

# Minute™ 质膜脂筏分离试剂盒

目录号 LR-042

## 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<sup>+</sup> / K<sup>+</sup> ATP 酶相关。传统的脂筏分离方法是从总膜结构中分离出脂筏，而不能分离质膜或者细胞器膜上的脂筏。为了克服传统方法的缺点，我们开发了此款基于离心管柱技术的质膜脂筏分离试剂盒。首先较大的质膜囊泡被分离出来，然后使用含有非离子表面活性剂缓冲液处理，通过台式离心机即可离心分离质膜脂筏部分。不使用传统的匀浆机和超速离心机，1h 左右即可高度富集质膜脂筏。

**\*如需分离总的脂筏，请使用 Minute™ 总脂筏分离试剂盒 Cat#LR-039**

## 试剂盒组分（20 tests）

- |             |      |
|-------------|------|
| 1. Buffer A | 15ml |
| 2. Buffer B | 10ml |
| 3. Buffer C | 10ml |
| 4. 研磨棒      | 2 个  |
| 5. 离心管柱+收集管 | 20 套 |

## 附加材料：

1xPBS

振荡器

台式高速离心机(10s 内可以达到 16000X g)

## 运输及储存：

常温运输，4 度保存

## 重要产品信息:

- 1.所有离心步骤应在 4°C 离心机中进行。
- 2.研究蛋白质磷酸化, 在使用前应在缓冲液 A 中加入磷酸酶抑制剂。如果蛋白质降解是一个问题, 在使用前加入蛋白酶抑制剂在缓冲 A 和 B 中。(添加抑制剂终浓度为 1x, 例 100x 抑制剂, 1ml 缓冲液中加 10 $\mu$ l 抑制剂)。
- 3.建议使用 BCA 蛋白质分析试剂盒测定蛋白质浓度。

## 操作步骤:

- 1.将离心管柱放入收集管中并在冰上孵育。使用前在冰上预冷冻缓冲液 A 和 B, **不要预冷缓冲液 C!**
2. **A.培养的细胞样品**, 通过低速离心 (500-600 $\times$ g, 5 分钟) 收集 30-40 $\times$ 10<sup>6</sup> 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 500 $\mu$ l 缓冲液 A 中。将细胞悬浮液在冰上孵育 5 分钟。剧烈涡旋 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. 柔软的组织样本**, 将 40-50 mg 组织 (新鲜或冷冻) 放入离心管柱中。将 200 $\mu$ l 缓冲液 A 加入离心管柱中, 用塑料棒向下扭转反复研磨组织 2-3 分钟。研磨后, 将 300 $\mu$ l 缓冲液 A 加入同一离心管柱中。转到步骤 3。  
**肌肉组织样品**, 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。
- 3.盖上离心管柱, 倒置混匀几次, 然后 16,000Xg 离心 30 秒。(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)
- 4.丢弃离心管柱, 大力涡旋震荡 10 秒钟重悬沉淀。1900Xg 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, 3000Xg, 4 度, 离心 15 分钟, 小心地将所有上清弃掉。沉淀是分离出的质膜组分 (质膜囊泡)。
6. 用 400 $\mu$ l 预冷缓冲液 B 移液器吹打 20-30 次将沉淀重悬, 在冰上孵育 30 分钟, 每 10 分钟短暂涡旋一次, 立即将管子放回冰上, 使其始终保持冷却。
- 7.加 400 $\mu$ l 缓冲液 C 到离心管中, 涡旋混匀 (处理会使得溶液变浑浊)。将离心管 10,000Xg 离心 5 分钟, 离心后, 脂筏漂浮在管的顶部。
8. 用移液器配上细的吸头 (如 SDS-PAGE 上样吸头) 插到管底, 缓慢地完全去除水相。或者也可以使用 21 号

针头的 2 毫升注射器。去除水相后，灰白色的脂筏会附着在离心管壁上。

9. 将离心管，16000Xg 离心 2min，使脂筏离心到管底部，完全去除残留液。这个沉淀即是分离的**质膜脂筏**，沉淀可使用 100-300 $\mu$ l 以下推荐的溶解液重悬用于实验，也可根据下游应用选择适合的其他溶解液。根据细胞/组织类型不同，最终蛋白质产量在 30-200  $\mu$ 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

