

文章编号: 1001-6155(2001)02-0055-05

六斑月瓢虫模板 DNA 的制备及 16SrDNA 序列扩增

庞虹

(中山大学生物防治国家重点实验室/昆虫学研究所, 广州 510275)

摘要: 本文对酒精浸泡的六斑月瓢虫 *Menochilus sexmaculata* (Fabricius) 标本进行基因组 DNA 的提取, 用线粒体 16 SrDNA 引物扩增出长度约为 500 bp 的 PCR 产物, 为进一步开展瓢虫的分子系统学研究打下基础。

关键词: 瓢虫科; 六斑月瓢虫; PCR; rDNA

中图分类号: S476+.2 **文献标识码:** A

瓢虫科分类当中, 尤其是高级阶元的分类研究, 相当程度上带有人为的因素, 所产生的问题用传统形态学方法难以解决。利用适当的分子生物学方法, 与比较形态学相结合, 有利于研究种群内个体的变异至种间的相互关系, 从物种的进化到各种高级分类阶元的相互关系, 使瓢虫分类研究有可能从简单的鉴定描述到研究其系统发育, 通过比较瓢虫不同类群之间的遗传距离, 确定各分类阶元的地位, 建立更能反映客观实际的系统树。

线粒体 16SrDNA 具有保守性, 适于高级分类阶元和远缘物种关系的分析, 以及推断早期的进化事件。近年, 16 SrDNA 序列已被广泛应用于不同种类昆虫如寄生蜂^[9]、果蝇 *Drosophilidae*^[10]、膜翅目细腰亚目 (Apocrita)^[11]、植食性叶甲 *Ophraella*^[12]、等翅目 *Isoptera*^[14]、虎甲科 *Cicindelidae*^[16]、蜡蝉总科 *Fulgoroidea*^[17] 和萤总科 *Cantharoidea*^[13] 等不同种类昆虫高级分类阶元的研究。

六斑月瓢虫 *Menochilus sexmaculata* (Fabricius) 是分布十分广泛的捕食性瓢虫, 色斑变异大, 易取材, 是理想的实验材料。

1 实验材料

取样为 1979 年 - 1999 年间采集并浸泡于 75% 或 95% 酒精中的六斑月瓢虫标本。

① **基金项目:** 广东省博士后研究基金、中山大学青年教师研究启动基金、生物防治国家重点实验室开放基金资助项目。97 级本科生龙健参加了部分实验。

作者简介: 庞虹 (1965 -) 女, 博士, 副研究员。

主要试剂: SDS、DTT、Tris - Cl、EDTA, 上海 Sangon。琼脂糖, 进口分装。蛋白酶 K, 德国。引物合成、DNA Marker, TaKaBa Biotech。Taq 酶, 华美生物工程公司。

2 方法及步骤

2.1 模板 DNA 的制备

有关瓢虫模板 DNA 的制备, 参考文献中有关昆虫模板 DNA 的制备方法, 加以改进。具体步骤如下:

2.1.1 取单个虫体置于 1.5ml 离心管, 分别加入研磨液 (digestion buffer) 0.5ml; SDS, 1%; DTT, 10mg/ml; Proteinase K, 0.5mg/ml; Tris - Cl, 10mmol pH = 8.0; EDTA, 2mmol。用酒精消毒过的小剪在离心管里将虫体剪碎。

2.1.2 将上述研磨液置于 50℃ 水浴箱 14 - 16 小时。

2.1.3 14000xg 离心 30 分钟, 取上清液。

2.1.4 加入等体积 (0.5ml) 饱和酚溶液 (pH = 8.0), 摇匀 10 分钟; 14000xg 离心 10 分钟, 取上清液。

2.1.5 加入酚、氯仿及异戊醇混合液 (25:24:1) 0.5ml, 摇匀 10 分钟; 14000xg 离心 10 分钟, 取上清液。重复此步骤一次。

2.1.6 加 0.5ml 氯仿: 异戊醇 (24:1), 摇匀 10 分钟, 14000xg 离心 10 分钟, 取上清液。重复此步骤一次。

2.1.7 加 1/10 体积的醋酸钠溶液 (3mol, pH = 5.2) 及两倍体积无水乙醇; 混匀, -20℃ 下 2 小时或 4℃ 下过夜。

2.1.8 14000xg, 4℃ 下离心 30 分钟使 DNA 沉淀。去上清液, 留沉淀 DNA。

2.1.9 加入 70% 酒精 0.5ml 清洗沉淀物, 将盐类溶出; 14000xg, 4℃ 下离心 10 分钟; 去上清液, 风干。

2.1.10 加入 50 μ l TE (Tris - Cl, 10mmol, pH = 8.0); EDTA, (1mmol) 保存。

2.1.11 取 5 μ l 提取物电泳检测。

取 5 μ l 用无菌水稀释 10 倍, 作为 PCR 时的模板。将所得 DNA 保存于 -20℃ 冰箱。

2.2 DNA 的复制与纯化

扩增线粒体 16 S rDNA, 引物为 CPD264 - 01: 5' - GCCTGTTTATCAAAAACAT - 3', CPD264 - 02: 5' - CCGGTCTGAACTCAGATCA - 3, 是参考各类昆虫的 16 S rDNA 序列所设计^[17], 其相对位置分别是 *Drosophila yakuba* 线粒体 DNA 序列的 13416 - 13396 及 12886 - 12884。该引物也曾用于萤火虫的分子系统研究^[13]。

以上 PCR 反应采用以下体系: MgCl₂, 1.5mmol, 3 μ l; 10 \times PCR Buffer 10 μ l; dNTPs, 200 μ mol, 10 μ l; Primer 1, 1 pmol, 1 μ l; Primer 2, 1 pmol, 1 μ l; Taq 酶, 4 unit; 模板 DNA, 1 μ g; 反应液总体积为 100 μ l。

2.2.1 在 200 μ l 的离心管中加入上述成份。

2.2.2 将离心管置于 PCR 仪, 于 94℃ 加热 20 秒, 然后按下列程序反应: 94℃ 40 秒 (Denaturation), 50℃ 40 秒 (annealing), 72℃ 40 秒 (extension)

34 个循环后, 72℃ 延续 10 分钟, 保存于 4℃ 下。

2.2.3 将扩增产物各取 5 μ l 电泳检测。

3 结果与分析

3.1 瓢虫 DNA 的提取

在现有的实验室条件下, 按本文提出的改进方法, 能获得瓢虫的 DNA 样品。以往在瓢虫的 RAPD 研究中, 对 DNA 的提取多为活体和冰冻样品^[15]。这种研究方法受保存条件限制, 不利于对瓢虫进行分子系统学的研究。本实验中的方法可从 1979 - 1999 年间采集的酒精浸制标本中提取 DNA (图 1), 对昆虫学多年积累的标本进行分子系统学研究将十分有利。

3.2 16SrDNA 的 PCR 扩增结果

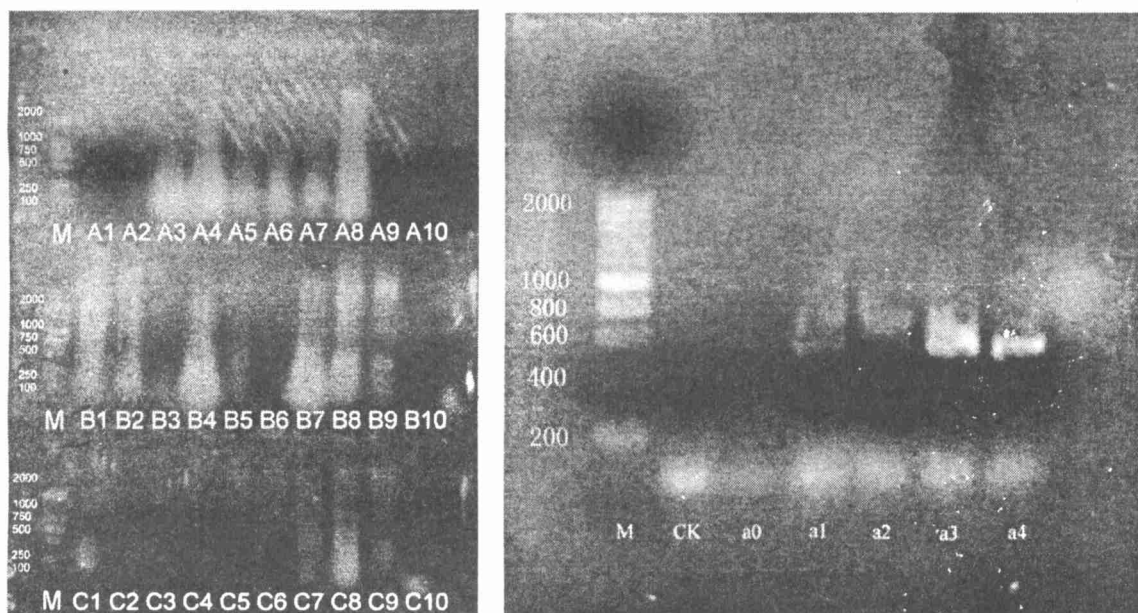


图 1 瓢虫科基因组 DNA 样品琼脂糖电泳检测图谱

图 2 引物 CPD264 - 01、CPD264 - 02 的 PCR 结果

M—DNA Marker

M—DNA Marker; a0 - a4—1999 年标本

A1 - A10—1999 年标本

CK—对照, 在反应体系中

B1 - B10—1984 年标本

以等量双蒸水代替 DNA 模板

C1 - C10—1979 年标本

使用 16 SrDNA 引物扩增从 1979 - 1999 年间采集的酒精浸泡标本中提取的 DNA, 均能在部分样品中获得长度约为 500bp 的 PCR 产物。图 2 为用 1999 年标本提取的 DNA 模板的扩增结果。本试验从技术方法上证明了利用多年酒精浸泡的标本制作模板进行 PCR 反应的可行性, 为今后应用 16SrDNA 进行瓢虫的系统学研究奠定了基础。

3.3 讨论

在扩增实验中,部分材料重复性差,原因可能是多方面的:本试验是用单个虫体来抽提的,不同虫体抽出的DNA量会不同;镁离子的浓度可显著影响PCR的产量及产物特异性。因此PCR反应的条件还有待进一步的改进,在确定样品的DNA浓度后,做样品的浓度梯度、镁离子的浓度梯度实验,以确定最佳的反应条件。

参考文献:

- [1] 王亚明,等. PCR介导的DNA序列分析在系统动物学中的应用[J]. 动物学杂志, 1996, 31(3): 54-59.
- [2] 王文,等. 一种改进的动物线粒体DNA提取方法[J]. 动物学研究, 1993, 14(2): 197-198.
- [3] 王文,等. 懒猴属的核糖体DNA变异及其种间分化关系[J]. 动物学研究, 1996, 17(1): 89-93.
- [4] 兰宏,等. 麂属动物陈旧皮张标本的DNA提取及PCR扩增[J]. 动物学研究, 1995, 16(2): 146-152.
- [5] 张迎春,等. 瓢虫的DNA提取研究[J]. 陕西师范大学学报, 1999, 27(1): 92-94.
- [6] 刘伟,等. rDNA在昆虫纲系统发育研究中的应用[J]. 昆虫知识, 1998, 35(2): 123-126.
- [7] 黄原,等. 昆虫核酸分子系统学研究进展[J]. 昆虫分类学报, 1995, 17(3): 180-184.
- [8] Ausubel, F. 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社. 1998.
- [9] Derr, J. N., S. K. Davis, J. B. Woolley, and R. A. Wharton. Reassessment of the 16SrDNA nucleotide sequence from members of the parasitic Hymenoptera [J]. *Mol. Phyl. Evol.* 1992, 1(4): 338-341.
- [10] DeSalle, R. The origin and possible time of divergence of the Hawaiian Drosophilidae: evidence from DNA sequences [J]. *Mol. Biol. Evol.* 1992, 9: 905-916.
- [11] Downton, M. and A. D. Austin. Molecular phylogeny of the insect order Hymenoptera: apocrotan relationship [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 91: 9911-9915.
- [12] Funk, D. J., D. J. Futuyma, G. Orti, and A. Meyer. Mitochondrial DNA sequences and multiple data sets: a phylogenetic study of phytophagous beetles (Chrysomelidae: Ophraella) [J]. *Mol. Biol. Evol.*, 1995, 12: 627-640.
- [13] Suzuki, Hirobumi. Molecular phylogenetic studies of Japanese Fireflies and their mating systems (Coleoptera: Cantharoidea) [J]. *TMU Bulletin of Natural History* 1997, No. 3: 1-53.
- [14] Kambhampati, S., K. M. Kjer, and B. L. Thorne. Phylogenetic relationships among termite families based on DNA sequence of mitochondrial 16S ribosomal RNA gene [J]. *Insect Mol. Biol.* 1996, 5: 229-238.
- [15] Roehrdanz, R. L. Defection of DNA Polymorphism in predatory Coccinellids using Polymerase Chain Reaction and Arbitrary Primers (RAPD-PCR) [J]. *Entomophaga* 1993, 38(4): 479-491.
- [16] Vogler, A. P. and D. L. Pearson. A molecular phylogeny of the tiger beetles (Cicindelidae): congruence of mitochondrial and nuclear rDNA sets [J]. *Mol. Phyl. Evol.* 1996, 6: 321-338.
- [17] Yeh, W. B., C. F. Hui, and C. T. Yang. Some considerations of evolutionary process in Fulgoro-morpha. Proc. 9th international Auchen. Congress, Sydney, Australia, 1997. pp. 32-33.

EXTRACTION OF DNAs IN *MENOCHILUS SEXMACULATA*
(COLEOPTERA: COCCINELLIDAE) AND
AMPLIFICATION OF 16SRDNA FRAGMENT BY PCR

PANG Hong

(State Key Laboratory of Biocontrol / Institute of Entomology,
Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Abstract: In this paper we report improved methods of DNA extract. The genomic DNA was extracted separately from alcohol steep samples. Fragments of about 500 bp of the mitochondrial 16S ribosomal RNA gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR) from the DNA using primers CPD264-01: 5' - GCCTGTTTATCAAAAACAT - 3', CPD264-02: 5' - CCGTCT-GAACTCAGATCA - 3'. The study results provide new data for phylogenetic reconstruction of the family relationships within coccinellids based on DNA sequences of rDNA gene.

Key words: Coccinellidae; *Menochilus sexmaculata*; PCR; 16SrDNA