

其他技术与方法

SSCP 技术检测松毛虫赤眼蜂 mtDNA 编码区 SNPs 的可行性研究^{*}

董 辉^{1**} 谢丽娜¹ 钱海涛¹ 丛 斌^{1***} 王宏侠²

(1. 沈阳农业大学植物保护学院 沈阳 110866; 2. 抚顺出入境检验检疫局 抚顺 113006)

摘 要 SNPs 标记是最具广泛利用潜力的第 3 代遗传标记, 本研究旨在了解 SSCP 技术检测松毛虫赤眼蜂 *Trichogramma dentrolimi* mtDNA 编码区 SNPs 的灵敏度和精确度, 建立大规模筛查 SNPs 的技术平台。结果表明, 运用 SSCP 技术检测 40 个松毛虫赤眼蜂样本, 单倍型检出率达 100%。Cytb 和 CO II 基因 SNPs 的平均密度分别为 19 SNPs/kb 和 16 SNPs/kb。SSCP 技术操作简单、成本低廉、结果直观、易于分型, 适于松毛虫赤眼蜂线粒体编码区未知 SNPs 的检测, 建立了基于 SSCP 技术检测松毛虫赤眼蜂 mtDNA SNPs 的技术平台。

关键词 松毛虫赤眼蜂, SNPs 标记, SSCP, 线粒体 DNA

Feasibility of using SSCP polymorphism to detect the mtDNA coding region of *Trichogramma dentrolimi*

DONG Hui^{1**} XIE Li-Na¹ QIAN Hai-Tao¹ CONG Bin^{1***} WANG Hong-Xia²

(1. Laboratory for Bio-Control of Pest Insects, College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; 2. Fushun Enter-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Fushun 113006, China)

Abstract SNPs are powerful molecular markers. The purpose of this study was to capitalize on the sensitivity and precision of SSCP to detect the *Trichogramma dentrolimi* mtDNA coding region, and establish an efficient technology to discover SNPs. Our result show that forty *T. dentrolimi* individuals were detected by SSCP with a haploid detection rate of 100%. The SNPs average density of Cytb and CO II was 19 SNPs/kb and 16 SNPs/kb respectively. SSCP proved relatively easy and cost-effective to use and the results were intuitively and easily detected by genotyping. This method is suitable for detecting unknown SNPs in the mtDNA coding region.

Key words *Trichogramma dentrolimi*, SNPs marker, SSCP, mitochondrial DNA

单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 是指基因组内特定核苷酸位置上存在 2 种不同的核苷酸, 而其中最少有 1 种在群体中的出现频率不少于 1% (低于 1% 则视为点突变), 它是继限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 和微卫星标记 (simple sequence repeats, SSR) 之后

最有前途的第 3 代遗传标记。SNPs 标记是生物个体间最丰富的遗传变异来源, 已成为研究基因定位、分子标记辅助选择改良生物学性状、种群遗传结构和遗传多样性的一种新工具 (Lander, 1996; 董辉等, 2011)。近年来, 随着昆虫 DNA 序列数据增加和 51 种昆虫全基因组测序计划的完成或部分完成, DNA 序列数据库海量递增, SNPs 分型检测

^{*} 资助项目: 国家自然科学基金 (30871674, 30971962); 国家“十一五”科技支撑计划 (2006BAD0806-01); 辽宁省高校重点实验室支持计划项目 (2008S203); 辽宁省教育厅科研项目 (L2010488); 沈阳农业大学教师科研基金 (20091012)。

^{**} E-mail: biocontrol@163.com

^{***} 通讯作者, E-mail: bin1956@163.com

收稿日期: 2011-11-30, 接受日期: 2012-02-16

已成为研究者们广泛关注的焦点 (Gorrochotegui-Escalante *et al.*, 2000; Black and Vontas, 2007; Bass *et al.*, 2008)。

由于 SNPs 标记的基础是各种形式的单碱基突变,理论上任何用于单碱基突变或多态性的技术均可用于 SNPs 标记的检测。目前,筛查 SNPs 的主要方法包括 DNA 直接测序, DNA 芯片 (DNA chip), 变性高效液相色谱 (denaturing high performance liquid chromatography, dHPLC), 截短蛋白检测 (protein truncation test, PTT) 和单链构象多态性 (polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism, SSCP) (范忠鹏等, 2008)。在上述方法中, SSCP 具有快速、简便、廉价、灵敏度高及适用于大群体筛选等优点,其基本原理是以构象为基础因单碱基差异而引起 DNA 片段迁移率不同,从而表现出多态性。SSCP 作为大规模筛查 SNPs 的一种有效分子标记方法已广泛用于动物分子种群生物学特征分析、遗传性疾病检测及特定功能基因或片段的分型等领域 (以筛查动物基因多态性与数量性状关联分析应用最广),而相关研究在昆虫学领域鲜有报道 (Binz *et al.*, 2001; 孟彦, 2007; 张小辉等, 2007; Urdaneta-Marquez *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2008)。

本研究以松毛虫赤眼蜂 *Trichogramma dentrolimi* 为研究对象,利用 SSCP 技术检测 mtDNA 细胞色素 b 氧化酶基因 (*Cytb*) 和细胞色素 C 氧化酶亚基 II 基因 (CO II) 部分序列的单核苷酸多态性,同时结合直接测序,探讨了 SSCP 技术

检测松毛虫赤眼蜂线粒体编码区 SNPs 的可行性,以期建立大规模筛查 SNPs 的技术平台,为进一步利用 SNPs 标记发掘松毛虫赤眼蜂遗传资源及分析遗传结构奠定基础。

1 材料与方法

1.1 松毛虫赤眼蜂的采集

2010 年 7—8 月份于承德地区,采集油松毛虫 *Dendrolimus tabulaeformis* 卵,赤眼蜂自油松毛虫卵内孵化后,参照 Li 和 Shen (2002) 的蜂种鉴定方法,确定该蜂种为松毛虫赤眼蜂 *Trichogramma dentrolimi*。松毛虫赤眼蜂雌蜂标本用无水乙醇保存,置于 -20℃ 冰箱备用。

1.2 基因组 DNA 提取

取单头雌蜂置于 0.5 mL 离心管中,加入 40 μL 5% 的 Chelex-100 (SIGMA),充分研磨,加入 2 μL 蛋白酶 K (20 mg/mL) (大连宝生物 TaKaRa),55℃ 温育消化 2 h,消化后的产物于 99℃ 水浴 10 min,3 000 r/min 离心 30 s,使未消化的组织残渣沉淀,取上清液作为 PCR 模板,或 -20℃ 下保存备用。

1.3 *Cytb* 和 CO II 基因片段 PCR 扩增

松毛虫赤眼蜂 PCR 扩增反应体系为 20 μL,含 *Premix Ex Tap* (大连宝生物, TaKaRa) 10 μL,上游引物 0.5 μL (10 μmol/L),下游引物 0.5 μL (10 μmol/L),模板 1.2 μL, ddH₂O 7.8 μL。本研究所用引物序列、退火温度 (*T_m*)、产物大小等详见表 1。PCR 反应程序:94℃ 预变性 4 min;94℃ 变性 1 min, *T_m* 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环;

表 1 松毛虫赤眼蜂 mtDNA 基因片段扩增引物
Table 1 Primers for amplifying mtDNA gene fragments in *Trichogramma dentrolimi*

线粒体基因 mtDNA gene	引物名称 Primer	引物序列 Sequence of primers	退火温度 (℃) <i>T_m</i> (℃)	产物长度 (bp) Length (bp)
<i>Cytb</i>	CytbF	5'-TATGTTCTACCTTGAGGACAAATATC-3'	55	368
	Den2R	5'-GGGTCTCCTAAAATGTAAG-3'		
CO II	C2-J-3400	5'-CCACCAATTTCTGAACATTGACCA-3'	56	305
	C2-N-3661	5'-ATTACACCTCCTAATTATTAGGAAT-3'		

72℃ 延伸 7 min。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测合格后,置于 4℃ 冰箱保存备用。

1.4 随机抽取样本的多态性检测

从收集的松毛虫赤眼蜂样本中随机抽取 40 头雌蜂样本,分别采用 SSCP 和双向直接测序 2 种方法进行多态性检测。

1.4.1 SSCP 凝胶电泳与银染 根据 *Cytb* 和

CO II 基因片段长度分别做 10% 和 12% 的中性聚丙烯酰胺凝胶 ($m(\text{Aer}):m(\text{Bis}) = 291$), 凝胶面积为 $170\text{ mm} \times 170\text{ mm}$, 然后取 $1.5\text{ }\mu\text{L}$ PCR 产物加入 $1.5\text{ }\mu\text{L}$ 上样缓冲液 (95% 去离子甲酰胺, 0.025% 二甲苯菁, 0.025% 溴酚蓝, 40% 蔗糖), 瞬时离心混匀后, 98°C 变性 10 min , 取出立即置于冰上 5 min 上样, 175 V 电压电泳 24 h , 进行硝酸银染色, 用凝胶成像系统拍照。

1.4.2 直接测序 将检测有目的基因片段的 PCR 粗产物 $40\text{ }\mu\text{L}$ 委托北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司双向测序。

1.5 分析

运用 DNAMAN 和 DnaSP 5.0 序列分析软件对测序结果进行分析, 找出变异位点, 确定单倍型, 然后再与银染判断的多态类型结果进行比较。

2 结果与分析

用两对引物对整个基因组 DNA 进行目的片段扩增, 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳中检测后拍照 (图 1, 图 2)。从图 1 和图 2 可知, 扩增的目的产物均条带清晰, 片段符合预期的长度, 可用于下一步的分析。

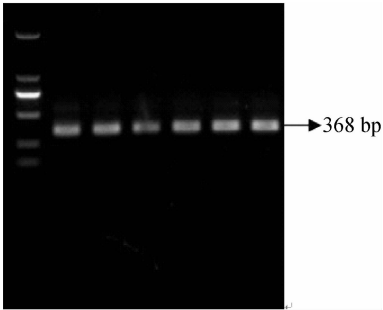


图 1 *Cytb* 基因片段 PCR 产物电泳检测结果
Fig.1 Electrophoresis results of PCR amplification of *Cytb* gene

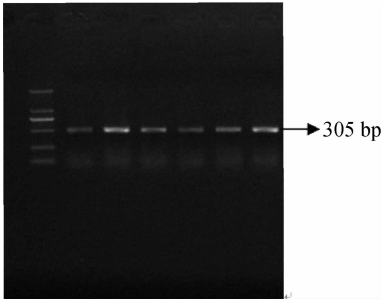


图 2 CO II 基因片段 PCR 产物电泳检测结果
Fig.2 Electrophoresis results of PCR amplification of CO II gene

40 头松毛虫赤眼蜂样本的 *Cytb* 和 CO II 基因片段经 SSCP 检测, 条带清晰, 重复性好, 且不同单倍型的电泳带型差异较大, 易于辨别。 *Cytb* 基因的多态性经检测发现 4 种单倍型, 并以不同频率出现: 其中单倍型 III 和单倍型 II 为常见单倍型, 单倍型频率分别为 0.40 和 0.25; 单倍型 I 为稀有单倍型, 频率为 0.15; 单倍型 IV 的频率为 0.2 (图 3)。 CO II 基因的多态性经检测发现 3 种单倍型, 也以不同的频率出现: 其中单倍型 I 和 III 为常见单倍型, 单倍型频率分别为 0.571 和 0.286; 单倍型 II 为稀有单倍型, 单倍型频率为 0.143 (图 4)。

将 40 头雌蜂样本的 *Cytb* 和 CO II 基因测序, 序列比对结果与 SSCP 技术检测的多态性一致, 样本的检出率达 100%。 由表 2 可知, *Cytb* 基因片段检出 4 种单倍型, 共 7 个 SNPs, 其中位于 36、172 和 231 碱基处发生转换, 位于 27、42、120 和 325 碱基处发生颠换, 转换与颠换比率为 3:4, SNPs 平均密度为 19 SNPs/kb, (A + T)% 含量为 74.5%。 由表 3 可知, CO II 基因片段检出 3 种单倍型, 共 7 个 SNPs, 其中位于 CO II 基因 33、139、190 和 215 碱基处发生转换, 位于 103 碱基处发生颠换, 转换与

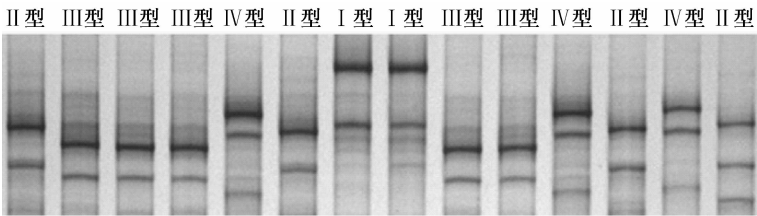


图 3 *Cytb* 基因片段 PCR 产物检测结果
Fig.3 Electrophoresis results of PCR amplification of *Cytb* gene

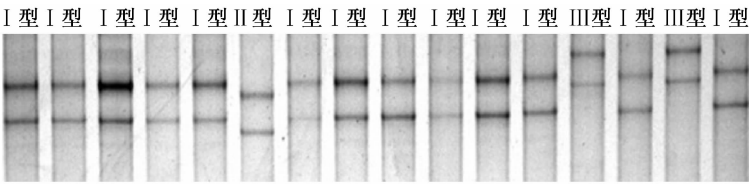


图 4 CO II 基因片段 PCR 产物检测结果

Fig. 4 Electrophoresis results of PCR amplification of CO II gene

表 2 松毛虫赤眼蜂 *Cytb* 基因的 SNPs 及单倍型

Table 2 The SNPs and haplotype of <i>Cytb</i> gene in <i>Trichogramma dentrolimi</i>								
单倍型 Haplotype	单倍型频率 Frequencies of haplotypes	核苷酸位置 Nucleotide position						
		27	36	42	120	172	231	325
I	0.15	C	G	A	A	G	C	G
II	0.25	C	G	T	T	G	T	T
III	0.40	A	A	T	A	A	C	T
IV	0.20	C	G	T	A	G	C	T

表 3 松毛虫赤眼蜂 CO II 基因的 SNPs 及单倍型

Table 3 The SNPs and haplotype of CO II gene in <i>Trichogramma dentrolimi</i>						
单倍型 Haplotype	单倍型频率 Frequencies of haplotypes	核苷酸位置 Nucleotide position				
		33	103	139	190	215
I	0.571	A	T	G	A	T
II	0.286	G	A	G	G	C
III	0.143	A	T	A	A	T

颠换比率为 4:1,SNPs 平均密度为 16 SNPs/kb,(A + T)% 含量为 76.8%。

3 讨论

SNPs 标记密度高、多态性丰富、比微卫星等重复序列多态性标记更具遗传稳定性(SNPs 基于单核苷酸的突变,突变率仅为 10⁻⁹),应用前景广(Brumfield *et al.*, 2003; Brito and Edwards, 2009)。SSCP 技术是目前检测 SNPs 的常用方法,对 PCR 扩增片段的长度要求较高,100~300 bp 片段的突变检出率达 99%,400 bp 片段的检出率也达 90%,能成功分析的最长片段达 775 bp(杜波和迟德富,2007)。SSCP 技术虽然能检测出 2 例样本的序列是否相同,即是否为同一种单倍型,但每

种单倍型具体的 SNPs 位点仅用 SSCP 却不得而知,仍需用测序法加以证实,因此 SSCP 与其他 SNPs 检测技术一样需结合 DNA 测序确定 SNPs 的变异位点及类型。

本研究利用 SSCP 技术检测的松毛虫赤眼蜂 mtDNA *Cytb* 和 CO II 基因片段长度均在 400 bp 以内,符合 SSCP 技术对片段长度的要求。全部松毛虫赤眼蜂个体 *Cytb* 和 CO II 基因测序后其结果与 SSCP 技术检测的多态类型一致,多态性检出率达 100%。Urdaneta-Marquez 等(2008)利用该技术检测埃及伊蚊 *Aedes aegypti* mtDNA 的 NADH 脱氢酶亚基 4(ND4)基因片段(386 bp)测序后多态性检出率与本研究结果一致,说明 SSCP 技术适于松毛虫赤眼蜂 *Cytb* 和 CO II 基因的分型。

序列比对发现,松毛虫赤眼蜂 *Cytb* 基因片段检测出 4 种单倍型,CO II 基因片段检测出 3 种单倍型,检出的单倍型数量低于玉米螟赤眼蜂(袁佳等,2011),分析可能与松毛虫赤眼蜂选取的基因(*Cytb*)片段长度小和样本数量低于玉米螟赤眼蜂有关。在本研究中我们发现,2 种 mtDNA 基因(A + T)% 含量虽均在 75% 左右,具有明显的 A/T 碱基偏倚性。另外,松毛虫赤眼蜂 *Cytb* 基因转换与颠换比率为 3:4,CO II 基因转换与颠换比率为 4:1,仅 *Cytb* 基因片段符合基因组中 A/T 碱基含量高,颠换出现频率大的理论(Radman and Wagner, 1986),具体原因尚需进一步研究。

本研究结果表明 SSCP 技术结合 DNA 测序分型技术能快速筛查出松毛虫赤眼蜂 mtDNA 编码区 SNPs 作为遗传标记,为进一步利用更多的 SNPs 标记深入研究松毛虫赤眼蜂种群遗传变异奠定了坚实的技术基础。

参考文献 (References)

- Bass C, Williamson MS, Field LM, 2008. Development of a multiplex real-time PCR assay for identification of members of the *Anopheles gambiae* species complex. *Acta Trop.*, 107 (1):50 – 53.
- Binz T, Reusch TBH, Wedekind C, Milinski M, 2001. SSCP analysis of *Mhc* class IIB genes in the threespine stickleback. *J. Fish Biol.*, 58(3):887 – 890.
- Black IV WC, Vontas JG, 2007. Affordable assays for genotyping single nucleotide polymorphisms in insects. *Insect Mol. Biol.*, 16(4):377 – 387.
- Brito PH, Edwards SV, 2009. Multilocus phylogeography and phylogenetics using sequence-based markers. *Genetica*, 135 (3):439 – 455.
- Brumfield RT, Beerli P, Nickerson DA, Edwards SV, 2003. The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. *Trends Ecol. Evol.*, 18(5):249 – 256.
- Gorrochotegui-Escalante N, Munoz MD, Fernandez-Salas I,

- Beatty BJ, Black WC IV, 2000. Genetic isolation by distance among *Aedes aegypti* populations along the northeastern coast of Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 62(2):200 – 209.
- Lander ES, 1996. The new genomics: global views of biology. *Science*, 274(5287):536 – 539.
- Li ZX, Shen ZR, 2002. PCR _ based technique for identification and detection of *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Entomol. Sin.*, 9 (1):9 – 16.
- Radman M, Wagner R, 1986. Mismatch repair in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Gen.*, 20:523 – 538.
- Urdaneta-Marquez L, Bosio C, Herrera F, Rubio-Palis Y, Salasek M, Black IV WC, 2008. Genetic relationships among *Aedes aegypti* collections in Venezuela as determined by mitochondrial DNA variation and nuclear single nucleotide polymorphisms. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 78 (3):479 – 491.
- Wong J, Tripet F, Rasgon JL, Lanzaro GC, Scott WT, 2008. SSCP Analysis of scnDNA for genetic profiling of *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 79(4):511 – 517.
- 董辉, 钱海涛, 柳晓利, 丛斌, 2011. SNPs 分子标记技术在昆虫学研究中的应用. 应用昆虫学报, 48(1):167 – 173.
- 杜波, 迟德富, 2007. PCR-SSCP 技术在昆虫学研究中的应用. 昆虫知识, 44(3):333 – 336.
- 范忠鹏, 朱旺升, 张超, 周宇荀, 李凯, 梁银明, 邢正宏, 陈国强, 柏熊, 肖君华, 2008. 荧光—构象敏感凝胶电泳技术筛查上海市郊区野生小家鼠线粒体编码区 SNP 位点. 遗传, 30(4):475 – 478.
- 孟彦, 许尚忠, 咎林森, 高雪, 任红艳, 陈金宝, 2007. SSCP 技术用于牛 mtDNA 多态性检测的可行性研究. 中国畜牧兽医, 34(4):67 – 71.
- 袁佳, 王振营, 何康来, 白树雄, 李菁, 2011. 玉米螟赤眼蜂不同地理种群 mtDNA 基因序列分析及遗传分化研究. 中国生物防治学报, 27(1):16 – 21.
- 张小辉, 许尚忠, 高雪, 张路培, 任红艳, 陈金宝, 2007. 不对称 PCR-SSCP 在基因突变检测中的应用. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 35(6):15 – 23.