

## 真菌基因组DNA快速提取试剂盒

货号：DD104-01

规格：50次

保存：15-25 °C

### 【产品概述】

本产品采用DNA吸附柱和新型独特的溶液系统，适合从真菌组织细胞中快速简单地提取基因组DNA。可在30分钟内完成一个或多个100mg新鲜或20mg干燥的真菌样品DNA的纯化工作。提取过程无需用酚氯仿等有机物抽提，也无需异丙醇或乙醇沉淀，并能快速高效地去除多糖类、酚类和酶抑制物等杂质，纯化的DNA可直接用于PCR、酶切和杂交等实验。

新鲜或干燥的真菌组织（细胞）磨碎后经裂解液裂解；蛋白质、多糖、细胞残片被沉淀去除；基因组DNA在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜，再通过一系列快速的漂洗—离心的步骤，进一步将多糖、多酚、细胞代谢物、蛋白等杂质去除，在低盐洗脱缓冲液作用下得到纯净的基因组DNA。

### 【产品组分】

货号	组分	储存	体积
DD104-101	RNase A (10mg/ml)	-20°C	250 ul
DD104-102	缓冲液A1	室温	20 ml
DD104-103	缓冲液A2	室温	7 ml
DD104-104	缓冲液A3 (首次使用前按说明加指定量无水乙醇)	室温	15 ml
DD104-105	漂洗液WB (首次使用前按说明加指定量无水乙醇)	室温	13ml
DD104-106	洗脱缓冲液EB	室温	15 ml
DD104-107	吸附柱AC&收集管	室温	50套

### 【保存条件】

室温（15-25°C）保存，保质期一年。

### 注意事项：

1. 缓冲液A1、A3低温时可能出现析出和沉淀，可以在65°C水浴几分钟帮助重新溶解（A3加入乙醇前可加热，加入乙醇后不可加热），恢复澄清透明后冷却到室温即可使用。
2. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

### 【产品特点】

1. 本产品不需要使用苯酚，不需要乙醇沉淀。
2. 快速，简捷，单个样品操作可在1小时内完成。
3. 数种去多糖、多酚成份和多次柱漂洗确保高纯度， $OD_{260}/OD_{280}$ 比值达1.7~1.9，可直接用于PCR，Southern-blot和各种酶切反应。

### 【实验准备】

1. 所有的离心步骤均在室温完成，使用转速可以达到13,000 rpm的台式离心机。
2. 开始实验前将需要的水浴先预热到65°C备用。
3. 缓冲液A3中含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，避免沾染皮肤，眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。

4. 不同来源的真菌组织细胞材料中提取DNA 的量会有差异，一般100mg新鲜组织典型产量可达3-25  $\mu$ g。
5. 洗脱液EB不含有螯合剂EDTA，不影响下游酶切、连接等反应。也可以使用水洗脱，但应该确保pH大于7.5，pH过低影响洗脱效率。用水洗脱DNA应该保存在-20℃。DNA如果需要长期保存，可以用TE缓冲液洗脱（10mM Tris-HCl，1mM EDTA，pH 8.0），但是EDTA可能影响下游酶切反应，使用时可以适当稀释。
6. 真菌种类复杂，没有一种试剂盒可以提取所有种类的真菌DNA。如果有的真菌多糖多酚含量过于丰富、次级代谢产物太复杂导致本试剂盒效果不佳，可以选择本公司的CTAB法植物DNA提取试剂盒提取真菌，一般该试剂盒对于多糖多酚次级代谢产物复杂的真菌DNA提取效果良好。

#### 【操作步骤】

**提示：**（1）首次使用前请在漂洗液WB和缓冲液A3中加入指定量无水乙醇，充分混匀，加入后请及时标注，以免重复。

1. 取适量真菌组织在研钵中加入液氮充分碾磨成细粉。
2. 转移细粉（新鲜真菌组织100 mg 或干重组织20 mg）到一个1.5ml离心管，不要解冻，加入400  $\mu$ l缓冲液A1 和4  $\mu$ l RNase A(10 mg/ml)，旋涡振荡，充分混匀帮助裂解。

**如果组织裂解困难，可根据需要加一个轻柔匀浆10秒的步骤帮助裂解。大多数情况下不需要离心去除未完全裂解的组织，因为后面有一个离心去除的步骤。**

**可选：多糖含量特别高的时候可以在A1加入2%PVP40,000；多酚含量特别高的时候可以在A1中加入0.2% beta巯基乙醇。也可两者同时加入。**
3. 65℃水浴10分钟，在水浴过程中颠倒离心管2-3次，混合样品。
4. 加入130  $\mu$ l 缓冲液A2，充分混匀，冰上放置5分钟，14,000 rpm 离心5-10 分钟，小心吸取上清到一个新的1.5ml离心管，注意不要吸到界面物质。
5. 计算上清量，加入1.5倍体积的A3（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），立即吹打混匀。

**加入A3可能会出现絮状沉淀，但不影响DNA提取。注意将A3直接加入到上清并立即吹打混匀。**
6. 将上一步所得混合物（包括可能出现的沉淀）加入一个吸附柱AC中，（吸附柱放入收集管中）13,000 rpm离心30-60秒，倒掉收集管中的废液（先加650  $\mu$ l离心，弃废液，再加入剩余的溶液，再次离心）。
7. 加入600  $\mu$ l漂洗液WB（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），12,000 rpm 离心30秒，弃掉废液。
8. 加入600  $\mu$ l漂洗液WB，12,000 rpm 离心30秒，弃掉废液。
9. 将吸附柱AC放回空收集管中，13,000 rpm离心2分钟，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
10. 取出吸附柱AC，放入一个干净的离心管中，在吸附膜的中间部位加100  $\mu$ l洗脱缓冲液EB，室温放置3-5分钟，12,000 rpm 离心1分钟。将得到的溶液重新加入吸附柱中，室温放置2分钟，12,000 rpm离心1分钟。

洗脱体积越大，洗脱效率越高，如果预计和需要产量高，可增大洗脱体积，如果需要DNA浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是最小体积不应少于50  $\mu$ l，体积过小降低DNA洗脱效率，减少DNA产量。
11. DNA可以存放在2-8℃，-20℃可以长期保存。

**【常见问题分析及解决方案】**

问题	评论与建议
DNA产量低	*处理材料过量或者裂解不完全- <b>建议</b> : 使用适量的起始材料, 充分研磨或者匀浆 *结合条件不恰当- <b>建议</b> : 步骤5精确估计上清量, 加入1.5倍体积A3量要准确
RNA残留	*真菌RNA含量太丰富- <b>建议</b> : 提高RNase A处理浓度
未提取到DNA	*漂洗液WB中忘记加无水乙醇- <b>建议</b> : 第一次实验时, 在漂洗液WB中加入指定量无水乙醇。
离心柱堵塞	*研磨裂解不充分, 团块多; 裂解物太粘稠; 离心力太小- <b>建议</b> : 参见步骤2, 加一个离心步骤去除; 减低起始材料量, 不要处理过量, 加大离心力
洗脱下来的DNA溶液带颜色或者膜上有明显的色素残留	*漂洗次数不够- <b>建议</b> : 步骤8完成后, 加500 $\mu$ l乙醇再漂洗一遍 *起始材料太多过量- <b>建议</b> : 减少起始处理材料, 不要过量
洗脱下来的DNA产量低	*离心柱残留有较多乙醇或者底部不慎沾有乙醇- <b>建议</b> : 确保做了步骤9, 否则残留乙醇会影响洗脱效率。 *使用了水或者其他非最佳液体代替洗脱缓冲液- <b>建议</b> : 仔细阅读步骤10和注意事项5和只使用洗脱缓冲液EB洗脱。 *洗脱缓冲液量偏低- <b>建议</b> : 使用200 $\mu$ l洗脱缓冲液洗脱
A <sub>260</sub> 吸光值异常偏高	*一些硅基质膜成分一起洗脱下来, 干扰了吸光值- <b>建议</b> : 将洗脱的基因组DNA溶液13,000rpm再离心一分钟, 小心取上清使用。
DNA下游酶切不能切开或者酶切不完全	*一些硅基质膜成分一起洗脱下来, 抑制了酶切反应- <b>建议</b> : 将洗脱的基因组DNA溶液13,000rpm再离心一分钟, 小心取上清使用。 *离心柱残留有较多乙醇或者底部不慎沾有乙醇抑制了酶切反应- <b>建议</b> : 确保做了步骤9, 然后空气中晾几分钟, 让残留乙醇挥发。

**【备注】**

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时, 承诺为您更换等量合格产品, 本公司对此产品所承担的责任仅限于产品价值本身。