



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105713900 A

(43)申请公布日 2016.06.29

(21)申请号 201610187019.0

(22)申请日 2016.03.29

(71)申请人 广州市玛达生物科技有限公司

地址 510515 广东省广州市白云区广州大道北同和中路28号之一金圣大厦05楼14房

(72)发明人 周小明 邢达 廖玉辉

(74)专利代理机构 广州市华学知识产权代理有限公司 44245

代理人 裘晖

(51)Int.Cl.

C12N 15/10(2006.01)

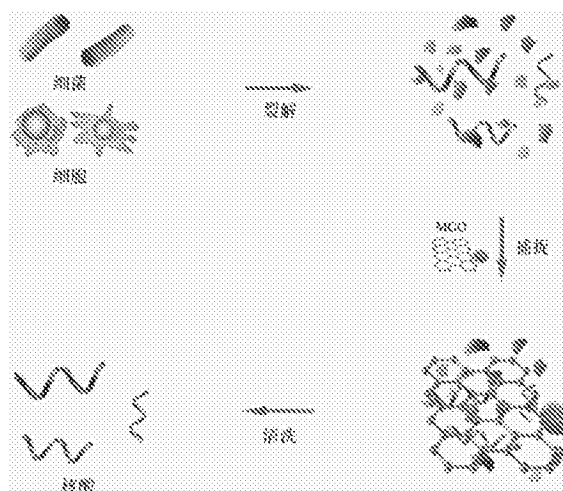
权利要求书2页 说明书7页 附图3页

(54)发明名称

基于磁性石墨烯纳米复合物的核酸提取方法

(57)摘要

本发明公开一种基于磁性石墨烯纳米复合物的核酸提取方法,属于新型核酸提取技术领域。本发明利用氧化石墨烯表面羧基基团做为连接位点,使其和氨基磁珠连接,从而实现磁性石墨烯纳米复合物的合成;随后,采用裂解液配合蛋白酶K的方法,实现细胞的裂解,释放核酸;通过离心去除细胞碎片后,在上清液中加入磁性石墨烯纳米复合物捕捉核酸;最后,经过磁分离清洗提纯后即得到核酸样品。本发明的方法具有提取过程简单,易操作,提取效率高,储存方便,且具有RNA保护功能等特点,对于分子生物学及相关学科的发展具有重要意义。



1. 基于磁性石墨烯纳米复合物的核酸提取方法,其特征在于包括如下步骤:

首先,利用氧化石墨烯表面羧基基团做为连接位点,使其和氨基磁珠连接,从而实现磁性石墨烯纳米复合物的合成;随后,采用裂解液配合蛋白酶K的方法,实现细胞的裂解,释放核酸;通过离心去除细胞碎片后,在上清液中加入磁性石墨烯纳米复合物捕捉核酸;最后,经过磁分离清洗提纯后即得到核酸样品。

2. 根据权利要求1所述的基于磁性石墨烯纳米复合物的核酸提取方法,其特征在于:所述的细胞在裂解前需要进行前处理。

3. 根据权利要求2所述的基于磁性石墨烯纳米复合物的核酸提取方法,其特征在于:所述的细胞来源于动物细胞、革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、动物组织、动物血液或植物组织。

4. 根据权利要求1~3任一项所述的基于磁性石墨烯纳米复合物的核酸提取方法,其特征在于:所述的核酸样品包括DNA和RNA。

5. 根据权利要求1~3任一项所述的基于磁性石墨烯纳米复合物的核酸提取方法,其特征在于:所述的核酸样品中加入DNA酶,得到RNA样品。

6. 根据权利要求1~3任一项所述的基于磁性石墨烯纳米复合物的核酸提取方法,其特征在于:所述的核酸样品中加入RNA酶,得到DNA样品。

7. 根据权利要求3所述的基于磁性石墨烯纳米复合物的核酸提取方法,其特征在于:所述的动物细胞的前处理,包括如下步骤:

a. 对于游离培养的细胞采用离心收集的方式,使细胞聚集于离心管底部,再用PBS缓冲液清洗两次去除残留的细胞培养液即得到细胞沉淀;

b. 对于贴壁培养的细胞采用消化液消化或细胞刮刀使细胞脱壁、并游离至培养液中,通过离心收集的方式,使细胞聚集于离心管底部,再用PBS缓冲液清洗两次去除残留的细胞培养液即得到细胞沉淀;

c. 向步骤a或b中收集的细胞沉淀中加入Sample protector,并浸泡,变性细胞中的RNA酶;

d. 去除Sample protector,离心收集细胞沉淀,冷冻于-80℃冰箱备用。

8. 根据权利要求3所述的基于磁性石墨烯纳米复合物的核酸提取方法,其特征在于:所述的革兰氏阳性菌的前处理,采用方法a和方法b中的一种,包括如下步骤:

a. 溶菌酶溶解细胞壁

a) 离心收集过液培养的革兰氏阳性菌,去除培养液后,用PBS缓冲液清洗3次,得到菌体沉淀;

b) 向步骤a)中收集的细胞沉淀中加入Sample protector,并浸泡,变性菌体中的RNA酶;

c) 离心收集菌体沉淀,去除Sample protector,将所得菌体冷冻于-80℃冰箱备用;

d) 加入溶菌酶,37℃孵育;

b. 液氮研磨去除细胞壁

a) 离心收集过液培养的革兰氏阳性菌,去除培养液后,用PBS缓冲液清洗3次,得到菌体沉淀;

b) 向步骤a)中收集的细胞沉淀中加入Sample protector,并浸泡,变性菌体中的RNA酶;

c)将步骤b)中所得的菌体移至研钵当中,倾倒液氮,并剧烈研磨成粉后,收集粉末并冷藏于-80℃冰箱备用;

所述的革兰氏阴性菌的前处理,参照革兰氏阳性菌的前处理的方法a。

9.根据权利要求3所述的基于磁性石墨烯纳米复合物的核酸提取方法,其特征在于:

所述的动物组织的前处理,包括如下步骤:

a.取新鲜的动物组织,切成小块加入Sample protector,并浸泡,变性组织中的RNA酶;

b.离心去除Sample protector,所得组织块儿现用,或冷藏于-80℃冰箱备用;

c.将步骤b中所得的组织块儿移至研钵当中,倾倒液氮,并剧烈研磨成粉后,收集粉末并冷藏于-80℃冰箱备用;

所述的动物血液的前处理,包括如下步骤:

a.目标提取核酸在血细胞中

a)如目标核酸存在于血细胞中,则需要先收集血细胞,通过高速离心使血细胞沉降,去上清,收集细胞;

b)向步骤a)中收集的细胞沉淀中加入Sample protector,并浸泡,变性血细胞中的RNA酶;

c)离心收集菌体沉淀,去除Sample protector,将所得血细胞冷冻于-80℃冰箱备用;

b.目标提取核酸在血清中

分离血细胞后得到的血清,直接冻纯,再经历细胞裂解过程出去蛋白。

10.根据权利要求3所述的基于磁性石墨烯纳米复合物的核酸提取方法,其特征在于:

所述的植物组织的前处理,包括如下步骤:

a.取新鲜的植物组织,切成小块加入Sample protector,并浸泡,变性组织中的RNA酶;

b.离心去除Sample protector,所得组织块儿现用,或冷藏于-80℃冰箱备用;

c.将步骤b中所得的组织块儿移至研钵当中,倾倒液氮,并剧烈研磨成粉后,收集粉末并冷藏于-80℃冰箱备用。

基于磁性石墨烯纳米复合物的核酸提取方法

技术领域

[0001] 本发明属于新型核酸提取技术领域,特别涉及一种基于磁性石墨烯纳米复合物的核酸提取方法。

背景技术

[0002] 核酸作为遗传信息的载体,是生物体内重要的生物信息分子,也是分子生物学研究的主要对象。为了实现核酸功能探索及生理意义相关研究,通常需要对核酸进行分离纯化。因此,核酸提取是分子生物学实验技术中最重要、最基本的操作之一,广泛应用于。目前,提取DNA基因组主要采用“磁珠法”、“吸附柱法”、“CTAB法”、“SDS法”等去实现生物样品中DNA的提取,这些方法存在操作过程复杂、提取周期长等缺点。而RNA的提取则常采用经典的TRIzol试剂盒提取法,TRIzol试剂中的主要成分为异硫氰酸胍和苯酚,其中异硫氰酸胍可裂解细胞,促使核蛋白体的解离,使RNA与蛋白质分离,并将RNA释放到溶液中。当加入氯仿时,它可抽提酸性的苯酚,而酸性苯酚可促使RNA进入水相,离心后可形成水相层和有机层,这样RNA与仍留在有机相中的蛋白质和DNA便分离开。水相层主要为RNA,有机层主要为DNA和蛋白质。然而,该方法存在处理样品量有限、易污染RNA酶、易降解等缺点。值得注意的是异硫氰酸胍是一种有毒、可致癌的化学试剂,在提取过程中给实验者带来巨大的伤害。因此,开发新型、快速、高保真、生物兼容性的核酸提取方法对于分子生物学及相关学科的发展具有重要意义。

[0003] 近年来,随着纳米技术的快速发展,纳米材料已广泛的运用于生命科学领域。其中,氧化石墨烯更是成为了“明星”纳米材料,并广泛运用于电子学、材料学、诊断学等学科。众所周知,氧化石墨烯能够通过“ π - π 堆叠”效应实现吸附核酸的目的,该效应启发笔者利用氧化石墨烯特异性的捕捉核酸,从而实现核酸提取的目的。加之,我课题组前期专利(中国专利:201310178816.9)公开了一种基于氧化石墨烯材料的RNA保护方法,该方法揭示了氧化石墨烯具有优异的RNA保护能力,且具有保护效率高、保护时效长的特点。因此,整合氧化石墨烯的RNA保护天赋、石墨烯的网格状结构及吸附核酸的性能,我们开发了一种基于磁性石墨烯纳米复合物的核酸提取方法,该方法操作简单、耗时短、且能为RNA提供有效的保护。

发明内容

[0004] 为了现有核酸提取技术的缺点与不足,本发明的目的在于提供一种基于磁性石墨烯纳米复合物的核酸提取方法。本发明采用磁性石墨烯做为纳米载体,利用石墨烯刚性表面的吸附核酸能力,为核酸提供广阔的吸附截面,由此达到捕捉核酸的目的。

[0005] 本发明的目的通过下述技术方案实现:

[0006] 基于磁性石墨烯纳米复合物的核酸提取方法,包括如下步骤:

[0007] 首先,利用氧化石墨烯表面羧基基团做为连接位点,使其和氨基磁珠连接,从而实现磁性石墨烯纳米复合物的合成;随后,采用裂解液配合蛋白酶K的方法,实现细胞的裂解,

释放核酸;通过离心去除细胞碎片后,在上清液中加入磁性石墨烯纳米复合物捕捉核酸;最后,经过磁分离清洗提纯后即得到核酸样品。

[0008] 所述的细胞可来源于动物细胞、革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、动物组织、动物血液或植物组织;

[0009] 所述的细胞在裂解前需要进行前处理;

[0010] 所述的核酸样品包括DNA和RNA;

[0011] 所述的核酸样品中加入DNA酶,得到RNA样品;

[0012] 所述的核酸样品中加入RNA酶,得到DNA样品;

[0013] 所述的基于磁性石墨烯纳米复合物的核酸提取方法,包括以下具体步骤:

[0014] 1)样品前处理

[0015] ①动物细胞样品处理

[0016] 动物细胞细胞膜较薄、刚性弱、容易裂解,样品前处理包含以下步骤:

[0017] a. 对于游离培养的细胞采用离心收集的方式,使细胞聚集于离心管底部,再用PBS缓冲液清洗两次去除残留的细胞培养液即可得到细胞沉淀。

[0018] b. 对于贴壁培养的细胞采用消化液消化或细胞刮刀使细胞脱壁、并游离至培养液中,通过离心收集的方式,使细胞聚集于离心管底部,再用PBS缓冲液清洗两次去除残留的细胞培养液即可得到细胞沉淀。

[0019] c. 向步骤a或b中收集的细胞沉淀中加入Sample protector,并浸泡30min,变性细胞中的RNA酶,从而避免细胞在前处理过程中出现降解。

[0020] d. 去除Sample protector,离心收集细胞沉淀,冷冻于-80℃冰箱备用。

[0021] ②革兰氏阳性菌样品前处理

[0022] 革兰氏阳性菌细胞壁较厚、刚性强、较难裂解,样品前处理可通过两种方法实现:

[0023] a. 溶菌酶溶解细胞壁

[0024] a) 离心收集过液培养的革兰氏阳性菌,去除培养液后,用PBS缓冲液清洗3次。得到菌体沉淀。

[0025] b) 向步骤a)中收集的细胞沉淀中加入Sample protector,并浸泡30min,变性菌体中的RNA酶,从而避免菌体在前处理过程中出现降解。

[0026] c) 离心收集菌体沉淀,去除Sample protector,将所得菌体冷冻于-80℃冰箱备用。

[0027] d) 加入20mg/mL的溶菌酶200μL,37℃孵育半小时。

[0028] b. 液氮研磨去除细胞壁

[0029] a) 离心收集过液培养的革兰氏阳性菌,去除培养液后,用PBS缓冲液清洗3次。得到菌体沉淀。

[0030] b) 向步骤a)中收集的细胞沉淀中加入Sample protector,并浸泡30min,变性菌体中的RNA酶,从而避免菌体在前处理过程中出现降解。

[0031] c) 将步骤b)中所得的菌体移至研钵当中,倾倒液氮,并剧烈研磨成粉后,收集粉末并冷藏于-80℃冰箱备用。

[0032] ③革兰氏阴性菌样品前处理

[0033] 革兰氏阴性菌细胞壁较薄,易于破碎,只需参照步骤②a;

[0034] ④动物组织样品前处理

[0035] 动物组织样品最好“现切现用”，以防止核酸降解，特别是容易降解的RNA，动物组织样品的前处理过程主要包括以下步骤：

[0036] a. 取新鲜的动物组织，用手术剪剪切成小块(约3毫米)加入Sample protector，并浸泡1小时，变性组织中的RNA酶。

[0037] b. 离心去除Sample protector，所得组织块儿可现用，或冷藏于-80℃冰箱备用。

[0038] c. 将步骤b中所得的组织块儿移至研钵当中，倾倒液氮，并剧烈研磨成粉后，收集粉末并冷藏于-80℃冰箱备用。

[0039] ⑤动物血液样品前处理

[0040] 动物血液样品需要做到“现取现用”血液中含有丰富的酶类，对于核酸的提取存在巨大的隐患。因此，血液中核酸的提取始终是巨大难题，相应的样品前处理就需要因实际需求而异：

[0041] a. 目标提取核酸在血细胞中

[0042] a) 如目标核酸存在于血细胞中，则需要先收集血细胞，通过高速离心使血细胞沉降，去上清，收集细胞。

[0043] b) 向步骤a)中收集的细胞沉淀中加入Sample protector，并浸泡30min，变性血细胞中的RNA酶。

[0044] c) 离心收集菌体沉淀，去除Sample protector，将所得血细胞冷冻于-80℃冰箱备用。

[0045] b. 目标提取核酸在血清中

[0046] 分离血细胞后得到的血清，可直接冻纯(-80℃)，再经历细胞裂解过程出去蛋白即可。

[0047] ⑥植物组织样品前处理

[0048] a. 取新鲜的植物组织，用手术剪剪切成小块(约2毫米)加入Sample protector，并浸泡1小时，变性组织中的RNA酶。

[0049] b. 离心去除Sample protector，所得组织块儿可现用，或冷藏于-80℃冰箱备用。

[0050] c. 将步骤b中所得的组织块儿移至研钵当中，倾倒液氮，并剧烈研磨成粉后，收集粉末并冷藏于-80℃冰箱备用。

[0051] 2) 细胞裂解、核酸捕捉及清洗

[0052] ①细胞裂解

[0053] 本发明以单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)为例，具体讲述了在经历过样品前处理后的细胞裂解过程：

[0054] a. 配置细胞裂解液

[0055] 配置SDS裂解缓冲液，各成分间浓度如下：Tris-HCl(pH值8.0，终浓度50mM)；EDTA(pH值8.0，终浓度20mM)；NaCl(0.4M)；SDS(2%)。充分混匀后灭菌备用。

[0056] b. 细胞裂解

[0057] 加入步骤a中所得的SDS细胞裂解液。通常情况下， 10^7 个细胞加入1.5mL即可，充分震荡混匀后，并加入蛋白酶K水浴加热至70℃15分钟。直至混合液澄清。

[0058] c. 将步骤b)所得的澄清液冷却至室温，并离心除去少量沉淀。保存上清液备用。

[0059] 本发明以单增李斯特菌为例，验证了该裂解方法的可行性，实验结果如图2B和C的

原子力表征图所示,完整的单增李斯特菌,在经历样品前处理后充分的裂解了。由此,该裂解方法的可行性得到了充分的验证。

[0060] ②核酸捕捉及清洗

[0061] a.向步骤①所得上清液中加入磁性石墨烯纳米复合物50 μ L(1mg/mL)充分震荡混匀。

[0062] b.室温孵育十分钟,使核酸充分地吸附在磁性石墨烯纳米复合物的表面。

[0063] c.磁分离,使磁性石墨烯纳米复合物聚集于底端,吸去上清,依次加入70%的乙醇、PBS缓冲液清洗沉淀,并充分震荡,使磁性石墨烯纳米复合物分散开来,再循环以上步骤两到三次即可得到吸附有磁性石墨烯纳米复合物,并将其干燥至无液体残留。

[0064] d.向步骤c中所得的吸附有磁性石墨烯纳米复合物,加入TE缓冲液100 μ L,并加热至70 $^{\circ}$ C,使核酸和磁性石墨烯分离。磁分离去掉磁性石墨烯纳米复合物,收集上清即可得到核酸提取物。

[0065] 本发明相对于现有技术,具有如下的优点及效果:

[0066] (1)本发明提取过程简单,易操作。

[0067] (2)本发明提取效率高。

[0068] (3)本发明储存方便。

[0069] (4)本发明具有RNA保护功能。

附图说明

[0070] 图1是基于磁性石墨烯纳米复合物的核酸提取方法原理图。

[0071] 图2是实施例2中以单增李斯特菌为例的核酸提取结果:其中,图2A.提取过程分步图;图2B.单增李斯特菌原子力显微镜表征;图2C.细胞裂解碎片原子力显微镜表征;图2D.提取产物电泳图。

[0072] 图3是实施例2中以单增李斯特菌为例的RNA或DNA提取结果:其中,图3A.RNA、DNA基因组提取物电泳图;图3B.灰度分析图

[0073] 图4是动物细胞、组织、血液样品及植物组织样品的RNA提取结果;其中,图4A.动物细胞及组织RNA提取物电泳图;图4B.动物血液及植物组织样品RNA提取电泳图。

[0074] 图5是本发明的RNA提取效率与TRIzol试剂盒的提取效率及荧光降解率的对比结果;图5A.磁性石墨烯纳米复合物核酸提取方法与TRIzol法电泳对比;图5B.磁性石墨烯纳米复合物核酸提取方法与TRIzol法荧光结果;图5C.磁性石墨烯纳米复合物核酸提取方法与TRIzol法荧光强度对比图;图5D.磁性石墨烯纳米复合物核酸提取方法与TRIzol法荧光降解率对比图。

具体实施方式

[0075] 下面结合实施例及附图对本发明作进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限于此。

[0076] 实施例1磁性石墨烯纳米复合物的构建及样品前处理

[0077] 1)磁性石墨烯纳米复合物的构建

[0078] 本发明采用氧化石墨烯做为合成材料,利用氧化石墨烯表面的羧基基团作为连接

位点,并通过酰胺键与氨基包被磁珠相连,最终实现磁性石墨烯纳米复合物的合成。磁性石墨烯纳米复合物的合成主要包括以下步骤:

[0079] ①取10mg的氧化石墨烯(粒径为1微米)溶解于30mL双蒸水中,并超声一个半小时,使氧化石墨烯充分溶解,得到0.33mg/mL的氧化石墨烯溶液,并储存于4℃冰箱备用。

[0080] ②氧化石墨烯羧基活化

[0081] 向步骤①中所得氧化石墨烯溶液中加入4mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),并充分混匀后,加入5mg的1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC),充分混匀后,在37℃下搅拌反应1小时,并超声半个小时使羧基活化的氧化石墨烯重新分散成单层的无聚集的溶液。

[0082] ③酰胺键连接

[0083] 向步骤②所得的溶液中加入10mg氨基磁珠(粒径为200nm),并充分混匀。密封后,37℃搅拌反应过夜,得到磁性石墨烯纳米复合物粗产品。

[0084] ④纯化

[0085] 步骤③中所得粗产品中,含有少部分未连接磁珠的石墨烯,需要进行纯化以去除溶液中没有磁性的氧化石墨烯。本发明采用磁分离的方法,使具有磁性的氧化石墨烯汇聚于磁场一端,去除没有磁性的上清溶液,再加入等体积的PBS缓冲液(浓度为1×),移除磁场后混匀震荡,然后再进行磁分离操作2次即可得到较纯的磁性石墨烯纳米复合物(MGO)。

[0086] 2)样品前处理

[0087] ①动物细胞样品处理

[0088] 动物细胞细胞膜较薄、刚性弱、容易裂解,样品前处理包含以下步骤:

[0089] a.对于游离培养的细胞采用离心收集的方式,使细胞聚集于离心管底部,再用PBS缓冲液清洗两次去除残留的细胞培养液即可得到细胞沉淀。

[0090] b.对于贴壁培养的细胞采用消化液消化或细胞刮刀使细胞脱壁、并游离至培养液中,通过离心收集的方式,使细胞聚集于离心管底部,再用PBS缓冲液清洗两次去除残留的细胞培养液即可得到细胞沉淀。

[0091] c.向步骤a或b中收集的细胞沉淀中加入Sample protector(Takara),并浸泡30min,变性细胞中的RNA酶,从而避免细胞在前处理过程中出现降解。

[0092] d.去除Sample protector,离心收集细胞沉淀,冷冻于-80℃冰箱备用。

[0093] ②革兰氏阳性菌样品前处理

[0094] 革兰氏阳性菌细胞壁较厚、刚性强、较难裂解,样品前处理可通过两种方法实现:

[0095] a.溶菌酶溶解细胞壁

[0096] a)离心收集过液培养的革兰氏阳性菌,去除培养液后,用PBS缓冲液清洗3次。得到菌体沉淀。

[0097] b)向步骤a)中收集的细胞沉淀中加入Sample protector,并浸泡30min,变性菌体中的RNA酶,从而避免菌体在前处理过程中出现降解。

[0098] c)离心收集菌体沉淀,去除Sample protector,将所得菌体冷冻于-80℃冰箱备用。

[0099] d)加入20mg/mL的溶菌酶200μL,37℃孵育半小时。

[0100] b.液氮研磨去除细胞壁

[0101] a)离心收集过液培养的革兰氏阳性菌,去除培养液后,用PBS缓冲液清洗3次。得到

菌体沉淀。

[0102] b)向步骤a)中收集的细胞沉淀中加入Sample protector,并浸泡30min,变性菌体中的RNA酶,从而避免菌体在前处理过程中出现降解。

[0103] c)将步骤b)中所得的菌体移至研钵当中,倾倒入液氮,并剧烈研磨成粉后,收集粉末并冷藏于-80℃冰箱备用。

[0104] ③革兰氏阴性菌样品前处理

[0105] 革兰氏阴性菌细胞壁较薄,易于破碎,只需参照步骤②a;

[0106] ④动物组织样品前处理

[0107] 动物组织样品最好“现切现用”,以防止核酸降解,特别是容易降解的RNA,动物组织样品的前处理过程主要包括以下步骤:

[0108] a.取新鲜的动物组织,用手术剪剪切成小块(约3毫米)加入Sample protector,并浸泡1小时,变性组织中的RNA酶。

[0109] b.离心去除Sample protector,所得组织块儿可现用,或冷藏于-80℃冰箱备用。

[0110] c.将步骤b中所得的组织块儿移至研钵当中,倾倒入液氮,并剧烈研磨成粉后,收集粉末并冷藏于-80℃冰箱备用。

[0111] ⑤动物血液样品前处理

[0112] 动物血液样品需要做到“现取现用”血液中含有丰富的酶类,对于核酸的提取存在巨大的隐患。因此,血液中核酸的提取始终是巨大难题,相应的样品前处理就需要因实际需求而异:

[0113] a.目标提取核酸在血细胞中

[0114] a)如目标核酸存在于血细胞中,则需要先收集血细胞,通过高速离心使血细胞沉降,去上清,收集细胞。

[0115] b)向步骤a)中收集的细胞沉淀中加入Sample protector,并浸泡30min,变性血细胞中的RNA酶。

[0116] c)离心收集菌体沉淀,去除Sample protector,将所得血细胞冷冻于-80℃冰箱备用。

[0117] b.目标提取核酸在血清中

[0118] 分离血细胞后得到的血清,可直接冻纯(-80℃),再经历细胞裂解过程出去蛋白即可。

[0119] ⑥植物组织样品前处理

[0120] a.取新鲜的植物组织,用手术剪剪切成小块(约2毫米)加入Sample protector,并浸泡1小时,变性组织中的RNA酶。

[0121] b.离心去除Sample protector,所得组织块儿可现用,或冷藏于-80℃冰箱备用。

[0122] c.将步骤b中所得的组织块儿移至研钵当中,倾倒入液氮,并剧烈研磨成粉后,收集粉末并冷藏于-80℃冰箱备用。

[0123] 实施例2细胞裂解、核酸捕捉、清洗及纯化

[0124] ①细胞裂解

[0125] 本发明以单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)(购买于广州微生物菌种保藏中心)为例,见图2;具体讲述了在经历过样品前处理后的细胞裂解过程:

[0126] a. 配置细胞裂解液

[0127] 配置SDS裂解缓冲液,各成分间浓度如下:Tris-HCl(pH值8.0,终浓度50mM);EDTA(pH值8.0,终浓度20mM);NaCl(0.4M);SDS(2%)。充分混匀后灭菌备用。

[0128] b. 细胞裂解

[0129] 加入步骤a中所得的SDS细胞裂解液。通常情况下,10⁷个细胞加入1.5mL即可,充分震荡混匀后,并加入蛋白酶K水浴加热至70℃15分钟。直至混合液澄清。

[0130] c. 将步骤b所得的澄清液冷却至室温,并离心除去少量沉淀。保存上清液备用。

[0131] 本发明以单增李斯特菌为例,验证了该裂解方法的可行性,实验结果如图2B和C的原子力表征图所示,完整的单增李斯特菌,在经历样品前处理后充分的裂解了。由此,该裂解方法的可行性得到了充分的验证。

[0132] ②核酸捕捉及清洗

[0133] a. 向步骤①所得上清液中加入磁性石墨烯纳米复合物50μL(1mg/mL)充分震荡混匀。

[0134] b. 室温孵育十分钟,使核酸充分地吸附在磁性石墨烯纳米复合物的表面。

[0135] c. 磁分离,使磁性石墨烯纳米复合物聚集于底端,吸去上清,依次加入70%的乙醇、PBS缓冲液清洗沉淀,并充分震荡,使磁性石墨烯纳米复合物分散开来,再循环以上步骤两到三次即可得到吸附有磁性石墨烯纳米复合物,并将其干燥至无液体残留。

[0136] d. 向步骤c中所得的吸附有磁性石墨烯纳米复合物,加入TE缓冲液100μL,并加热至70℃,使核酸和磁性石墨烯分离。磁分离去掉磁性石墨烯纳米复合物,收集上清即可得到核酸提取物。

[0137] 核酸提取实验结果如图2D所示,本发明能够稳定的从菌体中提取核酸(包括DNA和RNA)。与此同时,在步骤“①细胞裂解”所得的上清液中加入RNA酶或DNA酶可分别出去上清中的RNA或DNA,从而得到单独的DNA基因组或RNA基因组。实验结果如图3所示,由此可知,本发明不仅可作为DNA的提取方法,也可作为RNA的提取方法,或者将胞内核酸一并提出。

[0138] 同时,本发明以实际样品RNA提取为例,描述了本发明用于动物细胞、组织、血液样品及植物组织样品的RNA提取过程,实验结果如图4所示,由此证明了该发明用于复杂样品的RNA提取的可行性。另外,我们对比了传统的RNA提取方法与本发明的提取效率,如图5A和B所示,本发明的提取效率与TRIzol试剂盒的提取效率基本持平,由此证明了本发明的提取效率较好。相比而言,本发明的RNA保护功能是该方法的另一个亮点,由图5C和D可知,受磁性石墨烯纳米复合物保护的RNA能在空气中长效保存,相比TRIzol试剂盒而言其降解率低。

[0139] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

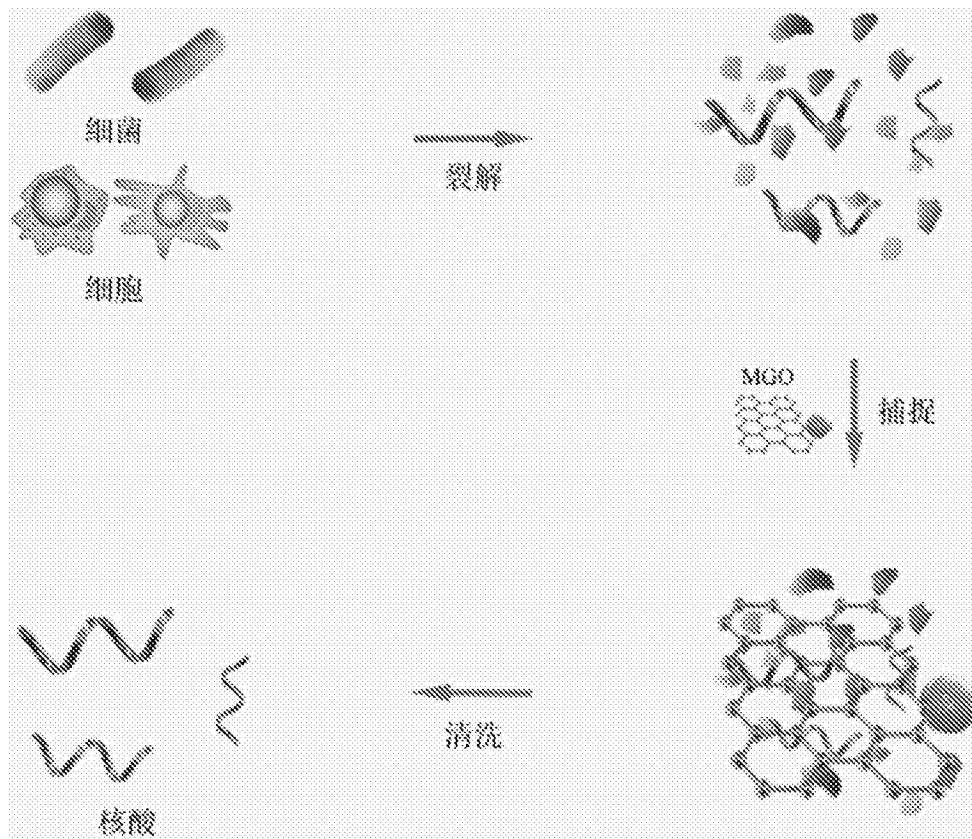


图1

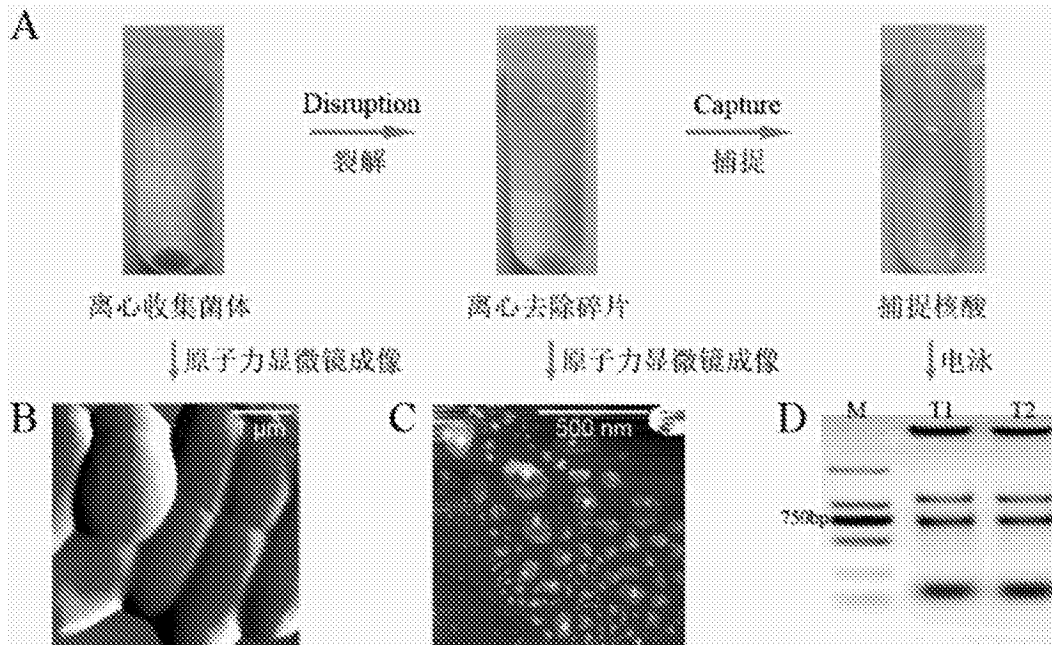


图2

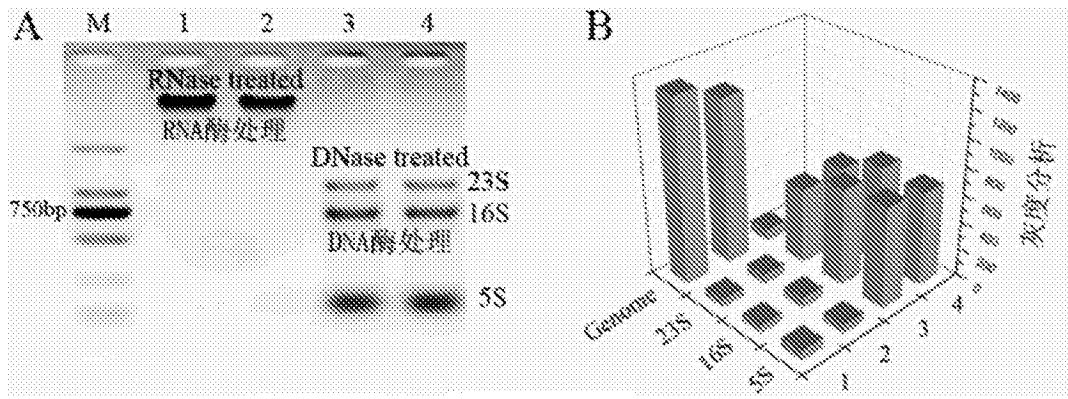


图3

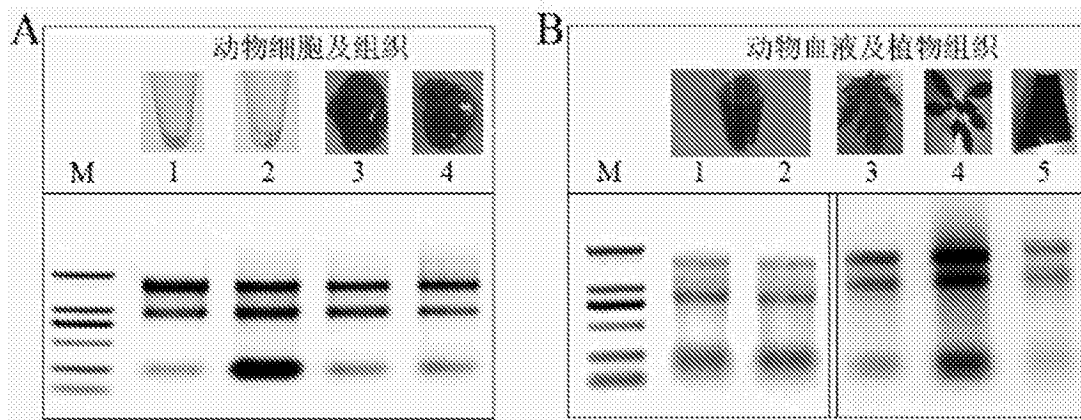


图4

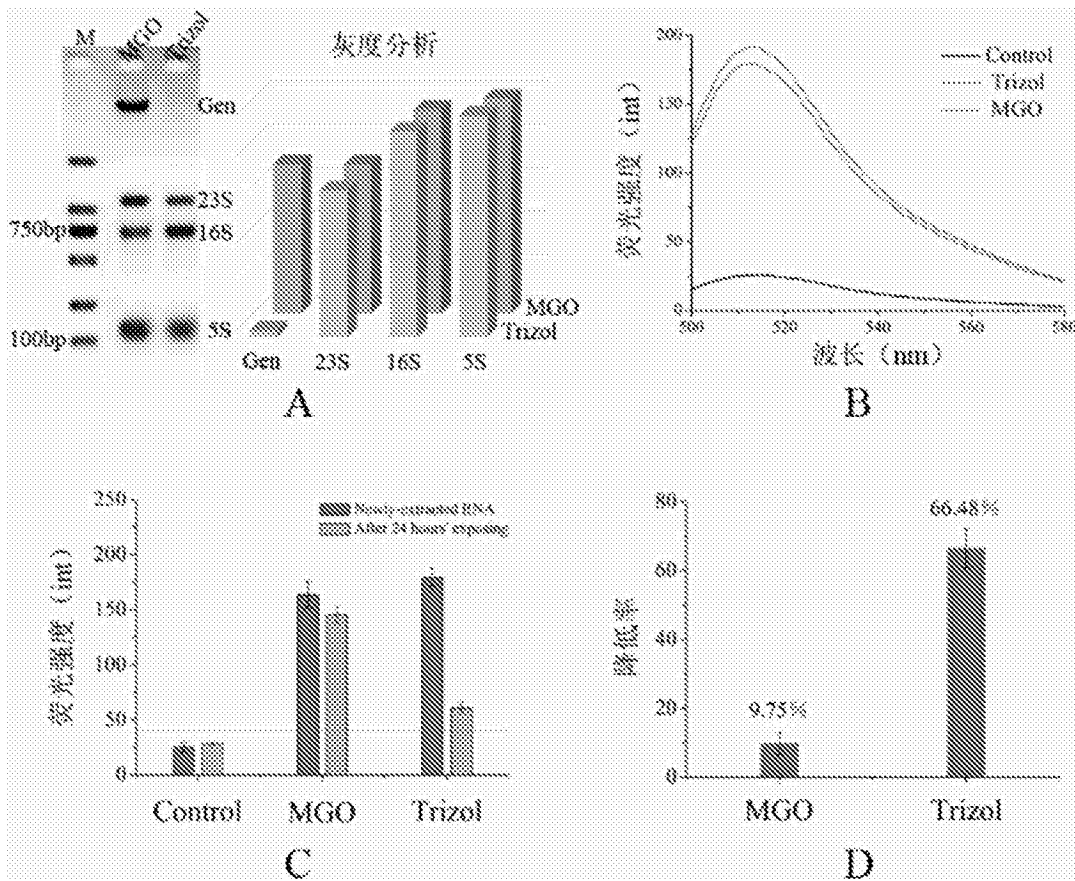


图5