

天
净
沙
系
列

CAT#:80803-50

常温运输及保存

TIANDZ

柱式动物线粒体 DNA_{OUT}, PCR 级
Column Animal mtDNA_{OUT}

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 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 mtDNA 提取方法是先温和裂解细胞, 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。本方法克服了上述缺点, 具有下列优点:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 不需要单独纯化线粒体, 柱式法纯化, 操作简单快捷。 2. 得到的 mtDNA 可以直接用于 PCR。 3. 每 10^7 个动物细胞一般能得到 100ng 左右的 mtDNA, 每克组织一般能得到 3-5 ug mtDNA。 4. 注意: 本产品只适合于动物材料, 不适合于植物材料, 因为植物线粒体 DNA 一般都十分巨大, 非常难提。 																										
<p>规格及成分</p>	<table border="1" data-bbox="517 725 1342 1238"> <thead> <tr> <th>成份</th> <th>编号</th> <th>大扁盒包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>柱式动物线粒体 DNA 提取溶液 A</td> <td>80803A</td> <td>13 mL</td> </tr> <tr> <td>柱式动物线粒体 DNA 提取溶液 B</td> <td>80803B</td> <td>13 mL</td> </tr> <tr> <td>柱式动物线粒体 DNA 提取溶液 C</td> <td>80803C</td> <td>18 mL</td> </tr> <tr> <td>离心吸附柱</td> <td>60911</td> <td>50 套</td> </tr> <tr> <td>通用洗柱液</td> <td>60408</td> <td>50 mL</td> </tr> <tr> <td>DNA 洗脱液</td> <td>70705</td> <td>10 mL</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>80803sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>			成份	编号	大扁盒包装	柱式动物线粒体 DNA 提取溶液 A	80803A	13 mL	柱式动物线粒体 DNA 提取溶液 B	80803B	13 mL	柱式动物线粒体 DNA 提取溶液 C	80803C	18 mL	离心吸附柱	60911	50 套	通用洗柱液	60408	50 mL	DNA 洗脱液	70705	10 mL	使用手册	80803sc	1 份
成份	编号	大扁盒包装																									
柱式动物线粒体 DNA 提取溶液 A	80803A	13 mL																									
柱式动物线粒体 DNA 提取溶液 B	80803B	13 mL																									
柱式动物线粒体 DNA 提取溶液 C	80803C	18 mL																									
离心吸附柱	60911	50 套																									
通用洗柱液	60408	50 mL																									
DNA 洗脱液	70705	10 mL																									
使用手册	80803sc	1 份																									
<p>运输及保存</p>	<p>常温运输, 短期可以在室温放置; 长期保存最好放 4℃。</p>																										
<p>自备试剂</p>	<p>无</p>																										
<p>使用方法</p>	<p>一: 培养细胞预处理</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 用自备的 0.25% 胰酶消化液处理约 10^7 个培养细胞, 离心收集后弃上清。 2. 用 PBS 或 TBS 等缓冲液洗涤细胞两次, 离心得到的细胞沉淀直接用于 mtDNA 提取。 <p>二: 组织细胞预处理</p> <ol style="list-style-type: none"> 3. 用剪刀将 1g 新鲜的动物组织剪碎 (芝麻大小最好), 转移到 1.5mL 塑料离心管中, 用于 mtDNA 提取。注意: 最好不要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刺破, 使其 DNA 释放出来被胞浆中的 DNA 酶降解, 影响回收率。 <p>三: 血液预处理</p> <ol style="list-style-type: none"> 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 洗涤白细胞两次, 得到的白细胞沉淀用于 mtDNA 提取。 																										

四：mtDNA 提取

5. 在细胞沉淀或剪碎的组织中加入 250 uL 冰浴的溶液 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。
6. 加入 250 uL 常温的溶液 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），温和反复颠倒混匀 10 次。千万不要剧烈振荡。
7. 冰上放置 6-8 分钟。注意不要超过 8 分钟。
8. 加入 350 uL 冰浴的溶液 C，温和混匀 4-6 次，可见白色沉淀物产生，然后放冰上放置 20-25 分钟。
9. 室温 12000-15000 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。
10. 静置 5 分钟以让 DNA 与离心吸附柱充分结合，此步十分重要。
11. 室温 12000-15000 g 离心 1 分钟，弃收集管中的废液。
12. 加入 500 uL 的通用洗柱液，室温 12000-15000 g 离心 1 分钟，弃收集管中废液。注意：通用洗柱液中含乙醇，用后需要将盖拧紧存放，否则乙醇会挥发。
13. 重复上步 1 次。
14. 室温 12000-15000 g 离心 1 分钟，甩干残留液体。此步不能省略，否则残留乙醇会影响 DNA 的后续使用（如 DNA 上样时不能沉淀到加样孔中）。
15. 将离心吸附柱置于一个新的 1.5 mL 塑料离心管中，加入 30-50 uL 65-80℃预热的 DNA 洗脱液，室温放置 2 分钟。常温的 DNA 洗脱液也可以用于洗脱，但产量稍微有所降低。
16. 室温 12000-15000 g 离心 1 分钟，离心管底溶液即 mtDNA。
17. 由于本公司离心吸附柱结合 DNA 能力较强，如果再加 30-50 uL DNA 洗脱液到离心吸附柱中，往往还能洗脱下很多 mtDNA（相当于第一次洗脱的 20-30%），但注意不要使用上步得到的 mtDNA 溶液来洗脱。
18. 12000-15000 g 离心 1 分钟，离心管底溶液即线粒体 DNA。每 10⁷ 个动物细胞一般能得到 100ng 左右的 mtDNA，每克组织一般能得到 3-5 ug mtDNA。如果 DNA 需要浓缩，可以使用本公司的核酸浓缩剂。
19. 由于 DNA 机械断裂，电泳时 DNA 可能不呈现专一的带，但此 mtDNA 溶液可以直接用于 PCR。

关联产品

核酸浓缩剂（CAT#: 110801-30）

背景资料

线粒体

线粒体是合成 ATP 和脂肪酸的细胞器，每个细胞有多个线粒体，每个线粒体有多个线粒体基因组，例如每个酿酒酵母(*S. cerevisiae*)细胞里有 20 多个线粒体，人淋巴细胞有数个，肝细胞有 500-2500 个，卵母细胞有上千个。除少数低等真核生物线粒体基因组为线状 DNA 外，其他生物线的线粒体基因组都是环状 DNA。线粒体基因组缺乏组蛋白，故无核小体。哺乳动物的线粒体基因 DNA 没有内含子，几乎每一对核苷酸都参与一个基因的组成，有许多基因的序列是重叠的。不同物种的线粒体基因组的大小相差悬殊，在动物中的趋势是物种越高等，mtDNA 越小。常见物种 mtDNA 的大小列表：

物种	mtDNA 大小 (KB)	例子
脊椎动物	15.7-17.5	小鼠为 16,295bp; 人类为 16,569bp
昆虫	14.5-17.9	
原虫	18.5-40.0	
真菌	18.9-95.0	酵母为 75Kb, 曲霉为 32Kb
藻类	15.0-18.0	
高等植物	120-2700	玉米 mtDNA 为 600 Kb

人 mtDNA 只有 D 环区(D-loop, 参与复制启动)和另外 87 个 bp 不是编码基因外，其余序列共编码 13 个蛋白质 (细胞色素 b、细胞色素氧化酶的 3 个亚基、ATP 酶的 2 个亚基以及 NADH 脱氢酶的 7 个亚基)、24 个 rRNA (包括 1 个 16SrRNA、1 个 12SrRNA 和 22 个 tRNA)。人类的神经肌肉变性疾病如 Leber 氏遗传性视神经病、帕金森病、早老痴呆症、线粒体脑肌病、母系遗传的糖尿病和耳聋等都同线粒体基因有关。与细胞核 DNA 相比，mtDNA 具有下列特点：①突变率高，是核 DNA 的 10-100 倍左右，有利于检查出在较短时期内基因发生的变化，有利于比较不同物种的相同基因之间的差别，确定这些物种在进化上的亲缘关系；②母性遗传(maternal inheritance)，这是由于动物精子的细胞质极少，子代 mtDNA 基本上都是来自卵细胞，因此具有相同 mtDNA 序列的个体必定是来自一位共同的雌性祖先。