

天  
净  
沙  
系  
列

CAT#:130886-50

常温运输和保存

**TIANDZ**

## 植物线粒体总蛋白提取试剂盒

Plant Mitochondria Protein Purification Kit

使用手册 V1.2

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: [www.tiandz.com](http://www.tiandz.com); 电话: 400-6765278; 电邮: [order@tiandz.com](mailto:order@tiandz.com)

## 产品及特点

植物线粒体是重要的植物细胞器,负责 ATP 的产生。此外植物很多重要的特性(如雄性不育)也跟线粒体相关,是母系遗传研究的重要材料。对植物线粒体进行生化和遗传研究都需要进行线粒体纯化。本产品就是专门用于植物细胞线粒体总蛋白提取的试剂盒,它具有下列特点:

1. 即用型试剂盒,用户不需要单独配制各种溶液。
2. 线粒体提取部分提供粗提和精提两种操作方案,粗提利用常规台式冷冻离心机的差速分离原理进行线粒体粗提,所得线粒体含少量其他细胞器污染,可用于后续的 SDS-PAGE, Western, ELSIA 和蛋白组分析,也可以用于 PCR 级别的线粒体 DNA 和 RNA 提取。
3. 精提利用冷冻超速离心(离心力达 40000g)制备的密度梯度来将粗提制备的线粒体和其他细胞成分进一步分开,得到线粒体精提液,适用于后续的偶联分析、体外线粒体蛋白合成、线粒体成份定位等精细实验。也可用于后续的 SDS-PAGE、Western、ELSIA、蛋白组分析和测序级别的线粒体 DNA 和 RNA 提取。
4. 本产品足够 5 次提取,每次可处理 10g 绿色植物组织(可得 1-2.5 mg 左右线粒体)或 20g 非绿色植物组织(可得 2-5 mg 左右的线粒体)。
5. 采用温和的中性裂解成分,蛋白保持天然活性。
6. 得到的提取物可以直接用于 SDS-PAGE、2D 电泳、免疫印迹分析、蛋白活性测定和 BCA 法及 Lowry 法蛋白定量(不适用于 Bradford 法)。

## 规格及成分

| 成分             | 编号         | 大纸盒包装    |
|----------------|------------|----------|
| 匀浆液            | 130886a    | 250 mL   |
| 洗涤液            | 130886b    | 250 mL×2 |
| 离心介质溶液         | 130886c    | 150 mL   |
| Percoll        | 17-0891-09 | 50 mL    |
| BSA 干粉         | 9048-46-8  | 10g      |
| 带柄尼龙筛          | ---        | 1 只      |
| 软毛笔            | ---        | 1 只      |
| 植物线粒体总蛋白提取溶液 A | 130886d    | 3 mL     |
| 植物线粒体总蛋白提取溶液 B | 130886e    | 300 μL   |
| 使用手册           | 130886sc   | 1 份      |

| <b>运输及保存</b>    | 常温运输和保存，保存期限一年。   |            |       |    |      |            |         |                 |            |          |             |              |            |
|-----------------|---|------------|-------|----|------|------------|---------|-----------------|------------|----------|-------------|--------------|------------|
| <b>自备试剂</b>     | 超纯水，可能需要 5 M KOH 调 pH，如果需要去除细胞核 DNA，还需要自备 25mM MgCl <sub>2</sub> 溶液、0.5M EDTA 溶液、DNase 干粉和另购更多洗涤液。  |            |       |    |      |            |         |                 |            |          |             |              |            |
| <b>使用方法</b>     | <p><b>注意：线粒体膜对温度高度敏感，所以整个操作必须在冰上或者在冷室进行，所用植物组织，器皿和溶液均需要在 4℃ 预冷。任何情况下线粒体的温度都不要超过 4℃。</b></p> <p><b>一：选择组织</b></p> <p>1. 植物组织不同，线粒体产率不同，请以下表为参考：</p> <table border="1" data-bbox="472 607 1465 860"> <thead> <tr> <th>植物组织种类</th> <th>线粒体产率</th> <th>说明</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>根和块茎</td> <td>0.3 mg/10g</td> <td>如土豆，红薯等</td> </tr> <tr> <td>黄化苗（下胚轴、子叶、胚芽鞘）</td> <td>2-5 mg/10g</td> <td>多酚含量低于叶片</td> </tr> <tr> <td>有光合作用的叶片和子叶</td> <td>1-2.5 mg/10g</td> <td>需放置在暗处 3 天</td> </tr> </tbody> </table> <p>2. 一般纯化最好选用用黄化苗。如果用绿色组织（如叶片），需将植物提前放在暗室至少 3 天以降低淀粉含量，否则淀粉颗粒将干扰线粒体的纯化。</p> <p>3. 一次实验需要 40 mL 匀浆液、约 90 mL 洗涤液和 35 mL 密度梯度离心介质（配制方式是一次性将 9.8g (8.7mL) Percoll 加入到 26.3mL 离心介质溶液中，充分混匀后得到 35mL 密度梯度离心介质）。这三种溶液用前均需要加入 BSA 干粉使其终浓度为 0.1%（100mL 溶液加 0.1g BSA 干粉，轻柔颠倒混匀或搅拌溶解后放冰上预冷待用）。每次实验用多少配多少，不要预先将所有 BSA 干粉加入，否则容易长菌。</p> <p><b>二：线粒体粗提操作流程</b></p> <p>1. 将 10 g 的绿色植物组织（如去叶脉后的嫩叶子，愈伤组织）或 20 g 干净的非绿色植物组织（如发芽组织、根、块茎等）浸泡在冰水中 10 分钟，用纸吸干液体后浸泡在预冷的 40 mL 匀浆液（需先加 0.1% BSA）中，在浸泡状态下剪成 1cm<sup>2</sup> 大小的碎片。注意：如果样品可分成多组平行处理，得到线粒体粗提物后再汇集，否则线粒体产率将急剧降低。</p> <p>2. 将匀浆液和其中的植物组织碎片转移到 Waring 匀浆器中，中速匀浆 3 次，每次 15 秒，每次之间间隔 10 秒以便让碎片沉淀下来到刀片处。也可使用研磨法。具体操作是将匀浆液和其中的植物组织碎片转移到预冷的研钵中，研磨 3-4 分钟。注意：植物组织匀浆后释放的物质会使匀浆液酸化，降低 pH，而线粒体对 pH 变化非常敏感，因此建议匀浆后用 pH 试纸检测匀浆液的 pH，如果低于 7.0，必须用自备的 5 M KOH 将 pH 调到 7.0 以上才进入下一步。</p> | 植物组织种类     | 线粒体产率 | 说明 | 根和块茎 | 0.3 mg/10g | 如土豆，红薯等 | 黄化苗（下胚轴、子叶、胚芽鞘） | 2-5 mg/10g | 多酚含量低于叶片 | 有光合作用的叶片和子叶 | 1-2.5 mg/10g | 需放置在暗处 3 天 |
| 植物组织种类          | 线粒体产率   | 说明         |       |    |      |            |         |                 |            |          |             |              |            |
| 根和块茎            | 0.3 mg/10g  | 如土豆，红薯等    |       |    |      |            |         |                 |            |          |             |              |            |
| 黄化苗（下胚轴、子叶、胚芽鞘） | 2-5 mg/10g  | 多酚含量低于叶片   |       |    |      |            |         |                 |            |          |             |              |            |
| 有光合作用的叶片和子叶     | 1-2.5 mg/10g  | 需放置在暗处 3 天 |       |    |      |            |         |                 |            |          |             |              |            |

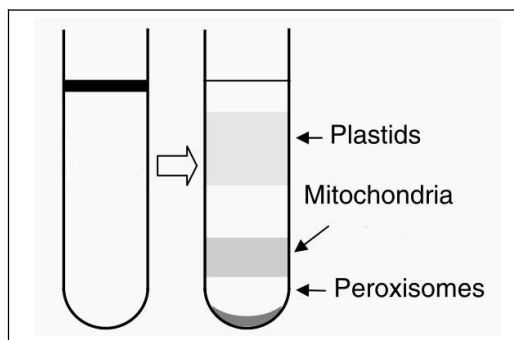
3. 用带柄尼龙筛过滤匀浆液，穿透液可通过预冷的漏斗收集到预冷的 50 mL 的塑料离心管中。带柄尼龙筛可以洗干净后可以反复使用。
  4. 在低速固定角度冷冻离心机上 4℃ 1000 g 离心 5 分钟，沉淀为未破碎的细胞、破碎细胞的碎片、细胞核和淀粉颗粒，上清含线粒体。小心转移上清到新的预冷的 50mL 塑料离心管中。
  5. 将装上清的离心管在水平冷冻离心机上 4℃ 12,000 g 离心 20 分钟，弃上清液，所得棕绿色沉淀即为纯化的线粒体粗提物。有时沉淀底部还有白色的淀粉沉淀，属于正常现象。
  6. 加入 10 mL 预冷的洗涤液（需先加 0.1% BSA，下同）中，用软毛笔轻柔重悬线粒体沉淀(如果最底下有白色淀粉沉淀，需要避免重悬之)。不能剧烈震荡，否则线粒体容易破裂。
  7. 将线粒体重悬液转移到新的 50mL 离心管中，再加入 30mL 预冷的洗涤液（终体积为 40 mL）中，4℃ 1000 g 离心 5 分钟。线粒体将在上清中。
  8. 将上清转移到新的预冷的 50mL 离心管中，4℃ 12000 g 离心 20 分钟，沉淀为线粒体。小心弃上清。到此步时，线粒体回收率一般在 15-30%。
  9. 在沉淀中加入 2 mL 预冷的洗涤液。用软毛笔轻柔重悬，得到线粒体粗提液。如果有平行提取，可将最多 4 管线粒体沉淀重悬在 2 mL 洗涤液中。线粒体粗提液中线粒体的回收率一般在 45-75%。
  10. 所得线粒体粗提液含其他细胞器（如类囊体膜，质体，过氧化物酶体，乙醛酸循环体,或细菌）污染，但可直接用于 PCR 级线粒体 DNA 和 RNA 的提取、呼吸链功能测定、蛋白浓度测定和线粒体精提。如果需要长期保存，则可以在线粒体重悬液中加入 1/20 体积的自备 DMSO，混匀后分成 0.5 mL/管，然后放-80℃保存。如此保存的线粒体酶活性和膜完整性在几年内都不会发生变化。
- 三：细胞核 DNA 的去除（纯化测序级的线粒体 DNA 才需要进行此操作。本产品不提供相关试剂，实验步骤仅供参考）**
11. 预留 50uL 线粒体粗提液做对照，在约 2 mL 剩余的线粒体粗提液中加入 40 uL 25mM 的 MgCl<sub>2</sub>，再加入 200ug DNase 干粉或溶液（总量为 200ug 即可），混匀后冰上放置 60 分钟降解 DNA。取少量样品（如 50uL）在 PCR 仪器中加热到 95℃变性 10 分钟灭活 DNase，再取其中的 10uL 和 10uL 预留的样品一起进行细胞核基因专一性 PCR，如果 DNase 处理的样品没有扩增，而预留样品有扩增，则表明 DNA 去除比较干净（达到 PCR 检测的极限），则进入下一步。

如果未去除干净，则继续在冰上放置，直到 PCR 检测不到细胞核 DNA。

- 加入 0.32 mL 预冷的自备 0.5M 的 EDTA 溶液和 40mL 预冷的洗涤液。
- 4°C 1000 g 离心 5 分钟，将上清转移到新的预冷的 50mL 离心管中，4°C 12000 g 离心 20 分钟，沉淀为去除细胞核 DNA 的线粒体。重悬在 2mL 洗涤液中。

#### 四：线粒体精提操作方案（需要 40000g 的超速冷冻离心机）

- 在 50 mL 预冷的塑料离心管中先后加入 35 mL 预冷的密度梯度离心介质（配制方法见第三步，用前需先加 0.1% BSA）。
- 将 2 mL 线粒体粗提物重悬液铺在密度梯度离心介质上。
- 在超速水平离心机上 4°C 40,000 g 离心 45 分钟，最上层为黄色或橙色的质体带（如果材料是绿色植物，此带将是绿色），其下的白色不透明的带即为线粒体，管底沉淀为过氧化物酶体。其示意图如下：



- 用广口吸管（可将 1 mL 蓝枪头中间剪断后使用）收集线粒体带，注意避开其上的质体带过氧化物酶体沉淀，估计所取舍线粒体溶液的体积。
- 在 15-20 分钟的时间内缓慢加入至少 4 倍体积的预冷的洗涤液。
- 转入 50 mL 塑料管离心管中，在冷冻离心机上 4°C 15,000 g 离心 20 分钟，沉淀为线粒体。
- 将线粒体沉淀用软毛笔小心重悬在至少 4 倍体积的预冷的洗涤液中，在冷冻离心机上 4°C 15,000 g 离心 20 分钟，弃上清，沉淀即为洗涤后的线粒体精提物。到此步时，线粒体回收率一般在 5-15%。
- 将精提的线粒体重悬在 1mL 预冷的洗涤液中。重悬的线粒体可以立即使用，在冰上最多可放置 5-6 小时。如果需要长期保存，则可以在线粒体重悬液中加入 1/20 体积的 DMSO，混匀后分成 0.5 mL/管，然后放 -80°C 保存。如此保存的线粒体酶活性和膜完整性在几年内都不会发生变化。

#### 五：线粒体总蛋白提取

- 每 10mg 湿重线粒体沉淀加入 0.5 mL 植物线粒体总蛋白提取溶液 A 和 50μL 植物线粒体总蛋白提取溶液 B，吹打混匀。

|                    |  |
|--------------------|--|
|                    | <p>23. 冰上放置 30 min 至 1h。</p> <p>24. 4℃ 12,000 g 离心 1 min。</p> <p>25. 将上清液转移至一新的 1.5 mL 塑料离心管中即得到蛋白溶液，可置于 -70℃冰箱保存或立即使用。如果要进行 SDS-PAGE 电泳，可取部分样品到离心管中，加入 5×SDS-PAGE 上样缓冲液（终浓度为 1×），在沸水中处理 5 min 后立即上样电泳。其他功能检测：请自备方法。</p> |
| <p><b>关联产品</b></p> | <p>动物线粒体纯化试剂盒(CAT#:111113-5)</p> <p>酵母线粒体纯化试剂盒(CAT#:111209-5)</p>  |