技术与方法

蓟马基因组 DNA 提取方法的改进*

张利娟[1,2] 沈登荣[1,2] 张宏瑞[1,2**] 张宏伟[3] 李正跃[1,2]

(1. 云南农业大学农业生物多样性与病虫害控制教育部重点实验室 昆明 650201;
2. 云南农业大学植物保护学院 昆明 650201;3. 普洱市宁洱县农业技术推广中心 普洱 665100)

摘 要 在昆虫分子生物学的研究中,从昆虫样品中有效地获得总 DNA 是分子实验成功的前提。但是,常规提取方法由于不能保留昆虫所有的形态特征,这对于体形较小的珍稀标本是不适用的。文中通过对改进的盐析法和 STE 法与 KAc 法的对比,发现盐析法和 STE 法提取的 DNA 质量明显优于 KAc 法,并且能够通过针刺从单头蓟马中成功提取 DNA 而不影响形态鉴定。2 种提取方法的优点是单头蓟马在提取过 DNA 以后,虫体仍然可用以做成永久玻片进行形态鉴定。提取的 DNA 经实验证明,可以顺利的进行 mtDNA-COI 和 rDNA-ITS2 基因序列引物的扩增。

关键词 蓟马,DNA 提取,PCR

Method improvement for extraction genomic DNA from thrips

ZHANG Li-Juan[1,2] SHEN Deng-Rong[1,2] ZHANG Hong-Rui[1,2**]
ZHANG Hong-Wei[3] LI Zheng-Yue[1,2]

(1. Ministry of Education Key Laboratory of Agriculture Biodiversity for Plant Disease Management, Kunming 650201, China;
2. Plant Protection College, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;
3. Extension Centre of Agricultural Technology, Puer 665100, China)

Abstract To isolate total DNA from insect samples is a crucial prerequisite for successful PCR reactions. However, regular methods for isolating insect DNA can't resolve all the morphological characters of insects. Because these methods destroy insects' morphological characteristics they are obviously not suitable for scarce and small insects such as thrips. In this article, two methods of salting-out and the STE method of extracting genome DNA from individual thrips are compared to KAc. The results suggest that, the quality of DNA samples extracted by the salting-out and STE methods was obviously better and more suitable for PCR than those obtained by the KAc method. Genome DNA was extracted from individual thrips by piercing one side of the specimen's abdomen with a minute, sterilized pin, thereby avoiding destroying their morphological features. Experiments demonstrated that the extracted DNA was suitable for PCR amplification using the sequencing primers Mitochondrial Cytochrome Oxidase I and the ITS2 region of ribosomal DNA.

Key words thrips, DNA extraction, PCR

蓟马是缨翅目 Thysanoptera 昆虫的通称,种类多,分布广。许多种类广泛分布于世界各地。蓟马的食性较复杂,植食性栖花蓟马如西花蓟马 *Franliniella occidentalis*(Pergande)在植物花内活动取食,少数蓟马种类通过取食危害和传播植物病毒造成严重的经济损失,多数蓟马种类在危害的同时也能为植物传播花粉,对植物的繁殖和进化起着有益的作用;有些危害叶片的种类可形成虫瘿,如榕母管蓟马 *Gynaikothrips ficorum*(Marchal)在榕树上形成饺子状的虫瘿,大大降低园林观赏

* 资助项目:农业部公益性行业科研专项项目(200803025)、云南省自然基金面上项目(2007C054M)。

** 通讯作者,E-mail: hongruizh@126.com

收稿日期:2010-10-16,接受日期:2010-12-17

植物的价值，是农作物、林木、果树和园林观赏植物上的重要害虫。一些肉食性蓟马，如横纹蓟马 *Aeolothrips fasciatus* (Linnaeus)、塔六点蓟马 *Scolothrips takahashii* Priesner 等能捕食其它小型节肢动物，如螨类等；国外资料还报道了一些蓟马种类专食杂草，如 *Liothrips urichi* Karny 可用于生物防治，又是重要的农林益虫，具有重要的经济意义。另外，有相当多的蓟马种类，如肯廷冠管蓟马 *Stephanothrips kentingensis* Okajima，在枯枝叶屑中和树皮下，以菌类及其消化产物为食，在森林生态系统中起到重要的作用。因此，对蓟马的分类、鉴定及其起源和进化进行深入研究，对我们防治有害的和利用有益的蓟马具有一定的指导作用。由于蓟马个体微小，属于微型昆虫，体长仅 0.5 ~ 2.0 mm，而且蓟马种内还存在一定的形态变异，仅依靠传统的通过外部形态特征对其种类进行鉴定已经难以满足实际工作的需要。因此，近年来利用分子生物学技术从核酸水平对蓟马进行物种鉴别和探讨其物种的起源、遗传及进化，已成为一种趋势。对于一些微型昆虫来说，能够找到一种合适的提取方法从单个个体中取得高质量的 DNA，是进行分子生物学研究的关键。本文在参考前人工作的基础上(温硕洋和何晓芳，2003；邓顺等，2007；贺红等，2008；滕希等，2009)，提取过程中做了一系列优化和改进，利用改进方法提取缨翅目蓟马的 DNA，可以作为利用 souther 杂交技术、PCR 技术等为核心的分子标记，旨在为今后广泛开展其亲缘关系分析、基因组比较和遗传多态性等分子生物学研究提供一定的基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

用于实验的蓟马标本见表 1。

表 1 蓟马标本的来源和保存方式

Table 1 The sources and ways of preservation of thrips specimens

种名 Species	采集地 Collection site	寄主植物 Host plant	日期 Collection date	保存方式 Way of preservation
花蓟马 *Frankliniella intonsa* (Trybom)	河北省阜城县	油菜 *Brassica napus*	2007 - 7 - 30	无水乙醇(冷藏)
花蓟马 *Frankliniella intonsa* (Trybom)	安徽省黄山市	萝卜 *Daucus carota*	2010 - 6 - 28	无水乙醇(冷藏)
八节黄蓟马 *Thrips flavidulus* (Bagnall)	广西省来宾市	金丝桃 *Hypericum monogynum*	2009 - 8 - 7	无水乙醇(冷藏)
西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* (Pergande)	贵州省兴义市	油菜 *Brassica napus*	2009 - 5 - 10	无水乙醇(冷藏)
茶黄硬蓟马 *Scirtothrips dorsalis* Hood	云南省瑞丽市	柠檬 *Citrus limonum*	2010 - 5 - 6	无水乙醇(冷藏)
普通大蓟马 *Megalurothrips usitatus* (Bagnall)	云南省昆明市	黄豆 *Glycine max*	2009 - 7 - 13	新鲜标本、无水乙醇(冷藏)
狭翅筒管蓟马 *Haplothrips tenuipennis* Bagnall	云南省临沧市	三叶草 *Trifolium repens*	2010 - 6 - 28	无水乙醇(冷藏)
灰莉滑管蓟马 *Liothrips fagraeae* Priesner	云南省昆明市	非洲茉莉 *Fagraea ceilanica*	2010 - 6 - 23	新鲜标本、无水乙醇(冷藏)
端大蓟马 *Megalurothrips distalis* (Karny)	四川省攀枝花市	杜鹃 *Rhododendron pulchrum*	2010 - 5 - 9	无水乙醇(冷藏)
榕母管蓟马 *Gynaikothrips ficorum* (Marchal)	云南省丽江市	小叶榕 *Ficus microcarpa*	2010 - 9 - 1	新鲜标本、无水乙醇(冷藏)
榕母管蓟马 *Gynaikothrips ficorum* (Marchal)	云南省昆明市	小叶榕 *Ficus microcarpa*	2009 - 9 - 14	无水乙醇(冷藏)

1.2　主要药品及仪器

蛋白酶 K、Tris(三羟甲基氨基甲烷)、EDTA(乙二胺四乙酸)、NaCl、SDS(十二烷基硫酸钠)、100% 冰冻乙醇、70% 冷乙醇、r - taq 酶、$MgCl_2$、10 × PCR buffer、dNTPs、BSA、离心机、PCR 仪、快速混匀器、衡温数显水浴锅、电子天平、低温冰箱、电泳仪及其它的各种实验用品和仪器。

1.3　单头蓟马基因组 DNA 的提取方法

1.3.1　盐析法提取　参照(Rugman-Jones *et al.*, 2006)的提取方法,部分步骤有改进。

(1)将单头蓟马从 95% 乙醇保存液中取出,在干燥滤纸上放置 1 ~ 2 min,使虫体上带有的乙醇充分挥发。

(2)将蓟马转移到滴有 2 μL TNES 提取液(0.05 mol/L Tris,pH = 7.5,0.4 mol/L NaCl,0.02 mol/L EDTA,0.5% SDS)的载玻片上,将其载玻片放在解剖镜下,调至视野范围内,先用无菌的微针(昆虫针中的"00"号针为最好)将蓟马的翅展向身体的两侧,而后再用微针从蓟马腹部进行刺穿,一般穿刺以 4 ~ 6 下为宜,根据蓟马种类和个体大小的不同而选择合适的穿刺次数。将刺过的蓟马放入事先装有 10 μL 提取液的 2 mL 的离心管中,而后用移液器吸取 40 μL 的提取液冲洗针头滴入离心管中,再取 48 μL 提取液来回的冲洗载玻片上放蓟马的位置,连同原来的的 2 μL 提取液一同吸入离心管中。

(3)在上述离心管中加入 3μL 的蛋白酶 K(20 mg/mL)。而后将离心管放入 58℃ 水浴锅中水浴 3 ~ 4 h,(在水浴的过程中每 0.5 h 要拿出来混匀一次)。水浴后,先将离心管中的蓟马取出放入 75% 乙醇中,以便做成永久玻片用于种的鉴定,永久玻片的制法参考(Mound and Marullo, 1996;张宏瑞等,2006)关于蓟马玻片的制作方法。

(4)采用盐析法纯化总的 DNA(Sunnucks and Hales, 1996)。再在离心管中加入 30 ~ 40 μL 的 NaCl(5 mol/L),使蛋白质沉淀。常温下 14 000 rpm 离心 5 min,取上清液于另一离心管中。

(5)在装有上清液的离心管中加入其 2 倍体积(96% ~ 100%)的冰冻乙醇,将其在 - 20℃ 的冰箱中放置 1 h,常温下 13 000 rpm 离心 5 min,弃其上清液。

(6)加入与第(5)步相同体积的 70% 冷乙醇(- 20℃ 保存)洗涤 DNA,(14 000 rpm,离心 5 min),弃其上清液,此时便可以看到管底的 DNA 沉淀,然后将管口向下让 DNA 自然干燥。

(7)在干燥后的管中加入(15 ~ 20 μL)的无菌水,溶解 DNA,检测 DNA 的量。

可根据实际需要在 4℃ 或 - 20℃ 的冰箱中保存。

1.3.2　STE 提取法　参照(Gomi *et al.*, 1997)的方法,部分步骤有改进。

(1)将用无菌微针刺穿过的蓟马(蓟马的处理同盐析法)放入装有 30 μL STE 缓冲液(0.1 mol/L NaCl,0.01 mol/L Tris-HCl,0.001 mol/L EDTA,pH = 8)的 2 mL 的离心管中。

(2)加入 2 μL 的蛋白酶 K(20 mg/mL),而后 3 000 rpm 离心 1 min。

(3)58℃ 水浴 3 ~ 4 h,水浴过程中每 0.5 h 拿出来混匀一次。

(4)95℃ 初始变性 5 min。

(5)3 000 rpm 离心 1 min,之后 - 20℃ 保存,取 2 μL 作为 PCR 反应的模板,进行 PCR 的扩增。

1.3.3　KAC 提取法　参考安瑞生等(2002)的方法,部分步骤有改动。

(1)将处理过的蓟马(蓟马的处理同上)转入 2 mL 的离心管中,加入 100 μL 提取液 A(0.05 mol/L Tris—HCl,0.025 mol/L NaCl,0.025 mol/L EDTA,1% SDS)。

(2)60℃ 水浴 1 h,加入 100 μL 提取液 B(3 mol/L KAC,pH = 7.2)冰上放置 1 h 以上,14 000 rpm 离心 5 min 取上清液。

(3)加入 200 μL 的 Tris 饱和酚,混匀,14 000 rpm 离心 5 min,取上清液。

(4)加入 200 μL 的冷无水乙醇,—20℃ 冰箱中放置 1 h 以上。14 000 rpm 离心 10 min,将上清液倒掉。

(5)待离心管自然干燥后,加入 20 μL 的无菌水。

1.4　蛋白核酸分析仪检测

吸取 2 μL 样品 DNA 溶液,用无菌水稀释 100 倍,充分的混合均匀。将仪器先用无菌水校零,而后将待测液转入比色皿中,在蛋白核酸分析仪上测定其在 260 nm 和 280 nm 处的消光值(OD 值)。通过 OD_{260}/OD_{280} 的比值计算 DNA 样品的纯度。

样品浓度(ng/μL) = OD_{260} × 稀释倍数 × 50/1 000。

1.5 PCR 扩增

PCR 的扩增利用的是已经提取出来的总 DNA。然后用特异性引物进行 PCR 反应,以得到目标 mtDNA 和 rDNA 片段。在试验的过程中引用以下引物对 LCO1490 和 HCO2198(Folmer *et al.*, 1994)、mtD-7.2F 和 mtD-9.2R(Brunner *et al.*, 2002)、P1 和 52R(Glover *et al.*, 2010)进行蓟马 PCR 的扩增。LCO1490 和 HCO2198:LCO1490:5′-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3′, HCO2198: 5′-TAAACTTCAGGGTGACCAA AAAATCA-3′。mtD-7.2F 和 mtD-9.2R:mtD-7.2F:5′-ATTAGG AGCHCCHGAYATAGCATT-3′, mtD-9.2R: 5′-CAGGCAAGATTAAAATATAAACTTCTG-3′, P1 和 52R:P1:5′-ATCACTCGGC TCGTGGATCG-3′,52R: 5′-GTTAGT TTCTTTTCCTCCC CT-3′。PCR 的反应体系:单个样品的扩增体积为 50 μL,所用试剂包括 10 × PCR buffer(100 mmol/L Tris-HCl、pH = 8.3,500 mmol/L KCl,15 mmol/L $MgCl_2$)5 μL、dNTPs(各 2.5 mmol/L)4 μL、0.01 mmol/L 的上游和下游引物各 1 μL、TaKaRa Taq(5U/μL)1 μL、BSA(0.5 mg/mL)1 μL、DNA 模板 3 μL、用无菌水定容至 50 μL。扩增的条件:引物(LCO1490、HCO2198 和 P1、52R)的扩增条件,95℃ 预变性 5 min,然后 94℃ 变性 1 min,53℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 1 min 20 s,共 35 个循环,最后在 72℃ 充分延伸 10 min,在 4℃ 的条件下保存。引物(mtD-7.2 F、mtD-9.2 R)的扩增条件,95℃ 预变性 4 min,然后 94℃ 变性 30 s,52℃ 退火 50 s,72℃ 延伸 50 s,共 35 个循环,最后在 72℃ 充分延伸 7 min,在 4℃ 的条件下保存。扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测其纯度及亮度。

1.6 凝胶电泳检测 PCR 扩增产物

将梳子放入电泳胶槽中使其放平摆好,然后按所需浓度(1%)称取琼脂糖(0.3 g)放入三角锥形瓶中,用 0.5 × TBE 定容至 30 μL,将装有琼脂糖溶液的锥形瓶放入微波炉中加热至 3 min 拿出,待胶冷却至 60℃ 左右时,将胶倒入胶槽中,常温下冷却 10 ~ 20 min 左右,使胶凝固后拔去梳子将其推入电泳槽中。将 6 × Loading buffer 和花青素按照 40∶1 的比例混匀,取其混合液体 2 μL 与 2 μL 的 PCR 扩增样品,用移液器充分混匀以后点入胶孔中,Marker 采用的是 DL-2000。而后将胶放入装有 0.5 × TBE 的电泳槽中,胶孔朝向负极,液面约淹没胶面 1 mm 左右,在输出电压 120 V 下电泳 40 ~ 50 min,最后在凝胶成像分析系统中观察结果并照相。

2 结果与分析

图 1 ~ 4 为采用 3 对引物利用 3 种提取方法的扩增图谱。

通过核酸蛋白质分析仪的检测,利用盐析法提取的 DNA 样品的 OD_{260}/OD_{280} 在 1.4 ~ 1.6 之间,说明样品的纯度较高,在正常的提取样品纯度范围之内。样品的浓度在 50 ~ 100 ng/μL 的范围之内,平均浓度 70 ng/μL。利用 STE 法提取的 DNA 样品的 OD_{260}/OD_{280} 的值相对较低,浓度在 70 ~ 110 ng/μL 的范围之内,平均浓度 85 ng/μL。由于此方法在提取的过程中不存在转管现象,以至于纯度相对有些低,但是并不影响其 PCR 的扩增。利用盐析法和 STE 法从单头蓟马中提取出来的基因组 DNA 用 mtDNA-COI 和 rDNA-ITS2 的 3 对随机基因序列引物 LCO1490 和 HCO2198、mtD-7.2F 和 mtD-9.2R、P1 和 52R 扩增(图 1∶A 和图 3∶B)能够看出,条带整齐清晰,可见用这种方法提取的 DNA 质量较好,PCR 扩增结果稳定。KAc 法提取的 DNA 样品纯度在 1.6 ~ 1.8 之间,DNA 的浓度因虫体的大小不同有较大差异,一般介于 20 ~ 120 ng/μL,用同样的 3 对引物进行 PCR 扩增,从(图 4∶A 和图 4∶C)可以看出扩出的条带有时会出现拖尾现象而且条带有些弱,说明此法提取的 DNA 量较少,含有的蛋白质、多糖等杂质较多。

3 讨论

在 DNA 的提取过程中,实验材料的处理和操作过程还要注意以下几个细节:

(1)通常情况下采集回来的蓟马标本都保存在 75% 乙醇中用以永久保存,乙醇浓度高于 90% 虫体容易发脆,不利于永久玻片的制作。而用于提取 DNA 的标本则需要保存在 95% 左右的乙醇中,这就需要我们在提 DNA 之前的 3 ~ 4 h 将蓟马放入 95% 的乙醇中,从而保证提取的质量。

(2)蓟马的水浴时间视虫体的大小而定。一般情况下,管尾亚目 Tubulifera Haliday 的蓟马由

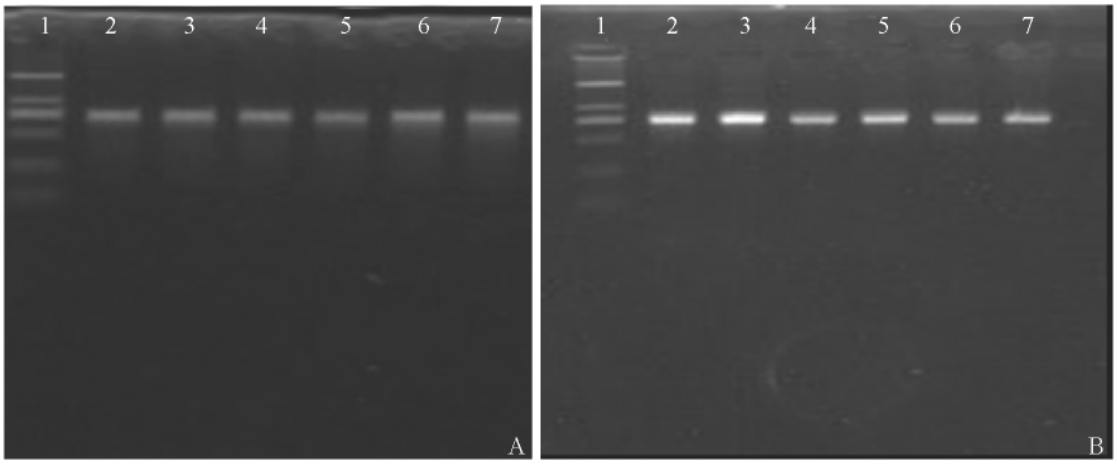


图 1　利用引物 LCO1490 和 HCO2198 的 STE 法(A)和盐析法(B)扩增结果

Fig. 1　Amplification pattern of genomic DNA using the primer pairs of LCO1490 and HCO2198 by "STE" method(A) and "salting-out" method(B)

1:DL2 000 marker;2:**榕母管蓟马** *G. ficorum*;3 ~ 4:**花蓟马** *F. intonsa*;5:**狭翅筒管蓟马** *H. tenuipennis*;6:**灰莉滑管蓟马** *L. fagraeae*;7:**茶黄硬蓟马** *S. dorsalis*

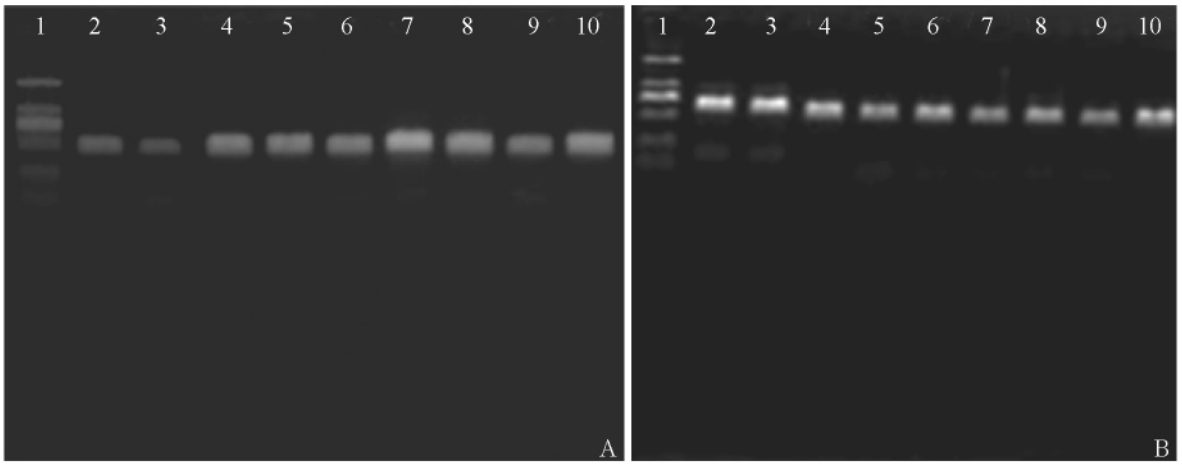


图 2　引物 mtD-7. 2F 和 mtD-9. 2R 的 STE 法(A)和盐析法(B)扩增结果

Fig. 2　Amplification pattern of genomic DNA using the primer pairs of mtD-7. 2F and mtD-9. 2R by "STE" method(A) and "salting-out" method(B)

1:DL2 000 marker;2:**端大蓟马** *M. distalis*;3:**茶黄硬蓟马** *S. dorsalis*;4:**榕母管蓟马** *G. ficorum*;5:**灰莉滑管蓟马** *L. fagraeae*;6:**花蓟马** *F. intonsa*;7:**普通大蓟马** *M. usitatus*;8:**八节黄蓟马** *T. flavidulus*;9:**狭翅筒管蓟马** *H. tenuipennis*;10:**榕母管蓟马** *G. ficorum*

于个体相对大一些可多刺几个孔,故水浴时间可短些,2 ~ 2. 5 h 就可以了,锯尾亚目 Terebrantia Haliday 的蓟马个体较小一般要水浴 3 ~ 4 h。

(3)由于蓟马属于微型昆虫,体长仅 0. 5 ~ 2. 0 mm,所以仅从解剖镜下很难准确的鉴定到种,这就需要在提蓟马 DNA 时尽量保留虫体的完整。所以在刺穿蓟马的过程中,应尽量从蓟马腹部的第二节起用无菌微针刺穿,因为腹部第一节的盾板是蓟马形态鉴定中的主要特征,操作熟练时可以从腹部的一侧进行刺穿,以保证另一侧的完整性,更利于鉴定到种。

改进方法的优点:改进的盐析法和 STE 法不

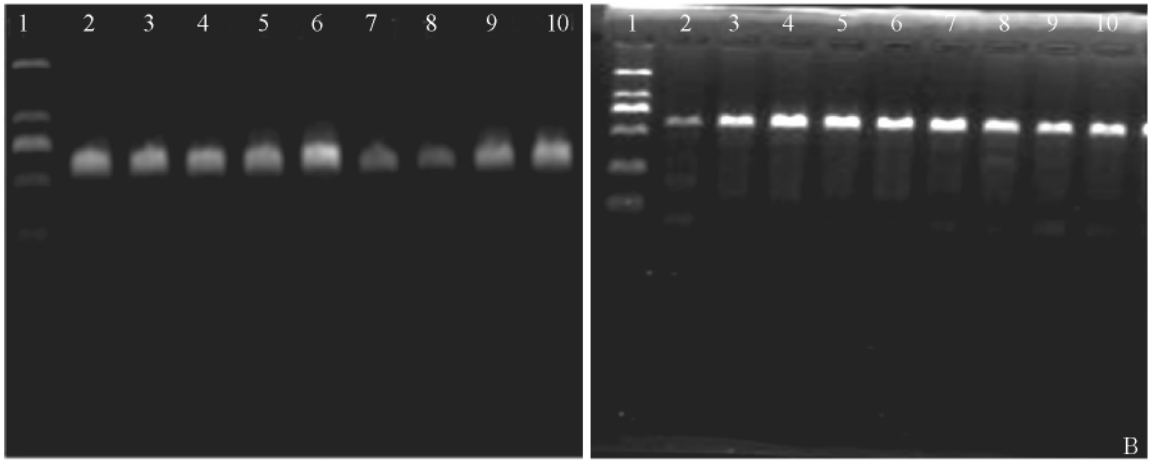


图 3 引物 P1 和 52R 的 STE 法(A)和盐析法(B)扩增结果

Fig. 3 Amplification pattern of genomic DNA using the primer pairs of P1 and 52R by "STE" method(A) and "salting-out" method(B)

1:DL2 000 marker;2 ~ 5:**西花蓟马** *F. occidentalis*;6:**花蓟马** *F. intonsa*;7 ~ 8:**端大蓟马** *M. distalis*;9 ~ 10:**普通大蓟马** *M. usitatus*

仅省去了复杂的抽提纯化过程,而且无需采用低温、液氮,也没有用到酚、氯仿等有毒的试剂。而是直接用蛋白酶 K 消化虫体中溢出的内容物,而且在操作的过程中盐析法仅转移上清液 1 次,STE**法则无需转移上清液,这在较大程度上降低了交叉感染的可能性。另外,与其它方法相比以上 2 种方法具有低成本、省时、经济等特点。**

参考文献(References)

安瑞生,谭声江,陈晓峰,2002. **小型昆虫** DNA **提取时匀浆方法的改进. 昆虫知识,**39(4):311—312.

Brunner PC, Fleming C, Frey JE, 2002. A molecular identification key for economically important thrips species (Thysanoptera: Thripidae) using direct sequencing and a PCR-RFLP-based approach. *J. Agri. Forest Entomol.*, 4: 127—136.

邓顺,张友军,褚栋,2007. **一种提取小型昆虫总** RNA **的有效方法. 昆虫知识,**44(4):593—596.

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *J. Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 3: 294—299.

Gomi K, Gotoh T, Noda H, 1997. Wolbachia having no effect on reproductive incompatibility in Tetranychus Kanzawai Kishida (Acari: Tetranychidae). *J. Appl. Entomol. Zool.*, 32: 485—490.

Glover RH, Collins DW, Walsh K, Boonham N, 2010. Assessment of loci for DNA barcoding in the genus *Thrips* (Thysanoptera: Thripidae). *J. Mol. Ecol. Res.*, 10(1): 51—59.

贺红,魏琮,袁向群,袁锋,2008. **一种提取麦红吸浆虫基因组** DNA **的方法. 昆虫知识,**45(6):984—986.

Mound LA, Marullo R, 1996. The thrips of Central and South America: An Introduction (Insecta: Thysanoptera). Associated Publishers, Gainesville, FL. 37—39.

Rugman-Jones PF, Hoddle MS, Mound LA, Stouthamer R, 2006. Molecular identification key for pest species of *Scirtothrips* (Thysanoptera: Thripidae). *J. Econ. Entomol.*, 99(5): 1813—1819.

Sunnucks P, Hales DF, 1996. Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). *J. Mol. Biol. Evol.*, 13: 510—524.

滕希,武强,万方浩,2009. **盐析法提取烟粉虱基因组** DNA. **生物技术通报,**(8):166—168.

温硕洋,何晓芳,2003. **一种适用于昆虫痕量** DNA **模板制备的方法. 昆虫知识,**40(3):276—279.

张宏瑞,Okajima S,Mound LA,2006. **蓟马采集和玻片标本的制作. 昆虫知识,**43(5):725—728.