

Minute™ 代谢组分析专用胞质胞核分离试剂盒

目录号：MT-059

描述：

此款无去垢剂的细胞质与核分离试剂盒专为从培养细胞及组织中制备代谢物分析样本而设计。可在 40 分钟内完成完整细胞核的分离，无需使用 Dounce 匀浆器和去垢剂。传统的细胞核分离方法通常使用非离子去垢剂，但这类物质可能会干扰质谱检测，并导致核内代谢物渗漏。

在本方法中，首先使用 Buffer A 对细胞或组织进行致敏处理，然后在离心力作用下使其沿 Z 字形路径通过离心管柱。细胞在穿过离心管柱时发生破裂，而完整的细胞核随之释放到接收管的溶液中。随后通过离心将细胞核与细胞质组分分离，并使用甲醇或其他合适溶剂提取核代谢物。

试剂盒组份 (20 Preps)：

- | | |
|----------------|------|
| 1. Buffer A | 15ml |
| 2. Buffer B | 20ml |
| 3. Buffer C | 25ml |
| 4. 离心管柱 | 20 个 |
| 5. 2ml 接收管套管 | 20 个 |
| 6. 1.5ml 塑料研磨棒 | 2 个 |
| 7. 组织研磨粉 | 2.0g |

运输与储存： 常温运输，4°C 储存

所需附加材料

1. 桌面台式离心机(10s 内转速可达 16,000Xg)
2. 甲醇 (LC-MS 级)

重要产品信息

分离细胞核的纯度和完整性取决于细胞或组织的质量和类型，产量可能也会相应变化。

操作方法：

哺乳动物组织操作步骤

准备工作：在冰上预冷缓冲液；将离心管柱插入接收管中形成套管；离心机 4°C 预冷

- 1. 样品准备：**向离心管柱中加入 20-30 mg 新鲜或冷冻的软组织。如果是冷冻组织，使用前需在冰上彻底解冻。
对于肌肉组织，请先将其置于洁净的玻璃或塑料板上，用锋利刀片彻底将组织切碎成浆状或糊状，再转移至离心管柱中。若得率较低，加入试剂盒提供的组织研磨粉可有助于提高得率（参见下文“技术要点 3”）。
- 2. 研磨处理：**向离心管柱中加入 200 μ l 预冷的 Buffer A。使用试剂盒提供的研磨棒的**扁平端**向下按压并扭转研磨组织约 1-2 分钟（研磨棒可重复使用，用清水冲洗清洁即可）。对于肌肉组织，研磨时间需翻倍。
- 3. 孵育：**再次向离心管柱中加入 300 μ l 预冷的 Buffer A，**开盖**在冰上孵育 5-10 分钟。对于肌肉组织，孵育时间应延长至 20-30 分钟。孵育结束后，盖上管盖并轻轻颠倒数次以混匀。
- 4. 离心过柱：**使用台式离心机，4°C，16,000 \times g 离心 20 秒。
可选步骤： 将接收管中的沉淀用涡旋振荡仪重悬，吸回到离心管柱上，再次离心过柱一次，可提高最终得率。
- 5. 胞质胞核分离：**弃去离心管柱，大力涡旋振荡 10 秒重悬接收管中的沉淀。4°C，600 \times g 离心 4 分钟收集细胞核沉淀（粗提细胞核组分）。将上清液（粗提胞质组分）转移至预冷的新的 1.5ml 离心管中，并接第 9 步处理。
- 6. 细胞核纯化：**用 0.8-1.0 ml 预冷的 Buffer B 将细胞核沉淀重悬，4°C，1,000 \times g 离心 5-8 分钟去除膜碎片。离心后小心的弃去所有上清液。沉淀即为分离出的细胞核（第一次纯化后的细胞核）。若担心大个细胞器污染（如线粒体），可使用改良版的 Buffer B（参见下文“技术要点 2”）。
- 7. 进一步纯化细胞核：**用 0.8 ml 预冷的 Buffer C 将沉淀重悬，4°C，600 \times g 离心 5 分钟。弃去上清液。沉淀即为分离出的**细胞核**（纯化后的细胞核）。

可选步骤： 可保留此上清液以便在实验出现问题时进行排查。

8. **细胞核计数与采样**：将细胞核沉淀重悬于 17 μ l 预冷的 Buffer C 中。取 6 μ l 悬液用于细胞计数仪计数（可使用 AO/PI 或台盼蓝按 1:1 比例染色）。剩余的 10 μ l 细胞核悬液将用于 LC/MS（液质联用）分析（参见下文“技术要点 1”）。

9. **细胞质组分纯化**：将第 5 步中保留的上清液 4 $^{\circ}$ C，16,000 \times g 离心 20 分钟。将上清液转移至新离心管中，此即为**细胞质组分**用于代谢物分析。（参见下文“技术要点 1”）。

培养细胞操作步骤

准备工作：在冰上预冷缓冲液；将离心管柱插入接收管中形成套管；离心机 4 $^{\circ}$ C 预冷

1. **细胞收集与洗涤**：通过低速离心（500 \times g，离心 5 分钟）收集 10-40 \times 10⁶ 个培养细胞。用预冷的 1 ml PBS 洗涤细胞沉淀一次，并完全去除上清液。

2. **孵育**：用 500 μ l 预冷的 Buffer A 将细胞沉淀重悬，在冰上孵育 8-10 分钟。孵育结束后，大力涡旋振荡离心管 20-30 秒。随后将细胞悬液转移至离心管柱套管中。

3. **离心过柱**：台式离心机，4 $^{\circ}$ C，16,000 \times g 离心 20 秒。接收管中的沉淀用吸头反复吹吸重悬沉淀，然后将悬液转移回离心管柱中再次离心过柱一次。

4. **胞质胞核分离**：弃去离心管柱，大力涡旋振荡 10 秒重悬接收管中的沉淀。4 $^{\circ}$ C，600 \times g 离心 4 分钟收集细胞核沉淀（粗提细胞核组分）。将上清液（粗提胞质组分）转移至预冷的新的 1.5ml 离心管中，并接第 8 步处理。

5. **细胞核纯化**：用 0.8-1.0 ml 预冷的 Buffer B 将细胞核沉淀重悬，4 $^{\circ}$ C，1,000 \times g 离心 5-8 分钟去除膜碎片。离心后小心的弃去所有上清液。沉淀即为分离出的细胞核（第一次纯化后的细胞核）。若担心大个细胞器污染（如线粒体），可使用改良版的 Buffer B（参见下文“技术要点 2”）。

6. **进一步纯化细胞核**：用 0.8 ml 预冷的 Buffer C 将沉淀重悬，4 $^{\circ}$ C，600 \times g 离心 5 分钟。弃去上清液。沉淀即为分离出的**细胞核**（纯化后的细胞核）。

可选步骤：可保留此上清液以便在实验出现问题时进行排查。

7. **细胞核计数与采样**：将细胞核沉淀重悬于 17 μ l 预冷的 Buffer C 中。取 6 μ l 悬液用于细胞计数仪计数（可使用

AO/PI 或台盼蓝按 1:1 比例染色)。剩余的 10 μ l 细胞核悬液将用于 LC/MS (液质联用) 分析 (参见下文“技术要点 1”)。

8. **细胞质组分纯化**: 将第 5 步中保留的上清液 4 $^{\circ}$ C, 16,000 \times g 离心 20 分钟。将上清液转移至新离心管中, 此即为**细胞质组分**用于代谢物分析。(参见下文“技术要点 1”)。

技术要点 (Tech Notes)

1. 代谢组分析前处理

1) 代谢物的甲醇提取:

分离出的细胞核组分: 取 10 μ l 悬浮在 Buffer C 中的细胞核, 加入 90 μ l 预冷甲醇混合。

细胞质组分: 取 100 μ l 细胞质组分, 加入 400 μ l 预冷甲醇混合。

2) 细胞样本处理与提取: 使用液氮对核样本进行三次冻融循环。在冷冻循环之间在冰水浴中进行超声波处理, 以破坏核膜。然后将样品在 -20 $^{\circ}$ C 下孵育 3 小时以沉淀蛋白质, 孵育后 4 $^{\circ}$ C, 16000 \times g 离心 15 分钟。将上清液转移到一个新的试管中, 使用真空离心浓缩仪 (SpeedVac) 在 -20 $^{\circ}$ C 下干燥, 并在 -80 $^{\circ}$ C 下储存。分析前, 用 100 μ l 乙腈/水 (1:1, v/v) 复溶样品, 用于 LC-TQMS 分析(液相色谱-三重四极杆质谱)。

3) 空白对照建议: 建议按照相同的甲醇提取流程, 分别使用 Buffer A 作为细胞质空白对照, 使用 Buffer C 作为细胞核空白对照。

2. 线粒体污染处理 (改良版的 Buffer B)

若担心线粒体污染, 可使用改良版 Buffer B 替代原 Buffer B (例如: 向 1 ml Buffer B 中加入 10 μ l 用 ddH₂O 配制的 10% NP-40 并混匀) 来重悬核沉淀。使用改良版 Buffer B 时, 请在下一步中用 0.5 ml Buffer C 洗涤两次。

3. 适用性与优化

本试剂盒已在大鼠肝脏组织和人类细胞系中得到验证。对于骨骼肌等硬组织，在第 2 步的组织浆中加入 50-60 mg 组织研磨粉，可有助于提高细胞核得率。

更多信息和活动请扫描
二维码关注官方公众号

