

适用于 SSR 分析的半粒水稻干种子 DNA 快速提取

王惠¹, 郭峰¹, 关超¹, 段玉玺², 白洪志³

1. 沈阳农业大学生物科学技术学院, 沈阳 110866

2. 沈阳农业大学植物保护学院, 沈阳 110866

3. 沈阳农业大学土地与环境学院, 沈阳 110866

摘要 为了寻找操作简便、耗时短、成本低,适用于简单重复序列(SSR)分析的水稻基因组 DNA 快速提取方法,以水稻沈农 265 的半粒干种子为材料,采用 SDS 提取液进行一步裂解,并将 RNA 去除操作融入抽提过程,SDS 浓度为 0.5%(W/V),水浴 10min,氯仿/异戊醇抽提,简单快速地获得了高质量水稻基因组 DNA。经琼脂糖凝胶电泳检测,DNA 纯度较高,完整性较好,能够满足 SSR 扩增模板的需求。该方法可大大缩短水稻种子 DNA 提取时间,为 SSR 标记在水稻种子遗传多样性分析、分子标记辅助选择等方面的应用奠定基础。

关键词 水稻;半粒干种子;基因组 DNA 提取;SSR

中图分类号 S511, Q523

文献标志码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2013.25.009

Rapid DNA Extraction from Half-grain Rice Dry Seeds for SSR Analysis

WANG Hui¹, GUO Feng¹, GUAN Chao¹, DUAN Yuxi², BAI Hongzhi³

1. College of Bioscience and Biotechnology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China

2. Plant Protection College, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China

3. College of Land and Environment, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China

Abstract To explore an easy, rapid and economical approach for extracting rice (*Oryza sativa* L.) genomic DNA for SSR (Simple Sequence Repeat) analysis, half-grain dry seed of rice Shennong265 is taken as tested material, just one step was used for cell lysis by SDS buffer, and the operation of RNA digestion was integrated into protein extraction. During this process, the SDS concn was 0.5% (W/V), water bath time was 10min, extraction with chloroform/isoamyl alcohol was used. High quality genomic DNA from rice seed was obtained simply and quickly. In this paper, the results of agarose gel electrophoresis all showed that the purity and integrity of the isolated DNA were satisfying; the amplified bands were clear as well as good in repeatability and stability, indicating that it can be used in SSR marker analysis. This is a time-saving method for extraction of genomic DNA, and can be effectively applied in genetic diversity analysis of rice seed and marker aided breeding activity.

Keywords rice; half-grain dry seeds; genomic DNA extraction; SSR

0 引言

简单重复序列(Simple Sequence Repeat, SSR)分子标记技术被广泛用于遗传多样性分析、分子标记辅助育种、指纹图

谱构建等。模板 DNA 能否快速提取及提取质量高低直接影响分子标记分析效率的高低^[1]。目前,提取水稻基因组 DNA 所用的材料主要有叶片、发芽幼苗、幼嫩茎段、干种子等。在

收稿日期:2013-04-09;修回日期:2013-06-30

基金项目:辽宁省教育厅科研项目(L2010493);沈阳农业大学博士后基金资助项目(66098)

作者简介:王惠,副教授,研究方向为植物生物化学与分子生物学,电子信箱:wanghuisynd@yahoo.com.cn;段玉玺(通信作者),教授,研究方向为植物病理学,电子信箱:duanyx@syau.edu.cn;白洪志(共同通信作者),副教授,研究方向为环境微生物学,电子信箱:baihongzhi2003@sina.com

水稻 DNA 提取过程中,一般都是以水稻幼苗叶片为材料,经液氮研磨提取 DNA。此过程需要经过浸种催芽、幼苗培养、液氮研磨等过程,DNA 提取周期较长。若以种子为材料,不用等待其萌发,可以随时对其进行 DNA 提取及其相关研究,不仅省去了育苗的时间、节约了液氮费用,还具有简便、快速、经济等优点。自 Chunwongse 等^[2]发明了用水稻和小麦半粒种子提取 DNA 的方法以来,McDonald 等和 Kang 等相继发展了从棉花、花生、大豆等作物半粒种子中提取 DNA 的方法^[3-5],国内也有很多研究者发展了一些从半粒种子中提取 DNA 的方法^[6-7]。尽管这些方法的效果很好,但仍存在 DNA 提取周期较长、实验成本较高等问题,不能完全适应实际快速检测的需要。

本研究拟在参考前人工作的基础上,探索一种适于水稻半粒种子 SSR 分析的操作简便、耗时短、成本低且又能保证扩增质量的水稻基因组 DNA 提取方法,为 SSR 标记技术更好地应用于水稻种子纯度鉴定、分子标记辅助选择等奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为水稻沈农 265 的干种子,由沈阳农业大学水稻研究所提供。

1.2 DNA 提取方法

(1) 取 1 粒水稻干种子,去掉颖壳,整粒种子对等切成两部分,取胚乳部分(带有完整胚的部分在室温下保持干燥,可用于发芽出苗的其他实验),放入预冷的研钵中研碎后转移到 1.5mL 离心管中,加入 1mL 60℃ 预热的 DNA 提取液(200mmol/L Tris-HCl, pH7.5; 288mmol/L NaCl; 25mmol/L EDTA; 0.5% SDS (W/V); 2% β-巯基乙醇 (V/V)) 混匀,60℃ 水浴 10min,振荡 2~3 次。

(2) 水浴结束后,12000r/min 离心 5min。

(3) 取 800μL 上清液转入新的离心管,加入等体积氯仿:异戊醇(24:1)混合均匀,12000r/min 离心 5min。

(4) 取 600μL 上清液转入新的离心管,加入 2 倍体积 -20℃ 预冷的无水乙醇,-20℃ 下静置 1h 以上。

(5) 用灭菌牙签挑取絮状 DNA 沉淀至另一新的离心管中,再用 75% 乙醇洗涤一次。

(6) 超净工作台上风干后,加入 200μL TE (10mmol/L Tris-HCl, pH7.5; 1mmol/L EDTA) 回溶 DNA。

(7) 将溶解的 DNA 溶液 12000r/min 离心 1min (由于在 DNA 提取过程中没有添加任何试剂去除蛋白,故 DNA 沉淀中可能含有一些蛋白质和不能溶解的物质,需离心使之与 DNA 溶液分离),上清液即为 DNA 溶液,4℃ 保存待用。

1.3 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量

吸取 8μL DNA 提取液,加 2μL 上样缓冲液,电压 5V/cm,溴化乙锭染色,1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。电泳结果在凝胶成像系统中拍照记录。

1.4 SSR 扩增反应体系

选取前期预实验中筛选出的多态性较好的 4 对 SSR 引

物(由上海生工生物工程技术有限公司合成)用于扩增:

RM19 (Forward: 5'-CAAAACAGAGCAGATGAC-3', Reverse: 5'-CTCAAGATGACGCCAAGA-3')

RM169 (Forward: 5'-TGGCTGGCTCCGTGGTAGCTG-3', Reverse: 5'-TCCCGTTGCCGTTTCATCCCTCC-3')

RM232 (Forward: 5'-CCGGTATCCTTCGATATTGC-3', Reverse: 5'-CCGACTTTTCTCCTGACG-3')

RM289 (Forward: 5'-TTCCATGGCACACAAGCC-3', Reverse: 5'-CTGTGCACGAACTTCCAAAG-3')。

SSR 扩增反应体系 20μL, 包括:10×PCR buffer 2.0μL, Mg²⁺(25mmol/L)1.2μL, dNTP (2.5mmol/L)1.6μL, 正向引物(10μmol/L)1.0μL, 反向引物(10μmol/L)1.0μL, TaqDNA 聚合酶(5U/μL)0.2μL, DNA 模板(25ng/μL)2.0μL, 灭菌 ddH₂O 11.0μL。

PCR 反应程序:94℃ 预变性 5min;94℃ 变性 30s,55℃ 退火 30s,72℃ 延伸 1min,35 个循环;72℃ 延伸 5min,4℃ 保存。

扩增产物在 6.0% 变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳,按文献[8]方法银染后观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 DNA 纯度和浓度检测结果

从图 1 可以看出,提取的 DNA 样品电泳后条带清晰,呈完整的单一条带,无拖尾现象,说明从半粒水稻干种子中提取的基因组 DNA 质量较好,无 DNA 降解,可用于后续 SSR 分析。

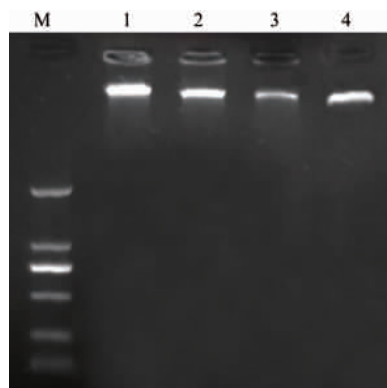


图 1 DNA 样品的琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis results of DNA samples
注:泳道 1~4 为沈农 265 干种子提取的 DNA;M 为 Marker DL2000。
Notes: Lane 1~4 are DNA extracted from the seeds of Shennong 265; M is Marker DL2000.

2.2 SSR 扩增结果

用 4 对 SSR 引物对水稻干种子提取的 DNA 进行扩增。从图 2 可以看出,提取的 DNA 样品可以扩增出较好的条带,带型清楚,弱杂带少,易于读带。扩增结果说明提取的 DNA 样品纯度完全可以满足 SSR 分析。

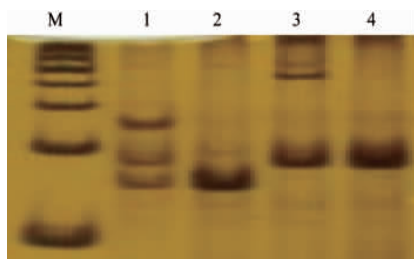


图2 SSR引物对水稻干种子的扩增结果
Fig. 2 SSR amplified products from rice dry seed using primer

注:泳道1~4为SSR引物RM19, RM169, RM232, RM289的扩增结果;M为100~1000bp ladder DNA。

Notes: Lane 1~4 are amplified products from RM19, RM169, RM232, RM289; M is 100~1000bp ladder DNA.

3 讨论

提取高质量基因组DNA是对水稻种子进行遗传多样性分析、分子标记辅助选择等研究的重要技术环节之一,也是保证实验结果可靠性和可重复性的关键。与常规DNA提取法^[9-11]相比,本研究以半粒水稻干种子为材料,省去了叶片提取DNA时用液氮研磨和苯酚提取的步骤,大大降低了成本和有害试剂对人体的毒害,整个实验过程在25~30min内即可完成,适于短时间内大规模的DNA提取工作。同时,在SDS提取液中添加 β -巯基乙醇作为抗氧化成分消除多酚类物质的干扰,采用氯仿:异戊醇(24:1)进行抽提,相比常规的以叶片为材料的提取法^[12-14],不仅能获得高质量的DNA,而且简单快速,省去了育苗和液氮研磨等环节,在降低实验成本的同时大大提高了工作效率。此外,为简化DNA提取过程,研究直接采用SDS提取液进行一步裂解,省去使用提取缓冲液进行前处理的操作,并将RNA的去除操作融入抽提过程,简化了一般情况下DNA提取后再纯化的繁琐操作。

该方法获得的DNA样品经琼脂糖凝胶电泳检测后表明,DNA条带清晰,完整性好,并无DNA降解,RNA污染少。用4对SSR引物对该方法提取的DNA样品进行扩增,可得到较好的条带,且带型清楚,弱杂带少,易于读带。说明本文提出的方法适用于半粒水稻干种子DNA的快速提取及SSR分析工作。

4 结论

以水稻半粒干种子为材料进行DNA提取,采用SDS提取液进行一步裂解,并将RNA的去除操作融入抽提过程,SDS浓度为0.5%(W/V),水浴10min,氯仿/异戊醇抽提,从而简单快速地获得高质量水稻基因组DNA。琼脂糖凝胶电泳检测结果表明,所得DNA纯度高,完整性好。另外,SSR分析结果也显示,扩增带型清晰易辨,重复性与稳定性好。相比常规的以水稻幼苗叶片为材料的DNA提取法,该方法在降低实

验成本的同时大大提高了工作效率,质量完全可以满足利用SSR分子标记进行遗传多样性分析、分子标记辅助育种、指纹图谱构建等分析的需要。

参考文献 (References)

- [1] Xin Z, Velten J P, Oliver M J, et al. High-throughput DNA extraction method suitable for PCR[J]. *BioTechniques*, 2003, 34(4): 820-826.
- [2] Chunwongse J, Martin G B, Tanksley S D. Pre-germination genotype screening using PCR amplification of half-seeds[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1993, 86(6): 694-698.
- [3] MacDonald M B, Elliot L J, Sweeney P M. DNA extraction from dry seeds for RAPD analyses in varietal identification studies[J]. *Seed Science and Technology*, 1994, 22(1): 171-176.
- [4] Kang H W, Cho Y G, Yoon U H, et al. A rapid DNA extraction method for RFLP and PCR analysis from a single dry seed[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1998, 16(1): 1-9.
- [5] 翟文学, 陆朝福, 朱立煌, 等. 谷类作物半粒种子的PCR分析及其在标记辅助选择育种中的应用[J]. *生物工程学报*, 1996, 12(4): 416-421. Zhai Wenxue, Lu Chaofu, Zhu Lihuang, et al. *Chinese Journal of Biotechnology*, 1996, 12(4): 416-421.
- [6] 赵妹华, 李文利, 谭海东. 农作物种子及半粒种子DNA RAPD扩增研究[J]. *杂粮作物*, 1999, 19(3): 22-25. Zhao Shuhua, Li Wenli, Tan Haidong. *Rain Fed Crops*, 1999, 19(3): 22-25.
- [7] 马伯军, 王文明, 赵彬, 等. 水稻抗白叶枯病基因Xa-4的PCR标记研究[J]. *遗传*, 1999, 21(3): 9-12. Ma Bojun, Wang Wenming, Zhao Bin, et al. *Hereditas*, 1999, 21(3): 9-12.
- [8] Chen X, Tenmykh S, Xu Y, et al. Development of a microsatellite framework map providing genom-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1997, 95(4): 553-567.
- [9] 赵红霞, 谢攀, 黄志坚, 等. 一种改良的水稻总DNA提取方法[J]. *湖北大学学报: 自然科学版*, 2006, 12(4): 389-392. Zhao Hongxia, Xie Pan, Huang Zhijian, et al. *Journal of Hubei University: Natural Science Edition*, 2006, 12(4): 389-392.
- [10] 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[J]. *中国水稻科学*, 2002, 16(1): 67-70. Wang Xiufeng, Yang Jianbo, Xiang Taihe, et al. *Chinese Journal of Rice Science*, 2002, 16(1): 67-70.
- [11] 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[J]. *中国水稻科学*, 2005, 19(6): 561-563. Chen Wenye, Bao Jinsong, Zhou Xiangsheng, et al. *Chinese Journal of Rice Science*, 2005, 19(6): 561-563.
- [12] 张静. 4种水稻基因组DNA微量提取方法对ISSR-PCR试验的影响[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(24): 14540-14541. Zhang Jing. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39(24): 14540-14541.
- [13] 王婧, 杨洁, 丁华, 等. 适用于SSR-PCR试验的水稻基因组DNA提取方法的比较[J]. *湖北农业科学*, 2012, 51(24): 5794-5797. Wang Jing, Yang Jie, Ding Hua, et al. *Hubei Agricultural Sciences*, 2012, 51(24): 5794-5797.
- [14] 赵国珍, 贾育林, 严宗卜, 等. 一种高效便捷的水稻DNA提取法及其应用[J]. *中国水稻科学*, 2012, 26(4): 495-499. Zhao Guozhen, Jia Yulin, Yan Zongbu, et al. *Chinese Journal of Rice Science*, 2012, 26(4): 495-499.

(责任编辑 王媛媛)