

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2010.00054

结合 SSR 标记和 STS 标记对家蚕无鳞毛翅基因的定位

王修业¹, 李木旺^{1,2}, 赵云坡³, 徐安英^{1,2}, 郭秋红³, 黄勇平³, 郭锡杰^{1,2}

1. 中国农业科学院蚕业研究所, 镇江 212018;
2. 江苏科技大学生物技术与环境工程学院, 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: 家蚕突变表型无鳞毛翅(*non-lepis wing*, *nlw*)由隐性基因 *nlw* 控制。由于家蚕雌性不发生交换, 文章采用有鳞毛翅品系 P50 和无鳞毛翅品系 U06 两个品系组配 F₁ 代及 BC₁ 回交群体, (U06×P50)×U06 和 U06×(U06×P50) 分别记作 BC₁F 和 BC₁M, 根据已经构建的家蚕 SSR 分子标记连锁图谱及已经发表的有关序列对 *nlw* 基因进行了连锁及定位分析。得到 8 个与 *nlw* 基因连锁的 SSR(Simple sequence repeat)标记和 1 个 STS(Sequence-tagged sites)标记。BC₁F 群中的所有正常翅个体均表现出与(U06×P50)F₁ 相同的杂合带型; 而所有无鳞毛个体带型与亲本 U06 一致, 为纯合型。利用 BC₁M 群体构建了关于 *nlw* 基因的遗传连锁图, 连锁图的遗传距离为 125.7 cM, 与 *nlw* 基因最近的引物为 STS 标记 cash2p, 图距为 11.4 cM。

关键词: 家蚕; 无鳞毛基因; 基因定位; SSR; STS

Mapping of non-lepis wing gene *nlw* in silkworm (*Bombyx mori*) using SSR and STS markers

WANG Xiu-Ye¹, LI Mu-Wang^{1,2}, ZHAO Yun-Po³, XU An-Ying^{1,2}, GUO Qiu-Hong³, HUANG Yong-Ping³, GUO Xi-Jie^{1,2}

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

Abstract: The non-lepis wing of silkworm (*Bombyx mori*) is controlled by the recessive gene, *nlw*. Owing to lack of crossing over in females, the reciprocal backcrossed F₁ (BC₁) progenies were used for linkage analysis and mapping of *nlw* based on the SSR linkage map and STS markers using the wild type (+^{*nlw*}/+^{*nlw*}) silkworm strain P50 and U06 with scaleless wing (*nlw/nlw*). The *nlw* gene was linked to eight SSR markers and one STS marker. All the individuals with the wild type in the BC₁F (Using F₁ as female to backcross to the recessive parent, that is (U06×P50)×U06) showed heterozygous profile of (U06×P50) F₁, and the ones with non-lepis wing in BC₁F exhibited the homozygous profile of the strain U06. Using a reciprocal BC₁M (Using F₁ as male to backcross to the recessive parent, that is U06×(U06×P50))cross, we constructed a linkage map of 125.6 cM, and the distance between *nlw* and the nearest marker cash2p was 11.4 cM.

Keywords: *Bombyx mori*; non-lepis wing; gene location; simple sequence repeat (SSR); sequence-tagged sites (STS)

收稿日期: 2009-05-26; 修回日期: 2009-09-13

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(编号: 2005CB121004), 农业部行业专项(编号: nyhyzx07-020)和江苏省青蓝工程项目资助

作者简介: 王修业(1984-), 男, 硕士研究生, 专业方向: 特种经济动物饲养。Tel: 0511-85616575; E-mail: DNA1984@126.com

通讯作者: 李木旺(1972-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 家蚕分子遗传学。Tel: 0511-85616575; E-mail: muwang_li@hotmail.com

家蚕作为鳞翅目的重要昆虫,其特征之一就是成虫的翅上附有一层鳞毛^[1],就像其他鳞翅目昆虫如蝴蝶一样。然而在我国神农架和重庆彭水县先后发现了家蚕的一种突变体,其成虫具有无鳞毛翅(*non-lepis wing, nlw*)^[2,3]。Zhou 等^[4~6]在形态学和发育水平对无鳞毛翅进行了发生机制的研究;代方银等^[3]将 *nlw* 定位在第 13 号染色体上,并育成了 13 号连锁群上包括 *nlw* 在内的三隐性系统。

随着家蚕分子生物学的发展,先后构建了 RFLP、RAPD、AFLP、SSR、SNP 家蚕分子遗传连锁图^[7~12],为家蚕基因定位与图位克隆奠定了坚实的基础。微卫星或简单重复序列(Simple sequence repeat, SSR)由于具有高度多态性,分布均匀,共显性,高度重复性以及便于高通量操作等优点,成为基因定位、QTL 分析、遗传多样性、图位克隆及分子标记辅助育种等工作的有力工具^[13~15]。Miao 等^[11]构建了家蚕的 SSR 分子标记遗传连锁图, Li 等^[16]已利用该标记对家蚕浓核病抗性基因 *nsd-Z* 进行了定位分析,此外,家蚕的黄血黄茧性状也得到了 SSR 定位^[17~19]。序列标签位点(Sequence-tagged sites, STS)^[20]在 1989 年被提出后最早用于人类基因组作图,以其在基因组中有唯一的定位这一特点被广泛应用于基因定位和种质鉴定^[21]。本研究采用有鳞毛正常品系 P50 和无鳞毛突变体 U06 组成正反测交群体(U06×P50)×U06 和 U06×(U06×P50),利用已构建的家蚕 SSR 标记连锁图和已得的一个 STS 标记对家蚕 *nlw* 基因进行了连锁及定位分析,为图位克隆家蚕 *nlw* 基因奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

所用家蚕品种为 P50 和 U06,均保存于中国农业科学院蚕业研究所。P50 基因型为⁺*nlw*⁺*nlw*,表型为有鳞毛翅;U06 基因型为 *nlw nlw*,表型为无鳞毛翅。由于家蚕雌不发生交换,用 P50 和 U06 两个品系组配 F₁ 代及 BC₁ 回交群体, (U06×P50)×U06 和 U06×(U06×P50)分别记作 BC₁F 和 BC₁M。BC₁F 用来进行连锁分析,BC₁M 用来进行重组作图。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取

待蚕蛾羽化后,根据其翅膀上是否有鳞毛进行分型,每个雌雄个体单独抽提基因组 DNA。取 1/3 蛾放入研钵中,用液氮研磨,倒入含有 600 μL 家蚕 DNA 抽提缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 100 mmol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA)的 EP 管中,加入 5 μL 20 mg/mL 的蛋白酶 K, 50℃ 消化过夜,酚/氯仿抽提,无水乙醇沉淀 DNA,最后用 200 μL 灭菌去离子水溶解,每个个体的基因组 DNA 经过分光光度计(Bio Photometer, Eppendorf)定量后,将 DNA 稀释到 10 ng/μL 于 96 孔 PCR 板, -20℃ 保存备用。

1.2.2 PCR 反应

参照 SSR 分子标记连锁图^[11],每连锁群选取在 P50 和 U06 之间有多态的标记 2 个,用 BC₁F 筛选与 *nlw* 连锁的标记, STS 标记 cash2p 来自于参考文献[5],最后获得与 *nlw* 连锁的多态引物如表 1 所示。PCR 反应体系: 10×PCR Buffer (500 mmol/L KCl, 100 mmol/L Tris-Cl, 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。

表 1 与 *nlw* 基因连锁的 SSR 和 STS 标记

标记符号	引物序列 (5' 3')
S1302	GTCCGTTCAAGCTTATCGTCA AGCATCCCCACTATCGTCAACT
S1303	GCATCCCCACTATCGTCAACTAAAC TCCGTTCAAGCTTATCGTCAGTA
S1304	GTGTTGGACTCCCTAATAATGATGAC TGATAAACGGTCGAAAGGATAGG
S1305	GCCTTTATTAACGGATGCGGG AATGAGCGATTTAGTGGGCAA
cash2p	GTATAACAACCTTTGGATTAATTGG GATTGGACTCAGTATATTCG
S1309	TTACAACCTTTGAGATGCGATTTT GCAGATTTAATCGGCGTTCCC
S1310	CAGTGCGAGTATTACAAGAAACAGATT GCGATAAGACCGCCAATTGTA
S1311	ACTACCCGTAGTTGTAATTTGATCTTTT ACGTGTTTGGTTTGCTCGCT
S1314	GCGACAGATCGTTACGGCTAGA TTTTGCGGTGTTTAGTATTGTGG

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

STS 标记 cash2p 的扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶检测。SSR 标记的 PCR 产物经琼脂糖凝胶检测后, 取约 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

根据 ABI377 测序仪电泳结果, 利用 MAPMAKER 3.0 [22] 作图软件, 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), 再用 Kosambi 方法 [23] 进行多点分析绘制连锁图。

2 结果与分析

2.1 回交后代的表现型与基因型

F_1 代 ($+^{nlw}nlw$) 全部为正常有鳞毛个体。 BC_1F 后代个体数为 368 个, 其中正常个体与无鳞毛个体分别为 196 和 172 个。 BC_1M 后代个体数为 187 个, 正常个体数与无鳞毛个体数分别为 102 和 85。经卡平方检测, 卡平方值分别为 1.55 和 1.57, 说明两个群体两个性状分离个体数均符合 1:1 的分离比。

2.2 与 nlw 基因连锁的 SSR 标记及其在 BC_1F 群中的基因型

连锁检测结果显示, 用位于 SSR 分子连锁图第 13 连锁群的多态性分子标记进行连锁检测时, 11 个无鳞毛个体的电泳带型与 U06 相同, 为纯合型的一条带。11 个有鳞毛个体带型与 F_1 一致, 均为杂合型

的 2 条带 (图 1: A、B), 与 cash2p 引物 [5] 的扩增结果一致。根据孟德尔遗传规律, 父本 U06 以及 BC_1F 群中的无鳞毛个体的基因型为 $nlw\ nlw$ 纯合型, 而该群体中的有鳞毛个体及母本 F_1 的基因型应该为 $+^{nlw}nlw$ 杂合型。说明 nlw 基因位于 SSR 分子连锁图的第 13 连锁群。其他连锁群在 BC_1F 中表现随机分布, 说明不与之连锁。本研究在第 13 连锁群上发现 9 对与 nlw 基因连锁的多态性引物, 分别为 S1302、S1303、S1304、S1305、cash2p、S1309、S1310、S1311 和 S1314。

2.3 BC_1M 群的基因型分析及 nlw 基因连锁图

利用 BC_1M 后代的 187 个个体来确定与 nlw 基因连锁的 9 对多态性引物的顺序及遗传距离。其中 85 个为无鳞毛个体, 102 个正常个体, 在统计时, 个体带型与 U06 一致的 (纯合型) 记作 1, 与 F_1 一致的 (杂合型) 记作 2。在没有发生交换的情况下, 85 个无鳞毛个体的带型应该与 U06 相同, 102 个有鳞毛个体其带型应该与 F_1 相同。如果 BC_1M 群的雄性亲本 F_1 在 nlw 基因与标记之间发生了交换, 相对应的有鳞毛后代的带型将与 U06 相同, 而无鳞毛后代与 F_1 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 nlw 基因的分子连锁图。SSR 标记及 nlw 基因的排列次序为: S1302、S1303、S1304、S1305、 nlw 、cash2p、S1309、S1310、S1311 和 S1314。连锁图的遗传距离为 125.7 cM, 与 nlw 基因最近的引物为 cash2p, 图距为 11.4 cM (图 2)。

2.4 S1305 和 cash2p 之间 ORF 的预测

根据定位结果, 将距离 nlw 两侧最近的标记的

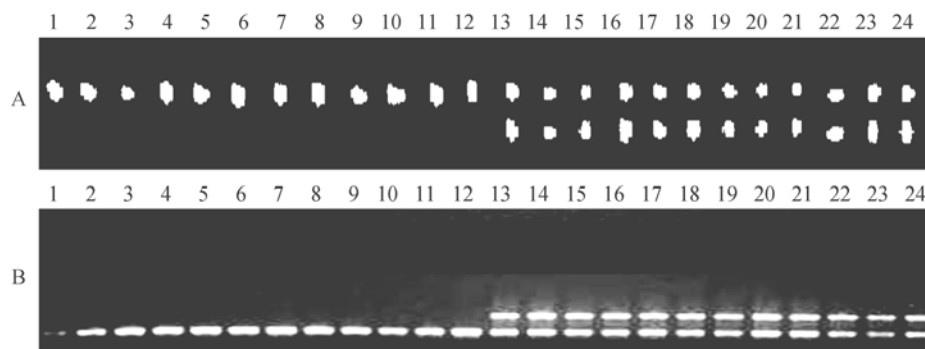


图 1 与 nlw 基因连锁的 SSR 标记在 BC_1F 群中的遗传方式

A: S1303; B: cash2p。1~11: BC_1F 群中的无鳞毛个体; 12: U06- BC_1F 的父本; 13: (U06 x P50) F_1 - BC_1F 的母本; 14~24: BC_1F 群中的有鳞毛个体。

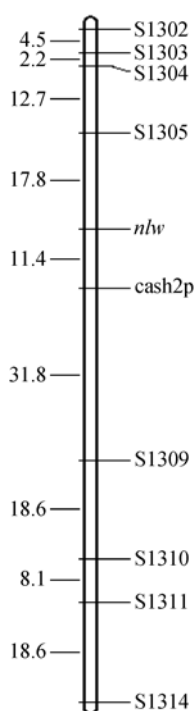


图 2 *nlw* 基因与 SSR 和 STS 标记之间的连锁图

基因组序列进行比对, Kaikoblast 结果显示 S1305 与 *cash2p* 之间的物理距离为 3.2 Mb, 在一个 ORF 至少有 100 个氨基酸的条件下, Clonemanager 软件检测到 726 个 ORF。

3 讨论

由于 SSR 标记是共显性的, BC_1 代中正常翅个体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 U06 相同, 那么该个体发生了交换; 无鳞毛翅个体本应该全部为纯合型, 带型与 U06 相同, 若不同则为交换型个体。如上所述, 利用家蚕雌性不发生交换的特点, 采用正反交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, 并且没有品种的特异性, 比 RAPDs 或者 AFLP 有着明显的优势, 更适合于定位克隆。本研究在 13 号连锁群上找到 9 对与 *nlw* 连锁的引物, 并构建了它们在第 13 连锁群上的连锁图。虽然本实验所用群体多态性明显, 但 S1306、S1307、S1308 在该群体中没有多态, 导致 S1305 和 *cash2p* 之间距离过大(29.2 cM), 应进一步在两引物之间设计并筛选新的 SSR 和 STS 位点对 *nlw* 进行精细定位, 并组配相应的大群体, 对该基因进行图位克隆。

Zhou 等^[5]利用果蝇与家蚕中基因的同源性设计

了 *cash2p* 引物, 此引物在家蚕 cDNA 中扩增一段被称为 *Bm-ASH1* 的基因, 文章认为 *Bm-ASH1* 基因在家蚕鳞毛发育过程中起了重要作用, 经 Blast 发现该基因位于第 13 号连锁群上, 而代方银等^[3]认为 *nlw* 也在 13 号连锁群上, 所以我们推测两者有可能是同一个基因。本实验中 *cash2p* 在 BC_1F 中的扩增结果显示 *nlw* 基因确实在第 13 号连锁群上, 验证了代方银等的结果, 而在 BC_1M 中的扩增情况又表明我们要找的 *nlw* 基因并不是 *Bm-ASH1*。Zhou 等^[6]后来在家蚕中又发现 3 个与胚胎和鳞毛发育相关的基因: *Bm-ASH2*、*Bm-ASH3* 和 *Bm-ase*, Blast 显示三者都在第 13 号连锁群上, 其中 *Bm-ase* 在我们筛到的两个标记 S1305 和 *cash2p* 之间, 在物理距离上 *Bm-ASH1* 和 *Bm-ase* 之间有 115 kb, 而图距显示 *Bm-ASH1* 与 *nlw* 相距 11.4 cM, 所以 *Bm-ase* 是否为 *nlw* 仍需要进一步的验证。这些与家蚕无鳞毛发育相关的基因以家族的形式出现在同一条染色体上, 并且都在同一个 Scaffold 上, 它们在后基因时期如何调控鳞毛的发生都值得进一步研究, 所以若能对 *nlw* 基因进行克隆并对其产物进行分析, 将有助于了解无鳞毛发生及发育的调控网络。

参考文献(References):

- [1] 吕鸿声. 中国养蚕学. 上海: 上海科技出版社, 1990.
- [2] 张志芳, 秦俭. 蚕蛾透明翅的研究. 蚕业科学, 1991, 17(3): 186-187.
- [3] 代方银, 谭端, 童晓玲, 胡海, 鲁成, 向仲怀. 含有母性影响遗传基因的连锁定位系的构建. 遗传, 2007, 29(11): 1393-1398.
- [4] Zhou QX, Tang SM, Chen Y, Yi YZ, Zhang ZF. A scaleless wings mutant associated with tracheal system developmental deficiency in wing discs in the silkworm, *Bombyx mori*. *Int J Dev Biol*, 2004, 48(10): 1113-1117.
- [5] Zhou QX, Li YN, Shen XJ, Yi YZ, Zhang YZ, Zhang ZF. The scaleless wings mutant in *Bombyx mori* is associated with a lack of scale precursor cell differentiation followed by excessive apoptosis. *Dev Genes Evol*, 2006, 216(11): 721-726.
- [6] Zhou QX, Zhang TY, Xu WH, Yu LL, Yi YZ, Zhang ZF. Analysis of four achaete-scute homologs in *Bombyx mori* reveals new viewpoints of the evolution and functions of this gene family. *BMC Genet*, 2008, 9(24): doi: 10.1186/1471-2156-9-24.
- [7] 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: 109-126.
- [8] Promboon A, Shimada T, Fujiwara H, Kobayashi M.

- Linkage map of random amplified DNAs (RAPDs) in the silkworm, *Bombyx mori*. *Genet Res*, 1995, 66: 1-7.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] Miao XX, Xu SJ, Li MH, Li MW, Huang JH, Dai FY, Marino SW, Mills DR, Zeng PY, Mita K, Jia SH, Zhang Y, Liu WB, Xiang H, Guo QH, Xu AY, Kong XY, Lin HX, Shi YZ, Lu G, Zhang XL, 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.
- [12] 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.
- [13] Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res*, 1989, 17(16): 6463-6471.
- [14] 毛瑞鑫, 刘福军, 张晓峰, 张研, 曹顶臣, 鲁翠云, 梁利群, 孙效文. 鲤鱼乳酸脱氢酶活性的 QTL 检测. *遗传*, 2009, 31(4): 407-411.
- [15] 侯成香, 李木旺, 张月华, 钱荷英, 孙平江, 徐安英, 苗雪霞, 郭秋红, 相辉, 黄勇平. 利用 SSR 标记进行家蚕部分品种资源的指纹图谱分析. *中国农业科学*, 2006, 39(10): 2124-2131.
- [16] Li M, Guo Q, Hou C, Miao X, Xu A, Guo X, Huang Y. Linkaged and mapping analyses of the denosinosis non-susceptible gene *nsd-Z* in the silkworm *Bombyx mori* using SSR markers. *Genome*, 2006, 49(4): 397-402.
- [17] 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进行定位及连锁分析. *蚕业科学*, 2006, 32(4): 464-468.
- [18] 李霞, 李木旺, 郭秋红, 徐安英, 黄勇平, 郭锡杰. 家蚕黄血抑制基因的 SSR 定位. *遗传*, 2008, 30(8): 1039-1042.
- [19] Zhao YP, Li MW, Xu AY, Hou CX, Li MH, Guo QH, Huang YP, Guo XJ. SSR based linkage and mapping analysis of *C*, a yellow cocoon gene in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Science*, 2008, (15): 399-404.
- [20] Olson M, Hood L, Cantor C, Bostein D. A common language for physical mapping of the human genome. *Science*, 1989, 245(4925): 1434-1435.
- [21] Chandra A, Kaushal P. Identification of diploid *Stylosanthes scabra* accessions from existing germplasm of *S. scabra* utilizing genome-specific STS markers and flow cytometry, and their molecular characterization. *Mol Biotechnol*, 2009, 42(3): 282-291.
- [22] Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newberg L. MAPMAKER: an interactive computer package for constructive primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, 1987, 1(2): 174-181.
- [23] Kosambi DD. The estimation of map distances from recombination values. *Ann Eugen*, 1944, 12(2): 172-175.

• 综合信息 •

中国遗传学会模式生物与人类健康研讨会第一轮通知

模式生物是指一类被深入研究旨在揭示特定生命现象普遍规律的生物物种。大多数生物学过程在长期的进化过程中是高度保守的, 因此, 许多生物学过程在大多数或所有的模式生物中都是类似的, 模式生物也因此在生物学研究中具有不可替代的重要作用。模式生物应用与人类健康研究有着紧密的联系。为此, 中国遗传学会拟于 2010 年 4 月在江西南昌举办主题为“模式生物与人类健康”的研讨会。会议将邀请我国遗传学、细胞生物学、分子生物学和发育生物学等研究领域的专家和代表, 就国内外相关领域的最新进展举行演讲和探讨。希望通过此次研讨会, 推动模式生物在国内生物学和医学研究中的应用, 促进交流与合作, 会议将评选青年学者论文, 并从投稿论文中遴选报告人, 为青年学者提供学术交流的平台。

1. 主办单位: 中国遗传学会 中国军事医学科学院生物工程所 江西农业大学

2. 承办单位: 中国遗传学会发育遗传委员会 动物遗传委员会

3. 会议组织委员会: 薛勇彪 孟安明 杨晓 杨维才 王海波 王铸钢 林鸿宣 金力 傅松滨 朱大海 高翔 李宁 黄路生 陈大华 吴晓晖

4. 征文内容: 与人类健康研究相关的各类模式生物的发展和稳态维持、生理和病理特征、遗传修饰和分子机制等基础和应用研究。征文截止日期: 2010 年 2 月 10 日

5. 会议时间、地点: 2010 年 4 月上旬在江西南昌召开。具体事宜详见第二轮通知。

6. 报名信箱: geneticsociety@163.com

中国遗传学会