

快速粗提取致病疫霉菌菌丝 DNA 的方法

李海娟, 孙银银, 权军利, 单卫星

(西北农林科技大学 植物保护学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:为满足规模分析病菌群体、认识病菌的群体遗传变异特征,以致病疫霉菌(*Phytophthora infestans*)为材料,建立快速、简便的用于 PCR 扩增的病菌基因组 DNA。分别大量和微量提取基因组 DNA,比较 2 种方法所提取的 DNA 用于 SSR 标记的 PCR 扩增效果。结果表明:以微量粗提法所得的病菌基因组 DNA 质量足以用于 PCR 扩增,与大量提取所得的 DNA 的 PCR 扩增非常一致,并且粗提的 DNA 与大提的 DNA 一样都可以在 -20℃ 条件下保存。基于 PCR 扩增的遗传标记广泛用于病菌群体的分析,该研究建立的基于玻璃珠振荡法提取疫霉菌菌丝基因组 DNA 的微量提取方法需材少、简便且快速有效,为规模分析疫霉菌群体奠定了基础。

关键词:疫霉菌;基因组 DNA;PCR 扩增

中图分类号:S 435.32 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)17-0168-03

由致病疫霉菌^[1] (*Phytophthora infestans* (Mont) de Bary) 引起的马铃薯晚疫病是全球范围内马铃薯生产的一种毁灭性病害^[2]。联合国粮农组织 1996 年的年度报告认为,晚疫病的危害性、防治难度及对社会的影响已超过了水稻稻瘟病和小麦锈病,被视为国际第一大作物病害。由于该病的危害性已经引起全世界的关注,20 世纪 90 年代初以来,关于致病疫霉菌群体遗传学的研究也已经在各大实验室开展^[3-8]。目前,致病疫霉菌群体遗传多样性研究采用的最简便的标记方法是 SSR 标记 (Simple sequence repeat),即简单重复序列标记,因为该方法具有位点特异性、重复性好等优点,且已经具备稳定的 SSR 标记引物^[9]。致病疫霉菌菌丝 DNA 的提取是 SSR 标记的基础,而且群体遗传学分析所要求的菌株数量一般都是比较庞大的,所以在这一过程中,菌丝 DNA 的提取工作往往会成为 SSR 标记进展速度慢的主要因素之一。通常,提取致病疫霉菌菌丝 DNA 都是采用尿素法^[10],这种方法提取的 DNA 质量虽好,但是步骤繁多,费时费力,不适合于对 DNA 质量要求相对较低的 SSR 标记中的 PCR 扩增。因此,能够摸索得到快速、有效微量粗提取菌丝 DNA 的方法,对推进致病疫霉菌群体遗传学研究具有重要意义。

第一作者简介:李海娟(1984-),女,福建古田人,硕士,现主要从事植物免疫学研究。E-mail:lihaijuan-123@163.com。

通讯作者:单卫星(1967-),男,新疆新源人,博士,教授,博士生导师,现主要从事分子植物病理学研究工作。

基金项目:国家公益性行业科研专项资助项目(3-20);现代农业产业技术体系资助项目(nycytx-15)。

收稿日期:2010-04-10

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试病菌 从马铃薯晚疫病病叶上分离得到的致病疫霉菌(*P. infestans*)分离物。

1.1.2 主要试剂 含尿素的 DNA 提取液、Tris 饱和酚 (pH 7.8~8.0)、氯仿、异丙醇、乙醇(以上试剂为尿素法提取用);微量粗提取用的 TE 提取缓冲液(50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA (pH 8.0))、直径为 500 μm 的玻璃珠(以上试剂为玻璃珠振荡法提取用);1×TAE 电泳缓冲液等。

1.1.3 主要仪器 漩涡仪;离心机;PCR 仪等。

1.2 试验方法

1.2.1 菌体培养方法 固体培养时将带有致病疫霉菌的琼脂块放在黑麦培养基(RSA)表面,1 个培养皿可接 2~4 块,然后置于 16℃ 的培养箱内黑暗培养 5~6 d,菌丝即可铺满整个培养皿;液体培养时,用灭菌牙签挑取数块 1 cm×1 cm 的菌块放在培养皿内,倒入适量的黑麦液体培养基,在 16℃ 的培养箱内黑暗培养 10~14 d 即可收集菌丝。若菌丝需求小,可不进行液体培养,直接在固体培养基上刮取。收集的菌丝放入 2 mL 离心管中液氮速冻后保存在 -80℃ 条件下备用。

1.2.2 DNA 提取方法 尿素法:采用含有尿素的 DNA 提取液进行提取,步骤详见参考文献^[10]。玻璃珠振荡法:①用牙签挑取少量(0.02~0.04 g 左右)致病疫霉菌菌丝放入 2 mL 离心管中,加入约 100 mg 直径为 500 μm 的玻璃珠,再加入 500~800 μL(视菌丝量而定)的微量粗提取缓冲液 TE;②用玻璃棒快速捣碎 5 min 后,在漩涡仪上大于 2 000 r/min 振荡 10~15 min,或直至菌丝彻底打碎为止;③常温下,14 000 r/min 离心 10 min;④吸

取上清液,尽量不含漂浮的菌丝,并将含有 DNA 的上清液保存在 -20°C 条件下备用。

1.2.3 DNA 的 PCR 检测 分别以用玻璃珠振荡法微量粗提的致病疫霉菌菌丝 DNA 和用尿素法大量提取的菌丝 DNA 为模板,以致病疫霉菌 SSR 标记引物之一的 PiO_2 [9] 为引物 (PiO_2F : CAGCCTCCGTGCAAGA, PiO_2R : AAGGTGCGCGAAGACC) 进行 PCR 扩增,扩增片段大小为 142~166 bp。每 25 μL PCR 反应体系包括 1 X 反应 buffer, 100 μM dNTP, 100 μM 上下游引物, 0.5 个单位 DNA 聚合酶和 10~100 ng 模板 DNA。PCR 反应程序: 94°C 预变性 2 min; 94°C 变性 30 s, 66°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 13 个循环, 每个循环退火温度降低 1°C ; 94°C 变性 30 s, 53°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 28 个循环; 72°C 延伸 2 min; 4°C 保存。PCR 扩增产物用 2% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测。

1.2.4 PCR 产物的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 取以上所获得的 PCR 产物各 2 μL 混合一定量的 loading buffer, 用 12% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离扩增片段(具体操作步骤参见《分子克隆实验指南》, Sambrook, 1989)。在 30 W 条件下电泳 6 h, 结束后取出凝胶, 用银染法 [11] 进行染色并照相观察结果。

1.2.5 DNA 的稳定性检测 为了检测这种粗提的 DNA 能否在 -20°C 条件下长时间保存, 可用保存在 -20°C 冰柜中 6 个月的粗提菌丝 DNA 和大提菌丝 DNA 为模板, 重新做如同 1.2.3 所述的 PCR 检测, 并对比其结果。如果结果一致, 可证明粗提的菌丝 DNA 在一定条件下也是可以保存一段时间的。

2 结果与分析

2.1 DNA 的 PCR 检测结果

图 1 显示的是分别以这 2 种方法提取的致病疫霉菌菌丝 DNA 为模板, 以 PiO_2 为引物进行 PCR 扩增的结果。由图 1 可以看出, 在 PCR 条件一致的情况下, 用玻璃珠振荡法微量粗提取的 DNA 经 PCR 扩增的结果与用尿素法大量提取的 DNA 的 PCR 结果是非常一致的, 这可以由条带的亮度和特异性来显示。

2.2 PCR 产物的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

各取 2 μL PCR 产物用 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳的结果也显示, 用以上 2 种方法所提取的 DNA 做 PCR 扩增后的扩增产物在非变性聚丙烯酰胺凝胶中具有一样的分离效果, 这也进一步证明了玻璃珠振荡法微量提取菌丝 DNA 的可靠性(图 2)。

2.3 DNA 的稳定性检测

用在 -20°C 冰柜中保存了 6 个月的经玻璃珠振荡法粗提的致病疫霉菌菌丝 DNA 为模板, 以 PiO_2 为引物进行 PCR 扩增, 并且以尿素法提取 DNA 的 PCR 结果作为对照, 来检测这种粗提 DNA 的稳定性。琼脂糖电泳

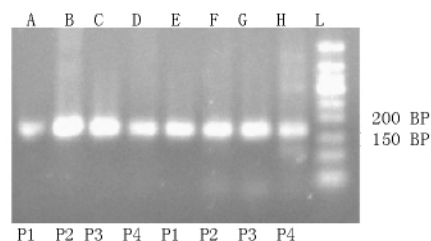


图 1 扩增产物的琼脂糖电泳图

注: A, B, C, D 用以尿素法提取的菌丝 DNA 为模板的扩增结果; E, F, G, H 用以玻璃珠振荡法微量粗提取菌丝 DNA 为模板的扩增结果; L: 50 bp DNA Ladder; P1, P2, P3, P4 代表致病疫霉菌的 4 个不同分离物。

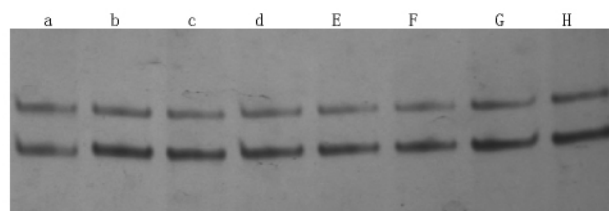


图 2 PCR 扩增产物的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳图

注: A, B, C, D 用以大提的菌丝 DNA 为模板进行扩增的 PCR 产物的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳结果; E, F, G, H 用以粗提的菌丝 DNA 为模板进行扩增的 PCR 产物的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳结果。

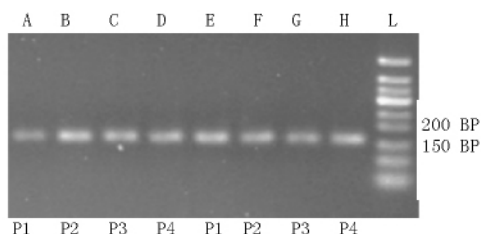


图 3 扩增粗提产物的琼脂糖电泳图

注: A, B, C, D 用以粗提的菌丝 DNA 为模板扩增的结果; E, F, G, H 用以大提的菌丝 DNA 为模板扩增的结果; L: 50 bp DNA Ladder; P1, P2, P3, P4 代表致病疫霉菌的 4 个不同分离物。

结果显示, 所扩增片段的条带亮度和特异性在这二组之间是没有差异的(图 3)。

3 讨论

DNA 提取是分子生物学研究的基本技术之一。对于致病疫霉菌来说, 由于其引起的马铃薯晚疫病危害之大, 对其群体遗传结构的研究已经刻不容缓。目前, 我国致病疫霉菌群体遗传学研究的效率还处于较低水平, 原因之一是需要连续的大量采集和分离样品, 工作量较大; 另外是常规提取病原菌 DNA 的方法费时费力, 由此, 更加大了研究的难度。而在该研究中提出的微量粗提取菌丝 DNA 的极其简便的玻璃珠振荡法就很适合做致病疫霉菌群体遗传多样性研究, 特别是适合于 SSR 标记方法中涉及到的 PCR 扩增, 原因是: 首先, 与步骤繁琐

的常规方法相比,此方法虽然只是微量粗提,所得的 DNA 质量并不高,但是可以足够被应用于 PCR 分析,并且结果与常规方法非常一致;其次,此方法明显具有以下优点:第一,使用的菌丝量极少,完全可以使用在固体培养基上直接刮取的菌丝,避免了液体培养所带来的麻烦(如易污染等);第二,不用配制常规方法中一般都要用到的成分复杂的 DNA 提取液,节省准备时间,且所用的试剂都是常规试剂,容易购买;第三,操作极其简单,可在短时间内对大量样品进行提取,每人每天可提上百个样品。除此之外,试验还验证了微量粗提取的 DNA 与大量提取的 DNA 一样也可以在一 20℃ 条件下长期保存(至少 6 个月)。但是,该方法在有其充分的优点的同时也存在不足之处,最突出的缺点是用这种方法粗提取的 DNA 因为质量低,所以仅适合做后期的 PCR 分析,不适合于对 DNA 质量要求比较高的试验操作,如 southern 杂交等。

据了解,目前,虽然有关于 DNA 的小量提取方法的报道^[12-13],但这些方法大多都是在大提方法的基础上进行不同程度的简化,仍需要使用 DNA 提取液提取、酚和氯仿抽提等,而该研究中开发的这种新方法不仅避免了其它小提方法中仍然存在的繁琐步骤,而且可以得到同样的 PCR 效果。因此,可以帮助解决很多丝状植物病原真菌群体遗传学研究所遇到的难题,具有极大的创新意义。

参考文献

[1] De Bary M. Researches into the nature of the potato fungus *Phytophthora infestans* [C]. Journal of the Royal Agricultural Society of England. 1876,12(3):239-269.

- [2] Erwin D C, Ribeiro O K. *Phytophthora* disease worldwide [M]. Saint Paul, MN, USA: APS Press, 1996.
- [3] Goodwin S B, Spielman L J, Matuszak J M, et al. Clonal diversity and genetic differentiation of *Phytophthora infestans* populations in northern and central Mexico [J]. Phytopathology, 1992, 82(9): 955-961.
- [4] Drenth A, Goodwin S B, Fry W E, et al. Genotypic diversity of *Phytophthora infestans* in the Netherlands revealed by DNA polymorphisms [J]. Phytopathology, 1993, 83(10): 1087-1092.
- [5] Lionel L, Didier A. French isolates of *Phytophthora infestans* from potato and tomato differ in phenotype and genotype [J]. European Journal of Plant Pathology, 1998, 104(6): 583-594.
- [6] Wangsomboondee T, Trout G C, Shoemaker M A, et al. *Phytophthora infestans* populations from tomato and potato in North Carolina differ in genetic diversity and structure [J]. Phytopathology, 2002, 92(11): 1189-1195.
- [7] Akino S, Kato M, Gotoh K, et al. Genetic relationships between the dominant genotypes of *Phytophthora infestans* in Hokkaido, Japan [J]. Journal of Genetic Plant Pathology, 2005, 71(3): 200-203.
- [8] Chacón M G, Adler N E, Jarrin F, et al. Genetic structure of the population of *Phytophthora infestans* attacking *Solanum ochroanthum* in the highlands of Ecuador [J]. European Journal of Plant Pathology, 2006, 115(2): 235-245.
- [9] Lees A K, Wattier R, Shaw D S, et al. Novel microsatellite markers for the analysis of *Phytophthora infestans* populations [J]. Plant Pathology, 2006, 55(3): 311-319.
- [10] Dudler R. The single-copy actin gene of *Phytophthora megasperma* encodes a protein considerably diverged from any other known actin [J]. Plant Molecular Biology, 1990, 14(3): 415-422.
- [11] Bassam B J, Gresshoff P M. Silver staining DNA in polyacrylamide gels [J]. Nature protocols, 2007, 2(11): 2649-2654.
- [12] 戈海泽, 郭刚, 张瑞, 等. 玻璃珠法提取基因组 DNA. [J]. 天津医科大学学报, 2006, 12(2): 313-314.
- [13] 张颖慧, 魏东盛, 邢来君, 等. 一种改进的丝状真菌 DNA 提取方法. [J]. 微生物学通报, 2008, 35(3): 466-469.

Rapid Coarse DNA Extraction Method for *Phytophthora infestans* Mycelia

LI Hai-juan, SUN Yin-yin, QUAN Jun-li, SHAN Wei-xing

(College of Plant Protection, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: To facilitate large scale analysis and understanding of genetic variation in pathogen populations using PCR-based molecular markers, a quick, simple procedure was developed for extracting genomic DNA of *Phytophthora infestans* from small amount of mycelial tissues. Genomic DNA was extracted using urea-based large-scale procedure and the developed mini-scale protocol, and the quality was compared by PCR amplification of selected SSR markers. The results showed that there was no significant difference for PCR amplification of SSR markers between the genomic DNA isolated using two different methods, and the coarse DNA can also remain stable under -20℃. PCR-based molecular markers are widely used in population studies of plant pathogens, the developed glass beads-based method is simple, fast, and uses tiny amount pathogen mycelial tissues, making it possible for large-scale analysis of pathogen population and a better understanding of pathogen population biology.

Key words: *Phytophthora*; genomic DNA; PCR amplification