水稻 PCR 扩增模板的快速制备

桑贤春,何光华,张 毅,杨正林,裴 炎
(西南农业大学 农业部生物技术与作物品质改良重点开放实验室,重庆 400716)

摘 要:用碱处理水稻嫩叶,取碱处理水稻叶片浸出液直接用作 PCR 扩增的模板,扩增结果稳定、准确,与常规提取的 DNA 扩增效果相比没有显著差异。用此方法制备的模板室温下 2 周之内、4℃下 3 周之内、－20℃下 4 个月以上扩增结果不变。此方法所需试剂均为常规试剂,具有需要材料少、成本低、简便、快捷等优点,尤其适合材料比较宝贵的转基因水稻的预筛选和大样本量的 PCR 检测,为分子标记技术的实际应用创造了条件。

关键词:水稻; 基因组 DNA; PCR 模板; 方法
中图分类号:Q75 **文献标识码**:A **文章编号**:0253－9772(2003)06－0705－03

The Simple Gain of Templates of Rice Genomes DNA for PCR

SANG Xian-Chun, HE Guang-Hua, ZHANG Yi, YANG Zheng-Lin, PEI Yan
(*Key Laboratory of Biotechnology and Crop Quality Improvement of Ministry of Agriculture Southwest Agricultural University, Chongqing* 400716, *China*)

Abstract: The solution of alkali-treated fresh rice leaves was used directly as the templates of PCR. The amplified results were stable, reliable, and had no difference compared with that amplified with rice total DNA extracted by common method. The stable results can still be obtained based on the templates kept at 25℃ for tow weeks, at 4℃ for three weeks, at －20℃ for over four months. With this technique, less material and only common reagent are required, which is especially adapted to the screening of the precious trangenic rice in advance and large-scale PCR tests.

Key words: rice; genomic DNA; PCR templates; methodology

分子标记技术在农业生产中具有广泛的用途,它不仅可以有效地进行作物的品种种性和纯度的鉴定,同时在改良作物和选育新的品种方面也有广泛的应用[1]。以分子标记产生的多态性为基础设计特异引物,转化为对模板要求不严格的常规 PCR 方法(SCAR),是节约成本,推动生物技术应用于实际生产的有效途径之一。但是利用分子标记进行辅助育种、品种种性鉴定、纯度分析和对转基因材料的筛选等,都需要大量的样本,而常规法提取 DNA,不仅费工费时,而且成本高,难以在实际生产中应用。虽然也有简易制备水稻模板方法的报道[2～5],但是需要材料多,对实验条件要求严格,成本仍然较高。本文报道我们的研究结果。

1 材料和方法

1.1 实验材料

本实验所用材料为水稻细胞质雄性不育系Ⅱ-32A,由西南农业大学水稻研究室提供。

1.2 处理方法

取水稻新鲜叶片 1cm^2 左右剪成小块,放入 0.5 mL 的 Eppendorf 管中,加 100 μL 0.25mol/L 的 NaOH,沸水浴 30s,再加 100 μL 0.25 mol/L 的 HCI 和 50 μL 1 mol/L Tris-HCI,沸水中再孵育 2 min。以上述碱处理的叶片浸出液直接作为模板进

收稿日期:2002－11－11;**修回日期**:2003－03－24
基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200173);重庆市自然科学基金项目(2002－7278)
作者简介:桑贤春(1978－),男,山东郓城人,在读硕士研究生,研究方向:农业生物技术。E-mail:sangxianchun@163.net
通讯作者:何光华(1968－),男,研究员,研究方向:作物遗传育种。E-mail:hegh@swau.cq.cn

行 PCR 扩增，对照用水稻基因组的制备参照 Mechond 等的方法稍有改动[6]。

1.3 PCR 反应体系

引物由我们自行设计，上海生物工程公司合成。PCR 反应体系 10 μL，包括 1 μL 10×PCR 缓冲液，1.5 mmol/L 的 $MgCl_2$，0.1 mmol/L dNTP，5 ng 的正反引物和 0.5 U 的 DNA *Taq* 聚合酶。模板分别为碱处理的叶片、碱处理叶片的浸出液(1.5 μL)和常规提取的基因组 DNA。

PCR 反应在 PE2400 型 DNA 扩增仪上进行。反应程序为：94 ℃变性 3 min 后，按 94 ℃变性 30 s，60 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 1 min，35 个循环后，72 ℃再延伸 10 min。扩增产物在 1.2%的含 EB 的琼脂糖凝胶上电泳，紫外灯下观察，凝胶自动成像系统一次成像拍照。

2 结果与分析

2.1 以碱处理水稻叶片的浸出液为模板扩增结果的稳定性和可靠性

以Ⅱ-32A 碱处理的叶片浸出液为模板进行扩增，结果发现 100 个单株检测结果与我们先前所做的结果一致[7]。说明以碱处理叶片的溶液为模板扩增效果良好。我们应用此方法制备了其他一些材料的模板，并进行了 SSR 引物的筛选，结果发现不仅全部引物都扩出了带纹，而且扩增结果与以 CTAB 法制备的模板扩增结果相比无差异。

我们用此方法制备模板，采用 SCAR 技术对水稻细胞质雄性不育系进行了纯度检验。结果表明与常规法检验结果一致(将另文报道)。这表明不但不同引物间扩增效果无差异而且完全可应用于农业生产中。

为了检验该方法是否可应用于其他作物，我们又采用此方法制备模板对转基因小麦、油菜进行了 PCR 验证，结果转基因小麦扩出了带纹，而转基因油菜未扩出带纹。这表明此方法也可用于简易制备小麦的 PCR 扩增模板。

2.2 以常规提取的 DNA，碱处理叶片和碱处理叶片的浸出液为模板对 PCR 扩增结果的影响

以碱处理叶片和碱处理叶片的浸出液为模板分别进行 PCR 扩增，同时以提取的水稻基因组 DNA 为对照。结果发现在其他条件完全一致的情况下，两种模板都能扩出带纹(图 1)。但在样品较多的情况下，以碱处理叶片的浸出液为模板扩增的稳定性要优于以碱处理的叶片为模板。可能原因是叶片在沸水浴中处理不均匀，且在取碱处理的叶片为模板时，量度也难以把握，而以碱处理的水稻叶片浸出液为模板则避免了这种情况，因而扩增结果更加稳定。

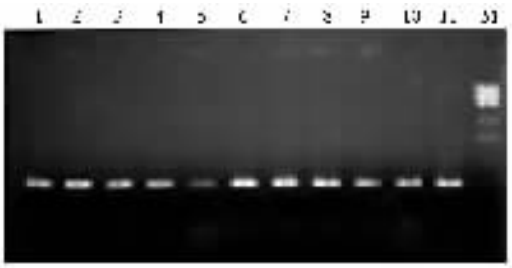

图 1 不同模板的扩增结果比较

M：DNA 标准分子质量；1～5：模板为碱处理叶片；6～10：模板为碱处理叶片液；11：常规提取 DNA。

Fig. 1 PCR profile with different PCR templates

M: Marker for DNA molecular weight; 1～5: Alkali-treated leaves; 6～10: Solution of alkali-treated leaves; 11: Rice total DNA extracted by common method.

2.3 碱处理叶片处理液在不同温度下保存对实验结果的影响

把模板分别保存于温室、4 ℃和－20 ℃的环境下。结果发现：在两周之内，三者扩增的效果没有明显差异，2 周后发现，室温下保存的叶片处理液开始长菌，3 周后 4 ℃下保存的材料也开始长菌，而在－20 ℃的环境下保存，4 个月后仍未长菌。分别以在室温、4 ℃下保存了 30 d 和在－20 ℃下保存了 120 d 的碱处理叶片的浸出液为模板进行 PCR 扩增。结果发现(图 2)：在室温和 4 ℃下保存的部分材料不能扩出带纹，而在－20 ℃下保存了 120 d 的处理液仍能扩增出清晰的带纹，且与新处理的叶片浸出液扩增结果一致。可能原因是室温和 4 ℃下的材料长菌，降解了溶液中的 DNA。

为检验不同生长期的叶片处理对 PCR 扩增效果的影响，我们分别取了三叶期、抽穗期、灌浆期等各个时期的叶片进行碱处理。结果发现，无论任何时期的叶片，只要是新发出的幼嫩叶片，扩增结果都没有显著差别，但是在空中暴露时间较长的老叶片的碱处理液的扩增效果则较差，而且在相同的保存条件下，碱处理的老叶片比碱处理的幼嫩叶片更易长菌。可能原因是老叶片比幼嫩叶片带的菌更多，

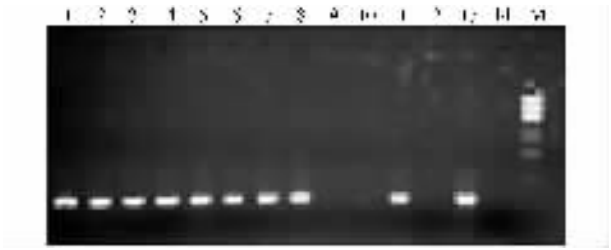

图 2　同种处理材料在不同温度下保存的扩增效果

M:DNA 标准分子量;1～3:鲜叶片;
4～6:－20℃ 120d; 7～9:4℃ 30d;
10～12:25℃ 30d;13:常规法提取 DNA; 14 水对照。

Fig. 2　PCR profile with solution of alkali-treated rice leaves kept at different temperatures

M:Marker for DNA molecular weight;1～3:Fresh templates;
4～6:Kept at －20℃ for 120 days;
7～9:Kept at 4℃ for 30 days;
10～12:Kept at 25℃ for 30 days;
13:DNA extracted by common method;14:Water.

更不易杀死。但是适当延长碱处理的时间,则不但能改善老叶片处理液的扩增效果,而且还可以降低处理样品的长菌率,从而使模板更加稳定。但效果仍稍逊于幼嫩叶片。

3　讨　　论

虽然碱处理的叶片浸出液中含有蛋白质等大量杂质,但似乎并不影响 PCR 引物与模板的结合。PCR 反应是当前生物技术应用最广泛的技术之一,它对模板要求不太严格,且易于实现自动化。分子标记技术在农业上已得到广泛应用,而根据 AFLP、RAPD 等技术找出的特异片段序列设计特异引物进行常规的 PCR 扩增(SCAR),则是分子标记技术在农业生产上应用的趋势之一[8～9]。我们用碱处理的叶片浸出液直接作 PCR 扩增的模板,不需要改造的 PCR 缓冲液,对实验条件要求也不严格,而扩增结果稳定可靠。我们用此方法制备模板对水稻细胞质雄性不育系进行了纯度鉴定,发现效果良好(将另文报道)。此方法为分子标记技术在农业上的广泛应用创造了条件。

参 考 文 献(References):

[1] LI Shi-Gui, WANG Yu-Ping, LI Han-Yun, ZHOU Kai-Da, ZHU Li-Huang. Utilization of a microsatellite marker to identify rice blast resistance gene in two segregatin populations[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2000, 16(3): 324～327.
李仕贵,王玉平,黎汉云,周开达,朱立煌. 利用微卫星标记鉴定水稻的稻瘟病抗性[J]. 生物工程学报, 2000, 16(3): 324～327.

[2] ZHAN Qing-Cai. Studies of identification of purity and factuality of hybrid rice seeds using microsatellite marker[J]. Hybrid Rice, 2002, 17(5): 46～50.
詹庆才. 利用微卫星 DNA 标记进行杂交水稻种子纯度鉴定的研究[J]. 杂交水稻 2002, 17(5): 46～50.

[3] WANG Xiu-Feng, YANG Jian-Bo, XIANG Tai-He, LI Li, NI Da-Hu. A new method for PCR reaction from alkali-treated rice leaf tissues[J]. Chinese J Rice Sci, 2002, 16(1): 67～70.
汪秀峰,杨剑波,向太和,李　莉,倪大虎. 一种叶片直接用作 PCR 扩增的新方法及其应用[J]. 中国水稻科学, 2002, 16(1): 67～70.

[4] Steiner J J, Poklemba C J, Fjellstyom R G, Elliott L F. A rapid one-tube genomic DNA extraction process for PCR and RAPD analyses[J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23: 2569～2570.

[5] WANG Xiu-Feng, LI Li, PI Tao-Hua, NI Da-Hu, ZHANG Yi, XIANG Tai-He, YANG Jian-Bo. Lyophilized mixture of PCR ingredients and its application[J]. Hereditas(Beijing): 2002, 24(2): 171～173.
汪秀峰,李　莉,皮桃花,倪大虎,张　毅,向太和,杨剑波. PCR 反应混合液的冻干处理及其应用[J]. 遗传, 2002, 24(2): 171～173.

[6] Mocouch S R, Kohert G, Yu Z H, Wang Z Y, Khush G S, Coffiman W R, Tanksley S D. Molecular mapping of rice chromosomes[J]. TAG, 1988, 76: 815～829.

[7] HE Guanghua, HOU Lei, XIAO Yuehua, LUO Xiaoying, NIU Guoqing, YANG Guangwei, PEI Yan. A common sequence dofference between cytoplasmic male sterile lines and their maintainer lines existing in rice(*Oryza satival*.)chloroplast tRNA-leu gene region[J]. Euphytica, 2003, 131(3): 269～274.

[8] Sonneveld T, Robbins T P, Boskovic R, Tobutt K R. Cloning of six cherry self-incompatibility alleles and development of allele-specific PCR detection[J]. Theo Appl Gen, 2001, 102: 1046～1058.

[9] Gu W K, Weeden N F, Yu J, Wallace D H. Large scale cost-effective screening of PCR products in marker-assisted selection applications[J]. Theor Appl Genet, 1995, 91: 465～470.