

Minute™ 植物质膜蛋白分离试剂盒

目录号:SM-005-P

描述:

植物膜蛋白占植物细胞总蛋白的很小一部分，但是在植物生理学中起着非常重要的作用。传统的植物膜组分分离纯化方法是蔗糖密度梯度离心法和双液相法。这些方法虽然比较有效，但是需要超高速离心和大量的起始原材料，操作过十分繁琐和费时。为了克服植物膜组分提取中的缺点，我们特别开发了此款植物膜组分提取试剂盒。植物组织首先通过 Buffer A 中致敏，匀浆，然后通过一个特殊的离心管柱，在此过程中匀浆的组织通过柱子特有的 Z 字形通路后细胞膜被切割成大小相等的碎片，后续无需超高速离心，通过差速离心法和密度梯度离心法将天然的质膜组分从未破裂的细胞，细胞核，细胞浆和细胞器的混合物中分离出来。在每次实验中仅需使用相同量的起始材料，离心力和离心时间，即可高度富集膜组分，并保证一致性良好。整个操作过程大约 1 小时可以完成。

应用:

试剂盒用于快速从植物组织中分离天然膜组分，可应用于 SDS-PAGE, immunoblottings, ELISA, IP, 膜蛋白质结构分析, 2-D, 酶活性测定及其他应用。

试剂盒组份(50T):

1. 25ml Buffer A
2. 10ml Buffer B
3. 50 个离心管柱
4. 50 个收集管
5. 2 根塑料研磨棒
6. 组织分离粉

储存:

Buffer A 和 Buffer B 需在-20℃储存

所需附加材料

1XPBS (pH7.2-7.4)
涡旋振荡仪
台式离心机

重要产品信息

1. 仔细阅读整个操作说明。使用前将 Buffer A 和 Buffer B 完全解冻后翻转几次摇匀，放置于冰上。将离心管柱和接收管套管放置于冰上预冷。
2. 离心机请调整成 RCF/Xg 模式，按照离心力设置离心机，所有离心步骤都需要在室温 4°C 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 Buffer 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 Buffer 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 Buffer 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操作，请勿使用液氮研磨。

膜组分分离步骤

注：由于植物样品的多样性，选择合适的研磨方式是质膜分离的关键。

1. 将离心管柱及接收管套管放置冰上预冷。
2. **A. 大部分较软的植物组织样品**，将新鲜组织或冷冻组织（200-300mg）切成小片（1-2mm X 1-2mm），放入离心管柱套管上，用 1ml 吸头反复挤压组织减少体积，称取 50-80mg 组织分离粉加入离心管柱中的样品上方，用塑料棒反复向下按压扭转研磨组织 1-2 分钟。加入 100ul Buffer A 至离心管柱中，然后继续研磨几分钟，研磨后再加入 Buffer A 至离心柱满为止，**开盖**冰上孵育 5 分钟。接转步骤 3。
B. 含水量较多的组织样品(例如水果组织)，将大约 300mg 组织样品剪切成小块放入离心管柱中，用 1ml 吸头反复挤压组织减少体积，台式离心机最高速离心 1 分钟去除多余水分，然后按照上一条描述方法匀浆，匀浆后冰上孵育 5 分钟，接转步骤 3。
C. 对于比较坚硬组织样品（如根和水稻叶片），匀浆步骤可在离心管柱外部使用研钵或类似的匀浆装置进行匀浆(但不要使用液氮研磨)。匀浆后加入适量的 Buffer A（约 300-400ul），将其转移到离心管柱套管上，冰上孵育 5 分钟，接转步骤 3。
3. 盖上盖子，16,000Xg 离心 30 秒。**(离心机需要 10s 左右达到 16,000Xg)**

4. 弃去离心管柱，涡旋大力震荡 10-20 秒重悬收集管中的沉淀。

以下步骤将植物组织匀浆分为四个组分：细胞核、细胞浆、细胞器和质膜。

5. 700Xg 离心 3 分钟，**(沉淀包括完整的细胞核，叶绿体和大的碎片)。**

6. 将上清转移到新的 1.5ml 离心管中，4°C，16,000Xg 离心 30 分钟（延长离心时间可以增加产量）。弃去上清**（上清为胞浆组份，如需要可保存）**，保存沉淀**（沉淀为总膜组份包括细胞器和质膜）**。如果不需要分离质膜做到此步骤即可，将总膜组份存储于-80°C。如果需要进一步分离质膜，请不要冷冻总膜组份，继续第 7 步骤。

7. 加入 200ul Buffer B 用吸头反复吹打或涡旋震荡重悬第 6 步的总膜组份。4°C，7,800Xg 离心 5 分钟（注意：如果最终质膜组份中含有细胞器膜污染，此步骤离心时间可增加到 20 分钟提高纯度）。**沉淀部分为细胞器。**

8.第 7 步离心后，小心的将上清液转移到新的 **2.0ml 离心管中**，加入 1.6ml 预冷的 1X PBS (pH7.2-7.4) **(此步骤 PBS 不可减量)**，盖上盖子翻转混匀几次。16,000Xg 离心 30 分钟（延长离心时间可以增加产量）。弃去上清液，保存沉淀**（沉淀为质膜组分）**。产量一般为每个样品 10-100ug。如需较大量质膜，可将几个质膜沉淀合并增加总量。质膜组分可以根据下游实验需求用 20-200ul 含表面活性剂的 Buffer 溶解。推荐使用下表中 Minute™ 系列溶解液溶解质膜组分。做等电聚焦（2D 凝胶第一维）我们建议使用：7M 尿素/2M 硫脲/2%Chaps 和 20mM DTT (使用前将 DTT 加入以上混合液中)。

***膜蛋白属难溶蛋白，一般裂解液对其溶解效率较低，建议购买配套溶解液。**

推荐按照下游实验应用选购以下蛋白溶解液溶解膜组分

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

常见问题

问题	解决方案
低蛋白产量	增加起始细胞/组织的数量 增加第二步孵育时间到 10 分钟
低蛋白活性	保证裂解物低温/添加蛋白酶抑制剂
离心 30 秒后离心管柱中还存留细胞裂解物	减少起始细胞/组织的数量或增加离心时间到 2 分钟
质膜组分中有胞浆蛋白污染	用 0.5ml 预冷的 PBS (含 0.3MNaCl, pH9.5) 清洗质膜沉淀

更多信息和活动请扫描
二维码关注官方公众号

