

Minute™ 肝脏组织高纯度内质网分离试剂盒

目录号:ER-035

描述:

内质网 (ER) 是一种重要的膜结构, 在功能上连接核膜和质膜。肝脏中富含大量的内质网, 是最常用于分离 ER 的原材料。传统分离 ER 的方法是基于密度梯度超速离心法, 该方法需要大量的起始材料, 方法冗长耗时, 且交叉污染严重。目前, 所有用于内质网分离的商业试剂盒都是基于上世纪 70 年代发展起来的方法。本试剂盒与市场上其他内质网分离试剂盒不同, 采用离心管柱技术, 该技术简单、快速, 只需要少量的组织, 无需使用杜恩斯匀浆机和超高速离心, 即可分离冷冻肝组织的天然内质网 (主要是粗面内质网)。整个操作可以在大约 2 小时内完成。

试剂盒组分(20 Preps):

1. 缓冲液 A 15ml
2. 缓冲液 B 4ml
3. 缓冲液 C 4ml
4. 塑料研磨棒 2 根
5. 离心管柱 20 个
6. 收集管 20 个

所需附加材料:

1XPBS

涡旋振荡仪

台式离心机 (10s 内可以升速至 16,000Xg)

运输储存:

常温运输, 4 度储存。

重要产品信息:

1. 使用前仔细阅读整个操作说明, 并将离心管柱和接收管套管放置于冰上预冷。
2. 离心机请调整成 RCF/X g 模式, 按照离心力设置离心机。所有离心步骤都需要在 4°C 室温下或者低温离心机中进行。
3. 研究蛋白磷酸化, 磷酸酶抑制剂应在使用前加入缓冲液 A 中。蛋白酶抑制剂可以选择添加或不添加, 如添加在使用前加入缓冲液 A 中 (请按照蛋白酶或磷酸酶抑制剂母液比例, 例如母液是 100x, 添加时按照 1: 100 添加, 1ml 缓冲液 A 添加 10ul 抑制剂)。
4. 推荐使用 BCA 方法测定蛋白浓度。
5. 研磨方式请按说明书操作, 请勿使用液氮研磨。

操作方法:

注: 缓冲液 C 需恢复室温, 摇匀再使用

1. 将离心管柱及接收管套管放在冰上预冷。
2. 将 30-35mg 冷冻的肝脏组织样品 (冷冻肝脏需在室温下完全解冻, 但不推荐使用新鲜组织, 因为最终产量和纯度较低, 新鲜样品实验前需在 -20°C 或 -80°C 下保存过夜) 放置于离心管柱套管中, 加 200μl 缓冲液 A, 用塑料棒反复向下按压扭转研磨 2-3 分钟。再加 350μl 缓冲液 A 到离心管柱中。(注: 研磨棒塑料棒可重复使用, 用 75% 酒精擦拭或用蒸馏水冲洗干净即可。)
3. 盖上盖子, 翻转几次混匀, 16,000 X g 离心 30s。 (此步骤需离心机需 10S 内到达 16,000 X g)
4. 弃去离心管柱, 大力涡旋震荡 10S 确保重悬沉淀, 2,000 X g 离心 5min, (沉淀中包含细胞核, 大的细胞碎片和一些未破裂的细胞)。

5. 将上清转移至一个新的 1.5ml 离心管中（尽量避免吸取到管壁的油脂），16,000 X g，4℃离心 30min。离心完毕，小心的吸取 400μl 上清转移至一个新的 1.5ml 离心管中。（离心所得沉淀主要是大的细胞碎片，线粒体，溶酶体和细胞质膜。）
6. 将 200 μl 缓冲液 B 添加到 400μl 上清液的离心管中，涡旋震荡混匀(缓冲液 B 与上清的比例为 1:2)。4℃，孵育 30min。
7. 16,000 X g，4℃离心 10min，完全弃去上清。在沉淀中加入 200μl PBS 吹打 40-50 次重悬沉淀，涡旋振荡 20 秒。室温孵育 15 分钟，每 5 分钟振荡一次。2,000 X g 离心 5min。
8. 将上清转移至一个新的 1.5ml 的离心管中。在上清中加入 200μl 的缓冲液 C，涡旋振荡混匀，(上清的体积和缓冲液 C 的体积比为 1: 1)。4℃，孵育 20 分钟。
9. 10,000 X g 离心 10min，弃去上清液。再次 10,000 X g 离心几秒钟，甩掉管壁残留的液体后，将残液完全去除。
10. 沉淀即为内质网组分，主要包含粗面内质网。非水溶性的内质网沉淀，可根据下游实验使用 50-200μl 合适的溶解液来溶解，推荐使用下表中溶解液溶解内质网。内质网样品如果不立即使用，请在溶解液中添加蛋白酶抑制剂 cocktails，将样品冻存于-80℃。

推荐按照下游实验应用选购以下蛋白溶解液

产品名称	货号	下游实验应用
Minute™变性蛋白溶解液	WA-009	SDS-PAGE 电泳, WB, 胰酶消化, 用生物素标记或组氨酸标记纯化蛋白质等实验
Minute™非变性蛋白溶解液	WA-010	ELISA, IP, CO-IP, 酶活性检测等其他应用
Minute™质谱专用蛋白溶解液	WA-011	胰酶消化及后续的质谱分析

技术说明：

1. 内质网（ER）的最终产量与起始材料的量成正比。如果在第 7 步 $16,000 \times g$ 离心 10 分钟后未看到明显的沉淀，将起始材料增加到每份样本 50-80 毫克。
2. 如果使用的起始材料超过 50 毫克，但第 7 步 $16,000 \times g$ 离心 10 分钟后的沉淀仍然很小或看不到，那么将第 5 步离心力 $16,000 \times g$ 降低到 $12,000 \times g$ ，离心 20 分钟。
3. 新鲜肝脏样本应在实验前在 -20°C 或 -80°C 下保存过夜。
4. 如果使用 WA-009 溶解内质网溶解不完全，可向 WA-009 中加入 SDS 终浓度至 0.4%。
5. 为了评估内质网富集程度，我们推荐在 WB 中使用内质网特异性抗体（如 calreticulin）比较分离的内质网和组织总裂解物，确保在 SDS - PAGE 中蛋白质上样量相等，我们还建议转膜后用丽春红对印迹进行染色，以判断蛋白质上样量是否一致。

更多信息和活动请扫描
二维码关注官方公众号

