

Minute™ 植物脂筏分离试剂盒

目录号: PL-051

描述:

有大量证据表明，在动物和植物膜系统中都存在抗去污剂膜（DRM）的亚结构域，即脂筏。脂筏组分中鞘脂与蛋白的比例大大增加且具有更高的胆固醇浓度。脂筏在真核细胞的信号转导和蛋白质转运中起着重要作用。传统分离脂筏的方法使用非离子去污剂提取，然后使用蔗糖梯度超速离心，这种方法需要大量的起始样品（数百克），并且除了耗时的操作外，还需要专用设备。为此我们开发了这种从植物组织中快速分离提取脂筏的方法，仅需毫克级的起始样品，无需超高速离心，约 1 小时即可完成脂筏的分离。

试剂盒组分(20T):

- | | |
|-------------|-------|
| 1. 缓冲液 A | 10ml |
| 2. 缓冲液 B | 10ml |
| 3. 缓冲液 C | 1.2ml |
| 4. 缓冲液 D | 10ml |
| 5. 塑料研磨棒 | 2 根 |
| 6. 蛋白提取粉 | 2g |
| 7. 离心管柱/收集管 | 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 A, B, C 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. 考虑蛋白降解问题或研究蛋白磷酸化，蛋白酶/磷酸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. 需准备预冷的 ddH₂O。
5. 研磨方式请按说明书进行，请勿使用液氮或研磨仪研磨。

操作方法：

1. 取 200-250mg 新鲜植物幼叶或幼苗，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 80-100 次以压缩叶片体积（此步大概需要 1-2min）。加 50-80mg 蛋白提取粉到离心管柱中。
2. 用试剂盒中研磨棒用力向下按压反复扭转研磨 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。）
3. 再加入 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，8,000Xg 离心 10min。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，将上清转移到一个新的 1.5ml 离心管中。
4. 16,000Xg，离心 30min，弃去上清。小心的加入 1ml 预冷的 ddH₂O 清洗沉淀，**不要打散沉淀**，将水立即弃掉。
5. 加入 450ul 缓冲液 B 吹打沉淀重悬，再向管中加入 50ul 缓冲液 C 混匀后 4℃ 孵育 30min。孵育完成后，大力涡旋震荡 20s，10,000Xg，离心 5min。离心后将上清转移至新的 1.5ml 离心管中。
6. 加入 500ul 缓冲液 D，简单振荡混匀，冰上孵育 10min。孵育完成后 10,000Xg，离心 5min。离心后，脂筏会漂浮在管子最上层。
7. 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。或者也可以使用配有 21 号针头的 2 毫升注射器。去除水相后（水相为非脂筏膜蛋白，如需要可保留），浅白绿色的脂筏会附着在离心管壁上。
8. 将离心管 16,000Xg，离心 5min，将脂筏离心到管底部，完全去除残液。小心的加入 200ul 预冷的 ddH₂O 清洗沉淀，**不要打散沉淀**，并将水快速弃掉。得到的沉淀即是分离的**脂筏**组分，脂筏沉淀可以根据下游应用选择 100-200ul 适合的溶解液进行溶解。推荐根据下表选购蛋白溶解液。根据样品类型不同，最终蛋白质产量在 50-100 ug/样品范围内。

技术要点：

1. 分离的脂质筏在用于 2D 凝胶等应用分析时，需要透析以降低盐浓度。
2. 上清液中的非脂筏蛋白推荐使用蛋白质沉淀试剂盒沉淀富集（货号：WA-006）。
3. 分离的脂筏主要来自质膜和其他内膜系统。
4. 可以使用传统的有机萃取方法从分离的脂筏中进一步提取脂质。

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

