

# 选育家蚕抗病品种的基因工程研究<sup>\*</sup>

## I. 家蚕卵DNA在大肠杆菌中无性繁殖

叶志华 叶玉坤 黄自然 方菲芳 唐维六

(广东省微生物研究所)

(蚕桑系)

### 提 要

从抗病力较强的家蚕多化性金黄茧系品种“白皮淡”的卵提取DNA,以质粒pBR322为载体,在大肠杆菌中组建了家蚕卵DNA片段的无性繁殖系。通过插入失活和菌落的同位素示踪原位杂交签定,共筛选出Tc<sup>R</sup>Ap<sup>S</sup>的克隆菌株16个,定名为pSO<sub>1~16</sub>。经限制性内切酶降解及琼脂糖凝胶电泳测定,这些克隆的蚕卵DNA片段的分子量分别为0.2~6.3×10<sup>6</sup>道尔顿。

家蚕基因工程的目标旨在提高茧丝质量和增强抗逆性。家蚕丝心蛋白基因的分离及其表达的调控历来受到重视。Suzuki等<sup>[16][17]</sup>鉴定了丝心蛋白的mRNA是由18个核苷酸的重复序列构成,通过反转录而获得丝心蛋白的cDNA片段。对于试图利用细菌合成丝心蛋白的工作有一定的推动作用。陈元霖等报道<sup>[2][3]</sup>,将蓖麻蚕蛹的DNA(包括核蛋白)注射到家蚕体腔内,据说能引起某些变异。另一方面是蚕体免疫机理的研究。注射大肠杆菌或超声波处理均能诱导借古比天蚕(*Hylophora cecropia*)<sup>[9][11][16]</sup>、柞蚕(*Antheraea pernyi*)<sup>[1][6][14]</sup>及家蚕(*Bombyx mori*)<sup>[6][7]</sup>的血淋巴产生一些抗菌肽。这些抗菌肽的活性与蚕体抗病力有密切的关系。但不同蚕品种之间有明显的差异。Lee等<sup>[13]</sup>通过基因工程手段已获得抗菌肽前体P<sub>4</sub>、P<sub>5</sub>在大肠杆菌K-12的克隆菌株。本研究首先利用抗病力强的家蚕品种的蚕卵DNA片段克隆于大肠杆菌,以获得无性繁殖的蚕卵DNA片段,以此注射于家蚕期待提高其后代的抗病力。

## 材 料 与 方 法

### (一) 供试家蚕卵

用“白皮淡”品种,系多化性越南金黄茧系统,具有较强的抗病力。以胚胎发育到最长期的卵作为抽提DNA的材料。

### (二) 家蚕卵DNA的抽提及纯化

按Suzuki等<sup>[16]</sup>及翁醒华等<sup>[4]</sup>的方法进行。提取蚕卵DNA后,将其溶解于TE缓冲液(10mM Tris-HCl, 1mMEDTA, pH8.0)中,分别加入核糖核酸酶(100微克/毫升)和蛋白酶E(1毫克/毫升),各在37℃处理一小时。然后用等体积的氯仿-异戊醇(24

<sup>\*</sup> 本文承华南农业大学校长卢永根教授审阅,深表谢意!陈劲伟、陈小铃参加部分工作。

: 1, 体积比)反复抽提至无蛋白层为止取出水相层,加入两倍体积的无水乙醇使DNA沉淀。用玻棒将DNA搅出并溶于少量TE缓冲液中,在4℃下用TE缓冲液进行透析。

### (三) 体外重组

取5微克家蚕卵DNA和1微克大肠杆菌质粒pBR322(南方医院王昌才同志赠予)。分别加入5微升10×反应缓冲液(500mM NaCl, 100mM Tris-HCl, pH7.5; 100mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM = 硫代苏糖醇)及10单位的限制性内切酶PstI(上海东风生化试剂厂)。最后,加入无菌水至总体积为50微升。置37℃反应2小时后,在65℃处理5分钟以终止反应。将以上两种DNA的酶解液混合,加入10微升10×连接酶缓冲液(0.66M Tris-HCl, pH7.5; 50mM = 硫代苏糖醇, 10mM ATP)和10单位的T<sub>4</sub>DNA连接酶(中国科学院生物物理所),置12℃反应12小时,连接的DNA产物供转化之用。

### (四) 转化及克隆菌株的筛选

用大肠杆菌HB101 (recA<sup>-</sup>R<sup>-</sup>M<sub>k</sub><sup>-</sup>Sm<sup>R</sup>)作为受体菌。按Cohen等<sup>[10]</sup>方法进行转化。转化后的菌体先在37℃培养1小时,使抗药性得以表达,然后接种于含四环素(Tc)20微克/毫升的LB固体培养基(蛋白胨的1%,酵母浸膏0.5%, NaCl 1%, 琼脂2%, pH7.5)上,置37℃培养。同时作受体菌和DNA的培养作为对照。

将选择培养基上生长的Tc<sup>R</sup>菌落复印到含氨苄青霉素(Ap)50微克/毫升的LB培养基上培养,挑选出Tc<sup>R</sup>Ap<sup>S</sup>的菌落。最后供作原位杂交法以筛选克隆菌株。

### (五) P<sup>32</sup>—标记DNA探针的制备及菌落原位杂交

用New England Nuclear公司的缺口翻译系统及所提供的反应条件,用P<sup>32</sup>—标记家蚕卵DNA。反应终止后,用5毫升容积的葡聚糖G-75柱将反应物作凝胶过滤,每管收集300~400微升的洗脱液,用FY-1辐射仪(国营建安仪器厂)检测其dpm值。收集第一个放射线峰的洗脱液作为探针,用于菌落原位杂交。

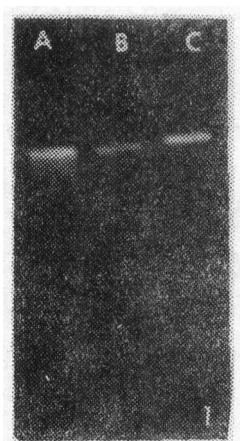
菌落原位杂交是参照Grustein等<sup>[12]</sup>的方法。将长有菌落的硝酸纤维膜作变性处理后,置于10毫升预杂交溶液[50%甲酰胺, 5×Denhardt's溶液, 5×SSPE溶液(0.9M NaCl, 5mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.4; 5mM EDTA, pH7.4), 0.1%SDS, 变性的小牛胸腺DNA25微克/毫升]中,在42℃预杂交6小时。然后加入1微克P<sup>32</sup>—标记的蚕卵DNA(探针),在42℃杂交30小时。滤膜经洗涤,吸干,用X光胶片进行放射自显影。

### (六) 重组质粒的酶切及电泳

按Birnboim等<sup>[8]</sup>的碱性裂解法从克隆菌株中分离重组质粒,加入限制性内切酶PstI进行降解后,作琼脂糖凝胶电泳。同时,加入经限制性内切酶EcoRI降解的λDNA(中山医学院马润泉同志赠予)作为分子量标志。电泳条件:琼脂糖0.8%,电泳缓冲液为89mM Tris, 89mM 硼酸, 2mM EDTA, pH7.8。

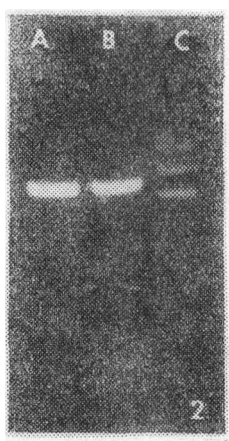
## 结果与讨论

(一) 家蚕卵DNA片段的克隆菌株的组建:从10克家蚕卵中分离到约1毫克DNA,紫外吸收OD<sub>260nm</sub>/OD<sub>280nm</sub>的比值为1.6,可被限制性内切酶PstI及BamHI降解。见图1。



A: PstI降解后的 DNA;  
B: BamHI降解后的DNA;  
C: 未经酶解的DNA。

图1 家蚕卵DNA酶切反应的电泳图谱



A: PstI降解后的 DNA;  
B: BamHI降解后的DNA;  
C: 未经酶解的DNA。

图2 pRB322 DNA的酶切反应的电泳图谱

用PstI限制性内切酶分别降解家蚕卵DNA及pBR322 DNA(见图2),两者混合后,用T<sub>4</sub>DNA连接酶连接。然后转化到大肠杆菌HB101中。在含四环素的培养基中筛选出Tc<sup>R</sup>转化体,转化率为 $2 \times 10^{-6}$  ( $2 \times 10^3$ 转化子/微克DNA)。

(二) 克隆菌隆的筛选及鉴定: 根据插入失活的原理,将得到的Tc<sup>R</sup>转化体复印到含氨苄青霉素的培养基上培养。从复印的570个Tc<sup>R</sup>转化体中筛选到Tc<sup>R</sup>Ap<sup>S</sup>菌株48个。由于酶切后载体DNA分子间可能互相连接或切口碱基序列的某些改变也可能使转化体具有Tc<sup>R</sup>Ap<sup>S</sup>的表型。因此,必须用专一性的探针进行DNA杂交才能鉴定出真正含有家蚕卵DNA片段的克隆菌株。

通过缺口翻译使家蚕卵DNA为P<sup>32</sup>—所标记。标记物凝胶层析分离的结果见图3。收集第1个放射线峰的产物为P<sup>32</sup>—标记的家蚕DNA。用液体闪烁器测定其放射线强度为 $6 \times 10^3$  dpm/微克DNA。用制备的探针与Tc<sup>R</sup>Ap<sup>S</sup>菌株作原位杂交后,再行放射自显影。从中鉴定出与家蚕卵DNA杂交阳性的菌株共16株。见图4。

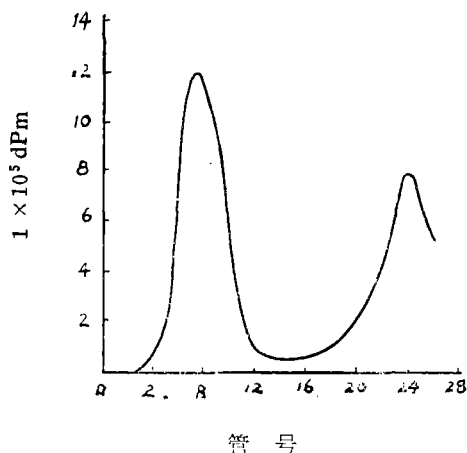


图3 P<sup>32</sup>—标记家蚕卵DNA探针层析回收图谱

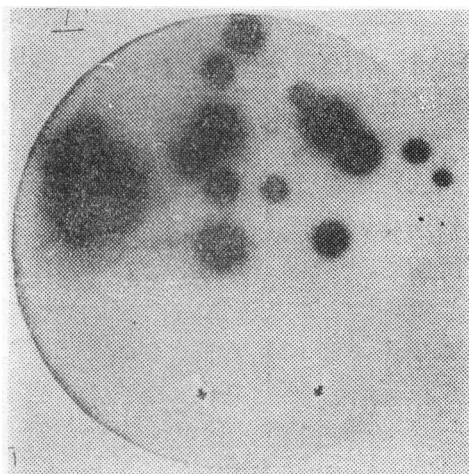
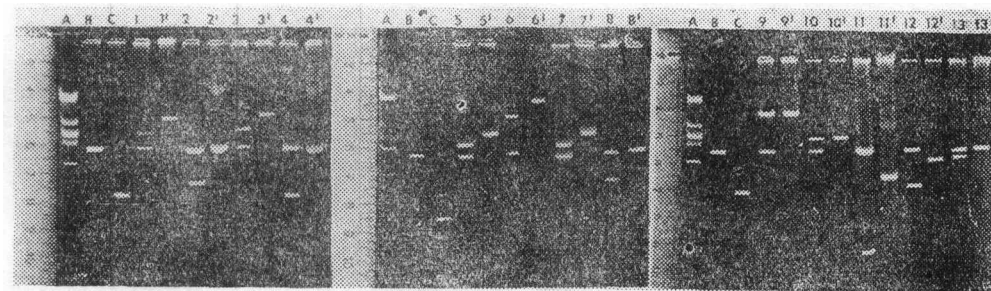


图4 Tc<sup>R</sup>Ap<sup>S</sup>菌株与P<sup>32</sup>—标记的家蚕卵DNA原位杂交的放射自显影图。(黑色斑: 示P<sup>32</sup>—DNA杂交阳性菌落放射自显影; →: 为对照; 示大肠杆菌HB101 (pBR322) 菌落)。

(三) 重组质粒的酶切分析及分子量测定：通过碱性裂解法从克隆菌株中分离、纯化重组质粒DNA，经PstI酶解后，作琼脂糖凝胶电泳。从图3中可看出13株克隆株重组质粒的酶切电泳图谱之中，除一条相当于pBR322质粒的线性分子带外，均出现另一条新的区带，这是重组进去的家蚕卵DNA片段。按电泳迁移率计算，这些克隆DNA分子量分别为 $0.2 \sim 6.3 \times 10^6$ 道尔顿。其余3株克隆株的重组质粒虽经PstI酶切，但电泳图



A: EcoRI酶切后的 $\lambda$ DNA; B: PstI酶切后的pBR322DNA; C: 未经酶切的pBR322DNA; 1~13, PstI酶切后重组质粒pSO<sub>1</sub>~<sub>13</sub>DNA; 1'~13': 未经酶切的重组质粒pSO<sub>1</sub>~<sub>13</sub>DNA。

图5 重组质粒酶切后的电泳图谱

谱上并未出现载体DNA及插入家蚕卵DNA，而只有一条分子量比pBR322大的区带（图版未列）。这可能是重组后切口碱基对序列发生改变，致使PstI酶无法识别。

(四) 家蚕卵DNA在大肠杆菌中建立无性繁殖体系得到确认，将16个重组质粒定名为pSO<sub>1</sub>~<sub>16</sub>。它们的特性列于表1。可以作为家蚕基因文库的素材，可供制备足够数量而又纯化的家蚕卵DNA片段，为进一步研究家蚕基因的结构与功能创造有利条件。目前，已将以上的重组质粒DNA注射于不同品种的家蚕或蛹体内，以观察对形质、生化及抗病力的影响。

表 1 家 蚕 卵 DNA 克 隆 菌 株 的 特 性

| 菌株编号 | 重组质粒编号                        | 菌 抗 株 性 |    |    | 菌落原位<br>杂 交 | DNA 克隆的<br>分 子 量<br>(10 <sup>6</sup> 道尔顿) |
|------|-------------------------------|---------|----|----|-------------|-------------------------------------------|
|      |                               | Tc      | Ap | Sm |             |                                           |
| 1    | p <sup>SO</sup> <sub>1</sub>  | R       | S  | R  | +           | 3.9                                       |
| 2    | p <sup>SO</sup> <sub>2</sub>  | R       | S  | R  | +           | 1.0                                       |
| 3    | p <sup>SO</sup> <sub>3</sub>  | R       | S  | R  | +           | 4.4                                       |
| 4    | p <sup>SO</sup> <sub>4</sub>  | R       | S  | R  | +           | 0.8                                       |
| 5    | p <sup>SO</sup> <sub>5</sub>  | R       | S  | R  | +           | 6.3                                       |
| 6    | p <sup>SO</sup> <sub>6</sub>  | R       | S  | R  | +           | 4.0                                       |
| 7    | p <sup>SO</sup> <sub>7</sub>  | R       | S  | R  | +           | 0.2                                       |
| 8    | p <sup>SO</sup> <sub>8</sub>  | R       | S  | R  | +           | 1.6                                       |
| 9    | p <sup>SO</sup> <sub>9</sub>  | R       | S  | R  | +           | 2.2                                       |
| 10   | p <sup>SO</sup> <sub>10</sub> | R       | S  | R  | +           | 3.2                                       |
| 11   | p <sup>SO</sup> <sub>11</sub> | R       | S  | R  | +           | 5.6                                       |
| 12   | p <sup>SO</sup> <sub>12</sub> | R       | S  | R  | +           | 3.5                                       |
| 13   | p <sup>SO</sup> <sub>13</sub> | R       | S  | R  | +           | 1.7                                       |
| 14   | p <sup>SO</sup> <sub>14</sub> | R       | S  | R  | +           | 未测                                        |
| 15   | p <sup>SO</sup> <sub>15</sub> | R       | S  | R  | +           | 未测                                        |
| 16   | p <sup>SO</sup> <sub>16</sub> | R       | S  | R  | +           | 未测                                        |

Tc: 四环素; Ap: 氨苄青霉素; Sm: 链霉素; R: 抗性; S: 敏感; +: 杂交阳性。

## 参 考 文 献

- [1] 祁国荣、周奇、屈贤铭、黄自然: 超声波诱导柞蚕蛹血淋巴产生抗菌物质,《科学通报》, (10) 1983: 622~624。
- [2] 陈元霖、郑之修、胡保民: 蓖麻蚕去氧核糖核酸诱导家蚕遗传变异的初步研究,《遗传学报》, 6 (1) 1979: 83。
- [3] 吕慧梅、李桂兰、陈元霖: 蓖麻蚕遗传转化体丝心蛋白氨基酸的研究,《遗传学报》, 9 (3): 243~245。
- [4] 翁醒华、唐慷、胡华萃、袁永杭、厉玲、赵衍、蔡小茵: 家蚕卵DNA的抽提的初步研究,《杭州大学学报》, (9) 1982: 336~339。
- [5] 黄自然、王少颐: 注射大肠杆菌诱导柞蚕蛹血淋巴产生抗菌物质,《华南农学院学报》, (2) 1982: 65~68。
- [6] 杉山孔宏、大庭义郎、河合一吉、多田宜文、菊地干雄:《日本细菌学杂志》, (36), 1981: 145。
- [7] 肥山良之、大森和则、菊地干雄,《日成细菌学杂志》, 33, 1978: 234。
- [8] Birnboim, H. C., Doly, J., Nucleic Acids Res., 7, 1979: 1513-1523。
- [9] Boman, H. C., Nilsson-Faye, I., Paul, K., Rasmuson, Jr. T., Infect Immun., 10, 1974: 136-145。

- [10] Cohen, S. N., et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 69, 1972: 2110-2114.
- [11] Hultmark, D., Engtorn, A., Bennich, H., Pauur, R., Boman, H. G., Eur. J. Biochem., 127, 1982: 219-224.
- [12] Grunstein, M., Hogness, D., proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 72, 1975: 3961-3965.
- [13] Lee, J. Y., Edlund. T., Ny, T., Faye, I., Boman, H. G., The EMBO Journal, 2, 1983: 577-581.
- [14] Qu, Xian-ming, Steiner, H., Engtorn, A., Bennich, H., Boman, H. G., Eur. J. Biochem., 127, 1982: 219-224.
- [15] Steiner, H., Hultmark, D., Engtorn, A., Bennich, H. G., Boman, H. G., Nature, (London) 294, 1981: 246-248.
- [16] Suzuki, Y., Brown, D. D., J. Mol. Biol., 70, 1972: 637-649.
- [17] Suzuki, Y., Suzuki, E., J. Mol. Biol., 88, 1974: 393-407.

## THE GENETIC ENGINEERING STUDIES ON THE BREEDING DISEASE RESISTANT VARIETIES OF SILKWORM, *Bombyx mori*

### I. Extraction of DNA from silkworm eggs and cloned in *Escherichia coli*

Ye Zhihu Ye Yukun

Husng Zirsu Fung Feifssng Tsng Weilui

(Gusngdong Institute of Microbiology)

(Deqsrtment of Sericulture)

### ABSTRACT

Chromosomal DNA of silkworm, *Bombyx mori* was digested with BamHI or PstI, ligated to BamHI or PstI-cleaved dephosphorylated pBR 322 DNA and transformed into *Escherlcherichia coli* HB 101. 8 of Tc<sup>S</sup>AP<sup>R</sup> and 48 of Tc<sup>R</sup>AP<sup>S</sup> clones were obtained.

These Clones were identified by single colony hybridization. Plasmid DNA preparations and restriction analyses were used to determine 13 of He recombinants. It was estimated that the molecular weights of inserted DNA fragments to be 0.2-6.3 10<sup>6</sup> dal. Further investigations would be suggested to reveal its expression in *E. coli*.