

小麦干种子基因组DNA的提取及效果研究

王红梅, 厚毅清, 欧巧明

(甘肃省农业科学院生物技术研究所, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 分别采用试剂盒和CTAB法提取小麦干种子基因组DNA, DNA样品经紫外光谱吸收、琼脂糖凝胶电泳、PCR扩增检测。结果表明, 试剂盒提取DNA操作过程快速简便、成本较低, DNA产率和纯度优于CTAB法。通过多重PCR技术分别以小麦LMW-GS亚基Glu-B3位点和黑麦碱secalin-p基因的特异引物进行扩增, 均能够扩增出清晰的目标条带, 提取的基因组DNA能够满足分子检测的实验要求。

关键词: 小麦; 干种子; 基因组DNA; 提取效果

中图分类号: S512.1; Q781 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1463(2014)10-0013-03

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2014.10.005

Study on the DNA Extraction Effects from Dry Seeds of Wheat

WANG Hong-mei, HOU Yi-qing, OU Qiao-ming

(Institute of Biotechnology, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China)

Abstract: Two rapid DNA isolation methods from dry seeds of wheat was established by DNA extraction kit and CTAB in this study. The DNA samples were detected in terms of the UV spectrophotometer analysis, agarose gel electrophoresis, PCR amplification respectively. The results indicates that the method with DNA Extraction Kits was simple, rapid and low costs, the extraction rate and purity of DNA was better than that of the CTAB. Using the DNA samples as template, the Glu-B3 locus of wheat LMW-GS and ω -secalin gene of triticale could be amplified with distinct and specific target bands by multiplex PCR. The genomic DNA extracted from dry seeds of wheat can meet the needs of molecular tests.

Key words: Wheat; Dry seeds; Genomic DNA; Extraction effects

小麦是我国主要粮食作物之一, 目前关于小麦分子生物学方面的研究日益深入, 先进技术如基因克隆与转化、遗传图谱构建、特定基因型检测、分子标记辅助育种及DNA指纹数据库构建等在小麦育种中广泛应用^[1-6]。高质量DNA的提取是在分子水平上对植物进行系统分析与研究的基础, 关于植物基因组DNA提取的方法有很多^[7-8], 但多数需要以植物新鲜组织为材料提取基因组, 这就需要在植物生长季节取样或通过室内培养提供, 并且需要液氮研磨, 存在步骤多、耗时长等

缺点。植物干种子在常温下可稳定保存, 用种子提取DNA不受季节和形态的限制, 具有极大的便利性^[9-11]。我们以小麦干种子为实验材料, 分别采用试剂盒和CTAB法提取基因组DNA, 并对DNA产率、纯度和提取成本进行了对比分析, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

供试小麦种子由甘肃省农业科学院小麦研究所提供。植物基因组DNA提取试剂盒DP305和

收稿日期: 2014-07-08

基金项目: 甘肃省农业科学院农业科技创新专项“甘肃小麦品种资源IBL/IRS易位系的分子标记检测研究”(2012GAAS06-4)、甘肃省农业生物技术研究与开发项目“持久条锈病抗源BJ144抗锈基因发掘及抗锈小麦新品系的培育”(GNSW-2011-07)、甘肃省科技支撑计划项目“小麦5B染色体基因组抗锈基因关联分析及抗锈新品系培育”(1304NKCA142)部分内容

作者简介: 王红梅(1972—), 女, 甘肃灵台人, 助理研究员, 主要从事农业生物技术应用研究。联系电话: (0)13893659623。E-mail: 676640934@qq.com

进一步改良利用。

2) 2013年春小麦生长发育期寡照、多雨、热量高中有降, 但也变化多端, 特别是3月高温无雨, 7月上旬多雨寡照均创造临夏有记载以来的历史之最, 造成个别品系的倒伏, 致使小麦抗病性不能

充分体现, 在小麦生长期对条锈病免疫和近免疫的品系表现不太明显, 而赤霉病感染较明显, 发病率高, 籽粒灌浆也受到一定的影响, 总的来说当年的气候对小麦生长不利。

(本文责编: 陈珩)

表 1 多重 PCR 扩增引物和扩增条件

基因 (位点)	引物序列 (3'-5')	扩增片段大小 (bp)	参考文献	扩增条件
Sec-P	F: ACC TTC CTC ATC TTT GTC CT R: CCG ATG CCT ATA CCA CTA CT	1 076	Chai, <i>et al</i>	94 °C 变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 34 个循环, 72 °C 延伸 10 min。
Glu-B3	F: GGT ACC AAC AAC AAC CC R: GTT GCT GCT GAG GTT GGT TC	630	Van Campenhout S, <i>et al</i>	

DNA Marker V 购自北京天根生化科技有限公司, PCR 扩增引物由 invitrogen 北京生物科技有限公司合成, Taq DNA 聚合酶、RNA 酶、dNTP 等生化试剂均购自中科瑞泰(北京)生物科技有限公司, CTAB、Tris-Cl、EDTA-Na₂、酚-氯仿等化学试剂均为分析纯。

超低温冰箱为 SANYO ULTRA LOW MDF-382E, 电子天平为 Explorer OHAUS 公司生产的万分之一分析天平, 台式高速离心机型号为 Heraeus D-37520, PCR 仪为 BIO-RAD T100™。凝胶成像分析系统为 BIO-RAD Gel Doc™ XR+, 电泳仪为 DYY-III7B 型, 电热恒温水浴锅为 HWS24, 紫外可见分光光度计为 Helios Alpha, 微量移液器为 Eppendorf 等。

1.2 方法

1.2.1 小麦种子基因组 DNA 提取 选取少量小麦种子, 用小块干净布包起来并用钳子夹碎, 再用研钵研成粉末(或者采用微量种子破碎仪磨粉), 将大约 100 mg 粉末转移到 1.5 mL 的离心管中, CTAB 提取 DNA 参照魏琦超等的方法^[12], 试剂盒提取方法参照 DP305 试剂盒使用说明书。每处理一个样彻底清理仪器, 以免 DNA 样品之间的交叉污染。

1.2.2 DNA 纯度和浓度的测定 将 2 μL DNA 用双蒸水稀释至 500 μL, 用紫外分光光度计测定样品液在 230、260、280 nm 波长下的吸光值, 并计算 OD₂₆₀/OD₂₃₀, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的值。DNA 样品的浓度(μg/μL)=OD₂₆₀×稀释倍数×0.05。

1.2.3 DNA 分子量大小及完整性的检测 取 2 μL DNA 溶液、5 μL dd H₂O 和 3 μL 上样缓冲液混匀点样, 以 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 用溴化乙锭染色, 在凝胶成像仪上进行观察并照相。用标准分子量 Marker 及 Image lab 4.0 软件估算 DNA 条带分子量大小。

1.2.4 PCR 扩增检测 根据 1.2.2 中测定的 DNA 浓度, 将所有 DNA 样品的浓度稀释至 50 ng/μL, 取 1 μL DNA 稀释液作为模板, 以小麦 1BS 上的 LMW-GS 亚基 Glu-B3 基因和黑麦 1RS 上的 secalin-p 基因的特异引物进行扩增, 反应体系为 20

μL。PCR 扩增引物^[13-14]和扩增条件见表 1。反应结束后取 10 μL 扩增产物于 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳, 电压 5~10 V/cm, 电泳时间 30 min。

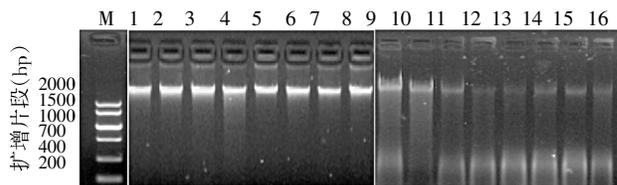
2 结果与分析

2.1 DNA 样品的产率和纯度

采用试剂盒可以从大约 100 mg 的小麦粉中提取 DNA 平均约 7.5 μg, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 1.75~1.94, 表明蛋白质、酚类等杂质去除干净, 且无 RNA 污染, DNA 样品产率高、纯度好。而用 CTAB 法从大约 100 mg 的小麦粉中提取 DNA 平均约 2.8 μg, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值比较分散, 在 1.6~2.3, 大于 2.0 的样品有 RNA 污染, 小于 1.7 的存在蛋白质、多糖等杂质。可见使用试剂盒提取的 DNA 在产量和纯度上都优于 CTAB 法。

2.2 改良 CTAB 法提取 DNA 的完整性

由图 1 可以看出, 采用试剂盒和 CTAB 法提取的 DNA 电泳谱带单一整齐, 证明 2 种方法都可以从小麦干种子中提取较为完整的总 DNA, 经 Image lab 4.0 软件估算分子量大小为 50 kb 左右, 但提取效果存在明显差异。由试剂盒提取的 DNA 电泳条带整齐清晰, 蛋白、RNA 去除彻底, 而 CTAB 法提取的 DNA 电泳条带弱, 点样孔有少量蛋白质或多糖类物质残留, 泳道有不同程度的拖尾现象, 可能在提取过程中由于操作步骤繁琐、时间长, 使 DNA 分子发生少量降解, 同时存在少量的 RNA 污染。



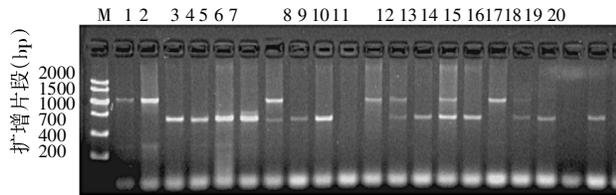
M: DNA Marker V; 1~8 为试剂盒提取的 DNA;
9~16 为 CTAB 法提取的 DNA

图 1 小麦种子中提取的基因组 DNA 电泳图谱

2.3 样品 DNA 多重 PCR 扩增结果

以小麦干种子提取的 DNA 为模板, 及小麦 Glu-B3 位点和黑麦 Sec-p 基因的特异引物进行多重 PCR 扩增的结果(图 2)表明, Glu-B3 和 Sec-p 位点 PCR 扩增片段大小分别为 630 bp 和 1 076 bp,

与预期目标片段大小一致。由试剂盒提取的样品扩增产物亮度强, 条带清晰, CTAB 法提取的模板扩增效果较差。



M: DNA Marker V; 1~10 为以试剂盒提取的 DNA 为模板;
11~20 以 CTAB 法提取的 DNA 为模板

图 2 小麦 Glu-B3、黑麦 Sec-p 位点 PCR 扩增产物电泳图谱

2.4 成本比较

提取小麦干种子基因组 DNA, 采用试剂盒和 CTAB 法的实验成本相当。试剂盒价格虽然较高(100 次样本价格为 600 元), 但在 2 d 内即可轻松完成从磨样、DNA 提取到琼脂糖凝胶电泳检测等工作, 实验成本约 7.2 元/样品, 效果好且省时又省力。CTAB 法从小麦干种子提取 DNA, 100 个样品从磨样到 DNA 提取纯化完成需 5 d 时间, 人工加试剂费用, 估算成本为 8.0 元/样品, 比试剂盒提取成本稍高但效果不如试剂盒。

3 小结与讨论

1) 采用试剂盒从小麦干种子提取基因组 DNA 产率高、纯度好。100 mg 样品提取 DNA 量平均为 7.5 μg , $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 比值为 1.75 ~ 1.94, DNA 片段大小完整、不干扰酶活性等, 能够满足分子检测、遗传标记等分子生物学实验。CTAB 法 DNA 产率较低, 存在蛋白质、多糖等杂质, 有少量 RNA 污染, 虽然对 PCR 扩增影响不大, 但 DNA 量偏少, 远不能满足酶切、基因位点多态性分析等实验需求, 该提取方法有待进一步改良。

2) 一般认为, 试剂盒提取 DNA 的实验成本远高于常规的 CTAB 法。但我们多次实验证明, 试剂盒的实验成本低于后者。以 100 个样本来估算, 采用 CTAB 法从植物幼嫩叶片中提取 DNA 质量, 从获得小麦实生苗、溶液配制与消毒、磨样到 DNA 提取纯化完成最少需要 11 d 时间, 熟练实验工人工费以 60 元/d 计, 加上化学试剂及液氮等的费用, 实验成本大于 10 元/样品(不包括水电费及仪器设备折旧费), 工作量大、耗时而且成本不低。目前, 随着劳动力市场人工工资的逐年上涨, 人工费在所有实验成本中占相当大的比例, 是导致实验成本不断上升的主要因素。

3) 小麦干种子 DNA 在常温下不易降解, 可方便在任何季节和环境下提取。试剂盒操作方法快速简便, 但需要注意种子磨粉一定要充分呈细粉状,

取样尽量不带麸皮; 样品量控制在 100 ~ 150 mg, 若大于 150 mg 反而会降低 DNA 产量; 65 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴时间由 30 min 延长到 1 h, 每隔 10 min 轻轻颠倒离心管几次使提取缓冲液与样品充分混匀, 注意操作细节可以大大提高 DNA 产率和纯度。

参考文献:

- [1] 何中虎, 夏先春, 陈新民, 等. 中国小麦育种进展与展望[J]. 作物学报, 2011, 37(2): 202-215.
- [2] 董淑静, 许为钢, 胡琳, 等. 43 个河南主推小麦品种抗条锈病基因的分子检测[J]. 华北农学报, 2012, 27(5): 157-162.
- [3] 李景良, 易玲, 李林, 等. 青稞 Hval-hv 基因对小麦的遗传转化研究[J]. 西南农业学报, 2012, 25(5): 1558-1562.
- [4] 杨燕, 王晓丽, 刘世鑫, 等. 利用 STS 标记检测我国小麦推广品种的抗穗发芽基因型[J]. 华北农学报, 2013, 28(3): 183-188.
- [5] 邵宏波, 梁宗锁, 邵明安. 小麦抗旱生理生化和分子生物学研究进展与趋势[J]. 草业学报, 2006, 15(3): 5-17.
- [6] 魏亦勤, 李红霞, 叶兴国, 等. 外源抗病基因导入小麦的应用研究[J]. 甘肃农业科技, 2002(3): 10-13.
- [7] 张志清, 郑有良, 王丕武, 等. 微量法提取高质量小麦 DNA 供大规模 PCR 分析[J]. 西北农业学报, 2005, 14(6): 83-86.
- [8] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 中国国家标准化管理委员会. GB/T 19495.3—2004 转基因产品检测核酸提取纯化方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [9] 张泽华, 刘萌娟, 张敏娟, 等. 一种用于干种子快速提取基因组 DNA 的方法[J]. 干旱地区农业研究, 2007, 11(25): 35-37.
- [10] 张富丽, 刘勇, 宋君, 等. 一种 DNA 提取新方法在转基因水稻种子检测中的应用[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(10): 2118-2121.
- [11] ZHANG F L, LIU Y, SONG J, *et al.* A method for rapid salt-extraction of high-quality genomic DNA from plant seeds[J]. Agricultural Science & Technology - Hunan, 2012, 13(3): 485-488.
- [12] 魏琦超, 畅丽萍, 周岩, 等. 利用改良 CTAB 法提取小麦干种子总 DNA[J]. 山西农业科学, 2009, 37(6): 30-32.
- [13] CHAI J F, ZHOU R H, JIA J Z, *et al.* Development and application of a new codominant PCR marker for detecting 1BL/1R wheat-rye chromosome translocations[J]. Plant Breeding, 2006, 125: 302-304.
- [14] VAN CAMPENHOUT S, VANDER STAPPEN J, SAGI L, *et al.* Locus specific primers for LMW glutenin genes on each of the group I chromosomes of hexaploid wheat[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1995, 91: 313-319.

(本文责编: 王建连)