

Minute™ 植物高尔基体富集试剂盒

目录号 PG-049

描述：

植物高尔基体在细胞生理结构和蛋白转运中起着重要的作用。然而高尔基体蛋白质组学的研究因高尔基体富集和纯化方法有限而受阻。传统分离高尔基体采用密度离心法，这既繁琐又费时，通常还需要大量的起始原料。众所周知，植物的高尔基体堆不稳定，如果使用一般的匀浆方法，则可能会导致高尔基体完整性下降，这意味着无法使用电子显微镜的形态学手段来评估高尔基体。本试剂盒克服了传统方法缺点，通过使用基于离心管柱的匀浆方法，通过差速离心和选择性沉淀来富集高尔基体。该方案简单明了，只需要毫克量的起始原料，高尔基体组分就可以获得显著富集（2-3 倍）。

试剂盒组分：

1. 缓冲液 A 10ml
2. 缓冲液 B 1.2ml
3. 缓冲液 C 4ml
4. 缓冲液 D 0.5ml
5. 塑料研磨棒 2 根
6. 离心管柱 20 个
7. 收集管 20 个

运输储存： 常温运输，4 度保存

重要产品信息：

1. 操作前请仔细阅读整个操作说明。缓冲液使用前放置于冰上预冷。
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/蛋白酶抑制剂应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添加，例如母液是 100x，添加时按照 1: 100 添加，即 1ml 缓冲液 A 添加 10ul 抑制剂）。
4. 稀释需要预冷的 dd H₂O，需自备。
5. 研磨方式请按说明书进行，请勿使用液氮研磨。

操作方法：

1. 将 200-250mg 新鲜植物叶片或幼苗加到离心管柱中，将叶片折叠卷起塞入到离心管柱中。加入 100ul 缓冲液 A，用 200ul 吸头按压叶片 100-200 次以压缩叶片体积（此步大概需要 2-3min）。
2. 用试剂盒中提供的研磨棒用力向下扭转按压研磨 200 次（大约 2-3min）。（注意：研磨棒可重复使用，用 70%酒精擦拭或用蒸馏水冲洗干净，用纸巾擦干。）
3. 再加 400ul 缓冲液 A 到离心柱中，用 200ul 吸头将样品搅拌混匀。盖上盖子，5000Xg 离心 10min。离心后，将 500ul 上清转移至一新的 1.5ml 离心管中。
4. 加 50ul 缓冲液 B 到离心管中，涡旋震荡混匀，冰上孵育 30-40min。
5. 孵育完成后，11000Xg，离心 10min，离心后将上清完全弃除。小心加入 1ml 预冷的双蒸水，不要打散沉淀，迅速去除所有液体，这样可以去除附着于管壁的 rubisco。
6. 加 150-200ul 缓冲液 C，用移液器上下吹打 30-40 次将沉淀重悬。在冰上孵育 15min，每 5min 涡旋振荡一次。孵育完成后，5000Xg，离心 5min 去除聚集颗粒（通常是一些浅绿色的沉淀）。
7. 将上清转移到一个新的离心管中，加入上清液 1/10 体积的缓冲液 D（例如上清液有 200ul，加入 20ul 缓冲液 D）。**这个混合液就是富集的高尔基体组分。**可以直接用 BCA 法测定蛋白浓度。通常蛋白得率在 40-60ug 每个样品。
8. 如果不立刻进行下游实验，可以将产物保存在-80 度。验证高尔基体的富集情况，需使用高尔基体专用标志物抗体进行 WB 检测，同时使用组织总蛋白做对照，验证时，确保总蛋白和高尔基体蛋白等质量上样。分离得到的高尔基体组分，与合适的上样缓冲液混合处理后，可直接用于 SDS-PAGE 和 WB 检测。用于其他应用推荐使用下方列表中溶解液，例如做 IP，Co-IP 实验建议在高尔基体溶液中按 1:1 加入 WA-010 后进行下游实验。

技术说明：

1. 本试剂盒已经拟南芥（*A. thaliana*）叶片，烟草（*N. tabacum*）叶片，白菜型油菜（*B. rapa*）叶片和甘蓝型油菜（*B. napus.*）叶片测试。其他类型样品或许亦可适用，但效果可能会因样品而异。
2. 高尔基体的富集程度也会因样品而异。通常情况下，大部分样品可将高尔基体富集 2-3 倍。
3. 如果富集的高尔基体浓度较低（第 7 步），第 6 步得到的沉淀可以用 100ul 缓冲液 C 重悬。但是这样的操作会引发部分蛋白的损失。
4. 分离的高尔基体可能存在内质网的一些交叉污染，但是因样品而异。

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

