

天
净
沙
系
列

CAT#:221108-15

常温运输和保存，有三个低温成分

BINGENE

动物线粒体 DNA 纯化试剂盒(测序级)

使用手册 V1.0

江苏天净沙基因诊断技术有限公司

网址: www.bingene.com; 电话: 400-6605850; 电邮: order@bingene.com

<p>产品及特点</p>	<p>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。本产品先纯化动物细胞线粒体、再从中纯化其 DNA。它具有下列特点：</p> <ol style="list-style-type: none"> 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，再柱式法纯化其中的 DNA，基因组 DNA 污染少。 3. 本产品可以用 15 次，一次可以处理约 1×10^8 个培养细胞（相当于 5 瓶 150 mm 培养细胞），可以纯化到 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 15 次动物线粒体 DNA 纯化。 7. 本产品只能用于科研。 																																																												
<p>规格及成分</p>	<p style="text-align: center;">本产品使用大扁盒包装</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 25%;">成份</th> <th style="width: 25%;">编号</th> <th style="width: 25%;">规格</th> <th style="width: 25%;">包装材料</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>动物线粒体提取溶液 A</td> <td>221108a</td> <td>50 mL</td> <td>60 mL 本色瓶</td> </tr> <tr> <td>动物线粒体提取溶液 B</td> <td>221108b</td> <td>250 mL×2</td> <td>250mL 本色瓶</td> </tr> <tr> <td>蔗糖</td> <td>221108c</td> <td>100 g</td> <td>125mL 本色瓶</td> </tr> <tr> <td>詹纳斯绿 B 染色液 (0.2%)</td> <td>211252</td> <td>1 mL</td> <td>2 mL 棕色管</td> </tr> <tr> <td>DNase A 干粉</td> <td>211249a</td> <td>5 mg</td> <td>0.5mL 亮黄盖</td> </tr> <tr> <td>10×DNase A 反应液</td> <td>6-0893b</td> <td>0.5 mL</td> <td>0.5 mL 本色盖</td> </tr> <tr> <td>Benzonase (1U/uL)</td> <td>220969</td> <td>100 uL</td> <td>0.5mL 红盖管</td> </tr> <tr> <td>细胞器 DNA 纯化溶液 A</td> <td>211254a</td> <td>15 mL</td> <td>15 mL 本色瓶</td> </tr> <tr> <td>细胞器 DNA 纯化溶液 B</td> <td>211254b</td> <td>7.5 mL</td> <td>10 mL 本色瓶</td> </tr> <tr> <td>细胞器 DNA 纯化溶液 C</td> <td>211254c</td> <td>30 mL</td> <td>30 mL 本色瓶</td> </tr> <tr> <td>通用洗柱液</td> <td>220143</td> <td>15 mL</td> <td>15 mL 本色瓶</td> </tr> <tr> <td>DNA 洗脱液 (基因组 DNA 专用)</td> <td>220150</td> <td>10 mL</td> <td>10 mL 本色瓶</td> </tr> <tr> <td>离心吸附柱</td> <td>220144</td> <td>15 套</td> <td>塑料袋</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>221108sc</td> <td>1 份</td> <td>无</td> </tr> </tbody> </table>	成份	编号	规格	包装材料	动物线粒体提取溶液 A	221108a	50 mL	60 mL 本色瓶	动物线粒体提取溶液 B	221108b	250 mL×2	250mL 本色瓶	蔗糖	221108c	100 g	125mL 本色瓶	詹纳斯绿 B 染色液 (0.2%)	211252	1 mL	2 mL 棕色管	DNase A 干粉	211249a	5 mg	0.5mL 亮黄盖	10×DNase A 反应液	6-0893b	0.5 mL	0.5 mL 本色盖	Benzonase (1U/uL)	220969	100 uL	0.5mL 红盖管	细胞器 DNA 纯化溶液 A	211254a	15 mL	15 mL 本色瓶	细胞器 DNA 纯化溶液 B	211254b	7.5 mL	10 mL 本色瓶	细胞器 DNA 纯化溶液 C	211254c	30 mL	30 mL 本色瓶	通用洗柱液	220143	15 mL	15 mL 本色瓶	DNA 洗脱液 (基因组 DNA 专用)	220150	10 mL	10 mL 本色瓶	离心吸附柱	220144	15 套	塑料袋	使用手册	221108sc	1 份	无
成份	编号	规格	包装材料																																																										
动物线粒体提取溶液 A	221108a	50 mL	60 mL 本色瓶																																																										
动物线粒体提取溶液 B	221108b	250 mL×2	250mL 本色瓶																																																										
蔗糖	221108c	100 g	125mL 本色瓶																																																										
詹纳斯绿 B 染色液 (0.2%)	211252	1 mL	2 mL 棕色管																																																										
DNase A 干粉	211249a	5 mg	0.5mL 亮黄盖																																																										
10×DNase A 反应液	6-0893b	0.5 mL	0.5 mL 本色盖																																																										
Benzonase (1U/uL)	220969	100 uL	0.5mL 红盖管																																																										
细胞器 DNA 纯化溶液 A	211254a	15 mL	15 mL 本色瓶																																																										
细胞器 DNA 纯化溶液 B	211254b	7.5 mL	10 mL 本色瓶																																																										
细胞器 DNA 纯化溶液 C	211254c	30 mL	30 mL 本色瓶																																																										
通用洗柱液	220143	15 mL	15 mL 本色瓶																																																										
DNA 洗脱液 (基因组 DNA 专用)	220150	10 mL	10 mL 本色瓶																																																										
离心吸附柱	220144	15 套	塑料袋																																																										
使用手册	221108sc	1 份	无																																																										
<p>运输及保存</p>	<p>常温运输和保存，保存期限一年。但 DNase A 干粉、10×DNase A 反应液、Benzonase 三个成分需要低温运输，-20℃保存。</p>																																																												
<p>自备试剂</p>	<p>PBS 缓冲液、氯仿、0.5M EDTA 溶液 (pH8.0)。人细胞核专一性 TPMT VNTR 上游引物 5 GCT CCG CCC TGC CCA TTT 3，下游引物 5 GCC TCC GCC ACC AAT</p>																																																												

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。

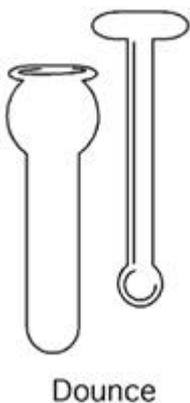
一：准备工作

8. 将 50mL 动物线粒体提取溶液 A 和 250mL 溶液 B 放冰上预冷待用。
9. 配制 1.0M 低比重溶液 100mL: 将 34 克蔗糖用 100mL 动物线粒体提取溶液 B 溶解并放冰上待用。
10. 配制线粒体重悬液 100mL: 将 75 mL 动物线粒体提取溶液 B 和 25 mL 1.0M 低比重溶液混合，放冰上待用。
11. 未用完的 1.0M 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

12. 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 1×10^8 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 1000g 4℃ 离心 10 分钟收集 1×10^8 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。
13. 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。
14. 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。
15. 冰上放置 4-5 分钟。注意：冰浴时间不要超过 5 分钟。
16. 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。
17. 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 uL 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。
18. 加入 1/3 体积的、预冷的 1.0 M 低比重溶液, 轻柔混匀。
19. 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。

Dounce 匀浆器



20. 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 50uL 左右上清液到载玻片上，再滴入 50 uL 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。
21. 用固定角度转子 (fixed-angle rotor) 离心机 4°C 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。
22. 用 5 mL 线粒体重悬液重悬线粒体，4°C 15,000 g 离心 15 分钟，弃上清。
23. 重复上步一次。
24. 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°C 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

25. 将线粒体重悬于 0.3 mL 预冷的线粒体重悬液中，取 10 uL 作为未处理线粒体（后面将使用）。
26. 加入 6 uL Benzonase (1U/uL) 溶液和 30 uL 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°C 保存）。
27. 37°C 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 uL 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。
28. 加入 10 uL 自备的 0.5M 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）。
29. 4°C 10,000 g 离心 10 分钟，弃上清。
30. 用 1 mL 的预冷线粒体重悬液重悬线粒体后，4°C 10,000 g 离心 10 分钟，弃上清留沉淀。
31. 重复上步操作，最后得到无基因组 DNA 污染的线粒体沉淀。

四：线粒体 DNA 提取

32. 在线粒体沉淀中加入 600uL 预热的细胞器 DNA 纯化溶液 A 到线粒体沉淀中，充分

	<p>吹打均匀。</p> <p>33. 再加入 300uL 预热的细胞器 DNA 纯化溶液 B 到离心管中（此溶液粘稠，需要预热到 65℃取用），颠倒数次混匀。此时溶液中可能有白色丝状悬浮物产生。</p> <p>34. 65℃放置 5 分钟。</p> <p>35. 加入 200 uL 自备氯仿，震荡混匀 10-30 秒，此时溶液将呈乳白色。如果省略次步，得到的 DNA 中将有蛋白污染。</p> <p>36. 12,000g 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，避免触及中间的白膜。</p> <p>37. 加入 1.5 倍体积的细胞器 DNA 纯化溶液 C，颠倒混匀后转移到离心吸附柱中，静置 2 分钟。</p> <p>38. 12,000 g 室温离心 1 分钟，弃收集管中的穿透液。</p> <p>39. 将 0.5 mL 通用洗柱液加入离心柱中，12,000g 室温离心 1 分钟，弃穿透液。</p> <p>40. 重复上步操作一次。</p> <p>41. 空甩半分钟去除残留液体，将离心吸附柱转移到新的 1.5 mL 离心管中。</p> <p>42. 加 30-50 uL DNA 洗脱液（基因组 DNA 专用），室温放置 3-5 分钟。</p> <p>43. 12,000 g 室温离心 1 分钟即得纯化的 mtDNA 溶液，立即使用或放-20℃长期保存。</p>
<p>关联产品</p>	<p>植物线粒体 DNA 纯化试剂盒</p>