

应用种特异性 PCR 技术快速鉴定窝梗天牛

郑斯竹¹, 徐梅², 杨晓军², 安榆林²

(1. 苏州出入境检验检疫局外来有害生物防控技术中心, 江苏苏州 215000;

2. 江苏出入境检验检疫局, 南京 210001)

摘要: 针对窝梗天牛 (*Arhopalus foveicollis*) 与其他幽天牛族昆虫难以准确快速识别的问题, 以窝梗天牛为靶标, 并以 14 种幽天牛为参照, 采用基于线粒体 DNA (mtDNA) 细胞色素 C 氧化酶亚基 I (*COI*) 基因序列的种特异性 (species-specific *COI*, SS-*COI*) PCR 方法, 研究其快速分子检测技术。通过已知鞘翅目 *COI* 基因序列通用型引物 J1718/N2191, 获得窝梗天牛及其他 14 种天牛的 *COI* 基因序列, 根据测序结果设计 SS-*COI* 引物 1 对 (WGF1/WGR1), 其扩增片段大小为 254 bp。种特异性检验结果指出, 该引物只对窝梗天牛的 *COI* 基因可扩增出 254 bp 大小的片段。研究表明, 该技术体系完全可用于窝梗天牛的准确识别及检测监测, 对有效阻截其进入我国具有重要意义。

关键词: 森林保护学; 窝梗天牛; 幽天牛族; 种特异性 PCR; 分子检测; 快速鉴定

中图分类号: S763 文献标识码: A 文章编号: 1674-2850(2015)21-2279-05

Rapid identification of *Arhopalus foveicollis* (Cerambycidae: Asemini) by using species-specific PCR technique

ZHENG Sizhu¹, XU Mei², YANG Xiaojun², AN Yulin²

(1. Technology Center for Prevention and Control of Alien Pests, Suzhou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Suzhou, Jiangsu 215000, China;

2. Jiangsu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing 210001, China)

Abstract: In the present study, a method with *Arhopalus foveicollis* as target and 14 other kinds of species of Asemini as reference was described on the development of DNA markers for rapidly identifying *A. foveicollis* for the problem of fast recognition between species of Asemini and *A. foveicollis*. A pair of universal primers was designed based on mitochondrial DNA (mtDNA) cytochrome C oxidase subunit I (*COI*) gene sequences using species-specific *COI* (SS-*COI*). Using the universal primers (J1718/N2191) of Coleoptera, the mtDNA *COI* genes of *A. foveicollis* and its similar species were amplified and sequenced. And then one pair of SS-*COI* primers (WGF1/WGR1) was designed, which was amplified a single band of 254 bp. The results showed that only *COI* gene of *A. foveicollis* specimens were detected with 254 bp. The diagnostic PCR assay developed here provides a quick, simple and reliable molecular technique for the identification and monitoring of *A. foveicollis*, which will be useful in intercepting and blocking the further spreading of *A. foveicollis*.

Key words: forest protection; *Arhopalus foveicollis*; Asemini; species-specific PCR; molecular detection; rapid identification

0 引言

窝梗天牛 (*Arhopalus foveicollis*) 是一种具有潜在经济重要性的害虫, 主要分布于加拿大和美国部分

基金项目: “十二五” 国家科技支撑计划重点项目 (2012BAK11B03); 国家质检总局科技计划项目 (2014IK023, 2015IK156); 江苏出入境检验检疫局科技项目 (2013KJ55, 2014KJ44)

作者简介: 郑斯竹 (1984—), 女, 农艺师, 主要研究方向: 昆虫分类鉴定. E-mail: zhengsizhu@126.com

地区, 宁波穿山口岸和辽宁大窑湾口岸曾在美国花旗松原木中截获过该虫, 全国尚未有分布记载。该害虫主要为害砍伐后的松树和云杉等植物, 其幼虫通常钻蛀树干为害, 卵、蛹及成虫均在木材内生长发育, 多个虫态可随原木、木方、板材及木质包装的运输而传播。我国的针叶树种植面积甚广, 若受到窝梗天牛危害, 其木材产品的品质及经济效益将明显下降^[1]。

由于大多数昆虫在不同的发育阶段, 形态结构变化很大。不同地理分布的同种昆虫, 有时形态也有差异, 因此根据形态特征进行昆虫鉴定有时会比较困难, 尤其是针对卵、蛹、幼虫以及残体的截获, 通常很难进行快速、准确的鉴定。如何提高天牛种类鉴定工作的准确性, 是科研工作关注的重点, 也是检验检疫部门迫切需要解决的难题。

随着分子生物学技术的飞速发展, 基于不同物种在基因组上的差异和 PCR 技术, 衍生了一系列分子生物学技术手段用于区分、鉴别不同物种。其中, 种特异性 PCR 技术 (species-specific PCR, SS-PCR) 是指在设计目标引物时必须充分考虑引物的特异性, 使其在扩增未知模板时可以根据目标条带的有无将目标种与非目标种区分。这里采用基于 mtDNA *COI* 基因序列的种特异性 PCR 技术与方法^[2], 从检测监测的角度, 研究其快速检测技术; 同时以我国口岸截获的窝梗天牛及其他 14 种近似种为对象进行种特异性检验。该检测技术体系的建立可为窝梗天牛快速检测与准确识别提供依据, 为有效阻截窝梗天牛进入我国提供技术保障。

1 材料与方法

1.1 实验材料

研究采用的标本均为江苏口岸近年截获, 包括幽天牛族 3 个属的 15 种不同地理来源的天牛成虫 (如表 1 所示), 这些种类在形态上与窝梗天牛相似。

表 1 实验标本名称与来源

Tab. 1 Species and location of test samples of Cerambycidae

样品名称	产地	采集时间
糙梗天牛 (<i>Arhopalus asperatus</i>)	加拿大 (Canada)	2009.11
窝梗天牛 (<i>A. foveicollis</i>)	美国 (USA)	2010.08
褐梗天牛 (<i>A. rusticus</i>)	法国 (French)	2009.12
梗天牛属 (<i>A. sp</i>)	美国 (USA)	2011.07
暗梗天牛 (<i>A. tristis</i>)	韩国 (Korea)	2010.06
赤梗天牛 (<i>A. unicolor</i>)	韩国 (Korea)	2010.09
地中海梗天牛 (<i>A. ferus</i>)	葡萄牙 (Portugal)	2008.05
梗天牛属 (<i>A. sp</i>)	不详	2010.12
三穴梗天牛 (<i>A. foveatus</i>)	江苏 (Jiangsu)	2009.07
脊鞘幽天牛 (<i>Asemum striatum</i>)	加拿大 (Canada)	2011.01
光胸断眼天牛 (<i>Tetropium castaneum</i>)	台湾 (Taiwan)	2011.03
红棕断眼天牛 (<i>T. cinnamoater</i>)	美国 (USA)	2011.07
暗褐断眼天牛 (<i>T. fuscum</i>)	德国 (Germany)	2010.04
落叶松断眼天牛 (<i>T. gabrieli</i>)	俄罗斯 (Russian)	2006.05
铁杉断眼天牛 (<i>T. velutinum</i>)	美国 (USA)	2012.01

1.2 DNA 提取

采用北京 GenMagBio 公司生产的动物细胞组织/细胞基因组 DNA 磁珠提取试剂盒提取 DNA。

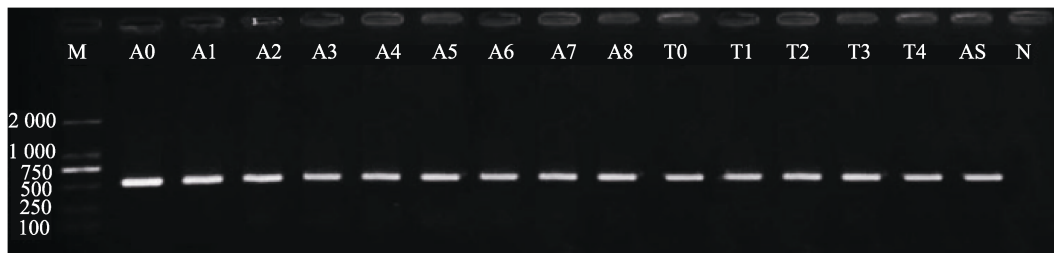
剪取实验用部分虫体 (无水乙醇浸泡保存标本, 用无菌蒸馏水冲洗浸泡 4~5 次, 弃水; 干标本无菌

蒸馏水浸泡 3 h 后吸干水分)。处理后的天牛肌肉组织置于 2 mL 离心管中, MM400 球磨仪中震荡碾磨 (30 次/s) 30 s, 加入 180 μ L Lysis Buffer 和 20 μ L Proteinase K, 震荡混匀, 常温过夜。之后 55 $^{\circ}$ C 震荡温浴 1~3 h, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 加入 200 μ L Binding Buffer 和 200 μ L 无水乙醇, 充分混匀后加入 20 μ L 磁珠, 轻柔颠倒混匀 10 min. 将离心管置于磁力架, 吸弃管内液体, 保留磁珠, 加入 500 μ L Wash Buffer I, 颠倒混匀 2 min 后置于磁力架, 弃去管内液体, 采用 Wash Buffer II 同样方法洗涤 2 次。离心管仍置于磁力架上, 缓慢加入 Wash Buffer III 至液体覆盖磁珠, 1 min 后移走管内液体。最后加入 20 μ L Elution Buffer, 55 $^{\circ}$ C 水浴 10 min 洗脱磁珠上吸附的 DNA^[3-4]。

1.3 幽天牛 *COI* 基因扩增与分析

研究采用鞘翅目 *COI* 基因通用引物 J1718 (5'-GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC-3') 和 N2191 (5'-CCCGGTAAAATTTAAAATATAAACTTC-3')^[5]。

反应体系为 25 μ L 体系, 其中 10 \times buffer 2.5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 2.0 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 1.0 μ L, Taq 酶 0.25 μ L (以上试剂均由 TaKaRa 公司提供), 引物 (20 mmol/L) 各 0.5 μ L, 提取的模板 DNA 1 μ L, 加入 ddH₂O 使总体积达到 25 μ L. 反应过程为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 进入循环, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C/47 $^{\circ}$ C (第一轮引物退火温度为 55 $^{\circ}$ C, 第二轮引物退火温度为 47 $^{\circ}$ C) 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min (35 个循环); 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min. PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖电泳分离, 可得到约 528 bp 的扩增片段, 如图 1 所示。



注: M 为 DNA 分子量标准 DNA Ladder; A0 为糙梗天牛 (*A. asperatus*); A1 为赤梗天牛 (*A. unicolor*); A2 为三穴梗天牛 (*A. foveatus*); A3 为梗天牛属 (*A. sp*) (USA); A4 为褐梗天牛 (*A. rusticus*); A5 为暗梗天牛 (*A. tristis*); A6 为窝梗天牛 (*A. foveicollis*); A7 为地中海梗天牛 (*A. fesus*); A8 为梗天牛属 (*A. sp*); T0 为铁杉断眼天牛 (*T. velutinum*); T1 为暗褐断眼天牛 (*T. fuscum*); T2 为落叶松断眼天牛 (*T. gabrieli*); T3 为红棕断眼天牛 (*T. cinnamoater*); T4 为光胸断眼天牛 (*T. castaneum*); AS 为脊鞘幽天牛 (*A. striatum*); N 为阴性对照

图 1 幽天牛 *COI* 基因通用引物扩增结果电泳图

Fig. 1 PCR amplification results of Aseminae species using *COI* gene universal primers

1.4 窝梗天牛 *SS-COI* 引物设计

将测序获得的 15 种幽天牛的 mtDNA *COI* 碱基序列输入 BioEdit 软件进行分析比对, 并将 *COI* 基因输入 Primer 5.0 软件寻找适合作为引物的位点, 将适合成为引物的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 位点与其他 14 条序列的相同位点进行比对, 找出可以将目标序列与其他序列区分, 且适合作为引物的碱基片段, 根据引物设计原理进行修改, 设计窝梗天牛 *SS-COI* 引物 1 对 (WGF1/WGR1)。上游引物 WGF1 的碱基序列为 5'-ATACAGGTAAAGAAAGTAAAAG-3', 下游引物 WGR1 的碱基序列为 5'-TTCTTCTTATAATTAGTAAAG-3'。

1.5 PCR 反应条件的筛选

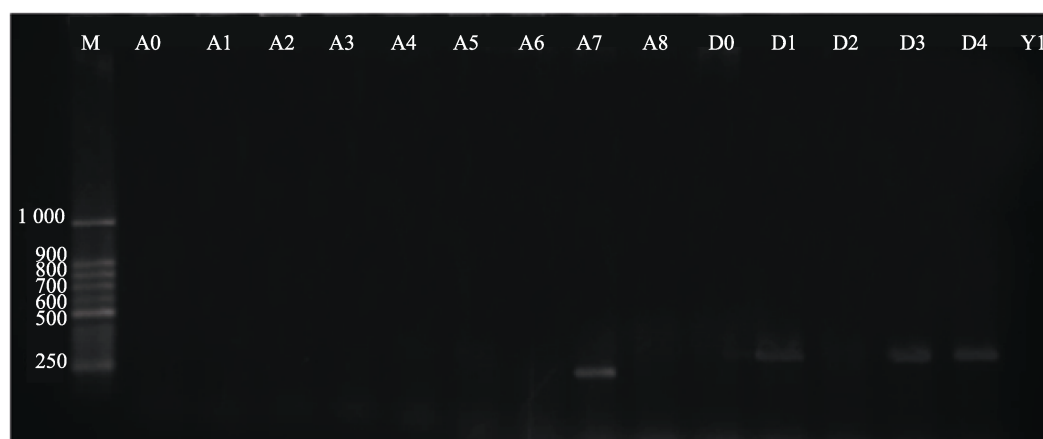
在 PCR 反应条件优化中, 退火温度的优化为最主要方面, 因此研究主要针对不同的反应体系, 对退

火温度进行优化。最终确定最优反应过程为: 95℃, 5 min; 50℃, 30 s; 35 个循环。

2 结果与分析

以 15 种幽天牛成虫 DNA 为模板, 采用鞘翅目通用引物 J1718/N2191 进行 PCR 扩增。电泳结果显示, 引物对幽天牛扩增效果强, 每种幽天牛均扩增出一条清晰的靶标片段。将经电泳检测验证合格的 PCR 产物进行双向测序, 结果显示, 扩增片段长约为 528 bp, 为 mtDNA *COI* 基因 5' 端的克隆片段 (如图 1 所示)。根据 15 种幽天牛的测序结果设计窝梗天牛 *SS-COI* 引物 1 对 (WGF1/WGR1), 如图 2 所示。窝梗天牛 (A7) 样品扩增出长约 254 bp 的 DNA 条带, 而暗褐断眼天牛 (D1)、红棕断眼天牛 (D3) 和光胸断眼天牛 (D4) 3 个样品均扩增出长 400 bp 左右的 DNA 条带, 其他样品无扩增条带。实验结果表明, 引物 (WGF1/WGR1) 可以很好地区分窝梗天牛与其他 14 种天牛。

因为 WGF1/WGR1 引物 3' 端具有连续碱基, 实验采用具有校正功能的 Ex taq 酶代替普通的 RT taq 酶。



注: M 为 DNA 分子量标准 DNA Ladder; A0 为糙梗天牛 (*A. asperatus*); A1 为赤梗天牛 (*A. unicolor*); A2 为三穴梗天牛 (*A. foveatus*); A3 为梗天牛属 (*A. sp*) (USA); A4 为褐梗天牛 (*A. rusticus*); A5 为暗梗天牛 (*A. tristis*); A6 为窝梗天牛 (*A. foveicollis*); A7 为地中海梗天牛 (*A. ferus*); A8 为梗天牛属 (*A. sp*); D0 为铁杉断眼天牛 (*Tetropium velutinum*); D1 为暗褐断眼天牛 (*T. fuscum*); D2 为落叶松断眼天牛 (*T. gabrieli*); D3 为红棕断眼天牛 (*T. cinnamoater*); D4 为光胸断眼天牛 (*T. castaneum*); Y1 为脊鞘幽天牛 (*A. striatum*)

图 2 *SS-COI* 引物 WGF1/WGR1 种特异性检验电泳图

Fig. 2 Amplification pattern of mtDNA using *SS-COI* primers WGF1/WGR1

3 讨论与结论

研究筛选出 *SS-COI* 引物 1 对 (WGF1/WGR1), 其可将窝梗天牛与幽天牛族 (*Asemini*) 其他 14 种天牛在凝胶电泳图谱中区分开。在检疫部门, 对天牛的检疫技术主要为形态学鉴定。但它存在 2 个较大的缺点: 1) 难以对幼虫作出鉴定; 2) 对于不完整的虫体, 难以进行鉴定。而现代分子生物学方法克服了形态学鉴定的不足。近年来, 利用 PCR 扩增生物体基因某一特异基因片段进行有害生物的检测、鉴定的方法, 由于其快速、准确和简便的特点, 在国际上广泛应用, 但国内在天牛种类快速分子研究方面, 仅安榆林等^[6]应用随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 技术分析了墨天牛属中松墨天牛 (*Monochamus alternatus*)、云杉大墨天牛 (*M. urussovi*) 和云杉小墨天牛 (*M. sutor*) 3 个近缘种的 DNA 多态性; 通过对同种天牛幼虫的浸渍标本和新鲜标本的 DNA 多态性研究发现, 浸渍标本与新鲜标本 DNA 扩增后的电泳指纹图谱完全一致; 同种害虫不同虫态间的 DNA 指纹图谱完全一致, 3 种随机引物可明显鉴别 3 种天牛幼虫。2004 年, 安榆林等^[7-8]以 21 个光肩星天牛 (*Anoplophora*

glabripennis) 样本、5 个黄斑星天牛 (*Anoplophora nobilis*) 样本及 8 种星天牛近缘种为实验材料, 进行了 mtDNA *COI* 基因测序, 并以此段基因为对象针对光肩星天牛设计了一对特异 PCR 引物, 结果表明所设计的引物对有较高的特异性和灵敏度。为在检疫实践中不受天牛生活周期、发育虫态和残缺虫体材料的限制, 实验尝试针对不同天牛类群进行特异性引物设计, 但由于标本种类不足及时间有限, 仅针对幽天牛族中的窝梗天牛设计了特异性引物, 其具有很强的实用性, 使口岸天牛的检疫既快速, 又准确。就天牛的鉴定而言, 包含 2 个层面: 一是鉴定已知特定材料的真实性, 二是鉴定未知材料。本研究对于更多检疫性天牛的快速鉴定还存在局限性, 有必要继续增加天牛种类, 以满足检疫部门的需要。

研究对特异 PCR 反应的反应体系和反应条件的优化进行了探讨。在常规 PCR 中, 通常采用三步法进行扩增, 保证在 72℃ 延伸, 但在这里使用三步法进行退火温度梯度实验无法扩增出目标条带。选用两步法后, 目标条带出现, 说明当引物条件苛刻时使用两步法能够得到三步法得不到的片段。实验中 *SS-COI* 引物 (WGF1/WGR1) 除了扩增目标条带外, 针对红棕断眼天牛 (*T. cinnamoater*) 和光胸断眼天牛 (*T. castaneum*) 均在 300~400 bp 之间扩增出同样大小的条带, 可以这对引物为基础进行进一步研究, 在其他位点对窝梗天牛进行区分。同时, 由于幽天牛族昆虫种类较多, 有许多种类在研究中未涉及, 因此实验设计的 *SS-COI* 引物 (WGF1/WGR1) 的特异性有待进一步验证。

[参考文献] (References)

- [1] 安榆林, 徐梅, 杨晓军, 等. 外来森林有害生物[M]. 北京: 科学出版社, 2012.
AN Y L, XU M, YANG X J, et al. Forest exotic pests[M]. Beijing: Science Press, 2012. (in Chinese)
- [2] 田虎, 李小凤, 万方浩, 等. 利用种特异性 COI 引物 (SS-COI) 鉴别扶桑绵粉蚧[J]. 昆虫学报, 2013, 56 (6): 689-696.
TIAN H, LI X F, WAN F H, et al. Identification of *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae) with species-specific COI (SS-COI) primers[J]. Acta Entomologica Sinica, 2013, 56(6): 689-696. (in Chinese)
- [3] 郑斯竹, 安榆林, 徐梅, 等. 多年保存天牛科标本的 DNA 微量提取方法[J]. 植物检疫, 2012, 26 (3): 30-34.
ZHENG S Z, AN Y L, XU M, et al. The method of extraction trace DNA from Cerambycidae tissues which were preserved for many years[J]. Plant Quarantine, 2012, 26(3): 30-34. (in Chinese)
- [4] 郑斯竹, 安榆林, 徐梅, 等. 天牛幼虫保存与 DNA 提取方法比较研究[J]. 中南林业科技大学学报, 2012, 32 (5): 144-148.
ZHENG S Z, AN Y L, XU M, et al. Comparative studies on DNA extraction and preservation of *Monochamus alternatus* larva specimens[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2012, 32(5): 144-148. (in Chinese)
- [5] BONACUM J, DESALLE R, O'GRADY P, et al. New nuclear and mitochondrial primers for systematics and comparative genomics in Drosophilidae[J]. Dros. Inf. Serv., 2001, 84: 201-204.
- [6] 安榆林, 刁彩华, 朱宏斌, 等. 墨天牛属三个近缘种的 RAPD 分析[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 1998, 22 (4): 35-38.
AN Y L, DIAO C H, ZHU H B, et al. Analysis three species of *Monochamus* with RAPD[J]. Journal of Nanjing Forestry University: Natural Sciences Edition, 1998, 22(4): 35-38. (in Chinese)
- [7] 安榆林, 王保德, 杨晓军, 等. 光肩星天牛种群间及其近缘种遗传关系的 RAPD 研究[J]. 昆虫学报, 2004, 47 (2): 229-235.
AN Y L, WANG B D, YANG X J, et al. Characterizing populations of *Anoplophora glabripennis* and related taxa with RAPD[J]. Acta Entomologica Sinica, 2004, 47(2): 229-235. (in Chinese)
- [8] 安榆林, 黄晓明, 杨晓军, 等. 光肩星天牛及其近缘种 mtDNA 序列和基因特点[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2004, 28 (4): 6-12.
AN Y L, HUANG X M, YANG X J, et al. A Study on mtDNA sequence and its genetic characteristics of *Anoplophora glabripennis* and its sibling species[J]. Journal of Nanjing Forestry University: Natural Sciences Edition, 2004, 28(4): 6-12. (in Chinese)