

文章编号: 1005-0906(2004)02-0111-03

玉米单粒和单叶片 DNA 快速提取及 SSR 标记分析

高文伟², 李晓辉³, 李新海¹

(1. 中国农业科学院作物育种栽培研究所, 农业部作物遗传育种重点开放实验室, 北京 100081;
2. 新疆农业大学农学系, 新疆 乌鲁木齐 830052; 3. 东北农业大学农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 优化建立了玉米单粒种子胚和单叶片基因组 DNA 快速提取方法。琼脂糖凝胶检测结果表明, 提取的 DNA 主带清晰, 无降解现象, 质量好, 可以满足 SSR-PCR 分析的需要。结合采用 SSR 分子标记技术, 此 DNA 提取方法可有效地用于玉米种子纯度检验和分子标记辅助育种。

关键词: 玉米; DNA 提取; SSR 标记; 种子纯度; 分子标记辅助选择

中图分类号: S513.035.2

文献标识码: A

A Method of DNA Rapid Extraction from Single Corn Kernel and Leaf and SSR Marker Analysis

GAO Wen-wei², LI Xiao-hui³, LI Xin-hai¹

(1. Institute of Crop Breeding and Cultivation, CAAS, Key Laboratory of Crop Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture, Beijing 100081; 2. Departement of Agriculture, Xinjiang Agricultural University, Wulumuqi 830052; 3. College of Agronomy, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: A method of DNA rapid extraction from single kernel and leaf of maize was developed in this paper. Agrosegel detection revealed that the main band of the DNA extracted by the rapid method is clear and no degraded, indicating that it can be used in SSR marker analysis. With adoption of SSR mark technology, the DNA extraction method can be effectively employed in seed purity analysis and marker aided breeding activity.

Key words: *Zea mays* L.; DNA extraction; SSR marker; Seed purity; Marker aided selection

近年来, 分子标记技术已逐步被应用于种子纯度检验、标记辅助选择或转基因作物种子检测等研究领域(赵久然, 1999; 李晓辉等, 2003; 梁荣奇等, 2001), 有力地促进了种子检测和育种技术的发展。但采用分子标记技术开展科研工作的前提应首先建立起大规模快速提取个体 DNA 的方法。以往大多以较大的幼芽或叶片为材料, 采用 CTAB 法或 SDS 法提取 DNA, 操作步骤复杂, 所需时间较长, 不能满足种子检测和标记辅助选择技术的需要。王玉民等(1996)和郭景伦等(1997)先后提出用于玉米种子 RAPD 分析的单粒种子 DNA 提取方法。本文在已有研究基础上, 以单粒种子胚和单叶片为材料, 旨在建立能结合 SSR 标记技术用于玉米种子纯度检验和标记辅助选择的 DNA 快速提取方法。

收稿日期: 2003-06-20; 修回日期: 2003-09-09

基金项目: 本研究得到科技部重点项目(K2000-20-43)资助

作者简介: 高文伟(1973-), 男, 硕士研究生, 从事玉米遗传育种及种子技术研究。Tel: 010-68918596

1 材料与方法

1.1 实验材料

玉米单交种四单 19 及亲本自交系 (444 和 Mo17), 用于种子纯度检验。自交系是通过套袋自交获得, 杂交种为手工配制。19 份优质蛋白玉米(QPM)材料用于 opaque2(o2)基因的微卫星标记检测。

1.2 实验方法

1.2.1 引物

SSR 引物 phi090 和 phi057 序列来自 Maize DB (2002), 由上海生物工程公司合成。

1.2.2 DNA 提取方法

单粒种子胚 DNA 提取: 选取若干粒种子, 用镊子和刀片将种子切开取胚, 放入 1.5 mL 离心管中。加入 100 μ L 氯仿, 用锥形玻璃棒碾磨。加入 300 μ L DNA 提取液 (100 mM pH 7.6 Tris-HCl, 100 mM EDTA, 500 mM NaCl, 1.5% SDS), 并充分混匀。12 000 r/min, 离心 2 min。吸上清液, 在 0.8% 琼脂糖电泳检测或稀

释数倍后,直接用于 PCR 扩增。

单叶片 DNA 提取:取 4~5 叶期玉米幼苗的叶片于 1.5 mL 的 PCR 管中,放入液氮缸中。用锥形玻璃棒研磨叶片成粉末状(速度要快,以防降解)。加入 700 μ L 2%的“SDS”提取液,充分混匀。在 65℃下,水浴 30 min。加入等体积的氯仿,充分混匀。5 000 r/min,离心 10 min,取上清液置于一新的 1.5 mL 管中。加入等体积异丙醇,沉淀 DNA。5 000 r/min,离心 10 min,弃上清液。用 1 mL 70%乙醇洗涤两次。晾干沉淀后加入 300 μ L 1×TE 溶解 DNA。

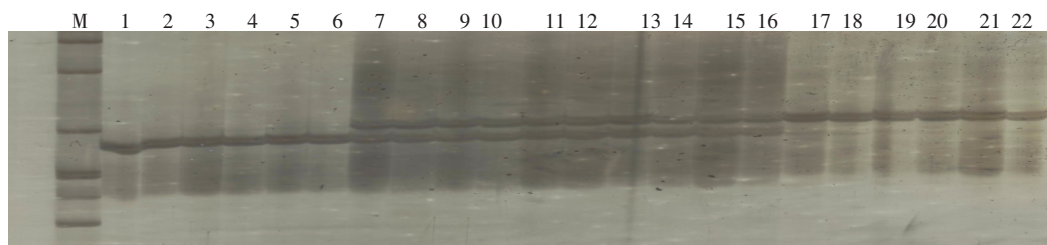
1.2.3 SSR 标记技术

PCR 扩增体系、热反应程序、聚丙烯酰胺凝胶电泳检测、银染程序等流程参见李晓辉等(2003)的实验方法。

2 结果与分析

2.1 玉米单粒种子胚和单叶片 DNA 快速提取与检测

如图 1 所示,用玉米单粒种子胚快速提取技术获得的基因组 DNA 经琼脂糖凝胶检测,其主带清晰,整齐一致,分子量在 40~50 kb,无降解现象。经紫外分光光度计检测,A260/A280 比值在 1.8~2.0,表明提取的 DNA 质量较好,浓度比较一致。与传统方法(如 CTAB 和 SDS 法)相比,本文提出的方法无 DNA 沉淀和用 TE 溶解等步骤,操作简单,所需时间较短。



1~6 为 444; 7~16 为四单 19; 17~22 为 Mo17

图 3 玉米杂交种四单 19、亲本 444 和 Mo17 的 SSR 扩增图谱

2.3 单叶片 DNA 提取方法在优质蛋白玉米 o2 基因标记辅助选择中的应用

监测育种材料的赖氨酸含量是优质蛋白玉米育种的关键环节。采用物理或生化技术测定赖氨酸含量,技术繁杂且费用昂贵。o2 基因可以显著提高玉米子粒胚乳中的赖氨酸含量。同时 o2 基因的克隆及微卫星标记 phi057 的开发(Chin 等,1996),亦为采用分子标记辅助选择 o2 基因,进而选育 QPM 材料提供了条件。

图 1 玉米单粒胚快速提取的 DNA 电泳检测

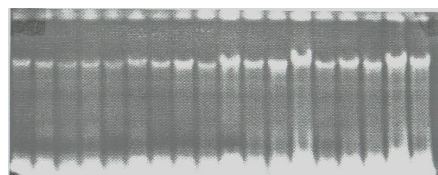


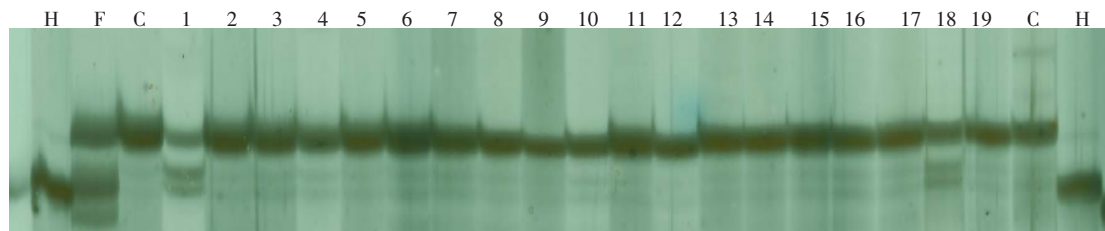
图 2 玉米单叶片快速提取的 DNA 电泳检测

由图 2 可见,用单叶片快速提取法获得的 18 份 DNA 质量较好,主带清晰,未发生降解现象。由于未去除 RNA,其含量较高,但这并不影响 PCR 扩增。

2.2 单粒种子胚 DNA 快速提取方法在玉米种子纯度检验中的应用

用单粒种子胚 DNA 快速提取方法抽提玉米杂交种四单 19 及亲本自交系(444 和 Mo17)的 DNA。采用能够揭示亲本间遗传多态性的引物 phi090 对四单 19 及其亲本进行 SSR 标记分析。由图 3 可见,1~6 和 17~22 泳道分别为亲本 444 和 Mo17 的扩增带,7~16 泳道为杂交种四单 19 的扩增带。所有泳道的扩增带型均十分清晰。这表明用此方法提取的 DNA 完全可以满足 SSR 标记分析,用于玉米种子纯度检验。

用单叶片 DNA 提取方法抽提 19 份 QPM 材料的 DNA,利用微卫星标记 phi057 检验其在 o2 位点的纯合程度。从图 4 可见,除 1 号材料扩增带型与黄早四×CA335 一致,呈杂合带型外,其余 18 份材料的带型均与 CA335 一致,为 o2o2 纯合型,说明这些材料在 o2 位点已纯合。同时可以看出,所有 19 份材料的扩增带型均很清晰,表明用本文提出的方法抽取的 DNA 可以满足优质蛋白玉米 o2 基因标记辅助选择的需要。



H 为普通玉米黄早四, F 为黄早四×CA335, C 为优质蛋白玉米 CA335, 1~19 为优质蛋白玉米材料

图 4 利用微卫星标记 phi057 扩增 19 份优质蛋白玉米材料的单株基因型谱带

3 讨 论

DNA 提取是分子标记技术应用于玉米育种研究的关键步骤, 高效、低成本是其普及推广的前提。目前, SSR 标记技术已被用于种质鉴定、种子纯度分析、遗传图谱构建、基因定位及标记辅助选择等研究领域。本文优化提出的单粒种子胚和单叶片 DNA 快速提取方法实用性较强, 操作步骤简单, 需时短, 完全可以满足 SSR-PCR 扩增要求。对于一个操作者来说, 采用此法在一个工作日内可提取 100 ~ 200 份样品的 DNA, 成功率在 99% 以上。结合 SSR 标记技术, 种子检验部门和育种者可将此 DNA 提取方法有效地用于玉米品种纯度鉴定和分子标记辅助育种。

参考文献:

- [1] 王玉民, 庄丙昌, 等. 玉米半粒种子 DNA 提取及 TAPD 分析[J]. 玉米科学, 1996, 4(3): 27-28.
- [2] 李晓辉, 李新海, 等. SSR 标记技术在玉米杂交种纯度鉴定中的应用[J]. 作物学报, 2003, 29(1): 63-68.
- [3] 赵久然, 郭景伦, 等. 利用 DNA 指纹鉴定玉米杂交种纯度及其真伪技术的研究[J]. 玉米科学, 1999, 7(1): 9-13.
- [4] 郭景伦, 赵久然, 等. 玉米单粒种子 DNA 提取新方法[J]. 北京农业科学, 1997, 15(2): 1-2.
- [5] 梁荣奇, 张义荣, 等. 利用 Wx 基因分子标记辅助选择培育糯性小麦[J]. 遗传学报, 2001, 28(9): 856-863.
- [6] Chin E, Senior L, Shu H, et al. Maize simple repetitive DNA sequence: Abundance and allele variation. Genome, 1996, 39: 866-873.