Minute™ 质膜蛋白和细胞组分分离试剂盒

目录号：SM-005

描述：

Minute ™ 总膜和质膜提取试剂盒利用离心管柱专利技术可以分离出天然的膜蛋白，其原理是细胞/组织通过 Buffer A 致敏，然后细胞以 Z 字形路径通过离心管柱，在这个过程中细胞膜会破裂，分离出完整的核,因此最终获得的膜蛋白中不含有核膜和核蛋白污染。通过差速离心和密度离心（无需超速离心）把细胞蛋白分为：**细胞核，细胞质，细胞器及质膜**。细胞高速离心通过具有 Z 字形通路的离心管柱时细胞膜会破裂，所以本试剂盒无需匀浆。匀浆在分离细胞膜实验中的主要问题是每次匀浆的过程中蛋白质图谱都会发生变化，因此导致最终质膜的纯度有显著变化（实验间差异）。相比而言，我们的试剂盒只要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，即可获得一致性更好的结果。整个操作过程在 45 分钟内可以完成。

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蛋白，可应用于 SDS-PAGE，immunoblottings，ELISA，IP，膜蛋白质结构分析，2-D，酶活性测定及其他应用。

试剂盒组份：

1. 25 ml 裂解液 A
2. 10 ml 裂解液 B
3. 50 个离心管柱
4. 50 个收集管
5. 4 根塑料研磨棒
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

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 完全解冻后摇匀，放置于冰上。将离心管柱和接收管套管放置于冰上预冷。
2. 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**
4. 推荐使用 BCA 试剂盒用于蛋白浓度测定

膜蛋白分离步骤

A.总膜蛋白分离

1. 将离心管柱及接收管套管放置冰上预冷
2. **细胞样品，**低速离心（500-600Xg，5 分钟）收集 1-50 X 10^6 个细胞。接转 3a 步骤。**组织样品，**接转 3b 步骤。**（贴壁细胞样品建议使用细胞刮刀收集，尽量不使用胰酶消化）**

注意：从细胞样品中分离质膜蛋白，建议细胞量为 20-50 X 10^6 个细胞。

3a. 用预冷的 PBS 清洗一次细胞。去除上清，在 Buffer A 中重悬细胞（起始细胞数小于 5X 10^6 加入 200ul Buffer A，起始细胞数大于 5X 10^6 加入 500ul Buffer A）。冰上孵育 5-10 分钟。**涡旋大力震荡 10-30 秒。**迅速将细胞悬液转入离心管柱中。接转步骤 4.

3b. **组织样品**，将新鲜组织（10-30mg）或冷冻组织（20-30mg）放置于离心管柱上。加入 200ul Buffer A，用塑料棒反复扭转研磨组织 1 分钟（注意：如果你的样品是骨骼或是心肌，建议在研磨前加入 100-200mg 组织分离粉）。再加入 300ul Buffer A，用吸头吹打几次后，**开盖**冰上孵育 5 分钟。接转步骤 4.

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。用 75%酒精擦拭或用蒸馏水冲洗干净。

4.盖上盖子， 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膜蛋白得率）

优化：细胞样品建议第 4 步完成后再次重悬细胞，转移回离心管柱中，16,000Xg 再次离心 30 秒，重复此步骤可以增加 20-30%产量。

5.弃去离心管柱，涡旋大力震荡 10 秒重悬细胞。

以下步骤将细胞分为四组分：细胞核、细胞质、细胞器和质膜。

6.700Xg，离心 1 分钟**（沉淀是完整的细胞核）**。将上清转移到新的 1.5ml 离心管中，4℃，16000Xg 离心 10-30 分钟（延长离心时间可以增加产量），弃去上清**（上清为胞浆组份）**，保存沉淀**（沉淀为总膜蛋白组份包括细胞器和质膜）**。如果不需要分离质膜做到此步骤即可，产量一般为 10-500ug/样品。可将总膜组份存储于-70℃或者根据下游实验选择溶解液溶解。如果需要提取质膜，请不要冷冻总膜组份。分离质膜继续第 7 步骤。

B.质膜蛋白分离

7. 加入 200ul Buffer B 用吸头反复吹打或涡旋震荡重悬总膜蛋白组份。4℃，7800Xg，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。**

8.小心的将上清液转移到新的 2.0ml 离心管中，加入 1.6ml 预冷的 PBS 混匀几次。16000Xg，离心 15-30 分钟（延长离心时间可以增加产量）。弃去上清液，保存沉淀**（沉淀为质膜蛋白）**。产量一般为 10-300ug/样品。质膜蛋白可以根据下游实验需求用 20-200ul 含表面活剂的缓冲液溶解。推荐使用下表中 Minute™ 系列溶解液溶解膜蛋白。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)。

推荐按照下游实验应用选择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

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于质膜中。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.

常见问题

问题	解决方案
低蛋白产量	增加起始细胞/组织的数量 增加第三步孵育时间到 10 分钟
低蛋白活性	保证裂解液低温/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液	减少起始细胞/组织的数量或增加离心时间到 2 分钟
质膜蛋白中有胞浆蛋白污染	用 0.5ml 预冷的 PBS（含 0.3MNacl，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