

水稻种子高质量 DNA 抽提

刘菊红, 徐艳, 熊立仲*

作物遗传改良国家重点实验室, 华中农业大学, 武汉

*通讯作者邮箱: lizhongx@mail.hzau.edu.cn

引用格式: 刘菊红, 徐艳, 熊立仲. (2018). 水稻种子高质量 DNA 抽提. *Bio-101* e1010103. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010103.

实验原理: 水稻种子含有较少量的基因组 DNA, 为了尽可能多而完整地将其抽提出来, 需要加入去污剂 SDS 裂解细胞, Proteinase K 降解蛋白, 再用 CTAB 进行抽提。

实验目的: 高质量地抽提水稻种子胚乳中的基因组 DNA, 可用于基因型鉴定, 余下含胚的部分可进行后续发芽实验。若不需要发芽, 可抽提整粒种子。

关键词: 水稻, 种子, DNA

材料与试剂

1. 2 ml 离心管
2. 刀片 (切种子)
3. 各种型号枪头 (20 μ l, 200 μ l, 1 ml)
4. 水稻种子
5. 液氮
6. CTAB (BBI, catalog number: CB0108)
7. Tris (BBI, catalog number: TB0194)
8. HCl (36-38%, 分析纯)
9. SDS (BBI, catalog number: SB0485)
10. NaCl (BBI, catalog number: SB0476)
11. EDTA (Sangon, catalog number: E0105)
12. PVP (polyvinylpyrrolidone), Mr40,000
13. Proteinase K (Takara, catalog number: D9033)
14. NaOH (Sigma, catalog number: S8045)
15. Chloroform (国产, 分析纯)

16. Isoamyl alcohol (国产, 分析纯)
17. Phenol (Sangon, catalog number: PD0419-3)
18. 95% Ethanol (国产, 分析纯)
19. RNase 酶
20. Extraction buffer (见溶液配方)
21. 2x CTAB solution (见溶液配方)
22. 1 M Tris-HCl (pH 8.0) (见溶液配方)
23. 0.5 M EDTA (pH 8.0) (见溶液配方)

仪器设备

1. 研钵
2. 移液枪
3. 恒温水浴锅
4. 冷冻离心机 (Backman)

实验步骤

将种子去壳 (如果该种子还要用于发芽, 用刀将其从中间切开, 分为含胚和不含胚的两部分, 含胚的部分用于后续发芽实验, 不含胚的部分) 置 2 ml 离心管中待抽提 DNA。

1. 在 2 ml 离心管中加入 400 μ l Extraction buffer (含 Proteinase K 50 μ g), 37 °C 孵育 1 h。
2. 用研钵研磨。
3. 加入 400 μ l (等体积) 2x CTAB solution。
4. 加入等体积的酚仿 (氯仿:异戊醇 24:1, 5%苯酚), 轻柔摇 15 min。
5. 12,000 rpm, 4 °C 离心 10 min, 吸取上清至新的 1.5 ml 离心管。
6. 加入 2/3 体积的异丙醇, 室温沉淀 10 min (或用 2 倍体积无水乙醇 -20 °C 沉淀 1 h 以上)。
7. 12,000 rpm 离心 10 min, 去上清。
8. 70%乙醇, 12,000 rpm 离心 5 min, 去上清。
9. 吹干后, 用含 1 μ l RNase (10 mg/ml) 的 50 μ l ddH₂O (或 TE) 溶解。

结果与分析

得到的 DNA 可以跑琼脂糖胶检测质量。通常可以得到接近于叶片质量的基因组 DNA，可用于 PCR 检测基因型，或 Southern blot (需要 ≥ 5 粒种子以获得足够的 DNA)。

注意事项

Proteinase K 和 PVP 的添加在实验中不可省略，否则有时可能不能抽提到理想质量的基因组 DNA。

溶液配方

1. Extraction buffer

	母液	100 ml
200 mM Tris-HCl (pH 8.0)	1 M	20 ml
200 mM NaCl		1.1688 g
25 mM EDTA	0.5 M	5 ml
0.5% SDS		0.5 g
ddH ₂ O		to 100 ml

2. 2x CTAB solution

	母液	100 ml
2% CTAB (w/v)		2 g
100 mM Tris-HCl (pH 8.0)	1 M	10 ml
20 mM EDTA (pH 8.0)	0.5 M	4 ml
1.4 M NaCl		8.1816 g
1%PVP		1 g
ddH ₂ O		to 100 ml

3. 1 M Tris-HCl (pH 8.0) 50 ml

用 ddH₂O 40 ml 溶解 Tris 6.057 g，浓 HCl 调 pH 至 8.0，定容到 50 ml。

4. 0.5 M EDTA (pH 8.0) 10 ml

称取 1.8612 g EDTA，加 8 ml ddH₂O，用固体 NaOH 调 pH 至 8.0，定容到 10 ml。

参考文献

1. Kang, H. W., Cho, Y. G., Yoon, U. H. and Eun, M. Y. (1998). [A rapid DNA extraction method for RFLP and PCR analysis from a single dry seed.](#) *Plant Mol Biol Rep* 16: 1-9.