

细胞核蛋白分离方法

Nuclear Protein Isolation Protocol

徐艳, 陈香嵩, 熊立仲*

作物遗传改良国家重点实验室, 华中农业大学, 武汉

*通讯作者邮箱: lizhongx@mail.hzau.edu.cn

引用格式: 徐艳, 陈香嵩, 熊立仲. (2018). 细胞核蛋白分离方法. *Bio-101* e1010122. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010122.

How to cite: Xu, Y., Chen, X. S. and Xiong, L. Z. (2018). Nuclear protein isolation protocol. *Bio-101* e1010122. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010122. (in Chinese)

实验原理: 样品在 Buffer A 作用下细胞破裂, 释放胞浆蛋白及其他蛋白, 离心后所得沉淀中包含细胞核, 再经高盐 Buffer 抽提可得到核蛋白。

实验目的: 抽提核蛋白可用于 PAGE 电泳, Western blot, 免疫共沉淀等下游实验, 可排除胞质蛋白及其他蛋白的影响

关键词: 核蛋白抽提, 高盐 buffer, 低盐 buffer, 透析

材料与试剂

注: 所有试剂尽量用 *sigma* 进口试剂。

1. 液氮
2. 10 ml/50 ml 离心管
3. 1.5 ml 离心管
4. Miracloth (Calbiochem, catalog number: 475855)
5. 各种型号枪头
6. HEPES (pH 7.8)
7. KCl
8. MgCl₂
9. EDTA
10. Sucrose
11. Triton X-100

12. DTT
13. PMSF
14. Glycerol
15. Buffer A (见溶液配方)
16. Low Salt Buffer (见溶液配方)
17. High Salt Buffer (见溶液配方)
18. Dialysis Buffer (透析液) (见溶液配方)

仪器设备

1. 量筒
2. 烧杯
3. 天平
4. 高速离心机
5. 移液枪
6. 振荡器
7. 摇床
8. 磁力转子
9. 磁力搅拌器
10. 计时器
11. 透析袋

实验步骤

1. 液氮磨样。
2. 称 5-10 g 粉末，装入预冷 10 ml/50 ml tube 中，加入 15-30 ml Buffer A，摇匀，致混合物呈可流动的粘稠液体。置冰上 10 min，间或颠倒。
3. 膜布(Miracloth)过滤，先单层膜布滤一次，再双层膜布滤一次。
4. 将所得上清液 4 °C 离心，3,000 x g，20 min，可见绿色沉淀。
5. 弃上清，用 5 ml Buffer A 重悬沉淀，轻柔吸打混匀，转至 10 ml tube 中。
6. 4 °C 离心，2,000 x g，15 min。

7. 弃上清，用 1 ml Buffer A 重悬沉淀，轻柔吸打混匀，转至 1.5 ml tube 中。
8. 4 °C 离心，2,000 x g，10 min。
9. 弃上清，加 180 µl Low Salt Buffer，吸打混匀 (较难吸打)。
10. 加 270 µl High Salt Buffer，吸打混匀；若起始样品量较多，此步样品将变得极粘稠，吸打不动，只能用枪头搅匀。
11. 将样品用冰袋包裹，放振荡器上振 30 min；或置翻转摇床上 4 °C 摇 1 h。
12. 4 °C 离心，14,000 x g，20 min。
13. 吸上清，会吸到很多混浊物，再 14,000 x g，4 °C 离心 5 min。
14. 吸上清，移入 1.5 ml tube 中，-20 °C/-70 °C 保存。如需进一步纯化见下步。
15. (可选)透析：将上清吸入透析袋中，用夹子夹好，放入装有 500 ml 透析液的烧杯中，烧杯中加磁力转子，放在冰盒中，置磁力搅拌器上，透析袋漂浮于液面上，2 h；
16. (可选)透析好的蛋白，从透析袋中吸出，移入 1.5 ml tube 中，-20 °C/-70 °C 保存。

注意事项

1. 所有操作均须在冰上进行，各种离心管、Buffer 用前也需置冰中预冷。
2. 根据样品量的多少，可相应适量增减几种 Buffer 用量。

溶液配方

注：所有试剂尽量用 *sigma* 进口试剂。

1. Buffer A

10 mM HEPES(pH 7.8)

10 mM KCl

10 mM MgCl₂

5 mM EDTA

250 mM sucrose

0.5% Triton-X-100

用前添加：1 mM DTT；0.2 mM PMSF

冰上预冷

2. Low Salt Buffer

20 mM HEPES (pH 7.8)

20 mM KCl

1.5 mM MgCl₂

0.2 mM EDTA

25% Glycerol

用前添加: 0.5 mM DTT; 0.2 mM PMSF

冰上预冷

3. High Salt Buffer

20 mM HEPES (pH 7.8)

1.6 M KCl

1.5 mM MgCl₂

0.2 mM EDTA

25% Glycerol

用前添加: 0.5 mM DTT; 0.2 mM PMSF

冰上预冷

4. Dialysis Buffer(透析液)

20 mM HEPES(pH 7.8)

100 mM KCl

0.2 mM EDTA

20% Glycerol

用前添加: 0.5 mM DTT; 0.2 mM PMSF

冰上预冷