

Minute™ 植物内质网富集试剂盒

目录号:PR-048

描述:

植物内质网 (ER) 的分离和富集对于阐明 ER 相关细胞功能至关重要。传统的 ER 分离方法既繁琐又费时。在动物细胞中, ER 与微管紧密相连和高尔基体聚集在微管组织中心。在植物细胞中内质网与肌动蛋白微丝相连, 在细胞核附近未发现微管组织中心。由于植物 ER 的结构特性, 分离/富集植物内质网 ER 比动物样品更难。Minute™ 植物内质网 ER 富集试剂盒专为植物样品设计, 可在 1 小时左右从植物叶片样品中富集 1-3 倍的内质网 ER 组分, 且基本不含高尔基体污染, 富集后的 ER 组分可用于植物蛋白质转运研究。

试剂盒组分(20 Preps):

1. 缓冲液 A 20ml
2. 缓冲液 B 1.2ml
3. 缓冲液 C 10ml
4. 塑料研磨棒 2 根
5. 离心管柱 20 个
6. 收集管 20 个

运输储存: 常温运输, 4 度保存。

重要产品信息:

1. 操作前请仔细阅读整个操作说明。缓冲液使用前放置于冰上预冷。
2. 离心机请调整成 RCF/ X 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. 研究蛋白磷酸化，磷酸酶/蛋白酶抑制剂应在使用前加入缓冲液 A 中。（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 A 添加 10ul 抑制剂）。
4. 实验中所需 ddH₂O，需自备。
5. 请勿使用液氮研磨，研磨方式请按说明书进行。

操作方法：

1. 取 200-250mg 新鲜植物叶片或幼苗，将叶片折叠卷起塞入到离心管柱套管中。加入 100ul 缓冲液 A，用 200ul 吸头按压叶片 100-200 次以压缩叶片体积（此步大概需要 2min）。
2. 用试剂盒中研磨棒向下按压扭转研磨 200 次（大约 2-3min）。（注意：研磨棒可重复使用，用 70%酒精擦拭或用蒸馏水冲洗干净，用纸巾擦干即可。）再加入 400ul 缓冲液 A 到离心柱中，用 200ul 吸头将样品吹打混匀。盖上盖子，6,000Xg 离心 5min（这步为去除叶绿体）。弃去离心管柱，将上清转移到新的 1.5ml 离心管中。16,000 X g，离心 15min，小心去除上清。
3. 小心地加入 1.5ml 预冷的 dd H₂O，不要打散沉淀，迅速去除所有液体。
4. 向沉淀中加入预冷 450ul 缓冲液 A 和 50ul 缓冲液 B，用移液器上下吹打（大约 2min）重悬沉淀，大力振荡涡旋 20s，放于冰上孵育 5min。孵育完成后 10,000 X g，离心 10min，离心后将上清转移至新的 1.5ml 离心管中。
5. 再向管中加 500ul 缓冲液 C，混匀后放于冰上孵育 10min。孵育完成后 16,000 X g，离心 10min，将上清弃掉，16,000 X g 再次离心 2min 去除残液，务必将残液去除干净。沉淀即为富集的内质网 ER 组分。
6. 可根据下游实验选择合适的溶解液 100-200ul 将富集的内质网沉淀复溶（蛋白溶解液可根据下表进行选择）。内质网蛋白可以用 BCA 法测定蛋白浓度，通常蛋白得率在 40-80ug 每个样品。

技术说明：

1. 本试剂盒已使用植物叶片样品验证适用性，其他类型样品例如种子和软茎或许亦可适用，但效果可能会因样品而异。
2. 使用叶片样品提取内质网时第 6 步得到的沉淀可能会呈现浅绿色。如果沉淀绿色较重可能是由叶绿体碎片混入导致，可以用 200ul 缓冲液 A 反复吹打，冰上孵育 10min，4,000 X g 离心 5min，保留上清（上清是富集的 ER 组分），弃去绿色沉淀。
3. 经内部研究显示 ER 富集的程度取决于样本类型，通常大部分样品可将内质网 1-3 倍富集，可能有少量高尔基体的交叉污染。
4. 富集后的 ER 含有较高浓度的盐。对于某些应用，如 2D 凝胶分析，需要用凝胶过滤柱或透析除去盐分。

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

更多信息和活动请扫描
二维码关注官方公众号

