# 产品简介：

**细胞线粒体分离试剂盒**

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。

细胞线粒体分离试剂盒(Cell Mitochondria Isolation Kit)是快速便捷分离培养细胞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(如梱测线粒体膜电位)，获得的蛋白可用于 SDS-PAGE、Western、双向电泳等蛋白分析。本试剂盒提供台盼蓝染色液和 PMSF，可以分别判断线粒体质量和提取细胞浆蛋白。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): Mitochondria Lysis buffer  试剂(B): Trypan Blue Stain | 100ml  10ml | -20℃  4℃ 避 光 |
| 试剂(C): Wash buffer | 100ml | -20℃ |
| 试剂(D): Mitochondria Stock buffer | 10ml | -20℃ |
| 试剂(E): Protein Stock buffer(5×) | 20ml | RT |
| 试剂(F): PMSF(100×) | 1.5ml | -20℃ |

**自备材料：**

1、 胰蛋白酶

2、 低温离心机、匀浆器

3 、 PBS

**操作步骤**(仅供参考)**：**

1、清洗：用预冷的 PBS 清洗细胞 1 次，4℃ 1000g 离心 5min，其上清。

2、裂解：沉淀用 1～2ml 预冷的 Mitochondria Lysis buffer 重悬细胞，冰浴放置 10～ 15min，可用相差显微镜梱测膨胀的程度。

3、匀浆：把细胞悬液转移至 Dounce 匀浆器中，匀浆 10～20 次。不同细胞或不同匀浆器

所需的匀浆次数有所不同，需自行优化。

4、台盼蓝染色(可选)：取约 2～5μl 细胞匀浆液，加入 30～50μl Trypan Blue Stain，混匀， 显微镜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，但勿过度匀浆，否则易导致线粒体的机械损伤。同时记录对于该细胞的匀浆次数，在后 续实验时不必再摸索匀浆次数。

5、立即取匀浆液，加入等量 Wash buffer，轻轻颠倒混匀数次。

6、4℃，1300g 离心 5min 以去除细胞核、未破碎的细胞和大的膜碎片。

7、上清液转移至一干净离心管，4℃ 1000g 离心 5min，重复 2 次。

8、上清液转移至一干净离心管，4℃ 12000～15000g 离心 15min，重复 1 次。

9、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。

10、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(如台盼蓝染色液)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 Wash buffer 中不必加入 PMSF。如果用于制备线粒体蛋白样品，Mitochondria Lysis buffer 和 Wash buffer 中需添加 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 15000g，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。5、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

**有效期：** 12 个月有效。