

线粒体/胞浆制备试剂盒 (GHK220601)

描述:线粒体/胞浆制备试剂盒 (Mitochondria Isolation Kit)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。

严格按照说明操作,总是能制备获得高纯度线粒体。一篇方法学研究论文发现,用普利莱试剂盒制备线粒体的得率、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。

适用:从组织、培养细胞制备高纯度线粒体,同时分离细胞胞浆成分。

组成: Mito Solution 100 ml for 50 次制备
 200 ml for 100 次制备

储存: -20 °C 12个月有效

操作步骤:

以下所有操作均在 **4 °C** 进行

- 组织匀浆:** 100~200 mg **新鲜**组织如肝、脑、肾、心肌等,剪为 0.5cm^2 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 Mito Solution。用间隙严紧的研杵上下研磨组织 20 次。 **培养细胞匀浆:** $800 \times g$ 5 min 离心收集细胞。单次提取需 $2-5 \times 10^7$ 个细胞。加入 1.5 ml 冰预冷 Mito Solution 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。
- 将匀浆液转移到离心管中, $800 \times g$, 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 $800 \times g$ 离心 5 min at 4 °C, 弃沉淀。
- 将上清液转移到新的离心管。 $10,000 \times g$ 离心 10 min 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。
- 洗涤线粒体:** 加入 0.2 ml Mito Solution, 轻弹管底重悬线粒体沉淀; $12,000 \times g$ 离心 10 min 4 °C。弃上清,线粒体沉淀在管底。
- 重悬线粒体:** 可以用 Mito Solution 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 100 mg 组织提取的线粒体用 50 μl , 约每 5×10^7 个细胞提取的线粒体用 100 μl 。用量请根据组织或细胞类型进行微调。
- 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:第一,全程低温操作,将样品管放在**冰水浴**而不是碎冰块中;第二,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;第三,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。
- 如果不得不用电动匀浆器(polytron),可选用 6500 转,刀头上下进出 4 次共计 10 秒。不同的电动匀浆器性能 差别甚大,除非步步监测,否则分离结果难以预料。

- 3.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。
- 4.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 Mito Solution 重悬线粒体, 再加入 2x SDS-PAGE 样品缓冲液。
5. Cytochrome oxidase, Monoamine oxidase, Succinate dehydrogenas, Glutamate dehydrogenase 可用作线粒体的标志酶。
- 6.重悬线粒体: 可以用 Mito Solution 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 100 mg 组织提取的线粒体用 50 μ l, 约每 5×10^7 个细胞提取的线粒体用 100 μ l。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。