

Minute™ 哺乳类动物组织及细胞总脂筏分离试剂盒

目录号 LR-039

描述：

脂筏是含有高水平胆固醇和鞘脂的小质膜结构域。脂筏被发现存在于质膜 (PM) 和一些内膜系统中, 如线粒体相关膜 (MAMS) 和内质网等。脂筏参与许多细胞过程, 如信号转导, 膜转运和蛋白质分选。脂质修饰的蛋白质和一些跨膜蛋白质集中在脂筏中, 而其他蛋白质被排除在外。脂筏还被发现与质膜上的 Na^+ / K^+ ATP 酶相关。传统的脂筏分离方法是用蔗糖梯度法或 OptiPrep 密度法, 采用超高速离心法分离, 需要大量的起始样品, 而且该方法繁琐、耗时。为了克服传统方法的缺点, 我们利用离心管柱技术开发了这款简单、快速的脂筏分离试剂盒。首先将样品的总膜 (总膜即质膜 PM 和细胞器膜总和) 组分分离, 然后用含有非离子表面活性剂的缓冲液处理, 最后使用台式离心机离心分离耐表面活性剂组分。整个过程无需使用密度梯度和超高速离心, 可以在 90 分钟内从培养的细胞/组织中高度富集脂筏。

注: 如果需要分离质膜脂筏, 可以使用 Minute™ 质膜脂筏分离试剂盒 cat # LR-042

试剂盒组分 (20T) :

1. 缓冲液 A 15ml
2. 缓冲液 B 10ml
3. 缓冲液 C 10ml
4. 研磨棒 2 个
5. 离心管柱 20 个
6. 收集管 20 个

运输及储存: 常温运输, 4 度保存。

附加材料:

1xPBS

振荡器

台式高速离心机(10s 内可以达到 16000Xg)

重要产品信息:

1. 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。
2. 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）。如果考虑蛋白降解问题可以分别在缓冲液 A 和 B 中添加蛋白酶抑制剂。
3. 推荐使用 BCA 方法测定蛋白浓度。
4. 研磨方式请按说明书来操作，请勿使用液氮研磨。

操作步骤：

注意：实验前请将缓冲液 C 恢复常温，混匀备用。

1. 将离心管柱放入收集管中，放置在冰上预冷，缓冲液 A 和 B 放在冰上预冷，**但请不要预冷缓冲液 C!**
2. **A.对于培养的细胞**，通过低速离心（500-600×g，5 分钟）收集 30-40×10⁶ 个细胞。用预冷 PBS 洗涤细胞一次。完全除去上清液，将沉淀重悬于 500μl 缓冲液 A 中。将细胞悬浮液在冰上孵育 5 分钟，**剧烈涡旋震荡 10-30 秒**。立即将细胞悬浮液转移到离心管柱中。转到第 3 步。
B.对于柔软组织样本，将 30-40 mg 组织（新鲜或冷冻）放入离心管柱中。将 200μl 缓冲液 A 加入离心管柱中，用塑料棒反复扭转研磨组织，2-3 分钟。研磨后，再次加入 300μl 缓冲液 A。转到步骤 3。**对于肌肉组织**，将组织放在干净的玻璃或塑料板的表面上，用锋利的刀片将组织切成组织匀浆状。将组织转移到离心管柱中，并如上所述进行研磨。**塑料棒是可重复使用的，用 70%酒精或水清洗干净即可。**
3. 盖上离心管柱，倒置混匀几次，然后 16,000 xg 离心 30 秒。**（此步骤推荐使用可在 10S 内达到离心力的台式离心机，离心机的离心力和升速时间会影响最终得率）**
4. 弃去离心管柱，剧烈涡旋 10 秒钟重悬沉淀。1000×g 离心 5 分钟**（沉淀物包含细胞核，大细胞碎片和一些未破裂的细胞）**。
5. 将所有上清液转移到新鲜的 1.5ml 离心管中，16,000×g，4 度，离心 30 分钟。沉淀是**总膜**。小心地将所有上清液**（胞浆部分）**转移到新的 1.5ml 管中，如果需要胞浆组分保存即可。
6. 沉淀中加入 500μl 预冷缓冲液 B，重复上下吸打 20-30 次，并剧烈涡旋 10 秒重悬。立刻在冰上孵育 30 分钟，期间每隔 10 分钟涡旋震荡一次，并立即将管子放回冰上，使其始终保持冷却。
7. 将离心管 16,000×g 离心 10 分钟。将上清液转移到新的 1.5ml 离心管中，向管中加入 0.5ml 缓冲液 C 并通过短暂涡旋震荡充分混合**（管中的溶液变得混浊）**。将管在冰上孵育 2 分钟。10,000 X g 离心 10 分钟。

离心后，脂筏漂浮在管的顶部。

8. 将一个细的吸管头（如 SDS-PAGE 样品加样针）插到移液器上，插入管子底部，缓慢并完全地去除水相。或者，也可以使用配备 21 号针头的 2 毫升注射器。去除水相后，脂筏会粘附在离心管壁上。
9. 16000 x g 离心 5 分钟。完全除去上清液。沉淀是分离的**脂筏**，可使用下面列出的溶解液 50-200 μ l 重悬，或者根据下游应用情况选择其他缓冲液重悬。根据细胞/组织类型不同，最终蛋白质产量在 30-100 μ g/样品范围内。

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

