

## 通用型基因组 DNA 快速提取试剂盒

### 一、产品简介

本试剂盒采用独特的裂解液,配合 proteinase K 裂解细胞释放基因组 DNA,释放的基因组 DNA 被选择性吸附到硅胶膜上。获得的 DNA 包括基因组 DNA、线粒体和病毒 DNA,可直接应用于酶切、PCR、基因芯片、NGS 等后续实验。

#### 适合处理以下几类来源的非液体类样品:

- A. 人和动物组织: 1-25 mg 动物组织或穿刺组织、福尔马林浸泡的组织、石蜡包埋切片、鼠尾、毛囊、指甲等
- B. 干燥的人和动物体液: 滤纸、纸巾或样品采集卡上的干血点和唾液、香烟过滤嘴等
- C. 可离心收集的  $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^7$  动物细胞
- D. 可离心收集的  $1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^9$  细菌
- E. 可离心收集的  $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^7$  酵母或真菌细胞
- F. 10-100 mg 真菌菌块或菌丝

#### 方法简便,具备以下特点:

- ✓ 处理人和动物组织无需研磨
- ✓ 处理人和动物组织分散细胞和释放 DNA 为同一个步骤,无需使用两个温度分两个步骤操作
- ✓ 处理离心收集的细菌和细胞在悬浮样品后直接进行裂解,无需再添加裂解试剂
- ✓ 处理石蜡包埋切片无需脱蜡

#### 处理部分样品需用户自备或购买的试剂和耗材:

从石蜡包埋切片中提取 DNA,需用户购买过滤柱-F (Cat#NC412)

从干燥于纸巾或滤纸的体液中提取 DNA,需用户购买过滤柱-N (NC414)

从革兰氏阳性细菌中提取基因组 DNA,需用户自备或者购买 Lysozyme 裂解缓冲液 (Cat#RE103)

从金黄色葡萄球菌中提取基因组 DNA,需用户自备或者购买 Lysostaphin (Cat#RE104)

从酵母中提取基因组 DNA,需用户自备或者购买 Lyticase 裂解缓冲液 (Cat#RE102)

#### 相关产品信息:

目录号	产品名	处理样品	产品特点
DK803	痕量 DNA 提取试剂盒	痕量细胞、体液和组织 (详见说明书)	更高的回收率 对 DNA 片段大小无选择性
DK805	口腔拭子 DNA 快速提取试剂盒	口腔拭子	有效去除食物残渣 DNA

## 二、试剂盒组成和储存

组成内容	DK806-01 (50 次)	DK806-02 (200 次)	原理与用途
Proteinase K*	1 ml	1 ml×4	降解蛋白
Buffer SLA	30 ml	120 ml	分散、裂解细胞、释放 DNA
Buffer GD2	20 ml	80 ml	调整 DNA 结合条件
Buffer WDA	30 ml	120 ml	洗涤去除蛋白
Buffer WB1 <sup>§</sup>	16 ml	65 ml	洗涤去除盐
DNA 吸附柱-C15	50 个	200 个	选择性吸附 DNA
收集管	50 个×2	200 个×2	接收废液
1.5 ml 离心管(用于洗脱)	50 个	200 个	接收洗脱的 DNA
TE*	15 ml	30 ml	洗脱 DNA
说明书	1 份	1 份	

\*Proteinase K: 20 mg/ml, 室温保存; 如析出不溶物, 使用前摇晃混合均匀。

<sup>§</sup>Buffer WB1: 第一次使用前按试剂瓶所示体积加入无水乙醇, 混合均匀。

\*TE: 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0(25°C)。

所有试剂盒组成成分可于室温储存。

## 三、注意事项

1. Proteinase K、Buffer SLA、Buffer GD2 和 Buffer EDA 含刺激性化合物, 避免沾染皮肤、眼睛和衣服、谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛, 立即使用大量水或生理盐水冲洗沾染处, 必要时寻求医疗咨询。
2. 使用后应及时盖紧试剂瓶盖, 以免影响下次使用效果。

## 四、样品处理方法索引

处理样品方法	页码
五、从 1-25 mg 动物组织或穿刺组织、鼠尾、毛囊、指甲等样品中提取 DNA.....	3
六、从石蜡包埋组织和切片中提取 DNA.....	4
七、从福尔马林浸泡的组织中提取 DNA.....	5
八、从干燥的体液中提取 DNA.....	6
九、从动物细胞和革兰氏阴性菌中提取 DNA.....	7
十、革兰阳性菌和真菌破壁方法.....	8-9

## 五、从 1-25 mg 动物组织或穿刺组织、鼠尾、毛囊、指甲等样品中提取 DNA

### 实验准备

56℃水浴、金属浴或温箱，推荐使用恒温震荡仪

第一次使用前，按试剂瓶所示体积在 Buffer WB1 中加入无水乙醇，混合均匀

### 操作步骤

所有离心参数为使用台式快速离心机，室温 12,000-16,000×g；如离心机转速只能设定为 rpm，设定为低于最高转速 1,000 rpm。

1. 称取 1-25 mg 动物组织或穿刺组织、鼠尾、毛囊、指甲样品，尽可能切碎或剪碎样品，放入干净 1.5ml 离心管（自备）。

△ 切碎或剪碎动物组织可以减少操作步骤 2 的温育时间。肌肉和内脏等组织可以切为肉泥状，鼠尾可以剪切为薄片。

2. 加入 **400 µl Buffer SLA** 和 **20 µl Proteinase K**，56℃温育，间断混合，直至组织块完全被消化。延长温育时间不影响效果，可温浴过夜。

温浴时间因组织类型和大小而异，例如切碎的肌肉组织约 30 min 即可消化完全，鼠尾 1-2 小时可消化完全；

毛发、骨组织和某些致密结缔组织等不能被完全消化，不影响后续实验。

可选步骤：鼠尾含大量细毛，可在温浴结束后离心 1 min，将上清转移至干净的离心管，以提高纯度。

可选步骤：如需彻底去除 RNA，在此步骤加入 8 µl RNase A1（50 mg/ml）溶液（Cat#RE101-02）。RNA 残留不影响 PCR，但影响定量、酶切。

△ 为方便操作，可事先将 Proteinase K 和 Buffer SLA 按照 1:20 的比例预混；两者混合后需 1 小时内使用完。

3. 加入 **300 µl Buffer GD2**，翻转离心管 5 次或移液器吹打 3 次，转入 DNA 吸附柱-C15（置于收集管）-----！勿将未消化的组织转入 DNA 吸附柱

4. 离心 1 min，将 DNA 吸附柱-C15 放入另外一个干净的收集管中。

5. 加入 **500 µl Buffer WDA**，离心 1 min，弃废液，将 DNA 吸附柱-C15 放回收集管中。

6. 加入 **500 µl Buffer WB1**，离心 1 min，弃废液，将 DNA 吸附柱-C15 放回收集管中。

7. 重复步骤 6。

8. 离心 2 min。

9. 将 DNA 吸附柱-C15 转入试剂盒携带的 1.5 ml 离心管，向硅胶膜的中央加 15-200 µl TE 或去离子水(pH≥7.0)，离心 1 min。

△ 56-70℃预热 TE 或者去离子水(pH≥7.0)，可以提高洗脱效率。

△ 如果使用去离子水洗脱，需用 NaOH 将去离子水 pH 调整至≥7.0。

△ 重复洗脱可以提高洗脱效率。重复洗脱的两种方法：

a. 洗脱的 DNA 溶液转入 DNA 吸附柱中进行洗脱，获得的 DNA 浓度高于方法 b；

b. 重新加入洗脱液进行洗脱，洗脱效率高于方法 a。

## 六、从石蜡包埋组织和切片中提取 DNA

### 实验准备

65°C 和 90°C 水浴、金属浴或温箱，推荐使用恒温震荡仪

需单独订购过滤柱-F (Cat#NC412)

第一次使用前，按试剂瓶所示体积在 Buffer WB1 中加入无水乙醇，混合均匀

### 操作步骤

所有离心参数为使用台式快速离心机，室温 12,000-16,000×g；如离心机转速只能设定为 rpm，设定为低于最高转速 1,000 rpm。

1. 石蜡切片：刮取 1-8 张切片，转入干净的 1.5ml 离心管（自备），无需脱蜡。

石蜡包埋组织：尽可能切碎组织，称取 <25 mg 组织转入干净的 1.5ml 离心管（自备），无需脱蜡。

2. 加入 **400 µl Buffer SLA** 和 **20 µl Proteinase K**，65°C 温育；

温浴 10 分钟后石蜡开始融化，混合均匀，继续温浴 1 小时，间断混合，延长温育时间不影响效果，可温浴过夜。

△ 为方便操作，可事先将 Proteinase K 和 Buffer SLA 按照 1:20 的比例预混；两者混合后需 1 小时内使用完。

3. 90°C 温育 1 小时-----！此步骤为去除 DNA 交联，延长温浴时间会导致 DNA 更严重的片段化

4. 将步骤 3 的溶液连同石蜡转入过滤柱-F(置于 2 ml 离心管)，室温放置 5 min，1,000-2,000×g 离心 10 秒，丢弃过滤柱-F。

室温放置，溶液温度降低，石蜡析出，过滤柱-F 可截留析出的石蜡-----！请勿使用更高离心力或更长离心时间，避免石蜡穿透过滤柱

5. 在步骤 4 的滤液中加入 **350 µl Buffer GD2**，翻转离心管 5 次或移液器吹打 3 次，转入 DNA 吸附柱-C15（置于收集管）。

6. 离心 1 min，将 DNA 吸附柱-C15 放入另外一个干净的收集管中。

7. 加入 **500 µl Buffer WDA**，离心 1 min，弃废液，将 DNA 吸附柱-C15 放回收集管中。

8. 加入 **500 µl Buffer WB1**，离心 1 min，弃废液，将 DNA 吸附柱-C15 放回收集管中。

9. 重复步骤 8。

10. 离心 2 min。

11. 将 DNA 吸附柱-C15 转入试剂盒携带的 1.5 ml 离心管，向硅胶膜的中央加 15-200 µl TE 或去离子水(pH≥7.0)，离心 1 min。

△ 56-70°C 预热 TE 或者去离子水(pH≥7.0)，可以提高洗脱效率。

△ 如果使用去离子水洗脱，需用 NaOH 将去离子水 pH 调整至≥7.0。

△ 重复洗脱可以提高洗脱效率。重复洗脱的两种方法：

a. 洗脱的 DNA 溶液转入 DNA 吸附柱中进行洗脱，获得的 DNA 浓度高于方法 b；

b. 重新加入洗脱液进行洗脱，洗脱效率高于方法 a。

## 七、从福尔马林浸泡的组织中提取 DNA

### 实验准备

56℃和 90℃水浴、金属浴或温箱，推荐使用恒温震荡仪

第一次使用前，按试剂瓶所示体积在 Buffer WB1 中加入无水乙醇，混合均匀

### 操作步骤

所有离心参数为使用台式快速离心机，室温 12,000-16,000×g；如离心机转速只能设定为 rpm，设定为低于最高转速 1,000 rpm。

1. 将组织从固定液中取出，用去离子水、PBS 或 TE 洗涤 2 次，尽可能去除洗涤液。
2. 称取 1-25 mg 组织，尽可能切碎组织，转入干净的 1.5 ml 离心管(自备)。
3. 加入 **400 µl Buffer SLA**和 **20 µl Proteinase K**，56℃温育 1 小时，间断混合，延长温育时间不影响效果，可温浴过夜。

△ 为方便操作，可事先将 Proteinase K 和 Buffer SLA 按照 1:20 的比例预混；两者混合后需 1 小时内使用完。

4. 90℃温育 1 小时-----! 此步骤为去除 DNA 交联，延长温浴时间会导致 DNA 更严重的片段化
5. 加入 **350 µl Buffer GD2**，翻转离心管 5 次或移液器吹打 3 次，转入 DNA 吸附柱-C15 (置于收集管)。
6. 离心 1 min，将 DNA 吸附柱-C15 放入另外一个干净的收集管中。
7. 加入 **500 µl Buffer WDA**，离心 1 min，弃废液，将 DNA 吸附柱-C15 放回收集管中。
8. 加入 **500 µl Buffer WB1**，离心 1 min，弃废液，将 DNA 吸附柱-C15 放回收集管中。
9. 重复步骤 8。
10. 离心 2 min。
11. 将 DNA 吸附柱-C15 转入试剂盒携带的 1.5 ml 离心管，向硅胶膜的中央加 15-200 µl TE 或去离子水(pH≥7.0)，离心 1 min。

△ 56-70℃预热 TE 或者去离子水(pH≥7.0)，可以提高洗脱效率。

△ 如果使用去离子水洗脱，需用 NaOH 将去离子水 pH 调整至≥7.0。

△ 重复洗脱可以提高洗脱效率。重复洗脱的两种方法：

- a. 洗脱的 DNA 溶液转入 DNA 吸附柱中进行洗脱，获得的 DNA 浓度高于方法 b；
- b. 重新加入洗脱液进行洗脱，洗脱效率高于方法 a。

## 八、从干燥的体液中提取 DNA

### 实验准备

65℃水浴、金属浴或温箱，推荐使用恒温震荡仪

第一次使用前，按试剂瓶所示体积在 Buffer WB1 中加入无水乙醇，混合均匀

体液干燥于滤纸或纸巾等介质，后者在水溶液中易分散而无法离心去除，需单独订购过滤柱-N（NC414）

2 ml 离心管，避免样品卡在离心管内壁

### 操作步骤

所有离心参数为使用台式快速离心机，室温 12,000-16,000×g；如离心机转速只能设定为 rpm，设定为低于最高转速 1,000 rpm。

#### 1. 样品裁剪与收集

裁剪 100-400 mm<sup>2</sup> 包含血液、唾液、痰液或精液等体液的滤纸/纸巾/衣物等介质，置于 2 ml 离心管（自备）；

裁剪香烟过滤嘴（近嘴端 2-6 mm），置于 2 ml 离心管（自备）；

3. 加入 **400 μl Buffer SLA** 和 **20 μl Proteinase K**，65℃温育 1 小时，间断混合，延长温育时间不影响效果，可温浴过夜。

△ 为方便操作，可事先将 Proteinase K 和 Buffer SLA 按照 1:20 的比例预混；两者混合后需 1 小时内使用完。

#### 4. 耗材组装：

将收集管置于离心管架→ 将 DNA 吸附柱置于收集管

处理滤纸/纸巾等介质，需单独订购过滤柱-N，将过滤柱-N 置于 DNA 吸附柱上

5. 在步骤 3 的溶液中加入 **350 μl Buffer GD2**，翻转离心管 5 次或移液器吹打 3 次混合均匀；

将溶液转入 DNA 吸附柱-C15（置于收集管），继续操作步骤 6；

处理滤纸/纸巾等介质，将溶液转入步骤 4 准备的过滤柱-N，室温放置 5 min，溶液自然滤过滴入 DNA 吸附柱，丢弃过滤柱-N，继续操作步骤 6。

6. 离心 1 min，将 DNA 吸附柱-C15 放入另外一个干净的收集管中。

7. 加入 **500 μl Buffer WDA**，离心 1 min，弃废液，将 DNA 吸附柱-C15 放回收集管中。

8. 加入 **500 μl Buffer WB1**，离心 1 min，弃废液，将 DNA 吸附柱-C15 放回收集管中。

9. 重复步骤 8。

10. 离心 2 min。

11. 将 DNA 吸附柱-C15 转入试剂盒携带的 1.5 ml 离心管，向硅胶膜的中央加 15-200 μl TE 或去离子水(pH≥7.0)，离心 1 min。

△ 56-70℃ 预热 TE 或者去离子水(pH≥7.0)，可以提高洗脱效率。

△ 如果使用去离子水洗脱，需用 NaOH 将去离子水 pH 调整至≥7.0。

△ 重复洗脱可以提高洗脱效率。重复洗脱的两种方法：

a. 洗脱的 DNA 溶液转入 DNA 吸附柱中进行洗脱，获得的 DNA 浓度高于方法 b；

b. 重新加入洗脱液进行洗脱，洗脱效率高于方法 a。

## 九、从动物细胞和革兰氏阴性菌中提取 DNA

### 实验准备

65°C 水浴、金属浴或温箱，推荐使用恒温震荡仪

第一次使用前，按试剂瓶所示体积在 Buffer WB1 中加入无水乙醇，混合均匀

### 操作步骤

所有离心参数为使用台式快速离心机，室温 12,000-16,000×g；如离心机转速只能设定为 rpm，设定为低于最高转速 1,000 rpm。

#### 1. 样品收集

- 悬浮培养的动物细胞：**离心 1 min，收集 $\leq 5 \times 10^6$ 细胞，弃尽上清。
- 贴壁培养的细胞：**用温和方法(例如胰蛋白酶消化)处理成细胞悬液，离心 1 min，收集 $\leq 5 \times 10^6$ 细胞。弃尽上清。
- 已分离的淋巴细胞和分散的动物组织细胞等：**估计细胞数量( $\leq 5 \times 10^6$  细胞)，彻底去除残留的分离液。
- 液体培养的细菌：**培养至 OD600 为 1-1.5，约  $1.0 \times 10^9$  细胞/ml 菌液；离心 1 min，收集 $\leq 2 \times 10^9$ 细菌。
- 固体培养的细菌：**刮取固体培养基表面的菌落，收集 $\leq 2 \times 10^9$ 细菌到干净的 1.5 ml 离心管。

#### 2. 加入 400 $\mu$ l Buffer SLA 和 20 $\mu$ l Proteinase K，vortex 或用 1 ml 枪头吹打悬浮沉淀物；

65°C 温育 30 min，间断混合，延长温育时间不影响效果，可温浴过夜。

可选步骤：部分革兰氏阳性菌或真菌未充分破壁，可在温浴结束后离心 1 min，将上清转移至干净的离心管，以提高纯度。

可选步骤：如需彻底去除 RNA，在此步骤加入 8  $\mu$ l RNase A1 (50 mg/ml) 溶液 (Cat#RE101-02)。RNA 残留不影响 PCR，但影响定量、酶切。

△ 为方便操作，可事先将 Proteinase K 和 Buffer SLA 按照 1:20 的比例预混；两者混合后需 1 小时内使用完。

#### 3. 加入 300 $\mu$ l Buffer GD2，翻转离心管 5 次或移液器吹打 3 次，转入 DNA 吸附柱-C15 (置于收集管)。

#### 4. 离心 1 min，将 DNA 吸附柱-C15 放入另外一个干净的收集管中。

#### 5. 加入 500 $\mu$ l Buffer WDA，离心 1 min，弃废液，将 DNA 吸附柱-C15 放回收集管中。

#### 6. 加入 500 $\mu$ l Buffer WB1，离心 1 min，弃废液，将 DNA 吸附柱-C15 放回收集管中。

#### 7. 重复步骤 6。

#### 8. 离心 2 min。

#### 9. 将 DNA 吸附柱-C15 转入试剂盒携带的 1.5 ml 离心管，向硅胶膜的中央加 15-200 $\mu$ l TE 或去离子水(pH $\geq$ 7.0)，离心 1 min。

△ 56-70°C 预热 TE 或者去离子水(pH $\geq$ 7.0)，可以提高洗脱效率。

△ 如果使用去离子水洗脱，需用 NaOH 将去离子水 pH 调整至 $\geq$ 7.0。

△ 重复洗脱可以提高洗脱效率。重复洗脱的两种方法：

- 洗脱的 DNA 溶液转入 DNA 吸附柱中进行洗脱，获得的 DNA 浓度高于方法 b；
- 重新加入洗脱液进行洗脱，洗脱效率高于方法 a。

## 十、革兰阳性菌和真菌破壁方法

革兰氏阳性菌和真菌需使用特异性酶或机械力破壁，DNA 产量与破壁效率有关。

### A. 大多数革兰氏阳性细菌破壁方法

已知下列革兰氏阳性菌的细胞壁能被 Lysozyme 破坏：

*Clostridia butyricum* (丁酸梭状芽胞杆菌)

*Clostridia Spotogenes* (孢子梭状芽胞杆菌)

*Clostridia tyrobutyricum* (干酪丁酸梭状芽胞杆菌)

*Listeria monocytogenes* Scott A (单核细胞增多李氏菌)

用户需自备或购买 **Lysozyme 裂解缓冲液 (Cat#RE103)**：

组成内容	RE103 (50 次)	成分与储存条件
Lysozyme	1.5 ml	150 mg/ml, -20°C 长期保存。
1.25xLysozyme Buffer	10 ml	25mM Tris, pH8.0(25°C), 2.5mM EDTA, 1.5% Triton; 室温储存。

#### A1. 样品收集

- 液体培养的细菌：培养至 OD600 为 1-1.5，约含  $1.0 \times 10^9$  细胞/ml 菌液。室温  $5,000 \times g$  离心 10 min，收集  $\leq 2 \times 10^9$  细菌。
- 固体培养的细菌：刮取固体培养基表面的菌落，收集  $\leq 2 \times 10^9$  细菌到干净的 1.5 ml 离心管。

A2. 加入 120  $\mu$ l 1.25xLysozyme Buffer 和 30  $\mu$ l Lysozyme (150 mg/ml)，充分悬浮沉淀，37°C 温浴 30 min。

A3. 加入 280  $\mu$ l Buffer SLA 和 20  $\mu$ l Proteinase K，翻转离心管 5 次混合均匀；

65°C 温育 30 min，间断混合，延长温育时间不影响效果，可温浴过夜。

可选步骤：部分革兰氏阳性菌或真菌未充分破壁，可在温浴结束后离心 1 min，将上清转移至干净的离心管，以提高纯度。

可选步骤：如需彻底去除 RNA，在此步骤加入 8  $\mu$ l RNase A1 (50 mg/ml) 溶液 (Cat#RE101-02)。RNA 残留不影响 PCR，但影响定量、酶切。

继续 page7, 九、从动物细胞和革兰氏阴性菌中提取 DNA ---操作步骤 3

### B. 金黄色葡萄球菌破壁方法

Lysostaphin 能有效裂解金黄色葡萄球菌细胞的细胞壁，用户需自备或购买 **Lysostaphin(1.2U/ $\mu$ l) (Cat#RE104, 500  $\mu$ l)**。

#### B1. 样品收集

- 液体培养的细菌：培养至 OD600 为 1-1.5，约  $1.0 \times 10^9$  细胞/ml 菌液。室温  $5,000 \times g$  离心 10 min，收集  $\leq 2 \times 10^9$  细菌。
- 固体培养的细菌：刮取固体培养基表面的菌落，收集  $\leq 2 \times 10^9$  细菌到干净的 1.5 ml 离心管。

D2. 加入 140  $\mu$ l Buffer TE，充分悬浮沉淀。

D3. 处理金黄色葡萄球菌，加入 10  $\mu$ l Lysostaphin(1.2U/ $\mu$ l)；混合均匀，37°C 温育 30 min。

处理表皮葡萄球菌加入 20  $\mu$ l Lysostaphin(1.2U/ $\mu$ l)；混合均匀，37°C 温育 30 min。

D4. 加入 260  $\mu$ l Buffer SLA 和 20  $\mu$ l Proteinase K，翻转离心管 5 次混合均匀；

65°C 温育 30 min，间断混合，延长温育时间不影响效果，可温浴过夜。

可选步骤：部分革兰氏阳性菌或真菌未充分破壁，可在温浴结束后离心 1 min，将上清转移至干净的离心管，以提高纯度。

可选步骤：如需彻底去除 RNA，在此步骤加入 8  $\mu$ l RNase A1 (50 mg/ml) 溶液 (Cat#RE101-02)。RNA 残留不影响 PCR，但影响定量、酶切。

继续 page7, 九、从动物细胞和革兰氏阴性菌中提取 DNA ---操作步骤 3



### C. 酵母细胞破壁方法

液体培养的酵母细胞分散性较好, Lyticase 能有效裂解酵母细胞的细胞壁, 用户需自备或购买 **Lyticase 裂解缓冲液 (Cat# RE102)**:

组成内容	RE102 (50 次)	成分与储存条件
Lyticase	250 $\mu$ l	12 U/ $\mu$ l, -20 $^{\circ}$ C 长期保存。
山梨醇 Buffer	25 ml	1M 山梨醇, 10 mM EDTA pH7.5(25 $^{\circ}$ C), 14mM $\beta$ -巯基乙醇; 室温储存。

C1. 培养酵母菌至 OD600 为 1-1.5, 约  $1-2 \times 10^7$  细胞/ml 菌液。用干净的 1.5 ml 离心管, 12,000 $\times$ g 离心 1 min, 收集  $\leq 5 \times 10^7$  酵母细胞, 弃上清。

C2. 加入 495  $\mu$ l 山梨醇 Buffer 和 5  $\mu$ l Lyticase (12 U/ $\mu$ l), 充分悬浮沉淀。固定在摇床上, 30 $^{\circ}$ C, 220 rpm 震荡 1 小时;

5000 $\times$ g 离心 5 min, 弃尽上清。

继续 page7, 九、从动物细胞和革兰氏阴性菌中提取 DNA ---操作步骤 2

### D. 霉菌破壁方法

细胞壁裂解酶能有效裂解霉菌细胞的细胞壁, 用户需自备细胞壁裂解酶和裂解缓冲液:

a. 配制裂解缓冲液 Buffer KC: 0.64 M KCl, 0.2 M CaCl<sub>2</sub>;

b. 准备细胞壁裂解酶: Driselase (Sigma Pro.No. D9515), Lysing enzyme (Sigma Pro.No. L1412);

c. 用 Buffer KC 配制 5 $\times$ 细胞壁裂解酶: 称取 Driselase 和 Lysing enzyme 各 300mg, 加入 6ml Buffer KC 充分溶解 (可能有不溶的成分, 不影响使用), 再加入 4ml 甘油混合均匀, -20 或 -70 $^{\circ}$ C 保存。

D1. 取 1 mm $\times$ 1 mm 的菌丝块或  $4 \times 10^6$  霉菌细胞, 转入 1.5 ml 离心管中。

D2. 加 1ml Buffer KC 剧烈摇晃, 12,000 $\times$ g 离心 20 秒, 弃上清; 重复此步骤 2 次。

D3. 加 800  $\mu$ l Buffer KC 和 200  $\mu$ l 5 $\times$ 细胞壁裂解酶, 将 1.5ml 离心管固定在摇床上, 30 $^{\circ}$ C, 60 rpm 震荡 3 小时; 700 $\times$ g 离心 4 min, 弃尽上清。

继续 page7, 九、从动物细胞和革兰氏阴性菌中提取 DNA ---操作步骤 2

### E. 液氮研磨破壁

E1. 称取 50-100 mg 真菌菌块或菌丝, 或收集  $\leq 5 \times 10^7$  真菌细胞, 转入研钵中。

E2. 加入少量液氮, 迅速研磨, 待样品变软, 再加少量液氮, 再研磨, 如此三次; 加入 400  $\mu$ l Buffer SLA, 迅速研磨至样品融化。

E3. 将融化的样品转入干净的 1.5 ml 离心管中, 在研钵中加入 50  $\mu$ l Buffer SLA 清洗研钵和研磨棒, 合并入 1.5ml 离心管中。

加入 20  $\mu$ l Proteinase K, 翻转离心管 5 次混合均匀; 65 $^{\circ}$ C 温育 30 min, 间断混合, 延长温育时间不影响效果, 可温浴过夜。

可选步骤: 部分革兰氏阳性菌或真菌未充分破壁, 可在温浴结束后离心 1 min, 将上清转移至干净的离心管, 以提高纯度。

可选步骤: 如需彻底去除 RNA, 在此步骤加入 8  $\mu$ l RNase A1 (50 mg/ml) 溶液 (Cat#RE101-02)。RNA 残留不影响 PCR, 但影响定量、酶切。

继续 page7, 九、从动物细胞和革兰氏阴性菌中提取 DNA ---操作步骤 3