

Minute™ 脂肪组织组分分离试剂盒

目录号 AF-023

描述：

脂肪组织中蛋白质含量仅占不到 2% ，由于其高脂肪和低蛋白含量，所以脂肪组织组份分离在技术上极具挑战性。脂肪组织特别是白色脂肪组织（WAT）已经被证实除了具有能量储存功能外，还与内分泌和器官炎症有关。从脂肪组织中提取和分析蛋白质对于了解许多生理/病理状态越来越重要。众所周知目前生物样品中水油乳化物最难分离，我公司研发的具有独特表面性质的带孔径的离心管柱和优化的无表面活性剂的缓冲液系统，可以将脂肪组织分为水溶性蛋白（主要包括胞质蛋白）和非水溶性蛋白（主要包括质膜，细胞器如线粒体）两部分。试剂盒中的缓冲液都不含伯胺，表面活性剂和还原剂。分离出的蛋白质可以应用于所有下游实验，包括 TMT 标记，酶消化，质谱分析和其他应用。

应用：

可应用于质谱分析，2-D，ELISA，SDS-PAGE, immunoblotting, IP，酶活性检测及其他应用。

试剂盒组分

1. 15ml 缓冲液 A
2. 15ml 缓冲液 B
3. 20 个 1.5ml 离心管
4. 2 根 1.5ml 研磨棒
5. 20 套离心管柱及接收管
6. 蛋白提取粉 (2g)

储存：

4°C 储存

所需附加材料

台式离心机（最大转速 14000-16000xg）

重要产品信息

蛋白酶抑制剂不是必须加入，但是如果下游实验需要较长时间或者蛋白提取后保存较长时间，建议在缓冲液 A 中添加蛋白酶抑制剂。推荐使用 BCA 试剂盒用于蛋白浓度测定。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。**所有的离心步骤需在低室温或者低温离心机中进行。**

操作步骤：

脂肪组织组分分离（白色脂肪组织或棕色脂肪组织）

1. 将缓冲液 A，离心管柱和接收管套管放置于冰上预冷。
2. 秤取 200-300mg 新鲜或冷冻脂肪组织，把它放在几层纸巾上，用拇指和食指挤压，从组织中去除一部分油。将组织放入试剂盒提供的 1.5ml 离心管中，秤取 100mg 蛋白提取粉加入样品中，加入 50ul 缓冲液 A。
3. 用研磨棒扭转研磨组织样品匀浆 1-2 分钟。再加入 500ul 缓冲液 A，继续研磨样品 1 分钟。研磨棒可以重复使用，用酒精擦拭清洁，空气干燥。
4. 盖上盖子，350xg 离心 1 分钟，将吸头插入脂肪聚集层下将 400ul 上清液转移到放置在接收管里的离心管柱中（一些脂肪聚集物被带入不影响结果）。
5. 开盖孵育 10 分钟，在冰桶上盖上盖子或一张纸。孵育后立即盖上盖子，350xg 离心 1 分钟。
6. 弃去离心管柱后，再次 14000-16000xg 离心 20 分钟。将上清液（**水溶性组分**）倒入新的 1.5ml 离心管中（实验室自备），在冰上孵育（通常情况下，上清液顶部有一层薄薄的脂肪聚集物，14000-16000xg 离心 15-20 分钟即可去除或者将吸头插入脂肪聚集层下将上清液转移到新管中）。如果

有脂肪聚集附着到管壁上用小张纸巾将其擦掉。保留沉淀（**非水溶性组分**）。

7. 在上步沉淀中加入 400ul 缓冲液 B 吹打重悬沉淀，14000-16000xg 离心 15-20 分钟。完全去除缓冲液 B，保存沉淀（**此步为去除非水溶性组分中少量的水溶性组分。沉淀为非水溶性蛋白组分包括主要的质膜和细胞器**）。非水溶性组分可以根据下游实验用 50-60ul 含有表面活性剂的溶液溶解或蛋白溶解液进行溶解，不同组织类型非水溶性组分通常蛋白产量为 30-60ug/样品。如果需要大量蛋白，可以一次同时操作多个样品管，最后将沉淀收集在一起即可。水溶性蛋白组分得率通常为 2-3mg/ml。

脂肪细胞组分分离

1. 低速离心收集 50-100million 脂肪细胞。在 1.5ml 离心管中加入 1ml 预冷的 PBS（可根据上述建议加入磷酸酶抑制剂或者蛋白酶抑制剂）重悬细胞。加入 100mg 蛋白提取粉。
2. 500xg 离心 3 分钟，弃去上清液。用研磨棒扭转研磨 1-2 分钟使细胞匀浆。加入 500ul 缓冲液 A，继续研磨 30 秒。
3. 350xg 离心 1 分钟，然后将 400ul 将上清液转移到放置在接收管里的离心管柱中。接转上述步骤 5-7.

非水溶性蛋白可以根据实验需求溶解到含有不同表面活性剂的溶液中，推荐使用下表中 MinuteTM 系列溶解液溶解非水溶性蛋白。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

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

