

② 581-583

瓢虫干标本基因组 DNA 的提取及 RAPD 分析

张迎春, 郑哲民

Q969.496.8

(陕西师范大学 生命科学学院, 陕西 西安 710062)

摘要:实验对保存多年的瓢虫干标本进行了基因组 DNA 提取和 RAPD-PCR 扩增。结果显示 DNA 分子的提取与保存年代长短无直接关系;RAPD-PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测,分子量大小约为 1 984 bp~630 bp;不同种瓢虫的 DNA 用同一引物,扩增片段呈多态表现,同一种瓢虫的干标本保存时间虽不同,但扩增产物中均具有相同的 DNA 片段。

关键词:瓢虫;干标本;RAPD-PCR;DNA

基因组

中图分类号:Q969.4968

文献标识码:A

文章编号:1000-274 X (1999)-0581-03

分子生物学的飞速发展,使人们对生物体的认识已从形态构造深入到核酸分子的水平。通过分析不同物种 DNA 分子的结构异同来探讨物种的起源分化,已成为现代生物学的研究热点之一。近年来,国内外有关昆虫 DNA 分子的研究已涉及到蚜虫^[1]、蚊^[2]、蝗虫^[3]、蟋蟀^[4]等一些昆虫种类。在众多的文献资料中,尚不见从保存多年的昆虫干标本中提取 DNA 分子报道,这对研究昆虫的系统进化显然是一种缺憾。据文献^[5]对昆虫冰冻标本 DNA 的研究方法,对保存多年的瓢虫干标本进行了基因组 DNA 分子的提取和随机扩增多态性 DNA(Random Amplified Polymorphic DNA)研究,旨在探索昆虫分子系统学和分子进化生物学研究的方法。

1 材料和方法

1.1 材料

实验材料选自陕西师范大学生命科学学院和动物研究所标本室。1981~1995年保存至今的瓢虫针插干制标本共 41 份。肉眼观察和解剖镜下观察无霉变、虫蛀,以保证样品 DNA 无其他因素的干扰。

1.2 基因组 DNA 提取

将瓢虫个体在 1.5 mL eppendorf 管中用塑料研杆粉碎,然后用文献^[6]的方法进行 DNA 提取。在

提取 DNA 的过程中,为保证 DNA 的纯度,用氯仿:异戊醇(24:1)反复抽提 3 次,再经异丙醇沉淀,离心(11 000 r/min)15 min,70%酒精洗涤、干燥。

1.3 RAPD-PCR 反应条件

所用 Tag DNA 聚合酶及随机引物购自上海生工(Sangon)生物工程技术公司,引物序列为 S92:5'-CAGCTCACGA-3'。PCR 仪为美国产 Thermolyse Amlitron I 型微电脑自动基因扩增仪。每个反应系统体积为 25 μ L。内含 10 \times buffer[500 mmol KCl,100 mmol Tris-HCl(pH 8.0),0.1 mmol EDTA,1 mmol DTT,0.1 TritonX-100]2.5 μ L,dNTP 0.15 mmol,MgCl₂ 1.5 mmol,引物 20 ng,DNA 样品 25 ng,Tag DNA 聚合酶 2 μ L,无菌水 17.2 μ L。每个循环程序变性为 94 C 30 s;退火为 37 C 2 min;延伸 72 C 2 min。共进行 45 个循环。反应前在 94 C 预变性 1 min 45 s,45 个循环结束后在 72 C 延伸 10 min。

1.4 琼脂糖凝胶电泳

配制 1.5%的琼脂糖凝胶,内含溴化乙锭(EB) 0.5 μ g/mL,电泳缓冲液为 0.5 \times TBE(pH 8.0),电压 100 V,2 h,紫外检测仪下观察并拍照。

2 结果

在用于提取的 41 份瓢虫干标本中,有 5 份获得

收稿日期:1999-03-04

基金项目:陕西省自然科学基金资助项目(No. 97SM101)

作者简介:张迎春(1956-),女,陕西西安人,陕西师范大学副教授,从事分子系统学研究。

基因组 DNA 分子,占提取个体的 12.2%。1980 年的标本为 4 只个体,其中 2 只获得 DNA 分子,1982,1985,1990 年保存的个体标本中均只有 1 个标本提取出 DNA 分子,1995 年标本中提取出 DNA 分子的个体数为 0。可见,从干标本中所提取出的 DNA 分子与标本保存年代长短没有直接关系。

将上述提取的 DNA 分子用同一随机引物,在同一反应条件下进行 RAPD-PCR 扩增,扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测、拍照,结果见图 1。其中阴性对照无扩增片段,实验重复性良好,表明 DNA 提取和扩增过程未受到外源 DNA 分子污染。扩增产物与 DNA 分子量标志物作对比,1980~1996 年保存的干标本 DNA 均有扩增片段出现,分子量最大为 1 984 bp,最小为 630 bp,第 2 泳道为阴性对照。位于 1,3,4 泳道的扩增产物分属 3 个不同的瓢虫种类,扩增 DNA 片段的数量有较大的差异;位于 1,5,6,7 泳道的扩增产物属于同一种瓢虫。其中第 7 泳道为 1996 年保存的干标本 DNA 扩增片段,与之相比,小于 630 bp 的片段在 1980,1985,1990 年的干标本 DNA 中均未呈现,但均具有 1 584 bp,1 256 bp 的 DNA 扩增片段。

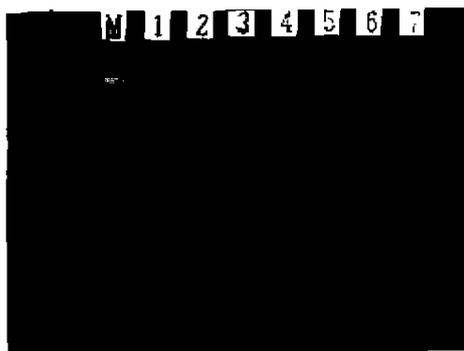


图 1 不同年代瓢虫标本 RAPD-PCR 扩增产物电泳图谱
Fig. 1 The electrophoresis pattern of RAPD-PCR products in coccinlids dry samples of different years

M 标准分子量标志物 2 阴性对照 1,5 1980 年干标本
3,4,6 1982,1985,1990 年干标本 7 1996 年干标本

3 讨 论

当前,系统学和进化生物学十分重视从长期保存的标本中提取 DNA 分子的研究工作,利用现代生物学技术对物种进行核酸分子水平上的分析与研究,不仅扩展了分子生物学的应用范围,更重要的是可以为物种的系统学研究和分子进化生物学方面的研究从本质上提供新的依据。笔者曾在保存两年以

内的干标本、酒精浸泡标本及新鲜瓢虫个体标本中进行了 DNA 提取研究,获得 DNA 分子的个体占所提取个体的 90% 以上^[7]。本实验对保存多年的干标本进行 DNA 提取,所获得 DNA 分子的个体则明显减少,但在 1980 年保存的标本中能提取出 DNA 分子,而同样的方法在 1995 年保存的标本中却没有提取出来。这一结果显然与标本的保存年代无直接关系。死亡的动物与具生命活力的动物机体相比,从生物化学角度看,由于体内代谢停止,细胞内的酶系统失去调控而开始自身降解,细胞内 DNA 分子也有被降解的可能。但是,死亡一定时间后,细胞因逐渐失去水分,酶逐渐失活,这种自身降解作用将逐渐减少,最终停止。由此可见,水分的存在与否、存在时间的长短与酶活动是相关的,而酶活动对 DNA 的保存是十分不利的。这也许是保存多年的昆虫干标本 DNA 能否提取出来的主要因素。然而,昆虫标本是否及时进行干燥处理,是 DNA 分子否能进行长期保存的关键。这与文献[8]曾在脊椎动物及哺乳类动物陈旧标本中提取 DNA 的研究结果基本一致。按此推测,就目前的技术和方法,若不了解标本保存前的干燥处理情况,要从保存于博物馆、标本室的标本中提取出 DNA 分子的可能性是不确定的。

本研究在 RAPD 实验中,用一条引物对多年干标本中提取的不同种瓢虫 DNA 进行扩增,首先从技术方法上证明了实验的可行性,为今后运用多种引物对提取出的 DNA 分子进行深入研究提供了例证。其次,从实验结果中可看出,同一条引物对不同种的瓢虫 DNA 扩增出的 DNA 片段大小、数目不同,呈多态表现。这说明不同种瓢虫的 DNA 分子,与这一引物反向互补的 DNA 碱基序列空间位置有差异,因而从分子水平上证明了种的差异。引人注目的是,同种瓢虫个体虽采集年代不同,保存时间长短不一,但从同一反应条件下所获得扩增产物的比较来看,具有分子量等同的特异性片段,从本质上说明它们具有共同的分子结构。这对今后从大量引物中找出具有鉴别性的引物及其带谱,对物种进行系统的分析研究及进行分子进化的研究具有十分重要的意义。这一实验还可以从一个侧面证明 RAPD-PCR 技术的优点:①DNA 用量少,尽管从多年瓢虫干标本中 DNA 提取量微小,但完全可以用于扩增;②对模板 DNA 质量要求不高,无论是以往的新鲜标本、冰冻标本,还是本实验所用的多年干标本都可以用于扩增;③方法简便,与其他分子生物学技术相比,它不需克隆、转移杂交等繁复程序。因而,这一技术

对瓢虫等小型昆虫进行分子水平上的深入研究有着 重要的应用价值。

参考文献:

- [1] Black I V W C, Duteau N M, Puterka G J. Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA poly morphisms in aphids (*Homoptera: aphididae*)[J]. Bulletin of Entomological Research, 1992, 8:151-159.
- [2] Kambhampati S W C, Black I V, Kai K S. Random amplified polymorphic DNA of mosquito species and populations (*Diptera: Culicidae*) techniques ,statical analysis, and applications[J]. Med Entomol, 1992, 29(6):939-945.
- [3] 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 garsshoppers[J]. Genome, 1992, 35:569-574.
- [4] Harrison R G, Rand D M, Wheeler W C. Mitochondrial DNA size variation within individual crickets[J]. Science 1985, 228: 1 446-1 448.
- [5] Roehdanz R L, Flanders R V. Detection of DNA polymorphisms in predatory coccinellids using polymerase chain reaction and arbitrary primers (RAPD-PCR)[J]. Entomophaga, 1993, 4:479-491.
- [6] Boyce T M, Zwick M E, Aquado C F. Mitochondrial DNA in the pine weevil; size structure and heterophasmy[J]. Genetics, 1989, 123:825-836.
- [7] 张迎春,郑哲民,安书成. 瓢虫 DNA 分子的提取及研究[J]. 陕西师范大学学报(自然科学版), 1999, 29(2):92-94.
- [8] Paabo S, Gifford J A, Wilson A C. Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain[J]. Nuc Acid Res, 1988, 16: 7 775-7 787.
- [9] 兰 宏,王 文,施立明. 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(2):146-152.

(编 辑 张银玲)

RAPD analysis of genomic DNA specimens of dry coccinellid specimens

ZHANG Ying-chun, ZHENG Zhe-min

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

Abstract: The Genomic DNA was extracted and amplified from dry samples of coccinellids (*Coleoptera coccinellidae*). Whether the DNA could be extracted has no relationship with preserving time . The DNA fragments amplified with RAPD-PCR were examined by agarose gel electrophoresis (AGE). Its molecular weight was 1 984 bp to 360 bp. DNAs of different species amplified by same primer show polymorphism . Although dry samples of same species were different preserving time ,the DNA amplified from same species has same fragments.

Key words : coccinellids; genomic DNA; RAPD anoalysis