亚细胞结构线粒体提取试剂盒

产品货号： AR0156

产品批号： 见外包装标签

产品保存： -20°C保存，一年有效，台盼蓝可4°C保存。

产品说明：细胞线粒体提取试剂盒用于从动物细胞或新鲜组织中分离出完整的线粒体，然后用含有蛋白酶抑制剂的裂解液裂解线粒体得到纯度高的线粒体蛋白。适合于新鲜的动物组织以及培养细胞的线粒体蛋白的制备。线粒体的分离基本原理是，加入缓冲液匀浆通过机械方法破碎组织或培养细胞，经过低速差速离心去除残渣碎屑和巨大细胞器，然后通过高速差速离心获得线粒体。获得的线粒体具有完整的膜结构及生理功能。获得的线粒体也可以被试剂盒中的线粒体裂解液或其它适当裂解液裂解后用于SDS-PAGE，IP，免疫印迹，双向电泳，免疫共沉淀，酶活测定等后续蛋白分析等。

产品规格：

成分	规格
线粒体抽提液	100ml
线粒体裂解液	50ml
台盼蓝染色液	10ml
PMSF（100mM）	1ml

使用方法：

线粒体的提取

溶液准备：室温溶解各溶液，置于冰上，根据需要取适量的抽提液和裂解液，临用前按比例加入PMSF，使PMSF的终浓度为1mM。

1.样本处理

a.组织处理：称取100-200 mg新鲜组织，预冷的PBS或生理盐水冲洗，洗净血水，滤纸吸干，用剪刀剪为碎块放入小容量玻璃匀浆器内。加入10倍体积的预冷的线粒体抽提液，在冰上匀浆（匀浆程度判定：无明显的组织碎片）。

b.细胞处理：（对于悬浮细胞，直接离心收集细胞。对于贴壁细胞，用细胞刮刮下细胞，离心收集细胞。）用预冷的PBS或生理盐水重悬细胞， 600g，4℃离心5分钟沉淀细胞,尽量吸尽上清，加入适量的预冷的线粒体抽提液(约为细胞湿体积的的5-7倍)，用移液器吹打数下，使抽提液和细胞充分接触，冰上孵育10-15分钟，期间拿出震荡数次（此时可以取少量细胞液用台盼蓝染色，细胞液和台盼蓝按1：1的比例混合，镜检，当有80%的细胞为蓝色时，可不必匀浆，若不够，把细胞悬液转移到一适当大小的玻璃匀浆器中匀浆几下，镜检，直到达到80%）。

注意：建议初始细胞量为2000万-5000万个细胞。请勿过度匀浆，过度匀浆会导致线粒体的机械损伤。

2.将匀浆液转移到离心管，4℃，600g 离心10分钟。细胞核、大的膜碎片、未裂解细胞等沉淀在管底。（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。）

3.将上清液转移到新的离心管，4℃，12000g 离心10分钟，离心后的上清含胞浆成分，小心去除上清，沉淀即为分离得到的线粒体。（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16000g，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。）

注意：本步骤收集上清，并且在收集上清时注意勿触及沉淀，随后把收集的上清12,000g，4℃离心10分钟，取上清即为去除线粒体的细胞浆蛋白。

线粒体蛋白的提取

1.按每10μl线粒体湿体积，加入50-70μl上述配制好的线粒体裂解液。

2.置于4℃裂解15-30分钟，期间拿出震荡数次。

3.10000g，4℃离心10分钟，取上清为线粒体全蛋白提取物。

注意事项：

1.整个操作过程为保证线粒体的完整，操作的环境如温度（0—4℃）和 PH(7.2-7.4）保持恒定，同时尽可能短的操作时间。

2.匀浆次数依照匀浆器的松紧而定，次数过少，细胞破损不完全，就会影响线粒体产量。

3.若用于双向电泳，需使用双向电泳的裂解液处理线粒体。

4.建议使用BCA蛋白定量试剂盒测线粒体蛋白浓度(博士德产品货号为AR0146)。