

#A10039



核蛋白提取试剂盒套装 (含内参)

Order 021-34695924
orders@ab-mart.com
Support 400-6123-828
support1@ab-mart.com
Web www.abmart.cn

产品描述

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。

同时试剂盒中含有配套的核蛋白内参抗体（P30266, Histone H3.1 Rabbit pAb）。

产品组分及储存条件

货号	组分	规格	储存条件
A10009XS	核蛋白提取试剂盒	10T	4°C
P30266XF	核内参抗体	10ul	-20°C

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/1x10⁸ 细胞，建议操作细胞量>1x10⁷ 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 1-2x10⁶/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，计数时需要使用肽酚蓝检测活细胞比例>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

2.1 自备溶液：1x PBS，500mM EDTA（与 1xPBS 1:500 稀释制备细胞解离液用）

2.2 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】；

2.3 胞浆蛋白释放缓冲液 B（A 液备选）；

2.4 缓冲液 C；

2.5 缓冲液 D；

2.6 缓冲液 E（D 液备选）

2.5 蛋白酶抑制剂（货号：A10004，200×，需额外购买，或者使用其他蛋白酶抑制剂）

3. 核蛋白提取流程

3.1 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混匀，各缓冲液 4° C 保存。

3.2 1x PBS 重悬并计数好的细胞 1000 g 离心 5 min，弃上清。

3.3 立即按 2ml/ 1x10⁷ 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/1x10⁸ 细胞。

3.4 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/1x10⁷ 细胞比例加缓冲液 C，吹打混匀后，4° C 摇床温和混匀 30 min。

3.5 14,000 rpm 4° C 离心 10 min，保留沉淀。

3.6 按 0.2 ml/1x10⁷ 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 10min，收集上清为胞核蛋白提取液。

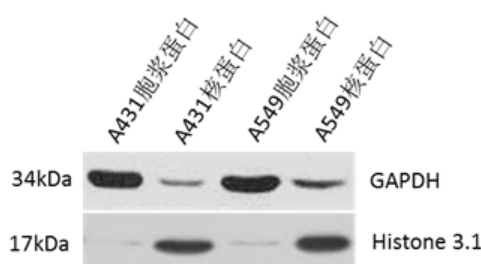
3.7 部分 DNA 结合牢固的蛋白，需要使用含变性剂缓冲液处理提高提取得率，如果不需要提取蛋白的天然构象活性，核蛋白提取时可使用缓冲液 E，同上，超声后，4° C 条件下，摇床温和混匀 1hr 或过夜以达充分变性提取目的，之后以 14,000 rpm 4° C 离心 10 min，收集上清为胞核蛋白提取液。

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。也可以使用 BCA 定量，但是准确度不高，只能用来调平上样量。

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，用于后续 WB 分析。WB 分析时，使用试剂盒所带的膜蛋白内参抗体作为内参。（同时建议带上 GAPDH 作为对照内参，判断胞浆蛋白残留情况，参考结果见下图）

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 ⁷			
浆蛋白（缓冲液 A/B）	2 ml	1-2 mg/ml	2-4 mg	2-4 mg/10 ⁷ 细胞
膜蛋白（缓冲液 C）	0.2 ml	1-2 mg/ml	0.2-0.4 mg	0.2-0.4 mg/10 ⁷ 细胞



P30266 Histone H3.1 Antibody 信息

Description: Core component of nucleosome. Nucleosomes wrap and compact DNA into chromatin, limiting DNA accessibility to the cellular machineries which require DNA as a template. Histones thereby play a central role in transcription regulation, DNA repair, DNA replication and chromosomal stability.

UniProt: P68431

Mol Weight: 17kDa

Isotype: Rabbit IgG

Reactivity: Human, Mouse, Rat, Pig, Bovine, Sheep, Dog, chicken

Application: WB 1:5000~1:10000 IHC 1:50~1:100 ICC/IF 1:50~1:200