



杜艳伟,张煦,李佳男,等.一种简便高效的大豆基因组 DNA 快速提取方法[J].黑龙江农业科学,2022(12):15-18,19.

# 一种简便高效的大豆基因组 DNA 快速提取方法

杜艳伟<sup>1</sup>,张 煦<sup>1</sup>,李佳男<sup>2</sup>,姜振峰<sup>1</sup>

(1.东北农业大学/大豆生物学教育部重点实验室/农业农村部东北大豆生物学与遗传育种重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150030;2.中储粮北方农业开发有限公司,黑龙江 嫩江 161400)

**摘要:**CTAB 或者预混试剂盒是当前提取植物基因组 DNA 的常用方法,提取步骤比较繁琐,提取时间较长且在提取过程中会用到易制毒试剂,具有一定风险性。探索一种适用于植物基因组 DNA 的绿色不易制毒、操作简单、效率高和耗时短的提取技术,不仅可以节省时间,还能提高效率,避免易制毒试剂对人身和环境的危害。基于上述目的,本研究借鉴其他作物快速高效提取基因组 DNA 的方法,基于 NaOH 裂解法建立了一个简便快速提取大豆基因组 DNA 的技术方法。该技术方法能满足常规分子辅助育种的高通量样品基因组 PCR 检测,具有一定的利用价值和应用前景。

**关键词:**大豆;NaOH;DNA 提取;PCR

当前,科研人员对农作物的研究水平和深度正逐渐提高,除了需要调查基础的田间农艺性状外,还要进行更深层次的分子水平研究,以明确性状的调控机理。分子实验操作过程的首要步骤就是提取植物组织 DNA,例如转基因技术、分子标记、基因克隆等都是提取 DNA 为前提<sup>[1-3]</sup>。常规的 DNA 提取工作量较大,耗费时间较长,是后续分子检测的重要限制环节,所以建立一个快速且保证质量的 DNA 提取方法十分必要<sup>[4]</sup>。实验目的不同,实验需要的基因组 DNA 总量也不同。例如,转基因检测、分子标记检测等实验只需要微量 DNA 就可通过 PCR 扩增来达到实验目的<sup>[5]</sup>。因此,可以采用降低样品取样量的方法减少取样时间和试剂消耗,同时配合提取环节技术改进来提高基因组 DNA 提取效率。

现今,提取植物基因组 DNA 的方法主要有预混试剂盒、SDS 法、微波法、CTAB 法<sup>[6-9]</sup>等,其中 CTAB 法是提取 DNA 常用方法之一。CTAB 法提取植物组织 DNA 的成本较低,但实验步骤较繁琐、药品耗量大、提取效率低、耗时长、对人体和环境有潜在危害等特点。试剂盒法虽有操作简易、毒害少、质量高等优点,但其成本较高、且实验时间只是比 CTAB 法相对缩短。此外,还有 Kamiya 和

Kiguchi 提出的钻孔法,孟山都公司的自动无污染种子取样器<sup>[10]</sup>,Zou 等<sup>[11]</sup>开发的试纸条快速提取纯化植物组织 DNA 的方法,以及通过简单的加热、稀释等操作便能提取多个样品组织的 DNA 的方法<sup>[12]</sup>,这些方法虽然简便快捷,但仍需要专用材料,费用较高。因此,对于普通实验室而言,开发一种简单、快速、无易制毒试剂且低成本的提取基因组 DNA 方法显得尤为重要。

本研究在当前降低易制毒试剂使用量背景下,探索了一种绿色无易制毒试剂、操作简单和效率较高的大豆基因组 DNA 提取技术,并以其作为模板进行 PCR 扩增,并对提取效果进行验证。本试验选取大豆育性不同的资源作为材料,利用 NaOH 法提取大豆组织 DNA,与预混试剂盒提取的 DNA 质量进行比较,并检测其浓度;同时以其为模板进行 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳,评价通过两种方法提取出的 DNA 质量是否具有显著差异,结果表明利用 NaOH 法提取的基因组 DNA 可以稳定地进行 PCR 分析。同时,本研究成功提取了大豆不同组织的 DNA,证明 NaOH 法对植物基因组 DNA 提取具有较好的组织适用性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本研究所用植物材料为不育系后代大豆和常规大豆东农 50。将东农 50 大豆种子种植在草炭土:蛭石(1:1)的培养钵中,在温度设定为 28℃,相对湿度为 60%,光照条件为光照 16 h/黑暗 8 h 的培养箱内种植 12 d 左右,待大豆植株三出复叶长出

收稿日期:2022-10-10

基金项目:国家自然科学基金项目(31571693,32172072);黑龙江省自然科学基金项目(LH2021C025)。

第一作者:杜艳伟(1996—),女,硕士研究生,从事大豆遗传育种研究。E-mail:1426562852@qq.com。

通信作者:姜振峰(1976—),男,博士,副教授,从事大豆高产株型及基于不育系的资源创新。E-mail:jzhf@neau.edu.cn。

后提取 DNA。同时,在向阳本科生实验实习基地选取大豆不育系后代材料的嫩叶和豆荚,用于组织 DNA 提取。

主要试剂有 0.5 mol·L<sup>-1</sup> NaOH、100 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl(pH=8)、1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA (pH=8)、*Taq* 酶、琼脂糖和 DNA Maker。

主要仪器有梯度 PCR 仪、组织研磨仪、台式冷冻离心机、电泳槽、照胶仪、4℃冰箱、-20℃低温冰箱、快速光度计。

1.2 方法

1.2.1 样品采集 选取健康大豆植株的幼嫩叶片 0.05 g,用 75%酒精消毒后的镊子夹进灭菌的 1.5 mL 离心管,在管内放 4 粒直径 3 mm 的钢珠,然后放入装有液氮的泡沫箱中。最后用组织研磨仪快速研磨 90~120 s 至粉状,将离心管放回液氮。

1.2.2 NaOH 法 打开离心管取出钢珠后,在粉末中加入 500 μL 的 NaOH(0.5 mol·L<sup>-1</sup>)上下颠倒 3~5 次,直至混匀,静置 10 min。静置完成后,将离心管在 25℃条件下 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min。慢慢取出离心管后,取 10 μL 上清液转移到新的离心管中,加入 90 μL 的 TE buffer (100 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl、1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA) 中和,将 DNA 置于-20℃备用。

1.2.3 试剂盒 选用 OMEGA 公司 D5511 SP Plant DNA Kit 型试剂盒。步骤:(1)准备干燥的样品;(2)将大约 10~30 mg 的样品放到新的离心管中;(3)加入 600 μL SP1 Buffer 和 5 μL RNase A,用涡旋仪混匀;(4)65℃孵育 10 min,期间颠倒混匀两次;(5)加入 SP2 Buffer 210 μL,用涡旋仪混匀;(6)冰浴 5 min,然后 10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min;(7)将上清转移至 Homogenizer Column,离心 2 min;(8)将裂解液吸入至灭菌后的 1.5 mL 离心管;(9)加入裂解液 1.5 倍体积的 SP3 Buffer,涡旋混匀;(10)转移 650 μL 混合裂解液到 HiBind DNA Mini Column 中,离心 1 min,倒掉滤液;(11)重复操作,直到将混合裂解液全部转移过柱;(12)加入 650 μL SPW Wash Buffer 到 HiBind DNA Mini Column 收集管中,离心 1 min,弃滤液;(13)重复步骤(12),用 SPW Wash Buffer 进行第二次洗涤;(14)将 HiBind DNA Mini Column 套入到 2 mL 收集管中,最大速度空柱离心 2 min 干燥;(15)将 HiBind DNA Mini Column 装入灭菌后

的 1.5 mL 离心管中,在吸附柱中央点入 50~100 μL 65℃已预热的 Elution Buffer,静置 3~5 min,最大速度离心 1 min;(16)重复步骤(15);(17)将 DNA 置于-20℃备用。

1.2.4 DNA 浓度测定 用快速分光光度计检测提取的大豆基因组 DNA 浓度,以 TE 缓冲液作为对照。

1.2.5 PCR 反应及电泳检测 本试验选取大豆的可育引物(F:GACGACCTTGTTGAGTCGAGA;R:ATGAAGTTTGATGGTTCACGTACTA)和不育引物(F:GCACCAACCTTCCAAGAGTC;R:GCAACCAAGCAAAAAGAGGA)进行 PCR 扩增。PCR 反应体系见表 1,PCR 程序见表 2。

表 1 PCR 反应体系

组分	每管加入量/μL
模板	2.0
正向引物(10 mmol·L <sup>-1</sup> )	1.0
反向引物(10 mmol·L <sup>-1</sup> )	1.0
<i>Taq</i> 酶	12.5
ddH <sub>2</sub> O	8.5
总体积	25.0

表 2 PCR 程序

温度/℃	时间
94	5 min(预变性)
94	30 s
55	30 s
72	30 s
72	10 min(终延伸)
4	∞(保存)

利用 0.8% 的琼脂糖凝胶进行电泳,检测 PCR 产物的质量。

1.2.6 引物合成与数据分析 SSR 引物由库美生物有限责任公司合成。利用 Excel 2019 对试验数据进行整理和作图。

2 结果与分析

2.1 DNA 浓度检测

对通过 NaOH 法和试剂盒提取出的东农 50 的叶片 DNA 进行浓度检测,结果显示利用 NaOH 法提取大豆 DNA 的量平均为 47 ng·μL<sup>-1</sup>,利用试剂盒提取大豆 DNA 的量平均为 163 ng·μL<sup>-1</sup>。试验结果表明,试剂盒提取大豆 DNA 的量比 NaOH 法提取的量多 3 倍左右(图 1),两种方法提取大豆 DNA 的总量有明显差异。

2.2 PCR 扩增及电泳检测

为验证上述步骤中利用 NaOH 提取的组织 DNA 能否满足 PCR 分子检测的质量需求,本研究利用 NaOH 法和试剂盒对大豆品种东农 50 新鲜幼嫩的叶片组织提取的 DNA 进行 PCR 扩增比较。利用大豆可育基因特异引物扩增 NaOH 法提取的基因组 DNA,并与试剂盒法作对照进行比较。试验结果表明,利用 NaOH 法提取出的基因组 DNA 的 PCR 扩增目标基因条带清晰,与试剂盒提取的基因组 DNA 的 PCR 检测结果一致(图 2)。上述结果表明可以利用 NaOH 法提取大豆基因组 DNA 进行目标基因的 PCR 扩增。

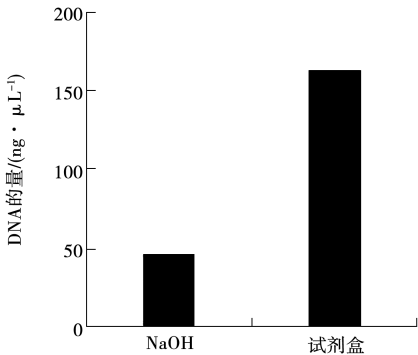
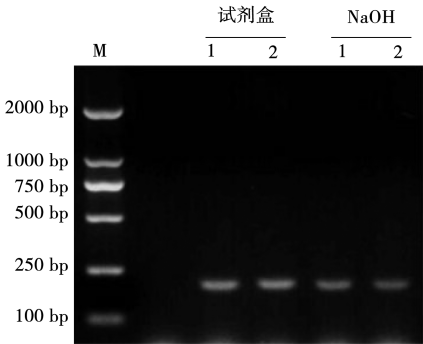


图 1 不同方法提取大豆基因组的 DNA 浓度检测

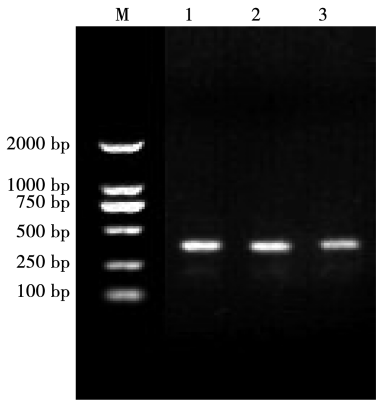


M. DL 2000 Marker; 泳道 1、2. 东农 50 叶片。

图 2 不同方法提取基因组的 PCR 检测

2.3 NaOH 法提取大豆不育系材料叶和豆荚组织 DNA 的 PCR 鉴定

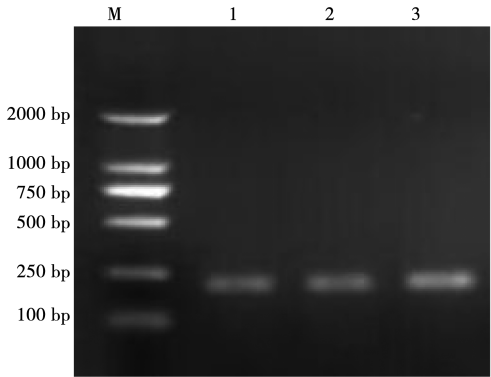
为进一步确定上述步骤中 NaOH 提取及 PCR 检测结果的可靠性,利用 NaOH 法提取 3 份大豆不育系后代材料 DNA 后,利用一对不育引物扩增 NaOH 法提取的 3 份不育系材料叶片 DNA。PCR 检测结果显现出清晰特异的条带,证明 NaOH 法提取的大豆组织 DNA 质量满足不育系后代材料 PCR 鉴定要求,可以利用 NaOH 法提取大豆基因组,并进行不育系大豆后代遗传信息的 PCR 检测(图 3)。



M. DL2000 Marker; 1. 不育系后代 4 号材料叶片; 2. 不育系后代 6 号材料叶片; 3. 不育系后代 8 号材料叶片。

图 3 利用 NaOH 法提取大豆不育系材料叶片 DNA 的 PCR 检测

对通过 NaOH 法提取的大豆不育系后代的可育豆荚组织 DNA,利用可育引物进行 PCR 扩增。结果显示,大豆豆荚组织样品的 DNA 提取效果良好,可作为模板进行 PCR 检测,且 PCR 特异性较强(图 4)。说明 NaOH 法可对大豆荚(图 4)和叶片(图 3)不同组织进行有效的 DNA 提取,对组织样品不具有选择性。



M. DL2000 Marker; 1. 不育系后代 76 号材料的豆荚; 2. 不育系后代 161 号材料的豆荚; 3. 不育系后代 164 号材料的豆荚。

图 4 利用 NaOH 法提取大豆不育系材料豆荚组织 DNA 的 PCR 检测

2.4 两种 DNA 提取方法对比

从表 3 可以看出,提取同一样品的组织 DNA,利用 NaOH 法耗时明显短于试剂盒方法。NaOH 法耗时 0.4 h,而试剂盒约 3.0 h。说明利用 NaOH 法提取 DNA 不仅时间短、使用仪器少且所用试剂容易获取。

表 3 NaOH 法及试剂盒提取大豆 DNA 的对比			
提取方法	仪器	试剂	累计时长/h
NaOH	离心机	NaOH	0.4
试剂盒	离心机,水浴锅	SP(1-3) Buffer, SPW Wash Buffer	3.0

3 讨论

快速有效地进行 DNA 提取是后续 PCR 扩增以及分子检测的前提和基础。本研究提出了一种利用不易制毒试剂快速提取大豆组织 DNA 的方法,并将其与植物 DNA 提取试剂盒的 DNA 提取效果进行对比。两种方法提取 DNA 的过程差异主要有以下几个方面:(1)在时间方面,试剂盒需要多次洗涤,反复涡旋离心静置,其中还包括多次更换离心管,提取过程至少需要 3 h 左右才可完成。且实验样本数量较多时,试验耗时会更长。NaOH 法操作便捷,不需反复涡旋离心洗涤和更换离心管,从而可以节省大量等待时间,整个提取过程只需要 0.4 h,耗时较少。(2)在试剂方面,试剂盒所使用药品需要 5 种。而 NaOH 法使用药品简单,所用药品属于常用药品,价格低,安全性相对较高。(3)在操作方面,试剂盒提取步骤繁多琐碎,在实验中易出现操作失误导致实验失败,而 NaOH 法操作步骤少,可以避免由于复杂的过程而导致失败的风险。(4)DNA 提取效果方面,NaOH 法和试剂盒提取方法得到的 DNA 质量并无明显差别,均能够满足常规 PCR 检测。为检测该方法对植物 DNA 提取的稳定性,本试验同时提取了大豆的豆荚 DNA,并进行 PCR 检测。结果表明 NaOH 法可以稳定地提取植物不同组织 DNA,并应用于 PCR 检测。

本提取方法优点在于无需任何易制毒试剂,无环境污染,且只需一台离心机和 2 个分别装有 NaOH 和 TE 缓冲液的锥形瓶即可完成 DNA 提取,提取成本低。与现有的 DNA 提取相比,减少了操作步骤,节约了时间,降低了样品提取成本,可以高效完成高通量样品的 DNA 提取工作,适合当前经常进行的遗传群体高通量标记分析工作。虽然常用提取法进行 DNA 提取,其 DNA 提取质量好,但某些实验仅需少量 DNA 且对于 DNA 的质量要求并不高。如利用 NaOH 提取 DNA 进行分子检测在菠菜<sup>[13]</sup>、甜菜<sup>[14]</sup>、真菌<sup>[15]</sup>及细菌<sup>[16]</sup>等物种中都展开了一系列应用并获得

成功,这也体现了 NaOH 裂解法在 DNA 提取过程中的优势。

4 结论

本研究建立了一个具有绿色安全、步骤少、低成本和操作简单等优点的大豆 DNA 提取方法,提取的大豆基因组 DNA 可应用于常规 PCR 检测,可节约实验时间及成本,并为后续进行杂交后代选择和分子标记辅助高通量筛选提供帮助,能够促进大豆分子生物学向实用性方向发展,具有广泛的应用前景和利用价值。

参考文献:

[1] 许明,程祖铨,黄志伟,等.一种适于转基因水稻 PCR 检测的微量 DNA 快速提取法[J].生物技术通报,2010(3):128-130.

[2] XIE Y,LI J Y,FAN Z Q,et al. DNA extraction and ISSR primer screening of *Camellia chekiangoleosa* [J]. Agricultural Science & Technology,2011,12(6):825-828.

[3] 刘皓,刘青,吴旭干,等.不同提取方法和不同组织对中华绒螯蟹 DNA 提取效果的比较研究[J].广东农业科学,2014,41(24):147-150.

[4] 苟小清,付振艳,王晓军.一种用于转基因水稻快速检测的 DNA 提取方法[J].安徽农业科学,2012,40(35):17014-17015,17018.

[5] 申恒,刘慧慧,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(6):74-80.

[6] 刘秀丽,吕红,范小峰.两种茄科植物基因组提取方法的比较[J].陇东学院学报,2017,28(1):53-56.

[7] 田永强,苏敏,赵洪林,等.微波法快速提取丝状真菌基因组 DNA[J].中国抗生素杂志,2008,33(11):703-705.

[8] 张宇,唐志鹏,秦荣耀,等.金柑叶片和果实总 DNA 提取方法比较[J].经济林研究,2018,36(1):158-162.

[9] 肖婉钰,孙艺嘉,周贤玉,等.8 种试剂盒的水稻 DNA 提取效果比较研究[J].种子科技,2021,39(18):5-6,12.

[10] 程文,夏正俊,冯献忠,等.一种快速、无损大豆种子 DNA 提取方法的建立和应用[J].植物学报,2016,51(1):68-73.

[11] ZOU Y,MASON M G,WANG Y,et al. Nucleic acid purification from plants,animals and microbes in under 30 seconds[J]. PloS Biology,2017,15(11):e2003916.

[12] 孙林静,马忠友,苏京平,等.一种简单快速的 DNA 提取方法在水稻上的应用[J].天津农学院学报,2007(3):1-4.

[13] 孙稚成,孙兆法,段玉军,等.碱解法快速提取菠菜基因组 DNA 方法的优化[J].中国农学通报,2020,36(36):79-83.

[14] 吴则东,王华忠,倪洪涛.不同碱裂解法快速提取甜菜大群体 DNA 的研究[J].中国糖料,2013(3):32-34.

[15] 王茜,侯飞侠,王艺璇,等.碱裂解法快速提取虫草属真菌 DNA 研究[J].时珍国医国药,2016,27(4):995-997.

[16] 邹治情,王俊玲,陈思,等.改良碱裂解法和煮沸法提取金黄色葡萄球菌 DNA 效果的比较[J].江苏大学学报(医学版),2018,28(3):267-270.



孙红,陈勇. 冬季保护性耕作对稻田土壤酶活性及水稻产量的影响[J]. 黑龙江农业科学, 2022(12):19-23.

# 冬季保护性耕作对稻田土壤酶活性及水稻产量的影响

孙红<sup>1,2</sup>, 陈勇<sup>1</sup>

(1. 四川农业大学 农学院, 四川 成都 611130; 2. 黑龙江省农业科学院 大豆研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

**摘要:**为了合理利用农田,提高土地利用效率,改善稻田土壤环境,促进水稻增产。在连续 2 年大田分区定位试验基础上,以水稻品种 F 优 498 为供试材料,研究了薯-稻(PR)、油-稻(RR)、冬闲-稻(WFR)3 种植模式下稻田土壤酶活性的动态变化及不同种植方式对水稻产量的影响。结果表明,PR、RR 较对照 WFR 相比,可显著提高土壤中过氧化氢酶活性和脲酶活性,水稻整个生长期中过氧化氢酶活性在分蘖盛期和齐穗期达到峰值,2 个时期均是 PR 模式最高,分别为 2.78 和 2.38 mL·g<sup>-1</sup>。3 种耕作模式的脲酶活性均在水稻抽穗期最高,具体表现为 PR>RR>WFR,抽穗期后稻田土壤脲酶活性开始下降,齐穗期至成熟期脲酶活性下降幅度最大。各处理下水稻单位面积的有效穗和产量的变化趋势均为 PR>RR>WFR,PR 和 RR 模式较 WFR 模式分别提高了 14.00%、4.96% 和 7.23%、0.72%。说明 PR、RR 两种保护性耕作模式较 WFR 这种非保护耕作模式能够提高土壤酶活力,增加水稻有效穗数和产量。

**关键词:**保护性耕作;稻田;土壤酶活性

保护性耕作是 20 世纪初,在美国农业生产严重受损时,为了保护农业生产而不断发展起来的一种耕作制度<sup>[1]</sup>。稻田冬季保护性耕作是一种我国的传统农业耕作方式,广泛运用于我国水热

资源丰富,适宜水稻或其他作物复种,能够种植冬季作物的南方稻田区<sup>[2]</sup>。相关研究表明稻田保护性耕作能够涵养水源、提高水分利用率,增加土壤养分含量<sup>[3]</sup>,改善土壤结构、减少土壤的侵蚀破坏,减少有害气体的排放<sup>[4]</sup>。稻田冬季保护性耕作不仅能够提高作物产量节本增收,带动稻田高产高效,同时还是一种兼顾经济效益、生态效益和社会效益,可解决粮食安全和农业结构调整及农民增收等社会问题的种植方式<sup>[5-6]</sup>。

收稿日期:2022-10-06

第一作者:孙红(1991—),女,硕士,农艺师,从事耕作栽培与生理生态研究。E-mail:sunhong\_99@126.com。

通信作者:陈勇(1979—),男,博士,副教授,硕士,从事稻田轮作制度与农业生态研究。E-mail:yongchen@sicau.edu.cn。

## A Rapid Extraction Method for Soybean DNA Without Poisonable Chemicals

DU Yan-wei<sup>1</sup>, ZHANG Xu<sup>1</sup>, LI Jia-nan<sup>2</sup>, JIANG Zhen-feng<sup>1</sup>

(1. Northeast Agricultural University/Key Laboratory of Soybean Biology in Chinese Ministry of Education/Key Laboratory of Soybean Biology and Genetics Breeding of Chinese Agriculture Ministry, Harbin 150030, China; 2. North Corporation of Sinograin, Nenjiang 161400, China)

**Abstract:** Usually, CTAB method or kit and other methods are commonly used to extract plant genomic DNA, but the extraction procedures are often cumbersome, the extraction time is long, and poisonable chemicals will be often used in the extraction process, which has certain risks to our health and surrounding environment. Exploring a green extraction technology suitable for genomic DNA that is not poisonable, simple to operate, high efficiency and short in time can not only save experimental time, but also improve experimental efficiency. The current study uses NaOH to carry out a simple and rapid extraction of soybean DNA. This technology meets the conventional PCR detection and has certain utilization value and application prospects.

**Keywords:** soybean; NaOH; DNA extraction; PCR