

二次蔗糖密度梯度离心纯化线粒体

周望展 黄君 况凌云 周晓静 郭能能 吕建新* 刘丹慧*

(温州医学院细胞与分子医学研究所, 浙江省医学遗传学重点实验室, 温州 325035)

摘要 该研究以小鼠肝组织和脑组织为原材料, 对常规的差速离心法结合密度梯度离心纯化线粒体的方法进行改进, 发现在常规操作步骤上增加一次非线性蔗糖密度梯度离心可以有效地提高线粒体纯度。透射电镜及免疫印迹鉴定结果显示, 增加一次密度梯度离心后, 线粒体纯度大大提高, 而对线粒体得率影响有限。虽然这样延长了实验时间, 但线粒体膜电位及琥珀酸脱氢酶比活实验证实, 在线粒体纯度获得提高的同时, 其活力并没有受到明显影响。因此, 建议在进行线粒体蛋白质组检测等对线粒体纯度有较高要求的实验时, 可以增加一次或者二次非线性蔗糖密度梯度离心, 在维持线粒体活力的同时, 提高其纯度, 有利于后续实验的开展。

关键词 线粒体纯化; 两次非线性蔗糖密度梯度离心; 透射电子显微镜

Mitochondrial Purification by Two Times Sucrose Density-gradient Centrifugation

Zhou Wangzhan, Huang Jun, Kuang Lingyun, Zhou Xiaojing, Guo Nengneng, Lü Jianxin*, Liu Danhui*

(Institute of Molecular & Cellular Medicine, Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

Abstract Mitochondrial fraction produced by differential centrifugation is often contaminated by other organelles and cytosolic components, and its further applications are thus limited. Density-gradient centrifugation is the most used strategy to improve the mitochondrial purity. However, mitochondria fraction obtained by density-gradient centrifugation is still slightly contaminated. In this report, we found an additional discontinuous sucrose density-gradient centrifugation will significantly improve the mitochondrial purity. Transmission electron microscopy and Western blot results suggested mitochondrial fraction isolated by differential centrifugation contained large amount of other organelles and cytosolic components. The isolated mitochondria were still contaminated by other impurities after one time discontinuous sucrose density-gradient centrifugation, although its purity was significantly enhanced. Impressively, the mitochondrial purity was highly improved by the second time centrifugation, and the yield was only slightly affected. The results of mitochondrial membrane potential and succinate dehydrogenase activity assay indicated that the mitochondrial membrane integrity and function were kept well with prolonged experimental procedure. Thus we suggest one or two additional density-gradient centrifugations could easily improve the mitochondria purity to facilitate further assays.

Key words mitochondrial purification; two times discontinuous sucrose density-gradient centrifugation; transmission electron microscopy

收稿日期: 2012-10-12 接受日期: 2013-01-06

浙江省自然科学基金(批准号: Y2090378)、浙江省公益性技术应用研究计划项目(批准号: 2011C33041)和浙江省教育厅项目(批准号: 20070909)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0577-86689771, E-mail: jxlu313@163.com; Tel: 0577-86699651, E-mail: danhui_liu@yahoo.com.cn

Received: October 12, 2012 Accepted: January 6, 2013

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No.Y2090378), Research on Public Welfare Technology Application Projects of Zhejiang Province (Grant No.2011C33041) and the Foundation of Department of Education of Zhejiang Province (Grant No.20070909)

*Corresponding authors. Tel: +86-577-86689771, E-mail: jxlu313@163.com; Tel: +86-577-86699651, E-mail: danhui_liu@yahoo.com.cn

网络出版时间: 2013-03-28 17:21 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130328.1721.005.html>

线粒体是细胞内的重要细胞器,是产生能量的重要场所,为细胞提供90%以上的ATP,在细胞活动中起着非常关键的作用^[1-2]。人类很多疾病的发生与线粒体的功能异常有着密切的联系,线粒体功能障碍在疾病发病过程中起着重要作用^[1]。随着线粒体研究的深入,线粒体的分离方法也不断改进^[3]。使用常规的差速离心法提取线粒体,虽然能够快速分离线粒体,但分离的线粒体含有大量的杂质^[4-5]。吴媛等^[6]比较了差速离心法与几种线粒体分离试剂盒的分离效果,发现虽然这些分离方法速度较快,但均含有大量的胞浆蛋白。差速离心获得的线粒体所含的杂质主要来自胞浆蛋白和内质网^[2]。目前纯化线粒体的方法大多是差速离心结合密度梯度离心,差速离心得到的粗提线粒体通过蔗糖密度梯度的纯化,杂质蛋白含量已大幅下降,但还含有一部分。本实验尝试采用两步纯化,对第一次蔗糖密度梯度纯化得到的线粒体进行第二次纯化,以提高线粒体纯度。通过透射电镜与免疫印迹检测,我们发现两步法得到的线粒体纯度明显高于前两者,增加的离心步骤对线粒体的得率及时间耗费影响有限。同时,线粒体膜电位以及琥珀酸脱氢酶比活测定结果显示,虽然延长了实验时间,但线粒体活力并没有受到明显影响。因此,只要增加一次非线性密度梯度离心操作,就可以有效提高线粒体纯化纯度,利于进一步实验的开展。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 8周龄B6小鼠(温州医学院实验动物中心提供)3-5只,体重24.0~25.5 g。

1.1.2 实验试剂 Hanks' Balanced Salt Solution(长风生物有限公司),红细胞裂解液、蔗糖匀浆缓冲液(0.25 mol/L蔗糖,10 mmol/L Hepes-NaOH,10 mmol/L EDTA,pH7.4),蔗糖梯度溶液[30%(w/v)/40%(w/v)/55%(w/v),100 mmol/L EDTA,100 mmol/L Hepes-NaOH,pH7.4]。吐温-20、Protein Marker(Bio-Rad公司),BCA蛋白浓度测定试剂盒、Actin抗体、COX IV抗体、PDI抗体、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(H+L)、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG(H+L)、Western及IP细胞裂解液、PMSF蛋白酶抑制剂、BeyoECL Plus、线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)均购自碧云天生物

技术研究所,琥珀酸脱氢酶检测试剂盒(南京建成生物研究所)。

1.2 方法

1.2.1 肝组织和脑组织的前期处理 颈椎脱臼法处死小鼠,快速取出小鼠的肝组织或脑组织,称重,置于10 mL预冷的Hanks'平衡缓冲液中。以下操作过程均在4 °C条件下进行:将整个肝组织或脑组织悬浮液倒入铜网中,进行研磨。研磨后的肝细胞或脑细胞颗粒悬浮液再用铜网过滤,滤液于4 °C,1 500 r/min离心5 min。弃去上清液,向沉淀中加入10 mL红细胞裂解液,重悬沉淀,静置1 min,于4 °C、1 500 r/min离心5 min。弃去上清液,向沉淀中加入6 mL Hanks'平衡缓冲液,重悬沉淀,于4 °C、1 500 r/min离心5 min。沉淀即为肝细胞或脑细胞颗粒。

1.2.2 线粒体的分离与纯化 (1)在肝细胞或脑细胞颗粒沉淀中加入3 mL蔗糖匀浆缓冲液,使沉淀悬浮。将悬浮液移入匀浆器中,先用LOOSE匀浆棒上下匀浆5次,然后用TIGHT匀浆棒上下匀浆20次。(2)把匀浆液移入15 mL的离心管中,用蔗糖匀浆缓冲液补到10 mL,充分混匀,于4 °C、1 000×g离心10 min。(3)取上清液,沉淀重复第一步骤,继续进行匀浆,用TIGHT匀浆棒上下匀浆15次。于4 °C、1 000×g离心10 min。(4)取上清液,将这步的上清液与上一步的上清液加在一起,置于50 mL的离心管中。于4 °C、15 000×g离心15 min。(5)弃上清,沉淀中加20 mL蔗糖匀浆缓冲液,将沉淀悬浮。于4 °C、15 000×g离心15 min。(6)弃上清,沉淀中加1.5 mL蔗糖匀浆缓冲液,将沉淀悬浮后移入匀浆器中,用TIGHT匀浆棒上下匀浆5次。将1.5 mL线粒体悬浮液沿壁缓慢加到非线性蔗糖密度梯度(在离心管中先铺一层3 mL 55%的蔗糖溶液,然后依次再铺上3 mL 40%和30%的蔗糖溶液)的上方。于4 °C、135 000×g离心22 min。(7)线粒体在蔗糖密度梯度中分为三层,取出位于40%/55%的第三层0.75 mL液体即一步纯化线粒体。用2 mL蔗糖匀浆缓冲液将第三层液体稀释,再次加到非线性蔗糖密度梯度的上方。于4 °C、135 000×g离心22 min。(8)再次取出位于40%/55%的位置线粒体层的1 mL液体置于15 mL离心管中,在其中加入7 mL的蔗糖匀浆缓冲液,稀释二步纯化的线粒体。于4 °C、15 000×g离心15 min,沉淀即为二步纯化的线粒体。

1.2.3 透射电子显微镜(选肝组织线粒体做为样

品) 线粒体沉淀中加2 mL胎牛血清, 使沉淀悬浮, 15 000×g, 离心15 min, 弃去上清液, 再逐滴加入戊二醛固定液浸泡整个线粒体沉淀, 4 °C固定过夜; 用生理盐水漂洗, 再分别经以下步骤固定与漂洗: 2.5%戊二醛, 4 °C、2 h以上, 0.1 mol/L磷酸缓冲液漂洗3次, 每次15 min; 1%锇酸1 h, 0.1 mol/L磷酸缓冲液漂洗3次, 每次15 min。样品块于1%醋酸铀中染2 h, 经梯度脱水(50%、70%、80%、90%丙酮各15 min, 100%丙酮2次, 各10 min), 浸透(丙酮:包埋液=1:1, 37 °C烘箱2 h; 丙酮:包埋液=1:4, 37 °C烘箱过夜; 纯包埋液, 45 °C烘箱2 h), 包埋聚合(45 °C烘箱3 h, 65 °C烘箱48 h); 此后经半薄和超薄切片; 最后将标本置于透射电子显微镜H-7500下观察并拍照。

1.2.4 不同纯化水平的线粒体蛋白提取 线粒体(包括粗提线粒体、一次离心所得线粒体、二次离心所得线粒体)经Western及IP细胞裂解液(含PMSF)裂解, BCA法检测蛋白质浓度。通过蛋白质浓度可以得到相应的粗提线粒体、一次离心线粒体、二次离心线粒体的产量及得率。

1.2.5 免疫印迹检测 配制12% SDS-PAGE胶, 样品的上样量均为30 μg, 于70 V、30 min和120 V、80 min进行电泳; 用300 mA、1 h进行转膜; 5%脱脂牛奶常温下封闭2~3 h后, 在4 °C孵育一抗过夜(COX IV抗体1:1 000稀释、PDI抗体1:1 000稀释、β-actin抗体1:2 000稀释); TBST洗4次, 每次5 min。孵育二抗(辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG, 辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠IgG)1 h。TBST洗4次, 每次5 min; ECL显影, 曝光(Bio-Rad凝胶成像分析仪)。

1.2.6 检测不同纯化水平的线粒体膜电位(选肝组织线粒体做为样品) 按照试剂盒说明书操作, 处理后的样品用荧光酶标仪检测, 检测JC-1单体时把激发光设置为490 nm, 发射光设置为530 nm; 检测JC-1聚合物时, 把激发光设置为525 nm, 发射光设置为590 nm。

1.2.7 检测不同纯化水平的线粒体琥珀酸脱氢酶活性(选肝组织线粒体做为样品) 按照试剂盒说明书操作: 比色在600 nm处, 蒸馏水调零后, 将待测线粒体样品0.1 mL加入干净的比色皿底部, 快速将试管中已预温好的试剂倒入比色皿中, 同时按下秒表, 于反应5 s时读吸光度 D_1 值; 比色皿不要拿开, 1 min后, 即65 s时读吸光度 D_2 值。记录 ΔD 值= D_1 值- D_2 值。按下列公式计算SDH活性。酶的比活性(U/mg prot)=[ΔD 值

(0.01)/反应时间(min)]/取样量中的蛋白(mg), 定义: 每毫克蛋白每分钟使反应体系的吸光度降低0.01为1个比活性单位。

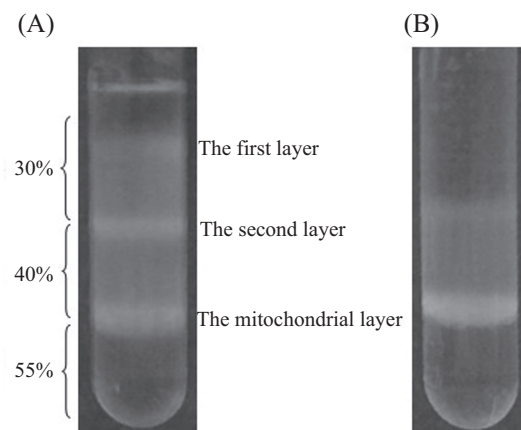
2 结果

2.1 非线性蔗糖密度梯度离心结果

小鼠肝组织与脑组织粗提线粒体通过一步纯化后, 非线性蔗糖密度梯度明显的分为3层(图1A), 大部分线粒体集中于蔗糖密度梯度40%/55%的位置, 取出该层液体按比例稀释后, 再次加到新的非线性蔗糖密度梯度上方, 进行第二次离心。第二次离心后, 位于蔗糖密度梯度40%/55%的位置有明显的分层, 而在与第一次离心第二层相同的位置也有一层杂质, 但其数量已经明显变少(图1B)。

2.2 不同纯化水平的线粒体得率

由表1结果可见, 线粒体得率随着纯化水平的提高而下降, 例如肝组织粗提线粒体经过第一次离心后, 得率由3.29%下降到1.42%, 下降幅度很大, 而经第二次离心后, 得率由1.42%下降到1.02%, 影响较小。脑组织粗提得率为5.22%, 经过第一次和第二次离心后, 得率则分别降为2.26%和1.81%。



A: 第一次离心: 粗提线粒体加到非线性蔗糖密度梯度的上方, 经离心后, 形成明显的三个分层; B: 二次离心: 将第一次离心得到的线粒体重新加到非线性蔗糖梯度的上方, 进行二次离心。

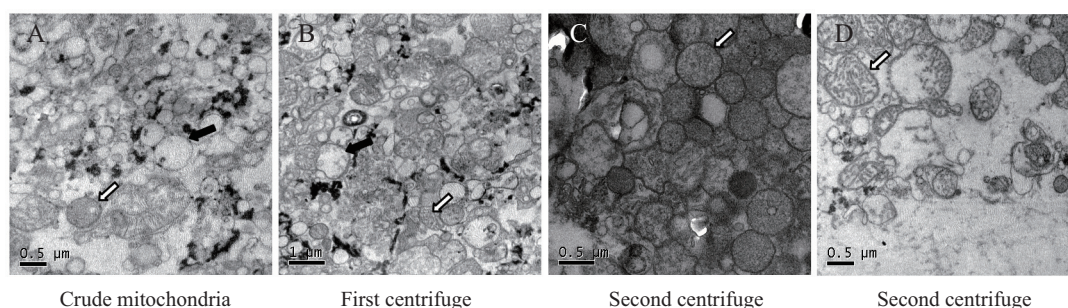
A: first centrifuge: crude mitochondria were loaded to discontinuous sucrose density gradient, forming obvious three stratification after centrifuge; B: second centrifuge: mitochondrial fraction from first centrifugation was reloaded to the top of sucrose gradient and then centrifuged.

图1 两次非线性蔗糖密度梯度离心纯化线粒体

Fig.1 Mitochondrial purification by two times discontinuous sucrose density gradient

表1 不同组织不同纯化水平的线粒体得率

样品	重量	纯化水平	产量	得率
Sample	Weight	Level of purification	Volume of production	Yield
Liver	1.295 g	Crude mitochondria	4 256.0 μg	3.29%
	1.065 g	First centrifuge	1 508.6 μg	1.42%
	1.215 g	Second centrifuge	1 242.2 μg	1.02%
Brain	0.386 g	Crude mitochondria	2 015.5 μg	5.22%
	0.365 g	First centrifuge	826.6 μg	2.26%
	0.372 g	Second centrifuge	673.5 μg	1.81%



透射电镜观察粗提线粒体及经非线性蔗糖密度梯度一次离心和二次离心后的线粒体。

Representative transmission electron microscopy images of crude mitochondria and further purified mitochondrial fraction after first and second discontinuous sucrose density-gradient centrifugation.

图2 不同纯化水平的线粒体透射电镜结果

Fig.2 Electron micrographs of mitochondrial from different purification levels

2.3 透射电子显微镜检测线粒体纯度

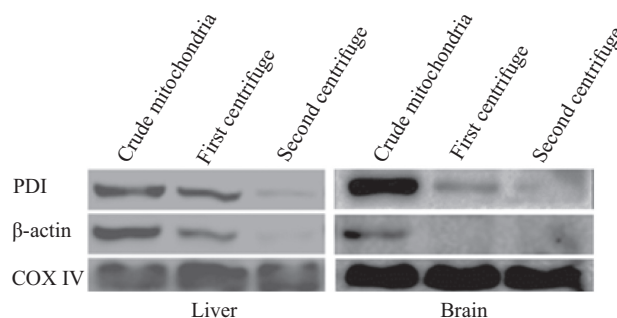
通过透射电镜检测小鼠肝组织线粒体发现,粗提线粒体含大量其他杂质细胞器,主要为滑面内质网。滑面内质网通常为膜管和膜囊状,在电镜观察下为空泡状结构,从图2A中观察发现,粗提线粒体中含最多的杂质细胞器为滑面内质网,而且含量很高。图2B为一次离心所得线粒体,线粒体明显被富集,虽然内质网含量有所降低,但还含有相当一部分内质网等杂质细胞器存在。图2C和2D为二次离心线粒体,含有极少量的空泡结构,说明内质网的含量已比较少(白色箭头指线粒体,黑色箭头指内质网)。

2.4 免疫印迹检测结果

我们对线粒体纯度评价采用分布于细胞浆内、表达量丰富的 β -actin作为胞浆的标志蛋白^[6];选用定位于线粒体内膜的细胞色素C氧化酶IV(cytochrome C oxidase IV, COX IV)为线粒体的标记蛋白;蛋白二硫键异构酶(protein disulfide isomerase, PDI)定位于内质网腔^[7],即PDI可作为内质网(endoplasmic reticulum, ER)的标志蛋白。

从肝组织、脑组织的线粒体蛋白免疫印迹结果可以看出,线粒体经过粗提后,含有大量的内质网蛋

白和胞浆蛋白。粗提线粒体经过一次离心与二次离心后,在总上样量相同的情况下,内质网蛋白和胞浆蛋白明显逐步减少,线粒体蛋白也被逐步富集,而且在经过第二次离心后,杂质蛋白的含量已下降到一个很低的水平(图3)。

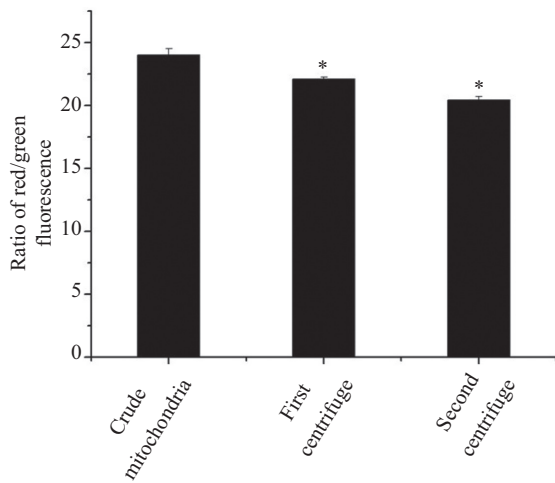


利用免疫印迹检测不同纯化水平的线粒体蛋白纯度,在蛋白量相同的条件下,比较不同纯化水平线粒体蛋白的杂质含量。左:肝组织;右:脑组织。

Equal amount of total proteins of crude mitochondria and mitochondrial fractions after first and second centrifugation were loaded to SDS-PAGE gels, and the amounts of ER marker (PDI), cytosolic protein β -actin and mitochondrial marker (COX IV) were analyzed by Western blot according to standard protocol. Left: liver tissue, Right: brain tissue.

图3 免疫印迹检测线粒体纯度

Fig.3 Mitochondrial purity analyzed by Western blot



纯化所得线粒体用JC-1染色,以红色荧光与绿色荧光的比值来衡量线粒体膜电位的高低。 $*P < 0.05$,与粗提线粒体组相比。Purified mitochondria were stained with JC-1. Mitochondrial membrane potential was showed as the ratio between red and green fluorescence. $*P < 0.05$ compared with the crude mitochondrial group.

图4 不同纯化水平的线粒体膜电位检测

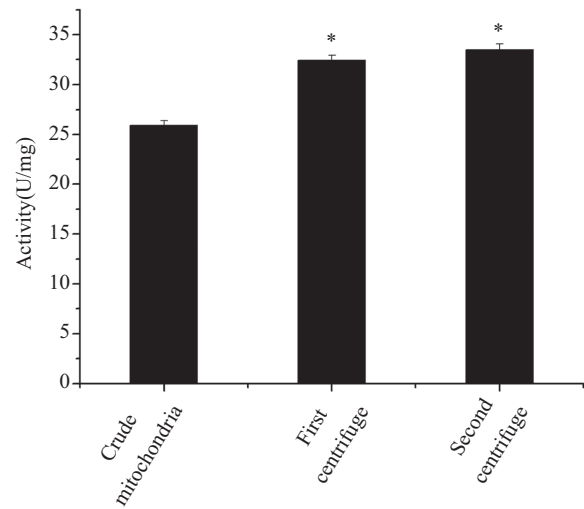
Fig.4 Mitochondrial membrane potential assay

2.5 不同纯化水平的线粒体膜电位检测结果

线粒体纯化方法改进的一个重要指标是线粒体功能的保持。为了检测在线粒体纯化过程中,线粒体功能的保持及结构的完整,我们通过JC-1染色检测了肝组织线粒体膜电位的变化来反应线粒体的损伤情况^[8]。结果显示,与粗提线粒体比较,经过第一次离心与第二次离心后,线粒体膜电位仅略有下降(图4)。由于膜电位是线粒体膜完整性的重要指标,因此,我们的实验结果说明增加一次离心步骤对线粒体膜完整性影响较小。

2.6 不同纯化水平的线粒体琥珀酸脱氢酶活性检测结果

细胞器特定功能相关酶活性的检测可以作为衡量细胞器纯度及功能的重要指标。琥珀酸脱氢酶参与三羧酸循环,是线粒体纯度与功能检测的标志酶之一^[9-10]。为了进一步检测增加的离心步骤对线粒体活性的影响,我们检测了不同纯化水平所得线粒体的琥珀酸脱氢酶比活力。结果表明,随着纯化水平的提高,琥珀酸脱氢酶的比活力也随之上升(图5)。这一结果进一步说明增加一次离心步骤可以在保持线粒体活性与功能的同时,提高其纯度。



比色法测定不同纯化水平线粒体琥珀酸脱氢酶活性,比活力以每毫克蛋白产生的酶活力来表示。 $*P < 0.05$,与粗提线粒体组相比。The succinate dehydrogenase activity was analyzed and expressed as U/mg protein. $*P < 0.05$ compared with the crude mitochondrial group.

图5 不同纯化水平的线粒体琥珀酸脱氢酶活性检测

Fig.5 Succinate dehydrogenase activity assay

3 讨论

线粒体分离纯化到目前为止还是一个没有完全很好解决的问题,细胞中各种亚细胞结构的构成和性质各不相同,彼此却紧密联系。有些细胞器形态大小很接近,进而造成在差速离心时很难将沉降系数相近的细胞器分开。因此,要将与线粒体沉降系数接近的细胞器分开,这是本实验主要的研究目的。

我们选用实验室比较常用、廉价的物质——蔗糖作为分离介质,并采用非线性蔗糖密度梯度离心。非线性蔗糖密度梯度有3个梯度,每个梯度的浓度分别为55%(w/v)、40%(w/v)和30%(w/v)。通过蔗糖密度梯度离心,线粒体大部分集中在55%(w/v)与40%(w/v)的分界面^[11]。小鼠肝组织与脑组织粗提线粒体经过第一次密度梯度离心后,有三个显著的分层,说明粗提线粒体中含杂质细胞器种类及含量均比较多,而经第二次密度梯度纯化后,在密度梯度中间仍有杂质分层,说明第一次离心所得线粒体还混有部分杂质细胞器。由不同纯化水平的线粒体得率显示,随着纯化水平的提高可以获得较纯的线粒体,但其产率往往会随之相应地降低,但增加一步密度梯度离心步骤对线粒体得率影响有限。Sickmann等^[12]

采用差速离心和两次蔗糖密度梯度离心从酵母中分离出了高纯度的线粒体, 其两步蔗糖密度梯度离心均需1小时。蔗糖是一种常用的梯度介质, 虽然它不影响分子间的相互作用, 但蔗糖黏度大、渗透性高, 线粒体的分离时间过长, 对其活性与完整性均有影响。本实验将蔗糖密度梯度离心时间减少后, 发现也可以得到高纯度线粒体。这样即使进行两次蔗糖密度梯度离心, 也可以避免或降低由于实验时间耗费过长而引起蔗糖对线粒体活性与完整性产生的影响。为了检测纯化过程对线粒体活性和功能的影响, 我们检测了不同纯化水平的线粒体膜电位以及琥珀酸脱氢酶比活力。正常的线粒体膜电位是维持线粒体进行氧化磷酸化、产生ATP的前提, 为保持线粒体功能所必需^[8]; 琥珀酸脱氢酶存在于所有有氧呼吸的细胞内, 是三羧酸循环中唯一与线粒体内膜结合的酶, 可间接反映线粒体功能和组织的供氧情况, 是线粒体三羧酸循环的标志酶, 对于评价线粒体功能具有重要意义^[9-10]。通过检测线粒体膜电位发现, 随着纯化水平的提高, 膜电位仅略有下降。琥珀酸脱氢酶检测结果显示, 随着纯化水平的提高, 琥珀酸脱氢酶的比活力也随之上升。

通过透射电镜观察肝组织线粒体纯化情况发现, 内质网为主要的杂质细胞器, 免疫印迹验证了这一结果, 并同时显示了胞浆蛋白的去除情况。通过透射电镜和免疫印迹检测线粒体分离过程中的各个纯化水平的纯化情况, 让我们清晰看到内质网和胞浆蛋白随着纯化水平的提高而发生的变化, 并且得到的纯化线粒体的完整性与活性均比较好。本纯化方法在线粒体蛋白质学的研究中已有实际的应用, 尤其是在组织线粒体蛋白质学的研究。线粒体纯度越高, 所鉴定的蛋白质中杂质蛋白质的污染也就越少, 线粒体的纯度对线粒体蛋白质的鉴定与研究非常关键^[13]。

目前在国内, 关于线粒体的分离纯化方法的报道比较多, 但鲜有文献报道是结合透射电镜与免疫印迹法同时对不同组织分离纯化的线粒体产物进行鉴定并进行功能检测的。本实验方法借鉴了国外研究经验, 尝试并改良了相关的方法, 为线粒体的深入研究提供一个实用、廉价的分离纯化方法。

参考文献 (References)

- 1 Johannsen DL, Ravussin E. The role of mitochondria in health and disease. *Curr Opin Pharmacol* 2009; 9(6): 780-6.
- 2 李文瑞, 姜颖, 贺福初. 线粒体蛋白质组分离鉴定策略及数据诠释. 军事医学科学院院刊(Li Wenrui, Jiang Ying, He Fuchu. Purification, identification and data annotation of mitochondria proteomics and their strategy. *Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences*) 2006; 30(1): 84-7.
- 3 尚涛, 张建新, 李兰芳. 提取分离肺脏线粒体的方法研究. 河北医药(Shang Tao, Zhang Jianxin, Li Lanfang. Research of methods for isolation of mitochondria from lung in rat. *Hebei Medical Journal*) 2006; 28(1): 252-3.
- 4 许红, 高誉珊, 吴海霞, 孙红梅, 和欣, 王媛媛. 高效分离与裂解脑线粒体的方法. 首都医科大学学报(Xu Hong, Gao Yushan, Wu Haixia, Sun Hongmei, He Xin, Wang Yuanyuan. *Journal of Capital Medical University*) 2010; 31(1): 134-5.
- 5 Timmons MD, Bradley MA, Lovell MA, Lynn BC. Procedure for the isolation of mitochondria, cytosolic and nuclear material from a single piece of neurological tissue for high-throughput mass spectral analysis. *J Neurosci Methods* 2011; 197(2): 279-82.
- 6 吴媛, 董凌月, 安威, 安云庆. 几种不同提取线粒体的方法对线粒体含量及活性的影响. 首都医科大学学报(Wu Yuan, Dong Lingyue, An Wei, An Yunqing. Comparison between different methods to extract mitochondria and its effects on mitochondria content and activity. *Journal of Capital Medical University*) 2010; 31(2): 241-4.
- 7 Wang SB, Shi Q, Xu Y, Xie WL, Zhang J, Tian C, et al. Protein disulfide isomerase regulates endoplasmic reticulum stress and the apoptotic process during prion infection and PrP mutant-induced cytotoxicity. *PLoS One* 2012; 7(6): e38221.
- 8 陈小媛, 张秋玲, 白波. 电针对脑缺血再灌注大鼠脑组织细胞线粒体膜电位及凋亡的影响. 针刺研究(Chen Xiaoyu, Zhang Qiuling, Bai Bo. Effect of electroacupuncture on mitochondrial membrane potential and apoptosis in the cerebral cortex in rats with focal cerebral ischemia/reperfusion injury. *Zhen Ci Yan Jiu*) 2008; 33(2): 107-10.
- 9 季宇彬, 吴盼, 朗朗. 龙葵碱对小鼠睾丸生殖细胞线粒体损伤的研究. 药物评价研究(Ji Yubin, Wu Pan, Lang Lang. *Drug Evaluation Research*) 2009; 32(2): 117-20.
- 10 孔祥义, 程水英, 孙素玲, 张鹰. 钼对小鼠肝线粒体琥珀酸脱氢酶活性的影响. 动物医学进展(Kong Xiangyi, Cheng Shuiying, Sun Suling, Zhang Ying. Effect of molybdenum on succinate dehydrogenase activity in liver mitochondria of mice. *Progress in Veterinary Medicine*) 2011; 32(3): 90-3.
- 11 Graham JM. Isolation of mitochondria from a homogenate using a sucrose density gradient. *Encyclopedia Life Sciences* 2004; doi: 10.1038/npg.els.0003807.
- 12 Sickmann A, Reinders J, Waqner Y, Joppich C, Zahedi R, Meyer HE, et al. The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(23): 13207-12.
- 13 Meisinger C, Pfanner N, Truscott KN. Isolation of yeast mitochondria. *Methods Mol Biol* 2006; 313: 33-9.