

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2017.01.012

# 基于 16S rDNA 基因的谷斑皮蠹 PCR 检测技术

张祥林<sup>1\*</sup>, 李京<sup>1,2</sup>, 罗明<sup>2</sup>, 李亚伟<sup>1</sup>, 王翀<sup>1</sup>, 张小菊<sup>1</sup>

<sup>1</sup>新疆出入境检验检疫局, 新疆乌鲁木齐 830063; <sup>2</sup>新疆农业大学农学院, 新疆乌鲁木齐 830052

**摘要:** 【目的】谷斑皮蠹是一种重要的检疫性害虫, 在新疆周边多个国家分布, 口岸检疫人员多次从进境货物中截获谷斑皮蠹, 该虫对新疆的农业生产极具威胁。【方法】以谷斑皮蠹的 16S rDNA 基因为靶序列, 用昆虫通用引物对 4 种供试皮蠹进行 PCR 扩增, 将扩增产物进行克隆和测序, 用生物软件设计检测谷斑皮蠹的特异性引物与探针。【结果】设计的特异性引物(TG-SNP-F/TG-SNP-R)及所建立的常规 PCR 方法能有效检测出谷斑皮蠹, 其扩增产物的片段大小为 250 bp, 灵敏度为  $3 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。设计的特异性引物(TG-F/TG-R)和探针(TG-probe), 以及所建立的实时荧光 PCR 方法, 对谷斑皮蠹的检测特异性强, 灵敏度达  $0.8 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。【结论】建立的常规 PCR 方法和实时荧光 PCR 检测方法能够对谷斑皮蠹进行准确鉴定, 为口岸检疫人员检测进境货物中携带的谷斑皮蠹提供技术支持。

**关键词:** 谷斑皮蠹; 16S rDNA; 常规 PCR; 实时荧光 PCR

## Study on molecular detection technology of *Trogoderma granarium* based on 16S rDNA

ZHANG Xianglin<sup>1\*</sup>, LI Jing<sup>1,2</sup>, LUO Ming<sup>2</sup>, LI Yawei<sup>1</sup>, WANG Chong<sup>1</sup>, ZHANG Xiaoju<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Xinjiang Entry and Exit Inspection and Quarantine Bureau, Urumqi, Xinjiang 830063, China;

<sup>2</sup>College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052, China

**Abstract:** 【Aim】The *Trogoderma granarium* is an important quarantine pest, found in many counties in Xinjiang. It was intercepted many times by port quarantine officers. 【Method】The study was carried out using the *T. granarium*'s 16S rDNA gene as target fragments. The universal insect primer was used amplify DNA from the four *Trogoderma* spp.. *T. granarium*'s specific primers and probes were designed by using biological software. 【Result】The designed primers TG-SNP-F/TG-SNP-R could specifically detect the *T. granarium* by conventional PCR. The amplified fragment was 250 bp, and its sensitivity was  $3 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ . Real-time PCR methods of detecting the *T. granarium* had strong specificity, with sensitivity of  $0.8 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ . 【Conclusion】*T. granarium* was accurately identified by using the conventional as well as real-time PCR, and provides technical support for port quarantine officers to detect *T. granarium* in imported goods.

**Key words:** *Trogoderma granarium*; 16S rDNA; conventional PCR; real-time PCR

近年来,随着我国对外贸易的日益频繁,多种危险性害虫随进境货物相继传入我国。谷斑皮蠹 *Trogoderma granarium* Everts 属皮蠹科斑皮蠹属,是国际上重要的危险性仓储害虫(Hulme, 2009)。谷斑皮蠹可危害多种谷类及经济作物,对谷物造成约 20% 的损失(张生芳, 2004)。该虫在新疆周边多个

国家分布发生,对新疆农业生产的威胁极大。口岸检疫人员经常从进境货物中检出该虫。由于谷斑皮蠹与黑斑皮蠹 *T. glabru*、花斑皮蠹 *T. variabile* 和条斑皮蠹 *T. teukton* 等在形态上较为相似,特别是幼虫形态差异很小,难以区分,因此需要借助分子检测方法进行鉴定。马骏等(2009)以 COI 基因为

收稿日期(Received): 2016-09-02 接受日期(Accepted): 2016-11-07

基金项目: 国家质检公益性行业科研专项(201310091)

作者简介: 张祥林, 男, 研究员。研究方向: 有害生物鉴定及分子检测。

\* 通信作者(Author for correspondence), E-mail: XL6479@163.com

靶序列设计了一对扩增谷斑皮蠹和黑斑皮蠹的特异性引物;陈岩等(2010)以 CO I 基因为靶序列,并以黑斑皮蠹、花斑皮蠹、条斑皮蠹为对照,设计了一对扩增谷斑皮蠹的特异性引物;Castalanelli *et al.* (2011)根据扩增出的斑皮蠹属与相近属的 18S rDNA 和 2 个线粒体基因(COI, Cytochrome b)来分析它们的系统发育关系;邓海娟等(2014)对斑皮蠹属、皮蠹属、圆皮蠹属的样品 COI 基因序列进行分析,同时构建了它们的系统法发育树;Rachel *et al.* (2014)研究发现,16S rDNA 较 COI 基因更适合鉴别皮蠹科中的几种不同的属。本研究以谷斑皮蠹 16S rDNA 为靶序列,以花斑皮蠹、黑斑皮蠹、条斑皮蠹为对照样品,利用通用引物对供试样品进行 PCR 扩增,将扩增产物进行克隆和测序,根据测序的结果设计筛选出用于检测谷斑皮蠹的特异性引物和探针,并建立谷斑皮蠹的常规 PCR 及实时荧光 PCR 快速检测方法,可用于口岸检疫人员对进境货物中携带的谷斑皮蠹的检测鉴定。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试样品

供试的谷斑皮蠹、花斑皮蠹样品由中国检验检疫科学研究院提供,黑斑皮蠹、条斑皮蠹样品由新疆出入境检验检疫局采集。

### 1.2 样品 DNA 提取

用磁珠法血液基因组 DNA 提取试剂盒(天根 DP329)提取供试的 4 种皮蠹样品的 DNA,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.3 通用引物的 PCR 扩增

用 Simon *et al.* (1994)报道的昆虫通用引物对 4 种供试样品进行 PCR 扩增。引物序列为 16S LR-J-12961:TTTAATCCAACATCGAGG, 16S LR-N-13398:CGCCTGTTTAACAAAAACAT。

PCR 反应体系:2×Taq PCR Green Mix 12.5  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物( $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )各 0.5  $\mu\text{L}$ , DNA 模板( $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )2  $\mu\text{L}$ , 加水至 25  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件:95  $^{\circ}\text{C}$  15 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  42 s, 42  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 共 40 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  5 min。取 PCR 产物 5  $\mu\text{L}$ , 用 1.0% 琼脂糖凝胶进行电泳检测, 用凝胶成像仪观察照相。

### 1.4 克隆与 PCR 鉴定

凝胶成像仪下用刀片切下含目的片段的胶块,

用 DNA 回收试剂盒(DP209-03)回收目的片段。将该片段与载体 pGM-T 进行连接, 然后转化至 Top 10 感受态细胞中。在含有氨苄抗生素(AMP<sup>+</sup>)的平皿培养基上培养, 从该平皿中挑取白色菌落至培养液中, 恒温摇床振荡培养。用高纯度质粒小提试剂盒(DP104)从培养液中提取重组质粒 DNA, PCR 检测提取物, 将阳性重组质粒送北京鼎国公司测序。

### 1.5 常规 PCR 检测技术

1.5.1 特异性引物的设计 将测序结果与 NCBI 上发布的谷斑皮蠹序列进行 BLAST 比对分析, 验证测序结果的准确性, 然后用 Primer Permier 5.0 软件设计出一对检测谷斑皮蠹的特异性引物, 该对引物的序列为 TG-SNP-F: 5'-AATGAATGGTTGGACGAATGA-3'; TG-SNP-R: 5'-CTAGAAGAATTACGCTGTTATCC-3'。将合成的该对引物配成  $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  母液,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存, 使用时将母液稀释 10 倍。

1.5.2 常规 PCR 检测及灵敏度测定 用所设计并合成的 TG-SNP-F/TG-SNP-R 一对引物扩增谷斑皮蠹、花斑皮蠹、黑斑皮蠹和条斑皮蠹 DNA。PCR 反应体系为 2×Taq PCR Green Mix 12.5  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物( $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )各 1  $\mu\text{L}$ , DNA 模板( $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )2  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 8.5  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件为:95  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  30 sec, 47  $^{\circ}\text{C}$  50 sec, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 共 40 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。

将提取的谷斑皮蠹 DNA 质粒( $8\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )稀释成 8 个浓度梯度:8、7、6、5、4、3、2、1  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ , 其他条件不变, 进行 PCR 检测, 测定该方法的灵敏度。

### 1.6 实时荧光 PCR 检测技术

1.6.1 特异性引物与探针的设计 用 DNAMAN 软件将重组质粒的测序结果与 NCBI 上发布的谷斑皮蠹序列进行 BLAST 比对分析, 然后用 Primer Permier 5.0 软件设计一对谷斑皮蠹的特异性引物和探针。该对引物和探针序列为 TG-F: 5'-CCTGCTC-CCTGATTGATTT-3'; TG-R: 5'-CGATAAGAAGCTCTGTAGAAG-3'; TG-probe: FAM-CTGGAATGAATGGTTGGACGAAATG-TAMRA-3。

1.6.2 实时荧光 PCR 检测及灵敏度测定 用引物 TG-F/TG-R 和探针 TG-probe 对供试的 4 种皮蠹进行实时荧光 PCR 扩增。荧光 PCR 反应体系:2.5×real Master Mix 8  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物各 1  $\mu\text{L}$ , 探针 0.5  $\mu\text{L}$ , 20×Probe Enhancer solution 1  $\mu\text{L}$ , 模板 2  $\mu\text{L}$ , 超纯水

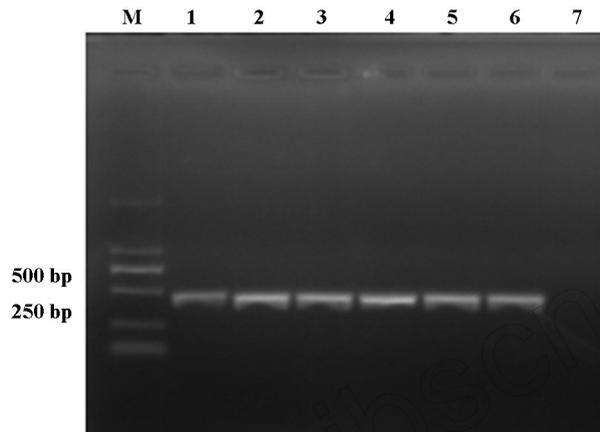
补至 20  $\mu\text{L}$ 。荧光 PCR 反应条件:94  $^{\circ}\text{C}$  2 min;94  $^{\circ}\text{C}$  20 s,51  $^{\circ}\text{C}$  20 s,68  $^{\circ}\text{C}$  1 min,共 40 个循环。

将提取的谷斑皮蠹 DNA 模板(8  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )进行 10  $\times$  系列稀释成 8 个浓度梯度,作为模板进行实时荧光 PCR 扩增,其他条件不变,测定该引物和探针及其检测方法的灵敏度。

## 2 结果与分析

### 2.1 通用引物扩增结果

用通用引物 16S LR-J-12961/16S LR-N-13398 扩增供试的谷斑皮蠹、花斑皮蠹、黑斑皮蠹和条斑皮蠹等 4 种皮蠹,将 PCR 扩增产物进行电泳,结果表明,4 种皮蠹均有扩增条带,各条带的片段大小均为 420 bp(图 1)。



M:2000 bp DNA ladder; 1~3:谷斑皮蠹; 4:黑斑皮蠹; 5:花斑皮蠹; 6:条斑皮蠹; 7:空白对照。

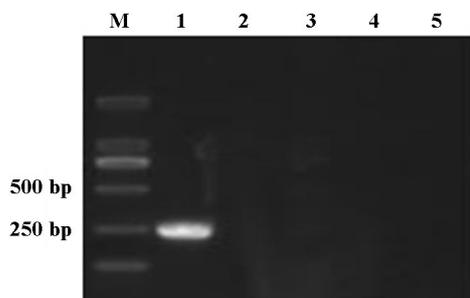
M: 2000 bp DNA ladder; 1~3: *T. granarium*; 4: *T. glabrum*; 5: *T. variabile*; 6: *T. teukton*; 7: Blank.

图 1 通用引物 16S LR-J-12961/16S LR-N-13398 对样品的 PCR 检测结果

Fig.1 The result of PCR amplified samples by universal primer 16S LR-J-12961/16S LR-N-13398

### 2.2 常规 PCR 引物特异性检测及灵敏度测定结果

用设计的引物 TG-SNP-R/TG-SNP-R 扩增供试的谷斑皮蠹、花斑皮蠹、黑斑皮蠹和条斑皮蠹,将 PCR 扩增产物进行电泳,结果表明,仅谷斑皮蠹出现 250 bp 大小的扩增片段,其他样品则无扩增片段,说明该对引物的特异性很强,能够有效地区分谷斑皮蠹与其他 3 种皮蠹(图 2)。



M:2000 bp DNA ladder;1:谷斑皮蠹 2:黑斑皮蠹  
3:花斑皮蠹 4:条斑皮蠹 5:空白对照。

M: 2000 bp DNA ladder; 1: *T. granarium*; 2: *T. glabrum*;  
3: *T. variabile*; 4: *T. teukton*; 5: Blank.

图 2 特异性引物 TG-SNP-R/TG-SNP-R 扩增结果

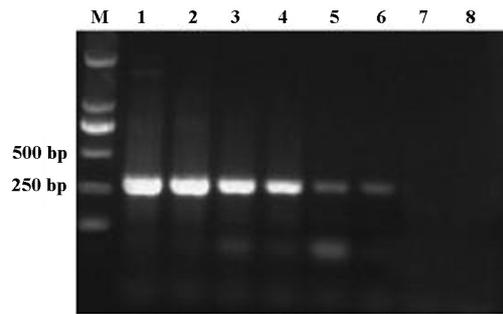
Fig.2 The result of PCR amplified by  
primer TG-SNP-R/TG-SNP-R

从常规 PCR 的灵敏度测定结果来看,第 1~6 号泳道均有不同亮度的电泳条带,其中 1 和 2 号泳道的条带亮度最亮,以 2 号泳道条带最亮,因此,最佳模板浓度是 7  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。从 5 号泳道开始,随着模板用量的减少,条带的亮度也减弱,6 号泳道仍有较弱的条带,第 7 号泳道则完全没有条带,这说明该对引物及其所建立的常规 PCR 检测方法可以特异性地检测到 DNA 浓度为 3  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  的谷斑皮蠹(图 3)。

### 2.3 实时荧光 PCR 引物与探针特异性验证及灵敏度检测结果

用引物 TG-F/TG-R 和探针 TG-probe 对 4 种皮蠹进行 PCR 扩增,结果表明,谷斑皮蠹荧光信号指数增加,其他 3 种皮蠹在荧光信号收集结束前未出现增长(图 4)。

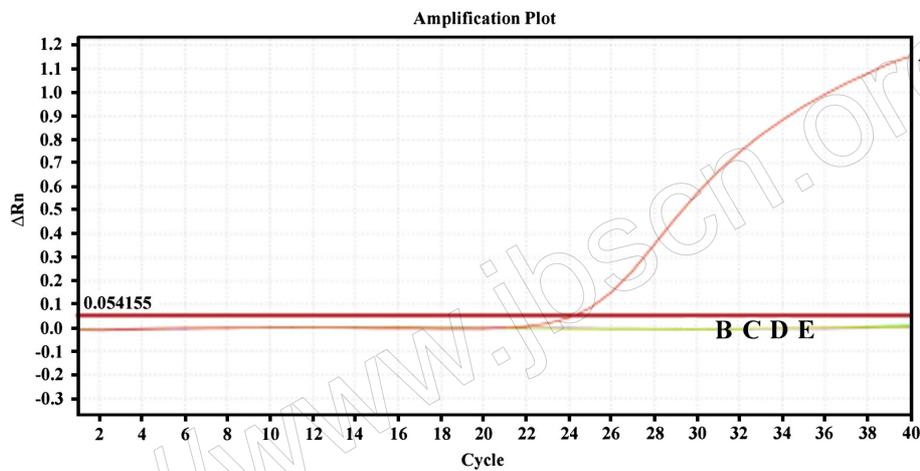
对谷斑皮蠹 DNA 质粒稀释的 8 个浓度梯度进行实时荧光 PCR 检测,结果表明,DNA 浓度越大,Ct 值越小,当 DNA 浓度为  $8 \times 10^{-7} \text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  时,仍可检测到荧光信号,当 DNA 浓度为  $8 \times 10^{-8} \text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  时,则未检测到荧光信号,说明能够检测到的最低 DNA 浓度为 0.8  $\text{fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (图 5)。



1~8 泳道模板浓度:8、7、6、5、4、3、2、1  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ; M:DNA marker DL2000。  
 Different template concentration of 1~8: 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ; M: DNA marker DL2000.

图 3 不同 DNA 模板浓度的 PCR 扩增结果

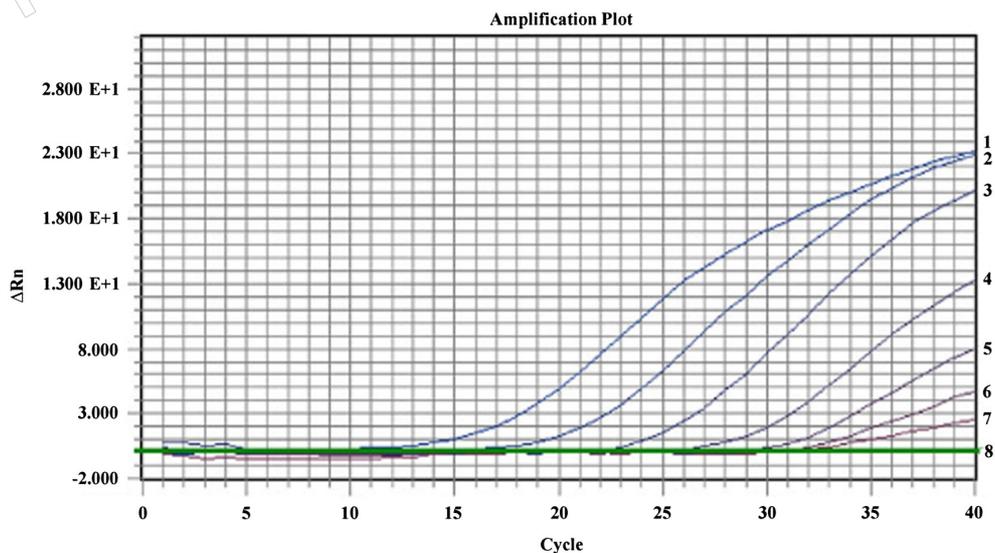
Fig.3 The result of PCR amplified at different template concentration



A: 谷斑皮蠹; B: 花斑皮蠹; C: 黑斑皮蠹; D: 条斑皮蠹; E: 空白对照。  
 A: *T. granarium*; B: *T. variabile*; C: *T. glabrum*; D: *T. teukton*; E: Blank.

图 4 实时荧光 PCR 检测供试样品的结果

Fig.4 The result of detecting *Trogoderma* spp. by real-time PCR



1~8 质粒浓度:  $8 \times 10^{-1}$ ,  $8 \times 10^{-2}$ ,  $8 \times 10^{-3}$ ,  $8 \times 10^{-4}$ ,  $8 \times 10^{-5}$ ,  $8 \times 10^{-6}$ ,  $8 \times 10^{-7}$ ,  $8 \times 10^{-8} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。  
 Different plasmids potencies of 1~8:  $8 \times 10^{-1}$ ,  $8 \times 10^{-2}$ ,  $8 \times 10^{-3}$ ,  $8 \times 10^{-4}$ ,  $8 \times 10^{-5}$ ,  $8 \times 10^{-6}$ ,  $8 \times 10^{-7}$ ,  $8 \times 10^{-8} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ .

图 5 实时荧光 PCR 中不同质粒浓度检测谷斑皮蠹结果

Fig.5 The result of detecting *T. granarium* in different plasmids potencies by real-time PCR

### 3 讨论

通过以谷斑皮蠹的 16S rDNA 基因为靶序列所设计的引物 TG-SNP-R/TG-SNP-R, 对供试的 4 种皮蠹进行常规 PCR 扩增, 能够有效区分谷斑皮蠹与其他 3 种皮蠹, 说明该对引物的特异性强, 且灵敏度较高, 能够检测到 DNA 浓度为  $3 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  的谷斑皮蠹。此外, 用 16S rDNA 基因为靶序列所设计的引物 TG-F/TG-R 和探针 TG-probe, 对供试的 4 种皮蠹进行实时荧光 PCR 扩增, 也能够有效地区分谷斑皮蠹与其他 3 种皮蠹, 说明该对引物和探针的特异性很强, 且灵敏度高, 能够检测到 DNA 浓度为  $0.8 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  的谷斑皮蠹。

马骏等(2009)、陈岩等(2010)、刘聪等(2012)和邓海娟等(2014)在针对皮蠹科斑皮蠹属不同种的区分时, 均以各种皮蠹的线粒体 DNA 的 COI 基因为靶序列, 然后根据 CO I 基因序列比对结果设计特异性引物, 或选用限制性内切酶进行酶切分析, 区分了同源性接近的斑皮蠹属的不同种。本项研究以皮蠹的 16S rDNA 为靶序列, 设计了特异性引物和探针, 建立了能有效检测出谷斑皮蠹的常规 PCR 方法和实时荧光 PCR 方法, 经验证, 这 2 对引物和探针及其所建立的 PCR 检测方法的特异性好, 灵敏度高, 优于前人以 CO I 基因为靶序列所设计的引物及检测方法。

### 参考文献

- 陈岩, 朱水芳, 陈克, 2010. 谷斑皮蠹分子检测方法. 植物检疫, 24(1): 22-23.
- 邓海娟, 郑斯竹, 高渊, 2014. 基于 mtDNA COI 基因的皮蠹科三属的系统发育关系研究. 江苏农业科学, 42(3): 23-26.
- 刘聪, 蒋湘, 樊武疆, 2012. 花斑皮蠹和黑斑皮蠹(鞘翅目: 皮蠹科)的快速分子鉴定. 北京农学院学报, 27(2): 27-28.
- 马骏, 胡学难, 梁帆, 2009. 谷斑皮蠹与黑斑皮蠹的分子鉴定. 植物检疫, 23(4): 27-28.
- 张生芳, 2004. 谷斑皮蠹的世界分布及化学防治. 植物检疫, 18(2): 125-128.
- CASTALANELLI M A, BAKER A M and MUNYARD K A, 2011. Molecular phylogeny supports the paraphyletic nature of the genus *Trogoderma* (Coleoptera: Dermestidae) collected in the Australasian ecozone. *Bulletin of Entomological Research*, 102(1): 17-28.
- HULME P E, 2009. Trade, transport and trouble: managing invasive species pathways in an era of globalisation. *Journal of Applied Ecology*, 46(1): 10-18.
- RACHEL L O, ROXANNE E F and NORMAN B B, 2014. Molecular identification of *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae) using the 16s gene. *Journal of Pest Science*, 87(4): 701-710.
- SIMON C, FRATI F, BECKENBACH A and CRESPI B, 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87(6): 651-701.

(责任编辑: 郭莹)