

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.01039

家蚕黄血抑制基因的 SSR 定位

李霞¹, 李木旺², 郭秋红³, 徐安英¹, 黄勇平³, 郭锡杰^{1,2}

1. 江苏科技大学生物与环境工程学院, 镇江 212018;
2. 中国农业科学院蚕业研究所, 镇江 212018;
3. 中国科学院上海植物生理生态研究所, 上海 200032

摘要: 家蚕黄茧性状主要由 3 个基因控制, 分别是黄血基因(Yellow blood, *Y*), 黄血抑制基因(Yellow inhibitor, *I*) 和黄茧基因(Out-layer yellow cocoon, *C*)。 *I* 基因阻止类胡萝卜素从中肠上皮细胞到血淋巴的转运, 是天然黄茧形成过程中的重要控制基因。利用家蚕雌性不发生交换的特点, 采用黄血黄茧品系 KY 和白血白茧品系巴格达特(Ba)组配正反交群体(Ba×KY)×KY 和 KY×(Ba×KY), 分别记作 BC₁F 和 BC₁M, 根据已经构建的家蚕 SSR 分子标记连锁图谱对 *I* 基因进行了定位及连锁分析。筛选出 3 个与 *I* 基因连锁的 SSR 标记。BC₁F 群中的所有白血个体均表现出与(Ba×KY) F₁ 相同的杂合型带型; 而所有黄血个体带型与亲本 KY 一致, 为纯合型。利用另一个群体 BC₁M 构建了关于 *I* 基因的遗传连锁图, 连锁图的遗传距离为 38.4 cM, 与 *I* 基因最近的引物为 S0904, 图距为 7.4 cM。

关键词: 家蚕; 黄血抑制基因; SSR 定位

Mapping of the yellow inhibitor gene *I* in silkworm *Bombyx mori* using SSR markers

LI Xia¹, LI Mu-Wang², GUO Qiu-Hong³, XU An-Ying², HUANG Yong-Ping³, GUO Xi-Jie^{1,2}

1. College of Biotechnology and Environmental Engineering, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212018, China;
2. Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China;
3. Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China

Abstract: The yellow color of silkworm (*Bombyx mori*) cocoon is mainly controlled by three genes, *Y* (yellow blood), *I* (yellow inhibitor) and *C* (out-layer yellow cocoon) genes. *I* gene locates on the 9th chromosome of silkworm and prevents the transport of carotenoid from epithelia of midgut into hemolymph. Owing to a lack of crossing over in females, reciprocal backcrossed F₁(BC₁) progenies were used for linkage analysis and mapping of the *I* gene based on the SSR linkage map using silkworm strains Baghdad (Ba), which express white hemolymph (*II*+^Y+^Y), and KY, which express yellow hemolymph (+^I+^IYY). The gene of interest was linked to three (S0904, S0905, and S0906) SSR markers. All the individuals with white hemolymph in the BC₁F (BC₁ was generated using F₁ as female) showed heterozygous profile of (Ba×KY) F₁, and the yellow ones in BC₁F showed the homozygous profile of the strain KY. Using a reciprocal BC₁M cross, we con-

收稿日期: 2007-12-15; 修回日期: 2008-04-28

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(编号: 2005CB121000)和江苏省自然科学基金项目(编号: BK2006508)资助[Supported by National Basic Research Program of China(973 Program)(No. 2005CB121000) and Natural Science Foundation of Jiangsu Province(No. BK2006508)]

作者简介: 李霞(1983-), 女, 河南新乡人, 硕士研究生, 专业方向: 家蚕分子遗传学。Tel: 0511-85616575; E-mail: xli007ky@msn.com

通讯作者: 李木旺(1972-), 男, 安徽东至人, 博士, 副研究员, 研究方向: 家蚕功能基因组及分子育种。Tel: 0511-85616575; E-mail: cangene@pub.zj.jsinfo.net

structed a linkage map of 38.4 cM, and the distance between *I* gene and the nearest marker S0904 is 7.4 cM.

Keywords: *Bombyx mori*; yellow inhibitor gene; SSR linkage map

家蚕黄茧性状主要由 3 个基因控制, 分别是黄血基因 (Yellow blood, *Y*)、黄血抑制基因 (Yellow inhibitor, *I*) 和黄茧基因 (Out-layer yellow cocoon, *C*)。*Y* 基因控制类胡萝卜素由中肠进入血淋巴; 而 *I* 基因阻止色素从中肠到血淋巴的转运, 从而抑制 *Y* 基因的表达; *C* 基因通过控制色素从血淋巴到丝腺的吸收过程来决定蚕茧是否为黄色及内层或外层蚕茧着色^[1]。黄茧以黄血基因 *Y* 的存在为前提条件, 而黄血抑制基因 *I* 通过对 *Y* 的抑制而影响茧色的表现。

近年来, 家蚕分子生物学研究取得了长足的进步, 先后构建了 RFLP、RAPD、AFLP、SSR 和 SNP 家蚕分子遗传连锁图^[2~7], 为家蚕基因定位奠定了坚实的基础。SSR 标记由于其高多态性、分布均匀、共显性、高重复性以及能高通量操作等优点, 已经成为目前使用最广泛的第二代分子标记^[8]。Miao 等^[6]构建了一张家蚕的 SSR 分子标记遗传连锁图, Li 等^[9]利用该标记对家蚕浓核病抗性基因 *nsd-Z* 进行了定位。影响家蚕茧色生成的基因较多, Tabunoki 等^[10]发现并克隆了一个类胡萝卜素转运蛋白并证明其在黄色茧的形成中具有重要作用。赵云坡等^[11]筛选了 6 个与 *Y* 基因连锁的 SSR 标记。利用家蚕雌性不发生交换的特点, 本研究采用黄血黄茧品系 KY 和白血白茧品系巴格达特 (Ba) 组配正反交群体 (Ba×KY)×KY 和 KY×(Ba×KY), 根据已经构建的家蚕 SSR 分子标记连锁图谱对 *I* 基因进行定位及连锁分析, 为进一步利用图位克隆分离 *I* 基因奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

家蚕品种为中国农业科学院蚕研究所保存的 KY 和巴格达特 (Ba), KY 是中系二化性品种, 基因型 $YY+^{I+}$, 表型为黄血黄茧; Ba 是欧系一化性品种, 基因型 $+^{Y+}II$, 表型为白血白茧。由于家蚕雌不发生交换, 用 Ba 和 KY 两个近交系组配 F_1 代及 BC_1 回交群体, (Ba×KY)×KY 和 KY×(Ba×KY), 分别记作 BC_1F 和 BC_1M 。 BC_1F 用来进行连锁分析, BC_1M 用来进行重组作图。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取

将黄血个体和白血个体分开上簇, 提取蛹 DNA。将半个蚕蛹放入加有家蚕 DNA 抽提缓冲液的 EP 管中, 用匀浆器研磨。抽提缓冲液的组成: 50 mmol/L 的 Tris-HCl (pH 8.0), 100 mmol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA, 150 μg/mL 的蛋白酶 K。50℃ 消化 8~10 h, 酚氯仿抽提。用异丙醇沉淀 DNA, 最后样品 DNA 溶解在 0.1×TE (pH 8.0) 中, 单头抽提的 DNA 经过分光光度计 (Bio Photometer, Eppendorf) 定量后, 将 DNA 稀释到 10 ng/μL, 按编号顺序存放于 96 孔 PCR 板中, -20℃ 保存备用。

1.2.2 PCR 扩增

PCR 引物选自 SSR 分子标记连锁图^[6], 每连锁群选取在 KY 和 Ba 之间有多态的标记 2 个。PCR 扩增体系: 10× PCR buffer (500 mmol/L KCl, 100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.4, 15 mmol/L MgCl₂) 2 μL; dNTP 各 0.2 mmol/L; 正反向引物各 0.2 μmol/L; *Taq* DNA 聚合酶 0.5 U; DNA 模板 20 ng, 加 ddH₂O 至终体积 20 μL。

PCR 扩增程序: (1) 95℃ 预变性 3 min; (2) 14 个 Touchdown 循环, 94℃ 45 s, 复性温度由 63℃ 每循环依次递减 0.5℃ 直到 56℃, 复性 40 s, 72℃ 延伸 1 min; (3) 24 个正常 PCR 反应循环, 94℃ 40 s, 56℃ 40 s, 72℃ 1 min; (4) 72℃ 10 min。

1.2.3 电泳

PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶检测后, 取 0.5 ng (0.01 pmol/L) 加入蓝色葡聚糖, 然后 95℃ 变性 3 min, 迅速置冰上冷却, 采用 ABI377 (ABI PRISM) 测序仪用 5% 的测序胶电泳检测。

1.2.4 数据分析

采用作图软件 Mapmaker 3.0^[12], 以 3 点作图先初步定位每个标记, 然后根据整个数据阵计算重组值 (*LOD* 取 5.0), 基于 Kosambi 方法, 进行多位点分析, 绘制出连锁群上标记的顺序^[13]。

2 结果与分析

2.1 回交后代的表现型与基因型

F₁ 代($Y^{+^Y}I^{+^I}$)全部表现出白血性状。BC₁F 后代个体数为 429 个, 其中白血个体与黄血个体分别为 222 和 207 个。BC₁M 后代个体数为 369 个, 白血个体数与黄血个体数分别为 175 和 194。经卡平方检测, 两个群体白血与黄血性状分离个体数均符合 1: 1 的分离比。

2.2 与 *I* 基因连锁的 SSR 标记及其在 BC₁F 群中的基因型

经连锁检测分析, 结果发现, 用位于 SSR 分子

连锁图第 9 连锁群的多态性分子标记进行连锁检测时, 11 个黄血个体的电泳带型与 KY 相同, 为纯合型的一条带。11 个白血个体带型与 F₁ 一致, 均为 2 条带, 全部为杂合型(图 1 A, B)。根据孟德尔遗传规律, 父本 KY 以及 BC₁F 群中的黄血个体的基因型为 $+^{+^+}$ 纯合型, 而该群体中的白血个体及母本 F₁ 的基因型应该为 I^{+^I} 杂合型。说明 *I* 基因位于 SSR 分子连锁图的第 9 连锁群, 结果与形态遗传学一致。其他连锁群在 BC₁F 中表现随机分布, 说明与之不连锁。本研究在第 9 连锁群上发现 3 对与 *I* 基因连锁的多态性引物, 分别为 S0904、S0905 和 S0906(表 1)。

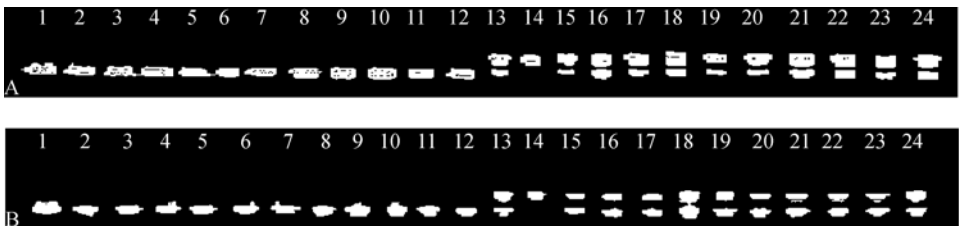


图 1 与 *I* 基因连锁的 SSR 标记(A: S0904; B: S0905)在 BC₁F 群中的遗传方式
1~11: BC₁F 群中的黄血个体; 12: KY-BC₁F 的父本; 13: (Ba×KY)F₁-BC₁F 的母本; 14: Ba-(Ba×KY)F₁ 的母本; 15~24: BC₁F 群中的白血个体。
Fig. 1 Representative inheritance pattern of SSR markers (A: S0904 and B: S0905) linked to *I* in the BC₁F (BC₁ was generated using F₁ as female) cross
1 - 11: Yellow haemolymph individuals; 12: KY, the father of the BC₁F populations; 13: (Ba×KY) F₁, the mother of the BC₁F populations; 14: Ba, the mother of (Ba×KY) F₁; 15 - 24: Individuals with white blood.

表 1 与 *I* 基因连锁的 SSR 标记

标记符号	引物序列
Locus symbol	Primer sequence (5' 3')
S0904	AGTTGGAGGATAGGGATCGTTTT TTGCATTAGTCTGTGGCGAGC
S0905	GTTTCATCAAATCATACTATACCAAATCAAT ATCGGCTCAACTTGTGGGAA
S0906	CCCTTGCCATTTGTCACTC CCCCGCATCGTCCATA

2.3 BC₁M 群的基因型分析及 *I* 基因连锁图

用 192 个 BC₁M 后代来确定与 *I* 基因连锁的多态性引物顺序及遗传距离。其中 96 个为黄血个体, 96 个白血个体。在统计条带时, 个体带型与 KY 一致的(纯合型)记作 1, 与 F₁ 一致的(杂合型)记作 2。在没有发生交换的情况下, 96 个白血个体的带型应该与 F₁ 相同, 96 个黄血个体其带型应该与 KY 相同。如果 BC₁M 群的雄性亲本 F₁ 在 *I* 基因与 SSR 位点之间发生了交换, 相对应的白血后代的带型将与 KY 相同, 而黄血后代与 F₁ 一致。采用作图软件 Mapmaker 3.0, 以 3 点作图先初步定位每个标记, 然后根据整个数据阵计算重组值(*LOD* 取 5.0)。绘制出 *I* 基因的分子连锁图(图 2)。

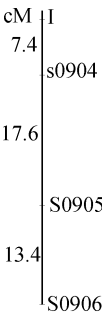


图 2 *I* 基因与 SSR 标记之间的连锁图
Fig. 2 Mapping of *I* gene and SSR markers

SSR 标记及 *I* 基因的排列次序为: *I*、S0904、S0905 和 S0906。连锁图的遗传距离为 38.4 cM, 与 *I* 基因最近的引物为 S0904, 图距为 7.4 cM。

3 讨论

本研究中, 找到 3 对与黄血抑制基因(*I*)连锁的 SSR 引物, 并构建了它们在第 9 连锁群上的连锁图, 大小为 38.4 cM, 与 *I* 基因最近的引物为 S0904。采用 BC₁M 中的黄血个体和白血个体来定位 *I* 基因。由于 SSR 标记是共显性的, 白血表型后代本应该全

部为杂合型, 带型与 F_1 一致, 如果某一个体带型与 KY 相同那么该个体发生了交换; 黄血表型后代本应该全部为纯合型带型, 带型与 KY 相同, 若不同则为交换型个体。如上所述, 利用家蚕的雌性不发生交换的特点, 采用正反交 BC_1 群体进行精确的连锁分析及作图是可行的。由于 SSR 标记在家蚕中分布广泛适合构建图谱, 并且没有品种的特异性, 相对于 RAPDs 或者 AFLP 有着明显的优势, 更适合于定位克隆。第九连锁群上与 I 基因最近的引物为 S0904, 图距为 7.4 cM。SSR 标记及 I 基因的排列次序为: I 、S0904、S0905 和 S0906。由于原连锁图上的 S0901、S0902、S0903 和 S0904 等标记引物在 KY 和 Ba 之间没有多态性, 本研究未能在 I 基因的另一端没有能够找到相关标记, 将其精确定位。有关工作将在后期家蚕基因组精细图的基础上, 筛选更多的 SSR 和 STS 位点, 对其进行精细定位, 并组配相应的大群体, 对该基因进行定位克隆分析。

家蚕黄茧着色是因为类胡萝卜素的存在, 在这些色素的吸收和转运的过程中有多种蛋白的参与。已有的研究显示家蚕中的类胡萝卜素结合蛋白 (Carotenoid-binding protein, CBP) 是依赖 Y 基因的蛋白^[10], 其表达的降低会导致黄茧着色的下降^[14]。编码 CBP 的基因亦从家蚕丝腺 cDNA 文库中得到克隆^[15], 并证实了细胞不能吸收类胡萝卜素是 Y 的等位隐性基因个体表现白血和白茧的根本原因^[16], 即黄茧以黄血基因 I 的存在和表达为前提条件。黄血抑制基因 I 通过对 Y 的抑制而影响茧色的表现, 所以若能对 I 基因进行克隆并对其产物进行分析, 将有助于了解这些基因的功能和调控网络。

参考文献(References):

- [1] LV Hong-Sheng. The Sericultural Science in China. Shanghai: Shanghai Science and Technical Press, 1990.
吕鸿声. 中国养蚕学. 上海: 上海科技出版社, 1990.
- [2] Shi J, Heckel DG, Goldsmith MR. A genetic linkage map for the domesticated silkworm, *Bombyx mori*, based on restriction fragment length polymorphism. *Genet Res*, 1995, 66(2): 109–126.
- [3] Promboon A, Shimada T, Fujiwara H, Kobayashi M. Linkage map of random amplified DNAs (RAPDs) in the silkworm, *Bombyx mori*. *Genet Res*, 1995, 66(1): 1–7.
- [4] Yasukochi Y. A dense genetic map of the silkworm, *Bombyx mori*, covering all chromosomes based on 1018 molecular markers. *Genetics*, 1998, 150(4): 1513–1525.
- [5] Tan YD, Wan C, Zhu Y, Lu C, Xiang Z, Deng HW. An amplified fragment length polymorphism map of the silkworm. *Genetics*, 2001, 157(3): 1277–1284.
- [6] Miao XX, Xub SJ, Li MH, Li MW, Huang JH, Dai FY, Marino SW, Mills DR, Zeng P, Mita K, Jia SH, Zhang Y, Liu WB, Xiang H, Guo QH, Xu AY, Kong XY, Lin HX, Shi YZ, Lu G, Zhang X, Huang W, Yasukochi Y, Sugasaki T, Shimada T, Nagaraju J, Xiang ZH, Wang SY, Goldsmith MR, Lu C, Zhao GP, Huang YP. Simple sequence repeat-based consensus linkage map of *Bombyx mori*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(45): 16303–16308. [\[DOI\]](#)
- [7] Yamamoto K, Narukawa J, Kadono-Okuda K, Nohata J, Sasanuma M, Suetsugu Y, Banno Y, Fujii H, Goldsmith MR, Mita K. Construction of a single nucleotide polymorphism linkage map for the silkworm, *Bombyx mori*, based on bacterial artificial chromosome end sequences. *Genetics*, 2006, 173(1): 151–161. [\[DOI\]](#)
- [8] Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res*, 1989, 17(16): 6463–6471. [\[DOI\]](#)
- [9] Li M, Guo Q, Hou C, Miao X, Xu A, Guo X, Huang Y. Linkage and mapping analyses of the denosonucleosis non-susceptible gene *nsd-Z* in the silkworm *Bombyx mori* using SSR markers. *Genome*, 2006, 49(4): 397–402. [\[DOI\]](#)
- [10] Tabunoki H, Higurashi S, Ninagi O, Fujii H, Banno Y, Nozaki M, Kitajima M, Miura N, Atsumi S, Tsuchida K, Maekawa H, Sato R. A carotenoid-binding protein (CBP) plays a crucial role in cocoon pigmentation of silkworm (*Bombyx mori*) larvae. *FEBS Letters*, 2004, 567(2): 175–178. [\[DOI\]](#)
- [11] ZHAO Yun-Po, XU An-Ying, LI Mu-Wang, LI Ming-Hui, GUO Qiu-Hong, SUN Ping-Jiang, QIAN He-Ying, ZHANG Yue-Hua, GUO Xi-Jie. SSR based linkage and mapping and analysis of yellow blood (Y) gene in silkworm, *Bombyx mori*. *Science of Sericulture*, 2006, 32(4): 464–468.
赵云坡, 徐安英, 李木旺, 李明辉, 郭秋红, 孙平江, 钱荷英, 张月华, 郭锡杰. 利用 SSR 标记对家蚕黄血基因的定位及连锁分析. *蚕业科学*, 2006, 32(4): 464–468.
- [12] Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newburg L. MAPMAKER: an interactive computer package for constructive primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, 1987, 16(2): 224–230.
- [13] Kosambi DD. The estimation of map distances from recombination values. *Ann Eugen*, 1944, 12(3): 172–175.
- [14] Tsuchida K, Jouni ZE, Gardetto J, Kobayashi Y, Tabunoki H, Azuma M, Sugiyama H, Takada N, Maekawa H, Banno Y, Fujii H, Iwano H, Wells MA. Characterization of the carotenoid-binding protein of the Y-gene dominant mutants of *Bombyx mori*. *J Insect Physiol*, 2004, 50(4): 363–372. [\[DOI\]](#)
- [15] Tabunoki H, Sugiyama H, Tanaka Y, Fujii H, Banno Y, Jouni ZE, Kobayashi M, Sato R, Maekawa H, Tsuchida K. Isolation, characterization, and cDNA sequence of a carotenoid binding protein from the silk gland of *Bombyx mori* larvae. *J Biol Chem*, 2002, 277(35): 32133–32134. [\[DOI\]](#)
- [16] Tsuchida K, Katagiri C, Tanaka Y, Tabunoki H, Sato R, Maekawa H, Takada N, Banno Y, Fujii H, Wells MA, Jouni ZE. The basis for colorless hemolymph and cocoons in the Y-gene recessive *Bombyx mori* mutants: a defect in the cellular uptake of carotenoids. *J Insect Physiol*, 2004, 50(10): 975–983. [\[DOI\]](#)