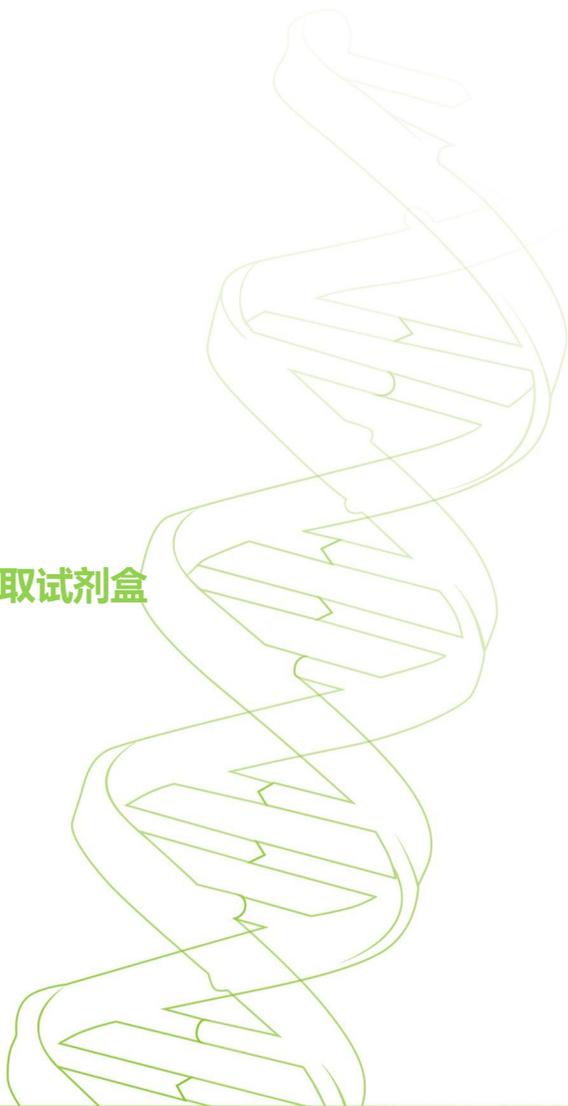


Imagene®

Fungi DNA Kit

真菌基因组 DNA 快速提取试剂盒



CODONX
RESEARCH & ANSWER MORE

FOR RESEARCH USE ONLY
NOT INTENDED FOR DIAGNOSTIC PURPOSES

真菌基因组 DNA 快速提取试剂盒

目录号 DE128

使用说明书

网站: www.codonx.com
咨询电话: 010-56315162
技术支持 QQ: 3090544158

- 1/适用范围
- 2/试剂盒组成、储存、稳定性
- 3/储存事项
- 4/产品介绍
- 5/产品特点
- 6/注意事项
- 7/操作步骤
- 8/问题与解决方法

1/适用范围:

适用于快速提取真菌组织细胞基因组DNA。

2/试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50 次 (DE128-01)	100 次 (DE128-02)
RNase A(10mg/ml)	-20℃	250 µl	500 µl
缓冲液 A	室温	25 ml	50 ml
缓冲液 B	室温	10 ml	20 ml
缓冲液 C	室温	15 ml	25 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 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
吸附柱 DA	室温	50 个	100 个
收集管 CT (2ml)	室温	50 个	100 个

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

3/储存事项:

1. 缓冲液 A、C 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（缓冲液 C 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。

4/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。

5/产品特点：

1. 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。
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。

6/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 C 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。

7/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 C 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 A 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缓冲液 A 加入 2%PVP40, 000；多酚含量特别高的时候可以在缓冲液 A 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 B，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 倍体积的缓冲液 C（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），立即吹打混匀。

加入缓冲液 C 可能会出现絮状沉淀，但不影响 DNA 提取。注意将缓冲液 C 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 DA 中，（吸附柱 DA 放入收集管 CT 中）13,000 rpm 离心 30-60 秒，倒掉收集管 CT 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 DA 放回空收集管 CT 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 DA，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 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，可以放置在一20℃。

8/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 倍体积缓冲液 C 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	<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>

酶切不完全

*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。



CodonX(China) Biotechnology Co., Ltd

Yizhuang Biomedical Park
Building 6, No.88 6th Kechuang St.Economic-Technological Development Area,Beijing,China
Tel: 010-56315162 www.codonx.com