

YAC 介导的天蚕丝素基因向家蚕的转移及其在 F_2 代中的表达

李振刚 周丛照 唐恒立

范久戈

(中国科学技术大学生物系, 合肥 230026)

(安徽省农科院蚕桑研究所, 合肥 230030)

关键词 家蚕 天蚕 丝素基因 酵母人工染色体

天蚕 (*Antheraea yamamai*) 是天蚕蛾科柞蚕属的一种大型野生绢丝昆虫, 其丝质优良, 素有“丝中皇后”的美称。但天蚕和家蚕 (*Bombyx mori*) 的亲缘关系较远, 为了获取具有天蚕丝质性状的家蚕转化体, 利用传统的遗传育种方法是行不通的, 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歧异存在于核心区^[1], 这种歧异反映在蛋白质水平上就表现为两者丝质性状的不同。家蚕丝在 65℃ 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

1.1 材料

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 由华盛顿大学的 M.V.Olson 博士惠赠, 含有天蚕丝素基因核心区的质粒 pAy6.8 由日本国立生物研究所的 Y.Suzuki 博士赠送。

1.2 方法

1.2.1 天蚕丝素基因的制备及其显微注射 天蚕丝素基因 YAC 克隆——Afy1 在复旦大学遗传学研究所人类基因组实验室构建^[2]。挑取 Afy1 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, BIO-RAD) 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 BioLabs) 消化 LMA。显微注射到产后的 8 h 的蚕卵中, 参照 Yamamoto 的 ‘pricking’ 法^[4] 加以改进, 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,DNA浓度为100 $\mu\text{g/mL}$.

1.2.2 F_1 代转基因家蚕的获得及其传代培养 利用天蚕丝素基因核心区片段 Af6.8 (质粒 pAy6.8 经 BamHI 酶切后回收 6.8 kb 的片段)为探针,采用随机引物法掺入 α - ^{32}P dATP 标记之 (试剂盒购自 BRL 公司),在显微注射后饲养的 74 个蚕蛾中发现 6 个杂交呈阳性 (约占 8%),这 6 个 F_1 代的转基因家蚕雌雄交配后产卵,用以培育 F_2 代.

1.2.3 F_2 代转基因家蚕中天蚕丝素基因和 YAC 的杂交检测 分别以 Af6.8 和 YAC 载体 DNA (质粒 pYAC4 经 BamHI 酶切后电泳回收 10.8 kb 的片段)为探针,对 F_2 代的 100 个蚕蛾进行 DNA 斑点杂交.蚕蛾总 DNA 的制备参照 Bothwell 的方法进行^[9].

1.2.4 F_2 代转基因家蚕中外源基因拷贝数的确定 选取上述 Af6.8 杂交阳性的蚕蛾 DNA,以天蚕基因组 DNA (丝素基因的拷贝数为 1) 为参照,测定转基因家蚕中外源基因的拷贝数,每组样品依次点样 0.1, 1, 2, 5, 10 μL (DNA 浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

1.2.5 天蚕丝素基因在 F_2 代转基因家蚕中表达情况的检测 由于天蚕丝素分子量很大 (约 330 ku),而且不溶于水,因此无法制备其单克隆抗体进行 Western blot 直接检测,而只能借助于丝质的化学性质 (如酸碱抗性) 及其氨基酸组分分析.

2 结果与讨论

2.1 天蚕丝素基因和 YAC 在 F_2 代转基因家蚕中的整合及其对应关系

F_2 代的 100 个蚕蛾中有 12 个表现为杂交阳性,占总数的 12%,这明显高于 F_1 代的 8%,说明天蚕丝素基因从 F_1 代传至 F_2 代后整合比率 (稳定性) 有所提高. 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 F_2 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,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.

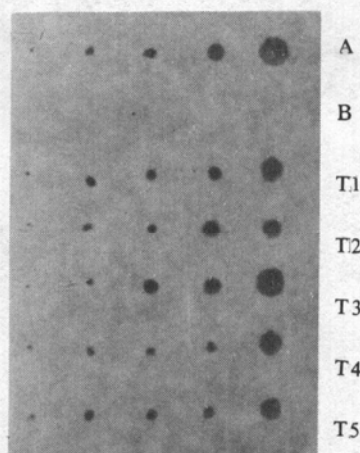


图 1 F_2 代转基因家蚕中天蚕丝素基因拷贝数的测定

每排从左至右依次为 0.1, 1.2, 5, 10 μL (DNA 浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). A 示天蚕 (*Antheraea yamamai*), B 示家蚕 (*Bombyx mori*), T1~T5 转基因家蚕

2.2 F_2 代转基因家蚕中天蚕丝素基因的拷贝数

我们从上述 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 1). 结果表明,这 5 个 F_2 代转基因家蚕中天蚕丝素基因的拷贝数都与天蚕相近,即外源基因可能以单拷贝形式存在于受体基因组中.

2.3 天蚕丝素基因在 F_2 代转基因家蚕中的表达

2.3.1 茧丝酸碱抗性的变异 对 F_2 代 150 个茧的酸碱耐受力分析,发现 10% 的茧酸碱抗性达到家蚕茧的 1.5 倍以上,介于家蚕茧和天蚕茧之间 (天蚕茧的酸碱抗性分别相当于家蚕茧的 2.09 倍和 1.68 倍).

2.3.2 茧层丝素的氨基酸组分变化 分子杂交及茧丝酸碱抗性检测后,选出 30 个 F_2 代的蚕茧,制备茧层丝素进行

氨基酸组分分析,以天蚕和家蚕的茧层丝素作为对照.表 1 中给出的是其中 3 个较为接近天蚕的结果.这说明整合到 F_2 代家蚕基因组中的天蚕丝素基因已经表达.由于家蚕丝素基因也同时表达,因此转基因家蚕的茧层丝素可能是一种天蚕丝素和家蚕丝素的混合体,其氨基酸组分也就介于二者之间.天蚕丝素是重链-重链型结构,而家蚕丝素则是重链-轻链型,所以难以准确计算出转基因家蚕茧中天蚕丝素占有的比例.

表 1 F_2 代转基因家蚕茧层丝素的一些主要氨基酸组分质量百分数的比较

	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Met	Ile	Leu	Tyr	Lys	His	Pro	NH ₃
天蚕	0.50	6.89	2.03	21.06	39.20	0.15	0.42	0.35	5.84	0.13	0.14	1.58	0.83
转基因家蚕 A	0.91	6.50	2.24	35.22	28.68	0.12	0.69	0.43	6.67	0.36	0.20	1.76	0.91
转基因家蚕 B	0.91	6.54	2.24	34.49	28.09	0.13	0.70	0.40	5.65	0.42	0.18	1.74	0.87
转基因家蚕 C	0.90	7.02	2.22	37.02	30.30	0.16	0.63	0.39	6.53	0.40	0.17	1.79	0.92
家蚕	1.08	7.80	2.61	32.78	26.51	0.09	0.94	0.58	6.47	0.51	0.23	1.03	0.74

对 F_2 代的转基因家蚕进行传代培育,并逐代筛选,以进一步提高天蚕丝素基因在家蚕中的稳定性和表达效率,有望获得具有天蚕优良丝质性状的家蚕新品种.

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. *Analytical Biochemistry*, 1987, 163:391~397
- 4 Yamamoto F, Furusawa M, Furusawa I *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
- 5 Bothwell A. *Method for Cloning and Analysis of Eukaryotic Genes*. Boston: Jones & Bartlett Publishers, 1990. 38~39