

家蚕胚胎发育时期的 RNA 干涉研究*

刘 春 帅小蓉 程廷才 徐汉福 李春峰 代方银 夏庆友** 向仲怀

(西南农业大学蚕学与生物技术学院, 农业部蚕桑学重点实验室, 重庆 400716)

摘要 通过导入特定基因的 dsRNA 特异性地关闭该基因的功能, 由此产生的现象为 RNA 干涉. 为在家蚕胚胎发育时期建立有效的 RNAi 技术体系, 在前人的基础上以家蚕第三白卵基因 *Bmwh3* 为材料, 建立了有效的 RNAi 技术体系, 结果表明, 成功诱导第三白卵突变表型的有效注射时间为产卵后 8 h 内, *wh3*dsRNA 的有效浓度须大于 2.0 g/L. 在发育胚胎的第三天注射 *wh3*dsRNA, 同样可诱导第三白卵突变的另一表型——半透明蚁蚕, 根据实验结果初步推测, *Bmwh3* 不仅参与眼色素和卵浆液膜色素前体的转运, 还可能参与胚胎体壁色素前体的转运.

关键词 RNA 干涉, 家蚕, *Bmwh3* 基因, 第三白卵突变

学科分类号 Q522, S881.2

RNA 干涉是 Fire 等^[1]首次在秀丽线虫中发现, 并证明属于转录后水平的基因沉默机制. 目前已在线虫^[2,3]、果蝇^[4,5]、真菌^[6]及脊椎动物^[7,8]和植物等生物中建立了 RNAi 技术. RNAi 主要通过 dsRNA 被一种称为 Dicer 的核酸酶切成大约 21 ~ 25 nt 的干扰性小 RNA 片段 (siRNA), 由 siRNA 介导识别并靶向切割同源性靶 mRNA 分子而实现^[9~12].

家蚕白卵突变有几个不同的位点, 而 *Bmwh3* 基因与 *w3* 位点 (10 ~ 19.6) 的突变相关, *w3* 位点是一个复等位位点, 有多个突变类型, 如第三白卵 (*w3*)、透明白卵 (*w3^{oe}*) 和 Aojuku 透明白卵 (*w3^{aj}*) 等. *w3* 位点的突变通常以卵浅褐色或淡黄色及蚁蚕的半透明皮肤作为标志. 家蚕的 *Bmwh3* 基因与果蝇的白眼基因高度同源, 果蝇的白眼基因编码一种转运蛋白, 参与眼色素和嘌呤色素前体的转运, 并使二者在眼处结合使眼着色, 若失去了这种转运蛋白, 将导致色素不能在眼中积累, 使果蝇呈白眼突变体^[13]. 家蚕第三白卵基因 (*Bmwh3*) 全长 mRNA 序列为 2 677 bp, 位于 441 ~ 2 501 bp 之间有一个开放阅读框, 它编码一种依赖于 ATP 酶的跨膜转运蛋白 ABC (ATP-binding cassette), 全长 687 个氨基酸. 该转运蛋白有一个 ATP 结合结构域 (domain) 及 6 个跨膜结构域, 它参与眼色素前体的转运^[14~17]. *Bmwh3* 基因在胚胎发育早期就开始表达, 该基因的沉默将直接引起形态学上的变化, 表现为蚕卵不着色且蚁蚕皮肤半透明, 是一个探讨 RNAi 技术效果的合适基因.

Quan 等^[13]以日系品种 N200 用 *Bmwh3* 基因初步证实了 RNAi 在家蚕中的作用. 他们以 GFP 基因作为对照, 将 *Bmwh3* 基因的 dsRNA 注入产卵后 7 h

内的蚕胚胎中, 得到了该基因的突变表型, 蚕卵不着色且蚁蚕皮肤半透明. RNA 印迹分析表明, 在注射了 dsRNA 的胚胎中, 其内源基因 *Bmwh3* 的表达明显受到抑制. 在此基础上, 本实验重点探讨了在华系品种中不同注射时间, 不同 *Bmwh3* dsRNA 浓度对于干涉效果的影响, 目的是快速地建立一套完整的家蚕 RNAi 技术体系, 以便能应用于高通量研究家蚕的基因功能.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 *Bmwh3* 基因: 由全国兴惠赠, 其克隆包括 *Bmwh3* 基因 mRNA 中部 598 ~ 1 523 bp 的正向序列片段 *w3* ~ 1 和反向序列片段 *w3* ~ 14 (图 1).

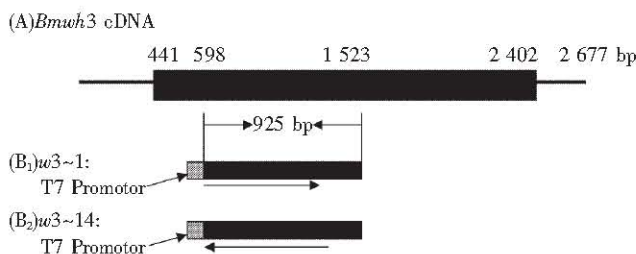


Fig. 1 Features of *Bmwh3* cDNA and the plasmids used in the experiment

(A) Representation of the structure of the silkworm *Bmwh3* cDNA; (B₁) *w3* ~ 1 of mRNA of *Bmwh3* gene; (B₂) *w3* ~ 14 of mRNA of *Bmwh3* gene.

* 国家自然科学基金资助项目 (30270691).

** 通讯联系人.

Tel: 023-68250748, Fax: 023-68251128

E-mail: xiaqy@swau.cq.cn

收稿日期: 2003-08-26, 接受日期: 2003-09-28

1.1.2 蚕品种: 华系大造二化性品种。

1.1.3 试剂及酶: *Pst* I 酶、Klenow 酶、RNA 合成 Kit (Ribomax™ Large Scale RNA Production System-T7 Kit), 为 Promega 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 *Bmwh3* 基因 dsRNA 的制备: 将克隆 *w3* ~ 1 和 *w3* ~ 14 分别加以培养, 用碱裂解法大量抽提质粒 DNA, 电泳检测。制备 dsRNA 的方法参照文献 [13] 进行。首先用 *Pst* I 酶线性化质粒 *w3* ~ 1 和 *w3* ~ 14, Klenow 酶补平并纯化回收, 然后用 Ribomax™ Large Scale RNA Production System-T7 (Promega 公司) 试剂盒分别以线性化的 *w3* ~ 1 和 *w3* ~ 14 为模板进行体外转录得到正、负链 RNA (sense and antisense RNA), 琼脂糖凝胶电泳估计转录产物浓度, 最后将摩尔数大致相等的正、负链 RNA 混合, 于 94℃ 处理 2 ~ 3 min 后, 冷却至室温。退火的双链 RNA 用适量的无 Rnase 的 Dnase I 消化 DNA 模板, 经酚、酚/氯仿、氯仿抽提, 乙醇沉淀, 并溶解于 20 μl 去离子水中, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 用分光光度计检测浓度, 并按一定的浓度梯度稀释, 保存于 -80℃ 备用。

1.2.2 蚕卵准备及显微注射: 将产后 4 h 内的蚕卵用比重为 1.110 的 HCl 于室温浸泡 80 min 以解除滞育, 用 '502 胶' 将蚕卵固定于载玻片上 (卵孔均朝上), 并用 37% 的甲醛蒸气消毒 2 ~ 3 min。处理后的蚕卵用微量注射仪 (NARISHIGE) 进行注射, 注射部位可以是卵表面的任何部位。注射时间分早期注射时间 (产卵后 4 ~ 8 h、10 ~ 12 h、20 h) 和晚期注射时间 (产卵后 72 h 以后) 两种。注射物质分别为不同浓度 (0.2, 1.0, 2.0 g/L) 的 *Bmwh3* dsRNA, 高压灭菌水, 2.0 g/L 的 *Bmwh3* 质粒 DNA, 注射体积 10 nl 左右。蚕胚胎注射后立即用石蜡封口, 甲醛蒸气消毒 (甲醛浓度、处理时间同前) 处理后, 置于 25℃ 条件下催青, 使其正常发育。

1.2.3 注射后的 RNAi 表型观察: 在早期注射时间段注射的蚕卵在注射后的第 4 天统计未着色卵数及嵌合体卵数, 以后每天观察记录未着色卵及嵌合体卵出现情况, 统计其孵化率及皮肤半透明蚁蚕的头数。对于晚期注射时间段所注射的蚕卵只观察其孵化率及皮肤半透明蚁蚕的头数。

2 结 果

2.1 *Bmwh3* 基因 dsRNA 的制备

碱裂解法大量提取质粒 DNA, 电泳得到清晰的

目的带 (图 2)。对该克隆进行序列分析, 确认与 *Bmwh3* 基因的主要结构区域序列一致, 可以用于 *Bmwh3* 基因 dsRNA 的制备。用 Ribomax™ Large Scale RNA Production System-T7 (Promega 公司) 试剂盒以线性化的质粒 *w3* ~ 1 和 *w3* ~ 14 为模板分别合成正、负 RNA 链, 将摩尔数大致相等的正、负链 RNA 混合、退火, 制备 dsRNA。经分光光度计测定, $A_{260} = 2.443$, $A_{280} = 1.192$, ($A_{260}/A_{280} = 2.065$), 浓度为 5.9 g/L。分别将 *w3* ~ 1 及 *w3* ~ 14 的 ssRNA 和纯化前、后的 dsRNA 在 1% 的琼脂糖凝胶中电泳检测, 得到清晰的目的带 (图 3)。

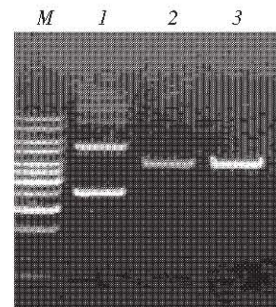


Fig. 2 The plasmid DNA of *Bmwh3* and digested by *Pst* I
M: Marker (1 kb ladder); 1: The plasmid DNA of *Bmwh3*; 2, 3: *w3* ~ 1, *w3* ~ 14 plasmid DNA by *Pst* I digestion.

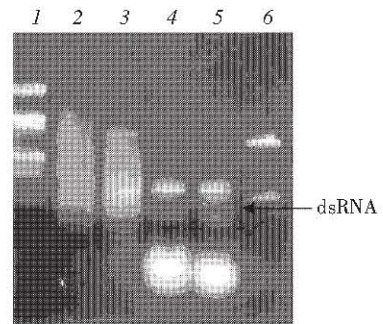


Fig. 3 The *Bmwh3* dsRNA of agarose gel electrophoresis
1: Marker (λ DNA/*Hind* III); 2: *w3* ~ 1 ssRNA; 3: *w3* ~ 14 ssRNA; 4: dsRNA of *Bmwh3* (before purification); 5: dsRNA of *Bmwh3* (after purification); 6: The *Bmwh3* plasmid by *EcoR* I.

2.2 *Bmwh3* dsRNA 对蚕卵表型的影响

2.2.1 不同注射时间对卵色的影响: 野生型的蚕卵刚产下时呈淡黄色, 随着胚子的不断发育, 卵色逐渐变深, 大约 2 天左右转变为褐色, 最后为深褐色 (图 4a)。而 *w3* 位点突变 (第三白卵突变) 的蚕卵为浅褐色或淡黄色 (图 4b 和图 4c)。比较几种不同注射时间的效果, 发现产卵后 8 h 注射

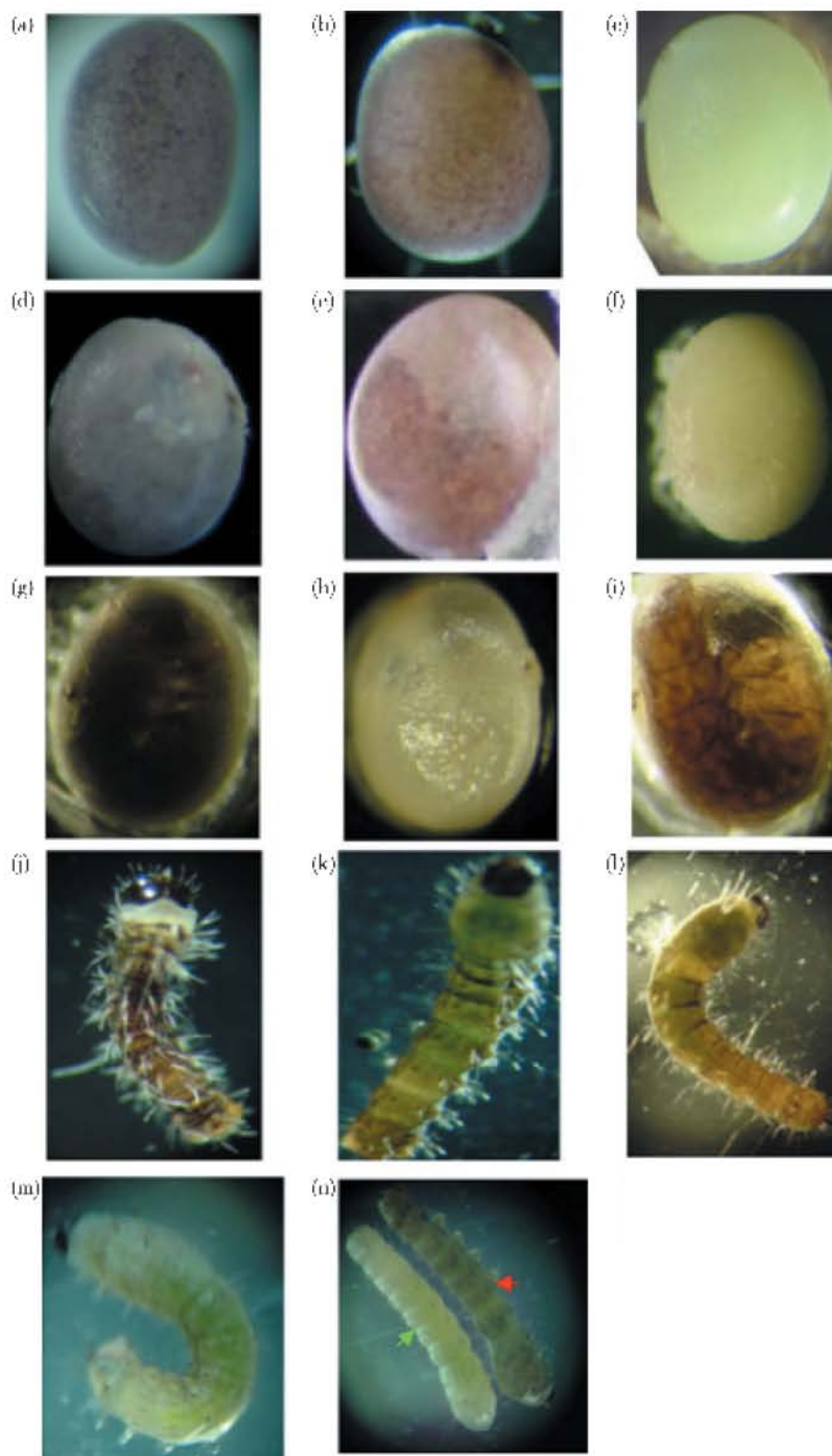


Fig. 4 Phenotypic changes following injection of the *Bmwh3* dsRNA into the wild-type eggs

(a) Wild-type eggs (dark brown); (b) (c) The mutant eggs of *w3* and *w3^{oe}*; (d) Phenotype of control eggs; (e) (f) Induction of mosaic eggs and the white eggs by injection of *Bmwh3* dsRNA; (g) Wild-type embryos at turned-dark stage; (h) (i) Phenotypes of the induced white eggs developed into head and body pigmentation stages; (j) Wild-type larvae; (k) Larvae of *w3* on the third day of the first instar; (l) Translucent larvae after injection *Bmwh3* dsRNA into later developed eggs; (m) Phenotypes of translucent larvae on the third day induced by injection *Bmwh3* dsRNA into early developed eggs; (n) Phenotypes of translucent larvae induced and wide-type larvae at the first molting stage (red arrows refers to the wide-type larvae and green arrows refers to translucent larvae induced).

Bmwh3 dsRNA 的蚕卵, 于注射后的第三天观察到了嵌合体卵 (图 4e) 及未着色卵白卵 (图 4f), 说明产生了干涉现象. 产卵后 10 h 注射, 绝大部分为嵌合体卵, 诱导的突变现象不明显. 产卵后 20 h 注射, 则着色完全正常. 而作为对照, 注射 *Bmwh3* 基因原质粒和双蒸水的蚕卵正常着色 (图 4d).

2.2.2 不同 dsRNA 浓度对卵色的影响: 从表 1 中可以看出, 产卵后 8 h 注射 *Bmwh3* 基因不同浓度的 dsRNA 对干涉现象的产生有明显的影响. 在浓度为 2.0 g/L 时, 绝大部分为白卵, 其干涉效果比较彻底; 当浓度为 1.0 g/L 时, 干涉不彻底, 大部分为嵌合体卵; 而低于 0.2 g/L, 基本不能产生干涉作用.

Table 1 Effect of the *Bmwh3* dsRNA injected into the eggs

Injection	$\rho/(g \cdot L^{-1})$	Injection time	Number of injected eggs	Number of eggs with the following colour			Number of hatched	Number of the translucent larvae
				White	Mosaic	Dark brown		
dsRNA of <i>Bmwh3</i>	0.2	8	50	0 (0)	0 (0)	50 (100)	14 (28)	0 (0)
	1.0	8	50	0 (0)	24 (48)	26 (52)	16 (32)	0 (0)
	2.0	8	50	47 (94)	2 (4)	1 (2)	13 (26)	6 (48)
	2.0	10	90	16 (18)	54 (60)	17 (19)	33 (37)	0 (0)
	2.0	20	50	0 (0)	2 (4)	48 (96)	25 (50)	0 (0)
	2.0	72	50	0 (0)	0 (0)	50 (100)	30 (60)	13 (43)
<i>Bmwh3</i> plasmid	2.0	8	50	0 (0)	0 (0)	50 (100)	16 (32)	0 (0)
ddH ₂ O		8	50	0 (0)	0 (0)	50 (100)	17 (34)	0 (0)
No injection			50	0 (0)	0 (0)	50 (100)	48 (96)	0 (0)

The injection volume is about 10 nl. The plasmid DNA of *Bmwh3*, ddH₂O and without injection were controls.

2.3 *Bmwh3* dsRNA 对蚕胚子、蚁蚕肤色的影响

野生型的蚕胚子发育到第 8 天时, 头部开始呈现黑色, 随着胚子发育的营养需要, 胚子将其黑褐色的浆液膜食下而使胚子呈黑色, 其体壁和刚毛也开始着色, 这个时期称为转青期. 早期注射 *Bmwh3* dsRNA 诱导的白卵在第 8 天时其卵色仍未着色, 在卵孔处出现黑色小点 (图 4h), 在转青期, 卵壳内的胚子在体视显微镜下清晰可见其附肢和刚毛, 体壁呈褐色 (图 4i). 而正常着色的蚕胚子在转青期呈黑色, 不能观察到附肢和刚毛 (图 4g). 晚期注射 *Bmwh3* dsRNA 的蚕胚子发育同正常胚子.

野生型蚁蚕孵化出壳时, 皮肤呈黑褐色而且不透明 (图 4j). 注射 *Bmwh3* 基因 dsRNA 的蚕卵刚孵化出的蚁蚕皮肤颜色呈褐色, 在第 2 天其半透明的皮肤明显可见, 但透明的程度不一样. 晚期注射 *Bmwh3* dsRNA 诱导的蚕卵所孵化的蚁蚕与第三白卵的蚁蚕相似, 皮肤呈半透明状 (图 4k, l). 早期注射 *Bmwh3* 基因 dsRNA 诱导的白卵所孵化的蚁蚕的皮肤高度透明 (图 4m), 并且可持续到二龄

末. 晚期所注射的该现象只能维持 2 天左右, 到三龄后, 基本就看不到突变性状, 其生长发育与正常一样.

3 讨 论

3.1 蚕品种的影响

Quan 等以卵色正常的日系品种 N200 蚕卵作为实验材料, 用 RNAi 技术成功地诱导了第三白卵突变表型的产生. 本实验用正常卵色的华系二化性品种大造蚕卵作为注射材料, 也得到了类似的结果. 由此初步推测, RNAi 可在不同的蚕品种中发挥作用. 由于品种间的差异, 成功诱导第三白卵突变的技术体系却有很大的不同. 本实验在采用 Quan 等的实验参数时未能诱导第三白卵突变, 经过大量的尝试, 其有效的体系为: 蚕卵产后 2~5 h 内用比重为 1.110 HCl 室温浸泡 80 min 以解除滞育, 产后 7~8 h 注射浓度为 2.0 g/L 的 *Bmwh3* dsRNA, 注射体积 10 nl 左右. 而 Quan 等在 N200 中所用的主要条件为, 蚕卵产后 4 h 内用 0.9 mol/L HCl 在 25℃ 浸泡 1 h, 在产后 6~7 h 注射 *Bmwh3* dsRNA 2~3 nl.

3.2 注射时间、浓度对卵色干涉效果的影响

实验结果表明, 外源性 *Bmwh3* dsRNA 能有效地抑制蚕卵内源基因的表达, 诱导白卵的产生, 但其干涉效果受 dsRNA 进入蚕卵内的时间及其 dsRNA 浓度的影响. 从注射剂量上看, 干涉的有效范围为每粒蚕卵注射约 10 nl 2.0 g/L 的 dsRNA, 即每粒卵注射 dsRNA 20 ng 左右. 从注射时期上看, 产卵经过时间短于 10 h 为最佳时期, 这与蚕胚胎发育进程相符合. 产卵 12 ~ 15 h 为胚盘形成期, 在 20 h 后则胚盘已完全形成. 而卵色是由母性遗传物质所控制的, 胚盘一旦形成, 卵色就能正常表达. 由于 dsRNA 介导的基因干涉是属于转录后基因沉默, 即 dsRNA 导入后导致细胞中同源 mRNA 降解, 从而干扰其内源基因的表达. 因此, 从产卵后 8 h 内能诱导白卵, 而 20 h 不能成功诱导的结果分析, 负责转运卵色素前体的 *Bmwh3* 基因主要作用时期为胚盘形成前, 而在产卵 20 h 后正常表达并合成蛋白质, 发挥相应功能, 因此卵色也不再受 dsRNA 的影响.

3.3 *Bmwh3* dsRNA 对蚁蚕皮肤的干涉影响

家蚕 *w3* 位点的突变除卵色与正常不同外, 还伴随幼虫皮肤的半透明性状. 到目前为止, 还未见对由 *w3* 突变引起的皮肤半透明的分子机理进行阐明的报道. Quan 等的实验表明, 注射 *Bmwh3* dsRNA 会引起蚁蚕皮肤透明, 基本证明了这两种表型都由 *Bmwh3* 所控制. 但是, 由于卵色与蚁蚕皮肤透明性在形成时间上有所不同, 因此, 对于后者是由前者所决定的还是二者都由 *Bmwh3* 基因直接作用所决定的问题, 从全国兴的实验来看并不能完全回答. 根据 Abraham 等^[17] 的研究表明, *Bmwh3* 在胚胎发育的表达高峰实际上是第 5 天到第 9 天, 也就是在卵色已经固定之后. 由此推测, *Bmwh3* 在家蚕胚胎发育期还有其他重要的功能, 本实验将 *Bmwh3* dsRNA 注入发育到第 3 天的蚕胚子中, 虽然卵色不再受到影响, 但其孵化的蚁蚕与早期注射诱导的白卵所孵化的蚁蚕同样具有半透明皮肤性状. 结合从早期注射诱导的白卵在点青期及转青期的胚子着色情况, 可以推测 *Bmwh3* 除了在胚盘形成前就开始表达, 并参与卵色的决定外, 还持续表达并参与蚕胚子皮肤透明性状的决定. 根据 *Bmwh3* 基因结构与功能的关系分析, *Bmwh3* 很可能同样通过参与色素前体的转运而决定蚁蚕的皮肤透明性.

3.4 长链 RNAi 技术对干涉效果的影响及家蚕功能基因组研究的意义

从 RNAi 的原理上讲, 实际上只需要基因的部分序列就可以获得理想的干涉效果. 如果所使用序列太长, 与其他基因部分相同的可能也增大, 干涉的特异性有降低的危险. 但是, 这种危险性将会因物种不同和基因组结构特征的不同而有所差异. 因此, 尽管最近的研究有使用短序列的趋势, 本实验还是选用了长 dsRNA 技术, 主要目的是希望建立一套有效的家蚕 RNAi 体系, 使之能直接应用到基于 EST 序列的基因功能分析. 目前家蚕的功能基因数据中最多的为大小在 500 ~ 700 bp 之间的 EST 序列, 如果能够直接加以应用, 可减少人工合成 siRNA 的成本和时间. 实验结果表明, 长 dsRNA 对基因的沉默具有序列特异性, 经诱导的白卵及半透明蚁蚕其生长发育与正常完全相同, 未见有明显的副作用影响.

在家蚕胚胎发育时期建立高效的 RNAi 技术, 将有助于家蚕胚胎发育相关功能基因的研究, 如功能鉴定, 表达时间和作用方式等. 同时, 家蚕胚胎时期的 RNAi 探索, 将为在其他生长发育时期和组织器官中建立有效的 RNAi 技术提供重要参考, 为家蚕功能基因组的研究提供有力的工具.

参 考 文 献

- 1 Fire A, Xu S, Montgomery M K, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, **391** (6669): 806 ~ 811
- 2 Montgomery M K, Xu S, Fire A, *et al.* RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (26): 15502 ~ 15507
- 3 Timmons L, Fire A. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*, 1998, **395** (6705): 854
- 4 Yang D, Lu H, Erickson J W, *et al.* Evidence that processed small dsRNAs may mediate sequence-specific mRNA degradation during RNAi in *Drosophila* embryos. *Curr Biol*, 2000, **10** (19): 1191 ~ 1200
- 5 Jason R, Kennerdell, Richard W, *et al.* Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. *Nat Biotechnol*, 2000, **18** (8): 896 ~ 898
- 6 Thomas T, Phillip D Z, Ruth L, *et al.* Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA *in vitro*. *Genes & Development*, 1999, **13** (24): 3191 ~ 3197
- 7 Florence W, Magdalena Z G. Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nature Cell Biology*, 2000, **2** (2): 70 ~ 75
- 8 Svoboda P, Stein P, Hayashi H, *et al.* Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. *Development*, 2000, **127** (19): 4147 ~ 4156
- 9 Zamore P D, Tuschl T, Sharp P A, *et al.* RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 ~ 23 nucleotide intervals. *Cell*, 2000, **101** (1): 25 ~ 33

- 10 Bernstein E, Caudy A A, Hammond S C, *et al.* Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 2001, **409** (6818): 363 ~ 366
- 11 Hammond S M, Caudy A A, Hannon G J, *et al.* Posttranscriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nature Rev Genet*, 2001, **2** (2): 110 ~ 119
- 12 Misquitta L, Paterson B M. Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNAi): a role for nautilus in embryonic somatic muscle formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (4): 1451 ~ 1456
- 13 Quan G X, Kanda T, Tamura T, *et al.* Induction of the white egg 3 mutant phenotype by injection of the double-stranded RNA of the silkworm white gene. *Insect Molecular Biology*, 2002, **11** (3): 217 ~ 222
- 14 Ewart G D, Cannell D, Cox G B, *et al.* Mutational analysis of the traffic ATPase (ABC) transporters involved in uptake of eye pigment precursors in *Drosophila melanogaster* implications for structure-function relationships. *J Biol Chem*, 1994, **269** (14): 10370 ~ 10377
- 15 Sullivan D T, Bell L A, Paton D R, *et al.* Genetic and functional analysis of tryptophan transport in Malpighian tubules of *Drosophila*. *Biochem Genet*, 1980, **18** (11 ~ 12): 1109 ~ 1130
- 16 Mackenzie S M, Brooker M R, Gill T R, *et al.* Mutations in the white gene of *Drosophila melanogaster* affecting ABC transporters that determine eye colouration. *Biochim Biophys Acta*, 1999, **1419** (2): 173 ~ 185
- 17 Abraham E G, Sezutsu H, Kanda T, *et al.* Identification and characterization of a silkworm ABC transporter gene homologous to *Drosophila white*. *Mol Gen Genet*, 2000, **264** (1 ~ 2): 11 ~ 19

Study on The RNA Interference of *Bombyx mori* Embryo*

LIU Chun, SHUAI Xiao-Rong, CHENG Ting-Cai, XU Han-Fu,

LI Chun-Feng, DAI Fang-Yin, XIA Qing-You **, XIANG Zhong-Huai

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

Abstract Double-stranded RNA (dsRNA) can induce sequence-specific inhibition of gene function, this phenomenon is termed RNA interference (RNAi). An effective RNAi method of silkworm (*Bombyx mori*) embryo by introduction of double-stranded RNA corresponding to the silkworm *Bmwh3* gene into the preblastoderm eggs of wild-type has been established based on the previous research. The results showed that the RNAi was successful when injected *Bmwh3* dsRNA into the preblastoderm eggs within 8h after laid of wide-type silkworm and the concentration of the *Bmwh3* dsRNA must be high to 2.0 g/L. It can also induce the other *w3* mutant phenotype——translucent larvae when injected *Bmwh3*dsRNA into the third day of developed eggs. A conclusion can be primarily drawn that the *Bmwh3* is not only involved in the transport of the precursors of the ommochrome and pteridine pigments to the eye and egg, but also involved in the transport of the precursors of the pigments to the larvae skin.

Key words RNAi, *Bombyx mori*, *Bmwh3* gene, *w3* mutant

* This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (30270691).

** Corresponding author. Tel: 86-23-68250748, Fax: 86-23-68251128, E-mail: xiaqy@swau.cq.cn

Received: August 26, 2003 Accepted: September 28, 2003