

FUJIFILM**Wako**

Code No. 295-73901(100 assays)

LyoPure™ Nuclear and Cytoplasmic Extractor Kit

LyoPure™ Nuclear and Cytoplasmic Extractor Kit enable stepwise extraction of cytoplasmic and nuclear fractions (soluble and insoluble) from mammalian cells or tissue.

A sample is separated into cytoplasmic and nuclear fraction with Nuclear Fractionation Buffer (1). Soluble intact nuclear fraction is extracted from the nuclear fraction with Nuclear Extraction Buffer (2). Insoluble nuclear fraction is solubilized and extracted as a denatured protein fraction from the remaining nuclear fraction with SDS Lysis Buffer (3). The denatured proteins are allowed to apply western blot assay.

[Kit Components]

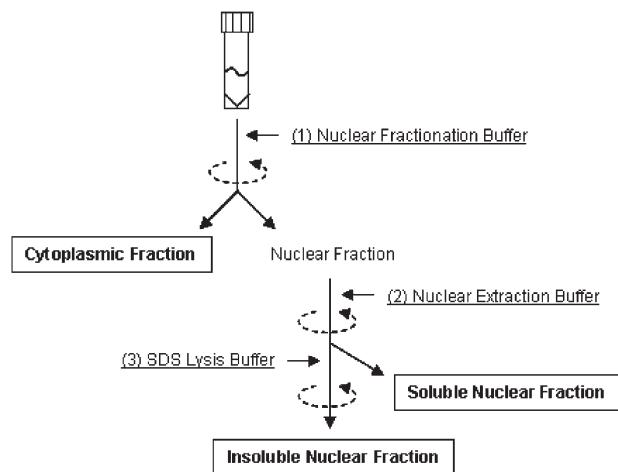
- ① Nuclear Fractionation Buffer 100 mL × 1 bottle
- ② Nuclear Extraction Buffer 75 mL × 1 bottle
- ③ SDS Lysis Buffer 20 mL × 1 bottle

[Storage]

2-10°C

[Package]

100 assay

[Protocol Flowchart]**[Additional Materials Required]****-Instruments/labware**

- Refrigerated microcentrifuge
- Vortex mixer
- Desktop centrifuge
- Ultrasonic sonicator
- 1.5 mL microcentrifuge tubes
- Micropipette
- Pipette tips

- Cell scraper (for cells sample)
- Ultrasonic sonicator
- Dounce or potter homogenizer (for tissue sample)

-Reagents

- PBS (-)
- Trypsin-EDTA (for cells sample)

[Please Read Before Starting]**-Instruments/labware**

- Use sterilized microcentrifuge tubes and pipette tips.
- To avoid protease contamination, be sure to wear a mask and plastic gloves during experiment.

- Microcentrifuge tubes must be pre-chilled on ice.

-Reagents

- Be careful not to contaminate reagents with protease.
- Keep reagents in this kit on ice during experiment.

-Treatment of tissue sample from human and laboratory waste

- Please deal with a human tissue sample as a susceptibility infectious sample. This includes waste liquid and equipments such as microcentrifuge tubes, pipette tips and gloves after experiment. Dispose of these biohazardous wastes according to the guidelines of the institution which belong to.

[Protocol]**Sample Preparation****○ For adherent cells**

- 1) Culture cells to be 2×10^6 - 1×10^7 *1
- 2) Remove culture medium from cell culture dishes or plates and wash the cells with PBS (-) twice.
- 3) Harvest cells with trypsin-EDTA or a cell scraper.
- 4) Centrifuge at $200 \times g$ at 4°C for 5 minutes and discard the supernatant.
- 5) Suspend the cells pellet with 1 mL of PBS (-) and transfer it into pre-chilled 1.5 mL microcentrifuge tube.
- 6) Centrifuge at $200 \times g$ at 4°C for 5 minutes and discard the supernatant.
- 7) Suspend the cell pellet with 1 mL of PBS (-).
- 8) Centrifuge at $200 \times g$ at 4°C for 5 minutes and discard the supernatant.

○ For suspension cells

- 1) Culture cells to be 2×10^6 - 1×10^7 *1
- 2) Centrifuge at $200 \times g$ for 5 minutes at 4°C and discard the supernatant.
- 3) Suspend the cells pellet with 1 mL of PBS (-) and transfer it into a pre-chilled 1.5 mL microcentrifuge tube.
- 4) Centrifuge at $200 \times g$ at 4°C for 5 minutes and discard the supernatant.
- 5) Suspend the cells pellet with 1 mL of PBS (-).
- 6) Centrifuge at $200 \times g$ at 4°C for 5 minutes and discard the supernatant.

*1 It is recommended to determine an appropriate culture medium and cell number depending on cell lines of interest. The maximum number of cell is approximately 2×10^7 /assay.

○ For tissue

- 1) Cut 20-100 mg of tissue into small pieces and transfer it into a pre-chilled 1.5 mL microcentrifuge tube.
- 2) Suspend the tissue with 1mL of PBS (-).
- 3) Centrifuge at $500 \times g$ at 4°C for 5 minutes and discard the supernatant.
- 4) Repeat steps 2 and 3.

Nuclear and Cytoplasmic Protein Extraction

Table.1 Reagent volumes for different cell numbers and tissue weight

Cell number	① Nuclear Fractionation buffer (μL)	② Nuclear Extraction buffer (μL)	③ SDS Lysis buffer (μL)
2×10^6	100	50	50
5×10^6	250	125	100
1×10^7	500	250	200
Tissue weight (mg)	① Nuclear Fractionation buffer (μL)	② Nuclear Extraction buffer (μL)	③ SDS Lysis buffer (μL)
20	100	50	100
50	500	250	200
100	1000	500	400

○ For Cells

Cytoplasmic Fraction

- Add the appropriate volume of "① Nuclear Fractionation Buffer" depending on the cell number (See Table. 1) to the cells pellet and vortex the tube.
- Incubate on ice for 10 minutes.
- Mix by pipetting or vortexing.
- Centrifuge at $500 \times g$ at $4^\circ C$ for 10 minutes.
Please use the pellet as a sample for nuclear protein extraction.
- Transfer the supernatant into a pre-chilled 1.5 mL microcentrifuge tube and centrifuge at $20,000 \times g$ at $4^\circ C$ for 10 minutes.
- Transfer the supernatant into a pre-chilled 1.5 mL microcentrifuge tube (Cytoplasmic Fraction).^{*2}
Proceed the next step to extract nuclear fraction if needed.

Soluble Nuclear Fraction

- Add $500 \mu L$ of "① Nuclear Fractionation Buffer" to the pellet prepared in the above-mentioned Step 4) and vortex the tube. Be careful not to use "② Nuclear Extraction Buffer" in this step.
- Centrifuge at $500 \times g$ at $4^\circ C$ for 10 minutes and discard the supernatant carefully.
- Add the appropriate volume of "② Nuclear Extraction Buffer" (See Table. 1) to the pellet and vortex sufficiently.
- Incubate on ice for 30 minutes, as vortex every 10 minutes.
- Centrifuge at $20,000 \times g$ at $4^\circ C$ for 10 minutes.
- Transfer the supernatant into a pre-chilled 1.5 mL microcentrifuge tube (Soluble Nuclear Fraction).^{*2*3}

Insoluble Nuclear Fraction

- Add $500 \mu L$ of "② Nuclear Extraction Buffer" to the pellet produced in the above-mentioned Step 11) and vortex the tube. Be careful not to use "③ SDS Lysis Buffer" in this step.
- Centrifuge at $20,000 \times g$ at $4^\circ C$ for 10 minutes and discard the supernatant carefully.
- Add the appropriate volume of "③ SDS Lysis Buffer" (See Table. 1) to the pellet and vortex the tube.
- Sonicate the tube with ultrasonic sonicator until the pellet is disappear.
- Centrifuge at $20,000 \times g$ at $4^\circ C$ for 10 minutes.
- Transfer the supernatant into a pre-chilled 1.5 mL microcentrifuge tube (Insoluble Nuclear Fraction).^{*2}

○ For Tissue

- Add the appropriate volume of "① Nuclear Fractionation Buffer" depending on the tissue weight (See Table. 1) to the tissue and homogenize it with a dounce or potter homogenizer.^{*4}
- Transfer the tissue suspension into a pre-chilled 1.5 mL microcentrifuge tube.

fuge tube.

- Incubate on ice for 10 minutes.
- Mix by pipetting or vortexing.
- Centrifuge at $500 \times g$ at $4^\circ C$ for 10 minutes.
Please use the pellet as a sample for nuclear protein extraction.
- Transfer the supernatant into a pre-chilled 1.5 mL microcentrifuge tube and centrifuge at $20,000 \times g$ at $4^\circ C$ for 10 minutes.

⟨Optional protocol⟩

After centrifugation, if cloudiness appears in the supernatant, it is mostly removable by a centrifugal filter (Millipore, Ultrafilter-MC 0.45 μm , UFC30HV00).

- Transfer the supernatant into a pre-chilled 1.5 mL microcentrifuge tube (Cytoplasmic Fraction).^{*2}
Proceed the next step to extract nuclear fraction if needed.
- Add $500 \mu L$ of "① Nuclear Fractionation Buffer" to the pellet produced in the previous step 5) and vortex. Be careful not to use "② Nuclear Extraction Buffer" in this step.
- Proceed step 8) in Soluble Nuclear Fraction for cells.

*2 Store extracts $-80^\circ C$ until use. Use protease inhibitors as needed.

*3 Soluble nuclear fraction is extracted under high salt concentration.

Dilute it or exchange buffers as needed.

*4 The maximum weight of tissue is approximately 100 mg/assay.

⟨Troubleshooting⟩

Problem	Possible Cause	Solution
Low cytoplasmic protein	Cells or tissue was not sufficiently lysed.	Increase amount of "Nuclear Fractionation Buffer". Vortex thoroughly and increasing vortexing time.
Low soluble nuclear protein	Reagents were confused.	Check the protocol and reagents' description.
	Pellet was not sufficiently lysed.	Increase amount of "Nuclear Extraction Buffer". Vortex thoroughly and increasing vortexing time.
Low insoluble nuclear protein	The reagents were confused.	Check the protocol and reagents' description.
	Pellet was not disappear.	Increase amount of "SDS Lysis Buffer". Increasing sonication time.
No or low protein activity detected	Proteases were activated.	Keep sample and reagents on ice during experiment. Immediately, store extracts at $-80^\circ C$. Use protease inhibitor as needed.

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan

Telephone : +81-6-6203-3741

Faximile : +81-6-6201-5964

<http://fwk.fujifilm.co.jp>

FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation	FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH
1600 Bellwood Road Richmond, VA 23237 U.S.A. Telephone : +1-804-271-7677 Facsimile : +1-804-271-7791 http://www.wakousa.com	Fuggerstrasse 12 D-41468 Neuss Germany Telephone : +49-2131-311-0 Facsimile : +49-2131-311100 http://www.wako-chemicals.de

リソピュア™ 核・細胞質タンパク質 エキストラクターキット

ほ乳培養細胞および組織から細胞質タンパク質と核タンパク質（可溶性タンパク質と難溶性タンパク質）を段階的に分画・抽出するキットです。Nuclear Fractionation Buffer を用いてサンプルの細胞質タンパク質画分と核タンパク質画分を分画します。得られた核画分から Nuclear Extraction Buffer を用いて、可溶性核タンパク質画分をインタクトな状態で抽出することができます。さらに、難溶性核タンパク質画分を SDS Lysis Buffer を用いて可溶化し、ウエスタンプロットに使用可能な変性タンパク質として抽出することができます。

【キット構成】

- ① Nuclear Fractionation Buffer 100mL × 1 本
- ② Nuclear Extraction Buffer 75mL × 1 本
- ③ SDS Lysis Buffer 20mL × 1 本

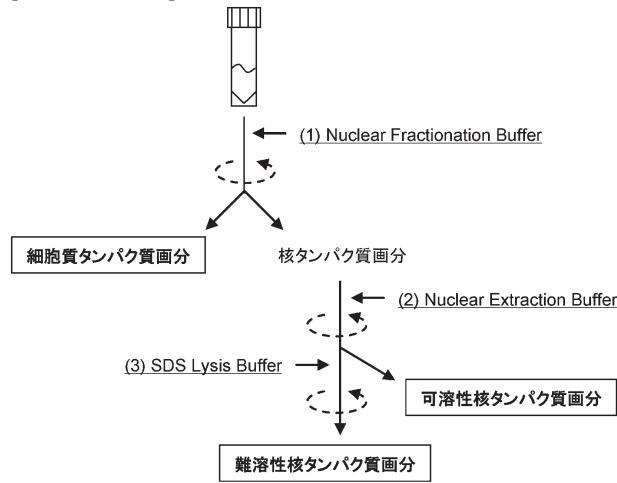
【保存条件】

2-10°C

【容量】

100 回用

【フローチャート】



【必要な機器 / 器具および試薬】

- 機器 / 器具など
- 冷却式遠心分離機
- ボルテックスミキサー
- 草上遠心機
- 超音波破碎機
- 1.5mL 容マイクロ遠心チューブ
- マイクロビペット
- ピペットチップ
- セルスクレイパー（細胞をサンプルとする場合）

- ・超音波破碎機（プローブ式や密閉式）
- ・ホモジナイザー（ダウンス式やポッター式：組織をサンプルとする場合）
- 試薬
- ・PBS (-)
- ・Trypsin-EDTA（細胞をサンプルとする場合）

【ご使用の前に】

- 機器 / 器具機器
 - ・チューブ、ピペットチップは滅菌済みのものを使用して下さい。
 - ・プロテアーゼの混入を避けるため、実験中は必ずマスクとプラスチック手袋をして下さい。
 - ・使用するチューブは、あらかじめ氷上に置き、冷やしておいて下さい。
- 試薬
 - ・プロテアーゼが混入しないよう注意して下さい。
 - ・実験中は、キットの試薬を氷上に置き、冷やしておいて下さい。
 - ・ヒト試料および使用済み消耗品の取り扱い
 - ・ヒト試料は感染性試料として取り扱って下さい。また操作中に発生した廃液、実験に用いたピペットチップやマイクロチューブ等は感染性廃棄物として、所属施設のガイドラインに従って適切に廃棄して下さい。

【プロトコール】

サンプル調製

○接着細胞の場合

- 1) 細胞数が $2 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ となるよう培養する。^{*1}
- 2) 培地を除き、PBS (-) で 2 回洗浄する。
- 3) Trypsin-EDTA 溶液もしくはセルスクレイパーで細胞をディッシュから剥がす。
- 4) 細胞懸濁液を $200 \times g$ 、4°Cで 5 分間遠心分離し、上清を除く。
- 5) 細胞ペレットに 1mL の PBS (-) を加え懸濁し、氷冷した 1.5mL 容マイクロ遠心チューブへ移す。
- 6) $200 \times g$ 、4°Cで 5 分間遠心分離し、上清を除く。
- 7) 細胞ペレットに 1mL の PBS (-) を加え、懸濁する。
- 8) $200 \times g$ 、4°Cで 5 分間遠心分離し、上清を除く。

○浮遊細胞の場合

- 1) 細胞数が $2 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ となるよう培養する。^{*1}
- 2) $200 \times g$ 、4°Cで 5 分間遠心分離し、上清を除く。
- 3) 細胞ペレットに 1mL の PBS (-) を加え懸濁し、氷冷した 1.5mL 容マイクロ遠心チューブへ移す。
- 4) $200 \times g$ 、4°Cで 5 分間遠心分離し、上清を除く。
- 5) 細胞ペレットに 1mL の PBS (-) を加える。
- 6) $200 \times g$ 、4°Cで 5 分間遠心分離し、上清を除く。

*1 培地や細胞数は、目的の細胞株に応じて検討することを推奨します。使用細胞数の上限は、 2×10^7 / アッセイです。

○組織の場合

- 1) 目的の組織を 20-100mg になるよう細かく切り、氷冷した 1.5mL 容マイクロ遠心チューブに移す。
- 2) 細胞片に 1mL の PBS (-) を加える。
- 3) $500 \times g$ 、4°Cで 5 分間遠心分離し、上清を除く。
- 4) ステップ 2), 3) の操作を繰り返す。

核・細胞質タンパク質の抽出

表1 必要な各試薬量

細胞数	① Nuclear Fractionation buffer (μL)	② Nuclear Extraction buffer (μL)	③ SDS Lysis buffer (μL)
2×10^6	100	50	50
5×10^6	250	125	100
1×10^7	500	250	200
組織量 (mg)	① Nuclear Fractionation buffer (μL)	② Nuclear Extraction buffer (μL)	③ SDS Lysis buffer (μL)
20	100	50	100
50	500	250	200
100	1000	500	400

○細胞の場合

細胞質タンパク質画分の抽出

- 細胞数に応じて、表1に記載された量の“① Nuclear Fractionation Buffer”を細胞ペレットに加え、ボルテックスミキサーで混合する。
- 氷上で10分間静置する。
- ビベッティングまたはボルテックスミキサーで混合する。
- $500 \times g$ 、4°Cで10分間遠心分離する。
ここで得られたペレットを、核タンパク質抽出用サンプルとしてご使用下さい。
- 上清を氷冷した1.5mL容マイクロ遠心チューブへ移し、 $20,000 \times g$ 、4°Cで10分間遠心分離する。
- 上清を氷冷した1.5mL容マイクロ遠心チューブへ移す。(細胞質タンパク質画分)。^{*2}
核タンパク質画分を調製する場合、次のステップに進む。

可溶性核タンパク質画分の抽出

- 500 μLの“① Nuclear Fractionation Buffer”を前述のステップ4)で得られたペレットに加え、ボルテックスミキサーで混合する。ここで“② Nuclear Extraction Buffer”を使用しないよう注意して下さい。
- $500 \times g$ 、4°Cで10分間遠心分離し、上清を除く。
- 細胞数に応じて、表1に記載された量の“② Nuclear Extraction Buffer”をペレットに加え、ボルテックスミキサーで十分に混合する。
- 30分間氷上でインキュベートする。10分間おきにボルテックスミキサーで混合する。
- $20,000 \times g$ 、4°Cで10分間遠心分離する。
- 上清を氷冷した1.5mL容マイクロ遠心チューブへ移す。(可溶性核タンパク質画分)。^{*2*3}

難溶性核タンパク質画分の抽出

- 500 μLの“② Nuclear Extraction Buffer”をステップ11)で得られたペレットに加え、ボルテックスミキサーで混合する。ここで“③ SDS Lysis Buffer”を使用しないよう注意して下さい。
- $20,000 \times g$ 、4°Cで10分間遠心分離し、上清を除く。
- 細胞数に応じ、表1に記載された量の“③ SDS Lysis Buffer”をペレットに加え、ボルテックスミキサーで混合する。
- 超音波破碎機(プローブ式や密閉式)を用いて、ペレットが消失するまでサンプルの破碎処理を行なって下さい。
- $20,000 \times g$ 、4°Cで10分間遠心分離して下さい。
- 上清を氷冷した1.5mLマイクロ遠心チューブへ移して下さい。(難溶性核タンパク質画分)。^{*2}

○組織の場合

- 使用する組織量に応じて、表1に記載された量の“① Nuclear Fractionation Buffer”を組織片に加え、ホモジナイザー(ダウンス型やポッター型)で組織片を破碎する。^{*4}
- 組織懸濁液を氷冷した1.5mL容マイクロ遠心チューブへ移す。
- チューブを氷上で10分間静置する。

- ビベッティングまたはボルテックスミキサーで混合する。

- 500 × g、4°Cで10分間遠心分離する。
ここで得られたペレットを、核タンパク質抽出用サンプルとしてご使用下さい。
- 上清を氷冷した1.5mL容マイクロ遠心チューブへ移し、 $20,000 \times g$ 、4°Cで10分間遠心分離する。

〈補足〉

遠心分離後、上清に白い浮遊物が現れることがあります。その際は、遠心フィルター(Millipore, Ultrafree-MC 0.45 μm, UFC30HV00)を用いてろ過処理を行うことで、浮遊物をほぼ除去することができます。

- 上清を氷冷した1.5mL容マイクロ遠心チューブへ移す。(細胞質タンパク質画分)。^{*2}
核タンパク質画分を調製する場合、次のステップに進む。
- 500 μLの“① Nuclear Fractionation Buffer”を前述のステップ5)で得られたペレットに加え、ボルテックスミキサーで混合する。ここで“② Nuclear Extraction Buffer”を使用しないよう注意して下さい。
- 以下、「細胞の場合 - 可溶性核タンパク質画分の抽出 - ステップ8)」へ進んで下さい。

*2は-80°Cで保管して下さい。必要に応じてプロテアーゼ阻害剤を加えて下さい。

*3可溶性核画分は塩濃度が高くなっています。必要に応じて、希釈やバッファー交換を行なって下さい。

*4使用組織量の上限は100mg/アッセイ程度です。

〈トラブルシューティング〉

問題	考えられる原因	対策
細胞質画分のタンパク量が少ない。	細胞または組織が十分に溶解していない。	“Nuclear Fractionation Buffer”的量を増やして下さい。 ボルテックスを強めにを行い、ボルテックスの時間を長くして下さい。
可溶性核画分のタンパク量が少ない。	使用する試薬を誤っています。	プロトコールと試薬名を確認して下さい。
	ペレットが十分に溶解していない。	“Nuclear Extraction Buffer”的量を増やして下さい。 ボルテックスを強めにを行い、ボルテックスの時間を長くして下さい。
難溶性核画分のタンパク量が少ない。	使用する試薬を誤っています。	プロトコールと試薬名を確認して下さい。
	ペレットが消えない。	“SDS Lysis Buffer”的量を増やして下さい。 超音波破碎の時間を長くして下さい。
タンパク質の活性がない、もしくは低い。	プロテアーゼが活性化している。	実験中はサンプルと試薬を氷上に置いて下さい。抽出物はすぐに-80°Cで保管して下さい。 必要に応じてプロテアーゼ阻害剤を使用して下さい。

製造発売元

富士フィルム 和光純薬株式会社

大阪市中央区道修町三丁目1番2号

Tel : 06-6203-3741

2304KA3