

家蚕二化性品种 (品系) 转基因用蚕卵的预处理技术研究

唐顺明^{1,2} 沈兴家^{1,2} 赵巧玲^{1,2} 章 扬² 张国政^{1,2} 郭锡杰^{1,2}

(¹中国农业科学院蚕业研究所, 农业部蚕桑遗传改良重点开放实验室, 江苏镇江 212018

²江苏科技大学, 江苏镇江 212003)

摘 要 家蚕为卵滞育昆虫, 二化性家蚕品种 (品系) 的化性由上代卵期温度与光照等调控。将若干个二化性家蚕品种 (品系) 以 17~18℃ 温度催青诱导子代蚕卵非滞育, 筛选出 1 个经济性状较优的实用品种“秋丰”、1 个突变品系 P33, 二者非滞育卵圈比例分别达到 96.4% 和 89.6%, 正常催青的良卵实用孵化率分别达到 96.11% 和 98.58%, 解决了采用显微注射法以家蚕实用品种构建转基因系统过程中因蚕卵滞育不能及时孵化的难题。另对利用 20% 盐酸-2% 甲醛混合液刺激解除蚕卵滞育的方法以及非滞育蚕卵表面用 70% 乙醇消毒的方法进行了尝试, 前者可以获得 96% 以上的孵化率, 后者可以缩短蚕卵预处理时间。

关键词 家蚕; 化性; 催青温度; 非滞育卵; 转基因

中图分类号 S883 **文献标识码** B **文章编号** 0257-4799(2009)04-0872-05

Studies on Pretreatment of Eggs From Bivoltine Silkworm Varieties (Strains) for Microinjection Transgene

TANG Shun-Ming^{1,2} SHEN Xing-Jia^{1,2*} ZHAO Qiao-Ling^{1,2}
ZHANG Yang² ZHANG Guo-Zheng^{1,2} GUO Xi-Jie^{1,2}

(¹ The Key Laboratory of Genetic Improvement of Silkworm and Mulberry Ministry of Agriculture Sericultural Research Institute Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang Jiangsu 212018 China

² Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang Jiangsu 212003 China)

Abstract The silkworm *Bombyx mori* is a species of insect with diapause during egg stage. The voltinism of bivoltine silkworm variety (strain) is regulated by temperature and illumination in its parental egg stage. From a number of bivoltine varieties (strains) of which eggs were induced to become non-diapause by control of temperature at 17~18℃ during egg incubation, one practical silkworm variety Qufeng with excellent economic characters and one mutants strain P33 were selected. Their non-diapause egg batch percentages were 96.4% and 89.6%, and practical hatching abilities of good eggs under normal incubation condition were 96.11% and 98.58%, respectively. These results have resolved the difficulty that diapause eggs can not hatch directly after microinjection in transgenic studies. In addition, the efficiency of dipping eggs in mixture of 20% hydrochloric acid and 2% formaldehyde solutions for activating diapause eggs and the effect of surface disinfection with 70% ethanol for non-diapause eggs before microinjection were investigated. The results showed that the former

could provide a hatching ability higher than 96%, and the latter could shorten the egg pretreatment durations significantly.

Key words *Bombyx mori*; Voltinism; Incubation temperature; Non-diapause egg; Transgene

收稿日期: 2009-08-13

资助项目: 国家重点基础研究发展计划“973”项目 (编号 2005CB12-1004), 国家高技术研究与发展计划“863”项目 (编号 2007AA100504), 江苏省高校自然科学基金项目 (编号 07KJD230052)。

作者简介: 唐顺明 (1971-), 男, 浙江, 博士, 副研究员。

E-mail: tangshunming2002@163.com

通信作者: 沈兴家, 研究员, 博士生导师。

E-mail: shenxj3@yahoo.com.cn

自 20 世纪 70 年代以来, 家蚕 (*Bombyx mori*) 转基因技术取得了重要进展, 建立了精子介导法^[1-3]、

基因枪法^[4-5]、显微注射法^[6-8]、病毒介导法^[9]、孤雌生殖法^[10-12]等多种外源基因导入方法,并利用同源重组原理进行了转基因尝试。最近的研究发现,从昆虫中鉴定出的 PiggyBac 转座子对家蚕也有基因转座功能,已经利用该转座子通过显微注射方法获得了稳定遗传的转基因系统^[8,13-15]。

由于现行生产上推广应用的家蚕品种基本为二化性品种,产卵后需要采用盐酸浸渍等人工处理方法才能孵化,而且大多数品种的卵壳比较坚硬,难以直接构建以提高和改进蚕丝产量和品质为目标的转基因家蚕系统,制约了实用家蚕品种转基因的研究进展。多化性品种尤其是无滞育期的多化性品种,在胚胎发育早期(2~8 h)经过转基因显微注射后,不需要进行盐酸刺激处理就可以直接催青孵化,这也是迄今构建的转基因家蚕大多采用 Nistar 等多化性品种的原因。然而,家蚕多化性品种除了抗性外,茧质性状却较差,应用于家蚕转基因的研究其实用化价值很低。如果能够建立一种简单易行的蚕卵解除滞育的处理方法,使用于转基因的家蚕实用品种的蚕卵在进行显微注射后不经过盐酸刺激就可以直接孵化,无疑将对转基因实用家蚕系统的构建发挥重要的作用。

家蚕为卵滞育昆虫,二化性家蚕品种的化性变化受上代卵期温度与光照诱导调控,25℃以上高温催青促进产下滞育卵,15℃催青促进产下非滞育卵^[16-18]。据此,我们采用蚕种低温催青的方法,对若干个家蚕品种(品系)进行了化性调控试验,期望解决家蚕二化性品种(品系)因蚕卵滞育而不能利用显微注射法构建转基因家蚕系统的难题。

1 材料与方法

1.1 蚕品种与主要试剂

家蚕品种(品系):秋丰、白玉、芙蓉、A1、A16、S16、S17、54A7532、P33、玉龙 A 玉龙 B Nistar;由中国农业科学院蚕业研究所、农业部蚕桑遗传改良重点开放实验室保存。

试剂:盐酸、乙醇和甲醛等试剂均为国产分析纯。

1.2 蚕卵催青方法

取每个供试品种(品系)的越年蚕种 3 个卵圈,置于生化培养箱(SPX-250)用 17~18℃的低温和

黑暗催青,至转青后第 3 日(即孵化前 1 d)转移到 25~26℃保护,催青时间 27 d。对照组各供试品种以常规催青温度与光照条件处理。孵化后的幼虫采用桑叶育,常规温度、湿度饲养与保护,羽化后同一饲养区交配制种。

1.3 蚕卵用高浓度盐酸处理的方法

将正常催青饲养获得的雌、雄蛾在光照下交配 8~9 h 后拆对,雌蛾在室温(25~26℃)黑暗条件下产卵;约 50 只雌蛾产卵于同一张连纸上,每隔 15 min 更换 1 次连纸,并做好标记。产下的卵再经 1~4 h 室温保护后,参照文献[19]的方法用 20% 盐酸-2% 甲醛混合液在室温下浸渍 30~60 min 然后用清水脱酸 15 min 蒸馏水冲洗数次后用于孵化试验和显微注射。

1.4 蚕卵表面消毒方法

为了缩短转基因研究中蚕卵显微注射操作的前处理时间,对在产卵后室温保护 2 h 的非滞育蚕卵先用 70% 乙醇进行蚕卵表面消毒,再用无水乙醇处理以除去蚕卵表面水分。

2 结果与分析

2.1 催青诱导产生高比例非滞育卵的二化性家蚕品种(品系)筛选

在 17~18℃的低温和黑暗催青条件下孵化的家蚕,有的品种产下的子代几乎全为滞育卵,有的品种产下部分滞育卵和部分非滞育卵(表 1)。在供试的 12 个品种(品系)中,非滞育卵发生比例最高的品种是秋丰,达 96.4%;其次是突变品系 P33 达 89.6%;芙蓉和 A16 分别为 58.2% 和 31.9%;白玉、54A 等品种则未发生非滞育卵。对照组各供试品种经正常温度催青孵化的蚕产下的子代全部为越年卵。

对秋丰、P33 产下的非滞育卵在 25~25.5℃中催青,第 8 天转青,第 10 天孵化,且孵化齐,良卵孵化率分别达到 96.11% 和 98.58% (表 2)。由这种非滞育卵正常温度催青孵化出的蚁蚕仍为二化性。

秋丰为生产上大面积推广的经济性状优良家蚕品种。突变品系 P33 属于中国系统,幼虫具有有限性斑纹,发育齐一,生命率和抗不良环境能力中等,茧色洁白,主要经济性状达到实用品种水平。因此,这 2 个品种(品系)可以提供家蚕转基因研究应用。

表 1 不同二化性家蚕品种(品系)蚕卵 17~18℃催青后子代蚕卵的非滞育卵率调查
Table 1 Percentage of non-diapause eggs in the offspring of different bivoltine silkworm varieties (strains) of which eggs were incubated under 17~18℃

品种(品系) Silkworm variety(strain)	总卵量 / 圈 ¹⁾ Number of total egg batches	非滞育卵量 / 圈 Number of non-diapause egg batches	兼性卵量 / 圈 Number of diapause and non-diapause egg batches	滞育卵量 / 圈 Number of diapause egg batches	非滞育卵圈率 / % ²⁾ Percentage of non-diapause egg batches
秋丰 Qiu feng	83	80	0	3	96.4
白玉 Baiyu	79	0	0	79	0
芙蓉 Furong	55	32	0	23	58.2
A1	26	2	0	24	7.7
A16	119	38	1	80	31.9
Sl6	80	0	9	71	0
Sl7	71	0	0	71	0
54A	108	0	0	108	0
7532	56	1	0	55	1.8
P33	87	78	2	7	89.6
玉龙 A Yulong A	55	0	0	55	0
玉龙 B Yulong B	72	0	0	72	0

1)低温黑暗催青蚕卵生产的子代蚕种的卵圈数; 2)低温黑暗催青蚕卵生产的子代蚕种卵圈数中非滞育卵圈的百分率。
1) The number of offspring egg batches produced from the eggs incubated under low temperature and dark condition. 2) The percentage of non-diapause egg batches in the offspring egg batches produced from the eggs incubated under low temperature and dark condition.

表 2 二化性品种秋丰、突变品系 P33非滞育卵的孵化率调查
Table 2 Hatchability of non-diapause eggs from bivoltine silkworm variety Qiu feng and mutant strain P33

品种(品系) Silkworm variety(strain)	卵圈序号 No. of egg batch	不受精卵量 / 粒 Number of non-fertilized eggs	转青死卵量 / 粒 Number of eggs died after body pigmentation	孵化卵量 / 粒 Number of hatched eggs	总良卵量 / 粒 Total number of good eggs	良卵孵化率 / % Hatchability of good eggs
秋丰 Qiu feng	1	0	16	425	441	96.11
	2	0	22	614	636	
	3	0	10	512	522	
	4	3	36	523	559	
	合计 Total	3	84	2 074	2 158	
P33	1	0	5	535	540	98.58
	2	2	13	526	539	
	3	0	7	471	478	
	4	0	4	486	490	
	合计 Total	2	29	2 018	2 047	

2.2 用高浓度盐酸处理促使滞育卵发育
用高浓度盐酸在室温条件下对二化性家蚕突变品系 P33和实用品种芙蓉的蚕卵进行处理,设置 3 种产卵后保护时间和 3种浸酸时间,浸酸后 25~25.6℃催青,各品种的蚕卵孵化情况见表 3。用

20%盐酸-2%甲醛混合液浸渍 30 min的孵化率最高,均达到 96%以上;在产卵后 1.5~2.5 h内,不同保护时间对蚕卵孵化率几乎没有影响,而当浸渍时间延长至 45 min浸酸死卵数明显增加;浸渍 60 min的孵化率都很低。因此,在制备显微注射法家蚕转

基因用蚕卵时, 以产卵后 1.5~2.5 h 用 20% 盐酸-2% 甲醛混合液浸渍 30 min 为最佳, 不仅可以获得较高的孵化率, 而且可以有较长的适宜转基因注射时间。

表 3 蚕卵常温高浓度盐酸刺激孵化的试验结果
Table 3 Experimental results of silkworm egg hatchability after activation with high concentration of hydrochloric acid at room temperature

产卵后 时间 / h Duration post oviposition	浸酸时间 / min Duration of treatment in acid	突变品系 P33 Mutant strain P33			实用品种芙蓉 Practical variety Furong				
		孵化 卵量 / 粒 Number of hatched eggs	浸酸死 卵量 / 粒 Number of dead eggs from acid treatment	转青死 卵量 / 粒 Number of dead eggs after body pigmentation	实用孵化 率 / % Practical hatchability	孵化 卵量 / 粒 Number of hatched eggs	浸酸死 卵量 / 粒 Number of dead eggs from acid treatment	转青死 卵量 / 粒 Number of dead eggs after body pigmentation	实用孵 化率 / % Practical hatchability
1.5	30	231	2	4	97.06	689	10	10	97.18
	45	407	18	10	93.56	48	83	170	15.95
	60	242	95	90	56.67	19	170	131	6.13
2.0	30	424	0	17	96.15	838	11	16	96.88
	45	424	4	15	95.71	423	31	298	68.72
	60	148	135	131	35.75	20	175	238	4.62
2.5	30	619	2	2	99.36	1178	15	6	98.25
	45	434	37	120	73.43	763	20	242	74.44
	60	227	102	81	55.37	12	864	70	1.27

2.3 用乙醇对蚕卵表面消毒缩短卵预处理时间

对无滞育多化性品种 Nistar 的蚕卵和由低温催青获得的秋丰、P33 子代非滞育蚕卵, 在产卵后经室温保护 2 h 即用 70% 乙醇进行蚕卵表面消毒, 再用无水乙醇处理脱水, 25~25.5℃催青。结果表明, 高浓度乙醇对蚕卵表面消毒不影响蚕卵孵化, 可以缩短蚕卵预处理时间, 从而增加适宜转基因操作的时间。

3 讨论

二化性家蚕品种 (品系) 的化性变化受上代卵期催青温度与光制等环境条件的调控, 25℃以上高温催青促进产下滞育卵, 15℃温度催青促进产下非滞育卵^[16-17]。我们曾将蚕卵置于 15~16℃温度条件下催青, 催青经过却长达 35~40 d 而且孵化的蚁蚕体质虚弱。因此, 本试验采用 17~18℃的温度催青, 催青经过为 27~28 d 从供试的 12 个二化性家蚕品种 (品系) 筛选出子代蚕卵非滞育的 1 个生产用蚕品种秋丰和 1 个突变品系 P33 其子代蚕卵中的非滞育卵率以卵圈计算达 90% 以上, 且孵化齐一。这种非滞育卵的基因组并未改变, 与其亲本完全一致, 其滞育性的改变是亲代卵期对感受低温环境作出应答的结果^[18], 因此采用正常温度催青, 孵

化出的蚁蚕继续饲养, 其后代仍为滞育卵。本试验建立的方法解决了用显微注射法以家蚕二化性品种 (品系) 构建转基因系统中因蚕卵滞育不能直接孵化的难题。

对蚕卵早期胚胎采用高浓度盐酸室温处理的方法, 同样可以达到促使蚕卵孵化的目的^[19]。然而, 如果产卵后保护时间过短 (1 h 以内) 则发生大量的浸酸死卵; 保护时间过长 (3 h 以上), 虽然孵化率可以达到 98% 以上, 但适宜转基因注射的时间很短。本试验表明, 在室温下浸酸条件以产卵后 1.5~2.5 h 用 20% 盐酸-2% 甲醛混合液浸渍 30 min 为最佳, 不仅可以获得较高的孵化率, 而且可以获得较长的适宜转基因操作的时间。

与多化性品种 Nistar 相比, 秋丰等生产实用品种的蚕卵卵壳较厚, 不利于显微注射操作, 因此实用品种显微注射的操作方法也需要进一步研究改进。

参考文献 (References)

[1] 郭秀洋, 周泽扬, 冯丽春, 等. 利用精子介导法向蚕卵导入外源基因的研究 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2001 28 (3): 423~425
[2] 左正宏, 吴春旭, 桂慕燕, 等. 家蚕精子介导报告基因 gfp 和 ge

- 转移技术的研究 [J]. 厦门大学学报 (自然科学版), 2006 45 (4): 580-584
- [3] 张业顺, 夏定国, 张国政, 等. 家蚕精子介导转基因技术体系的优化 [J]. 蚕业科学, 2007 33(2): 201-206
- [4] 孟智启, 姚山麟, 王为民, 等. 基因枪喷射在家蚕外源基因转移中的应用 [J]. 浙江农业学报, 1992(2): 93-95
- [5] 陈秀, 赵均, 张峰, 等. 新霉素抗性基因在家蚕中的插入和表达 [J]. 生物化学和生物物理学报, 1999 31(1): 90-92
- [6] 尼克拉耶夫 A I 重组 DNA 显微注射导入家蚕早期胚胎 [J]. 国外农学-蚕业, 1991(1): 19-24
- [7] Tanuma T, Kanda T, Takaya S, et al. Transient expression of chimeric CAT genes injected into early embryos of domesticated silkworm *Bombyx mori* [J]. Jpn J Genet, 1990 65(6): 401-410
- [8] Tanuma T, Thibert C, Royer C, et al. Germ line transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon derived vector [J]. Nat Biotechnol, 2000 18(1): 81-84
- [9] Mori H, Yamao M, Nakazawa H, et al. Transovarian transmission of a foreign gene in the silkworm *Bombyx mori* by Autographa californica nuclear polyhedrosis virus [J]. Biotechnol, 1995 13: 1005-1007
- [10] 李振刚, 周丛照, 唐恒立, 等. YAC 介导的天蚕丝素基因向家蚕的转移及其在 E_2 代的表达 [J]. 科学通报, 1995 40(24): 2267-2269
- [11] 徐厚镨, 陈震右, 孙文翔, 等. 激光诱发家蚕孤雌生殖试验初报 [J]. 蚕业科学, 1990 16(4): 236-237
- [12] 王永强, 徐孟奎, 何秀玲, 等. 家蚕现行品种孤雌生殖的研究 [J]. 蚕业科学, 2001 27(1): 20-23
- [13] Handler A M. Use of the piggyBac transposon for germ line transformation of insects [J]. Insect Biochem Mol Biol, 2002 32(10): 1211-1220
- [14] Tamai M, Munetsuna H, Yoshizawa K, et al. Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons [J]. Nat Biotechnol, 2003 21(1): 34-35
- [15] 代红久, 王铸钢, 费俭, 等. 利用鳞翅目来源的转座子 piggyBac 建立高效稳定的转基因家蚕技术 [J]. 科学通报, 2005 50(14): 1470-1474
- [16] 中国农业科学院蚕业研究所. 中国养蚕学 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1991: 164-182
- [17] 徐卫华, 张元琪, 王盈, 等. 昆虫滞育的分子机理——家蚕胚子发育期的温度条件与滞育激素基因表达 [J]. 中国科学 C 辑, 1998 28(2): 154-159
- [18] 黄君霆. 家蚕滞育分子机制的研究 [J]. 蚕业科学, 2003 29(1): 3-8
- [19] Inoue S, Kanda T, Inamura M, et al. A fibroin secretion deficient silkworm mutant *Nd^{sd}* provides an efficient system for producing recombinant proteins [J]. Insect Biochem Mol Biol, 2005 35(1): 51-59

