

细胞核蛋白提取试剂盒说明书

货号: JX45

描述: 在破碎组织细胞时加入活化剂, 帮助裂解细胞, 反复振荡或使用剪切力释放细胞核, 然后在温和条件下低速离心收集细胞核。在 30-60 分钟内完成, 无需特殊设备, 简便易行, 重复性好。适用于从组织块、贴壁或悬浮培养细胞制备完整高纯度细胞核。制备的细胞核仍然保持其在细胞内时所具有的形状和大小, 是进行细胞核相关实验、研究蛋白核转位、DNA-蛋白相互作用、以及进行 WBt 和免疫共沉淀的理想材料。

组成: 100 ml Buffer 1 (CER), 5 ml Reagent A, 100 ml Buffer 2 (NER), for 100 preparations.

储存: 短期 4°C。可分装出一部分-20°C 保存。

适用: 从组织块、贴壁或悬浮培养细胞制备完整的细胞核。

Step-1A 培养细胞裂解

- 1 贴壁细胞需消化或刮下细胞, 悬浮细胞可直接离心, PBS 洗涤, $800 \times g$ 5 min 收集细胞。计数, 并估计细胞沉淀的体积。每次提取需要 $1-2 \times 10^7$ 个细胞。通常每 1×10^7 个细胞的沉淀体积约 100 μ l。
- 2 加入 10 倍于细胞沉淀体积的 1 ml 冰预冷的 Buffer 1 (CER), 振荡重悬细胞。冰水浴 5 分钟。
- 3 加入 1/20 体积约 50 μ l Reagent A, 剧烈振荡混合。冰水浴 5 分钟。再次剧烈振荡。
- 4 将细胞裂解物 3 次或多次通过 22 号针头剪切, 或用小容积间隙紧密的玻璃匀浆器上下研磨 20 次。在相差显微镜下检查游离的核应达到 95% 而未裂解细胞应少于 5%。否则继续剪切或研磨。

Step 1-B 组织块破碎和裂解

- 1 称取 100-200 mg 新鲜组织如肝脏、脑, PBS 冲洗, 加入 1 ml (约 10 倍组织体积) 冰预冷的 Buffer 1 (CER)。
- 2 用间隙紧密的研杵上下研磨培养上下研磨组织 10 次。冰水浴 5 分钟。
- 3 加入 1/20 体积约 50 μ l Reagent A, 混合。冰水浴 5 分钟。剧烈振荡。
- 4 在相差显微镜下检查游离的核应达到 95% 而未裂解细胞应少于 5%, 否则继续剪切或研磨。
- 5 如有必要, 用滤纸过滤组织匀浆裂解物。

Step 2 细胞核制备

- 1 将组织或细胞匀浆物转移到离心管。 $1000 \times g$ 离心 3 min 4°C 沉淀细胞核, 弃上清。
- 2 用 10 倍于细胞核体积(~0.5 ml) Buffer 2(NER) 重悬核。 $2000 \times g$ 离心 10 min at 4°C, 弃上清。
- 3 重复步骤 2 洗涤细胞核。在相差显微镜下细胞核应游离分散在清亮背景下存在颗粒物表明细胞质成分残留; 核聚集表明存在粘连性的细胞骨架或染色质, 通常由于细胞匀浆破碎不足或起始细胞数太多。
- 4 弃上清。用 50-100 μ l 适宜的缓冲液重悬细胞核, 进行下一步实验。或将细胞核沉淀直接-70°C 保存, 注意解冻后会有部分核在融化过程中破裂。

注意:

- 1 破碎细胞是关键环节。与组织块相比, 培养细胞特别是贴壁细胞较难破壁。组织细胞裂解物 3 次或多次通过 22 号针头剪切破碎细胞, 或用小容积玻璃匀浆器、间隙紧密的研杵上下研磨培养 20 次。用相差显微镜检查未裂解细胞应少于 5%。否则继续剪切或研磨。
- 2 基于梯度密度离心原理, 以离心力 g 计算正确的离心速度十分重要。
- 3 加入何种缓冲液重悬细胞核, 取决于用户后续的实验。如做 WB 可用 RIPA 裂解缓冲液。
- 4 进行 Western Blot 和 2D-胶电泳, 可先用小体积的水重悬核沉淀, 然后加入样品缓冲液, 如果直接用含 SDS 的缓冲液裂解核将释放大量粘稠的 DNA 使样品难以分散。反复加热变性有助于 DNA 断裂, 可通过细针头反复抽吸打断 DNA。免疫沉淀时可直接加入 IP 缓冲液。

官方网址: www.genesion.com.cn

订货热线: 4006-169-114、020-84224925

Email: whiga22@126.com

