

密级：

论文编号：

中国农业科学院 学位论文

家蚕无鳞片翅突变体 *scaleless* 产生机理的研究

**Studies on the mechanisms of the scaleless wings mutant in the
silkworm, *Bombyx mori***

博 士 研 究 生：周庆祥

指 导 教 师：张志芳 研究员

申 请 学 位 类 别：农学博士

专 业：特种经济动物饲养

研 究 方 向：昆虫发育生物学

培 养 单 位：蚕业研究所

研究生院

提交日期 2007 年 6 月

Secrecy:

No.

Chinese Academy of Agricultural Sciences
Ph.D Dissertation

**Studies on the mechanisms of the scaleless wings mutant in the
silkworm, *Bombyx mori***

Ph.D Candidate: Qingxiang Zhou

Advisor: Prof. Zhifang Zhang

Major: Rearing of Special-type Economic Animals

Specialty: Developmental Biology

Chinese Academy of Agricultural Sciences

June 2007

中 国 农 业 科 学 院

博士学位论文评阅人、答辩委员会名单表

论文题目	家蚕无鳞片翅突变体 <i>scaleless</i> 产生机理的研究					
论文作者	周庆祥	专 业	特种经济 动物饲养	研究方向	昆虫发育生物学	
指导教师	张志芳		培养单位(研究所、中心)		蚕业所	
姓名	职称	硕(博) 导师	单 位	专 业	签 名	
评 阅 人	硕博连读生学位论文由研究生院统一组织盲评。					
答 辩 主 席	朱 江	教 授	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	苏州大学生命科学院	蚕分子生物学	朱江
答 辩 委 员	贡成良	教 授	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	苏州大学生命科学院	蚕分子生物学	贡成良
	陈永昌	教 授	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	江苏大学医学院	分子生物学	陈永昌
	何家禄	研究员	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	中国农科院蚕业所	分子生物学	何家禄
	郭锡杰	研究员	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	中国农科院蚕业所	蚕分子病理学	郭锡杰
	沈兴家	研究员	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	中国农科院蚕业所	蚕分子生物学	沈兴家
	沈中元	研究员	硕导 <input checked="" type="checkbox"/> 博导 <input type="checkbox"/>	中国农科院蚕业所	蚕病理学	沈中元
			硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input type="checkbox"/>			
会议记录(秘书)		任永利				
论文答辩时间地点		2007年6月19日上午, 江苏镇江				

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：

时间： 年 月 日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

论文作者签名：

时间： 年 月 日

导师签名：

时间： 年 月 日

摘 要

翅面被覆鳞片是鳞翅目昆虫的主要特征之一；鳞片对于鳞翅目昆虫具有重要的生理意义，而鳞片构成的各种翅面图案具有特定的发育机制和进化模式，因此鳞翅目昆虫的鳞片在昆虫生理学、发育生物学以及生物进化，甚至害虫防治上都具有重要的研究价值。本文以家蚕无鳞片翅突变体 *scaleless* (*sl*) 为材料，从形态学、细胞生物学和分子生物学角度对突变体的产生机理进行了研究，力图阐明无鳞片翅突变表型的发生机理；并为鳞翅目昆虫鳞片的发育机制提供理论参考。

首先从探明家蚕翅的生长发育机制入手，调查了五龄幼虫及蛹期翅原基（翅）的大小和形态变化，并建立了翅原基摘除和移植技术，为论文的深入研究提供实验和理论基础。翅原基在五龄前期生长缓慢，变态前生长最快；蛹期翅芽大小基本不变，但伴随有鳞片的形成和色素沉积过程。家蚕幼虫期的造血器官紧密附着在翅原基上，形成造血器官-翅原基复合体。五龄早期将 4 个造血器官-翅原基复合体全部摘除，家蚕幼虫仍能正常生长并发育成蛹和具有交配及产卵能力的蛾；同时其发育过程中血球总数仍呈增长趋势，但是明显低于正常蚕，由此推测化蛹变态中造血器官的崩解是变态的结果而不是其必要因素。全部造血器官-翅原基复合体摘除后配合使用 MH 或 JHA 均会增加熟蚕体内的血球数量，认为保幼激素在造血器官-翅原基复合体全部摘除的蚕体内有促进血球有丝分裂的作用。

运用建立的翅原基（翅）解剖技术，分析了家蚕突变体 *scaleless* 的表型性状，发现其成虫翅面鳞片明显比野生型（WT）的少，并且所具有的少量鳞片比野生型的小且分叉少。五龄幼虫翅原基的相互移植实验证明决定这一突变性状的调控因子不存在于体液中，而是存在于翅原基自身内部。化蛹前 *scaleless* 的翅原基与 WT 的在形态和结构上没有明显差异，化蛹后 WT 家蚕的翅脉开始出现气管分叉并延伸进入翅面，2 d 蛹时已经可以看到翅脉之间的气管相互交织形成网状；但是 *scaleless* 家蚕蛹的翅脉中气管分叉少并且延伸不良。蛹期经过高氧分压处理可以部分挽回 *scaleless* 家蚕翅面的鳞片，使其成虫翅面鳞片明显增多。在幼虫五龄早期的翅原基表面划一道浅的刻痕使翅脉受伤，亦可形成成虫翅面鳞片少的表型。因此我们推测翅原基的翅脉中气管发育异常致使翅面细胞缺氧是导致 *scaleless* 鳞片变少的一个重要原因。

进一步实验阐明了 *scaleless* 突变体家蚕细胞生物学方面的产生机理。AO/EB 染色及 Caspase-3/7 活性分析结果显示在蛹的早期，翅面鳞片的发育伴随有细胞凋亡的参与。2 d 时大量翅面细胞凋亡，存活的细胞则整齐地排列在翅的表面。*scaleless* 家蚕不同于野生型，其翅面大量细胞凋亡现象比 WT 出现的晚 1 天，且翅面细胞几乎全部死亡；并且 Caspase-3/7 的最大活性相当于 WT 的近 10 倍。同时有关凋亡小体和 DNA 片段化的实验结果也说明 *scaleless* 蛹期翅面细胞过度凋亡，从而产生了成虫翅面少鳞片的突变性状。

AS-C 基因与果蝇背板刚毛的发育有关；AS-C 的同源体基因（ASH）*B-ASH1* 也控制着蝴蝶翅面鳞片的形成。为了从分子生物学角度阐明家蚕 *scaleless* 突变体的产生机理，克隆并鉴定了家蚕的 AS-C 同源体基因。发现家蚕至少有四个 ASH 基因，分别命名为 *Bm-ASH1*、*Bm-ASH2*、*Bm-ASH3* 和 *Bm-ase*；四个基因均具有明显的 bHLH 基序，并且前三个基因编码的蛋白质的 C-端也具有 16~17 个氨基酸组成的保守区，这些都符合 AS-C 同源体基因的特点。同源性比较和进化分析说明三

个原神经基因中 *Bm-ASH1* 是最早分化形成的一个; *Bm-ASH2* 和 *Bm-ASH3* 同源性最高, 推测相对于 *Bm-ASH1* 形成较晚。用 RT-PCR 和实时荧光定量 PCR 检测了家蚕 *ASH* 基因在幼虫期不同组织器官及胚胎发育过程中的表达情况, 发现 *Bm-ASH1* 和 *Bm-ASH2* 表达范围最广, 胚胎发育过程中也有较高的表达量; 而 *Bm-ASH3* 表达特异性相对较高, 因此推断其形成较 *Bm-ASH2* 为晚, 即 *Bm-ASH3* 是四个家蚕 *ASH* 基因中最晚形成的一个。*ase* 基因主要在神经前体细胞中表达, 因此 *Bm-ase* 表达范围较窄, 组织中总体表达量较低。但同源比较和功能分析都不能将家蚕的三个原神经基因和果蝇的一一对应, 因此其命名依然按照发现的先后顺序进行。

通过半定量 RT-PCR 发现家蚕的吐丝期和蛹期, *Bm-ASH1* 和 *Bm-ASH3* 基因在 *scaleless* 和 WT 家蚕中的表达时相几乎一致; *Bm-ASH2* 只在 0 d~2 d 的 WT 蛹翅中表达, 而 *scaleless* 中没有检测到表达信号。原位杂交结果也证明 *Bm-ASH2* 在 *scaleless* 蛹翅中不能正常表达。将 WT 及 *scaleless* 的 *Bm-ASH2* 基因起始密码子上游的启动子序列克隆并测序, 发现 *scaleless* 的 ATG 上游 1 027 bp 处有一段连续 26 bp 的缺失突变。利用家蚕细胞瞬时表达系统分析了 *Bm-ASH2* 基因启动子活性, 发现 *scaleless* 比 WT 低得多, 只与截去了其缺失的 26 bp 的 979 bp WT 启动子片段的活性相当。EMSA 结果显示 *scaleless* 缺失的 26 bp 序列可以特异性结合某种核蛋白。遗传学实验则证明 26 bp 序列缺失与无鳞片翅突变表型紧密连锁。这些都说明 *scaleless* 的 *Bm-ASH2* 基因因启动子突变而使其不能正常转录和表达。利用瞬时表达系统使 *Bm-ASH2* 基因在 *scaleless* 早期蛹翅中表达, 可以使翅面鳞片明显增多, 进一步说明 *Bm-ASH2* 是家蚕翅面鳞片产生的关键因子。从而初步阐明了家蚕无鳞片翅突变体 *scaleless* 产生的分子机理。

关键词: 家蚕, *scaleless* 突变体, 翅原基, 鳞片, 产生机理

Abstract

The coating of scales on the surface of the wings is a basic characteristic of lepidopteran adults. Wing scales have important physical function to Lepidoptera, and patterns formed by multicolored scales not only have specifically developmental mechanisms, but also are a key innovation during lepidopteran evolution. So lepidopteran wing scales are valuable for the studies of insect physiology, developmental biology, biologic evolution, and even pest control. In this thesis, we studied the silkworm scaleless wings mutant (*scaleless*, *sl*) on morphological, cell biological and molecular biological levels, and tried to clarify the mechanism of the mutant and offer references for the studies on the development of lepidopteran wing scales.

We carried out our studies beginning with the development of the wing discs/wings, in size and shape, during the 5th instar larval and pupal period. We found that the wing disc grew slowly in the prophase of the larva, while very fast just before metamorphosis. We also found that pupa was a period of the wing buds perfecting, with wing scale formation and pigmentation. Hemopoietic organ is located tightly near or attach to the imaginal wing disc in the silkworm, *Bombyx mori*, and the two kinds of organs are customarily called by a joint name as hemopoietic organ-wing disc complex. We successfully extirpated the complexes of 5th instar larvae, and found that even when all of the complexes were extirpated, majority of the silkworms could still develop into moths normally. Using this technique, we studied the effects of the extirpation on the hemopoiesis of the silkworm, by investigating the change of density and total of hemocytes circulating in the final instar larval hemolymph. We found that mitosis could offer enough hemocytes for the development of the silkworms whose complexes were totally extirpated. And the collapse of the hemopoietic organs during wandering might be a consequence of metamorphosis, but not a prerequisite for pupation. Exogenous hormones could elevate the mitosis of circulating hemocytes in complexes totally extirpated silkworm; and during early spinning stage, complexes extirpation might cause a certain extent hemopoietic compensation of the remainders. The feasibility of the silkworm wing discs growing and developing in exotic site was proved by reciprocal transplantation technique. The results afforded us the background for the following studies.

We investigated the morphology of *scaleless* and found that it had many fewer wing scales than wild type (WT), and that the remaining scales were smaller in shape with fewer furcations. Reciprocal transplantation of wing discs between *scaleless* and WT revealed that the WT wing disc could develop into a small wing with scales after transplantation into a *scaleless* larva; however, the *scaleless* wing disc developed into a small wing without scales in a WT larva. Upon dissection of WT and *scaleless* wing discs at different stages from the fifth instar larva to adulthood, no obvious differences were found before pupation. However, after pupation, tracheae produced from WT wing veins extended to the lacunae between the veins and formed a network on the second day after pupation, whereas this did not

happen in *scaleless*. At the same time, no marked difference of the adult body tracheal development was found between the mutant and wild type. Furthermore, if the surface of a wing disc was cut and its veins injured, the resulting wing also had fewer scales than that of WT. Also, we found that higher partial pressure of O₂ could rescue the loss of scales in *scaleless*. These data suggest that the factors affecting the growth of scales were not produced in the hemolymph, but in the wing disc itself. It is also implied that wing scale development is dependent on the correct organization of tracheal system in the wing disc.

We gave data to clarify the mechanism of the mutation of *scaleless* at the cell biological level. The results of AO/EB dying and Caspase-3/7 analysis showed that programmed cell death participates in the wing scale development during early pupal stage. On 2d, well ranged cells could be seen on the pupal wing, surrounded with vast dead ones. There were significant differences between that of *sl* and the wild type (WT) at each phase. Well-differentiated scale precursor cells did not form in *sl* when they had formed in WT. The peak of Caspase-3/7 activity in *sl* occurred one day later than, and ten times as much as that in WT. Apoptotic bodies and DNA ladder studies also showed that there was excessive apoptosis in *sl* early pupal wing.

AS-C (*achaete-scute* Complex) genes are associated with the development of *Drosophila* notum bristles, and a homolog of *AS-C* (*ASH*), *B-ASH1*, controls the formation of butterfly wing scales. In order to clarify the mechanism of the scaleless wings mutation of *sl* at the molecular level, we cloned and analyzed the *AS-C* homolog in *Bombyx mori*. Four genes, *Bm-ASH1*, *Bm-ASH2*, *Bm-ASH3* and *Bm-ase* were cloned, and the proteins coded by the four genes had a typical bHLH motif each, and the former three also each had a 16-17 aa conservative region at the C-terminal. All of these indicated the four genes according with the characteristic of *AS-C* homolog. Homologous comparison and evolutionary analysis showed that *Bm-ASH1* formed earliest among the three preneural genes; while *Bm-ASH2* and *Bm-ASH3* were mostly homologous, and might both occur later than *Bm-ASH1*. We investigated the expression level in various larval organs and different embryo developmental ages using RT-PCR and realtime quantitative PCR methods. *Bm-ASH1* and *Bm-ASH2* were expressed in most of the organs and had a high expression level in proper embryo ages. *Bm-ASH3* was more differential, so we deduced it formed at the most near time and gained special function. *Bm-ase* was also more special and the detected expression level was low. But neither homologous comparison nor functional analysis could correspond the three *Bombyx* preneural genes to those of *Drosophila*, so we still named the genes after their discovered order.

Both of the results of semi-quantative RT-PCR and *in situ* hybridization showed that *Bm-ASH2* gene expressed abnormal in *scaleless* pupal wing. The gene expressed highly in 0 d-2 d WT pupal wing, but very low in *scaleless*. Sequencing results showed that there was a continuous absent mutation of 26 bp, 1 027 bp upstream of *Bm-ASH2* initial code in *scaleless* genome. The transcriptional activity of

scaleless's *Bm-ASH2* promoter was much lower than that of the WT, just the same as the truncated 979 bp promoter segment of WT without the 26 bp. EMSA result indicated that the 26 bp had a special binding nuclear protein. Genetic experiments also showed that the 26 bp sequence absent was tightly linked with the *scaleless* wings mutated phenotype. All of the results proved that the mutation in *scaleless*'s *Bm-ASH2* promoter caused the failure of *Bm-ASH2* gene's transcription and translation. If artificially made the *Bm-ASH2* gene expressed in early *scaleless* pupal wing with immediate expression system, the wing scales on the adult wing were increased significantly. So *Bm-ASH2* gene is a key regulator for the formation of silkworm wing scales.

Key words: *Bombyx mori*, scaleless wings mutant, wing disc, wing scale, mechanism

目 录

第一章 引 言	1
1.1 国内外研究现状（文献综述）	1
1.1.1 完全变态昆虫的成虫盘之一 —— 翅原基	1
1.1.2 鳞翅目昆虫的翅面鳞片	2
1.1.3 果蝇刚毛的发育	3
1.1.4 <i>achaete-scute</i> 复合体 (AS-C) 及其同源体 (ASH)	5
1.1.5 氧气供应与鳞片发育的关系及气管发生的调控机制	7
1.1.6 家蚕血球的生成机理	8
1.2 研究目的和意义	11
1.2.1 研究目的	11
1.2.2 研究意义	11
1.3 研究内容	12
1.3.1 家蚕翅原基发育规律的研究及翅原基摘除、移植技术的建立	12
1.3.2 家蚕无鳞片翅突变体 <i>scaleless</i> 的形态学分析	12
1.3.3 家蚕无鳞片翅突变体 <i>scaleless</i> 蛹期翅面细胞凋亡研究	12
1.3.4 家蚕 AS-C 同源体基因的克隆、鉴定与分析	12
1.3.5 家蚕无鳞片翅突变体 <i>scaleless</i> 形成的分子机理	13
第二章 家蚕翅原基发育规律的研究	14
2.1 材料与方法	14
2.1.1 家蚕	14
2.1.2 翅原基的解剖与测量	14
2.1.3 翅原基的摘除实验	15
2.1.4 翅原基的移植实验	15
2.2 结果	15
2.2.1 五龄幼虫及变态过程中翅原基的大小变化	15
2.2.2 家蚕五龄幼虫翅原基及蛹期翅芽形态的变化	16
2.2.3 家蚕翅原基的摘除	17
2.2.4 家蚕翅原基的移植	18
2.3 讨论	19
第三章 造血器官-翅原基复合体摘除对家蚕造血功能的影响	21
3.1 材料与方法	21
3.1.1 家蚕	21
3.1.2 造血器官-翅原基复合体的摘除	21
3.1.3 造血器官-翅原基复合体全部摘除后家蚕幼虫的外源激素处理	22
3.1.4 血细胞记数	22
3.2 结果	22

3.2.1 全部造血器官-翅原基复合体摘除后家蚕的发育情况.....	22
3.2.2 造血器官-翅原基复合体全部摘除对家蚕五龄幼虫体内血球数的影响.....	23
3.2.3 外源激素对 4HWC 家蚕体内血球数的影响	23
3.2.4 摘除不同数量翅原基对熟蚕体内血球数的影响	24
3.3 讨论.....	25
第四章 家蚕无鳞片翅突变体 <i>scaleless</i> 的形态学分析	27
4.1 材料与方法.....	27
4.1.1 家蚕	27
4.1.2 突变体 <i>scaleless</i> 与野生型家蚕翅（翅原基）的形态比较.....	28
4.1.3 突变体 <i>scaleless</i> 与野生型家蚕之间翅原基的解剖及相互异位移植.....	28
4.1.4 翅原基受伤对鳞片和翅发育的影响.....	28
4.1.5 高氧分压处理蚕蛹.....	28
4.1.6 气管丛的解剖.....	29
4.2 结果.....	29
4.2.1 WT 与 <i>scaleless</i> 成虫翅的形态比较	29
4.2.2 WT 与 <i>scaleless</i> 家蚕间的翅原基相互异位移植	30
4.2.3 WT 与 <i>scaleless</i> 家蚕五龄幼虫翅原基及蛹期翅芽的解剖与观察.....	30
4.2.4 翅原基表面划痕和主气管切断对鳞片和翅发育的影响	31
4.2.5 高氧分压对翅面鳞片发育的影响.....	32
4.2.6 无鳞片翅突变体 <i>scaleless</i> 与野生型家蚕气管系统的比较.....	33
4.3 讨论.....	33
第五章 家蚕无鳞片翅突变体 <i>scaleless</i> 蛹期翅面细胞凋亡研究	35
5.1 材料与方法.....	36
5.1.1 家蚕	36
5.1.2 吖啶橙/溴化乙锭（Acridine Orange/Ethidium Bromide, AO/EB）和 Hoechst 染色	36
5.1.3 Caspase-3/7 活性检测	36
5.1.4 DNA 片断化检测.....	37
5.2 结果.....	37
5.2.1 AO/EB 染色结果表明 <i>scaleless</i> 蛹翅面细胞在发育过程中大量死亡	37
5.2.2 Caspase-3/7 活性检测结果表明翅面上的细胞死亡是由凋亡引起的	39
5.2.3 <i>scaleless</i> 蛹翅中凋亡小体和 DNA 片段化现象明显	40
5.3 讨论.....	40
第六章 家蚕 AS-C 同源体基因的克隆、鉴定与功能分析	42
6.1 材料与方法.....	42
6.1.1 家蚕	42
6.1.2 菌种与质粒.....	42
6.1.3 总 RNA 抽提	42
6.1.4 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳.....	43

6.1.5 反转录 PCR (RT-PCR)	44
6.1.6 cDNA 末端快速扩增 RACE (SMART-RACE cDNA amplification kit, Clontech)	44
6.1.7 质粒 DNA 少量抽提	45
6.1.8 DNA 和 RNA 浓度测定	45
6.1.9 质粒 DNA 的限制性内切酶反应	45
6.1.10 DNA 电泳和 DNA 胶回收	46
6.1.11 DNA 连接	46
6.1.12 大肠杆菌感受态细胞的制备	46
6.1.13 质粒 DNA 或连接产物的转化	47
6.1.14 重组质粒的鉴定	47
6.1.15 家蚕基因组 DNA 的制备 (赵巧玲等, 2000)	47
6.1.16 Southern 杂交	48
6.1.17 实时荧光定量 RT-PCR (Realtime Quantitative RT-PCR)	49
6.1.18 DNA 和蛋白质序列的比对及进化分析	50
6.1.19 本章所用 PCR 引物列表	50
6.2 结果	51
6.2.1 家蚕 AS-C 同源体基因 <i>Bm-ASH1</i> cDNA 的克隆	51
6.2.2 家蚕 AS-C 同源体基因 <i>Bm-ASH2</i> 、 <i>Bm-ASH3</i> 及 <i>Bm-ase</i> cDNA 的克隆	52
6.2.3 家蚕 <i>ASH</i> 基因与其他昆虫 <i>ASH</i> 基因的同源性比较	55
6.2.4 昆虫 <i>ASH</i> 基因的进化分析	57
6.2.5 家蚕 <i>ASH</i> 基因在不同组织中的表达分布	58
6.2.6 家蚕 <i>ASH</i> 基因在胚胎发育过程中的表达时相	59
6.2.7 家蚕 <i>ASH</i> 基因结构分析	61
6.3 讨论	63

第七章 家蚕无鳞片翅突变体 *scaleless* 形成的分子机理的初步探讨 69

7.1 材料与方法	69
7.1.1 家蚕	69
7.1.2 菌种与质粒	70
7.1.3 半定量 RT-PCR	70
7.1.4 原位杂交	70
7.1.5 昆虫细胞操作	72
7.1.6 DNA 点突变的引入	73
7.1.7 质粒 DNA 的大量抽提	73
7.1.8 家蚕蛹翅核蛋白抽提 (Blough et al., 1999; Feng et al., 2000)	74
7.1.9 凝胶阻滞分析	75
7.1.10 DNA 碱性电泳	78
7.1.11 质粒介导的功能基因在家蚕蛹翅中的过量表达	78
7.1.12 本章所用引物和寡核苷酸序列列表	78
7.2 结果	80
7.2.1 家蚕 <i>ASH</i> 基因在翅原基和蛹翅中的表达时相	80
7.2.2 家蚕 <i>Bm-ASH1</i> 和 <i>Bm-ASH2</i> 基因在家蚕蛹翅中的表达分布	80
7.2.3 家蚕 <i>Bm-ASH2</i> 基因启动子活性分析	83

7.2.4 突变体家蚕 <i>Bm-ASH2</i> 基因启动子缺失区段与核蛋白结合实验	87
7.2.5 家蚕突变体 <i>scaleless</i> 的遗传学分析.....	87
7.2.6 家蚕 <i>Bm-ASH2</i> 基因在 <i>sl</i> 蛹翅中过量表达对蛾翅表型的影响	88
7.3 讨论.....	91
第八章 结 论	94
参考文献	97
致谢	106
作者简历	107

英文缩略表

英文缩写	英文全称	中文名称
Ag	<i>Anopheles gambiae</i>	疟蚊
Am	<i>Apis mellifera</i>	意大利蜜蜂
AO/EB	Acridine Orange/Ethidium Bromide	吖啶橙/溴化乙锭
AS-C	<i>achaete-scute</i> complex	<i>achaete-scute</i> 复合体 (<i>ac/sc</i> 复合体)
ASH	<i>achaete-scute</i> homolog	AS-C 的同源体
Asp	<i>Archispirostreptus</i>	非洲巨马陆
bHLH	basic helix-loop-helix	碱性螺旋-环-螺旋
Bm	<i>Bombyx mori</i>	家蚕
BW	body wall	体壁
ch	chordotonal organ	弦音器
Cn	<i>Hydra vulgaris cnidarian</i>	棕色水螅
Cs	<i>Cupiennius salei</i>	热带捕猎蛛
Dm	<i>Drosophila melanogaster</i>	黑腹果蝇
Dr	<i>Danio rerio</i>	斑马鱼
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay	凝胶电泳迁移率（凝胶阻滞）实验
es	external sensory organ	体表感觉器官
EST	Expressed Sequence Tag	表达序列标签
FB	fat body	脂肪体
FGF	fibroblast growth factor	纤维原细胞生长因子
FGFR	fibroblast growth factor receptor	纤维原细胞生长因子受体
G	gonad	生殖腺
Gg	<i>Gallus gallus</i>	红原鸡
H	head	头部
He	hemocyte	血球

hr3	homologous region-3	家蚕杆状病毒同源重复区 3
Hs	<i>Homo sapiens</i>	智人
HWC	hemopoietic organ-wing disc complex	造血器官-翅原基复合体
IE1	immediate-early gene 1 promoter	杆状病毒立即早期基因 1 启动子
JHA	juvenile hormone analogue	保幼激素类似物
Lf	<i>Lithobius forficatus</i>	欧洲蜈蚣
Luc+	<i>luciferase</i> gene	荧光素酶基因
M	<i>Mus musculus</i>	野生小家鼠
md	multiple dendritic neuron	多树突神经原
MG	midgut	中肠
MH	molting hormone	蜕皮激素
MT	malpighian tubule	马氏管
O	ovary	卵巢
ORF	open reading frame	开放阅读框
Pc	<i>Podocoryne carnea</i>	水母
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PNS	peripheral nervous system	外周神经系统
Pt	<i>Pan troglodytes</i>	黑猩猩
RACE	Rapid amplification of cDNA ends	cDNA 末端快速扩增
RLU	relative light units	相对光单位
S-G	silk gland	丝腺
<i>sl</i>	<i>scaleless</i>	家蚕无鳞片翅突变体
T	testis	睾丸
Tc	<i>Tribolium castaneum</i>	红粉甲虫（赤拟谷盗）
TC	tracheal cluster	气管丛
WD	wing disc	翅原基
WT	wild type	野生型
Xl	<i>Xenopus laevis</i>	非洲爪蟾

第一章 引言

1.1 国内外研究现状（文献综述）

1.1.1 完全变态昆虫的成虫盘之一 —— 翅原基

成虫盘是完全变态昆虫所具有的，发育为成虫个体相应器官的幼虫器官，在生物个体生长发育机制方面具有非常重要的研究价值。翅原基是完全变态昆虫的成虫盘之一，发育为成虫的翅。经过数千万倍的增长，翅原基最终会变为成虫的翅膀，在这一过程中一系列基因的程序性表达起着关键性作用（Jockusch and Nagy, 1997）。例如翅原基的前后轴（anterior/posterior axis, A/P）由 *engrailed* (*en*)、*hedgehog* (*hh*)、*decapentaplegic* (*dpp*) 等基因的时序和空间表达决定；背腹轴（dorso-ventral axis, D/V）的形成则与 *vestigial* (*vg*)、*wingless* (*wg*) 等基因表达有关。果蝇是生物界公认的模式昆虫，以其翅原基为研究对象的工作已经进行了很多，并且取得了很大的成果。但果蝇并不能代表昆虫纲的所有昆虫类型。鳞翅目昆虫的翅原基在昆虫翅发育的研究上有其自身的优越性（Kango-Singh et al., 2001）。家蚕是很好的鳞翅目模式昆虫（吕鸿声, 1991），其翅原基共有 2 对，分别位于第 2、第 3 胸节的两侧。家蚕翅原基的发育与激素等血液中的一些调控因子有关（Kawasaki and Iwashita, 1987a; Kango-Singh et al., 2001）。与翅相关的突变体，如家蚕的无翅突变体 *fl*, *rw* 和 *Vg* 等，是研究昆虫翅原基及翅发育的常用材料（Fujiwara and Hojyo, 1997）。应用翅原基在不同家蚕个体之间的相互移植技术，Hojyo and Fujiwara（1997）证明了控制 *fl* 无翅突变的调控因子不分泌到血淋巴中，而是存在于翅原基自身之中。

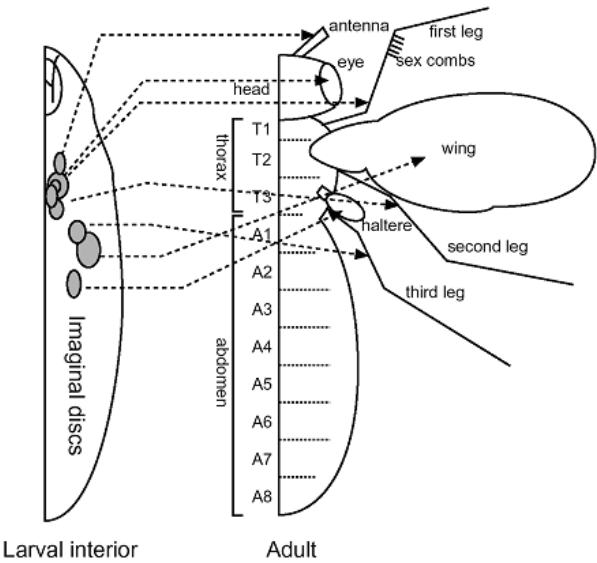


图 1.1 果蝇幼虫成虫盘及各自对应的成虫器官示意图。

Fig. 1.1 A sketch map for *Drosophila* imaginal discs and the corresponding adult organs.

1.1.2 鳞翅目昆虫的翅面鳞片

鳞翅目昆虫，无论蝴蝶还是蛾子，大部分种类都是成虫全身被覆鳞片，其中以翅面上的鳞片最具特色，这也是“鳞翅目”名称由来的主要依据。鳞片可以具有不同的颜色，从而形成形形色色的花纹和图案。这些花纹和图案并不是随机产生，而是有着特定的规范，它们不仅构成鳞翅目昆虫重要的保护色和拟态形式，还是昆虫进化过程中自然界不断选择的结果，因此昆虫翅面图案又是鳞翅目昆虫进化和分类学研究的重要依据（Galant et al., 1998）。鳞翅目昆虫的鳞片还能够吸收太阳能，帮助昆虫调节体温（Biro et al., 2003）。此外，鳞片的发育和翅面花纹的形成也是发育生物学的热点。

1. 成虫翅面鳞片的结构

鳞片个体很小，长度只有几微米到几十微米，因此只能在显微镜下才能看清楚。鳞片具有不同的形状，通常扁平而宽阔，顶部或有分叉，也有的鳞片为细长形或三角形。每一个鳞片的基部都有一个小柄，镶嵌在自己的鳞片白（scale socket）内，因此鳞片白的排列形式也就决定了鳞片的排列形式。将成虫翅面的鳞片洗净，显微镜下可以清楚地看到鳞片白均匀的排列在翅面上。然而，不同的昆虫种类鳞片的排列方式是各异的，有的平行排列，有的成簇排列，而更多的则是随机排列。但是所有正常的鳞片都是由翅基部到端部方向排列的，并且呈规则的覆瓦状。在高倍显微镜下可以看清鳞片的细微结构，每个鳞片上有很多与鳞片长轴平行的脊线，有的还被横线分成格子。鳞片有内外表面之分，脊线和横线就分布在外表面，内表面则平坦而无明显特点（Yoshida and Aoki, 1989; Simonsen, 2001）（图 1.2）。

根据显微结构，鳞片可以分为覆鳞（cover scale）和基鳞（basal scale or ground scale）两种类型。成虫翅的覆鳞通常比基鳞长，并且完全覆盖住基鳞；同时，在大多数昆虫种类中，覆鳞比基鳞具有更艳丽的色彩（Ghiradella, 1985; Nijhout, 1991）。从功能上看，鳞片又可以分为结构性鳞片（structural scale）和感觉性鳞片（sensory scale）。感觉性鳞片主要分布在翅脉附近和翅的边缘。鳞翅目昆虫翅上的感觉器官除了感觉性鳞片外还有感觉性刚毛（sensory bristle）和钟型感受器（campaniform sensilla）等（Yoshida et al., 2001）。

2. 鳞片的发生

鳞片（主要指结构性鳞片）在蛹期开始形成，蛹发育早期，鳞片前体细胞（scale precursor cell）

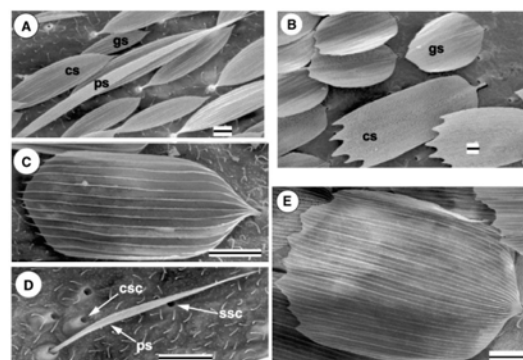


图 1.2 鳞翅目昆虫几种类型鳞片的显微结构。A. 蛱蝶科，B. 新蛱蝶科，C 和 D. 小蛱蝶科，E. 扇蛱蝶科；bar = 10 μ m。（引自 Simonsen, 2001）

Fig. 1. 2 Microstructure of several types of lepidopteran wing scales. A. Neopseustidae, B. Neotheoridae, C. Micropterigidae ground scale, D. Micropterigidae scale arrangement, E. Mnesarchaeidae.

进行第一次有丝分裂（这次分裂垂直于翅面）产生两个子细胞（daughter cell），其中背离翅面的一个死亡，而另一个则存活下来并且分化成与周围上皮细胞不同的类型。存活下来的子细胞成为多倍体而个体变大并进行第二次有丝分裂，产生鳞片构建细胞（scale-building cell）和鳞片白构建细胞（socket-building cell）。两次分裂结束后，鳞片构建细胞即开始产生一种长的指状突起，即初生鳞片（firstbirth scale），初生鳞片继续生长并最终形成鳞片（Nijhout, 1991; Galant et al., 1998）。

3. 鳞翅目昆虫的翅面图案（wing pattern）

前面已经提到，翅面图案（wing pattern）是鳞翅目昆虫的一种拟态形式，因此鳞翅目昆虫翅面图案在鳞翅目害虫防治上具有一定的研究前景。蝴蝶和蛾子翅面上五彩斑斓的花纹是不同色彩的鳞片有规则的排列形成的。但是鳞片并非生来就具有颜色，而是由色素沉积产生，这就是说未成熟的鳞片是无色的（Takayama and Yoshida, 1997; Takayama et al., 1997; Janssen et al., 2001）。色素的沉积发生在蛹的末期，大约从成虫羽化前 24 小时开始。不同种类的色素的沉积过程是连续的，而不是同时的；另外不同类型的色素对太阳能的吸收能力也有不同（Nijhout, 1991; Koch et al., 2000 a）。有些鳞片还具有荧光现象，荧光在覆鳞和基鳞上都可以发生（Kumazawa et al., 1996）。

许多鳞翅目昆虫的成虫翅面上都有大小、色彩不同的眼斑（eyespot），并且一些种类的突变体与野生型之间的眼斑在形态和所处位置上具有形式多样的差异。因此，眼斑成为鳞翅目昆虫翅面花纹研究的热点。经过多年的研究，科学家们已经阐明了许多种类眼斑的形成和决定途径，例如已知 *wingless* (*wg*)、*decapentaplegic* (*dpp*)、*distal-less* (*Dll*) 等与眼斑形成的部位有关（Brunetti et al., 2001; Carroll et al., 1994）。

4. 鳞翅目昆虫的鳞片和果蝇的刚毛

鳞翅目昆虫的鳞片（scale）与果蝇的刚毛（bristle）、爬行动物的鳞甲（scale or scute）、两栖类动物的外皮（skin）、鸟类的羽毛（feather）以及哺乳动物的毛发（hair or fur）等具有类似的结构和功能。形态学、细胞生物学、发育生物学和分子生物学都证明了鳞翅目昆虫的鳞片与果蝇的刚毛具有相同的起源（Overton, 1966; Overton, 1967; Galant et al., 1998）。而且在果蝇研究上已经取得了很多成果，可以借助来研究鳞翅目昆虫鳞片的发育机制。

1.1.3 果蝇刚毛的发育

果蝇的外周神经系统（peripheral nervous system, PNS）共有四种主要感觉器官：体表感觉器官（external sensory organ, es），弦音器（chordotonal organ, ch），多树突神经原（multiple dendritic neuron, md）和光感受器（photoreceptor）。果蝇的刚毛是体表感觉器官的代表，它的形成由一系列基因的程序性表达所调控。

1. 刚毛感觉系统的构成

每一个完整的刚毛感觉系统包括四个成员，即刚毛、白（槽）、神经元和神经鞘。刚毛由毛原细胞（trichogen）异化产生，位于体表；刚毛的基部镶嵌在由膜原细胞（tormogen）分化产生的白（socket）内。刚毛中还有神经细胞（neurone）的轴突插入，神经细胞由神经鞘细胞（thecogen）所扶持和保护（Ghysen and Dambly-Chaudiere, 1989; Ghysen and Dambly-Chaudiere, 1993）（图 1.3）。

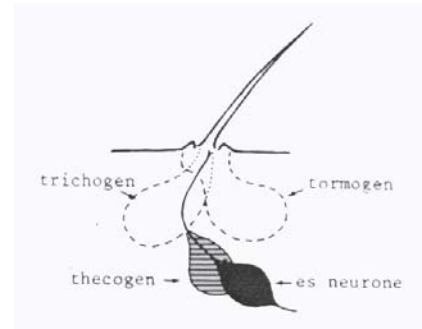


图 1.3 果蝇刚毛感觉系统的构成。（引自 Ghysen and Dambly-Chaudiere, 1989）

Fig. 1.3 Composition of bristle system.

2. 刚毛的形成

经过多年的研究，科学家们已经基本阐明了刚毛的发育机理，并建立了理论模型（Ghysen and Dambly-Chaudiere, 1989; Jan and Jan, 1994）（图 1.4）。刚毛发育的第一步是原神经基因（proneural gene）在前神经细胞簇（proneural cluster）中的表达，这类基因是具有 bHLH 结构域（basic helix-loop-helix domain）的一系列转录因子，如 *achaete* (*ac*)、*scute* (*sc*) 和 *lethal of scute* (*lsc*) 等。表达这类基因的细胞可以分化为神经前体细胞（neural precursor cell），因此前神经细胞簇的位置也就决定了将来体表感觉器官的位置（Cubas et al., 1991; Skeath and Carroll, 1991）。然而，并不是前神经细胞簇中的每一个成员，而是只有其中的一个或几个发育为感觉器官，其他细胞则朝着表皮细胞的命运发展。这些细胞进行互作，最终决定谁会存活下来。这一过程由 *Notch*、*Delta*、*big brain* 等一系列神经性基因（neurogenic gene）控制（Artavanis-Tsakonas and Simpson, 1991; Ghysen et al., 1993）。一旦神经前体细胞被确定下来，神经前体基因（neural precursor gene）和神经型选择基因（neural-type selector gene）就会在其中表达，前者主要决定神经性分化；后者则主要决定将来发育成的感觉器官的类型（Blochliger et al., 1988; Dambly-Chaudiere et al., 1992; Brand et al., 1993）。接下来前体细胞经过两次有丝分裂产生四个不同类型的细胞，四个子细胞进一步发育为特定的功能细胞，也就是前面提到的刚毛感觉系统的四个组成部分（Bodmer et al., 1989）。

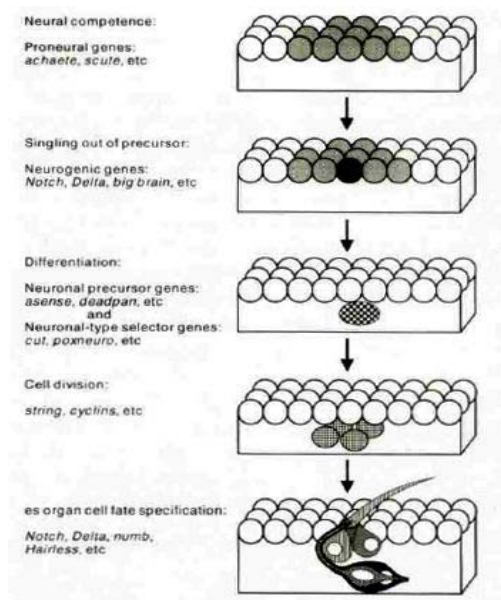


图 1.4 果蝇刚毛发育的理论模型。（引自 Jan and Jan, 1994）

Fig. 1.4 A model of bristle development.

至今在多种类型的动物中都克隆到了 *AS-C* 的同源体基因（*achaete-scute* homolog, *ASH*）。

1.1.4 *achaete-scute* 复合体 (AS-C) 及其同源体 (ASH)

AS-C 包括果蝇的四个关系密切的、对神经系统发育有重要作用的基因，它们都编码 bHLH 型的转录因子。这四个基因分别是 *achaete* (*ac*)、*scute* (*sc*)、*lethal of scute* (*l'sc*) 以及 *asense* (*ase*)，其中前三个属于原神经基因 (proneural gene)，*asense* 属于神经前体基因 (neural precursor gene)。很多动物中都克隆到了与 AS-C 功能类似的同源体基因，统称为 AS-C 同源体 (*achaete-scute* homolog, ASH) 基因 (Alonso and Cabrera, 1988; Johnson et al., 1990; Johnson et al., 1992; Ferreiro et al., 1993; Galant et al., 1998; Deblandre et al., 1999; Wheeler et al., 2003; Jonsson et al., 2004)。

1. AS-C 的基因结构

运用遗传学的手段，科学家们构建了 AS-C 的遗传图谱 (图 1.5)。从图谱可见，自左到右分别排列的是 *achaete* (*ac*)、*scute* α 、*lethal of scute* (*l'sc*)、*scute* β 和 *scute* γ 。其中 *lethal of scute* 位于 *scute* α 和 *scute* β 之间，如果这一段基因缺失会影响中枢神经系统的正常发育而导致胚胎死亡，故而得名。重组位点 (breakpoint) 越接近 *l'sc*，变异越大，果蝇会产生越少的刚毛 (Garcia-Bellido, 1979; Campos-Ortega, 1998; Usui et al., 2004)。随着分子生物学的发展，果蝇的全基因组被测序，并且构建了物理图谱。这段序列长约 100 Kb，位于 X 染色体的远端部。这段 DNA 总共可编码七个完整的基因，其中四个具有共同的保守结构，即 bHLH，也就是 AS-C 的四个家族成员 (Alonso and Cabrera, 1988; Martin-Bermudo et al., 1993; Modolell and Campuzano, 1998)。

当然，在如此长的 DNA 序列中还排列着很多顺式作用元件 (*cis-regulatory sequence*) (如图 1.5 中 Enhancers 所示)。正是这些顺式作用元件的存在，才使得每个基因会准确地适当的时间和位置进行表达 (Modolell and Campuzano, 1998; Gibert and Simpson, 2003)。

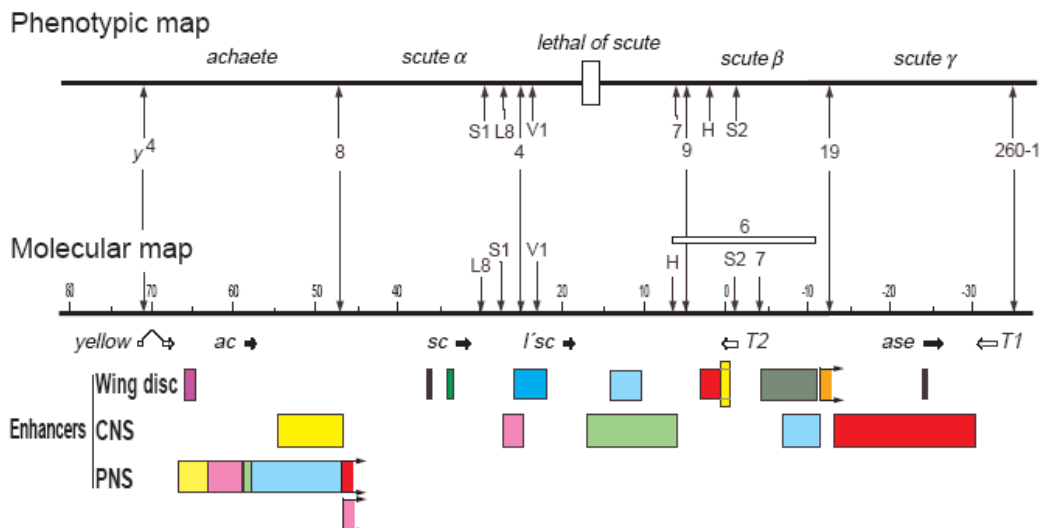


图 1.5 AS-C 的遗传图谱和物理图谱。朝上的箭头表示构建遗传图谱时与染色体重组相关的断裂点。简单起见，只用上标表示断裂点的名称 (即 S1 表示 *sc*^{S1})。常用的指示这些区域重组断裂点用向下的长箭头指示其在物理图谱中的位置。*sc*⁶ 区域 (位于 *sc* 下游的长约 17Kb 的序列) 用长方框表示。水平空白箭头表示转录本单位，实心箭头表示 AS-C 基因。(引自 Modolell and Campuzano, 1998)

Fig. 1. 5 The phenotypic and molecular maps of AS-C. Vertical arrows indicate the inferred order of the breakpoints associated with the chromosomal rearrangements used to construct the map. For simplicity, only the distinctive superindex has been indicated to name the breakpoints (so, «S1» means sc^{S1}). The names of the genetic regions are indicated. Rearrangements normally used to define these regions have long downwards arrows that point to the actual location of the breakpoints in the molecular map. Extent of the sc^6 deletion is indicated. Coordinates on the DNA line are in kilobase pairs. Under this line, thick horizontal arrows indicate transcription units. Filled arrows correspond to proneural genes.

2. AS-C 基因的表达调控

AS-C 的四个成员中, *ac* 和 *sc* 的关系最为密切, 它们可以共用一些调控元件。但是 *sc* 的顺式调控机制又比 *ac* 复杂的多。有些研究表明基因组中 *ac* 的序列 (T5) 和 *sc* 的序列 (T4) 在 *ac* 和 *sc* 的转录上是相互调控的; 但更多的研究则表明两者共用调控序列, 只是这一序列位于 *ac* 之中。*l'sc* 在成虫盘中几乎不表达, 它的顺式调控机制也是比较复杂的 (Campos-Ortega, 1998; Alonso and Cabrera, 1988)。小鼠的 *MASH1* 也有类似的顺式调控机制 (Johnson et al., 1992)。

刚毛是果蝇外周神经系统 (peripheral nervous system, PNS) 四种主要感觉器官的代表, 它的形成由一系列基因的程序性表达所调控, AS-C 在此过程中起中心作用。在神经发育过程中, AS-C 的四个基因起着不同的作用, 其中 *achaete* (*ac*)、*scute* (*sc*) 和 *lethal of scute* (*l'sc*) 属于原神经基因 (proneural gene), *asense* 属于神经前体基因 (neural precursor gene)。*ac/as* 编码的蛋白质可以与另一个原神经基因 *daughterless* 编码的 bHLH 型蛋白质 Da 结合形成异源二聚体以行使转录因子功能 (Martinez et al., 1993; Jan and Jan, 1994)。*ac*、*sc* 和 *ase* 的启动子区域都具有 E-box (5'-CANNTG-3'), 能够进行自调节。AS-C 基因表达还受到一些反式作用因子的调节。*extramacrochaetae* (*emc*) 编码的蛋白质 EMC 是具有 HLH 结构域的转录因子, 但不具有碱性区域 (basic domain), 从而可以与 *ac*、*sc* 等的表达产物竞争, 使其不能与 Da 正常结合, 从而抑制 AS-C 基因的表达 (Van Doren et al., 1992; Martinez et al., 1993; Gibert and Simpson, 2003)。*hairy* 是另一个对 AS-C 进行反式调节的基因, 编码的蛋白质也具有 bHLH 结构域, 但是它结合的是不同于 E-box 的其它位点, 可以结合在 AS-C 启动子上从而阻碍其正常转录 (Chen et al., 1997; Fisher and Caudy, 1998)。*emc* 和 *hairy* 被称为 “prepattern” 基因, 因为它们界定了前神经细胞簇 (proneural cluster) 的范围, 不表达 “prepattern” 基因的细胞共价组 (equivalence group) 就构成了前神经细胞簇。接下来是由 Notch 信号通路 (Notch signaling pathway) 介导的细胞互作, 使将来不分化为神经前体细胞 (neural precursor cell) 的前神经细胞中 AS-C 基因的表达都受到抑制 (Reed, 2004)。在这一通路中, *Enhancer of split* (*E(spl)*) 编码的蛋白因子起着关键性作用。神经前体基因 (neural precursor gene) 和神经型选择基因 (neural-type selector gene) 会在神经前体细胞中表达, 前者主要决定神经性分化, 而后者则主要决定将来发育成的感觉器官的类型。前体细胞经过两次有丝分裂产生四个不同类型的细胞, 四个子细胞进一步发育为特定的功能细胞 (Jan and Jan, 1994)。信号分子 (signalling molecular) Dpp 和 Wg 在维持 AS-C 基因的表达和调控 “prepattern” 基因的表达中也起着重要作用 (Calleja, 2002)。

1.1.5 氧气供应与鳞片发育的关系及气管发生的调控机制

氧气是生物体正常生长发育不可缺少的营养元素之一。翅原基的体外培养实验表明,当氧气分压较高时,翅原基生长较快,并且在95%O₂+5%CO₂下鳞片会比正常氧气分压下提前四天形成(Kawasaki and Iwashita, 1987b)。*B-ASH1*是鳞翅目昆虫*precis coenia*的*AS-C*同源体基因,它控制这鳞片的形成。但是在气管到达翅原基的边缘之前*B-ASH1*没有表达,可见其表达与氧气供应有关(Galant et al., 1998)。

在昆虫的翅脉当中,保护着神经和气管,其中的气管又会分出很多分支,最终以微气管到达组织器官的表面,以保证生物个体正常生长发育所需(Garcia-Bellido and de Celis, 1992; Roch et al., 1998; Samakovlis et al., 1996; Ebner et al., 2002)。气管是上皮管分枝网络的模型,与哺乳动物的血管和肺有着类似的结构(Metzger and Krasnow, 1999)。通过遗传筛选技术已经确认果蝇气管网络的形成与大约50个基因的表达有关。当气管细胞形成以后,延伸是气管网络形成的主要途径。气管的延伸主要受FGF信号通路(FGF signaling pathway)调控(Ghabrial et al., 2003)。首先气管细胞中*tracheiless*和*tango*基因共同编码的bHLH-PAS异源二聚体型转录因子和*ventral veinless* (*vvl*)编码的POU同源域转录因子启动纤维原细胞生长因子受体(fibroblast growth factor receptor, FGFR)Breathless(*Btl*)——一种跨膜受体酪氨酸激酶(RTKs)——的表达(Llimargas and Casanova, 1997)。同时,配体基因纤维原细胞生长因子(FGF) *branchless* (*bnl*)也进行表达,但它的表达不是发生在气管细胞中,而是在气管囊(tracheal sac)周围的表皮和外胚层细胞中。接下来,气管细胞向着FGF信号的中心迁移,形成一级分枝。然后*bnl*停止在原细胞中的表达,而是在更远的地方表达,气管分枝就向着新的FGF中心继续延伸。而*bnl*的表达主要受*decapentaplegic* (*dpp*)、*wingless* (*wg*)等轴向控制基因调控。在次级气管分枝过程中*bnl*和*btl*同样起着关键性作用,通过激活次级分枝基因*yan*和*pointed*促使次级分枝进行延伸;负调控基因*sprouty* (*spry*)则会阻断FGF信号通路从而限定分枝的继续延伸。在气管网络的最末端是终分枝气管,直接与组织细胞相连对其供氧。低氧可以促进终气管的形成,高氧则会阻碍其形成。原因是缺氧的细胞可以分泌气管形成信号,从而使终气管形成以到达其位置。研究表明这一信号就是Branchless (FGF)。*blistered*是气管末梢分枝的关键调节基因,在末梢分枝气管细胞中表达,受Branchless信号调节(Ghabrial et al., 2003; Petit et al., 2002; Zelzer and Shilo, 2000; Samakovlis et al., 1996)。

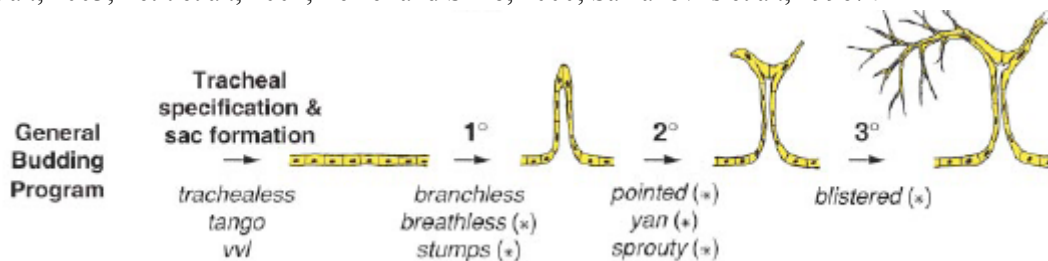


图 1.6 果蝇 (*Drosophila*) 气管发育示意图。星号 (*) 指示的基因的表达需要气管发育过程中较早表达的基因的诱导。数字表示气管的分级。(引自 Ghabrial et al., 2003)

Fig. 1.6 A sketch map of *Drosophila* tracheal development. Asterisks (*) indicate genes whose expression is triggered by genes that function in earlier steps in the program. The numbers indicate the grade of the trachea.

1.1.6 家蚕血球的生成机理

家蚕具有开放式的循环系统，各个器官直接沉浸在血液中。在家蚕幼虫的背中线上有一条背血管，习惯上称之为心脏，背血管通过伸缩运动来提供动力以维持血液循环。家蚕的血液存在着很多细胞，即血球细胞。而这些血球细胞又是由家蚕的造血器官产生并释放到血液中的，血液中的血球可以通过有丝分裂来进行增殖。我们知道，蚕蛾有两对翅，分别位于 2、3 胸节的两侧。蚕蛾的翅则由位于幼虫 2、3 胸节两侧的翅原基发育而来。造血器官就紧密附着在翅原基的内侧，共有四个。

1. 家蚕幼虫血球的类型

家蚕的幼虫共有五类血球细胞，即原白血球、浆细胞、颗粒细胞、小球细胞和拟绛色细胞。五种血球具有不同的形态特征：（1）原白血球是五种血球中最小的一种，圆形或卵圆形。它的表面光滑，没有粘性；细胞核大而明显，细胞质相对较少；（2）浆细胞是家蚕的保卫细胞，圆形、纺锤形或梨形，其中以纺锤形居多。新生的浆细胞与原白血球类似，很难将二者分辨清楚。浆细胞是一种有粘性的血球细胞；（3）颗粒细胞是家蚕的另一种保卫细胞，圆形或卵圆形，具有较强的吞噬作用和分泌功能。细胞核比较小，细胞质中有很多小颗粒，故而得名。这类血球具有粘性；（4）小球细胞为圆形或卵圆形，其最大的特性就是细胞质中具有 1~20 个明显的小球，从而致使细胞表面成波状突起。小球细胞不具有粘性；（5）拟绛色细胞，圆形或卵圆形，因为个体很大而习惯上常被称为巨大细胞。显微镜下可以看到气泡状的内含物。现在常用的血球分类方法，无论运用普通光学显微镜还是相衬显微镜或微分干涉显微镜，都是建立在这些形态特征基础之上的（森精, 1970; Nakahara et al., 2003）。

各类血球在家蚕体内的比例也不尽相同，一般认为颗粒细胞在血球中所占比例最高，五龄期可达血球总数的 50%~60%。拟绛色细胞则仅占血球总数的 1%左右。其他三种类型细胞居中（Nakahara et al., 2003; 浙江农业大学, 1991）。

家蚕幼虫体内的血球体积只占血液总容积的 0.034%~0.605%，但是数目很多，可达 $10^6 \sim 10^7$ 个/cm³。并且蚕体血液中的血球总数也会随龄期、营养、品种及环境等的不同而有很大的变化（板谷健吾, 1936）。

2. 家蚕幼虫的血球生成

家蚕的血球是由中胚层分化形成的，在很长的一段时期内，曾经有许多学者一直认为家蚕胚后生长发育所需的血球都是通过血球自身的有丝分裂来增殖的（Beaulaton, 1979）。到了 1964 年，Nittono 等（Nittono et al., 1964）用烫伤的方法证明了家蚕造血器官的造血功能，认为家蚕的血球主要是通过造血器官来增殖的，同时某些种类的游离于血液中的血球的有丝分裂又是这一过程的补充。家蚕血液中的血球数目与家蚕幼虫的发育阶段有很大关系，每龄初期血球数开始增多，而到龄末时会出现一个高峰以供蜕皮和变态所需（Sato and Akai, 1977）。

造血器官并不能产生所有种类的血球，一般认为只有原白血球和浆细胞是在其中合成并释放的 (Beaulaton, 1979; Nittono et al., 1964)。其中原白血球又被公认具有干细胞功能，可以分裂分化为其他类型的血球细胞 (Yamashita and Iwabuchi, 2001)。也有人认为浆细胞也具有多能性，可以分化成除原白血球外的其他三种血球 (Beaulaton, 1979)。

3. 家蚕的造血器官

家蚕的造血器官共有两对，分别位于幼虫第二、第三胸节两侧，紧密附着在翅原基内侧 (Beaulaton, 1979; Nittono et al., 1964)，因此两种器官习惯上被统称为造血器官-翅原基复合体。

蚁蚕的造血器官部位便产生了由 25~30 个细胞组成的细胞集团；孵化 48 小时后细胞数增至 45~50 个。而在第 1 次蜕皮前后已经有幼小的血球释放到家蚕的血液中。在 1~4 龄期，未分化的细胞均匀分布在造血器官内；但到五龄起蚕时，造血器官内则产生不同的囊胞，包裹着不同类型的血球细胞 (Sato and Akai, 1977)。

与其他器官一样，家蚕造血器官的生长也是受体内激素调节的，因此会随家蚕发育时期的不同而发生着很大的变化。在家蚕幼虫的每龄初期造血器官便开始增大，蜕皮期间会有很多血球从中释放出来并伴随有造血器官的部分崩坏。家蚕吐丝开始时，更多的血球陆续释放到血液中；待吐丝完毕之后，包被造血器官的被膜被完全崩坏，血球全部释放到血液中，造血器官也就此消失 (Sato and Akai, 1977; Akai and Sato, 1971)。可见从家蚕幼虫最后一次蜕皮到化蛹前是体内血球数变化最大的时期，因此对家蚕造血功能的研究一般都选择在这个时期进行。

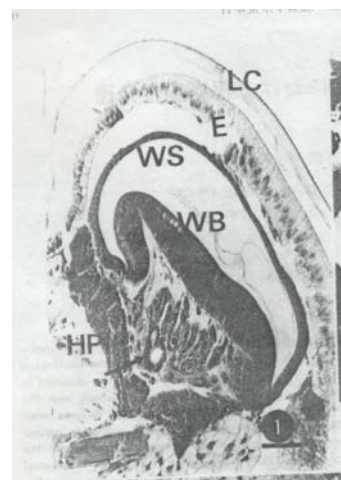


图 1.7 家蚕翅原基切面图。

Fig. 1. 7 A slice picture of silkworm wing disc. LC, larval cuticle; E, epidermis; WS, wing sack; WB, wing bud; HP, hemopoietic tissue.

4. 研究家蚕造血器官造血功能的常用方法

对造血器官的研究最早是通过组织学的手段进行的，因此当时只是推测附着在翅原基内侧的器官可能具有造血功能，但是实验生理学方面的研究很缺乏。后来有些学者开始设法通过破坏家蚕造血器官以研究其造血功能 (Nittono et al., 1964)，并且这一手段成为现在常用的研究方法之一。Nittono 等 (1964) 用烧红的针烫伤五龄第 2 天幼虫的造血器官-翅原基复合体，并通过观察处理后家蚕体内不同种类血球数的变化进行研究。他们观察到造血器官被破坏后家蚕体内的血球总数几乎不再增加，并且原白血球和浆细胞在血液内血球总数中的比例会下降；从而确证了家蚕造血器官的造血功能并推测造血器官只产生原白血球和浆细胞两种血球细胞。Nittono 等的这次实验是家蚕造血器官研究史上的经典实验之一，然而其不足之处在于，破坏造血器官的同时也会损伤周围的其他器官组织，从而使处理蚕的死亡率很高。另外也有人通过注射同位素来破坏家蚕的造血器官，但是这种方法也会造成造血器官外的组织器官的大面积损伤从而影响研究效果。

重离子束具有高能直线传递特性，并且对靶材料的照射范围是可以控制的。应用重离子照射技术，Tu 等 (2002) 研究了家蚕的造血器官。发现家蚕的造血器官被重离子照射后，蚕体内的血

球数明显少于没有照射的。徐世清等（2002）则用原位固定切片和体外悬滴培养的方法调查了重离子照射对家蚕造血器官的形态和血球分泌功能的影响。认为重离子照射后家蚕幼虫的造血器官被膜会逐渐解离，并且照射剂量越大解离越快；同时，重离子照射会显著降低造血器官的分泌能力和血球的生成能力。虽然重离子的射程是可以控制的，但是不同家蚕个体的大小是不同的，即造血器官与体表间的距离是有差别的。因此，在同一组实验中，必定有很多个体会因为射程相对太浅而使造血器官无法被理想破坏，或者因为射程相对太深而破坏前胸腺等器官进而影响家蚕的正常变态（徐世清等, 2002; Tu et al., 1999）。上述研究手段在一定程度上都存在着不可控制性，从而干扰研究结果。

随着生物学的发展，体外培养技术也应用到了造血器官的研究中。据我们所知，这类研究最早是在 *Papilio xuthus*（一种蝴蝶）中进行的（Mitsuhashi, 1972）。后来便被引用到了家蚕造血器官的研究中来。家蚕的血浆是维持造血器官的造血功能所必需的，因为在用无蚕血浆培养基培养时，造血器官内的细胞数没有增加甚至有些微减少，并且观察不到血球的释放。如果在培养基中加入一定量的蚕血浆，则在培养开始后的 48 h 内便会观察到造血器官内细胞数的增加和大量血球细胞的释放。因此推测家蚕血液中存在造血器官内血球生成和释放的促进因子。通过对不同时期造血器官的培养发现五龄初期幼虫造血器官的造血潜能最大，随着龄期的增长，这种潜能则逐渐减弱。另外，家蚕血淋巴中血球生成和促进因子的作用除在刚蜕皮后有稍微的下降外，之后一直处于较明显的增长趋势直至开始吐丝（Nakahara et al., 2003）。因此可以认为这种促进因子在整个五龄期均起重要作用。在家蚕造血器官的体外培养实验中还观察到了各类血球细胞（Han et al., 1995），然而所观察到的细胞的 95% 以上为原白血球和浆细胞，另外还有很少的颗粒细胞，而小球细胞和拟绛色细胞则几乎看不到。Yamashita and Iwabuchi（2001）则对原白血球进行了单独培养，他们发现近 60% 的培养原白血球分化成了其他类型的细胞，而剩余的则通过有丝分裂生成新的原白血球。与 Beaulaton（1979）的观点不同，他们认为浆细胞和颗粒细胞均为终分化细胞，而部分小球细胞则可能具有分化成颗粒细胞的潜在能力。另外在这次实验中没有观察到拟绛色细胞，因此推测这类血球细胞可能具有不同于其他各类血球细胞的来源。然而，据已有的资料推断这一结论具有一定的盲目性，因为拟绛色细胞在家蚕血液中的含量本来就是很少的，因此在有限的实验中观察不到也是有可能的。

Han（1998）通过组织学的方法研究了家蚕的造血器官，认为家蚕造血器官的致密细胞群（islets）中存在 3~4 种类型的干细胞，而在其疏松细胞群中观察到了除小球细胞以外的其他四类血球细胞，即认为这四类血球细胞都可以由造血器官直接生成。可见，对于究竟有那几种血球细胞是可以由造血器官直接生成并释放的，在不同的研究中具有不太一致的观点。但是原白血球和浆细胞可以由造血器官直接生成并释放到血液中几乎是被公认的。然而，当今已有的研究结果中仍然存在着很多分歧，相信随着研究工作的深入，会由分歧走向统一，使人们对家蚕造血功能的认识更接近真理。

1.2 研究目的和意义

1.2.1 研究目的

1. 通过家蚕五龄幼虫翅原基的发育规律研究,熟悉翅原基解剖操作并了解其发育过程,为翅原基的摘除和移植技术的建立提供操作和理论依据。
2. 建立家蚕五龄幼虫翅原基摘除技术以进一步研究翅原基—造血器官复合体摘除对家蚕造血功能的影响;建立家蚕五龄幼虫翅原基移植技术以为家蚕无鳞片翅突变体*scaleless*的初步研究提供研究方法。
3. 对家蚕无鳞片翅突变体*scaleless*进行形态学分析,为其深入研究寻找切入点。
4. 研究无鳞片翅突变体*scaleless*翅面细胞凋亡现象,了解其产生突变表型的细胞生物学特性。
5. 克隆家蚕*ASH*基因并分析其基因结构和表达特性,为家蚕无鳞片翅突变体*scaleless*产生的分子机理研究提供分子生物学理论和基础。
6. 阐明家蚕无鳞片翅突变体*scaleless*产生的分子机理,丰富家蚕基础理论研究并为同类研究开阔思路和方法。

1.2.2 研究意义

1. 翅原基是完全变态昆虫的成虫盘之一,在生物发育和基因调控的研究上具有重要的意义。鳞翅目昆虫的翅原基在昆虫翅发育的研究上有其自身的优越性,如个体较大、前后翅具有空间上的差异及翅原基可进行体外组织培养等。通过其发育规律研究掌握家蚕翅原基操作技术,为今后的研究提供基础。以前尚没有四个翅原基全部摘除后家蚕能够正常发育的成功报道,因此此项技术为我们首次完成,为其研究填补了空白。
2. 果蝇的*AS-C*基因主要控制神经系统的发育,同时具有控制性别决定、肌肉发生、马氏管形成等多种功能。目前*AS-C*的同源体基因(*ASH*)在很多动物中都得到了克隆,是一个非常热门的研究领域。同时*ASH*基因家族又是研究进化过程中基因重复现象的很好模型,因为昆虫进化中伴随有*ASH*基因数量增多的现象。对家蚕*ASH*基因的克隆和研究可以丰富这一基因家族的信息,为其进化和功能研究扩充理论基础。*AS-C*基因与果蝇刚毛的发育有关,*B-ASH*基因与蝴蝶翅面鳞片的发育相关;因此家蚕*ASH*基因对家蚕无鳞片翅突变体*scaleless*产生的分子机理的研究具有一定的意义。
3. 鳞片构成的图案是鳞翅目昆虫拟态和保护色的主要形式,在逃避天敌方面具有重要的意义,而鳞翅目昆虫是农业害虫的主要类群之一。因此如果能够探明鳞片的生成机制,进而破坏它的正常发育,使昆虫体表的图案不能够形成,就可以达到防治鳞翅目害虫的目的。同时,鳞片与包括人类毛发在内的很多种动物的体表覆盖物具有相同的起源和类似的结构与功能,因此鳞片发育机理又具有重大的经济价值和医学意义。家蚕无鳞片翅突变体*scaleless*成虫翅面上只有很少的鳞片,是研究翅面鳞片发生和发育的理想材料;对其深入研究有利于阐明鳞翅目昆虫鳞片产生的模式和调控途径。为了便于研究,我们建立了瞬时表达质粒介导的功能基因在蛹翅中过量表达的技术体系,并取得了理想的结果;为家蚕功能基因研究提供了新的思路和方法。

4. 家蚕的血球细胞在家蚕的代谢、变态以及免疫方面都起着重要作用,在不同的发育时期乃至不同的外界环境或刺激下游离于家蚕循环系统中的血球数目都会发生很大的变化。因此家蚕的造血功能与家蚕的生长发育与生理变化都有密切的联系。研究家蚕的造血功能,对于进一步揭示家蚕的生命现象具有很好的研究意义。同时,在研究家蚕免疫和抵御不良环境方面也有一定的研究价值,以利于生产。

1.3 研究内容

1.3.1 家蚕翅原基发育规律的研究及翅原基摘除、移植技术的建立

1. 解剖家蚕五龄幼虫翅原基及蛹翅,测量各个时期翅原基(翅)大小并观察其形态特征,研究翅原基(翅)的发育规律。
2. 五龄早期摘除不同数量的翅原基,探索翅原基摘除的最适时间和方法;并调查翅原基摘除对家蚕经济性状的影响。
3. 利用建立的四个造血器官—翅原基复合体摘除摘除技术,通过调查蚕体内的血球数量的变化,对家蚕造血器官的造血功能进行研究。
4. 五龄早期将家蚕的翅原基移植到另一头蚕的腹部,观察化蛾后腹部是否有小翅生出。

1.3.2 家蚕无鳞片翅突变体 *scaleless* 的形态学分析

1. 解剖家蚕翅原基、蛹翅及蛾翅,观察*scaleless*与野生型家蚕间的表型差异。
2. *scaleless*与野生型家蚕间进行翅原基异位移植实验,观察移植后生出的小翅翅面鳞片情况,确定控制突变表型形成的因子位于翅原基(翅)内部还是体液中。
3. 将翅原基划伤,观察化蛾后其翅面鳞片发育情况。
4. 高氧分压处理*scaleless*蚕蛹,观察化蛾后翅面鳞片是否增多。
5. 解剖并观察*scaleless*与野生型家蚕气管系统发育有无差异。

1.3.3 家蚕无鳞片翅突变体 *scaleless* 蛹期翅面细胞凋亡研究

1. 吖啶橙/溴化乙锭(AO/EB)和Hoechst染色观察野生型和突变体家蚕蛹翅翅面细胞凋亡情况。
2. 提取蛹翅总蛋白,检测Caspase-3/7活性,确证细胞凋亡现象。
3. 检测蛹翅中是否又DNA ladder现象出现,进一步确证细胞凋亡现象。

1.3.4 家蚕 AS-C 同源体基因的克隆、鉴定与分析

1. 提取家蚕蚕卵和幼虫不同组织总RNA,并进行反转录。
2. 基因库中搜索家蚕序列中AS-C基因的同源片段,并依此设计引物。

3. 用RACE方法克隆家蚕的*AS-C*同源体基因 (*Bm-ASH*), 并对其基因结构进行分析。
4. 比较克隆到的家蚕*ASH*基因与其它昆虫*ASH*基因间的同源性和并阐明其进化关系。
5. 利用RT-PCR分析家蚕*ASH*基因在不同组织中的表达分布。
6. 利用实时荧光定量RT-PCR分析家蚕*ASH*基因在胚胎发育过程中的表达时相。

1.3.5 家蚕无鳞片翅突变体 *scaleless* 形成的分子机理

1. 半定量RT-PCR分析家蚕*ASH*基因在*scaleless*和野生型家蚕翅原基及蛹翅中的表达差异。
2. 原位杂交进一步确证家蚕*ASH*基因在*scaleless*和野生型家蚕翅原基及蛹翅中的表达差异, 发现*Bm-ASH2*基因在突变体蛹翅中不能正常表达。
3. 克隆并分析*scaleless*和野生型家蚕*Bm-ASH2*基因启动子结构, 发现突变体的启动子有一段缺失突变。
4. 利用家蚕细胞瞬时表达系统对家蚕*Bm-ASH2*基因启动子活性进行分析, 同时比较突变体和野生型家蚕间*Bm-ASH2*基因启动子活性在家蚕细胞中有无区别。
5. 凝胶阻滞实验分析*scaleless*缺失的序列是否有特异性结合蛋白。
6. 利用家蚕无鳞片翅突变表型近等基因系培育过程中的中间品系分析启动子序列中的缺失突变是否与突变表型紧密连锁。
7. 将荧光素酶报告基因*luc+*克隆到带*IE1*启动子和*hr3*增强子的pBacPAK8质粒载体中并注射蚕蛹, 检测*luc+*能否在蛹翅中稳定表达。
8. 将*Bm-ASH2*基因克隆到带*IE1*启动子和*hr3*增强子的pBacPAK8质粒载体中并在蛹初期注射入蛹翅中, 观察*Bm-ASH2*基因过量表达对突变体和野生型家蚕翅面鳞片数量的影响。

第二章 家蚕翅原基发育规律的研究

家蚕是完全变态昆虫，其成虫的一些器官由成虫盘发育而来。翅原基是家蚕成虫盘之一，位于第2、第3胸节的两侧，前后各1对(meso- and meta-thoracic discs, or fore- and hind-wing discs)，分别发育为成虫的前后翅(fore- and hind-wings)(森精, 1970; Hojyo and Fujiwara, 1997; Kango-singh et al., 2001)。在家蚕的一生，尤其在幼虫到蛹以及蛹到成虫的变态过程中，翅原基发生着很大的变化。家蚕幼虫的翅原基外被表皮，由表皮形成翅囊，翅芽生长在翅囊内部，而在幼虫翅原基的内侧紧密附着有家蚕的造血器官(Kawasaki and Iwashita, 1987a; 徐世清等, 2002; Tu et al., 2002)。在化蛹变态中，包被造血器官的被膜崩坏，造血器官也就此消失(浙江农业大学, 1991)，化蛹后翅原基外翻形成蛹翅，蛹翅表皮下面是将来发育为成虫翅的翅芽(Kango-singh et al., 2001)。目前从发育生物学方面对翅原基的研究比较深入。果蝇作为模式昆虫，以其翅原基为研究对象的工作很多，并且取得了很大的成果；但果蝇并不能代表昆虫纲的所有昆虫类型，尤其象家蚕这样的鳞翅目昆虫，在翅原基的形态和发育上与果蝇还是有很大差别的(Kango-singh et al., 2001; Albert, 1994)。同时，鳞翅目昆虫的翅原基在昆虫翅发育的研究上有其自身的优越性，如个体较大、前后翅具有空间上的差异及翅原基可进行体外组织培养等(Hojyo and Fujiwara, 1997)。基于家蚕翅原基的研究前景，我们对其发育规律进行了初步调查，并进行了家蚕幼虫翅原基的摘除和异位移植实验。为论文的后续研究工作打好基础。

2.1 材料与方法

2.1.1 家蚕

家蚕品种 JY- I 由中国农业科学院蚕业研究所保存，常规饲养方法饲育(吕鸿声, 1991)，四龄将眠前收集实验蚕备用。

2.1.2 翅原基的解剖与测量

参照文献(森精, 1970)，实验蚕麻醉后侧放于蜡盘上，右侧朝上，用刀片在2、3胸节的翅原基附近划开，然后用尖头镊子把翅原基取出并放于生理盐水中。等全部解剖完毕后在解剖镜下调查翅原基的大小并拍照。先将翅原基放在滴有适量生理盐水的超薄载玻片上，然后用测微尺、血球计数板或直尺测量从翅原基后缘到尖部的长度，每次测量取透射光和反射光读数的中间值以消除误差。实验从四龄将眠前(记为-2 d，五龄起蚕记为0 d，其他类推)开始，每日定时测量家蚕体长和体重并解剖，每次处理15头蚕，解剖得完整的前后翅原基各6~14只。实验进行到幼虫化蛹为止。

蚕上簇 3 d 后剖出, 收集发育一致的个体进行实验, 保存温度为 26℃, 从刚化蛹(记为 0 d pupa, 其他类推)开始直至化蛾。

2.1.3 翅原基的摘除实验

五龄第 3 日蚕饥饿 6 小时(h)后冰上麻醉, 一侧朝上, 用刀片在翅原基附近划开小口, 用镊子将翅原基取出后用低熔点蜡或琼脂糖封口。等蚕复苏后按标准方法饲育。实验中共进行了 6 种处理, 分别为摘除右前翅原基(rFWD)、右后翅原基(rHWD)、前翅原基(FWD)、后翅原基(HWD)、右翅原基(rWD)及全部翅原基(WD), 全部处理在 4 h 内完成, 同时设无摘除对照。

2.1.4 翅原基的移植实验

5 龄第 1 日蚕饥饿 6 h 后冰上麻醉, 将供体蚕右前翅原基(rFWD)移入受体蚕的腹部。蚕复苏后按标准方法继续饲育。

2.2 结果

2.2.1 五龄幼虫及变态过程中翅原基的大小变化

由图 2.1、2.2 可知, 家蚕从 4 眠前一直到化蛹前(约 11 d 后化蛹), 前后翅原基均呈总体增长趋势。眠中基本没有变化, 从起蚕(0 d)到盛食期末(6 d)翅原基平缓增长, 接下来的两天则基本没有伸长。实验蚕在第 9 天(即 8 d 与 9 d 之间)成熟, 这个过程中翅原基明显变大, 而吐丝期间却基本处于停滞状态, 吐丝完毕后又迅速生长, 化蛹前(11 d, 见图 2.5)的翅原基已经与蛹初期翅芽同样大小。前后翅原基生长趋势基本一致, 但后部翅原基相对滞后。由以上结果可以明显看出, 5 龄幼虫翅原基呈缓慢生长状态, 蚕成熟后迅速生长, 这与家蚕体内蜕皮激素的浓度有关。成虫蜕皮前后翅的大小变化更加明显, 如果对将蜕皮蚕进行人工蜕皮, 则其不能正常展翅, 说明蜕皮过程对于成虫展翅是必需的。

我们研究了家蚕五龄幼虫翅原基生长与体长及体重生长的关系。从图 2.3 和图 2.4 可以明显看出, 翅原基相对于体长在家蚕幼虫成熟后才表现出明显的增长趋势。而相对于体重则呈明显的“u”字形生长。可见 5 龄幼虫期家蚕所吸收的营养主要用于机体的生长, 而翅原基生长处于次要状态, 到营养生长末期, 翅原基相对体长和体重开始快速增长。

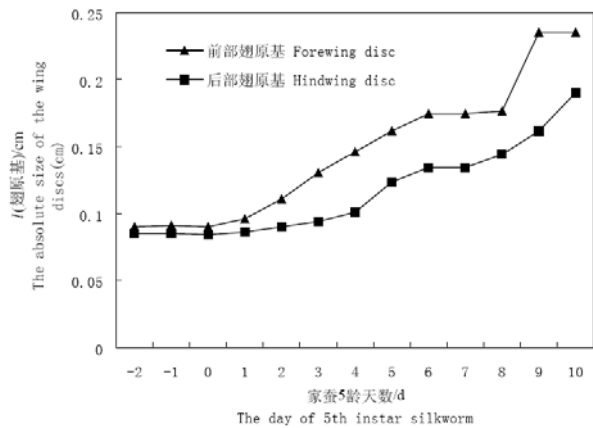


图 2.1 家蚕五龄幼虫翅原基大小的变化。

Fig. 2. 1 The absolute size of the 5th instar larval silkmoth wing discs.

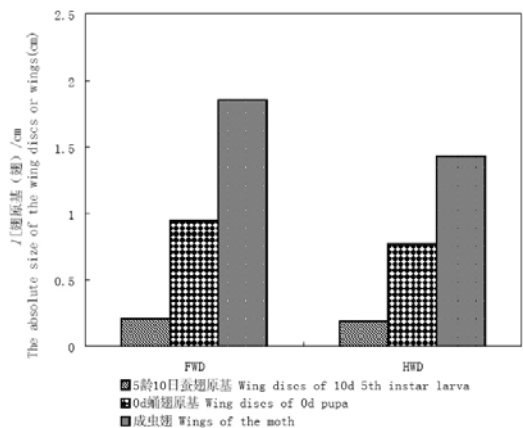


图 2.2 变态前后翅原基（翅）大小的变化。

Fig. 2. 2 The size of the wing discs or wings before and after metamorphism.

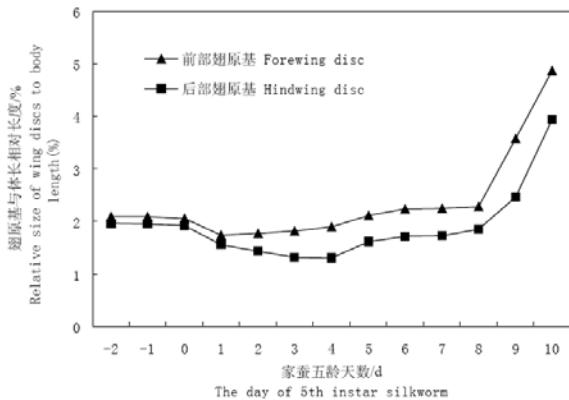


图 2.3 家蚕翅原基与蚕体长相对长度的变化。

Fig. 2. 3 The relative size of silkmoth wing discs to its body length.

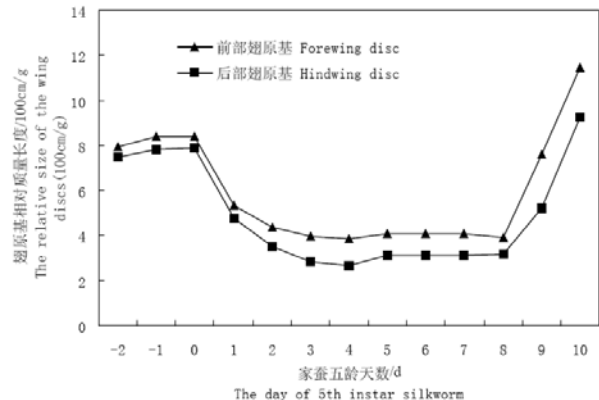


图 2.4 家蚕翅原基与蚕体重的相对质量长度变化。

Fig. 2. 4 The relative size of the silkmoth wing discs to heavy.

2.2.2 家蚕五龄幼虫翅原基及蛹期翅芽形态的变化

5 龄幼虫翅原基虽然在大小生长上相对缓慢，但形态变化很大。2~3 d 以及 8~11 d 这两个阶段中形态变化最为明显，11 d 时翅原基的形状已基本接近蛹期。图 2.5 给出了翅原基在化蛹前几个明显不同的形态。72 h 前后是五龄家蚕体内蜕皮激素的一个最低峰，而从幼虫成熟到化蛹前家蚕体内蜕皮激素浓度又呈显著的波动状态 (Calvez, 1981; Kawasaki et al., 1995; Sakurai et al., 1998)。同时家蚕最后一次蜕皮后的 1 d 内翅原基完成了蛹期定型 (Pupal commitment)，失去了对保幼激素的敏感性，0~3 d 内对蜕皮激素的敏感性逐渐增强 (Kawasaki et al., 1995; Obara et al., 2002)。因此我们猜测蜕皮激素浓度的波动诱发了翅原基形态的变化。



图 2.5 家蚕五龄幼虫翅原基的形态。a. 2d 前部翅原基 (Hep 为造血器官); b. 9d 前部翅原基; c. 11d 前部翅原基。

Fig. 2.5 The wing disc of silkworm 5th instar larva. a. The fore-wing disc of 2 d 5th instar larval; b. The fore-wing disc of 9 d 5th instar larval; c. The fore-wing disc of 11 d 5th instar larval.

蛹的翅芽被保护在表皮之下,在整个蛹期,翅芽的大小没有太明显的变化,并且翅芽的形状在蛹的初期也已基本固定,因此蛹期是翅芽完善的过程,包括翅脉的硬化、鳞片的形成、花纹的出现等(图 2.6)。在解剖过程中,我们发现蛹前期的翅有较大的弹性,解剖出来的翅芽即使放在清水中也会收缩,但在 4%福尔马林中固定,则不会发生收缩,不过从蛹期第 3 日(3 d pupa)开始则失去了这一特性。在蛹早期即可见翅芽的边缘细胞稀疏且膨大,可能是翅缘的鳞片细胞正处于形态变化中所致。在我们这批实验材料中,蛹期第 3 日开始见初生鳞片,5 d 时便成长为鳞片,之后一段时间中鳞片有增多现象。翅面上的鳞片开始时为毛状,8 d 时发育为柳叶状,之后逐渐出现分叉,化蛾后呈现棕榈叶状;而翅缘的鳞片直到成虫仍为毛状。9 d 时出现花纹,大约再过 2 d 后(11 d pupa)化蛾。可见翅的鳞片是逐步发育而进行形态变化并着色的。由以上结果可知,蛹期翅芽的完善过程是程序性的,很多基因的表达都是时间特异性的,这为家蚕翅原基、翅芽及翅的深入研究提供了便利条件。

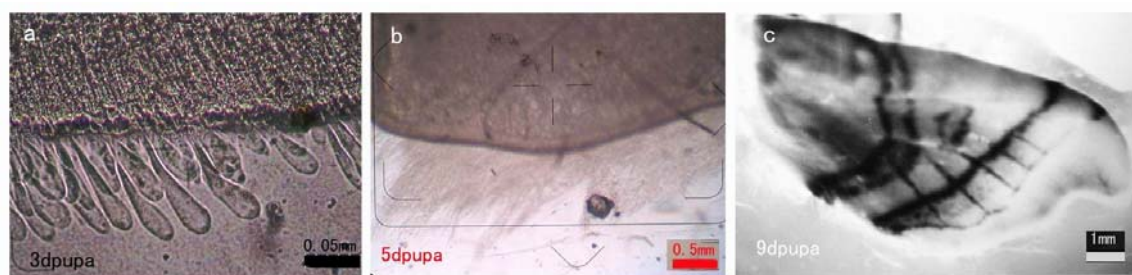


图 2.6 家蚕蛹期翅芽的形态。a. 3 d 蛹翅芽 (边缘可见初生鳞片); b. 5 d 蛹翅芽 (边缘出现毛状鳞片); c. 9 d 蛹翅芽 (翅面花纹清晰可见)。

Fig. 2.6 The wing bud of silkworm pupa. a. 3 d pupa wing bud (firstbirth scales could be seen); b. 5 d pupa wing bud (hairy scales can be seen); c. 9 d pupa wing bud (stripes can be seen).

2.2.3 家蚕翅原基的摘除

我们对家蚕五龄幼虫不同翅原基进行了摘除实验，结果显示，摘除不同数量的翅原基后家蚕均可成活并正常变态，但总体来说，摘除越多，成活率越低。然而即使将翅原基全部摘除，家蚕同样可以正常生长、发育和交配、产卵。图 2.7 是翅原基全摘除蚕的蛹和成虫。而就全茧量来说，处理蚕低于对照蚕（CK），可能因为失血过多所致，但都在对照蚕的 80% 以上。茧层率与对照相差不到 6%，rWD 高出 26.3%，但其全茧量则最低，可能是由于雄蛹太多引起的（表 2.1）。从以上结果可以看出，把翅原基摘除以后，存活下来的家蚕在经济性状上没有太大的变化。



图 2.7 五龄幼虫期全部翅原基摘除的家蚕（WD）的蛹和成虫。a. WD 蚕的蛹（左边）；b. WD 蚕的成虫；c. WD 蚕的雌蛾与 rFWD 蚕的雄蛾在交配中。

Fig. 2. 7 Pupa and moth of WD 5th instar larval silkworm. a. The pupa of WD; b. The moth of WD; c. The moths of WD (♀) and rFWD (♂) are mating.

表 2.1 翅原基摘除蚕的性状调查表。

Table 2. 1 Character of wing disc(s) excluded silkworms.

处理	处理蚕数	结茧数	结茧率	全茧量（克）	指数	茧层率	指数
Tretments	（头）	（粒）	（%）	Weight of each	Index	（%）	Index
	Number of	Number of	Cocoons	cocoon		Cocoon	
	silkworms	cocoons	rate			shell rate	
CK	12	10（6♂）	83.3	2.01	100.0	22.9	100.0
rFWD	10	8（3♂）	80.0	1.99	99.1	24.2	105.5
rHWD	10	8（4♂）	80.0	1.77	88.0	24.2	105.8
FWD	10	8（4♂）	80.0	1.81	90.2	24.0	106.1
HWD	10	6（3♂）	60.0	1.95	97.0	23.8	104.0
rWD	15	9（7♂）	60.0	1.69	84.1	28.9	126.3
WD	15	6（4♂）	40.0	1.73	86.2	21.7	94.8

注：需要特别说明的是，我们的实验是在中秋期进行的，桑叶叶质较差，可能会对实验数据有一定的影响。但是各种处理呈现出基本一致的规律，可见本实验结果是可靠的。

2.2.4 家蚕翅原基的移植

把家蚕的前部翅原基移入另一条蚕的腹部后，受体蚕会正常生长并变态，化蛹后在翅原基移入处生出了小翅，翅脉清晰可见。化蛾后可以看到翅上只生出了少量鳞片，可能是移入后翅原基

营养不良造成的，但证明了家蚕翅原基异位移植的可行性。移植后的蚕蛹和蚕蛾见图 2.8。

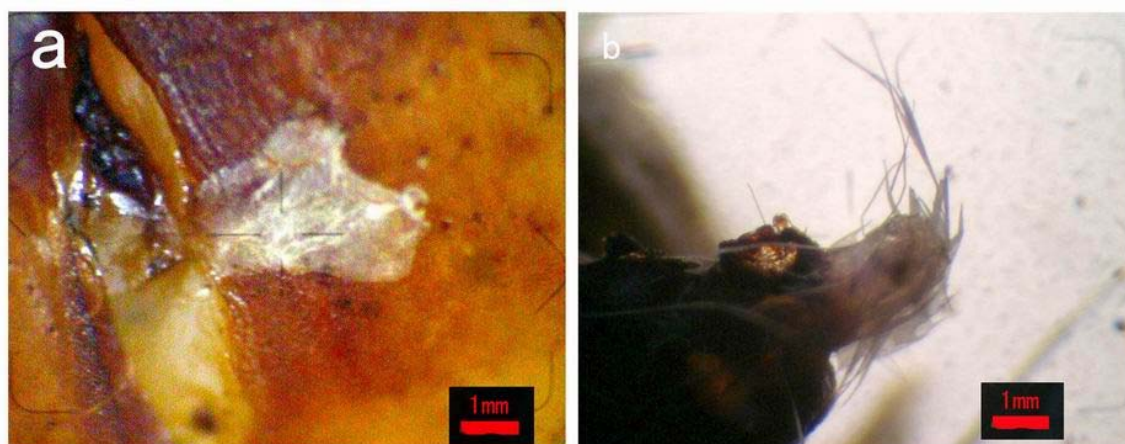


图 2.8 翅原基异位移植后受体蚕的蛹和成虫腹部生出的翅。a. 异位移植受体蚕的蛹腹部生出的翅；b. 异位移植受体蚕的成虫腹部生出的翅。

Fig. 2.8 The small wing developed from the abdomen of the exotic transplantation receptor. a. The small wing developed from the abdomen of the receptor's pupa; b. The small wing developed from the abdomen of the receptor's moth.

2.3 讨论

家蚕在变态过程中形态上发生着巨大的变化，包括腹足的消失、外生殖器的发生、翅的形成等。其实家蚕的翅并不是在变态中突然出现的，而是在幼虫期就已经形成并缓慢生长，这是昆虫生活史向着缩短趋势进化的结果，也是全变态昆虫的优势所在 (Truman and Riddiford, 2002)。缩短了取食时间，积累足够的营养之后进入很少活动的蛹期，再进行快速发育。这样一方面可以充分利用幼虫期积累下来的养分，另一方面可以专心进行变态后发育，从而能在较短时间内完成很大的变化。家蚕的翅原基在五龄初期就开始了蛹期定型 (Pupal commitment)，在这一过程中，血淋巴中的许多调节因子可能是必需的；与此同时，翅原基对保幼激素的敏感性大大降低，这也正是家蚕得以完成蛹期定型的主要原因之一，而随着昆虫体内保幼激素的消失，蜕皮激素的单独存在又巩固了这一决定并促进了翅原基的形态变化 (Kawasaki et al., 1995; Obara et al., 2002; Fujiwara and Hojyo, 1997)。本实验的结果恰好与其符合。而家蚕成熟后，尤其吐丝完毕进入预蛹期后，无论在大小还是形态上翅原基都有飞跃式的变化，这也正是家蚕体内高剂量的蜕皮激素作用的结果。

研究表明，家蚕的血球细胞是家蚕个体保卫作用和损伤修复所必需的，同时它们又在家蚕变态中起到分解不再需要的组织和器官的作用 (徐世清等, 2002; Tu et al., 2002)。可见要有足量的血球细胞来维持家蚕正常变态。家蚕幼虫的血球主要有 5 种类型，它们是原白血球、浆细胞、颗粒细胞、小球细胞和拟绛色细胞，其中前两者均具有有丝分裂能力 (浙江农业大学, 1991; Beaulaton, 1979)。前人认为，4 个翅原基或造血器官摘除后家蚕很难成活和变态，主要因为失血过多或游离的血球细胞没有足够的分裂能力进行补偿 (Kango-singh et al., 2001; Beaulaton, 1979)。我们在实

验中对家蚕不同翅原基进行了摘除,结果显示,即使将五龄幼虫的翅原基全部摘除,家蚕也会正常发育直至羽化为成虫,并且还能交配和产卵。如上所述,家蚕的造血器官是与翅原基紧密附着的,在摘除中应该是把造血器官同翅原基一起摘下,即使不能全部摘下,但也会将其大部分去掉。因此,本实验结果至少可以得出三种可能的推论:其一是家蚕血球细胞在造血器官受损后有丝分裂能力会增强,进而生成足够的血球;其二是造血器官有很强的再生能力,残余的一小部分即可释放出供5龄幼虫生长和变态所需的血球;其三可能还有其它的造血器官存在。在文献(Tu et al., 2002)重离子照射家蚕造血器官的实验中也曾提到这一可能性。至于用重离子杀伤家蚕造血器官会使家蚕在变态中死亡(徐世清等, 2002),我们推测可能是因为重离子照射伤害了家蚕的其他组织、器官而造成的。总之,家蚕的造血器官和在变态中血球的作用可能具有更加复杂的机制,进一步的研究工作正在进行。后面有一章的内容专门研究了翅原基摘除对家蚕血球数量的影响。

果蝇的翅原基具有再生能力,因此将其一部分移入其他部位或其他个体中仍然会发育成完整的翅(Albert et al., 1994; Müller, 1998)。而家蚕幼虫的翅原基是没有再生能力的,这便增加了家蚕翅原基移植工作的难度。Hojyo 和 Fujiwara (1997)已经证明了家蚕翅原基同部位移植的可行性,本实验则进一步证明了家蚕翅原基异位移植也是可行的。

第三章 造血器官-翅原基复合体摘除对家蚕造血功能的影响

家蚕的血细胞由造血器官产生,造血器官靠近或附着在翅原基上,二者被统称为造血器官-翅原基复合体(Akai and Sato, 1971; Nittono et al., 1964)。5龄初期,造血器官表面有一层组织膜,到了吐丝终了期,膜被崩坏,血细胞全部游离到体液中,造血器官消失(Sato and Akai, 1977)。家蚕幼虫的血球有原白血球、浆细胞、颗粒细胞、小球细胞和拟绛色细胞5种类型(Nittono, 1960),一般认为原白血球和浆细胞可由造血器官直接产生,而其他三种血球都是由这两种血细胞通过有丝分裂和分化形成的(Beaulaton, 1979; Nittono et al., 1964)。但是也有人认为原白血球具有干细胞特征,浆细胞和小球细胞是终分化细胞,颗粒细胞可能是小球细胞的前体,拟绛色细胞由其他类型血细胞分化而来(Yamashita and Iwabuchi, 2001)。

Han等(1995)以及Nakahara等(2003)曾分别用造血器官体外培养的方法研究了血球形成的生理特性。他们发现体外培养时家蚕体液的加入可以起到刺激血球形成的作用。Han发现体外蜕皮激素和保幼激素Ⅲ均有促进造血器官中血球释放的功能;Nakahara也认为蜕皮激素有此功能,但是他发现保幼激素Ⅰ对血细胞的释放没有明显的促进作用。

家蚕体内造血器官在每龄初期明显增大,到蜕皮前就会因大量释放血球而崩解(Akai and Sato, 1971)。体液中血细胞密度随着家蚕的发育时期的不同而有巨大的变化(Matsumoto and Sakurai, 1957)。这种变化也是由体内的激素调控的(Hoffmann, 1970; Sorrentino et al., 2002)。前人曾用烧红的针烫伤或应用重离子照射破坏造血器官来研究幼虫的造血功能(Nittono et al., 1964; Tu et al., 2002)。Tu等发现用重离子照射家蚕5龄幼虫的造血器官-翅原基复合体,可以致使5龄后期体内血球数比正常蚕的大大减少。

我们运用上一章建立的家蚕造血器官-翅原基复合体摘除技术,调查了造血器官-翅原基摘除后家蚕体内血球变化情况。

3.1 材料与方法

3.1.1 家蚕

家蚕品种JY-I,1-4龄蚕按常规饲养方法(吕鸿声,1991)饲育,收集5龄起蚕进行实验。5龄蚕饲养条件为25℃、70%-80%相对湿度。

3.1.2 造血器官-翅原基复合体的摘除

五龄起蚕用70%酒精体表消毒后在无菌冰水中麻醉,等蚕失去知觉后置于蜡盘上,然后用解剖刀在翅原基附近划开小口,用尖头镊子将造血器官-翅原基复合体取出后用蜡封口。解剖完的蚕

在 4℃ 冰箱中保育 2 h, 然后取出并置室温下, 等蚕复苏后喂桑并正常饲养。实验中我们进行了不同数量复合体的摘除, 包括全部摘除 (4 HWC)、摘除左后复合体外的三个 (3 HWC)、摘除右侧两个复合体 (2 HWC) 和只摘除右前复合体 (1 HWC)。同时设对照 CK0 和 CK, 其中 CK0 不进行任何处理; CK 在家蚕幼虫胸节远离翅原基的部位划一道伤口使之流血, 其他操作同摘除实验。全部实验操作在 8 h 内完成, 然后各种处理的蚕同时饲食并同条件下饲养。

3.1.3 造血器官-翅原基复合体全部摘除后家蚕幼虫的外源激素处理

造血器官-翅原基复合体完全摘除的家蚕饲育一周天后用外源蜕皮激素 (MH) 和保幼激素类似物 (JHA) 处理。MH 的使用方法是将 MH 原液用无菌水稀释成 $0.1 \mu\text{g}/\text{mm}^3$ 浓度后进行注射, 每头蚕注射 $1 \mu\text{g}$; JHA 原液用吐温保存, 使用前用无菌水稀释成 $100 \text{ mg}/\text{Kg}$ 后对家蚕进行体喷。

3.1.4 血细胞记数

用针头将家蚕第一对腹足扎破, 取 3-4 滴血, 迅速用生理盐水稀释成适当倍数并用血球记数板记数。对于已经结茧的蚕, 将毛脚从茧中剪出后进行实验。家蚕血液量 (体积) 约占蚕体总重 (重量) 的 20%-24% (Horie et al., 1971), 本实验中用 20% 来估算家蚕幼虫体内的血球总数。

3.2 结果

3.2.1 全部造血器官-翅原基复合体摘除后家蚕的发育情况

全部复合体摘除后, 我们发现 60% 以上的家蚕可以正常生长发育直至化蛾 (图 3.1)。其发育时间与正常蚕的没有明显差别, 同时茧层率在正常茧的 80% 以上。蛹期时翅原基摘除留下的伤口虽然是愈合的, 但是很容易破裂而流血。

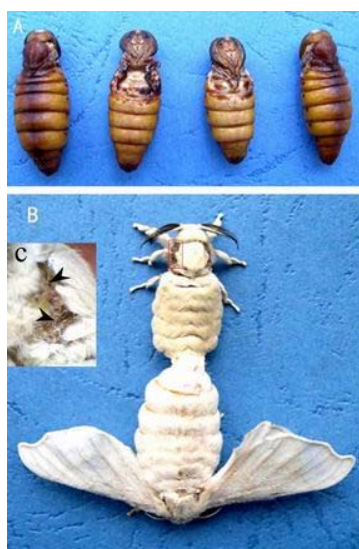


图 3.1 造血器官-翅原基复合体全部摘除后的家蚕发育成的蛹和蛾。A. 复合体摘除后的蛹; B. 复合体摘除后的蚕蛾与正常蚕蛾在交配; C. B 中方框区域放大图, 箭头所指的位置是前翅和后翅着生的位置。

Fig. 3. 1 Pupae and moths of hemopoietic organ-wing disc complexes totally extirpated silkworms. Wings of the pupae are missing (A) and a moth without wings is mating with an intact one (B). (C) shows the enlargement of the boxed region in (B). Arrow heads in (C) indicate the region where the wings should be extruded.

3.2.2 造血器官-翅原基复合体全部摘除对家蚕五龄幼虫体内血球数的影响

四个复合体全部摘除蚕（4 HWC）体内的血球密度在五龄 1 d 和 2 d 时均极显著高于对照（ $P<0.01$ ）（图 3.2, A）；3 d 时与对照持平，之后一直处于略低水平，但无显著性差异（ $P>0.05$ ）。待蚕开始吐丝（约在 7 d 以后）后差异显著增加（ $P<0.05$ ）。单独看 4 HWC 蚕的在全龄中的变化规律可知，从 4 d 达到最低后又有逐渐增加的趋势，但吐丝开始后又逐渐减少。CK 蚕体内的血球密度变化趋势总体上与 CK0 一致，只是在 1 d 和 4 d 有细微的降低，但不显著（ $P>0.05$ ）。

就蚕体内血球总数来看，无论 CK0 或 CK 还是 4 HWC 在吐丝前均呈总体增长趋势（图 3.2, B）。而吐丝后与 CK0 及 CK 不同，4 HWC 的有所下降。另外，1 d 时 4 HWC 的血球总数要多于 CK0 和 CK 的（ $P<0.05$ ）；从 2 d 到 4 d 三者基本一致（ $P>0.05$ ）；5 d 起开始表现出 4 HWC 的血球总数小于 CK0 和 CK 的（ $P<0.05$ ）；而 8 d 和 9 d 时这种差异更加显著（ $P<0.01$ ）。

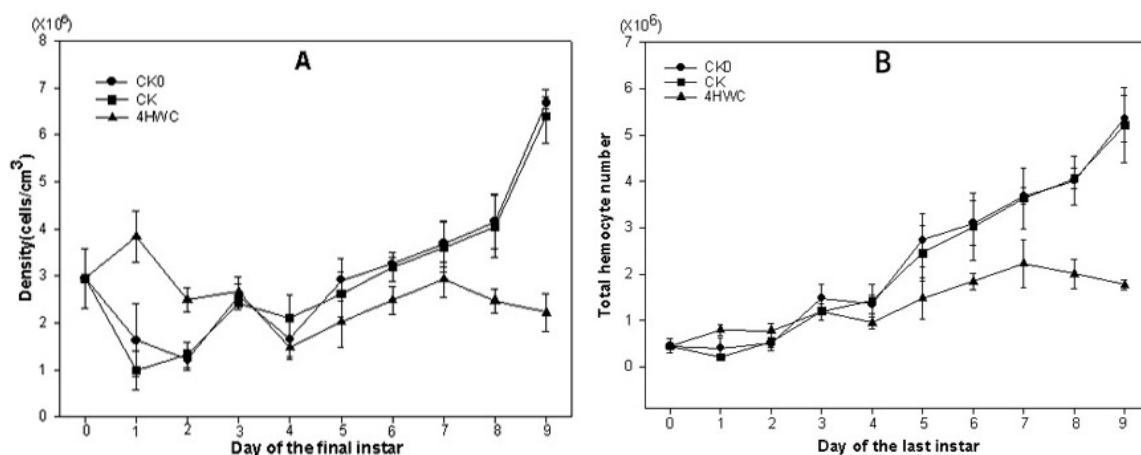


图 3.2 四个造血器官-翅原基全部摘除后家蚕体内的血球变化。A. 血球密度变化；B. 血球总数变化。4HWC 表示四个复合体全部摘除，CK 和 CK0 表示对照。

Fig. 3. 2. Hemocyte changes of 4 HWC and controls (CK and CK0). A. Hemocyte density; B. Total hemocytes.

3.2.3 外源激素对 4 HWC 家蚕体内血球数的影响

保幼激素和蜕皮激素处理后均使家蚕的龄期延长，9 d 时还没有开始吐丝。我们调查了激素处理后的 4 HWC 家蚕在 5 龄 3 d、6 d 和 9 d 的血球数（图 3.3）。结果显示无论从血球密度还是血球总数角度分析，MH 和 JHA 处理 4 HWC 家蚕在 3 d 时均低于没有进行激素处理者（密度， $P<0.05$ ；总数， $P<0.01$ ）。但是 MH 和 JHA 处理间没有显著性差异（ $P>0.05$ ）。6 d 时三者基本持平（ $P>0.05$ ）。9 d 时表现出显著性差异，即激素处理可以使血球密度和血球总数明显高于未进行激素处理的（MH， $P<0.05$ ；JHA， $P<0.01$ ），并且 JHA 的增加效果高于 MH 的（ $P<0.05$ ）。

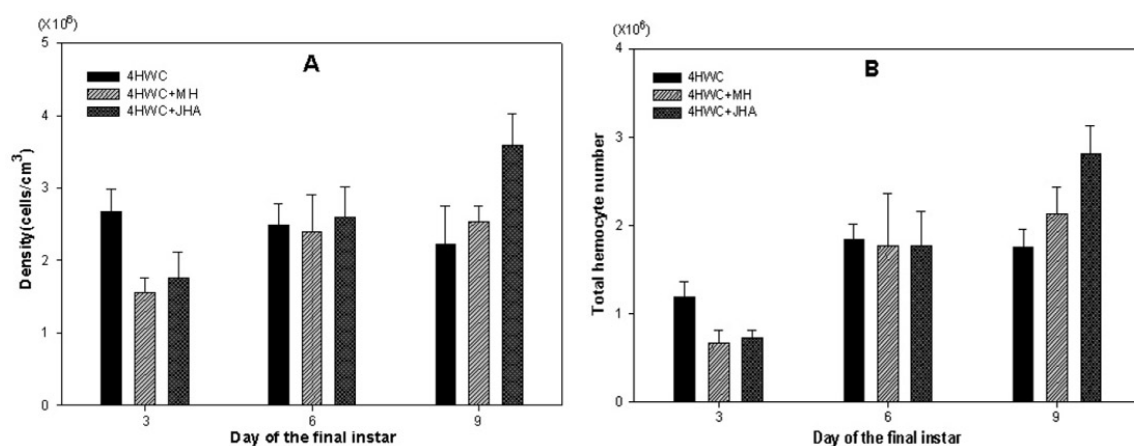


图 3.3 激素处理与不处理的 4HWC 家蚕体内血球数的比较。A. 血球密度比较；B. 血球总数比较。4 HWC 表示不用激素处理，4 HWC+MH 表示用蜕皮激素处理，4 HWC+JHA 表示用保幼激素处理。

Fig. 3.3. Hemopoietic compare between 4 HWCs with and without hormone treatment. A. Hemocyte density; B. Total hemocytes.

3.2.4 摘除不同数量翅原基对熟蚕体内血球数的影响

因为熟蚕时造血器官开始崩裂，此时蚕体内血球数最多，因此实验调查选在熟蚕期进行。从图 3.4 可以看出，摘除不同数目的翅原基对家蚕体内的血球密度和血球总数的影响趋势基本一致。从血球密度来看，吐丝开始后 12 h 时，摘除一个复合体虽然略低于对照的，但是可以忽略 ($P>0.05$)。摘除 2-3 个后比对照少且达到了显著水平 ($P<0.05$)，但是摘除 1-3 个之间并没有明显差异 ($P>0.05$)。另外，摘除 4 个复合体后明显比其他少 (CK0, $P<0.01$; 1HWC, 2 HWC, 3 HWC, $P<0.05$)。而从血球总数来看，吐丝 12 h 后变化趋势基本与血球密度的相似，只是 1 HWC 也比 CK0 的低了很多 ($P<0.05$)。

然而，吐丝开始后 36 h，这些差异又有所变化，表现在造血器官-翅原基摘除越多，血球密度越小。血球总数亦随摘除个数的增加而表现出梯度减少趋势 ($P<0.05$)。

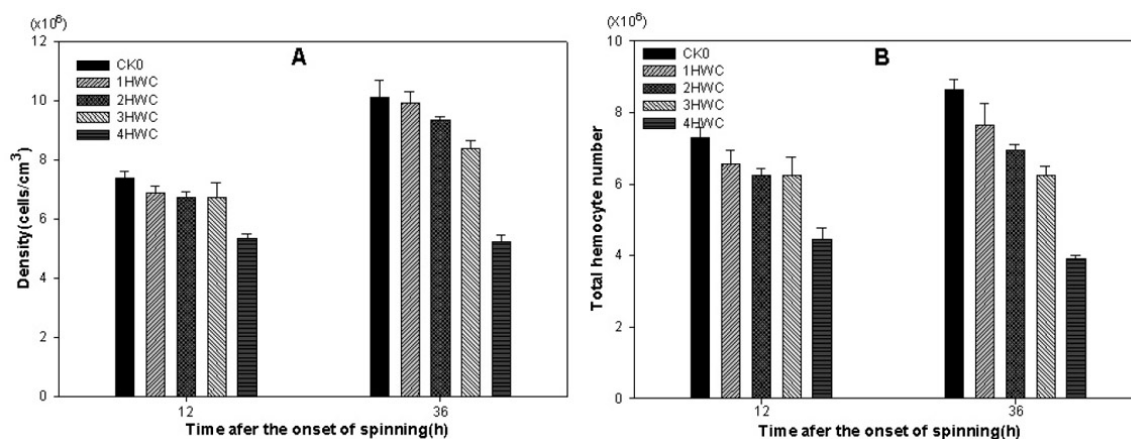


图 3.4 摘除不同数目的造血器官-翅原基复合体对家蚕造血功能的影响。A. 血球密度；B. 血球总数。1 HWC 表

示只摘除右前复合体, 2 HWC 表示摘除右侧两个复合体, 3 HWC 表示摘除左后复合体外的三个, 4 HWC 表示全部摘除。

Fig. 3. 4. Effect of extirpation of various numbers of hemopoietic organ-wing disc complexes on hemopoiesis. A. Hemocyte density; B. Total hemocytes.

3.3 讨论

昆虫的血球细胞是由造血器官产生并释放到体液中的 (Nittono et al., 1964; Akai and Sato, 1971)。Nittono 等 (1964) 用烧红的针在家蚕幼虫 5 龄第 2 天时烫伤全部造血器官-翅原基复合体, 发现烫伤后家蚕体内血球数明显变少, 但是也有些烫伤后的蚕能正常化蛾。这种方法会导致烫伤组织太多, 从而造成烫伤蚕的大量死亡 (Tu et al., 2002)。应用重离子对家蚕造血器官-翅原基进行照射可以使其局部损伤, 从而克服了烫伤的不足。Tu et al. (2002) 已经成功的利用重离子照射进行了家蚕造血功能的研究, 并且发现照射后家蚕体内的血球数明显减少。然而, 同等强度的重离子射程是一定的, 而家蚕不同个体的造血器官距离表皮深度是不一样的, 因此可能会因为太浅而不能理想的杀伤造血器官, 或者太深而伤及前胸腺等器官进而致使家蚕不能正常变态 (Tu et al., 1999; 徐世清, 2002)。

以前的研究认为将家蚕的四个造血器官-翅原基复合体摘除后家蚕很快就会死亡 (Beaulaton, 1979; Kango-Singh et al., 2001)。但我们成功地将四个复合体全部摘除后家蚕仍能正常生存直到化蛾 (图 3.1)。运用这一技术, 我们研究了翅原基全部摘除后家蚕造血功能的变化。但是本实验没有对家蚕血球细胞类型进行分类。

正常蚕 (CK0) 与人工失血蚕 (CK) 的血球密度和总数基本一致, 因此完全可以用 CK0 做对照 (图 3.2)。我们发现造血器官-翅原基复合体在 5 龄 0 d 全部摘除后, 1 d 和 2 d 蚕体内的血球密度和总数均显著高于对照, 估计这是因为摘除时破碎的造血器官中未成熟的血球释放到了血液中所致。然而 3 d 时即降低到与对照相当的水平, 愈伤过程需要血球的参与并且未成熟的血球细胞可能容易死亡, 从而造成了 4 HWC 蚕体内多余血球的迅速减少。在重离子照射实验中也有类似的报道 (徐世清等, 2002)。随着家蚕的生长发育, 体内的血球密度和总数均有增加, 但是 4HWC 的一直处在低于对照的水平。这些又进一步证明了造血器官的功能。

家蚕的血球细胞具有有丝分裂能力, 并且受伤后分裂能力增强 (Beaulaton, 1979; Gardiner and Strand, 2000), 还发现血液中的原白血球细胞可能具有干细胞特性 (Yamashita and Iwabuchi, 2001)。我们的实验结果显示, 虽然 4HWC 蚕体内的血球总数明显低于 CK0 的, 但是吐丝前都呈持续上升趋势, 并能满足蚕的生长发育和变态所需 (图 3.2)。由此我们推测家蚕血液中必定含有具有干细胞特性的血球细胞。吐丝开始后家蚕体内的血球数会有明显增加; 吐丝终了期, 膜被崩坏, 血细胞全部游离到体液中, 此时血液中的血球密度最大 (Akai and Sato, 1971; Sato and Akai, 1977), 我们的结果也正符合这一点。但是, 4HWC 蚕体内的血球总数增加幅度很低, 在吐丝前后达到最高, 之后又有所下降。推测这是因为成熟后家蚕组织的清理消耗了一些血球细胞 (Kurata et al., 1989) 而造成。

血球不仅是昆虫的防卫细胞,同时还起到清理家蚕体内不再需要的组织器官的功能(Kurata et al., 1989),可见血球细胞具有重要的作用。我们将家蚕的四个翅原基全部摘除后,被摘除蚕能够正常存活并变态直至化蛾和产卵,并且其茧层率在正常家蚕的 80% 以上。因此,变态过程中造血器官中血球的大量释放可能是变态的结果而不一定是变态所必需的前提条件。

昆虫幼虫中与发育有关的激素主要是蜕皮甾醇和保幼激素。在完全变态昆虫中,最后一龄幼虫体内保幼激素会下降到一个特定的滴度,这伴随有蜕皮激素的微量增加,进而促进昆虫幼虫停食、预变态行为如吐丝以及幼虫组织到蛹期组织变化的定型(commitment)(Truman and Riddiford, 2002)。外源激素的使用会破坏家蚕体内蜕皮激素和保幼激素的正常平衡,从而影响家蚕的发育(Morohoshi 1976, Sakurai et al. 1989, Akai et al. 1989, Satake et al., 1998, Gu and Chow 2003,);而对家蚕 5 龄幼虫体内血球数量没有显著影响。我们发现翅原基全部摘除后再使用蜕皮甾醇(MH)或保幼激素类似物(JHA)都会影响蚕体内血球的变化。并且两者的影响结果类似,只是 JHA 的效果比 MH 更大一些(图 3.3)。但是我们还不能清楚地说明激素作用的具体机理,进一步的研究工作需要进行。

家蚕的造血器官总共有四个,分别位于四个翅原基的内侧(Beaulaton, 1979, Han et al., 1998)。Tu et al. (1999)用重离子照射发现,某个造血器官的损伤对未损伤者的造血功能没有补偿促进作用。本实验中我们发现吐丝开始后 12 h 血球密度和血球总数在摘除 1-3 个翅原基之间差别都很小,并且 1HWC 与 CK0 没有显著性差异(图 3.3)。可见吐丝前期部分翅原基摘除蚕体内的造血器官中的血球释放速度比正常情况下要快,说明有一定的补偿作用;而在 36 h 接近吐丝终了期时,全部造血器官破裂,所有血球都释放到了体液中,这样,摘除数目越多,血球数越少。

第四章 家蚕无鳞片翅突变体 *scaleless* 的形态学分析

翅原基是完全变态昆虫的成虫盘之一，发育为成虫的翅。翅原基在幼虫期生长缓慢，但是在预蛹期会发生快速的变化，其生长发育与激素滴度及血液因子有很大关系（Kawasaki and Iwashita, 1987; Kango-Singh et al., 2001）。与翅相关的突变体是研究昆虫翅原基及翅发育的常用材料，家蚕无翅突变主要有 *fl*、*rw*、*Vg* 三种类型，其中以 *fl* 纯合体的突变表型最为明显。*fl* 突变体的翅原基在幼虫最后一次蜕皮以前与野生型并没有明显差别，只是到了五龄期才呈现不同，主要是气管向翅面的延伸受阻而引起 *fl* 翅原基的萎缩及退化（Fujiwara and Hojyo, 1997）。Hojyo 和 Fujiwara（1997）通过 *fl* 与野生型家蚕五龄幼虫之间翅原基的相互移植证明了 *fl* 不是由血液因子调控的，而是由于其翅原基中一种由蜕皮激素诱导产生的 41KD 蛋白的缺失所致。

蝶和蛾同属于鳞翅目昆虫，成虫翅面被覆鳞片是它们的基本特征之一。关于翅面鳞片的研究在蝴蝶上进行的较多，蝴蝶翅上由不同颜色的鳞片形成的不同图案不仅是蝴蝶的保护色，而且是长期自然选择的结果，因此在进化和分类上蝴蝶翅面花纹是一个重要的研究领域（Galant et al., 1998）。翅面花纹的形成主要与色素沉积有关，而色素的沉积又是随着鳞片的成熟而逐渐完成的（Koch et al., 2000a; Koch et al., 2000b）。研究表明蝴蝶眼斑的最终形成由一系列调节基因的嵌套表达所调控（Brunetti et al., 2001）。

翅脉是昆虫翅的一个主要组成部分，起着支持翅面的作用，并且翅脉还充当着气管和神经在翅中分布的通路（Roch et al., 1998; Garcia-Bellido and de Celis, 1992）。气管是一个庞大的网状系统，可以将氧气直接送达各个组织器官。氧气就是通过气门进入气管系统并由末端封闭的微气管送入所有组织的（Ebner et al., 2002; Samakovlis et al., 1996）。

我们保存有一个家蚕突变种，为 90 年代初从中国湖北省的农村征集而得。其成虫翅面上的鳞片明显比野生型家蚕的少，肉眼看起来几乎是透明的，故称之为透明翅。张志芳等（1991）已经从遗传学角度证明了这一突变表型是单基因隐性性状，并将此基因定名为 *n lw* (none lepies wings, 现改称为 *scaleless*)。以 *scaleless* 突变体为研究材料，调查了它与野生型家蚕成虫翅的主要区别；运用移植技术证明了控制这种突变性状的调控因子不是存在于体液中，而是在翅原基内起作用的。并且通过解剖观察发现蛹期翅面上从翅脉中分化出的气管的延伸受阻，由此推测造成这种突变的主要原因是氧气供应不足而妨碍了鳞片的正常形成。

4.1 材料与方法

4.1.1 家蚕

野生型 (WT) 家蚕品种 JY- I 及 *scaleless* 突变型品种神农一号均由中国农业科学院蚕业研究所保存。家蚕 1-4 龄幼虫按《中国养蚕学》（吕鸿声, 1991）中所讲标准方法饲养，五龄起蚕时将

实验用蚕置于 25℃、70~80% 相对湿度条件下饲养并进行实验。

4.1.2 突变体 *scaleless* 与野生型家蚕翅（翅原基）的形态比较

家蚕野生型成虫的翅剪下后用生理盐水洗下大部分鳞片，用滤纸吸干后在倒置显微镜下观察并拍照；*scaleless* 则直接拍照。

5 龄幼虫的翅原基及蛹的翅用镊子和解剖刀解剖出来后在 PBS（137mmol/L NaCl, 2.7mmol/L KCl, 10mmol/L Na₂HPO₄ and 2mmol/L KH₂PO₄）中漂洗，然后在显微镜下观察突变体与野生型的形态学差异。

4.1.3 突变体 *scaleless* 与野生型家蚕之间翅原基的解剖及相互异位移植

5 龄 1 d 幼虫用 70% 酒精体表消毒后用无菌冰水进行麻醉，然后将两个品种的家蚕各一条置于蜡盘上，用刀片在受体蚕第 4 和第 5 腹节之间的节间膜上划一道尽量小的伤口，然后把供体蚕的右前部翅原基取出并从受体蚕伤口处移入其体内。所有操作均在冰上进行，每次移植保证在三分钟内完成。移植好的蚕置 4℃ 下保育 1 h 后放于室温中复苏，待蚕开始爬动后喂食并正常饲育。两种相互移植分别进行 50 头蚕。

4.1.4 翅原基受伤对鳞片和翅发育的影响

5 龄 1 d 幼虫用 70% 酒精体表消毒后用无菌冰水进行麻醉，然后在解剖镜下用手术刀在家蚕右前翅原基部位的中部横向划一道浅的切口，尽量微微伤及翅原基表面。操作中的条件按照翅原基移植方法（2.1.4）进行，共处理 20 头蚕。此外，我们将右前翅原基的一条主气管切断并观察对翅原基发育的影响，共处理了 20 头蚕。

4.1.5 高氧分压处理蚕蛹

1 d 蛹置 50% O₂ 或 90% O₂ 的高氧分压下直到羽化。然后按照 4.1.2 的方法对翅进行处理后对肘脉 1（Cu₁）和肘脉 2（Cu₂）之间区域的鳞片白细胞进行计数（图 4.1）。

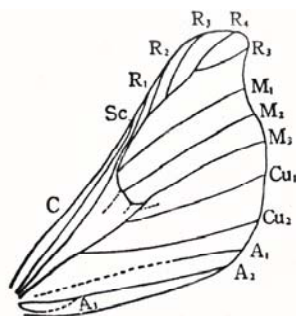


图 4.1 家蚕前翅翅脉示意图。

Fig. 4.1 A sketch map of silkworm fore-wing veins.

4.1.6 气管丛的解剖

蚕蛾冰上麻醉后用解剖剪从背中线上剪开，轻轻移走中肠，观察突变体和野生型家蚕之间气管系统有无差异，并解剖左侧胸部第2对气管丛进行拍照。

4.2 结果

4.2.1 WT 与 *scaleless* 成虫翅的形态比较

幼虫期和蛹期 *scaleless* 与野生型家蚕在幼虫及蛹期外形上没有明显差异，而成虫却有明显不同。野生型家蚕成虫翅面上布满了鳞片，而 *scaleless* 成虫的翅面上却只有少量的鳞片，几乎是透明的（图 4.2 B）。将 WT 右前翅从基部剪下并把翅面上的部分鳞片用生理盐水洗下，用滤纸吸干，压平后在显微镜下观察，可以清楚的看到翅面上密布着鳞片白细胞（socket cell）（图 4.3 A）；而 *scaleless* 却只有很少的鳞片白细胞（图 4.3 B）。我们还发现 WT 的鳞片要比 *scaleless* 的大且分叉多。可见二者的形态学差异是非常明显的。



图 4.2 野生型和突变体家蚕的蚕蛾。A. 野生型家蚕蚕蛾 (WT), B. *scaleless* 突变体蚕蛾, C. *scaleless* 蛹期 50% O₂ 高氧分压处理后的蚕蛾。

Fig. 4.2 Silkmooths of Wild type (A), *scaleless* under atmospheric conditions (B) and *scaleless* under 50% O₂ (C). There are obviously many fewer wing scales in *scaleless* (B) than in WT (A) and the wings of *scaleless* seem to be transparent. There are many more wing scales in *scaleless* under 50% O₂ (C) than under normal atmospheric conditions.

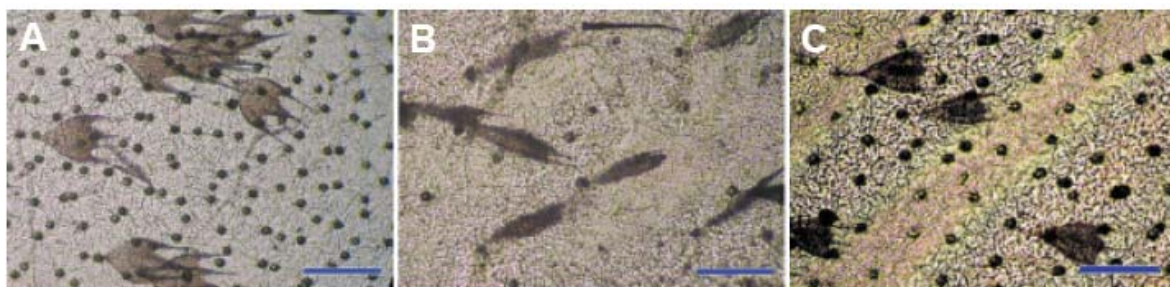


图 4.3 野生型和突变体家蚕的蚕蛾翅面放大图。A. 野生型家蚕蚕蛾 (WT), B. *scaleless* 突变体蚕蛾, C. *scaleless* 蛹期 50% O₂ 高氧分压处理后的蚕蛾。

Fig. 4.3 Enlarged portion of the wings. (A) Most scales of WT were washed off before observation. Sockets (black

dots) are arranged compactly, while the wings of *scaleless* (B) appear in their natural state, without washing. Few sockets are present. It also can be seen that scales in *scaleless* are not only fewer but smaller than in WT and that not all of the sockets support scales. (C) It is obvious that socket cells in moths developed under 50% O₂ are much more abundant than that under normal atmospheric conditions. Most of the scales in (C) were washed off before observation. Bar, 100 μ m.

4.2.2 WT 与 *scaleless* 家蚕间的翅原基相互异位移植

如图 4.4 所示,翅原基相互移植后的蚕化蛾后在移入处生出了小翅。WT 翅原基移入 *scaleless* 后生出的小翅大多布满了鳞片(约 64%, 28 只中的 18 只)(图 4.4 A),而 *scaleless* 的翅原基移入 WT 后生出的小翅上却没有鳞片(23 只)(图 4.4 B)。因此可以推测, *scaleless* 的突变表型由翅原基自身内部的调控因子所控制,而与体液因子无关。

此外,我们还观察了小翅的细微结构,翅脉清晰可见。而且受体蚕体内有很多气管与移入的翅原基相连,其中有一些从移入的翅原基自身伸展出来进入蚕体内,也有的发自受体内部而伸入移入的翅原基中。

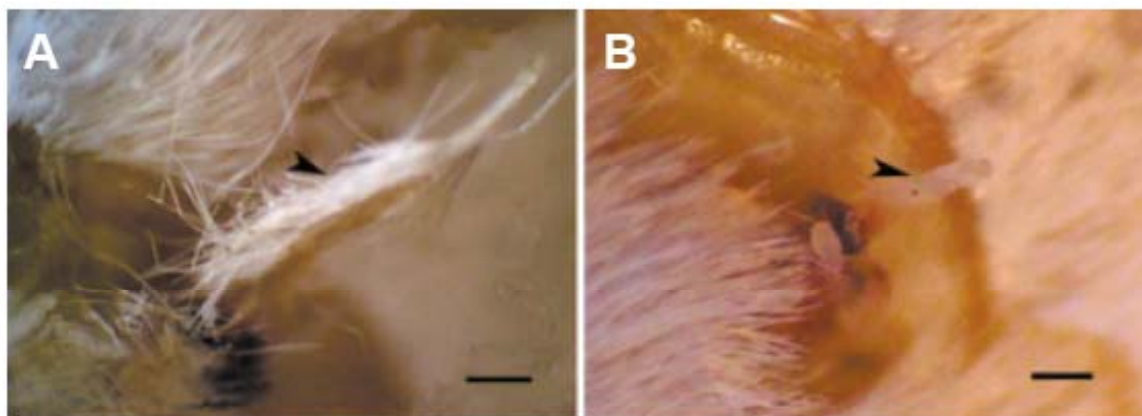


图 4.4 翅原基异位移植后在受体蚕腹部生成的小翅。A. 野生型翅原基移入 *scaleless* 家蚕后长出的小翅,翅面上有很多鳞片; B. 突变体翅原基移入 WT 家蚕后长出的小翅,翅面上没有鳞片存在。

Fig. 4.4 Small wings developed from transplanted wing discs. Note that (A) the wing developed from a transplanted WT wing disc into a *scaleless* silkmoth is covered with scales, while (B) no scales are present on the wing developed from a transplanted *scaleless* wing disc into a WT silkmoth. Arrows show the transplanted wings. Bar, 1 mm.

4.2.3 WT 与 *scaleless* 家蚕五龄幼虫翅原基及蛹期翅芽的解剖与观察

自 5 龄 0 d 幼虫开始每天解剖并观察翅原基,我们发现在前期 WT 与 *scaleless* 没有明显差异。化蛹后在翅脉两侧有气管簇生出,1d WT 蛹的气管簇会有微气管伸出,而 *scaleless* 的却基本没有。2 d 蛹时这一差异更加明显(图 4.5),WT 的翅脉两侧开始有很多微气管伸出并且交织在翅脉间的翅面上;而 *scaleless* 的翅脉上却很少有气管伸出,并且偶尔可见的气管也极度的发育不良,因此

翅脉之间的翅面部分基本看不到微气管的存在。之后一段时间内没有明显变化，但到后期（约自 7 d 开始）WT 因为翅面的增厚和鳞片的发育而再无法看清翅面上的气管。

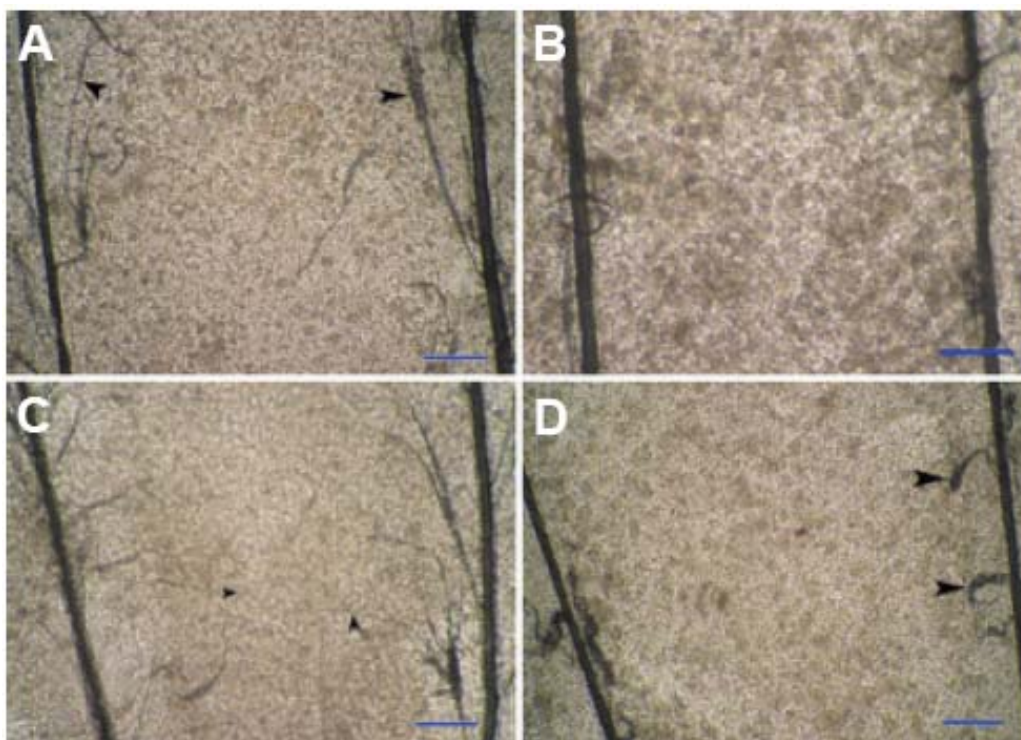


图 4.5 突变体 *scaleless* 和野生型家蚕蛹翅比较。A. 1d WT 蛹翅, B. 1d *scaleless* 蛹翅, C. 2d WT 蛹翅, D. 2d *scaleless* 蛹翅。

Fig. 4.5 Differences between pupal wings of *scaleless* and WT. On the first pupal day (A), many tracheae protrude from the vein and have invaded into wing lacuna between the veins in WT (arrows), while (B) there are almost no tracheae in the wing lacuna between the veins in *scaleless*. On the second pupal day (C), more tracheae have invaded into the wing lacuna between the veins than in the 1 d pupa in WT (arrows). (D) There are still no tracheae in the wing lacuna between the veins in *scaleless* or only tracheal cluster buds just protrude out of the veins (arrows). Bar, 100 μ m.

4.2.4 翅原基表面划痕和主气管切断对鳞片和翅发育的影响

5 龄早期在翅原基表面划一道浅的切口可以致使化蛾后翅上的鳞片少且小（图 4.6）。与正常蚕比较，受伤的前翅面积变小，以至于和同侧的没有受伤的后翅大小相当。20 头处理蚕中有 15 只发育成蛾，其中有 2 只产生了上述现象。

20 头将右前翅原基主气管挑断的蚕中有 14 只正常羽化，除有 1 只没有异常外其余 13 只右前翅都基本没有发育。

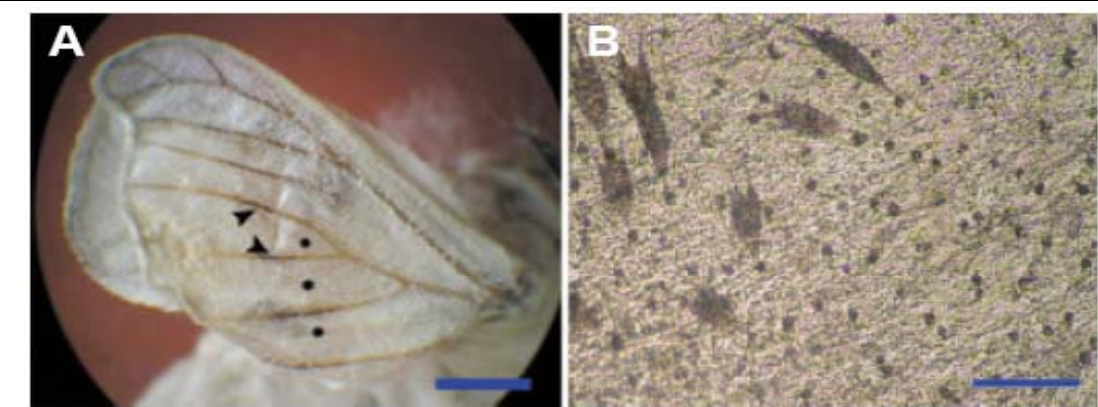


图 4.6 五龄初期人工受伤翅原基发育成的前翅。A. 前翅的大小与后翅几乎相当，并且划痕附近的区域鳞片明显减少；B. A 中星号区域放大。

Fig. 4. 6 Adult forewing from a forewing disc that was injured at early 5th instar. (A) Note that the size of the forewing, which should be larger than the hindwing, was about equal to that of the hindwing and that some areas of this forewing have only a few scales (asterisks). The arrows indicate a crease produced by cutting the wing disc and the blackened portion of the vein. (B) An enlarged portion of the wing. This preparation was made without washing. The sockets and scales are fewer than in WT (Fig. 5.3, A) but more than in *scaleless* (Fig. 5.3, B). Note that not all of the sockets support scales. Bars, 3 mm in (A) and 100 μ m in (B).

4.2.5 高氧分压对翅面鳞片发育的影响

50% O₂ 氧分压下放置的蛹比正常大气分压下蛹的蛹期经过长一天。高氧分压处理的 *scaleless* 的蚕蛾翅面鳞片比正常的显著增多（表 4. 1）。遗憾的是 50% O₂ 氧分压处理的蚕蛹全部死亡。

表 4. 1 高氧分压处理后 *scaleless* 成虫翅面鳞片臼细胞数。

Table 4. 1 Number of socket cells of *scaleless* adult after treatment with high O₂ partial pressure.

分类	翅个数	每 mm ² 翅面上鳞片臼细胞数	标准偏差	分组
Sort	Wing number	Mean of socket cell number per mm ²	Standard deviation	T grouping
WT	10	499	12	A
<i>scaleless</i>	10	51	8	B
<i>scaleless</i> +50%O ₂	10	376	70	C

注：WT stands for wild type, *scaleless* stands for the *scaleless* wing mutant, and *scaleless*+50%O₂ stands for *scaleless* developed under 50% O₂ partial pressure. Cell numbers per mm² wing portion of the three sorts are significantly different. While the standard deviation of *scaleless*+50%O₂ is much larger than that of the others. Different letters in the column named “T grouping” indicate a statistically significant difference (ANOVA, $p<0.01$).

4.2.6 无鳞片翅突变体 *scaleless* 与野生型家蚕气管系统的比较

解剖并比较 *scaleless* 与野生型蚕蛾的气管系统,发现两者之间并没有明显的不同。下图(图 4.7) 是蚕蛾的右侧第二气管丛。

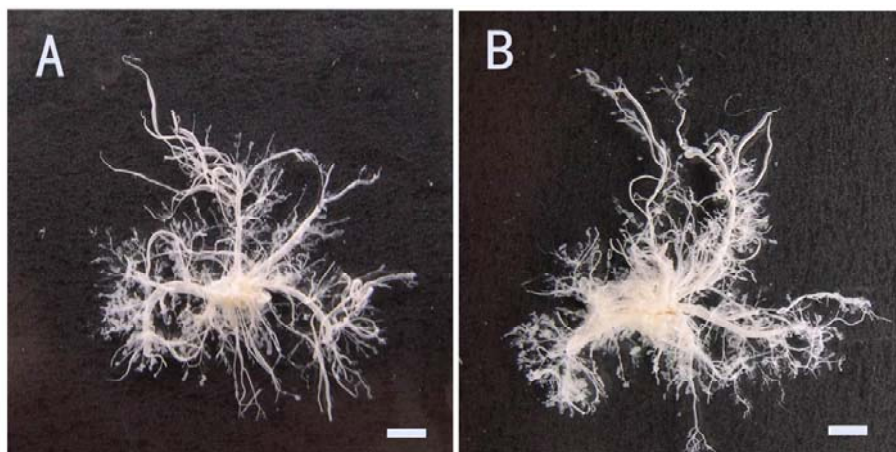


图 4.7 WT (A) 与 *scaleless* (B) 蚕蛾的气管丛。

Fig. 4.7 Tracheal clusters of WT (A) and *scaleless* (B). There are lots of branches extending from the both of them. Bar, 1mm.

4.3 讨论

形态观察结果表明, *scaleless* 突变体成虫翅面的鳞片要比 WT 的明显少。为了证明 *scaleless* 的调控机制,我们首先进行了翅原基的移植实验。翅原基的发育与昆虫体内蜕皮激素的滴度有很大关系, Hojyo 和 Fujiwara (1997) 的实验表明应在 3 d 以前进行翅原基移植。我们选在 5 龄 1 d 进行移植,以保证成功率。此外,实验中将翅原基单独摘下后放在受体蚕的腹节中很难生出翅,成虫后从植入处将移入的翅原基解剖出来,发现已经变黑或被受体蚕作为异物处理而包被,甚至找不到了移入的翅原基。这一现象与 Hojyo 和 Fujiwara (1997) 提到的完全一样。因此移植时尽量将翅原基上的气管一起植入,并放置在节间膜的浅层表皮处,在化蛹后就可以看到移植的小翅发生(图 2.8, a)。有 64% 的移入 *scaleless* 受体蚕的 WT 翅原基在化蛾后发育成了生有鳞片的小翅;而移入 WT 受体蚕的 *scaleless* 翅原基虽然也能发育成小翅,但却全部没有生出鳞片(图 4.4)。由此看来决定 *scaleless* 性状的调控因子不存在于血淋巴中并且不是外分泌型的,而是由翅原基本身或其附近结构产生的;也有可能五龄之前就已经完成了这一决定。

将蛾腹部生出的小翅解剖后观察,可以清楚的看到有很多气管伸入了移入的组织,而没有长成小翅的翅原基在化蛾后却很少或没有气管伸入。由此可见翅的生长发育与气管是密切相关的。氧气是真核生物维持生命所不可或缺的营养元素之一,它在家蚕翅原基的生长发育及鳞片的形成过程中起着重要作用。翅原基体外培养表明,氧气分压越大,翅原基发育越迅速,并且在 95% O_2 + 5% CO_2 高氧分压情况下可以提前 4 天形成鳞片。体液中存在着翅原基分化所必需的物质,因

此要想体外培养翅原基并使之产生鳞片, 体液的添加是必要的 (Kawasaki and Iwashita, 1987b; Kawasaki et al., 1995)。另外, Fujiwara 和 Hojyo (1997) 发现家蚕无翅突变 *fl* 的发生与翅面中气管的延伸有关, 而我们已经通过移植实验证明了 *scaleless* 的产生与体液因子没有关系。因此, 我们将方向转移到了翅原基的结构研究上。

从解剖结果来看, 幼虫吐丝前 *scaleless* 与 WT 的翅原基发育情况基本一致, 甚至刚化蛹后仍没有明显差异。到了蛹期 2 d 可以看到 WT 的翅脉周围有很多微气管伸出, 并且在翅脉之间的翅面上相互交织成网状。与此相反, *scaleless* 的翅脉上却很少有微气管伸出, 即便是有, 也发育不良, 从而无法延伸到翅面进而形成网状结构 (图 4.5)。气管是昆虫呼吸系统的主要组成部分, 它将氧气输送到各组织器官的过程中起着重要的作用 (Samakovlis et al., 1996)。因此我们推测因为缺氧而致使 *scaleless* 翅面上的鳞片细胞增殖受到抑制或者引起细胞的过度凋亡。

实验中我们还根据以上结果人工模仿出了少鳞片的翅。由五龄早期表面划有切口的翅原基发育而来的翅的翅脉有部分黑化 (图 4.6), 而翅脉是气管的通道 (Garcia-Bellido and de Celis, 1992)。这说明翅脉中气管受伤影响了氧气循环的畅通进而影响了鳞片的形成, 从另一个角度证明了气管在翅面鳞片形成中的重要作用。此外, 高氧分压能够部分挽回 *scaleless* 翅面上的鳞片 (图 4.2 C, 图 4.3 C; 表 4.1)。这进一步证明了突变体翅中气管的缺陷导致了翅面细胞缺氧, 进而形成了无鳞片翅的表型。

Galant 等 (1998) 在蝴蝶 *Precis coenia* 中克隆到了 AS-C (*achaete-scute Complex*) 的同源体基因 (homolog) *ASH1*, 并证明 *ASH1* 是鳞片前体细胞的形成所不可缺少的。在气管侵入翅原基之前, 检测不到 *ASH1* 的信号; 到气管差不多延伸到翅缘时才有 *ASH1* 的表达。也就是说气管的伸入是 *ASH1* 正常表达所必需的。而 *scaleless* 在蛹前期气管便延伸不良, 因此我们推测 *scaleless* 的突变性状很可能是由于从翅脉中发出的微气管在翅面上的延伸受阻, 进而导致翅中 AS-C 同源体基因不能正常表达引起的。

对果蝇气管异常突变体的研究已经比较深入。果蝇胚胎中, 气管的延伸由 FGF 受体 *Breathless* (Btl) 操纵, 而 Btl 又由 *branchless* (*bnl*) 编码的类 FGF 配体蛋白所激活 (Zelzer and Shilo, 2000)。*ventral veinless* (*vvl*) 是气管延伸所必需的基因, 并且它是 *bnl* 的上游基因, 是 Btl 受体激活所不可缺少的 (de Celis et al., 1995)。在幼虫期, Vvl 蛋白在翅脉中是平均分配的, 但到了蛹期, 它的分配却因不同部位的翅脉而异, 例如到果蝇蛹壳形成后 24-30 h 时, 在间脉 (*intervein*) 中已无法检测到 Vvl 的存在 (Roch et al., 2002)。*vvl* 基因的突变可以导致某段翅脉的缺失。有关气管发育异常的突变在果蝇胚胎中研究较多, 而且在家蚕胚胎的丝腺中已经成功克隆了 *Bombyx trachealess* 基因, 这个基因在家蚕气管与丝腺前体的形成中承担着重要角色 (Matsunami et al., 1999)。*trachealess* 也是一个调控气管形态形成的基因, 它的突变可以导致气管盘的缺失和入鞘异常 (Younossi-Hartenstein and Hartenstein, 1993; Zelzer and Shilo, 2000)。家蚕突变体 *scaleless* 翅中气管延伸受阻可能与这些基因的表达异常有关, 但需进一步的研究进行证明。

第五章 家蚕无鳞片翅突变体 *scaleless* 蛹期翅面细胞凋亡研究

翅面被覆鳞片是鳞翅目昆虫成虫（蛾子和蝴蝶）的主要特征之一，蛾子和蝴蝶五彩缤纷的翅面图案和花纹亦由五颜六色的鳞片构成（Beldade and Brakefield, 2002）。翅面的图案和花纹对昆虫具有重要的生理意义，如保温和拟态等；同时，它们也为生物进化与发育研究提供了理想的课题（Weatherbee et al., 1999; Koch et al., 2000 b; Brunetti et al., 2001）。许多与翅面花纹形成有关的基因已经被鉴定（Carroll et al., 1994; Koch et al., 2000 a）。形态学、细胞生物学和发育生物学的证据均表明鳞翅目昆虫的翅面鳞片与昆虫的感觉毛，如果蝇的小刚毛（microchaete），具有类似的结构和功能（Galant et al., 1998）。作为生物学研究最重要的模式生物之一，果蝇被广泛地用来研究刚毛的发生与刚毛排列模式，一系列与之有关的发育机理被阐明（Jan and Jan, 1994）。

果蝇的小刚毛由内外两组细胞组成，外面一组为支持细胞，包括杆状细胞（shaft cell）和白细胞（socket cell）；里面一组为感觉细胞，包括神经细胞（neuron）和神经鞘细胞（sheath cell）（图 5.1）。这些细胞是由一个原母细胞（primary precursor cell）（pI）在蛹期经过四次不对称的细胞分裂形成的。pI 分裂为两个次级母细胞（secondary precursor cell），pIIa 和 pIIb。然后 pIIb 产生一个神经胶质细胞（glial cell）和一个三级母细胞（tertiary precursor cell）pIIIb。而 pIIa 则分裂为一个白细胞和一个杆状细胞。最后，pIIIb 分裂形成一个神经细胞和一个神经鞘细胞（Gho et al., 1999）。在这一发育过程中，神经胶质细胞在产生后不久就执行了细胞凋亡，从而形成了由四个细胞构成的小刚毛的格局（Fichelson and Gho, 2003）。蝴蝶翅面鳞片与果蝇的小刚毛有着类似的发育途径，但是只发生两次不对称的细胞分裂。当原母细胞分裂完成后，相当于 pIIa 的细胞继续分裂产生一个白细胞和一个鳞片细胞；而另外一个细胞则发生了凋亡（Yoshida and Aoki, 1989; Nijhout, 1991; Galant et al., 1998）。

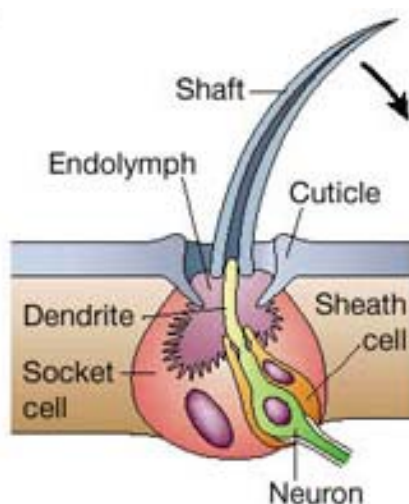


图 5.1 果蝇刚毛示意图。

Fig. 5.1 A Sketch of the *Drosophila* microchaete.

上一章我们已经提到 *scaleless* 无鳞片翅表型的发生可能与翅原基中器官的延伸受阻有关。但是，我们还不清楚突变体中的鳞片细胞是因为不能正常形成还是形成后因某种原因而死亡。怀着这个疑问，我们比较了突变体家蚕和野生型家蚕翅面细胞的凋亡水平。以阐明突变表型的产生是否与细胞的过度凋亡有关。

5.1 材料与方法

5.1.1 家蚕

野生型家蚕品种芙蓉 (WT) 和五鳞片翅突变体家蚕品种 *scaleless* (*sl*) 均由中国农业科学院蚕业研究所保存 (注: 这两个品种在时间上具有类似的发育经过)。家蚕幼虫参照《中国养蚕学》(吕鸿声, 1991) 中所讲标准方法饲养, 新化蛹存放于 25℃、70~80% 相对湿度条件下以供实验所用。

5.1.2 吖啶橙/溴化乙锭 (Acridine Orange/Ethidium Bromide, AO/EB) 和 Hoechst 染色

把蛹翅解剖出来并在 PBS 缓冲液 (137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na₂HPO₄ and 2 mmol/L KH₂PO₄) 中洗涤, 然后转移到载玻片上。将 20 μl 事先准备好的 AO/EB 染色液 (100 mg/ml AO and 100 mg/ml EB in PBS) 加到翅面上。染色 5 分钟后, 用 PBS 溶液将多余的染色液洗掉。染色好的翅放在 20 μl 的 4% 福尔马林 (用 PBS 溶液稀释) 中固定 15 分钟。盖好盖玻片后在倒置荧光显微镜下观察并拍照。用 Hoechst 按照同样的步骤进行染色。

5.1.3 Caspase-3/7 活性检测

参照 Aschkenazi 等 (2002) 及 Kamsteeg 等 (2003) 的方法抽提组织总蛋白。四只蛹的右前翅放入玻璃匀浆器中用 150 μl 匀浆缓冲液 (3mM DTT in PBS) 研磨, 匀浆充分后移入一 1.5 ml 试管中, 再向试管中加入 150 μl 2×裂解缓冲液 (2% NP40 and 0.2% SDS in PBS), 冰上放置 20 分钟。然后 14 000 rpm 离心 10 分钟, 收集上清并 -70℃ 保存备用。抽提液的蛋白含量用 Bradford 方法测定 (Bradford, 1976)。用 Caspase-Glo™ 3/7 Assay System 试剂盒 (Promega) 测定每个样品 2 μg 蛋白 (用匀浆缓冲液稀释到 15 μl) 中 Caspase-3/7 的活性。每个样品的光量子数用液体闪烁计数器 (Beckman LS6000 Series, USA) 检测。每个蛹期检测点至少进行三次独立重复。最后用 student's t-检验对数据进行统计分析。

5.1.4 DNA 片断化检测

凋亡片段化 DNA 参照 Herrmann 等 (1994) 的方法进行分离。四只蛹的右前翅放入玻璃匀浆器中用 180 μ l DNA 匀浆缓冲液 (20 mM EDTA and 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) 研磨, 匀浆充分后移入一 1.5 ml 试管中, 再向试管中加入 90 μ l 3 \times 裂解缓冲液 (3% NP40 溶于 DNA 匀浆缓冲液中), 冰上放置 1 分钟。1 600 \times g 离心 5 分钟, 收集上清并加 SDS 至终浓度 1%; RNase A (终浓度为 5 μ g/ μ l) 56 $^{\circ}$ C 消化 2 小时, 接着用蛋白酶 K (终浓度为 2.5 μ g/ μ l) 37 $^{\circ}$ C 消化 2 小时以上。向抽提液中加入 1/2 体积的 10 M 醋酸铵和 2.5 倍体积的无水乙醇沉淀 DNA。DNA 沉淀用凝胶电泳上样缓冲液溶解并在 1.2% 琼脂糖凝胶上进行电泳。

5.2 结果

5.2.1 AO/EB 染色结果表明 *scaleless* 蛹翅面细胞在发育过程中大量死亡

应用 AO/EB 染色方法我们可以把死亡细胞与活细胞区分开来, 因为 AO 只进入活细胞, 正常的细胞核及处于凋亡早期的细胞核呈现绿色; EB 只能进入死细胞, 将死细胞及凋亡晚期细胞的细胞核染成橙红色。图 5.2 a~f 显示的是野生型家蚕从初化蛹 (0 d) 到成虫的染色结果, 从中可以看出: 在家蚕翅面鳞片的发育过程中伴随有细胞死亡现象。死亡细胞在 1 d 蛹翅中首次观察到, 到 2 d 时, 可以看到翅面上规则排列着被许多死亡细胞包围着的活细胞 (图 5.2 b)。我们推测这些规则排列着的活细胞就是鳞片母细胞 (Galant et al. 1998)。3 d 时死细胞和活细胞相伴随, 并且大部分的死细胞已经被清理干净 (图 5.2 c)。当蛹发育至 5 d 时, 鳞片细胞已经形成并继续生长 (图 5.2 d), 甚至已能看到正在发育的小翅 (图 5.2 d')。从 5.5 d (图 5.2 e) 开始鳞片变得越来越大并且变得不透明。图 5.2 f 是 8 d 时的蛹翅, 这时距羽化大约两天时间。

与野生型家蚕相比, *scaleless* 蛹翅的发育过程经历了不同的细胞死亡形式 (图 5.2 g~l)。在蛹的初期, 二者翅面染色结果相同 (图 5.2 g), 细胞全部被染成绿色。但是到了 2 d, *scaleless* 却没有像 WT 那样出现大量的细胞死亡现象并形成规则排列的鳞片母细胞 (图 5.2 h)。而接下来的几天里, 细胞成片死亡, 甚至有些区域几乎再也看不到活细胞 (图 5.2 i)。到 5 d 时, 只有极少的细胞还存在于翅的表面。很明显, 这时的翅面非常粗糙, 估计是因为死亡的细胞还没来得及被清理干净所致 (图 5.2 j)。从图 5.2 e, k 可以看出, 鳞片规则地排列在野生型蛹翅的表面, 而 *scaleless* 蛹翅的表面则只有很少的鳞片, 并且整个翅面崎岖不平。最后, 随着羽化, WT 和 *scaleless* 成虫的翅面差异显而易见 (图 5.2 WT, sl)。需要补充说明的是, *scaleless* 的翅面并不是绝对的没有鳞片, 尤其是翅的边缘仍然有一些毛状的鳞片形成。

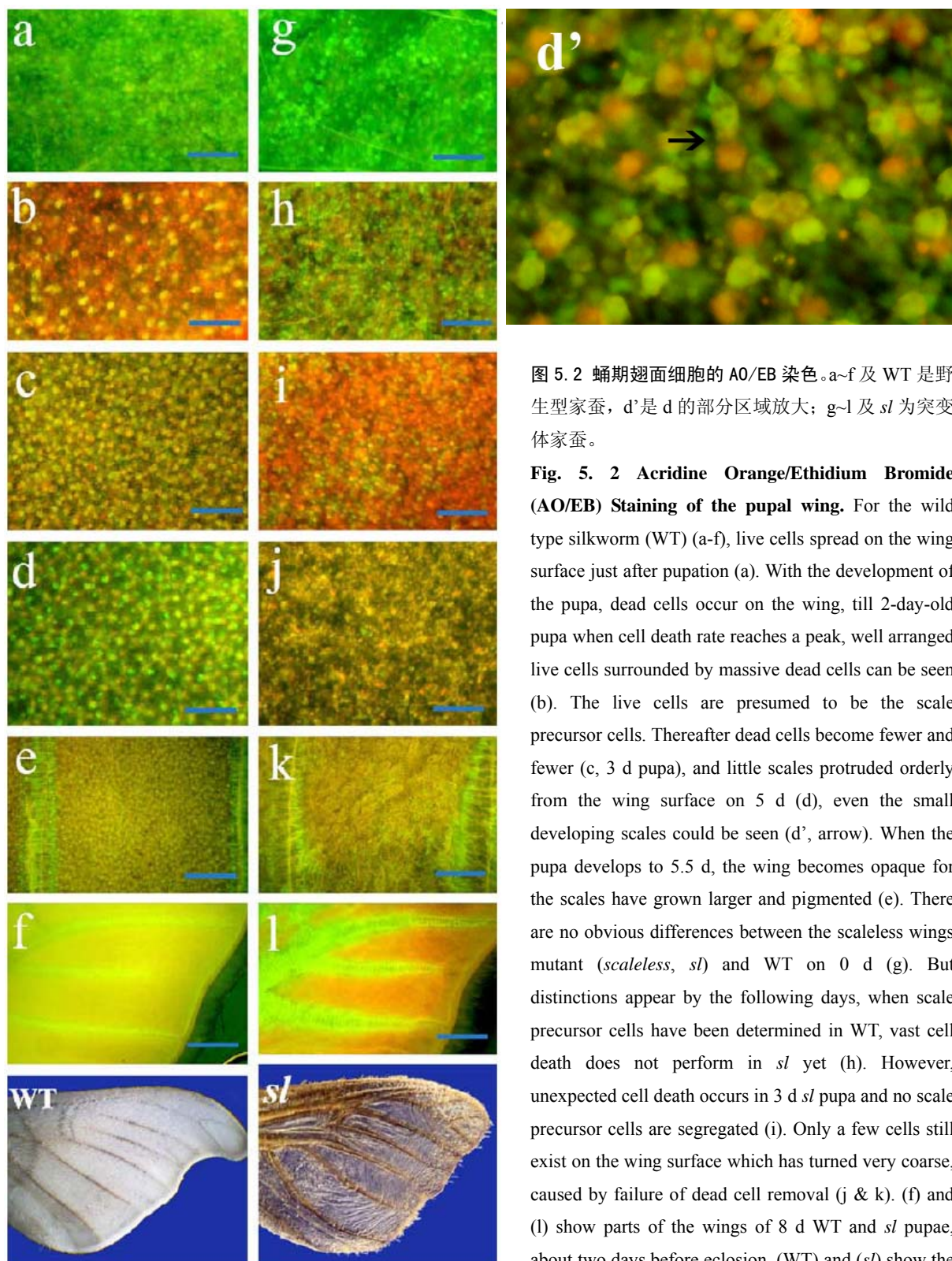


图 5.2 蛹期翅面细胞的 AO/EB 染色。a~f 及 WT 是野生型家蚕，d' 是 d 的部分区域放大；g~l 及 *sl* 为突变体家蚕。

Fig. 5. 2 Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB) Staining of the pupal wing. For the wild type silkworm (WT) (a-f), live cells spread on the wing surface just after pupation (a). With the development of the pupa, dead cells occur on the wing, till 2-day-old pupa when cell death rate reaches a peak, well arranged live cells surrounded by massive dead cells can be seen (b). The live cells are presumed to be the scale precursor cells. Thereafter dead cells become fewer and fewer (c, 3 d pupa), and little scales protruded orderly from the wing surface on 5 d (d), even the small developing scales could be seen (d', arrow). When the pupa develops to 5.5 d, the wing becomes opaque for the scales have grown larger and pigmented (e). There are no obvious differences between the scaleless wings mutant (*scaleless*, *sl*) and WT on 0 d (g). But distinctions appear by the following days, when scale precursor cells have been determined in WT, vast cell death does not perform in *sl* yet (h). However, unexpected cell death occurs in 3 d *sl* pupa and no scale precursor cells are segregated (i). Only a few cells still exist on the wing surface which has turned very coarse, caused by failure of dead cell removal (j & k). (f) and (l) show parts of the wings of 8 d WT and *sl* pupae, about two days before eclosion. (WT) and (*sl*) show the wings of the new eclosion silkworm. (e, k) distal is at the top; others, distal is to the right. Bars=100 μ m in a-d & g-j, =0.3 mm in e & k, and =1 mm in f & l.

5.2.2 Caspase-3/7 活性检测结果表明翅面上的细胞死亡是由凋亡引起的

为了阐明蛹期翅面细胞的死亡是否由细胞程序性死亡引起的,我们检测了 Caspase-3/7 的活性。在这一实验中,我们从 1.5 d 蛹开始检测。实验结果表明,在野生型家蚕的蛹翅中,1.5 d 时还几乎检测不到 Caspase-3/7 活性,而到了 2 d 其活性则达到了一个峰值,然后便急剧下降,自 3.5 d 开始已经几乎再也检测不到(图 5.3 右上角的曲线图)。可见,在蛹翅的发育过程中, Caspase-3/7 活性迅速变化并在很短的时间内行使其功能。在突变体家蚕 *scaleless* 蛹翅中, Caspase-3/7 活性也有一个与 WT 类似的变化趋势(图 5.3)。然而不同的是,其峰值的出现要比 WT 晚一天,并且最大活性约是 WT 最大活性的十倍之多。

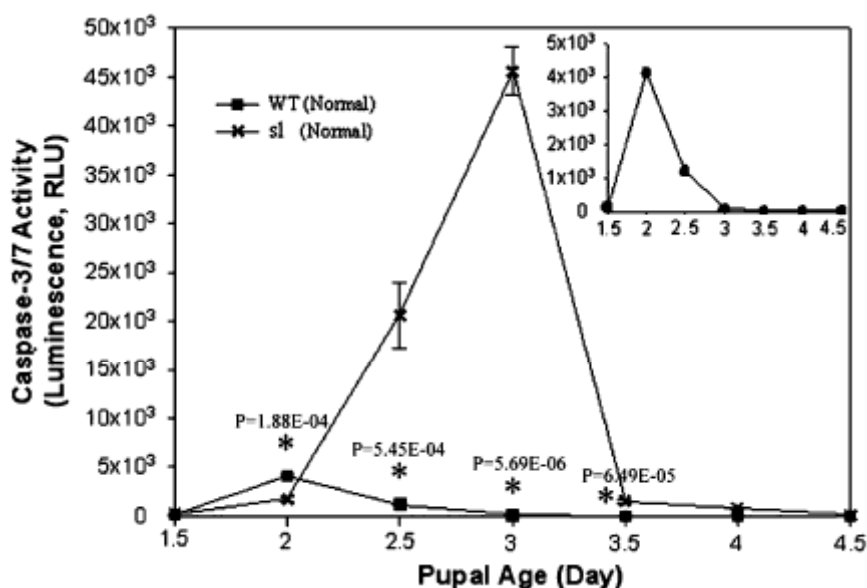


图 5.3 蛹翅中的 Caspase-3/7 活性分析。右上角为野生型家蚕蛹翅 Caspase-3/7 活性时相的放大图。差异的显著性用 student's t-检验进行分析,图中标出了各个时期比较的 P 值; *表示 $P < 0.01$ 。

Fig. 5.3 Caspase-3/7 activity in the pupal wings. The Caspase-3/7 activity in the WT pupal wings is even undetectable in early pupa (the graph on top right corner). It reaches a top on 2 d, and then decreases sharply. Till 3 d, the enzyme activity becomes noticeably lower again, and becomes undetectable in the following days. But the Caspase-3/7 activity pattern in *sl* is much different from that in WT. It is almost still undetectable in early *sl* pupa and only half of that in WT on 2 d, but increases sharply later and reaches a peak ten times as much as that of WT. Though the enzyme activity decreases abruptly just after the peak, it is detectable all the way till 4 d. All of the data shows that apoptosis is dramatically induced during the pupal wing development and processes excessively in *sl*. Asterisks indicate there are statistically significant differences between *sl* and WT. Statistical tests of significance were performed by the student's t-test and P values are shown. *, $P < 0.01$.

由上面的结果可以得出以下结论:细胞凋亡在家蚕蛹翅的发育过程中是必需的;突变体 *scaleless* 蛹翅细胞的凋亡显著高于野生型家蚕。

5.2.3 *scaleless* 蛹翅中凋亡小体和 DNA 片段化现象明显

凋亡小体和 DNA 片段化是被公认的细胞凋亡的另外两个基本特征 (Herrmann et al., 1994; Hacker, 2000)。实验中我们用 Hoechst 对蛹翅进行了染色, 并在高倍荧光显微镜下观察。到 4 d 时, 根据上文的结果, WT 蛹翅中的凋亡已经完成, 因此本实验中没有观察到凋亡小体; 而 *scaleless* 蛹翅中却仍然有明显的凋亡小体存在 (图 5.4 A)。DNA ladder 在 *scaleless* 蛹翅中同样能明显的检测到, 而 WT 中却几乎看不到 (图 5.4 B)。这些结果进一步说明在 *scaleless* 蛹翅发育过程中伴随有过度的细胞凋亡现象。

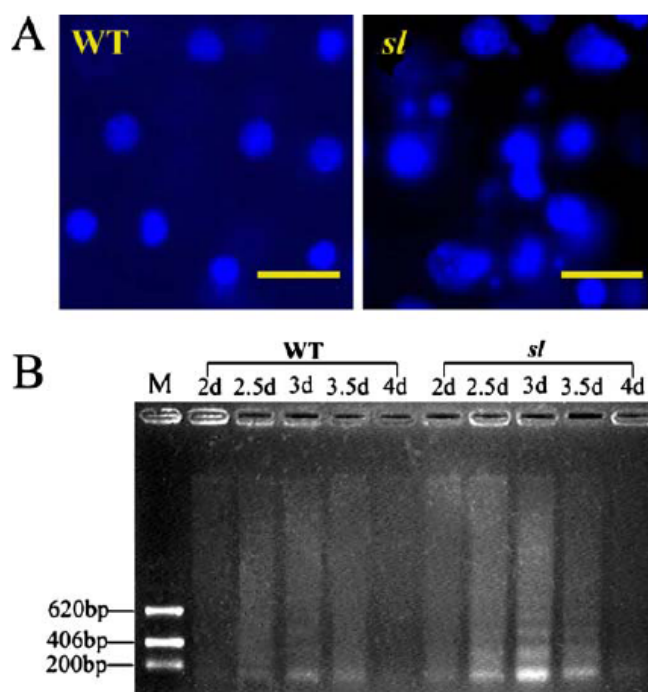


图 5.4 蛹翅中凋亡小体和 DNA 片段化分析。A. Hoechst 染色结果, WT 和 *sl* 分别表示野生型和突变体家蚕; B. 不同发育时期的 WT 和 *sl* 蚕蛹翅的 DNA ladder, M 表示 DNA Marker, d 表示天数。

Fig. 5.4 Apoptotic bodies and DNA ladder can be seen in the *scaleless* pupal wing. Regularly arranged cells enchain in WT 4 d pupa wing separately, while most of the cells in the *sl* pupa wing are unshaped and apoptotic bodies can be seen around some of the cells (A). Another apoptosis signal, DNA fragments performs in *sl*, and DNA ladder presents clearly in the wings of 2.5 d, 3 d and 3.5 day pupae. But DNA ladder can not be seen clearly in WT (B). (A) Distal is to the top; Bars=15 μ m.

5.3 讨论

我们已经报道了家蚕无鳞片翅突变体与翅原基中气管延伸受阻有关, 同时翅原基在 *scaleless* 与 WT 家蚕之间的相互移植证明控制这一突变表型的因子存在于翅原基内部。研究中发现突变体翅面鳞片的缺失可能与细胞的死亡有关, 而前文已经提到翅面鳞片细胞的发育是从蛹期开始的,

因此我们研究了蛹期翅发育过程中的细胞凋亡现象。为了利于实验的开展，本研究中我们使用了与 *scaleless* 突变体相同发育经过的品种芙蓉为对照。

与蝴蝶一样，家蚕的翅发育过程中也伴随有细胞凋亡现象（图 5.2 a~f）。刚化蛹时，整个翅面布满了紧密排列的活细胞（图 5.2 a）。不久之后便出现了细胞死亡现象，并且很快遍及整个翅面。到 2 d 蛹时，细胞凋亡达到顶峰，在死亡细胞的之间有规则排列着存活下来的细胞（图 5.2 b），这些就是将来发育成鳞片的鳞片母细胞。众所周知，细胞凋亡需要 caspase 家族蛋白酶的表达，caspase 活性检测已经成为一种可靠的细胞凋亡诊断方法（Denecker et al., 2001）。因此以上实验数据充分说明细胞程序性死亡在家蚕翅面鳞片细胞的发育过程中起着不可或缺的作用。

与野生型家蚕不同，*scaleless* 的细胞死亡过程不是很规则，大量细胞死亡现象出现的晚 1 天，但明显的严重（图 5.2 g~l）。从图中我们可以看出，大量细胞死亡出现在 3 d，存活的极少数细胞无规则的排列在翅的表面（图 5.2 i）。到 5 d 时，WT 中研究可以看到发育初期的小鳞片（图 5.2 d'），而这时 *scaleless* 蛹翅粗糙的表面却只存在少数的细胞（图 5.2 j）。我们推测由于细胞是过度凋亡，因此死亡的细胞来不及被清理，从而造成了 *scaleless* 蛹翅面的崎岖不平。为了验证 *scaleless* 翅面细胞的大量死亡是否为程序性死亡，我们检测了蛹翅中 Caspase-3/7 的活性。发现突变体蛹翅中 Caspase-3/7 峰值出现也比野生型晚了 1 天，而其最大活性却是野生型的 10 倍（图 5.3）。凋亡小体和 DNA ladder 结果进一步证实了 *scaleless* 蛹翅细胞的过度凋亡现象（图 5.4）。

上一章中提到 *scaleless* 突变表型的产生与翅中气管发育缺陷有关。1 d 蛹时开始出现突变体翅气管发育异常，接下来的几天更加明显；同时高氧分压处理能够部分挽回 *scaleless* 翅面鳞片。本章我们阐明了 *scaleless* 蛹翅中存在严重的细胞凋亡，从而导致了最终的无鳞片翅。可以推测，*scaleless* 蛹翅细胞的过度凋亡可能是因为翅中气管发育受阻而引起的缺氧所致。因此，直接引起突变的因子可能与翅原基中气管发育相关。

第六章 家蚕 *AS-C* 同源体基因的克隆、鉴定与功能分析

碱性螺旋-环-螺旋 (bHLH, basic helix-loop-helix) 家族的转录因子在后生动物 (metazoans) 发育过程中担当着重要的角色, 包括对神经发生、肌肉发生、血球发生、性别决定及中肠发育等的调控 (Weintraub, 1993; Jan and Jan, 1993; Hassan and Bellen, 2000; Massari and Murre, 2000; Ledent et al., 2002)。bHLH区域由约60个氨基酸组成, 带有一个结合DNA的碱性区域 (b) 和两个被非保守的环 (loop) 隔开的 α 螺旋 (Helix)。HLH促进其形成同源或异源二聚体; 二聚体中的两个碱性区域会与由六个核苷酸组成的特异DNA序列 (E-box) 结合 (Massari and Murre, 2000)。

果蝇的*AS-C* (*achaete-scute complex*) 由四个编码bHLH转录因子的基因*acheate* (*ac*)、*scute* (*sc*)、*lethal of scute* (*l'sc*) 和*asense* (*ase*) 组成, 这四个基因为果蝇神经前体细胞发育所必需 (Cubas et al., 1991; Skeath and Carroll, 1991; Jan and Jan, 1994; Calleja et al., 2002;)。 *AS-C* 的同源体基因在很多动物中, 包括水螅、水母等低等腔肠动物直到高等哺乳动物乃至人类, 都得到了克隆 (Johnson et al., 1990; Jasoni et al., 1994; Grens et al., 1995; Botella et al., 1996; Pistillo et al., 2002; Skaer et al. 2002; Wülbeck et al., 2002; Wheeler et al., 2003; Jonsson et al., 2004; Schlatter et al., 2005)。

双翅目 (蝇类和蚊子)、膜翅目 (蜜蜂)、鞘翅目 (甲虫) 和鳞翅目 (蝴蝶) 昆虫中都克隆到了 *AS-C* 的同源体基因。*ASH* 基因在果蝇刚毛及蝴蝶鳞片的发育过程中具有关键性作用 (Skeath and Carroll, 1991; Galant et al., 1998)。为了对 *scaleless* 突变体的分子机理深入研究, 我们克隆了家蚕的 *AS-C* 的同源体基因, 并对其基因结构和表达特性进行了分析。

6.1 材料与方法

6.1.1 家蚕

家蚕品种 JY- I 由中国农业科学院蚕业研究所保存。家蚕 1-4 龄幼虫按《中国养蚕学》(吕鸿声, 1991) 中所讲标准方法饲育, 五龄起蚕时将实验用蚕置于 25℃、70~80% 相对湿度条件下饲养并进行实验。

6.1.2 菌种与质粒

大肠杆菌受体菌株 *E. coli* DH10B 由本实验室保存; T 克隆质粒载体 pMD18-T 购自宝生物工程 (大连) 有限公司。

6.1.3 总 RNA 抽提

1. 利用 Trizol 抽提组织总 RNA

- (1) 将样品组织放入盛有 Trizol (1 ml/50~100 mg 组织) 的玻璃匀浆器中匀浆, 组织体积不要超过 Trizol 体积的 10%。
- (2) 将匀浆液在室温下放置 5 min 以使核蛋白质复合体完全裂解。
- (3) 加入氯仿 (0.2 ml/1 ml Trizol), 盖紧管盖并剧烈震荡 15 sec; 室温下放置 2~15 min。

- (4) 4℃, 12 000 g 离心 15 min。随着离心, 混合液被分为三相: 处于下层的浅红色酚-氯仿有机相、间相和上层无色水相。RNA 存留在水相中, 而 DNA 和蛋白质则存留于间相和有机相中。水相体积约为用于匀浆的 Trizol 体积的 60%。
- (5) 将水相移入新管, 加异丙醇 (0.5 ml/ 1 ml Trizol); 室温放置 5~10 min。同时将间相和有机相保存于 4℃ 以备分离 DNA 和蛋白质所用。
- (6) 4~25℃, 12 000 g 离心 8 min。RNA 沉淀 (离心前通常看不到) 在管壁或管底形成胶状的或白色的小球。
- (7) 弃上清, 用 75% 乙醇清洗 RNA 沉淀; 然后 4~25℃, 7 500 g 离心 5 min。75% 乙醇使用量为 ≥ 1 ml/ml Tri Reagent。
- (8) 弃上清, 干燥; 沉淀重溶于 30 μ l DEPC 处理的双蒸水 (ddH₂O) 或去离子甲酰胺中。 -70℃ 保存备用。若沉淀难溶, 可用吸管吹打数次并 55~60℃ 温育 10~15 min。

2. Solution D 法抽提蚕卵总 RNA

- (1) 称取约 0.3 g 蚕卵, 用 2 ml Solution D 研钵中冰上研磨至粘性消失。
- (2) 转移到玻璃匀浆器中充分匀浆, 1 500 g 离心 5min; 上清转入 Eppendorf 管内, 每管 0.5 ml。
- (3) 加 50 μ l 2 M NaAc (pH 4.0), 0.5 ml 酚 (pH 7.0), 0.1 ml 氯仿/异戊醇 (49:1), 颠倒混匀后冰上放置 15 min。
- (4) 4℃, 12 000 g 离心 15 min。
- (5) 取上层水相 (约 0.5 ml), 如果界面上蛋白较多可重复 3-4 步骤 (不用再加 NaAc)。
- (6) 加入 0.5 ml 异丙醇混匀, -20℃ 放置 1 h 以上。
- (7) 4℃, 12 000 g 离心 15 min, 沉淀 RNA 并干燥。
- (8) 沉淀重溶于 100 μ l solution D, 加入 10 μ l NaAc (pH4.0), 300 μ l 乙醇, 混匀后 -20℃ 放置 1 h 以上。
- (9) 4℃, 12 000 g 离心 15 min 沉淀 RNA。
- (10) 弃上清, 加 1 ml 70% 乙醇洗一次; 4℃, 12 000 g 离心 3 min。
- (11) 弃上清, 干燥; 沉淀重溶于 30 μ l DEPC 处理的双蒸水 (ddH₂O) 或去离子甲酰胺中。 -70℃ 保存备用。

溶液配方:

Solution D: 10 g guanidinium thiocyanate (异硫氰酸胍), 0.106 g sarcosyl (十二烷基肌氨酸钠), 0.7 ml 0.75 M 柠檬酸钠 (pH7.0), 11.72 ml ddH₂O; 65℃ 溶解 (此溶液不能高压灭菌, 4℃ 下可保存 3 个月以上); 用之前每 1 ml Solution D 溶液加入 7 μ l 2-mercaptorthanol (2-巯基乙醇)。

2 M NaAc (pH4.0): 配 2 M NaAc 溶液用乙酸调 pH 至 4.0。

6.1.4 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳

1. 称取 1.2 g 琼脂糖, 加到 62 ml ddH₂O 中, 加热溶解; 待琼脂糖完全溶解后放至 60℃ 水浴中, 温度平衡后加入 20 ml 5×MOPS 和 18 ml 甲醛溶液; 混匀后倒胶。
2. 取 1 μ l 抽提的 RNA 溶解于 10 μ l 试样 buffer, 65℃ 水浴 15 min, 冰浴 5 min。
3. 把凝聚好的变性胶放入 1×MOPS 中, 100 V 预电泳 5 min。

4. 将 RNA 稍离心后加入 1 μ l 上样 buffer (含 20 μ g/ μ l EB), 点样。
5. 45 V 电泳 1 h, 然后 75 V 电泳至溴酚蓝到胶的 2/3 处。若室温高于 15°C, 最好在电泳槽周围加冰上以保持低温。约每小时用 5 ml 移液器将两极电泳液交换一次。
6. 紫外灯下观察 RNA 质量并拍照。

溶液配方:

5×MOPS: 0.1 M MOPS, 0.025 M NaAc, 0.005 M EDTA。

试样 buffer: 5×MOPS 200 μ l, 甲醛 350 μ l 溶于 450 μ l ddH₂O。

上样 buffer: 100 μ l 10 mg/ml 溴酚蓝和 2 μ l 0.5M EDTA 溶于 398 μ l ddH₂O, 然后与 500 μ l 甘油混合均匀。

6.1.5 反转录 PCR (RT-PCR)

1. cDNA 第一链合成

- (1) 取 2 μ l RNA ($\leq 1 \mu$ g) + 2 μ l Oligo d (T)₂₀V (0.5 μ g) + 13.75 μ l DEPC 处理水; 70°C, 5 min, 迅速置冰上 5 min。
- (2) 加入 5 μ l 5×M-MLV buffer + 1.25 μ l 10 mM dNTP + 1 μ l M-MLV-RT (200 U), 使终体积为 25 μ l。
- (3) 混匀后室温放置 10 min。
- (4) 42°C 反应 1 h。
- (5) 70°C 2 min 灭活 RTase, -20°C 保存备用。

2. PCR 反应 (以 50 μ l 反应体系为例)

ddH ₂ O:	40 μ l
10×PCR buffer:	5 μ l
dNTP (10 mM):	1 μ l
primer1 (20 pmol/ μ l):	1 μ l
Primer2 (20 pmol/ μ l):	1 μ l
模板 DNA:	1 μ l
Taq 酶:	1 μ l
总体积:	50 μ l

PCR 反应程序一般为 95°C 预变性 4 min; 95°C 40 sec, 退火 40 sec (退火温度为引物 T_m 值减 5°C), 72°C 延伸适当时间 (一般 1 min 可扩增 1 Kb 长的 DNA 片段), 30 个循环; 72°C 补延伸 10 min。若用 *pfu* 酶进行扩增, dNTP 使用量和延伸时间都要加倍。PCR 引物设计原则参照《PCR 技术实验指南》(黄培堂等, 1998)。

6.1.6 cDNA 末端快速扩增 RACE (SMART-RACE cDNA amplification kit, Clontech)

1. 分别混合 5'-RACE cDNA 反应体系和 3'-RACE cDNA 反应体系。前者为 1 μ g Total RNA, 1 μ l 5'-CDS primer 和 1 μ l SMART II A oligo; 后者为 1 μ g Total RNA 和 1 μ l 5'-CDS primer。分别用 ddH₂O 补充至终体积为 5 μ l。

2. 将上述体系混合均匀后稍离心, 70℃水浴 2 min。
3. 两管中分别加入以下成分: 2 μ l 5 \times First-strand buffer, 1 μ l DTT (20 mM), 1 μ l dNTP Mix (10 mM) 和 1 μ l PowerScript Reverse Transcriptase, 终体积为 10 μ l。
4. 混合均匀后稍离心, 42℃反应 1.5 h。
5. 用 Tricine-EDTA buffer 稀释所得的第一链 cDNA。如果使用的 Total RNA<200 ng, 加 20 μ l; 若 >200 ng, 加 100 μ l; 如果用 poly A+ RNA 作为模板, 则加 250 μ l。
6. 72℃放置 7 min 灭活反转录酶。
7. -20℃长期保存 (三个月)。
8. 用特异性引物和试剂盒中的公用引物进行嵌套 PCR 扩增目的基因。
9. 扩增所得片段回收后克隆并测序。

以上步骤参照《SMART™ RACE cDNA Amplification Kit User Manual》进行。

6.1.7 质粒 DNA 少量抽提

1. 挑取单菌落接种于含 Amp 或 Kan (100 μ g/ml) 的 3 ml LB 培养基中, 37℃振荡培养过夜。
2. 取 1.5 ml 菌液, 12 000 g 离心 1 min, 弃上清。
3. 用 150 μ l 溶液 I 悬浮沉淀, 冰上放置 15 min。
4. 加 300 μ l 溶液 II 和 150 μ l 氯仿, 轻轻倒转混匀后冰浴 5 min。
5. 加 450 μ l 溶液 III, 振荡混匀后冰浴 15 min。
6. 12 000 g 离心 10 min, 取上清, 加 0.6 倍体积异丙醇, 混匀后于 4℃放置 20 min。
7. 12 000 g 离心 10 min, 弃上清, 沉淀溶于 250 μ l TER (含 20 μ g/ml Rnase A 的 TE) 中, 37℃消化 20 min。
8. 加 350 μ l PPT Buffer, 混匀后置 4℃放置 15 min。
9. 12 000 g 离心 10 min, 弃上清, 1 ml 70%乙醇洗一次, 干燥, 用 40 μ l 0.1 \times TE (pH8.0) 溶解沉淀, -20℃保存备用。

溶液配方:

溶液 I: 50 mmol/L 葡萄糖, 25 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA (pH8.0)。

溶液 II: 0.2 mol/L NaOH, 1% SDS。

溶液 III: 3 mol/L NaAc, pH4.8。

PPT Buffer: 22 体积异丙醇, 1 体积 5 mol/L 醋酸钾, 2 体积双蒸水。

6.1.8 DNA 和 RNA 浓度测定

参照《精编分子生物学实验指南》(颜子颖等, 1998) 中的方法进行。

6.1.9 质粒 DNA 的限制性内切酶反应

参照产品说明中各种酶的最适反应条件进行。反应体系一般包含质粒 DNA 1~2 μ g, 1/10 体积的 10 \times 酶反应缓冲液, 酶量为 2-4 U/ μ g DNA, 总体积一般为 15~20 μ l。最适温度 (一般为 37

℃) 下反应 1~2 h, 用琼脂糖凝胶电泳鉴定酶切是否完全。

6.1.10 DNA 电泳和 DNA 胶回收

1. 玻璃奶法纯化回收 DNA 片段

- (1) PCR 产物或酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳, 切下目的 DNA 条带。
- (2) 加入 3 倍体积 (v/w) 的 6 mol/L NaI, 65℃ 下使凝胶溶解。
- (3) 冰上放置 2min 后加入 8 μ l 玻璃奶吸附 DNA, 冰上再放置 5 min。
- (4) 12 000 g 离心 5 sec, 去上清; 沉淀用 New Wash 溶液洗涤 3 次。
- (5) 晾干后用适量 0.1 \times TE (10~50 μ l) 悬浮, 离心后取上清, 将 DNA 保存于 -20℃ 备用。

溶液配方:

6 mol/L NaI: 将 0.75 g Na_2SO_3 溶于 40 ml 双蒸水中, 加入 45 g NaI 并搅拌至完全溶解。用 Whatman 滤纸或 NC 膜过滤, 在暗处保存。

玻璃奶 (Glassmilk): 100 mg/ml 的 Silica (Sigma S-5631)。将 10 g Silica 溶于 100 ml 1 \times PBS 中, 沉淀 2 h, 弃上清, 重复该步骤 2~3 次; 2 000 g 离心 2 min, 将沉淀物溶于 3 mol/L 的 NaI 中, 终浓度为 100 mg/ml, 4℃ 下避光保存。

New Wash: 20 mmol/L Tris-Cl (pH7.4)、1 mmol/L EDTA 及 100 mmol/L NaCl 溶液与等体积的无水乙醇混合配制而成。

2. 使用试剂盒柱回收

参照购买的胶回收试剂盒使用说明书进行。

6.1.11 DNA 连接

连接反应总体积为 10 μ l, 外源片段与载体的摩尔比一般为 2~3:1, 10 \times T4 DNA 连接缓冲液 1 μ l。若为粘末端连接, 加 T4 DNA 连接酶 0.5~1 μ l, 16℃ 连接 8 h 以上; 若是平末端连接, 加 2 μ l T4 DNA 连接酶, 18~22℃ 连接过夜。T 载体克隆则参照试剂盒说明书进行。

6.1.12 大肠杆菌感受态细胞的制备

1. -70℃ 冻藏的 DH10B 甘油菌在 LB 平板上复苏。
2. 挑取单菌落, 接种到 3 mL 不含抗生素的 LB 液体培养基中, 37℃ 振荡培养过夜。
3. 吸取 1 mL 培养过夜的菌液接种到 100 mL 新鲜的 LB 液体培养基中, 37℃ 振荡培养 2~3 h, 使 OD 值达到 0.6 左右。
4. 将菌液收集到灭菌的离心瓶中, 4℃, 3 800 rpm 离心 5 min, 弃上清; 菌体重悬于 20~30 ml 预冷的 75 mmol/L CaCl_2 溶液中, 冰浴 30 min。
5. 4℃, 3 800 rpm 离心 5 min, 弃上清; 沉淀中加入 10 ml 含 10% 甘油的冷 75 mmol/L CaCl_2 溶液, 用枪头轻轻将菌体吹起, 使混合均匀。
6. 冰上放 3~4 h 后分装小管 (100 μ l /管), -70℃ 冻存。

6.1.13 质粒 DNA 或连接产物的转化

1. 取-70℃冻存的感受态细胞，用双手搓至大部分融化后（一定不能完全融化）迅速置冰上。
2. 感受态细胞完全融化后加入质粒 DNA 20~100 ng 或连接混合物 5 μ l，轻轻混匀，冰浴 30 min。
3. 42℃热激 90 sec，迅速置冰上 1~2 min。
4. 加入 1 ml 已温育至 37℃的 LB 培养基，37℃振荡（ ≤ 150 rpm）培养 1 h。
5. 4 000 g 离心 5 min，去部分上清后（留 150~200 μ l）涂布于含适当抗生素的 LB 平板上。
6. 37℃倒置培养过夜。

6.1.14 重组质粒的鉴定

1. 菌落 PCR 法鉴定

挑取转化所得的单菌落溶于 50 μ l ddH₂O 中，然后取 1 μ l 做模板，用可以扩增外源基因片段的引物进行 PCR，一般 PCR 反应体系为 10~15 μ l 即可。PCR 结束后电泳检测是否能够扩增出目的片段。

2. 快速细胞破碎法鉴定 (Beuken et al., 1998)

重组后的质粒与原来的质粒分子量有较大差别时可用此法检出重组克隆。分别挑取多个单菌落接种于 3 ml 含 80 μ g/ml Amp 的 LB 培养基中，37℃振荡培养过夜。取 300~500 μ l 菌液于 Eppendorf 管中，12 000 g 离心 10 sec，弃上清，沉淀中加入 30 μ l 裂解上样缓冲液（6%蔗糖，0.1%溴酚蓝），再加入 20 μ l 苯酚/氯仿（1:1），将菌体弹起，充分振荡，12 000 g 离心 5 min，取上清上样电泳，观察结果。

3. 酶切鉴定

首先小量抽提质粒 DNA（6.1.7），然后利用合适的限制性内切酶进行酶切反应，琼脂糖凝胶电泳鉴定 DNA 片段大小。

4. DNA 测序

随着测序技术的发展，测序费用越来越低，因此可以将克隆好的质粒初步鉴定后进行测序以进一步确认质粒重组的正确性。这是最直接最可靠的鉴定方法。

6.1.15 家蚕基因组 DNA 的制备 (赵巧玲等, 2000)

1. 将 1 颗冰冻的蚕蛹剪碎，加 10 ml 冷抽提液 A，用玻璃匀浆器冰上充分研磨。
2. 用 3 层纱布滤去碎片，滤液转移到离心管中；4℃，1 500 g 离心 3 min。
3. 弃上清；沉淀中加 1.5 ml 抽提液 B 悬浮，混匀；冰上放置 15 min。
4. 用等体积（1.5 ml）的 TE 饱和酚抽提 1 次；4℃，12 000 g 离心 8 min。
5. 取上清液，用等体积的氯仿抽提 1 次；4℃，12 000 g 离心 8 min。若蛋白较多或对 DNA 纯度要求较高，可重复 4~5 步骤。
6. 取上清液，加入 2 倍体积的无水乙醇沉淀 DNA，-20℃放置 20 min 以上。
7. 4℃，12 000 g 离心 8 min；弃上清，沉淀用 75%乙醇洗涤，稍晾干；溶于适量 TER（含 20 μ g/ml RNaseA 的 TE）中-20℃保存备用。

溶液配方:

抽提液 A: 0.25 mol/L Sucrose (蔗糖), 10 mmol/L EDTA, 30 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)。

抽提液 B: 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 10 mmol/L EDTA, 0.15 mol/L NaCl, 1% Sarcosyl (十二烷基肌氨酸钠); 配置后可 4℃ 稳定保存。

6.1.16 Southern 杂交

1. 选择合适的限制性内切酶对基因组 DNA 进行酶解, 每个反应用 20 μ g DNA。
2. 将酶切产物用 1:1 苯酚/氯仿抽提一次, 12 000 g 离心 8 min; 取上清, 加入 1/10 体积的 3 mol/L 醋酸钠溶液 (pH 5.4) 和 2 倍体积的无水乙醇, -20℃ 放置 20 min 以上; 12 000 g 离心 8 min, 沉淀用 75% 乙醇洗一次; 干燥后溶于 20 μ l 0.1×TE 中。
3. 在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳, 待溴酚蓝至胶的 2/3 处时停止电泳; EB (溴化乙锭) 染色, 拍照 (需用直尺记录 Marker 的位置)。
4. 转膜
 - (1) 将拍照后的凝胶用 ddH₂O (双蒸水) 漂洗两次以洗去胶表面的 EB, 然后置 0.25 mol/L HCl 中浸泡 10~15 min (使大分子量 DNA 原位断裂, 便于转移), 直至溴酚蓝变成黄色; 用 ddH₂O 漂洗两次, 加入数倍体积的 0.4 mol/L NaOH 浸泡至溴酚蓝重新变为蓝色 (使 DNA 变性)。
 - (2) 将事先裁好的比胶稍大的滤纸和尼龙膜 (或硝酸纤维素膜) 各一张在 0.4 mol/L NaOH 中浸泡 5~10 min; 将滤纸平铺于真空转膜仪 (BioRad) 的多孔纤维板正中, 用玻璃棒赶走气泡; 再将尼龙膜放于滤纸上, 赶走气泡; 将带窗口的塑料膜置于尼龙膜上, 窗口正对膜; 将凝胶置于窗口上 (胶边要压住塑料膜 5 mm 以上), 赶走气泡; 压紧转膜仪的封套后开动真空泵, 调节压力表 (约 2 inchs.Hg), 此时凝胶边缘逐渐与塑料膜贴紧, 用手指轻压凝胶的四个边缘部位使之与塑料膜充分贴紧; 倒入 1 000 ml 0.4 mol/L NaOH (或 10×SSC) 作为转膜液; 转移 1~2 h。
 - (3) 转移结束后, 用 2×SSC 漂洗尼龙膜两次, 置滤纸上风干。
 - (4) 将干燥的尼龙膜置滤纸上用 UV 交联仪交联 5 min; 或夹于两张滤纸中间 80℃ 烘烤 1~2 h 使 DNA 与尼龙膜发生交联。

溶液配方:

20×SSC: 参照《分子克隆实验指南 (第三版)》(黄培堂等, 2002)。

5. 预杂交: 将预先配制好的预杂交液 10 ml 倒入杂交管中, 然后将预先用 6×SSC 浸湿的尼龙膜 (DNA 面朝上) 放入杂交管内, 赶走气泡; 60℃ 预杂交 3~6 h。

预杂交液配方 (10 ml):

组 分	体 积	终浓度
ddH ₂ O:	5.4 ml	
20×SSC:	3 ml	6×
50×denhardt:	1 ml	5×
10% SDS:	0.5 ml	0.5%
鲑鱼精 DNA (10 mg/ml):	0.1 ml	100 μ g/ml

注：鲑鱼精 DNA 用前煮沸 5 min，迅速置于冰上；即配即用。

6. 探针标记

- (1) 将 Klenow Fragment 以外的组分置冰上融化。
- (2) 将模板 DNA 用 ddH₂O 或 TE 稀释成 1~25 µg/ml 后，95~100℃水浴 2~5 min 使双链 DNA 变性；然后迅速置冰上。
- (3) 探针标记反应体系：

组 分	体 积	终浓度
ddH ₂ O:		
5×labeling buffer:	10 µl	1×
Mixture of the unlabeled dNTPs (1.25 mM each, -dATP) :	2 µl	50 µM each
Denatured DNA template:	25 ng	500 ng/ml
Nuclease-free BAS (10mg/ml) :	2 µl	400 µg/ml
[α- ³² P]dATP (10mCi/ml, ~3000Ci/mmol) :	5 µl	333 nM
DNA polymerase I large (Klenow) fragment:	5 units	100 U/ml
Total volume:	50 µl	

注：将酶和带同位素标记的 dATP 外的组分在冰上混合后直接加到同位素管中，最后加酶；混匀后稍离心。25℃反应 1~2 h。

7. 杂交：将标记好的探针混合物 95~100℃煮 2~5 min，迅速置冰上 5 min；将其加入到杂交管中。注意将探针加到预杂交液中，不要直接加到膜上。60℃杂交过夜。
8. 洗膜：先后用 2×SSC/0.1%SDS，1×SSC/0.1%SDS，0.1×SSC/0.1%SDS 洗膜液分别洗膜三次；每次 65℃，15 min。一般 2×SSC/0.1%SDS 和 1×SSC/0.1%SDS 用于洗去膜上吸附的游离探针；0.1×SSC/0.1%SDS 用于洗去非特异性杂交探针。用 0.1×SSC/0.1%SDS 洗的过程中随时检测膜上的放射性，根据其强度调整洗膜次数。
9. 压片：将洗好的尼龙膜拿出后用滤纸将膜表面的残留液吸干（但如果打算重复使用这张尼龙膜，则必须保证膜潮湿），将其用塑料薄膜固定在增感屏上，并用放射性墨水辅助标定位置；然后在暗室中将 X 光片压入增感屏。-70℃放置过夜（时间可根据具体情况进行调整；另外有些材料的增感屏不需要置于-70℃，室温放置即可）。
10. 洗片：将预先市购的显影粉和定影粉按照使用说明配成溶液；在暗室中进行洗片，将压好的 X 光片置显影液中 5 min，清水中涮洗一下，置定影液中 5 min。
11. 结合步骤 3 中所拍凝胶电泳照片对杂交结果进行分析。

6.1.17 实时荧光定量 RT-PCR (Realtime Quantitative RT-PCR)

1. 根据目的基因 cDNA 序列设计引物，使扩增片段在 250 bp 以下，同时保证扩增的特异性。
2. 提取感兴趣的家蚕组织总 RNA 进行反转录 (6.1.5)；可事先用 RNA 做模板进行 PCR 检测有无基因组 DNA 污染，若有，应该先用 DNA 酶消化后再进行反转录。
3. 按如下 PCR 反应体系混合各种成分：SYBR Green Realtime PCR Master Mix 10 µl、Primer 1 (10 mM) 0.6 µl、Primer 2 (10 mM) 0.5 µl、cDNA (约相当于 10 ng RNA 的转录产物) 1 µl，

再用 ddH₂O 补充至终体积 20 μ l。

4. 用如下程序在荧光定量 PCR 仪 (Chromo 4 Detector, MJ Research) 上进行检测: 95°C 3 min; 95°C 15 sec, 60°C (可据实际情况调整) 15 sec, 72°C 30 sec, 40 个循环; 溶解曲线从 60°C 到 95°C, 每 0.2°C 读取 1sec。
5. 标准曲线的制作: 将包含扩增片段序列目的基因及内参基因片段克隆到 pMD18-T 载体上, 测定质粒浓度并按每 μ l $10^6 \sim 10^2$ 个拷贝进行梯度稀释作为标准样进行荧光定量 PCR。以所得 Ct 值对相应的拷贝数的对数作图, 即得各个基因扩增的标准曲线及其线性方程 $y=ax+b$ 。
6. 对荧光定量 PCR 结果进行分析, 根据标准曲线方程计算 x 值, 则待测基因的拷贝数 $Y=10^x$ 。

6.1.18 DNA 和蛋白质序列的比对及进化分析

除使用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 网址上的 BLAST 工具外, 借助 DNASTAR 软件包中的工具进行序列分析 (Burland, 2000)。需要做进化树的序列用 CLUSTAL X 软件包进行比对 (Thompson et al., 1997; Jeanmougin et al., 1998), 然后用 PHYLIP 软件包中的程序制作进化树 (Felsenstein, 2002)。

6.1.19 本章所用 PCR 引物列表

表 6.1 本章所用 PCR 引物列表。

Table 6.1 PCR primers used in this chapter.

引物名称	引物序列	用途
BASP1	5'-ATCGCTTTCATCTAAAAGCCTCTTTA-3'	扩增家蚕 <i>ASH1</i> 基因
NBASP1	5'-AGCCGAGGGAATATGTTGTCGGAGTGC-3'	cDNA 5'末端
BASP2	5'-CGGAGGAATGCGCGAGAGCGGAATAGAG-3'	扩增家蚕 <i>ASH1</i> 基因
NBASP2	5'-GAGGTTCTCCTCCAGAAAATTAAGCAAGG-3'	cDNA 3'末端
ORF2-F	5'-GTCAAAATGCTCCAAGAAATCC-3'	扩增家蚕 <i>ASH2</i> 基因 ORF
ORF2-R	5'-GATATAACTATTTTTGTTGCCACC-3'	
ORF3-F	5'-AAATTAATGCGCGGCCGTCC-3'	扩增家蚕 <i>ASH3</i> 基因 ORF
ORF3-R	5'-TCACTTTTCTTGCCACCACGAGAT-3'	
ORF4-F	5'-GCCGAAATGAGCTCCATCG-3'	扩增家蚕 <i>ase</i> 基因 ORF
ORF4-R	5'-TTATTTTTTATTAACAGTTTTCGTAGG-3'	
ASH2-3'	5'-AATAGCGAGACGTAATGCACGGGA-3'	扩增家蚕 <i>ASH2</i> 基因
ASH2-3'N	5'-GATTCAACGCACTTCGCCGTCA-3'	cDNA 3'末端
ASH3-3'	5'-CAAGAAGAAACGCCAGGGAAAGGA-3'	扩增家蚕 <i>ASH3</i> 基因
ASH3-3'N	5'-GAAAAGACTGCCTGCCGCAGT-3'	cDNA 3'末端
ase-3'	5'-ACGGAATGCGCGGGAACGGAA-3'	扩增家蚕 <i>ase</i> 基因 cDNA
ase-3'N	5'-GGCGACACATACCCGAAGAAG-3'	3'末端
Q-A3-F	5'-CCCCATCGAACACGGAATCG-3'	实时荧光定量 PCR 中扩
Q-A3-R	5'-CGACGTACATGGCGGGCGT-3'	增内参基因 <i>Bm-actin A3</i>

Q1F	5'-GAGGTCCTCCAGAAAATTAAGCAAGG-3'	实时荧光定量 PCR 中扩
Q1R	5'-AGACACGAATGATGGGGCTGG-3'	增 <i>Bm-ASH1</i>
Q2F	5'-GATTCAACGCACTTCGCCGTCA-3'	实时荧光定量 PCR 中扩
Q2R	5'-CCCGATTTTCTTGATCACGCGTAATAC-3'	增 <i>Bm-ASH2</i>
Q3F	5'-CAAGAAGAAACGCCAGGGAAAGGA-3'	实时荧光定量 PCR 中扩
Q3R	5'-TTAGGAATGCCAAGCGCTGCATC-3'	增 <i>Bm-ASH3</i>
Q4F	5'-GGCGACACATACCCGAAGAAG-3'	实时荧光定量 PCR 中扩
Q4R	5'-GATTCCATGCAGGAACGAGACGT-3'	增 <i>Bm-ase</i>
Oligo d(T) ₂₀ V	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV-3'	用于反转录

6.2 结果

6.2.1 家蚕 *AS-C* 同源体基因 *Bm-ASH1* cDNA 的克隆

1. 家蚕 EST 库中 *AS-C* 同源序列的查找及 RACE 引物的设计

利用果蝇 *AS-C* 基因之一 *ac* (*achaete*) 编码的蛋白质 (AC) 序列搜索家蚕 EST 库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST, tblastn>)。比对结果中有一条 EST 序列在氨基酸水平上与 AC 的 bHLH 具有很高的同源性。根据搜索到的 EST 序列设计 5'-RACE 和 3'-RACE 特异性扩增引物 (图 6.1)。

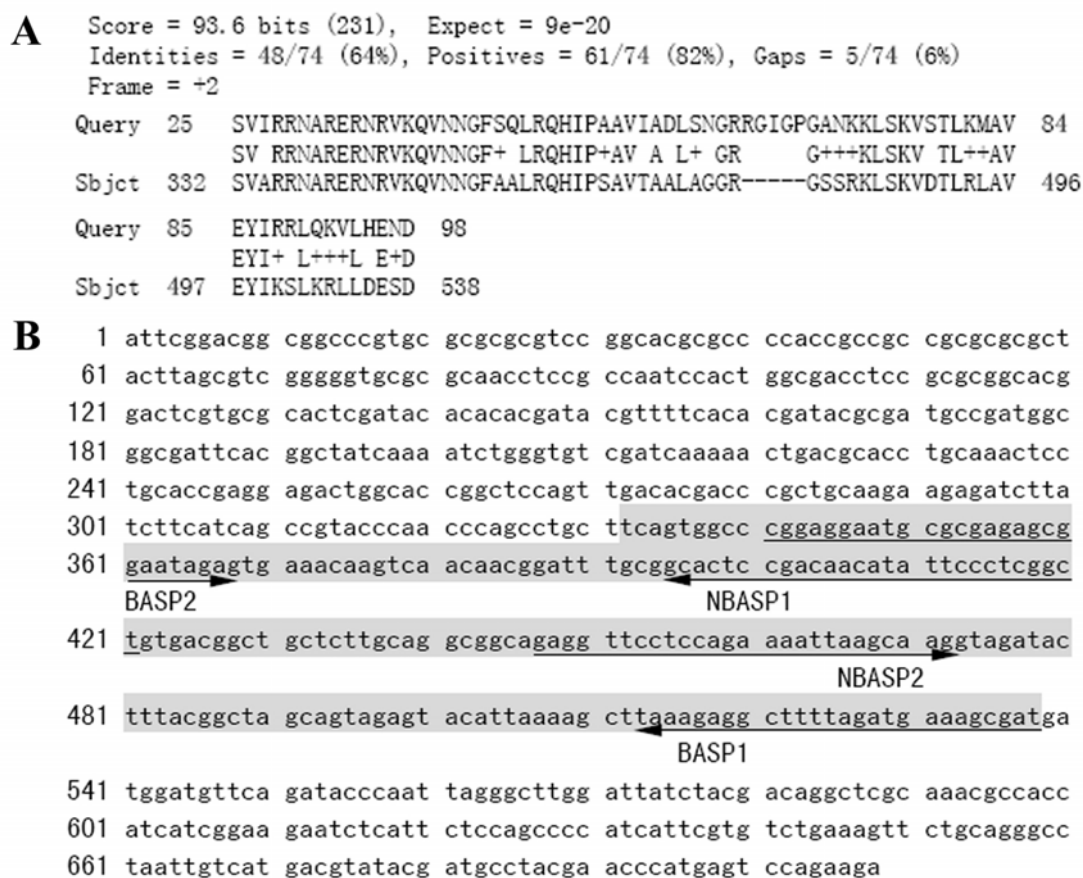


图 6.1 用 *ac* 基因编码的蛋白质序列比对家蚕 EST 库的结果及 RACE 引物的设计。A. 搜索到的序列与 AC bHLH 区

域的一致性高达 64%；B. 箭头方向表示引物的方向。

Fig. 6. 1 The result of blasting silkworm EST database with AC amino acid sequenc and the design of RACE primers. A. A sequence found from silkworm EST database has 64% identities with the bHLH region of AC; B. The arrows under the sequences show the direction of the primers.

2. *Bm-ASH1* 基因 cDNA 的获得

首先用 BASP1 和 BASP2 引物对(表 6.1)以家蚕中肠 cDNA 为模板进行 PCR 扩增中间片段, 经测序后确证 *Bm-ASH1* 基因在中肠中表达。然后用设计好的 5'-RACE 引物 BASP1、NBASP1 及 3'-RACE 引物 BASP1、NBASP1 以中肠来源的 RACE cDNA 模板做嵌套 PCR, 分别得到 360 bp 的 5'-RACE 扩增产物和 1 Kb 的 3'-RACE 扩增产物。测序后将所得序列拼接, 得到一个 1332 bp 的 cDNA 序列(含 Poly (A)尾巴), 其中含有一个 582 bp 的开放阅读框, 编码 193 个氨基酸, 蛋白质序列中包含明显的 bHLH 基序。在开放阅读框后 6 个核苷酸处对应于基因组序列有一个内含子。距 Poly (A)尾巴上游 10bp 处有一个加尾信号(AATAAA)(图 6.2)。

```

GCCAATCCACTGGCGACCTCCGCGGGCAGGACTCGTGCGCACTCGATACACACGATACGTTTTACACGATACGCG 80
ATGCCGATGGCGGCGATTACGGGTATCAAAATCTGGGTGTCGATCAAAAAGTACGACCTGCAAACGCCTACACCGAG 160
M P M A A I H G Y Q N L G V D Q K L T H L Q T P T P R
GAGACTTGCGCGGCTCCAGTTGACACGACCCGCTGCAAGAAGAGATCTTATCTTCATCAGCCGTACCCAAACCCAGCCTG 240
R L A P A P V D T T R C K K R S Y L H Q P Y P T Q P
CTTCGGTGGCCGGAGGAATGCGCGAGAGCGGAATAGAGTGAAACAAGTCAACAACGGATTGCGGCACTCCGACAACAT 320
A S V A R R N A R E R N R V K Q V N N G F A A L R Q H
ATTCCCTCGGCTGTGACGGCTGCTCTTGACGGCGGAGAGGTTCTCCAGAAAATTAAGCAAGGTAGATACTTTACGGCT 400
I P S A V T A A L A G G R G S S R K L S K V D T L R L
AGCAGTAGAGTACATTAAGCTTAAAGAGGCTTTAGATGAAGCGATGATGGATGTTGAGATACCAATAGGGCTTG 480
A V E Y I K S L K R L L D E S D D G C S D T Q L G L
GATTATCTACGACAGGCTCGCAACGCCACCATCATCGGAAGAATCTCATTCTCCAGCCCCATCATTCTGTGTGAAAGT 560
G L S T T G S Q T P P S S E E S H S P A P S F V S E S
TCTGCAGGGCCTAATTGTCATGACGTATACGATGCTACGAACCCATGAGTCCAGAAGACGAGGAAGTACTTGACGTCAT 640
S A G P N C H D V Y D A Y E P M S P E D E E L L D V I
ATCGTGGTGGCAACAACAGTGACAAGGGAACGAGCCTTGACAGTGAACAAGTGGGGCCATTGAGCGGCAATTGGTGATT 720
S W W Q Q Q
ATGAAAAAACGAGTATTCTCAAGGAAGACCCGATGGAGCGGAGGGACTCCGAGAGAGCCTCTAATTAAGCGTAATCA 800
GTATATTCCTAATGAGTGGGGATAATGGTGGACAACGACGAGCTCATCGACGATTCCGTCGAGCGACTTTACTTCGAAC 880
GAACGCTGCATTTATACATCAATGGAATAGCAGCTCCAAGACTGAAACGATCATTGTTCCATACAAGCATTTAAAGTT 960
ATATTAGTACCGCTGTGCCTTAGTTTTAACGTTAGATAGTAAACCTTCCATTAAATTATAGCCTATACAATTGTTATCTA 1040
GTCATTATCTTTAAGAATGCTGTTAATTGCTATTATATTATTATAATTCGGTGATGTGGACCAATGCCCGTATTATAA 1120
ATATTTAATGGAATGATCAAAAGCCAACCTTACTTTACGTAAGGATCTATGAGACAAAGACTTTTAGTTAATAAAGTTAAT 1200
ATTAGTATTACAAGCATGATTCCTAATAATGTAAGATGTTATTAAGATCCATTGTTACTATTGAGCACTTGGTTTTTCT 1280
GTAATAGATCAAAATAAATGATTCTGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1332

```

图 6.2 *Bm-ASH1* 基因 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列。实线框出的是 bHLH 区域, 虚线框出的是 C-端保守区, 阴影显示的是加尾信号, “┐”表示此处对应于基因组序列有一内含子存在。

Fig. 6. 2 The nucleotide and amino acid sequences of *Bm-ASH1*. The bHLH region encoded by *Bm-ASH1* is boxed with real line and the C-terminal conserved region is boxed with broken line. The Putative polyadenylation signal (AATAAA) is indicated with shadow, and “┐” shows the putative site connects the two exons in the cDNA.

6.2.2 家蚕 *AS-C* 同源体基因 *Bm-ASH2*、*Bm-ASH3* 及 *Bm-ase* cDNA 的克隆

1. 家蚕基因组序列库中 *AS-C* 同源序列的查找

利用克隆得到的家蚕 *Bm-ASH1* 基因编码的蛋白质序列搜索家蚕基因组序列库中与其同源的

序列 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>, insect)。比对结果中有六条基因组 DNA 序列氨基酸水平上与 *Bm-ASH1* 蛋白质 bHLH 区域有很高的一致性。这六条 DNA 片段可以归纳为四组, 其中一组为 *Bm-ASH1* 的基因组序列, 另外三组则为未知基因序列 (图 6.3)。经过分析, 发现未知的三组基因组序列均含有一个较大的开放阅读框, 大小分别为 720 bp、726 bp 和 1 215 bp。

```
>gb|AADK01030307.1 Bombyx mori strain Dazao Ctg030307, whole genome shotgun sequence
      Length=3775

      Score = 73.2 bits (178),  Expect = 7e-13
      Identities = 39/57 (68%), Positives = 50/57 (87%), Gaps = 3/57 (5%)
      Frame = +1

Query   14      KQVNNGFAALRQHIPS AVTAALAGG--RGSS-RKLSKVDTLRLAVEYIKSLKRLD  67
          KQVN+GF ALR+H+P++V AAL+GG  RGSS +KLSKVDTLR+ VEYI+ L++LLDE
Sbjct   1714    KQVNDGFNALRRHLPASVVAALSGGARRGSSGKKLSKVDTLRMVVEYIRYLQQLD  1884

>gb|AADK01036667.1 Bombyx mori strain Dazao Ctg036667, whole genome shotgun sequence
      Length=2669

      Score = 72.4 bits (176),  Expect = 1e-12
      Identities = 36/56 (64%), Positives = 47/56 (83%), Gaps = 2/56 (3%)
      Frame = +2

Query   14      KQVNNGFAALRQHIPS AVTAALAGG--RGSSRKLSKVDTLRLAVEYIKSLKRLD  67
          KQVN+GF ALR+ +P+AV AAL+GG  RGS +KLSKVDTLR+ VEYI+ L+ ++DE
Sbjct   1667    KQVNDGFNALRKRLPAAVVAALSGGARRGSGKKLSKVDTLRMVVEYIRYLNQNMID  1834

>gb|AADK01011379.1 Bombyx mori strain Dazao Ctg011379, whole genome shotgun sequence
      Length=10597

      Score = 64.7 bits (156),  Expect = 2e-10
      Identities = 33/56 (58%), Positives = 44/56 (78%), Gaps = 3/56 (5%)
      Frame = +2

Query   14      KQVNNGFAALRQHIPS AVTAALA---GGRGSSRKLSKVDTLRLAVEYIKSLKRLD  66
          +QVN+GFAALR+HIP  V AA      RG ++KLSKV+TLR+AVEYI++L+ LL+
Sbjct   7985    RQVNDGFAALRRHIPEEVAAAFETTNSNRGPNKKLSKVETLRMAVEYIRNLESLLN  8152
```

图 6.3 用 *Bm-ASH1* 基因编码的蛋白质序列比对家蚕基因组序列库的结果。

Fig. 6.3 The result of homologous searching silkworm Genomic database using *Bm-ASH1* amino acid sequenc.

2. *Bm-ASH2*、*Bm-ASH3* 及 *Bm-ase* 基因 cDNA 的获得

以家蚕 0 d 蛹翅 cDNA 为模板对家蚕 *Bm-ASH2*、*Bm-ASH3* 及 *Bm-ase* 基因 ORF 进行扩增, 均得到与预测大小相同的目的 DNA 片段。再根据测序结果分别设计 3'-RACE 引物, 然后以 0 d 蛹翅来源的 3'-RACE cDNA 模板进行嵌套 PCR, 分别得到约 1.2 Kb、700 bp、1.35 Kb 的扩增产物。将测序结果分别与各自的 ORF 序列拼接后得到的 cDNA 长度分别为 *Bm-ASH2* 1 449 bp、*Bm-ASH3* 990 bp、*Bm-ase* 1 695 bp。其中 *Bm-ASH2* 含有一个 720 bp 的开放阅读框, 编码 239 个氨基酸; *Bm-ASH3* 含有一个 726 bp 的开放阅读框, 编码 241 个氨基酸; *Bm-ase* 含有一个 1 215 bp 的开放阅读框, 编码 404 个氨基酸。三个基因编码的蛋白质序列中均包含明显的 bHLH 基序; 距 Poly (A) 尾巴 12 bp、15 bp、14 bp 处各有一个加尾信号 (AATAAA)。在 *Bm-ASH2* 开放阅读框后 4 个核苷酸处对应于基因组序列有一个内含子; 而另外两个基因则没有发现内含子 (图 6.4~6.6)。

```

ATGCTCCAAGAAATCCAGCTAGTTCAAGGTCAGACGAATTACGTGGTCGTTTCTTCCGGATATCCCTCCAATACATTGAA 80
M L Q E I Q L V Q G Q T N Y V V S S G Y P S N T L N
TAAATCATCTTTAGAGAAACGAAACGTTGCTATAGCTCCAGCGCTGAGAAAAATTACGTCACACACGACACTCCACCGA 160
K S S L E K R N V A I A P A P E K N Y V T H D T P P
ATCTACACTACAGGAAAAAGGTGCACTTCAGAACTAATCCGTACACTGGACCACAGGCCGCTCAATAGCGAGACGTAAT 240
N L H Y R K K V H F R T N P Y T G P Q A A S I A R R N
GCACGGGAACGAAATCGCGTAAACAAGTGAATGATGGATTCAACGCACCTTCGCCGTACCTGCCGGCTTCTGTAGTGGC 320
A R E R N R V K Q V N D G F N A L R R H L P A S V V A
AGCTCTGTCCGGTGGCGCCAGACGAGGTTCTGTCAGGGAAGAACTTAGCAAAGTCGACACATTGCCGGATGGTTGTTGAAT 400
A L S G G A R R G S S G K K L S K V D T L R M V V E
ATATAAGGTACCTTCAGCAGTTATTAGACGAAAGTGATGCCGCATTAGGTATTACGCGTGATCAAGAAAAATCGGAAAAA 480
Y I R Y L Q Q L L D E S D A A L G I T R D Q E N R E N
ATCCAAGCAATAACTCAGTTCAGCCGATGACTTCTATTGACATGGATGACGGGTTTTTCTACGGAAGTGGATCACCTTG 560
I P S N N S V Q P M T S I D M D D G F F Y G S G S P C
TTCAGAGAAGGCAGATTGCCAGCTCCTTCGGAATGTTCTTCGGGTGTGCTTCGGCGTATTCCGGCTGTCGATCGTTACG 640
S E K A D S P A P S E C S S G V S S A Y S A V D R Y
AGGTTACTACGCAACAATGGAATCAATGGATGAAGAAGAACTCTTAGACGTCATTTTCATGGTGGCAACAAAAATAG 720
E V T T Q Q Q M G S M D E E E L L D V I S W W Q Q K
TTATATCCCCCAGAGCCCAATCATAGATGGACGTAACCTCCGAAAAATTATTGTGCATAAACACGAAAAGACTCTTATAT 800
TTCTAGTCAAAGTGCCTTAAACATAGTTTTAATCGCGTATTTTCGGATACAAATTCGTTTATGAATTGTAATGAAGGAAT 880
TAACGGACTGCTCTTTAATTGTAAGAAAGAAAACAGACTGATTGATTTATAATGTAAGACTAGTTTCATTGTCCGAAA 960
GAGATAATAAACTAAAATCGATATTTGATTTAAAGTAATTAATTAAGCGGTGTTTCTGTAATTACTTTGTTTTAAAAA 1040
TAATACATATTTCTTTGTTTTCAAAAACACATTAGTTCAAAATCGTTTAGGTAATTTTGTATCCTCCCATTTAAAT 1120
ATATTGTCGTGCTTATTTTATTTCTTAATATAAATTTTGAATACAGTTTCAAGGTTAAAGAAAAAAATGCTTTTCAC 1200
AAAAAATAGCAAGCAATCGATCTTAAATATAACCACATTATCGTCATTAATTTTAAAGTTAGTGAATTCTGTCGTAT 1280
TGTAATTTTGTACCTGTTAATAATTACCGAGGCTTTGTAATTAATGCGTTCTAGTAATCGGGTCAGTCGATTTAATTGT 1360
AAAAAGTTATAGGTAGATAGCCGTAATCGTAAGCTTAGATAATAAACTATTTATTGGAAAAAATTTTTTTTTTTT 1440
AAAAA 1449

```

图 6.4 *Bm-ASH2* 基因 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列。实线框出的是 bHLH 区域，虚线框出的是蛋白质 C-端保守区，阴影显示的是加尾信号，“┐”表示此处对应于基因组序列有一内含子存在。

Fig. 6. 4 The nucleotide and amino acid sequences of *Bm-ASH2*. The bHLH region encoded by *Bm-ASH2* is boxed with real line and the C-terminal conserved region is boxed with broken line. The Putative polyadenylation signal (AATAAA) is indicated with shadow, and “┐” shows the putative site connects the two exons in the cDNA.

```

ATGCGCGGCCGTCGGAGCCCTCATTACAGTCTTACGCGTCGAGACGTTTACACATTATTCAGTGCACATCTCACTGCTC 80
M R G R P E P S F T S Y A S R R L H I I Q C T S H C S
ATTGACGAATTCGAATAGTAAATGATTAAGGAATTCATCATAAGTCTAACTACACTCTATACGTAAATGACTCACCAG 160
L T N S N S K M I K G I H H K S N Y T L Y V N D S P
AAATGGTGGCAATCGCACCGGCACCTGAACTCGATTAACATTAGAGTTGGAACCAAAAAATATAATTACAAGAACTGC 240
K M V A I A P A P E T R L T L E L E P K K Y N Y K N C
AGCCACAACGGAATCAAGCTGCTTCGATTGCAAGAAGAAACGCCAGGGAAGGAACGCTGTGAAACAAGTGAACGATGG 320
S H N G T Q A A S I A R R N A R E R N R V K Q V N D G
ATTCAACGCGTTGAGGAAAAGACTGCCTGCCGCGAGTCGATGCGCATTATCCGGAGGCGGAGACGTGGTTCCGGGAAGA 400
F N A L R K R L P A A V V A A L S G G A R R G S G K
AACTCAGCAAAGTAGACACACTACGAATGGTCGTCGAATATATAAGGTATTTACAAAATATGATTGACGAAAGCGATGCA 480
K L S K V D T L R M V V E Y I R Y L Q N M I D E S D A
GCGCTTGGCATTCCCTAAGCAGCCTTCGATAGACTTATCGACGATCAGCTATGAAGCGGATGATGGTGTCTTCGAAAGGAG 560
A L G I P K Q P S I D L S T I S Y E A D D G V F E R S
TTCTCCATATACGAGCTCGGTTCCCTCACCAGCGGGCTCCGAAAGCTCTTCAGGCGTGTATCAAATTTATTCACAAGGCT 640
S P Y T D S V P S P A G S E S S S G V S S N Y S Q G
ACATTCAAATTTTCAAATCGAAGAACAATAACTCAATGGATGACGACCTACTTAATACTATCTCGTGGTGGCAAGAA 720
Y I P N F Q I E E Q I T P M D D D L L N T I S W W Q E
AAGTGAATTTGTATCCGTTAATGTCGATGTATGTAATCTAGTCATTTTTTTAGACAATTTAGCGTCTCTTTGTGTAAT 800
K
TTTGTACATTCCCGTATATAGTAATTTATAAATAAATTAATAAATACTGTTTACAAGTAGCGGCTGTGAGTAGAATTTCCA 880
GGTTGTGAAATTAATATAAGACTGATTATATTCGACCATTTTGTAAATGTTTTTTTGTGAATAAACTTTTATTACACGT 960
GAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 990

```

图 6.5 *Bm-ASH3* 基因 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列。实线框出的是 bHLH 区域，虚线框出的是蛋白质 C-端保守区，阴影显示的是加尾信号。

Fig. 6.5 The nucleotide and amino acid sequences of *Bm-ASH3*. The bHLH region encoded by *Bm-ASH3* is boxed with real line and the C-terminal conserved region is boxed with broken line. The Putative polyadenylation signal (AATAAA) is indicated with shadow.

```

ATGAGCTCCATCGATATCGTAGTCTTCCGCAACGCGTCAGTCAACAAGGCCAGATTCTTCAAGAAACCGTGAATAATTC 80
M S S I D I V F R N A S V N K A Q I L Q E T V N N S
CTTAAACATAACGAACAACGATCCCAATCAAAATGCGAGACGTGAAATTATAGTTTTAAGAAAAAACAAAGGATCCAAC 160
L N I T N N D P N Q N A R R E I I V L R K K Q R I Q
CCGCCGATACCGTGTCTGTGCCTGCACTGATGCAACCATTCGATCATCAAGCGTGCTAGCGAAAAAGCAAGA 240
P A D T V S V P A L M R T I E P S S S S V L A K K A R
TACCGAGAAAATACGAGTTCGGATGAAACTGTGCGTACCTACACCGTTA GCGGTCGCTCGACGGAATGCGCGGGAACG 320
Y R E N T S S D E T V R T P T P L A V A R R N A R E R
GAACAGAGTACGTCAAGTGAACGATGGATTTGCGGCTCTCCGGCGACACATACCGAAGAAGTAGCCGCGGCTTTGAGA 400
N R V R Q V N D G F A A L R R H I P E E V A A A F E
CGACTAACTCCAACAGAGACCGAACAACAACTCAGTAAAGTGGAACATTAAGAATGGCGGTGAGTACATCGGAAC 480
T T N S N R G P N K K L S K V E T L R M A V E Y I R N
TTGGAAAGTTTACTTAACATCGGCCATGCTGACAAAGAAACACGTCTCGTTCTGTCATGGAATCATTCCCTTCGCCAGC 560
L E S L L N I G H A D K E N T S R S C M E S F P S P A
ATCATCGTCTCCGAGAGAAAACAGTCAAGAGAGGAGCTATTTTCATGATTAGTTTCGCTGCCCTAGAAGAAGAGGAACTAG 640
S S S P R E N S Q E R S Y F M I S S P A L E E E E L
ATGAAGATGAAATAGACGGAACCTGGCTTACGTACGACGAGTATGTCGACATTGCAGCCTCAGAAAATTTTCACTTA 720
D E D E I D G L P G L R Q Q Q Y V D I A A S E N F H L
GTGTCTACGCCACATCTGTACGATGAAGAAGAAGGTCAACCTCTTACACCATCATCGGATTTACTGGTTCAAGATGAAGT 800
V S T P H L Y D E E E G Q P L T P S S D L L V Q D E V
AAATTACATATCTAGACGCACATTTTCAGTTTCCAAATTCGCCGAACATTTCTCTGTAATACCCGAACAAATACC 880
N S H I L D A H F Q F P N S A E H F S V I P E Q N Y
TGAGTGAACGGAAGTGCCAGTCAGTGAAGTGATTTTGAAATCAAATACGCGGATTCCCTTAATCAACACATCCAACAA 960
L S E T E V P V S E S D F E I K Y A D S L N Q H I Q Q
AGCTTCAACGAAACACTGATATACCTTTTGCTTGAATCCGGATCTTATCTTCCGAAAACAGTTCAAGTTCAAGGA 1040
S F N E N T D I P F A L N P D L I L P E N Q F K F K E
AAGTGACAATGGTTCTTTCACGGAAAACGAAGATTTTGTGAAGTTGAATTAAGGAACCTCCAGATATCCAAGTGA 1120
S D N G S F T E N E D F C E V E L K K E L P D I Q V
CGCCGAGGACAGAGAACAATTCGAAGAACTCTAAATGGTGGCAGGAGAGAAACGAGACAAACCGTCTACGAAAAC 1200
T P E D R E Q F E E T L K W W Q E K T R Q T R P T K T
GTTAATAAAAAATAATAATTTTATGAACAATAATTACGATAGGAAATGTTGTAGATAAATTTACTTAAATATTTATT 1280
V N K K
TTAATTGTAATAGAATGAAACATACAGCTGTGTGTACCAAGGTGCAAGGTGGGTTGTAACGGTCAATGTTAAGCGCTTGG 1360
CAATTAATGTTAAGCTCCTGTTTACTATAGACTTTGTACATGTTTCAGTCGCGATTTGAATGTATGTAGGTAGTTTCAGT 1440
GTTTTATCTAAGATCTCTAATCGCTCACTATTATTTATTTATTTAAGTGCTCCGTGAAGTATTGTTTGTATGTAGTTTA 1520
ATATTATCTCGAATTTAAGGCACCTAAAAATTTCTGTAATGATTTAGATGTCTTAATAAGTGCTTAGGATAATGTGA 1600
AAATTGTGATACATTATTTTATATTACTGCATATGTACATTGGTAAGAAATAAATTTTGTAAATTTGCAAAAAA 1680
AAAAAAAAAAAAAAAA 1695

```

图 6.6 *Bm-ase* 基因 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列。实线框出的是 bHLH 区域，阴影显示的是加尾信号。

Fig. 6.6 The nucleotide and amino acid sequences of *Bm-ase*. The bHLH region encoded by *Bm-ase* is boxed with real line, and the Putative polyadenylation signal (AATAAA) is indicated with shadow.

6.2.3 家蚕 *ASH* 基因与其他昆虫 *ASH* 基因的同源性比较

将家蚕的 *ASH* 基因与蝴蝶的 *B-ASH1* 基因及果蝇 *AS-C* 基因编码的氨基酸序列进行同源比较，发现每个基因均具有一段非常保守的碱性基序 (basic) 和两段螺旋基序 (helix)，在两段螺旋基

序的中间有一段保守性较低的环(loop)。在每个基因的C-端则具有一个保守的16~17个氨基酸组成的基序(图6.7)。

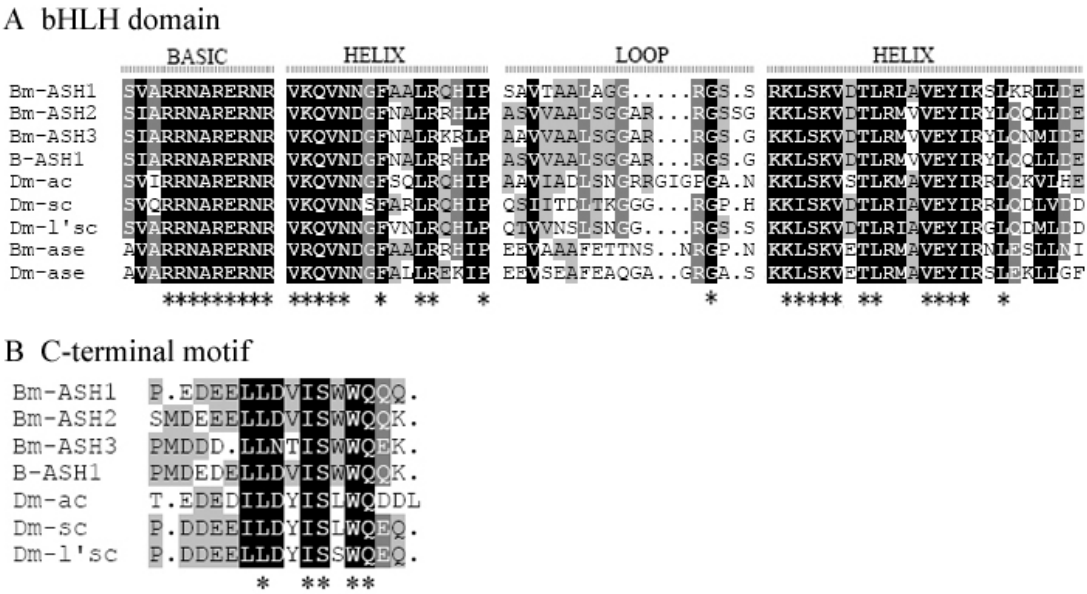


图 6.7 家蚕 *ASH* 基因与蝴蝶的 *B-ASH1* 基因及果蝇 *AS-C* 基因编码的蛋白质的同源比较。

Fig. 6.7 Homologous comparison among proteins coded by *Bm-ASHs* of *Bombyx mori*, *B-ASH1* of the butterfly and *AS-C* of *Drosophila*.

表6.2列出了家蚕*ASH*基因与其他昆虫*ASH*基因在蛋白质水平上的同源性。*Bm-ASH1*、*Bm-ASH2*、*Bm-ASH3*与非鳞翅目昆虫的*ASH*基因相比较，*Bm-ASH1*与它们的同源性均为最高，其中与*Ag-ASH* 79.1% (47.7%)、*Am-ASH* 77.6% (50.8%)、*Tc-ASH* 76.1% (46.6%)、*Dm-l'sc* 74.6% (40.9%)、*Dm-sc* 68.7% (42.0%)、*Dm-ac* 68.7% (31.6%)。与果蝇的四个*AS-C*比较，*Bm-ASH1*、*Bm-ASH2*、*Bm-ASH3*均与*Dm-l'sc*具有最高的同源性，分别为74.6% (40.9%)、72.1% (31.0%)、72.1% (36.9%)。*Bm-ASH2*与*B-ASH1*氨基酸全序列同源性高达90.3%，bHLH区域序列则完全一致。家蚕四个*ASH*基因相互间同源性以*Bm-ASH2*与*Bm-ASH3*为最高，为91.3% (49.8%)。*Bm-ase*与其他物种的*ase*基因具有相对较高的同源性，bHLH区域同源性均在70%以上。与*Bm-ASH1*、*Bm-ASH2*、*Bm-ASH3*在bHLH区域同源性均超过70%的基因只有三个，分别是*B-ASH1*、*Dm-l'sc*和*Ag-ASH*。

表 6.2 家蚕 *ASH* 基因与其他昆虫 *ASH* 基因编码的蛋白质同源性比较。

Table 6.2 Homologous comparison among proteins coded by *Bm-ASHs* and other insect *ASHs*.

	Percent Identity (%)			
	Bm-ASH1	Bm-ASH2	Bm-ASH3	Bm-ase
Bm-ASH1	/			
Bm-ASH2	71.6 (44.6)	/		
Bm-ASH3	70.1 (36.8)	91.3 (49.8)	/	
Ag-ASH	79.1 (47.7)	70.6 (34.3)	70.6 (30.7)	67.6 (19.7)

Am-ASH	77.6 (50.8)	67.1 (32.2)	63.8 (26.1)	68.6 (25.8)
B-ASH1	73.1 (38.9)	100.0 (90.3)	91.3 (47.9)	66.7 (26.5)
Dm-ac	68.7 (31.6)	65.7 (28.9)	66.2 (30.3)	60.0 (28.4)
Dm-sc	68.7 (42.0)	62.3 (27.2)	58.0 (27.4)	59.4 (21.2)
Dm-l'sc	74.6 (40.9)	72.1 (31.0)	72.1 (36.9)	61.8 (27.2)
Tc-ASH	76.1 (46.6)	62.9 (34.3)	63.8 (26.1)	67.1 (28.1)
Bm-ase	67.2 (31.1)	62.9 (30.1)	60.9 (27.0)	/
Ag-ase	68.7 (30.1)	54.3 (20.9)	56.5 (21.6)	71.4 (22.0)
Am-ase	73.1 (38.9)	68.8 (26.8)	62.5 (23.7)	71.9 (24.9)
Dm-ase	70.1 (37.8)	57.1 (23.0)	60.9 (24.5)	74.3 (24.0)
Tc-ase	70.1 (36.8)	63.2 (25.1)	58.8 (26.1)	77.9 (33.5)

注：括号中的数字表示氨基酸全序列的同源性，括号左侧的数字表示的是 bHLH 区域的同源性。Ag：疟蚊 (*Anopheles gambiae*)，Am：意大利蜜蜂 (*Apis mellifera*)，B：蝴蝶 (*Junonia coenia*)，Bm：家蚕 (*Bombyx mori*)，Dm：黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*)，Tc：红粉甲虫 (赤拟谷盗) (*Tribolium castaneum*)。

6.2.4 昆虫 *ASH* 基因的进化分析

将来自不同昆虫的 *ASH* 基因编码的氨基酸序列进行比对，然后用 PHYLIP 软件进行进化分析。腔肠动物棕色水螅 *Cn-ASH* 和水母 *Pc-ASH* 处在进化的最早阶段，捕猎蛛的 *Cs-ASH1* 和 *Cs-ASH2* 与所有昆虫的 *ASH* 处在并列水平上。这些与前人的结果类似 (Skaer et al., 2002; Wheeler et al., 2003)，说明了进化树的可靠性。在昆虫 *ASH* 分枝上，所有的 *ase* 基因 (*Ag-ase*, *Am-ase*, *Bm-ase*, *Dm-ase*, *Tc-ase*,) 聚集于一个分枝；*ase* 外的基因 (*Ag-ASH*, *Am-ASH*, *B-ASH*, *Bm-ASH1*, *Bm-ASH2*, *Bm-ASH3*, *Dm-ac*, *Dm-sc*, *Dm-l'sc*, *Tc-ASH*,) 则聚集在另一个分枝上。*Bm-ASH1* 与 *Dm-l'sc* 及其它昆虫的非 *ase* 基因进化上相对较近；*Dm-ac* 和 *Dm-sc* 被归为一类，这也与以前的研究相同；而 *Bm-ASH2*, *Bm-ASH3* 和 *B-ASH1* 被分到同一个小分枝上，说明这三个基因进化上关系较近 (图 6.8)。

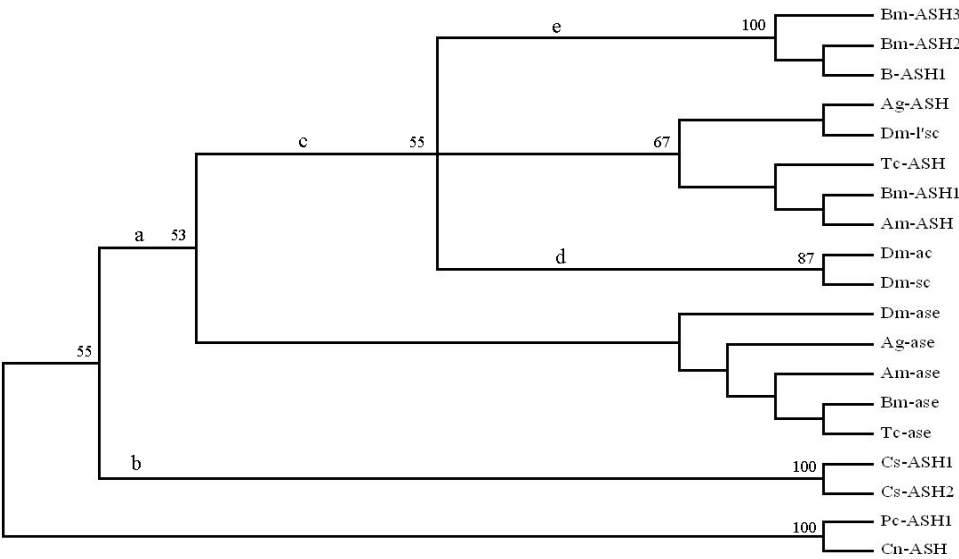


图 6.8 昆虫 *ASH* 基因的进化树。将来自不同昆虫的 *ASH* 基因编码的氨基酸序列进行比对，然后做进化树。分叉处的数字表示 100 棵进化树中出现在该分枝的次数；Ag: 疟蚊 (*Anopheles gambiae*), Am: 意大利蜜蜂 (*Apis mellifera*), B: 蝴蝶 (*Junonia coenia*), Bm: 家蚕 (*Bombyx mori*), Cn: 棕色水螅 (*Hydra vulgaris cnidarian*), Cs: 热带捕猎蛛 (*Cupiennius salei*), Dm: 黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*), Pc: 水母 (*Podocoryne carnea*), Tc: 红粉甲虫 (赤拟谷盗) (*Tribolium castaneum*)。

Fig. 6.8 Phylogenetic analysis of insect *ASH*s. Amino acid sequences are aligned and then the phylogenetic tree is constructed. The numbers on the branches indicate the number of times the partition of the proteins into the sets which are separated by that branch occurred among the trees, out of 100 trees. Ag stands for *Anopheles gambiae*, Am stands for *Apis mellifera*, B stands for *Junonia coenia*, Bm stands for *Bombyx mori*, Cn stands for *Hydra vulgaris cnidarian*, Cs stands for *Cupiennius salei*, Dm stands for *Drosophila melanogaster*, Pc stands for *Podocoryne carnea*, Tc stands for *Tribolium castaneum*.

6.2.5 家蚕 *ASH* 基因在不同组织中的表达分布

取 5 龄 3 d 幼虫及刚开始吐丝家蚕的不同组织抽提总 RNA，反转录后取 1 μ l 做模板进行 RT-PCR。以家蚕看家基因 *Bm-actin A3* 作为内参照，扩增时进行 25 个循环；四个目的基因各进行 30 个循环。从电泳结果可以看出 (图 6.9)，*Bm-ASH1* 和 *Bm-ASH2* 在各个胚层中均有表达；而 *Bm-ASH3* 和 *Bm-ase* 只在外胚层和中胚层中表达，内胚层 (MG，中肠) 中没有表达。四个基因在丝腺 (S-G)、血液 (He) 和脂肪体 (FB) 中均没有或仅有非常微弱的表达。气管丛 (Tc) 中和生殖腺 (G) 中四个基因均有比较稳定的表达。*Bm-ASH1* 在特定组织中的表达是比较稳定的，即只要是表达的组织，在两个时期均有表达。*Bm-ASH2* 是表达范围最广的一个，几乎在各个时期、各种组织都会表达，虽然有些组织中的表达量非常低。*Bm-ASH3* 在头部的表达类似 *Bm-ASH2*，具有时间特异性。*Bm-ase* 在各个组织中的表达都相对较低并且最具有戏剧性，在不同时期及各个组织间表达差异较大。

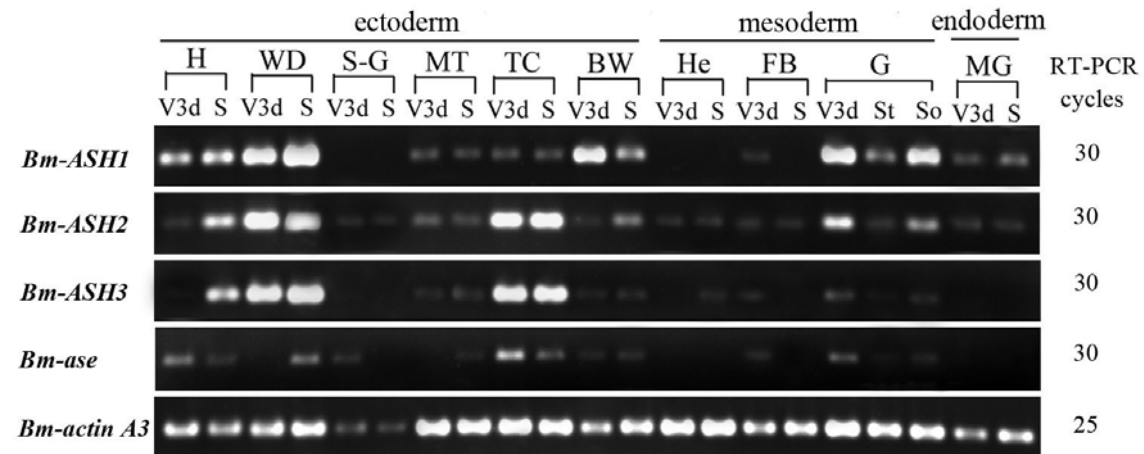


图 6.9 家蚕 *ASH* 基因在不同组织中的表达分布。RT-PCR 模板分别来自头部 (H)，翅原基 (WD)，丝腺 (S-G)，马氏管 (MT)，器官丛 (TC)，体壁 (BW)，血球 (He)，脂肪体 (FB)，生殖腺 (G) 和中肠 (MG)；T 和 O 分别表示睾丸和卵巢；V3d 表示 5 龄 3 d 幼虫，S 表示刚开始吐丝的家蚕 (约为 5 龄 8 d)。

Fig. 6. 9 Tissue expression profiles of the *ASH* genes of silkworm. RT-PCR templates were derived from H (head), WD (wing discs), MG (midgut), S-G (silk glands), FB (fat body), MT (malpighian tubules), BW (body wall), He (hemocyte), TC (tracheal cluster), and G (gonad) (including T (testis) and O (ovary)). V3d stands for the 3rd days of the 5th instar larvae, and S stands for the beginning of spinning (about on the 8th days of the 5th instar larvae).

6.2.6 家蚕 *ASH* 基因在胚胎发育过程中的表达时相

取家蚕不同发育时期的胚胎提取总 RNA 1 μg ，经反转录后将 cDNA 稀释成原来体积的 4 倍，取 1 μl （约相当于 10 ng 总 RNA 转录量）做模板进行实时荧光定量 RT-PCR。从图 6. 10 可以看出，包括内参在内的五个基因的溶解曲线均有非常明显的单一峰，其中 *Bm-actin A3* 的峰值约在 $88.2 \pm 0.2^\circ\text{C}$ ，*Bm-ASH1* 约在 $85 \pm 0.4^\circ\text{C}$ ，*Bm-ASH2* 约在 $88.6 \pm 0.2^\circ\text{C}$ ，*Bm-ASH3* 约在 $88 \pm 0.2^\circ\text{C}$ ，*Bm-ase* 约在 $85.6 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 。说明五个基因均具有较好的特异性扩增。在 *Bm-ASH3* 和 *Bm-ase* 的 T_m 曲线图中各有少数几条曲线没有明显的峰值，荧光强度几乎为 0，估计是因为这些时期的样品中基因没有扩增而造成。扩增曲线图显示在一定范围内每个基因的扩增效率均呈现较好的线性（图 6.11）。这些都表明了结果的可靠性。

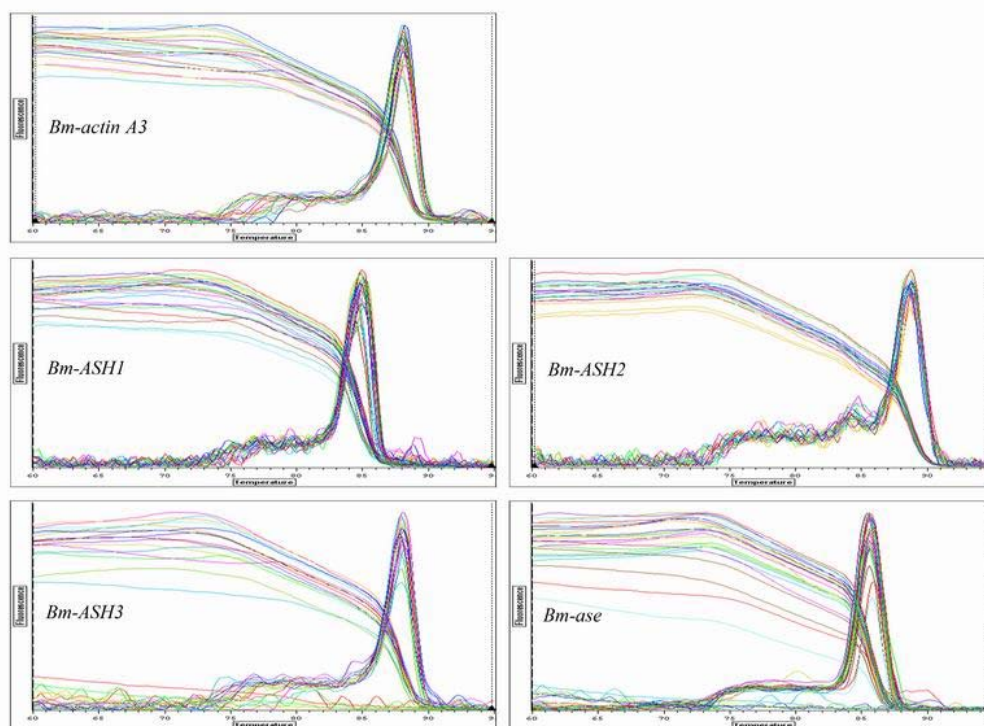


图 6. 10 家蚕 *Bm-actin A3*、*Bm-ASH1*、*Bm-ASH2*、*Bm-ASH3*、*Bm-ase* 基因扩增片段的溶解曲线。

Fig. 6. 10 Melting curves of the amplicated fragments of *Bm-actin A3*, *Bm-ASH1*, *Bm-ASH2*, *Bm-ASH3* and *Bm-ase* genes.

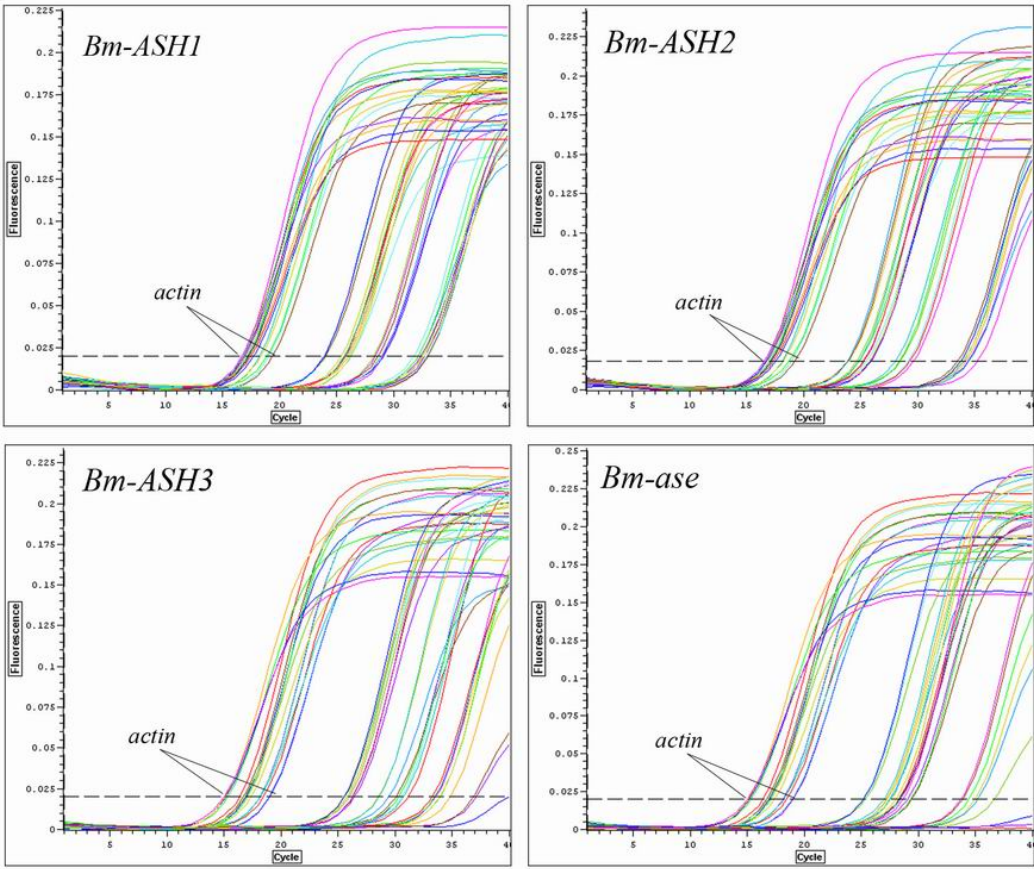


图 6.11 家蚕 *Bm-ASH1*、*Bm-ASH2*、*Bm-ASH3*、*Bm-ase* 基因的扩增曲线。
Fig. 6.11 Amplification curves of *Bm-ASH1*, *Bm-ASH2*, *Bm-ASH3* and *Bm-ase* genes.

按照 6.1.17 的方法制作标准曲线并制定线性方程，各个曲线的 R^2 均大于 0.995，说明线性都非常好（误差小）；各个方程的截距有一定开差，说明各个基因的扩增效率不同（图 6.12）。

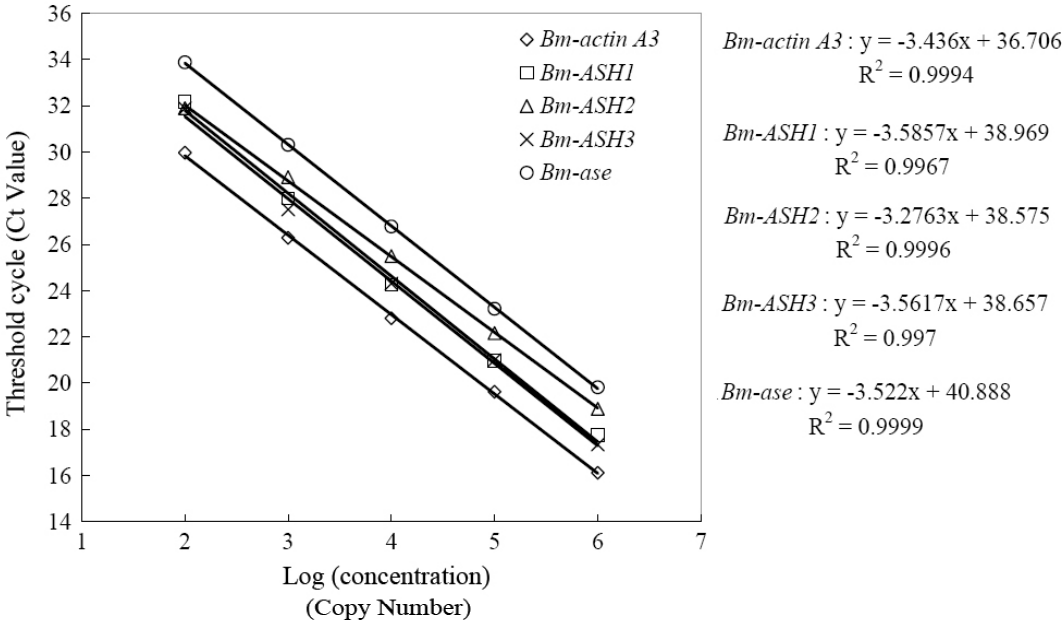
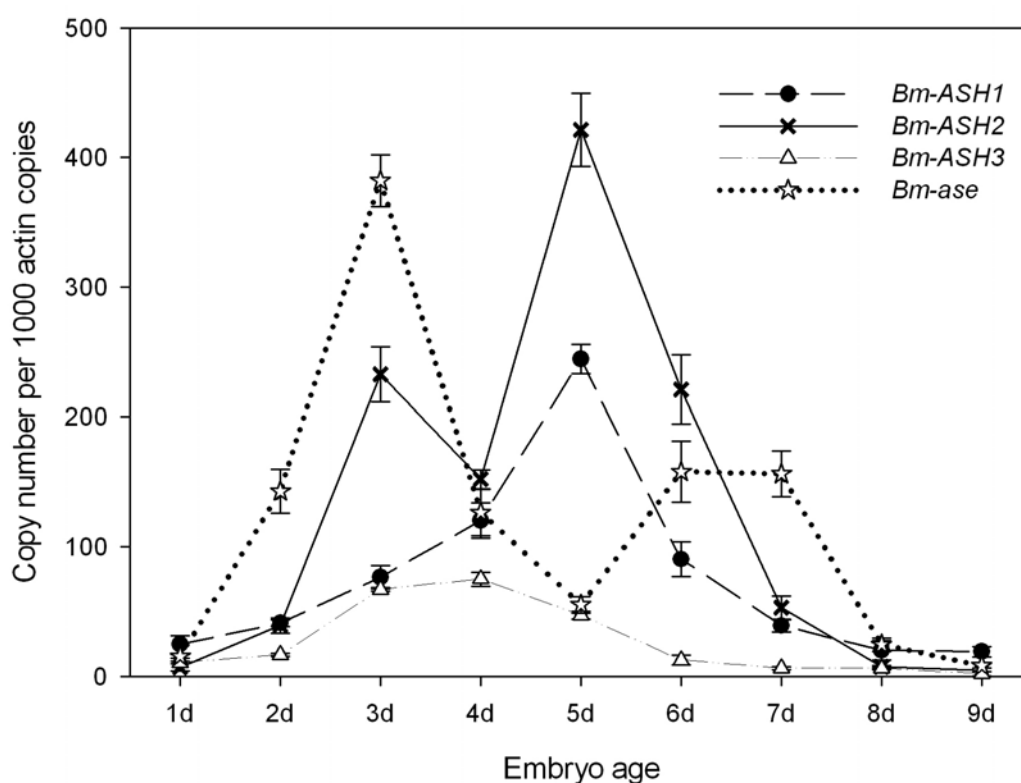


图 6.12 家蚕 *Bm-actin A3*、*Bm-ASH1*、*Bm-ASH2*、*Bm-ASH3*、*Bm-ase* 基因扩增的标准曲线。

Fig. 6. 12 Standard curves of *Bm-actin A3*, *Bm-ASH1*, *Bm-ASH2*, *Bm-ASH3* and *Bm-ase* genes' amplification.

图 6. 13 是四个家蚕 *ASH* 基因在胚胎发育各个时期与内参基因 *Bm-actin A3* 相比的相对表达量, 表示的是每 1000 个 *actin* 基因拷贝中目的基因的拷贝数。*Bm-ASH1* 在 5 d 时有一个明显的峰值 (244 copies), 比前后两天的拷贝数分别高出约 2 和 3 倍; *Bm-ASH2* 在 5 d 也有一个峰值 (422 copies), 此外在 3 d 时还有一个稍低但明显的峰 (233 copies); *Bm-ASH3* 在 4 d 时有一个不太明显的峰 (75 copies), 比前后两天均高出不到两倍; *Bm-ase* 在家蚕胚胎中的表达也是最具有戏剧性的一个, 在 3 d 时达到最大峰值 (382 copies) 后表达量急剧下降, 直到 5 d 时只有 55 copies, 接下来的两天显著增高并且持续表达 (158 & 156 copies)。8 d 时大约处在蚕卵的点青期, 此时蚁蚕已经形成, 从这个时期开始四个基因已经几乎没有表达了 (<25 copies)。10 d 时蚁蚕孵化。

图 6. 13 家蚕 *ASH* 基因在胚胎的表达时相。图中数值表示的是 1000 个 *Bm-actin A3* 拷贝中目的基因的拷贝数。**Fig. 6. 13** Expression changes of silkworm *ASH* genes in silkworm embryo. The numerical value are relative copy number of *ASH* cDNA per 1000 *Bm-actin A3* cDNA copies.

6.2.7 家蚕 *ASH* 基因结构分析

1. 基因结构分析

用克隆得到的四个家蚕 *ASH* 基因的 cDNA 序列分别 Blast 家蚕的 SilkDB 数据库 (<http://silkworm.genomics.org.cn>) (Wang et al., 2005), 得到了各个基因对应的 scaffold, 分别为 Scaffold002070、Scaffold007910、Scaffold013050 和 Scaffold000880。这四个 scaffold 的长度分别为 39 751bp、18 248bp、10 194bp 和 53 622bp。*Bm-ASH1* 开放阅读框后约 6 bp 处有一个 1 167 bp

的内含子; *Bm-ASH2* 放阅读框后约 4 bp 处有一个 191 bp 的内含子; *Bm-ASH3* 和 *Bm-ase* 的基因序列中没有内含子存在。各个基因的开放阅读框内部均没有内含子存在 (图 6. 14)。

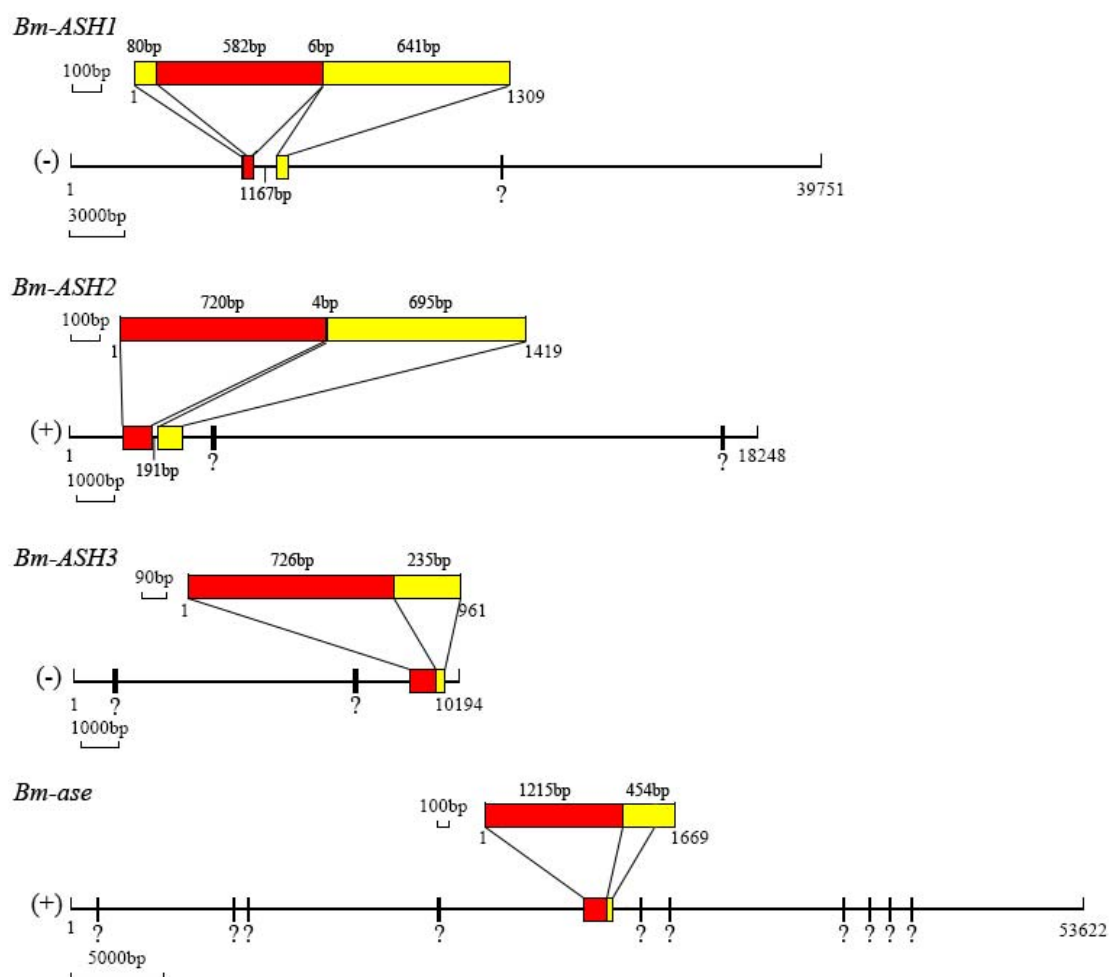


图 6. 14 家蚕 *ASH* 基因结构图。红色表示开放阅读框, 黄色表示 cDNA 非编码区域; 基因组图谱前面的“+”、“-”号表示 SilkDB 数据库中的序列对应于 cDNA 是正链或负链; “?” 表示 scaffold 中没有测定的区段。

Fig. 6. 14 Genomic structure of silkworm *ASH* genes. Red stands for the ORF region, and yellow stands for non-coding regions; (+) and (-) shows the giving genomic sequence in SilkDB is forward or reverse. “?” show the region unsequenced.

2. 家蚕 *Bm-ASH1* 基因的基因组 Southern 分析

在家蚕基因组测序完成之前, 我们对 *Bm-ASH1* 基因进行了基因组 Southern 分析 (图 6. 15)。根据当时已知的一段基因组序列信息选用 *Bam*HI、*Bgl*II、*Eco*RI、*Xba*I 和 *Xho*I 分别对基因组 DNA 酶切, 转膜后以 3'-RACE 产物为探针进行杂交。从杂交结果可以明显看出 *Bm-ASH1* 基因在家蚕中为单拷贝, 图谱显示的信息跟后来发表的家蚕基因组序列一致 (Mita et al., 2004; Xia et al., 2004)。图中 B 和 C 分别来自两个不同家蚕品种, *Bgl*II 的结果显示了不同品种之间的限制性酶切位点多态性。

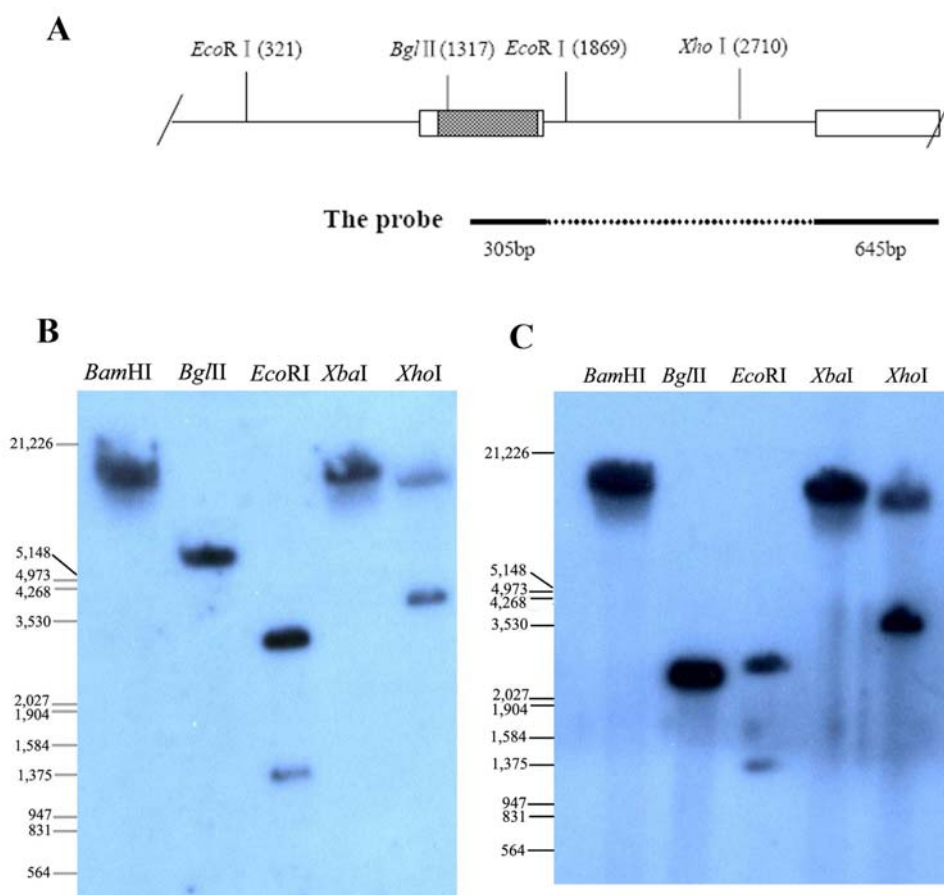


图 6.15 家蚕 *Bm-ASH1* 基因的基因组 Southern 分析。A. 探针的设计和酶切位点的选择；B 和 C 是来自两个不同家蚕品种（JY- I 和 *sl*）的 Southern 杂交结果。

Fig. 6.15 Genomic Southern blot of *Bm-ASH1* gene. A. Design of the probe and selection of the restriction enzymes. B and C are the blotting results of two different silkworm breeds JY-I and *sl*.

6.3 讨论

至今已经有许多种生物的基因组序列得到了测定，其中来自动物基因组的信息为 20 世纪 70 年代 Ohno (1970) 和 Lewis (1978) 提出的表型进化与基因重复相关联的假说提供了证据 (Skaer et al., 2002)。真核生物和脊椎动物的起源都伴随有基因重复扩增的过程，很多情况下，脊椎动物中的一些多拷贝基因对应于无脊椎动物的同源基因都只是单拷贝。基因重复能够导致生物表型的多样性，因为重复的基因中有的可以获得新的功能，而其他的则行使基因家族的原始功能。原神经基因 (proneural gene) 是后生动物进化过程中通过基因重复和分离而来的一个很大的基因家族，它们编码具有 bHLH 基序的转录因子，能够把细胞转化为具有神经潜能的细胞并确定神经细胞的类型 (Brunet and Ghysen, 1999; Chan and Jan, 1999)。achaete-scute complex (AS-C) 就是这个大家族中的一类基因。

许多昆虫来源的和非昆虫来源的 AS-C 同源体基因 (achaete-scute homolog, *ASH*) 得到了克隆。

昆虫来源的 *ASH* 在进化过程中经历了三次重复事件 (Skaer et al., 2002; Wheeler et al., 2003)。腔肠动物水螅只有一个 *ASH* 基因 (Grens et al., 1995), 当与昆虫来源的 *ASH* 基因进行进化分析时会被单独列为一组, 因此把它假定为 *ASH* 基因的祖先。甲虫和蚊子中都只有两个 *ASH* 基因, 一个原神经基因和一个 *asense* 基因; 这个 *ASH* 基因从一个变为两个的进化过程被定为昆虫 *ASH* 基因的第一次重复事件 (图 6.16 a)。实蝇则具有两个原神经基因 *Cv-l'sc* 和 *Cv-sc* 及一个 *asense* 基因, 这是第二次重复事件 (图 6.16 c)。果蝇比实蝇又多出一个 *ac* 基因, 这个基因扩增过程即为第三次重复事件 (图 6.16 d)。蜘蛛虽然也是节肢动物, 但严格意义上不属于昆虫, 它也有两个 *ASH* 基因, 其中一个为原神经基因, 另一个的功能则类似 *asense*, 但是在进化上独立于昆虫之外 (图 6.16 b)。

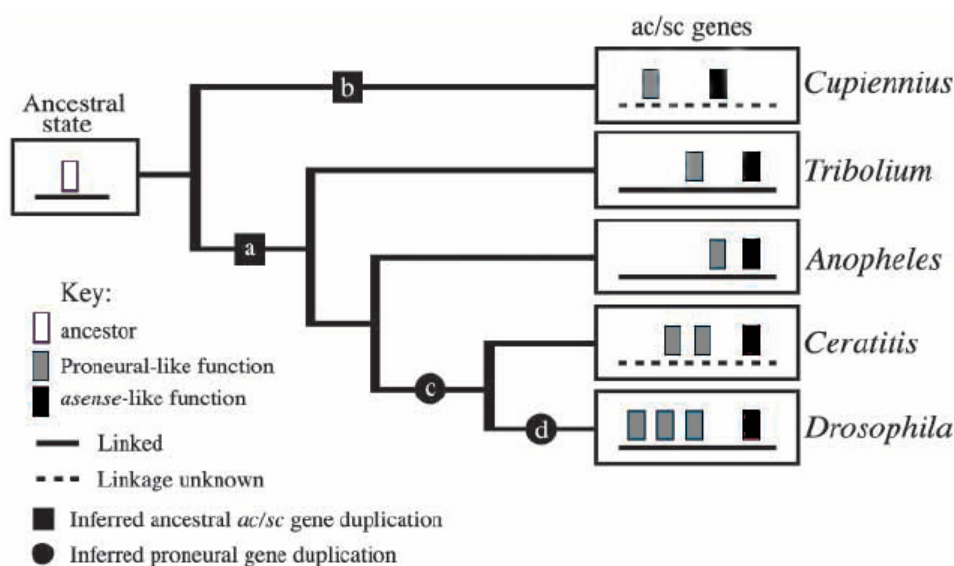


图 6.16 *ac/sc* 基因进化模式图。灰色表示原神经基因, 黑色表示 *asense*-like 基因。(引自 Wheeler et al., 2003)

Fig. 6.16 A Model for *ac/sc* gene evolution. The *ac/sc* genes, their developmental functions (proneural-like, gray or *asense*-like, black), and existence in complexes have been mapped on a standard species tree (Maddison et al., 2001). Branch lengths are not drawn to scale. (Referred from Wheeler et al., 2003)

借助我们已掌握的方法 (Xia et al., 2006), 从家蚕中克隆到了四个 *ASH* 基因, 从编码的蛋白质结构预测其中一个属于 *asense* 基因, 定名为 *Bm-asense*; 另外三个同属于原神经基因, 定名为 *Bm-ASH1*、*Bm-ASH2*、*Bm-ASH3*。与鳞翅目以外的昆虫 *ASH* 基因相比, 家蚕四个 *Bm-ASH* 基因中均以 *Bm-ASH1* 与它们的同源性最高; 而 *Bm-ASH2* 和 *Bm-ASH3* 的同源性又是四个 *Bm-ASH* 基因之间最高的, bHLH 区域同源性甚至达到 91.3%。因此我们推测家蚕的 *ASH* 基因在进化上也经历了三次重复事件, 其中最近的一次是 *Bm-ASH2* 和 *Bm-ASH3* 之间的分化, 也就是说三个家蚕原神经基因中 *Bm-ASH1* 是相对原始的一个。进化上鳞翅目和双翅目在昆虫纲中都属于相对高等的两个目, 并且亲缘关系相对较近 (郑乐怡和归鸿, 1999)。然而我们不能将家蚕的三个原神经基因与果蝇的三个原神经基因一一对应, 故对其命名仍然按照发现的顺序进行。稍微低等的双翅目昆虫蚊子只有两个 *ASH* 基因, 因此推测家蚕 *ASH* 基因的第二和第三次重复与果蝇的是相互独立的 (图 6.8 c, e)。

家蚕属于蚕蛾科，蝴蝶 *Junonia coenia* 为蛱蝶科，二者进化上临近（郑乐怡和归鸿，1999；雷朝亮和荣秀兰，2003）。*B-ASH1* 和 *Bm-ASH2* 编码的蛋白质全序列同源性高达 90.3%，bHLH 区域则为 100%。可见二个 *ASH* 基因在进化上是非常近的。由此推断，*Junonia coenia* 至少还有一个 *asense* 类似基因和一个 *Bm-ASH1* 类似基因没有得到克隆。膜翅目昆虫蜜蜂、鞘翅目昆虫红粉甲虫中分别成功克隆到了一个原神经基因和一个 *asense* 基因；通过对人体虱基因组序列的预测也发现其可能只表达一个原神经基因和一个 *asense* 基因（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST, insect>）。多个 *ASH* 基因重复只在双翅目和鳞翅目昆虫中出现还是其他类别的昆虫中也存在这种现象？要解释清楚这个问题，需要进行更多的有关 *ASH* 基因的研究。在其他已经进行全基因组测序的昆虫中，发现各自的 *ASH* 基因间是相连的；用家蚕的四个 *ASH* 基因分别搜索家蚕基因组序列库（<http://silkworm.genomics.org.cn>），得到了四个独立的 scaffold，但却均不能相互连接，也许各个基因间相连的序列还没有测通，当然也存在四个基因分列于不同染色体上的可能性。

我们比较了来自腔肠动物门（水螅1个和水母1个），节肢动物门昆虫纲（果蝇4个、家蚕4个、蚊子2个、蜜蜂2个、甲虫2个、蝴蝶1个）、蜘蛛纲（捕猎蛛2个）、多足纲（蜈蚣1个和马陆1个），脊椎动物（人5个、黑猩猩1个、小鼠4个、红原鸡2个、非洲爪蟾3个、斑马鱼2个）的38个 *ASH* 基因编码的蛋白质序列（图6.17）。每个蛋白质都有一个非常保守的bHLH基序，除所有的 *asense* 基因及 *M-ASH3*、*M-ASH4*、*Hs-ASH3*、*Hs-ASH3'* 和 *Hs-ASH4* 外其他基因的C-端均有一段非常保守的氨基酸序列（其中 *Cs-ASH2*、*Xl-ASH3a* 和 *Xl-ASH3b* 保守性较差）。昆虫 *ASH* 基因编码蛋白的C-端均具有16~17个氨基酸组成的基序（图6.7 B）；而脊椎动物来源的 *ASH* 及 *Cs-ASH1*、*Lf-ASH*、*Asp-ASH* 与昆虫C-端有一小段同源性很高（对应 *Dm-l'sc* 的 PDDEELL D）。值得一提的是 *Cs-ASH1*、*Lf-ASH*、*Asp-ASH* 与脊椎动物来源的 *ASH* 在C-端具有极高的同源性；尤其 *Lf-ASH* 和 *Asp-ASH*，甚至在bHLH以外的N-端还有一段大约20个氨基酸的与脊椎动物 *ASH* 高度保守的序列（对应 *Asp-ASH* 的 PEMRCKRRINFAQLGYNLPQ）。从以上分析结果来看，蜘蛛纲和多足纲的 *ASH* 基因在进化上与脊椎动物更相近。假设C-端无保守序列的 *M-ASH3*、*M-ASH4*、*Hs-ASH3*、*Hs-ASH4* 和 *Hs-ASH3'* 均具有类似 *asense* 基因的功能，则说明在高等动物中除原神经基因外，*asense* 基因在进化中也伴随有基因重复事件，这需要进一步的科学研究加以补充和证实。

已知 AS-C 基因主要与神经系统发育有关，但是也有研究表明果蝇中四个 AS-C 基因还具有其他功能，如 *scute* 参与性别决定的调控；*l'sc* 参与肌肉前体的规范；*achaete* 则与马氏管的发育有关。我们用 RT-PCR 检测了家蚕不同组织中 *ASH* 表达的情况（图 6.9）。结果发现 *Bm-ASH1* 和 *Bm-ASH2* 基因表达最为广泛，在各个胚层中均有表达；而 *Bm-ASH3* 和 *Bm-ase* 则不在内胚层（MG，中肠）中表达，*Bm-ase* 在各个组织中的表达量均较低，这可能是因为表达 *Bm-ase* 的细胞均是已经定型的细胞，这类细胞相对较少而导致。而荧光定量 RT-PCR 的结果则说明 *ASH* 基因在家蚕胚胎的发育过程中也担当着重要的角色；*Bm-ASH1* 和 *Bm-ASH3* 基因分别在胚胎发育的 5d 和 3d 出现一个表达峰，但 *Bm-ASH3* 基因 mRNA 拷贝数很低；而 *Bm-ASH2* 则在 3d 和 5d 各出现一个峰值（图 6.13）。已知果蝇中很多情况下 AS-C 基因的调控作用是协同进行的（Campos-Ortega, 1998; Alonso and Cabrera, 1988），因此我们推测 *Bm-ASH2* 的功能相对广泛，并且不同的功能分别需要 *Bm-ASH1* 或 *Bm-ASH3* 的协同；而 *Bm-ASH3* 也许是最近才出现的基因，因而具有相当有限的功能。果蝇的 *asense* 基因主要被证明在已经定型了的神经细胞中表达（Dominguez and Campuzano, 1993），*Bm-ase* 的表达时相说明在家蚕胚胎发育过程中可能伴随有两次不同的神经系统发育高潮。

Cn-ASH	MOLLFPRL	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	45
Pc-ASH1	MOLLYPKRN	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	46
Asp-ASH	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	71
Lf-ASH	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	86
Hs-ASH1	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	81
M-ASH1	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	83
Gg-ASH	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	78
Dr-ASH1a	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	66
Dr-ASH	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	43
X1-ASH1	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	36
Dr-ASH	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	41
Hs-ASH2	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	18
Pt-ASH2	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	18
M-ASH2	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	86
Gg-ASH2	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	12
X1-ASH3a	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	14
X1-ASH3b	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	14
Cs-ASH1	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	32
Cs-ASH2	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	43
Ag-ASH	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	62
Dm-1'sc	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	52
Dm-ac	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	61
Dm-sc	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	36
B-ASH1	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	36
Bm-ASH2	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	56
Bm-ASH3	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	47
Am-ASH	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	67
M-ASH1	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	63
Tc-ASH	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	29
Bm-ase	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	51
Tc-ase	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	46
Am-ase	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	95
Dm-ase	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	108
Ag-ase	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	90
Hs-ASH3	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	31
M-ASH3	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	106
Hs-ASH3'	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	81
Hs-ASH4	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	85
M-ASH4	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	107
Cn-ASH	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	61
Pc-ASH1	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	92
Asp-ASH	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	104
Lf-ASH	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	59
Hs-ASH1	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	89
M-ASH1	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	74
Gg-ASH	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	166
Dr-ASH1a	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	100
Dr-ASH	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	99
X1-ASH1	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	162
Dr-ASH	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	79
Hs-ASH2	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	66
Pt-ASH2	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	126
M-ASH2	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	129
Gg-ASH2	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	203
X1-ASH3a	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	187
X1-ASH3b	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	182
Cs-ASH1	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	169
Cs-ASH2	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	147
Ag-ASH	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	150
Dm-1'sc	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	135
Dm-ac	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	124
Dm-sc	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	124
B-ASH1	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	192
Bm-ASH2	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	113
Bm-ASH3	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	116
Am-ASH	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	115
Bm-ASH1	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	131
Tc-ASH	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	161
Bm-ase	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	177
Tc-ase	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	191
Am-ase	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	141
Ag-ase	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	192
Dm-ase	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	193
Hs-ASH3	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	136
M-ASH3	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	167
Hs-ASH3'	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	179
Hs-ASH4	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	266
M-ASH4	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	160
Cn-ASH	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	149
Pc-ASH1	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	218
Asp-ASH	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	134
Lf-ASH	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	117
Hs-ASH1	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	126
M-ASH1	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	129
Gg-ASH	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	203
Dr-ASH1a	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	187
Dr-ASH	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	182
X1-ASH1	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	169
Dr-ASH	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	147
Hs-ASH2	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	150
Pt-ASH2	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	135
M-ASH2	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	124
Gg-ASH2	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	124
X1-ASH3a	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	192
X1-ASH3b	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	113
Cs-ASH1	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	116
Cs-ASH2	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	115
Ag-ASH	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	131
Dm-1'sc	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	161
Dm-ac	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	177
Dm-sc	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	191
B-ASH1	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	141
Bm-ASH2	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	192
Bm-ASH3	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	193
Am-ASH	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	136
Bm-ASH1	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	167
Tc-ASH	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	179
Bm-ase	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	266
Tc-ase	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	160
Am-ase	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	149
Ag-ase	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	218
Dm-ase	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	134
Hs-ASH3	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	117
M-ASH3	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	126
Hs-ASH3'	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	129
Hs-ASH4	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	203
M-ASH4	MAVSTTLT	LNHMHVNN--CAETVEQIN	GYTSNVICHNSVNGG	187

67

图 6.17 不同物种来源的 ASH 基因编码的蛋白质的同源性分析。Ag: 疟蚊 (*Anopheles gambiae*), Am: 意大利蜜蜂 (*Apis mellifera*), Asp: 非洲巨马陆 (*Archispirostreptus*), B: 蝴蝶 (*Junonia coenia*), Bm: 家蚕 (*Bombyx mori*), Cn: 棕色水螅 (*Hydra vulgaris cnidarian*), Cs: 热带捕猎蛛 (*Cupiennius salei*), Dm: 黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*), Dr: 斑马鱼 (*Danio rerio*), Gg: 红原鸡 (*Gallus gallus*), Hs: 智人 (*Homo sapiens*), Lf: 欧洲蜈蚣 (*Lithobius forficatus*), M: 野生小家鼠 (*Mus musculus*), Pc: 水母 (*Podocoryne carnea*), Pt: 黑猩猩 (*Pan troglodytes*), Tc: 红粉甲虫 (赤拟谷盗) (*Tribolium castaneum*), Xl: 非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*)。各个基因或编码的蛋白质的 GenBank 登陆号 (Accession No.) 分别为: Ag-ase (AAAB01008963)、Ag-ASH (AAK97461)、Am-ase (XP_393664)、Am-ASH (XP_393665)、Asp-ASH (AJ536345)、B-ASH1 (AAC24714)、Bm-ASH1 (NP_001037416)、Bm-ASH2 (unregistered)、Bm-ASH3 (unregistered)、Bm-ase (unregistered)、Cn-ASH (U36275)、Cs-ASH1 (CAC27516)、Cs-ASH2 (CAC27517)、Dm-ac (AAF45498)、Dm-ase (AAF45502)、Dm-sc (AAF45499)、Dm-l'sc (AAF45500)、Dr-ASH1a (NP_571294)、Dr-ASH1b (NP_571306)、Gg-ASH1 (NP_989743)、Gg-ASH2 (NP_990280)、Lf-ASH (AAT99570)、Hs-ASH1 (NP_004307)、Hs-ASH2 (NP_005161)、Hs-ASH3 (NP_065697)、Hs-ASH3' (XP_935353)、Hs-ASH4 (NP_982260)、M-ASH1 (Q02067)、M-ASH2 (NP_032580)、M-ASH3 (NP_064435)、M-ASH4 (XP_993416)、Pc-ASH1 (AAN85110)、Pt-ASH2 (XM_521719)、Tc-ASH (AAQ23386)、Tc-ase (AAQ23387)、Xl-ASH1 (Q06234)、Xl-ASH3a (AAA18499)、Xl-ASH3b (AAA18500)。

Fig. 6.17 Homologous analysis of various ASH Proteins. Ag stands for *Anopheles gambiae*, Am stands for *Apis mellifera*, Asp stands for *Archispirostreptus*, B stands for *Junonia coenia*, Bm stands for *Bombyx mori*, Cn stands for *Hydra vulgaris cnidarian*, Cs stands for *Cupiennius salei*, Dm stands for *Drosophila melanogaster*, Dr stands for *Danio rerio*, Gg stands for *Gallus gallus*, Hs stands for *Homo sapiens*, Lf stands for *Lithobius forficatus*, M stands for *Mus musculus*, Pc stands for *Podocoryne carnea*, Pt stands for *Pan troglodytes*, Tc stands for *Tribolium castaneum*, Xl stands for *Xenopus laevis*.

第七章 家蚕无鳞片翅突变体 *scaleless* 形成的分子机理的初步探讨

前面几章从形态学和细胞生物学角度分析了家蚕无鳞片翅突变体 *scaleless* 的突变性状, 已经阐明控制突变性状的因子位于翅原基(翅)内部, 而与体液因子无关。在果蝇中, *AS-C* 基因控制着被板刚毛的发生; 鳞翅目昆虫的鳞片与果蝇的刚毛有着类似的结构 (Overton, 1966; Overton, 1967; Cubas et al., 1991; Skeath and Carroll, 1991)。蝴蝶中已经成功克隆了 *AS-C* 的同源体基因 *B-ASH1*, 并且研究表明蝴蝶翅面鳞片的形成与此基因的表达相关 (Galant et al., 1998)。第五章已经报道从家蚕中克隆到了四个 *ASH* 基因。在以上研究的基础上, 本章从家蚕翅原基及蛹翅入手, 分析 *Bm-ASH* 基因在 *scaleless* 突变体中相对于野生型家蚕的表达差异, 并进一步阐明引起差异的原因; 试图阐明 *scaleless* 发生无鳞片翅突变表型的分子机理。

7.1 材料与方法

7.1.1 家蚕

家蚕品种 7532、芙蓉、*scaleless* 均由中国农业科学院蚕业研究所保存。家蚕 1-4 龄幼虫按照《中国养蚕学》(吕鸿声, 1991) 中讲述的标准方法饲养, 5 龄起蚕时将实验用蚕置于 25℃、70~80% 相对湿度条件下饲养并进行实验。带 *scaleless* 突变表型的家蚕近等基因系由中国农业科学院蚕业研究所沈兴家研究员培育完成 (图 7.1)。

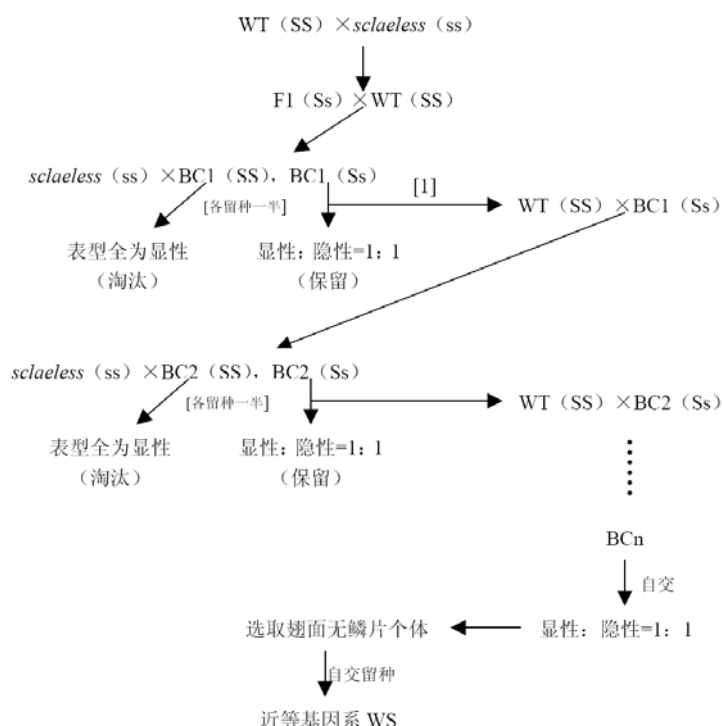


图 7.1 带 *scaleless* 突变表型的家蚕近等基因系建立路线图。圆括号中表示基因型, 注 [1] 所示的前后两个步骤

可同时进行，工作量增倍，耗时减半。

Fig. 7. 1 A sketch of the construction of near isogenic lines of silkworm with scaleless wings mutant phenotype.

Letters in parentheses stands for the genotypes.

7.1.2 菌种与质粒

大肠杆菌菌株 *E. coli* DH10B 由本实验室保存；T 克隆质粒载体 pMD18-T 购自大连宝生物有限公司；pGEM-3Z、pGL3-Basic、pRL-CMV 载体均购自 Promega 公司。

7.1.3 半定量 RT-PCR

1. 抽提家蚕自吐丝开始到羽化前的翅原基和翅总 RNA，并进行反转录。
2. 根据感兴趣的基因序列设计引物，一般扩增片段在 300~400 bp 左右为宜；以反转录所得的 cDNA 为模板进行 PCR，扩增 18 个循环。扩增体系为 20 μ l。
3. 取扩增产物各 5 μ l 在 1.5% 的琼脂糖凝胶上进行电泳，待溴酚蓝到至凝胶的 2/3 处时停止电泳。
4. 碱性下转法转膜 (Chomczynski, 1992):

电泳好的凝胶在 ddH₂O 中漂洗两次，然后在碱性转膜液 (3 M NaCl and 8 mM NaOH) 中浸泡 10 min，同时浸泡尼龙膜。找一个平面放置事先剪好的吸水纸 (约 10 cm 厚)，上面平铺略大于尼龙膜的滤纸 6~8 层；放上尼龙膜，将凝胶轻轻平铺于膜上，赶走气泡；凝胶上放两层浸湿的滤纸 (滤纸一定不能大于胶面，以防短路)；最上层放置长的滤纸或纱布，两端各浸入转膜液中。转膜 1~2 h，取下，干燥，交联。

5. 按 6.1.16 中方法杂交、洗膜、压片和曝光。

7.1.4 原位杂交

1. 用于制备探针的模板 DNA 的准备

将家蚕的 *ASH* 基因的 ORF 克隆至 pGEM-3Z 质粒载体中，并鉴定其相对于 T7 启动子的方向，若用 T7 RNA 聚合酶转录，正接的转录出正链 RNA，反接的转录出负链 RNA。使用合适的限制性内切酶将质粒模板线性化。用 T7 RNA 聚合酶进行标记时质粒模板应预先切成平端或 5' 突出端。

也可以将 T7 或 SP6 等启动子序列设计到扩增特异基因的引物的 5' 端，PCR 扩增后经纯化直接用作转录模板。

2. 非放射性探针的制备

(1) 根据标记试剂盒 (宝灵曼公司) 说明书进行探针标记，反应体系如下：

DEPC处理水:	9.5 μ l
线性化的模板 (~1 μ g):	1.5 μ l
10 \times DIG RNA Labeling Mix:	2 μ l
50 mM DTT:	2 μ l
10 \times T7 RNA polymerase buffer:	2 μ l
T7 RNA polymerase (20 U/ μ l):	2 μ l

Rnase Inhibitor (20 U/ μ l):	1 μ l
Total volume:	20 μ l

- (2) 按以上反应体系混匀后 37℃ 反应 2 h (反应约 90 min 时取 1 μ l 反应液电泳, 检测转录效果)。
- (3) 加入 2 μ l RNase-free 的 DNase I (10 U/ μ l) 消化模板 DNA, 37℃ 温育 20 min。
- (4) 加入 2 μ l 0.5 M EDTA (pH 8.0) 终止反应。
- (5) 加入 2.5 μ l (1/10 体积) 4 M LiCl, 75 μ l (3 倍体积) -20℃ 预冷的无水乙醇; -20℃ 放置 3 h。
- (6) 4℃, 14 000 g 离心 20 min。
- (7) 弃上清, 加入 -20℃ 预冷的 70% 乙醇 100 μ l 洗涤沉淀。
- (8) 4℃, 14 000 g 离心 5 min。
- (9) 弃上清, 室温干燥 10 min。
- (10) 用 50 μ l DEPC 处理水 (或去离子甲酰胺) 重溶 RNA。
- (11) 取 2 μ l 电泳检测标记效果。
- (12) 将标记好的探针稀释或浓缩至约 50~100 ng/ μ l, 分装后 -20℃ 保存备用。

3. 原位杂交反应步骤

- (1) 家蚕蛹翅在冷的昆虫生理盐水 (0.75% NaCl) 中解剖。
- (2) 将解剖出的组织迅速放入新鲜配制的固定液中常温固定 2~3 h (或 4℃ 固定过夜)。
注: 如果不立即进行下面的实验, 固定好的组织可转移到 ME buffer 中 -20℃ 短期保存。使用前用乙醇复水 (90%—80%—70%—DEPC 处理水各约 2 min)。
- (3) 用 PBST_{0.2} 漂洗 3 次, 每次 5 min。
- (4) 用终浓度为 20 μ g/ml 的蛋白酶 K 37℃ 消化 15 min。
- (5) 加终浓度为 0.2% (m/V) 的甘氨酸 (Gly) 溶液中中止反应, 室温放置 10 min。
- (6) 4% 多聚甲醛固定液中再固定 30 min。
- (7) PBST_{0.2} 洗 2 次, 每次 5 min。
- (8) 杂交液 (HS) 中 45℃ 预杂交 2 h。
- (9) 加入 100-500 ng 探针到, 45℃ 杂交过夜 (一般需要杂交 24 h 以上)。
- (10) 杂交过夜的组织用 PBST_{0.2} 在 37℃ 漂洗 4 次, 时间分别为 10 min, 20 min, 30 min, 30 min。
- (11) 在 GB- PBST_{0.2} (含 56℃ 灭活 10 min 的 5% 羊血清和 2% BSA) 中室温封闭 2 h。
- (12) 再在用 GB- PBST_{0.2} 500 倍稀释的 DIG-AP (碱性磷酸酶标记的抗 DIG-羊 Fab 片段的抗体) 中浸 2 h。
- (13) PBST_{0.2} 洗 3 次, 每次 10 min。
- (14) 在 NBT/BCIP 中显色, 最好避光保存, 显色时间据具体情况而定。
- (15) 样品置载玻片上, 用甘油封片, 光镜观察。

溶液配方:

固定液 (10 ml):

组分	储存液浓度	体积	终浓度
DEPC 处理水		7.96 ml	
甲醛	37%	1 ml	3.7%

Hepes (pH 7.9)	1 M	1 ml	100 mM
MgCl ₂	1 M	20 μ l	2 mM
EDTA	0.5 M	20 μ l	1 mM

ME buffer: 90% 甲醇, 50 mM EDTA。

PBST_{0.2}: Tween20 溶于 1×PBS 使终浓度为 0.2%。

蛋白酶 K、甘氨酸稀释 buffer: 0.5 M EDTA 100 μ l 和 1 M Tris-HCl 500 μ l 溶于 50 ml DEPC 处理水。

4% 多聚甲醛固定液: 称取 2 g 多聚甲醛溶于 50 ml DEPC 处理的 PBS (pH 7.2) 中, 60℃ 溶解至溶液透明。

杂交液 (HS):

20×SSC:	250 μ l
甲酰胺原液:	500 μ l
封阻剂:	20 mg
肝素钠 (20 mg/ml):	2.5 μ l
酵母 tRNA (10 mg/ml):	10 μ l
鲑精 DNA (5 mg/ml):	20 μ l
DEPC 处理水:	217.5 μ l
总体积:	1 ml

7.1.5 昆虫细胞操作

1. 细胞的传代

倒掉含待传代细胞的 15 cm² 培养瓶中的培养基, 加入新鲜培养基, 用弯头吸管吹打贴壁细胞, 使其脱落, 根据细胞密度按照 1:2~3 的比例将细胞悬浮液转移至新培养瓶中, 补加新鲜的 TC-100 完全培养基使终体积为 3~4 ml。置 27℃ 培养。

2. 细胞的冻存

取对数生长期的细胞 (存活率 97~98%), 用弯头吸管吹打贴壁细胞, 转移入 15 ml 离心管中, 3 000 g 离心 5~6 min, 弃上清, 加入一定体积的 TC-100 培养基重悬细胞, 用血球计数板计数, 使细胞密度达到 0.5~1.0×10⁷/ml, 加入等体积的用于冻存的新鲜培养基 (经过滤除菌的含 20% DMSO 的完全培养基), 冰上操作。将细胞悬浮液转移至冻存管中 (通常为每管 1 ml), 然后将冻存管置于塑料泡沫盒中, 缓慢冷冻细胞。先放入 -20℃ 冰箱中 2~3 h, 再转移至 -80℃ 冰箱中过夜, 最后将冻存管置于液氮罐中。

3. 细胞的复苏

迅速取出液氮中冻存的细胞, 于 37℃ 水浴, 轻轻摇动, 待冻存液完全融化后, 酒精棉消毒冻存管外壁, 将解冻的细胞转移入至少 5 倍体积的、预先加入 15 cm² 培养瓶中的冷 (4℃) 的新鲜 TC-100 完全培养基中, 整个操作在 2 min 内完成。让细胞在室温下贴壁 1 h, 再将之置于 27℃ 培养箱中培养 2~3 h, 待细胞贴壁后, 更换培养基。根据细胞生长状况, 进行换液或传代。以上操作均参照 Summers 和 Smith (1987) 操作手册进行。

4. 细胞计数

用血球计数板进行细胞记数, 根据细胞密度决定是否用 PBS 稀释, 如先稀释, 计算时应乘以稀释倍数。取细胞悬液 0.4 ml, 加 0.1 ml 台盼蓝染液 (0.2%), 混合均匀后在 2 min 内将样品加到血球计数板上, 记录计数板上四个大方格内活细胞数和死细胞数 (注: 活细胞透明发亮, 而死细胞则被染成蓝色)。

5. 质粒 DNA 由脂质体介导转染昆虫细胞。

- (1) 接种约 $0.5 \sim 1 \times 10^6$ 细胞于 15 cm^2 培养瓶中, 27°C 贴壁培养过夜。
- (2) 除去含 FBS (胎牛血清) 的培养基, 用 1.5 ml 无血清培养基洗细胞两次, 再加入 1.5 ml 无血清培养基 (事先从冰箱中拿出平衡至 27°C)。
- (3) 将 5 μl 脂质体溶于一定体积的灭菌水中, 然后加入待转染的质粒 DNA, 轻轻混匀后室温放置 15 min 使脂质体充分包埋 DNA。每种转染质粒加入量各为 1 μl (0.125 pmol/ μl), 每次转染均配有海参荧光素酶报告质粒 pRL-CMV 共转染作为内参照 (0.0125 pmol)。
- (4) 将转染液逐滴加入到培养瓶中, 边加边摇匀。
- (5) 27°C 培养 4 h 后弃去含转染液的无血清培养基, 加入 3 ml 含 FBS 的培养基。
- (6) 27°C 培养适当时间用于瞬时表达分析。

若转染的样品数很多, 可用 12 孔板或 24 孔板代替细胞瓶, 细胞接入量和转染时所用质粒数按板孔面积推算。

6. 细胞的裂解和荧光素酶活性的测定

- (1) 转染 48 h 后将贴壁细胞用吸管轻轻吹起, 移入 1.5 ml 离心管中, 4°C , 10 000 g 离心 2 min, 弃上清; 将剩余者移入同一离心管中再离心, 弃上清。
- (2) 用 1 ml PBS 重悬细胞, 4°C , 10 000 g 离心 2 min, 弃上清; 重复一次。
- (3) 按《Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)》说明书裂解细胞并测定荧光素酶活性。

7.1.6 DNA 点突变的引入

1. 以待突变位点为中心设计引物 ΔmF 和 ΔmR , 突变的碱基同时设计在两个引物序列中; ΔmF 和 ΔmR 至少有 20 个碱基互补, 互补序列中 G+C 不少于 10 个。并设计能扩增模板 DNA 全长的引物 F 和 R。
2. 以待突变 DNA 为模板, F+ ΔmR 及 ΔmF +R 为引物分别进行 PCR, PCR 反应最好用 *pfu* 等高保真 DNA 聚合酶进行。扩增不多于 30 个循环。
3. PCR 产物胶回收, 分别溶于适量 ddH₂O 中 (不宜过浓)。两种 PCR 产物作为模板在同一体系中反应, 在不加引物的情况下延伸 1~3 个循环; 然后加入引物 F+R 继续扩增 30 个循环。
4. 将最终 PCR 产物回收、克隆并进行测序, 验证突变位点是否被成功引入。

7.1.7 质粒 DNA 的大量抽提

1. 挑取单菌落接种于 3 ml 含适量 Amp 或 Kan 的 LB 液体培养基中, 37°C 振荡培养过夜。
2. 取 100 μl 过夜培养液接种于 100 ml LB 液体培养基中, 37°C 振荡培养过夜。
3. 5 000 rpm 离心 5 min 收集菌体, 用 3 ml 溶液 I 悬浮沉淀, 冰浴 20 min。

4. 加 6 ml 溶液 II，再加 500 μ l 氯仿，轻轻倒转混匀后冰浴 15 min。
5. 加 9 ml 溶液 III，剧烈振荡后冰浴 20 min。
6. 12 000 rpm 离心 10 min，上清移入新管，加 0.6 倍体积异丙醇，混匀后 -20℃ 放置 20 min。
7. 12 000 rpm 离心 10 min，沉淀用 1 ml TER (含 20 μ g/mL RNaseA 的 TE) 溶解，37℃ 消化 30 min。
8. 用等体积苯酚、苯酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1)、氯仿各抽提一次。
9. 上清中加入 1/3 体积的 8 M NH_4Ac 和 0.6 倍体积的异丙醇，混匀后 -20℃ 放置 20 min。
10. 12 000 rpm 离心 10 min，沉淀用预冷的 75% 乙醇洗一次，稍晾干；用 0.7 ml 1×TE buf 溶解沉淀，加入等体积的 1.6 M NaCl 溶液 (含 13% PEG)，室温静置 20 min。
11. 12 000 rpm 离心 10 min，沉淀用预冷的 75% 乙醇洗一次，稍晾干；用 0.45 ml 1×TE buf 溶解沉淀，加入 1/10 体积的 3 M NaAc (pH 6.2) 和 2 倍体积的无水乙醇，-20℃ 沉淀 2 h 以上。
12. 12 000 rpm 离心 10 min，用 75% 乙醇洗涤一次，真空干燥沉淀；沉淀溶于一定体积的 1×TE buf 中，-20℃ 保存备用。

溶液配方：参照 6.1.7。

7.1.8 家蚕蛹翅核蛋白抽提 (Blough et al., 1999; Feng et al., 2000)

1. 解剖并称取蛹翅组织约 50 mg，加 1 ml 预冷的 PBS；用玻璃匀浆器在冰上匀浆。
2. 500 g 离心 2~3 min 沉淀细胞，弃上清；沉淀用 400 μ l 预冷的 buffer A，振荡 15 sec 使细胞充分悬浮；冰上放置 10 min。
3. 振荡 10 sec，然后 4℃，16 000 g 离心 5 min；将上清移入新管 (细胞质抽提蛋白)。
4. 沉淀用 500 μ l 冷的 buffer C 振荡 15 sec 重悬；冰浴 30 min，每 10 min 振荡 10 sec。
5. 4℃，16 000 g 离心 10 min，立即将上清 (含核蛋白) 转移到一个新的预冷的离心管中；定量。
6. 抽提好核蛋白置 -70℃ 保存备用。

溶液配方：

buffer A (配制 10ml)：

组分	储存液浓度	体积	终浓度	备注
ddH ₂ O		9.76 ml		
Hepes-KOH (pH7.9)	1 M	100 μ l	10 mM	
MgCl ₂	1 M	15 μ l	1.5 mM	
KCl	1 M	100 μ l	10 mM	
DTT (dithiothreitol)	1 M	5 μ l	0.5 mM	用前加
PMSF	0.1 M	20 μ l	0.2 mM	用前加

buffer C (配制 1ml)：

组分	储存液浓度	体积	终浓度	备注
ddH ₂ O		641.6 μ l		
Hepes-KOH (pH7.9)	1 M	20 μ l	20 mM	
Glycerol	25%	250 μ l	10%	

NaCl	5 M	84 μ l	420 mM	
MgCl ₂	1 M	1.5 μ l	1.5 mM	
EDTA	0.5 M	0.4 μ l	0.2 mM	
DTT (dithiothreitol)	1 M	0.5 μ l	0.5 mM	用前加
PMSF	0.1 M	2 μ l	0.2 mM	用前加

7.1.9 凝胶阻滞分析

1. 用作探针的 DNA 片段的准备

- (1) 如果探针 DNA 是合成的，则两边要有伸出的粘端；如果是 PCR 产物则设计引物时引入一个酶切位点末端（被补平时能吸收 dATP）。因为实验中所用探针长度较短（<70 bp），故均为合成。
- (2) 把合成的待退火的单链寡核苷酸用 ddH₂O 配制成 50 μ M 溶液备用。
- (3) 按如下体系将反应物混合：

ddH ₂ O:	50 μ l
10 \times DNA oligo annealing buffer:	10 μ l
DNA oligo A (50 μ M):	20 μ l
DNA oligo B (50 μ M):	20 μ l
Total volume:	100 μ l

- (4) 按如下方案用 PCR 仪进行退火反应：

表 7.1 合成的寡核苷酸退火反应步骤。

Table 7.1 Reaction steps of oligonucleotide annealing.

步骤	温度	时间	说明
1	95 $^{\circ}$ C	2 min	让 DNA oligo 充分变性
2	每 8 s 下降 0.1 $^{\circ}$ C，降至 25 $^{\circ}$ C（注 1）	约 90 min	退火
3	4 $^{\circ}$ C	长时间保持	暂时存放

注 1：如果所使用的 PCR 仪不具备下降 0.1 $^{\circ}$ C 的功能，也可设为每 90 s 下降 1 $^{\circ}$ C。

溶液配方：

10 \times DNA oligo annealing buffer (1ml):

组分	储存液浓度	体积	终浓度
ddH ₂ O		680 μ l	
Tris-HCl (pH 7.5)	1 M	100 μ l	100 mM
NaCl	5 M	200 μ l	1 M
EDTA	0.5 M	20 μ l	10 mM

2. 用聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化退火后的 DNA 片段（压碎与浸泡法）

- (1) 配制合适浓度的非变性聚丙烯酰胺凝胶（《分子克隆实验指南（第三版）》，p.418），DNA 样品上样后进行电泳。
- (2) 电泳完毕后将凝胶卸下，用手提式紫外灯在 260 nm 波长下从上方照射凝胶（置于增感屏上），DNA 条带会呈现深蓝色。若无手提式紫外，亦可用 EB 对凝胶染色后操作。
- (3) 用干净的解剖刀切下含有目的条带的凝胶（使切下的凝胶尽量小）。
- (4) 将切下的凝胶条移入离心管中，用一次性吸头或接种针对着管壁将凝胶挤碎。
- (5) 估计出凝胶条的大致体积，向离心管中加入 1~2 倍体积的丙烯酰胺凝胶洗脱缓冲液。
- (6) 盖上离心管盖，37℃ 摇动温育。<500 bp 的 DNA 温育 3~4 h，大片段 DNA 温育 12~16 h。
- (7) 4℃，16 000 g 离心 1 min；将上清移入另一新离心管中，注意切勿将胶块转移进去。
- (8) 向凝胶沉淀物中再加入 0.5 倍体积的洗脱缓冲液；混匀，再次离心，合并两次上清液。
- (9) 上清液中加入 2 倍体积的冷无水乙醇，-20℃ 沉淀 1 h 以上；4℃，12 000 g 离心 20 min 回收 DNA。
- (10) 用 200 μ l TE (pH 8.0) 溶解 DNA，加入 25 μ l 乙酸钠缓冲液（3 mol/L, pH 5.4），2 倍体积的冷无水乙醇再次沉淀 DNA。
- (11) 用 70% 乙醇洗涤 DNA 沉淀，干燥后溶于 50 μ l TE 中，定量，-20℃ 保存备用。

溶液配方：

丙烯酰胺凝胶洗脱缓冲液（1 ml）：

组分	储存液浓度	体积	终浓度
ddH ₂ O		938 μ l	
乙酸铵	10 M	50 μ l	500 mM
四水合乙酸镁	1 M	10 μ l	10 mM
EDTA	0.5 M	2 μ l	1 mM

3. 探针的标记

- (1) 按如下体系进行标记反应：

ddH ₂ O:	14 μ l
10× Klenow buffer:	2 μ l
[α - ³² P]dATP (10 μ lCi/ μ l):	1 μ l
纯化好的待标记 DNA 片段:	2 μ l (3 pmol)
<u>DNA polymerase I large (Klenow) fragment:</u>	<u>1 μl</u>
Total volume:	20 μ l

混匀后 30℃ 反应 15 min（可适当延长反应时间）。

- (2) 反应结束后加入 80 μ l ddH₂O 使终体积为 100 μ l，再加入 1/8 体积的 10 M 乙酸铵（即 12.5 μ l）和 2.5 倍体积的无水乙醇（~300 μ l）。-70℃ 沉淀 1 h 或 -20℃ 沉淀 2 h 以上。
- (3) 4℃，12 000 g 离心 30 min；70% 乙醇洗涤一次，DNA 沉淀干燥后溶于 50 μ l ddH₂O。
- (4) 标记好的探针可 -20℃ 暂时保存，但一边不宜超过 3 天。

4. EMSA 电泳胶的配制

所需胶的浓度和配制方法参照《分子克隆实验指南（第三版）》（p.418）（黄培堂等, 2002）。

5. EMSA 结合与竞争反应

(1) 如下设置 EMSA 结合反应：

A. 阴性对照：

ddH ₂ O:	14 μ l
5 \times EMSA 结合缓冲液:	4 μ l
核蛋白:	0 μ l
标记好的探针:	2 μ l
总体积:	20 μ l

B. 样品反应

ddH ₂ O:	12 μ l
5 \times EMSA 结合缓冲液:	4 μ l
核蛋白:	2 μ l (5 μ g)
标记好的探针:	2 μ l
总体积:	20 μ l

C. 特异性探针冷竞争反应：

ddH ₂ O:	10 μ l
5 \times EMSA 结合缓冲液:	4 μ l
核蛋白:	2 μ l (5 μ g)
标记好的探针:	2 μ l
未标记的特异性探针:	2 μ l (3 pmol)
总体积:	20 μ l

D. 突变探针冷竞争反应：

ddH ₂ O:	10 μ l
5 \times EMSA 结合缓冲液:	4 μ l
核蛋白:	2 μ l (5 μ g)
标记好的探针:	2 μ l
未标记的突变探针:	2 μ l (3 pmol)
总体积:	20 μ l

注：所使用的标记好的 2 μ l 探针的放射性强度约为 10 000 cpm。

(2) 结合反应混合液混合均匀后置室温（25 $^{\circ}$ C）反应 30 min，再冰上放置 30 min。

(3) 用 7% 中性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分析，以 1 \times TBE 作为电泳缓冲液；上样前 10 V/cm 预电泳 30 min。按顺序上样，空白孔中加 10 μ l 溴酚蓝电泳上样缓冲液作为指示。10 V/cm 电泳，待溴酚蓝迁移至胶下端 4/5 处时停止电泳。整个电泳过程在 4 $^{\circ}$ C 进行。

(4) 将凝胶卸下，按照干胶仪说明书进行干胶。

(5) 用磷屏曝光 3 h，扫描并分析电泳结果。

溶液配方：

5 \times EMSA 结合缓冲液（1 ml）：

组分	储存液浓度	体积	终浓度
ddH ₂ O		65 μ l (210 μ l)	
Hepes-KOH (pH7.9)	1 M	50 μ l (50 μ l)	50 mM (50 mM)
KCl	1 M	250 μ l (125 μ l)	250 mM (125 mM)
MgCl ₂	1 M	20 μ l (—)	20 mM (—)
DTT (dithiothreitol)	1 M	5 μ l (5 μ l)	5 mM (5 mM)
EDTA	0.5 M	10 μ l (10 μ l)	5 mM (5 mM)
BAS	10 mg/ml	50 μ l (50 μ l)	0.5 mg/ml (0.5 mg/ml)
Poly(dI-dC) • Poly(dI-dC)	5 μ g/ μ l	50 μ l (50 μ l)	0.25 μ g/ μ l (0.25 μ g/ μ l)
Glycerol		500 μ l (500 μ l)	50%

注：括号左边为高盐结合缓冲液，括号内为低盐结合缓冲液。

7.1.10 DNA 碱性电泳

1. 准确称量一定质量的琼脂糖粉，用蒸馏水配制适宜浓度 (m/V) 的溶液；在微波炉中将悬浊液加热至琼脂糖完全溶解。
2. 将热的琼脂糖溶液放入事先准备好的 55℃ 水浴锅中平衡温度。待温度平衡后加入 0.1 倍体积的 10× 碱性琼脂糖凝胶电泳缓冲液，混匀后灌制凝胶。
注：溴化乙锭在高 pH 条件下不与 DNA 结合，故碱性琼脂糖凝胶中不能加 EB。另外，高热情况下 NaOH 可使多糖分解，故不能直接用碱性溶液加热溶解琼脂糖。
3. 将用无水乙醇沉淀的 DNA 样品溶于 10~20 μl 1× 碱性凝胶电泳缓冲液中，再加 0.2 倍体积的 6× 碱性凝胶上样缓冲液。
4. 在 1× 碱性凝胶电泳缓冲液中以 <3.5 V/cm 的电压开始电泳，当指示剂迁移出加样孔后关闭电源，在凝胶上面放置一块玻璃板，继续电泳至溴甲酚绿迁移了凝胶长度的近 2/3 时停止电泳。
5. 将凝胶用蒸馏水漂洗两次后放在中和溶液中室温浸泡 45 min。
6. 用蒸馏水再漂洗凝胶两次，放在 0.5 $\mu g/ml$ 的溴化乙锭中染色 30 min。
7. 迅速在凝胶成像仪中对凝胶进行拍照。

溶液配方：

10× 碱性琼脂糖凝胶电泳缓冲液：500 mmol/L NaOH，10 mmol/L EDTA。

6× 碱性凝胶上样缓冲液：300 mmol/L NaOH，6 mmol/L EDTA，0.15% (m/V) 溴甲酚绿，0.25% (m/V) 二甲苯酚。

碱性琼脂糖凝胶中和溶液：1 mol/L Tris-HCl (pH 7.6)，1.5 mol/L NaCl。

7.1.11 质粒介导的功能基因在家蚕蛹翅中的过量表达

将需要过量表达的基因的 ORF 克隆到带有 *IE1* 启动子和 *hr3* 增强子的 pBacPAK8 质粒载体中 (Chen et al., 2004)，构建成 pBacPAK8-IE1-ORF-hr3 瞬时表达质粒。然后将 3~5 μg 质粒 DNA 用脂质体包埋 (7.1.5, 5) 后用尖头毛细管注射到蛹翅中，每只蛹注射 10 μl 。最好选用 24 h 以前的蚕蛹进行注射，因为这时蛹表皮较软，利于注射。注射中尽量避免蚕蛹出血。注射后的蚕蛹置 25℃，适时观察。

7.1.12 本章所用引物和寡核苷酸序列列表

表 7.2 本章所用 PCR 引物和寡核苷酸序列列表。

Table 7.2 PCR primers and oligonucleotides used in this chapter.

引物名称	引物序列	用途
BmA3-210	5'-CCCCATCGAACACGGAATCG-3'	半定量 RT-PCR 中扩增内
BmA3-601	5'-CGCTCGGCAGTGGTAGTGAA-3'	参基因 <i>Bm-actin A3</i>
BmASH1-380	5'-CAGATACCCAATTAGGGCTTGG-3'	半定量 RT-PCR 中扩增
BmASH1-785	5'-GCTCGACGGAATGCGTCGAT-3'	<i>Bm-ASH1</i>
BmASH2-225	5'-AATAGCGAGACGTAATGCACGGGA-3'	半定量 RT-PCR 中扩增

BmASH2-449	5'-CCGATTTTCTTGATCACGCGTAATAC-3'	<i>Bm-ASH2</i>
BmASH3-272	5'-CAAGAAGAAACGCCAGGGAAAGGA-3'	半定量 RT-PCR 中扩增
BmASH3-519	5'-CCATCATCCGCTTCATAGCTGATCGT-3'	<i>Bm-ASH3</i>
Bmase-303	5'-ACGGAATGCGCGGGAACGGAA-3'	半定量 RT-PCR 中扩增
Bmase-523	5'-GATTCCATGCAGGAACGAGACGT-3'	<i>Bm-ase</i>
BmASH1-F	5'-AGGATCCCGATACGCGATGCCGATGG-3'	<i>Bm-ASH1</i> 基因 ORF 的
BmASH1-R	5'-TCTCGAGCCTTTGTCACTGTTGTTGCCACC-3'	PCR 扩增与后续克隆
BmASH2-F	5'-AGGATCCGTCAAAATGCTCCAAGAAATCC-3'	<i>Bm-ASH2</i> 基因 ORF 的
BmASH2-R	5'-TCTCGAGGATATAACTATTTTTGTTGCCACC-3'	PCR 扩增与后续克隆
BmASH3-F	5'-AGGATCCAAATTAATGCGCGGCCGTCC-3'	<i>Bm-ASH3</i> 基因 ORF 的
BmASH3-R	5'-TCTCGAGTCACTTTTCTTGCCACCACGAGAT-3'	PCR 扩增与后续克隆
Bmase-F	5'-AAGATCTGCCGAAATGAGCTCCATCG-3'	<i>Bm-ase</i> 基因 ORF 的 PCR
Bmase-R	5'-TCTCGAGTTATTTTTTATTAACAGTTTTCGTAGG-3'	扩增与后续克隆
Dmda-F	5'-AGGATCCGAAATGGCGACCAGTGACG-3'	<i>Dm-da</i> 基因 ORF 的 PCR
Dmda-R	5'-TGTCGACCTATTGCGGAAGCTGGGC-3'	扩增与后续克隆
Luc-F	5'-AGGATCCATGGAAGACGCCAAAAACA-3'	<i>Luciferase</i> 基因的 PCR 扩
Luc-R	5'-TCTCGAGTTACACGGCGATCTTTCCG-3'	增与后续克隆
BmASH2P-1300	5'-AGAGCTCGTATAACAACCTTTGGATTAATTGG-3'	Bm-ASH2P 启动子片段的扩增及点突变的引入；引物中下划线部分表示 E-box 区域，小写字母表示引入突变后的碱基。
BmASH2P-979	5'-AGAGCTCGACTCTAATGCAAAATAAAAATACG-3'	
BmASH2P-774	5'-AGAGCTCATTTTCATTACGTTTACAACCTAAC-3'	
BmASH2P-541	5'-AGAGCTCACATAAAGCTTTGATAAGATCTAC-3'	
BmASH2P-188	5'-AGAGCTCATATAACCCGTGCGCGT-3'	
BmASH2P-R	5'-GCTCGAGAATTTTGACGTGTTTACACGATC-3'	
BmASH2P-797EmF	5'-AAACTCTTGATG <u>aAGCc</u> GATCGTTGATGT-3'	
BmASH2P-797EmR	5'-ACATCAACGATAC <u>gGCTt</u> CATCAAGAGTTT-3'	
BmASH2P-194EmF	5'-TTTGCAGCCGGCG <u>aAGGc</u> GATATAACCCGT-3'	
BmASH2P-194EmR	5'-ACGGGTTATAT <u>gCCTt</u> CGCCGGCTGCAAA-3'	
Cash2pF	5'-GTATAACAACCTTTGGATTAATTGG-3'	用于 Bm-ASH2P 突变区段大小的比较
Cash2pR	5'-GATTGGACTCAGTATATTCG-3'	
dfdF	5'-TATGCTTAGTGTTAATTAGCCGTGATCCCAA TTGTCTACTCTATTACG-3'	用于 EMSA 探针合成
dfdR	5'-TCGTAATAGAGTAGACAATTTGGGATCACGGC TAATTAACACTAAGCAT-3'	
Δ dfdF	5'-TATGCTTAGTGTCGTCTATTACG-3'	
Δ dfdR	5'-TCGTAATAGACGACACTAAGCAT-3'	
SLF	5'-TAATTAGCCGTGATCCCAAATTGTCTAC-3'	
SLR	5'-TGTAGACAATTTGGGATCACGGCTAATT-3'	

注：引物序列中的斜体部分表示引入的限制性酶切位点。

7.2 结果

7.2.1 家蚕 *ASH* 基因在翅原基和蛹翅中的表达时相

取野生型 7532 (WT) 及突变体 *scaleless* 家蚕吐丝期及蛹期的翅原基和翅抽提总 RNA, 反转录后进行半定量 PCR。从结果看出, 突变体与野生型家蚕之间 *Bm-ASH1* 和 *Bm-ASH3* 的整体表达趋势相似; *Bm-ASH2* 在野生型家蚕 0 d、1 d、2 d 蛹翅中的表达量较高, 其它时期几乎检测不到, 而 *scaleless* 在整个时期都没有检测到表达; *Bm-ase* 也有差异, 主要表现在 S₁~P₀ 时期 (图 7.2)。

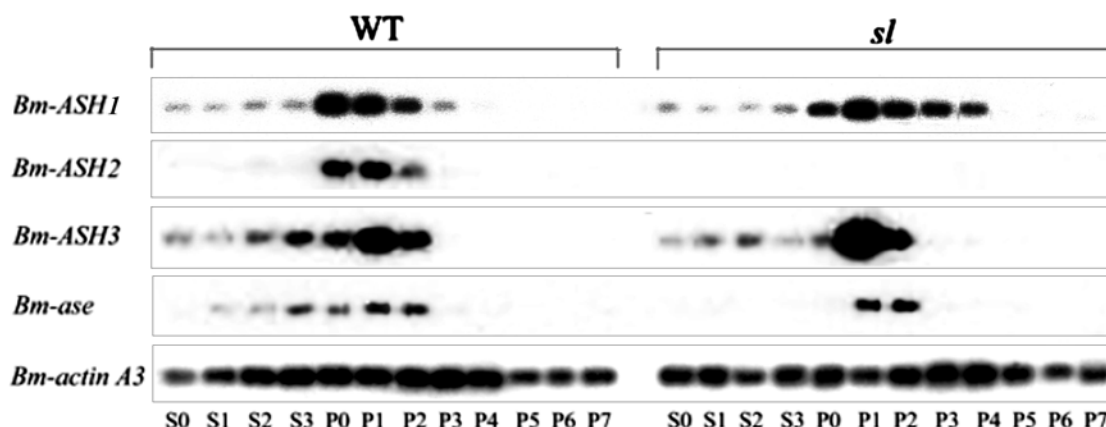


图 7.2 家蚕 *ASH* 基因在翅原基和蛹翅中的表达时相。用 1 μ g 总 RNA 反转录, 然后进行 PCR, 扩增 18 个循环; PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶进行分离并转膜和杂交。S0-S3 表示开始吐丝后的天数, P0-P7 表示化蛹后的天数。

Fig. 7.2 Developmental changes of *Bm-ASH* genes in WT and *sl* pupal wing. 1 μ g of total RNA extracted from wing discs or pupal wings was used to RT-PCR amplification for 18 cycles. PCR products were electrophoresed on a 1.5% agarose gel and hybridized using labeled cDNAs as a probe. S0-S3 represent days after the beginning of spinning, and P0-P7 represent days after pupation.

7.2.2 家蚕 *Bm-ASH1* 和 *Bm-ASH2* 基因在家蚕蛹翅中的表达分布

为了进一步研究家蚕 *ASH* 基因在家蚕蛹翅中的表达特性, 我们选取了家蚕 1d 蛹翅进行原位杂交。先把家蚕的 *ASH* 基因 ORF 扩增后 (正向引物带有 *Bam*H I 位点; *ase* 从 ATG 开始 152bp 处有一 *Bam*H I 位点, 故引物中换成其同尾酶 *Bgl* II, 见 7.1.12) 克隆到 pMD18-T 载体中, 再用 *Bam*H I 单酶切克隆入 pGEM-3Z 载体中, 每个基因均选取相对于 T7 启动子正反向克隆各一个 (图 7.3 A)。然后将质粒模板线性化, 并根据 7.1.4 中方法进行探针标记, 标记好的探针取 2 μ l 用琼脂糖凝胶电泳进行检测 (图 7.3 B)。

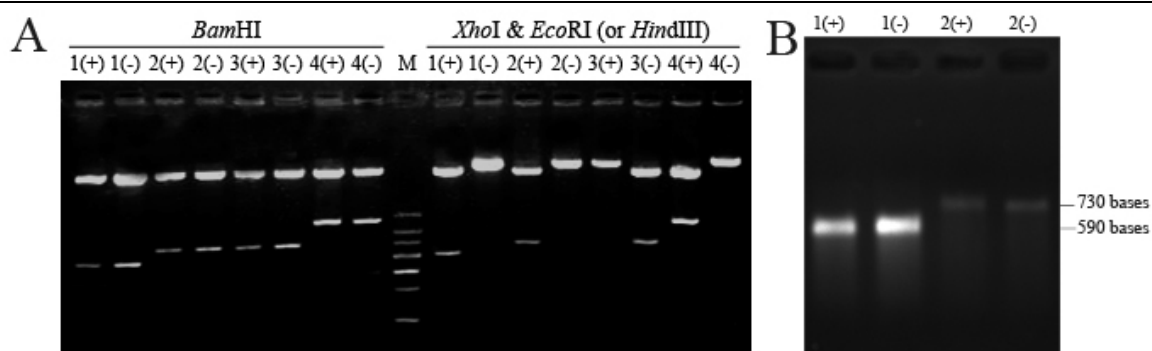


图 7.3 克隆入 pGEM-3Z 载体中的家蚕 *ASH* 基因相对于 T7 启动子的正反向酶切鉴定 (A) 及标记好的探针的电泳鉴定 (B)。M, DNA marker, 七条带的大小分别为 1 200bp、900bp、750bp、600bp、300bp 和 150bp。 *Bam*HI 单酶切后均能切除预测大小的目的条带, 说明 ORF 均已克隆入 pGEM-3Z 载体。 *Xho*I & *Eco*RI 双酶切 pGEM-3Z-*ASH*1、pGEM-3Z-*ASH*2、pGEM-3Z-*ase*, 若为正接则可切出与单酶切相同的片段, 若为反接则只能将质粒线性化; *Xho*I & *Hind*III 双酶切 pGEM-3Z-*ASH*3, 若为反接则可切出与单酶切相同的片段, 若为正接则只能将质粒线性化。1、2、3、4 分别代表 pGEM-3Z-*ASH*1、pGEM-3Z-*ASH*2、pGEM-3Z-*ASH*3、pGEM-3Z-*ase*; (+) 表示正接, (-) 表示反接。

Fig. 7.3 Identification of ligation directions from T7 promoter of *ASH* genes cloned into pGEM-3Z vector (A) and inspection the signed probe on agarose gel (B). M stands for the DNA marker, the seven segments are 1 200bp, 900bp, 750bp, 600bp, 300bp and 150bp, separately. The results digested by *Bam*HI show the genes are all cloned into the vector successfully. As deduced, double enzyme digestion by *Xho*I & *Eco*RI of pGEM-3Z-*ASH*1, pGEM-3Z-*ASH*2 or pGEM-3Z-*ase* would make results the same as by *Bam*HI for forward direction ligations, while only make the plasmid linear for reverse direction ligations. Double enzyme digestion by *Xho*I & *Hind*III of pGEM-3Z-*ASH*3 would make results the same as by *Bam*HI for reverse direction ligations, while only make the plasmid linear for forward direction ligations. The numbers of 1-4 stands for pGEM-3Z-*ASH*1, pGEM-3Z-*ASH*2, pGEM-3Z-*ASH*3 and pGEM-3Z-*ase* respectively. (+) shows forward direction ligation, and (-) shows reverse direction ligation.

从杂交结果可以看出, *Bm-ASH1* 在 WT 和 *sl* 中的表达分布几乎没有差别, 有表达的细胞并不是很规则的排列在翅面上 (图 7.4)。 *Bm-ASH2* 则不然, 在野生型家蚕的翅面上表达 *Bm-ASH2* 的细胞规则地排列着, 类似于 AO/EB 染色结果 (图 5.2 b); 而 *sl* 翅面上仅有非常少的细胞表达 *Bm-ASH2* 基因 (图 7.5)。值得一提的是在有些 *sl* 个体的翅面上有些区域会有明显的表达 *Bm-ASH2* 基因的细胞。 *Bm-ASH3* 和 *Bm-ase* 基因的原位杂交结果均没有检测到表达信号。推测是因为单个细胞中表达量太低, 达不到检测水平; 或表达这两个基因的细胞位于表皮下面, 运用此法进行杂交时探针不能穿过所致。总之, *Bm-ASH2* 基因在 *scaleless* 和 WT 家蚕蛹翅中具有显著的表达差异。

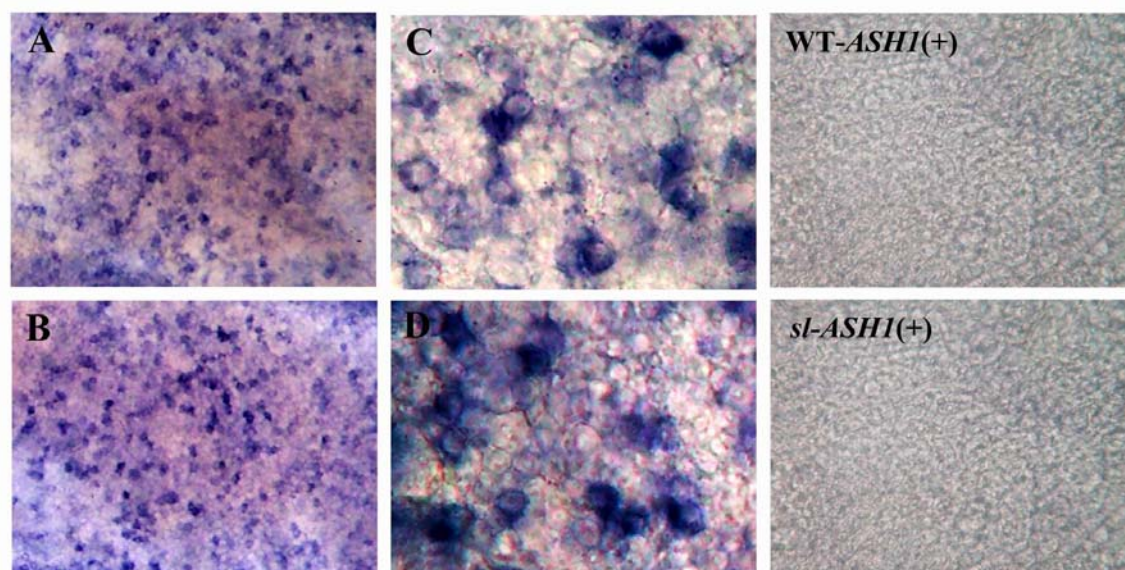


图 7.4 家蚕 *Bm-ASH1* 基因在家蚕蛹翅中的表达分布。A、C 和 B、D 分别是野生型家蚕和突变体家蚕，其中 C、D 是 A、B 部分区域放大。

Fig. 7. 4 Expression pattern of *Bm-ASH1* gene in pupa wing of the silkworm. A, C and B, D shows the results of WT and *sl* respectively, and B and D are enlargement of partial region of A and C respectively. Distal is to the right.

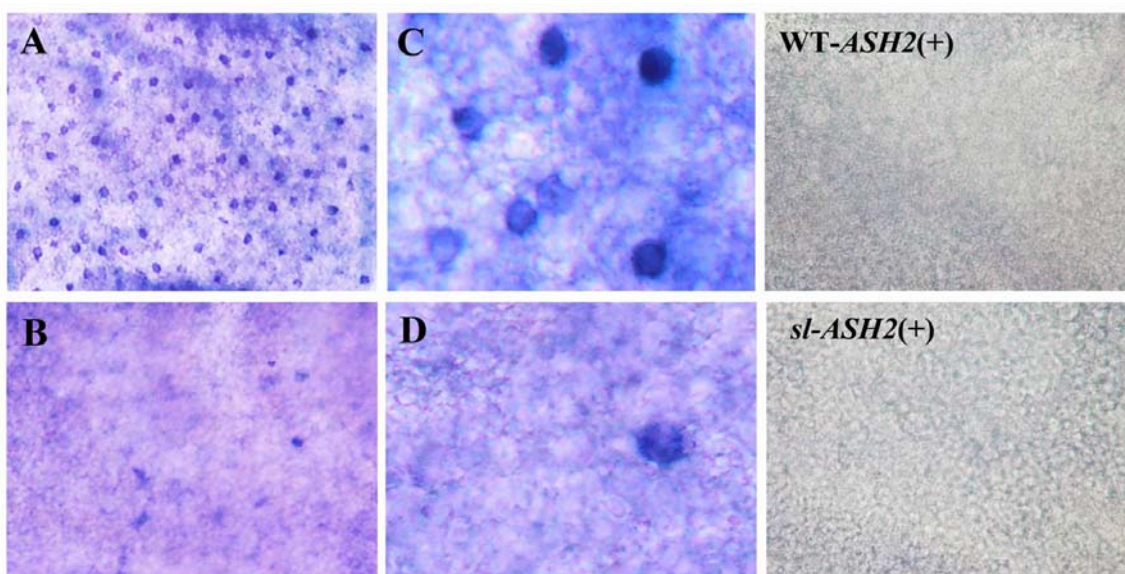


图 7.5 家蚕 *Bm-ASH2* 基因在家蚕蛹翅中的表达分布。A、C 和 B、D 分别是野生型家蚕和突变体家蚕，其中 C、D 是 A、B 部分区域放大。可以明显得看出表达 *Bm-ASH2* 的细胞规则得排列在野生型蛹翅表面，而 *sl* 翅面上却只有很少的细胞被检测到有 *Bm-ASH2* 的表达。

Fig. 7. 5 Expression pattern of *Bm-ASH2* gene in pupal wing of the silkworm. A, C and B, D shows the results of WT and *sl* respectively, and B and D are enlargement of partial region of A and C. Distal is to the right. It is obvious that cells expressing *Bm-ASH2* are well arranged in WT pupal wing, while only a few cells is detected expressing *Bm-ASH2* gene.

7.2.3 家蚕 *Bm-ASH2* 基因启动子活性分析

为了阐明 *scaleless* 蛹翅中 *Bm-ASH2* 基因表达异常的机理，我们从启动子特性入手，探讨其在转录调控上有无异常。

1. *Bm-ASH2* 基因启动子的结构分析

根据 GenBank 已发表的家蚕基因组序列设计引物 BmASH2P-1300 和 BmASH2P-R (表 7.2)，以家蚕 WT (7532) 和 *sl* 基因组 DNA 为模板扩增 *Bm-ASH2* 开放阅读框上游的序列，经克隆测序后分别得到了 1 178 bp 和 1 152 bp 的 DNA 片段 (图 7.6)，下文分别称为 ASH2P 和 *sl*-ASH2P。比对后发现与 WT 相比，*sl* 的 ASH2P 序列中共有 11 个点突变，其中 10 个颠换、一个置换。差别更大的是 *sl* 在 ATG 上游 1 027 bp 处有一段连续 26 bp 的缺失突变。在 ATG 上游 194 bp 和 797 bp 处各有一个典型的 A 组 E-box (CAGGTG 和 CAGCTG)。

WT (7532)	GTATAACAACCTTTGGATTAATTGGTAAGAACAGTCGTGAAGTCAAATGGACAAAAGCAAGAAGCATTGTCAATGCAAAAG	80
<i>scaleless</i> (<i>sl</i>)G...A.....	80
WT (7532)	TTCAAATGAGTCACATTTGACATAATATGGTATGCTTAGTGTTAATTAGCCGTGATCCCAAATTGTCTACTCTATTACG	160
<i>scaleless</i> (<i>sl</i>)TC..G.....CG-----	134
WT (7532)	AATATTCGGAACACCGGAGCCAAAAGCAATAACAACAAGGACTCTAATGCAAAATAAAATACGAATATACTGAGTCCAA	240
<i>scaleless</i> (<i>sl</i>)T.....	214
WT (7532)	TCATACTCGAACCCGGGCCCTCTAGTCACGCCCCACTATGAAGCAATGATGCGATAAAAATAACCAAGTGATAGTAGTAG	320
<i>scaleless</i> (<i>sl</i>)	294
WT (7532)	TATCAAAAATTAGCTGATTCTGTTTTTGAATATGAACAACACGAACATAAACTCTTGATGCAGCTGTATCGTTGATGTT	400
<i>scaleless</i> (<i>sl</i>)G.....T.....	374
WT (7532)	TATAATTTTCATTACGTTTACAACTAACCGCACCGGTTCCCGAATTCGAATATTGCTTTCATTAAATGTAATGTCGACGT	480
<i>scaleless</i> (<i>sl</i>)	454
WT (7532)	ATTTTATCGATGAAGCTTCGATAAGCGACCACTCGACCGCTTGATTTTATGACAAAATATATCTGAAGATACAAGATGAT	560
<i>scaleless</i> (<i>sl</i>)	534
WT (7532)	AAAACGGACTTTTAGCTGTTTTGATTTACTTGTATCAACAGCATAATAAATCTATAGTAATTGTTACTAATTTTCACA	640
<i>scaleless</i> (<i>sl</i>)	614
WT (7532)	TAAAGCTTTGATAAGATCTACAACATATCGATAAGTTATAAAAAATACATATATTTAAAGAAATTCCTTAAACAATAACT	720
<i>scaleless</i> (<i>sl</i>)C	694
WT (7532)	ACCGGTACCGATATCGTGCAAGCACTCTGATCTTTCTTGATTTTACGTGTTCTAGATAAGATATTTATTTTCATATG	800
<i>scaleless</i> (<i>sl</i>)	774
WT (7532)	GCTCCTAATATAATAACTTTTCAGTGCTCACTAGAAAAACCGGGCACGCGTTGATCAACCTGCCCGCGCCACGATCTC	880
<i>scaleless</i> (<i>sl</i>)	854
WT (7532)	CCCCAGCCAGTACGCCAGGTACGAACCCGCACGTATAGGGGGAAGGGATGCTCGAAAATAATAGGGGAAGAGAATTTTAA	960
<i>scaleless</i> (<i>sl</i>)A.....	934
WT (7532)	AATTTATATTTTTGACGCCGCCGAGGTGATATAACCGTGCGCGTGCGCGCGGCCCACTTGTACGTGAAGCTCCAC	1040
<i>scaleless</i> (<i>sl</i>)	1014
WT (7532)	CGCGCGCGTTTCGCGTTTCTGCTTACTGACCGAAAGCTCCACAAAGCCTTCCCTATCGCGCAGTGCGTATTCGATAGCCG	1120
<i>scaleless</i> (<i>sl</i>)	1094
WT (7532)	CGTCGATTGGTCGTGCGTCCGTATCTATCGCAGACGATCGTGTAACACGTCAAATG	1178
<i>scaleless</i> (<i>sl</i>)ATG	1152

图 7.6 突变体 (*scaleless* (*sl*)) 和野生型 (WT (7532)) 家蚕 *Bm-ASH2* 基因启动子序列比较。最 3' 末端箭头框出的是起始密码子，阴影部分指示的是 *scaleless* (*sl*) 连续缺失的区段。方框中的序列是推测的 E-box。

Fig. 7. 6 Comparison of the promoter sequences between *Bm-ASH2* gene between *scaleless* (*sl*) and WT (7532) silkworms. The arrow at the 3'-end of the sequences shows the start codon. The continuous missing region in *scaleless* (*sl*) is shaded. Two presumed E-boxes are boxed.

2. 启动子活性分析

(1) 质粒构建

将 PCR 扩增所得的不同长度及将推定的 E-box 突变的启动子片段首先构建到 pMD18-T 载体中,经测序确认正确后再通过酶切进一步克隆入荧光素酶报告质粒载体 pGL3-Basic 中(图 7.7 A);家蚕的四个 *ASH* 基因及果蝇来源的 *daughterless* (*da*) 基因(由美国贝勒医学院 Hugo J. Bellen 教授实验室的 Karen L. Schulze 博士赠送)的 ORF 分别构建于带 *IE1* 启动子和 *hr3* 增强子的瞬时表达质粒载体 pBacPAK8 中, ORF 置于 *IE1* 和 *hr3* 之间(图 7.7 B)。

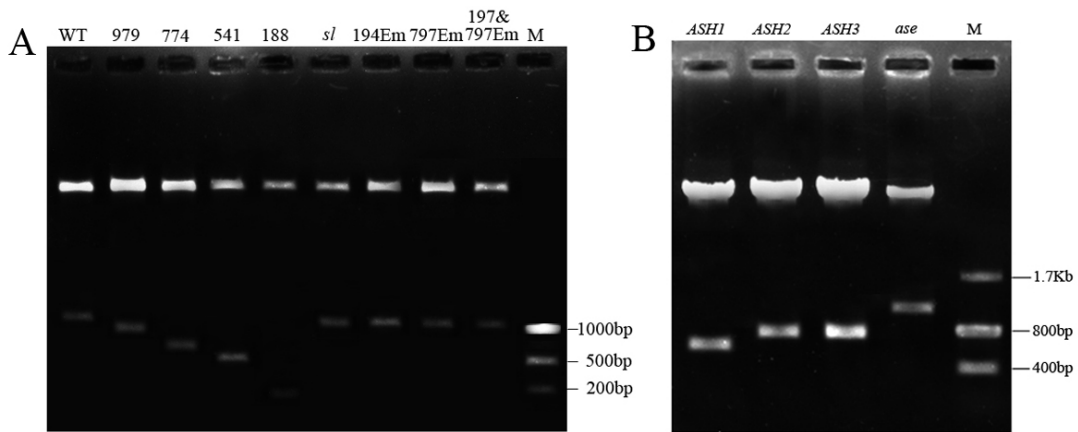


图 7.7 用于启动子活性分析的质粒酶切鉴定。A. pGL3-ASH2P(WT)、pGL3-979(979)、pGL3-774(774)、pGL3-541(541)、pGL3-188(188)、pGL3-sl-ASH2P(*sl*)、pGL3-194Em(194Em)、pGL3-797Em(797Em)、pGL3-194&797Em(194&797Em) 质粒的 *SacI* & *XhoI* 双酶切鉴定; B. pBacPAK8-IE1-*ASH1*-hr3(*ASH1*)、pBacPAK8-IE1-*ASH2*-hr3(*ASH2*)、pBacPAK8-IE1-*ASH3*-hr3(*ASH3*)、pBacPAK8-IE1-*ase*-hr3(*ase*) 质粒的 *Bam*HI & *XhoI* 双酶切鉴定。

Fig. 7.7 Identification of plasmids used for promoter activity analysis with restriction enzymes. A. Double enzyme digestion by *SacI* & *XhoI* of pGL3-ASH2P(WT), pGL3-979(979), pGL3-774(774), pGL3-541(541), pGL3-188(188), pGL3-sl-ASH2P(*sl*), pGL3-194Em(194Em), pGL3-797Em(797Em), pGL3-194&797Em(194&797Em). B. Double enzyme digestion by *Bam*HI & *XhoI* of pBacPAK8-IE1-*ASH1*-hr3(*ASH1*), pBacPAK8-IE1-*ASH2*-hr3(*ASH2*), *ASH2P*+pBacPAK8-IE1-*ASH3*-hr3(*ASH3*), pBacPAK8-IE1-*ase*-hr3(*ase*).

(2) 家蚕 *ASH* 基因和果蝇 *da* 基因对 *Bm-ASH2* 基因启动子的转录调节作用

将报告质粒 pGL3-ASH2P 和瞬时表达质粒 pBacPAK8-IE1-ORF-hr3 以不同方式进行组合共转染家蚕 BmN 细胞,以除质粒外的细胞转染物组分为空白对照(Blank)。每组转染均配有海参荧光素酶报告质粒 pRL-CMV 共转染作为内参照(图 7.8)。转染后 48 小时收集细胞并测定双荧光强度,将测得的萤火虫荧光值除以海参荧光值,同时将各种组合中比值最高的设定为 100,其他组合计算其相对值。在各种组合中,ASH2P+ASH1+*da* 三种质粒(下文均以启动子或基因名称代表质粒名称)共转染家蚕 BmN 细胞后 ASH2P 活性最强;Blank、pGL3-Basic+ASH1+*da*、ASH2P+pBacPAK8-IE1-hr3(未克隆入任何外源基因的 OFR)及 PGL3-ASH2P 转染后测得的荧光素酶活性均非常低,基本可以忽略;ASH2P 与 ASH2+*da*、ASH3+*da*、*ase*+*da* 共转染以及与五种转录因子单独共转染后 ASH2P 活性也远比 ASH2P+ASH1+*da* 组合低得多($P<0.01$)。因此我们选

择 ASH2P 启动子的不同片段与 ASH1+da 共转染家蚕 BmN 细胞以进一步研究 ASH2P 启动子功能。

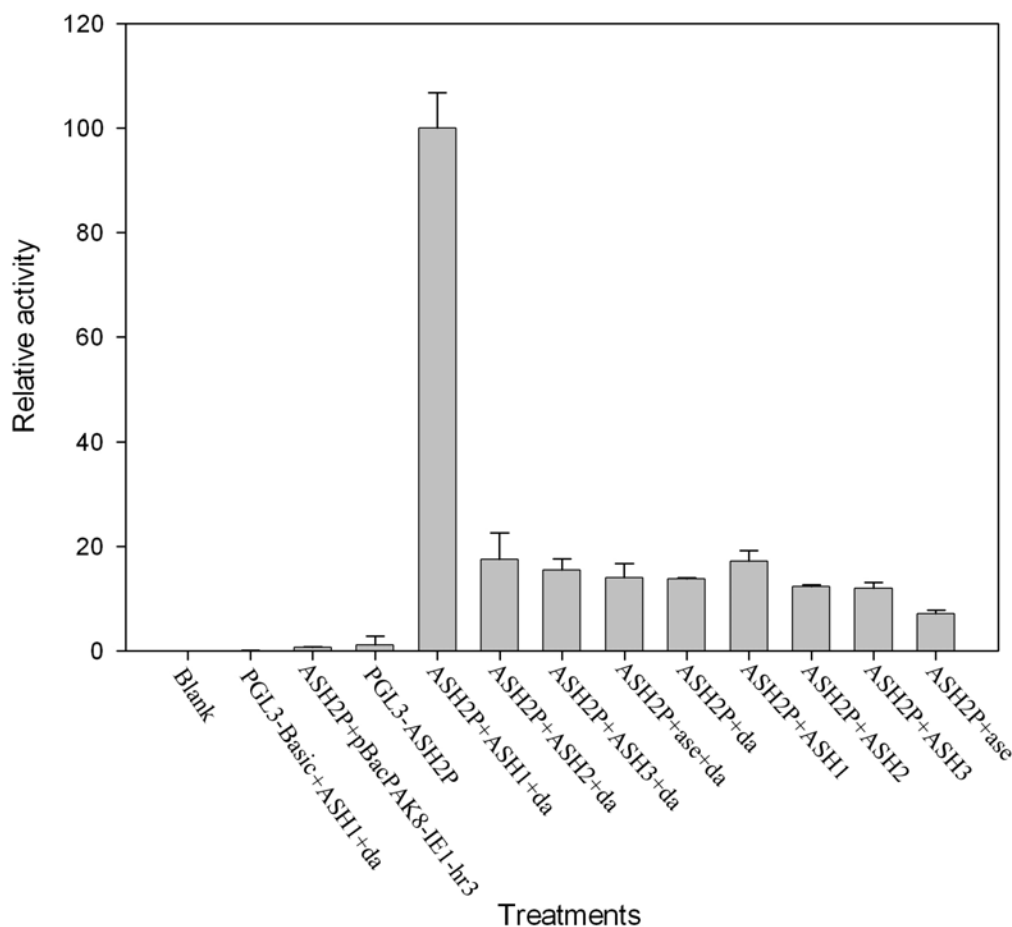


图 7.8 荧光素酶报告质粒 pGL3-ASH2P 和瞬时表达质粒 pBacPAK8-IE1-ORF-hr3 以不同组合方式转染 BmN 细胞后 ASH2P 启动子的活性分析。ORF 代表的基因有 *Bm-ASH1*、*Bm-ASH2*、*Bm-ASH3*、*Bm-ase* 和 *Dm-da* (*daughterless*)。每种处理至少重复 3 次。

Fig. 7.8 Activity analysis of ASH2P promoter by co-transfection of luciferase reporter plasmid pGL3-ASH2P with different immediately expression plasmids pBacPAK8-IE1-ORF-hr3. ORF stands for genes *Bm-ASH1*、*Bm-ASH2*、*Bm-ASH3*、*Bm-ase* or *Dm-da* (*daughterless*). At least three independent repeats were carried out for each treatment.

(3) ASH2P 启动子截短及 E-box 位点的突变分析

按照图 7.9 A 所示将 ASH2P 启动子截短为 ATG 上游 979 bp、774 bp、541bp 和 188 bp 的片段并分别克隆入 pGL3-Basic 荧光素酶报告质粒载体中。然后将各个报告质粒分别与 ASH1+da 组合共转染家蚕 BmN 细胞。每次截短后启动子活性均显著性降低 ($P<0.01$) 其中降低幅度最大的是从 ASH2P 全长到 979 bp, 后者只相当于前者的约 1/5; 估计截去的 199 bp 中含有一个重要的转录调控元件 (图 7.9 B)。将 ASH2P 启动子序列中两个预测的 E-box 单独突变和共同突变后用同样的方法进行启动子活性分析。三种突变处理均使启动子活性显著性降低 ($P<0.01$), 但是 ATG 上游 194 bp 处的 E-box 突变要比 797 bp 处 E-box 突变造成的影响大得多 ($P<0.01$), 而两者同时突变后启动子活性与 194 bp 处的 E-box 突变后启动子活性却没有显著性差异 ($P>0.05$)。估计 797 bp 处 E-box 距 ATG 太远而促进转录的能力较 194 bp 处的 E-box 弱。

(4) *scaleless* 突变体家蚕 ASH2P 启动子活性显著降低

将 *scaleless* *Bm-ASH2* 基因的启动子 sl-ASH2P 克隆到 pGL3-Basic 载体中, 用同样的方法与 ASH1+da 共转染家蚕 BmN 细胞, 分析 sl-ASH2P 的活性 (图 7.9 B)。发现 sl-ASH2P 活性比野生型家蚕 ASH2P 活性显著性降低($P<0.01$); 而 sl-ASH2P 活性与 979 bp 启动子活性相当($P>0.05$)。可见, sl-ASH2P 发生突变的区段可能破坏了整个启动子中很关键的一个元件。

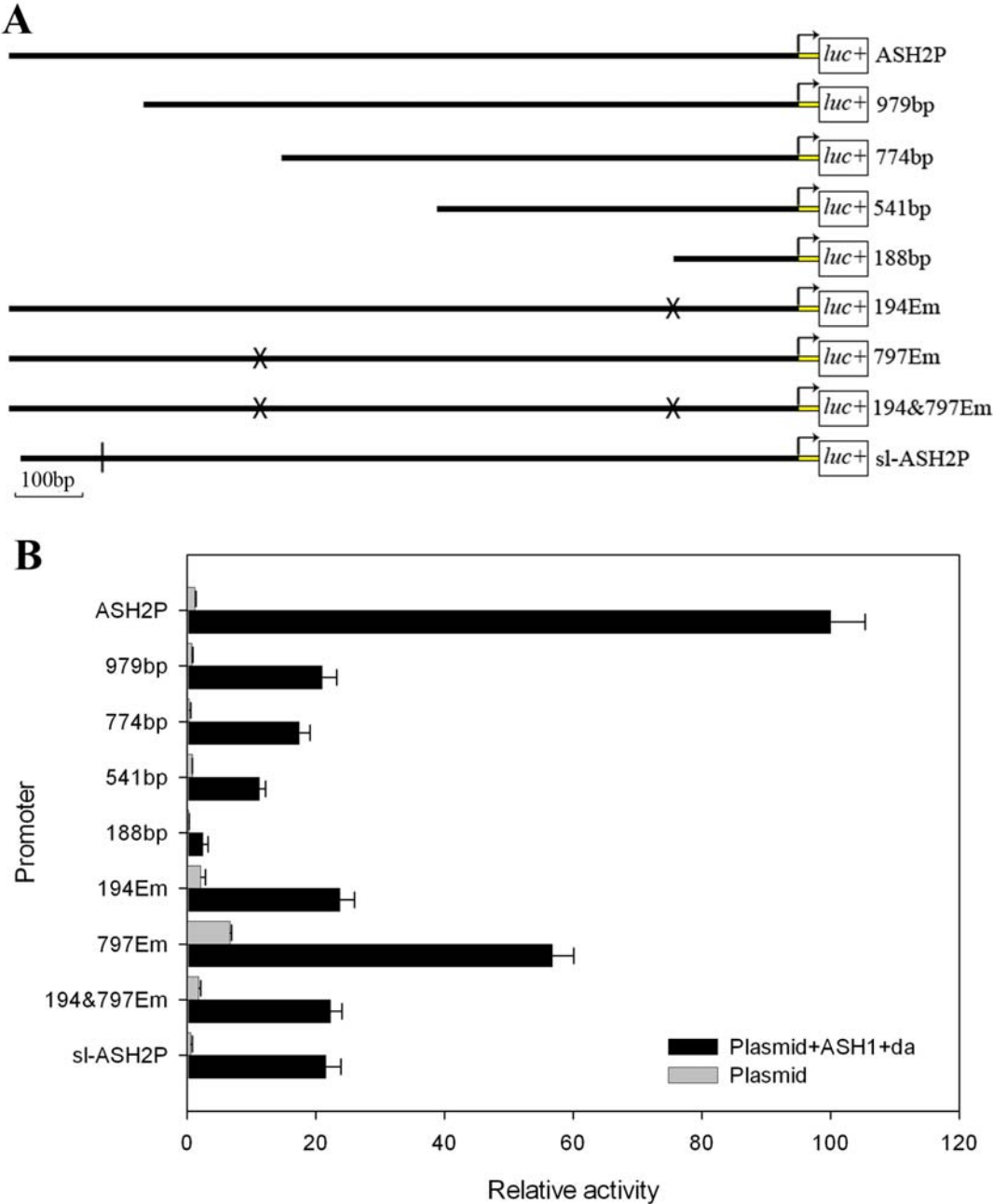


图 7.9 ASH2P 启动子截短与 E-box 位点的突变分析及 *scaleless* 与 WT 启动子活性比较。A. 启动子片段设计示意图, 194Em、797Em 及 194&797Em 中的叉号表示 E-box 突变的位置, sl-ASH2P 中的 “|” 表示连续缺失突变的位置; B. “Plasmid” 表示启动子片段克隆到 pGL3-Basic 载体中后单独转染 BmN 细胞。每种处理至少重复 3 次。

Fig. 7. 9 Promoter activity analysis of ASH2P partial segments and after E-box mutation, and the activity comparison between ASH2P promoters of *scaleless* and WT. A. The design of the partial segments of the promoter.

Forks in 194Em、797Em and 194&797Em show the sites of the E-boxes mutated, and “|” in *sl*-ASH2P shows the continuous missing mutation position. B. “Plasmid” stands for transfecting BmN cells of promoters segments in pGL3-Basic vector without transcriptional factors. At least three independent repeats were carried out for each treatment.

7.2.4 突变体家蚕 *Bm*-ASH2 基因启动子缺失区段与核蛋白结合实验

为了进一步证明 *sl*-ASH2P 启动子中缺失的序列的作用, 用 1 d 蛹翅的核抽提蛋白进行了凝胶阻滞分析。所用的探针中 *dfd* 表示包含 *sl*-ASH2P 启动子缺失部位在内的一段 49 bp 的来自野生型家蚕 ASH2P 启动子的序列, Δ *dfd* 指对应于 *dfd* 的来自 *sl*-ASH2P 启动子的序列 (23 bp), SL 表示 *sl*-ASH2P 启动子连续缺失的序列 (28 bp, 包含与连续缺失突变 5'-端相连的两个突变碱基)。探针均为合成寡核苷酸后退火再纯化 (表 7.2)。从图 7.10 可以看出: *dfd* 与某种核蛋白特异性结合, 而未标记的 Δ *dfd* 对其结合没有竞争; 未标记的 *dfd* 和 SL 均能够竞争掉与标记的 *dfd* 特异性结合核蛋白。

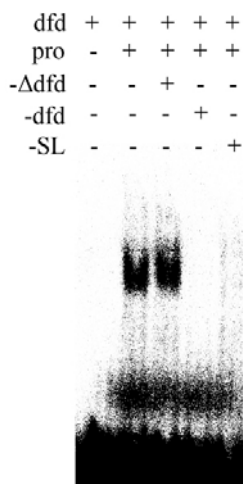


图 7.10 *sl*-ASH2P 启动子中缺失区段的凝胶阻滞实验。“+”表示结合反应中有这种成分,“-”表示结合反应中不包含这种成分,“pro”表示抽提的核蛋白, Δ *dfd*、*dfd* 及 SL 前面的“-”表示没有进行标记。

Fig. 7.10 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) analysis of the interaction of pupal wing nucleolus protein with *sl*-ASH2P missing region. “+” shows the component is included and “-” shows the component is not included in binding reactions. “pro” stands for the nucleolus protein. Minus signs ahead of Δ *dfd*、*dfd* and SL indicate unlabeled of the probes.

7.2.5 家蚕突变体 *scaleless* 的遗传学分析

从遗传学角度分析了家蚕野生型、突变体及其近等基因系或近等基因系培育的中间种系的 ASH2P 启动子结构。根据启动子序列设计引物 Cash2pF 和 Cash2pR (表 7.2), 然后用蚕蛾来源的基因组 DNA 为模板进行 PCR。因为 *scaleless* 的启动子在两条引物之间的区段比 WT (7532) 缺失了 26 bp, 所以扩增出的片段长度应该为 216 bp, 而 WT (7532) 的应为 242 bp。将 PCR 产物在 3% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 结果发现 *sl* • 7532BC6 带突变表型的自交 F2 代 (图 7.11 A line3)、*sl* • 7532BC7 回交 *sl* 中的突变表型个体 (图 7.11 A line4) 与 *sl* (图 7.11 A line2) 电泳图谱一致, 均比 WT (7532) 小 26 bp。而 *sl* • 7532BC7 回交 *sl* 中的正常表型个体 (图 7.11 A line5) 及 *sl* • Furong 杂交一代 (测序已知 Furong 与 7532 的 ASH2P 启动子序列完全一样) (图 7.11 A line5) 均扩增出三条带, 其中两条分别与 *sl* 和 WT 的一样大, 而另一条带明显滞后。推测是因为 PCR 扩增过程

中形成了 *sl* 与 WT 扩增条带的杂合 DNA, 因其会在中间形成环而其电泳时滞后。碱性琼脂糖凝胶电泳结果说明了猜测的正确性 (图 7.11 B), *sl* • 7532BC7 回交 *sl* 中的正常表型个体 (图 7.11 B line5) 和 *sl* • Furong 杂交一代 (图 7.11 B line6) 扩增产物在单链状态下均为两条带, 且分别与 WT 和 *sl* 的一致。可见 26 bp 缺失是与无鳞片翅的突变表型紧密连锁的。

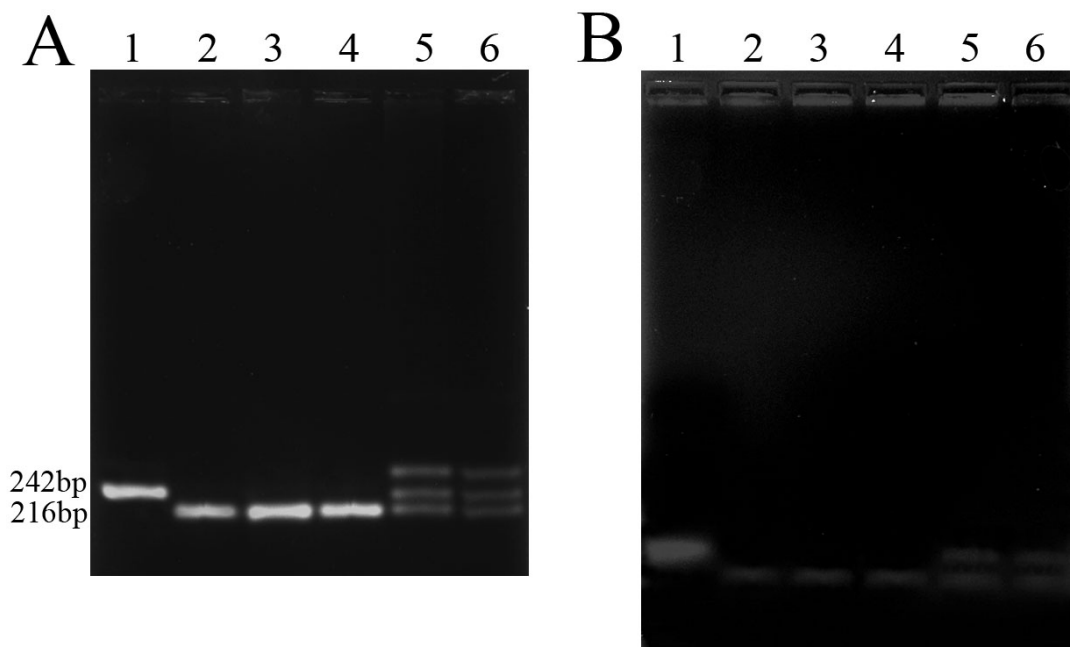


图 7.11 正常表型和突变表型家蚕 ASH2P 启动子中 *sl* 缺失区段大小比较。以 Cash2pF 和 Cash2pR (表 7.2) 为引物扩增家蚕 Bm-ASH2 启动子的部分区域, WT (7532) 可扩增出 242 bp 的片段, 而 *sl* 应该扩增出 216 bp。A. 普通琼脂糖凝胶电泳; B. 碱性琼脂糖凝胶电泳。泳道 1: WT (7532); 泳道 2: *sl*; 泳道 3: *sl* • 7532BC6 自交 F2 代 (均为突变表型); 泳道 4: *sl* • 7532BC7 回交 *sl* 后代中的突变表型个体; 泳道 5: *sl* • 7532BC7 回交 *sl* 后代中的正常表型个体; 泳道 6: *sl* • Furong 杂交一代。

Fig. 7.11 Size comparison of *sl* missing region in ASH2P between silkworms with normal and scaleless wings phenotype. PCR was carried out with primers Cash2pF and Cash2pR (Table 7.2). As expected, the WT (7532) should amplify DNA fragment of 242 bp, and *sl* 216 bp. A. Normal agarose gel electrophoresis; B. Alkaline agarose gel electrophoresis. Line1: WT (7532); Line2: *sl*; Line3: *sl* • 7532BC6 self-cross F2 (all with scaleless wings); Line4: Filial generation individuals with scaleless wings phenotype after *sl* • 7532BC7 back cross with *sl*; Line5: Filial generation individuals with normal phenotype after *sl* • 7532BC7 back cross with *sl*; Line6: The first filial generation i of *sl* crossing with Furong.

7.2.6 家蚕 Bm-ASH2 基因在 *sl* 蛹翅中过量表达对蛾翅表型的影响

1. 外源基因在家蚕蛹翅中过量表达体系的建立

将荧光素酶报告基因 *luc+* 克隆到带 *IE1* 启动子和 *hr3* 增强子的 pBacPAK8 质粒载体中构建成瞬时表达质粒载体 pBacPAK8-IE1-luc-hr3。将构建好的 pBacPAK8-IE1-luc-hr3 5 μ g 注射到 12 h 蛹的左前翅中, 36 h 后解剖蛹翅, 用 50 μ l 裂解液 (Dual-Luciferase Reporter Assay System, Promega) 进行裂解, 然后取 10 μ l 测定荧光素酶活性 (表 7.3)。同时以未注射的右前翅作对照。实验中共注射了 15 只蚕蛹, 其中一只因感染细菌病死亡, 另外 14 只中只有两只检测不到荧光素酶活性 (14 %); 有十只测得的光量子数在 1 500 RLU 以上 (71.4 %), 其中共有六只在 7 000 RLU 以上 (42.9 %)

%), 三只在 10 000 RLU 以上 (21.4%), 有一只甚至达到 248 064 RLU。可见用 pBacPAK8-IE1-ORF-hr3 质粒注射到家蚕蛹翅中会使外源基因有一定的瞬时表达, 故可用于功能基因在蛹翅中的过量表达。

表 7.3 瞬时表达质粒载体 pBacPAK8-IE1-luc-hr3 注射到家蚕蛹翅中后荧光素酶活性检测。

Fig. 7.3 Luciferase activity detection after immediate expression plasmid pBacPAK8-IE1-luc-hr3 was injected into pupal wing.

Number	Luminescence (RLU)		
	The left wing	The right wing	The remainder of the left and right wings
1	248145	81	248064
2	12017	90	11927
3	10883	89	10794
4	8896	93	8803
5	8439	96	8343
6	7120	80	7040
7	4042	76	3966
8	3054	84	2970
9	2102	79	2023
10	1851	88	1763
11	517	78	439
12	100	78	22
13	89	94	-5
14	79	72	7

注: 12h 蛹左前翅注射 pBacPAK8-IE1-luc-hr3 5μg, 36 h 后解剖; 每个蛹翅用 50 μl 裂解液裂解, 取 10 μl 检测。右前翅未注射, 作为对照。

2. 家蚕 *Bm-ASH2* 基因在蛹翅中的过量表达对 *scaleless* 突变表型的影响

将 pBacPAK8-IE1-ASH2-hr3 质粒注射到家蚕 12 h 蛹的左前翅中, 同时以注射 pBacPAK8-IE1-hr3 质粒作为对照, 每只注射 5 μg。36 h 后解剖被注射的蛹翅进行原位杂交 (图 7.12)。发现 *Bm-ASH2* 基因转录出的正、负单链 RNA 作探针均有杂交信号, 估计是很多质粒停留在细胞表面或细胞质, 因而原位杂交时能够与单链的 RNA 结合所致。

实验中共对 50 只 *scaleless* 蚕蛹注射了 pBacPAK8-IE1-ASH2-hr3 质粒, 有 45 只化蛾, 其中 8 只两只前翅的鳞片均很多 (17.8%这是因为 *scaleless* 表型受环境影响较大, 讨论中将提及); 16 只左前翅没能正常展翅 (35.6%)。剩下的 21 只蚕蛾中有 9 只 (42.9%) 与正常 *scaleless* 蚕蛾表型相同; 其余 12 只 (57.1%) 均表现出左翅比右翅翅面鳞片显著增多的表型, 其中一只左前、后翅均有较多鳞片, 一只左前翅与右前翅没有区别, 而左后翅翅面鳞片明显增多, 另外 10 只蚕蛾均为左前翅翅面鳞片显著增多 (图 7.13)。注射 pBacPAK8-IE1-hr3 质粒的对照蚕蛾没有观察到这

种现象,只是亦有许多蚕蛾翅展不正常。而注射 pBacPAK8-IE1-ASH2-hr3 质粒的野生型蚕蛾与正常的肉眼水平上看不出差异。根据 4.1.2 讲述的方法对注射 pBacPAK8-IE1-ASH2-hr3 质粒的蚕蛾翅面鳞片白细胞进行统计,发现 *Bm-ASH2* 基因过量表达对野生型家蚕没有影响;注射 pBacPAK8-IE1-ASH2-hr3 质粒的 *scaleless* 蚕蛾右翅亦与正常相当,而左翅的鳞片白细胞明显增多,只是统计结果的标准差很大(表 7.4)。

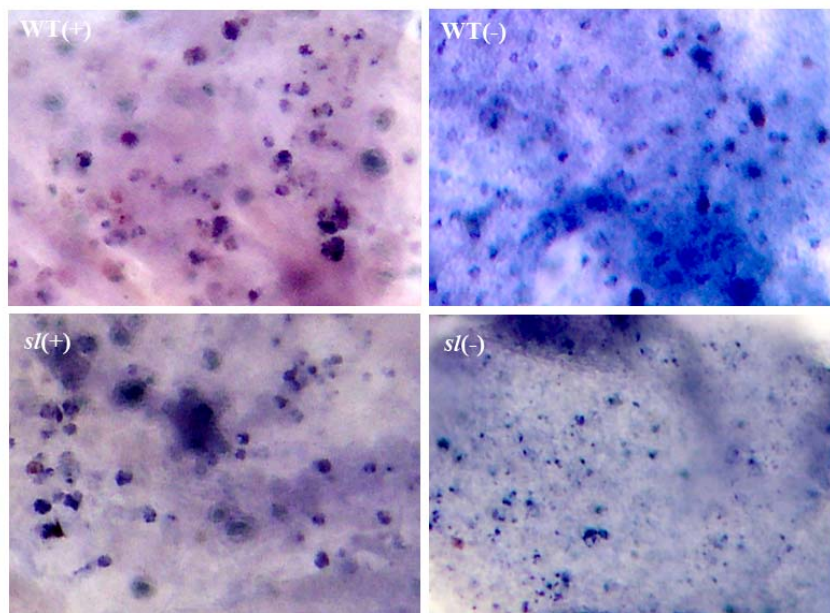


图 7.12 注射 pBacPAK8-IE1-ASH2-hr3 质粒的左前翅的 *Bm-ASH2* 基因原位杂交。WT, 野生型家蚕 7532; *sl*, 突变体家蚕 *scaleless*。(+) 代表正链杂交, (-) 代表负链杂交。每种处理均有杂交信号。

Fig. 7. 12 *In situ* hybridization of *Bm-ASH2* gene on pBacPAK8-IE1-ASH2-hr3 plasmid injected pupal left fore-wings. WT, wide type silkworm breed 7532; *sl*, silkworm *scaleless* wings mutant *scaleless*. (+) stands for hybridizing with *Bm-ASH2* sense chain RNA, and (-) stands for hybridizing with *Bm-ASH2* antisense chain RNA.



图 7.13 注射 pBacPAK8-IE1-ASH2-hr3 质粒的 *scaleless* 蚕蛾左前翅翅面鳞片显著增多。Left 是左前翅翅面区域放大图; right 表示右前翅翅面区域放大图。

Fig. 7. 13 Wing scales on the *scaleless* left fore-wing which was injected with pBacPAK8-IE1-ASH2-hr3 plasmid are increased significantly. “left” shows the enlargement of partial left wing of the moth, and “right” shows the enlargement of partial right wing of the moth.

表 7.4 注射 pBacPAK8-IE1-ASH2-hr3 质粒的家蚕蛾翅面鳞片细胞统计。

Fig. 7.4 Numbers of wing socket cells of pBacPAK8-IE1-ASH2-hr3 plasmid injected silkmoths.

Sort	Wing number	Mean of socket cell number per mm ²	Standard deviation	T grouping
WT	10	462	31	A
WT-left	10	464	22	A
WT-right	10	464	31	A
<i>scaleless</i>	10	51	8	B
<i>scaleless</i> -left	10	374	134	C
<i>scaleless</i> -right	10	53	12	B

注：WT stands for wild type, WT-left stands for the left wing of pBacPAK8-IE1-ASH2-hr3 plasmid injected WT silkmoth, and WT-right stands for the right wing of pBacPAK8-IE1-ASH2-hr3 plasmid injected WT silkmoth; *scaleless* stands for the *scaleless* wing mutant, *scaleless*-left stands for the left wing of pBacPAK8-IE1-ASH2-hr3 plasmid injected *sl* silkmoth, and *scaleless*-right stands for the right wing of pBacPAK8-IE1-ASH2-hr3 plasmid injected *sl* silkmoth. There are no differences among WT, WT-left and WT-right, are also no differences between *scaleless* and *scaleless*-right. While Cell numbers per mm² wing portion of *scaleless*-left are significantly more than that of *scaleless* and *scaleless*-right, though the standard deviation is much larger. Different letters in the column named “T grouping” indicate a statistically significant difference (ANOVA, $p < 0.01$).

7.3 讨论

半定量 RT-PCR 和原位杂交结果都显示家蚕无鳞片翅突变体 *scaleless* 在蛹初期翅面细胞中 *Bm-ASH2* 基因相对于野生型家蚕表达异常（图 7.2, 图 7.5）。野生型家蚕中，表达 *Bm-ASH2* 基因的细胞规则地排列在蛹翅表面；而 *scaleless* 蛹翅表面只有非常少的细胞表达 *Bm-ASH2*。第六章中已经分析说明 *Bm-ASH2* 基因与蝴蝶的 *B-ASH1* 基因具有非常高的同源性，因此我们推测这两个基因具有相似的功能。Galant et al. (1998) 推测 *B-ASH1* 基因与鳞片的形成相关。对 *scaleless* 的研究进一步证实了这一推论。

生物新表型的出现主要取决于特定基因空间表达谱的变化。如果特定基因的编码框没有发生突变，那么其表达特性的变化则可能是顺式调控序列（cis-regulatory sequence）的变更或调控其表达的反式作用因子（trans-acting transcription factors）部署或功能的改变引起的，当然也可能两者兼而有之。因此，要想了解新的表型特征的进化需要鉴定控制这一表型形成的基因的功能，同时需要阐明调控基因表达的顺式和反式作用方式的变化（Calkhoven and Ab, 1996; Lewin, 2000; Gompel et al., 2005）。通过研究知道 *Bm-ASH2* 基因在家蚕不同组织中的表达范围很广（图 6.9），说明它可能具有多种功能，同时 *scaleless* 除成虫翅面鳞片很少这一突变表型外其它特征都与野生型家蚕没有明显差异（第四章）。因为目前尚不清楚调控 *Bm-ASH2* 基因特异性表达的转录因子有哪些，因此只能从其顺式调控元件入手进行研究。

根据家蚕基因组序列设计引物扩增 *Bm-ASH2* 基因 ATG 上游基因组序列。结果发现 *scaleless* 在 5'-端 1 027 bp 处有一段连续 26 bp 的缺失突变。家蚕细胞瞬时表达系统是研究家蚕基因启动子

活性的有力工具(唐顺明等, 2003; Zhang et al., 2004)。将野生型家蚕 *Bm-ASH2* 基因启动子序列克隆到荧光素酶报告质粒载体 pGL3-Basic 中, 然后转染家蚕细胞, 发现启动子活性极低。考虑到果蝇中 *AS-C* 基因具有自调控或基因间调控的特性, 同时分析发现家蚕 *Bm-ASH2* 基因启动子序列有两个明显的 A 组 E-box (GAGGTG 或 GAGCTG)。而 *AS-C* 基因是与 *daughterless* 形成异源二聚体行使功能的。因此我们便将家蚕的 *ASH* 基因和果蝇的 *daughterless* 基因(家蚕的 *daughterless* 尚未得到成功克隆)分别克隆到带有强启动子 *IE1* 和增强子 *hr3* 的 pBacPAK8 载体中构建成瞬时表达质粒。然后用不同组合的瞬时表达质粒与报告质粒共转染家蚕细胞, 结果发现报告基因表达量显著增强, 其中以与 *ASH1*+da 组合最强。我们便选择这一组合研究了家蚕 *Bm-ASH2* 基因启动子特性, 发现预测的 E-box 对于启动子活性非常重要。*scaleless* 整个启动子活性只与截掉 5'-端不到 200 bp 的 WT 启动子序列活性相当(图 7.9), 不到 WT 全长启动子活性的 1/4。而 *scaleless* 缺失的序列就在截掉的序列当中, 这说明这段只有 26 bp 的序列具有比较重要的功能。凝胶阻滞分析结果更加证明了这一推断, 因为这段序列具有特异性结合的蛋白(图 7.10)。

近等基因系对于研究单基因引起的突变非常有用。我们调查了野生型家蚕 7532(或芙蓉)无鳞片翅突变表型近等基因系培育过程中间品系的 *Bm-ASH2* 基因启动子序列, 发现只要具有突变表型, 家蚕的 *Bm-ASH2* 基因启动子序列中均缺失了 26 bp 区段; 正常表型的家蚕中, 只要是杂合的(即回交纯合 *scaleless* 后能产生 1:1 表型后代的品系), *Bm-ASH2* 基因启动子序列也是杂合的, 即具有正常的和缺失的两种启动子序列。这些遗传学实验说明 *Bm-ASH2* 基因启动子序列中 26 bp 缺失与无鳞片翅突变表型是紧密连锁的。

为了进一步说明 *Bm-ASH2* 基因的表达异常是引起无鳞片翅突变表型的关键因素, 我们进行了 *Bm-ASH2* 基因在 *scaleless* 蛹翅中过量表达实验。启动子 *IE1* 和增强子 *hr3* 均来自家蚕杆状病毒, 因此它们在家蚕中具有较强的活性(吕鸿声, 1998)。首先将荧光素酶报告基因替换 pBacPAK8-*IE1*-*ASH2*-*hr3* 中的 *ASH2* 基因, 然后以脂质体介导注射到 12 h 蚕蛹翅中, 36 h 后检测注射质粒的蛹翅中荧光素酶活性, 发现多数个体均有报告基因表达。这便为 *ASH2* 基因在家蚕蛹翅中的表达的提供了理论依据。半定量结果说明 *Bm-ASH2* 基因在野生型家蚕蛹翅中的表达主要集中在前三天, 因此注射 pBacPAK8-*IE1*-*ASH2*-*hr3* 质粒便选择了 12 h 蛹, 均注射左翅。近 60% 注射过质粒的正常展翅的 *scaleless* 蚕蛾的左翅翅面鳞片比右翅显著增多, 但鳞片较野生型小且分叉少(图 4.3, 图 7.13)。而过量表达没有引起野生型家蚕翅面鳞片数量的变化(表 7.4)。说明 *Bm-ASH2* 基因是家蚕翅面鳞片形成的必要而非充分条件; 同时也说明家蚕翅面鳞片的选择还决定于 *Bm-ASH2* 以外的基因, 它们协调控制鳞片的形成。*Bm-ASH2* 基因过量表达能够部分挽回 *scaleless* 丢失的鳞片, 说明与鳞片相关的 *Bm-ASH2* 的上游或协同调控基因在结构上是正常的; 但是不能排除有些基因受 *Bm-ASH2* 的反馈调控而引起表达的异常。这些都需要进一步的更加广泛的研究加以证实。

需要特别说明的是: *scaleless* 的突变表型受环境影响严重, 其中比较重要的一个环境因素是温度。在蛹前期经受低温冲击后, *scaleless* 蚕蛾的翅面鳞片会明显增多(相关数据在本文未作详细分析)。同时, *scaleless* 翅面上并不是绝对没有鳞片存在, 而是在边缘或翅面的部分区域仍然有一些鳞片, 其形状主要呈毛状, 推测属于有感觉功能的鳞片(第一章; Yoshida et al., 2001)。我们注意到, 家蚕的四个 *ASH* 基因均在蛹翅中表达, 且其高表达期均集中在蛹期 0 d~3 d 之间; 除 *Bm-ASH2* 不能在 *scaleless* 蛹翅中正常表达外, *Bm-ASH1* 和 *Bm-ASH3* 的表达特性在 *scaleless* 和

WT 家蚕中几乎完全一致；虽然吐丝期 *Bm-ase* 在突变体中几乎检测不到表达信号，但在蛹的初期仍能正常表达。由此我们推测 *Bm-ASH1* 和 *Bm-ASH2* 主要决定结构性鳞片的发生；而 *Bm-ASH1*、*Bm-ASH2* 和 *Bm-ase* 共同调控感觉性鳞片的发生（图 7.14）。

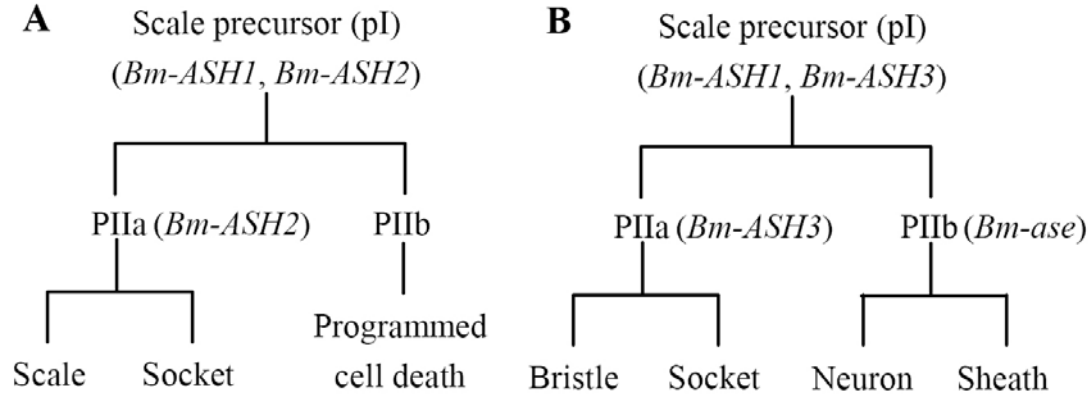


图 7.14 家蚕鳞片发育模式图。A. 结构性鳞片；B. 感觉性鳞片，最终形成的感觉毛用“Bristle”表示。（仿 Galant et al., 1998）

Fig. 7. 14 A Model for silkworm wing scale development. A. structural scale, and B. sensory scale. (Referred to Galant et al., 1998)

第八章 结 论

翅面被覆鳞片是鳞翅目昆虫的主要特征之一；鳞片对于鳞翅目昆虫具有重要的生理意义，而鳞片构成的各种翅面图案具有特定的发育机制和进化模式，因此鳞翅目昆虫的鳞片在昆虫生理学、发育生物学以及生物进化，甚至害虫防治上都具有重要的研究价值。20 世纪 90 年代初，张志芳等发现了一个家蚕突变种 *nlw*（现更名为 *scaleless*），其成虫翅面只具有很少的鳞片；并从遗传学角度证明了其突变表型是由单基因控制的隐性性状。本论文从调查家蚕五龄幼虫翅原基发育规律入手，建立了翅原基摘除和移植技术；并利用家蚕翅原基摘除技术探讨了家蚕幼虫的造血功能。在熟练掌握翅原基和翅解剖技术的基础上，首先从形态学角度分析了家蚕无鳞片翅突变体 *scaleless* 的表型特征；然后从细胞生物学角度研究了家蚕蛹翅凋亡现象，发现 *scaleless* 的发生与翅面细胞过度凋亡有关。克隆了家蚕 *achaete-scute* 复合体（*AS-C*）的同源体基因，并分析了它们的基因结构及在家蚕不同组织中的表达分布和在家蚕胚胎发育过程中的表达时相。在以上研究的基础上，对 *scaleless* 发生的分子机理进行了探索。

从家蚕幼虫 4 眠前一直到化蛹前，前后翅原基均呈总体增长趋势，但 5 龄幼虫期生长缓慢，蚕吐丝后开始迅速生长；成虫蜕皮前后翅的大小变化更加明显。翅原基相对于体长在家蚕幼虫吐丝后才表现出明显的增长趋势；而相对于体重则呈明显的“u”字形生长。5 龄幼虫翅原基虽然在大小生长上相对缓慢，但形态变化很大，2~3 d 以及 8~11 d 这两个阶段中形态变化最为明显，11 d 时翅原基的形状已基本接近蛹期。蛹的翅芽被保护在表皮之下，整个蛹期翅芽的大小和形状没有明显变化，但伴随有翅面鳞片的发生，说明蛹期是翅完善的过程，包括翅脉的硬化、鳞片的形成、花纹的出现等。选择变化相对较小的五龄 1d 翅原基进行摘除和移植实验为宜。五龄幼虫早期摘除不同数量的翅原基（造血器官—翅原基复合体，下文简称为复合体）后家蚕均可成活并正常变态；将复合体全部摘除，家蚕同样可以正常生长、发育和交配、产卵，其茧层率等经济性性状没有太大的变化；并且蚕体内的血球总数在吐丝前都呈持续上升趋势，能够满足蚕的生长发育和变态所需。由此推测家蚕血液中含有具有干细胞特性的血球细胞。

幼虫期和蛹期 *scaleless* 与野生型家蚕在幼虫及蛹期外形上没有明显差异；但是成虫期野生型家蚕翅面上布满了鳞片，而 *scaleless* 成虫的翅面上却只有少量的鳞片，因此几乎是透明的。显微镜下可以清楚的看到野生型家蚕成虫翅面上密布着鳞片白细胞（socket cell），而 *scaleless* 的却很少；并且 WT 的鳞片要比 *scaleless* 的大且分叉多。翅原基相互移植实验证明 *scaleless* 的突变表型由翅原基自身内部的调控因子所控制，而与体液因子无关。5 龄幼虫期 WT 与 *scaleless* 翅原基形态上没有明显差异；化蛹后 WT 的翅脉中开始有很多微气管伸出并且交织在翅脉间的翅面上；而 *scaleless* 的翅脉上却很少有气管伸出。翅原基主气管切断能够使成虫翅面鳞片明显减少，而高氧分压处理能够使 *scaleless* 的蚕蛾翅面鳞片显著增多。这些证据说明突变体蛹翅中气管的缺陷导致了翅面细胞缺氧，进而形成了无鳞片翅的表型。

家蚕翅面鳞片的发育过程中伴随有细胞凋亡现象，凋亡的细胞在 1 d 蛹翅中开始出现，到 2 d 蛹时，翅面上规则排列着被许多死亡细胞包围着的活细胞（推测这些规则排列着的活细胞就是鳞

片母细胞)。说明在家蚕蛹翅的发育过程中伴随有细胞凋亡来完成鳞片细胞的选择和决定。与野生型家蚕相比, *scaleless* 蛹翅的发育过程中没有像 WT 那样形成规则排列的鳞片母细胞, 而是在 3 d 蛹时翅面细胞几乎全部凋亡, 从而使鳞片细胞不能正常形成, 致使突变体成虫表现为无鳞片翅性状。

AS-C 调控果蝇刚毛的生成, *B-ASH1* 控制蝴蝶翅面鳞片的发育; 因此我们结合生物信息学手段和 cDNA 末端快速扩增方法成功克隆了四个家蚕 *ASH* 基因, 分别命名为 *Bm-ASH1*、*Bm-ASH2*、*Bm-ASH3* 和 *Bm-ase*。四个基因的 cDNA 长度分别为 1 332 bp、1 449 bp、990 bp 和 1 695 bp; 各自编码 193、239、241、和 404 个氨基酸, 蛋白质序列中均有一个 bHLH 基序, *Bm-ASH1*、*Bm-ASH2*、*Bm-ASH3* 的 C-端则同时具有 16-17 个氨基酸的保守区。它们编码的蛋白质的 bHLH 基序和 C-端保守区与其它昆虫 *ASH* 的同源性很高。因此, 四个家蚕 *ASH* 基因符合 AS-C 同源体基因的特性, 其中 *Bm-ASH1*、*Bm-ASH2* 和 *Bm-ASH3* 为原神经基因, *Bm-ase* 为 *asense* 功能类似基因。*Bm-ASH1* 是家蚕三个原神经中相对原始的一个, 而 *Bm-ASH2* 和 *Bm-ASH3* 进化上亲缘关系相对较近。*Bm-ASH2* 与蝴蝶的 *B-ASH1* 基因编码的蛋白质全序列同源性高达 90.3%, bHLH 区域则为 100%, 估计二者有着相同的功能。通过搜索家蚕基因组序列库, 共得到了四个基因对应的 121.8 Kb 的序列, 但四个序列间尚不能成功拼接。家蚕不同组织中 *Bm-ASH1* 和 *Bm-ASH2* 基因表达范围极为广泛, 在各个胚层中均有表达; 而 *Bm-ASH3* 和 *Bm-ase* 在内胚层中没有检测到表达信号。*Bm-ASH1* 和 *Bm-ASH3* 基因分别在胚胎发育的 5 d 和 3 d 出现一个表达峰, 而 *Bm-ASH2* 则在 3 d 和 5 d 各出现一个峰值, *Bm-ase* 也在 3 d 出现一个峰值, 而 6 d~7 d 也保持较高的表达水平, 说明在家蚕发育胚胎中可能伴随有两次不同的神经系统发育高潮。可见 *ASH* 基因在家蚕发育过程中承担着广泛而重要的角色, 并且四个基因具有不同的分工。然而, 同源比较和功能分析都不能将家蚕的三个原神经基因和果蝇的一一对应, 因此其命名依然按照发现的先后顺序进行。

Bm-ASH2 与蝴蝶的 *B-ASH1* 具有极高的一致性, 推测 *Bm-ASH2* 与家蚕翅面鳞片的生成有关, 进而推测 *scaleless* 突变表型的产生伴随有 *Bm-ASH2* 基因在其翅面细胞中的异常表达。半定量 RT-PCR 和原位杂交结果证实了这一推测, 规则排列的鳞片母细胞中 *Bm-ASH2* 基因稳定表达; 而 *scaleless* 翅面上只有很少的细胞中能够检测到 *Bm-ASH2* 基因的表达信号。通过对突变体和野生型家蚕 *Bm-ASH2* 基因启动子序列比较发现 *scaleless* 中具有一段连续的 26 bp 序列缺失突变。利用家蚕细胞瞬时表达系统检测启动子活性, *scaleless* 的 *Bm-ASH2* 基因启动子活性与截去包括 26 bp 序列在内的约 200 bp 片段后的野生型启动子序列活性相当; EMSA 结果显示此 26 bp 序列能够特异性结合某种核蛋白; 同时遗传学分析发现 26 bp 序列缺失与无鳞片翅突变信息紧密连锁。总之, *Bm-ASH2* 基因启动子序列中 26 bp 序列缺失突变可能是引起突变表型发生的关键因素。对 *Bm-ASH2* 基因启动子活性分析同时发现其序列中至少包含两个 A 组型 E-box, 并且它们对于启动子正常活性具有一定的作用。还发现伴随有 bHLH 转录因子存在情况下启动子才具有理想的活性, 尤其 *ASH1+da* 组合对启动子活性促进能力最强。据此可以推测 *Bm-ASH1* 的编码产物对 *Bm-ASH2* 基因的表达具有调控功能。pBacPAK8-IE1-luc-hr3 质粒注射到蚕蛹翅中, 36 h 后能检测到荧光素酶活性, 说明利用这种方法可以使目的基因在蛹翅中表达。pBacPAK8-IE1-*ASH2*-hr3 质粒注射到 12 h 蛹翅中使外源的 *Bm-ASH2* 基因在其中表达, 结果发现注射了质粒的 *scaleless* 翅面鳞片显著增多; 而注射对野生型家蚕翅面鳞片数量没有影响。证明 *Bm-ASH2* 基因在 *scaleless* 蛹翅中的缺失表达导致了突变表型的产生; 但 *Bm-ASH2* 基因的表达只是鳞片发生的必要而非充分条件。

综上所述，本论文已经基本从形态学、细胞生物学及分子生物学角度阐明了家蚕无鳞片翅突变体 *scaleless* 的发生机理。然而，*scaleless* 蛹期翅面气管发育有缺陷，同时氧气的供应为鳞片发育所必需；而家蚕 *ASH* 基因在气管丛中有很强的表达，且半定量和原位杂交结果显示 *Bm-ASH2* 基因在 *scaleless* 蛹翅细胞中不能正常表达。那么，*Bm-ASH* 基因与气管的发育之间又是怎样的调控与被调控关系？*scaleless* 翅面鳞片的缺失与蛹期翅面细胞的过度凋亡有关，那么细胞的过度凋亡与 *Bm-ASH2* 基因的表达关系如何？*Bm-ASH2* 基因在细胞定型过程中又是起着怎样的作用？同时它又是怎样与其他基因协同调控鳞片细胞的形成的？*Bm-ASH2* 基因在 *scaleless* 蛹翅中不能正常表达是由于其上游调控区缺失了 26 bp 的一段序列，并且证明这 26 bp 片段能够特异性结合某种核蛋白，那么这种核蛋白到底是什么？它的具体功能是什么呢？家蚕成虫除翅面具有鳞片外，其整个体表都布满了不同形状的鳞片（鳞毛）；而 *scaleless* 成虫体表鳞毛与 WT 在肉眼水平上没有明显差异，那体表鳞毛和翅面鳞片的发育机制又有何异同呢？另外，家蚕 *ASH* 基因具有相对广泛的表达谱，那么它们在不同的组织中又是各自担当着什么样的角色呢，与果蝇的 *AS-C* 基因功能有何异同？由以上分析可见 *scaleless* 突变体及家蚕的 *AS-C* 同源体基因还具有非常广阔的研究空间，大量深入而细致的工作需要继续进行。

参考文献

1. 雷朝亮, 荣秀兰. 普通昆虫学. 北京: 中国农业出版社; 2003.
2. 板谷健吾. 蚕体生理学. 东京: 明文堂; 1936.
3. 吕鸿声. 中国养蚕学. 上海: 上海科学技术出版社; 1991.
4. 吕鸿声. 昆虫病毒分子生物学. 北京: 中国农业科技出版社; 1998.
5. 黄培堂等 (译). PCR 技术实验指南. 北京: 科学出版社; 1998.
6. 黄培堂等 (译). 分子克隆实验指南 (第三版). 北京: 科学出版社; 2002.
7. 森精. カイコによる新生物実験. 东京: 三省堂; 1970.
8. 唐顺明, 易咏竹, 沈兴家, 张志芳, 李奕仁, 何家禄. 家蚕(苏·菊×明·虎)幼虫血清蛋白基因 (BmLSP)启动子特性分析. 科学通报 2003, 48: 2261-2265.
9. 徐世清, 木口宪尔, 凌尔军, 白井孝治, 深本花菜, 屠振力. 重离子射线对家蚕幼虫造血功能的影响. 蚕业科学 2002, 28: 298-300.
10. 颜子颖, 王海林 (译). 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社; 1998.
11. 郑乐怡, 归鸿. 昆虫分类. 南京: 南京师范大学出版社; 1999.
12. 浙江农业大学. 蚕体解剖生理学. 北京: 农业出版社; 1991.
13. 张志芳, 秦俭. 家蚕蛾透明翅的遗传学研究 (初报). 蚕业科学 1991, 17: 186-187.
14. 赵巧玲, 张志芳, 何家禄. 家蚕蛹体基因组 DNA 的快速制备方法. 蚕业科学 2000, 26: 63-64.
15. Akai H., Kobayashi J., Takabayashi K., Chida I. Changes of ecdysteroid levels of *Bombyx* larvae after JH and ecdysterone treatments. J Seric Sci Jnp 1989, 58: 436-438.
16. Akai H., Sato S. An ultrastructural study of the haemopoietic organs of the silkworm, *Bombyx mori*. J Insect Physiol 1971, 17: 1665-1676.
17. Albert B., Bray D., Lewis J., al. e. Molecular biology of the cell. New York & London: Garland publishing, Inc; 1994.
18. Alonso M. C., Cabrera C. V. The *achaete-scute* gene complex of *Drosophila melanogaster* comprises four homologous genes. EMBO J 1988, 7: 2585-2591.
19. Artavanis-Tsakonas S., Simpson P. Choosing a cell fate: a view from the Notch locus. Trends Genet 1991, 7: 403-407.
20. Aschkenazi S., Straszewski S., Verwer K. M., Foellmer H., Rutherford T., Mor G. Differential regulation and function of the Fas/Fas ligand system in human trophoblast cells. Biol Reprod 2002, 66: 1853-1861.
21. Beaulaton J. Hemocytes and hemocytopoiesis in silkworms. Biochimie 1979, 61: 157-164.
22. Beldade P., Brakefield P. M. The genetics and *EVO-DEVO* of butterfly wing patterns. Nat Rev Genet 2002, 3: 442-452.
23. Beuken E., Vink C., Bruggeman C. A. One-Step Procedure for Screening Recombinant Plasmids

- by Size. *BioTechniques* 1998, 24: 748-750.
24. Biro L. P., Balint Z. S., Kertesz K., Vertesy Z., Mark G. I., Horvath Z. E., Balazs J., Mehn D., Kiricsi I., Lousse V., et al. Role of photonic-crystal-type structures in the thermal regulation of a Lycaenid butterfly sister species pair. *Phys Rev E* 2003, 67: 021907.
 25. Blochlinger K., Bodmer R., Jack J., Jan L. Y., Jan Y. N. Primary structure and expression of a product from cut, a locus involved in specifying sensory organ identity in *Drosophila*. *Nature* 1988, 333: 629-635.
 26. Blough E., Dineen B., Esser K. Extraction of Nuclear Proteins from Striated Muscle Tissue. *BioTechniques* 1999, 26: 202-206.
 27. Bodmer R., Carretto R., Jan Y. N. Neurogenesis of the peripheral nervous system in *Drosophila* embryos. *Neuron* 1989, 3: 21-32.
 28. Botella L. M., Donoro C., Shchez L., Segarra C., Granadino B. Cloning and Characterization of the *scute (sc)* Gene of *Drosophila subobscura*. *Genetics* 1996, 144: 1043-1051.
 29. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976, 7: 248-54.
 30. Brand M., Jarman A. P., Jan L. Y., Jan Y. N. *asense* is a *Drosophila* neural precursor gene and is capable of initiating sense organ formation. *Development* 1993, 119: 1-17.
 31. Brunet J. F., Ghysen A. Deconstructing cell determination: Proneural genes and neuronal identity. *Bioessays* 1999, 21: 313-318.
 32. Brunetti C. R., Selegue J. E., Monteiro A., French V., Brakefield P. M., Carroll S. B. The generation and diversification of butterfly eyespot color patterns. *Curr Biol* 2001, 11: 1578-1585.
 33. Burland T. G. DNASTAR's lasergene sequence analysis software. *Methods Mol Biol* 2000, 132: 71-91.
 34. Calkhoven C. F., Ab G. Multiple steps in the regulation of transcription-factor level and activity. *Biochem J* 1996, 317: 329-342.
 35. Calleja M., Renaud O., Usui K., Pistillo D., Morata G., Simpson P. How to pattern an epithelium: lessons from *achaete-scute* regulation on the notum of *Drosophila*. *Gene* 2002, 292: 1-12.
 36. Calvez B. Progress of developmental programme during the last larval instar of *Bombyx mori*: relationships with food intake, ecdysteroids and juvenile hormone. *J Insect Physiol* 1981, 27: 233-239.
 37. Campos-Ortega J. A. The genetics of the *Drosophila achaete-scute* gene complex: a historical appraisal. *Int J Dev Biol* 1998, 42: 291-297.
 38. Carroll S. B., Gates J., Keys D. N., Paddock S. W., Panganiban G. E., Selegue J. E., A. W. J. Pattern formation and eyespot determination in butterfly wings. *Science* 1994, 265: 109-114.
 39. Chan Y. M., Jan Y. N. Conservation of neurogenic genes and mechanisms. *Curr Opin Neurobiol* 1999, 9: 582-588.
 40. Chen H., Thiagalingam A., Chopra H., Borges M. W., Feder J. N., Nelkin B. D., Baylin S. B., Ball D. W. Conservation of the *Drosophila* lateral inhibition pathway in human lung cancer: a

- hairy*-related protein (*HES-1*) directly represses *achaete-scute* homolog-1 expression. Proc Natl Acad Sci USA 1997, 94: 5355-5360.
41. Chen Y., Yao B., Zhu Z., Yi Y., Lin X., Zhang Z., Shen G. A constitutive super-enhancer: homologous region 3 of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. Biochem Biophys Res Commun 2004, 318: 1039-1044.
 42. Chomczynsk P. One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. Anal Biochem 1992, 201: 134-139.
 43. Cubas P., de Celis J., Campuzano S., Modolell J. Proneural clusters of *achaete-scute* expression and the generation of sensory organs in the *Drosophila* imaginal wing disc. Genes Dev 1991, 5: 996-1008.
 44. Dambly-Chaudiere C., Jamet E., Burri M., Bopp D., Basler K., Hafen E., Dumont N., Spielmann P., Ghysen A., Noll M. The paired box gene *pox neuro*: a determinant of poly-innervated sense organs in *Drosophila*. Cell 1992, 69: 159-172.
 45. de Celis J. F., Llimargas M., Casanova J. Ventral veinless, the gene encoding the Cfl transcription factor, links positional information and cell differentiation during embryonic and imaginal development in *Drosophila melanogaster*. Development 1995, 121: 3405-3416.
 46. Deblandre G. A., Wettstein D. A., Koyano-Nakagawa N., Kintner C. A two-step mechanism generates the spacing pattern of the ciliated cells in the skin of *Xenopus* embryos. Development 1999, 126: 4715-4728.
 47. Denecker G., Vercammen D., Declercq W., Vandenabeele P. Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. Cell Mol Life Sci 2001, 58: 356-370.
 48. Dominguez M., Campuzano S. asense, a member of the *Drosophila achaete-scute* complex, is a proneural and neural differentiation gene. EMBO J 1993, 12: 2049-2060.
 49. Ebner A., Kiefer F. N., Ribeiro C., Petit V., Nussbaumer U., Affolter M. Tracheal development in *Drosophila melanogaster* as a model system for studying the development of a branched organ. Gene 2002, 287: 55-66.
 50. Felsenstein J. PHYLIP: Phylogentic inference package, version 3.6. edn. Washington: Department of Genome Sciences, University of Washington; 2002.
 51. Feng Z., Wu A. Z., Zhang Z., Chen C. C. GATA-1 and GATA-4 Transactivate Inhibin/Activin b-B-Subunit Gene Transcription in Testicular Cells. Mol Endocrinol 2000, 14(11): 1820-1835.
 52. Ferreiro B., Skoglund P., Bailey A., Dorsky R., Harris W. A. *XASH1*, a *Xenopus* homolog of *achaete-scute*: a proneural gene in anterior regions of the vertebrate CNS. Mech Dev 1993, 40: 25-36.
 53. Fichelson P., Ghos M. The glial cell undergoes apoptosis in the microchaete lineage of *Drosophila*. Development 2003, 130: 123-133.
 54. Fisher A., Caudy M. The function of *hairy*-related bHLH repressor proteins in cell fate decisions. Bioessays 1998, 20: 298-306.
 55. Fujiwara H., Hojyo T. Developmental profile of wing imaginal discs of *flugellos (fl)*, a wingless

- mutant of the silkworm, *Bombyx mori*. Dev Genes Evol 1997, 207: 12-18.
56. Galant R., Skeath J. B., Paddock S., Lewis D. L., B. C. S. Expression pattern of a butterfly *achaete-scute* homolog reveals the homology of butterfly wing scales and insect sensory bristles. Curr Biol 1998, 8: 807-813.
57. Garcia-Bellido A. Genetic analysis of the *achaete-scute* system of *Drosophila melanogaster*. Genetics 1979, 91: 491-520.
58. Garcia-Bellido A., de Celis J. F. Developmental genetics of the venation pattern of *Drosophila*. Annu Rev Genet 1992, 26: 277-304.
59. Gardiner E. M., Strand M. R. Hematopoiesis in larval *Pseudoplusia includens* and *Spodoptera frugiperda*. Arch Insect Biochem Physiol 2000, 43: 147-164.
60. Ghabrial A., Luschnig S., Metzstein M. M., Krasnow M. A. Branching morphogenesis of the *Drosophila* tracheal system. Annu Rev Cell Dev Biol 2003, 19: 623-647.
61. Ghiradella H. The structure and development of iridescent Lepidopteran scales: the *Papilionidae* as a showcase family. Entomol Soc Am 1985, 78: 252-264.
62. Gho M., Bellaiche Y., Schweisguth F. Revisiting the *Drosophila* microchaete lineage: a novel intrinsically asymmetric cell division generates a glial cell. Development 1999, 126: 3573-3584.
63. Ghysen A., Dambly-Chaudiere C. Genesis of the *Drosophila* peripheral nervous system. Trends Genet 1989, 5: 251-255.
64. Ghysen A., Dambly-Chaudiere C. The specification of sensory neuron identity in *Drosophila*. BioEssays 1993, 15: 293-298.
65. Ghysen A., Dambly-Chaudiere C., Jan L. Y., Jan Y. N. Cell interactions and gene interactions in peripheral neurogenesis. Genes Dev 1993, 7: 723-733.
66. Gibert J. M., Simpson P. Evolution of *cis*-regulation of the proneural genes. Int J Dev Biol 2003, 47: 643-651.
67. Gompel N., Prud'homme B., Wittkopp P. J., Kassner V. A., Carroll S. B. Chance caught on the wing: *cis*-regulatory evolution and the origin of pigment patterns in *Drosophila*. Nature 2005, 433: 481-487.
68. Grens A., Mason E., Marsh J. L., Bode H. R. Evolutionary conservation of a cell fate specification gene: the *Hydra achaete-scute* homolog has proneural activity in *Drosophila*. Development 1995, 121: 4027-4035.
69. Gu S. H., Chow Y. S. Stimulation of juvenile hormone biosynthesis by different ecdysteroids in *Bombyx mori*. Zool Stud 2003, 42: 450-454.
70. Hacker G. The morphology of apoptosis. Cell Tissue Res 2000, 301: 5-17.
71. Han S. S., Lee M. H., Kim W. K., Wago H., Yoe S. M. Hemocytic differentiation in hemopoietic organ of *Bombyx mori* larvae. Zool Sci 1998, 15: 371-379.
72. Han S. S., Lee M. H., Yun T. Y., Kim W. K. Haemopoiesis in *in vitro* haemopoietic organ culture of *Bombyx mori* Larvae. Korean J Entomol 1995, 25: 281-290.
73. Hassan B. A., Bellen H. J. Doing the *MATH*: is the mouse a good model for fly development?

- Genes Dev 2000, 14: 1852-1865.
74. Herrmann M., Lorenz H. M., Voll R., Grunke M., Woith W., Kalden J. R. A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments. *Nucleic Acids Res* 1994, 22: 5506-5507.
 75. Hoffmann J. A. Endocrine regulation of the production and differentiation of hemocytes in an orthopteran insect *Locusta migratoria*. *Gen Comp Endocrinol* 1970, 15: 198-219.
 76. Hojyo T., Fujiwara H. Reciprocal transplantation of wing discs between a wing deficient mutant (*fl*) and wild type of the silkworm, *Bombyx mori*. *Dev Growth Differ* 1997, 39: 599-606.
 77. Horie Y., Inokuchi T., Watanabe K., Yanagawa H. On the haemolymph volume of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Seric Sci Jpn* 1971, 40: 330-334.
 78. Jan Y. N., Jan L. Y. HLH proteins, fly neurogenesis, and vertebrate myogenesis. *Cell* 1993, 75: 827-830.
 79. Jan Y. N., Jan L. Y. Genetic control of cell fate specification in *Drosophila* peripheral nervous system. *Annu Rev Genet* 1994, 28: 373-393.
 80. Janssen J. M., Monteiro A., Brakefield P. M. Correlations between scale structure and pigmentation in butterfly wings. *Evol Dev* 2001, 3: 415-423.
 81. Jasoni C. L., Walker M. B., Morris M. D., Reh T. A. A chicken *achaete-scute* homolog (*CASH-1*) is expressed in a temporally and spatially discrete manner in the developing nervous system. *Development* 1995, 120: 769-783.
 82. Jeanmougin F., Thompson J. D., Gouy M., Higgins D. G., Gibson T. J. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci* 1998, 23: 403-405.
 83. Jockusch E. L., Nagy L. M. Insect evolution: how did insect wings originate? *Curr Biol*. 1997 Jun 1;7(6):R358-61. 1997, 7: R358-361.
 84. Johnson J. E., Birren S. J., Anderson D. J. Two rat homologues of *Drosophila achaete-scute* specifically expressed in neuronal precursors. *Nature* 1990, 346: 858-861.
 85. Johnson J. E., Birren S. J., Saito T., Anderson D. J. DNA binding and transcriptional regulatory activity of mammalian *achaete-scute* homologous (*MASH*) protein revealed by interaction with a muscle-specific enhancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89: 3596-3600.
 86. Jonsson M., Mark E. B., Brantsing C., Brandner J. M., Lindahl A., Asp J. Hash4, a novel human *achaete-scute* homologue found in fetal skin. *Genomics* 2004, 84: 859-866.
 87. Kamsteeg M., Rutherford T., Sapi E., Hanczaruk B., Shahabi S., Flick M., Brown D., Mor G. *Phenoxodiol*--an isoflavone analog--induces apoptosis in chemoresistant ovarian cancer cells. *Oncogene* 2003, 22: 2611-2620.
 88. Kango-Singh M., Singh A., Gopinathan K. P. The wings of *Bombyx mori* from larval discs exhibiting an early differentiated state: a preliminary report. *J Biosci* 2001, 26: 167-177.
 89. Kawasaki H., Iwashita Y. Development of wing disc in the fifth larval instar of *Bombyx mori*. *J Seric Sci Jpn* 1987, 52: 89-98.
 90. Kawasaki H., Iwashita Y. Differentiation of wing disc of the fifth larval instar of *Bombyx mori* in *vitro* culture condition. *J Seric Sci Jpn* 1987, 56: 65-71.

91. Kawasaki H., Nagata M., Tsuchida K., Kanke E. Acquisition of competence for pupal development of the wing disc during the final feeding stage of *Bombyx mori*. J Seric Sci Jpn 1995, 64: 487-492.
92. Koch P. B., Behnecke B., ffrench-Constant R. H. The molecular basis of melanism and mimicry in a swallowtail butterfly. Curr Biol 2000a, 10: 591-594.
93. Koch P. B., Lorenz U., Brakefield P. M., ffrench-Constant R. H. Butterfly wing pattern mutants: developmental heterochrony and co-ordinately regulated phenotypes. Dev Genes Evol 2000b, 210: 536-544.
94. Kumazawa K., Negita K., Hasegawa T., Tabata H. Fluorescence from cover and basal scales of morpho-sulkowskyi and papilio-xuthus butterflies. J Exp Zool 1996, 275: 00015-00019.
95. Kurata S., Komano H., Natori S. Dissociation of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) fat body by pupal haemocytes in vitro. J Insect Physiol 1989, 35: 559-565.
96. Ledent V., Paquet Q., Vervoort M. Phylogenetic analysis of the human basic helix-loop-helix proteins. Genome Biol. 2002, 3: research0030.1-0030.18.
97. Lewin B. Genes VII. New York: Oxford University Press; 2000.
98. Lewis E. B. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. Nature 1978, 276: 565-570.
99. Llimargas M., Casanova J. ventral veinless, a POU domain transcription factor, regulates different transduction pathways required for tracheal branching in *Drosophila*. Development 1997, 124: 3273-3281.
100. Maddison D. R., Maddison W. P., Schulz K. S., Wheeler T., Frumkin J. The Tree of Life Web Project. <http://tolweb.org> 2001.
101. Martin-Bermudo M. D., Gonzalez F., Dominguez M., Rodriguez I., Ruiz-Gomez M., Romani S., Modolell J., Jimenez F. Molecular characterization of the *lethal of scute* genetic function. Development 1993, 118: 1003-1012.
102. Martinez C., Modolell J., Garrell J. Regulation of the proneural gene achaete by helix-loop-helix proteins. Mol Cell Biol 1993, 13: 3514-3521.
103. Massari M. E., Murre C. Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. Mol Cell Biol 2000, 20: 429-440.
104. Matsumoto T., Sakurai M. Studies on the blood of silkworm, *Bombyx mori* L. (IV) On the volume of the haemocytes in the blood of silkworm. J Seric Sci Jpn 1957, 26: 150-156.
105. Matsunami K., Kokubo H., Ohno K., Xu P. X., Ueno K., Suzuki Y. Embryonic silk gland development in *Bombyx*: molecular cloning and expression of the *Bombyx trachealess* gene. Dev Genes Evol 1999, 209: 507-514.
106. etzger R. J., Krasnow M. A. Genetic control of branching morphogenesis. Science 1999, 284: 1635-1639.
107. Mita K., Kasahara M., Sasaki S., Nagayasu Y., Yamada T., Kanamori H., Namiki N., Kitagawa M., Yamashita H., Yasukochi Y., et al. The genome sequence of silkworm, *Bombyx mori*. DNA Res 2004, 11: 27-35.
108. Mitsuhashi J. Primary culture of the hemocytopoietic organ of *Papilio xuthus* Linne. Applied

- Entomol Zool 1972, 7: 39-41.
109. Modolell J., Campuzano S. The *achaete-scute* complex as an integrating device. Int J Dev Biol 1998, 42: 275-282.
110. Morohoshi S. The developmental physiology of silkworm. Tokyo: Tokyo University publishers; 1976.
111. Müller W. A. Developmental Biology. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 1998.
112. Nakahara Y., Kanamori Y., Kiuchi M., Kamimura M. *In vitro* studies of hematopoiesis in the silkworm: cell proliferation in and hemocyte discharge from the hematopoietic organ. J Insect Physiol 2003, 49: 907-916.
113. Nijhout H. F. The development and evolution of butterfly wing patterns. Washington/London: Random House (Smithsonian Inst. Press); 1991.
114. Nittono Y. Studies on the blood cells in the silkworm, *Bombyx mori* L.. Bull Seric Exp Sta 1960, 16: 171-266.
115. Nittono Y., Tomabechi S., Onodera N. Formation of hemocytes near imaginal wing discs in the silkworm, *Bombyx mori* L. (Preliminary note). J Seric Sci Jpn 1964, 33: 43-45.
116. Obara Y., Miyatani M., Ishiguro Y., Hirota K., Koyama T., Izumi S., Iwami M., Sakurai S. Pupal commitment and its hormonal control in wing imaginal discs. J Insect Physiol 2002, 48: 933-944.
117. Ohno S. Evolution by Gene Duplication. Berlin: Springer Verlag; 1970.
118. Overton J. Microtubules and microfibrils in morphogenesis of the scale cells of *Ephesia kuniella*. J Cell Biol 1966, 29: 293-305.
119. Overton J. The fine structure of developing bristles in wild type and mutant *Drosophila melanogaster*. J Morph 1967, 122: 367-380.
120. Petit V., Ribeiro C., Ebner A., Affolter M. Regulation of cell migration during tracheal development in *Drosophila melanogaster*. Int J Dev Biol 2002, 46: 125-132.
121. Pistillo D., Skaer N., Simpson P. *scute* expression in *Calliphora vicina* reveals an ancestral pattern of longitudinal stripes on the thorax of higher Diptera. Development 2002, 129: 563-572.
122. Reed R. D. Evidence for Notch-mediated lateral inhibition in organizing butterfly wing scales. Dev Genes Evol 2004, 214: 43-46.
123. Roch F., Baonza A., Martin-Blanco E., Garcia-Bellido A. Genetic interactions and cell behaviour in blistered mutants during proliferation and differentiation of the *Drosophila* wing. Development 1998, 125: 1823-1832.
124. Roch F., Jimenez G., Casanova J. EGFR signalling inhabits Capicua-dependent repression during specification of *Drosophila* wing veins. Development 2002, 129: 993-1002.
125. Sakurai S., Okuda M., Ohtaki T. Juvenile hormone inhibits ecdysone secretion and responsiveness to prothoracicotropic hormone in prothoracic glands of *Bombyx mori*. Gen Comp Endocrinol 1989, 75: 222-230.
126. Samakovlis C., Hacohen N., Manning G., Sutherland D. C., Guillemin K., Krasnow M. A. Development of the *Drosophila* tracheal system occurs by a series of morphologically distinct but

- genetically coupled branching events. *Development* 1996, 122: 1395-1407.
127. Satake S. I., Sakurai S., Kaya M. Hemolymph ecdysteroid titer and ecdysteroid-dependent developmental events in the last-larval stadium of the silkworm, *Bombyx mori*: role of low ecdysteroid titer in larval-pupal metamorphosis and a reappraisal of the head critical period. *J Insect Physiol* 1998, 44: 867-881.
128. Sato S., Akai H. Development of the hemopoietic organs of the silkworm, *Bombyx mori* L.. *J Seric Sci Jpn* 1977, 46: 397-403.
129. Schlatter R., Maier D. The Enhancer of split and *Achaete-Scute* complexes of *Drosophilids* derived from simple ur-complexes preserved in mosquito and honeybee. *BMC Evol Biol* 2005, 5: 67.
130. Simonsen T. J. The wing vestiture of the non-ditrysian Lepidoptera (Insecta). Comparative morphology and phylogenetic implications. *Acta Zool.(Stockholm)* 2001, 82: 275-298.
131. Skaer N., Pistillo D., Gibert J. M., Lio P., Wulbeck C., Simpson P. Gene duplication at the *achaete-scute* complex and morphological complexity of the peripheral nervous system in Diptera. *Trends in Genetics* 2002, 18: 399-405.
132. Skeath J., Carroll S. B. Regulation of *achaete-scute* gene expression and sensory organ pattern formation in the *Drosophila* wing. *Genes Dev* 1991, 5: 984-995.
133. Sorrentino R. P., Carton Y., Govind S. Cellular immune response to parasite infection in the *Drosophila* lymph gland is developmentally regulated. *Dev Biol* 2002, 243: 65-80.
134. Summers M., Smith G. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. Texas Agricultural Experiment Station bulletin 1987, no. 1555.
135. Takayama E., Yoshida A. Color pattern formation on the wing of the butterfly *Pieris rapae*. 1. Caution induced alteration of scale color and delay of arrangement formation. *Dev Growth Differ* 1997, 39: 23-31.
136. Takayama E., Motoyama M., Yoshida A. Color pattern formation on the wing of a butterfly *Pieris rapae*. 2. Color determination and scale development. *Dev Growth Differ* 1997, 39: 485-491.
137. Thompson J., Gibson T., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids. Res.* 1997, 25: 4876-4882.
138. Truman J. W., Riddiford L. M. Endocrine insights into the evolution of metamorphosis in insects. *Annu Rev Entomol* 2002, 47: 467-500.
139. Tu Z. L., Kobayashi Y., Kiguchi K., Watanabe H., Yamamoto K. Effects of heavy-ion radiosurgery on the hemopoietic function of the silkworm *Bombyx mori*. *J Radiat Res* 2002, 43: 269-275.
140. Tu Z. L., Shirai K., Kanekatsu R., Kiguchi K., Kobayashi Y., Taguchi M., Watanabe H. Effects of local heavy ion beam irradiation on the hemopoietic organs of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Seric Sci Jpn* 1999, 68: 491-500.
141. Usui K., Pistillo D., Simpson P. Mutual exclusion of sensory bristles and tendons on the notum of dipteran flies. *Curr Biol* 2004, 14 (12):1047-1055.
142. Van Doren M., Powell P. A., Pasternak D., Singson A., Posakony J. W. Spatial regulation of

- proneural gene activity: auto- and cross-activation of *achaete* is antagonized by *extramacrochaetae*. *Genes Dev* 1992, 6: 2592-2605.
143. Wang J., Xia Q., He X., Dai M., Ruan J., Chen J., Yu G., Yuan H., Hu Y., Li R., et al. SilkDB: a knowledgebase for silkworm biology and genomics. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33: D399-402.
144. Weatherbee S. D., Nijhout H., Grunert L. W., Halder G., Galant R., Selegue J., Carroll S. B. *Ultrabithorax* function in butterfly wings and the evolution of insect wing patterns. *Curr Biol* 1999, 9: 109-115.
145. Weintraub H. The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell* 1993, 75: 1241-1244.
146. Wheeler S. R., Carrico M. L., Wilson B. A., Brown S. J., Skeath J. B. The expression and function of the *achaete-scute* genes in *Tribolium castaneum* reveals conservation and variation in neural pattern formation and cell fate specification. *Development* 2003, 130: 4373-4381.
147. Wülbeck C., Simpson P. The expression of *pannier* and *achaete-scute* homologues in a mosquito suggests an ancient role of *pannier* as a selector gene in the regulation of the dorsal body pattern. *Development* 2002, 129: 3861-3871.
148. Xia A. H., Zhou Q. X., Yu L. L., Li W. G., Yi Y. Z., Zhang Y. Z., Zhang Z. F. Identification and analysis of YELLOW protein family genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics* 2006, 7:195.
149. Xia Q., Zhou Z., Lu C., Cheng D., Dai F., Li B., Zhao P., Zha X., Cheng T., Chai C., et al. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science* 2004, 306: 1937-1940.
150. Yamashita M., Iwabuchi K. *Bombyx mori* prohemocyte division and differentiation in individual microcultures. *J Insect Physiol* 2001, 47: 325-331.
151. Yoshida A., Aoki K. Scale arrangement pattern in a lepidopteran wing. 1. Periodic cellular pattern in the pupal wing of *Pieris rapae*. *Dev Growth Differ* 1989, 31: 601-609.
152. Yoshida A., Noda A., Emoto J. Bristle Distribution Along the Wing Margin of the Small White Cabbage Butterfly (Lepidoptera: *Pieridae*). *Ann Entomol Soc Am* 2001, 94: 467-470.
153. Younossi-Hartenstein A., Hartenstein V. The role of the tracheae and musculature during pathfinding of *Drosophila* embryonic sensory axons. *Dev Biol* 1993, 158: 430-447.
154. Zelzer E., Shilo B. Z. Cell fate choices in *Drosophila* tracheal morphogenesis. *BioEssays* 2000, 22: 219-226.
155. Zhang T. Y., Kang L., Zhang Z. F., Xu W. H. Identification of a POU factor involved in regulating the neuron-specific expression of the gene encoding diapause hormone and pheromone biosynthesis-activating neuropeptide in *Bombyx mori*. *Biochem J* 2004, 380: 255-263.

致 谢

本研究受以下项目部分资助：国家自然科学基金项目（No. 30271007）；国家高技术研究发展计划（863 计划）（No. AA2006Z220, AA2006Z440）；国家重大基础研究计划（973 计划）（No. 2005CB121006）。特此致谢！

本论文是在我的导师张志芳研究员的悉心指导下完成的，五年来张老师一直鞭策和鼓励我，在我的论文研究工作上倾注了大量心血。在论文完成之际，向张老师致以衷心的感谢和崇高的敬意。

论文研究工作主要在中国农业科学院蚕业研究所农业部家生物技术重点开放实验室和中国农业科学院生物技术研究所完成。特别感谢蚕业所的沈兴家研究员，博士期间所用的家蚕材料多为沈博士提供。感谢我的师母易咏竹老师在细胞操作方面的帮助和生活上的关心。感谢何家禄老师、唐顺明博士、杜厚琴女士、孙崇瑜老师及所领导的关怀与帮助。感谢生物所的沈桂芳先生、李轶女老师、倪丕冲老师和刘春英老师在实验准备上的帮助。在刚刚过去的五年中，一起共事过的陈寅博士、林旭瑗博士、李爱玲硕士、余招峰硕士、夏爱华硕士、王霞硕士等同学在生活和工作上给了我很多帮助，在此一并感谢。感谢研究生院的老师们，也感谢兄弟课题组的同学们的帮助。

论文中所用到的 RACE 和原位杂交技术均在中国科学技术大学徐卫华教授实验室学习掌握。徐老师实验室和谐的气氛和刻苦钻研的精神深深地影响了我，使我在以后的科研道路上受益终生。特别感谢张天翼博士，我的分子生物学方面的操作可以说是由他启蒙的。也要感谢徐老师实验室的魏兆军博士、刘健博士、徐军博士、崔帅英博士、洪波硕士、侯成林硕士等同学给予的无私帮助。凋亡小体实验是在北京大学陈建国老师实验室进行的，感谢李慧惠博士给予的技术指导。

还要感谢我的大学同学栗华、曹翠平、张作法、韩进、褚金翔等同学在文献查阅等方面给予的帮助和生活上给予的亲切关怀。

感谢Rhode Island大学的Marian R. Goldsmith教授和研究生院的外教杨真真老师在英文文章修改方面给予的帮助；也感谢吕鸿声先生对本论文的建议和修改。

最后感谢我的父母，感谢他们的养育之恩，也感谢他们无论何时都给我的支持和鼓励；感谢我的弟弟和弟妹，有他们陪伴在父母身边才使我能够放心地追逐自己的梦想。感谢我的未婚妻余霖霖，在我最艰苦的两年中她给了我莫大的精神力量和支持，使我能够坚强地一直往前走。还有许许多多关心着我的亲朋好友，我在这里不能一一列举，让我用最真挚的心一并对他们道一声谢谢！

周庆祥

2007 年 6 月

作者简历

周庆祥，男，汉族，1980年4月出生，山东高青人。1998年9月考入山东农业大学林学院蚕学系，并于2002年7月获农学学士学位。同年9月考入中国农业科学院研究生院，攻读特种经济动物饲养专业硕士学位；2004年获得提前攻读博士学位资格。

博士期间已发表和待发表的论文：

1. **Qing-Xiang Zhou**, Yi-Nü Li, Xing-Jia Shen, Yong-Zhu Yi, Yao-Zhou Zhang and Zhi-Fang Zhang. The scaleless wings mutant in *Bombyx mori* is associated with a lack of scale precursor cell differentiation followed by excessive apoptosis. *Development Genes & Evolution* 2006, 216: 721–726. (SCI IF₂₀₀₅=2.55)
2. Ai-Hua Xia*, **Qing-Xiang Zhou***, Lin-Lin Yu, Wei-Guo Li, Yong-Zhu Yi, Yao-Zhou Zhang and Zhi-Fang Zhang. Identification and analysis of YELLOW protein family genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics* 2006, 7: 195. (* Co-first authors) (SCI IF₂₀₀₅=4.09)
3. **Qing-xiang Zhou**, Xing-jia Shen, Yong-zhu Yi, Ai-hua Xia and Zhi-fang Zhang. Hemocyte Changes after the Extirpation of the Hemopoietic Organ-wing Disc Complexes in the Silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *International Journal of Industrial Entomology* 2006, 13: 79-83
4. **Qingxiang Zhou**, Shunming Tang, Yin Chen, Yongzhu Yi, Zhifang Zhang and Guifang Shen. A scaleless wings mutant associated with tracheal system developmental deficiency in wing discs in the silkworm, *Bombyx mori*. *The International Journal of Developmental Biology* 2004, 48: 1113–1117. (SCI IF₂₀₀₅=2.05)
5. 周庆祥, 易咏竹, 张志芳, 陈寅, 何家禄, 吕鸿声. 家蚕翅原基的一些发育规律研究. 蚕业科学 2004, 30: 44-49.
6. 周庆祥, 张志芳. 家蚕血球的生成机理. 中国蚕业 2004, 25: 82-84.
7. **Qingxiang Zhou** et al. There are four *achaete-scute* Complex homologs in the lepidopteran silkworm, *Bombyx mori*. (Under preparing)
8. **Qingxiang Zhou** et al. The developmental mechanism of the silkworm scaleless wings mutant. (Under preparing)