

○ **Préparation des tampons**

▪ **Tampon « A » ou « cyto »**

Cf (mM)	Produit	Cstock (M)	Volume pour 10 mL
10 mM	HEPES ¹	1,00 M	100,0 µL
10 mM	KCl ²	1,00 M	100,0 µL
0,1 mM	EDTA ²	0,50 M	2,0 µL
0,1 mM	EGTA	0,50 M	2,0 µL
1 mM	DTT ³	0,10 M	100,0 µL
0,5 mM	PMSF ⁴	0,10 M	50,0 µL
	H2O qsp		9,65 mL

▪ **Tampon « C » ou « noyaux »**

20 mM	HEPES ¹	1,00 M	200,0 µL
400 mM	NaCl ²	3,00 M	1333,3 µL
1 mM	EDTA ¹	0,50 M	20,0 µL
1 mM	EGTA	0,50 M	20,0 µL
1 mM	DTT ³	0,10 M	100,0 µL
1 mM	PMSF ⁴	0,10 M	100,0 µL
10 mM	NaF ⁵	0,30 M	333,3 µL
1 X	Protease inhibitors ⁶	25 X	400,0 µL
5,00%	Glycérol	100,00%	500,0 µL
	H2O qsp		6,99 mL

○ **Extraction**

1. Decrocher les cellules, transférer dans un tube, centrifuger et éliminer le surnageant.
2. Rincer les cellules (10⁶) dans du PBS froid avec inhibiteurs de protéases.
Répéter
3. Centrifuger, éliminer le surnageant, resuspendre délicatement dans 400µL de « A » froid
4. Incuber 15 min sur glace
5. Ajouter 25µL de NP-40 10%⁷, vortexer vigoureusement 10 sec.
6. Centrifuger 30 sec, 16 000 x g. Le surnageant contient les protéines cytosoliques
7. Rincer le culot (noyaux) avec 400µL de Tampon A froid
8. Centrifuger 30 sec, 16 000 x g, éliminer le surnageant
9. Ajouter 50µL de tampon C froid sur le culot
10. Agiter sur roue 15 min à 4° (ou bien vortexer 10 secondes toutes les 2 minutes)
11. Centrifuger 5 min, 16 000 x g
12. Récupérer le surnageant qui contient les protéines nucléaires
13. Eventuellement, répéter les étapes 9 à 12 si toutes les protéines ne sont pas extraites

¹ FW = 238,31g/mol. Stock 1M : 11,915g dans 50mL H₂O, conserver à -20°

² Stock de Nathalie

³ FW = 154,25g/mol. Stock 0,1M : 31mg dans 2mL H₂O, conserver à -20°

⁴ FW = 174,19g/mol. Stock 0,1M : 35mg dans 2mL EtOH, conserver à RT ou -20°. TOXIQUE

⁵ FW = 41,99g/mol. Stock 0,3M : 126mg dans 10mL H₂O, conserver à -20°

⁶ Roche 11873 580 001, une tablette dans 2mL H₂O, garder à -20°

⁷ Solution aqueuse