



Fungus Mitochondrial DNA Extraction Kit (Spin Column)

真菌线粒体 DNA 快速提取试剂盒(离心柱)

说明书

【产品简介】

线粒体是存在于绝大多数真核细胞内的一种基本的重要的细胞器。它是细胞进行氧化磷酸化的场所。线粒体基因组不仅是研究 DNA 结构与复制转录的良好模型,也是研究真核细胞核酸与蛋白质合成非常合适的模型系统。本试剂盒提供了一套方便的工具从各种细胞和组织中提取 MTDNA,产量高,纯度高,不污染基因组 DNA。纯化的 MTDNA 可用于多种研究,比如酶处理分析、Southern blotting、克隆、PCR 分析以及扩增等。

【试剂盒组成】

试剂盒组成	LG-0110A(50 次)	LG-0110B (100 次)
裂解液 PLB	36ml	72ml
RNase A(10mg/ml)	500µl	1ml
溶液 MTA	12ml	24ml
溶液 MTB	24ml	48ml
溶液 MTC	18ml	36ml
漂洗液 WB	12ml	24ml
洗脱液 EB	2×2ml	4×2ml
离心纯化柱	50 个	100 个
说明书	1 份	1 份

【试剂运输及储存条件】

试剂运输可在室温环境下进行。储存时,溶液MTA加入RNase A后须置4℃保存,溶液MTC可置4℃保存,其余组分可保存在室温。

【自备实验器材】

试剂类: 异丙醇、无核酸酶水。

耗材类: 经无核酸酶水处理并高压灭菌(121℃, 30 分钟)的 2ml 和 1.5ml 离心管及 10µl、200µl、1000µl 吸嘴、一次性手套、口罩。

设备类: 电动匀浆机、各种规格的移液器、低温和常温台式离心机、震荡仪、研钵,手术刀,金属镊,水浴锅,冰盒。

【操作步骤】

1. 取适量真菌菌丝(200-500mg)用电子天平称量,放入液氮中研磨至粉末状。然后立即将该组织转移至加有 600µl 裂解液 PLB 的无核酸酶的离心管中,如仍有块状物质,用电动匀浆机在冰浴中匀浆组织约 15s 直到看不见明显的组织块。

注意: 处理标本前可以先往 PLB 中加入 1-4%巯基乙醇。

2. 用移液器吸打混匀,65℃水浴 30min,每隔 10 min 上下轻轻颠倒混匀。
3. 将上清液于4℃, 14000xg低温离心30min。
4. 弃上清,得到线粒体沉淀。往沉淀中加入150µl预冷的溶液MTA,用移液器吹散混匀沉淀。

注意: 请确认是否已经往溶液MTA中加入RNase A。

5. 将裂解物于37℃温水浴 1hr 以彻底除去RNA。



6. 往裂解物中加入300 μ l溶液MTB, 轻柔颠倒离心管10次混匀, 至于冰浴变性7min。
7. 加入 225 μ l 溶液 MTC, 轻柔颠倒离心管 10 次混匀, 至于冰浴复性 30min。
8. 4 $^{\circ}$ C, 12000xg 低温离心 6min。
9. 小心吸取上清至一新的离心管, 加入 0.6 倍体积的异丙醇, 用移液器吸打混匀。
10. 立即吸取 700 μ l 样品以及有可能形成的沉淀, 加入带有 2ml 收集管的离心纯化柱。轻盖盖子, 11,000 x g, 室温离心 15s, 弃尽废液。
11. 将剩余的样品转移至离心柱, 重复第 10 步。
12. 往离心柱中加入 500 μ l 漂洗液 WB, 轻盖盖子, 11,000 x g, 室温离心 15s, 弃尽废液。
注意: 第一次使用前请确认是否已经往WB 中加入适量无水乙醇。
13. 重复第12步, 用500 μ l 漂洗液WB再次洗涤离心柱, 最后一次洗涤后, 11,000 x g离心空柱1min干燥硅胶膜。
注意: 完全去除洗液对最后溶解是非常重要的, 洗液的残留会影响最终的洗脱。
14. 将离心柱转移至一新的无RNA酶的1.5ml离心管中, 往硅胶膜中央滴加60 μ l无核酸酶水, 轻盖管盖, 室温静置1min, 11,000 x g 离心1min洗脱RNA。
注意: 洗脱体积不宜小于50 μ l, 否则会影响洗脱效果。
15. 把洗脱液滴加回硅胶膜重复第14步洗脱。
16. 如需后续操作, 请始终将溶解的DNA至于冰上, 保存请置于-80 $^{\circ}$ C。
注意: 为增加 DNA 的得率, 洗脱液体积不应少于 50 μ l, 体积过小会影响回收效率, 洗脱液的 pH 值也对洗脱效率有很大影响, 若用 ddH₂O 洗脱液应保证 pH 7.0-8.5 范围内, pH 低于 7.0 会影响洗脱效率; DNA 需置于-20 $^{\circ}$ C保存, 以防止 DNA 降解。

【注意事项】

1. 操作时请使用一次性手套和口罩。
2. 第一次使用前请确认是否已经往漂洗液WB中加入适量乙醇。
3. 为增加洗脱效果, 可将洗脱液EB于65 $^{\circ}$ C水浴加热后使用。

【有效期】

本试剂盒有效期为12个月, 请在有效期内使用。

注: 本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。