

· 遗传快报 ·

蓖麻蚕 DNA 导入家蚕引起遗传变异的研究 ——基因组 DNA 的 RAPD 检测^①

张春玲^② 陈元霖^③ 桂慕燕 刘春宇

(厦门大学细胞生物学研究室, 361005)

摘要 借助于精子介导, 在家蚕受精的过程中将蓖麻蚕 DNA 转入家蚕卵内, 从它们后代获得了新的变异品系。本文采用 RAPD 技术对这些品系基因组 DNA 进行了分析。结果表明, 所用 50 种 10mer 随机引物中有 49 个检测出 DNA 的多态性, 统计分析图谱中各类扩增带, 其中变异品系与其相应受体的差异带占其总带数的 26~37%, 提示外源 DNA 导入受体后引起后代基因组的显著变异, 并对这些变异的进行了讨论。

关键词 蓖麻蚕, 家蚕, DNA 导入, RAPD

中图分类号 Q319.3

RAPD Analysis of Hereditary and Variation of Domesticated Silkworm Generated by Introduction of Eri Silkworm DNA

ZHANG Chunling CHEN Yuanlin GUI Muyan LIU Chunyu

(Institute of Cell Biology, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract With the aid of domesticated silkworm sperms eri silkworm DNA was transferred into domesticated silkworm eggs during insemination, and variant strains were obtained from the progenies. Genomes of three new strains were analyzed using RAPD assay. Polymorphic fingerprints were obtained from 49 out of 50 primers. Different kinds of amplified bands in RAPD patterns were calculated and analyzed, the variant bands between variants and their recipients counted for 26~37% of the total bands of each variant. The results indicated that exogenous DNA introduced into recipients induced remarkable variation in progeny genomes. The significance of the variation was discussed.

Key words Domesticated silkworm, Eri silkworm, DNA introduction, Variation, RAPD

通过外源 DNA 直接导入的方法改变高等动植物固有的遗传特性, 在育种实践和遗传进化理论研究上都有重要意义, 因此, 这类研究越发引起国内外学者的兴趣。我国科学工作者的实验结果表明, 将各种不同来源的 DNA 分别导入不同的动植物个体, 都有可能获得可遗传的变异性状。家蚕 (*Bombyx mori* L.) 和蓖麻蚕 (*Philosamia cynthia ricini* Boisduval.) 在生物分类学上是属于不同科的两种昆虫, 前者属家蚕蛾科 (*Bombycidae*), 后者属天蚕蛾科 (*Saturniidae*)。在这两种昆虫之间, 我们采用实验材料的不同配合方式和外源 DNA 的不同导入方法进行多次实验

① 国家自然科学基金资助的项目。

② 张春玲, 女, 28 岁, 硕士学位, 专业方向为细胞生物学。

③ 通讯联系人。

研究, 结果表明, 在实验后代都出现了性状的变化, 有些变异是可以遗传的^[1~4], 并且在血液酯酶同工酶分析上也看到, 变异个体与受体的酯酶同工酶谱存在着明显的差异。但是, 长期以来, 由于受到技术的限制, 对于这类变异的事实还难从分子水平上得到验证。

本文采用 RAPD 技术, 对由于导入蓖麻蚕 DNA 引起家蚕变异的新品系基因组 DNA 进行检测, 并与其供体和受体相比较, 试图从分子水平上寻找遗传变异的直接证据。

1 材 料 和 方 法

1.1 蚕

供体: 蓖麻蚕品种桂虎斑和素白; 受体: 家蚕品种湖₂₀₄和苏学₅。

BT₈₇₂和 BT₈₇₃: 将桂虎斑 DNA 导入湖₂₀₄后获得的变异品系。具体方法参见我们以前的文章^[4]。

BT₉₂₄: 将素白 DNA 导入苏学₅获得的变异品系, 具体方法同前(吴福泉等)^[6]。

1.2 基因组 DNA 提取

取早期蚕蛹置于玻璃匀浆器中, 加匀浆缓冲液进行匀浆, 随后进行氯仿/异戊醇抽提和乙醇沉淀。提取的 DNA 经 Shimadzu UV-240 紫外检测和琼脂糖凝胶电泳鉴定, A_{260}/A_{280} 介于 1.8~2.0 之间, 片段 > 50kb^[5]。

1.3 RAPD 检测

RAPD 扩增引物试剂盒购自美国 Operon 公司。反应体系(25 μ l)含 1U Taq 酶, 约 5pmol/L 引物, 100 μ mol/L dNTP, 约 25ng 样板 DNA。反应扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 5s, 36 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 共 40 个循环, 再 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。扩增产物在 1.4% 琼脂糖凝胶中电泳检测, 经溴化乙啶染色后, 紫外光下观察、拍照。

1.4 相似率(Similarity)分析

根据 Nei 等人的相似率分析公式进行数据分析: 相似率 = $(2 \times Nab) / (Na + Nb) \times 100\%$ 。

其中 Nab 为样品 a 和 b 之间共有的 DNA 扩增带数目, Na 为样品 a 具有的 DNA 扩增带数目, Nb 为样品 b 具有的 DNA 扩增带数目。

2 结 果

采用 50 个随机引物对 7 种样品基因组 DNA 进行 RAPD 扩增, 除 1 个引物(OPW-14)无扩增产物外, 其余 49 个引物每个引物可得扩增带 6~28 条, 平均每个引物 16 条, 绝大多数扩增带大小在 300~3 000bp 之间。

2.1 蓖麻蚕(供体)和家蚕(受体)的 RAPD 分析

50 个引物在蓖麻蚕桂虎斑和素白两个品种的基因组 DNA 中分别扩增出 307 和 322 条可分辨的带, 它们之间的相似率为 85.85%。在家蚕湖₂₀₄和苏学₅中分别扩增出 407 和 398 条可分辨的带, 两者之间的相似率为 72.30% (见表 1)。

表 1 蓖麻蚕(供体)、家蚕(受体)、变异品系相互间的相似率

品 种 ¹⁾	扩增带 总 数	共 有 扩 增 带 数					相 似 率 (%)				
		B	C	D	E	F	B	C	D	E	F
A	307	270	91		82	76	85.85	25.49		24.01	19.87
B	322										
C	407										
D	398	93	291				25.83	72.30			
E	376		340					86.85			
F	358		310		310			81.05		84.47	
G	390	85		337			23.88		85.53		

1) 桂虎斑(A); 素白(B); 湖₂₀₄(C); 苏学₅(D); BT₈₇₂(E); BT₈₇₃(F); BT₉₂₄(G)。

蓖麻蚕和家蚕在昆虫分类学中属于不同科的昆虫, 亲缘关系甚远。在桂虎斑与湖₂₀₄以及素白与苏₅之间的相似率分别为 25.49% 和 25.83。如表 1 所示, 种间的相似率大大地低于同种不同品种间的相似率, 可见采用 RAPD 扩增的 DNA 多态性分析方法探讨物种间的亲缘关系是可行的^[7]。

2.2 变异品系的 RAPD 分析

用 50 个引物对变异品系 BT₈₇₂、BT₈₇₃ 和 BT₉₂₄ 的基因组 DNA 进行扩增, 并与其相对应的供体和受体进行比较 (见表 2)。

表 2 BT₈₇₂、BT₈₇₃、BT₉₂₄ 中各类扩增带的比例 (%)

品系名称	扩增带与总数	与供、受体都相同的带	仅与受体相同的带	仅与供体相同的带	供、受体所没有的带	从受体中消失的带	与受体差异带总数
BT ₈₇₂	376	21.3	69.2	0.5	9.0	16.5	26.0
BT ₈₇₃	358	20.4	65.9	0.3	13.1	23.8	37.2
BT ₉₂₄	390	20.8	65.6	1.0	12.6	15.3	28.9

BT₈₇₂ 和 BT₈₇₃ 基因组 DNA 分别扩增出 376 和 358 条可分辨带。BT₈₇₂ 和 BT₈₇₃ 与桂虎斑的相似率分别为 24.01% 和 19.87%, 而与湖₂₀₄的相似率则分别为 86.85% 和 81.05%。BT₈₇₂ 和 BT₈₇₃ 相互间的相似率为 84.47%。BT₉₂₄ 的基因组 DNA 扩增出 390 条可分辨带, 它与素白的相似率为 23.88%, 而与苏₅的相似率为 85.53%。

由上述结果可见, 由蓖麻蚕 DNA 导入家蚕获得的后代, 基因组结构与受体有极大的相似性, 而与供体相差甚远。尽管如此, 在各变异品系与受体比较中仍可看到一些明显的差异。例如, 在变异品系基因组的 RAPD 扩增图谱中, 出现有数量不等的“差异带”, 包括: (1) 在供体和受体中都有的“新带”; (2) 消失了一些在受体中存在的带 (“缺失带”); (3) 出现仅与供体相同的“目的带”。虽然“目的带”的出现是很个别的, 在 BT₈₇₂、BT₈₇₃ 和 BT₉₂₄ 中分别只有 1、2 和 4 条, 但是, 差异带的总数可占各自总带数的 26~37% (见表 2、图 1、2)。

3 讨 论

1986 和 1987 年, 我们采用将蓖麻蚕 DNA 注入家蚕处女蛾交配囊后, 用同种家蚕雄蛾进行交配的方法, 在实验组后代个体发育的不同时期观察到了性状的变化, 并分别选育出 3 个稳定的新品系^[4]。1992 年, 吴福泉等采用同样的方法也从实验组后代选育出 4 个新的品系 (BT₉₂₁ 至 BT₉₂₄)^[6]。BT₈₇₂、BT₈₇₃ 和 BT₉₂₄ 这 3 个品系不仅在形态上表现出与受体的差异, 尤其在全茧量、茧层量和抗性等方面也比受体有显著的提高。可见外源总 DNA 的导入不仅可以改变由单基因控制的性状, 也可以改变由多基因控制的数量性状^[6]。

基因组 DNA 的 RAPD 分析表明, 在变异品系的随机扩增图谱中, 存在大量 (60% 以上) 与受体相同的扩增带, 同时也出现约 26~37% 与受体不同的“差异带”, 即出现上述的“新带”、“目的带”和“缺失带”。这些“差异带”的出现, 提示外源 DNA 可能已掺入了受体基因组中。

掺入的外源 DNA 对受体基因组的影响可能是很复杂的, 它可能通过同源重组使基因组发生重排, 导致基因组结构的改变, 如核苷酸或 DNA 片段插入、替换或缺失等。在应用大豆和小麦等进行的实验中, 也得到相同/相似的实验结果。说明通过导入外源 DNA 引起遗传性状的变化, 可能在分子水平上存在着共同的作用机制。由于外源 DNA 掺入受体基因组的方式带有随机性, 因而其后代出现的变异往往具有偶然性和多样性的特点, 因此, 可以为育种工作者提供更多的选择机会, 创造丰富的种质资源。

我们还看到, 由蓖麻蚕精子“受精”的家蚕后代基因组 DNA 的 RAPD 扩增图谱中, 也出现与外源 DNA 导入的家蚕后代相似的“差异带”^[5], 这说明, 远缘杂交后代出现变异, 可能是由于在“受精”的过程中, 精子含有的异种 DNA 对母本基因组作用的结果。

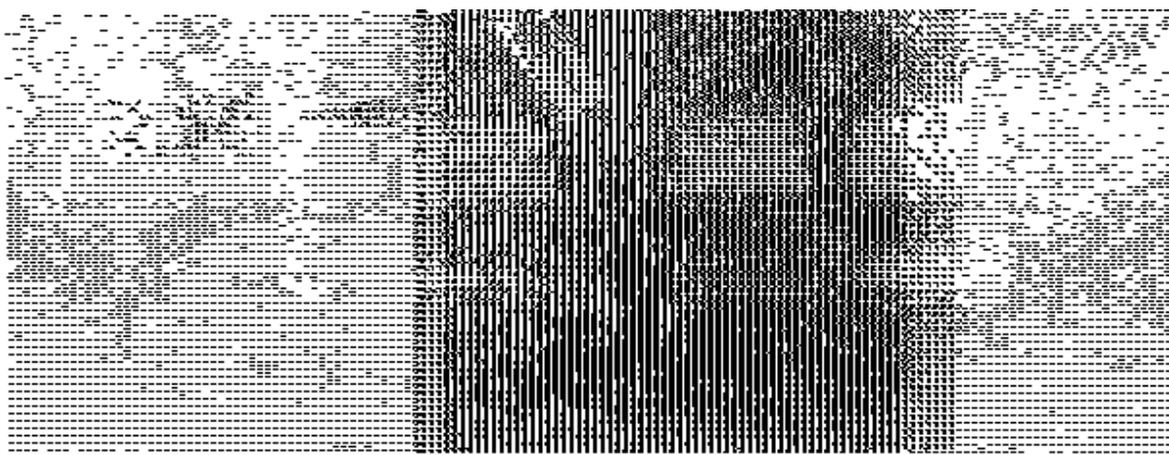


图1 引物 OPI-09(5' TGGAGAGCAG 3')
扩增图谱

箭头示 BT₉₂₄ 中的“目的带”

图2 引物 OPW-20(5' TGTGGCAGCA 3') 扩增图谱
右边箭头示 BT₈₇₂、BT₈₇₃ 中的“新带”

左边箭头示 BT₉₂₄ 中的“缺失带”

M. λDNA - EcoRI/ Hind III; 1. 苏学₅; 2. BT₉₂₄; 3. 素白; 4. 湖₂₀₄; 5. BT₈₇₂; 6. BT₈₇₃; 7. 桂虎斑; N. 无模板对照。

参 考 文 献

- 1 陈元霖, 郑子修, 胡保民. 蓖麻蚕去氧核糖核酸诱导家蚕遗传变异的初步研究. 遗传学报, 1979, 6(1): 83
- 2 陈元霖, 郑子修, 胡保民. 家蚕去氧核糖核酸诱导蓖麻蚕遗传变异的初步研究. 遗传学报, 1979, 6(1): 84
- 3 陈元霖, 郑子修, 胡保民等. 蚕类 DNA 诱导遗传变异的研究——家蚕 DNA 对蓖麻蚕的诱变作用. 中国科学(B 辑); 1981, 9: 1153~1159
- 4 刘春宇, 陈元霖, 桂慕燕等. 家蚕和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
- 6 吴福泉等. 家蚕外源 DNA 诱变品系的选育及其组配研究. 广东农业科学, 1995, 3: 34~37
- 7 刘春宇, 张春玲, 陈元霖. 家蚕和蓖麻蚕的基因组 RAPD 检测. 蚕业科学, 1997, 23(4): 215~220
1997-09-05 收稿, 1997-12-28 修回。

欢迎订阅 1997、1998 年《遗传》增刊

为迎接第十八届国际遗传学大会 1998 年 8 月在北京召开, 向大会推荐优秀论文, 中国遗传学会于 1997 年 8 月、10 月分别在昆明和青岛召开了五届一次植物遗传学术讨论会和动物遗传学术讨论会。《遗传》编辑部已将这两次会议的主要论文审查筛选后汇集成 1997 年《遗传》增刊(动物遗传学专辑)和 1998 年《遗传》增刊(植物遗传学专辑)正式出版发行。

1997 年《遗传》增刊[(97)京新出报刊增准字第 188 号]共 96 页, 发表论文 40 余篇, 内容包括动物分子遗传、动物细胞遗传、动物遗传育种和动物数量遗传等, 每本 10 元。1998 年《遗传》增刊[(98)京新出报刊增准字第 035 号]共 144 页, 发表论文 60 余篇, 内容包括植物分子遗传、植物细胞遗传、植物遗传育种和植物数量遗传等, 每本 20 元。欢迎相关专业的读者订阅, 免收邮费。请将订增刊款寄到: 100101 北京 中国科学院遗传所《遗传》编辑部李绍武收, 附言注明“购 XX 年增刊 XX 册”即可, 收款后即寄来该期增刊和发票。