

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、修饰及包装到囊泡中，以运送到目标位置。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离心，需要大量的起始材料，并且方法冗长且耗时。与其他高尔基体分离试剂盒不同，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，高度富集天然高尔基体。整个操作过程可以在 2h 内完成，**可以得到高尔基体的两个亚结构，高尔基体和高尔基体分泌囊泡。**

试剂盒组分：

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 内可以升速至 16000Xg)

运输储存： 常温运输，4 度保存

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。试剂盒适合于富集肝脏组织的高尔基成分。其他组织使用时可能需要优化。
2. 离心机请调整成 RCF 模式 (xg)，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进行，请勿使用液氮研磨。

操作方法：

注：缓冲液 B 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。
A 培养细胞，500-600Xg 收集 25-35 x 10⁶ 细胞，用预冷的 PBS 清洗细胞一次。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 组织样品（新鲜或冷冻），放置于离心管柱上，加 200ul 缓冲液 A，用塑料棒用力按压扭转研磨 2-3 分钟，再加 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 70%酒精擦拭或用蒸馏水冲洗干净。）
2. 盖上盖子，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. 不弃去离心管柱，5000X 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），16000X g，4°C 离心 30min。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线粒体，内质网，溶酶体和细胞质膜。
4. 将 400 ul 缓冲液 B 添加到 400ul 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 1:1）。在冰上，孵育 10-15min。孵育完成后，8000X g，离心 5min。
5. 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），可检测到标志物 Clint1 和 TGN38，如需浓缩这个组分请参考第 9 步操作）。用 200ul 预冷的缓冲液 A 吹打 40-50 次重悬沉淀，8000Xg，离心 5min。

6. 上清转移到一个新的 1.5ml 的离心管中。加入 100ul 缓冲液 C，涡旋震荡 20s 混匀。冰上孵育 20min。
7. 8000Xg 离心 10min，弃去上清。再次 8000Xg 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。
8. 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）（如果不及时使用样品，请在溶解液中添加蛋白酶抑制剂，并将样品冻存于 -80℃）。
9. 富集反面高尔基体分泌的囊泡，加 100ul 缓冲液 D 到第 5 步收集的上清液里，涡旋混匀 10s。冰上孵育 20min 后 16000xg 离心 5min。完全弃去上清，再次离心，去除管壁残液。加 50-100ul 溶解液根据下游实验从下面表格选取。

技术要点：

1. 这个试剂盒分别得到的高尔基体的两个部分：一部分是高尔基体（不含有囊泡），一部分是高尔基体反面囊泡（可能含有极微量的高尔基体顺面囊泡）。
2. 第 8 步富集的高尔基体含有顺面高尔基体标志物 GM-130 和一些反面高尔基体标志物例如 Clint1 和 Golgin97。
3. 第 9 步获得的高尔基体囊泡含有反面高尔基体其标志物可以用 TGN46, TGN38 和 Clint1 鉴定。

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

