

# ProteinExt<sup>®</sup> Mammalian Mitochondria Isolation Kit for Tissue

使用前请仔细阅读说明书

目录号: DE501

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<sup>®</sup> Mammalian Mitochondria Isolation Kit for Tissue提供了两种用于分离哺乳动物组织样品线粒体的方法(试剂法和匀浆法)。同匀浆法相比,试剂法的提取过程更温和,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,分离出的线粒体适用于蛋白检测、细胞凋亡、信号转导及代谢研究等实验。

## 试剂盒组成

Component	DE501-01 (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
Bovine Serum Albumin (BSA)	500 mg
ProteinSafe™ Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-free (100×)	1.2 ml

## 软组织操作步骤

### 方法一: 试剂法

- 1、取50-200 mg组织, 加入1 ml预冷的PBS, 将组织剪成小块。
- 2、将剪碎的组织转移至玻璃匀浆器中进行匀浆(通常只需3-5次即可, 切勿过度匀浆, 导致细胞破裂), 1,000×g离心3分钟, 小心弃上清。
- 3、加入2 ml PBS, 重悬, 1,000×g离心3分钟, 小心弃上清。
- 4、加入800 µl MIB I/BSA (含有4 mg/ml BSA的MIB I), 振荡5秒, 冰上静置2分钟(不要超过2分钟)。
- 5、加入10 µl MIB II, 振荡5秒。
- 6、冰上孵育5分钟, 期间每分钟振荡一次。
- 7、加入800 µl MIB III, 颠倒混匀5-6次(切勿振荡)。
- 8、2-8℃, 700×g离心10分钟。
- 9、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。)
- 10、小心收集上清(细胞浆蛋白), 于-80℃保存。
- 11、向沉淀中加入500 µl MIB III, 重悬。
- 12、2-8℃, 12,000×g离心15分钟。
- 13、小心弃上清, 沉淀即为线粒体。
- 14、(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<sup>®</sup> 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。
- 15、(可选步骤2)如线粒体样品用于功能检测, 可加入MSB (~40 µl/100 mg组织), 重悬后1小时内检测。



### 方法二：匀浆法

- 1、同“软组织操作方法一：试剂法”步骤1。
- 2、同“软组织操作方法一：试剂法”步骤2。
- 3、同“软组织操作方法一：试剂法”步骤3。
- 4、加入1 ml MIB I/BSA (含有4 mg/ml BSA的MIB I), 振荡5秒, 冰上静置2分钟 (不要超过2分钟)。
- 5、将组织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。)
- 6、将细胞悬液转移至一个新的2 ml离心管。
- 7、后续步骤同“软组织操作方法一：试剂法”步骤7-15。

### 硬组织操作方法

#### 方法一：试剂法

- 1、取50-200 mg组织, 加入2-4 ml预冷的PBS洗涤, 小心弃PBS, 用剪刀将组织剪成小块。
- 2、(可选步骤)加入750  $\mu$ l胰酶 (0.25%), 冰上消化3分钟, 1,000 $\times$ g离心3分钟, 小心弃上清。
- 3、加入750  $\mu$ l PBS/BSA (含有4 mg/ml BSA的PBS), 将组织转移至玻璃匀浆器中进行匀浆 (通常只需3-5次即可, 切勿过度匀浆, 导致细胞破裂), 1,000 $\times$ g离心3分钟, 小心弃上清。
- 4、后续步骤同“软组织操作方法一：试剂法”步骤4-15。

#### 方法二：匀浆法

- 1、同“硬组织操作方法一：试剂法”步骤1。
- 2、(可选步骤)同“硬组织操作方法一：试剂法”步骤2。
- 3、加入750  $\mu$ l PBS/BSA (含有4 mg/ml BSA的PBS), 混匀, 1,000 $\times$ g离心3分钟, 小心弃上清。
- 4、加入1 ml BSA/MIB I (含有4 mg/ml BSA的MIB I), 振荡5秒, 冰上静置2分钟 (不要超过2分钟)。
- 5、将组织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。)
- 6、将细胞悬液转移至一个新的2 ml离心管。
- 7、后续步骤同“软组织操作方法一：试剂法”步骤7-15。

### 注意事项

- MIB I、III和MSB使用前需加入ProteinSafe™ Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-free (100 $\times$ ), 使其工作浓度为1 $\times$ 。
- 所有操作均需在冰上或2-8 $^{\circ}$ C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, 则要使用新鲜的组织样品进行线粒体提取。

本产品仅供研究, 不用于临床诊断。

版本号: V1-202008

服务投诉电话 +86-10-57815020

服务投诉邮箱 complaints@transgen.com.cn

