

Minute™ 胞质胞核分离试剂盒（细胞样品）

目录号:SC-003

描述:

Minute™ 细胞样品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哺乳动物细胞，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:

使用本试剂盒可快速获得细胞样品中天然胞浆和胞核蛋白,下游可应用于 SDS-PAGE, immunoblottings, ELISA, IP, 蛋白定位, 凝胶迁移分析, 2-D, 亦可用于胞质胞核组分分离, 后续分别进行 RNA 提取, 用于 RNA 定位实验。本试剂盒提供了目前可用于分离天然细胞质和核蛋白的快速方法。

试剂盒组分:

50 Preps:

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

4 Preps:

1. 2.0ml 胞浆提取缓冲液
2. 1.5ml 胞核提取缓冲液
3. 4 个离心管柱
4. 4 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提取缓冲液中。研究蛋白磷酸化，磷酸酶抑制剂应在使用前加入提取缓冲液。做RNA相关实验时，需添加RAN酶抑制剂到提取缓冲液中。（各类抑制剂的添加方法请按照抑制剂母液比例，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）。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。

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分钟后吹打混匀（**注：如果需要获取高纯度的核蛋白，需要延长此步孵育时间至15分钟**），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 1×10^7 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：如果需要获取高纯度的核蛋白，需要延长此步孵育时间至 15 分钟）。用吸头吹打刮取裂解物后转移到预冷的 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 ² 培养瓶	500	250

胞质胞核分离步骤

1. 4°C, 台式离心机最高速离心 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。此处如有不可溶絮状白色物为正常现象。（如核蛋白提取浓度低，可适当延长每次孵育及震荡时间，也可反复冻融加速细胞核裂解）。

3. 迅速将核提取物转入到预冷的离心管套管中，14,000-15,000Xg，离心 30 秒。弃掉离心管柱。将核蛋白储存于-80°C。一般产量为 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，通常会检出胞浆中有 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

