

技术与方法 Techniques and Methods

微量大豆种子基因组 DNA 的快速制备

徐景升* 姚伟 余爱丽 张木清 陈如凯

福建农林大学农业部甘蔗生理生态与遗传改良重点实验室, 福州 350002

Rapid Extraction of Genomic DNA from Minim Soybean Seed

XU Jing-Sheng*, YAO Wei, YU Ai-Li, ZHANG Mu-Qing, CHEN Ru-Kai

Key Laboratory of Eco-physiology & Genetics Improvement for Sugarcane of Ministry of Agriculture, Fujian Agricultural and Forestry University, Fuzhou 350002

提要 用改良的 CTAB 法, 从微量大豆种子样品中快速提取了基因组 DNA, 并从大豆基因组中扩增到了大豆蛋白酶抑制剂基因。

关键词 CTAB; PCR; 模板; 大豆种子

PCR 技术具有操作简便、灵敏度高的特点, 在分子生物学领域, 尤其是分子检测中已得到了广泛的应用。但是植物基因组 DNA 提取过程耗时费力, 影响了后续工作。本文针对大豆种子体积小和坚硬的特点, 根据 PCR 反应的要求, 用改良的 CTAB 法^[1, 2], 实现了微量大豆种子基因组 DNA 的快速提取。

材料与amp;方法

1 材料

大豆 (*Glycine max*) 种子由吉林农业科学院提供。实验中所用的 Taq 酶 (Taq plus I DNA 聚合酶) 和引物均购自上海生物工程公司。

2 方法

2.1 基因组 DNA 制备 大豆种子去种皮后切取 1/8 (约为 20 mg) 放入 1.5 mL 离心管中, 加入 250 μL 50 $^{\circ}\text{C}$ 预热提取液 (200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8.0 的 Tris-HCl、200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl、25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA、0.5% SDS), 混合均匀, 置于 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中 10 min; 加入蛋白酶 K, 终浓度为 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 混合均匀, 用自制研杵 (取 1 mL 枪头, 将尖端切去 2 mm, 用酒精灯稍微灼烧, 使其熔化并凝固成圆端, 枪头尖端切去多少以灼烧后所形成的圆端能否与 1.5 mL 离心管底部良好吻合为准, 经试验以切去 2 mm 为宜) 充分研磨, 继续放在水浴中 15 min, 期间颠倒混合数次。加入 250 μL CTAB 缓冲液 [2% CTAB、100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8.0 的 Tris-HCl、20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA、1.4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl、1% 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP, 40 kD)]。用等体积的酚、氯仿、

异戊醇混合液 (体积比 25 : 24 : 1) 抽提后, 以 13 000 $\times g$ 离心 5 min; 并用等体积的氯仿抽提, 再以 13 000 $\times g$ 离心 5 min; 取上清液, 加入等体积的异丙醇, 混匀后, 于室温下静置 3 min, 以 13 000 $\times g$ 离心 5 min。DNA 沉淀用 70% 乙醇充分洗涤 2 次, 晾干, 溶于 50 μL 去离子水中, 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下储存备用。

2.2 PCR 扩增 扩增大豆蛋白酶抑制剂基因 *ScII* 时, PCR 引物为: ScII1, 5' ATG GAA CTG AAC CTC TTC AA 3'; ScII2, 5' CTA GTC ATC ATC TTC ATC AC 3'。PCR 产物为 252 bp。扩增抗草甘膦基因 *EPSPS* (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, EPSPS, 磷酸烯醇式丙酮酰莽草酸合成酶) 时, PCR 引物为: EPSPS1, 5' CCT CAA CGT GCT GAT GAA CC 3'; EPSPS2, 5' GCG AGA ATC GGA TAT TCG TC 3', PCR 产物为 201 bp。两个 PCR 反应使用同一体系。反应总体积为 25 μL , 组分为: 1 \times PCR 缓冲液、2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 、0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs、1 mL 模板 DNA、2.5 U Taq 酶, 引物浓度为 0.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 39 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。扩增产物

收稿 2003-12-08 修定 2004-04-08

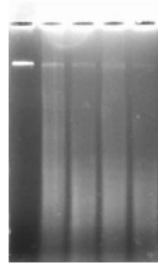
资助 福建省重大国际合作项目 (2001I002) 和 “863” 高新技术发展计划课题 (2001AA241191)。

* E-mail: xjs5211@sina.com.cn, Tel: 0591-3768242

分别做酶切和测序分析。

结果与讨论

从20 mg的大豆种子中一般可以提取到0.3~0.7 μg 的大豆基因组DNA, DNA得率随着加入蛋白酶K前水浴时间的减少而逐渐降低(图1)。当水浴时间低于10 min时,大豆种子块研磨困难,所得DNA的浓度在2 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 左右,PCR结果不稳定。以本文方法制备的大豆种子基因组DNA为模板,我们扩增到了大豆蛋白酶抑制剂基因*ScII*的252 bp片段(图2)。经*Hae*III酶切鉴定,得到180和72 bp 2个片段(图3)。



对照 1 2 3 4

图1 大豆基因组DNA提取结果

对照: λ DNA, 50 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$; 1~4:加入蛋白酶K之前50°C水浴时间30、20、15、10 min。

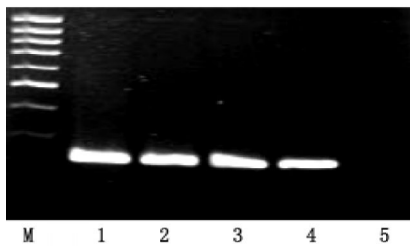
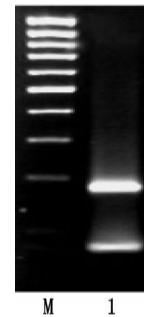


图2 大豆蛋白酶抑制剂基因(*ScII*)PCR扩增结果

M:梯级分子量标准(1.0、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3 kb); 1~4:加入蛋白酶K之前50°C水浴时间30、20、15、10 min; 5:无模板的空白对照。

在大豆种子DNA提取过程中,由于大豆种子坚硬,水浴温度和时间常影响其研磨效果,从而影响DNA的得率和质量。温度低,水浴时间延长,DNA降解的机会增加;温度高,蛋白酶K容易失活,DNA会受到内源核酸酶的攻击。所以,在加入蛋白酶K之前,水浴温度和时间以大豆种子小块软化,可充分研碎为准。选择50°C的水浴温度,可保证蛋白酶K在短时间内发挥作用。蛋白酶K浓度达到100 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$,可确保其功



M 1

图3 大豆蛋白酶抑制剂基因(*ScII*)252 bp的PCR产物经*Hae*III酶切结果

M:梯级分子量标准(1.0、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2 kb); 1:252 bp PCR产物经*Hae*III酶切结果。

能发挥。研磨是关键,研磨不充分,DNA得率明显降低。用自制的1 mL枪头研杵,其尖端与1.5 mL的离心管底部吻合良好,可保证研磨充分。同时,研杵一次性使用,样品间无交叉污染,方便快捷。从我们的实验结果可以看出,在保证大豆种子块可以充分研磨的前提下,水浴时间对PCR模板质量影响不大,4个处理的模板都可得到良好的扩增。

我们使用本文的方法,从进口大豆中扩增出了*EPSPS*基因201 bp片段(图4),测序结果证明是该基因的部分片段。此方法适于转基因大豆种子快速检测,每人每天可以处理200份样品。



M 1

图4 *EPSPS*基因扩增结果

M:梯级分子量标准(1.0、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2 kb); 1:*EPSPS*基因201 bp PCR产物。

参考文献

- 1 田清震,盖钧镒,喻德跃等.大豆DNA扩增片段长度多态性(AFLP)研究.大豆科学,2000,19(3):210~217
- 2 Tao Z, Cai X-F, Yang S-L et al. Detection of exogenous genes in genetically modified plants with multiplex polymerase chain reaction. Plant Mol Biol Rep, 2000, 19:289~298