

芹菜中核酸内切酶 CEL I 的提取和应用概述

李荣华, 曾凡逢, 郭培国*, 郑燕玲, 缪申裕, 陈建辉, 柯德森, 谢国文

(1. 广州大学生命科学学院, 广东广州 510006; 2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要 CEL I 是从芹菜中分离出来的一种单链特异性核酸酶, 属于 S1 核酸内切酶家族中的一种, 能准确切割异源双链 DNA 错配位点。概述了 CEL I 酶的分离技术及其在发现单核苷酸多态性 (SNP) 方面的应用, 为从事动、植物及人类遗传研究的科技工作者提供参考。

关键词 CEL I 核酸酶; 提取; 单核苷酸多态性; 应用

中图分类号 S636.3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)25-10803-04

A Summary of the Extraction and Application of Endonuclease CEL I in Celery

LI Rong-hua et al (College of Life Science, Guangzhou University, Guangzhou, Guangdong 510006)

Abstract CEL I is a kind of single-strand specific nuclease isolated from celery, belonging to one kind of S1 endonuclease family. It could cut the mismatch sites of heteroduplex DNA. The separation technology of CEL I enzyme and its application in single nucleotide polymorphisms were summed up. It provided references for the scientific workers engaged in the genetics research of plant, animal and human beings.

Key words CEL I nuclease; Extraction; Single nucleotide polymorphism; Application

CEL I 是 1998 年发现的一种单链特异性核酸酶 (Single-strand specific nuclease)^[1], 其等电点为 6.0~6.5, 分子量为 43 kDa, 催化活性需要 Mg^{2+} 和 Zn^{2+} 的参与^[2], 属于 S1 核酸内切酶家族中的一种, 为胞内酶^[3]。单链特异性核酸酶主要应用于清除 DNA 或 RNA 双链分子存在的单链^[4], 这类酶如 S1 核酸酶和绿豆核酸酶在 20 多年前就已广泛应用于切割双链 DNA 分子中的末端单链悬突^[5], 它们具有相同的关键残基和类似的结构, 但是在切割单核苷酸碱基对时表现出较大的差异^[6]。一些早期的研究表明, 这类酶可以切割异源双链 DNA 分子中的错配位点^[4, 7], 但是随后的研究表明这种切割是不可行的^[8-9]。一个重大的进步是美国宾夕法尼亚州 Fox Chase 癌症研究中心的 Yeung 博士和他的同事从芹菜中提取出来一种单链特异性核酸酶 CEL I 酶, 能较好地从 3' 端切割异源双链 DNA 分子中错配的单核苷酸碱基对^[1]。这个发现解决了低成本、高通量发现 DNA 序列中 SNP 等多态性技术的瓶颈, 在此基础上, 用 CEL I 酶结合 LI-COR DNA 序列分析仪 (LI-COR, USA) 或 ABI 遗传分析仪 (Applied Biosystem, USA) 开发出的 Tilling 和 Ectilling 技术, 可以发现大量基因组序列中存在的点突变^[10]。现在, 这种技术已成为反向遗传学研究中探讨基因功能的较佳方法之一, 并在多种不同动、植物 (如拟南芥、玉米、水稻、斑马鱼) 突变群体和自然群体多态性的研究工作中取得了不少成绩^[11-13]。因此, 活力高和稳定性好的核酸内切酶 CEL I 是从事这方面研究工作的保障, 探讨芹菜中 CEL I 酶的提纯和应用十分有意义。

1 CEL I 核酸内切酶的分离纯化

1.1 CEL I 分离纯化的意义 由于 CEL I 酶是目前生物界发现的唯一能准确切割异源双链 DNA 中存在错配位点的酶^[13], 在遗传学研究和应用领域中扮演重要的角色, 具有广阔的应用前景。美国环球基因有限公司 (Transgenomic, Inc.)

与 Yeung 研究小组合作, 生产了以 CEL I 酶为核心成分的 SURVEYOR 试剂盒。利用此试剂盒, 结合双色变性聚丙烯酰胺凝胶电泳技术, 能大量准确地发现特定区域或基因突变产生的 SNP 等多态性^[14]。目前此酶及反应的试剂盒已在我国上市 (参见网站: <http://www.transgenomic.com.cn>), 但是购买此酶的费用很高, 仅 100 个反应的 CEL I 需 800 美元; 另外, 该公司所生产的酶未解决好稳定性问题, 即使使用干冰 (-70 左右) 运输到我国, 该酶也基本上失去了应有的活性; 因此, 在国内难以购买到质优价廉的 CEL I。这样, 探讨芹菜中 CEL I 酶的提纯和应用十分有意义。

1.2 CEL I 分离纯化的步骤 任何一种酶的分离纯化都应遵循其物理化学特性, 选择适当的分离方法和分离介质, 在此基础上, 才能抛弃或减少多次长时间使用高速、超速冷冻离心和多次使用层析和凝胶过滤的传统提取方法, 提高提取的效率。

就 CEL I 的分离和提取方法来讲, Oeykowski 等在 1998 年首先报道了从芹菜中提取 CEL I 的技术^[1]。随后, 很多科技工作者对提取此酶的方法进行了改进^[2-3, 12], 其中 Yang 等的提取方法被广泛接受, 其 CEL I 酶提纯过程如表 1 所示^[3]。从表 1 可看出, 79.34 L 的粗提液, 总酶活力为 1.9×10^7 U, 经过 8 次纯化, 最终获得 0.5 ml 的纯酶, 酶的比活力从原来的 9.7×10^2 U/ng 升至 3.1×10^7 U/ng, 纯度提高 33 000 倍; 酶活力从原来的 1.9×10^7 U 减至 3.1×10^5 U, 回收率为 1.63%。

1.3 CEL I 核酸内切酶分离纯化的局限性 现有报道 CEL I 核酸内切酶的提取方法比较复杂, 如多次长时间使用高速、甚至超速离心步骤, 多次使用凝胶过滤和离子交换层析等复杂的过程, 此外酶的回收率也较低 (低于 10%), 酶的纯度不高, 易产生蛋白聚集现象, 导致酶的贮存及酶活性不稳定, 在使用上存在不少问题。

1.4 分离纯化 CEL I 酶的设想与实施 从我国利用 CEL I 酶从事反向遗传学研究 (如探讨基因多态性和基因功能的关系)、人类疾病的个性化诊断、分子标记辅助育种等研究和应用情况来看, 目前已有介绍国外这方面研究工作的文章^[15-17], 利用此酶的研究工作刚刚起步 (如油菜的 948 项目研究, <http://cpst.hzau.edu.cn/yc/xiangmu.aspx>), 在今后几年

基金项目 国家自然科学基金项目 (30640045); 教育部留学回国人员科研启动基金项目 [(2007) 1108]; 广州市科技局科技计划 [(2007J)-C0111]; 广州市教育局科研项目 (62002); 广州市留学回国人员科研启动基金项目 (200703)。

作者简介 李荣华 (1966-), 女, 云南红河人, 在读硕士, 实验师, 从事作物功能基因组学和分子育种的研究。* 通讯作者, 博士, 教授, E-mail: guopg@yahoo.com.cn。

收稿日期 2008-06-16

中它将成为我国从事相关研究和应用工作的热点。因此, CEL I 酶在我国将具有广阔的应用前景, 市场潜力很大。而芹菜中 CEL I 酶提取及其稳定性的研究工作, 从我国已有的报道来看, 仅有 2 篇关于 CEL I 粗酶提取的相关报道^[18-19]。

但从他们的提取方法来看, 只是简单地重复国外的方法。因此, 研究得出高纯度、高稳定性的 CEL I 酶, 以及在此基础上开发出我国利用 CEL I 酶来大量发现 SNP 等多态性的试剂盒, 将具有广阔的应用前景。

表 1 从芹菜中分离、提纯 CEL I 酶的分步及酶活力得率³⁾

Table 1 The fractional steps and enzyme activity yield of separating and purifying CEL I enzyme from celery

步骤	总体积 L	蛋白总量 ng	总活力 U	比活力 U ng	提纯倍数
Step	Total volume	Total amount of protein	Total activity	Specific activity	Purification multiple
Buffered juice	79.34	19 399	1.9×10^7	9.7×10^2	
25% (NH ₄) ₂ SO ₄ supernatant	70.56	17 005	1.6×10^7	9.2×10^2	1.0
80% (NH ₄) ₂ SO ₄ pellet	8.00	2 072	9.0×10^6	4.4×10^3	4.5
Con A Sepharose 4B	2.50	6.750	3.6×10^6	5.4×10^5	553.8
DEAE Sephacel	0.12	2.690	2.4×10^6	8.8×10^5	907.6
Phosphocellulose P 11	0.48	0.408	1.5×10^5	3.8×10^6	3 854.0
Phenyl Sepharose CL 4B	0.34	0.054	5.6×10^5	1.0×10^7	10 676.0
Mono Q	0.03	0.030	3.6×10^5	1.2×10^7	12 316.0
Superdex 75	0.000 5	0.005	3.1×10^5	3.1×10^7	33 000.0

鉴于 CEL I 酶在反向遗传学研究中的重要作用及目前分离纯化 CEL I 酶的限制性, 笔者提出分离纯化 CEL I 酶的工艺流程设想与实施步骤, 如图 1 所示。

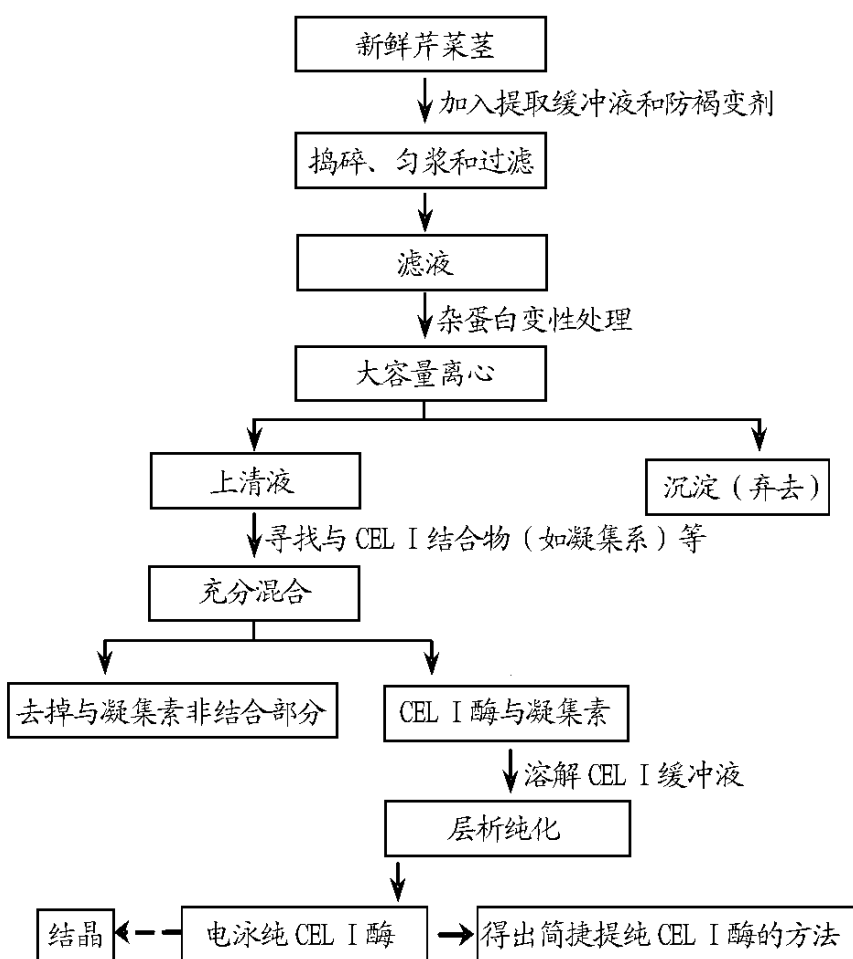


图 1 分离纯化 CEL I 酶的工艺流程设想

Fig. 1 The technological process assumption for separating and purifying CEL I enzyme

该技术路线在充分利用 CEL I 酶物理和化学性质的基础上, 研究如何减少和清除提取液中有色物质, 选用某种或几种物理化学的方法使更多的杂蛋白快速沉淀, 或反之使 CEL I 酶快速沉淀, 其中以低速(或短时间高速)大容量离心代替高成本和长时间的高速或超速冷冻离心; 探讨采用何种物质(如凝集素)、方式和方法在不减少 CEL I 酶回收率的前提下进一步地纯化 CEL I 酶; 筛选出适宜的凝胶或离子交换剂进行一次层析获得电泳纯 CEL I 酶, 以替代多次高速甚至超速冷冻离心、多次凝胶过滤和离子交换层析等费时和高成本且妨碍大量生产的提纯步骤。根据这种思路, 经过近 2 年的研

究, 已获得了较好的研究结果(数据待发表)。

2 CEL I 酶在发现 SNP 中的应用

单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP)是指近缘种群或同种个体在基因组水平或某一特定遗传位点中由单个核苷酸(A、T、G、C)替换引起的单核苷酸差异^[20], 而定向诱导基因组局部突变(Targeting induced local lesions in genomes, Tilling)和 Ectilling(Tilling 技术在自然群体中的应用)技术是近年来研发出的一种寻找 SNP 等多态性的全新技术方法^[13], 具有高的准确性、低花费、快速大量地发现突变群体或自然群体中特定区域 DNA 分子的变异, 如 DNA 序列中的 SNPs、小的插入和缺失等, 可获得单个基因或某个蛋白保守结构域的突变与功能之间的关系^[11-13]。这种技术方法的关键点之一是利用芹菜中的 CEL I 核酸内切酶切割异源双链(Heteroduplex) DNA 错配位点来发现 DNA 序列中的 SNP。

SNP 在真核生物的基因组中具有分布广泛、密度高、稳定性好、通常具二等位基因(Biallele)的特性, 基本上克服了 RFLP、AFLP 和 SSR 等分子标记存在的不足, 适合进行高通量自动化的基因分型^[13, 21]。目前 Tilling 和 Ectilling 技术方法已成为发现基因或染色体上特定区域点突变的一种重要手段, 在功能基因组学、人类疾病诊断、作物遗传改良与分子育种、精细遗传和物理图谱的构建与整合、生物多样性与进化遗传学等领域具有广阔的应用前景^[20-21]。

具体讲来, 利用芹菜中核酸内切酶 CEL I 来发现 SNP, 可以直接应用于以下几个方面。

2.1 基于连锁不平衡的关联分析 在基于连锁不平衡基础上针对复杂性状进行关联分析时, SNP 被考虑作为最适合的分子标记^[21]。在分析多基因控制的性状时, 可用于发现候选基因或基因组特定区域的 SNP 及与表型的关联关系, 获得候选基因与表型性状的关联程度。例如建立 SNP 与表型(如人类疾病)之间的联系, 可得出某些 SNP 或 SNP 单体型与特定疾病、特定地区发病人群乃至个别患者的相关性, 疾病的诊断和治疗将更有针对性, 可以做到个体化诊治。

近几年来, SNP 已在人类遗传病、药学以及肿瘤研究中得到了应用, 如 Zhou 等利用 2 条常染色体上的 20 个 SNPs, 使用

荧光定量PCR 的方法,检测早期结肠癌患者的等位位点来判断病人预后^[22]。在大规模或全基因组范围内检测SNPs 与疾病相关性方面,Möhrenweiser 等使用高密度SNP 芯片(包含近1 500 个SNPs),在全基因组范围内检测了膀胱癌患者的SNPs 发生情况^[23],这种全基因组范围内的SNPs 分析具有潜在的预后和诊断价值。

2.2 在功能基因组学中的应用 功能基因组学的主要内容将是充分了解动、植物和人类基因组DNA 序列的变异(主要是SNP),进而揭示某些特异性状如人类多基因疾病和其他生物学性状的遗传学基础。利用CELI 发现的SNP,可以促进基因组学性状表达的基因网络研究,了解基因、环境与表型的内在联系,加速突变体的筛选并掌握其遗传信息。如动、植物反向遗传学研究中采用Tilling 和Ectilling 方法,可发现基因SNP/ 单体型(Haplotype) 与表型的关系,了解多基因控制复杂性状之间的联系及某一功能基因突变后对表型的影响,在发现SNP 的同时还可进行基因分型。如利用SNP 发现对氧磷酯酶1 (Paraoxonase 1) 基因的SNP 与阿尔茨海默(Alzheimer) 病密切相关^[24],N 乙酰基转移酶II 基因中的SNP 与局限性肠炎(又称克罗恩病,Crohn's Disease) 密切相关^[25]。

在药物基因组学研究中,通过检测SNP 可揭示人群中不同个体对药物敏感性差异的根本原因。不同的人群、个体由于不同的遗传背景而对某些药物具有不同的反应性,据美国1994 年的报告,因药物副作用而入院患者达200 万人,因药物副作用而死亡的人数达10 万人^[26]。由于SNP 不仅可以作为遗传标记,通过连锁或关联分析定位疾病易感基因,以及研究其与药物反应性的关系,而且有些SNP 本身就可直接导致疾病或引起药物 毒物反应性的差异。一些SNP 被发现与抗癌和抗焦虑药物的敏感性相关^[27],因此,在使用某种药物之前,进行个体SNP 分析,是预防药物副作用,提高疗效的关键。这种以基因分型为基础的医疗将随着功能基因组时代的到来而一天天向我们走近。

在植物功能基因的SNP 研究中,近年来已取得了不少的成绩,如发现小麦 Wx-D1 基因(编码结合在淀粉粒上的淀粉合成酶,Granule bound starch synthase I) 中的SNP 是影响小麦淀粉特性的重要原因^[28],功能基因中的SNP 改变玉米谷粒成分和淀粉含量^[29],玉米中八氢番茄红素合成酶(Phytoene synthase) 基因中的SNP 单体型决定籽粒颜色^[30],小麦 Glu-D1 位点上高分子量麦谷蛋白x- 型基因启动子区域的一个SNP 与高分子量麦谷蛋白亚单位1Dx5 和1Dy10 关联^[31],与水稻低温抗性相关的交替氧化酶基因中SNP 导致了水稻对低温抗性的改变^[32],大麦 CxP I 基因(编码丝氨酸羧基酶I) 位点上的SNP 能很好地检测丝氨酸羧基酶基因的表达量和麦芽的品质^[33],一个cDNA 片段中的SNP 与辣椒的辛辣程度密切相关^[34]等。

2.3 DNA 指纹的确立 传统的DNA 指纹分析主要是采用RFLP、AFLP 和SSR 等方法,由于SNP 基本上克服了这些分子标记存在的不足^[13,21],可用于物种鉴定、物种起源与亲缘关系、遗传育种等领域;也可用于法医研究中的罪犯身份鉴别、亲子鉴定等。如Gimes 等对红色头发的研究中,通过对犯罪现场罪犯所遗留的生物检材的特殊SNP 位点进行分型,可以

提供罪犯的一些外在特征,如头发的颜色、眼睛的颜色等^[35];此外在器官移植中供体和受体间的配对选择及物种进化的应用和研究中都具有重要意义。

2.4 群体遗传学和连锁不平衡 利用SNP 标记能详细和快速地研究群体的组成及其相互关系,能有效地分析基因型和表型之间的关系。

由于人类自然群体中连锁不平衡值通常较小且易衰减(一般间隔大于1.0 cM 的基因间连锁不平衡很少出现),因此,许多学者致力于应用近期的群体混合行为产生的连锁不平衡作为检测基因连锁的可行性研究策略。在1988 年就有学者率先提出该策略的基本思路^[36],随后Biscoe 等在1994 年从理论研究和模型试验两方面对该策略进行了发展^[37]。迄今为止,与群体的连锁不平衡水平紧密相关的单体型频率广泛应用于基因定位的研究中。

2.5 遗传图谱的构建 建立精细的遗传连锁图谱需要分布广泛、密度高和稳定性好的遗传标记,而SNP 正是这一类型的分子标记。因此,利用SNP 构建的遗传连锁图在作物上能将数量特性位点(QTL) 定位于更小的染色体区域内,更有利于分子标记辅助选择育种(MAS);在人类疾病的遗传连锁分析中,可用于疾病易感基因定位,其定位的精度将比微卫星标记精细得多,可直接用于指导易感基因克隆等。如Nasu 等建立了213 个共显性的遍布于整个水稻基因组SNP 分子标记,并将94 个SNP 整合到已有的遗传图谱中分布在全部12 条染色体上^[38]。此外,Guo 等利用大麦的SNP 及其他分子标记,在构建遗传连锁图谱的基础上,发现了一些与抗旱性相关的数量特性位点^[39]。

2.6 生物多样性分析 SNP 同样适用于分析生物界的进化与进化过程中物种多样性的形成、基因组的突变以及突变的选择等。

众所周知,水稻 Wx 基因是决定糯性强弱的主要因子,该基因存在GT 型(即AGGT 和AGTT) 的SNP。Yanaraka 等在大量分析的基础上发现AGGT 来自粳稻,而AGTT 来自籼稻,指出该SNP 可作为判断糯性强弱及籼粳稻遗传进化的一个标记;同时研究还得出籼粳杂交选育出的水稻品种中鲜见AGGT 的原因,即人们在种植过程中偏好AGTT 类型的品种而使得它在栽培品种中占优势^[28]。Varshney 等利用遗传背景差异大的6 个国家大麦地方品种作为研究材料,获得了一些具有基因信息的SNPs,利用这些SNPs,分析了它们的单体型与遗传相似性的关系,确定出可以用来作为大麦遗传多样性分析的分子标记^[40]。

参考文献

- OLEYKOWSKI C A, BRONSON M L L I N S C R, GODWIN A K, et al. Mutation detection using a novel plant endonuclease[J]. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26: 4597- 4602.
- TILL B J, BURDNER C, COMI L, et al. Mismatch cleavage by single-strand specific nucleases[J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32: 2632- 2641.
- YANG B, WEN X, KODALI N S, et al. Purification, cloning, and characterization of the CELI nuclease[J]. *Biochemistry*, 2000, 39: 3533- 3541.
- SHENK T E, RHODES C, RIGBY P W, et al. Biochemical method for mapping mutational alterations in DNA with S1 nuclease: the location of deletions and temperature sensitive mutations in simian virus 40[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1975, 72: 989- 993.
- HENKOFF S. Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing[J]. *Gene*, 1984, 28: 351- 359.
- SOKURENKO E V, TCHESNOKOVA V, YEUNG A T, et al. Detection of simple

- mutations and polymorphisms in large genomic regions[J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29:111.
- [7] AHMAD A, HOLLOWAN WK, HOLLIDAY R. Nuclease that preferentially inactivates DNA containing mismatched bases[J]. *Nature*, 1975, 258:54-56.
- [8] SILBER J R, LOEB L A. S1 nuclease does not cleave DNA at single-base mismatches[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1981, 656:256-264.
- [9] HOWARD J T, WARD J, WATSON J N, et al. Heteroduplex cleavage analysis using S1 nuclease[J]. *Biotechniques*, 1999, 27:18-19.
- [10] COLBERT T, TILL B J, TOMPA R, et al. High throughput screening for induced point mutations[J]. *Plant Physiol*, 2001, 126:480-484.
- [11] HENKOFF S, COMAI L. Single-nucleotide mutations for plant functional genomics[J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2003, 54:375-401.
- [12] WENHOLDS E, VAN EEDEN F J, KOSTERS M, et al. Efficient target-selected mutagenesis in zebrafish[J]. *Genome Res*, 2003, 13:2700-2707.
- [13] COMAI L, HENKOFF S. TILLING: practical single-nucleotide mutation discovery[J]. *Plant J*, 2006, 45:684-694.
- [14] JUNE P A, BORRAS A M, KUANG Y, et al. A rapid and sensitive enzymatic method for epidermal growth factor receptor mutation screening[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12:751-758.
- [15] 吴海滨, 朱汝财, 赵德刚. TILLING 技术的原理与方法述评[J]. *分子植物育种*, 2004, 2(4):574-580.
- [16] 张宁, 杨泽. Tilling 技术及其在遗传学中的应用[J]. *生命的化学*, 2004, 24(6):516-517.
- [17] 韩微波, 刘录祥, 郭会君, 等. 小麦诱变育种新技术研究进展[J]. *麦类作物学报*, 2005, 25(6):125-129.
- [18] 韩锁义, 杨玛丽, 盖钧镒, 等. CEL I 酶的粗提取及其活性检测[J]. *遗传*, 2006, 28(9):1112-1116.
- [19] 林英, 陈冬妹, 赵萍, 等. CEL I 酶的粗纯化及活性分析[J]. *农业生物技术学报*, 2007, 15(6):1006-1011.
- [20] RSCH N, MERKANGAS K. The future of genetic studies of complex human diseases[J]. *Science*, 1996, 273:1516-1517.
- [21] SHIMM MM. Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high throughput mutation detection and genotyping technologies[J]. *Clin Chem*, 2001, 47:164-172.
- [22] ZHOU W, GOODMAN S N, GALLIZIA G, et al. Counting alleles to predict recurrence of early-stage colorectal cancers[J]. *Lancet*, 2002, 359(9302):219-225.
- [23] MOHREWEISER H W, JONES I M. Variation in DNA repair is a factor in cancer susceptibility: A paradigm for the promises and perils of individual and population risk estimation[J]. *Mutat Res*, 1998, 400(1/2):15-24.
- [24] HE X M, ZHANG Z X, ZHANG J W, et al. Gln92Arg polymorphism in paraoxonase 1 gene is associated with Alzheimer disease in a Chinese Han ethnic population[J]. *Chin Med J*, 2006, 119(14):1204-1209.
- [25] MACHIDA H, TSUKAMOTO K, WEN C Y, et al. Gohn's disease in Japanese is associated with a SNP haplotype of N-acetyltransferase 2 gene[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(31):4833-4837.
- [26] ABBOTT A. Special section on human genetics: With your genes Take one of these three times a day[J]. *Nature*, 2003, 425:760-762.
- [27] SHIN H K, KIM T J, LEE H S, et al. The Correlation between genetic polymorphism of CYP2D6 (A118G) and MDR1 (C3435T) with analgesia and the adverse effects by epidural morphine[J]. *Korean J Anesthesiol*, 2007, 52(1):16-22.
- [28] YAMANAKA S, NAKAMURAI, WATANABE K N, et al. Identification of SNPs in the waxy gene among glutinous rice cultivars and their evolutionary significance during the domestication process of rice[J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 108:1200-1204.
- [29] WILSON L M, WHITT S R, IBANEZ A M, et al. Dissection of maize kernel composition and starch production by candidate gene association[J]. *Plant Cell*, 2004, 16:2719-2733.
- [30] PALAISA K A, MORGANTE M, WILLIAMS M, et al. Contrasting effects of selection on sequence diversity and linkage disequilibrium at two phytoene synthase loci[J]. *Plant Cell*, 2003, 15:1795-1806.
- [31] SCHWARZ G, SIFT A, WENZEL G, et al. DHPLC scoring of a SNP between promoter sequences of HMW glutenin x-type alleles at the Glu-D1 locus in wheat[J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51:4263-4267.
- [32] ABE F, SATO K, MIURA K, et al. A single nucleotide polymorphism in the alternative oxidase gene among rice varieties differing in low temperature tolerance[J]. *FEBS Letters*, 2002, 527:181-185.
- [33] POTOKINA E, PRASAD M, MALYSHEVA L, et al. Expression genetics and haplotype analysis reveal cis regulation of serine carboxypeptidase I (Cxp I), a candidate gene for malting quality in barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. *Funct Integr Genomics*, 2006, 6:25-35.
- [34] GARCIA CLAVER A, FELLMANS M, GIL ORIEGA R, et al. Identification, validation and survey of a single nucleotide polymorphism (SNP) associated with pungency in *Capsicum* spp[J]. *Theor Appl Genet*, 2007, 115(7):907-916.
- [35] GRIMES E A, NOAKE P J, DIXON L, et al. Sequence polymorphism in the human melanocortin 1 receptor gene as an indicator of the red hair phenotype[J]. *Forensic Sci Int*, 2001, 122(2/3):124-129.
- [36] CHAKRABORTY R, SMOUSE P E. Recombination of haplotypes leads to biased estimates of admixture proportion in human population[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85:3071-3074.
- [37] BRISCOE D, STEPHENS J C, O'BRIENS J. Linkage disequilibrium in admixed population: Application in gene mapping[J]. *The Journal of Heredity*, 1994, 85(1):59-63.
- [38] NASU S, SUZUKI J, OHIA R, et al. Search for and Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in Rice (*Oryza sativa*, *Oryza rufipogon*) and Establishment of SNP Markers[J]. *DNA Research*, 2002, 9(5):163-171.
- [39] GUO P, BAUM M, GRANDO S, et al. QTLs for Chlorophyll and fluorescence parameters in barley under post-flowering drought[J]. *Euphytica*, 2008, 163:203-204.
- [40] VARSHNEY R K, THEL T, SREINOM C RAJIC T, et al. Identification and validation of a core set of informative genetic SSR and SNP markers for assaying functional diversity in barley[J]. *Molecular Breeding*, 2008, 22(1):1-13.
- [17] 佚名. 浙江开发天然彩色蚕丝技术[J]. *纺织信息周刊*, 2005(18):18.
- [18] 罗玉功. 国内外彩色茧研究现状[J]. *北方蚕业*, 2004, 25(3):14-15.
- [19] DEODIKAR G B, KAMATE I A, KSHRSAGAR K K. New strains of mulberry silkworm (*Bombyx mori* L.) by induced asexual parthenogenesis[J]. *Ind J Seric*, 1977, 16(1):43-48.
- [20] 张峰, 陈秀, 赵昀, 等. 抗NPV-核酶转基因蚕的研究[J]. *生物化学与生物物理学报*, 1999, 31(3):331-333.
- [21] 佚名. 千秋蚕变——访西南农业大学蚕桑重点实验室夏庆友教授[J]. *蚕学通讯*, 2004, 24(1):32-33.
- [22] 李军, 费建明, 李玉峰, 等. 丝胶茧蚕品种选育初报[J]. *蚕桑通报*, 2006, 37(3):20-22.
- [23] 董占鹏. 蚕类抗菌肽及其研究进展[J]. *蚕学通讯*, 2003, 23(3):14-20.
- [24] 董占鹏, 陈松, 罗坤, 等. 家蚕分子育种研究进展[J]. *广西蚕业*, 2002, 39(3):4-8.
- [25] 戎锐, 李振刚. 家蚕转基因研究进展[J]. *昆虫知识*, 1998, 35(3):189-191.
- [26] 代方银, 程龙. 为了21世纪“丝绸之路”[J]. *蚕学通讯*, 2004, 24(1):55-61.
- [27] 夏庆友. 家蚕突变基因及重要性状功能基因组研究[J]. *蚕学通讯*, 2004, 24(2):2-3.

(上接第10802页)

- [8] 马志明, 石晓燕, 查新民, 等. 转基因家蚕的研究进展[J]. *江苏蚕业*, 2001(2):6-10.
- [9] NAGARAJU J, KANDA T, YUKUHIRO K, et al. Attempt at transgenesis of the silkworm (*Bombyx mori* L.) by egg injection of foreign DNA[J]. *Applied Entomology and Zoology*, 1996, 31(4):587-596.
- [10] 赵昀, 张峰, 陈秀, 等. 用绿色荧光蛋白进行转基因蚕的研究[J]. *高技术通信*, 1996(6):16-19.
- [11] 陈萍. 家蚕品种研究进展[J]. *蚕学通讯*, 2000, 20(1):16-22.
- [12] 吴大洋. 现代生物技术与蚕业[J]. *四川蚕业*, 2002(2):4-8.
- [13] 古巧珍. 家蚕基础品种选育研究进展[J]. *陕西农业科学*, 1999(3):27-29.
- [14] 宋新华, 潘学燕, 李慧兵, 等. 我国家蚕品种的变迁及现行品种种质基础分析[J]. *西北农业学报*, 2001, 10(3):112-115.
- [15] 李振刚, 周丛照, 唐恒立, 等. YAC介导的天蚕丝素基因向家蚕的转移——天蚕丝素基因 YAC 克隆在家蚕的表达[J]. *昆虫学报*, 1997, 40(1):3-6.
- [16] 张慧勤, 王志新. 蜘蛛丝的研究与应用[J]. *中原工学院学报*, 2005, 16(4):47-50, 69.