

Minute™ 新鲜/冷冻组织胞质胞核分离试剂盒

目录号:NT-032

描述:

从细胞和组织中分离胞质和胞核组分是一种常见的实验。细胞样品的组分分离相对简单直接,然而,从组织样品中特别是冷冻组织中将胞质和胞核组分分离干净是很具挑战的。因为冷冻和反复冻融会引起组织细胞结构的改变,加之不适当的匀浆方式和效率低的提取缓冲液,使得交叉污染十分严重。目前大多数商业试剂盒设计可同时用于细胞和组织样品,但是忽略了两种类型样品之间的结构差异。因此,从新鲜/冷冻组织中分离胞质和胞核组分时,交叉污染问题无法避免(见下文参考文献 1 和 2)。这款新型的胞质和胞核分离试剂盒专用于组织样品的胞质胞核分离,试剂盒特有的缓冲液体系和独特的操作方法可以将交叉污染降到最低。整个操作可以在 30 分钟内完成。

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。

试剂盒组分(20T):

1. 缓冲液 A 25ml
2. 缓冲液 B 10ml
3. 缓冲液 D 1.5ml
4. 缓冲液 N 1.5ml
5. 1.5ml 离心管 40 个
6. 1.5ml 研磨杵 2 个
7. 蛋白质提取粉 2 克

运输: 常温运输

储存: 4 度保存

重要产品信息：

1. 实验开始前将缓冲液 A 和缓冲液 B 冰上预冷。
2. 所有的离心步骤请在 4 度环境或 4 度冷冻离心机离心。
3. 使用前推荐将蛋白酶抑制剂加入分装的缓冲液 A 中。
4. 研究蛋白磷酸化，磷酸酶抑制剂应在使用前加入到分装的缓冲液 A 和缓冲液 B 中。
(添加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，1ml缓冲液添加10ul抑制剂)。
5. 推荐使用 BCA 法测定蛋白浓度。
6. 缓冲液 D 中如出现白色沉淀，使用前可将缓冲液 D 在 37 度水浴至沉淀溶解。

操作方法：

1. 取 20-30mg 新鲜或冷冻组织样品，放入试剂盒提供的 1.5ml 离心管中，加入 250ul 缓冲液 A 覆盖组织，冰上孵育 5 分钟。使用提供的研磨杵慢慢地反复扭转研磨样品 1 分钟（大概 40-60 次）。研磨杵可以重复使用，用清水清洁后，用纸巾擦干即可。
2. 14,000 X g，离心 5 分钟。转移 200μl 上清液(胞质组分)到新的自备的离心管中保存。(如果上清液不够澄清，14,000 X g，再离 5 分钟进一步澄清)。用研磨杵如上所述再次把沉淀进一步研磨（研磨 60-100 次）。将研磨杵放置于管中，加入 0.8 ml 缓冲液 A 到管中。再研磨几次，拿出研磨杵。用 1 毫升吸头上下吹打 15-20 次混匀。在冰上孵育 5-8 分钟，让大的组织碎片通过重力作用沉到底部，将 0.7 ml 的上清液转移到一个新的试剂盒提供的 1.5 ml 管中(尽量避免管底大的组织碎片)。
3. 500Xg，离心 2 min，弃去上清液。加入 0.5 ml 的缓冲液 B，涡旋振荡 10-20 秒重悬沉淀。冰上孵育 5 分钟，2,000 X g 离心 2 分钟，完全去除上清液。
4. 沉淀是分离的**细胞核**，根据不同的下游应用有两种核蛋白提取方式可选：

A. 变性核蛋白提取 (提取出的核蛋白适用于 SDS-PAGE、Western blotting 等应用)

用 50μl 缓冲液 D 重悬沉淀(悬液可能粘稠，这是正常的)。称取 50-60mg 的蛋白提取粉，加入沉淀(尽量避免接触管壁)。用研磨杵扭转研磨约 60-100 次。研磨杵仍置于离心管中，加入 50-150ul 的缓冲液 A 到管中，再研磨几次(使用缓冲液 A 的多少取决于沉淀的大小。研磨杵可以重复使用，用清水清洁后，用纸巾擦干即可)。14,000 X g，离心 5 分钟。将上清液转移到一个新的自备离心管中(即是**细胞核蛋白**)。可将蛋白酶抑制剂添加到核蛋白溶液中并储存于-20 或-80 度。蛋白质浓度一般为 1-2mg/ml。

B. 非变性核蛋白提取 (提取出的核蛋白适用于 ELISA、IP、酶活性测定、凝胶延滞实验等应用)

用 50μl 缓冲液 N 重悬沉淀。室温孵育 5 分钟。称取 50-60 毫克蛋白提取粉加入沉淀(尽量避免接触管壁)。用研磨杵扭转研磨约 60-100 次。研磨杵仍置于离心管中，加入 50-150ul 的缓冲液 A 到管中，

再研磨几次(使用缓冲液 A 的多少取决于沉淀的大小)。10,000 X g, 离心 5 分钟, 将上清液转移到一个新的自备的离心管中(即是细胞核蛋白)。可将蛋白酶抑制剂添加到核蛋白溶液中并储存于-20 或-80 度。蛋白质浓度一般为 0.5-1mg/ml。

关于胞质和胞核内参:

许多抗体在WB 中被用于检查组分分离的交叉污染。文献中常用的胞质内参包括但不限于GAPDH, HSP90, LC3 A/B, Tubulin, HIF1, ESR1, ACTB 和Actin 等。我们推荐使用GAPDH, HSP90 或LC3 A/B 作为胞质内参, 不推荐使用 β -actin, 因为Actin也存在于细胞核(见参考文献3 和4)。细胞核内参我们推荐使用LaminB1, Lamin A/C, SC-35 或histones。

参考文献 :

1. Kuster et al (2011) Nuclear protein extraction from frozen porcine myocardium. *JPhysiol. Biochem.* 67:165-173.
2. Murray et al (2009) Assessment of ProteoExtract subcellular fractionation kit reveals limited and incomplete enrichment of nuclear subproteome from frozen liver and heart tissue. *Proteomics.* 9(15):3934-3938.
3. Dopie et al (2012) Active maintenance of nuclear actin by importin 9 supportstranscription. *PNAS* E544-E552.
4. Falahzadeh et al (2015) The potential roles of actin in nucleus. *Cell J.* 17:7-14

更多信息和活动请扫描
二维码关注官方公众号

