

# Minute™ 内体及细胞组分分离试剂盒

目录号:ED-028

## 描述:

初级内体（EE）是次级成熟内体的起点，初级内体主要是由内吞的囊泡相互融合形成。初级内体不仅仅通过网格蛋白介导的信号通路接受胞吞物，还有其他许多通路。胞吞机制除了在维持正常细胞生理中起到重要作用，还在阿尔兹海默病和遗传性溶酶体储积症等许多疾病中发挥了很大作用。传统分离内体的方法是采用密度梯度超速离心法，需要大量起始原材料，方法繁琐费时。Minute™ 内体分离试剂盒基于离心管柱法，快速简单，仅需要少量的培养细胞或者毫克级的组织样品。本试剂盒可以从培养的细胞和组织样品中大量沉淀富集初级内体，有助于该领域的研究。

## 试剂盒组分(20 preps):

- |          |       |
|----------|-------|
| 1. 缓冲液 A | 15ml  |
| 2. 缓冲液 B | 15ml  |
| 3. 塑料研磨棒 | 2 根   |
| 4. 离心管柱  | 20 个  |
| 5. 收集管   | 20 个  |
| 6. 组织分离粉 | 2.5 克 |

## 所需附加材料:

1XPBS, 涡旋振荡仪, 台式离心机

## 储存:

常温运输, 4°C 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. 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。(各类抑制剂的添加方法请按照抑制剂母液比例, 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)。
4. 推荐使用 BCA 法测定蛋白浓度。

## 操作方法:

1. 将离心管柱及接收管套管放在冰上预冷。
  2. 培养的细胞样品。低速离心 (500-600Xg, 5min) 收集 10-30 x10<sup>6</sup> 细胞, 接第 3a 步。组织样品接第 3b 步。
  - 3a. 用预冷的 PBS 清洗细胞一次, 完全去除上清, 加 500ul 缓冲液 A 将细胞重悬, 并放置于冰上孵育 5-10min, 大力涡旋振荡 10-30s, 立即将细胞悬液转移至离心管柱套管中, 接第 4 步。
  - 3b. 组织样品。将 10-20mg 组织样品 (新鲜或冷冻) 放置于离心管柱套管上, 加入 200ul 缓冲液 A, 用塑料研磨棒反复向下挤压扭转研磨 1min。(注: 如果样品是骨骼肌或心肌, 建议在研磨前添加 100mg 组织分离粉到离心管柱上)。再加入 300ul 缓冲液 A 到离心柱中, 用移液器上下吹打几次, 开盖冰上孵育 5min, 接第 4 步。
- 注意: 一些未均质组织的存在不会影响样品的质量。塑料研磨棒可以重复使用, 用 70% 的酒精清洗即可。**
4. 盖上盖子, 16,000Xg 离心 30s (建议使用可在 10s 内升至 16,000Xg 的台式离心机)。离心后可将接收管中的样品重悬, 吸回离心管柱中, 再过一次柱子以增加最终内体的产量。

5. 弃去离心管柱，将收集管的液体涡旋振荡混匀 10s，700Xg 离心 2-3min（沉淀为完整的细胞核和一些未破裂的细胞）。
6. 将上清转移至一个新的 1.5ml 离心管中，16,000Xg，4°C，离心 30-60min（延长离心时间可以提高纯度）。离心后，再次将上清转移至一个新的 1.5ml 离心管中（沉淀为大的细胞器和质膜）。
7. 估算管中溶液体积，加入一半体积的缓冲液 B，振荡混匀（即缓冲液 B 与样品的比例为 1：2）。4°C 孵育 1h 或过夜（延长孵育时间可以增加产量）。缓冲液 B 与样品的比例，可以根据内体的最终得率在 0.25:1-1:1 的范围内调节（首次实验不建议调整）。
8. 10,000Xg，4°C，离心 30min，弃掉上清（上清是胞浆组分，如需要可选择保留），沉淀即是内体。产量通常在 20-100ug 每个样品。内体可以根据下游实验选择合适的溶解液重悬溶解。推荐使用下表中 Minute™ 系列溶解液溶解内体蛋白。

### 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™ 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. 分离出的内体的产率和纯度可能因特定的组织/细胞类型而异。
2. 如果在第 8 步 10,000 X g 离心后没有沉淀物，将起始材料加倍，并在第 4 步将细胞过离心管柱两次。
3. 缓冲液 B 与上清液的比例可以根据最终结果进行调整。如果产率低，将比例提高到 1:1；如果细胞质蛋白污染过多，则降低该比例。
4. 为了评估分离出的内体的产率和纯度，我们建议在 Western blotting（WB）中使用针对内体的特异性抗

体, 如 EEA1, 将其与总细胞/组织裂解物进行比较, 并确保在 SDS-PAGE 中总蛋白与内体蛋白等量上样。转膜后用丽春红染色可以了解有关蛋白质上样量的信息。

5. 分离出的内体沉淀不溶于水, 必须溶解在含去污剂的缓冲液中以进行蛋白质定量。如果使用 WA-009 (见上表) 仍不能有效溶解沉淀物, 可在 WA-009 中添加 SDS 到 0.4% 的最终浓度, 并增加蛋白质溶解试剂的体积。

6. 缓冲液 B 含有聚乙二醇 (PEG), 可能干扰质谱分析, 需要在分析前将其去除 (参考文献: Zhao C, O'Connor PB. Removal of polyethylene glycols from protein samples using titanium dioxide. Anal Biochem. 2007 Jun 15;365(2):283-5)。

更多信息和活动请扫描  
二维码关注官方公众号

