硬组织线粒体分离试剂盒

产品简介:

线粒体是细胞呼吸的主要场所,细胞活动所需的能量主要由在线粒体内进行的氧化所产生的能量来供应,制备线粒体的关键是保持线粒体的完整性和纯度,可通过分级分离法获得,即先低俗出去细胞核以及细胞碎片,再进行高速梯度离心分离线粒体。

硬组织线粒体分离试剂盒(Hard Tissue Mitochondria Isolation Kit)是快速便捷分离动物硬组织(如骨骼肌)中的线粒体的试剂盒,分离线粒体的同时可以获得去除线粒体的细胞浆蛋白,可用于分析细胞色素 C 等线粒体蛋白向胞浆的释放,大部分获得的线粒体都含有完整的内膜和外膜,并具有线粒体的生理功能(如检测线粒体膜电位),获得的蛋白可用于 SDS-PAGE、Western、双向电泳等蛋白分析。该试剂盒适用于从动物硬组织(心肌、骨骼肌)或其他难以分离线粒体的组织中提取线粒体。该试剂盒仅用于科研领域,不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成:

编号 / 名称	GCCS0205 50T	Storage
试剂(A): Wash Buffer	100ml	-20℃
试剂(B): Mitochondria Lysis Buffer	50ml	-20℃
试剂(C): Mitochondria Stock Buffer	50ml	-20℃
试剂(D): Protein Stock Buffer (5×)	10ml	RT
试剂(E): PMSF(100×)	1.5ml	-20℃
使用说明书	1 份	

自备材料:

1、 低温离心机、匀浆器、尼龙网或细胞筛

操作步骤(仅供参考):

1、清洗:动物禁食 24h 后处死,取新鲜横纹肌等组织,迅速称重 50~100mg,用预冷的 Wash buffer 清洗 2 次,弃 Wash buffer,冰上剪成 30mm^3 大小的组织碎片。

2、裂解:加入 10 倍体积的预冷的 Mitochondria Lysis Buffer,置于冰浴 5~10min。

3、匀浆Ⅰ:转移至预冷的 Dounce 匀浆器中,匀浆 10~20 次,或采用电动匀浆器,700rpm,8~10 次;不同组织或不同匀浆器所需的匀浆次数有所不同,需自行优化。

4、匀浆Ⅱ:4℃搅拌孵育 5~10min。用等体积的 Mitochondria Stock Buffer 稀释至匀浆

液，再次重复步骤 3。

5、离心：用尼龙网或细胞筛过滤匀浆液，4℃ 1000g 离心 15min，重复 1 次，以去除细胞核、未破碎的细胞和大的膜碎片。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 2000g 离心 10min，其缺点是相同数量细胞的线粒体抽提得率会下降。

6、上清液转移至一干净离心管，4℃ 12000g 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 6000g 离心 10min，其缺点是相同数量细胞的线粒体抽提得率会下降。

7、弃上清，沉淀为线粒体，如果希望获得去除线粒体的细胞浆蛋白，应在本步骤中收集上清，并且在收集上清时注意勿触及沉淀，随后把收集的上清 12000g 4℃离心 10min，上清即为去除线粒体的细胞浆蛋白。

8、保存：弃上清，用适当缓冲液悬浮沉淀。如果用于线粒体酶活性或功能的分析，线粒体沉淀应重悬于 Mitochondria Stock Buffer；如果用于线粒体蛋白的分析，获得的细胞浆蛋白应保存于 1×Protein Stock Buffer，即按细胞浆蛋白：Protein Stock Buffer (5×)=1：4 比例混合；如果用于双向电泳，应使用恰当的保存液。

注意事项：

1、试剂(如 PMSF)对于不同实验不必全部使用，在实验条件成熟后可以不必使用。

2、如果不是用于制备线粒体蛋白，Mitochondria Lysis Buffer 和 Mitochondria Stock Buffer 不必加入 PMSF；如果用于制备线粒体蛋白样品，Mitochondria Lysis Buffer 和 Mitochondria Stock Buffer 需添加 PMSF；PMSF 一定要在试剂加入到样品中前 1～2min 内加入，以免 PMSF 在水溶液中很快失效。

3、分离线粒体的所有步骤均需在冰上或 4℃进行，所用溶液需冰浴或 4℃预冷，全部操作时间尽量控制在 1h 以内。

4、通常在分离线粒体时前后两次离心速度选取 1000g 和 12000g，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用 2000g 和 6000g。

5、试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。

6、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。



有效期：12 个月有效。低温运输，按要求保存。

相关产品：

产品编号	产品名称
GCCS0001	ACK 红细胞裂解液(ACK Lysis Buffer)
GCPW0053	Western 抗体洗脱液(碱性)
GCTC0713	葡萄糖检测试剂盒(GOD-POD 比色法)