

Minute™ 质膜蛋白和细胞组分分离试剂盒

目录号：SM-005

描述：

Minute™ 质膜和细胞组分分离提取试剂盒是新一代质膜和细胞组分分离工具，去除了传统方法中均质化和密度梯度离心(包括两相分离)相关的不可控变化，提供了无与伦比的便利性和一致性。

工作原理：

细胞/组织通过 Buffer A 致敏，然后在高速离心下细胞以 Z 字形路径通过离心管柱，这个过程中细胞膜会破裂，分离出完整的核，因此消除了膜组分中细胞核的污染。随后使用常规台式离心机（无需超速离心）进行差速和密度离心，进一步从细胞裂解物（粗膜、完整细胞核、胞浆和细胞器的混合物）中分离质膜。整个过程完成可获得 5 种不同的细胞组分：**细胞核，细胞浆，总膜，细胞器及质膜**。本试剂盒每次实验使用同样起始样品量，设定固定的离心力和离心时间，即可获得一致性良好的结果。整个操作过程约 45 分钟即可完成。

应用：

本试剂盒可以从细胞或者组织样品中快速分离天然膜组分，可应用于 SDS-PAGE，免疫印迹，ELISA，IP，膜蛋白质结构分析，2-D，酶活性测定，纳米材料包裹及其他应用。

试剂盒组份：

50 Preps:

1. 25 ml 缓冲液 A
2. 10 ml 缓冲液 B
3. 50 个离心管柱
4. 50 个收集管
5. 2 根塑料研磨棒
6. 组织分离粉

4 Preps:

1. 2.0 ml 缓冲液 A
2. 1.0 ml 缓冲液 B
3. 4 个离心管柱
4. 4 个收集管
5. 1 根塑料研磨棒
6. 组织分离粉

储存： -20°C 储存

所需附加材料：

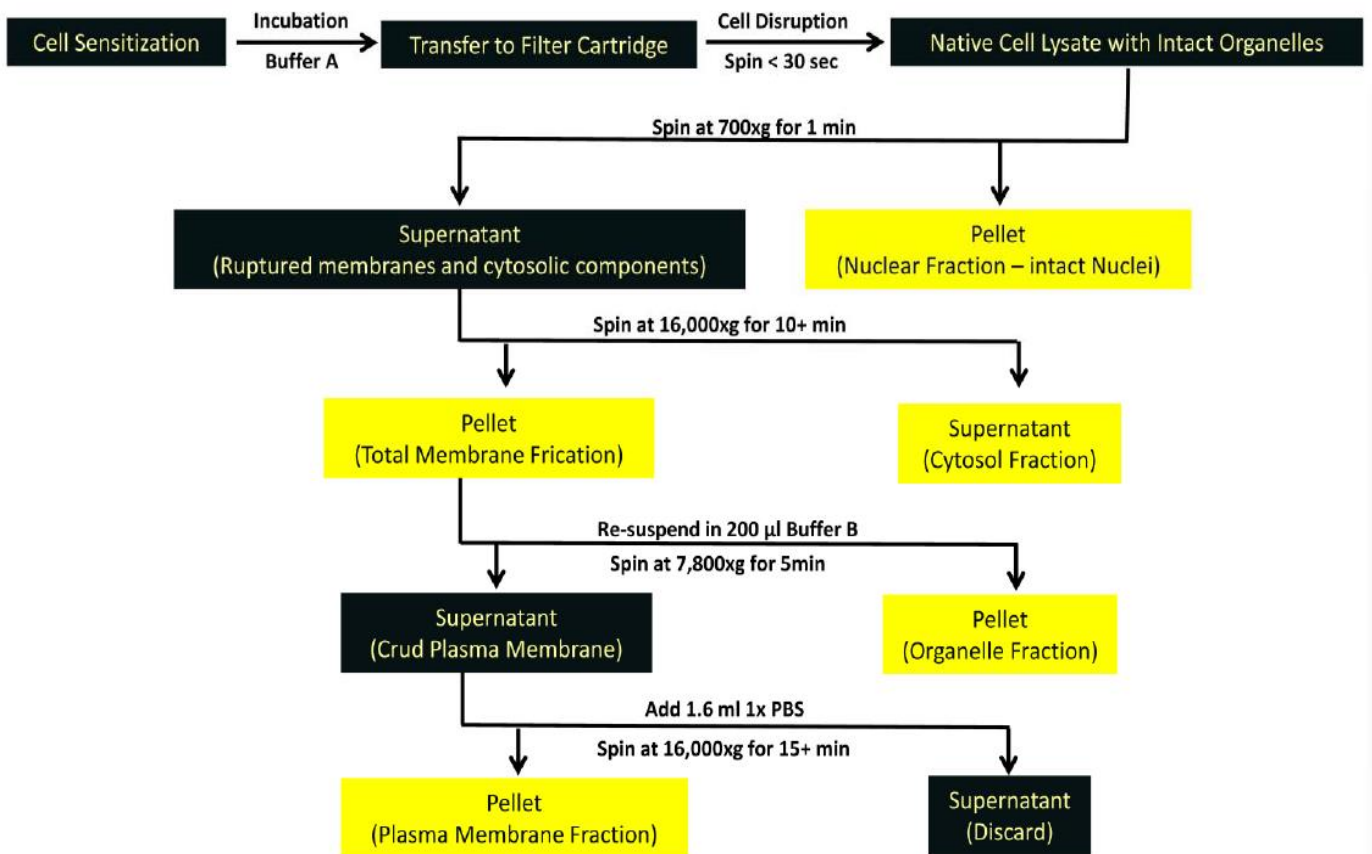
1XPBS，涡旋震荡仪，台式离心机（可在 10S 内达到 16,000 X g）

重要产品信息：

1. 仔细阅读整个操作说明。将缓冲液 A 和缓冲液 B 完全解冻后翻转几次摇匀，放置于冰上。将离心管柱套入接收管中成为套管，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分装的缓冲液 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，即 1ml 缓冲液 A 添加 10ul 抑制剂）。
4. 推荐使用 BCA 蛋白测定法测定蛋白浓度。
5. 研磨方式请按说明书操作，请勿使用液氮研磨。

操作流程图：

The Workflow



膜组分分离步骤：

A. 总膜组分分离

1. 将离心管柱 (filter cartridges) 套入接收管成为套管，放置于冰上预冷。
2. 细胞样品：
 - 低速离心 (500-600Xg, 5 分钟) 收集 $1-50 \times 10^6$ 个细胞。对于贴壁细胞，请参阅下面的细胞收集技术说明。

注意：如从细胞样品中想获取肉眼可见的质膜组分，建议使用 $20-50 \times 10^6$ 个细胞。

- 用预冷的 PBS (500-600Xg, 5 分钟) 清洗一次细胞。完全去除上清，加入 Buffer A 重悬细胞 (起始细胞数小于 5×10^6 加入 200ul Buffer A, 起始细胞数大于 5×10^6 加入 500ul Buffer A)。冰上孵育 5-10 分钟。**涡旋大力震荡 10-30 秒，确保重悬细胞。**迅速将细胞悬液转入离心管柱套管中。接转步骤 3.

组织样品：

- 将新鲜组织 (10-30mg) 或冷冻组织 (20-30mg) 放置于离心管柱套管上。加入 200ul Buffer A, 用塑料棒反复向下按压扭转研磨组织 1 分钟。

(注意：如果样品是肌肉组织或结缔组织较多的难研磨样品，建议研磨前在离心管柱中加入 100-120mg 组织分离粉)。

- 再加入 300ul Buffer A 到离心管柱中，用移液器上下吹打混匀样品，开盖冰上孵育 5 分钟。
接转步骤 3.

注意：存在少量的非均质组织不会影响样品的质量。塑料棒可重复使用，清洁时，用 75% 酒精擦拭或用蒸馏水冲洗干净。

3. 盖上盖子，**16,000Xg，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膜组分得率)

可选优化：细胞样品建议第 3 步完成后用移液器重悬接收管中的沉淀，再转移回同一个离心管柱

中，16,000Xg 再次离心 30 秒，重复过柱步骤可以增加 20-30%产量。

4. 弃去离心管柱，涡旋大力震荡 10 秒重悬接收管中的沉淀物。

以下步骤将细胞分为四个组分：细胞核、细胞浆、细胞器和质膜。

5. 700Xg，离心 1 分钟（**沉淀是完整的细胞核和极少部分未破碎的完整细胞，如需要可保存**）。将上清转移到一个新的 1.5ml 离心管中，4°C，16,000Xg 离心 10-30 分钟（延长离心时间可以增加产量），弃去上清（**上清为胞浆组份，如需要可保存**），保存沉淀（**沉淀为总膜组份，包括细胞器和质膜**）。如果不需要将细胞器和质膜分离为两部分，做到此步骤收集总膜即可。总膜产量一般为 10-500ug/样品。可将总膜沉淀存储于-70°C或者根据下游实验选择溶解液溶解。如果需要分离到质膜，请不要冷冻总膜组份。继续第 6 步骤分离质膜。

B.质膜组分分离

6. 加入 200ul Buffer B 用吸头反复吹打或涡旋震荡重悬第 5 步得到的总膜组份。4°C，7,800Xg，离心 5 分钟（注意：如果最终质膜组份中含有细胞器膜污染，此步骤离心时间最多可增加到 20 分钟提高纯度，第一次使用建议按照说明书操作，无需调整离心时间）。**沉淀部分为细胞器，如需要可保存。**

7. 小心地将上清液转移到新的 **2.0ml 离心管中**，加入 1.6ml 预冷的 PBS 翻转几次混匀（**此步 1.6ml PBS 不可减量**）。16,000Xg，离心 30 分钟（延长离心时间可以提高最终产量）。弃去上清液，保存沉淀（**沉淀为质膜组分**）。质膜产量一般为 10-300ug/样品。质膜沉淀可以根据下游实验需求用 20-200ul 含表面活性剂的缓冲液溶解。做蛋白相关实验推荐使用下表中 Minute™ 系列溶解液溶解膜组分。做等电聚焦（2D 凝胶第一维）我们建议使用：7M 尿素/2M 硫脲/2%Chaps 和 20mM DTT（使用前将 DTT 加入以上混合液中）。

***膜蛋白属难溶蛋白，一般裂解液对其溶解效率较低，建议购买配套溶解液。**

推荐按照下游实验应用选购以下蛋白溶解液溶解膜蛋白

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

技术说明:

1. 贴壁细胞可以使用胰酶消化后, 如步骤 2 中进行清洗。如担心胰酶消化对膜蛋白造成影响, 可以使用细胞刮刀进行收集。收集的细胞需要用移液器反复吹打以到达良好的分散效果。有时贴壁细胞很难得到准确的细胞计数。在这种情况下, 可通过低速离心 (500-600Xg, 5 分钟) 在 1.5ml 离心管中收集并清洗细胞, 并用同样的 1.5ml 离心管中加入 40ul 水进行体积的比较。推荐使用湿体积大概 40ul 的细胞样品作为质膜分离的起始原料。
2. 缓冲液 A 可能导致某些细胞类型的细胞裂解, 例如 Jurkat 细胞, 并堵塞离心管柱。这个问题可以通过用 1X PBS 以 1: 1 稀释缓冲液 A 来解决。
3. 如果使用 Western blotting 检测质膜富集效果, 需要同时检测具有相同蛋白上样量的总蛋白作为阳性对照。我们推荐使用 Na⁺/K⁺-ATPase (Cat# IN-SM005AB) 作为质膜内参, 并使用 Minute™ Total Protein Extraction Kit (Cat# SD-001/SN-002) 进行总蛋白提取, 进行无偏差检测。

关于分离出的质膜蛋白评价

许多研究人员利用 WB 对分离的膜蛋白进行纯度检测。一些常用的“胞浆内参”不仅仅存在于胞浆。例如 actin(1), GAPDH (2) 和 tubulin (3) 主要存在于胞浆但是他们存在于质膜中。所以在某些细胞和组织的膜蛋白中可以检测到这些内参的弱信号不足为奇。更多相关信息, 请参阅以下出版物:

- (1). Gruenstein E., et al. (1975). Actin associated with membranes from 3T3 mouse fibroblast and Hela cells. Journal of cell Biology. 64:223-234.
- (2). Terrasse R., et al. (2012). Human and pneumococcal cell surface glyceraldehydes -3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) proteins are both ligands of human C1q protein. J. Biol. Chem. 287:42620-42633.
- (3). Wolff J. (2009). Plasma membrane tubulin. Biochemica et BiophysicaActa. (BBA)-Biomembranes 1788:1415-1433.

常见问题

问题	解决方案
低蛋白产量	增加起始细胞/组织的样品量 增加第 2 步孵育时间到 10 分钟
低蛋白活性	保证裂解物低温/添加蛋白酶抑制剂
离心 30 秒后离心管柱中还存留细胞裂解物	减少起始细胞/组织的数量或增加离心时间到 2 分钟
质膜组分中有胞浆蛋白污染	用 0.5ml 预冷的 PBS (含 0.3M NaCl, pH9.5) 清洗质膜沉淀

更多信息和活动请扫描
二维码关注官方公众号

