

玉米半粒种子 DNA 提取及 RAPD 分析

王玉民 庄炳昌 邓崇辉

(吉林省农业科学院,公主岭 136100)

摘要 本试验探索了采用半粒玉米种子提取 DNA 并进行 RAPD 分析的方法,结果发现:(1)利用本试验所用方法从半粒玉米种子中提取的 DNA 质量好,分子量大,完全可以用作 RAPD 分析。(2)RAPD 分析的结果表明,仅用 2 个引物就在供试 6 份材料中表现出较好的多态性,说明 RAPD 用于种子纯度及品种鉴定是可行的。本文还对 RAPD 技术和同工酶技术进行了比较,并讨论了此方法在育种中的应用。

关键词 玉米 种子 DNA 提取 RAPD 分析

玉米是世界上主要粮食作物之一,目前在生产上全部使用杂交种。玉米自交系的纯度直接关系到杂交种的质量,而杂交种的质量又直接影响玉米的生产。因此,玉米自交系及杂交种纯度检测对玉米生产具有重要的意义。以往种子纯度鉴定主要利用传统形态学方法、同工酶电泳、种子蛋白电泳等方法。现在同工酶电泳已广泛用于种子纯度检测,但常需几种同工酶同时使用才能获得可靠的结果。随着分子生物学的发展,Williams(1990)的 Welsh(1991)发展了随机扩增多态性 DNA 技术(RAPD),仅仅几年的时间就被广泛应用于分类、进化、基因定位等研究领域。McDonald, M. B. 等利用几种材料种子提取 DNA 并进行 RAPD 扩增,说明 RAPD 可以用于品种鉴定。我们拟通过本试验建立起一套适合于玉米种子纯度鉴定的方法,直接为玉米生产和杂交育种服务。

1 材料和方法

1.1 材料

我们选用了 4 个玉米自交系 Mo17、吉 853、丹 340、新 846,2 个玉米杂交种吉单 180 和吉单 159。

1.2 方法

DNA 提取参照 H. Tai Thomas 的方法,0.7%琼脂糖凝胶电泳检测。

RAPD 反应:反应体系总体积 25 μ l,其中模板 DNA 10ng,200 μ M dNTP,引物 200nM(opron 公司生产),2.5 μ l 10 倍反应缓冲液(100mM Tris-HCl pH=8.3,500mM KCl,20mM MgCl₂,0.001%gelatin,0.1% Np-40),1 单位 Taq DNA 聚合酶,加 2 滴石蜡油防止蒸发。反应循环参数为 94℃1 分钟,35℃2 分钟,72℃2 分钟,5 个循环,然后 94℃30 秒,35℃1 分钟,72℃1 分 30 秒,40 个循环,最后 72℃延伸 10 分钟。

电泳检测:反应产物加 3 μ l 上样缓冲液,1.4%琼脂糖凝胶(内含 0.5 μ g/ml 溴化乙锭)电泳,透式紫外灯下观察并照相。

2 结果与讨论

图 1 表明,用此方法从半粒玉米种子中提取的 DNA 质量较好,可以用作 RAPD 分析。采用此方法有 2 个特点,一是方法简单,每天可提取上百个样品;二是得到的 DNA 量大,半粒玉米种子约可提取总 DNA 5 μ g,可以做 500 次 RAPD 分析。

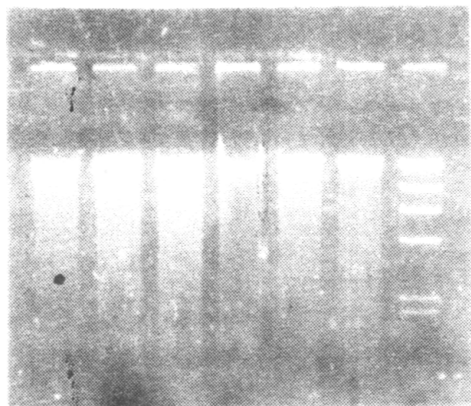


图1 玉米半粒种子总 DNA 从左到右:1. Mo17;2. 吉 853;3. 吉单 180;4. 丹 340;5. 新 846;6. 吉单 159;7. Marker, DNA/Hian II。下图同。

从图 2 可以看到,我们所用的引物 OPG11 和 OPG18 都得到了较好的扩增结果。OPG11 有 9 条带,OPG18 有 6 条带;且多态性较好。引物 OPG11 扩增的 a 带可以将自交系吉 853 和丹 340 与其它供试材料区分开;OPG18 扩增的 b 带,自交系吉 853 没有;OPG18 扩增的 c 带,吉 853 和丹 340 都没有。如果我们采用更多的引物,相信可以取得更好的结果。

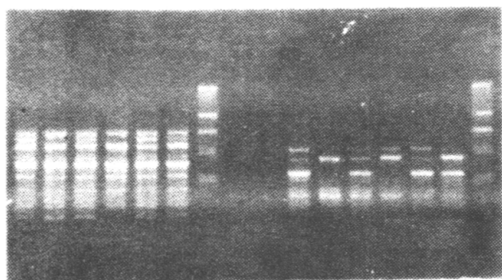


图2 引物 OPG11 和 OPG18 的扩增结果

种子蛋白电泳和同工酶电泳已广泛用于

种子纯度检测和品种鉴定,但由于蛋白质水平上的差异较小,而且能被检测的种类有限,因此具有一定的局限性。选用 RAPD 作为品种和种子纯度检测手段,具有其独特的优越性,首先因为它检测的是基因的碱基组成而不是基因产物,它不受环境条件与发育状况等的影响,具有更高的分辨力和可靠性。其次,目前仅 Oprong 公司生产的引物就有 1000 多种,而现在采用的同工酶只有 20 多种,完全可以区分所有的自交系和杂交种。RAPD 分析的成本约为每样本 8.00 元,比同工酶分析要高,但对于一些难以区分的材料它将是十分有效的。此外,随着一些性状的分子标记的建立,RAPD 分析还可以辅助进行杂种后代的早期筛选,加速育种进程。总之,该技术的建立为玉米育种及种子检验提供了一种新的可靠的鉴定手段。

参 考 文 献

- 1 Wang Chun et al. ,Polyacrylamide gel electrophoresis of salt-soluble proteins for maize variety identification and genetic purity assessment, Seed Science and Technology, 1994, 22: 51-57
- 2 McDonald. M. B. et al. ,DNA extraction from dry seeds for RAPD analysis in varietal identification studies, Seed Science and technology, 1994, 22: 171-176
- 3 Thomas. H. Tai et al. , Plant Molecular Biology Report, 1990, 8(4): 297.
- 4 Williams. J. G. K. , Kubelik, A. R. , Nucleic Acid Research, 1990, 18, 6531.