

Chlex-100 法快速提取甜瓜白粉病菌基因组 DNA

刘建利, 赵海霞

(北方民族大学 生物科学与工程学院, 宁夏 银川 750021)

摘要: 现以白粉病菌分生孢子为材料, 用 Chlex-100 法快速提取白粉病菌基因组 DNA, 并以此为模板 PCR 扩增出 5.8S-ITS rDNA 区段, 以建立快速提取甜瓜白粉病菌基因组 DNA 的方法。结果表明: Chlex-100 法是快速提取白粉病菌基因组 DNA 的高效方法。

关键词: Chlex-100; 白粉病菌; 基因组 DNA

中图分类号: S 436.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2010)10—0167—03

甜瓜白粉病(Melon powdery mildew)为甜瓜的常见病, 俗称“白毛病”, 分布广泛, 发生普遍。春秋二季发病较重, 发病率 70%~100%, 严重影响甜瓜生产, 最高可使甜瓜减产 60%。同时影响甜瓜的成熟度和含糖量, 从而影响甜瓜的品质和商品性。该病的病原菌属专性寄生, 不能人工培养, 且记载较为混乱, 郑儒永等^[1]在《中国真菌志》中为子囊菌亚门真菌白粉菌目单囊壳属瓜类单囊壳(*Sphaerotheca cucurbitae*)和白粉属葫芦科白粉菌(*Erysiphe cucurbitacearum*), 也有研究认为是白粉属二孢白粉菌(*Erysiphe cichoracearum*)和单囊壳属单囊壳白粉菌(*Sphaerotheca fuliginea*), 并认为后者较为常见^[2-3]。上述几种病原菌无性阶段形态相似, 而有性阶段的闭囊壳不经常出现, 所以给甜瓜白粉病病原菌分类鉴定工作造成困难。因此, 若要有效防治甜瓜白粉病害, 首先必须澄清其病原体的种类。

近年来随着分子生物学的发展, 对于病原菌的鉴定, 采以 PCR 扩增属、种特异性 DNA 序列, 再与数据库中已有序列进行比对, 在形态鉴定基础上, 进一步提高鉴定的准确性, 缩短了鉴定时间^[4-12]。利用白粉病病原菌无性繁殖阶段的个体一分生孢子和菌丝提取基因组 DNA, PCR 扩增相应的属、种特异性 DNA 序列, 鉴定、区分形态高度相似的白粉病病原菌已经成为可能。分子生物学鉴定病原菌工作中, DNA 提取至关重要。白粉病病原菌专性寄生、仅能依靠植物体存活, 尚不能体外培养, 在提取病菌的基因组 DNA 时, 在病株上很难分离获得纯的材料, 直接影响从中提取基因组 DNA 的效果。同时, 白粉病病原菌分生孢子和菌丝, 具有独特的细胞

结构, 尤其是细胞壁的组分^[13], 致使常规提取 DNA 方法如液氮低温冷冻研磨或石英砂常温研磨破碎细胞壁的 SDS 和 CTAB 破壁效果差, 而且操作繁琐, 费时费力。王娜等^[14]为避免混入宿主或其它杂物的基因组 DNA, 影响 PCR 扩增, 采用弹孢法收集黄瓜白粉病原菌样本, 在解剖镜下除去杂质后用针将孢子和菌丝压碎破碎细胞壁提取到黄瓜白粉病 DNA, 贾少锋^[15]和曾晓葳等^[16]采用玻璃珠破碎小麦白粉病菌细胞壁在用 CTAB 法提取到小麦白粉病 DNA, 高宏华等^[17]采用单斑分离法和直接收集法收集橡胶白粉菌菌体, 采用石英砂振荡破壁法、氯化苄法和尿素法提取橡胶白粉菌基因组 DNA。以上方法所得到的基因组 DNA 的产量与纯度均不理想, 而且操作也比较繁琐, 不易掌握。

Chlex-100 是 1 种化学离子螯合树脂, 由苯乙烯和苯二乙烯共聚体组成, 其悬液在碱性环境 pH (10~11) 和 100℃的条件下, 可导致细胞膜的破裂和 DNA 的变性并释放出来^[18], 并且 Chlex-100 能结合许多可能影响下一步分析的其它外源物质, 并能通过结合金属离子, 防止 DNA 降解^[19]。由于 Chlex-100 能有效除去非核酸有机物, Chlex-100 提取 DNA 具有经济、简便、高效等优点, 目前已被广泛用于从全血或血痕、精液或精斑、毛发、植物、动物、细菌细胞等提取 DNA^[20-25]。

该研究利用 Chlex-100 法快速提取白粉病分生孢子中的 DNA, 建立从白粉病病原菌快速提取 DNA 的方法, 以期为该菌的分子生物学研究及系统发育分析的提供相应的技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 标本采集 白粉病病原菌 2009 年 9 月在宁夏中部干旱带中卫市鸣沙镇采集甜瓜主栽品种“玉金香”发病植株感染白粉病的叶片, 带回室内刷下粉状物; 25℃环境下, 10 000 r/min 离心 1 min 除杂; 收集橡胶白粉菌菌体。采用人工接种的方法将病原菌保存于温室培育的甜瓜苗上。

第一作者简介: 刘建利(1973-), 男, 硕士, 讲师, 现主要从事微生物分子生物学研究工作。E-mail: ljl7523@126.com。
基金项目: 宁夏回族自治区自然科学基金资助项目(NZ0958); 2009 年宁夏大学生创新性实验资助项目。
收稿日期: 2010-02-10

1.1.2 试验仪器和试剂 分子量标准 λ DNA/*HindIII* Marker 和 DNA Marker D (Biobasic 公司)、*Taq* DNA 聚合酶和 dNTPs 等分子生物学试剂, 购自北京全式金生物公司, 其它生化试剂为国产分析纯。所用试剂、塑料耗材和玻璃器皿等物品, 均经高压灭菌处理。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 取约 500 个分生孢子体置于 1.5 mL 离心管中, 然后加入 50 μ L 5% Chelex-100 混匀, 56 $^{\circ}$ C 水浴 4 h, 旋涡震荡混匀, 沸水浴 10 min, 旋涡震荡混匀, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 20 μ L 于加入 EB 的 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳, 以 λ DNA/*HindIII* Marker 分子量标准, 紫外灯下观察, 剩余作为 PCR 检测模板。

1.2.2 PCR 扩增真菌 5.8S-ITS 引物 由上海生工合成。ITS1: 5'-CGT AAC AAG GTT TCC GTA GG-3' (20mer); ITS4: 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3' (20mer)。PCR 反应体系组成: 10 \times PCR 反应缓冲液 (含 Mg^{2+}) 2.5 μ L, dNTP 溶液 (各为 10 mM) 0.5 μ L, 正反引物 (10 μ M) 各 0.5 μ L, *Taq* 酶 (5 U/ μ L) 0.5 μ L, 模板 10 μ L, 水补足反应体系, 使总体积为 25 μ L。循环参数为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 再按 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s、55 $^{\circ}$ C 复性 45 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

1.2.3 扩增产物鉴定 扩增产物于加入 EB 的 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳, 以 DNA Marker D 分子量标准, 紫外灯下观察。

2 结果与分析

2.1 Chelex-100 法从分生孢子中提取甜瓜白粉病病原菌基因组 DNA 结果

采用 Chelex-100 法从甜瓜白粉病病原菌分生孢子中提取得到基因组 DNA, 如图 1, 大小大约 27 kb, 呈带状, 有拖尾现象, 说明有部分降解, 而且纯度不高。根据亮度判断, 浓度约为 20~30 ng/ μ L, 可满足 PCR 要求。

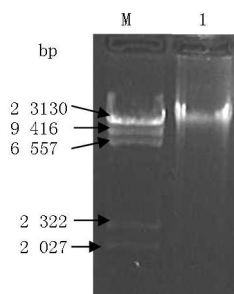


图 1 Chelex-100 法从分生孢子中提取甜瓜白粉病病原菌基因组 DNA 电泳结果

2.2 PCR 扩增结果

用 Chelex-100 法从甜瓜白粉病病原菌分生孢子中提取得到基因组 DNA 10 μ L 约 200~300 ng 作为模板, 用真菌 5.8S-ITS rDNA 引物扩增, 如图 2, 得到扩增条

带, 大小约 600 bp, 与真菌 5.8S-ITS rDNA 区段长度吻合。

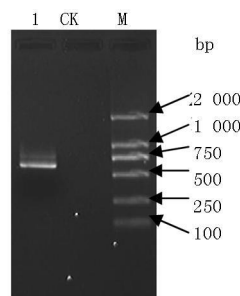


图 2 PCR 扩增结果

M. DNA Marker D CK. 对照 1.. PCR 产物

3 讨论

采用 Chelex-100 制备的 DNA 模板的 PCR 扩增效果理想, 应用于白粉病分生孢子基因组 DNA 提取非常简便、快速, 所需试剂少, 又避免了使用有毒化学试剂酚和氯仿, 适合对大量样品的 DNA 模板的提取。以上结果说明用 Chelex-100 提取白粉病分生孢子基因组 DNA 是一种有效的方法。但 Chelex-100 提取的模板与底物、核膜及其它组分一起保留下来, 蛋白质和多糖等杂质也没有很好去除, DNA 纯度比有机溶剂提取法低。所以其只适合用于 PCR 分析, 而不适合于 RFLP 分析。

参考文献

- [1] 郑儒永. 中国真菌志. 白粉菌目 [M]. 北京: 科技出版社, 1987: 78-316.
- [2] 王娟, 邓建新, 宫国义. 甜瓜抗白粉病育种研究进展 [J]. 中国瓜菜, 2006, 13(1): 33-36.
- [3] 王建设, 陈杭. 甜瓜抗白粉病鉴定 [J]. 华北农学报, 2000, 15(1): 125-128.
- [4] 刘春来, 杨明秀, 文景芝. 大豆疫霉菌 ITS 分子检测程序的建立及其应用 [J]. 微生物学通报, 2007, 34(6): 1158-1162.
- [5] 唐建辉, 王伟, 王源超. 西瓜炭疽病菌 *Colletotrichum orbiculare* 的分子检测 [J]. 中国农业科学, 2006, 39(10): 2028-2035.
- [6] 郑雪芳, 蓝江林, 曹宜. 瓜类作物枯萎病病原菌的分类鉴定及其 ITS 序列差异性分析 [J]. 中国农业科学, 2008, 41(12): 4077-4084.
- [7] 邢红梅, 丁平, 王克荣. 等. 红掌炭疽病病原的分离鉴定及其核糖体 DNA ITS 序列分析 [J]. 园艺学报, 2009, 36(5): 743-748.
- [8] 付娟妮, 刘兴华, 蔡福带. 等. 石榴采后腐烂病原菌的分子鉴定 [J]. 园艺学报, 2007, 34(4): 877-882.
- [9] 严进, 施宗伟, 宋福. 等. 河北和山东鸭梨果实上链格孢菌鉴定 [J]. 植物保护学报, 2009, 36(1): 37-43.
- [10] 赵思峰, 方许阳, 姜海荣. 等. 新疆加工番茄腐霉根腐病原鉴定及其 rDNA 的 ITS 区段分析 [J]. 植物保护学报, 2009, 36(3): 219-224.
- [11] 曾大兴, 戚佩坤, 姜子德. 等. 弯孢炭疽菌 rDNA ITS 区的 RFLP 分析及分类研究 [J]. 植物病理学报, 2004, 34(5): 431-436.
- [12] 朱桂宁, 蔡健和, 胡春锦. 等. 广西山药炭疽病病原菌的鉴定与 ITS 序列分析 [J]. 植物病理学报, 2007, 37(6): 572-577.
- [13] 贺运春. 真菌学 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2008: 26.
- [14] 王娜, 马雅军, 代光辉. 等. 黄瓜霜霉病和白粉病病原菌的 rDNA-ITS 序列分析 [J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2007, 35(10): 156-159.
- [15] 贾少锋, 段霞瑜, 周益林. 等. 小麦白粉菌 ISSR 分子标记体系构建及其分离菌株的多样性分析 [J]. 植物保护学报, 2007, 34(5): 493-499.
- [16] 曾晓蕊, 骆勇, 周益林. 等. 基于小麦白粉病菌 rDNA ITS 序列的 PCR

低温胁迫对金边瑞香生理生化变化的影响

阙生全, 甘志凯

(南昌理工学院 生物环境工程系, 江西 南昌 330013)

摘要:研究了低温胁迫下金边瑞香幼苗 SOD 活性和游离脯氨酸含量的变化。结果表明:从这些生理指标 10 d 的变化情况看,金边瑞香品种幼苗 SOD 活性呈现先上升后下降的变化趋势,游离脯氨酸含量逐渐增加,表明金边瑞香对低温有较强的适应能力,具有较强的抗寒性。

关键词:金边瑞香; 低温胁迫; 超氧化物歧化酶; 游离脯氨酸

中图分类号:S 685.99 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)10-0169-02

金边瑞香 (*Daphne odora* var. *marginata* Mak.) 属瑞香科金边瑞香属植物,是著名观赏花木之一。其叶缘金黄色,花紫色,早春开放,开花期间能使满室飘香,香味独特,观赏价值较高^[1]。金边瑞香喜温生长,然而由于在冬春严寒季节,低温仍然是影响其产量和品质的主要因子之一,因此,该试验在超氧化物歧化酶(SOD)活性和游离脯氨酸含量的变化方面研究了低温对金边瑞香的生理生化影响,旨在探讨其生理指标与抗寒性的关系,以指导的金边瑞香防寒管理。

第一作者简介:阙生全(1975-),男,硕士,讲师,现主要从事植物耐逆境方面研究工作。E-mail:qsq2003@126.com。
收稿日期:2010-01-26

分子检测[J].植物病理学报,2008,38(2):211-214.
[17] 高宏华,刘先宝,罗大全等.橡胶白粉菌(*Oidium heveae* Steinmann)基因组 DNA 的提取方法[J].热带农业科学,2007,27(6):8-11.
[18] Walsh P S, Metzger D A, Higuchi R. Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR based typing from forensic material [J]. Biotechniques, 1991(10): 506-513.
[19] 陈辉,刘永波,谢庆瑞,等.有机酚法和 Chelex-100 法提取不同组织微量 DNA 效果比较[J].郑州大学学报(医学版),2004,39(6):988-991.
[20] 廖启洪,梁志东,李丽敏,等.用 Chelex 制备 DNA 模板扩增分析 DIS80 位点多态性[J].华夏医学,2001,14(6):768-769.

1 材料与方法

1.1 试验材料

江西农业大学培育的品种江西大余金边瑞香。

1.2 试验方法

2008 年 4 月 20 日进行播种,2008 年 5 月 20 日将幼苗盆栽置于 4℃ 的低温胁迫处理 10 d,每隔 2 d 剪取鲜叶测定其 SOD 活性和游离脯氨酸含量的变化^[2-3],以室外生长的材料作为对照。

2 结果与分析

2.1 低温胁迫下金边瑞香幼苗 SOD 活性的变化

经低温胁迫后,与对照相比金边瑞香幼苗 SOD 活性变化趋势是随着胁迫时间的延长逐渐上升,8 d 时达

[21] 黄晓晶,刘天佳,蔡志宇.用 Chelex 法制备 AP-PCR 细菌 DNA 模板[J].福建医科大学学报,2002,36(2):221-223.[22] 周月琴,朱伟,刘志萍等.用 Chelex-100 快速提取微量血痕中的 DNA [J].复旦学报(医学版),2003,30(4):379-380.
[23] 赵秀玲,闻伟刚,余旭平,等. Chelex-100 快速提取动物源饲料 DNA 方法的建立[J].上海交通大学学报(农业科学版),2004,22(1):82-85.
[24] 王永,兰青阔,张莉,等.改良 Chelex-100 法和 CTAB 法用于转基因抗草甘膦大豆检测效果的比较[J].大豆科学,2008,27(5):888-901.
[25] 郑秀芬.法医 DNA 分析[M].北京:中国人民公安大学出版社,2002.

Application of Chelex-100 Method to Extract the Genomic DNA of Melon Powdery Mildew

LIU Jian-li, ZHAO Hai-xia

(College of Biological Sciences and Engineering, North University for Ethnicity Yinchuan, Ningxia 750021)

Abstract: The study aimed to establish a rapid method to extract the genomic DNA from Melon powdery mildew. Taking conidia of melon powdery mildew as materials, the extraction genomic DNA of melon powdery mildew by the Chelex-100 extraction method were investigated in this paper. The genomic DNA extraction was had extracted successfully from conidia of melon powdery mildew by the Chelex-100 extraction method. And 5.8S-ITS was amplification with this DNA as PCR templates Chelex-100 method was a rapid method to extract the genomic DNA from melon powdery mildew.

Key words: Chelex-100; melon powdery mildew; genomic DNA