

天
净
沙
系
列

CAT#:130831-15

常温运输和保存，保存期限一年。

TIANDZ

丝状真菌线粒体 DNAout

Filamentous Fungal Mitochondrial DNAout

使用手册 V1.1

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

<p>产品及特点</p>	<p>线粒体是重要的、负责能量产生的极其重要的细胞器。对丝状真菌线粒体进行生化、遗传和分子生物学研究都需要先进行线粒体纯化。本产品就是基于密度梯度离心的，专门用于从丝状真菌叶片中纯化完整线粒体、再从中纯化线粒体 DNA 的试剂盒。它具有下列特点：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 即用型试剂盒，用户不需要单独配制各种溶液。 2. 所得线粒体可用于后续的 SDS-PAGE、Western、ELISA、蛋白组分析、线粒体 DNA 和线粒体 RNA 纯化。 3. 本产品足够 15 次线粒体纯化和 15 次线粒体 DNA 提取，每次可处理 10-20g 菌丝体，能得到 1-5 mg 左右线粒体。 4. 已经成功用于 <i>Aspergillus candidus</i>、<i>Aspergillus nidulans</i>、<i>Magnaporthe oryzae</i>、<i>Neurospora crassa</i>、<i>Penicillium chrysogenum</i>、<i>Rhizopus stononifer</i> 等丝状真菌。 																											
<p>规格及成分</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="512 898 908 972">成 份</th> <th data-bbox="908 898 1102 972">编 号</th> <th data-bbox="1102 898 1398 972">15 次大盒包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="512 972 908 1037">溶液 A</td> <td data-bbox="908 972 1102 1037">130831a</td> <td data-bbox="1102 972 1398 1037">250 mL×2</td> </tr> <tr> <td data-bbox="512 1037 908 1102">成分 B</td> <td data-bbox="908 1037 1102 1102">130831b</td> <td data-bbox="1102 1037 1398 1102">150 g(干粉)</td> </tr> <tr> <td data-bbox="512 1102 908 1167">溶液 C</td> <td data-bbox="908 1102 1102 1167">130831c</td> <td data-bbox="1102 1102 1398 1167">120 mL</td> </tr> <tr> <td data-bbox="512 1167 908 1232">带柄尼龙滤膜</td> <td data-bbox="908 1167 1102 1232">130831d</td> <td data-bbox="1102 1167 1398 1232">1 个</td> </tr> <tr> <td data-bbox="512 1232 908 1296">通用线粒体 DNAout 溶液 A</td> <td data-bbox="908 1232 1102 1296">130831e</td> <td data-bbox="1102 1232 1398 1296">10 mL</td> </tr> <tr> <td data-bbox="512 1296 908 1361">通用线粒体 DNAout 溶液 B</td> <td data-bbox="908 1296 1102 1361">130831f</td> <td data-bbox="1102 1296 1398 1361">5 mL</td> </tr> <tr> <td data-bbox="512 1361 908 1420">使用手册</td> <td data-bbox="908 1361 1102 1420">130831sc</td> <td data-bbox="1102 1361 1398 1420">1 份</td> </tr> </tbody> </table>				成 份	编 号	15 次大盒包装	溶液 A	130831a	250 mL×2	成分 B	130831b	150 g(干粉)	溶液 C	130831c	120 mL	带柄尼龙滤膜	130831d	1 个	通用线粒体 DNAout 溶液 A	130831e	10 mL	通用线粒体 DNAout 溶液 B	130831f	5 mL	使用手册	130831sc	1 份
成 份	编 号	15 次大盒包装																										
溶液 A	130831a	250 mL×2																										
成分 B	130831b	150 g(干粉)																										
溶液 C	130831c	120 mL																										
带柄尼龙滤膜	130831d	1 个																										
通用线粒体 DNAout 溶液 A	130831e	10 mL																										
通用线粒体 DNAout 溶液 B	130831f	5 mL																										
使用手册	130831sc	1 份																										
<p>运输及保存</p>	<p>常温运输和保存，保存期限一年。</p>																											
<p>自备试剂</p>	<p>去离子水、氯仿、异丙醇、75%乙醇、TE。</p>																											
<p>使用方法</p>	<p>注意：纯化 DNA 提取用的线粒体的要求比纯化功能研究用的线粒体的要求要低，但整个操作还是最好在冰上或者在冷室进行，所用器皿和溶液最好在 4℃ 预冷，离心最好要在 4℃ 进行，离心力以 g 而不是 rpm 计算。</p> <p>一：菌丝的摇瓶培养</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 使用合适的丝状真菌培养基，接种孢子至终浓度为 2×10^6/mL。一般 100 mL 液体培养基可以得到 0.8-1.2g 菌丝体，而本方法一次可以处理 10-20g 菌丝体，故最好一次培养 1-2 升。 2. 在合适的温度（如 25℃、30℃ 或 37℃，根据真菌不同而不同）250rpm/min 																											

摇晃培养 16-20 小时。

3. 用多层纱布或多层过滤纸过滤收集菌丝，用冰浴的自备去离子水洗涤菌丝三次去除残留的培养基。
4. 用吸水纸吸干菌丝的水分，称重后立即使用。如果在 -80°C 或液氮长期放置，线粒体回收效率将减低。

二：线粒体粗提液的制备

5. 制备溶液 A 工作液：每次提取需 150mL 溶液 A 工作液，制备方法是将 20mL 溶液 A 和 130mL 自备去离子水混合，冰上预冷即可。
6. 在 200mL 烧杯中，加入 100mL 预冷的溶液 A 工作液，再加入新制备的菌丝体，然后全部转移到 Waring 匀浆机（家用果汁匀浆机）中，低速匀浆 10 秒，避免起泡沫。用玻璃棒把菌丝按入匀浆机底部后，再低速匀浆 10 秒。注意：还可以选择 Dounce 玻璃匀浆器，Polytron 匀浆机和研磨（加玻璃珠）等方法，但它们单次处理量一般都较小，需多份处理再汇集。
7. 用带柄尼龙滤膜过滤匀浆液，用预冷的 200 mL 量筒收集穿透液。
8. 将剩下的菌丝体转移到 Waring 匀浆机中，再加入 40 mL 预冷的溶液 A 工作液，低速匀浆 10 秒，用上步的带柄尼龙滤膜过滤，用预冷的 200 mL 量筒收集穿透液。注意：带柄尼龙滤膜后可反复使用。
9. 将穿透液分到 4 个预冷的 50 mL 的塑料离心管中（每个约 35 mL）。
10. 在水平转子离心机上 4°C 4000 g 离心 10 分钟，小心转移上清（含线粒体的部分）到 4 个新的离心管中。沉淀含细胞核和未裂解的细胞，可以弃之不用。如果要用于纯化细胞核 DNA，则可以放 -80°C 长期保留。
11. 将含上清液的 4 个离心管在 4°C 10000 g 离心 20 分钟。
12. 每个离心管中加 2.5mL 预冷的溶液 A 工作液重悬线粒体沉淀并汇集（共约 10 mL），此为线粒体粗提液。
13. 如果直接用线粒体粗提液提取线粒体 DNA，容易有细胞核 DNA 污染。具体步骤是：在水平转子离心机上 4°C 10000 g 离心 7 分钟，小心弃上清，沉淀为线粒体，直接用于第三步的线粒体 DNA 提取。
14. 如果需要高纯度、无污染的线粒体 DNA，则需要用密度梯度离心法将完整的线粒体和其他细胞碎片进一步分离。具体见下步线粒体精提液的制备。

三：线粒体精提液的制备（密度梯度离心法）

15. 制备重液和轻液：将 4.1 克成分 B 干粉加到 6.3 mL 溶液 C 中，充分摇晃混匀

	<p>得 10 mL 重液。将 4.1 克成分 B 干粉加到 6.3 mL 去离子水中，充分摇晃混匀得 10mL 轻液。</p> <p>16. 在 50 mL 塑料离心管中先加入 10 mL 重液，再在其上轻轻加上 10 mL 轻液，最后加上第 11 步所得的约 10 mL 线粒体粗提液。</p> <p>17. 加平衡离心管后在水平转子冷冻超速离心机上 4℃ 43000 g 离心 2 小时，重液和轻液间的带为完整线粒体。</p> <p>18. 用广口吸管小心将线粒体转移到新的离心管中，加入等倍体积的预冷的溶液 C，轻柔混匀。取少量在相差显微镜下检查线粒体完整性。</p> <p>19. 在水平转子离心机上 4℃ 19000 g 离心 20 分钟，小心将上清吸出后，线粒体沉淀可以直接用于 DNA 提取。</p> <p>四：线粒体 DNA 提取</p> <p>20. 将 600 uL 通用线粒体 DNAout 溶液 A 加入到上步得到的线粒体沉淀中并吹打混匀，然后转移到 1.5 mL 离心管中。</p> <p>21. 65℃放置 5 分钟。</p> <p>22. 加入 300 uL 通用线粒体 DNAout 溶液 B，震荡混匀 10-30 秒。注意：溶液 B 非常粘稠，可以将其预热到 65℃并剪掉一截枪头后再取。</p> <p>23. 加入 200 uL 自备的氯仿，震荡混匀 10-30 秒。</p> <p>24. 12,000 g 室温离心 3 分钟。此时上清液将变得透明，中间层有白膜。</p> <p>25. 小心转移上清液（约 0.8 mL）到一个新的 1.5 mL 离心管中，避免触及中间层的白膜，可留少量上清不取。</p> <p>26. 加入 1 倍体积的自备异丙醇，颠倒 30 次混匀。</p> <p>27. 12,000 g 室温离心 5 分钟，小心弃上清液。</p> <p>28. 在离心管中加入 1 mL 自备的 75%乙醇，震荡 30 秒。</p> <p>29. 12,000 g 室温离心 1 分钟，小心弃上清液。</p> <p>30. 12,000 g 室温离心半分钟，残留液体将汇集在管底。</p> <p>31. 用洗液枪吸弃管底残留液（约 50 uL）。</p> <p>32. 加 50-100 uL 自备的 TE 缓冲液，溶解 DNA 沉淀即得线粒体 DNA 溶液。直接取 5-10 uL 电泳检测，其余放直接使用或放-80℃冰箱备用。</p>
<p>关联产品</p>	<p>柱式丝状真菌线粒体纯化试剂盒</p>