

## 真菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书

货号：AC11020

规格：50T/ 100T

保存：室温蛋白酶K, RNaseA -20℃放置；其他温(15℃-25℃) 干燥保存，复检期 12 个月，2℃-8℃保存时间更长。

试剂盒内容:	AC11020-50T	AC11020-100T
RNase A	1ml	1ml×2
蛋白酶 K	1ml	1ml×2
玻璃珠	6g	11g
溶液 A	10ml	20ml
溶液 B	10ml	20ml
漂洗液	15ml	15ml×2
洗脱液	10ml	20ml
吸附柱	50 个	100 个
收集管	50 个	100 个
说明书	1 份	1 份

### 产品简介：

真菌是具有真核和细胞壁的异养生物，种属很多，已报道的属达 1 万以上，种超过 10 万个。真菌通常又分为三类，即酵母菌、霉菌和蕈菌（大型真菌）。对于酵母菌和霉菌，可以用玻璃珠处理，而对于大型真菌，可直接用液氮研磨。经过前期处理的菌液，用硅质膜吸附，即可得到高纯度的基因组。提取纯化后的 DNA，可以直接用于 PCR/Real time-PCR, sequencing, Southern blot, mutant analysis, SNP 等下游应用实验。

### 操作步骤：

**使用前请先在漂洗液中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶体上的标签。所有离心步骤均为使用台式离心机在室温下离心。**

#### 1、样品的处理：

1) 对于酵母菌，取 1-2ml 培养好的菌液，离心收集，弃上清。加入 200ul 溶液 A，加入 20ul RNase A，再加入 100mg 玻璃珠，在高速振荡器上振荡，约 5-10min。

2) 霉菌(孢子也可相同处理)：取 50-100mg 菌丝，加 200ul 溶液 A，用玻璃研磨器适当研磨分散菌丝，加入 20ul RNase A，再加入 100mg 玻璃珠，在高速振荡器上振荡，约 30min。

3) 大型真菌（如蘑菇等）：称取 50-100mg 样品，倒入适量的液氮，立即研磨重复 3 次，使样品研成粉末（如无液氮，可加 200ul 溶液 A 后用玻璃研磨器适当研磨），加 200ul 溶液 A，加入 20ul RNase A，再加入 100mg 玻璃珠，在高速振荡器上振荡，约 5min。

2、加入 20ul 的蛋白酶 K(10mg/ml)，充分混匀，55℃水浴消化 30min，消化期间可颠倒离心管混匀数次。12000rpm 离心 2min。将上清转移到一个新的离心管中。如有沉淀，可再次离心。

3、在上清中加入 200ul 溶液 B，充分混匀。如出现白色沉淀，可放 55℃水浴 5min，沉淀即会消失，不影响后续实验。如溶液未变清亮，说明样品消化不彻底，可能导致提取的 DNA 量少及不纯，还有可能导致上柱后堵柱子，

请增加消化时间。

4、再加入 200ul 无水乙醇，充分混匀，此时可能会出现絮状沉淀，不影响 DNA 的提取，将溶液和絮状沉淀都加入吸附柱中，放置 2 分钟。

5、12000rpm 离心 1min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。

6、向吸附柱中加入 600ul 漂洗液(使用前请先检查是否已加入无水乙醇)，12000rpm 离心 1min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。

7、向吸附柱中加入 600ul 漂洗液，12000rpm 离心 1min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。

8、12000rpm 离心 2min，将吸附柱置于室温或 50℃温箱放置数分钟，目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，否则漂洗液中的乙醇会影响后续的实验如酶切、PCR 等。

9、将吸附柱放入一个干净的离心管中，向吸附膜中央悬空滴加 50-200ul 经 65℃水浴预热的洗脱液，室温放置 5min，12000rpm 离心 1min。

10、离心所得洗脱液再加入吸附柱中，室温放置 2min，12000rpm 离心 2min，即可得到高质量的基因组 DNA。

### 注意事项：

1. 由于真菌种类万千，对于一些特别难处理的真菌，可用液氮研磨，再用玻璃珠振荡，蛋白酶 K 处理，一般都可以得到一定量的基因组 DNA，如电泳检测很弱，一般 PCR 都会有较好结果。

2. 若溶液 A 或溶液 B 中有沉淀，可在 55℃水浴中重新溶解。

3. 如果 DNA 提取量很少，可加长玻璃珠处理时间，如果提取 DNA 成弥散短条带，可减少玻璃珠处理时间。

4. 洗脱缓冲液的体积最好不少于 50ul，体积过小会影响回收效率；洗脱液的 pH 值对洗脱效率也有影响，若需要用水做洗脱液应保证其 pH 值在 8.0 左右(可用 NaOH 将水的 pH 值调至此范围)，pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率；DNA 产物应保存在-20℃，以防 DNA 降解。

5. DNA 浓度及纯度检测：得到的基因组 DNA 片段的大小与样品保存时间、操作过程中的剪切力等因素有关。回收得到的 DNA 片段可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。DNA 应在 OD<sub>260</sub> 处有显著吸收峰，OD<sub>260</sub> 值为 1 相当于大约 50 μg/ml 双链 DNA、40 μg/ml 单链 DNA。OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值应为 1.7-1.9，如果洗脱时不使用洗脱缓冲液，而使用去离子水，比值会偏低，因为 pH 值和离子存在会影响光吸收值，但并不表示纯度低。

6. 在确保样品无误的情况下，如经过多次试验，都无法提出 DNA，请将部分样品寄至我公司，我们代为摸索优化条件，以使您的实验能够正常进行下去。