天净沙系列

CAT#:221109

常温运输及保存

天净沙

动物线粒体蛋白质纯化试剂盒

Animal Mitochondrial Protein Purification Kit

使用手册 V0.5

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

线粒体是非常重要的细胞器，它不但跟很多人类疾病相关，而且还是母系遗传研究的重要材料。本产品可用于动物细胞线粒体总蛋白的快速微量提取，可用于各种后续实验研究。它具有下列特点：

1. 即开即用，用户不需要自己配制各种溶液，优化各种条件。
2. 本试剂盒有粗提和精提两个操作选项，但是精提需要超速离心机。粗提所得线粒体可以直接用于蛋白分析（SDS-PAGE、Western Blot、ELISA 等）、蛋白组分析和线粒体 DNA 纯化。精提线粒体可以用于偶联分析和体外线粒体蛋白合成等实验。
3. 本产品一次可以处理约 2×10^8 个培养细胞，30 mg 培养细胞（相当于 15 瓶 150 mm 培养细胞）可以纯化到到 0.5-1.5 mg 线粒体。
4. 本产品适用于各种动物悬浮培养细胞和贴壁培养细胞，不能用于动物实体组织。
5. 提供线粒体染液，可以在操作中随时监测纯化过程中线粒体的完整性。
6. 得到的总蛋白可以直接用于 SDS-PAGE、2D 电泳、免疫印迹分析、蛋白活性测定和 BCA 法及 Lowry 法蛋白定量（不适用于 Bradford 法）。
7. 本产品仅用于科研。

规格及成分

本产品使用大扁盒包装

成分	编号	规格	包装
动物线粒体纯化溶液 A	221109a	15 mL	15 mL 本色瓶
动物线粒体纯化溶液 B	221109b	150 mL	150 mL 本色瓶
蔗糖	CAS:57-50-1	30 g	60 mL 本色瓶
詹纳斯绿 B 染色液（0.2%）	211252	300 μL	1 mL 棕色管
蛋白微量提取溶液 A	221109c	5 mL	5 mL 本色瓶
蛋白微量提取溶液 B	221109d	450 μL	1 mL 本色管
使用手册	221109sc	1 份	无

运输及保存

常温运输及保存，有效期 1 年。其中蛋白微量提取溶液 A、蛋白微量提取溶液 B 低温运输，-20℃保存。

自备物品

PBS 缓冲液。

使用流程

注意：线粒体膜对温度高度敏感，所以整个操作必须在冰上或冷室进行，所要用到的溶液和离心管都必须预先冷却，否则线粒体容易破裂。

一：准备工作（此步骤同柱式动物线粒体 DNAout 中线粒体提取步骤）。未用完的下列溶液需要-20℃保存，否则容易长菌。下次使用前务必让沉淀溶解并摇晃均匀。

1. 将动物线粒体纯化溶液 A 和溶液 B 放冰上预冷待用。

2. 配制 1.7 M 高比重溶液（精提时需要配制此溶液，粗提时不需要配制此溶液）：36 g 蔗糖用溶液 B 溶解并定溶到 60 mL，冰上预冷待用。
3. 配制 1.0 M 低比重溶液。粗提时需要低比重溶液 100 mL，配制方法是将 34 g 蔗糖用溶液 B 溶解并定溶到 100 mL，冰上预冷待用。精提时需要低比重溶液 150 mL，配制方法是将 51 g 蔗糖用溶液 B 溶解并定溶到 150 mL，冰上预冷待用。
4. 配制线粒体重悬液。粗提时需要重悬液 200 mL，配制方法是将 150 mL 溶液 B 和 50 mL 1 M 低比重溶液混合；精提时需要重悬液 300 mL，配制方法是将 225 mL 溶液 B 和 75 mL 1 M 低比重溶液混合，即得 300 mL 线粒体重悬液，冰上预冷待用。

二：线粒体粗提（此步骤同柱式动物线粒体 DNAout 中线粒体提取步骤）

5. 如果提取材料是单层细胞，先用 60 mL 自备的 PBS 缓冲液洗涤 2×10^8 个培养的单层细胞，共洗涤 2 次。然后用塑料刮匙刮下细胞，重悬在 60 mL PBS 缓冲液中。如果是悬浮细胞，则 1000×g 4℃离心 10 分钟收集 2×10^8 个细胞，再用 60 mL PBS 缓冲液洗涤 2 次，最后将细胞重悬在 60 mLPBS 缓冲液中。
6. 用平甩转子（swinging-bucket rotor）离心机 1000×g 4℃离心 10 分钟，吸弃上清，保留细胞沉淀。
7. 加入 5 倍体积（以细胞沉淀的体积为基数）的预冷的动物线粒体纯化溶液 A，轻柔重悬细胞。
8. 冰上放置 4-5 分钟。注意：冰浴时间不要超过 5 分钟。
9. 如果是成纤维细胞，由于其难以裂解，可将细胞重悬液在-80℃放置 20-30 分钟后再化冻，然后进入下步操作。如果不是成纤维细胞，则直接进入下步操作。
10. 将细胞重悬液体转移到预冷的 Dounce 玻璃匀浆器中（工作体积为 10-15 mL，间隙为 0.12 mm，最好是玻璃材质，否则线粒体产率会降低）匀浆适当次数。细胞株不同，其最适匀浆次数不同，一般需要 40 次-60 次左右。匀浆是线粒体纯化最关键的步骤，故匀浆前最好先通过预实验确定最适匀浆次数，方法是每匀浆 5-10 次后，取 2-3 μL 匀浆液到载玻片上，然后在相差显微镜下观察，完整细胞数量降低到 20%以下为佳。
11. 加入 1/3 体积的、预冷的 1.0M 低比重溶液，轻柔混匀。
12. 用平甩转子离心机 4℃ 1000×g 离心 10 分钟。沉淀含残留完整细胞、细胞碎片和细胞核，上清液含线粒体。
13. 转移上清液到离心管中，冰上放置。在显微镜下检测上清液中线粒体的完整性。具体

	做法是先滴 50 μL 左右上清液到载玻片上，再滴入 50 μL 詹纳斯染液绿 B 染色液 20 分钟，油镜下观察，蓝绿色颗粒状物即为线粒体。 14. 用固定角度转子（fixed-angle rotor）离心机 4℃ 15000×g 离心 15 分钟，弃上清，所得棕黑色沉淀即为粗提线粒体沉淀。 15. 用 10 mL 线粒体重悬液重悬线粒体，4℃ 15000×g 离心 15 分钟，弃上清。 16. 重复上步一次。 17. 最后用适量的线粒体重悬液重悬线粒体，可用于各种后续实验（本试剂盒不提供相关试剂），如果用于下面的精提操作，则用 10 mL 线粒体重悬液重悬。 **三：线粒体精提（需要超速离心机）** 18. 在跟超速离心机匹配的 50 mL 的离心管中，加入 10 mL 预冷的高比重溶液，再在上面加上 10 mL 预冷的低比重溶液，最后再加上 10 mL 线粒体粗提液。 19. 70000×g 4℃离心 40 分钟，线粒体将位于高比重溶液和低比重溶液之间区域。 20. 小心用广口吸管吸出线粒体到新的离心管中，加入等体积的线粒体重悬液。 21. 用平甩转子（swinging-bucket rotor）离心机 1000×g 4℃离心 10 分钟，吸弃上清，保留线粒体沉淀。 22. 用 10 mL 线粒体重悬液重悬线粒体，在平甩转子离心机上 4℃ 1000×g 离心 10 分钟，吸弃上清，保留线粒体沉淀。 23. 再重复上步一次。 24. 最后用适量线粒体重悬液重悬线粒体，得到线粒体精提液。可以直接用于 Lowry 法蛋白浓度测定，也可以用于其他后续实验。 **四：总蛋白提取** 25. 每 10 mg 湿重线粒体沉淀加入 0.5 mL 蛋白微量提取溶液 A 和 50 μL 蛋白微量提取溶液 B，吹打混匀。 26. 冰上放置 30 分钟至 1 小时至溶液变清。 27. 4℃ 12,000×g 离心 1 分钟。 28. 将上清液转移至一新的 1.5 mL 塑料离心管中即得到蛋白溶液，可置于-70℃冰箱保存或立即使用。如果要进行 SDS-PAGE 电泳，可取部分样品到离心管中，加入 5×SDS-PAGE 上样缓冲液（终浓度为 1×），在沸水中处理 5 分钟后立即上样电泳。
关联产品	动物线粒体纯化试剂盒