

用于 PCR 的大豆 DNA 快速提取改良方法

王家保, 吴跃进, 余增亮

(中国科学院等离子体物理研究所离子束生物工程学重点实验室 安徽 合肥 230031)

摘要: 大豆 DNA 的提取是进行大豆分子生物学研究的基础。为了探索方便快捷的适合大豆分子生物学研究的 DNA 提取方法, 在 Aljanabi 和 Martinez 1997 年提出的通用 DNA 快速盐提法的基础上, 调整缓冲液中 NaCl、Tris-HCl、EDTA 浓度, 提出一种适合大豆叶片 DNA 提取的改良盐提方法。该方法具有快速、简易和环境友好的特点。试验表明, 该改良方法所提 DNA 凝胶条带清晰, 无拖尾, 浓度在 $1.5397 \sim 2.1039 \mu\text{g/L}$ 之间, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 检测值在 $1.6913 \sim 1.8025$ 之间, 所提 DNA 适用于 PCR, PCR 结果理想。

关键词: 大豆; DNA 提取; 改良方法; PCR

中图分类号: S565.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2006)05-0035-04

An Improved Method of Soybean DNA Rapid Extraction for PCR Utilization

WANG Jia-bao, WU Yue-jin, YU Zeng-liang

(Ion Beam Bioengineering Laboratory of Plasma Physics Institute, Chinese Academy of Science, Hefei 230031, China)

Abstract: In order to search a rapid, simple method extracting soybean DNA for molecular study, the concentration NaCl, Tris-HCl and EDTA were adjusted based on the method of extracting soybean DNA by Aljanabi and Martinez at 1997. An improved method of DNA salt extraction from soybean leaf was developed, which was rapid, simple and environment amiable. The experiments showed that the quality of DNA extracted by this improved method was much higher, DNA stripes were very clear without tagging, the concentration was $1.5397 \sim 2.1039 \mu\text{g/L}$ and $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ was $1.6913 \sim 1.8025$.

Key words: Soybean; DNA extraction; Improved method; PCR

自从 Kary Mullis 等首次报道 PCR 技术以来^[1], PCR 技术得到迅速的发展, 同时也成为生物研究工作者不可或缺的研究手段, 而 DNA 的提取则是进行 PCR 的前导工作。植物 DNA 的提取方法常用 CTAB 法和 SDS 法^[2], 近来关于大豆 DNA 提取的方法报道也较多^[3~7]。这些方法虽然经典、成熟, 但操作比较繁琐, 而且有些化学成分对环境不太友好, 对操作人员身体有害。因此, 在 Aljanabi 和 Martinez 1997 年提出的通用 DNA 快速盐提法^[8]的基础上, 改良了大豆叶片 DNA 提取方法。改良后的 DNA 盐提方法比较简单且对环境友好, 对操作

人员危害亦相对降低。

1 材料和方法

1.1 材料

试验所用大豆系本实验室自有大豆品系 MY2002-3、Y2002-1、诱豆 101 和南农 88。将大豆幼嫩叶片从田间采下置于放有冰袋的保温盒内带回实验室备用。

1.2 DNA 提取试剂

提取缓冲液: 1.0 mol/L NaCl , $100 \text{ mmol/L Tris-HCl}(\text{pH } 8.0)$, $50 \text{ mmol/L EDTA}(\text{pH } 8.0)$; 20%

收稿日期: 2005-12-20

作者简介: 王家保(1978-), 男, 安徽舒城人, 在读硕士研究生, 研究方向: 大豆复叶发育机理。

的 SDS; 20 mg/ml 的蛋白酶 K; 6 mol/L 的 NaCl; 异丙醇; 70% 酒精和纯酒精。

1.3 DNA 提取步骤

①各称取每个大豆品种叶片样品 100 mg, 用剪刀剪成细条, 放入 1.5 ml 灭菌的 Eppendorf 管中。

②每管加入提取缓冲液 400 μl, 用塑料棒旋转碾碎后加 40 μl 20% 的 SDS 和 8 μl 20 mg/ml 蛋白酶 K, 放在国胜 SZ-1 快速混匀器上振荡混匀 30s。

③将样品放于 65 °C 水中温育 2 h。

④向每管加入 300 μl 6 mol/L 的 NaCl, 振荡混匀 30 s。

⑤严格配平 10 000 转离心 5 min。

⑥将上清转入干净的 Eppendorf 管中, 加入等体积预冷的异丙醇, 轻柔混匀后-20 °C 冰箱放置 1 h。

⑦轻轻挑出絮状 DNA 沉淀, 分别用 70% 酒精和纯酒精各洗一次后, 晾干。

⑧将 DNA 样品溶解于 300 μl 灭菌的蒸馏水中, -20 °C 保存备用。

1.4 DNA 浓度、纯度和质量检测

1.4.1 DNA 浓度的测定和纯度检测 DNA 样品的浓度一般可根据其在 260 nm 的吸收值来确定。50 μg/ml 的双链 DNA 对 260 nm 紫外光的吸收值为 1.0。凡是浓度大于 0.25 μg/ml 的纯净 DNA 样品均可按此关系, 由其 OD₂₆₀ 值求出其浓度, DNA 样品浓度 (μg/ml) = OD₂₆₀ × 样品稀释倍数 × 50/1 000。纯度检测通过 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 来确定。紫外吸收测定所用仪器为北京普析通用仪器公司的 TU-1901 型双光束紫外可见分光光度计。

1.4.2 DNA 质量的琼脂糖凝胶电泳检测 各取 6 μl DNA 样品和大约 1 μl 的 Loading dye, 混匀后在含有 EB(溴乙锭), 质量浓度为 20 mg/ml 的 7% 琼脂糖凝胶上电泳, 电泳电压 100 V。检测使用 Marker 为上海生工生物工程技术有限公司 M0321。电泳 50min 后用 Tanon Gis-1000B 型凝胶成像系统检测拍照。

1.5 PCR 扩增

1.5.1 随机引物扩增反应 随机引物扩增反应使用 25 μl 反应体系, 每管加入 Buffer 2.5 μl, 随机引物 0.5 μl, DNA 模板 0.5 μl, MgCl₂ 2 μl, dNTP 0.5 μl, Tag 酶 0.2 μl, 18.8 μl ddH₂O。其中随机引物为本实验室从备有的上海生工生物工程技术有限公司 2 000 多条引物中随机挑选的 1 条。扩增反应仪器为德国培肯公司 Eppendorf 的 Mastercycler

Gradient, 反应程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s; 37 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 90 s; 返回步骤②并循环 34 次; 72 °C 延伸 10 min; 4 °C 保存。扩增结果检测同上述 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测, 只是凝胶浓度为 1.2%。

1.5.2 特异引物扩增反应 特异引物扩增使用 50 μl 反应体系, 每管加入 Buffer 5.0 μl, 引物 1、引物 2 各 0.8 μl, DNA 模板 1.0 μl, MgCl₂ 4 μl, dNTP 1 μl, Tag 酶 0.4 μl, 37.0 μl ddH₂O。其中特异引物为委托上海生工生物工程技术有限公司合成的, 用于扩增与叶发育相关的 PHAN 基因, 该引物对的设计是使用 Primer 5 软件根据 GeneBank 中报道的 PHAN 的 CDs 设计的, 设计扩增片段大小为 989 bp。反应同随机扩增, 只是退火温度为 58 °C, 扩增结果检测也相同。

2 结果与分析

2.1 DNA 浓度和纯度测定结果

表 1 和表 2 的数据为 3 次测量的平均值。由表 1 可以看出, 该改良方法提取 DNA 的浓度基本能满足 PCR 要求。由表 2 可以看出, 4 个样品的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值在 1.6913 ~ 1.8025 之间, 这表明 DNA 质量较好, DNA 受损程度不高且比较纯, 蛋白质、酚类及多糖类杂质去除较完全。纯的 DNA 溶液其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值应为 1.8, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值大于 1.9 时, 表明有 RNA 污染, 小于 1.6 表明有蛋白质或酚污染^[2]。

表 1 大豆叶片提取 DNA 浓度检测

品种名称	DNA 浓度(μg/L)
M Y2002-3	1.5397
Y2002-1	1.9767
诱豆 101	2.0106
南农 88	2.1039

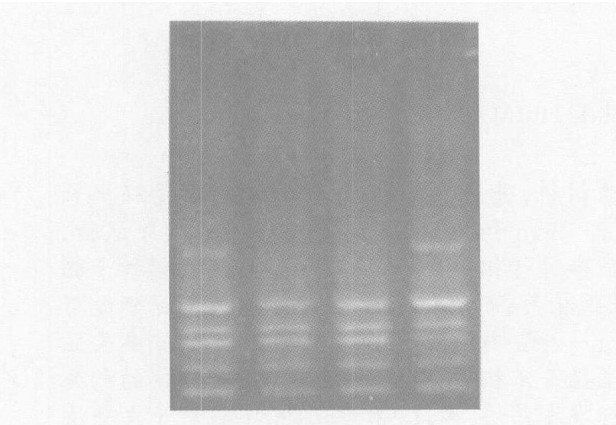
表 2 大豆叶片提取 DNA 纯度检测

品种名称	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀
M Y2002-3	1.7601
Y2002-1	1.7637
诱豆 101	1.8025
南农 88	1.6913

2.2 琼脂糖凝胶电泳检测

提取 DNA 的质量好坏, 通常用琼脂糖凝胶电泳检测。从图 1 可以看出, 该改良方法所提大豆叶片基因组 DNA 质量较好, 主带较清晰, 2, 3, 4 条带皆较 Marker 亮, 只是第 1 条带较弱, 因为表 1 显示该条带样品中 DNA 含量较少, 所有电泳条带拖尾

现象不明显,在凝胶电泳图的底部基本没有 DNA 或 RNA,DNA 降解较少。

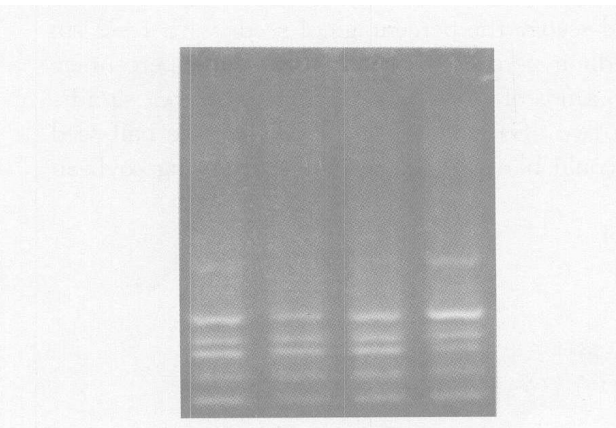


1 为 MY2002-3; 2 为 Y2002-1; 3 为诱豆 101; 4 为南农 88;
M 为上海生工生物工程公司 DNA Marker

图 1 DNA 样品琼脂糖凝胶电泳图

2.3 PCR 结果

基因组 DNA 是否可用,可通过 PCR 扩增进行验证。图 2 和图 3 分别为 4 个样品 DNA 的随机引物扩增和特异引物扩增结果。由图 2 和图 3 可以看出,使用该改良方法提取的 DNA 用于 PCR 比较理想,扩增条带较清晰。其中特异引物扩增结果更能说明该改良方法提取的 DNA 能很好地用于 PCR 反应,我们将特异扩增的 PCR 反应原液经纯化试剂盒纯化后,可直接交由测序公司进行测序反应,用于进一步研究。

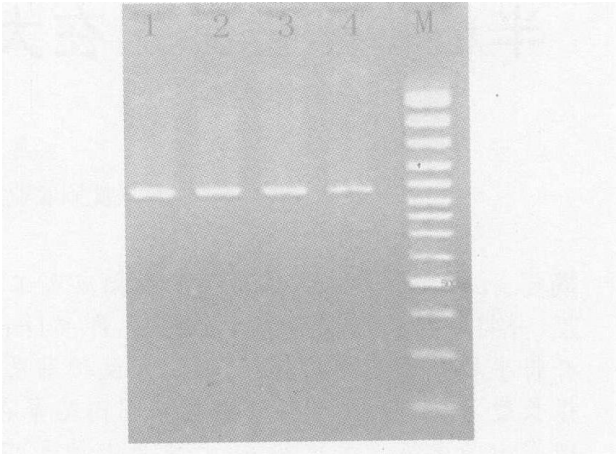


1 为 MY2002-3; 2 为 Y2002-1; 3 为诱豆 101; 4 为南农 88

图 2 DNA 样品随机引物扩增图

3 讨论

分子生物学的发展,对植物 DNA 提取技术的要求是快速、简便。本研究主要报道基于 Aljanabi 和 Martinez 1997 年提出的通用 DNA 快速盐提法而



1 为南农 88; 2 为诱豆 101; 3 为 Y2002-13; 4 为 MY2002-3;
M 为上海生工生物工程公司 DNA Marker SM0321

图 3 DNA 样品特异引物扩增图

改良的大豆 DNA 提取方法。该方法省略了液氮中研磨的操作而简化了操作步骤,同时避免了使用酚/氯仿抽提,进而减少了酚/氯仿对实验人员的伤害。

本试验中,DNA 提取缓冲液成分较原报道有所变动,增加了 NaCl、Tris-HCl 和 EDTA 的浓度。彭玉华等认为 1.0 mol/L 的 NaCl 在减少 DAN 降解的同时可以清除严重降解的 DNA,是大豆叶片 DNA 提取的理想条件^[3]。EDTA 可以螯合金属离子,而某些金属离子对酶类的活性是至关重要的,如 Mg^{2+} ,如果酶不能与金属离子结合,酶就失去了活性,核酸酶类也是如此,所以 EDTA 可避免提取 DNA 时核酸酶类污染,造 DNA 的降解。

Aljanabi 和 Martinez 认为,65 °C 水浴时间可以超过 1 h 甚至过夜。我们认为温育时间过长对 DNA 质量影响较大,很多色素、酚类物质会严重影响 DNA 质量。另外,在提取经异丙醇沉淀的 DNA 时,没有使用离心方法,而是用玻璃棒挑出,这样可以减少杂质和 DNA 一起沉淀形成污染而影响 DNA 质量。

参考文献:

[1] Saiki R K, Scharf S, Faloona F, *et al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia[J]. Science, 1985, 230: 1350-1354.

[2] 王关林,方宏筠. 植物基因工程(第 2 版)[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 742-744.

[3] 彭玉华,王晓琳. 以 PCR 为目的的大豆叶片 DNA 快速分离方法[J]. 中国油料作物学报, 1996, 18(4): 34-36.

半粒种子发芽法在大豆种子活力测定中的应用

郝 雪, 王 玺*

(沈阳农业大学, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 以 10 个大豆品种新种子和相应人工老化种子为材料, 进行半粒种子发芽试验, 测量胚根长度, 并将胚根长度划分为 4 个范围, 即 $<1\text{cm}$ 、 $1\sim2\text{cm}$ 、 $2\sim3\text{cm}$ 和 $\geq3\text{cm}$ 。同时进行标准发芽试验, 并将半粒种子发芽试验、标准发芽试验结果与田间出苗率进行相关分析。结果表明: 大豆新种子胚根长度 $\geq3\text{cm}$ 的种子百分数与田间出苗率存在极显著正相关; 而胚根长度 $<1\text{cm}$ 的种子百分数与田间出苗率呈显著负相关; 大豆老化种子胚根长度在 $1\sim2\text{cm}$ 内的种子百分数与田间出苗率呈显著正相关。新种子、老化种子的发芽势与田间出苗率呈显著正相关, 而发芽率与田间出苗率的相关性则未达到显著水平。可见, 半粒种子发芽法稍优于标准发芽法, 因此, 初步认为, 半粒种子发芽法作为大豆种子活力测定的一种方法, 具有可行性。

关键词: 大豆; 半粒种子发芽; 种子活力

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2006)05-0038-04

Half-seed Germination Method for Testing Soybean Seed Vigor

HAO Xue, WANG Xi*

(Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: The new seeds and artificial-aged seeds of ten varieties of soybean were used in this experiment to study the correlation between radicle length and field emergence by half-seed germination and standard seed germination. Radicle length was divided into four ranges: $<1\text{ cm}$, $1\sim2\text{ cm}$, $2\sim3\text{ cm}$ and $\geq3\text{ cm}$. The results showed as followings: For new seeds, there was significant correlation between the percentage of seeds producing $\geq3\text{cm}$ radicle length and the field emergence percentage, while was significantly negative correlation between the percentage of seeds with $<1\text{cm}$ radicle length and the field emergence percentage all at 0.01 level; for the aged seeds, the percentage of seeds with $1\sim2\text{ cm}$ radicle length significantly correlated with the field seedling percentage; the field seedling percentage positively correlated with the germination energy of two kinds of seeds at 0.05 levels, but not significantly correlated with the germination rate of the both two. So it was considered that the half-seed germination was slightly better than standard test and could be used as a method for testing soybean seed vigor.

Key words: Soybean; Half-seed germination; Seed vigor

收稿日期: 2005-12-05

作者简介: 郝 雪(1981-), 女, 辽宁盘锦人, 在读硕士研究生, 主要从事种子生理方面的研究。

通讯作者: 王 玺(1963-), 男, 辽宁沈阳人, 教授, 博士, 主要从事种子学教学与科研工作。

E-mail: wangxi-sn2008@tom.com

[4] 周思君. 小样品大批量大豆模板 DNA 快速分离法[J]. 大豆科学, 1999, 18(4): 318-321.

[5] 关荣霞, 常汝镇, 邱丽娟. 用于 SSR 分析的大豆 DNA 的快速提取[J]. 大豆科学, 2003, 22(1): 73-74.

[6] 王小丹, 吕慧颖, 张敬, 等. 以 PCR 为目的的大豆叶片 DNA 提取方法的比较研究[J]. 分子植物育种, 2004, 2(6): 891-894.

[7] 陈庆山, 刘春燕, 吕东, 等. 大豆 DNA 提取基本原理的探讨[J]. 东北农业大学学报, 2004, 35(2): 129-134.

[8] Salah M. Aljanabi and Iciar Martinez, Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(22): 4692-4693.