

# Minute™ 植物 Rubisco 去除试剂盒

目录号:RD-046

## 描述：

植物主要通过叶片感知来自环境的信号，科学界的主要目标之一是通过叶片蛋白组的分析，来分析信号级联的组成部分。然而，主要的瓶颈是存在一种高丰度蛋白质——Rubisco，它占叶片蛋白的 40-80%。用 LC-MS/MS 进行蛋白质的表达和鉴定时，通常高丰度的 Rubisco 会掩盖低丰度蛋白质的检测。一种特殊的 IgY 共轭树脂在商业上可用于从总蛋白提取物中去除 Rubisco，但它只能处理少量的蛋白质，而且非常昂贵。文献中还介绍了其他的方法，但这些方法通常比较繁琐和耗时。Minute™ 植物 Rubisco 去除试剂盒使用离心管柱技术和专用的 Rubisco 去除缓冲液，可有效克服以上困难。与其它方法相比，该方法简单、直接、可在约 1 小时内完成。Rubisco 去除后的总蛋白可用于许多下游应用，如 SDS-PAGE、2DE 和 LC-MS/MS 分析。

## 试剂盒组分(20T):

1. 缓冲液 A 15ml
2. 缓冲液 B 5ml
3. 缓冲液 C 1.0ml
4. 离心管柱和收集管 20 套
5. 1.5ml 离心管专用研磨杵 2 根
6. 研磨粉 4g

## 所需附加材料

台式离心机（最高离心力至 16,000Xg）。

1.5ml 离心管

蛋白浓度测定建议使用 BCA 方法测定。

## 运输储存：

常温运输，4 度保存。

## 操作方法：

开始前仔细阅读整个操作说明。在使用前建议将蛋白酶抑制剂添加到分装的缓冲液 A 中（蛋白酶抑制剂浓度为 1X，例 100X 蛋白酶抑制剂，1ml A 液中加 10ul 蛋白酶抑制剂）。所有离心步骤请在 4 度离心。缓冲液 A 在冰上预冷，缓冲液 B 和 C 使用前恢复室温，并混匀。

1. 将 150-200mg 新鲜/冷冻的植物叶片加到离心管柱套管里。折叠卷起叶片将其塞入到离心管柱中，并加 100ul 缓冲液 A 和 80mg 研磨粉。用 200ul 吸头按压叶片 100 次以压缩叶片体积。
2. 用研磨棒**平头端**反复向下按压扭转研磨 150-200 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即可。）
3. 再加 200ul 缓冲液 A 到离心柱中，用 200ul 吸头将样品混匀。盖上盖子，16,000Xg 离心 1min。弃去离心管柱，用吸头将接收管中样品上下吹打重悬混匀，然后将所有液体转移到一个新的 1.5ml 离心管中。
4. 加 80-100mg 研磨粉到管里，用研磨棒**尖头端**扭转研磨 150-200 次。盖上盖子 300Xg 离心 2min。将 200ul 上清转移到一个新的 1.5ml 离心管里。（如需要此处可以保存 50ul 匀浆液作为去除 Rubisco 前的总蛋白对照）。
5. 上清部分 16,000Xg 离心 30min。离心后将所有上清转移到一个新的 1.5ml 离心管中，并将其放置于冰上备用。（此部分为水溶性组分）
6. 慢慢地加 200ul 缓冲液 A 到沉淀（**微粒体组分**）里，不要打散沉淀。然后立刻弃掉缓冲液 A。这一步是为了去除残留的胞浆蛋白。加入 200ul 预冷的缓冲液 A，用移液器吹打重悬沉淀然后加入 20ul 缓冲液 C。混匀后室温孵育 5min，16,000Xg 离心 5min。弃掉沉淀，上清是可溶性微粒体蛋白组分，将上清转移到一个新的 1.5ml 离心管中放置冰上备用。
7. 在第 5 步得到的 200ul 水溶性组分里加 200ul 缓冲液 B（上清和缓冲液 B 的比列是 1: 1）。涡旋震荡混匀，冰上孵育 10min。10,000Xg 离心 5min，沉淀是去除的 Rubisco。将 400ul 上清转移至第 6 步得到的 200ul 的微粒体蛋白组份里涡旋震荡混匀。**这就是去除 Rubisco 后的总蛋白（600ul）。**

因为总蛋白提取过程中含有高浓度的盐和表面活性剂，所以需要 TCA 法沉淀蛋白去除盐分才可以用于 SDS-PAGE，2D 胶分析和质谱分析。我们推荐使用 Invent Cat#WA-006 快速高效蛋白沉淀试剂，已经公布过的改良版的 TCA 方法也可以使用。（Niu L. et al. (2018) Modified TCA/acetone precipitation of plant proteins for proteomic analysis. PLoS ONE 13(12): e0202238. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202238>).

## 技术要点：

1. 说明书中样品起始量对于大多数样品而言得率是足够的。样品不要超过200mg，并非样品越多结果越好。
2. 对于大多数叶片样品而言，经过 TCA 沉淀后最终蛋白产量一般在 100-200ug/样品。
3. 本说明书操作是将可溶性微粒体组分和水溶性组分合并后，获得去除 Rubisco 的总蛋白。如果需要，也可将微粒体组分和水溶性组分分别用 TCA 沉淀。但是需要将第 7 步得到的 400ul 上清转移到新的 1.5ml 离心管，并加入 20ul 缓冲液 C，然后再进行 TCA 沉淀。
4. 如果需要水溶性的组分（从第 5 步获取），可以直接进行一些下游实验如 IP 等，无需去除 Rubisco，也无需进行 TCA 沉淀。

更多信息和活动请扫描  
二维码关注官方公众号

