

细胞核微量制备试剂盒

Nuclei Miniprep Kit

使用手册 V1.0

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

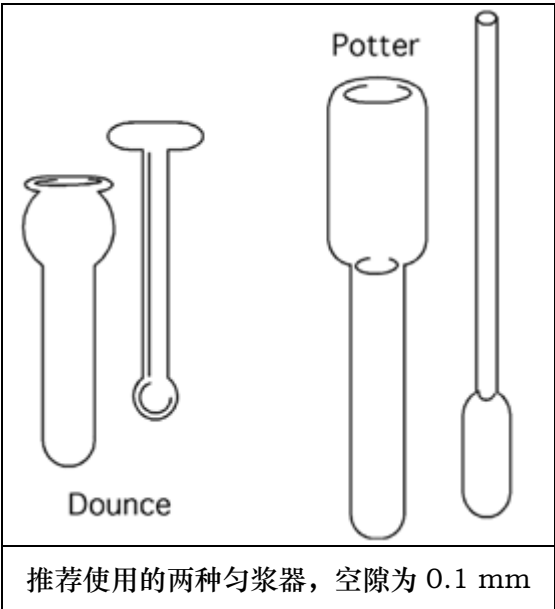
原理及特点	用高密度介质来分离动物软体组织（如肝脏、脾脏等）细胞核是目前主流的方法，它是由 Chauveau 于 1956 年发明，其原理是细胞核的密度较大，在高速离心条件下（40 000g 1 小时）可在高密度介质（2.2mol/l 蔗糖溶液）中沉降下来，从而达到与细胞质其它成分分开的目的。该方法能通过一步离心得到较高纯度的细胞核，得到广泛应用。本产品就是在 Chauveau 方法的基础上优化改进而来，它具有下列特点： 1. 基于密度梯度分离，可有效去除细胞质及其他细胞器，得到的细胞核纯净， 2. 加进氯化钙、氯化镁、氯化钾等改变分离介质渗透压的物质，减少了细胞核的脆性，增加了细胞核的完整性。 3. 精心调节了介质的 pH，防止细胞核在分离过程中的聚集，还能保持细胞核的精细结构 4. 快速，整个操作过程仅需 1 小时即可完成（对一个样品而言）。 5. 提供染色试剂，可以在普通光学显微镜下检测纯化的细胞核的纯度。 6. 处理温和，得到的细胞核中的大部分蛋白质都具有活性，可以用于胶迟阻实验、酶活性分析细胞凋亡、信号传递、代谢和蛋白组学等的研究；也可用于超大片段 DNA 的纯化。 7. 不但适用于动物和植物培养细胞，还能用于实体组织（能用 Dounce 或 Potter 匀浆器匀浆的组织均可）。 8. 一次微量提取足够处理 0.1 克组织或 10E7 个培养细胞，本产品足够 50 次微量提取。			
规格及成分		成 份	编 号	50 次包装
		溶液 A 成分一	100601A1	100 mL
		溶液 A 成分二（干粉）	100601A2	约 20 g
		溶液 B 成分一	100601B1	50 mL
		溶液 B 成分二（干粉）	100601B2	约 100 克
		细胞核染色液		1 套
		使用手册	100601sc	1 份
运输及保存	常温运输和保存，有效期一年			
自备试剂	手动或电动 Dounce 或 Potter 组织匀浆器（研磨杵和套管的空隙最好为 0.1 mm，如果小于细胞核的直径，则会使细胞核破裂）、水平式低温高速离心机、光学显微镜。			

使用方法

一、准备工作：先将溶液 A 的成分二（干粉）全部加入到溶液 A 成分一（溶液）中，摇晃溶解后得到 100mL 溶液 A。将溶液 B 的成分二（干粉）全部加入到溶液 B 成分一（溶液）中，摇晃溶解后得到 50mL 溶液 B。
4℃放置不能超过 2 天，长期放置需要放-20℃。

二、微量细胞核分离（放量提取各试剂的用量可以按比例放大）：

- 1. 对组织细胞：称取 100~200 mg 新鲜组织（如动物肝脏、脑、心肌和植物叶片等），用自备的 PBS 或生理盐水洗净血水，滤纸吸干，用剪刀或刀片将其剪为碎块（最好大小为 1cm³，过小反而不利于匀浆）放入小容量 Dounce 或 Potter 玻璃匀浆器内。
- 2. 对培养细胞：用自备胰酶按标准方法消化培养细胞，PBS 洗涤，800×g 5~10 分钟离心收集细胞，计数。每次微量提取需要 5 × 10E7 个细胞，加入 1.0 mL 预冷的溶液 A 重悬细胞，然后转移到小容量 Dounce 或 Potter 玻璃匀浆器内，
- 3. 用 Dounce 或 Potter 组织匀浆器在冰上破碎组织或细胞。如果用手动匀浆器，一般需要 20~30 次。如果用电动匀浆器，一般需要处理 3-5 次，每次 5~10 秒钟（转速为 500r/min）。



- 4. 将匀浆液转移到离心管中。如果匀浆液有可见的结缔组织和未破碎的组织块，可以用三层自备的纱布放在 1.5 mL 离心管管口，将匀浆液过滤进入离心管。可取少量滤液涂在载玻片上制得涂片 A，自然干燥涂片以便染色做显微镜观察。
- 5. 4℃，700-800×g 水平离心 5-10 分钟。细胞核沉淀在收集管底部，弃上清。可取少量上清液涂在载玻片上制得涂片 B，自然干燥涂片以便染色

	做显微镜观察。 6. 加入 0.5 mL 预冷溶液 A 重悬沉淀。用预冷的匀浆器（用前需要将表面的组织洗去）重悬沉淀。可取少量上清液涂在载玻片上制得涂片 C，自然干燥涂片以便染色做显微镜观察。 7. 在水平型离心管中加入 0.5mL 预冷的溶液 B，然后靠管壁慢慢加入上步得到的重悬液。 8. 在 4℃ 23000g 离心 30 分钟，管底的沉淀即为细胞核。 9. 小心吸弃上清液。注意：上清一般比较粘稠，最好倒立一段时间。 10. 用 0.5 mL 溶液 A 重悬沉淀。 11. 在 4℃ 1500g 离心 5 分钟，吸弃上清，沉淀即为纯净的细胞核。可以直接使用，也可以加等体积的自备甘油，混匀后放液氮或-70℃保存。可取少量上悬浮液涂在载玻片上制得涂片 D，自然干燥涂片以便染色做显微镜观察。 12. 用本方法一般可以从 0.1g 肝脏组织中纯化到 $1-2 \times 10^7$ 个细胞核。如果后续试验是 Western Blot 和 2D-胶电泳，可直接加入上样缓冲液裂解细胞核后上样。 三、显微镜检测涂片，计算效率 1. 将干燥后的 A-D 四张涂片加入固定液固定 15 分钟，晾干。 2. Giemsa 染液染 10 分钟。 3. 自备蒸馏水漂洗数秒，用滤纸吸干水。 4. 用显微镜（40×）检查涂片，细胞核将呈紫红色，混杂的细胞质为浅蓝色碎片。根据每步细胞核的数量可以粗略估计回收效率。
问题及解答	本手册强烈建议用离心力 g 而不是转速计算所需的离心速度，因为不同的离心机转子直径不同，即使是同一转速，其离心力也不同。如果只知道转速，可用下式计算离心力。 $G = 1.11 \times (10^{-5}) \times R \times [\text{rpm}]^2$ G 为离心力，一般以 g（重力加速度）的倍数来表示；[rpm]² 即转速的平方；R 为离心机转子的半径（单位为厘米）。