

人体蠕形螨基因组 DNA 提取方法的比较研究

余俊萍¹ 张锡林^{2*} 王光西¹ 杨燕¹ 何谐² 王利芳¹

【摘要】 目的 比较两种人体蠕形螨基因组 DNA 提取方法,用随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 方法进行初步分析。 **方法** 分别用经典方法和小型昆虫试剂盒提取人体蠕形螨基因组 DNA,并设计 5 条随机引物,应用 RAPD 技术对人体毛囊蠕形螨基因组 DNA 进行随机扩增,扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后分析。 **结果** 小型昆虫试剂盒提取人体蠕形螨基因组 DNA 的纯度高于酚氯仿抽提方法,但浓度低。引物 P3 扩增出 2 条人体蠕形螨条带。引物 P4 扩增出 3 条条带。 **结论** 经典方法提取人体蠕形螨基因组的 DNA 能够满足基因组 DNA 的 RAPD 分析要求。

【关键词】 毛囊蠕形螨;DNA 抽提;随机扩增多态性 DNA

Comparison between two methods of extracting DNA from *Demodex folliculorum* SHE Jun-ping¹, ZHANG Xi-lin^{2*}, WANG Guang-xi¹, YANG Yan¹, HE Xie², WANG Li-fang¹. ¹Department of Pathogen Biology of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China ²Department of Pathogen Biology of the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

* Corresponding author; ZHANG Xi-lin, Email: jsczxl@tmmu.edu.cn

Supported by the Health Department of Sichuan Province in 2011 Funded Project (100245) and Luzhou Medical College Project in 2010 Funded Project (767)

【Abstract】 Objective To compare two methods of extracting DNA from *Demodex folliculorum* and to preliminarily analyse DNA with RAPD. **Methods** DNA of *follicle mites* was extracted by either phenol-chloroform extraction or insect DNA extracting kit. Five pairs of random primers were designed to randomly amplify the genomic DNA by random amplified polymorphic DNA (RAPD). The products were analyzed by 1.5% agarose electrophoresis. **Results** The genomic DNA of demodicid mites extracted with insect DNA kit was more pure than DNA extracted by phenol-chloroform extraction, but its concentration was much lower than that extracted by phenol-chloroform extraction. Two and 3 bands were obtained with P3 and P4 primers, respectively.

Conclusion The genomic DNA extracted by phenol-chloroform extraction could meet the requirement of RAPD analysis.

【Key words】 *Demodex folliculorum*; DNA extraction; Random amplified polymorphic DNA

蠕形螨是一类小型永久性体表寄生虫,寄生于人和哺乳动物的毛囊和皮脂腺内。寄生于人体的蠕形螨主要有毛囊蠕形螨 (*Demodex folliculorum*, Df) 和皮脂蠕形螨 (*Demodex brevis*, Db),人群普遍易感,呈世界性分布,国内报道人群感染率在 0.8% ~ 81.0%^[1]。近年临床调查结果显示,面部皮肤病的蠕形螨检出率为 92.55%^[2],感染以毛囊蠕形螨为主,皮脂蠕形螨次之,混合感染相对较少^[3],颜面、鼻、额、眼睑和外耳道的部位寄生密度较高,虫体以细胞液等为营养物质,其强壮的螯肢对宿主的皮肤组织有不同程度的损害,临床上可致皮肤瘙痒、脂溢性皮炎、痤疮、酒渣鼻等。

由于蠕形螨个体微小(100~400 μm),体外培养困难,离开人体后短时间内即变形、死亡,这成为影响人体蠕形螨深入研究的瓶颈。目前,对蠕形螨病的许多基础理论问题尚未完全清楚,研究多限于流行病学调查和药物的研发,尚未发现有效的预防和治疗措施。GenBank 中有关人体蠕形螨的基因组资料也较少。本实验通过对人蠕形螨基因组 DNA 提取方法进行探讨,并对两种方法提取的 DNA 进行随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 初步分析,比较两种 DNA 抽提方法的优劣。

1 材料和方法

1.1 标本

人体蠕形螨由泸州医学院附属医院皮肤科采集患者鼻部皮脂,采用自制刮取式取螨器、昆虫针作为取螨工具。选用 2% (安利) 餐具洗洁精作为皮脂溶解剂,用凹玻片作为清洗容器,从受检者的皮脂分泌

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4122.2011.01.002

基金项目:2011 年四川省卫生厅资助课题(100245)及泸州医学院 2010 年资助课题(767)

作者单位:¹646000,四川泸州医学院病原生物学教研室;²400038,重庆第三军医大学病原生物学教研室

* 通信作者:张锡林,Email:jsczxl@tmmu.edu.cn

物中完整地分离出清洁的活毛囊螨^[4],置 1.5 ml 离心管中,20 μ l 的 PBS 保存,100 只/管,-4 $^{\circ}$ C 保存。微小按蚊和大劣按蚊由第三军医大学病原生物学教研室提供,实验室常年传代饲养。成蚊饲养条件为室温 24 ~ 25 $^{\circ}$ C,相对湿度 70% ~ 80%,蚊羽化第 3 天给予正常小白鼠血餐一次,随后喂 10% 蔗糖水。

1.2 试剂

蛋白酶 K、饱和酚 (pH 8.0)、氯仿、异戊醇和 RNA 酶等均购自上海生工生物技术有限公司,PCR 试剂盒及 *Taq* 酶购自大连宝生物公司,溴化乙锭购自 Sigma 公司,小型昆虫 DNA 抽提试剂盒购自 OMEGA Bio-Tek 公司。

1.3 随机引物

采用 Primer5.0 软件,以引物中不同的 GC 含量,自行设计 5 条随机引物,由上海基康生物技术有限公司合成。引物序列和 GC 含量见表 1。

表 1 随机引物种类、序列和 GC 含量
Table 1 Random oligonucleotide primers

引物 Primer	序列 Sequences	G + C (%)
P1	5'-GTA GTC ACA T-3'	40
P2	5'-GTA GAC CGA T-3'	50
P3	5'-CAA TCG CCG T-3'	60
P4	5'-CAG CAC CCA C-3'	70
P5	5'-CGG CCC CTG T-3'	80

1.4 基因组 DNA 的提取

人体毛囊蠕形螨 50 只,加入 TE 缓冲液 (pH 8.0, 1 mol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA) 300 μ l,将微型小杵置于 1.5 ml 离心管底,置冰浴中充分研磨。

分别取雌性大劣按蚊成蚊、微小按蚊 (去头) 各 5 只,蚊体用无菌生理盐水反复洗涤 3 次,迅速置入 1.5 ml 匀浆器进行充分研磨^[5]。

按经典的 DNA 提取方法分别将以上 3 个组各加入 30 μ l 蛋白酶 K (终浓度 100 ~ 200 μ g/ml),震荡混匀,56 $^{\circ}$ C 水浴 3 h,沸水煮 5 min,分别用等体积的饱和酚:酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1) 各抽提 1 遍。加入 1/10 体积 3 mol/L 醋酸钠和 2 倍体积冷无水乙醇,混匀后置于 -20 $^{\circ}$ C 30 min 以上,13 400 \times g 离心 20 min,弃上清。沉淀 DNA 用 70% 乙醇洗涤 2 次,65 $^{\circ}$ C 水浴挥干。

小型昆虫 DNA 抽提试剂盒提取人体蠕形螨基因组 DNA:研磨方法同前,其余步骤按试剂盒说明

书进行。

用紫外分光光度计检测所提取 DNA 的含量。

1.5 PCR 反应

PCR 反应体系:模板 5 μ l,10 \times 缓冲液 5 μ l,dNTP 4 μ l,引物 5 μ l,Mg²⁺ 4 μ l,*Taq* 酶 1 μ l,补充灭菌双蒸水至 50 μ l。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,36 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 90 s,共 45 个循环;70 $^{\circ}$ C 5 min。取扩增产物 20 μ l 于 1.5% 琼脂糖凝胶 125 V 电泳分离 30 min,用溴化乙锭染色,在紫外荧光检测仪下观察电泳结果,凝胶图像扫描仪取图并分析。

2 实验结果

2.1 DNA 提取

用紫外分光光度计检测所提取的基因组,结果经典方法提取的微小按蚊、大劣按蚊和人体毛囊蠕形螨的吸光度 (A) 值依次为 1.83、2.20 和 1.81,浓度依次为 738.2、1 038.1 和 346.89 μ g/ml。试剂盒提取的人体毛囊蠕形螨的 A 值为 2.05,浓度为 73.4 μ g/ml。实验证明,采用经典方法提取的蠕形螨基因组 DNA 含量较高,而采用小型昆虫试剂盒提取出的基因组 DNA 含量较低。两种方法检测的 A 值均在正常范围内。

2.2 人体蠕形螨基因组 DNA 的 RAPD 结果

引物 P3 扩增微小按蚊 DNA 得到 1 条 200 bp 带,扩增大劣按蚊 DNA 有 1 条条带 (100 ~ 400 bp)。扩增经典方法提取的蠕形螨 DNA 得到 2 条带 (200 ~ 300 bp),而试剂盒提取的未见条带 (图 1)。

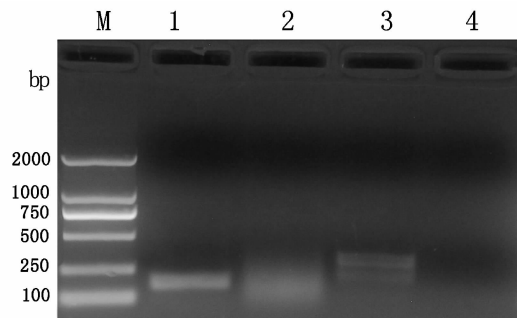


图 1 随机引物 P3 扩增 DNA 结果
M:DNA 标志物,1:经典方法提取的微小按蚊 DNA,2:经典方法提取的大劣按蚊 DNA,3:经典的方法提取的蠕形螨 DNA,4:试剂盒提取的蠕形螨 DNA

Fig. 1 Results of RAPD with primer 3
M:DNA marker,1:DNA of *An. minimus* by phenol-chloroform, 2:DNA of *An. diru* by phenol-chloroform,3:DNA of follicle mites by phenol-chloroform,4:DNA of follicle mites by insect DNA extracting kit

引物 P4 扩增微小按蚊 DNA 获得 4 条带(150 ~ 750 bp), 扩增大劣按蚊 DNA 得到 100 ~ 400 bp 明亮弥散条带。扩增经典方法提取的蠕形螨 DNA 获得 3 条带(200 ~ 600 bp), 而试剂盒提取的未见条带(图 2)。

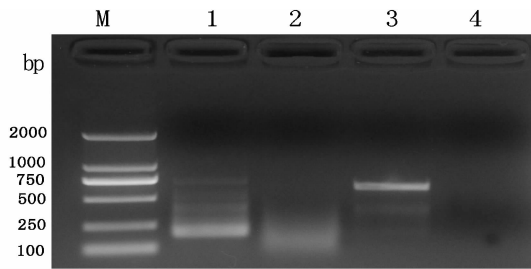


图 2 随机引物 P4 扩增 DNA 结果
M:DNA 标志物,1:经典方法提取的微小按蚊 DNA,2:经典方法提取的大劣按蚊 DNA,3:经典方法提取的蠕形螨 DNA,4:试剂盒提取的蠕形螨 DNA
Fig. 2 Results of RAPD from DNA by primers P4
M:DNA marker,1:DNA of *An. minimus* by phenol-chloroform, 2:DNA of *An. diru* by phenol-chloroform,3:DNA of follicle mites by phenol-chloroform,4:DNA of follicle mites by insect DNA extracting kit

将引物 P1-P5 对微小按蚊和大劣按蚊以及人体毛囊蠕形螨 DNA 模板随机扩增结果见表 2。从表中可见,经典方法提取的两种按蚊和蠕形螨基因组 DNA 均获得较理想 RAPD 结果,小型昆虫试剂盒提取的蠕形螨基因组 DNA 由于含量太低,经 RAPD 后均未见任何条带。

表 2 引物 P1-P5 对微小按蚊和大劣按蚊及用经典方法提取的蠕形螨基因组 DNA RAPD 扩增结果

Table 2 Length of DNA fragments of two mosquitos and *Demodex folliculorum* amplified with primers P1- P5 by RAPD

引物 Primers	样品 Samples	DNA 条带数 No. of DNA bands	扩增 DNA 片段长度 (bp) Length of DNA fragments (bp)
P1	微小按蚊	0	
	大劣按蚊	0	
	人蠕形螨	0	
P2	微小按蚊	3	150,600,1 300
	大劣按蚊	1	100 ~ 500
	人蠕形螨	0	
P3	微小按蚊	1	200
	大劣按蚊	1	100 ~ 400
	人蠕形螨	2	200,300
P4	微小按蚊	4	150,400,500,750
	大劣按蚊	1	100 ~ 400
	人蠕形螨	3	200,400,600
P5	微小按蚊	1	200
	大劣按蚊	1	100 ~ 400
	人蠕形螨	0	

3 讨论

基因组 DNA 的提取是分子生物学研究的一项基础技术,是后续试验成功的关键^[6],基因组 DNA 的提取方法较多,但人体蠕形螨的基因组研究较少,仅见 2007 年赵岩等^[7]的报道,用自制水晶研钵研磨

后采用经典方法提取毛囊螨基因组 DNA,琼脂糖电泳检测其大小为 23 kb。因而,有必要寻找一种有效、简便的基因组 DNA 提取方法,为人体蠕形螨分子遗传学的相关研究奠定基础。

本实验采用微型小杵做研磨工具,操作时与 1.5 ml 离心管管壁紧密磨合,研磨充分,研磨后可直接在离心管内提取基因组 DNA,最大限度避免标本的损失,具有高效、快捷等优点。此方法适用于采集困难、样本量少的标本。

实验证明,小型昆虫试剂盒提取基因组 DNA 虽然能获得较高纯度样品,但由于过柱时丢失太多,致使浓度太低而无法进行 RAPD。经典方法提取虽然纯度不及前者,但能获得较高浓度的 DNA 样品,从而获得较理想的 RAPD 结果。所以,提取人蠕形螨基因组 DNA 采用经典方法更适宜。RAPD 技术具有样品用量少、灵敏度高、特异性强和检测容易等优点,还可缩短研究周期,提高研究效率^[8]。本研究初步结果提示通过 RAPD 技术在人体蠕形螨分子遗传学的相关研究中是可以尝试的。

近年来,随着社会的日益发展,人们越来越注重面部皮肤的美容和健康。临床研究发现皮肤蠕形螨感染者中有的有临床表现,多数人则无明显变化。通过人体蠕形螨分子遗传学的相关研究对临床上有体征和无体征感染者体表虫体的遗传多态性和致病性进行研究和分析,结合临床表现,比较不同来源蠕虫种间差异,筛选和寻找致病基因,从分子流行病学角度寻找蠕形螨分子遗传标志和螨虫易感基因,为促进人类健康,尤其是青少年的身心健康提供基础资料。

参 考 文 献

- [1] 吴观陵. 人体寄生虫学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2005:513.
- [2] 杨晓红,段希玲. 青年学生蠕形螨感染调查研究[J]. 山西职工医学院学报,2001,11(2):34-35.
- [3] Jansen T, Kastner U, Kreuter A, et al. Rosacea-like demodicidosis associated with acquired immunodeficiency syndrome[J]. Br J Dermatol,2001,144(1):139-142.
- [4] 余俊萍,胡朝惠,王光西,等. 皮脂分泌物中人体蠕形螨分离方法的改进[J]. 寄生虫病与感染性疾病,2009,7(4):190-192.
- [5] 孙恩涛,张锡林,秦志辉. 大劣按蚊和斯氏按蚊核糖体基因内转录第二间隔区序列分析[J]. 中国人兽共患病学报,2007,23(5):445-452.
- [6] 马新红,亢娟娟,康相涛,等. 鸡基因组 DNA 不同提取方法的比较研究[J]. 江西农业大学学报,2010,32(1):181-184.
- [7] 赵岩,郭淑玲,刘莹,等. 人体蠕形螨显微操作分离技术的探讨[J]. 中国病原生物学杂志,2007,2(1):67-68.
- [8] 张锡林,徐文岳,段建华. 斯氏肺吸虫和华支睾吸虫基因组多态 DNA 的初步分析[J]. 第三军医大学学报,2000,22(9):865-867.

(收稿日期:2010-09-17)

(本文编辑:姬晓云)