

Minute™ 动物细胞/组织溶酶体分离试剂盒

目录号:LY-034

描述:

溶酶体是真核细胞中负责清除废物的球形囊泡。溶酶体中含有消化酶，对于分解多余或受损的细胞器、食物颗粒、以及被吞噬的病毒和细菌起着至关重要的作用。溶酶体是相对较大的细胞器，大小从 0.1 到 1.2 μm 不等。分离溶酶体是研究细胞自噬、蛋白质降解和蛋白质再循环重要的第一步。传统的溶酶体分离方法是基于 20 世纪 70 年代开发的技术，需要大量的起始材料和繁琐的过程，严重的交叉污染不可避免。本试剂盒利用离心管柱技术，简单、快速、高效。无需使用杜恩斯匀浆器和超高速离心，即可显著富集天然溶酶体，整个操作耗时不超过 90 分钟。所需的起始细胞/组织的量远小于传统方法。

试剂盒组份 (20 preps):

- | | |
|-------------|------|
| 1. Buffer A | 15ml |
| 2. Buffer B | 2ml |
| 3. 塑料研磨棒 | 2 个 |
| 4. 离心管柱 | 20 个 |
| 5. 接收管 | 20 个 |

所需附加材料:

1XPBS, 涡旋振荡器, 台式离心机 (10s 内离心力可达 16,000X g)

运输及储存:

常温运输, 4 $^{\circ}\text{C}$ 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 (Filter Cartridges) 套入接收管成为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. **对于蛋白磷酸化研究，磷酸酶抑制剂务必在使用前加入缓冲液 A 中。如果担心蛋白质降解，使用前可在 Buffer A 和 Buffer 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)
4. 推荐使用 BCA 法进行蛋白浓度测定。
5. 请注意，分离的溶酶体产量和纯度可能因具体细胞/组织类型和所用起始样品的量而异。您可能需要优化操作以获得最佳结果 (具体优化操作请参阅下面的技术说明)。

操作步骤：

1. 将离心管柱 (Filter Cartridges) 套入接收管成为套管放置于冰上预冷。
2. **细胞样品**，低速离心 (500-600X g, 5 分钟) 收集 25-30×10⁶ 个细胞。用预冷的 PBS 清洗细胞一次，完全去除上清，加入 500μl Buffer A 重悬细胞沉淀，在冰上孵育 5-10 分钟，用涡旋振荡器大力**涡旋振荡 10-30 秒**。迅速将细胞悬液转入离心管柱套管中。转接步骤 3。
组织样品，将 20-30mg 组织 (新鲜或冷冻) 放置于离心管柱套管中。加入 200μl Buffer A，用塑料棒向下按压反复扭转研磨组织 1 分钟。研磨后再向离心管柱中加入 300μl Buffer A，用移液器上下吹打混匀，**开盖**在冰上孵育 5 分钟。转接步骤 3。
注意：塑料棒是重复使用的，可以用 70% 的酒精或者水清洗。
3. 盖上盖子，翻转管体几次混匀，16,000X g，离心 30 秒。**(此步骤需离心机在 10S 内到达 16,000Xg，否则可能影响得率)**

(可选优化：细胞样品过柱之后，可以再次重悬接收管中沉淀，转移回同个离心管柱中再次过柱增加产量)

4. 弃去离心管柱，剧烈涡旋振荡 10S 重悬接收管中沉淀，2,000X g，离心 3min。**沉淀包含细胞核，大的细胞碎片和一些未破碎的细胞。**
5. 将所有上清转移到新的 1.5ml 离心管中，4°C，11,000X g，离心 15min。**此步所得沉淀主要包含线粒体和细胞碎片。**小心将 400ul 上清转移至一个新的 1.5ml 离心管中，16,000Xg，4°C，离心 30min，完全去除上清。
6. 加入 200ul 预冷的 Buffer A,用吸头反复吹打 60-100 次重悬沉淀后，剧烈涡旋振荡 20s 混匀。2,000X g，4°C，离心 4min。小心地将上清转移至一个新的 1.5ml 离心管中，加入 100ul Buffer B,短暂涡旋振荡混匀（注意：此处上清和 Buffer B 的比例是 2：1）。在冰上孵育 30min，11,000X g，离心 10min，将上清完全去除干净。将管子再次 11,000X g 离心几秒钟，去除残留液体。
7. **沉淀为高度富集的溶酶体组分**，可根据下游应用使用 50-150ul 溶解液或适合的溶液重悬沉淀（见下表格）。
推荐根据下游实验从下表中选择合适的 Minute™ 系列溶解液溶解溶酶体。

推荐按照下游实验应用选购以下蛋白溶解液溶解溶酶体蛋白

| 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 |

技术说明：

1. 样品的产量范围一般为 50-100ug/样品。如果产率低于此范围，则考虑增加样品的起始量。如果在步骤 6，11,000X g 离心后没有可见沉淀，则可分别检测步骤 5 中 11,000X g 离心后的上清和沉淀中是否存在溶酶体。如果在步骤 5 的沉淀中可以检出大量溶酶体，则可将步骤 5 中的离心力由 11,000X g 降低至 8,000X g-10,000X g。

2. 分离的溶酶体沉淀是非水溶性的，必须溶解在含有去垢剂（表面活性剂）的缓冲液中以进行蛋白质定量。如果使用 WA-009 不能有效溶解沉淀（见上表），则向 WA-009 中加入 SDS 至终浓度达到 0.4%，并增加 WA-009 的使用体积。Buffer B 中的某些成分可能会干扰质谱分析，应在胰蛋白酶消化后去除。
3. 为了评估分离的溶酶体的产率和纯度，我们建议使用溶酶体标志物如 Lamp 1/Lamp 2 具有特异性的抗体，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 中的蛋白质加载量相等，可用丽春红染色转移后的印迹膜，以对蛋白质加载量是否有显著变化进行了解。
4. 溶酶体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，某些胞浆蛋白标志物，如 actin 和 tubulin，也可能与细胞器相关。因此，在分离的溶酶体级分中检测到这些蛋白质并不意外。
5. 溶酶体的产量主要取决于两个因素：一是起始样品的量，二是细胞膜破裂的效率。在细胞通过离心管柱前后用台盼蓝染色，可以很容易地评估细胞膜的破裂效率。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%。如果细胞破裂效率低，解决方案是将细胞重新悬浮在 Buffer A 中，并在 -80°C 下反复冻融两次，然后继续按照标准流程操作。
6. 缓冲液 B 含有 PEG，可能会干扰质谱分析，需要在分析前去除（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

