

# 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，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

### 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，500Xg 离心 1 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（**注：如果需要获取特别纯的核蛋白，需要延长此步孵育时间**），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  $1 \times 10^6$  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（**注：如果需要获取特别纯的核蛋白，需要延长此步孵育时间**）。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 <sup>2</sup> 培养瓶	500	250

## 胞质胞核分离步骤

1. 4°C, 最高速(14000-16000Xg)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, 8000Xg, 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, 14000-16000Xg, 离心 30 秒。弃掉离心管柱。将核蛋白储存于-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

