



酵母内质网提取试剂盒

货号: EX2930

规格: 50T/100T

有效期: 2-8°C保存, 有效期一年。

产品内容:

名称	50T	100T	储存条件
酵母内质网提取液 A	20ml	40ml	2-8°C保存
酵母内质网提取液 B	25ml	50ml	2-8°C保存
酵母内质网提取液 C	20ml	40ml	2-8°C保存
酵母洗涤液 D	50ml	100ml	2-8°C保存
内质网保存液 E	20ml	40ml	2-8°C保存

注:

1. 试剂盒2-8°C保存, 开盖后组份按要求条件保存。
2. 酵母洗涤液D长期不用时-20°C保存。
3. 试剂拆封后请尽快使用完!

产品简介:

内质网存在于除哺乳动物成熟的红细胞外的各种真核细胞中。内质网为由生物膜构成的互相连通的片层隙状或小管状系统, 膜片间的隙状空间称为池, 通常与细胞外隙和细胞浆基质之间不直接相通。这种细胞内的膜性管道系统一方面构成细胞内物质运输的通路, 另一方面为细胞内各种各样的酶反应提供广阔的反应面积。内质网的功能与蛋白质的合成、糖类和脂类的合成、解毒、同化作用有关, 并且还具有运输蛋白质的功能。

本试剂盒提供全套试剂, 适用于从各种酵母样品中提取内质网。提取过程简单方便。

本试剂盒不能用于冷冻样品的内质网提取。

本试剂盒可以用于完整内质网提取相关的实验, 也可以用于下游内质网蛋白提取等实验。

本试剂盒需要使用高速离心。

自备试剂和仪器:

离心机、振荡器、涡旋混匀器、移液器、冰箱、冰盒, PBS缓冲液、离心管、吸头、一次性手套

使用方法:

一、使用注意事项:

- 1、旋帽离心管装的试剂在开盖前请短暂离心, 将盖内壁上的液体甩至管底, 避免开盖时液体洒落。
- 2、实验过程中的所有试剂须预冷; 所有器具须放-20°C冰箱预冷。整个过程须保持样品处于低温。
- 3、要求离心力50000×g的离心, 没有条件的话可以采用30000×g-50000×g离心力, 最好能达到45000×g左右。最小离心力需要保证30000×g。

4、如果需要回收所有光面内质网小泡，最后一个离心步骤的离心力需要提高到100000×g。

二、操作步骤：

1、酵母培养物，在4℃，1000×g条件下离心5-10分钟，小心吸取培养基，尽可能吸干，收集酵母沉淀。

2、用PBS洗涤酵母两次，每次洗涤后尽可能吸干上清。

【注】：在1000×g离心5分钟。

3、每100μl体积或100mg湿重酵母沉淀物中加入400μl 酵母内质网提取液A，混匀后，在30℃条件下保温15分钟。

【注】：酵母数量根据实验情况调整，每次的裂解液用量并不是一定的。

4、在1000×g条件下离心5-10 分钟，收集酵母沉淀。

5、用300μl酵母洗涤液D洗涤酵母两次，离心收集酵母。

6、酵母沉淀物中加入500μl 酵母内质网提取液B，充分混匀后。

【注】：

①根据酵母细胞量调整提取液用量，一般加菌体体积的 2-5 倍均可。

②按酵母菌体体积每 100μl 或 100mg 湿重菌体加入 250-500μl 提取液。

7、在37℃或室温条件下轻微振荡 60-90 分钟。

【注】：

①使用振荡器/摇床的较低转速，提取液能轻微晃动即可。没有振荡条件也可以不振荡，稍微延长提取液的处理时间，中间每隔10分钟用移液器吹打混匀即可。

②不同酵母样本需要处理的时间差异较大。根据下游细胞裂解的难易程度调整，如果下游试剂C处理后沉淀没有明显减少，需要延长此步骤处理时间。可以延长至 2 小时。

8、在2000×g条件下离心5-10 分钟，弃上清，收集沉淀。

9、沉淀用300μl 酵母洗涤液D洗涤两次，离心收集沉淀。

10、在沉淀中加入400μl 酵母内质网提取液C，充分混匀，然后在振荡器上振荡 10-30分钟。

【注】：

①使用振荡器/摇床的较低转速，提取液能轻微晃动即可。

②没有振荡器的话，在4℃静置，稍微延长处理时间，中间每隔几分钟用移液器吹打混匀即可。

③试剂C处理后下一步骤的沉淀应减少，否则延长处理时间。

11、在 4℃，500×g 条件下离心5 分钟，弃沉淀，收集上清。

12、将上清吸入另一干净离心管。

13、在4℃，11000×g条件下离心20分钟。弃沉淀，收集上清。

14、将上清在4℃，50000×g条件下离心45分钟。弃上清，留沉淀。

【注】：

①如果条件允许，可将离心力加大到100000×g，有利于提高光面内质网小泡回收率。

②如果用大的离心转头，液体量太少不好离心的话，可以添加PBS增加液体量。

15、在沉淀中加入200-400μl内质网保存液E，混匀。

【注】：

- ①也可不用试剂盒中的内质网保存液重悬，根据下游实验需要选择合适的缓冲液重悬内质网或直接用于下游实验。
 - ②需要提取内质网蛋白时可以直接在沉淀中加入适量蛋白裂解液进行裂解。
- 16、在 4℃，50000×g 条件下离心 20 分钟。弃上清，收集沉淀。即得到酵母内质网样品。
- 17、根据下游实验需要，将沉淀用相应的缓冲溶液重悬。置冰箱备用或直接用于下游实验。

注意事项：

1. 正式实验前请选取几个样本做预实验，以优化实验条件，取得最佳实验效果。
2. 螺旋盖微量试剂管装的试剂在开盖前请短暂离心，将盖和管内壁上的液体离心至管底，避免开盖时试剂损失。
3. 禁止与其他品牌的试剂混用，否则会影响使用效果。
4. 样品或试剂被细菌或真菌污染或试剂交叉污染可能会导致错误的结果。
5. 最好使用一次性吸头、管、瓶或玻璃器皿，可重复使用的玻璃器皿必须在使用前清洗并彻底清除残留清洁剂。
6. 实验后完成后所有样品及接触过的器皿应按照规定程序处理。