

家蚕基因特异性 CAPs 标记获得及其分子系统学应用

黄健华¹, 苗雪霞¹, 李木旺^{1,2}, 张 勇¹, 赵卫国², 黄勇平¹

(1. 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 上海 200032; 2. 中国农业科学院镇江蚕业研究所, 镇江 212018)

摘要:选取家蚕 *attacin* 和 *alpha-amylase* 基因序列, 设计特异性引物, 在家蚕品系 P50、C108 和子一代 (F₁) 中扩增。分别采用 4 种不同的限制性内切酶对扩增产物酶切, 最后每个基因都获得了一个 CAPs 分子标记。依据所得的两个 CAPs 分子标记对 12 个品系的家蚕遗传多样性进行了初步研究, 构建了其分子系统树。

关键词:家蚕; CAPs 标记; 多态; 酶切; 分子系统树

中图分类号: Q75

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2005)04-0584-05

The Acquisition of Two Silkworm CAPs Markers and Their Use in Genetic Diversity and Phylogenetic Relationship

HUANG Jian-Hua¹, MIAO Xue-Xia¹, LI Mu-Wang^{1,2}, ZHANG Yong¹,
ZHAO Wei-Guo², HUANG Yong-Ping¹

(1. Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China; 2. Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China)

Abstract: Cleaved amplified polymorphic sequence (CAPs) markers are based on PCR amplification of known genes, cDNA sequences or RAPD sequences. The PCR products are digested by restriction enzymes, generating the simple type of data as heterozygotes and homozygotes. Here we designed primers based on silkworm *attacin* and *alpha-amylase* genes, then digested the PCR products in silkworm strains P50, C108 and their progeny F₁ using 4 different restriction enzymes respectively. Furthermore, the genetic diversity and phylogenetic relationship of 12 silkworm strains were investigated using the obtained two CAPs markers.

Key words: *Bombyx mori* (L.); CAPs; polymorphism; enzyme digestion; molecular dendrogram

分子标记在生物体中具有数量丰富、遗传稳定以及操作简便等特点。目前, 分子标记在家蚕研究中被用于遗传图谱构建^[1~3]、分子遗传育种^[4, 5]和遗传多样性研究^[6, 7]等。到目前为止, 所采用的分子标记主要分为两类: 一类是以 Southern 杂交技术为核心的分子标记, 如 RFLP; 另一类是以 PCR 技术为核心的分子标记, PCR 技术因其简便、快捷高效等特点在分子标记技术的发展上受到了广泛的关

注, 如 AFLP、RAPD、SSR、ISSR 等等。本文提及的 CAPs (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) 也是一种以 PCR 为基础的分子标记 (又称为 PCR-RFLP)^[8, 9]。其基本步骤是: 先进行 PCR 扩增, 然后将 PCR 扩增产物用限制性内切酶酶切, 再用琼脂糖凝胶电泳将 DNA 片段分开, 用溴化乙锭染色、观察。CAPs 标记所采用的 PCR 引物是针对特定的基因序列而设计, 序列源自基因组数据库、cDNA 序列以及

收稿日期: 2004-08-10; 修回日期: 2004-09-06

基金项目: 上海市科学技术委员会基础研究重点项目基金 (编号: 03JC14077) 及中科院重要方向项目 (编号: KSCX2-SW-318) [Supported by Grants from Shanghai Commission of Science and Technology (No. 03JC14077) and Knowledge Innovation Program from Chinese Academy of Sciences (CAS) (No. KSCX2-SW-318)]

作者简介: 黄健华 (1980—), 男, 江苏人, 在读博士研究生, 研究方向: 昆虫功能基因研究。E-mail: jhhuang@iris.sipp.ac.cn

通讯作者: 黄勇平 (1963—), 男, 陕西人, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 昆虫功能基因研究。E-mail: yongping@iris.sipp.ac.cn; Tel: 021-54924047

致 谢: 本研究得到中科院昆明动物研究所细胞与分子进化开放实验室苟世康、吴世芳、林世英、朱春玲、庞俊峰、向余劲功、聂龙等老师在实验上的帮助, 谨致谢意!

已克隆的 RAPD 条带等。它揭示的是特异性 PCR 扩增片段中限制性酶切位点变异的信息,因而成为检测单核苷酸多态性的一种良好方法^[10]。目前 CAPs 标记因其稳定可靠、快速有效,并可实现自动化^[11],引起了国内外的关注,已被运用于生物有机体遗传多样性研究^[12,13]和品种鉴定^[14]。

本研究从 GenBank 数据库选取已知的家蚕 *attacin* 和 *alpha-amylase* 基因序列,通过 Primer premier 5 软件设计引物,在家蚕品系 P50、C108 及其子一代(F_1)中进行 PCR 扩增。分别选取 4 种不同的限制性内切酶对扩增产物进行酶解,获得了家蚕 *attacin* 和 *alpha-amylase* 基因的 CAPs 分子标记。并根据获得的标记在家蚕 12 个品系中进行了分析,构建了其分子系统树。

1 材料和方法

1.1 家蚕材料

P50;C108;(P50×C108) F_1 ;防 4;海南绵蚕;大草;华八三五;日 110;苏 16;三眠白卵;常德金黄;法 50B;镇江野蚕;甘肃种;Nisfari。所有品种均由中国农业科学院蚕业研究所家蚕品种基因库馈赠。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取

用常规苯酚/氯仿法,在采集到的家蚕后部丝腺中提取 DNA,−20℃ 保存备用。

1.2.2 引物的设计及 PCR 扩增,测序

GenBank 上得到家蚕 *attacin* 和 *alpha-amylase*

基因序列,用 Primer Premier 5 软件设计引物,并用 DNAClub 软件分析扩增产物的酶切位点。在 Techne Tc-412 PCR 仪上进行扩增。

对家蚕 *alpha-amylase* 基因的两个亲本 P50, C108 扩增产物进行测序。

1.2.3 扩增产物的酶切

分别以两个亲本 P50、C108 及其子一代(F_1)个体基因组 DNA 为模板,经 PCR 扩增的产物,用限制性内切酶酶切。酶切反应体系 20 μ L,含有 3 μ L PCR 扩增产物,2 μ L 缓冲液,0.5 μ L 的内切酶,14.5 μ L 的 ddH₂O,酶切 2 h 以上,然后加入 4 μ L 溴酚蓝在 2% 琼脂糖凝胶上电泳(1×TAE 电泳缓冲液),170 V,25 min,溴化乙锭染色,凝胶成像仪成像。

1.2.4 用 popgene V3.2 进行遗传多样性分析

将获得的两个家蚕 CAPs 分子标记,在家蚕 12 个品系中进行扩增,分别用限制性内切酶酶切,获得的带型统计结果用 popgene V3.2 (<http://www.ualberta.ca/~fyeh/index.htm>) 软件按类平均数聚类方法(UPGMA)进行聚类分析。

2 结果分析

2.1 引物序列和单酶切位点的分布

依据家蚕的两个已知基因 *attacin* 和 *alpha-amylase* 序列,分别设计了一对引物序列,并用 DNAClub 软件分析了扩增产物的限制性内切酶酶切位点,对每个基因分别选取 4 个酶切位点,且是单酶切位点,这样有利于基因型分析和数据统计(表 1)。

表 1 基因 *attacin* 和 *alpha-amylase* 的基因登录号、扩增引物以及酶切种类

Table 1 The GenBank Accession number, primer sequences and single enzyme site of the silkworm *attacin* and *alpha-amylase* genes

基因名称 Gene	登录号 Accession number	引物序列(5'→3') Primer sequences (5'→3')	单酶切位点 Single enzyme site
<i>attacin</i>	D76418	ATTF: ATGAGATAATAATGTATGGAGGTTTT ATTR: GATGAGGAATGATGTTGGGAA	<i>Alu</i> I <i>Dra</i> I <i>Mbo</i> I <i>Mlu</i> I
<i>alpha-amylase</i>	U07847	ALPF: AGGATAATACTTGCGGTAATGG ALPR: GCGGTGGATGATACGAGC	<i>Hae</i> III <i>Sac</i> II <i>Bcl</i> I <i>Stu</i> I

2.2 CAPS 标记的鉴定

引物 ATTF、ATTR 和 ALPF、ALPR 分别在家蚕 P50、C108 和子一代(F_1)中进行 PCR 扩增,都能扩增出单一条带(图 1),长度分别约为 658 bp 和 799 bp,说明该基因片段本身没有多态性。而对 *attacin* 基因扩增产物用 *Alu* I, *Dra* I, *Mbo* I 和 *Mlu* I 4 种限制性内切酶酶切,发现内切酶 *Mlu* I 不

能酶切 C108 的扩增产物。同样,我们对家蚕 *alpha-amylase* 基因扩增产物用 *Hae* III, *Sac* II, *Bcl* I 和 *Stu* I 等 4 种限制性内切酶酶切,发现 *Bcl* I 酶也不能切开 C108 的扩增产物(图 2)。因此这是两个家蚕基因在 P50 和 C108 间特异性的 CAPs 标记,从遗传模式可以看出 CAPs 标记为共显性标记。同时,我们将家蚕 *alpha-amylase* 基因在 P50 和 C108

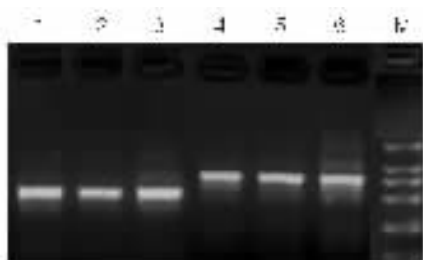


图 1 两个基因的扩增图谱

1: P50; 2: C108; 3: F₁; 4: P50; 5: C108; 6: F₁。
 I 组: 1~3 为家蚕 *attacin* 基因; II 组: 4~6 为家蚕 *alpha-amylase* 基因。M: Marker, 从上到下依次为 2 000 bp, 1 000 bp, 750 bp, 500 bp, 250 bp 和 100 bp。

Fig.1 The PCR amplified products

1: P50; 2: C108; 3: F₁; 4: P50; 5: C108; 6: F₁。 I group: 1~3 silkworm *attacin* gene; II group: 4~6 silkworm *alpha-amylase* gene. M: marker from top to down: 2 000 bp, 1 000 bp, 750 bp, 500 bp, 250 bp and 100 bp.

品系中 PCR 扩增产物的测序结果和 GenBank 中的序列,用软件进行分析比较(图 3),发现在 C108 中 *Bcl* I 限制性内切酶的酶切碱基位点发生了突变(TGATCA->TGACCA),和酶切实验结果相吻合。

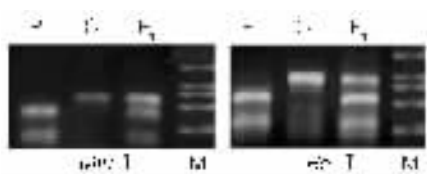


图 2 家蚕 *attacin* 和 *alpha-amylase* 基因扩增产物分别用 *Mlu* I 和 *Bcl* I 限制性内切酶酶切多态图谱

M: Marker 从上到下依次为 2 000 bp, 1 000 bp, 750 bp, 500 bp, 250 bp 和 100 bp。

Fig.2 The products of silkworm *attacin* and *alpha-amylase* genes digested by *Mlu*I and *Bcl*I respectively

M: marker from top to down: 2 000 bp, 1 000 bp, 750 bp, 500 bp, 250 bp and 100 bp.

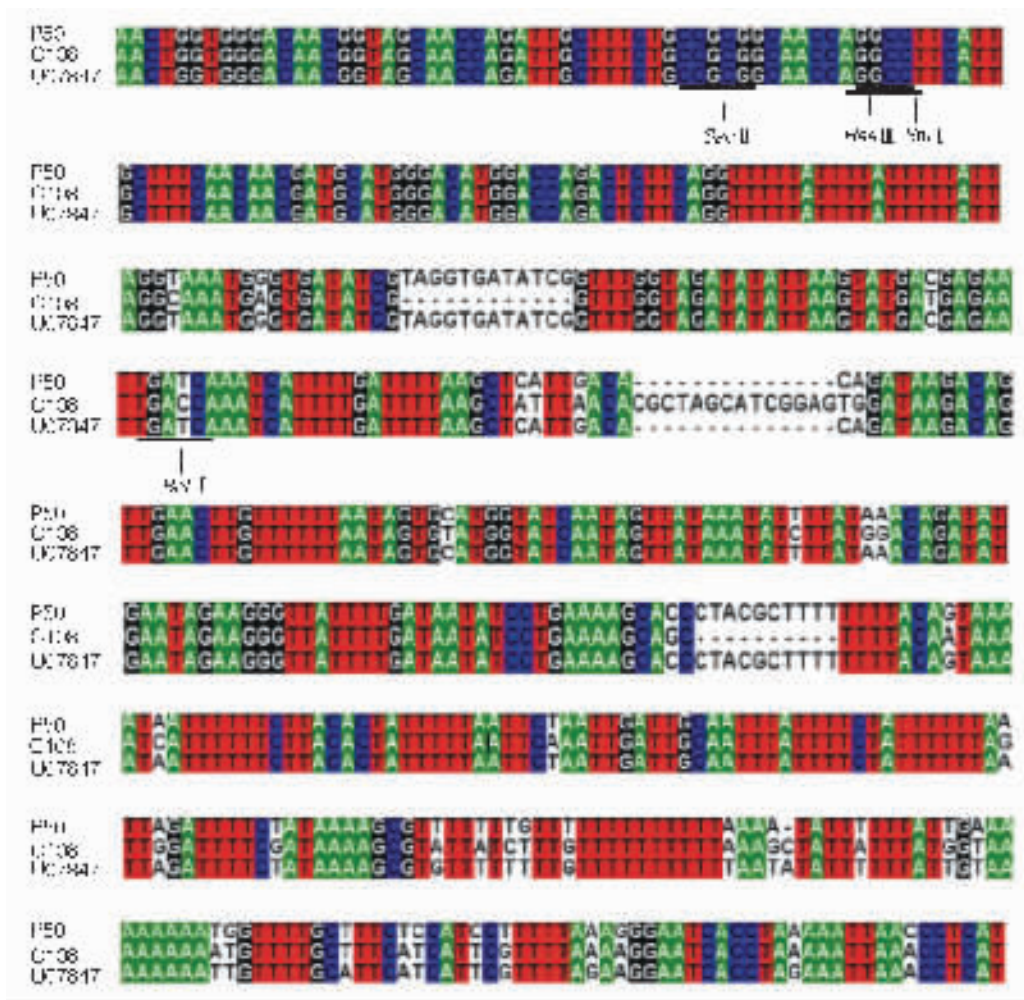


图 3 家蚕 P50, C108 的 *alpha-amylase* 基因和网上同源基因 U07847 的序列比较

Fig.3 Comparison of silkworm *alpha-amylase* gene sequence between P50, C108 and homologue sequence U07847 on GenBank

2.3 CAPs 标记在品系进化中的初步分析

为进一步研究 CAPs 分子标记在家蚕品种鉴定和分子系统学研究中的应用,用获得的 2 个 CAPs 分子标记对家蚕 12 个品系进行分析,发现家蚕 *attacin* 基因的 CAPs 分子标记在 12 个品系间的扩增产物是单一的条带,没有多态性;而 *alpha-amylase* 基因的 CAPs 分子标记在 12 个品系间的扩增产物本身具有 PCR 多态性(图 4,B)。依据酶切产物的电泳胶图中每一等位基因上的酶切情况,对 *attacin* 基因有 3 种基因型,不具备该酶切位点记为 AA, 都具备该酶切位点记为 BB, 杂合型记为 AB; 对 *alpha-amylase* 基因检测到 4 种基因型, 不具备该酶切位点的长片段记为 AA, 不具备该酶切位点的短片

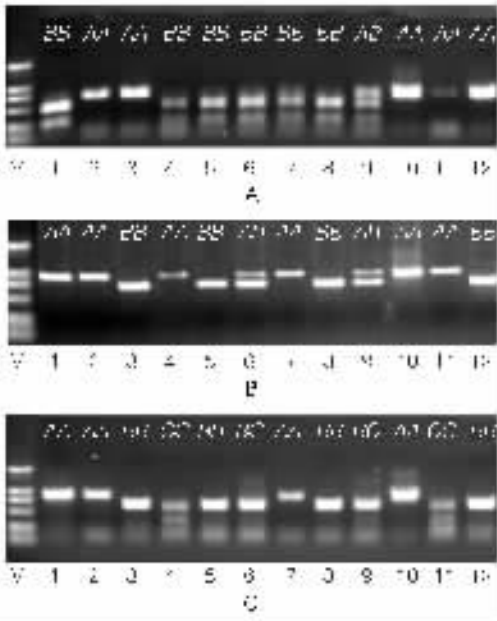


图 4 家蚕 12 品系 CAPs 标记酶切图谱

A: *attacin*/Mlu I ;B: *alpha-amylase* PCR 扩增多态;
C: *alpha-amylase*/Bcl I 。1:防 4; 2:海南绵蚕;
3:大草;4:华八三五;5:日 110;6:苏 16;7:三眠白卵;
8:常德金黄;9:法 50B;10:镇江野蚕;11:甘肃种;
12:Nisfari;M: marker, 从上到下依次为 2 000 bp、1 000 bp、
750 bp、500 bp、250 bp 和 100 bp。

Fig.4 Two CAPs markers showed the polymorphism among 12 silkworm strains

A: *attacin*/Mlu I ;B: *alpha-amylase* PCR polymorphism; C: *alpha-amylase*/Bcl I .

1: Fang 4; 2: Hainan mianjian; 3: Da cao; 4: Hua ba san wu;
5: Ri 110; 6: Su 16; 7: M3 white egg; 8: Changde jinhuang;
9: Fa 50B; 10: Zhenjiang mandarina; 11: Gansu strain;
12: Nisfari. M: marker, from top to down: 2 000 bp, 1 000 bp,
750 bp, 500 bp, 250 bp and 100 bp.

段记为 BB, 都具备该酶切位点的为记 CC, 杂合型记为 BC, 另外两种杂合型等位基因 AB 和 AC 在该 12 品系中未被发现(图 4, A、C)。对统计所得数据用 popgene V3.2 进行聚类分析, 初步建立了其 UPGMA 树状图(图 5)。

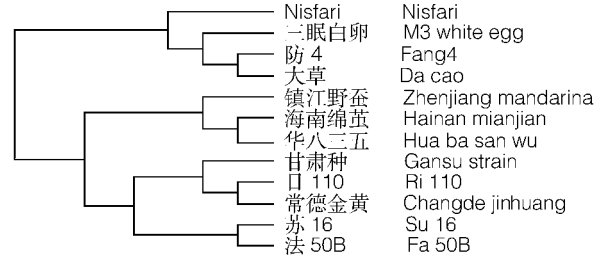


图 5 12 个家蚕品系的亲缘关系聚类图

Fig.5 UPGMA clustering of 12 silkworm, *Bombyx mori* ecotypes based on 2 CAPs markers

3 讨论

家蚕是我国重要的经济昆虫,其分子标记辅助育种工作是一项十分重要的内容。相对于其他一些分子标记的费时费力和重复性差^[15]等缺点, CAPs 分子标记是比较简便的一种方法,而且在基因组中亦广泛存在,并可实现自动化操作^[11]。另外 CAPs 分子标记是针对已知基因或 cDNA 序列所得到的,功能都是已知的,优点是可将它和家蚕分子标记遗传图谱以及传统的形态遗传图谱相互整合,获知这些基因在染色体上的具体位置,从而能够准确定位基因,具有极高的创新价值。

CAPs 标记对于检测基因的染色体变化特别是单核苷酸的变异十分灵敏,因而在基因水平上进行生物体遗传多样性研究有着广泛的应用前景。生物种群随着生态和环境的变化,在基因水平上不断地变化与发展,以满足自身的持续发展需要。本实验运用基因 *attacin* 和 *alpha-amylase* 的 CAPs 标记对家蚕的系统进化作了初步的研究,如图 5 所示,两个标记将 12 个品种聚成两大类,在第一大类由中国种和印度种组成,唯一的印度种 Nisfari 与其他的中国种距离更远一些;在第二大类中,由中、日、欧 3 大地理系统和镇江野蚕组成,欧系品种法 50B 和其他品种距离较远,其次是镇江野蚕和其他家蚕品种距离也比较远,这些结果与常规形态学上的遗传关系有一定的吻合,我们更有理由相信只要增加分子标记的数量,就能够得到较完善的有关家蚕不同地理

品种、化性、眠性等相关的系统进化树,能够为家蚕的起源和进化提供更多的有用信息。

参考文献(References):

- [1] Yasukochi Y. A dense genetic map of the silkworm, *Bombyx mori*, covering all chromosomes based on 1018 molecular markers. *Gene-tics*, 1998, 150(4): 1513~1525.
- [2] LI Bin, LU Cheng, ZHOU Ze-Yang, XIANG Zhong-Huai. Construction of silkworm RAPD molecular linkage map. *Acta Genetica Sinica*, 2000, 27(2): 127~132.
李斌,鲁成,周泽扬,向仲怀. RAPD 标记构建家蚕分子连锁图. *遗传学报*, 2000, 27(2): 127~132.
- [3] Tan Y D, Wan C, Zhu Y, Lu C, Xiang Z, Deng H W. An amplified fragment length polymorphism map of the silkworm. *Gene-tics*, 2001, 157(3): 1277~1284.
- [4] Chatterjee S N, Pradeep A R. Molecular markers (RAPD) associated with growth, yield and origin of the silkworm, *Bombyx mori* L. in India. *Genetica*, 2003, 39(12): 1612~1624.
- [5] Chatterjee S N, Mohandas T P. Identification of ISSR markers associated with productivity traits in silkworm, *Bombyx mori* L. *Genome*, 2003, 46(3): 438~447.
- [6] Nagaraju J, Reddy K D, Nagaraja G M, Sethuraman B N. Comparison of multilocus RFLPs and PCR-based marker systems for genetic analysis of the silkworm, *Bombyx mori*. *Heredity*, 2001, 86(Pt 5): 588~597.
- [7] LIU Chun-Yu, CHEN Yuan-Lin, GUI Mu-Yan, ZHANG Chun-Ling. Studies on the mechanism of variations of hybrids of domesticated silkworm and Eri silkworm-RAPD analysis of genome. *Hereditas*(Beijing), 1998, 20(2): 5~8.
刘春宇,陈元霖,桂慕燕,张春玲. 家蚕与蓖麻蚕杂交后代变异机理探讨: 基因组 RAPD 检测. *遗传*, 1998, 20(2): 5~8.
- [8] Konieczny A, Frederick M A. A procedure for mapping *Arabi-*

dopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *The Plant Journal*, 1993, 4(2): 403~410.

- [9] Baumbusch L O, Sundal I K, Hughes D W, Galau G A, Jakobsen K S. Efficient protocols for CAPs-based mapping in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2001, 19(3): 137~149.
- [10] Neff M M, Neff J D, Chory J, Pepper A E. dCAPs, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. *The Plant Journal*, 1998, 14(3): 387~392.
- [11] Scott D M, Amasino R M. A robust method for detecting single-nucleotide changes as polymorphic markers by PCR. *The Plant Journal*, 1998, 14(3): 381~385.
- [12] Barth S, Melchinger A E, Lubberstedt T. Genetic diversity in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. investigated by cleaved amplified polymorphic sequence (CAPs) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Ecology*, 2002, 11(3): 495~505.
- [13] Kaundun S S, Matsumoto S. Development of CAPs markers based on three key genes of the phenylpropanoid pathway in tea, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, and differentiation between assamica and sinensis varieties. *Theor Appl Genet*, 2003, 106(3): 375~383.
- [14] YU Bo-Lan, HUANG Zhao-Feng, ZHOU Wen-Juan, ZHANG Wen-Jun. The creation of 1H chromosome-specific CAPs and ASA markers of barley. *Acta Genetica Sinica*, 2001, 28(6): 550~555.
余波澜,黄朝峰,周文娟,张文俊. 大麦 1H 特异性 CAPs 标记和 ASA 标记的创制. *遗传学报*, 2001, 28(6): 550~555.
- [15] Koebner R M D. Generation of PCR-based markers for the detection of rye chromatin in a wheat background. *Theor Appl Genet*, 1995, 90(5): 740~745.

欢迎订阅 2006 年《中国生物防治》

《中国生物防治》是中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所和中国植物保护学会主办的学术期刊。是全国中文核心期刊,被国内外多家重要的检索系统与数据库收录。内容涉及农、林、牧、水产、卫生和环境科学等领域中的有害生物,如昆虫、病毒、细菌、真菌、线虫、杂草等的生物防治技术及其机理研究。

主要栏目:研究报告、专题综述、基础知识与实验技术、研究简报、国外生防等。

读者对象:农林牧、贮粮、卫生各领域的科研、教学、各级管理干部、开发人员,大学生、研究生、中学生物教师、基层技术骨干等。

《中国生物防治》季刊,16开,64页。国内邮发代号 2-507。每册定价 10 元,全年 40 元,全国各地邮局均有订售。

编辑部尚存 1985~2004 年过期刊(2~5 元/册),2000、2002、2004、2005 年增刊(10 元/册),1985~2004 年精装合订本 1~20 卷(卷价分别为 2003、2004 年 40 元,其余年 30 元),(均含邮费),欢迎来函订购。

地址:北京中关村南大街 12 号,中国农科院农业环境与可持续发展研究所《中国生物防治》编辑部,邮编:100081。

电话:010-68919774, E-mail: zhangxl@cjac.org.cn; yangxl@cjac.org.cn。