

动物硬组织活性线粒体分离试剂盒产品说明书（中文版）

主要用途

动物硬组织活性线粒体分离试剂是一种旨在从动物硬组织中分离出活性完整而纯化的线粒体细胞器的权威而经典的技术方法。该技术由大师级科学家精心研制、成功实验证明的。适合于动物硬组织（心脏或肌肉）的活性线粒体的制备。其制备物产量高，活性保存，可以被用于线粒体酶活性、细胞凋亡、信号传递、能量代谢、蛋白组学和病理生理学等的研究。产品不含污染性蛋白水解酶和核酶，即到即用，性能稳定，分离产量和纯度堪称同类产品最佳。

技术背景

线粒体细胞器的分离是现代细胞生物学研究的最常用的手段之一。从任何组织或细胞分离线粒体的技术方法基本上采用：第一，通过机械或化学方法破裂细胞；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；甚至，第四，可以通过等密度离心获得纯度更高的线粒体。

产品内容

清理液（Reagent A）	毫升
裂解液（Reagent B）	毫升
净化液（Reagent C）	毫升
强化液（Reagent D）	毫升
保存液（Reagent E）	毫升
活性液（Reagent F）	微升
酶解液（Reagent G）	毫升
产品说明书	1 份

保存方式

保存 净化液（Reagent C）、活性液（Reagent F）和酶解液（Reagent G）在 -20℃冰箱里，避免反复冻融；其余的保存在 4℃冰箱里，有效保证 12 月

用户自备

15 毫升锥形离心管：用于线粒体初步制备物的存放
50 毫升锥形离心管：用于细胞或组织收集后离心或清洗
1.5 毫升离心管：用于保存线粒体
4℃台式离心机：用于沉淀细胞
4℃超速离心机：用于分离细胞器成分
DOUNCE 匀浆器：用于裂解细胞

实验步骤

一、组织匀浆法

实验开始前，将试剂盒里的**活性液 (Reagent F)**冻融，然后移出 xx 微升**活性液 (Reagent F)**、1 毫升**净化液 (Reagent C)**和 xx 毫升的**裂解液 (Reagent B)**到 15 毫升锥形离心管里，混匀后，标记为**裂解工作液**，放进冰槽里备用。然后进行下列操作。

1. 手术取出动物组织，并称重以确定组织重量（实验前最好使动物空腹 12 至 24 小时）
2. （选择步骤）放进预冷的 50 毫升锥形离心管
3. （选择步骤）加入适量的（1 克组织需要 5 毫升）**清理液 (Reagent A)**清洗 1 次
4. 即刻用刀片切碎组织
5. 放进一个预冷的 15 毫升锥形离心管
6. 加入预冷的 xx 毫升**酶解液 (Reagent G)**，充分混匀
7. 放进冰槽里孵育 3 分钟
8. 放进 4℃台式离心机离心 2 分钟，速度为 1000g
9. 小心抽去上清液
10. 加入预冷的 xx 毫升**清理液 (Reagent A)**和 xx 毫升**净化液 (Reagent C)**，充分混匀
11. 放进 4℃台式离心机离心 2 分钟，速度为 1000g
12. 小心抽去上清液
13. 加入预冷的 xx 毫升**裂解工作液**
14. 涡旋震荡 5 秒，充分混匀
15. 即刻放入预冷的 DOUNCE 匀浆器
16. 在冰槽里用研磨棒匀化组织（约 80 下）（注意：参见注意事项 7）
17. 将所有组织匀浆物移入 15 毫升锥形离心管
18. 放进 4℃台式离心机离心 10 分钟，速度为 1500g
19. 小心移出上清液到另一个新的预冷的 15 毫升锥形离心管——此步骤去除细胞核和未溶解的细胞
20. 放进 4℃超速离心机离心 10 分钟，速度为 10000g
21. 小心抽去上清液，保留沉淀颗粒——此步骤获得线粒体沉淀物
22. （选择步骤）加入预冷的 xx 毫升**保存液 (Reagent E)**
23. （选择步骤）放进 4℃超速离心机再次离心 5 分钟，速度为 10000g
24. （选择步骤）小心抽去上清液
25. 加入 xx 毫升**保存液 (Reagent E)**，充分混匀
26. 即刻移入 1.5 毫升离心管，放进-70℃冰箱里保存

二、化学处理法

实验开始前，将试剂盒里的**活性液 (Reagent F)**冻融，然后移出 xx 微升**活性液 (Reagent F)**、xx 毫升**净化液 (Reagent C)**和 xx 毫升的**裂解液 (Reagent B)**到 15 毫升锥形离心管里，混匀后，标记为**裂解工作液**，放进冰槽里备用。然后进行下列操作。

1. 手术取出动物组织，并称重以确定组织重量（实验前最好使动物空腹 12 至 24 小时）
2. （选择步骤）放进预冷的 50 毫升锥形离心管
3. （选择步骤）加入适量的（1 克组织需要 xx 毫升）**清理液 (Reagent A)**清洗 1 次

4. 移入一个液氮冻存管
5. 即刻放进液氮罐过夜
6. 次日从液氮罐里取出，即刻（最快速度）碾碎组织（注意：切莫使组织冻融）
7. 放进一个 15 毫升锥形离心管
8. 加入预冷的 xx 毫升 **酶解液 (Reagent G)**，充分混匀
9. 放进冰槽里孵育 3 分钟
10. 放进 4℃ 台式离心机离心 2 分钟，速度为 1000g
11. 小心抽去上清液
12. 加入预冷的 xx 毫升 **清理液 (Reagent A)** 和 xx 毫升 **净化液 (Reagent C)**，充分混匀
13. 放进 4℃ 台式离心机离心 2 分钟，速度为 1000g
14. 小心抽去上清液
15. 加入预冷的 xx 毫升 **裂解工作液**
16. 涡旋震荡 5 秒，充分混匀
17. 在冰槽里孵育 2 分钟，其中每间隔一分钟涡旋震荡 5 秒
18. 加入预冷的 xx 毫升 **强化液 (Reagent D)**
19. 涡旋震荡 5 秒，充分混匀
20. 在冰槽里孵育 5 分钟，其中每间隔一分钟涡旋震荡 5 秒（注意：参见注意事项 8）
21. 加入预冷的 xx 毫升 **保存液 (Reagent E)**，用手混匀
22. 放进 4℃ 台式离心机离心 10 分钟，速度为 1500g
23. 小心移出上清液到另一个新的预冷的 15 毫升锥形离心管——此步骤去除细胞核和未溶解的细胞
24. 放进 4℃ 超速离心机离心 10 分钟，速度为 10000g
25. 小心抽去上清液，保留沉淀颗粒——此步骤获得线粒体沉淀物
26. （选择步骤）加入预冷的 xx 毫升 **保存液 (Reagent E)**
27. （选择步骤）放进 4℃ 超速离心机再次离心 5 分钟，速度为 10000g
28. （选择步骤）小心抽去上清液
29. 加入 xx 毫升 **保存液 (Reagent E)**，充分混匀
30. 即刻移入 1.5 毫升离心管，放进 -70℃ 冰箱里保存

注意事项

1. 本产品为 10 次（1 克动物组织）或 50 次（200 毫克动物组织）操作
2. 实际操作动物组织重量与试剂使用量按比例调整：例如 200 毫克动物组织：试剂用量是标准用量的五分之一
3. 所有操作均须严格在 4℃ 或以下状态进行
4. 使用时，避免污染母液，尤其是 **裂解液 (Reagent B)** 和 **保存液 (Reagent E)**
5. 建议使用足够的组织量
6. 建议严格控制操作时间
7. 通常匀化次数为 80 下达到 80% 的细胞裂解为理想状态，但不同的组织或细胞类型会存在差异。用户可以通过显微镜观察 3 微升匀浆物的细胞裂解程度：完整细胞呈现发亮的圆环。低于 50% 可以增加匀化次数
8. 通常孵育 5 分钟达到 80% 的细胞裂解为理想状态，但不同的组织或细胞类型会存在差异。用户可以通过显微镜观察 3 微升裂解物的细胞裂解程度：完整细胞呈现发亮的圆环。低于 50% 可以增加孵育时间和涡旋震荡次数
9. 对于难以裂解的组织，采用物理匀浆法是优先推荐的技术处理

10. 通常 1 克动物硬组织的线粒体含量为 1 至 10 毫克线粒体蛋白
11. 如果需要计量线粒体，稀释后数分钟内完成，否则线粒体将分解
12. 本产品所获得的线粒体纯度和产量最为理想。通过调整10000g离心速度到3000至8000g，可以提高粗提的线粒体纯化程度，但线粒体产量相应减少
13. 如果需要获得95%以上纯度的线粒体，建议使用动物硬组织高质纯化线粒体分离试剂盒—10006.4.3
14. 线粒体正常活性测定方法是： CITRATE SYNTHASE 活性、氧化磷酸化、细胞色素吸收峰谱等
15. 线粒体内外膜完整测定方法是：CYTOCHROME C OXIDASE 活性和荧光 JC 染色
16. 本公司提供线粒体套餐：ROS、NAO、MitoTRACK、JGB、线粒体溶解等
17. 本公司提供系列线粒体分析试剂产品

质量标准

1. 本产品经鉴定性能长期稳定
2. 本产品经鉴定分离的线粒体内外膜完整
3. 本产品经鉴定分离的线粒体维持正常活性
4. 本产品经鉴定不含污染性蛋白酶和核酶