

血液线粒体DNA提取试剂盒

产品货号：26857

产品规格：50T

产品简介：

本试剂盒可用于从人或者哺乳动物外周血中分离出完整而纯化的线粒体DNA。

线粒体DNA提取的关键是尽可能的去掉核DNA。本试剂盒利用差速离心得到比较纯净的线粒体，再利用DNA酶消化和裂解缓冲系统等多步骤去掉核DNA，最后得到纯净的线粒体DNA。可用于PCR等对纯度要求较高的实验。

产品组成：

产品名称	50T	保存条件
DNase I	12mg	-20°C
RNase A	0.5ml	-20°C
红细胞裂解液（10×）	100ml	室温
细胞裂解液	50ml	2-8°C
线粒体清洗液	25ml	2-8°C
DNA酶反应液	6ml	2-8°C
线粒体裂解液	10ml	室温
蛋白沉淀液	7.5ml	2-8°C
核酸助沉剂	0.5ml	2-8°C
TE缓冲液	25ml	2-8°C

本试剂盒整体保存于2-8°C一年，DNase I和RNase A -20°C保存。使用前，在DNase I中加入600μL（50T）的DNA酶反应液，分装后-20°C保存三个月，如果超过三个月，活性可能会降低，请自行订购DNase I。线粒体裂解液使用前常温保存，如有沉淀可37°C水浴溶解，不影响使用。

操作步骤：

准备工作：在DNase I中加入600μL（50T）的DNA酶反应液，适当分装后-20°C保存。红细胞裂解液（10×）用双蒸水稀释10倍成工作液。线粒体裂解液保存于常温，如有沉淀37°C水浴溶解，离心机温度下降到4°C（2-8°C），如无低温离心机，也可以常温离心，并将离心时间为10min的改为5min，但最后所得DNA品质及产量可能会有一定影响。

1. 血液处理：

血液要求：EDTA抗凝外周血，最好使用新鲜血液。对于陈旧血液，由于冻凝过程中冰晶已经对细胞核膜和线粒体膜产生损伤，所以线粒体DNA得率会大大减少。取外周血约3-5ml（适当分成几管），加入3倍体积的红细胞裂解液（稀释后的工作液），混匀，800×g 5min离心收集白细胞。加入1-2红细胞裂解液（稀释后的工作液），吹打重悬白细胞，合并于一管中，800×g 5~10min离心收集白细胞。此时如果白细胞有可见红色，可再次用少量红细胞裂解液洗细一次。

2. 在收集到的白细胞中，加入1.0mL冰预冷的细胞裂解液重悬细胞，将细胞悬液转移到小容量玻璃匀浆器内，0°C冰浴研磨20~40次。

3. 匀浆物转移到离心管，4°C，1000×g离心5min。

4. 取上清，加入一新的离心管中，4°C，1000×g再次离心5min（一共两次离心，完整去核）。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

5. 取上清，加入一新的离心管中，4°C，12,000 ×g离心10min。离心后的上清含胞浆成分，可从中提取胞浆蛋白。将上清转移到新离心管，线粒体沉淀在管底。
6. 在线粒体沉淀中加入0.5mL线粒体清洗液重悬线粒体沉淀，4°C，1000×g离心5min。
7. 取上清，加入一新的离心管中，4°C，12,000×g离心10min。弃上清，高纯度的线粒体沉淀在管底。
8. 加入100μL DNA酶反应液重悬线粒体，吹打均匀后，再加入10μL DNase I溶液（见准备工作），混匀，37°C水浴10min。此步为消化线粒体表面吸附的核DNA。4°C，12,000×g离心5min。尽可能的弃上清，再加入200μL TE重悬线粒体沉淀，4°C，12,000×g离心5min，洗去残留的DNA酶。
9. 得到的沉淀，用200μL TE缓冲液重悬线粒体沉淀，加入10μL RNase A。加入200μL线粒体裂解液，轻轻混匀（不可吹打），放置1-2min，再加入150μL蛋白沉淀液，迅速混匀。4°C，12,000×g离心5min。此步骤可进一步去除核DNA。
10. 取上清，加入一新的离心管中（如用于酶切分析，可加入此步：选用等体积的酚氯仿异戊醇25:24:1抽提一次，再用氯仿抽提一次，或者直接用氯仿抽提两次，一般来说，此步可去掉一些微量蛋白及糖类，但会造成线粒体DNA的损失，因而用于PCR时可省，并不影响后续实验），加入0.6倍体积的异丙醇（如无异丙醇，可加入2.5倍体积的乙醇沉淀DNA，如离心管太满可分两管）及5-10μL核酸核酸助沉剂，混匀，-20°C沉淀半小时左右（此步可省），4°C，12,000×g离心10min。
11. 弃上清，再加入1ml 70%乙醇清洗，4°C，12,000 × g离心5min。重复用70%乙醇洗一次。
12. 弃上清，再次离心1min吸弃上清，不要碰到管底，开盖凉干约5-10min。
13. 加入10-20μL TE缓冲液，轻弹管底，37°C水浴5分钟，线粒体DNA溶解。
14. 进行DNA检测及-20°C保存，进行下步的实验。

注意事项:

1. 为保证获得完整及尽可能多的线粒体，匀浆条件要示：第一是全程低温操作。第二是快速。第三，如有条件可将匀浆后的碎片在显微镜下观察。
2. 线粒体DNA本身含量很低，如果电泳检测不到，可加大上样量，用更少量的TE溶解沉淀，或者直接进入PCR检测。
3. 以离心力g计算正确的离心速度，不同的离心机可据此精确计算离心速度。

附：一般低温度离心机都有离心力显示，如果没有，可以用以下公式简单的换算。

转速与离心力换算

$$G=1.11 \times (10^{-5}) \times R \times [\text{rpm}]^2$$

G为离心力，一般以g（重力加速度）的倍数来表示；

[rpm]² 即：转速的平方； R为半径，单位为厘米。

有效期：12个月。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com