

## Fungal DNA Extraction Mini Kit

真菌 DNA 小量提取试剂盒

本产品适合于从 10~100mg 植物或真菌样品中提取基因组 DNA。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，适合于从各种真菌或植物样品中快速提取高纯度的基因组 DNA, 无需采用酚氯仿抽提等步骤，安全无毒。得到的 DNA 可直接用于 PCR，荧光定量等实验。

### 产品组份

产品编号	DNF351-01 (10 Preps)	DNF351-02 (50 Preps)	DNF351-03 (250 Preps)
DNA Extraction Mini Columns II	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
Buffer TL	7 ml	35 ml	175 ml
Buffer IRP	3 ml	12 ml	60 ml
Buffer PBB	5 ml	20 ml	80 ml
Buffer W1A	4.4 ml	13 ml	66 ml
Buffer W2B	5 ml	15 ml	2×40 ml
Buffer EB	2 ml	10 ml	60 ml
RNase Solution	300 ul	600 ul	1.2 ml

版本号: 2018-07

### 保存条件

本产品可在室温(15~25℃)保存 12 个月，长期保存时需置于 2-8℃。低温下，Buffer TL 及 Buffer W1A 可能会有沉淀形成，需 37℃ 水浴让沉淀完全溶解。

### 准备事项

- Buffer PBB/W1A/W2B 使用前，须按瓶子标签所示，加入无水乙醇进行稀释。

## 实验步骤(常规方案)

1. 液氮研磨：用液氮将植物或真菌样品研磨成细小粉末。称取 30~100mg 粉末至 2.0ml 离心管中。

若无液氮研磨，可用玻璃匀浆器等工具进行机械破碎；样品初次提取推荐样品量为 30~50mg，根据结果再调整用量。

2. 加入 500 $\mu$ l Buffer TL 及 5 $\mu$ l RNase Solution 至样品中，高速涡旋充分打散样品，65 $^{\circ}$ C 振荡温浴 15-30 分钟。

在该步骤加入 20 $\mu$ l 2-巯基乙醇有利于提高产量。

3. 恢复至室温，加入 180 $\mu$ l Buffer IRP 至裂解液中，剧烈振荡充分混匀。

该步骤中混匀程度与提取 DNA 纯度有关，须尽可能充分振荡至溶液均一。

4. 14,000  $\times$  g 离心 5 分钟，转移 500 $\mu$ l 上清至新的离心管中，加入 1.5 倍体积的 Buffer PBB，充分涡旋混匀。

5. 把 DNA Extraction Mini Columns II 装在 2ml 收集管中。把第 4 步的混合液转移至过滤柱中。13,000  $\times$  g 离心 20 秒。

6. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。转移剩余混合液至柱子。13,000  $\times$  g 离心 30 秒。

7. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 500 $\mu$ l Buffer W1A（确认已经加入乙醇）至柱子上。10,000  $\times$  g 离心 10 秒。

8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500 $\mu$ l Buffer W2B（确认已经加入乙醇）至柱子中，10,000  $\times$  g 离心 10 秒。

9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500 $\mu$ l Buffer W2B（确认已经加入乙醇）至柱子中，10,000  $\times$  g 离心 10 秒。

10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。13,000  $\times$  g 离心 2 分钟。

该步骤去除 DNA 柱中残留的乙醇，乙醇残留会影响后续的酶促反应。当洗脱体积低于 50 $\mu$ l 时，该步骤结束后应打开 DNA 柱盖子于室温空气干燥 10 分钟后再进行洗脱，避免乙醇残留对酶促反应的影响。

11. 将柱子转移至 1.5ml 离心管。加入 30~100 $\mu$ l Buffer EB 至柱子膜中央。室温静置 3 分钟。13,000  $\times$  g 离心 1 分钟。

柱子最小的洗脱体积是 30 $\mu$ l，若对产量要求较高，推荐进行第二次洗脱，将洗脱液重新加至柱子膜中央，室温静置 3 分钟，13,000  $\times$  g 离心 1 分钟。

12. 弃去柱子，把 DNA 保存于 -20 $^{\circ}$ C。

## 实验步骤（寄生真菌等）

1. 离心收集真菌沉淀，吸弃所有上清液。
2. 加入 500 $\mu$ l Buffer TL 及 5 $\mu$ l RNase Solution、100mg 玻璃粉（0.4~0.6mm）至样品中，高速涡旋 5 分钟充分打散样品，65 $^{\circ}$ C 振荡温浴 15-30 分钟。

在该步骤加入 20 $\mu$ l 2-巯基乙醇有利于提高产量。

3. 恢复至室温，加入 180 $\mu$ l Buffer IRP 至裂解液中，剧烈振荡充分混匀。  
该步骤中混匀程度与提取 DNA 纯度有关，须尽可能充分振荡至溶液均一。
4. 14,000  $\times$  g 离心 5 分钟，转移 500 $\mu$ l 上清至新的离心管中，加入 1.5 倍体积的 Buffer PBB，充分涡旋混匀。
5. 把 DNA Extraction Mini Columns II 装在 2ml 收集管中。把第 4 步的混合液转移至过滤柱中。13,000  $\times$  g 离心 30 秒。
6. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。转移剩余混合液至柱子。13,000  $\times$  g 离心 30 秒。
7. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 500 $\mu$ l Buffer W1A（确认已经加入乙醇）至柱子上。10,000  $\times$  g 离心 10 秒。
8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500 $\mu$ l Buffer W2B（确认已经加入乙醇）至柱子中，10,000  $\times$  g 离心 10 秒。
9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500 $\mu$ l Buffer W2B（确认已经加入乙醇）至柱子中，10,000  $\times$  g 离心 10 秒。
10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。13,000  $\times$  g 离心 2 分钟。

该步骤去除 DNA 柱中残留的乙醇，乙醇残留会影响后续的酶促反应。当洗脱体积低于 50 $\mu$ l 时，该步骤结束后应打开 DNA 柱盖子于室温空气干燥 10 分钟后再进行洗脱，避免乙醇残留对酶促反应的影响。

11. 将柱子转移至 1.5ml 离心管。加入 30~100 $\mu$ l Buffer EB 至柱子膜中央。室温静置 3 分钟。13,000  $\times$  g 离心 1 分钟。  
柱子最小的洗脱体积是 30 $\mu$ l，若对产量要求较高，推荐进行第二次洗脱，将洗脱液重新加至柱子膜中央，室温静置 3 分钟，13,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
12. 弃去柱子，把 DNA 保存于-20 $^{\circ}$ C。

## 常见问题

### 1. DNA 产量低

- 基因组 DNA 洗脱困难，延长洗脱时间并增加洗脱次数提高洗脱效率。
- 对于寄生真菌等未经液氮研磨等机械破碎方式的样品，玻璃珠破碎不可省略。
- 裂解步骤加入 2-巯基乙醇有利于提高产量
- 样品用量过多，减少样品用量。

### 2. 下游结果不理想

- **乙醇残留**：对于敏感应用，必须晾干 10 分钟后进行洗脱。
- **样品量过多**：超量样品导致纯度下降，减少样品用量。