

一种从大豆胞囊线虫中快速提取 DNA 的方法

练云¹,冯文强^{1,2},雷晨芳¹,李金英¹,武永康¹,王庭峰¹,陆莉莉¹,卢为国¹

(1. 河南省农业科学院 经济作物研究所/国家大豆改良中心郑州分中心/农业部黄淮海油料作物重点实验室,河南 郑州 450002; 2. 山东农业大学 生命科学学院/作物生物学国家重点实验室,山东 泰安 271018)

摘要:由于大豆胞囊线虫(soybean cyst nematode,SCN)特殊的生长环境,用细菌专用 DNA 试剂盒提取方法提取 DNA 的质量不理想,而且耗时长,本文介绍了一种快速提取线虫 DNA 的方法。通过比较细菌专用 DNA 试剂盒提取法、质粒试剂盒提取法和 CTAB 法,发现利用质粒提取试剂盒,改良提取步骤,可以快速的提取质量较好的线虫 DNA,rDNA-ITS 区域序列扩增可有效扩增出目的基因,该方法可以直接用于线虫基因获取试验。

关键词:大豆;大豆胞囊线虫;DNA 提取;生理小种

中图分类号:Q786 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2016.06.1043

A Method for Rapid Extraction of DNA from Soybean Cyst Nematode

LIAN Yun¹, FENG Wen-qiang^{1,2}, LEI Chen-fang¹, LI Jin-ying¹, WU Yong-kang¹, WANG Ting-feng¹, LU Li-li¹, LU Wei-guo¹

(1. Institute of Industrial Crops, Zhengzhou National Subcenter for Soybean Improvement/Key Laboratory of Oil Crops in Huang-huaihai Plains, Ministry of Agriculture, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China; 2. State Key Laboratory of Crop Biology, College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

Abstract: In this paper, we reported a method for rapid extraction of DNA from soybean cyst nematode(SCN). It is difficult and time consuming to obtain high quality DNA by using bacterial genomic DNA extraction kit for the special growth environment of SCN. Three methods for extraction of DNA were compared in this study, including Bacterial genomic DNA extraction kit, San Prep column plasmid DNA Kit and CTAB method. Results showed that DNA isolated by improved San Prep column plasmid DNA Kit was high quality with time saving. We verified the quality by amplification sequence effectively from rDNA-ITS region. The method could be used for DNA obtaining from cyst and the later molecular manipulations of genes cloning.

Keywords: Soybean; Soybean cyst nematode; DNA extraction; Race

大豆胞囊线虫病是常见的世界性线虫病害,导致大豆大面积减产^[1-2]。培育抗病品种是抵御 SCN 病最经济有效的途径,发掘抗病相关基因并对其进行分子生物学研究对培育抗病新品种有重要指导意义。

而从 SCN 中快速提取高纯度、高质量的 DNA 是进行分子生物学研究的必要前提和关键。已有研究中,提取线虫 DNA 的报道较多,比如从单胞囊或单线虫中提取 DNA 用于扩增目标基因^[3-6],研究不同虫态 DNA 质量和不同 DNA 模板对 PCR 扩增产物的影响^[7]等。这些方法存在诸多缺陷,例如:提取 DNA 耗时长,在裂解步骤中,仅 37℃ 水浴就需要 1 h;仅适于从单胞囊或单线虫中扩增目标基因的研究,从 SCN 中大量提取 DNA 的试验操作比较困难;在不进行前处理的条件下,采用已报道的方法从大量 SCN 中很难获得高质量的 DNA,提取的 DNA 极易降解。为了从 SCN 中快速提取到量大、高质量的 DNA,我们首先对 SCN 进行前处理,以期一

次性破碎多个胞囊,提高获取 DNA 的量;其次,利用质粒提取试剂盒提取胞囊 DNA 并对该方法做了改进,比较了细菌专用 DNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒和 CTAB 法获得大豆胞囊线虫 DNA 的效果。旨在获得一种高效的线虫 DNA 提取方法,为 SCN 的深入研究奠定试验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

感病大豆品种为 Lee 68,由河南省农业科学院经济作物研究所大豆研究室保存。

SCN 生理小种 2、4 和 5 号分别采集自河南省农业科学院经济作物研究所 SCN2 病圃、SCN4 病圃和 5 号病土存储箱。将感病大豆植株在病土中繁殖后获得相应生理小种的胞囊。

1.2 方法

1.2.1 大豆幼苗培养播种和移栽 大豆材料首先在蛭石中萌发 3~5 d,子叶出土后,取出植株并用细

流水冲洗掉根部的蛭石,尽量选取生长一致的幼苗移栽到装有无菌土或相应病土的塑料杯中,每杯1株,置于智能光照培养中培养^[8]。

1.2.2 胞囊的分离与前处理 将病土和无菌细沙以3:1的比例均匀混合制备成试验病土,将发育3~5 d的 Lee 68,移栽至病土中并于温室培养,约22 d后,将大豆植株从病土中倒出,采用淘洗-过筛法^[8]从根系中分离胞囊。前处理为胞囊的分离过程,将胞囊冲洗到铺有滤纸的过滤漏斗中,用10 cm直有齿眼科镊将胞囊一一挑取到1.5 mL预冷的离心管中(离心管置于冰上),收集体积约50 μL。液氮速冻后-70℃保存。

1.2.3 DNA提取 DNA的3种提取方法分别为:Bacterial Genomic DNA Extraction kit Ver 3.0试剂盒;SanPrep柱式质粒DNA小量抽提试剂盒;CTAB法。利用SanPrep柱式质粒DNA小量抽提试剂盒

提取DNA时,在加完Solution 3后,离心条件改变为4 000 g,10 min。其它两种方式按照试剂盒常规操作方法完成。

1.2.4 琼脂糖电泳 采用1×TAE作为电泳缓冲液,琼脂糖凝胶浓度为1%,电压为5 V·cm⁻¹。

1.2.5 rDNA-ITS区域的序列扩增 用到的通用引物共有4对,分别为:ITS-F+ITS-R,预扩增片段约为800 bp;18S-F+18S-R,预扩增片段约为800 bp;D2A+D3B,预扩增片段约为300 bp;TW81+AB28,预扩增片段约为800 bp。扩增体系(20 μL)的组成:10×buffer(含Mg²⁺),2 μL;2.5 mmol·L⁻¹ dNTP,0.5 μL;10 μmol primer 1,1 μL;10 μmol primer 2,1 μL;模板,2 μL; *Taq* 酶,0.5 μL; ddH₂O,13 μL。将反应管在PCR仪(Eppendorf)上进行扩增。扩增程序:95℃ 2 min;95℃ 30 s,55℃~58℃ 30 s,72℃ 30~90 s,35个循环;72℃ 7 min。

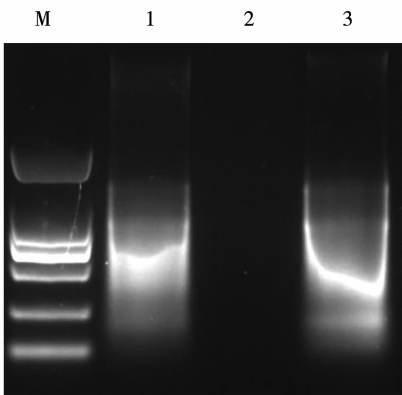
表1 通用引物序列及扩增条件
Table 1 Universal primer sequences and amplification conditions

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	扩增条件及基因长度 Amplification conditions and gene length
ITS-F	TTGATTACGTCCCTGCCCTTT	58℃,延伸90 s,750~1000 bp
ITS-R	ACGAGCCGAGTGATCCACCG	
18S-F	TTGGATAACTGTGGTTTAACTAG	55℃,延伸90 s,750~1000 bp
18S-R	ATTTACCTCTCACGCAACA	
D2A	ACAAGTACCGTGAGGGAAAGT	57℃,延伸30 s,300 bp
D3B	GACCCGTCTTGAAACACGGA	
TW81	GTTTCGGTAGGTGAACCTGC	57℃,延伸90 s,750~1000 bp
AB28	ATATGCTTAAGTTCAGCGGCT	

2 结果与分析

2.1 DNA的完整性分析

三种DNA提取方法均能获得一定量的基因组DNA(图1)。4次提取试验结果表明:Bacterial Genomic DNA Extraction kit Ver 3.0法、San Prep column plasmid DNA Kit法、CTAB法获得DNA的260 nm/280 nm的范围分别为:1.90~2.34、1.84~1.95、2.75~3.66,从DNA纯度和完整性上看,利用San Prep column plasmid DNA Kit法提取的DNA纯度最高,其次是Bacterial Genomic DNA Extraction kit Ver 3.0法提取的DNA;利用同等起始胞囊量提取的DNA,从提取的浓度上看,Bacterial Genomic DNA Extraction kit Ver 3.0法提取的DNA浓度最大、得率最高,其次是利用CTAB法提取的DNA。



M: GM335; 1: Bacterial Genomic DNA Extraction kit Ver 3.0; 2: San Prep柱式质粒DNA小量抽提试剂盒; 3: CTAB。
M: GM335; 1: Bacterial Genomic DNA Extraction kit Ver 3.0; 2: San Prep column plasmid DNA Kit; 3: CTAB。

图1 不同提取方法提取DNA质量比较
Fig. 1 Compare of the DNA extracted by different extraction methods

2.2 比较不同方法提取的 DNA 扩增目的基因效果

利用以上 3 种方法提取的基因组 DNA 为模板,分别进行目的基因扩增检测,结果都能扩增到目的基因,使用 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒较 Bacterial Genomic DNA Extraction Kit Ver 3.0 提取到的 DNA 纯度更高,更容易扩增到目的基因(图 2),而且在 DNA 提取过程中,该方法更省时,整个

提取过程约需要 30 min,省去了在 37℃ 消化 1 h 的步骤。使用 Bacterial Genomic DNA Extraction Kit Ver 3.0 方法提取过程约需要 90 min。利用 CTAB 法提取的 DNA 做模板,扩增目标基因很不稳定,即便是利用优化好的试验条件,扩增出目标基因也具有很大的偶然性,常常扩增不到目标基因或扩增出的条带极弱。

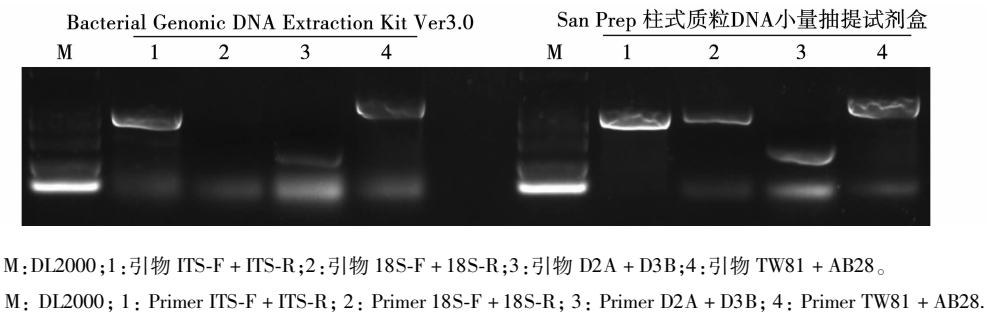


图 2 不同提取方法扩增目标基因

2.3 利用不同生理小种的基因组 DNA 为模板扩增 rDNA-ITS 区域

利用 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒提取了不同生理小种的基因组 DNA,然后用 4 种

rDNA-ITS 区域的通用引物进行了验证。结果表明,这 4 对引物均可从 3 个生理小种的 DNA 中顺利扩增到目标基因(图 3)。

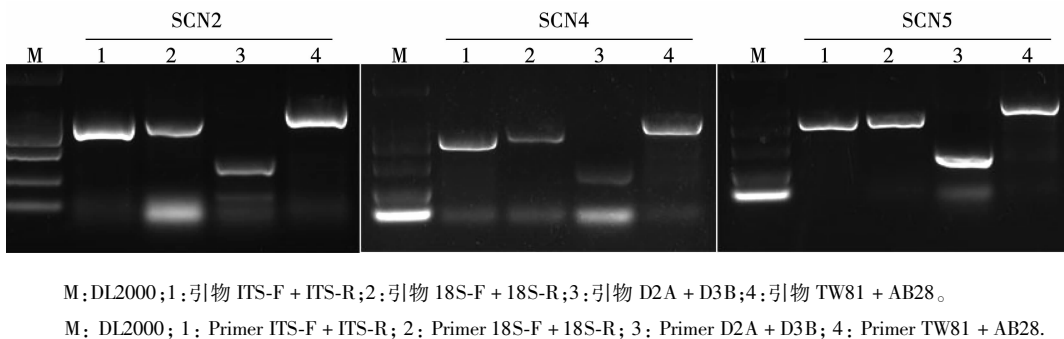


图 3 从不同生理小种的 DNA 中扩增目标基因

Fig. 3 Target genes obtained from DNA template of different SCN races

3 结论与讨论

3.1 外界环境对 DNA 质量的影响

在提取细菌 DNA 过程中,可能会有 RNA 污染、蛋白质污染等因素影响目的基因的扩增,为消除该影响,一般在提取过程中加入 RNA 酶、蛋白酶 K 等以消除此类污染;而对于大豆胞囊线虫等生长环境特殊的群体来说,还面临着胞囊表面存在难以去除干净的水分、土壤等因素干扰,在提取 DNA 过程中很容易被广泛存在于土壤和水分中的非常稳定的 DNA 酶降解,从而难以获得完整性强的 DNA。利用淘洗-过筛法搜集的胞囊直接提取 DNA(图 4),看不到基因组 DNA 主条带,利用该 DNA 为模板扩增目标基因,4 对引物均未扩增出目标基因。

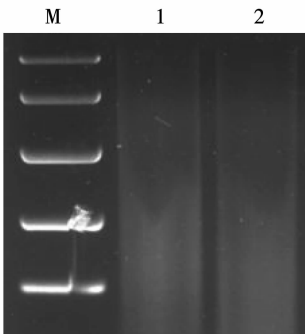


图 4 未经前处理的胞囊提取 DNA

Fig. 4 DNA extracted from cyst without pretreatment

本研究对 SCN 进行了前处理,将常规方法处理后的胞囊分散在铺有滤纸的漏斗里,用眼科镊挑取单个胞囊,在很大程度上有效去除了附着在胞囊表面的水分和土壤,提高了提取 DNA 的纯度和质量。3 种提取方法中除质粒试剂盒提取的 DNA 主条带较弱,另外两种方法均能较清晰的看到 DNA 主条带。

3.2 DNA 量小的原因分析

利用不同的提取方法和不同量的胞囊提取 DNA,发现 DNA 得率总是很小,分析其原因:首先,提取过程中,步骤是先裂解菌体使 DNA 溶解,然后去除蛋白质,再用无水乙醇或异丙醇沉淀,此过程的每一步 DNA 都会损失;其次,由于胞囊特殊的生长环境,得到相对干净的胞囊比较困难,本研究的前处理过程对胞囊进行了反复冲洗并挑取单个胞囊,但是挑取过程过长,胞囊出现萎缩、干瘪,极易导致 DNA 降解。通过比较,我们选用了挑取 50 μL 体积的胞囊,与从大肠杆菌的 DNA 提取过程相比,SCN 的胞囊量就很少,而且线虫中的基因拷贝数低,因此得到的 DNA 量也少;再次,细菌中 DNA 的含量本来就不高,而且会随着试验操作遭到破坏,造成 DNA 的折断等,因此,从 SCN 中提取的 DNA 得率很低。

3.3 质粒提取试剂盒可用于快速提取 SCN 的 DNA

已有的胞囊 DNA 提取方法提取过程耗时长、而且仅适于对单一胞囊或线虫的研究。对需要 DNA 量大的分子生物学试验,如 Southern、Northern 等试验,已有的提取方法不仅耗时,也很难满足试验对 DNA 在质和量上的要求。基于从动物、植物、微生物细胞中提取 DNA 的步骤均是先裂解细胞壁、去除蛋白和 RNA 污染的原理,我们在对胞囊进行预处理的前提下,利用质粒提取试剂盒从胞囊群体中提取 DNA,试验结果表明,该方法可以从 SCN 中提取到纯度较高的 DNA。由于 SCN 量少、而且基因组拷贝数低,优化了破碎细胞后的离心步骤,主要对转速做了调整,多次试验结果表明 4 000 g,10 min 足以使破碎的细胞壁及蛋白附着到管壁,减少 DNA 的损失。常用的线虫 DNA 提取方法的整个提取过程需

要 90 min,改良质粒提取试剂盒的操作步骤后提取线虫 DNA 仅需 30 min,具有快速的特点;另外,使用 3 种方法提取的 DNA 做模板,从线虫的 rDNA-ITS 区域扩增目标基因,比较结果显示,用质粒试剂盒提取的 DNA 纯度相对较高,而且很容易扩增到目标基因。

参考文献

- [1] Peng D L, Peng H, Wu D Q, et al. First report of soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*) on soybean from Gansu and Ningxia China[J]. Plant Disease, 2015, 100(1): 229.
- [2] Wrather J A, Koenning S R. Estimates of disease effects on soybean yields in the United States 2003 to 2005[J]. Journal of nematology, 2006, 38(2): 173-180.
- [3] Subbotin S A, Peng D L, Moens M. A rapid method for the identification of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* using duplex PCR[J]. Nematology, 2001, 3(4): 365-371.
- [4] Zheng J W, Subbotin S A, Waeyenberge L, et al. Molecular characterisation of Chinese *Heterodera glycines* and *H. avenae* populations based on RFLPs and sequences of rDNA-ITS regions[J]. Russian Journal of Nematology, 2000, 8(2): 109-113.
- [5] 王暄, 梁中伟, 裴世安, 等. 江苏省小麦禾谷胞囊线虫群体核糖体 DNA-ITS 区序列分析[J]. 南京农业大学学报, 2010, 33(6): 55-62. (Wang X, Liang Z W, Pei S A, et al. Sequences analysis of rDNA-ITS region of cereal cyst nematodes on wheat from Jiangsu Province[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2010, 33(6): 55-62.)
- [6] 牛雯雯, 王暄, 李红梅, 等. 基于线粒体 DNA-COI 序列的禾谷胞囊线虫和非利普胞囊线虫双重 PCR 检测[J]. 中国农业科学, 2016, 49(8): 1499-1509. (Niu W W, Wang X, Li H M, et al. Duplex-PCR detection for *Heterodera avenae* and *Heterodera filipjevi* based on mtDNA-COI sequences[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2016, 49(8): 1499-1509.)
- [7] 郑雅楠, 段玉玺, 孙晶双, 等. 大豆胞囊线虫不同虫态 DNA 提取方法及 ITS-rRNA 扩增[J]. 植物保护学报, 2009, 36(5): 477-478. (Zheng Y N, Duan Y X, Sun J S, et al. DNA extraction methods and ITS-rRNA analysis from different growth stages of *Heterodera glycine*[J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2009, 36(5): 477-478.)
- [8] 练云, 魏荷, 王金社, 等. 影响大豆胞囊线虫生理小种鉴定因素探讨[J]. 分子植物育种, 2015, 13(6): 1259-1264. (Lian Y, Wei H, Wang J S, et al. A study on the factors that influence the race-identification of soybean cyst nematode[J]. Molecular Plant Breeding, 2015, 13(6): 1259-1264.)