



花蓮區

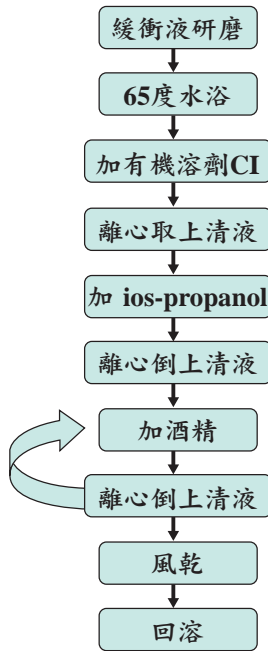
農技報導

123

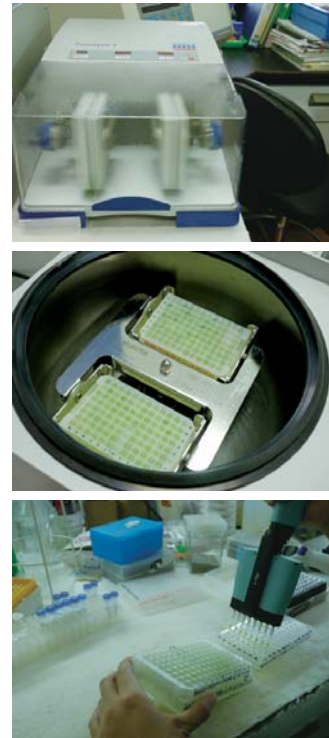
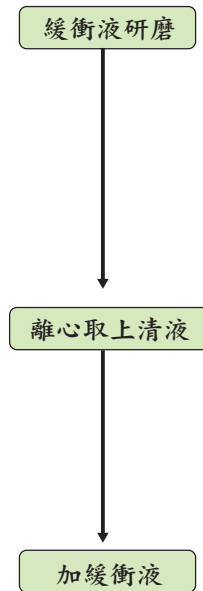
中華民國一〇六年三月出版 發行單位 行政院農業委員會花蓮區農業改良場 發行人：范美玲

快速萃取番茄葉片 DNA 技術

傳統快速抽DNA步驟



新研發快速抽DNA方法



王啟正

前言

利用分子標記輔助進行育種具有許多優點，如可在苗期提早篩選及節省田間空間及人力、並節省後裔檢定的時間，並可以堆疊抗病基因等等，因此已經成為許多種苗公司育種之工具。然而，分子標記輔助育種雖然有許多好處，但相對的增加實驗室的工作，因為傳統抽取 DNA 方式及 PCR 電泳耗時耗力，在國外大型種苗公司已經使用機械快速抽 DNA、機械手臂輔助 PCR、real time PCR 技術及毛細管電泳等儀器來節省人力。然而台灣之種苗公司多為中小型企業，雖有意願進行分子標記輔助育種，但人力不足、無財力採購貴重之相關自動抽取 DNA 機械設備及專用耗材，可是在作物育種族群以分子標記大量篩選苗期某些性狀基因，必須符合快速省工省時原則，以免影響作物幼苗之定植最適期，因此一個便宜、快速抽取 DNA 技術是目前中小型種苗公司進行分子標記輔助育種所必需之技術。

番茄為世界第一大蔬菜作物，品種多樣化，在番茄分子標記輔助育種上，如何縮短抽取大量苗期植株 DNA 以便進行之篩選，也是

非常重要的。然而番茄葉片中含有許多多醣類，也含有許多 PCR 抑制物質，根據一些前人研究報告中所獲得的粗萃取液體進行 PCR 的檢出率極低，本場經過多年分子標記輔助育種過程中不斷改進快速抽取的方式與緩衝液成分，終於獲得一個穩定、簡單、快速且省時省力的快速萃取 DNA 技術，若使用文獻的分子標記檢出率可達 99.1% 以上，十分適合應用在種苗業進行分子標記輔助育種使用。

快速萃取番茄葉片 DNA 技術介紹

本技術係利用兩種特殊緩衝液配方，將番茄葉片經過研磨等 3 個步驟後之稀釋液即可當作偵測番茄抗病基因 PCR 反應之樣本 DNA 用，比傳統抽 DNA 方法或是市售抽取 DNA 套組都省時省力，尤其適用在大批等待種植之番茄樣本抗病基因檢測。

在使用快速萃取法之前，準備好緩衝液 A 與緩衝液 B，先取樣：將番茄苗的一半子葉或相同大小本葉取下依序放入 2 個 96 孔深孔盤中（圖一），此步驟為此快取法與傳統抽取 DNA 的共同必經步驟，耗時約 15 分鐘。



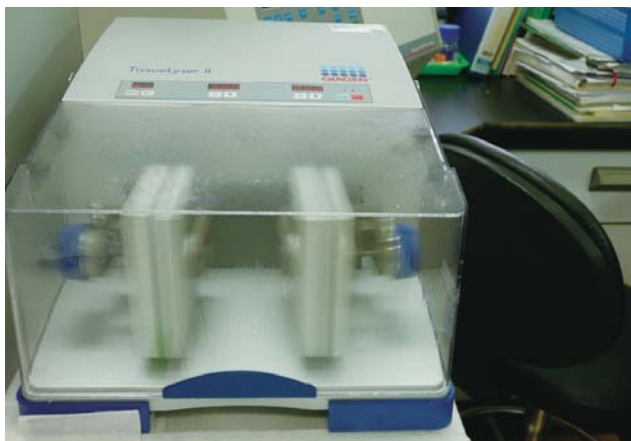
▲圖一、用鑷子將番茄苗的本葉取下依序放入 96 孔深孔盤中。



▲圖二、利用電動八爪微量分注器將緩衝液 A 加入含葉片之深孔盤中。

萃取第一步驟是將緩衝液 A 加入含葉片之深孔盤中，可利用電動八爪微量分注器以節省時間（圖二），再將鋼珠放入孔洞中，將深孔盤蓋子蓋好，使用震盪研磨機研磨（圖三），總共耗時約 2 分鐘，若是使用一次研磨一盤的震盪研磨機，則需耗時約 3 分鐘。第二步驟是離心（圖四），將研磨好的樣本離心，使用便宜小型盤式離心機需 4 分鐘，但使用大型盤式離心機可將離心時間縮短至 90 秒鐘。第三步驟為：在樣本離心時利用電動八爪微量分注器將緩衝液 B 加入另一片 PCR 盤中，離心後用

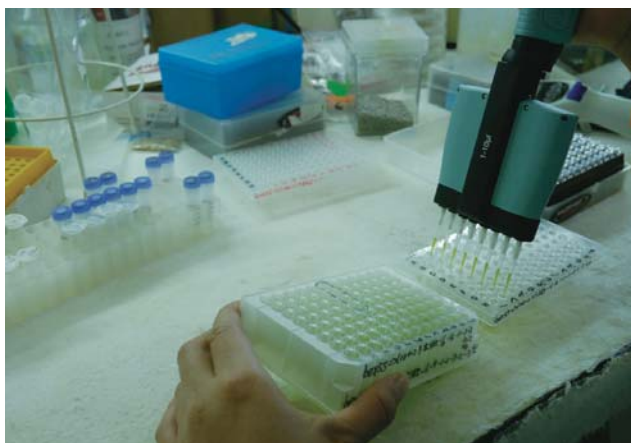
八爪分注器吸取上清液加入另一含有緩衝液 B 之 PCR 盤中（圖五），耗時約 2 分鐘，此混合液體即可以作為分子標誌 PCR 檢測之樣品，使用後可使用鋁箔密封封膜置入 4°C 冷藏，至少可以貯存 3 個月，貯存後之樣本經 PCR 檢測之條帶依然清晰可以判讀基因型。以上三個步驟共耗時約 8-10 分鐘，可萃取 192 (96×2) 個樣本之粗萃 DNA。此粗萃 DNA 經過分子標誌 PCR 檢測電泳條帶都非常清楚（圖六），證明是確實可應用的快速分子標誌輔助育種技術。



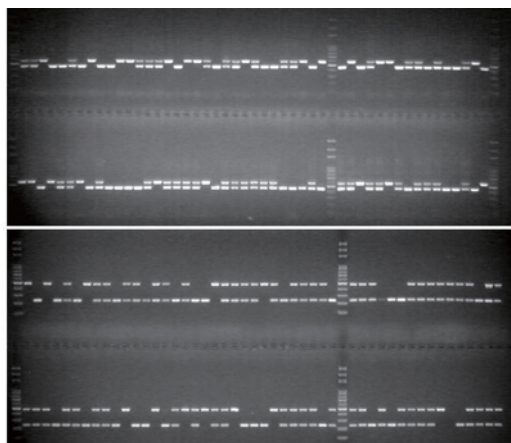
▲圖三、使用一次 2 盤的震盪研磨機研磨可節省時間。



▲圖四、使用便宜小型盤式離心機。



▲圖五、用八爪分注器吸取上清液加入緩衝液 B 中，混合後的液體即可以作為分子標誌 PCR 檢測之樣品。



▲圖六、使用快速萃取的番茄育種 DNA 進行 Ty-2（上）及 Ty-3（下）基因上分子標誌檢測之電泳圖。

經濟效益分析及本技術特色

一、省工

在節省人工方面，以多數種苗商使用之研磨機一次只能抽取一盤 DNA 而言，本快速萃取法抽取 192 個樣本 DNA 僅需 8-10 分鐘，而傳統快速法最少需要 149 分鐘（如封面圖示），若是抽取 96,000 樣本，本快速萃取法較傳統快速抽取 DNA 方法節省約 294 個工作天，約 13.4 個工作月，也就是說每抽取 96,000 樣本就可以減少一個人年以上的薪水支出。以月薪 2 萬 2 千元計算，每年可節省約 29 萬 4 千元工資，三年共節省約 88.2 萬元工資。

二、短期內可篩選大量育種後代

番茄定植以 30-45 天苗齡最為適合，傳統的 DNA 萃取方式過於耗時，等到大批植株後裔篩選後苗株老化則對定植於田間生長有不良影響，然而本番茄快萃 DNA 技術因為省時，十分適合套用在分子標誌輔助育種流程中，使用本法加採葉片 192 個樣本僅需要 23 分鐘，以每月上班日 22 天計算，可以抽取 44,076 個樣本，而傳統法最多只能抽取 6,181 樣本，效率約為 7 倍，也就是說若要在一個月內完成 45,000 樣本的篩選，以傳統萃取方法必須多請 6 個員工才能達成。本快抽法效率高，可在大量樣本適植期前檢測完畢。

三、節省耗材

在節省耗材方面，本技術所需 2 種緩衝液各配置一公升僅共需 102.2 元，抽取每 100 個樣本 DNA 僅需 0.51 元，傳統抽取 DNA 藥劑至少要 5 種，每公升都要上千元，換算每 100 個樣本至少需要 320 元，便宜 627.5 倍。

再者，傳統抽取 DNA 方法至少要 11 個步驟，本場研發之快速萃取 DNA 方法僅需 3 個步驟，兩個方法抽取 96 個樣本每個步驟約需 150 元之塑膠耗材費用，因此快速抽取法至少省略 8 個步驟，至少可節省塑膠耗材費用 1,200 元，若是抽取 96,000 樣本，可節省耗材費用 120 萬元。

結語

本快速萃取番茄 DNA 技術僅需兩種成本便宜的緩衝液，192 個樣本僅需 8-10 分鐘，如上所述，此法較傳統抽取 DNA 法不僅節省時間也省下藥品及耗材，而且可在定植前快速完成大量育種族群之篩選工作，因此，十分適合應用在分子標誌輔助育種流程中。本萃取法已經可以確定適用在番茄、木瓜及水稻，未來可以再調整緩衝液配方及抽取步驟，以適用更多作物。🌱

TIP 葉片取樣小技巧



在播種時可使用 8×13 的穴盤，最後一排 8 株為補苗用，因此採樣只需利用位置對應 8×12 相同的深孔盤位置，在 PCR 檢測後可直接辨認相同位置植株基因型，可以省去植株編號的時間及人力。

ISSN 1563-1192



GPN 2007800049