天净沙系列

CAT#:221108

常温运输和保存，有三个低温成分

天净沙

动物线粒体 DNA 纯化试剂盒（测序级）

Animal mtDNA Purification Kit

使用手册 V1.0

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

线粒体是非常重要的细胞器，它不但跟很多人类疾病相关，而且还是母系遗传研究的重要材料。对线粒体进行遗传研究和进化研究都需要纯化线粒体 DNA。本产品先纯化动物细胞线粒体、再从中纯化其 DNA。它具有下列特点：

1. 即开即用，用户不需要自己配制各种溶液，优化各种条件。
2. 两步法，先纯化线粒体，再柱式法纯化其中的 DNA，基因组 DNA 污染少。
3. 本产品可以用 15 次，一次可以处理约 1E8 个培养细胞（相当于 5 瓶 150 mm 培养细胞），可以纯化到到 0.2-0.5 mg 线粒体。
4. 适用于各种动物悬浮培养细胞和贴壁培养细胞，不建议用于动物实体组织。
5. 提供线粒体染液，可以在操作中随时监测纯化过程中线粒体的完整性。
6. 本产品足够 15 次动物线粒体 DNA 纯化。
7. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品第一部分编号为 221108pt1，采用大扁盒包装，常温运输和保存

成分	编号	规格	包装
动物线粒体提取溶液 A	221108a	50 mL	60 mL 本色瓶
动物线粒体提取溶液 B	221108b	250 mL×2	250 mL 本色瓶
蔗糖	221108c	100 g	125 mL 本色瓶
詹纳斯绿 B 染色液（0.2%）	211252	1 mL	2 mL 棕色管
细胞器 DNA 纯化溶液 A	211254a	15 mL	15 mL 本色瓶
细胞器 DNA 纯化溶液 B	211254b	7.5 mL	10 mL 本色瓶
细胞器 DNA 纯化溶液 C	211254c	30 mL	30 mL 本色瓶
通用洗柱液	220143	15 mL	15 mL 本色瓶
DNA 洗脱液 （基因组 DNA 专用）	220150	10 mL	10 mL 本色瓶
离心吸附柱	220144	15 套	塑料袋
使用手册	221108sc	1 份	无

本产品第二部分编号为 221108pt2，采用塑料袋包装，低温运输，-20℃保存

成分	编号	规格	包装
DNase A 干粉	211249a	5 mg	0.5 mL 黄盖管
10×DNase A 反应液	6-0893b	0.5 mL	0.5 mL 本色盖
Benzonase（1 U/μL）	220969	100 μL	0.5 mL 红盖管

运输及保存

第一部分常温运输和保存，第二部分低温运输，-20℃保存。保存期均一年。

自备试剂	PBS 缓冲液、氯仿、0.5 M EDTA 溶液（pH 8.0）。人细胞核专一性 TPMTVNTR 上游引物 5 GCT CCG CCC TGC CCA TTT 3，下游引物 5 GCC TCC GCC ACC AAT GAC 3，人线粒体专一性 HV2 区上游引物 5 GGT CTA TCA CCC TAT TAA CCA C3，下游引物 5 CTG TTA AAA GTG CAT ACC GCC A3。
使用方法	**注意：线粒体膜对温度高度敏感，故必须在冰上或冷室操作，溶液和离心管都需预冷。** **一：准备工作** 8. 将 50 mL 动物线粒体提取溶液 A 和 250 mL 动物线粒体提取溶液 B 放冰上预冷待用。 9. 配制 1.0 M 低比重溶液 100 mL：将 34 克蔗糖用 100 mL 动物线粒体提取溶液 B 溶解并放冰上待用。 10. 配制线粒体重悬液 100 mL：将 75 mL 动物线粒体提取溶液 B 和 25 mL 1.0 M 低比重溶液混合，放冰上待用。 11. 未用完的 1.0 M 低比重溶液和线粒体重悬液需要-20℃保存，否则容易长菌。下次使用前需充分溶解沉淀并摇匀。 **二：线粒体粗提** 12. 如果提取材料是单层培养细胞，先用 20 mL 自备的 PBS 缓冲液洗涤 1E8 个培养的单层细胞，共洗涤 2 次。然后用塑料刮匙刮下细胞，重悬在 20 mL PBS 缓冲液中。如果是悬浮细胞，则 4℃ 1000×g 离心 10 分钟收集 1E8 个细胞，再用 20 mL PBS 缓冲液洗涤 2 次，最后将细胞重悬在 20 mL PBS 缓冲液中。 13. 用平甩转子（swinging-bucket rotor）离心机 1000×g 4℃离心 10 分钟，弃上清留沉淀。 14. 加入 5 倍体积(以细胞沉淀的体积为基数)的预冷的动物线粒体提取溶液 A，轻柔重悬细胞。 15. 冰上放置 4-5 分钟。注意：冰浴时间不要超过 5 分钟。 16. 如果是成纤维细胞，由于其难以裂解，可将细胞重悬液在-80℃放置 20-30 分钟后再化冻，然后进入下步操作。如果不是成纤维细胞，则直接进入下步操作。 17. 将细胞重悬液体转移到预冷的 Dounce 玻璃匀浆器中（工作体积为 10-15 mL，间隙为 0.12 mm，最好是玻璃材质，否则线粒体产率会降低）匀浆适当次数。细胞株不同，其最适匀浆次数不同，一般需要 40 次-60 次左右。匀浆是线粒体纯化最关键的步骤，故匀浆前最好先通过预实验确定最适匀浆次数，方法是每匀浆 5-10 次后，取 2-3 μL 匀浆液到载玻片上，然后在相差显微镜下观察，完整细胞数量降低到 20%以下为佳。

18. 加入 1/3 体积的、预冷的 1.0 M 低比重溶液，轻柔混匀。
19. 用平甩转子离心机 4℃ 1000×g 离心 10 分钟。沉淀含残留完整细胞、细胞碎片和细胞核，上清液含线粒体。
20. 转移上清液到离心管中，冰上放置。在显微镜下检测上清液中线粒体的完整性。具体做法是先滴 50 μL 左右上清液到载玻片上,再滴入 50 μL 詹纳斯染液绿 B 染色液 20 分钟，油镜下观察，蓝绿色颗粒状物即为线粒体。
21. 用固定角度转子（fixed-angle rotor）离心机 4℃ 15,000×g 离心 15 分钟，弃上清，所得棕黑色沉淀即为粗提线粒体沉淀。
22. 用 5 mL 线粒体重悬液重悬线粒体，4℃ 15,000×g 离心 15 分钟，弃上清。
23. 重复上步一次。
24. 如果后续实验是提取 mtDNA 用于 PCR 或 Southern 杂交，则直接进入第四部分 mtDNA 提取，也可以放-80℃长期保存待用。如果后续实验是提取 mtDNA 用于高通量测序，则必须彻底降解掉其中的细胞核 DNA 污染。匀浆过程中一个破裂的细胞核释放出的 DNA 相当于上百万个线粒体的 DNA 量之合，所以无论如何小心，粗提线粒体中必有大量的细胞核 DNA 污染，如果不将其清除，高通量测得的序列将绝大部分来于核 DNA 而非 mtDNA。

三：细胞核 DNA 的去除及鉴定

25. 将线粒体重悬于 0.3 mL 预冷的线粒体重悬液中，取 10 μL 作为未处理线粒体（后面将使用）。
26. 加入 6 μL Benzonase（1 U/μL）溶液和 30 μL DNase A 溶液（配法：将 0.5 mL 10×DNase A 反应液加到装有 5 mg DNase A 干粉的离心管中得到 10 mg/mL DNase A 溶液，未用完的此溶液需要分装后放-20℃保存）。
27. 37℃保温一段时间酶切细胞核 DNA。注意：最好先预实验，每隔一段时间取 10 μL 样品，灭活其中的 DNase 后作为模板用 PCR 扩增人基因组 TPMT VNTR 位点和人 mtDNA HV2 区(两基因的 PCR 引物见自备试剂)，检测不到 VNTR 基因而能检测到 mtDNA 基因的处理时间为最佳。相关引物和 PCR 试剂需要自备。可用未处理线粒体作为对照。
28. 加入 10 μL 自备的 0.5 M EDTA 溶液（pH 8.0）以终止酶反应。詹纳斯绿 B 染色并在显微镜下检查线粒体完整性（操作见上）。
29. 4℃ 10,000×g 离心 10 分钟，弃上清。
30. 用 1 mL 的预冷线粒体重悬液重悬线粒体后，4℃ 10,000×g 离心 10 分钟，弃上清留沉淀。

	31. 重复上步操作，最后得到无基因组 DNA 污染的线粒体沉淀。 四：线粒体 DNA 提取 32. 在线粒体沉淀中加入 600 μL 预热的细胞器 DNA 纯化溶液 A 到线粒体沉淀中，充分吹打均匀。 33. 再加入 300 μL 预热的细胞器 DNA 纯化溶液 B 到离心管中（此溶液粘稠，需要预热到 65℃取用），颠倒数次混匀。此时溶液中可能有白色丝状悬浮物产生。 34. 65℃放置 5 分钟。 35. 加入 200 μL 自备氯仿，震荡混匀 10-30 秒，此时溶液将呈乳白色。如果省略次步，得到的 DNA 中将有蛋白污染。 36. 12,000×g 室温离心 2 分钟。此时上清液将变得透明，中间层有白膜。小心转移上清液到一个新的 1.5 mL 塑料离心管中，避免触及中间的白膜。 37. 加入 1.5 倍体积的细胞器 DNA 纯化溶液 C，颠倒混匀后转移到离心吸附柱中，静置 2 分钟。 38. 12,000×g 室温离心 1 分钟，弃收集管中的穿透液。 39. 将 0.5 mL 通用洗柱液加入离心柱中，12,000×g 室温离心 1 分钟，弃穿透液。 40. 重复上步操作一次。 41. 空甩半分钟去除残留液体，将离心吸附柱转移到新的 1.5 mL 离心管中。 42. 加 30-50 μL DNA 洗脱液（基因组 DNA 专用），室温放置 3-5 分钟。 43. 12,000×g 室温离心 1 分钟即得纯化的 mtDNA 溶液，立即使用或放-20℃长期保存。
关联产品	植物线粒体 DNA 纯化试剂盒