



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 400-699-0631

http:// www.real-tims.com.cn

E-mail: real-times@vip.163.com

动物组蛋白提取试剂盒 (Animal Total Histone Extraction Kit)

产品货号	名称	规格
RTD8110	动物组蛋白提取试剂盒	50 次

● 产品简介

组蛋白 (Histone) 是指所有真核生物的细胞核中, 与 DNA 结合存在的碱性蛋白质的总称, 它和 DNA 共同组成核小体结构。它们是染色质的主要蛋白质组分, 作为 DNA 缠绕的线轴, 并在基因调控中发挥作用。组蛋白通常含有 H1, H2A, H2B, H3, H4 等 5 种成分。除 H1 外, 其他 4 种组蛋白均分别以二聚体(共八聚体) 相结合, 形成核小体核心。DNA 便缠绕在核小体的核心上。而 H1 则与核小体间的 DNA 结合。因此, 一般认为组蛋白作为结构支持体的作用比其基因调节作用更为重要。组蛋白可受到甲基化、乙酰化、磷酸化、聚 ADP 核糖酰化, 以及与泛醌 (ubiquinone) 相结合等几种类型的修饰。组蛋白的修饰与染色质结构的变化及基因活性的控制关系紧密。

该试剂盒采用优化配方, 可以迅速从细胞或组织中提取组蛋白, 同时配套有 HDAC(Histone deacetylase, 组蛋白去乙酰化酶)抑制剂, 可以维持组蛋白酰基化水平。

对于细胞样品, 如果每个样品的数量不超过一千万个 (10^7) 细胞(细胞沉淀体积 PCV 100 μ l), 本试剂盒可以抽提 50 个样品; 对于组织样品, 如果每个样品的重量不超过 50 mg, 本试剂盒可以抽提 50 个样品。每一千万细胞或 100 mg 组织提取的组蛋白含量约为 0.4 mg。

● 产品组成

产品编号	名称	规格	贮存
RTD8110-01	裂解缓冲液	100 ml	4 $^{\circ}$ C
RTD8110-02	提取缓冲液	15 ml	4 $^{\circ}$ C
RTD8110-03	中和缓冲液	5 ml	4 $^{\circ}$ C
RTD8110-04	去乙酰化酶抑制剂 (40 \times)	5 ml	-20 $^{\circ}$ C
RTD8110-05	1 M DTT (500 \times)	0.1 ml	-20 $^{\circ}$ C
RTD8110-06	PMSF (100 \times)	1.5 ml	-20 $^{\circ}$ C

● 贮存条件和运输:

按照标签温度贮存, 一年有效; 试剂盒湿冰运输。

● 使用方法:

一 培养细胞组蛋白提取:

1.1 即用型裂解缓冲液配制:

常温融解试剂盒中的试剂, 溶解后立即放置在冰上, 混匀。取适当体积的裂解缓冲液, 在使用前数分钟内加入 1/100 体积的 PMSF (100 \times) 和 1/50 体积去乙酰化酶抑制剂 (40 \times), 配成

即用型裂解缓冲液，随后立即放于冰上待用。

1.2 准备细胞:

1.2.1 对于贴壁细胞: 用 PBS 漂洗一遍, 弃 PBS; 再加入适量 PBS, 用细胞刮刀刮下细胞, 或用 0.02% EDTA (0.5 mM) 溶液处理细胞使细胞不再贴壁很紧, 并用移液器吹打下细胞。450 g 4°C 离心 5 min 收集细胞, 尽最大努力吸尽上清, 留下细胞沉淀备用。尽量避免用胰酶消化细胞, 以免胰酶降解需要抽提的目的蛋白。

1.2.2 对于悬浮细胞: 450 g 4°C 离心 5 min 收集细胞, 用 PBS 洗一遍, 离心收集细胞, 尽最大努力吸尽上清, 留下细胞沉淀备用。

1.3 按照下表加入各种试剂体积:

细胞数量	细胞沉淀体积 (PCV) (μl)	即用型裂解缓冲液 (μl)	
		第一次裂解	第二次裂解
1×10^7	100	1000	500

注: 1×10^7 (一千万) HeLa 细胞, 其细胞沉淀体积 (PCV, Packed Cell Volume) 约为 100 μl。

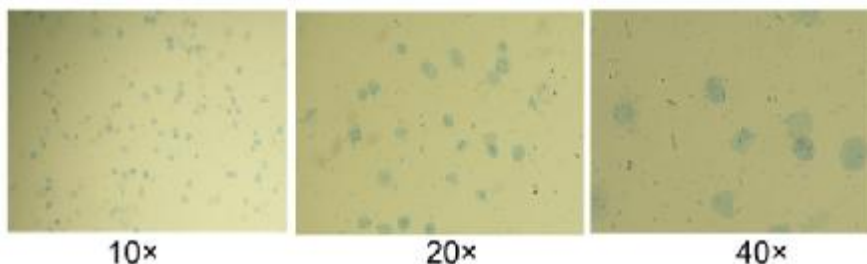
1.4 细胞裂解:

1.4.1 第一次裂解: 细胞沉淀中加入即用型裂解缓冲液 (10 倍 PCV 体积), 用移液器吹打重悬细胞沉淀, 不要涡旋震荡, 把细胞沉淀完全悬浮并分散开, 冰浴 15 分钟, 间歇混匀。

1.4.2 第二次裂解: 600 g 4°C 离心 5 min 收集细胞, 尽最大努力吸尽上清, 细胞沉淀中加入即用型裂解缓冲液 (5 倍 PCV 体积)。

1.4.3 匀浆: 用超声破碎细胞 (推荐 130W 功率超声 1 分钟, 超声 2 秒, 停顿 3 秒) 或用玻璃匀浆器冰浴匀浆 5-10 次或使用注射器用 27G 针头处理裂解物 10-15 次 (货号: PE2719, 蛋白提取针头套装), 以彻底裂解细胞, 收集裂解混合物, 冰浴处理 15 分钟。

注: 此步骤不要过度匀浆或超声处理, 否则得到的组蛋白会污染较多的胞浆蛋白, 可以用台盼蓝染色观察细胞裂解情况, 建议 70-80% 细胞裂解为适宜裂解程度。加入裂解缓冲液后, 细胞膜完全破裂, 胞浆完全释放, 但细胞核保持完整。镜检下可以看到完全染成蓝色的细胞核。



1.4.4 4 °C

16,000g

离心 15 分钟, 去掉上清, 保留沉淀。

1.5 细胞组蛋白提取:

1.5.1 沉淀重悬于 0.25 ml 提取缓冲液中, 超声处理 (推荐 130W 功率超声 2 分钟, 超声 2 秒,

停顿 3 秒), 冰浴 30 分钟, 间歇混匀。

注: 超声处理为必须步骤, 否则沉淀很难彻底溶解, 大大降低组蛋白提取得率。

1.5.2 4℃ 16000g 离心 10 分钟, 收集组蛋白上清。

1.5.3 即用型中和缓冲液配制:

取适当体积的中和缓冲液, 在使用前数分钟内加入 1/100 体积的 PMSF (100×), 1/40 体积去乙酰化酶抑制剂和 1/500 体积 1M DTT, 配成即用型中和缓冲液, 随后立即放于冰上待用。

1.5.4 组蛋白上清中加入 0.3 倍体积即用型中和缓冲液, 混匀, 即为组蛋白提取溶液。

注: 组蛋白溶液电泳检测时, 如果加入上样缓冲液后溶液变黄, 加入 1/10 体积中和缓冲液将颜色调整为蓝色后再上样。

1.6 组蛋白贮存:

组蛋白溶液-20℃贮存一周或-80℃长期贮存。

二 新鲜组织组蛋白提取:

2.1 即用型裂解缓冲液配制:

常温融解试剂盒中的试剂, 溶解后立即放置在冰上, 混匀。取适当体积的裂解缓冲液, 在使用前数分钟内加入 1/100 体积的 PMSF (100×) 和 1/40 体积去乙酰化酶抑制剂, 配成即用型裂解缓冲液, 随后立即放于冰上待用。

2.2 准备组织:

组织块迅速置于预冷的1×PBS 中, 漂洗数次, 滤纸吸干水分, 将组织切成细小的组织块, 称重组织, 按照下表加入各试剂的量

组织重量 (mg)	即用型裂解缓冲液 (μl)	
	第一次裂解	第二次裂解
50	1000	500

注: 50 mg 新鲜组织相当于细胞沉淀体积 (PCV, Packed Cell Volume) 约为 100 μl。

2.3 组织裂解:

2.3.1 第一次裂解: 组织中加入即用型裂解缓冲液 (10 倍 PCV 体积), 用玻璃匀浆器冰浴匀浆 10-20 次, 以彻底裂解细胞, 收集裂解混合物, 冰浴处理 15 分钟, 间歇混匀。

2.3.2 第二次裂解: 4℃ 600 g 离心 5 min 收集细胞, 尽最大努力吸尽上清, 细胞沉淀中加入即用型裂解缓冲液 (5 倍 PCV 体积)。

2.3.3 用超声破碎细胞 (推荐 130W 功率超声 1 分钟, 超声 2 秒, 停顿 3 秒) 或用玻璃匀浆器冰浴匀浆 5-10 次或使用注射器用 27G 针头处理裂解物 10-15 次 (货号: PE2719, 蛋白提取针头套装), 以彻底裂解细胞, 收集裂解混合物, 冰浴处理 15 分钟。

注: 此步骤不要过度匀浆或超声处理, 否则得到的组蛋白会污染较多的胞浆蛋白, 可以用台盼蓝染色观察细胞裂解情况, 建议 70-80% 细胞裂解为适宜裂解程度。加入裂解缓冲液后, 细胞膜完全破裂, 胞浆完全释放, 但细胞核保持完整。镜检下可以看到完全染

成蓝色的细胞核。

2.3.4 16,000g 4℃离心 15 分钟，去掉上清，保留沉淀。

2.4 组织组蛋白提取：

2.4.1 沉淀重悬于 0.25 ml 提取缓冲液中，超声处理（推荐 130W 功率超声 2 分钟，超声 2 秒，停顿 3 秒），冰浴 30 分钟，间歇混匀。

注：超声处理为必须步骤，否则沉淀很难彻底溶解，大大降低组蛋白提取得率。

2.4.2 4℃ 16000g 离心 10 分钟，收集组蛋白上清。

2.4.3 即用型中和缓冲液配制：

取适当体积的中和缓冲液，在使用前数分钟内加入 1/100 体积的 PMSF（100×），1/40 体积去乙酰化酶抑制剂和 1/500 体积 1M DTT，配成即用型中和缓冲液，随后立即放于冰上待用。

2.4.4 组蛋白上清中加入 0.3 倍体积即用型中和缓冲液，混匀，即为组蛋白提取溶液。

注：组蛋白溶液电泳检测时，如果加入上样缓冲液后溶液变黄，加入 1/10 体积中和缓冲液将颜色调整为蓝色后再上样。

2.5 组蛋白贮存：

组蛋白溶液-20℃贮存一周或-80℃长期贮存。

三 实验示例：

程序：收集 2 ml 293 细胞（细胞密度 1×10^7 ），PBS 漂洗 2 次，加入 1 ml 即用型裂解缓冲液，混匀，冰浴 15 分钟；离心收集细胞，加入 0.5 ml 即用型裂解缓冲液，130W 功率超声 1 min，冰浴 15 分钟；16000 g 离心 15 分钟；沉淀中加入 0.25 ml 即用型提取缓冲液，130W 功率超声 2 分钟，冰浴 15 分钟；16000 g 离心 15 分钟；收集 0.2 ml 组蛋白上清，加入 60 μ l 中和缓冲液，即为组蛋白提取溶液。取 40 μ l 组蛋白溶液，加 20 μ l 5×上样缓冲液，20 μ l 水，10 μ l 中和缓冲液（溶液由黄色变为蓝色），制备为组蛋白上样溶液，上样 5, 10, 15, 20 μ l。电泳后 FastBlue 染色 30 分钟。

