



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109486808 A
(43)申请公布日 2019.03.19

(21)申请号 201811364509.9

(22)申请日 2018.11.16

(71)申请人 许昌学院

地址 461000 河南省许昌市魏都区八一路
88号

(72)发明人 王德国 朱凯 王永真

(74)专利代理机构 郑州铭晟知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 41134

代理人 张鹏

(51)Int.Cl.

C12N 15/10(2006.01)

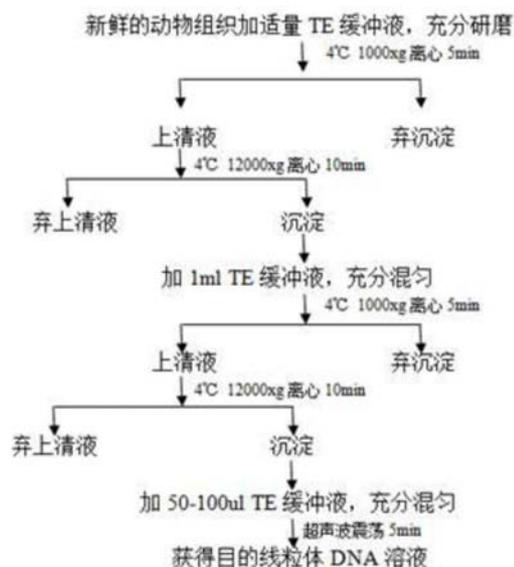
权利要求书1页 说明书8页
序列表4页 附图5页

(54)发明名称

一种适用于可视化环介导等温扩增的动物
线粒体DNA提取方法

(57)摘要

本发明涉及分子生物学技术领域,具体涉及一种适用于可视化环介导等温扩增的动物线粒体DNA提取方法,包括如下步骤:(1)将动物组织充分研磨后,加入TE缓冲液,放入离心机,0-4℃ 800-1200g离心,取上清液;(2)将步骤(1)得到的上清液于4℃ 10000-14000g离心,取沉淀;(3)向步骤(2)得到的沉淀中添加TE缓冲液,混匀,0-4℃ 800-1200g离心,取上清液;(4)将步骤(3)得到的上清液于0-4℃ 10000-14000g离心,取沉淀;(5)向步骤(4)得到的沉淀中加入缓冲液,混匀,超声震荡。该动物线粒体DNA提取方法操作简单、所用到的试剂的种类少、所需的时间也更短。



1. 一种适用于可视化环介导等温扩增的动物线粒体DNA提取方法,其特征在于,包括如下步骤:(1)将动物组织充分研磨后,加入TE缓冲液,0-4℃800-1200g离心3-10min,取上清液;(2)将步骤(1)得到的上清液于0-4℃10000-14000g离心10-15min,取沉淀;(3)向步骤(2)得到的沉淀中添加TE缓冲液,混匀,放入离心机,0-4℃800-1200g离心3-10min,取上清液;(4)将步骤(3)得到的上清液于0-4℃10000-14000g离心10-15min,取沉淀;(5)向步骤(4)得到的沉淀中加入缓冲液,混匀,超声震荡。

2. 一种适用于可视化环介导等温扩增的动物线粒体DNA提取方法,其特征在于,包括如下步骤:(1)将动物组织充分研磨后,加入TE缓冲液,0-4℃1000g离心5min,取上清液;(2)将步骤(1)得到的上清液于0-4℃12000g离心10min,取沉淀;(3)向步骤(2)得到的沉淀中添加TE缓冲液,混匀,放入离心机,0-4℃1000g离心5min,取上清液;(4)将步骤(3)得到的上清液于0-4℃12000g离心10min,取沉淀;(5)向步骤(4)得到的沉淀中加入缓冲液,混匀,超声震荡。

3. 根据权利要求1所述的适用于可视化环介导等温扩增的动物线粒体DNA提取方法,其特征在于:所述超声震荡在0-4℃的环境中进行。

4. 根据权利要求1或2所述的适用于可视化环介导等温扩增的动物线粒体DNA提取方法,其特征在于,所述超声震荡的时间为1-8min。

5. 根据权利要求3所述的适用于可视化环介导等温扩增的动物线粒体DNA提取方法,其特征在于,所述超声震荡的时间为5min。

6. 根据权利要求1或2所述的适用于可视化环介导等温扩增的动物线粒体DNA提取方法,其特征在于,所述TE缓冲液的pH=8.0。

一种适用于可视化环介导等温扩增的动物线粒体DNA提取方法

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学领域,具体涉及一种适用于可视化环介导等温扩增的动物线粒体DNA提取方法。

背景技术

[0002] 目前常见的动物线粒体DNA的常用提取方法一般是先将细胞破碎,破碎的方法有化学法(渗透压、酶水解、自溶、冻融等)和机械法(研磨破碎、均质机破碎、超声波破碎和匀浆器破碎,然后通过差速离心法获取线粒体,再采用0.2mol/L NaOH-1% SDS破碎线粒体膜(超声破碎法虽然可用于细胞破碎和细胞器膜的破碎,但是由于超声破碎会对DNA造成损伤,在提取DNA时,通常不采用超声法来进行细胞破碎或线粒体膜破碎),使线粒体DNA游离出来。再采用SDS法、氯仿抽提法、试剂盒法等,此类提取往往具有提取时间长、试剂复杂、试剂有毒等缺点。

[0003] 可视化环介导等温扩增技术是一种可以肉眼观测结果的恒温基因扩增技术,可用于肉源性掺假检测,具有检测时间短、灵敏度高、特异性强的优点,但较长的基因提取时间和复杂的基因提取试剂限制此技术的推广应用。并且可视化环介导等温扩增技术由于其高特异性、高灵敏度、无需复杂仪器等优点,对模板DNA的纯度和浓度要求偏低,因此,开发出一种快速、简单、安全的线粒体DNA提取方法对可视化环介导等温扩增技术的推广应用极为重要。

[0004] CN104328193A一种用于地沟油检测的试剂盒及其检测方法中公开了一种用TE缓冲液提取食用油中的样品DNA,进而基于LAMP法检测该食用油中是否含有动物性成分的技术方案,具体提取方法如下:在2mL离心管中加入400 μ L TE缓冲液,然后加入食用油1mL,涡旋震荡混匀3-8min,室温下13000r/min离心5min,去除上层油脂,留下层水相,在所述离心管I中再次加入食用油1mL,颠倒混匀,离心,共重复5-20次,所得水相即为待测样品DNA。但是动物组织的成分相对油脂来说更加复杂,且线粒体DNA由于其含量少,提取的难度大,上述方法不适用于从动物组织中提取线粒体DNA。

发明内容

[0005] 本发明提供一种适用于可视化环介导等温扩增的动物线粒体DNA提取方法,以解决现有技术中动物线粒体DNA提取周期长、试剂复杂和试剂有毒等问题。

[0006] 本发明的适用于可视化环介导等温扩增的动物线粒体DNA提取方法采用如下技术方案:一种适用于可视化环介导等温扩增的动物线粒体DNA提取方法,包括如下步骤:(1)将动物组织充分研磨后,加入TE缓冲液,0-4 $^{\circ}$ C 800-1200g离心3-10min,取上清液;(2)将步骤(1)得到的上清液于0-4 $^{\circ}$ C 10000-14000g离心10-15min,取沉淀;(3)向步骤(2)得到的沉淀中添加TE缓冲液,混匀,放入离心机,0-4 $^{\circ}$ C 800-1200g离心3-10min,取上清液;(4)将步骤(3)得到的上清液于0-4 $^{\circ}$ C 10000-14000g离心10-15min,取沉淀;(5)向步骤(4)得到的沉淀

中加入缓冲液,混匀,超声震荡。

[0007] 优选的,所述适用于可视化环介导等温扩增的动物线粒体DNA提取方法,包括如下步骤:(1)将动物组织充分研磨后,加入TE缓冲液,放入离心机,4℃1000g离心5min,取上清液;(2)将步骤(1)得到的上清液于4℃12000g离心10min,取沉淀;(3)向步骤(2)得到的沉淀中添加TE缓冲液,混匀,放入离心机,4℃1000g离心5min,取上清液;(4)将步骤(3)得到的上清液于4℃12000g离心10min,取沉淀;(5)向步骤(4)得到的沉淀中加入缓冲液,混匀,超声震荡。

[0008] 优选的,所述超声震荡在0-4℃的环境中进行。

[0009] 优选的,所述超声震荡的时间为1-8min。

[0010] 优选的,所述超声震荡的时间为5min。

[0011] 优选的,所述TE缓冲液的pH=8.0。

[0012] 本发明的有益效果是:本发明的动物线粒体DNA提取方法仅需要用到TE缓冲液,避免有害试剂,安全性更好;本发明的动物线粒体DNA提取可在30min内完成,提取速度快,而且由于仅用了TE缓冲液一种试剂,还可缩短试剂配制的时间;本发明的动物线粒体DNA提取方法可满足可视化环介导等温扩增等实验的需求。

[0013] 本发明创造性地采用超声震荡来破碎线粒体膜,可有效缩短提取线粒体DNA所用的时间;通过控制超声震荡的时间和温度,可以起到减少超声震荡造成对线粒体DNA的破坏,保障动物线粒体DNA的提取效果能够满足可视化环介导等温扩散实验的需要。

附图说明

[0014] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动性的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0015] 图1为按照本发明的方法提取得到的猪线粒体DNA与空白对照组用于可视化环介导等温扩增的实验结果图;

[0016] 图2为按照本发明的方法提取得到的动物线粒体DNA与采用试剂盒法提取得到的动物线粒体DNA进行可视化环介导等温扩增实验的效果对比图;

[0017] 图3为其余步骤不变、4℃超声震荡1min提取得到的动物线粒体DNA与空白对照组用于可视化环介导等温扩增的实验结果图;

[0018] 图4为其余步骤不变、4℃超声震荡8min提取得到的动物线粒体DNA与空白对照组用于可视化环介导等温扩增的实验结果图;

[0019] 图5为其余步骤不变、4℃超声震荡10min提取得到的动物线粒体DNA与空白对照组用于可视化环介导等温扩增的实验结果图;

[0020] 图6为其余步骤不变、不进行超声震荡提取得到的动物线粒体DNA与空白对照组用于可视化环介导等温扩增的实验结果图;

[0021] 图7为按照本发明的方法从鸡肉组织中提取得到的线粒体DNA与空白对照组用于可视化环介导等温扩增的实验结果图;

[0022] 图8为按照本发明的方法从牛肉组织中提取得到的线粒体DNA与空白对照组用于

可视化环介导等温扩增的实验结果图；

[0023] 图9为按照本发明的方法从鸭肉组织中提取得到的线粒体DNA与空白对照组用于可视化环介导等温扩增的实验结果图；

[0024] 图10为本发明的适用于可视化环介导等温扩增的动物线粒体DNA提取方法的其中一种具体实施方式的流程图。

具体实施方式

[0025] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0026] 实施例一:提取猪肉线粒体并用可视化环介导等温扩增实验验证提取效果。

[0027] 1、猪肉线粒体DNA的提取:(1)向0.2g的新鲜猪肉组织添加1ml TE缓冲液(PH=8.0)后充分研磨后,放入高速离心机,4°C1000g离心5min,然后取上清液;(2)将步骤(1)得到的上清液放置于高速离心机中4°C12000g离心10min,取沉淀;(3)向步骤(2)得到的沉淀中添加1ml TE缓冲液(PH=8),充分混匀后,放入高速离心机,4°C1000g离心5min,再次取上清液;将步骤(4)得到的上清液于4°C12000g离心10min,再次取沉淀;(5)向步骤(4)得到的沉淀中加入100μL TE缓冲液,充分混匀,放入超声波振荡仪,4°C超声震荡5min,即得猪肉线粒体DNA提取液(具体流程参见图10)。

[0028] 2、配制可视化环介导等温扩增反应体系,检测是否提取到了猪肉线粒体DNA。

[0029] (1)反应体系(总体积20μL)

成分	母液浓度	用量(μL)	终浓度
F3	10uM	0.2	0.1uM
B3	10uM	0.2	0.1uM
LF	10uM	0.8	0.4uM
FIP	10uM	1.6	0.8uM
BIP	10uM	1.6	0.8uM
buffer	10x	2	
dNTP	10 mmol/L	2.4	1.2 mmol/L
Mg ²⁺ 离子	50 mmol/L	1.2	3 mmol/L
Mn ²⁺ 离子	10 mmol/L	1	0.5 mmol/L
间苯二酚钠盐	10 mmol/L	1	0.5 mmol/L
bst 酶(100U)	100U/μL	0.1	10U
DEPC 水		补足 20μL	
模板 DNA		1	

[0030] (2)引物模板

[0032]

猪F3	5' -TAAACACCCCACCCATA-3'
猪B3	5' -GGTCTGCTACTAGTATTCAGAA-3'
猪FIP	5' -TAGGGCCAACACTCCACCTAG-AACCAGAATGATATTTCTTATTCGC-3'
猪BIP	5' -TAATGCCATACTGCACACATC-GCATTGACTTAGTGGTCGA-3'
猪LF	5' -AGGAATTGAACGTAGAATAGCGTAG-3'

[0033] (3) 扩增反应:将配制好的溶液用移液枪注入PCR管(右侧两个PCR管中的样品,其中模板DNA即为从猪肉组织中提取得到的猪肉线粒体DNA提取液),并设置对照组(左侧两个PCR管中的样品,其中模板DNA用1 μ L TE缓冲液代替),放入58 $^{\circ}$ C恒温水浴锅中反应1h,如反应液为红色则为阴性;如反应液变为黄色则为阳性。实验结果如图1所示,添加有从猪肉组织中提取到的猪肉线粒体DNA提取液的PCR管中反应液的颜色为黄色,而对照组的反应液呈棕红色,表明按照本发明的方法可以从猪肉组织中提取得到猪肉线粒体DNA,且可满足可视化环介导等温扩增实验的需求。

[0034] 实施例二:设置阳性对照组验证本发明的动物线粒体DNA提取方法的可行性。

[0035] 实验组:以实施例一中提取得到的猪肉线粒体DNA提取液为实验组,对应图2中的右侧两个PCR管中的样品。

[0036] 对照组:以从SENO公司购买的动物线粒体DNA提取试剂盒提取得到的猪肉线粒体DNA提取液为对照组,对应图2中的左侧两个PCR管中的样品。

[0037] 按照实施例一的方法配制反应体系(除模板DNA分别为实验组和对照组DNA提取液外,其余均相同),将配制好的反应溶液分别用移液枪注入PCR四联管,左侧两个样品为对照组样品,右侧两个样品为实验组样品。参照图2可知,实验组与对照组的检测结果一致,且反应液颜色基本一致。

[0038] 实施例三:考察超声震荡的时长对动物线粒体DNA提取效果的影响:

[0039] 1.4 $^{\circ}$ C超声震荡1min:按照实施例一的方法提取猪肉线粒体DNA,其中超声震荡的步骤为4 $^{\circ}$ C超声震荡1min,配制反应体系(同实施例一),将配制好的溶液用移液枪注入PCR管,并设置对照组(空白对照,将模板DNA替换为TE缓冲液),对应图3左侧两个PCR管中为对照组样品,右侧两个PCR管中为超声震荡1min得到的样品。从图3中可以看出,超声震荡1min得到的猪肉线粒体DNA用于可视化环介导等温扩增得到的反应液的颜色比对照组的反应液的颜色浅,表明提取得到了线粒体DNA,但颜色差别较小,表明提取得到的线粒体DNA勉强可以满足可视化环介导等温扩增实验的需求。

[0040] 2.4 $^{\circ}$ C超声震荡8min:按照实施例一的方法提取猪肉线粒体DNA,其中超声震荡的步骤为4 $^{\circ}$ C超声震荡8min,配制反应体系(同实施例一),将配制好的溶液用移液枪注入PCR管,并设置对照组(空白对照,将模板DNA替换为TE缓冲液),对应图4中左侧两个PCR管中为对照组样品,右侧两个PCR管中为超声震荡8min得到的样品。从图4中可以看出,超声震荡8min得到的猪肉线粒体DNA用于可视化环介导等温扩增得到的反应液的颜色与对照组的反应液的颜色差别极小,表明超声震荡8min提取得到的动物线粒体DNA少,勉强可以满足可视化环介导等温扩增实验的需求。

[0041] 3.4 $^{\circ}$ C超声震荡10min:按照实施例一的方法提取猪肉线粒体DNA,其中超声震荡的步骤为4 $^{\circ}$ C超声震荡10min,配制反应体系(同实施例一),将配制好的溶液用移液枪注入PCR

管,并设置对照组(空白对照,将模板DNA替换为TE缓冲液),对应图5中PCR管左侧两个管中为对照组样品,右侧两个管中为超声震荡10min得到的样品。从图5中可以看出,超声震荡10min得到的猪肉线粒体DNA用于可视化环介导等温扩增得到的反应液的颜色与对照组的反应液的颜色基本无差别,表明超声震荡10min提取得到的动物线粒体DNA不能满足可视化环介导等温扩增实验的要求。

[0042] 4. 仅加TE缓冲液进行离心,不超声震荡:

[0043] 提取猪肉线粒体DNA:向0.2g的新鲜猪肉组织添加1ml TE缓冲液(PH=8.0)后充分研磨后,放入高速离心机,4℃1000g离心5min,然后取上清液;(2)将步骤(1)得到的上清液放置于高速离心机中4℃12000g离心10min,取沉淀;(3)向步骤(2)得到的沉淀中添加1ml TE缓冲液(PH=8),充分混匀后,放入高速离心机,4℃1000g离心5min,再次取上清液;将步骤(4)得到的上清液于4℃12000g离心10min,再次取沉淀,并加入100 μ L TE缓冲液溶解;

[0044] LAMP实验验证提取效果:配制反应体系(同实施例一),将配制好的溶液用移液枪注入PCR管,并设置对照组(空白对照,将模板DNA替换为TE缓冲液),对应图6中四联PCR管左侧两个管中为对照组样品,右侧两个管中为仅加TE缓冲液离心,不经过超声震荡提取得到的样品。从图6中可以看出,以仅加TE缓冲液离心,不经过超声震荡提取得到的样品为模板DNA用于可视化环介导等温扩增得到的反应液的颜色与对照组的反应液的颜色基本无差别,表明采用仅加TE缓冲液离心,不经过超声震荡的方法提取猪肉线粒体的效果差。

[0045] 实施例四:以鸡、牛、鸭的组织为样本提取线粒体DNA,并通过可视化环介导等温扩增方法检测提取效果。

[0046] 1. 分别从鸡、牛、鸭的组织中提取线粒体DNA:方法和步骤同实施例一

[0047] 2. 配制反应体系和反应液,并分别进行可视化环介导等温扩增实验:

[0048] 2.1 以从鸡的组织中提取到的线粒体DNA为模板DNA:

[0049] (1) 反应体系(总体积20 μ L)

[0050]

成分	母液浓度	用量(μ L)	终浓度
DMSO		1.4	
F3	10 μ M	0.2	0.1 μ M
B3	10 μ M	0.2	0.1 μ M
LB	10 μ M	0.8	0.4 μ M
FIP	10 μ M	1.6	0.8 μ M
BIP	10 μ M	1.6	0.8 μ M
buffer	10x	2	
dNTP	10 mmol/L	2.4	1.2 mmol/L
Mg ²⁺ 离子	50 mmol/L	1.6	3 mmol/L
Mn ²⁺ 离子	10 mmol/L	1	0.5 mmol/L
间苯二酚钠盐	10 mmol/L	1	0.5 mmol/L
bst 酶	100U/ μ L	0.1	10U

	(100U)		
[0051]	DEPC 水		补足 20 μ L
	模板 DNA		1

[0052] (2) 引物模板

[0053]

成分	引物序列
鸡F3	5' -TCAGCAATTCCTACATTGG-3'
鸡B3	5' -GGTGAGTATGAGAGTTAAGCC-3'
鸡FIP	5' -AGGAGGAAGTGTAAGGCGAAGA-TTTT-CCTAGTAGAGTGAGCCTGAG-3'
鸡BIP	5' -TCATCCACCTCACCTTCCTACA-TTTT-TTGTCAGAGTCGGATGAGA-3'
鸡LB	5' -CGAATCAGGCTCAAACAACC-3'

[0054] (3) 扩增反应:将配制好的溶液用移液枪注入PCR管,并设置对照组(空白对照,将模板DNA替换为TE缓冲液),图7中的四联PCR管中的左侧两个管内为按照本发明的方法从鸡肉中提取到的样品,右侧两个管内为对照组样品。从图7中可以看出,左侧2个管中的反应液呈黄色,表明检测到了鸡肉线粒体DNA的存在,即本发明的动物线粒体DNA提取方法适用于鸡。

[0055] 2.2以从牛的组织中提取到的线粒体DNA为模板DNA:

[0056] (1) 反应体系(总体积20 μ L)

成分	母液浓度	用量 (μ L)	终浓度
DMSO		1.4	
F3	10 μ M	0.2	0.1 μ M
B3	10 μ M	0.2	0.1 μ M
LF	10 μ M	0.8	0.4 μ M
LB	10 μ M	0.8	0.4 μ M
[0057] FIP	10 μ M	1.6	0.8 μ M
BIP	10 μ M	1.6	0.8 μ M
buffer	10x	2	
dNTP	10 mmol/L	2.4	1.2 mmol/L
Mg ²⁺ 离子	50 mmol/L	1.6	3 mmol/L
Mn ²⁺ 离子	10 mmol/L	1	0.5 mmol/L
间苯二酚钠	10 mmol/L	1	0.5 mmol/L

成分	母液浓度	用量 (μ L)	终浓度
[0058] 盐			
bst 酶 (100U)	100U/ μ L	0.1	10U
DEPC 水		补足 20 μ L	
模板 DNA		1	

[0059] (2) 引物模板

[0060]

牛F3	5' -TACGCAATCTTACGATCAATCC-3'
牛B3	5' -CCGTTGGTATTAGCACTAGG-3'
牛FIP	5' -GGCTCAGAATAGGCATTGGCTCCCTACTACACACCTCCAA-3'
牛BIP	5' -AGCAGACCTACTGACACTCACAGATGCTAGTTGTCCGATGG-3'
牛LF	5' -TGGTCGGAATATTATGCTTCGT-3'
牛LB	5' -AGGACAACCAGTCGAACAC-3'

[0061] (3) 扩增反应:将配制好的溶液用移液枪注入PCR管,并设置对照组(空白对照,将模板DNA替换为TE缓冲液),图8中的四联PCR管中的左侧两个管内为按照本发明的方法从牛肉中提取得到的样品,右侧两个管内为对照组样品。从图8中可以看出,左侧的2个管中的反应液呈黄色,表明检测到了牛肉线粒体DNA的存在,即本发明的动物线粒体DNA提取方法适用于牛。

[0062] 2.3以从鸭的组织中提取到的线粒体DNA为模板DNA:

[0063] (1) 反应体系(总体积20 μ L)

成分	母液浓度	用量 (μ L)	终浓度
DMSO		1.4	
F3	10 μ M	0.2	0.1 μ M
B3	10 μ M	0.2	0.1 μ M
FIP	10 μ M	1.6	0.8 μ M
BIP	10 μ M	1.6	0.8 μ M
buffer	10x	2	
dNTP	10 mmol/L	2.4	1.2 mmol/L
Mg ²⁺ 离子	50 mmol/L	1.6	3 mmol/L
Mn ²⁺ 离子	10 mmol/L	1	0.5 mmol/L
间苯二酚钠	10 mmol/L	1	0.5 mmol/L

[0064]

成分	母液浓度	用量 (μ L)	终浓度
盐			
bst 酶 (100U)	100U/ μ L	0.1	10U
DEPC 水		补足 20 μ L	
模板 DNA		1	

[0065]

[0066] (2) 引物模板

[0067]

鸭F3	5' -TCTGGGCATTCTTCCACTCA-3'
鸭B3	5' -TCGTCAATGTTAGGGCGTG-3'
鸭FIP	5' -TGGGGTTGAGCGGTTTGATGC-TTTT-CTAGTACCAACCCCGAACT-3'
鸭BIP	5' -AACACAGCCATCCTCCTAGCCT-TTTT-TGGCATGTTTTCGGTTTCCT-3'

[0068] (3) 扩增反应:将配制好的溶液用移液枪注入PCR管,并设置对照组(空白对照,将模板DNA替换为TE缓冲液),图9中的四联PCR管中的左侧两个管内为对照组样品,右侧两个管内为按照本发明的方法从鸭肉中提取得到的样品。从图9中可以看出,右侧的2个管中反应液的颜色呈黄色,表明检测到了鸭肉线粒体DNA的存在,即本发明的动物线粒体DNA提取方法适用于鸭。

[0069] 综上,本发明的动物线粒体DNA提取方法适用于多种动物。

[0070] 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,所作的任何修改、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>	许昌学院	
<120>	一种适用于可视化环介导等温扩增的动物线粒体DNA提取方法	
<160>	20	
<170>	SIPOSequenceListing 1.0	
<210>	1	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	1	
	taaacacccc accccata	18
<210>	2	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	2	
	ggtctgctac tagtattcag aa	22
<210>	3	
<211>	46	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	3	
	tagggccaac actccaccta gaaccagaat gatatttett attcgc	46
<210>	4	
<211>	41	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	4	
	taatgcccat actgcacaca tcgcattgac ttagtggtcg a	41
<210>	5	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	5	
	aggaattgaa cgtagaatag cgtag	25
<210>	6	
<211>	20	
<212>	DNA	

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 6	
tcagcaattc cctacattgg	20
<210> 7	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 7	
ggtgagtatg agagttaagc c	21
<210> 8	
<211> 46	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 8	
aggaggaagt gtaaggcgaa gattttccta gtagagtgag cctgag	46
<210> 9	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 9	
tcatccacct caccttccta cattttttgt cagagtcgga tgaga	45
<210> 10	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 10	
gaatcaggct caaacaacc	19
<210> 11	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 11	
tacgcaatct tacgatcaat cc	22
<210> 12	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 12	
ccgttggtat tagcactagg	20

<210> 13	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 13	
ggctcagaat aggcattggc tccctactac acacctccaa	40
<210> 14	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 14	
agcagacctc ctgacactca cagatgctag ttgtccgatg g	41
<210> 15	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 15	
tggtcggaat attatgcttc gt	22
<210> 16	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 16	
aggacaacca gtcgaacac	19
<210> 17	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 17	
tctgggcatt cttccactca	20
<210> 18	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 18	
tcgtcaatgt tagggcgtg	19
<210> 19	
<211> 45	
<212> DNA	

<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 19	
tggggttgag cggtttgatg cttttctagt accaaccccc gaact	45
<210> 20	
<211> 46	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 20	
aacacagcca tcctcctage cttttttggc atgttttcgg tttcct	46

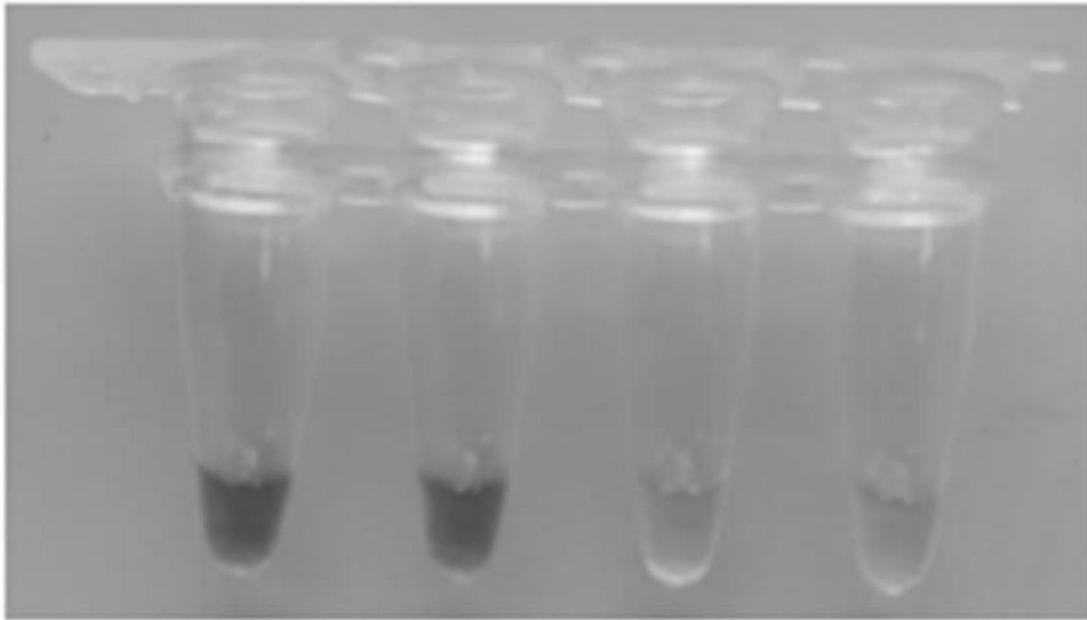


图1

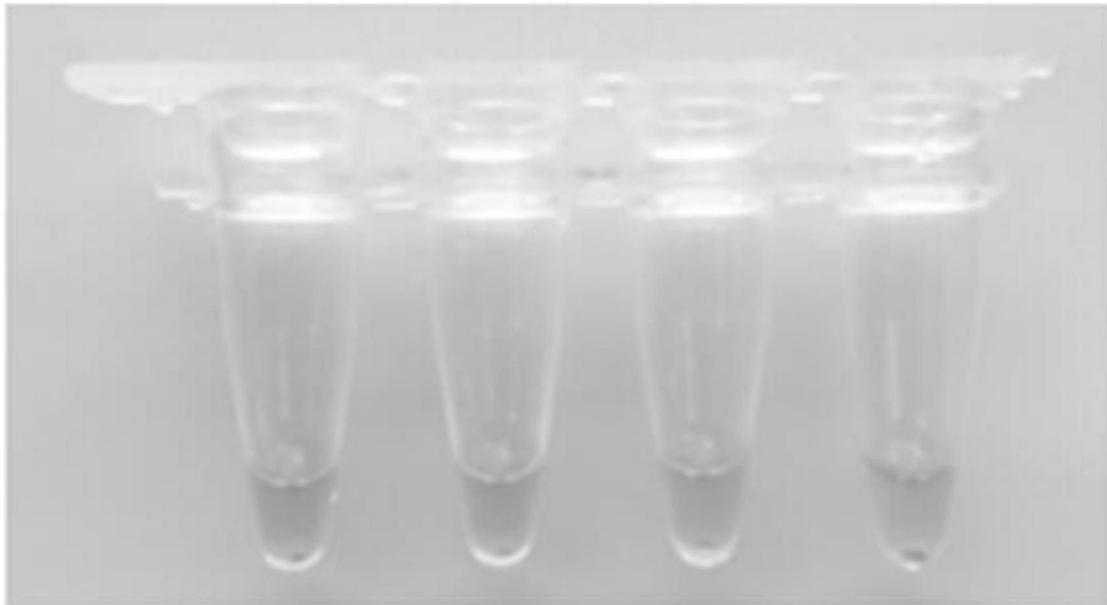


图2

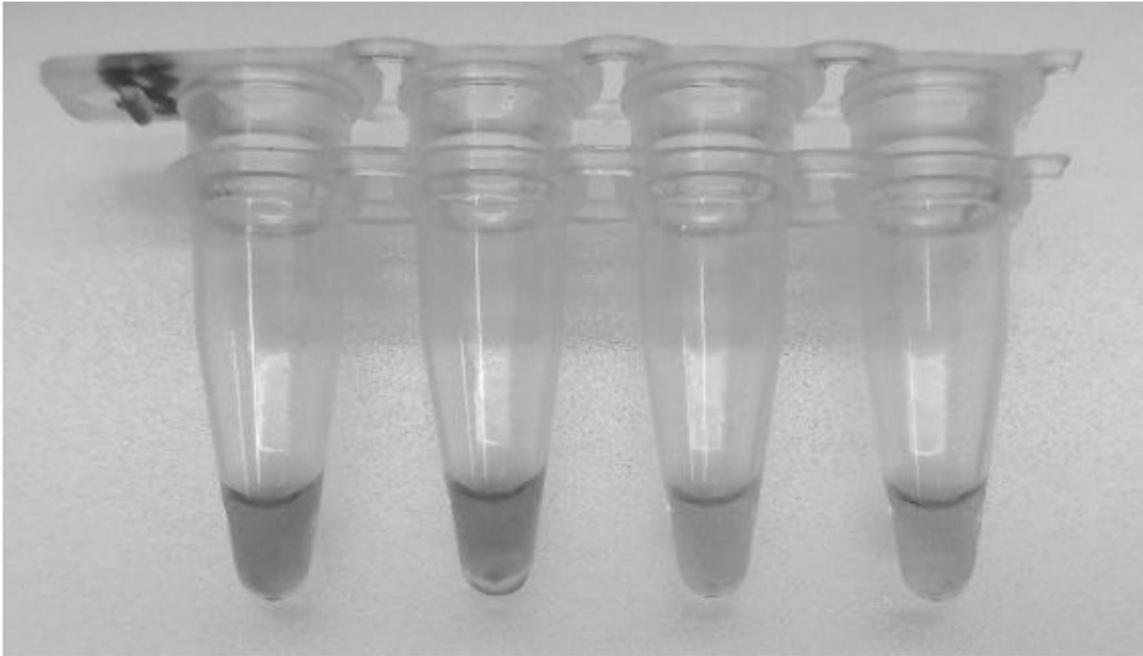


图3

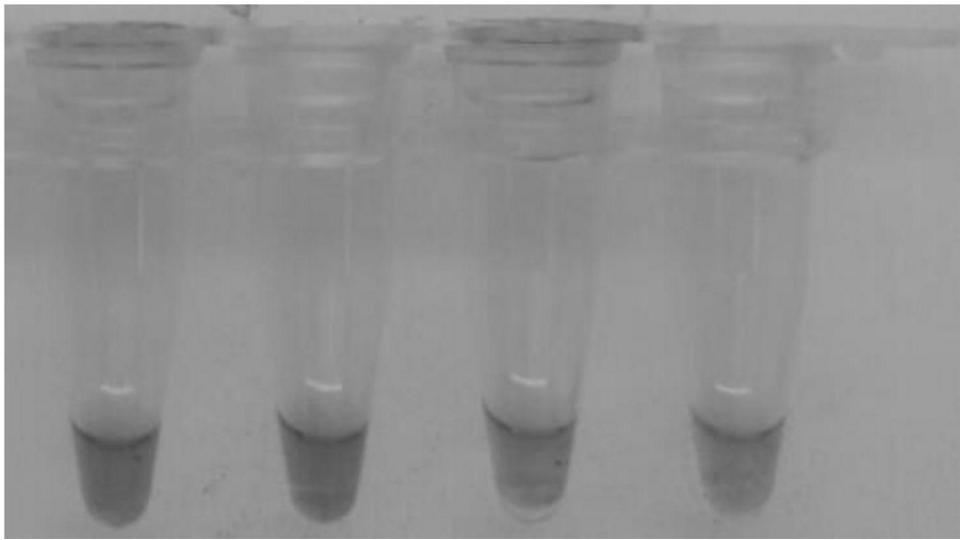


图4

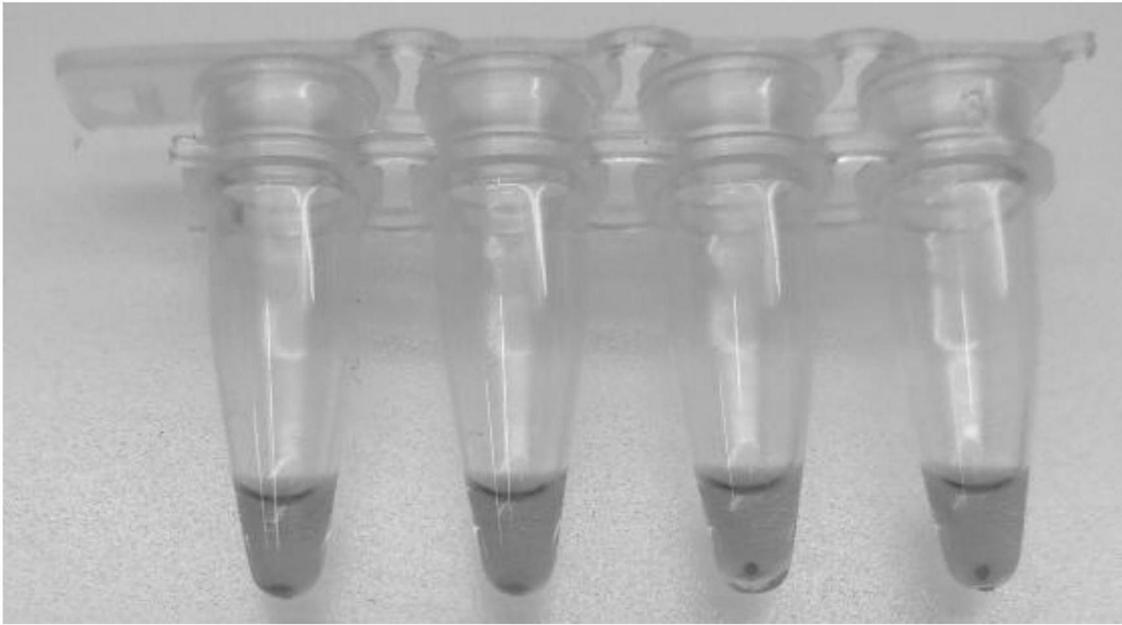


图5

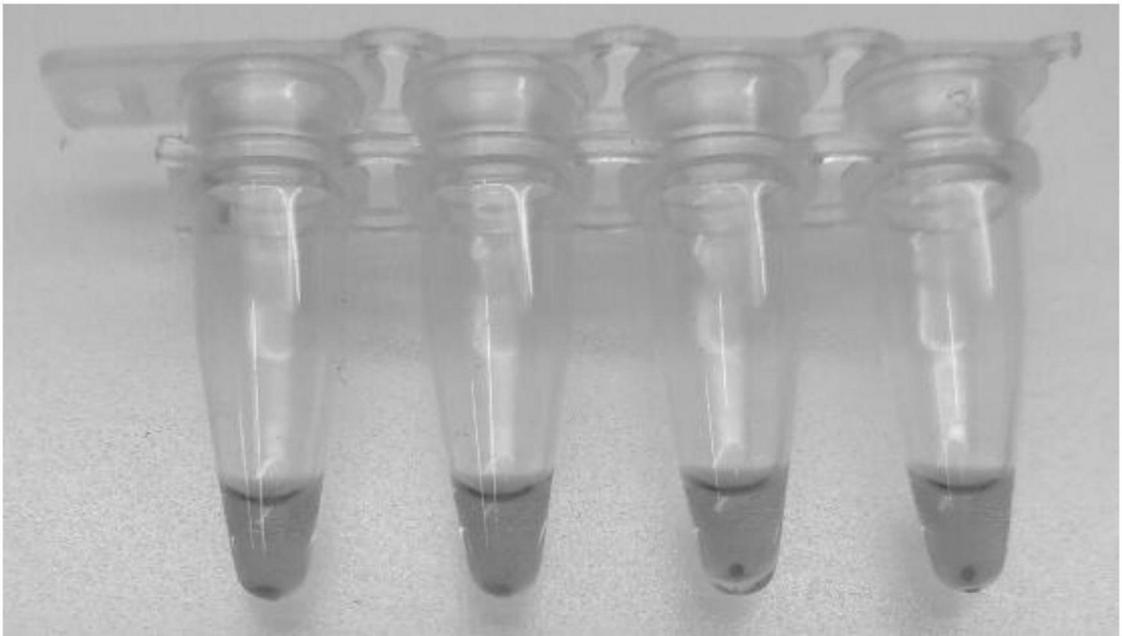


图6

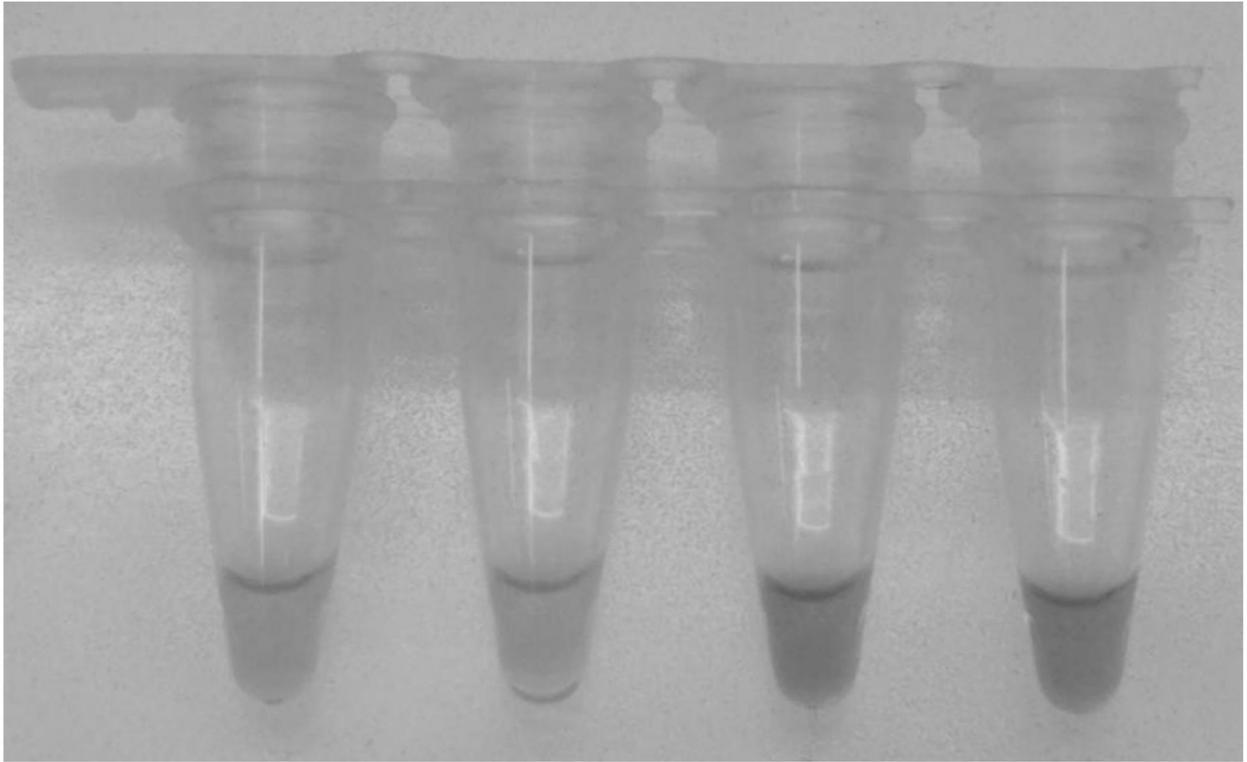


图7



图8

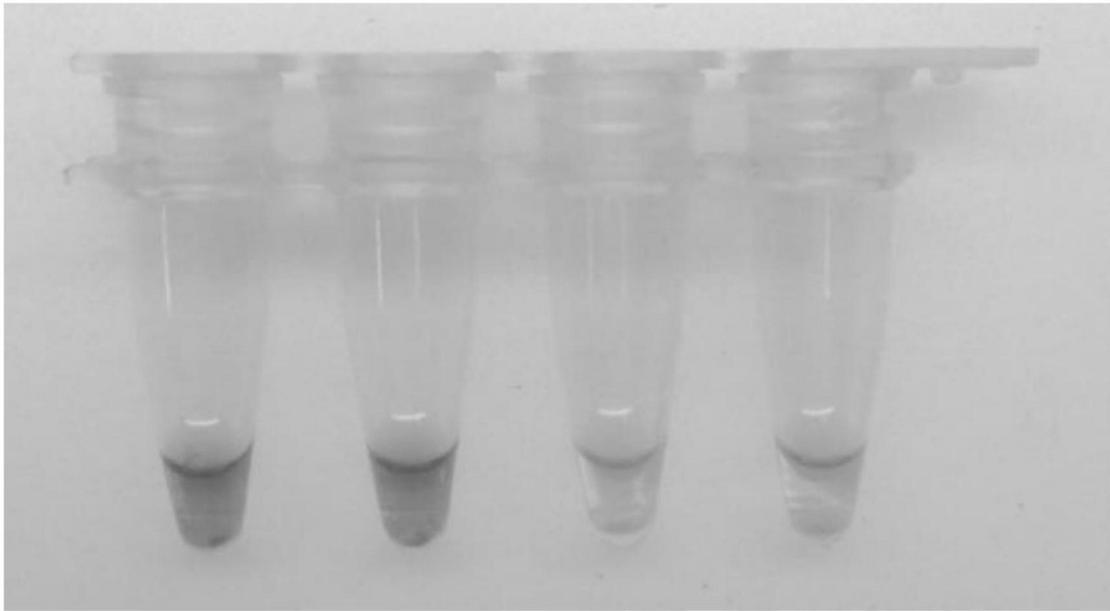


图9

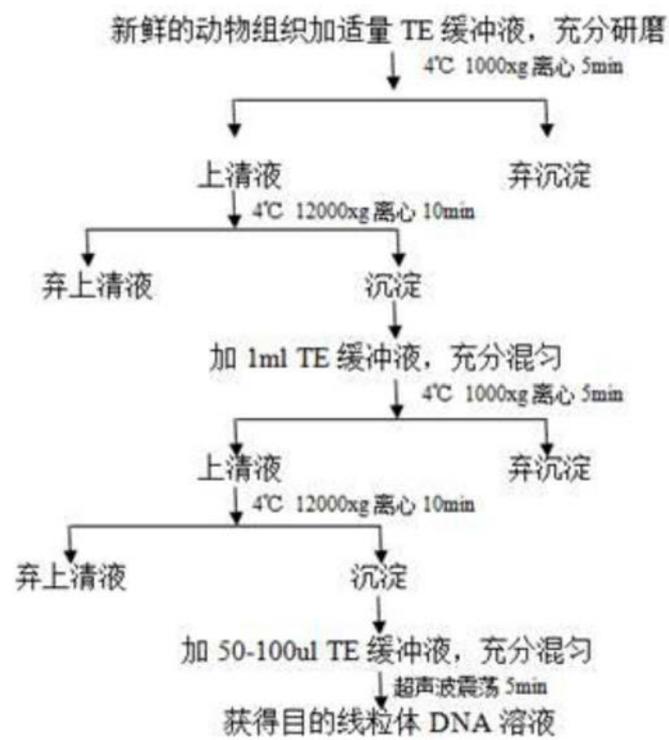


图10