

家蚕丝心蛋白 H 链基因的荧光原位杂交(FISH)*

宋方洲^{①②**} 张平波^{②③} 易发平^{①②} 洪锡钧^③ 鲁 成^②
伴野丰^④ 藤井博^④ 古贺克己^④

(①重庆医科大学基础医学院, 重庆 400016; ②西南农业大学蚕桑学农业部重点实验室, 重庆 400716;

③西南师范大学生命科学学院, 重庆 400715; ④九州大学农学部, 福岡 812-8581, 日本)

摘要 蚕丝业在国民经济中占有极为重要的地位. 家蚕作为重要的模式生物和生物反应器, 历来为人们所关注. 有关蚕丝基因的结构、表达调控和分子进化都已有较详细的研究和报道, 但关于蚕丝结构基因的分子细胞遗传学基因定位的研究, 几乎尚无报道. 经用荧光原位杂交技术(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)对家蚕丝心蛋白 H 链基因(*Fib-H*)的分子细胞遗传学定位研究结果, 初步将家蚕丝心蛋白 H 链基因定位在了分子细胞遗传学第 25 连锁群染色体的端部, 即 25~0.0 的位置, 从而解决了该基因迄今尚未定位的问题, 并证实了丝心蛋白 H 链基因在染色体位置上为单一座位.

关键词 家蚕 丝心蛋白基因 荧光原位杂交 基因定位

家蚕(*Bombyx mori* L.)既是重要的经济昆虫, 又是可与果蝇相媲美的经典模式生物, 历来为人们所关注. 丝心蛋白是家蚕茧丝的最重要蛋白, 它决定茧丝的重量和质量性状. Suzuki 等人^[1]首先分离和鉴定出家蚕后部丝腺的丝心蛋白 mRNA, 并测定了部分序列; Ohshima 等人^[2]克隆了丝心蛋白的全基因及其两端的侧翼序列, 并发现丝心蛋白主要由 350 kD 的重(H)链和 25.8 kD 的轻(L)链以及 P25 蛋白组成. 有关丝心蛋白 H 链基因的结构^[3~5]、表达调控^[6,7]和分子进化^[8]都已有了较为详细的研究. 另外, 在实验遗传学上, 关于丝素重链基因(*Fib-H*)的定位已落实到了第 25 连锁群, 但具体位点尚不清楚, 而且在细胞学染色体上的定位也未见报道. 不仅如此, 蚕的其他结构基因的分子细胞学定位尚无人涉及. 为了弄清丝心蛋白 H 链基因在染色体上的真实位置, 我们用荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)技术对家蚕各个时期染色体进行了分子细胞学的基因定位研究, 发现丝心蛋白 H 链基因位于第 25 连锁群染色体的端部, 这将对蚕类乃至昆虫的染色体与分子细胞遗传学及基因定位等方面的研究产生重要的影响.

1 材料与方法

1.1 材料

家蚕品种大造(os, *Xan*, *K*, *Nd*, *Sel*, *E-tr*), 夏芳, 秋白, C₁₀₈, BT924 及 b₀₅ 均由西南农业大学

2001-11-19 收稿, 2002-02-25 收修改稿

* 国家自然科学基金重点基金(批准号: 39730730)、国家自然科学基金(批准号: 39770574)、教育部高等学校骨干教师资助计划(批准号: GG-230-10625-1065)、留学回国人员科研启动基金和日本文部省科学研究基金(国际学术研究)(批准号: 09045069)资助项目

** E-mail: fzsong@swau.cq.cn

家蚕基因库提供。

1.2 染色体标本制作

采用改良今井涂片法,即取家蚕生殖腺(精巢或卵巢)于低渗液中低渗 30 min 以上,剔除脂肪、气管等杂物;将生殖腺置于洁净载玻片中央,吸取固定液 I (3 无水乙醇:3 冰乙酸:4 蒸馏水),沿倾斜玻片滴于生殖腺上方,平放玻片再滴 1~2 滴固定液 I,待固定液 I 快干时,用解剖针刺破,切碎生殖腺并迅速均匀地涂片,其后于细胞涂片中央滴加固定液 II (1 无水乙醇:1 冰乙酸)1~2 滴,待即干时滴加固定液 III (冰乙酸原液)1~2 滴,自然风干后保存。

1.3 探针制备

参照 Sambrook 等人^[9]的方法用碱法提取含丝心蛋白 H 链基因的 pFb2.9 质粒 DNA,并经 PEG 纯化后,按“DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit I”(Cat. No. 1745832, Boehringer Mannheim)说明书,用随机引物法进行标记:在 *EcoR* I 或 *Pst* I 单酶切后的线性化 pFb2.9 质粒 DNA(1 μ g)中加灭菌双蒸水稀释至 16 μ L;沸水浴 10 min 变性后,立即置冰乙醇浴中;在冰上加入 4 μ L DIG-High Prime,混匀后瞬时离心,置 37℃恒温箱过夜;加 2 μ L 0.2 mmol/L EDTA 终止反应。探针纯化按如下步骤进行:在标记好的探针溶液中加入 2.5 μ L 4 mmol/L LiCl 和 75 μ L 预冷(-20℃)乙醇,混匀,置-70℃,30 min 后取出 12000 r/min 离心 15 min,小心弃去上清液后加入 50 μ L 70%冰乙醇洗涤沉淀,真空干燥 DNA,加 20~50 μ L TE (10 mmol/L Tris-HCl pH 7.6, 1 mmol/L EDTA pH 8.0)溶解 DNA,存于-20℃冰箱备用。

1.4 标记效率测定

参照“DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit I”(Cat. No. 1745832, Boehringer Mannheim)说明书,在 DIG 标记测试条上点上一系列 DIG 标记的 DNA 稀释液,加入 Anti-DIG-AP 聚合物和显色底物 NBT/BCIP 进行斑点杂交,经免疫显色检测,并同已稀释好的 DIG 标记 DNA 的对照条(标准)进行比较。

1.5 荧光原位杂交

每张染色体标本经 2×SSC 的 600 μ L RNase A (100 μ g/mL, Sigma 公司)处理后,用 70%, 90%和 100%的系列乙醇脱水,再用蛋白酶 K 处理(37℃, 10 min)后,于 70℃ 70%甲酰胺/2×SSC 中变性 3 min,立即置冰乙醇系列中各 5 min。干燥后,将 50 μ L 经 100℃沸水浴变性 7 min 后的鲜配杂交混合液滴于玻片上。混合液中不同成分含量如下:探针 DNA 1 μ g, 50%甲酰胺, 10%硫酸葡聚糖及 2×SSC。杂交标本盖上玻片后,在 PCR 仪上分别经 80℃和 55℃各处理 2~5 min,最后置潮湿杂交盒中 37℃杂交过夜。

1.6 免疫荧光检测

杂交后的标本于 37℃依次经 50%甲酰胺/2×SSC 2 次,每次 3 min, 2×SSC 2 次,每次 3 min 及 4×SSC 1 次 5 min 洗涤后,用 50 μ L 4×SSC/3% BSA/0.1% Tween 20/10 mmol/L MgSO₄ 封阻 15 min,加 50 μ L Anti-DIG-Fab-Fluorescein (2 μ g/mL)于 37℃温育 45 min,经 4×SSC/0.1% Tween 20/10 mmol/L MgSO₄ 室温振荡冲洗 3 次,每次 3 min。玻片用 PI(5 mg/mL)和 DAPI(2 mg/mL)复染 15 min,加 50 μ L 抗荧光淬灭剂(Vectashield, Vector laboratories, CA94010)后用指甲油封片,于 Olympus BH-2 型荧光显微镜下,用 O570 红色滤光镜观察信号,并用 Kodak ppc400 彩色胶卷照相。

2 结果与讨论

2.1 探针制备及标记效果测定

提取纯化的 pFb2.9 质粒 DNA 经紫外分光光度仪测得 A_{260}/A_{280} 介于 1.6~1.8 之间, 证明提取纯化的 DNA 溶液中既无 RNA, 也无蛋白或酚的污染. 酶切鉴定结果见图 1. pFb2.9 质粒 DNA 经 *EcoR* I, *Pst* I 单酶切后各出现分子量 2.9 kb 的一条清晰的带, 而用 *EcoR* I 和 *Pst* I 双酶切出现两条带, 这进一步验证了前面质粒 DNA 提取纯化步骤是正确的. DIG 标记的蚕丝心蛋白 H 链基因探针 pFb2.9 经斑点杂交免疫显色检测其标记效率(图 2).

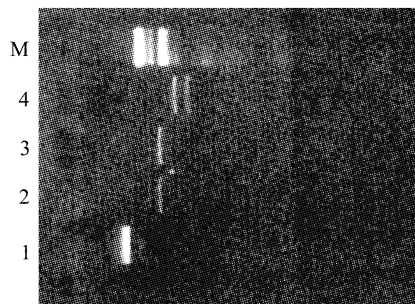


图 1 pFb2.9 质粒 DNA 的酶切鉴定结果
1 示 pFb2.9 质粒 DNA; 2 示 *Pst* I 单酶切 pFb2.9; 3 示 *EcoR* I 单酶切 pFb2.9; 4 示 *EcoR* I 和 *Pst* I 双酶切 pFb2.9; M 示分子量标准(λ -DNA/*EcoR* I + *Hind* III)

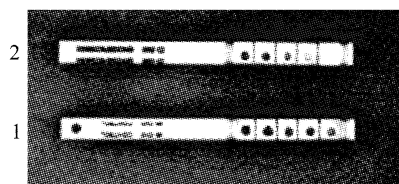


图 2 DIG 标记的 pFb2.9 探针效率检测
1 示 DIG 标记鲑精 DNA 的对照标准; 2 示 DIG 标记家蚕丝心蛋白 H 链基因的 pFb2.9 探针. 稀释倍数从左至右分别为: 3.3, 10, 33, 100, 330

2.2 荧光标记原位分子杂交和丝心蛋白 H 链基因分子细胞学定位

将用地高辛(DIG)标记蚕丝心蛋白 H 链基因的 pFb2.9 探针分别在不同家蚕品种的染色体片上进行 FISH 定位, 荧光显微镜观察偶线期分裂相 4 个、粗线期分裂相 250 个、终变期分裂相 3 个、中期分裂相 20 个和间期 154 个. 在多数粗线期分裂相(238/250)的某一条染色体端部位置上可见单一的黄绿色荧光亮点——杂交信号, 其余未见杂交信号, 结合实验遗传学的连锁遗传图分析, 该染色体为第 25 连锁群(图版 I -1, 2, 附本刊后, 下同).

经多次荧光原位杂交重复实验结果表明, 间期杂交成功的可能性最大(但对于基因定位来讲, 似乎无多大意义), 粗线期次之, 而中期最难看到杂交信号(仅观察到一个有丝分裂中期染色体的杂交信号, 呈两个黄色小亮点, 位于两个颗粒状染色体末端). 究其原因, 推测与家蚕中期染色体结构致密、数目多($n = 28$)、呈颗粒状有关. 观察还发现偶线期的一个细胞有双杂交信号出现, 呈较亮的绿色小圆点, 恰好分处在两条同源染色体的端部(图版 I -3). 同时, 在有丝分裂中期的两条染色体的端部也观察到杂交信号(图版 I -4), 与偶线期观察到的结果相吻合. Okazaki 等人^[10]在家蚕端粒 DNA 序列的 FISH 研究中也曾报道过粗线期有双杂交信号出现, 但本研究未发现蚕丝心蛋白 H 链基因在粗线期出现双杂交信号, 可能是由于家蚕粗线期染色体配对太紧密, 致使两个杂交信号合二为一的缘故. 通常负染剂 PI 发红光, 故染色体被染成红色, 荧光素 Fluorescein 和 FITC 都发绿光, 故在染色体上的杂交信号应呈黄绿色荧光, 可是一旦 PI 见光漂白或因某些细胞染色体染色程度不够, 使背景染色体发暗, 相应地, 杂交信号便会呈现绿光. 家蚕上出现的这种情况在人类染色体 FISH 研究^[11]中也有类似的报道.

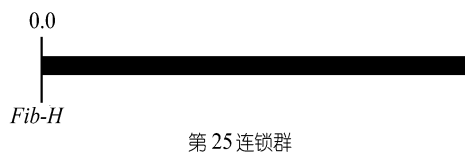


图 3 家蚕丝心蛋白 H 链基因 FISH 图

以上研究结果, 结合实验遗传学的连锁遗传图, 可将蚕的丝心蛋白(丝素)重(H)链基因(*Fib-H*)初步定位在分子细胞遗传学的第 25 连锁群染色体的端部, 即 25~0.0 的位置(图 3), 从而解决了迄今国内外关于此基因尚未定位的问题。

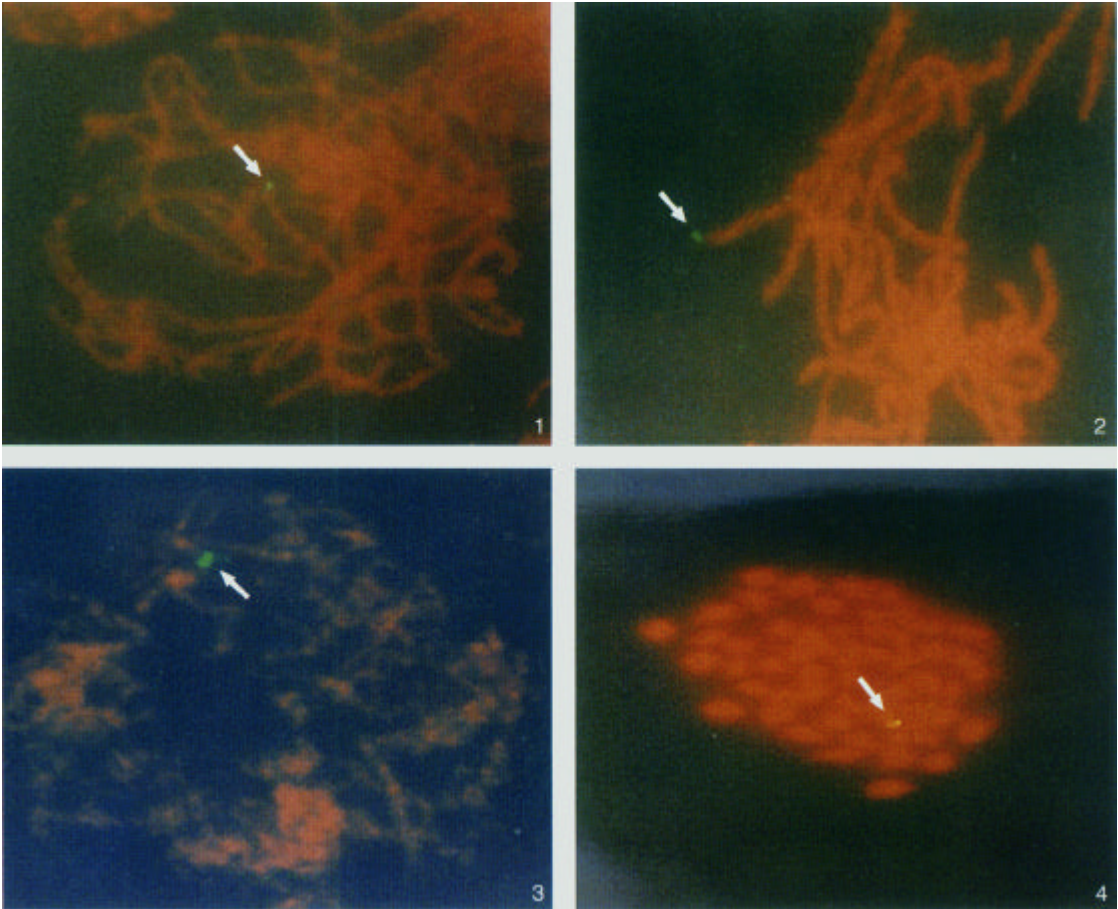
FISH 是一种最直接分析 DNA 序列在染色体或 DNA 分子上排列的分子细胞遗传学技术, 已被广泛地应用于动植物基因组结构的研究、分子细胞遗传学的基因定位、DNA 分子物理图谱的构建、染色体的同源性与物种间亲缘关系的研究、转基因的分子细胞学鉴定与染色体定位等^[12,13]。但是, 由于家蚕染色体自身的特殊性, 如数目多、弥散型着丝粒、中期呈短杆状乃至颗粒状、内部结构致密、分带不易以及家蚕上可利用探针数目的限制等诸多因素, 有关家蚕 FISH 的研究文献极为有限。目前仅土田等人^[14]在家蚕染色体上找到与人染色体着丝粒部位有共通性的 DNA 片段和 Okazaki 等人^[10]证明了家蚕所有染色体端粒上有(TTAGG)_n 戊核苷酸序列存在的文献报道, 还未见有关蚕的结构基因的荧光原位杂交及分子细胞学基因定位的报道。本研究借鉴了人类及其他动植物 FISH 研究方法, 利用丝心蛋白 H 链基因 pFb2.9 探针, 对家蚕第 25 连锁群的丝素重(H)链基因进行分子细胞遗传学定位, 获得了初步结果。这对于开创蚕的分子细胞遗传学研究, 提高蚕的遗传育种学水平具有十分重要的意义, 而且将对蚕类乃至昆虫的染色体与分子细胞遗传学及基因定位和转基因动物的检测等方面的研究产生积极的推动作用。同时, 为了建立一套适宜于蚕类乃至昆虫的荧光原位杂交的技术体系, 我们对实验方法进行了改良, 尤其是变性处理方法与 Okazaki 等人^[10]有所不同。在一般的 FISH 方法中, 通常采用二次变性即染色体和探针分别变性再杂交。本研究考虑到家蚕染色体结构非常致密的特性, 采用染色体“三重”变性的方法, 即在前两次变性基础上, 杂交前在 PCR 仪上再进行一次高温变性(80℃), 目的是使蚕的染色体充分解螺旋, 有利于探针 DNA 与染色体 DNA 杂交上。同时, 采用相对宽松的杂交后冲洗条件, 既要保证杂交的特异性, 又要使探针信号稳定地保留在染色体上, 以最大限度地保证杂交的成功。

参 考 文 献

- 1 Suzuki Y, Brown D D. Isolation and identification of the messenger RNA for silk fibroin from *Bombyx mori*. J Mol Biol, 1972, 63: 409~429
- 2 Ohshima Y, Suzuki Y. Cloning of the silk fibroin gene and its flanking sequences. Proc Natl Acad Sci USA, 1977, 74(12): 5363~5367
- 3 Manning R F, Gage L P. Physical map of the *Bombyx mori* DNA containing the gene for silk fibroin. J Biol Chem, 1978, 253(6): 2044~2052
- 4 Tsujimoto Y, Suzuki Y. Structural analysis of the fibroin gene at the 5 end its surrounding regions. Cell, 1979, 16: 425~436
- 5 Mita K, Ichimura S, James T C. Highly repetitive structure and its organization of the silk fibroin gene. J Mol Evol, 1994, 38: 581~592
- 6 Tsuda M, Suzuki Y. Translation modulation *in vitro* of the fibroin gene exerted by a 200-base-pair region upstream from the TATA box. Proc Natl Acad Sci USA, 1983, 80: 7442~7446
- 7 Hui C C, Matsuno K, Suzuki Y. Fibroin gene promoter contains a cluster of homeodomain binding sites that interact with three silk gland factors. J Mol Biol, 1990, 213(4): 651~670
- 8 Sprau K U, Roth M B, Manning R F, et al. Alleles of the fibroin gene coding for proteins of different lengths. Cell, 1977, 17:

407~412

- 9 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 502~504
- 10 Okazaki S, Tshchida K, Maekawa H, et al. Identification of a pentanucleotide telomeric Sequence, (TTAGG)_n, in the Silkworm *Bombyx mori* and in other insects. Molecular and Cellular Biology, 1993, 3: 1424~1432
- 11 黄浩杰, 张锡然, 陈宜峰. 用染色体原位抑制杂交法研究人和猕猴染色体同源性. 遗传学报, 1993, 20(3): 193~200
- 12 吴 刚, 崔海瑞, 夏英武. 原位杂交技术在植物遗传育种上的应用. 植物学通报, 1999, 16(6): 625~630
- 13 王 玲, 宁顺斌, 宋运淳, 等. 原位杂交技术的发展与应用. 植物学报, 2000, 42(11): 1101~1107
- 14 Tsuchida K, Miyajima N, Deng L R, et al. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) as applied to chromosome of silkworm, *Bombyx mori*. The 62nd Anniversary Meeting of the Japanese Society of Sericultural Science, 1992, 62: 36



1 示家蚕丝心蛋白 H 链基因 pFb2.9 探针在雄蚕早粗线期染色体上的杂交信号(箭头所示); 2 示家蚕丝心蛋白 H 链基因 pFb2.9 探针在雄蚕粗线期染色体上的杂交信号(箭头所示); 3 示家蚕丝心蛋白 H 链基因 pFb2.9 探针在雄蚕偶线期染色体上的杂交信号(箭头所示); 4 示家蚕丝心蛋白 H 链基因 pFb2.9 探针在雄蚕有丝分裂中期染色体上的杂交信号(箭头所示)