

天
净
沙
系
列

CAT#:180702-5
常温运输和保存

TIANDZ

柱式植物线粒体DNAout

Column Plant Mitochondria DNAout

使用手册 V1.3

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

产品及特点

植物线粒体是重要的植物细胞器,负责 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。对植物线粒体进行遗传研究需要进行线粒体 DNA 纯化。本产品就是专门用于植物细胞线粒体 DNA 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。
2. 提供粗提和精提两种操作方案,粗提利用常规台式冷冻离心机的差速分离原理进行线粒体粗提,所得线粒体含少量其他细胞器污染,可用于后续的 PCR 级别的线粒体 DNA 提取。
3. 精提利用冷冻超速离心(离心力达 40000g)制备的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,适用于后续的测序级别的线粒体 DNA 提取。
4. 本产品足够 5 次提取,每次可处理 10g 绿色植物组织(可得 1-2.5 mg 左右线粒体)或 20g 非绿色植物组织(可得 2-5 mg 左右的线粒体)。

规格及成分

成分	编号	大纸盒包装
植物线粒体提取匀浆液	111208a	250 mL
植物线粒体提取洗涤液	111208b	250 mL×2
植物线粒体提取离心介质溶液	111208c	150 mL
Percoll	17-0891-09	50 mL
BSA 干粉	9048-46-8	10g
带柄尼龙筛	111208d	1 个
软毛笔	111208e	1 只
詹纳斯绿 B 染色液 (0.2%)	111207d	1 mL
DNase A 干粉	101004a	1 mg
细胞器 DNA 纯化溶液 A	180702a	3 mL
细胞器 DNA 纯化溶液 B	180702b	750 uL
使用手册	180702sc	1 份

运输及保存

常温运输和保存,保存期限一年。

自备试剂

超纯水、5 M KOH (调 pH 用), 25mM MgCl₂ 溶液、0.5M EDTA 溶液、氯仿、异丙醇、75%乙醇、TE 缓冲液或超纯水。

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：选择植物组织

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/10g	如土豆，红薯等
黄化苗（下胚轴、子叶、胚芽鞘）	2-5 mg/10g	多酚含量低于叶片
有光合作用的叶片和子叶	1-2.5 mg/10g	需放置在暗处 3 天

2. 一般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，否则淀粉颗粒将干扰线粒体的纯化。

3. 一次实验需要 10g 绿色植物组织（或 20 g 干净的非绿色植物组织）、40 mL 匀浆液、约 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式是一次性将 9.8g = 8.7mL Percoll 加入到 26.3mL 本试剂盒提供的离心介质溶液中，充分混匀后得到 35mL 密度梯度离心介质）。上述三种溶液用前均需要加入 BSA 干粉使其终浓度为 0.1%（100mL 溶液加 0.1g BSA 干粉，轻柔颠倒混匀或搅拌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，否则容易长菌。

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、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 0.1% BSA）中，在浸泡状态下剪成 1cm² 大小的碎片。注意：处理样品量太大的话线粒体产率会急剧降低，所以如果同一样品太多可分成多组平行处理，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 KOH 将 pH 调到 7.0 以上才进入下一步。

6. 用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。带柄尼龙筛可以洗干净后可以反复使用。

7. 在低速固定角度冷冻离心机上 4℃ 1000 g 离心 5 分钟，沉淀为未破碎的细胞、破碎细胞的碎片、细胞核和淀粉颗粒，上清含线粒体。小心转移上清到新的预冷的 50mL 塑料离心管中。
8. 将装上清的离心管在水平冷冻离心机上 4℃ 12,000 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。有时沉淀底部还有白色的淀粉沉淀，属于正常现象。
9. 加入 10 mL 预冷的洗涤液（已加 0.1% BSA，下同）中，用软毛笔轻柔重悬线粒体沉淀。不能剧烈震荡，否则线粒体容易破裂。
10. 将线粒体重悬液转移到新的 50mL 离心管中，再加入 30mL 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 50mL 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%。
12. 在沉淀中加入 2 mL 预冷的洗涤液。用软毛笔轻柔重悬，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。线粒体粗提液中线粒体的回收率一般在 45-75%。
13. 在显微镜下检测上一步重悬液中线粒体的完整性。具体做法是先滴 50uL 左右的线粒体重悬液到载玻片上，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。
14. 所得线粒体粗提液含其他细胞器（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 DNA 完整性在几年内都不会发生变化。

三：细胞核 DNA 的去除（纯化测序级的线粒体 DNA 才需要进行此操作）

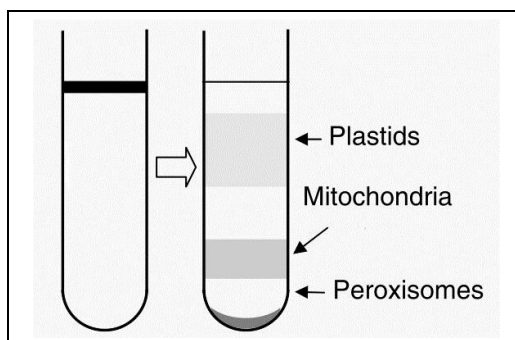
15. 预留 50uL 线粒体粗提液做对照，在约 2 mL 剩余的线粒体粗提液中加入 40 uL 25mM 自备的 MgCl₂，再加入 0.2mg DNase 干粉，混匀后冰上放置 60 分钟降解 DNA。取少量样品（如 50uL）在 PCR 仪器中加热到 95℃ 变性 10 分钟灭活 DNase，再取其中的 10uL 和 10uL 预留的样品一起进行细胞核基因专一性 PCR（需要用户自己设计引物和自备 PCR 试剂），如果 DNase 处理过的样品没有扩增，而预留样品有扩增，则表明 DNA 去除比较干净（达到 PCR 检测的极限），则进入下一步。如果未去除干净，则继续在冰上放置，直到 PCR 检测不到细胞

核 DNA。

16. 加入 0.32 mL 预冷的自备 0.5M 的 EDTA 溶液和 40mL 预冷的洗涤液。
17. 4℃ 1000 g 离心 5 分钟,将上清转移到新的预冷的 50mL 离心管中,4℃ 12000 g 离心 20 分钟,沉淀为去除细胞核 DNA 的线粒体。重悬在 2mL 洗涤液中。
18. 在显微镜下检测上一步得到的重悬液中线粒体的完整性。具体做法是先滴 50uL 左右的线粒体重悬液到载玻片上,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。

四：线粒体精提操作方案（需要 40000g 的超速冷冻离心机）

19. 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（配制方法见第三步，用前需先加 0.1% BSA）。
20. 将 2 mL 线粒体粗提物重悬液铺在密度梯度离心介质上。
21. 在超速水平离心机上 4℃ 40,000 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：



22. 用广口吸管（可将 1 mL 蓝枪头中间剪断后使用）收集线粒体带,注意避开其上的质体带过氧化物酶体沉淀,估计所取含线粒体溶液的体积。
23. 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。
24. 转入 50 mL 塑料管离心管中,在冷冻离心机上 4℃ 15,000 g 离心 20 分钟,沉淀为线粒体。可以直接进入第 25 步进行 DNA 提取。如果暂时不提取 DNA,则把线粒体沉淀放-80℃保存。

五：线粒体 DNA 的提取

25. 在线粒体沉淀中加入 600 uL 65℃预热的细胞器 DNA 提取溶液 A,用移液枪充分吹打均匀。
26. 再加入 150 uL 65℃预热的细胞器 DNA 提取溶液 B,颠倒数次混匀。此时溶液中可能有白色丝状悬浮物产生。由于溶液 B 比较粘稠,可以采取称量方法取用,150 uL 约等于 150-160 mg。也可以将 1 mL 枪头剪去一截再吸取。

27. 65°C放置 5 分钟。不能室温放置，否则 DNA 产量会降低 10-20%。
28. 加入 200 uL 自备氯仿，涡旋震荡混匀 30 秒，此时溶液将呈乳白色。
29. 14000 g 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，避免触及中间层的白膜。
30. 加入 1 倍体积(约 750 uL)的异丙醇到上清液中，用手上下颠倒 30 秒混匀。此时一般将有絮状 DNA 沉淀出现。
31. 14000 g 室温离心 3 分钟。此时管底将有微小 DNA 沉淀，小心弃上清，注意不要丢弃 DNA 沉淀。
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. 重复上述 75%乙醇洗涤操作一次。
34. 短暂离心，小心吸弃残留的液体（约 50 μ L）。此步不要省略，否则残留的液体（含乙醇）将会影响 DNA 电泳、酶切很 PCR 等反应。
35. 立即加入 50-100 μ L TE 缓冲液或超纯水充分溶解线粒体 DNA 沉淀。
36. 直接取 5-10 uL 电泳检测 DNA，再测 OD 计算浓度和纯度，其余样品放-20°C 保存备用。

关联产品

动物线粒体纯化试剂盒(CAT#:111113-5)