# 产品简介：

**硬组织线粒体分离试剂盒**

线粒体是细胞呼吸的主要场所，细胞活动所需的能量主要由在线粒体内进行的氧化所产 生的能量来供应。制备线粒体的关键是保持线粒体的完整性和纯度，可通过分级分离法获得， 即先低俗出去细胞核以及细胞碎片，再进行高速梯度离心分离线粒体。

硬组织线粒体分离试剂盒(Hard Tissue Mitochondria Isolation Kit)是快速便捷分离动物硬组织(如骨骼肌)中的线粒体的试剂盒，分离线粒体的同时可以获得去除线粒 体的细胞浆蛋白，可用于分析细胞色素 C 等线粒体蛋白向胞浆的释放，大部分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(如检测线粒体膜电位)，获得的蛋白 可用于 SDS-PAGE、Western、双向电泳等蛋白分析。该试剂盒适用于从动物硬组织(心肌、骨骼肌)或其他难以分离线粒体的组织中提取线粒体。该试剂盒仅用于科研领域，不宜用于临床诊断或其他用途。

# 产品组成：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 试剂(A): Wash buffer  试剂(B): Mitochondria Lysis buffer  试剂(C): Mitochondria Stock buffer | 100ml  50ml  50ml | -20℃  -20℃  -20℃ |
| 试剂(D): Protein Stock buffer (5×) | 10ml | RT |
| 试剂(E): PMSF(100×) | 1.5ml | -20℃ |

**自备材料：**

1、 低温离心机、匀浆器

2、 尼龙网或细胞筛

**操作步骤**(仅供参考)**：**

1、清洗：动物禁食 24h 后处死，取新鲜横纹肌等组织，迅速称重 50～100mg，用预冷的Wash buffer 清洗 2 次，弃 Wash buffer，冰上剪成 30mm3 大小的组织碎片。

2、裂解：加入 10 倍体积的预冷的 Mitochondria Lysis buffer，置于冰浴 5～10min。

3、匀浆Ⅰ：转移至预冷的 Dounce 匀浆器中，匀浆 10～20 次，或采用电动匀浆器，700rpm，

8～10 次。不同组织或不同匀浆器所需的匀浆次数有所不同，需自行优化。

4、匀浆Ⅱ：4℃搅拌孵育 5～10min。用等体积的 Mitochondria Stock buffer 秲释至匀浆

液，再次重复步骤 3。

5、离心：用尼龙网或细胞筛过滤匀浆液，4℃，1000g 离心 15min，重复 1 次，以去除细胞核、未破碎的细胞和大的膜碎片。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 2000g 离心 10min，其缺点是相同数量细胞的线粒体抽提得率会下降。

6、上清液转移至一干净离心管，4℃ 12000g 离心 10min。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 6000g 离心 10min，其缺点是相同数量细胞的线粒体抽提得率会下降。

7、弃上清，沉淀为线粒体，如果希望获得去除线粒体的细胞浆蛋白，应在本步骤中收集上 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 10min，上

清即为去除线粒体的细胞浆蛋白。

8、保存：弃上清，用适当缓冲液悬浮沉淀。如果用于线粒体酶活性或功能的分析，线粒体 沉淀应重悬于 Mitochondria Stock buffer；如果用于线粒体蛋白的分析，获得的细胞浆蛋白应保存于 1×Protein Stock buffer，即按细胞浆蛋白：Protein Stock buffer (5×)=1:4

比例混合；如果用于双向电泳，应使用恰当的保存液。

# 注意事项：

1、试剂 (如 PMSF)对于不同实验不必全部使用，在实验条件成熟后可以不必使用。

2、如果不是用于制备线粒体蛋白，Mitochondria Lysis buffer 和 Mitochondria Stock buffer 不必加入 PMSF。如果用于制备线粒体蛋白样品，Mitochondria Lysis buffer 和 Mitochondria Stock buffer 需添加 PMSF。PMSF 一定要在试剂加入到样品中前 1～ 2min 内加入，以免 PMSF 在水溶液中很快失效。

3、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，全部操作

时间尽量控制在 1h 以内。

4、通常在分离线粒体时前后两次离心速度选取 1000g 和 12000g，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用 2000g 和 6000g。

**有效期：** 12 个月有效。