

文章编号: 1005-0906(2004)02-0114-02

# 玉米 DNA 的小量快速提取

杜何为, 黄敏, 张祖新

(长江大学生命科学学院, 湖北 荆州 434025)

**摘要:** 以玉米的幼叶为实验材料, 用小量快速法提取玉米总 DNA。提取的 DNA 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果发现 DNA 质量较好, 所得的 DNA 可用于 RAPD 和 DNA 酶切等技术。此法具有提取速度快、DNA 质量好和经济实用等优点, 为玉米及其他植物 DNA 的提取提供了一个快速、简便的途径。

**关键词:** 玉米; DNA 提取; 小量快速法

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

## A Method on Small-scale and Rapid Isolation of Genomic DNA of Maize

DU He-wei, HUANG Min, ZHANG Zu-xin

*(The Faculty of Life Science, Yangze University, Jingzhou 434025, China)*

**Abstract:** Genomic DNA from maize young leaves was extracted by a new small-scale and rapid isolating method. The extracted DNA was perfect quality, and could be used to RAPD, SSR and RFLP. The method had displayed many fine characteristics such as high efficiency, perfect quality, practicality and so on. It is good way for maize and other plants to extract their genomic DNA.

**Key words:** Maize (*Zea mays* L.); Genomic DNA extract; Small-scale and rapid isolation

在一些分子生物学实验中, DNA 的质量至关重要, 它直接影响到后续实验的进行。植物 DNA 的提取有许多方法, 一步法<sup>[1]</sup>尽管提取速度很快, 但提取的植物 DNA 质量较差, 只能用于 PCR、RAPD 等技术, 不能用于 DNA 酶切、RFLP 等技术; 用传统的 CTAB 法提取植物 DNA<sup>[2]</sup>, 质量很好, 但较费时, 一天只能提取近百份材料, 很难满足 SSR、RAPD 等大规模研究的需求; 用小量快速法可克服以上两种方法的缺点, 既有很快的提取速度, 又能获得较好的 DNA 质量, 提取的 DNA 可用于 SSR、RAPD 及 RFLP 等技术, 是一种比较理想的玉米 DNA 提取方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

玉米 (*Zea mays* L.) 自交系综 31、自 330 和 A188 由湖北农学院生命科学院玉米课题组保存。

收稿日期: 2003-08-01

基金项目: 湖北省教育厅项目(2003B001)

作者简介: 杜何为(1976-), 男, 硕士, 湖北大冶人, 主要从事植物基因工程的研究。Tel: 0716-8083863(H) 8081257(O)

E-mail: dyhewei666@sohu.com

注: 张祖新为本文通讯作者。Tel: 13872242266

E-mail: zux\_zhang@263.net

### 1.2 实验方法

1.2.1 DNA 的抽提方法 本方法是在 Clarke 等人<sup>[3]</sup>的基础上改良而成。

DNA 提取液成分: 10 mM Tris-HCl(pH8.0), 2 100 mM NaCl, 50 mM EDTA, 2% PVP, 2% CTAB, 140 mM  $\beta$ -ME( $\beta$ -ME 在使用前才加)。

实验步骤:

(1) 取 0.2 ~ 0.4 g 玉米幼叶于 1.5 mL 离心管中, 加入 0.8 mL 的提取液, 用电钻研磨(钻头用适当大小的玻璃棒替代, 与 1.5 mL 离心管底接触的一端磨尖, 使玻璃棒能与管底充分接触)。

(2) 65°C 水浴 30 min, 水浴期间要温和摇荡 2 ~ 3 次, 水浴后取出离心管放于室温自然冷却 5 min。

(3) 向离心管中加入 0.8 mL 的异戊醇: 氯仿(1:24), 轻轻摇动 5 min, 然后 5 000 r/min 离心 5 min。

(4) 取上清液于另一 1.5 mL 离心管中, 加入 75  $\mu$ L 的 3 mol/L NaCl 和 1 mL 预冷的无水乙醇沉淀 DNA。

(5) 12 000 r/min 离心 10 min, 去上清液。加 1 mL 70% 乙醇洗, 沉淀 30 min, 倒掉乙醇, 干燥 DNA。

(6) 待 DNA 干燥后, 加 200  $\mu$ L 灭菌的 ddH<sub>2</sub>O(或 TE) 溶解 DNA, 溶解后置于 4°C 条件下保存备用。

1.2.2 RAPD 扩增反应 扩增反应体系为每管 25  $\mu$ L, 其中 20 ng/ $\mu$ L 模板 DNA 3  $\mu$ L, 10 mM RAPD 引

物 1  $\mu\text{L}$ , 10 mM dNTPs 0.4  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$ buffer 2.5  $\mu\text{L}$ , 25 mM  $\text{MgCl}_2$  1.5  $\mu\text{L}$  和 Taq 酶 5 U/ $\mu\text{L}$  0.2  $\mu\text{L}$ , 加 ddH<sub>2</sub>O 至 25  $\mu\text{L}$ , 加矿物油 1~2 滴。

反应扩增程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$  3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 42 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 35 循环; 72 $^{\circ}\text{C}$  10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$  保存。

1.2.3 DNA 酶切反应体系 取 DNA 5  $\mu\text{g}$ , 加入 ECOR I 酶后用移液枪上下缓慢抽吸 2~3 次进行混合, 加 ddH<sub>2</sub>O 至总体积为 20  $\mu\text{L}$ , 然后将反应管放入 37 $^{\circ}\text{C}$  水浴锅中, 过夜。

## 2 结果与分析

### 2.1 小量快速法提取 DNA 的浓度测定

将小量快速法提取的 DNA, 任意取 5 管, 每管取 5  $\mu\text{L}$  用 ddH<sub>2</sub>O(或 TE) 稀释至 1 mL 测定其浓度, 测量结果如表 1。

表 1 小量快速法提取 DNA 的浓度测量结果

材料	A260	A260/A280	DNA 浓度( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
1	0.042	1.840	392.7
2	0.032	1.880	288.3
3	0.047	1.897	420.8
4	0.058	1.923	626.3
5	0.032	1.937	314.4

从表 1 可以看出, A260 nm/280 nm 的比值在 1.8 左右, DNA 浓度介于 0.3~0.63 mg/mL, 说明所提取的 DNA 纯度较高。

### 2.2 DNA 电泳检测

将小量法提取的玉米总 DNA 在 0.8% 的琼脂糖凝胶中电泳, 电泳结果如图 1。

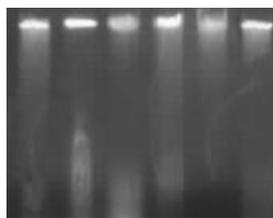


图 1 小量快速法提取的 DNA 凝胶电泳

从图 1 可以看出, 小量快速法提取的 DNA 有清晰的主带, 也有少部分降解, 产生拖尾现象, 但总的来说提取的 DNA 质量较好。

### 2.3 RAPD 分析

将小量法提取的 DNA, 用于 RAPD 扩增, 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果如图 2。

从图 2 可知, 小量快速法提取 DNA 可用于 RAPD 分析, 但由于 RAPD 技术对 DNA 质量要求不高, 故 RAPD 扩增结果不足以说明小量快速法提取 DNA 质量的优劣。

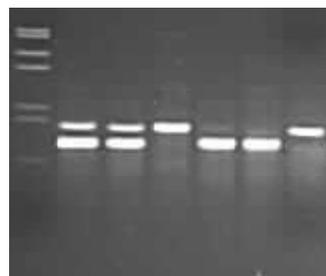
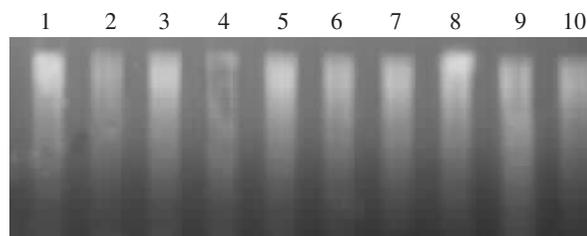


图 2 小量法玉米 DNA 的 RAPD 电泳图

### 2.4 酶切结果分析

将小量法和 CTAB 法提取的 DNA 各取 5 管, 每管取 5  $\mu\text{g}$ , 用 ECOR I 进行酶切, 酶切结果如图 3。



1~5 泳道为小量法提取 DNA 酶切结果; 6~10 泳道为 CTAB 法提取 DNA 酶切结果

图 3 DNA 酶切电泳图

从图 3 可以看出, 小量法提取的 DNA 可用于酶切, 酶切的效果与 CTAB 法提取的 DNA 酶切结果相当, 说明用小量法提取的 DNA 质量较好, 可用于 DNA 酶切、RFLP 等技术。

## 3 讨论

本方法用电钻代替传统的研钵, 极大地提高了 DNA 提取速度, 每人平均每天可提取数百份玉米材料, 并且提取的 DNA 质量较好, 可用于 RAPD、SSR 等大规模研究分析, 也可用于 RFLP 等技术。本方法也可用来提取银杏、水稻、小麦和油菜等植物 DNA, 是一种比较理想的 DNA 提取方法。

使用本方法应该注意以下几点: ①实验材料的叶片或其它组织应越嫩越好, 较老的组织用本方法也可提取 DNA, 但提取的 DNA 质量较差。②提取过程中应注意实验材料的用量, 取材过多, 容易造成实验失败, 一般取 0.20~0.40 g 左右的叶片, 提取效果较好。

### 参考文献:

- [1] 张明永, 孙彩云, 梁承邨. 一步法提取植物 DNA 用于大规模 RAPD 分析[J]. 遗传, 2000, 22(2): 106.
- [2] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理技术[M]. 北京: 北京科学出版社, 1998.
- [3] Clarke B C, Moran L B, Appels R. DNA analysis in wheat breeding. Genome, 1989, 32: 334-339.