

# 细胞线粒体分离试剂盒

## 产品简介：

细胞线粒体分离试剂盒(Cell Mitochondria Isolation Kit)是用于快速分离培养细胞线粒体的试剂盒。本试剂盒在分离线粒体的同时可以获得去除线粒体的细胞浆蛋白,可用于研究细胞色素 c 等线粒体蛋白向胞浆的释放。使用本试剂盒分离获得的线粒体纯度较高,并且绝大部分分离获得的线粒体都含有完整的内膜和外膜,并具有线粒体的生理功能。因此本试剂盒分离得到的线粒体可以用于线粒体的生理功能等方面的研究。例如可以使用安特柏线粒体膜电位检测试剂盒测定分离得到的线粒体的膜电位。

本试剂盒分离得到的线粒体也可以被试剂盒中的线粒体裂解液或其它适当裂解液裂解后用于 SDS-PAGE、Western、双向电泳等蛋白分析。

本试剂盒提供了线粒体制备过程中匀浆程度的重要判断指标,即台盼蓝染色,使分离得到的线粒体的质量更加有保证。台盼蓝染色液为选用试剂,在实验条件成熟后可以不必使用。

本试剂盒提供了蛋白酶抑制剂 PMSF,使匀浆时蛋白酶的活性被适当抑制,这样在获得线粒体的同时还可以获得有时有用的去除了大量线粒体的蛋白,在进行蛋白或酶活分析时可以作为对照。

如果每个样品的细胞数量为 2000-5000 万,本试剂盒可以处理 50-100 个样品。

## 主要组分：

| 产品名称     | 规格                   |
|----------|----------------------|
| 线粒体分离试剂  | 125ml                |
| 台盼蓝染色液   | 10ml                 |
| 线粒体储存液   | 15ml                 |
| 线粒体裂解液   | 15ml                 |
| PMSF(晶体) | 可配制 1.5ml 100mM PMSF |
| PMSF(溶剂) | 1.5ml                |

## 储存条件：

-20℃保存, 12 个月。

台盼蓝染色液可以 4℃保存, PMSF(晶体)和 PMSF(溶剂)配制成 100mMPMSF 溶液前可室温保存。

## 使用说明：

**1. 准备溶液：**室温融解试剂盒中的各种溶液，溶解后立即置于冰上并混匀。第一次使用时，把 1.5ml PMSF(溶剂)加入到 PMSF(晶体)中，溶解并混匀，即得到 1.5ml 100mM PMSF。配制好的 100mM PMSF 溶液-20℃保存。如果最终目的是制备线粒体蛋白样品，根据样品数量，取适量线粒体分离试剂备用，在线粒体分离试剂加入到细胞样品中前数分钟内加入 PMSF，使 PMSF 的最终浓度为 1mM。取适量线粒体裂解液备用，在线粒体裂解液加入到线粒体样品中前数分钟内加入 PMSF，使 PMSF 的最终浓度为 1mM。

**2. 收集细胞：**

**对于贴壁细胞：**用 PBS 洗一遍，用胰酶细胞消化液消化细胞，离心收集细胞。

**对于悬浮细胞：**直接离心收集细胞。

**3. 洗涤细胞：**用冰浴预冷的 PBS 轻轻重悬细胞沉淀，取少量细胞计数，剩余细胞 600g，4℃离心 5 分钟。弃上清。

**4. 预处理：**加入 1-2.5ml 线粒体分离试剂或临用前添加了 PMSF 的线粒体分离试剂至 2000-5000 万细胞中，轻轻悬浮细胞，冰浴放置 10-15 分钟。

**5. 匀浆：**把细胞悬液转移到一适当大小的玻璃匀浆器中，匀浆 10-30 下左右。

**6. 匀浆效果的鉴定：**不同细胞不同匀浆器所需的匀浆次数有所不同，需自行优化。通常可以在匀浆 10 次后取约 2 微升细胞匀浆，加入 30-50 微升台盼蓝染色液，混匀后显微镜下观察台盼蓝染色阳性(蓝色)细胞的比例。如果阳性细胞比例不足 50%，增加 5 次匀浆。随后再同前取样进行台盼蓝染色鉴定。当阳性比例超过 50%时即可停止匀浆进入下一步。请勿过度匀浆，过度匀浆会导致线粒体的机械损伤。同时记录对于该细胞的匀浆次数，通常在后续实验时不必再摸索匀浆次数。

**7. 把细胞匀浆在 600g，4℃离心 10 分钟。**

**注：**如需获得纯度更高的线粒体，可以将此步骤的离心速度改为 1000g，其它离心条件不变；获得更高纯度线粒体的缺点是相同数量细胞的线粒体抽提得率会下降。

**8. 小心把上清转移到另一离心管中，在 11,000g，4℃离心 10 分钟。**

**注：**如需获得纯度更高的线粒体，可以将此步骤的离心速度改为 3500g，其它离心条件不变；获得更高纯度线粒体的缺点是相同数量细胞的线粒体抽提得率会下降。

**9. 小心去除上清。沉淀即为分离得到的细胞线粒体。**

**注：**如果希望获得去除线粒体的细胞浆蛋白，在本步骤需收集上清，并且在收集上清时注意勿触及沉淀。随后把收集的上清 12000g，4℃离心 10 分钟。取上清即为去除线粒体的细胞浆蛋白。

**10. 线粒体的使用：**

10A. 如果用于完整线粒体的功能或酶活性研究，初始 2000-5000 万细胞分离得到的线粒体样品中可以加入 150-200 微升线粒体储存液，重悬线粒体。

10B. 如果用于线粒体的蛋白分析，初始 2000-5000 万细胞分离得到的线粒体样品中可以加入 150-200 微升临用前添加了 PMSF 的线粒体裂解液裂解线粒体。裂解后的线粒体可以用于 PAGE、Western、IP 以及线粒体中的一些酶活性的测定

等。裂解后的蛋白样品可以使用 BCA 法测定蛋白浓度。

10C . 如果用于双向电泳, 请使用适当的用于双向电泳的裂解液处理线粒体。

**注意事项:**

1. 试剂盒中的试剂对于不同的实验目的不必全部使用。
2. 如果不是用于制备线粒体蛋白样品, 线粒体分离试剂和线粒体裂解液中不必加入 PMSF。
3. 如果用于制备线粒体蛋白样品, 线粒体分离试剂和线粒体裂解液中需添加 PMSF。PMSF 一定要在线粒体分离试剂或线粒体裂解液加入到样品中前 2-3 分钟内加入, 以免 PMSF 在水溶液中很快失效。
4. 分离线粒体的所有步骤均需在冰上或 4℃进行, 所用溶液需冰浴或 4℃预冷。
5. 通常在分离线粒体时前后两次离心速度选取 600g 和 11,000g, 如果希望纯度更高, 但对线粒体的得率要求不高, 前后两次离心速度可以采用 1000g 和 3500g。
6. 台盼蓝与 PMSF 对人体有毒, 请注意小心防护。
7. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

**\*本试剂仅供实验室研究使用**