

## 组蛋白提取方案

### 1. 细胞制备

- (1) 4°C、300×g 离心悬浮细胞 5 分钟。小心除去上清液，留下沉淀。
- (2) 将 2~3ml 1×PBS 加入沉淀中并涡旋。
- (3) 4°C、300×g 离心悬浮细胞 5 分钟。小心除去上清液，留下沉淀。
- (4) 将 2~3ml 1×PBS 加入沉淀中并涡旋。
- (5) 300×g °C离心 5 分钟。吸出上清液，保留沉淀。

### 2. 提取

- (1) 加入 2X 沉淀体积的预冷 Buffer A (每  $1.0 \times 10^7$  细胞约 300 uL Buffer A) , 轻轻吹打使沉淀悬浮。
- (2) 冰上孵育 15 分钟。
- (3) 添加 1X 体积的 10% NP-40 溶液 (300 uL Buffer A 和 30 uL NP-40 溶液) , 涡旋 10 秒。
- (4) 4°C、10,000×g 离心 20 秒。
- (5) 收集上清液, 转移至干净的离心管中, 可立即使用或冷冻 (-20°C保存) , 理论上此为胞浆蛋白。
- (6) 将沉淀中剩余的上清完全吸出并丢弃, 然后加入 1 倍沉淀体积的预冷 Buffer B ( $1.0 \times 10^7$  细胞约 50 uL Buffer) , 轻轻吹打使沉淀悬浮。
- (7) 置于 4°C摇床上, 以最低速度摇动 30 min。
- (8) 4°C、16,000×g 离心 5 分钟, 收集上清液作为核蛋白裂解液, 转移至干净的离心管中, -20°C保存, 用 BCA 定量蛋白浓度。

### 3. 建议的缓冲液

#### 缓冲液 A

- 10 mmol/L HEPES-NaOH (pH7.9)
- 15 mmol/L 氯化钾
- 1 mmol/L 氯化镁
- 0.1mmol/L 乙二胺四乙酸
- 1 mmol/L DTT,
- 1 mmol/L PMSF (使用时添加)
- 1 mmol/L 100×蛋白酶抑制剂 (使用时添加)

#### 缓冲液 B

- 20 mmol/L HEPES-NaOH (pH7.9)
- 0.42 摩尔/升氯化钠

- 1.5 mmol/L 氯化镁
- 0.2mmol/L 乙二胺四乙酸
- 25%甘油
- 0.5 mmol/L DTT
- 0.5 mmol/L PMSF (使用时添加)
- 1 mmol/L 100×蛋白酶抑制剂 (使用时添加)