

5 种主要农作物 DNA 快速提取方法研究

王伟威, 孟庆虹, 张瑞英, 关海涛, 陈凯新, 高 锋, 赵 琳, 姚鑫淼
(黑龙江省农业科学院 农产品质量检验中心, 哈尔滨 150086)

摘要:以玉米、小麦、大豆、高粱, 水稻的种子和 幼苗的 4 种处理组织为材料, 利用 碱煮法对 DNA 提取程序进行了研究, 建立了一种简单、快速的 DNA 提取程序。该程序提取的 DNA 可用 SSR 引物进行扩增, 扩增产物质量好, 并且能满足这 5 种常见作物的分子标记研究。
关键词: 农作物; DNA 提取; 碱煮法
中图分类号: S51 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2008)05-0001-02

Research on Fast DNA Extraction of Five Main Crops

WANG Wei-wei, MENG Qing-hong, ZHANG Rui-ying, GUAN Hai-tao, CHEN Kai-xin, GAO Feng, ZHAO Lin, YAO Xin-miao
(Cereal Quality Research Center of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086)

Abstract: According to this experiment, a simple fast DNA extraction method was established, which using five crops (maize, wheat, soybean, broomcorn and rice) prepared by four treatments (entire seeds, smashed seeds, entire seedlings, smashed seedlings) as material while using NaOH as extraction buffer. The extracted DNA could be used for SSR marker PCR reaction and the PCR productions have good quality, which made a step on molecular marker research.
Key words: crop; DNA extraction; NaOH method

近二十多年来, 生物技术以前所未有的速度迅速发展, 它是一个新兴独立的技术领域, 其核心是基因工程。而 DNA 的提取和纯化是基因工程研究的基础操作, 实施分子标记, 基因文库构建、分子标记辅助育种、转基因检测等都以提取 DNA 为前提。现在常用的植物 DNA 的提取方法主要是 CTAB (十六烷基三甲基溴化铵)法和 SDS (十二烷基磺酸钠)法两种方法^[1]。虽然研究者们对植物 DNA 的提取方法做了许多改进研究, 但大部分方法提取步骤繁琐, 所用试剂多是有毒有害药物^[2-3]。如何更简便有效地提取到纯净、合格的大分子双链 DNA, 一直是植物生物技术研究者关注的问题。植物细胞不同于动物细胞, 除了具有细胞壁外, 还含有大量的多糖、脂质、色素和酚类物质^[4], 给 DNA 的提取和纯化带来许多困难。并且不同植物材料的细胞内容物在组成上有所不同, 因此, 对不同的植物材料采取不同的 DNA 提取方法, 以保证提取的 DNA 的质量^[5]。为此, 本研究以玉米、水稻、大豆、小麦、高粱

等主要作物为材料, 以减少操作步骤、不用有毒有害的化学试剂为目标, 通过实验找到一种快速简便的、能满足分子标记研究要求的植物 DNA 提取方法, 该方法不仅可以广泛适用于植物分子生物学领域的 DNA 制备, 而且对大幅度缩短种子纯度检验、转基因检测时间, 提高检测效率, 降低检测成本具有重要意义和实用价值。

- 1 材料
- 本实验选用了玉米、小麦、大豆、高粱和水稻 5 种常见作物的种子和幼苗作为 DNA 提取的原料。
- 2 实验方法
- 2.1 DNA 提取和检验
- 2.1.1 植物材料处理 本实验对 5 种作物的种子和幼苗做如下的 4 种处理: 完整的种子, 被粉碎的种子, 完整的幼苗, 被破坏的幼苗。其中玉米种子取半粒(含胚乳), 大豆种子取整粒, 小麦、高粱和水稻种子均取多粒(约 5 粒), 幼苗均由单粒培养。
- 2.1.2 DNA 提取 A. 将 5 种植物材料的 4 种处理组织分别装入 1.5 mL 离心管, 并编号, 作物种子约取 200 mg, 叶片组织约取 0.5 cm²以嫩叶为宜; B. 在离心管中加入 400 μ L, 1 mol \cdot L⁻¹ NaOH, 确保将植物组织完全浸泡, 沸水浴 5 min; C. 在离心管中

收稿日期: 2008-04-14
基金项目: 黑龙江省自然科学基金重点项目(ZJN0601-02); 黑龙江省农业科学院青年基金项目
第一作者简介: 王伟威(1981-), 男, 哈尔滨人, 硕士, 研实, 从事生物技术研究。E-mail: davidww@126.com.

加入 200 μL , 1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl(pH8.0), 沸水浴 1 min; D. 加入 200 μL , TE (pH8.0); E. 吸取 2 μL 液体作为 PCR 反应模板。

2.1.3 DNA 检验 分别吸取不同植物不同组织不同处理提取的 DNA 溶液 5 μL 在 0.8%琼脂糖凝胶中电泳, 检测 DNA 质量。

2.2 扩增反应和扩增产物检验

按以下反应条件进行 PCR 扩增: 在 20 μL 的反应体系中, 包括 1X Buffer, 0.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP, 0.25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SSR 引物, 1.0 U Taq DNA 聚合酶, 2 μL DNA 溶液。反应程序条件按照不同引物采用不同的退火温度、延长时间和循环次数。吸取得到的各 PCR 扩增产物 6 μL 在 1.5%琼脂糖凝胶中电泳, 检测不同植物不同组织扩增的效果。

3 结果与分析

3.1 提取的 DNA 质量

经过 0.8%琼脂糖凝胶电泳对各个 DNA 溶液进行检验后, 未发现 DNA 条带。

3.2 扩增产物质量

经过 1.5%琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检验, 发现玉米、大豆、小麦和水稻的 4 种组织均具有清晰的扩增产物条带(见图 1~4), 以高粱种子中提取的 DNA 为模板的扩增反应并未发现产物, 以高粱叶片中提取的 DNA 为模板的扩增反应具有扩增产物(见图 5)。比较 4 种组织处理可发现叶片提取 DNA 的成功率高于种子, 而且比较完整组织和破坏组织, 并未发现有大的差别, 可以说明 NaOH 对于细胞壁在沸水浴 5 min 的条件下基本上可以破坏大部分的细胞壁, 而不需要对组织进行机械处理。

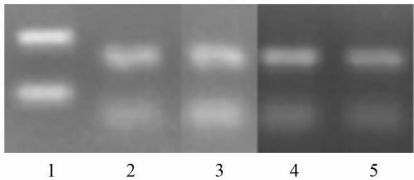


图 1 玉米 PCR 扩增产物检验

1—Marker 250bp, 100bp; 2—完整种子; 3—被粉碎种子; 4—完整幼苗; 5—被破坏幼苗; 下同。

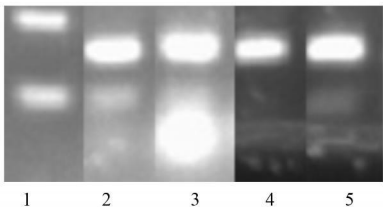


图 2 大豆 PCR 扩增产物检验

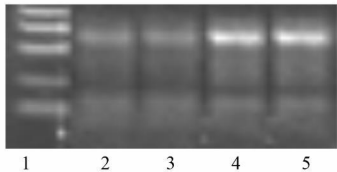


图 3 小麦 PCR 扩增产物检验

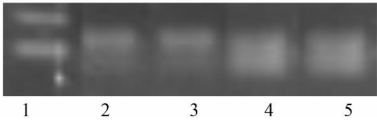


图 4 水稻 PCR 扩增产物检验

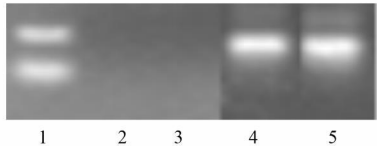


图 5 高粱 PCR 扩增产物检验

4 讨论

NaOH 的作用是破坏细胞壁, 从而使细胞内的遗传物质得到释放, 沸水浴则加快细胞壁破坏的速度和程度, 但提取液的 pH 过高会影响 PCR 扩增, 因此 Tris-HCl(pH8.0)作为 pH 调节的缓冲液被加入使溶有 DNA 的溶液 pH 趋近于 8.0。但同时我们发现, 植物组织附近的溶液 pH 仍然很高, 在加入 DNA 模板的时候, 有很大的几率会抽取到组织附近的溶液而影响 PCR 扩增, 因此我们用沸水浴 1 min 来使组织中残留的 NaOH 与溶液中的 Tris-HCl 得到充分的混合, 使 pH 达到 8.0 左右。

对于玉米和大豆类大籽粒作物, 此方法可简便地用来提取单籽粒 DNA, 但对于小麦、水稻类小籽粒作物, 用此方法从单籽粒中提取的 DNA 量会较弱, 所以若要单籽粒提取 DNA, 建议采用幼苗组织作为提取材料。

高粱种子经过碱煮后会有大量色素出现, DNA 溶液呈黑红色, 并且 PCR 反应无产物, 推断是色素中的某些成分对 PCR 反应产生影响, 具体原理有待于后续的研究。

5 结论

通过对本实验的研究结果分析可得出: 对于本实验所采用的 5 种植物材料, 采用种子作为提取组织除高粱外均可获得好的 PCR 扩增产物, 采用叶片作为提取组织均可获得好的 SSR 标记 PCR 扩增产物。利用此方法, 大大提高了 DNA 提取速度, 节约了药品使用成本, 减少了有毒药品污染。

参考文献:

[1] 刘龙洲, 曲延英. 三种玉米 DNA 提取方法探究[J]. 新疆农业大学学报, 2003, 26(1): 31-33.

[2] 赵艳丽, 刘国琴. 一种快速提取小麦 DNA 的方法[J]. 郑州工程学院学报, 2002, 23(3): 62-65.

[3] 汪秀峰, 杨剑波. 小麦叶片直接用于 PCR 和 RAPD 反应的方法[J]. 遗传, 2002, 24(3): 332-334.

[4] 张凤娟, 张满良. 一种改进的水稻总 DNA 的快速提取方法[J]. 植物检疫, 2004(6): 330-332.

[5] 李余良, 吉田晋弥. RAPD 标记鉴定作物品种单粒种子提取 DNA 方法的改进[J]. 广东农业科学, 2000(3): 15-16.

