

Minute™ 质膜/蛋白和细胞组分分离试剂盒

目录号：SM-005

描述：

Minute™ 质膜和细胞组分分离提取试剂盒不含去垢剂和 EDTA，是新一代天然质膜（PM）和细胞组分分离工具，它去除了使用传统方法中杜恩斯匀浆和密度梯度离心（包括两相分离）相关的不可控变化，提供了卓越的便利性和一致性。

工作原理：

细胞/组织通过 Buffer A 致敏，然后在高速离心下细胞以 Z 字形路径通过离心管柱，这个过程中细胞膜会破裂，分离出完整的核，因此消除了膜组分中细胞核的污染。随后使用常规台式离心机（无需超速离心）进行差速和密度离心，进一步从细胞裂解物（粗膜、完整细胞核、胞浆和细胞器的混合物）中分离质膜。整个过程完成可获得 5 种不同的细胞组分：**细胞核，细胞浆，总膜，细胞器及质膜**。本试剂盒每次实验使用同样起始样品量，设定固定的离心力和离心时间，即可获得一致性良好的结果。整个操作过程约 45 分钟即可完成。

应用：

本试剂盒可以从细胞或者组织样品中快速分离天然膜组分，可应用于 SDS-PAGE，免疫印迹，ELISA，IP，膜蛋白质结构分析，2-D，酶活性测定，纳米材料包裹及其他应用。

试剂盒组份：

50 Preps：

1. 25 ml 缓冲液 A
2. 10 ml 缓冲液 B
3. 50 个离心管柱

4 Preps：

1. 2.0 ml 缓冲液 A
2. 1.0 ml 缓冲液 B
3. 4 个离心管柱

- | | |
|-------------|-------------|
| 4. 50 个收集管 | 4. 4 个收集管 |
| 5. 2 根塑料研磨棒 | 5. 1 根塑料研磨棒 |
| 6. 组织分离粉 | 6. 组织分离粉 |

储存： -20℃储存

所需附加材料：

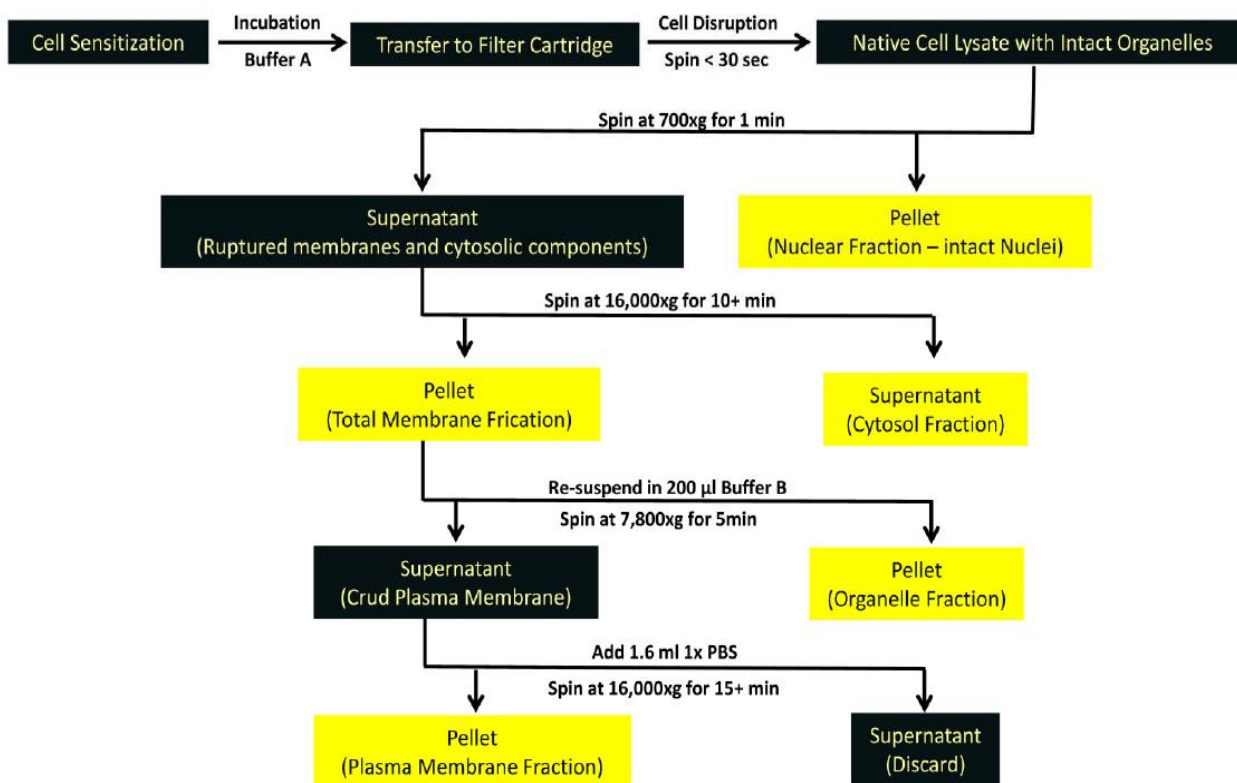
1XPBS，涡旋震荡仪，台式离心机（可在 10S 内达到 16,000 X g）

重要产品信息：

1. 仔细阅读整个操作说明。将缓冲液 A 和缓冲液 B 完全解冻后翻转几次摇匀，放置于冰上。将离心管柱套入接收管中成为套管，放置于冰上预冷。
2. 离心机请调整成 rcf/X g 模式，按照离心力设置离心机，所有离心步骤都需要在 4℃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分装的缓冲液 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（请按照蛋白酶或磷酸酶抑制剂母液比例，例如母液是 100X，添加时按照 1：100 添加，即 1ml 缓冲液 A 添加 10ul 抑制剂）。
4. 推荐使用 BCA 蛋白测定法测定蛋白浓度。
5. 研磨方式请按说明书操作，请勿使用液氮研磨。

操作流程图：

The Workflow



操作步骤：

A. 总膜组分分离

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 $1-50 \times 10^6$ 个细胞。对于贴壁细胞，请参阅下面的细胞收集技术说明。

注意： 如从细胞样品中想获取肉眼可见的质膜组分，建议使用 $20-50 \times 10^6$ 个细胞。

● 用预冷的 PBS（500-600X g，5 分钟）清洗一次细胞。完全去除上清，加入 Buffer A 重悬细胞（起始细胞数小于 5×10^6 加入 200ul Buffer A，起始细胞数大于 5×10^6 加入 500ul Buffer A）。冰上孵育 5-10 分钟。涡旋大力震荡 10-30 秒，确保重悬细胞。迅速将细胞悬液转入离心管柱套管中。接转步骤 3。

组织样品：

●将新鲜组织（10-30mg）或冷冻组织（20-30mg）放置于离心管柱套管上。加入 200ul Buffer A，用塑料棒反复向下按压扭转研磨组织 1 分钟。

（注意：如果样品是肌肉组织或结缔组织较多的难研磨样品，建议研磨前在离心管柱中加入 100-120mg 组织分离粉）。

●再加入 300ul Buffer A 到离心管柱中，用移液器上下吹打混匀样品，开盖冰上孵育 5 分钟。接转步骤 3。

注意：存在少量的非均质组织不会影响样品的质量。塑料棒可重复使用，清洁时，用 75%酒精擦拭或用蒸馏水冲洗干净。

3. 盖上盖子，16,000X 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膜组分得率）

可选优化：细胞样品建议第 3 步完成后用移液器重悬接收管中的沉淀，再转移回同一个离心管柱中，16,000X g 再次离心 30 秒，重复过柱步骤可以增加 20-30%产量。

4. 弃去离心管柱，涡旋大力震荡 10 秒重悬接收管中的沉淀物。

以下步骤将细胞分为四个组分：细胞核、细胞浆、细胞器和质膜。

5. 700X g，离心 1 分钟（沉淀是完整的细胞核和极少部分未破碎的完整细胞，如需要可保存）。将上清转移到一个新的 1.5ml 离心管中，4℃，16,000X g 离心 10-30 分钟（延长离心时间可以增加产量），弃去上清（上清为细胞浆组份，如需要可保存），保存沉淀（沉淀为总膜组份，包括细胞器和质膜）。如果不需要将细胞器和质膜分离为两部分，做到此步骤收集总膜即可。总膜产量一般为 10-500ug/样品。可将总膜沉淀存储于-70℃或者根据下游实验选择溶解液溶解。如果需要分离到质膜，请不要冷冻总膜组份。继续第 6 步骤分离质膜。

B.质膜组分分离

6. 加入 200ul Buffer B 用吸头反复吹打或涡旋震荡重悬第 5 步得到的总膜组份。4℃，7,800X g，离心 5 分钟

（注意：如果最终质膜组份中含有细胞器膜污染，此步骤离心时间最多可增加到 20 分钟提高纯度，第一次使用建议按照说明书操作，无需调整离心时间）。沉淀部分为细胞器，如需要可保存。

7. 小心地将上清液（200ul）转移到新的 **2.0ml 离心管中**，加入 1.6ml 预冷的 PBS 翻转几次混匀**(此步 1.6ml PBS 不可减量)**。16,000X g，离心 30 分钟（延长离心时间可以提高最终产量）。弃去上清液，保存沉淀（**沉淀为质膜组分**）。质膜产量一般为 10-300ug/样品。质膜沉淀可以根据下游实验需求用 20-200ul 含表面活性剂的缓冲液溶解。做蛋白相关实验推荐使用下表中 Minute™ 系列溶解液溶解膜组分。做等电聚焦（2D 凝胶第一维）我们建议使用：7M 尿素/2M 硫脲/2%Chaps 和 20mM DTT (使用前将 DTT 加入以上混合液中)。

***膜蛋白属难溶蛋白，一般裂解液对其溶解效率较低，建议购买配套溶解液。**

推荐按照下游实验应用选购以下蛋白溶解液溶解膜蛋白

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，用生物素标记或氨基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. 贴壁细胞可以使用胰酶消化后，如步骤 2 中进行清洗。如担心胰酶消化对膜蛋白造成影响，可以使用细胞刮刀进行收集。收集的细胞需要用移液器反复吹打以到达良好的分散效果。有时贴壁细胞很难得到准确的细胞计数。在这种情况下，可通过低速离心（500-600X g，5 分钟）在 1.5ml 离心管中收集并清洗细胞，并用同样的 1.5ml 离心管中加入 40ul 水进行体积的比较。推荐使用湿体积大概 40ul 的细胞样品作为质膜分离的起始原料。
2. 缓冲液 A 可能导致某些细胞类型的细胞裂解，例如 Jurkat 细胞，并堵塞离心管柱。这个问题可以通过用 1X PBS 以 1：1 稀释缓冲液 A 来解决。
3. 如果使用 Western blotting 检测质膜富集效果，需要同时检测具有相同蛋白上样量的总蛋白作为阳性对照。我们推荐使用 Na⁺/K⁺-ATPase（Cat# IN-SM005AB）作为质膜内参，并使用 Minute™ Total Protein Extraction Kit (Cat# SD-001/SN-002)进行总蛋白提取，进行无偏差检测。

关于分离出的质膜蛋白评价：

许多研究人员利用 WB 对分离的膜蛋白进行纯度检测。一些常用的“胞浆内参”不仅仅存在于胞浆。例如 actin(1), GAPDH (2) 和 tubulin (3) 主要存在于胞浆但是他们也存在质膜中。所以在某些细胞和组织的膜蛋白中可以检测到这些内参的弱信号不足为奇。更多相关信息，请参阅以下出版物：

- (1). Gruenstein E., et al. (1975). Actin associated with membranes from 3T3 mouse fibroblast and Hela cells. Journal of cell Biology. 64:223-234.
- (2). Terrasse R., et al. (2012). Human and pneumococcal cell surface glyceraldehydes -3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) proteins are both ligands of human C1q protein. J. Biol. Chem. 287:42620-42633.
- (3). Wolff J. (2009). Plasma membrane tubulin. Biochemica et BiophysicaActa. (BBA)-Biomembranes 1788:1415-1433.

常见问题

问题	解决方案
低蛋白产量	增加起始细胞/组织的样品量 增加第 2 步孵育时间到 10 分钟
低蛋白活性	保证裂解物低温/添加蛋白酶抑制剂
离心 30 秒后离心管柱中还存留细胞裂解物	减少起始细胞/组织的数量或增加离心时间到 2 分钟
质膜组分中有胞浆蛋白污染	用 0.5ml 预冷的 PBS (含 0.3M NaCl, pH9.5) 清洗 质膜沉淀

更多信息和活动请扫描
二维码关注官方公众号



Minute™ 非变性蛋白溶解液

目录号:WA-010

描述：

此试剂用于溶解 Invent 试剂盒提取（目录号：SM-005, SM-005-P, CP-011, NE-013, YM-017, MM-018 和 AF-023 等）或其他公司试剂盒提取的不可溶性蛋白。溶解的蛋白质为非变性蛋白，可应用于 ELISA, IP/Co-IP, 酶活性检测和其他应用。

操作方法：

1. 在提取后的蛋白沉淀中（**建议：溶解前可用预冷的 PBS 清洗两次**）加入适当量的溶解液，加入溶解液的体积需要根据蛋白沉淀的大小以及下游实验所需的蛋白浓度决定。通常每个样品使用 50-200ul 即可。
2. 用吸头反复吹打重悬蛋白沉淀（尽量避免气泡），台式离心机最高转速离心 1-2 分钟，去除不可溶组分，取上清进行下游实验。推荐使用 BCA 法检测蛋白浓度。
3. 非变性蛋白溶解液对不同样品膜蛋白溶解效率不同。一般情况下，为了进一步提高蛋白质的溶解度，可以添加 CHAPS（两性离子表面活性剂，Sigma）到溶解液中至终浓度为 1-4%。

包装： 10ml（仅用于科学研究）

运输和储存： 常温运输，室温储存。

更多信息和活动请扫描
二维码关注官方公众号



Minute™ 动物细胞/组织总蛋白提取试剂盒

目录号:SD-001/SN-002

描述:

Minute™ 动物细胞/组织总蛋白提取试剂盒是新一代基于离心管柱技术的蛋白提取系统,旨在从动物培养细胞和组织中快速高效地提取总蛋白。与传统的基于溶液的方法不同(例如 RIPA 缓冲液,通常会导致蛋白质丢失和蛋白图谱改变),离心管柱技术能够保持蛋白质的完整性并能获得可重复的结果。

离心管柱技术结合优化高效的裂解缓冲液可以更简单有效地提取总蛋白,只需 1-5 分钟即可获取 1-8 mg/ml 的蛋白质。试剂盒同时提供变性和天然两种不同的裂解液,用户可根据下游应用进行选择,满足不同实验需求。

提取体系最低可以低至 20µl,是起始材料有限时的理想选择。

应用:

Minute™总蛋白提取试剂盒能够快速高效地从无脊椎动物和脊椎动物培养细胞及组织中分离总蛋白。可应用于 SDS-PAGE、Western blotting、免疫沉淀 (IP)、ELISA 和酶活性测定等下游应用。该试剂盒提供了更快的总蛋白制备方案,并且可以轻松适用于高通量工作流程。提取的蛋白质也适合作为柱层析小规模纯化的起始材料。

试剂盒组分:

50 Preps:

1. 25ml 变性细胞裂解液 (SD-001)
2. 25ml 天然细胞裂解液 (SN-002)
3. 50 个离心管柱
4. 50 个收集管
5. 2 根塑料研磨棒

4 Preps:

1. 2.0ml 变性细胞裂解液 (SD-001)
2. 2.0ml 天然细胞裂解液 (SN-002)
3. 4 个离心管柱
4. 4 个收集管
5. 1 根塑料研磨棒

****注:试剂盒中的细胞裂解液不含任何还原剂和伯胺。**

运输储存： 常温运输，室温保存。

重要产品信息：

1. Minute™ 总蛋白提取试剂盒是一款快速总蛋白提取试剂盒。蛋白酶抑制剂不是必须加入，但是如果下游实验需要较长时间或者蛋白提取后需要保存较长时间，建议添加蛋白酶抑制剂，以防止蛋白降解。研究蛋白磷酸化，磷酸酶抑制剂应在使用前加入裂解液中，以保持蛋白磷酸化状态。（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 裂解液中添加 10ul 抑制剂）。推荐使用 BCA 试剂盒用于蛋白浓度测定。
2. 裂解液的使用要根据下游实验来选择，变性裂解液（SD-001）适合用于 SDS-PAGE，WB 实验，天然裂解液（SN-002）适合用于 ELISA，IP，CO-IP，酶活性检测等实验。
3. 使用 SD-001 变性裂解液提取的蛋白和使用 SN-002 天然裂解液提取的蛋白，做 WB 上样前，仍需加 Loading buffer 混匀煮沸样品后上样。
4. 如果变性裂解液在低温情况下出现沉淀，在 37 度以上孵育至沉淀复溶即可正常使用。

所需附加材料：

1 X PBS、涡旋震荡仪、台式离心机、BCA 蛋白定量试剂盒

操作方法：

细胞样品总蛋白提取

- 1.将离心管柱（filter cartridges）放入收集管中形成离心管柱套管，并将其置于冰上预冷。
- 2.通过低速离心收取细胞，在 1.5 ml 微量离心管中用预冷的 PBS 洗涤细胞沉淀一次。
- 3.以 500-600X g 离心 3 分钟沉淀细胞，弃去上清液。
- 4.向细胞沉淀中加入 20-500 μ l 裂解液（SD-001 或 SN-002）。涡旋 10-20 秒以完全裂解细胞（也可使用移液器吹打）。推荐使用的裂解液量与细胞比例，请参见下方表 1-4。
- 5.将混匀的裂解物转移至离心管柱套管中。使用台式离心机在 14,000-16,000X g 下离心 30 秒。

6.弃去离心管柱，收集管中的液体即是提取的总蛋白，可用于下游应用。

从培养细胞中提取蛋白质的建议（裂解液用量仅供参考，可根据细胞数量增加或减少）

- 使用变性裂解缓冲液（SD-001）提取总蛋白

A.悬浮细胞

以 500-600 X g 离心 3 分钟收取细胞。用预冷的 1X PBS 清洗细胞，并估算细胞湿体积。

表 1.针对不同细胞体积推荐的裂解缓冲液体积 *

细胞体积 (ul)	裂解液 (ul)	相当细胞量# X 10 ⁶
3	20	0.3
5	50	0.5
10	100	1
20	200	2

B.贴壁细胞

用预冷的 1 X PBS 清洗细胞后，加入适当的裂解液并通过上下移液吹打 10-20 次裂解培养容器中的细胞。

表 2.不同贴壁细胞数的裂解缓冲液推荐用量*

器皿	细胞数量	裂解液 (ul)
24 孔板	0.1-0.2 Million	50
6 孔板	0.6-0.8 Million	200
25 cm ² 培养瓶	1.5-2 Million	500

-使用天然裂解缓冲液（SN-002）提取总蛋白

A.悬浮细胞

以 500-600 X g 离心 3 分钟收取细胞。用预冷的 1X PBS 清洗细胞，并估算细胞湿体积。

表 3.不同细胞体积加入裂解液体积表*

细胞体积 (ul)	裂解液 (ul)	相当细胞量# × 10 ⁶
3	25	0.3
5	50	0.5
10	100	1
20	200	2

B.贴壁细胞

用预冷的 1 X PBS 清洗细胞，加入适当的裂解液在培养容器中通过上下移液吹打 10-20 次裂解细胞。

表 4.不同贴壁细胞量加入裂解液体积表*

器皿	细胞数量	裂解液 (ul)
24 孔板	0.1-0.2 Million	50
6 孔板	0.6-0.8 Million	250
25 cm ² 培养瓶	1.5-2 Million	500

动物组织总蛋白提取

1. 将离心管柱 (filter cartridges) 放入收集管中形成离心管柱套管，并将其置于冰上预冷。
2. 将 1-20 mg 新鲜或冷冻组织置于收集管中的离心管柱中。使用塑料棒以扭转运动研磨组织 20-30 次。将 50-200 μ l 裂解缓冲液 (SD-001 或 SN-002) 直接加入离心管柱中 (**对于不同的样品起始量，需按比例调整裂解液的用量。建议按照样品重量与裂解液 1: 10 添加**)。继续研磨 10-20 次直至使组织均质化。

注：塑料棒可重复使用。用蒸馏水彻底冲洗，然后用干净的纸巾擦干。

3. 盖上盖子，使用台式离心机以最大速度 (14,000-16,000 X g) 离心 30 秒至 1 分钟。
4. 弃取离心管柱，收集管中的液体是提取的总蛋白，可用于下游应用。

高通量提取总蛋白

离心管柱与裂解缓冲液（SD-001 或 SN-002）配合使用，非常适合高通量应用，能够同时从多种动物组织样本或培养细胞中快速、一致地提取总蛋白。为了在高通量工作流程中获得最佳性能，需要配备可容纳多个 2 mL Eppendorf 管配件的样品混合器或涡旋器，最低转速为 2,500 rpm。

- 1.将 5-30 mg 新鲜或冷冻组织放入已安装于收集管中的离心管柱中。
- 2.在每个离心管柱中加入 100-300 μ l 裂解缓冲液（SD-001 或 SN-002）。盖紧盖子并将其放入多通道采样适配器中。
- 3.室温下 2,000-2,500 rpm 涡旋 3-5 分钟
- 4.涡旋结束后，将所有样品连同混合装置一起转移到兼容的转子适配器（例如 96 孔板适配器）中，并以最大转速离心 1-2 分钟。或者取出离心管柱套管，放入台式离心机中以最大转速离心 30 秒至 1 分钟。
- 5.收集管中的液体即为总蛋白，可用于下游应用。蛋白产量通常在 1-5 mg/ml 之间。

注意：

- a). 对于培养细胞样品，请参阅表 1-4 了解缓冲液体积和处理方法。涡旋（步骤 3）通常可以省略。
- b). 虽然提高涡旋速度和持续时间可以提高蛋白产量，但请勿超过 28,000rpm 或涡旋时间超过 10 分钟，因为这可能会损害蛋白的完整性。

技术说明：

- 1.本实验可在室温下进行。
2. 只要离心后没有堵塞离心管柱，说明可以容纳比推荐量更多的起始材料。组织样本起始量推荐范围为 1-20mg/次，建议不超过 30mg/次。
- 3.细胞样品收取后可用 0.5 至 1 ml 预冷的 PBS 洗涤 1-2 次。
- 4.由于变性裂解液效率更高，使用变性裂解液通常比使用天然裂解液蛋白产量高。
5. 如果使用非常少量的组织（<5mg），在塑料棒研磨匀浆后在室温下孵育 5 分钟可能会提高产量。
- 6.提取的蛋白质可在-80℃下长期保存。

常见问题

问题	解决方案
裂解物太粘稠，无法用 200-1000μL 吸头吹打	将细胞裂解物倒入离心管柱套管中或将吸头尖端剪掉
离心 30 秒后离心柱上还存留细胞裂解物	减少起始细胞/组织的数量或增加细胞裂解液用量
低蛋白浓度	增加起始细胞/组织的数量或减少细胞裂解液用量
高分子量范围（100-300KDa）蛋白条带弱	增加细胞裂解液量，确保细胞/组织裂解充分

更多信息和活动请扫描
二维码关注官方公众号



Invent® Na⁺/K⁺ ATPase α1

重组兔单克隆抗体

目录号: IN-SM005AB

描述:

Na⁺/K⁺ ATP 酶存在于细胞膜中, 是一种能够交换钠离子和钾离子的活性转运酶。1957 年由 J.C. Skou 发现。除了少数例外 (如猫和狗的红细胞膜), 它存在于所有动物的细胞膜中。细菌中虽也有报道, 但实例很少, 至于在植物是否存在, 尚未确定。它只有在 Na⁺和 K⁺同时存在时才有活性。在 ATP 分解过程中, 酶分子发生变构(构象变化), 使结合的 Na⁺和 K⁺从细胞膜内转移到细胞膜外, 或从细胞膜外转移到细胞膜内。故其可作为细胞膜(质膜)的标记物。

应用:

本抗体可用于免疫印迹 (WB), 免疫组化 (IHC), 免疫荧光 (ICC/IF), 流式细胞术 (Flow) 等。

重要产品信息:

产品包装: 20ul / 100ul

反应物种: Human, Mouse, Rat

宿主/亚型: Rabbit / IgG

浓度: 1 mg/ml

分子量: 预测条带大小: 113 kDa

运输: 4°C

存储: 4°C可短期存储, 长期存储于-20°C, 避免反复冻融

所需附加材料 (需自备):

离心机, 抗体稀释液

操作方法：

1. 将抗体管放入离心机中，将转速提高到 4000rpm，使液体达到管底。
2. 根据不同的应用，参照表 1 按比例稀释抗体。

表1. 不同应用的抗体稀释比例

下游应用	稀释比例
Western Blot (WB)免疫印迹	1:1,000-1:5,000
Immunohistochemistry (IHC) 免疫组化	1:50-1:200
Immunocytochemistry (ICC/IF) 免疫荧光	1:50-1:200
Flow Cytometry (Flow)流式细胞术	1:50-1:100

技术说明：

膜蛋白在高温下容易形成多聚体，建议制备WB样品时煮样温度不要超过70℃。

本品仅供研究使用，不可用于临床诊断。

更多信息和活动请扫描
二维码关注官方公众号

