

# Minute™ 脂肪组织/细胞胞质和 单个细胞核分离试剂盒

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。完整分离出来的细胞核可以满足很多应用例如可以做单个细胞核的 RNA 测序，SDS-PAGE，免疫印迹，ELISA，IP，蛋白定位，凝胶迁移，2-D 胶等。

## 试剂盒组分(20T):

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

所需附加材料：1X PBS（不含钙离子）配制的 5%BSA 缓冲液。

**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。如果胞浆蛋白需要进行下游实验，蛋白酶抑制剂应该在使用之前加入到N/C缓冲液中。（抑制剂的添加方法请按照蛋白酶或磷酸酶抑制剂母液比例，例如母液是100x，添加时按

照1: 100添加, 即1ml缓冲液中添加10ul抑制剂)。

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 相关的实验, 例如单个核 RNA 测序, **RNAse 抑制剂应添加到分装的 N/C 缓冲液中。**

## 操作方法:

除有特别说明外, 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。

### 脂肪组织样品:

1. 称取 150-160mg 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**试剂盒提供的** 1.5ml 管底, 加入 200ul N/C 缓冲液。
2. 用试剂盒提供的研磨杵按压扭转轻推管壁和管底匀浆组织 2-3 分钟。匀浆后, 再次加入 500ul N/C 缓冲液, 继续匀浆 20-30 次。研磨杵可重复使用, 用纸将研磨杵上的脂肪擦掉, 然后用 70%的酒精清洗干净即可。
3. 将离心管柱放到收集管内, 将上述匀浆后物加到离心管柱套管里 (**如果含有一些脂肪组织碎片也不影响**)。
4. 将离心管柱**开盖**, 在-20°C, 冷冻孵育 10-15min。孵育之后, 立刻**盖上盖子**, 13,000Xg, 离心 15-20s。
5. 弃去离心管柱, 用 1ml 移液器上下吹打沉淀 10-20 次重悬 (尽量避免吸附在管壁的油脂)。将所有匀浆物转移到新的 1.5ml 的离心管里。盖上盖子, 1,200Xg, 离心 5min。
6. 离心后将上清全部倒出 (上清是**胞质组分**, 如需要可保留。分离得到的细胞质组分蛋白含量约为 0.5-1mg/ml。) 注意: 弃掉上清后, 将管子开口朝下放置, 用棉签将附着于管壁的油脂擦拭干净。不要碰到管底位置的细胞核沉淀。
7. 将离心管调转开口朝上, 加入 30-50ul 用 PBS 配制的 5%的 BSA 溶液, 用移液器吹打 10-20 次重悬沉淀 (沉淀大多数情况下是看不到的)。分离的细胞核可在显微镜下用台盼蓝染色观察测定, 或用荧光显微镜进行 DNA 染色检测。通常情况每种样品可以得到 50,000-100,000 个完整的细胞核。分离得到的细胞核可用于 FACS, snRNA-seq, scATAC-seq, scDNAseq, 以及细胞核蛋白质, DNA 和 RNA 的提取。细胞核如需运输或长期存放, 推荐使用 **Minute™抗聚集细胞核存储液 (Cat# WA-014)**。

## 脂肪细胞样品：

1. 1,000Xg 低速离心 5min，在 1.5ml 离心管中收取 10-20x10<sup>6</sup> 个脂肪细胞，用预冷的 PBS 清洗细胞两次。将 PBS 去除干净。  
注意：如果脂肪细胞在离心后浮在顶部，用注射器取出培养基或 PBS。
2. 加入 0.7ml N/C buffer 用移液器上下吹打 10-15 次将细胞沉淀重悬。在-20℃，冷冻孵育 10min。
3. 以下步骤参见上面脂肪组织样品第 3 步到第 7 步操作。

## 技术要点：

1. 用上述方法分离的细胞核已经干净纯净并且分散性良好。如果需要更高纯度的细胞核，可采用流式细胞仪对其进行进一步分选。
2. 如果没有棉签，可以用镊子夹着小块纸巾将油脂擦拭干净。
3. 步骤 6 得到细胞质部分可以进一步纯化，4℃，12,000Xg，离心 10min，将纯净的细胞质转移到新的离心管里。
4. 如果得到的细胞核下游用于 RNA-seq，推荐用酶消化组织分离出脂肪细胞后，再使用该试剂盒分离细胞核，这样可以得到更多的细胞核(见参考下文)。

## 参考文献：

1. Rajbhandari, P., Arneson, D., Feng, A. C., Ahn, I. S., Diamante, G., Zaghari, N., ... & Smale, S. T. (2019). Single Cell Analysis Reveals Immune Cell-Adipocyte Crosstalk Regulating the Transcription of Thermogenic Adipocytes. *eLife*. 2019;8:e49501

更多信息和活动请扫描  
二维码关注官方公众号

