

研究简报

利用精子介导法向蚕卵导入外源基因的研究*

郭秀洋 周泽扬** 冯丽春 汪琳 鲁成 向仲怀

(西南农业大学农业部蚕桑学重点实验室, 重庆 400716)

摘要 为建立家蚕转基因中切实可行、操作简便的外源基因导入方法, 进行了精子介导法探索, 以精子介导法的三种方式向家蚕导入所构建质粒 pFbGFP, 并通过 PCR 扩增和 DNA 印迹等手段, 已连续两代从基因组 DNA 检测到导入外源基因 GFP 的存在, 其中的一种导入方式到第二代阳性率约 30%。结果表明该法可有效进行家蚕转基因的外源基因导入。

关键词 转基因, 家蚕, 精子介导

学科分类号 S881.2⁺4

家蚕作为一种有重要经济价值的昆虫和基础研究模式生物, 其转基因研究具有十分重要的意义。而外源基因导入的成熟方法体系构建, 一直是家蚕转基因研究中急需解决的课题。精子介导法是利用精子头部正电荷可捕获外源 DNA (电负性) 的特性, 将外源目的基因与精子混合孵育, 这种精子在受精过程中可将外源 DNA 导入受精卵, 它是动物转基因研究中外源基因导入的一种重要方式, 已在小鼠^[1]、猪^[2]、鸡^[3]等多种动物中应用。在家蚕研究中, Shamila 和 Mathavan^[4]曾进行过向幼虫精巢注入外源基因方式的探讨。本研究就利用精子携带的方式向蚕卵导入外源基因进行了探讨。

1 材料

各种酶类购自 Promega 公司; DIG DNA Labeling Kit 及生化试剂购自 Boehringer Mannheim 公司。质粒 pFb100、pBIN-gfp-ER、大肠杆菌菌株 JM109 为本室保存。外源基因导入用器具自制。外源基因受体蚕品种为夏秋用种夏芳。上下游引物由上海生物工程公司合成。一个 OD260 稀释到 250 μl (约 20 μmol/L)。序列为: 上游引物: 5' GAGTTGTCCCAATTCTTG3'; 下游引物: 5' GCCATGTGTAATCCCAGC3'。

2 方法

2.1 质粒 pFbGFP 的构建

质粒 pFb100^[5] 以 *Sma* I 和 *Hind* III 双酶切,

回收约 1 000 bp 丝素基因启动子小片段; 质粒 pBIN-gfp-ER^[6] 以 *Bam*H I 酶切后去掉约 800 bp CaMV35S 启动子小片段而回收载体大片段。将以上两回收片段用 T4 DNA 连接酶进行连接并转化 JM109 感受态细胞。挑取抗卡那霉素菌落, 提取其质粒进行酶切鉴定, 得到了重组质粒, 命名为 pFbGFP (图 1)。

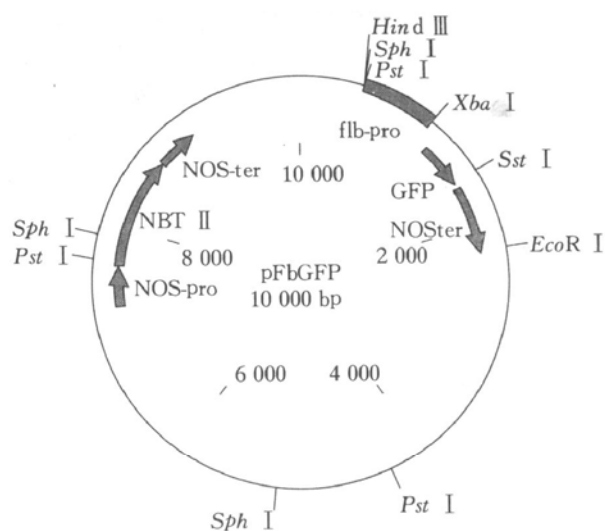


Fig. 1 Plasmid pFbGFP

* 重庆市科委院士基金 (渝科委计 [1998] 19 号) 和中华农业科教人才基金 (99-03-A-1) 资助。

** 通讯联系人。

Tel: 023-68251271, E-mail: zyzhou@swau.edu.cn

收稿日期: 2000-06-05, 接受日期: 2000-07-07

2.2 精子介导法的三种方式

方式一 (先注后交法): 将携带外源基因质粒 (2 g/L) 5 μl 以毛细管玻璃拉成的玻璃针注入处女蛾交尾囊, 然后让其与雄蛾交配. 检测其所产卵孵化而成的个体是否携带外源基因. 方式二 (先交后注法): 将交配 30 min 后的雌雄蛾拆对, 再由雌蛾交配囊注入携带外源基因质粒 (2 g/L) 5 μl, 然后使其产卵孵化, 所得个体为检测对象. 方式三 (人工受精法): 将交配 30 min 后的雌雄蛾拆对, 解剖雌蛾, 取出交尾囊中的精液, 令其与携带外源基因质粒 (2 g/L) 5 μl 混匀并注入处女蛾交尾囊, 以其产卵孵化所得个体为检测对象.

2.3 转基因个体的检测

2.3.1 PCR 扩增检测: 扩增体系: 10 mmol/L 10× 缓冲液: 2.5 μl; 10 mmol/L Mg²⁺ 1.5 μl; 10 mmol/L dNTPs (2.5 mmol/L × 4) 2 μl; 20 pmol/L 上游引物 1 μl; 20 pmol/L 下游引物 1 μl; 0.1 g/L 模板 DNA 1 μl; 5U/μl taq 酶 0.2 μl; 双蒸水 15.8 μl. 扩增程序: 94℃ 7 min, 94℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 1 min 30 个循环, 72℃ 10 min, 4℃ 保温.

2.3.2 DNA 杂交方法: 参照 Boehringer Mannheim 公司随试剂盒提供的《The DIG System User's Guide for Filter Hybridization》进行.

3 结 果

3.1 转 pFbGFP 蚕的 PCR 检测继代

各种介导方式的 G₀ 代各蛾区随机取十头蚕后部丝腺混合提取 DNA, 以其作为模板使用前记引物进行 PCR 扩增, 能扩增出导入的 GFP 基因 (660 bp) 者为阳性蛾区 (图 2). 各阳性蛾区的个体自交制种得 G₁ 代卵圈, 所得卵圈作即时浸酸处理, 催青孵化后各卵圈取 50 头蚁蚕提取 DNA 作

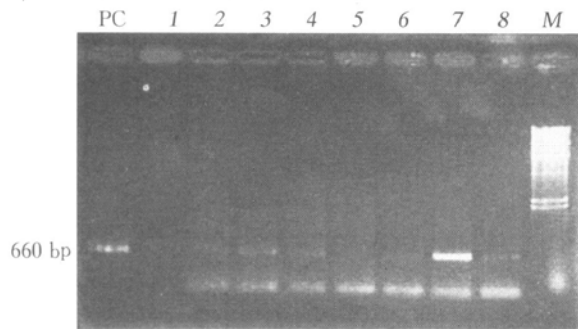


Fig. 2 PCR assay of G₀ generation

PC (positive control): 660 bp positive fragment (pFbGFP as template); M (marker): λ/ Hind III; 1 ~ 8: PCR product of G₀ generation.

为模板, 再以同样方法进行 PCR 扩增, 筛选出能够产生 660 bp 预期片段的阳性卵圈的蚁蚕饲养, 至化蛾后随机留取部分个体自交制种, 制种后的蛾分雌雄单蛾抽提 DNA, 检测其阳性情况 (图 3), 仅阳性蛾留种继代. 各代检测继代情况见表 1.

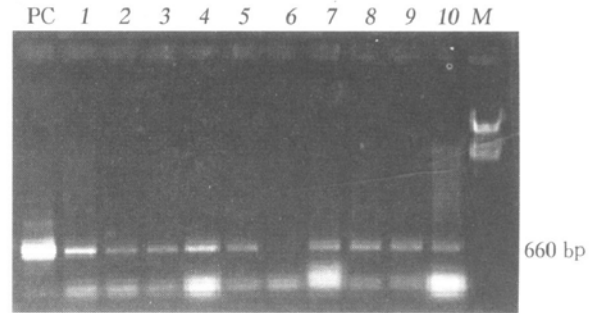


Fig. 3 PCR assay of G₁ generation

PC (positive control): 660 bp positive fragment (pFbGFP as template); M (marker): λ/ Hind III; 1 ~ 10: PCR product of G₁ generation.

Table 1 Statistics of rearing and detection results of transformants obtained by sperm-mediated methods

| | Method 1 | Method 2 | Method 3 |
|--|-----------|-----------|-----------|
| Number of moth batch of G ₀ | 12 | 10 | 9 |
| Number (ratio) of positive moth batch of G ₀ by PCR | 5 (41.7%) | 3 (33.3%) | 2 (22.2%) |
| Number of moth batch of G ₁ | 20 | 20 | 8 |
| Number (ratio) of positive moth batch of G ₁ by PCR | 6 (30%) | 3 (15%) | 1 (12.5%) |
| Number of moth batch of G ₂ from positive parents | 16 | 0 | 1 |

3.2 转 pFbGFP 蚕 G₀、G₁ 代 DNA 检测

从 G₀、G₁ 代各选十头 PCR 阳性个体蚕, 取其总 DNA 各 15 μg, EcoRI 酶切、0.7% 琼脂糖凝胶电泳后, 转移到 NC 膜. 以引物特异扩增质粒 pBIN-gfp-ER 上的 GFP 基因片段作为探针用地高辛标记, 进行 DNA 杂交, 结果见图 4、5. 各代均检测出阳性信号, 但各代情况不同, 不同个体间也有差异.

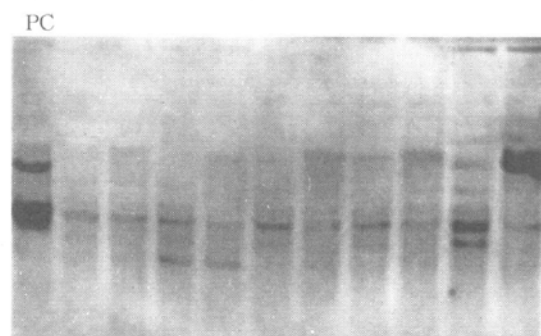


Fig. 4 Southern blot analysis of G₀ generation

PC: positive control; others are genome southern blot of G₀ generation.

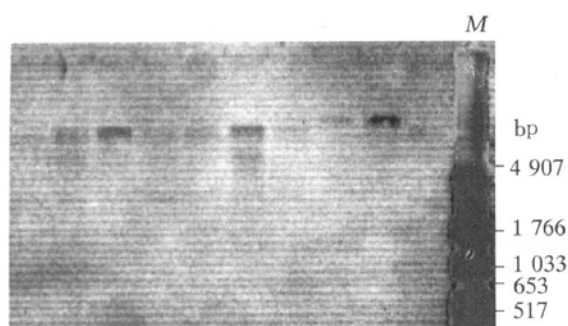


Fig. 5 Southern blot analysis of G1 generation

M (marker): pBR328/ *Bam*H I + *Bgl*I + *Hinf*I ; others are genome southern blot of G1 generation.

4 讨 论

如何有效地将外源基因导入家蚕早期受精卵细胞核中, 是家蚕转基因研究的攻关课题. Tamura 等^[7]进行过蚕卵显微注射法的探讨; 陈元霖等^[8]以人工受精法进行过家蚕与蓖麻蚕的远源杂交实验. 本研究所用家蚕精子介导方法, 操作简单易行. 几种精子介导方式均得到较好的结果, 运用 PCR 和 DNA 印迹等方法在 G0 代和 G1 代中均检测到导入外源基因 *gfp* 的存在, 表明本法确实能够有效地将外源基因导入家蚕早期受精卵细胞核中. G0 代 DNA 杂交结果表明, 外源基因以多拷贝形式进入家蚕基因组中, G1 代只出现单一杂交条带, 其原因有可能是部分导入的外源基因被宿主排除、降解丢失, 与此同时, 带有家蚕丝素基因启动子的载体进入蚕卵后发生了单位点同源重组, 外源基因

在相应位置整合而得以保留. 另外一方面, 在阳性个体中外源基因呈杂合状态也会造成上述结果.

在本研究中, 以方式一所得阳性蛾区比例及阳性继代率最高, 表明经过改进完善, 本方式可发展为成熟的行之有效的方法.

参 考 文 献

- 1 Lavitrano M, Camaioni A, Fazio V M, *et al.* Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell*, 1989, **57** (5): 717~ 723
 - 2 Horan R, Powell R, McQuaid S, *et al.* Association of foreign DNA with porcine spermatozoa. *Arch Androl*, 1991, **26** (2): 83 ~ 92
 - 3 Nakanishi A, Iritani A. Gene transfer in the chicken by sperm-mediated methods. *Mol Reprod Dev*, 1993, **36** (2): 258~ 261
 - 4 Shamila Y, Mathavan S. Sperm-mediated gene transfer in the silkworm *Bombyx mori*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 1998, **37**: 168~ 177
 - 5 Tsujimoto Y, Hirose S, Tsuda M, *et al.* Promoter sequence of fibroin gene assigned by *in vitro* transcription system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, **78** (8): 4838~ 4842
 - 6 Jefferson R A, Kavanaugh T A, Bevan M W. GUS fusion: beta-galactosidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*, 1987, **6**: 3901~ 3907
 - 7 Tamura T, Kanda Y, Takiya S, *et al.* Transient expression of chimeric CAT genes injected into early embryo of the domesticated silkworm *Bombyx mori*. *Jpn J Genet*, 1990, **65**: 401~ 410
 - 8 陈元霖, 桂慕燕, 陈智毅, 等. 家蚕和蓖麻蚕人工受精的初步研究. *厦门大学学报 (自然科学版)*, 1993, **32** (增刊 1): 9 ~ 15
- Chen Y L, Gui M Y, Chen Z Y, *et al.* *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 1993, **32** (supplement 1): 9~ 15

Sperm-mediated Gene Transformation of Silkworm*

GUO Xiu-Yang, ZHOU Ze-Yang**, FENG Li-Chun, WANG Lin, LU Cheng, XIANG Zhong-Huai

(The Key Sericulture Laboratory of Agricultural Ministry, College of Sericulture & Silk,
Southwest Agricultural University, Chongqing 400716, China)

Abstract To find practical and simple transformation methods in transgenic silkworm research, the sperm-mediated methods were tried. The constructed plasmid pFbGFP was transformed into silkworm (*Bombyx mori*) with three different sperm-mediated transformation methods. Positive results of PCR and Southern blotting was screened in the following two generations. 30% positive rate of the second generation was obtained by one of the methods. This result showed that this was an effective method for transformation of silkworm with foreign gene.

Key words sperm-mediating, silkworm (*Bombyx mori*), transgenic

* This work was supported by the Academician Funds of Chongqing Science Committee (Yu Sci. Com. [1998] No. 19) and the Talent Funds of Chinese Agricultural Science Education (99-03-A-1).

** Corresponding author. Tel: 86-23-68251271, E-mail: zyzhou@swau.edu.cn

Received: June 5, 2000 Accepted: July 7, 2000