

稻飞虱基因组 DNA 提取方法的比较*

刘佳妮¹, 桂富荣¹, 李正跃^{1**}, 沈文武²

(1. 农业生物多样性与病虫害控制教育部重点实验室, 生物多样性研究与应用技术国家工程中心, 云南农业大学 植物保护学院, 云南 昆明 650201; 2. 云南省建水县植保植检站, 云南 建水 654300)

摘要: 以褐飞虱 (*Nilaparvata lugens* Stal) 为材料, 分别采用 SDS 法, CTAB 法, 冰 KAc 法和饱和 NaCl 法提取褐飞虱的基因组 DNA。通过电泳、紫外光谱分析和 ISSR-PCR 扩增等检测手段, 比较分析了 DNA 数量与质量。结果表明: CTAB 法和 SDS 法提取的 DNA 质量明显优于冰 KAc 法和饱和 NaCl 法, 适于 PCR 扩增。并且 SDS 法提取的 DNA 经过 PCR 扩增后得到较多的多态性位点。因此, SDS 法是实验室提取稻飞虱基因组有效, 经济实用的方法。

关键词: 基因组 DNA; DNA 提取; 稻飞虱

中图分类号: S 435.112.3 文献标识码: A 文章编号: 1004-390X (2008) 05-0037-05

Comparative Study on Methods for Extraction of Genomic DNA of Rice Planthopper

LIU Jia-ni¹, GUI Fu-rong¹, LI Zheng-yue¹, SHEN Wen-wu²

(1. Key Laboratory of Agro-biodiversity and Pest Management of Education Ministry of China, The National Center for Agro-biodiversity, College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;
2. Plant Protect Station of Jianshui, Jianshui 654300, China)

Abstract: Genomics DNA were extracted from the rice planthopper *Nilaparvata lugens* (Stal) using SDS, CTAB, KAc and NaCl method, respectively. DNA was detected by electrophoresis, UV and ISSR-PCR. The results suggested that, the quality of DNA samples extracted by CTAB method and SDS method was obviously better and more suitable for PCR than that by the other two methods, furthermore, SDS method presented the most polymorphic sites. Therefore, the SDS method was the most effective, practical and economic method in the genomic DNA extraction of planthopper in laboratory.

Key words: genomic DNA; DNA extraction; rice planthopper

近年来, 随着昆虫分子系统学和进化研究的迅猛发展, 利用分子生物学技术从核酸水平对昆虫进行物种鉴别和探讨物种起源与进化是现代昆虫分子系统学和系统发育学的研究热点^[1]。在研究中, 无论是以 southern 杂交技术为核心还是以 PCR 技术为核心的分子标记, 都需要提取一定数量和高质量的 DNA 为前提。在群体分子遗传学研究中, 由于研究样本量大, 除了要求获得适当数量和高质量的 DNA 以外, 还需要在方法上简便易

行, 成本低廉^[2,3]。

稻飞虱 (*Nilaparvata lugens*) 是亚洲水稻生产上的重要害虫, 其种群有着非常复杂的空间结构, 是一种大范围迁飞性昆虫, 在我国发生和危害十分频繁和严重。早几年, 国内有学者对稻飞虱不同地理种群做过 RAPD 分析, 从 DNA 水平上初步探讨了稻飞虱地理种群间的遗传差异^[4,5] 以及不同生物型基因组的遗传分化^[6,7], 但对稻飞虱基因组 DNA 提取方法的比较研究较少。本实验比较

收稿日期: 2007-11-20 修回日期: 2007-12-21

* 基金项目: 国家“973”计划项目 (2006CB100204); 云南省科技攻关项目 (2006SG23)。

作者简介: 刘佳妮 (1983-), 女, 硕士研究生, 主要从事害虫综合治理方面的研究工作。

** 通讯作者 Corresponding author: 李正跃, 男, 教授, 博士生导师。 E-mail: lizhengyue@vip.km169.net

了 4 种稻飞虱基因组 DNA 的提取方法, 探讨不同提取方法的异同点, 以期为进一步用简单序列重复区间 (Inter-simple Sequence Repeat, ISSR) 分子标记技术检测云南不同地理种群稻飞虱的遗传多样性打下良好的基础, 从而明确其迁飞规律和路线, 为稻飞虱的预测预报和持续治理提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试虫来源及其种类

褐飞虱 (*Nilaparvata lugens* Stal) 的成虫样本采自云南省昆明、宜良、昭通、曲靖、丽江、保山等地, 实验中挑取体重, 大小基本一致的雌性成虫为实验材料并提取总 DNA。

1.2 样本处理

田间采集的褐飞虱饥饿 24 h 以上, 使其消化道内的物质充分消化, 以防外源 DNA 干扰实验结果。将其浸入到 85% 的酒精中, 4 ℃ 冰箱保存待用。DNA 提取前用灭菌的双蒸水浸泡标本 12 h 以上^[8]。

1.3 基因组 DNA 的提取

1.3.1 KAc 冰浴法

每个种群取 3 头飞虱长翅型雌成虫置于 1.5 mL 离心管中, 加入 50 μ L 提取缓冲液 (0.1 mol/L Tris-HCl, 0.1 mol/L NaCl, 0.2 mol/L 蔗糖, 0.05 mol/L EDTA, 0.5% SDS), 置于 -20 ℃ 冰箱中 5 min 后取出, 用细玻棒捣碎匀浆, 玻棒用 450 μ L 提取缓冲液冲洗; 65 ℃ 水浴 1 h (其间取出混匀 2~3 次); 加入 1/5 体积 8 mol/L KAc 的提取液, 冰浴 1 h 以上; 取出后 12 000 r/min 离心 15 min, 加入 2 倍体积预冷无水乙醇, 混匀, 置于 -20 ℃ 冰箱中 1~2 h, 沉淀 DNA; 后 12 000 r/min, 离心 15 min, 小心倒弃上清液, 收集沉淀, 用预冷 70% 乙醇洗涤 2 次; 晾干沉淀, 每管加入适量的 ddH₂O, 于 4 ℃ 充分溶解, -20 ℃ 保存备用。

1.3.2 饱和 NaCl 法

每个种群取 3 头飞虱长翅型雌成虫放入 1.5 mL 离心管中, 加入 500 μ L 提取缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA), 充分研磨; 加 50 μ L 10% SDS, 混匀; 57 ℃ 水浴消化过夜; 加 5 mol/L NaCl 500 μ L, 在旋涡混合器上高速混合 30 s; 10 000 r/min 离心 30 min; 取上清, 加入等体积的预冷异丙醇; -20 ℃ 冰箱放置 1 h 以上, 取出于 1 2000 r/min

离心 10 min; 用预冷的 70% 乙醇洗涤沉淀, 干燥后, 加入适量 ddH₂O 于 4 ℃ 充分溶解 DNA, -20 ℃ 保存备用。

1.3.3 SDS 法

每个种群取 3 头飞虱长翅型雌成虫置于 1.5 mL 离心管中, 加入 50 μ L 提取缓冲液 (0.5% SDS, 100 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, 50 mmol/L EDTA), 于液氮中充分研磨, 匀浆, 玻棒用 350 μ L 提取缓冲液冲洗, 再加入 0.2% β -巯基乙醇; 65 ℃ 水浴 1 h (其间取出混匀 2~3 次), 12 000 r/min 离心 10 min; 移上清液于另一离心管中, 加入 300 μ L 饱和 NaCl 溶液, 混匀后 12 000 r/min 离心 10 min; 移上清液于另一离心管中, 加入等体积预冷的异丙醇, 充分混匀, 于 -20 ℃ 冰箱放置 1 h 以上; 12 000 r/min 离心 10 min, 小心倾尽上清液, 收集沉淀, 用预冷 70% 乙醇洗涤沉淀 3 次; 晾干沉淀; 每管加入适量 ddH₂O, 4 ℃ 充分溶解 DNA, 于 -20 ℃ 保存备用。

1.3.4 CTAB 法

每个种群取 3 头飞虱长翅型雌成虫置于 1.5 mL 离心管中, 加入 50 μ L 2 \times CTAB 提取缓冲液 (0.1 mol/L Tris-HCl, 0.02 mol/L EDTA, 1.4 mol/L NaCl, 0.05% CTAB, pH = 8.3) 于液氮中充分研磨, 匀浆, 玻棒用 350 μ L 提取 Buffer 冲洗, 再加入 0.2% β -巯基乙醇; 65 ℃ 水浴 1 h (其间取出混匀 2~3 次), 常温下 10 000 r/min 离心 15 min; 取上清液, 加入等体积的氯仿: 异戊醇 (24:1) 抽提, 在摇床上缓慢摇晃 20 min 后, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 反复抽提 2 次; 再加等体积预冷的异丙醇于 -20 ℃ 冰箱沉淀 1 h 以上, 11 000 r/min 离心 15 min; 用预冷 70% 乙醇洗涤沉淀; 晾干沉淀; 每管加入适量 ddH₂O, 4 ℃ 充分溶解 DNA, 于 -20 ℃ 保存备用。

1.4 DNA 质量检测

1.4.1 DNA 电泳检测

取 2 μ L DNA, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测样品, 以 50 ng/ μ L 的 λ DNA 为 Marker, 室温下 80 V 电泳 2 h, EB 染色, 凝胶成像系统分析仪检测并拍照。

1.4.2 紫外光谱分析

用紫外分光光度计 (上海产 UV-7504PC) 测定 DNA 样品在 260 nm 和 280 nm 下的吸光值。计算 A_{260}/A_{280} 的比值。

DNA 的得率按紫外分光光度计测定的 260 nm 处的吸光值计算:

DNA 得率 = $OD_{260} / (0.02 \times L) \times \text{稀释倍数} \times \text{原液体积}$

L 为比色杯厚度; 0.02 为每毫升溶液中含 1 μg DNA 钠盐时的光密度; OD_{260} 为 260 nm 波长处的光密度读数。

1.5 ISSR-PCR 扩增

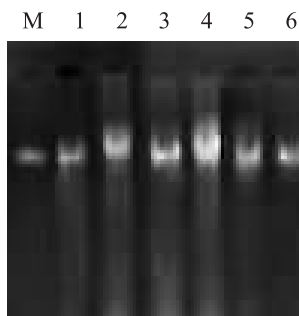
采用加拿大哥伦比亚大学生物技术实验室 (UBCBL) 提供的引物系列, 委托上海生工公司合成的 ISSR 引物 844 (5' - 3' 的序列为 CTCTCTCTCTCTCTCTC) 对所提取的稻飞虱 DNA 模板进行扩增。20 μL 的反应体系中含有 DNA 模板 30 ng 左右; 10 \times PCR Buffer 2 μL ; Mg^{2+} 2.5 mmol/L; dNTPs 1.5 $\mu\text{mol/L}$; primer 1.6 μL ; Taq 酶 1.0 U; 去离子甲酰胺 0.2%; 最后加 ddH₂O 至 20 μL 。扩增的反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min, 然后进行 35 个循环: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 复性 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min。循环结束后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶上电泳。Marker 为 200 bp DNA Ladder, EB 染色后凝胶成像系统观察拍照。

2 结果与分析

2.1 不同方法提取稻飞虱基因组 DNA 结果

2.1.1 KAc 冰浴法

用 KAc 冰浴法提取的 DNA 所得的电泳条带基本不成线型, 还有明显拖尾现象及严重降解 (图 1), 说明此法提得的 DNA 可能含较多的蛋白



M: λDNA , 50 ng/ μL ; 泳道 1-6: 昆明, 宜良, 昭通, 曲靖, 丽江, 保山(下图同)

M: λDNA , 50 ng/ μL ; Lane 1-6: genomic DNA of *Nilaparvata lugens*'s from Kunming, Yi liang, Zhaotong, Qujing, Lijiang, Baoshan, the same as below.

图 1 KAc冰浴法提取DNA电泳检测结果

Fig. 1 Eletropherogram of genomic DNA extracted by KAc method

质, RNA 和多糖大分子杂质, 容易降解。且 A_{260}/A_{280} 的值小于 1.5, 不太符合 ISSR 分析, 构建基因组文库及 PCR 扩增对模板 DNA 的要求。

2.1.2 饱和 NaCl 法

用饱和 NaCl 法提取的 DNA 电泳后条带不太规整, 拖尾严重, 有明显的降解 (图 2), 说明提取的 DNA 不太纯净, 可能含有 RNA、蛋白质、色素等大分子杂质; DNA 条带亮于 Marker, 说明 DNA 量大于 100 ng/ μL 。

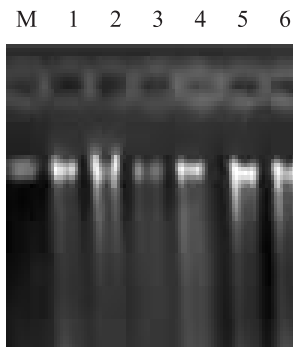


图 2 饱和NaCl法提取DNA电泳检测结果

Fig. 2 Eletropherogram of genomic DNA extracted by NaCl method

2.1.3 SDS 法

用 SDS 法提取的 DNA 电泳条带较整齐, 与 100 ng/ μL 的 Marker 相比较亮 (图 3), 表明获得的 DNA 量较大, 条带很少有拖尾及弥散现象, 说明提取的 DNA 片段完整, 降解极少, 但是 DNA 样品纯度不是太高, 若还需进行更加深入的下游实验, 还需要利用 RNA 酶进行纯化, 以防止 RNA 对实验的干扰。

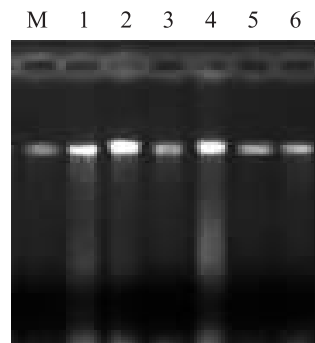


图 3 SDS法提取DNA电泳检测结果

Fig. 3 Eletropherogram of genomic DNA extracted by SDS method

2.1.4 CTAB 法

用 CTAB 法提取的 DNA 电泳的图像主带清晰规则且较亮, DNA 获得量大于或等于 $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$, 主带无拖尾现象 (图 4), 说明此方法提取的 DNA 较为完整, 降解少, 无蛋白质等杂质。本实验中 CTAB 法用 β -巯基乙醇强变性剂和氯仿、异戊醇反复抽提, 蛋白去除效果较好, 但抽提过程繁琐, 易损失 DNA。

2.2 不同方法提取的 DNA 的光密度比值及得率比较

CTAB 法和 SDS 法提取的 DNA 样品在 A_{260}/A_{280} 的吸光值均在 $1.6 \sim 1.9$ 之间 (表 1), 说明本实验所用方法得到的 DNA 比较纯净, 蛋白质、酚类及多糖杂质去除的比较完全, SDS 法提取的 DNA 得率大于 CTAB 法所提取的 DNA; 而 KAc 和饱和

NaCl 法提取的 DNA 样品 A_{260}/A_{280} 都小于 1.6 , 说明提取的 DNA 夹杂着较多的蛋白质, 对以后的构建基因组文库及 PCR 扩增等分析有一定影响。

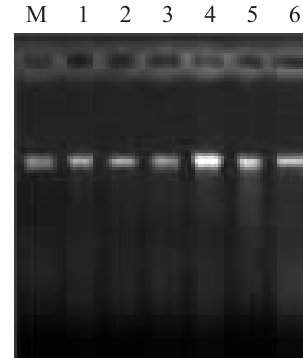
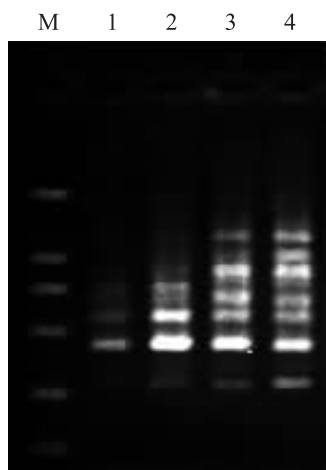


图 4 CTAB法提取DNA电泳检测结果
Fig. 4 Electropherogram of genomic DNA extracted by CTAB method

表 1 不同方法提取的褐飞虱 DNA 的吸光度比值及得率

Tab. 1 A_{260}/A_{280} and the extract rate of *Nilaparvata lugens*'s DNA by 4 methods

方法 method	A_{260}/A_{280}			A_{260}/A_{280} 平均值 average	DNA 得率/ $(\text{ng} \cdot \text{g}^{-1})$ DNA yield			DNA 提取率平均值 average extract rate
KAC 冰浴法	1.51	1.43	1.48	1.49	48.4	53.6	50.9	50.2
KAC method	1.54	1.46	1.58		47.1	54.8	47.8	
饱和 NaCl 法	1.48	1.52	1.49	1.54	70.3	65.9	69.7	64.9
NaCl method	1.65	1.58	1.56		62.8	61.9	58.7	
CTAB 法	1.79	1.69	1.84	1.79	56.3	47.8	50.2	51.6
CTAB method	1.80	1.78	1.86		49.3	51.5	53.7	
SDS 法	1.67	1.59	1.65	1.63	66.7	68.9	63.2	63.7
SDS method	1.58	1.64	1.62		59.1	58.5	65.8	



M: 200bp Ladder; 1: KAc冰浴法; 2: NaCl 法; 3: CTAB法; 4: SDS法

1: KAc method; 2: NaCl method; 3: CTAB method; 4: SDS method

图 5 4种方法提取DNA的ISSR-PCR扩增

Fig.5 ISSR-PCR amplification of genomic DNA of *Nilaparvata lugens* using four extraction methods

2.3 PCR 扩增结果分析

4 种 DNA 提取方法对褐飞虱 DNA 样品在相同的条件下进行 ISSR-PCR 扩增, SDS 法和 CTAB 法获得了清晰的扩增谱带, 且 SDS 法经过 PCR 扩增所得到的条带要比 CTAB 法更加清晰, 多态性略高一些 (图 5)。 β -巯基乙醇强变性剂和氯仿、异戊醇等药品均为易挥发的有毒物质, 可能会残留在提取的 DNA 样品中, 进行 PCR 扩增时影响扩增结果。而 KAc 法和 NaCl 法提取的 DNA 样品在进行 ISSR-PCR 扩增后只得到较少的多态性位点, 可能是由于提取的 DNA 样品部分降解以及 DNA 中残留较多的蛋白和多糖等杂质, 影响了扩增效果。经多次重复实验, 发现 SDS 法提取的 DNA 在 ISSR-PCR 扩增中稳定性和重复性较好, 说明这种方法所提的 DNA 在质量和数量较适于 PCR 扩增。

3 讨论

检测 anyong 比较看来, SDS 法和 CTAB 法提取的 DNA, 电泳检测点样孔干净, 主带清晰整齐, 无拖尾现象, 且条带亮, DNA 获得率都在 50 ng/ μ L 以上, ISSR-PCR 扩增效果较好。证明这两种提取方法所获得的 DNA 质量和数量都占优势, 较适合后续分子检测(如 PCR 及 blotting)的要求。而冰 KAc 法和饱和 NaCl 法提取的 DNA 操作较简单, 但是产物杂质较多, 电泳后主带不完整, 拖尾现象较明显, 降解也严重, 在质量和数量上都欠缺, 很难达到相关的下游实验要求。

一般认为若 $A_{260}/A_{280} > 1.8$, 说明 DNA 中含有 RNA, 可考虑用 RNA 酶处理样品; 若 $A_{260}/A_{280} < 1.6$, 说明样品中存在蛋白质, 应再用氯仿/异戊醇抽提, 以乙醇沉淀纯化 DNA^[9]。本实验中 CTAB 法和 SDS 法提取的 DNA 样品在 A_{260}/A_{280} 的吸光值均在 1.6~1.9 之间, 说明本试验所用方法得到的 DNA 比较纯净, 蛋白质、酚类及多糖杂质去除的比较完全; 而冰 KAc 法和饱和 NaCl 法提取的 DNA 样品 A_{260}/A_{280} 都小于 1.6, 说明提取的 DNA 夹杂着较多的蛋白质, 对以后的构建基因组文库及 PCR 扩增等分析有一定影响。

本试验中 SDS 法提取 DNA 采用全虫体, 昆虫组织较难破碎, 用一般匀浆方法易造成 DNA 断裂, 而且在此过程中 DNA 可能被核酸酶降解。液氮快速冷冻标本, 低温匀浆, 有利于细胞破碎, 其核酸能更多地释放出来, 所需要的实验流程相对较简单, 所花时间也少, 得率较高。另外, 加入了 β -巯基乙醇, 不仅可以防止褐化, 还可以防止 DNA 断裂并重聚为二聚体。DNA 的纯化通常采用的是二倍体积的无水乙醇或者等体积异丙醇, 比较来看, 异丙醇沉淀效果要好一些, 但是最后往往难以除去^[10]。模板中混有少量蛋白质或 RNA, 对扩增效果几乎没有影响。因而模板制备

过程中没有用 RNA 酶处理, 大大缩短了试验时间, 且本试验中没有用到传统的蛋白酶 K, 试验结果未受到很大的影响, 还大大节省了试验的开支。

[参考文献]

- [1] 陈学新. 昆虫分子系统学和进化 [M] //程家安, 唐振华. 昆虫分子生物学. 北京: 科学出版社, 2001.
- [2] ROEHRDANZ R L, NORTH D T. Mitochondrial DNA Restriction Fragment Variation and Biosystematics of the Boll Weevil (*Anthonomus grandis*) [J]. Southwest Entomol, 1992, 17: 101-108.
- [3] 龚鹏, 杨效文, 谭声江, 等. 分子遗传标记技术及其在昆虫科学中的应用 [J]. 昆虫知识, 2001, 38 (2): 86-91.
- [4] 万由衷, 曲志才, 曹清玉, 等. 不同种群灰飞虱 (*Laodelphax striatellus*) 的 RAPD 分析 [J]. 复旦学报 (自然科学版), 2001, 40 (5): 535-539.
- [5] 许俊, 赵艳, 吴爱忠, 等. 不同地区灰飞虱群体的 RAPD 分析 [J]. 上海交通大学学报 (农业科学版), 2001, 19 (1): 21-24.
- [6] 许晓风, 程遐年, 邹运鼎. 褐飞虱不同生物型基因组 DNA 的 RAPD 分析 [J]. 安徽农业大学学报, 2000, 27 (1): 5-8.
- [7] 王桂荣, 樊叶杨, 庄杰云, 等. 稻褐飞虱的 DNA 遗传变异性分析 [J]. 昆虫学报, 2001, 44 (1): 123-126.
- [8] DILLON N, AUSTIN A D, BARTOWSKY E. Comparison of Preservation Techniques for DNA Extraction from Hymenopterous Insects [J]. Insect Molecular Biology, 1996, 5 (1): 21-24.
- [9] 代金霞, 于有志, 郑哲民. 拟步甲科昆虫基因组 DNA 提取的比较研究 [J]. 宁夏大学学报 (自然科学版), 2004, 25 (1): 66-68.
- [10] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 北京: 科学出版社, 1992.