Version 1

*SteadyPure*动物组织细胞核分离试剂盒

SteadyPure Animal Tissue Nuclear Extraction Kit

Code No. AG21047

包装量： 50 rxns
保存温度： 4℃ 保存

➢ 产品概述

本产品旨在提供一种快速高效的细胞核分离纯化方法，单次反应可从小于 100 mg 的动物组织中分离纯化获得细胞核。采用密度梯度离心法，在保持细胞核膜稳定性和染色质空间结构稳定性的同时，显著减少了细胞碎片杂质的残留。使用本产品分离纯化获得的细胞核完整性好，纯度高，可用于多种表观遗传学研究，包括 ATAC-seq、 CUT&Tag 及 CUT&RUN 等下游实验。

➢ 产品组成

Buffer NAL	50 ml
Buffer NAP-1	25 ml
Buffer NAP-2	25 ml
Buffer NAP-3	25 ml
Buffer NAW	35 ml

➢ 保存及运输

保存温度：4℃ 保存

运输温度：冰袋运输

➢ 实验前准备

1. 自备：蛋白酶抑制剂（Code No. AG21501）、离心管（RNase-free）、 40μm 紫色细胞滤网（Code No. AG21306）、70μm 橙色细胞滤网（Code No. AG21307）、匀浆器、水平离心机。

➢ 注意事项

1. 若分离纯化获得的细胞核需用于 RNA 相关实验，所有试剂建议添加 RNase 抑制剂(终浓度≥1,000 U/ml）及 DTT（终浓度 2 mM）。
2. 细胞核分离纯化的所有步骤都需在冰上进行操作。

➢ 样品前处理

1. 配制裂解液：向 1.5 ml 或 2 ml 离心管中加入 1 ml Buffer NAL 和 10μl 100X 的蛋白酶抑制剂（Code No. AG21501），吹打混匀后置于冰上备用，该试剂需现配现用。

【注：若使用其他品牌的蛋白酶抑制剂，请参考其说明书进行配置，使蛋白酶抑制剂在 1 ml Buffer NAL 中的终浓度为 1X。】

◆ **液氮研磨（针对较难研磨的动物组织样本，建议使用液氮研磨，如皮肤组织、肌肉组织、肠组织等。）**

2. 将新鲜或 -80℃ 冻存的动物组织样品转移至液氮预冷的研钵中，用研杵研磨动物组织（研磨过程中需要不断向研钵中补加液氮），直至研磨成粉末状。

【注：过度研磨可能导致背景碎片增加，影响细胞核的完整性，研磨不充分可能导致细胞核释放不完全，故建议研磨成粉末状后即可停止研磨。】

3. 将小于 100 mg 已研磨成粉末状的动物组织样本转移至上述含有配制好的裂解液的离心管中，立即高速涡旋混匀或用移液枪反复吹打直至组织裂解液中无明显沉淀，冰上静置 5 ~ 10 min。

【注：组织样本的投入量可根据样本类型和经验进行调整。】

◆ **匀浆研磨（针对易研磨的动物组织样本，建议使用匀浆研磨，如肝脏组织、脑组织等。）**

2. 向匀浆器中加入 1 ml 步骤 1 配置好的裂解液，取 ≤100 mg 新鲜或 -80℃ 冻存的动物组织样品转移至上述匀浆器中，充分研磨组织直至无明显组织沉淀。

【注：过度研磨可能导致背景碎片增加，影响细胞核的完整性，研磨不充分可能导致细胞核释放不完全，故建议研磨成无明显块状后即可停止研磨。】

3. 转移上述组织裂解液至 1.5 ml 离心管中，冰上静置 5 ~ 10 min。

【注：研磨后的组织裂解液可能不足 1 ml，对后续操作没有影响，可直接进行后续操作步骤。】

4. 选取 2 ml 离心管，将 70 μm 橙色细胞滤网（Code No. AG21307）固定于管口，将上述组织裂解液转移至 70 μm 橙色细胞滤网中，重力法过滤组织裂解液至 2 ml 离心管中。

【注：若组织裂解液流动不畅时，可使用移液枪吹打，加速过滤。】

5. 2,300 rpm (500 ×g)，4℃ 离心 5 min，小心弃除上清，可保留少量上清以免吸到沉淀。加入 500 μl Buffer NAP-1 重悬细胞核。

6. 选取 2 ml 离心管，将 40 μm 紫色细胞滤网（Code No. AG21306）固定于管口，将上述细胞核悬液转移至 40 μm 紫色细胞滤网中，重力法过滤细胞核悬液至 2 ml 离心管中。

➢ 细胞核纯化

◆ **方案一：粗提法（操作快速，获得的细胞核数量多，但可能纯度较低，杂质较多）**

1. 将上述滤液 2,300 rpm (500 ×g)，4℃ 离心 5 min，小心弃除上清，可保留少量上清以免吸到沉淀。

2. 轻弹上述离心管底，加入 500 μl 的 Buffer NAW，轻柔吹打重悬细胞核。

3. 2,300 rpm (500 ×g)，4℃ 离心 5 min，小心弃除上清，可保留少量上清以免吸到沉淀。

4. 轻弹上述离心管底，加入适量的 Buffer NAW，轻柔吹打重悬细胞核。取 1 ~ 5 μl 细胞核悬液，通过 DAPI 染色在荧光显微镜下(或台盼蓝染色在普通光学显微镜下)进行细胞核膜完整性观察以及细胞核数量计数。

【注：① Buffer NAW 可根据实际情况进行调整，若沉淀较多，建议投入 100 μl ~ 200 μl Buffer NAW 重悬细胞核，若沉淀较少，建议投入 50 μl ~ 100 μl Buffer NAW 重悬细胞核。

② 若沉淀较多，为方便计数，建议在进行 DAPI 染色前，取 1 ~ 5 μl 细胞核悬液进行 2 ~ 5 倍的体积稀释。】

5. 将上述剩余的细胞核悬液于2,300 rpm (500 ×g)，4℃ 离心 5 min，小心弃除上清液，可保留少量上清以免吸到沉淀。分离纯化获得的细胞核建议尽快进行下游实验以获得更好的实验数据。

➢ 细胞核纯化

◆ **方案二：精提法（获得的细胞核可能较少，但纯度较高，杂质较少）**

建议使用水平转子进行下述离心操作：

1. 取一支新的离心管，向离心管中加入 500 μl Buffer NAP-3，再沿管壁缓慢加入 500 μl Buffer NAP-2，此时溶液分为两层，再将上述滤液沿管壁缓慢加入，此时溶液分为 3 层，3540 rpm（1200 ×g），4℃ 离心 20 min。

【注：① 此步骤试剂需要缓慢加入，枪头尖残留的少量试剂不要用力打入，避免冲击影响分层。

② 若使用 15 ml 离心管进行水平离心，可按比例增加 Buffer NAP-3 、 Buffer NAP-2 的用量，例如增加至 1 ml。】

2. 细胞核位于下层（NAP-3），小心弃除上层（NAP-1）和中间层（NAP-2），转移下层（NAP-3）至新的合适的离心管中。

3. 向吸取的细胞核层中加入 500 μl Buffer NAW 并吹打混匀，2,300 rpm (500 ×g)，4℃ 离心 5 min，小心弃除上清液。

【注：若上述步骤 2 中 Buffer NAP-3 的加入量为 1 ml，此处步骤 3 中 Buffer NAW 的加入量建议增加至 1 ml。】

4. 轻弹上述离心管底，加入适量的 Buffer NAW，轻柔吹打重悬细胞核。取 1 ~ 5 μl 细胞核悬液，通过 DAPI 染色在荧光显微镜下(或台盼蓝染色在普通光学显微镜下)进行细胞核膜完整性观察以及细胞核数量计数。

【注：① Buffer NAW 可根据实际情况进行调整，若沉淀较多，建议投入 100 μl ~ 200 μl Buffer NAW 重悬细胞核，若沉淀较少，建议投入 50 μl ~ 100 μl Buffer NAW 重悬细胞核。

② 若沉淀较多，为方便计数，建议在进行 DAPI 染色前，取 1 ~ 5 μl 细胞核悬液进行 2 ~ 5 倍的体积稀释。】

5. 将上述剩余的细胞核悬液于 2,300 rpm (500 ×g)，4℃ 离心 5 min，小心弃除上清液，可保留少量上清以免吸到沉淀。分离纯化获得的细胞核建议尽快进行下游实验以获得更好的实验数据。

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。
For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.