

家蚕 *Bm Tpi* 基因 Z 染色体定位牛宝龙^{1,2}, 吕顺霖¹, 翁宏彪², 沈卫锋², 孟智启^{2*}

(1. 浙江大学动物科学学院 杭州 310029; 2. 浙江省农业科学院蚕桑研究所 杭州 310021)

摘要: 采用实时定量 PCR 技术, 以家蚕 *Bombyx mori* 第 11 号染色体上的 *DH-PBAN* 基因为参照基因, 检测家蚕不同个体间 *Bm Tpi* 基因与常染色体上 *DH-PBAN* 基因的拷贝数之比。雄体 *Bm Tpi*: *DH-PBAN* = 1.0, 雌体 *Bm Tpi*: *DH-PBAN* = 0.5。并用已经定位于 Z 染色体上的 *Bm Kettin* 基因为参照, 检测 *Bm Tpi* 基因的拷贝数与 *Bm Kettin* 基因的拷贝数之比。雄体 *Bm Tpi*: *Bm Kettin* = 1.0, 雌体 *Bm Tpi*: *Bm Kettin* = 1.0, 证明 *Bm Tpi* 基因在家蚕基因组中的拷贝数与 *Bm Kettin* 基因相同, 说明 *Bm Tpi* 基因位于 Z 染色体上。

关键词: 家蚕; *Bm Tpi* 基因; *DH-PBAN* 基因; *Bm Kettin* 基因; Z 染色体; 实时定量 PCR

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2005)04-0622-05

Localization of the *Tpi* gene on Z chromosome of the silkworm, *Bombyx mori* by real-time quantitative PCR

NIU Bao-Long^{1,2}, LU Shun-Lin¹, WENG Hong-Biao², SHEN Wei-Feng², MENG Zhi-Qi^{2*} (1. College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; 2. Sericulture Research Institute, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

Abstract: The ratio of copy number between *Bm Tpi* and *DH-PBAN*, which is located on the 11th chromosome was detected with the real-time quantitative PCR technique. It was 1.0 in males and 0.5 in females. The ratio of copy number between *Bm Tpi* and *Bm Kettin*, which is located on Z chromosome, was same in males and females. This indicated that the copy number of *Bm Tpi* was equal to that of *Bm Kettin* in the silkworm genome, i. e. one copy in females and two in males. The results suggest that *Bm Tpi* is located on Z chromosome in the genome of silkworm.

Key words: *Bombyx mori*; *Bm Tpi*; *DH-PBAN*; *Bm Kettin*; Z chromosome; real-time quantitative PCR

家蚕 *Bombyx mori* 的性染色体属于 ZW 型, 雄性为 ZZ, 雌性为 ZW。细胞内 Z 染色体数与常染色体组数之比在雌雄间存在差异, 雄性为 2Z:2A = 1.0, 雌性为 Z:2A = 0.5。如果 Z 染色体上基因在雌性中为 1 个拷贝, 则雄性中为 2 个拷贝, 雌雄间拷贝数存在差异, 其表达产物是否也不一样? 即是否有剂量补偿现象? Suzuki 等(1998, 1999)克隆了家蚕的 2 个 Z 连锁基因 *T15.180a* 和 *Bm Kettin*, 发现这 2 个基因的 mRNA 在雄性中的表达量是雌性的 2 倍, 这说明家蚕没有剂量补偿现象。

研究表明, 鳞翅目纯蛱蝶属 *Heliconius* 昆虫的 *Tpi* 基因位于 Z 染色体上, *Tpi* 基因型差异与种内拟态多样性及种间杂交不育有关, 是进行物种隔离研究的基础(Jiggins *et al.*, 2001a, 2001b; Beltran *et al.*, 2002; Naisbit *et al.*, 2002; Flanagan *et al.*, 2004)。我们利用家蚕的 EST 数据库成功克隆了家

蚕 *Tpi* 基因(简称 *Bm Tpi*, GenBank 序列号: AY734490, 另文发表), 并分析了其基因结构。

为了进一步确定 *Bm Tpi* 基因是否在家蚕的 Z 染色体上, 我们采用实时定量 PCR 技术, 以家蚕第 11 号染色体上的 *DH-PBAN* 基因为参照基因, 检测家蚕雌雄不同个体间 *Bm Tpi* 基因与常染色体上 *DH-PBAN* 基因的拷贝数之比, 将 *Bm Tpi* 基因定位于 Z 染色体上; 并用已经定位于 Z 染色体上的 *Bm Kettin* 基因为参照, 定量 PCR 检测 *Bm Tpi* 基因的拷贝数与 *Bm Kettin* 基因的拷贝数之比, 验证 *Bm Tpi* 基因在家蚕基因组中的拷贝数。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

限制酶、T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶和克

基金项目: 国家自然科学基金项目(30371087)

作者简介: 牛宝龙, 男, 1967 年生, 博士研究生, 研究方向为分子生物学, Tel.: 0571-86404173; E-mail: niubaolong@hotmail.com

* 通讯作者 Author for correspondence, Tel.: 0571-86404173; E-mail: csswsjz@zaas.org

收稿日期 Received: 2004-11-03; 接受日期 Accepted: 2005-03-07

隆载体 pMD-T 为 TaKaRa 公司产品 ; 特异性引物、探针合成、DNA 序列测定委托 TaKaRa 公司进行。宿主菌 *E. coli* TG1 为本实验室保存。p50 家蚕由浙江省农业科学院蚕桑研究所提供。核酸蛋白质分析仪为 Beckman 公司 Spectrophotometer DU 640。离心机为 Eppendorf 公司 5417R, 定量 PCR 仪为美国 ABI 公司生产的 7700 Sequence Detector 分析仪。

1.2 家蚕个体基因组 DNA 的提取及其浓度测定

取每头家蚕蛹的脂肪组织少许, 分别放入 1.5 mL 离心管中, 用牙签捣碎, 提取过程参照夏庆友等

(1996) 的方法进行, 获得的 DNA 溶于 100 μ L TE。取 10 μ L DNA 溶液, 用 TE 稀释到 100 μ L, 在核酸蛋白质分析仪 Spectrophotometer DU 640 上测定 260 nm 及 280 nm 的 OD 值, 计算 DNA 溶液的浓度。根据所测定的浓度稀释成 100 ng/ μ L 的浓度, 作为定量 PCR 反应的模板。

1.3 引物合成

根据 GenBank 登录的 *DH-PBAN* 基因(序列号: D16230)、*Bm Kettin*(序列号: AB079865) 和 *Bm Tpi* 基因(序列号: AY734490) 序列合成引物(表 1)。

表 1 用于扩增 *Bm Tpi*、*DH-PBAN* 和 *Bm Kettin* 基因的引物

Table 1 Details of the primers used for the amplification of *Bm Tpi*, *DH-PBAN* and *Bm Kettin* gene

基因 Gene	引物 Primer	扩增产物长度(碱基对) Size of the amplification product (bp)	
<i>Bm Tpi</i> (AY734490)	<i>Bm Tpi</i> -F	5'-GGTGTTCCTGCTATTACCTGTCT-3'	
	<i>Bm Tpi</i> -R	5'-ATGACCAAGTATAACCCAATTTACT-3'	265
	探针 Probe	5'-FAM-CAGAACTGTTGGAAGTCTCCA-MGB-3'	
<i>DH-PBAN</i> (D16230)	<i>DH-PBAN</i> -F	5'-AAAGCGACAGAGGAGCTCACAGTGA-3'	
	<i>DH-PBAN</i> -R	5'-GGTTCATCGGCTTGCCTCTCGT-3'	270
	探针 Probe	5'-VIC-GATCAATGAAGCCATCCACTG-MGB-3'	
<i>Bm Kettin</i> (AB079865)	<i>Bm Kettin</i> -F	5'-CATAATCAAACGACTCTTAGGGTAAAG-3'	
	<i>Bm Kettin</i> -R	5'-GACGCGATTTCGATTGCCGCGTCAC-3'	296
	探针 Probe	5'-VIC-GCAAGAGACGTATGTGCAAGA-MGB-3'	

1.4 定量 PCR 检测 *Bm Tpi* 基因拷贝数

1.4.1 标准曲线的制定: 以家蚕基因组 DNA 为模板, 用 *Bm Tpi*-F、*Bm Tpi*-R 引物进行 PCR 扩增, 回收 PCR 产物, 与 pMD-T 载体(摩尔比为 3:1) 连接, 挑选阳性克隆, 测序, 质粒抽提后用分光光度计分别测定 *Bm Tpi* 基因克隆的 A_{260nm} 值, 计算质粒浓度, 根据公式: 浓度(μ g/ μ L) $\times 6.02 \times 10^{23}$ / 分子质量 $\times 10^9$ 将其换算为拷贝数。再依次稀释至 2×10^7 、 2×10^6 、 2×10^5 、 2×10^4 、 2×10^3 、 2×10^2 个拷贝/ μ L, 作为制备定量 PCR 检测的标准模板。

PCR 的反应体系: 不同稀释浓度的 *Bm Tpi* 质粒模板 5 μ L; *Bm Tpi* 基因定量 PCR 检测引物各 1 μ L (20 pmol); *Bm Tpi* 基因探针 10 pmol; dNTPs 1 μ L (各 2.5 mmol/L); $10 \times$ 反应缓冲液 2.5 μ L; MgCl₂ 2 μ L (25 mmol/L); Taq 聚合酶 1 U, 补加水至 25 μ L, 在定量 PCR 仪 7700 Sequence Detector 上进行 DNA 扩增和分析。

PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s; 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 32 个循环, 60 $^{\circ}$ C 时采集荧光, 检测 FAM 的荧光强度(波长为 510

nm)。反应结束后用定量 PCR 仪的分析软件对实验结果进行分析, 用已知基因拷贝数与 PCR 循环域值 (cycle threshold, Ct) 的关系绘制标准曲线。

分别用同样的方法制定 *DH-PBAN* 基因及 *Bm Kettin* 基因的定量 PCR 检测标准曲线, 检测 VIC 的荧光强度(波长 510 nm)。

1.4.2 家蚕基因组中 *Bm Tpi* 基因拷贝数的测定: 取家蚕单蛾基因组 DNA 500 ng (5 μ L) 模板; 加入 dNTPs 1 μ L (各 2.5 mmol/L); $10 \times$ 反应缓冲液 2.5 μ L; MgCl₂ 2 μ L (25 mmol/L); Taq 聚合酶 1 U, *Tpi* 基因和 *DH-PBAN* 基因定量 PCR 检测引物各 1 μ L (20 pmol); *Bm Tpi* 基因和 *DH-PBAN* 基因探针各 10 pmol; 补加水至 25 μ L。PCR 反应条件同 1.4.1 节, 进行 DNA 扩增, 60 $^{\circ}$ C 时采集荧光, 同时检测 FAM 的荧光强度(波长为 510 nm) 和 VIC 的荧光强度(波长 510 nm), 并利用标准曲线计算 2 个基因各自的拷贝数。样本重复数为雌雄各 50 头蛾。

1.4.3 *Bm Tpi* 基因位于 Z 染色体的验证: 以同样的定量 PCR 体系和条件, 用家蚕 *Bm Kettin* 基因定量 PCR 检测引物代替 *DH-PBAN* 基因的引物进行检测,

利用标准曲线计算 *Bm Tpi* 基因和 *Bm Kettin* 基因各自的拷贝数,验证家蚕 *Bm Tpi* 基因在基因组中的位置。

2 结果

2.1 标准曲线的建立

定量 PCR 过程中检测到的荧光信号可直接反映基因扩增的效果,扩增的产物表现为相对荧光强度(relative fluorescence number, R_n),扩增产物的增加量表现为相对荧光强度的变量(difference of relative fluorescence number, DR_n),当相对荧光强度的变量达到设定的 PCR 循环阈值(C_t)时,扩增产物的增加量与 PCR 反应管中起始模板中拷贝数有直接的关系,研究表明 C_t 与起始模板中拷贝数呈比例关系, C_t 越小,起始模板中拷贝数越多,相反, C_t 越大,起始模板中拷贝数越少。

通过用不同拷贝数的家蚕 *Bm Tpi* 基因标准品进行定量 PCR 检测,在 510 nm 波长检测 FAM 的荧光强度,获得相对荧光强度的变量曲线(图 1),图中域值设定为 0.1 时,随着拷贝数的递增,各曲线的 C_t 值分别为 20.293, 21.341, 22.563, 23.823, 25.435 和 26.696。用 C_t 值与拷贝数作图,获得 *Bm Tpi* 基因标准曲线(图 2)。

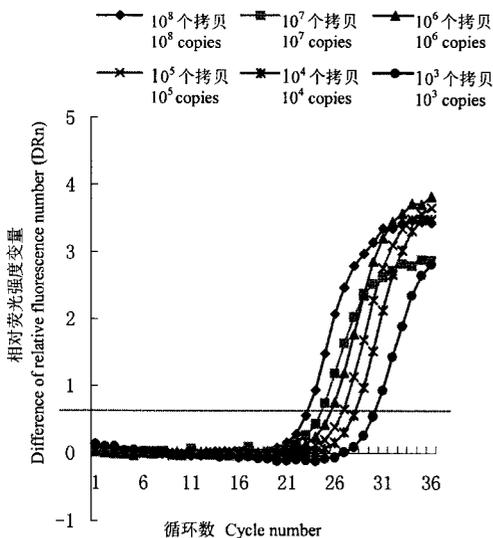


图 1 *Bm Tpi* 基因标准品定量 PCR 不同循环数与相对荧光强度变化量的检测曲线

Fig. 1 The graphs of real-time quantitative PCR fluorescence profiles against cycle number with the difference of relative fluorescence number for the ten-fold from 10^3 to 10^8 copies of the *Bm Tpi*

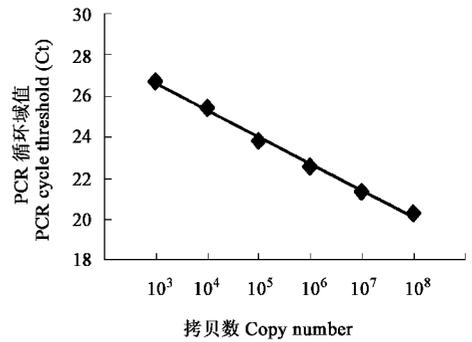


图 2 *Bm Tpi* 基因拷贝数与定量 PCR 循环阈值(C_t)的关系

Fig. 2 *Bm Tpi* DNA amplification standard curves generated by plotting the number of the target gene DNA copies versus cycle threshold(C_t)

分别用不同拷贝数的 *DH-PBAN* 基因和 *Bm Kettin* 基因标准品进行定量 PCR 检测,在 510 nm 波长检测 VIC 的荧光强度,获得各拷贝数的 C_t 值,并用 C_t 值与拷贝数作图,分别绘制出 *DH-PBAN* 基因和 *Bm Kettin* 基因的标准曲线(图 3)。

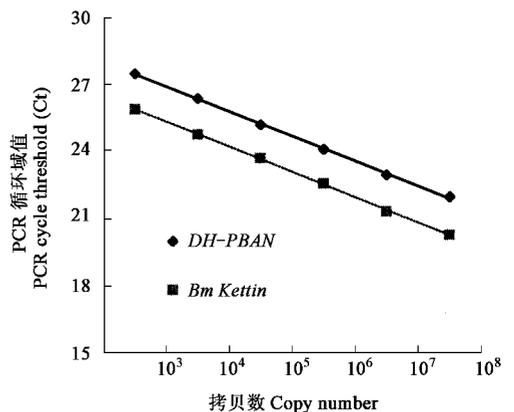


图 3 *DH-PBAN* 基因和 *Bm Kettin* 基因的拷贝数与定量 PCR 循环阈值(C_t)的关系

Fig. 3 *DH-PBAN* and *Bm Kettin* DNA amplification standard curves generated by plotting the number of the target gene DNA copies versus cycle threshold(C_t)

2.2 家蚕基因组中 *Bm Tpi* 基因拷贝数的测定及其染色体定位

取家蚕个体基因组 DNA 为模板,在同一 PCR 反应管中同时对基因 *Bm Tpi* 和 *DH-PBAN* 的拷贝数进行定量 PCR 检测。由于从每头家蚕蛾提取的 DNA 中基因拷贝各不相同,检测的 *Bm Tpi* 基因和 *DH-PBAN* 基因的拷贝数也不一样。但位于第 11 号染色体上的 *DH-PBAN* 为单拷贝基因,说明在雌雄基因组中,*DH-PBAN* 基因的拷贝数都是 2 个。这样利用同一 PCR 反应管中 *Bm Tpi* 基因拷贝数与 *DH-PBAN* 基因拷贝数的比值,就可获得家蚕基因组中 *Bm Tpi* 基

因的拷贝数。

通过对家蚕雌雄各 50 头蛾 *Bm Tpi* 基因拷贝数与 *DH-PBAN* 基因拷贝数的比值研究发现,在雌雄家蚕基因组中有明显的差异,在雌蚕中 *Bm Tpi* 基因拷贝数与 *DH-PBAN* 基因拷贝数的比值平均为 0.5 ± 0.154 ,而在雄蚕中该比值平均为 1.0 ± 0.165 (图 4 : A) 雌雄间存在显著差异 ($P < 0.001$),可见 *Bm Tpi* 基因在家蚕雌雄个体中的拷贝数不同,在雌蚕中含有 1 个拷贝,在雄蚕中有 2 个拷贝,而家蚕基因组中

Z 染色体的数目在雌雄间是有差异的,在雌蚕中有 1 个 Z 染色体,在雄蚕中有 2 个 Z 染色体,这说明家蚕的 *Bm Tpi* 基因位于 Z 染色体上。

同时,研究发现在雌雄个体中 *Bm Tpi* 基因和 *Bm Kettin* 基因拷贝数的比值都为 1.0 ± 0.165 (图 4 : B),可见在家蚕基因组中,*Bm Tpi* 基因与 *Bm Kettin* 基因的拷贝数是相等的,而 *Bm Kettin* 基因位于 Z 染色体上,在雌蚕中为 1 个拷贝,在雄蚕中为 2 个拷贝,这也进一步证明了 *Bm Tpi* 基因在 Z 染色体上。

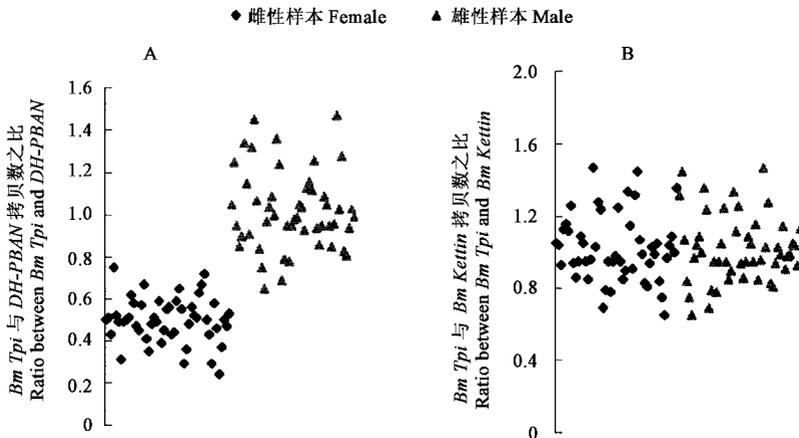


图 4 家蚕雌雄基因组中 *Bm Tpi* 基因与 *DH-PBAN*(A)和 *Bm Kettin*(B)基因拷贝数之比

Fig. 4 The scattergraph of the ratio between *Bm Tpi* and *DH-PBAN*(A) and *Bm Kettin*(B) in the female and male silkworm genome

3 讨论

目前人们已在家蚕 Z 染色体上获得多个分子标记,Yasukochi(1998)采用 RAPD 技术先后获得多个 Z 染色体上的分子标记连锁图;Tan 等(2001)利用 AFLP 技术获得 Z 染色体分子标记连锁图;Kadono-Okuda 等(2002)构建了家蚕 EST 分子标记连锁图,并将 3 个 EST 标记定位在 Z 染色体上,这些分子标记多是采用三点杂交技术确定的,而且这些分子标记有很大的不确定性,很少具有功能基因。Suzuki 等(1998,1999)通过对 3 个 Z 染色体连锁的 RAPD 标记研究发现,其中 1 个为功能基因,并命名为 *T15*,通过比较杂交发现 *T15* 基因在雌雄个体中的表达有差异,并利用差异显示技术克隆了家蚕 *Bm Kettin* 基因,采用三点杂交实验将其定位于 Z 染色体上,通过比较杂交发现 *Bm Kettin* 基因表达 mRNA 在雌雄个体中有明显差异,随后对与 *Bm Kettin* 基因连锁的约 320 kb 的 Z 染色体片段进行分析,发现有约 14 个功能基因,其中 13 个基因表达 mRNA 在雌雄个体中

有明显差异(Koike *et al.*, 2003),说明家蚕没有剂量补偿现象。

为了能准确检测家蚕基因组中 *Bm Tpi* 基因的拷贝数,我们选用分别位于 11 号染色体上的 *DH-PBAN* 基因和位于 Z 染色体上的功能基因 *Bm Kettin* 作为参照基因,通过比较家蚕雌雄个体间 *Bm Tpi* 基因拷贝数与已经定位在 11 号染色体上的 *DH-PBAN* 基因的拷贝数之比,准确检测到家蚕基因组中 *Bm Tpi* 基因的拷贝数与 *Bm Kettin* 基因的拷贝数相等,雄体中为 2 个拷贝,雌体中为 1 个拷贝,从而证明 *Bm Tpi* 基因位于 Z 染色体上。

目前,除家蚕外,长翅蝶、棉铃虫、玉米螟(Dopman *et al.*, 2004)等鳞翅目昆虫的 *Tpi* 基因全都定位于 Z 染色体上,基因结构相似,这说明 *Tpi* 基因在鳞翅目昆虫中具有相对保守的遗传特性,是在基因水平进行鳞翅目昆虫种群隔离、种间杂交不育及物种进化研究的理想候选基因。至于 *Bm Tpi* 基因在 Z 染色体上的具体位点,需要进一步进行三点杂交实验及荧光原位杂交实验进行检验。

参 考 文 献 (References)

- Beltran M, Jiggins CD, Bull V, Linares M, Mallet J, McMillan WO, Bermingham E, 2002. Phylogenetic discordance at the species boundary: comparative gene genealogies among rapidly radiating *Heliconius* butterflies. *Mol. Biol. Evol.*, 19: 2 176 – 2 190.
- Dopman EB, Bogdanowicz SM, Harrison RG, 2004. Genetic mapping of sexual isolation between E and Z pheromone strains of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*). *Genetics*, 167: 301 – 309.
- Flanagan NS, Tobler A, Davison A, Pybus OG, Kapan DD, Planas S, Linares M, Heckel D, McMillan WO, 2004. Historical demography of Mullerian mimicry in the neotropical *Heliconius* butterflies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 9 704 – 9 709.
- Jiggins CD, Naisbit RE, Coe RL, Mallet J, 2001a. Reproductive isolation caused by colour pattern mimicry. *Nature*, 411: 302 – 305.
- Jiggins CD, Naisbit RE, Linares M, Salazar C, Yang ZH, Mallet J, 2001b. Sex-linked hybrid sterility in a butterfly. *Evolution*, 55: 1 631 – 1 638.
- Kadono-Okuda K, Kosegawa E, Mase K, Hara W, 2002. Linkage analysis of maternal EST cDNA clones covering all twenty-eight chromosomes in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.*, 11: 443 – 451.
- Koike Y, Mita K, Suzuki MG, Maeda S, Abe H, Osogawa K, deJong PJ, Shimada T, 2003. Genomic sequence of a 320-kb segment of the Z chromosome of *Bombyx mori* containing a *kettin* ortholog. *Mol. Genet. Genomics*, 269: 137 – 149.
- Naisbit RE, Jiggins CD, Linares M, Salazar C, Mallet J, 2002. Hybrid sterility, Haldane's rule and speciation in *Heliconius cydno* and *H. melpomene*. *Genetics*, 161: 1 517 – 1 526.
- Suzuki GM, Shimada T, Kobayashi M, 1998. Absence of dosage compensation at the transcription level of a sex-linked gene in a female heterogametic insect, *Bombyx mori*. *Heredity*, 81: 275 – 283.
- Suzuki GM, Shimada T, Kobayashi M, 1999. *Bm Kettin*, homologue of the *Drosophila Kettin* gene, is located on the Z chromosome in *Bombyx mori* and is not dosage compensated. *Heredity*, 82: 170 – 179.
- Tan YD, Wan CL, Zhu YF, Lu C, Xiang ZH, Deng HW, 2001. An amplified fragment length polymorphism map of the silkworm. *Genetics*, 157: 1 277 – 1 284.
- Xia QY, Zhou ZY, Lu C, Xiang ZH, 1996. Isolation of RAPD markers for Y, Nl^1 and Z chromosome in *Bombyx mori*. *Journal of Southwest Agricultural University*, 18(2): 114 – 118. [夏庆友, 周泽扬, 鲁成, 向仲怀, 1996. 家蚕 Y, Nl^1 基因和 Z 染色体的 RAPD 分子标记研究. 西南农业大学学报, 18(2): 114 – 118]
- Yasukochi Y, 1998. A dense genetic map of the silkworm, *Bombyx mori*, covering all chromosomes based on 1018 molecular markers. *Genetics*, 150: 1 513 – 1 525.

(责任编辑: 黄玲巧)