

技术与方法

一种经济高效提取实蝇基因组 DNA 的方法^{*}

杨 燕¹ 白永华² 王绍君² 周 剑² 李克海² 丁元明^{2**}

(1. 云南农业大学 云南 650201; 2. 云南出入境检验检疫局 云南 650228)

An effective and economical method for extracting genomic DNA from the fruit fly. YANG Yan¹, BAI Yong-Hua², WANG Shao-Jun², ZHOU Jian², LI Ke-Hai², DING Yuan-Ming^{2**} (1. Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. Yunnan Exit-Entry Inspection and Quarantine Bureau, Kunming 650228, China)

Abstract An effective method for extracting genomic DNA from individual specimens is important for the study of molecular phylogenetics in the fruit fly. This paper presented a method for extracting genomic DNA from individual fruit fly. The results showed that the genomic DNA could be successfully extracted from adult, larval and pupal of fruit flies. Meanwhile, this method is also suitable for dried specimens or specimens preserved in alcohol. Compared with traditional methods like CTAB and SDS, it is pretty simple, time saving and effective.

Key words genomic DNA, fruit fly, extraction

摘 要 单头实蝇高质量基因组 DNA 的获得为实蝇分子生态学研究奠定了重要基础。本文提出一种经济高效的实蝇基因组 DNA 提取方法,该方法广泛适用于不同虫态、不同保存条件的实蝇标本,与传统的 CTAB 法和 SDS 法相比操作简单、耗时短,得率高。

关键词 基因组 DNA, 实蝇, 提取

实蝇是双翅目 Diptera 实蝇科 Tephritidae 一大类昆虫的统称,由于其中部分种类如地中海实蝇 *Ceratitis capitata*、昆士兰实蝇 *Bactrocera tryoni*、橘小实蝇 *B. dorsalis* 等危害广,经济意义大,长期以来一直是国内外研究的热点。近些年来,随着分子生物学技术在生物学各个领域的不断渗透,从而使得对实蝇的研究也更加深入,如 1999 年 He 等用 EPIC 和 RFLP-PCR 相结合的方法对美国地中海实蝇的起源进行了研究^[1]。2001 年 Bonizzoni 等用微卫星标记分析了加利福尼亚地中海实蝇的起源问题^[2]。2004 年 Gilchrist 等通过 26 个微卫星标记检测了 2000~2002 年在 Adelaide 所捕获的昆士兰实蝇,对昆士兰实蝇在澳大利亚南部发生的原因进行了分析^[3]。在国内,李文芬等采用基因芯片的方法对地中海实蝇及其近缘种的检测进行

了研究^[4]。而这些研究的开展都离不开高质量基因组的提取这一前提。纵观国内外进行实蝇分子生物学研究方面的文章发现,大多数的研究者倾向于使用试剂盒来进行实蝇基因组提取,少部分使用其他方法。对于标本数量不多的定性类研究,试剂盒不失为一种可行的方法。但是对于标本数量很大的分子生态学研究,试剂盒显然过于昂贵。并且还存在着因实蝇个体小,有些稀有种类难于获得新鲜标本等一系列问题。为了能更好更深入地开展实蝇分子生物学相关研究,解决基因组提取这一瓶颈,本文就 DNA 提取所存在的问题进行了全方位的探讨,

^{*} 资助项目: 国家质量监督检验检疫局重点项目 (2008IK264)。

^{**} 通讯作者, E-mail: dingdym2008@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-06-11, 修回日期: 2009-07-04

旨在提出一种省时、高效、经济的方法。

1 材料和方法

1.1 材料

橘小实蝇幼虫和蛹为无水乙醇浸泡 -20°C 保存 1 年的标本。2008 年采集的橘小实蝇成虫一部分用无水乙醇 -20°C 保存,一部分自然干燥,室温下保存于标本盒中。

1.2 试剂

所用 PCR 试剂 (Taq 酶, dNTPs, $10 \times$ buffer), D2000Marker 购自天根生物工程公司。蛋白酶 K 购自 Merck KgaA 公司。引物为大连宝生物公司合成。Tris Base、SDS、EDTA 均为 sigma 公司出品,其余试剂为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 基因组提取 参考分子克隆所述提取哺乳动物 DNA 方法,并经改进^[5]。具体步骤如下:

(1)把单头虫放入 2.0 mL EP 管中,加入液氮用塑料研杆彻底研磨。

(2)加入 600 μL 裂解缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1 mmol/L EDTA pH 8.0, 0.1% SDS)。

(3)向裂解液中加入 3 μL 蛋白酶 K (20 mg/mL),混匀后于 55°C 水浴 2 h。

(4)消化液置 4°C 预冷后,加入 200 μL 醋酸钾溶液 (60 mL 5 mol/L 醋酸钾, 11.5 mL 冰醋酸 28.5 mL 水),振荡混合。

(5)12 000 r/min 离心 15 min,转移上清到新 EP 管,加入等体积异丙醇,充分混合,12 000 r/min 离心 15 min。

(6)小心倾倒上清,加入 70% 乙醇清洗 2 次,干燥后加入 40 μL TE (内含 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RnaseA),放入 37°C 温箱 30 min,取出后 -20°C 保存。

CTAB 法参考张迎春等改进的 DNA 提取方法^[6],干标本法参考朴美花等提出的膜翅目昆虫干标一基因组提取方法^[7]。

1.3.2 PCR 反应 反应体系为:50 μL 体积, 50 ng 模板 DNA, 0.5 μL 2.5U Taq 酶, 5 μL 10

$\times$ buffer, 2 μL 10 mmol/L Primers, 4 μL 2.5 mmol/L dNTPs。PCR 反应在 eppendorf mastercycle gradient thermal cycler 上进行。

引物:采用 mtDNA *COI* 基因的一段序列^[8]

正向引物 UEA7

(5'TACAGTTGGAATAGACGTTGATAC3')

反向引物 UEA10

(5'TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA3')

扩增条件: 94°C 5 min, 95°C 40 s, 48°C 30 s, 72°C 1 min, 30 个循环, 72°C 延伸 7 min。

目标产物片断长度约为 700 bp。

从反应混合液中取出 5 μL 扩增产物用 1.5% Agarose 电泳分析。

各部分实验均设 5 个平行样并重复 3 次。

2 结果

2.1 不同虫态

2.1.1 基因组 DNA 电泳结果 采用本文叙述的 DNA 提取方法分别提取了实蝇成虫、幼虫、蛹的基因组 DNA, 可以看到均有较亮的带 (图 1)。说明该方法适用于不同虫态基因组 DNA 的提取。

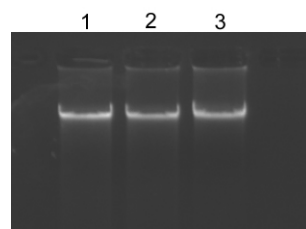


图 1 不同虫态基因组 DNA 电泳结果

1: 成虫 2: 幼虫 3: 蛹

2.1.2 PCR 电泳结果 用上文所提取的基因组 DNA 为模板进行 *COI* 基因部分片断的 PCR 反应, 可以看到均有较亮的目的条带 (图 2), 说明用该方法提取的基因组 DNA 适用于以 PCR 反应为基础的一系列后续实验。

2.2 不同保存条件

2.2.1 基因组 DNA 电泳结果 用本文 DNA 提取方法提取了橘小实蝇成虫自然干燥标本和

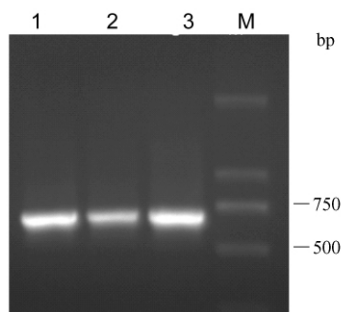


图2 不同虫态 PCR 电泳结果

1: 成虫 2: 幼虫 3: 蛹 M: Marker D2000

酒精保存标本。可看到 2 种保存条件下的标本都能提取出质量较好的 DNA,但酒精保存标本 DNA 质量优于自然干燥标本(图 3)。

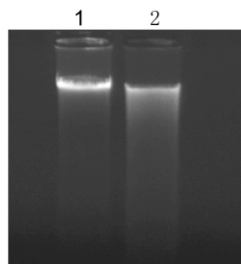


图3 不同保存条件基因组 DNA 电泳结果

1: 酒精浸泡标本 2: 自然干燥标本

2.2.2 PCR 电泳结果 图 4 中,用上文所提取的 DNA 为模板进行 *COI* 基因部分片段的 PCR 反应,均能很好地扩增出目的条带(图 4)。

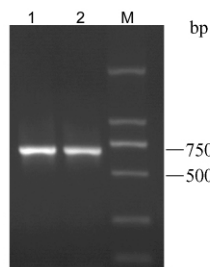


图4 不同保存条件 PCR 电泳结果

1: 酒精浸泡标本 2: 自然干燥标本

M: Marker D2000

2.3 不同方法

2.3.1 CTAB 法 (1) 基因组 DNA 电泳结果:采用 CTAB 法与本试验所采用的方法同时

进行基因组 DNA 提取,所用材料橘小实蝇成虫均是无水乙醇 -20℃ 保存 1 年的标本。从图 5 中可以看出用本试验方法所提取的基因组 DNA 不论是完整性还是量上都优于 CTAB 法。

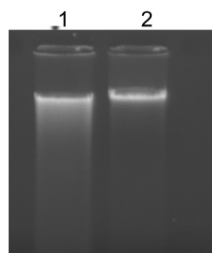


图5 不同方法基因组 DNA 电泳结果

1: CTAB 法 2: 本试验方法

(2)PCR 电泳结果 以上述基因组 DNA 为模板进行 *COI* 基因部分片断 PCR,结果显示 2 种方法均能获得高质量的目的条带(图 6)。

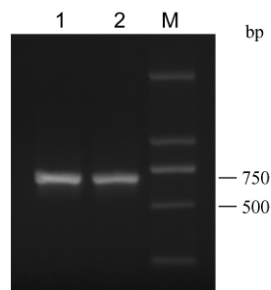


图6 不同方法 PCR 电泳结果

1: CTAB 法 2: 本试验方法 M: Marker D2000

2.3.2 干标本提取法 (1) 基因组 DNA 提取采用膜翅目昆虫干标本基因组提取方法和本文所提出的方法同时进行基因组 DNA 提取,所用材料为 2008 年采集的橘小实蝇成虫自然干燥标本。从图 7 中可以看出,本实验方法所提取的基因组 DNA 完整性更好。

(2)PCR 电泳结果 *COI* 基因部分片断 PCR 结果显示 2 种方法都能扩增出高质量的目的条带(图 8)。

3 结论与讨论

从结果可以看出本试验所用方法适用于不同虫态,不同保藏条件下单头实蝇基因组 DNA

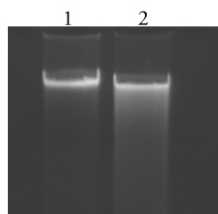


图 7 不同方法基因组 DNA 电泳结果

1: 本试验方法 2: 干标本法

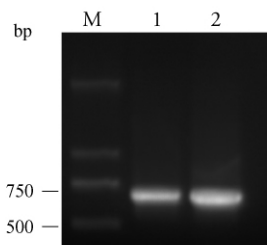


图 8 不同方法 PCR 电泳图

1: 本实验方法 2: 干标本法 M: Marker D2000

的提取,且 DNA 的量和完整性都能达到后续试验的要求。与 CTAB 法相比较而言,因为省去了酚仿抽提这一繁琐步骤,不仅减轻了有机溶剂对实验人员健康的损害、降低了成本,而且 DNA 的提取量和完整性都得到了提高。同时当进行种群遗传多样性研究时,由于需要进行大规模基因组 DNA 的提取,使用该方法不仅大大节约了人力物力,也可使研究的工作效率得到很大提高。与膜翅目干标本提取法相比较,保存期在 1 年以内的干标本,不论是本文所用方法还是膜翅目干标本法均能获得 DNA,但显然本文方法更省时省力。同时也可看到保存标本最好用无水乙醇浸泡低温冻存,这也和张迎春等的结果一致^[6]。本文所介绍的 DNA 提取方法在其他昆虫中有过类似研究,如石晶等比

较过不同方法对蚧虫 DNA 提取的效果,其中的醋酸钾法和氯化钠法与本试验方法同属盐析法^[9],但技术路线与本方法有较大差异。若单从操作步骤上来说本试验方法要更为简便省时。作者实验室采用本方法成功提取了长蠹科和豆象科害虫基因组 DNA,但本方法的适应性有多广,还有待进一步研究。尽管如此,本方法还不失为一种简单、高效、低成本、适用性好的昆虫基因组 DNA 提取方法。

参 考 文 献

- 1 He M., Haymer D. S. Genetic relationships of populations and the origins of new infestations of the Mediterranean fruit fly. *Mol. Ecol.* 1999 **8**(8):1 247 ~ 1 258.
- 2 Bonizzoni M., Zheng L., Guglielmino C. R., et al. Microsatellite analysis of medfly bioinfestation in California. *Mol. Ecol.* 2001 **10**(10):2 515 ~ 2 524.
- 3 Gilchrist A. S., Sved J. A., Meats A. Genetic relations between outbreaks of the Queensland fruit fly, *Bactrocera tryoni* in Adelaide in 2000 and 2002. *Entomology* 2004 **43**(2):157 ~ 164.
- 4 李文芬,余道坚,颜亨梅,等.地中海实蝇及其近缘种基因芯片检测研究. *昆虫学报* 2008 **51**(1):61 ~ 67.
- 5 莎姆布鲁克.见莎姆布鲁克主编,分子克隆.北京:科学出版社 2002.483.
- 6 张迎春,刘波,郑哲民,等.不同保藏处理的昆虫标本 DNA 提取及其随机扩增多态 DNA 反应. *昆虫学报* 2002 **45**(5):693 ~ 695.
- 7 朴美花,陈学新,何俊华.膜翅目昆虫干标本的基因组 DNA 提取. *动物分类学报* 2002 **27**(4):672 ~ 675.
- 8 Lunt D. H., Zhang D. X., Szymura J. M., et al. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Mol. Biol.* 1996 **5**(3):153 ~ 165.
- 9 石晶,谢映平,薛皎亮,等.蚧虫基因组 DNA 不同提取方法的比较. *昆虫知识* 2005 **42**(2):207 ~ 211.