

细胞线粒体分离试剂盒

C777612

C777612	Component	1Kit	Storage
C777612A	2×线粒体分离试剂	65mL	-20℃
C777612B	线粒体储存液	15mL	-20℃.Store in the dark.
C777612C	线粒体裂解液	15mL	-20℃. Store in the dark.
C777612D	台盼蓝染色液	10mL	2-8℃. Store in the dark.
C777612E	PMSF	1mL	-20℃. Store in the dark.

产品简介:

细胞线粒体分离试剂盒（均浆法）是针对培养细胞设计的一种快速、便捷型的线粒体分离试剂。本试剂盒分离的线粒体纯度较高，绝大部分都含有完整的内膜和外膜，既可用于线粒体内、外膜完整性等生理功能等方面的研究，也可以用本试剂盒中提供的线粒体裂解液或其它适当裂解液裂解收集的线粒体，用于 SDS-PAGE、Western、双向电泳等蛋白分析。同时，在使用本试剂盒分离线粒体时，也可获得去除线粒体的细胞浆蛋白，应用于细胞色素 c 等线粒体蛋白向胞浆的释放的分析。

如果每个样品的细胞数量为 $2\sim5\times10^7$ ，该试剂盒可处理 50~100 个样品。

操作流程:

1、试剂准备

- 1.1 准备溶液：室温融解试剂盒中的各种溶液，溶解后立即置于冰上并混匀
- 1.2 线粒体分离试剂：用等体积的蒸馏水将 2×线粒体分离试剂稀释为 1×线粒体分离试剂。
- 1.3 如果最终目的是制备线粒体蛋白样品：

线粒体分离试剂：在分离试剂中加入蛋白酶抑制剂或 PMSF。线粒体裂解液：在裂解液中加入蛋白酶抑制剂或 PMSF。

2、细胞准备

- 2.1 收集细胞：对于贴壁细胞：用 PBS 洗一遍，用胰酶细胞消化液消化细胞，离心收集细胞；对于悬浮细胞：直接离心收集细胞。
- 2.2 洗涤细胞：用预冷的 PBS 轻轻重悬细胞沉淀，取少量细胞用于计数，剩余细胞 600g，4℃ 离心 5min 沉淀细胞。弃上清。

3、细胞匀浆及匀浆效果鉴定

- 3.1 在 $2\sim5\times10^7$ 细胞中，加入 1~2.5mL 线粒体分离试剂，轻轻悬浮细胞，冰浴放置 10-15min。
- 3.2 把细胞悬液转移到适当大小的玻璃匀浆器中，匀浆 10-30 下左右。
- 3.3 通常可在匀浆 10 次后取约 2μL 细胞匀浆，稀释 20 倍后加入台盼蓝染色液，混匀后显微

镜下观察台盼蓝染色阳性(蓝色)细胞的比例。如果阳性细胞比例不足 50%，增加 5 次匀浆。随后再同前取样进行台盼蓝染色鉴定。当阳性比例超过 50%时即可停止匀浆进入下一步。

4、线粒体的收集

4.1 把细胞匀浆在 600g，4°C 离心 10min。

注：如需获得纯度更高的线粒体，可以将此步骤的离心速度改为 1000g，其它离心条件不变；获得更高纯度线粒体的缺点是相同数量细胞的线粒体抽提得率会下降。

4.2 小心把上清转移到另一离心管中，在 11,000g，4°C 离心 10min。

注：如需获得纯度更高的线粒体，可以将此步骤的离心速度改为 3500g，其它离心条件不变；获得更高纯度线粒体的缺点是相同数量细胞的线粒体抽提得率会下降。

4.3 小心去除上清。沉淀即为分离得到的细胞线粒体。

注：如果希望获得去除线粒体的细胞浆蛋白，在本步骤，收集上清，并在收集上清时注意勿触及沉淀。随后把收集的上清 12000g，4°C 离心 10min。取上清即为去除线粒体的细胞浆蛋白。

5、线粒体的使用

5.1 如果用于完整线粒体的功能或酶活性研究，初始 $2\sim5\times10^7$ 细胞分离得到的线粒体样品中可以加入 150-200 μ L 线粒体储存液，重悬线粒体。

5.2 如果用于线粒体的蛋白分析，初始 $2\sim5\times10^7$ 细胞分离得到的线粒体样品中可加入 150-200 μ L 线粒体裂解液处理线粒体。裂解后的线粒体可以用于 PAGE、Western、IP 以及线粒体中的一些酶活性的测定等。裂解后的蛋白样品可用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。

5.3 如果用于双向电泳，请使用适当的用于双向电泳的裂解液处理线粒体。

注意事项：

- 1、试剂盒不提供 PBS、BCA 蛋白定量试剂盒、PMSF。
- 2、如果不用于制备线粒体蛋白样品，线粒体分离试剂和线粒体裂解液中不必加入蛋白酶抑制剂或 PMSF。反之，如果用于制备线粒体蛋白样品，需在线粒体分离试剂和线粒体裂解液中加入蛋白酶抑制剂或 PMSF。
- 3、分离线粒体的所有步骤均在冰上或 4°C 进行，所用溶液需冰浴或 4°C 预冷。
- 4、通常在分离线粒体时前后两次离心速度选取 600g 和 11,000g，如果希望纯度更高，但对线粒体的得率要求不高，前后两次离心速度可以采用 1000g 和 3500g。
- 5、对于大量制备，可根据细胞数，按比例方法所使用的试剂。
- 6、为了您的自身安全，使用试剂前，请做好防护，如穿实验服，带手套等。

温馨提示

为了您的自身安全，使用试剂前，请做好防护，如穿实验服，带手套等。