

Minute™ 植物膜蛋白提取试剂盒

目录号：SM-005-P

描述：

植物膜蛋白占植物细胞总蛋白的很小一部分，但是在植物生理学中起着非常重要的作用。传统的植物膜蛋白分离纯化方法是蔗糖密度梯度离心法和双液相法。这些方法虽然比较有效，但是需要超高速离心和大量的起始原材料，操作过十分繁琐和费时。为了克服植物膜蛋白提取中的缺点，我们特别开发了此款植物膜蛋白提取试剂盒。植物组织首先通过缓冲液 A 中致敏，匀浆，然后通过一个特殊的离心管柱，在此过程中匀浆的组织通过柱子特有的 Z 字形通路后细胞膜被切割成大小相等的碎片，后续无需超高速离心，通过差速离心法和密度梯度离心法将天然的质膜蛋白从未破裂的细胞，细胞核，细胞质和细胞器的混合物中分离出来。在每次实验中仅需使用相同量的起始材料，离心力和离心时间，即可高度富集膜蛋白，并保证一致性良好。整个操作过程大约 1 小时可以完成。

应用：

试剂盒用于快速从植物组织中分离天然膜蛋白，可应用于 SDS-PAGE, immunoblottings, ELISA, IP, 膜蛋白质结构分析, 2-D, 酶活性测定及其他应用。

试剂盒组份 (50 次)：

1. 25 ml 裂解液 A
2. 10 ml 裂解液 B
3. 50 个离心管柱
4. 50 个收集管
5. 4 根塑料研磨棒
6. 组织分离粉

储存：

-20°C 储存

所需附加材料

1XPBS
涡旋震荡仪
台式离心机

说明书中 rpm 根据 Eppendorf 5415C 台式离心机换算，不同离心机可按步骤中 Xg 换算。

重要产品信息

1. 仔细阅读整个操作说明。将缓冲液 A 和缓冲液 B 完全解冻后摇匀，放置于冰上。将离心管柱和接收管套管放置于冰上预冷。
2. 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。
4. 推荐使用 BCA 试剂盒用于蛋白浓度测定

膜蛋白分离步骤

组织匀浆：由于植物样品的多样性，选择最佳的匀浆方法是得到最佳结果的关键。

1. 将离心管柱及接收管套管放置冰上预冷
2. **A. 大部分较软的植物组织样品**，将新鲜组织或冷冻组织（200-300mg）切成小片（1-2mmX1-2mm），放入离心管柱套管上，用 1ml 吸头反复挤压组织减少体积，称取 50-80mg 组织分离粉加入离心管柱中，用塑料棒反复扭转研磨组织 1-2 分钟。加入 100ul Buffer A 至离心管柱中，然后继续研磨几分钟，加 A 至满为止，开盖冰上孵育 5 分钟。接转步骤 3。
B. 含水量较多的组织样品(例如水果组织)，将大约 300mg 组织样品剪切成小块放入离心管柱中，台式离心机最高速离心 1 分钟去除多余水分，然后按照上一条描述方法匀浆，匀浆后冰上孵育 5 分钟，接转步骤 3。
C. 较难研磨的组织样品（例如根和水稻叶片），匀浆步骤可在离心管柱外用研钵或同类匀浆设备进行操作。匀浆后，加入适量的 Buffer A（大约 300-400ul），冰上孵育 5 分钟，将匀浆好的样品转移到离心管柱中，然后接转步骤 3。
3. 盖上盖子，14000rpm（16,000Xg）离心 30 秒。（需要最短时间达到设定转速）

4. 弃去离心管柱，涡旋大力震荡 10-20 秒重悬沉淀。

以下步骤将植物组织匀浆分为四个组分：细胞核、细胞质、细胞器和质膜。

5. 3000rpm (700Xg) 离心 1 分钟 **(沉淀包括完整的细胞核和大的碎片)**。

6. 将上清转移到新的 1.5ml 离心管中，4C°，16000Xg 离心 30 分钟（延长离心时间可以增加产量）。弃去上清 **(上清为胞浆组份)**，保存沉淀 **(沉淀为总膜蛋白组份包括细胞器和质膜)**。如果不需要分离质膜做到此步骤即可，将总膜组份存储于-80°C。如果需要分离质膜，请不要冷冻总膜组份，继续第 7 步骤。

7. 加入 200ul Buffer B 用吸头反复吹打或涡旋震荡重悬第 6 步的总膜蛋白组份。4C°，10000rpm (7800Xg) 离心 5 分钟（注意：如果最终质膜组份中含有细胞器膜污染，此步骤离心时间可增加至 20 分钟提高纯度）。**沉淀部分为细胞器。**

8. 第 7 步离心后，小心的将上清液转移到新的 2.0ml 离心管中，加入 1.6ml 预冷的 PBS，盖上盖子混匀几次。14000rpm (16000Xg) 离心 30 分钟（延长离心时间可以增加产量）。弃去上清液，保存沉淀 **(沉淀为质膜蛋白)**。产量一般为每个样品 10-100ug。如需较大量质膜，可将几个质膜沉淀合并增加总量。质膜蛋白可以根据下游实验需求用 20-200ul 含表面活性剂的缓冲液溶解。推荐使用下表中 Minute™ 系列溶解液溶解膜蛋白。做等电聚焦 (2D 凝胶第一维) 我们建议使用：7M 尿素/2M 硫脲/2%Chaps 和 20mM DTT (使用前将 DTT 加入以上混合液中)。

推荐按照下游实验应用选择以下蛋白溶解液溶解膜蛋白

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

常见问题

问题	解决方案
低蛋白产量	增加起始细胞/组织的数量 增加第二步孵育时间到 10 分钟
低蛋白活性	保证裂解物低温/添加蛋白酶抑制剂
离心 30 秒后离心管柱中还存留细胞裂解物	减少起始细胞/组织的数量或增加离心时间到 2 分钟
质膜蛋白中有胞浆蛋白污染	用 0.5ml 预冷的 PBS (含 0.3MNaCl, PH9.5) 清洗质膜沉淀

更多信息和活动请扫描
二维码关注官方公众号

