

文章编号: 1001-1498(2005)05-0641-03

一种有效的蚜虫基因组 DNA 提取方法

杨子祥, 冯颖*, 陈晓鸣

(中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 云南 昆明 650224)

关键词: 蚜虫; 基因组 DNA; 提取方法

中图分类号: Q523 文献标识码: A

An Effective Method for Extraction Genomic DNA from Aphids

YANG Zi-xiang, FENG Ying, CHEN Xiaoming

(The Research Institute of Resource Insects, CAF, Kunming 650224, Yunnan, China)

Abstract: Aphid is a group of small insects in the Homoptera. There are approximately 4 000 aphid species all over the world. Many of them attack important agricultural crops and therefore have economic importance. However, some species such as Chinese gallnut aphids are beneficial for human beings. Most aphids display complex life cycles with alternation of sexual and asexual generations and host plant alternation. Molecular genetic markers have good stabilities, high variability and mostly are free from environmental influences. So they were very suitable for aphid research and could tackle some problems which the traditional taxonomical methods could not solve. The paper introduced a simple and effective method that could extract genomic DNA from a single aphid individual and could be used for the research of molecular genetic marker such as RAPD, RFLP and DNA sequence determination.

Key words: aphid, genomic DNA, extraction method

蚜虫属于同翅目 (Homoptera) 蚜总科 (Aphidoidea) 和球蚜总科 (Adelgoidea), 世界上已知种类为 4 000 多种^[1], 我国已报道的种类 1 000 余种^[2]。蚜虫大多数是害虫, 它们刺吸植物汁液, 直接影响植物生长, 同时间接传播病毒病害, 造成农业上的损失, 如棉蚜 (*Aphis gossypii* Glover)、麦长管蚜 (*Macrosiphum avenae* (Fabricius)) 等; 少数种类如五倍子蚜 (*Schlechtendalia chinensis* (Bell)) 是重要的资源昆虫, 具有较高的经济价值^[3]。蚜虫身体微小, 形态变异大, 生活习性复杂, 并具有多型多态现象, 研究它较为困难, 尤其是在分类和鉴定、近缘种的识别等方面, 传统的研究方法往往难以发挥作用。近年

来, 应用分子遗传标记技术, 从 DNA 水平上研究蚜虫的分类和生物学特性, 日益受到蚜虫研究者的重视; 与形态学等基因表达型的特征相比, 分子遗传特征是更本质的特征, 其变异只来源于 DNA 系列的差异, 具有稳定性高、受环境条件影响小, 信息内容丰富等优点, 非常适合于蚜虫的研究^[4]。要从分子水平研究蚜虫, 首先面临的问题就是基因组 DNA 的提取, 特别是个体微小的单头蚜虫 DNA 的提取, 因此寻求简便、快速、有效的蚜虫 DNA 的提取方法, 对于蚜虫分子生物学研究具有重要的意义。

自上世纪 80 年代以来, 研究人员对小型昆虫基因组 DNA 的提取方法进行了不断的探索和改进。

收稿日期: 2005-03-15

基金项目: 国家科技部基础性资金项目“资源昆虫种质资源收集、整理、保存”(192)的部分内容

作者简介: 杨子祥 (1968—), 男, 贵州安顺人, 高级工程师, 在读博士生。

* 通讯作者: 冯颖, 研究员, E-mail: yingf@263.com

Boye 借鉴植物 DNA 的提取方法,采用 CTAB 法提取松树皮象 (*Pissodes strobi* Peck) 的 DNA; Black M^[5] 采用了匀浆法提取蚜虫基因 DNA 并用于 RAPD 扩增,取得了很好的效果。田英芳^[6] 等参照 Marchant (1988) 蝗虫基因组 DNA 提取方法,综合了其他方法的优点,建立了一种简易的昆虫基因组 DNA 的提取方法,但该方法以蟋蟀、天牛、蝗虫等为材料,未涉及微小昆虫;杨效文^[7] 在烟蚜 (*Myzus persicae* (Sulzer)) 的研究中采用加入两种提取液的方法,安瑞生等^[8] 对这种方法作了改进,以后的蚜虫研究人员大多采用这种方法。

作者在五倍子蚜虫研究中尝试和比较了 Black M、田英芳和杨效文的提取方法,并以田英芳的方法为基础,对部分步骤作了改进,改进的方法能快速、有效地提取单头蚜虫的基因组 DNA,满足 RAPD 分子标记和 DNA 序列测定等研究的需要。本方法也适用于同翅目其他微小昆虫(如介壳虫)基因组 DNA 的提取。

1 材料和方法

1.1 材料

五倍子蚜虫为新鲜或乙醇浸泡标本,包括角倍蚜 (*Schlechtendalia chinensis* Bell)、倍蛋蚜 (*Schlechtendalia peitan* Tsai et Tang)、倍花蚜 (*Nunudea shinaii* Matsumura)、肚倍蚜 (*Kaburagia rhusicola* Takagi) 和肚倍枣铁亚种 (*Kaburagia rhusicola ensigallii* Tsai et Tang) 等。2004 年 6—11 月采于四川峨嵋、陕西西乡、云南禄丰和昆明等地,收集有翅或无翅蚜,无水乙醇浸泡, - 20 ℃ 保存。

1.2 试剂及溶液

(1) 匀浆缓冲液:按 8 份 A 液、1 份 B 液和 1 份 C 液配制,现配现用。

A 液: Tris-Base 0.05 mol · L⁻¹, NaCl 0.1 mol · L⁻¹, EDTA 0.1 mol · L⁻¹, 调节 pH 值为 7.6, 高压灭菌后备用;

B 液: 5% 的 SDS;

C 液: 2 mg · mL⁻¹ 的蛋白酶 K (40 U · mg⁻¹, Merck 产品, 上海华舜分装), - 20 ℃ 保存。

(2) Tris-平衡酚 (天津灏洋公司), 氯仿 异戊醇 (24 : 1), 无水乙醇及 70% 乙醇。

1.3 主要仪器

UVP GDS-8000 凝胶成像分析系统, 含 LabWork 4.0 图像分析软件分析 (基因公司), PTC-200 智能

PCR 仪 (美国 MJ Research), 台式高速离心机 (德国 Hemle), ESP 300 电泳仪 (上海天能)。

1.4 提取步骤

(1) 洗涤 取新鲜或无水乙醇浸泡的单头蚜虫, 置于无水乙醇、双蒸水中依次漂洗, 吸水纸吸干。

(2) 研磨 将蚜虫转至 1.5 mL⁻¹ 的离心管中, 加入 100 μL⁻¹ 匀浆液, 用与离心管配套的组织捣碎棒充分研磨, 直至虫体完全破碎; 组织捣碎棒用 500 μL 匀浆液冲洗。

(3) 水浴 45 ℃ 水浴 1 ~ 3 h, 中途取出混匀 2 ~ 3 次, 直至混合液清亮为止。

(4) 酚抽提 在通风柜中操作, 在混合液中加入 600 μL 的平衡酚, 7 000 转离心 10 min, 用大口径枪头取上清液至另一干净的离心管中。

(5) 氯仿 异戊醇抽提 在通风柜中操作, 在上清液中加入 550 μL 氯仿 异戊醇 (24 : 1), 缓慢颠倒 10 次, 8 000 转离心 10 min, 用大口径枪头取上清液至另一干净的离心管中。

(6) 沉淀 DNA 加入 1 000 μL 冷无水乙醇 (预先放置于 - 20 ℃ 冰箱中) 沉淀 DNA, - 20 ℃ 冰箱内放置 30 min 以上; 12 000 转离心 10 min, 小心倾去上清液。

(7) 洗涤 DNA 在留有 DNA 沉淀的离心管中加入 500 μL 冷的 70% 乙醇 (预先放置于 - 7 ℃ 冰箱内), 12 000 转离心 10 min, 小心倾去上清液。

(8) 干燥和溶解 将离心管倒扣在干净的餐巾纸上, 自然干燥后, - 20 ℃ 冰箱内保存。使用时每管加入 20 μL 的双蒸水充分溶解。

1.5 DNA 样品检测

采用 1% 的琼脂糖, 点样孔宽 3 mm, 上样量 1.5 μL · 孔⁻¹, 88 V (4 V · cm⁻¹), 电泳时间 70 min; 电泳完毕后, EB 染色, 在紫外灯下照相、检测和分析。

2 结果与讨论

作者首次将田英芳介绍的方法应用于蚜虫基因组 DNA 的提取, 并针对蚜虫个体微小、体表常有蜡质的特点, 对部分步骤作了改进:

(1) 匀浆缓冲液的 pH 值有一个变动范围 (7.0 ~ 8.0), 不同昆虫适应于不同的 pH 值^[6]; 对蚜虫而言, pH 值为 7.6 时, 效果最好。

(2) 匀浆缓冲液分两次加入, 确保研磨的充分, 减少 DNA 的损失。

(3) 将水浴的温度从 37 ℃ 提高到 45 ℃, 增加蛋

白酶 K 的活性,节省了时间,减少了 DNA 的降解。

(4)减少平衡酚的抽提次数,提高了 DNA 的得率。

与目前蚜虫研究中采用较多的冰冻(或液氮冷冻)后用牙签捣碎虫体相比,本方法采用组织捣碎棒研磨破碎虫体,无需冰冻,在常温下即可操作,简化了操作步骤,并可使研磨更为充分和彻底。

从图 1 可以看出,用本方法提取单头蚜虫的 DNA,谱带整齐,无拖尾,产量和质量都比较稳定, DNA 结构较为完整,经与 DNA 的比较分析,所提取的 DNA 片段大小约为 48 kb,每头蚜虫提取的 DNA 约为 1.5 μg ,可以满足蚜虫分子生物学的需要。用本方法提取的 DNA 进行 RAPD 随机引物 PCR 扩增,也取得了很好的效果(图 2)。

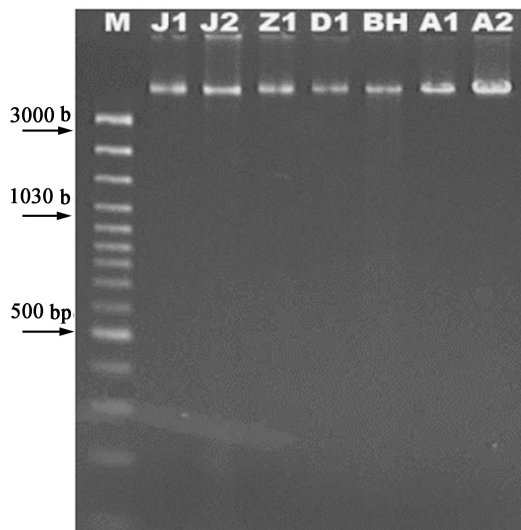


图 1 4种倍蚜虫基因组 DNA 的电泳
1%琼脂糖, 88 V ($4 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$), 70 min; M: 标准分子量 (Marker); J1, J2: 角倍蚜; Z1: 肚倍蚜枣铁亚种; D1: 肚倍蚜; BH: 倍花蚜; A1: DNA, $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; A2: DNA, $150 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$

用本法提取的 DNA,在电泳检测时有时会出现拖尾或 RNA 带,这是由于少量 DNA 或 RNA 降解所致。RNA 对 PCR 扩增一般没有影响,如果想去除 RNA,可在 DNA 溶解液中加入 RNAase,一般每管加 $1 \mu\text{L}$ ($10 \text{ mg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$),处理 1 h 以上,可以有效地去除 RNA。如果不立即实验,也可将 DNA 溶液置于 4 冰箱内,让 RNA 自然降解。

真核生物的 DNA 提取方法虽然很多,但其原理和步骤基本相同,即:破碎细胞,在 EDTA 存在的情况下,用蛋白酶 K 消化细胞或组织,用去垢剂如 SDS 溶解细胞膜并使蛋白质变性,再用各种有机溶剂如酚、氯仿等纯化 DNA。其中破碎细胞是关键步骤,

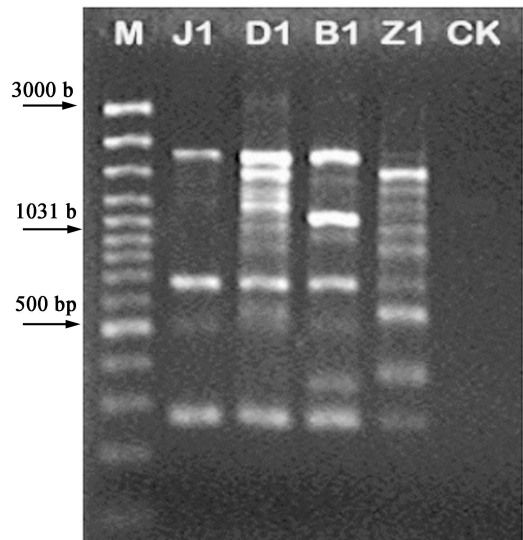


图 2 4种五倍子蚜虫的 RAPD 随机引物 PCR 扩增
2%琼脂糖, 88 V ($4 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$), 80 min; 引物: S118, 0.2 OD, 上海生工; M: 标准分子量 (Marker); J1: 角倍蚜; D1: 肚倍蚜; B1: 倍蛋蚜; Z1: 肚倍蚜枣铁亚种; CK: 对照 (ddH_2O)

研磨是否充分将直接影响 DNA 提取的量和纯度^[9,10],对于蚜虫而言,还需考虑如何破碎其外骨骼。另外,在提取过程中, DNA 会受到各种因素的影响而降解,因此应预先准备好试剂和材料,合理安排实验步骤,及时操作,减少停留时间。

参考文献:

- [1] 张广学, 钟铁森. 中国经济昆虫志, 第 25 册, 同翅目, 蚜虫类 (一) [M]. 北京: 科学出版社, 1983
- [2] 任珊珊, 乔格侠, 张广学. 甘肃省蚜虫物种多样性研究 [J]. 动物分类学报, 2003, 28 (2): 221 ~ 227
- [3] 张广学, 乔格侠, 钟铁森, 等. 中国动物志 (昆虫纲 14 卷 同翅目 蚜科, 瘦绵蚜科) [M]. 北京: 科学出版社, 1999
- [4] 龚鹏, 杨效文, 谭声江, 等. 分子遗传标记技术及其在昆虫科学中的应用 [J]. 昆虫知识, 2001, 38 (2): 86 ~ 91
- [5] Black I W C, DuTeau N M, Puterka G J, et al. Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids [J]. Bulletin Entomological Research, 1992, 82: 151 ~ 159
- [6] 田英芳, 黄刚, 郑哲民, 等. 一种简易的昆虫基因组 DNA 提取方法 [J]. 陕西师范大学学报 (自然科学版), 1999, 27 (4): 82 ~ 84
- [7] 杨效文, 张孝羲, 陈晓峰. 不同寄主植物上烟蚜 DNA 多态性的 RAPD-PCR 分析 [J]. 植物保护学报, 1999, 26 (2): 147 ~ 152
- [8] 安瑞生, 谭声江, 陈晓峰. 小型昆虫 DNA 提取时匀浆方法的改进 [J]. 昆虫知识, 2002, 39 (4): 311 ~ 312
- [9] 徐广, 郭予元, 梁革梅, 等. SDS-苯酚法提取高质量的棉铃虫 DNA [J]. 昆虫知识, 2000, 37 (3): 177 ~ 178
- [10] J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔. 分子克隆实验指南 (第三版) [M]. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等译. 北京: 科学出版社, 2002