

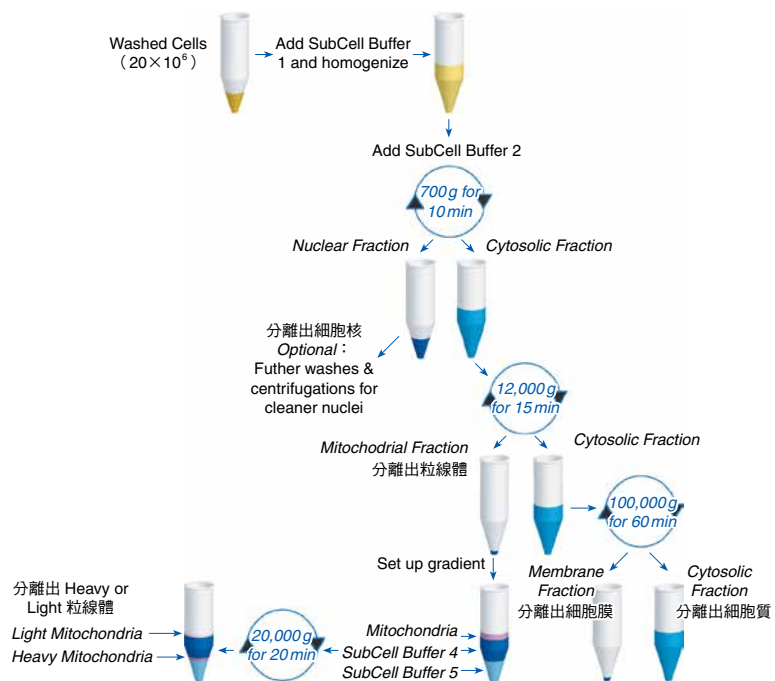
FOCUS™ SubCell for Subcellular Fractionation

理所當然的胞器分離術 | 編輯：汪谷威

細胞，基本上可以被認為是生物體結構與功能的最小單位，有許多科學家會針對其型態結構、生理機能和細胞週期展開一系列的研究。但是越來越多研究並非只單對整個細胞，而是針對某個細胞的胞器。像是近年來關於細胞凋零（Apoptosis）或細胞死亡（Cell Death）研究不斷增加，但其探討區域已變為粒線體、細胞質或細胞核等不同胞器的蛋白表現所導致的生理意義，因此了解其蛋白表現的位置變成相當重要的議題。舉例而言，Shiheidō Y. *et al.* 在 2016 曾針對一牙周致病菌 *Porphyromonas gingivalis* 對心肌的受損程度以及心肌梗塞後容易產生心臟壞死做了各種的研究，除動物研究外，作者更分離出各種胞器，以分別探討不同胞器內的氧化壓力程度，且發現到 *Porphyromonas gingivalis* 感染會抑制粒線體的自噬反應，進而加速心肌梗塞後期心臟的氧化壓力。此外當進行微量蛋白質體分析，如：2D electrophoresis 或是 mass spectrometry，組織中過高的總蛋白含量可能會掩蓋真正要分析的微量蛋白，造成誤判的問題。因此一個可以完善分離出所需胞器的工具更顯得極為重要，將成為影響後續實驗成功與否的關鍵！

● 致勝的要點

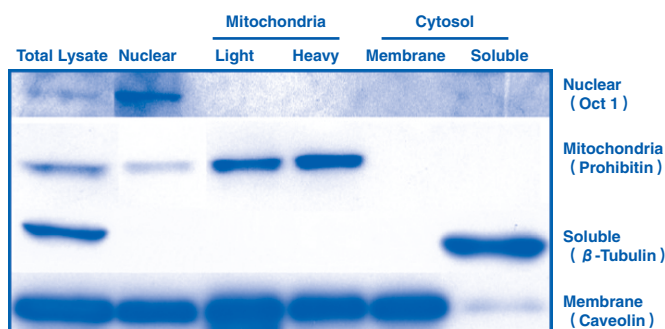
在 1940 年代，科勞特（Albert Claude）就發明了以離心分離胞器的方法。基於此原理，G-Biosciences



圖一：FOCUS™ SubCell kit 的操作流程圖

FOCUS™ SubCell kit 提供一個快速簡便來分離各種包含細胞核、粒線體、細胞質與細胞膜等胞器的方法，並適用不同動物物種之細胞與組織。

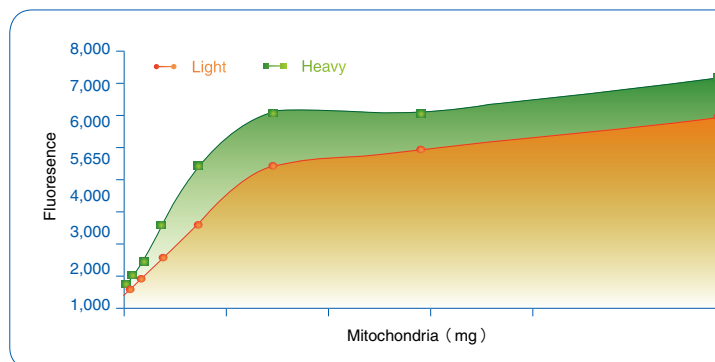
一組 FOCUS™ SubCell kit 可以進行 50 次約 2×10^7 細胞數的胞器分離，以離心與不同性質的 Lysis Buffer 分離其胞器蛋白，其分離的流程圖依圖一所示。經過 FOCUS™ SubCell kit 分離 14×10^6 的 NIH3T3 細胞之胞器，並利用 Western blot 檢視其萃取之效果與純度（圖二）。



圖二：分離後各細胞胞器的 Western Blot 結果

其中 Oct-1 是細胞核中的轉錄因子，理當只會在細胞核中被偵測到。從結果圖中可以發現，在 Total lysate 中僅能檢測到微量的 Oct-1，但經過 FOCUS™ SubCell kit 處理後，在細胞核中可以檢測非常明顯的 Oct-1，並且不會在分離的粒線體、細胞質或細胞膜中偵測到此蛋白。Prohibitin 是位於粒線體內膜的蛋白並與多種細胞生理反應，如：細胞凋零、細胞週期、細胞老化、訊息傳遞及細胞修復等。由圖二中可以發現其在 Heavy 和 Light 粒線體內大量檢測出來。雖然也有少量的 Prohibitin 發現於細胞核中，但是其實有一些研究指出，細胞核或細胞膜上會有 Prohibitin 存在，故即使本次實驗的細胞核上有 Prohibitin 存在也並不會影響此結果。而細胞質則是使用細胞微管蛋白 β -tubulin 來做驗證，同樣獲得極佳的結果，僅有細胞質和 Total Lysate 部分檢測到此蛋白。最後 Caveolin 為位於各細胞內膜上，直徑約 50-100nm 的凹陷結構，會參與許多細胞內部的訊號調控。因此除了細胞質外，其餘胞器都會有其蹤跡。由本綜合結果可以發現，使用 FOCUS™ SubCell kit 分離出的胞器皆非常乾淨，可有效降低傳統方法常見的交叉污染 (cross-contamination)。

一般而言，分離胞器就是為了後續的研究做準備，所以胞器的完整性亦成為各分離套組重視的特點之一。就粒線體來說，多數會專注於代謝路徑探討等研究，而此時粒線體最好是具有活性的，這樣才可以有效探討其電位差或是能量代謝。因此在將 FOCUS™ SubCell kit 分離出的粒線體以 Cytochrome C oxidase 測試確認其完整程度，



圖三：利用 JC-1 assay 偵測粒線體活性之結果

有 85 % 的 heavy 粒線體及 79 % light 粒線體並未受到任何損傷。另外由圖三得知，利用 JC-1 assay 以測量其膜電位差來判斷粒線體之活性。粒線體若健康，JC-1 分子會進到帶負電的粒線體內，並藉由螢光訊號來判讀。由圖三得知，無論是 Heavy 或是 Light 粒線體均保留其內膜完整性及活性，且有 90 % 的粒線體具有活性。

由以上的實驗結果得知，FOCUS™ SubCell kit 可以有效分離各胞器之蛋白，解決蛋白質間 Cross-Contamination 的問題，且有 90 % 的粒線體活性可被保留，有利於客戶做後續實驗之分析，並可搭配 BCA kit (#786-570) 做後續定量，簡單又便利。另有針對粒線體分離 (FOCUS™ Mitochondria) 的套組也可提供選購。✍

貨號	品名	規格
786-260	FOCUS™ SubCell Kit	50 preps
786-570	BCA Protein Assay	500 assays / 2500 micro-assays
786-022	FOCUS™ Mitochondria	50 preps

● 發表文獻

- Shiheido, Y. et al. (2016) J Mol Cell Cardiol.
 - Das, S. et al. (2015) Sci Rep.
 - Capel, F. et al. (2015) J. Nutr. Biochem.
 - Dagda, R.K. et al. (2014) J. Neurochem.
 - Dodmane, P.R. et al. (2014) Toxicol. Sci.
 - Stallings, N.R. et al. (2013) PLOS.
 - Melendez, J. et al. (2013) Gastroenterology.
 - Zhu, J.H. et al. (2012) Cell Death Dis.
 - Losel, R.M. et al. (2010) PLOS.
 - Stallings, N.R. et al. (2010) Neurobiol. Diss.
 - Titworth, W. et al. (2009) Glia.
 - Upreti, M. et al. (2008) Mol Cancer Ther.
 - Son, M. et al. (2007) PNAS.
 - Maiuri, M.C. et al. (2007) EMBO J.
- (因版面設計故無法全部刊登，請見諒)