

长尾麝凤蝶干制标本不同部位基因组提取效果分析

豆园园¹ 邓樱花^{1,2} 张洪权^{1,2} 陈功轩^{1,2}

(1. 湖北第二师范学院化学与生命科学学院, 武汉 430205;

2. 湖北第二师范学院植物抗癌活性物质提纯与应用湖北省重点实验室, 武汉 430205)

摘要: 利用动物基因提取试剂盒提取长尾麝凤蝶干制标本足、触角、喙管及前翅的基因组 DNA, 用琼脂糖凝胶电泳以及超微量核酸蛋白检测仪分析提取的基因组 DNA 的质量, 比较不同取材部位基因组 DNA 的提取效果。实验结果表明: 触角提取的量高于足, 触角最高和最低提取浓度分别为 25.0ng/μl 和 9.5ng/μl, 足的最高和最低提取浓度分别为 19.4ng/μl 和 10.4ng/μl, 且足与触角提取物 OD260/OD280 值均在 1.5 以上; 但长尾麝凤蝶的足与触角所提取的基因组 DNA 的量稳定性都较差; 喙管与前翅基因组 DNA 的提取量稳定, 但明显低于触角与足的提取量。

关键词: 长尾麝凤蝶; 干制标本; 基因组提取;

长尾麝凤蝶, 属于凤蝶科凤蝶亚科麝凤蝶属, 主要分布在我国西部、中部及南部。一般翅呈黑或黑褐色, 前翅文脉两侧灰色或黄褐色, 后翅外缘波形, 有大弯月形红色斑, 后翅反面红色斑纹更明显。幼虫主要寄生在异叶马兜铃等植株上, 成虫一般喜吸食合欢、粉叶羊蹄甲、接骨草等花蜜。近年来分子生物学技术在昆虫学各领域中发挥着重要作用, 而基因组 DNA 的提取作为起始步骤是分子生物学技术的基础和前提。由于干标本 DNA 具有易降解的特性, 并受馆藏条件、采集后的处理方式等因素的影响, 在蝴蝶干制标本基因组 DNA 提取方面的研究较少。在实际操作中, 不同的实验方法, 不同的材料所提取得到的 DNA 的质量和数量都相差较大。

本研究主要是通过昆虫基因组 DNA 的提取、超微量核酸蛋白测量仪、琼脂糖凝胶电泳等分子生物学手段, 对长尾麝凤蝶干制标本中足、触角、喙管、前翅等部位基因组 DNA 的提取效果进行分析与比较, 为以后同类型干制标本基因组提取提供参考。

一、实验部分

(一) 实验材料、试剂及仪器

实验所用长尾麝凤蝶取自湖北第二师范学院化学与生命科学学院动物标本实验室, 为本科生野外实习所采集、制作、保存的干制标本。

主要试剂包括: 动物基因提取试剂盒(天根生化科技有限公司)、蛋白酶 K、Rnase 酶、无水乙醇、超纯水、琼脂糖、1xTAE 缓冲液、6xLoading buffer、Goldviewd 等。

主要仪器: 移液器、台式离心机、超低温冰箱、灭菌锅、水浴锅、电磁炉、电子天平、电泳仪、水平电泳槽、凝胶成像系统(ChemiDoc

XRS+)、超微量核酸蛋白检测仪(ND2000)等。

(二) 基因组 DNA 的提取

1. 样品预处理

将同一标本保存盒中所有长尾麝凤蝶足、触角、喙管、前翅四个部位分别取下、混匀、存放。从混匀的样品中分别称取长尾麝凤蝶干制标本足、触角、喙管、前翅 6mg 进行分类编号。将称取的标本置于 1.5mlEP 管内加无菌水浸泡 48h。将浸泡后的标本置于研钵中进行充分研磨, 将研磨后的各个样品均分为三份, 置于新的离心管中, 重新进行分类编号。

2. 基因组 DNA 的提取

将经过充分研磨的样品按照基因组 DNA 提取试剂盒的方法分别提取各个样品基因组 DNA。将提取物置于冻存盒中保存、备用。

(三) 提取物检测

1. 提取物浓度检测及纯度检测

使用超微量核酸蛋白检测仪对提取物进行纯度和浓度的检测, 分别对提取物在波长 260nm 和波长 280nm 处的吸收值进行检测, 根据 OD260/280 值来检测提取物的纯度情况, 以判断长尾麝凤蝶不同部位基因组 DNA 的提取效果。核酸的最大吸收波长为 260nm, 蛋白质的最大吸收波长为 280nm。纯度较高的 DNA 样品 OD260/280 在 1.5-1.8 之间, 高于 1.8 表明样品中有 RNA 残留; 低于 1.5 表明 DNA 样品存在被蛋白质或苯酚污染的情况。

2. 提取物电泳检测

取 5 μL 的提取物与 1 μL 6xLoading buffer 混匀, 上样到 0.9% 琼脂糖凝胶中, 将凝胶放入 1xTAE 电泳液中, 使用电泳仪电泳, 再用凝胶成像系统观察各样品的 DNA 条带结果, 判断不同蝴蝶不同部位基因组 DNA 的提取效果, 以及是否有蛋白质污染等。琼脂糖凝胶电泳检测时, 若样品 DNA 条带整齐、无拖尾, 则说明提取的 DNA 较完整, 也无杂质; 反之, 则可说明提取物被降解或混有杂质。

二、实验结果与分析

(一) 不同部位提取物中基因组 DNA 的检测结果与分析

从提取的长尾麝凤蝶不同部位基因组 DNA 的所有数据中选取浓度和纯度值都比较均匀、有效的五组数据, 计算出每组中不同部位的 3 个样品提取物的平均值进行分析比较。不同部位的 2mg 样品提取物溶于 100 μL TE 溶液后测得浓度与 OD260/OD280 值见图 1 和图 2。

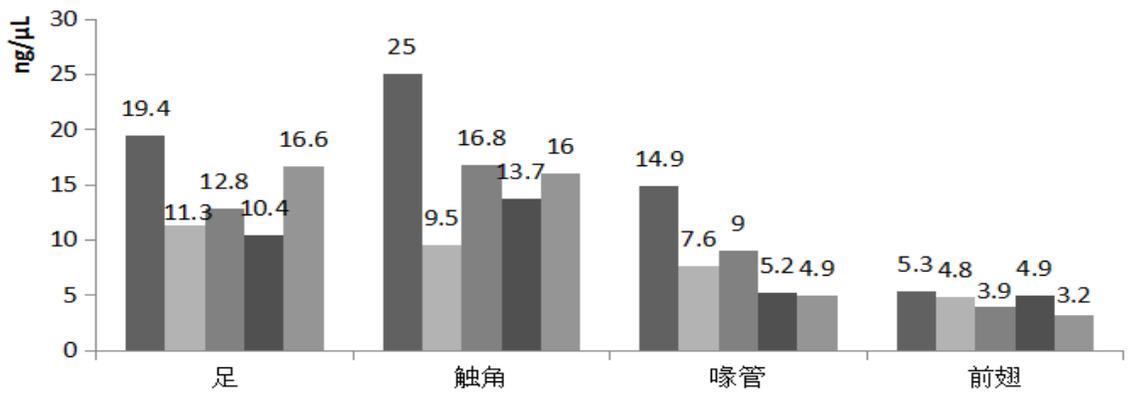


图 1. 长尾麝凤蝶不同部位提取物浓度 (ng/μL)

表 1. 长尾麝凤蝶不同部位提取物浓度标准差

样品	足	触角	喙管	前翅
标准差	3.80	5.68	4.05	0.85

从图 1 可知, 长尾麝凤蝶中触角基因组 DNA 浓度最高值为 25.0ng/μL, 最低值为 9.5ng/μL; 足提取物浓度最高为 19.4ng/μL, 最低浓度为 10.4ng/μL; 喙管提取物最高浓度为 14.9ng/μL, 最低浓度为 4.9ng/μL; 前翅提取物最高浓度为 5.3ng/μL, 最低浓度为 3.2ng/μL。由图 1 可以看出长尾麝凤蝶触角的提取物

浓度相对更高, 足次之, 喙管更低一些, 前翅的提取物浓度最低。

结合表 1 可得, 长尾麝凤蝶触角中提取物浓度值最高, 但标准差值为 5.68, 在本组数据中最高, 故触角中基因组 DNA 的提取量稳定性最差; 足的提取物浓度标准差值为 3.80, 在本组数据中相对较小, 故足的提取出的量相对稳定; 喙管的提取浓度标准差值为 4.05, 相对较大, 故喙管中基因组的提取量稳定性也较差; 前翅的提取物浓度标准差为 0.85, 虽然前翅的提取含量最低, 但它是长尾麝凤蝶的四个部位中提取量最稳定的一个部位。

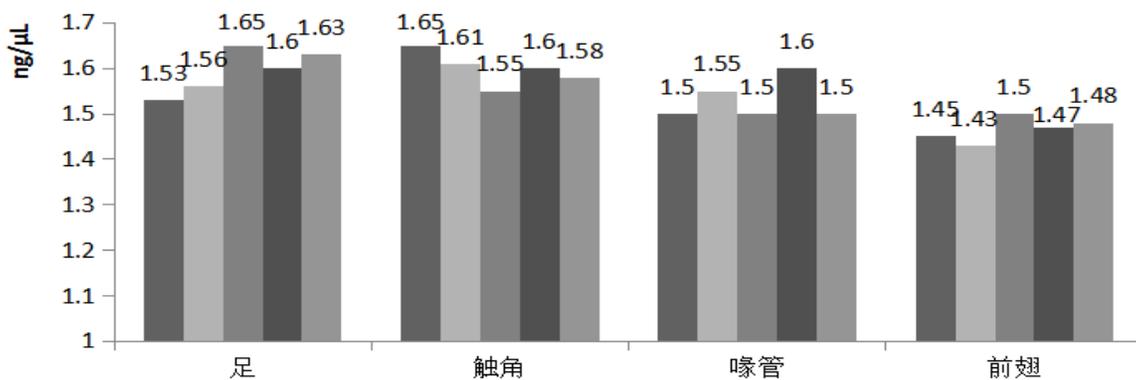


图 2. 长尾麝凤蝶不同部位提取物 OD260/OD280 值

表 2. 长尾麝凤蝶不同部位提取物 OD260/OD280 标准差

样品	足	触角	喙管	前翅
标准差	0.051	0.037	0.042	0.085

由表 2、图 2 可知长尾麝凤蝶不同部位提取的基因组 DNA 的 OD260/OD280 值最大为 1.65, 足与触角中纯度范围均为 1.50~1.65; 喙管中提取物纯度最大为 1.60, 大部分数据位于 1.50~1.60 中; 前翅纯度范围为 1.43~1.50。其中, 足、触角、喙管的提取物纯度相

对较高, 前翅纯度较差, 可能存在污染等情况。结合各部位基因组 DNA 纯度标准差顺序: 触角 < 喙管 < 足 < 前翅, 可知长尾麝凤蝶触角中的基因组 DNA 提取纯度最为稳定, 喙的提取纯度也相对稳定, 足中纯度的稳定性相对较差, 而前翅基因组 DNA 的提取纯度稳定性最差。

(三) 提取物电泳检测结果与分析

取上述样品提取物, 用 0.9% 琼脂糖凝胶电泳检测长尾麝凤蝶基因组 DNA, 各部位检测结果见图 3。

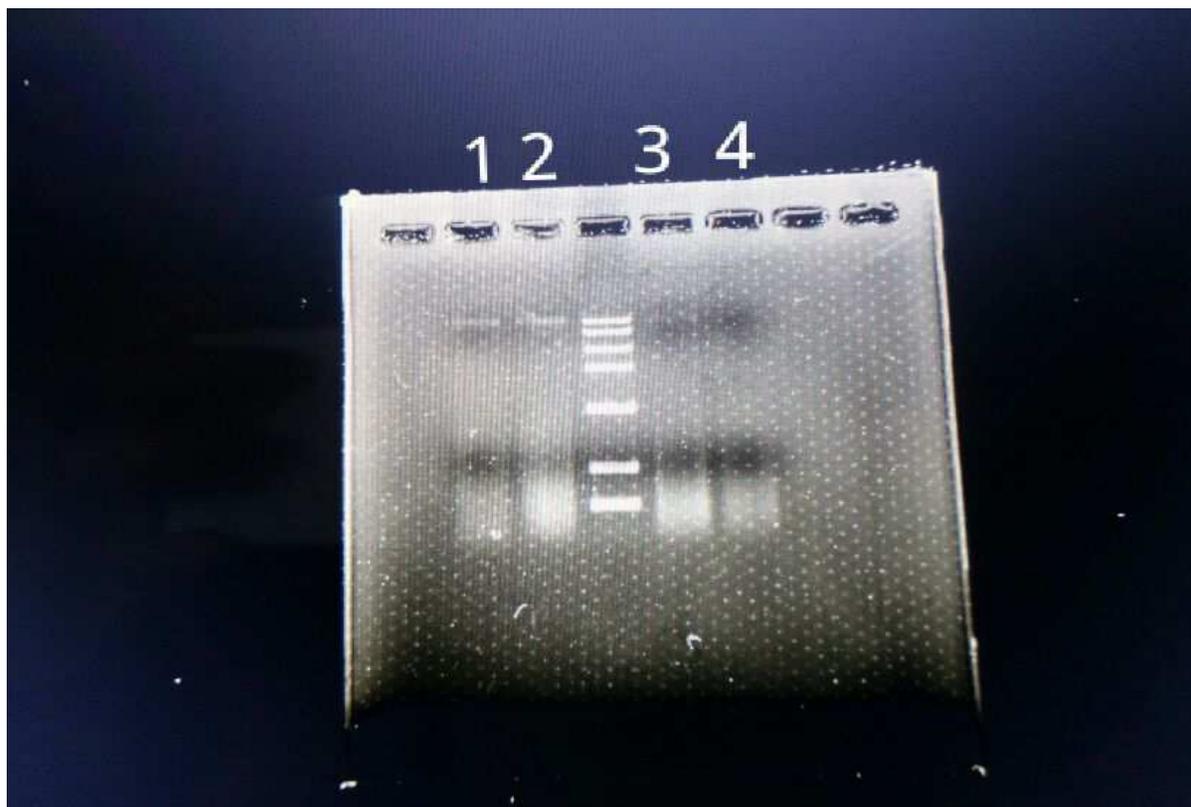


图 3. 长尾麝凤蝶不同部位提取物电泳检测图

(编号 1 2 3 4 分别代表其足、触角、喙管、翅膀 4 个部位)

由图 3 可知, 在长尾麝凤蝶中足和触角的泳道在 15000bp 处均出现清晰地条带、喙管和前翅并未在 15000bp 处出现条带, 且 4 个部位的泳道内都出现了拖尾。这可能是由于喙管和前翅中完整的基因组 DNA 浓度太低, 导致在 15000bp 处未出现条带, 出现拖尾可能是样品在保存过程中存在部分降解。

三、结语

长尾麝凤蝶干标本不同部位的 DNA 提取量依次为触角 > 足 > 喙管 > 前翅; 触角与足的基因组 DNA 提取效果都较好, 喙管与前翅的稳定性更高。足和触角的提取量稳定性都较低, 而喙管与前翅的稳定性更高。长尾麝凤蝶中提取出的触角基因组 DNA 浓度、纯度值相对来说都较高, 纯度稳定性也较高, 但其提取量的标准差过大, 提取出的基因组 DNA 的含量稳定性差。这可能是由于实验中所选用的触角本身存在问题, 导致提取稳定性差。足部基因组 DNA 的浓度及其稳定性均较好, 纯度值较高, 但其纯度标准差较大, 提取物的纯度值的稳定性也较差, 可能是因为标本的个体差异或者保存质量, 导致提取出的基因组 DNA 的纯度差异较大。喙管中提取物浓度、纯度及稳定性都相对较低, 提取效果较差, 这可能是由于喙管本身的结构导致其基因组 DNA 较难提取, 或喙管在保存过程中受环境影响导致提取量较低。前翅的提取物浓度、纯度及其提取纯度稳定性都较低, 但其提取物浓度的稳定性较高, 证明前

翅中基因组 DNA 的含量本身较低。因此后续实验在不受量的影响时候可以选取喙管作为提取材料, 如果对提取量有比较高的要求则尽量选择长尾麝凤蝶的足作为提取材料。

参考文献:

- [1] 武春生. 中国动物志 昆虫纲 第二十五卷 鳞翅目 凤蝶科 凤蝶亚科 锯凤蝶亚科 绢蝶亚科: 科学出版社, 2001, 10: 89-90
- [2] 查玉平, 徐芬, 骆启规. 蝴蝶干标本 DNA 的提取及 RAPD 分析 [J]. 华中师范大学学报, 2006, 40 (3): 416-418.
- [3] 武春生, 高国龙. 大自然的舞姬. 森林与人类, 2006, 6: 44-49.
- [4] 钟爱华, 李多云, 张海琪. 大弹涂鱼基因组 DNA 两种提取法的比较 [J]. 海洋学研究, 2005, 23 (4): 36-40.

基金项目: 湖北省教育厅科学研究计划指导性项目 (B2018205); 湖北省高等学校优秀中青年科技创新团队计划项目 (T201718)