

微型节肢动物的高质量 DNA 提取与全基因组扩增

High-quality DNA Extraction and Whole Genome Amplification of Microarthropods

丁银环, 杜诗雨, 张峰*

南京农业大学植物保护学院昆虫系, 南京 210095

*通讯作者, 邮箱: fzhang@njau.edu.cn

引用格式: 丁银环, 杜诗雨, 张峰. (2021). 微型节肢动物的高质量 DNA 提取与全基因组扩增. *Bio-101 e1010605*. Doi: 10.21769/BioProtoc. 1010605.

How to cite: Ding, Y. H., Du, S. Y. and Zhang, F. (2021). High-quality DNA Extraction and Whole Genome Amplification of Microarthropods. *Bio-101 e1010605*. Doi: 10.21769/BioProtoc. 1010605. (in Chinese)

摘要: 现代分子生物学研究往往需要足量的特定生物的高质量基因组 DNA, 但如果样品数量和质量不足, 这点很难实现。全基因组扩增技术可以在没有序列倾向性的前提下有效地扩增不同生物微量组织或少量细胞中的全部基因组 DNA, 为后续的多基因、多位点以及基因组全面研究提供足量的 DNA 模板。本文提供了一套提取高质量基因组 DNA 和全基因组扩增的详细方案、步骤和参数。其最适用于微型节肢动物系统发育学研究, 也可为其他类群多样的生物学研究提供借鉴。

关键词: 微型节肢动物, DNA 提取, 全基因组扩增, 高通量测序, 系统发育学

研究背景

近年来, 高通量测序技术的发展以及成本的降低, 极大地促进了分子生物学技术在各领域的广泛应用 (潘孝明等, 2014)。然而, 大多数高通量测序需要足量高质量的基因组 DNA 作为起始材料。由于样品的来源、固有特性和保存条件等限制, 导致可供分析使用的 DNA 难以满足要求。在一些实际应用中, 起始材料量非常有限, 例如胚胎植入前遗传学诊断仅使用 1-2 个胚胎细胞进行分析检测 (Harper and Sengupta, 2012), 法医鉴定中只有痕量 DNA 样品 (蔡海强等, 2011); 此外, 在使用古生物学或福尔马林、固定石蜡包埋处理的标本时, 样品处理方式和存储条件也可能会降低现有 DNA 的质量和浓度 (Czyz

et al., 2015)。在微型节肢动物生物学研究中同样存在这些限制，标本数量、体型以及保存的方式对于分子生物学而言都不理想，尤其是一些珍贵的老标本。在这些情况下，只能对有限数量的遗传标记进行评估，直接分析样本的基因组DNA在技术上具有挑战性。

为了能利用现代分子生物学技术全面分析这些样本，基因组DNA可以通过扩增的方式提高其产量 (Long *et al.*, 2020)。全基因组扩增技术经过近30年的发展，已经相当成熟，克服了传统PCR方法出现的非特异扩增和扩增偏向性。多重置换扩增技术 (multiple displacement amplification, MDA) 能够对有限的样品进行快速、均匀、无偏向性的全基因组位点扩增，能够确保基因组高覆盖度，量化拷贝数。全基因组扩增的前提是从来源有限的样本材料中尽可能多地获取高质量的起始DNA模板，因此基因组DNA的提取质量也是极其关键的一步。

本文提供了详细的基因组DNA提取和全基因组扩增方案的实验流程，有助于初学者短时间内掌握。该方案已在节肢动物多个门类 (如弹尾纲、缨翅目、虱目、膜翅目、蜚蠊目) 中应用，其有效性已在弹尾纲的分子系统学研究中得以验证，详细结果请参阅Sun *et al.*, 2020。

材料与试剂

1. QIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN, catalog number: 56304, 15-25 °C 储存, 保质期 1 年)
2. QIAGEN REPLI-g UltraFast Mini Kit (QIAGEN, catalog number: 150033, -20 °C 储存, 保质期 3 年)
3. QIAGEN REPLI-g Single Cell Kit (QIAGEN, catalog number: 150343, -20 °C 储存, 保质期半年)
4. 50x TAE 缓冲液 (Solarbio, catalog number: T1060-500, 室温储存, 保质期 1 年)
5. 琼脂糖 (BBI, catalog number: A600014-0060, 室温储存, 保质期 5 年)
6. 核酸染料 (BBI, catalog number: A606696-0600, 2-8 °C 储存, 保质期 2 年)
7. λ /HindIII DNA Marker (Novoprotein, catalog number: dm011-01b, 4 °C 保存 3 个月, -20 °C 保存 2 年)
8. Qubit dsDNA BR 检测试剂盒 (Invitrogen, catalog number: Q32850, 2-8 °C 冰箱中避光保存)

9. Qubit dsDNA HS 分析试剂盒 (Invitrogen, catalog number: Q32851, 2-8 °C 冰箱中避光保存)

仪器设备

1. 高压灭菌锅 (松下健康医疗器械株式会社 (日本制造), catalog number: MLS-3781L-PC)
2. 真空离心浓缩仪 (博然科仪有限公司, catalog number: RVC2-25CD Plus)
3. 电泳仪 (北京六一仪器厂, catalog number: DYCP-31DN)
4. 超纯水制机 (昆山总督机械有限公司, catalog number: MUL9000(A)-H-20)
5. 制冰机 (SNAYO, catalog number: SYM-F140AY65)
6. 凝胶紫外成像系统 (上海欧翔科学仪器有限公司, catalog number: Gelx 1650)
7. 烘箱 (上海新苗医疗器械制造有限公司, catalog number: DH6-9073658-III)
8. PCR 仪 (Alpha Thermal Cycler, catalog number: AC196)
9. Qubit 荧光定量计 (Invitrogen, catalog number: Q33216)
10. 超净工作台 (上海沪静医疗器械有限公司, catalog number: VD-850)
11. 金属浴仪器 (杭州龙扬科学仪器有限公司, catalog number: HB10)
12. 数显恒温水浴锅 (金坛市杰瑞尔电器有限公司, catalog number: HH-2)
13. 3 μ l、10 μ l、20 μ l、100 μ l、200 μ l、1 ml 移液器 (BIOHIT, catalog number: 12662158)
14. 微波炉 (广东格兰仕微波生活电器制造有限公司, catalog number: P70D20N1P-G5(WO))
15. -20 °C 冰箱 (中科美菱低温科技股份有限公司, catalog number: DW-YL270)
16. 普通 4 °C 冰箱 (美的集团电冰箱制造 (合肥) 有限公司, catalog number: BCD-283UTM6)
17. 漩涡混合器 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司, catalog number: VORTEX-5)
18. 离心机 (长沙湘智离心机仪器有限公司, catalog number: TGL-20MB)
19. 电子天平 (塞多利斯科学仪器 (北京) 有限公司, catalog number: 00000246)

实验步骤

首先, 我们提取样品 DNA, 然后对 DNA 总量进行测定, 对于浓度过低或总量无法满足

测序要求的 DNA 模板进行全基因扩增。为了尽量减少污染，所有实验耗材都必须在实验前进行高温灭菌后烘干待用，严格佩戴手套、口罩，所有实验操作均在超净工作台中完成。

一、DNA 提取

对于微型节肢动物的 DNA 提取，我们推荐使用试剂盒 QIAamp DNA Micro Kit (catalog number: 56304)，该试剂盒可以从痕量样本中提取并纯化基因组 DNA 和线粒体 DNA，有效提高获取的 DNA 质量和总量。本文以微型节肢动物为例，介绍 DNA 提取、开始前准备事项和其他注意要点。具体实验步骤可以参阅试剂盒操作手册 <https://www.qiagen.com/cn/resources/resourcedetail?id=085e6418-1ec0-45f2-89eb-62705f86f963&lang=en>。

1. 取完整个体或部分组织于 1.5 ml 的离心管中。

注意：对于外壳坚硬的样品，建议液氮冷冻研磨后进行实验，以确保基因组 DNA 充分提取。

2. 立即加入 180 μ l 的 Buffer ATL，并稳定至室温 (15-25 $^{\circ}$ C)。

3. 向离心管中加入 20 μ l 的 Proteinase K，旋涡混合器震荡涡旋 15 s 充分混匀。

4. 将 1.5 ml 离心管置于 56 $^{\circ}$ C 金属浴锅中 4-6 h，为了更好的提取效果可以适当延长时长，甚至过夜，直至个体表皮透明或样品完全溶解。

5. 加入 200 μ l Buffer AL，盖好离心管盖，旋涡混合器震荡涡旋 15 s 充分混匀。

注意：为了保证有效的裂解，必须对样品和缓冲液进行充分混合以得到均匀的溶液。

6. 加入 200 μ l 乙醇 (95%或无水乙醇)，盖好离心管盖，通过旋涡混合器震荡涡旋 15 s 彻底混匀，并在室温 (15-25 $^{\circ}$ C) 下静置 5 min。

注意：如果室温超过 25 $^{\circ}$ C，可以事先将乙醇在冰上冷却。

7. 简单离心 1.5 ml 的离心管，以移除吸附在盖子内的液滴。

8. 将吸附柱放入收集管中，用 1 ml 移液枪细心将步骤 7 中全部裂解溶液转移到带有 2 ml 收集管的吸附柱中，避免弄湿边缘。盖上盖子，以 6,000 \times g 离心 1 min，舍弃装有废液的收集管，将吸附柱置于干净的 2 ml 收集管中。

注意：如果提取后需要保留残留的组织虫壳，我们可以在转移裂解溶液时把虫壳 (通常近乎透明) 留在原 1.5 ml 的离心管中，加入适量 75%的乙醇，-20 $^{\circ}$ C 保存，以备后续形态学研究需要。如果离心后裂解溶液没有完全通过膜，再次以更高的转速离

心到吸附柱内无液体。

9. 小心地打开吸附柱，加入 500 μ l Buffer AW1，避免弄湿边缘。盖上盖子，以 6,000 \times g 离心 1 min，舍弃装有废液的收集管，将吸附柱置于干净的 2 ml 收集管中。

10. 小心地打开吸附柱，加入 500 μ l Buffer AW2，避免弄湿边缘。盖上盖子，以 6,000 \times g 离心 1 min，再次舍弃装有废液的收集管，将吸附柱置于干净的 2 ml 收集管中。

注意：避免吸附柱和收集管中废液之间的接触。

11. 全速 20,000 \times g 离心 3 min 以完全干燥膜，避免乙醇洗脱液的带入干扰一些下游应用。

12. 将吸附柱置于干净的 1.5 ml 离心管中，并丢弃装有废液的收集管。小心打开吸附柱的盖子，并将 20-100 μ l Buffer AE 或蒸馏水加到膜的中心。

注意：如果高 pH 或 EDTA 影响敏感的下流应用，请使用超纯水进行洗脱。确保 Buffer AE 或蒸馏水为室温 (15-25 $^{\circ}$ C)。如果洗脱体积 < 50 μ l，将 Buffer AE 或者超纯水添加到膜的中心，以确保完全洗脱 DNA。吸附柱可以灵活选择洗脱体积，可以根据下游应用 (如 DNA 浓度) 的要求选择适当的体积。洗脱液的体积将比添加到吸附柱中的溶液体积少 5 μ l。

13. 盖上盖子，室温 (15-25 $^{\circ}$ C) 静置 1 min。高速 20,000 \times g 离心 1 min。

注意：离心前，将装有 Buffer AE 或蒸馏水的吸附柱在室温下静置 5 min，通常有利于提高 DNA 产量。

二、DNA 检测

浓度测量：利用 Qubit 3.0 荧光定量计和 Qubit dsDNA HS 分析试剂盒 (catalog number: Q32851) 测定核酸量，以判断 DNA 获取总量是否满足公司测序初始模板要求。

常规 PCR 检测 (可选)：为了进一步确认物种以及分析需求，如使用条形码序列用于物种鉴定，我们可以选取单个基因片段进行 PCR 扩增、凝胶电泳、Sanger 测序、序列拼接、比对等。

三、DNA 浓缩

对于 DNA 浓度极低的样品，我们推荐使用真空离心浓缩仪快速浓缩 DNA 以提高扩增的初始 DNA 模板浓度和全基因组扩增的成功率。真空离心浓缩仪的相关设置：50 μ l

DNA, 30 °C, 离心浓缩约 2 h 可获得干燥的 DNA。

四、全基因组扩增

QIAGEN REPLI-g UltraFast Mini Kit 和 Qiagen REPLI-g Single Cell Kit 都是基于多重置换扩增技术, 可对有限的 DNA 模板进行快速、均匀、无偏向性的全基因组扩增。然而, 两个试剂盒的适用性不同。QIAGEN REPLI-g UltraFast Mini Kit 针对 > 10 ng 的基因组 DNA 模板进行全基因组扩增, 一个反应通常会产生 7-10 µg 的 DNA, 使用低质量的 DNA 通常会降低产量, 在我们的经验中, 对于 < 10 ng 的基因组 DNA 模板使用该试剂盒进行全基因组扩增均失败。Qiagen REPLI-g Single Cell Kit 对于真核 DNA 可以使用较小量的 DNA (1-10 ng, 经验表明可以更少量) 进行扩增, 甚至对于细菌 10-100 pg DNA, 也能产出高达 40 µg 的 DNA。考虑到单个样本全基因组扩增成本 (QIAGEN REPLI-g UltraFast Mini Kit 110 元/样, Qiagen REPLI-g Single Cell Kit 265 元/样), 对于总 DNA 量低于 50 ng 和 10 ng 的样品可以分别由试剂盒 QIAGEN REPLI-g UltraFast Mini Kit 和 Qiagen REPLI-g Single Cell Kit 进行全基因组扩增。实验开始前准备事项和其他注意要点也可以参阅试剂盒操作手册: <https://www.qiagen.com/mx/resources/resourcedetail?id=dad149da-3f86-4f74-8293-6e2b7f13dd38&lang=en>, <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=38faca1c-64b0-4281-aab3-aa8324bbd181&lang=en>, 具体扩增流程如下:

QIAGEN REPLI-g UltraFast Mini Kit

1. 准备足够的 UMK Buffer D1 (组分见表 1) 和 UMK Buffer N1 (组分见表 2), 用于整个基因组的扩增反应。

注意: UMK Buffer D1 和 UMK Buffer N1 储存时间不超过 3 个月, 表 1 和表 2 中给出的总体积适用于多达 40 个反应。

表 1. UMK Buffer D1 的制备

组分	体积
Reconstituted Buffer DLB	5 µl
Nuclease-free water	35 µl

总体积	40 μl
-----	-----------------------------

表 2. UMK Buffer N1 的制备

组分	体积
Stop solution	8 μ l
Nuclease-free water	72 μ l
总体积	80 μl

- 向浓缩的 DNA 模板中加入 1 μ l 超纯水。

注意：模板 DNA 的量应大于 10 ng。

- 添加 1 μ l 的 UMK Buffer D1 到 DNA 中。短暂地旋涡混合并离心。

- 将样品在室温 (15-25 °C) 下静置 3 min。

- 添加 2 μ l 的 UMK Buffer N1 到样品中。短暂地旋涡混合器并离心。

- 在冰上溶解 REPLI-g UltraFast DNA Polymerase。在室温下解冻所有其他组分，然后快速离心。

注意：REPLI-g UltraFast DNA Polymerase 解冻后可形成沉淀。沉淀可以通过 10 s 涡旋溶解。

- 根据表 3 在冰上准备预混合液，并短暂的旋涡混合并离心。

注意：预混合液应始终保持在冰上，并立即添加 REPLI-g UltraFast DNA Polymerase。

表 3. 预混合液的制备

组分	体积
REPLI-g UltraFast Reaction Buffer	15 μ l
REPLI-g UltraFast DNA Polymerase	1 μ l
总体积	16 μl

- 添加 16 μ l 的预混合液到步骤 5 中的 4 μ l 变性 DNA 中。

- 将装有 DNA 的离心管放置于金属浴中 30 °C 保持 1.5 h。

10. 金属浴 65 °C 保持 3 min 使 REPLI-g UltraFast DNA Polymerase 灭活。

注意：如果扩增的 DNA 要用于 PCR 分析，失活后的 DNA 在水或 TE Buffer 中稀释为 1:25 (如 2 μ l DNA + 48 μ l 水/TE Buffer)。每个 PCR 用 2-3 μ l 稀释的 DNA。

11. -20 °C 储存扩增的 DNA。

QIAGEN REPLI-g Single Cell Kit

1. 按照配方制备足够的 SCK Buffer D1 和 SCK Buffer N1 用于全基因组扩增反应 (表 4 和 5)。

注意：表 4 和 5 中给出的 SCK Buffer D1 和 SCK Buffer N1 的总体积足以用于 12 个反应。如果进行较少的反应，请将剩余的 SCK Buffer D1 和 SCK Buffer N1 存储在 -20 °C。SCK Buffer D1 和 SCK Buffer N1 不得储存超过 3 个月。

表 4. SCK Buffer D1 的制备

组分	体积
Reconstituted Buffer DLB	7 μ l
Nuclease-free water	25 μ l
总体积	32 μl

表 5. SCK Buffer N1 的制备

组分	体积
Stop Solution	9 μ l
Nuclease-free water	51 μ l
总体积	60 μl

2. 向浓缩的 DNA 模板中加入 2.5 μ l 超纯水。

3. 向 DNA 中加入 2.5 μ l SCK Buffer D1。涡旋混合后，短暂离心。

4. 在室温下静置 3 min。

5. 加入 5.0 μ l SCK Buffer N1。通过涡旋混合和离心后，存放在冰上。

6. 在冰上解冻 REPLI-g sc DNA Polymerase。在室温下解冻所有其他组分，涡旋，然后短暂离心。

注意: REPLI-g sc DNA Polymerase 可在解冻后形成沉淀。通过涡旋 10 s 将沉淀溶解。

7. 根据表 6 准备预混合液，涡旋混匀并短暂离心。

注意: 按照表 6 中列出的顺序添加预混合液组分。加入超纯水和 REPLI-g sc Reaction Buffer 后，短暂涡旋混合、离心后，再添加 REPLI-g sc DNA Polymerase。要准备用于多个反应的预混料，请根据反应数增加 10% 的配料。预混料应该保持在冰中，并在添加了 REPLI-g sc DNA Polymerase 后立即使用。

表 6. 预混合液的制备

组分	体积/反应
H ₂ O sc	9 μ l
REPLI-g sc Reaction Buffer	29 μ l
REPLI-g sc DNA Polymerase	2 μ l
总体积	40 μl

8. 添加 40 μ l 预混合液到 10 μ l 来自步骤 5 的变性 DNA 中。

9. 金属浴 30 °C 反应 8 h。

注意: 可根据下游分析 DNA 需求量控制反应时间，能满足高通量测序要求即可，不必过度扩增，金属浴 16 h 可获得最大 DNA 产量约 40 μ g。

10. 金属浴 65 °C 下 3 min 使 REPLI-g sc DNA Polymerase 失活。

11. 扩增的 DNA 可以在 4 °C 进行短期保存 (不超过一周) 或 -20 °C 保存进行长期保存。

注意: 扩增的 DNA 应作为基因组 DNA，建议存储浓度至少为 100 ng/ μ l。

12. 根据制造商的说明，使用合适体积的水或 TE Buffer 稀释扩增的 DNA。如果进行 PCR 分析，则将扩增的 DNA 按 1:100 的比例稀释，并为每个 PCR 反应使用 2 μ l 稀释的 DNA。

五、浓度测量

利用 Qubit 3.0 荧光定量计和 Qubit dsDNA BR 检测试剂盒 (catalog number: Q32850)

测定全基因组扩增后的核酸量。

六、凝胶电泳

使用 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳检测全基因组扩增产物，通过与 marker 比对，在紫外光下查看条带的亮度与长度。

七、储存或送测

最终的全基因组扩增产物可以储存于 -20 °C 冰箱或直接干冰运输送测。

数据分析

本方案中，我们随机选取了以往实验中弹尾纲、膜翅目、缨翅目的部分样品，通过检测 10 种昆虫全基因组扩增前、后 DNA 浓度差异 (表 7)，可以看出该流程全基因组扩增效果显著。其中，弹尾纲物种通过全基因组扩增后，通过 DNA 高通量测序数据进行基因组的组装、BUSCO 完整性评估以及分子系统学研究进一步证明了该方案的有效性 (相关数据详见 Sun *et al.*, 2020)，适用于微型节肢动物系统发育等生物学研究。

表 7. 已有研究效果一览表

类群	物种名称	扩增前浓度 (ng/μl)	扩增后浓度 (ng/μl)
弹尾纲	<i>Ceratophysella communis</i>	0.640	632
	<i>Mesaphorura yosii</i>	0.204	674
	<i>Oncopodura yosiana</i>	0.345	620
	<i>Sminthurides bifidus</i>	0.151	584
膜翅目	<i>Anthophora</i> sp.1	5.7	299.6
	<i>Anthophora</i> sp.2	7.2	311.1
缨翅目	<i>Liothrips</i> sp.	0.835	684.8
	<i>Stephanothrips</i> sp.	0.322	537
	<i>Holothrips</i> sp.	0.229	675
	<i>Adraneothrips</i> sp.	0.385	303

致谢

感谢国家自然科学基金项目 (31970434、31772491) 的资助。

竞争性利益声明

作者声明没有利益冲突。

参考文献

1. 蔡海强, 柳海涛, 李安, 唐文如, 罗瑛. (2010). [全基因组扩增技术及其在法医个体识别中的应用](#). *遗传* 32(11): 1119-1125.
2. 潘孝明, 梁兴国. (2014). [全基因组扩增技术原理及研究进展](#). *生物技术通报* 12: 47-54.
3. Harper, J. C. and Sengupta, S. B. (2012). [Preimplantation genetic diagnosis: state of the art 2011](#). *Hum Genet* 131(2): 175-186.
4. Czyz, Z. T., Kirsch, S. and Polzer, B. (2015). [Principles of whole-genome amplification](#). *Methods Mol Biol* 1347: 1-14.
5. Long, N., Qiao, Y., Xu, Z. Tu, J. and Lu, Z. (2020). [Recent advances and application in whole-genome multiple displacement amplification](#). *Quant Biol* 8: 279-294.
6. Sun, X., Ding, Y., Orr, M. C. and Zhang, F. (2020). [Streamlining universal single-copy orthologue and ultraconserved element design: a case study in Collembola](#). *Mol Ecol Resour* 20(3): 706-717.