

优化醋酸钾(KAC)法提取蚜虫基因组 DNA

赵丽娟¹, 漆永红², 刘永刚², 张正英^{1*}

(1. 甘肃农业科学院生物技术研究所, 甘肃兰州 730070; 2. 甘肃农业科学院植物保护研究所, 甘肃兰州 730070)

摘要 [目的]探索一种简便、有效的单头蚜虫基因组 DNA 提取方法。[方法]以从不同地区采集的桃蚜为试材,采用改进的 KAC 法和优化的 KAC 法提取单头桃蚜的基因组 DNA,用紫外分光光度计测定所提 DNA 的浓度(以 OD_{260/280}表示),用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测所提 DNA 的纯度,比较 2 种方法的提取效果;对优化 KAC 法所提 DNA 进行 PCR 扩增和电泳检测。[结果]优化 KAC 法提取的单头蚜虫基因组 DNA 的 OD_{260/280} 为 1.6~1.9,浓度为 20~50 ng/g;改进 KAC 法提取的单头蚜虫基因组 DNA 的 OD_{260/280} 为 1.4~1.7,浓度为 8~25 ng/g;来自同一地方桃蚜的基因组 DNA PCR 扩增产物的电泳条带基本相同。[结论]优化改进的 KAC 法提取的桃蚜基因组 DNA 浓度和纯度均较高。

关键词 基因组 DNA; 桃蚜; 提取方法; 优化

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)10-04394-02

Extraction of Genome DNA of Aphid by Optimized Potassium Acetate (KAC)

ZHAO Li-juan et al (Institute of Bio-technique, Gansu Academy of Agricultural Science, Lanzhou, Gansu 730070)

Abstract [Objective] The aim was to explore a simple and effective extraction method for extracting genome DNA of single aphid. [Method] With peach aphids from different areas as the tested materials, the improved KAC method and optimized KAC method were taken to extract the genome DNA of single aphids. The concn. of obtained DNA (OD_{260/280}) was determined by ultraviolet spectrophotometer and its purity was determined by 0.8% agarose gel electrophoresis. The extraction effects of 2 methods were compared. The DNA obtained by optimized KAC method was amplified with PCR and detected by electrophoresis. [Result] The OD_{260/280} of single aphids genome DNA extracted with optimized KAC method was 1.6-1.9 and its concn. was 20-50 ng/g. The OD_{260/280} of single aphids genome DNA extracted with improved KAC method was 1.4-1.7 and its concn. was 8-25 ng/g. The electrophoresis strip of PCR amplification products of single aphids genome DNA from the same area was similar. [Conclusion] The concn. and purity of aphids genome DNA extracted with optimized KAC method were higher.

Key words Genome DNA; Peach aphid; Extraction method; Optimization

蚜虫(Aphidinea)为同翅目(Homoptera)蚜总科(Aphidoidea)和球蚜总科(Adelgoidea)昆虫,世界已知 4 700 余种^[1],我国蚜虫资源丰富,已知的有 1 000 余种^[2]。大多数蚜虫为重要的农林经济植物害虫^[3],但也有少数种类的蚜虫如五倍子蚜(*Schlechtendalia chinensis* (Bell))是具有较高经济价值的资源昆虫^[4]。桃蚜(*Myzus persicae* (Sulzer))是同翅目(Homoptera)蚜科(Aphididae)的一种杂食性害虫,其寄主植物多达 74 科 285 种,该类蚜虫通过刺吸汁液、传播病害等造成作物植株矮小,叶片黄化、卷缩,产量和品质下降^[5-6]。蚜虫是昆虫世界中较为奇特的一个类群,其形态变化大,个体小,且具有多型现象。根据传统的形态学特征对蚜虫进行分类和鉴定时,鉴定过程繁琐复杂,且鉴定技术不易掌握。而近年来发展起来的分子生物学方法能够准确、快捷的鉴定蚜虫形态和生物学特性^[7]。

单头蚜虫基因组 DNA 提取是开展蚜虫分子遗传学研究的前提。蚜虫 DNA 的提取方法很多,如 Black 等^[8]采用匀浆法提取蚜虫基因组 DNA 并用于 RAPD 扩增,我国学者田英芳等^[9]采用 SDS 法提取昆虫基因组 DNA,杨效文等^[10]采用醋酸钾(KAC)法提取烟蚜 DNA,安瑞生等^[11]对 KAC 法进行了改进。

笔者以安瑞生等的 KAC 提取方法为基础^[11],根据蚜虫体型微小,体表有外骨骼等特点,对改进的 KAC 法进行了优化,旨在探索一种简便、有效的单头蚜虫基因组 DNA 提取方法,解决蚜虫 DNA 提取困难且 DNA 不稳定等问题,为蚜虫分子生物学研究提供技术支撑。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集与保存。供试桃蚜(*Myzus persicae* (Sulzer))于 2007~2008 年采自甘肃省武威市、定西市、天水市等 13 个地区的马铃薯植株。将从各地区采集的有翅蚜和无翅蚜分别放入 1.5 ml 离心管中,用无水乙醇浸泡, -20 °C 保存。

1.1.2 试剂及仪器。DNA 提取匀浆缓冲液,由 A 液、B 液、C 液 3 部分组成,各溶液现配现用(A 液:Tris-HCl 0.05 mol/L, NaCl 0.025 mol/L, EDTA 0.025 mol/L, pH 值 8.0; B 液:1% SDS 溶液; C 液:20 mg/ml 蛋白酶 K)。主要仪器:Heraeus 台式高速离心机, JY 600⁺ 电泳仪, FTI-500 凝胶成像分析系统, MJ PTC-100 PCR 仪, HeLIOSa 紫外分光光度计。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取。将无水乙醇中浸泡的蚜虫置于无水乙醇、双蒸水中依次漂洗,用吸水纸吸干水分。将漂洗后的单头蚜虫移至 1.5 ml 离心管中,加入 50 μl DNA 提取匀浆缓冲液,用灭菌牙签充分研磨,直至虫体完全破碎,再用 150 μl 匀浆液分次将牙签冲洗干净。65 °C 水浴 120 min(期间取出混匀 3 次),直至混合液清亮。在混合液中迅速加入 100 μl KAC 溶液,立即轻摇混匀, -20 °C 静置 1 h, 12 000 rpm 离心 10 min。取离心后的上清液,加 2 倍体积预冷的无水乙醇(使用前 -20 °C 静置 1 h 以上)充分混匀, -20 °C 静置 5 h, 12 000 rpm 离心 15 min, 弃上清,得 DNA 沉淀。向离心管内加入 200 μl 70% 乙醇洗涤 DNA 沉淀, 12 000 rpm 离心 10 min, 倾去上清液。将离心管倒扣在干净的餐巾纸上,自然干燥后加入无菌 1 × TE 溶液(pH = 8.0) 25 μl,用手指轻弹使 DNA 充分溶解,然后将离心管放入 50 °C 水浴中温浴 8 h, -20 °C 保存备用。

基金项目 甘肃省科技厅事业费(QS031-C31-15)。

作者简介 赵丽娟(1979-),女,河北行唐人,硕士,从事种质资源研究工作。*通讯作者。

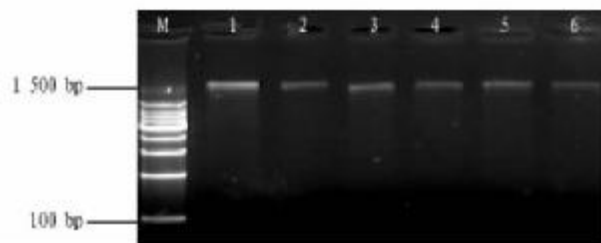
收稿日期 2009-01-07

1.2.2 DNA 浓度和纯度检测。 DNA 纯度采用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测,上样量 3.0 μl /孔,电压 80 V(4 V/cm),电泳时间 45 min,电极缓冲液为 1 \times TBE。0.05% EB 染色,紫外灯下观察、照相、分析,以 GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus 为分子量标准。用紫外分光光度计测定 DNA 的 OD_{260} 值和 $OD_{260/280}$ 值,据此确定 DNA 浓度。

1.2.3 PCR 扩增。 选用 SSR 随机引物 *myz9* (5' - 3') (F: AACCTCACCTCGTGGAGTTCG, R: CTTGGATGTGTGTGGGGTGC) 对所提取的模板 DNA 进行扩增。PCR 反应体系为 20 μl ,其中含 2 μl 10 \times Buffer(含 Mg^{2+}),1.6 μl 10 mmol/L dNTPs,2.4 μl 25 ng 引物,1.2 μl 2.5U Taq 聚合酶,0.8 μl DNA 模板和 12 μl ddH₂O。反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,35 个循环:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s,52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s,再 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。将扩增后的 DNA 在 1.5% 琼脂糖凝胶中进行电泳,上样量为每孔 6.0 μl ,电压 90 V(4 V/cm),电泳时间 60 min,电极缓冲液为 1 \times TBE。0.05% EB 染色,紫外灯下观察、照相、分析。以 GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus 为分子量标准。

2 结果与分析

2.1 优化的 KAC 法提取的桃蚜基因组 DNA 检测结果 优化的 KAC 法提取的单头桃蚜基因组 DNA 的电泳图谱见图 1。由图 1 可知,DNA 电泳条带基本呈线形,谱带整齐,无拖尾现象,说明提取的 DNA 结构较完整。紫外分光光度计检查结果表明,DNA 样品的 $OD_{260/280}$ 值在 1.6 ~ 1.9 之间,说明提取的 DNA 浓度较高,其浓度介于 20 ~ 50 ng/ μl ,平均为 40 ng/ μl ,可满足桃蚜分子生物学的需要。



注:M 为 Marker;1~6 为桃蚜基因组 DNA。

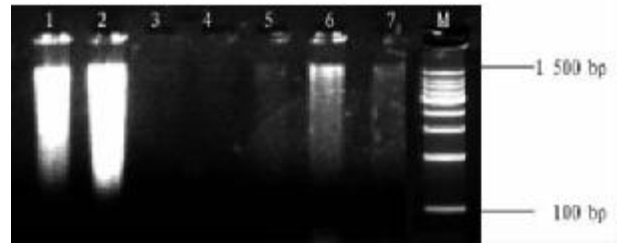
Note: M. Marker; 1-6. *Myzus Persicae* genomic DNA.

图 1 优化的 KAC 法提取的桃蚜基因组 DNA 电泳图谱

Fig. 1 The electrophoretogram of *Myzus Persicae* genomic DNA by optimized Kalium Aceticum method

2.2 改进的 KAC 法提取的桃蚜基因组 DNA 检测结果 改进的 KAC 法提取的单头桃蚜的基因组 DNA 电泳图谱见图 2。由图 2 可知,DNA 扩增产物没有聚成条带,拖尾现象严重,检测不到 DNA,说明该方法提取的 DNA 量较少,得率低,且杂质多。紫外分光光度计检测结果表明,DNA 样品的 $OD_{260/280}$ 值在 1.4 ~ 1.7 之间,说明 DNA 含量低,而其中蛋白质含量较高。DNA 浓度介于 8 ~ 25 ng/ μl ,平均为 16 ng/ μl 。

2.3 PCR 扩增结果 用 SSR 随机引物 *myz9* 对优化后的 KAC 法提取的桃蚜基因组 DNA 进行 PCR 扩增,对扩增产物进行电泳检测(图 3)。由图 3 可知,同一地方桃蚜的基因组 DNA 扩增的条带基本相同,可见优化的 KAC 法提取的 DNA 质量较好,扩增产物性质稳定。而改进的 KAC 法提取的桃蚜基因组 DNA 没有扩增出稳定的条带。

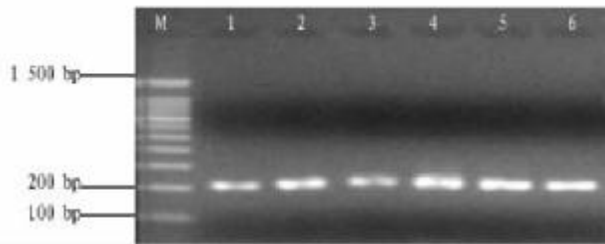


注:M 为 Marker;1~7 为桃蚜基因组 DNA。

Note: M. Marker; 1-7. *Myzus Persicae* genomic DNA.

图 2 未优化的改进的 KAC 法提取桃蚜基因组 DNA 电泳图谱

Fig. 2 The electrophoretogram of *Myzus Persicae* genomic DNA by improved Kalium Aceticum method



注:M 为 Marker;1~6 为 PCR 扩增产物。

Note: M. Marker; 1-7. *Myzus Persicae* genomic DNA.

图 3 桃蚜基因组 DNA SSR 随机引物 PCR 扩增结果

Fig. 3 PCR amplification results of SSR random primers of *Myzus Persicae* genomic DNA

3 结论与讨论

运用分子生物学技术从核酸水平研究昆虫的种类和生物学特征是现代昆虫分子系统学和昆虫遗传学的研究热点之一^[12]。与形态学等基因表达型特征相比,分子遗传特征是生物的本质的特征,其变异只来源于 DNA 序列的差异,具有稳定性高,受环境条件影响小等特点,非常适合小型昆虫蚜虫的研究^[13]。该试验对安瑞生等^[11]改进的 KAC 法进行了优化,优化后的方法能够简便、有效地提取单头蚜虫基因组 DNA,且所提取的 DNA 质量好、性质稳定,为蚜虫分子生物学研究提供了技术上的保证。

在真核生物中,95% DNA 主要存在于细胞核中,分离提取 DNA 总的原则是保证 DNA 一级结构的完整性和高纯度。同改进的 KAC 法比较,优化的 KAC 提取法具有以下优点:①在蚜虫基因组 DNA 提取过程中,破碎细胞是关键。该方法在常温下直接用灭菌的一次性牙签捣碎虫体,成本低、不易造成交叉污染且操作简便。②匀浆液分 2 次加入,确保研磨充分,样品损失少,DNA 得率高。③针对蚜虫体表有外骨骼,消化困难等特点。该方法在提取匀浆液中加入蛋白酶 K 促进蚜虫组织彻底消化,同时将水浴时间从 45 min 延长至 120 min,提高了蛋白酶 K 的活性,促进了 RNA 分解。④取消了平衡酚和氯仿抽提,提高了 DNA 得率。⑤延长了 DNA 沉淀时间,减少了 RNA 干扰。⑥在提取昆虫基因组 DNA 时,许多方法采用新鲜或冻存标本,而该研究以酒精浸泡 1 年多的蚜虫为标本,所提取的 DNA 质量好、性质稳定。由此可见,改进 KAC 法提取蚜虫基因组 DNA 操作简单,对试剂设备要求较低,是一种较好的有效提取蚜虫 DNA 的方法。

(下转第 4398 页)

流速 68.1 ml/min。补充气流速 56 ml/min。六六六各异构体的出峰保留时间(min)依次为:α-六六六 25.345 min、γ-六六六 27.866 min、β-六六六 33.479 min、δ-六六六 34.881 min。

1.2.2 正交试验确定最佳降解条件。采用正交试验研究 pH 值、接种量、NH₄Cl 添加量、KH₂PO₄ 用量及 MgSO₄ 用量对试验菌株降解六六六能力的影响。

表1 菌体降解六六六的条件及其水平

Table 1 Conditions and levels of strain degradation hexachlorocyclohexane

因素 Factors	水平 Levels			
	1	2	3	4
A(PH 值)pH value	5	5.5	6	6.5
B(接种量//%) Inoculated-pathogen quantities	2	4	6	8
C(NH ₄ Cl//g/L)	0.40	0.80	1.20	1.60
D(KH ₂ PO ₄ //g/L)	0.15	0.30	0.45	0.60
E(MgSO ₄ //g/L)	0.10	0.20	0.30	0.40

注:接种量为培养 24 h 的菌液,于 3 000 r/min 的震荡器离心,取菌体进行称量。

Note: Inoculated-pathogen quantities are bacteria solution which have been cultured for 24 hours, concussion centrifugation with 3 000 r/min and weighed the strains.

1.2.3 优势菌株在最佳降解条件下的驯化。取优势菌株,在最佳条件下,以六六六为唯一碳源对其进行驯化。10 ℃、150 r/min 摇床震荡培养 30 d,取出测试其驯化效果。

2 结果与分析

2.1 优势菌株的确定 通过筛选,得到降解六六六的优势菌株 2 号菌。不同菌体对六六六 4 种异构体的降解效果如图 1 所示。

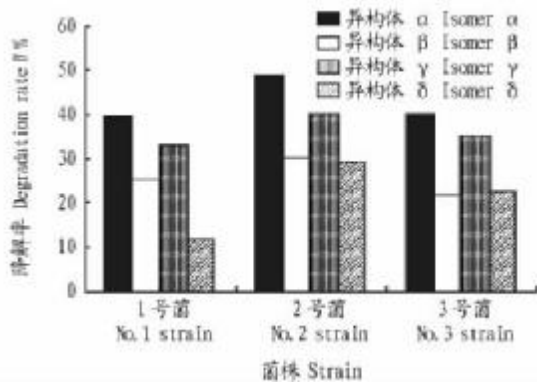


图1 不同菌株对六六六 4 种异构体的降解效果

Fig.1 Degradation effect of different strains on four isomers of hexachlorocyclohexane

由图 1 可知,在相同试验条件下,2 号菌株对六六六各种异构体的降解率均高于其他菌株,被确定为优势菌株。

2.2 最佳降解条件的确定 由正交试验可知,六六六的最佳降解条件为:选用 2 号菌株为降解菌、接种量 8%、NH₄Cl 1.2 g/L、KH₂PO₄ 0.3 g/L、MgSO₄ 0.1 g/L,pH 值 5.5,此条件下六六六的降解率达到 45.23%。

2.3 优势菌株在最佳降解条件下的驯化效果 经 30 d 驯化,菌株对六六六的降解率由驯化前的 45.23% 提高到驯化后的 54.68%。

驯化培养后菌体的生长曲线及降解率随时间的变化关系如图 2 所示。

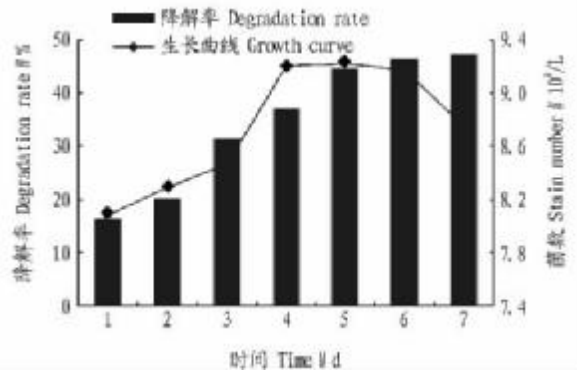


图2 菌体生长与降解率的关系

Fig.2 The relationship between strain growth and degradation rate

由图 2 可知,驯化前 5 d 内,菌体数量呈增加趋势,从第 6 d 起菌体数量呈下降趋势,而其对六六六的降解率一直升高。说明处于静止期的微生物代谢活力虽然比对数增长期差,但其去除污染物的效果依然很好。

3 结论与讨论

该研究通过试验筛选出降解六六六的优势菌株,利用正交试验确定了该菌株降解六六六的最佳条件。在最佳降解条件下对优势菌种进行了驯化,结果表明,经 30 d 驯化的菌株对六六六的降解率由 45.23% 提高到 54.68%。

参考文献

[1] 刘相梅,彭平安,黄伟林,等.六六六在自然界中的环境行为及研究动向[J].农业环境与发展,2001(2):38-40.

[2] ZHANG S M,M X F,AN Q. Persistence and biodegradation of BHC in soil [J]. Acta Pedol Sin,1988,20(1):79-84.

[3] GU Z L,XIE S Q,ZHANG S M. Microbial degradation of γ-BHC in soil with adequate moisture content[J]. Acta Pedol Sin, 1981,18(3):273-279.

[4] 方玲.降解有机氯农药的微生物菌株分离筛选及应用效果[J].应用生态学报,2000,11(1):249-252.

(上接第 4390 页)

发生,成功地获得了生长健壮、分化完全的幼苗,但是依然存在培养时间过长和繁殖率偏低等问题。在后续研究过程中,将进一步研究鹤望兰组织培养过程中所用的培养基种类、外源激素的种类浓度和比例关系等,建立起更经济、更完善,适合于大规模生产应用的鹤望兰组织培养技术体系。

参考文献

[1] 王振忠,蔡邦平,陈登雄,等.鹤望兰的自花与异花授粉研究[J].北京林业大学学报,2001,23(2):32-35.

[2] 平金培.鹤望兰种子育苗[J].植物杂志,1990,17(2):26.

[3] 王金发,何小玲.鹤望兰无性繁殖试验探索[J].园艺学报,2000,27(4):300-302.