天净沙系列

CAT#:221130

低温运输，-20℃保存

天净沙

植物线粒体蛋白质纯化试剂盒

Plant 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

植物线粒体是重要的植物细胞器，负责 ATP 的产生。此外植物很多重要的特性(如雄性不育)也跟线粒体相关，是母系遗传研究的重要材料。对植物线粒体进行生化和遗传研究都需要进行线粒体纯化。本产品就是专门用于植物细胞线粒体总蛋白提取的试剂盒，它具有下列特点：

1. 即用型试剂盒，用户不需要单独配制各种溶液。
2. 线粒体提取部分提供粗提和精提两种操作方案，粗提利用常规台式冷冻离心机的差速分离原理进行线粒体粗提，所得线粒体含少量其他细胞器污染，可用于后续的 SDS-PAGE,Western,ELSIA 和蛋白组分析,也可以用于 PCR 级别的线粒体 DNA 和 RNA 提取。
3. 精提利用冷冻超速离心（离心力达 40000×g）制备的密度梯度来将粗提制备的线粒体和其他细胞成分进一步分开，得到线粒体精提液，适用于后续的偶联分析、体外线粒体蛋白合成、线粒体成份定位等精细实验。也可用于后续的 SDS-PAGE、Western、ELSIA、蛋白组分析和测序级别的线粒体 DNA 和 RNA 提取。
4. 本产品足够 15 次提取，每次可处理 10 g 绿色植物组织（可得 1-2.5 mg 左右线粒体）或 20 g 非绿色植物组织（可得 2-5 mg 左右的线粒体）。
5. 采用温和的中性裂解成分，蛋白保持天然活性。
6. 得到的提取物可以直接用于 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
匀浆液	221130a	250 mL×3	250 mL 本色瓶
洗涤液	221130b	250 mL×6	250 mL 本色瓶
离心介质溶液	221130c	150 mL×3	150 mL 本色瓶
Percoll	CAS:65455-52-9	150 mL	150 mL 本色瓶
牛血清白蛋白干粉	CAS:9048-46-8C	30 g	60 mL 本色瓶
带柄尼龙筛	30-220341	1 个	塑料袋
软毛笔	30-220342	1 个	塑料袋
植物线粒体总蛋白提取溶液 A	221130d	10 mL	10 mL 本色瓶
植物线粒体总蛋白提取溶液 B	221130e	1 mL	1.5 mL 本色管
使用手册	221130sc	1 份	无

运输及保存	常温运输及保存，有效期 1 年。
自备物品	超纯水，5 M KOH 溶液。如果需要去除细胞核 DNA，还需要自备 25 mM $MgCl_2$ 溶液、0.5 M EDTA 溶液、DNase 干粉和另购更多洗涤液。

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者在冷室进行，所用植物组织，器皿和溶液均需要在 4℃预冷。任何情况下线粒体的温度都不要超过 4℃。

一：选择组织

1. 植物组织不同，线粒体产率不同，请以下表为参考：

植物组织种类	线粒体产率	说明
根和块茎	0.3 mg/10 g	如土豆，红薯等
黄化苗（下胚轴、子叶、胚芽鞘）	2-5 mg/10 g	多酚含量低于叶片
有光合作用的叶片和子叶	1-2.5 mg/10 g	需放置在暗处 3 天

2. 一般纯化最好选用用黄化苗。如果用绿色组织（如叶片），需将植物提前放在暗室至少 3 天以降低淀粉含量，否则淀粉颗粒将干扰线粒体的纯化。
3. 一次实验需要 40 mL 匀浆液、约 90 mL 洗涤液和 35 mL 密度梯度离心介质（配制方式是一次性将 9.8 g（8.7 mL）Percoll 加入到 26.3 mL 离心介质溶液中，充分混匀后得到 35 mL 密度梯度离心介质）。这三种溶液用前均需要加入 BSA 干粉使其终浓度为 0.1%（100 mL 溶液加 0.1 g BSA 干粉，轻柔颠倒混匀或搅拌溶解后放冰上预冷待用）。每次实验用多少配多少，不要预先将所有 BSA 干粉加入，否则容易长菌。

二：线粒体粗提操作流程

4. 将 10 g 的绿色植物组织（如去叶脉后的嫩叶子，愈伤组织）或 20 g 干净的非绿色植物组织（如发芽组织、根、块茎等）浸泡在冰水中 10 分钟，用纸吸干液体后浸泡在预冷的 40 mL 匀浆液（需先加 0.1%BSA）中，在浸泡状态下剪成 1 cm^2 大小的碎片。注意：如果样品可分成多组平行处理，得到线粒体粗提物后再汇集，否则线粒体产率将急剧降低。
5. 将匀浆液和其中的植物组织碎片转移到 Waring 匀浆器中，中速匀浆 3 次，每次 15 秒，每次之间间隔 10 秒以便让碎片沉淀下来到刀片处。也可使用研磨法。具体操作是将匀浆液和其中的植物组织碎片转移到预冷的研钵中，研磨 3-4 分钟。注意：植物组织匀浆后释放的物质会使匀浆液酸化，降低 pH，而线粒体对 pH 变化非常敏感，因此建议匀浆后用 pH 试纸检测匀浆液的 pH，如果低于 7.0，必须用自备的 5 M KOH 将 pH 调到 7.0 以上才进入下一步。

6. 用带柄尼龙筛过滤匀浆液，穿透液可通过预冷的漏斗收集到预冷的 50 mL 的塑料离心管中。带柄尼龙筛可以洗干净后可以反复使用。
7. 在低速固定角度冷冻离心机上 4℃ 1000×g 离心 5 分钟，沉淀为未破碎的细胞、破碎细胞的碎片、细胞核和淀粉颗粒，上清含线粒体。小心转移上清到新的预冷的 50 mL 塑料离心管中。
8. 将装上清的离心管在水平冷冻离心机上 4℃ 12,000×g 离心 20 分钟，弃上清液，所得棕绿色沉淀即为纯化的线粒体粗提物。有时沉淀底部还有白色的淀粉沉淀，属于正常现象。
9. 加入 10 mL 预冷的洗涤液（需先加 0.1% BSA，下同）中，用软毛笔轻柔重悬线粒体沉淀(如果最底下有白色淀粉沉淀，需要避免重悬之)。不能剧烈震荡，否则线粒体容易破裂。
10. 将线粒体重悬液转移到新的 50 mL 离心管中，再加入 30 mL 预冷的洗涤液（终体积为 40 mL）中，4℃1000×g 离心 5 分钟。线粒体将在上清中。
11. 将上清转移到新的预冷的 50 mL 离心管中，4℃12000g 离心 20 分钟，沉淀为线粒体。小心弃上清。到此步时，线粒体回收率一般在 15-30%。
12. 在沉淀中加入 2 mL 预冷的洗涤液。用软毛笔轻柔重悬，得到线粒体粗提液。如果有平行提取，可将最多 4 管线粒体沉淀重悬在 2 mL 洗涤液中。线粒体粗提液中线粒体的回收率一般在 45-75%。
13. 所得线粒体粗提液含其他细胞器（如类囊体膜,质体,过氧化物酶体，乙醛酸循环体,或细菌）污染，但可直接用于 PCR 级线粒体 DNA 和 RNA 的提取、呼吸链功能测定、蛋白浓度测定和线粒体精提。如果需要长期保存,则可以在线粒体重悬液中加入 1/20 体积的自备 DMSO，混匀后分成 0.5 mL/管，然后放-80℃保存。如此保存的线粒体酶活性和膜完整性在几年内都不会发生变化。

三：细胞核 DNA 的去除（纯化测序级的线粒体 DNA 才需要进行此操作。本产品不提供相关试剂，实验步骤仅供参考）

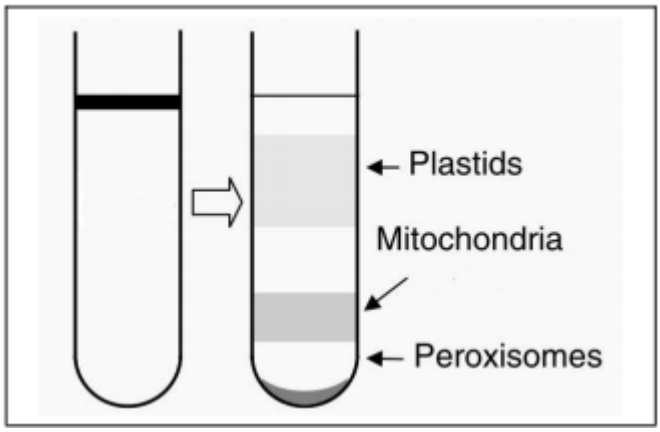
14. 预留 50 μL 线粒体粗提液做对照，在约 2 mL 剩余的线粒体粗提液中加入 40 μL 25 mM 的 MgCl2，再加入 200 μg DNase 干粉或溶液（总量为 200 μg 即可），混匀后冰上放置 60 分钟降解 DNA。取少量样品（如 50 μL）在 PCR 仪器中加热到 95℃变性 10 分钟灭活 DNase，再取其中的 10 μL 和 10 μL 预留的样品一起进行细胞核基因专一性 PCR，如果 DNase 处理的样品没有扩增，而预留样品有扩增，则表明 DNA 去除比较干净（达到 PCR 检测的极限），则进入下一步。如果未去除干

净，则继续在冰上放置，直到 PCR 检测不到细胞核 DNA。

15. 加入 0.32 mL 预冷的自备 0.5 M 的 EDTA 溶液和 40 mL 预冷的洗涤液。
16. 4℃ 1000×g 离心 5 分钟，将上清转移到新的预冷的 50 mL 离心管中，4℃ 12000 ×g 离心 20 分钟，沉淀为去除细胞核 DNA 的线粒体。重悬在 2 mL 洗涤液中。

四：线粒体精提操作方案（需要 40000×g 的超速冷冻离心机）

17. 在 50 mL 预冷的塑料离心管中先后加入 35 mL 预冷的密度梯度离心介质（配制方法见第三步，用前需先加 0.1%BSA）。
18. 将 2 mL 线粒体粗提物重悬液铺在密度梯度离心介质上。
19. 在超速水平离心机上 4℃ 40,000×g 离心 45 分钟，最上层为黄色或橙色的质体带（如果材料是绿色植物，此带将是绿色），其下的白色不透明的带即为线粒体，管底沉淀为过氧化物酶体。其示意图如下：



20. 用广口吸管（可将 1 mL 蓝抢头中间剪断后使用）收集线粒体带，注意避开其上的质体带过氧化物酶体沉淀，估计所取含线粒体溶液的体积。
21. 在 15-20 分钟的时间内缓慢加入至少 4 倍体积的预冷的洗涤液。
22. 转入 50 mL 塑料管离心管中，在冷冻离心机上 4℃ 15,000×g 离心 20 分钟，沉淀为线粒体。
23. 将线粒体沉淀用软毛笔小心重悬在至少 4 倍体积的预冷的洗涤液中，在冷冻离心机上 4℃ 15,000×g 离心 20 分钟，弃上清，沉淀即为洗涤后的线粒体精提物。到此步时，线粒体回收率一般在 5-15%。
24. 将精提的线粒体重悬在 1 mL 预冷的洗涤液中。重悬的线粒体可以立即使用，在冰上最多可放置 5-6 小时。如果需要长期保存，则可以在线粒体重悬液中加入 1/20 体积的 DMSO，混匀后分成 0.5 mL/管，然后放-80℃保存。如此保存的线粒体酶活性和膜完整性在几年内都不会发生变化。

五：线粒体总蛋白提取

	25. 每 10 mg 湿重线粒体沉淀加入 0.5 mL 植物线粒体总蛋白提取溶液 A 和 50 μL 植物线粒体总蛋白提取溶液 B，吹打混匀。 26. 冰上放置 30 min 至 1 h。 27. 4℃ 12,000×g 离心 1 min。 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 min 后立即上样电泳。其他功能检测：请自备方法。
关联产品	植物线粒体纯化试剂盒