

医学媒介生物微量组织直接扩增 DNA 条形码序列方法的研究

胡佳, 岳巧云, 邱德义, 吴可量, 刘德星, 汪小东, 魏晓雅, 陈健, 廖俊蕾

中山出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 广东 中山 528403

摘要: **目的** 为保证 DNA 条形码序列模板 DNA 来源的单一性, 和最大程度减少凭证标本的形态破坏, 建立一种从医学媒介生物微量组织中免提取, 直接扩增 DNA 条形码序列的方法。 **方法** 以螨、蚤、蜱单个个体以及小至蝇类后足 1/5 跗节的组织块为材料, 通过优化裂解液浓度、裂解液和缓冲液配比, 优化反应体系和反应条件, 用 KOD FX DNA 聚合酶进行 DNA 条形码序列的直接扩增, 反应产物测序, 与 NCBI 基因库中的序列进行比较以验证其是否被污染。 **结果** 裂解液优化为 NaOH 50 mmol/L; 裂解液和缓冲液配比优化为 9:1; 反应体积优化为每 50 μ l 反应体系中 2 \times KOD FX DNA 聚合酶 buffer (含 Mg^{2+}) 25 μ l, 2 mmol/L dNTP 10 μ l, KOD FX DNA 聚合酶 (1 U/ μ l) 1 μ l, 正向引物 LCO1490 (20 μ mol/L)、反向引物 HCO2198 (20 μ mol/L) 各 1 μ l; 反应条件优化为: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 68 $^{\circ}$ C 7 min。测序结果显示无污染, 均为有效序列。 **结论** 该方法操作简单而且省去了 DNA 提取的步骤, 节约了时间和费用, 适合螨、蚤、蜱单个个体以及小至蝇类后足 1/5 跗节的组织块 DNA 条形码序列的直接扩增。

关键词: 免提取; 医学媒介生物; 微量组织; DNA 条形码

中图分类号: R384 文献标志码: A 文章编号: 1003-4692(2014)04-0297-04

DOI: 10.11853/j.issn.1003.4692.2014.04.003

Direct amplification of barcode DNA from microtissues of medical vectors

HU Jia, YUE Qiao-yun, QIU De-yi, WU Ke-liang, LIU De-xing, WANG Xiao-dong,

WEI Xiao-ya, CHEN Jian, LIAO Jun-lei

Zhongshan Entry-Exit Inspection and Quarantine Technology Center, Zhongshan 528403, Guangdong Province, China

Corresponding author: YUE Qiao-yun, Email: yueqy@zs.gdciq.gov.cn

Supported by the National Key Technology R&D Program (No. 2012BAK11B05), Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine Science and Technology Project (No. 2012IK223), Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau Science and Technology Project (No. 2011GDK10, 2013GDK36, 2013GDK39) and Zhongshan City Science and Technology Project (No. 20123A298)

Abstract: Objective To ensure the purity of template in amplification of barcode DNA from the microtissues of medical vectors and to minimize the morphological damage to specimens, a method of direct PCR without DNA extraction was established.

Methods Individuals of mites, fleas, and ticks, as well as the first tarsus of metapodium from flies, were used as samples in this study. The concentration of lysis buffer and the ratio of lysis vs. stop buffer were optimized to determine the reaction conditions. KOD FX DNA polymerase was used instead of Taq DNA polymerase to directly amplify barcode DNA. The PCR product was sequenced and aligned with GenBank sequences using Blast to test whether the sequences were contaminated. **Results** The optimized lysis buffer was 50 mmol/L NaOH. The optimized ratio of lysis vs. stop buffer was 180 μ l:20 μ l. The optimized reaction system (50 μ l) was determined as follows: 2 \times KOD FX DNA polymerase buffer (containing Mg^{2+}) 25 μ l, 2 mmol/L dNTP 10 μ l, KOD FX DNA polymerase (1 U/ μ l) 1 μ l, forward primer LCO1490 (20 μ mol/L) 1 μ l, and reverse primer HCO2198 (20 μ mol/L) 1 μ l. The reaction conditions were optimized as follows: 95 $^{\circ}$ C 3 min for pre-heating; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, and 68 $^{\circ}$ C 1 min for 35 cycles, followed by extension 7 min at 68 $^{\circ}$ C. No contamination was found by Blast alignment of amplified sequences.

Conclusion The method established in this study is easy to operate, and omission of DNA extraction will save time and expenses. This method is suitable for direct amplification of barcode DNA from mites, fleas, ticks, and even the first tarsus of fly metapodium.

Key words: Direct PCR; Medical vector; Microtissue; Barcode DNA

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划课题(2012BAK11B05); 国家质检总局项目(2012IK223); 广东出入境检验检疫局课题(2011GDK10, 2013GDK36, 2013GDK39); 中山市课题(20123A298)

作者简介: 胡佳, 男, 硕士, 农艺师, 从事医学媒介生物 DNA 条形码的研究, Email: hujiakoala@163.com

通讯作者: 岳巧云, Email: yueqy@zs.gdciq.gov.cn

螨、蚤、蜱等医学媒介生物,由于携带和传播多种病原体,对人类的健康威胁很大^[1-2]。其个体非常微小,特别是螨类体长大部分 $<0.5\text{ mm}$ ^[3],单个个体利用现有的DNA提取方法或者商业试剂盒很难得到浓度足够高的模板DNA,后续特定基因的PCR扩增很难进行。现在普遍的做法是将几个甚至几十个个体混合在一起,提取基因组DNA,不能保证模板DNA来源的种类单一性,给后续分子分析造成很大麻烦。以前的免提取PCR直接扩增方法,多数用于细菌、原生动物和酵母^[4-7],近几年也有在植物、真核生物组织和全血中应用,但组织量要求至少 $1\sim 10\text{ mg}$ ^[8-11],甚至有研究将整只黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)或者血吸虫投入反应体系中直接进行PCR^[12]。

本研究研制一种从医学媒介生物微量组织免提取直接扩增DNA条形码序列的方法,实验证明该方法适合螨、蚤、蜱单个个体以及小至蝇类后足1/5跗节的组织块,操作简单且可省去DNA提取的步骤。DNA条形码技术是近几年新兴的利用生物本身普遍具有的一段保守性适中、容易获得的基因片段作为标准,建立在DNA扩增、测序和比对技术基础之上的一种物种鉴定手段。DNA条形码数据的建立,凭证标本即DNA数据的来源标本非常重要,便于以后数据和标本的查证。为保证凭证标本的形态完整性,在取组织时,尽量减小组织块,利用本研究可以将凭证标本的组织块减小至螨等医学媒介生物的大小,有效保证凭证标本的形态完整性。

1 材料与方法

1.1 材料 蚤、螨、蜱为本实验室从褐家鼠(*Rattus norvegicus*)体表获得。蝇的1/5后足跗节(约为 $10\text{ }\mu\text{g}$)为本实验本底调查中获得的瘦叶带绿蝇(*Hemipyrellia ligurriens*)。

1.2 模板制备 取1只螨或者其他微小动物个体或者蝇后足1/5跗节(约为 $10\text{ }\mu\text{g}$),放入 1.5 ml 离心管中,加入液氮,用研磨棒研磨成粉状;加入 $180\text{ }\mu\text{l}$ 50 mmol/L NaOH裂解液, $95\text{ }^\circ\text{C}$ 10 min ;短暂离心,加入 $20\text{ }\mu\text{l}$ 缓冲液(100 mmol/L Tris, 1 mol/L KCl, 10 mmol/L EDTA, pH值 9.5), $95\text{ }^\circ\text{C}$ 10 min ; $12\text{ }000\times g$ 离心 1 min ,取上清备用。

1.3 裂解液浓度、裂解液和缓冲液配比的优化 裂解液浓度的优化:取蝇的1/5后足跗节(约为 $10\text{ }\mu\text{g}$),分别加入 $180\text{ }\mu\text{l}$ 浓度为 10 、 25 、 50 、 75 和 100 mmol/L 的NaOH作为裂解液。按1.2方法制备模板DNA。取上清液进行DNA条形码序列扩增。分析NaOH作为裂解液的最适浓度。

1.4 裂解液和缓冲液配比的优化 取蝇1/5后足跗节(约为 $10\text{ }\mu\text{g}$),分别加入 $20\text{ }\mu\text{l}$ 裂解液、 $180\text{ }\mu\text{l}$ 缓冲液;

$60\text{ }\mu\text{l}$ 裂解液、 $140\text{ }\mu\text{l}$ 缓冲液; $120\text{ }\mu\text{l}$ 裂解液、 $80\text{ }\mu\text{l}$ 缓冲液; $180\text{ }\mu\text{l}$ 裂解液、 $20\text{ }\mu\text{l}$ 缓冲液以及 $200\text{ }\mu\text{l}$ 裂解液。按1.2方法制备模板DNA,取上清液为DNA模板进行DNA条形码序列扩增,筛选最优裂解液和缓冲液的配比。

1.5 退火温度的优化 序列扩增的退火温度选择 32 、 34 、 36 、 38 、 40 、 42 、 44 、 46 、 48 、 50 、 52 、 54 、 56 、 58 、 60 、 62 和 $64\text{ }^\circ\text{C}$ 。

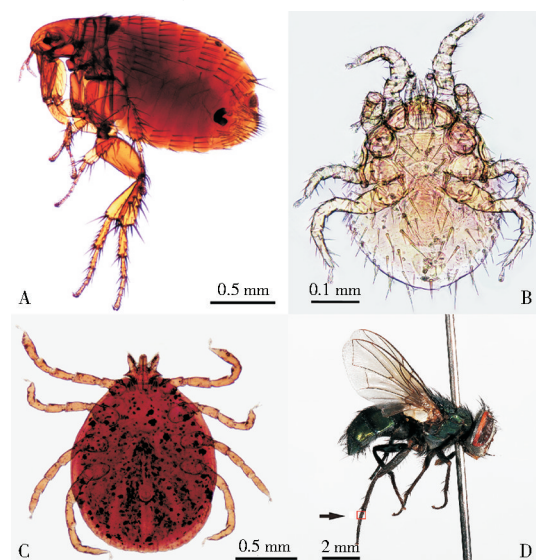
1.6 DNA条形码序列的扩增 采用动物DNA条形码序列通用引物: LCO1490: GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G, HCO2198: TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA^[13]。PCR反应体系:每 $50\text{ }\mu\text{l}$ 反应体系中 $2\times$ KOD FX DNA聚合酶 buffer(含 Mg^{2+}) $25\text{ }\mu\text{l}$, 2 mmol/L dNTP $10\text{ }\mu\text{l}$, KOD FX DNA聚合酶($1\text{ U}/\mu\text{l}$) $1\text{ }\mu\text{l}$, 正反向引物($20\text{ }\mu\text{mol/L}$)各 $1\text{ }\mu\text{l}$, ddH₂O $10\text{ }\mu\text{l}$, 模板DNA $2\text{ }\mu\text{l}$ 。PCR条件: $95\text{ }^\circ\text{C}$ 3 min ; $98\text{ }^\circ\text{C}$ 10 s , $50\text{ }^\circ\text{C}$ 30 s , $68\text{ }^\circ\text{C}$ 1 min , 35个循环; $68\text{ }^\circ\text{C}$ 7 min 。

1.7 测序及比对 PCR产物均经过1%琼脂糖凝胶电泳确认,经纯化后,克隆到pGM-T载体,重组菌落PCR鉴定插入片段正确的阳性克隆,分别随机挑选3个送交英潍捷基(上海)贸易有限公司测序。以T7启动子和SP6启动子通用测序引物进行双向测序,验证同一阳性克隆的有效序列。

测序所得结果与GenBank数据库进行Blast,并将测序所得序列上传至GenBank。

2 结果

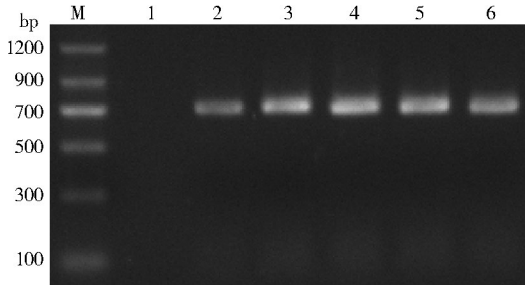
2.1 受试医学媒介生物 受试医学媒介生物经形态鉴定分别为印鼠客蚤(*Xenopsylla cheopis*)、太原厉螨(*Laelaps taingueni*)、血红扇头蜱(*Rhipicephalus sanguineus*)及瘦叶带绿蝇(图1)。



注: A. 印鼠客蚤; B. 太原厉螨; C. 血红扇头蜱; D. 瘦叶带绿蝇; 箭头所指的框内约为后足跗节的1/5。

图1 受试媒介生物
Figure 1 Medical vectors tested in this study

2.2 裂解液浓度的优化 分别用10、25、50、75和100 mmol/L NaOH 裂解液 180 μl 加 20 μl 缓冲液提取的DNA为模板,PCR扩增均出现1条约710 bp的片段,阴性对照无扩增条带,当裂解液浓度为50 mmol/L时,PCR条带最亮(图2),因此最佳裂解液浓度为50 mmol/L NaOH。

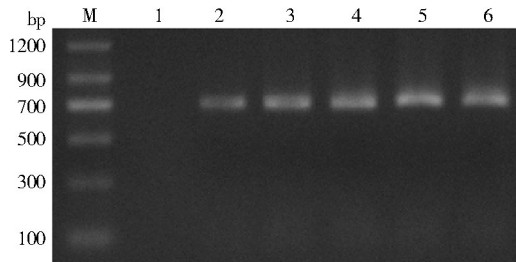


注: M. DNA 标准分子质量; 1. 阴性对照; 2~6. 分别为10、25、50、75、100 mmol/L NaOH。

图2 不同浓度裂解液制备模板扩增出的DNA条形码序列结果

Figure 2 Electrophoresis of barcode DNA amplified from the templates prepared with lysis buffer of different concentrations

2.3 裂解液和缓冲液配比的优化 分别用裂解液:缓冲液为1:9、3:7、3:2、9:1和全裂解液提取的DNA为模板,PCR扩增均出现1条约710 bp的片段,阴性对照无扩增条带。其中PCR条带最亮的是裂解液和缓冲液的最优配比9:1(图3)。

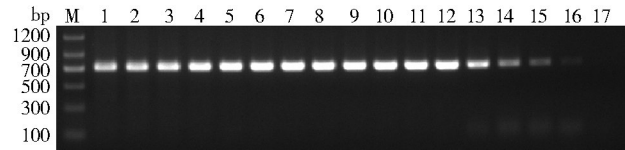


注: M. DNA 标准分子质量; 1. 阴性对照; 2~5. 裂解液:缓冲液分别为1:9、3:7、3:2、9:1; 6. 全裂解液。

图3 不同比例裂解液和缓冲液制备模板扩增出的DNA条形码序列结果

Figure 3 Electrophoresis of barcode DNA amplified from the templates prepared with different ratios of lysis vs. stop buffer

2.4 退火温度的优化 用最优配比的裂解液和缓冲液提取蝇的1/5后足跗节DNA为模板,PCR退火温度设为32~64℃,每2℃为一个梯度。可以看到从32~62℃ PCR均扩增出1条约710 bp的片段。条带在40~52℃之间最亮(图4),兼顾退火温度过低,降低扩增片段的特异性考虑,最适温度确定在50℃。

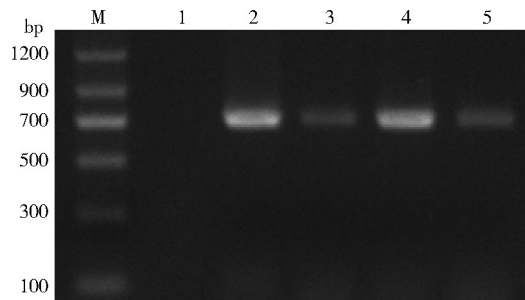


注: M. DNA 标准分子质量; 1~17. 分别为32~64℃。

图4 不同退火温度扩增出的DNA条形码序列结果

Figure 4 Electrophoresis of barcode DNA amplified at different annealing temperatures

2.5 受试医学媒介生物的DNA条形码扩增 用蝇后足1/5跗节、螨、蚤、蜱提取的DNA为模板,PCR均扩增出1条约710 bp的片段(图5)。



注: M. DNA 标准分子质量; 1. 阴性对照; 2. 蝇1/5后足跗节; 3. 螨; 4. 蚤; 5. 蜱。

图5 最优裂解液和缓冲液,最适退火温度和最佳浓度扩增出的结果

Figure 5 Electrophoresis of barcode DNA amplified at the optimal annealing temperature, optimal template concentration, and optimal ratio of lysis vs. stop buffer

经测序及Blast,结果见表1,说明样品及反应体系未被污染,均为有效序列。

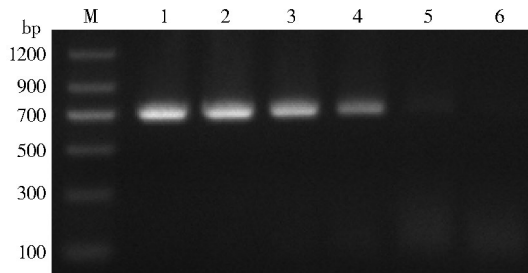
2.6 PCR敏感度实验 用蝇1/5后足跗节在最优条件下提取的DNA作为模板,分别稀释1、2、10倍为模板做扩增,均可以看到1条约710 bp的条带,稀释100倍和1000倍则无扩增条带(图6),在最优条件下,PCR扩增浓度可低至3~5 ng。

表1 扩增序列信息

Table 1 Information of the amplified sequences

种类	片段大小 ^a (bp)	基因序列号	与之相似度最高的基因序列号及种名	相似度 (%)
太原厉螨	658	KF437542	JX837922 美绥螨 <i>Ameroseiidae</i> sp.	81
血红扇头蜱	658	KF437543	JX416325 血红扇头蜱 <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	99
瘦叶带绿蝇 ^b	658	KF437544	FJ614823 瘦叶带绿蝇 <i>Hemipyrellia ligurriens</i>	100
印鼠客蚤	658	KF437545	JN008922 食鼠蚤 <i>Echidnophaga</i> sp.	84

注: a. 不包含引物; b. 为蝇的后足1/5跗节。



注: M. DNA 分子质量标准; 1. 提取液为 200 μl , 取 2 μl 为模板; 以 1 的模板为基准, 分别稀释; 2. 稀释 1 倍; 3. 稀释 2 倍; 4. 稀释 10 倍; 5. 稀释 100 倍; 6. 稀释 1000 倍。

图 6 最优条件下扩增蝇类 1/5 跗节的 DNA 条形码序列最佳模板浓度结果

Figure 6 Electrophoresis of barcode DNA from the first tarsus of fly metapodium amplified at the optimal template concentration, with all other conditions optimized

3 讨论

地球上生物种类约 870 万种, 其中 650 万种陆地生物, 220 万种海洋生物; 870 万种生物中有 780 万种动物, 30 万种植物, 60 万种真菌。且 870 万种是一个估算值, 误差在 130 万种左右, 因此地球生物总数在 740 万~1000 万种之间, 但目前只有 120 万种为已知种类^[13]。如此繁多的种类, 纯粹的形态种类鉴定就很难对所有的物种一一鉴别。

DNA 条形码技术是近年新兴的利用生物本身普遍具有的一段保守性适中、容易获得的基因片段作为标准, 建立在 DNA 扩增、测序和比对技术基础之上的一种物种鉴定手段。在动物界, 尤其是节肢动物的 DNA 条形码主要是以 CO I (mtDNA 线粒体细胞色素氧化酶亚基 I) 标准的一段长度为 658 bp 的基因片段为标准基因进行比较, 大多数种类可以得到准确的鉴定^[14]。BOLD (Barcoding of Life Data System, 专业的 DNA 条形码数据网站) 中已有 DNA 条形码数据的种类为 181 924 种 (截止到 2013-08-26 11:20), 与 870 万种的生物种类数量相比较, 仅约为 2.1%, 仍有约 98% 的种类尚未被 DNA 条形码编码, 就是与已知的 120 万种相比较, 已有 DNA 条形码的种类也仅占 15.2%, 因此建立生物 DNA 条形码的任务非常艰巨。全世界已记录的蚤类约为 2500 种^[3], GenBank 中仅有 7 种蚤类的序列, 其中仅 1 条为 DNA 条形码序列; 全世界已记录的恙螨和革螨为 3000 多种^[3], GenBank 中只有 33 种恙螨和革螨的序列, 其中仅 5 条为 DNA 条形码序列。可见 GenBank 中的数据还十分不完善, 尤其是这类微小的医学媒介生物种类的序列十分缺乏, 对利用 DNA 条形码技术进行种类鉴定造成很大的妨碍。序列比对结果中蚤和螨的最高相似度仅为 84% 和 81%, 因为 GenBank 中没有相对应种的序列, 本研究投放到

GenBank 中的太原厉螨和印鼠客蚤的 DNA 条形码序列是对数据库的一个有效补充。

本研究采用 KOD FX DNA 聚合酶, 其与一般的聚合酶相比较, 具有较强的抗干扰能力, 能以粗裂解液直接作为扩增模板进行 PCR 反应。

本研究建立的方法对于医学媒介生物单个个体如螨、蚤、蜱或者极微量动物组织块 (蝇的 1/5 后足跗节, 约 10 μg) 是可行的。相比普通提取 DNA 的方法, 该方法简单、快速、高效, 需要的组织量少, 对标本尤其是 DNA 条形码的凭证等珍贵标本损害更少, 使标本保留的形态更完整。本研究为医学媒介生物, 或者其他微小生物的单一个体和微量组织块提供了提取 DNA 的方法, 可以避免混合使用多个个体造成 DNA 模板不单一的问题, 为后续分子生物学实验打下了基础。

参考文献

- [1] 马广鹏, 孙传范, 赵娜, 等. 中国蜱传病主要流行趋势及防控科技对策[J]. 中国农业科技导报, 2011, 13(2): 105-109.
- [2] 赵俊伟, 王环宇, 王英. 中国蜱传病原体分布研究概况[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2012, 23(5): 445-448.
- [3] 陆宝麟, 吴厚永. 中国重要医学昆虫分类与鉴别[M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 2003: 464, 714, 763.
- [4] Alshahni MM, Makimura K, Yamada T, et al. Direct colony PCR of several medically important fungi using Ampdirect plus[J]. Jpn J Infect Dis, 2009, 62(2): 164-167.
- [5] Fode-Vaughan KA, Wimpee CF, Remsen CC, et al. Detection of bacteria in environmental samples by direct PCR without DNA extraction[J]. Biotechniques, 2001, 31(3): 598-607.
- [6] Liu YS, Thomas RJ, Phillips WA. Single-step direct PCR amplification from solid tissues[J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23(9): 1640.
- [7] Aljanabi SM, Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(22): 4692-4693.
- [8] Shokralla S, Singer GAC, Hajibabaei M. Direct PCR amplification and sequencing of specimens' DNA from preservative ethanol[J]. Biotechniques, 2010, 48(3): 233.
- [9] Bellstedt DU, Pirie MD, Visser JC, et al. A rapid and inexpensive method for the direct PCR amplification of DNA from plants[J]. Am J Botany, 2010, 97(7): e65-68.
- [10] Mercier B, Gaucher C, Feugeas O, et al. Direct PCR from whole blood, without DNA extraction[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(19): 5908.
- [11] Chomezynski P, Rymaszewski M. Alkaline polyethylene glycol-based method for direct PCR from bacteria, eukaryotic tissue samples, and whole blood[J]. Biotechniques, 2006, 40(4): 454.
- [12] Grevelding CG, Kampkötter A, Hollmann M, et al. Direct PCR on fruitflies and blood flukes without prior DNA isolation[J]. Nucleic Acids Res, 1996, 24(20): 4100-4101.
- [13] Mora C, Tittensor DP, Adl S, et al. How many species are there on earth and in the Ocean?[J]. PLoS Biol, 2011, 9(8): 1-8.
- [14] Hebert P, Ratnasingham S, de Waard JR. Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit I divergences among closely related species[J]. Proc Royal Soc B: Biol Sci, 2003, 270 Suppl: S96-99.

收稿日期: 2014-02-25