



## 细胞线粒体提取纯化试剂盒说明书

产品编号：MC0001-A

本试剂盒仅供科研使用

### 目录

一、 背景介绍.....	2
二、 实验原理.....	3
三、 试剂盒优点.....	3
四、 实验材料及仪器准备.....	4
五、 样本收集.....	4
六、 操作步骤.....	5
七、 注意事项.....	6
八、 联系我们.....	7



## 一、背景介绍

### 1、结构

线粒体是真核细胞内的双层膜细胞器，一般呈短棒状或圆球状，直径在 0.5 到 10 微米左右（因生物种类和生理状态而异）。线粒体由外至内可划分为外膜、膜间隙、内膜和基质四个功能区。外膜比较光滑，内膜则向内褶皱形成线粒体嵴。嵴形状是判断线粒体的重要形态学指标。

### 2、功能

线粒体是真核生物进行氧化代谢的部位，是糖类、脂肪和氨基酸等进行三羧酸循环和氧化磷酸化的场所，产生的 ATP 是生物重要的能量来源。因此，线粒体是细胞产生生物能量，进行有氧呼吸的主要场所，被称之为细胞的“能量工厂”。线粒体还可以储存钙离子，可以和内质网、细胞外基质等结构协同作用，从而控制细胞中的钙离子浓度的动态平衡。

线粒体具有独立的 DNA。与细胞核 DNA 不同，线粒体 DNA 属于母系遗传。与线粒体异常相关的疾病，是一大类遗传代谢病。其临床表现复杂，临床上确诊比较困难，往往需要通过大分子酶学活性检测分析并结合遗传学基因分析的双重手段确定病因。

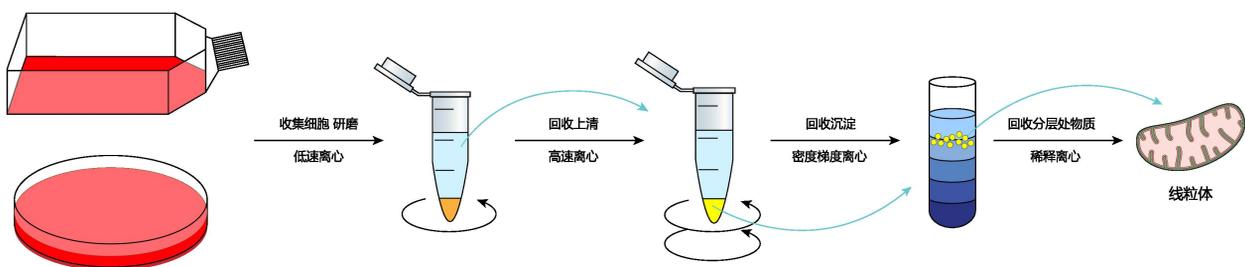
线粒体作为生物能代谢的主要细胞器，对各种异常代谢和细胞损伤最为敏感。最常见的病理改变可以概括为线粒体氧化磷酸化异常以及线粒体数量、大小和结构的改变。此外，线粒体的损伤和衰老与保健也有着密切的关联。如果能够保持线粒体的完好无损就可以保持细胞的活力，就能够有更强的新陈代谢，也能够抵抗衰老。有关线粒体内外膜活性，电子传递链功能以及线粒体 DNA、RNA 和蛋白质合成等实验研究一直是生物医学研究的重要内容。而线粒体的完整性对于实验研究的可靠性有着决定性的影响。因此分离提取到较好的线粒体是实验中最为关键的一个环节。

## 二、实验原理

本试剂盒根据不同细胞器在沉降系数方面的差异，通过系列离心，搭配试剂盒内特定密度介质获取高度纯化、结构完整的线粒体。

实验采用较温和的方法破碎细胞，将线粒体释放出来。随后用较低的离心力离心去除大部分细胞器，上清用较高的离心力离心沉淀线粒体。得到粗提物的主要成分为线粒体，内质网等其它细胞器杂质。随后将其均匀铺设在高密度、低粘度、等渗、无毒特定介质上，离心获取目标产物线粒体。

### 实验示意图



## 三、试剂盒优点

1、纯度高：经过差速离心和密度梯度离心，在富集线粒体的同时去除了大部分细胞器的杂质，纯化倍数达5倍以上。

2、结构完整：本试剂盒破碎细胞采用高精度细胞研磨杵，密度梯度离心介质选用的为低粘度、等渗的介质，从源头确保了线粒体结构的完整性。

3、生物学活性好：提取的线粒体经特定酶活验证具有较好的生物学活性，能够进行各种线粒体活性相关的实验检测。

4、应用范围广：纯度高、结构完整、具有生物学活性的线粒体，可以进行各种线粒体相关的实验。如 mtDNA 相关的线粒体病的遗传学研究，线粒体形态学研究，线粒体呼吸链



相关蛋白的功能性研究，特定线粒体蛋白的鉴定与提取，线粒体蛋白组学研究，线粒体蛋白相互作用的研究。

#### 四、实验材料及仪器准备

##### 1、试剂盒内容

编号	名称	规格	数量	保存
1	试剂 A	50ml	1 瓶	2-8℃ 冷藏
2	试剂 B	10ml	1 瓶	2-8℃ 冷藏
3	试剂 C	50ml	1 瓶	2-8℃ 冷藏
4	试剂 D (100×)	10ml	1 瓶	-20℃ 冷藏
5	试剂 E1	10ml	1 瓶	2-8℃ 冷藏
6	试剂 E2	10ml	1 瓶	2-8℃ 冷藏
7	试剂 E3	10ml	1 瓶	2-8℃ 冷藏
8	试剂 E4	10ml	1 瓶	2-8℃ 冷藏
9	试剂 E5	10ml	1 瓶	2-8℃ 冷藏
10	台盼蓝染色液	10ml	1 瓶	2-8℃ 冷藏
11	使用说明书		1 份	

2、仪器准备：超速离心管、涡旋震荡仪、细胞研磨器、超速冷冻离心机

#### 五、样本收集

##### 1、收集细胞：

对于贴壁细胞：吸弃培养基，PBS 洗一遍，用胰酶消化细胞，37℃ 5 分钟。1000rpm 室



温离心 5 分钟，收集细胞。

对于悬浮细胞：1000rpm 室温离心 5 分钟，收集细胞。

2、洗涤细胞：用预冷的 PBS 轻轻重悬细胞沉淀，1000rpm 室温离心 5 分钟，弃上清。  
重悬细胞并计数。

## 六、操作步骤

### 1、准备溶液：

根据实验需要，取适量试剂 A，按比例加入试剂 D（100×），混匀即可，配置成 AD 混合液。

2、预处理：按每 2000 万个细胞，加入 0.3-0.5ml 预冷的 AD 混合液，轻轻悬浮细胞，放置于冰上 5 分钟。（注：小体积研磨破碎效率高于大体积）

### 3、研磨：

破碎细胞过程如下：使用研磨器研磨大约 30-45 次，并进行匀浆效果鉴定实验（不同细胞不同匀浆器所需的匀浆次数有所不同）。

通常建议研磨途中取 10ul 细胞匀浆液，加入 10ul 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%，即可增加 10 次匀浆，随后进行相同的检测操作。当阳性比例超过 50% 时即可进行下一步，切勿过度研磨，否则会导致线粒体的损伤。

4、用 AD 混合液冲洗研磨器壁，连同研磨后的匀浆液转移至 5ml 离心管中，4℃，1000g 离心 10 分钟，将获得的上清转移至另一离心管中，4℃，10000g 离心 10 分钟，沉淀即为粗提线粒体。

5、向粗提线粒体中加入 1ml 试剂 E5，轻轻吹打使线粒体悬浮。



在超速离心管中由下向上按如下顺序添加不连续密度梯度介质: 0.5ml 试剂 E1, 1ml 试剂 E2, 1ml 试剂 E3, 1ml 试剂 E4, 1ml 含有线粒体的试剂 E5。铺层完毕, 4°C, 52000g 离心 90 分钟。

6、离心完毕, 小心用枪吸取位于 E3 和 E4 分层的物质 (具体情况可能需要根据实验结果调整), 将溶液收集到普通 EP 管中, 加入三倍体积的试剂 A 混匀后, 4°C, 10000g 离心 10 分钟, 收集沉淀。

7、将沉淀用试剂 C 洗涤一次, 4°C, 10000g 离心 10 分钟, 沉淀即为纯化后结构完整的线粒体。

8、线粒体的处理:

客户可以根据自己的实验需要将纯化后的线粒体产品进行以下处理

A: 加入 100-250ul 试剂 C 重悬线粒体, 得到线粒体悬液, 进行线粒体活性相关的检测。

B: 向线粒体沉淀中加入 200-500ul 试剂 B (含试剂 D), 冰上裂解 0.5 小时。最后 4°C, 12000g 离心 10 分钟, 上清即为线粒体蛋白样品。

## 七、注意事项

1、建议单次提取的细胞数量至少为  $2 \times 10^8$  个, 否则可能会得到的线粒体数量过少。

2、实验过程中所有的操作都需要在冰上完成, 以减少蛋白质降解。试剂 D (100×) 需要在实验开始前按比例加入, 其有效时间约为一小时, 需要尽快完成提取以免其失效。

3、线粒体的使用 (适用于线粒体代提客户):

本试剂盒提取的线粒体使用保护剂进行保护运输, 客户在收到线粒体之后需自行离心去除保护剂, 即加入 2mL 试剂 C 并吹打混匀, 10000g 离心 10 分钟, 得到的沉淀即为



线粒体产品。

## 八、联系我们

生产及研发：上海市浦东新区天雄路 166 弄 2 号楼 401-408、413、414 室

国际贸易部：上海市浦东新区盛荣路 88 弄 1 号楼 601 室

网址：[www.bluegene.cc](http://www.bluegene.cc) 或 [www.elisakit.cc](http://www.elisakit.cc)

联系电话：400-882-6373/021--61106433/021--61106434/021-61106435/021--61106436

国内市场部	
售前一	QQ: 2247355151 或邮箱: sale_bluegene@163.com
售前二	QQ: 3247299548 或邮箱: joan@bluegene.cc
技术部售后	tech@bluegene.cc
其他咨询	sales@bluegene.cc