

水稻基因组 DNA 简易制备方法

孙川^{1,2,#} 陈刚^{1,2,#} 饶玉春¹ 张光恒¹ 高振宇¹ 刘坚¹ 鞠培娜¹ 胡江¹
郭龙彪¹ 钱前^{1,*} 曾大力^{1,*}

(¹中国水稻研究所 水稻生物学国家重点实验室, 浙江 杭州 310006; ²扬州大学 农学院, 江苏 扬州 225009; # 共同第一作者; * 通讯联系人, E-mail: qianqian188@hotmail.com; dalizeng@126.com)

A Simple Method for Rapid Preparation of Rice Genomic DNA

SUN Chuan^{1,2,#}, CHEN Gang^{1,2,#}, RAO Yuchun¹, ZHANG Guangheng¹, GAO Zhenyu¹, LIU Jian¹, JU Peina¹, HU Jiang¹, GUO Longbiao¹, QIAN Qian^{1,*}, ZENG Dalizeng^{1,*}

(¹State Key Laboratory of Rice Biology, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China; ²Agricultural College, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; # These authors contributed equally to this paper; * Corresponding authors, E-mail: qianqian188@hotmail.com; dalizeng@126.com)

SUN Chuan, CHEN Gang, RAO Yuchun, et al. A simple method for rapid preparation of rice genomic DNA. Chin J Rice Sci, 2010, 24(6): 677-680.

Abstract: A simple method for preparation of rice genomic DNA was developed. A small amount (1 - 50 mg) of leaf tissue of rice seedling, 500 μ L of extraction buffer, and one steel bead were put into a 2 mL microcentrifuge tube. After vigorously mashing for 2 min, 5 μ L of the supernatant was directly applied to PCR amplification. Otherwise, the supernatant was precipitated with 2 volumes of ethanol to obtain high quality genomic DNA. This method is simple, rapid, low cost, and reliable for PCR analysis. One person can manipulate as many as 96 samples for PCR in 10 minutes. It is especially suitable for genotyping of large number of samples.

Key words: DNA extraction; high throughput PCR amplification; sample preparation; methodology; rice

孙川, 陈刚, 饶玉春, 等. 水稻基因组 DNA 简易制备方法. 中国水稻科学, 2010, 24(6): 677-680.

摘要: 介绍了一种用于 PCR 的水稻基因组 DNA 的快速制备方法。该方法只需将少量 (1~50 mg) 样品、适量提取液 (500 μ L) 和一粒钢珠放入 2 mL 离心管, 在细胞破碎仪中粉碎 2 min, 经离心后可直接取少量 (约 5 μ L) 上清液作为 PCR 的模板 DNA, 也可进一步根据需要进行高质量 DNA 的提取。该方法具有成本低、操作快速简便等优点, 一个人可以在 10 min 内完成 96 份样品 DNA 的简易制备, 特别适合高通量的分子检测。

关键词: DNA 提取; 高通量 PCR 扩增; 样品制备; 方法; 水稻

中图分类号: Q94 236; Q943; S511.03

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2010)06-0677-04

基于 PCR 技术的分子标记已广泛地运用于种子纯度鉴定、亲缘关系的分析、分子标记辅助育种、基因定位以及转基因植株检测等。在水稻和大多数其他作物中, 以 PCR 技术为基础的标记如简单重复序列标记 (SSR 标记或微卫星标记), 由于其具有多态性好、可靠性高、技术简单、价格便宜和 DNA 模板使用量低等优点, 在分子生物学中得到了广泛的应用。另一方面, 随着生物技术的不断发展、水稻基因组测序的完成、功能基因鉴定的日益增多, 分子标记辅助选择育种越来越多地应用于作物新品种的改良^[1-3], 即通过对与表型紧密连锁的 DNA 分子标记的筛选, 以快速获取带有目的表型的理想植株。

为了应用 PCR 检测技术, 人们需要从组织样品中提取 DNA。然而, DNA 提取是一项耗费人力、物力的烦琐工作, 提取的 DNA 也仅在筛选、鉴定时使用了很少的一部分, 剩余的大部分 DNA 将作为累赘而被废弃。尽管人们也一直致力于 DNA 抽提方法的改进, 但目前应用的主要方法仍烦琐、费时, 如 CTAB 法^[4] 和 SDS 法^[5]。因此, 在大规模的基于 PCR 的基因型检测作业中, 高效、快速、简便的模板 DNA 制备显得非常重要。

1 材料与方法

1.1 植物材料

本实验使用的水稻品种主要包括日本晴、台中本地 1 号 (TN1)、春江 06、中花 11、G 堡和 Jaimaica 等。将水稻种子催芽 2~3 d, 发芽后播于水田中备用。

1.2 化学试剂

试剂 A: pH 7.5, 含有 150 mmol/L 山梨糖醇, 125 mmol/L Tris, 25 mmol/L EDTA-Na₂, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Na₂SO₃, 质量分数 0.8% 的十六烷基三甲基溴化胺 (CTAB), 质量分数 2% 的月桂酰-N-甲基氨基乙酸钠。

试剂 B: pH 9.0, 含有 100 mmol/L Tris, 500 mmol/L KCl, 18 mmol/L MgCl₂, 质量分数 1% 的 Triton X-100。

试剂 C: DNA 提取液。在使用前由试剂 A、试剂 B、蒸馏水按 1:2:7 的体积比混合而成, 再加入体积分数 0.2% 的

收稿日期: 2010-03-11; 修改稿收到日期: 2010-04-11。

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大科技专项资助项目 (2008ZX08009-003); 国家自然科学基金资助项目 (30771160); 浙江省自然科学基金杰出青年团队项目 (R3090023)。

- 巯基乙醇。

试剂 D :10× PCR 反应缓冲液 pH 9.0 ,含有 50 mmol/L Tris ,250 mmol/L KCl ,9 mmol/L MgCl₂ ,质量分数 0.5% 的 Triton X-100 ,体积分数 10% 的牛血清白蛋白 (BSA)。

1.3 模板 DNA 制备

提取水稻 DNA 的方法包括以下步骤 :

1) 取约 0.01 g 水稻叶片放入 2 mL 的圆底离心管 (江苏海门耀华玻璃仪器厂) ,加入 500 μL 试剂 C 和 200 μL 氯仿 ,并加入 1 粒钢珠 (5 mm 碳素钢珠 ,上海自行车钢珠厂) ;

2) 使用细胞破碎仪 (TissueLyser ,QIAGEN ,德国) ,在 28 Hz 的频率下 ,对水稻样品破碎 2 min ;

3) 将破碎后的样品在 8 000 ~ 10 000 r/min 下离心 4 ~ 6 min ;

4) 以试剂 D 作为 PCR 反应缓冲液 ,取 4 ~ 6 μL 上清液直接作为模板 DNA ,用于 PCR 检测 ;

若需对 PCR 检测后的部分目标样品提取 DNA 以保存备用或他用 ,则可继续实施以下步骤 :

5) 根据 PCR 检测结果 ,从上述第 3 步中挑出对应样品 ,取 400 μL 上清液于一新的离心管 ,加 400 ~ 800 μL 无水乙醇轻摇混匀 ,沉淀 30 ~ 60 min 后于 8 000 ~ 10 000 r/min 下离心 10 ~ 15 min ;

6) 弃上清液 ,用 500 μL 70% 的乙醇洗涤 ,在 8 000 ~ 10 000 r/min 下离心 10 ~ 15 min ;

7) 弃上清液 ,倒置离心管至晾干 ,即获得 DNA ,可于 -20 °C 下长期保存备用或加 200 μL 超纯水溶解。

1.4 PCR 分析

PCR 反应体系为 20 μL :取 5 μL 上清液作为 PCR 模板 ,2 μL 试剂 D 作为 PCR 反应缓冲液 ,另外加 5 nmol/L dNTPs ,8 pmol/L 引物和 1 U *Taq* 酶。PCR 反应在东盛热循环仪上进行 ,反应程序为 :94 °C 下预变性 4 min ;每个循环

94 °C 下 30 s ,55 °C 下 30 s ,72 °C 下 30 s ,循环 35 次 ;最后 72 °C 下 10 min。PCR 产物于 3% ~ 4% 的琼脂糖凝胶中进行电泳检测。本研究所用的引物如表 1 所示。

1.5 DNA 产量和纯度分析

测定样品在吸光度为 260 nm 和 280 nm 处的 OD 值 ,用于评测样品中 DNA 的产量和浓度。

2 结果与分析

2.1 模板 DNA 的快速制备

取约 0.01 g 水稻叶片 (实际操作中无需称量 ,目测大概即可) 放入 2 mL 的圆底离心管中 ,加入 500 μL 试剂 C 和 200 μL 氯仿 ,并加入 1 粒直径约 5 mm 的钢珠 ;使用细胞破碎仪对水稻样品进行破碎 (一次可操作 48 个样品) ,离心后的上清液可用于 PCR 扩增反应。取 20 μL 上清液进行琼脂糖凝胶电泳检测 ,由图 1 可见 ,尽管有少量 DNA 降解 ,但大部分 DNA 片段的分子量仍较大。

2.2 SSR 标记检验模板 DNA 的 PCR 扩增效果

在 DNA 制备过程中 ,由于使用了氯仿进行抽提 ,离心后

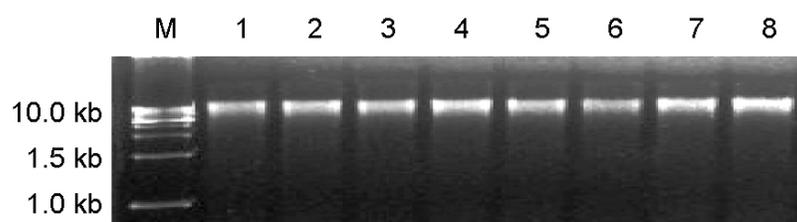


图 1 本方法制备的水稻基因组 DNA

Fig. 1. Preparation of genomic DNAs from leaf tissues of rice.

M Marker ;泳道 1 ~ 8 为本方法提取的水稻基因组 DNA。

M , Marker ; Lanes 1 to 8 , Rice genomic DNA prepared by the method .

表 1 PCR 引物序列

Table 1. Sequences of used primers for PCR .

引物名称 Primer	正向引物 Forward primer (5'-3')	反向引物 Reverse primer (5'-3')	产物大小 Product/bp
RM3252	GGTAACTTTGTTCCCATGCC	GGTCAATCATGCATGCAAGC	153
RM1247	TTCTCAGCTGCTTGTGCATC	CCTCCAAGGTAAGGGGTTTC	183
NB316	ATGTGTGCTTCGTCGTGAT	TTCTCACATCTGAACCTCTCC	153
NB478	GGGCTGTCATTGTCACGAG	GGCATCGACTCATCAGCC	188
NB444	TCGTCCATCCATTGATGCTAATC	TGCCATTTATCATTGTCATTC	187
NB876	TTGGAGAGACGAGCGAGAGAG	AGTGTTGGTGAGCATAGCAGTTG	147
NB231	AGAATAGAGTGCATCATCGTC	AACCTGATAGGTGGAAGATGTAC	185
NB342	ACCATGCCTCATGACATGTGG	TGGTTTTGTGTAGCTCTGTCCG	128
NB558	GCTCCACAGAAAAGCAAAGC	TGCAACAGTAGCTGTAGCCG	143
NB789	GAATGGGATTAGACGATTTG	CCATGAGTGACATCAAAGG	206
NB678	CCTGGTTAGCACTACAGCTC	TAGTTGGCTATGTCCACACC	87
NB665	AAGTCGAAGGAGGAGTTGTC	CACCGAACTAAAGACGAG	126
NB442	CTTTGTAGACCGTATCAATTGTCC	GAAACGTCTGGCGAGTTCC	139
NB642	GCAGGAGTATATACGCAGGG	ACTCAGCGTGCTCAACCTG	131
NB942	ATCAGCAGCAGATTGGTGC	TACCCTTAGTCTCCTATGTGTCC	130

另随机选取的 Gramene 网站已公布的 19 对 SSR 引物 ,分别是 RM7581、RM1361、RM3740、RM8213、RM17713、RM13、RM19234、RM1019、RM5055、RM6356、RM1328、RM5795、RM217、RM3183、RM5711、RM3819、RM1337、RM7376、RM493。

Another selected 19 pairs of SSR primers are RM7581 , RM1361 , RM3740 , RM8213 , RM17713 , RM13 , RM19234 , RM1019 , RM5055 , RM6356 , RM1328 , RM5795 , RM217 , RM3183 , RM5711 , RM3819 , RM1337 , RM7376 and RM493 .

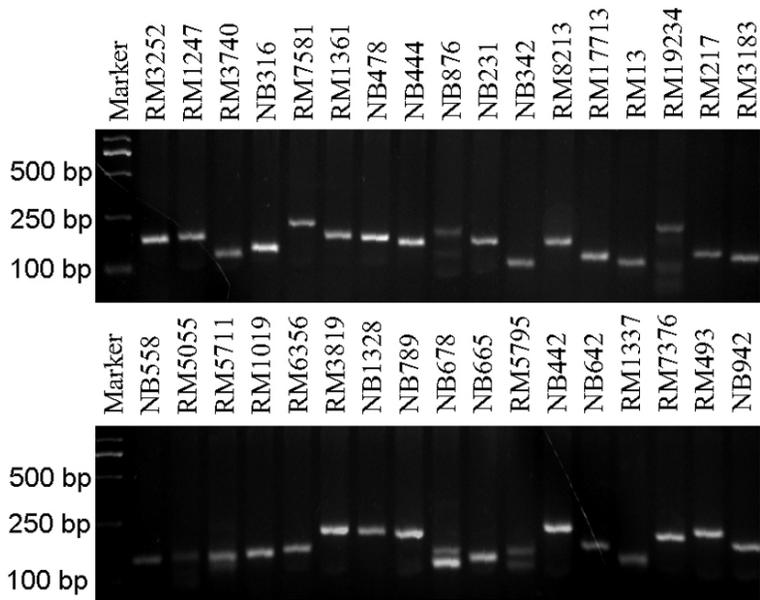


图 2 4 对 SSR 和 STS 引物的 PCR 扩增产物的电泳结果
Fig. 2 PCR results for a total of 34 pairs of SSR primers and STS primers distributed evenly in the rice genome .

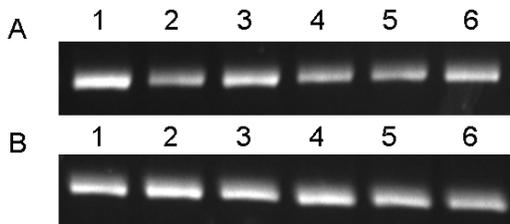


图 3 RM3252 的 PCR 扩增产物
Fig. 3 . PCR products with the primer RM3252 .

A - 来自不同品种的模板 DNA 的 PCR 扩增产物电泳结果。泳道 1~6 分别来自日本晴、TN1、春江 06、中花 11、G 堡和 Jaimaica ; B - 来自不同组织样品的模板 DNA 的 PCR 扩增产物电泳结果。泳道 1~6 分别来自水稻的嫩叶、老叶、茎、鞘、穗和根。

A , The PCR products of RM3252 from different varieties . Lanes 1 to 6 are from Nipponbare , TN1 , Chunjiang 06 , Zhonghua 11 , G-Bao and Jaimaica , respectively ; B , The PCR products of RM3252 from different tissues . Lanes 1 to 6 are from young leaf , old leaf , stem , sheath , panicle and root , respectively .

的上清液可直接用于 PCR 扩增。同时 ,为检验简易制备的 DNA 对 PCR 引物是否有较高的要求 ,选用了分布于水稻不同染色体的 34 对 SSR 和 STS 引物进行 PCR 扩增(表 1,图 2) ,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测 ,发现用于扩增的所有引物的 PCR 产物的电泳条带均清晰明亮 ,片段大小也符合预期(图 2)。同时 ,还对来自不同水稻品种叶片制备的 DNA 进行了 PCR 扩增检测 ,图 3 A 显示了 6 份材料制备的 DNA 样品 ,经 RM3252 扩增后的琼脂糖凝胶电泳检测结果。另外 ,还进一步对来自老叶、茎、叶鞘、穗、根等组织的样品制备了模板 DNA ,结果表明所有模板均能扩增出产物(图 3 B)。

2.3 不同储存时间的模板 DNA 的 PCR 扩增效果

本方法制备 DNA 过程简单、操作简便快捷 ,在基因型的初步检测、筛选和鉴定过程中 ,当天就可完成 DNA 的制备、PCR 扩增和电泳检测等过程 ,对于部分一次性的初步筛选和鉴定工作 ,模板 DNA 无需长时间保存。为此 ,我们比较了 DNA 样品短期的储存时间及储存温度对 PCR 扩增效果的影响。每天取 0.01 g 叶片用于制备模板 DNA ,吸取上清液后 ,分 2 份分别保存于 4 和 -20 的冰箱中 ,至第 7 天取

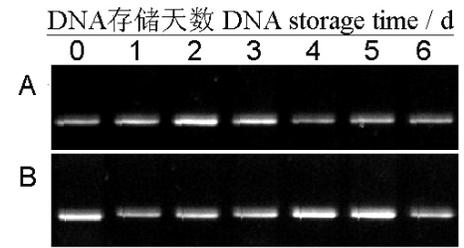


图 4 RM1247 的 PCR 扩增产物
Fig. 4 . PCR products with the primer RM1247 .

A - 在 4 条件下储存 0~6 d 的模板 DNA ; B - 在 -20 条件下储存 0~6 d 的模板 DNA。

A , The template DNA was stored at 4 ; B , The template DNA was stored at -20 .

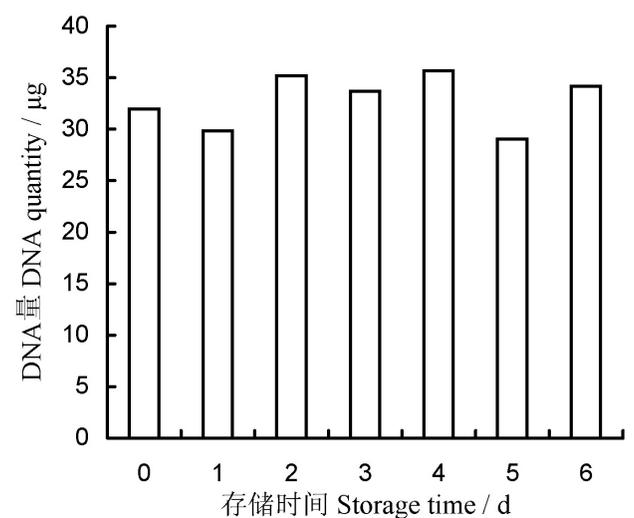


图 5 条件下储存 1~6 d 的 DNA 样本经沉淀、洗脱纯化后的 DNA 量
Fig. 5 Quantity of DNA obtained from extraction of 4 stored DNA samples with ethanol .

出所有保存的模板用于 PCR 扩增。图 4 是 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳检测结果 ,由此可见 ,在 4 或 -20 储存条件下 ,存放 1~7 d 的模板 DNA 不影响 PCR 的扩增效果。

2.4 DNA 的纯化和检测

在 PCR 筛选和鉴定基因型过程中 ,可能需要对筛选出来的部分重要目标单株提取高质量的 DNA 以保存备用或作其他用途。简易制备的 DNA 除了直接作为模板 DNA 用于 PCR 扩增外 ,还可用无水乙醇沉淀获得高质量的 DNA。图 5 是在 4 条件下分别存放 1~6 d 的样品经乙醇沉淀、洗脱后获得的 DNA 量 ,结果表明 ,在 4 储存条件下 ,简易制备的 DNA 量不受贮存时间的影响 ,0.01 g 水稻叶片最终大约可获得 30 μg DNA。

3 讨论

植物基因组 DNA 制备的方法已有很多报道 ,如经典的 CTAB 法^[4]、SDS 法^[5] ,另外还有一些简化的制备方法 ,如 SDS 一步法^[6]、NaOH 处理幼叶直接作为 PCR 模板法^[7]、简易提取法^[8]、剪切法^[3]、微量提取法^[9]。对于需要大量样品进行基因型分析的研究来说 ,这些方法或操作效率仍需进一步提高 ,或者其制备的模板 DNA 的扩增结果不够稳定。

与其他常规植物 DNA 提取法^[3-12] 相比 ,本方法有几个明显的特点和积极效果 :1) 快速简便 ,一个人可以在 10 min 内完成 96 份可用于 PCR 筛选的水稻基因组 DNA 的简易制

备 2) 成本低, 提取过程中减少了多种试剂的使用量, 若从水稻中快速提取 DNA 仅应用于 PCR 反应时, 无需使用乙醇或异丙醇沉淀 3) DNA 产量高, 0.01 g 左右的水稻样品可用作 100 次 PCR 扩增的 DNA 模板使用 4) 周期短, 由于所需的水稻样品少, 催芽、播种 5~8 d 后就可取少量叶片用于 PCR 检测 5) 对 PCR 检测后的部分目标样品, 可进一步用乙醇沉淀、洗脱纯化, 获得的 DNA 可长期保存或作其他用途, 实现短期使用和长期保存的兼顾 6) 除可用于水稻 DNA 快速提取外, 也可用于其他作物样品 DNA 的提取。

从植物中提取的基因组 DNA 通常含有抑制 PCR 扩增的物质^[13-14], 本文所述的 DNA 提取方法, 加入氯仿和 β -巯基乙醇于提取液中用于去除多糖和水稻叶组织中的多酚等物质, 以避免对 PCR 反应的抑制作用^[15]; 而在配制的 PCR 反应缓冲液中加入 BSA, 有助于稳定 *Taq* 酶的活性, 可以提高 PCR 的效率。提取的 DNA 中含有少量 RNA 并不影响 PCR 的后续实验, 因此, DNA 的进一步提纯过程可以省略^[16]。同时, 该方法提取的 DNA 质量接近于 CTAB 法, DNA 可长期保存。该方法适用于水稻各组织和器官的 DNA 提取, 如根、茎秆、成熟种子等, 在其他植物中也可能有广泛的适用性。

参考文献:

- [1] 王 兰, 龙云铭, 刘耀光. 一种用于 PCR 的植物基因组 DNA 快速制备方法. *分子植物育种*, 2009, 7(2): 425-428.
- [2] 余守武, 刘宜柏. 分子标记在水稻遗传育种中的应用. *江西农业大学学报: 自然科学版*, 2003, 25(1): 111-116.
- [3] 赵红霞, 谢 攀, 黄志坚, 等. 一种改良的水稻总 DNA 提取方法. *湖北大学学报: 自然科学版*, 2006, 12(4): 389-392.
- [4] Stewart C N Jr, Via L E. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *BioTechniques*, 1993, 14(5): 748-750.
- [5] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, et al. Phenol/SDS method for plant RNA preparation//*Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley and Sons, Inc, 1996.
- [6] 王会文, 吴 琛, 赵晓瑜, 等. SDS 一步法制备 PCR 模板. *河北大学学报: 自然科学版*, 2002, 22(2): 186-188.
- [7] 汪秀峰, 杨剑波, 向太和, 等. 一种叶片直接用作 PCR 扩增的新方法及其应用. *中国水稻科学*, 2002, 16(1): 67-70.
- [8] 陈文岳, 包劲松, 周祥胜, 等. 一种可用于 PCR 分析的水稻 DNA 简易提取法. *中国水稻科学*, 2005, 19(6): 561-563.
- [9] 邱福林, 王和和, 陈 洁, 等. 用于水稻突变体大量筛选的 DNA 微量快速提取法. *中国水稻科学*, 2006, 20(3): 329-332.
- [10] Paris M, Carter M. Cereal DNA: A rapid high throughput extraction method for marker assisted selection. *Plant Mol Biol Rep*, 2000, 18(4): 357-360.
- [11] Mace E S, Buhariwalla H K, Crouch J H. A high throughput DNA extraction protocol for tropical molecular breeding programs. *Plant Mol Biol Rep*, 2003, 21(4): 459a-459h.
- [12] Xu X, Kawasaki S, Fujimura T, et al. A protocol for high throughput extraction of DNA from rice leaves. *Plant Mol Biol Rep*, 2005, 23(3): 291-295.
- [13] Kamalay J, Tejwari R, Keith Rufener G. Isolation and analysis of genomic DNA from single seeds. *Crop Sci*, 1990, 30(5): 1079-1084.
- [14] John M E. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucl Acids Res*, 1992, 20(9): 2381.
- [15] Sambrook J, Russell D. 分子克隆实验指南. 3 版. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2002.
- [16] Sharp P J, Kreis M, Shewry P R, et al. Location of α -amylase sequences in wheat and its relatives. *Theor Appl Genet*, 1988, 75(2): 286-290.