

## FastPure Fungal DNA Kit Handbook

### FastPure 真菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书（离心柱型）

#### 产品组成

FastPure Fungal gDNA Mini Kit		
产品编号	EK-1209-50T	EK-1209-100T
纯化次数	50 次	100 次
Buffer BB	25mL	50mL
Buffer IRB	17mL	34mL
Buffer WB	12mL	24mL
Proteinase K Solution (20mg/mL)	1.1mL	2.2mL
Lyticase Solution (25mg/mL)	0.6mL	1.2mL
Buffer EB	15mL	30mL
DNA Mini Columns	50 个	100 个
2mL Collection Tubes	50 个	100 个
使用手册	1	1

#### 产品介绍

本产品适合于从  $5 \times 10^7$  培养真菌样品中提取总 DNA。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提，也无需进行耗时的醇类沉淀，整个提取过程只需 30~60min。得到的 DNA 可直接用于 PCR、Southern Blot 等实验。

#### 存储条件

本产品除 Proteinase K Solution 和 Lyticase Solution 外，可在室温(15~25°C)保存 12 个月。Proteinase K Solution 和 Lyticase Solution 请分装保存于-20°C。

#### 需要额外准备的材料

- 无水乙醇（96%-100%）
- 无菌 1.5mL 离心管
- 异丙醇
- 20mg/mL RNase A 溶液
- PBS

#### 开始前注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

- 样品应避免反复冻融，否则会导致提取的 DNA 片段较小且提取量下降。
- 若 Buffer BB 或 Buffer IRB 中有沉淀，可在 37°C 水浴中重新溶解，摇匀后使用。
- 水浴锅温度设置至 70°C。

#### 开始前试剂准备

- Buffer IRB 按瓶子标签所示提前加入相应体积的无水乙醇
- Buffer WB 按瓶子标签所示提前加入相应体积的无水乙醇

**操作步骤:**

1. 取 200 $\mu$ L 真菌菌液（最多不超过  $5 \times 10^7$  cells）于无酶 1.5mL 离心管中。
2. 10000 $\times$ g 离心 1min 或 3000 $\times$ g 离心 5min 收集真菌沉淀。
3. 加入 200 $\mu$ L 无菌 PBS 将真菌重悬。  
注意：为尽可能减少 LB 等真菌培养基对提取过程中的影响，可重复步骤 2-3 一次。
4. 加入 10 $\mu$ L Lyticase Solution 至溶液中，充分涡旋混匀 15-20s 后 37 $^{\circ}$ C 孵育 30-60min。  
注意：过量的真菌细胞会导致破壁酶破壁效果不好，如若发现提取效果不好时，可适当增加破壁酶溶液量。对于一些难裂解的真菌（如丝状真菌或含有色素的真菌），孵育时间可延长至 1-2 小时。若有条件，辅助使用液氮研磨将显著提高得率。
5. （可选）加入 5 $\mu$ L RNase A Solution(20mg/mL，自备) 至消化液中，颠倒混匀，室温或 37 $^{\circ}$ C 放置 5-10min。
6. 将所得溶液加入 200 $\mu$ L Buffer BB 并充分混匀，加入 20 $\mu$ L Proteinase K Solution 后立即混匀，彻底混匀后置于 70 $^{\circ}$ C 水浴中孵育 10min。
7. 将溶液从水浴中取出，并加入 100 $\mu$ L 异丙醇充分混匀。  
加入异丙醇后，可能会出现丝状或云雾状 DNA 析出，这属于正常现象。
8. 于 13000 $\times$ g 离心 5min，离心结束后取上清溶液加入核酸吸附柱（提前套在 2mL 收集管中）。  
加入异丙醇后应立即充分颠倒混匀。离心后取上清液时，请勿触碰底部的沉淀物，以防止杂质堵塞吸附柱。
9. 以 8000 $\times$ g 离心 1min，离心完后倒掉收集管中的废液。
10. 向吸附柱中加入 500 $\mu$ L Buffer IRB，8000 $\times$ g 离心 1min，离心完后倒掉收集管中的废液。
11. 向吸附柱中加入 500 $\mu$ L Buffer WB（已加入无水乙醇），8000 $\times$ g 离心 1min，离心完后倒掉收集管中的废液。
12. 重复操作步骤 11 一次。

13. 倒掉收集管中的废液后将吸附柱再次套入收集管中，最大转速（ $\sim 13,400 \times$ g）离心 2min 以除尽 Buffer WB。将吸附柱套入新的 1.5mL 无酶离心管中并开盖置于室温放置 5-10min 彻底晾干乙醇。

注意：Buffer WB 中的乙醇残留会影响后续的酶反应实验。

14. 向吸附柱膜中间位置悬空滴加 50-100 $\mu$ L Buffer EB，室温静置 2min 后，最大转速（ $\sim 13,400 \times$ g）离心 2min 收集核酸溶液。丢弃柱子，盖上离心管盖子置于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

注意：洗脱体积不应小于 30 $\mu$ L，体积过少会影响回收效率。洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。为了提高 DNA 的回收量，可将 Buffer EB 加热（约 60 $^{\circ}$ C）并洗脱两次，可增加约 15-20% 得率。

**常见问题:**

1. 柱子堵塞
  - 样品用量太多: 减少样品用量。真菌细胞量应控制在  $5 \times 10^7$  以内。
  - 样品裂解不充分: 重新提取，加入 Buffer BB 及蛋白酶 K 后充分涡旋混匀。
2. DNA 纯度不达标:
  - 样品用量太多: 减小用量。
  - 某些真菌会产生大量的多糖或次生代谢产物: 可减少起始样本量; 或在加入 Buffer BB 裂解后, 增加一次 12000 $\times$ g 离心 3 min 取上清的操作, 再进入异丙醇沉淀步骤。
3. DNA 产量低
  - 试剂准备有误: 检查 Buffer IRB 和 Buffer WB 中是否加入无水乙醇。
  - 样品消化不充分: 用液氮或研磨仪可提高样品消化效果, 延长 Proteinase K 消化时间或过夜消化。
  - 洗脱不充分: 洗脱液需加到膜中央, 增加洗脱体积或次数。