

Minute™ 胞质蛋白酶体富集试剂盒

目录号:PT-040

描述：

蛋白酶体是一种非溶酶体形式的细胞内降解途径，需要代谢能量和泛素聚合物。26s蛋白酶体是由两种亚基构成（1个20s蛋白酶体和1或者2个19s调节复合物）。从细胞/组织中快速温和的分离蛋白酶体是研究蛋白酶体结构和功能的必经之路。蛋白酶体主要分布在细胞质中，但是在胞核中也可以检测到。超高速离心和亲合法是分离蛋白酶体常用的传统方法。这些方法虽然相对有效，但是通常耗时较长且产量极低。多数以亲和为基础的方法都需要苛刻的洗脱条件这样会影响分离出的蛋白酶体的活性，从而限制下游应用。为了克服这些缺点，我们开发了这款基于离心管柱技术与特制沉淀缓冲溶液配合的胞质蛋白酶体分离试剂盒。首先去除细胞核和大多数细胞器，然后优先沉淀细胞质蛋白酶体，该试剂盒分离的蛋白酶体不包括核蛋白酶体(如果需要富集核蛋白酶体可以使用Cat # PN-041)。该方法简单、快速、得率高。这种温和操作可以保持蛋白酶体与泛素和其他蛋白质的互动，可用于研究蛋白酶体的结构和功能。富集的蛋白酶体也可以用作亲和法纯化蛋白酶体的起始材料。

试剂盒组分(20T)：

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

所需附加材料：

1XPBS

台式离心机 (10s 内可以升速至 16,000Xg)

运输储存： 常温运输，4 度储存。

重要产品信息：

1. **仔细阅读整个操作说明。离心机请调整成 RCF/Xg 模式，按照离心力设置机。**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。蛋白酶抑制剂可以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，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）。**
3. 推荐使用 BCA 方法测定蛋白浓度。
4. **研磨方式请按说明书来操作，请勿使用液氮研磨。**

操作方法：

注：缓冲液 B 需恢复常温，摇匀后使用。

1. 将离心管柱及接收管套管放在冰上预冷。Buffer A 放置冰上预冷。
2. **A 培养的细胞样品**，500-600Xg 离心 5min，收集 30-40 X 10⁶ 细胞，用预冷的 PBS 清洗细胞一次，完全弃去 PBS。用 450ul 缓冲液 A 重悬细胞沉淀。涡旋大力振荡 10-30s，迅速转移至离心管柱套管中，转接步骤 3。
B 柔软组织样品，将 30-40mg 组织样品（新鲜或冷冻），放置于离心管柱套管上，加 200ul 缓冲液 A，用塑料棒反复向下按压扭转研磨 2-3 分钟，研磨后再加入 250ul 缓冲液 A 到离心柱中，用移液器上下吹打混匀，转接步骤 3。
肌肉组织样品，将组织放置一块干净的玻璃片上，用锋利的刀片将组织切成小片（肉糜状），再转移至离心管柱套管上，再按如上方法研磨操作（注：研磨棒塑料棒可重复使用，用 70%酒精擦拭或用蒸馏水冲洗干净即可。）
3. 盖上盖子，翻转管子几次混匀，16,000X g 离心 30s。**（此步骤需离心机需 10S 内到达 16,000Xg）**（可选优化：细胞样品过柱之后，可以吹打重悬接收管中的细胞，转移回同个离心管柱中再次过柱一次，增加产量）
4. 弃去离心管柱，涡旋震荡混匀，16,000Xg 离心 30min，吸取 400ul 上清转移至一个新的 1.5ml 离心管中。
离心所得沉淀主要是细胞核，大的细胞碎片，细胞器和细胞质膜。
5. 将 400 ul 缓冲液 B 添加到 400ul 上清液的离心管中(缓冲液 B 与上清的比例为 1:1)。涡旋震荡 10-20S 混匀。冰上孵育 10min。10,000X g，离心 10min，弃上清，保留沉淀。
6. 将离心管再次 10,000Xg 离心几秒，尽量将管壁残液去除干净。沉淀是富集得高纯度蛋白酶体，蛋白酶体很容易溶于水溶液。
7. 可以用 100-200ul PBS 复溶蛋白酶体沉淀或者根据下游实验选择合适的缓冲溶液，推荐使用 **WA-009/WA-010/WA-011**。蛋白得率通常在 1-2mg/ml，而且蛋白酶体保有活性。复溶蛋白酶体溶液中含有盐分会影响

2D 胶分析。盐分可以通过透析或者脱盐柱去除。

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

