

线粒体分离蛋白提取试剂盒

货号: HKW2015

【产品信息】

产品名称	产品货号	规格	有效期
线粒体分离蛋白提取试剂盒	HKW2015	30T	一年

【产品简介】

此款线粒体分离及蛋白提取试剂盒可高效的从动物组织和培养的细胞中分离高纯度的线粒体，分离得到的线粒体具有完整的内膜和外膜，具有完整的线粒体功能，可用于线粒体生理功能的研究。同时分离得到线粒体被裂解液裂解后可用于蛋白免疫印迹，免疫沉淀等蛋白分析实验。

关于试剂盒

- 本试剂盒可以分离得到高纯度线粒体，可用于流式细胞仪相关检测。
- 本试剂盒提供了线粒体保存液，可用于保存分离得到的高纯度线粒体用于后续实验。
- 本试剂盒提供了线粒体裂解液，可高效的裂解分离得到的高纯度线粒体。
- 本试剂盒提供了线粒体染料 Janus Green B，可快速的判定提取效果。
- 本试剂盒中有 0.4%台盼蓝溶液可用于匀浆效果进行鉴定，细胞破碎达到 60%即可停止匀浆，请勿过度匀浆。
- 本试剂盒只适用于新鲜的组织样本，请勿使用经过冷冻保存的组织。
- 用于制备线粒体蛋白，需要提前加入蛋白酶抑制剂混合液，否则不必加入。
- 如果每个样品的数量为 2000 万个细胞或 100 mg 组织，本试剂盒可以处理 30 个样品。

【产品组成】

产品目录	主要成分	产品规格
HKW2015-1	线粒体分离液 A	30mL
HKW2015-2	线粒体分离液 B	30mL
HKW2015-3	线粒体分离液 C	15mL
HKW2015-4	线粒体分离液 D	2.5mL
HKW2015-5	线粒体洗涤液	30mL*2
HKW2015-6	线粒体保存液	3mL
HKW2015-7	线粒体裂解液	10mL
HKW2015-8	Janus Green B	1mL
HKW2015-9	SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (4X)	2mL
HKW2015-10	普通型蛋白酶抑制剂混合液	1mL
HKW2015-11	0.4%台盼蓝溶液	1mL

【储存与运输】

干冰 (dry ice) 运输; -20℃ 保存, 一年有效。一个月内使用可4℃ 保存。

【使用方法】

1、提取前准备: 将试剂盒中溶液室温解冻, 解冻后放置于冰上。提前 4℃ 预冷离心机。如果用于制备线粒体蛋白样品, 线粒体分离液 A、线粒体分离液 B、线粒体分离液 C、线粒体洗涤液、线粒体裂解液根据提取的样本量分别取出对应体积的试剂, 在使用前按 100:1 添加蛋白酶抑制剂混合液 (100×) 备用。

2、样品预处理

a、对于细胞: 收集细胞 4℃, 500 g 离心 5 min, 用预冷的 PBS 洗涤两遍。然后在冰上, 按每 2000 万细胞直接加入 1 ml 预冷的线粒体分离试剂 A。

b、对于组织: 现取新鲜的动物组织, 用冰的 PBS 洗净组织块上附着的脂肪和血液等杂质, 用滤纸吸干水分后称重, 在离心管中将组织块剪碎, 然后在冰上, 按每 100 mg 组织加 1 ml 预冷的线粒体分离试剂 A。

3、样品匀浆: 将样品悬液转移到合适大小的预冷玻璃匀浆器中, 在冰浴条件下对样品匀浆。

注: 不同的样品所需匀浆次数不同, 培养细胞建议匀浆 3-5 次, 组织样本建议 5-10 次。鉴定方法: 取 20 μl 匀浆 3 次后的细胞样品或匀浆 5 次后的组织样品, 加入等体积的 0.4%台盼蓝溶液, 混匀, 在显微镜下观察台盼蓝溶液染色阳性 (蓝色) 细胞数目的比例, 当阳性 (蓝色) 细胞破碎达到 60%即可停止匀浆, 请勿过度匀浆。若阳性 (蓝色) 细胞比例未达到 60%, 适当增加 1-2 次匀浆, 随后按照同样的方法使用台盼蓝溶液进行鉴定。

4、线粒体粗分离：根据步骤3中样品匀浆液的体积，取等体积的线粒体分离试剂B加至离心管底部，然后沿管壁缓慢地加样品匀浆液使其覆盖于上层。对于培养的细胞样品使用4℃，600 g离心10 min，收集最上层分离层。对于组织样品使用4℃，700 g离心10 min，收集最上层分离层。

注：（1）匀浆液置于线粒体分离试剂B上层时要沿管壁小心加入，同时及时离心，以防匀浆液中的颗粒自然下沉，影响后面的离心分层效果。

（2）离心后上清会分成2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、将收集的上清转移至新的1.5 ml EP管中，每管1 ml。4℃，10000 g离心10 min，收集沉淀。收集得到的沉淀即为粗线粒体。

6、高纯度线粒体分离：

a、高纯度线粒体分离液准备：按照线粒体分离液C：线粒体分离液D=17:3的比例配制，现用现配。按照每管（1.5 ml EP）0.5 ml提前加入新的EP管中。

b、将步骤5中的粗线粒体沉淀按每管（1.5 ml EP）加入0.5 ml的线粒体洗涤液重悬。

c、将重悬的粗线粒体缓慢的加入到高纯度线粒体分离液的上层。4℃，22000 g离心10 min，收集沉淀。

d、每管沉淀加入1 ml的线粒体洗涤液重悬沉淀，4℃，16000 g离心5 min，收集沉淀。收集到的沉淀为高纯度的线粒体。

7、线粒体染色鉴定：取适量沉淀涂片，滴加Janus Green B染液染20 min，盖上盖玻片，在显微镜下镜检。在显微镜下线粒体呈现出蓝绿色小棒状或哑铃状。

8、线粒体的使用：

a、用于完整线粒体的功能或酶活性研究：初始2000万个细胞或100 mg组织可以加入200 μl线粒体保存液，重悬线粒体，并及时使用。如果不能及时使用，建议-80℃保存。冻存后的线粒体样品不推荐用于完整线粒体的功能的研究，但可以用于线粒体蛋白分析、免疫印迹、免疫沉淀等实验。

b、用于线粒体蛋白分析：初始2000万个细胞或100 mg组织可以加入100 μl线粒体裂解液（线粒体裂解液在使用前按每100:1添加普通型蛋白酶抑制剂混合液），裂解后的线粒体样品可以用于PAGE、免疫印迹、免疫沉淀等后续实验。

c、用于免疫印迹：裂解后的线粒体样品按照3:1比例，混合线粒体的蛋白样品和SDS-PAGE上样缓冲液。100℃沸水浴加热5 min，以充分变性蛋白。冷却至室温后，直接上样到SDS-PAGE胶加样孔内即可。

【注意事项】

- 1、分离线粒体的所有步骤都需在低温下进行。
- 2、不同的样品中线粒体的含量和大小均不同，可根据实验情况调整线粒体分离液和线粒体裂解液的使用量。
- 3、本试剂盒只适用于新鲜的组织样本，请勿使用经过冷冻保存的组织。
- 4、可根据实验要求对样本进行线粒体粗分离和高纯度分离。
- 5、请及时使用保存在线粒体储存液中的线粒体。
- 6、如果用于制备线粒体蛋白样品，线粒体分离液A、线粒体分离液B、线粒体分离液C、线粒体洗涤液、线粒体裂解液都需提前加入蛋白酶抑制剂混合物。用于磷酸化抗体检测还需提前加入磷酸酶抑制剂混合物。

- 7、本试剂盒中的普通型蛋白酶抑制剂混合液适用于常规蛋白的提取，针对特别容易降解的蛋白推荐使用增强型蛋白酶抑制剂混合液。
- 8、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液中含少量 DTT，有轻微刺激性气味，但不含剧毒的巯基乙醇。
- 9、抽提得到的线粒体蛋白可以使用 BCA 法测定蛋白浓度，不适用 Bradford 法测蛋白浓度。
- 10、本试剂盒中试剂都应在室温下溶解，请勿加热。
- 11、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴好一次性手套操作。

常见问题	可能原因	解决方案
未得到线粒体	匀浆过度，导致线粒体破碎	减少匀浆次数
	样品不新鲜	取新鲜样品分离
	样品量太少	增加提取的样品量
核蛋白中含有胞浆蛋白	粗线粒体置于高纯度线粒体分离液的上层时操作不当导致二者未分层	将粗线粒体沿管壁小心加入在高纯度线粒体分离液的上层，且快速离心