



细胞线粒体提取纯化试剂盒说明书

(同样说明书见英文版)

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、 实验材料及仪器准备.....	3
四、 样本收集.....	4
五、 操作步骤.....	4
六、 注意事项.....	5



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。

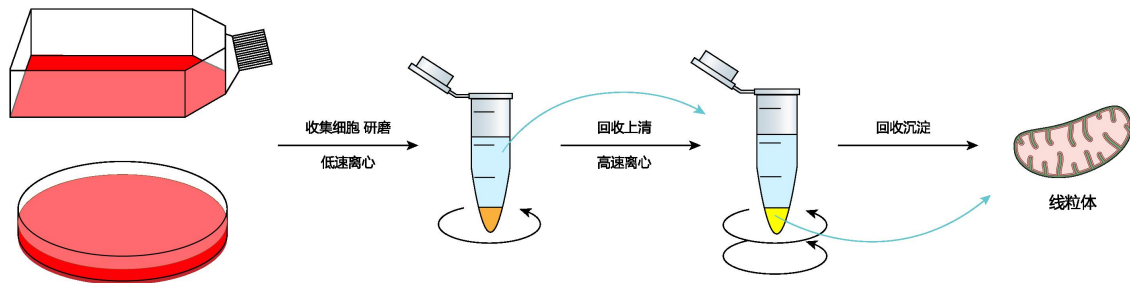
线粒体具有独立的 DNA。与细胞核 DNA 不同，线粒体 DNA 属于母系遗传。与线粒体异常相关的疾病，是一大类遗传代谢病。其临床表现复杂，临床上确诊比较困难，往往需要通过大分子酶学活性检测分析并结合遗传学基因分析的双重手段确定病因。

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，搭配试剂盒内特定缓冲溶液获取高度纯化、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。此方法操作简单，能较快获取大量线粒体。实验示意图



三、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	台盼蓝染色液	10ml	1 瓶	2-8℃ 冷藏
6	使用说明书	10ml	1 份	2-8℃ 冷藏

2、仪器准备：涡旋振荡仪、细胞研磨器



四、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。

五、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。

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

6、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℃，12000g 离心 10 分钟，上清即为线粒体蛋白样品。

六、注意事项

1、建议单次提取的细胞数量至少为 2×10^7 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 D 并吹打混匀，10000g 离心 10 分钟，得到的沉淀即为线粒体产品。