

# 小样品大批量大豆模板 DNA 快速分离法<sup>\*</sup>

周思君

(黑龙江省农科院生物技术研究中心 150086)

## 摘 要

用自己改制的微量样品研磨器解决了大豆鲜组织的大批量小样品的无损耗快速研磨问题。用随机引物 PCR 检测模板 DNA 的质量,比较了不同提取缓冲液、不同温度及不同处理时间对模板 DNA 质量的影响。结果表明用 SDS 提取缓冲液、65–80℃ 处理 5 分钟、氯仿异戊醇抽提一次,可得到适用于 PCR 反应的理想大豆模板 DNA。作者已用该方法分离了千余份大豆样品 DNA,效果稳定。

**关键词** 大豆; PCR; DNA 分离

PCR 反应的性质决定其对模板 DNA 的纯度要求不十分严格。因此,许多实验室发展了适合于不同作物的模板 DNA 快速分离法<sup>[1–3]</sup>。用叶盘 PCR 法筛选转化体,省去不必要的报告基因序列,以减少有害的变异,是植物转化实用化的发展趋势<sup>[4]</sup>。我们用花粉管通道法进行大豆基因转移获得了大量待筛选的种子,用特异引物通过 PCR 技术初步筛选转化体,具有简便、快速、经济等优点。但由于样品数量大,模板 DNA 的分离成了决定筛选效率的关键环节。尤其是如何解决大批量小样品的研磨问题至关重要。经过反复探索,用自动螺钉旋具改制成微量样品研磨器,在 1.5ml 的微量离心管内研样,解决了大豆鲜组织的大批量小样品的无损耗快速研磨问题,并简化了 DNA 提取的程序,收到了很好的效果。本文报道具体的操作程序和结果。

## 材料和方法

### 1 微量样品研磨器的改制

用中国机械进出口总公司生产的自动螺丝批(螺旋棘轮螺钉旋具)改制微量样品研磨器。将产品配带的三个十字花形的转头在砂轮上磨一下,使之与微量离心管的下部形状(圆锥形)相吻合。

### 2 样品的制备

取单株收获的大豆种子,每株 4–5 粒,放入 50ml 离心管内发芽(将离心管挤牢在饭盒等容器内,每次可处理数十份),28℃ 两到三天。取下胚轴和胚根 0.1–0.2g(或生长在

<sup>\*</sup> 收稿日期 1999-06-21 Received on June 21, 1999

大田的大豆幼苗的未展开叶 0.1–0.2g)放入 1.5ml微量离心管内,将离心管放入液氮中冻几秒钟后置工作台上,将微量研样器的转头放入离心管并迅速按动手柄数次。样品研好后将转头取出,用镊子或硬毛刷剔出转头沟槽中的样品,用蒸馏水涮洗两次,然后用干净纱布擦净转头(或更换转头)可进行下一个样品的操作。研好的样品放入冰中或  $-20^{\circ}\text{C}$  备用。

### 3 提取缓冲液成分

试验采用两种提取缓冲液:

SDS 100mM Tris-HCl(pH8.0), 500mM NaCl, 50mM EDTA, 1.25% SDS

CTAB 1.0% W/V CTAB, 0.7M NaCl, 10mM EDTA, 50mM Tris-HCl(pH8.0),

### 0.1% 巯基乙醇

#### 4 DNA提取程序

- 每管加入 500ul在  $65^{\circ}\text{C}$ 水浴中预热的 SDS提取缓冲液,混匀;
- 放入  $65-80^{\circ}\text{C}$ 水浴中,颠倒离心管数次,放出管内冷气,保温 5–20分钟;
- 每管加入 150ul 5M KAC,混匀,冰浴 10分钟并不断混匀;
- $4^{\circ}\text{C}$ , 10000 RPM,离心 10分钟;
- 将上清移入另一离心管内,加入等体积的氯仿异戊醇(24:1),快速颠倒离心管直至形成乳状液不再很快分层;
- $4^{\circ}\text{C}$ , 8000 RPM离心 5分钟;
- 小心将上清移入另一离心管中,加入 2倍体积的冷乙醇,混匀,放置 5–10分钟;
- $4^{\circ}\text{C}$ , 10000 RPM离心 10分钟;
- 倒掉上清,用 70%乙醇洗管壁和沉淀两次,将离心管倒置在纸巾上,干燥 20–30分钟;
- 每管加入 200ul TE缓冲液溶解沉淀

### 5 模板 DNA的检测

#### 5.1 琼脂糖凝胶电泳检测

取 4ul DNA溶液加 1ul上样缓冲液,在 0.8%琼脂糖凝胶上电泳。用  $\lambda$  DNA作 Marker,凝胶用溴化乙锭染色,在紫外灯下观察电泳结果

#### 5.2 PCR检测

将提取的样品 DNA溶液稀释 10–50倍后用作模板,用一个随机引物进行 PCR扩增反应。反应体积为 20ul(2.0mM dNTPs 1.6ul, 25mM MgCl<sub>2</sub> 2ul, 10X反应缓冲液 2ul, 随机引物 1ul, 模板 DNA 1ul, 4u/ul Taq酶 0.4ul, 水 11ul)。反应程序为  $95^{\circ}\text{C}$ , 10分钟 + 30个循环( $94^{\circ}\text{C}$ , 1分钟;  $35^{\circ}\text{C}$ , 1分钟;  $72^{\circ}\text{C}$ , 2分钟) +  $72^{\circ}\text{C}$ , 10分钟,  $4^{\circ}\text{C}$ 保温。反应结束后, PCR扩增产物在 1.4%琼脂糖凝胶上电泳

## 结果与讨论

### 1 微量样品研磨器的效果

中国机械进出口总公司出品的螺旋棘轮螺钉旋具的转头的直径和长度与 1.5ml的离

?1994–2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://w

心管最为匹配,用其改制的微量样品研磨器效果最好。快速按动手柄,转头的转速可达 300 RPM 左右,转头上的十字沟槽与离心管壁形成较大研磨力,使经液氮冷冻的样品很容易被研碎。研磨一个样品只需 0.5–1 分钟。大豆下胚轴经液氮冷冻后较硬,如用国产离心管容易破裂,需用进口离心管进行研磨。叶片、幼苗等不太硬的样品可用国产离心管,以降低成本。

## 2 两种提取缓冲液的效果比较

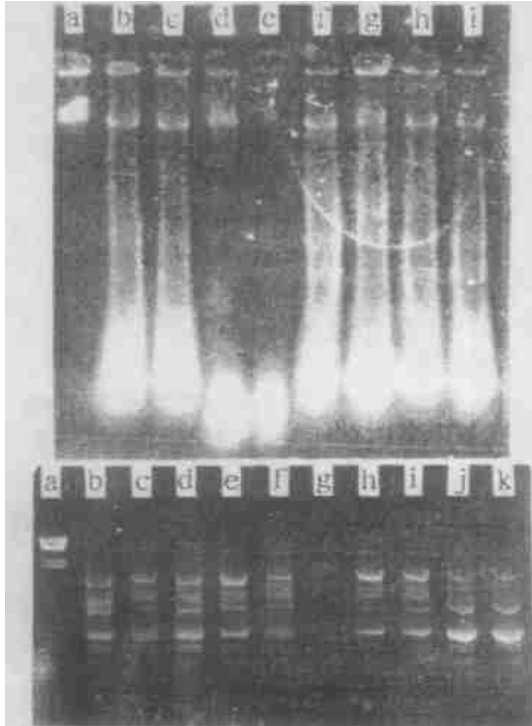


图 1 琼脂糖凝胶电泳鉴定模板 DNA

Fig. 1 Examination of the template DNA by electrophoresis in agarose gel

(a)  $\lambda$ -DNA; (b, c). SDS 65°C 20min; (d). CTAB 65°C 10min; (e). CTAB 65°C 20min; (f). SDS 65°C 5min; (g). SDS 65°C 10min; (h). SDS 80°C 5min; (i). SDS 80°C 10min

图 2 随机引物 PCR 鉴定模板 DNA 质量

Fig. 2 Examination of the template DNA by random primer PCR

(a). Marker; (b, c). SDS 65°C 20min; (d). SDS 65°C 5min; (e). SDS 65°C 10min; (f). CTAB 65°C 10min; (g). CTAB 65°C 20min; (h). SDS 80°C 5min; (i). SDS 80°C 10min; (j, k). SDS 65°C 5min (大豆叶片 DNA DNA from soybean leaves)

两种提取缓冲液提取的大豆模板 DNA 的质量比较的结果表明,用 CTAB 提取液提取的大豆基因组 DNA (图 1d, e) 较 SDS 提取液降解严重,前端的小片段比后者的小。当处理时间为 20 分钟时, DNA 已基本上全部降解而缺少大片段的谱带 (图 1e)。用其作为模板的 PCR 扩增产物无带 (图 2g)。而 SDS 提取液提取的 DNA 的质量在不同条件下比较稳定 (图 1b, c, f–i)。

## 3 不同温度和处理时间对大豆模板 DNA 质量的影响

从 DNA 溶液的电泳 (图 1) 和 PCR 扩增产物的电泳 (图 2) 的结果可以看出 65°C 和 80°C 两个温度处理所得的模板 DNA 的质量无明显差异;处理时间 5–20 分钟之间也无明显差异。这说明由于样品体积较小,处理时间可以短一些。为了降低成本,提高效率,可以采用 65°C 处理 5 分钟。

## 小 结

按本文所述方法改制的微量样品研磨器成本低 (每支只需十几元钱),使用方便,研磨

效果好,不但解决了大豆大批量微量样品的研磨问题,也适用于愈伤组织、试管苗等其它植物小样品的研磨,是样品研磨技术上的一个突破。

本文的大豆模板 DNA 分离程序,只用氯仿异戊醇抽提一次,并且提取时间可缩短到 5 分钟,是目前最简单、快速的方法。用该程序每天可处理近百个样品(取决于离心机转头的孔数)。程序中两个关键步骤是:① 氯仿抽提时应反复颠倒离心管(30 秒钟以上)直至停止时形成的乳浊液不很快分层;② 最后一步 DNA 溶解时,体积不能太小(100–200  $\mu$ l)。体积太小,溶解困难,并影响 PCR 扩增的效果。我们用 0.1–0.2 g 的样品量,最后溶解体积为 200  $\mu$ l,再稀释 10–50 倍用作模板,PCR 扩增的效果很好。

已使用该方法处理了上千份大豆样品,效果稳定。同时还用该方法分离了马铃薯、水稻、小麦等其它作物的 DNA,也收到很好效果。

### 参 考 文 献

- [1] Hong Wang et al. 1993. A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic Acids Res*, 21(7): 4153–4154
- [2] Oard JD et al. 1992. Rapid isolation of rice and maize DNA for analysis by random-primer PCR. *Plant Molecular Biology Reporter*, 10: 234–241
- [3] Stewart Jr. CN. 1994. Soybean DNA isolation procedure using fresh tissue. *Soybean Genetics Newsletter*, 21: 243–244
- [4] Robert GB. 1997. Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48: 297–326

## RAPID ISOLATION OF SOYBEAN DNA FOR PCR WITH LARGE NUMBERS OF SMALL SAMPLES

Zhou Sijun

(*Biotechnology Research Center, Heilongjiang Academy  
of Agricultural Sciences, Harbin, 150086*)

### Abstract

The problem of grinding large numbers of small samples of fresh soybean tissues rapidly and without loss was solved by using a grinder modified with a spiral ratchet screw driver. The effect of different extraction buffers, different temperatures and different treatment times on the quality of DNA were compared by examining the DNA with random-primer PCR. The result showed that soybean template DNA suitable for PCR reaction could be gotten by using SDS extraction buffer, 5 minutes treatment with 65–80°C and one time of extraction with chloroform and iso-amyl alcohol. DNA was isolated from more than a thousand soybean samples with this procedure. The effect was stable.

**Key words** Soybean; PCR; DNA isolation