

Minute™ 动物细胞/组织溶酶体分离试剂盒

目录号:LY-034

描述:

溶酶体是真核细胞中的球形囊泡，负责清除废物。溶酶体中的消化酶在消化多余或受损的细胞器、食物颗粒和吞噬的病毒和细菌中起着至关重要的作用。溶酶体是比较大的细胞器，大小从 0.1 到 1.2 μm 不等。分离溶酶体是研究细胞自噬、蛋白质降解和蛋白质循环重要的第一步。传统的溶酶体分离方法是基于密度梯度超速离心法的。需要大量的起始材料，并且方法冗长且耗时，具有显著的交叉污染。目前，所有用于溶酶体分离的商业试剂盒都是基于上世纪 70 年代的方法。我们的试剂盒与市场其他溶酶体分离试剂盒不同，使用离心管柱技术，简单、快速、高效。所需的起始细胞/组织的量远小于传统方法。该试剂盒可以有效地富集培养的细胞或组织中的溶酶体，无需使用杜恩斯匀浆器和超高速离心。整个操作过程可在 1.5 小时内完成。

试剂盒组份(20T):

- | | |
|-------------|------|
| 1. Buffer A | 15ml |
| 2. Buffer B | 2ml |
| 3. 塑料研磨棒 | 2 个 |
| 4. 离心管柱 | 20 个 |
| 5. 接收管 | 20 个 |

所需附加材料

1XPBS

涡旋震荡仪

台式离心机(10s 内转速可达 16,000Xg)

运输及储存：

常温运输，4°C储存。

重要产品信息

1. 仔细阅读整个操作说明。将离心管柱和接收管套管放置于冰上预冷。
2. 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，磷酸酶抑制剂应在使用前加入缓冲液 A 中。如果担心蛋白有降解问题使用前可在 Buffer A 和 Buffer 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，例如母液是 100x，添加时按照 1: 100 添加，1ml 缓冲液 A 添加 10ul 抑制剂）
4. 推荐使用 BCA 法测定蛋白浓度。

操作步骤

1. 将离心管柱及接收管套管放置冰上预冷。
2. **细胞样品**，低速离心（500-600Xg，5 分钟）收集 25-30x 10⁶ 个细胞。转接 3a。组织样品转接 3b。
- 3a** 用预冷的 PBS 清洗一次细胞，完全去除上清，加 500μl Buffer A 重悬细胞，在冰上孵育 5-10 分钟，大力涡旋震荡 **10-30 秒**。迅速将细胞悬液转入离心管柱套管中。转接步骤 4。
- 3b 组织样品**，将 20-30mg 组织（新鲜或冷冻）放置于离心管柱套管中。加入 200μl Buffer A，用塑料棒向下按压反复扭转研磨组织 1 分钟至匀浆状。再加入 300μl Buffer A，上下吹打混匀，在冰上 **开盖** 孵育 5 分钟。转接步骤 4。注意：塑料棒是重复使用的，可以用 70% 的酒精或者水清洗。
4. 盖上盖子，翻转几次，16,000X g，离心 30 秒。**（此步骤需离心机快速升速，10S 内到达 16,000Xg 可提高得率）（可选优化：细胞样品过柱之后，可以再次重悬接收管中悬液，转移回同个离心管柱中再次过柱，可以增加产量）**
5. 弃去离心管柱，涡旋大力重悬沉淀 10S，2,000X g，离心 3min **（沉淀包含细胞核，细胞大碎片**

和一些未破碎的细胞)。

6. 将所有上清转移到新的 1.5ml 离心管中, 4°C, 11,000X g, 离心 15min。此步所得沉淀主要包含线粒体和细胞碎片。小心将 400ul 上清转移至一个新的 1.5ml 离心管中, 16,000Xg, 4°C, 离心 30min, 完全去除上清。
7. 加入 200ul 预冷的 Buffer A,用吸头反复吹打 60-100 次后用力涡旋震荡 20s 重悬沉淀。2,000Xg, 4°C, 离心 4min。小心的将上清转移至一个新的 1.5ml 离心管中, 加入 100ul Buffer B, 振荡混匀(注意: 此处上清和 Buffer B 的比例是 2: 1)。在冰上孵育 30min, 11,000X g,离心 10min。将上清完全去除干净。将管子再次 11,000X g 离心几秒钟, 去除残留液体。
8. 沉淀为高度富集的溶酶体, 可根据下游应用使用 50-150ul 溶解液或适合的溶液重悬沉淀(见下表格)。产量一般为 50-100ug/样品。如果蛋白浓度比较低, 可以增加样品的起始量。溶酶体沉淀可以根据下游实验从下表中选择合适的 Minute™ 系列溶解液溶解溶酶体。

推荐按照下游实验应用选购以下蛋白溶解液溶解溶酶体蛋白

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

