

# Minute<sup>TM</sup> 线粒体分离试剂盒 (动物细胞和组织)

目录号 MP-007

## 描述：

Minute<sup>TM</sup> 线粒体分离试剂盒，由优化缓冲液系统和离心管柱及 2.0ml 接收管组成，能够快速从动物细胞和组织中分离出天然线粒体蛋白。由于使用了方便，简单，高产的离心管柱技术，与其他商业试剂盒相比，样品处理范围更广泛，可从 5-40million/样品中分离出完整的线粒体。缓冲液系统不含表面活性剂和 EDTA，无需匀浆器或组织搅拌器，操作可在 30 分钟完成。

## 应用：

可应用于 SDS-PAGE, immunoblottings, IP, ELISA, 膜蛋白结构分析, 2-D, 酶活性检测及其他应用。

## 试剂盒组分

1. 15ml 缓冲液 A
2. 30ml 缓冲液 B
3. 50 个离心管柱
4. 50 个收集管
5. 4 根塑料研磨棒
6. 组织研磨粉

## 储存：

-20C°储存

## 所需附加材料：

1XPBS

涡旋震荡仪

台式离心机

## 重要信息

1. 仔细阅读整个操作说明。将缓冲液 A 和缓冲液 B 完全解冻后摇匀，放置于冰上。将离心管柱和接收管套管放置于冰上预冷。
2. 所有离心步骤都应在 4°C 室温下或者低温离心机中进行。
3. 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。蛋白酶抑制剂可根据情况选择添加或不添加。
4. 推荐使用 BCA (Pierce, Cat #:23227) 试剂盒用于蛋白浓度测定

## 操作步骤：

**(操作说明中 rpm 是根据 Eppendorf5415C 台式离心机计算)，不同离心机可按步骤中 Xg 换算。**

1. 将缓冲液 A 和缓冲液 B 完全解冻后摇匀，放置于冰上。将离心管柱和接收管套管放置于冰上预冷。
2. 低速离心 (500-600Xg, 5 分钟) 收集 5-40 X 10<sup>6</sup> 个细胞。**(建议使用 3-4X10<sup>7</sup> 个细胞效果为佳)**  
**(贴壁细胞样品建议使用细胞刮刀收集，尽量不使用胰酶消化)**
3. 用预冷的 PBS 清洗一次细胞。弃去上清，加入 250ul Buffer A 涡旋震荡重悬细胞。冰上孵育 5-10 分钟，涡旋大力震荡 20-30 秒。将细胞悬液转入离心管柱中。接转步骤 4。

**组织样品**，将新鲜组织或冷冻组织 (20-30mg) 放置于离心管柱上。加入 250ul Buffer A，用塑料棒反复扭转研磨组织 1 分钟 (注意：如果你的样品是骨骼肌，在研磨前加入 100-120mg 组织分离粉)。开盖冰上孵育 5 分钟。接转步骤 4。

**注意：**少量非均质组织不会影响样本质量。塑料棒可重复使用，用 75% 酒精擦拭或用蒸馏水冲洗干净。

4. 盖上盖子，14000rpm (16,000Xg) 离心 30 秒。**(需要最短时间达到设定转速)**，弃去离心管柱，涡旋震荡重悬沉淀。

**可选优化：**细胞样品建议第 4 步完成后再次重悬细胞，转移回同个离心管柱中，14000rpm

**(16,000Xg) 再次离心 30 秒，重复此步骤可以增加 20-30%产量。**

5. 涡旋震荡重悬沉淀，3000rpm 离心 1 分钟 **(沉淀为细胞核)**，小心的将上清液转移到新的 2.0ml 离心管中，加入 400ul 缓冲液 B，涡旋震荡 10 秒混合溶液。
6. 14000rpm (16,000Xg) 离心 10 分钟。弃去上清液 **(上清液包含胞浆和质膜蛋白)**，加入 200ul 缓冲液 B 涡旋震荡 10 秒重悬沉淀。10000rpm (7800Xg) 离心 5 分钟 **(沉淀为比线粒体大的细胞器)**。将上清液转移到新的 2.0ml 离心管中。加入 1.6ml 预冷的 PBS，14000rpm (16,000Xg) 离心 15 分钟。弃去上清液 **(上清为比线粒体小的细胞器)**，保存沉淀 **(沉淀为分离出的线粒体)**。  
一般可获得 5-200ug 蛋白。

线粒体蛋白可以根据下游实验需求使用 10-200ul 含有表面活性剂的缓冲液溶解。推荐使用下表中 Minute™ 系列溶解液溶解线粒体。做等电聚焦 (2D 凝胶第一维) 我们建议使用：7M 尿素/2M 硫脲/2%Chaps 和 20mM DTT (使用前将 DTT 加入以上混合液中)。

**推荐按照下游实验应用选择以下蛋白溶解液**

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

## 常见问题

问题	解决方案
低蛋白产量	增加起始细胞数量 步骤 3 孵育时间增加到 10 分钟
低蛋白活性	保持样品低温/加入蛋白酶抑制剂
离心 30 秒后离心管中还存留细胞裂解液	减少起始细胞数量或增加离心时间到 2 分钟

更多信息和活动请扫描  
二维码关注官方公众号

