

Minute™ 哺乳动物红细胞膜分离试剂盒

目录号:RP-057

描述:

红细胞 (RBC) 是循环系统的重要组成部分,负责将氧气和二氧化碳输送到全身。了解红细胞膜的表面组成,特别是多样化蛋白质微阵列的研究,对于血液生物学和疾病的研究至关重要。本试剂盒提供了一种快速有效的方法用于从红细胞中分离天然质膜 (PM) 囊泡及相关膜蛋白。本试剂盒利用差速离心和特制的蛋白质提取粉温和地裂解红细胞,同时富集质膜组分。本方法不使用去污剂,保留了膜蛋白的天然构象,有利于膜相关蛋白的下游研究。整个操作可在约 1 小时内完成,即可获得高度富集的质膜,并最大限度地减少红细胞内成分如血影蛋白和血红蛋白对质膜的污染。

试剂盒组分(20 preps):

- | | |
|---------------|------|
| 1. Buffer A | 30ml |
| 2. Buffer B | 30ml |
| 3. 蛋白提取粉 | 5.0g |
| 4. 锥形研磨杵 | 2 个 |
| 5. 1.5 ml 离心管 | 20 个 |

运输与储存: 4°C运输, 4°C储存。

附加材料: 台式离心机, 1XPBS

重要产品信息：

在质膜分离之前，推荐将蛋白酶抑制剂添加到分装的缓冲液 A 中。研究蛋白质磷酸化时，需在缓冲液 A 中添加磷酸酶抑制剂（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，即 1ml 缓冲液中添加 10ul 抑制剂）。获得的蛋白推荐使用 BCA 法测定蛋白质浓度。可以使用抗凝的全血作为起始材料，但是更建议使用纯化的红细胞或者是去除了白细胞和血小板的样品作为起始材料。

操作步骤：

1. 在**试剂盒提供**的 1.5ml 离心管中，4°C，2000X g 离心 3 分钟收集红细胞沉淀。红细胞沉淀的湿体积大小应在 50-150 μ l 范围内。推荐使用 100 μ l 沉淀作为起始材料为宜，最多不要超过 150 μ l。
2. 用 1 ml 预冷的 1X PBS 上下吹打清洗红细胞沉淀，4°C，2,000 X g 离心 3 分钟，完全除去上清液。
3. 向沉淀中加入 50 μ l 缓冲液 A，吹打重悬沉淀，然后加入 100-120 mg 蛋白质提取粉末至管底部。用锥形研磨杵按压沉淀来回扭转研磨 200-300 次，大约需要 3 分钟。此步骤用于裂解红细胞。
4. 向管中加入 0.4 ml 缓冲液 A，继续扭转研磨约 1 分钟。再次加入 0.4 ml 缓冲液 A（两次共加入 0.8 ml），盖上管盖，并剧烈涡旋震荡 20 秒混匀。冰上孵育 10 分钟让蛋白提取粉沉到底部。（注：研磨杵可重复使用，清洁时只需用 ddH₂O 冲洗干净，用纸巾擦干即可）。
5. 将管 100 X g（约 1000 rpm），4°C，离心 3 分钟，此步是为了去除蛋白质提取粉末。将上清液转移至新的自备预冷 1.5ml 离心管中，不要扰动白色沉淀。
6. 将离心管 16,000 X g，4°C，离心 20-30 分钟，沉淀是**粗提质膜**。去除上清液，不要扰动粉红色沉淀（上清即是**胞质组分**，如需要可以保存）。
7. 向沉淀中加入 0.5 ml 缓冲液 A 和 0.5 ml 缓冲液 B，用移液器上下吹打 20-30 次重悬沉淀。盖上管盖并剧烈涡旋震荡 20 秒，然后 4°C，16,000 X g 离心 10 分钟，完全去除上清液。
8. 加入 1 ml 缓冲液 B 用移液器上下吹打将沉淀重悬，在冰上孵育 5-10 分钟，然后 4°C，16,000 X g 离心

10 分钟。这步是为了清洗粗提的质膜。(此步也可将 1ml 缓冲液 B 分为 0.5 ml 清洗两次, 可以得到更纯净的质膜)。

9. 洗涤后的沉淀是不溶于水的**质膜组分**。根据不同下游实验可将沉淀溶解于 50-150 μ l 含去污剂的溶解液中(建议参见下表)。通常 100 μ l 起始材料, 预计可产生 40-60 ug 膜蛋白。

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

技术要点:

1. 蛋白提取粉的用量应根据起始红细胞沉淀体积按比例调整。
2. 对于起始样品在 50-100 μ l 之间的红细胞沉淀, 我们建议使用 100 mg 蛋白提取粉, 起始体积超过 100 μ l 时加入 150 mg 研磨粉, 以确保样品量不同条件下获得最佳蛋白质提取效率。
3. 缓冲液 A 是用于裂解红细胞的低渗缓冲液, 缓冲液 B 是用于去除红细胞质膜与非特异结合蛋白的洗涤缓冲液, 通过洗涤有助于去除不需要的质膜污染物。
4. 本试剂盒仅适用于哺乳动物红细胞, 不适用于非哺乳动物红细胞。
5. 分离的质膜溶解后可直接用于 WB 分析, 然后, 对于 ELISA 和免疫沉淀等应用, 因步骤 8 沉淀中含有残留的缓冲液 B, 可能会干扰这些实验的测定, 推荐使用 0.5ml PBS 洗一次, PBS 清洗可有效去除残留的缓冲液 B 提高检测性能。

更多信息和活动请扫描二维码关注官方公众号

