

技术与方法

二种大实蝇的 PCR-RFLP 快速鉴定方法^{*}林丽莉¹ 吴佳教^{2**} 曾 玲¹ 梁广文¹ 胡学难² 莫仁浩²

(1. 华南农业大学昆虫生态研究室 广州 510642; 2 广东检验检疫技术中心 广州 510623)

Rapid identification of two species of *Tetradacus* by PCR-RFLP. LIN Li-Li¹, WU Jia-Jiao^{2**}, ZENG Ling¹, LIANG Guang-Wen¹, HU Xue-Nan², MO Ren-Hao² (1. *Laboratory of Insect Ecology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China*; 2. *Guangdong Inspection and Quarantine Technology Center, Guangzhou 510623, China*)

Abstract The rapid molecular diagnostic technique for identification of *Bactrocera* (*Tetradacus*) *tsuneonis* and *Bactrocera* (*Tetradacus*) *minax* was based on PCR-RFLP of the mitochondrial DNA (mtDNA) and ribosomal DNA (rDNA). With four pairs of primers and five restriction endonucleases (*Mn*I, *Mse*I, *Ase*I, *Dra*I and *Ssp*I), these two species can be discriminated according to the restrictive patterns. The result was not affected by the geographical origins, host plants of the fruit flies, or even the life stages, sexes and preservation of the individuals. This method should be useful in production and quarantine application.

Key words *Bactrocera* (*Tetradacus*) *tsuneonis*, *Bactrocera* (*Tetradacus*) *minax*, PCR-RFLP, COII, ITS1

摘 要 应用 PCR-RFLP 技术, 对我国部分地区发生分布的蜜柑大实蝇和橘大实蝇开展了分子生物学鉴定方法研究。结果表明, 利用 4 组引物对目标实蝇的 CO II 和 ITS1 基因进行 PCR 扩增, 并借助 *Mn*I, *Mse*I, *Ase*I, *Dra*I 和 *Ssp*I 等 5 种限制性内切酶对扩增产物进行酶切, 能从多个途径把 2 种大实蝇区分开。所建立的方法不受目标实蝇食物源、地理来源和标本保存条件的影响, 对不同虫态和不同性别的个体均适用, 可在生产和检疫实践中对蜜柑大实蝇和橘大实蝇进行快速鉴定。

关键词 蜜柑大实蝇, 橘大实蝇, PCR-RFLP, COII, ITS1

蜜柑大实蝇 *Bactrocera* (*Tetradacus*) *tsuneonis*^[1] 与橘大实蝇 *Bactrocera* (*Tetradacus*) *minax*^[1] 属双翅目 Diptera 实蝇科 Tephritidae 寡毛实蝇属 *Bactrocera* 大实蝇亚属 *Tetradacus*, 是国际上关注的危险性害虫, 同时也是我国重要的国内检疫对象。

蜜柑大实蝇和橘大实蝇在我国主要柑橘产区如广西、贵州、四川、湖南等局部地区均有发生和分布^[2~7]。这 2 种大实蝇的外部形态十分相似, 长期以来, 主要是以成虫体上的鬃序分布及其数量和雌虫的产卵器特征作为区分依据^[1,8]。但是, 成虫体鬃的分布及其数量在个体间常有变异^[9], 这给鉴定, 尤其是雄成虫的鉴定带来一定的困难。此外, 2 种大实蝇从卵饲养

至成虫均需经历 160 ~ 200 d 的漫长的蛹期^[1,10], 这使它们的幼体更是难以鉴定。然而, 2 种大实蝇都主要以幼虫蛀果为害, 并主要以卵、幼虫和蛹随寄主果实、土壤或运输工具作远距离传播, 所以, 在实际生产和检疫工作中更常见的却是对实蝇幼体的鉴定。

目前, 有关蜜柑大实蝇和橘大实蝇快速鉴定方法的研究仅见于汪兴鉴等的报道, 他们利用血淋巴蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳成功区

^{*} 广东省自然科学基金项目资助(04020713); 广东省科技厅科学事业项目资助(2004B20501006)。

^{**} 通讯作者 Email: WuJJ@iqtc.cn

收稿日期: 2006-08-16, 修回日期: 2006-10-12, 接受日期: 2007-

分了大实蝇的 3 龄幼虫^[1], 然而, 该方法只局限于对大实蝇 3 龄幼虫的鉴定, 因此在推广应用上受到限制。本研究拟从分子生物学角度, 借助 PCR-RFLP 分子标记技术探索 2 种大实蝇快速鉴定方法, 以满足生产和检疫实践的需求。

1 材料与方法

1.1 供试标本

本实验所用的大实蝇标本是来源于广西、湖南等柑橘产区的新鲜、烘干和酒精浸泡标本,

参照汪兴鉴等报道的方法^[1] 对大实蝇进行形态学鉴定。

1.2 主要试剂

1.2.1 引物: 实验所用引物详见表 1。其中, FFCIQPA 和 FFCIQPC 2 对引物根据相关实蝇线粒体 DNA (mtDNA) CO II 序列设计; 引物 baITS1f、BcucomR 和 DacusR 则根据相关实蝇核糖体 DNA (rDNA) ITS1 序列设计。引物皆由上海博亚生物技术有限公司合成。

表 1 PCR 引物(从 5' 到 3' 端)

引物代码	扩增基因	引物序列	Tm 值(°C)
FFCIQPAF	CO II	ATCCAACATCGAGGTCGCAAAC	57.7
FFCIQPAR		GGCTGGTATGAACGGTTCGACGAG	63
FFCIQPCF	CO II	AAACTAGATACCTTTATAAAC	45.9
FFCIQPCR		GTAACATAGTAGATGTACCGGAA	54.2
baITS1f	ITS1	GGAAGGATCATTATTGTGTTC	53.9
BcucomR		TTTTCAACCCAAACATTACAAGT	51
baITS1f	ITS1	GGAAGGATCATTATTGTGTTC	53.9
DacusR		GAATGCTTAGTTCAACAAAAACAT	51.4

1.2.2 酶及其他试剂: 实验所用的 Taq 酶、PCR 反应体系试剂(dNTPs、10× buffer 和 Mg²⁺)、琼脂糖、EB 均购自华美生物工程公司。100 bp 和 41 bp Ladder Marker 分别购自日本 TOYOBO 公司和北京鼎国生物技术有限责任公司。限制性内切酶 *Mnl* I, *Mse* I, *Ase* I 和 *Ssp* I 购自英国 BioLabs 公司, *Dra* I 购自日本 TOYOBO 公司。

1.3 方法

1.3.1 DNA 提取: 切取供试实蝇部分个体, 放入 1.5 mL 微离心管中, 加入一定量的提取缓冲液 A (10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 10 mmol/L EDTA, 60 mmol/L NaCl, 50%蔗糖), 用烧熔后的枪头将样品磨碎, 然后加入等体积的缓冲液 B (300 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 100 mmol/L EDTA, 0.1 V 10% SDS, 50%蔗糖), 冰浴 10 min。加入等体积的苯酚, 混合后离心 5 min, 离心条件为 4℃, 14 000 r/min(下同)。吸取上清液, 加入等体积的苯酚、氯仿、异戊醇混合液, 混合比例为 25:24:1, 混合后离心 5 min。吸取上清液, 加入等体积的氯仿:异戊醇混合液(24:1), 混合

后再离心 5 min。吸取上清液, 用 2 倍体积的冷冻无水乙醇和 0.1 倍体积的 3 mol/L 醋酸铵溶液沉淀, 置于-20℃冷冻 30 min 以上。冷冻后取出, 离心 20 min, 弃去上清液, 用 70%乙醇洗沉淀物 1 次, 弃去乙醇。风干, 加入 1×TE 30 至 100 μL, 4℃下保存备用。

1.3.2 PCR 扩增反应: PCR 扩增体系包括: 1.5 × Buffer, dNTPs(0.2 mmol/L), 引物(各 0.4 μmol/L), Mg²⁺ (1.5 mmol/L), DNA 1 μL, Taq 酶 1 U, 加 ddH₂O 至总反应体积达 25 μL。

PCR 扩增条件为: 94℃预变性 3 min, 94℃变性 45 sec, 56℃退火 60 sec, 72℃后延伸 90 sec, 35 个循环后, 72℃后延伸 10 min。

扩增反应在梯度 PCR 仪(EXPRESS-G 型)上进行。

1.3.3 酶切反应: 在 15 μL 反应体系中加入 10 μL PCR 产物, 3 U 内切酶, 1×buffer, 最后加 ddH₂O 至 15 μL, 将上述混合液置 37℃水浴 2~3 h。

1.3.4 产物检测: 使用 1×TBE 缓冲液制作

2%~4%的琼脂糖凝胶,取5~8 μ L PCR 扩增产物或酶切产物进行电泳检测,用100 bp 或41 bp Ladder Marker 作为标准分子量标记,以电压约为5 V/cm 的条件下电泳1~2 h,然后将凝胶置于溴化乙锭(1 μ g/mL)中染色30 min 左右,最后在凝胶成像系统(Bio-Print 型)中成像,并用Biocapt 软件拍照分析。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果

用FFCIQPA、FFCIQPC、baITS1f-BcucomR 和baITS1f-DacusR 4 对引物对所提取的DNA 进行扩增,扩增产物电泳结果如图1 所示。结果表明,引物FFCIQPA 和引物FFCIQPC 对2 种大实蝇CO II 基因扩增片段分别均为350 bp 和450 bp。扩增片段大小在2 种间没有差别,不能只凭借PCR 扩增产物将2 种大实蝇区分开。baITS1f-BcucomR 对蜜柑大实蝇和橘大实蝇ITS1 基因扩增的片段分别约为680 bp 和590 bp;baITS1f-DacusR 对蜜柑大实蝇和橘大实蝇ITS1 基因扩增的片段则分别为660 bp 和550 bp。上述2 对引物对2 种大实蝇ITS1 基因扩增片段的大小差别不大,也无法借助PCR 扩增产物较直观地将它们区分开来。

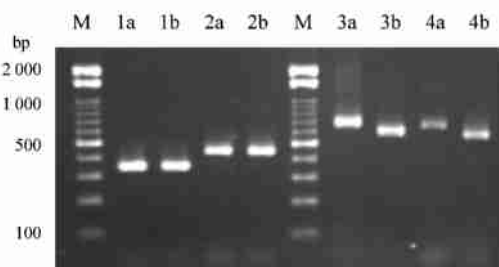


图1 蜜柑大实蝇和橘大实蝇的CO II 和ITS1 基因PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

M. 100 bp ladder a. 蜜柑大实蝇 b. 橘大实蝇 1. 二种实蝇的引物FFCIQPA 扩增产物 2 二种实蝇的引物FFCIQPC 扩增产物 3 二种实蝇的引物baITS1f-BcucomR 扩增产物 4. 二种实蝇的引物baITS1f-DacusR 扩增产物

2.2 酶切结果

选取了多种限制性内切酶对上述扩增产物进行酶切,其中*Mnl* I、*Mse* I、*Ase* I、*Dra* I 和

Ssp I 等5 种内切酶的酶切结果如下所述。

2.2.1 FFCIQPA 引物扩增产物的酶切结果:限制性内切酶*Mnl* I 对2 种大实蝇的FFCIQPA 引物扩增产物的酶切结果(图2)显示,蜜柑大实蝇有1 个酶切位点,被切成2 条带;而橘大实蝇没有酶切位点,因此,容易借助酶切位点数将2 种大实蝇区分开。其他4 种内切酶则无法将2 种大实蝇的FFCIQPA 扩增产物区分开来(结果未在文中列出)。

2.2.2 FFCIQPC 引物扩增产物的酶切结果:2 种大实蝇的FFCIQPC 引物扩增产物可分别被内切酶*Mse* I、*Ase* I 和*Ssp* I 所区分(见图2)。其中,*Mse* I 对橘大实蝇有2 个切点,对蜜柑大实蝇只有1 个切点。*Ase* I 则只对蜜柑大实蝇有1 个切点,对橘大实蝇不具切点。利用这2 种酶,通过酶切位点数的不同可区分2 种大实蝇。而*Ssp* I 虽对蜜柑大实蝇和橘大实蝇均有2 个切点,但根据酶切片段的的大小不同也可将其区分。*Mnl* I 和*Dra* I 无法区分2 种大实蝇的FFCIQPC 扩增产物(结果未在文中列出)。

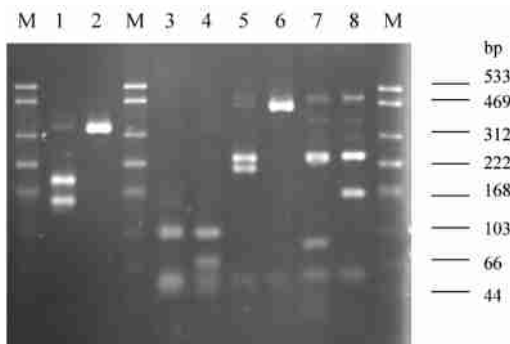


图2 *Mnl* I (1~2), *Mse* I (3~4), *Ase* I (5~6)和*Ssp* I (7~8)2 种大实蝇CO II 基因的酶切电泳图

M. 41bp-ladder 1. 蜜柑大实蝇引物FFCIQPA 扩增产物 2 橘大实蝇FFCIQPA 扩增产物酶切结果 3. 5. 7. 蜜柑大实蝇引物FFCIQPC 扩增产物酶切结果 4 6 8 橘大实蝇引物FFCIQPC 扩增产物酶切结果

2.2.3 baITS1f-BcucomR 引物扩增产物的酶切结果:2 种大实蝇的baITS1f-BcucomR 引物扩增产物可分别被*Dra* I 和*Ssp* I 2 内切酶区分,酶切图谱如图3 所示。*Dra* I 对2 种大实蝇的扩增产物均有1 个切点,但酶切片段的的大小明显

不同。*Ssp* I 则对 2 种大实蝇的扩增产物具有不同的酶切位点数, 其中, 蜜柑大实蝇具有 1 个切点, 呈现 2 条谱带; 橘大实蝇有 2 个切点, 呈 3 条谱带, 容易区分。其余 3 种内切酶不能较理想地区分 *baITS1f-BcucomR* 扩增产物(结果未在文中列出)。

2.2.4 *baITS1f-DacusR* 引物扩增产物的酶切结果: 与 *baITS1f-BcucomR* 引物扩增产物的酶切结果相似, 2 种大实蝇的 *baITS1f-DacusR* 引物扩增产物也能被 *Dra* I 和 *Ssp* I 酶切区分(图 3), 2 种酶对蜜柑大实蝇的产物都只有 1 个切点, 对橘大实蝇则皆具 2 个切点。其余 3 种内切酶不能较理想地区分 *baITS1f-DacusR* 扩增产物(结果未在文中列出)。

上述各酶切产物的片段大小见表 2。

上述结果表明, 借助 FFCIQPA、FFCIQPC、*baITS1f-BcucomR* 和 *baITS1f-DacusR* 4 对引物及 *Mnl* I , *Mse* I , *Ase* I , *Dra* I 和 *Ssp* I 5 种限制

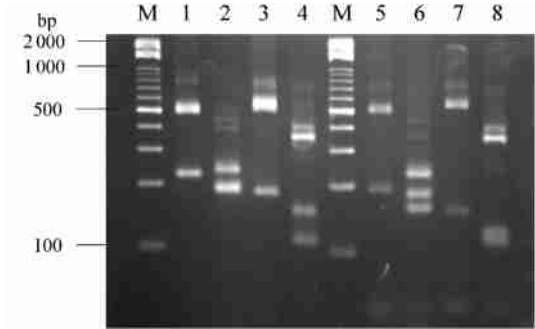


图 3 *Dra* I (1~2, 5~6)和 *Ssp* I (3~4, 7~8)对 2 种大实蝇 *ITS1* 基因的酶切电泳图
M. 100 bp-ladder 1, 3. 蜜柑大实蝇引物 *baITS1f-BcucomR* 扩增产物酶切结果 2, 4. 橘大实蝇引物 *baITS1f-BcucomR* 扩增产物酶切结果 5, 7. 蜜柑大实蝇引物 *baITS1f-DacusR* 扩增产物酶切结果 6, 8. 橘大实蝇引物 *baITS1f-DacusR* 扩增产物酶切结果

性内切酶的相应搭配能从多个途径、较好地对蜜柑大实蝇与橘大实蝇进行区分。

表 2 不同限制性内切酶对两种大实蝇扩增序列酶切片段大小(bp)

限制性 内切酶	种类	引物		引物		引物			引物		
		FFCIQPA		FFCIQPC		baITS1f-BcucomR			baITS1f-DacusR		
<i>Mnl</i> I	蜜柑大实蝇	189	154								
	橘大实蝇	341									
<i>Mse</i> I	蜜柑大实蝇		105	57							
	橘大实蝇		104	72	57						
<i>Ase</i> I	蜜柑大实蝇		234	215							
	橘大实蝇		447								
<i>Ssp</i> I	蜜柑大实蝇		238	92	60	538	191		538	156	
	橘大实蝇		238	167	60	356	158	116	349	125	112
<i>Dra</i> I	蜜柑大实蝇					510	228		510	197	
	橘大实蝇					235	197		226	183	161

2.3 酶切结果稳定性

将橘大实蝇不同虫态、不同性别的个体, 用上述方法以 *baITS1f-DacusR* 为引物进行 PCR 扩增(图 4), 并用限制性内切酶 *Dra* I 对扩增产物进行酶切分析(图 5), 所得的扩增和酶切谱带在不同个体中完全一致。此外, 以同样的方法对取食不同寄主和不同来源的橘大实蝇, 以及不同虫态、不同性别、不同寄主和不同来源的蜜柑大实蝇分别进行 PCR-RFLP 测试, 所得到的扩增和酶切结果在同种实蝇的不同虫态、不同性别、不同寄主及不同来源的个体中是完全一

致的(相应的电泳图未列出), 这表明, 所确立的快速鉴定方法不受蜜柑大实蝇与橘大实蝇的个体来源、寄主、虫态和性别的影响, 具有较高的稳定性。

3 结论与讨论

(1)本研究结果表明, 蜜柑大实蝇与橘大实蝇的 *CO II* 和 *ITS1* 基因具有明显的多态性, 通过 PCR-RFLP 方法, 借助 4 对引物及 5 种限制性内切酶的相应搭配, 能从多个途径将这 2 种大实蝇区分开来。所使用的 4 对引物均能在 PCR

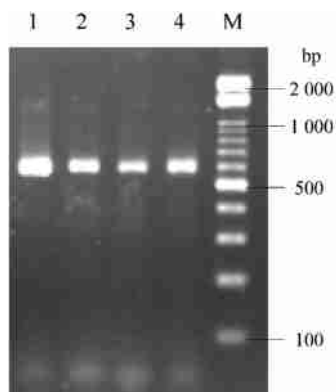


图 4 不同虫态和不同性别的橘大实蝇引物
baITS1f-DacusR 扩增产物电泳图
M. 100 bp-ladder 1 幼虫 2 蛹 3. 雄成虫 4 雌成虫

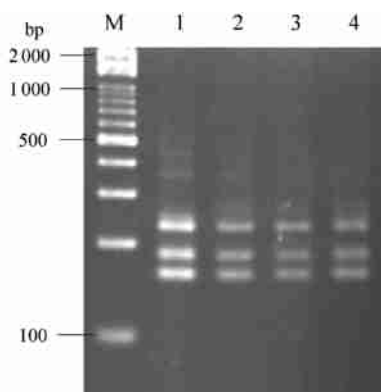


图 5 *Dra*I 对不同虫态和不同性别的橘大实蝇
引物 baITS1f-DacusR 扩增产物的酶切电泳图
M. 100 bp-ladder 1 幼虫 2 蛹 3. 雄成虫 4 雌成虫

仪上一次实现,从 DNA 抽提到获取酶切产物电泳图谱的整个过程可在 15 h 内完成,真正建立了这 2 种大实蝇的快速鉴定方法,实现了快速鉴定的目的。

(2)所建立的快速鉴定方法对不同虫态、不同性别及不同寄主(结果未在文中列出)的大实蝇个体均适用,而且不受标本保存条件和地理

来源的影响,具有较高的稳定性。该方法解决了传统的外部形态鉴定对虫态的限制,实现了利用大实蝇幼体(卵、幼虫或蛹)进行鉴定的目的,对生产和检疫上的鉴定尤为适用。

(3)此快速鉴定方法所需的样品量极微,单头大实蝇幼虫即可进行多达 300 次的检测试验,借助部分个体就能进行区分鉴定,有利于解决残缺个体的鉴定问题。

(4)本研究针对蜜柑大实蝇与橘大实蝇的 CO II 和 ITS1 基因,筛选出 *Mnl* I, *Mse* I, *Ase* I, *Dra* I 和 *Ssp* I 5 种限制性内切酶进行酶切,已经实现了 2 种大实蝇的种间区分。随着研究的深入,可进一步研究 2 种大实蝇各自的地理种群间的遗传多态性,进而探讨其种群结构和基因漂流规律。

致谢 本研究部分大实蝇标本由湖南出入境检验检疫局和广西出入境检验检疫局赠送,广东检验检疫技术中心的梁广勤研究员和梁帆研究员在标本的形态鉴定方面给予热情的帮助,在此谨向他们表示衷心的感谢!

参 考 文 献

- 1 汪兴鉴,罗禄怡. 昆虫知识, 1995, 32(5): 310~315.
- 2 赵又新. 植物保护, 1991, 17(4): 33~34.
- 3 余仕长,王正义,杨光发,冯雨宣. 昆虫知识, 1996 33 (4): 210~212.
- 4 夏忠敏. 贵州农业科学, 1998, 26(4): 21~23.
- 5 王志敏,朱明华,包亚明. 植物检疫, 1997, 11(3): 156~158.
- 6 赵学谦,范京安. 西南农业大学学报, 1996, 18(6): 515~518.
- 7 孙太安. 植物检疫, 2004, 18(2): 108~109.
- 8 陈世骧,谢蕴贞. 昆虫学报, 1955, 5(1): 123~126.
- 9 韦党扬,赵琦. 昆虫知识, 1988, 25(5): 282.
- 10 杨胜官. 贵州农业科学, 1989, 17(6): 23~26.

Insect Science 最新动态

据 ISI 新近发布的期刊引证报告(Journal Citation Report), Insect Science 2006 年影响因子为 0.596,即时指标 0.103. Insect Science 在 SCI 收录的 69 种昆虫学期刊中排名第 43 位(见 P516 排行表)。

欢迎登陆刊物全文上网网页(www.blackwell-synergy.com/loi/ins)免费注册成为 Synergy 用户,您可以通过 email 及时获得 Insect Science 最新一期的出版信息。

(赵云鲜)