

Minute™ 肌肉组织及细胞线粒体提取试剂盒

目录号 MM-038

描述：

肌肉细胞内拥有大量的线粒体是因为肌肉细胞不断被用来驱动身体，另一种富含线粒体的器官是心脏，线粒体约占心脏细胞的 40%。然而，从肌肉组织中分离线粒体并非易事，因为纤维间线粒体隐藏在肌肉纤维的深处。传统方法通常需要使用电动组织匀浆机，并使用超高速离心机，利用高密度介质（如 Percoll 梯度）进行纯化。本试剂盒利用了新一代离心管柱技术，可以从肌肉样品中快速、简单的分离线粒体，且易操作。从新鲜/冷冻肌肉组织中分离完整的线粒体仅需约 1 小时，产率高。

应用：

该试剂盒用于快速从肌肉组织/培养的肌肉细胞中分离线粒体，用于 SDS-PAGE, 免疫印迹, ELISA, IP, 2-D 凝胶, 酶活性测定, 线粒体膜电位测定和其他应用。

试剂盒组分 (50T)

1. Buffer A 25ml
2. Buffer B 10ml
3. 离心管柱 50 个
4. 收集管 50 个
5. 研磨棒 2 个
6. 组织研磨粉 5g

运输及储存： Buffer A 和 Buffer B, 4°C 运输, -20°C 储存。

附加材料：

1xPBS 无钙离子

震荡器

台式离心机(10s 内可以达到 16000Xg)

重要产品信息：

- 1.仔细阅读整个说明书。完全解冻缓冲液 A 和缓冲液 B，冰上预冷离心管柱和收集管。
- 2.所有离心步骤应在 4°C 的冷室或冷冻离心机中进行。
- 3.如果研究蛋白质磷酸化，应在使用前将磷酸酶抑制剂加入缓冲液 A 中，同时建议加入蛋白酶抑制剂。
- 4.建议使用 BCA 蛋白质分析试剂盒测定蛋白质浓度。
- 5.塑料棒是可重复使用的，用水清洗并用纸巾擦干即可。

线粒体分离步骤：

1. 样品准备：完全解冻缓冲液，将瓶子翻转几次并放在冰上。冰上预冷离心管柱和收集管

组织样本：将一片新鲜/冷冻组织（30-40 毫克）放在干净的玻璃或塑料板的表面上。用锋利的刀片将组织切成小块直到组织转变成糊状物质（这将花费约 3-4 分钟）。将切碎的组织转移到离心管柱上。向离心管柱上加入 80mg 组织研磨粉，然后加入 200 μ l 缓冲液 A。用提供的塑料棒用扭转力反复将组织推到离心管柱表面重复研磨组织 2-3 分钟。再次加入 300 μ l 缓冲液 A 到离心管柱中。转到第 2 步。

培养的肌细胞：通过低速离心（600 \times g，5 分钟）收获 20-30 百万个细胞。用 1ml 冷 PBS 洗涤一次并完全除去 PBS。将沉淀重悬于 50 μ l 缓冲液 A 中并转移至离心管柱中。向离心管柱中加入 80mg 组织研磨粉，用提供的塑料棒用扭转力反复将组织推到离心管柱表面重复研磨组织 2-3 分钟。再次加入 300 μ l 缓冲液 A 到离心管柱中。转到第 2 步。

2. 盖上离心管柱并将管倒置几次，然后 16,000 Xg 离心 30 秒。弃去离心管柱并短暂涡旋管以重悬沉淀。
3. 1,000 Xg 离心管 5 分钟（沉淀物含有细胞核，细胞碎片和一些未破裂的细胞）。将上清液转移到新的微量离心管中，以 11,000 \times g 离心 20 分钟。
4. 完全去除上清液（上清是细胞浆部分，可能含有一些破碎的线粒体，特别是当使用冷冻组织时，如需要可保存）。沉淀中加入 200 μ l 缓冲液 B 上下吹打 30-40 次重悬，然后剧烈涡旋震荡 20 秒。
5. 11,000 Xg 离心 10 分钟（此步骤离心时间范围为 5-15 分钟，对于特定样品，可进行优化以获得最佳结果。通常，缩短离心时间可以提高线粒体的产量，延长离心时间可以提高线粒体纯度但可能会降低最终

产量)。离心后，将上清液转移到新的 1.5ml 离心管中，并向管中加入 0.3ml 预冷 PBS，涡旋震荡充分混匀。

6. 16,000×g 离心 20 分钟。沉淀是分离的完整的线粒体。通常，可以获得 10-100μg 蛋白质。线粒体沉淀可溶于 20-100μl 蛋白溶解液中。对于等电聚焦（2D 凝胶的第一维），我们建议使用：7M 尿素/ 2M 硫代尿素/ 2%Chaps 和 20mM DTT（在使用前将 DTT 添加到上述混合物中）。根据不同的下游应用，推荐选购以下溶解液来溶解线粒体。

推荐按照下游实验应用选购以下蛋白溶解液

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	增加样品起始量 增加研磨时间或增加步骤 6 离心时间
严重交叉污染	最终线粒体沉淀使用 0.5ml 含 0.3M NaCl 的不含钙 PBS 溶液清洗
第 2 步离心 30 秒后离心管中尚存留细胞裂解液	减少起始样品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

