

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. 缓冲液 A 25ml
2. 缓冲液 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：

4°C 运输，-20°C 储存。

附加材料：

1xPBS 无钙离子

振荡器

台式离心机(10s 内可以达到 16,000Xg)

重要产品信息：

- 1.仔细阅读整个说明书。使用前完全解冻缓冲液 A 和缓冲液 B，冰上预冷离心管柱和收集管。
- 2.离心机请调整成RCF/ Xg模式，按照离心力设置离心机，所有离心步骤应在4°C室温下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。(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.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套管中。向离心管柱上加入 80mg 组织研磨粉，然后加入 200 μ l buffer A。用提供的塑料棒反复向下按压扭转将组织研磨组织 2-3 分钟。再次加入 300 μ l buffer A 到离心管柱中。转到第 2 步。

培养的肌肉细胞样品：通过低速离心（600 Xg，5 分钟）收获 $2-3 \times 10^7$ 个细胞。用 1ml 冷 PBS 清洗细胞一次并完全除去 PBS。加入 50 μ l buffer A 重悬细胞沉淀并转移至离心管柱套管中。向离心管柱中加入 80mg 组织研磨粉，用提供的塑料棒反复向下按压扭转研磨 2-3 分钟。再次加入 300 μ l buffer A 到离心管柱中。转到第 2 步。

2. 盖上离心管柱并翻转混匀几次，然后 16,000 Xg 离心 30 秒。弃去离心管柱并涡旋震荡重悬接收管中沉淀。
3. 1,000 Xg 离心 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 1.5ml 离心管中，11,000 Xg 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 buffer B 上下吹打 30-40 次重悬沉淀，然后大力涡旋震荡 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 Xg 离心 20 分钟。沉淀是分离的完整的线粒体。通常可以获得 10-100 μ g 蛋白质。线粒体沉淀可根据下游实验溶于 20-100 μ l 含有表面活性剂的溶解液中。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 秒后离心管中中还存留细胞裂解液	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

