

Minute™ 哺乳动物组织及细胞总脂筏分离试剂盒

目录号:LR-039

描述:

脂筏是含有高水平胆固醇和鞘脂的小质膜结构域。脂筏被发现存在于质膜 (PM) 和一些内膜系统中, 如线粒体相关膜 (MAMS) 和内质网等。脂筏参与许多细胞过程, 如信号转导, 膜转运和蛋白质分选。脂质修饰的蛋白质和一些跨膜蛋白质集中在脂筏中, 而其他蛋白质被排除在外。脂筏还被发现与质膜上的 Na^+ / K^+ ATP 酶相关。传统的脂筏分离方法是用蔗糖梯度法或 OptiPrep 密度法, 采用超高速离心法分离, 需要大量的起始样品, 而且该方法繁琐、耗时。为了克服传统方法的缺点, 我们利用离心管柱技术开发了这款简单、快速的脂筏分离试剂盒。首先将样品的总膜 (总膜即质膜 PM 和细胞器膜总和) 组分分离, 然后用含有非离子表面活性剂的缓冲液处理, 最后使用台式离心机差速离心分离出耐表面活性剂的脂筏组分。整个过程无需使用密度梯度和超高速离心, 可以在 90 分钟内从培养的细胞/组织中高度富集脂筏。

注: 如果需要分离质膜脂筏, 请使用 Minute™ 质膜脂筏分离试剂盒 Cat # LR-042。

试剂盒组分(20 preps):

1. 缓冲液 A 15ml
2. 缓冲液 B 10ml
3. 缓冲液 C 10ml
4. 研磨棒 2 个
5. 离心管柱 20 个
6. 收集管 20 个

附加材料: 1X PBS, 振荡器, 台式离心机(10s 内可以达到 16,000Xg)

运输及储存： 常温运输，4 度保存。

重要产品信息：

1. **离心机请调整成离心力 (rcf 或 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。
2. **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。如果担心蛋白降解问题可以分别在缓冲液 A 和 B 中添加蛋白酶抑制剂。**（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，即 1ml 缓冲液中添加 10ul 抑制剂）。
3. 推荐使用 BCA 方法测定蛋白浓度。
4. **研磨方式请按说明书操作，请勿使用液氮或匀浆仪等方式研磨。**

操作步骤：

注意：实验前请将缓冲液 C 恢复至室温，混匀备用。

1. 将离心管柱放入收集管中成为套管，放置在冰上预冷，缓冲液 A 和 B 放在冰上预冷，**但请不要预冷缓冲液 C!**
2. **A.对于培养的细胞**，通过低速离心（500-600Xg，5 分钟）收集 **30-40×10⁶** 个细胞。用预冷 PBS 洗涤细胞一次。完全除去上清液，加入 500μl 缓冲液 A 将沉淀重悬。将细胞悬液在冰上孵育 5 分钟后，**大力涡旋震荡 10-30 秒**。立即将细胞悬液转移到离心管柱套管中。转接第 3 步。
B.对于柔软组织样本，将 30-40 mg 组织（新鲜或冷冻）放入离心管柱中。将 200μl 缓冲液 A 加入离心管柱中，用塑料棒反复向下按压扭转研磨组织 2-3 分钟。研磨后，再次加入 300μl 缓冲液 A。转接第 3 步。
对于肌肉组织，需将组织放在干净的玻璃或塑料板的表面上，用锋利的刀片将组织切成组织匀浆状。再将组织转移到离心管柱套管中，并如上所述进行研磨。

***塑料棒是可重复使用的，用 70%酒精或水清洗干净即可。**

3. 盖上离心管柱，翻转倒置混匀几次，然后 16,000 X g 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最终得率)

4. 弃去离心管柱，大力涡旋震荡 10 秒钟重悬沉淀。1,000Xg 离心 5 分钟 **(沉淀物包含细胞核，大细胞碎片和一些未破裂的细胞)**。
5. 将所有上清液转移到新的 1.5ml 离心管中，16,000Xg，4°C，离心 30 分钟。沉淀是**总膜**。小心地将所有上清液 **(胞浆部分)** 弃掉 **(如需检测胞浆组分，转移到新的 1.5ml 管中保存使用)**。
6. 沉淀中加入 500µl 预冷缓冲液 B 重复吹打 20-30 次重悬沉淀，然后大力涡旋震荡 10 秒。立刻在冰上孵育 30 分钟，期间每隔 10 分钟涡旋震荡一次，并立即将管子放回冰上，使其始终保持冷却。
7. 将离心管 15,000X g 离心 10 分钟。将上清液转移到新的 1.5ml 离心管中，向管中加入 0.5ml 缓冲液 C 并通过短暂涡旋震荡充分混合 **(管中的溶液变得混浊)**。将管在冰上孵育 2 分钟。10,000X g 离心 10 分钟离心后，脂筏漂浮在管的顶部。
8. 将一个细的吸管头 (如 SDS-PAGE 样品加样针) 插到移液器上，插入管子底部，缓慢并完全地去除水相。或者也可以使用配备 21 号针头的 2 毫升注射器。去除水相后，脂筏会粘附在离心管壁上。
9. 将离心管 15,000X g 离心 5min，使脂筏离心到管底部，完全去除残留液。小心地加入 1ml 预冷的 ddH₂O 不要触动沉淀，然后完全弃去上清 (详见下文技术要点)。这个沉淀即是分离的**脂筏**，沉淀可使用 50-200µl 以下推荐的溶解液重悬用于实验，也可根据下游应用选择适合的其他溶解液。根据细胞/组织类型不同，最终蛋白质产量在 30-100 µg/样品范围内。

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
Minute™高效蛋白沉淀剂 (30ml)	WA-006	沉淀非脂筏蛋白 (详见技术要点)

技术要点:

1. 在第 9 步中用水冲洗沉淀是为了去除可能干扰下游应用的残留缓冲液成分，如 SDS-PAGE 和 Western blotting。通常这样处理足以减少干扰。
2. 如果还是不满意，可以用 100-200ul 的 WA-009 变性蛋白溶解液（见上表）重悬脂筏沉淀，再用脱盐柱进一步去除干扰。
3. 还可以将溶好的脂筏溶液在冷水中透析（如 10K Slide-A-Lyzer 迷你透析装置）。
4. 第 8 步得到的液相组分是非脂筏蛋白组分，由于其含有干扰组分，不能直接用于 WB 检测。如需非脂筏蛋白可以使用 Minute™ 高效蛋白沉淀剂(Cat#WA-006)从液相组分中将蛋白沉淀出来进行 WB 检测。如果使用 WA-006，请注意一下操作细节：取 600-800ul 液体组分到 1.5ml 离心管里，按照 WA-006 的标准流程操作。全部孵育均需在冰上操作，去除上清液时需用移液器吸取而不要直接倾倒。洗涤缓冲液添加到含有沉淀蛋白质的管中，洗涤缓冲液出现浅灰白色颜色(这是正常现象)。但需确保洗涤后蛋白沉淀在管底部。
5. 使用 SDS-PAGE 和 WB 测定脂筏的富集程度时，使用总蛋白作为对照非常重要，且需等量上样。
6. 如果在最终的脂筏组分中 flotillin 等脂筏标志物条带较弱或检测不到时，可将步骤 6 加入缓冲液 B 后的孵育时间从 30 分钟减少至 15 分钟，或用 ddH₂O 稀释缓冲液 B（8 份缓冲液 B+2 份 ddH₂O）。
7. 缓冲液 B 含有曲拉通 X-100，需要在质谱分析之前将其去除。

(<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/Application-Notes/TR0019-Remove-detergent.pdf>).

更多信息和活动请扫描
二维码关注官方公众号

