

## 线粒体/胞浆制备试剂盒

### KP313 50次

#### 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	KP313
Mitochondria Isolation buffer	4°C	100ml

本试剂盒在所需温度储存 12 个月不影响使用效果。

#### 产品介绍:

线粒体/胞浆制备试剂盒用于从组织或培养细胞中分离线粒体和细胞胞浆成分。加入分离溶液，匀浆破碎组织细胞，经过数次 800g 和 12000g 离心，在 60 分钟内即可分离出完整的线粒体和胞浆成分。制备的线粒体具有很高的生物学活性，可进行各种功能研究如酶学测定，更可用于 Western Blot、2D-胶、线粒体蛋白或 DNA 提取、蛋白质组学等研究。制备线粒体的得率、活性、纯度优于蔗糖密度梯度离心法和 Invotrogen/Pierce 线粒体提取试剂盒方法。

#### 操作步骤:

以下所有操作均在 4°C 进行

1. 组织匀浆: 100~200 mg 新鲜组织如肝、脑、肾、心肌等，剪为 0.5cm<sup>2</sup> 碎块放入小容量玻璃匀浆器内。估计组织块总体积。加入 1.5 ml 冰预冷的 Mitochondria Isolation buffer。用间隙严紧的研杵上下研磨组织 20 次。
2. 培养细胞匀浆: 800×g 5 min 离心收集细胞。单次提取需 2-5×10<sup>7</sup> 个细胞。加入 1.5 ml 冰预冷 Mitochondria Isolation buffer 重悬细胞，将细胞悬液转移到小容量玻璃匀浆器内，用间隙严密的研杵研磨细胞 30 次。
3. 将组织或者细胞匀浆液转移到离心管中，800×g，4°C 离心 5 min。（胞核、膜碎片、未裂解细胞等在管底，弃去）收集上清液并转移到新的离心管。再次 800×g 离心 5min at 4 °C，弃沉淀。

4. 将上清液转移到新的离心管。10,000 × g 离心 10 min at 4 °C。线粒体沉淀在管底。离心后的上清含胞浆成分，可收集用于对照实验。
5. 洗涤线粒体：加入 0.2 ml Mitochondria Isolation buffer，轻弹管底重悬线粒体沉淀；12,000×g 离心 10min at 4°C。弃上清，线粒体沉淀在管底。
6. 重悬线粒体：可以用 Mitochondria Isolation buffer 重悬线粒体沉淀，也可以用合适后续实验的自备缓冲液来裂解线粒体沉淀，具体用量是：约每 100mg 组织提取的线粒体用 50 μl，约每  $5 \times 10^7$  个细胞提取的线粒体用 100μl。用量请根据组织或细胞类型进行微调。
7. 裂解线粒体后，进行蛋白浓度测定。立即使用或 -70 °C 保存。

## 说明：

制备高质量线粒体的关键：

- a. 全程低温操作，将样品管放在冰水浴而不是碎冰块中。
- b. 快速，微量 制备比大规模制备操作更快速，更容易获得完整的线粒体，且得率高。
- c. 在不破坏亚细胞器的情况下破碎细胞是制备线粒体的最关键环节。破碎效果与组织细胞类型有关；与组织块相比，贴壁培养细胞在用玻璃匀浆器匀浆时较难破壁。用 1-3 ml 小容量玻璃匀浆器(而不是其它破碎装置)上下研磨培养细胞 20-30 次。玻璃匀浆器须配套选用间隙严密的研杵，其特征是将研杵插入匀浆器套管后，可提起研杵而套管不会脱落。正确的匀浆不是旋转研杵，而是上下缓慢推拉研杵，研杵推进和提升过程中细胞遭受压力的剧变而破碎。研磨程度可用相差显微镜进行检查当未裂解细胞在~50%即可。过度研磨会破坏线粒体，而研磨不足将降低线粒体得率。
- d. 不同的离心机必须跟据离心力 g 计算正确的离心转速(允许 10%波动)，否则将导致不纯。
- e. 进行 Western Blot 可直接用 RIPA 裂解液或 SDS-PAGE 样品缓冲液裂解线粒体；也可先用 Mitochondria Isolation buffer 重悬线粒体，再加入 2x SDS-PAGE 样品缓冲液。