



细胞线粒体分离试剂盒

Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells

包装清单

Cat No.	组分	包装规格-100T
MCK-0021	线粒体分离试剂 (Mitochondria Isolation Reagent)	125 mL
	台盼蓝染色液 (Trypan Blue)	10 mL
	线粒体储存液 (Mitochondria Storage Buffer)	15 mL
	线粒体裂解液 (Mitochondria Lysis Buffer)	15 mL
	PMSF(晶体)	For 1.5 mL 100 mM
	PMSF(溶剂)	1.5 mL
	说明书	1 份

产品简介

细胞线粒体分离试剂盒(Cell Mitochondria Isolation Kit)是用于快速便捷地分离培养细胞线粒体的试剂盒。

线粒体是真核细胞中产生能量的主要部位，具有双层膜结构。制备线粒体的关键在于确保线粒体的完整性和纯度。通常先低速离心去除细胞核及细胞碎片，再高速离心获得线粒体。

默科的细胞线粒体分离试剂盒可快速分离所培养细胞的线粒体，且线粒体纯度较高，绝大多数具有完整的内外膜及生理功能。提取的线粒体也可被相应裂解液裂解后得到线粒体蛋白，用于 SDS-PAGE、WB、双向电泳等蛋白分析。此外，本试剂盒也可用于提取不含线粒体的细胞浆蛋白。本试剂盒可检测 50-100 个样品，建议每个样品的细胞数量为 2.5×10^7 个。

保存条件

-20℃保存，有效期一年。

注意事项

- 若要制备线粒体蛋白样品，需在 Mitochondria Isolation Reagent 和 Mitochondria Lysis Buffer 中加入 PMSF，且 PMSF 一定要在试剂加入样品前 1-2 min 内加入，防止 PMSF 失效。
- 整个实验在冰上或 4℃ 进行。所用溶液需冰浴或 4℃ 预冷。
- 本实验获得的线粒体样品若不能及时使用，建议 -80℃ 保存。冻存后的线粒体不建议用于膜电位的检测。
- Trypan Blue 和 PMSF 对人体有害，使用时务必小心。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明

- 从 -20℃ 冰箱中取出各试剂，室温解冻，置于冰上备用。
- 将 1.5mL PMSF (solvent) 加入 PMSF (crystal) 中，充分溶解，即得 1.5mL 100mM PMSF 溶液。
- 提前接种细胞，至细胞密度达到 70-90%。
- 收集细胞：
贴壁细胞：弃去细胞培养液，加入 PBS 洗涤一次。加入 Trypsin Buffer 消化细胞，100-200 g，4℃ 离心 5-10 分钟。
悬浮细胞：100-200 g，4℃ 离心 5-10 分钟收集细胞。 **注：**Trypsin Buffer 本试剂盒未提供，需另行购买。
- 加入预冷的 PBS 重悬细胞，600 g，4℃ 离心 5 分钟，弃去上清。
- 每 2.5×10^7 个细胞中加入 1-2.5 mL Mitochondria Isolation Reagent (含 1 mM PMSF)，轻轻重悬细胞，冰浴 10-15 分钟。
- 将细胞悬液转移至匀浆器中，匀浆 10-30 下。

注：①需根据细胞类型及匀浆器类型自行优化匀浆次数。

②可在匀浆 10 次后取 2 μ L 细胞匀浆，加入 30-50 μ L Trypan Blue 染色鉴定匀浆效果。若阳性细胞（蓝色）比例不足 80%，增加 5 次匀浆并用 Trypan Blue 染色鉴定，直至阳性比例超过 80%。

③请勿过度匀浆，防止线粒体损伤。

- 将细胞匀浆 600 g，4℃ 离心 10 分钟。

注：此步离心目的在于去除细胞核、细胞碎片及未裂解细胞。将离心速度提升至 1,000 g 可获得更纯的线粒体，但线粒体抽提率相对下降。

- 将上清转移至干净的离心管，11,000 g，4℃ 离心 10 分钟。

注：此步离心目的在于沉淀线粒体。将离心速度改为 3,500 g 可获得更纯的线粒体，但线粒体抽提率相对下降。



10. 弃去上清，所得沉淀即为细胞线粒体。

注：此步骤也可用于获得不含线粒体的细胞浆蛋白。收集本步骤中的上清，12,000 g，4℃ 离心 10 分钟，获得的上清液即为不含线粒体的细胞浆蛋白。后续可用 BCA 法或 Bradford 法测定蛋白浓度。

11. 线粒体的应用：

（1）完整线粒体的功能及酶活研究：每 $2-5 \times 10^7$ 个细胞分离得到的线粒体中加入 150-200 μL Mitochondria Storage Buffer，重悬备用。后续可使用默科的线粒体膜电位检测试剂盒（Cat. No.: MCK-0013）测定分离得到的线粒体的膜电位。

（2）线粒体蛋白分析：每 $2-5 \times 10^7$ 个细胞分离得到的线粒体中加入 150-200 μL 临用前添加了 PMSF 的 Mitochondria Lysis Buffer（PMSF 终浓度为裂解后得到的线粒体蛋白经 12,000g，4℃，离心 3-5 min 后可用于 PAGE、WB、IP 及酶活测定，也可用 BCA 法或 Bradford 法测定蛋白浓度。