

YAC 介导的天蚕丝素基因向家蚕的转移 ——天蚕丝素基因-YAC 克隆在家蚕的表达

李振刚 周丛照 唐恒立

(中国科学技术大学生物系 合肥 230026)

范久戈

(安徽省农业科学院蚕桑研究所 合肥 230030)

摘要 本文为天蚕 *Antheraea yamamai* 丝素基因在家蚕 *Bombyx mori* 成功表达的首次报道。我们构建了天蚕丝素基因的 YAC 克隆,然后把含有该克隆的 DNA 溶液导入家蚕受精卵。分子杂交实验证明天蚕丝素基因已整合到家蚕基因组中。通过丝心蛋白氨基酸组分分析以及茧丝的溶解性比较,发现有部分转基因家蚕表达了天蚕丝素基因。 F_2 代的转基因家蚕蛾的染色体 DNA 中同时还存在 YAC 序列,说明 YAC 对丝素基因具有介导作用。天蚕丝素基因以单拷贝形式存在于转基因家蚕中。

关键词 家蚕, 天蚕, 丝素基因, 酵母人工染色体

丝质性状的改良一直是家蚕 *Bombyx mori* 遗传育种的主要目标之一。为了获得具有优良丝质性状的家蚕新品种,构建转基因家蚕 (transgenic silkworm) 是一种行之有效的,它比传统的遗传育种法具有研究周期短、目的性强等优点。天蚕 *Antheraea yamamai* 丝质优良,素有“丝中皇后”的美称,但天蚕家养驯化尚未成功,不能大批室内饲养,它与家蚕的亲缘关系较远而无法进行有性杂交,必须借助于基因转移。YAC (yeast artificial chromosome) 作为一种大容量的基因工程载体,在真核基因转移方面有其独特的优越性。

天蚕和家蚕丝质基因的主要差异存在于核心区^[1],这种差异反映在蛋白质水平上就表现为两者丝质性状的差异。家蚕丝在 65 °C 下易溶于 $\text{CaCl}_2 : \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} : \text{H}_2\text{O}$ (摩尔比 1 : 2 : 8) 溶液中,而天蚕丝则根本不溶。天蚕丝对酸碱的耐受力也比家蚕丝高得多。黄绿色的天蚕丝和白色的家蚕丝还为我们提供了一种直接的感官指标。一方面,我们可以利用天蚕丝素基因核心区片段或 YAC 作为探针来检测外源 DNA 在转基因家蚕中的整合情况;另一方面,我们可以通过丝心蛋白的氨基酸组分分析、茧色及茧丝溶解性比较,来确定天蚕丝素基因是否在转基因家蚕中表达。

1 材料与方法

天蚕由黑龙江蚕业研究所提供,家蚕品种(苏春)由中国蚕业研究所供给,质粒

pYAC4由华盛顿大学 M. V. Olson 博士惠赠, 含有天蚕丝素基因核心区的质粒 pAy 6.8 由日本国立生物研究所的 Y. Suzuki 博士赠送。

1.1 天蚕丝素基因 YAC 克隆 DNA 的制备

1.1.1 天蚕丝素基因 YAC 克隆的构建: 首先用来自天蚕 5 龄幼虫后丝腺的 DNA 构建了天蚕-YAC 基因库^[1], 插入 YAC 的天蚕 DNA 片段平均长度为 570 kb。然后根据已知的天蚕丝素基因的 5' 序列合成 PCR 引物: 5'-TGTTTCATGATAGGGGTTTAA-3' 和 5'-TCATTACCAGAAAGATGTGG-3', 从天蚕-YAC 基因库中筛选出阳性克隆 Afy-1 作为转基因之用。Afy-1 全长 440 kb, 包含了整个丝素基因编码区及侧翼序列^[2]。

1.1.2 Afy-1 DNA 的制备: 挑取 Afy-1 的单菌落, 置于 AHC 培养液中培养过夜, 采用 Burgers 等的方法^[3]制备原生质体, 然后置于琼脂糖包埋块中以 Proteinase K 消化, 经均质电场脉冲电泳 (CHEF-DR II, BIORAD) 分离, 用低熔点琼脂糖 (LMA) 凝胶回收 440 kb 的目的片段, 加入琼脂糖酶 (Agarase, New England Bio-Labs) 消化 LMA 后备用。

1.2 显微注射

注射溶液的制备依本实验室方法^[4], DNA 浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。蚕卵像其他昆虫卵一样, 具有坚硬的外壳与较高的内压, 长期以来用传统的玻璃微针的显微注射法, 难以奏效。我们对 Yamamoto 的 “pricking” 法^[5]加以改进, 收到较好的效果。方法是把原法的玻璃微针改为经电解的钨针, 改直接的针刺为旋转地钻入, 既加快了注射速度, 又大大地减少了刺压时的损伤。先把产后 3 h 以内的家蚕卵置硅胶中 30 min 以减小卵的内压; 滴注射液于卵壳表面, 以尖端为 10~20 μm 的钨针 (经电解制得) 在微型电动机 (micromotor) 驱动下穿过液滴钻入卵内, 当钨丝旋转退出时, DNA 溶液乘瞬时负压而进入蚕卵, 同时有部分溶液进入卵壳与卵黄膜之间而作缓慢的渗透。

1.3 对茧丝溶解性的检测

每一个经 “pricking” 后而产生的茧均经茧丝检测液 ($\text{CaCl}_2 : \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} : \text{H}_2\text{O}$, 摩尔比 1 : 8 : 2) 溶解实验。取 10 mg 茧丝置于 7.5 mL 检测液中, 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热, 筛选出那些溶解缓慢或不溶的蚕茧进一步做丝心蛋白的氨基酸分析。

1.4 分子杂交

雌、雄蛾交配后拆对, 先让雌蛾产卵留种, 然后依照 Bothwell 等的方法^[6], 提取所有蚕蛾的染色体 DNA。

1.4.1 杂交探针的制备和标记: 质粒 pAy6.8 及 pYAC4 的扩增、抽提和纯化依《Molecular Cloning》上的方法^[7]。两种质粒分别经 *Bam*HI 完全酶解, 以低熔点琼脂糖电泳分别回收 6.8 kb 的片段 Af6.8^[1] 和 10.8 kb 的 YAC (即通常所用的 YAC 载体左、右臂连在一起)^[8]。纯化后的探针用 $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -dATP 以随机引物法标记 (试剂盒购自 BRL 公司)。

1.4.2 DNA 斑点杂交: DNA 样品经沸水和 NaOH 溶液双重变性后点于尼龙膜上, 每点 5 μg , 80 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤 2 h, 按常规方法进行预杂交、杂交、洗膜和放射自显影。先以 Af6.8 作

为探针进行杂交，压片后去除尼龙膜上的杂交探针，然后在回收的膜上以 YAC 作为探针进行杂交，这样既可避免重复点膜的麻烦，还可节省 DNA 样品，而且两种探针的杂交结果之间具有良好的对应关系。

1.5 氨基酸组分的分析

100 mg 蚕丝在 8 mL 脱胶液(0.5%KOH,0.05%Na₂CO₃)中于 95 ℃~98 ℃处理 2 次，每次 50 min 然后把丝转移到 8 mL、0.05%Na₂CO₃ 的溶液中，于 90℃下 30 min。以蒸馏水洗涤 3 次至中性，真空干燥备用。脱胶后的蚕丝(丝心蛋白)的酸解按常规进行。氨基酸分析在日立 835 型自动分析仪上进行。

2 结果与讨论

2.1 显微注射后家蚕的培育

转基因组及对照组的家蚕品种均为苏春。由于显微注射时的机械损伤以及外源 DNA 溶液对蚕卵内环境的影响，因此转基因组的蚕卵孵化率远远低于对照组(表 1)。

表 1 显微注射后家蚕的培育情况

组别	Pricking 总数	成活卵数	孵化数	结茧数	出蛾数
转基因	5 000	3 100~3 500	110	78	74 (39♀35♂)
对照	1 000	900	850	800	762

2.2 茧丝颜色及溶解度的变异

在 F₁ 代中出现了约 20%的淡绿色茧，F₂ 代中则有近 60%的茧为淡绿色。它们与天蚕的黄绿茧相近，而明显不同于家蚕白茧。茧色的详细遗传机制尚不清楚，但它在 5 龄末期后部丝腺中与丝素基因同时活化和表达，因此二者可能同属于一个基因活动群。

F₁ 代 78 个茧中有 4 个在 CaCl₂·C₂H₅OH:H₂O 溶液中溶解缓慢(溶解时间大于 48 h，家蚕茧为 12 h)，但没有像天蚕茧那样不溶解。对 F₂ 代 150 个茧的酸碱耐受力分析，发现 10%的茧的酸碱抗性达到家蚕茧的 1.5 倍以上。

2.3 天蚕丝素基因和 YAC 的杂交检测

以 Af6. 8 作为探针，在 F₂ 代中发现 6 个阳性杂交斑点(约占总数的 8%)；而 F₂ 代的 100 个蚕蛾中有 12 个表现为杂交阳性(图 1)，说明到 F₂ 代时仍有 12%的家蚕中保留了天蚕丝素基因。

为了进一步确认 YAC 在天蚕丝素基因转移过程中的介导作用，我们还对 F₂ 代的蚕蛾进行了 YAC 杂交检测，结果表明有 17 个蚕蛾的染色体 DNA 中存在 YAC 序列(图 2)，其中有 7 个与天蚕丝素基因的杂交阳性结果一致(约为 60%)。这种并非 100%的对应关系，可能与带有天蚕丝素基因的 YAC 大片段 DNA 在整合和传代过程中发生重组互换或剪接有关。

2.4 氨基酸组分的变异

茧丝溶解性、分子杂交等检测后,筛选出 30 个可能的转基因家蚕的蚕茧进行了丝蛋白的氨基酸组分分析。同时,用天蚕、家蚕茧作为对照。本文只给出了 F₁ 代的结果(表 2),F₂ 代与此相类似。

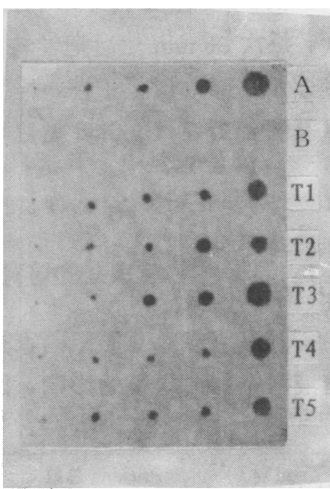
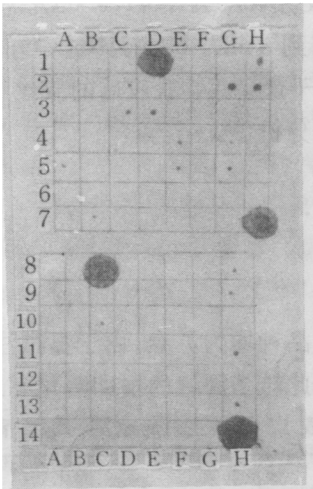
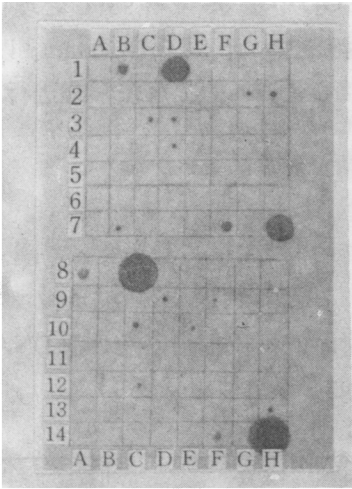


图 1 天蚕丝素基因的斑点杂交结果(探针为 Af6.8)
B₁, F₇, A₈, F₁₄ 为天蚕 DNA; D₁, H₇, C₈, H₁₄ 为质粒 pAy6.8; C₁, G₇, B₈, G₁₄ 为家蚕 DNA (阴性对照); 其余 100 个均为 F₂ 代蚕蛾 DNA

图 2 YAC 探针的斑点杂交结果
所有斑点都与图 1 中完全对应

图 3 F₂ 代转基因家蚕中天蚕丝素基因拷贝数的测定
每排从左至右依次为 0, 1, 2, 5, 10 μ L (DNA 浓度为 0.5 μ g/ μ L)
A: *Antheraea yamamai*; B: *Bombyx mori*; T1~T5: 转基因家蚕

表 2 一些主要氨基酸组分的比较 (%)

氨基酸	家蚕	转 基 因 家 蚕				天蚕
		1	2	3	4	
Gly	36.84	34.64	35.19	37.13	26.14	23.92
Ala	30.54	31.8	28.85	30.77	21.58	44.23
Ser	9.12	6.63	6.18	6.79	4.4	5.49
Tyr	11.8	6.40	7.88	6.94	5.93	5.60
Glu	2.24	2.10	2.05	2.06	1.38	1.77
Val	3.07	3.01	2.78	2.95	1.92	1.11
Ile	0.87	0.65	0.63	0.65	0.38	0.35
Leu	0.75	0.57	0.55	0.60	0.33	0.49
Phe	1.33	1.20	1.24	1.10	0.85	0.59
Lys	0.51	0.44	0.35	0.41	0.22	0.21
Pro	0.82	0.62	0.60	0.53	0.38	0.62
Amide	1.98	1.86	1.78	1.70	3.32	2.91

2.5 F₂ 代转基因家蚕中天蚕丝素基因的拷贝数

从上述 Af6.8 杂交阳性的 12 个蚕蛾中随机挑选了 5 个作拷贝数测定,以天蚕基因组 DNA 作为标准阳性对照,家蚕基因组 DNA 作为阴性对照(图 3)。结果表明,这 5 个 F₂ 代转基因家蚕中天蚕丝素基因的拷贝数都与天蚕相近。一般外源基因以多拷贝首尾相连方式(Head to Tail)整合在转基因动物的基因组中^[9],但本文中外源基因却是以单拷贝形式存在。这可能与本文转移的是一个 440 kb 的 DNA 大片段有关,它无需以多拷贝首尾相连方式就能稳定存在于受体基因组中。

参 考 文 献

- 1 Tamura T, Inoue H, Suzuki Y. The fibroin gene of *Antheraea yamamai* and *Bombyx mori* are different in their core regions but reveal a striking sequence similarity in their 5' end and 5' flanking regions. *Mol. Gen. Genet.*, 1987, **207**: 189~195
- 2 Tang H L, Cai J H, Li Z G. YAC-base transfer of fibroin gene from *Antheraea yamamai* to domestic silkworm *Bombyx mori*. *Science in China (Series B)*. 1995, **38**(5): 590~595
- 3 Burgers P M J, Percival R J. Transformation of yeast spheroplasts without cell fusion. *Anal. Biochem.* 1987, **163**: 391~397
- 4 Li Z G, Shen X X, Fan J G *et al.* Transfer of exogenous genes by microbeam laser between *Antheraea yamamai* and *Antheraea pernyi* in Wild Silkmooths 89'90'91' (eds. Akai, H., Kiuchi, M.), Ibaraki: International Society for Wild Silkmooths, 1991, 129~135
- 5 Yamamoto F *et al.* The 'Pricking' Method, a new efficient technic for mechanically introducing foreign DNA into the nuclei of culture cells. *Exp. Cell Res.*, 1982, **142**: 79~84
- 6 Bothwell A *et al.* *Method for Cloning and Analysis of Eukaryotic Genes*, 1990, Jones & Bartlett Publishers, Boston, 38~39
- 7 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 1. 25~1. 28; pp. 1. 40~1. 41
- 8 Burke D T, Carle G F, Olson M V. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science*, 1987, **236**: 806
- 9 刘庆辉, 刘德培, 郭志晨等. 纯合子人 β -E-珠蛋白基因转基因鼠系的建立. *科学通报*, **39**(22): 2101~2102

**YAC-BASED TRANSFER OF FIBROIN GENE FROM
ANTHERAEA YAMAMAI TO *BOMBYX MORI*
——EXPRESSION OF THE YAC CLONE CONTAINING
A. *YAMAMAI* FIBROIN GENE IN *B. MORI***

Li Zhengang Zhou Congzhao Tang Hengli

(Department of Biology, University of Science and Technology of China Hefei 230026)

Fan Jiuge

(Sericulture Research Institute of Anhui Hefei 230030)

Abstract This paper is the first report of the expression of *Antheraea yamamai* fibroin gene in *Bombyx mori*. We have constructed an yeast artificial chromosome (YAC) clone containing the fibroin gene of *A. yamamai*, and transferred this DNA clone into the fertilized eggs of *B. mori*. Dot blot indicates that the fibroin gene has integrated into the genome of *B. mori*. By analyzing the fibroin amino acid composition and the silk solubility, we found that *A. yamamai* fibroin gene has expressed in some of the transgenic *B. mori*. The existence of YAC sequence in the F₂ progeny of transgenic *B. mori* suggested that YAC is a medium for the transfer of fibroin gene. There is only one copy of *A. yamamai* fibroin gene in the haploid of F₂ progeny.

Key words *Bombyx mori*, *Antheraea yamamai*, fibroin gene, yeast artificial chromosome