

家蚕与柞蚕的基因组 RAPD 分析

林青松 刘朝良* (安徽农业大学生命科学学院, 安徽合肥 230036)

摘要 用 RAPD 技术对家蚕和柞蚕进行基因组 DNA 分析, 研究和比较家蚕和柞蚕之间的遗传多态性, 确定家蚕和柞蚕的遗传差异。该实验中共使用了 6 种随机引物: 5-GACCGCTTGT-3', 5-CAGGCCCTTC-3', 5-TGACGGCGGT-3', 5-CAGCACTGAG-3', 5-CAGCACTGAG-3', 5-CAAGGGCAGA-3', 扩增出 60 条清晰的条带; 单个随机引物的扩增条带数在 8~11 条; 所扩增的基因组 DNA 条带的分子量在 0.3~3.3 kb。计算结果得出家蚕与柞蚕的遗传距离较大, 平均距离约为 0.639。实验还发现, 在等量组织、同条件下抽提 DNA 时, 从丝腺中抽提出的 DNA 量最大, 从中肠和脂肪中抽提出的 DNA 量相对较少。

关键词 家蚕; 柞蚕; RAPD; 多态性

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)09-02579-02

RAPD Analysis of *Bombyx mori* and *Antheraea pernyi*

LIN Qingsong et al. (Department of Sericulture, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036)

Abstract Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) was used to analyze the genetic diversity between *Antheraea pernyi* and *Bombyx mori*. The result showed that six arbitrary primers which were used in this experiment could be amplified clearly. And a total of about sixty patterns were obtained. Each primer gave eight to ten bands. The genetic distance between *Bombyx mori* and *Antheraea pernyi* was 0.639. The result also showed that on the same conditions and with the same content of tissue, the content of DNA in silk gland was the most. The content of DNA in midgut and fat body was less than silk gland.

Key words *Bombyx mori*; *Antheraea pernyi*; RAPD; Polymorphism

自 20 世纪 90 年代 RAPD 技术出现后, 它很快被广泛用于对家蚕等绢丝昆虫基因组遗传分析上。1995 年, 鲁亮等^[1]叙述了 RAPD 技术的特点及其在昆虫分类中的应用。1996 年, 翁宏飏等^[2]使用 RAPD 技术对家蚕的基因组进行多态性研究, 分析了各供试品种材料之间的遗传差异。2001 年, 桂慕燕等^[3]使用 RAPD 技术对几种绢丝昆虫进行多态性分析, 确定家蚕和野桑蚕的遗传距离最小, 为 0.376 0, 家蚕与蓖麻蚕的遗传距离最大, 为 0.748 8。2001 年, 桂慕燕等使用 RAPD 技术又发现柞蚕品种间的遗传距离约为 0.066~0.165 9, 与蓖麻蚕品种间的遗传差异相近。2001 年, 刘春宇等^[4]进行了家蚕与蓖麻蚕的基因组 RAPD 检测, 其结果与桂慕燕等的研究结果较为一致。2001 年, 金长江等^[5]使用 RAPD 技术检测了激光辅助天蚕当代 DNA 分子水平的诱变效率。总之, RAPD 技术的出现, 使人们对家蚕起源的研究又更进了一步。

笔者用 RAPD 技术对家蚕和柞蚕的基因组 DNA 的多态性进行研究, 以期探讨家蚕与柞蚕的遗传关系, 确定家蚕和柞蚕的遗传差异。

1 材料与方 法

1.1 供试材料 家蚕由安徽农业大学蚕业丝绸系蚕场提供, 为皖₅ × 皖₆ 一代杂交种; 柞蚕是从山东蚕业研究所引进的二化性品种“克青”。2 种蚕发育到 5 龄后期时取出丝腺、中肠、脂肪, 放入离心管中置 -20℃ 冰箱中保存。

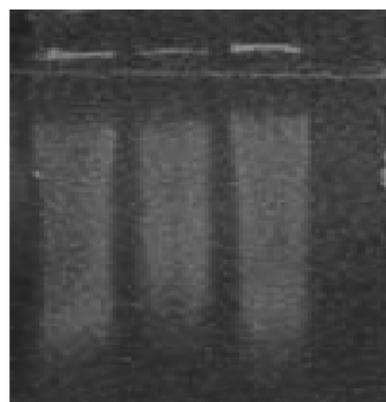
1.2 主要试剂 蛋白酶 K (AMRESCO), 核糖核酸酶 A (AMRESCO), 灭菌蒸馏水, 抽提缓冲溶液 E (20 mmol/L Tris-HCl pH 值 8.0, 100 mmol/L EDTA pH 值 8.0, 0.5% SDS), 十二烷基磺酸钠, 巯基乙醇, 溴酚蓝, 酸性平衡酚, 氯仿, 乙醇, 异戊醇, 随机引物, PCR 缓冲液, dNTP, MgCl₂ 等。

1.3 DNA 模板的制备 取家蚕和柞蚕的丝腺、中肠和脂肪

体在事先预冷的研钵中磨碎至粉末状, 转入离心管中, 加入缓冲溶液 E 和蛋白酶 K (终浓度为 50 μg/ml), 置于 55℃ 温水浴中恒温震荡 3 h, 再加入 3 μl 核糖核酸酶 A 于 37℃ 温水浴中恒温震荡 1 h (酶的终浓度为 25 ng/ml), 完成后加入等体积的酸性苯酚抽提 1 次, 等体积的酚:氯仿(1:1)抽提 1 次, 酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)混合液抽提 1 次, 加 2 倍体积的无水乙醇沉淀 DNA, 70% 的乙醇将 DNA 沉淀洗 2 次, 最后用 TE 溶解稀释, 置于 -20℃ 的冰箱中保存备用。用 752 型紫外分光光度计测其纯度和含量。保证 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值在 1.8 左右, DNA 浓度为 10 μg/ml 左右。

1.4 RAPD 扩增体系及程序 参照 Willans 及夏庆友等^[6]的方法进行。反应总体积为 25.0 μl, 含有模板 DNA 3 μl, 引物 2 μl, PCR 缓冲液 2.5 μl, MgCl₂ 1.5 μl, 灭菌去离子水 15.5 μl, dNTP 0.5 μl。反应在 PRC 仪上进行。扩增程序为 94℃ 变性 30 s, 40℃ 退火 60 s, 72℃ 延伸 90 s, 35 个循环后接 72℃ 7 min 延伸。扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳 90 min。电泳缓冲液为 1 × TBE。电泳后在凝胶成像仪上观察并照相。

1.5 数据分析方法 根据公式: $D = 1 - F$ 计算遗传距离值。式中, D 代表遗传距离, F 代表基因组遗传的相似系数。 $F = 2N_{XY} / (N_X + N_Y)$, 其中 N_X 、 N_Y 分别代表样品被扩增条带数, N_{XY} 代表 2 个样品被扩增出的分子量相同的基因组 DNA 的条带数。



注: 1. 家蚕; 2, 3 柞蚕。

图 1 DNA 电泳图

2 结果与分析

2.1 DNA 抽提 抽提方法参照“1.3”DNA 模板制备方法, 在抽提时要保证所抽提出 DNA 的浓度和纯度。DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值在 1.8 左右, DNA 浓度为 10 μg/ml 左右。抽提 DNA 图谱见图 1。

从琼脂糖凝胶电泳可以发现, DNA 的含量较高, 亮度较大,

基金项目 国家自然科学基金项目(30371088); 教育部留学回国基金项目。

作者简介 林青松(1956-), 男, 安徽滁州人, 实验师, 从事桑树栽培的教学和研究工作。* 通讯作者, E-mail: cyschx@163.com。

收稿日期 2007-01-26

但是拖尾较长,这可能是在抽提过程中 DNA 的某些片段被破碎,造成拖尾。

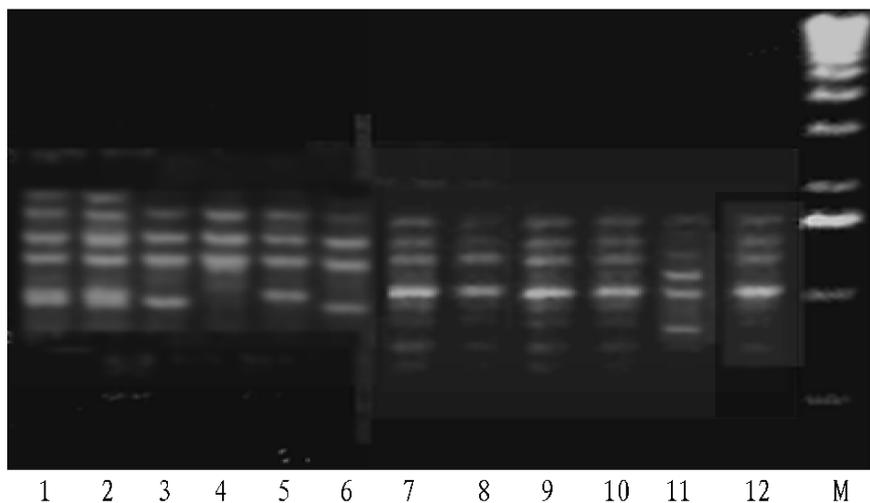
2.2 不同组织的 DNA 含量 实验发现不管是家蚕还是柞蚕,在使用同一方法抽提 DNA 时,等量(0.1 g)的丝腺、中肠和脂肪于同一抽提条件下,从丝腺中抽提出的 DNA 量大于中肠和脂肪中的;脂肪和中肠的 DNA 含量相对较少,结果见表1。

表1 家蚕和柞蚕3种组织中的 DNA 含量 $\mu\text{g}/\text{ml}$

蚕种类	脂肪	中肠	丝腺
家蚕 (<i>Bombyx mori</i>)	14.531	16.527	17.641
柞蚕 (<i>Artleræa pernyi</i>)	16.457	16.874	17.954

2.3 家蚕和柞蚕基因组 RAPD 分析 结果见图2。

该实验使用了6种随机引物,5-GACCGCTTGF3,5-CAGGCCCTTG3,5-TGACGGCGGT3,5-CAGCACTGAC3,5-CAGCACTGAG3,5-CAAGGGCAGA3,共扩增出60条清晰的条带;单个随机引物的扩增条带数在8~11条;所扩增的基因组 DNA 条带的分子量在0.3~3.3 kb。



注:1~6 模板为柞蚕基因组 DNA;7~12 模板为家蚕基因组 DNA;M 为 Marker。1、7 为引物 S37;2、8 为引物 S21;3、9 为引物 S174;4、10 为引物 S447;5、11 为引物 S427;6、12 为引物 S206。

图2 家蚕与柞蚕 RAPD 分析图谱

随机引物扩增结果统计见表2。

该实验结果所扩增出的条带清晰,引物 S37、S174 和 S206 扩增的条带数相同,达

表2 随机引物扩增结果

引物编号	碱基序列	(G+C) 含量 %	扩增带数
S37	5-GACCGCTTGF3	60	11
S21	5-CAGGCCCTTG3	70	9
S174	5-TGACGGCGGT3	70	11
S447	5-CAGCACTGAC3	60	10
S427	5-CAGCCCAGAG3	70	8
S206	5-CAAGGGCAGA3	60	11

家蚕与柞蚕的遗传距离约为0.639,介于0.6~0.7,与有关报道的家蚕和柞蚕的遗传距离较为一致。

3 讨论

家蚕和柞蚕均为具有较高经济价值的绢丝昆虫,在生物学特性上有一定的相似性。然而家蚕为蚕蛾科 *Bombyx* 属,柞蚕为大蚕蛾科 *Artleræa* 属,家蚕和柞蚕是同目、不同属昆虫。故两者亲缘关系较之有关报道的家蚕与野桑蚕亲缘关系远。该实验结果表明,家蚕与柞蚕之间的遗传多态性较大,为0.639,比家蚕与蓖麻蚕之间的遗传距离小,而比家蚕与野桑蚕之间的遗传距离大。这与遗传学中,亲缘关系越远,遗传距离越大,亲缘关系越近,遗传距离越小相一致。家蚕和柞蚕不是同属,在遗传上必然存在差异。且柞蚕主要是在野外生长,与家蚕相比,其生活环境多样化,生活力强,适应性强,个体差异性大,家蚕由于长期在室内饲养,生活力较差这都决定了家蚕和柞蚕之间必然存在着较大的遗传差异。在 RAPD 图谱中,根据分子量 Marker,可断定扩增出 DNA 片段的长度在0.3~3.3 kb。

参考文献

- [1] 鲁亮,归鸿.RAPD 技术的特点及其在昆虫分类学中的应用[J].昆虫学报,1995,38(1):117-122.
- [2] 翁宏飏,徐孟奎,张耀洲.家蚕的 RAPD 及其品种间的差异[J].浙江农业大学学报,1996,22(2):152-156.
- [3] 桂慕燕,左正宏,陈元霖.五种绢丝昆虫随机扩增多态性 DNA 分析[J].遗传,2001,23(1):25-28.
- [4] 刘春宇,张春玲,陈元霖.家蚕和蓖麻蚕的基因组 RAPD 检测[J].蚕业科学,1997,23(4):215-220.
- [5] 金长江,陈复生,徐厚炳,等. He Ne 激光辅照天蚕生物学效应[J].激光生物学报,2001,11(1):23-27.
- [6] 夏庆友,周泽扬,鲁成,等.家蚕的 RAPD 的扩增条件、重复性及遗传模型研究[J].蚕业科学,1996,22(1):21-25.