

细胞/组织线粒体提取试剂盒使用说明书

【包装规格】

产品编号	产品名称	包装
EK-6115	细胞/组织线粒体提取试剂盒	50T/100T/500T
EK-6115A	线粒体分离试剂A	50ml/100ml/500ml
EK-6115B	线粒体分离试剂B	0.6ml/1.2ml/6ml
EK-6115C	线粒体分离试剂C	65ml/130ml/650ml
EK-6115D	BSA 牛血清白蛋白干粉（组织用）	0.25g/0.5g/2.5g
	使用说明书	1 份

【保存条件】

4°C保存 3 个月，-20°C保存 12 个月

【概述】

线粒体是细胞代谢的核心。本试剂盒采用成熟的去污剂裂解法，可在不使用超速离心的情况下，从培养细胞或硬/软组织中快速富集线粒体。 双方案支持：兼容 Dounce 匀浆法（试剂 C 稀释液）和 试剂裂解法。 高完整性：维持线粒体外膜完整，适用于下游呼吸链活性、膜电位（JC-1）及蛋白分析。 纯度优化：提供差速离心参数，可根据需求降低溶酶体和过氧化物酶体污染。

【使用建议（仅供参考）】

选项 A：动物细胞分离线粒体

- 使用前立即添加蛋白酶抑制剂（自备）至试剂 A 和试剂 C 中；仅将抑制剂添加到用于实验的试剂量中，而不是添加到储备溶液中。
 - 在 2.0mL 微量离心管中以~850×g 离心 2 分钟收获沉淀 2×10^7 个细胞，小心地取出并丢弃上清液。
 - 加入 800μL 线粒体分离试剂 A，以中速涡旋 5 秒，并将试管在冰上孵育 2 分钟。
- 注意：孵育时间不要超过 2 分钟以避免损害线粒体完整性。
- 加入 10μL 线粒体分离试剂 B，以最大速度涡旋 5 秒。
 - 将试管在冰上孵育 5 分钟，孵育过程中每分钟以最大速度涡旋数秒。
 - 加入 800μL 线粒体分离试剂 C 倒置试管数次混合（不要涡旋）。
 - 将离心管在 4°C 下以 700×g 离心管离心 10 分钟。

8. 将上清液转移到新的 2.0 mL 离心管中，并在 4°C 下以 12,000×g 离心 15 分钟。

注意：如需获得更纯的线粒体部分，减少>50%溶酶体和过氧化物酶体污染物，更改为以 3000×g 离心 15 分钟。

9. 将上清液（胞质部分）转移到新管中，沉淀含有分离的线粒体。

10. 向沉淀中加入 500μL 线粒体分离试剂 C，然后以 12,000×g 离心 5 分钟，弃去上清液，沉淀即为纯化后得到的线粒体。

11. 在下游处理之前将线粒体沉淀保持在冰上。冻融可能会损害线粒体的完整性。

选项 B: 50-200mg 动物组织分离线粒体

1. 使用前立即添加蛋白酶抑制剂（自备）至试剂 A 和试剂 C 中；仅将抑制剂添加到用于实验的试剂量中，而不是添加到储备溶液中。

洗涤缓冲液配制：将试剂 C 与纯水 1:1 混合摇匀即可（如需 1ml 洗涤缓冲液，则取 0.5ml 试剂 C 加入 0.5ml 纯水混匀即可）。

2. 取 50-200mg 组织在 PBS 溶液中切碎，使用匀浆机中破碎以破碎组织关联，应减少细胞破裂。

注意：如组织较硬如心脏组织，可 50-200 毫克的硬组织（心脏）在含有 0.3 毫克/毫升胰蛋白酶的 PBS 溶液中切成小块，并在冰上孵化三分钟。孵育后，样品在 4°C 的温度下以 700×g 离心一分钟。然后仔细丢弃上清液，并收集组织颗粒。添加 800 微升含有 4 毫克/毫升 BSA 的 PBS 溶液，并使用 Polytron 或 Dounce 均质器研磨组织样品，以破坏组织关联。

3. 组织匀质物在 4°C 下以 1000×g 离心 3 分钟，小心地取出并丢弃上清液。

4. 加入 800μL 线粒体分离试剂 A（加入适量 BSA 粉末至终浓度为 4mg/ml），以中速涡旋 5 秒，并将试管在冰上孵育 2 分钟。

注意：孵育时间不要超过 2 分钟以避免损害线粒体完整性。

5. 加入 10μL 线粒体分离试剂 B，以最大速度涡旋 5 秒。

6. 将试管在冰上孵育 5 分钟，孵育过程中每分钟以最大速度涡旋数秒。

7. 加入 800μL 线粒体分离试剂 C 倒置试管数次混合（不要涡旋）。

8. 将离心管在 4°C 下以 700×g 离心管离心 10 分钟。

9. 将上清液转移到新的 2.0 mL 离心管中，并在 4°C 下以 12,000×g 离心 15 分钟。

注意：如需获得更纯的线粒体部分，减少>50%溶酶体和过氧化物酶体污染物，更改为以 3000×g 离心 15 分钟。

10. 将上清液（胞质部分）转移到新管中，沉淀含有分离的线粒体。

11. 向沉淀中加入 500μL 洗涤缓冲液重悬沉淀，然后以 12,000×g 离心 5 分钟，弃去上清液，沉淀即为纯化后得到的线粒体。

注意：洗涤缓冲液配制参考步骤 1 中。

12. 在下游处理之前将线粒体沉淀保持在冰上。冻融可能会损害线粒体的完整性。

【注意事项】

1. 尽量减少反复冻融的次数，以免效率下降。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作