

Minute™ 哺乳动物细胞/组织线粒体分离试剂盒

目录号：MP-007

描述：

Minute™ 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完整天然的线粒体。由于使用离心管柱技术使得分离操作变得方便，简单，高产，易用。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。缓冲液系统不含任何表面活性剂和 EDTA，无需使用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

50T:

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. 2 根塑料研磨棒

4T:

1. 1.5ml 缓冲液 A
2. 3.0ml 缓冲液 B
3. 4 个离心管柱
4. 4 个收集管
5. 1 根塑料研磨棒

储存： -20℃ 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。使用前将缓冲液 A 和缓冲液 B 完全解冻后翻转摇匀，放置于冰上。将离心管柱和接收管套管放置于冰上预冷。
2. **离心机请调整成RCF/Xg模式，按照离心力设置离心机**，所有离心步骤都应在4℃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。
(添加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)。
4. 推荐使用 BCA 法测定蛋白浓度。

操作步骤：

- 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 10-40 X 10⁶ 个细胞。**(建议使用 3-4X10⁷ 个细胞效果为佳)**
3. 用 1ml 预冷的 PBS 清洗一次细胞。完全弃去上清，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，确保细胞打散。将细胞悬液转入离心管柱套管中。接转步骤 4。

组织样品，将新鲜组织或冷冻组织 (20-30mg) 放置于离心管柱套管上。加入 250ul Buffer A，用塑料研磨棒反复向下按压扭转研磨组织 1 分钟，**开盖**冰上孵育 5 分钟。接转步骤 4。如果样品是肌肉组织请选用 Minute™ 肌肉组织及细胞线粒体分离试剂盒(Cat# MM-038)。

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

- 4.盖上盖子，16,000Xg 离心 30 秒。**(离心机需在 10S 左右达到 16,000Xg)**，弃去离心管柱，涡旋震荡重悬接收管中沉淀。

可选优化：细胞样品建议第 4 步离心后再次重悬接收管中细胞，转移回同个离心管柱中，16,000Xg 再次离心 30 秒，重复过柱步骤可以增加 20-30%产量。

5. 涡旋震荡重悬沉淀后，700Xg 离心 1 分钟（沉淀为细胞核及部分未破碎细胞），小心地将上清液转移到新的 1.5ml 离心管中，加入 300ul 缓冲液 B（上清液和缓冲液 B 比例为 1:1.2 即 250ul/300ul），涡旋震荡 10 秒混合溶液。注意：加入缓冲液 B 的比例可以在 1:1 到 1:1.6（250ul/400ul）之间调整。如果最终线粒体得率比较低可以调整缓冲液 B 比例为 1:1。如果得到的线粒体交叉污染比较严重可以调整缓冲液 B 比例为 1:1.5 或者 1:1.6。
6. 16,000Xg 离心 10 分钟（如果最终线粒体产量过低，可以将此步离心时间延长至 30min）。弃去上清液（上清液包含胞浆和质膜蛋白，如需要可保持），加入 200ul 缓冲液 B 吹打重悬沉淀，再涡旋震荡 10-20 秒混匀。
7. 8,000Xg 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，16,000Xg 离心 15-30 分钟。弃去上清液（上清为比线粒体小的细胞器），保存沉淀（沉淀为线粒体）。一般每个样品可获得 10-200ug 蛋白。线粒体沉淀可以根据下游实验需求使用 10-200ul 含有表面活性剂的溶解液溶解。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, 用生物素标记或氨基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 5 改变上清与缓冲液 B 的比例; 步骤 6 增加离心时间
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

