

## 目 录

简 介	2
原 理	2
保质期	2
试剂盒组成	3
准备工作	4
方案 1:真菌组织 DNA 抽提	5
方案 2:寄生真菌 DNA 抽提	6
方案 3:痰液寄生真菌 DNA 抽提	7
常见问题回答	8

版本: 2010-01

## 简介

HiPure Fungal DNA Kit 为真菌 DNA 抽提提供一种快速可靠的方法。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，提取过程中无需进行耗时的醇类沉淀，也无需用到酚氯仿抽提，整个提取过程只需 40 分钟。试剂盒适合于从小于 100mg 真菌样品和寄生真菌中提取高纯度的总 DNA。该方法得到的 DNA 可直接用于 PCR, SSR, AFLP, RAPD, 以及 Southern blot 等实验。

试剂盒	Fungal DNA Mini Kit	Fungal DNA Midi Kit	Fungal DNA Maxi Kit
编号	D3171	D3172	D3173
组织用量	100mg	500mg	2g
结合能力	100µg	500µg	2.5mg
柱型	1.5 ml 柱	15 ml 柱	50 ml 柱

## 原理

HiPure 硅胶柱是采用高结合力的玻璃纤维滤膜为基质。滤膜在高浓度离子化剂(如盐酸胍或异硫氰酸胍)条件下，可通过氢键和静电吸附核酸，而蛋白质或其它杂质不被吸附而去除。吸附了核酸的滤膜经洗涤去除蛋白质和盐，最后可以用低盐缓冲液(如 Buffer TE)或水，洗脱出滤膜上吸附的核酸。得到的核酸纯度高，可直接用于各种下游实验。

HiPure Fungal DNA Kit 基于硅胶柱纯化方式。样品在含 SDS 裂解液中匀浆裂解，DNA 释放到裂解液中，用高浓度盐沉淀去除多糖、蛋白质等杂质。得到上清液并加入乙醇和结合液，转移至柱子中过滤，DNA 被吸附上柱子的膜上，而蛋白质等杂质则不被吸附而去除。柱子经 Buffer GW2 洗涤去除盐分，最后 DNA 被 Buffer AE (10Mm Tris, pH8.5) 洗脱。洗脱的 DNA 可直接用于 PCR、Southern blot、RAPD 等实验。

## 保质期

本产品组份可在室温下保存 18 个月。RNase A 干粉室温运输和保存，长期保存(>3 个月)放置于-20~8℃。

## 组 成

### HiPure Fungal DNA Mini Kit

产品编号	D3171-01	D3171-02	D3171-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure gDNA Mini Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
RNase A	5 mg	10 mg	45 mg
氧化锆珠 (0.4-0.6mm)	2 g	7 g	30 g
Protease Dissolve Buffer	1.8ml	5ml	15ml
Buffer STE	10 ml	30 ml	150 ml
Buffer SDS	1 ml	3 ml	20 ml
Buffer PS	3 ml	10 ml	50 ml
Buffer PBD*	6 ml	20 ml	100 ml
Buffer GW2*	6 ml	20 ml	2 x 50 ml
Buffer AE	5 ml	15 ml	30 ml
说明书	1	1	1

### 需要准备材料和工具

- 无水乙醇(96-100%)
- 小型离心管(<12,000 × g)
- 65℃水浴锅或 95℃水浴锅
- Buffer PBD 使用前按瓶子标签加入适量的无水乙醇进行稀释
- 用无水乙醇稀释 Buffer GW2，并于室温保存
- 溶解 RNase A (15mg/ml): 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 溶解 RNase A 至终浓度为 15mg/ml，颠倒混匀让 RNase A 充分溶解。RNase A 干粉可在室温下保存，但溶解的 RNase A 须保存于-20~8℃。

## 方案 1. 真菌 DNA 常规提取

该方案采用液氮研磨裂解真菌细胞壁的方法，适合于从大多数的真菌样品中提取高纯度的总 DNA。纯化的 DNA 包括基因组 DNA 和叶绿体 DNA。以下离心条件都在室温下进行。

### 1. 真菌样品的收集:

- **固体培养的真菌:** 用接种环或细胞刮从培养基上刮下真菌样品，转移至研钵中，立即加入液氮将真菌研磨成细小的粉末。
- **液体培养的真菌:** 离心或过滤收集真菌，尽量去除培养液。把湿的菌丝体转移至研钵中，立即加入液氮将真菌研磨成细小的粉末。
- **真菌性寄生真菌:** 将样品转移至研钵中，用液氮将样品研磨成粉末。
- **微量样品 (珠磨):** 若真菌样品非常微量，液氮研磨可能会引起样品的丢失。按附加方案进行操作。

### 2. 转移 $\leq 100\text{mg}$ 已研磨的样品至 1.5ml 离心管中。立即加入 360 $\mu\text{l}$ Buffer STE 和 40 $\mu\text{l}$ Buffer SDS 至样品中，涡旋使样品充分分散。65 $^{\circ}\text{C}$ 处理 15 分钟。

正确使用组织用量，才能获得理想结果。过量样品会造成柱子堵塞，而引起产量和纯度下降。由于真菌样品 DNA 和其它代谢物质含量差别很多。初次实验时，我们推荐使用 50mg 样品，根据实验结果再调整组织用量。Buffer STE/ Buffer SDS 可预先混匀。

### 3. (可选)加入 10 $\mu\text{l}$ RNase A 至裂解液中。涡旋混匀，室温静置 15~30 分钟消化去除 RNA。

### 4. 加入 140 $\mu\text{l}$ Buffer PS 至裂解液中。涡旋混匀 30 秒，冰上放置 10 分钟。

### 5. 室温下，13,000 $\times$ g 离心 5 分钟。小心转移 400 $\mu\text{l}$ 上清液至新的离心管中。

### 6. 加入 600 $\mu\text{l}$ Buffer PBD(已用无水乙醇稀释)至样品中。涡旋混匀 30 秒。若出现明显的絮状沉淀，用移液枪吸打尽量打散沉淀。

Buffer PBD 在使用之前，必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签进行稀释。

### 7. 把 DNA 结合柱装在收集管。转移一半混合液至柱子中。8,000 $\times$ g 离心 60 秒。

### 8. 倒弃滤液把柱子装回收集管。转移剩余混合液至柱子中。8,000 $\times$ g 离心 60 秒。

### 9. 倒弃滤液把柱子装回收集管。加入 600 $\mu\text{l}$ Buffer GW2(已用无水乙醇稀释)至柱子

中。8,000 × g 离心 60 秒。

Buffer GW2 在使用之前，必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签进行稀释。

10. 倒弃滤液把柱子装回收集管。加入 600µl Buffer GW2(已用无水乙醇稀释)至柱子中，8,000 × g 离心 60 秒。
11. 倒弃滤液把柱子装回收集管。10,000 × g 离心 2 分钟去除柱子中残留的乙醇。
12. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中。加入 30~100µl 预热到 65°C Buffer AE 至柱子的膜中央。室温静置 2 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。  
柱子最小洗脱体积是 30µl。若需要获得最高产量的 DNA，建议重复洗脱一次。
13. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于-20°C或-80°C

### 附加流程（珠磨法裂解）

1. 在 2ml 离心管中，加入 100mg 氧化锆珠(0.4~0.6mm)和 360µl Buffer STE。
2. 把真菌样品转移至装有玻璃珠的离心管中，最高速度涡旋 5~10 分钟。  
真菌带有很厚的细胞壁，是影响产量的最为关键的因素。裂解真菌的常见的方法有液氮研磨，珠磨法和酶法。当样品处理量很少时，液氮研磨会导致样品的损失。这一步最好采用珠磨仪，如 FastPrep-24 进行匀浆。
3. 静置 2 分钟让样品沉降到管底。转移匀浆液至新的离心管中。
4. 加入 40µl Buffer SDS 颠倒混匀。95°C 处理 15 分钟。
5. 按方案 1 的第 3~13 步进行操作。

## 方案 2. 从动物组织和液体样品中提取真菌 DNA

该方案适合于从动物组织或液体样品中抽提寄生真菌 DNA。该方案需要 Proteinase K, 需另外订购。

1. 取 1ml 组织匀浆液或液体样品至 1.5ml 离心管中, 加入 100 $\mu$ l Buffer SDS 和 10 $\mu$ l Proteinase K (20mg/ml), 混匀, 55 $^{\circ}$ C 水浴 15~30 分钟。  
处理组织样品时, 取 50~100mg 组织, 加入 1ml Buffer PBS, 用玻璃匀浆器进行匀浆。
2. 10,000  $\times$  g 离心 3 分钟收集真菌细胞, 小心吸弃所有的上清液。
3. 加入 300 $\mu$ l Buffer STE 和 100mg 氧化锆珠(0.4~0.6mm)至沉淀团中。
4. 在涡旋仪上, 最高速度涡旋 3~5 分钟使真菌充分裂解。
5. 静置 2 分钟, 小心转移上清液至新的离心管中。
6. 加入 30 $\mu$ l Buffer SDS 至样品中, 颠倒混匀。95 $^{\circ}$ C 处理 15 分钟。
7. 加入 450 $\mu$ l Buffer PBD(已用无水乙醇稀释)至样品中。立即涡旋混匀。
8. 把 DNA 结合柱装在收集管。转移混合液至柱子中。8,000  $\times$  g 离心 60 秒。
9. 倒弃滤液把柱子装回收集管。加入 600 $\mu$ l Buffer GW2(已用无水乙醇稀释)至柱子中。8,000  $\times$  g 离心 60 秒。  
Buffer GW2 在使用之前, 必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签进行稀释。
10. 倒弃滤液把柱子装回收集管。加入 600 $\mu$ l Buffer GW2(已用无水乙醇稀释)至柱子中, 8,000  $\times$  g 离心 60 秒。
11. 倒弃滤液把柱子装回收集管。13,000  $\times$  g 离心 2 分钟去除柱子中残留的乙醇。
12. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中。加入 20-50 $\mu$ l Buffer AE 至柱子的膜中央。静置 1 分钟。13,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
13. 丢弃 DNA 结合柱, 把 DNA 保存于-20 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ C

### 方案 3. 从痰液样品中提取真菌 DNA

该方案适合于从痰液样品中提取真菌 DNA 和结核杆菌 DNA。

1. 在痰液样品中，加入 2 倍体积的 NALC-NaOH 液化液。高速涡旋直到样品充分液化。若样品无法打散或比较粘稠，加入更多的 NALC-NaOH 液化液并涡旋。
2. 室温静置 15 分钟。加入 5 倍体积 Buffer PBS 至样品中，涡旋混匀。
3.  $3,000 \times g$  离心 20 分钟收集真菌细胞。小心吸弃所有的上清液。
4. **加入 300 $\mu$ l Buffer STE 和 100mg 氧化锆珠(0.4-0.6mm)，自配)至沉淀团中。**
5. 在涡旋仪上，最高速度涡旋 5~10 分钟使真菌充分裂解。
6. 静置 2 分钟，小心转移上清液至新的离心管中。
7. **加入 30 $\mu$ l Buffer SDS 至样品中，颠倒混匀。95 $^{\circ}$ C 处理 15 分钟。**
8. **加入 600 $\mu$ l Buffer PBD(已用无水乙醇稀释)至样品中。立即涡旋混匀。**
9. 把 DNA 结合柱装在收集管。**转移一半混合液至柱子中。** $8,000 \times g$  离心 60 秒。
10. 倒弃滤液把柱子装回收集管。**转移剩余混合液至柱子中。** $8,000 \times g$  离心 60 秒。
11. 倒弃滤液把柱子装回收集管。**加入 600 $\mu$ l Buffer GW2(已用无水乙醇稀释)至柱子中。** $8,000 \times g$  离心 60 秒。  
Buffer GW2 在使用之前，必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签进行稀释。
12. 倒弃滤液把柱子装回收集管。**加入 600 $\mu$ l Buffer GW2(已用无水乙醇稀释)至柱子中，** $8,000 \times g$  离心 60 秒。
13. 倒弃滤液把柱子装回收集管。 $13,000 \times g$  离心 2 分钟去除柱子中残留的乙醇。
14. **将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中。加入 20-50 $\mu$ l Buffer AE 至柱子的膜中央。静置 1 分钟。** $13,000 \times g$  离心 1 分钟。
15. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于-20 $^{\circ}$ C 或-80 $^{\circ}$ C

## 常见问题解答

该列表可能有利于解决提取过程所碰到的问题。Magen 的技术人员也可以随时为您提供服务，若您对试剂盒存在问题或建议，或您在分子生物学碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽能力为您排忧解难。

现象	原因及解决方法
<b>柱子堵塞</b>	
转移上清液时带有太多沉淀	在下次提取过程中，转移上清液时不要吸到沉淀物。若吸到沉淀物，可把上清液再离心一次。
裂解液非常粘稠	某些真菌样品中含有丰富的粘液和高分子多糖，会让裂解液变得非常粘稠。减少样品用量或加入 Buffer STE 的用量。
离心速度太低	提高离心速度
<b>DNA 产量低</b>	
样品匀浆不充分	用液氮将样品研磨细小的粉末状。或延长珠磨仪的研磨时间和速度。
样品裂解不充分	加入 Buffer STE 后，没有让真菌样品充分分散。而涡旋无法让样品充分分散，可用移液枪吸打几次。
不正确的结合条件	计算上清液的体积，加入正确的 Buffer PBD 和无水乙醇。
产生絮状沉淀时，没有打散	当加入 Buffer PBD 和无水乙醇时，有些样品会产生明显的絮状沉淀物，必须用移液枪吸打尽量打散沉淀物。
洗脱效率不够	洗脱时 Buffer AE 预热至 65℃，并加到膜中央，室温放置 3 分钟。Buffer AE 的洗脱体积不够。
Buffer GW2 中乙醇没有加入或加入量不够	按说明书或瓶子标签所示，加入正确的乙醇。
柱子没有空甩	柱子必须空甩 2-3 分钟以去除膜上残留的乙醇。