

Minute™ 酵母线粒体富集试剂盒

目录号:YM-017

描述:

传统酵母线粒体分离方案通常涉及基于离心的多个亚细胞分级分离步骤。这些方法通常包括酵母细胞制备、玻璃珠裂解均质化处理、差速离心以及各类使用超速离心机的密度梯度程序，这些流程费力且耗时。

相比之下，我们提供了一种简单快速的酵母线粒体富集方案。这种温和、无需特殊仪器的方法能在大约 1 小时内完成天然线粒体及其关联蛋白的分离，且无需超速离心。试剂盒中配有优化的无表面活性剂的缓冲液，每份样本可产出 50-100ug 线粒体蛋白。

应用:

分离出的线粒体可应用于 SDS-PAGE, WB, IP, ELISA, 酶活性检测，蛋白质组学及其他生化分析。

试剂盒组分(50 Preps):

1. 30ml 缓冲液 A
2. 10ml 缓冲液 B
3. 5g 蛋白提取粉
4. 2 根 1.5ml 离心管研磨棒
5. 50 个 1.5ml 离心管

储存:

-20℃储存

所需附加材料：

1XPBS, 台式离心机(最大离心力大于 14,000 X g)

重要信息：

在分离前建议在分装的 Buffer A 中添加蛋白酶抑制剂。如研究蛋白磷酸化，磷酸酶抑制剂应在使用前加入缓冲液 A 中。（请按照蛋白酶或磷酸酶抑制剂母液比例，例如母液是 100x，添加时按照 1：100 添加，1ml 缓冲液 A 添加 10ul 抑制剂）。推荐使用 BCA（Pierce）试剂盒用于蛋白浓度测定。

操作步骤：

1. 用**试剂盒提供**的 1.5ml 离心管离心收集处于对数生长期的酵母细胞，确保收集细胞的湿体积在 30-40ul 之间，细胞体积大小可通过与另一个装入 30-40ul 水的 1.5ml 离心管进行对比。
2. 加入 1ml 预冷的水重悬细胞，加入 100mg 蛋白提取粉到管中，涡旋震荡混匀，然后在最高转速下离心 2 分钟，完全弃掉上清液。
3. 用提供的研磨棒反复扭转按压研磨沉淀 2-3 分钟（大约 300-400 次研磨）。加入 300ul Buffer A 到管中，继续研磨 30 秒。（注意：研磨棒可重复使用，简单浸泡在洗涤剂中，用清水冲洗干净，用纸巾擦干即可）。盖上盖子，大力涡旋震荡 10 秒。
4. 4℃，2,000Xg，离心 2 分钟。将上清液转移到新的预冷的 1.5ml 离心管中（实验室自备），放置于冰上。沉淀再次重复步骤 3 一次，在冰上合并两次上清液（600ul）在离心管中。
5. 4℃，最高离心力下离心 20 分钟。将上清转移到新的离心管中**(此部分为酵母胞浆蛋白组分)**。漂浮的白色物质是细胞壁碎片，可以通过移液去除。沉淀中加入 200ul Buffer B 用移液器吹打 20-30 次重悬沉淀，并确保同时冲洗管壁完全重悬。为了提高线粒体的纯度，可以进行可选的离心步骤（见技术说明 4）。

注意：提高纯度的同时会降低得率，建议在得率可控的范围下再考虑进行纯化。

6. 向含有 200ul 重悬浮沉淀的离心管中加入 1.4ml 预冷的 1X PBS。盖上管盖，倒置几次，4°C 以最高转速离心 30 分钟。沉淀即为富集的**酵母线粒体**，可用 50-150ul 含去污剂的缓冲液将其溶解（见技术说明 2）。最终制备物通常含有 50-100ug 蛋白质。为提高线粒体溶解效率推荐使用下表中的溶解液。对于等电聚焦（2D 胶的第一维），建议使用：7M 尿素、2M 硫代尿素、2% CHAPS 和 20MM DTT（在使用前将 DTT 加入混合物中）。

推荐按照下游实验应用选购以下蛋白溶解液溶解线粒体蛋白

产品名称	货号	下游实验应用
Minute™ 变性蛋白溶解液	WA-009	SDS-PAGE 电泳，WB，胰酶消化，用生物素标记或组氨酸标记纯化蛋白质等实验
Minute™ 非变性蛋白溶解液	WA-010	ELISA，IP，CO-IP，酶活性检测等其他应用
Minute™ 质谱专用蛋白溶解液	WA-011	胰酶消化及后续的质谱分析

技术说明：

1. 蛋白质产量与起始细胞数量和研磨时间成正比。研磨可以通过扭转和上下按压来完成。初始细胞体积最多可使用 50ul。
2. 用含去污剂的缓冲液重新悬浮线粒体沉淀，确保彻底冲洗管壁。将混合物在室温下孵育 5 分钟，然后以 10,000 X g 离心 3 分钟。沉淀包含残留的完整酵母细胞和不溶性物质。将上清液转移到新的微量离心管中以用于进一步的应用。
3. 为了评估线粒体的富集程度，我们建议使用酵母线粒体特异性抗体（例如 Por1）进行 WB 分析，需确保在总细胞裂解物和富集的线粒体组分之间进行等量蛋白质上样的比较。
4. 为了提高线粒体纯度，可以进行以下可选步骤：在步骤 5 用 200 ul 缓冲液 B 重悬浮沉淀后，4°C，

4,000 X g 离心 5 分钟。将上清液转移到新的 1.5ml 离心管中，加入 1.4ml 预冷的 PBS，然后按照步骤 6 中描述的方法进行离心。

更多信息和活动请扫描
二维码关注官方公众号

