

应用长 PCR 扩增蝗虫线粒体全基因组

刘念 胡婧 黄原*

(陕西师范大学生命科学院 西安 710062)

摘要 :介绍了用两对长 PCR 引物扩增蝗虫(Acridoidea)线粒体全基因组的方法。从 NCBI 的核酸数据库下载得到 36 种已测昆虫线粒体全基因组,选取 cytochrome *b* (Cyt *b*) cytochrome oxidase subunit II(CO II) 和 cytochrome oxidase subunit I(CO I) 基因的保守区域设计两对引物。其中引物 LP03 和 LP04 从 CO I 向 Cyt *b* 扩增,引物 LPCyt *b* 和 LPCO II 从 Cyt *b* 向 CO II 扩增,两对引物扩增的片段之间有大体 1 kb 的重叠。应用这两对引物成功扩增出 10 种蝗虫的线粒体基因组。考虑到在设计引物过程中所选序列在其他昆虫中的保守性,它们应能在大部分昆虫线粒体基因组扩增中发挥作用。

关键词 :长 PCR,引物,蝗虫,线粒体基因组

中图分类号 :Q 955 文献标识码 :A 文章编号 :0250-3263(2006)02-61-05

Amplification of Grasshoppers Complete Mitochondrial Genomes Using Long PCR

LIU Nian HU Jing HUANG Yuan

(College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract :Long PCR was used to amplify complete mitochondrial genomes of 10 Acridoidea species. Two sets of primers were designed based on conserved regions of Cyt *b*, CO II, and CO I genes which were downloaded from the NCBI. One pair of primers (LP03 and LP04) amplified the region from CO I to Cyt *b*, while the other (LPCyt *b* and LPCO II) amplified the region from Cyt *b* to CO II. There was about 1 kb overlapping region between the two fragments. Although the primers used in this study were examined only in grasshoppers, a possibility of their application to other insects is very high since the high degree of sequence conservation is shown on primer sites in other insects.

Key words :Long PCR; Primers; Acridoidea; Mitochondrial genome

长 PCR 技术由于其自身的优势,被用来扩增线粒体基因组,在生命科学中发挥着重要的作用^[1]。然而在扩增大于 5 kb 的线粒体 DNA (mtDNA) 片段技术上仍很困难,限制了长 PCR 的广泛应用^[2,3]。现今,应用长 PCR 扩增线粒体序列在人类^[4,5]及一些哺乳动物^[6]、鱼类^[7]、鸟类、爬行类^[8]、节肢动物^[9,10]等均有报道,但在昆虫中很少。

本文从 NCBI 的核酸数据库下载得到 36 种昆虫线粒体全基因组。对下载序列加以比对,选取线粒体 DNA Cyt *b*、CO II、CO I 基因的保守区域,参照引物设计原则,设计出两对引物

LPCyt *b* 和 LPCO II、LP03 和 LP04 分别可扩增长 8 kb 和 9 kb 的线粒体基因组片段。引物 LPCyt *b* 和 LPCO II 从 Cyt *b* 向 CO II 扩增;引物 LP03 和 LP04 从 CO I 向 Cyt *b* 扩增。通过对 PCR 反应各影响因素进行优化组合,寻找到最适长 PCR 反应条件,在 10 种蝗虫中扩增出目的片段,为进一步测定这些物种的线粒体全基因组

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No.30470238);

* 通讯作者, E-mail: yuanh@snnu.edu.cn;

第一作者介绍 刘念,女,硕士研究生,研究方向:系统与进化昆虫学, E-mail: liunian@stu.snnu.edu.cn

收稿日期 2005-04-06, 修回日期 2006-01-16

提供了充足的材料。

1 材料与方法

1.1 细胞总 DNA 的提取 分析主要针对 10 种蝗虫(表 1)。配制 A 液(0.005 mol/L Tris、0.01 mol/L NaCl、0.01 mol/L EDTA; pH 7.0 ~ 8.0); B 液(0.5% SDS); C 液(0.2 mg/ml 蛋白酶 K)。按 A 液:B 液:C 液 = 8:1:1 的比例配成匀

浆缓冲液。把标本的肌肉置于其中研磨后放在 65℃ 水浴消化 3 h。用平衡酚(pH 7.6 ~ 7.8)提纯两次,再用 Cl(氯仿:异戊醇 = 24:1)提纯一次。最后用 -20℃ 预冷的 100% 乙醇沉淀和 70% 乙醇洗涤总 DNA。在总 DNA 提取过程中,最好在 4℃ 下离心,离心不超过 12 000 g,防止总 DNA 的降解和断裂。

表 1 实验标本概要

Table 1 Summarization of sample in experiment

科 Family	属 Genus	标本名称 Sample	采集地点 Location	时间 Time (年.月)	保存方式 Preservation
斑翅蝗科 Oedipodidae	飞蝗属 <i>Locusta</i>	东亚飞蝗 <i>Locusta migratoria manilensis</i>	海南海口	2003.10	乙醇浸泡
网翅蝗科 Arcypteridae	网翅蝗属 <i>Arcyptera</i>	隆额网翅蝗 <i>Arcyptera coreana</i>	陕西眉县	2002.07	乙醇浸泡
癩蝗科 Pamphagidae	笨蝗属 <i>Haplotropis</i>	笨蝗 <i>Haplotropis brunneriana</i>	陕西眉县	2002.07	乙醇浸泡
剑角蝗科 Acridoidae	蚱蜢属(剑角蝗属) <i>Acrida</i>	中华蚱蜢 <i>Acrida cinerea</i>	陕西韦曲	2002.07	乙醇浸泡
斑腿蝗科 Catantopidae	星翅蝗属 <i>Calliptamus</i>	意大利蝗 <i>Calliptamus italicus</i>	甘肃永靖	2001.08	乙醇浸泡
斑腿蝗科 Oedipodidae	车蝗属 <i>Gastrimargus</i>	云斑车蝗 <i>Gastrimargus marmoratus</i>	云南西双版纳	1998.07	乙醇浸泡
斑腿蝗科 Catantopidae	蹦蝗属 <i>Sinopodisma</i>	霍山蹦蝗 <i>Sinopodisma houshana</i>	陕西柞水	2002.09	乙醇浸泡
癩蝗科 Pamphagidae	短鼻蝗属 <i>Filchnerella</i>	永登短鼻蝗 <i>Filchnerella yongdangensis</i>	甘肃永靖	2001.08	乙醇浸泡
斑腿蝗科 Oedipodidae	皱膝蝗属 <i>Angaracris</i>	红翅皱膝蝗 <i>Angaracris rhodopa</i>	甘肃永登	2001.08	乙醇浸泡
斑腿蝗科 Catantopidae	稻蝗属 <i>Oxya</i>	中华稻蝗 <i>Oxya chinensis</i>	陕西长安	2004.09	新鲜个体

1.2 引物设计 从 NCBI 的核酸序列数据库中下载 36 条昆虫线粒体全基因组,其中包括半翅目(Hemiptera)昆虫 7 种;翅目(Plecoptera)昆虫 1 种;缨尾目(Thysanura)昆虫 1 种;蜚蠊目(Blattodea)昆虫 1 种;鳞翅目(Lepidoptera)昆虫 5 种;双翅目(Diptera)昆虫 11 种;啮虫目(Psocoptera)昆虫 1 种;膜翅目(Hymenoptera)昆虫 2 种;缨翅目(Thysanoptera)昆虫 1 种;鞘翅目(Coleoptera)昆虫 4 种;直翅目(Orthoptera)昆虫 1 种。选取 Cyt b、CO II、CO I 基因的相应区域,用 Clustal X(1.83)多重序列比对程序^[11]对这 3 组基因分别比对,找出保守序列。CO I 基因中还添加了几条本实验室自己测得的序列。参考在 Cyt b、CO II、CO I 这 3 个基因处的两对通用引物 CB-N-11328^[12]、CB-J-11338^[12]、COI-RLR^[13]、CO II-Cro2^[13] 遵循引物设计原则^[14,15]设计出长 PCR 引物 LP03(32mer) 5'-CATTATTTTGATTYTTTGWCAYCCAGAAGT-3'。其他 3 条引物 LP04(32mer) 5'-AAAATWGCRTAWGCAAATARAAAA

TATCATTTC-3'; LPCO II(32mer) 5'-TGATTAGCTCCACAAATTTCTGAACATTGACC-3'; LPCyt b(32mer) 5'-WACACCAGTTCATATTDAACCAGAATGATATT-3'。使用引物设计软件对引物作全面的分析评价,确保这些引物不会形成非常稳定的引物间或引物内二聚体及发夹结构。设计出的引物由 BGI Life Tech Co., Ltd. 合成并纯化。

1.3 长 PCR 扩增反应 用设计的 2 对引物扩增东亚飞蝗的线粒体全基因组。对影响长 PCR 反应的各项因素,如模板浓度、引物浓度、Mg²⁺ 离子浓度、dNTP 浓度、退火温度和时间等进行分析,找出适合模板和引物的最佳条件。参考 TaKaRa La TaqTM(TaKaRa Biotechnology Co., Ltd.) 使用说明,配制 50 μl 反应混合液 10 × LA PCR Buffer II(Mg²⁺ Free) 2.5 mmol/L MgCl₂, 每种 dNTP 各 400 μmol/L,两种引物各 0.8 μmol/L, 2.5 个单位的 TAKARA LA Taq 酶,以及 0.1 ~ 1 μg 总 DNA 模板,灭菌水补足到 50 μl,在 Bio-Rad Mycycler PCR 仪中进行 PCR 反应,反应条

件:94℃预变性 2 min;92℃变性 30 s;64℃退火 30 s;68℃延伸,12 min,扩增 20 个循环;另 20 个循环是在延伸步骤每一循环增加 20 s;最后 68℃总延伸 7 min。整个反应置于冰上操作,反复吹吸混匀反应液。长 PCR 反应产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测,λDNA \ Hind III 作为标记,在紫外透射仪下观察电泳结果。

2 结 果

凝胶电泳检测(图 1)初步证实,引物 LP03 和 LP04 从 10 种蝗虫总 DNA 中扩增出了目的片段。为进一步证实扩增的目的片段是线粒体 DNA,将飞蝗产物切胶后用 U-gene 试剂盒(U-

gene Biotechnology Co., Ltd.)纯化。用 Big-Dye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems Pty Ltd.)和引物 LPCO II 及 LPCyt b 在 AB 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems Pty Ltd.)上直接测长 PCR 产物两端序列。在 NCBI 的核酸序列数据库中搜索与测序结果匹配度最高的序列:上游引物 LP03 所测序列与 *Locusta* sp. JD-2003 cytochrome oxidase subunit I (CO I) gene;下游引物 LP04 所测序列与 *Locusta migratoria* mitochondrion cytochrome b gene 具有最高的匹配度,这表明扩增产物是目的片段。引物 LPCO II 和 LPCyt b 的扩增情况与引物 LP03 和 LP04 相似,在此不再赘述。

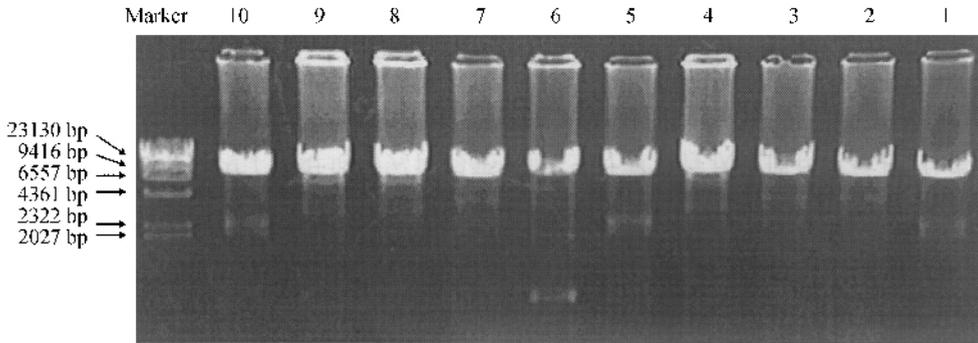


图 1 引物 LP03 与 LP04 扩增蝗虫线粒体基因凝胶电泳检测结果

Fig.1 PCR amplification of complete mitochondrial genomes with LP03 and LP04 in ten Acridoidea species

1. 东亚飞蝗;2. 隆额网翅蝗;3. 笨蝗;4. 中华蚱蜢;5. 意大利蝗;
6. 云斑车蝗;7. 霍山蹦蝗;8. 永登短鼻蝗;9. 红翅皱膝蝗;10. 中华稻蝗。

1. *Locusta migratoria manilensis*; 2. *Arcyptera coreana*; 3. *Haplotropis brunneriana*; 4. *Acrida cinerea*; 5. *Calliptamus italicus*;
6. *Gastrimargus marmoratus*; 7. *Sinopodisma houshana*; 8. *Filchnerella yongdengensis*; 9. *Angaracris rhodopa*; 10. *Oxya chinensis*.

3 讨 论

PCR 技术是现今分子生物学实验室应用相当广泛的技术之一。用它分析 mtDNA 避免了传统方法分离 mtDNA 的费力和耗时,避免了常规 PCR 非特异性扩增核内假基因的干扰。但稳定扩增长于 5 kb 的长片段仍有许多困难^[3]。这是因为长 PCR 技术与常规 PCR 技术相比,对反应中各因素的要求更严格。

各种来源的、降解的、有缺刻的和未纯化 DNA 都在常规 PCR 中成功的应用过,但较长的模板 DNA 中有更多位点容易在变性步骤中发

生脱嘌呤和脱氨,所以长 PCR 反应中模板要求是完整的 DNA 模板^[16,17]特别是在一步扩增全线粒体基因组中,对 PCR 模板要求更严格^[18]。本次实验将全线粒体基因组分成两部分来扩增,适当降低长 PCR 反应对模板的苛刻要求。

引物的好坏往往是 PCR 成败的关键,对于长 PCR 反应而言更是如此。所选引物的好坏决定了 PCR 产物的大小、位置以及 PCR 反应条件和扩增产量等一些重要物理参数。好的引物可以避免背景和非特异性产物的产生。标准 PCR 的引物设计原则,如引物与模板的序列要紧密互补,引物与引物之间避免形成稳定的二

聚体及发夹结构,引物不能在模板的非目的位点引发 DNA 聚合反应(即错配)等^[11,12],也适用于长 PCR 技术。

通过从 NCBI 的核酸序列数据库中下载 36 条昆虫全线粒体基因组,在通用引物 CB-N-11328^[14]、CB-J-11338^[14]、CO I -RLR^[15]、CO II -Cro2^[15]的基础上,遵守引物设计原则,向 3'端或 5'端延伸或删除数个碱基以达到长 PCR 引物的要求。在修改通用引物的过程中尽量选取保守性好的位点,防止多义碱基的出现,特别是尽量避免引物 3'末端位于密码子的第三位,避免 3'末端的简并。总之引物简并位点引入要谨慎,虽然引物使用简并位点后,其适用性增强,但特异性也降低了。引物简并后 PCR 反应应当在比较高的引物浓度下进行,因为在反应混合物中的大多数寡聚物并不是被用来引发专一反应,而只是产生高的背景而已^[12]。

本次实验的引物设计过程参考了一些通用引物,以确保引物的通用性。长 PCR 的引物一般较长,引物每增加一个核苷酸能使反应提高大约 4 倍的特异性^[16]。例如在 CO I 中通过多重序列比对发现几个较为保守的区域。特别是通用引物 CO I -RLR^[15] 5'-TTGATTTTTGGTCA TCCAGAAGT-3'所在区域。考虑通用引物所在区域 5'端保守性较 3'端好,向 5'端延伸 8 个碱基并对其中 3 个多义位点采取简并,得到长 PCR 引物 :LP03(32mer) 5'-CATTATTTTGATTY TTTGGWCAYCCAGAAGT-3'。用同样的方法设计出其他 3 条引物。在此次实验中,通过对长 PCR 各个影响因素的优化组合,成功扩增出东亚飞蝗、隆额网翅蝗、笨蝗;中华蚱蜢、意大利蝗、云斑车蝗、霍山蹦蝗、永登短鼻蝗、红翅皱膝蝗、中华稻蝗。等直翅目昆虫线粒体基因组。考虑在引物设计过程中,选用了 NCBI 的核酸序列数据库中 36 条昆虫全线粒体基因组,包括有翅亚纲 12 个目的昆虫的代表,通过对长 PCR 反应条件的优化,这两对引物应该在其他目昆虫中有更广泛的应用。

参 考 文 献

- [1] 叶维萍,黄原.长 PCR 技术及其在动物学中的应用.动物学杂志,2003,38(3):105~109.
- [2] Suzanne Cheng, Shertg-Yung Chang, Patti Gravitt, et al. Long PCR-As increasingly longer DNA targets are amplified reliably, new applications for PCR are becoming possible. *Nature*, 1994, 369: 684~685.
- [3] Roehrdanz R L. Amplification of complete insect mitochondrial genome in two easy pieces. *Insect Molecular Biology*, 1995, 4(3):169~172.
- [4] Cheng S, Higuchi R, Stoneking M. Complete mitochondria genome amplification. *Nature Genetics*, 1994, 7: 350~351.
- [5] Li Y Y, Hengstenberg C, Maisch B. Whole mitochondrial genome amplification reveals basal level multiple deletions in mtDNA of patients with dilated cardiomyopathy. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 1995, 210: 211~218.
- [6] Nelson W S, Prodohl P A, Avise J C. Development and application of long-PCR for the assay of full-length animal mitochondrial DNA. *Molecular Ecology*, 1996, 5: 807~810.
- [7] Jae-Seong Lee, Masaki Miya, Yong-Sung Lee, et al. The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of the self-fertilizing fish *Rivulus marmoratus* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) and the first description of duplication of a control region in fish. *Gene*, 2001, 280: 1~7.
- [8] Axel Janke, Ulfir Amason. The complete mitochondrial genome of alligator mississippiensis and the separation between recent archosauria (birds and crocodiles). *Mol Biol Evol*, 1997, 14(12): 266~272.
- [9] Francesco Nardi, Antonio Carapelli, Pietro Paolo Fanculli, et al. The complete mitochondrial DNA sequence of the basal hexapod *Tetradontophora bielaniensis*: evidence for heteroplasmy and tRNA translocations. *Mol Biol Evol*, 2001, 18(7): 293~304.
- [10] Mitsugu M Yamauchia, Masaki U Miyab, mutsumi Nishida. Complete mitochondrial DNA sequence of the swimming crab, *Portunus trituberculatus* (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Gene*, 2003, 311: 129~135.
- [11] Thompson J, Gibson T J, Plewniak, et al. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(24): 4876~4882.
- [12] Chris Simon, Francesco Frati, Andrew Beckenbach, et al. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann Entomol Soc Am*, 1994, 87(6): 651~701.
- [13] Roehrdanz R L. An improved primer for PCR amplification of mitochondrial DNA in a variety of insect species. *Insect*

- Molecular Biology* , 1993 **2**) 89 ~ 91 .
- [14] 张新宇 , 高燕宇 . PCR 引物设计软件使用技巧 . 生物信息学 2004 **4**) : 15 ~ 18 .
- [15] 郑仲承 . 寡核苷酸的优化设计 . 生命的化学 , 2001 , **21** (3) 254 ~ 256 .
- [16] Barnes W M . PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from λ bacteriophage templates . *Proc Natl Acad Sci USA* , 1994 **91** : 216 ~ 220 .
- [17] Cheng S , Chen Y , Monforte J A , *et al* . Template integrity is essential for PCR amplification of 20-to 30-kb sequences from genomic DNA . *PCR Methods Appl* , 1995 **4** : 294 ~ 298 .
- [18] Ui Wook Hwang , Chan Jong Park , Tai Soon Yong , *et al* . One-Step PCR amplification of complete arthropod mitochondrial genomes . *Molecular Phylogenetics and Evolution* , 2001 **19** (3) 345 ~ 352 .