

Minute™ 植物内体富集试剂盒

目录号:PE-050

描述：

了解内膜系统及其生物学意义对于理解植物生长发育是很重要的。内体是细胞表面胞吞物质分选和转运以及高尔基体向溶酶体或液泡运输过程中的一个重要细胞器。在植物细胞中，已经确定了两个明确定义的内体：反式高尔基体网络（等效于早期内体）和多泡体（等效于晚期内体）。传统分离和纯化这两个部分采用蔗糖梯度离心方法，操作十分繁琐，费时。某些情况下，也会采用蔗糖梯度分离与免疫亲和相结合的方法，但通常需要大量的起始样品（10-50 克）。因此我们开发了这款基于离心管柱和选择性沉淀相结合的内体富集试剂盒。该方法简单、快速，只需少量的起始样品。

试剂盒组分(20T)：

1. 缓冲液 A 10ml
2. 缓冲液 B 10ml
3. 缓冲液 C 10ml
4. 塑料研磨棒 2 根
5. 离心管柱 20 套

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/ Xg 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。
3. 研究蛋白磷酸化，磷酸酶/蛋白酶抑制剂应在使用前加入分装的缓冲液 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. 研磨方式请按说明书进行，请勿使用液氮研磨。

操作方法：

1. 取 200-250mg 新鲜/冷冻植物幼叶或幼苗加，将叶片折叠卷起塞入到离心管柱套管中。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 1-2min）。
2. 用试剂盒中研磨棒反复向下按压扭转研磨 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，用纸巾擦干即可。）
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，10,000Xg 离心 5min。这一步可以去除叶绿体，细胞核和一些大碎片。离心后，弃去离心柱，将所有上清转移到一个新的 1.5ml 离心管中。
4. 4°C，16,000Xg，离心 10min，将 500ul 上清转移至一个新的 1.5ml 离心管中。
5. 加入 500ul 缓冲液 B 到管中，涡旋震荡混匀，放于冰上孵育 5min。孵育完成后 2,800Xg，离心 5min（这一步可以去除植物样品中最易交叉污染部分 rubisco）。离心后将所有上清转移至新的 1.5ml 离心管中，再向管中加 500ul 缓冲液 C，涡旋震荡混匀后放于冰上孵育 20min。
6. 孵育完成后 10,000Xg，离心 5min，将上清完全弃掉，小心地加入 1.5ml 预冷的 ddH₂O，不要打散沉淀，将水立即倒掉（这一步是除去残留的试剂），**沉淀即为富集的内体组分**。沉淀可用 100-200ul 适合于下游实验的溶解液重悬沉淀，上下吹打混匀后使用。**蛋白溶解液可根据下表进行选择。**

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

