



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 400-699-0631

[http:// www.real-tims.com.cn](http://www.real-tims.com.cn)

E-mail: real-times@vip.163.com

动物线粒体提取及电泳样品制备试剂盒（细胞样品）

Ver760566-2.0

(Animal Cell Mitochondria Isolation and Electrophoresis Sample Preparation Kit)

货号	名称	规格
RTD8117	动物线粒体提取及电泳样品制备试剂盒（细胞样品）	50 次

● 产品简介

动物细胞线粒体提取及电泳样品制备试剂盒(Animal Cell Mitochondria Isolation and Electrophoresis Sample Kit)可以快速便捷分离培养细胞的线粒体，并可以制备进行线粒体蛋白变性或 BN 电泳的样品。试剂盒的提取缓冲系统不含任何表面活性剂和螯合剂 EDTA，分离获得的线粒体纯度较高，并且绝大部分分离获得的线粒体都含有完整的内膜和外膜，可以用于线粒体的生理功能等方面的研究。**另外，优化的裂解配方配套离心柱法有效裂解细胞，省去了经典方法使用玻璃匀浆器的繁琐操作，更加省时省力。**同时，本试剂盒在分离线粒体的同时可以获得去除线粒体的细胞胞浆蛋白，可以研究线粒体蛋白向胞浆内的运输机制。

该产品约 80 分钟即可完成培养细胞线粒体的提取。线粒体是在温和、非变性条件下提取的，结合不同的溶解液，溶解后的线粒体可以用于 SDS-PAGE 变性电泳检测、Blue Native 非变性电泳检测等。另外，提取的线粒体具有生理功能，可以用于线粒体的生理功能等方面的研究。

按照每次提取 2×10^7 细胞计算，试剂盒可以提取线粒体大约 50 次。

由于组织的特殊性，该试剂盒不建议用于组织线粒体提取。

● 产品组成

产品编号	名称	规格	贮存
RTD8117-01	分离缓冲液 A	15 ml	-20°C
RTD8117-02	分离缓冲液 B	15 ml	-20°C
RTD8117-03	漂洗缓冲液	30 ml	-20°C
RTD8117-04	贮存缓冲液	3 ml	-20°C
PS1020	变性蛋白溶解液	5 ml	RT
CD-50	离心柱套装 (包含离心柱和 2ml 连盖收集管)	50 个	RT
PN1020	膜蛋白重悬液 (BN 电泳用)	5 ml	-20°C
DM1080	膜蛋白增溶液 A	5 ml	-20°C
PL130-01	10×膜蛋白 A 型上样缓冲液	1 ml	-20°C
	说明书		

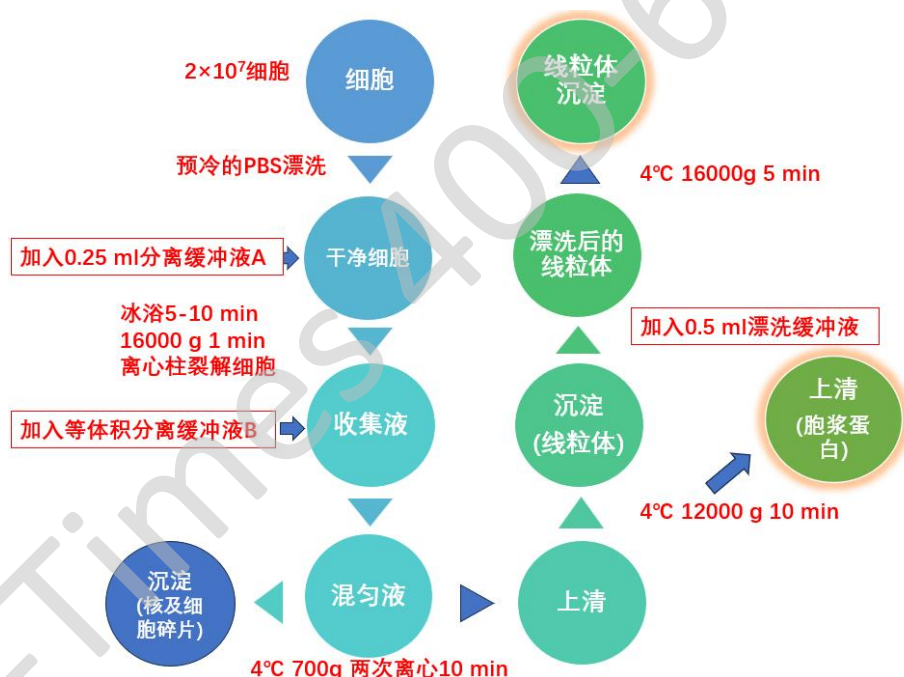
● 贮存条件和运输：

按照标签温度贮存；有效期一年；湿冰运输。

● 用前必读：

1. 离心机请调整成 RCF/g 模式，按照离心力设置离心机（不要根据转速 rpm 模式设置），所有离心步骤都需要在 4℃ 低温离心机中进行。
2. 将分离缓冲液 A，分离缓冲液 B，漂洗缓冲液和贮存缓冲液混匀后放置于冰上。将离心柱套入 2 ml 连盖收集管中，盖好管盖，放置于冰上预冷。
3. 蛋白提取推荐添加蛋白酶抑制剂(自备，试剂盒不提供)，根据蛋白酶抑制剂母液浓度提前添加在膜蛋白提取溶液中（如抑制剂母液是 100×，添加时按照 1:100 添加，即 1ml 膜蛋白提取溶液添加 10 μl 抑制剂）。研究蛋白磷酸化，需要添加磷酸酶抑制剂(自备，试剂盒不提供)。
4. 蛋白定量推荐使用 BCA 方法，可以选择 BCA 蛋白浓度测定试剂盒（货号：RTP7102）。

● 实验流程：



● 使用方法：

一. 准备溶液：

常温溶解试剂盒中的各种溶液，溶解后立即置于冰上并混匀。细胞数量建议使用 2×10^7 加入 0.25 ml 分离缓冲液 A，太低的细胞数量会导致最终线粒体提取过少。细胞数量也不能过多（不要超过 5×10^7 ），太多的细胞会超过离心柱处理能力，导致离心柱堵塞，裂解细胞不够彻底。

按照下表大体估算分离缓冲液 A 的使用体积：

细胞类型	培养器皿	细胞数量	收集细胞数量	分离缓冲液 A (ml)
悬浮细胞			$\sim 2 \times 10^7$	0.25
贴壁细胞	96 孔板	$\sim 1 \times 10^5$	调整细胞数目到 2×10^7	0.25
	24 孔板	$\sim 5 \times 10^5$		
	6 孔板	$\sim 2.5 \times 10^6$		
	25cm ² 培养瓶	$\sim 2 \times 10^6$		
	75cm ² 培养瓶	$\sim 8 \times 10^6$		
	35 mm 培养皿	$\sim 2 \times 10^6$		
	60 mm 培养皿	$\sim 5 \times 10^6$		
	100 mm 培养皿	$\sim 1.5 \times 10^7$		

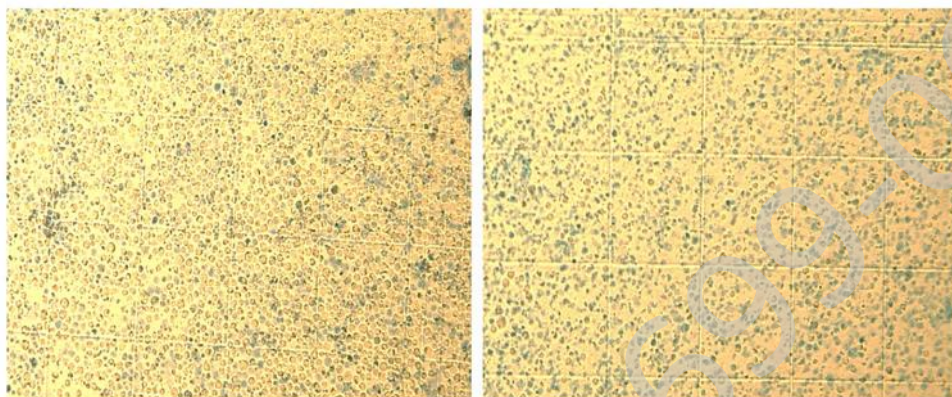
二. 收集细胞：

- 2.1 对于贴壁细胞：细胞用 PBS 漂洗一遍，弃 PBS；再加入适量 PBS，用细胞刮刀刮下细胞，或用 0.02% EDTA (0.5 mM) 溶液处理细胞使细胞不再贴壁很紧，并用移液器吹打下细胞。400 g (~ 2000 rpm) 4℃ 离心 5 min 收集细胞，尽最大努力吸尽上清，留下细胞沉淀备用。**尽量避免用胰酶消化细胞，以免胰酶降解需提取的目的蛋白。**
- 2.2 对于悬浮细胞：400 g (~ 2000 rpm) 4℃ 离心 5 min 收集细胞，用 PBS 洗一遍，离心收集细胞，尽最大努力吸尽上清，留下细胞沉淀备用。

三. 裂解细胞膜：

- 3.1 细胞沉淀中加入 0.25 ml 准备好的分离缓冲液 A (含蛋白酶抑制剂)，用移液器吹打重悬细胞沉淀，**不要涡旋剧烈震荡，冰浴处理 5-10 分钟**，间歇 2-3 混匀。
注：建议将起始细胞数不要低于 2×10^7 ，否则将导致最后线粒体得率过低。**冰浴时间不要超过 10 分钟，时间太长可能导致线粒体中更多的胞浆污染。**
- 3.2 将细胞悬液转移到离心柱中，盖上管盖，16,000 g (~ 13000 rpm) 4℃ 离心 1 分钟，离心后收集管底部会有沉淀形成。
注：离心柱最大体积为 0.6 ml，可以处理约 $2-5 \times 10^7$ 细胞数量；**太多的细胞数量可能会超过离心柱的处理能力，导致离心柱堵塞，筛板上方堆积细胞，裂解细胞不够彻底。**
- 3.3 弃去离心柱，盖好 2 ml 收集管管盖，用 1ml 移液器轻柔吹打重悬收集管中的沉淀。

3.4 判断细胞裂解程度(可选):取 10 μ l 收集管中的溶液,加入等体积台盼蓝染色液(自备),用台盼蓝染色快速判断细胞裂解程度是否合适,染色后~80%细胞应台盼蓝阳性,细胞核均匀染成蓝色,可见有少量未破碎的完整细胞。如果出现大量细胞碎片或弥散染料交联,说明步骤 3.1 冰浴处理时间过长(超过 10 分钟),导致细胞过度裂解。



K562 细胞(2×10^7)加入 0.25 ml 分离缓冲液 A 冰浴 10 分钟后台盼蓝染色(左),细胞过离心柱 16000 g 离心 1 分钟,收集液重悬后台盼蓝染色(右)。染色结果对比表明~80%细胞已经破裂,细胞核完整,未弥散交联,说明细胞裂解程度适合于后续线粒体提取。

四. 去除细胞核和未破碎的细胞:

4.1 根据步骤 3.3 中 2 ml 收集管中液体体积,加入等体积的分离缓冲液 B(如收集管中体积为 0.25 ml,则加入 0.25 ml 分离缓冲液 B),混匀。

注:必须根据收集管内的体积加入等体积分离缓冲液 B,随意加入体积可能会导致线粒体破裂,影响线粒体的纯度。

4.2 700 g (~2700 rpm) 4℃离心 10 分钟,小心将上清(上清稍有浑浊)转移到新的 1.5 ml 离心管中。注意:转速不要超过 700 g,否则会降低线粒体的得率。

关键步骤:吸取上清时不要触及沉淀,甚至可以丢弃部分上清不吸取,以免上清(含线粒体)中污染核蛋白。此步骤得到的细胞核纯度不高,混杂有没有完全破碎的完整细胞,不建议用于相关实验。

4.3 上清 700 g (~2700 rpm) 4℃再次离心 10 分钟,小心将上清(上清稍有浑浊)转移到新的 1.5 ml 离心管中。

注:此步骤进一步去除细胞核和未破碎的细胞,沉淀会明显少于步骤 4.2:吸取上清时不要触及沉淀,甚至可以丢弃部分上清不吸取,以免上清(含线粒体)中污染核蛋白。

五. 收集线粒体:

上清 12000 g 4℃离心 10 分钟,沉淀即为提取的线粒体。上清是胞浆蛋白,如需要可保存备用。**关键步骤:此步骤必须完全将上清吸取干净,可以用大吸头叠加小吸头方式彻底吸弃上清,以免线粒体中污染胞浆蛋白。**

六. 线粒体漂洗:

线粒体沉淀中加入 0.5 ml 漂洗缓冲液, 轻柔重悬沉淀, 16,000 g, 4℃离心 5 分钟, 弃上清, 沉淀即为漂洗后的线粒体。

七. 线粒体的使用:

7.1 线粒体功能研究:

如果用于完整线粒体的功能或酶活性研究, 初始 2×10^7 细胞分离得到的线粒体样品中加入 50 μ l 线粒体贮存缓冲液 (线粒体浓度 1-3 μ g/ μ l), 重悬线粒体后 -80℃ 备用。不建议长期贮存, 尽快使用。

7.2 线粒体蛋白电泳:

7.2.1 线粒体蛋白变性样品处理 (SDS-PAGE):

7.2.1.1 初始 2×10^7 细胞分离得到的线粒体沉淀中建议使用 50 μ l 变性蛋白溶解液 (货号: PS1020) 溶解线粒体沉淀 (线粒体浓度 1-3 μ g/ μ l);

7.2.1.2 BCA 方法测定蛋白浓度 (货号: RTP7102);

7.2.1.3 取测定浓度后的样品加入 SDS-PAGE 上样缓冲液 (自备, 货号: PL080), 建议调整上样液浓度为 1 μ g/ μ l, 95℃处理 5 分钟; 对于多次跨膜蛋白 (Multi-pass membrane protein) 的变性电泳检测, 样品建议使用 37℃处理 30 分钟或者 50℃处理 10 分钟, 不要 95℃加热 5 分钟, 因为在 95℃高温情况下, 多次跨膜蛋白极易聚集形成多聚体, 样品会聚集, WB 检测会表现为比实际蛋白大小更大的分子量;

7.2.1.4 使用 SDS-PAGE 凝胶 (货号: RTD6132/RTD6133/RTD6134/RTD6116) 电泳, 每个泳道上样 5-20 μ l (5-20 μ g)。

7.2.2 线粒体蛋白 BN 非变性样品处理 (BN- PAGE):

准备溶液: 即用型膜蛋白增溶溶液 A

	配制量 5 ml
增溶剂粉末 (DDM)	50 mg
溶解缓冲液 (2×)	2.5 ml
灭菌水	补至 5 ml
注 1: 建议一次全部配制, 由于粉末蓬松状态, 不建议称取粉末后分次配制。	
注 2: 一定是用水补到 5 ml 刻度线 (由于粉末体积影响, 加入溶解缓冲液后不要直接加入 2.5 ml 水), 轻柔混匀, 避免产生大量气泡。	
注 3: 配制好的即用型膜蛋白增溶溶液 -20℃ 贮存, 尽量避免反复冻融。	

7.2.2.1 初始 2×10^7 细胞分离得到的线粒体沉淀中建议使用 50 μ l 膜蛋白重悬液 (BN 电泳用) (货号: PN1020) 重悬线粒体沉淀;

7.2.2.2 BCA 方法测定蛋白浓度 (货号: RTP7102);

7.2.2.3 用膜蛋白重悬液 (BN 电泳用) (货号: PN1020) 调整蛋白浓度为 1 μ g/ μ l, 按需分装, 每管 50 μ l, -80℃ 保存待用;

7.2.2.4 取一管 50 μl 样品，溶化混匀后 4 $^{\circ}\text{C}$ 16000 g 5 分钟，去除上清，保留沉淀；
7.2.2.5 沉淀中加入 50 μl 即用型膜蛋白增溶溶液 A，轻柔重悬沉淀，尽量不产生气泡，冰浴 10 分钟；

7.2.2.6 4 $^{\circ}\text{C}$ 16000 g 15 分钟，取上清至一干净 1.5 ml 离心管中即为增溶后线粒体蛋白溶液（小心不要吸取沉淀），此时得到的线粒体蛋白浓度为 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (0.1%)，其中去垢剂 DDM（n-Dodecyl β -D-maltoside, β -DM, n-十二烷基- β -D-麦芽糖苷）终浓度为 1%；

注：线粒体膜蛋白的增溶过程中，蛋白和去垢剂 DDM 的含量比例极其严格，试剂盒使用蛋白含量:去垢剂含量=1:10（质量比例），该比例已经测试可以很好溶解出线粒体氧化磷酸化五大复合物。然而，线粒体超复合物（SC）的溶解建议用 Digitonin（毛地黄皂苷，货号：SD141）。

7.2.2.7 线粒体蛋白溶液中加入 1/10 体积 10 $\times$ 膜蛋白 A 型上样缓冲液（配套膜蛋白增溶溶液 A 使用）（货号：PL130），使用 BN 凝胶电泳（货号：RTD6139, RTD6140），每个泳道上样 5-20 μg 。

7.2.3 线粒体蛋白等电聚焦样品处理（2D 凝胶第一维电泳）：

建议线粒体沉淀中使用溶解液:7 M 尿素,2 M 硫脲,2%CHAPS,20 mM DTT(自备)。

7.3 线粒体蛋白 IP 或 CO-IP 实验：

7.3.1 初始 2×10^7 细胞分离得到的线粒体沉淀中建议使用 50 μl 线粒体贮存缓冲液溶解线粒体沉淀（线粒体浓度 1-3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ）；

7.3.2 BCA 方法测定蛋白浓度（货号：RTP7102）；

7.3.3 用贮存缓冲液调整蛋白浓度为 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，按需分装，每管 50 μl ，-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存待用；

7.3.4 取一管 50 μl 样品，溶化混匀后 4 $^{\circ}\text{C}$ 16000 g 5 分钟，去除上清，保留沉淀；

7.3.5 沉淀中加入 50 μl Western IP 细胞裂解液（货号：WL1020），混匀后冰浴 15 min；16000 g 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min 取上清进行 IP 或 Co-IP 实验。

八. 线粒体产量和质量的评价：

8.1 线粒体产量：

细胞系	细胞数量	线粒体蛋白
K562	2×10^7	50-70 μg
Jurkat	2×10^7	40-50 μg
Hela	2×10^7	50-75 μg
NIH-3T3	2×10^7	40-60 μg

8.2 线粒体质量评价：

线粒体质量评价首先看提取的线粒体是否具有完整的内外膜结构（进行线粒体功能活性研究），其次要看裂解后的线粒体蛋白是否有明显的富集，其三是要看裂解后的线粒体蛋白是否有其他组分交叉污染，最后看提取的线粒体中是否可以检测出目的蛋白。使用专门的线粒体内参检测（下表），可以初步确认提出的是线粒体蛋白。线粒体蛋白是否有效富集需要用总蛋白作为对

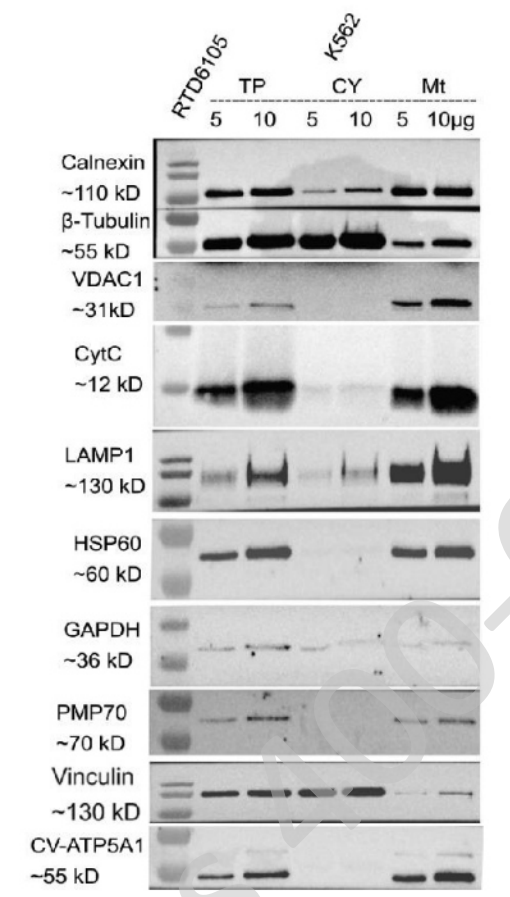
照，与总蛋白相比，线粒体内参蛋白是否有明显富集。线粒体蛋白中的交叉污染可以用其他组分内参检测线粒体蛋白样品，如关注线粒体蛋白中是否有胞浆蛋白污染，可以使用胞浆蛋白内参检测线粒体蛋白，检测条带的强弱即说明线粒体蛋白与胞浆蛋白交叉污染的程度。用目标蛋白抗体检测线粒体蛋白，验证是否可以检测到目的蛋白，蛋白大小是否符合预期。

位置	内参名称	大小 kD	SDS-PAGE WB 预期结果
内外膜腔	CytC	~12 kD	胞浆中不应该存在 线粒体中高度富集
线粒体外膜	VDAC1	~31 kD	胞浆中不应该存在 线粒体中高度富集
内质网膜	Calnexin	~100 kD	由于 MAM (Mitochondria-associated ER membranes)，传统方法无法去除线粒体中内质网的污染
溶酶体膜	LAMP1	~100-130 kD	传统方法无法去除线粒体中溶酶体的污染
过氧化物酶膜	PMP70	~70 kD	传统方法无法去除线粒体中过氧化物酶体的污染
线粒体内膜	CI-NDUFB8	~20 kD	胞浆中不应该存在 线粒体中高度富集
	CII-SDHB	~ 30kD	
	CIII-UQCRC2	~48 kD	
	CIV-COX4	~17 kD	
	CV-ATPA1	~55 kD	

许多研究人员利用 WB 对分离的线粒体蛋白进行纯度检测，经常发现一些常用的胞浆内参能在线粒体蛋白中检测到，例如 β -actin^[1], GAPDH ^[2] 和 β -tubulin，这是由于这些胞浆内参不仅存在于胞浆也存在于线粒体中，因此可以在线粒体蛋白中检测到胞浆内参。更多信息，请参阅以下论文：

1. Hatch, Anna L., Pinar S. Gurel, and Henry N. Higgs. Novel roles for actin in mitochondrial fission. *Journal of Cell Science* (2014) 127, 1–12
2. Zhang, Jin-Ying, et al. Critical protein GAPDH and its regulatory mechanisms in cancer cells. *Cancer Biol Med* 2015;12:10-22.

九. 实验示例：



2×10^7 K562 细胞线粒体提取后 SDS-PAGE 检测