

# 用于 SSR 分析的大豆 DNA 的快速提取<sup>\*</sup>

关荣霞 常汝镇 邱丽娟

(中国农业科学院作物品种资源研究所 100081)

**摘要** 描述了一种可从大豆种子及叶片中快速提取 DNA 的方法,既节省时间,又可获得供上百次 PCR 扩增使用的 DNA。并通过实验证明该方法获得的 DNA 可用于大豆 SSR 分析。

**关键词** 大豆; DNA; SSR

**中图分类号** S 565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2003)01-0073-02

随着分子生物学的飞速发展,SSR 等分子生物学技术已被广泛地应用于大豆的遗传多样性分析、遗传图谱的构建、抗病基因的分子标记等研究<sup>[1-3]</sup>。从不同大豆的不同组织中快速获取可用于 PCR 扩增的 DNA,对于高通量样品分析具有重要的意义。本文介绍的方法从样本材料的准备以及 DNA 的提取上都比原有的方法节省一半时间。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及样品的准备

供试材料为大豆干种子和从大田采集的幼嫩叶片。引物为随机选取的大豆 SSR 引物。

大豆种子材料的准备:从大豆植株上取嫩绿的叶片,每份材料取约 2cm<sup>2</sup> 大小的叶片组织,置于 1.5ml 离心管中,取少量液氮加入离心管,用玻璃棒或不锈钢锥子将冻干的叶片迅速捣碎(无液氮时可直接用玻璃棒将叶片捣碎),备用。

### 1.2 DNA 的提取与 PCR 扩增

DNA 提取:在上述装有备用材料的 1.5ml 离心管中加入 400 $\mu$ l 预热的 SDS 提取液(含 100mmol/L Tris-HCl pH8.5, 50mmol/L EDTA pH8.0, 500mmol/L NaCl, 2%SDS),65℃水浴 30min,加入等体积酚/氯仿(1:1),充分混匀,静置 10min,1000rpm 离心 5min,取上清液于另一新离心管中,加入 2 倍体积无水乙醇,6000rpm 离心 2min,弃上清,用 70%乙醇洗 DNA 沉淀一次,风干,加 300 $\mu$ l 超纯水溶解。

PCR 反应体系及循环参数:PCR 反应体系含 1X 的 PCR Buffer, 1.5mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 150 $\mu$ mol/L dNTPs, 150pmol/L 引物, 1.0U Taq 酶, 2 $\mu$ l dna 溶液,加 ddH<sub>2</sub>O 补足 20 $\mu$ l。PCR 反应程序为 94℃预变性 30sec, 47℃退火 30sec, 72℃延伸 30sec, 运行 35 个循环;最后 72℃延伸 5min。扩增产物中加入 6 $\mu$ l Loading Buffer, 94℃变性 5min,取出后置于冰水中迅速冷却,6%变性聚丙烯酰胺电泳检测。

## 2 结果与分析

用上述方法提取的大豆种子及叶片 DNA,加入 300 $\mu$ l 超纯水溶解,可直接用于 SSR 检测,并能得到清晰的谱带(图 1)。此方法与传统的 DNA 提取方



1—8: 种子 DNA 扩增结果 9—16: 叶片 DNA 扩增结果

1—8: Amplification of soybean seed DNA

9—16: Amplification of soybean DNA isolated from leaf sample

图 1 SSR 扩增结果

Fig. 1 Result of SSR amplification

\* 收稿日期:2002-10-28

作者简介:关荣霞(1974-),女,博士,研究方向大豆分子标记辅助育种。导师:常汝镇研究员。

法相比,可节省大量的时间:(1)用于提取 DNA 的材料无需在研钵中研磨。(2)采用酚/氯仿(1:1)一次抽提,减少了抽提次数。其次本方法可以节约实验材料,使一粒种子的 PCR 检测与蛋白质亚基检测可以同时进行,而叶片可以在出苗到花期的任何时间采集,无需将采集时间限制在幼苗阶段<sup>[4]</sup>,对于品种纯度的检测以及大田真假杂种的鉴定非常方便。另外此方法提取的 DNA 量远高于一步法<sup>[5]</sup>。

本方法的操作需注意以下几点:(1)材料不能过多,否则可能会因为蛋白质抽提不彻底而导致扩增失败。(2)采集叶片时尽量取侧枝嫩芽,叶片面积 2cm<sup>2</sup> 大小为宜,以便一次抽提去净色素及蛋白。

该方法经多次重复验证,上前已在实验室推广,分别用于大豆遗传多样性分析,以及杂种纯度鉴定

等研究。

参 考 文 献

1 赵洪锦,王玉民,李启云,等. 不同纬度栽培大豆和野生大豆 SSR 分析[J]. 大豆科学, 2001, 20(3): 172-176.  
2 Cregan P B, Jarvik T, Shoemaker R C, Lark K G, . et al. An integrated genetic linkage map of the soybean genome[ J]. Crop Sci. 1999, 39: 1464-1490.  
3 王永军,盖钧镒,邢邯,等. 抗感 SCN 基因的一个 RAPD 标记[ J]. 大豆科学, 2000, 19(4): 293-298.  
4 周思君. 小样品大批量大豆模板 DNA 快速分离法[ J]. 大豆科学, 1999, 18(4):318-321.  
5 张永明,孙彩云,梁承邨. 一步法提取植物 DNA 用于大规模 RAPD 分析[ J]. 遗传, 2000, 22(2): 106

RAPID ISOLATION OF SOYBEAN DNA FOR SSR ANALYSIS

Guan Rongxia Chang Ruzhen Qiu Lijuan

(*Institute of Crop Germplasm and Resources, CAAS, Beijing 100081*)

**Abstract** Good quality and quantity DNA can be isolated rapidly from soybean seed and leaf sample by this simple method, and the DNA was successfully used for SSR analysis.

**Key words** Soybean; DNA SSR