线粒体蛋白提取试剂盒

50T WLA034a

仅用于科学研究,不能用于诊断

产品信息

产品名称 线粒体蛋白提取试剂盒

产品概述 本试剂盒用于从哺乳动物组织或细胞中提取线粒体蛋白。其原理首先是从动物组织或细胞中分离出完整的线粒体，然后用含有蛋白酶抑制剂及磷酸酶抑制剂的裂解缓冲液裂解线粒体得到高纯度的线粒体蛋白。

本试剂盒可用于Western Blot、免疫共沉淀等后续研究。

包装信息

WLA034a	试剂名称				
	线粒体蛋白抽提试剂A	线粒体蛋白抽提试剂B	线粒体蛋白抽提试剂C	0.1M PMSF	1M DTT
50T	50ml	10ml	5ml	600μl	100μl
保存条件	-20℃	-20℃	-20℃	-20℃	-20℃

保存条件 本试剂盒各试剂均于-20℃保存，自订购之日起一年内有效。

注意事项

1. 全程低温操作。
2. 微量制备比大规模制备操作更方便和快速，因而更容易获得完整的线粒体。
3. 在不破坏亚细胞器的情况下破碎细胞是制备线粒体的最关键环节。与组织块相比，培养细胞特别是贴壁培养细胞在用玻璃匀浆器匀浆时较难破壁，因而要选用小容量玻璃匀浆器、间隙严密的研杵上下研磨培养细胞。在相差显微镜下检查未裂解细胞应在50%左右即可。过度研磨将破坏线粒体，研磨不足将降低得率。
4. 以离心力g计算正确的离心速度，不同的离心机可据此精确计算离心速度。相对离心力RCF值（g值）取决于转子的转速（rpm）和旋转半径（r，以mm计算），可用如下公式表示：RCF=1.11×10-6（rpm）2×r。
5. 进行Western Blot和2D电泳，可直接加入样品缓冲液裂解线粒体。
6. PMSF一定要在裂解液加入到样品中前2-3min内加入，以免PMSF在水溶液中不稳定而失效。
7. 本试剂盒对于组织样品，仅适合于新鲜组织，对冻存过的组织抽提效果较差。

操作流程

1. 准备试剂：室温溶解并分别混匀线粒体蛋白抽提试剂A和线粒体蛋白抽提试剂B后，立即冰浴。取适量的线粒体蛋白抽提试剂A和线粒体蛋白抽提试剂B备用，在使用前数分钟内加入PMSF和DTT，使其终浓度均为1mM。

2. 样本的处理及破碎效果的鉴定：

A. 细胞裂解匀浆

a. 取对数生长期5x10^{7}个细胞，弃培养液，用预冷的1xPBS洗2-3次。

b. 细胞重悬于1ml预冷的线粒体蛋白抽提试剂A，之后转移至1ml玻璃匀浆器中，于冰浴中上下抽拉30次，相差显微镜下检查未裂解细胞应在50%左右即可。

B. 组织裂解匀浆

a. 称取新鲜组织100-200mg，用PBS洗2-3次，并用滤纸吸干。

b. 把组织剪切成非常细小的碎片，每50-100mg加入1ml预冷的线粒体蛋白抽提试剂A，之后转移至1ml玻璃匀浆器中，于冰浴中上下抽拉20次，相差显微镜下检查未裂解细胞应在50%左右即可。

3. 去除细胞核和未破碎的细胞：

将细胞或组织匀浆物转移到离心管中，4℃，1000g离心10min，弃沉淀，将上清移至新EP管中。

4. 胞浆、线粒体粗品制备：

将上步骤中得到的上清4℃，10000g离心20min，所得上清和沉淀分别为胞浆、线粒体粗品。

5. 细胞浆蛋白的纯化：

将胞浆蛋白转移至离心管中，4℃，10000g离心20-30min，所得上清为纯化的胞浆蛋白。

6. 线粒体蛋白的提取：

将线粒体沉淀重悬于线粒体蛋白抽提试剂B中，4℃，10000g离心10min，重复3次，所得线粒体沉淀于线粒体蛋白抽提试剂C中溶解。

7. 蛋白浓度的测定：

用BCA法测定蛋白浓度，分装保存于-70℃。