

Minute™ 脂肪组织/细胞胞质胞核分离试剂盒

目录号 AN-029

描述：

脂肪细胞是体内主要的能量储存场所，也起关键的内分泌功能。因此了解脂肪细胞的发展和功能是了解在生理和病理条件下代谢平衡关键。在实验室中，细胞核和细胞质的分离是很普通的实验，然而对于脂肪细胞来说，分离这两种细胞组分由于其含有高浓度的脂类和低含量的蛋白，比其他细胞要困难的多。文献报道的脂肪组织细胞核细胞质分离的方法繁琐又耗时，且起始样品至少要 50g 组织量。Minute™ 脂肪组织胞质胞核分离试剂盒提供了一种快速简便的从脂肪组织获得高纯度细胞核的方法，重要的是只需要毫克级组织样品，就有可能从小动物和活性标本中分离出细胞核和细胞质。

试剂盒组分

- | | |
|--------------|------|
| 1. N/C 缓冲液 | 15ml |
| 2. 1.5ml 管子 | 20 个 |
| 3. 1.5ml 研磨杵 | 2 个 |
| 4. 离心管柱 | 20 个 |
| 5. 离心收集管 | 20 个 |

储存： 常温运输，4 度保存。

重要产品信息

1. 仔细阅读整个操作说明。将离心管柱和接收管套管放置于冰上预冷。
2. 请确保冰箱温度在-20℃附近。
3. 研究蛋白磷酸化，**磷酸酶抑制剂应在使用前加入 N/C 缓冲液中**。蛋白酶抑制剂可以选择添加或不添加，如添加在使用前加入缓冲液 A 中。如果你有兴趣使用胞浆蛋白进行下游实验，那么蛋白酶抑制剂应该在使用之前加入到 N/C 缓冲液中。
4. 推荐使用 BCA 试剂盒用于蛋白浓度测定。
5. 如果分离的细胞核用于 RNA 相关的工作，例如单个核 RNA 测序，**RNAse 抑制剂应添加到 N/C 缓冲液中**。

操作方法：

无特殊规定，下面步骤均在室温下操作完成。样品可以使用新鲜组织或者冷冻组织。冷冻组织需要在 37°C 解冻。

脂肪组织

1. 称取 120-150mg 新鲜/冷冻组织 (**不建议超过 160mg**)，切割成小片 (约 2-3 X 2-3mm)，将组织放到 1.5ml 管中，加 600ul N/C 缓冲液。
2. 用管杵按压扭转匀浆组织 2-3min，匀浆后，可以看到脂肪沫粘附在管壁和研磨杵上。研磨杵是重复使用的，用纸将研磨杵上的脂肪擦掉，然后用 70%的酒精清洗干净。
3. 将离心管柱放到收集管内，从管上方将匀浆后的液体加入离心管柱上 (**含有脂肪组织也没问题**)。
4. 将离心管柱**开盖**，在-20°C，冷冻孵育 20min (确保冰箱温度在-20°C附近)。孵育之后，立刻**开盖**，500xg，离心 2-3min (如果离心管柱里有液体残留，将离心力增加到 1000xg，离心 1min)
5. 弃去离心管柱，盖上盖子，轻轻振荡，1000xg，离心 4min。注意观察细胞核的位置，要清楚细胞核所处的位置，因为分离出来的细胞核是透明的，在大多数情况下是不可见的。
6. 根据实验需求弃去上清或者保存上清 (**上清是细胞质**)，加 30ul PBS 或者是其他适合的溶液重悬细胞核沉淀。可以用台盼蓝染色在显微镜下观察细胞核产量。如果有荧光显微镜可以使用，DNA 染色。通常情况下。可以得到 50,000—100,000 个完整的细胞核。分离得到的细胞质蛋白含量约为 0.5-1mg/ml。分离得到的细胞核可用于蛋白质，DNA 和 RNA 的提取。

脂肪细胞

1. 500-700xg 低速离心 5min，收取 10-20X10⁶ 脂肪细胞，用预冷的 PBS 清洗细胞两次。将 PBS 去除干净。
2. 加 0.7ml N/C buffer 将细胞沉淀重悬，用移液器上下吹打 10-15 次。冰上孵育 5-10min。
3. 将离心管柱放入收集管，将细胞混液转移到柱子里。
4. 将离心管柱开盖，在-20°C，冷冻孵育 20min (确保冰箱温度在-20°C附近)。孵育之后，立刻放入离心机，管子开盖，500xg，离心 2-3min (如果离心管柱里有液体残留，将离心力增加到 1000xg，离心 1min，如果细胞悬浮液不含大量脂质，则可不使用离心管柱，加入 N/C 缓冲液处理的细胞可以在 1000 xg 的条件下直接离心 3-4min)。
5. 弃去离心管柱，盖上盖子，涡旋混匀。1000xg，离心 4min。离心后注意观察细胞核的位置，要清楚细胞核可能所处的位置，因为分离出来的细胞核是透明的。
6. 根据实验需求弃去上清或者保存上清 (**上清是细胞质**)，加 500ul PBS 或者是其他适合的溶液重悬细胞核沉淀。

常见问题

该方法简单直接，但是需要关注第 4 步的孵育时间，这对组织匀浆中水相与油相分离的关键步骤。由于每个实验室冰箱的实际温度是不同的，如果遇到严重的油脂污染，我们建议做以下简单的测试来确定最佳孵育时间：加入 0.5ml 的水到 1.5ml 离心管中，开盖放到用于冷冻孵育的冰箱中，确定水完全冻结所需的最短时间，这个时间就是第 4 步孵育的最佳时间。

更多信息和活动请扫描
二维码关注官方公众号

