



蒋 丽

**Qproteome Mitochondria Isolation Kit
(Cat. 37612)---从真核细胞中提取线粒体蛋白**

声明：本中文操作说明由**QIAGEN**上海员工内部翻译，仅供参考，以英文操作说明为准。鉴于个人理解差异，如有中英文不符合的地方，请即时联系我们。

试剂盒组分：

Qproteome Mitochondria Isolation Kit		Cat. no. 37612
Number of preps		12
Lysis Buffer		3 x 10 ml
Disruption Buffer		35 ml
Mitochondria Storage Buffer		100 ml
Mitochondria Purification Buffer		20 ml
Protease Inhibitor Solution (100x)		2 x 300 µl

储存：

Lysis Buffer自收到之日起需存于-20°C，其他组分需存于2-8°C。

提取流程

Disruption buffer重悬沉淀

Storage Buffer重悬线粒体用于保存



洗细胞， lysis buffer重悬， 温育10min



1000 x g, 10 min



上清液包含胞浆蛋白



1000 x g, 10 min



沉淀中包含细胞核、细胞残骸、未破碎的细胞



6000 x g, 10 min



上清液包含其它微粒



重悬沉淀，用移液枪转移至Purification and Disruption Buffer液相层上面



14,000 x g, 15 min



得到高纯度的线粒体

实验人员需要准备:

- ✓ 0.9% (w/v)的NaCl
- ✓ 普通摇床
- ✓ 钝头针（直径26或21）、注射器（1ml或2ml容量）用于细胞破碎和匀质化
- ✓ -20°C 丙酮（可选）

注意事项:

- ✓ 所有操作均应在 4°C 完成，Buffer需要先预冷，分离的蛋白要迅速放入液氮，并储存于 -80°C 。
- ✓ 为了下游的实验（例如SDS-PAGE分析），洗脱下的部分要浓缩。（例如丙酮沉淀）
- ✓ 使用之前要确保Lysis Buffer和Disruption Buffer中加入1/100体积的Protease Inhibitor Solution (100x)（例如，需要用2ml的Disruption buffer, 请加入20 μl Protease Inhibitor Solution [100x]）

1. 将含有 5×10^6 至 2×10^7 个细胞的悬浮液倒入15ml的圆锥管中，4°C、500 x g离心10min，小心地去除上清。
2. 用1 ml 0.9%的 NaCl 洗细胞。
3. 重悬细胞：如果 $<1 \times 10^7$ 细胞，用1ml移液枪吸取1ml预冷的Lysis Buffer 上下吹吸；如果 $\geq 1 \times 10^7$ 细胞，用1ml枪头吸取2ml预冷的Lysis Buffer 上下吹吸，然后 4°C摇床上温育10min。 （此处要确保Protease Inhibitor Solution已加入Lysis Buffer）
4. 4°C，1000 x g离心10min。
5. 小心地去除上清。(该上清里主要是胞浆蛋白)
6. 重悬细胞，用1ml移液枪吸取1.5ml预冷的Disruption Buffer上下吹吸。钝头针和注射器用于细胞破碎。缓慢吸取溶解产物至注射器，一次性打出，重复10次。（或者您也可以用Dounce 或 Potter组织研磨仪来破碎细胞）
 1. （此处要确保Protease Inhibitor Solution已加入Disruption Buffer）

7. 将溶解产物4°C、1000 x g离心10min，上清小心转入一干净1.5ml EP管中。
(下层颗粒包含细胞核，细胞残骸和未破酥的细胞。如果实验要求的话，可以重复步骤6和7，用500ul预冷的Disruption Buffer 再抽提一次，每次抽提的上清都需要在下一步之前收集好)
8. 4°C，6000 x g离心步骤7中的上清10min。
9. 小心除去上清。(下层颗粒主要是线粒体，上清主要是微粒和碎片)
10. b. 用1ml移液器吸取750 µl Mitochondria Purification Buffer至步骤9中的细胞颗粒中，小心地上下吹吸。
另外吸取750 µl Mitochondria Purification Buffer至2ml离心管中，缓慢吸取500 µl Disruption Buffer放于Mitochondria Purification Buffer下层，小心的沿着管壁将线粒体悬浮液放置于以上两种Buffer上层（见下页Figure 2）。（由于粘稠性不同，Disruption Buffer和 Mitochondria Purification Buffer不会轻易融合，让它们处于分层状态）
11. b. 4°C，14000 x g离心15min。(线粒体存于管子的下半部分)
12. b.小心地转移1.5 ml上清，不要碰到有线粒体的位置。（保留上清用于后续分析）

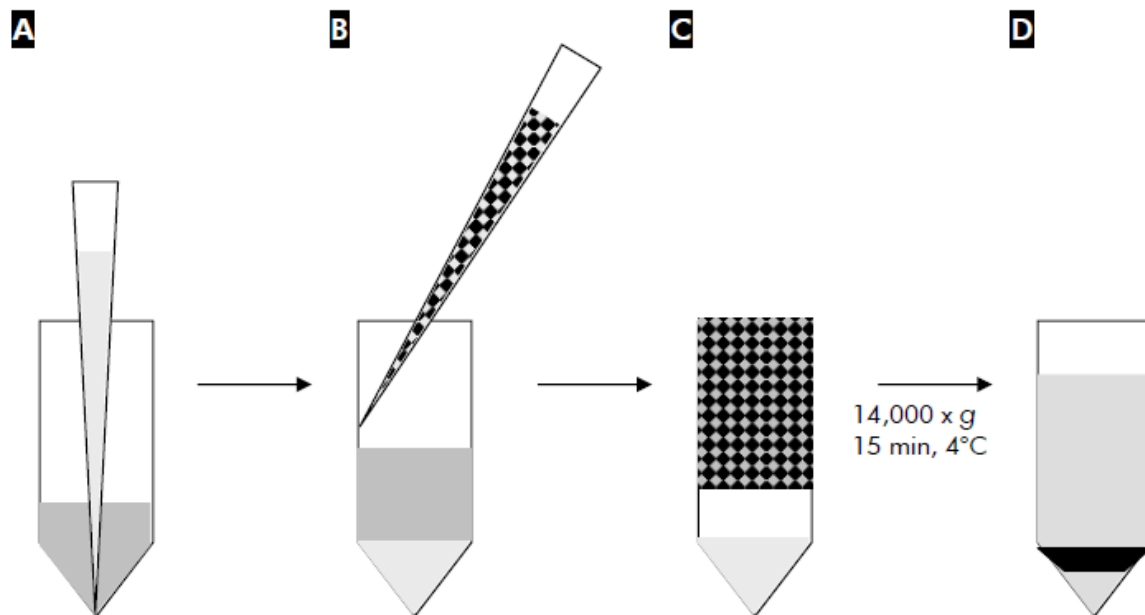


Figure 2 **A** In a 2 ml tube, 500 μ l Disruption Buffer is pipetted under 750 μ l Mitochondria Purification Buffer. **B** – **C** The crude mitochondria preparation from protocol step 9 is layered on top of the Mitochondria Purification Buffer. **D** After centrifugation, mitochondria are concentrated in a band towards the bottom of the tube.

A.在2ml EP管中加入750ul Mitochondria Purification Buffer，然后沿管底小心再打入500ul Disruption Buffer。

B-C 以上两种buffer加入EP管后会出现分层现象，把步骤9中的线粒体悬浮液沿管壁缓慢加入两buffer上层。

D.离心后，线粒体会位于靠近管底的一条带中。

13. b.小心地从管底转移有线粒体的那条带0.5ml solution至一新管中。（管子一侧的颗粒（由密度梯度介质构成）一定不能被破坏了，由于线粒体颗粒是透明的，很难用肉眼看到）
14. b.用1.5 ml Mitochondria Storage Buffer稀释步骤13b中的悬浮液， 4°C、8000 x g 离心10min。
15. b.吸掉1.5 ml悬浮液，剩下的用1.5 ml Mitochondria Storage Buffer稀释， 然后4°C、8000 x g离心10min。
16. b.重复步骤15b，直到线粒体在管底形成沉淀。（在去除上清时，要确保线粒体颗粒没有被破坏或丢失）
17. b. 根据实验需求选择Mitochondria Storage Buffer或相应buffer重悬线粒体沉淀。

丙酮沉淀（可选）：

该 protocol 用于需要浓缩和去盐的蛋白样本，下游应用诸如2D-PAGE。

1. 加入4倍体积冰上预冷的丙酮至蛋白样品中，冰育15mi。
2. 在4°C 预冷的离心管里12,000 x *g*离心10min。弃上清，用1 ml 80%丙酮洗线粒体蛋白。
3. 空气中晾干。（不要晾干过度，导致难于重悬）