

苹果黑星病菌DNA提取方法研究^{*}

胡小平, 杨家荣, 商文静, 杨之为

(西北农林科技大学 植保学院 植保资源与病虫害治理教育部重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 采用CTAB法、SDS法、Parker法及改进的SDS法提取苹果黑星病菌的DNA, 经紫外分光光度计测定, 改进SDS法提取的DNA得率较其他3种方法高, 约为Parker法的2倍。改进SDS法提取的DNA $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 值为1.700~1.900, DNA纯度较高, 而其他3种方法提取的DNA $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 值均高于1.900, DNA中所含RNA的量较高。4种方法提取的DNA在230 nm波长处的吸收值分别为0.658, 0.257, 0.926和0.208, 说明DNA不同程度地被酚类物质所污染, 但改进的SDS法提取的DNA受污染程度最小。

[关键词] 苹果黑星病菌; DNA提取方法; DNA得率

[中图分类号] S436.611.1⁺9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)04-0041-03

苹果黑星病 (*Venturia inaequalis* (Cooke) Wint.) 又称疮痂病 (Apple Scab), 也称黑点病 (Black Spot), 是世界各苹果 (*Malus* sp.) 产区的重要病害之一, 严重时会造成苹果落叶落果, 直接影响苹果的产量及其商品价值。该病主要发生在中国的黑龙江、吉林两省, 辽宁、河南、河北、甘肃、宁夏、山东、陕西、新疆、四川、云南等省局部地区有分布^[1], 已被列为国内检疫对象^[2]。苹果黑星病菌DNA的提取是其分子群体遗传学等的研究基础, 快速地提取高质量的DNA, 可大大提高工作效率。作者曾采用CTAB法、SDS法及Parker法^[3]提取苹果黑星病菌DNA, 但DNA的得率不高, 提取的DNA呈棕色, 很难用限制性内切酶完全降解, 加之苹果黑星病菌在培养基中生长缓慢, 因此, 如何提高其DNA的得率和纯度是影响深入研究的关键所在。为此, 作者对SDS法进行了改进, 获得了预期效果, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 供试材料与试剂

苹果黑星病菌 (*V. inaequalis*) 为从Gala苹果病叶上的分离物 (菌株编号为V001), 由西北农林科技大学植物生态病理学实验室提供。

EDTA、溴酚兰、Tris饱和酚、氯仿、乙酸钠、Tris-HCl、DNA Marker (DGL 2000) 等购自北京鼎国生物技术发展中心, α -巯基乙醇、琼脂糖、聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)、SDS、十二烷基肌氨酸钠等购自

Sigma公司, 其他化学试剂购自西安化学药剂公司。

1.2 菌体培养方法

液体培养基配方为马铃薯200 g去皮切碎, 加水1 000 mL煮沸0.5 h, 用纱布滤去马铃薯, 加入蔗糖15 g, 用水定容至1 000 mL, 用1 mol/L HCl调节pH至5.0~6.0, 分装, 8磅灭菌30 min。待培养基冷却至55℃左右时, 加入硫酸链霉素, 使之终质量浓度达40 mg/L。待培养基冷却至室温时, 接入苹果黑星病菌, 于18~20℃, 120 r/min摇培约40 d后, 用双层纱布过滤, 获得菌丝体, 用无菌滤纸尽量吸干其中的水分, 贮于-20℃备用。

1.3 DNA提取方法

1.3.1 CTAB法、SDS法 参见文献[4]。

1.3.2 Parker法 参见文献[3]。

1.3.3 改进的SDS法 ①称取100 mg苹果黑星病菌菌体, 置于-20℃预冷的研钵中, 立即加入液氮, 迅速研磨至粉末状, 分装于1.5 mL离心管中; ②加入600 μ L DNA提取液 (质量分数4%十二烷基肌氨酸钠; 100 mmol/L Tris-Cl, pH 8.0; 10 mmol/L EDTA, pH 8.0), 混匀, 65℃水浴中保温30 min后, 将离心管迅速移入冰浴中静置5 min。加入Tris饱和酚和氯仿各300 μ L, 充分混匀, 室温静置10 min, 4℃12 000 r/min离心5 min; ③吸取上清, 加入等体积的氯仿, 混匀, 4℃12 000 r/min离心5 min; ④吸取上清, 加入1/5体积的3 mol/L的NaAc (pH 6.0) 和3/5体积的异丙醇, 混匀, 室温静置10 min, 4℃12 000 r/min离心5 min; ⑤弃上

* [收稿日期] 2002-04-07

[基金项目] 欧盟科技合作基金项目 (ICA 4-CT-2001-10001); 西北农林科技大学青年基金项目

[作者简介] 胡小平 (1971-), 男, 宁夏固原人, 讲师, 在读博士, 主要从事植物病理学研究。E-mail: xphu@163.com

[通讯作者] 杨家荣 (1957-), 男, 四川蓬溪人, 研究员, 博士, 主要从事植物病理学研究。E-mail: yljryang@163.net

清,加入 500 μL 体积分数 70% 乙醇,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/m in 离心 3 m in;⑥弃上清,瞬时离心,吸弃残液;⑦离心管置于超净台上干燥 1 h,加入 100 μL 无菌双蒸水,加入 2 μL 的 5 mg/mL RNase,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下保温 30 m in;

1.4 DNA 浓度与纯度的测定

以紫外分光光度计(Biophotometer, Eppendorf),测定DNA 溶液在 230,260 和 280 nm 波长处的消光值,计算DNA 的质量浓度。

1.5 DNA 质量检测

制备质量分数 0.8% 的琼脂糖凝胶(内含 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 溴化乙锭),取 3 μL DNA 样品与等体积的

上样缓冲液混合后上样,同时点入 8 μL DGL-2000 Marker,以 70 V 电压电泳 1 h 后,在 UV I 自动凝胶成像系统(BTS-20-M,UV ISoft)上观察、照相。

2 结果与分析

采用 CTAB 法、SDS 法、Parker 法及改进的 SDS 法提取苹果黑星病菌的DNA,经紫外分光光度计测定,获得的 DNA 质量浓度分别为 0.036, 0.173, 0.350 和 0.567 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,说明改进的 SDS 法提取的DNA 得率较其他 3 种方法高,约为 Parker 法的 2 倍(表 1)。

表 1 不同方法提取的苹果黑星病菌DNA 的含量

Tabel 1 Content of DNA of *Venturia inaequalis*

DNA 提取方法 DNA extraction method	DNA 含量/ $(\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1})$ Content of DNA	A_{230}	A_{260}/A_{280}
CTAB 法 CTAB method	0.036	0.658	1.93
SDS 法 SDS method	0.173	0.257	1.94
Parker 法 Parker method	0.350	0.926	1.95
改进的 SDS 法 Modified SDS method	0.567	0.208	1.86

4 种方法提取的苹果黑星病菌DNA 的 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 值分别为 1.93,1.94,1.95 和 1.86,其中改进的 SDS 法提取的DNA $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 值为 1.700~1.900,说明DNA 纯度较高,而其他 3 种方法提取的DNA $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 值均高于 1.900,说明提取的

DNA 中所含RNA 的量较高。4 种方法提取的DNA 在 230 nm 波长处的消光值分别为 0.658,0.257,0.926 和 0.208,说明DNA 不同程度地被酚类物质所污染,但采用改进的 SDS 法提取的DNA 受污染程度最小(表 1)。

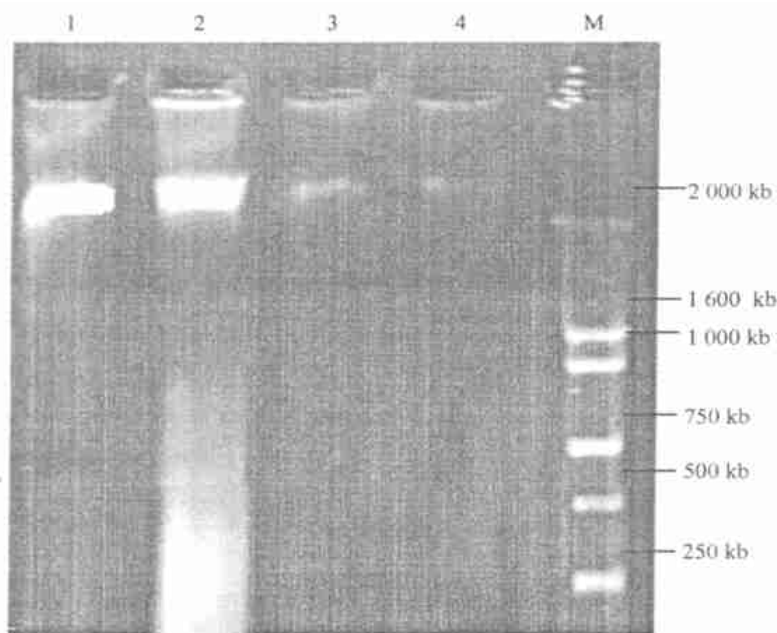


图 1 琼脂糖凝胶上苹果黑星病菌DNA 的电泳图

1 改进 SDS 法;2 Parker 法;3 SDS 法;4 CTAB 法;M. Marker

Fig 1 DNA patterns of *Venturia inaequalis* in agros gel

1. Modified SDS mothed; 2. Parker method; 3. SDS method; 4. CTAB method; 5. DNA Marker

质量分数 0.8% 琼脂糖凝胶电泳结果表明(图 1),改进的 SDS 法及 Parker 法提取的苹果黑星病

菌样品DNA 的谱带较清楚,但 Parker 法提取的样品DNA 中RNA 含量较高,CTAB 法和 SDS 法提

取样品DNA的谱带较弱。

3 讨 论

DNA提取是分子生物学研究的基本技术之一。提取的DNA中蛋白质、RNA及多酚类物质含量少、片段大是试验结果可靠性和重复性的保证^[5]。

由于苹果黑星病菌在培养基中生长缓慢,为了提高其DNA得率,本研究在SDS法的基础上进行了一些改进,用质量分数4%的十二烷基肌氨酸钠代替质量分数3%的SDS裂解细胞;在提取液中加入体积分数2%的 α -巯基乙醇,以防止酚类化合物

与DNA共价结合,提高限制性内切酶对基因组DNA的酶切效果;加入体积分数1%的PVP主要是起抗氧化作用,减少酚类化合物的含量。

用改进SDS法提取的苹果黑星病菌DNA呈纯白色,而其他几种方法提取的DNA均呈现不同程度的棕色,这是其中含有一定量的RNA和酚类化合物所致。采用改进的SDS法,1人1d能提取100份以上的样品,且DNA质量高,可满足分子标记等技术的需求。为了进一步提高苹果黑星病菌DNA的得率和纯度,最大程度地降低其他因素的影响,还需要对此方法进一步改进和优化。

[参考文献]

- [1] 中国农业百科全书编辑委员会植物病理学编辑委员会,中国农业百科全书编辑部. 中国农业百科全书(植物病理学卷)[M]. 北京: 农业出版社, 1996 366- 367.
- [2] 全国农业技术推广服务中心. 植物检疫性有害生物图鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001 290- 292
- [3] Parker D M, Hilber U W, Bodmer M, et al. Production and transformation of conidia of *Venturia inaequalis* [J]. Phytopathology, 1995, 85 (1): 87- 91.
- [4] 金冬雁, 黎孟枫, 译. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 2002
- [5] 姜 玲, 蔡礼鸿. 一种提取银杏中DNA的方法[J]. 植物生理学通讯, 2000, 36(4): 340- 342

Study on the method for DNA extraction of *Venturia inaequalis*

HU Xiao-ping, YANG Jia-rong, SHANG Wen-jing, YANG Zhi-wei

(The Key Laboratory of Plant Protection Resources and Pests Management of Chinese Ministry of Education,
College of Plant Protection, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: DNA extraction quality of *Venturia inaequalis* using CTAB method, SDS method, Parker's method and modified SDS method was detected by ultraviolet spectrometer. Results showed that DNA extraction rate using modified SDS method was higher than that of other three methods. It was twice of DNA extraction rate of Parker's method. $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ value of DNA from modified SDS method was between 1.700 and 1.900. It showed that the DNA had high purity. However, $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ value of DNA from other three methods were greater than 1.900. The DNA contained RNA. The abstraction value of 4 methods at 230 nm was 0.658, 0.257, 0.926 and 0.208 respectively. It showed that DNA was polluted by phenol at different level. Among them, DNA from modified SDS method was polluted slightly.

Key words: *Venturia inaequalis*; DNA extraction method; DNA extraction rate