



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 400-699-0631

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）

(Animal Cell Mitochondria Isolation and Electrophoresis Sample Preparation Kit)

产品货号	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 30 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。

● 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℃
RTD8117-02	分离缓冲液 B	15 ml	-20℃
RTD8117-03	漂洗缓冲液	30 ml	-20℃
RTD8117-04	贮存缓冲液	3 ml	-20℃
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℃
DM1080	膜蛋白增溶液 A	5 ml	-20℃
PL130-01	10×膜蛋白 A 型上样缓冲液	1 ml	-20℃
	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°C 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)。

● 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。如果最终实验目的是制备线粒体蛋白样品, 根据样品数量, 取适量体积分离缓冲液 A 加入蛋白酶抑制剂。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	细胞沉淀体积(PCV)(μl)	分离缓冲液 A (μl)
悬浮细胞		$\sim 2 \times 10^7$	~ 200	250
贴壁细胞	96 孔板	$\sim 1 \times 10^5$	调整细胞数目到 2×10^7	250
	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	$\sim 1.5 \times 10^7$		

注:(二百万, 2×10^6)HeLa 细胞, 其细胞沉淀体积 (PCV, Packed Cell Volume) 大约为 20 μl。

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°C 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°C 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 250 μl 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，**涡旋剧烈震荡 30-60 秒，冰浴处理 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。

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 600 μ l；**确保离心机可以在 10 秒内达到 16000 g。**

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。

四. 去除细胞核和未破碎的细胞：

溶液 700 g (~2700 rpm) 4℃ 离心 1 分钟，用 200 μ l 吸头小心将上清（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 700g，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。如果使用 250 μ l 分离缓冲液 A，建议吸取 200 μ l 上清。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。

五. 收集线粒体：

5.1 上清中加入等体积的分离缓冲液 B（如步骤 4 吸取 200 μ l 上清，则加入 200 μ l 分离缓冲液 B），混匀；

5.2 16000 g (~13000 rpm) 4℃ 离心 10 分钟，用 200 μ l 吸头吸去上清，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 200 μ l 吸头分次吸取上清，最后用 10 μ l 吸头将残余上清彻底吸净，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 100-150 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。

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；

7.2.1.2 BCA 方法测定蛋白浓度（货号：RTP7102）；

7.2.1.3 用变性蛋白溶解液调整蛋白浓度为 1 μ g/ μ l，按需分装，每管 50 μ l，-80℃ 保存待用；

7.2.1.4 取一管 50 μ l 样品加入 SDS-PAGE 上样缓冲液（货号：PL080, PL113, PL121）处理，建议调整上样液浓度为 0.5 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**, 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;

7.2.1.5 使用 SDS-PAGE 凝胶(货号: RTD6132, RTD6116)电泳, 每个泳道上样 10-40 μl (5-20 μg)。

7.2.2 线粒体蛋白 BN 非变性样品处理:

准备溶液: 即用型膜蛋白增溶液 A:

	配制量 5 ml
增溶剂粉末 (DDM)	50 mg
溶解缓冲液 (2 \times)	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批配制。 注 2: 一定是用水补到 5 ml 刻度线 (由于粉末体积影响, 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 μl 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 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 按需分装, 每管 50 μl , -80℃ 保存待用;

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

7.2.2.5 沉淀中加入 50 μl 膜蛋白增溶液 A (货号: DM1080), 轻柔重悬沉淀, 尽量不产生气泡, 冰浴 10 分钟;

7.2.2.6 4℃ 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 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 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%;

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)。

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	100-150 μg

Jurkat	2×10^7	80-100 μg
Hela	2×10^7	100-150 μg
NIH-3T3	2×10^7	80-120 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。

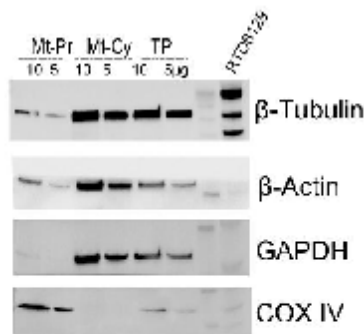
位置	内参名称	大小 kD
细胞膜	Na-K ATPase	100
内质网膜	Calnexin	~90
线粒体膜	COX IV	17

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:



K562线粒体提取试剂检测

Mt-Pr 线粒体蛋白

Mt-CY 线粒体提取中的胞浆蛋白

TP RIPA提取总蛋白

β -Tubulin 1:5000; β -Actin 1:10000;

GAPDH 1:10000; COX IV 1:5000