

水霉菌总 DNA 提取方法研究

可小丽^{1, 2} 汪建国¹ 顾泽茂³ 李 明^{1, 2} 龚小宁¹

(11 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 21 中国科学院研究生院, 北京 100039; 31 华中农业大学水产学院, 武汉 430070)

摘要: 本实验采用 EP 管反复冻融和研磨的破壁方式, 利用溶菌酶法、CTAB 法、改良 CTAB 法、尿素法、十二烷基硫酸钠(SDS)法等 5 种方法, 分别对 5 种鱼类致病性水霉菌(寄生水霉、多子水霉、异株水霉及两未定种)的基因组 DNA 进行提取, 并采用紫外分光光度计和 ITS 区基因(包括 518S rDNA)PCR 扩增对 DNA 进行了评价。紫外分光光度计检测结果表明, 5 种方法均可提取到水霉菌 DNA, 其中改良 CTAB 法提取的 5 种水霉菌的 DNA 产量和质量最高, A₂₆₀/A₂₈₀ 在 11.79) 11.82 之间, 浓度为 45Lg/mL; PCR 检测结果表明, 只有改良 CTAB 法提取的 DNA 全部扩增到明亮、整齐、无拖尾的特异性条带, 其他几种方法均存在暗带或无带现象。因此, 改良 CTAB 法可以作为水霉菌 DNA 提取以开展分子生物学研究的首选方法。

关键词: 水霉菌; DNA 提取; 溶菌酶; 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB); 尿素; 十二烷基硫酸钠(SDS)
中图分类号: Q233 文献标识码: A 文章编号: 1002-3207(2008)012-0062-06

水霉菌(*Saprolegnia* sp1)是鱼类真菌性疾病的主要病原, 一般通过菌丝和孢子感染鱼体和鱼卵, 对水产养殖业危害极大^[1) 6]。开展水霉菌的致病分子机制、品种分子标记鉴定及基因诊断等分子生物学研究, 都需要获得高质稳定的基因组 DNA。关于真菌 DNA 提取的方法, 国内外已有很多报道, 但不同真菌种类、菌丝类型、细胞壁结构及次生代谢产物等特点不一, 很难有通用性提取方法^[7, 8]。水霉菌是一种丝状真菌, 对其 DNA 的提取, 国外主要借鉴其他丝状真菌 DNA 提取的方法^[9, 10], 获得了成功, 但均未做详细报道, 国内尚无相关报道。作者尝试用这些方法提取寄生水霉(*Saprolegnia parasitica*)等 5

种水霉菌 DNA, 获得量较少, 同时含有较多杂质, 不利于进一步的分子生物学研究。本研究采用 EP 管反复冻融和研磨的破壁方式, 比较了溶菌酶法、CTAB 法、改良 CTAB 法、尿素法和 SDS 法对寄生水霉等 5 种水霉菌 DNA 的提取效果, 以期探索出适合水霉菌 DNA 提取的最佳方法, 为水霉菌的分子生物学研究提供基础。

1 材料和方法

111 菌种及其来源 菌株名称及来源见表 1。常规方法接种, 用玉米片代替大麻籽依据 Paul 所述方法^[9]分离纯化。常规保存, 定期转种。

表 1 菌株名称和来源
Tabl 1 The name and source of the fungi

分离菌种 Isolates	寄主 Host	感染部位 Infected site	寄主来源 The source of the host
寄生水霉 <i>Saprolegnia parasitica</i>	长吻 <i>Leiocassis longirostris</i>	胸鳍 Pectoral fin	中国科学院水生生物研究所 Institute of Hydrobiology of Chinese Academy of science
多子水霉 <i>Sl farax</i>	草鱼鱼苗 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	鳃盖 Operculum	国家级洪泽水产良种场 National wellbred aquafarm of Hongze Lake
异株水霉 <i>Sl dioica</i>	鲫鱼 <i>Carassius auratus</i>	尾鳍 Tail fin	中国科学院水生生物研究所 Institute of Hydrobiology of Chinese Academy of science
<i>Sl sp1</i>	斑点叉尾 <i>Ictalurus pundatus</i>	头部 Caput	国家级洪泽水产良种场 National wellbred aquafarm of Hongze Lake
<i>Sl sp2</i>	黄颡鱼 <i>Pelteobagrus fulvidraco</i>	背鳍 Dorsal fin	中国科学院水生生物研究所 Institute of Hydrobiology of Chinese Academy of science

112 菌种培养、收集和处理 利用常规划平板或孢子涂布方法,将 5 种菌株分别接种于玉米培养基(玉米粉 30g,琼脂 715) 910g,蒸馏水 500mL),置 25 e 培养。4 天后,用高压灭菌的尖头镊子取一定量菌丝于灭菌 EP 管内,依次用无菌生理盐水、20mmol/L EDTA 及无菌水漂洗,然后用无菌的吸水纸将菌丝吸干。分别称取上述菌丝 30 mg 于 115mL 的 EP 管内,加 20mmol/L Tris#HCl 和 20mmol/L EDTA 各 10LL,放于-70 e,冰冻 30min 后,用与 EP 管配套的无菌微型玻璃研磨棒研磨 5) 10min。重复上述冰冻研磨步骤。研磨后冰浴 2) 3min,用重蒸水将研磨液稀释至 500LL 备用。

113 主要试剂 TaqDNA 聚合酶(5U/LL)、dNTPs(10mmol/L)、DNA buffer(10 @Mg²⁺)、DNA2Marker(DL2000)均购于上海申能博彩生物科技有限公司;尿素、 β 巯基乙醇和溶菌酶均购于武汉天源生物技术有限公司;十二烷基硫酸钠(SDS)购于华美生物工程有限公司;十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)和聚乙烯吡咯烷酮(PVP)购于昆明杰辉生物技术有限公司。

114 DNA 提取方法

1141 溶菌酶法 取上述 5 种菌株的研磨稀释液 100LL 于 5 支灭菌的 115mL EP 管中,分别加入 4LL 1mol/L Tris#HCl(pH 810),4LL 1mol/L EDTA(pH 810),SDS 2%,加入溶菌酶至终浓度 1 mg/mL 65 e 水浴 2h。DNA 的提取依照常规苯酚(氯仿)异戊醇方案。最后提取的 DNA 溶于 30LL TE 缓冲液中(10mmol/L Tris#HCl, pH 810; 1mmol/L EDTA, pH 810)。

11412 CTAB 法 参照吴志红^[11]的方法进行。分别在上述 5 支菌种研磨稀释液的 EP 管内加入 2% 的 CTAB, 100mmol/L Tris#HCl, pH 810, 20mmol/L EDTA, pH 810, 114mol/L NaCl, 65 e 水浴 45) 60min, 加入等体积的酚B氯仿B异戊醇(25B24B1), 颠倒混匀, 12000r/min 离心 25min。取上层水相至另一离心管中, 加入 016 倍体积冰冷的异丙醇, 颠倒混匀, 4 e 放置 20min, 10000r/min 离心 10min, 弃上清, 70% 乙醇洗涤沉淀 2 次。干燥后用适量 TE 缓冲液溶解沉淀, 加入等体积预冷的 5mol/L LiCl, 混匀, 重复异丙醇洗涤及后续步骤。最后提取的 DNA 溶于 30LL TE 缓冲液中。

11413 改良 CTAB 法 取上述 5 种菌株的研磨稀释液 100LL 于 5 支灭菌 115mL EP 管中, 分别加入 500LL CTAB 裂解液(100mmol/L Tris#HCl, pH 810; 20mmol/L EDTA, pH 810; 114mol/L NaCl; 3% CTAB;

2% β 巯基乙醇(用前加入); 4%(w/v)PVP)。65 e 水浴 2h, 加入 100LL 315mol/L NH₄Ac, 轻轻颠倒混匀, 冰浴 30min, 10000r/min 离心 5min, 取上清, 加入等体积的酚B氯仿B异戊醇(25B24B1)混合溶液, 轻摇 10min, 8000r/min 离心 5min, 抽提两次, 加入等体积的氯仿B异戊醇(24B1)混合液, 轻摇 10min, 8000r/min 离心 5min。接下来的处理同溶菌酶法。

11414 尿素法 参照陈官芝等^[12]和 Tan 等^[13]的尿素法。取 5 种菌株的研磨稀释液 100LL 于 5 支灭菌 115mL EP 管中, 分别加入 500LL 尿素裂解液(尿素 8mol/L; NaCl 015mol/L; Tris#HCl 20mmol/L, pH 810; EDTA 20mmol/L, pH 810; SDS 2%; 115% β 巯基乙醇(用前加入); 4%(w/v)PVP)。65 e 水浴 115h, 加 150LL 715mol/L KAc, 混匀, 冰浴 30min, 10000r/min 离心 5min。将上清吸入另一离心管, 然后依照改良 CTAB 法提取 DNA。

11415 SDS 法 参照傅骏华等^[14]和杨潇远等^[15]方法。取上述 5 菌种的研磨稀释液 100LL 于 5 支灭菌的 115mL EP 管中, 分别加入 500LL SDS 裂解液(Tris#HCl 011mol/L, pH 810; EDTA 0105mol/L, pH 810; NaCl 015mol/L; SDS 4%; 115% β 巯基乙醇(用前加入)), 94 e 水浴 15) 20min。加 150LL 715mol/L KAc, 颠倒混匀, 冰浴 30min 后, 10000r/min 离心 5min。DNA 提取的后续步骤和保存同溶菌酶法。

115 DNA 样品浓度及质量测定 取 5LL 各菌种 DNA, TE 稀释至 100 倍, 混匀, 转入分光光度计的石英比色杯中, 用等体积的 TE 作空白对照, 利用 LIST2 ED27FO6 紫外分光光度计测定 DNA 的 A_{260/280}值和浓度。

116 PCR 扩增及电泳检测 用真菌 ITS 区通用引物^[16], ITS1:

5c2TCCGTAGGTGAACCTGCGG23c, ITS4: 5c2TCCTC2 CGCITATGATATGC23c 进行 PCR 扩增。PCR 反应采用 25LL 体系: DNA buffer 215LL, dNTPs 015LL, DNA 模板量 1LL, 引物(浓度均为 31125Lmol/L) ITS1 和 ITS4 均为 1LL, ddH₂O 1817LL, Taq 酶 013LL。反应程序为: 94 e 5min; 94 e 30s, 55 e 30s, 72 e 60s, 35 cycles; 72 e, 5min。取 5LL PCR 产物进行 018% 琼脂糖凝胶电泳, 平行实验 2 次, UVIPromMW 软件成像系统拍照。

2 结果

211 DNA 提取方法的紫外分光光度计检测 利用 5 种不同的裂解液提取 5 种鱼类致病性水

霉菌株基因组 DNA, 其 A₂₆₀/A₂₈₀比值和浓度见表 2。从 A₂₆₀/A₂₈₀比值分析, 改良 CTAB 法提取的各菌种 DNA, A₂₆₀/A₂₈₀比值较接近, 均在 1180 左右; SDS 法提取的各菌种 DNA, 比值最低为 1119, 平均只有 1132.; 在 CTAB 和尿素法中, 各 A₂₆₀/A₂₈₀比值差异较大(p< 0105), 且实验证明这两种方法重复性较差; 溶菌酶法提取的各菌种 DNA, A₂₆₀/A₂₈₀比值普遍偏

低, 最高不超过 1169。提取的 DNA 溶解于相等体积的 TE 缓冲液, DNA 浓度最高的是改良 CTAB 法, 平均达 45 Lg/mL; 其次是尿素法、CTAB 法和溶菌酶法, 但这 3 种方法对菌种似乎有一定的选择性, 各菌种间 DNA 浓度差异较大(p< 0105); 平均浓度最低的为 SDS 法, 为 29 Lg/mL。

表 2 五种提取方法获得的基因组 DNA 的质量
Tabl 2 Quality and yield of the genomic DNA extracted with five methods

方法 Methods	菌种 The fungi	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	DNA 浓度 The density of DNA (Lg/mL)
溶菌酶 Lysozyme	寄生水霉(S l parasitica)	11 69	50
	多子水霉(S l fεrax)	11 11	20
	异株水霉(S l dī oīca)	11 48	45
	S1sp ₁	11 39	20
	S1sp ₂	11 53	21
CTAB Hexadecyltrimethyl anmonium bromide	寄生水霉(S l parasitica)	11 24	22
	多子水霉(S l fεrax)	11 39	33
	异株水霉(S l dī oīca)	11 28	38
	S1sp ₁	11 19	29
	S1sp ₂	11 47	20
改良 CTAB Improved hexadecyltrimethyl anmonium bromide	寄生水霉(S l parasitica)	11 79	40
	多子水霉(S l fεrax)	11 81	44
	异株水霉(S l dī oīca)	11 82	42
	S1sp ₁	11 87	48
	S1sp ₂	11 80	51
尿素 Carbamide	寄生水霉(S l parasitica)	11 69	22
	多子水霉(S l fεrax)	11 01	19
	异株水霉(S l dī oīca)	11 52	19
	S1sp ₁	11 41	34
	S1sp ₂	11 48	44
SDS Sodium dodecyl sulfat e	寄生水霉(S l parasitica)	11 25	27
	多子水霉(S l fεrax)	11 77	23
	异株水霉(S l dī oīca)	11 75	40
	S1sp ₁	11 46	23
	S1sp ₂	11 18	25

212 DNA 提取方法的 PCR 检测

上述 5 种方法提取的 DNA 样品经 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳检测, 所得 ITS 区基因片段大小与 GeneBank 中同类序列大小一致(690) 750 bp), 结果如图 1。由图 1 可知, 改良 CTAB 法获得的 5 菌种 DNA 全部扩出目的片段, 条带明亮, 且重复性好; 其

他几种提取方法均有暗带或无条带现象。溶菌酶法中, 多子水霉(S l fεrax) 和 S1 sp₂带暗淡, 其他几条带均呈模糊状态; CTAB 法中, 寄生水霉(S l parasiti2 ca) 和 S1 sp₂未扩出目的条带, 且多子水霉条带暗淡; 尿素法和 SDS 法中, 多子水霉和 S1sp₂条带均较暗, 此外尿素法提取的寄生水霉和 S1sp₁菌种 DNA

有拖尾现象, SDS 法中多子水霉(*S1 ferax*)和 *S1 sp*₂ 条带模糊。经过平行检测, 排除 PCR 反应本身的各种原因, 暗带或无条带现象的出现说明所提取的基

因组 DNA 纯度不够或浓度太低, 从而影响了 PCR 扩增结果。由此可知, 改良 CTAB 法提取的水霉菌基因组 DNA 质量优于其他几种方法。

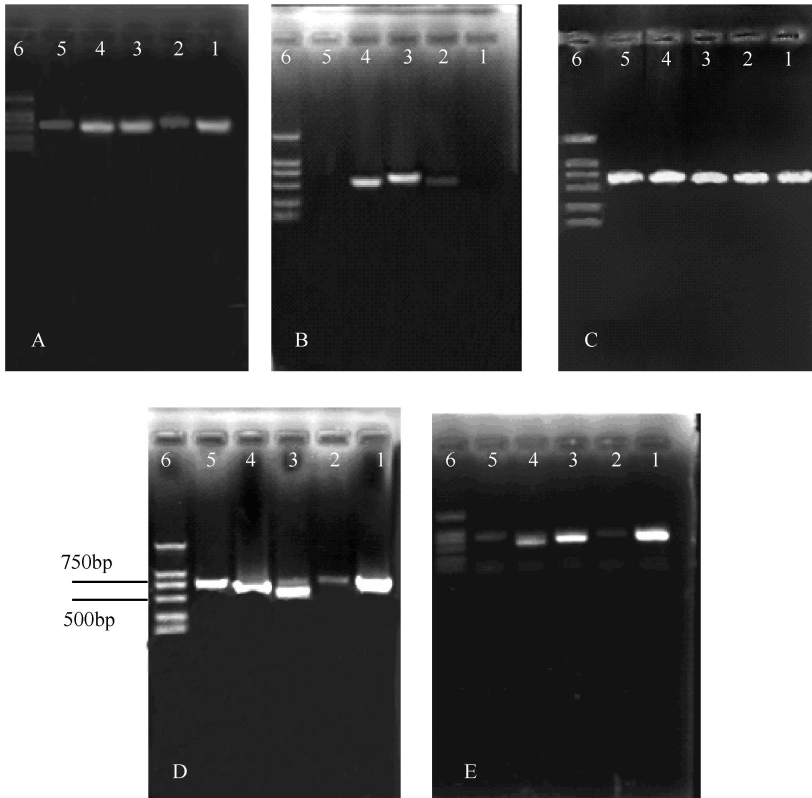


图 1 五种水霉菌样品 ITS 区基因 PCR 扩增产物电泳结果图

Fig 1 The result of Electrophoresis of amplification of ITS rDNA control region gene of five pathogenic fungi
A, B, C, D, E 分别代表溶菌酶法, CTAB 法, 改良 CTAB 法, 尿素法和 SDS 法的 DNA 扩增结果。1, 2, 3, 4, 5 分别代表寄生水霉(*S1 parasitica*), 多子水霉(*S1 ferax*), 异株水霉(*S1 dioica*) 以及两未定种 *S1 sp*₁和 *S1 sp*₂样品, 6 为分子标记 DL2000
A, B, C, D, E representing the results of DNA amplification of the methods of lysozyme, CTAB, improved CTAB, $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ and SDS respectively| Lane1: *Saprolegnia parasitica* |Lane2: *S1 ferax*| Lane3: *S1 dioica*| Lane4: *S1 sp*₁| Lane5: *S1 sp*₂| Lane6: DNA Marker DL2000

3 讨 论

提取高质量的 DNA 是进行水霉菌分子生物学研究的基础。水霉菌细胞壁较坚硬, 主要由纤维素、葡聚糖、甘露聚糖等组成, 不易充分裂解, 因此, 提取水霉菌 DNA 的首要步骤就是如何破壁。我们研究比较了几种常规破壁方法, 如玻璃珠机械破壁法、液氮研磨法以及超声波破壁法^[20]等, 发现这些方法或成本高, 或操作繁琐, 或 DNA 得率较低。经反复摸索、实验, 我们采用 EP 管- 70℃ 反复冻融研磨破壁, 此法效果较好, 而且具有操作简便、污染机会少、成本低等优点。在实验中, 我们还发现研磨菌丝体时, 适当加大 Tris#HCl 和 EDTA 的量, 能减少研磨过程中 DNA 的降解。

水霉菌中富含多糖、多酚及色素等次生代谢物, 因此提取高质量的 DNA 关键是有有效的除去这些杂质。在常规的 SDS 法和尿素法操作中, 这些物质易与 DNA 发生不可逆结合, 使 DNA 呈褐色、黏稠状, 影响 DNA 质量。本实验在改良 CTAB 法的 DNA 提取液中加入 2% B 巯基乙醇(用前加入)和 4% PVP 有效防止了酚类物质氧化, 提取的 DNA 为透明状。多糖是影响水霉菌 DNA 纯度的另一常见因素, 这类化合物可与 DNA 同时沉淀, 使 DNA 呈胶状, 从而影响 DNA 样品的浓缩, CTAB 能有效沉淀多糖, 再经氯仿、异戊醇抽提, 也可除去一部分多糖。CTAB 浓度以 3% 为最佳, 既能有效除去多糖等杂质, 又易于提纯时与 DNA 分开, 不造成额外污染。另外, 我们参

考 Couchu 等^[18]的方法, 提取液经 NH_4Ac 或 KAc 冰浴处理后再经酚氯抽提, DNA 黏稠度大大降低, 纯度和产量也有所提高。

一般认为所提取 DNA 经紫外分光光度计检测时, 其 A_{260}/A_{280} 比值在 1.80 左右说明 DNA 纯度最高, 若该值小于 1.8 说明所提取的 DNA 含蛋白质较高, 大于 2.10 则说明 RNA 未抽提干净。由表 2 可知, 改良 CTAB 法提取的各菌种 DNA, 无论纯度还是产率都优于其他几种方法。

综上, 本实验选用的 5 种方法都可以提取水霉菌 DNA, 但各种方法提取的 DNA 纯度和产量存在较大差别, 改良 CTAB 法能较好的除去多糖、多酚及蛋白质等杂质, 提取的 DNA 产量及纯度均较高, 可以作为水霉菌 DNA 提取以开展分子生物学研究的首选方法。

参考文献:

- [1] Li A H, Nie P, Lu Q Z. A primary study of *Saprolegnia* and its pathogen of *Lateolabrax Japonicus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1999, 23(4): 388) 390 [李爱华, 聂品, 卢全章. 花鲈水霉病及其病原的初步研究. 水生生物学报, 1999, 23(4): 388) 390]
- [2] Hatai K, Hoshiai G I. Pathogenicity of *Saprolegnia parasitica* coker [A]. In: Muller G J. Protland, Oregon, U. S (Eds.), salmon *Saprolegnia* [M]. Department of Enery, Bonneville power Administration, 1994
- [3] Hussein M M, Hatai K, Nomura T. *Saprolegnia* in salmonids and their eggs in Japan [J]. *J Wildl Dis*, 2001, 37: 204) 207
- [4] Hatai K, Hoshiai G. Mass mortality in cultured coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) due to *Saprolegnia parasitica* coker [J]. *J Wildl Dis*, 1992, 28: 532) 536
- [5] Willoughby L G, Pickering A D. Viable *Saprolegnia* spores on the epidemics of the salmonid fish *Salmo trutta* and *Salmo alpinus* [J]. *Trans Br Mycol Soc*, 1997, 68: 91) 95
- [6] Whisler H C. Identification of *Saprolegnia* spp. pathogenic in Chinook salmon [M]. Washington, D. C., US Department of Energy, 1996
- [7] Karakousis A, Tan L, Ellis D, et al. An assessment of the efficiency of fungal DNA extraction methods for maximizing the detection of medically important fungi using PCR [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, 65: 38) 48
- [8] Min J, Arganoza M T, Ohmberger J, et al. Alternative methods of preparing whole cell DNA from fungi for dot blot, restriction analysis, and colony filter hybridization [J]. *Anal Biochem*, 1995, 225: 94) 100
- [9] Paul B, Steciow M M. *Saprolegnia multi spora*, a new oomycetes isolated from water samples taken in a river in the Burgundian region of France [J]. *FEMS Microbiology Letter*, 2004, 237: 393) 398
- [10] Bangyeekhun E, Quiniou S M A, Bly J E, et al. Characterisation of *Saprolegnia* sp. isolates from channel catfish [J]. *Dis Aquat Org*, 2001, 45: 53) 59
- [11] Wu Z H, Wang T H, Huang W, et al. A simplified method for chromosome DNA preparation from filamentous fungi [J]. *Mycosystema*, 2001, 20(4): 575) 577 [吴志红, 汪天虹, 黄卫, 等. 简便易行的丝状真菌染色体 DNA 提取法. 菌物系统, 2001, 20(4): 575) 577]
- [12] Chen G Z, Wang Y, Xu X L, et al. Experimental study on DNA extraction methods of nosogenesis fungi [J]. *Chin J Dermatol*, 2005, 35(5): 408) 409 [陈官芝, 王云, 徐秀莲, 等. 致病性真菌 DNA 提取方法的实验研究. 中华皮肤科杂志, 2002, 35(5): 408) 409]
- [13] Tan S L, Dossett M, Katze M G. Extraction of genomic DNA suitable for PCR analysis from dried plant rhizomes/ roots [J]. *Biotech*, 1998, 25 (5): 796) 801
- [14] Fu J H, Li L C. Studies on the protocol optimum and preliminary application RAPD in maize [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 1997, 23 (1): 56) 61 [傅骏华, 李连城. 玉米 RAPD 程序优化研究及其初步探讨. 作物学报, 1997, 23(1): 56) 61]
- [15] Yang X Y, Wang L Y, Li Z Y, et al. Studies on celerity DNA extraction methods of nosogenesis fungi of keratitis [J]. *Chin J Lab Med*, 2005, 28(9): 961 [杨潇远, 王丽娅, 李振勇, 等. 角膜炎常见致病真菌 DNA 快速提取方法的探索. 中华检验医学杂志, 2005, 28(9): 961]
- [16] Leclerc M C, Guillot J, Deville M. Taxonomic and phylogenetic analysis of *saprolegniales* (oomycetes) inferred from LSU rDNA and ITS sequence comparisons [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2000, 77: 369) 377
- [17] Glee P M, Russell P J, Welsch J A, et al. Methods for DNA extraction from *Candida albicans* [J]. *Anal Biochem*, 1987, 164: 207) 213
- [18] Couchu J A, Fritz P J. Isolation of DNA from plants high in polyphenols [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1990, 8: 8) 12

STUDY ON TOTAL DNA EXTRACTION METHODS OF SAPROLEGNIA

KE XiaoLi^{1, 2}, WANG JianGuo¹, GU ZeMao³, LI Ming^{1, 2} and GONG XiaoNing¹

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Science, Wuhan 430072; 2. The Graduate School of the Chinese Academy of Science, Beijing 100039; 3. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract: Saprolegnia are parasitic on fish and their eggs and known as the most important pathogens in freshwater fish. Infectious diseases caused by water molds can cause losses of freshwater fish in both nature and commercial fish farms. It is very important to obtain the high quality and effective total DNA to study the mechanism of molecular nosogenesis, identify the species using molecular marker and gene diagnoses.

In this study, *Saprolegnia parasitica*, *S. ferax*, *S. dolica*, *S. sp₁* and *S. sp₂* were used as test materials. The DNA extraction methods of Lysozyme, CTAB, improved CTAB, $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ and SDS were compared. Firstly, the 30 mg (net weight) of freshly subcultured mycelium of five different pathogenic fish fungi were taken to freeze at -70°C for 30 min in 1.5 mL Eppendorf tubes, respectively. Then they were transferred to room temperature and grinded using appropriate abrasive tool. This process was repeated once. Secondly, the trituration of five mycelium were digested by lysozyme digestion, CTAB digestion, improved CTAB digestion, $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ digestion and SDS digestion, respectively, then extracted DNA using relevant processes. The yield and quality of DNA were evaluated with ultraviolet radiation spectrophotometer and PCR of the ITS rDNA. The result of ultraviolet radiation spectrophotometer showed that DNA can be obtained using five different methods and the genomic DNA extracted with improved CTAB method had the best quality and yield, the A_{260}/A_{280} ratio was between 1.79) 1.82 and the concentration of DNA was about 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The result of PCR showed that five DNA samples extracted with improved CTAB method can be well amplified and obtained the bright, no tail and trim electrophoresis strip. However, there were unclear or vacant electrophoresis strips in the DNA samples extracted with other methods. Therefore, the DNA extraction method of improved CTAB was the best method to gain the DNA of *Saprolegnia* for the study of molecular level.

Key words: *Saprolegnia*; DNA extraction; CTAB; Lysozyme; $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$; SDS