

目 录

简 介	2
原 理	2
保质期	2
试剂盒组成	3
准备工作	4
方案 1:大型真菌 DNA 抽提	5
方案 2:液体培养或寄生真菌 DNA 抽提	6
方案 3:寄生真菌 DNA 富集抽提	7

版本: 202401

简介

HiPure Fungal DNA Kit 为真菌 DNA 抽提提供一种快速可靠的方法。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，提取过程中无需进行耗时的醇类沉淀，也无需用到酚氯仿抽提，整个提取过程只需 40 分钟。试剂盒适合于从小于 100mg 真菌样品和寄生真菌中提取高纯度的总 DNA。该方法得到的 DNA 可直接用于 PCR, SSR, AFLP, RAPD, 以及 Southern blot 等实验。

试剂盒	Fungal DNA Mini Kit	Fungal DNA Midi Kit	Fungal DNA Maxi Kit
编号	D3171	D3172	D3173
组织用量	100mg	500mg	2g
结合能力	100 μ g	500 μ g	2.5mg
柱型	1.5 ml 柱	15 ml 柱	50 ml 柱

原理

HiPure 硅胶柱是采用高结合力的玻璃纤维滤膜为基质。滤膜在高浓度离子化剂(如盐酸胍或异硫氰酸胍)条件下，可通过氢键和静电吸附核酸，而蛋白质或其它杂质不被吸附而去除。吸附了核酸的滤膜经洗涤去除蛋白质和盐，最后可以用低盐缓冲液(如 Buffer TE)或水，洗脱出滤膜上吸附的核酸。得到的核酸纯度高，可直接用于各种下游实验。

HiPure Fungal DNA Kit 基于硅胶柱纯化方式。样品在含 SDS 裂解液中匀浆裂解，DNA 释放到裂解液中，用高浓度盐沉淀去除多糖、蛋白质等杂质。得到上清液并加入乙醇和结合液，转移至柱子中过滤，DNA 被吸附上柱子的膜上，而蛋白质等杂质则不被吸附而去除。柱子经 Buffer GW2 洗涤去除盐分，最后 DNA 被 Elution Buffer (10Mm Tris, pH8.5)洗脱。洗脱的 DNA 可直接用于 PCR、Southern blot、RAPD 等实验。

组 成

HiPure Fungal DNA Mini Kit

产品编号	D3171-01	D3171-02	D3171-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure DNA Mini Columns II	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
塑料小勺子	2 个	4 个	10 个
氧化锆珠(0.6-0.8mm)	15 g	50 g	250 g
Buffer ATL	10 ml	40 ml	180 ml
Buffer PS	3 ml	10 ml	50 ml
Buffer GWP	10 ml	40 ml	250 ml
Buffer GW2*	6 ml	10 ml	50 ml
Elution Buffer	5 ml	15 ml	30 ml
说明书	1	1	1

保 质 期

本产品组份可在室温下保存 18 个月。RNase A 干粉室温运输和保存，长期保存(>3 个月)放置于-20~8℃。

需要准备材料和工具

- 无水乙醇(96-100%)
- 小型离心管(<12,000 × g)
- 65℃水浴锅
- 用无水乙醇稀释 Buffer GW2，并于室温保存

方案 1. 大型真菌 DNA - 液氮研磨

该方案采用液氮研磨裂解真菌细胞壁的方法,适合于从大型真菌或样品量较多的样品中提取高纯度的真菌总 DNA。

1. 用液氮将真菌组织研磨成粉末,转移 50~150mg 样品至 1.5ml 离心管中,立即加入 600 μ l Buffer ATL 至样品中,涡旋使样品充分分散。65 $^{\circ}$ C 处理 10 分钟。
动植物组织中寄生真菌(液氮研磨破壁):取 100~100mg 植物组织、或 25-50mg 动物组织用液氮将样品研磨成粉末。若样品富含多酚类物质,加入 2-巯基乙醇至 Buffer ATL,终浓度 1%,提高裂解液的抗氧能力。
2. 加入 150 μ l Buffer PS 至样品,涡旋混匀 10 秒。室温下,13,000 \times g 离心 5 分钟。
3. 转移 650 μ l 上清液至新离心管中,加入 650 μ l Buffer GWP,颠倒混匀 10~15 次。
4. 把 HiPure DNA Mini Columns II 柱装在收集管,转移一半体积的混合液至柱子中。10,000 \times g 离心 60 秒。
5. 倒弃滤液把柱子装回收集管。转移剩余混合液至柱子中。10,000 \times g 离心 60 秒。
6. 倒弃滤液把柱子装回收集管。加入 600 μ l Buffer GW2(已用无水乙醇稀释)至柱子中。10,000 \times g 离心 60 秒。
Buffer GW2 在使用之前,必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签进行稀释。
7. 倒弃滤液,把柱子套回收集管中。加入 300 μ l Buffer GW2(已用无水乙醇稀释)至柱子。13,000 \times g 离心 2 分钟。
取出柱子时不要颠倒或侧转,不要让柱子的底部碰到收集管中的液体。若碰到了液体,倒弃废液后,把柱子放回收集管中再离心一次甩干柱子。
8. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中,加入 30~50 μ l 预热到 65 $^{\circ}$ C Elution Buffer 至柱子的膜中央。室温静置 3 分钟,12,000 \times g 离心 1 分钟。
9. 再加入 30~50 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C 的 Elution Buffer 至柱子的膜中央。放置 3 分钟。12,000 \times g 离心 1 分钟。
10. 丢弃 DNA 结合柱,把 DNA 保存于-20 $^{\circ}$ C。

方案 2. 真菌 DNA - 珠磨法提取

该方案采用氧化锆珠珠磨裂解真菌细胞壁，适合于从液体培养真菌、菌丝体、孢子粉、微量真菌、寄生真菌等粉末状或细胞状真菌样品中提取高纯度的总 DNA。

1. 真菌样品的收集：

- **固体培养真菌：**加入 1.5~1.8ml 生理盐水或 PBS 从固体培养基刮洗出真菌，并转移至 2.0ml 离心管中，13,000 × g 离心 3 分钟收集真菌，倒弃上清液。
- **液体培养真菌 (1×10⁷)：**转移 1.8ml 真菌培养液(湿重不要超过 100mg)至 2.0ml 离心管中，13,000 × g 离心 3 分钟收集真菌，倒弃上清液。
- **孢子粉：**转移 30-50mg 孢子粉至 2.0ml 离心管中。
- **体液中寄生真菌：**转移 1.0-1.8ml 血清，血清，分泌液，拭子浸泡液、组织匀浆液，体液等液体样品至 2.0ml 离心管中。13,000 × g 离心 10 分钟收集真菌，倒弃上清液。
- **痰液：**取适量痰液，加入 4 倍体积的新鲜制备的 0.1% DTT 溶液，涡旋混匀 10 秒，室温放置 15~30 分钟，期间要不断涡旋震荡，直至团块消失，痰液全部匀质化。取 1.8ml 液化液至 2.0ml 离心管中，13,000 × g 离心 10 分钟收集细菌，倒弃上清液。
- **全血：**取 0.5ml 全血至离心管中，加入 3 倍红细胞裂解液 (10 × Buffer RBC) 裂解红细胞，500 × g 离心 5 分钟沉淀去除白细胞。转移 1.5~1.8ml 上清液至 2.0ml 离心管中，13,000 × g 离心 10 分钟收集细菌，倒弃上清液。
- **组织中寄生真菌：**取 30~100mg 冻存或新鲜的动植物组织，加入 1.0~1.5ml 生理盐水或 PBS 进行充分匀浆，静置 1~3 分钟沉淀去除大颗粒后，转移上清液至 2ml 离心管中，13,000 × g 离心 10 分钟收集微生物，倒弃上清液。

2. 加入 600µl Buffer ATL 和一勺氧化锆珠 (0.6-0.8mm) 至样品中，盖紧盖子，在涡旋仪上最高速度涡旋 10-15 分钟，或珠磨仪进行高效珠磨。

- 涡旋仪：推荐使用美基涡旋仪 MagMix A，这台涡旋仪带 2ml 离心管的夹具，可一次高效处理 10~20 个样品。实验室常用的涡旋仪或带振荡功能的恒温金属浴也可以使用，使有恒温金属浴时需要 2ml 离心管中，让管子间的磨擦力防止管子无效旋转减少

珠磨效果。

- Powerlyzer 珠磨仪：建议 2000rpm 珠磨 30 秒，暂停 30 秒，再 2000rpm 珠磨 30 秒。
 - FastPrep24 珠磨仪：建议 5m/s，珠磨 30 秒，暂停 30 秒，再 5m/s 珠磨 30 秒。
 - Tissue Lysis II 珠磨仪：建议 25Hz 珠磨 5 分钟，重新调整位置后再 25Hz 珠磨 5 分钟。
3. 65°C 处理 10 分钟。
 4. 加入 150µl Buffer PS 至样品中，涡旋混匀 5 秒。室温下，13,000 × g 离心 5 分钟。
 5. 转移 650µl 上清液至新的离心管中，加入 650µl Buffer GWP 至样品中，颠倒混匀 6-8 次。
 6. 把 HiPure DNA Mini Columns II 柱装在收集管，转移一半体积的混合液至柱子中。10,000 × g 离心 60 秒。
 7. 倒弃滤液把柱子装回收集管。转移剩余混合液至柱子中。10,000 × g 离心 60 秒。
 8. 倒弃滤液把柱子装回收集管。加入 600µl Buffer GW2(已用无水乙醇稀释)至柱子中。10,000 × g 离心 60 秒。
Buffer GW2 在使用之前，必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签进行稀释。
 9. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。加入 300µl Buffer GW2(已用无水乙醇稀释)至柱子。13,000 × g 离心 2 分钟。
取出柱子时不要颠倒或侧转，不要让柱子的底部碰到收集管中的液体。若碰到了液体，倒弃废液后，把柱子放回收集管中再离心一次甩干柱子。
 10. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中，加入 30~50µl 预热到 65°C Elution Buffer 至柱子的膜中央。室温静置 3 分钟，12,000 × g 离心 1 分钟。
 11. 再加入 30~50µl 预热至 65°C 的 Elution Buffer 至柱子的膜中央。放置 3 分钟。12,000 × g 离心 1 分钟。
 12. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于-20°C。

方案 3. 从动物组织和液体样品中富集真菌 DNA

该方案适合于从动植物组织或液体样品中富集提取寄生真菌 DNA。该方案采用 SDS 选择性温和裂解方法去除真核细胞 DNA。您可以根据项目要求，增加 DNase I 或 NaOH 等处理方法，进一步去除真核细胞 DNA，提高总 DNA 中真菌 DNA 的比例。

1. 真菌样品的收集：

- **体液中寄生真菌：**转移 1.0ml 血清，血清，分泌液，拭子浸泡液、组织匀浆液，体液等液体样品至 2.0ml 离心管中。加入 0.5ml Buffer ATL，颠倒混匀，37°C 放置 10 分钟裂解真核细胞，其间反复颠倒混匀数次裂解真核细胞。13,000 × g 离心 10 分钟收集真菌，倒弃上清液。
- **痰液：**取适量痰液，加入 3 倍体积的 4% NaOH，涡旋混匀 10 秒，室温放置 15~30 分钟，期间要不断涡旋震荡，直至团块消失，痰液全部匀质化。取 1.8ml 液化液至 2.0ml 离心管中，13,000 × g 离心 10 分钟收集真菌，倒弃上清液。
- **全血：**取 0.5~2ml 全血至离心管中，加入 3 倍红细胞裂解液（10 × Buffer RBC）裂解红细胞，4,000 × g 离心 10 分钟收集真菌，倒弃上清液。加入 0.5ml 灭菌水重悬细胞，转移至 2.0ml 离心管中，加入 0.5ml Buffer ATL 至样品中，颠倒混匀，37°C 放置 10 分钟裂解真核细胞，13,000 × g 离心 10 分钟收集真菌，倒弃上清液。
- **组织中寄生真菌：**取 30~100mg 冻存或新鲜的动植物组织，加入 1.0ml 生理盐水或 PBS 进行充分匀浆，并转移至 2.0ml 离心管中，加入 0.7ml Buffer ATL，颠倒混匀，37°C 放置 10 分钟裂解真核细胞。13,000 × g 离心 10 分钟收集微生物，倒弃上清液。

2. 加入 600µl Buffer ATL 和一勺氧化锆珠（0.6-0.8mm）至样品中，盖紧盖子，在涡旋仪上最高速度涡旋 10-15 分钟，或珠磨仪进行高效珠磨。

- **涡旋仪：**推荐使用美基涡旋仪 MagMix A 或高效的水平式涡旋仪 MagMix B。这两台涡旋仪带 2ml 离心管的夹具，可一次高效处理 10~20 个样品。实验室常用的涡旋仪或带振荡功能的恒温金属浴也可以使用，使有恒温金属浴时需要 2ml 离心管中，让管子间的磨擦力防止管子无效旋转减少珠磨效果。
- **PowerLyzer 珠磨仪：**建议 2000rpm 珠磨 30 秒，暂停 30 秒，再 2000rpm 珠磨 30 秒。

- FastPrep24 珠磨仪：建议 5m/s，珠磨 30 秒，暂停 30 秒，再 5m/s 珠磨 30 秒。
 - Tissue Lysis II 珠磨仪：建议 25Hz 珠磨 5 分钟，重新调整位置后再 25Hz 珠磨 5 分钟。
3. 65°C 处理 10 分钟。
 4. 加入 150µl Buffer PS 至样品中，涡旋混匀 5 秒。室温下，13,000 × g 离心 5 分钟。
 5. 转移 650µl 上清液至新的离心管中，加入 650µl Buffer GWP 至样品中。颠倒混匀 3-5 次。
 6. 把 HiPure DNA Mini Columns II 柱装在收集管，转移一半体积的混合液至柱子中。10,000 × g 离心 60 秒。
 7. 倒弃滤液把柱子装回收集管。转移剩余混合液至柱子中。10,000 × g 离心 60 秒。
 8. 倒弃滤液把柱子装回收集管。加入 600µl Buffer GW2(已用无水乙醇稀释)至柱子中。10,000 × g 离心 60 秒。
Buffer GW2 在使用之前，必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签进行稀释。
 9. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。加入 300µl Buffer GW2(已用无水乙醇稀释)至柱子。13,000 × g 离心 2 分钟。
取出柱子时不要颠倒或侧转，不要让柱子的底部碰到收集管中的液体。若碰到了液体，倒弃废液后，把柱子放回收集管中再离心一次甩干柱子。
 10. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中，加入 30~50µl 预热到 65°C Elution Buffer 至柱子的膜中央。室温静置 3 分钟，12,000 × g 离心 1 分钟。
 13. 再加入 30~50µl 预热至 65°C 的 Elution Buffer 至柱子的膜中央。放置 3 分钟。12,000 × g 离心 1 分钟。
 14. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于-20°C。