天净沙系列

CAT#:220350

常温运输及保存

天净沙

植物线粒体 DNA 纯化试剂盒（测序级）

Plant Mitochondria DNA Purification Kit

使用手册 V1.01

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

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。而对植物线粒体进行遗传研究需要进行线粒体 DNA 纯化。本产品就是专门用于植物细胞线粒体 DNA 纯化的试剂盒，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. 提供精提操作方案，先进行粗提，再利用冷冻超速离心（离心力达 40000×g）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，适用于后续的测序级别的线粒体 DNA 提取。
3. 本产品足够 5 次提取，每次可处理 10 g 绿色植物组织（可得 1-2.5 mg 左右线粒体）或 20 g 非绿色植物组织（可得 2-5 mg 左右的线粒体）。
4. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本试剂第一部分包装为大扁盒，编号为 220350pt1，常温运输和保存。

成分	编号	规格	包装
植物线粒体提取匀浆液	211250a	250 mL	250 mL 本色瓶
植物线粒体提取洗涤液	211250b	250 mL×2	250 mL 本色瓶
植物线粒体提取离心介质溶液	211250c	150 mL	250 mL 本色瓶
Percoll	211251	50 mL	60 mL 本色瓶
带柄尼龙筛	30-220341	1 个	自封袋
软毛笔	30-220342	1 个	logo 热封袋
詹纳斯绿 B 染色液（0.2%）	211252	1 mL	1.5 mL 棕色管
细胞器 DNA 纯化溶液 A	220350a	3 mL	5 mL 本色瓶
细胞器 DNA 纯化溶液 B	220350b	750 μL	1.5 mL 本色管
使用手册	220350sc	1 份	无

本试剂第二部分包装为 logo 热封袋，编号为 220350pt2，低温运输，4℃保存。

成分	编号	规格	包装
BSA 干粉	211248	1 g	5 mL 本色瓶
DNase A 干粉	211249	1 mg	0.5 mL 蓝盖管

运输及保存

pt1 常温运输及保存，pt2 低温运输，4℃保存，有效期一年。

自备试剂

超纯水、5 M KOH（调 pH 用），25 mM $MgCl_2$ 溶液、0.5 M EDTA 溶液、氯仿、异丙醇、75%乙醇、TE 缓冲液或超纯水。

使用方法

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℃。

一、选择植物组织

1. 植物组织不同，线粒体产率不同，请以下表为参考：

植物组织种类	线粒体产率	说明
根和块茎	0.3 mg/10 g	如土豆，红薯等
黄化苗（下胚轴、子叶、胚芽鞘）	2-5 mg/10 g	多酚含量低于叶片
有光合作用的叶片和子叶	1-2.5 mg/10 g	需放置在暗处 3 天

2. 一般纯化最好选用黄化苗。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。
3. 一次实验需要 10 g 绿色植物组织（或 20 g 干净的非绿色植物组织）、40 mL 植物线粒体提取匀浆液、约 90 mL 植物线粒体提取洗涤液和 35 mL 植物线粒体提取密度梯度离心介质(密度梯度离心介质的配制方式是一次性将 9.8 g=8.7 mL Percoll 加入到 26.3 mL 本试剂盒提供的植物线粒体提取离心介质溶液中，充分混匀后得到 35 mL 植物线粒体提取密度梯度离心介质）。上述三种溶液用前均需要加入 BSA 干粉使其终浓度为 0.1%（100 mL 溶液加 0.1 g 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。

二、线粒体粗提操作流程

4. 将 10 g 的绿色植物组织（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，取出用纸吸干液体后浸泡在预冷的 40 mL 匀浆液(已加 0.1% BSA)中，在浸泡状态下剪成 1 cm^2 大小的碎片。注意：处理样品量太大的话线粒体产率会急剧降低，所以如果同一样品太多可分成多组平行处理，得到线粒体粗提物后再汇集。
5. 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。
6. 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。

7. 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 50 mL 塑料离心管中。
8. 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。
9. 加入 10 mL 预冷的植物线粒体提取洗涤液（已加 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。
10. 将线粒体重悬液转移到新的 50 mL 离心管中，再加入 30 mL 预冷的植物线粒体提取洗涤液，4℃ 1000×g 离心 5 分钟。线粒体将在上清中。
11. 将上清转移到新的预冷的 50 mL 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%。
12. 在沉淀中加入 2 mL 预冷的植物线粒体提取洗涤液。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 植物线粒体提取洗涤液中。线粒体粗提液中线粒体的回收率一般在 45-75%。
13. 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 左右的线粒体粗提液到载玻片上，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. 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。如果需要长期保存，则直接放-80℃保存。如此保存的线粒体 DNA 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）

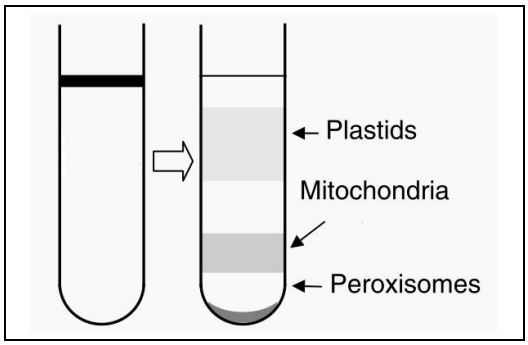
15. 预留 50 μL 线粒体粗提液做对照，在约 2 mL 剩余的线粒体粗提液中加入 40 μL 25 mM 自备的 $MgCl_2$，再加入 0.2 mg DNase A 干粉，混匀后冰上放置 60 分钟降解 DNA。取少量样品（如 50 μL）在 PCR 仪器中加热到 95℃变性 10 分钟灭活 DNase，再取其中的 10 μL 和 10 μL 预留的样品一起进行细胞核基因专一性 PCR（需要用户自己设计引物和自备 PCR 试剂），如果 DNase 处理过的样品没有扩增，而预留样品有扩增，则表明 DNA 去除比较干净（达到 PCR 检

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。

16. 加入 0.32 mL 预冷的自备 0.5 M 的 EDTA 溶液和 40 mL 预冷的植物线粒体提取洗涤液。
17. 4℃ 1000×g 离心 5 分钟，将上清转移到新的预冷的 50 mL 离心管中，4℃ 12000×g 离心 20 分钟，沉淀为去除细胞核 DNA 的线粒体。重悬在 2 mL 植物线粒体提取洗涤液中。
18. 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 左右的线粒体粗提液到载玻片上，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。

四、线粒体精提操作方案（需要 40000×g 的超速冷冻离心机）

19. 在 50 mL 预冷的塑料离心管中先后加入 35 mL 预冷的植物线粒体提取密度梯度离心介质（配制方法见第 3 步，用前需先加 0.1% BSA）。
20. 将 2 mL 线粒体粗提物重悬液铺在植物线粒体提取密度梯度离心介质上。
21. 在超速水平离心机上 4℃ 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：



22. 用广口吸管（可将 1 mL 蓝抢头中间剪断后使用）收集线粒体带，注意避开其上的质体带过氧化物酶体沉淀，估计所取含线粒体溶液的体积。
23. 在 15-20 分钟的时间内缓慢加入至少 4 倍体积的预冷的植物线粒体提取洗涤液。
24. 转入 50 mL 塑料管离心管中，在冷冻离心机上 4℃ 15,000×g 离心 20 分钟，沉淀为线粒体。可以直接进入第 25 步进行 DNA 提取。如果暂时不提取 DNA，则把线粒体沉淀放-80℃保存。

五、线粒体 DNA 的提取

25. 在线粒体沉淀中加入 600 μL 预热的细胞器 DNA 提取溶液 A，用移液枪充分吹打均匀。

	26. 再加入 150 μL 65℃预热的细胞器 DNA 提取溶液 B，颠倒数次混匀。此时溶液中可能有白色丝状悬浮物产生。由于溶液 B 比较粘稠，可以采取称量方法取用，150 μL 约等于 150-160 mg。也可以将 1 mL 枪头剪去一截再吸取。 27. 65℃放置 5 分钟。不能室温放置，否则 DNA 产量会降低 10-20%。 28. 加入 200 μL 自备氯仿，涡旋震荡混匀 30 秒，此时溶液将呈乳白色。 29. 14000×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，避免触及中间层的白膜。 30. 加入 1 倍体积(约 750 μL)的异丙醇到上清液中，用手上下颠倒 30 秒混匀。此时一般将有絮状 DNA 沉淀出现。 31. 14000×g 室温离心 3 分钟。此时管底将有微小 DNA 沉淀，小心弃上清，注意不要丢弃 DNA 沉淀。 32. 在离心管中加 1 mL 75%乙醇，短暂震荡，14000×g 室温离心 3 分钟，弃上清。 33. 重复上述 75%乙醇洗涤操作一次。 34. 短暂离心，小心吸弃残留的液体（约 50 μL）。此步不要省略，否则残留的液体（含乙醇）将会影响 DNA 电泳、酶切很 PCR 等反应。 35. 立即加入 50-100 μL TE 缓冲液或超纯水充分溶解线粒体 DNA 沉淀。 36. 直接取 5-10 μL 电泳检测 DNA，再测 OD 计算浓度和纯度，其余样品放-20℃保存备用。
关联产品	植物线粒体 DNA 纯化试剂盒（PCR 级）