微流控芯片技术用于三种小蠹 COⅠ-COⅡ区的 PCR-RFLP 分析*

张龙霞[1**] 李惠萍[2***] 裴雁曦[1]

(1. 山西大学生命科学学院 太原 030006; 2. 山西出入境检验检疫局 太原 030024)

摘 要 本研究运用 PCR-RFLP 对红脂大小蠹 *Dendroctonus valens* LeConte、长毛干小蠹 *Hylurgops longipilis* Reiher 和六齿小蠹 *Ips acuminatus* Gyllenhal mtDNA 的 COⅠ-COⅡ基因进行扩增。通过酶切位点的分析比较,筛选特异性的内切酶,结合微流控芯片技术对酶切产物进行快速检测。建立 3 种小蠹的准确、快速区分鉴定方法。

关键词 微流控芯片技术,红脂大小蠹,长毛干小蠹,六齿小蠹,PCR-RFLP

Analysis of PCR-RFLP data on the COⅠ-COⅡ gene of three bark beetle species (Coleoptera: Scolytidae) by microfluidics

ZHANG Long-Xia[1**] LI Hui-Ping[2***] PEI Yan-Xi[1]

(1. College of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;
2. Shanixi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Taiyuan 030024, China)

Abstract PCR-RFLP was used to amplify and analyze the COⅠ-COⅡ genes in the mtDNA of *Dendroctonus valens* LeConte, *Hylurgops longipilis* Reiher and *Ips acuminatus* Gyllenhal. Specific restriction enzymes were screened by comparison of restriction recognition sites. The amplified gene fragments could be analyzed quickly by microfluidics following enzyme digestion. The results indicate that this technique can accurately and rapidly identify these three beetle species.

Key words microfluidics, *Dendroctonus valens*, *Hylurgops longipilis*, *Ips acuminatus*, PCR-RFLP

红脂大小蠹 *Dendroctonus valens* LeConte、六齿小蠹 *Ips acuminatus* Gyllenhal、长毛干小蠹 *Hylurgops longipilis* Reiher 是松属(*Pinus* L.)植物的常见共栖寄生昆虫,主要危害马尾松、赤松、华山松、油松、樟子松、黑松等(刘丽, 2008),以成虫和幼虫蛀害松树嫩梢、枝干或伐倒木,引起油松林大面积死亡,造成严重的经济损失,因此成为高危险性的森林害虫(李计顺等,2001;苗振旺等,2001)。其中外来入侵种——红脂大小蠹近年来危害较重,扩散迅速(苗振旺等,2004),已被国家和部分省区列为检疫性害虫,是林木进出境和调运的重点关注对象(徐洪儒等,2006)。

目前,昆虫的形态鉴定仍是植物检疫中的重要方法,但对形态相似的种类或卵及幼虫,形态学的方法很难对其做出准确鉴定,因此一些先进的技术和方法已被尝试用于植物检疫鉴定。分子生物学技术能够帮助人们获得不同物种间存在的基因差异,从分子水平提高物种间遗传进化关系研究的准确性(马建等,2010),因此昆虫的分子鉴定技术越来越受到人们的重视,如吴佳教等(2005)利用 PCR-RELP 技术成功地对口岸截获频率较高的 9 种检疫性实蝇进行快速鉴定。近年来发展起来的微流控芯片技术因其采用纳米材料、灵敏度很高、速度快,被广泛用于各个领域,特别是与高灵敏检测方法结合,开辟了检测技术的应用新途径(王新珏等,2011);但目前国内有关微流控芯片

* 资助项目:国家质检总局风险分析专项和重大植物疫情监测和风险预警关键技术研究(2008IK264)。

** E-mail: 514zlxsd@163.com

*** 通讯作者,E-mail: lihyyuiping@163.com

收稿日期:2011-09-22,接受日期:2011-11-17

技术用于生物种类鉴定的报道不多，因此将微流控芯片技术应运于红脂大小蠹及其共栖相似种的鉴定是一种创新性尝试。

本研究将微流控芯片技术与 PCR-RFLP 相结合，用于 3 种小蠹 COⅠ-COⅡ区的差异分析，以期建立快速、准确、灵敏度高的鉴定方法，提高检疫效率，加强阻截外来入侵种的能力。

1　材料与方法

1.1　材料

红脂大小蠹、长毛干小蠹和六齿小蠹均采自油松（*Pinus tabulaeformis* Carr.）。

1.2　试剂及仪器

1.2.1　试剂　CTAB、EDTA、TRIS 购自上海索莱宝生物科技有限公司；蛋白酶 K、RNA 酶、OMGE 胶回收试剂盒、*Eco*RI 购自宝生物工程（大连）有限公司；Agarose Invitrogen 购自上海贸易公司；β-巯基乙醇购自美国 Amresco。

1.2.2　仪器　安捷伦 2100 芯片生物分析仪（美国）、Bio-RAD Power Pac 300 电泳系统（美国伯乐）、GENE GENIUS 全自动凝胶成像分析系统（英国 Syngene）、ZF-Ⅰ型三用紫外分析仪（上海）、Miniplus 离心机（德国 Eppendorf）、EYEL4 投入式恒温水槽（日本）。

1.3　样品全基因组 DNA 提取

在显微镜下挑取未被微生物感染的 3 种小蠹虫各一头，用无水乙醇清洗 3 次，再用蒸馏水浸泡清洗 3 次，将虫体晾干备用。用 CTAB 法提取基因组（Boyce *et al.*，1989；林万华等，2006）。

1.4　PCR 扩增筛选

本试验选用 Provencher 等（2005）及 Simon 等（1994）报道的昆虫基因组研究中常用的 3 对引物进行扩增筛选，引物由 TARAKA 合成。

引物Ⅰ：C1-J-2753ywr（5′-GTAAACCTAACATTTTTYCCWCARCA-3′）和 C2-N-3662（5′-CCACAAATTTCTGAACATTGACC-3′）；

引物Ⅱ：Y-J-1460（5′-TACAATTTA TCG CCTAAA CTTCAGCC-3′）和 TL2-N-3014（5′-TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3′）；

引物Ⅲ：TL2-J-3037（5′-ATGGCAGATTAGTGCAATGG-3′）和 TK-N-3785（5′-GTTTAAGAGACCAGTACTTG-3′）。

扩增体系：*Taq* DNA 聚合酶 0.3 U、dNTP 4 μL、10 × Buffer 5 μL、上下游引物各 2 μL，模板 5 μL，ddH_2O 补足 50 μL。扩增条件：95 ℃ 2 min 后，按 94 ℃，1 min；50 ~ 40℃（－2℃/1 cycle），1 min；72 ℃，2 min 进行 33 个循环，72 ℃，10 min。4℃保存。

扩增结束后取 5 μL PCR 反应产物，以 1 × TAE 缓冲液、1% 琼脂糖凝胶电泳，附带 Marker 检测。

1.5　PCR 产物纯化

将 50 μL PCR 反应产物用 1% 琼脂糖凝胶，在 1 × TAE 缓冲液中进行电泳，大约 40 min 后，利用 OMGE 胶回收试剂盒对其进行纯化。

1.6　酶切反应

选取常用的限制性核酸内切酶 *Eco*RI、*Apa* Ⅰ、*Eco*R Ⅴ、*Sac* Ⅱ进行酶切反应。

反应体系：10 × HBuffer 2 μL、*Eco*RI 3 μL、模板 8 μL、ddH_2O 补足 20 μL。

反应条件：37℃水浴过夜。

1.7　色谱分析

运用安捷伦 2100 芯片生物分析仪对酶切反应液进行检测分析。

2　结果与分析

2.1　3 种小蠹虫基因组 DNA 电泳图谱

采用 CTAB 法对 3 种小蠹虫全基因组提取后，用 1% 琼脂糖凝胶电泳，结果见图 1。从电泳结果来看，DNA 条带清晰，无拖尾降解现象，可用于特定核酸序列的扩增和测序等试验。

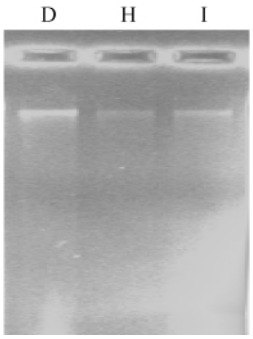

图 1　3 种小蠹虫基因组 DNA

Fig. 1　The genomic DNA of three bark beetle species

D 代表红脂大小蠹 *Dendroctonus valens*；H 代表长毛干小蠹 *Hylurgops longipilis*；I 代表六齿小蠹 *Ips acuminatus*.

2.2　扩增图谱分析

采用 3 对引物对 3 种小蠹虫基因组 DNA 进行 PCR 扩增后,得到扩增片段的图谱及大小(图 2)。引物Ⅰ的扩增片段约为 1 000 bp,条带清晰、单一、亮度高;引物Ⅱ的扩增片段大小约为 2 000 bp,但有其它杂带,且不稳定;引物Ⅲ对于红脂大小蠹无特异条带;因此选取用引物Ⅰ扩增的产物进行酶切反应。

2.3　特异性内切酶的确定

运用 *Eco*RI、*Apa*Ⅰ、*Eco*RⅤ、*Sac*Ⅱ对引物Ⅰ扩增的 3 种小蠹虫 PCR 产物进行酶切反应,结果显示 *Apa*Ⅰ、*Eco*RⅤ、*Sac*Ⅱ对引物Ⅰ扩增的相应片段没有酶切位点,只有 *Eco*RI 存在酶切位点。

2.4　微流控芯片技术对酶切产物的检测分析

采用微流控芯片技术对 *Eco*RI 的酶切片段进行上机分析,结果显示:*Eco*RI 对 3 种蠹虫 COⅠ-COⅡ扩增片段的酶切位点不同(表 1),对长毛干小蠹没有酶切位点,对红脂大小蠹和六齿小蠹存在一个酶切位点(图 3),但酶切片段大小不同。电泳色谱图(图 3)显示:红脂大小蠹的酶切位点在 244 bp 处,酶切片段大小为 244 bp 和 691 bp;六齿小蠹的酶切位点在 335 bp 处,酶切片段大小为 335 bp 和 572 bp。因此 *Eco*RI 可作为 3 种蠹虫 COⅠ-COⅡ序列分析的特征内切酶,可对红脂大小蠹、长毛干小蠹和六齿小蠹进行准确区分鉴定。

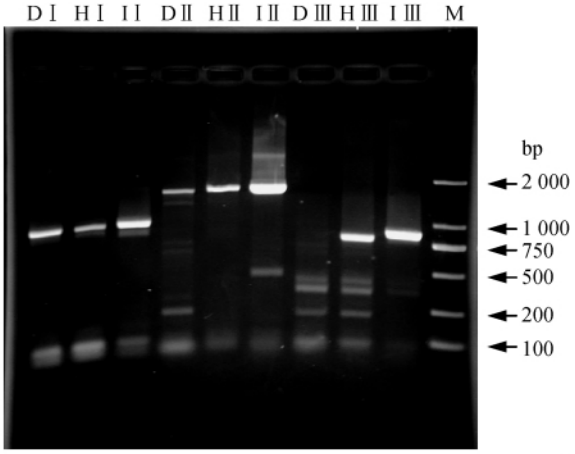

图 2　3 种小蠹虫基因扩增电泳图

Fig. 2　Amplification of the COⅠ-COⅡ gene of three kinds of Scolytidae

M:maker;DⅠ、HⅠ、IⅠ:引物Ⅰ扩增的红脂大小蠹、长毛干小蠹、六齿小蠹基因片段;DⅡ、HⅡ、IⅡ:引物Ⅱ扩增的红脂大小蠹、长毛干小蠹、六齿小蠹基因片段;DⅢ、HⅢ、IⅢ:引物Ⅲ扩增的红脂大小蠹、长毛干小蠹、六齿小蠹基因片段。

M:maker; DⅠ,HⅠ,IⅠ: the amplified gene fragment of *Dendroctonus valens*, *Hylurgops longipilis* and *Ips acuminatus* using primer Ⅰ; DⅡ,HⅡ,IⅡ: the amplified gene fragment of *Dendroctonus valens*, *Hylurgops longipilis* and *Ips acuminatus* using primer Ⅱ; DⅢ,HⅢ,IⅢ: the amplified gene fragment of *Dendroctonus valens*, *Hylurgops longipilis* and *Ips acuminatus* using primer Ⅲ.

表 1　*Eco*RI 对 3 种小蠹的酶切结果

Table 1　Digestion results of COⅠ-COⅡ gene from three bark beetle species by *Eco*RI

种类 Species	酶切位点数 Number of restriction enzyme sites	酶切位点序列 Sequence of restriction enzyme sites	酶切位点 Restriction enzyme sites	酶切片段长度(bp) Size of restriction enzyme sites
红脂大小蠹 *Dendroctonus valens*	1	G/AATTC	244	244,691
长毛干小蠹 *Hylurgops longipilis*	0	G/AATTC	无	920
六齿小蠹 *Ips acuminatus*	1	G/AATTC	335	335,572

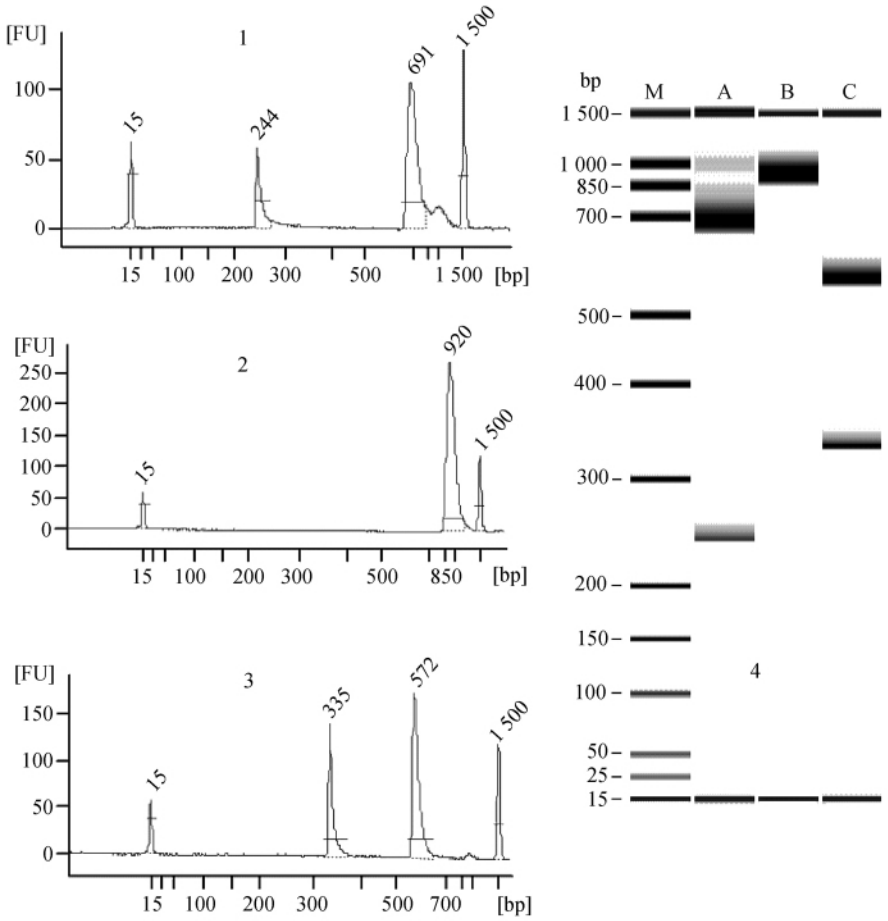

图 3　3 种小蠹酶切电泳色谱图及模拟电泳图

Fig. 3　Enzyme digestion electropherogram and analog electrophoresis of three bark beetle species

1:红脂大小蠹; 2:长毛干小蠹; 3:六齿小蠹; 4:3 种蠹虫模拟电泳图。

1: *Dendroctonus valens*; 2: *Hylurgops longipilis*; 3: *Ips acuminatus*; 4: analog electrophoresis of three bark beetle species.

3　讨论

红脂大小蠹、长毛干小蠹和六齿小蠹成虫从显微形态易于区分,但其幼虫非常相似,且共生于同一寄主中,很难区分。本实验运用 PCR-RFLP 分子标记方法从分子水平确定其基因差异,并引入微流控芯片检测新技术,建立了快速区分 3 种小蠹的方法,不仅可对成虫,而且对各个生物虫态均能区分鉴定,特别是方便了对检疫性红脂大小蠹的现场查验。

微流控芯片技术是通过采用玻璃、石英或各种聚合物材料加工成微米、纳米级通道,以高压直流电场为驱动力,对样品进行进样、分离及检测,大大提高了检测速度和灵敏度(董娅妮和方群,2008)。传统琼脂糖凝胶电泳对 DNA 片段的分辨率约为 100 bp,只能区分相差 100 bp 以上的 DNA 片段,对于一些低聚物条带常模糊不清(吕冬霞,2010)。而微流控芯片技术对 DNA 的分辨率精确到 2 ~5 bp,同时检测样品量仅为 1 μL,检测时间大大缩短,因此该技术为区分基因差异极小的相近种提供了有效手段,在准确诊断检疫性有害生物及推动生物物种系统遗传研究有着广阔应用前景(王翠娟等,2007)。

参考文献(References)

Boyce TM, Zwick ME, Aquado CF, 1989. Mitochondrial DNA in the pine weevil: size structure and heterophasmy. *Gen. Soc. Am.*, 123(4):825—836.

Provencher LM, Morse GE, Weeks AR, Normark BB, 2005. Parthenogenesis in the *Aspidiotus nerii* complex

(Hemiptera: Diaspididae): a single origin of aworldwide, polyphagous lineage associated with *Cardinium bacteria*. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 98(5):629—635.

Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P, 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 87(6):651—701.

董娅妮，方群，2008. 微流控芯片毛细管电泳在蛋白质分离分析中的应用研究进展. 色谱，26(3):269—273.

李计顺，常国彬，宋玉双，王艺伟，常宝山，2001. 实施工程治理,控制红脂大小蠹虫灾——对红脂大小蠹爆发成因及治理对策的探讨. 中国森林病虫，20(4):41—44.

林万华，黎宗展，陈振鹏，周善义，2006. 昆虫全基因组 DNA 的保存及提取. 广西师范大学学报(自然科学版)，24(2):86—88.

刘丽，2008. 青海云杉天然林小蠹虫种类、生态位与监测技术研究. 硕士学位论文. 北京:北京林业大学.

吕冬霞，2010. 细胞生物学技术. 北京:科学出版社. 273.

马建，李成德，邓立文，杜文胜，2010. 基于 COⅠ基因限制性内切酶谱差异对几种杨树蛀干害虫幼虫的辅助鉴别. 东北林业大学学报，38(5):84—87.

苗振旺，张钟宁，王培新，郭玉永，孙江华，2004. 外来入侵害虫红脂大小蠹对寄主挥发物的反应. 昆虫学报，47(3):360—364.

苗振旺，周维民，霍履远，王晓丽，范俊秀，赵明梅，2001. 强大小蠹生物学特性研究. 山西林业科技，41(1):34—37.

王翠娟，邵华，张放，2007. 微流控芯片技术在基因分析研究中应用. 中国公共卫生，27(7):829—831.

王新珏，祝莹，方群，2011. 基于微流控芯片的色谱技术的研究进展及其应用. 色谱，29(2):99—104.

吴佳教，胡学难，赵菊鹏，梁帆，梁广勤，2005. 9 种检疫性实蝇 PCR-RELP 快速鉴定研究. 植物检疫，19(1):2—6.

徐洪儒，李颖超，李镇宇. 2006. 红脂大小蠹在中国成灾原因及扩散趋势分析. 植物检疫，20(5):278—281.