

小麦条锈菌基因组DNA的分离及其 RAPD分析体系的建立*

曹丽华^{1,2}, 康振生¹, 魏国荣¹

(1 西北农林科技大学 植保学院 生物技术中心, 陕西 杨凌 712100;

2 河南农业大学 植保学院, 河南郑州 450002)

[摘要] 对小麦条锈菌基因组DNA分离的氯化苄法和CTAB/SDS法进行了比较分析, 认为后者无降解, 质量高, 可用于RAPD分析。试验对小麦条锈菌RAPD反应条件进行了优化, 建立了标准化的小麦条锈菌RAPD反应体系, 即10×Reaction Buffer 2.5 μL, MgCl₂ 2 mmol/L, dNTPs 0.15 mmol/L, 模板DNA 40 ng, 引物 10 ng, Taq 1 U, ddH₂O 15.76 μL。

[关键词] 小麦条锈菌; DNA提取; RAPD; 反应体系优化

[中图分类号] S435.121.4⁺2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)04-0033-04

小麦条锈病发生面积大、流行成灾率高、危害严重。使用抗病品种, 辅以化学药剂是防治该病的主要途径。但生产中的一个突出问题是小麦品种抗条锈性的丧失, 这主要是由条锈菌毒性新小种的产生和发展引起的^[1]。小麦条锈菌体积小、繁殖快、群体大、毒性变异频率高。迄今, 我国已发现32个条锈菌生理小种。常规的生理小种鉴定和毒性分析方法繁杂、费工费时, 准确性易受到鉴定条件的影响, 严重制约了条锈菌群体生物学的研究。

分子生物学的发展, 为研究病原菌自然群体的遗传结构和流行区系间的关系、监测各地生理小种的组成及变异动态提供了新方法。然而, 目前小麦条锈菌DNA水平的研究相对较少, 主要是因为小麦条锈菌的菌种繁殖困难, 夏孢子细胞壁厚, 富含多糖、蛋白质及色素类杂质, 即使从萌发的夏孢子中提取DNA, 效率也仅为10 μg/g^[2], 难以满足锈菌分子生物学的需要。

小麦条锈菌为专性寄生菌, 无有性阶段, 目前对其遗传背景了解不多。就此类病原菌而言, RAPD因其技术简便、快速、费用低, 可提供大量的分子标记, 因此, 适用于从分子水平研究生理小种的进化与亲缘关系, 客观认识病原物的群体生物学特性。采用RAPD技术, Chen等^[3]研究了北美不同地域23个分离系115个单孢菌的RAPD谱型, 认为RAPD聚类组与地域及毒力聚类不相关。单卫星等^[2]通过对

中国小麦条锈菌13个分离系的RAPD分析, 检测到了小种间及小种内的遗传变异, 得到了分离系特异的RAPD图谱, 但未找到小种特异性分子标记。由于上述研究所筛选的随机引物数较少, RAPD扩增条件及参数不同, 故难以较全面地反映小麦条锈菌的遗传多样性。基于上述原因, 本研究试图进一步完善小麦条锈菌gDNA(基因组DNA)的提取方法, 以期得到足量、完整、高纯度的gDNA, 供锈菌分子生物学研究应用, 并且优化建立适于小麦条锈菌的RAPD分析体系, 以便进行大规模的引物筛选, 完善小麦条锈菌的RAPD研究。

1 材料和方法

1.1 供试菌种的繁殖与鉴定

供试菌种由西北农林科技大学植物保护学院植物免疫室提供, 条锈菌单孢系的分离、鉴定按常规方法进行^[1]; 夏孢子的繁殖在感病品种铭贤169上进行。收集菌种抽真空后封存, -70℃保存, 以备gDNA提取应用。

1.2 小麦条锈菌gDNA的提取

1.2.1 氯化苄法 本法在Shan Weir-xing等^[2]的基础上改进: 取50 mg锈菌夏孢子, 加1 g灭菌石英砂, 加液氮反复研磨呈粉状; 移入1.5 mL离心管后, 加500 μL预冷的提取液(100 mmol/L Tris-HCl, pH 9.0; 100 mmol/L EDTA, pH 8.5)混匀。加

* [收稿日期] 2003-03-21

[基金项目] 国家“973”计划项目(G200016201)

[作者简介] 曹丽华(1971-), 女, 山西临汾人, 讲师, 在读博士, 主要从事植物免疫学研究。

[通讯作者] 康振生(1958-), 男, 四川安岳人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事植物免疫学研究。

55 μL 质量分数 20% SDS 后 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h; 加等体积氯化苄后, 65 $^{\circ}\text{C}$ 继续水浴 30 min。在混合液中加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc (pH 5.2), 混匀后冰浴 1 h; 4 $^{\circ}\text{C}$ 14 000 r/min 离心 10 min, 取上清; 用等体积的酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1) 及氯仿各抽提 1 次后, 加等体积异丙醇沉淀核酸, 沉淀物经体积分数 70% 的乙醇漂洗 2 次, 室温干燥, 再溶入适量的 TE (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1 mmol/L EDTA) 中; 加适量 RNase 37 $^{\circ}\text{C}$ 处理 30 min, 氯仿抽提, 最后在上清液中加 2.5 倍体积乙醇, -20 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀 DNA 过夜; DNA 保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 体积分数 70% 的乙醇中。

1.2.2 CTAB/SDS 法 本法在 Chen 等^[3]的基础上改进: 取 25 mg 夏孢子, 加灭菌石英砂 0.5 g, 加液氮反复研磨至粉状后转入 1.5 mL 离心管, 加 1 mL 预冷的提取缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 150 mmol/L NaCl, 100 mmol/L EDTA) 充分混匀, 加 60 μL 质量分数 20% SDS, 混匀后 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h, 加 150 μL 5 mol/L NaCl 与 130 μL CTAB/NaCl (1 g CTAB 溶于 10 mL 0.7 mol/L NaCl 中) 后再 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h; 将反应物平均分配到 2 支 1.5 mL 离心管中后, 加等体积酚: 氯仿: 异戊醇与氯仿分别抽提, 其余步骤同氯化苄法。

1.3 小麦条锈菌 RAPD 分析体系的优化

小麦条锈菌 gDNA 含量的测定采用紫外分光

光度法, 模板 DNA 的使用质量浓度为 20 ng/ μL ; 10 bp 随机引物购自上海生物工程公司, 用灭菌去离子水稀释至 10 ng/ μL 备用; 4 种 dNTPs 与 Taq 酶, MgCl₂, 10 $\times$ Reaction Buffer 均购自华美生物工程公司。RAPD 的反应体系为 25 μL , 且每次反应均以无菌去离子水替代模板 DNA 为对照。为优化 RAPD 分析体系, 并进行了不同模板质量 DNA (20, 40, 60, 80, 100 μg), Taq 酶量 (1, 1.2, 1.5, 2 U), MgCl₂ (1.5, 2.0 mmol/L), dNTPs (0.15, 0.2 mmol/L), 引物量 (10, 15, 20 ng) 的优化筛选试验。

扩增反应在 PTC-100 热循环仪上进行: 94 $^{\circ}\text{C}$, 5 min, 1 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s, 36 $^{\circ}\text{C}$, 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$, 90 s, 45 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。扩增产物用质量分数 1.5% 琼脂糖凝胶 1 $\times$ TAE 电泳缓冲液电泳分离, 以凝胶成像系统记录分析 RAPD 谱型。

2 结果与分析

2.1 小麦条锈菌 gDNA 的提取

采用改良氯化苄法与 CTAB/SDS 法都得到了片段长度为 21 kb 的 gDNA (图 1), 得率分别为 300~700 和 100~500 $\mu\text{g/g}$ 。经紫外分光光度法检测, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值 > 1.7, 其提取质量与数量可满足 RAPD, RFLP, AFLP 等分子生物学研究需要。

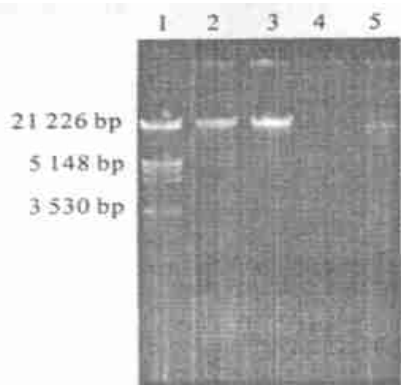


图 1 小麦条锈菌 gDNA 电泳图谱

1. Lambda DNA/EcoRI + HindIII marker;
- 2, 5. CTAB/SDS 法提取的 gDNA;
3. 氯化苄法提取的 gDNA; 4. 对照

Fig 1 The electrophoresis analysis of genomic DNA

1. Lambda DNA/EcoRI + HindIII marker;
- 2, 5. The gDNA prepared using the CTAB/SDS method;
3. The gDNA prepared using the benzyl chloride method; 4. CK

为比较氯化苄法和 CTAB/SDS 法的优劣, 作者进行了条中 29 号不同单孢菌系的 RAPD 分析 (图 2)。由图 2 可知, 氯化苄法的 gDNA 得率较高,

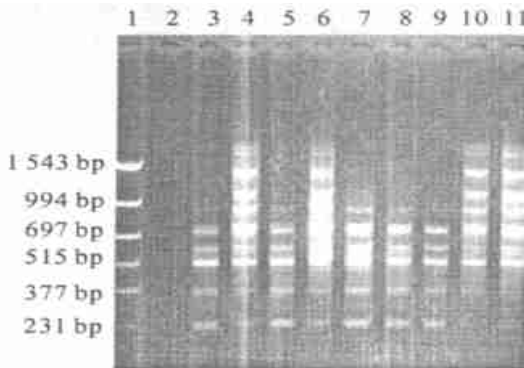


图 2 2 种 DNA 提取法的 RAPD 谱型

1. PCR marker; 2. 无菌水对照; 3, 5, 7~9. 氯化苄法提取的模板 DNA;
- 4, 6, 10, 11. CTAB/SDS 法提取的模板 DNA

Fig 2 The RAPD profile of two DNA extraction methods

1. PCR marker; 2. CK amplified with ddH₂O;
- 3, 5, 7-9. Amplified with gDNA extracted by benzyl chloride method;
- 4, 6, 10, 11. Amplified with gDNA extracted by CTAB/SDS method

但存在一定程度的降解, 其 RAPD 谱带集中在 800~250 bp。而 CTAB/SDS 法较氯化苄法省时, gDNA 基本无降解, 断裂, 拖尾少, 其 RAPD 谱带集

中在 2 000~200 bp。对寻找特异DNA 标记的分子生物学试验而言,CTAB/SDS 法显然优于氯化苄法。

2.2 小麦条锈菌RAPD 优化体系的建立

不同模板质量DNA 浓度,不同 *Taq* 酶量及MgCl₂ 与dNTPs 量、引物量的优化筛选试验结果见图3~6。

经反复对比认为,模板DNA 40 ng, *Taq* 酶1~1.5 U, MgCl₂ 2 mmol/L, dNTPs 0.15 mmol/L, 引

物量10 ng的扩增效果最佳,因此最后确定的优化体系为: 10 × Reaction Buffer 2.5 μL, MgCl₂ 2 mmol/L, dNTPs 0.15 mmol/L, 模板DNA 40 ng, 引物10 ng, *Taq* 1 U, ddH₂O 15.76 μL。多次RAPD 试验证明,该反应体系稳定性好、重复性强。在使用不同公司(宝泰克,生工,华美等)与同一公司(华美)不同批次的 *Taq* 酶时,均能得到稳定、清晰的RAPD 谱型,综合考虑试验结果及成本,本研究选用华美公司的 *Taq* 酶与dNTPs。

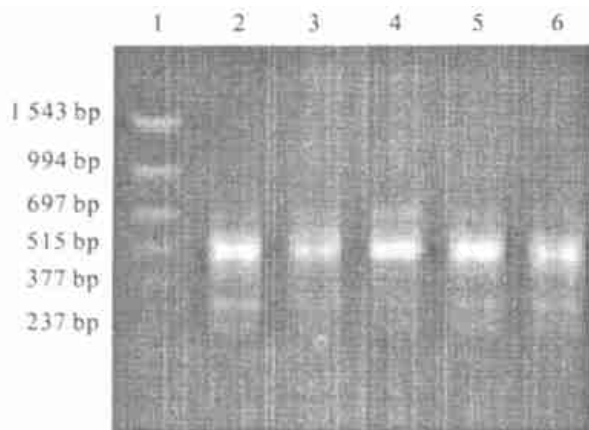


图3 不同模板DNA 质量浓度时的RAPD 谱型

Fig. 3 The RAPD profile of different amount of template DNA

1. PCR marker; 2. 100 ng; 3. 80 ng; 4. 60 ng; 5. 40 ng; 6. 20 ng

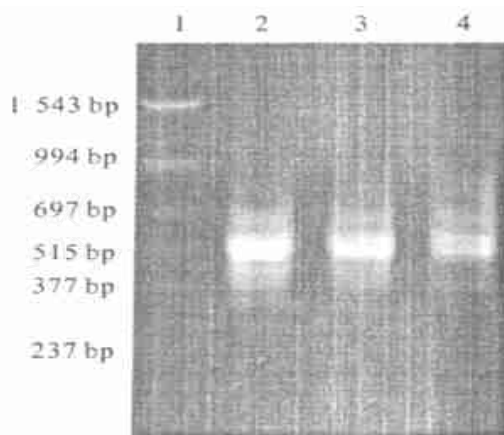


图4 不同引物量时的RAPD 谱型

Fig. 4 The RAPD profile of different amount of primer

1. PCR marker; 2. 10 ng; 3. 15 ng; 4. 20 ng

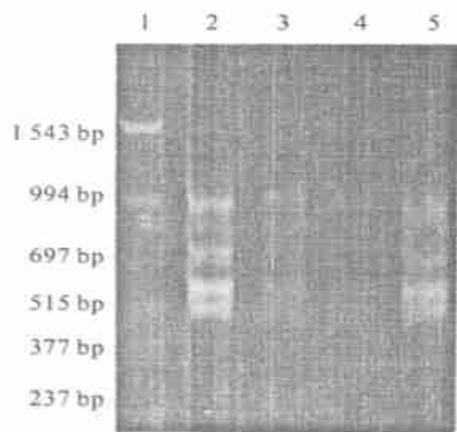


图5 不同MgCl₂ 与dNTPs 量时的RAPD 谱型

Fig. 5 The RAPD profile of different amount of MgCl₂/dNTPs

1. PCR marker; 2. MgCl₂ 20 mmol/L, dNTPs 0.15 mmol/L;
3. MgCl₂ 1.5 mmol/L, dNTPs 0.2 mmol/L;
4. MgCl₂ 1.5 mmol/L, dNTPs 0.5 mmol/L;
5. MgCl₂ 2.0 mmol/L, dNTPs 0.2 mmol/L

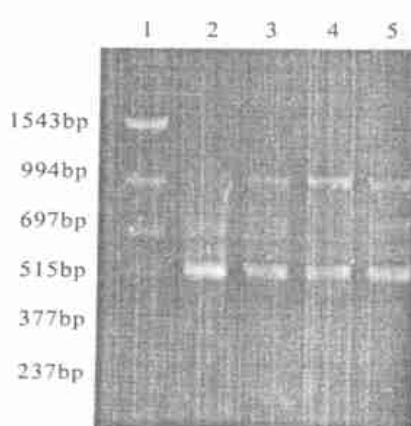


图6 不同*Taq* 酶量时的RAPD 谱型

Fig. 6 The RAPD profile of different amount of *Taq* polymerase

1. PCR marker; 2. *Taq* 1.5 U; 3. *Taq* 2.0 U;
4. *Taq* 1.2 U; 5. *Taq* 1.0 U

3 讨论

3.1 小麦条锈菌基因组DNA 的提取

多数植物病原真菌的gDNA 提取自菌丝,操作

相对简单。小麦条锈菌是严格的专性寄生菌,无法人工培养,夏孢子是其gDNA 的唯一来源,因此试验材料不易获得;加之小麦条锈菌夏孢子的抗逆性强,细胞壁厚,呈橘红色,富含RNA、蛋白质、多糖及色

素类杂质,用一般的机械破壁或抽提缓冲液无法提取到 gDNA,或因杂质浓度高而导致提取的 DNA 呈胶状物^[4],无法进行核酸的定量分析和后续操作,如酶切、扩增、基因克隆等。

经反复试验对比作者发现,在条锈菌夏孢子 DNA 提取中应注意以下问题:①夏孢子的机械破壁程度与 DNA 的提取得率呈正相关,因此,研磨必须充分,否则夏孢子的破壁不完全。②应保证化学试剂与夏孢子细胞壁及内含物的充分作用。研磨后加入抽提缓冲液、质量浓度 20% SDS 及氯化苄或 CTAB/NaCl 等试剂时,应彻底混匀,如果反应物呈乳浊状,则提取不到 gDNA 或 gDNA 的得率急剧下降。③提取缓冲液的组分与对比对 gDNA 得率至关重要。常规的 DNA 提取法常单独使用 SDS 或 CTAB,SDS 是阴离子型去垢剂,可破坏蛋白质分子内的疏水相互作用,使非极性基团暴露于介质水中,降低非极性侧链从水介质到疏水内部的自由能。而 CTAB 是阳离子型去垢剂,可通过形成去垢剂、磷脂和蛋白质混合微团溶解生物膜,去除膜脂和多糖^[5]。鉴于锈菌材料的特殊性,本试验中结合使用 CTAB/

SDS 法。④应注意抽提缓冲液的 pH 值与 EDTA 浓度。氯化苄法或 CTAB/SDS 法的 DNA 抽提缓冲液均呈弱碱性,有利于破壁反应。若 pH 值太低,则破壁反应受抑制,作用不完全, DNA 的得率低; pH 值太高(> 11)又易导致 DNA 变性和降解^[6,7]。由于 EDTA 可抑制限制性内切酶活性,防止 DNA 降解,且易与酚分层^[8],本试验采用 100 mmol/L 的 EDTA 极限浓度^[9],并在 65 °C 摇床水浴,旨在完全抑制 DNA 限制性内切酶活性与色素的氧化作用,保证 gDNA 的顺利提取。

3.2 小麦条锈菌优化体系的建立

RAPD 技术简单快捷,试验成本低,无须预先了解 DNA 序列的信息,但 RAPD 带谱对试验程序和条件的变化很敏感,不同实验室及不同操作人员的试验结果难于比较、交流,因此 RAPD 试验条件的标准化十分重要^[10]。本研究确定了小麦条锈菌的 RAPD 优化体系。经多批次 DNA 扩增证明,该体系的可靠性及重复性较好,可满足小麦条锈菌大规模 RAPD 分析的需要。

[参考文献]

- [1] 李振歧,商鸿生. 小麦锈病及其防治[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1989
- [2] Shan Wei-xing, Chen Shou-yi, Kang Zhen-sheng. Genetic diversity in *Puccinia striiformis* Westend. F. sp. *tritici* revealed by pathogen genome-specific repetitive sequence[J]. Can J Bot, 1998, 76: 587- 595
- [3] Chen X M, Line R F, Leung H. Relationship between virulence variation and DNA polymorphism in *Puccinia striiformis* is[J]. Phytopathology, 1993, 83: 1489- 1497
- [4] Clark M S. 植物分子生物学——实验手册[M]. 顾红雅, 瞿礼嘉, 主译. 北京: 高等教育出版社, 1998
- [5] 吴冠芸, 潘华珍, 吴 晖. 生物化学与分子生物学实验常用数据手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000
- [6] 朱 衡, 瞿 峰, 朱立煌. 利用氯化苄提取适于分子生物学分析的真菌 DNA[J]. 真菌学报, 1994, 13(1): 34- 40
- [7] Zhu Heng, Qu Feng, Zhu Li-huang. Isolation of genomic DNA from plants, fungi and bacteria using benzyli chloride[J]. Nucleic Acids Research, 1993, 21: 5279- 5280
- [8] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999
- [9] 刘学堂, 郭金城, 张元恩. 棉花黄萎病菌 gDNA 提取方法和不同单孢的 RAPD 分析[J]. 河南农业大学学报, 1999, 33(3): 274- 278
- [10] 荆玉祥, 匡延云, 李德葆. 植物分子生物学——成就与前景[M]. 北京: 科学出版社, 1995

Studies on methods for gDNA extraction and RAPD analysis of wheat stripe rust

CAO Li-hua^{1,2}, KANG Zheng-sheng¹, WEI Gou-rong¹

(1 College of Plant Protection, Bio-tech Center, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China)

Abstract Comparing two gDNA extraction methods of the wheat stripe rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*), the author regards the CTAB method is better than the PhCH₂Cl method to search the special molecule markers. In order to facilitate communion, a standard RAPD system is also provided in this research.

Key words wheat stripe rust; DNA extraction; RAPD; optimization of the reaction system