

不同取样方式对 DNA 快速提取效果的影响

易红梅¹, 张 芳^{1,2}, 王凤格¹, 赵久然¹, 陈景堂², 郭景伦¹, 王 璐¹

(1. 北京农林科学院玉米研究中心, 北京 100094; 2. 河北农业大学, 河北 保定 071001)

摘要: 利用快提法对不同取样部位及不同取样时期的样品提取 DNA 并进行 PCR 检测, 结果表明: PCR 扩增效果较好的样品包括种子胚、胚乳、未发芽时的水培初生根和次生根的根尖、发芽 1 d 的胚芽(幼叶)、发芽 1~3 d 的胚芽鞘、以及发芽 3~5 d 的中胚轴; 而发芽后的水培根尖、发芽 3 d 的幼叶、发芽 5 d 的胚芽鞘、发芽 10 d 的中胚轴提取的 DNA 扩增效果较差或没有扩增产物。

关键词: DNA 快速提取; 玉米; 胚; 胚乳

中图分类号: Q781 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)增刊-0114-03

The Infection on the Quick DNA Extraction by Different Sampling

YI Hong mei¹, ZHANG Fang^{1,2}, WANG Feng-ge¹, ZHAO Jiur an¹,
CHEN Jing tang², GUO Jing-lun¹, WANG Lu¹

(1. Maize Research Center, Beijing Academy of Agricultural Forestry Sciences, Beijing 100089, China;

2. Department of Agronomy, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: Different tissues and the optimal time fitting for quick DNA extraction technique were compared. The results showed that the technique was well applied in the following tissues for DNA extraction: embryo, endosperm, radicle cultivated in water, coleoptile germinated 1-3 d, hypocotyl germinated 3-5 d materials. But the DNA extracted from tender leaf, coleoptile, radicle missing optimal time was failed amplification.

Key words: Quick DNA extraction; Maize; Embryo; Endosperm

近年来, 分子标记技术已逐渐被应用于种子纯度检测、标记辅助选择或转基因作物种子检测等研究领域^[1-3], 大大地促进了种子检测和育种技术的发展。然而, SSR 分子标记技术最终能否在玉米品种特异性或种子纯度快速鉴定中应用、普及和推广, DNA 快速提取技术是关键, 利用常规的 DNA 提取方法, 操作步骤复杂, 提取时间长, 已不能满足育种和生产经营商业化的玉米品种特异性或纯度室内快速鉴定的需要, 特别是室内检测和田间一对一的植株生长不冲突的前提下, DNA 的快速提取极大的影响了室内鉴定在玉米 DNA 指纹库构建和分子标记辅助育种中的应用。因此, 玉米 DNA 快速提取方法仍是国内外学者研究的热点。

本研究的目的是针对郭景伦等^[4]提出的快速提取法, 进一步比较不同取样部位及取样时期提取的 DNA 对 SSR 检测效果的影响, 确定适于毛细管电泳荧光检测系统要求的最佳取样方式, 为建立高通量

的玉米 DNA 指纹鉴定平台提供重要的前提和基础。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试玉米材料为我国常用玉米杂交种农大 108。

1.1.1 DNA 提取方法 采用玉米单粒种子 DNA 快速提取法^[4]: 将样品分别放入 96 孔深孔板中, 每孔加入 150 μ L DNA 提取液(0.1 mol/L NaOH), 沸水加热 8 min, 然后每孔再分别加入 150 μ L TE 缓冲液(pH2.0), 直接取 2 μ L 进行 SSR 扩增, 或 4 $^{\circ}$ C 保存。比较了不同取样部位(胚、胚乳、水培初生根、水培侧根、胚芽鞘、中胚轴、幼叶)及不同取样时期(未发芽及发芽 1, 3, 5, 10 d)提取的 DNA 的扩增效果, 以确定快提法的适用范围。

1.1.2 PCR 扩增及电泳检测 从本实验室筛选确定并重新设计的 20 对多态性高、扩增效果好的 SSR

收稿日期: 2007-03-16

基金项目: 北京农业育种基础研究创新平台, 北京市自然科学基金项目(YZPT02-06)

作者简介: 易红梅(1982-), 女, 湖北荆州人, 硕士, 主要从事玉米生物技术应用研究

张 芳(1981-), 女, 河北邢台人, 在读硕士, 主要从事玉米遗传育种研究

通讯作者: 赵久然(1962-), 男, 研究员, 北京人, 博士, 主要从事玉米遗传育种及栽培研究

陈景堂(1967-), 男, 河北平泉人, 教授, 硕士, 硕士生导师, 主要从事玉米遗传育种研究工作。

核心引物中选取^[5], 引物由上海英骏公司合成。

SSR 扩增反应体系为: 20 μ L 反应液中包括: 10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 0.001% Gelatin, 2.5 mmol/L MgCl₂, 0.16 mmol/L 4dNTP, 0.25 μ mol/L SSR 引物, 1 单位 Taq DNA 聚合酶, 2 μ L DNA 模板。

反应程序采用 68–94 二步法扩增: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 1 个循环; 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 68 $^{\circ}$ C 退火 35 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 扩增在 PTC – 100 PCR 仪 (MJ Research, Watertown, MA) 上进行。

比较了快提法提取的 DNA 的扩增产物在两种电泳检测系统上的检测效果, 其一是常规 PAGE 凝胶电泳结合快速银染法, 方法见王凤格等^[6]; 其二是毛细管电泳结合五色荧光检测法, 仪器采用

ABI3730XL 遗传分析仪。

2 结果与分析

2.1 不同取样部位和取样时期提取 DNA 对 PCR 扩增的影响

利用快提法对不同取样部位及不同取样时期的样品提取 DNA 并进行 PCR 检测, 结果汇总在表 1。PCR 扩增效果较好的样品包括种子胚、胚乳、未发芽时的水培初生根和次生根的根尖、发芽 1 d 的胚芽 (幼叶)、发芽 1~3 d 的胚芽鞘、以及发芽 3~5 d 的中胚轴, 提取的 DNA, 而发芽后的水培根尖、发芽 \geq 3 d 的幼叶、发芽 \geq 5 d 的胚芽鞘、发芽 \geq 10 d 的中胚轴提取的 DNA 扩增效果较差或没有扩增产物。

表 1 不同取样部位和取样时期提取的 DNA 的检测结果

Tab.1 Testing result of different tissues and sampling time

不同取样部位 Different tissues	不同取样时期 Different sampling time				
	未发芽 Ungemination	发芽 1 d 1 d after germination	发芽 3 d 3 d after germination	发芽 5 d 5 d after germination	发芽 10 d 10 d after gemination
幼叶 Tender leaves		++ (胚芽)	+	+	-
幼嫩胚芽鞘 Tender coleoptile		++	++	+	-
幼嫩中胚轴 Tender mesocotyl			++	++	+
幼嫩根尖 Tender root tip	++ (水培)	+	+	-	-
胚 Embryo	++				
胚乳 Endosperm	++				

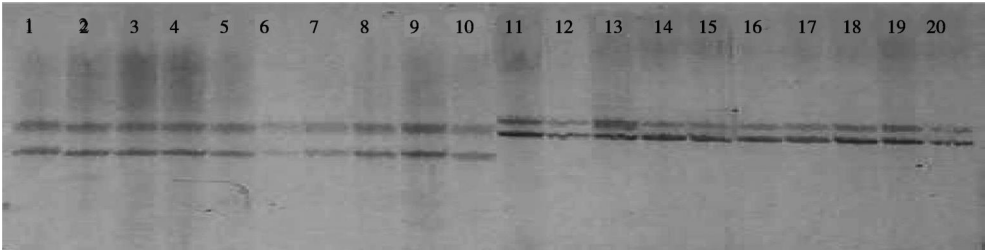
注: ++ : 扩增正常; + : 扩增带弱或重复性差; - : 未扩出和扩增效果差; 其他没有设计试验

Note: ++ : good effect; + : bad effect or bad repeatability; - : no band ; blank: no experiment

分析不同取样时期和取样部位 DNA 提取效果产生差异的原因, 我们认为样品组织的老嫩是影响 DNA 提取效果的最大因素。由于快提法提取 DNA 的产率比常规的方法低, 且 DNA 未进行纯化, 因此组织越幼嫩, DNA 提取效果越好。对未发芽的种子而言, 胚和胚乳均适于取样; 对发芽的材料而言, 处于生长点部位的组织, 细胞壁薄, 利用煮沸的方法就能够破壁, 细胞分裂旺盛, 单位体积内 DNA 的浓度高于其他部位; 且组织内含有的次生代谢物少, 影响 PCR 扩增的抑制物浓度较低, 因此也适于取样。随着组织的生长和分化, 细胞壁变厚, 细胞分裂缓慢, 并且积累了一定的次生代谢物, 如叶绿素、多糖等, 煮沸法获得的 DNA 产率低且纯度低, 影响 PCR 扩增效果。

根据上述研究结果, 提出快提法的应用策略:

要求取样后继续生长。可选的取样部位为: 胚乳、未发芽时的水培初生根和次生根的根尖、发芽 1 d 的胚芽 (幼叶)、发芽 1~3 d 的芽鞘、以及发芽 3~5 d 的中胚轴。试验表明, 最适取样部位为胚乳, 在取胚乳组织时大小要适当, 不要切的过多, 否则会影响种子的生长, 也不宜取的太少, 以至模板太少引起扩增失败, 切下约 1 mm 左右厚度的胚乳组织即可。取胚乳组织检测后的种子仍然能够正常发芽生长, 与未切除胚组织的种子生长情况无明显差异。取胚芽鞘、中胚轴、根尖等组织进行检测, 虽然幼苗能够继续生长, 但由于对幼苗的伤害较大, 影响幼苗的正常生长。取胚的话, 则会造成种子无法发芽生长。



1~5, 11~15 为胚乳 DNA, 6~10, 16~20 为胚 DNA

1~5, 11~15 endosperm DNA; 6~10, 16~20 embryo DNA

图 1 胚乳、胚组织 DNA 快速煮沸法提取 DNA 扩增结果

Fig.1 Amplification result of DNA extracted from embryo and endosperm by boiling method

取样后无需继续生长。可选取样部位除了上述五个部位外,还包括胚。推荐最适取样部位为胚与胚乳,因与切取胚芽鞘、中胚轴、根尖等相比,省略了种子发芽的过程,缩短了总的检测时间。如图 1 所示,胚和胚乳 DNA 快速提取法提取的 DNA SSR 扩增结果清晰可用于室内大批量的快速鉴定。

2.2 快速煮沸法在不同电泳检测系统上的应用效果

利用快速煮沸提取法提取不同玉米品种胚乳 DNA,利用不同 SSR 引物进行检测,结果表明该方法提取的 DNA 适用于不同引物及不同品种,并对不同的检测平台(变性 PAGE 凝胶结合快速银染法检测系统和毛细管电泳荧光检测系统)均适用。

图 2 为利用快提法对两个品种进行一致性检测的 PAGE 凝胶电泳图片,结果表明:扩增谱带扩增清

晰,非特异性扩增不明显,带型容易统计,且没有明显缺管现象。图 3 为快提法提取 DNA 的扩增产物的毛细管电泳图片,引物标记四种不同荧光。图片显示峰值较高,主峰明显,没有明显非特异峰,表明用快速煮沸法提取的 DNA 完全可以用于毛细管电泳荧光检测。

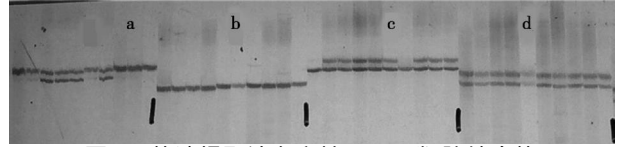


图 2 快速提取法在变性 PAGE 凝胶结合快速银染法检测系统上的应用效果

Fig.2 Effect of DNA extracted by boiling method in degenerative polyacrylamide gel

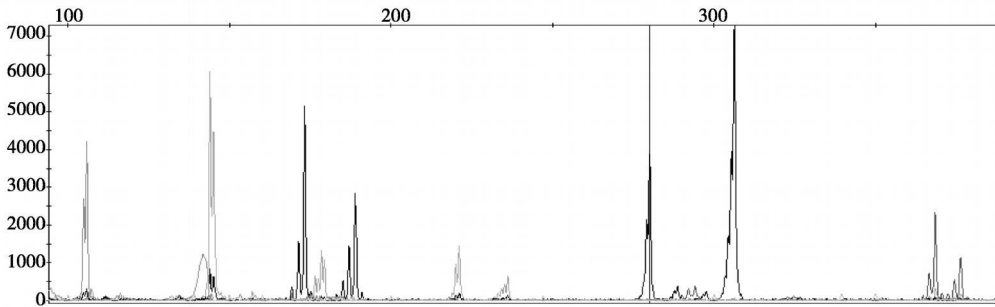


图 3 快速提取法在毛细管电泳荧光检测系统上的应用效果

Fig.3 Applied effects of boiling method in capillary electrophoresis fluorescence detection system

3 讨论

北京农林科学院玉米研究中心承担了“国家区试玉米品种一致性、真实性检测”,每年国家、省区试品种多达上千份,要在短短的几个月时间内保证完成区试样品的一致性和真实性检测工作,最需要解决的问题就是如何提高 DNA 提取的速度。ABI3730DNA 分析仪检测系统的建立为高通量玉米品种 DNA 样品检测搭建了一个平台,而样品 DNA 的准备时间成了提高玉米品种检测效率的瓶颈^[7]。利用传统方法提取 100 株单株幼苗 DNA 需要 8 h,现在利用 DNA 快速提取法提取同样数量的 DNA 只需 30 min,大大缩短了 DNA 提取时间,提高了工作效率,并且容易实现自动化,而且快速提取法操作简单、成功率高、成本低、对人体安全,可以满足利用 SSR 分子标记技术进行玉米品种快速鉴定的需要。利用胚乳 DNA 快速提取法不仅可以大大提高品种的检测效率,并且结合毛细管电泳检测法可以将玉米品种的一致性检测与 DNA 指纹的构建有机地结合在一起。

参考文献:

- [1] 李晓辉,李新海,李文华,等. SSR 标记技术在玉米杂交种纯度鉴定中的应用[J]. 作物学报, 2003, 29(1): 63-68.
- [2] 赵久然,郭景伦,孔艳芳,等. 利用 DNA 指纹鉴定玉米杂交种纯度及其真伪技术的研究[J]. 玉米科学, 1999, 15(2): 1-2.
- [3] 梁荣奇,张义荣,刘守斌,等. 利用 Wx 基因分子标记辅助选择培育糯性小麦[J]. 遗传学报, 2001, 28(9): 856-863.
- [4] 郭景伦,赵久然,王风格. 适用于 SSR 分子标记的玉米单粒种子 DNA 快速提取新方法[J]. 玉米科学, 2005 (2): 16-17.
- [5] 王风格,赵久然,戴景瑞,等. 玉米通用 SSR 核心引物筛选及高通量多重 PCR 复合扩增体系建立[J]. 科学通报, 2006, 23(51): 2737-2745.
- [6] 王风格,赵久然,郭景伦,等. 一种改进的玉米 SSR 标记的 PAGE/快速银检测新方法[J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(5): 606-607.
- [7] Stein N, Herren G, Keller B. A New DNA extraction method for high-throughput marker analysis in a large genome species such as Triticum aestivum[J]. Plant Breeding, 2001, 120: 345-356.