



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

动物组织线粒体提取试剂盒（软组织） (Animal Soft Tissue Mitochondria Isolation Kit)

Ver.765374-1.0

产品货号	名称	规格
RTD8116	动物组织线粒体提取试剂盒（软组织）	30 次

● 产品简介

动物组织线粒体提取试剂盒(Animal Tissue Mitochondria Isolation Kit)可以快速便捷分离动物组织的线粒体。试剂盒的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，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。另外，试剂盒配套 BSA 溶液（不含脂肪酸），在组织匀浆阶段，可以结合游离脂肪酸并保护线粒体膜完整性，有助于提高线粒体产量、纯度及功能完整性。

由于组织硬度的特殊性，该试剂盒适用于软组织如肝脏、脑、肾脏、肺组织的线粒体提取，对于硬组织如心脏或骨骼肌线粒体的提取，不建议使用。

该产品约 90 分钟即可完成组织线粒体的提取。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 非变性电泳检测以及等电聚焦电泳等。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。按照每次提取使用 100 mg 组织计算，试剂盒可以使用大约 30 次。试剂盒不建议用于细胞线粒体提取。

● 产品组成

产品编号	名称	规格	贮存
RTD8116-01	分离缓冲液 A	30 ml	-20℃
RTD8116-02	分离缓冲液 B	30 ml	-20℃
RTD8116-03	分离缓冲液 C	15 ml	-20℃
RTD8116-04	分离溶液 D	2.5 ml	4℃
RTD8116-05	漂洗缓冲液	60 ml	-20℃
RTD8116-06	贮存缓冲液	3 ml	-20℃
RTD8116-07	BSA 溶液（50 mg/ml，不含脂肪酸）	1.5 ml	-20℃
TB0515-1ml	台盼蓝染色液	1 ml	4℃
YMC07-5	塑料研磨杵	5 根/包	RT
	说明书		

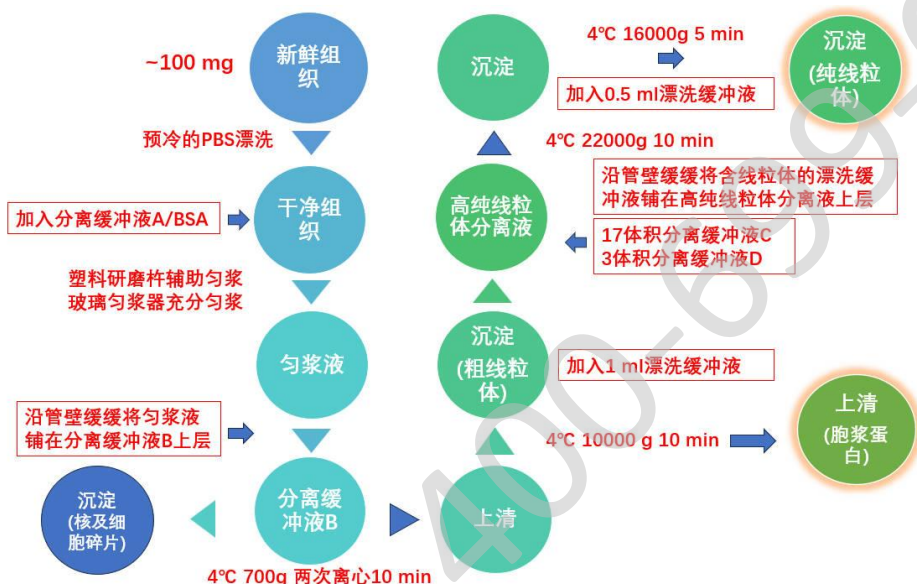
● 贮存条件和运输：

-20℃贮存，一个月内使用可以 4℃贮存；有效期一年；湿冰运输。

● 自备材料：

1×PBS；玻璃匀浆器（预冷）；蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂；剪刀或刀片；冰；1.5 ml 离心管；2 ml 离心管；低温离心机（转速可达到 22000 g），离心机请调整成 RCF/g 模式。

● 实验流程：



● 使用方法：

一. 准备溶液：

1.1 常温溶化试剂盒中的各种溶液，溶解后立即混匀置于冰浴中预冷。

1.2 蛋白提取推荐添加蛋白酶抑制剂（试剂盒不提供），根据蛋白酶抑制剂母液浓度提前在分离缓冲液 A，分离缓冲液 B，分离缓冲液 C，漂洗缓冲液中加入抑制剂（如抑制剂母液是 100×，添加时按照 1:100 添加，如 1ml 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（试剂盒不提供）。缓冲液的抑制剂现用现加，不建议贮存。

1.3 分离缓冲液 A/BSA 混合溶液：提取前，分离缓冲液 A 中加入 50 mg/ml BSA 溶液至浓度为 2 mg/ml (0.2%)，如 1 ml 分离缓冲液 A 中加 40 μl 50 mg/ml BSA 溶液。该溶液现用现配，不建议贮存。

二. 组织匀浆：

2.1 组织漂洗：

取~100 mg 新鲜组织，用 1×PBS 清洗两次，弃净清洗液。

注：说明书匀浆步骤适合于软组织(例如肝脏、脑、肾脏、肺)中分离线粒体；对于硬组织如心肌和骨骼肌组织，不推荐使用。

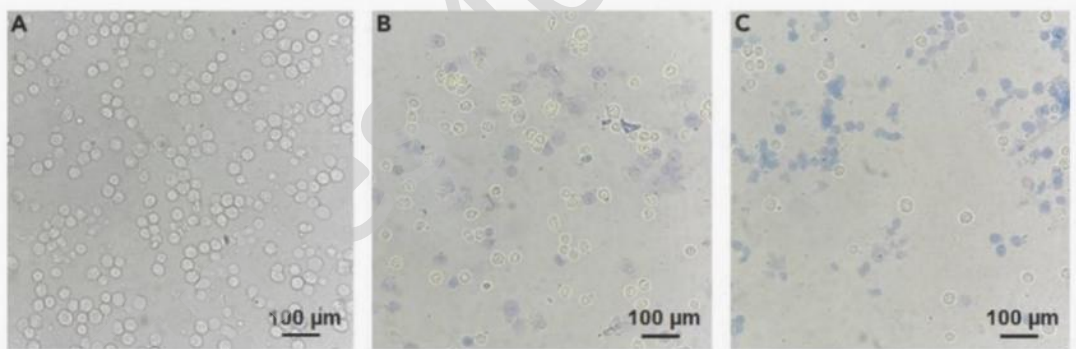
2.2 组织破碎（关键步骤）：

2.2.1 用剪刀或刀片将组织切成细小的碎片，置于 1.5 ml 离心管中；

2.2.2 离心管中先加入 0.5 ml 分离缓冲液 A/BSA 混合溶液，轻轻悬浮组织碎片；用塑料研磨杵在 1.5 ml 离心管中旋转研磨组织 2-5 次，至组织成为匀浆悬浮液（无需研磨彻底，至无明显大颗粒即可）；

2.2.3 随后将匀浆悬浮液转移到玻璃匀浆器中（用剪刀将 1 ml 吸头剪成宽口有助于吸取），再补加入 0.5 ml 分离缓冲液 A/BSA 混合溶液，玻璃匀浆器匀浆 5-10 次，每 100 mg 组织需要使用 1 ml 分离缓冲液 A/BSA 混合溶液。

注：此匀浆步骤为关键环节，预先使用配套的塑料研磨杵研磨组织有利于随后玻璃匀浆器更充分的研磨。玻璃匀浆器须配套选用间隙严密的研杵，其特征是将研杵插入匀浆器套管后，可提起研杵而套管不会脱落。正确的匀浆不是旋转研杵，而是上下缓慢推拉研杵一次为一次完整的匀浆过程。**匀浆次数原则是宁少勿多，建议初始匀浆次数~5 次，台盼蓝染色后显微镜观察匀浆程度后再确定是否继续增加匀浆次数，过度匀浆会导致胞浆和线粒体的交叉污染。**破碎效果与组织类型有关，不同的样品所需匀浆次数不同。鉴定方法：取 10 μ l 匀浆后的样品，加入等体积的台盼蓝溶液，混匀，在显微镜下观察台盼蓝溶液染色阳性（蓝色）细胞数目的比例，当阳性（蓝色）细胞破碎达到 80% 即可停止匀浆，请勿过度匀浆。若阳性（蓝色）细胞比例未达到 80%，适当增加 1-2 次匀浆，随后按照同样的方法使用台盼蓝溶液进行鉴定。



台盼蓝染色观察匀浆程度示意图 A 匀浆前 B 匀浆器台盼蓝染色 C 匀浆后台盼蓝染色

三. 线粒体的粗分离：

3.1 根据步骤 2 中样品匀浆液的体积，取等体积的分离缓冲液 B 加至 2 ml 离心管底部，然后沿管壁缓慢地加样品匀浆液使其覆盖于上层。

注：匀浆液置于分离缓冲液 B 上层时要沿管壁小心加入，同时及时离心，以防匀浆液中的颗粒自然下沉，影响后面的离心分层效果。

3.2 700 g 4℃ 离心 10 min，收集上清至 2 ml 离心管中，沉淀为细胞核及未破碎的细胞。

注：离心后上清可能会分成两层，收集最上层分离层，如果分层不明显则将所有上清收集；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）中污染其他蛋白；此步骤得到的细胞核纯度不高，混杂没有完全破碎的完整细胞，不建议用于相关实验。

3.3 上清再次 700 g 4℃离心 10 min，收集上清至 2 ml 离心管中。

注：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）中污染其他蛋白。

3.4 将上清溶液 10,000 g 4℃离心 10 min，沉淀即为粗线粒体，加入 0.5 ml 漂洗缓冲液重悬。

注：此步骤得到的上清是胞浆蛋白，如需要可保存备用。

四. 高纯度线粒体分离：

4.1 高纯度线粒体分离液准备：

按照分离缓冲 C:分离溶液 D=17:3 的比例配制，现用现配。进行一次提取需要 0.5 ml 高纯度线粒体分离液。

	高纯度线粒体分离液总体积	
	0.5 ml	1 ml
分离缓冲液 C	425 μ l	0.85 ml
分离溶液 D	75 μ l	0.15 ml

4.2 取 0.5 ml 配好的高纯线粒体分离液提前加入到 1.5 ml 离心管中。

4.3 将步骤 3.4 中重悬的 0.5 ml 粗线粒体溶液缓慢地加入到高纯度线粒体分离液的上层；

注：要确保粗线粒体溶液和高纯线粒体分离液是等体积比例加入。

4.4 22000 g 4℃离心 10 min，弃上清，保留沉淀；

注：如果离心机转速达不到 22000 g，改用 16000 g 4℃离心 30 min。

4.5 沉淀中加入 1 ml 漂洗缓冲液重悬，4℃，16000 g 离心 5 min，收集到的沉淀即为高纯度的线粒体。

五. 线粒体的使用：

5.1 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 100 mg 组织分离得到的线粒体样品中加入 100-200 μ l 线粒体贮存缓冲液，重悬线粒体后-80℃备用。不建议长期贮存，尽快使用。

5.2 线粒体蛋白变性样品处理（SDS-PAGE）：

5.2.1 初始 100 mg 组织分离得到的线粒体沉淀中建议使用 100-200 μ l 线粒体贮存缓冲液溶解线粒体沉淀（线粒体浓度 1-5 μ g/ μ l）；

5.2.2 BCA 方法测定蛋白浓度（货号：RTP7102）；

5.2.3 用贮存缓冲液调整蛋白浓度为 1 μ g/ μ l，按需分装，每管 50 μ l，-80℃保存待用；

5.2.4 取一管 50 μ l 样品，溶化混匀后 4℃ 16000 g 5 分钟，去除上清，保留沉淀；

5.2.5 沉淀中加入 50 μ l 1×SDS-PAGE 上样缓冲液溶解（自备），此时上样液浓度为 1 μ g/ μ l；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；

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

5.3 线粒体蛋白 BN 非变性样品处理 (BN-PAGE):

5.3.1 初始 100 mg 组织分离得到的线粒体沉淀中建议使用 100-200 μl 膜蛋白重悬液 (BN 电泳用) (货号:PN1020) (试剂盒不提供) 重悬线粒体沉淀;

5.3.2 BCA 方法测定蛋白浓度 (货号: RTP7102);

5.3.3 用膜蛋白重悬液 (BN 电泳用) 调整蛋白浓度为 $1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 按需分装, 每管 $50\text{ }\mu\text{l}$, -80°C 保存待用;

5.3.4 取一管 $50\text{ }\mu\text{l}$ 样品, 溶化混匀后 4°C 16000 g 5 分钟, 去除上清, 保留沉淀;

5.3.5 沉淀中加入 $50\text{ }\mu\text{l}$ 膜蛋白增溶溶液 A (货号: DM1080) (试剂盒不提供), 轻柔重悬沉淀, 尽量不产生气泡, 冰浴 10 分钟;

5.3.6 4°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 $1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 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%;

5.3.7 线粒体蛋白溶液中加入等体积 $2\times$ 膜蛋白 A 型上样缓冲液 (配套膜蛋白增溶溶液 A 使用) (货号: PL131) (试剂盒不提供), 此时蛋白浓度为 $0.5\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 使用 BN 凝胶电泳 (货号: RTD6139, RTD6140), 每个泳道上样 $5\text{--}10\text{ }\mu\text{g}$ 。

5.4 线粒体蛋白 IP 或 CO-IP 实验:

5.4.1 初始 100 mg 组织分离得到的线粒体沉淀中建议使用 100-200 μl 线粒体贮存缓冲液溶解线粒体沉淀 (线粒体浓度 $1\text{--}5\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$);

5.4.2 BCA 方法测定蛋白浓度 (货号: RTP7102);

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

5.4.4 取一管 $50\text{ }\mu\text{l}$ 样品, 溶化混匀后 4°C 16000 g 5 分钟, 去除上清, 保留沉淀;

5.4.5 沉淀中加入 $50\text{ }\mu\text{l}$ Western&IP 细胞裂解液 (货号: WL1020), 混匀后冰浴 15 min; 16000 g 4°C 离心 10 min 取上清进行 IP 或 CO-IP 实验。

5.5 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, 试剂盒不提供)。

六. 线粒体产量和质量的评价:

6.1 线粒体产量:

组织	质量	线粒体蛋白
肾脏	$\sim 100\text{ mg}$	$100\text{--}200\text{ }\mu\text{g}$
肝脏	$\sim 100\text{ mg}$	$150\text{--}300\text{ }\mu\text{g}$
肺	$\sim 100\text{ mg}$	$100\text{--}150\text{ }\mu\text{g}$
脑组织	$\sim 100\text{ mg}$	$100\text{--}150\text{ }\mu\text{g}$

6.2 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, 其三要看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 Membranes), 传统方法无法去除线粒体中内质网,溶酶体和过氧化物酶体的污染
溶酶体膜	LAMP1	~100-130 kD	
过氧化物酶膜	PMP70	~70 kD	
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	

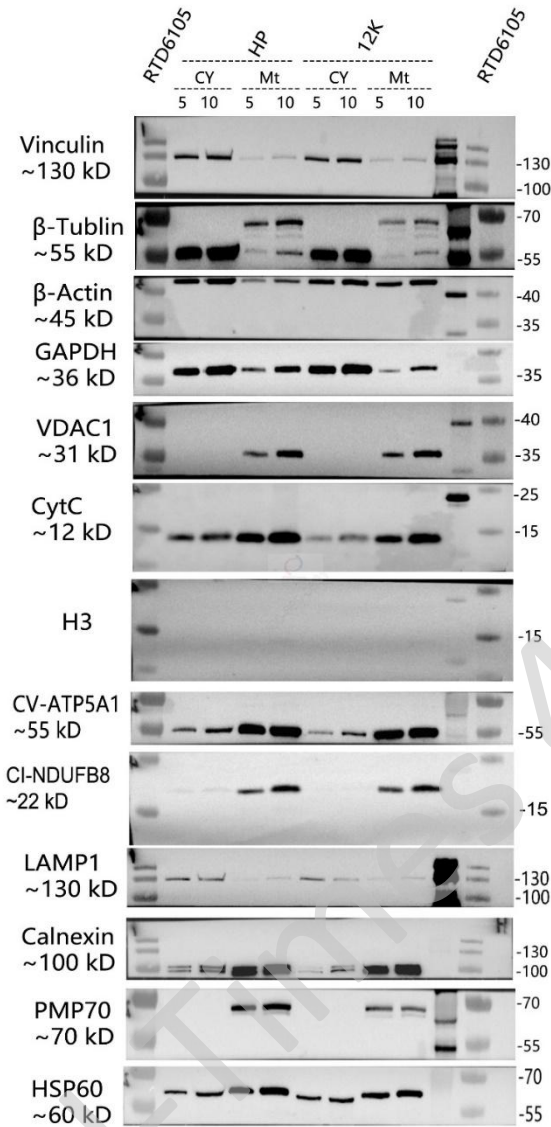
许多研究人员利用 WB 对分离的线粒体蛋白进行纯度检测, 经常发现一些常用的胞浆内参能在线粒体蛋白中检测到, 例如 β -actin^[1], GAPDH ^[2] 和 β -tubulin, 这是由于这些胞浆内参不仅存在于胞浆也存在于线粒体中, 因此可以在线粒体蛋白中检测到胞浆内参。更多信息, 请参阅以下论文:

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.

七. 实验示例:

7.1 变性 SDS-PAGE WB 检测:



小鼠肾脏线粒体试剂盒方法提取 (RTD8116)

对比低渗裂解液提取方法 (12K) WB 检测

材料: 小鼠肾脏-80 度冻存组织

胞浆蛋白交叉污染: 四种胞浆内参在线粒体中都有交叉污染, 然而胞浆蛋白在胞浆中富集明显;

HSP60 在胞浆和线粒体中都明显存在, 说明 HSP60 不适合作为线粒体纯度的检测指标;

外膜完整性: VDAC1 胞浆中没有检测到, 说明线粒体外膜保持完整; 细胞色素 C 胞浆中有交叉污染, 说明膜间隙蛋白有泄露;

核蛋白: 胞浆和线粒体中都没有检测到核蛋白内参 H3, 说明线粒体中几乎没有核蛋白污染;

溶酶体和过氧化物酶以及内质网污染: 由于

MAM (Mitochondria-Associated Membranes)

存在, 线粒体中可以检测到相应的标志蛋白, 提取方法无法做到不包含 MAM 的线粒体

线粒体内膜蛋白: CV 和 CI 复合物标志蛋白线粒体中明显富集, 胞浆中含量很低