

- 1986, **15** (6) :1 292 ~ 1 295.
- 8 Lewis T. (ed.) ,Thrips as Crop Pests. Cambridge Press ,1997. 1 ~ 13.
- 9 González D. ,Friesen R. ,Leigh E. F. ,Wilson T. ,Waggoner M. In :Parker B. L. ,Skinner M. , Lewis T. (eds.) ,Thrips Biology and Management. New York :Plenum Press ,1995. 317 ~ 323.
- 10 Gaum W. G. ,Gliomee J. H. Pringle K. L. *Bull. Entomol. Res.* , 1994, **84** :219 ~ 224.
- 11 van Rijin P. C. J. ,Mollema C. Steenhuis-Broers G. M. *Bull. Entomol. Res.* ,1995, **85** :285 ~ 297.
- 12 Trichilo P. J. ,Leigh T. F. *Ann. Entomol. Soc. Am.* ,1988, **81** : 64 ~ 70.
- 13 Felland C. M. ,Hull L. A. ,Teulon D. A. J. Cameron E. A. *Can. Entomol.* ,1993, **125** :971 ~ 973.
- 14 Cho K. ,Eckel C. S. ,Walgenbach J. F. , Kennedy G. C. *J. Econ. Entomol.* ,1995, **88** :1 658 ~ 1 665.
- 15 Steiner M. Y. *Environ. Entomol.* ,1990, **19** :1 605 ~ 1 613.
- 16 Shipp J. L. ,Wang K. ,Binns M. R. *J. Econ. Entomol.* ,2000, **93** (6) :1 732 ~ 1 740.
- 17 van den Meiracker R. A. F. ,Ramakers P. M. J. *Med. Fac. Landbouww. Gent.* ,1991, **56** :241 ~ 249.
- 18 Bakker F. M. ,Sabelis M. W. *Entomol. Exp. Appl.* ,1989, **50** :47 ~ 51.
- 19 Robb K. L. ,Parrella M. P. In :Parker B. L. ,Skinner M. ,Lewis T. (eds.) ,Thrips Biology and Management. New York : Plenum Press ,1995. 365 ~ 370.
- 20 Helyer N. L. ,Brobyn P. J. *Ann. Appl. Biol.* ,1992, **121** :219 ~ 231.

家蚕微卫星 DNA 的研究进展

阮灵伟 叶向群 桂慕燕*

(厦门大学生命科学学院 福建 厦门 361005)

Advances in the research on silkworm microsatellite DNA. RUAN Ling-Wei , YE Xiang-Qun , GUI Mu-Yan
(School of Life Science , Xiamen University , Fujian 361005 , China)

Abstract In this article ,the molecular marker technology is outlined and the application principle ,method and traits of microsatellite marker of silkworm are reviewed. Especially ,we introduce the applications of the technology in the *Bombyx mori* in detail and the outlook of genetic analysis ,marker-assisted selection and so on are prospected.

Key words molecular marker , microsatellite , *Bombyx mori*

摘要 概述了分子标记技术 ,就其中的微卫星标记技术的原理、方法与特点进行了介绍 ,重点就该技术在家蚕中的研究进展进行了综述 ,并展望了该技术在家蚕的遗传分析、辅助选择育种等应用中的前景。

关键词 分子标记 , 微卫星 , 家蚕

1 分子标记技术概述

在遗传育种的研究过程中 ,人们一直在致力于寻找一些可靠的遗传标记 (genetic marker) 来提高选种效率与效能。所谓遗传标记^[1]是指那些能表达生物的变异性 ,且能稳定遗传 ,可被检测的性状或物质 ,一般包括形态学标记、细胞学标记、生化标记、免疫学标记和分子标记等。分子标记 (molecular marker) ,也称 DNA 标记 (DNA marker) ,是基因型在 DNA 水平上的表现形式 ,与其他标记比较 ,具有其独特的优越性 : (1) 受环境条件影响小 ; (2) 基因组 DNA 变异性

极其丰富 ,稳定性高 ; (3) 不同发育阶段、不同组织的 DNA 都可以用于分析 ; (4) 不同种群之间广泛可比。

从 20 世纪 80 年代开始 ,随着分子生物学的飞速发展 ,出现了多种多样的分子标记^[2,3]。以 Southern 杂交为基础的分子标记技术有 :限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP)、单链构像多态性 RFLP (SSCP - RFLP)、变性梯度凝胶电泳 RFLP

* 通讯作者 ,E-mail : ruanlingwei @etang.com

收稿日期 :2004-01-02 ,修回日期 :2004-05-31

(DGGE - RFLP)等。以 PCR 技术为基础的分子标记技术有:单链构像多态性 PCR (SSCP - PCR)、随机扩增多态性 DNA (randomly amplified polymorphic DNA ,RAPD)、扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism ,AFLP)、选择性扩增 DNA 片段 (selective amplification DNA fragments ,SADF)等。以重复序列为基础的分子标记技术有:微卫星 DNA 标记(SSR)、小卫星 DNA 标记、卫星 DNA 标记等。

2 微卫星技术

在名目繁多的分子标记中,微卫星分子标记具有按照孟德尔方式分离、呈共显性遗传、在数量方面没有生物学上的限制、多态性高(其多态信息含量在 0.7 以上)、每个位点均有许多等位形式、实验程序相对简化且稳定可靠等优点而越来越多地为人们所选用。

所谓微卫星 (microsatellite)是指以少数几个核苷酸(多数为 2~4 个)为核心单位,呈多次串联重复的 DNA 序列,也称简单序列重复 (simple sequence repeats)、短串联重复 (short tandem repeats)或简单序列长度多态性 (simple sequence length polymorphism)^[4]。在真核生物中大约每隔 10~50 kbp 就存在 1 个微卫星^[5],且它们广泛存在于染色体几乎所有区域^[6,7]。

微卫星标记按其核心单位的碱基数可分为单 2,3,4,5,6 核苷酸微卫星。人和动物的微卫星重复单位较为常见的是 (TG)_n 和 (CT)_n^[8,9],虽然微卫星在昆虫中的研究较少,但在果蝇^[10]、蜜蜂^[11]等的研究中也发现其重复单位存在 (TG)_n 和 (CT)_n 这 2 种形式。

根据微卫星自身结构,Weber 将微卫星分为完全、不完全和复合微卫星^[12]。完全微卫星是由不中断的重复单位串联而成;不完全微卫星是指重复单位间有 3 个以下的非重复碱基间隔,且两间隔间重复单位连续重复数不低于 3;复合微卫星是指由几类串联重复单位构成,中间有 3 个以下碱基间隔,且两间隔间重复单位连续重复数不低于 5。

关于微卫星的产生,多数研究者认为是遗

传物质 DNA 在复制或修复时,滑动链与互补链碱基错配,导致一个或几个重复单位的插入或缺失,从而在不同个体或不同种群间产生长度多态性^[13]。

微卫星分析的关键在于开发基因组中某个微卫星两侧的引物序列。通常有 4 条途径:(1)用经典的分子生物学方法从基因组文库中获得含有微卫星的阳性克隆;(2)通过检索 GenBank、EMBL 等 DNA 序列数据库获得微卫星序列;(3)寻找已存在的微卫星引物;(4)使用与所研究的物种亲缘关系较近的物种的引物。在获得微卫星序列后,便可进行引物的设计、PCR 扩增,最后对扩增产物进行研究分析。

3 家蚕微卫星的研究进展

家蚕不仅是一种重要的经济昆虫,而且还是遗传、发育等生物科学研究中理想的实验动物模型^[14]。传统的家蚕育种都是建立在形态学的基础上,将形态学指标(如丝纤维长度、幼虫期经过、茧色等)优良的品种进行杂交,从而获得新的变异品种。目前,家蚕已拥有 400 多个遗传突变体,并且大多已绘制成遗传图谱^[15]。由于形态学指标容易受环境条件的影响,而且经过多代杂交后,形态学指标也逐渐模糊,很难再区分开来。在形态学指标捉襟见肘之际,分子标记技术应运而生,解决了这一局限性问题。通过分子标记不仅可以建立遗传图谱,而且还可以将重要的性状特点同分子标记联系起来,辅助筛选优良品种。如 RFLP^[16]、RAPD^[17~21]等都先后应用到家蚕的研究当中。随着分子标记的日趋成熟,微卫星标记技术以其操作简便、稳定可靠,而成为新的研究热点。

Reddy 等将放射性标记的寡核苷酸 (GT)₁₀ 和 (CT)₁₀ 与家蚕基因组文库进行点杂交,发现在 3 513 个克隆中,含 (GT)₁₀/(CA)₁₀ 的克隆有 57 个,估计其在蚕基因组中的频率为 2×10^{-2} kbp;而 (GA)₁₀/(CT)₁₀ 则有 27 个阳性克隆,在基因组中的频率为 0.96×10^{-2} kbp^[22]。这一特点与这 2 类微卫星在人类基因组中的分布相似^[12],但不同于蜜蜂^[7]、老鼠^[23]、猪^[24]等的微卫

星分布情况。通过对阳性克隆的 DNA 片段测序,这 2 类微卫星共有 28 种不同的序列(包括 18 个完全微卫星,8 个不完全微卫星和 2 个复合微卫星)。

根据所发现的微卫星,他们设计了 17 对 PCR 引物,以 13 个品系的家蚕 DNA(包括 6 个滞育品系和 7 个非滞育品系)为模板进行 PCR 扩增。结果显示在 15 个扩增位点上存在着显著的差别:在 11 个 (GT)_n 位点中,等位基因共有 85 个,每个位点的等位基因数从 3~17 个不等;而在 4 个 (CT)_n 位点上等位基因共有 28 个,每个位点的等位基因数从 5~9 个不等。根据等位基因的分布情况进行了杂合性的分析表明,在 15 个有明显差异的位点中,它们的杂合性范围在 0.66~0.90 之间(完全微卫星的杂合性为 0.8,不完全微卫星的杂合性为 0.78,复合微卫星的杂合性为 0.76)。

对 15 个位点扩增的产物进行 UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic means) 分析,结果不仅与实际的情况相符,而且也与之前 Nagaraja 等 RAPD 分析的结果相同^[17]。这一结果表明家蚕基因组的特征用微卫星标记系统来表示是完全可以实现的,用其来进行家蚕的遗传分析、辅助选择育种等研究是完全可行的。

微卫星标记的获得需要建立、筛选基因组文库和克隆、测序等,实验工作量比较大、费时。随着 PCR 技术的发展,内嵌 SSR 引物 PCR (inter-simple sequence repeat-PCR, ISSR-PCR) 这一技术大大简化了微卫星标记的研究。这一技术是在短重复序列的 5' 端或 3' 端锚定上 2~4 个碱基,以此为引物进行 PCR 扩增。这一技术不仅操作较为简便,而且信噪比较高,可将亲缘关系非常接近的个体区分开来^[25],现在这一技术已广泛应用到各种生物的遗传分析中^[26~29]。

根据这一技术,Reddy 等设计了 7 个寡核苷酸序列,4 个在 5' 端锚定碱基,3 个在 3' 端锚定碱基。通过对 13 个家蚕品系(包括 6 个滞育品系和 7 个非滞育品系)进行 PCR 扩增,有 6 个引物(除 1 个 3' 端锚定碱基引物外)可扩增出

多态性的产物,最少的扩增出 18 条带,最多的扩增出 57 条带,总共有 239 条带,有 184 条带 (77%) 显示出多态性^[30]。其中 2 个 3' 端锚定碱基的引物共扩增出 79 条带,72% 显示多态性;而 4 个 5' 端锚定碱基的引物共扩增出 160 条带,79% 显示多态性。由此可见,5' 端锚定碱基的引物比 3' 端锚定碱基的引物具有更高的特异性,这一结果与之前的研究相同^[25]。与之前的 RAPD^[17] 等在家蚕中的应用相比,ISSR—PCR 表现出更高的多态性与复杂度。

通过分析特异性标记在 F1 和 F2 代中的分离情况,他们发现 F2 代中这些标记的分离情况与预期比值相符,说明其是按孟德尔方式进行分离的。在对 13 个家蚕品系(包括 6 个滞育品系和 7 个非滞育品系)进行 UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic means) 分析后,其结果也与之前的 RAPD^[17]、微卫星分析^[22] 等的结果相同。

4 展望

随着家蚕微卫星技术的日趋成熟,这一技术将广泛地应用到家蚕的研究当中,进一步促进蚕业及其相关产业的发展。

4.1 用于构建遗传图谱

微卫星是一种共显性标记,其遗传分析过程相对简化,不仅利于作图群体间标记转换^[31],而且也便于从遗传图谱向物理图谱过渡^[32,33]。随着研究的进行,越来越多的微卫星将会被发现,构建以微卫星标记为主的家蚕遗传图谱是完全可能的。

4.2 用于种质的鉴定

由于微卫星座位的复等位性,使它易于鉴别同一物种的不同基因型,以此为基础的研究分析可以反映出物种的地理分布、家谱关系等多态性特点。Reddy 等就通过微卫星分析将 13 个家蚕品系分成滞育与非滞育两组,其结果与之前的分析结果相同。同样可用这类标记来鉴定个体的纯度及真假杂种。此外,也可用来研究物种的亲缘关系及起源。Reddy 将 NB18 与 NB4D2 这 2 个品系的家蚕分为 1 组,这与它们

拥有共同的日本祖先的实际情况是一致的。另外,被分在同一亚组的 *Moria* 和 *Sarupat* 2 个品系也具有相似的特征及相同的地理分布。研究中还发现,大多数的微卫星引物可以有效地从野蚕的基因组中扩增出产物,这将大大简化野蚕的遗传分析,尤其是那些濒危、遗传特征不甚了解的品种,这将为家蚕的育种增添更多的种质资源^[22,30]。

4.3 用于基因定位及分子标记辅助育种

长期以来对家蚕的一些重要经济性状进行选择 and 改良主要根据个体或群体的表型值,然而这类性状的表型值易受环境影响。由于无法确定个体基因值,从而易造成较大的误差,导致进展缓慢。Reddy 在研究中发现微卫星的一些标记与家蚕的滞育与否密切相关,在 Sat211 位点上(此位点微卫星为 (GT)¹⁰) PCR 扩增的带在 96~146 bp 之间,其中 96 bp 和 134 bp 的带显示出与滞育的特性有关,而 99 bp 和 146 bp 的带则为非滞育品系所特有。因此如果也能将其他的经济性状同微卫星标记联系起来,用于育种的辅助选择,这将大大加快育种的进程。

养蚕业在我国有着5 000多年的悠久历史,从蚕类的种质资源到养殖技术我国都在世界上具有一定的地位,而微卫星作为分子标记在蚕类中的研究才刚刚起步,对于广大研究者来说是机遇与挑战并存。相信随着微卫星技术的发展及其在蚕业中的广泛应用,将创造我国蚕业新的辉煌。

参 考 文 献

- 1 刘长国,罗军,杨公社.黄牛杂志,2001,27(6):41~45.
- 2 赵卫国,潘一乐.中国蚕业,2000,2:40~41.
- 3 龚鹏,杨效文.昆虫知识,2001,38(2):86~90.
- 4 Chin E. C. L. *Genome*, 1996, 39:866~873.
- 5 Tautz D. *Nucl. Acid Res.*, 1989, 17:6463~6471.
- 6 Winter A. K., Fredholm M., Thomsen P. D. *Genomics*, 1992, 12:281~288.
- 7 Hamada H., Pitirino M., Kakunaga T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, 79:6465~6469.
- 8 Dib C., Faure S., Fizames C., Samson D., Drouot N., Vignal A. *Nature*, 1996, 380:152~154.
- 9 Dietrich W. F., Miller J., Steen R., Merchant M. A., Damronboles D. *et al.*, *Nature*, 1996, 380:149~152.
- 10 Pardue M. L., Lowenhaupt K., Rich A., Nordheim A. *EMBO J.*, 1987, 6:1781~1789.
- 11 李建科. 郑洲牧业工程高等专科学校报, 2002, 22(2):85~89.
- 12 Weber J. J. *Genome*, 1990, 7:524~530.
- 13 Schlotterer C., Tautz D. *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:211~215.
- 14 Goldsmith M. R. In: Goldsmith M. R., Wilkins A. S. (ed.), *Molecular Model System of the Lepidoptera*. New York: Cambridge University Press, 1995. 21~76.
- 15 Doira H. *Genetical Stocks and Mutations of Bombyx mori: Important Genetic Resources*. Institute of Genetic Resources, Kyushu University, Fukuoka Japan. 1992.
- 16 Shi J., Heckel D. G., Goldsmith M. R. *Genet. Res.*, 1995, 66:109~126.
- 17 Nagaraja G. M., Nagaraju J. *Electrophoresis*, 1995, 18:1633~1638.
- 18 左正宏, 桂慕燕, 王学民, 陈元霖. 遗传, 2001, 23(2):128~130.
- 19 刘春宇, 陈元霖, 桂慕燕, 张春玲. 遗传, 1998, 20(2):5~8.
- 20 张春玲, 陈元霖, 刘春宇, 桂慕燕. 遗传, 1998, 20(3):1~4.
- 21 桂慕燕, 左正宏, 陈元霖. 遗传, 2001, 23(1):25~28.
- 22 Reddy K. D., Abraham E. G., Nagaraju J. *Genome*, 1999, 42:1057~1065.
- 23 Estoup A., Solignac M., Harry M., Cornuet J. M. *Nucl. Acids Res.*, 1993, 21:1427~1431.
- 24 Wintero A. D., Fredholm M., Thomsen P. B. *Genomics*, 1992, 12:281~288.
- 25 Zetkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. *Genomics*, 1994, 20:176~183.
- 26 Kantety R. V., Zeng X., Bennetzen J. L., Zehr B. *Mol. Breed.*, 1995, 1:365~373.
- 27 Charters Y. M., Robertson A., Wilkinson M. J., Ramsay G. *Theor. Appl. Genet.*, 1996, 92:442~447.
- 28 Provan J., Powell W., Waugh R. *Genome*, 1996, 39:767~769.
- 29 Tsumura Y., Ohba K., Strauss S. H. *Theor. Appl. Genet.*, 1996, 92:40~45.
- 30 Reddy K. D., Nagaraju J., Abraham E. G. *Heredity*, 1999, 83:681~687.
- 31 Guiford P., Prakash S., Zhu J. M., Rikkerink E., Gardiner S., Bassett H., Rorster R. *Theor. Appl. Genet.*, 1997, 94:249~254.
- 32 Inoue T. *Theor. Appl. Genet.*, 1994, 89:728~734.
- 33 Olson M. *Science*, 1989, 245:1434~1435.