

Minute™ 胞质胞核分离试剂盒

目录号：SC-003

描述：

Minute™ 胞质胞核分离试剂盒由胞浆提取缓冲液，胞核提取缓冲液和离心管柱及 2.0ml 收集管组成。本试剂盒可以快速的从动物细胞/组织，原生质体（植物，细菌，酵母，真菌）中分离天然的胞浆和胞核蛋白。操作时间小于 15 分钟。

应用：

可应用于 SDS-PAGE, immunoblottings, ELISA, IP, 蛋白定位, 凝胶迁移分析, 2-D 等其他应用。可快速获得天然胞浆和胞核蛋白。

试剂盒组分

1. 25ml 胞浆提取缓冲液
2. 25ml 胞核提取缓冲液
3. 50 个离心管柱
4. 50 个收集管

运输： 常温运输

储存： 4 °C 保存

重要产品信息

蛋白酶抑制剂不是必须加入，但是如果下游实验需要较长时间或者蛋白提取后保存较长时间，建议添加蛋白酶抑制剂到胞浆裂解液中。胞核提取缓冲液中含有 300mM 盐，对于某些下游应用，可能需要稀释或者脱盐操作。推荐使用 BCA 试剂盒用于蛋白浓度测定。研究蛋白磷酸化，磷酸酶抑制剂应在使用前加入裂解缓冲液。

所需附加材料

1XPBS

涡旋震荡仪

台式离心机

BCA 蛋白定量试剂盒

微型管杵（组织样品需要）

操作方法：

A. 悬浮细胞样品（包括植物，细菌，酵母和真菌制备的原生质体）

1.500Xg, 3 分钟低速离心收集细胞，用预冷的 PBS 清洗一次

2.将细胞转移到 1.5ml 离心管中，3000rpm 离心 1-5 分钟，弃去上清。

3.按表格 1 加入适量的胞浆提取缓冲液（**请注意样品及裂解液的比例，以达到最佳效果**），涡旋大力震荡 15 秒，冰上孵育 5 分钟，混匀。接转胞质胞核分离步骤。

表格 1，不同细胞体积应加入相应体积缓冲液

细胞体积 (ul)	胞浆提取缓冲液 (ul)	胞核提取缓冲液 (ul)
5	50	25
10	100	50
20	200	100
50	500	250

* NIH3T3 和 293T 细胞 10ul 体积相当于 1×10^6 个细胞

B. 贴壁细胞

1.贴壁细胞生长至融合度 90-100%，将预冷的 PBS 直接加入细胞培养板，培养皿或培养瓶中清洗细胞两次，吸去上清。

2.按表格 2 将适量的胞浆提取缓冲液均匀的加入整个器皿表面，冰上静置 5 分钟。用吸头吹打几次后转移到预冷的 1.5ml 离心管中。涡旋大力震荡 15 秒。接转胞质胞核分离步骤。（**请注意样品及裂解液的比例，如浓度较低请减少裂解液使用量**）

表格 2，不同贴壁细胞量应加入相应体积缓冲液

器皿	胞浆提取缓冲液 (ul)	胞核提取缓冲液 (ul)
24 孔板	80	25
6 孔板	300	150
25 cm ² 培养瓶	500	250

C. 组织样品

1. 称重适量组织样品，放入预冷的 1.5ml 离心管中。
2. 用预冷的 PBS 清洗组织样品一次。3000rpm 离心 1 分钟，弃去上清，尽可能的使沉淀干燥。
3. 按表格 3 加入适量胞浆提取缓冲液，用微型管杵或微粉碎机匀浆，去除没有完全匀浆的组织碎片。接转胞质胞核分离步骤。

表格 3，不同组织样品量应加入相应体积缓冲液

组织样品 (mg)	胞浆提取缓冲液 (ul)	胞核提取缓冲液 (ul)
5	50	25
10-15	100	50
15-20	200	100
20-30	500	250

胞质胞核分离步骤

1. 4°C，最高速(14000-16000rpm)离心 5 分钟
2. 将上清液（上清为胞浆组份）转移到一个新的预冷的 1.5ml 离心管中。将沉淀（**可选优化：用 0.5ml 预冷 PBS 重悬，10000rpm，离心 3-5 分钟清洗沉淀可以减少胞浆蛋白污染**）中加入适量的胞核提取缓冲液，涡旋大力震荡 15 秒，冰上孵育 1 分钟。然后重复震荡 15 秒，冰上孵育 1 分钟四次。（**如核蛋白提取浓度低，可适当延长每次孵育及震荡时间**）
3. 迅速将核提取物转入到预冷的离心管套管中，14000-16000rpm，离心 30 秒。弃掉离心管柱。将核蛋白储存在-80°C。一般产量 1.5-2.5mg/ml。

常见问题

问题	解决方法
低蛋白浓度	增加细胞/组织起始量或者减少细胞裂解液用量
低蛋白活性	将裂解液预冷/添加蛋白酶抑制剂
胞核内有严重的胞浆污染	在胞浆提取缓冲液中加入 NP-40 至终浓度 0.1%

备注：核内参推荐使用 Lamin-B1，检测核内参请勿使用 H3，已有文献证实(见参考文献)，线粒体中也含有 H3，本试剂盒分离后，线粒体存在于胞浆组分，如用 H3 检测胞浆，一定会检出胞浆中有 H3。

参考文献：

Choi, et al(2011), Shot-gun proteomic analysis of mitochondrial D-loop DNA binding proteins: identification of mitochondrial histonesw. Mol. BioSyst .,2011,7,1523–1536. DOI: 10.1039/c0mb00277a

更多信息和活动请扫描
二维码关注官方公众号

