



陈燕南, 范成, 张锋, 朱朝东, 陈军. 一种对甲螨无形态损伤的 DNA 提取技术 [J]. 环境昆虫学报, 2022, 44 (3): 751–755.

一种对甲螨无形态损伤的 DNA 提取技术

陈燕南^{1,3}, 范成^{1,2}, 张锋², 朱朝东^{1,3}, 陈军^{1,3*}

(1. 中国科学院动物研究所动物进化与系统学国家重点实验室, 北京 100101;

2. 河北大学生命科学学院动物系统学与应用重点实验室, 河北保定 071002; 3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 甲螨是一类重要的土壤动物, 体型微小, 一般具有较厚的体壁。本研究针对甲螨这一特定类群, 探讨了一种无形态特征损伤的 DNA 提取技术。通过结合试剂盒 DNA 提取法, 并适当改进实验条件, 设计出一套行之有效的 DNA 提取流程。通过对提取 DNA 之后的标本进行形态学观察, 发现其主要的分类学特征均保存完好, 可以作为凭证标本长期保存。本研究所提供的 DNA 提取技术既可以提取出足够的 DNA 又可以保留凭证标本, 因此能有效促进甲螨分子分类学相关研究。

关键词: 甲螨; 无损; DNA 提取; 凭证标本; 形态特征

中图分类号: Q968.1; S433

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2022) 03-0751-05

A new method for DNA extraction without destroying morphological characters applied to oribatid mites

CHEN Yan-Nan^{1,3}, FAN Cheng^{1,2}, ZHANG Feng², ZHU Chao-Dong^{1,3}, CHEN Jun^{1,3*} (1. Key Laboratory of Zoological Systematics and Evolution, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 2. Key Laboratory of Zoological Systematics and Application, College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002, Hebei Province, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Oribatid mites are of great significance in soil ecological system. They are small (0.1 ~ 1 mm) and usually sclerotized heavily. This research provided an efficient and non-destructive DNA extraction method for oribatid mites. By changing the method of DNA extraction and using DNeasy blood and tissue kit, a new method for DNA extraction without destroying morphological features could be applied to oribatid mites. The morphological characters valuable for identifying the specimens had not been destroyed after DNA extraction with this method, and the voucher specimen could be kept for further studies. This method could not only obtain high quality DNA templates but also keep voucher specimen. It could be an efficient way to help DNA taxonomy on oribatid mites.

Key words: Oribatid mites; non-destructive; DNA extraction; voucher specimen; morphological character

甲螨 (oribatid mites) 隶属于节肢动物门 Sarcoptiformes 甲螨亚目 Oribatida, 其体型微小 (体长多为 0.1 ~ 1 mm), 形态结构复杂, 种类众多, Arthropoda 蛛形纲 Arachnida 蜱螨亚纲 Acari 疥螨目

基金项目: 国家科技基础资源调查专项 (2019FY101800); 国家自然科学基金 (3207042); “一带一路”国际科学组织联盟联合研究合作专项 (ANSO-CR-KP-2020-04)

作者简介: 陈燕南, 男, 1995 年生, 博士研究生, 研究方向为蜱螨多样性与系统学, E-mail: 1477911683@qq.com

* 通讯作者 Author for Correspondence: 陈军, 博士, 研究员, 研究方向为蜱螨多样性与系统学, E-mail: chenjun@ioz.ac.cn

收稿日期 Received: 2020-11-29; 接受日期 Accepted: 2021-03-05

目前世界上已经发现并记录的甲螨达 11 000 种以上, 估计实际种数超过 50 万种 (Norton and Behan-Pelletier, 2009)。甲螨多栖息于土壤腐殖质中, 主要为菌食性和腐食性, 在土壤腐殖质的分解过程中发挥着重要作用, 是一类重要的土壤动物。

由于甲螨种类众多、个体微小, 某些种类形态结构还存在种内变异现象, 因而仅仅依靠其形态特征有时难以准确鉴定物种和分析其系统发育关系 (Navajas and Fenton, 2000)。20 世纪分子生物学的革命性变化, 尤其是在 80 年代中期聚合酶链式反应技术和 DNA 测序技术的产生, 促进了分子生物学在物种鉴定与进化研究方面的应用 (Cruickshank, 2010)。进入 21 世纪以来, 分子分类技术 (Tautz *et al.*, 2003) 和 DNA 条形码技术 (Hebert *et al.*, 2003a) 等新研究手段更是极大地推动了分子分类学在生物多样性研究中的广泛应用。在进行上述相关研究时, 往往首先需要提取生物的 DNA。但是, 由于体型微小, 体壁高度硬化, 从甲螨个体提取 DNA 而又不损伤其外部形态结构特征非常困难, 从而使得分子分类学在甲螨多样性研究中尚未得到很好应用。

在其它螨类研究中, 往往可以从同一物种中挑选出多个个体, 将这些个体彻底粉碎研磨然后进行 DNA 提取, 便可获得足够的 DNA。但这种方法应用在甲螨研究中面临着极大的障碍: 甲螨物种众多, 从一号土样中分离出的甲螨一般不止一种; 形态特征多样且不易观察; 大多数种类体表高度骨化, 依据形态特征进行物种鉴定时, 必须对标本进行透明 (一般为浸泡在乳酸中一周至一个月时间) 后在显微镜下观察。经过这些步骤处理后的标本便很难再从中提取 DNA。为保证分子数据与形态鉴定所对应标本的一致性, 需要首先提取甲螨的 DNA, 并尽可能保留其形态结构特征, 然后再进行传统的形态学物种鉴定 (Rowley *et al.*, 2007)。

为解决这些问题, 近年来有不少学者曾尝试探讨过保存凭证标本的无损伤 DNA 提取技术。高艳等研究并改进了小型节肢动物无形态损伤的 DNA 提取方法 (高艳和卜云, 2014); 单振菊等也曾研究过一种具厚几丁质外壳微小节肢动物无损伤 DNA 提取方法 (单振菊等, 2017)。但这些方法在甲螨中的应用效果并不是很理想。国外学者 Ota 等 (2011)、Ahaniyazad 等 (2018) 虽然针对甲螨无损伤 DNA 提取方法进行过探讨, 并取得了一定

的进步, 但 Ota 等的方法只在某些甲螨类群 (卷甲螨科 Phthiracaridae、洼甲螨科 Camisiidae 和长单翼甲螨科 Protoribatidae) 中可以提取出足够的 DNA, 不能在所有的甲螨 DNA 提取中取得良好的效果。Ahaniyazad 等提供的方法需要自己配制试剂, 这与应用商品化的 DNA 提取试剂盒相比将会更加耗时, 特别是当样本量非常多时, 显然会耗费大量的时间, 而且自己配制试剂进行 DNA 提取也不容易保证 DNA 质量的稳定性。因此, 非常有必要在无形态损伤 DNA 提取方面继续改良技术。

本研究在前人研究的基础上, 结合了试剂盒 DNA 提取法, 提出一套针对甲螨无形态损伤的高效 DNA 提取方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 甲螨的获得

在北京市奥林匹克森林公园 (N40°0'46.29", E116°22'50.30") 柏树林下采集土壤样本, 将土样放在布氏漏斗 (Berlese-Tullgren funnel) 中, 自然风干 120 h, 并在布氏漏斗底部放一个盛有 30 mL 无水乙醇的 200 mL 烧杯用来收集甲螨标本, 在收集过程中及时补充无水乙醇。

将收集到的甲螨标本在体视显微镜下查看, 挑选数头形态特征相同的个体, 通过清洗、透明、制作临时玻片后在系统显微镜下观察形态特征, 经鉴定后均为大翼甲螨科 Galumnidae 大翼甲螨属 *Galumna* 显大翼甲螨中华亚种 *Galumna obivus sinensis* (Jacot, 1922)。然后在其它土样分离得到的甲螨中挑选该种标本, 用于后续研究。

1.1.2 试剂

QIAGEN 组织和血液 DNA 提取试剂盒。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取

向 6 个灭菌的 1.5 mL 离心管中各放入 1 头甲螨样本, 再向 6 个离心管中各加入 180 μ L Buffer ATL, 之后再分别加 20 μ L 蛋白酶 K, 混匀后, 55 $^{\circ}$ C 水浴 24 h, 次日取出离心管, 分别向每个离心管中加入 200 μ L Buffer AL, 然后 70 $^{\circ}$ C 水浴 10 min。再从水浴锅里取出离心管, 向离心管里加入 200 μ L 无水乙醇。将离心管内的液体充分混匀之后, 将离心管内所有的液体全部转移到吸附柱内, 并将离心管内存留的甲螨标本用蒸馏水冲洗

干净后放入 80% 乙醇中保存。将吸附柱放进离心机中 8 000 rpm 离心 1 min, 换上新的收集管, 向吸附柱内加入 500 μL 的 Buffer AW1, 再将吸附柱放进离心机中 8 000 rpm 离心 1 min, 再换上新的收集管, 向吸附柱内加入 500 μL Buffer AW2, 此时将吸附柱放进离心机中 14 000 rpm 离心 4 min。最后换上灭过菌的离心管, 向吸附柱内加入 50 μL Buffer AE, 将离心管静止 1 h 后, 再将其放进离心机中 8 000 rpm 离心 2 min。在 -20°C 保存 DNA 模板。

1.2.2 PCR 扩增反应

PCR 反应体系: 正反引物各 1 μL , PCR Master Mix 15 μL , ddH₂O 3 μL , DNA 模板 5 μL 。扩增引物如下: 正向引物 Leo1490: 5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3'; 反向引物 Hco2198: 5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3'; 引物由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 扩增的反应条件如下: 96°C 预变性 3 min, 95°C 变性 10 s, 46°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 运行 35 个循环。最后 72°C 延伸 5 min。

1.2.3 PCR 反应产物检测

每个样本取 5 μL PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 结果用凝胶电泳成像系统观察。

1.2.4 测序及比对

将电泳分析有目的条带的 PCR 产物原液送北京天一辉远生物科技有限公司进行常规纯化双向测序。为验证所提取的 DNA 确实是来自于甲螨的 DNA, 将测序所得结果与 GenBank 数据库进行比对, 以确定 PCR 扩增序列以及 DNA 模板是否正确。

1.2.5 临时玻片标本的制作

将提取完 DNA 之后保留下来的甲螨标本放在凹形载玻片上, 滴上少许乳酸, 稍微调整甲螨肢体的姿势使其便于观察; 轻轻盖上盖玻片, 用吸水纸在载玻片上吸收多余的乳酸; 稍等片刻, 在显微镜下观察并拍照。拍照后将甲螨标本放入 80% 乙醇保存。

1.2.6 扫描电镜拍照

将提取完 DNA 之后保留下来的甲螨标本放在脱水硅胶中脱水 24 h, 脱水后的甲螨喷金后放入扫描电镜下拍照, 以观察其形态特征是否完好。

2 结果与分析

2.1 DNA 序列分析

将测序所得的结果与 GenBank 数据库进行比

对, 比对结果显示本次实验提取的 DNA 序列与甲螨亚目中的大翼甲螨科 Galumnidae 同源性最高, 验证了所提取的 DNA 是来自大翼甲螨科。但由于 GenBank 数据库中缺少显大翼甲螨中华亚种 *Galumna obivus sinensis* (Jacot, 1922) 的 DNA 序列数据, 所以造成与本次实验提取的 DNA 序列的最高相似度也只有 86% 左右, 并不能达到精确的物种水平的鉴定。

2.2 甲螨标本的形态对比

将未进行 DNA 提取实验的甲螨标本与经过本次 DNA 提取实验的甲螨标本分别制作成临时玻片在显微镜下进行形态观察, 并进行扫描电镜拍照。对比结果显示: 提取过 DNA 的甲螨标本形态保存完好, 并没有发生明显的形态改变 (图 1)。其重要的分类学特征如: 感器 (bothridial setae)、梁毛 (lamellar setae)、吻毛 (rostral setae)、前背板 (prodorsum)、后背板 (notogaster)、翅形体 (pteromorph)、下颚体 (subcapitulum)、生殖板 (genital plate)、肛板 (annal plate)、步足 (leg) 等均保存完好 (图 1, 图 2), 可以作为凭证标本长期保存。

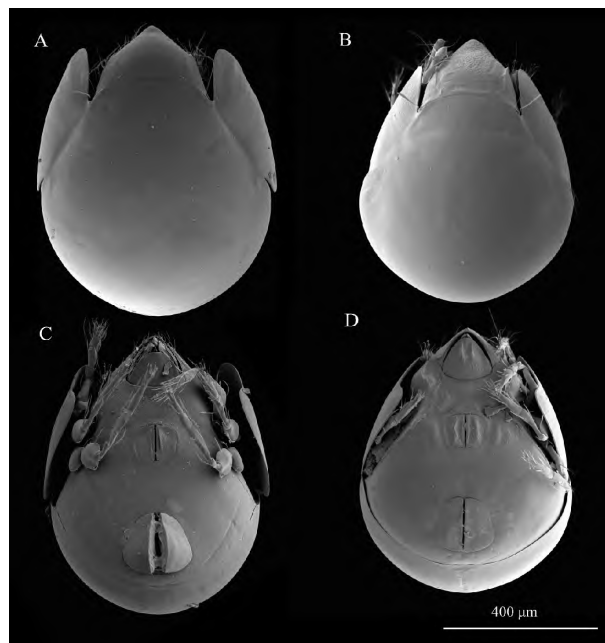


图 1 提取 DNA 的甲螨标本与未提取 DNA 的甲螨标本扫描电镜对比照片

Fig. 1 SEM photographs of oribatid mites with DNA extraction and without DNA extraction

注: A, B, 背面观; C, D, 腹面观; A, C 为未提取过 DNA 的甲螨标本; B, D 为提取 DNA 的甲螨标本。
Note: A, B, Dorsal view; C, D, Ventral view; A, C, Specimen without DNA extraction; B, D, Specimen after being DNA extracted.

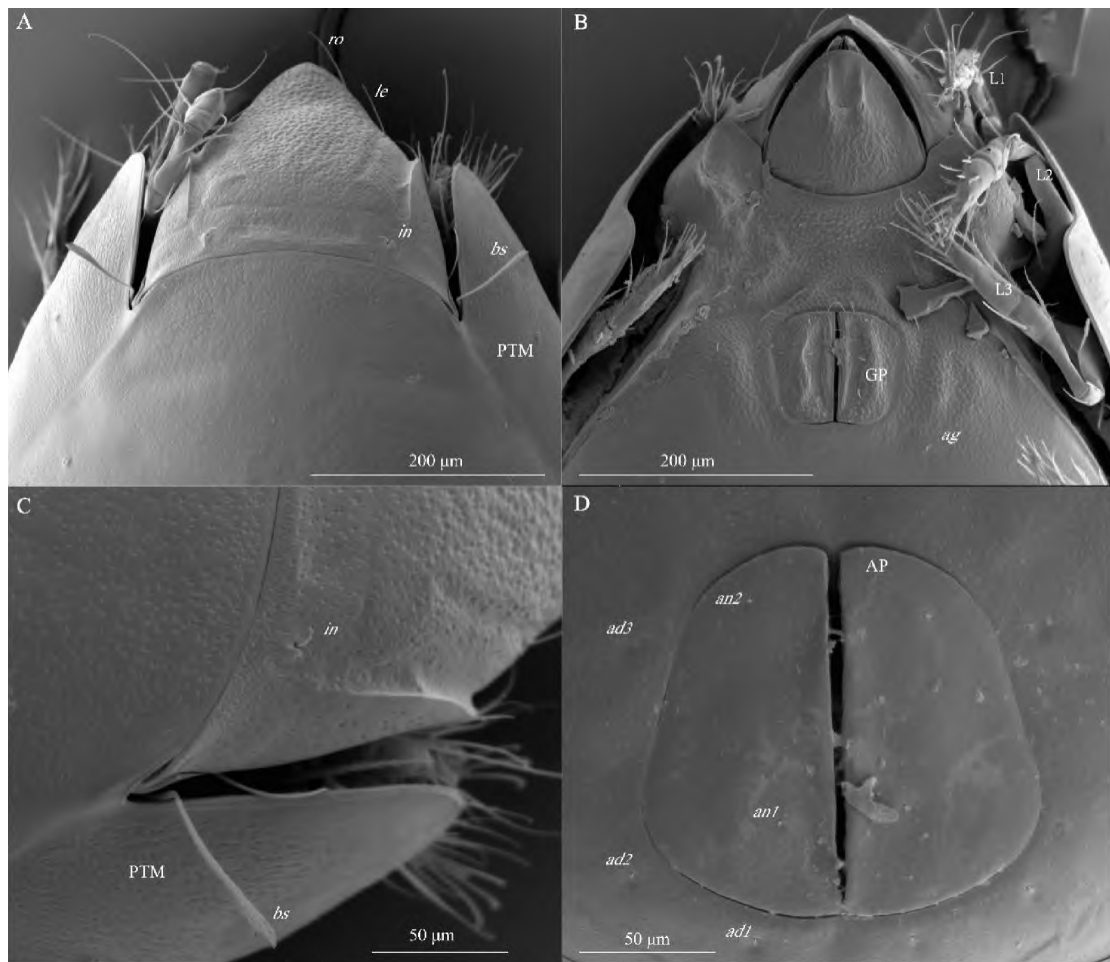


图2 经过 DNA 提取之后的甲螨标本形态结构扫描电镜照片

Fig. 2 SEM photographs of morphological characters after being DNA extracted in oribatid mites

注: *ad*, 肛侧毛; *ag*, 侧殖毛; *an*, 肛毛; AP, 肛板; *bs*, 感器; GP, 生殖板; *in*, 梁间毛; L, 步足; *le*, 梁毛; PTM, 翅形体; *ro*, 吻毛。Note: *ad*, Adanal setae; *ag*, Aggenital; *an*, Anal setae; AP, Anal plate; *bs*, Bothridial setae; GP, Genital plate; *in*, Interlamellar setae; L, Leg; *le*, Lamellar setae; PTM, Pteromorph; *ro*, Rostral setae.

3 结论与讨论

本实验所选取的显大翼甲螨中华亚种个体相对较大(体长 725 ~ 775 μm , 宽 525 ~ 550 μm), 使用此无损 DNA 提取方法, 可以只用一头标本就能提取出足够的 DNA。对于其它体型更小的甲螨, 可以适当增加甲螨的个数, 以保证能够提取出足够的 DNA 用于后续分子生物学实验。

随着 DNA 条形码和分子分类学等新概念的提出, 利用基因序列辅助鉴定物种已经越来越普遍, 许多分类学者都在积极地参与构建包含不同物种形态特征与分子数据的数据库 (Hebert *et al.*,

2003b)。当前, 虽然在各大数据库中已收录了一些甲螨物种的 DNA 序列数据, 但是很多的 DNA 序列都没有凭证标本与之对应, 这可能是由于很多情况下在进行 DNA 提取实验时已经将甲螨标本破坏了, 只有一些在 DNA 提取之前借助显微镜拍摄的照片可供查阅、参考和比较。然而甲螨由于种类众多、形态特征多样、体型微小等因素影响, 仅仅根据这些照片一般很难对这些标本的物种鉴定是否正确进行核对, 与之对应的分子数据的可靠性无疑会大打折扣, 这在一定程度上也限制了甲螨分子生物学的相关研究。

目前对于甲螨的分子分类学工作者而言, 一个较大的难点就是如何将 DNA 分子数据与甲螨

的形态特征数据准确无误地对应起来。在其它体型较大的动物中,通常采取的做法是取标本个体的一小部分来进行 DNA 提取,其余的部分作为凭证标本进行保存 (Starks and Peters, 2002)。甲螨个体微小,很难只取一小部分进行 DNA 提取就能获得后续实验所需足够的 DNA,况且甲螨一般具有较坚硬的外壳,在进行切取的时候很难保证不损伤重要的形态特征,实际操作中很容易造成整个个体都被破坏,从而导致后续无法依据形态特征进行物种鉴定。而使用本研究提供的甲螨 DNA 提取方法,既能获得足够的 DNA,还可以相当完好的保存凭证标本,有助于开展甲螨分子生物学研究。

致谢: 感谢蒙皓博士在分子生物学实验中给予的指导,感谢张魁艳老师、李荣同学在扫描电镜观察与拍照过程中给予的帮助。

参考文献 (References)

- Ahaniazad M, Bagheri M, Roumi V, et al. An efficient and non-destructive DNA extraction method for oribatid mites [J]. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 2018, 51: 187 - 196.
- Cruickshank RH. Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks [J]. *Systematic and Applied Acarology*, 2010, 7: 3 - 14.
- Gao Y, Bu Y. A modified non-destructive DNA extraction method for microarthropods [J]. *Sichuan Journal of Zoology*, 2014, 33 (2): 216 - 220. [高艳, 卜云. 一种改进的小型节肢动物无形态损伤的 DNA 提取方法 [J]. *四川动物*, 2014, 33 (2): 216 - 220]
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, et al. Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 2003a, 270: 313 - 321.
- Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species [J]. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 2003b, 270: S596 - S599.
- Navajas M, Fenton B. The application of molecular markers in the study of diversity in acarology: A review [J]. *Experimental and Applied Acarology*, 2000, 24: 751 - 774.
- Norton RA, Behan-Pelletier VM. Chapter 15. Suborder Oribatida. In: Krantz GW, Walter DE, eds. *A Manual of Acarology*, Third Edition [C]. Lubbock: Texas Tech University Press, 2009: 430 - 564.
- Ota A, Karasawa S, Nakamura T, et al. Non-destructive DNA extraction protocol for oribatid mites (Acari: Oribatida) [J]. *Edaphologia*, 2011, 89: 19 - 24.
- Rowley DL, Coddington JA, Gates MW, et al. Vouchering DNA-barcoded specimens: Test of a nondestructive extraction protocol for terrestrial arthropods [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2007, 7: 915 - 924.
- Shan ZJ, Qiu DY, Yue QY. A method of obtaining high quality DNA templates from tiny thick-chitin arthropods without damaging morphology of the voucher specimens [J]. *Chinese Journal of Vector Biology and Control*, 2017, 28 (1): 27 - 30. [单振菊, 邱德义, 岳巧云. 一种具厚几丁质外壳微小节肢动物无损伤凭证标本高质量 DNA 模板的获取方法 [J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2017, 28 (1): 27 - 30]
- Starks PT, Peters JM. Semi-nondestructive genetic sampling from live eusocial wasps, *Polistes dominulus* and *Polistes fuscus* [J]. *Insectes Sociaux*, 2002, 49: 20 - 22.
- Tautz D, Arctander P, Minelli A, et al. A plea for DNA taxonomy [J]. *Trends in Ecology and Evolution*, 2003, 18: 70 - 74.