

ProteinExt[®] Mammalian Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells

使用前请仔细阅读说明书

目录号: DE401

保存: ProteinSafe[™] Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-free (100×)和 MSB -20℃保存一年, 其它2-8℃保存一年。

产品说明

ProteinExt[®] Mammalian Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells提供了两种用于分离哺乳动物细胞线粒体的方法(试剂法和匀浆法)。同匀浆法相比,试剂法的提取过程更温和,无需进行匀浆可以最大限度地降低对线粒体的损害,并且可以同时处理多个样品。本试剂盒具有分离效果好、操作简便、快速等优点,分离出的线粒体可用于蛋白检测、细胞凋亡、信号转导及代谢研究等实验。

试剂盒组成

Component	DE401-01 (50 rxns)
Mitochondria Isolation Buffer I (MIB I)	50 ml
Mitochondria Isolation Buffer II (MIB II)	500 μl
Mitochondria Isolation Buffer III (MIB III)	65 ml
Mitochondria Storage Buffer (MSB)	4 ml
ProteinSafe [™] Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-free (100×)	1.2 ml

操作方法

方法一: 试剂法

- 1、收集 2×10^7 个细胞,用1 ml预冷的PBS洗涤两次,1,000×g离心3分钟,小心弃上清。
- 2、向细胞沉淀中加入800 μl MIB I,振荡5秒,冰上静置2分钟(不要超过2分钟)。
- 3、加入10 μl MIB II,剧烈振荡5秒。
- 4、冰上孵育5分钟,期间每分钟剧烈振荡一次。
- 5、加入800 μl MIB III,颠倒混匀5-6次(切勿振荡)。
- 6、2-8℃,700×g离心10分钟。
- 7、小心将上清转移至一个新的2 ml离心管,2-8℃,12,000×g离心15分钟。(注:如需获得更高纯度的线粒体,可以将此步的离心速度改为3,000×g,其它条件不变。不过,获得更高纯度线粒体的缺点是,相同数量细胞的线粒体得率也会降低。)
- 8、小心收集上清(细胞浆蛋白),于-80℃保存。
- 9、向沉淀中加入500 μl MIB III,重悬。
- 10、2-8℃,12,000×g离心15分钟。
- 11、小心弃上清,沉淀即为线粒体。
- 12、(可选步骤1)如线粒体样品用于蛋白检测,可以直接加入蛋白裂解液裂解,推荐使用TransGen ProteinExt[®] Mammalian Total Protein Extraction Kit,目录号DE101。另外,也可将线粒体或线粒体裂解物置于-80℃保存备用。
- 13、(可选步骤2)如线粒体样品用于功能检测,可加入MSB (~40 μl/1×10⁷个细胞),重悬后1小时内检测。

方法二: 匀浆法

- 1、收集 2×10^7 个细胞,用1 ml预冷的PBS洗涤两次,1,000×g离心3分钟,小心弃上清。
- 2、向沉淀中加入1 ml MIB I,振荡5秒,冰上静置2分钟(不要超过2分钟)。
- 3、将细胞悬液转移至玻璃匀浆器中,匀浆30-50次(注:可以将细胞用0.4%台盼蓝染色,置于显微镜下观察,当大于50%的细胞着色时,即可停止匀浆。匀浆次数过少会影响线粒体的得率,而过度匀浆则会导致线粒体的机械损伤)。



4、将细胞悬液转移至一个新的2 ml离心管。

5、以下步骤同“试剂法”操作方法第5-12步。

注意事项

- MIBI、MIBIII和MSB使用前需加入ProteinSafe™ Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-free (100×), 使其工作浓度为1×。
- 所有操作均需在冰上或2-8℃进行。
- 采用匀浆法时, 需自备1-2 ml玻璃匀浆器, 匀浆次数随细胞和细胞数不同而不同。
- 如需进行下游功能检测, 则要使用新鲜的细胞样品进行线粒体提取。

本产品仅供研究, 不用于临床诊断。

服务投诉电话 +86-10-57815020

服务投诉邮箱 complaints@transgen.com.cn

