天净沙系列

CAT#:221107

常温运输和保存，有三个低温成分

天净沙

动物线粒体纯化试剂盒

Animal Mitochondrial Purification Kit

使用手册 V0.5

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。本产品用于纯化动物细胞线粒体。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，再去除细胞 DNA。
3. 本产品可以用 5 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 5 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 221107pt1，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	221107a	20 mL	25 mL 本色瓶
动物线粒体提取溶液 B	221107b	170 mL	250 mL 本色瓶
蔗糖	221107c	35 g	60 mL 本色瓶
詹纳斯绿 B 染色液（0.2%）	211252	1 mL	2 mL 棕色管
使用手册	221107sc	1 份	无

本产品第二部分编号为 221107pt2，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	2 mg	0.5 mL 黄盖管
10×DNase A 反应液	6-0893b	200 μL	0.5 mL 本色盖
Benzonase（1 U/μL）	220969	35 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

1. 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。

2. 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。
3. 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。
4. 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

5. 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。
6. 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。
7. 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。
8. 冰上放置 4-5 分钟。注意：冰浴时间不要超过 5 分钟。
9. 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。
10. 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。
11. 加入 1/3 体积的、预冷的 1.0 M 低比重溶液，轻柔混匀。
12. 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。
13. 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。
14. 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。 15. 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。 16. 重复上步一次。 17. 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** 18. 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）。 19. 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）。 20. 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。 21. 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）。 22. 4℃ 10,000×g 离心 10 分钟，弃上清。 23. 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。 24. 重复上步操作，最后得到无基因组 DNA 污染的线粒体沉淀。
关联产品	植物线粒体 DNA 纯化试剂盒