



线粒体蛋白提取试剂盒说明书（简化版）

(G008-1)

一、产品简介

本试剂盒用于从哺乳动物组织或细胞中提取线粒体蛋白。其原理首先是从动物组织或细胞中分离出完整而且纯化的线粒体，然后用含有蛋白酶抑制剂及磷酸酶抑制剂的裂解缓冲液裂解线粒体得到高纯度的线粒体蛋白。本试剂盒可用于 Western Blot、免疫共沉淀等后续研究。

二、试剂组份

试剂编号	试剂组成	规格装量		保存条件
		G008-1-1 50T	G008-1-2 100T	
R1	裂解液 1	100 ml	200 ml	-20℃ 保存，有效期一年
R2	溶液 A	25 ml	50 ml	-20℃ 保存，有效期一年
R3	漂洗液	10 ml	20 ml	-20℃ 保存，有效期一年
R4	裂解液 2	50 ml	100 ml	-20℃ 保存，有效期一年
R5	磷酸酶抑制剂	500 μ l	1000 μ l	-20℃ 保存，有效期一年
R6	蛋白酶抑制剂	50 μ l	100 μ l	-20℃ 保存，有效期一年
R7	PMSF（100mM）	500 μ l	1000 μ l	-20℃ 保存，有效期一年

三、自备仪器和试剂

低温高速离心机、剪刀、微量移液器、1.5m L离心管、涡旋振荡器、相差显微镜下、PBS

四、操作步骤

（一）线粒体的提取

1、样本的处理

A、培养细胞裂解匀浆

- 按照常规方法收集细胞。用PBS洗涤一次细胞并计数，离心（2000rpm，5min）收集细胞，吸尽上清。每次提取需要 5×10^7 个细胞。
- 加入1.5ml预冷的裂解液1重悬细胞，冰浴放置10~15min。
- 将细胞悬液转移到小容量玻璃匀浆器内，0℃~4℃冰浴研磨细胞 30~40 次。
- 转入第2步进行操作。

B、组织裂解匀浆



- a、称取100~200 mg新鲜组织如肝脏、脑、心肌等，PBS或生理盐水冲洗，洗净血水，滤纸吸干。
 - b、把组织放在一个置于冰上的离心管或培养皿中，用剪刀或刀片把组织剪切成非常细小的组织碎片，放置于玻璃匀浆器中。
 - c、加入1.5 ml冰预冷的裂解液1，冰浴上研磨组织20次。
 - d、转入第2步进行操作。
- 2、将细胞或组织匀浆物转移到离心管，4℃，800×g离心5 min。细胞核、大的膜碎片、未裂解细胞等在管底。
 - 3、在另一个新的预冷的离心管中预先加入0.5ml 溶液A，将匀浆后的上清液0.5ml（溶液A：上清液体积=1：1）沿管壁小心地加入预冷的离心管中，覆盖于溶液A的上层。
 - 4、4℃离心（15,000×g 10 min）。离心后的上清为胞浆成分，将上清转移到新离心管，沉淀为线粒体。
 - 5、往沉淀中加入0.2 ml漂洗液重悬线粒体沉淀，4℃离心（15,000×g 10 min），弃上清。

（二）蛋白的提取

1、裂解液2工作液的准备

在每1ml 冷裂解液2加入10μl磷酸酶抑制剂，1μl蛋白酶抑制剂和5μl 100mM PMSF，混匀。冰上保存数分钟待用。

- 2、每20μl 线粒体压积中，加入200μl 上述配制好的冷裂解液2工作液。
- 3、置于4℃摇床平台上，温和振荡15 min。
- 4、离心（12,000rpm，4℃）15min，取上清为线粒体蛋白提取物，进行蛋白定量（建议用BCA法）。
- 5、分装保存于-70℃，避免反复冻融。