

文章编号: 1005-0906(2005)02-0016-02

适用于 SSR 分子标记的玉米单粒种子 DNA 快速提取新方法

郭景伦, 赵久然, 王凤格

(北京市农林科学院玉米研究中心, 北京 100089)

摘要: 研究了玉米单粒种子 DNA 的提取新方法, 利用该方法提取 DNA, 液氮、研磨、离心、沉淀、SDS、CTAB 及氯仿都不用, 一个工作人员提取 100 粒种子(1 个检测样品)DNA 只需 30 min 左右, 一天可以提取 1600 粒种子(16 个检测样品)的 DNA, 并且提取的 DNA 分子量大, 不降解, 完全可以满足利用 SSR 分子标记进行 DNA 指纹分析的需要, 为 DNA 指纹技术在玉米种子纯度及真伪快速鉴定中的广泛应用解决了关键性技术难题。

关键词: 玉米; 单粒种子; DNA 提取; SSR 分子标记

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

A New Rapid DNA Extraction Method from Maize Single Dry Seed Suitable for SSR Analysis

GUO Jing-lun, ZHAO Jiu-ran, WANG Feng-ge

(Maize Research Center, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing 100089, China)

Abstract: A new rapid DNA extraction method from maize single dry seed was studied. It needed no liquid nitrogen, no grinding, no centrifuged, no precipitated, no SDS, no CTAB, no chloroform, et al. It costs about 30 minutes to extract DNA from each of 100 dry seeds, and in a single day, one person can complete DNA isolation from more than 1600 individuals, and the quality of DNA extracted using this method was suitable for SSR analysis. It resolved the critical technique problem of DNA fingerprint widely used in identification of maize seed purity.

Key words: Maize; Dry seed; DNA extraction; SSR analysis

DNA 指纹技术的诞生, 对于玉米种子纯度和真伪鉴定来说, 是一场技术革命, 解决了过去一些玉米品种利用同工酶和蛋白质电泳技术无法进行纯度鉴定的难题。然而 DNA 指纹技术能否得到普及和推广, DNA 快速提取技术是关键, 因此国内外学者一直没有停止对 DNA 快速提取方法的研究。但是目前应用的方法提取时间仍然偏长, 不能适应玉米种子纯度快速鉴定的需要。因此, 本文尝试研究出一种新的玉米单粒种子 DNA 提取方法, 不仅能进一步提高 DNA 的提取速度, 而且提取的 DNA 又能完全满足 SSR 分子标记的需要, 解决 DNA 指纹技术在玉米种子纯度快速鉴定中应用存在的关键性技术难题。

1 材料与方法

(1) 实验材料。京科 15 种子 10 粒, 母本 9853 种子 5 粒, 父本 BA 种子 5 粒。

(2) DNA 提取。将每一粒干种子的胚取下, 分别放入 96 孔深孔板中, 每孔加入 150 μ L 提取液(0.1M NaOH, 0.1% 溴酚蓝), 盖上封口膜, 沸水加热 5 min, 然后每孔分别加入 150 μ L TE 缓冲液(pH2.0), 放在 4℃ 冰箱保存备用。

利用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 溴乙锭染色, 紫外灯下观察照相, 检测 DNA 质量。

(3) 引物。本试验采用的 SSR 引物由上海生工合成。

(4) SSR 反应体系。20 μ L 反应液其中包括: 10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 0.001% Gelatin, 2.5 mmol/L MgCl₂, 0.16 mmol/L 4 d NTP, 0.25 μ mol/L SSR 引物, 1 单位 Taq DNA 聚合酶, 2 μ L DNA 模板。

收稿日期: 2004-11-10

作者简介: 郭景伦(1968-), 男, 山东苍山人, 硕士, 副研究员, 主要从事分子标记辅助玉米遗传育种科研工作。

Tel: 010-51503558 E-mail: gjl671018@126.com

(5)SSR 反应程序。PCR 扩增在 PTC-100 PCR 仪 (MJ Research) 上进行。反应程序为:95℃预变性 2 min,一个循环;94℃变性 40 s,55℃退火 35 s,72℃延伸 45 s,共 30 个循环;最后在 72℃延伸 7 min。

(6)电泳。PCR 产物变性后在 4.5%测序胶上分离。预电泳 85 W,20 min;电泳 80 W,20 min。

(7)银染。10%冰醋酸固定 3 min;双蒸水快速漂洗 1 次,不超过 10 s;0.2%AgNO₃ 溶液染色 5 min;显影液(3%NaOH,0.5%甲醛)显影;10%冰醋酸定影。



1~5 号为母本 9853 的 DNA,6~15 为京科 15 的 DNA,16~20 为父本 BA 的 DNA

图 1 用快速方法提取的 DNA 质量

2.2 SSR 分析结果

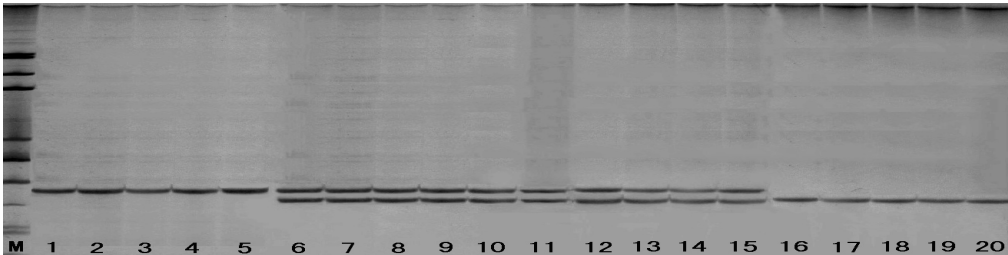
将上述 DNA 一起进行 SSR 分析(图 2),尽管用快速方法提取的 DNA 中含有多种杂质,如多糖、蛋白质、叶绿素等,但是并不影响 PCR 扩增,即对 SSR 分析结果没有影响。从图 2 上可以看出,京科 15 母

2 结果与分析

2.1 DNA 质量

每管吸取 15 μL DNA,分别加入 5 μL 溴酚蓝,用 1%琼脂糖电泳检测 DNA 质量(图 1)。从图 1 中可以看出,虽然用快速提取方法在提取 DNA 的过程中,没有用液氮碾磨,没有用氯仿、SDS 等试剂,没有离心,没有沉淀,但是提取出来的 DNA 却没有降解。

本 9853 和父本 BA 都只有一条带,母本带分子量大,父本带分子量小,而京科 15 的带型为父母本互补,有两条带,带型清晰。因此,用快速方法提取的 DNA 质量完全可以满足利用 SSR 分子标记进行 DNA 指纹分析的需要。



1~5 号为母本 9853 的指纹,6~15 为京科 15 的指纹,16~20 为父本 BA 的指纹

图 2 利用新方法提取的 DNA SSR 分析结果

3 讨 论

利用本文介绍的玉米单粒种子 DNA 提取新方法,提取的 DNA 仍然能够满足 SSR 分析的需要,最关键的是速度快,一个人提取 100 粒种子的 DNA 只需 30 min 左右,一人一个工作日可以提取 1 600 粒种子(16 个种子样品)的 DNA。因此,经过改进 DNA 提取方法,优化 PCR 反应程序,简化银染技术,要分析一个玉米种子样品(100 粒种子)的纯度,从 DNA 提取,到 PCR 扩增,经过电泳,染色,到最后统计出结果,总共只需 4 h 左右。与目前普遍应用的同工酶和蛋白质电泳技术相比,DNA 指纹技术已经成为室内检测玉米种子纯度的最快方法。

虽然利用快速提取新方法提取的 DNA 没有降解,但是由于存在多糖、蛋白质、叶绿素等细胞内含物杂质以及 Na⁺、Tris-HCl、EDTA 等化学物质,因此扩增时 DNA 用量不宜过多,2~3 μL 比较合适,如果 DNA 用量过大,容易造成反应体系中杂质过多,影响扩增,容易发生有些管扩增不出来的现象,并且 DNA 用量越大,缺管数量就越多。

参考文献:

[1] 王玉民,庄丙昌,等. 玉米半粒种子 DNA 提取及 RAPD 分析[J]. 玉米科学,1996,4(3):27-28.

[2] 郭景伦,赵久然,尉德铭,等. 玉米单粒种子 DNA 提取新方法[J]. 北京农业科学,1997,15(2):1-2.

(下转第 25 页)

(上接第 17 页)

- [3] 高文伟, 李晓辉, 李新海, 等. 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.
- [4] McDonld M B. DNA extraction from dry seeds for RAPD analysis in varietal identification studies. Seed Science and Technology, 1994, 22: 171-176.
- [5] Chen D H, Ronald P C. A rapid DNA minipreparation method suitable for AFLP and other PCR applications. Plant Molecular Biology Reporter, 1999, 17: 53-57.
- [6] Csaikl U M, Bastian H, Brettschneider R, et al. Comparative analysis of different DNA extraction protocols: A fast, universal maxi-preparation of high quality plant DNA for genetic evaluation and phylogenetic studies. Plant Molecular Biology Reporter, 1998, 16: 69-86.
- [7] Stein N, Herren G and Keller B. A new DNA extraction method for high-throughput marker analysis in a large-genome species such as *Triticum aestivum*. Plant Breeding, 2001, 120: 354-356.
- [8] 杜何为, 黄 敏, 张袒新. 玉米 DNA 的小量快速提取[J]. 玉米科学, 2004, 12(2): 114-115.