PCR-SSCP 技术在昆虫学研究中的应用*

杜　波**　　迟德富***

（东北林业大学林学院　哈尔滨　150040）

The application of PCR-SSCP in the research of entomology. DU Bo**, CHI De-Fu***（*College of Forestry, Northeast Forestry University*, Haerbin 150040, China）

Abstract　PCR-SSCP is a simple and sensitive method to screen mutations. This method is applied more and more widely along with its development and maturation. In recent years, PCR-SSCP is used in many fields of Entomology: screening gene mutation, identifying insects, studying the diversity of the genes, and constructing the genetic linkage map. This review includes the principle, new discovery, advantages and disadvantages of PCR-SSCP and finally the applications of the method in entomology is intrduced.

Key words　PCR-SSCP, mutation detection, genetic linkage map

摘　要　聚合酶链式反应－单链构象多态性（PCR-SSCP）技术是一种简便、灵敏的突变检测方法。随着该技术的不断发展和完善，其应用也越来越广泛。尤其是近年来该技术在昆虫学研究中涉及了：基因突变位点的检测、昆虫分类鉴定、多样性分析及连锁图谱的构建等多个领域。文章综述 PCR-SSCP 技术的发现、原理、在昆虫学研究中的应用及其优点和不足之处。

关键词　PCR-SSCP，突变检测，连锁图谱

1984 年，Noumi 等人在对大肠杆菌的正常和突变 F1-ATPase 基因的研究中发现，该基因经过酶切后，在中性聚丙烯酰胺凝胶（PAGE）中电泳后，含突变位点的单链和正常的单链片段有不同的迁移速率。相同长度的 DNA 小片段，即使仅一个碱基不同，都能明显地分开[1]。这种因碱基差异而引起的 DNA 片段迁移率不同的现象，叫单链构象多态性（single-strand conformation polymorphism，SSCP）。从该方法问世以来，经不断的发展，现在已经成为众多学科检测 DNA 突变和诱导损伤，及基因多态性分析的重要方法。

1　PCR-SSCP 技术的基本原理

PCR-SSCP 技术是通过非变性聚丙烯酰胺做介质，电泳合适大小的单链 DNA（ssDNA）片段，然后显影观察 ssDNA 之间的迁移率的差异。该方法依据的原理是：单链 DNA 在适宜的条件下（如：稳定的低温，非变性的聚丙烯酰胺凝胶等），能折叠成各种构象。单链在非变性聚丙烯酰胺凝胶中的迁移速率和 DNA 分子大小无关，而取决于单链的分子构象，分子构象不同，其迁移速率就不一样。单链 DNA 的分子构象是由分子内部碱基决定的，其稳定性靠分子内局部顺序的相互作用（主要是氢键作用）来维持。因此不同的序列有不同的构像，即使只有 1 个碱基的差异，其单链的构象也不相同[2,3]。后来研究的证据表明，影响迁移率的主要是 ssDNA 分子的三级结构而不是二级结构[2]。

2　PCR-SSCP 技术在昆虫研究中的应用

自 1984 年 Noumi 发现单链构象多态性现象后，该技术经过了一系列的发展和完善。Orita 等首先将 SSCP 和 PCR 技术结合起来对

*黑龙江省森林重大病虫害高效安全持续控制技术项目（GB06B304）。

** E-mail：fosker@163.com

*** 通讯作者，E-mail：chidefu@126.com

收稿日期：2006-10-11，修回日期：2007-01-08

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.n

PCR 扩增的片段进行分析[4,5]。1989 年 Hoshino 等用银染法取代了放射性同位素对 PCR-SSCP 结果进行分析，增强了该项技术的安全性[6]。为了进一步提高检测率，之后人们又发展起来了 RNA-SSCP 技术[1]，以及将双脱氧测序、毛细管电泳法和 SSCP 结合起来，使 SSCP 方法具有更高的分辨率、检测率和重复性[7,8]。

随着 PCR-SSCP 技术的不断发展和完善，其在各领域的应用也越来越广泛。Hiss, Norris 等将该技术首次应用于昆虫研究，他们运用 SSCP 方法分析了蜱、叶蝉、蚊子和亲缘关系接近的内寄生蜂的部分 12S 或 16S rDNA 基因。银染后在所有的分类单元中都观察到了种的特异性条带，而种内在分子水平上的单碱基突变也能被检测到[9]。此后，PCR-SSCP 技术在昆虫研究中得到了广泛的应用。其主要包括以下几个方面。

2.1 基因突变位点的检测

Morel 等将果蝇的 KC167 细胞经含低浓度的溴化乙锭(20 ng/mL)的培养基培养，然后用 PCR-SSCP 方法分析 mtDNA 来检测突变。通过与对照组比较得出，用溴化乙锭培养的细胞能产生线粒体 DNA 突变[10]。Zhang 等运用 SSCP 方法分析了美国科罗拉多马铃薯瓢虫 *Henosepilachna vigintioctomaculata* 的 AchE 基因的部分片段(163 bp)，该片段含有 S291G 突变，根据此突变的有无来区别薯虫对谷硫磷的抗性和敏感个体。并通过测序来确认这一特异性点突变。同时还指出类似的方法可用于对任何抗性和敏感昆虫的点突变检测[11]。Sunnucks 等用 SSCP 方法检测了长管蚜 *Sitobion aphids EF*1α 基因的内含子突变，并以此来研究 *Sitobion aphids* 孤雌生殖的进化。同时还用该方法检测了 *Sitobion aphids* 相同长度微卫星片段的序列突变和 mtDNA 核酸的换位拷贝[2]。

2.2 用于昆虫分类鉴定

Burban 等用 PCR-RELP-SSCP 方法分析了 *Matsucoccus feytaudi* 的线粒体 DNA，并将其分为 3 个主要谱系，并确定这 3 个谱系与其寄主病史有明显的关系[12]。Sedlmair 等对 *Orinocarabus* 亚属进行分类学研究[13]。运用 SSCP 技术分析该亚属的泛素基因(ubiquitin gene)，获得种群特异性条带后绘制了树状图。且该图与传统的形态学分类不一样。Salvato 等用 ALFP 和 SSCP 技术，对松异舟蛾 *Thaumetopoea pityocampa* 和异舟蛾 *Thaumetopoea wilkinsoni* 这 2 个同胞种 9 个种群的 COⅠ 和 COⅡ基因进行分析结果表明，这 2 个种从第四冰期前分离后就产生了很大的遗传分化，且进一步证实了松异舟蛾有很大的地理分布差异[14]。Chen 等从中国南方 9 个省采集了微小按蚊 *Anopheles minimus*，并进行形态学分类，然后用分子技术进行鉴定。他们用 SSCP 方法分析了微小按蚊核糖体 DNA 28S 的 D3 区域，并通过 mtDNA COⅡ基因测序来确定其分类地位[15]。Chen 等运用 SSCP 方法分析了中国南部微小按蚊和溪流按蚊 *Anopheles fluviatilis* 的 28S 的 D3 区域和 ITS2 基因，揭示了这 2 个种之间的关系和区别[16]。Weeto 等运用 SSCP 方法对从非洲 11 个国家采集的 900 个致死按蚊 *Anopheles funestus* 标本进行分析，并把其划分为 5 类：*An. funestus*，*An. vaneedeni*，*An. parensis*，*An. leesoni* 和 *An. rivulorum*.[17]。Nice 等运用 SSCP 技术对北美红珠灰蝶属 *Lycaeides* 的线粒体 AT 富含区 263 bp 的区域进行分析，得出依据形态命名的 2 个种之间只有 26%的遗传变异[18]。Marquez 等对非洲和北美的家蝇各 4 个种群的 8 个线粒体位点进行 SSCP 分析，并得出在北美和非洲家蝇之间没有基因流动[19]。

2.3 多样性分析

PCR-SSCP 方法还可用于对基因片段多态性的检测。Wohlford 等在研究刺舌蝇 *Glossina morsitans morsitans* 种群结构的时候，运用 PCR-SSCP 技术对来自赞比亚、津巴布韦、莫桑比克及实验室饲养的 8 个刺舌蝇种群线粒体 DNA 的 4 个位点进行多态性分析，在 12S 和 16S1 上获得 4 个等位基因，而在 16S2 和 COⅠ 上有 5 个等位基因。并通过 χ^2 分析得出种群间的等位基因频率有很大差异[20]。在对家蝇的研究中，Marquez 等运用 PCR-SSCP 研究了亚洲及太平洋西岸不同生物地理分布区家蝇种群的线粒

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

体多样性[21]。通过对47个家蝇样本的16S2和COⅡ基因的SSCP分析,检测到了14个单倍型[9]。Meneses等用SSCP方法研究了巴西里约热内卢雄性白蛉 *Lutzomyia intermedia* 3个种群的线粒体DNA(16S,12S,COⅠ),检测出在种群间有很高的单倍体多态性,而在种群内部的多态性水平却不高[22]。Gorrochotegui-Escalante等对墨西哥和美国南部的埃及伊蚊中肠的早期胰岛素基因进行了SSCP分析,通过测序找到了90个分化位点,并绘制出了它们之间的关系图[23]。

2.4 基因连锁图谱的构建

Stuart等结合PCR-RAPD和SSCP方法对小麦瘿蚊 *Mayetiola destructor* 的无毒力基因(avirulence gene)*vH6* 和OPG15-1进行遗传作图,得出这2个基因都是性连锁基因,并且这2个位点的遗传距离是(2.5±2.5)cM[24]。Severson等运用SSCP、RFLP和SNP分析了埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 的基因组DNA和cDNA,并构建了复合遗传连锁图[25]。Ullmann等采用SSCP技术和RAPD、微卫星及STARs技术结合,分析了肩突硬蜱 *Ixodes scapularis* 基因组的127个位点,构建了跨越14个连锁群,长616 cM的连锁图谱[26]。

2.5 用于对昆虫体内寄生物的研究

Baer等运用PCR-SSCP方法对寄生于蚜虫的菜少脉蚜茧蜂 *Diaeretiella rapae* 线粒体DNA的2 041对碱基进行分析,并对其中42个SSCP单倍型核酸序列进行测序分析来确定是否从不同寄主蚜虫上采集的 *D. rapae* 种群在遗传上有其独立的分化谱系。最后得出结论,线粒体DNA单倍型和寄主种类并无相关性[27]。Mohr等研究了3种蜜蜂(*Apis mellifera carnica*、*Bombus terrestris*、*Osmia bicornis*)成虫和幼虫消化道里的细菌群落。对其部分16S rRNA扩增后运用SSCP方法来分析多样性,以此来揭示昆虫如何特异性地选择它们自己的细菌群落[28]。

3 PCR-SSCP技术的优点及不足

自银染技术在PCR-SSCP中代替放射性同位素后,促进了该技术的迅速发展。在同类技术中显现出了极大的优势:(1)PCR-SSCP技术极大地改善了突变的检测效率,且该技术不需要专项的设备,操作过程直截了当,是合适的非放射性标记检测方法[8],是一种低费用,短耗时的方法。(2)PCR-SSCP技术的另一主要优点是适宜进行大样本检测,这在种群统计分析中尤为重要[29]。(3)对研究的目的基因,除了需要知道其扩增的信息外,PCR-SSCP方法不需要了解其他的序列信息,并且该方法还是检测杂合子的一种理想方法[30]。(4)和等位基因特异性扩增相比,PCR-SSCP方法更多地利用了PCR扩增产物的信息,而且还能提供更有价值的种群遗传信息[30]。

另一方面,PCR-SSCP技术因一些因素的限制也有其不足之处:(1)PCR-SSCP方法的突变检测率和所分析片段的长短有关,与片段长度成反比。一般100~300 bp片段的突变检测率为99%,400 bp片段的检测率为80%,能用SSCP成功分析的最长片段为775 bp[2]。然而另有报道认为片段的长度对突变体检测率影响不大[8]。(2)PCR-SSCP虽然是最简单的突变检测技术之一,但可能检测不到所有的突变位点,因此这还不是检测所有突变的完美方法[31]。(3)在采用PCR-SSCP技术的时候需要以经验为据。目前还没有能推断单链DNA不同构型数量或电泳性质的精确计算方法,难以解释含多条条带的电泳结果[8]。(4)在抗性突变检测中,DNA模板中的无效突变及一些和抗性无关的突变可能影响区分抗性和敏感个体的能力。虽能通过PCR-SSCP检测出扩增DNA片段中是否有突变,但不能直接得到发生突变的具体核苷酸[11],需要通过DNA测序进一步确定。最后,影响SSCP实验结果的因素比较多,如:电泳温度、聚丙稀酰胺凝胶的浓度、缓冲液组成及电泳条件等[2]。实验时需要摸索实验条件,当条件适合时能100%检测出突变体[8]。

参 考 文 献

1 Noumi T., Mosher M. E., Natori S., Tutai M., Kanazawa H. *J. Biol. Chem.*, 1984, **259**: 10 071~10 075.

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

2 Sunnucks P., Wilson A. C. C., Beheregaray L. B., Zenger K., French J. *Mol. Ecol.*, 2000, **9**: 1 699 ~ 1 710.
3 丁建松, 曹毅, 童建. 辐射防护通讯, 2004, **24**(5): 27 ~ 31.
4 Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K., Sekiya T. Proc. *Nation. Acad. Sci.*, 1989, **86**: 2 766 ~ 2 770.
5 Orita M., Suzuki Y., Sekiya T. *Genomics*, 1989, **5**(4): 87.
6 Hoshino S., Kimura A., Fukuda Y. *Hum. Immunol.*, 1992, **33**(2): 98.
7 Liu Q., Feng J., Sommers S. *Genomics*, 1992, **13**(2): 441 ~ 443.
8 Jicun Ren. J. *Chromatography B*, 2000, **741**: 115 ~ 128.
9 Hiss R. H., Norris D. E., Dietrich C. H., Whitcomb R. F., West D. F. *Insect Mol. Biol.*, 1994, **3**: 171 ~ 182.
10 Morel F., Debise R., Renoux M., Touraille S., Ragno M. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 1999, **29**: 835 ~ 843.
11 Zhang A., Dunn J. B., Marshall Clark J. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 1999, **65**: 25 ~ 35.
12 Burban C., Petit R. J., Carcreff E., Jactel H. *Mol. Ecol.*, 1999, **8**: 1 593 ~ 1 602.
13 Sedlmair D., Gerstmeier R., Einspanier R. *European J. Entomol.*, 2000, **97**: 387 ~ 394.
14 Salvato P., Battisti A., Concato S., Masutti L., Patarnello T. *Mol. Ecol.*, 2002, **11**: 2 435 ~ 2 444.
15 Chen B., Harbach R. E., Butlin R. K. *Med. Veterin. Entomol.*, 2002, **16**: 253 ~ 265.
16 Chen B., Butlin R. K., Pedro P. M., Wang X. Z., Harbach R. E. *Med. Veterin. Entomol.*, 2006, **20**: 33 ~ 43.
17 Weeto M. M., Koekemoer L. L., Kamau L., Hunt R. H., Coetzee M. *Transact. Roy. Soc. Trop. Med. Hygiene*, 2004, **98**(3): 142 ~ 147.
18 Nice C. C., Anthony N., Gelembiuk G., Raterman D., Ffrench-constant C. *Mol. Ecol.*, 2005, **14**: 1 741 ~ 1 754.
19 Marquez J. G., Krafsur E. S. *Insect Mol. Biol.*, 2003, **12**(2): 99 ~ 106.
20 Wohlford D. L., Krafsur E. S., Griffiths N. T., Marquez J. C., Baker M. D. *Med. Veterin. Entomol.*, 1999, **13**: 377 ~ 385.
21 Marquez J. G., Bangs M. J., Krafsur E. S. *Med. Veterin. Entomol.*, 2003, **17**: 429 ~ 435.
22 Meneses C. R. V., Cupolillo E., Monteiro F., Rangel E. F. *Med. Veterin. Entomol.*, 2005, **19**: 38 ~ 47.
23 Gorrochotegui-Escalante N., Lozano-Fuentes S., Bennett K. E., Molina-Cruz A., Beaty B. J. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2005, **35**: 771 ~ 788.
24 Stuart J. J., Schulte S. J., Hall P. S., Mayer K. M. *Genome*, 1998, **41**: 702 ~ 708.
25 Severson D. W., Meece J. K., Lovin D. D., Saha G., Morlais I. *Insect Mol. Biol.*, 2002, **11**(4): 371 ~ 378.
26 Ullmann A. J., Piesman J., Dolan M. C., Black W. C. *Insect Mol. Biol.*, 2003, **12**(2): 201 ~ 210.
27 Baer C. F., Tripp D. W., Bjorksten T. A., Antolin M. F.. *Mol. Ecol.*, 2004, **13**: 1 859 ~ 1 869.
28 Mohr K. I., Tebbe C. C. *Environ. Microbiol.*, 2006, **8**(2): 258 ~ 272.
29 Marquez J. G., Vreysen M. J. B., Robinson A. S., Bado S., Krafsur E. S. *Med. Veterin. Entomol.*, 2004, **18**: 288 ~ 295.
30 Sharpe R. G., Hims M. M., Harbach R. E., Butlin R. K. *Med. Veterin. Entomol.*, 1999, **13**: 265 ~ 273.
31 Hayashi K. *Genet. Anal.*, 1999, **14**: 193 ~ 196.

杀蚊苏云金芽孢杆菌及其晶体蛋白研究进展*

赵新民[1,2] 夏立秋[1**] 王发祥[1] 丁雪知[1]
(1. 湖南师范大学生命科学学院 长沙 410081; 2. 湖南城市学院化学与环境工程系 益阳 413049)

Research progress on mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* and its crystal proteins. ZHAO Xin-Min[1,2], XIA Li-Qiu[1**], WANG Fa-Xiang[1], DING Xue-Zhi[1] (1. *College of Life Science, Hunan Normal University*, Changsha 410081, China; 2. *Department of Chemistry and Environmental Engineering, Hunan City University*, Yiyang 413049, China)

Abstract Ever since the discovery of the first *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* strain capable of killing mosquito larvae, there are many reports about the occurrence of mosquitocidal strains belonging to different subspecies/

*国家自然科学基金资助项目(30670052)。
** 通讯作者, E-mail: xialq@hunnu.edu.cn
收稿日期: 2006-03-07, 修回日期: 2006-04-10
?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n