天净沙系列

CAT#:221160

常温运输和保存

血液线粒体 DNA 提取试剂盒（沉淀法）

Blood Mitochondria DNA Isolation Kit

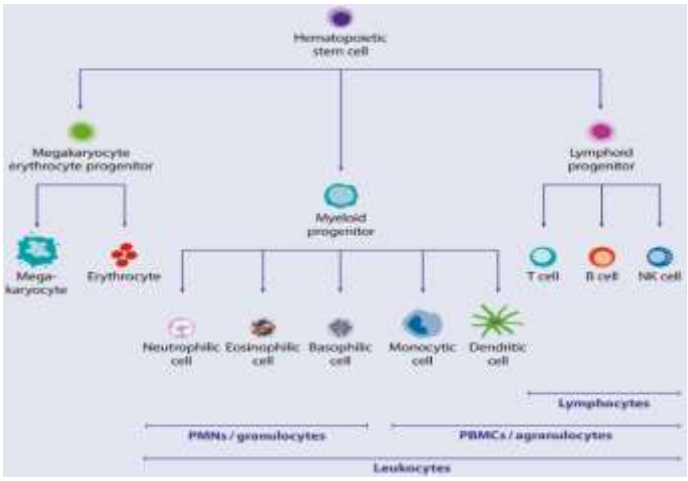
使用手册 V1.1

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.bio

产品及特点

本产品是在本公司血液 DNA 提取产品基础上开发的、专门用于从新鲜或冷冻的人抗凝全血中提取线粒体 DNA（Mitochondrial DNA，mtDNA）的试剂。人血液中的细胞分类如下：



人血液中红细胞与白细胞的数量比例为 1000-6000：1，但红细胞中没有 DNA，故所提线粒体 DNA 主要来源于白细胞。白细胞分多型核白细胞（Polymorphonuclear Leukocytes，PMNs）和外周血单个核细胞（Peripheral Blood Mononuclear Cells，PBMCs）两类细胞，前者包括占白细胞总数 50-70%的中性粒细胞 Neutrophils，0.5-5%的嗜酸性粒细胞 Eosinophils 和 0-1%的嗜碱性粒细 Basophils。后者包括占白细胞总数 20-40%的淋巴细胞 Lymphocyte（T 细胞、B 细胞和 NK 细胞），1-8%的单核细胞 Monocyte 和 0.3-0.9%的树突状细胞 Dendritic Cell。本试剂盒具有下列特点：

1. DNA 产率高。如果样本为新鲜血液，线粒体 DNA 产率最高可以达到 1 μg/mL 新鲜血液。如果样本为冻存血液，DNA 产率差别较大。
2. DNA 纯净，OD260/OD280 在 1.8-2.0 之间。
3. 可直接用于 PCR、酶切、杂交等实验。
4. 适用于哺乳动物血液，不适用于其他动物血液。
5. 本产品足够使用 50 次，每次可以处理 3 mL 抗凝血液。
6. 每 1E7 个白细胞可以纯化到 40-80 ng mtDNA。
7. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品使用大扁盒包装

成分	编号	规格	包装
10×红细胞裂解液（DNA 纯化用）	220171	15 mL	15 mL 本色瓶
冻存血液红细胞裂解液（DNA 纯化用）	230505	250 mL×2	250 mL 本色瓶
白细胞洗涤液	221160d	100 mL	125 mL 本色瓶
线粒体 DNA 提取溶液 A	221160a	6.5 mL	10 mL 本色瓶
线粒体 DNA 提取溶液 B	221160b	6.5 mL	10 mL 棕色瓶

	线粒体 DNA 提取溶液 C	221160c	9 mL	10 mL 本色瓶
	去蛋白溶液	230507	50 mL	60 mL 棕玻瓶
	微量核酸沉淀剂（IPA 型）	230506	50 mL	60 mL 本色瓶
	DNA 洗脱液（基因组纯化专用）	220125	10 mL	10 mL 本色瓶
	使用手册	221160sc	1 份	无

运输及保存

常温运输和保存，保存期限一年。

自备试剂

1.5 mL 塑料离心管，75%乙醇。

使用方法

一、新鲜血液白细胞的分离

本试剂盒只提供基于全血红细胞裂解法的白细胞制备试剂。由于有很多方法（如自然沉降法、差异沉淀法、Ficoll 分离法，氯化铵分离法等）从新鲜抗凝血液制备白细胞，因此用户可以用自选的方法制备白细胞。如果选择用自备试剂制备白细胞，则本步操作可以跳过。

1. 将 3 mL 人新鲜抗凝血液转移到一个干净的 15 mL 塑料离心管中。
2. 按照 10：1 的比例加入 0.3 mL10×红细胞裂解液（DNA 纯化用）使其终浓度为 1×；轻柔颠倒数次混匀，静置 10 分钟（期间可轻柔颠倒混匀几次）。注意：红细胞裂解液（DNA 纯化用）一旦打开后，非常容易污染细菌，未用完的部分最好-20℃保存，下次使用前，要溶解后充分摇匀。
3. 室温下 500×g 离心 8 分钟沉淀白细胞核。上清将呈现红色，这是红细胞裂解后释放出血红蛋白的颜色。弃上清。
4. 在沉淀中加入 1 mL 的白细胞洗涤液，轻柔重悬白细胞沉淀得到白细胞重悬液。
5. 离心 500×g 8 分钟，弃上清。在沉淀中加入 1mL 的白细胞洗涤液，轻柔重悬白细胞沉淀得到白细胞重悬液。
6. 对白细胞重悬液进行细胞计数。由于人白细胞浓度差异比较大（新生儿童为 15-20×E9 个/L，半岁到 2 岁儿童为 11-12×E9 个/L，4-14 岁为 8×E9 个/L，成人为 4-10×E9 个/L，L 指血液体积），故需要从下步开始使用固定细胞数。
7. 将 1E7 个白细胞转移到 1.5 mL 塑料离心管，1500×g 离心 4 分钟，弃上清，白细胞将形成沉淀。
8. 所得白细胞沉淀可以直接用于 DNA 提取，也可放置在-20℃待用。

二、线粒体 DNA 的提取

9. 在白细胞沉淀中加 130 μL 线粒体 DNA 纯化溶液 A，用移液枪吹打数次混匀后放冰上。
10. 再加入 130 μL 线粒体 DNA 纯化溶液 B，轻柔颠倒混匀 10 次。此溶液为蓝色，混匀后混合液的蓝色将变得均匀。冰上准确放置 8 分钟。

	11. 再加入 180 μL 线粒体 DNA 纯化溶液 C，轻柔颠倒混匀 10 次，混合液将变成无色。冰上准确放置 25 分钟。如果颜色异常，需要停止实验，分析原因。 12. 在 4℃下 13000×g 离心 20 分钟。 13. 将上清（含线粒体 DNA）转移到一只新的 1.5 mL 塑料离心管中。 14. 加入等体积的去蛋白溶液，涡旋震荡 3 分钟混匀。 15. 室温 13000×g 离心 5 分钟，转移无色的水相到一只新的 1.5 mL 塑料离心管中，不要取蓝色的液体。 16. 在无色的上清中加入等体积的微量核酸沉淀剂（IPA 型），颠倒 10 次混匀，室温 13000×g 离心 10 分钟，去尽上清，注意不要触及管底微量沉淀。 17. 加入 1 mL 自备的 75%乙醇，充分混匀后室温 13000×g 离心 3 分钟，去尽上清，注意不要触及管底微量沉淀。重复此步一次。 18. 短暂离心，去尽残留溶液大约 50 μL（此步十分重要，不要省略）。 19. 短暂晾干半分钟，加入 50 μL DNA 洗脱液（基因组专用）溶解 DNA。一般能得到 40-80 ng mtDNA。 20. 溶解后的 DNA 可以立即用于后续的 OD 检测、酶切、PCR 或其他实验，也可以放置在-20℃长期保存。如果需要更多 mtDNA，可以使用滚环扩增法进行扩增。 **三、冻存血液线粒体 DNA 的纯化** 21. 将冻存血液放 37℃水浴化冻。 22. 将 2 mL 抗凝新鲜血液转移到一个干净的 15 mL 塑料离心管中。 23. 加入 4 倍体积（8 mL）的冻存血液红细胞裂解液（DNA 纯化用），台式摇床上轻柔摇晃 10 分钟混匀。注意：冻存血液红细胞裂解液（DNA 纯化用）一旦打开后，非常容易污染细菌，未用完的部分最好-20℃保存，下次使用前，要溶解后充分摇匀。 24. 在 4℃ 1000×g 离心 4 分钟，转移上清到新的离心管中。 25. 将上清在 4℃ 12000×g 离心 10 分钟，弃上清，保留沉淀。 26. 接第 7-19 步进行线粒体 DNA 纯化。注意：由于陈旧血液在冻凝过程中冰晶已经对细胞核膜和线粒体膜产生损伤，所以离心得到的白细胞不能洗涤。同时由于有很多线粒体被冰晶刺破，线粒体 DNA 已经流失，故其得率会比新鲜血液线粒体 DNA 少，具体减少多少跟冻凝时间长短有关。
关联产品	滚环扩增试剂盒