

Minute™ 植物胞质胞核分离试剂盒

目录号:PF-045

描述：

本试剂盒用于新鲜或冷冻的柔软植物组织进行细胞组分分离。与其他商用试剂盒以及实验室常用方法不同，不需要大量起始材料（几克）和较长时间的。本试剂盒仅使用 100-200 毫克的起始材料，通过使用离心管柱技术配合特有专用缓冲系统，1 小时左右可将样品分离成胞浆、细胞核、叶绿体和微粒体四个组分。分离的组分可用于多种应用，包括但不限于蛋白质转运研究、核蛋白提取和核酸纯化/测序。分离出的高纯度核可用于蛋白质组学、流式细胞术分析、DNA 测序、蛋白质-蛋白质和蛋白质-DNA 相互作用研究。分离原理：研磨组织以释放植物细胞，然后快速通过离心管柱破坏细胞膜，通过差速离心得到不同的细胞组分。只需使用台式离心机即可。该试剂盒已被验证用于多种样品，如拟南芥、菠菜、豌豆和油菜等。

试剂盒组分(20T):

1. 缓冲液 A 30ml
2. 缓冲液 B 1ml
3. 缓冲液 C 25ml
4. 离心管柱和收集管 20 套
5. 1.5ml 离心管专用研磨杵 2 根
6. 研磨粉 2g

所需附加材料（试剂盒中未提供）

台式离心机（所有离心步骤均需在 4-8 度进行）

1X PBS

用 1 X PBS 配制的 5% BSA (流式实验时准备)

1.5ml 离心管

运输及储存： 常温运输，4 度储存

操作方法：

注意：开始前仔细阅读整个操作说明。建议在使用前将蛋白酶抑制剂加在缓冲液 A 和 PBS 中（蛋白酶抑制剂终浓度为 1x，例 100x 蛋白酶抑制剂，1ml 缓冲液 A 液中加 10ul 蛋白酶抑制剂）。本试剂盒操作体系最低可降至 50mg 起始样本。缓冲液 A 和缓冲液 B 使用前需冰上预冷。

1. 将 100-150mg 新鲜/冷冻的植物嫩叶加到离心管柱套管中，折叠卷曲叶片将其塞入到离心管柱中。加入 100ul 缓冲液 A，用 200ul 吸头按压叶片 100-200 次以压缩叶片体积（此步大概需要 2-3min）。
2. 用研磨棒的**平头端**反复向下按压扭转研磨 100-200 次（大约 2-3min）。（注意：研磨棒可重复使用，用 70% 酒精擦拭或用蒸馏水冲洗干净，用纸巾擦干即可。）
3. 再加 300ul 缓冲液 A 到离心柱中，用 200ul 吸头将样品搅拌混匀。盖上盖子，1,500Xg 离心 5min。**（可选优化：离心后，将接收管中 200ul 上清转回离心管柱上重复研磨，可增加最终产量）**。弃去离心管柱，如需分离胞浆及微粒体组分，将收集管中的上清转移到一个新的 1.5ml 离心管中放到冰上备用（见下面 4A 步骤，如不分离可弃掉），沉淀用 1ml 预冷的 PBS 吹打重悬，然后 1,200Xg 离心 5min。弃掉上清，加入 1ml 缓冲液 A 吹打重悬沉淀，同时添加 20ul 缓冲液 B，大力涡旋振荡 10-20s，确定沉淀完全复溶于完整的细胞核分离（见 4B 步骤）。

以下操作步骤根据实验需求选择，**如需分离胞浆及微粒体组分，从 4A 步骤开始，如仅需细胞核组分，从 4B 步骤开始。**

4A. 分离细胞浆和微粒体组分：

第 3 步所得上清 4,000Xg 离心 10min（**沉淀主要为破碎的叶绿体**）。将上清转移到一个新的 1.5ml 离心管中，16,000Xg 离心 30min。（**上清是胞浆组分，沉淀是已经去除大部分细胞核及叶绿体的微粒体组分即：细胞器和质膜组分**）

4B. 分离细胞核：

- a. 将第 3 步重悬的沉淀在冰上孵育 5min，1,200Xg 离心 5min。
- b. 完全去除上清，沉淀用 200ul 预冷的 PBS 移液器上下吹打 30-40 次重悬备用。
- c. 将 1.2ml 缓冲液 C 加到一个**新的** 1.5ml 离心管中，将步骤 b 中 PBS 重悬的沉淀用移液器小心贴着管壁缓慢吹出到 C 液上方。
- d. 1,200Xg，离心 5min，离心后清晰可见一个白色或浅绿色沉淀以及绿色上清。将上清完全去除干净，用 0.5ml 预冷 PBS 清洗沉淀（**沉淀为分离的完整细胞核**）。细胞核可以根据下游实验复溶在合适的溶

解液中。例如：蛋白抽提实验，可以将核用 50-100ul 含有表面活性剂的裂解液裂解，得到的蛋白可以进行 WB 检测，ELISA 或者 IP（详见下表以及技术说明）。测定蛋白浓度，推荐使用 BCA 法。如果下游是做流式检测分析可以用 0.2-0.5ml 含 5%BSA 的 PBS 重悬细胞核。核酸提取，可用 Tris 缓冲液或者其他合适的细胞核缓冲液重悬。

技术说明：

1. 本试剂盒对幼嫩的植物叶片最有效，但也适用于其他软组织，如种子、外壳和软茎。对于非叶片软组织，将其切割成 1 x 1 mm 或更小的碎片，按照操作步骤进行即可。非叶片组织获取的细胞核的纯度通常不如叶片组织。在大多数情况下，主要污染物是质体（plastids）而不是叶绿体。
2. 如果分离的细胞核有明显的绿色，用 0.5ml PBS 加 20ul 缓冲液 B 重悬细胞核，冰上孵育 10min，1,000Xg 离心 5min 收集清洗过的细胞核。
3. 说明书中样品起始量对于大多数样品而言得率是足够的。样品不要超过 200mg，并非样品越多结果越好。
4. 从分离的细胞核沉淀中提取蛋白，如使用 WA-009 溶解液（参照下面表格），加入 50ul 蛋白溶解液后，需加入 40-50mg 试剂盒中提供的蛋白分离粉到管底部，用试剂盒中研磨棒**尖头端**用力研磨 100-200 次。再补加 50ul WA-009 溶解液，8,000Xg 离心 5min，上清为分离出来的核蛋白溶液。蛋白得率通常在 20-50ug/样品。如果需要更多的蛋白，可将多管分离的核合并在一起再提取蛋白即可。

推荐按照下游实验应用选购以下蛋白溶解液

产品名称	货号	下游实验应用
Minute™变性蛋白溶解液	WA-009	1D 或者 2D 电泳，WB，胰酶消化，如果是做 2DE，需要在跑胶前将蛋白进行 TCA 沉淀处理。
Minute™非变性蛋白溶解液	WA-010	ELISA，IP，CO-IP，凝胶移位分析，酶活性检测等其他应用

更多信息和活动请扫描
二维码关注官方公众号

