

杨金霞, 阮传清, 刘波, 等. 柑橘木虱 *Diaphorina citri* Kuwayama 内生菌 DNA 不同提取方法的比较分析 [J]. 福建农业学报, 2013, 28 (4): 361-365.

YANG J-X, RUAN C-Q, LIU B, et al. Comparative evaluation on different methods to extract endophytic bacteria DNA from *Diaphorina citri* Kuwayama [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2013, 28 (4): 361-365.

柑橘木虱 *Diaphorina citri* Kuwayama 内生菌 DNA 不同提取方法的比较分析

杨金霞^{1,2}, 阮传清², 刘波², 陈建利²

(1. 福建农林大学生命科学院, 福建 福州 350003;

2. 福建省农业科学院农业生物资源研究所, 福建 福州 350003)

摘要: 通过分析细菌 16S rDNA 基因序列的 PCR 扩增与克隆测序结果, 比较传统方法和试剂盒法对柑橘木虱 *Diaphorina citri* Kuwayama 内生菌 DNA 模板的提取效果。试验表明, 4 种方法中, FastDNA 试剂盒方法提取的 DNA 模板较适合于后续柑橘木虱内生菌 16S rDNA 的扩增, 且扩增产物可以很好地用于克隆测序; 传统提取方法经济节约, 但提取的 DNA 量及纯度较低; 试剂盒提取方法, 操作简单, 质量稳定, 易标准化, 但成本较高。4 种方法各具优缺点, 用 FastDNA 试剂盒提取的 DNA 模板, 其 PCR 产物能满足克隆需要。

关键词: 柑橘木虱; 内生细菌; 总 DNA; 提取方法

中图分类号: S 436

文献标识码: A

Comparative evaluation on different methods to extract endophytic bacteria DNA from *Diaphorina citri* Kuwayama

YANG Jin-xia^{1,2}, RUAN Chuan-qing², LIU Bo², CHEN Jian-li²

(1. College of Life Science, Fujian Agricultural and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China;

2. Bio-Resources Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China)

Abstract: To find a better method for the extraction of endophytic bacteria DNA from Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama, we compared the traditional methods and FastDNA Kits. The result showed that the DNA template extracted with the method of FastDNA Kits (MP Biomedical) was more suitable for PCR amplification, and the amplification product could be well used for cloning and sequencing. In the contrast, although the other three methods were cheaper, the amount and purity of DNA extracted with them were decreased. Our results suggested that the extraction with the FastDNA kits was stable and convenient for operation and standardization but expensiveness. In summary, four methods had respective advantages and disadvantages, and FastDNA kits provided more stable DNA for PCR and sequence cloning.

Key words: *Diaphorina citri* Kuwayama; endophytic bacteria; total DNA; extraction

柑橘木虱 *Diaphorina citri* Kuwayama 是柑橘黄龙病病菌 亚洲型 *Candidatus Liberibacter asiaticus* 和 美洲型 *Candidatus Liberibacter americanus* 迄今发现的唯一的自然传播昆虫介体。由其传播的柑橘黄龙病在我国南方以及亚洲、美洲等柑橘产区均有发生, 给柑橘产业造成巨大损失^[1]。柑橘木虱吸食黄龙病株后便终生携带黄龙病菌, 而且传毒率非常高^[1]。田间若没有木虱, 即使

存在黄龙病株, 黄龙病也蔓延不开^[2]。由于黄龙病病原菌仍无法人工培养, 黄龙病的病理学研究、抗病品种和抗病药剂的筛选很难有所发展^[1]。目前控制黄龙病的手段, 除了培育无病苗、挖除病株外, 主要是对柑橘木虱进行化学防治和生物防治。化学防治可以延缓病害的扩散, 但环境污染、农药残留及木虱抗药性等问题日趋严重; 引入木虱天敌的生物防治方法可明显降低木虱种群, 有很大的发展空间。

收稿日期: 2013-01-10 初稿; 2013-02-06 修改稿

作者简介: 杨金霞 (1985-), 女, 硕士, 研究方向: 应用微生物学与基因工程 (E-mail: yangxyz123006@126.com)

通讯作者: 刘波 (1957-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 微生物生物技术与农业生物药物 (E-mail: liubofaas@163.com)

基金项目: 国家农业公益性行业科研专项 (201003067); 中美合作项目 (6618-22320-001-37S)

间,但是具有一定的季节限制性,在控制病害传播方面的效果需要进一步验证^[3]。因此有必要开辟新途径,阻断木虱对柑橘黄龙病的传播。

已有研究表明,昆虫体内的细菌与昆虫间存在协同进化关系,对昆虫生长发育及传病能力均有影响^[4]。如蚜虫内共生菌为蚜虫的生存提供必需的氨基酸、维生素等物质^[5],去除内共生菌后蚜虫将不能生存也不能传播循回持久性病毒^[6]。许长藩^[7]研究了若虫或成虫木虱刺吸柑橘黄龙病株,病菌经消化道传染至唾液腺,再经刺吸新植株传播病菌,传病方式与蚜虫极其相似。Subandiy zh^[8]研究了柑橘木虱内共生菌群落结构,表明木虱体内微生物十分丰富,木虱体内存在的大量共生微生物可能为其合成和提供必需的营养,还可能对病原菌在木虱体内的转移和增殖产生影响。目前有关木虱内生菌的研究已有些报道,不同研究中,内生菌 DNA 提取方法不同^[8]。在昆虫内生菌多样性研究中,由于内生菌种类多,数量少,不仅要获得高质量和适当数量的 DNA,还要求昆虫细菌 DNA 提取方法简单易行,便于掌握,重复性好^[9]。目前,对于昆虫 DNA 提取方法的研究较多,但是对于昆虫内生菌 DNA 提取方法的报道还比较少。本研究参考 4 种 DNA 提取方法提取木虱内生菌 DNA 并对这些方法进行比较,旨在为柑橘木虱内生细菌总 DNA 的提取提供参考。4 种方法提取的木虱内生菌 DNA 采用原核生物细菌 16S rDNA 通用引物能够特异性地将内生细菌 DNA 扩增出来,从而与真核生物昆虫木虱总 DNA 区分开来。

1 材料和方法

1.1 材料来源

试验材料为福建省农业科学院农业生物资源研究所人工气候室九里香上的柑橘木虱成虫。主要仪器:高速冷冻离心机;研磨棒;恒温水浴锅;微量移液器;漩涡混合器;电泳仪、水平电泳槽和凝胶成像系统等。主要试剂:75% 酒精;2% NaClO 溶液;FastDNA 提取试剂盒;0.08 mol·L⁻¹ NaCl;0.16 mol·L⁻¹ Sucrose;0.06 mol·L⁻¹ EDTA;0.5% SDS;0.1 mol·L⁻¹ Tris-HCl, pH8.6;8 mol·L⁻¹ 醋酸钾;70% 乙醇;100% 乙醇;0.1 mol·L⁻¹ NaCl;0.2 mol·L⁻¹ Sucrose;0.05 mol·L⁻¹ EDTA;0.5% SDS;0.1 mol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 9.1。

1.2 细菌 DNA 提取方法

方法 a: 参考贺红等^[10]的麦红吸浆虫基因组

DNA 提取方法略加改进。(1) 清洗:采集人工气候室内木虱,2% NaClO 浸泡 30 s,75% 酒精浸泡 1 min,无菌水清洗 10 遍以上,分别取 20、30 头置于 1.5 mL 离心管内,塑料研杵研磨;(2) 匀浆:在离心管中加入预热的 DNA 提取液 100 uL (0.08 mol·L⁻¹ NaCl;0.16 mol·L⁻¹ Sucrose;0.06 mol·L⁻¹ EDTA;0.5% SDS;0.1 mol·L⁻¹ Tris-HCl, pH8.6),用干净的研棒研磨虫体,使其达完全匀浆;(3) 水浴:将离心管放入水浴箱,65°C 水浴 30~60 min;(4) 加高浓度的醋酸钾溶液,低温静置;取出离心管,加入 8 mol·L⁻¹ 的醋酸钾溶液,使其终浓度达 1 mol·L⁻¹;然后放入冰箱,4°C 静置 30 min(可过夜);(5) 离心:室温下(一般 4~15°C 均可)12 000 r·min⁻¹ 离心 30 min,弃沉淀;(6) 乙醇沉淀 DNA:在上清液中加入 2 倍体积 95% 乙醇,冰上放置 15 min,然后 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,弃去上清液,管底即为 DNA(肉眼看不见);(7) 冲洗,干燥:加入 500 uL 70% 乙醇,12 000 r·min⁻¹ 离心 3 min,倒去乙醇。再重复洗涤 1 次。将离心管放在超净台上,自然干燥(约 4~5 h);(8) 保存:每管加入 25 uL TE (10 mmol·L⁻¹ Tris,1 mmol·L⁻¹ EDTA, pH8.0) 缓冲液,轻敲管壁,使其溶解,放入冰箱 4°C 保存。

方法 b: 参考李正西等^[11]桃蚜 DNA 提取方法略加改进。采集人工气候室内木虱,2% NaClO 浸泡 30 s,75% 酒精浸泡 1 min,无菌水清洗 10 遍以上,分别取 20、30 头置于 1.5 mL 离心管内,塑料研杵研磨。(1) 加入 100 uL 裂解缓冲液 (0.1 mol·L⁻¹ NaCl;0.2 mol·L⁻¹ Sucrose;0.05 mol·L⁻¹ EDTA;0.5% SDS;0.1 mol·L⁻¹ Tris-HCl, pH9.1) 进一步匀浆,然后在 65°C 水浴锅水浴 30 min;(2) 加入 8 mol·L⁻¹ 的醋酸钾溶液,使其终浓度达 1 mol·L⁻¹;冰浴 30 min;(3) 然后在 12 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,并将上清液转移到新的离心管中,加入等体积的 100% 乙醇,室温静置 5 min;12 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,弃上清液,沉淀用 70% 冰冻乙醇洗 1 次,100% 冰冻乙醇洗 1 次,室温干燥,用 40 uL 纯水重悬,−20°C 保存。

方法 c: 参考田英芳等^[12]的昆虫基因组 DNA 提取方法稍加改进。试剂及溶液:匀浆缓冲液由 8 份 A 液、1 份 B 液及 1 份 C 液组成(用时新鲜配制)。A 液:Tris 0.05 mol·L⁻¹,NaCl 0.1 mol·L⁻¹,EDTA 0.1 mol·L⁻¹,pH7.0~8.0;B 液:5% 的 SDS;C 液:2 mg·mL⁻¹ 的蛋白酶 K,平衡酚

pH6.7~7.8, 另外, 氯仿: 异戊醇(24:1), 无水乙醇及70%乙醇。操作步骤: (1) 研磨: 采集人工气候室内木虱, 2%NaClO浸泡30 s, 75%酒精浸泡1 min, 无菌水清洗10遍以上, 分别取20、30头置于1.5 mL离心管内, 加入0.6 mL匀浆液用特制的与离心管相匹配的小杵研磨; (2) 水浴: 37°C水浴1~3 h, 直至混合液消化得很清亮为止; (3) 酚抽提: 在混合液中加入等体积的平衡酚, 上下缓慢颠倒10次, 切勿剧烈振荡, 在台式高速离心机上6 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心10 min, 取上清液; (4) 重复步骤3, 直至水相与酚相的界面处看不到白色的蛋白质层为止, 取上清液; (5) 氯仿: 异戊醇(24:1)抽提: 在上清液中加入等体积的氯仿: 异戊醇, 上下缓慢颠倒10次, 在台式高速离心机上8 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心10 min, 取上清液; (6) 沉淀DNA: 在上清液中加入2倍体积的冷无水乙醇(置-20°C冰箱内预冷)沉淀DNA, 冰箱内放置10 min, 12 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心10 min, 弃上清液; (7) 洗涤DNA: 在留有沉淀的离心管中加入1 mL 75%冷乙醇洗涤DNA, 在台式高速离心机上10 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心5 min, 去上清液; (8) 保存: 自然干燥, 冰箱内4°C长期保存, 使用时加入超纯水或TE溶解。

方法d: 采用Fast试剂盒提取基因组DNA。(1) 采集人工气候室内木虱, 2%NaClO浸泡30 s, 75%酒精浸泡1 min, 无菌水清洗10遍以上, 分别取20、30头置于1.5 mL离心管内, 跟进样品加入1.0 mL CLS-TC; 塑料研杵研磨。(2) 14 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心10 min; 取上清600~700 μL 放入2 mL离心管, 加等体积的Bingding Matrix, 漩涡混匀(重要); 室温涡旋5 min(低速); (3) 14 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心10 s, 弃上清; 加500 μL SEWS-M, 轻轻悬浮沉淀物; (4) 14 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心1 min, 弃上清; 14 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心10 s, 弃残余液体; 用100 μL DES轻轻洗脱DNA, 55°C水浴5 min; 14 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心1 min, 转移洗脱后的DNA, -20°C保存。

1.3 DNA浓度和纯度检测

采用分光光度计测其DNA浓度和DNA纯度。

1.4 PCR反应条件

PCR总反应体系25 μL , 包括: 10×PCR缓冲液2.5 μL , dNTPs(各2.5 mmol·L⁻¹)0.5 μL , MgCl₂(50 mmol·L⁻¹)1 μL , 16S rDNA通用引物(20 ng· μL^{-1} , 由上海博尚合成)1 μL , Taq酶0.3 μL , DNA模板(12~15 ng· μL^{-1})1

μL , 灭菌超纯水18.7 μL 。PCR扩增程序: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 45 s, 72°C 90 s, 循环30次; 72°C 10 min。吸取4 μL 在1.5%的琼脂糖凝胶上电泳检测, 电压100 V, 室温下电泳40 min。用UVIBANDV.99系统照相, 根据DNA Marker DL3000判读DNA条带大小。进行PCR扩增采用正向引物: 27F(5'-AGAGTTGATCCTGGC-TCAG-3'); 反向引物: 1492R(5'-TACGGTTA-CCTTGTACGACTT-3')

1.5 PCR产物的克隆试验

选择以上4种DNA提取方法中, 扩增效果较好的PCR产物, 进行克隆试验, 检测DNA提取、扩增结果是否满足克隆条件。

2 结果与分析

2.1 提取木虱内生菌DNA的提取检测结果

由DNA提取检测的结果(图1)可知, 4种不同方法从20、30头木虱提取内生细菌DNA中, 前2种方法主带清晰, 但拖尾严重, 第3种方法主带不清晰, 拖尾也很严重, 说明样品DNA完整性遭到破坏, RNA污染较为严重。第4种方法主带清晰, 无拖尾现象, 说明样品DNA完整性较好, 无RNA污染。

2.2 浓度检测结果

经检测DNA浓度可知(表1), 参考改进的提取麦红吸浆虫基因组DNA的方法、参考桃蚜DNA抽提(Bengder的方法略加改进)、一种简单的昆虫总DNA提取方法等3种方法的DNA浓度较高, FastDNA试剂盒法DNA浓度相对较低, 但其260/280值在1.8左右, 纯度较高。

表1 细菌总DNA的浓度

Table 1 Total DNA concentration of bacteria

样品编号	OD值/(ng· μL^{-1})	260/280
a20	632.7	1.41
a30	2756.6	1.52
b20	929.0	1.62
b30	997.6	1.68
c20	891.1	1.91
c30	1880.2	1.94
d20	181.7	1.81
d30	199.4	1.75

注: 样品编号后a、b、c、d分别表示4种不同的DNA提取方法, 其后的20、30表示用于提取DNA的木虱数量。

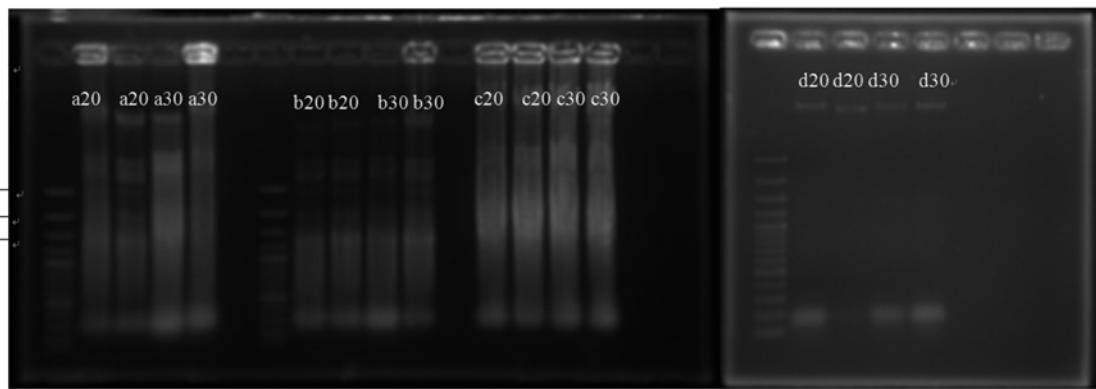


图 1 4 种不同方法提取 DNA 凝胶电泳图

Fig. 1 Gel electrophoresis diagram of DNA extracted with 4 different methods

注: a、b、c、d 分别表示不同的 DNA 提取方法, 即参考改进的提取麦红吸浆虫基因组 DNA 的方法、参考桃蚜 DNA 抽提 (Bengder 的方法略加改进)、一种简单的昆虫基因组 DNA 提取方法、FastDNA 试剂盒提取木虱 DNA; 20、30 分别表示提取 DNA 的木虱头数。

2.3 PCR 反应结果

利用 4 种方法提取的总 DNA 进行 PCR 扩增时, 统一稀释至 $12\sim15 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 采用通用引物 16S rDNA 扩增(图 2), 参考改进的提取麦红吸浆虫基因组 DNA 的方法、参考桃蚜 DNA 抽提 (Bengder 的方法略加改进)、一种简单的昆虫基因组 DNA 提取方法提取产物扩增后经凝胶电泳无条带, 而 FastDNA 试剂盒法提取 DNA 的 PCR 扩增效果较好。

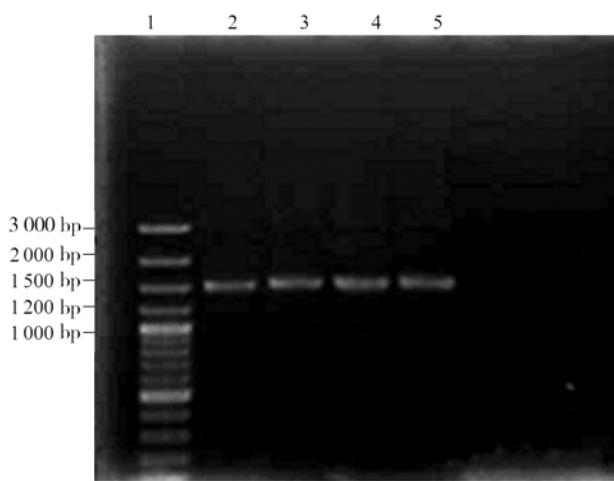


图 2 FastDNA 试剂盒法提取 DNA 的 PCR 扩增产物凝胶电泳图

Fig. 2 Gel electrophoresis diagram of PCR amplification from DNA extracted with FastDNA kit

注: 1 为 Mark; 2~5 为 PCR 扩增产物 4 个重复。

2.4 PCR 产物克隆结果

随机挑取 10 个克隆子 PCR 进行验证, 结果显

示 FastDNA 试剂盒法提取 DNA 进行 PCR 扩增后产物的克隆效率较高 (图 3)。将菌液提取质粒测序鉴定, 其中 2 个分别为沃尔巴克氏内共生菌 (*Wolbachiae bacterium endosymbiont*)、合胞体内共生体 (*Syncytium endosymbiont*), 其最高相似度分别为 100%、99%。由以上结果可见 FastDNA 试剂盒法提取 DNA 可以很好地用于后续试验。

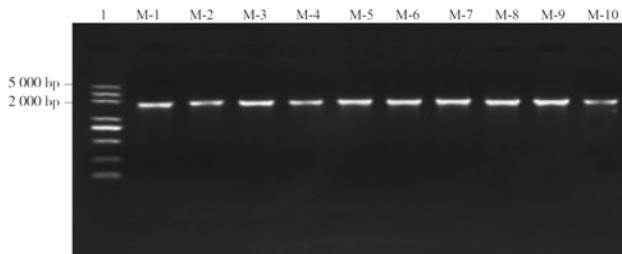


图 3 随机选择的阳性克隆子

Fig. 3 Part of randomly selected positive clones

注: 1 为 Mark; M-1~M-10 分别表示随机挑取的 10 个克隆子。

3 讨 论

昆虫体内是一个复杂的微生态系统, 存在大量的微生物, 这些微生物对寄主发育、营养吸收和防御方面都起着十分重要的作用^[13]。已有研究发现, 昆虫内生细菌和寄主之间少数属于病原菌与寄主的关系^[14], 同时这些共生微生物在抵御外来细菌的入侵、定殖和加强免疫系统的功能中也起着重要作用。因此昆虫体内生菌群的功能以及与机体的相互关系的研究非常重要。细菌基因组 DNA 往往要用于 PCR 扩增等后续分子生物学操作, DNA 的浓度

和纯度对于后续试验操作会有很大影响, 因此提取的总DNA是否能很好应用于PCR扩增也是检测DNA质量的一个重要方面。本研究比较了4种提取木虱内生细菌总DNA的方法, 为后续分子生物学技术的开展提供微生物的DNA模板。

结果显示参考贺红等^[10]、李正西等^[11]、田英芳等^[12]方法改进的3种方法提取的总DNA完整性较低, PCR扩增需要进一步摸索。FastDNA试剂盒法提取的总DNA纯度和完整性较高, 浓度相对较低, 但是浓度为12~15 ng·μL⁻¹, 1 μL就可以得到很好的扩增效果。PCR扩增产物可以很好地进行克隆测序。缺点是成本相对较高。由于FastDNA试剂盒法提取柑橘木虱内生菌DNA操作简单, 结果稳定, 纯度高, 重复性好, 节省时间, 所以针对木虱内生菌总DNA, 试剂盒提取法应为首选方法。

参考文献:

- [1] 陈建利, 阮传清, 刘波, 等. 柑橘木虱对柑橘不同品种的趋性[J]. 福建农业学报, 2011, 26 (2): 280—283.
- [2] 袁辉, 李安国. 桂林柑橘木虱种群分布特点及防治对策探讨[J]. 广西植保, 2007, 20 (4): 31—32.
- [3] 杜丹超, 鹿连明, 张利平, 等. 柑橘木虱的防治技术研究进展[J]. 中国农学通报, 2011, 27 (25): 178—181.
- [4] 殷幼平, 刘婷婷, 田圣超, 等. 16S rDNA序列的柑桔木虱体内共生菌多样性研究[J]. 昆虫学报, 2011, 54(6): 664—674.
- [5] DOUGLAS A E. Nutritional interactions insect—microbial sym-bioses: aphids and their symbiotic bacteria Buchnera [J]. Annu Rev Entomol, 1998, 43: 17—37.
- [6] 林林, 吴云锋, 崔晓峰. 玉米蚜体内参与传毒的共生菌groEL基因的克隆和原核表达[J]. 中国病毒学, 2003, 18 (1): 54—57.
- [7] 许长藩, 夏雨华, 李开, 等. 柑桔黄龙病的病原在木虱体内循环的研究[J]. 植物病理学报, 1990, 20 (2): 25—30.
- [8] SUBANDIYAH S, NIKOH N, TSUYUMU S, et al. Complex endosymbiotic microbiota of the Citrus Psyllid *Diaphorina citri* (Homoptera: Psylloidea) [J]. Zoological Science, 2000, 17: 983—989.
- [9] 石晶, 谢映平, 薛皎亮, 等. 蚜虫基因组DNA不同提取方法的比较[J]. 昆虫知识, 2005, 42 (2): 207—211.
- [10] 贺虹, 魏琮, 袁向群, 等. 一种提取麦红吸浆虫基因组DNA的方法[J]. 昆虫知识, 2008, 45 (6): 984—986.
- [11] 李正西, 李定旭. 桃蚜自然种群初级和次级共生菌的分子鉴定[J]. 昆虫学报, 2005, 48 (5): 810—814.
- [12] 田英芳, 黄刚, 郑哲民, 等. 一种简易的昆虫基因组DNA提取方法[J]. 陕西师范大学学报, 1999, 27 (4): 82—84.
- [13] 苗雪霞, 丁德诚. 蚜虫与其胞内共生细菌的相互作用[J]. 生命科学, 2003, 15 (4): 242—247.
- [14] DILLON R J, CHARNLEY A K. Mutualism between the desert locust *Schistocerca gregaria* and its gut microbiota [J]. Research in Microbiology, 2002, 153 (8): 503—509.

(责任编辑: 张 梅)