

Minute™ 溶酶体分离试剂盒

目录号：LY-034

描述：

溶酶体是真核细胞中的球形囊泡，负责清除废物。溶酶体中的消化酶在消化多余或受损的细胞器、食物颗粒和吞噬的病毒和细菌中起着至关重要的作用。溶酶体是比较大的细胞器，大小从 0.1 到 1.2 μm 不等。分离溶酶体是研究细胞自噬、蛋白质降解和蛋白质循环重要的第一步。传统的溶酶体分离方法是基于密度梯度超速离心法的。需要大量的起始材料，并且方法冗长且耗时，具有显著的交叉污染。目前，所有用于溶酶体分离的商业试剂盒都是基于上世纪 70 年代发展起来的方法。我们的试剂盒与市场上的任何其他溶酶体分离试剂盒不同，使用专利技术的离心管柱，简单、快速、高效。所需的起始细胞/组织的量远小于传统方法。该试剂盒可以显著地富集培养细胞或组织中的溶酶体，而不使用杜恩斯匀浆器和超高速离心。整个操作过程可以在不到 1.5 小时内完成。

试剂盒组份：

1. BufferA 15ml
2. BufferB 2ml
3. 塑料研磨棒 2 个
4. 离心管柱 20 个
5. 接收管套管 20 个

所需附加材料

1XPBS

涡旋震荡仪

台式离心机(10s 内转速可达 16000Xg)

运输及储存:

常温运输, 4°C 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. 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。如果担心蛋白有降解问题使用前可在 Buffer A 和 Buffer B 中添加蛋白酶抑制剂。**
4. 推荐使用 BCA 法测定蛋白浓度。

操作步骤

1. 将离心管柱及接收管套管放置冰上预冷

A 细胞样品, 低速离心 (500-600Xg, 5 分钟) 收集 25-30x 10⁶ 个细胞。用预冷的 PBS 清洗一次细胞, 完全去除上清, 加 500 ul Buffer A 重悬细胞, 在冰上孵育 5-10 分钟, 用力**涡旋震荡 10-30 秒**。迅速将细胞悬液转入离心管柱中。转接步骤 2.

B 组织样品, 将 20-30mg 组织 (新鲜或冷冻) 放置于离心管柱上。加入 200ul Buffer A, 用塑料棒反复扭转研磨组织 1 分钟。再加入 300 ul Buffer A, 上下吹打混匀, 在冰上**开盖**孵育 5 分钟。接转步骤 2. 注意: 塑料棒是重复使用的, 可以用 70% 的酒精或者水清洗。

2. 盖上盖子, 翻转几次, 16,000X g, 离心 30 秒。**(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 3min **(沉淀包含细胞核, 细胞大碎片和一些未破碎的细胞)**。

4. 将上清转移到新的 1.5ml 离心管中，4°C，11000X g 离心 15min。此步所得沉淀主要包含线粒体和细胞碎片。小心的取 400ul 上清转移至一个新的 1.5ml 离心管中，16000Xg，4°C，离心 30min，完全去除上清。
5. 加入 200ul 预冷的 Buffer A 用吸头反复吹打 60-100 次后用力涡旋震荡 20s。2000X g，4°C，离心 4min。小心的将上清转移至一个新的 1.5ml 离心管中，加 100ul Buffer B, 振荡混匀（注意：上清和 Buffer B 的比例是 2: 1）。在冰上孵育 30min，11000X g 离心 10min。将上清完全去除干净。可以将管子再次 11000X g 离心几秒钟，以便将剩余上清去除干净。
6. 沉淀为高度富集的溶酶体，可根据下游应用使用 50-150ul 溶解液重悬沉淀（见下表格）。产量一般为 50-100ug/样品。如果蛋白浓度比较低，可以增加样品的起始量。非水溶性的溶酶体沉淀可以根据下游实验从下表中选择合适的 Minute™ 系列溶解液溶解溶酶体。

推荐按照下游实验应用选购以下蛋白溶解液溶解溶酶体蛋白

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

