

# 中蜂与意蜂王浆中 DNA 的 RAPD 分析

邹 阳, 黄 康, 颜伟玉 曾志将\*

(江西农业大学 蜜蜂研究所, 江西 南昌 330045)

**摘要:**以中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*)和意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*)王浆为材料,用改进的苯酚-氯仿法提取蜂王浆中的 DNA,利用 35 个随机引物对提取出来的 DNA 进行 RAPD 扩增,结果表明:有 6 个随机引物能扩增出谱带,其中 1 个引物对所有王浆 DNA 样品的扩增结果完全相同,5 个引物出现多态性。共检测到 32 条扩增谱带,其中 24 条为多态带。

**关键词:**蜜蜂;王浆;DNA 提取;RAPD

中图分类号:S896.3 文献标识码:A

## The Assessment of DNA in Royal Jelly from *Apis mellifera* and *Apis cerana* by RAPD markers

ZOU Yang, HUANG Kang, YAN Wei - yu, ZENG Zhi - jiang\*

(Honeybee Research Institute, JAU, Nanchang 330045, China)

**Abstract:** The experiment used royal jelly of *Apis cerana* and *Apis mellifera* as materials, extracted the DNA of royal jelly with modified phenol - chloroform method, the extracted DNA was analyzed by RAPD with 35 arbitrary primers. The results showed that: in the 35 primers that were tested, 1 obtained the same bands. 5 were polymorphous, a total of 32 bands were obtained, of which 24 were polymorphic.

**Key words:** honeybee; royal jelly; DNA extraction; RAPD

蜂王浆是 6~15 日龄工蜂头部内一对呈葡萄状的王浆腺分泌的一种乳白色或淡黄色浆状物质。目前对蜂王浆的研究主要集中在蛋白质、脂类、糖类、氨基酸等方面<sup>[1-3]</sup>,此外蜂王浆中还含有核酸。1964 年 Marko 等人首次报导了意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*,简称意蜂)王浆冻干粉中含有 DNA,证实了意蜂王浆中含有 DNA<sup>[4]</sup>。1979 年牛春艳等人提取并测定了意蜂新鲜王浆中的 DNA<sup>[5]</sup>。但在目前,国内外没有关于中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*,简称中蜂)王浆中是否含有 DNA 的报道。

随机扩增多态 DNA(random amplified polymorphic DNA,简称 RAPD)技术是由 Williams 和 Welsh 两个研究小组同时发展起来的一项在 DNA 分子水平上进行大分子多态性检测的技术,目前该技术已成功应用于蜜蜂等各种生物的研究中<sup>[6-10]</sup>。但目前也没有关于蜜蜂王浆中 DNA 的 RAPD 的任何报道。为此,我们分别提取了中蜂和意蜂王浆中的 DNA,首次证实了中蜂王浆中含有核酸,并运用 RAPD 技术对这两种蜜蜂王浆 DNA 进行了扩增,现总结报道如下。

收稿日期:2006 - 12 - 22

基金项目:江西省自然科学基金资助项目(0530031)

作者简介:邹阳(1981 - ),男,硕士生,主要从事蜜蜂科学研究;\*通讯作者:曾志将,教授,E-mail:bees1965@sina.com.

# 1 材料与方 法

## 1.1 实验材料

1.1.1 实验王浆来源 实验所用王浆产自江西农业大学蜜蜂研究所饲养的中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*)和意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*),每种蜜蜂各 7 份。-70 ℃ 贮藏。

1.1.2 主要试剂与仪器 STE(30 mmol/L Tris - HCl, 200 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl, pH8.0); 0.1 g/mL 的 SDS 细胞裂解液;蛋白酶 K(200 μg/mL);水饱和酚,  $V_{\text{苯酚}}:V_{\text{氯仿}}:V_{\text{异戊醇}}(25:24:1)$  混合液,  $V_{\text{氯仿}}:V_{\text{异戊醇}}(24:1)$ ;TE(10 mmol/L Tris - HCl, 1 mmol/L EDTA, pH8.0); $\rho = 75\%$  乙醇;琼脂糖,溴化乙锭;Taq 酶、dNTPs、10 × Buffer(含  $Mg^{2+}$ )、DNA Marker 均购于大连宝生物工程有限公司;随机引物购于上海生工(S 系列)和美国 Opera 公司(OP 系列);使用的 PCR 仪为德国 Eppendorf 公司产品,型号为 Mastercycle Gradient,PCR 扩增使用的 35 个引物为 10 聚体随机引物,分别为  $S_{27}$ 、 $S_{101}$ 、 $S_{121}$ 、 $S_{165}$ 、 $S_{168}$ 、 $S_{349}$ 、 $S_{354}$ 、 $S_{358}$ 、 $S_{369}$ 、 $S_{378}$ 、OPA - 01、OPA - 02、OPA - 03、OPA - 04、OPA - 05、OPC - 01、OPC - 02、OPC - 03、OPC - 04、OPC - 05、OPD - 01、OPD - 02、OPD - 03、OPD - 04、OPD - 05、OPJ - 01、OPJ - 02、OPJ - 03、OPJ - 04、OPJ - 05、OPK - 01、OPK - 02、OPK - 03、OPK - 04、OPK - 05。

## 1.2 实验方法

1.2.1 王浆 DNA 的提取 采用改进的苯酚 - 氯仿法。

1.2.2 DNA 质量和纯度检测 (1)电泳分析:取 2 μL DNA 加样于 9 g/L 琼脂糖凝胶泳道中,电泳缓冲液为 10 × TAE,电压为 6 V/cm,电泳时间为 20 min,凝胶成像仪上观察 DNA 分子的大小、完整性并拍照。(2)纯度检测:取 1 μL DNA 样品,加 ddH<sub>2</sub>O 至 50 μL,在 Eppendorf BioPhotometer(德国, EPPENDORF 公司)核酸定量仪上测定 OD<sub>260</sub>, OD<sub>280</sub>,  $OD_{260}/OD_{280}$ ;DNA 纯度 =  $OD_{260}/OD_{280}$ 。

1.2.3 RAPD - PCR 反应 (1)10 μL 反应体系中包括:模板 10 ng/μL, 2.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mmol/L dNTPs, 0.3 mmol/L 引物, 1 U/10 μL Taq DNA 聚合酶;(2)RAPD - PCR 反应程序为:94 ℃ 预变性 4 min, 94 ℃ 变性 1 min, 37 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 2 min, 40 个循环;后延伸 10 min。

1.2.4 电泳检测 PCR 扩增产物 RAPD 扩增所得到的 PCR 产物在 15 g/L 琼脂糖, 10 × TAE 电泳缓冲液、EB 染色,在凝胶成像仪下观察、拍照,记录。

1.2.5 扩增产物的数据分析 电泳获得的基因组扩增图谱的每一条带,均为一个分子标记,并代表引物的一个结合位点,计算图谱带数量。

# 2 实验结果

## 2.1 王浆 DNA 的提取质量

DNA 的提取质量往往是决定 RAPD 分析成功与否的关键。电泳结果表明,所提取的基因组 DNA 主带明亮、清晰(图 1)。按上述方法测定的王浆 DNA 的  $A_{260}/A_{280}$  比值在 1.56 ~ 1.82 之间;表明 DNA 的纯度较高,基本无蛋白质或酚类物质等干扰物质。

## 2.2 RAPD 扩增结果

实验所用的 35 个随机引物中,有 6 个随机引物能扩增出谱带,其中引物  $S_{349}$  的 PCR 扩增产物在中蜂和意蜂王浆 DNA 的所有样品中完全一样。引物  $S_{27}$ 、 $S_{101}$ 、 $S_{358}$ 、 $S_{378}$ 、OPA - 03 的扩增产物表现样品之间的 DNA 多态性(表 1)。PCR 的扩增片段在 0.2 ~ 2.0 kb 之间。图 2 为引物  $S_{354}$  的 RAPD 扩增结果。

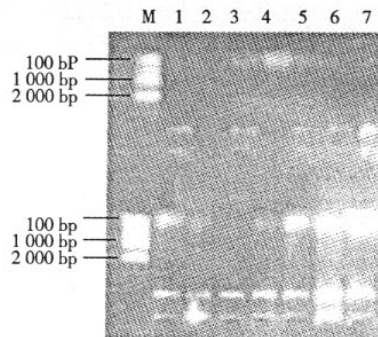


图 1 蜂王浆中提取的 DNA

Fig. 1 DNA extracted from royal jelly

注:上面 8 个孔道,从左到右依次为 DNA Marker 和中华蜜蜂王浆 7 个样品的 DNA;下面 8 个孔道,从左到右依次为 DNA Marker 和意大利蜜蜂王浆 7 个样品的 DNA。

表 1 RAPD 引物及其 PCR 扩增结果  
Tab.1 The RAPD primers and their results

引物名称	碱基序列	标记数	标记可变数	多态数		多态频率 /%
				中蜂王浆 DNA	意蜂王浆 DNA	
S <sub>27</sub>	GAAACGGGTC	7	5	4	5	71.43
S <sub>101</sub>	GCTCGGACAA	5	4	2	3	80.00
S <sub>349</sub>	TGAGCCTCAC	3	0	0	0	0.00
S <sub>358</sub>	TGGTGGCACA	3	1	3	2	33.33
S <sub>378</sub>	CCTAGTCCAC	6	6	4	3	100.00
OPA-03	AGTCAGCCAC	8	8	5	4	100.00
总数多态 /%	32	24	18	17		75.00 56.25 53.12

### 3 讨 论

6 个引物在 2 种蜜蜂王浆 DNA 之间共扩增出 32 条片段,其中 24 条为多态。多态片段占总扩增片断的比例为 75.00%。所用的 6 个引物中:引物 S<sub>378</sub> 和引物 OPA-032 个扩增的谱带全为多态性片段,引物 S<sub>27</sub> 和引物 S<sub>101</sub> 扩增片段多态率大于 70%。同一引物

在不同种蜜蜂的王浆样品中得到一部分相同的扩增谱带,在一定的程度上说明中蜂和意蜂王浆 DNA 之间具有一定的同源性;同一引物在同种蜜蜂的不同王浆样品中得到不同的扩增谱带,提示在同一种蜜蜂的不同王浆样品的 DNA 之间具有一定的复杂性,其详细机理还有待于进一步探讨。

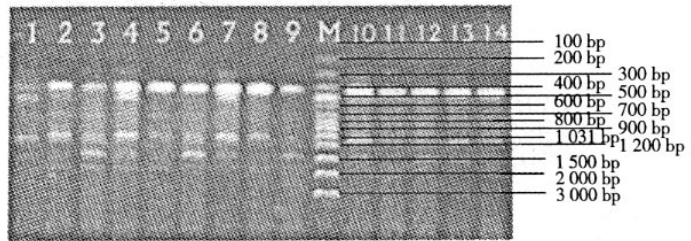


图 2 引物 S<sub>354</sub> 的扩增结果

Fig.2 PCR product of primer S<sub>354</sub>

注:1~7 为中蜂王浆 DNA 的扩增结果,8~14 为意蜂王浆 DNA 的扩增结果

### 参考文献:

[1] Echigo T, Takenaka T, Yatsunami K. Comparative studies on chemical composition of honey, royal jelly and pollen loads [J]. Bulletin of the Faculty of Agriculture, The Tamagawa University, 1986, 26: 1-12.  
 [2] Haydak M H. Honey bee nutrition [J]. Annual Review of Entomology, 1970, 15: 143-156.  
 [3] Howe S R, Dimick P S, Benton A W. Composition of freshly harvested and commercial royal jelly [J]. Journal of Apicultural Research, 1985, 24: 52-61.  
 [4] Marko P, Pecháníl, Vittek J, et al. Some phosphorus compounds in royal jelly [J]. Nature, 1964, 202: 188-189.  
 [5] 牛春艳, 申春玲, 李玉海, 等. 王浆核算含量的测定和核糖核酸的提取 [J]. 中国养蜂, 1979(6): 17-19.  
 [6] 张国防, 陈存及, 邢建宏. 樟树 RAPD 反应体系的优化 [J]. 江西农业大学学报, 2006, 28(3): 373-376.  
 [7] 江香梅, 温强, 叶金山. 江梅朱砂根群体遗传多样性 RAPD 分析 [J]. 江西农业大学学报, 2006, 28(5): 762-765, 779.  
 [8] 赵喜华, 张乐华, 王曼莹. 11 种杜鹃花 RAPD 分类学初步研究 [J]. 江西农业大学学报, 2006, 28(4): 544-547.  
 [9] 陈义挺, 赖钟雄, 郭志雄, 等. 枇杷主要种类的 RAPD 分析 [J]. 江西农业大学学报, 2003, 25(2): 258-261.  
 [10] 颜伟玉, 谢宪兵, 饶波, 等. 蜜蜂 DNA 提取纯化与 RAPD 反应体系的建立 [J]. 江西农业大学学报, 2003, 25(5): 783-786.