



北京艾德莱生物科技有限公司

Aidlab Biotechnologies Co., Ltd

- ◆ 真菌基因组**DNA**快速提取试剂盒
 - ◆ 目录号 **DN41**
 - ◆ 使用手册
 - ◆ 实验室使用，仅用于体外
-

真菌基因组 DNA 快速提取试剂盒

目录号: **DN41**

目录编号	包装单位
DN4101	50次
DN4102	100次
DN4103	200次

❖ 适用范围:

适用于快速提取真菌组织细胞基因组DNA

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50 次	100 次	200 次
RNase A(10mg/ml)	-20℃	250 μl	500 μl	1 ml
缓冲液 AP1	室温	25 ml	50 ml	100 ml
缓冲液 AP2	室温	10 ml	20 ml	40 ml
缓冲液 AP3/E	室温	15 ml	25 ml	50 ml
		第一次使用前按说明加指定量乙醇		
漂洗液 WB	室温	15 ml	25ml	50ml
		第一次使用前按说明加指定量乙醇		
洗脱缓冲液 EB	室温	15 ml	20 ml	40 ml
吸附柱 AC	室温	50 个	100 个	200 个
收集管 (2ml)	室温	50 个	100 个	200 个

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项:

1. 裂解液 AP1、AP3/E 低温时可能出现析出和沉淀，可以在 65℃ 水浴几分钟帮助重新溶解（AP3 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。



❖ 产品介绍：

该试剂盒采用 DNA 吸附柱和新型独特的溶液系统，适合于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。提取过程不需要用到有毒的酚氯仿等有机物抽提，也不需要用到耗时的异丙醇或乙醇沉淀，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；然后基因组 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，多酚和细胞代谢物，蛋白等杂质去除，最后低盐的洗脱缓冲液将纯净基因组 DNA 从硅基质膜上洗脱。

❖ 产品特点：

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
2. 不需要使用有毒的苯酚等试剂，也不需要乙醇沉淀等步骤。
3. 快速，简捷，单个样品操作一般可在 1 小时内完成。
4. 数种去多糖、多酚成份和多次柱漂洗确保高纯度，OD260/OD280 典型的比值达 1.7~1.9，可直接用于 PCR，Southern-blot 和各种酶切反应。



❖ **注意事项**

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的传统台式离心机,如Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
2. 开始实验前将需要的水浴先预热到 65℃ 备用。
3. 缓冲液 AP3/E 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3-25μg。
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 **DN14 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：**（实验前请先阅读注意事项）

提示：

⇒ 第一次使用前请先在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇，充分混匀，加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！

⇒ 第一次使用前请先在缓冲液 AP3/E 中加入指定量无水乙醇！

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 μ l 缓冲液 AP1 和 4 μ 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 AP1 加入 **2%PVP40, 000**；多酚含量特别高的时候可以在 AP1 中加入 **0.2% beta 巯基乙醇**。也可两者同时加入。

3. 65 $^{\circ}$ C 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 μ l 缓冲液 AP2，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 AP3/E（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），立即吹打混匀。

加入 **AP3/E** 可能会出现絮状沉淀，但不影响 **DNA** 提取。注意将 **AP3/E** 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 μ l 离心，弃废液，再加入剩余的溶液，再次离心）。

-
- 
7. 加入 600 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 $^{\circ}$ C, 如果要长时间存放, 可以放置在 -20 $^{\circ}$ C。
 - 12.

❖ 问题与解决方法

问题	评论与建议
DNA 产量低	<p>*处理材料过量或者裂解不完全-建议：使用适量的起始材料，充分研磨或者匀浆</p> <p>*结合条件不恰当-建议：步骤 5 精确估计上清量，加入 1.5 倍体积 AP3/E 量要准确</p>
RNA 残留	<p>*真菌 RNA 含量太丰富-建议：提高 RNase A 处理浓度</p>
未提取到 DNA	<p>*漂洗液 WB 中忘记加无水乙醇-建议：第一次实验时，在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇。</p>
离心柱堵塞	<p>*研磨裂解不充分，团块多；裂解物太粘稠；离心力太小-建议：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</p>
洗脱下来的 DNA 溶液带颜色或者膜上有明显的色素残留	<p>*漂洗次数不够-建议：步骤 8 完成后，加 500μl 乙醇再漂洗一遍</p> <p>*起始材料太多过量-建议：减少起始处理材料，不要过量</p>
洗脱下来的 DNA 产量低	<p>*离心柱残留有较多乙醇或者底部不慎沾有乙醇-建议：确保做了步骤 9，否则残留乙醇会影响洗脱效率。</p> <p>*使用了水或者其它非最佳液体代替洗脱缓冲液-建议：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。</p> <p>*洗脱缓冲液量偏低-建议：使用 200μl 洗脱缓冲液洗脱</p>
A ₂₆₀ 吸光值异常偏高	<p>*一些硅基质膜成分一起洗脱下来，干扰了吸光值-建议：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。</p>
DNA 下游酶切不能切开或者酶切不完全	<p>*一些硅基质膜成分一起洗脱下来，抑制了酶切反应-建议：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。</p> <p>*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-建议：确保做了步骤 9，然后空气中晾几分钟，让残留乙醇挥发。</p>