

小麦种子直接 PCR

小麦是世界第二大粮食作物，仅次于玉米，作为人类主食之一，对于小麦的研究由来已久。现在利用现代分子生物学手段改良小麦种子，筛选优良品种成为各大种子研究机构的首选。另外由于现今转基因植物的广泛应用以及外来生物入侵，海关检验检疫部门对于转基因，病虫害检测方面也需要一些快速高效的检测手段。

Omega Bio-Tek Seed Direct PCR kit 能够快速，准确，高效，安全的从各种干燥或者新鲜植物种子中制备高质量的基因组 DNA 用于快速的 PCR 检测，特别适合各种高通量快速检测实验。

方案一：

特点：完全不用离心和研磨操作，也不用长时间浸泡种子，只需将一粒完整的种子在裂解液中消化 1-2 小时即可以用来 PCR 检测。

一、**材料：**新鲜或者放置不超过一年的小麦种子样品

二、**方法：**

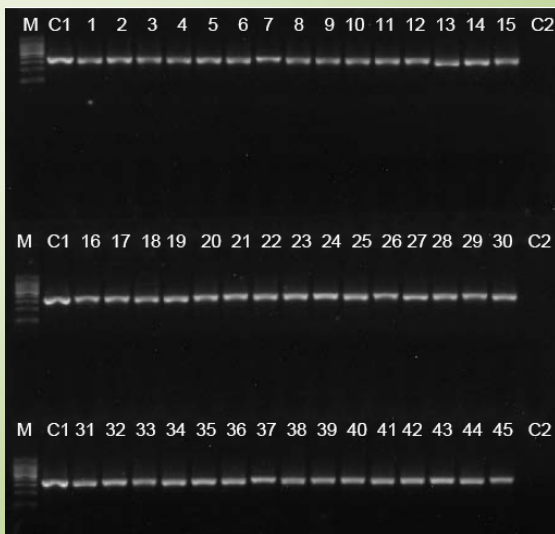
1、取 1 粒小麦种子放入 2ml 离心管中，加入 95ul PS1 和 5ul PS2，56℃水浴 1-2 小时。

2、将样品置于 90℃水浴 5min，冷却后加入 100ul PS3，短暂涡旋 20 秒。所得抽提液可直接作为 PCR 反应的模板。

注：如果样品较多，可以先将 PS1 和 PS2 按比例混合，再分装到每个样品管中。客户也可以使用 PCR 管或者 96 孔 PCR 板代替 2ml 离心管，直接在 PCR 仪上加热。

三、结果：

1、取 5ul E.Z.N.A. Seed Direct PCR Kit 抽提的 DNA 作为 50ul 体系 PCR 扩增的模板，以植物 ITS1 为目标基因（上游引物：5'-AGAAATCGTAACAAGGTTTCCGTAGG-3'，下游引物：5'-TCTCCGCTTATTGATATGC-3'），Omega 2×Taq Master Mix 35 个循环扩增约 650bp 左右的片段，取 10% PCR 产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳结果如下。结果表明，使用 E.Z.N.A. Seed Direct PCR Kit 抽提得到的基因组 DNA 完全可以用于 PCR 反应，扩增出来的目的条带清晰，大小一致。



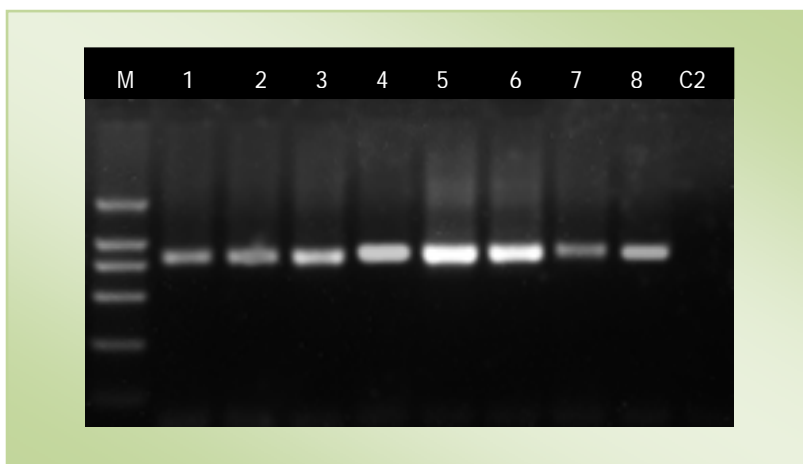
M: 200bp DNA marker

C1: 阳性对照（一粒干燥的小麦种子使用 E.Z.N.A.Plant DNA Mini kit 抽提后，用 100ul Elution Buffer 洗脱，取 3ul 作为 PCR 反应的模板）；

C2: 阴性对照（用灭菌双蒸水作为模板）

1-45: 不同小麦种子样品

2、取 5ul E.Z.N.A. Seed Direct PCR Kit 抽提的 DNA 作为 50ul 体系 PCR 扩增的模板，以小麦 alpha-type gliadin 为目标基因（上游引物：5'- AGACCTTTCTCATCCTTGCC-3',下游引物：5'- TTCCTTATTCCTCGAACTGG-3'），Omega 2×Taq Master Mix 35 个循环扩增 766bp 的片段，取 16% PCR 产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳结果如下。结果表明，使用 E.Z.N.A. Seed Direct PCR Kit 抽提得到的基因组 DNA 完全可以用于 PCR 反应，扩增出来的目的条带清晰，大小一致。



M: DL2000 DNA marker

C2: 阴性对照（用灭菌双蒸水作为模板）

1-8: 八粒小麦种子

方案二:

特点: 完全不用离心和研磨操作,也不用长时间浸泡种子,只需将一粒完整的种子在裂解液中消化 1 小时,加入蛋白酶后稍微戳破小麦种子表皮,再消化 1 小时左右即可以用来 PCR 检测。

一、材料: 超过两年并且特别干燥的小麦种子

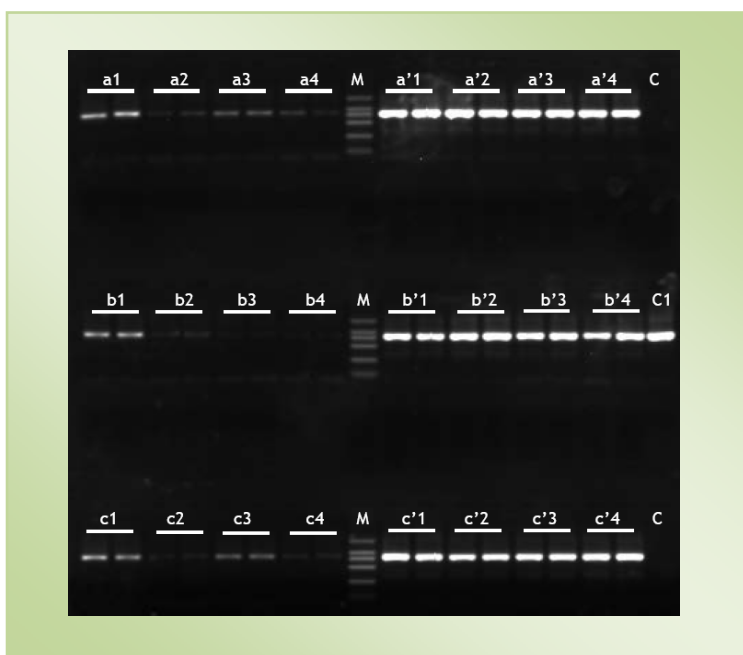
注: 此类种子由于放置时间较长,表面 DNA 氧化降解严重,需要稍微破除表皮才能获得较完整的基因组 DNA。

二、方法:

1. 取 1 粒小麦种子放入 2ml 离心管中,加入 95ul PS1, 60° C 水浴 1 小时。
 2. 加入 5ul PS2, 并用枪头稍微戳破小麦种子表皮, 涡旋 30-60 秒, 56° C 水浴 1 小时。
 3. 将样品置于 90° C 水浴 5min, 冷却后加入 100ul PS3, 短暂涡旋 20 秒。所得抽提液可直接作为 PCR 反应的模板。
- 注: 如果样品较多, 可以先将 PS1 和 PS2 按比例混合, 再分装到每个样品管中。客户也可以使用 PCR 管或者 96 孔 PCR 板代替 2ml 离心管, 直接在 PCR 仪上加热

三、结果:

1. 取 5ul E.Z.N.A. Seed Direct PCR Kit 抽提的 DNA 作为 50ul 体系 PCR 扩增的模板, 以小麦 alpha-type gliadin 为目标基因 (上游引物: 5'- AGACCTTTCTCATCCTTGCC-3', 下游引物: 5'- TTCCTTATTTTCCTCGAACTGG-3'), Omega 2×Taq Master Mix 35 个循环扩增 766bp 的片段, 取 16% PCR 产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳结果如下。结果表明, 使用 E.Z.N.A. Seed Direct PCR Kit 方案二抽提得到的基因组 DNA 完全可以用于 PCR 反应, 扩增出来的目的条带清晰, 大小一致。而使用 E.Z.N.A. Seed Direct PCR Kit 方案一抽提得到的基因组 DNA 用于 PCR 反应时有一些样品不能得到扩增。



a1-a4, b1-b4, c1-c4: 三种不同品系的小麦种子各取 4 粒, 使用方案一抽提的 DNA 用于 PCR 扩增

a'1-a'4, b'1-b'4, c'1-c'4: 使用方法一抽提过 DNA 后的小麦取出来, 再按照方案二抽提 DNA 用于 PCR 扩增

M: DL2000 DNA marker

C1: 阳性对照 (一粒干燥的小麦种子使用 E.Z.N.A. Plant DNA Mini kit 抽提后, 用 100ul Elution Buffer 洗脱, 取 3ul 作为 PCR 反应的模板)

C: 阴性对照 (用灭菌双蒸水作为模板)

2、取 5ul E.Z.N.A. Seed Direct PCR Kit 抽提的 DNA 作为 50ul 体系 PCR 扩增的模板，以小麦 alpha-type gliadin 为目标基因（上游引物：5'- AGACCTTTCTCATCCTTGCC-3',下游引物：5'- TTCCTTATTTTCCTCGAACTGG-3'），Omega 2×Taq Master Mix 35 个循环扩增 766bp 的片段，取 16% PCR 产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳结果如下。结果表明，使用 E.Z.N.A. Seed Direct PCR Kit 方案二抽提得到的基因组 DNA 完全可以用于 PCR 反应，扩增出来的目的条带清晰，大小一致。

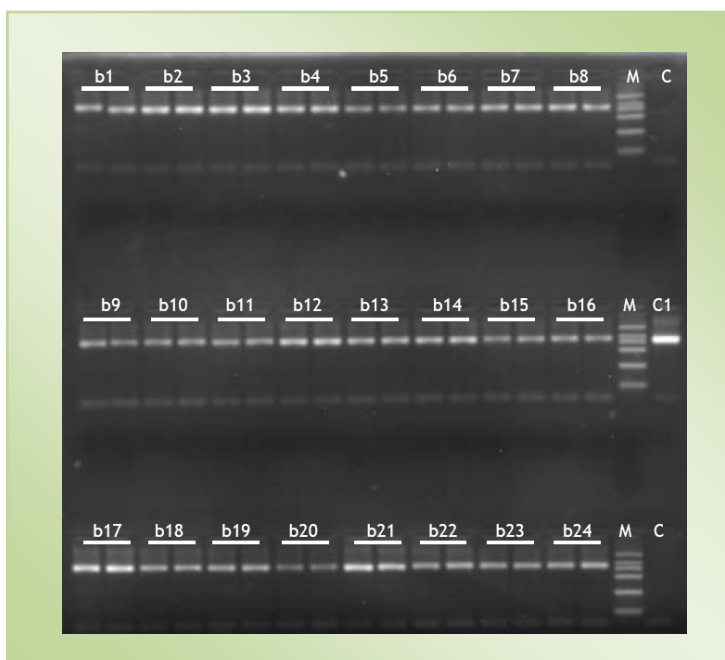


M: DL2000 DNA marker

a1-a24: 品系 I 小麦种子 24 粒

C1: 阳性对照（一粒干燥的小麦种子使用 E.Z.N.A.Plant DNA Mini kit 抽提后，用 100ul Elution Buffer 洗脱，取 3ul 作为 PCR 反应的模板）

C: 阴性对照（用灭菌双蒸水作为模板）

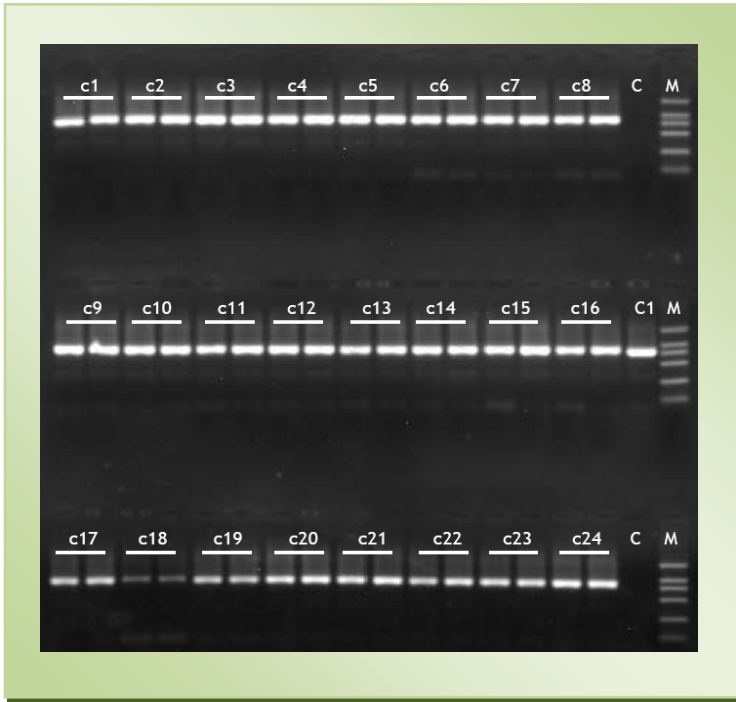


M: DL2000 DNA marker

b1-b24: 品系 II 小麦种子 24 粒

C1: 阳性对照（一粒干燥的小麦种子使用 E.Z.N.A. plant DNA Mini kit 抽提后，用 100ul Elution Buffer 洗脱，取 3ul 作为 PCR 反应的模板）

C: 阴性对照（用灭菌双蒸水作为模板）



M: DL2000 DNA marker

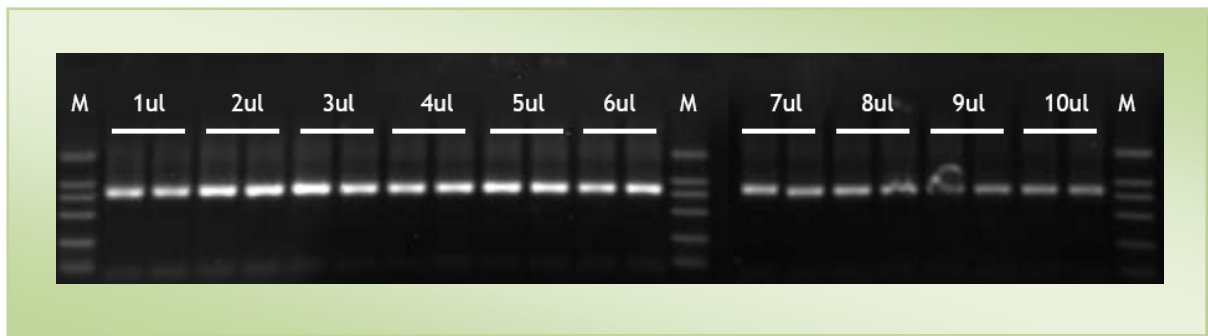
c1-c24: 品系 III 小麦种子 24 粒

C1: 阳性对照(一粒干燥的小麦种子使用 E.Z.N.A. plant DNA Mini kit 抽提后,用 100ul Elution Buffer 洗脱,取 3ul 作为 PCR 反应的模板)

C: 阴性对照 (用灭菌双蒸水作为模板)

方案三

分别取 1ul-10ul E.Z.N.A. Seed Direct PCR Kit 方案二抽提得到的 DNA 作为 PCR 模板,以小麦 alpha-type gliadin 为目标基因 (上游引物: 5'- AGACCTTCTCATCCTTGCC-3',下游引物: 5'- TTCCTTATTCCTCGAACTGG-3'), Omega 2×Taq Master Mix 35 个循环扩增 766bp 的片段,取 16% PCR 产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳结果如下。结果表明,使用 E.Z.N.A. Seed Direct PCR Kit 抽提得到的基因组 DNA 足够用于 PCR 扩增,且细胞裂解释放的抑制因子经过 PS3 Buffer 中和以后对 PCR 不再有抑制作用,扩增出来的目的条带清晰,大小一致。



M: DL2000 DNA marker