

Technical literature is available at: www.mesgenbio.com. E-mail MesGen Technical Services if you have questions on use of this system: tech@mesgenbio.com



产品简介

真菌是具有真核和细胞壁的异养生物，种属很多，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。

产品特点

1. 操作简单、快速：1-3h即可获得超纯的真菌基因组DNA；
2. 无毒害：无需使用酚、氯仿等有害试剂，操作安全；
3. 产物纯度高：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；

产品包装

组分	50 tests	100 tests
Solution A	10mL	20mL
Solution B	10mL	20mL
Binding Buffer	15mL	30mL
DNA Wash Buffer	12mL	24mL
Elution Buffer	10mL	20mL
RNase A	1mL	2mL
Proteinase K	1mL	2mL

操作方法

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 **Solution A**，加入20ul **RNase A**，再加入100mg玻璃珠（破壁用玻璃珠，直径<106um，客户自备，也可以向我们订购，货号MB0001），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 **Solution 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，加200ul **Solution 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**Proteinase K**（10mg/ml），充分混匀，60°C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 **Solution B**，充分混匀，放60°C水浴5min，溶液逐步变清亮。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，可适当增加消化时间；12000rpm

离心2min, 取上清, 转移到新的离心管中;

4、加入300ul **Binding Buffer**, 充分混匀, 将溶液加入吸附柱中, 也可以分次加入柱中;

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500ul **DNA Wash Buffer** (使用前请先检查是否已加入规定体积的无水乙醇), 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500ul **DNA Wash Buffer**, 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°C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°C水浴预热的**Elution Buffer**, 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. 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。

3. 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°C, 以防 DNA 降解。

4. 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 OD260 处有显著吸收峰, OD260 值为 1 相当于大约 50 $\mu\text{g/ml}$ 双链 DNA、40 $\mu\text{g/ml}$ 单链 DNA。OD260/OD280 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。

保存条件

RNase A, Proteinase K 置于-20°C; 其余组成室温保存, Solution B 中若有沉淀, 可在 65°C水浴中重新溶解, 不影响试剂盒正常使用。

仅供科学研究, 不得用于临床治疗