

# 一种非致死提取单头家蝇基因组 DNA 的简便方法

潘婧<sup>1</sup>, 万华<sup>1,2</sup>, 邱星辉<sup>1</sup>

1 中国科学院动物研究所, 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100101; 2 中国科学院研究生院

**摘要:** **目的** 家蝇是一种广泛分布的重要公共卫生害虫, 开展其遗传学、分子生物学的研究为认识和利用家蝇、有效地控制蝇传疾病提供科学依据。遗传学、分子生物学的研究常需要用到 DNA 样品和聚合酶链反应(PCR), 建立一种简单快速的 DNA 提取方法, 为研究工作提供极大的便利。**方法** 剪取家蝇的双翅或后足置于提取液中, 温育 1 h 后获得家蝇基因组 DNA 的样品; 以此基因组 DNA 为模板, 扩增 *CYP6D1v1* 基因; 测定去翅或去后足的家蝇繁殖能力。**结果** 基因组 DNA 成功地从家蝇个体的双翅或后足中提取, 此 DNA 制备液可直接用于 PCR 扩增; 剪除双翅或后足对家蝇个体无致命损伤, 不影响家蝇的正常繁殖。**结论** 该方法快速、简便、有效且样品非致死, 提取的 DNA 可以应用于诸如用 PCR 法鉴定个体基因型等的后续分析。

**关键词:** 家蝇; DNA 提取; 方法

中图分类号: R384.2 文献标志码: A 文章编号: 1003-4692(2012)03-0191-03

## A simple method for rapid and non-lethal isolation of genomic DNA from single flies of *Musca domestica*

PAN Jing<sup>1</sup>, WAN Hua<sup>1,2</sup>, QIU Xing-hui<sup>1</sup>

1 State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 2 Graduate University of the Chinese Academy of Science

Corresponding author: QIU Xing-hui, Email: qiuxh@ioz.ac.cn

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31172160) and Major National Science and Technology Projects of China (No. 2008ZX10004-010)

**Abstract: Objective** The house fly *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), is a very important disease vector. Research in genetics and molecular biology on this pest is helpful for developing an effective control strategy. In genetic studies, it often needs to use the DNA sample and polymerase chain reaction (PCR) technique. A simple and non-lethal method for isolation of genomic DNA should facilitate studies in population genetics and the generation of fly lines of interest. **Methods** Genomic DNA was isolated from immersing the hind legs or wings of house flies in the lysis buffer and incubating at 37 °C for 1 h. **Results** Genomic DNA was extracted successfully from wings or legs of individual flies. A fragment of the *CYP6D1v1* gene was amplified with the DNA as template. Wing or leg ablation did not affect the survival and fertility of flies. **Conclusion** The method is fast, simple, effective and non-lethal. The DNA prepared by this method can be used directly in PCR for subsequent analysis such as genotyping. Flies without hind legs or wings can produce enough offspring to establish a population.

**Key words:** *Musca domestica*; DNA extraction; Method

家蝇(*Musca domestica*)是一种广泛分布的重要公共卫生害虫<sup>[1-2]</sup>。开展其遗传学、分子生物学的研究为认识和利用家蝇、有效地控制蝇传疾病提供科学依据。遗传学、分子生物学的研究常需要用到 DNA 样品和聚合酶链反应(PCR), 特别是进行抗性遗传学的研究如家蝇抗性位点基因(导致拟除虫菊酯抗性的

*CYP6D1v1* 基因<sup>[3-4]</sup>)频率的检测中, 需要检测成百上千的家蝇个体, 简单快速的提取方法可以为研究工作提供极大的便利。另外, 某些研究工作需要提取 DNA 的同时保证试虫的存活和繁殖能力<sup>[5]</sup>。例如, 需要建立携带某等位基因的家蝇品系, 一种有效的策略是先对家蝇个体的基因型进行鉴定, 在保持试虫存活力和繁殖力的情况下, 用已知基因型的雄雌个体配对以产生具有目标基因型的后代, 这需要采用非致死的方法提取基因组 DNA。然而, 现报道的家蝇基因组 DNA 方法包括多个操作步骤, 费时费力, 且对生物样品是致死的<sup>[6]</sup>, 为此, 我们参考 Carvalho 等<sup>[5]</sup>提取果蝇

基金项目: 国家自然科学基金(31172160); 国家科技重大专项课题(2008ZX10004-010)

作者简介: 潘婧(1988-), 女, 满族, 研究助理, 主要从事家蝇抗药性的研究。Email: pjwolf@126.com

通讯作者: 邱星辉, Email: qiuxh@ioz.ac.cn

(*Drosophila melanogaster*) DNA的方法,建立了一种适合家蝇基因组DNA提取的快速简便而非致死的方法。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料与仪器** 本实验室BJD抗性品系家蝇,25℃常规饲养。溶液A:10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.2),1 mmol/L EDTA,25 mmol/L NaCl,4℃保存;溶液B:20 mg/ml蛋白酶K(proteinase K,MERK公司)用灭菌水配制,-20℃保存。DNA提取液:溶液A和溶液B按100:1混合(使蛋白酶K终浓度为200 μg/ml),现用现配。

PCR试剂(TaKaRa宝生物工程(大连)有限公司);DNA Marker(天根生化科技有限公司);琼脂糖(西班牙Biowest公司);PCR仪(MyCycler™ thermal cycler,美国Bio-RAD公司),电泳仪、凝胶紫外分析仪(美国Bio-RAD公司);水浴锅。

**1.2 基因组DNA提取** 剪取家蝇双翅或1对后足,置200 μl PCR管中,100℃孵育3 min。取30 μl DNA提取液到200 μl PCR管中,浸没翅膀或足,37℃水浴60 min,95℃孵育5 min。所得样品可直接用于PCR,也可以保存在4℃,1个月内稳定。

**1.3 抗性相关CYP6D1v1等位基因的PCR检测** 参考Seifert和Scott<sup>[3]</sup>的方法进行。PCR总反应体系20 μl,包括:10×PCR buffer 2 μl,dNTPs(各2.5 mmol)2 μl,引物AS2(100 pmol/ml)(5'-CAT TGG ATC ATT TTT CTC ATC-3') 0.4 μl,引物Slpr(100 pmol/ml)(5'-GCA TTC GAA TCA TTC TGT TTC AC-3') 0.4 μl,TaKaRa Taq DNA聚合酶0.2 μl,DNA模板5 μl,灭菌水10 μl。PCR扩增程序:94℃ 5 min;94℃ 45 s,55℃ 30 min,72℃ 50 s,循环35次;72℃ 5 min。吸取8 μl PCR产物,与2 μl加样缓冲液混匀上样,在2%的琼脂糖凝胶上电泳检测,电压160 V,室温下电泳18 min。根据DNA Marker 100 bp Ladder读DNA条带大小。

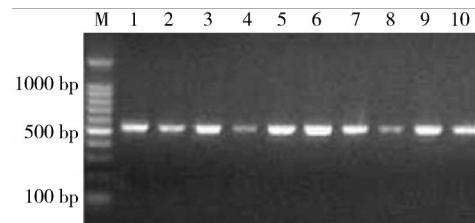
**1.4 去翅或足后家蝇繁殖力测定实验** 取BJD品系家蝇的蛹单独装入玻璃管中,待家蝇羽化后,用镊子与剪刀配合剪去家蝇双翅或后足,雌雄单对饲养。将配对家蝇放入铺好麦麸的塑料杯中饲养,同时提供食物(红糖奶粉混合)与水。待其子代开始孵化后,移除亲本成虫,添加新鲜麦麸于塑料杯中。记录子代成虫数。每处理设3个重复,并设立未去翅和足的对照组。

**1.5 统计学处理** 采用SPSS 13.0软件,用单因素方差分析(ANOVA)对研究结果进行统计学分析,平均数差异采用Tukey's HSD检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 DNA直接用于PCR** 用上述方法提取的家蝇基

因组DNA用于PCR扩增。图1显示,取双翅和后足制备的基因组DNA均可以得到较好的PCR扩增结果,PCR产物条带清晰,特异性强(单一条带),无非特异性扩增。该方法可以用于检测大量样品的基因型。

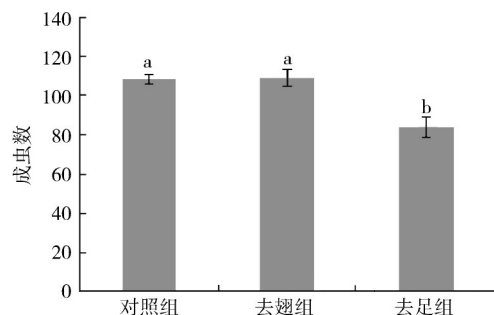


注:M. Marker 100 bp DNA Ladder; 1~2. 后足; 3~9. 双翅; 10. 成虫(传统提取方法DNA)<sup>[6]</sup>。

图1 CYP6D1v1等位基因的PCR扩增结果

Fig. 1 PCR amplification results of CYP6D1v1 allele

**2.2 去翅或足不影响家蝇交配繁殖** 非致死的DNA提取方法采用家蝇双翅或足提取DNA,繁殖率试验结果表明(图2),去除双翅或后足的家蝇可以正常交配产生后代,对家蝇F1代成虫数量有一定的影响( $F_{2,6}=11.535, P=0.009$ )。平均数多重比较结果显示,对照组与去翅组F1代的成虫数差异无统计学意义( $P>0.05$ )。尽管去除后足处理组F1代成虫数只有对照组的77%( $P<0.05$ ),但每对家蝇产生的后代数 $>80$ 个。可见去除双翅或后足的家蝇,获得后代的数目可以满足下一步实验要求,不影响家蝇的传代和品系的建立。



注:不同字母表示各组经ANOVA分析,在 $P=0.05$ 水平上差异有统计学意义。

图2 单对家蝇交配F1代总虫数量

Fig. 2 The number of offspring produced per single paired flies

## 3 讨 论

分子生物学技术在家蝇等病媒生物的研究中应用越来越广泛,经常需要用到基因组DNA。尤其在种群遗传学研究中,由于研究样本量大,既要保证DNA的样品质量,又需要在操作上快速有效,甚至还要保证生物样品的存活,因此建立一种简便非致死的方法具有重要意义。

(下转第197页)

2000~3000 m之间的林带或高山草甸带,可能是该海拔区间内植物覆盖度较好,适合昆虫的繁衍生息。但寄蝇种类依然相对有限,分析原因可能是采集时间均为2010—2011年的7、8月,时间相对较短,物种多样性有可能被低估,并且该地区气候特点属于干旱与半干旱,植被相对稀疏,海拔又相对较高,不适于其他区系昆虫的渗透。

志谢 内蒙古和宁夏贺兰山国家级自然保护区管理局领导和工作人员对贺兰山寄蝇科昆虫资源调查给予大力支持与帮助;内蒙古师范大学白晓拴博士、河北大学王新谱博士分别对内蒙古贺兰山和宁夏贺兰山科学考察进行精心组织 and 帮助;沈阳师范大学谭晨参与野外采集工作,一并志谢

#### 参考文献

- [1] O'Hara JE, Shima H, Zhang CT. Annotated catalogue of the Tachinidae (Insecta: Diptera) of China [J]. Zootaxa, 2009, 2190: 1-236.
- [2] 马耀,李鸿昌,康乐. 内蒙古草地昆虫[M]. 陕西杨陵:天则出版社,1991:xiv+467.
- [3] 高兆宁,刘育锯,杨彩霞,等. 宁夏农业昆虫实录[M]. 陕西杨陵:天则出版社,1993:10+336.
- [4] 能乃扎布. 内蒙古昆虫[M]. 呼和浩特:内蒙古人民出版社,1999:12+506.
- [5] 张春田. 寄蝇科[M]//王新谱,杨贵军. 宁夏贺兰山昆虫. 银川:宁夏人民出版社,2010:8+1-472+49图版.
- [6] Crosskey RW. A taxonomic conspectus of the Tachinidae (Diptera) of the Oriental Region [J]. Bull Br Mus Natl Hist Entomol Suppl,

- 1976,26:357.
- [7] Tschorsnig HP, Richter VA. Family Tachinidae, 691-827 [M]// Papp L, Darvas B. (eds.). Contributions to a Manual of Palaearctic Diptera (with special reference to flies of economic importance). Volume 3. Budapest: Higher Brachycera. Science Herald, 1998: 880.
- [8] 赵建铭,梁恩义,史永善,等. 双翅目:寄蝇科[M]//薛万琦,赵建铭. 中国蝇类(下册). 沈阳:辽宁科学技术出版社,1998: 1661-2206+32图版.
- [9] 赵建铭,梁恩义,史永善,等. 中国动物志. 昆虫纲. 第23卷. 双翅目:寄蝇科(一)[M]. 北京:科学出版社,2001:1-305.
- [10] Mesnil LP. 64g. Larvaevorinae (Tachininae) [M]. Die Fliegen der Palaarktischen Region, 1944-1975, 10(Lieferung 312), 1-1435+ pls. I-IX.
- [11] Mesnil LP. Nouveaux tachinaires de la Region Palearctique principalement de l'URSS et du Japon [J]. Bull Ins R Sci Nat Belg, 1963,39(24):1-56.
- [12] Herting B. Catalogue of Palearctic Tachinidae (Diptera) [J]. Stuttg Beitr Naturkunde Ser A (Biologie), 1984,369:1-228.
- [13] Tschorsnig HP, Herting B. Die Raupenfliegen (Diptera: Tachinidae) Mitteleuropas: Bestimmungstabellen und Angaben zur Verbreitung und Ökologie der einzelnen Arten [J]. Stuttg Beitr Naturkunde Ser A (Biologie), 1994,506:1-170.
- [14] 赵红格,刘池洋,王锋,等. 贺兰山隆升时限及其演化[J]. 中国科学D辑:地球科学,2007,37(增刊1):185-192.
- [15] Wiegmann BM, Trautwein MD, Winkler IS, et al. Episodic radiations in the fly tree of life [J]. PNAS, 2011, 108(14): 5690-5695.
- [16] 徐养鹤,徐光远,于兆英. 贺兰山植被与垂直分布[J]. 西北植物研究,1983,8增刊:84-85.

收稿日期:2012-01-10

(上接第192页)

本研究提出的DNA提取方法是非致死的,实验证明剪除双翅对家蝇的生长繁殖能力无明显影响(图2)。另外,本文描述的方法具有简便、有效、省时等优点,在进行DNA提取时,不需采用低温、液氮,无需用酚、氯仿等有毒试剂抽提,可避免有毒试剂对实验操作人员身体的侵害,减少对环境的污染。提取过程中省去了无水乙醇沉淀,也无需70%乙醇洗涤和RNAase消化等步骤,制备的样品可以直接用于PCR(图1),整个过程仅耗时1.5 h。该方法满足了快速、简便且非致死的要求,类似的策略可望推广用于其它昆虫。

在DNA提取过程中,为保证DNA提取的质和量以及得到好的PCR结果,需要注意几个细节:①配制溶液A时pH值一定要控制在8.2左右,否则会影响PCR效果;②在取材时,注意剪去翅膀不要伤到虫体,以保证试虫的存活和繁殖;③在DNA的提取过程中,100℃孵育3 min可以使双翅更容易浸没在提取液中,以提高DNA的得率;④煮沸过程中,盖紧管盖,避免沸水进入200 μl PCR管中;⑤注意双翅需浸泡于DNA提取液中,与提取液充分接触;⑥用该方法提取的DNA

用于PCR时,根据反应体系调整DNA的模板量,DNA样品的体积不超过PCR体系总体积的1/4。

#### 参考文献

- [1] Scott JG, Liu N, Kristensen M, et al. A case for sequencing the genome of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) [J]. J Med Entomol, 2009,46(2):175-182.
- [2] 李梅,何凤琴,邱星辉. 家蝇抗药性的分子遗传机制[J]. 寄生虫与医学昆虫学报,2005,12(4):238-244.
- [3] Seifert J, Scott JG. The *CYP6D1v1* allele is associated with pyrethroid resistance in the house fly, *Musca domestica* [J]. Pestic Biochem Physiol, 2002,72(1):40-44.
- [4] Qiu XH, Li M, Luo HJ, et al. Molecular analysis of resistance in a deltamethrin-resistant strain of *Musca domestica* from China [J]. Pestic Biochem Physiol, 2007,89(2):146-150.
- [5] Carvalho GB, William W, Benzer S, et al. Non-lethal PCR genotyping of single *Drosophila* [J]. Bio Techniques, 2009, 46(4): 312-314.
- [6] Rinkevich FD, Zhang L, Hamm RL, et al. Frequencies of the pyrethroid resistance alleles of *Vssc1* and *CYP6D1* in house flies from the eastern United States [J]. Insect Molec Biol, 2006, 15(2): 157-167.

收稿日期:2011-11-22