



核蛋白提取实验报告

一、实验器材及试剂

1、主要实验器材及耗材

名称	厂家	货号
涡旋混匀仪	杭州申花科技有限公司	SH-VM500S
复合转子离心机	杭州申花科技有限公司	SH-Mini7KS
移液器	德国艾本德股份公司	312000011
移液器	德国艾本德股份公司	312000020
移液器	德国艾本德股份公司	312000038
移液器	德国艾本德股份公司	312000046
移液器	德国艾本德股份公司	312000054
台式高速冷冻离心机	湖南恒诺仪器设备有限公司	2-16R
酶标仪	赛默飞世尔仪器有限公司	Multiskan FC
离心管 1.5mL (无菌无酶, 10 支/独立小包)	合肥科兔生物科技有限公司	KTL-15-W
盒装滤芯吸头 1250 μ L 加长 (无菌无酶)	合肥科兔生物科技有限公司	KTX-H200L-W
盒装滤芯吸头 200 μ L (无菌无酶)	合肥科兔生物科技有限公司	KTX-H200L-W
盒装滤芯吸头 100 μ L (无菌无酶)	合肥科兔生物科技有限公司	KTX-H100L-W
盒装滤芯吸头 20 μ L (无菌无酶)	合肥科兔生物科技有限公司	KTX-H20L-W
盒装滤芯吸头 10 μ L (无菌无酶)	合肥科兔生物科技有限公司	KTX-H10L-W
超净工作台	苏净安泰	SW-CJ-1FD
翘板摇床	杭州申花科技有限公司	SH-Y09-295

2、主要实验试剂

试剂	厂家	货号
BCA 蛋白浓度检测试剂盒	上海碧云天生物技术有限公司	No.P0010
双色 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 5 \times	上海碧云天生物技术有限公司	No.P0285
Validation Data Gallery	Proteintech Group	PK10014

二、核蛋白提取详细实验步骤

1、核蛋白提取

- a. **提取前准备:** 将试剂盒中试剂室温解冻, 解冻后放置于冰上。提前 4 $^{\circ}$ C 预冷离心机。核蛋白抽提试剂 A、核蛋白抽提试剂 B、核蛋白洗涤液 A、核蛋白洗涤液 B 根据提取的样本量分别取出对应体积的试剂, 在使用前按 100:1 添加蛋白酶抑制剂混合液 (100 \times) 备用。



b. 样品预处理:

(1) 细胞样品核蛋白提取

收集细胞 4°C, 500 g 离心 5 min, 用预冷的 PBS 洗涤两遍, 尽可能吸取残留的 PBS。然后在冰上, 按每 2000-5000 万细胞直接加入 1 mL 的预冷核蛋白抽提试剂 A。

(2) 组织样品

取新鲜的组织, 用预冷的 PBS 洗净组织块上附着的脂肪和血液等杂质, 用滤纸吸干水分后称重, 在离心管中将组织块剪碎, 然后在冰上, 按每 100 mg 组织加 1 mL 预冷的核蛋白抽提试剂 A。

- c. 将样品转移到合适大小的预冷玻璃匀浆器中, 在冰浴条件下对样品匀浆 5-10 次。
- d. 样品匀浆液在冰上孵育 10 min, 期间每隔 2 min 上下颠倒一次, 4°C, 6500 g 离心 5 min, 收集上清为胞浆蛋白。
- e. 收集沉淀, 用 1 mL 的核蛋白洗涤液 A 重悬沉淀。4°C, 6500 g 离心 5 min, 收集沉淀。
- f. 沉淀中加入 1 mL 的核蛋白洗涤液 B 重悬沉淀, 在涡旋仪上剧烈涡旋 1 min (涡旋 10 s, 停 10 s)。4°C, 6500 g 离心 5 min, 再次收集沉淀。
- g. 沉淀中加入 100 μ L 的核蛋白抽提试剂 B 重悬沉淀。在涡旋仪上剧烈涡旋 2 min (涡旋 10 s, 停 10 s), 然后冰上放置 10 min, 重复涡旋及放置步骤 3 次。
- h. 4°C, 16000 g 离心 10 min, 收集上清为核蛋白。
- i. 将收集到的核蛋白样品进行冰浴超声 (启动时间: 3s 关闭时间: 5s, 共 2min)
- j. 根据收集到的核蛋白样品的体积, 加入 4 倍体积的核蛋白稀释液。此时如果收集到的核蛋白粘度高, 可对样品进行超声波处理, 直至样品不粘稠。

2、蛋白定量

(1) 蛋白标准品的准备

- a. 取 1.2ml 蛋白标准配制液加入到一管蛋白标准(30mg BSA)中, 充分溶解后配制成 25mg/ml 的蛋白标准溶液。配制后可立即使用, 也可以-20°C长期保存。
- b. 取适量 25mg/ml 蛋白标准, 稀释至终浓度为 0.5mg/ml。例如取 20 μ l 25mg/ml 蛋白标准, 加入 980 μ l 稀释液即可配制成 0.5mg/ml 蛋白标准。蛋白样品在什么溶液中, 标准品也宜用什么溶液稀释。但是为了简便起见, 也可以用 0.9%NaCl 或 PBS 稀释标准品。稀释后的 0.5mg/ml 蛋白标准可以-20°C长期保存。

(2) BCA 工作液的配制



根据样品数量，按 50 体积 BCA 试剂 A 加 1 体积 BCA 试剂 B(50:1)配制适量 BCA 工作液，充分混匀。例如 5ml BCA 试剂 A 加 100 μ l BCA 试剂 B，混匀，配制成 5.1ml BCA 工作液。 BCA 工作液室温 24 小时内稳定。

(3) 蛋白浓度检测

- a. 将标准品按 0、1、2、4、8、12、16、20 μ l 加到 96 孔板的标准品孔中，加标准品稀释液补足到 20 μ l，相当于标准品浓度分别为 0、0.025、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5mg/ml。
- b. 加适当体积样品到 96 孔板的样品孔中。如果样品不足 20 μ l，加标准品稀释液补足到 20 μ l。请注意记录样品体积。
- c. 各孔加入 200 μ l BCA 工作液，37 $^{\circ}$ C 放置 20-30 分钟。
- d. 用酶标仪测定 A562，或 540-595nm 之间的波长的吸光度。
- e. 根据标准曲线和使用的样品体积计算出样品的蛋白浓度。
- f. 根据定量结果调整蛋白浓度，确保上样时各泳道蛋白总量一致。
- g. 根据样品体积按照 1: 5 的体积比加入 5 \times 双色 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液，混匀后于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min。
- h. 将变性后的蛋白样品放在-20 摄氏度冰箱冷冻保存。