

Minute™ 神经组织/细胞单个细胞核分离试剂盒

目录号:BN-020

描述:

分离的细胞核被广泛应用于 FACS 分析、单个细胞核分析 (如 RNA-seq 和 ATAC-seq)、免疫荧光染色、细胞周期分析和凋亡研究等多种实验。单细胞 RNA-seq 是研究组织复杂细胞组成的有力技术。然而, 神经元是高度相互连接的, 很难从神经元组织中, 如大脑和脊髓等获得单个细胞。从冷冻的神经元组织中分离出完整的细胞更加困难。由于这些局限性, 单细胞 RNA-seq 可以被单个核 RNA-seq 取代。传统方法从神经元组织中分离细胞核是非常繁琐和耗时, 产率通常很低, 且很难去除髓鞘和其他细胞成分的污染。本试剂盒可有效解决这些问题, 而且操作简单、快速、高效, 15-30 分钟即可获得高纯度单个细胞核。与传统方法相比, 试剂盒需要的起始样品量更低, 且样品起始量可在 1-60mg 范围内调整。缓冲液中含有专用的混合表面活性剂可有效裂解细胞。如需无表面活性剂的配方, 请选择使用无表面活性剂完整细胞核分离试剂盒 (Cat#NI-024)。

试剂盒组分(20T):

1. 缓冲液 A 15ml
2. 缓冲液 B 25ml
3. 离心管柱/收集管 20 套
4. 1.5ml 研磨杵 2 个

储存: 常温运输, 4 度保存。

附加材料:

台式离心机, 含 5%BSA 的 1xPBS

重要产品信息:

开始实验前请认真阅读说明书 (包括文末的技术要点)。本试剂盒可以从大多数神经组织/细胞 (冷冻或新鲜) 中分离细胞核。细胞核的纯度和完整性不同样品会有所差异。通常情况下, 大脑灰质和培养的神经细胞的得率和纯度要高于大脑白质和脊髓样品。所有的离心步骤都可以在室温进行。请在实验前仔细阅读以下技术要点。如果分离的细胞核用于 RNA 的相关实验, 请使用前分别在缓冲液 A 和缓冲液 B 里添加 RNAase 酶抑制剂。

操作方法：

(样品量范围：脑组织 1-80mg，脊髓组织 1-50mg)

(缓冲液需提前预冷)

1. 称取 20-30mg 新鲜/冷冻组织放入 1.5ml 离心管中，加入 200ul 预冷的缓冲液 A。用提供的研磨杵按压反复扭转匀浆组织 50-60 次。(研磨杵是可重复使用的，用 70%的酒精清洗即可。)
2. 再加入 500ul 预冷缓冲液 A 到离心管中继续研磨 20-30 次至匀浆状，冰上孵育 5min。孵育后将匀浆物转入离心管柱接收管套管中（避免避开管底部较大的碎片），**开盖**在-20 度冰箱孵育 5-10min。
3. 盖上盖子，立刻 13,000Xg，离心 30s。弃去离心管柱，用移液器上下吹打 10-20 次将沉淀重悬（尽量避开粘附于管壁上的油脂）。如果离心后柱子上有液体残留，可以将起始样品量减半操作。
4. 600Xg，离心 5min。小心去除上清，加入 200ul 预冷的含有 5%BSA 的 PBS 重悬沉淀（这就是分离的细胞核，大多数情况下沉淀不是很明显）。这个细胞核悬液将用于下一步覆盖于 Buffer B 上。
5. 将 1ml 预冷的缓冲液 B 加到一个**新的** 1.5ml 离心管里（如有气泡请去除），将 200ul 第 4 步所得 PBS 细胞核重悬液用移液器小心贴着管壁缓慢吹出到缓冲液 B 的上方。1,000Xg，离心 10min。离心后，细胞碎片油脂和磷脂会留在上层（乳状层）。下方的沉淀为纯化的细胞核。用 1ml 吸头小心地将乳状层吸出丢弃，倒掉残留的缓冲液 B，用 50-200ul 含有 5%BSA 的 PBS 或者其他合适的缓冲液将细胞核沉淀重悬。确保将管壁冲洗干净收集所有的细胞核。

培养的神元细胞操作步骤：（缓冲液需冰上预冷）

1. 600Xg 低速离心 5min 收集 1×10^5 - 1×10^7 个细胞，用 1ml 预冷的 PBS 清洗细胞一次，将 PBS 去除干净。加入 200ul 缓冲液 A，用提供的研磨杵研磨 20-30 次。再加入 400ul 缓冲液 A 到管中，混匀后将细胞裂解物倒入离心管柱接收管套管中。在-20 度冰箱**开盖**孵育 5-10min。孵育后操作同上面第 3 步至第 5 步。

技术要点：

1. 虽然本试剂盒可以使用的样品量范围比较宽泛，但如果起始样品量不是限制因素，我们建议最好使用 10-30mg 组织或 $2-5 \times 10^6$ 个培养细胞以得到最佳效果。起始样品越多得到的细胞核越多。
2. 最终细胞核的纯度取决于样品类型。例如大脑灰质和一些培养细胞，分离出的细胞核相对干净，甚至可不使用缓冲液 B 清洗。只需用 0.5ml 含有 5%的 BSA 的 PBS 清洗第 4 步得到的细胞核沉淀即可。但如果使用脊髓或白质，则推荐使用缓冲液 B 对核进行清洗。
3. 通常大脑皮层样品可获得完整细胞核的产量一般约为 1×10^6 /每 10mg 组织。如果起始组织或细胞非常少，缓

冲液 B 的清洗可能导致细胞核进一步损失。

4.如果细胞核沉淀经过 Buffer B 清洗后明显减少，步骤 5 中离心速度可以增加至 1,000-1,500Xg，10min。这个离心力范围可以最大限度的提高细胞核产量而不会受到髓鞘的污染。

更多信息和活动请扫描
二维码关注官方公众号

