

Minute™ 肝脏组织高纯度内质网分离试剂盒

目录号:ER-035

描述：

内质网（ER）是一种重要的膜结构，在功能上连接核膜和质膜。肝脏中富含大量的内质网，是最常用于分离 ER 的原材料。传统分离 ER 的方法是基于密度梯度超速离心法,该方法需要大量的起始材料，方法冗长耗时，且交叉污染严重。目前，所有用于内质网分离的商业试剂盒都是基于上世纪 70 年代发展起来的方法。本试剂盒与市场上其他内质网分离试剂盒不同，采用离心管柱技术，该技术简单、快速，只需要少量的组织，无需使用杜恩斯匀浆机和超高速离心，即可分离冷冻肝组织的天然内质网（主要是粗面内质网）。整个操作可以在大约 2 小时内完成。

试剂盒组分(20T)：

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

所需附加材料：

1XPBS

涡旋震荡仪

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. 使用前仔细阅读整个操作说明，并将离心管柱和接收管套管放置于冰上预冷。
2. 离心机请调整成 RCF/Xg 模式，按照离心力设置离心机。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。
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。蛋白酶抑制剂可以选择添加或不添加，如添加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）。
4. 推荐使用 BCA 方法测定蛋白浓度。
5. 研磨方式请按说明书操作，请勿使用液氮研磨。

操作方法：

注：缓冲液 C 需恢复室温，摇匀再使用

1. 将离心管柱及接收管套管放在冰上预冷。
2. 将 30-35mg 冷冻的肝脏组织样品（冷冻肝脏需在室温下完全解冻，但不推荐使用新鲜组织，因为最终产量和纯度较低）放置于离心管柱套管中，加 200 μ l 缓冲液 A，用塑料棒反复向下按压扭转研磨 2-3 分钟。再加 350 μ l 缓冲液 A 到离心管柱中。（注：研磨棒塑料棒可重复使用，用 75%酒精擦拭或用蒸馏水冲洗干净即可。）
3. 盖上盖子，翻转几次混匀，16,000X g 离心 30s。（此步骤需离心机需 10S 内到达 16,000Xg）
4. 弃去离心管柱，大力涡旋震荡 10S 确保重悬沉淀，2,000X g 离心 5min，（沉淀中包含细胞核，大的细胞碎片和一些未破裂的细胞）。
5. 将上清转移至一个新的 1.5ml 离心管中（尽量避免吸取到管壁的油脂），16,000X g，4°C 离心 30min。离心完毕，小心的吸取 400 μ l 上清转移至一个新的 1.5ml 离心管中。（离心所得沉淀主要是大的细胞碎片，线粒体，溶酶体和细胞质膜。）
6. 将 200 μ l 缓冲液 B 添加到 400 μ l 上清液的离心管中，涡流震荡混匀(缓冲液 B 与上清的比例为 1:2)。4°C，孵育 30min。
7. 16,000X g，4°C 离心 10min，完全弃去上清。用 200 μ l PBS 重悬沉淀吹打 40-50 次，涡悬振荡 20s。室温孵育 15min，每 5min 振荡一次。2,000Xg 离心 5min，将上清转移至一个新的 1.5ml 的离心管中。在上清中加入 200 μ l 的缓冲液 C(按照上清的体积和缓冲液 C 的体积比 1: 1)。4°C，孵育 20min。
8. 10,000Xg 离心 10min，弃去上清液。再次 10,000Xg 离心几秒钟，甩掉管壁残留的液体，将残液完全去除。
9. 沉淀即为内质网，主要包含粗面内质网。非水溶性的内质网沉淀，可根据下游实验使用 50-200 μ l 合适的

溶解液来溶解或重悬，推荐使用下表中溶液溶解内质网。内质网样品如果不立即使用，请在溶解液中添加蛋白酶抑制剂 cocktails，将样品冻存于-80℃。

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

