

适于 SSR 分析的大豆干种子中 DNA 快速提取

张 伟, 谢甫缙, 宋显军, 曹 萍, 郭玉华

(沈阳农业大学 农学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 为了探寻大豆干种子中的 DNA 快速提取方法, 以 2 个大豆品种的干种子为材料, 在 SDS 提取液中加入蛋白酶 K、NP-40、Tween-20 情况下, 并减少氯仿/异戊醇的抽提次数, 研究对提取 DNA 质量的影响。结果表明, SDS 提取液中加入 3 种试剂后, 即使使用氯仿/异戊醇抽提 1 次, 其 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 值也在 1.8~2.0 之间, 能够满足 SSR 扩增模板的需求。说明此方法既可获得较高纯度的 DNA, 又可大大缩短大豆干种子中的 DNA 提取时间。

关键词: 大豆; DNA 提取; SDS; SSR

中图分类号: S565.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)02-0133-03

Rapid Extraction of Genome DNA from Soybean Dry Seed for SSR Analysis

ZHANG Wei, XIE Fu ti, SONG Xian jun, CAO Ping, GUO Yu hua

(College of Agronomy, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: To develop a rapid DNA extraction method, the quality of DNA was examined with soybean dry seeds as materials, adding proteinase K, NP-40 and Tween-20 to SDS extracting solution, and reducing the chloroform/isoamyl extraction times. The results showed that when adding the three reagents to SDS extracting solution, the OD_{260}/OD_{280} value of DNA was between 1.8 and 2.0 even extracted once by chloroform/isoamyl. Thus, good quality and quantity template DNA suitable for SSR analysis was obtained with reduced time.

Key words: Soybean; DNA extraction; SDS; SSR

生物技术研究的基础是量大而质高的 DNA 提取^[1-4]。以往多数以大豆幼苗叶片为材料提取 DNA^[5-8], 周期较长。若以种子为材料, 不用等待其萌发, 可以随时对其进行 DNA 提取并做相关研究。自从 Chunwongse^[9] 和 McDonald^[10] 以大豆种子为材料提取的 DNA, 利用 PCR 技术成功扩增了 DNA 片段以来, 我国学者以大豆种子为材料, 也提出了一些 DNA 提取新方法, 有的是直接用叶片提取方法来提取种子中的 DNA^[11, 12], 有的则将 SDS 法和 CTAB 法相结合提取种子中的 DNA^[13-16]。虽然这些方法取得了较好效果, 但大都比较繁琐、费时。本研究在 SDS 提取液中加入 3 种试剂, 得到了一种快速、简便、可操作性强的大豆干种子 DNA 快速提取方法。

1 材料和方法

1.1 材料

取 2 个品种沈农 6 号、OhioFG1 的干种子。

1.2 试剂

SDS 提取液: 1.25% SDS, 100 mmol/L Tris-HCl pH 8.5, 50 mmol/L EDTA pH 8.0, 500 mmol/L NaCl。引物由上海生物工程公司合成, SDS、蛋白酶 K、NP-40、Tween-20 等试剂, 购自北京天为时代公司。

1.3 DNA 的提取

参照 Rogers 等^[9]的步骤, 略有改进。提取液中加入蛋白酶 K 的终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, NP-40、Tween-20 的终浓度为 0.5%。提取流程为: (1) SDS 抽提液 2 mL 分别加入容量为 7 mL 离心管, 再加入 1% β -巯基乙醇, 2% PVP。置于 55℃ 恒温水浴锅中保存。(2) 取单粒种子, 去皮后直接研磨, 将研磨好的样品转入预热的 7 mL 离心管中, 轻轻混匀。(3) 55℃ 水浴 30 min, 每 10 min 轻轻摇动混匀。(4) 待样品冷却至室温后, 加等体积氯仿/异戊醇(24:1)溶液, 温和摇动 5 min。(5) 12 000 $\times g$ 离心 10 min, 吸取上清液, 加等体积氯仿/异戊醇(24:1), 温和摇动 5 min, 吸取上清液

收稿日期: 2006-11-20

基金项目: 国家“948”计划项目(2003-Q04)

作者简介: 张伟(1979-), 男, 黑龙江肇东人, 博士研究生, 主要从事大豆产量生理研究

通讯作者: 谢甫缙(1966-), 男, 江西上犹人, 教授, 博士生导师, 主要从事大豆株型育种与栽培研究。

移入另一支 7 mL 离心管。(6) 重复第(5)步 2 次。(7) 小心抽取上清液加入预冷的 2 倍体积的无水乙醇, - 20℃条件下放置 30 min。用玻璃棒拨出沉淀, 转移到 1.5 mL 离心管中。如果样品出现云雾状沉淀, 低速离心(4℃, 12 000×g, 10 min), 收集沉淀。(8) 加 1 mL 70% 乙醇冲洗 2 次, 再用无水乙醇清洗 1 次, 超净工作台上吹干。(9) 加 200 μL TE 缓冲液, 4℃下溶解 DNA。

1.4 DNA 纯度和浓度计算

分别取 20 μL DNA 溶解液, 用 TE 缓冲液稀释 25 倍后, 用紫外分光光度计测其在 OD₂₆₀、OD₂₈₀ nm 波长处的紫外吸收值。当 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值接近 1.8~ 2.0, DNA 纯度符合质量标准。DNA 浓度(μg/mL) = OD₂₆₀ × 50 μg/mL × 稀释倍数。

1.5 DNA 质量检测

电压降 5 V/cm, 溴化乙锭染色, 0.7% 琼脂糖凝胶电泳。电泳后紫外光下观察并照相。

1.6 SSR 扩增检测

PCR 扩增程序: PCR 扩增反应在 TECHNE 公司生产的 TG-512 PCR 仪上进行, 反应体系为: 10× 缓冲液 2.00 μL、2.00 ng/μL 模板 DNA、0.15 μmol/L SSR 引物、150.00 μmol/L dNTPs、1 U Taq 酶、2.0 mmol/L Mg²⁺, 加 ddH₂O 至终体积 20.00 μL。基本程序为: 94℃预变性 10 min; 94℃变性 30 s, 47℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 共 35 个循环; 72℃延伸 10 min, 4℃保存。扩增产物进行 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 70 V 电压电泳 90 min, 改进的 Sanguinetti 银染方法进行银染。

2 结果与分析

2.1 提取 DNA 的纯度和产量

表 1 提取大豆种子中 DNA 产量和纯度
Tab. 1 Yield and purification of DNA extracted from soybean dry seeds

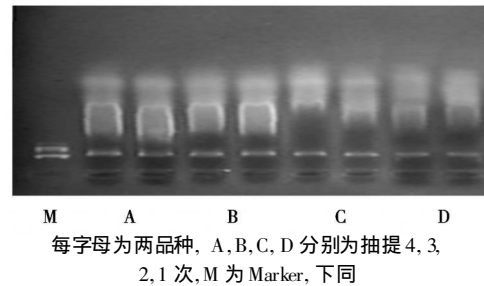
抽提次数 Extracting times	材料 Materials	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	DNA 浓度/(μg/mL) DNA concentration
4	沈农 6 号	0.38	0.21	1.81	940.0
	OhioFG1	0.38	0.20	1.87	957.5
3	沈农 6 号	0.39	0.22	1.82	982.5
	OhioFG1	0.41	0.22	1.86	1 017.5
2	沈农 6 号	0.45	0.24	1.88	1 132.5
	OhioFG1	0.42	0.23	1.84	1 042.5
1	沈农 6 号	0.45	0.23	1.92	1 125.0
	OhioFG1	0.48	0.26	1.88	1 200.0

SDS 提取液中加入蛋白酶 K、NP-40、Tween-20 的情况下, 即使用氯仿/异戊醇抽提 1 次, 两品种提取 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 也在 1.8~ 2.0 之间(表 1), 符合 DNA 的质量标准。从 DNA 的产量上看, 随着抽提次数减少 DNA 的浓度呈下降趋势, 说明随着抽提次数

的增加 DNA 的量要有一些损失, 损失量的大小与其操作者熟练程度有很大关系。

2.2 提取 DNA 的质量

SDS 提取液中加入蛋白酶 K、NP-40、Tween-20 使用氯仿/异戊醇抽提 1~ 4 次情况下, DNA 质量无明显差异(图 1)。虽然在凝胶底部出现了不同程度的小片段产物(主要是降解的小分子 DNA 和 RNA), 但其 DNA 主带清晰一致。



Each letter represents two varieties; A, B, C, D means extracted 4, 3, 2, 1 times, respectively; M: Marker, the same as below

图 1 提取大豆种子中 DNA 的质量
Fig. 1 DNA results from soybean dry seed

2.3 提取 DNA 的 SSR 分析

使用 SSR 引物 Satt082 对提取种子中的 DNA 进行分析, 结果表明, 此方法使用氯仿/异戊醇抽提 1~ 4 次情况下都能得到稳定的谱带(图 2), 完全符合 PCR 的要求。

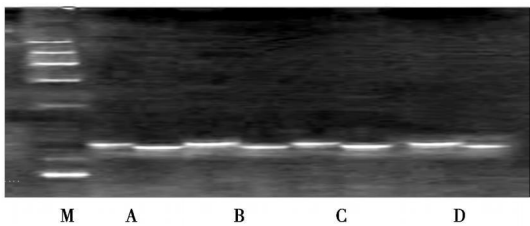


图 2 提取大豆种子中 DNA 的 SSR 分析
Fig. 2 SSR results DNA from soybean dry seed

3 讨论

大豆干种子中的蛋白质含量很高, 占种子干质量的 40% 左右, 所以 DNA 与杂蛋白分离困难, 现有的提取方法虽然取得了一定的效果, 但均比较烦琐、费时。在 SDS 提取液中加入至终浓度为 100 μg/mL 的蛋白酶 K 和 0.5% NP-40、Tween-20 情况下, 只需氯仿/异戊醇抽提 1~ 2 次即可满足 SSR 的分析, 大大节省了大豆干种子中 DNA 提取时间。

NP-40、Tween-20 都是非离子型去污剂, 有利于破坏细胞而释放 DNA。蛋白酶 K 起到酶解蛋白质的作用, 尤其是与 DNA 结合的蛋白质, 提取液中加入蛋白酶 K 后, 在第 3、4 次抽提时已经看不到中间的蛋白层, 抽提效果明显改善。

大豆干种子中的 DNA 提取过程中应注意一些问题: 干种子去种皮后再研磨成粉末状, 可以减少色素等物质的含量, 从而提高所提取 DNA 的质量; 蛋白酶 K 活性的温度范围为 37~ 60℃, 所以水浴温度最好不要超过 60℃, 55℃较适宜; 在氯仿/异戊醇抽提时, 应使氯仿/异戊醇与提取到的上清液反应 5 min 以上再进行离心, 不适宜立即离心, 其间应颠倒离心管数次; 在沉淀 DNA 时, 加入无水乙醇后干种子 DNA 很难聚集沉出, 需要低速离心; 由于 DNA 沉淀呈胶状, 较难转移, 需要用圆头玻璃棒拨出或直接加入适量的 TE 溶液溶解。

参考文献:

- [1] 陈庆山, 刘春燕, 吕 东, 等. 大豆 DNA 提取原理的探讨[J]. 东北农业大学学报, 2004, 35(2): 151– 153.
- [2] 郭景伦, 赵久然, 辛景树, 等. 玉米单株幼芽 DNA 快速提取新方法[J]. 华北农学报, 2005, 20(1): 38– 40.
- [3] 王铁固, 陈彦惠, 吴连成, 等. 利用若干单株混合提取 DNA 方法进行玉米群体 SSR 的分析[J]. 华北农学报, 2005, 20(1): 6– 11.
- [4] 刘殿林, 杨瑞环, 哈玉洁. 黄瓜基因组 DNA 提取与 RAPD 分析[J]. 华北农学报, 2002, 17(4): 9– 12.
- [5] 关荣霞, 常汝镇, 邱丽娟. 用于 SSR 分析的大豆 DNA 的快速提取[J]. 大豆科学, 2003, 22(1): 73– 74.
- [6] 王晓丹, 吕慧颖, 张 敬, 等. 以 PCR 为目的的大豆叶片 DNA 提取方法的比较研究[J]. 分子植物育种, 2004, 2(6): 891– 894.
- [7] 周思君. 小样品大批量大豆模板 DNA 快速分离[J]. 大豆科学, 1999, 18(4): 318– 321.
- [8] Doyle J L, Doyle J J. Isolation of plant DNA fresh tissue focus[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 12: 13– 15.
- [9] Chunwongse, J Martin G B, Tanksley S D. Pre germination genotypic screening using PCR amplification of half seeds[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1993, 86: 694– 698.
- [10] McDonald M B. DNA extraction from dry seeds for RAPD analyses in varietal Identification Studies[J]. Seeds Science and Technology, 1994, 22: 171– 174.
- [11] 杨少辉, 张丽娟, 段会军, 等. 大豆种子 DNA 的提取方法[J]. 大豆科学, 2003, 22(2): 151– 152.
- [12] 铁双贵, 张 莉, 卫 敏, 等. 玉米骨干自交系品质基因 SSR 标记遗传多样性研究[J]. 河南农业科学, 2005(11): 27– 29.
- [13] 田苗苗, 周延清, 牛敬媛, 等. 单粒干燥大豆种子基因组 DNA 提取的有效方法[J]. 生物学通报, 2005, 40(10): 38– 40.
- [14] 徐景升, 姚 伟, 余爱丽, 等. 微量大豆种子基因组 DNA 的快速制备[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(5): 595– 597.
- [15] 王家保, 吴跃进, 余增亮. 用于 PCR 的大豆 DNA 快速提取改良方法[J]. 河南农业科学, 2006(5): 35– 37.
- [16] 刘遵春, 包东娥, 廖明安. 梨基因组 DNA 提取方法比较研究[J]. 华北农学报, 2006, 21(4): 48– 50.
- [17] 郭景伦, 赵久然, 辛景树, 等. 玉米单株幼芽 DNA 快速提取新方法[J]. 华北农学报, 2005, 20(1): 38– 40.