

# 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（ER）是一种重要的膜结构，其连接核膜和质膜，在真核细胞蛋白质运输的胞外途径中起关键作用。在细胞质中合成的蛋白质被定向运送到内质网，囊泡再从内质网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速离心，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 20 世纪 70 年代开发的方法。与这些传统方法不同，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(20 Preps):

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, 涡旋振荡器, 台式离心机 (**10s 内可以升速至 16,000X g**)

**运输储存：** 常温运输，4 度储存。

## 重要产品信息：

1. 操作前请仔细阅读整个操作说明。将离心管柱插入接收管形成套管放置于冰上预冷。
2. **离心机请调整成离心力 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. 涉及蛋白磷酸化的研究，务必在使用前将磷酸酶抑制剂加入缓冲液 A 中。如果担心蛋白质降解，可以在使用前在缓冲液 A 中加入蛋白酶抑制剂（请按照蛋白酶或磷酸酶抑制剂母液比例添加，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。** 分离的 ER 的产率和纯度可能会根据特定的细胞/组织类型和所用起始材料的量有所变化。可以通过优化以实现最佳结果（具体优化方案见下面的技术说明）。

## 操作方法：

**注：使用前将缓冲液 D 恢复室温，并摇匀再使用。**

1. 将离心管柱套入接收管中形成套管放在冰上预冷。
2. **培养的细胞样品：** 500-600X g 收集 25-35 X 10<sup>6</sup> 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。涡旋振荡器剧烈涡旋 20-30s，并迅速将细胞悬液转移至离心管柱上，转接步骤 3。

**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，加入 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 3。（注：塑料研磨棒可重复使用，用 70% 酒精擦拭或用

蒸馏水冲洗干净。)

3. 盖上盖子,上下颠倒套管混匀几次,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)
4. 弃去离心管柱,涡旋震荡 10s 完全重悬沉淀,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)。
5. 将所有上清转移至一个新的 1.5ml 离心管中(如样品含有油脂尽量避免吸取到油脂,特别是对于肝脏组织),8,000X g, 4°C离心 10min。离心完毕,小心地吸取 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。
6. 将 40 ul 缓冲液 B 添加到 400μl 上清液的离心管中。涡旋振荡混匀(缓冲液 B 与上清的比例为 1:10)。在 4 度,孵育 20-30min。
7. 8,000X g, 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,需用移液器仔细吹打管壁,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。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,振荡混匀(按照上清液体积和缓冲液 D 体积 1:1), 4 度孵育 20min。
8. 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。
9. 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°C。

**推荐按照下游实验应用选购以下蛋白溶解液溶解内质网**

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:

- 通常情况下, 糙面内质网沉淀在第 7 步 8,000X g 离心后是肉眼可见的。然而对于某些细胞类型, 内质网沉淀可能不太明显, 看起来是透明的。如果出现这种情况, 可以将第 6 步孵育的时间延长至 1h, 并将第 7 步离心力提升至 10,000Xg。即使这样沉淀仍然不明显, 可以假设内质网沉淀存在继续完成后续操作步骤。
- 如果使用培养细胞为样品富集内质网产量低于 20ug, 可以考虑增加细胞数量至  $5 \times 10^7$ 。按照第 2 步骤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°C 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。用试剂盒中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 3 步骤的操作。
- 为了评估分离的 ER 的产率和纯度, 我们建议使用 ER 特异性抗体如 calreticulin 在 Western 印迹 (WB) 中将其与总细胞/组织裂解物进行比较, 检测中需确保 SDS-PAGE 中的蛋白质上样量相等。我们还建议用丽春红对转移后的印迹膜进行染色, 以测定蛋白质载量是否有显著变化。
- ER 的产率主要受两个因素的影响: A.起始材料的用量和 B.细胞膜破碎的效率。细胞膜破碎的效率可以通过在细胞通过离心管柱之前和之后用台盼蓝对细胞进行染色判断。细胞通过离心管柱前细胞存活率应高于 90%, 细胞通过离心管柱后细胞存活率应低于 30%。
- ER 富集的程度取决于样品类型。众所周知, 细胞内的膜结构是相互连接的, 某些细胞浆标蛋白标志物, 如 actin 和 tubulin 也可以与细胞器缔合。因此, 在分离的 ER 组分中检测到这些蛋白质并不意外。

6. 如果分离的 ER 组分没有检测出 ER 标志物的富集，则需要在 WB 实验中对如下组分进行检测：总细胞裂解物、步骤 5 的上清和步骤 7 在 8,000 X g 离心后的上清液、步骤 7 中添加缓冲液 C 离心后的沉淀，以及步骤 8 最终分离的 ER 沉淀。从这些检测中获得的结果可以为优化操作提供见解。

更多信息和活动请扫描  
二维码关注官方公众号

