

经验交流

利用 SADF 法进行家蚕基因组 DNA 多态性分析*

何宁佳 鲁成 周泽扬 向仲怀

(西南农业大学蚕桑丝绸学院, 农业部蚕桑学重点开放实验室, 重庆 400716)

摘要 从家蚕品种 C108 和大造后部丝腺提取的基因组 DNA, 用 *Pst* I 酶解后与自己设计的人工接头相连, 并用与人工接头序列相匹配的选择性引物进行选择 PCR 扩增 (selective amplification). 扩增产物经琼脂糖电泳检测显示, 用 SADF 法在两品种中能检测到稳定的 DNA 多态性片段.

关键词 家蚕, 分子标记, 选择性扩增

学科分类号 S881.24

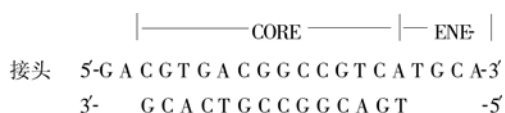
DNA 分子标记的筛选是进行基因组研究的基础, 其成果广泛应用于分子连锁图谱的构建、基因定位、基因克隆以及生物进化和分类的研究. 随着 PCR 技术的发展, 随机扩增多态性 DNA 分析 (RAPD)^[1] 提供了与 RFLPs 有所不同的新的标记来源, 而 Zabeau Marc 和 Vos Pieter 创建的 AFLP 技术^[2] 使 DNA 多态分析进一步发展. 我们以 AFLP 技术原理为基础, 建立了适于家蚕染色体 DNA 多态分析的选择性扩增 DNA 片段 (selective amplification DNA fragments) 多态分析方法, 即 SADF 法. 并成功地从家蚕材料 C108 和大造中筛选到分子标记.

1 材料和方法

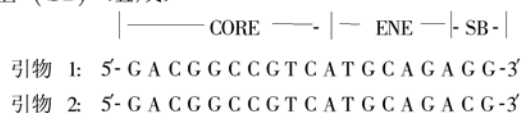
1.1 材料

1.1.1 家蚕材料: C108 和大造为西南农业大学家蚕基因库保存.

1.1.2 人工接头设计: 合成 2 条部分互补的寡聚核苷酸链, 稀释为 200 mg/L, 于 37℃ 退火 10 min 后冷至室温, 4℃ 保存备用. 接头包括核心序列 (CORE) 和酶特定序列 (ENE), 即 3'-TGCA 能与用 *Pst* I 酶解的基因组 DNA 片段粘端互补:



1.1.3 引物设计: SADF 引物由核心序列 (CORE), 酶特定序列 (ENE) 和 3 个选择碱基 (SB) 组成.



接头与引物均为上海植物生理研究所 BECKMAN 生物技术示范实验室合成.

1.2 方法

1.2.1 SADF 反应流程 (图 1):

1.2.2 基因组 DNA 的抽提: 参照 Maniatis 的方法进行^[3].

1.2.3 酶解连接及其 SADF 模板 DNA 的制备: 基因组 DNA 用 *Pst* I 酶解与人工接头的连接在同一反应体系中完成. 在 20 μl 的反应体系中, 含有基因组 DNA 0.2 μg, 接头 0.2 μg, 20 单位 *Pst* I, 2 单体 T4DNA 连接酶 (Promega 公司产品), 1 mmol/L ATP,

* 国家自然科学基金资助项目 (39570557).

收稿日期: 1997-10-07, 修回日期: 1998-05-10

10 mmol/L Tris-HCl pH 7.8, 5 mmol/L DTT, 60 mmol/L KCl, 1 mmol/L EDTA. 在 37℃ 反应 1 h, 20℃ 1 h 为 1 循环, 共循环 3 次. 用灭菌双蒸水稀释后置 4℃ 备用.

1.2.4 PCR 反应体系及扩增程序: 参照 Boehringer 公司的 PCR Applications Manual 进行. 反应总体积为 25 μl, 含有 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl pH 9.0, 0.1%

Triton-100, 1 ~ 3 mmol/L MgCl₂, dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各为 0.1~ 0.3 mmol/L, SADF 引物为 60~ 160 ng, 模板 DNA 0.0064 ~ 4 ng, 1 单位的 Taq 聚合酶 (Promega 产品). 扩增条件为 94℃ 变性 30 s, 56~ 62℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 90 s, 35 个循环后 72℃ 链延伸 7 min, 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 经溴乙锭染色后紫外灯下观察拍照.

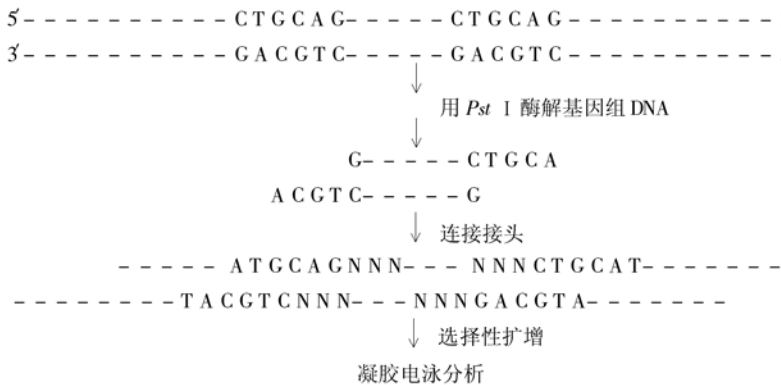


图 1 SADF 反应流程

2 结果与讨论

2.1 接头与引物

SADF 是对经一种限制性内切酶切割后的基因组 DNA 片段进行选择扩增, 成功的关键在于接头与引物的设计, 而接头与引物的设计又是基于对限制性内切酶的选择. *Pst* I 是识别位点为六个碱基的甲基化敏感性限制性内切酶, 用它切割基因组 DNA, 所得片段大多数可能为单拷贝的结构基因. 据鲁成等^[4]的研究表明, 家蚕基因组 DNA 经 *Pst* I 酶解后, 片段大小分布均一, 并用 DIG 标记的丝素基因探针 P^{Fb100} 进行 RNA 印迹, 在 C108 和大造间得到多态型的带, 以此为据, 首选 *Pst* I 酶切家蚕基因组 DNA. 在接头的设计中, 核心部分 G+ C 含量达到 68.7% 与之相对引物的 G+ C 含量, 为 63% ~ 74%, 使 PCR 反应能在较高退火温度下进行^[5]. 在接头中插入了 *Xma* III 识别位点, 既可提高 G+ C 含量, 也便于对扩增片段进行克隆, 接头的一端有两个碱

基 (GA) 突出, 用于防止接头自身连接, 另一端为 *Pst* I 酶切粘端, 但把 CTGCA-3' 的 C 碱基用 A 碱基置换, 从而使接头中不含有 *Pst* I 酶切位点, 接头与基因组 DNA 片段连接后不再被 *Pst* I 酶切^[6] (图略).

2.2 SADF 法筛选家蚕的分子标记

用 SADF 法选择 15, 16, 21 号引物对两个家蚕原种大造和 C108 进行扩增 (图 2), 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测表明, 每一扩增反应均能获得 20 条以上的扩增片段, 能检测的片段大小在 100~ 2 000 bp 之间. 这任选的三个引物在大造和 C108 间均有多态性带出现, 其中, 引物 15 得到 3 个多态性片段, 引物 16 得到 5 个多态片段, 引物 19 得到 3 个多态片段. 由此可见, SADF 法筛选家蚕分子标记的效率高于 RFLPs 和 RAPD.

大造和 C108 是构建家蚕分子连锁图谱普遍采用的材料. 用 SADF 法成功地从中获得分子标记表明了此方法可用于家蚕分子图谱的构建. 为了获得大量的分子标记, 可以设计合成

一系列互补的 3' 末端随机组合 3 碱基的选择性引物, 用这些引物进行选择性的扩增得到的 SADF 标记, 将与 RFLPs 标记, RAPD 标记一并用于构建家蚕的分子连锁图谱.

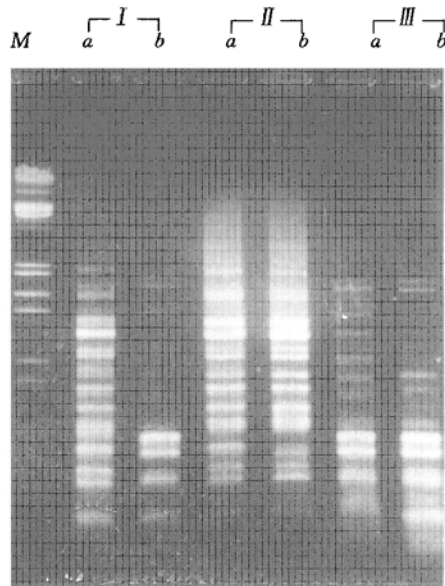


图 2 SADF 筛选家蚕的分子标记

M: λDNA/ *Eco*R I + *Hind* III; a: C108; b: 大造.
I: 15 号引物 (GAA); II: 16 号引物 (CGA); III: 21 号引物 (GAC).

参 考 文 献

1 Williams J G K, Kubelik A R, Livak k J, *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetics markers. *Nucleic Acids Res*, 1990, **18** (22): 6531~6535
2 Vos P, Hogers R, Bleeker M, *et al.* AFLP: a new

technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acides Research*, 1995, **23** (21): 4407~ 4414
3 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, *et al.* *Molecular Cloning A Laboratory Mannal*. New York: Cold Spring Harbor, 1989. 463~ 466
4 鲁 成, 冯丽春, 刘连碧 (Lu C, Feng L C, Liu L B). 家蚕丝蛋白基因分子标记的建立. *西南农业大学学报 (J Southwest Agric Univ)*, 1996, **18** (2): 100~ 102
5 Gustavo C A, Brant J B, Peter M G. Primer-template interaction during DNA amplification fingerprinting with single arbitrary oligonucleotides. *Mol Gen Genet*, 1992, **235** (2): 157~ 165
6 陈 洪, 王振山, 朱立煌 (Chen H, Wang Z S, Zhu L H). SRFA 法构建水稻的 DNA 指纹图谱. *生物工程学报 (Chin J Biotech)*, 1996, **12** (3): 266~ 269

The Polymorphic Analysis of Silkworm Genomic DNA by an Effective Method——SADF. HE Ning-Jia, LU Cheng, ZHOU Ze-Yang, XIANG Zhong-Huai (*The Key Sericultural Laboratory of Agricultural Ministry, College of Sericulture, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716, China*).

Abstract Genomic DNA extracted from the posterior silk glands of two silkworm varieties, C108 and Dazao were digested with *Pst* I and ligated with synthetic adapter. Selective amplification of DNA fragments (SADF) was performed using suitable primers which annealed to adapter regions. Agarose gel electrophoresis shown that DNA polymorphic fragments were appeared for both C108 and Dazao.

Key words silkworm, molecular marker, selective amplification