

线粒体蛋白提取试剂盒

说明书修订日期: 2020.07.10

Cat Number: KGP850/KGP8100

Store at -20°C for 12 months

For Research Use Only (科研专用)

一、试剂盒说明

凯基线粒体蛋白提取试剂盒首先从动物细胞或组织中分离出完整而纯化的线粒体, 然后用含有蛋白酶抑制剂及磷酸酶抑制剂的裂解缓冲液 Lysis Buffer 裂解线粒体得到纯度高的线粒体蛋白。

本试剂盒适合于动物软组织(肝或脑组织)和硬组织(肌肉)以及培养细胞的线粒体蛋白的制备。其中线粒体的分离原理基本上采用: 第一, 通过机械方法破裂细胞; 第二, 通过低速差速离心去除残渣碎屑和巨大细胞器; 第三, 通过高速差速离心获得线粒体。获得的线粒体蛋白可用于 Western Blot、免疫共沉淀等后续研究。

二、试剂盒组份

组份	KGP850 50 tests	KGP8100 100 tests	保存条件
Lysis Buffer1	100 mL	200 mL	2-8°C
Medium Buffer	25 mL	50 mL	
Wash Buffer	10 mL	20 mL	
Lysis Buffer2	50 mL	100 mL	
100×磷酸酶抑制剂	250 μL	500 μL	-20°C
1000×蛋白酶抑制剂	50 μL	100 μL	
PMSF (100mM)	500 μL	1000 μL	

注意事项: Lysis Buffer1、Medium Buffer与Wash Buffer短期内(1-2周)可存放4℃, 若长期不使用需-20℃冻存。

三、操作步骤

I 线粒体的提取

1. 样本处理

- 组织匀浆: 称取 100~200 mg 新鲜组织如肝脏、脑、心肌等, PBS 或生理盐水冲洗, 洗净血水, 滤纸吸干, 用剪刀剪为碎块放入小容量玻璃匀浆器内。加入 1.5 mL 冰预冷的 Lysis Buffer1, 0°C 冰浴上下研磨组织 20 次;
- 培养细胞匀浆: 消化细胞, PBS 洗涤, 800 × g 5~10 min 离心收集细胞。计数。每次提取需要 5 × 10⁷ 个细胞, 加入 1.5 mL 冰预冷的 Lysis Buffer1 重悬细胞, 将细胞悬液转移到小容量玻璃匀浆器内, 0°C~4°C 冰浴用间隙严密的研杵研磨细胞 30~40 次;

- 将组织或细胞匀浆物转移到离心管, 4°C, 800 × g 离心 5 min。细胞核、大的膜碎片、未裂解细胞等在管底;
- 在另一个新的预冷的离心管中预先加入 0.5mL Medium Buffer, 将匀浆后的上清液 0.5mL (Medium Buffer: 上清液体积=1: 1) 沿管壁小心地加入该离心管中, 覆盖于 Medium Buffer 的上层。
- 4°C, 15,000 × g 离心 10 min。离心后的上清含胞浆成分, 将上清转移到新离心管(分装保存于-70°C), 留作后面 western 检测用;
- 在线粒体沉淀中加入 0.2 ml Wash Buffer 重悬线粒体沉淀, 即为分离出的线粒体。如需进行 WB 实验, 提取线粒体蛋白, 可接着 4°C, 15,000 × g 离心 10 min, 弃上清, 取线粒体沉淀裂解蛋白;

II 蛋白的提取

- 1、 在每 mL 冷 Lysis Buffer2 加入 5 μ L 磷酸酶抑制剂, 1 μ L 蛋白酶抑制剂和 5 μ L 100mM PMSF, 混匀。冰上保存数分钟待用。
- 2、 每 20 μ L 线粒体压积中, 加入 200 μ L 上述配制好的冷 Lysis Buffer2;
- 3、 置于 4 $^{\circ}$ C 摇床平台上, 温和振荡 15 min;
- 4、 14,000rpm, 4 $^{\circ}$ C 离心 15min, 取上清为线粒体蛋白提取物, 蛋白定量 (Bradford 法、BCA 法);
- 5、 分装保存于 -70 $^{\circ}$ C, 避免反复冻融, 留作后面 western 检测用。

四、注意事项

1. 为保证获得完整的线粒体, 第一是全程低温操作, 将样品管放在冰水浴而不是碎冰块中。第二是快速。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。第三, 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。
2. 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。
3. 进行 Western Blot 和 2D-胶电泳, 可直接加入样品缓冲液裂解线粒体。
4. 所有接触样品的用具及试剂均需预冷。

凯基相关产品 (详见凯基网站 <http://www.keygentec.com.cn>)

1、 蛋白提取

核蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒
全蛋白提取试剂盒
膜蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒
线粒体蛋白提取试剂盒
活性蛋白提取试剂盒
红细胞裂解液
细菌蛋白提取试剂盒
酵母蛋白提取试剂盒
植物蛋白提取试剂盒
蛋白裂解液系列

2、 蛋白定量

BCA 法蛋白定量检测试剂盒
Bradford 法蛋白定量检测试剂盒
Lowry 法蛋白定量检测试剂盒

3、 蛋白染色

蛋白质银染检测试剂盒
蛋白质考马斯亮蓝染色检测试剂盒
考马斯亮蓝蛋白快速染液

4、 蛋白分子量 Marker

5、 Western blotting 组装试剂盒

凯基蛋白提取和 SDS-PAGE 凝胶电泳试剂盒
凯基 Western blotting 检测试剂盒

6、 Western blotting 化学发光试剂盒

ECL 检测试剂盒
加强型 ECL 检测试剂盒