倍沃医学

真菌基因组 DNA 提取试剂盒

（BW-GD2416） *Ver: 260801*

产品简介

本试剂盒可快速可靠地从多种真菌及其组织中分离纯化得到高质量的细胞总 DNA。可在 1 小时内处理至多 100 mg 的新鲜组织（或至多 50 mg 的干燥组织）。结合了本公司的 Mini Column 的可逆核酸结合特性、速度及通用性，可从真菌组织裂解物中去除多糖、酚类化合物和酶抑制剂。

纯化的 DNA 适用于 PCR、限制性酶切和杂交技术。由于不涉及有机提取，减少了塑料污染和手工操作时间，允许更多的样品可以并行处理。

若初次使用真菌 gDNA 分离试剂盒，请在开始使用前阅读本手册以熟悉操作步骤。干燥或新鲜的真菌组织被破坏，然后在含有洗涤剂的特殊配制的缓冲液中裂解。随后沉淀出蛋白质，多糖和细胞碎片。然后调整结合条件，并将样品上样至 Mini Column。两个快速洗涤步骤可去除残留物，例如残留的多糖，然后将纯 DNA 用水或低离子强度的缓冲液洗脱。纯化的 DNA 无需进一步纯化即可直接用于下游应用。

产品贮存及稳定性

本试剂盒自生产之日起可保存 12 个月。RNase A 可在室温（15-25℃）稳定储存一年。若要长期储存，请于 4℃储存。其他所有试剂及用品可保存于室温（15-25℃）。

产品构成

Catalog#	-00	-01	-02
Preps	4	50	250
DNA Mini Columns	4	50	250
2 mL Collection Tubes	4	50	250
Buffer FG1	3 mL	35 mL	160 mL
Buffer FG2	1 mL	8 mL	40 mL
Buffer FG3	2 mL	20 mL	100 mL
RNase A (20 mg/mL)	25 µL	270 µL	1.4 mL
DNA Wash Buffer*	2 mL	15 mL	3 x 24 mL
Elution Buffer	1.5 mL	15 mL	50 mL
User Manual	1	1	1

要点

- Elution Buffer：使用前预热至 65℃。
- DNA Wash Buffer：使用前请将 8 mL（BW-GD2416-00）或 60 mL（BW-GD2416-01）或 96 mL（BW-GD2416-02）96-100% 乙醇加入至每个 DNA Wash Buffer 瓶内。
- 对每份新鲜（或干燥）的样品，选择合适的操作：

A. **干燥组织**：使用≤50 mg 的粉末状组织，产物在 southern 实验中是足够的。

B. **新鲜或冷冻组织**：使用≤100 mg 新鲜或冷冻的粉末状组织。

注意事项

- Buffer FG1 和 FG3 在低温条件下易形成沉淀，使用前请分别置于 50℃预热溶解沉淀。

实验前需准备的材料

- 离心机（12,000 ×g）
- 无核酸酶的 1.5 mL 或 2.0 mL 离心管
- 水浴锅（65℃）
- 无菌去离子水（65℃）
- 96-100%乙醇
- 液氮（用于新鲜/冷冻样品）
- 纸巾

操作步骤

A. 干燥组织样品

这是分离总细胞（线粒体、叶绿体、基因组）DNA 最可靠的方法。DNA 得率对于 southern blot 和 RFLP 图谱是充足的。

对于较长时间保存野外样品，干燥是不错的选择。样品可以在 45℃烘箱中干燥过夜，研磨成粉末后置于室温下干燥保存。制备干燥样品时，将大约 50 mg 的干燥组织放入 2 mL 离心管，使用研杵研磨。对于后续做 PCR 和克隆来说，研杵最好一次性使用，使用后立即浸泡于稀释的漂白液中直至清洗干净。一次性研杵可多次灭菌。

1. 在 10-50 mg 粉末状的干燥组织中加入 **600 µL Buffer FG1**，剧烈涡旋混匀，确保没有团块。

注：每组 4-6 管：研磨，加入 Buffer FG1，进行步骤 2。干燥组织不要超过 50 mg。

2. 65℃孵育 10 min，期间颠倒混匀两次。

可选：如果必要的话，孵育前加入 **5 μL RNase A**（20 mg/mL）来去除 RNA。

3. 加入 **140 μL Buffer FG2**，涡旋混匀。冰上孵育 5 min，≥10,000 ×g 离心 10 min。

4. 小心地将上清液转移至一个新的离心管，确保不会触及沉淀或转移任何碎片。加入 **0.5 倍 Buffer FG3** 和 1 倍体积的无水乙醇，涡旋混匀以均质化。加入乙醇后可能形成沉淀，但不会影响纯化。

5. 将一个 **DNA Mini Column** 插入 **2 mL Collection Tube**，转移样品至 **Mini Column**，10,000 ×g 离心 1 min，弃滤液，重复使用 **2 mL Collection Tube**。

6. 加入 **600 μL DNA Wash Buffer**（使用前加入乙醇），10,000 ×g 离心 1 min，弃滤液，重复使用 **2 mL Collection Tube**。

注：DNA Wash Buffer 浓缩液使用前需按要求加入 96-100%乙醇。

7. 加入 **600 μL DNA Wash Buffer**，10,000 ×g 离心 1 min，弃滤液，重复使用 **2 mL Collection Tube**。

8. 打开柱子盖子，最大转速空离 2 min（12,000 ×g），干燥柱子。此步骤对于残留乙醇的去除非常重要。

9. 转移 **Mini Column** 至一个干净的 1.5 mL 离心管，加入 **50-100 μL** 65℃预热的 **Elution Buffer**（或去离子水，可根据客户样本量及具体下游实验需求调整洗脱体积），室温静置 3-5 min。10,000 ×g 离心 1 min。

可选：加入另外的 **50-100 μL Elution Buffer** 二次洗脱得到 DNA 但总浓度会降低。

10. DNA 得率取决于样品的类型和质量，一般来说，50 mg 干燥组织可以纯化得到 10-50 μg 的 DNA，其 A_{260}/A_{280} 值为 1.7-1.9。

操作步骤

B. 新鲜或冷冻样品

该方案适用于大多数新鲜或冷冻组织样品，可有效回收 DNA。然而，由于各种真菌的含水量、多糖含量差异很大，样品量应控制在 200 mg 以内。最好使用幼嫩的叶片或者针叶。提取得到的 DNA 可足够用于 Southern 分析中的几个泳道。

准备样品时，将组织样品置于 1.5 mL 或 2 mL 离心管内，然后用镊子将其浸入液氮中冷冻。使用一次性研杵研磨。或者也可让液氮蒸发后将样品储存于-70℃。对于后续做 PCR 和克隆来说，研杵最好一次性使用，使用后立即浸泡于稀释的漂白液中直至清洗干净。一次性研杵可多次灭菌。对于标准的 southern 分析，通过对样品进行乙醇洗涤和表面擦拭，同一根研杵可以重复使用几次。

1. 将 **100 mg** 真菌样品置于离心管，快速加入 **600 μL Buffer FG1**，涡旋混匀，确保没有团块。DNA 无法从团块中有效提取。

注：每组 4-6 管，浸没于液氮中，研磨，加入 Buffer FG1，进行步骤 2。每个离心管使用 100 mg 组织，若得率和纯度可以的话，将初始样品量增加至 200 mg。

2. 65℃孵育 10 min，期间颠倒混匀两次。

可选：若有必要，加入 **5 μL RNase A**（20 mg/mL）来去除 RNA。

3. 加入 **140 μL Buffer FG2**，涡旋混匀。冰上孵育 5 min，≥10,000 ×g 离心 10 min。

4. 小心地将上清液转移至一个新的离心管，确保不会触及沉淀或转移任何碎片。加入 **0.5 倍 Buffer FG3**，和 1 倍体积的无水乙醇，涡旋混匀以均质化。加入乙醇后可能形成沉淀，但不会影响纯化。

5. 将一个 **DNA Mini Column** 插入 **2 mL Collection Tube**，转移样品至 **Mini Column**，10,000 ×g 离心 1 min，弃滤液，重复使用 **2 mL Collection Tube**。

6. 加入 **600 μL DNA Wash Buffer**（使用前加入乙醇），10,000 ×g 离心 1 min，弃滤液，重复使用 **2 mL Collection Tube**。

注：DNA Wash Buffer 浓缩液使用前需按要求加入 96-100%乙醇。

7. 加入 **600 μL DNA Wash Buffer**，10,000 ×g 离心 1 min，弃滤液，重复使用 **2 mL Collection Tube**。

8. 打开柱子盖子，最大转速空离 2 min（12,000 ×g）。此步骤对于残留乙醇的去除非常重要。

9. 转移 **DNA Mini Column** 至一个干净的 1.5 mL 离心管，加入 **50-100 μL** 65℃预热的 **Elution Buffer**（或去离子水，可根据客户样本量及具体下游实验需求调整洗脱体积），室温静置 3-5 min。10,000 ×g 离心 1min。

可选：加入另外的 **50-100 μL Elution Buffer** 二次洗脱得到 DNA 但总浓度会降低。

10. DNA 得率取决于样品的类型和质量，一般来说，200 mg 新鲜叶片组织可以纯化得到 20-50 μg 的 DNA，其 A_{260}/A_{280} 值为 1.7-1.9。

操作步骤（负压/离心法）

1. 按照先前的方法，准备新鲜或干燥样品，直至转移 **DNA/Buffer FG3/乙醇**混合物至一个 **DNA Mini Column**。

2. 按厂家说明准备负压装置，将 **DNA Mini Column** 连接至负压

装置。

3. 转移 **DNA/Buffer FG3/乙醇**混合物至一个 **DNA Mini Column**。

4. 打开负压装置，使样品通过 **DNA Mini Column**，关闭负压装置。

5. 加入 **600 µL DNA Wash Buffer**，打开负压装置，使滤液流下。重复此步骤。

6. 将 **DNA Mini Column** 转移至一个离心管，离心 1 min 以干燥柱子。

7. 转移 **DNA Mini Column** 至一个干净的 1.5 mL 离心管，加入 **50-100 µL** 65℃预热的 **Elution Buffer**（或去离子水，可根据客户样本量及具体下游实验需求调整洗脱体积），室温静置 1-2 min，离心 1 min 洗脱 DNA。

常见问题解答

问题	可能原因	建议
柱子堵塞	吸取上清液时吸到沉淀	加入 Buffer FG2 后，确保没有转移沉淀至柱子
	上柱前，DNA 没有完全溶解	确保加入 Buffer FG3 和乙醇之前，DNA 溶解。
	样品太粘稠	起始样品量不要超过建议用量。可以增加 Buffer FG1 和 FG2 的量，每个样品使用 2 个及以上的柱子。
	加入 Buffer FG2 后沉淀不完全	加入 Buffer FG2 后增加离心时间。
低 DNA 得率	起始样品没有完全破坏	对于干燥和新鲜样品，加入 Buffer FG1 前一定要充分均质化。
	组织裂解不充分	减少初始样品使用量或增加 Buffer FG1 和 FG2 的量。
	DNA 残留在柱子上	增加洗脱体积至 200 µL，离心前 65℃孵育 5 min。
	DNA 漂洗不当	DNA Wash Buffer 使用前按要求加入乙醇。
下游实验有问题	盐离子污染	DNA Wash Buffer 须在室温保存。
	乙醇残留	DNA 漂洗两次后，确保空离干燥，使得残留乙醇完全去除。

BIOMIGA（中国）
www.beiwobiomedical.com
400-115-2855
sales@beiwobiomedical.com