D3195　HP Fungal DNA Kit

简易中文步骤

√实验前请按英文说明书正确稀释和保存 SPW Wash Buffer

➢　使用【无水乙醇】对 SPW Wash Buffer 进行稀释，稀释后室温保存

货号	加入量
D3195-00	10mL
D3195-01	100mL
D3195-02	100mL（每瓶）

A. 干燥样品

这是分离总细胞（线粒体，叶绿体和基因组）DNA 的最有效方法。对于 RFLP 定位，Southern 杂交上的几个轨迹的产量通常是足够的。干燥可以延长新鲜样品在处理前的保存时间。样品可通过在 45℃烘箱下过夜来干燥，研磨成粉，并在室温下干燥保存。干燥样本制备：取≤50mg 的干燥组织置于一个小离心管中（建议用 2mL 的管来处理 > 50mg 的组织）用小的研杵来研磨。一次性的 Kontes 研杵可以很好的满足要求，Omega 公司有售（货号 SSI-1014-39 和 SSI-1015-39）。对于 PCR 和克隆等关键工作，最好使用一次性研杵。制备小颗粒干粉有利于得到较高的 DNA 质量及产量。

1. 将10-50mg的干燥粉末加入到含有600μl Buffer CPL和10μl β-巯基乙醇的2.0mL离心管中，涡旋混匀。

   TIP：以 4-6 组管进行实验，每组样品研磨，加入 Buffer CPL 和β-巯基乙醇后，在加另一组之前，先进行步骤 2。最开始时所用干燥样品量不要超过 50mg，后续可根据结果增加样品用量。

2. 在 65℃孵育 30min，期间取出离心管混匀 2 次。

   选做：如果需要，可在孵育前加入 10μl RNase A (50mg/mL) 到裂解液中除去 RNA。

3. 加入 600μl 氯仿：异戊醇（24:1）混合物，涡旋混匀，＞10,000xg 离心 5min；
4. 小心转移 300μl 上清液到新的 1.5mL 离心管中，注意不要转移到沉淀物；
5. 加入 150μl Buffer CXD 和 300μl 无水乙醇调节结合条件，涡旋混匀，加入乙醇后可能会形成沉淀，但不会影响 DNA 的提取；

   Note：可在此步之后进入真空抽滤提取，详见后文。

6. 将 HiBind® DNA column 套入到 2mL 收集管中，转移步骤 5 混合液（包括沉淀物）到 HiBind® DNA column 中，10,000xg 离心 1min，弃滤液；
7. 将 HiBind® DNA column 套回到 2mL 收集管中，加入 650μl SPW Wash Buffer（已加无水乙醇稀释），10,000xg 离心 1min，弃滤液；

中国区总代理:广州飞扬生物工程有限公司 | 技术支持 020-32051125 | QQ:800848200 | omegabiotek.com.cn

Note：SPW Wash Buffer 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。

8. 重复步骤 7；

9. 将 HiBind® DNA column 套回到 2mL 收集管中，最大速度离心 2min 干燥柱子，此步主要用于去除多余的乙醇，以免影响下游操作；

10. 将 HiBind® DNA column 套入到新的 1.5mL 离心管中，加入 100μl 在 65℃预热的 Elution Buffer（或无菌水），室温静置 2min，10,000xg 离心 1min 洗脱 DNA，减小洗脱体积将减少产量，但不建议用超过 200μl 的洗脱液进行洗液。

11. 重复步骤 10，再次加入 100μl Elution Buffer，应使用另一新的 1.5mL 离心管以保持第一次洗脱的浓度。

B. 新鲜或冻存样品

这一方案适合于从新鲜或冻存的真菌组织样本高效地提取样品基因组 DNA。由于不同真菌中水份及多糖含量的巨大差别，样本的使用量应该控制在≤200mg。幼叶和针叶的提取效果最佳。该方法抽提的 DNA 足够于 Southern 杂交中的几条印迹条带的用量。准备样本时，收集新鲜组织于一个 1.5mL 或 2 mL 的小离心管中，用镊子夹住离心管，浸入液氮以冷冻样本，可以使用从 VWR 中购买的一次性 Kontes 颗粒研磨器（Cat ＃KT749521-0500）研磨样品。或者，也可让液氮挥发后把样品贮存在-70℃环境下备用。对于 PCR 和克隆等关键工作，最好使用一次性研杵。

1. 将收集到的样品（起始量 100mg）加入到 2.0mL 离心管中，加入 500μl Buffer CPL 和 10μl β-巯基乙醇，涡旋混匀裂解样品；

TIP：以 4-6 样为一组进行实验，每组样品研磨，加入 Buffer CPL 和β-巯基乙醇后，在加另一组之前，先进行步骤 2。最开始时所用干燥样品量用 100mg，如果产率和纯度令人满意，可增加样品用量至 200mg。

2. 在 65℃孵育 15min，在孵育期间取出离心管混匀 2 次。

选做：如果需要，可在孵育之前加入 10μl RNase 到裂解液中除去 RNA。

3. 加入 500μl 氯仿：异戊醇（24:1）混合液，涡旋混匀，≥10,000xg 离心 5min；

4. 小心转移 300μl 上清液到新的 1.5mL 离心管中，注意不要转移到沉淀；

5. 加入 150μl Buffer CXD 和 300μl 无水乙醇调节结合条件，涡旋混匀；

6. 将 HiBind® DNA column 套入到 2mL 收集管中，转移步骤 5 混合液（包括沉淀物）到 HiBind® DNA column 中，10,000xg 离心 1min，弃滤液；

7. 将 HiBind® DNA column 套回到 2mL 收集管中，加入 650μl SPW Wash Buffer（已加无水乙醇稀释），10,000xg 离心 1min，弃滤液；

Note：SPW Wash Buffer 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。

中国区总代理:广州飞扬生物工程有限公司 | 技术支持 020-32051125 | QQ:800848200 | omegabiotek.com.cn

8. 重复步骤 7；
9. 将 HiBind® DNA column 套回到 2mL 收集管中，最大速度离心 2min 干燥柱子，此步主要用于去除多余的乙醇，以免影响下游操作；
10. 将 HiBind® DNA column 套入到新的 1.5mL 离心管中，加入 50-100μl 在 65℃预热的 Elution Buffer（或无菌水），室温静置 2min，10,000xg 离心 1min 洗脱 DNA，减小洗脱体积将减少产量，但不建议用超过 200μl 的洗脱液进行洗液。
11. 重复步骤 10，再次加入 50-100μl Elution Buffer，应使用另一新的 1.5mL 离心管以保持第一次洗脱的浓度。

C. 针对低 DNA 含量的样本

这一改进的方案可以从低 DNA 含量，或需要高产量的新鲜、冷冻或干燥样品中快速分离出 DNA。此方案增加了起始材料量，所以 DNA 产量高于从方案 A 和 B 所得。注意：此试剂盒中的试剂是为标准方案（方案 A 和 B）设计的。使用此方案需要额外的溶液。这些溶液可以单独从经销商够得，货请登录获得定购信息。

遵从方案 A、B 部分中关于制备干燥、新鲜样品的建议，注意该方案样品大小的限制。

干燥样品 - 使用≤200 mg 干燥组织

新鲜样品 - 使用≤400 mg 新鲜/冻存组织

1. 收集样本于 15mL 离心管中，立即加入 9.0 mL Buffer CPL，涡旋混匀裂解样本；
   可选：使用前，每 1 mL Buffer CPL 加入 10μl 2-巯基乙醇，充分混匀备用
2. 加入 4.5 mL 氯仿：异戊醇（24:1）混合液，最大速度涡旋混匀后 3,000xg 室温离心 10min；
3. 小心转移上清至新的 15mL 离心管，注意切勿吸取到任何沉淀。再次加入 4.5 mL 氯仿：异戊醇（24:1）混合液，最大速度涡旋混匀后 3,000xg 室温离心 10min；
4. 小心转移上清 300ul 到新的 15mL 离心管，加入 0.7 倍上清体积异丙醇，涡旋混匀沉淀 DNA;
5. 3,000xg 室温离心 10min 收集 DNA 沉淀，延长离心时间不会提高产量；
6. 小心去掉上清，请确保不倒掉 DNA 沉淀。把离心管导致于干燥吸水纸上 1min 去除多余水分。但没必要干燥 DNA 沉淀；
7. 加入 400μl 预热至 65℃无菌水，涡旋重悬沉淀。加入 10μl RNase A(50mg/mL)混匀，为了有效溶解 DNA，可在 65℃短暂孵育；
8. 加入 200μl Buffer CXD 和 400μl 无水乙醇涡旋混匀，调节结合条件，加入乙醇可能会形成沉淀，但不会影响 DNA 的形成；
9. 把 HiBind® DNA column 套在 2.0 mL 收集管中（盒内提供），每次转移 700μl 混

中国区总代理:广州飞扬生物工程有限公司 | 技术支持 020-32051125 | QQ:800848200 | omegabiotek.com.cn

合液至结合柱中。10，000xg 离心 1min 以结合 DNA 上柱，弃滤液；

10. 重复第 9 步至所有混合液过柱，弃收集管；

11. 将 HiBind® DNA column 套在另一个收集管中，再加入 650μl SPW Wash Buffer 至 HiBind® DNA column 中，室温 10,000×g 离心 1min，弃去滤过液。重复使用此收集管；

Note：SPW Wash Buffer 在使用前必须按照说明书用无水乙醇稀释。

12. 再次加入 650μl SPW Wash Buffer 重复第 11 步；

13. 将 HiBind® DNA column 重新套回 2mL 收集管中，空柱 10,000×g 离心 2min 以干燥结合柱的基质；此步主要用于去除多余的乙醇，以免影响下游操作。

14. 将 HiBind® DNA column 套于 1.5mL 灭菌离心管，加入 100μl 65℃预热 Elution Buffer 至结合膜中央。室温静置 1min 后，10,000×g 离心 1min 洗脱 DNA。

15. 加入 100μl Elution Buffer，重复第 14 步。建议使用另一新 1.5mL 离心管收集二次洗脱液，可保持第一次洗脱管内高浓度 DNA 不被稀释。

TIP：加入在 60℃-70℃预热的 Elution Buffer，室温静置 5min 后洗脱，可增加产量。最终产量决定于样品大小、干燥和新鲜情况，该方法可以通常获得 2μl-10μl 限制性 DNA。

真空抽滤方案

1. 按照标准方案步骤，准备干燥样品，直至到将 DNA/Buffer CXD/乙醇混合物转移过柱前；

2. 按照说明书，将真空抽滤装置与柱子连接；

3. 将含有 DNA/Buffer CXD/乙醇的混合物转移到柱子中；

4. 打开真空抽滤装置，直至全部混合液转移过柱，关闭真空抽滤装置；

5. 加入 750μl SPW WashBuffer，打开真空抽滤装置，直至全部混合液转移过柱，关闭真空抽滤装置，重复该步骤一次；

6. 将柱子从真空抽滤装置取下，套入到 2mL 收集管中，离心 1min 干燥柱子；

7. 将柱子套入到新的 1.5mL 离心管中，加入 150μl Elution Buffer 或无菌水，最大速度离心 1min 洗脱 DNA。

中文翻译仅供辅助阅读，详情请以英文说明书为准

中国区总代理:广州飞扬生物工程有限公司 | 技术支持 020-32051125 | QQ:800848200 | omegabiotek.com.cn