

# 农作物种子核酸真空抽滤快速提取方法的研究

张海波 张宏军 雷 军 张 英

(陕西省种子工作总站,西安 710018)

**摘要:**为解决转基因检测中植物种子核酸提取步骤多、效率低的难题,发明了非接触式连接装置,组装了真空抽滤快速提取装置,改进了核酸提取方法。该方法提取的种子核酸质量和浓度符合需求,核酸完整性好、无降解、无扩增抑制物,有效解决了种子样品核酸快速提取的技术难题。对转基因玉米 Bt11 的检测结果表明,该核酸提取方法适用于农作物种子的转基因检测。

**关键词:**核酸提取;分子检测;种子;真空抽滤

## Research on Vacuum Filtration Method in Rapid Extraction of Nucleic Acid from Crop Seeds

ZHANG Haibo, ZHANG Hongjun, LEI Jun, ZHANG Ying

(Shaanxi Seed Working Station, Xi'an 710018)

分子检测方法越来越多地应用于农作物种子的转基因成分和品种真实性检测项目中,这些方法通常以核酸检测为主,以 PCR 扩增为核心<sup>[1]</sup>。PCR 扩增的首要步骤是核酸提取。因为有细胞壁,植物的核酸提取不同于动物组织,过程比较复杂,尤其是农作物种子干物质较多,核酸提取更为困难<sup>[2]</sup>。种子核酸提取是进行 PCR 扩增的基础,是获得高质量检测结果的前提,但因其步骤多且费时长,也是整个方法的限速步骤。

目前农作物种子主流的核酸提取方法需要用到十二烷基硫酸钠(SDS)、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、饱和酚、氯仿等化学试剂,这些试剂对人

体有毒有害,不宜长期使用。商业化试剂盒法多采用离心过滤柱式,提取时间长、操作复杂,难以对大批量样品进行核酸提取,且产生的离心管等垃圾较多。碱煮法虽然快速,但是核酸质量不高,且不易保存,无法进行复检<sup>[3]</sup>。

为解决核酸快速高效提取问题,本研究发明了一种用于核酸抽滤的非接触式连接装置<sup>[4]</sup>,改进了核酸提取真空抽滤技术。该技术快速、简便、可操作性好、实用性强,能够使 PCR 技术在农作物种子分子检测中得到更为广泛的普及和推广。

### 1 材料与方法

**1.1 试验材料** 本试验中玉米、小麦和水稻的种子为陕西省农作物种子检验站收藏,转基因玉米粉末 Bt11 (ERM-BF412BK)由欧洲标准局(IRMM, Institute for reference materials and measurements)制

**基金项目:**陕西省农业科技创新专项农作物转基因安全检测筛查(陕农计财[2023]76号)

**通信作者:**张英

[21] 丁成伟,刘超,王健康,孙克新,郭荣良. 水稻品种生态适应性的综合评价. 生态农业研究,1999,7(1):62-65

[22] 杨舒婷,唐道冥,孙利娜,陈尔,林茂,李冰,李进华. 50个不同品种大花绣球在南宁的引种适应性综合评价. 中国热带农业,2024(2):17-29

[23] 巴图,李建波,李国兴,王文迪,马宇,吕二锁,杜慧婷,徐寿军,刘志萍. 基于熵权-TOPSIS模型的大麦萌发期耐碱种质评价. 种子,2023,42(5):55-62

(收稿日期:2024-10-12)

作,并通过上海安谱实验科技股份有限公司购买。

吸附柱法植物核酸提取试剂盒(MolPure Plant DNA Kit)购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司(Yeasen Biotechnology),实时荧光PCR扩增试剂(Pro Taq HS 预混型探针法 qPCR 试剂盒 AG11704)购自湖南艾科瑞生物工程有限公司,扩增引物和探针由湖南艾科瑞生物工程有限公司合成。

## 1.2 试验方法

**1.2.1 核酸抽滤快速提取法** 核酸抽滤快速提取使用吸附柱法植物核酸提取试剂盒提供的试剂,其中洗脱和离心步骤由本研究设计的真空抽滤方法代替。具体提取步骤如下:将种子样品磨碎,称取100mg放入2mL离心管中,加入400 $\mu$ L裂解液和5 $\mu$ L RNase,混匀后60 $^{\circ}$ C加热10min,期间混匀数次;加入130 $\mu$ L去蛋白液,混匀后12000r离心5min;取上清400 $\mu$ L,加入600 $\mu$ L结合液,混匀加入吸附柱中;将吸附柱通过发明的连接装置与真空抽滤提取系统连接,打开真空泵,待液体全部吸入真空腔中后,加2次漂洗液漂洗;将吸附柱取下,12000r离心2min,恒温震荡仪烘干5min,加入洗脱液200 $\mu$ L,12000r离心1min,获得的溶液为所提取的核酸。

**1.2.2 试剂盒提取方法** 利用吸附柱法植物核酸提取试剂盒提取试验材料的核酸,具体操作步骤参照试剂盒使用说明书,其中起始种子材料的质量以及最终的核酸洗脱液体积与核酸抽滤快速提取法保持一致,以便将两种核酸提取方法所提取核酸的质量进行比较。

**1.2.3 核酸质量检测** 提取的核酸使用紫外分光光度计ND2000(赛默飞世尔科技公司,Thermo Fisher Scientific)测定核酸的纯度和浓度,核酸纯度由260nm吸光值和280nm吸光值的比值判定,1.6~2.0为符合要求。核酸浓度由260nm吸光值计算,260nm吸光值为1.0表明核酸浓度为50ng/ $\mu$ L。使用8g/L琼脂糖凝胶电泳和EB染色检测核酸样品的完整性,没有严重拖尾表明提取的核酸未降解,符合试验要求。

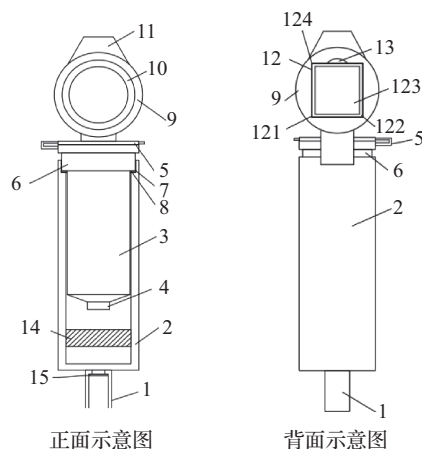
**1.2.4 内源基因PCR扩增** 采用GB/T 19495.4—2018《转基因产品检测 实时荧光定性聚合酶链式反应(PCR)检测方法》中的方法,根据玉米、小麦和水稻的内源基因*zSSIb*、*Wx012*和*SPS*基因检测方法,分别合成Taqman探针实时荧光PCR的引物。Taqman探针实时荧光PCR扩增条件及扩增程序依

据上述执行标准执行。扩增使用ABI StepOne Plus实时荧光PCR仪(美国Applied Biosystems)进行,使用仪器自带软件进行数据分析。

**1.2.5 转基因玉米检测分析** 采用农业部2122号公告—14—2014《转基因植物及其产品成分检测 抗虫和耐除草剂玉米Bt11及其衍生品种定性PCR方法》中的转基因玉米Bt11检测方法,合成Bt11内源基因和转化体特异性检测的Taqman探针和实时荧光PCR引物。对使用核酸抽滤快速提取方法提取的标准物质转基因玉米Bt11的核酸进行实时荧光检测。Taqman探针实时荧光PCR扩增条件及扩增程序依据上述执行标准执行,扩增循环数为45个循环,扩增使用ABI StepOne Plus实时荧光PCR仪进行,使用仪器自带软件进行数据分析。

## 2 结果与分析

**2.1 核酸抽滤快速提取装置** 为改良离心过滤柱式提取时间长、操作复杂、产生垃圾多等问题,本研究首先设计了一种用于核酸抽滤的非接触式连接装置。该连接装置结构示意图如图1所示。该装置由连接管和吸附柱组成,连接管的下端固定连接有连接头,与真空腔连接。吸附柱的外侧设有连接部,与连接管螺纹槽连接,连接头的下端内侧设有密封圈,连接管的内侧设有单向阀,防止逆流。在第二堵盖的背面增设带有软磁层的打标槽,可以方便利用软磁层磁吸带有标签纸的铁片,利用标签纸可以方便对对应使用的连接管进行打标。当连接管重复使用

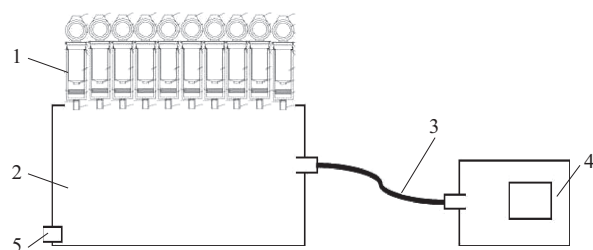


1:连接头,2:连接管,3:吸附柱,4:吸附口,5:第一堵盖,6:连接部,7:螺纹槽,8:第一密封圈,9:第二堵盖,10:橡胶圈,11:揭块,12:打标机构,121:打标槽,122:铁片,123:标签纸,124:软磁层,13:弧槽,14:单向阀,15:第二密封圈

图1 连接装置结构示意图

时,可以方便地将对应的标签纸铁片取下更换,不需要按照传统的方式直接将标签纸粘在连接管上,避免更换撕揭不便等问题。

利用图1的非接触式连接装置,联合使用真空腔和真空泵,组建了核酸抽滤快速提取装置,详见图2示意图。核酸抽滤快速提取装置由非接触式连接装置、真空腔和真空泵3部分组成。真空腔顶部每排有10个小孔,可同时插10个非接触式连接装置,下部有废液口。真空腔通过连接软管与真空泵连接。真空泵可提供-760mmHg的真空度,考虑到整个装置的气密性,一般使用时达到-600mmHg的真空度时即可实现真空抽滤。

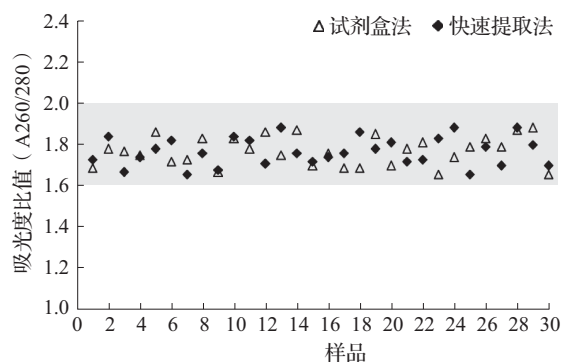


1:非接触式连接装置,2:真空腔,3:连接软管,4:真空泵,5:废液口

图2 核酸抽滤快速提取装置示意图

**2.2 核酸质量分析** 使用试剂盒提取法和核酸抽滤快速提取法分别提取玉米、水稻和小麦粉末样品各10份,其中玉米样品标记为1~10号,水稻样品为11~20号,小麦样品为21~30号。核酸质量和核酸浓度测定结果分别如图3和图4所示。

对于核酸质量,A260/280的比值在1.6~2.0之间的为核酸质量合格,可用于种子的分子检测。试剂盒提取法获取的玉米、水稻和小麦核酸A260/280



A260/280 比值落在浅灰色区域(1.6~2.0)为核酸质量合格,浅灰色区域以外为不合格

图3 试剂盒提取法和核酸抽滤快速提取法

获得的核酸质量比较

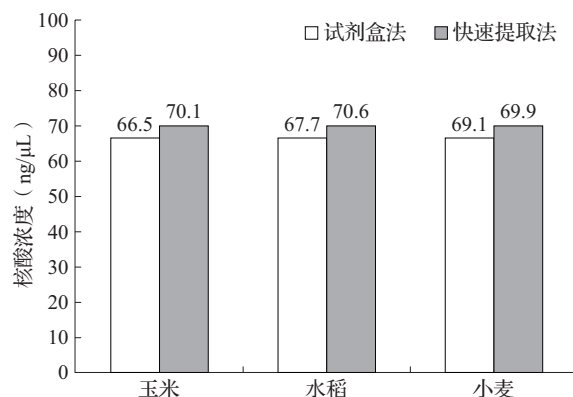


图4 试剂盒提取法和核酸抽滤快速提取法获得的核酸平均浓度比较

的比值中位值分别是1.77、1.75、1.79,核酸抽滤快速提取法获取的玉米、水稻和小麦核酸A260/280的比值中位值分别是1.74、1.76、1.73。从图3可以看出,试剂盒法和快速提取法获得的核酸,A260/280的比值都在1.6~1.9之间,符合分子检验要求。两组数据无显著差异,说明两种方法提取的核酸质量无较大差别。由图4可知,提取的玉米、水稻、小麦核酸浓度分别在62.5~83.0ng/μL、56.0~82.0ng/μL、53.0~83.5ng/μL之间,中位值分别是66.0ng/μL、67.0ng/μL和66.0ng/μL,符合检测要求。

**2.3 核酸完整性分析** 使用0.8%的琼脂糖对提取的核酸进行琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图5所示。从图中可以看出,采用核酸抽滤快速提取法提取的玉米、水稻和小麦的核酸在0.8%的琼脂糖凝胶电泳试验中亮度高、弥散少、无拖尾,说明提取的核酸量足、降解少、大小一致,满足进行下一步转基因成分分析的要求。

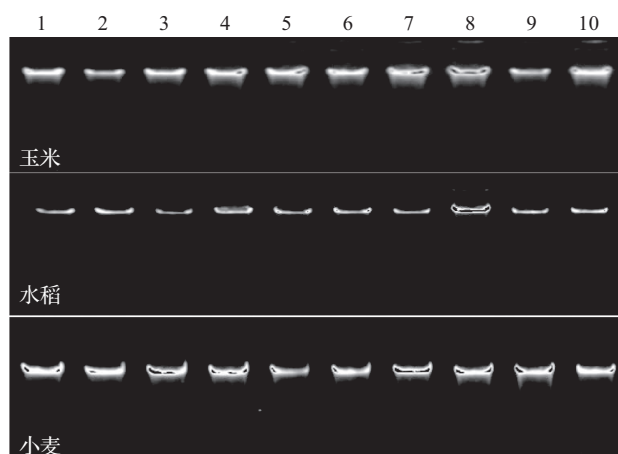


图5 0.8% 琼脂糖凝胶电泳结果

**2.4 内源基因扩增结果** 使用实时荧光PCR方法,对核酸抽滤快速提取法提取的核酸进行内源基因扩增,结果如图6所示。从图中可以看出,玉米、水稻和小麦的内源基因 *zSSIb* (图6A)、*SPS* (图6B) 和 *Wx012* (图6C) 都能够得到完整扩增,Ct值(循环阈值)在24~26之间,说明提取的玉米、水稻和小麦核酸不存在扩增抑制物,适合进行转基因成分的PCR检测。

**2.5 转基因玉米 Bt11 检测结果分析** 以转基因玉米 Bt11 的标准物质为检测对象,应用核酸抽滤快速

提取方法提取核酸。分别对玉米内源基因 *zSSIb* 和 Bt11 转化体特异性片段进行实时荧光扩增,结果如图7所示。转基因玉米 Bt11 内源基因 *zSSIb* (图7A) 和 Bt11 转化体(图7B)特异性片段都扩增出了典型的S型扩增曲线,Ct值分别是24.33和24.26。检测结果表明,本研究建立的核酸抽滤快速提取方法适合进行转基因作物的核酸提取和实时荧光检测。

### 3 讨论与结论

核酸提取是植物转基因检测的基础性、关键环节,核酸质量的高低直接影响转基因检测结果的

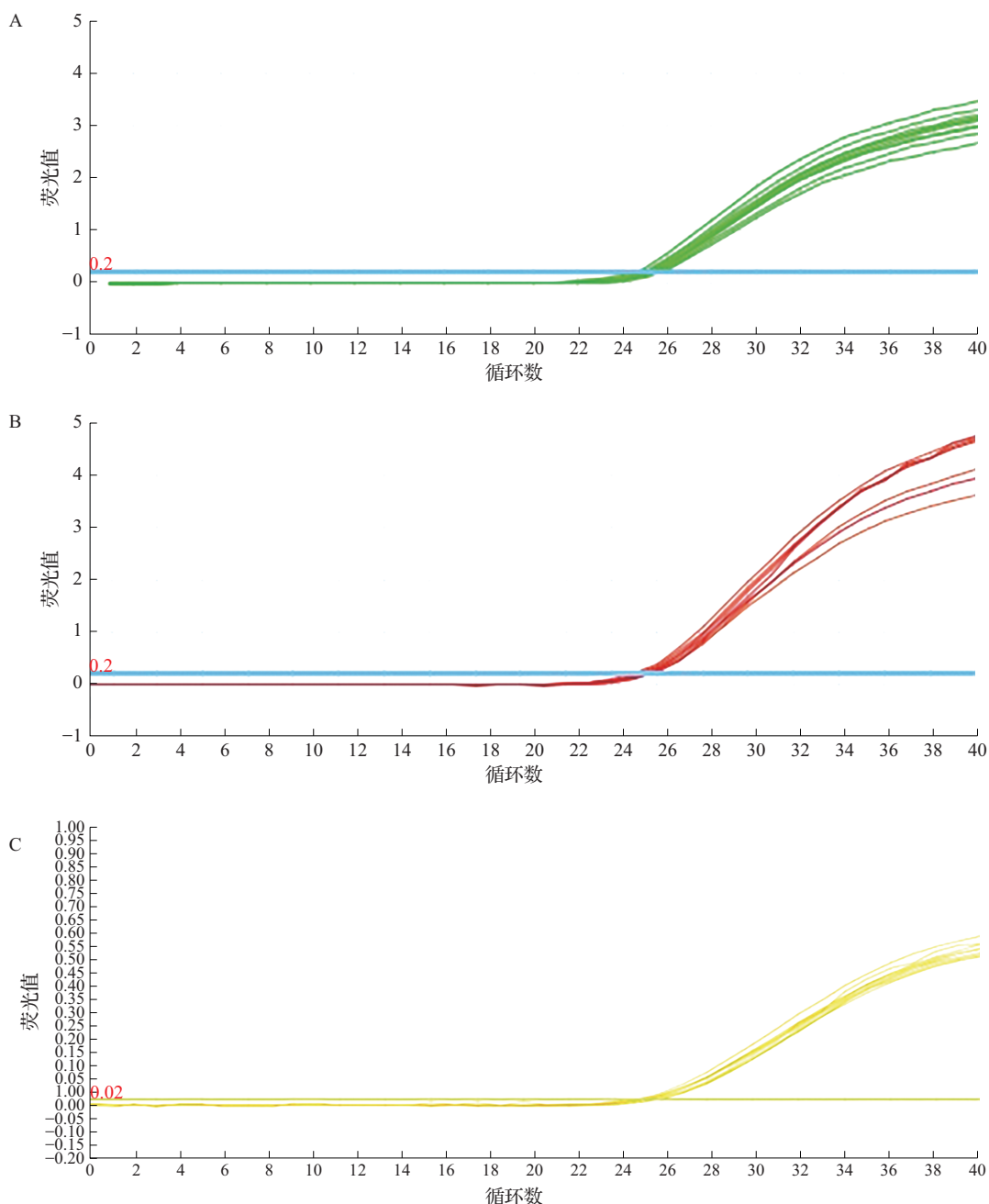


图6 玉米、水稻和小麦内源基因 *zSSIb*、*SPS* 和 *Wx012* 扩增曲线



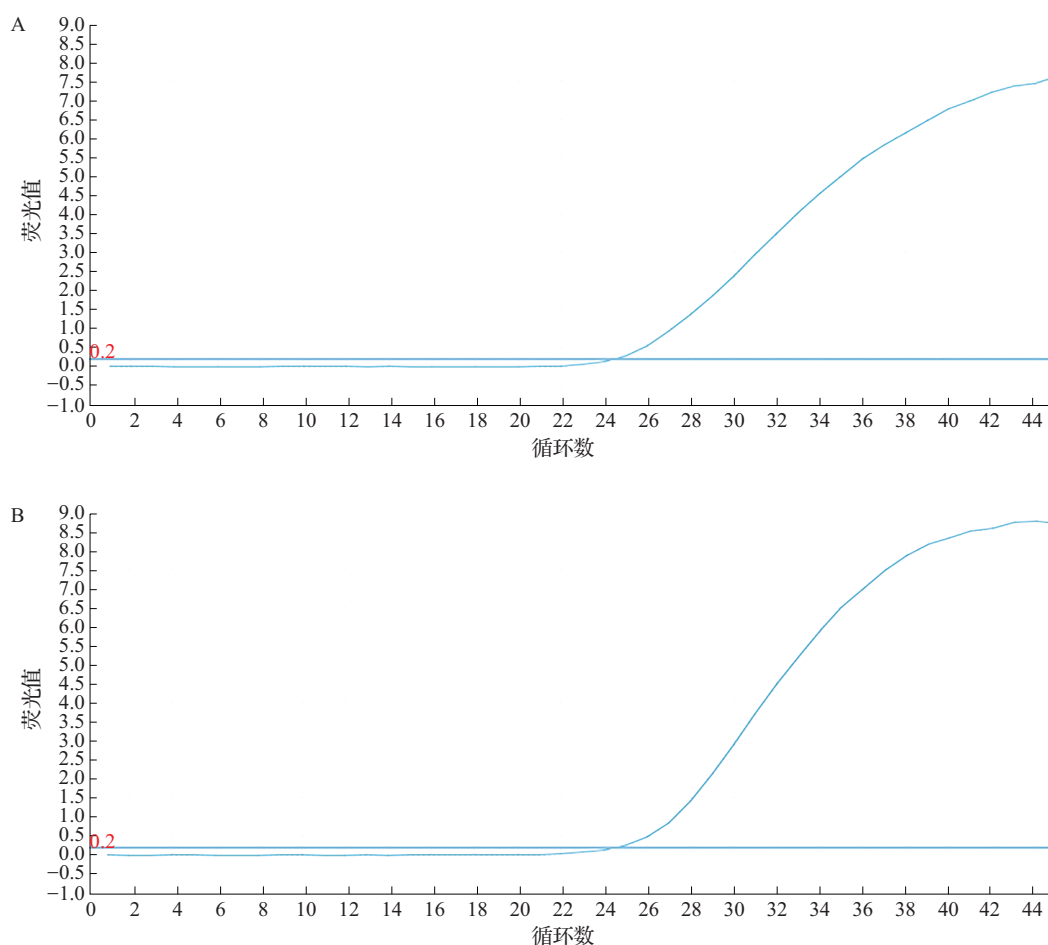


图7 转基因玉米 Bt11 内源基因 *zSSIb* 和转化体特异性扩增曲线

准确性<sup>[5]</sup>。为了提高转基因检测中核酸提取的速度和通量,本研究用真空抽滤方法代替离心的方法,改进了核酸提取技术,发明了非接触式连接装置,组装了核酸抽滤快速提取装置。经测定,提取的种子核酸 A260/280 比值在 1.6~2.0 之间,浓度中位值分别是 66.0ng/ $\mu$ L、67.0ng/ $\mu$ L 和 66.0ng/ $\mu$ L。0.8% 的琼脂糖电泳提示核酸完整度好,无降解拖尾。内源基因扩增表明提取的核酸无扩增抑制物。使用非接触式连接装置,避免了样品之间产生污染,有利于种子转基因检测结果质量控制<sup>[6]</sup>。

核酸抽滤快速提取技术解决了实验室种子检测中提取种子样品核酸的技术难题。由于使用了真空抽滤技术,核酸提取步骤由原来的 14 步减少为 7 步,一次提取所用时间由原来的 142min 缩短到 58min,所需时间减少约 60%,效率提升 140% 以上。该方法减少了提取环节,提高了核酸提取的效率和通量,保证了提取纯度。使用了非接触方式抽滤,使离心管和废液收集管可重复使用,节约了实验耗材,

克服了样品间易污染的难题,可高效助力种子分子检测。

#### 参考文献

- [1] 李凌燕,肖冰,王颢潜,乌兰,邓志峰,陈红,梁晋刚. 转基因玉米 MON87419 实时荧光 PCR 定性检测方法的建立. 种子,2023,42 (8):16-20
- [2] 陈欲,汪小福,陈笑芸,彭城,徐俊锋,李玥莹. 基因组 DNA 快速提取及在转基因大豆检测中的应用. 中国油料作物,2021,43 (1): 70-76
- [3] 权永兵,黄永辉,徐森锋,廖力,林伟,张卫东. 改良十六烷基三甲基溴化铵-磁珠核酸提取方法及在植物转基因检测中的应用. 食品安全质量检测学报,2019,10 (23):8042-8047
- [4] 张英,张海波,雷军,忽瑞,杨娟妮,刘冰,马亚琴,陈西. 一种用于核酸抽滤的非接触式连接装置. 中国:CN202320076389.2,2023-05-02
- [5] 罗建兴,刘国强,呼李乐,郭梁. 转基因作物检测技术研究进展. 食品安全质量检测学报,2023,14 (15):139-148
- [6] 雷军,苟飞凡,张海波. 种子转基因检测实验室污染原因排查和分析应对. 中国种业,2023 (7):26-30

(收稿日期:2024-10-12)