

技术与方法

中国常见仓储书虱 PCR-RFLP 快速识别^{*}秦 萌 李志红^{**} 孙 晓 康芬芬 伍 祎

(中国农业大学农学与生物技术学院 北京 100094)

Rapid discrimination of four common species of store booklice *Liposcelis*, from China using PCR-RFLP^{*}. QIN Meng, LI Zhi-Hong^{**}, SUN Xiao, KANG Fen-Fen, WU Yi (College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract Rapid discrimination of four common species of store booklice, *Liposcelis entomophila* (Enderlein), *L. bostrychophila* (Badonnel), *L. decolor* (Peaman) and *L. paeta* Peaman was conducted by using PCR-RFLP. Genomic DNA was extracted from booklice with CTAB. Genes of 16S rRNA were amplified with specific primers and PCR products were digested with 5 restriction endonucleases respectively. The results showed that the PCR product was estimated to be about 500 bp in length, which could be digested by *Dra*I. All the booklice examined could be discriminated according to the relevant banding patterns. The results were not affected by geographical populations, developmental stages and sexes of the four species. It is suggested that this method is reliable for rapid discrimination of the four booklice species.

Key words PCR-RFLP, booklice, mtDNA, rapid discrimination

摘 要 应用 PCR-RFLP 技术, 对我国 4 种常见仓储书虱即嗜虫书虱 *Liposcelis entomophila* (Enderlein)、嗜卷书虱 *L. bostrychophila* (Badonnel)、无色书虱 *L. decolor* (Peaman) 和小眼书虱 *L. paeta* (Peaman) 开展快速识别方法的研究。采用 CTAB 法从上述 4 种书虱体内提取基因组 DNA, 选用 1 对引物扩增 16S rDNA 基因区域, 分别用 5 种限制性内切酶对 PCR 产物进行酶切。结果表明, PCR 扩增片段大小约为 500 bp, 用限制性内切酶 *Dra* I 酶切得到的片段可将供试书虱区分开。该方法不受 4 种供试书虱地理种群、虫态(成虫、若虫)和性别的影响, 可用于 4 种书虱的快速识别。

关键词 PCR-RFLP, 书虱, mtDNA, 快速识别

书虱隶属啮虫目 Psocoptera 虱啮科 Liposcelididae 虱啮属 *Liposcelis* (Motschulsky), 为半变态昆虫, 是啮虫目中最具有经济意义的 1 个属^[1-3]。该属昆虫已知 120 余种, 我国已报道 23 种^[2], 其中常见仓储书虱主要包括 4 种即嗜虫书虱 *L. entomophila* (Enderlein)、嗜卷书虱 *L. bostrychophila* (Badonnel)、无色书虱 *L. decolor* (Peaman) 和小眼书虱 *L. paeta* Peaman。这些书虱或单独发生或混合发生, 广泛存在于多种仓储物中, 在我国检疫口岸, 也是一类常有截获的有害生物。仓储书虱不仅直接危害仓储物, 而且还由于极强的活动性以及身体上粘附的排泄物等能携带、传播病菌而直接给人们的健康

带来威胁^[4]。近年来书虱危害以及抗性的发展引起了普遍重视, 但因其个体微小(体长约 1 mm)等特点, 开展形态鉴定存在一定困难。储粮工作者和口岸检疫人员急需一种经济、快速、准确的识别方法来确认书虱种类, 进而采取有效的防治措施和检疫处理措施。

近年来, 基于 DNA 分析的分子生物学技术在昆虫遗传图谱、近缘种鉴定、种群遗传分析等领域得到一定应用^[5-7], 可以有效解决形态特

* 中国与捷克政府间科技合作项目。

** 通讯作者, E-mail: lizh@cau.edu.cn

收稿日期: 2006-11-30, 修回日期: 2006-02-05,

接受日期: 2007-03-07

征无法解决的部分问题,特别是外形相似种类、幼期阶段或不同地理分布种群等的鉴定^[8-10,14],为上述问题的解决提供了新的途径。作者以嗜虫书虱、嗜卷书虱、无色书虱和小眼书虱为材料,将聚合酶链式反应(PCR)与限制性片段长度多态性分析(RFLP)技术相结合,在国内首次对书虱的分子识别进行研究,旨在探索经济、快速、准确的书虱种类识别方法,为仓储害虫防治和口岸检疫提供技术帮助和支持。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

本实验所用的书虱材料由中国粮食科学研究院曹阳教授提供,经中国农业大学李法圣教授、作者李志红副教授进行形态学鉴定。嗜虫书虱采自湖北和重庆,嗜卷书虱采自重庆和广西,无色书虱采自重庆和河南,小眼书虱采自浙江和江西,经中国农业大学植物检疫实验室人工饲养。饲养条件为:在温度 28.5℃、湿度 70% 的恒温培养箱下,用全麦粉:脱脂奶粉:酵母粉=10:1:1 的人工饲料喂养^[11]。

1.2 主要试剂

1.2.1 引物:扩增目的片段为 mtDNA 16S rDNA 基因中一段大小约为 500 bp 的片段。用于扩增的引物是 16Sar 和 16Sbr^[12],其序列分别为 5'-CGCTGTT~TAAC~AAA~AACAT-3' 和 5'-CCGGTCTG~AACTC~AGAT~CACGT-3',引物由上海生物工程有限公司合成。

1.2.2 酶及其他试剂:本实验所用限制性内切酶 *Dra* I, *Nhe* III, *Hind* III, *Mse* I 和 *Eco*R I 均购自宝生物工程有限公司; *Taq* 酶购自晶美科技有限公司; Marker II、*Msp* I 购自天为时代科技有限公司;蛋白酶 K、RNA 酶购自上海生物工程有限公司; dNTPs、10× buffer 和 $MgCl_2$ 购自宝生物工程有限公司。

1.3 方法

1.3.1 基因组 DNA 的制备:基因组 DNA 提取在参照龚鹏等^[13]的方法基础上进行一些修改:嗜虫书虱、无色书虱和小眼书虱分别采集雌成虫、雄成虫各 20 头、若虫(雌、雄均有)30 头;嗜

卷书虱为孤雌生殖,采集雌成虫 20 头、若虫(雌、雄均有)30 头。供试书虱用无水乙醇杀死后,用双蒸水清洗晾干(勿干透),分别放入 1.5 mL 无菌离心管中。加入 200 μ L 提取缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, pH 7.0, 1.4 mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA, 2% CTAB),研匀后加入 3 μ L 蛋白酶 K (20 mg/mL),置于 60℃ 水浴锅(DK-S22 型)中保温 1 h,其间上下混匀 3 次。加入 500 μ L 苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)混匀 5 min,放入离心机(SORVA11 型)中,10 000 r/min 离心 15 min 后取上清液约 200 μ L,加入冰冷无水乙醇 400 μ L 和 3 mol/L 醋酸铵(pH 7.0)20 μ L,混匀后置于-20℃ 1 h 以上,取出,14 000 r/min 离心 10 min,用 70% 乙醇洗涤 1 次,37℃ 干燥后,加入灭菌水 30 μ L 室温下溶解 DNA。然后置于-20℃ 保存待用。

1.3.2 PCR 扩增反应:PCR 扩增体系包括:10× buffer 2 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 0.5 μ L; 引物(5 μ mol/L) 0.5 μ L, $MgCl_2$ (25 mmol/L) 2 μ L; DNA 1 μ L; *Taq* 酶(1.0 U/ μ L) 1 μ L; 加入 ddH₂O 至总反应体积达 20 μ L。PCR 扩增条件:94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 45 sec, 50℃ 退火 45 sec, 72℃ 延伸 45 sec, 35 个循环后 72℃ 延伸 10 min。扩增反应在 PCR 仪(AB9700PCR 型)上进行。使用 1× TAE (0.004 mol/L Tris-acetate, pH 8.0, 0.002 mol/L Na₂EDTA)缓冲液制作 1.5% 琼脂糖(spain)凝胶,取 5 μ L PCR 扩增产物进行电泳检测,Marker II 作为分子量标准参照物,在电压约为 5 V/cm 的条件下电泳 1 h,然后将凝胶置于溴化乙锭(1 μ g/mL)中染色,最后在紫外成像系统记录结果。

1.3.3 酶切反应:在 20 μ L 反应体系中加入 10 μ L PCR 产物,3 U 内切酶,1× buffer,最后加水至 20 μ L,将上述混合液置于 37℃ PCR 仪中温育 3 h。使用 1× TBE 缓冲液制作 3.5%~4.0% 的琼脂糖凝胶,取 8 μ L 酶切产物进行电泳检测,用 *Msp* I 作为标准分子量标记,在电压约为 4 V/cm 的条件下电泳 3 h,然后将凝胶置于溴化乙锭(1 μ g/mL)中染色 10 min 左右,最后在紫外成像系统记录结果。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果与分析

所有书虱样品经 PCR 扩增后, 均扩增出 500 bp 左右的 DNA 片段, 且扩增结果不受书虱地理种群、虫态以及性别的影响(图 1)。

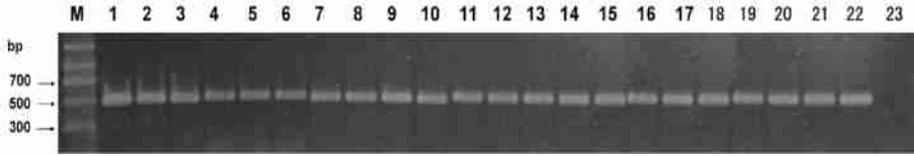


图 1 PCR 产物电泳图

M. DNA 相对分子量标准 1~3. 湖北的嗜虫书虱 ♀、♂ 成虫和若虫 4~6 重庆的嗜虫书虱 ♀、♂ 成虫和若虫 7~8. 重庆的嗜卷书虱 ♀ 成虫和若虫 9~10. 广西的嗜卷书虱 ♀ 成虫和若虫 11~13. 重庆的无色书虱 ♀、♂ 成虫和若虫 14~16. 河南的无色书虱 ♀、♂ 成虫和若虫 17~19 浙江的小眼书虱 ♀、♂ 成虫和若虫 20~22 江西的小眼书虱 ♀、♂ 成虫和若虫 23 空白对照。(下图同)

2.2 酶切结果与分析

用 5 种限制性内切酶 *Dra* I, *Nhe* III, *Hind* III, *Mse* I, *Eco*R I 分别对上述供试书虱扩增产物进行酶切, 构建酶切图谱。结果表明限制性内切酶 *Dra* I 能将 4 种书虱区分开(图 2): (1) 不同种类书虱的酶切片段大小不同: 嗜虫书虱有 4 个酶切片段, 片段大小约为 250, 115, 67, 60

bp; 嗜卷书虱, 无色书虱, 小眼书虱均有 2 个酶切片段, 片段大小各不相同, 分别约为 320, 100 bp; 325, 180 bp; 280, 160 bp。(2) 同种类书虱不同地理种群、不同虫态以及不同性别的个体酶切结果完全相同, 表明本研究所确立的方法不受书虱地理种群、虫态以及性别的影响, 具有较高的稳定性。

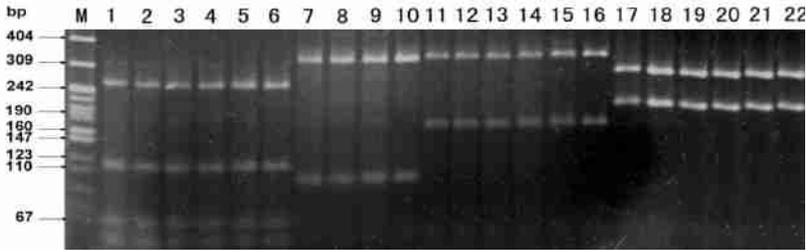


图 2 酶切产物电泳图谱

3 讨论

用于种类分子鉴定的技术有很多, 方法也在不断地改进, 比如设计特异引物来扩增目的基因、RAPD、目的基因的 PCR-RFLP、AFLP、微卫星 DNA、以及目的基因的直接测序等, 其中 PCR-RFLP 是一种较为容易、快速、可靠的方法。根据生物在长期的进化过程中, 不同物种的 DNA 序列会产生不同程度的变异, 从而体现在限制性内切酶识别位点的不同, 酶切后会产生不同数量的酶切片段以及片段大小的差异, 由此构建酶切图谱, 进行种类鉴定。

本研究运用 PCR-RFLP 技术对我国 4 种常见仓储书虱的快速识别进行初步探讨, 结果具有一定的代表性, 为书虱分子鉴定打下一定基础。(1) 借助 1 对引物 16Sar/Sbr 和 1 种限制性内切酶 *Dra* I, 通过 PCR-RFLP 技术可将我国常见仓储书虱即嗜虫书虱、嗜卷书虱、无色书虱和小眼书虱进行识别; 从 DNA 提取到酶切图谱构建整个过程仅需要 12 h, 实现了经济、快速识别书虱的目的。(2) 该方法对供试书虱不同地理种群、不同虫态以及不同性别的个体均适用, 结果具有较高的准确性和稳定性。

鉴于本实验时间有限, 要选择特征更明

显, 反应更灵敏的方法还有待进一步的研究。目前我们正沿着以下三方面深入研究: (1) 丰富书虱地理种群。本实验所用的书虱地理种群来自国内, 所确立的引物和限制性内切酶是否适用于国外地理种群尚需进一步研究。(2) 改进基因组 DNA 提取方法。本实验采用多头书虱提取基因组 DNA, 今后需进一步探索单头书虱提取基因组 DNA 的方法, 使本研究所建立的书虱快速识别更具实际应用意义。(3) 探索其它分子鉴定技术用于书虱种类识别的可行性。本研究仅利用 PCR-RFLP 技术对书虱的种类识别进行了初步探索。随着研究的逐步深入可考虑采用其它分子鉴定技术, 比如 PCR-SCR、对扩增产物进行测序后设计种特异引物进行特异扩增等等, 探讨其针对书虱快速鉴定的可行性。

致谢 承蒙中国粮食科学研究院曹阳老师惠赠标本, 感谢国家粮食局李福君先生等对本研究的大力支持和帮助, 同时感谢中国农业大学昆

虫学系的彩万志教授阅读全文并提出宝贵意见!

参 考 文 献

- 1 New T R. *Orient. Ins.*, 1987, 21: 1~109.
- 2 李志红. 北京: 中国农业大学学位论文, 1994.
- 3 白旭光, 曹阳. 中国粮油学报, 1997, 2(1): 1~3.
- 4 McFarlane J. A. *Trop. Stor. Prod. Infor.*, 1982, 44: 3~10.
- 5 安榆林. 中国进出境动植物检 1997, 2: 38~39
- 6 陈乃中. 植物保护, 1997, 3(3): 20~21.
- 7 吴佳教, 胡学难, 赵菊鹏, 梁帆, 梁广勤. 植物检疫, 2005 19(1): 2~6.
- 8 Muraji M., Nakahara S. *Insect Mol. Biol.*, 2001, 10(6): 549~559.
- 9 Muraji M., Nakahara S. *Appl. Entomol. Zool.*, 2002, 37(3): 437~446
- 10 吴佳教, 梁帆, 胡学难, 赵菊鹏, 梁广勤. 江西农业大学学报, 2004, 26(5): 770~773.
- 11 丁伟, 王进军, 赵志模. 西南农业大学学报, 2001, 3(4): 304~308.
- 12 Simons C., Frati F., Bechenback A., Crespi B., Liu H., et al. *Ann. Entomol. Soc. Amer.*, 1994, 7(6): 651~701.
- 13 龚鹏, 沈佐锐, 李志红. 昆虫知识, 2002, 39(3): 188~190.
- 14 杜波, 迟德富. 昆虫知识, 2007, 44(3): 333~336.

一种测定鳞翅目幼虫取食选择的方法 ——叶碟法及其改进和注意事项^{*}

汤清波¹ 王琛柱^{2**}

(1. 河南农业大学昆虫学系 郑州 450002;

2. 农业虫鼠害综合治理研究国家重点实验室 中国科学院动物研究所 北京 100101)

Leaf disc test used in caterpillar feeding preference study. TANG Qing-Bo¹, WANG Chen-Zhu^{2**}(1. *Department of Entomology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China*; 2. *State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*)

Abstract Leaf disc test is a universal method in the study of feeding preference of lepidopteran larvae. In this paper, Jermey-leaf-disc-test and its modifications were described. The conditions and limitations of the test were also discussed, including physiological state of the test larvae, the lasting time of larval feeding, the number of discs, and the measurement of disc area.

Key words caterpillar, feeding preference, leaf disc test, glass Petri dish

* 国家自然科学基金项目(30471148)。

** 通讯作者, Email: czwang@ioz. ac. cn

收稿日期: 2007-09-04, 修回日期: 2007-09-13