

大量 - 高纯 - 高浓度DNA的制备

邵玉强¹, 金家铖¹, 李雪刚¹, 刘亮伟^{1,2*}

¹河南农业大学生命科学学院, 河南 郑州

²农业部农业酶工程重点实验室, 河南 郑州

收稿日期: 2022年4月6日; 录用日期: 2022年6月8日; 发布日期: 2022年6月17日

摘要

氯化铯(CsCl)梯度离心能够大量制备DNA, 柱回收试剂盒能够快速制备DNA, 结合二者优势开发大量 - 高纯 - 高浓度DNA的制备方法。本研究以长度5.9 kb的PCR产物为材料, 通过CsCl-EB溶液75,000 rpm离心6 h、注射器收集目标DNA、柱回收去除EB、CsCl回收得到DNA。2000 μL PCR产物CsCl离心后、1个柱回收洗脱四次得到22.1 μg DNA, A260/A230纯度指标高达1.99。3000 μL优化PCR产物CsCl离心后、6个柱回收, 洗脱一次得到DNA浓度高达391 ng/μL, 洗脱四次得到DNA量高达61.5 μg。与之相比, 胶回收2000 μL PCR产物仅得到9.6 μg DNA、A260/A230指标仅0.29, 远低于纯净DNA指标2, 而柱回收2000 μL PCR产物有较多非特异性条带。CsCl离心 - 柱回收方法能够制备大量 - 高纯 - 高浓度DNA, 从而满足对高质量DNA的需要。

关键词

大量, 高纯, 高浓度, DNA制备

Production of DNAs in Large-Quantity, High-Purification, and High-Concentration

Yuqiang Shao¹, Jiacheng Jin¹, Xuegang Li¹, Liangwei Liu^{1,2*}

¹The Life Science College, Henan Agricultural University, Zhengzhou Henan

²The Key Laboratory of Enzyme Engineering of Agricultural Microbiology, Ministry of Agriculture, Zhengzhou Henan

Received: Apr. 6th, 2022; accepted: Jun. 8th, 2022; published: Jun. 17th, 2022

Abstract

Cesium chloride (CsCl) centrifugation recovers DNA in large quantity, and recovery-column recovers

*通讯作者。

DNA rapidly. The two methods' advantages are combined to develop a CsCl centrifugation-column recovery method to produce DNAs in large-quantity, high-purification, and high-concentration. The study used 5.9 kb PCR-amplified DNA products as materials, ultra-centrifuged in a CsCl-EB solution at 75,000 rpm for 6 h, collected target DNAs by a syringe, and recovered target DNAs by a column to discard EB and CsCl. After CsCl centrifugation of 2000 μ L PCR products, a 1-column recovery recovered DNAs in a 22.1 μ g quantity and a high to 1.99 A260/A230 after a four-time elution. After CsCl centrifugation of 3000 μ L of optimized PCR products, a 6-column recovery recovered DNAs in a high to 391 ng/ μ L concentration by a one-time elution and a high to 61.5 μ g quantity by a four-time elution. In comparison, gel-recovery of 2000 μ L PCR products recovered DNAs in a low to 9.6 μ g quantity and a low to 0.29 A260/A230. Column-recovery of 2000 μ L PCR products had many un-specific DNA bands. CsCl centrifugation-column recovery produces DNAs in large-quantity, high-purification, and high-concentration, and can fulfill demand for high quality of DNAs.

Keywords

Large-Quantity, High-Purification, High-Concentration, DNA Production

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

DNA 用于分子生物学[1] [2] [3] [4] [5]、基因重组[6] [7] [8]、酶工程等领域[9] [10] [11]，这些领域十分关注 DNA 纯度、浓度和总量，所以 DNA 制备方法至关重要。DNA 制备方法有苯酚、氯仿和异戊醇 (25:24:1, pH 8.0)抽提 - 乙醇沉淀[12]，十六烷基三甲基溴化铵(CTAB) [13]，氯化铯(CsCl)梯度离心等方法 [14] [15] [16]。经典的 CsCl 离心最早用于制备质粒 DNA，但是需要异丙醇抽提去除溴化乙锭(EB)、乙醇沉淀 DNA，透析去除 CsCl 等多步繁琐工作[17] [18] [19]。目前，DNA 制备采用琼脂糖电泳 - 胶回收试剂盒、PCR 产物柱回收试剂盒[20]。因为快速方便，胶回收、柱回收成为常用 DNA 制备方法[5] [14] [21]。但是，胶回收、柱回收只能满足体外重组 DNA 小批量制备，难以制备大量 - 高纯 - 高浓度 DNA，对于大分子量的载体 DNA 更是如此。

然而，DNA 重组常需要大量 - 高纯 - 高浓度 DNA。外切酶 VIII 截短体 tExo 作为胞外同源重组酶时活性检测需要 10,000 ng 的 5.0 kb 线性化载体 pGEX-6P-1 [8]。ET 作为胞内同源重组酶时需要转化高达 100 ng/ μ L 目的 DNA、浓度高达 200 ng/ μ L 的 2.2 kb 线性载体 p15A-cm、10,000 ng/ μ L 的 8 kb 线性载体 pBeloBAC11、及 10,000 ng/ μ L 的 7.5 kb 线性载体 pBAC2015 [12]。此类线性载体 DNA 仍需要苯酚、氯仿和异戊醇、异丙醇沉淀等多步繁琐工作。如果探讨基因重组效率与酶量、反应时间、宿主细胞活性、酶促动力学等多种因素的关系，则需要更大量 - 高浓度 DNA。DNA 连接反应、酶切反应中间物通过胶回收纯化时，DNA 浓度常低于 5 ng/ μ L，其 A260/A230 纯度指标只有 0.45~0.29。但是，DNA 测序浓度要求达到 10 ng/ μ L，纯净 DNA 260/A230 指标要求达到 2。柱回收不能去除未完全反应的底物 DNA。基因组编辑时，需要转化达到 50,000 ng guide-RNA、50,000 ng Cas9 表达质粒(13.2 kb)、50,000 ng 供体 DNA (5.2 kb) [22]，所以，迫切需要大批量 - 高纯 - 高浓度 DNA。

本研究基于 CsCl 梯度离心能够大量制备 DNA、柱回收能够快速制备 DNA 的优势，开发了 CsCl 离心 - 柱回收方法。以 5.9 kb 的 PCR 产物 pET28a-xyn (黑曲霉 GH11 木聚糖酶基因)为材料[23]，先通过 CsCl

梯度离心、注射器回收目的 DNA、柱回收去除 EB 和 CsCl, 从而快速制备大量 - 高纯 - 高浓度 DNA。进而通过非等量引物 PCR 优化、6 个柱回收进一步提高 DNA 纯度、浓度、回收量。同时与 PCR 产物经胶回收、柱回收方法进行比较。

2. 材料与方法

2.1. 材料

Q5 DNA 聚合酶, dNTPs, 限制性内切酶 DpnI、Xho I, T4 DNA 连接酶(T4lig)均来自 NEB 公司(北京)。引物 JFV2810 (CAGCCATATGATGAGTGCCG)和 JRV2812 (CATATGGCTGCGG CGCGGCACC) (下划线为 10 bp 同源臂)、DNA 回收试剂盒来自于上海生物工程有限公司(上海)。质粒 pET28a-xyn (*Aspergillus niger* GH11 木聚糖酶基因)由本实验室构建。

2.2. DNA 扩增

PCR 扩增体系含有 12 ng 质粒 pET28a-xyn 为模板, 250 μ mol JFV2810, 250 μ mol JRV2812, 200 μ M dNTPs, 1 U Q5 DNA 聚合酶, 1 \times Q5 DNA 聚合酶 buffer, 以水补足 50 μ L, 扩增 2000 μ L PCR 产物。PCR 程序: 98 $^{\circ}$ C 变性 3 min, 28 个循环: 98 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 双退火程序(67 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 15 s) [24], 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。DpnI 消解模板反应体系为: 17 μ L PCR 产物, 1 \times DpnI buffer, 1 μ L 20 U/ μ L DpnI, 37 $^{\circ}$ C 消解模板 4 h, 80 $^{\circ}$ C 灭活 DpnI 30 min。

2.3. CsCl 密度梯度离心 - 柱回收方法

CsCl 密度梯度离心: 2000 μ L PCR 产物加水补足 4 mL, 加入终浓度 1.55 g/mL CsCl, 30 $^{\circ}$ C 下溶解, 再加入终浓度 0.2 mg/mL EB (溴化乙锭), 30 $^{\circ}$ C 下溶解。用液体石蜡油加满离心管, 热熔器封口。样品在离心机 NVT100 转子中 75,000 rpm 超速离心 6 h (Beckman, USA), 与 pET28a-xyn 质粒 DNA 平行超离心作为对照, 从而确定目的 DNA 位置(在 302 nm 紫外光下观察), 用 1 mL 注射器从离心管顶部缓慢吸出目的 DNA 至 1.5 mL 干净 EP 管中。

柱回收 DNA: 注射器收集目的 DNA 溶液中含有 1.55 g/mL CsCl 和 0.2 mg/mL EB, 需要去除 CsCl 和 EB 得到纯化 DNA, 根据 PCR 产物柱回收试剂盒指南[20], 向 DNA 溶液中加入 5 倍体积 B3 缓冲液混匀, 而后移入回收柱, 8000 g 离心 30 s, 加入 500 μ L 清洗液(wash solution), 9000 g 离心 30 s, 倒掉清洗液, 重复清洗一次。回收柱在 9000 g 离心 2 min, 在烘箱 15 min 晾至无酒精味。回收柱膜中央加入 35 μ L elution buffer, 60 $^{\circ}$ C 水浴 2 min, 9000 g 离心 2 min, 得到 DNA 溶液, 探讨 1~4 次洗脱 DNA 回收量、浓度、纯度。用 Nanodrop 1000 检测 DNA 浓度(Thermo scientific, USA), 电泳检测 DNA 条带。

非等量引物 PCR 优化: 因为引物 JFV2810 和 JRV2812 具有 10 bp 同源臂, PCR 反应体系中加入降低 10 倍的 JFV2812 引物进行非等量引物 PCR 扩增[24], 其它 PCR 试剂和 PCR 程序如上。探讨 2000 μ L 非等量引物 PCR 产物经 CsCl-EB 离心、1 个柱回收 DNA 的效率。

6 个柱回收 DNA: 当 DNA 量大于回收柱最大承载量时, 1 个柱回收可能丢失部分 DNA, 为了提高 DNA 回收率, 探讨了 3000 μ L 非等量引物 PCR 产物经 CsCl-EB 离心、6 个柱回收 DNA 的效率。

2.4. 胶回收方法比较

为了与 CsCl 离心 - 柱回收方法比较, 取 2000 μ L PCR 产物经 DpnI 消解模板, 凝胶电泳后, 胶回收纯化 DNA, 每次洗脱体积 30 μ L, 共洗脱三次, 将各批次洗脱液混匀。

取 7568 ng 质粒 DNA 用于 4 份 XhoI 酶切反应, 每份酶切体系含有 1892 ng pET28a-xyn 质粒, 2 μ L 20

U/μL 的 Xho I, 1 × cut smart 缓冲液, 37°C 酶切 2 h, XhoI 酶经 70°C 灭活 20 min, 凝胶电泳后, 胶回收 DNA。

2.5. 柱回收方法比较

为了与 CsCl 离心 - 柱回收方法比较, 取 2000 μL PCR 产物经 DpnI 消解模板, 分别上 5 个柱回收 DNA, 每次洗脱体积 30 μL, 共洗脱三次, 将各批次洗脱液混匀。

1768 ng DNA 用于 4 份连接反应, 每份连接体系含有 442 ng 线性质粒 pET28a-xyn DNA, 1 × T4 DNA 连接酶 buffer, 400 U T4 DNA 连接酶, 加水补足 50 μL。25°C 连接 3 h, T4 DNA 连接酶经 80°C 灭活 2 h。连接产物经柱回收纯化, 依次进行二次连接、柱回收纯化、再经三次连接, 而后凝胶电泳检测。

3. 结果与分析

3.1. CsCl 密度梯度离心 - 柱回收方法

2000 μL PCR 产物经 CsCl-EB 超离心后, 根据质粒 DNA 对照中线性 DNA 位置(图 1_3), 用注射器回收 PCR 产物样品中目的 DNA (图 1_4), 凝胶电泳检测显示回收产物为 5.9 kb 目的 DNA (图 1_5,6)。注射器回收 DNA 溶液中含有 1.55 g/mL CsCl 和 0.2 mg/mL EB, 经过 1 个柱回收去除 CsCl 和 EB [20], 一次洗脱得到 10.8 μg DNA (图 1), 可以满足 10,000 ng 线性化载体需要[8]。回收 DNA 浓度高达 145.2 ng/μL, 能够满足 100 ng/μL 浓度目的 DNA 的需要[12], A260/A230 纯度指标高达 2.35 (表 1), 达到纯净 DNA 的 A260/A230 指标 2。经过四次洗脱共得到 22.1 μg DNA, 四次洗脱得到 DNA 浓度为 61.7 ng/μL, 远高于 DNA 测序要求。

DNA 洗脱曲线显示 2~4 次洗脱 DNA 量依次减少(图 1_8), DNA 洗脱曲线表明一次洗脱 DNA 占 DNA 总量 49%, 但是一次洗脱 DNA 浓度为总 DNA 的 2.1 倍, 四次洗脱得到 22.1 μg DNA, 接近于洗脱曲线理论值 19.7 μg。目前无论胶回收还是柱回收 DNA 时, 常用一次洗脱, *i.e.*, 回收 DNA 只有总 DNA 的一半。该结果表明四次洗脱可以提高 DNA 总量, 一、二次洗脱可以提高 DNA 浓度。DNA 洗脱曲线与异丙醇去除 EB 效率、酶分子热失活曲线相似[23], 均为指数衰减曲线。

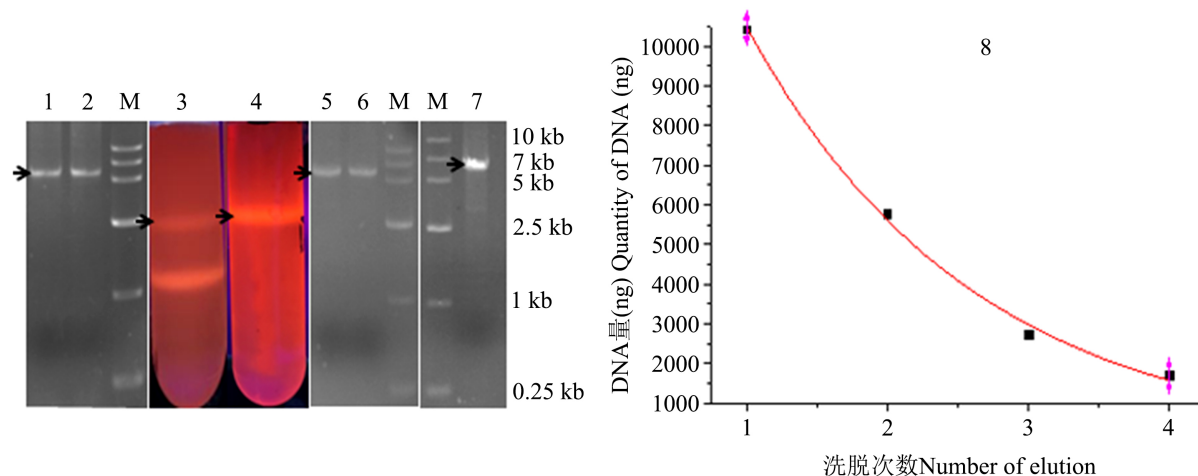


Figure 1. DNA Electrophoresis and CsCl centrifugation, M. DNA marker VI; 1~2. PCR products; 3~4. CsCl centrifugation and ultra-violet assay of plasmid and PCR products; 5~6. Syringe recovery products of CsCl centrifugation; 7. Column recovery DNA; 8. DNA extraction profile

图 1. DNA 电泳及 CsCl 离心, M. DNA marker VI; 1~2. PCR 产物, 3~4. CsCl 离心和紫外光检测质粒和 PCR 产物, 5~6. CsCl 离心后注射器回收产物; 7. CsCl 离心 - 柱回收 DNA; 8. DNA 洗脱曲线

Table 1. DNA recovery and quality assay
表 1. DNA 回收量及质量检测

项目 Item	洗脱 Elution	A260/A280	A260/A230	浓度 Concentration ng/μL	DNA 量 DNA quantity (μg)
CsCl centrifugation 1-column recovery of 2000 μL PCR products	1 st	1.92	2.35	145.2	10.8
	4	1.99	1.99	61.7	22.1
CsCl centrifugation 1-column recovery of 2000 μL optimized PCR products	1 st	1.91	2.27	189.6	17.1
	4	1.86	2.10	91.3	36.2
CsCl centrifugation 6-column recovery of 3000 μL optimized PCR products	1 st	1.87	2.19	391.0	28.2
	4	1.81	2.00	173.5	61.5
Gel-recovery of 2000 μL PCR products		1.77	0.29	50.4	9.6
Gel-recovery of 7568 ng XhoI-cut plasmids		1.85	1.07	23.3	1.8
Column-recovery of 2000 μL PCR products		1.86	2.14	167.3	66.9

3.2. 方法优化

非等量引物 PCR 优化: DNA 回收量与 PCR 扩增效率有关, PCR 扩增效率受到同源臂引物影响[24] [25], 所以进行单侧引物量降低 10 倍的非等量引物 PCR 扩增。2000 μL 非等量引物 PCR 产物经 CsCl-EB 离心后、1 个柱回收一次洗脱得到 17.1 μg DNA, 浓度高达 189.6 ng/μL, 四次洗脱回收 DNA 高达 36.2 μg, 是 2000 μL 常规 PCR 产物回收量的 1.6 倍(表 1)。

多柱回收: 当 DNA 量大于回收柱最大承载量时, 1 个柱回收可能损失 DNA。取 3000 μL 非等量引物 PCR 产物经 CsCl-EB 离心后、6 个回收柱回收, 一次洗脱得到 28.2 μg DNA、浓度高达 391 ng/μL (表 1), 能够满足对 200 ng/μL 线性载体 DNA 浓度的需求[12], 如果要满足 10,000 ng/μL 线性载体的要求, 则需要 9000 μL 非等量引物 PCR 产物经 6 个柱一次洗脱回收 DNA。四次洗脱回收 DNA 量高达 61.5 μg, 是 1 个柱回收 DNA 量的近 2 倍, 说明多个柱回收更利于大量 DNA 制备。

3.3. 胶回收方法比较

2000 μL PCR 产物胶回收得到 9.6 μg DNA (只有 CsCl 离心 - 柱回收等量 PCR 产物得到 DNA 的 43%), 其 A260/A230 指标只有 0.29 (远低于 CsCl 离心 - 柱回收 DNA 的纯度 1.99) (表 1)。1.2 μg 线性 pET28a-xyn DNA 经 E588 酶切产物胶回收浓度只有 5.4 ng/μL, 达不到 DNA 测序要求, 其 A260/A230 指标只有 0.09, 显示 DNA 中有较多碳水化合物、胍盐污染, 因为 DNA 回收试剂盒使用碳水化合物硅胶, 当 DNA 浓度低时污染较高。

7568 ng 质粒 pET28a-xyn 经 XhoI 酶切后产物, 胶回收得到 1.8 μg DNA, 浓度 23.3 ng/μL (表 1), 其 A260/A230 指标为 1.07 (低于 CsCl 离心 - 柱回收 DNA 的纯度 1.99), 显示有较好的纯度(图 2_1,2), 但是回收率只有 23%。

3.4. 柱回收方法比较

2000 μL PCR 产物经柱回收得到 66.9 μg DNA, 浓度为 167.3 ng/μL, 其 A260/A230 指标 2.14, 可以计算出 PCR 产物中 DNA 浓度为 0.03 ng/μL。因为柱回收无法去除非特异性 DNA 条带, 凝胶电泳检测柱

回收产物显示很多非特异性条带(图 2_6,7), 与 CsCl 离心 - 柱回收 DNA 纯度有很大差距(图 1_7)。

1.8 μg DNA 经过第一次连接反应电泳检测有明显产物条带(图 2_3), 一次连接产物柱回收纯化后经第二次连接反应, 电泳检测只有隐约产物条带(图 2_4), 二次连接产物经柱回收纯化后再经第三次连接反应, 电泳检测没有产物条带(图 2_5), 说明 DNA 连续柱回收效率很低。凝胶电泳检测的最低限度为 10 ng, DNA 多步连接反应时, 柱回收效率严重影响实验结果, 需要高达 37.8 μg 的 DNA 用于第一次连接、柱回收, 而后用于第二次连接、柱回收, 才能经第三次连接后达到电泳检测的限度, 所以迫切需要大量 - 高纯 - 高浓度 DNA。

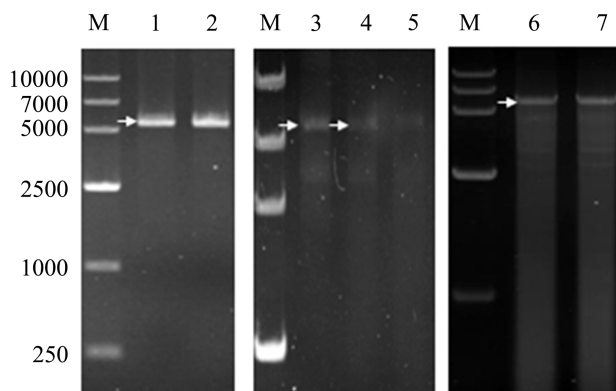


Figure 2. Electrophoresis of column-recovery products, 1~2. Gel-recovery product of XhoI-cut plasmids pET28a-xyn; 3. 1st ligation products; 4. 2nd ligation products; 5. 3rd ligation products; 6~7. Column-recovery of PCR products
图 2. 柱回收产物电泳, M. DNA Marker VI; 1~2. XhoI 酶切质粒 pET28a-xyn 胶回收产物; 3. 一次酶连产物; 4. 二次酶连产物; 5. 三次酶连产物; 6~7. 柱回收 PCR 产物

4. 讨论

DNA 制备大体分为传统方法和试剂盒回收方法[12]-[18] [26], 经典 CsCl 离心方法最早用来制备质粒 DNA [18], 但是步骤繁琐, 需要异丙醇抽提去除 EB、乙醇沉淀 DNA [19], 透析去除 CsCl 等操作[20] [21]。胶回收、柱回收试剂盒方便快捷, 但是只能制备少量 DNA。检测 DNA 酶学性质往往需要 nmol、甚至 μmol 级别的 DNA。本研究基于 CsCl 离心大量制备和柱回收快速制备 DNA 的优势, 开发了大量 - 高纯 - 高浓度 DNA 的制备方法。3000 μL 非等量引物 PCR 产物经 CsCl-EB 离心后、6 个回收柱回收, 一次洗脱得到 DNA 浓度高达 391 ng/ μL (表 1), 能够满足胞内同源重组对浓度高达 200 ng/ μL 线性载体 DNA 的需求[12], 四次洗脱回收 DNA 量高达 61.5 μg , 据笔者所知这是目前达到的最大 DNA 回收量、纯度、浓度。由表 1 可知 CsCl 离心 - 柱回收 DNA A260/A230 纯度在 1.99~2.35 之间, 与纯净核酸指标一致, 而胶回收 DNA A260/A230 纯度只有 0.29, 柱回收 DNA 则含有较多杂带 DNA。CsCl 离心 - 柱回收 DNA A260/A280 指标与胶回收、柱回收没有太大差别。通过胞外分子内同源重组构建无缝质粒时[5], 12 bp 分子内同源臂线性 DNA pET21a-XynB4 需要 360 ng 经 Exnase II 重组得到 6 个转化子, 经外切酶 VIII 全酶和 T 蛋白重组得到 2 个转化子, 同样需要大量 - 高纯 - 高浓度 DNA。

根据 CsCl 梯度离心平衡时间分离大小不同的 DNA。因为大小不同的 DNA 分子需要不同的离心时间达到平衡, 5.9 kb 大分子 DNA 需要 6 h 离心达到平衡, 而 185 bp 的小分子 DNA 需要 15~25 h 离心才能达到平衡, DNA 分子量越小所需离心时间越长。这是因为 DNA 片断越小插入的 EB 量越少, 则其密度越小, 所需离心力越高、离心时间越长。DNA 需要 $2 \times 10^5 \text{ g}$ 的相对离心力, RNA 需要 $4 \times 10^5 \text{ g}$ 的相对

离心力, 单链 DNA 与 RNA 相似, 如果用单侧引物 PCR 扩增 DNA, 则 PCR 产生可能含在单链 DNA、非特异双链 DNA 杂带, 通过控制离心力和离心时间去除杂带。

因为需要柱回收去除 CsCl 离心产物中的 CsCl 和 EB, 柱回收试剂盒效率也是影响 DNA 回收效率的因素。不同公司的试剂盒回收率明显不同[5] [14], Genemark 柱回收率为 80~95%, 胶回收率为 60%~90%, Tiangen 回收率为 80%。笔者通过胶回收 5.9 kb 大分子 DNA A260/A230 指标只有 0.29 (表 1), 回收 7600 ng DNA 时 A260/A230 才能达到 1.07 (表 1), 最好使用回收效率好的试剂盒。

5. 结论

综上所述, 本研究结合 CsCl 梯度离心大量制备 DNA、柱回收快速制备 DNA 的优势, 开发了大量 - 高纯 - 高浓度 DNA 的制备方法。在此基础上, 通过非等量引物 PCR 扩增、6 个回收柱回收进一步提高 DNA 制备效率, 一次洗脱回收 DNA 浓度高达 391 ng/ μ L, 四次洗脱回收 DNA 量高达 61.5 μ g, A260/A230 纯度指标高达 1.99, 各项指标均显著高于胶回收、柱回收, 从而满足对大量 - 高纯 - 高浓度 DNA 的质量需求。

基金项目

国家自然科学基金面上项目“基于同源/非同源结构置换的木聚糖酶 - 葡聚糖酶结构元件功能解析”(31771915)。

参考文献

- [1] 申恒, 刘思慧, 李跃, 等. 一种用于 PCR 的番茄 DNA 快速粗提方法[J]. 生物技术通报, 2022, 38(7): 62-68.
- [2] 戴剑, 洪德林, 张大栋, 等. 一种快速高效的 DNA 提取方法研究[J]. 麦类作物学报, 2011, 31(3): 437-442.
- [3] 韩静丹, 秦萌, 王献. 铁线蕨总 DNA 提取方法比较分析[J]. 河南农业大学学报, 2012, 46(2): 182-187.
- [4] Lohman, G.J.S., Chen, L. and Evans, T.C. (2011) Kinetic Characterization of Single Strand Break Ligation in Duplex DNA by T4 DNA Ligase. *Journal of Biological Chemistry*, **286**, 44187-44196. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.284992>
- [5] Liang, Y., Zhang, Y. and Liu, L. (2020) Intra-Molecular Homologous Recombination of Scarless Plasmid. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**, 1697-1697. <https://doi.org/10.3390/ijms21051697>
- [6] Zhang, Y., Buchholz, F., Muirers, J., et al. (1998) A New Logic for DNA Engineering Using Recombination in *Escherichia coli*. *Nature Genetics*, **20**, 123-128. <https://doi.org/10.1038/2417>
- [7] Zhang, J., Xing, X., Herr, A.B., et al. (2009) Crystal Structure of *E. coli* RecE Protein Reveals a Toroidal Tetramer for Processing Double-Stranded DNA Breaks. *Structure*, **17**, 690-702. <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.03.008>
- [8] 朱燕, 韩小韦, 牛毅男, 等. 核酸外切酶 VIII 截短体的重组表达及其在体外重组反应中的应用[J]. 生物工程学报, 2019, 35(5): 827-836.
- [9] Li, Z., Parris, S. and Saski, C.A. (2020) A Simple Plant High-Molecular-Weight DNA Extraction Method Suitable for Single-Molecule Technologies. *Plant Methods*, **16**, 38. <https://doi.org/10.1186/s13007-020-00579-4>
- [10] Xu, W., Liu, Y., Ye, Y., et al. (2016) C-Terminal Carbohydrate-Binding Module 9_2 Fused to the N-terminus of GH11 Xylanase from *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters*, **38**, 1739-1745. <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2149-5>
- [11] Liu, L., Zeng, L., Wang, S., et al. (2012) Activity and Thermostability Increase of Xylanase Following Transplantation with Modules Sub-Divided from Hyper-Thermophilic CBM9_1-2. *Process Biochemistry*, **47**, 853-857. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.02.024>
- [12] Wang, H., Li, Z., Jia, R., et al. (2018) ExoCET: Exonuclease *In Vitro* Assembly Combined with RecET Recombination for Highly Efficient Direct DNA Cloning from Complex Genomes. *Nucleic Acids Research*, **46**, e28. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1249>
- [13] Sudeshna, C., Anwasha, S. and Aravind, N.A. (2020) Comparison of DNA Extraction Methods for Non-Marine Molluscs: Is Modified CTAB DNA Extraction Method More Efficient than DNA Extraction Kits? *Biotech*, **10**, 69. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-2051-7>
- [14] Sambrook, J. and Green, M.R. (2017) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Forth Edition, Translated by He, F.C.,

Science Press, Melbourne, 54.

- [15] Good, L. and Nazar, R.N. (1995) Visualization of CsClEt₂Br Plasmid Preparations under Visible Light. *Biotechniques*, **18**, 556-558.
- [16] 江玉梅, 汪仁, 束晓春. 用改良密度梯度离心法提取石蒜叶片和鳞茎总 RNA [J]. 植物资源与环境学报, 2008, 17(3): 78-80.
- [17] Song, J., Kanazawa, I., Sun, K., *et al.* (1999) Removal of Ethidium Bromide and Cesium Chloride from Plasmid DNA by Ethanol Precipitation. *Biotechniques*, **26**, 1056-1060. <https://doi.org/10.2144/99266bm11>
- [18] Ward, L.H. and Jarvis, A.W. (1992) Rapid Removal of Cesium Chloride from DNA Obtained from Ultracentrifuge Gradients. *BioTechniques*, **12**, 76.
- [19] Joseph, J.W. and Kolodner, R. (1983) Exonuclease VIII of *Escherichia coli*, II Mechanism of Action. *Journal of Biological Chemistry*, **258**, 10418-10424. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)44473-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)44473-5)
- [20] Sangon Biotech. Diamond, DiaSpin PCR Product Purification Kit. User Manual (V 1.0), 12-15.
- [21] Mármol, P., Gómez, B., Gomes, C., *et al.* (2019) An Innovative DNA Extraction Method: Water versus Commercial Buffers. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, **7**, 282-284. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2019.09.111>
- [22] Zheng, X., Zheng, P., Zhang, K., *et al.* (2018) 5S rRNA Promoter for Guide RNA Expression Enabled Highly Efficient CRISPR/Cas9 Genome Editing in *Aspergillus niger*. *ACS Synthetic Biology*, **8**, 1568-1574. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00456>
- [23] Yang, A., Cheng, J., Liu, M., *et al.* (2018) Sandwich Fusion of CBM9_2 to Enhance Xylanase Thermostability and Activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, **117**, 586-591. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.199>
- [24] 黄亚威, 贺添艳, 杨昂, 等. 双退火温度 PCR 扩增[J]. 微生物学报, 2017, 57(8): 1262-1269.
- [25] 上官云杰, 梁亚萍, 杨昂, 等. 同源引物的非等量[J]. 河南科学, 2018, 36(3): 326-333.
- [26] Martín-Nunez, G.M., Gomez-Zumaquero, J.M., Soriguer, F., *et al.* (2012) High Resolution Melting Curve Analysis of DNA Samples Isolated by Different DNA Extraction Methods. *Clinica Chimica Acta*, **413**, 331-333. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.09.014>