FTA技术在植物DNA PCR流程中，样品采集，运输，纯化和储存方面的应用

Renate Karle, Fiona Holder and Martin Smith[1]

FTA Classic Card with applied leaf tissue samples

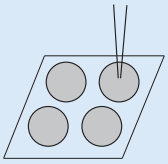
在植物分子研究中，基于PCR方法的发展☒常迅速。这些方法独立地或者同其他工具例如：从Marker辅助选择和分子定位到品☒鉴☒和系统性研究，从基因组到芯片技术等方法一起组合应用。PCR也经常被用于GMO (Genetically modified organisms)的检测。筛选可以从不同阶段☒始，例如从愈伤细胞到☒子最后是植物体。但需要筛选很多样品时，一☒快速简便的DNA样本准备方法会带来很多益处。这里我们描述一☒使用Whatman FTA技术的简便的，基于基质的DNA纯化过程。

在FTA卡上收集植物DNA是一个简单的过程，甚至可以在现场完成。植物组织被物理性地碾碎在卡上，DNA吸附在基质材料上。

包裹在FTA卡上的化学物质将病菌灭活，保护DNA不会发生降解，保证卡可以在室温保存很长一段时间。如果要为PCR做准备，基质材料用☒☒无毒的水性buffer洗涤。DNA在纯化过程中会保留下来继续吸附在基质上，一个小圆片1.2或者2mm直径）的基质就可以提供PCR所需的足☒量的模板。

下面有几个FTA卡应用于PCR的例子。马铃薯叶组织用FTA卡采集进行GM（Genetically modified）DNA序列的检测。大豆DNA用SSR引物扩增后进行品☒鉴☒。我们还展示了同一个FTA卡小圆片多次用于PCR扩增的能力。为了检测除了特☒性PCR反应外，DNA的总体储存质量，我们还用了高拷贝数叶绿体基因的引物，rbcL，叶绿体内含子序列trnL以及检测低拷贝核基因Rca和Rhg4。收集的DNA样品部分被立刻测试，另一部分在室温储存数月后测试。同竞争性的DNA纯化方法数据进行了数据比较。

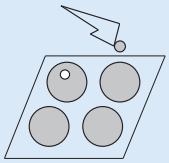
FTA 植物 Protocol



样品取样

将植物组织压在卡上或者直接用组织匀浆

完全干燥



取小片

在FTA卡上打孔，取下一块充满植物原料的小圆片

FTA 纯化试剂洗涤

将小片放入PCR管中用FTA纯化试剂洗涤☒次

每次都去除用过的试剂

TE-1 漂洗

用TE-1 buffer (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA pH 8.0) 洗☒次

每次用过的buffer都不重☒利用

干燥步骤

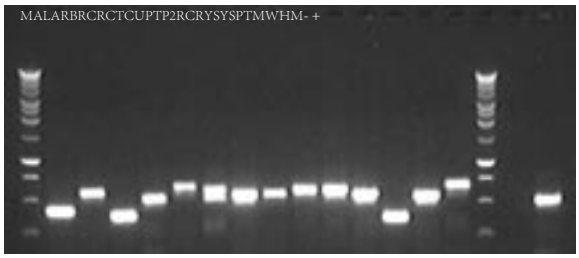
在PCR管中干燥

直接进行PCR

将PCR材料直接加入管中和小片混合，扩增

Whatman®

PCR扩增在FTA®卡上储存11个月的不同植物DNA



用通用引物扩增在叶绿体tRNA基因*trn*L（UAA）5'外显子和*trn*L（UAA）3'外显子之间的内含子序列。

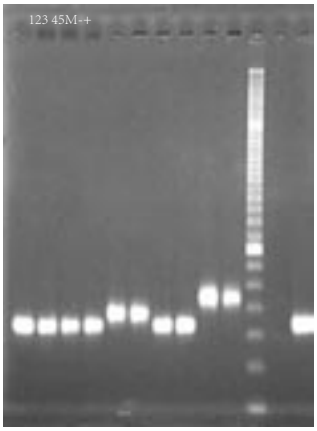
将植物叶片放在FTA卡上，再盖上胶片，用力挤压以收集DNA。从收集有样品DNA的FTA卡上取直径2mm的圆片进行50μL体系PCR反应。

植物物⊠：**AL=**紫花苜蓿，**AR=*Arabidopsis***，**BR=*Brassica***，**CR=**玉米，**CT=**棉花，**CU=**黄瓜，**PT=**马铃薯，**P2=**双倍体马铃薯，**RC=**水稻，**RY=**黑麦草，**SY=**大豆，**SP=**菠菜，**TM=**番茄，**WH=**小麦，**M=1kb Marker**

FTA卡能成功的用于收集、储存和纯化不同⊠的植物**DNA**

FTA®卡用于SSR扩增

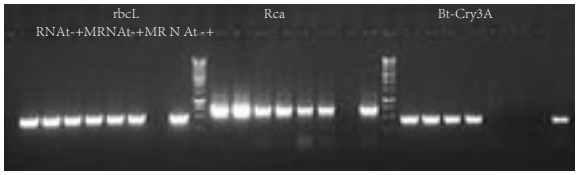
PCR扩增SATT309 -- --一个大豆SSR标记，与大豆囊肿线虫抗性紧密相关。用FTA卡取样5个不同种马铃薯DNA，叶片样本挑选自生长3周的马铃薯。取直径2mm的圆片进行50μL体系PCR反应，10μL反应液（各点样2孔，每个点样孔5μL）用于3%琼脂糖凝胶电泳（BioWhittaker Molecular Applications Inc.），M=20bp Marker



用**FTA**卡收集、纯化的**DNA**成功的用于辅助标记的筛选和基因型分析

凝胶电泳检测储存在FTA®卡上的马铃薯DNA

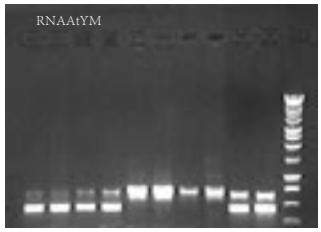
储存**6**个月



选择 3 个不同种的马铃薯叶片（**R**，**N**＝转基因条带；**AT=**商品化的一个非转基因物种），分别压在3张FTA卡上并保存于室温。取直径2mm的圆片进行50μL体系PCR反应，分别扩增3段基因：高拷贝的细胞器基因（*rbc*L），低拷贝的核基因（*Rca*）和*Bt-Cry3A*转基因。

用FTA卡取样5个不同⊠马铃薯DNA（**R**，**N**，**Y**＝转基因；**A**，**AT=**非转基因），保存于室温。PCR反应液中包含2个不同引物：一个用来扩增*Bt-Cry3A*基因（1790bp大小）中一段439bp大小的片段，另一个用来扩增*Rca*基因700bp大小的片段，M=1kb Marker

储存**10**个月

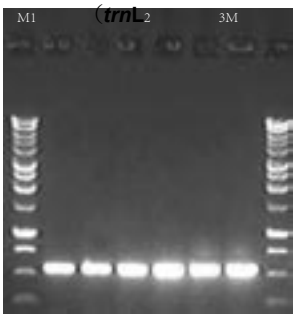


保存在**FTA**卡上数月的植物**DNA**仍然可以用于低拷贝数基因以及转基因的扩增

FTA®圆片反复用于PCR扩增

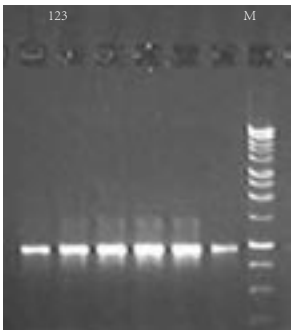
结合有3⊠不同大豆DNA的FTA圆片首先被用来扩增一段无编码叶绿体DNA片段。

首次**PCR**（***trn*L**）



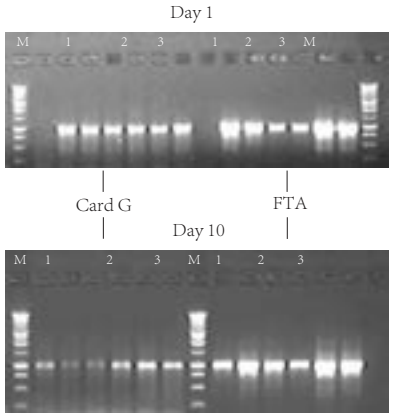
之后，将FTA圆片从PCR反应液中拿出来，用TE缓冲液洗2次，干燥后用于第二轮PCR反应，扩增一个低拷贝位点（*Rhg4*）。

第二轮**PCR**（***Rhg4***）



储存于**FTA**卡上的**DNA**样品经过洗涤能⊠再次用于**PCR**扩增

储存在FTA®卡上的DNA与储存在A公司卡片纯化系统基质上的DNA性能比较

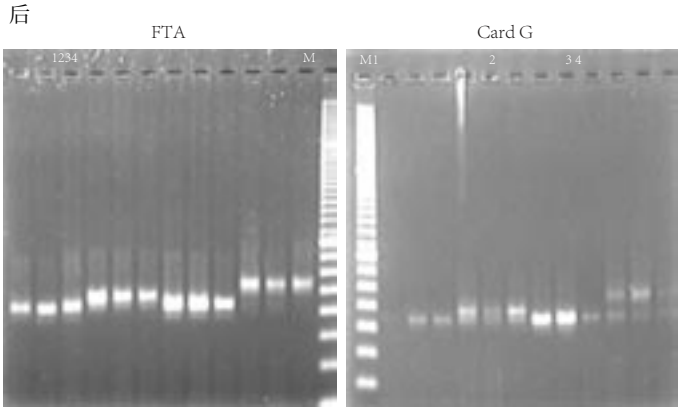


Rhg4位点的扩增

叶片样本挑选自生长3周的3个不同马铃薯物⊠，分⊠用FTA卡和A公司卡处理。在室温下储存1天和10天后进行PCR扩增。

分⊠取2mm的FTA圆片和3mm的A卡圆片用于50μL体系PCR反应。M=1kb Marker

SSR标记的扩增
将结合有4⊠不同大豆DNA的卡片在室温下储存3个月后

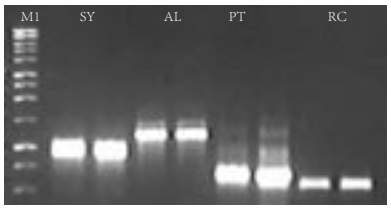


分⊠取圆片用于PCR扩增SATT309 -- 一个大豆SSR标记，与大豆囊肿线虫抗性紧密相⊠。3%琼脂糖凝胶电泳分析，每个样品上3个孔。M=20bp Marker

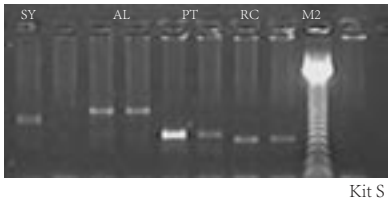
经**PCR**扩增验证，室温条件下储存在**FTA**卡上的大豆**DNA**保留了其高质量，而储存在**A**卡上的**DNA**一致性不高

We would like to thank Dr. David Douches and Dr. Dechun Wang (Department of Crop and Soil Sciences, Michigan State University) for their contribution.

FTA®卡与 DNA 化学抽提法纯化样品的PCR扩增比较



叶片组织分⊠来自于 4个不同物⊠（**SY=** 大豆，**AL=**紫花苜蓿，**PT=**马铃薯，**RC=**水稻）。用FTA卡处理并得到的 DNA，取2mm的圆片在25μL体系中进行PCR扩增（顶部凝胶图）；用S试剂盒提取的DNA，少量用于20μL体系PCR扩增（下部凝胶图）。



纯化当天对低拷贝基因*Rca*进行扩增。M1=1kb Marker，M2=123bp Marker

用**FTA**卡准备的**DNA**完全可以进行低拷贝基因的扩增，而用**S**试剂盒抽提得到的**DNA**无法满足分析所需要的⊠敏度

FTA®卡性能总结

- 对于**PCR**反应的**DNA**样品准备，**FTA**卡是一个方便的工具，它适用于各⊠各样的植物物⊠，固相的形式使实验室外收集成为可能，并简化了**DNA**的储存和运输。
- 用**FTA**卡储存、纯化的**DNA**能成功用在基于**PCR**的各⊠研究，例如标记筛选、品系鉴定、进化分析和低拷贝位点（如转基因）扩增。
- 整个纯化过程只使用无机物、无毒溶液，并且只需在室温下操作，不需要冷冻干燥或化学处理组织。

Whatman ®

产品信息

FTA® 标准卡

每张卡有四个样品区域用来存放挤压的叶片或者植物匀浆（ 每个区域最多25 μ） 。为同一个标本多次测试以及多个植物样品同时测试提供了方便。

指示型FTA 标准卡

与FTA标准卡样式相同，但当样品采集上去之后，卡的颜色会从粉红变为白色，起到指示作用。推荐用于无色样品，如口腔或者培⊠细胞的核酸采集。

FTA 迷你卡

每张卡上有⊠个 样品区域，可方便地应用无需要分⊠ 检测和纯化的核酸样品(每个区域最多25 μl 样品). 对于需要不同区域进行不同测试的样品很方便，可以独立操作。

指示型 FTA 迷你卡

与FTA迷你卡样式相同，但当样品采集上去以后，卡的颜色会从粉红变为白色，起到指示作用。推荐用于无色样品，如口腔或者培⊠细胞的核酸采集。

FTA 微型卡

每张卡只有一个样品区域。（每个样品区最多25ul样品）。推荐用于只有一个样品的实验。

指示型FTA 微型卡

与FTA微型卡样式相同，但当样品采集上去以后，卡的颜色会从粉红色变为白色，起到一⊠指示作用。推荐用于无色样品，如口腔或者培⊠细胞的核酸采集。

FTA 基因卡

带有较坚硬的外框，每张卡有三个样品区域，每孔可应用75ul全血或者10ul植物匀浆液。配备FTA基因卡托盘（WB100030）后，可与多⊠全自动液相工作站配合使用，实现高通量操作。

CloneSaver 克隆储存卡

采用96孔板形式专门为高通量应用所设计。包括颜色指示功能。可用于质粒和细菌DNA的储存及下游应用。

WHATMAN 目录订货信息

Cat. No.	描述	Qty/Pack
WB120205	FTA Classic Card	100
WB120206	Indicating FTA Classic Card	100
WB120055	FTA Mini Card	100
WB120056	Indicating FTA Mini Card	100
WB120210	FTA Micro Card	100
WB120211	Indicating FTA Micro Card	100
WB120208	FTA Gene Card	100
WB120028	CloneSaver Card	10
WB120204	FTA Purification Reagent	500 mL
WB100030	FTA Gene Card Tray	20
WB100005	Harris Micro Punch 1.2 mm (with Mat)	1
WB100006	Replacement Tip 1.2 mm	1
WB100007	Harris Micro Punch 2.0 mm (with Mat)	1
WB100008	Replacement Tip 2.0 mm	1
WB100020	Replacement Cutting Mat	1
WB100028	Harris Uni-Core 1.25 mm punch	4
WB100029	Harris Uni-Core 2.0 mm punch	4
WB100010	Multi-Barrier Pouch, Large	500
WB100011	Multi-Barrier Pouch, Small	500
WB100024	CloneSaver® Resealable Multi-Barrier Pouch	50
WB100016	FTA Card Mailer	50
WB100003	Desiccant Packets (1 gm)	1000

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

附件

FTA 纯化试剂

- 用于纯化保存在FTA卡上的核酸
- ⊠保得到高质量的DNA用于PCR或者SNP分析
- 出去亚铁红素，PCR抑制剂和其他潜在污染物
- 采用无毒，低盐的水溶液进行洗涤

FTA 基因卡托盘

- 可同时放置2张FTA基因卡用于全自动液流分配/加样系统
- 托盘规格符合SBS标准

Harris Micro 取样器和 Uni-Core 取样器 (1.2 mm 或者 2.0 mm) 及取样垫

- 推荐用于FTA卡上的精⊠取样，在使用推荐方法时不会有样品交叉污染
- 取样器头可以进行2000次取样，并可更换。不锈钢顶端经久耐用，并可以消毒
- 可抛弃式的Uni-Core 取样器可以进行300次取样
- 1.2 mm 取样器推荐用于采用FTA卡采集的全血和其它DNA含量较低的样品
- 2.0 mm 取样器推荐用于采用FTA卡采集的口腔细胞，质粒和其它DNA含量较低的样品

多重保护袋

大号

- 用于运输或保存FTA和FTA Elute标准卡
- 七层保护垫可使FTA卡免于暴露在空气中受到液体污染
- 有效的密封方法可以保证样品的保密性
- 外部标签纸便于实验者作标记或书写

小号

- 较小的尺寸适用于保存和运输FTA基因卡，迷你卡或者微型卡

CloneSaver 可密封袋

- 结构类似，但增加了可密封拉链保证可以方便取用 CloneSaver 或者 FTA 卡

干燥剂

- ⊠保FTA卡在运输和储存过程中保持干燥
- 通过颜色由蓝色变为粉红色来指示潮湿程度

Whatman 质量

Whatman 是分离技术的全球领导者，并且以为科学社团提供革命性产品和解决方案而著名。
我们的简化意识加快了发现的速度，降低了成本，节省了时间。

www.whatman.com.cn

Whatman, FTA and Clonesaver are trademarks of the Whatman Group.

中国
Whatman-Xinhua
Part of GE Healthcare
上海市江⊠路212号，凯迪克大厦14楼B2室
电话：86 21 51505518
传真：86 21 51505517
www.whatman.com.cn
E-mail: info@whatman.com

Asia Pacific
Whatman Asia Pacific Pte Ltd
171 Chin Swee Road
#08-01 San Centre
Singapore 169877
Tel: +65 6534 0138
Fax: +65 6534 2166
E-mail: wap@whatman.com

Whatman®

©Whatman Inc., Whatman is a registered trademark of Whatman International Ltd. FTA® is a registered trademark of Whatman Inc. CloneSaver® is a trademark of Whatman Inc.