FastPure Mitochondrial DNA Isolation Kit (Animal Tissue/Cell) Handbook
FastPure 动物组织/细胞线粒体 DNA 提取试剂盒说明书（离心柱型）

产品组成

FastPure Mitochondrial DNA Isolation Kit (Animal Tissue/Cell)		
产品编号	EK-6118-50T	EK-6118-100T
纯化次数	50 次	100 次
Buffer MSB	50mL	100mL
Buffer MPB	0.6mL	1.2mL
Buffer MWB	65mL	126mL
BSA 牛血清白蛋白干粉（组织用）	0.25g	0.5g
Buffer ATL	14mL	28mL
Buffer AL	12mL	24mL
Buffer AW1	19mL	37mL
Buffer AW2	13mL	26mL
Buffer EB	10mL	20mL
Proteinase K Solution (20mg/mL)	550μL	1.1mL
RNase A Solution (20mg/mL)	300μL	600μL
DNA Mini Columns	50 个	100 个
2mL Collection Tubes	50 个	100 个
使用手册	1 份	

产品介绍

本试剂盒采用"先分离、后裂解、再纯化"两段式流程：第一阶段通过差速离心从培养细胞或动物组织中快速富集完整线粒体，无需超速离心；第二阶段用蛋白酶 K 裂解线粒体，经高盐结合缓冲液处理后，利用硅胶膜吸附柱选择性结合 mtDNA，漂洗去除蛋白质、盐分等杂质，低盐缓冲液洗脱，获得高纯度、低核基因组污染的线粒体 DNA，可直接用于 mtDNA 拷贝数 qPCR、测序建库、酶切及 PCR 扩增等下游实验。

存储条件

本产品除 Proteinase K Solution 和 RNase A Solution 外，可在室温(15~25℃)保存 12 个月，低温下 Buffer ATL 可能会有沉淀形成，使用时需 55℃水浴让沉淀完全溶解。Proteinase K 溶液和 RNase A 溶液收到后请分装保存于-20℃。Buffer MSB/MPB/MWB 保存于 4℃。

需要额外准备的材料

- 无水乙醇（96%-100%）
- 无菌 1.5mL 离心管

开始前注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项：

- ☐ 样品应避免反复冻融，否则会导致提取的 DNA 片段较小且提取量下降。
- ☐ Proteinase K Solution 和 RNase A Solution 建议分装保存于-20℃，反复冻融会影响其活性。
- ☐ 小型高速离心机（~13000rpm）
- ☐ 水浴锅温度分别设置至 55℃。

开始前试剂准备

- ☐ 按瓶子标签所示，加入相应体积的无水乙醇稀释 Buffer AW1/AW2，于室温密封保存。

操作步骤:

I. 细胞/组织线粒体提取

A. 培养细胞样品预处理

（1）使用前立即添加蛋白酶抑制剂（自备）至试剂 A 和试剂 C 中；仅将抑制剂添加到当次使用量的试剂中，而不要添加到储备溶液中。

（2）在 2.0ml 微量离心管中以~850×g 离心 2 分钟，收获 2×10^7 个细胞的沉淀，小心吸除并丢弃上清液，所得细胞沉淀直接进入"线粒体分离通用流程"第 1 步。

B. 动物组织样品预处理（50-200mg）

（1）使用前立即添加蛋白酶抑制剂（自备）至试剂 A 和试剂 C 中；仅添加到当次使用量中。洗涤缓冲液配制：将试剂 C 与纯水 1:1 混合摇匀（如需 1ml 洗涤缓冲液，取 0.5ml 试剂 C 加入 0.5ml 纯水混匀即可，供通用流程第 7 步使用）。

（2）取 50-200mg 组织于 PBS 中切碎，使用匀浆机破碎组织关联，操作中应尽量减少细胞破裂。硬组织（如心脏）可先在含 0.3mg/ml 胰蛋白酶的 PBS 中切成小块，冰上孵育 3 分钟后，4℃、700×g 离心 1 分钟，弃上清并收集组织颗粒，加入 800μL 含 4mg/ml BSA 的 PBS，使用 Polytron 或 Dounce 匀浆器研磨。

（3）组织匀质物 4℃、1000×g 离心 3 分钟，小心吸除并丢弃上清液，所得组织沉淀进入"线粒体分离通用流程"第 1 步（该步骤中另需补加 BSA 干粉至终浓度 4mg/ml）。

C. 线粒体分离通用流程（细胞、组织沉淀通用）

以下步骤适用于经 A 或 B 预处理获得的沉淀，操作完全相同，仅第 1 步、第 7 步因样本来源略有差异（见括号内说明）。

1. 加入 800μL 线粒体分离试剂 A(组织样本需另补加适量 BSA 干粉至终浓度 4mg/ml)，中速涡旋 5 秒，将试管置于冰上孵育 2 分钟。
2. 加入 10μL 线粒体分离试剂 B，最大速度涡旋 5 秒。
3. 将试管置于冰上孵育 5 分钟，孵育过程中每分钟以最大速度涡旋数秒。
4. 加入 800μL 线粒体分离试剂 C，倒置试管数次混匀（不要涡旋）。
5. 将离心管 4℃、700×g 离心 10 分钟。
6. 将上清液转移至新的 2.0ml 离心管中，4℃、12,000×g 离心 15 分钟。
7. 将上清液（胞质部分）转移至新管中弃去，沉淀即为富集的线粒体。
8. 细胞样本：加入 500μL 线粒体分离试剂 C 重悬沉淀；组织样本：加入 500μL 洗涤缓冲液（配制见预处理 B-1）重悬沉淀。随后 12,000×g 离心 5 分钟，弃去上清液，所得沉淀即为纯化后的线粒体，用于后续 DNA 裂解步骤。

注意：孵育时间不要超过 2 分钟，以避免损害线粒体完整性；如需获得更纯的线粒体组分、减少>50%溶酶体和过氧化物酶体污染，可将第 6 步离心条件改为 3000×g、15 分钟；线粒体沉淀应尽快进入下一步裂解，冻融可能损害其完整性。

II. 线粒体 DNA 提取纯化

1. **向线粒体沉淀中加入 200μL 线粒体裂解液，充分振荡悬浮沉淀，确保无明显团块。**
2. **加入 20μL 蛋白酶 K（20mg/ml），涡旋混匀。**
3. **（可选）加入 4μL RNase A（20mg/ml），涡旋混匀，室温放置 2 分钟以去除 RNA 污染。**
4. **置于 56℃金属浴或水浴中孵育 10-30 分钟至裂解液变澄清；若样本量较大或裂解不完全，可延长孵育时间至 1 小时，期间间歇涡旋混匀。**
5. **加入 200μL 结合缓冲液，充分涡旋混匀约 15 秒。**
6. **加入 200μL 无水乙醇（96%-100%，自备），充分涡旋混匀约 15 秒；此时溶液中出现少量白色絮状物属正常现象。**
7. **将上一步所得混合液（含絮状物）全部转移至套有收集管的 DNA 纯化吸附柱中，室温 12,000×g 离心 1 分钟，弃流出液及收集管，将吸附柱置于新收集管中。**
8. **向吸附柱中加入 500μL 漂洗液 1 (首次使用前须按标签说明加入指定体积的无水乙醇），室温 12,000×g 离心 1 分钟，弃流出液，吸附柱放回收集管。**
9. **向吸附柱中加入 500μL 漂洗液 2 (首次使用前须按标签说明加入指定体积的无水乙醇），室温≥13,000×g 离心 3 分钟，弃流出液。**
10. **将吸附柱开盖，室温放置 2-3 分钟，或以≥13,000×g 空甩离心 1 分钟，彻底去除膜上残余乙醇。**
11. **将吸附柱转移至干净的 1.5ml 离心管中，于膜中央加入 30-100μL 洗脱缓冲液，室温静置 1-5 分钟，12,000×g 离心 1-2 分钟，收集管中的液体即为线粒体 DNA。**