

Minute™ 高尔基体富集试剂盒

目录号:GO-037

描述:

高尔基体(Golgi apparatus)又称高尔基复合体或高尔基器,由一系列扁平堆叠的囊(池)组成。高尔基体是真核细胞中重要的细胞器,负责蛋白质和脂质的运输、修饰及包装成囊泡,以运送到特定目标位置。高尔基体在不同细胞和组织类型中的数量和分布变化很大。获取高质量的高尔基体是研究其功能及与其他细胞器相互作用的重要第一步。传统分离高尔基体的方法是基于密度梯度超高速离心,需要大量的起始材料,并且方法费力且耗时。相比之下,本试剂盒采用离心管柱技术,操作简单、快速,只需少量起始材料,不需使用杜恩斯匀浆管和超高速离心机,即可高度富集天然高尔基体,并**可获取高尔基体的两个亚结构:即高尔基体和高尔基体分泌的囊泡**。整个操作过程可以在 2 小时内完成。

试剂盒组分(20 Preps):

1. 缓冲液 A 20ml
2. 缓冲液 B 8ml
3. 缓冲液 C 2ml
4. 缓冲液 D 2ml
5. 塑料研磨棒 2 根
6. 离心管柱 20 个
7. 收集管 20 个

所需附加材料:

1XPBS, 涡旋震荡仪, 台式离心机 (10s 内可以升至 16,000X g)

运输储存：

常温运输，4 度保存。

重要产品信息：

1. 请仔细阅读整个操作说明。使用前将离心管柱插入接收管形成套管放置于冰上预冷。**本试剂盒特别适于富集肝脏组织中的高尔基体。其他组织使用时可能需要优化。**
2. **离心机请调整成离心力 Rcf/g 模式，按照离心力设置离心机，所有离心步骤都需要在 4℃室温下或者低温离心机中进行。**
3. **如果您的研究涉及蛋白质磷酸化，磷酸酶抑制剂需要在使用前加入分装的缓冲液 A 中。如担心蛋白降解问题，可选择添加蛋白酶抑制剂，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添加，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进行，请勿使用液氮研磨。**请注意，分离的高尔基体的产率和纯度可能会因特定细胞/组织类型和所用起始材料的量而异。操作可根据需要优化，以实现最佳结果（优化方法请参阅下面的技术说明）。

操作方法：

注：缓冲液 B 需恢复室温，充分混匀后再使用。

1. 将离心管柱插入接收管形成套管放在冰上预冷。
2. **培养的细胞样品：**500-600X g，5 分钟，收集 $25-35 \times 10^6$ 细胞，用预冷的 PBS 清洗细胞一次，完全弃去上清。用 550ul 缓冲液 A 重悬细胞沉淀。剧烈涡旋振荡 20-30s，迅速转移至离心管柱套管上，接转步骤 3。

组织样品：将 30-40mg 组织样品（新鲜或冷冻），放置于离心管柱套管上，加入 200ul 缓冲液 A，用塑料棒反复向下按压扭转研磨 2-3 分钟，研磨后再加 350ul 缓冲液 A 到离心管柱中，用移液器上下吹打混匀。

转接步骤 3。（注：研磨棒塑料棒可重复使用，用 70%酒精擦拭或用蒸馏水冲洗干净即可。）

3. 盖上盖子，倒转套管几次混匀样品，16,000X g 离心 30s。（此步骤需离心机 10S 内到达 16,000X g）
4. 不弃去离心管柱，4℃，5,000X g 离心 5min。离心后，弃掉离心管柱，将上清转移至一个新的 1.5ml 离心管中（尽量避免吸取到油脂），16,000X g，4℃离心 30min。离心完毕，小心地吸取 400ul 上清转移至一个新的 1.5ml 离心管中。**离心所得沉淀主要是线粒体，内质网，溶酶体和细胞质膜。**
5. 将 400 ul 缓冲液 B 添加到 400ul 上清液的离心管中。涡旋振荡混匀(缓冲液 B 与上清的比例为 1:1)。在冰上，孵育 10-15min。孵育完成后，4℃，8,000X g，离心 5min。
6. 将上清转移至一个新的离心管中**(这个组分含有高尔基体的反面囊泡 (transitional vesicles) ，如需浓缩这个组分请参考第 10 步操作)**。用 200ul 预冷的缓冲液 A 吹打 40-50 次重悬沉淀，8,000X g，离心 5min。
7. 上清转移到一个新的 1.5ml 的离心管中。加入 100ul 预冷的缓冲液 C，涡旋振荡 20s 混匀。冰上孵育 20min。
8. 8,000X g 离心 10min，弃去上清。再次 8,000X g 离心几秒钟，甩掉管壁残留的液体，将残液完全去除。
沉淀是富集的高尔基体。
9. 富集的高尔基体可根据下游实验用 50-200ul 溶解液重悬沉淀（推荐选购以下表格中溶解液）。如果不立即使用样品，请在样品中请添加蛋白酶抑制剂，并将样品冻存于- 80℃。一般高尔基体的产量范围为每个样品 50-200ug。
10. 浓缩高尔基体分泌的反面囊泡，向第 6 步收集的上清液里，加入 100ul 缓冲液 D，涡旋振荡混匀 10s。冰上孵育 20min 后 16,000X g 离心 5min。完全弃去上清，再次 16,000X g 离心几秒钟，去除管壁残液。
沉淀为浓缩后的高尔基体囊泡，可根据下游实验用 50-100ul 合适的溶解液溶解。推荐使用下表中的溶解液。

推荐按照下游实验应用选购以下蛋白溶解液溶解高尔基体

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. 这个试剂盒可将高尔基体分为两个亚组分: 一部分主要由顺式高尔基体组成, 另一部分是高尔基体反面囊泡 (可能含有极微量的顺式高尔基体)。
2. 富集的高尔基体含有顺式高尔基体标志物, 如 GM-130 和一些反面高尔基体标志物, 如 Clint1 和 Golgin97。
3. 第 10 步获得的高尔基体囊泡含有反式高尔基体标志物, 如 TGN46, TGN38 和 Clint1。
4. 如果使用 WA-009 不能有效完全溶解高尔基体沉淀, 则考虑向 WA-009 中加入 SDS 到 0.4% 的终浓度, 并增加蛋白溶解液试剂的使用体积。缓冲液 C 中包含 PEG 可能会干扰质谱分析, 应在分析前去除。(去除方法参考: Zhao C, O'Connor PB. Removal of polyethylene glycols from protein samples using titanium dioxide. Anal Biochem. 2007 Jun 15;365(2):283-5).
5. 为了评估分离的高尔基体的产率和纯度, 我们建议使用高尔基体特异性抗体 (如 GM 130) 在 Western 印迹 (WB) 中将其与总细胞/组织裂解物进行比较。需确保 SDS-PAGE 中的蛋白质加载量相等。推荐用丽春红染色转移后的印迹膜, 以对蛋白质加载量是否有显著变化进行了解。
6. 高尔基体富集的程度取决于样品的类型。细胞内的膜结构是相互连接的, 并且在分离的高尔基体中检测到与细胞器相关的某些细胞浆标记蛋白, 如 actin 和 tubulin 并不罕见。
7. 由于内质网和高尔基体在物理上是相互连接的, 因此在最终的高尔基体中检测到内质网标记物并不令人意外。

外。内质网的污染程度因细胞或组织类型而异，通常细胞系样本通常比组织样本更纯净。

8. 请注意，正在出芽分泌的囊泡可能仅有部分从顺式高尔基体中去除，并且在步骤 10 中沉淀出芽分泌囊泡的效率是根据细胞或组织类型而变化的。
9. 高尔基体产量主要取决于两个因素：A.起始材料的量，和 B 细胞膜破裂的效率。在细胞通过离心管柱前后用台盼蓝染色，可以很容易地评估细胞膜的破裂效率。细胞通过离心管柱前细胞存活率应高于 90%，细胞通过离心管柱后细胞存活率应低于 30%。如果细胞破裂效率低，解决方案是将细胞重新悬浮在 Buffer A 中，并在-80℃ 下反复冻融两次，然后继续按照标准流程操作。
10. 如果分离的高尔基体组分未显示出预期的富集效果，则应在 WB 中检测以下组分：总细胞裂解物、步骤 4 中 16,000 X g 离心后的上清液和沉淀，步骤 5 中的沉淀，步骤 8 中的上清液和沉淀。分析这些结果将为优化操作提供见解。

更多信息和活动请扫描
二维码关注官方公众号

