

M5 Hiper Fungal Genomic DNA Kit

真菌基因组 DNA 提取试剂盒

使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 Hiper Fungal Genomic DNA Kit	50T	MF070-plus-01
M5 Hiper Fungal Genomic DNA Kit	200T	MF070- plus-04

【储存条件】 室温保存，12个月不影响使用效果。

【试剂盒组分】

试剂盒组成	保存	50次
RNase (10mg/ml)	常温	250 μ l
缓冲液 AP1	室温	20 ml
缓冲液 AP2	室温	7 ml
缓冲液 AP3/E	室温	15 ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇
漂洗液 WB	室温	13 ml 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
吸附柱 AC	室温	50 个
收集管 (2ml)	室温	50 个

- 缓冲液 AP1、AP3/E 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（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。
- 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。

【产品简介】

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】

- 离心吸附柱内硅基质膜全部采用特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。
- 不需要使用有毒的苯酚等试剂，也不需要乙醇沉淀等步骤。
- 快速，简捷，单个样品操作一般可在 1 小时内完成。
- 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。

【实验前准备及注意事项】

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。
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】**温馨提示：**

- ⇒ 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 400µl 缓冲液 AP1 和 4µl 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℃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 µl 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 650µl 离心,弃废液,再加入剩余的溶液,再次离心)。
7. 加入 600µl 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 600µl 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 100µl 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 50µl,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℃,如果要长时间存放,可以放置在 -20℃。

【常见 FAQ】

问题	评论与建议
DNA 产量低	*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 *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
RNA 残留	*真菌 RNA 含量太丰富- 建议 ：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- 建议 ： 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- 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
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- 建议 ：步骤 8 完成后，加 500μl 乙醇再漂洗一遍 *起始材料太多过量- 建议 ：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- 建议 ：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。 *洗脱缓冲液量偏低- 建议 ：使用 200μl 洗脱缓冲液洗脱
A ₂₆₀ 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- 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。
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- 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。 *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。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。