

#A10009

## 核蛋白提取试剂盒

□ 50T



Orders ■ 400-6123-828  
orders@ab-mart.com  
Web ■ www.ab-mart.com.cn

### 产品介绍

该产品为一款核蛋白提取试剂盒，快速且可重复，基于温度依赖的相分离，制备高度富集核蛋白提取样品。

### 核蛋白提取流程：

#### 1. 细胞准备

常规动物培养细胞在本流程下核蛋白得率约为：2-4mg/1x10<sup>8</sup>细胞，建议操作细胞量>1x10<sup>7</sup>细胞。细胞可在贴壁培养或悬浮培养下至活性浓度，一般为接近但未达饱和密度，例如80%满的贴壁密度，悬浮细胞约在1-2x10<sup>6</sup>/ml。过高的培养密度会导致死细胞增多，在蛋白提取过程中引入更多的碎片污染，例如DNA纤维沉淀。悬浮培养细胞在提取前离心去上清，1xPBS洗2遍去除培养基后重悬于1xPBS并计数备用，计数时需要使用台盼蓝检测活细胞比例>90%。贴壁细胞使用胰酶或其它解离方法解离为单细胞悬液，一般推荐1xPBS含1mM EDTA 37°C处理10 min以上（不同细胞处理时间有差异）以减小对核蛋白组的影响，细胞悬液以与悬浮培养细胞的方式洗涤与重悬计数备用。

#### 2. 溶液准备

- 1 自备溶液：1x PBS, 500mM EDTA（与1xPBS 1:500稀释制备细胞解离液用）
- 2 胞浆蛋白释放缓冲液A【适用大多数培养细胞，部分细胞系对缓冲液A较为敏感，在缓冲液A处理下会释放较多的DNA污染，表现为在缓冲液A处理下，溶液中会出现较多絮状DNA沉淀，导致包裹为细胞团，影响提取效率与产生污染，出现这种情况时使用胞浆蛋白释放缓冲液B】；
- 3 胞浆蛋白释放缓冲液B（A液备选）；
- 4 缓冲液C；
- 5 缓冲液D；
- 6 缓冲液E（D液备选）
- 7 蛋白酶抑制剂（货号：A10004，200x）

#### 3. 核蛋白提取流程

- 1 预先在需要使用到的缓冲液A/B, 缓冲液C, 缓冲液D/E中加入蛋白酶抑制剂（A10004）混匀，各缓冲液4°C保存。
- 2 1x PBS重悬并计数好的细胞 1000 g离心5 min，弃上清。
- 3 立即按 2ml/ 1x10<sup>7</sup>细胞比例加入胞浆蛋白释放缓冲液A或B，充分混匀，在4°C冰浴下摇床温和混匀10 min。细胞系首次实验可先使用缓冲液A液，如果在A液中出现显著絮状DNA释放，则需要更改为缓冲液B液。缓冲液A的加样比例根据细胞大小可作调整，一些血液来源细胞系细胞体积较小，与常规贴壁细胞系有明显差异，缓冲液A量可根据细胞体积差异与离心后的沉淀体积调整，例如人B细胞与T细胞来源细胞系，细胞体积可为常规贴壁细胞的1/10以下，缓冲液A可用到2ml/1x10<sup>8</sup>细胞。
- 4 14,000 rpm 4°C离心10 min，收集上清为胞浆蛋白提取液，沉淀按 0.2 ml/1x10<sup>7</sup>细胞比例加缓冲液C，吹打混匀后，4°C摇床温和混匀30 min。
- 5 14,000 rpm 4°C离心10 min，保留沉淀。
- 6 按0.2 ml/1x10<sup>7</sup>细胞比例加入缓冲液D，吹打混匀。核蛋白提取需要辅助以超声裂解以打断DNA长链，建议条件有低功率冰浴超声（例如20%以下），5 s/次，间隔10 s，超声10次。超声后在摇床冰浴温和混合30 min后，14,000 rpm 4°C离心10 min，收集上清为胞核蛋白提取液。
- 7 部分DNA结合牢固的蛋白，需要使用含变性剂缓冲液处理提高提取率，如果不需要提取蛋白的天然构象活性，核蛋白提取时可使用缓冲液E，同上，超声后，4°C条件下，摇床温和混匀1hr或过夜以达充分变性提取目的，之后以14,000 rpm 4°C离心10 min，收集上清为胞核蛋白提取液。

#A10009

## 核蛋白提取试剂盒

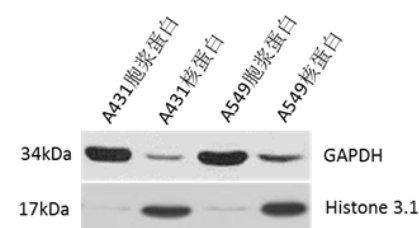
□ 50T



Orders ■ 400-6123-828  
orders@ab-mart.com  
Web ■ www.ab-mart.com.cn

3.8 上述收集的各蛋白组分进行蛋白定量，推荐氨基黑法，或稀释5倍以上用Bradford法测定。

3.9 核蛋白富集质检：各蛋白提取上清组分，制备为SDS蛋白裂解液，推荐蛋白浓度1 mg/ml以上，在SDS上分离后分别以，1）考染检测蛋白完整性，条带分布均匀，无特别高丰度组分蛋白富集；2）WB检测核蛋白富集与其它组分污染，推荐使用核蛋白内参抗体Histone H3.1 Rabbit Antibody（货号P30266）检测核蛋白富集情况，使用β-Tubulin( C66 )Mouse Antibody（货号M20005）检测胞浆蛋白污染，使用ATPB Mouse Antibody（货号M40013）或者Sodium Potassium ATPase Rabbit Antibody（货号T40109）检测膜蛋白污染。



### 动物细胞蛋白参考得率

	用量	蛋白浓度	蛋白总量	蛋白得率
Cells	1x10 <sup>7</sup>			
浆蛋白（缓冲液 A/B）	2 ml	1-2 mg/ml	2-4 mg	2-4 mg/10 <sup>7</sup> 细胞
核蛋白（缓冲液 D/E）	0.2 ml	1-2 mg/ml	0.2-0.4 mg	0.2-0.4 mg/10 <sup>7</sup> 细胞

### 注意事项

1. 细胞油脂含量较高时，蛋白提取液中会存在难以离心分离的白色悬浊上层，取样时可小心避开，或使用0.44um滤器过滤去除。
2. 本试剂盒不直接适合于有胞壁细胞与组织样本的核蛋白提取，如需处理有胞壁细胞样本或组织样本可：1）蛋白酶或纤维素酶等胞壁降解酶预处理，去除细胞壁后，按常规动物细胞的方式提取；2）动物组织样本可用胶原酶等蛋白酶预处理为单细胞悬液、植物组织可用纤维素酶、果胶酶等酶预处理为原生质体，或动物组织可用玻璃匀浆器小心分离出细胞后按常规动物细胞的方式提取。组织样本的核蛋白富集程度与纯度均会有所下降。