

Minute™ 内质网富集试剂盒（组织和细胞）

目录号：ER-036

描述：

内质网是连接核膜和质膜功能的主要膜结构。内质网在真核细胞蛋白转运的胞外途径中起重要作用。在细胞质中合成的蛋白质被运送到内质网，囊泡将蛋白质运送到高尔基体，然后与质膜融合。传统分离内质网的方法是基于密度梯度超离心，需要大量的起始样品，方法繁琐，耗时，交叉污染严重。目前，所有内质网分离的商用试剂盒都是基于上世纪 70 年代开发的方法。与市场上的内质网分离试剂盒不同，我们的内质网分离试剂盒使用离心管柱技术，简单、快速，只需少量的起始培养细胞或组织，不需要使用杜恩斯匀浆管和超高速离心，就能从培养的细胞/组织中分离出天然 ER(主要是粗面内质网)。整个操作可以在大约 2h 内完成。

试剂盒组分：

1. 缓冲液 A 20ml
2. 缓冲液 B 1ml
3. 缓冲液 C 1ml
4. 缓冲液 D 10ml
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 内可以升速至 16000X g)**

运输储存： 常温运输，4 度储存

重要产品信息：

- 1. 仔细阅读整个操作说明。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 模式，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. 请勿使用液氮研磨，研磨方式请按说明书来操作。

操作方法：

1. 将离心管柱及接收管套管放在冰上预冷。
 - a) 培养细胞，500-600X g 收集 25-35 X 10⁶ 细胞。用预冷的 PBS 清洗细胞一次，弃掉上清将，细胞沉淀放置到-70 到-80 度冰箱冷冻 10min。用 550ul 缓冲液 A 重悬细胞沉淀。涡旋振荡 20-30s，迅速转移至离心管柱上，转接步骤 2.
 - b) 组织样品，将 30-40mg 冷冻组织样品（新鲜组织至少需要在-20 或者-80 冰箱冷冻过夜），放置于离心管柱上，加 200ul 缓冲液 A，用塑料棒反复扭转按压研磨 2-3 分钟。再加入 350ul 缓冲液 A 到离心柱，用移液器上下吹打混匀。转接步骤 2。（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。）
2. 盖上盖子，上下颠倒混匀几次，16000X g 离心 30s。（此步骤需离心机快速升速，10S 内到达 16000Xg 可提高得率）（可选优化：细胞样品过柱之后，可以再次重悬细胞，转移回同个离心管柱中再次过柱，可以增加产量）
3. 弃去离心管柱，涡旋大力重悬沉淀 10S，2000X 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）
4. 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），8000X g，4°C 离心 10min。离心完毕，小心的吸取 400ul 上清转移至一个新的 1.5ml 离心管中（尽量避免吸取到油脂）。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。
5. 将 40 ul 缓冲液 B 添加到 400ul 上清液的离心管中。涡流震荡混匀(缓冲液 B 与上清的比例为 1:10)。在 4 度，孵育 20-30min。
6. 8000X g，4°C 离心 10min，完全弃去上清。用 400ul 预冷的缓冲液 A 吹打 40-50 次重悬沉淀，涡旋振荡 20s（此步沉淀有很多以透明状态附着于管壁，需用移液器吹打管壁，将沉淀全部吹散，涡旋振荡至肉眼不可见颗粒沉淀为止）。在重悬液中加入 40ul 的缓冲液 C(按照重悬的体积 1/10 体积)，涡旋振荡混匀，室温孵育 10-15min，每 5min 涡旋振荡一次（延长孵育时间到 30 分钟有助于增加内质网得率）。8000X g

离心 5min, 将 400ul 上清转移到一个新的 1.5ml 的离心管中。再加入 400ul 缓冲液 D(按照上清液体积和缓冲液体积 1:1), 4 度孵育 20min。注: 缓冲液 D 需恢复室温, 摇匀再使用。

7. 10000X g 离心 10min, 弃去上清液。再次 10000X g 离心几秒钟, 甩掉管壁残留的液体, 将残液完全去除。

沉淀是内质网, 主要是粗面内质网。内质网含量在不同类型的细胞/组织中有显著差异, 通常得率为 20-200ug/样品。非水溶性的内质网沉淀, 可根据下游实验用 50-200ul 溶解液重悬沉淀 (见下表格)。如果不及使用样品, 请在溶解液中添加蛋白酶抑制剂, 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

更多信息和活动请扫描
二维码关注官方公众号

