

## 升级版线粒体提取试剂盒 C0010

### 描述:

线粒体制备试剂盒 (Mitochondria Isolation Kit)用于从组织或培养细胞中分离线粒体和细胞胞浆成分。加入分离溶液,匀浆破碎组织细胞,经过数次800g和12000g离心,在60分钟内即可分离出**完整**的线粒体和胞浆成分。制备的线粒体具有很高的生物学活性,可进行各种功能研究如酶学测定,更可用于Western Blot、2D-胶、线粒体蛋白或DNA提取、蛋白质组学等研究。

严格按照说明操作,总是能制备获得高纯度线粒体。一篇方法学研究论文发现,用普利莱试剂盒制备线粒体的得率、活性、纯度优于蔗糖密度梯度离心法和 Invotrogen/Pierce 线粒体提取试剂盒方法。

### 适用:

从组织、培养细胞制备高纯度线粒体,同时分离细胞胞浆成分。

### 组成:

Mito Solution 100 ml for 50 次制备

200 ml for 100 次制备

### 储存:

-20 °C 12个月有效

### 操作步骤:

以下所有操作均在 4 °C 进行

- 组织匀浆:** 100~200 mg **新鲜**组织如肝、脑、肾、心肌等,剪为 0.5cm<sup>2</sup>碎块放入小容量玻璃匀浆器内。估计组织块总体积。加入 1.5 ml 冰预冷的 Mito Solution。用间隙严紧的研杵上下研磨组织 20 次。  
**培养细胞匀浆:** 800 × g 5 min 离心收集细胞。单次提取需 2-5 × 10<sup>7</sup> 个细胞。加入 1.5 ml 冰预冷 Mito Solution 重悬细胞,将细胞悬液转移到小容量玻璃匀浆器内,用间隙严密的研杵研磨细胞 30 次。
- 将匀浆液转移到离心管中, 800 × g , 4 °C 离心 5 min。(胞核、膜碎片、未裂解细胞等在管底,弃去)
- 收集上清液并转移到新的离心管。再次 800 × g 离心 5 min at 4 °C, 弃沉淀。
- 将上清液转移到新的离心管。10,000 × g 离心 10 min 4 °C。线粒体沉淀在管底。离心后的上清含胞浆成分,可收集用于对照实验。
- 洗涤线粒体:加入 0.2 ml Mito Solution,轻弹管底重悬线粒体沉淀;12,000 × g 离心 10 min 4 °C。弃上清,线粒体沉淀在管底。
- 重悬线粒体:可以用 Mito Solution 重悬线粒体沉淀,也可以用合适后续实验的自备缓冲液来裂解线粒体沉淀,具体用量是:约每 100 mg 组织提取的线粒体用 50 μl,约每 5 × 10<sup>7</sup> 个细胞提取的线粒体用 100 μl。用量请根据组织或细胞类型进行微调。
- 裂解线粒体后,进行蛋白浓度测定。立即使用或-70 °C 保存。

### 说明:

- 制备高质量线粒体的关键:第一,全程低温操作,将样品管放在**冰水浴**而不是碎冰块中;第二,快速,微量制备比大规模制备操作更快速,更容易获得完整的线粒体,且得率高;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。破碎效果与组织细胞类型有关;与组织块相比,贴壁培养细胞在用玻璃匀浆器匀浆时较难破壁。用 1-3 ml **小容量玻璃匀浆器(而不是其它破碎装置)**上下研磨培养细胞 **20-30 次**。**玻璃匀浆器须配套选用间隙严密的研杵,其特征是**将研杵插入匀浆器套管后,可提起研杵而套管不会脱落。**正确的匀浆**不是旋转研杵,而是上下缓慢推拉研杵,研杵推进和提升过程中细胞遭受压力的剧变而破碎。研磨程度可用相差显微镜进行检查当未裂解细胞在~50%即可。过度研磨会破坏线粒体,而研磨不足将降低线粒体得率。
- 如果不得不用电动匀浆器(polytron),可选用 6500 转,刀头上下进出 4 次共计 10 秒。不同的电动匀浆器性能差别甚大,除非步步监测,否则分离结果难以预料。
- 不同的离心机必须跟据离心力 g 计算正确的离心转速(允许 10%波动),否则将导致不纯。
- 进行 Western Blot 可直接用 RIPA 裂解液或 SDS-PAGE 样品缓冲液裂解线粒体;也可先用 Mito Solution 重悬线粒体,再加入 2x SDS-PAGE 样品缓冲液。
- Cytochrome oxidase, Monoamine oxidase, Succinate dehydrogenas, Glutamate dehydrogenase 可用作线粒体的标志酶。
- 重悬线粒体:可以用 Mito Solution 重悬线粒体沉淀,也可以用合适后续实验的自备缓冲液来裂解线粒体沉淀

具体用量是: 约每 100 mg 组织提取的线粒体用 50  $\mu$ l, 约每  $5 \times 10^7$  个细胞提取的线粒体用 100  $\mu$ l。用量请根据组织或细胞类型进行微调。

7. 裂解线粒体后, 进行蛋白浓度测定。立即使用或 $-70^{\circ}\text{C}$  保存。

发表英文论文时可供参考的书写方式: **Mitochondria Isolation Kit was purchased from Applygen Technologies Inc. (Beijing, China)**

发表中文论文时可标明: 线粒体/胞浆制备试剂盒购自北京普利莱基因技术公司

目前, 使用我公司线粒体/胞浆蛋白制备试剂盒发表的 SCI 英文论文已有多篇, 以下供参考:

- 1、Shangguan W J, Li H, Zhang Y H. Induction of G2/M phase cell cycle arrest and apoptosis by ginsenoside Rf in human osteosarcoma MG-63 cells through the mitochondrial pathway[J]. *Oncology reports*, 2014, 31(1): 305-313.
- 2、Zhou X, Zhao Y, Fang Y, et al. Hes1 is upregulated by ischemic postconditioning and contributes to cardioprotection[J]. *Cell biochemistry and function*, 2014, 32(8): 730-736.
- 3、Zhang P, Pan H, Wang J, et al. Telomerase activity-independent function of telomerase reverse transcriptase is involved in acrylamide-induced neuron damage[J]. *Biotechnic & Histochemistry*, 2014, 89(5): 327-335.
- 4、Zhou X L, Wan L, Xu Q R, et al. Notch signaling activation contributes to cardioprotection provided by ischemic preconditioning and postconditioning[J]. *J Transl Med*, 2013, 11: 251.
- 5、Zhang F, Zhang L, Sun L, et al. Effects of Fluid Shear Stress on Expression of Smac/DIABLO in Human Umbilical Vein Endothelial Cells[J]. *Current Therapeutic Research*, 2013, 74: 36-40.
- 6、Zhao G, Ma H, Shen X, et al. Role of glycogen synthase kinase  $\beta$ 3 in protective effect of propofol against hepatic ischemia-reperfusion injury[J]. *Journal of Surgical Research*, 2013, 185(1): 388-398.
- 7、Sun L L, Zhang L, Meng X L, et al. Effects of fluid shear stress on the expression of Omi/HtrA2 in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Molecular medicine reports*, 2013, 7(1): 110-114.
- 8、Sun L Q, Zhao J, Zhang T T, et al. Protective effects of Salvianolic acid B on Schwann cells apoptosis induced by high glucose[J]. *Neurochemical research*, 2012, 37(5): 996-1010.
- 9、Zhou Q, Li Y, Jin J, et al. Lx2-32c, a novel taxane derivative, exerts anti-resistance activity by initiating intrinsic apoptosis pathway in vitro and inhibits the growth of resistant tumor in vivo[J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2012, 35(12): 2170-2179.
- 10、Li W, Zhang J, An W. The conserved CXXC motif of hepatic stimulator substance is essential for its role in mitochondrial protection in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell apoptosis[J]. *FEBS letters*, 2010, 584(18): 3929-3935.
- 11、Fang N X, Yao Y T, Shi C X, et al. Attenuation of ischemia-reperfusion injury by sevoflurane postconditioning involves protein kinase B and glycogen synthase kinase 3 beta activation in isolated rat hearts[J]. *Molecular biology reports*, 2010, 37(8): 3763-3769.
- 12、Zhao C Q, Zhang Y H, Jiang S D, et al. Both endoplasmic reticulum and mitochondria are involved in disc cell apoptosis and intervertebral disc degeneration in rats[J]. *Age*, 2010, 32(2): 161-177
- 13、Yin Q, Jin P, Liu X, et al. SDF-1 $\alpha$  inhibits hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells through PI3K/Akt and ERK1/2 signaling pathways[J]. *Molecular biology reports*, 2011, 38(1): 9-16.