目 录

简 介----------2

原 理----------2

试剂盒组成----------3

保质期----------4

方案 1:真菌 DNA 小量抽提----------5

方案 2:真菌 DNA 纯化方案----------7

常见问题回答----------8

版本: 2010-01

简 介

HiPure FungalDNA Kit II 为真菌组织 DNA 抽提提供一种快速可靠的方法。试剂盒采用硅胶柱纯化技术和经典的 CTAB/氯仿抽提技术，适合于从各种真菌样品中快速提取高纯度的真菌 DNA。得到的 DNA 可直接用于 PCR, SSR, AFLP, RAPD 以及 Southern Blot 等实验。该系列提供了三种规格，以满足不同的需求。

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，可通过氢键和静电等物理作用吸附核酸，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 CTAB 裂解液中匀浆裂解，DNA 释放到裂解液中，用氯仿抽提去除多糖、蛋白质等杂质，得到上清液并加入结合液，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。

组 成

HiPure Fungal DNA Mini Kit II

产品编号	D3175-01	D3175-02	D3175-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure gDNA Mini Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
Buffer PTL	10 ml	40 ml	180 ml
Buffer PL*	5 ml	20 ml	80 ml
Buffer GW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
RNase A	1mg	5mg	25mg
Protease Dissolve Buffer	1.8ml	1.8ml	3ml
Buffer AE	3 ml	20 ml	60 ml
说明书	1	1	1

注：Buffer PL 和 Buffer GW2 使用前必须按瓶子标签或说明书所示，加入适量的无水乙醇进行稀释。

保 质 期

HiPure Fungal DNA Kit II 除 RNase A 外，可在室温下(15-25℃)干燥保存 18 个月。RNase A 室温运输，收到产品保存于 2-8℃。Buffer PTL 和 Buffer PL 在低温贮藏中可能会有沉淀析出，65℃水浴 30 分钟使之溶解。

准备材料和工具

- 无水乙醇(96-100%)
- 小型离心管(≤14,000 x g)
- 65℃水浴锅
- 研钵和研磨棒
- 氯仿
- 2-巯基乙醇(可选)
- 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，但溶解的 RNase A 须保存于-20~8℃。
- 按瓶子标签或下表所示，用适量的无水乙醇至 Buffer PL 瓶子中。

D3175-01	加入 10ml 无水乙醇至 Buffer PL 瓶子中
D3175-02	加入 40ml 无水乙醇至 Buffer PL 瓶子中
D3175-03	加入 160ml 无水乙醇至 Buffer PL 瓶子中

- 按瓶子标签或下表所示，用适量的无水乙醇至 Buffer GW2 瓶子中。

D3175-01	加入 20ml 无水乙醇至 Buffer GW2 瓶子中
D3175-02	加入 80ml 无水乙醇至 Buffer GW2 瓶子中
D3175-03	每瓶加入 200ml 无水乙醇至 Buffer GW2 瓶子中

方案 1. 真菌 DNA 小量提取

该方案适合于从≤100mg 新鲜/冻藏真菌样品，≤20mg 干燥真菌/种子样品提取高纯度的总 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。

操作流程：

1. 用液氮把真菌样品研磨成粉末，转移 50-100mg 新鲜/冻藏样品或 15-20mg 干燥样品至 2ml 离心管中。

   除液氮研磨外，也可以将用珠磨仪(如 FastPrep-24，2010 Gene Grinder)或机械匀浆器进行匀浆。采用珠磨仪匀浆时，我们推荐使用 2ml 真菌匀浆管，该匀浆管包含数粒钢珠和菱角锋利石石，能高效地对真菌样品进行分散研磨。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。真菌样品 DNA 和代谢物质含量差异很大。初次实验时，我们推荐使用 50mg 新鲜/15mg 干燥样品。根据实验结果再调整下一次的用量。若样品用量超过新鲜 100mg/干燥 30mg 时，Buffer PTL 须按比例增加。

2. **立即加入 600µl Buffer PTL 和 5µl RNase A 至样品中。**剧烈涡旋使样品充分分散。65ºC 水浴 15-30 分钟，期间颠倒混匀 2-3 次。

   加入 Buffer PTL 之前，样品不要解冻。若样品富含多酚类物质，加入 20µl 2-巯基乙醇至裂解液中。

3. **加入 600µl 氯仿至裂解液中，**最高速度涡旋混匀 30 秒。

4. 室温下，12,000 x g 离心 5 分钟。

5. 转移上清液至新的离心管中。**加入 1.5 倍体积的 Buffer PL(已用无水乙醇稀释)至上清液中。**涡旋混匀 20-30 秒。

   Buffer PL 在使用前须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签或说明书所示进行稀释。若混匀后出现明显的絮状沉淀，用移液枪吸打几次尽量打散沉淀团。

6. 把 DNA 柱装在收集管中。**转移一半体积的混合液至柱子中。**8,000 x g 离心 30-60 秒。

7. 倒弃滤液把柱子装回收集管。把剩余混合液转移至柱子中。8,000 × g 离心 30-60 秒。

8. 倒弃滤液把柱子装回收集管。**加入 650µl Buffer GW2(已用无水乙醇稀释)至柱子中。**8,000 × g 离心 30-60 秒。

   Buffer GW2 在使用之前须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示进行稀释。

9. 倒弃滤液把柱子装回收集管。**加入 650µl Buffer GW2(已用无水乙醇稀释)至柱子中。**8,000 × g 离心 30-60 秒。

10. 倒弃滤液把柱子装回收集管。10,000 x g 离心 2 分钟去除柱子中残留的乙醇。

11. 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 3 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。

12. **再加入 30-100µl 预热到 65°C Buffer AE 至柱子的膜中央。**室温静置 3 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。

13. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于-20℃。

方案 2. 真菌 DNA 纯化

该方案适合于从各种粗制的真菌 DNA 样品中进一步纯化 DNA。

1. 短暂离心 DNA 产物。用灭菌水将样品体积调整至 300μl。
2. **加入 450μl Buffer PL(已用无水乙醇稀释)，**涡旋混匀 30 秒。
   Buffer PL 在使用前须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签或说明书所示进行稀释。
3. 短暂离心收集管壁上的液滴。
4. 把 DNA 柱装在收集管中。**转移混合液至柱子中。**8,000 x g 离心 30-60 秒。
5. 倒弃滤液把柱子装回收集管。**加入 650μl Buffer GW2(已用无水乙醇稀释)至柱子中。**8,000 × g 离心 30-60 秒。
   Buffer GW2 在使用之前须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示进行稀释。
6. 倒弃滤液把柱子装回收集管。**加入 650μl Buffer GW2(已用无水乙醇稀释)至柱子中。**8,000 × g 离心 30-60 秒。
7. 倒弃滤液把柱子装回收集管。10,000 x g 离心 2 分钟去除柱子中残留的乙醇。
8. 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 3 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。
9. **再加入 30-100μl 预热到 65°C Buffer AE 至柱子的膜中央。**室温静置 3 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。
10. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于-20℃。

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扰难解。

现 象	原因及解决方法
柱子堵塞	
转移上清液时带有太多沉淀	在下一次提取过程中，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 PTL 的用量。
离心速度太低	提高离心速度
加入氯仿后，混匀不够	在下次制备时，加入氯仿时一定要剧烈振荡混匀。充分混匀时，溶液变成均一的乳白状。
DNA 产量低	
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 PTL 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 PL 和无水乙醇。
产生絮状沉淀时，没有打散	当加入 Buffer PL 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。