



细胞线粒体分离试剂盒

包装清单

| Cat No. | 组分 | 包装规格-100T |
|----------|--|-------------------|
| MCK-0021 | 线粒体分离试剂 (Mitochondria Isolation Reagent) | 125 mL |
| | 台盼蓝染色液 (Trypan Blue) | 10 mL |
| | 线粒体储存液 (Mitochondria Storage Buffer) | 15 mL |
| | 线粒体裂解液 (Mitochondria Lysis Buffer) | 15 mL |
| | PMSF(晶体) | For 1.5 mL 100 mM |
| | PMSF(溶剂) | 1.5 mL |
| | 说明书 | 1 份 |

产品简介

细胞线粒体分离试剂盒(Cell Mitochondria Isolation Kit)是用于快速便捷地分离培养细胞线粒体的试剂盒。

线粒体是真核细胞中产生能量的主要部位，具有双层膜结构。制备线粒体的关键在于确保线粒体的完整性和纯度。通常先低速离心去除细胞核及细胞碎片，再高速离心获得线粒体。

默科的细胞线粒体分离试剂盒可快速分离所培养细胞的线粒体，且线粒体纯度较高，绝大多数具有完整的内外膜及生理功能。提取的线粒体也可被相应裂解液裂解后得到线粒体蛋白，用于 SDS-PAGE、WB、双向电泳等蛋白分析。此外，本试剂盒也可用于提取不含线粒体的细胞浆蛋白。本试剂盒可检测 50-100 个样品，建议每个样品的细胞数量为 $2-5 \times 10^7$ 个。

保存条件

-20°C 保存，有效期 1 年。其中台盼蓝染色液也可以 4°C 保存，PMSF(晶体)和 PMSF(溶剂)在配制 100mM PMSF 溶液前可以室温保存。

注意事项

- 若要制备线粒体蛋白样品，需在 Mitochondria Isolation Reagent 和 Mitochondria Lysis Buffer 中加入 PMSF，且 PMSF 一定要在试剂加入样品前 1-2 min 内加入，防止 PMSF 失效。
- 整个实验在冰上或 4°C 进行。所用溶液需冰浴或 4°C 预冷。
- 本实验获得的线粒体样品若不能及时使用，建议 -80°C 保存。冻存后的线粒体不建议用于膜电位的检测。
- Trypan Blue 和 PMSF 对人体有害，使用时务必小心。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明

- 从 -20°C 冰箱中取出各试剂，室温解冻，置于冰上备用。
- 将 1.5mL PMSF (solvent) 加入 PMSF (crystal) 中，充分溶解，即得 1.5mL 100mM PMSF 溶液。
- 提前接种细胞，至细胞密度达到 70-90%。
- 收集细胞：

贴壁细胞：弃去细胞培养液，加入 PBS 洗涤一次。加入 Trypsin Buffer 消化细胞，100-200 g，4°C 离心 5-10 分钟。

悬浮细胞：100-200 g，4°C 离心 5-10 分钟收集细胞。注：Trypsin Buffer 本试剂盒未提供，需另行购买。

- 加入预冷的 PBS 重悬细胞，600 g，4°C 离心 5 分钟，弃去上清。
- 每 $2-5 \times 10^7$ 个细胞中加入 1-2.5 mL Mitochondria Isolation Reagent (含 1 mM PMSF)，轻轻重悬细胞，冰浴 10-15 分钟。
- 将细胞悬液转移至匀浆器中，匀浆 10-30 下。

注：①需根据细胞类型及匀浆器类型自行优化匀浆次数。②可在匀浆 10 次后取 2 μ L 细胞匀浆，加入 30-50 μ L Trypan Blue 染色鉴定匀浆效果。若阳性细胞（蓝色）比例不足 80%，增加 5 次匀浆并用 Trypan Blue 染色鉴定，直至阳性比例超过 80%。③请勿过度匀浆，防止线粒体损伤。

- 将细胞匀浆 600 g，4°C 离心 10 分钟。

注：此步离心目的在于去除细胞核、细胞碎片及未裂解细胞。将离心速度提升至 1,000 g 可获得更纯的线粒体，但线粒体抽提率相对下降。

- 将上清转移至干净的离心管，11,000 g，4°C 离心 10 分钟。

注：此步离心目的在于沉淀线粒体。将离心速度改为 3,500 g 可获得更纯的线粒体，但线粒体抽提率相对下降。

- 弃去上清，所得沉淀即为细胞线粒体。

注：此步骤也可用于获得不含线粒体的细胞浆蛋白。收集本步骤中的上清，12,000 g，4°C 离心 10 分钟，获得的上清液即为不含线粒体的细胞浆蛋白。后续可用 BCA 法或 Bradford 法测定蛋白浓度。