(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114426966 A
(43)申请公布日 2022.05.03

(21)申请号 202011179724.9

(22)申请日 2020.10.29

(71)申请人 西南大学
地址 400715 重庆市北碚区天生路2号

(72)发明人 陈新龙 尚丽娜 何光华

(74)专利代理机构 重庆信航知识产权代理有限公司 50218
代理人 穆祥维

(51)Int.Cl.
C12N 15/10(2006.01)

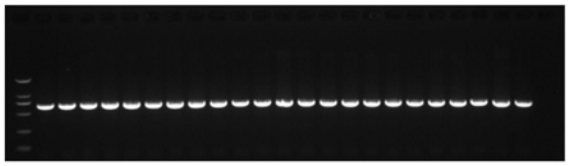
权利要求书1页 说明书21页
序列表4页 附图5页

(54)发明名称

一种用于快速无毒提取动植物或微生物基因组DNA的细胞裂解液、试剂盒和方法

(57)摘要

本发明公开了一种用于快速无毒提取动植物或微生物基因组DNA的细胞裂解液，由以下组分组成：10～300mM pH为7.5～9.0的Tris-HCl、1～2mM pH为8.0～8.5的Na_2EDTA、0.01%～0.1%(w/v)的LDS、0.01%～0.1%(v/v)的Tween-20、pH为7.0～8.5的纯水；本发明还提供了利用上述细胞裂解液快速无毒提取动植物或微生物基因组DNA的方法，该方法突破了国内外现有基因组DNA提取的时间限制，在15s内即可完成基因组DNA的提取，利用该方法获得的基因组DNA完整性好、PCR重复性高、兼容多种DNA聚合酶，可直接用于基因鉴定、基因克隆等多种下游分子生物学实验。



CN 114426966 A

1.一种用于快速无毒提取动植物或微生物基因组DNA的细胞裂解液，其特征在于，所述细胞裂解液由以下组分组成：10～300mM pH为7.5～9.0的Tris-HCl、1～2mM pH为8.0～8.5的Na_2EDTA、0.01％～0.1％(w/v)的LDS、0.01％～0.1％(v/v)的Tween-20、pH为7.0～8.5的纯水。

2.一种利用权利要求1所述的细胞裂解液快速无毒提取动植物或微生物基因组DNA的方法，其特征在于，所述方法为利用权利要求1所述的细胞裂解液释放待提取动植物或微生物细胞的基因组DNA，然后离心取上清液即得到含有待提取基因组DNA的溶液。

3.一种利用权利要求1所述的细胞裂解液快速无毒制备PCR模板的方法，其特征在于，所述方法包括如下步骤：

(1)在0.2mL无菌PCR管中加入2～5μL权利要求1所述的细胞裂解液；

(2)取微量破壁的动植物细胞或微生物细胞加入(1)中的细胞裂解液中即得到可直接用于PCR扩增的PCR模板。

4.一种用于快速无毒提取或PCR扩增动植物或微生物基因组DNA的试剂盒，所述试剂盒含有权利要求1所述的细胞裂解液。

5.根据权利要求4所述的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒还含有DNA聚合酶或PCR通用引物等任何在基因组DNA提取或下游分子生物学实验中需要用到的材料。

一种用于快速无毒提取动植物或微生物基因组DNA的细胞裂解液、试剂盒和方法

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学领域，具体涉及一种用于快速无毒提取动植物或微生物基因组DNA的细胞裂解液、试剂盒和方法。

背景技术

[0002] 基因组DNA的提取是分子生物学研究的基础，然而国内外现有技术均至少存在多个如表1所示的缺点：

[0003] 表1国内外各种现有基因组DNA提取技术的不足之处及其具体表现

[0004]

技术不足	技术不足的具体表现
适用的样本局限性大	在动物、植物及微生物基因组 DNA 提取中不通用；或仅适用于简单样本基因组 DNA 的提取，不适用于多糖多酚或油脂等含量较高的复杂样本。
适用的范围狭窄	仅适用于大量提取基因组 DNA，或仅适用于小量提取基因组 DNA，或仅适用于微量提取基因组 DNA，不能在大量、少量及微量提取基因组 DNA 中通用。
所获基因组DNA的PCR稳定性差	由于提取液组分不恰当或配比失衡，所获未经纯化的基因组 DNA 溶液中含有较多的 PCR 抑制物（如高浓度 EDTA），将其直接用于 PCR 模板，导致 PCR 稳定性差，结果无法重复。
所获基因组DNA的完整性差	提取试剂不温和等因素导致提取的基因组 DNA 完整性差，仅适合 2kb 以下的 DNA 片段扩增(用于基因分型、转基因鉴定等实验），不能用于 2kb 以上较大片段的基因克隆。
所获基因组DNA对不同DNA聚合酶兼容性差	提取的基因组 DNA 溶液中含有较多的 PCR 抑制物，仅适合用某种 Taq DNA 聚合酶或极少数高保真 DNA 聚合酶或对多种 PCR 抑制剂有较高耐受性的 DNA 聚合酶进行 PCR 反应，对市面大多数 DNA 聚合酶兼容性差或不兼容，给下游 PCR 检测、基因克隆等带来不少困难。
所获基因组DNA溶液无法长期保存	新提取的纯化 DNA 或 DNA 粗提液 PCR 效果较好，在室温或较低温度下放置一段时间，再次进行 PCR 时却检测不到 DNA 电泳条带，导致实验无法重复。
难以批量处理样品	一次性只能处理一至几十个样品，需要多批次才能完成成千上万个样品的基因组 DNA 提取。
仅可直接扩增，	不需要提取基因组 DNA，即取微量样本，利用耐抑制剂的 DNA 聚合酶直

[0005]

无法保存基因组 DNA 模板	接进行 PCR 反应，若 PCR 操作失误，则要重新取样，有些样品量极少的则无法再次实验。
必须提前制作 DNA 模板，无法取样直接扩增	必须提取基因组 DNA，无法取样品直接进行 PCR 反应。
提取所需时间长	分为四种情况，即（1）步骤多，且操作或等待时间长；（2）步骤多，但操作或等待时间短；（3）步骤少，但操作或等待时间长；（4）步骤少，且操作或等待时间短。现有技术中，仅有 Zou 等（2018）[Zou Y, Mason MG, Wang Y, Wee E, Turni C, et al. (2018) Correction: Nucleic acid purification from plants, animals and microbes in under 30 seconds. PLOS Biology 16(5): e1002630.]和 CN108866044A 一种快速提取基因组 DNA 的方法先后公开了利用纤维制品 30 秒提取基因组 DNA 的方法，其余方法的单个样品提取时间均在 5min 以上，有的方法甚至需要过夜温浴。
提取过程易交叉污染	采用滤纸等纤维制品吸附含有基因组 DNA 的上清液，经多次转管和漂洗即可在几十秒内获得基因组 DNA，但由于其吸附材质弹性较大，容易弹射液体污染其他样品，而且多次转管和漂洗也容易发生交叉污染；通过煮沸或加热蒸发法提取时，极易产生气溶胶，导致样品交叉污染，并且煮沸法和蒸发法可能导致试剂扩散至空气中，对实验者和环境均造成威胁。
提取价格昂贵	使用昂贵的化学试剂；或使用 FTA 采样卡、纳米磁珠、各类吸附柱等耗材；或使用非常规仪器设备，这些都会增加检测成本。
试剂用量过大	处理一个样品需要几百微升甚至几百毫升的试剂，既浪费试剂，又浪费耗材，也难以用于大批量样品的基因组 DNA 提取。
需多次添加不同试剂	使用时需要多次添加试剂，有些试剂的添加是为了中和酸碱（例如，无需加热即可迅速裂解细胞的试剂中通常含强碱，裂解之后添加一定比例的酸，使溶液 pH 适合某些 DNA 聚合酶），有些添加是为了沉淀或吸附 PCR 抑制物（例如，高浓度 SDS 可直接抑制下游 PCR 反应，故通常先用高浓度 SDS 使蛋白质变性，释放 DNA 之后再添加醋酸盐沉淀 SDS 并离心去除。），有些添加是为了稀释模板（例如，PCR 抑制物浓度过高，通常可以添加几倍体积的 TE 进行稀释，其目的是将 PCR 抑制物稀释至不足以抑制 PCR 反应。），不论是哪种，都比较繁琐，多次添加试剂也增加了不同样品交叉污染的概率，如果采用酸碱中和法快速提取，中和不当便会导致 pH 波动较大，可能抑制 DNA 聚合酶的活性，影响下游 PCR 稳定性。
试剂需要预处理	市售试剂盒或根据已公开的方法所配制的试剂，由于长期放置、温度降低或其他因素，往往导致某些组分溶解度降低而析出沉淀，使用前需要预处

[0006]

	理一段时间（如 37℃水浴溶解），若预处理不当也会影响基因组 DNA 的提取以及 PCR 稳定性。
样品用量较大	有些方法需要较多样品，大部分在 100mg 左右，不适用于组织发育早期的微量基因组 DNA 提取。
提取过程必须加热	有些方法在提取基因组 DNA 过程中，不区分样品种类，利用烘箱、热水或 PCR 等对各类样品进行 85℃以上加热或煮沸，容易破坏基因组 DNA 完整性，限制了下游分子实验的适用范围。
样品必须充分研磨	传统研磨方法是将样品充分研磨之后加入试剂提取，不能一次性获得组织匀浆，不利于样品的批量处理；也有将样品加入提取液中用研磨棒充分研磨成组织匀浆，不同样品需要更换研磨棒，且每个样品均需要一定时间完成，也不适用于大批量样品的处理。
使用各种酶类裂解细胞壁	使用如溶菌酶、纤维素酶和果胶酶等酶类裂解细胞壁，有诸多不足，其一，由于这些酶类对 PCR 有明显的抑制作用，往往需要过滤去除，不适用于批量处理；其二，各酶类的价格均较高，大大增加了成本；其三，含有各酶类的试剂盒或试剂对保存时间、保存温度等条件要求高，增加了对基础设施的要求。
使用有毒化学品	氯仿、苯酚、巯基乙醇或 DTT 等有毒试剂经常被用于核酸提取，稍有不慎便会对人体造成伤害，不仅如此，这些有毒试剂的购买、储存及废液处理比较复杂，其废液处理费用也较高。
试剂含强酸强碱组分	强酸和强碱具有极强的腐蚀性,能灼烧皮肤,还可引起上呼吸道的剧烈刺激，容易对实验者造成极大的伤害，例如在使用碱煮法时，移液不慎易灼伤皮肤，煮沸亦可能导致碱液飞溅入眼。
试剂含氨基酸或蛋白质	有些方法通过添加甘氨酸、BSA 等来提高试剂的缓冲能力和稳定性，而含有大量氨基酸或蛋白质的试剂容易滋生霉菌，在使用该种试剂的时候还要额外注意无菌操作，长期保存也会降低提取质量。
试剂保存条件苛刻	市面绝大部分提取液中含有 SDS 或 CTAB 等低温下溶解度极低的试剂，只能在常温或较高温度下长期保存，在温度较低时这些有效成分逐渐析出，再次使用则需要加热一段时间并摇动使沉淀充分溶解，若未充分溶解则会降低提取液的稳定性，导致 PCR 结果无法重复。还有一些方法中的试剂既不能长期保存于常温或较高温度，也不能长期保存于较低温度，例如 CN108866044A 公开的方法中试剂的有效成分包含 SDS，容易因温度降低而析出沉淀，介于此应将其保存于常温或较高温度下，但矛盾的是该方法中还包含了溶菌酶，又必须将其保存于较低温，故该试剂不适宜长期保存。
试剂含高浓度盐组分	试剂中含有高浓度的盐成分，高盐可以改变细胞渗透压，促进细胞裂解，是大部分基因组 DNA 提取试剂必备组分，然而高浓度的 NaCl、$MgCl_2$ 和

[0007]

	KCl 等都会抑制 PCR 反应，用该法提取 DNA 后还需要将盐除去，若不除去则无法兼容多种 DNA 聚合酶，需要用盐耐受性 DNA 聚合酶完成 PCR 反应，既耗时耗力，也需要更多成本。
试剂含高浓度高分子化合物	虽然在基因组 DNA 提取试剂中添加高分子化合物去除杂质可取得较好的效果，例如添加聚乙烯吡咯烷酮（PVP）可吸附样品中的多糖多酚，添加聚乙二醇（PEG）可吸附蛋白质，但添加浓度不宜过高，高浓度高分子化合物的溶液十分粘稠，不仅阻碍了细胞在提取液中的分散，所配试剂也容易吸附杂质形成团状污染物，导致试剂无法长期存放。

[0008] 因此，开发一种可以同时克服上述现有技术不足的基因组DNA提取方法成为亟待解决的问题。

发明内容

[0009] 有鉴于此，本发明的目的在于提供一种用于快速无毒提取动植物或微生物基因组DNA的细胞裂解液、试剂盒和方法，以克服上述现有技术中存在的诸多问题。本发明公开了一种用于快速无毒提取动植物或微生物基因组DNA的细胞裂解液、试剂盒；本发明还公开了利用上述细胞裂解液快速无毒提取动植物或微生物基因组DNA的方法，该方法突破了国内外现有基因组DNA提取的时间限制，只需15s即可内完成基因组DNA的提取，利用该方法获得的基因组DNA完整性好、PCR重复性高、兼容多种DNA聚合酶，可直接用于基因鉴定、基因克隆等多种下游分子生物学实验。

[0010] 本发明提供了一种用于快速无毒提取动植物或微生物基因组DNA的细胞裂解液，所述细胞裂解液由Tris-HCl、Na_2EDTA、LDS、Tween-20和纯水组成，具体为：10～300mM pH为7.5～9.0的Tris-HCl、1～2mM pH为8.0～8.5的Na_2EDTA、0.01％～0.1％(w/v)的LDS、0.01％～0.1％(v/v)的Tween-20、pH为7.0～8.5的纯水，并且在上述取值范围内的任意配比组合均可达到相同或相似的效果，所述裂解液可在-80～37℃长期保存，低温长期保存无沉淀析出，使用前无需预热处理。

[0011] 本发明还提供了一种利用上述细胞裂解液快速无毒提取动植物或微生物基因组DNA的方法，其特征在于，所述方法为利用上述细胞裂解液释放待提取动植物或微生物细胞的基因组DNA，然后离心取上清液即得到含有待提取基因组DNA的溶液。利用上述细胞裂解液裂释放基因组DNA时，可灵活采取不同的细胞壁破除手段和基因组DNA释放方式，对于容易研磨的样品，如新鲜样品、液体样品、微生物或昆虫等样品释放基因组DNA时，可将样品直接加入到20～50μL的上述细胞裂解液中研磨5s，即可迅速释放出基因组DNA；对于研磨困难的样品，如干样品、坚硬样品、或动物组织释放基因组DNA时，可先将样品用液氮速冻5s，研磨成粉末后加入20～50μL的上述细胞裂解液混匀，即可迅速释放出基因组DNA；如提取的基因组DNA仅用于基因鉴定，除了研磨法提取，还可以用加热法快速提取，如酵母文库筛选、马铃薯病原菌鉴定等，可将菌落挑入20μL上述细胞裂解液中，置于PCR中98℃加热2min，离心1s取上清即可用于PCR模板。研磨释放基因组DNA时，可以使用各类研磨介质、各类研磨仪器进行研磨，其目的主要是利用机械力快速破除细胞壁。加热释放基因组DNA时，加热的主要目的是辅助细胞裂解液破碎细胞并使溶液中的核酸酶变性失活。本发明方法还可结合其他各种细胞壁破除手段实施，具体破壁方式可根据实验需求灵活选择。在本发明的几个实施

例中以4mm钢珠作为研磨介质，用组织研磨仪研磨并破除细胞壁。在本发明的另两个实施例中用加热法辅助破除细胞壁，采用加热法辅助提取时，可在溶液表面覆盖一层油相或在带有热盖的PCR仪中加热，可有效防止气溶胶污染。离心时，离心速度通常选为1000～15000rpm，离心时间通常选为1～3s，离心上清液即为含有基因组DNA的溶液，可长时间保存于-80～37℃，可直接用于基因分型、转基因鉴定、5000bp以上的基因克隆、表达载体构建等各类分子实验的PCR模板，纯化后还可用于分子杂交和基因组文库构建等下游分子生物学实验。

[0012] 本发明还提供了一种利用上述细胞裂解液快速无毒制备PCR模板的方法，所述方法包括如下步骤：

[0013] (1)在0.2mL无菌PCR管中加入2～5μL的上述细胞裂解液；

[0014] (2)取微量破壁的动植物或微生物细胞加入(1)中的细胞裂解液中即得到可直接用于PCR扩增的PCR模板。

[0015] 在步骤(1)中，需要将2～5μL细胞裂解液加在PCR管的底部，便于样品与之接触。

[0016] 在步骤(2)中，对于不同样本，可选用不同的操作制备PCR模板，对于动植物细胞，可利用液氮法将动物组织或植物样品研磨成粉末，然后用无菌牙签或枪头沾取少量粉末加入到所述PCR管的细胞裂解液中即得到可直接用于PCR扩增的PCR模板；对于新鲜植物细胞，可取少量新鲜植物组织(如2mm X 2mm的油菜叶片)加入所述PCR管的细胞裂解液中，然后用无菌牙签或枪头将组织捅破即得到可直接用于PCR扩增的PCR模板；对于细菌单斑，可用无菌牙签挑取细菌单斑加入所述PCR管的细胞裂解液中即得到可直接用于PCR扩增的PCR模板。

[0017] 本发明还提供了一种用于快速无毒提取或PCR扩增动植物或微生物基因组DNA的试剂盒，所述试剂盒含有上述细胞裂解液，还可含有DNA聚合酶或PCR通用引物等任何在基因组DNA提取及下游分子生物学实验中需要用到的材料。其中，所述DNA聚合酶或PCR通用引物等材料可以根据实际需求以及样品的特点灵活组合。所述试剂盒能广泛应用于动植物和微生物的基因组DNA提取，其具有操作简单、成本低廉、安全无毒、不含强酸强碱、兼容各类DNA聚合酶等诸多优点，可在15s内提取基因组DNA，提取产物可直接用于基因分型、转基因鉴定、5000bp以上的基因克隆、表达载体构建等各类分子实验的PCR模板，纯化后还可用于分子杂交和基因组文库构建等下游分子生物学实验。该试剂盒还可应用于直接扩增PCR实验，即无需提取基因组DNA，直接将样品置于2～5μL的FN-C中用于PCR扩增模板，本发明的一个实施例中以油菜叶片为例进行了详细说明。

[0018] 本发明的有益效果：

[0019] (1)本发明提供的裂解液、试剂盒和方法可以在动物、植物和微生物中通用，应用范围广。

[0020] (2)本发明提供的基因组DNA提取方法不仅适用于含杂质较少的简单样本(如水稻、拟南芥、玉米、小麦等)，也适用于含杂质较多的复杂样本(如番茄、马铃薯、油菜、酵母、病原菌、血液等)，适用样本种类多，应用价值高。

[0021] (3)本发明首次公开一种可以在15s内完成基因组DNA提取的方法，突破了国内外现有基因组DNA提取的时间限制。

[0022] (4)本发明首次公开一种细胞裂解液，既适用于基因组DNA的快速提取，也可用于

直接PCR。相比之下，传统方法基于基因组DNA提取的PCR扩增可以一次提取多次扩增，但不适用于某些不需要二次扩增的核酸检测研究，于是逐渐兴起了直接PCR，其无需提取基因组DNA，因此也无法保存样品的基因组DNA，故不适用于需要多次扩增的核酸检测。而本发明方法突破了现有技术仅可用于基因组DNA提取或仅可用于直接PCR的应用限制，并且本发明提供的直接PCR方法可用普通Taq DNA聚合酶进行PCR扩增，降低了直接PCR对DNA聚合酶选择标准。

[0023] (5)本发明将LDS(十二烷基硫酸锂)和Tween-20组合用于基因组DNA提取，首次公开一种可以在不同温度条件下(-80～37℃)长期保存的基因组DNA提取试剂，克服了试剂的保存温度限制。相比之下，现有技术中提供的基因组DNA试剂均无法在低温长期保存，在温度较低时其有效成分(SDS或CTAB等)逐渐析出，再次使用还需要加热一段时间并摇动使沉淀充分溶解，若未充分溶解则会降低提取试剂的稳定性，导致PCR结果可重复性差。

[0024] (6)本发明提供的基因组DNA提取方法通过调整细胞裂解液的用量，既可以从大量样品中提取较多的基因组DNA(如200mg样品)，也可以从微量样品(如1mg样品)中提取基因组DNA。

[0025] (7)本发明提供的基因组DNA提取方法所获基因组DNA的PCR稳定性好，所用提取液组分及配比恰当，所获基因组DNA溶液无需纯化，可直接用于基因分型、转基因鉴定、表达载体构建等各类分子实验的PCR模板，节约了纯化时间和纯化成本。

[0026] (8)本发明提供的基因组DNA提取方法，所获基因组DNA溶液无需纯化，可直接用于5000bp以上的基因克隆，既克服传统快速基因组DNA提取方法仅适合2kb以下的DNA片段扩增的缺点，也克服了传统方法提取的基因组DNA必须纯化后才可用于5000bp以上的基因克隆的技术不足。此外，本发明方法提取基因组DNA无需纯化但并不限制对其纯化，经本发明方法提取的基因组DNA溶液，纯化后还可用于分子杂交和基因组文库构建等下游分子生物学实验。

[0027] (9)本发明提供的基因组DNA提取方法，获得的基因组DNA溶液中含有较少的PCR抑制物，对下游PCR反应体系中的DNA聚合酶种类要求低，可以兼容多种Taq DNA聚合酶和高保真DNA聚合酶，克服了现有技术仅适合使用某些Taq DNA聚合酶或高保真DNA聚合酶或对多种PCR抑制剂有较高耐受性的DNA聚合酶来完成PCR反应的技术不足，进一步降低了实验成本。

[0028] (10)本发明提供的基因组DNA提取方法，既适用于单个样品的处理，也适用于大批量样品的处理，熟练操作者利用常规仪器批量提取100个样品的基因组DNA仅需几分钟时间(不含取材时间)，可规模化推广使用。

[0029] (11)本发明提供的基因组DNA提取方法，无需煮沸或加热蒸发，无需借助滤纸等纤维制品吸附基因组DNA，无需漂洗纯化，无需移液(直接PCR)或仅需1次移液操作便可完成基因组DNA的快速提取，不易产生气溶胶，也不会导致试剂飞溅或扩散至空气中，可有效防止样品间的交叉污染，也减少了实验室环境污染。

[0030] (12)本发明提供的基因组DNA提取方法，无需使用昂贵的化学试剂，不需要诸如FTA采样卡、纳米磁珠、各类吸附柱等昂贵的耗材，也不需要非常规仪器设备(如自动化高通量核酸提取仪)。当然，本发明所述方法虽然不使用昂贵的试剂、耗材或仪器，但不限制其使用范围，本发明方法与采样卡、吸附柱、自动化高通量核酸提取仪等昂贵试剂、耗材或仪器

配合使用,也可以达到预期效果。

[0031] (13)本发明提供的基因组DNA提取方法,提取基因组DNA所需试剂用量很少,方便市场流通。例如将其应用于水稻QTL定位中,仅需40μL FN-C即可获得大约35μL的基因组DNA溶液,可满足至少70次的PCR扩增检测(10μL体系)。

[0032] (14)本发明提供的基因组DNA提取方法,提取基因组DNA所需样本用量很少。例如将其应用于拟南芥T-DNA插入突变体鉴定中,2mg新鲜组织即可满足至少30次的PCR扩增(50μL体系)。

[0033] (15)本发明提供的基因组DNA提取方法,试剂成分简单,仅含有4种化学试剂,并且使用时无需多次添加试剂,操作步骤简单。

[0034] (16)本发明提供的基因组DNA提取方法,所用试剂不含SDS或CTAB,长期存放于较低室温或低温冰箱内无沉淀析出,因此无需对试剂进行任何预处理(如37℃水浴溶解)。

[0035] (17)本发明提供的基因组DNA提取方法,可根据实际情况灵活选择各种细胞壁破除手段实施,克服传统技术中仅可使用某种单一破壁方法的缺点。

[0036] (18)本发明提供的基因组DNA提取方法,提取条件温和,可在室温下完成基因组DNA提取,无需高温加热或煮沸,所获基因组DNA完整性好。

[0037] (19)本发明提供的基因组DNA提取方法,样品不需要充分研磨,降低了细胞破碎难度。

[0038] (20)本发明提供的基因组DNA提取方法,所用试剂均为常规试剂,安全无毒,不使用氯仿、苯酚、巯基乙醇或DTT等有毒危险化学品。

[0039] (21)本发明提供的基因组DNA提取方法,所用试剂不含强酸或强碱,没有腐蚀性,安全性高。

[0040] (22)本发明提供的基因组DNA提取方法,所用试剂中不含氨基酸、蛋白质及高浓度高分子化合物,长期保存不易污染。

[0041] (23)本发明提供的基因组DNA提取方法,提取试剂及其提取产物中均不含有高浓度的对DNA聚合酶有抑制作用的盐成分。虽然高盐可以改变细胞渗透压,促进细胞裂解,是大部分基因组DNA提取试剂必备组分,但高浓度的NaCl、$MgCl_2$和KCl等都会抑制PCR反应,提取后还需要进行纯化步骤将盐除去。本发明所用试剂中不含上述高盐成分,提取的基因组DNA无需纯化,可直接用作PCR模板。

附图说明

[0042] 图1是拟南芥SALK_151408纯合突变体和Col-0野生型基因组DNA的PCR产物电泳图,泳道1为Marker(BM2000 DNA Marker),泳道2～25分别为不同单株提取基因组DNA的PCR产物,其中泳道2～24为不同突变体单株,泳道25为Col-0野生型单株;

[0043] 图2是用Col-0野生型基因组DNA克隆AtWUS基因5000bp启动子的PCR产物电泳图,泳道1为Marker(BM5000 DNA Marker),泳道2～6分别为不同单株提取基因组DNA的PCR产物;

[0044] 图3是中花11水稻基因组DNA的PCR产物电泳图,泳道1为Marker(BM2000 DNA Marker),泳道2～25分别为不同单株提取基因组DNA的PCR产物;

[0045] 图4是用日本晴水稻基因组DNA克隆OsPHO1;3基因5025bp启动子的PCR产物电泳

图,泳道1为Marker(BM5000 DNA Marker),泳道2～6分别为不同单株提取基因组DNA的PCR产物;

[0046] 图5是用克新18号马铃薯基因组DNA克隆StSP6A基因2612bp启动子的PCR产物电泳图,泳道1为Marker(BM5000 DNA Marker),泳道2～6分别为不同单株提取基因组DNA的PCR产物;

[0047] 图6是用中双11号油菜基因组DNA克隆SPL基因1960bp启动子的PCR产物电泳图,泳道1为Marker(BM2000 DNA Marker),泳道2～6分别为不同单株提取基因组DNA的PCR产物;

[0048] 图7是用番茄基因组DNA克隆LAT52基因612bp启动子的PCR产物电泳图,泳道1为Marker(BM2000 DNA Marker),泳道2～6分别为不同单株提取基因组DNA的PCR产物;

[0049] 图8是用玉米基因组DNA克隆ZmNAC1基因2089bp启动子的PCR产物电泳图,泳道1为Marker(BM2000 DNA Marker),泳道2～6分别为不同单株提取基因组DNA的PCR产物;

[0050] 图9是对蚜虫基因组DNA进行COI基因快速检测的PCR产物电泳图,泳道1为Marker(BM2000 DNA Marker),泳道2～25分别为不同蚜虫提取基因组DNA的PCR产物,其中泳道2～24是用细胞裂解液提取基因组DNA的PCR产物,泳道25是以清水替换FN-C作为对照;

[0051] 图10是拟南芥酵母双杂交cDNA文库筛选时提取酵母单斑基因组DNA的PCR产物电泳图,泳道1为Marker(BM2000 DNA Marker),泳道2～18分别为不同酵母单斑提取基因组DNA的PCR产物,其中泳道2～17是用细胞裂解液提取基因组DNA的PCR产物,泳道18是以清水替换FN-C作为对照;

[0052] 图11是对马铃薯病原菌大丽轮枝菌快速检测的PCR产物电泳图,泳道1为Marker(BM5000 DNA Marker),泳道2～25分别为不同病原菌菌落提取基因组DNA的PCR产物,其中泳道2～24是用细胞裂解液提取基因组DNA的PCR产物,泳道25是以清水替换FN-C作为对照;

[0053] 图12是利用直接PCR技术从中双11号油菜叶片中克隆SPL基因1960bp启动子的PCR产物电泳图,泳道1为Marker(BM2000 DNA Marker),泳道2～6分别为不同叶片提取基因组DNA的PCR产物;

[0054] 图13是从不同温度下保存2个月的马铃薯基因组DNA溶液中克隆StSP6A基因2612bp启动子的PCR产物电泳图,泳道1为Marker(BM5000 DNA Marker),泳道2～6分别为在37℃、25℃、4℃、-20℃和-80℃中保存2个月的马铃薯基因组DNA溶液的PCR产物。

具体实施方式

[0055] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步描述。下述实施例仅用于阐明本发明,不应理解为对本发明的限制;下述实施例中的实验方法均为常规方法;下述实施例中所用的材料、试剂和仪器等均可从市面购买;下述实施例中,序列表中各核苷酸序列的第1位均为相应DNA的5′末端核苷酸,末位均为相应DNA的3′末端核苷酸。在不背离本发明精神和实质的情况下,本领域技术人员对本发明方法、步骤或条件所作的修改或替换,均属于本发明的范围。

[0056] 实施例1:拟南芥基因组DNA的提取及应用

[0057] (一)拟南芥基因组DNA的提取方法:

[0058] (1)配制细胞裂解液:细胞裂解液由10～300mM pH为7.5～9.0的Tris-HCl、1～2mM pH为8.0～8.5的Na_2EDTA、0.01％～0.1％(w/v)的LDS、0.01％～0.1％(v/v)的Tween-20以

及pH为7.0～8.5的纯水组成，在上述取值范围内的任意配比组合均可达到相同或相似的效果，在本实施例中设置为10mM pH为8.0的Tris-HCl、2mM pH为8.2的Na_2EDTA、0.1％(w/v)的LDS、0.05％(v/v)的Tween-20以及pH为7.5的纯水。

[0059] (2)取约2mg拟南芥新鲜叶片置于加有1颗钢珠(直径为4mm)的2mL无菌离心管内，加入30μL细胞裂解液，置于自动研磨仪中，50Hz研磨5s。

[0060] (3)12000rpm离心1s，其上清含有基因组DNA，将上清液保存于室温。

[0061] (二)拟南芥T-DNA插入突变体的鉴定：

[0062] (1)按本实施例中(一)所述方法分别对23株拟南芥SALK_151408纯合突变体和1株Col-0野生型植株进行基因组DNA快速提取，所获含有基因组DNA的上清液直接用于PCR模板。

[0063] (2)PCR反应体系(10μL)：

[0064]

试剂	用量
模板	1μL
10 μmol L^{-1} 正向引物（序列 SEQ ID No.1）	0.5μL
10 μmol L^{-1} 反向引物（序列 SEQ ID No.2）	0.5μL
10×*EasyTaq* Buffer（+Mg^{2+}）	1μL
10 mM dNTPs	0.2μL
5 U μL^{-1} *EasyTaq* DNA 聚合酶	0.2μL
无菌超纯水	6.6μL

[0066] (3)PCR反应程序：

[0067]

反应步骤	反应温度	反应时间	
1	94℃	3min	
2	94℃	30s	35 循环
3	58℃	30s	
4	72℃	1min	
5	72℃	7min	
6	16℃	1s	

[0068] (4)PCR反应结束后，使用1％的琼脂糖凝胶进行电泳检测，检测结果如图1所示，23个T-DNA插入突变体的基因组DNA模板均可稳定扩增出清晰的目的条带，而野生型对照基因组DNA模板无法扩增出目的条带，PCR重复性好，扩增效果理想。

[0069] (三)拟南芥AtWUS基因5000bp启动子克隆：

[0070] (1)按本实施例中(一)所述方法对5株Col-0野生型植株进行基因组DNA快速提取，所获含有基因组DNA的上清液直接用于PCR模板。

[0071] (2)PCR反应体系(50μL)：

试剂	用量
模板	1μL
10 μmol L^{-1} 正向引物（序列 SEQ ID No.3）	1μL
10 μmol L^{-1} 反向引物（序列 SEQ ID No.4）	1μL
KOD FX Neo DNA 聚合酶	1μL
2×PCR Buffer for KOD FX Neo	25μL
2 mM dNTPs	10μL
无菌超纯水	11μL

[0072]

[0073] (3)PCR反应程序：

反应步骤	反应温度	反应时间	
1	94℃	2min	
2	98℃	10s	
3	58℃	30s	35 循环
4	68℃	2min30s	
5	68℃	7min	
6	16℃	1s	

[0074]

[0075] (4)PCR反应结束后，使用1％的琼脂糖凝胶进行电泳检测，检测结果如图2所示，5个不同野生型植株的基因组DNA模板均可稳定扩增出清晰的目的条带，PCR重复性好，扩增效果理想。

[0076] 实施例2：水稻基因组DNA的提取及应用

[0077] (一)水稻基因组DNA的提取方法：

[0078] (1)配制细胞裂解液：细胞裂解液由10～300mM pH为7.5～9.0的Tris-HCl、1～2mM pH为8.0～8.5的Na_2EDTA、0.01％～0.1％(w/v)的LDS、0.01％～0.1％(v/v)的Tween-20以及pH为7.0～8.5的纯水组成，在上述取值范围内的任意配比组合均可达到相同或相似的效果，在本实施例中设置为100mM pH为8.0的Tris-HCl、1mM pH为8.2的Na_2EDTA、0.05％(w/v)的LDS、0.06％(v/v)的Tween-20以及pH为7.0的纯水。

[0079] (2)取约2mg水稻新鲜叶片置于加有1颗钢珠(直径为4mm)的2mL无菌离心管内，加入40μL细胞裂解液，置于自动研磨仪中，50Hz研磨5s。

[0080] (3)12000rpm离心1s，其上清含有基因组DNA，将上清液保存于室温。

[0081] (二)水稻BSA法基因定位：

[0082] (1)按本实施例中(一)所述方法分别对24株中花11水稻进行基因组DNA快速提取，所获含有基因组DNA的上清液直接用于SSR分子标记的PCR模板。

[0083] (2)PCR反应体系(10μL)：

[0084]

试剂	用量
模板	1μL
10 μmol L^{-1} 正向引物（序列 SEQ ID No.5）	0.5μL
10 μmol L^{-1} 反向引物（序列 SEQ ID No.6）	0.5μL
10×*Taq* Buffer（+Mg^{2+}）	1μL
2 mM dNTPs	0.8μL
5 U μL^{-1} *Taq* DNA 聚合酶	0.2μL
无菌超纯水	6μL

[0085] (3)PCR反应程序：

[0086]

反应步骤	反应温度	反应时间	
1	94℃	3min	
2	94℃	30s	35 循环
3	56℃	30s	
4	72℃	30s	
5	72℃	7min	
6	16℃	1s	

[0087] (4)PCR反应结束后，使用1％的琼脂糖凝胶进行电泳检测，检测结果如图3所示，24个中花11水稻的基因组DNA模板均可稳定扩增出清晰的目的条带，PCR重复性好，扩增效果理想。

[0088] (三)水稻OsPHO1;3基因5025bp启动子克隆：

[0089] (1)按本实施例中(一)所述方法对5株日本晴水稻植株进行基因组DNA快速提取，所获含有基因组DNA的上清液直接用于PCR模板。

[0090] (2)PCR反应体系(50μL)：

[0091]

试剂	用量
模板	1μL
10 μmol L^{-1} 正向引物（序列 SEQ ID No.7）	1μL
10 μmol L^{-1} 反向引物（序列 SEQ ID No.8）	1μL
PrimeSTAR Max Premix（2×）	25μL
无菌超纯水	22μL

[0092] (3)PCR反应程序：

[0093]

反应步骤	反应温度	反应时间	
1	98℃	2min	
2	98℃	10s	35 循环
3	58℃	15s	
4	72℃	1min50s	
5	72℃	7min	
6	16℃	1s	

[0094] (4)PCR反应结束后,使用1%的琼脂糖凝胶进行电泳检测,检测结果如图4所示,5个不同日本晴植株的基因组DNA模板均可稳定扩增出清晰的目的条带,PCR重复性好,扩增效果理想。

[0095] 实施例3:马铃薯基因组DNA的提取及应用

[0096] (一)马铃薯基因组DNA的提取方法:

[0097] (1)配制细胞裂解液:细胞裂解液由10～300mM pH为7.5～9.0的Tris-HCl、1～2mM pH为8.0～8.5的Na_2EDTA、0.01%～0.1%(w/v)的LDS、0.01%～0.1%(v/v)的Tween-20以及pH为7.0～8.5的纯水组成,在上述取值范围内的任意配比组合均可达到相同或相似的效果,在本实施例中设置为100mM pH为8.0的Tris-HCl、2mM pH为8.2的Na_2EDTA、0.05%(w/v)的LDS、0.05%(v/v)的Tween-20以及pH为7.5的纯水。

[0098] (2)取约2mg马铃薯新鲜叶片置于加有1颗钢珠(直径为4mm)的2mL无菌离心管内,加入40μL细胞裂解液,置于自动研磨仪中,50Hz研磨5s。

[0099] (3)12000rpm离心1s,其上清含有基因组DNA,将上清液保存于室温。

[0100] (二)马铃薯StSP6A基因2612bp启动子克隆:

[0101] (1)按本实施例中(一)所述方法对5株克新18号马铃薯植株进行基因组DNA快速提取,所获含有基因组DNA的上清液直接用于PCR模板。

[0102] (2)PCR反应体系(50μL):

[0103]

试剂	用量
模板	1μL
10 μmol L^{-1} 正向引物(序列 SEQ ID No.9)	1μL
10 μmol L^{-1} 反向引物(序列 SEQ ID No.10)	1μL
KOD FX Neo DNA 聚合酶	1μL
2×PCR Buffer for KOD FX Neo	25μL
2 mM dNTPs	10μL
无菌超纯水	11μL

[0104] (3)PCR反应程序:

[0105]

反应步骤	反应温度	反应时间	
1	94℃	2min	
2	98℃	10s	35 循环
3	58℃	30s	
4	68℃	1min30s	
5	68℃	7min	
6	16℃	1s	

[0106] (4)PCR反应结束后,使用1%的琼脂糖凝胶进行电泳检测,检测结果如图5所示,5个不同马铃薯植株基因组DNA模板均可稳定扩增出清晰的目的条带,PCR重复性好,扩增效果理想。

[0107] 实施例4:油菜基因组DNA的提取及应用

[0108] (一)油菜基因组DNA的提取方法:

[0109] (1)配制细胞裂解液:细胞裂解液由10～300mM pH为7.5～9.0的Tris-HCl、1～2mM pH为8.0～8.5的Na_2EDTA、0.01%～0.1%(w/v)的LDS、0.01%～0.1%(v/v)的Tween-20以及pH为7.0～8.5的纯水组成,在上述取值范围内的任意配比组合均可达到相同或相似的效果,在本实施例中设置为100mM pH为8.0的Tris-HCl、1mM pH为8.2的Na_2EDTA、0.05%(w/v)的LDS、0.05%(v/v)的Tween-20以及pH为7.5的纯水。

[0110] (2)取约2mg油菜新鲜叶片置于加有1颗钢珠(直径为4mm)的2mL无菌离心管内,加入40μL细胞裂解液,置于自动研磨仪中,50Hz研磨5s。

[0111] (3)12000rpm离心1s,其上清含有基因组DNA,将上清液保存于室温。

[0112] (二)油菜SPL基因1960bp启动子克隆:

[0113] (1)按本实施例中(一)所述方法对5株中双11号油菜植株进行基因组DNA快速提取,所获含有基因组DNA的上清液直接用于PCR模板。

[0114] (2)PCR反应体系(50μL):

[0115]

试剂	用量
模板	1μL
10 μmol L^{-1} 正向引物(序列 SEQ ID No.11)	1μL
10 μmol L^{-1} 反向引物(序列 SEQ ID No.12)	1μL
Kodaq 2×PCR MasterMix	25μL
无菌超纯水	22μL

[0116] (3)PCR反应程序:

[0117]

反应步骤	反应温度	反应时间	
1	94℃	5min	
2	94℃	30s	35 循环
3	57℃	30s	
4	72℃	2min	
5	72℃	7min	
6	16℃	1s	

[0118] (4)PCR反应结束后,使用1%的琼脂糖凝胶进行电泳检测,检测结果如图6所示,5个不同油菜植株基因组DNA模板均可稳定扩增出清晰的目的条带,PCR重复性好,扩增效果理想。

[0119] 实施例5:番茄基因组DNA的提取及应用

[0120] (一)番茄基因组DNA的提取方法:

[0121] (1)配制细胞裂解液:细胞裂解液由10～300mM pH为7.5～9.0的Tris-HCl、1～2mM pH为8.0～8.5的Na_2EDTA、0.01%～0.1%(w/v)的LDS、0.01%～0.1%(v/v)的Tween-20以及pH为7.0～8.5的纯水组成,在上述取值范围内的任意配比组合均可达到相同或相似的效果,在本实施例中设置为100mM pH为8.5的Tris-HCl、1mM pH为8.0的Na_2EDTA、0.05%(w/v)的LDS、0.05%(v/v)的Tween-20以及pH为7.0的纯水。

[0122] (2)取约2mg番茄新鲜叶片置于加有1颗钢珠(直径为4mm)的2mL无菌离心管内,加入40μL细胞裂解液,置于自动研磨仪中,50Hz研磨5s。

[0123] (3)12000rpm离心1s,其上清含有基因组DNA,将上清液保存于室温。

[0124] (二)番茄LAT52基因612bp启动子克隆:

[0125] (1)按本实施例中(一)所述方法对5株番茄植株进行基因组DNA快速提取,所获含有基因组DNA的上清液直接用于PCR模板。

[0126] (2)PCR反应体系(50μL):

[0127]

试剂	用量
模板	1μL
10 μmol L^{-1} 正向引物(序列 SEQ ID No.13)	1μL
10 μmol L^{-1} 反向引物(序列 SEQ ID No.14)	1μL
10×*EasyTaq* Buffer(+Mg^{2+})	5μL
10 mM dNTPs	1μL
5 U μL^{-1} *EasyTaq* DNA 聚合酶	1μL
无菌超纯水	40μL

[0128] (3)PCR反应程序:

[0129]

反应步骤	反应温度	反应时间	
1	94℃	5min	
2	94℃	30s	35 循环
3	56℃	30s	
4	72℃	50s	
5	72℃	7min	
6	16℃	1s	

[0130] (4)PCR反应结束后,使用1%的琼脂糖凝胶进行电泳检测,检测结果如图7所示,5个不同番茄植株基因组DNA模板均可稳定扩增出清晰的目的条带,PCR重复性好,扩增效果理想。

[0131] 实施例6:玉米基因组DNA的提取及应用

[0132] (一)玉米基因组DNA的提取方法:

[0133] (1)配制细胞裂解液:细胞裂解液由10～300mM pH为7.5～9.0的Tris-HCl、1～2mM pH为8.0～8.5的Na_2EDTA、0.01%～0.1%(w/v)的LDS、0.01%～0.1%(v/v)的Tween-20以及pH为7.0～8.5的纯水组成,在上述取值范围内的任意配比组合均可达到相同或相似的效果,在本实施例中设置为100mM pH为8.0的Tris-HCl、2mM pH为8.0的Na_2EDTA、0.05%(w/v)的LDS、0.1%(v/v)的Tween-20以及pH为7.5的纯水。

[0134] (2)取约2mg玉米新鲜叶片置于加有1颗钢珠(直径为4mm)的2mL无菌离心管内,加入40μL细胞裂解液,置于自动研磨仪中,50Hz研磨5s。

[0135] (3)12000rpm离心1s,其上清含有基因组DNA,将上清液保存于室温。

[0136] (二)玉米ZmNAC1基因2089bp启动子克隆:

[0137] (1)按本实施例中(一)所述方法对5株玉米植株进行基因组DNA快速提取,所获含有基因组DNA的上清液直接用于PCR模板。

[0138] (2)PCR反应体系(50μL):

[0139]

试剂	用量
模板	1μL
10 μmol L^{-1} 正向引物(序列 SEQ ID No.15)	1μL
10 μmol L^{-1} 反向引物(序列 SEQ ID No.16)	1μL
Kodaq 2×PCR MasterMix	25μL
无菌超纯水	22μL

[0140] (3)PCR反应程序:

[0141]

反应步骤	反应温度	反应时间	
1	94℃	5min	
2	94℃	30s	35 循环
3	60℃	30s	
4	72℃	2min30s	
5	72℃	7min	
6	16℃	1s	

[0142] (4)PCR反应结束后,使用1%的琼脂糖凝胶进行电泳检测,检测结果如图8所示,5个不同玉米植株的基因组DNA模板均可稳定扩增出清晰的目的条带,PCR重复性好,扩增效果理想。

[0143] 实施例7:蚜虫基因组DNA的提取及应用

[0144] (一)蚜虫基因组DNA的提取方法:

[0145] (1)配制细胞裂解液:细胞裂解液由10～300mM pH为7.5～9.0的Tris-HCl、1～2mM pH为8.0～8.5的Na_2EDTA、0.01%～0.1%(w/v)的LDS、0.01%～0.1%(v/v)的Tween-20以及pH为7.0～8.5的纯水组成,在上述取值范围内的任意配比组合均可达到相同或相似的效果,在本实施例中设置为100mM pH为8.5的Tris-HCl、1mM pH为8.2的Na_2EDTA、0.05%(w/v)的LDS、0.06%(v/v)的Tween-20以及pH为7.5的纯水。

[0146] (2)将1头蚜虫清洗后置于加有20μL细胞裂解液的1.5mL无菌离心管内,用自动研磨棒研磨3s获得组织匀浆,将其转移至PCR仪中98℃加热2min。

[0147] (3)1000rpm离心1s,其上清含有基因组DNA,将上清液保存于室温。

[0148] (二)蚜虫COI基因检测:

[0149] (1)按本实施例中(一)所述方法分别对23头蚜虫进行基因组DNA快速提取,所获含有基因组DNA的上清液直接用于PCR模板,取1头蚜虫以清水替换FN-C作为对照。

[0150] (2)PCR反应体系(10μL):

[0151]

试剂	用量
模板	1μL
10 μmol L^{-1} 正向引物(序列 SEQ ID No.17)	0.5μL
10 μmol L^{-1} 反向引物(序列 SEQ ID No.18)	0.5μL
Kodaq 2×PCR MasterMix	5μL
无菌超纯水	3μL

[0152] (3)PCR反应程序:

[0153]

反应步骤	反应温度	反应时间	
1	94℃	5min	
2	94℃	30s	35 循环
3	58℃	30s	
4	72℃	1min	
5	72℃	7min	
6	16℃	1s	

[0154] (4)PCR反应结束后,使用1%的琼脂糖凝胶进行电泳检测,检测结果如图9所示,对照无条带,而用细胞裂解液提取的23个不同蚜虫的基因组DNA模板均可稳定扩增出清晰的目的条带,检测效果理想。

[0155] 实施例8:酵母基因组DNA的提取及应用

[0156] (一)酵母基因组DNA的提取方法:

[0157] (1)配制细胞裂解液:细胞裂解液由10～300mM pH为7.5～9.0的Tris-HCl、1～2mM pH为8.0～8.5的Na_2EDTA、0.01%～0.1%(w/v)的LDS、0.01%～0.1%(v/v)的Tween-20以及pH为7.0～8.5的纯水组成,在上述取值范围内的任意配比组合均可达到相同或相似的效果,在本实施例中设置为100mM pH为8.5的Tris-HCl、1mM pH为8.0的Na_2EDTA、0.06%(w/v)的LDS、0.06%(v/v)的Tween-20以及pH为7.5的纯水。

[0158] (2)挑取酵母单斑置于加有20μL细胞裂解液的0.2mL无菌PCR管内,在PCR仪中98℃加热2min。

[0159] (3)1000rpm离心1s,其上清含有基因组DNA,将上清液保存于室温。

[0160] (二)拟南芥酵母双杂交cDNA文库筛选:

[0161] (1)取拟南芥幼苗,构建酵母双杂交cDNA文库,用目的质粒与拟南芥酵母双杂交cDNA文库进行酵母次序转化,待酵母在SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade四缺培养基上长出2-3mm的单斑,按本实施例中(一)所述方法分别挑取16个单斑进行基因组DNA快速提取,所获含有基因组DNA的上清液直接用于PCR模板,挑取1个酵母单斑以清水替换FN-C作为对照。

[0162] (2)PCR反应体系(20μL):

[0163]

试剂	用量
模板	1μL
10 μmol L^{-1} 正向引物(序列 SEQ ID No.19)	0.5μL
10 μmol L^{-1} 反向引物(序列 SEQ ID No.20)	0.5μL
Kodaq 2×PCR MasterMix	10μL
无菌超纯水	8μL

[0164] (3)PCR反应程序:

[0165]

反应步骤	反应温度	反应时间	
1	94℃	3min	
2	94℃	30s	35 循环
3	58℃	30s	
4	72℃	2min15s	
5	72℃	7min	
6	16℃	1s	

[0166] (4)PCR反应结束后,使用1%的琼脂糖凝胶进行电泳检测,检测结果如图10所示,对照无条带,而用细胞裂解液提取的16个不同酵母单斑的基因组DNA模板均可稳定扩增出清晰的目的条带,扩增效果理想。

[0167] 实施例9:病原菌基因组DNA的提取及应用

[0168] (一)病原菌基因组DNA的提取方法:

[0169] (1)配制细胞裂解液:细胞裂解液由10～300mM pH为7.5～9.0的Tris-HCl、1～2mM pH为8.0～8.5的Na_2EDTA、0.01%～0.1%(w/v)的LDS、0.01%～0.1%(v/v)的Tween-20以及pH为7.0～8.5的纯水组成,在上述取值范围内的任意配比组合均可达到相同或相似的效果,在本实施例中设置为100mM pH为8.0的Tris-HCl、1mM pH为8.2的Na_2EDTA、0.055%(w/v)的LDS、0.055%(v/v)的Tween-20以及pH为7.0的纯水。

[0170] (2)挑取病原菌菌落置于加有20μL细胞裂解液的0.2ml无菌PCR管内,在PCR仪中98℃加热2min。

[0171] (3)1000rpm离心1s,其上清含有基因组DNA,将上清液保存于室温。

[0172] (二)马铃薯大丽轮枝菌的分离及快速检测:

[0173] (1)取马铃薯黄萎病感病株系茎段,流水冲洗干净后用镊子去皮,将茎段剪成0.5～1cm左右长度的茎段,于75%酒精中浸泡10min后转入15%次氯酸钠溶液中浸泡1min,用无菌水清洗2～3次,将茎段移至无菌滤纸上,用无菌滤纸吸干茎段表面水分,将茎段移至PDA培养基上培养至可见明显菌落形态。按本实施例中(一)所述方法分别挑取23个病原菌菌落进行基因组DNA快速提取,所获含有基因组DNA的上清液直接用于PCR模板,挑取1个病原菌菌落以清水替换FN-C作为对照。

[0174] (2)PCR反应体系(10μL):

[0175]

试剂	用量
模板	0.5μL
10 μmol L^{-1} 正向引物(序列 SEQ ID No.21)	0.5μL
10 μmol L^{-1} 反向引物(序列 SEQ ID No.22)	0.5μL
Kodaq 2×PCR MasterMix	5μL
无菌超纯水	3.5μL

[0176] (3)PCR反应程序：

[0177]

反应步骤	反应温度	反应时间	
1	94℃	3min	
2	94℃	30s	35 循环
3	59℃	30s	
4	72℃	45s	
5	72℃	7min	
6	16℃	1s	

[0178] (4)PCR反应结束后，使用1％的琼脂糖凝胶进行电泳检测，检测结果如图11所示，对照无条带，而用细胞裂解液提取的23个病原菌菌落中的基因组DNA模板均检测出大丽轮枝菌，均可稳定扩增出清晰的目的条带，扩增效果理想。

[0179] 实施例10：直接PCR及应用

[0180] (一)直接PCR方法：

[0181] (1)配制细胞裂解液：细胞裂解液由10～300mM pH为7.5～9.0的Tris-HCl、1～2mM pH为8.0～8.5的Na_2EDTA、0.01％～0.1％(w/v)的LDS、0.01％～0.1％(v/v)的Tween-20以及pH为7.0～8.5的纯水组成，在上述取值范围内的任意配比组合均可达到相同或相似的效果，在本实施例中设置为50mM pH为8.0的Tris-HCl、1mM pH为8.0的Na_2EDTA、0.04％(w/v)的LDS、0.1％(v/v)的Tween-20以及pH为7.0的纯水。

[0182] (2)在0.2mL无菌PCR管中加入2～5μL FN-C。

[0183] (3)用无菌牙签沾取少量粉末样品或直接夹取少量新鲜组织放入上述PCR管的FN-C中，直接将其作为PCR模板。

[0184] (二)利用直接PCR技术从油菜叶片中克隆SPL基因1960bp启动子：

[0185] (1)随机选取5个中双11号油菜的叶片，按本实施例中(一)所述方法进行直接PCR。

[0186] (2)直接PCR反应体系(50μL)：

[0187]

试剂或组织	用量
细胞裂解液	5μL
油菜叶片	1mg
10 μmol L^{-1} 正向引物（序列 SEQ ID No.11）	1μL
10 μmol L^{-1} 反向引物（序列 SEQ ID No.12）	1μL
10×*EasyTaq* Buffer（+Mg^{2+}）	5μL
10 mM dNTPs	1μL
5 U μL^{-1} *EasyTaq* DNA 聚合酶	1μL
无菌超纯水	35μL

[0188] (3)PCR反应程序：

[0189]

反应步骤	反应温度	反应时间	
1	94℃	5min	
2	94℃	30s	35 循环
3	56℃	30s	
4	72℃	2min30s	
5	72℃	7min	
6	16℃	1s	

[0190] (4)PCR反应结束后,使用1%的琼脂糖凝胶进行电泳检测,检测结果如图12所示,在使用FN-C的情况下,使用普通的EasyTaq DNA聚合酶对5个不同油菜叶片进行直接PCR,均可稳定扩增出清晰的目的条带,PCR重复性好,扩增效果理想,说明本发明提供的细胞裂解液不仅可以用于快速提取基因组DNA,还可用于直接PCR的样品处理。

[0191] 实施例11:快速提取的马铃薯基因组DNA溶液在不同温度下保存效果分析

[0192] (一)马铃薯基因组DNA的提取及保存:

[0193] (1)马铃薯基因组DNA的提取方法与实施例3完全相同。

[0194] (2)将经过上述步骤获得的含有马铃薯基因组DNA的上清液分装到5个0.2mL无核酸酶的PCR管中,分别保存于37℃、25℃、4℃、-20℃和-80℃。

[0195] (二)从不同温度下保存的马铃薯基因组DNA溶液中克隆StSP6A基因2612bp启动子:

[0196] (1)按本实施例中(一)所述方法,获得马铃薯基因组DNA溶液,并分别在37℃、25℃、4℃、-20℃和-80℃保存2个月,取上清液用作PCR模板。

[0197] (2)PCR反应体系(50μL):

[0198]

试剂	用量
模板	1μL
10 μmol L^{-1} 正向引物(序列 SEQ ID No.9)	1μL
10 μmol L^{-1} 反向引物(序列 SEQ ID No.10)	1μL
KOD FX DNA 聚合酶	1μL
2×PCR Buffer for KOD FX	25μL
2 mM dNTPs	10μL
无菌超纯水	11μL

[0199] (3)PCR反应程序:

[0200]

反应步骤	反应温度	反应时间	
1	98℃	2min	
2	98℃	10s	35 循环
3	58℃	30s	
4	68℃	2min10s	
5	68℃	10min	
6	16℃	1s	

[0201] (4)PCR反应结束后，使用1％的琼脂糖凝胶进行电泳检测，检测结果如图13所示，在37℃、25℃、4℃、-20℃和-80℃中保存2个月的马铃薯基因组DNA溶液，均能扩增出2612bp的单一条带，在37℃保存2个月的模板扩增条带较弱，在25℃、4℃、-20℃和-80℃中保存2个月的模板扩增条带均较亮，说明经本发明提供的快速基因组DNA提取方法提取的基因组DNA溶液可在-80～37℃长期保存。。

[0202] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已，并不用以限制本发明，凡在本发明的精神和原则之内，所有的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

序列表

<110> 西南大学

<120> 一种用于快速无毒提取动植物或微生物基因组DNA的细胞裂解液、试剂盒和方法

<160> 22

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<400> 1

attttgccga tttcggaac 19

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> 拟南芥(Arabidopsis thaliana)

<400> 2

tggcggtata gtggtcatct c 21

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> 拟南芥(Arabidopsis thaliana)

<400> 3

gcccaaccag attagtaaca ac 22

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> 拟南芥(Arabidopsis thaliana)

<400> 4

gtgtgtttga ttcgactttt gttc 24

<210> 5

<211> 26

<212> DNA

<213> 水稻(Oryza sativa L.)

<400> 5

gcatgatgat ttcaaatggg tgaatt 26

<210> 6

<211> 21

<212> DNA
<213> 水稻(Oryza sativa L.)
<400> 6
ccaccgtgag cgagaagagc a 21
<210> 7
<211> 26
<212> DNA
<213> 水稻(Oryza sativa L.)
<400> 7
ccgtggctag tggttactca gttatt 26
<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> 水稻(Oryza sativa L.)
<400> 8
tggcctcctc tcaccttgca g 21
<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> 马铃薯(Solanum tuberosum L.)
<400> 9
gccactccta ttaccttctc c 21
<210> 10
<211> 35
<212> DNA
<213> 马铃薯(Solanum tuberosum L.)
<400> 10
gataaaatta agtataatat aaggtttata tatta 35
<210> 11
<211> 22
<212> DNA
<213> 油菜(Brassica campestris L.)
<400> 11
gcatgacaac actcttgcat aa 22
<210> 12
<211> 24
<212> DNA
<213> 油菜(Brassica campestris L.)
<400> 12

tgatgatgat cactgagaga gagc 24

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> 番茄(Solanum lycopersicum)

<400> 13

ggtgtcgaca tactcgactc a 21

<210> 14

<211> 32

<212> DNA

<213> 番茄(Solanum lycopersicum)

<400> 14

tttaaattgg aatttttttt tttggtgtgt gt 32

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> 玉米(Zea mays L.)

<400> 15

cttcgatgca ccatatctct tctc 24

<210> 16

<211> 19

<212> DNA

<213> 玉米(Zea mays L.)

<400> 16

ggccgtcgac gacgacgat 19

<210> 17

<211> 25

<212> DNA

<213> 蚜虫(Aphidoidea)

<400> 17

attcaaccaa tcataaagat attgg 25

<210> 18

<211> 26

<212> DNA

<213> 蚜虫(Aphidoidea)

<400> 18

taaacttctg gatgtccaaa aaatca 26

<210> 19

<211> 24

<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 19
taatacgact cactataggg cgag 24
<210> 20
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 20
agatggtgca cgatgcacag 20
<210> 21
<211> 19
<212> DNA
<213> 大丽轮枝菌(Verticillium dahliae)
<400> 21
tccgtaggtg aacctgcgg 19
<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> 大丽轮枝菌(Verticillium dahliae)
<400> 22
tcctccgctt attgatatgc 20

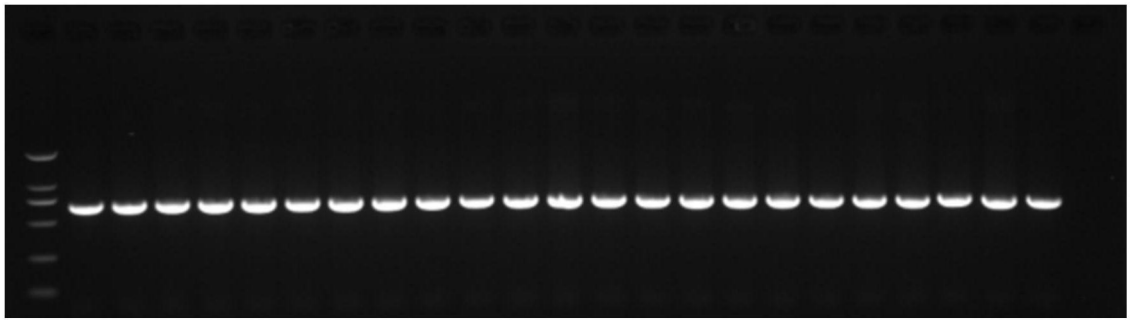


图1

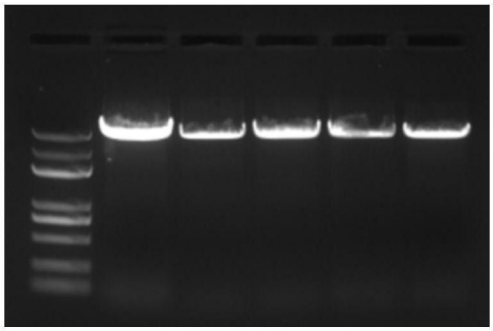


图2

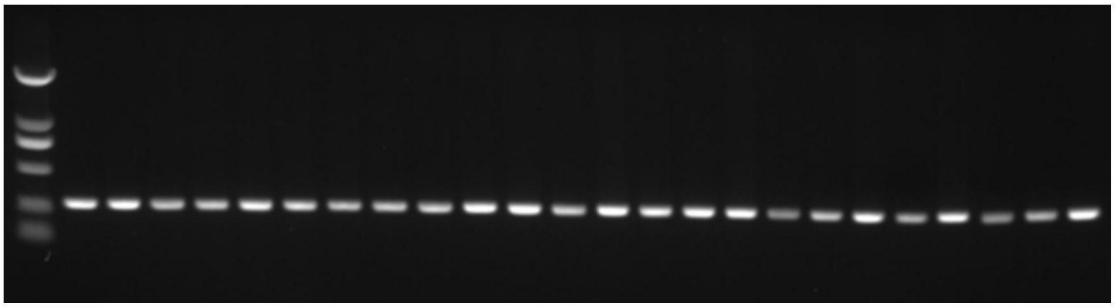


图3

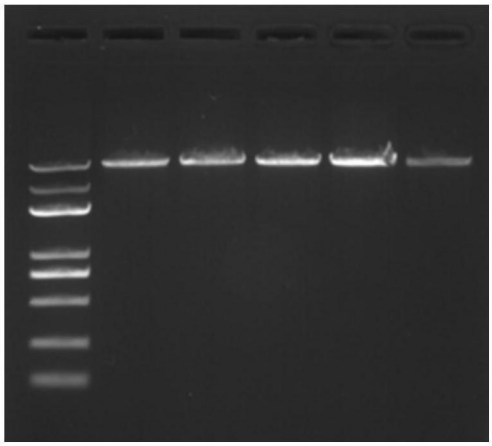


图4

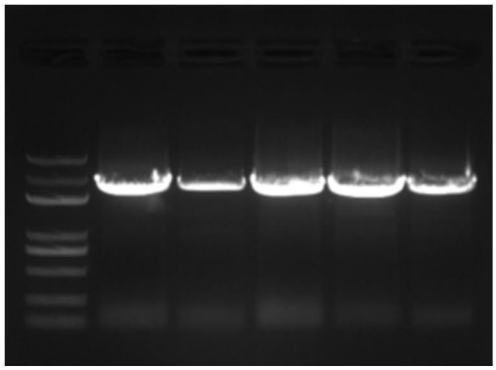


图5

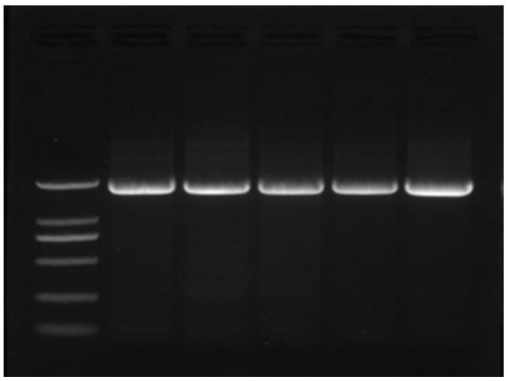


图6

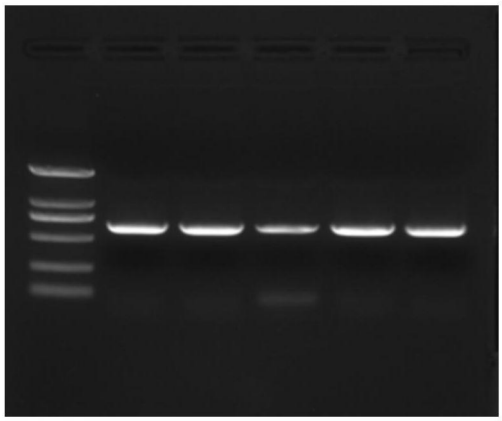


图7

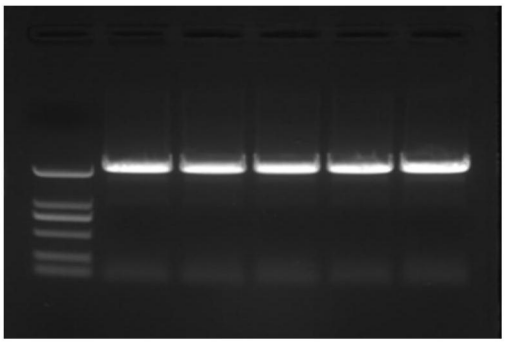


图8

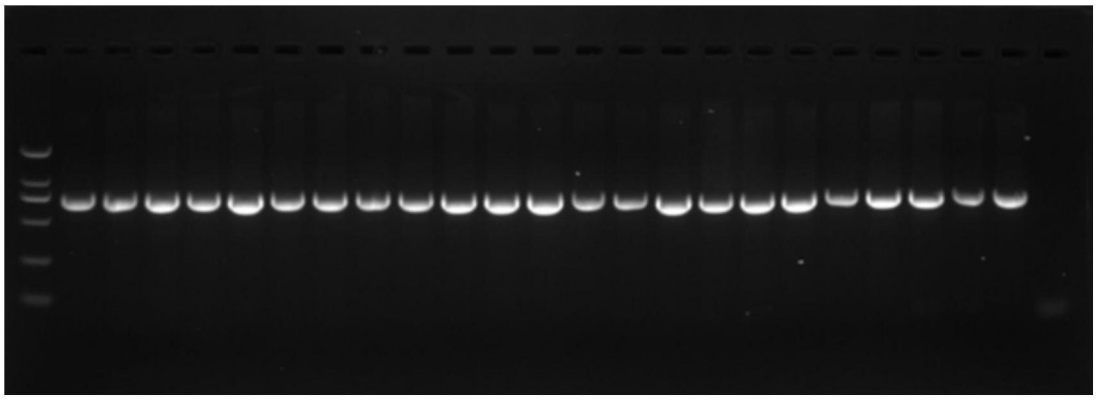


图9

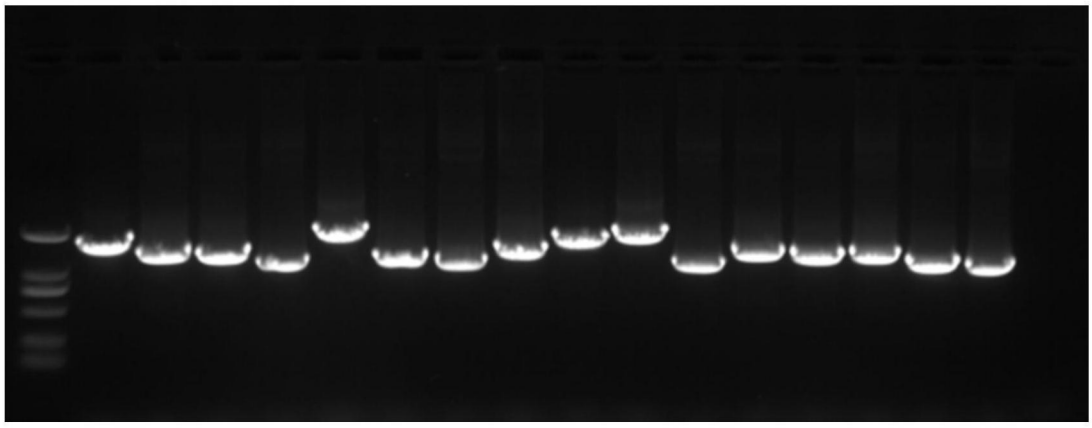


图10

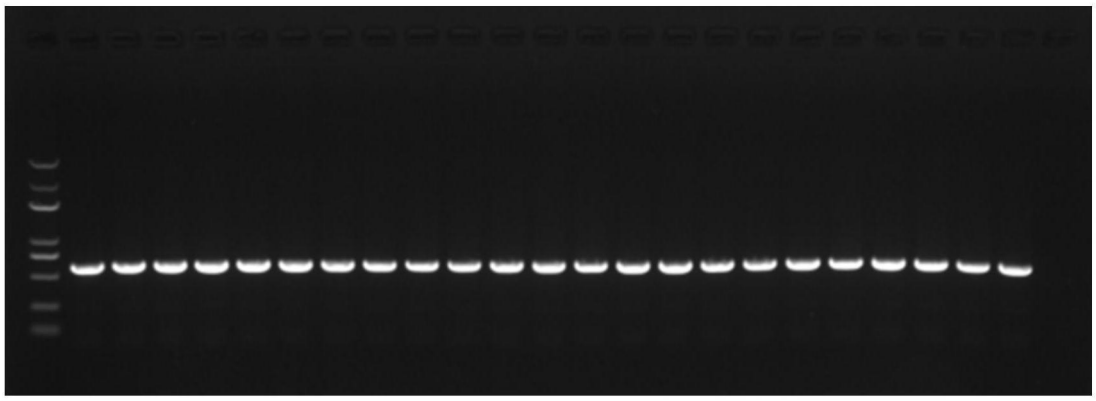


图11

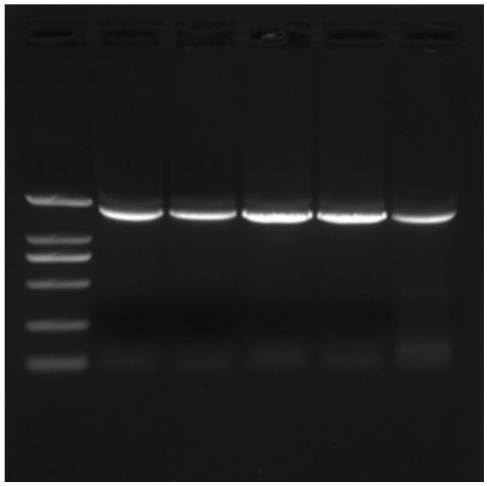


图12

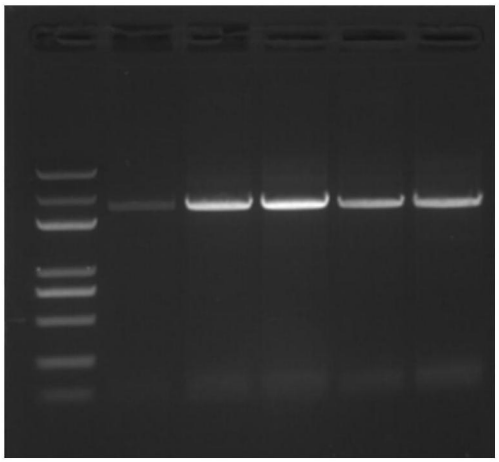


图13