

## 细胞线粒体提取试剂盒

### Cell Mitochondrial Extraction Assay Kit

货号: E-BC-E006

规格: 50 Assays/100 Assays

- 注意事项:**
1. 分离线粒体的所有步骤均需在冰上或4°C进行, 所用溶液和仪器4°C预冷。
  2. 离心机升降速度调至1档。
  3. 扩大细胞匀浆浓度不会等比例提高线粒体提取数量, 建议提取时一次处理多个 $1 \times 10^7$ 个细胞样本而不是 $n \times 10^7$ 个细胞样本。
  4. 快速操作, 及时使用分离得到的线粒体样本。

## 基本信息

|             |  |
|-------------|--|
| <b>用途</b>   | 本试剂盒适用于提取细胞中的线粒体细胞器。   |
| <b>检测原理</b> | 差速离心法是最为常用的细胞线粒体(mitochondria)的分离方法, 通常首先是制备细胞匀浆, 然后以低速离心去除细胞核、细胞碎片以及未破碎的细胞, 最后以高速离心沉淀线粒体。 |

## 提供试剂及物品

| 编号                 | 名称   | 规格1<br>(50 Assays) | 规格2<br>(100 Assays) | 保存方式             |
|--------------------|--|--------------------|---------------------|------------------|
| 试剂一<br>(Reagent 1) | 提取液<br>(Extraction Solution)                 | 55 mL × 1瓶         | 55 mL × 2瓶          | -20°C<br>保存6个月   |
| 试剂二<br>(Reagent 2) | 洗涤液<br>(Wash Buffer)                         | 28 mL × 1瓶         | 55 mL × 1瓶          | -20°C<br>保存6个月   |
| 试剂三<br>(Reagent 3) | 保存液<br>(Preservation Solution)               | 6 mL × 1瓶          | 12 mL × 1瓶          | -20°C<br>保存6个月   |
| 试剂四<br>(Reagent 4) | 台盼蓝染色液<br>(Trypan Blue Staining<br>Solution) | 5 mL × 1瓶          | 5 mL × 1瓶           | -20°C避光<br>保存6个月 |

**注:** 试剂盒试剂量规格以每次处理  $1 \times 10^7$  个细胞样本的试剂使用量计算。试剂严格按上表中的保存条件保存, 不同批次试剂盒中的试剂不能混用。

## 所需自备物品

**仪器:** 5 mL玻璃匀浆器, 高速低温冷冻离心机

**试剂:** PBS(0.01 M, pH 7.4)

## For Research Use Only

Tel: 400-999-2100

Web: [www.elabscience.cn](http://www.elabscience.cn)Email: [techsupport@elabscience.cn](mailto:techsupport@elabscience.cn)

## 试剂准备

使用前，试剂盒中的试剂放在2-8°C冰水中恢复至溶液状态。

## 操作步骤

① 细胞收集：对于贴壁细胞，用PBS(0.01 M, pH 7.4)清洗，胰酶消化，终止消化后用移液枪轻轻吹打重悬，离心收集；对于悬浮细胞，直接离心收集。

注：需在此步或下一步取少量细胞悬液进行计数。

② 细胞洗涤：按照每 $10^7$ 个细胞加入1 mL预冷的PBS(0.01 M, pH 7.4)，用移液枪轻轻吹打重悬，4°C，600 × g离心5 min，弃上清。

③ 预处理：按照每 $10^7$ 个细胞加入0.5 mL预冷的试剂一，用移液枪轻轻吹打重悬，冰浴放置10 min。

④ 细胞匀浆：用移液枪将步骤③中冰浴10 min后的细胞悬液轻轻吹打混匀，将0.5 mL细胞悬液转移至预冷的玻璃匀浆器中，上下匀浆10-30次。

注：若待处理细胞样本较多，建议多次操作，一个5 mL玻璃匀浆器最多处理 $10^7$ 个细胞，不要扩大匀浆规模。

注：用不同规格玻璃匀浆器所需的匀浆次数有所不同，需自行验证。建议匀浆10次后取10 μL细胞匀浆液，加入10 μL试剂四染色，3 min内于显微镜下观察或细胞计数仪分析。当蓝色细胞比例超过50%时即可停止匀浆进入下一步。如果蓝色细胞比例不足50%，增加5次匀浆，再同前操作进行染色鉴定。同时记录该细胞的匀浆次数，后续提取时不必再摸索匀浆次数。

⑤ 低速离心：将细胞匀浆转移至预冷的离心管中，用0.5 mL预冷的试剂一润洗玻璃匀浆器，将润洗液一起加入EP管中，4°C，600 × g离心10 min。

注：如需获得更高纯度的线粒体，可以将此步骤离心速度改为1000 × g，缺点是线粒体提取数量会下降。

⑥ 高速离心：小心地将上清液转移至新的预冷的离心管中，4°C，12000 × g离心10 min。

注：如需获得更高纯度的线粒体，可以将此步骤离心速度改为3500 × g，缺点是线粒体提取数量会下降。

⑦ 线粒体洗涤：小心地去除上清，加入0.5 mL预冷的试剂二，用移液枪轻轻吹打重悬，4°C，10000 × g离心10 min。

⑧ 线粒体收集：小心地去除上清，沉淀即为提取得到的细胞线粒体。

⑨ 线粒体使用：如用于完整线粒体的功能或活性研究，立刻使用；如用于线粒体的蛋白分析，请用合适的裂解液处理线粒体样本；如不能及时使用，可加入50 μL试剂三重悬线粒体，液氮速冻后-80°C可保存一个月。

注：冻存后的线粒体样品不推荐用于膜电位的检测，但可以用于线粒体蛋白或核酸的相关检测。

## For Research Use Only