天净沙系列

CAT#:220520

常温运输及保存

天净沙

动物线粒体 DNA 纯化试剂盒（过柱法，PCR 级）

Animal Mitochondrial DNA Purification Kit PCR Grade (Column Method)

使用手册 V1.2

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

动物线粒体 DNA（mtDNA）是进行分子进化研究和母性遗传研究的重要材料，但传统的两步式动物 mtDNA 提取方法需要先温和裂解动物细胞，分离线粒体，然后再从线粒体中提取 mtDNA。此方法中的温和裂解细胞的条件十分难以控制，需要针对不同组织材料单独进行优化，因此纯化效果差异很大。本方法克服了上述缺点，具有下列优点：

1. 不需要单独纯化线粒体，操作简单快捷。
2. 得到的动物 mtDNA 只能用于 PCR 分析，不能用于其它实验。
3. 可以用于培养的动物细胞，实体动物组织和血液。每 1E7 个动物细胞一般能得到 100 ng 左右的 mtDNA，每克实体动物组织一般能得到 1-2 μg mtDNA。
4. 本产品不能用于纯化植物线粒体 DNA（需要另购）。
5. 本试剂盒足够 50 次微量提取。
6. 本产品只可用于科研。

规格及成分

本产品用大扁盒包装

成分	编号	规格	包装
动物线粒体 DNA 纯化溶液 A	220520a	13 mL	15 mL 本色瓶
动物线粒体 DNA 纯化溶液 B	220520b	13 mL	15 mL 棕色瓶
动物线粒体 DNA 纯化溶液 C	220520c	18 mL	30 mL 本色瓶
离心吸附柱	220144	50 套	logo 热封袋
通用洗柱液	220143	50 mL	60 mL 本色瓶
DNA 洗脱液（基因组纯化用）	220125	10 mL	10 mL 本色瓶
使用手册	220520sc	1 份	无

自备试剂

待处理样品，0.25%胰酶消化液，PBS 缓冲液，1.5 mL 塑料离心管

运输及保存

常温运输与保存，有效期为 12 个月。

使用方法

一、培养细胞的预先处理（本试剂盒不含相关试剂）

1. 用自备的 0.25%胰酶消化液处理约 1E7 个培养的动物细胞，离心收集后弃上清，保留细胞沉淀。
2. 用 PBS 缓冲液洗涤细胞沉淀两次，最后得到的细胞沉淀将直接用作动物 mtDNA 提取的材料。

二、动物组织细胞预处理（本试剂盒不含相关试剂）

3. 用剪刀将 1 g 新鲜的动物组织剪碎（芝麻大小最好），转移到 1.5 mL 塑料离心管中，直接用作动物 mtDNA 提取的材料。注意：不能使用冻存的动物组织，因为冻凝过程中形成的冰晶会将线粒体膜和细胞膜刺破，其 DNA 已经释放出来，被体液中的 DNA 酶降解。

三、血液预处理

4. 将 3-5 mL 抗凝外周血静置 30 分钟或低速离心 5 分钟，取白细胞层。
5. 用自备 PBS 缓冲液洗涤白细胞两次，得到的白细胞沉淀用于 mtDNA 提取。

四、线粒体粗提物制备

6. 用自选方法将 1E7 个培养细胞或 1 g 实体组织匀浆。
7. 室温 700×g 离心 6 分钟，收集上清。
8. 将上清在室温 10000×g 离心 10 分钟，得线粒体粗提物沉淀。

五、mtDNA 提取

9. 在细胞沉淀或剪碎的组织或线粒体粗提物沉淀中加入 250 μL 冰浴的动物线粒体 DNA 纯化溶液 A，充分吹打分散。如果是剪碎的组织，不要等成块的组织溶解即可继续下步操作。
10. 加入 250 μL 常温的动物线粒体 DNA 纯化溶液 B（如果溶液 B 有沉淀，用前须 37℃加热溶解后冷却到室温方可使用），轻柔颠倒混匀 10 次，不要剧烈振荡。
11. 冰上放置 6-8 分钟。注意不要超过 8 分钟。
12. 加入 350 μL 冰浴的动物线粒体 DNA 纯化溶液 C，轻柔颠倒混匀 6 次，可见白色沉淀物产生。冰上放置 20 分钟。
13. 室温 13000×g 离心 10 分钟，小心将上清液转移到离心吸附柱中。由于此时的溶液比重较大，有时候出现沉淀漂浮是正常现象，取上清时避开漂浮的沉淀即可。
14. 静置 5 分钟以让 DNA 与离心吸附柱充分结合，此步十分重要。
15. 室温 13000×g 离心 1 分钟，弃收集管中的废液。
16. 加入 500 μL 的通用洗柱液，室温 13000×g 离心 1 分钟，弃收集管中废液。
17. 重复上步 1 次。
18. 室温 13000×g 离心 1 分钟，甩干残留液体。此步不能省略，否则残留通用洗柱液会影响 DNA 的后续使用（如 DNA 上样时不能沉淀到加样孔中）。
19. 将离心吸附柱置于一个新的 1.5 mL 塑料离心管中，加入 50 μL DNA 洗脱液（基因组纯化用），室温放置 2 分钟。

	20. 室温 13000×g 离心 1 分钟，离心管底溶液即 mtDNA。每 1E7 个动物细胞一般能得到 100 ng 左右的 mtDNA，每克实体动物组织一般能得到 1-2 μg 的 mtDNA。所得 DNA 量较少，不推荐使用 OD 检测或电泳检测的方式对所得 DNA 进行检测。检测如果 DNA 需要浓缩，可以使用本公司的核酸浓缩剂。本试剂盒得到的 mtDNA 一般有断裂，电泳时不呈现专一的带，但不影响作为 PCR 模板。
关联产品	植物线粒体 DNA 纯化试剂盒
更新备注	V1.1 加上线粒体粗体物作为起始材料

20230613zxl-wjw