

线粒体分离和线粒体酶提取检测试剂盒（差速离心法）

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

线粒体是半自主性细胞器，不仅是细胞内氧化磷酸化和合成三磷酸腺苷（ATP）的主要场所，为细胞的活动提供能量，而且在许多生命活动中具有重要调控作用。因此，准确和全面分离保持正常活性的线粒体已经成为许多研究的前提。

测定原理：

利用专门试剂温和匀浆组织和细胞，再采用差速离心法从匀浆中分离完整线粒体；利用专门试剂，配合超声波破碎线粒体，可以得到保持活性的线粒体酶。

试剂组成和配制：

试剂一：50mL×1 瓶，-20℃保存；

试剂二：10mL×1 瓶，-20℃保存；

试剂三：10mL×1 瓶，-20℃保存；

试剂四：1mL×1 支，-20℃保存；

提取步骤:

- 1、准确称取约 0.1g 组织或收集约 500 万细胞，加入 1mL 试剂一和 10uL 试剂四，用冰浴匀浆器或研钵研磨。
- 2、4 °C 600 g 离心 5min。
- 3、弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，4 °C 11000 g 离心 10min。
- 4、上清液即胞浆提取物，可用于研究线粒体蛋白向胞浆的释放。
- 5、沉淀为完整线粒体。含有完整的内膜和外膜，并具有线粒体的生理功能。可用于线粒体的生理功能等方面的研究。
- 6、在沉淀中加入 200uL 试剂二和 2uL 试剂四，超声波破碎（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3 秒，间隔 10 秒，重复 30 次），可用于线粒体酶活性测定。
- 7、在沉淀中加入 200uL 试剂三和 2uL 试剂四，超声波破碎（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3 秒，间隔 10 秒，重复 30 次），可用于线粒体蛋白浓度测定。

注意事项:

- 1、分离线粒体和提取线粒体蛋白质的所有步骤均需在冰上或 4°C 进行，所用溶液需冰浴或 4°C 预冷。
- 2、通常在分离线粒体时前后两次离心速度选取 600g 和 11,000g，如果希望纯度更高，但对线粒体的得率要求不高，前后两次离心速度可以采用 1000g 和 3500g。
- 3、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。