



三种无形态损伤提取粉螨 DNA 方法的改进与评估^{*}

范海页^{**} 朱永航 陈慧林 刘璐瑶 赵薇
曹玉祥 叶长江 孙恩涛^{***}

(皖南医学院检验学院, 芜湖 241002)

摘要 【目的】改进和评估无形态损伤提取粉螨 DNA 并保留完整凭证标本的方法。【方法】用改良 Chelex-100 法, STE 法和碱裂解法提取单只椭圆食粉螨 *Aleurolyphus ovatus* 基因组 DNA, 并进行凭证标本回收和形态观察。超微量分光光度计测定 DNA 的纯度。通过对 CO I 基因的扩增, 验证所提取的 DNA 是否满足 PCR 扩增。【结果】3 种方法处理后的凭证标本整体保持完整, 但碱裂解法处理后, 躯体刚毛易脱落, 凭证标本透明过度, 影响标本的形态鉴定。改良 Chelex-100 法的 A_{260}/A_{280} 比值为 1.95, 其余两种方法 A_{260}/A_{280} 均低于 1.8。3 种方法所提单只螨 DNA 均满足 PCR 扩增, 但 STE 法的扩增效果较差。【结论】改良 Chelex-100 法保存凭证标本完整, 不影响标本的形态鉴定; 提取的 DNA 纯度高, 可以满足 PCR 扩增和后续相关分子生物学研究, 且简单高效, 适于单只粉螨 DNA 的无形态损伤提取。

关键词 粉螨; DNA 提取; 无形态损伤; 改良 Chelex-100 法; 碱裂解法

Comparison of three methods of extracting DNA from acaroid mites without causing morphological damage to specimens

FAN Hai-ye^{**} ZHU Yong-Hang CHEN Hui-Lin LIU Lu-Yao ZHAO Wei
CAO Yu-Xiang YE Chang-Jiang SUN En-Tao^{***}

(School of Laboratory Medicine, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China)

Abstract 【Objectives】To evaluate three methods of extracting DNA from acaroid mites without causing morphological damage, thereby preserving complete voucher specimens. 【Methods】Genomic DNA of a single *Aleurolyphus ovatus* was extracted using the modified Chelex-100 method, the STE method, and the Alkaline lysis method, followed by voucher specimen recovery and morphological comparison. The purity of DNA was determined using an ultra microspectrophotometer. The COI gene was amplified to verify whether the extracted DNA met PCR amplification requirements. 【Results】Voucher specimens subjected to one of the 3 methods remained intact as a whole, but the alkaline lysis method caused excessive transparency of the cuticle and detachment of body bristles, compromising the morphological identification of specimens. The A_{260}/A_{280} ratio of the modified Chelex-100 method was 1.95, whereas that of the other two methods was < 1.8 . DNA extracted by either of the three methods met the standard for PCR amplification, although the degree of amplification achieved using the STE method was relatively poor. 【Conclusion】The modified Chelex-100 method had the least effect on the morphology of voucher specimens and did not compromise subsequent morphological identification. DNA extracted using this

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金项目 (31870352); 安徽省大学生创新创业项目 (S202110368044); 皖南医学院 2021 年度校大学生科研资助金项目 (WK2021XS20)

**第一作者 First author, E-mail: fhy2743317586@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: asdentao@126.com

收稿日期 Received: 2022-06-06; 接受日期 Accepted: 2023-02-16

method also has high purity, sufficient to meet the requirements of PCR amplification and subsequent molecular research. The Chelex-100 method is simple and efficient, and allows DNA to be extracted from single acaroid mites without morphological damage.

Key words acaroid mites; DNA extraction; without morphological damage; modified Chelex-100 method; alkaline lysis method

粉螨是我国常见的储藏物害虫, 不仅破坏储藏物质量, 还会对人们生活环境造成污染, 影响人类健康 (郑凌霄等, 2019)。由于粉螨个体微小 (0.2-0.5 mm), 仅通过形态学难以对近缘种、隐存种、残体、不同发育阶段等样本进行准确鉴定 (Zhang *et al.*, 2021), 而分子鉴定是有力的补充 (李文杰等, 2022)。目前, 螨类的分子鉴定常用整只螨体进行研磨, 无法保留凭证标本。然而, 凭证标本对物种错误鉴定时的复检、纠正以及新物种的发现具有重要意义 (Porco *et al.*, 2010; 高艳和卜云, 2014)。无形态损伤 DNA 提取既能获得足量 DNA, 同时也完整保存凭证标本, 避免了样本形态与分子信息关联的误差, 对粉螨等小型节肢动物的鉴定具有一定意义 (郑成卓等, 2023)。研究表明, Chelex-100 法、STE 法和碱裂解法等可用于无形态损伤提取小型节肢动物 DNA, 且操作简便、成本和毒性低, 但在扩增效率、适用范围和凭证标本保存等方面仍有一定的局限性 (Castalanelli *et al.*, 2010; 侯晓晖等, 2013; Aoyama *et al.*, 2015; Guzmán-Larralde *et al.*, 2017; Miura *et al.*, 2017; Ahaniazad *et al.*, 2018; Suaste-Dzul *et al.*, 2019; 夏慧敏等, 2019)。因此, 本文对 Chelex-100 法、STE 法和碱裂解法进行优化, 用于粉螨无形态损伤 DNA 提取, 以期获得一种简单高效的粉螨无形态损伤的 DNA 提取方法。

1 材料与方法

1.1 供试样本

椭圆食粉螨为实验室饲养。用饥饿处理后的新鲜椭圆食粉螨以及 75% 酒精 - 20 °C 固定 3 个月以上的椭圆食粉螨作为实验样本。

1.2 DNA 提取

提取前, 用零号毛笔挑取单只螨, 在蒸馏水

中清洗数次后, 转移至单个 EP (Eppendorf) 管 (0.2 mL) 中, 3 700 r/min 离心 2 min, 确保螨体置于管底。

1.2.1 改良 Chelex-100 法 参考 Miura 等 (2017) 提取 DNA 的方法加以优化改进。单只螨的 EP 管中加入 30 μ L 5% Chelex-100 溶液 (预先摇匀), 混匀离心; 将 EP 管置于恒温加热器 95 °C 加热 10 min, 取出, 12 000 r/min 离心 3 min。

1.2.2 STE 法 参考侯晓晖等 (2013) 的方法, 略有改进。单只螨的 EP 管中加入 30 μ L 的 STE 缓冲液 (100 mmol/L NaCl; 10 mmol/L Tris-HCl; 1 mmol/L EDTA (pH=8.0)); EP 管内再加入 3 μ L 蛋白酶 K (10 mg/mL), 充分混匀; 混合液置于 56 °C 水浴 3.5 h, 95 °C 变性 5 min, 灭活蛋白酶 K 后取出。

1.2.3 碱裂解法 参考赵金艳等 (2017) 的方法, 略有改进。单只螨的 EP 管中加入 20 μ L 0.2 mol/L NaOH 溶液, 振荡离心 10 min; EP 管置于恒温加热器 98 °C 加热 10 min, 取出加入 80 μ L 1 mol/L Tris-HCl 中和, 振荡混匀; 混合液置于高速冷冻离心机, 12 000 r/min 离心 10 min 后取出。

上述 3 种方法处理后, 均取上清液 1 μ L 作为 PCR 反应的模板。

1.3 玻片标本的制作

将已提取 DNA 的样本, 用“零”号毛笔取出, 置于盛有双蒸水的玻片上清洗 3 次, 除去样本表面的杂质, 再用封固液制成标本, 于 60 °C 烘箱中烘干 24 h 后取出于显微镜下观察拍照。

1.4 DNA 检测

1.4.1 DNA 纯度测定 采用超微量分光光度计, 分别测定 3 种方法所提取的 DNA A_{260}/A_{280} 的比值, 反映提取 DNA 的纯度。

1.4.2 PCR 扩增和测序 本研究采用线粒体 CO I 基因扩增, 扩增片段长度 658 bp。引物:

F (5'-TTTTCTACHAAYCATAAAGATATTGC-3');
R (5'-TATAAACYTCDGGATGNCCAAAAA-3')。
PCR 反应体系为: 总体积 25 μ L, 含 2 $\times$ Taq PCR
Mastermix 13 μ L, 上下游引物 (5 μ mol/L) 各
1 μ L, DNA 模板 2 μ L, 加灭菌蒸馏水补足。PCR
反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,
48 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 循环 34 次;
72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。

将扩增的 PCR 产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳
检测, 扩增成功的 PCR 产物送上海生工生物科

技有限公司进行双向测序, 测序所得结果进行
Blast 比对, 以校对扩增序列的正确性。

2 结果与分析

2.1 凭证标本的形态学分析

3 种方法处理不同保存方式的样本后的凭证
标本整体保持完整 (图 1: A-D)。但碱裂解法处
理的样本, 躯体刚毛易脱落, 体内软组织结构破
坏较为严重, 标本过于透明 (图 1: E-G)。

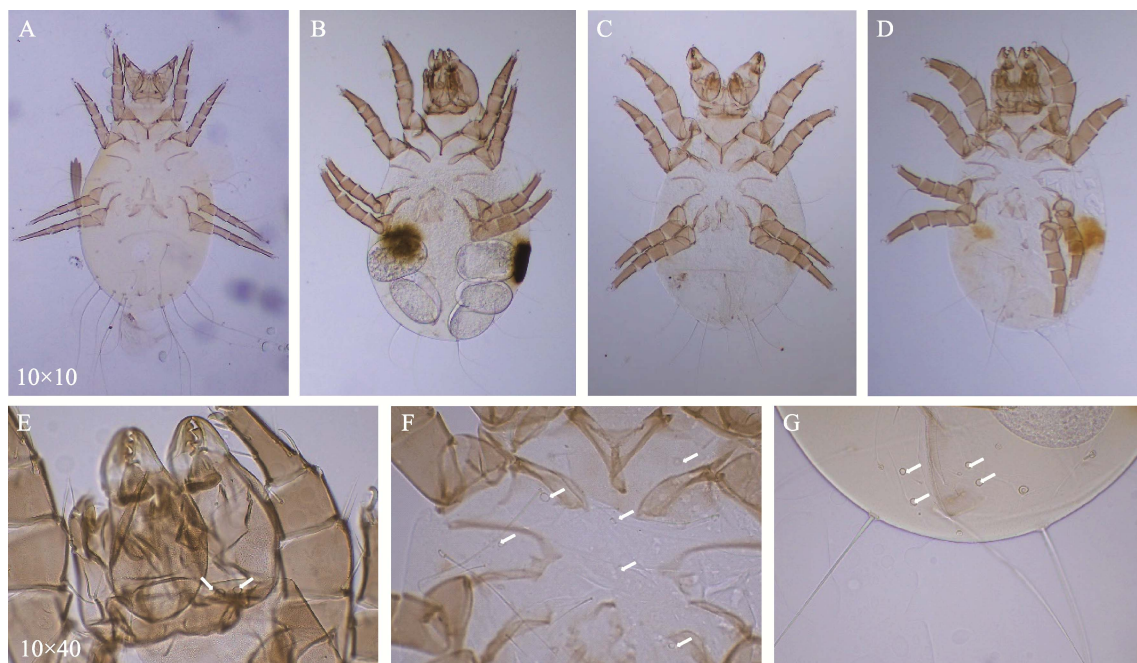


图 1 3 种方法处理后回收的凭证标本与未经处理的正常标本的形态对比

Fig. 1 Morphological comparison between the voucher specimens recovered by the three methods and the normal specimens without treatment

A. 未经处理椭圆食粉螨标本 (♀) $\times 100$; B. 改良 Chelex-100 法处理后的凭证标本 (♀) $\times 100$;

C. STE 法处理后的凭证标本 (♀) $\times 100$; D. 碱裂解法处理后的凭证标本 (♀) $\times 100$;

E, F, G. 碱裂解法处理后凭证标本的刚毛脱落情况 (♀) $\times 400$ 。箭头表示的是原有刚毛的位置。

A. Untreated specimen of *Aleurolyphus ovatus* (♀) $\times 100$; B. Voucher samples treated by modified Chelex-100 method (♀) $\times 100$; C. Voucher samples treated by STE method (♀) $\times 100$; D. Voucher samples treated by alkaline lysis method (♀) $\times 100$;

E, F, G. Seta shedding of the voucher specimens after alkaline lysis method (♀) $\times 400$.

Arrows in the figures indicate the position of the seta.

2.2 无形态损伤提取 DNA

2.2.1 DNA 纯度分析 用 3 种方法对新鲜和
酒精保存样本进行基因组 DNA 的提取。结果
显示, 活体和酒精保存样本所得 DNA 的

A_{260}/A_{280} 的比值相差不大。其中改良 Chelex-100
法的 A_{260}/A_{280} 的比值为 1.95, 在理想值范围;
而 STE 法和碱裂解法 A_{260}/A_{280} 的比值均显著低
于 1.8 (表 1)。

2.2.2 PCR 扩增结果分析 改良 Chelex-100

法、STE 法和碱裂解法提取不同保存方式的样本 DNA 作为 PCR 扩增的模板。结果显示, 改良 Chelex-100 法和碱裂解法扩增产物的电泳条带清晰单一、效果理想, 可以满足进一步研究的需求。而 STE 法的扩增效果较差, 部分电泳条带较暗且扩增效率低 (图 2, 图 3)。

表 1 超微量分光光度计检测结果
Table 1 Ultramicrospectrophotometer test results

方法 Method	样本材料 Sample	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
改良 Chelex-100 法 Modified Chelex-100 method	新鲜样本 Fresh samples	1.95±0.07
	酒精保存样本 Alcohol preserved samples	2.02±0.07
STE 法 STE method	新鲜样本 Fresh samples	0.97±0.01
	酒精保存样本 Alcohol preserved samples	0.96±0.02
碱裂解法 Alkaline lysis method	新鲜样本 Fresh samples	1.27±0.03
	酒精保存样本 Alcohol preserved samples	1.26±0.03

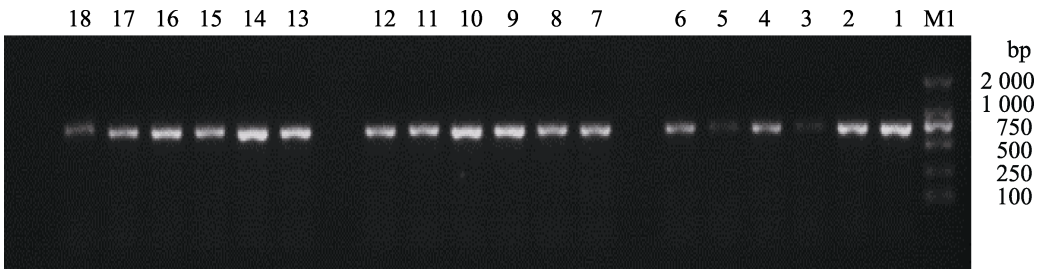


图 2 新鲜样本中 3 种方法提取的基因组 DNA 的 PCR 电泳结果
Fig. 2 PCR electrophoresis results of genomic DNA extracted by three methods in fresh samples

M1: DNA marker; 泳道 1-6: STE 法 PCR 结果; 泳道 7-12: 改良 Chelex-100 法 PCR 结果;
泳道 13-18: 碱裂解法 PCR 结果。
M1: DNA marker ; Lane 1-6: PCR results by STE method; Lane 7-12: PCR results by modified Chelex-100;
Lane 13-18: PCR results by alkaline lysis method.

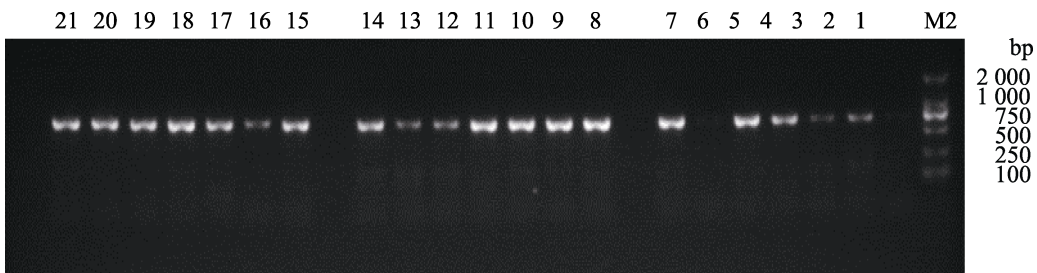


图 3 酒精保存样本中 3 种方法提取的基因组 DNA 的 PCR 电泳结果
Fig. 3 PCR electrophoresis results of genomic DNA extracted by three methods preserved samples in alcohol

M2: DNA marker; 泳道 1-7: STE 法 PCR 结果; 泳道 8-14: 改良 Chelex-100 法 PCR 结果;
泳道 15-21: 碱裂解法 PCR 结果。
M2: DNA marker ; Lane 1-7: PCR results by STE method; Lane 8-14: PCR results by modified Chelex-100;
Lane 15-21: PCR results by alkaline lysis method.

3 讨论

粉螨因个体微小,提取 DNA 多对整个螨体进行研磨而无法保留凭证标本。无形态损伤提取 DNA 保留了凭证标本,既避免了样本分子和形态信息关联的误差,又能为数据库提供较全面的凭证样本信息,对粉螨的鉴定具有一定意义。本研究利用改良 Chelex-100 法、STE 法和碱裂解法分别提取单头螨 DNA,并对凭证样本进行回收、观察。其中,改良 Chelex-100 法和 STE 法处理后的样本形态鉴别特征都保持完整,提取的 DNA 推测是缓冲液通过生殖区等薄角质层区域释放出 DNA (Gilbert *et al.*, 2007)。而碱裂解法处理的标本体内软组织结构破坏较为严重,标本过于透明,且躯体刚毛易脱落,导致重要鉴别特征的丢失,无法进一步鉴定。

本研究 3 种方法提取不同保存方式的样本 DNA 后,改良 Chelex-100 法所得 DNA 纯度均较好,而 STE 法和碱裂解法 A_{260}/A_{280} 显著低于 1.8,推测有蛋白质和酚类等污染。3 种方法提取后,改良 Chelex-100 法和碱裂解法所提 DNA 的 PCR 产物的电泳条带清晰单一,效果理想;而 STE 法的目的条带亮度和成功率相对较差。前期研究表明,充分研磨是 Chelex-100 法成功提取螨类等微小动物 DNA 的关键(邹志文等,2011)。但本研究结果显示,在整个 Chelex-100 法提取 DNA 过程中,样本未经过冻融研磨,也未添加蛋白酶 K,仅用 Chelex-100 颗粒的缓冲液,并通过提高孵育温度,加速细胞膜破裂、蛋白质变性,即可完成样本 DNA 的提取,从而保存了完整的凭证标本。此外,从提取时间分析,STE 法所需时间最长,碱裂解法提取操作中需两次加液中和和多次离心,故耗时较长,而改良 Chelex-100 法耗时最短,在 20 min 内即可完成单个操作。但是针对不同的物种,应考虑和平衡热浴处理时间,如针对具硬质外壳的样本,可适当延长改良 Chelex-100 法的热浴时间。

综上,改良 Chelex-100 法保存凭证标本完整,不影响标本的形态鉴定;操作简单高效,耗时短;提取的 DNA 纯度高,可以满足 PCR 扩增

和后续相关分子生物学研究,适于单只粉螨 DNA 的无形态损伤提取。

参考文献 (References)

- Ahaniazad M, Bagheri M, Roumi V, Ali Akrami M, 2018. An efficient and non-destructive DNA extraction method for oribatid mites. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 51(3/4): 187–196.
- Aoyama H, Saitoh S, Fujii S, Nagahama H, Shinzato N, Kaneko N, Nakamori T, 2015. A rapid method of non-destructive DNA extraction from individual springtails (Collembola). *Applied Entomology and Zoology*, 50(3): 419–425.
- Castalanelli MA, Severtson DL, Brumley CJ, Szito A, Footitt RG, Grimm M, Munyard K, 2010. A rapid non-destructive DNA extraction method for insects and other arthropods. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 13(3): 243–248.
- Gao Y, Bu Y, 2014. An improved method for DNA extraction from small arthropods without morphological damage. *Sichuan Animal*, 33(2): 216–220. [高艳, 卜云, 2014. 一种改进的小型节肢动物无形态损伤的 DNA 提取方法. 四川动物, 33(2): 216–220.]
- Gilbert MTP, Moore W, Melchior L, Worobey M, 2007. DNA extraction from dry museum beetles without conferring external morphological damage. *PLoS ONE*, 2(3): e272.
- Guzmán-Larralde AJ, Suaste-Dzul AP, Gallou A, Peña-Carrillo KI, 2017. DNA recovery from microhymenoptera using six non-destructive methodologies with considerations for subsequent preparation of museum slides. *Genome*, 60(1): 85–91.
- Hou XH, Zhang XM, Lv B, Han XJ, 2013. A method for extracting insect DNA. China: CN103243090A, 2013-08-14. [侯晓晖, 张雪梅, 吕彬, 韩晓静, 2013. 一种提取昆虫 DNA 的方法. 中国: CN103243090A, 2013-08-14.]
- Miura K, Higashiura Y, Maeto K, 2017. Evaluation of easy, non-destructive methods of DNA extraction from minute insects. *Applied Entomology and Zoology*, 52(2): 349–352.
- Li WJ, Chen ZL, Zhou SY, 2022. Phylogenetic study of the Camponotini (Hymenoptera: Formicidae) based on mitochondrial CO I gene variation. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 59(6): 1347–1361. [李文杰, 陈志林, 周善义, 2022. 基于线粒体 CO I 基因的弓背蚁族系统发育研究. 应用昆虫学报, 59(6): 1347–1361.]
- Porco D, Rougerie R, Deharveng L, Hebert P, 2010. Coupling non-

- destructive DNA extraction and voucher retrieval for small soft-bodied Arthropods in a high-throughput context: The example of Collembola. *Molecular Ecology Resources*, 10(6): 942–945.
- Suaste-Dzul AP, Rodríguez-Vélez JM, Rodríguez-Vélez B, Arredondo-Bernal HC, Gallou A, 2019. Non-destructive DNA extraction methods for entomophagous insects with emphasis on biological control. *Genome*, 62(4): 287–293.
- Xia HM, Huang J, Zheng ML, Chen S, Chen JH, 2019. A new non-destructive DNA extraction method for Braconidae specimens. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 48(6): 720–726. [夏慧敏, 黄珺, 郑敏琳, 陈湜, 陈家骅, 2019. 茧蜂标本形态无损提取DNA的新方法. 福建农林大学学报(自然科学版), 48(6): 720–726.]
- Zheng CZ, Qian XJ, Zhang J, Liu Heng-Liang, Wang XD, Dong ZX, Fu LH, Liu CZ, 2023. DNA barcoding based identification of locust species in the alpine grasslands of Gansu province. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 60(5): 1403–1411. [郑成卓, 钱秀娟, 张洁, 刘恒亮, 王兴铎, 董子信, 付连海, 刘长仲, 2023. DNA 条形码应用于甘肃省高山草原蝗虫物种的鉴定研究. 应用昆虫学报, 60(5): 1403–1411.]
- Zhang WY, Cheng J, Zhao YE, Niu DL, Guo HS, 2021. Molecular identification and DNA barcode screening of acaroid mites in ground flour dust. *Genome*, 64(9): 869–877.
- Zhao JY, Liu B, Wang WJ, Zhang Y, Zhang QD, 2017. A rapid alkaline lysis method of extraction pig genomic DNA suitable for PCR amplification. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 36(4): 90–94. [赵金艳, 刘榜, 王文君, 张宇, 张庆德, 2017. 一种适于 PCR 扩增的快速提取猪基因组 DNA 的碱裂解法. 华中农业大学学报, 36(4): 90–94.]
- Zheng LX, Yin CC, Wang YX, Li MN, Shao HF, Fang WX, Yang M, Zhao JH, Sun ET, 2019. Identification of acaroid mite species based on DNA barcoding. *Chinese Journal of Media Biology and Control*, 30(2): 180–184. [郑凌霄, 尹灿灿, 王逸泉, 李梦楠, 邵黄芳, 方惟希, 杨曼, 赵金红, 孙恩涛, 2019. 基于 DNA 条形码技术的粉螨种类鉴定研究. 中国媒介生物学及控制杂志, 30(2): 180–184.]
- Zou ZW, Zhang SQ, Xin TR, Yang XQ, Yang DL, Xia B, 2011. An improved Chelex-100 method for extracting DNA from single mite. *Journal of Nanchang University (Science Edition)*, 35(6): 564–567. [邹志文, 张素卿, 辛天蓉, 杨小强, 杨登录, 夏斌, 2011. 一种改进的 Chelex-100 法提取单头螨 DNA. 南昌大学学报 (理科版), 35(6): 564–567.]