

Minute™ 质膜脂筏分离试剂盒

目录号:LR-042

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从总膜结构中分离出脂筏, 而不能将质膜来源和细胞器膜来源的脂筏分离。为了克服传统方法的缺点, 我们开发了此款基于离心管柱技术的质膜脂筏分离试剂盒。首先较大的质膜囊泡被分离出来, 然后使用含有非离子表面活性剂缓冲液处理, 最后通过台式离心机差速离心分离质膜脂筏部分。不使用传统的匀浆机和超速离心机, 1h 左右即可高度富集质膜脂筏。

***如需分离总的脂筏, 请使用 Minute™ 总脂筏分离试剂盒 Cat#LR-039**

试剂盒组分(20 preps):

1. Buffer A 15ml
2. Buffer B 10ml
3. Buffer C 10ml
4. 研磨棒 2 个
5. 离心管柱+收集管 20 套

附加材料:

1xPBS, 振荡器, 台式高速离心机(10s 内可以达到 16,000X g)

上样吸头或配有 21 号针头的 2ml 注射器

运输及储存： 常温运输，4 度保存。

重要产品信息：

- 1.所有离心步骤应在 4°C 室温下或冷冻离心机中进行。
- 2.研究蛋白质磷酸化，在使用前应在缓冲液 A 中加入磷酸酶抑制剂。如果蛋白质降解可能会导致下游实验问题，在使用前加入蛋白酶抑制剂在缓冲 A 和 B 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）。
- 3.推荐使用 BCA 试剂盒测定蛋白质浓度。

操作步骤：

注：室温孵育 buffer C，使用前混匀。

1. 将离心管柱放入收集管中形成套管，放在冰上孵育。使用前在冰上预冷冻缓冲液 A 和 B，**不要预冷缓冲液 C!**
2. **A.培养的细胞样品**，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。将细胞混悬液在冰上孵育 5 分钟。大力涡旋震荡 10-30 秒，立即将细胞混悬液转移到离心管柱套管中。转接第 3 步。
B. 柔软的组织样本，将 40-50 mg 组织（新鲜或冷冻）放入离心管柱套管中，将 200μl 缓冲液 A 加入离心管柱中，用塑料棒向下按压扭转反复研磨组织 2-3 分钟。研磨后，再次加入 300μl 缓冲液。转接第 3 步。
肌肉组织样品，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。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。**

3. 盖上离心管柱，翻转倒置混匀几次，然后 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最终得率。**

(可选优化：细胞样品过柱之后，可以将接收管内液体混匀重悬，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，盖上盖子，大力涡旋震荡 10 秒钟重悬沉淀。1,900Xg 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，3,000Xg，4°C，离心 15 分钟，小心地将所有上清弃掉。沉淀是分离出的质膜组分（大的质膜囊泡）。

6. 用 400µl 预冷缓冲液 B 移液器吹打 20-30 次将沉淀重悬，在冰上孵育 30 分钟，每 10 分钟短暂涡旋一次，立即将管子放回冰上，使其始终保持冷却。

7. 加 400µl 缓冲液 C 到离心管中，涡旋震荡混匀（溶液会变得浑浊）。将离心管 10,000Xg 离心 5 分钟，离心后，脂筏漂浮在管的顶部。

8. 用移液器配上细的吸头（如 SDS-PAGE 上样吸头）插到管底，缓慢地完全去除水相。或者也可以使用配有 21 号针头的 2 毫升注射器。去除水相后，灰白色的脂筏会附着在离心管壁上。

9. 将离心管 16,000Xg 离心 2min，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，注意不要触动沉淀，然后将水再完全弃去（详见下文技术要点）。这个沉淀即是分离的**质膜脂筏**，沉淀可使用 100-300µl 以下推荐的溶解液重悬用于下游实验，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 30-200 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（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后进行 WB 检测。如果使用 WA-006，请注意以下操作细节：取 600-800ul 液相组分到 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.非常重要的一点是，使用 SDS-PAGE 和 WB 测定脂筏的富集程度时，需使用总蛋白作为对照，且等量上样。
- 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

