

Minute™ 哺乳动物组织及细胞总脂筏分离试剂盒

目录号:LR-039

描述：

脂筏是含有高水平胆固醇和鞘脂的小质膜结构域。脂筏被发现存在于质膜 (PM) 和一些内膜系统中, 如线粒体相关膜 (MAMS) 和内质网等。脂筏参与许多细胞过程, 如信号转导, 膜转运和蛋白质分选。脂质修饰的蛋白质和一些跨膜蛋白质集中在脂筏中, 而其他蛋白质被排除在外。脂筏还被发现与质膜上的 Na^+ / K^+ ATP 酶相关。传统的脂筏分离方法是用蔗糖梯度法或 OptiPrep 密度法, 采用超高速离心法分离, 需要大量的起始样品, 而且该方法繁琐、耗时。为了克服传统方法的缺点, 我们利用离心管柱技术开发了这款简单、快速的脂筏分离试剂盒。首先将样品的总膜 (总膜即质膜 PM 和细胞器膜总和) 组分分离, 然后用含有非离子表面活性剂的缓冲液处理, 最后使用台式离心机差速离心分离出耐表面活性剂的脂筏组分。整个过程无需使用密度梯度和超高速离心, 可以在 90 分钟内从培养的细胞/组织中高度富集脂筏。

注: 如果需要分离质膜脂筏, 请使用 Minute™ 质膜脂筏分离试剂盒 Cat # LR-042。

试剂盒组分(20T):

1. 缓冲液 A 15ml
2. 缓冲液 B 10ml
3. 缓冲液 C 10ml
4. 研磨棒 2 个
5. 离心管柱 20 个
6. 收集管 20 个

运输及储存: 常温运输, 4 度保存。

附加材料:

1xPBS

振荡器

台式高速离心机(10s 内可以达到 16,000Xg)

重要产品信息:

1. **离心机请调整成 RCF 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。

2. **研究蛋白磷酸化，磷酸酶抑制剂应在使用前加入缓冲液 A 中。如果担心蛋白降解问题可以分别在缓冲液 A 和 B 中添加蛋白酶抑制剂。**（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 缓冲液中添加 10ul 抑制剂）。
3. 推荐使用 BCA 方法测定蛋白浓度。
4. **研磨方式请按说明书操作，请勿使用液氮或匀浆仪等方式研磨。**

操作步骤：

注意：实验前请将缓冲液 C 恢复常温，混匀备用。

1. 将离心管柱放入收集管中，放置在冰上预冷，缓冲液 A 和 B 放在冰上预冷，**但请不要预冷缓冲液 C！**
2. **A.对于培养的细胞**，通过低速离心（500-600Xg，5 分钟）收集 30-40×10⁶ 个细胞。用预冷 PBS 洗涤细胞一次。完全除去上清液，加入 500μl 缓冲液 A 将沉淀重悬。将细胞悬液在冰上孵育 5 分钟后，**剧烈涡旋震荡 10-30 秒**。立即将细胞悬液转移到离心管柱套管中。转接第 3 步。
B.对于柔软组织样本，将 30-40 mg 组织（新鲜或冷冻）放入离心管柱中。将 200μl 缓冲液 A 加入离心管柱中，用塑料棒反复按压扭转研磨组织 2-3 分钟。研磨后，再次加入 300μl 缓冲液 A。转接第 3 步。对于**肌肉组织**，需将组织放在干净的玻璃或塑料板的表面上，用锋利的刀片将组织切成组织匀浆状。再将组织转移到离心管柱套管中，并如上所述进行研磨。
塑料棒是可重复使用的，用 70%酒精或水清洗干净即可。
3. 盖上离心管柱，倒置混匀几次，然后 16,000 Xg 离心 30 秒。**（此步骤推荐使用可在 10S 内达到离心力的台式离心机，离心机的离心力和升速时间会影响最终得率）**
4. 弃去离心管柱，剧烈涡旋 10 秒钟重悬沉淀。1,000Xg 离心 5 分钟**（沉淀物包含细胞核，大细胞碎片和一些未破裂的细胞）**。
5. 将所有上清液转移到新的 1.5ml 离心管中，16,000Xg，4°C，离心 30 分钟。沉淀是**总膜**。小心地将所有上清液**（胞浆部分）**弃掉**（如需胞浆组分检测，转移到新的 1.5ml 管中保存使用）**。
6. 沉淀中加入 500μl 预冷缓冲液 B 重复吹打 20-30 次重悬沉淀，然后剧烈涡旋 10 秒。立刻在冰上孵育 30 分钟，期间每隔 10 分钟涡旋震荡一次，并立即将管子放回冰上，使其始终保持冷却。
7. 将离心管 16,000Xg 离心 10 分钟。将上清液转移到新的 1.5ml 离心管中，向管中加入 0.5ml 缓冲液 C 并通过短暂涡旋震荡充分混合**（管中的溶液变得混浊）**。将管在冰上孵育 2 分钟。10,000 Xg 离心 10 分钟离心后，脂筏漂浮在管的顶部。
8. 将一个细的吸管头（如 SDS-PAGE 样品加样针）插到移液器上，插入管子底部，缓慢并完全地去除水相。或者也可以使用配备 21 号针头的 2 毫升注射器，去除水相后，脂筏会粘附在离心管壁上。
9. 将离心管 16,000Xg 离心 5min，使脂筏离心到管底部，完全去除残留液。小心地加入 1ml 预冷的 ddH₂O 不

要触动沉淀，然后完全弃去上清（详见下文技术要点）。这个沉淀即是分离的**脂筏**，沉淀可使用 50-200 μ l 以下推荐的溶解液重悬用于实验，也可根据下游应用选择适合的其他溶解液。根据细胞/组织类型不同，最终蛋白质产量在 30-100 μ g/样品范围内。

技术要点：

1. 在第 9 步中用水冲洗沉淀是为了去除可能干扰下游应用的残留的缓冲液成分，如 SDS-PAGE 和 Western blotting。通常这样处理足以减少干扰。
2. 如果还是不满意，可以用 100-200 μ l 的 WA-009 变性蛋白溶解液（见下表）重悬脂筏沉淀，再用脱盐柱进一步去除干扰。
3. 还可以将溶好的脂筏溶液在冷水中透析。
4. 第 8 步得到的液相组分是非脂筏蛋白组分，由于其含有干扰组分，不能直接用于 WB 检测。如需非脂筏蛋白可以使用 Minute™ 高效蛋白沉淀剂(Cat#WA-006)从液相组分中将蛋白沉淀出来进行 WB 检测。如果使用 WA-006，请注意一下操作细节：取 600-800 μ l 液体组分到 1.5ml 离心管里，按照 WA-006 的标准流程操作。全部孵育均需在冰上操作，去除上清液时需用移液器吸取而不要直接倾倒。洗涤缓冲液添加到含有沉淀蛋白质的管中，洗涤缓冲液出现浅灰白色颜色(这是正常现象)。但需确保洗涤后蛋白沉淀在管底部。
5. 非常重要是使用 SDS-PAGE 和 WB 测定脂筏的富集程度时，需使用总蛋白做为对照，且等量上样。

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
Minute™ 高效蛋白沉淀剂 (30ml)	WA-006	沉淀非脂筏蛋白（详见技术要点）

更多信息和活动请扫描
二维码关注官方公众号

