

蚕的基因工程研究概况

吴金美

(中国农业科学院蚕业研究所)

一、前言

据报载：“日本专家已利用家蚕核型多角体病毒载体系统来诊断爱滋病，经过对 109 名爱滋病患者和 50 名健康人进行血检，证实可以明确地区分病患者。该系统不仅能用于诊断，而且还可以用于预防免疫，美国政府已批准其用于爱滋病人人体免疫注射试验”。另据《日刊工业新闻》报道，日本的东丽公司正在利用蚕体生产能治疗猫的病毒症的干扰素。重组病毒接种后 4 天，提取蚕的体液予以精制，从每条蚕可提取 1 毫克干扰素。“这个生产方法和使用大鼠等动物细胞生产干扰素的方法相比，生产率提高 100 倍以上”。这些报道表明蚕的生物技术研究正以其独特的优势得到了日益广泛的重视和应用。

养蚕有着五千年以上悠久的历史。长期以来人们为了更好地利用这种吐丝昆虫已对其遗传、生理、生化等方面进行了深入的研究，积累了丰富的知识。尤其是 70 年代以来，随着分子生物学理论和技术的迅速发展，蚕的生物技术研究也取得了令人瞩目的成就。当前，基因工程、细胞工程和染色体工程的目标是分离对我们有用的基因，然后导入个体或细胞，并使其稳定地表达。本文就蚕的基因表达系统及从分子生物学角度已进行了深入研究的几个蚕基因研究现状作一简要介绍。

二、蚕的基因表达系统

1. 利用杆状病毒载体生产有用物质的基

因表达系统

尽管蚕在个体水平导入异种基因尚未成功，但是用蚕的多角体病毒为载体在蚕体内表达外源基因已经成功。家蚕在核型多角体病毒(NPV)感染的后期，会产生大量的多角体蛋白，这种多角体蛋白的存在与否并不影响病毒粒子的增殖与复制。因此利用其强启动子而将外源基因取代多角体蛋白结构基因的全部或一部分，就能使对我们有用的外源基因得到大量表达。因此，杆状病毒的转移载体一般都是利用多角体蛋白基因与质粒构建而成。在转移载体的合适位点插入外源基因，使多角体蛋白基因的 3'、5' 两端侧翼序列被外源基因隔开，而外源基因则处于多角体蛋白基因的启动子控制之下。该转移载体与野生型病毒 DNA 共转染昆虫细胞，通过体内同源重组就可得到带有外源基因的重组病毒，在多角体蛋白基因启动子驱动下表达外源基因。

利用家蚕 NPV 作为外源基因表达的载体，与其它载体系统相比有其独特的优点：如病毒基因组是双链 DNA，在 DNA 重组实验上容易用限制性内切酶处理；病毒粒子呈杆状，能插入较长的外源 DNA(7-8kb)；多角体蛋白基因有着非常强有力的启动子，在感染末期多角体蛋白可达到全部蛋白质的 20~30%；多角体能够用光学显微镜进行观察，可将此作为标记物，借以区分不产生多角体(OCC)的重组病毒空斑，容易地将重组病毒筛选出来，并进行纯化。利用 BmNPV 作载

体的蚕体表达系统比之细胞培养系统有着更大的应用潜力,有利于有用物质的工厂化生产;该表达系统能对表达产物进行正确的后加工等等。

前田等(1991)报道了由重组杆状病毒表达的昆虫特异性神经毒素 AaIT 的杀虫效果。化学农药的使用引起了对哺乳动物的毒性以及抗性害虫种类的出现与扩大,因而应用杆状病毒作为生物杀虫剂已引起了人们的广泛兴趣。但杆状病毒潜育期较长,感染后要经过相当长的时间才能引起幼虫死亡。借适当外源基因导入 BmNPV 可以提高病毒的致病性与杀虫效力。蝎毒中存在着多种神经毒素,其中除个别小分子多肽成分被证实是神经细胞膜上钾离子通道的阻断剂外,绝大部分是一类选择性地影响电压敏感钠离子通道的由 60-70 个氨基酸残基组成的单链多肽。AaIT 就是来自蝎毒的对昆虫具有特异性神经毒性的一种多肽,它选择性地作用于昆虫钠通道。前田等(1991)在家蚕神经肽(蚕素)的分泌信号序列之后合成编码 AaIT 的基因并插入到由多角体蛋白基因启动子控制的家蚕 NPV 转移载体 pBK273 中,所产生的重组质粒与家蚕野生型 NPV DNA 共转染家蚕培养细胞,筛选出重组病毒。当家蚕幼虫感染了带合成的 AaIT 基因的重组杆状病毒,所表达的蛋白分泌到血淋巴中,并产生与钠通道阻断一致的症状,即在感染后 40 小时蚕体颤抖、停止食桑,在 60 小时后出现麻痹及死亡。感染了对照病毒的幼虫在感染后 96 小时死亡。这些结果表明外源基因能在重组杆状病毒中表达,提早宿主昆虫中毒死亡,以减少害虫食叶损害程度,增强病毒制剂杀虫效率。

K. Morishita 等(1992)利用家蚕核型多角体病毒载体表达了鸟成红细胞增多病毒病的癌基因 v-erb B。v-erb B 与人的表皮生长因子(EGF)受体有广泛的同源性。用杆状病

毒载体大量表达 v-erb B 蛋白为该蛋白的生化及物理-化学分析打下了基础。研究表明,多角体蛋白部分仅由 8 个 N-末端氨基酸组成的融合蛋白的表达水平比非融合蛋白的表达水平高 10 倍。重组的 v-erb B 蛋白已被糖基化,并可自主地使酪氨酸残基发生磷酸化。结果证实家蚕杆状病毒载体系统适于 v-erb B 功能蛋白的大规模生产。

雷向东等(1993)报道了萤火虫荧光素酶基因在昆虫细胞 sf-21 中的表达。萤火虫荧光素酶在 ATP 和 Mg 离子存在下,催化 D-荧光素氧化脱羧,产生氧化荧光素,发出了可见光,利用构建的 pAcLu 转移载体与野生型 AcNPV DNA 共转染 sf-21 细胞,常规筛选重组病毒,并进行表达的荧光素酶活力跟踪测定。结果,培养细胞中荧光素酶的表达量为 $22\mu\text{g}/10^6$ 细胞。利用家蚕核型多角体病毒作载体表达该基因也在进行中。该研究为建立简便可行的以荧光素酶基因为标记基因用发光自显影法直接筛选重组病毒打下了基础。

储瑞银等(1989)利用重组 BmNPV 成功地在家蚕体内高效表达了乙肝表面抗原 pres₂-s。利用杆状病毒表达的外源基因还包括人促红细胞生成素 EPO(待发表)、颗粒-巨噬细胞集落刺激因子 GM-CSF(待发表)、流行性感胃病毒的血凝素 HA 蛋白基因等。周乃明等(1992)利用家蚕杆状病毒载体高效地表达了人乙肝表面抗原基因 HBsAg,表达量达 $752\mu\text{g}/$ 条蚕,为 HBsAg 的纯化及大量生产打下了良好的基础。

如何进一步从载体构建、细胞培养、病毒敏感型蚕品种的选择等方面来进一步提高外源基因的表达量及表达效率,是现在及将来宜着重研究的问题。我国家蚕的基因工程产品产业化正在加紧研究之中,相信不久的将来会有不少产品相继问世投入应用。

2. 体外转录系统

无细胞转录系统的应用,是分析组织特

异性表达基因的转录调控机制以及有关调控因子本质的有力手段(铃木等,1987)。最初有关体外转录系统的报道是 Manley 等(1980)用 Hela 细胞(子宫颈癌细胞)作成的。而以家蚕为材料作成的体外转录系统的首次报道则是津田和铃木在 1981 年用后部丝腺作成的,它能忠实地转录丝素基因。随着不同来源抽取物数量的增加,已经可以获得某种无细胞系统,使组织特异性表达基因以及同源异形基因在其中优先选择转录成为可能。在家蚕方面,已经发展了几十个不同的无细胞转录系统,都能忠实地转录丝素基因。应用这些系统已经证明了丝素基因与丝胶-1 基因无细胞转录的特异性。最近,在丝腺抽取物中已经获得了丝素基因与丝胶-1 基因的差别转录:在后部丝腺抽取物中丝素基因被优先地转录,而在中部丝腺抽取物中,丝胶-1 基因比丝素基因被更高效地转录。利用这些无细胞系统已经鉴定出了丝素基因与丝胶-1 基因的顺式作用因子和反式作用因子,研究了同源异形结构域蛋白在丝腺分化过程和丝蛋白基因表达中的作用。这些蛋白因子及其基因的鉴定将会阐明丝素和丝胶-1 基因的差别转录在这些分化了的组织中是如何被调控的,这将帮助我们去分析究竟哪一类分子在分化过程中起作用。这些无细胞转录系统是分析这些分子调控的关键工具。

3. 基因的瞬时表达系统

用磷酸钙法将克隆了的基因导入培养细胞可表达蚕的基因,把微量 DNA 注射到丝腺中也能使基因得以表达。田村等(1990)报道建立了一种基因导入家蚕早期胚胎的瞬时表达系统,以检测与 CAT 报告基因相连的启动子的活力。当胚子注射了超螺旋的含家蚕丝素基因启动子及 CAT 基因的 pFb(-860/+10)CAT 质粒 DNA 时,在产卵后约 30 小时可检测出很高的 CAT 活性。该高活性仅在胚胎的早期核分裂结束前(约在产卵

后 8 小时)注射质粒 DNA 时才可观察到。同时发现来源于昆虫的启动子,如家蚕丝胶-1 的启动子等在胚胎中表现为强有力的启动子;相反,来源于哺乳动物病毒基因的启动子如 SV40 早期基因等仅有弱的启动子活力;若注射线性化的 DNA 在胚胎中则没有表达活性或很弱。因此,这种利用 CAT 基因作报告基因的方法,可考虑作为分析启动子活力的检测系统及研究昆虫基因调节机制的有用工具。

另外,随着蚕的转座因子研究的深入,基因导入方面利用类似转位子序列已提上议事日程。

三、几个主要的蚕体基因的研究现状

1. 与丝蛋白合成有关的基因

茧丝由丝素与围在其外的丝胶构成。丝素蛋白分子是由分子量 35 万的大亚单位(H 链)和分子量 2.5 万的小亚单位(L 链或 P25 蛋白)各 1 分子组成,两种亚单位以二硫键相结合。丝素蛋白 H 链和 L 链的氨基酸组成显著不同。H 链包含结晶区与无定形区,前者占 60~65%,后者占 35~40%。结晶区的基本单位由 59 个氨基酸残基组成,即甘-丙-甘-丙-甘-丝-甘-丙-丙-甘-(丝-甘-丙-甘-丙-甘)_n-酪。每 4~7 个这样的基本单位(重复序列)构成一个区段,每个丝素分子内有这样的区段 10 个左右,因蚕品种而不同。区段与区段之间有一条 100~200 个氨基酸残基构成的无定形部分相连接。丝心蛋白 H 链和 L 链分别由不同的基因支配,丝心蛋白 H 链基因与 *Nd* 连续,位于第 25 连锁群;丝心蛋白 L 链与 *U* 连锁,位于第 14 连锁群。家蚕丝胶蛋白包含 4~6 种主要多肽,其中一些被糖基化,外观分子量 65~400kd,它们有很高的丝氨酸含量(16~42%)。蒲生(1977)用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离了 5 种丝胶蛋白组分。目前已有 5 个丝胶蛋白基因被分离克隆。其中

Ser 1 基因共有 8 个外显子, *Ser 1* 基因编码 4 个丝胶多肽组分。 *Ser 2* 基因全长 16200~16400bp, 单拷贝。 *Ser 2* 基因转录的初级产物 mRNA 前体经过不同剪接产生 2 种 mRNA: 5.0~6.4kb (依等位基因而不同) 以及 3.1kb。 *Ser 2* 基因在幼虫第 4 龄表达, 第 5 龄大量合成积累, 5 龄后期只在中部丝腺前区表达。除 *Ser 1* 和 *Ser 2* 基因外, 从家蚕基因文库中还分离克隆到 S_3 、 S_4 、 S_5 三个丝胶蛋白基因, 这三个基因分别为 3500nt、2950nt 及 45nt 的 mRNA 编码。与丝蛋白转录控制有关的蛋白质因子的基因也已克隆, 如 SGF-1、SGF-2、SGF-3、SGF-4 等。

非家蚕的丝素蛋白也从分子生物学的角度进行了深入研究。结果表明, 野蚕的丝素基因在其 5' 端上游的碱基序列几乎是一样的, 与家蚕相比较几乎没什么变化 (kusda 等, 1986)。属于大蚕蛾科的天蚕、柞蚕和蓖麻蚕的丝素不存在如同家蚕丝素的 L 链; 分子量约 22~25 万的丝素多肽以二个单体的形式以二硫键相结合。天蚕的丝素基因已被分离克隆, 其 5' 上游的碱基序列与家蚕丝素基因相比, 尽管蛋白质区的氨基酸序列完全不同, 但其 5' 端的第 1 个外显子的碱基序列却非常近似。这一碱基序列的相似性说明两者的原始基因是相同的, 推想, 各种各样的丝素基因是从共同的祖先型丝素基因衍生而来的。

2. 卵壳基因

蚕的卵壳具有复杂但规则的膜状构造。家蚕的卵壳蛋白基因是一群构成卵壳的结构蛋白基因, 它包括早期、中期、晚期卵壳蛋白基因在内共有 200 余个, 是一个庞大的基因族。这些基因根据其编码蛋白所司功能, 可分为 A、B、C、Hc-A 和 Hc-B 5 个族。卵壳基因结构的基本单位是基因对, 二个不同族的基因构成一个基因对, 反向同步转录。表达的功能单位可能是基因对或多个同步表达的基因对的一段染色体区域, 成对基因间的 5' 侧翼

序列对这种特异性表达调节起重要作用。家蚕卵壳蛋白基因启动子结合因子已鉴定的有 BCF I 和 BCF II。卵壳蛋白反义 RNA 对卵壳基因转录控制的研究也在进行。

3. 抗菌肽基因

蚕抗菌肽的基因工程研究已取得了很大进展。注射大肠杆菌、聚肌胞核苷酸、2', 5'-寡腺苷酸、菊酯类微量农药、超声波、热空气及 γ -射线等均能诱导柞蚕、家蚕、蓖麻蚕及某些昆虫产生各自的抗菌肽。天蚕、柞蚕及家蚕抗菌肽的氨基酸一级结构有很大程度的同源性, 按其结构大致可分两群, 以 cecropin D 为主的一群诱导产量多而杀菌活力稍低; 而 cecropin A 为主的一群则诱导量少而活性较高。抗菌肽具有广谱的杀菌作用。美国已应用人工合成的天蚕抗菌肽基因导入酵母中表达, 已获得天蚕抗菌素 (cecromycin) 可用于外伤敷用及食品、饲料的保鲜。人工合成柞蚕抗菌肽 D 基因转入根癌农杆菌的试验已成功。天蚕抗菌肽 B 基因转入马铃薯, 已获得抗青枯病的植株。抗菌肽基因导入水稻原生质体选育抗白叶枯病新品种的研究也正在进行中。蚕抗菌肽基因工程可能为选育抗病的动植物品种开辟一条新的途径 (黄自然等, 1992)。

4. 其他基因

其他已克隆分析的蚕的基因包括 30kp 基因、丝腺核糖体 RNA 和转移 RNA 基因、贮藏蛋白基因、滞育激素基因、卵特异蛋白基因、热激蛋白基因、肌动蛋白基因、泛激素基因、溶菌酶基因、羽化激素基因、蚕脑肽 (蚕素) 基因、凝集素基因、幼虫表皮蛋白基因、胸节基因、促前胸腺素基因等。

四、蚕生物技术其它领域的研究

家蚕卵的核移植技术的开发可作为有用性状导入的一个有用技术。1987 年小林等还开发了精母细胞移植的性状导入技术, 这种

调控昆虫生长与发育的内分泌体系

顾世红

(台湾中央研究院动物研究所)

调控昆虫蜕皮与变态的所谓的中心法则,早在近 50 年前就已确立。根据这一中心法则,昆虫体内蜕皮激素的升高引起蜕皮过程的发生,蜕皮后所产生的个体之性质是由保幼激素(JH)之量所决定(即 JH 多,幼虫蜕皮;JH 少,化蛹蜕皮;没有 JH,蛹变成虫之蜕皮)。笔者从家蚕中所产生的一种隐性三眠蚕突变系-rt 的内分泌体系之研究中发现,蜕皮激素之微量变化才是幼虫转变成蛹的决定因素,低浓度的蜕皮激素引起了最后一龄幼虫期 JH 之下降从而诱导了从幼虫到蛹的转变。

前 言

波兰的一位昆虫生理学家 Kopec 在 1917 年利用一种蛾类昆虫的最后一龄幼虫,

进行了一系列的结扎实验后发现,幼虫的脑是其进行变态所必须的,尽管他的研究在当时没有受到很大的重视,但是在以后的几十年的研究中,终于发现了这一研究结果揭开

方法加上生殖巢的冻结保存,就可以实现在世代不同的个体间交配,从而开发一种新的育种技术。蚕的遗传资源中保存着多种多样的性状,通过导入新的性状,可以创造出具有新的机能的蚕,如具有特细纤度茧丝及广食性蚕品种的育成,这些蚕可作为生物技术研究素材的重要宝库。家蚕的一些转座因子的发现,如类反转录病毒转座因子、类 copia 转座因子、核糖体 DNA 插入因子、Bm1 因子、k1.4 因子等,为建立有效的家蚕转基因技术创造了良好条件。

五、今后的展望

蚕是基础生物学领域的优良实验昆虫,也是一种利用价值很高的经济昆虫。随着家蚕 NPV 载体表达系统研究的进一步深入,相信利用该系统生产的有用蛋白种类将不断增多,达实用化的程度也将不断扩大,并日益显示其重要性。家蚕有其几千年人工驯养的历史,现在已完全具备工厂化大批饲养的条

件,生活周期相对又较短,所以作为有用蛋白生产的大型“发酵罐”确实是价廉物美,其发展前景是非常诱人的。

蚕的生物技术为开发新蚕品种、新育种素材创造了良好条件。应用重组 DNA、细胞融合、细胞核移植等新技术,人为扩大遗传变异,开发新的育种素材。如为了扩大新用途,要考虑育成适于西服领域的素材,育成极粗纤度、粗纤度、细纤度、极细纤度的蚕品种,引入天蚕的丝素基因以改良家蚕茧丝的性能,育成广食性、具抗性(如抗病、抗高、低温)的基础蚕品种以及具有特殊生理、生态特性的蚕品种等。

蚕生物技术的广泛应用,有赖于对生物学基础理论的进一步研究,在细胞生物学和发生生物学领域要掌握和了解充分的知识。蚕基因的表达和调控、性状的导入和导入性状的充分表达技术的研究,无疑将会为蚕业这一古老的传统产业增添新的内容,展示其崭新的发展前景。