

# 细胞核蛋白分离方法

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](mailto: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.

**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. MgCl<sub>2</sub>
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  $\mu$ l 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  $\times$  g, 20 min。
13. 吸上清, 会吸到很多混浊物, 再 14,000  $\times$  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 MgCl<sub>2</sub>

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 MgCl<sub>2</sub>

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 MgCl<sub>2</sub>

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