

一种适用于批量筛选和鉴定拟南芥突变体的 快速 DNA 提取方法^{*}

张小明^{1,2}, 勾雪娇^{1,2}, 梁 鹏³, 林华明⁴, 赵晋洁¹, 胡向阳¹

(1. 中国科学院 昆明植物研究所 西南野生生物种质资源库, 云南 昆明 650201;

2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 深圳华大基因科技服务有限公司, 广东 深圳 518083;

4. 广州基迪奥生物科技有限公司, 广东 广州 510224)

摘要: DNA 提取是拟南芥突变体筛选与鉴定中的关键环节. 结合拟南芥突变体鉴定特点和 DNA 提取特点, 对传统 SDS 法进行改良, 摸索出一种简易、快速且经济的 DNA 提取方法, 并将其应用到突变体的批量筛选与鉴定中. 使用该方法可在常温下利用 10 mg 左右拟南芥叶片, 以少量试剂, 通过简单的研磨、离心、沉降和干燥等步骤便能快速制备用于 PCR 检测的 DNA 模板. 采用本方法个人提取单个样品 DNA 仅需 15 min 左右, 每小时可提取 48 个 DNA 样品. 研究采用该方法提取了一批待鉴定拟南芥突变体的 DNA 样品, 利用三引物法对其进行 PCR 检测, 结果表明 DNA 样品浓度高, DNA 扩增成功率高达 100%, 且目的条带清晰, 说明该方法在拟南芥突变体的筛选和鉴定上是适用且高效的, 可广泛应用于实验室突变体库的建立.

关键词: 拟南芥; DNA 提取; SDS 抽提法; 聚合酶链式反应; 突变体鉴定; 三引物法

中图分类号: Q 94 - 336 **文献标志码:** A **文章编号:** 0258 - 7971(2015) 06 - 0909 - 07

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) 又称鼠耳芥、阿拉伯芥、阿拉伯草, 是十字花科(Crucifer) 拟南芥属(*Arabidopsis*) 植物^[1-2]. 作为一种基因组小、生长周期短、操作简便并已知基因组的模式植物, 拟南芥已在植物功能基因组学的研究中发挥着越来越重要的作用^[3-5], 被科学家誉为“植物界中的果蝇”^[6-9]. 在涉及到拟南芥的相关分子操作中, 有许多工作需要提取单株拟南芥的 DNA 样品用于 PCR 分析和检测, 如突变体的筛选、鉴定及遗传转化后的后代阳性植株的筛选等, 都是以提取 DNA 为前提的^[10-11]. 通常实验室待检测的拟南芥植株数量是较大的, 少则数 10 株, 多则几百株, 需要进行大量的 DNA 提取工作, 其工作量之大显而易见^[12].

目前使用较多的 DNA 提取方法为 SDS(十二烷基硫酸钠) 法^[13-14]、CTAB(十六烷基三乙基溴

化铵) 法^[15]、碱裂解法^[16] 及其改良后的方法等^[17-20], 此外还有尿素提取法^[21]、氯化苄提取法^[22] 等. 尽管利用传统的 SDS、CTAB 和 SDS - CTAB 等方法从植物中提取的 DNA 质量、产量和纯度均较高, 符合普通 PCR 检测的要求. 但这些方法大多需使用液氮对植物组织进行冷冻后研磨, 或需要较长时间水浴, 且通常操作步骤繁多复杂, 过程费力, 耗时长, 成本高, 成为限制拟南芥大规模突变体建库过程中提高效率和降低成本的关键因素^[23]. 因此, 建立一种适用于 PCR 扩增分析的简易、高效和低成本的 DNA 提取方法是十分迫切和必要的.

目前在 DNA 的提取方法上已经建立了一些快速的 DNA 提取方法^[24-29], 但这些方法通常存在操作步骤较多, 提取的 DNA 质量不高或提取成本较

* 收稿日期: 2015 - 08 - 19

基金项目: 国家自然科学基金(31470348).

作者简介: 张小明(1984 -), 男, 湖南人, 博士生, 主要从事植物生理生态学、生物化学与分子生物学研究. E-mail: zhangxiaoming@mail.kib.ac.cn.

通信作者: 胡向阳(1973 -), 男, 安徽人, 研究员, 博士生导师, 博士, 主要从事植物生理生态学、生物化学与分子生物学和逆境蛋白质组学等研究. E-mail: huxiangyang@mail.kib.ac.cn.

高等不足.而现有有关适合大规模 PCR 检测的简易快速 DNA 提取方法的报道较少^[60-31],钟罗宝,陈谷^[6]建立的方法虽然有简易、快速且经济的优点,但也存在提取的 DNA 产量较低,片段较短,1 000 bp 内扩增效果好,大于 1 000 bp 扩增效果不理想,不适用于较大片段的 PCR 检测分析.因此,有必要寻找一种简易、快速、高效且提取的 DNA 产量高、质量较好的 DNA 提取方法,以加速批量突变体筛选与鉴定进程,提高实验室批量突变体库的建立效率.

在前人的研究基础之上,本研究整合了传统 DNA 提取 SDS 法和 CTAB 法中的优点,将传统 SDS 法进行优化.舍弃了耗时长、成本高、较繁琐的步骤,如液氮研磨、高温水浴等,并去掉了大部分有毒的试剂,如氯仿、 β -巯基乙醇和异戊醇等有毒试剂,同时也去掉了高浓度乙醇洗涤 DNA 的步骤,而改用异丙醇洗涤,降低了成本,建立了一种利用少量试剂简易快速又经济地提取拟南芥新鲜叶片 DNA 的方法.我们将其应用于实验室拟南芥突变体的筛选和鉴定工作中,达到了较好的检测效果.相比其他方法,本方法具有简易、高效、快速、安全和取材少、低耗材、成本低等的优点,不失为一种拟南芥大规模突变体建库中 DNA 样品提取的可取方法.此外,该方法也可用于其他植物如水稻、玉米和烟草等转基因作物的批量筛选与鉴定中,对其他植物、动物和微生物等的 DNA 提取也有重要参考价值.

1 材料与方法

1.1 材料 供试材料为 Columbia 生态型拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 野生型 (Col-0, WT),待鉴定的 *HOS1-3* 基因的 T-DNA 插入突变系 *hos1-3* (Salk_069312) T1 代植株和已鉴定阳性对照植株.

试剂: 异丙醇, dd H₂O, DNA 提取缓冲液 (DNA extraction buffer): 含 200 mmol/L Tris-HCl, pH = 8.0; 250 mmol/L NaCl; 25 mmol/L EDTA, pH = 8.0; 0.5% SDS 等.

仪器及耗材: 旋转真空泵,核酸蛋白分析仪 ND1000,PCR 仪,电泳仪,凝胶成像系统,离心机,低温冰箱,剪刀,研磨棒,1.5 mL 离心管等.

1.2 DNA 的提取 该方法主要包括取样、研磨、离心、沉降和干燥等步骤.

(1) 取样 从生长 25 d 左右的待检测拟南芥基部剪取约 1 cm² 大小 (10 ~ 15 mg) 的健康叶片,放

入 1.5 mL 离心管中,根据需要进行标记.

(2) 研磨 将研磨棒插入离心管中,徒手或机械研磨数下后加入 200 μ L DNA 提取缓冲液 (DNA extraction buffer),充分研磨后再加入 200 μ L DNA 提取缓冲液,室温下静置 2 min.

(3) 离心 12 000 r/min 常温离心 3 ~ 5 min,吸取上清到另一新 1.5 mL 离心管中.

(4) 沉降 向上清中加入 300 μ L 异丙醇,上下颠倒数次,可看到白色絮状沉淀产生,即为 DNA; -20 $^{\circ}$ C 沉降 3 ~ 5 min, 12 000 r/min 常温或 4 $^{\circ}$ C 离心 4 ~ 6 min,弃上清留沉淀;向沉淀中继续加入 300 μ L 异丙醇润洗沉淀一次, 12 000 r/min 常温或 4 $^{\circ}$ C 离心 1 ~ 2 min,倒去上清,并用 200 μ L 枪尽量吸尽离心管底部残液,并将离心管倒立于吸水纸上.

(5) 干燥 将留有沉淀的离心管开盖于旋转真空泵中抽 3 min,或开盖于室温下通风处放置 5 min,使异丙醇挥发殆尽,加入 50 μ L dd H₂O 或 EB 并轻弹数下,以溶解沉淀中的 DNA,稍离心后上清即为制备的用于 PCR 扩增的 DNA 模板,通常 10 ~ 20 μ L 体系中加入 0.5 或 1 μ L 上清作为模板.上清可立即用于 PCR 实验,也可于 -20 $^{\circ}$ C 中长期保存.

1.2 DNA 的质量和含量测定 吸取 2 μ L DNA 样品在核酸蛋白分析仪 ND1000 上测定所提 DNA 的质量及其含量.

1.3 突变体的鉴定 本研究采用三引物法对待检测突变体材料进行筛选和鉴定.三引物法原理如图 1 所示,即采用 LP、RP 和 BP 三对引物对待测材料 DNA 进行 PCR 扩增.野生型植株 (wild type, 简称 WT) 因为目的基因的 2 条染色体上均无 T-DNA 插入,故其 PCR 产物仅有 1 种,约为 900 bp (即从 LP 到 RP 的片段长度);纯合突变体植株 (homozygous lines, 简称 HM) 因目的基因的 2 条染色体上均有 T-DNA 插入,而 T-DNA 自身长度约为 17 kb,使模板过长,这阻止了目的基因特异性扩增产物的形成,因而只能得到 1 种以 BP 与 LP (或 RP) 为引物进行扩增的 PCR 产物,其长度约为 410 + N bp (即从 LP 或 RP 到 T-DNA 插入位点间的片段,长度为 300 + N bp,加上从 BP 到 T-DNA 载体左边界的片段,长度为 110 bp);杂合突变体植株 (heterozygous lines, HZ) 因只在目的基因的 1 条染色体上有 T-DNA 插入,所以 PCR 扩增后可同时获得大小为 410 + N bp 和 900 bp 的 2 种产物^[62].上述 3 种情

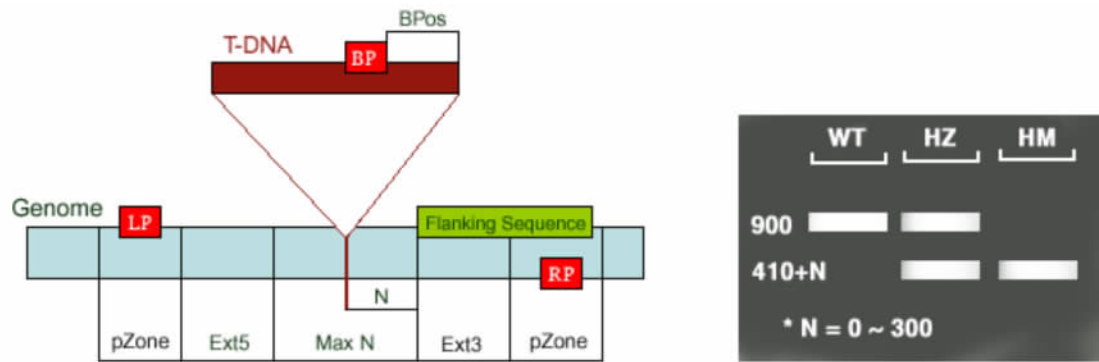


图1 三引物法原理图(详见 <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>)

Fig. 1 The principle of three primer method(For detailed information, please see <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>)

况的电泳结果差异明显,故能有效区分不同基因型的植株.相比其他方法,三引物法的优点是可同时鉴定出纯合突变体并确证 T-DNA 的插入情况.

1.4 PCR 扩增及电泳分析 以提取的 DNA 上清液为模板,采用 T-DNA 特异引物为 salkLBb1.3 (5'-ATTTTGCCGA TTTCGGAAC-3'), *HOS1*-3 基因的 LP 引物(5'-TGGACCGCATATTTTCAGG-TAG-3') 和 RP 引物(5'-AAGGCACGATAATG-GTCTTCC-3'),所有引物均由上海捷瑞生物工程有限公司合成.用于 PCR 扩增的反应体系为 20 μ L: 10 $\times$ buffer 2 μ L、2.5 dNTP 1.6 μ L、LP 端引物、RP 端引物(或 LB 引物)各 0.5 μ L、*taq* 酶 0.5 μ L、DNA 提取上清液 1 μ L、ddH₂O 13.9 μ L. PCR 扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,然后按下列程序进行 32 个循环:94 $^{\circ}$ C 30 s,56 $^{\circ}$ C 30 s(不同引物退火温度不同),72 $^{\circ}$ C 1 min;循环结束后再 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min;最后 4 $^{\circ}$ C ∞ .

反应结束后 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳,点样槽内依次加入 Marker、待检测样品 PCR 产物,阳性植株 DNA 为模板的阳性对照产物和野生型 DNA 为模板的阴性对照(均为先加 LP,RP 扩增产物,再加 LB,RP 扩增产物),电泳完后用凝胶成像系统进行拍照.

2 结果与分析

实验结果表明使用该方法提取单个材料的 DNA 样品仅需 15 min 左右,每小时可提取 48 个材料的 DNA 样品,1 个人 1 个工作日可提取 300 个 DNA 样品,提取速度较快.

2.1 DNA 质量及产量 从核酸蛋白分析仪 ND1000 检测的 DNA 模板信息(表 1)可知,所有提

取样品的 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 值均大于 1.8(或 2.0),表明样品中蛋白质、酚类等杂质较少.但 $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$ 值明显偏离 2.0,表明样品中存在多糖、多肽等其它杂质.从产量来看,使用该方法提取的 DNA 整体而言产量较高,但不同样品提取的 DNA 含量存在一定差异,测定的 DNA 质量浓度从 364.8 ng/ μ L 到 1 040.7 ng/ μ L 不等,这主要与所取叶片大小、叶片部位有较大关系.

2.2 PCR 扩增结果 从 PCR 扩增后的电泳检测结果(图 2)可以看出 DNA 扩增成功率为 100%,且目的条带单一、清晰,表明利用该方法对提取的 DNA 样品均能成功地进行 PCR 扩增.通过对琼脂糖凝胶电泳结果进行分析可知待鉴定的 20 个突变体材料中,共检测出 *HOS1* 纯合体 11 个,杂合体 7 个,另外 2 个为野生型,通过再次验证结果正确,纯合体可直接用于其他生理生化等实验中,而杂合体可收获种子再次播种,在下一代植株中鉴定获得纯合体.

综上所述,使用该方法提取 DNA 样品速度较快,产量较高,质量较好,符合普通 PCR 反应对 DNA 模板的要求.虽然不同样品提取的 DNA 质量和产量等有一定不同,且所有样品都存在一定的杂质污染,但这些因素并没有影响 PCR 扩增,所有待检测样品均得到了较理想的实验结果.

3 讨论

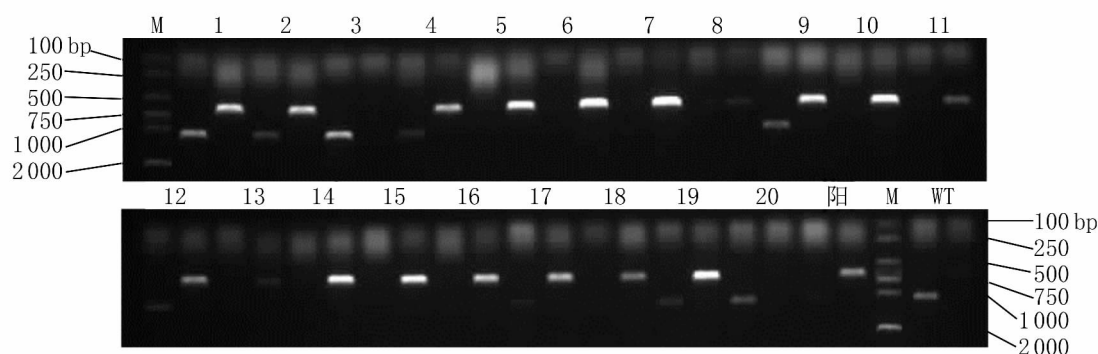
本研究建立了一种简易、快速且经济适用的拟南芥 DNA 提取方法,并用该方法提取了 20 个待检测突变体材料的 DNA,且用三引物法成功对其进行了 PCR 扩增和鉴定,实验结果理想.表明该方法可以提取到产量和质量均较好的 DNA 模板,适用于以 PCR 为基础的各种分子检测分析,可以用于

较大规模突变体的筛选、鉴定及遗传转化后的后代 阳性植株的筛选等.

表 1 研究中提取的基因组 DNA 纯度和浓度信息

Tab. 1 The purity and concentration information of genomic DNA extracted in the study

编号	$A_{260\text{ nm}} / A_{280\text{ nm}}$	$A_{260\text{ nm}} / A_{230\text{ nm}}$	质量浓度 / ($\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	编号	$A_{260\text{ nm}} / A_{280\text{ nm}}$	$A_{260\text{ nm}} / A_{230\text{ nm}}$	质量浓度 / ($\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)
1	2.20	0.87	661.6	12	2.15	0.95	587.5
2	2.22	0.60	366.6	13	2.20	0.84	825.3
3	2.16	0.96	488.1	14	2.14	0.72	438.8
4	2.18	1.04	637.1	15	2.19	0.81	530.3
5	2.15	0.88	572.9	16	2.19	0.73	478.0
6	2.09	0.78	492.2	17	2.17	0.72	456.1
7	2.19	0.68	379.9	18	2.18	0.74	473.2
8	2.23	0.65	371.7	19	2.16	0.85	547.7
9	2.15	0.96	1040.7	20	2.19	0.77	442.2
10	2.21	0.68	423.3	阳	2.14	0.73	640.6
11	2.21	0.77	647.6	WT	2.24	0.59	364.8



M: Marker; 阳: 阳性对照植株; WT: 野生型植株; 1~20: 待检测植株. 各编号均为先加 LP,RP 扩增产物,再加 LB,RP 扩增产物; LP,RP 扩增目的片段大小约 1 000 bp, LB,RP 扩增目的片段大小约 700 bp

图 2 待检测拟南芥突变体植株的 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR identification of *Arabidopsis* mutants to be detected (M: Marker; Postive: Postive control; WT: Wild Type; 1—20: Mutants to be detected. Each amplified product of LP,RP primers was added first, and that of LB,RP primers next; The target fragment length of LP,RP primers amplification is about 1 000 bp, and that of LB,RP primers amplification is about 700 bp)

此外本研究还用该方法提取到的 DNA 对部分样品进行过 SSR 分子标记检测,检测结果理想,分辨率明显增高,可见本方法还可以应用于基因定位及分子标记辅助育种等研究^[3]. 同时本研究利用提取到的 DNA 进行载体构建中较大目的片断的扩增,效果良好,可见本方法也可用于拟南芥载体构建和原核表达等相关研究中^[3].

该方法用到的试剂都是实验室常见的试剂,如异丙醇、Tris-HCl、SDS、CTAB 和 NaCl 等,且操作比较简单,主要只有 4 步. 与其他常规方法和简易方法相比该 DNA 提取方法主要有以下优点: ① 实验步骤少,操作简单省时省工; ② 需要叶片量少,只需 10 mg 左右,对植株损伤较小; ③ 无需液氮研磨、高温水浴和低温离心等,节约氮气且能耗大为

降低;④所需耗材很少,提取单个DNA样品只需要更换一次离心管,无乙醇洗涤步骤,成本大大降低;⑤实验中用到的试剂毒性很小,去掉了有毒的 β -巯基乙醇和氯仿等,对人体更安全;⑥DNA产量高,质量较好,所提取的DNA样品浓度高,片段较长,蛋白杂质较少。

尽管如此,该方法提取到的DNA模板有一定的多糖、多肽等杂质污染,对DNA纯度要求较大的研究较不适用,此时传统的CTAB法^[5]、SDS-CTAB法^[6]是较好的DNA提取方法。此外,随着各种实验仪器、设备的出现和广泛应用,对于本方法,待改善的是将研磨棒用研磨机代替以减少时间和人力,同时加样改用排枪等以节约时间,提高提取效率^[2],这些改进将大大加快DNA的提取速度,使DNA提取效率大大提高。此外用该方法提取的DNA $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$ 值偏低,有待通过改进DNA提取液配方而进一步改善该方法,以便快速提取到更高质量的DNA,更好地服务相关科研工作。

致谢:感谢中国科学院昆明植物研究所西南野生生物种质资源库温室周廷才在温室植物日常看护上所做的贡献;中国科学院昆明植物研究所西南野生生物种质资源库分子生物学实验平台为本研究提供旋转蒸发仪和核酸蛋白分析仪ND1000等,在此表示衷心感谢。

参考文献:

- [1] PRUITT R E, MEYEROWITZ E M. Characterization of the genome of *Arabidopsis thaliana* [J]. Mol Biol, 1986, 187: 169-183.
- [2] MEYEROWITZ E M. *Arabidopsis thaliana* [J]. Ann Rev Genet, 1987, 21: 93-111.
- [3] 陈璋. 拟南芥: 植物分子生物学的模式物种 [J]. 植物学通报, 1994, 11(1): 6-11.
CHEN Z. *Arabidopsis thaliana* as a model species for plant molecular biology studies [J]. Chinese Bulletin of Botany, 1994, 11(1): 6-11.
- [4] 郝林. 拟南芥——植物发育生物学和分子生物学实验的好材料 [J]. 植物生理学通讯, 1999, 35(3): 218-220.
HAO L. *Arabidopsis thaliana*: A good material for plant developmental biology and molecular biology experiments [J]. Plant Physiology Communications, 1999, 35(3): 218-220.
- [5] The Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana* [J]. Nature, 2000, 408(6814): 796-815.
- [6] 赵镡, 徐春晖. 拟南芥基因组测序工作圆满完成 [J]. 山东大学学报, 2001, 36(1): 89-93.
ZHAO D, XU C H. The genome sequencing work of *Arabidopsis thaliana* has been completed satisfactorily [J]. Journal of Shandong University: Natural Science Edition, 2001, 36(1): 89-93.
- [7] 毛健民, 李俐俐. 拟南芥——植物界的“果蝇” [J]. 生物学通报, 2001, 36(12): 13-14.
MAO J M, LI L L. *Arabidopsis thaliana*: the fruit fly of the plant kingdom [J]. Bulletin of Biology, 2001, 36(12): 13-14.
- [8] JANDER G, NORRIS S R, ROUNSLEY S D, et al. *Arabidopsis* map-based cloning in the post-genome era [J]. Plant Physiol, 2002, 129(2): 440-450.
- [9] 徐平丽, 张传坤, 孙万刚, 等. 模式植物拟南芥基因组研究进展 [J]. 山东农业科学, 2006, 6: 100-102.
XU P L, ZHANG C K, SUN W G, et al. Progresses of the research on the genome of *Arabidopsis thaliana* [J]. Shandong Agricultural Sciences, 2006, 6: 100-102.
- [10] XIN Z, VELTEN J P, OLIVER M J, et al. High-throughput DNA extraction method suitable for PCR [J]. Bio Techniques, 2003, 34(4): 820-826.
- [11] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1998: 742-744.
WANG G L, FANG H J. Principle and technology of plant gene engineering [M]. Beijing: Science Press, 1998: 742-744.
- [12] 邹华文, 黄丛林. 一种简单快速的拟南芥基因组DNA的微量提取方法 [J]. 长江大学学报: 自然科学版, 2006, 3(4): 193-194.
ZHOU H W, HUANG C L. A simple and rapid method for genome DNA extraction from *Arabidopsis* [J]. Journal of Yangtze University: Natural Sciences Edition, 2006, 3(4): 193-194.
- [13] 谭天伟, 黄留玉, 苏国富, 等. 分子生物学与生物技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
HAN T W, HUANG L Y, SU G F, et al. Molecular Biology and Biotechnology [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2003.
- [14] 彭学贤. 植物分子生物技术应用手册 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006.
PENG X X. Plant molecular biology technology application manual [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006.
- [15] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. Phyto-

- chemistry Bulltin,1987,19:11-15.
- [6] WANG H, QI M, CULTER A J. A simple method of preparing plant samples for PCR [J]. Nucleic Acids Res, 1993, 21(17): 4153-4154.
 - [7] ROGERS S O, BENDICH A J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium, and mummified plant tissues [J]. Plant Molecular Biology, 1985, 5(2): 69-76.
 - [8] 单志, 吴宏亮, 李成磊, 等. 改良 SDS 法提取多种植物基因组 DNA 研究 [J]. 广东农业科学, 2011, 47(8): 113-115.
SHAN Z, WU H L, LI C L, et al. Improved SDS method for general plant genomic DNA extraction [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2011, 47(8): 113-115.
 - [9] HUANG J, GE X, SUN M. Modified CTAB protocol using a silica matrix for isolation of plant genomic DNA [J]. Biotechniques, 2000, 28(2): 432-434.
 - [10] 闫庆祥, 黄东益. 利用改良 CTAB 法提取木薯基因组 DNA [J]. 中国农学通报, 2010, 26(4): 30-32.
YAN Q X, HUANG D Y. Genomic DNA extraction in cassava by modified CTAB method [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26(4): 30-32.
 - [11] SUN Y, ZHANG W, LI F L, et al. Identification and genetic mapping of novel genes that regulate leaf development in *Arabidopsis* [J]. Cell Research, 2000, 10(4): 325-335.
 - [12] 朱衡, 瞿峰, 朱立煌. 利用氯化苄提取适于分子生物学分析的真菌 DNA [J]. 真菌学报, 1994, 13(1): 34-40.
ZHU H, QU F, ZHU L H. Extraction of fungal DNA suitable for molecular biology analysis using benzyl chloride [J]. Acta Mycologica Sinica, 1994, 13(1): 34-40.
 - [13] SHARMA R, JOHN S J, DAMGAARD D M, et al. Extraction of PCR quality plant and microbial DNA from total rumen contents [J]. Biotechniques, 2003, 34(1): 92-97.
 - [14] 李婧婧, 周桂林, 彭家成, 等. 一种棉花 DNA 快速提取方法 [J]. 分子植物育种, 2015, 13(3): 670-674.
LI J J, ZHOU G L, PENG J C, et al. A fast process for cotton DNA extraction [J]. Molecular Plant Breeding, 2015, 13(3): 670-674.
 - [15] 闫双勇, 苏京平, 王胜军, 等. 一种同时适用于水稻种子和叶片的简单快速 DNA 提取方法 [J]. 中国稻米, 2011, 17(5): 11-13.
YAN S Y, SU J P, WANG S J, et al. A simple and fast DNA extraction method for rice seed and leaf [J]. China Rice, 2011, 17(5): 11-13.
 - [16] 戴剑, 洪德林, 张大栋, 等. 一种快速高效的 DNA 提取方法研究 [J]. 麦类作物学报, 2011, 31(3): 437-442.
DAI J, HONG D L, ZHANG D D, et al. Study on a rapid, high efficient DNA extraction method [J]. Journal of Triticeae Crops, 2011, 31(3): 437-442.
 - [17] 孙林静, 马忠友, 苏京平, 等. 一种简单快速的 DNA 提取方法在水稻上的应用 [J]. 天津农学院学报, 2007, 3(14): 1-4.
SUN L J, MA Z Y, SU J P, et al. Application of simple DNA extraction method to rice [J]. Journal of Tianjin Agricultural University, 2007, 3(14): 1-4.
 - [18] 张书红, 席章营. 快速提取玉米叶片 DNA 的新方法 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(13): 3776-3801.
ZHANG S H, XI Z Y. A new method on rapid extraction of DNA of maize leaf [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2007, 35(13): 3776-3801.
 - [19] 徐平丽, 赵晋平. 一种适宜拟南芥 PCR 检测的 DNA 提取方法 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(13): 6653-6654.
XU P L, ZHAO J P. A rapid DNA extraction method for PCR detection of *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010, 38(13): 6653-6654.
 - [20] 钟罗宝, 陈谷. 一种适用于大规模转基因作物 PCR 检测的简易 DNA 提取方法 [J]. 现代食品科技, 2008, 24(8): 794-797.
ZHONG L B, CHEN G. Study of a simplified DNA extraction method for the large-scale PCR detection of genetically modified crops [J]. Modern Food Science and Technology, 2008, 24(8): 794-797.
 - [21] 邱福林, 王和和, 陈洁, 等. 用于水稻突变体大量筛选的 DNA 微量快速提取法 [J]. 中国水稻科学, 2006, 20(3): 329-332.
QIU F L, WANG H H, CHEN J, et al. A rapid DNA miniprep extraction method for large-scale rice mutant screening [J]. Chinese Journal of Rice Science, 2006, 20(3): 329-332.
 - [22] 李敏, 杨双, 阮燕晔, 等. 拟南芥 T-DNA 插入突变体 *atsuc3* 的 PCR 鉴定 [J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(1): 91-94.
LI M, YANG S, YUAN Y H, et al. Identification of *atsuc3* with T-DNA insertion by PCR [J]. Plant Physiology Communications, 2006, 42(1): 91-94.
 - [23] 李珊珊, 孙春玉, 蒋世翠, 等. SSR 分子标记及其在植物遗传育种中的应用 [J]. 吉林蔬菜, 2014(5): 33-

38. LI S S, SUN C Y, JIANG S C, et al. SSR molecular markers and its applications in plant genetics and breeding [J]. JILIN SHUCAI, 2014(5): 33-38.
- [4] 林春晶, 韦正乙, 蔡勤安, 等. 几种植物转基因表达载体的构建方法 [J]. 生物技术, 2008, 18(5): 84-87.
- LIN C J, WEI Z Y, CAI Q A, et al. Approaches of constructing expressional vect plant genetic transformation [J]. Biotechnology, 2008, 18(5): 84-87.
- [5] 孙鑫, 崔洪志, 胡宝忠, 等. SDS-CTAB 结合法提取棉花总DNA [J]. 生物技术通报, 2004(5): 45-47.
- SUN X, CUI H Z, HU B Z, et al. A SDS-CTAB combined method for extracting total DNA from cotton plant [J]. Biotechnology Bulletin, 2004(5): 45-47.

A rapid DNA extraction method for batch screening and identification of *Arabidopsis* mutants

ZHANG Xiao-ming^{1,2}, GOU Xue-jiao^{1,2}, LIANG Peng³, LIN Hua-ming⁴, ZHAO Jin-jie¹, HU Xiang-yang¹

(1. Germplasm Bank of Wild Species in Southwest China, Kunming Institute of Botany,

Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3. BGI Tech Solutions Co., Ltd., Shenzhen 518083, China;

4. Guangzhou Genedenovo Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou 510224, China)

Abstract: DNA extraction is key to the screening and identification process of *Arabidopsis mutants*. Based on the characteristics of *Arabidopsis mutants* identification and DNA extraction, a simple, fast and economical DNA extraction method was worked out and applied into the batch screening and identification of mutants through modifying the traditional SDS extraction method. By using this method, DNA templates for PCR testing could be prepared quickly at room temperature from about 10 mg leaves, a small amount of reagent, and easy operation steps of grinding, centrifugation, sedimentation, and drying. A single DNA sample can be obtained in only about 15 minutes and 48 DNA samples are able to be extracted in an hour by the method. In this study, DNA samples of a batch of *Arabidopsis mutants* to be identified were prepared by applying the method, and then was detected by three primer PCR methods. The results showed that the concentration of DNA samples was high, the success rate of DNA amplification was up to 100% and the target bands were clear and ideal, which indicates that the method is suitable and efficient, and can be widely used for mutant library constructions in the laboratory.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; DNA extraction; SDS extraction method; PCR (polymerase chain reaction); mutant identification; three primer method