

真菌基因组 DNA 提取试剂盒

GV-Filamentous Fungi Genomic DNA Extraction Kit

Cat #: GV-F-DNA-50/ GV-F-DNA-100

产品规格: 50T/100T

保存与运输: 收到试剂盒, 请按照标签要求与相应条件保存。

本试剂盒适用于多种不同真菌的基因组 DNA 的提取。组织被裂解后, 经特异性结合 DNA 的离心柱吸附和独特的缓冲液系统提取纯化得基因组 DNA。纯化过的基因组 DNA 可以直接用作 PCR 模板、酶切、杂交等分子生物学实验。

三、试剂盒组成、储存、稳定性

| 成分 | 50T | 100T | 注意事项 |
|-------------------|------|--------|----------------------------------|
| β-Mercaptoethanol | 50μl | 100μl | |
| Buffer GF1 | 50ml | 100ml | |
| Buffer GF2 | 40ml | 80ml | |
| Buffer BL | 13ml | 26ml | |
| Buffer WF1 | 24ml | 48ml | Add 16ml(50T)/32ml(100T) ethanol |
| Buffer WF2 | 16ml | 2×16ml | Add 64 ml ethanol |
| Elution | 10ml | 20ml | For DNA Elute |
| Spin Columns | 50 | 100 | Max adsorption up to 20μg each |
| 1.5ml Tubes | 50 | 100 | |
| Handbook | 1 | 1 | |

β-Mercaptoethanol: 用之前低速离心, 避免挂壁。

Buffer GF1: 裂解液, 室温低时可能有沉淀, 37-65°C加热溶解。

Buffer GF2: 室温密闭贮存。

Buffer BL: 平衡液, 平衡液的加入能够激活硅基质膜, 改善吸附柱的吸附能力并提高吸附柱的均一性和稳定性, 专一吸附 DNA 的作用, 同时还可消除高温潮湿或其他不良环境因素对吸附柱造成的影响。

Buffer WF1: 洗涤液, 第一次使用前按照试剂瓶上指定加入无水乙醇, 室温密闭贮存。

Buffer WF2: 去盐液, 第一次使用前按照试剂瓶上指定加入无水乙醇, 室温密闭贮存。

Elution: 10mM Tris-HCl, pH8.0。室温密闭贮存。

一、注意事项

- 1、DNA 呈酸性, 建议在 10mM Tris-HCl, pH8.0 洗脱液中保存。
- 2、用平衡液处理过的柱子最好当天使用, 放置时间过长会影响效果。
- 3、β-Mercaptoethanol、Buffer GF1、Buffer GF2 和 Buffer BL 含有刺激性化合物, 操作时要戴乳胶手套和眼镜, 避免沾染皮肤、眼睛和衣服, 谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛时, 要立即用大量清水或生理盐水冲洗, 必要时寻求医疗咨询。

二、实验前试剂准备

- 1、第一次使用前 Buffer WF1 和 Buffer WF2 中按照试剂瓶上指定量加入无水乙醇。
- 2、检查 Buffer GF1 是否出现沉淀, 若有沉淀, 应于 37-65°C 水浴溶解后再使用。
- 3、将 Elution 或双蒸水 37-65°C 预热, 有利于提高洗脱效率。
- 4、离心柱预处理: 在离心柱中加入 200ul Buffer BL, 12000rpm 离心 1min, 去掉收集管中的平衡液。

四、操作步骤

- 1、取真菌 100mg 或者干粉样品 30mg，加入液氮充分研磨成粉末状。样品量不应超过 100mg（干粉样品 30mg），过多的样品使得裂解不充分，最终会导致基因组 DNA 提取量减少。
- 2、实验前在 1.5 ml 离心管中加入 800 μ l 的 Buffer GF1，于 65 $^{\circ}$ C 下预热，然后加入 β -Mercaptoethanol 至终浓度为 0.1%。
- 3、将研磨好的粉末加到以上预备好的 Buffer GF1 中，65 $^{\circ}$ C 水浴 20~30 min，其间颠倒混匀样品数次。
- 4、加入 500 μ l 氯仿，充分混匀，12,000 rpm 离心 5 min。
若真菌富含酚类、糖类（淀粉）在此步骤前进行 500 μ l 酚：氯仿（1：1）抽提一次。
- 5、小心吸取上层水相转入一个新的离心管中，加入 700 μ l Buffer GF2，充分混匀
- 6、将混匀的液体转入离心柱中（可分次转入），12,000 rpm 离心 1 min，弃废液。
- 7、加入 700 μ l Buffer WF1(使用前加入无水乙醇)，12,000 rpm 离心 30s~1min，弃废液。
- 8、加入 700 μ l Buffer WF2(使用前加入无水乙醇)，12,000 rpm 离心 30s~1min，弃废液。
- 9、加入 500 μ l Buffer WF2，12,000 rpm 离心 30 s~1 min，弃废液。
- 10、再次 12,000 rpm 离心 2min，将离心柱置于新的离心管中，并打开离心柱盖，于室温或 37 $^{\circ}$ C 恒温箱放置 5~10 min 直至无明显乙醇味。
- 11、在离心柱中央加入 50-200 μ l Elution(37-65 $^{\circ}$ C 预热)，室温放置 2~5min，12,000rpm 离心 2min。
- 12、离心得到的溶液再次加入离心柱中，室温放置 2 min，12,000 rpm 离心 2 min。
所得的溶液为纯化后的 DNA。

五、纯化效果检测

- 1、DNA 提取后得到的产物可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测完整性、浓度和纯度。
- 2、DNA 在 260nm 处有吸收峰，检测时应该使 OD₂₆₀ 值在 0.1 到 1.0 之间数值较准确。OD₂₆₀ 为 1 时大概相当于 50 μ g/ml 双链 DNA，40 μ g/ml 单链 DNA。
- 3、核酸浓度 (μ g/ml) = OD₂₆₀ × 50 × 稀释倍数。
- 4、OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的值应该为 1.7~2.0。

六、常见问题分析及建议：

- 1、DNA 产量低或没有 DNA。
 - 1) Buffer WF1、Buffer WF2 没有加无水乙醇：按说明书加入无水乙醇。
 - 2) 样品裂解不完全：适当延长裂解时间。
 - 4) 洗脱效率低：洗脱液使用前可 37-65 $^{\circ}$ C 预热，自备洗脱液 pH 值不合适，应保证在 7.5-8.5。
 - 5) 样品过量：按照说明书说明加样，或者按照试剂比例增加试剂量。
 - 6) 样品研磨不够充分：延长液氮研磨时间，以利于样品裂解。
- 2、DNA 纯度低。
 - 1) 消化不完全：样品量不要超过规定范围；延长消化时间，使样品充分消化。
 - 2) 洗涤不当：严格按照说明书步骤洗脱。
 - 3) 乙醇未除干净：适当延长晾干时间，使乙醇充分挥发。