

# 大豆种子 DNA 的提取方法<sup>\*</sup>

杨少辉<sup>1</sup> 张丽娟<sup>2</sup> 段会军<sup>1</sup> 张彩英<sup>1</sup>

(1. 河北农业大学农学院, 保定 071001; 2. 莱阳农学院农学系, 莱阳 265200)

**摘要** 用大豆干种子和叶片分别为材料, 进行以 PCR 为目的大豆模板 DNA 的提取和分析。实验结果表明: 利用大豆干种子为材料, 虽然在提取 DNA 量上比用叶片提取的少, 但对 PCR 扩增结果没有影响。因此, 用大豆干种子直接提取 DNA 可以节省育苗时间, 获得完全可以满足试验要求的大豆模板 DNA。

**关键词** 大豆; 干种子; PCR; DNA 提取

**中图分类号** S 565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2003)02-0151-03

在做 PCR 试验时, 首先面临的一个问题即是模板 DNA 的提取。对于大豆来说, 一般实验室都是利用幼苗叶片为材料, 经液氮研磨提取 DNA。此过程必须要经过浸种催芽、幼苗培养、液氮研磨等过程, 一般要用两周左右的时间才能进行 DNA 的提取并进一步开展实验。本方法用大豆干种子进行 DNA 提取可在一天内提取试验需模板, 从而节约了育苗时间和液氮费用, 具有简便、快速、经济等优点。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

大豆干种子、育好的大豆幼苗。

### 1.2 DNA 提取

#### 1.2.1 干种子提取 DNA

对前人有关 DNA 提取方法进行了适当改进, 具体步骤如下:

①取大豆干种子两粒, 去净种皮后在研钵中研磨成粉末状。

②平分四份移至 1.5ml 离心管中, 每管加入 500 $\mu$ L 65 $^{\circ}$ C 预热的 SDS 提取冲液(100mM Tris-HCl (pH8.0), 500mM NaCl, 50mM edta, 4% SDS), 混匀。浸软后再加入 450 $\mu$ L 缓冲液, 混匀。

③放入 65—80 $^{\circ}$ C 水浴中, 颠倒离心管数次, 保温 20 分钟。

④每管加入 500 $\mu$ L 5MKAC, 混匀, 冰浴 10 分钟。

⑤4 $^{\circ}$ C 10000rpm, 离心 2 分钟。

⑥将上清液移入另一离心管中, 加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1), 颠倒离心管直至形成乳状液不很快分层。

⑦4 $^{\circ}$ C 4000rpm, 离心 5 分钟。

⑧将上清液移入另一离心管中, 加入两倍体积的冷乙醇, 混匀, 放置 5—10 分钟。

⑨离心得到 DNA 沉淀。TE 缓冲液溶解后再利用氯仿-异戊醇(24:1)和氯仿各重复提取一次。

⑩风干 DNA 后, 每管加入 50 $\mu$ L TE 缓冲液溶解沉淀, 并于-20 $^{\circ}$ C 保存。

#### 1.2.2 叶片提取 DNA 方法

采用周思君(1999)的方法进行大豆叶片的 DNA 提取(用 1.25% SDS 提取缓冲液)。

### 1.3 模板 DNA 的检测

#### 1.3.1 琼脂糖凝胶电泳检测

取 4 $\mu$ L DNA 溶液加 1 $\mu$ L 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。

#### 1.3.2 PCR 检测

将提取的样品 DNA 溶液稀释 10—50 倍后作模板(最终模板浓度为 20 ng/ $\mu$ L), 用一个随机引物进行 PCR 扩增反应。反应体积为 25 $\mu$ L, 其中

\* 收稿日期: 2002-09-10

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目(301134)。

联系人: 张丽娟。

作者简介: 杨少辉(1977—), 女, 硕士, 现为南开大学博士研究生。

包括 PCR Buffer (含  $Mg^{2+}$ ) 2.5  $\mu$ L, 2mM 有 dNTP 2.5  $\mu$ L, Taq 酶 1.2U, 引物 3  $\mu$ L, 模板 40ng, 其余体积用超纯水补齐。反应混合物用 20  $\mu$ L 矿物油覆盖。PCR 反应在 PTC-100 型 DNA 扩增仪中进行。反应程序为: 94  $^{\circ}$ C 5 分钟, 一个循环; 94  $^{\circ}$ C 1 分钟, 36  $^{\circ}$ C 1 分钟, 72  $^{\circ}$ C 3 分钟, 44 个循环, 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 分钟。反应结束后扩增产物用含有 0.5  $\mu$ L/ml EB 的 1.4% 琼脂糖凝胶 120V 电压电泳 2 小时, 在

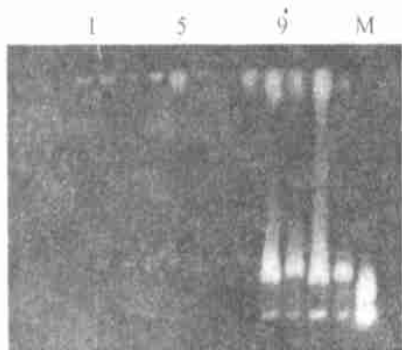


图 1 取样部位对 DNA 数量的影响

Fig. 1 Effect of extracted part to DNA No.

从左到右: 1—8. 用干种子提取 DNA

9—12 用叶片提取 DNA; M:  $\lambda$  DNA

紫外灯下检测结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 两种方法提取 DNA 数量的比较

两种方法提取的大豆模板 DNA 电泳结果表明, 用干种子提取的 DNA 在数量上比用叶片提取的 DNA 要少一些, 见图 1。



图 2 取样部位对 PCR 结果的影响

Fig. 2 Effect of extracted part to PCR result

从左到右: 1—4 用干种子提取 DNA

5—8 用叶片提取 DNA; M: DL 2000

### 2.2 两种方法提取 DNA 质量的比较

用干种子提取的 DNA 纯度比叶片提取的 DNA 要差一些, 用肉眼能够看出干种子提取的 DNA 粘度较小, 颜色微黄。而叶片提取的 DNA 呈白色絮状沉淀, 粘度较大。两种来源的 DNA 分别做 PCR 扩增, 结果没有明显区别, 如图 2。

## 3 小结

按本文所述用干种子提取 DNA 的方法方便、简单、成本低、效果好。尽管用干种子比用叶片提取的 DNA 数量要稍微少一些, 但也完全可以满足一般试验的需要量, 可以解决用叶片提取 DNA 所需时间长的的问题, 是目前大豆 DNA 提取中比较简便的一种方法。

提取过程中三个关键步骤是: ①种皮要去干净, 减少种皮中杂质的影响并利于研磨。②SDS 提取液的浓度由用叶片提取 DNA 时的 SDS 提取液 1.25% 浓度增至 4%。③增加氯仿—异戊醇 (24:1) 和氯仿的抽提次数, 以除去杂质和酚。

已经使用该方法提取了数十份大豆品种的 DNA, 效果稳定可靠。

## 参 考 文 献

- 1 McDonald M B, Elliot L J, Sweeney P M. DNA extraction from dry seeds for RAPD analysis in varietal identification studies [J]. Seed Science and Technology, 1994, 22: 171—176.
- 2 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 [J]. 大豆科学, 2000, 19(2): 210—217.
- 3 周思君. 小样品大批量模板 DNA 快速分离法 [J]. 大豆科学, 1999, 18(4): 318—321.

RAPID EXTRACTION OF SOYBEAN DNA FOR PCR FROM DRY SEED

Yang Shaohui<sup>1</sup> Zhang Lijuan<sup>2</sup> Duan Huijun<sup>1</sup>

(1. Agronomy College, HAU Baoding 071001; 2. Lanyang Agricultural College, Lanyang 265200)

**Abstract** A method for genomic DNA isolation of soybean was set up. The result showed that the improved extraction method from dry soybean seed was faster than from fresh leaf, and the sampling issue had no effect on the quality of DNA extracted. The extraction from dry seed can save many times and cut down expenses.

**Key words** Soybean; PCR; DNA extraction

免费供种 保价回收 预付回收资金

只需来封信 VCD 影碟机、V8088 话机、照相机和种源免费送给你。

我单位是专业从事中药材种植研究、良种繁育、推广、加工和回收为一体的科研机构,近年来研究开发出十几个适应大田、室内、阳台及庭院种植的品种,且好种易管,南北适宜的名贵中药良种,最佳种植期春 2—6 月,秋 8—11 月。人参头,生长期 50—60 天,667m<sup>2</sup> 产成药 1.5—2kg。回收价 50000 元/kg。泊夫兰从种到收 60 天,667m<sup>2</sup> 产成药 2—3kg,回收价 38500 元/kg。另向种植户提供草红花、冬虫夏草、仙人伞、柴胡、药枣等 80 余种药材。为解决药农后顾之忧,完成上交和创汇任务,由我单位免费供种,负责种植技术,上门现金回收产品,产品由我单位回收后(我)一(你)九按利润分成,签订五年产品法律公证回收合同。

为确保种植成功,凡合作者我单位将一律赠送 VCD 影碟机、V8088 话机及全套《中药材高产栽培新技术》光碟一套。另外,本单位面向全国招收驻外业务员授权总代理,月工资 1800 元。愿合作者速来信联系领取种子,来信时夹寄你地区土样 2g 于信内,供化验分析后即寄你地适宜种植品种,本广告长期有效,欢迎实地考察。

联系地址 河南省西峡县星火农业经济发展贸易部

联系人 代小红 邮 编 474500

电 话 0377—4671768 4671659(传真)

营业执照注册号 4113303007075 种子经营许可证 001