

基于 Chelex-100 和蛋白酶 K 的蚊虫足样本 DNA 提取技术^{*}

闫振天, 司凤玲, 鲜鹏杰, 何正波, 陈 斌

(重庆师范大学 昆虫与分子生物学研究所 媒介昆虫重庆市重点实验室 重庆市动物生物学重点实验室, 重庆 401331)

摘要:【目的】探索出一种蚊虫附肢(如单只足)微量 DNA 的提取方法,用于蚊虫分子鉴定和基因型研究。【方法】采用 Chelex-100 溶液和蛋白酶 K 结合的方法用于单只蚊虫足的微量 DNA 的提取。基于该方法,将不同方法保存的不同蚊种的足作为实验材料,从中提取蚊虫基因组 DNA;以之为模板,扩增核糖体 DNA 的 D2, D3, ITS2 区以及线粒体 COI 和 COII 基因,并对 PCR 扩增产物进行测序。【结果】提取到了高质量的基因组 DNA, PCR 扩增获得了高质量的 DNA 扩增片段,进一步测序获得了高质量的序列。【结论】该方法价格便宜,操作简单方便,减少了对蚊虫样本的依赖。单只足用于 DNA 提取不影响对剩下的部分开展形态学等研究,可以作为蚊虫分子生物学研究中微量 DNA 样本提取的重要方法,也为其他昆虫微量 DNA 的提取提供理论依据。

关键词: Chelex-100; 蛋白酶 K; 蚊虫; 足; DNA 提取; PCR 扩增

中图分类号: Q175

文献标志码: A

文章编号: 1672-6693(2017)05-0026-06

蚊科(Culicidae)昆虫是最重要的医学昆虫类群,它能传播疟疾、登革热、流行性乙型脑炎等多种传染病^[1]。蚊媒病是人类健康的主要威胁,每年全球有 7 亿人受感染,其中有上百万人死亡^[2]。世界卫生组织(WHO)估计:2015 年有 2.14 亿人感染疟疾,43.8 万人因疟疾死亡;每年约 0.67 亿至 1.36 亿人感染登革热^[3-4]。目前,疟疾仍是中国主要的公共健康问题^[5]。近些年来,尽管疟疾病例明显减少,但输入性恶性疟疾病例逐年增多^[6]。登革热正在成为中国人类健康新的威胁,例如:2014 年 7—10 月在广东爆发登革热,病例达到 44 497 例^[7]。

蚊虫分子生物学研究是蚊虫控制措施研究的基础,而这些研究往往需要使用大量的蚊虫微量样本提取 DNA。蚊虫存在大量隐存种,因此蚊虫分类学者不仅要去做蚊虫形态学鉴定,还需要做进一步的分子鉴定。传统的分子鉴定使用整只蚊虫提取 DNA,不仅破坏稀少的样本,而且不利于后续的数据与形态特征相对应。因此,急需探索一个高效的微量组织样本 DNA 提取技术。另外在功能基因组的研究方面,往往需要研究不同组织样本的基因表达;由于蚊虫个体小且组织样本不易获得,故而同样也急需微量组织样本的 DNA 提取技术。

Chelex-100 是一种螯合型离子交换树脂。它是由苯乙烯和苯乙二烯组成的聚合物,可以与二价金属离子螯合,高选择性地去除样品和缓冲液中的金属离子,从而避免样品中存在的金属离子在高温和低离子强度溶液中作为催化剂使 DNA 降解。Chelex-100 悬液在碱性和 100 ℃水浴条件下可使细胞膜破裂, DNA 因而可从细胞核中释放出来^[8-9]。Walsh 等人^[10]最早使用 Chelex-100 用于法医生物材料的 DNA 提取和检验,随后一些报道确认 Chelex-100 可高效提取微量生物材料的 DNA^[11-14]。本研究把 Chelex-100 溶液和蛋白酶 K 相结合,探索出了一种蚊虫微量组织(后足)基因组 DNA 提取的方法。通过该方法提取的 DNA 经过多个基因片段的 PCR 扩增和测序,结果表明:与以往的微量组织提取方法如微量 DNA 提取试剂盒相比,该方法更加简单、快捷、廉价,且对于蚊虫标本保存的方法要求低,可以作为蚊虫分子生物学研究中获取 DNA 模版的重要方法。

^{*} 收稿日期:2017-01-15 修回日期:2017-04-05 网络出版时间:2017-06-15 11:23

资助项目:“两江学者”计划专项经费项目;国家自然科学基金(No.31372265;No.31672363);国际原子能机构 CRP 项目(No.18268/R2);国家科技基础性工作专项重点项目(No.2015FY210300);重庆师范大学基金青年项目(No.13XLQ05);重庆市教委科学技术研究项目(No.KJ1600338)

第一作者简介:闫振天,男,实验师,研究方向为昆虫学,E-mail: yzt318@163.com;通信作者:陈斌,教授,E-mail: c_bin@hotmail.com

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20170615.1123.008.html>

1 材料与方法

1.1 供试材料

用于实验的 9 个样本取自重庆师范大学昆虫与分子生物研究所常年野外采集及实验室饲养种群的蚊虫,具体样品信息及编号见表 1。

表 1 用于蚊虫 DNA 提取的样品
Tab. 1 Mosquito samples used for DNA extraction

样本名称	编号	采集地点	采集时间	保存方法	取样部位
白纹伊蚊(<i>Aedes albopictus</i>)♂	AD-1	重庆大学城	2015-08-01	干燥保存	单只后足
白纹伊蚊♀	AD-2	重庆大学城	2015-08-01	体积分数为 85% 的酒精, -20 ℃ 保存	单只后足
三带喙库蚊 (<i>Culex tritaeniorhynchus</i>)♂	CX-1	重庆大学城	2015-08-01	干燥保存	单只后足
三带喙库蚊♀	CX-2	重庆大学城	2014-08-05	体积分数为 85% 的酒精, -20 ℃ 保存	单只后足
中华按蚊(<i>Anopheles sinensis</i>)♂	AN-1	实验室种群	2015-08-01	干燥保存	单只后足
中华按蚊♀	AN-2	实验室种群	2015-08-01	干燥保存	单只后足
中华按蚊♀	AN-3	云南元阳	2011-07-19	干燥保存	单只后足
中华按蚊♀	AN-4	安徽五河	2012-06-27	体积分数为 85% 的酒精, -20 ℃ 保存	单只后足
骚扰阿蚊(<i>Armigeres subalbatus</i>)♀	AR-1	重庆青木关	2015-08-01	干燥保存	单只后足

1.2 试剂

本研究中的主要试剂有: Chelex-100(C7901, Sigma 公司), 蛋白酶 K(规格: 20 mg · mL⁻¹, Takara 公司), 无菌水(双蒸水, 121 ℃ 灭菌), 2×Taq MasterMix(北京康为世纪生物科技有限公司), Chelex-100 溶液(称取一定质量的 Chelex-100 用无菌水配成质量分数为 5% 的溶液, 4 ℃ 冰箱保存)。

1.3 主要实验仪器及设备

本研究中的主要实验仪器及设备参见表 2。

表 2 主要实验仪器及设备

Tab. 2 Main instrument and equipment for the experiment

仪器/设备	生产厂家	仪器/设备	生产厂家
ND-2000 全波长微量测浓度仪	NanDrop	电子天平	上海精密科学仪器有限公司
电泳仪、水平电泳槽及配件	Bio-Rad	Milli Q Plus 超级纯水仪	MilliPORE
微量移液枪	Eppendorf	数显恒温水浴锅	江苏荣华
高速离心机	Eppendorf	PCR 仪	Bio-Rad

1.4 微量组织 DNA 的提取

1.4.1 试剂添加 将 100 μL 的枪头用剪刀剪去尖部少许, 取质量分数为 5% 的 Chelex-100 溶液(预先摇匀) 50 μL 到 250 μL EP 管中, 另取 2 μL 蛋白酶 K 加入其中。

1.4.2 样品处理 取蚊虫的单个后足或中足置于上述 EP 管中, 并用枪头或研磨棒将整根蚊腿捣碎后, 轻微涡旋震荡 30 s, 并离心混匀。

1.4.3 裂解 将经过处理的样品置于 56 ℃ 恒温水浴锅中水浴 6 h, 然后 95 ℃ 水浴 3 min, 最后以 14 000 r · min⁻¹ 离心 3 min, 取上清液作为所提取的基因组 DNA 模板。

1.5 PCR 扩增和测序

PCR 反应总体积为 25 μL, PCR 扩增的反应体系为: 模板 DNA 1 μL, 正反向引物(10 μmol · L⁻¹) 各 1 μL, ddH₂O 9.5 μL, 再加入 Taq Master mix 12.5 μL 到 25 μL。PCR 扩增反应的引物及扩增条件见表 3。扩增的 PCR 产物经质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 后送往上海生物工程有限公司测序。

表 3 PCR 扩增反应的引物及扩增条件

Tab. 3 Primers and amplification conditions used for PCR

引物名称	引物序列	扩增长度/bp	扩增条件	参考文献
D2	CP12(正向):5'-GTGGATCCAGT-CGTGTTGCTTGATAGTGCAG-3' CP15(反向):5'-GTGAATTCTTGGTC-CGTGTTTCAAGACGGG-3'	540	95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 40 s, 55 ℃ 退火 40 s,72 ℃ 延伸 1 min,35 个循环;72 ℃ 延伸 6 min	Krzywinski 等人 ^[15]
D3	D3a(正向):5'-GACC-CGTCTTGAACACG-GA-3' D3b(反向):5'-TCGGAAGGAACCAG-CTAC-TA-3'	335~367	95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 40 s, 55 ℃ 退火 40 s,72 ℃ 延伸 1 min,35 个循环;72 ℃ 延伸 6 min	Chen 等人 ^[16]
ITS2	ITS2A(正向):5'-TGTAAGTCTG-CAGGACA-CAT-3' ITS2B(反向):5'-TATGCTTAAATT-CAGGG-GGT-3'	512	95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 40 s, 55 ℃ 退火 40 s,72 ℃ 延伸 1 min,35 个循环后;72 ℃ 延伸 6 min	Beebe 等人 ^[17]
COI	LCO1490(正向):5'-GGTCAACAAA-TCA-TAAAGATATTGG-3' HC02198(反向):5'-TAAACTT-CAGGGTGACCAAAAAATCA-3'	710	95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 1 min;55 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1.5 min,35 个循环;72 ℃ 延伸 7 min	Folmer 等人 ^[18]
COII	LEU(正向):5'-TCTAATATGGCA-GAT-TAGTGCA-3' LYS(反向):5'-ACTTGCTTTTCAGT-CATCT-AATG-3'	685	95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 40 s, 55 ℃ 退火 40 s,72 ℃ 延伸 1 min,35 个循环;72 ℃ 延伸 6 min	Chen 等人 ^[16]

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 提取及吸光值测定

对从 9 只蚊虫样本单只后足中提取到的基因组 DNA 的质量浓度和纯度进行检测。由于 DNA 提取量少,用琼脂糖凝胶电泳直接检测无法检测出条带,故用 Nanodrop 检测 DNA 的 A260/A280 值及质量浓度。表 4 显示,从 2015 年采集的样本中提取到的 DNA 样品 A260/A280 值大多处在 1.5~1.9 之间,说明 DNA 纯度较高;而从 2011 年和 2012 年采集的样本 AN-3 和 AN-4 中提取到的微量 DNA 样品 A260/A280 的值分别只有 1.02 和 1.23,说明 DNA 纯度较低。从表 4 还可以看出,标本的保存年限和保存方式对从标本中提取到的 DNA 质量浓度影响不大。

表 4 从单只蚊足提取的基因组 DNA 的紫外吸光度值及质量浓度

Tab. 4 The UV absorbance values and mass concentrations of genomic DNAs extracted from single mosquito leg

样本编号	A260/A280	质量浓度/(ng · μL ⁻¹)	样本编号	A260/A280	质量浓度/(ng · μL ⁻¹)
AD-1	1.71	35.8	AN-2	1.37	44.1
AD-2	1.46	40.2	AN-3	1.02	69.7
CX-1	1.78	56.3	AN-4	1.23	32.5
CX-2	1.65	50.6	AR-1	1.98	78.5
AN-1	1.80	46.2			

2.2 模板 DNA PCR 的扩增效果

对提取到的微量 DNA 开展了核糖体 DNA 的 D2,D3,ITS2 区以及线粒体基因 COI 和 COII 的 PCR 扩增并

检测扩增效果。PCR 产物的电泳条带和测序结果显示:电泳条带都比较明亮单一,测序结果较好(图 1)。在 NCBI 进行 Blast 比对后,最终确认相关结果与之前形态学鉴定的种类完全一致。

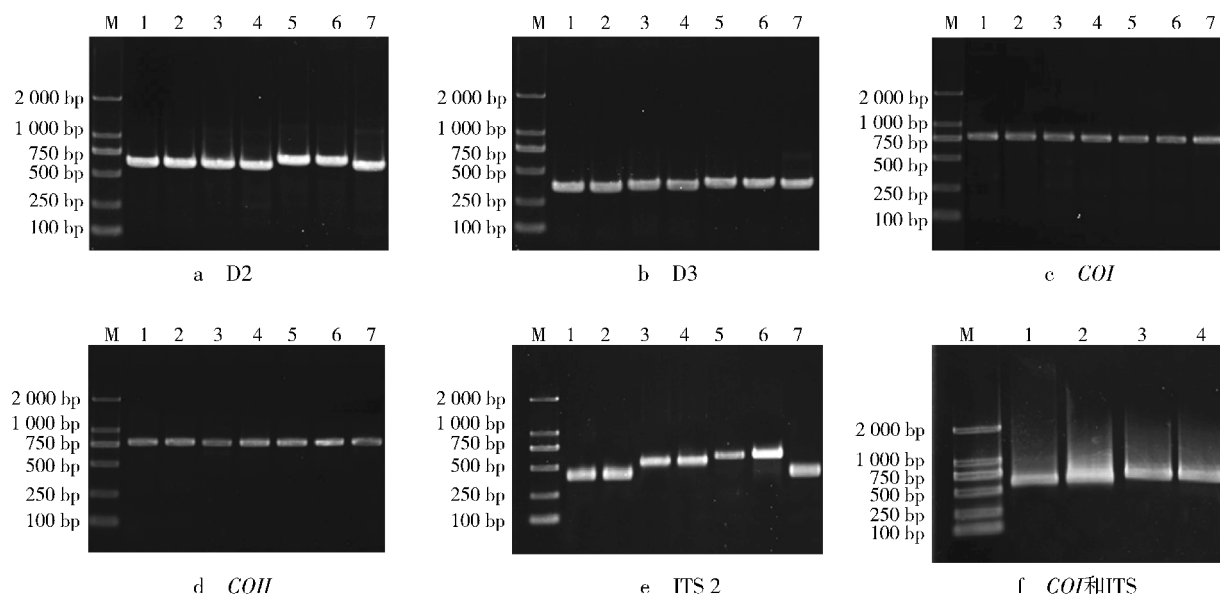


图 1 个基因片段扩增产物琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 The agarose gel electrophoresis of amplification products of 5 genomic loci

3 讨论

Chelex-100 是一种由苯乙烯、二乙烯苯共聚体组成的化学螯合树脂,含有成对的亚氨基二乙酸盐离子,可螯合多价离子,特别是对高价金属离子有很高的亲和力和螯合作用。Chelex-100 在低离子强度、碱性及煮沸的条件下,可以使细胞膜破裂,并使蛋白质变性;Chelex 颗粒可通过离心除去,从而使结合的物质与 DNA 分离^[19]。用 Chelex-100 法提取 DNA,提取过程始终在同一个试管内进行,不涉及转移,可减少污染机会,同时也降低了检材的损失,很适合微量检材的 DNA 提取。虽然该方法的提取纯度不高,但作为 PCR 反应模板制备拥有良好的效果^[20]。

3.1 提取效果

对生物学材料中 DNA 的提取一般采用“SDS 裂解材料+有机溶剂抽提”的方法。这样的方法步骤繁琐,费时费力,达不到微量提取的效果;且在提取过程中加入的 SDS 等裂解物质会严重干扰 PCR 反应,可能出现假阳性的结果^[21]。为了满足法医 DNA 检验中对原始检材需求小、PCR 扩增良好、检验结果准确等多方面的要求,除了传统的生物学提取方法外,Chelex-100 法被广泛应用于医学检验。本研究采用了 Chelex-100 溶液与蛋白酶 K 结合的方法提取蚊虫微量组织 DNA,对所提取的 DNA 纯度与质量浓度、PCR 产物和测序结果进行分析,发现蚊虫标本保存方式与时长对 DNA 提取的效果影响不大。所以整体来看,应用该技术提取微量 DNA 时间较短、质量较高,不失为一种操作简单、节省成本的方法。

3.2 适用范围

本研究使用的 Chelex-100 现已被广泛应用于法医鉴定^[22],但是在昆虫标本材料的分子鉴定方面也逐步被应用。邹志文等人^[14]曾用质量分数为 5% 的 Chelex-100 溶液提取单头螨(Arachnoidea)的 DNA,并成功应用于 COI 基因的 PCR 扩增。随后湛孝东等人^[23]也将该方法用于单头螨线粒体基因组提取并用于扩增 COI 基因,效果较好。应用 Chelex-100 的方法进行蚊虫微量 DNA 的提取目前尚未见报道。本研究采用 Chelex-100 溶液与蛋白酶 K 结合的方法成功提取了不同种属、不同保存方法及保存年限的单只蚊足基因组 DNA,并使用较少的 DNA 模板进行了线粒体基因、核基因等基因片段的扩增,均获得了良好的扩增和测序效果。综合以上几点,笔者认为本方法可作为分子生物学研究提取中小型昆虫样本微量 DNA 的一个重要方法。

3.3 裂解试剂与时长

本研究选取的材料为单只蚊足。由于昆虫腿部组织含角质层和肌蛋白较多,不易研磨破碎,不利于 DNA

的释放^[24];因此在放有蚊足的 EP 管中加入质量分数为 5% 的 Chelex-100 悬浮液后,还要加入蛋白酶 K,并用尖锐的枪头将蚊足捣碎,并保证在 56 ℃ 水浴保温裂解过程中蚊足浸没于液面下方。同时,由于腿足组织断裂效果较差,本研究也对保温裂解的时间进行了梯度摸索,分别采用 2, 4, 6 和 10 h 共 4 个时间梯度,最后确定 6 h 为最佳裂解时间。对于其他昆虫或节肢动物而言,应根据材料的组成成分、裂解的难易程度来摸索裂解的时间。

3.4 纯化与保存

如要对提取到的 DNA 进行纯化,需要去除其中蛋白质、脂类和离子等物质的污染。先用终质量浓度为 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 RNase 在 37 ℃ 下水浴 1 h,然后采用混合的有机溶剂(其中酚:氯仿:异丙醇的体积比为 25:24:1)抽提去除蛋白质得到纯净的 DNA^[25]。但由于该方法提取出来的 DNA 量较少,一般情况下不建议进行纯化。对提取到的 DNA 进行保存时应注意:1) 如是在近期内需要使用,应在 -20 ℃ 进行存放;2) 如长时间不需要使用而仅是作为样品存留时,应放置在 -80 ℃ 的超低温冰箱中保存。

参考文献:

- [1] 王梦蕾,苏昊,吴焜,等.中国蚊媒病流行现状及防治进展[J].热带医学杂志,2012,12(10):1280-1285.
WANG M L, SU H, WU K, et al. The progress and situation of mosquito-borne disease epidemic and control in China[J]. Journal of Tropical Medicine, 2012, 12(10): 1280-1285.
- [2] CARABALLO H, KING K. Emergency department management of mosquito-borne illness: malaria, dengue, and West Nile virus[J]. Emerg Med Pract, 2014, 16(5): 1-23.
- [3] WHO. Malaria[EB/OL]. [2017-01-15]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>.
- [4] WHO. Dengue and severe dengue[EB/OL]. [2017-01-15]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>.
- [5] 周水森,王漪,汤林华.2006 年全国疟疾形势[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2007,25(6):439-411.
ZHOU S S, WANG Y, TANG L H. Malaria situation in the People's Republic of China in 2006[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2007, 25(6): 439-411.
- [6] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会.我国疟疾的现状[R/OL]. [2017-01-15]. <http://www.moh.gov.cn/jnr/fzjrgzjz/201404/afcaf6455b264ac5b13c6bf48306b7e9.shtml>.
National Health and Family Planning Commission of PRC. Malaria situation in China[R/OL]. [2017-01-15]. <http://www.moh.gov.cn/jnr/fzjrgzjz/201404/afcaf6455b264ac5b13c6bf48306b7e9.shtml>
- [7] ZHAO H, ZHAO L Z, JIANG T, et al. Isolation and characterization of dengue virus serotype 2 from the large dengue outbreak in Guangdong, China in 2014[J]. Science China Life Sciences, 2014, 57(12): 1149-1155.
- [8] STEIN A, RAOULT D. A simple method for amplification of DNA from paraffin-embedded tissues[J]. Nucleic Acids Res, 1992, 20(19): 5237.
- [9] KRENKE B E, TEREBA A, ANDERSON S J, et al. Validation of a 16-locus fluorescent multiplex system[J]. J Forensic Sci, 2002, 47(4): 773-785.
- [10] WALSH P S, METZGER D A, HIGUCHI R. Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material[J]. Biotechniques, 1991, 10(4): 506.
- [11] 杨本海,刘永忠. Chelex-100 一步法快速提取外周血 DNA[J]. 皖南医学院学报, 1999, 18(1): 9.
YANG B H, LIU Y Z. A quick method of extraction DNA by Chelex-100 from peripheral blood[J]. Journal of Wanan Medical College, 1999, 18(1): 9.
- [12] 陈辉,刘永波,谢庆瑞,等.有机酚法和 Chelex-100 法提取不同组织微量 DNA 效果比较[J]. 郑州大学学报(医学版), 2004, 39(6): 988-991.
CHEN H, LIU Y B, XIE Q R, et al. Comparison the effect of phenol/chloroform method and Chelex-100 method on micro DNA extraction using different tissues[J]. Journal of Zhengzhou University (Medical Sciences), 2004, 39(6): 988-991.
- [13] 杨电,刘超,李越,等. Chelex 100 提取生物检材 DNA 实时 PCR 定量研究[J]. 中国法医学杂志, 2008, 23(1): 29-31.
YANG D, LIU C, LI Y, et al. Real-time PCR quantification study of DNA extracted by Chelex-100 method[J]. Chinese Journal of Forensic Medicine, 2008, 23(1): 29-31.
- [14] 邹志文,张素卿,辛天蓉,等.一种改进的 Chelex-100 法提取单头螨 DNA[J]. 南昌大学学报(理科版), 2011, 35(6): 564-567.
ZOU Z W, ZHANG S Q, XIN T R, et al. Extraction of DNA from single mite by promoted Chelex-100 method[J]. Journal of Nanchang University (Natural Science), 2011, 35(6): 564-567.
- [15] KRZYWINSKI J, WILKERSON R C, BESANSKY N J. 2001. Evolution of mitochondrial and ribosomal gene sequences in Anophelinae (Diptera: Culicidae): implications for phylogeny reconstruction[J]. Mol Phylogenet Evol, 2001, 18(3): 479-487.
- [16] CHEN B, BUTLIN R K, HARBACH R E. Molecular phylogenetics of the oriental members of the Myzomyia Series of *Anopheles* subgenus *Cellia* (Diptera: Culicidae) in-

- ferred from nuclear and mitochondrial DNA sequences[J]. Systematic Entomology, 2003, 28(1): 57-69.
- [17] BEEBE N M, SAUL A. Discrimination of all members of the *Anopheles punctulatus* complex by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis[J]. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1995, 53(5): 478-481.
- [18] FOLMER O, BLACK M, HOEH W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates[J]. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 1994, 3(5): 294-299.
- [19] BIO-RAD Laboratories. Chelex-100 and Chelex-20 chelating ion exchange resin instruction manual[Z]. USA: Bio-Rad Laboratories, 1998.
- [20] WILLARD J M, LEE D A, HOLLAND M M. Recovery of DNA for PCR amplification from blood and forensic samples using a chelating resin[J]. Methods Mol Biol, 1998, 98: 9-18.
- [21] 王永, 兰青阔, 张莉, 等. 改良 Chelex-100 法和 CTAB 法用于转基因抗草甘膦大豆检测效果的比较[J]. 大豆科学, 2008, 27(5): 898-901.
- WANG Y, LAN Q K, ZHANG L, et al. Comparison on effect of improved Chelex-100 method and CTAB method for Transgenic roundup ready soybean detection[J]. Soybean Science, 2008, 27(5): 898-901.
- [22] 王岩. 法医 DNA 常量检材 Chelex-100 提取法研究[D]. 吉林: 吉林大学, 2008.
- WANG Y. Study of forensic DNA constant samples Chelex-100 extraction[D]. Jilin: Jilin University, 2008.
- [23] 湛孝东, 李朝品, 席贻龙. 几种单头螨线粒体基因组提取方法的比较[J]. 中国医学创新, 2015, 12(18): 1-4.
- ZHAN X D, LI C P, XI Y L. The comparison of several extraction methods of one head mite mitochondrial genome[J]. Medical Innovation of China, 2015, 12(18): 1-4.
- [24] 彩万志, 庞雄飞, 花保桢, 等. 普通昆虫学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011: 100-101.
- CAI W Z, PANG X F, HUA B Z, et al. General entomology [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2011: 100-101.
- [25] 陈品健. 动物生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 30-32.
- CHEN P J. Animal Biology [M]. Beijing: Science Publishing House Press, 2001: 30-32.

Animal Sciences

A DNA Extraction Technique for Mosquito Legs Based on Chelex-100 and Proteinase K

YAN Zhentian, SI Fengling, XIAN Pengjie, HE Zhengbo, CHEN Bin

(Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, Chongqing Key Laboratory of Vector Insects,

Institute of Entomology and Molecular Biology, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: [Purposes] A trace amount DNA extraction technique was explored for a mosquitoes appendage (e.g., a single leg), using for the molecular identification and gene-typing research. [Methods] The micro DNA extraction of a single leg of mosquito was performed combined Chelex-100 with proteinase K. According to this method, the genomic DNA were obtained from different mosquito species and preserved with different methods as experimental materials. Using the extracted DNAs as templates, we amplified and sequenced the ribosome DNA D2, D3 and ITS2 loci and mitochondrial COI and COII genes. [Results] Using this technology, high-qualified genomic DNA, amplification products and sequencing results has been obtained. [Conclusions] The technique is advanced with low DNA extraction expenditure, operation simplicity, and more importantly the need of micro-quantified sample. The use of a single leg for DNA extraction can leave the mosquito body for subsequent morphological study. The technique is not only appropriate for DNA extraction of trace amount of mosquito sample, but also for other insects.

Keywords: Chelex-100; proteinase K; mosquito; leg; DNA extraction; PCR amplification

(责任编辑 方 兴)