

# 一种快速提取玉米大群体基因组 DNA 的方法

高玉峰 张攀 郝晓敏 严建兵 李建生 杨小红\*

(中国农业大学 国家玉米改良中心/农业部作物基因组学与遗传改良重点实验室,北京 100193)

**摘要** 快速高效的 DNA 提取方法是玉米大规模分子育种的第一步,因此,需要发展一种快速提取玉米基因组 DNA 的方法,以满足我国中小型实验室的需要。本研究介绍了一种可用于玉米大规模基因组 DNA 提取的方法:先利用改良碱煮法提取玉米籽粒小块胚乳的 DNA,进行基因型鉴定,对大群体进行筛选,再利用电钻磨样及简化的 CTAB 法快速提取玉米苗期叶片的 DNA,进行后期的研究。这种方法使得玉米大群体的筛选和研究简单化、快速化、常规化,可广泛应用于玉米分子育种。

**关键词** 玉米; 大群体; 胚乳; 碱煮法; 快速提取

中图分类号 S 512 文章编号 1007-4333(2011)06-0032-05 文献标志码 A

## A rapid DNA extraction method for large maize populations

GAO Yu-feng, ZHANG Pan, HAO Xiao-min, YAN Jian-bing,  
LI Jian-sheng, YANG Xiao-hong\*

(National Maize Improvement Center of China/Key Laboratory of Crop Genomics and  
Genetic Improvement, China Agricultural University, 100193 Beijing, China)

**Abstract** Maize is one of the most important crops in China. With the development of molecular biology, molecular breeding is becoming one of the hot spots in maize genetics and improvement. The rapid method of DNA extraction with high efficiency is the first step in large-scale molecular breeding. Therefore, developing a rapid DNA extraction method for large maize populations is necessary to meet the need of the small labs in China. In this study, a new method of extracting DNA for genotyping large populations was developed. Firstly, kernel endosperm tissue in maize was used to extract DNA by using the improved alkali-boiling method; secondly, tender leaf tissue in maize was used to extract DNA by utilizing electric drill milling and simplified CTAB method. These two methods were combined to prepare DNA for genotyping before and after planting. Compared with the conventional ways of genotyping in large populations, this new method with higher efficiency and lower costs could be widely used in maize molecular breeding.

**Key words** maize; large populations; endosperm; alkali-boiling method; rapid extraction

玉米是重要的粮食、饲料和工业原料,也是重要的能源作物<sup>[1]</sup>。2009 年我国玉米种植面积为 3 118.26 万 hm<sup>2</sup>, 超过水稻和小麦成为种植面积最大的农作物<sup>[2]</sup>。在过去一个世纪里,传统育种对玉米产量的增加起了至关重要的作用,但是其选择效率低,周期长,目前面临越来越大的挑战。加强玉米的基础研究对玉米的遗传改良十分必要<sup>[3]</sup>。近 20 年来,随着分子生物学的发展,利用分子标记

对控制玉米重要农艺性状和品质性状的 QTL 进行精细定位和克隆、玉米自交系分子标记辅助选择改良、玉米大规模转基因后代的检测等成为玉米分子育种的重要环节,而这些研究都需要进行大批量 DNA 的提取<sup>[4]</sup>。传统的基因型筛选方法是在田间种植玉米大群体后,取单个植株的叶片进行基因组 DNA 的提取,然后进行基因型筛选,操作冗余复杂,选择效率很低,严重制约了选择鉴定的效

收稿日期: 2011-04-11

基金项目: 国家“973”计划项目(2007CB109001)

第一作者: 高玉峰,博士研究生, E-mail: nongda7015@163.com

通讯作者: 杨小红,副教授,主要从事玉米基因组学研究, E-mail: redyx2005@126.com

率<sup>[5]</sup>。同时，已发展的玉米单粒种子 DNA 提取方法，主要是将种子粉碎或者是利用种子的胚提取 DNA<sup>[6-9]</sup>，这些方法破坏了种子，无法再种植得到后代。在对选择的单株进行后期研究时，由于需要大量的 DNA，通常是利用传统的方法从叶片中提取 DNA，操作步骤复杂，提取时间长，效率低<sup>[10]</sup>。本研究开发了一种玉米大群体基因型筛选的方法：先利用碱煮法提取玉米单籽粒胚乳的 DNA，快速进行基因型鉴定后，种植中选单株，然后利用电钻磨样及简化的 CTAB 法快速提取法提取玉米幼苗叶片的大量 DNA 用于后期的分子生物学分析。这种方法有利于提高玉米大群体基因型筛选和研究的效率。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以 B73 和 By804 组配的重组自交系<sup>[11]</sup>中含油量较高的一个家系为供体亲本，B73 为轮回亲本发展的 BC<sub>5</sub>F<sub>2</sub> 果穗上的种子及其发芽的植株叶片。

### 1.2 DNA 提取方法

#### 1.2.1 碱煮法快速提取玉米种子胚乳 DNA

将玉米种子于水中浸泡数分钟，取出放到吸水纸去除种子表面水分后，单粒放到木板上，用手术刀切下胚乳的一小部分(约整粒种子的 1/20，刚见到白色胚乳为宜)，放到 96 孔 PCR 板中，同时将取样后的种子放到 96 孔深孔板中对应的位置。向装有样品的 96 孔 PCR 板中，每孔加 100  $\mu$ L 的 0.1 mol/L NaOH，盖紧配套的硅胶盖，放入 PCR 仪中，99.9  $^{\circ}$ C 加热 10 min(此步也可在沸水中水浴)。冷却到室温后，快速离心，然后每孔加入 100  $\mu$ L 的 1 $\times$ TE (pH 2.0)，盖紧硅胶盖充分混匀并快速离心，上清液即可直接用做 PCR 反应的模板。

#### 1.2.2 电钻磨样及简化 CTAB 法快速提取玉米幼嫩叶片 DNA

在玉米 5 叶时期，取少量玉米叶片放入 2 mL 离心管中。用镊子将装有玉米叶片的 2 mL 的离心管放入液氮冷冻，然后拿出迅速利用电钻将叶片磨碎。加 600  $\mu$ L 预热至 65  $^{\circ}$ C 的 CTAB 提取缓冲液，混匀；65  $^{\circ}$ C 水浴 20~30 min，不时小心摇动离心管；取出离心管，待冷却至室温(25  $^{\circ}$ C)，加等体积氯仿：异戊醇(24:1)，缓慢充分摇动试管至有机相呈深绿色；室温下 8 000 r/min 离心 6 min，用 200  $\mu$ L 枪头将上清液转移到另一个 1.5 mL 离心管中；加 2/3

体积预冷的异丙醇(-20  $^{\circ}$ C)，混匀；室温下 8 000 r/min 离心 6 min，用 70% 乙醇漂洗 1 遍；将 DNA 晾干，加入适量 TE(pH 8.0，含 RNA 酶)溶解 DNA，保存在 -20  $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

### 1.3 检测方法

#### 1.3.1 DNA 质量检测

将 2 种方法提取的 DNA，以传统 CTAB 法<sup>[11]</sup>提取的 DNA 作为对照，用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测其质量，电泳检测结果在凝胶成像系统中观察并成像。

#### 1.3.2 PCR 产物检测

对于碱煮法提取的玉米种子胚乳基因组 DNA，直接取 5  $\mu$ L 进行 PCR 反应；对于电钻磨样、简化 CTAB 法和传统 CTAB 法提取的基因组 DNA，首先稀释到 10 ng/ $\mu$ L，然后取 5  $\mu$ L 作为模板进行 PCR 扩增。所用引物：1) 扩增 500 bp 片段，正向引物：ATGTCCCTGGAGATGGAGAAG，反向引物：CATCATCAAGCACGCAGTAAAG；2) 扩增 1 200 bp 的片段，正向引物：CAGCAGCGGTGGT-AATTCAR，反向引物：GGTTATGGTGAAG-TGGTGG。反应体系：总体积 15  $\mu$ L，其中 10 $\times$  Buffer 1.5  $\mu$ L，dNTP(2.5 mmol/L) 0.3  $\mu$ L，正向引物(10 pmol/L) 0.3  $\mu$ L，反向引物(10 pmol/L) 0.3  $\mu$ L，Taq(2.5 u/ $\mu$ L) 0.1  $\mu$ L，DNA 5  $\mu$ L，ddH<sub>2</sub>O 7.5  $\mu$ L。反应条件：先用 95  $^{\circ}$ C 变性 5 min，然后进行 35 个循环的扩增(95  $^{\circ}$ C 30 s，56  $^{\circ}$ C 30 s，72  $^{\circ}$ C 45 s)，最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应结束后，取 PCR 反应液(5  $\mu$ L)用 1% 的琼脂糖电泳进行检测。

### 1.4 种子发芽试验

随机选取切去一小部分胚乳的玉米种子 100 粒，分为 2 个重复，按国家农作物种子检验规程进行发芽试验，同时选取 100 粒正常的玉米种子作为对照。在播种后 4 和 7 d，统计其发芽率，并在 7 d 后测量每个植株的株高。

## 2 结果与分析

### 2.1 碱煮法提取玉米胚乳基因组 DNA

#### 2.1.1 DNA 的质量

切取玉米种子的一小块胚乳，通过改良碱煮法提取的 DNA 电泳结果见图 1。从中可以看出，这种方法所提的玉米基因组 DNA 浓度较低，完整性较差，但有可见的 DNA 主条带。

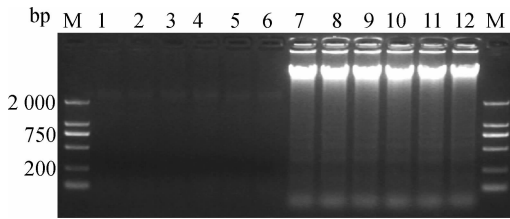


图1 改良碱煮法(泳道1~6)和传统CTAB法(泳道7~12)提取DNA比较

Fig. 1 Quality comparison of DNA extracted using improved alkali-boiling and conventional methods

### 2.1.2 模板DNA的PCR扩增

如图2所示,以通过改良碱煮法提取的DNA作为模板进行短片段的PCR扩增,都能扩增出来目的条带,并且条带清晰(泳道1~6),与以传统CTAB法提取的DNA为模板扩增的效果没有差别(泳道7~12)。结果说明利用碱煮法提取的DNA完全可以进行短片段基因组的PCR扩增,满足基因型检测的需求。以改良碱煮法提取的DNA作为模板进行长片段的PCR扩增时,无法获得以传统CTAB法提取的DNA为模板扩增出清晰的目的条带(图3)。

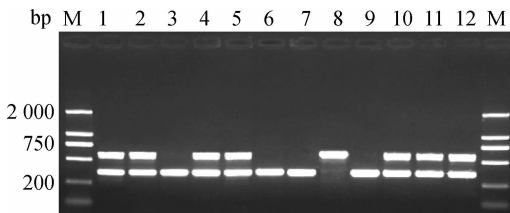


图2 改良碱煮法(泳道1~6)与CTAB法(泳道7~12)提取的DNA进行小片段PCR扩增结果

Fig. 2 Small PCR products amplified from DNA extracted using improved alkali-boiling and conventional CTAB methods

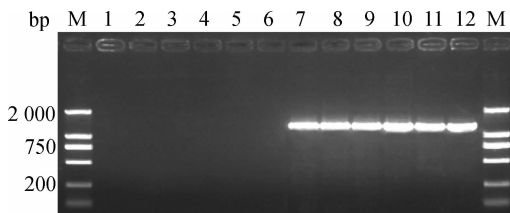


图3 改良碱煮法(泳道1~6)与CTAB法(泳道7~12)提取的DNA进行大片段扩增结果

Fig. 3 Big PCR products amplified from DNA extracted using improved alkali-boiling and conventional CTAB methods

### 2.1.3 切胚乳后的种子发芽率和发芽势

发芽试验时,4和7d统计的发芽率是一致的。其中在第1个重复中,切去一小块胚乳的种子50粒中有44粒正常发芽,发芽率为88%;正常种子中50粒有46粒正常发芽,发芽率为92%。在第2个重复中,切去一小块胚乳的种子50粒中有45粒正常发芽,发芽率为90%;正常种子中50粒中有44粒正常发芽,发芽率为88%。

同时,发芽7d后,在第1个重复中,切去胚乳的种子的幼苗平均株高为(15.9±1.9)cm,正常种子的幼苗平均株高为(16.1±2.2)cm;在第2个重复中,切去胚乳的种子的幼苗平均株高为(15.6±1.5)cm,正常种子的幼苗平均株高为(16.2±1.5)cm。通过*t*测验发现2个重复的切小块胚乳后种子与正常种子苗期株高差异都不显著( $P>0.05$ ,表1)。

表1 切小块胚乳后种子与正常种子苗期株高比较

Table 1 Comparison of seedling height between cutting seeds and CK

重复	株高(平均值±标准差)/cm		<i>P</i>
	切种子	对照	
重复1	15.9±1.9	16.1±2.2	0.54
重复2	15.6±1.5	16.2±1.5	0.08

综合上述,碱煮法提取的DNA完全可以满足基本的基因型检测要求,但无法满足进一步生物学研究的要求。同时,切去一小部分胚乳,并没有影响种子的发芽率和发芽势。

## 2.2 电钻法提取玉米幼嫩叶片的DNA

### 2.2.1 DNA的质量

通过电钻磨样,然后利用简化的CTAB法快速提取的DNA电泳结果见图4。从中可以看出基因组DNA的电泳条带整齐清晰,大小合适。这说明

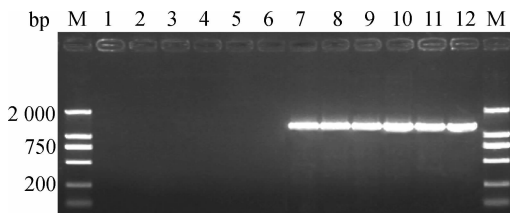


图4 电钻磨样及简化CTAB法(泳道1~6)和传统CTAB法(泳道7~12)提取DNA比较

Fig. 4 Quality comparison of DNA extracted using electric drill milling and conventional CTAB methods

电钻磨样及简化 CTAB 法完全可以提取完整的基因组 DNA。

### 2.2.2 模板 DNA 的 PCR 扩增

以电钻磨样及简化 CTAB 法快速提取的 DNA 为模板进行小片段的 PCR 扩增,可以扩增出清晰的目的条带(图 5)。同样,以其为模板进行长片段扩增,完全可以扩增出清晰的目的条带(1~6),并且与以传统 CTAB 法提取的 DNA 为模板扩增的效果没有差别(7~12)(图 6)。这些结果说明电钻磨样及简化 CTAB 法快速提取的 DNA 完全可以进行长片段基因组的 PCR 扩增。

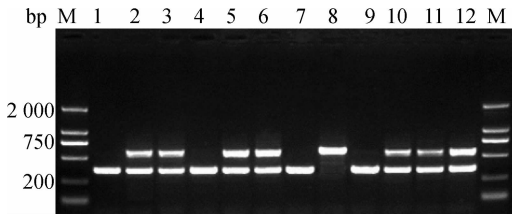


图 5 电钻磨样及简化 CTAB 法(泳道 1~6)与 CTAB 法(泳道 7~12)提取的 DNA 进行小片段 PCR 扩增结果

Fig. 5 Small PCR products amplified from DNA extracted using electric drill milling (lane1-6) and conventional CTAB (lane7-12) methods

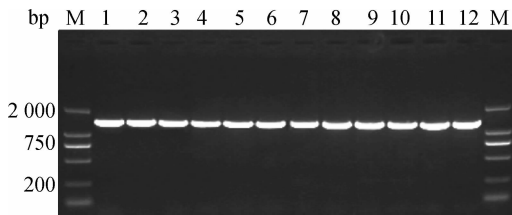


图 6 电钻磨样及简化 CTAB 法(泳道 1~6)与 CTAB 法(泳道 7~12)提取的 DNA 进行大片段扩增结果

Fig. 6 Big PCR products amplified from DNA extracted using electric drill milling (lane1-6) and conventional CTAB (lane7-12) methods

综上所述,虽然电钻磨样及简化 CTAB 法快速提取的 DNA 量少于传统的 CTAB 法,但是纯度高且完整性好,足以满足后期分子生物学分析需要。

## 3 讨论

玉米分子生物学和遗传育种的研究离不开基因组 DNA,其中一些研究对单个样本的 DNA 量的要

求并不高,但样本数很大,比如玉米基因和 QTL 精细定位时的大群体筛选、分子标记辅助育种的基因型鉴定、转基因后代的检测、自交系和品种纯度检测等。同时,随着海南南繁工作的常规化,每年两季种植的时间间隔短,更需要在短时间内快速鉴定大量群体的基因型。本方法切取玉米籽粒的胚乳,利用改良碱煮法提取玉米基因组 DNA,简单快速,每人每天可以完成大约 1 000 个样品的提取。同时,一些大规模的 DNA 提取实验中证实以改良碱煮法提取的 DNA 为模板进行 SSR 分子标记扩增目标条带的成功率一般大于 95%。这种方法不仅能够满足基因型鉴定的需求,而且在保证每季播种前都能鉴定出群体内单株基因型的同时,不影响种子的发芽率和发芽势,保证了筛选出的目标单株的种植,节省了大量的人力和物力。

对于目标单株的进一步研究,比如对精细定位中的重组单株、分子标记辅助育种中的中选单株、筛选出的转基因阳性植株等都需要大量的完整性好的 DNA 进行后期分子生物学研究,而且很多研究必须在授粉前完成。传统的 CTAB 法提取玉米基因组 DNA 的研究中,需要在大喇叭口时期取大量叶片进行 DNA 的提取,然后在短时间内完成各项研究,时间紧,任务重。本方法可以在玉米的苗期取少量叶片,然后结合电钻磨样及简化 CTAB 法快速提取 DNA,保证了各项研究能在授粉前完成。另外,传统方法从取样、磨样到 DNA 提取结束,2 人合作每天最多完成 100 个样品,而本方法从田间取样,到 DNA 最终提取结束,2 人合作每天大约能完成 400~500 个样品,大大提高了效率。

近年来,组织匀浆仪、测序仪及高通量 SNP 标记等设备和技術开始运用于玉米基因组 DNA 的提取和基因型检测中,特别是一些大型的跨国种子公司和国内外较大规模的实验室,已经实现了从 DNA 提取到基因型检测的高通量自动化流水线作业,这代表了玉米分子育种和大规模群体筛选技术的一个重要发展方向(卢洪,个人交流)。但这一整套仪器价格和运行成本高,对实验员的要求也比较高,对于国内大部分的科研和育种单位来说不一定经济实用。本文介绍的改良碱煮法成本低,简单易用,一个实验员培训一天即可熟练操作,并且可以达到相同的筛选效率,尤其适于国内中小规模实验室、育种单位等进行较大规模的基因型检测、自交系和品种纯度检测等研究工作。

## 4 结 论

利用本研究采用的方法能够快速完成玉米大群体的筛选和后期研究,大大提高了玉米基础研究和遗传改良中的大群体筛选效率。使玉米基因或QTL的图位克隆、分子标记辅助育种、转基因检测等简单化、快速化、常规化,具有广阔的应用前景。

## 参 考 文 献

- [1] Lawrence C J, Walbot V. Translational genomics for bioenergy production from fuelstock grasses: maize as the model species[J]. *Plant Cell*, 2007, 19: 2091-2094
- [2] 国家统计局. 中国统计年鉴[R]. 北京: 中国统计出版社, 2010
- [3] 戴景瑞. 我国玉米遗传育种的回顾与展望[C]//21世纪玉米遗传育种展望——玉米遗传育种国际学术讨论会文集. 北京: 中国农业出版社, 2000
- [4] 柴建芳, 刘旭, 贾继增. 一种适于PCR扩增的小麦基因组DNA快速提取法[J]. *植物遗传资源学报*, 2006, 7(2): 246-248
- [5] Gao S B, Martinez C, Skinner D J, et al. Development of a seed

DNA-based genotyping system for marker-assisted selection in maize[J]. *Mol Breed*, 2008, 22: 477-494

- [6] 徐其放, 朱苏文, 常弘. 玉米种子基因组DNA提取及RAPD分析[J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2003(5): 78-81
- [7] 魏琦超, 畅丽萍, 周岩, 等. 一种简便实用的玉米干种子基因组DNA提取方法[J]. *广东农业科学*, 2009(6): 165-167
- [8] 曾桂萍, 戴保威, 余显权. 快速提取玉米DNA方法的研究[J]. *安徽农业科学*, 2007, 35(23): 7110-7111
- [9] 李艺, 铁双贵, 朱卫红, 等. 快速CTAB法提取玉米种子胚基因组DNA[J]. *河南农业科学*, 2008(2): 17-20
- [10] 郭景伦. 适用于分子标记辅助育种的玉米单粒胚乳DNA快速提取方法[J]. *农业与技术*, 2005, 25(5): 114-115
- [11] Yang X H, Guo Y Q, Yan J B, et al. Major and minor QTL and epistasis contribute to fatty acid compositions and oil concentration in high-oil maize[J]. *Theor Appl Genet*, 2010, 120: 665-678
- [12] Stewart C J, Via L E. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications[J]. *Biotechniques*, 1993, 14(5): 748-749

(责任编辑: 袁文业)