

一种玉米叶片基因组 DNA 快速提取 新方法的初步研究

雷开荣¹, 石春焱², 李明顺³, 李晓辉³, 李新海³

(1. 重庆市农业科学研究所, 重庆市农作物生物工程中心, 重庆 400055; 2. 内蒙古通辽市农业科学院, 内蒙古 通辽 028000;
3. 中国农业科学院作物科学研究所, 农业部作物遗传育种重点开放实验室, 北京 100081)

摘要:在玉米分子标记辅助育种工作中,需要对大量群体的个体样本进行分子标记分析,其中 DNA 的高效快速提取是关键的技术环节。以异硫氰酸胍为主要提取试剂,结合使用组织研磨器(Qiagen TissueLyser),建立了一种玉米叶片基因组 DNA 的快速提取新方法。利用此方法提取玉米叶片基因组 DNA,具有使用药品少、操作步骤简单、快速、成本低、DNA 质量稳定等优点,通常情况下每人每个工作日可以提取 300 个 DNA 样品。此 DNA 提取方法可有效地用于玉米分子标记分析。

关键词:玉米;DNA 提取;异硫氰酸胍;分子标记

中图分类号:S513.01 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2006)02-0010-03

A New Method of Genomic DNA Extraction of Maize

LEI Kai-rong¹, SHI Chun-yan², LI Ming-shun³, LI Xiao-hui³, LI Xin-hai³

(1. Chongqing Institute of Agricultural Sciences, Chongqing Center of Bio-engineering for Crop, Chongqing 400055, China; 2. Inner Mongolia Tongliao Academy of Agricultural Sciences, Tongliao 028000, China; 3. Institute of Crop Science, CAAS, Key Lab of Crop Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture, Beijing 100081, China)

Abstract: A rapid and simple DNA extraction is essential in molecular marker aided selection in maize as a large amount of samples needed for analysis. In this paper, a new method of genomic DNA extraction from maize was established with guanidiniumthiocyanate (GuSCN), an indispensable reagent, combined with use of the Qiagen TissueLyser. This method is less-reagent used, rapid and simple to run, cost-saving, etc. Three hundred DNA samples could be extracted each workday by per capita using this method, revealing that this method can be effectively used in marker analysis of maize.

Key words: Maize; DNA extraction; GuSCN; Molecular marker

随着分子生物学的快速发展,以 PCR 为基础的多种分子标记技术如 RAPD, SSR, AFLP 等已广泛应用于玉米遗传多样性、种质资源评价、指纹图谱建立、性状标记与辅助选择等^[1-3]。在应用分子标记中, DNA 的高效、快速提取是基本环节。迄今,已建立了多种玉米 DNA 提取方法,如 SDS、CTAB 法^[4-7]。这些方法是为适应不同研究目的而建立

的,但尚存在着操作步骤多、程序复杂、耗时较长、研磨不均匀、研磨时需要添加液氮等缺点,在分子标记辅助育种工作中对大样本容量进行分析时,显得尤为突出。目前,在优质蛋白玉米(Quality protein maize, QPM)分子标记辅助选择中,基于 o_2 基因控制的玉米高赖氨酸含量的 SSR 分子标记技术已经建立,并在选育工作中开始应用^[8]。为了及时完成对

收稿日期:2005-12-25

基金项目:农业部 948 计划(2003-Q03-3);国家自然科学基金(30300223);2005 年“西部之光”访问学者计划项目

作者简介:雷开荣(1965-),副研究员,主要从事作物遗传改良与生物技术研究;李新海为通讯作者。

早期分离群体大量样本的 SSR 分子标记鉴定,及时准确的进行目标性状的前景选择,建立以叶片为材料基础的 DNA 快速提取方法是必要的。

本研究以玉米 QPM 群体幼苗至成熟期叶片为材料,在对多种玉米 DNA 提取方法进行比较的基础上,建立了以异硫氰酸胍为主要试剂,并结合组织研磨器(Qiagen TissueLyser)的 DNA 快速提取方法,并探讨了将提取的 DNA 用于玉米 RAPD 和 SSR 分子标记分析的可行性。

1 材料和方法

1.1 供试材料

以玉米 QPM 自交系 CA335、普通玉米自交系中黄 204 及((中黄 204 × CA335) × 中黄 204)BC₁F₁ 群体的幼苗和成熟期叶片为试材,用于 DNA 提取。

1.2 DNA 提取与检测

DNA 提取步骤:(1)将叶片剪成 1 cm² 大小,每 2 mL 圆底离心管中放入 2~3 片,每管放入 3 mm 钢珠 2 粒,加入 5 mol/L 异硫氰酸胍溶液 500 μL;(2)盖紧离心管盖,将离心管放入支架管孔内;用底盖和上盖将支架盖住(注意盖子的方向性);(3)在组织研磨器(Qiagen TissueLyser,由德国 Retsch 公司生产)上以 30 Hz 的频率震荡 30~60 s,交换支架的方向,再震荡 30~60 s,以保证样品研磨的均匀性。(4)加入 4 mol/L NaClO₄ (pH 5.2) 700 μL 混匀,室温放置 10 min。(5)12 000 r/min 离心 5 min,取上清,加入等体积无水乙醇,沉淀 DNA。(6)12 000 r/min 离心 5 min,弃上清。(7)加 1 mL 70%乙醇,洗涤沉淀。(8)12 000 r/min 离心 2 min,弃上清。(9)晾干沉淀或真空抽干,加 50 μL ddH₂O,完全溶解后,-20℃保存备用。

用 PE Lambda35 紫外分光光度计测定 DNA 样品的 A260/A280 比值;取 4 μL DNA 溶液在 0.8% 琼脂糖凝胶中进行电泳检测,用 EB 染色,Bio-RAD 凝胶成像系统拍照。

1.3 SSR 分子标记检测

SSR 引物 Phi057 序列摘自 Maize DB(2002),由上海生物工程公司合成。Taq DNA 聚合酶、d'NTP 等购自北京鼎国生物技术有限公司。

PCR 反应总体积为 10 μL,包括 10 × Buffer(含 20 mmol/L Mg²⁺) 1 μL,d'NTP(25 mmol/L) 0.1 μL,引物(20 μmol/L) 0.13 μL,Taq DNA 聚合酶(2 U/μL) 0.25 μL,DNA 模板 2.5 μL,ddH₂O 6.02 μL。热反应扩增

体系为:94℃变性 2 min,60℃退火 30 s,72℃延伸 50 s,1 个循环;94℃变性 50 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 50 s,35 个循环;在 72℃延伸 5 min。聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染程序参照李晓辉等^[3]方法进行。

1.4 RAPD 分子标记检测

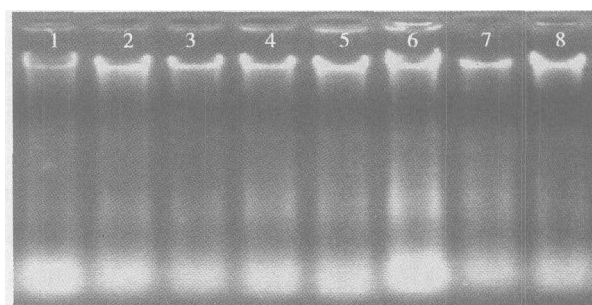
随机引物 OPC6 由上海生物工程公司合成,d'NTP,Taq DNA 聚合酶等购自北京鼎国生物技术有限公司。PCR 反应总体积为 25 μL,包括 2.5 μL 10 × Buffer,0.5 μL d'NTP,0.5 μL Taq 酶,1.5 μL MgCl₂,1 μL Primer,1 μL DNA(10 ng/μL),18 μL ddH₂O。热反应扩增条件为:94℃预变性 3 min,之后,94℃变性 30 s,37℃退火 30 s,72℃延伸 80 s,40 个循环后,再 72℃延伸 7 min。扩增产物在 1.4% 琼脂糖凝胶中进行电泳检测,EB 染色后,在 Bio-RAD 凝胶成像系统上进行图像记录并分析。

2 结果与分析

2.1 DNA 样品的质量检测

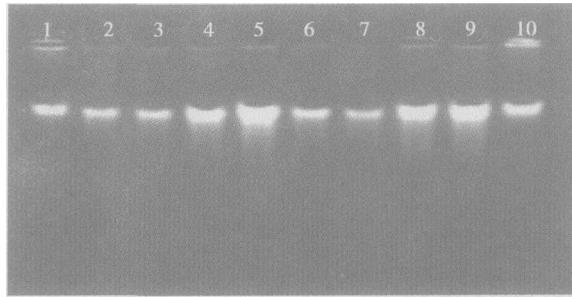
用紫外分光光度计分别测定了 10 个幼苗期叶片和成熟期叶片样品的 DNA 纯度。结果表明,幼苗期叶片 DNA 的 A260/A280 比值为(1.89 ± 0.12),成熟期叶片 DNA 的 A260/A280 比值为(1.93 ± 0.20)。

对样品 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳检测,发现用该法提取的玉米叶片 DNA 均有清晰一致的主带,没有发生明显的 DNA 降解现象(图 1,2)。由于在提取过程中没有去除 RNA,在电泳图中,可以看到明显的 RNA 带。检测结果表明,用异硫氰酸胍法提取的玉米叶片基因组 DNA 具有较高的纯度,符合分子标记分析的要求。



1~8 ((中黄 204 × CA335) × 中黄 204)BC₁F₁ 单株
1~8 individuals from BC₁F₁ population
((zhonghuang204 × CA335) × zhonghuang204)

图 1 用异硫氰酸胍法提取成熟期叶片 DNA 电泳图
Fig.1 Electrophoresis profile of DNA extracted from leaves at maturity time



1 ~ 10 ((中黄 204 × CA335) × 中黄 204)BC₁F₁ 单株

1 ~ 10 individuals from BC₁F₁ population

((zhonghuang204 × CA335) × zhonghuang204)

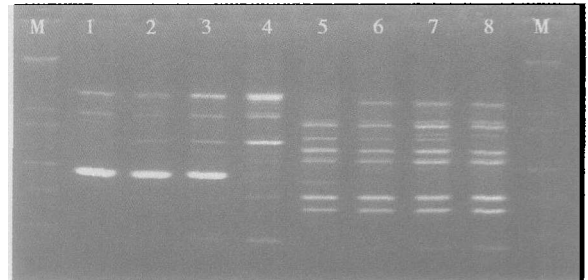
图2 用异硫氰酸胍法提取幼苗期叶片 DNA 电泳图

Fig.2 Electrophoresis profile of DNA extracted
from leaves at seedling stage

2.2 分子标记分析

分别用 RAPD 和 SSR 标记分析对异硫氰酸胍法提取的成熟期叶片 DNA 进行扩增。用随机引物 OPC6 对 DNA 样品进行扩增,能够得到清晰的 DNA 谱带,且不同 DNA 样品间存在带型差异(图 3)。用

SSR 引物 phi057 对玉米 QPM 回交群体中的个体进行 o_2 基因的前景选择,能够清晰地鉴定出纯合显性 O_2O_2 和杂合 O_2o_2 基因型(图 4)。电泳检测结果表明,用异硫氰酸胍法提取的玉米叶片基因组 DNA 可以用于 RAPD 和 SSR 标记分析。



M 分子量标准; 1 CA335; 2,3 中黄 204;

4 ~ 8 ((中黄 204 × CA335) × 中黄 204)BC₁F₁ 单株

M DNA Ladder I (100 bp); 1 CA335; 2,3 Zhonghuang 204;

4 ~ 8 Individuals from BC₁F₁ population ((zhonghuang 204 ×

CA335) × zhonghuang 204)

图3 用 RAPD 法检测用异硫氰酸胍法提取的 DNA 质量

Fig.3 Quality detection of DNA analyzed by RAPD method



M 分子量标准; 1 ~ 51 ((中黄 204 × CA335) × 中黄 204)BC₁F₁ 单株; 52 CA335

M Molecular standard; 1 ~ 51 Individuals from BC₁F₁ population ((zhonghuang204 × CA335) × zhonghuang204); 52 CA335

图4 用 SSR-PCR 法检测用异硫氰酸胍法提取的 DNA 质量

Fig.4 Quality detection of DNA analyzed by SSR method

3 讨论

建立快速、经济、可靠的 DNA 提取技术是育种工作所必须的基本环节。我们在已经建立的基于 o_2 基因控制的高赖氨酸含量分子标记技术基础上^[8], 针对 SSR 分子标记技术特点, 对目前采用的多种玉米 DNA 提取方法进行简化及比较研究, 认为根据研究目标可以建立相应的 DNA 提取技术。

本试验中, 用异硫氰酸胍法可以从玉米幼苗期及成熟期叶片中提取符合试验要求的 DNA, DNA 样品无降解、无缺样, 粗提 DNA 即可用于 RAPD 和 SSR 分子标记分析。

综合分析认为, 利用异硫氰酸胍法并结合组织研磨器提取玉米叶片基因组 DNA 的方法, 具有使用药品少、操作步骤简单、快速、成本低、DNA 质量稳定可靠等优点, 可以在玉米分子标记辅助育种工作中应用。利用该套 DNA 提取技术, 每人每个工作日可以提取 300 个以上的 DNA 样品, 满足了大样本容

量分子标记分析的需要, 为在分离世代进行目标基因的前景选择提供了技术基础。

参考文献:

- [1] 王 斌. 植物细胞工程与分子育种技术研究[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2003. 168 ~ 181.
- [2] 贾继增. 分子标记种质资源鉴定和分子标记育种[J]. 中国农业科学, 1996, 29(4): 1 ~ 10.
- [3] 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.
- [4] 王景雪, 孙 毅, 高武军. 一种简便实用的植物总 DNA 快速提取方法[J]. 山西大学学报(自然科学版), 2000, 23(3): 271 ~ 272.
- [5] 高文伟, 李晓辉, 李新海. 玉米单粒和单叶片 DNA 快速提取及 SSR 标记分析[J]. 玉米科学, 2004, 12(2): 111 ~ 113.
- [6] Edwards K, Johnstone C, Thompson C. A Simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis [J]. Nucleic Acids Research, 1991, 19(6): 1349.
- [7] 张 博, 张 露, 诸葛强, 等. 一种高效的树木总 DNA 提取方法[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2004, 28(1): 13 ~ 16.
- [8] 田清震, 李新海, 李明顺, 等. 优质蛋白玉米的分子标记辅助选择[J]. 玉米科学, 2004, 12(2): 108 ~ 110; 113.