不同保存方式下蝗虫组织 DNA 的提取及 RAPD 分析*

张建珍 郭亚平 马恩波**
（山西大学生命科学与技术学院 太原 030006）

摘要：为了开展蝗虫分子系统学研究，分别对冷冻、乙醇浸泡（100% 乙醇、70% 乙醇）和干制蝗虫标本用饱和 NaCl 法进行了基因组 DNA 的提取，并用随机引物进行扩增，结果表明：70% 乙醇固定的标本和部分干标本提取的总 DNA 得率较低，在琼脂糖凝胶电泳检测中大部分有明显降解，导致 PCR 扩增中信息缺失，甚至无扩增条带；而保存完好的干标本、-20℃冷冻标本和 100% 乙醇浸泡标本提取的总 DNA 带型整齐，无拖尾，PCR 扩增结果的稳定性好，成为蝗虫分子系统学研究中首选的三种保存方式。

关键词：蝗虫；保存方式；DNA 提取；RAPD 分析
中图分类号：Q7 **文献标识码**：A **文章编号**：0250-3263(2004)02-53-05

DNA Extraction and RAPD Analysis of Grasshopper Samples Kept under Different Conditions

ZHANG Jian-Zhen GUO Ya-Ping MA En-Bo
(*College of Life Science and Technology*, *Shanxi University*, *Taiyuan* 030006, *China*)

Abstract: To explore the molecular phylogenetic relationship of grasshoppers, genome DNA of grasshoppers which were frozen under -20℃, preserved in 100% ethanol, 70% ethanol or kept as a dry sample was extracted using saturated NaCl. Arbitrary regions of the genome DNA were amplified by polymerase chain reaction (PCR). The results indicated that DNA obtained from 70% ethanol fixed samples and some dried samples were visualized by ethidium bromide staining of agarose gels, the DNA was of a low molecular size and invariably proved to be degraded, which caused either information not to be obtained entirely or no amplified bands in PCR. However, the well-preserved dry samples, the frozen samples and 100% ethanol fixed samples were quite good for DNA extraction and RAPD analysis, and they were used as the optimal preserving condition in studying molecular phylogenetic relationship of grasshoppers.

Key words: Grasshopper; Samples preservation; DNA extraction; RAPD

蝗虫是农业生产上的重要害虫，为了有效地防治蝗虫为害，必须正确识别蝗虫种类。蝗虫系统分类学方面国内外学者做了大量的工作[1,2]，除应用常规形态分类特征予以鉴别外，也曾采用染色体核型和带型指标及同工酶生化指标进行过较为深入的研究[3~5]，但部分物种的鉴定在分类学界尚存在争议[1,6]，蝗虫系统分类学关系更深入的探讨还需要采用分子水平更合适的遗传标记来补充和完善。

随机扩增多态性 DNA(random amplified polymorphism

* 国家自然科学基金资助项目(No.30070112)，山西省自然科学基金资助项目(No.991096)；
** 通讯作者，E-mail: maenbo@public.ty.sx.cn;
第一作者介绍 张建珍，32 岁，女，博士研究生；研究方向：分子系统学。
收稿日期：2003-08-01，修回日期：2003-12-10

DNA, RAPD)是以聚合酶链反应(PCR)为基础,是 20 世纪90 年代初发展起来的一项 DNA 多态性检测技术[7,8]。由于其方法简便、快捷,在昆虫分类及系统学研究中被广泛应用[9~13]。RAPD-PCR 扩增对模板 DNA 质量要求较高,通常要求从新鲜标本中提取高分子量基因组 DNA 作为模板。然而,在实际工作中,很难直接用活标本进行实验,经常面临标本的保存问题,若标本保存不当,细胞内 DNA 发生降解,则难以获得高质量的 DNA 模板,导致 PCR 扩增结果不稳定甚至无扩增产物出现,给实验工作者带来诸多不便。本文比较了不同保存方式下蝗虫体细胞 DNA 的提取及 PCR 扩增结果,为蝗虫标本的正确保存和蝗虫分子系统学研究提供了基础数据。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫　本实验所用蝗虫标本见表 1。

表 1　研究样本来源及保存方式

种名	采集地点	采集时间（年．月）	保存方式
中华稻蝗	山西晋源	2002.8	100%乙醇固定
中华稻蝗	山西晋源	2002.8	70%乙醇固定
中华稻蝗	山西屯留	2001.7	冷冻
中华稻蝗	福建福州	1996.8	干标本
小稻蝗	云南龙陵	2002.9	100%乙醇固定
小稻蝗	陕西镇巴	1996.8	干标本
日本稻蝗	陕西西安	1993.7	干标本
黑翅竹蝗	广东鹤山	2002.8	干标本

1.2　总 DNA 的提取　取蝗虫后足股节肌肉,冷冻蝗虫标本用无菌三蒸水冲洗 2~3 次;乙醇固定标本用无菌三蒸水浸泡 48 h 以上,弃水;对干标本,用 500 μl 浸泡液(10 mmol/L Tris-HCl,200 mmol/L EDTA,50 mmol/L NaCl pH 8.0)浸泡 48 h 以上,弃去浸泡液,剪碎材料,加 400 μl 消化液(STE pH 8.0,1% SDS,200 μg/ml Proteinase K)于 55℃消化 8~12 h 以上,加 300 μl 饱和 NaCl,涡旋 30 s,10 000 r/min离心 30 min,转移上清,等体积异丙醇沉淀 DNA,TE(pH 8.0)溶解后,于 -20℃保存备用。

1.3　PCR 扩增　反应体系 25 μl,其中模板 DNA 20~50 ng,10×buffer 2.5 μl,Mg^{2+} 2~2.5 mmol/L,dNTP 0.2 mmol/L,引物 0.4 μmol/L(引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,共筛选出 24 条随机引物用于稻蝗的扩增,11 条随机引物用于竹蝗的扩增,选取在稻蝗和竹蝗的 PCR 扩增中稳定性很好的 3 个引物用于本实验中提取 DNA 的扩增,引物号及序列为 S134:5′-TGC TGC AGG T-3′,S148:5′-TGA CCA CGG T-3′,S1419:5′-ACA CCG ATG C-3′),*Taq* DNA 聚合酶 1U(华美生物工程公司提供)。反应条件为:94℃预变性 1 min 45 s;94℃变性 30 s,37℃退火 1 min 30 s,72℃延伸 2 min;45 个循环后,72℃延伸 10 min。

1.4　电泳及结果记录　提取的总 DNA 用含有 EB(0.5 μg/ml)的 0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测,取样品 1 μl,加 5 μl 灭菌水、1 μl 上样缓冲液混匀点入胶孔,100 V 恒压电泳 0.5 h;扩增产物用含有 EB(0.5 μg/ml)的 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,取样品 DNA 10 μl,加 2 μl 上样缓冲液,混匀后点入胶孔,100 V 恒压电泳 1.5 h,凝胶成像系统观察拍照。

2　结　果

2.1　总 DNA 的提取结果　用饱和 NaCl 法分别对冷冻标本、乙醇浸泡标本(100%乙醇,70%乙醇)和干标本进行体细胞 DNA 的提取,提取样品经电泳检测,结果见图 1~3。由图可见:冷冻标本、100%乙醇浸泡标本和保存

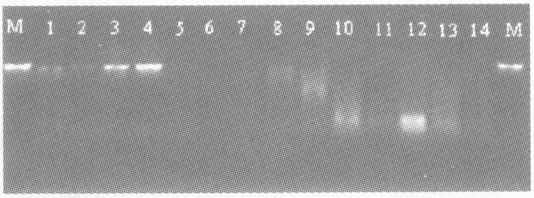

图 1　不同方式保存中华稻蝗提取 DNA 的琼脂糖凝胶电泳结果

M.λ DNA(100 ng); 1,2. 冷冻标本;3,4.100%乙醇浸泡标本;5,6.70%乙醇固定标本;7~14. 干标本

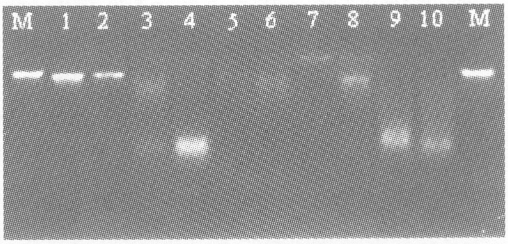

图 2　不同方式保存小稻蝗提取 DNA 的琼脂糖凝胶电泳结果

M.λ DNA(100 ng); 1,2.100%乙醇浸泡标本;3~10. 干标本

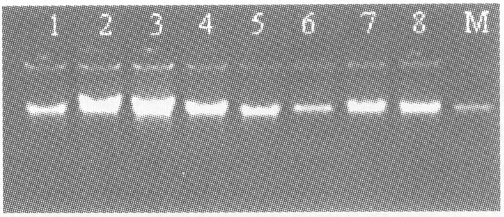

图 3　黑翅竹蝗干标本总 DNA 的琼脂糖凝胶电泳结果

1~8. 干标本;M.λ DNA(100 ng)

完好的干标本提取的总 DNA 在 λDNA 处有一亮带,无拖尾;而 70% 乙醇固定的蝗虫标本和部分干标本提取的总 DNA 在琼脂糖凝胶电泳检测中出现明显的降解。

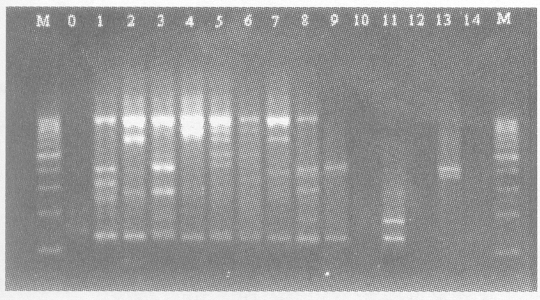

图 4　引物 S134 对中华稻蝗扩增的 RAPD 图谱

M. Marker(200 bp DNA Ladder);0. 空白对照;1,2. 冷冻标本;3,4. 100% 乙醇浸泡标本;5,6. 70% 乙醇固定标本;7 ~ 14. 干标本

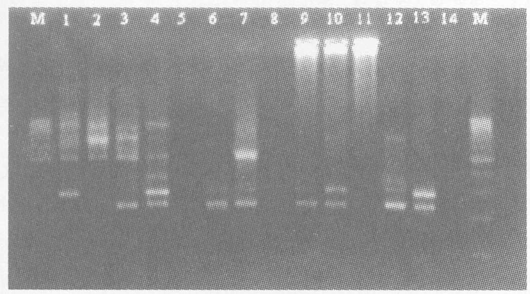

图 5　引物 S148 对中华稻蝗扩增的 RAPD 图谱

M. Marker(200 bp DNA Ladder);1,2. 冷冻标本;3,4. 100% 乙醇浸泡标本;5,6. 70% 乙醇固定标本;7 ~ 14. 干标本

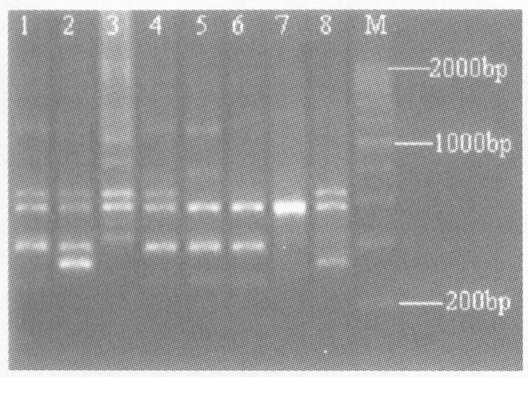

图 6　引物 S1419 对黑翅竹蝗 8 个个体扩增的 RAPD 图谱

1 ~ 8. 干标本(100 ng);M. Marker(200 bp DNA Ladder)

2.2　PCR 扩增结果　实验中用 3 个随机引物对不同保存方式蝗虫标本中提取的 DNA 进行了扩增,结果见图 4 ~ 6。由图可见,用高分子量 DNA(来自冷冻标本、100% 乙醇浸泡标本和快速干贮、保存完好的干标本)进行扩增时,均有好的扩增条带出现,且稳定性好。而用出现降解的 DNA(来自 70% 乙醇固定标本和部分干标本)做模板,扩增效果较差,甚至扩不出带来。

3　讨　论

3.1　DNA 质量对 RAPD 结果的影响　在昆虫分子系统学研究中,RAPD 以其方法简便、快捷、对模板的需要量少等特点而被广泛应用[14,15]。RAPD 依靠单一引物与基因组中某些特定的 DNA 序列退火扩增。这些能扩增的特定序列要求在 0.1 ~ 3 kb 范围内有与引物匹配的反向互补序列存在,即在 3 000 bp 范围内含有紧密相邻的反向重复序列,这类区域多随机分布于整个染色体基因组中。RAPD 分析的基本假设是用同一引物扩增的片段如果长度相等,则被视为同一基因座(即同源)。不同物种的基因组中与引物匹配的碱基序列的空间位置和数目都有可能不同,所以扩增产物的大小和数量也有可能不同。随机引物扩增结果除受物种本身的影响外,也与所获得的 DNA 模板的分子量大小有很大的相关性,若 DNA 降解,必然会影响随机扩增中条带的多少及有无。所以,RAPD 分析对模板 DNA 的质量要求较高,通常均从新鲜标本中提取高分子量的 DNA 作为模板。然而,在野外采集和运输标本的过程中,很难保证将活虫带回实验室。昆虫死亡后,细胞内的酶系统由于失去调控系统的控制,细胞内的 DNA 将被大量降解,因此,对野外采集的标本,采取何种保存方式使 DNA 降解减小到最低程度显得尤为重要。

本文分别用冷冻蝗虫标本、酒精浸泡标本和干标本进行基因组 DNA 的提取,研究中发现,冷冻标本、无水乙醇浸制的标本和快速干贮、保存完好的干标本,总 DNA 的得率及质量均较高,提取过程中加异丙醇沉淀时大部分有肉眼可见的 DNA 丝状物,琼脂糖凝胶电泳检测无降解,随机引物扩增的重复性也较好;70% 乙醇固定的标本和部分干标本 DNA 提取效果很差,异丙醇沉淀后一般看不到 DNA 丝状物,电泳检测中有明显降解,随机引物扩增反应中稳定性较差,甚至扩不出带来。王义权等[16]从不同固定剂保存的蛇肌肉标本中提取 DNA 并进行随机引物扩增时认为:降解后的小分子 DNA 对随机引物扩增的可重复性有很大影响。本文在蝗虫组织 DNA 的提取及扩增过程中也有同样的体会。

3.2　干标本 DNA 的提取　有关蝗虫的分类研究由来已久,前人已采集了大量的标本,命名了大量的模式种,这些模式种构成了昆虫系统分类的基础和框架,用分子生物学技术研究昆虫分类和系统演化时,若能用

到这些标本和模式种，可以极大地扩展昆虫分类和系统演化的分子生物学研究范围，有助于建立正确和完善的分类体系，推测正确的系统演化树，而能否应用这些标本的关键是能否获得高质量的 DNA。通过对大量年代跨度较大的干制标本 DNA 的提取并经高压液相色谱(HPLC)和电子显微术分析，Pabbo 等[17]认为：干制标本早期主要受内源酶水解而破坏，因此，从动物死亡到标本完全干燥的时间长短是该标本保留多大 DNA 分子最关键的因素，而与标本的保存年代没有相关性。他已证明从保存 4 年的干标本中提取的 DNA 分子降解程度与从 13 000 年前的标本中提取的 DNA 没有差异，甚至从 5 000 年前的木乃伊中提取的 DNA 分子更大些，他认为木乃伊死亡后及时脱水、干贮，抑制了内源酶的水解过程。兰宏等[18]从保存于标本馆中的麂属动物的陈旧皮张(保存年代为 4 ~ 34 年)中也得到高分子量 DNA，并用线粒体 DNA 细胞色素 *b*(Cyt *b*)通用引物进行 PCR 扩增，结果表明能否扩增出 307 bp 的目的片段与提取到的 DNA 分子量有关，与标本保存年代无相关性。本研究中作者分别从 2002 年、1996 年、1993 年采集自然干燥的标本中获得了高分子量 DNA。如何从干标本中获得高质量 DNA，作者有如下几点体会和建议：(1)在标本制备过程中要尽量缩短动物死亡到完全干燥的时间，尽可能减少动物死亡后 DNA 的降解，这是从干标本中获取大分子量 DNA 最关键的一步；(2)选取保存完好且无霉变的标本；(3)提取前的浸泡液应采用高浓度的 EDTA，以抑制 DNA 酶的活性；(4)软化时间要足够(24 ~ 48 h)，以保证肌肉组织的彻底消化；(5)选取简单、快速的提取方法，最大限度减少提取过程中 DNA 的损失。作者最近参考相关文献[19,20]，采用饱和 NaCl 法从蝗虫干标本中提取 DNA 取得了较好的结果，该方法操作步骤简单，大大缩短提取过程，保证了所提 DNA 的完整性和纯度。

3.3 DNA 的提取方法 提取基因组 DNA 常采用酚-氯仿法，此法有很多缺陷：酚等药品价格高且对人体有害；需要转移上清液多次，有机抽提多次，此过程中 DNA 有较大损耗，且浪费材料。本文参考汪永庆[19]、Salah[20]等建议的方法，对实验步骤进行了摸索和改进，成功地对不同保存方式的蝗虫标本进行了基因组 DNA 的提取。本方法与酚-氯仿法相比有以下优点：无需用酚抽提，省时、经济、适合小型昆虫基因组 DNA 的提取，其间仅转移上清液一次，DNA 得率高；适合不同处理材料以及其它昆虫的基因组 DNA 提取，获得的 DNA 可满足昆虫分子系统学研究的需要。

本研究发现 -20℃ 冷冻保存和 100% 乙醇浸泡保存的蝗虫标本为用于 RAPD 分析的最佳标本保存方式，干标本若采取合适的干制方式和提取方法也可获得满足 RAPD 研究的高质量 DNA。

参 考 文 献

[1] Hollis D. A preliminary revision of the Genus *Oxya* Audient-Serville (Orthoptera: Acridoidea). *Bulletin of British Museum (Natural History) Entomology*, 1971, **26**: 269 ~ 343.

[2] 郑哲民. 蝗虫分类学. 西安: 陕西师范大学出版社, 1993.

[3] 马恩波, 郭亚平, 郑哲民. 中国稻蝗属细胞分类学研究. 中国昆虫科学(英), 1994, **1**(2): 101 ~ 109.

[4] 马恩波, 郭亚平, 任竹梅等. 山稻蝗不同地域种群染色体 C 带核型研究. 动物分类学报, 2002, **27**(2): 252 ~ 259.

[5] 乔海暄, 段毅豪, 马恩波等. 蝗总科部分种类等位基因酶的比较研究(英). 遗传学报, 2002, **29**(2): 133 ~ 137.

[6] 马恩波, 郑哲民. 五种稻蝗染色体核型和 C 带带型的比较. 昆虫学报, 1989, **32**(4): 399 ~ 405.

[7] Williams J G, Kubelik A R, Livak K J, *et al*. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. *Nucl Acid Res*, 1990, **18**: 6 531 ~ 6 535.

[8] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl Acid Res*, 1990, **18**: 7 214 ~ 7 218.

[9] Apostol B I, Black W C, Reiter P. Population genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. *Heredity*, 1996, **76**: 325 ~ 334.

[10] Chapco W, Ashton N W, Martel R K B, *et al*. A feasibility study of the use of random amplified polymorphic DNA in the population genetics and systematics of grasshoppers. *Genome*, 1992, **35**: 569 ~ 574.

[11] 田英芳, 郑哲民. 七种蟋蟀基因组 DNA 的 RAPD 多态性研究. 昆虫分类学报, 2001, **23**(4): 248 ~ 252.

[12] 朱道弘, 安藤喜一, 城田安幸. 利用 RAPD 对稻蝗属昆虫亲缘关系的研究. 昆虫学报, 2001, **44**(3): 316 ~ 320.

[13] Chu J, Howard D J. Gene exchange in a ground cricket hybrid zone. *Journal of Heredity*, 1995, **86**: 17 ~ 21.

[14] 鲁亮, 归鸿. RAPD 技术的特点及其在昆虫分类中的应用. 昆虫学报, 1995, **38**(1): 117 ~ 122.

[15] 黄原. 分子系统学——原理、方法及应用. 北京: 中国农业出版社, 1998.

[16] 王义权, 周开亚, 徐路珊等. 不同固定剂保存动物组织标本对 RAPD 反应的影响. 动物学杂志, 1999, **34**(1): 33 ~ 37.

[17] Paabo S. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning and enzyme amplification. *Proceedings of National Academy of Sciences of USA*, 1989, **86**: 1 939 ~ 1 943.

[18] 兰宏,王文,施立明. 麂属动物陈旧皮张的 DNA 提取及 PCR 扩增. 动物学研究,1995,**16**(2):146 ~ 152.

[19] 汪永庆,王新国,徐来祥等. 一种动物基因组 DNA 提取方法的改进. 动物学杂志,2001,**36**(1)27 ~ 29.

[20] Salah M A, Iciar M. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucl Acid Res*,1997,**25**(22):4 692 ~ 4 693.