

Minute™ 动物细胞/组织内质网富集试剂盒

目录号：ER-036

描述：

内质网是连接核膜和质膜功能的主要膜性结构。内质网在真核细胞蛋白转运的胞外途径中起重要作用。在细胞质中合成的蛋白质被运送到内质网，囊泡将蛋白质运送到高尔基体，然后与质膜融合。传统分离内质网的方法是基于密度梯度超离心，需要大量的起始样品，方法繁琐，耗时，交叉污染严重。目前，所有商用内质网分离试剂盒都是基于上世纪 70 年代开发的方法。与市场上的内质网分离试剂盒不同，Minute™ 内质网分离试剂盒使用离心管柱技术，简单、快速，只需少量的起始培养细胞或组织，不需要使用杜恩斯匀浆管和超高速离心，就能从培养的细胞/组织中分离出天然内质网结构(主要是粗面内质网)。整个操作可以在大约 2h 内完成。

试剂盒组分(20T)：

1. 缓冲液 A 20ml
2. 缓冲液 B 1ml
3. 缓冲液 C 1ml
4. 缓冲液 D 10ml
5. 塑料研磨棒 2 根
6. 离心管柱 20 个
7. 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. 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. **离心机请调整成 Rcf (G) 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。
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. **请勿使用液氮，匀浆仪等研磨方式，研磨方式请按说明书操作。**

操作方法：

注：缓冲液 D 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。
 - A. 培养的细胞：500-600X g 收集 25-35 X 10⁶ 细胞。用预冷的 PBS 清洗细胞一次，弃掉上清。将细胞沉淀放置到 -70 到 -80 度冰箱冷冻 10min。冷冻后用 550ul 缓冲液 A 重悬细胞沉淀。涡旋振荡 20-30s，迅速转移至离心管柱上，转接步骤 2.
 - B. 组织样品：将 30-40mg **冷冻组织** 样品（新鲜组织至少需要在 -20 或者 -80 度冰箱冷冻过夜）放置于离心管柱上，加 200ul 缓冲液 A，用塑料棒向下按压并反复扭转研磨 2-3 分钟。研磨后再加入 350ul 缓冲液 A 到离心柱上，用移液器上下吹打混匀。转接步骤 2。（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。）
2. 盖上盖子，上下颠倒混匀几次，16,000X g 离心 30s。**（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混悬液，转移回同个离心管柱中再次过柱，可以增加产量）
3. 弃去离心管柱，涡旋大力 10S 重悬沉淀，2,000X g 离心 3min **（沉淀中包含细胞核，大的细胞碎片和一些未破裂的细胞）**。
4. 将所有上清转移至一个新的 1.5ml 离心管中（如样品有油脂尽量避免吸取到油脂），8,000X g，4°C 离心 10min。离心完毕，小心的吸取 400ul 上清转移至一个新的 1.5ml 离心管中（如样品有油脂尽量避免吸取到油脂）。**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。**
5. 将 40 ul 缓冲液 B 添加到 400ul 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 1:10）。在 4 度，孵育 20-30min。
6. 8,000Xg，4°C 离心 10min，完全弃去上清。用 400ul 预冷的缓冲液 A 吹打 40-50 次重悬沉淀，涡旋振荡 20s **（此步沉淀有很多以透明状态附着于管壁，需用移液器吹打管壁，将沉淀全部吹散，涡旋振荡至肉眼**

不可见颗粒沉淀为止。在重悬液中加入 40ul 的缓冲液 C(按照重悬的体积 1/10 体积)，涡旋振荡混匀，室温孵育 10-15min，每 5min 涡旋振荡一次（延长孵育时间到 30 分钟有助于增加内质网得率）。8,000X g 离心 5min，将 400ul 上清转移到一个新的 1.5ml 的离心管中。再加入 400ul 缓冲液 D 到上清液中，震荡混匀(按照上清液体积和缓冲液体积 1:1)，4 度孵育 20min。

7. 10,000X g 离心 10min，弃去上清液。再次 10,000X g 离心几秒钟，甩掉管壁残留的液体，将残液完全去除。
8. **沉淀是内质网**，主要是粗面内质网。内质网含量在不同类型的细胞/组织中有显著差异，通常得率为 20-200ug/样品。非水溶性的内质网沉淀，可根据下游实验用 50-200ul 溶解液重悬沉淀（见下表格）。如果不及使用样品，请在溶解液中添加蛋白酶抑制剂，将样品冻存于- 80℃。

技术要点：

- 1 通常情况下，糙面内质网沉淀在第 6 步 8,000X g 离心后是肉眼可见的。然而对于一些细胞类型，内质网沉淀可能是透明的不容易看到。如果出现这种情况，可以将第 5 步孵育的时间延长至 1h，第 6 步离心力提升至 10,000Xg。即使这样沉淀还是不明显，可以假设内质网沉淀存在继续完成后续操作步骤。确保在第 6 步用 400ul buffer A 清洗管壁时不要有遗漏。
- 2 如果使用培养细胞富集内质网产量低于 20ug，可以增加细胞数量至 5×10^7 。按照第 1 步骤 A 操作里的描述低速离心收集细胞沉淀。细胞沉淀用 100ul buffer A 重悬混匀，-20 冷冻 1h 备用。解冻细胞悬液后，吹打 30-40 次混匀后将其转移到离心管柱上。用研磨棒抵住离心管柱扭转按压对细胞样品进行 100 次研磨匀浆。匀浆完成后，加 400ul buffer A 到离心管柱上继续上述第 2 步骤的操作。

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

