

高纯度线粒体及线粒体蛋白提取试剂盒

本产品冰袋运输, 4℃保存, 保质期 12 个月, 使用时需进行无菌操作。

货号规格

货号	规格
PC205	30次

产品内容

组分名称	体积(30次)
线粒体提取液A	30 mL
线粒体提取液B	30 mL
线粒体提取液C	15 mL
线粒体提取液D	2.5 mL
线粒体洗涤液	25 mL×2
线粒体保存液	6 mL
线粒体裂解液	3 mL
健那绿染液	1 mL

产品特点

- 纯度高** — 利用两步密度梯度离心的原理, 提取到的线粒体纯度更高;
- 活性高** — 所提取的线粒体保留有完整的结构, 并具有很高的生物学活性;
- 应用广** — 本产品提取的线粒体可应用于:
 - (1) 线粒体的功能或酶活性研究;
 - (2) 线粒体蛋白分析: 如 SDS-PAGE、免疫印迹(WB)、免疫沉淀(IP)、蛋白质组学研究等;
 - (3) 线粒体 DNA(mtDNA)提取。

产品简介

本产品可在 60 min 内即可分离出完整的线粒体, 获得的线粒体具有完整的双层膜结构和很高的生物学活性, 可用于细胞凋亡、信号转导和代谢研究等下游应用以及线粒体蛋白质组学研究。此外, 提取的线粒体经裂解液裂解后即可得到线粒体蛋白, 可用于线粒体蛋白分析、SDS-PAGE、WB、IP 等实验。本产品可兼容动物组织及动物细胞中线粒体的提取, 当样品为 100 mg 组织或 2×10^7 个细胞, 本试剂盒可以处理 30 个样品。

自备材料

玻璃匀浆器、4℃离心机(离心力需达到 $21,000 \times g$)

使用说明

- 将试剂盒各组分离置于冰上, 使用时需进行无菌操作, 将离心机、玻璃匀浆器 4℃预冷;
- 样品准备:
 - 组织样品** 将新鲜组织样品用适量预冷的 1×PBS(货号: PS110)清洗, 取 100 mg 组织加入到合适大小的匀浆器中, 加入 1 mL 线粒体提取液 A;
注意: 请勿使用经冷冻保存的组织样品。
 - 细胞样品** 离心 5 min($500 \times g$, 4℃)收集细胞, 用适量预冷的 1×PBS 重悬细胞, 取 2×10^7 个细胞, 离心 5 min ($500 \times g$, 4℃)后弃尽上清, 加入 1 mL 线粒体提取液 A 重悬细胞, 并转至合适大小的匀浆器中。

3. 将样品匀浆多次,直至 **细胞破碎比例** 达到 50%-60% 即可停止匀浆;
注意: 细胞破碎程度是提取线粒体能否成功的关键,细胞破碎不足会影响线粒体的产量,细胞破碎过度则会影响线粒体结构的完整性。建议提前做预实验探索细胞破碎条件,推荐方案如下:
组织样品 匀浆 5~10 次左右,取匀浆悬液与台盼蓝染液混合,观察细胞破碎情况;
细胞样品 需要间隙严密的研杵方能达到破碎效果,匀浆 5 次后,取匀浆悬液与台盼蓝染液混合,根据破碎情况适当增加匀浆次数。请勿过度匀浆!
4. 在 2 mL EP 管中加入 1 mL **线粒体提取液 B**,沿管壁缓慢地加**匀浆液**使其覆盖于上层(此时出现分层现象),立即 4°C 离心 10 min(组织样品 700×g,细胞样品 600×g)。收集 1 mL 最上层分离层至 1.5 mL EP 管中;
注意: 离心后上清会分成两层,收集最上层分离层。如果分层不明显则将所有上清收集。
5. 将分离层溶液离心 10 min(10,000×g, 4°C),弃尽上清,沉淀即为粗线粒体,用 0.5 mL **线粒体洗涤液**重悬;
6. 在预冷的 1.5 mL EP 管中分别加入 425 μL **线粒体提取液 C** 和 75 μL **线粒体提取液 D**(即体积比 C:D=17:3,现用现配),充分混匀;
7. 将重悬的粗线粒体缓慢地加入步骤 6 中混合液的上层,立即离心 10 min(21,000×g, 4°C),弃尽上清。
注意: 离心机应在 15 sec 以内达到相应转速,否则会影响分离效果。
8. 加入 1 mL 的**线粒体洗涤液**重悬沉淀,离心 5 min(16,000×g, 4°C),收集沉淀,沉淀即为高纯度的线粒体;
9. 线粒体使用:
(1) 向沉淀中加入 200 μL **线粒体保存液**重悬,吹打混匀后,可用于完整线粒体的功能或酶活性研究;
(2) 向沉淀中加入 100 μL **线粒体裂解液**(可在裂解液中按 1:100(V/V) 加入 **100× 蛋白酶抑制剂** < 货号 GRF101>)重悬,吹打混匀后,即得到线粒体蛋白,可用于 SDS-PAGE、WB、IP、Co-IP 等后续实验。
10. 线粒体染色鉴定: 取 5 μL 用**线粒体保存液**重悬的线粒体,与 5 μL **健那绿染液**混匀后,滴加在载玻片上,盖上盖玻片,于显微镜下观察。可观察到线粒体呈现出蓝绿色小棒状或哑铃状。

注意事项

1. 提取全程请**低温无菌操作**,样品管需放在冰浴中;
2. 在不破坏亚细胞器的情况下破碎细胞是制备线粒体的关键,破碎效果与组织细胞类型有关,不同型号匀浆器的破碎效果也不同;
3. 处理细胞样品时破碎步骤较为关键,解决方案有:
(1) 选用间隙严密的研杵。将研杵插入匀浆器套管后,可提起研杵而套管不会脱落;
(2) 使用超声破碎仪破碎。可选用最低功率,探索破碎条件;
4. 用**线粒体保存液**重悬线粒体后,请及时使用。如无法及时使用,建议 -80°C 保存。冻存后的线粒体样品不推荐用于完整线粒体功能的研究,但可以用于线粒体蛋白分析、WB、IP 等实验。
5. 为了您的安全和健康,请穿实验服并戴一次性手套操作;
6. 本产品仅限科研使用。