天净沙系列

CAT#:221127

常温运输和保存

天净沙

植物线粒体 RNA 纯化试剂盒

Plant Mitochondria RNA Purification Kit

使用手册 V1.1

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.bi

产品及特点

植物线粒体是重要的植物细胞器，负责植物细胞 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，因此常常需要进行线粒体 RNA 纯化。本产品就是专门用于植物细胞线粒体 RNA 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或优化操作流程。
2. 提供粗提和精提两种操作方案。粗提只需常规台式冷冻离心机，利用差速分离原理进行线粒体粗提，所得线粒体虽然含少量其他细胞器污染，但可用于线粒体 RT-PCR，不能用于测序。
3. 精提需要冷冻超速离心（离心力达 40000×g），利用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，适用于后续测序级线粒体 RNA 提取。
4. 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）。

规格及成分

本试剂第一部分包装为大纸盒，编号为 221127pt1，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	211250c	150 mL	250 mL 本色瓶
Percoll	211251	50 mL	60 mL 本色瓶
0.2%詹纳斯绿 B 染色液	211252	1 mL	1.5 mL 棕色管
细胞器 RNA 纯化溶液 A	230348a	5 mL	5 mL 棕玻瓶
细胞器 RNA 纯化溶液 B	230348b	1 mL	5 mL 棕玻瓶
细胞器 RNA 纯化溶液 C	230348c	5 mL	5 mL 本色瓶
使用手册	221127sc	1 份	无包装

本试剂第二部分包装为塑料袋，编号为 221127pt2，低温运输，-20℃保存。

成分	编号	规格	包装
25 mM 氯化镁溶液	5-751	0.2 mL	0.5 mL 本色管
0.5 M EDTA 溶液	5-155	1.5 mL	1.5 mL 白盖管
BSA 干粉	CAS:9048-46-8	10 g	30 mL 本色瓶
DNase A 干粉	211249	5 mg	1.5 mL 蓝盖管

本试剂第三部分包装为自封袋，编号为 221127pt3，常温运输和保存

成分	编号	规格	包装

带柄尼龙筛	211250d	1 个	自有包装
软毛笔	211250e	1 只	自有包装

运输及保存

常温运输和保存，其中 4 个成分低温运输，-20℃保存。保存期限一年。

自备试剂

超纯水、5 M 氢氧化钾（调 pH 用）、0.5 M EDTA 溶液、75%乙醇。

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：准备工作

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	指多酚含量低的叶片
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. 线粒体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，否则淀粉颗粒将严重干扰线粒体的纯化。
3. 一次线粒体纯化实验需要 10 g 绿色植物组织(或 20 g 干净的非绿色植物组织)、40 mL 匀浆液、90 mL 洗涤液和 35 mL 密度梯度离心介质。密度梯度离心介质的配制方法是一次性将 9.8 g（=8.7 mL）Percoll 加入到 26.3 mL 离心介质中，充分混匀后得到 35 mL 密度梯度离心介质。上述三种溶液（匀浆液、洗涤液和加入了 Percoll 的离心介质）用前均需要先加入 0.1% BSA 溶液（100 mL 溶液加 0.1 g BSA 干粉），轻柔颠倒混匀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。

二：线粒体粗提操作流程

4. 将 10 g 的绿色植物组织（去叶脉后的嫩叶子或愈伤组织）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 BSA）中，在浸泡状态下剪成 1cm^2 大小的碎片。注意：处理样品量太大的话，可能超出裂解液的裂解能力，线粒体产率会急剧降低，所以如果需要放量处理同一样品，可分成多个组平行处理，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（打水果汁的匀浆器）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 氢氧化钾将 pH 调到 7.0 以上才进入下一步。

6. 用试剂盒提供的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。本试剂盒提供的一个带柄尼龙筛可以洗干净后反复使用。
7. 在低速固定角度冷冻离心机上 4℃ 1000×g 离心匀浆液 5 分钟，上清含线粒体，沉淀为未破碎的细胞、破碎细胞的碎片、细胞核和淀粉颗粒等。小心转移上清到新的预冷的 50mL 塑料离心管中。
8. 将含线粒体的离心管在水平冷冻离心机上 4℃ 12000×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。如果沉淀底部还有白色的淀粉沉淀，属于正常现象。
9. 在沉淀中加入 10 mL 预冷的洗涤液（已加 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，避免重悬之)。不能剧烈震荡，否则线粒体容易破裂。本试剂盒提供的一只软毛笔可以洗干净后反复使用。
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%之间。
12. 在线粒体沉淀中加入 2 mL 预冷的洗涤液。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 洗涤液中。
13. 在显微镜下检测重悬液中线粒体的完整性。具体做法是先滴一滴（约 50 μL）线粒体粗提液到载玻片上，再滴入 50 μL 0.2%詹纳斯绿 B 染色液，混匀孵育 20 分钟后，油镜下观察，蓝绿色颗粒状物即为线粒体。
14. 所得线粒体粗提液往往含其他细胞器（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 RNA 完整性在几年内都不会变化。

三：细胞核 DNA 的去除（纯化测序级的线粒体 RNA 才需要进行此操作）

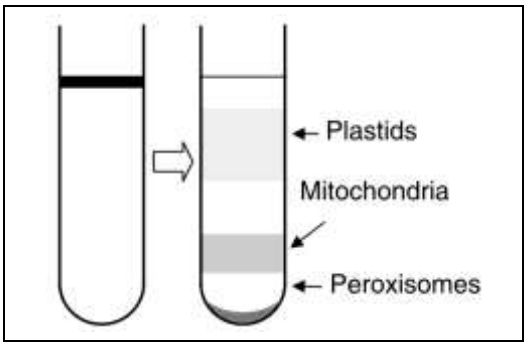
15. 预留 50uL 线粒体粗提液作对照，在约 2 mL 剩余的线粒体粗提液中加入 40 μL 25 mM 氯化镁，再加入 1 mg DNase A 干粉，混匀后冰上放置 60 分钟降解 DNA。然后取 50 μL 线粒体样品到一干净离心管中，剩下样品继续放冰上酶切 DNA。将取出的 50 μL 样品在 PCR 仪器中加热到 95℃变性 10 分钟灭活 DNase A，再取其中的

1-10 μL 做模板，用 1-10 μL 预留的线粒体粗提液做对照，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 A 处理过的样品没有扩增，而预留样品有扩增，则表明基因组 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 0.3 mL 预冷的 0.5 M 的 EDTA 溶液终止反应。
17. 再加入 40 mL 预冷的洗涤液，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。
18. 将上步离心管放 4℃ 12000×g 离心 20 分钟，沉淀为去除细胞核 DNA 之后的线粒体。重悬在 2 mL 洗涤液中。
19. 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 左右的线粒体重悬液到载玻片上，再滴入 50 μL 0.2%詹纳斯染液绿 B 染色液，染色 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）

20. 在 50 mL 预冷的塑料离心管中先后加入 35 mL 预冷的密度梯度离心介质（配制方法见第 3 步，用前需先加 BSA）。
21. 将第 18 步所得的 2 mL 线粒体粗提物重悬液铺在密度梯度离心介质上。
22. 在超速水平离心机上 4℃ 40000×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：



23. 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，估计所取含线粒体带的体积。
24. 在 15-20 分钟的时间内缓慢加入至少 4 倍体积的预冷的洗涤液。
25. 转入 50 mL 塑料管离心管中，在冷冻离心机上 4℃ 15000×g 离心 20 分钟，沉淀为线粒体。可以直接进入第 26 步进行 RNA 提取。如果暂时不提取 RNA，则把线粒体沉淀放-80℃保存。

	五：线粒体 RNA 的提取 26. 在上步所得的线粒体沉淀中加入 1 mL 细胞器 RNA 提取溶液 A，用移液枪充分吹打。 27. 再加入 200 μL 细胞器 RNA 提取溶液 B，颠倒数次混匀。 28. 室温放置 5 分钟。 29. 14000×g 室温离心 5 分钟。小心转移上清液（约 0.7 mL）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 倍体积的细胞器 RNA 提取溶液 C（用前颠倒摇晃均匀）到上清液中，用手上下颠倒 30 秒混匀。 31. 14000×g 室温离心 10 分钟，小心弃上清。 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. 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）将会影响后续反应。 34. 立即加入 30 μL 超纯水充分溶解线粒体 RNA 沉淀。 35. 直接取 1 μL 在 NanoDrop 上测 OD 计算浓度和纯度，其余样品放-80℃保存备用。
关联产品	植物线粒体 DNA 纯化试剂盒