

密级：

论文编号：

中国农业科学院 学位论文

家蚕、野桑蚕 *LSP* 与 *HSC70-4* 基因启动子功能
特性分析

**Functional and Characteristic Analysis of Promoters of *LSP* Gene
and *HSC70-4* Gene from *Bombyx mori* and *Bombyx mandarina***

研 究 生：唐顺明

指 导 教 师：李奕仁 张志芳

申请学位类别：农学博士

专业领域名称：特种经济动物饲养

研 究 方 向：家蚕遗传育种

培 养 单 位：中国农业科学院蚕业研究所

提交日期 2004 年 06 月

Chinese Academy of Agricultural Sciences

Dissertation for Ph.D. Degree

**Functional and Characteristic Analysis of Promoters of *LSP* Gene
and *HSC70-4* Gene from *Bombyx mori* and *Bombyx mandarina***

Author : Tang Shun-ming

Directors : Li Yi-ren , Zhang Zhi-fang

Major : Breeding of Special Industrial Animals

Direction : Genetics and Molecular Biology
of Silkworm

The Sericultural Research Institute,
Chinese Academy of Agricultural Sciences

Jun, 2004

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)

研究生签名：

时间： 年 月 日

导师签名：

时间： 年 月 日

论文评阅人与答辩委员会成员名单

论文评阅人：吕鸿声 研究员 中国农科院植保所

徐俊良 教授 浙江大学

孙崇荣 教授 复旦大学

答辩委员会主席：吴祥甫 研究员 中国科学院上海生化所

答辩委员会成员：沈桂芳 研究员 中国农科院生物技术所

孙崇荣 教授 复旦大学

鲁兴萌 教授 浙江大学

贡成良 教授 苏州大学

郭锡杰 研究员 中国农科院蚕业研究所

何家禄 研究员 中国农科院蚕业研究所

论文答辩日期：2004 年 6 月

目 录

英文缩写说明	
摘要.....	
Abstract	
第一章 文献综述.....	1
1.1 基因转录水平的顺式作用元件.....	1
1.1.1 核心启动子.....	1
1.1.2 启动子上游序列.....	2
1.1.3 增强子.....	2
1.1.4 绝缘子.....	3
1.1.5 时序与组织特异性调控序列.....	3
1.1.6 性别控制与同源异型盒.....	3
1.1.7 响应元件.....	4
1.2 反式作用因子.....	4
1.3 激素对昆虫基因的转录调控.....	5
1.3.1 几种主要昆虫激素的生物学功能.....	5
1.3.2 昆虫激素对相关基因的表达调控.....	7
1.4 家蚕基因启动子调控序列研究进展.....	9
1.4.1 丝素基因启动子.....	10
1.4.2 丝胶基因启动子.....	11
1.4.3 P25 基因启动子.....	12
1.4.4 贮藏蛋白基因启动子.....	12
1.4.5 卵壳蛋白基因启动子.....	13
1.4.6 肌动蛋白基因启动子.....	14
1.5 小结.....	15
第二章 研究目的与内容.....	16
2.1 研究目的与意义.....	16
2.2 研究内容.....	17
2.2.1 家蚕、野桑蚕 <i>LSP</i> 启动子的特性分析.....	17
2.2.2 家蚕、野桑蚕 <i>HSC70-4</i> 启动子的功能特性分析.....	17

2.2.3 BmNPVhr3 对家蚕、野桑蚕 <i>HSC70-4</i> 启动子活性的增强功能.....	17
---	----

第三章 一般实验材料和方法.....18

3.1 实验材料.....	18
3.1.1 昆虫细胞、家蚕与野桑蚕.....	18
3.1.2 昆虫激素.....	18
3.1.3 质粒和菌种.....	18
3.1.4 酶试剂及试剂盒.....	18
3.1.5 其它主要试剂.....	18
3.1.6 细菌培养基.....	18
3.1.7 昆虫细胞培养基.....	19
3.1.8 常用溶液及缓冲液.....	19
3.1.9 所用主要仪器和设备.....	21
3.2 普通实验方法.....	21
3.2.1 细胞的传代.....	21
3.2.2 细胞的冻存.....	21
3.2.3 细胞的复苏.....	22
3.2.4 细胞计数.....	22
3.2.5 功能质粒由脂质体介导在昆虫细胞中的转染.....	22
3.2.6 功能质粒在细胞和家蚕幼虫中的转染、瞬间表达及激素处理.....	22
3.2.7 功能质粒在细胞中的转染、瞬间表达及热激处理.....	22
3.2.8 功能质粒转染后四龄家蚕幼虫的热激处理.....	23
3.2.9 功能质粒转染后五龄家蚕幼虫的热激处理.....	23
3.2.10 功能质粒转染后五龄家蚕幼虫的冷激处理.....	23
3.2.11 家蚕、野桑蚕基因组 DNA 的制备方法.....	23
3.2.12 DNA 浓度测定.....	24
3.2.13 基因组 DNA 的碱变性方法.....	24
3.2.14 PCR 反应.....	24
3.2.15 碱法少量快速抽提质粒 DNA.....	25
3.2.16 碱法大量制备质粒 DNA.....	25
3.2.17 限制性内切酶反应.....	25
3.2.18 DNA 片段的分离与回收.....	26
3.2.19 DNA 的连接.....	26
3.2.20 质粒 DNA 的转化.....	26
3.2.21 重组质粒的鉴定.....	26
3.2.22 细胞抽提物的制备.....	27
3.2.23 荧光素酶分析.....	27

3.2.24 蛋白质浓度测定.....	27
3.2.25 β -半乳糖苷酶比活测定.....	27
第四章 野桑蚕、家蚕 <i>LSP</i> 基因 5'侧翼区的克隆与序列分析.....	29
4.1 材料与方法.....	29
4.1.1 试验材料与试剂.....	29
4.1.2 引物的合成.....	29
4.1.3 野桑蚕、家蚕基因组 DNA 的提取.....	29
4.1.4 PCR 法克隆野桑蚕、家蚕 <i>LSP</i> 基因 5'侧翼区片段及其纯化.....	30
4.1.5 野桑蚕、家蚕的 <i>LSP</i> 基因 5'侧翼区片段的亚克隆及测序.....	30
4.2 结果与分析.....	30
4.2.1 野桑蚕、家蚕 <i>LSP</i> 基因 5'侧翼区片段的扩增.....	30
4.2.2 重组质粒 pSK- <i>BmandLSP</i> 5'FR、pSK- <i>BmLSP</i> 5'FR 的酶切鉴定.....	30
4.2.3 <i>BmandLSP</i> 5'FR、 <i>BmLSP</i> 5'FR 测序结果与序列分析.....	30
4.3 讨论.....	31
第五章 家蚕幼虫血清蛋白基因(<i>BmLSP</i>)启动子特性分析.....	37
5.1 材料与方法.....	37
5.1.1 试验材料.....	37
5.1.2 报告质粒 pSK <i>BmLSP</i> (<i>I</i>)- <i>luc</i> 的构建.....	38
5.1.3 缺失不同调控元件的启动子的报告质粒构建.....	38
5.1.4 质粒的提取、酶切、DNA 片段制备、连接与转化.....	38
5.1.5 家蚕细胞培养与转染.....	38
5.1.6 瞬时表达测定分析.....	39
5.2 结果与分析.....	42
5.2.1 缺失突变启动子的报告质粒的酶切鉴定.....	42
5.2.2 <i>BmN</i> 细胞中 <i>BmLSP</i> (<i>I</i>) 启动子的转录活性.....	42
5.2.3 第一内含子对 <i>BmLSP</i> 基因启动子活性影响.....	42
5.2.4 启动子上游区对 <i>BmLSP</i> 基因启动子活性影响.....	45
5.2.5 各调控元件对 <i>BmLSP</i> 基因启动子活性影响的比较分析.....	45
5.2.6 外源昆虫激素对 <i>BmLSP</i> 基因启动子活性影响.....	46
5.3 讨论.....	48
第六章 野桑蚕、家蚕热激同源蛋白基因 (<i>HSC70-4</i>) 5'侧翼区的克隆与序列分析.....	50
6.1 材料与方法.....	50

6.1.1 试验材料.....	50
6.1.2 引物的合成.....	50
6.1.3 野桑蚕、家蚕基因组 DNA 的提取.....	51
6.1.4 PCR 法克隆野桑蚕、家蚕 <i>HSC70-4</i> 基因 5'侧翼区片段及其纯化.....	51
6.1.5 野桑蚕、家蚕的 <i>HSC70-4</i> 基因 5'侧翼区片段的亚克隆及测序.....	51
6.1.6 序列分析与可能的顺式调控元件的预测.....	51
6.2 结果与分析.....	51
6.2.1 野桑蚕、家蚕 <i>HSC70-4</i> 基因 5'侧翼区片段的扩增.....	51
6.2.3 野桑蚕、家蚕、 <i>HSC70-4</i> 基因 5'侧翼区片段的测序结果与序列分析.....	51
6.3 讨论.....	52
 第七章 家蚕 <i>HSC70-4</i> 基因启动子的功能分析.....	 55
7.1 材料与方法.....	55
7.1.1 材料.....	55
7.1.2 方法.....	55
7.2 结果与分析.....	58
7.2.1 报告质粒 p3Z- <i>BmHSC70-4-luc</i> 的酶切鉴定.....	58
7.2.2 在常态下 <i>BmHSC70-4</i> 启动子的转录活性.....	58
7.2.3 热激处理对 <i>BmHSC70-4</i> 启动子在 BmN、Sf 细胞和蚕体内的转录活性的影响.....	59
7.2.4 冷激处理对 <i>BmHSC70-4</i> 启动子在五龄家蚕体内转录活性的影响.....	60
7.2.5 <i>BmHSC70-4</i> 启动子在五龄家蚕不同发育阶段的转录活性.....	61
7.2.6 外源昆虫激素对 <i>BmHSC70-4</i> 启动子转录活性的影响.....	61
7.3 讨论.....	62
 第八章 野桑蚕 <i>HSC70-4</i> 基因启动子的功能分析.....	 65
8.1 材料与方法.....	65
8.1.1 材料.....	65
8.1.2 方法.....	65
8.2 结果与分析.....	65
8.2.1 报告质粒 p3Z- <i>BmandHSC70-4-luc</i> 的酶切鉴定.....	65
8.2.2 在常态下 <i>BmandHSC70-4</i> 启动子的转录活性.....	65
8.2.3 热激处理对 <i>BmandHSC70-4</i> 启动子在 BmN、Sf21 细胞和蚕体内的转录活性的影响.....	66
8.3 讨论.....	66

第九章 BmNPVhr3 对家蚕、野桑蚕 <i>HSC70-4</i> 基因启动子活性的增强功能.....	68
9.1 材料与方法.....	69
9.1.1 材料.....	69
9.1.2 方法.....	69
9.2 结果与分析.....	70
9.2.1 报告质粒的酶切鉴定.....	70
9.2.2 在 BmN 细胞内 <i>hr3</i> 对 <i>BmHSC70-4</i> 、 <i>BmandHSC70-4</i> 启动子转录活性的增强作用.....	71
9.2.3 在家蚕体内 <i>hr3</i> 对 <i>BmHSC70-4</i> 、 <i>BmandHSC70-4</i> 启动子的转录活性增强作用.....	71
9.2.4 <i>BmHSC70-4/hr3</i> 启动子组合在五龄家蚕不同发育阶段的转录活性.....	72
9.2.5 昆虫激素对 <i>BmHSC70-4/hr3</i> 启动子组合的活性的影响.....	73
9.3 讨论.....	74
第十章 结论.....	75
10.1 <i>Bm/Bmand LSP5'</i> FR 克隆与 <i>BmLSP</i> 启动子功能特性分析结论.....	75
10.2 <i>Bm/Bmand HSC70-45'</i> FR 片段克隆及其功能特性分析结论.....	77
10.3 BmNPVhr3 显著增强 <i>Bm/Bmand HSC70-4</i> 启动子转录活性.....	79
参考文献.....	81
致谢.....	91
附录 (测序图)	92
攻读博士期间发表论文统计.....	102
作者简历.....	104

英文缩写说明

5'flanking region: 5'FR	cpm: counts per minute
Bm: <i>Bombyx mori</i>	FBS: fetal bovine serum
Bmand: <i>Bombyx mandarina</i>	hpt: hours post transfection
<i>BmandHSC70-4</i> : <i>Bombyx mandarina</i> heat shock cognate 70-4 protein gene	<i>hr3</i> : homologous region-3
<i>BmandHSC70-4</i> : <i>Bombyx mandarina</i> heat shock cognate 70-4 protein	HSF: heat shock factor
<i>BmandLSP</i> : <i>Bombyx mandarina</i> larval serum protein gene	HSP70: heat shock protein 70
<i>BmandLSP</i> : <i>Bombyx mandarina</i> larval serum protein	<i>ie-1</i> : immediate-early gene-1
<i>BmHSC70-4</i> : <i>Bombyx mori</i> heat shock cognate 70-4 protein gene	JH: juvenile hormone
<i>BmHSC70-4</i> : <i>Bombyx mori</i> heat shock cognate 70-4 protein	JHA: juvenile hormone analogue
<i>BmLSP</i> : <i>Bombyx mori</i> larval serum protein gene	LUC: luciferase activity
<i>BmLSP</i> : <i>Bombyx mori</i> larval serum protein	<i>luc</i> : luciferase gene
<i>BmNPV</i> : <i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus	MH: molting hormone
	MTL: mariner-like element
	PBS: phosphate buffered saline
	PCR: polymerase chain reaction
	Sf: <i>Spodoptera frugiperda</i>
	β -gal : β -galactosidase

摘 要

从家蚕、野桑蚕基因组 DNA 克隆了 *LSP* 和 *HSC70-4* 基因启动子调控区,以 *luc* 为报告基因,构建了系列报告质粒,经脂质体转染昆虫细胞或蚕体内瞬时表达,对 *BmLSP* 和 *Bm/Bmand HSC70-4* 基因启动子的功能特性进行了分析研究,为进一步阐明 *LSP*、*HSC70-4* 基因的表达调控分子机理奠定了基础,同时为 *HSC70-4* 基因启动子实际应用进行了探索研究。本论文的主要研究内容如下:

一、*Bm/Bmand LSP* 5'FR 克隆与 *BmLSP* 启动子功能特性分析

克隆的 *Bm* 和 *Bmand LSP* 5'FR 片段经测序分析,涵盖了 *LSP* 的第一内含子,第一外显子、核心启动子区及其 5'上游区四部分;在启动子区域内有经典的 TATA 盒,脂肪体内组织特异性表达基因的共有序列和推定的激素响应元件,5'上游区发现了与家蚕丝素轻链基因第一内含子区域的高度同源序列和失活的部分水手转座子元件(MLE)。采用 PCR 法和限制性内切酶法获得了系列缺失 *BmLSP* 基因启动子,在 *BmN* 细胞瞬时表达系统考察了第一内含子(I)、含丝素轻链基因第一内含子区域同源序列(S)以及 MLE 对 *BmLSP* 基因启动子的转录活性的影响,结果表明 I 能显著增加启动子的转录活性达 5.4-5.8 倍,S 增加启动子转录活性 4.42 倍,暗示在 I、S 中可能存在类似增强子的元件。而 MLE 则抑制启动子的转录活性。昆虫激素 JHA 对 *BmLSP* 启动子转录活性影响呈现剂量依赖效应,1 μ g/ml 处理增加 2.97 倍,2-6 μ g/ml 处理不影响,8 μ g/ml 处理显著降低转录活性 2.85 倍;而 MH 处理对其活性没有显著影响。

二、*Bm/Bmand HSC70-4* 5'FR 克隆及启动子功能特性分析

克隆的 *BmandHSC70-4*、*BmHSC70-4* 5'FR 经测序分析涵盖了部分第一外显子和启动子区;推测了可能存在的顺式作用元件有 6 个 GATA 盒、2 个 CAAT 盒和 2 个热激响应因子(HSF)结合元件,但没有发现经典的 TATA 盒与 GC 盒。在常态下 *BmHSC70-4* 启动子、*BmandHSC70-4* 启动子在 *BmN* 细胞、sf21 细胞和五龄蚕体内都呈现高转录活性;37 $^{\circ}$ C 热激处理 *BmN*、Sf21 细胞和四龄蚕体能增加启动子的转录活性,且在 sf21 细胞中热激效果更为明显,而在五龄家蚕体内热激处理却抑制其转录活性;在五龄家蚕体内,JHA 不影响 *BmHSC70-4* 启动子转录活性,低剂量 MH 处理显著提高转录活性,而高剂量(5 μ g MH/头)处理没有显著影响;在家蚕五龄蚕体内不同发育阶段 *BmHSC70-4* 启动子的转录活性有所波动,到熟蚕期达到最高。以上结果表明 *Bm*、*BmandHSC70-4* 启动子既具有组成型特征,又有一定的诱导型特征。

三、*BmNPVhr3* 对 *Bm/Bmand HSC70-4* 启动子活性的增强功能

hr3 是来源于 *BmNPV* 同源序列,具有 *BmNPV* 复制起始位点和增强子的双重功能。结果表明 *hr3* 能增强 *Bm/Bmand HSC70-4* 启动子活性,在 *BmN* 细胞内增强 16-18 倍,且与 *hr3* 接入方向无关;在蚕体内分别增强 190.57 倍、242.19 倍;在五龄家蚕体内,JHA 不影响 *BmHSC70-4/hr3* 组合转录活性,不同剂量 MH 处理显著提高转录活性;在家蚕五龄蚕体内不同发育阶段 *BmHSC70-4/hr3* 启动子组合的转录活性有所波动,到熟蚕期达到最高,这与 *BmHSC70-4* 启动子一致,说明 *hr3* 只是增强转录活性,并不改变特性。以上结果显示 *HSC70-4/hr3* 启动子组合更适合在细胞稳定表达系统或转基因家蚕中驱动目的蛋白基因的转录表达。

关键词:家蚕,野桑蚕,幼虫血清蛋白基因,热激同源蛋白 70-4 基因,*BmNPVhr3*,启动子功能特性分析

Abstract

The regulation promoter region of *LSP* and *HSC70-4* are cloned from genomic DNA from *B. mori* and *B. mandarina*. A series of *luciferase* reporter plasmids, driven by *LSP* and *HSC70-4* promoters, are constructed, respectively. Via the transient expression system in BmN cells or silkworm transfected by lipofectin, the functional and characteristic analysis of the promoter are investigated. This will be helpful to further elucidate the regulation mechanism of *LSP* and *HSC70-4* expression and to apply of the promoters in stable transformation cell system or transgenic silkworm.

1. The Cloned *BmandLSP* and *BmLSP* 5'FR and Functional analysis of *BmLSP* promoter

The Cloned *BmandLSP* and *BmLSP* 5'FR, consisting of the first intron, the first exon, the core promoter region and 5'-upstream region, harbor the classic TATA box, sequences commonly found in insect genes that were specifically transcribed in fat body and the deduced ERE. The 5'-upstream region contains the homologous sequence with the first intron of Fib-L (S) and the inactive mariner like element (MLE). Using PCR and restriction endonuclease methods, a series of *luciferase* reporter plasmids, driven by different length of *BmLSP* promoters, are constructed. Via the transient expression system in BmN cells, the effects of the regulation elements and foreign insect hormones on the *BmLSP* promoter activity are investigated. The results show that the *BmLSP* promoter activity is enhanced by the intron with 5.4-5.8 folds, and by S with 4.42 folds, suggesting that the intron and S harbor the enhancer-like element. However, MLE in 5'-upstream region presents a negative effect on promoter activity. The effects of juvenile hormone analogue (JHA) on the *BmLSP* promoter activity appear the typical dose-dependent manner, that is, low concentration treatments increase the *BmLSP* promoter activity and high concentration treatments decrease it. Meanwhile, insect ecdysone (MH) treatment present no significant effect

2. The Cloned *BmandHSC70-4* and *BmHSC70-4* 5'FR, and Characterestic and functional analysis of *BmandHSC70-4* and *BmHSC70-4* promoters

The Cloned *BmandHSC70-4* and *BmHSC70-4* 5'FR, consisting of the partial first exon, the central promoter region and 5'-upstream region, harbor six GATAs, two CAATs and two HSFs, but no TATA and GC box. Under normal condition, transcriptional activities of *BmandHSC70-4* or *BmHSC70-4* promoter are high in BmN, Sf21 cells and the 5th instar larvae. By heat-shock treatment at 37 °C for 2hr, the enhancements of *BmandHSC70-4* or *BmHSC70-4* promoter activity are achieved in BmN cells, sf21 cells and 4th instar silkworm larvae, respectively. But heat-shock treatment for 5th instar silkworm larvae lead to a drastically decrease of the promoters' activity. In 5th instar silkworm larvae, JHA treatments have no significant effect, and injection of low level of MH (1-3 µg per os) can increase *BmHSC70-4* promoter activity, while high level of MH (5 µg per os) presents no effect. Transcriptional activity of promoter is changed with the different developmental stages and reaches the highest level at the wandering stage in 5th instar. From the above results obtained from *in vitro* and *in vivo*, we can deduce

that *BmandHSC70-4* or *BmHSC70-4* promoter is both constitutive and inducible promoter, suggesting that its potential application in cell stable expression system or transgenic *Bombyx mori*.

3. BmNPV *hr3* enhancing *BmHSC70-4* and *BmandHSC70-4* promoter transcriptional activity

BmNPV *hr3*, derived from *B. mori* Nucleopolyhedrovirus, functions as replication initiation site in viral DNA and enhancer for several promoters' transcription. Here, *hr3* also can increase the transcriptional activity of the *BmHSC70-4* and *BmandHSC70-4* promoter by 16-18 folds in BmN cells and 190.57-242.19 folds in 5th instar larvae. The *hr3*-mediated enhancement is orientation-independent.

In the 5th instar larvae, MH treatments enhance the transcriptional activity of the promoter combination. The maximum stimulating effect, by 5 μ g MH *per os* treatment, is achieved about 17.54 times, compared with the control. And the JHA treatments have no significant effects on it. The transcriptional activity of promoter combination is changed with the different developmental stages and reached the highest level at the wandering stage. This pattern of promoter combination is consistent with that of *BmHSC70-4* promoter, suggesting that *hr3* only enhances the promoter activity and can't change its character. From the above results, the promoter combinations of *BmHSC70-4/hr3* and *BmandHSC70-4/hr3* are the ideal ones for transgenic silkworm or stable transformation cell system due to their higher transcriptional activity. Moreover, it is changed with the development stages and hormone titer. To get higher productivity of expressed gene in the transgenic silkworm by this promoter combination in future, we can harvest the foreign gene product at wandering stage or administrate certain dose ecdysone with larva before harvest.

Keywords: *Bombyx mori*, *Bombyx mandarina*, Larval serum protein gene, Heat-shock-cognate 70-4 protein gene, BmNPV*hr3*, Functional and characteristic analysis of silkworm promoter

第一章 文献综述

在成千上万的真核生物基因中,在特定的时间,只有 15%左右的基因能在特定的细胞中表达。根据机体的不同发育阶段,不同的组织及不同的功能状态,选择性、程序性地在特定数量的特定基因被激活(Liang et al,1992),表达有功能的 RNA 与蛋白质等产物,从而使生物的组织与器官在一定的环境条件下保持正常的功能。这一系列的过程称为基因表达的调控。基因的表达调控根据其发生在同一事件中的先后次序,可分为转录水平调控(Transcriptional regulation),转录后水平调控(Post-transcriptional regulation),翻译水平调控(Translational regulation),蛋白质加工水平的调控(Protein maturation)等。而转录水平调控被认为基因表达最重要的调控方式之一。基因的转录受特定的顺式作用元件(*cis*-acting element)的影响,如启动子,增强子等功能元件,同时还受到反式作用因子(*trans*-acting factor)的调控,如蛋白质分子、激素蛋白质的复合物等一些具有可扩散特性的物质。一般来说,转录水平上基因的表达调控是通过顺式作用元件与反式作用因子间复杂的相互作用来实现的。

昆虫是地球上最多的物种,包括一些有益经济昆虫(如蜜蜂、家蚕等)和大量的有害昆虫。昆虫基因表达调控机理的解析是了解包括杀虫剂与抗病性、行为、进化和发育等在内的昆虫相关的重大问题的的重要组成部分。运用现代分子生物学手段,相关的结构基因已经可以得到阐明,而这些基因的表达调控却知之甚少。顺式作用元件 DNA 序列引导与转录相关的蛋白质(反式作用因子)的装配与否或效率高低直接影响到基因转录水平。另外,与编码区相比,顺式作用元件的变异更为频繁以适应环境条件的变化,而这些变异被认为是昆虫形态学多样性与发育机理进化等方面的主要驱动力(Mackay, 2001; Tautz, 2000)。

1.1 基因转录水平调控的顺式作用元件

1.1.1 核心启动子(Basal promoter):是指一个基因转录起始位点 5'端紧邻的 DNA 序列,一般由 TATA 盒(TATA Box)起始区(Initiator Region, Inr)和下游启动子元件(Downstream Promoter Element, DPE)组成。核心启动子的碱基序列、位置与功能上具有高度的保守性。单一的核心启动子元件能使基因在一个较为恒定的低水平上表达。

TATA 盒:核心启动子区通常包含一段富含 AT 碱基对的 TATA 碱基序列基序,称为 TATA 盒(又称 Hogness 盒)。TATA 盒的功能受到与转录起始位点相对应的方向、序列及位置的限制,一般位于帽位点上游-20- -30bp。与 TATA 结合蛋白质(TATA Binding Protein, TBP)结合,后者充当其它转录因子和 RNA 聚合酶的互作点。因而 TATA 盒的主要功能是参与转录的起始,从而影响基因的转录水平。

起始区(Inr):在无脊椎动物中,与转录起始位点相邻的一段保守的 DNA 序列构成的调控元件称为起始区。结合 TBP 相关因子(TBP-associate protein, TAFs)与 RNA 聚合酶(Chalkley et al, 1999; Purnell et al, 1994)。

下游启动子元件(DPE):一般位于+30bp,具有保守的 A/GGA/TC/TGT 序列,可以与 TAF 结合,是 TFIID 因子另外的锚定位点(Burke et al, 1998)。

上述的三种元件并不是存在于所有的核心启动子中。对果蝇的 205 个启动子调查表明, 将近 50%启动子存在可识别的 TATA 序列, 50%启动子存在 DPE, 大约三分之一的启动子两者都不存在 (Kutach et al, 2000)。四分之一节肢动物基因启动子存在 Inr (Cherbas et al, 1993)。

1.1.2 启动子上游序列 (Upstream promoter): 在 RNA 聚合酶 II 控制转录的基因的 5'端上游区常发现一些特征调控序列, 如 CAAT、OCT 或富含 GC 的启动子元件, 这些调控序列统称为启动子上游序列。如八体序列 (The octamer sequence, OCT), ATGCAAAT 与基因表达的时序性、组织特异性有关。启动子上游序列的位置一般比较固定, 距帽位点上游-80 - -220bp, 但方向却不定。它对启动子高活性是必需的。

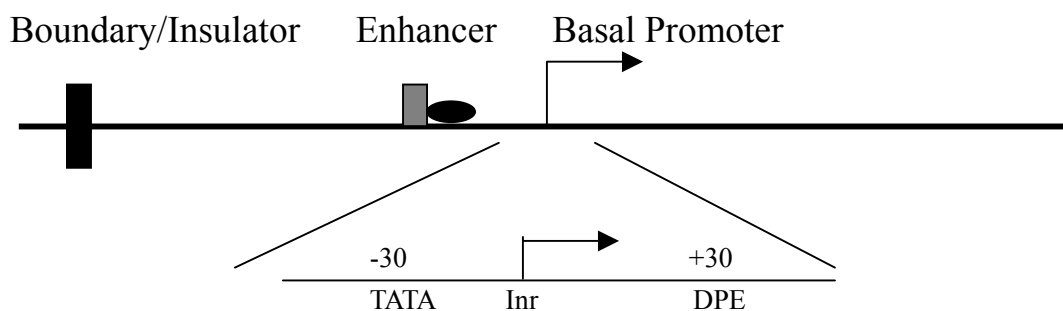


图 1.1 转录调控的顺式作用元件示意图

基础转录启动子 (Basal Promoter) 包括转录起始位点 (Inr) 上下 100bp 结合普通的转录因子。增强子 (Enhancer) 大小一般在 50bp-数百 bp, 位点不固定, 与特殊的转录因子结合, 控制基础转录的水平。边界元件 (Boundary) 或绝缘子 (Insulator) 是指阻止临近的调控元件对其所界定的基因的启动子起增强或抑制作用的一类边界序列。

1.1.3 增强子 (Enhancers): 增强子是一种参与基因转录激活的顺式作用的调节元件, 最早在 SV40 启动子中发现的, 现已在多种生物体的基因启动子中找到了增强子元件。增强子可以在远离启动子的位置, 无论是在其上游或下游, 无论何种取向, 均可发挥其功能 (Banerji et al, 1981; Blackwood et al, 1998)。

尽管增强子自己并不能启动自己进行转录, 但却能以不同的效率等级, 增强启动子的表达活性, 可以使基础转录速率增加 1-1000 倍左右。如果增强子含有组成型表达的转录因子的结合位点, 那么它便可以在所有类型的细胞中发挥作用; 而如果增强子含有参与基因调节的组织特异的转录因子的结合位点, 那么它则只能是在特定的组织中发挥作用, 或是对特殊的信号刺激作出反应 (Arnosti, 2003)。

增强子具有下列的一般特性:

增强子不具有启动子的专一性, 同一增强子可以对多种启动子起作用, 如家蚕杆状病毒

(BmNPV) 基因的增强子同源重复区 *hr3*, 对自身的 *ie-1*、*gp64*、*p10* 等启动子具有增强功能, 对外源启动子 *hsp70*, *CMV* 等也有增强的功能(Xiao et al, 2001; Lo et al, 2002; Chen et al, 2004)。

增强子的功能作用与方向无关, 不管是正向插入还是反向插入, 都具有正激活的功能效应, 也就是说存在于双链 DNA 任一条链上的增强子都是有活性的; 增强子的功能与位置无关, 无论位于基因的 5'上游, 还是基因的 3'下游, 抑或是处于基因内含子序列内部, 都能够发挥增加转录活性的功能效应; 增强子可以超远距离地发挥功能作用。现已知道大多数真核基因的增强子都是位于帽位点上游 100-500bp 处, 但位于距帽位点数千 bp 的 5'上游的增强子也能发挥功能。还发现有超远距离的增强子, 如白蛋白基因的增强子位于帽位点 5'上游 10kb 处, 同样可以发挥促进转录活性的功能(Blackwood et al, 1998)。

除了上述的一般特性外, 有些增强子具有寄主或组织的特异性, 它们只能在特定类型的细胞中发挥功能作用, 称为细胞专一性增强子。如免疫球蛋白基因的增强子只能在 B 淋巴细胞中有功能。这是由于细胞专一性增强子只有当细胞中含有相关激活蛋白的条件下才发挥其促进基因转录水平的功能; 还有一些增强子只有在特定条件的刺激下才有功能作用, 称之为调节型增强子, 如类固醇激素诱导基因表达, 生理休克, 尤其是热休克诱导的基因表达(Arnosti, 2003)。

1.1.4 绝缘子 (Insulator): 是指阻止临近的调控元件对其所界定的基因的启动子起增强或抑制作用的一类边界序列。因此绝缘子既是基因表达的调控元件, 又是一种边界元件(Gerasimova et al, 2001)。果蝇中绝缘子 SCS 和 SCS' 分别位于果蝇多线染色体 87A7 座位 *hsp70* 基因旁侧近端和远端的核酸酶高度敏感区, 它们是一种具有顺式调控作用的边界元件, 能使其界定的染色体结构域上的基因免受区域外两端正调控与负调控信号的影响(Kellum et al. 1991)。果蝇基因组中的另一个绝缘子 su 蛋白结合序列, 位于逆转录转座子 gypsy 中, 长约 340bp, 共有 12 个与 su 锌指蛋白结合位点。它能阻止任何被它所隔离的增强子的功能。绝缘子抑制增强子的功能是有极性的, 只能抑制处于绝缘子所在边界另一侧的增强子的作用, 而对处于同一结构域的增强子没有抑制作用(Cai et al, 1995)。绝缘子对基因表达的调控是一个非常复杂的过程, 它是通过细胞内特定的蛋白质因子相互作用而产生调控效应的(Gerasimova et al, 2001)。

1.1.5 时序与组织特异性调控序列 (Temporal control and tissue-specific regulatory sequence): 这些序列与生物体内不同时间和位置表达的因子互作, 调控基因的转录表达。如家蚕 P25 基因上游有两个特异性调控序列, 位于-37- -45bp 的 CATAACAAG 为 PSGF 因子的结合位点, 位于-71- -59bp 的 CTATTATTAAAC 为 SGFB 因子的结合位点。SGFB 因子是丝腺特有的调控因子, 存在于后部丝腺和中部丝腺, 而 PSGF 因子是后部丝腺特有的调控因子, 中部丝腺没有该因子。只有在 PSGF 因子作用下, SGFB 因子才能稳定有效地结合到调控序列, 从而 P25 基因只在后部丝腺表达 (Horard et al, 1997)。

1.1.6 性别控制与同源异型盒 (Sex-determination and the homeobox): 这些特异性的 DNA 调控序列控制着生物体的基本进程, 包括细胞分裂、性别控制、发育分化, 同时还控制与这些基本进程间接相关的基因的表达。

性别决定因子结合位点 (Sex determination factor binding sites), 果蝇的性别决定方式由调控

基因表达的级系 (Hierarchy) 构成。在级系的低层, 一种两性蛋白的转录因子 *dsx* 的 mRNA 可以不同方式剪接产生雌、雄特异性因子, 它们决定性别, 并控制着性别特异性体细胞中基因的表达。如在果蝇卵黄蛋白基因 1 与 2 (Abrahamsen et al, 1993; Burtis et al, 1991), 埃及伊蚊 (*A. aegypti*) 卵黄原蛋白 A1 基因中, 在非编码区都发现了两性的结合位点 (Romans et al, 1995)。家蚕的性别决定方式虽然与果蝇有所不同, 发现了与果蝇同源性较高的 *dsx* 基因, 基因结构不同, 但其转录产物呈现性别依赖型, *dsx^F* 是雌果蝇的 *dsx* 基因转录翻译产物, 在脂肪体细胞内与贮藏蛋白 SP1 基因的调控序列结合, 增强其表达, 还与其他性别末端分化基因如卵黄原蛋白基因, 卵特异性蛋白基因 ESP1, 对雄性性信息素结合蛋白基因的表达有抑制作用 (Ohbayashi et al, 2001; Suzuki et al, 2001, 2003)。

同源异型盒基因的产物是能识别高保守 DNA 序列的转录因子, 最早在果蝇中发现, 在发育中起到纽带的作用。其编码的蛋白质是决定胚胎极性、分节与节内发育定型的转录因子调控。果蝇早期发育的同源异型盒与哺乳动物的在序列、结构和功能上部分保守 (Graham et al, 1989)。家蚕的 E 复对等位基因群也是由同源异型盒控制转录的, 其同源异型盒与果蝇几乎完全相同 (Ueno et al, 1992)。

1.1.7 响应元件 (Response elements): 许多基因含有特异性或非特异性的响应元件的 DNA 序列, 能对环境因子或激素信号作出应答, 从而诱导或抑制该基因的转录与表达。

在一定的范围内, 环境响应元件能够刺激基因的表达。如在所有生物体内都存在的热激响应元件与金属响应元件。还有 cAMP、氧化胁迫、毒素、微生物侵染与饥饿等环境响应元件。

蜕皮激素与其受体蛋白结合形成激素蛋白质复合体, 进入细胞核与蜕皮激素响应元件 (Ecdysone response element, EcRE) 的 DNA 序列相结合, 从而诱导或抑制目的基因的表达。Riddihough (1987) 在果蝇 *HSP27* 启动子区第一次发现了 EcRE, 其序列与哺乳动物的雌激素响应元件相似。而且 EcRE 增加 2 个碱基可以转变成有功能的雌激素元件 (Martinez et al, 1991)。

1.2 反式作用因子

由启动子、增强子、响应元件等 DNA 序列与特定的功能基因连锁在一起, 组成基因转录的调控区。在转录调控过程中, 除了需要调控区外, 还得需要反式因子的作用, 来执行基因的转录调控 (Burke et al, 1998)。

体外转录研究表明, RNA 聚合酶 II 转录起始需要一些可扩散性的转录因子, 这些因子由其他基因编码 (表 1)。一般认为, 如果某个蛋白是体外转录系统中起始 RNA 合成所必需的, 它就是转录复合体的一部分。根据各个蛋白质成分在转录中的作用, 可将整个转录复合体分为 3 部分: 参与所有或某些转录阶段的 RNA 聚合酶亚基, 不具有基因特异性; 与转录的起始与终止有关的辅助因子, 也不具有基因特异性; 与特异调控序列结合的因子, 它们中有些被认为是转录复合体的一部分, 因为大多数基因启动子区含有这一特异序列, 如 TATA 区和 TF II D, 更多的是基因或启动子特异性结合调控蛋白, 它们是起始某个或某类基因转录所特有的因子 (Lee et al, 2000; Naar et al, 2001)。

反式作用因子对基因表达的调控主要有两种方式，一是转录起始复合物形成过程受到控制，二是通过专一因子的结合，提高 RNA 聚合酶起始转录活性（Lee et al, 2000）。

表 1 部分转录因子及其所结合的 DNA 位点

因子	种属	启动子	识别位点
SP1	人	启动子 GC 区	G GGC
			GGGCGG
			T AAT
B	果蝇	启动子 TATA 区	TATA 区或起点
TF II D	人	腺病毒	TATA 区
CTF/NF1	人	腺病毒、珠蛋白、TK	TATA 区
OCT1	人	组蛋白 H ₂ B	ATTTGCAT
OCT2	人	免疫球蛋白	ATGCAAAT
GCN	酵母	氨基酸生物合成基因	TGACTCA
GAL	酵母	基因簇上游激活序列	CGG (N ₁₁) CCG
Coup	鸡	血清蛋白基因启动子	GGTGTCAAAGGTCAAAC
cPcf	人	原癌基因 C-ψ 启动子	AGAAAGGGAAAGAA
TRIO	家蚕	丝素 P25、H 链启动子	AAGGGA/TC
UB2a	家蚕	丝素 P25、H 链启动子	CCCGCC
BMFA	家蚕	丝素 P25、H 链启动子	AAAATGGCG
SGFB	家蚕	丝素 P25、H 链启动子	CTATTTATTTAAC
PSGF	家蚕	丝素 P25	CATAACAAG

1.3 昆虫基因表达的激素调控

昆虫激素按照化学成分可分为三类，即神经肽类(neuropeptides)，甾体类(steroids)和类萜类(terpenoids)。神经肽类激素按其生物功能可分为两类，一类是调节昆虫发育分化的激素，主要包括促前胸腺素、促咽侧体激素、羽化激素、滞育激素、性外激素激活神经肽等，另一类是维持昆虫生理状态恒定性的激素，主要有利尿激素、脂质动员激素、促肌激素、FMRF 胺基神经肽等。在昆虫幼虫期发育起主要作用的是蜕皮激素和保幼激素，它们分别为甾体类和萜类化合物。现已研究比较透彻的有促前胸腺素、促咽侧体激素、羽化激素、滞育激素、蜕皮激素和保幼激素。这些激素相互作用构成昆虫内分泌的调控网络体系，协调控制着昆虫正常发育与变态等生命活动。

1.3.1 几种主要昆虫激素的生物学功能

1.3.1.1 滞育激素 (DH)

滞育是一种特殊的发育状态，其特点是代谢水平降低，形态发生暂停。滞育作为一种遗传特性是在昆虫进化过程中发生与形成的。地球上昆虫生活的环境条件，如温度、日照、雨量、饲料

植物的生长期等,都呈现周期性的剧烈变化。在不利的环境条件下,昆虫为了个体与种族的生存,不得不在某一阶段停止生长发育与生殖活动,同时降低代谢强度,发生一系列复杂的生理生化变化,产生某些适应不良环境的物质与结构,以便度过不良环境的阶段。经过漫长的进化历程,昆虫对环境周期性变化的反应,即在某一特定发育阶段停止生长发育的特点,逐渐固定下来成为一种遗传性状。根据滞育发生的虫态可将滞育分为四种类型:卵滞育、幼虫滞育、蛹滞育与成虫滞育。不同种类的滞育的机理不尽一致,经过多年的研究,普遍认为外界环境条件通过影响昆虫体内的神经内分泌系统而对滞育起到调控作用。目前对基于 DH 诱导的模式昆虫——家蚕卵滞育机理研究较为透彻。

家蚕 DH 由咽下神经节的神经分泌细胞分泌。蛹期第三天分泌的 DH 作用于发育中的卵巢,导致次代产下的卵在胚子发育期停止发育进入滞育。1995 年 Xu et al 克隆了家蚕 DH 的基因,推测了 DH 多肽前体的氨基酸组成。并从分子水平推断家蚕的滞育与否,不在于蛹期是否合成分泌 DH,而在于合成分泌 DH 的数量(徐,1999)。

DH 除了调节卵是否进入滞育之外,还能在家蚕的卵巢内引起几个明显的代谢反应。这些代谢反应并不影响卵是否进入滞育状态,但它们通过代谢的调节来提高滞育卵的存活率。DH 可以促进 3-羟基犬尿氨酸从血淋巴运输进卵巢,它在卵巢中积累并被转化成滞育卵的浆膜上所发现的眼色素,从而使卵的颜色变暗;DH 也能提高海藻糖酶的活性,导致脂肪体中糖原贮存减少而在卵巢中大量积累。糖原在滞育卵中起初被转变成可抗冻的山梨醇,这对于滞育的胚子来说起到了保护作用;DH 对酯酶 A 起抑制作用,这种酶可影响卵黄流通,是完成胚子发生所必需的一种关键酶,因而通过阻断酯酶 A, DH 可使卵的滞育能力得到加强。

1.3.1.2 保幼激素与蜕皮激素:

节肢动物最明显的特征是它们有一个坚硬的外壳。在昆虫中,这种坚硬的表皮限制了幼虫的生长,因此,必须在蜕皮的间隙期形成新表皮,脱去旧表皮。在发育完成后即发生变态。那些“不完全”变态(半变态)的动物,变态是由末期幼虫直接一步变成成虫的过程。而那些“完全”变态(全变态)的动物,变态期的变化就复杂得多了,并且在末期幼虫和成虫之间插入了一个蛹期。较高等的双翅目(Diptera)是这种变化的极限,经过变态,幼虫的大部分细胞死亡,成虫是由在幼虫中早就存在的但不显示功能的未分化的小细胞群(器官芽和成组织细胞)发育而成。

因为表皮是昆虫生长、发育的明显特征,所以人们一直十分注意蜕皮,即新表皮产生与旧表皮脱落的过程。在蜕皮过程开始时涉及三种激素:促前胸腺激素(PTTH),蜕皮激素(moulting hormone, ecdysone)和保幼激素(juvenile hormone, JH)。PTTH 由脑的神经分泌细胞分泌,并从神经组织释放到心侧体的细胞内。此激素刺激前胸腺(PTG;又叫腹门腺,蜕皮腺,在高等的双翅目体内是环腺的一部分)分泌蜕皮激素。然后蜕皮激素作用于真皮,启动产生新表皮的步骤。真皮层和老皮层分离(溶离作用, apolysis),蜕皮激素被泵入这个分离的空间。通常, DNA 的合成作用和细胞分裂就发生在这个时期。新表皮的最外层沉积后,蜕皮液内的消化酶被激活并开始降解老皮的内层。重新形成的新表皮的类型依赖于咽侧体所分泌的 JH 的量,当 JH 的浓度高时,产生的是幼虫的新表皮;当咽侧体不起作用时, JH 的滴定度下降时,就发生变态。蜕皮过程的后期,由另外两种激素,即羽化激素和催糞激素进行调节。蛹外皮的脱落至少在某些全变态昆虫体内是由脑分泌的另外一种激素——羽化素发动的。蜕皮后形成的新表皮通常是柔软的,所以它可以被适

当撑大。大多数昆虫围心组织释放的催鞣素使蜕皮后形成的新表皮变硬、变黑(Riddiford, 1985)。

在大多数昆虫体内, 变态后, 咽侧体恢复活动, 并再次分泌 JH。在饲养的雌性虫体内, 这通常是卵子发生的某个阶段必不可少的。典型的雄虫精子发生是在成虫的发育期, 而实际上是随着成虫的羽化而完成的。但在某些昆虫, 雄性附腺的成熟也需要 JH。

1.3.2 昆虫激素对相关基因的表达调控

1.3.2.1 昆虫激素调控基因表达的机理

蜕皮激素在前胸腺内合成并分泌到血液, 经血液可以迅速扩散到全身的各个器官中, 进入靶细胞, 与细胞质内的相应受体蛋白结合。受体蛋白分子含有 3 个功能区: 羧基端激素结合区、中部 DNA 结合区和氨基酸端转录调控区。在非激活状态时, 受体上结合了抑制蛋白复合物。一旦激素分子结合到受体的激素结合区, 便导致抑制蛋白复合物与受体解离, 暴露出 DNA 结合区, 受体被激活, 形成蜕皮激素-受体蛋白的复合体, 并诱导受体三维构象甚至化学性质发生改变, 可促使复合体与 TATA 盒附近的特异性蜕皮激素响应元件的 DNA 序列的结合, 诱导染色体疏松区的发生, 从而促进了基因的转录效率(Kiguchi, 1981; 1986)。

作为类固醇类激素的保幼激素 JH 也是在转录水平上调节蛋白质合成, 但调节方式和蜕皮激素 MH 有所不同。由咽侧体分泌的亲脂性 JH 在昆虫的体液中与载体蛋白 I 形成二元复合物一起被运输, 载体蛋白与激素的结合可以阻止 JH 与其他蛋白或亲脂性表面发生非特异性结合, 同时将 JH 输送给亲和力比载体蛋白还要高的受体, 使 JH 具有识别靶细胞的功能(吕, 1991)。其调控基因表达的有多种途径。一是与靶细胞表面的专一受体相结合, 激活位于细胞膜上与受体相连接的效应器, 进而向细胞内传递保幼激素所携带的生理信息, 并通过对 DNA 的调控最终影响蛋白质合成, 产生相应的生理效应(Yamamoto et al, 1988; Riddiford, 1994; 1996)。另一种途径是 JH 进入靶细胞, 与超气门基因(USP)蛋白受体结合, 诱导受体的三维构象改变, 与特异性的 DNA 序列结合, 从而调控相应基因的转录表达(Jones et al, 1995)。

滞育激素 DH 是一种多肽激素(吕鸿声, 1962), 分子量较大, 到达卵巢组织后不能直接进入卵母细胞内, 而是先与细胞表面的专一受体相结合, 激活位于细胞膜上与受体相连接的效应器, 进而向细胞内传递 DH 所携带的生理信号, 并通过对 DNA 的转录调控影响蛋白质合成, 产生一定的生理效应, 最终导致滞育(Yamashita et al, 1981; Sato et al, 1994)。

1.3.2.2 昆虫激素调控基因表达的实例

1.3.2.2.1 卵黄原蛋白(Vitellogenin, Vg)基因的激素调控

Vg 在幼虫期表达, 是昆虫合成卵黄蛋白的原料。不同昆虫来源的 Vg 有很高同源性(Blumenthalet al, 1987; Spieth et al, 1991)。Chinzei (1981)用摘除咽侧体的成熟期雌飞蝗, 添加外源 JH 后能刺激卵巢中 Vg mRNA 的大量转录。从飞蝗的基因组中克隆了两个 Vg 基因, 这两个 Vg 基因在注射 JH 后的五龄雌幼虫体内同步表达。比较了飞蝗 Vg 基因与美洲大蠊(*Periplaneta americana*) 卵鞘蛋白基因的 5' 侧翼区序列认为可能存在 JH 响应元件, 为 AAGGGTTC 八核苷酸序列。该序列也存在于果蝇 *hsp27* 基因上游序列中, 并与一个蜕皮激素响应元件部分序列有一定的相似性。Braun (1992) 用核抽提物-凝胶阻滞分析法检测了 Vg 基因的 5' 上游片段, 发现含有 JH AAGGGTTC 八核苷酸序列的 DNA 片段没有结合蛋白。而在-610- -549 bp 区发现了 JH 诱导

因子的结合位点。

在添加 JH 后,飞蝗卵巢内经过一段时间才出现 Vg mRNA。当放菌酮与 JH 一起添加时,Vg mRNA 滞后时间延长,这说明 JH 首先要刺激转录因子的生物合成,然后作用于 Vg 基因转录(Edwards et al, 1993)。体外转录体系实验支持了这个结果(Wyatt et al, 1996)。

家蝇的 Vg 基因表达研究同样证实了 JH 的间接作用,而非直接作用方式。用去头的雌家蝇注射不同浓度梯度蜕皮激素(MH),经 Northern 杂交分析表明,随着 MH 浓度的增加,Vg mRNA 也逐渐增加。Vg mRNA 出现高峰期为注射 MH 后 8h 以内。而 JH 处理,也出现上述结果,但在注射 JH24h 后才达到 Vg mRNA 高峰期(Agui et al, 1991)。

1.3.2.2.2 贮藏蛋白(Storage Proteins, SP)基因的激素调控

SP 的主要功能是为昆虫的体壁的形成与变态提供蛋白来源,以及为非取食的成虫期提供营养源。SP 基因的表达受到激素、光周期、性别与营养等因素的控制。SP 可分为 JH 抑制型 SP、富含蛋氨酸型 SP 和芳香族 SP 三大类。

在家蚕与烟草天蛾两种昆虫的 SP 基因得到较为彻底的研究。家蚕 SP1 基因的上游序列含有与蜕皮激素响应元件(EcRE)相似的 DNA 序列,第一内含子中存在与 SV40 增强子相似的基序(Sakurai et al, 1988)。芳香族型 SP2 基因同样含有与 SV40 增强子相似的基序和果蝇脂肪体内组织特异性表达基因的共有序列(Fujii et al, 1989)。幼虫期特有的 30K 家蚕血清蛋白(*BmLSP*)基因的上游序列中含有 7 核苷酸序列,即 TGATAA,其为贮藏蛋白基因所共有的序列(Fujiwara et al, 1992)。烟草天蛾的雌性特有贮藏蛋白基因的表达受到 JH 的特异性抑制(Webb et al, 1988)。

大蜡螟(*Galleria mellonella*)的贮藏蛋白基因的表达及其受内分泌系统的控制进行了一系列研究(Kumaran et al, 1987)。研究表明尽管蜕皮激素对大蜡螟芳香族型 Lhp76 贮藏蛋白基因的表达有抑制作用,但在该基因的上游区未能发现 EcRE DNA 序列(Memmel et al, 1992)。另一种贮藏蛋白基因 Lhp82 在幼虫的前四龄期表达受 JH 抑制,而在缺少 JH 的蛹期又受 MH 的抑制。对去脑的蛹期进行核失控分析(Nuclear run-off assay),结果表明 Lhp82 基因在缺少 JH 与 MH 时进行转录。如同 Lhp72 一样,Lhp82 基因的上游也未能发现 EcRE DNA 序列(Memmel et al, 1994)。

SP 基因一般应含有 EcRE-like DNA 序列。在卡罗拉多马铃薯甲虫(*Leptinotarsa decemlineata*)滞育蛋白 1 基因(DP1)的 mRNA 在变态期消失,在短日照的条件下又重新出现,这提示该基因的表达受到 JH 的控制(De et al, 1994)。DP1 基因的上游序列中既含有 EcRE-like DNA 序列,还有贮藏蛋白基因所共有的 TGATAA 7 核苷酸序列(Koopmanschap et al, 1995)。

1.3.2.2.3 角质层相关基因表达的激素调控

角质层组织是研究基因顺序表达的理想场所,以烟草夜蛾、惜古比天蚕为代表的鳞翅目昆虫的角质层基因研究基因转录调控成为一个热点(Riddiford, 1990)。

在烟草天蛾的生长与变态过程中,MH 和 JH 滴度得到精确的测定,这为研究激素调控角质层相关基因的工作提供了坚实的基础(Riddiford, 1990;1994)。在这奠基性质的工作中,业已证实,在幼虫非眠期、幼虫眠期、变态期以及蛹期角质层相关基因的表达呈现显著差异。这些基因往往是激素激活,暂时抑制,而后又被激素信号激活或永久抑制。体外幼虫角质层组织培养技术的成熟,为基因表达不受内源 MH 和 JH 影响创造了条件,从而用添加外源 MH 和 JH 方法来研究特

定的角质层基因的表达 (Hiruma et al, 1991)。

Hiruma 等 (1993) 建立了基于烟草夜蛾真皮的多巴脱羧酶 (Dopa decarboxylase, DDC) 基因调控的 JH 和 MH 相互作用的模型。JH 诱导长寿正调控转录因子而 MH 诱导短命负调控转录因子的假说得以证实。在这一级联事件中, 当 MH 诱导的转录因子降解后, 直到 JH 诱导的转录因子也降解后, DDC 的活性才能瞬时提高。从一般观点来看, 转录的负调控在决定基因时空性表达中起到重要作用 (Latchman, 1995)。

从惜古比天蚕基因组中, 涵盖编码软角质层蛋白 (HCCP12) 基因、硬角质层蛋白 (HCCP66) 基因以及 5' 非编码区的 DNA 片段已经克隆并测序 (Binger et al, 1994; Lamp et al, 1994)。经计算机同源检索法检索表明两基因在+20- +34bp 区域存在一个 EcRE 的不完全回文区的顺式调控元件, 然而凝胶阻滞分析后发现该区域并没有结合蛋白; HCCP66 基因在-74- -81bp 之间有一个经典的八核苷酸序列, 凝胶阻滞分析该区域结合了核抽提物, 但没有组织特异性 (Lamp et al, 1994)。在脊椎动物中 Oct-1 蛋白基因在全身都能表达, 而 Oct-2 蛋白基因只在特定类型的细胞中得以表达。还有 Pit-1 转录因子结合到类似八核苷酸序列的 DNA 区域, 有助于垂体组织特异性基因 (如催乳素基因、生长激素基因等) 的表达 (Ingraham, et al, 1988; Nelson, et al, 1988)。在家蚕角质层基因的 5' 顺式上游区也发现了类似 Pit-1 转录因子的识别序列 (Nakata et al, 1992)。

1.3.2.2.4 海藻糖酶 (Trehalase, TRE) 基因表达的激素调控

TRE 能使血液中的海藻糖分解成葡萄糖, 葡萄糖进入卵母细胞进一步合成糖元诱导卵滞育, TRE 是滞育激素调控代谢过程中的关键酶。

家蚕 TRE 基因表达调控进行了初步研究。体内和体外的生物学分析结果表明, DH 能诱导 TRE 活性的增加。进一步的研究表明, 将 DH 注射进除去咽下神经节 (SG) 的蛹体, 卵巢内 TRE mRNA 增加 7 倍, 不除 SG 的蛹 TRE mRNA 仅增加 3 倍。体外保育卵巢证实 DH 能提高 TRE mRNA 水平。以上结果表明 DH 是通过促进 TRE 基因转录来提高 TRE 的数量, 从而达到提高酶活性, 最终改变代谢途径, 诱导卵滞育 (Su et al, 1994; Ikeda et al, 1993)。

1.4 家蚕基因启动子调控序列的研究进展

经过人类数千年的驯化, 家蚕成为适应于人工大面积饲养的经济昆虫, 提供纯天然的蛋白质纤维, 被誉为“纤维皇后”。为了选育高质量、高产量的蚕品种, 其经典遗传学研究较为透彻, 191 个突变体标志基因定位于 28 个连锁群 (吕鸿声, 1991)。近十年来, 国内外学者先后构建了基于各种分子标记技术的分子连锁图谱, 如 RAPD 分子标记、AFLP 分子标记 (amplified fragment length polymorphisms)、RFLP 分子标记 (Restriction fragment length polymorphisms)、微卫星分子标记 (Microsatellites) 等 (Promboon et al, 1995; Yasukochi, 1998; Tan et al, 2001; Shi et al, 1995; Reddy et al, 1999)。

近几年, 我国科学家向仲怀小组构建了家蚕不同组织、不同发育阶段的 cDNA 文库, 开展大规模 EST (expression sequence tag) 测序分析, 在国际上首次获得 10 万条以上的 EST 序列。日本科学家 K. Mita 等构建 36 个 cDNA 文库, 获得 35000 条 EST 序列 (Mita et al, 2003)。家蚕基因组大小, 据 DNA 解离动力学法估算为 530Mb, 而最近用流式细胞计量技术方法估算为 450Mb 左

右(Gage 1974; Mita et al, 2004), 共含有 2 万多个基因。2003 年年底, 向仲怀院士领导的中国科学家小组运用全基因组霰弹法(Whole genome shotgun)完成了 6 倍于家蚕基因组的 DNA 测序工作, 构建了 95.54% 的覆盖率的家蚕基因组框架草图(Silkworm genome work draft map), 据初步注释(Annotation)得到 16948 个完整基因, 7285 个基因片段(黄, 2004)。2004 年年初, 日本科学家 K. Mita 等采用相同的方法完成了 3 倍于家蚕基因组的 DNA 测序工作, 构建了 75-86% 的覆盖率的家蚕基因组框架草图(Mita et al, 2004)。

随着家蚕基因组的测序完成, 进入后基因组时代。通过家蚕基因组的结构与功能的深入研究, 才能从分子水平阐明家蚕生长、发育、分化、性别控制等生命现象, 为阐明家蚕的蚕丝蛋白合成、蚕丝品质与产量、抗逆性与抗病性等重要经济性状的分子机理打下基础, 为用转基因等方法提高家蚕的经济性状满足人们的需求奠定基础。同时家蚕是鳞翅目昆虫的模式昆虫之一, 而鳞翅目昆虫是农业害虫中最主要的类群, 因而家蚕的上述生命现象的解明, 为鳞翅目害虫的防治, 特别是生物防治, 提供有意义的借鉴作用(黄, 2004)。基因的表达调控研究是家蚕基因结构与功能研究的主要内容, 而启动子是控制基因转录表达的调控序列。近二十年来, 有关学者采用体外转录系统、转染系统、转基因系统对一些家蚕基因启动子的调控序列功能特性进行了研究, 现简要综述如下。

1.4.1 丝素基因启动子

家蚕的丝素在后部丝腺表达分泌, 由轻链(25kDa)和重链(350kDa)经二硫键连接而成(Yamaguchi et al, 1989)。两条链分别由相应的 Fib-L、Fib-H 基因编码, 各自位于第 14、25 连锁群上(Kimura et al, 1985)。

Fib-H 基因部分序列首先由 Tsujimoto 等人(1979)克隆测序。由于第二外显子的结构特殊性, 重复序列特别多, 直到 2000 年由 Zhou 等人采用基因霰弹法结合 EST 库才完成完整的基因结构序列的测序工作。Fib-H 基因是由两个外显子和一个内含子组成。采用体外转录体系, 用后部丝腺细胞的核抽提物对 Fib-H 基因启动子调控区域(-240+24)进行凝胶阻滞分析表明, 体外转录活性最大时需要 5 个区域, 即 A、B、C、D、E 区, 在最接近编码区的 A 区发现结合有丝腺特异因子 SPF1 和泛在因子(ubiquitous factor) FBF-A1, 而 B 区却只能与 SPF1 结合, 离编码区较远的 C、D、E 区上结合后部丝腺特异因子 SPF2 和遍在因子 SPF3、SPF4。与家蚕其他丝蛋白基因以及天蚕重链基因的调控区域相比较发现, 共同存在 SGF-1 结合位点, 因而推测 SGF-1 对丝物质合成起到重要作用(Hui et al, 1990)。另外在 C、D、E 区含有 TCAATTAAAT 同源异型蛋白(homeodomain protein)的结合位点, TAAT 基序对结合 SPF2、SPF3、SPF4 因子十分重要。SGF3 的结合位点也存在于丝胶基因的调控区, 推测其对丝胶基因的表达也可能起到调控的作用。

采用体外转录体系, 1997 年 Takiya 等人对 Fib-H 基因的第一内含子调控区的顺式作用元件进行了检索, 发现存在大量八聚体 AT 富集区, 与 FMBPs(fibroin-modulator-binding proteins)因子特异性结合。在丝腺中主要有三种 FMBPs, 即 FMBP1、FMBP2 和 FMBP3。FMBP2 属于 Bm Fkh(Fork head homologue), FMBP3 属于 POU-M1(POU-domain protein)。这两种因子在幼虫的后期以及胚胎发育阶段都有时空特异性表达, 与 Fib-H 的表达不存在直接相关性。而 FMBP1 表达与 Fib-H 的时空特异性表达存在正相关。上述因子与 Fib-H 上游调控区相关元件也能结合。体外转录表明, 用寡聚核苷酸去竞争这些因子可以抑制顺式作用元件对基因转录的增强功能。上述结

果暗示在丝腺的发育过程中, Fib-H 基因的表达受到这些因子的联合协调调控。

由于 Fib-H 基因的启动子属于松散型启动子(Nony et al, 1995), 离基因很远的区域也可能存在顺式作用元件。2003 年 Zhou 等人对 Fib-H 基因的 80Kb (包括上游 62Kb) 序列进行了测定, 发现 62Kb 上游区 30% 的序列为重复序列, 包括 Bm1, L1Bm, 类似水手转座子元件 (MLE)。位于家蚕幼虫血清蛋白基因 (Bombyx mori larval serum protein gene, *BmLSP*) 上游调控区的 MLE 对其启动子活性有一定的抑制作用 (Tang et al, 2003)。另外在上游区还富含 MAR 基序 (matrix association region motifs), 共发现 24 个, 内含子中有一个, 可能与染色质拓扑结构有关。推测这些元件可能形成一个巨大的顺式调控区, 对 Fib-H 基因的表达时空特异性以及表达效率起到关键作用 (Zhou et al 2003), 这有待于进一步阐明。另外, Fib-H 基因在丝腺内超常规表达可能还与丝腺细胞是多倍体, 染色质呈现高度超螺旋结构有关 (Hirose et al, 1988)。

Fib-L 基因结构由 Kikuchi 等人在 1992 年完成, 由 7 个外显子和 6 个内含子组成, 长度共为 13472bp, 其中第一内含子占 60% 左右。第一内含子中含有大量的重复序列 (包括 Bm1, L1Bm、GTATCA、GTATCA 等) 和一些同家蚕 P25 基因、Fib-H 基因、贮藏蛋白 SP2 基因等相关序列的同源性较高的序列。通过体外转录系统以及与 Fib-H 相关序列比对表明, 在 Fib-L 基因的上游区存在大量同源区, 特别是存在顺式作用元件的调控区域。有关 Fib-L 启动子中转录调控元件的研究没有 Fib-H 多, 有待于进一步的研究。由于 Fib-L 基因结构比 Fib-H 基因理想, Fib-L 基因启动子在定位转基因家蚕中得到广泛应用。利用第 7 外显子两个臂进行同源重组, 产生 Fib-L 和目的蛋白的融合蛋白, 可以在家蚕分泌的丝物质里获得目的蛋白 (Yamao et al, 1999; Tomita et al, 2003)。

1.4.2 丝胶基因启动子

丝胶是包裹在丝素外面的一类蛋白质, 在家蚕中部丝腺合成 (吕鸿声, 1991)。目前已经克隆了两个丝胶基因, 即 Sericin-1 和 Sericin-2 基因(Okamoto, 1982; Michaille, 1990)。因发育阶段或组织空间的不同, 丝胶 mRNA 成熟过程中进行不同剪接, 可以形成不同的成熟 mRNA, Sericin-1 基因可以形成四种长度分别为 10.5, 9.0, 4.0, 5.8kb 的 mRNA (Matsuno et al, 1989), Sericin-2 基因可以形成两种长度分别为 6.4, 3.1kb mRNA, (Michaille et al, 1990), 因而在家蚕丝物质里存在多种丝胶。但目前到底有多少种丝胶基因还未完全确定。目前研究较为深入的是 Sericin-1 基因。Sericin-1 基因是由至少 5 个外显子和 4 个内含子组成 (Okamoto et al, 1982), 进一步研究表明其由 9 个外显子和 8 个内含子组成 (Garel et al, 1997), 核心启动子区含有 TATA 盒等元件, 启动子调控区存在与 Fib-H 基因的同源序列, 如-111—186bp 区与 Fib-H 基因相应的区域(Okamoto, 1982)。Matsuno 等人用中部丝腺细胞核抽提物, 利用体外转录体系和缺失启动子调控元件的方法进行了 Sericin-1 启动子调控区 (+165- -1400bp) 的研究。结果表明启动子区至少存在 3 个转录因子结合位点, 即 SA (-103- -85bp)、SB (-149- -135bp) 和 SC (-204 -183bp); 缺失 SA 和 SB 减弱启动子的活性, 与 SA 结合的转录因子 SGF1 是丝腺特异性的, 而与 SC 结合的蛋白因子 SGF3 在中部丝腺大量存在; 与来自后部丝腺细胞核抽提物相比, 中部丝腺的更能增强 SC 序列对启动子的活性。通过点突变 SC 区, 发现其不再与 SGF3 结合。上述结果表明 SC 结合因子 SGF3 对丝胶基因在中部丝腺特异表达有举足轻重的作用 (Matsuno et al, 1989; 1990)。

体外转录研究还表明, SGF3 与 POU-DM1 因子形成复合体后再与 SC 区结合, POU 因子是

控制发育相关基因表达调控的保守的反式作用因子 (Fukuta et al, 1993)。而采用免疫组化法和原位杂交等方法,在胚胎发育阶段以及幼虫阶段,活体内比较 SGF3/POU-DM1 因子与 Sericin-1 转录本之间的关系,发现在胚胎 26 期,在中部丝腺检测到 Sericin-1 转录本,而此时 SGF3/POU-DM 存在于整个丝腺,在中部丝腺却呈下降趋势,整个幼虫期也呈现相同的趋势。尽管在体外转录结果认为 SGF3/POU-DM 是正调控 Sericin-1 基因的表达,但活体体内结果与之相反,推测可能还存在其他作用因子调控 Sericin-1 基因的转录 (Matsunami et al, 1998)。

1.4.3 P25 蛋白基因启动子

P25 蛋白是一种糖蛋白,以二硫键与丝素重链蛋白结合,以非共价键与丝素轻链蛋白结合,三者在后部丝腺的表达摩尔数比为 1:6:6,对丝物质的结构稳定性起到关键作用 (Inoue et al, 2000; Tanaka et al, 1999)。在取食时期家蚕丝腺后部丝腺特异性表达。以法国里昂大学 P Couble 研究小组为主对其启动子进行了系列研究。1985 年 P Couble 等克隆了 P25 基因以及启动子调控区,发现了其上游的调控区与丝素基因的相应区域同源性很高。首先用体外转录体系,用后部丝腺细胞的核抽提物对 P25 基因启动子的凝胶阻滞分析,发现了位于-59—71 序列与丝腺特异蛋白 (SGFB) 结合 (与丝素重链基因启动子的-166—-154 的相似) 和位于-133-124 序列与家蚕各组织广泛存在的 BMFA 蛋白结合 (Durand et al, 1992)。1995 年又发现了-320、-265、-240、-171、-155 位点分别与 TRIOa, b, c, UB2a, UB2b 的蛋白结合 (Nony et al, 1995)。构建由长度为 1450bp 的 P25 启动子调控区控制下报告基因 LacZ,通过 P-element 转基因体系转到果蝇,结果发现 LacZ 基因只能在转基因果蝇的幼虫唾液腺特异性表达 (Bello et al, 1990; Nony et al, 1995)。构建由 P25 启动子调控区控制下报告基因 LacZ 的报告质粒,用基因枪导入到家蚕丝腺,然后再重新植入家蚕体腔,表达 48 小时后,取出进行染色,发现 LacZ 只在后部丝腺表达,在中部丝腺与后部丝腺之间有一条明显的分界线,这表明在启动子区已经包含了 P25 基因表达调控所需的所有元件 (Horard et al, 1994)。

为什么 P25 只在后部丝腺表达呢? Horard 等采用 LMPCR 法对 P25 所在的染色质区域进行研究,表明,在 P25 基础转录启动子区域已经保证其在后部丝腺特异性表达,其中有两个蛋白质因子参与特异性调控,一个是上述的 SGFB。另外一个为 PSGF (后部丝腺特异性调控因子),它起到稳定 SGFB 的作用, P25 基因在后部丝腺表达。而在中部丝腺没有 PSGF 因子, SGFB 不稳定无法启动 P25 的表达 (Horard et al, 1997)。另外发现了 P25 基因的主要反式作用因子 *fhx*, 其通过对染色质的状态的调控来控制 P25 的表达,还与 P25 只在取食期表达有关 (Julien, et al, 2002)。

1.4.4 贮藏蛋白基因启动子

家蚕贮藏蛋白在幼虫脂肪体内合成,受体内激素滴度的调控,为蛹期和成虫期贮藏能量。主要有贮藏蛋白 1 (Storage protein, SP1)、SP2 和一类 30K 小分子量脂蛋白质 (Low molecular weight Lipoprotein, LP)。

SP1 是一种性别二态性 (sexual dimorphism) 蛋白,即在四龄之前,雌雄蚕体内都表达,而五龄期,只在雌蚕体内大量表达 (Izumi et al, 1988)。SP1 基因由 5 个外显子和 4 个内含子组成,核心启动子含有 TATA 盒、CAT 盒等元件,第一内含子含有类似 SV40 增强子的序列,在上游调控区含有 TTTCCAT---ATCGAAA 序列,为蜕皮激素受体复合物的结合位点 (Sakurai et al, 1988)。

用体外转录系统, 分别用 BmN 细胞核抽提物与五龄雌蚕脂肪体细胞核抽提物对 SP1 启动子进行了研究, 结果表明-44— +16 为核心启动子区, 能高保真转录报告基因 CAT, 但添加 BmN 细胞核抽提物的启动子转录活性明显低于添加脂肪体细胞核抽提物的 (Sakurai et al, 1990; Mine et al, 1995)。Suzuki 等人用 *piggyBac* 系统将 *Bmdsx^F* 基因转入家蚕体内, 发现在转基因家蚕五龄雌蚕的脂肪体内 SP1 mRNA 比正常雌蚕多 1.5 倍左右, 雄蚕脂肪体内 SP1 mRNA 比正常雄蚕多 10 多倍, 这一结果表明 SP1 基因启动子上游存在与 *Bmdsx^F* 的结合的顺式调控元件, 转录表达受到 *Bmdsx^F* 正调控 (Suzuki et al, 2003)。

SP2 是一种芳香族的蛋白质, SP2 基因由 5 个外显子和 4 个内含子组成, 核心启动子含有 TATA 盒等元件, 启动子上游调控区存在 SV40 增强子的核心序列 (GCCGTGGAAAG)。脂肪体组织特异性表达增强子序列 (-160- -238bp) 以及糖皮质激素受体结合位点核心区 (TGTCC) (Fujii et al, 1989)。

30KD 蛋白在幼虫血液里是一族蛋白, 受体内的保幼激素 (JH) 调控, 在五龄第 2 天检测到, 而后随着 JH 消失, 其表达量急剧上升。目前已经克隆 3 个基因, 即 6G1、21G1 和 19G1, 具有相同的基因结构, 都为 1 个内含子、1 个非编码的外显子和 1 个编码区的外显子, 推测这些基因可能由一个共同的祖先进化而来的。核心启动子区都含有典型的 TATA 盒, 上游区都有蜕皮激素的响应元件 (Mori, et al, 1991a; 1991b)。

在幼虫血液里还有另一种 30KD 蛋白, 幼虫血清蛋白 (Larval Serum Protein, LSP), *BmLSP* 从蚁蚕开始至五龄第三天之前各个龄期食桑阶段都有转录表达, 每个龄期的初期表达量较高, 到四龄眠期停止转录表达, 五龄饱食后 *BmLSP* mRNA 虽有转录, 但其丰度比四龄食桑期明显减少, 第三天后骤然下降至很低水平, 熟蚕时完全消失, 在蛹期、成虫期也未检测到 *BmLSP* mRNA, 因而 LSP 与家蚕幼虫期发育, 尤其是与眠、蜕皮相关的血清贮藏蛋白。LSP 基因结构为 1 个内含子、1 个非编码的外显子和 1 个编码区的外显子, 核心启动子区-30~-24 bp 的 TATAAAA 为典型的 TATA 盒; -73~-67 bp TGATAAA 为数种昆虫脂肪体内组织特异性表达基因的共有序列; -70~-144 bp 之间含有 ATTTTCTT-27-ACGGCTGAT 推定的激素响应元件。启动子上游调控区含有丝素轻链基因第一内含子区域 (7639~7933 bp) 同源序列, -914~-1383 bp 为失活的部分水手转座子元件 (Fujiwara et al, 1992; 唐等, 2003)。

1.4.5 卵壳蛋白基因启动子

家蚕卵壳蛋白是在卵形成最后阶段由滤泡细胞合成, 卵壳蛋白基因大约有 200 个, 是一个典型的超基因家族, 位于第二染色体上。从进化上可分为 2 个分枝, 即 α 、 β (Lecanidou et al, 1986)。按基因的表达先后可分为早期 (ErA/ErB)、中期 (A/B)、晚期 (HcA/HcB) 三种类型基因家族。卵壳蛋白基因都成对出现, 中间间隔约 300bp 的共同 5' 侧翼区, 涵盖了基因调控表达顺式作用元件, 具有双向启动子功能。目前对 HcA.12-HcB.12 基因对进行了较为详细的研究。

HcA.12-HcB.12 基因之间有长度为 272bp 的侧翼区, 各自基因上游-30bp、-31bp 处存在 TATA 盒, 卵巢细胞特异表达基因特有的顺式作用元件 (TCACGT), 另外还有在多个卵巢表达基因中含有的序列 EI (TTTTGAAAT)、EII (CAGAATTG) 等。分别缺失启动子区 A 区 (-53- -87bp, 包含 EI、EII 区)、B 区 (-99- -133bp) 或 AB 区同时缺失, 以 CAT 作为报告基因, 通过 P-element 转基因体系转到果蝇, 发现 AB 区同时缺失时, 双向启动子的活性明显下降, 仅缺失 A 区时导致

启动子的特性改变,成为早期启动子特性,说明 B 区存在控制基因晚期表达的调控元件(Skeily et al, 1993);采用体外转录系统,对 HcA/B12 的基因启动子的顺式作用元件进行了研究,表明在 -56- -64bp, -84- -93bp 处有两个结合位点,分别与 BCFI 和 BCFII 因子结合。BCFI 因子先结合,对 BCFII 因子结合起到稳定作用,而且两者的复合体又是其他非特异转录因子结合的前提(Spoerel et al, 1991)。

将 HcA.12-HcB.12 整个基因对导入到家蚕杆状病毒基因组,并使重组病毒多角体蛋白的启动子失活,获得的重组病毒注射到所有 Hc 基因突变失活的家蚕蛹内,感染包括卵巢组织在内的所有内在组织器官。在卵巢细胞中发现 HcA.12 和 HcB.12 基因的 mRNA,表明这对基因之间的启动子片段涵盖了基因表达所需的顺式作用元件(Iatrou, 1990)。

另外,在晚期基因位点上基因发现了属于 β 分枝的 3 个早期家蚕卵壳蛋白基因 6F6.1、6F6.2 和 6F6.3,它们单个基因出现,并没有 α 分枝的基因对(Lecanidou et al, 1992 ;Kravariti et al, 1995)。为了确定 6F6.2 基因启动子的大小,Kravariti 等人(2001)克隆了约 160bp 片段,包括上游 138bp 和第一外显子的非编码区 16bp,以 LacZ 作为报告基因构建了报告质粒,采用基因枪法导入到化蛹第 7 天的卵巢细胞,在 Grace 培养基培养 48h 后,染色后发现只在早期卵着色,而对照 Hc12 在晚期卵着色,这结果表明克隆的启动子片段已经足以使基因的表达呈现时空特性,也就是说涵盖了启动子特异性表达所需的顺式调控元件。

最近,Iatrou 领导的研究小组正在从事卵巢内基因的表达调控受激素调控途径(Pathway)的研究,相信不久可以阐明激素对卵壳蛋白基因启动子的调控途径(Swevers et al, 2002)。

1.4.6 肌动蛋白基因启动子

肌动蛋白是存在于所有真核生物的细胞骨架中,进化上具有很高的保守性(Reisler, 1993)。家蚕肌动蛋白基因有 4 个,其中 2 个为肌肉细胞特有的肌动蛋白基因,Actin1、Actin2。另外两个为细胞质肌动蛋白基因,即 Actin3、Actin4,在所有的组织内都表达,但表达量有所差异,Actin3 在中肠组织中表达量高,而在表皮、丝腺、脂肪体组织中表达量较低,Actin4 恰好相反(Mounier et al, 1986, 1987 ;Mange et al, 1996)。目前对 Actin3、Actin4 基因研究较多,其基因结构为 Actin3 为 2 个内含子,一个非编码的外显子和 2 个编码的外显子,Actin4 为 3 个内含子,2 个非编码的外显子和 2 个编码的外显子。Actin3、Actin4 编码区只有两个氨基酸的突变,功能区相同,内含子区、启动子调控区以及 3' 区同源性都很高,这暗示两者是由一个较近的含有第一内含子的共同祖先基因进化而来的。核心启动子含有 TATA 盒,上游调控区和内含子区含有血清响应元件(CArG) 激活元件(ActE1)等调控元件。另外还发现 Actin4 的第一内含子具有启动子的特性,即 Actin4 可以产生两种 mRNA(Mange et al, 1996;1999)。

Mange 等(1997)人以 Actin3 基因上游 1893bp 和第一外显子区 85bp 的片段,PCR 法缺失一些上游调控元件的启动子,以 LacZ 作为报告基因构建系列缺失启动子片段的报告质粒,用阳性脂质体包埋报告质粒 DNA,转染 sf 细胞瞬时表达系统,48hpt 收集细胞,检测 β -gal 的活性,发现缺失-1893- -172bp 之间的启动子间的活性没有显著差异,表明这区域不含调控元件,而缺失-1893- -128bp,启动子活性突然升高 20 多倍,这说明在-171- -128bp 之间含有抑制 Actin3 基因启动子活性的元件(RA3);缺失-1893- -97bp 时,启动子活性遽然下降 100 倍,这同样暗示在-127- -97bp 区涵盖强激活元件;缺失-1893- -79bp 时, -96- -79 bp 包含 ActE1 元件,启动子活性下降 2

倍左右,表明其也激活 Actin3 的启动子活性;当上游调控区完全删除,只剩下外显子 85bp 时,检测不到 β -gal 的活性。以上结果表明 Actin3 基因启动子上游调控区含有两个相邻的调控区(-171- -128bp, -127- -97bp),分别正、负调控启动子的活性。

为了确证-171- -128bp 调控区,构建了仅缺失-173- -128bp 区域的启动子,发现其活性升高 22 倍,与上述缺失-1893- -128bp 结果一致;进一步缺失确定-171- -128bp 调控区,构建仅缺失(-173- -151bp)、(-150- -141bp)和(-140- -128bp)片段的启动子,发现其活性分别增加 4、2、3 倍左右,这表明该区含有多个负顺式作用元件。以丝腺细胞核抽提物对该区段竞争凝胶阻滞法确定了 10 碱基基序(RAs),即 AAAAGATGCG,

以丝腺细胞核抽提物,采用竞争凝胶阻滞法,在-127- -97bp 区确定了一个回文序列基序,(CCATATATGG),在脊椎动物中为血清响应元件(SRE)。构建突变 SRE 基序的 3 个碱基,导致启动子活性下降 80%,从这推断 SRE 基序结合血清样因子,增强启动子活性。采用 LMPCR 法对后部和中部丝腺的染色质区域进行原位杂交,结果表明至少有 100000 个 Actin3 基因拷贝与血清样因子结合,推测该基因在丝腺中表达受到与 RAs 基序结合的因子和血清样因子这两种相互拮抗因子的调控(Mange et al, 1997)。

由于 Actin 基因启动子区域较为紧凑,调控区研究比较透彻,在各种组织器官内都能转录表达,基于这些优势,Actin3, 4 基因的启动子广泛应用于细胞稳定表达系统和转基因家蚕中驱动外源目的基因(Fatyol et al, 1998; Imamura et al, 2003)。

1.5 小结

基因的表达调控是分子生物学领域的热门课题,特别在人、水稻、家蚕等生物体的基因组全序列的完成后,在诠释这些由 ATCG 组成“天书”,如何起到生物学功能?控制基因表达的启动子及其调控序列可以说是起到开关的作用。启动子的功能特性研究,可以解释基因的表达与否的原因,同时也可以从启动子调控序列的相关性中找出各基因协调表达的机理。

家蚕基因组测序工作由中国、日本科学家先后独自完成,这为进一步的家蚕分子生物学研究提供了坚实的基础平台。如前述,启动子及其调控序列的研究是热门课题之一,国外有关学者先后对部分家蚕基因启动子调控区已经进行了研究,解析了基因表达的调控途径,获得了一些很有意义的结果,如 *Fib-H*、*Fib-L*、*P25* 基因的按比例协调表达的机理等基础研究结果,这不仅丰富了基础分子生物学的内涵,同时为应用提供了技术支撑,如 *Fib-L*, *Actin3* 等启动子研究结果应用到转基因昆虫中,产生了巨大的经济价值。而我国作为蚕桑大国,在这方面的研究可以说还基本处于空白状态。因而很有必要在这方面开展一些研究。

家蚕是一种完全变态的鳞翅目的代表模式昆虫,它的生长发育变态受到体内激素协调调控,而激素起作用的最终途径是控制基因的表达与否或者效率的高低,因而激素与家蚕基因启动子活性之间的关系值得探讨研究。

第二章 研究目的与内容

2.1. 研究目的与意义

血液蛋白对昆虫的发育、繁殖有重要生理意义。家蚕血液蛋白可分为四类,即载脂蛋白(Lipoprotein)、卵黄原蛋白(Vitellogenin, Vg)、贮藏蛋白质(Storage protein, SP)和30K小分子量脂蛋白质(Low molecular weight Lipoprotein, LP)。LP是一组非伴性蛋白,可以分成15个种类以上,在雌雄体内都存在。大多数在五龄初期检测不到,第三天后急剧上升,吐丝期达最高,以后逐渐降低,羽化时消失(朱等, 1989; Kadono-Okuda et al, 1987)。但有一种分子量约为30K幼虫血清蛋白(Larval Serum Protein, LSP)与之相反,从蚁蚕开始至五龄第三天之前各个龄期食桑阶段脂肪体组织中都有转录表达,每个龄期的初期表达量较高,到四龄眠期停止转录表达,五龄饱食后*BmLSP* mRNA虽有转录,但其丰度比四龄食桑期明显减少,第三天后急剧下降至很低水平,熟蚕时完全消失,在蛹期、成虫期也未检测到*BmLSP* mRNA。*BmLSP*被认为是与家蚕幼虫期发育,尤其是与眠、蜕皮相关的血清贮藏蛋白(Fujiwara et al, 1990、1991、1992; Harshman et al, 1998)。因而*BmLSP*基因是从分子水平上研究家蚕幼虫期发育的理想基因(Fujiwara et al, 1992)。

如第一章所述,基因的表达受多个水平层次的调控,转录调控是最主要的一个环节,而启动子及其侧翼区的调控元件对基因的表达与否、表达量起到决定性的作用。*BmLSP*基因的调控序列,涵盖了第一内含子、第一外显子、启动子区和上游区。上游区还存在与家蚕丝素轻链基因第一内含子的高度同源区序列、失活的部分水手转座子元件等比较有意义的序列。上述可能的调控元件对*BmLSP*基因表达调控的作用还未进行过研究。家蚕幼虫期的发育是受激素调控,*BmLSP*基因与家蚕眠、蜕皮相关,那么昆虫激素对其启动子的转录是否起到调节作用值得探讨。上述问题的解析有助于阐明*BmLSP*基因的表达调控机理,同时为从分子生物学角度解析家蚕的变态行为提供借鉴。

*HSC70-4*基因是HSP70热激同源蛋白基因,主要是作为分子伴侣参与了蛋白质的折叠、跨膜运输、变性蛋白的重折叠、细胞蛋白的降解等细胞生命活动过程(Beckmann, et al, 1990; Deshaies, et al, 1988; Shei et al, 1992; Bercovich et al, 1997; Fink, 1999),对细胞在常态条件下维持正常的细胞生命活动、在一定时间的胁迫条件下也能生存下来具有重要生物学意义。一般来说,*HSP70*在常态下表达量极低,在胁迫条件下其转录与表达急剧增加。而*HSC70-4*在常态下能稳定表达,且表达量较高,在胁迫条件下表达量提高往往不明显(Craig, et al, 1983; Rybczynski, et al, 2000)。最近有报道*HSC70-4*的表达受到氨基酸类似物、蛋白体抑制剂、20-羟基蜕皮酮、双丁酰基cAMP、PTTH、保幼激素类似物(JHA)、4-苯基丁酸钠、乙醇等因子的影响,同时还受到各种细胞间信号影响(Hunt, et al., 1999; Rybczynski, et al., 2000; Rubenstein, et al. 2000)。*HSP70*与*HSC70-4*的表达还受到生物体的发育时期、组织的类型、细胞的周期等因素的影响(Craig, et al., 1983; Hung,

et al., 1998; Hunt, et al., 1999 ; Rinehart, et al., 2000 ; Rybczynski, et al., 2000; Karouna-Renier, et al., 2003)

r06 家蚕品种的 *HSC70-4* 基因已经克隆, 并对其特性进行了初步研究 (Lee et al , 2003)。但对其启动子的转录活性是否受到热激处理、冷激处理、发育阶段以及激素等因素影响, 目前还未开展研究。作为血缘关系最近的野桑蚕, 与家蚕最大的区别在于生存环境的恶劣, 那么它的 *HSC70-4* 基因启动子的功能特性又是如何? 与抗逆性是否相关? 同时结合本实验室现有的源于家蚕杆状病毒超强增强子 *hr3*, 进行了 *HSC70-4* 启动子/*hr3* 增强子表达组合的转录活性的研究。这些工作的开展旨在解明源于家蚕与野桑蚕的 *HSC70-4* 基因启动子的功能特性, 为 *HSC70-4* 启动子在细胞稳定表达系统或转基因家蚕的应用奠定一定的基础。

2.2 研究内容

2.2.1 家蚕、野桑蚕幼虫血清蛋白基因 (*LSP*) 启动子的特性分析

- 1、通过 PCR 法从家蚕、野桑蚕基因组 DNA 中克隆 *LSP* 启动子 5' 侧翼区, 测序
- 2、DNASTar 软件分析家蚕、野桑蚕之间的差异
- 3、NCBI 或 MatInspector 软件检索, 推测可能的顺式调控元件及同源序列
- 4、PCR 法和限制性内切酶法构建一系列缺失不同调控区 *BmLSP* 启动子
- 5、构建上述启动子控制下的 *Luc* 为报告基因的质粒
- 6、由脂质体介导将报告质粒导入家蚕 BmN 细胞, 进行瞬时表达
- 7、细胞培养基添加外源蜕皮激素 (MH) 保幼激素类似物 (JHA)
- 8、检测 *Luc* 活力, 确定不同调控元件、MH、JHA 对 *BmLSP* 启动子活性的影响。

2.2.2 家蚕、野桑蚕热激同源蛋白 70-4 基因 (*HSC70-4*) 启动子的功能特性分析

- 1、通过 PCR 法从家蚕、野桑蚕基因组 DNA 中克隆 *HSC70-4* 启动子 5' 侧翼区, 测序
- 2、DNASTar 软件比较家蚕、野桑蚕之间的差异
- 3、NCBI 或 MatInspector 软件检索, 推测可能的顺式调控元件及同源序列
- 4、构建 *BmHSC70-4*、*BmandHSC70-4* 基因启动子控制下的 *luc* 为报告基因的质粒
- 5、由脂质体介导将报告质粒导入家蚕 BmN, sf21 细胞, 四、五龄家蚕进行瞬时表达
- 6、热激处理细胞或 MH、JHA 处理、热激处理、冷激处理家蚕
- 7、检测 *Luc* 活力, 确定不同处理对 *BmHSC70-4*、*BmandHSC70-4* 启动子活性的影响。

2.2.3 家蚕杆状病毒 *hr3* 对 *BmHSC70-4*、*BmandHSC70-4* 启动子活性的增强功能

- 1、由 *BmHSC70-4*、*BmandHSC70-4* 启动子控制下 *luc* 报告基因下游接入 *hr3* 片段
- 2、由脂质体介导将报告质粒导入家蚕 BmN 细胞, 五龄家蚕进行瞬时表达
- 3、MH、JHA 处理五龄家蚕
- 4、确定 *hr3* 对 *BmHSC70-4*、*BmandHSC70-4* 启动子活性的影响, 以及不同处理对 *HSC70-4/hr3* 启动子组合的转录活性的影响。
- 5、提出 *HSC70-4/hr3* 启动子组合在细胞稳定表达系统或转基因家蚕应用的可能的途径

第三章 一般实验材料和方法

3.1 实验材料

3.1.1 昆虫细胞、家蚕与野桑蚕

昆虫细胞 Sf-21, Bm-N 为农业部家蚕生物技术重点开发实验室保存。

本实验所采用的家蚕品种有苏·菊×明·虎为农业部家蚕生物技术重点开放实验室提供。野桑蚕采集于江苏省镇江市中国农业科学院蚕研所桑园。

3.1.2 昆虫激素

昆虫蜕皮激素 20- β -羟基蜕酮(20- β -hydroxyecdysone)由中国农业科学院蚕业研究所研制,保幼激素类似物 ZR512 由山东农业大学崔为正教授惠赠。

3.1.3 质粒和菌种

受体菌 *E. coli* TG1, JM109, 质粒 Bluescript-SK(M13), 含 BmNPV-ZJ8 同源重复序列 (homologous region) *hr3* 质粒 pSK-*hr3* 及含完整萤火虫荧光素酶基因的质粒 pUL220 均为中科院上海生物化学研究所吴祥甫教授提供。pGEM-3Z 购自 Promega 公司。

3.1.4 酶试剂及试剂盒

各种限制性内切酶, T4 DNA 连接酶, Klenow 酶, *Taq* DNA 聚合酶及其配套缓冲液均为 GIBCO-BRL 公司产品; RNaseA 为上海丽珠东风生物技术有限公司产品; 蛋白酶 K 购自 Merck 公司。GeneClean 试剂盒、细胞抽提及荧光素酶检测试剂盒(E4030)为 Promega 公司产品。

3.1.5 其它主要试剂

TC-100 昆虫细胞培养基、胎牛血清(FBS)、Lipofectin 试剂均为 GIBCO-BRL 公司产品; X-gal 为 Boehringer Mannheim 公司产品; 琼脂糖为 Serva 公司产品; SDS 为 BDH 公司产品; Tris 购自 Sigma 公司; 蛋白胨、酵母抽提物购自 OXOID 公司; 溴化乙锭(EB)、考马斯亮兰 G250、R250 均购自 Fluka 公司; dNTPs、10 kD protein ladder 为 GIBCO-BRL 公司产品; 牛血清白蛋白购自东风丽珠公司; λ DNA/HindIII 标准分子量购自华美生物工程公司; 丙烯酰胺、N,N'-甲叉双丙烯酰胺为 Aldrich 化学有限公司产品; 琼脂粉为日本进口分装; Sepharose 2B 购自 Pharmacia 公司; 阳离子脂质 DDAB 及中性辅助脂质 DOPE 购自 Sigma 公司。各种寡核苷酸引物均由上海生物工程公司合成。细胞培养用无机试剂如 NaCl、KOH、NaHCO₃ 等购自 GIBCO-BRL 公司。细胞培养用抗生素等购自华北制药股份有限公司。其它试剂均为进口或国产分析纯级。

3.1.6 细菌培养基

LB 液体培养基的配制:

10 g 蛋白胨, 5 g 酵母抽提物, 10 g 氯化钠, 加去离子水溶解, 用 NaOH 调 pH 至 7.0~7.5,

定容至 1 000 ml。

LB 平板：LB 液体培养基中加入 1.5% 琼脂粉。

3.1.7 昆虫细胞培养基

1) 1×TC-100 培养基的配制：

按 GIBCO-BRL 公司产品说明书进行。

将 1 个包装(1×1 L)TC-100 粉剂边搅拌边加到双蒸水中；

加 0.35 g NaHCO₃，缓慢用 5 N KOH 调整 pH 至 6.1~6.2；

补加 1.1 g NaCl 调节渗透压；

补加双蒸水至 900 ml，0.22 μm 滤膜过滤除菌；

使用前添加 10% 经 56℃ 灭活 30 min 的胎牛血清、链霉素(终浓度为 100 μg/ml)及青霉素 G 钠盐(终浓度为 100 U/ml)。

2) 1×TNM-FH 培养基的配制：

将 1 个包装(1×1 L)Grace 粉剂溶于双蒸水中；

加入 3.3 g 水解乳蛋白及 3.3 g 酵母抽提物；

调整 pH 6.1~6.2 并补加双蒸水至 900 ml，0.22 μm 滤膜过滤除菌；

使用前添加 10% 经 56℃ 灭活 30 min 的胎牛血清、链霉素(终浓度为 100 μg/ml)及青霉素 G 钠盐(终浓度为 100 U/ml)。

3.1.8 常用溶液及缓冲液

1) TE Buffer

pH 7.4：10 mmol/L Tris-HCl(pH 7.4)，1 mmol/L EDTA(pH 8.0)。

pH 7.6：10 mmol/L Tris-HCl(pH 7.6)，1 mmol/L EDTA(pH 8.0)。

pH 8.0：10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)，1 mmol/L EDTA(pH 8.0)。

2) 碱法质粒抽提液

溶液 I(Sol. I)：50 mmol/L 葡萄糖，25 mmol/L Tris-HCl，10 mmol/L EDTA(pH 8.0)。

溶液 II(Sol. II)：0.2 mol/L NaOH，1% SDS。

溶液 III(Sol. III)：3 mol/L NaAc，pH 4.8。

3) PPT Buffer

22 倍体积异丙醇，1 倍体积 5 mol/L 醋酸钾，2 倍体积双蒸水。

4) New Wash

20 mmol/L Tris-Cl pH 7.4、1 mmol/L EDTA 及 100 mmol/L NaCl 与等体积的无水乙醇配制而成。

5) 6 mol/L NaI 溶液

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。

6) 玻璃奶(Glassmilk)

100 mg/ml 的 Silica(Sigma S-5631)。将 10 g Silica 溶于 100 ml 1×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。

7) 1×PBS(不含 Mg^{2+} 和 Ca^{2+})

137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 4.3 mmol/L Na_2HPO_4 , 1.4 mmol/L KH_2PO_4 , pH 7.3。

8) 50×电泳缓冲液(TAE)

242 g Tris, 57.1 ml 冰乙酸, 100 ml 0.5 mol/L EDTA (pH8.0), 定容至 1 000 ml。

9) 10×电泳缓冲液(TBE)

1.0 mol/L Tris-HCl, 0.83 mol/L 硼酸, 10 mmol/L EDTA (pH8.0)。

10) 凝胶上样缓冲液

25%甘油或 40%蔗糖, 0.25%溴酚蓝, 0.25%二甲苯青 FF。

11) 家蚕基因组 DNA 抽提液

A : 0.25mol/L Sucrose, 10 mmol/L EDTA, 30mmol/L Tris, pH7.5。

B : 10mmol/L Tris, 10 mmol/L EDTA, 0.15mol/L NaCl, 1% Sarcosyl, pH7.5。

12) 标准蛋白试剂

牛血清白蛋白(BSA)溶液: 用 0.15 mol/L NaCl 配制成 0.5 mg/ml, 作为标准蛋白。

13) BB buffer

0.2 mol/L Tris (use 1 mol/L stock, pH7.6 at 4℃), 0.2 mol/L NaCl, 0.01 mol/L 2-mercaptoethanol, 5% glycerol。

14) Z buffer

0.06 mol/L Na_2HPO_4 , 0.04 mol/L NaH_2PO_4 , 0.01 mol/L KCl, 0.001 mol/L MgSO_4 , 0.05 mol/L β -巯基乙醇, 调节 pH 为 7.0。

15) ONPG(邻硝基- β -D-半乳吡喃糖苷)

溶于 0.1 mol/L 磷酸钠(pH7.5)的 4 mg/ml ONPG 溶液。

16) $100\times\text{Mg}^{2+}$ 溶液

0.1 mol/L MgCl_2 , 4.5 mol/L β -巯基乙醇。

17) 脂质体的制备

DDAB/DOPE(Sigma 化学公司产品)脂质体(摩尔比为 1:2)按如下方法制备：

6.6 $\mu\text{mol/L}$ DDAB 和 13.4 $\mu\text{mol/L}$ DOPE 溶解在 1 ml 无水乙醇中；

取 142 μl 在旋涡振荡的情况下迅速注入到 858 μl 灭过菌的双蒸水中。终浓度为 2 mg/ml。

该脂质体在 4℃ 下可以稳定保存 6 个月以上。

18) 家蚕基因组 DNA 抽提液

抽提液 A：

0.25 mol/L Sucrose

10 mmol/L EDTA

30 mmol/L Tris pH 7.5

抽提液 B：

10 mmol/L Tris

10 mmol/L EDTA pH 7.5

0.15 mol/L NaCl

1% Sarcosyl

配置后在 4℃ 下可以稳定保存。

3.1.1.9 所用主要仪器和设备

SANYO 细胞培养箱，无菌操作台，Milli-Q 超纯水装置(Millipore 公司)，加压不锈钢过滤灭菌装置，Olympus 倒置显微镜，PTC-100^{TC} 型 PCR 仪(MJ Research Inc., USA)，Beckman L5-65B 超速离心机，日立低温高速离心机，Beckman LS-6000TA 液体闪烁计数器，岛津 UV-260 双光束紫外分光光度计，双波长薄层扫描仪，电泳凝胶干燥系统，多功能电泳图谱数据处理系统，Kodak DC120 数码成像分析系统，高性能计算机及 PC Gene 软件等。

3.2 一般实验方法

3.2.1 细胞的传代

在待传代的培养于 15 cm^2 方瓶中，倾去旧培养基，加入新鲜培养基，用弯头吸管吹打贴壁细胞，使其脱落，按照 1:2~3 的比例(根据细胞密度)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。

3.2.2 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 $0.5\sim 1.0\times 10^7$ /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, 使 DMSO 的终浓度为 10%), 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。

3.2.3 细胞的复苏

迅速取出液氮中冻存的细胞, 置于 37℃ 水浴中, 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 培养瓶中的新鲜的冷(4℃)的 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, 再将其置于 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^[26] 操作手册进行。

3.2.4 细胞计数

用血球计数板作细胞记数, 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)。

3.2.5 功能质粒由脂质体介导在昆虫细胞中的转染

接种约 $0.5\sim 1\times 10^6$ 细胞于 15 cm² 培养瓶中, 贴壁培养过夜;

除去含 FBS 的培养基, 用无血清培养基洗细胞二次, 再加 1 ml 无血清培养基;

在 100 μ l 反应体系中加入 1 μ g 质粒 DNA 和适量的阳离子脂质体 DDAB/DOPE 或 Lipofectin, 轻轻混匀以制成转染液, 27℃ 温育 15 min 使 DNA 被脂质体包埋后, 逐滴加入培养瓶中, 边加边摇匀;

4 h 后倾去含转染液的无血清培养基, 补加 3 ml 含 FBS 培养基;

27℃ 培养适当时间收集细胞, 用于瞬时表达分析。

在作转染实验时, 若需要用穿梭质粒作校正时, 在制备转染液时, 按 Lipofectin : 质粒 DNA = 3~5 μ l:1 μ g 的比例混合。

3.2.6 功能质粒在细胞和家蚕幼虫中的转染、瞬间表达及激素处理

按 GIBCO-BRL 公司产品说明书进行细胞转染。

以 $0.5\sim 1\times 10^6$ cells/ml 的密度接种细胞于 15 cm² 方瓶(1 ml 接种母液/瓶), 27℃ 培养箱中培养 24 h 使细胞完全贴壁生长;

预先将质粒 DNA 和 Lipofectin 按比例混合, 27℃ 温育 15 min 使 DNA 被脂质体包埋;

倾去已完全贴壁生长细胞的上清, 无血清培养基洗二次, 再加入 1 ml 无血清培养(含已被脂质体包埋的质粒 DNA)转染细胞 4~6 h;

倾去转染液, 加入 3 ml 含 10%FBS 的 TC-100 培养基;

在 3 ml 正常培养基中加入一定量的蜕皮激素或 JHA 使终浓度达到文章中所要求的,添加相应量的超纯水为对照。同时以转染含有 *Luc* 基因无启动子的质粒 pUL220 的细胞作空白对照,每组试验至少重复 3 次;

27 下培养 48 h 后收集细胞,准备进行荧光素酶活性测定。

类似地,每头家蚕在五龄蜕皮后的不同阶段注射 10-20 μ l 含 5 μ l 脂质体和 1 μ g DNA 的转染液,使报告质粒能被脂质体导入蚕的血淋巴细胞。在家蚕饲养和蚕丝业生产中,传统的昆虫激素的使用方法是將一定浓度的蜕皮激素喷洒在桑叶上喂食或將一定浓度的 JHA 体喷蚕体以增加丝产量。所以本研究采用此法对五龄家蚕幼虫在不同的时间进行激素的不同处理。蜕皮激素的不同处理:在五龄蜕皮后的不同时期,在 DNA 转染前 12 h 每头蚕直接注射不同剂量的蜕皮激素;保幼激素处理:在 DNA 转染前 12 h 体喷一定浓度 JHA 于蚕体表面。无菌水处理作为对照。每个处理由 3 组组成(选择具有相似重量的 3 头蚕为一组),每批实验重复 3 次。转染一定时间后,收集血淋巴,10 000 *g* 离心 5 min,收集血淋巴细胞,待测荧光素酶的活性。

3.2.7 功能质粒在细胞中的转染、瞬间表达及热激处理

细胞以约 $0.5\sim 1\times 10^6$ cells/ml 的密度接种于 15 cm^2 的方瓶置于 27 培养箱中培养,24 h 后,用 100 μ l 转染液(Lipofectin :质粒 DNA = 3~5 μ l:1 μ g)于 1 ml 无血清培养基中进行转染 4~6 h 后倾去上清,然后用 3 ml 正常培养基替换,于 27 培养箱再培养 7 h 后,再在 37 培养箱热激处理 2h。无热激处理为对照,每个转染均以 *ie-1* 控制下 β -gal 表达质粒作穿插质粒。在文中要求的时间收集细胞,准备荧光素酶活性的测定。

3.2.8 功能质粒转染后的四龄家蚕幼虫的热激处理

每头四龄家蚕在蜕皮后 24 h 注射 10 μ l 含由脂质体包埋的 1 μ g 质粒 DNA 转染液,质粒转染 30 h 后,再在 37 培养箱热激处理 2h。无热激处理为对照,36 hpt 后收集血淋巴细胞,经处理后进行酶活力的测定。

3.2.9 功能质粒转染后的五龄家蚕幼虫的热激处理

每头五龄家蚕在蜕皮后 24 h 注射 20 μ l 含由脂质体包埋的质粒 DNA 转染液,质粒转染 30 h 后,再在 37 培养箱热激处理 2h,无热激处理为对照,36 hpt 后收集血淋巴细胞,经处理后进行酶活力的测定。

3.2.10 功能质粒转染后的五龄家蚕幼虫的冷激处理

每头五龄家蚕在蜕皮后 24 h 注射 20 μ l 含由脂质体包埋的质粒 DNA 转染液,质粒转染 30 h 后,再在-15 冷藏箱冷激处理 15 min,无冷激处理为对照,36 hpt 后收集血淋巴细胞,经处理后进行酶活力的测定。

3.2.11 家蚕、野桑蚕基因组 DNA 的制备方法

将约 2g 的蚕丝腺或蛹,剪碎,加 10 mL 冷抽提液 A;

于组织研磨器在冰上充分研碎，用 3 层纱布滤去碎片；
滤液转移到离心管，在 1500g，4℃ 条件下离心 3min，弃去上清；
沉淀加适量的抽提液 B 悬浮，冰上放置 15 min；
用等体积的 TE 饱和酚抽提 1 次；
10000g 离心 7 min，取上清液；
然后用等体积的氯仿抽提 1 次，10000g 离心 7 min，取上清液；
加入 2 倍体积的无水乙醇沉淀 DNA；
沉淀用 75%乙醇洗涤，稍晾干；
溶于 0.1 × TE 缓冲液，加 RNA 酶消解 RNA 后于 -20℃ 保存备用。

3.2.12 DNA 浓度测定

作 DNA 定量时，应在 260 nm 和 280 nm 两个波长下读数。在 260 nm 的读数用于计算样品中的核酸浓度，OD 值为 1 相当于大约 50 μg/ml 双链 DNA 或 20 μg/ml 的单链寡核苷酸。可根据在 260 nm 以及 280 nm 的读数间的比值(OD_{260}/OD_{280})估计核酸的纯度。DNA 纯品的 OD_{260}/OD_{280} 值为 1.8，如果样品中污染有蛋白质或酚，其 OD_{260}/OD_{280} 将明显低于此值，此时无法对样品中的核酸进行精确定量。

3.2.13 基因组 DNA 的碱变性方法

用 ddH₂O 稀释基因组 DNA 浓度，使 32 μL 中含有 1.5-2.0 μg；
加入 8 μL 2 mol/L NaOH 溶液，轻轻转动试管，稍离心，室温放置 10 min；
加 7 μL 3M NaAc (pH 4.8) 和 4 μL ddH₂O，稍放置；
加入 120 μL 无水乙醇，充分混匀，置于冰上 15 min；
12000g 离心 15 min，收集 DNA 沉淀，控干；
用 70%冰乙醇轻轻洗涤沉淀，12000g 离心 10 min，收集 DNA 沉淀，控干；
重溶于 10 μL 0.1 × TE 缓冲液，-20℃ 保存备用。

3.2.14 PCR 反应

1、PCR 反应体系总体积：50 μL

ddH₂O：34.5 μL

10 × PCR 缓冲液：5 μL

Mg²⁺ (25mM)：3 μL

dNTP (2.5Mm)：4 μL

引物 1/2：1 μL/1 μL

模板：1 μL

Taq 酶：1 μL

充分混匀，稍离心，表面覆盖 50 μL 石蜡油。

2、PCR 反应条件：

94℃ 15 s，53℃ 1 min 30 s，72℃ 2 min 20 s，循环次数 30，最后在 72℃ 延伸 7 min。

具体参数有所调整，见文章中。

热启动 PCR：反应体系先不加 Taq 酶，94℃ 预变性 2min，在 1 min 45 s，暂停，取出，迅速放置-40℃ 1min，加 Taq 酶，稍离心，放回 PCR 仪，按照上述条件继续反应。

3.2.15 碱法少量快速抽提质粒 DNA

挑取单菌落接种于含 Amp 或 Kan(80 μg/ml)的 3 ml LB 培养基中，37℃ 振荡培养过夜；

取 1.5 ml 过夜培养物于 Eppendorf 管内，5 000 g 离心 5 min 收集菌体，弃上清；

用 100 μl Sol I 悬浮沉淀，室温下放置 5 min；

加 200 μl Sol II，轻轻倒转混匀，再加入 150 μl 氯仿，混匀后冰浴 5 min；

加 300 μl Sol III，倒转混匀后冰浴 5 min；

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；

12 000 g 离心 10 min，弃上清；

沉淀溶于 250 μl TER(含 20 μg/ml RnaseA 的 TE)中，37℃ 消化 20 min；

加入 350 μl PPT 沉淀 Buffer，混匀后置 4℃ 20 min；

12 000 g 离心 10 min，弃上清；

70%乙醇洗一次，真空干燥沉淀；

用 40 μl 0.1×TE(pH8.0)溶解，-20℃ 保存备用。

3.2.16 碱法大量制备质粒 DNA

单菌落接种于 3 ml LB 培养基，37℃ 振荡培养过夜；

取培养液 100 μl 接种于 100 ml LB 培养基中(含 80 μg/ml Amp 或 Kan)，37℃ 振荡培养 8-10h；

5 000 g 离心 5 min 收集菌体，弃上清；

加 3 ml Sol I，振荡悬浮沉淀，冰浴 10 min；

加 6 ml Sol II 轻轻倒转混匀，再加 800 μl 氯仿，冰浴 15 min；

加 9 ml Sol III，混匀后冰浴 20 min；

12 000 g 离心 10 min，上清加 0.6 倍体积异丙醇，混匀后于 4℃ 放置 20 min 以上；

12 000 g 离心 10 min，沉淀用 1 ml TE(含 20 μg/ml RnaseA)溶解；

37℃ 消化 15~30 min，加等体积的苯酚：氯仿/异戊醇(25:24:1)抽提一次；

用 Sepharose 2B 柱纯化质粒 DNA，在 260 nm 处收集第一吸收峰；

加 1/10 体积 3 mol/L NaAc (pH6.5)和 2 倍体积的无水乙醇，-20℃ 沉淀 DNA 1 h 以上；

12 000 g 离心 10 min，用 70%乙醇洗涤一次；

真空干燥沉淀，溶于 300~500 μl TE 中，测定 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 值，并计算 DNA 的浓度。

3.2.17 限制性内切酶反应

参照产品目录中各种酶的推荐条件，反应体系包含质粒 DNA 1~2 μg，1/10 体积的 10×酶反应缓冲液，酶量为 2~4 U/μg DNA，反应体积一般为 20 μl。在合适条件(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。

3.2.18 DNA 片段的分离与回收

1) 冻融法回收 DNA 片段

根据 DNA 片段大小, 选择适当浓度的琼脂糖凝胶进行电泳, 当准备回收的 DNA 片段与其它片段分开后, 在紫外灯下用手术刀切下所需条带, 放入小 Eppendorf 管中, 置于 -70°C 中 30 min, 然后于 37°C 温育 10 min 使凝胶融化。重复 1~3 次, $12\,000\text{ g}$ 离心 10 min, 吸出上清于 -20°C 保存。

2) 低熔点胶回收 DNA 片段

选择合适的低熔点凝胶电泳($3\sim 5\text{ V/cm}$), 切下所需的 DNA 条带, 置于 Eppendorf 管中, 加入 3 倍体积的 TE, 65°C 温育 10 min 使胶融化, 加入等体积的 37°C 预热的饱和酚抽提一次, 上清再用酚/氯仿、氯仿各抽提一次, 加入 1/10 体积的 $3\text{ mol/L NaAc}(\text{pH}6.5)$, 再加 2 倍体积无水乙醇沉淀回收 DNA。

3) 玻璃奶法纯化回收 DNA 片段

用普通凝胶进行电泳, 切下所需 DNA 条带, 称重后放入 Eppendorf 管中, 加入 3 倍体积(v/w) 的 6 mol/L NaI , 37°C 下使凝胶溶解, 再加入 $10\text{ }\mu\text{l}$ 玻璃奶吸附 DNA, 室温下放置 5 min, $12\,000\text{ g}$ 离心 5 s, 去上清, 沉淀用 New Wash 溶液洗涤 3 次, 晾干后用 $50\text{ }\mu\text{l TE}$ 溶解 DNA, 离心后取上清, 将 DNA 保存于 -20°C 备用。

3.2.19 DNA 的连接

连接总体积为 $10\text{ }\mu\text{l}$ 或 $15\text{ }\mu\text{l}$, 外源片段与载体的摩尔比一般为 $2\sim 3:1$, $5\times\text{T4 DNA}$ 连接缓冲液 2 或 $3\text{ }\mu\text{l}$, 若为粘末端连接, 加 T4 DNA 连接酶 $1\text{ }\mu\text{l}$, $12\sim 14^{\circ}\text{C}$ 连接 8 h 以上; 若是平头连接, 应加 $2\text{ }\mu\text{l T4 DNA}$ 连接酶, $18\sim 22^{\circ}\text{C}$ 连接过夜。

3.2.20 质粒 DNA 的转化

1) 感受态细胞的制备

-20°C 冻藏的 TG1 甘油菌在 LB 平板上复苏;

用灭菌牙签挑取单菌落, 放入 3 ml LB 培养基中, 37°C 振荡培养过夜;

取 $100\text{ }\mu\text{l}$ 过夜培养物接种到另一 3 ml LB 培养基中, 37°C 振荡培养 $2\sim 2.5\text{ h}$, 使 OD 值在 0.6 左右;

$5\,000\text{ g}$ 离心 4 min 收集菌体, 将菌体重悬于 $800\text{ }\mu\text{l } 75\text{ mmol/L}$ 冷 CaCl_2 中, 冰浴 30 min;

$5\,000\text{ g}$ 离心 4 min, 弃上清;

加入 $200\text{ }\mu\text{l } 75\text{ mmol/L}$ 冷 CaCl_2 , 轻轻敲打管壁, 使混合均匀, 冰上放 $4\sim 24\text{ h}$ 后用于转化。

2) 质粒 DNA 的转化

质粒 DNA $20\sim 100\text{ ng}$ 或连接混合物 $5\text{ }\mu\text{l}$ 加到 $200\text{ }\mu\text{l}$ 上述制备的感受态细胞中, 轻轻混匀, 冰浴 30 min;

再进行热休克(42°C 保温 2 min 或 37°C 保温 5 min), 迅速置冰上 $1\sim 2\text{ min}$, 加入 1 ml 已温育至 37°C 的 LB 培养基;

37°C 振荡培养 1 h, 稍离心, 去部分上清后涂布于数个含 $80\text{ }\mu\text{g/ml Amp}$ 的 LB 平板上。 37°C 倒置培养过夜。

3.2.21 重组质粒的鉴定

1) 快速细胞破碎法

构建后的质粒与原来的质粒分子量有一定差别时可用此法检出重组子(Beuken et al, 1998)。分别挑取多个单菌落转化子接种于 3 ml 含 80 $\mu\text{g/ml}$ Amp 的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养过夜;

取 500 μl 菌液于 Eppendorf 管中, 12 000 g 离心 10 秒, 弃上清;

加入 30 μl 缓冲液(6%蔗糖, 0.1%溴酚蓝), 再加入 20 μl 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。

2) 酶切鉴定

质粒 DNA 的快速抽提见本章 3.2.15。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。

3.2.22 细胞抽提物的制备

质粒 DNA 转染后 48 h 的细胞(或规定时间), 冰上收集细胞;

转移到 1.5 ml 离心管中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 以 12 000 g 离心 5 min, 去上清;

沉淀用 4 $\times$ 1 PBS 洗涤后两次;

加入 500 μl 裂解缓冲液(Promega 公司, 型号为 E4030)冻融一次以充分裂解细胞;

离心后取上清测定荧光素酶活力。

3.2.23 荧光素酶分析

取 100 μl 荧光素酶分析试剂于测定管中, 将方法 3.2.23 中制备的细胞抽提物根据要求用无质粒转染的细胞抽提液或细胞裂解液作适当稀释后, 取一定体积放入上述测定管中, 用 Tip 头快速抽吸 2~3 次使之混匀, 置于液体闪烁仪中测定 cpm 值, 测定温度为 25 $^{\circ}\text{C}$, 荧光素酶活力以 15 s 内所释放的光亮子数表示。将牛血清白蛋白配制成标准浓度的蛋白质(0.5 mg/ml), 用酶标仪进行蛋白质定量。

3.2.24 蛋白质浓度测定

取 96 孔点样板 1 块, 按照 1 个孔调零孔, 2 个孔标准蛋白孔, 每个待测样品占 2 个孔, 计算所需要的孔数, 每个孔 G-250 染料 50 μl ;

在调零孔中加入 20 μl 0.15M NaCl, 每个标准蛋白孔中加入 20 μl 标准蛋白溶液(0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 每个样品孔中加入 20 μl 细胞抽提物样品, 每次加入后用 Tip 头抽吸 2-3 下混匀; 用 DG3022A 型酶联检测仪在 590nm 下测定蛋白质含量。

3.2.25 β -半乳糖苷酶比活测定

穿梭载体校正系统 *E. coli* β -半乳糖苷酶比活测定:

- 1、份待测样品,混合 $100\times\text{Mg}^{2+}$ 溶液 $3\ \mu\text{l}$, $1\times\text{ONPG}$ (邻硝基- β -D-半乳糖苷) $66\ \mu\text{l}$, 细胞提取物(见 3.2.22) $30\ \mu\text{l}$, $0.1\ \text{mol/L}$ 磷酸钠(pH7.5) $201\ \mu\text{l}$;
- 2、 37°C 温育 30 分钟或出现淡黄色;
- 3、每套反应中加入 $500\ \mu\text{l}$ $1\ \text{mol/L}$ Na_2CO_3 中止反应,在 $420\ \text{nm}$ 波长读取反应混合液的光密度值;
- 4、在 β -半乳糖苷酶测定中,设置下列阳性和阴性对照:

	阳性对照 (μl)	阴性对照 (μl)
$100\times\text{Mg}$ 溶液	3	3
$1\times\text{ONPG}$	66	66
β -半乳糖苷酶 ($50\ \text{U/ml}$)	1	0
模拟转染细胞的抽提物	30	30
$0.1\ \text{mol/L}$ 磷酸钠	201	201

将大肠杆菌 β -半乳糖苷酶用 $0.1\ \text{mol/L}$ 磷酸钠(pH7.5)溶解配成 $3\ 000\ \text{U/ml}$ 的浓度。使用前将 $1\ \mu\text{l}$ β -半乳糖苷酶储存液转移至 $60\ \mu\text{l}$ $0.1\ \text{mol/L}$ 磷酸钠中。在阳性对照中取用 $1\ \mu\text{l}$ 稀释液($50\ \text{U/ml}$)。1 单位大肠杆菌 β -半乳糖苷酶定义为在 37°C 每分钟水解 $1\ \mu\text{mol}$ ONPG 所需酶量。

第四章 野桑蚕、家蚕 *LSP* 基因 5' 侧翼区的克隆与序列分析

昆虫的蜕皮与变态是一系列基因的程序性、组织特异性表达调控的生理行为 (Riddiford, 1994)。昆虫血清蛋白具有免疫、转运与贮藏等生理功能。免疫、转运功能的血清蛋白在发育过程中维持恒定水平,而作为贮藏功能的血清蛋白随着发育阶段的不同呈现有规律的变化,为昆虫的蜕皮或变态提供能源或原料 (Haunerland, 1996)。

家蚕血液蛋白可分为四类,即载脂蛋白 (Lipophorin)、卵黄原蛋白 (Vitellogenin, Vg)、贮藏蛋白质 (Storage protein, SP) 和 30K 小分子量脂蛋白质 (Low molecular weight Lipoprotein, LP)。LP 是一组非伴性蛋白,可以分成 15 个种类以上,在雌雄体内都存在。大多数在五龄初期检测不到,第三天后急剧上升,吐丝期达最高,以后逐渐降低,羽化时消失 (朱等, 1989; Kadono-Okuda et al, 1987)。在家蚕幼虫血液中,业已发现的主要贮藏蛋白有 SP1、SP2, 30kDa 蛋白,在幼虫期末龄后期大量表达,以准备足够的能源完成即将来临的变态(即幼虫变成蛹),以及为蛹期、成虫期生命活动贮藏所需的能源 (Harshman et al, 1998)。家蚕幼虫期一般要经历 4~5 个龄期,新龄期的开始需蜕皮,这个过程可能与分子量约为 30KD 的家蚕幼虫血清蛋白 (larval serum protein, *Bombyx mori*, BmLSP) 有关 (Fujiwara et al, 1990)。BmLSP 从蚁蚕开始至五龄第三天之前各个龄期食桑阶段都有转录表达,每个龄期的初期表达量较高,到四龄眠期停止转录表达,五龄饱食后 BmLSP mRNA 虽有转录,但其丰度比四龄食桑期明显减少,第三天后剧然下降至很低水平,熟蚕时完全消失,在蛹期、成虫期也未检测到 BmLSP mRNA。BmLSP 被认为是与家蚕幼虫期发育,尤其是与眠、蜕皮相关的血清贮藏蛋白。因而 BmLSP 基因是从分子水平上研究家蚕幼虫期发育的理想基因 (Fujiwara et al, 1991; 1992)。

LSP 基因结构已经解明,为 1 个内含子、1 个非编码的外显子和 1 个编码区的外显子,与其他 30KD LP 基因结构类似 (Fujiwara et al, 1992)。本实验从野桑蚕、家蚕苏·菊×明·虎基因组 DNA 中,以 PCR 法分别克隆了约 1.9 kb 野桑蚕的 *LSP* 基因 5'侧翼区 (The 5' flanking region of Larval Serum Protein gene, *Bombyx mandarina*, BmandLSP5'FR) 和家蚕苏·菊×明·虎的 *LSP* 基因 5'侧翼区 (The 5' flanking region of Larval Serum Protein gene, *Bombyx mori*, BmLSP5'FR (Suju×Minghu)), 进行了测序,序列进行了比较分析,发现一些可能的调控区域,可以供进一步的启动子功能特性分析研究。

4.1 材料与方法

4.1.1 试验材料与试剂

野桑蚕于 2002 年 8 月在中国镇江中国农业科学院蚕业研究所的桑园内采集,家蚕品种为苏·菊×明·虎;克隆所用的质粒载体为 pSK(+)(Amp^R),宿主菌为 *E.coli* TG1,均由农业部家蚕生物技术重点开放实验室保存;主要试剂 *Xba*、*Bam*H、*Hind*、High fidelity Taq 酶、T4DNA 连接酶及其他主要试剂购自 Gibco BRL 公司。

4.1.2 引物的合成

根据已报道的家蚕（朝·日×东·海）*LSP* 基因 5'侧翼区序列（Fujiwara et al, 1992），设计一对引物，分别导入 *Xba*、*Bam*H 限制性内切酶的酶切位点，由上海生物工程公司合成。

Forwards: 5'-ATT CTA GAG AAG GTA GTG AAG CCC CTT-3'

Reverse: 5'-TTG GAT CCC TGC AAT GCA ATA TAC GGA AA-3'

4.1.3 野桑蚕、家蚕基因组 DNA 的提取

取蚕幼虫后部丝腺约 1.0g，参照文献快速制备基因组 DNA 方法提取野桑蚕、家蚕基因组 DNA（赵等, 2000）。

4.1.4 PCR 法克隆野桑蚕、家蚕苏·菊×明·虎的 *LSP* 基因 5'侧翼区片段及其纯化

分别以经碱变性后的野桑蚕、家蚕苏·菊×明·虎基因组 DNA 为模板，94℃ 预变性 2 min，94℃ 15 s，53℃ 1 min 45 s，72℃ 2 min 30 s，35 个循环，72℃ 延伸 7 min。

PCR 产物经凝胶电泳分离目的片段，用 glassmilk 法纯化、回收。

4.1.5 野桑蚕、家蚕苏·菊×明·虎的 *LSP* 基因 5'侧翼区片段的亚克隆及测序

将 pSK 和回收的 PCR 产物分别用 *Xba* /*Bam*H 双酶切后，经 T4 DNA 连接酶连接，转化于 *E. coli* TG1。筛选出重组质粒 pSK-*BmandLSP5'*FR、pSK-*BmLSP5'*FR（Suju×Minghu），具体克隆方法参照文献（Sambrook et al, 1989）。经酶切鉴定正确的重组质粒 DNA 用于测序。由上海基康生物技术有限公司测定序列。用 DNASTAR、BLAST 和 MatInspector 软件进行序列分析。

4.2 结果与分析

4.2.1 野桑蚕、家蚕苏·菊×明·虎的 *LSP* 基因 5'侧翼区片段的扩增

PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定 结果见图 4.1 获得约 1.9 kb DNA 片段，与文献（Fujiwara et al, 1992）的相应片段大小一致，表明已经获得目的大小片段。

4.2.2 重组质粒 pSK-*BmandLSP5'*FR、pSK-*BmLSP5'*FR（Suju×Minghu）的酶切鉴定

根据朝·日×东·海的 *BmLSP* 5'侧翼区可知，在距 *Xba* 酶切位点 344bp 处有一个 *Hind* 酶切位点，对构建的重组质粒 pSK-*BmandLSP5'*FR、pSK-*BmLSP5'*FR 进行 *Xba* /*Bam*H、*Hind* 酶切鉴定，结果如图 4.2 所示。从图中可以看出，PCR 产物片段已接进 pSK 质粒，并具有 *Hind* 位点，基本上可以确定已分别克隆 *BmandLSP5'*FR、*BmLSP5'*FR 片段，将该重组质粒 DNA 进行序列测定。

4.2.3 野桑蚕和家蚕苏·菊×明·虎的 *LSP* 基因 5'侧翼区（*BmandLSP5'*FR、*BmLSP5'*FR（Suju×Minghu））测序结果与序列分析

BmLSP5'FR (Suju×Minghu) *BmandLSP5'FR* 经 T7 和 T3 启动子测序后,再合成一对测序引物测序,测得完整的序列,长度分别为 1901bp, 1886bp。结果见图 4.3。所获得的序列已经登陆 Genebank, 序列号分别 AY367064、AY172027; AY172028。

BmandLSP5'FR 与文献(Fujiwara et al, 1992) *BmLSP* 相应序列相比较, 同源性较高, 达 96.4%。克隆的片段涵盖了 *BmandLSP* 的第一内含子, 第一外显子、启动子区及其 5'上游区四部分。启动子区及其 5'上游区序列只有个别的碱基突变, 同源性高达 98.3%。第一外显子两者完全相同, 而第一内含子由于出现了 22 个碱基对缺失, 其同源性仅为 91.6%。

BmLSP5'FR (Suju×Minghu) 与文献(Fujiwara et al, 1992) *BmLSP* 相应序列相比较, 同源性很高, 达 98.9%。克隆的片段涵盖了 *BmLSP* 的第一内含子, 第一外显子、启动子区及其 5'上游区四部分。启动子区及其 5'上游区序列有个别的碱基突变。而两者的第一外显子与第一内含子完全相同, 同源性达 100%。

BmandLSP5'FR 与 *BmLSP5'FR* (Suju×Minghu) 两者都有以下几种功能元件: -30 ~-24 bp 的 TATAAAA 为典型的 TATA 盒; -73 ~-67 bp TGATAAA 为数种昆虫脂肪体内组织特异性表达基因的共有序列, 与朝·日×东·海幼虫血液蛋白(Fujiwara et al, 1992) 家蚕贮藏蛋白质 1 (Sakurai et al, 1988) 烟草天蛾 α -芳基载脂蛋白(aryphorin- α)(Willott et al, 1989) 食肉蝇(*Sarcophaga peregrina*) 贮藏蛋白质(Matsumoto et al, 1986) 黑腹果蝇 α -1 幼虫血液蛋白(Delaney et al, 1986) 的基因相对应的序列及其位点的比较见表 1, 只有家蚕贮藏蛋白质 1 为 TGATAAT, 其它都为 TGATAAA, 存在于转录起始位点的上游-70~-90bp(除黑腹果蝇 α -1 幼虫血液蛋白位于-436 bp 外); -70~-144 bp 之间含有 ATTTTCTT-27-ACGGCTGAT 推定的激素响应元件, 与文献(Fujiwara et al, 1992) *BmLSP* 相比有一个碱基突变, 与黑腹果蝇的激素响应元件(Mestril et al, 1986) 仅有 2 个碱基的变异。

经 BLAST 检索, *BmandLSP5'FR* (-304 ~-598 bp) 与家蚕 J139 的丝素轻链基因第一内含子区域(7639 ~7933 bp) 同源性达 90.6%。*BmandLSP5'FR* (-914~-1403 bp) 为失活的部分水手转座子元件(Mariner-like Element, MLE), 其中-914~-941 bp 的 28 个碱基为 MLE 元件一端的反向重复序列。与相应的 *BmLSP*、已失活的家蚕水手转座子元件(Inactive Bmmar1 mariner-like element) 和推定的具活性家蚕水手转座子元件(Bombyx mori Mariner 1, Bmmar1) 比较, 同源性分别为 97.0%, 94.7%, 93.4%(Fujiwara et al, 1992; Kumaresan et al, 2004; Robertson et al, 1996)。在 *BmLSP5'FR* (-303 ~-593 bp) (-909 ~-1398 bp) 区也具有上述同源序列和 MLE 元件。

4.3 讨论

本实验所克隆的野桑蚕和家蚕苏·菊×明·虎的 *LSP* 基因 5'侧翼区涵盖了核心启动子序列以及其他一些功能元件, 可以供进一步的启动子功能分析。

比较有趣的是本次实验发现了野桑蚕基因组中失活的部分水手转座子元件(MLE)。MLE 属于型转座子, 具有保守的 D, D34~37D(R) 阳性离子结合的功能基序, 广泛存在于无脊椎动物, 为宿主基因的突变提供了条件, 导致其基因组的多样性(Daniel et al, 1997)。在转座子的插入后, 宿主 DNA 为了降低因 MLE 的流动性造成的损害, 在转座酶编码区发生碱基突变、缺失或移码, 无法正常编码转座酶, 从而使 MLE 无法转位到基因组其它位点, 该突变的 MLE 在基因组得以残留并传代(Allan et al, 2000)。因而失活的 MLE 可以在物种的进化分析上加以利用(Cedric

et al, 2002)。从野桑蚕与家蚕的幼虫血液蛋白基因 5'侧翼区共同具有失活的 MLE 元件来看,转座事件发生在家蚕与野桑蚕还未分化的共同祖先的年代。另外近来在有花植物、脊椎动物,乃至人,都发现了 MLE 失活 MLE 元件的有无及其同源性有望广泛应用于分子进化分析领域(Daniel et al, 1997)。

一般来说,与基因编码区相比较,内含子及 5'侧翼区在进化角度上属于活跃区域,容易发生突变,属于中性变异,即在进化上的选择压比较小(Kusuda et al, 1986; Martinez et al, 2004)。从本次实验所获得家蚕与野蚕的片段比较也证实这一点,在第一外显子区两者完全相同,而在第一内含子与启动子上游区同源性分别为 91.6%、98.3%。而家蚕品种朝·日×东·海与苏·菊×明·虎是我国和日本的生产实用品种,经过杂交育种选育出来,选育材料遗传背景比较一致,因而在克隆的片段区域同源性很高,在内含子、第一外显子区域完全相同。

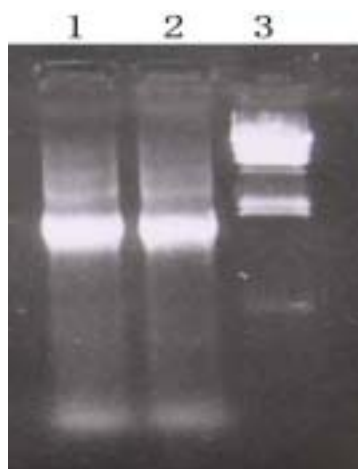


图 4.1 PCR 产物的电泳鉴定

Figure 4. 1 Identifications of PCR products by gel electrophoresis

1. 野桑蚕 2. 家蚕苏·菊×明·虎 3. 标准 DNA 分子量 Marker: λ DNA/ *Hind* (从上到下分别为 23.1, 9.41, 6.55, 4.36, 2.32, 2.0, 0.56 kb)

1. *Bombyx mandarina* 2. Suju×Minghu, *Bombyx mori* 3. Marker: λ DNA/ *Hind*, which bands represent 23.1, 9.41, 6.55, 4.36, 2.32, 2.0, 0.56 kb from above to downward, respectively

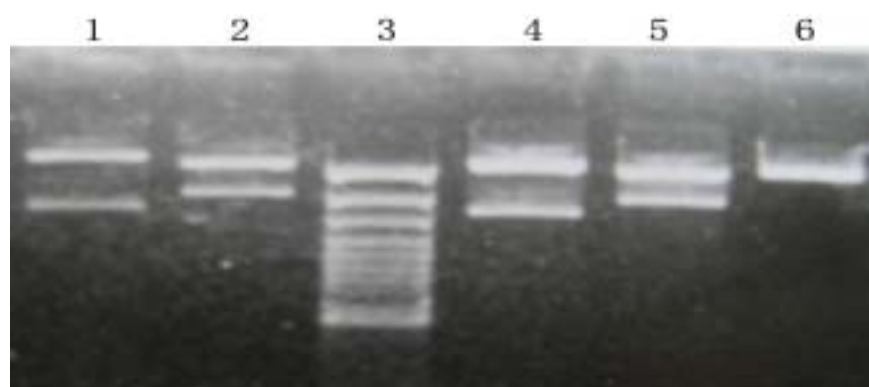
图 4.2 重组质粒 pSK-*BmandLSP* 5'FR、pSK-*BmLSP* 5'FR (Suju×Minghu) 限制性内切酶酶切鉴定图谱

Figure 4. 2 Identifications of pSK-*BmandLSP* 5'FR and pSK-*BmLSP* 5'FR (Suju×Minghu) by digestion with restriction endonucleases

1、2 pSK-*BmandLSP* 5'FR 经 *Xba* /*Bam*H 双酶切和 *Hind* 单酶切产物；4、5 pSK-*BmLSP* 5'FR (Suju×Minghu) 经 *Xba* /*Bam*H 双酶切和 *Hind* 单酶切产物；6 为 pSK 经 *Hind* 单酶切产物；3 标准 DNA 分子量 Marker (从上到下分别为 3000 bp, 2000 bp, 1500 bp, 1031 bp, 900 bp, 800 bp, 700 bp, 600 bp 和 500 bp)

pSK-*BmandLSP* 5'FR was digested by *Xba* /*Bam*H (1) and *Hind* (2); and pSK-*BmLSP* 5'FR (Suju×Minghu) was digested by *Xba* /*Bam*H (4) and *Hind* (5); pSK was digested by *Hind* (6); 3 is the Marker which bands represent 3000 bp, 2000 bp, 1500 bp, 1031 bp, 900 bp, 800 bp, 700 bp, 600 bp and 500 bp from above to downward, respectively.

(A)			
基因名称 Gene	生物名称 Organism	位置 Position	序列 Sequence
野桑蚕 <i>LSP</i> 基因 <i>BmandLSP</i>	野桑蚕 <i>Bombyx mandarina</i> ,	-73	TGATAAA
家蚕 <i>LSP</i> 基因 <i>BmLSP</i>	家蚕, 苏·菊 × 明·虎 <i>Bombyx mori</i> , Suju×Minghu	-73	TGATAAA
	家蚕, 朝·日 × 东·海 <i>Bombyx mori</i> , Tokai×Asahi	-73	TGATAAA
	家蚕 <i>B. mori</i>	-72	TGATAAT
贮藏蛋白基因 Storage Proteins	烟草天蛾 <i>M. sexta</i>	-88	TGATAAA
	食肉蝇 <i>S. peregrina</i>	-89	TGATAAA
	黑腹果蝇 <i>D. melanogaster</i>	-436	TGATAAA

(B)			
基因名称 Gene	生物名称 Organism	位置 Position	
野桑蚕幼虫血液蛋白基因 <i>BmandLSP</i>	野桑蚕 <i>Bombyx mandarina</i>	-114	ATTTTCTT-27-ACGGCTGAT -70
家蚕幼虫血液蛋白基因 <i>BmLSP</i>	家蚕, 苏·菊 × 明·虎 <i>Bombyx mori</i> ,	-114	ATTTTCTT-27-ACGGCTGAT -70
	Suju×Minghu		
	家蚕, 朝·日 × 东·海 <i>Bombyx mori</i> ,	-114	ATTTTCCTT-27-ACGGCTGAT -70
	Tokai×Asahi		
黑腹果蝇热激蛋白 23 基因 <i>HSP23</i>	黑腹果蝇 <i>D. melanogaster</i>	-228	ATTTTCCAT-19-ATGGCAGAT -192

表 4.1 野桑蚕、家蚕苏·菊 × 明·虎的 *LSP* 基因 5' 侧翼区与其它昆虫基因的比较
 Table 4.1 Sequence comparisons of the 5'-flanking region of the *BmandLSP* gene and *BmLSP* (Suju×Minghu) gene with the other insect genes.

(A) 昆虫脂肪体内组织特异性表达基因的共有序列, 引用序列分别为家蚕朝·日 × 东·海 *LSP* (Fujiwara et al, 1992) 家蚕贮藏蛋白 1 (Sakurai et al, 1988) 烟草天蛾 α -芳基载脂蛋白 (aryphorin- α) (Willott et al, 1989) 食肉蝇 (*Sarcophaga peregrina*) 贮藏蛋白 (Matsumoto et al, 1986) 黑腹果蝇 α -1 幼虫血液蛋白 (Delaney et al, 1986) 的基因。(B) 与家蚕朝·日 × 东·海 *LSP* 基因 Fujiwara et al, 1992、黑腹果蝇热激蛋白 23 基因 (Mestrl et al, 1986) 推定的激素响应元件序列的比较

(A) Comparison with sequences commonly found in insect genes that were specifically transcribed in fat body. The sequences cited above are *BmLSP* (Fujiwara et al, 1992), storage protein 1 of *B. mori* (Sakurai et al, 1988), aryphorin- α of *M. sexta* (Willott et al, 1989), storage protein of *Sarcophaga peregrina* (Matsumoto et al, 1986) and *LSP1- α* of *D. melanogaster* (Delaney et al, 1986) (B) Comparison with the deduced EREs of *BmLSP* gene Fujiwara et al, 1992 and the heat-shock protein 23(HSP23) of *D. melanogaster* (Mestrl et al, 1986) .

```

-1403                                     GAGAAGTAGT GAAGCCCCTT
-1399                                     .....
-1398                                     .....

-1383  AACAAACGCC TGTTCATAA TCAAGAATGG TCCGTCCAGC AAGACTCGGC GCCAGGTCAC AAAGCTCGGT CTATGCAGTC
-1379  .....A ..... ..... ..... .....T .....
-1378  .....A ..... ..... ..... .....T .....

-1303  TTGGTTGGAA ACGAACGTTT CGGACTTCAT CAGAGCTGAA AACTGGCCGT CGTCTAGTCC CGATCTTAAT CCGCTGGATT
-1299  .....T ..... ..... .....A .....
-1298  .....T ..... .....A .....

-1223  ATGATTTATG GTCAGTTTTA GAGAGTACGG CTTGCTCTGA ACGCCATGAT AATTTGGAGT CCCTAAAACA ATCCGTACGA
-1219  .....A .....C .....A .....T .....
-1218  .....A .....A .....T .....

-1143  TTGGCAGTGA AAAATTTTCC CAAGGAAAGA GTGCATGCTT CTATTGATAA CTGGCCTCAA CGTTTAAAGG ACTGTATTGC
-1139  .....T .....T .....G .....
-1138  .....T .....T .....G .....

-1063  AGCCAATGGA GACCACTTTG AATAAGCTTT TTATACTTTA AATTGTTTAA TATTTATGTA TTAAACTAAC ACACTGTAAA
-1049  .....C .....
-1048  .....C .....T .....

-983  AGTAATAAAT GTTATTTCCC ATAGAATTTT TTTTGTTTTT CTTTGTAACA GTATTTATGG CCAGACTAAG TATATTCATA
-979  .....G .....T .....
-978  .....G .....T .....

-903  TGCATGTAGT AATAAGCTGC TATTTCATAA TTACAAACAG ACACATCAAT TTTATTTATA TGTATAGATG TTTCAAATAT
-899  .....
-898  .....

-823  CACACTATTC GTGGTCACGG ACAACTGGAG TCGTTTTGGT ATGTGAACGT TGTTTCATTT ACATCTACAT ACAGTTCTAA
-819  .....
-818  .....G .....

-743  TGCATTATTA CGTTTTATCT ATATATTAAT ACGTGAAGCA AAAACTTTGT ATCCCTTTTT ACGAAAATTG CGCGGACGGA
-739  .....
-738  .....

-663  GGAGTATGAA ATTTTCCACA CTTATAGAGA ATATAGAGAA GTGCACAATG CTAATTTTTT TTTTAAATA ATGCATAAAA
-659  .....A .....
-658  .....A .....

-583  GATACATTAG ATCAATAAAG AAAACATTAC ACACACTACA TACCATGTAT TTGACGCACA CATACATGCA TGCATACTAT
-579  .....
-578  .....

-503  TTATTGTCAA ACTTTTGTTT TTGGCGTCTG TTGTCAAATT GAGAATAGAT TAAATATGGT TTGTCTTTGT TAATATTTTT
-503  .....
-502  .....G .....G .....

-423  TATAGTGTAG TCTTGCGGAA ATTTGTGATT ATAGAAGTAT AAAATACAAT CATAAAAGTG TACAACTTA CAATTCCAAT
    A.....G.....G.....

-343  TAATTATAGT CGAATTCCGA CTAAGTGGG ACCTCTAGTT TATTATTATT ACGTATTAAC TTTTCTCAAA CTACATAATT
    .....

-263  ACTTCAAAAC ACATTAAAAG TCGCTGTCAA AGACAAAGAC ATAGCCCACT TTCTCTGATA TCAGTGACAC CGGGAAATTC
    .....A .....G .....
    .....A .....G .....

-183  AACAAACAAA CATTTCAACT TTCTGTAACA TGTTTGACAC TGCTACAAAA ATTAACTTG TTTAGCAATA TTTTCTTAT
    .....A .....C .....
    .....A .....

-103  TAGTTATCAG CAACGTTTGA CCTACACGGC TGATAAACTA AGTTTTTTAT GTTCCGAAAA AAAATTCGAA TTGTATAAAA
    .....

```

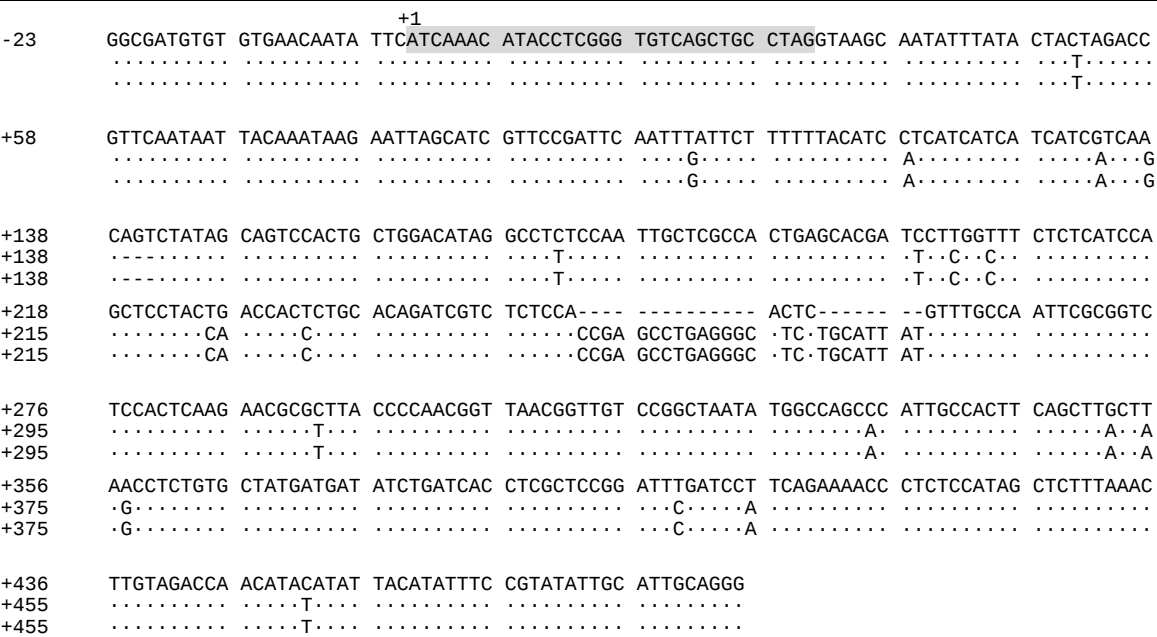


图 4.3 野桑蚕 *LSP* 基因 5' 侧翼区 () 和家蚕苏·菊×明·虎的 *LSP* 基因 5' 侧翼区 () 序列及其与朝·日×东·海 *LSP* 基因序列 () 的比较

Fig 4.3 Nucleotide sequence of the *BmandLSP5'FR* (), the *BmLSP5'FR* (Suju×Minghu)() and their alignments with *BmLSP5'FR* () (Fujiwara et al, 1992)

短线表示缺失，园点表示与野桑蚕 *LSP* 基因侧翼区相同，划线处为 TATA 盒，波浪线为与热激蛋白 23 的 ERE 同源序列，方框区为数种昆虫脂肪体内组织特异性表达基因的共有序列，阴影区域为第一外显子，其后为第一内含子。黑体为失活的部分水手转座子元件，斜体为与家蚕 J139 的丝素轻链基因相应区域的同源区。

Dashes represent deletions. Dots represent the same nucleotide as the *BmandLSP5'FR*. The TATA box is underlined. The wavy lines show the sequences homologous with the HSP23 ERE. The rectangle shows sequences commonly found in several insect genes that were specifically transcribed in fat body. The shadow region shows exon1 and the sequence following it is the first intron. The bold-face is supposed to be the part of inactive Mariner-like element and the italics indicate the sequences similarity to that of the J139 fibrion light-chain gene.

第五章 家蚕幼虫血清蛋白基因(*BmLSP*)启动子特性分析

我们已从家蚕苏·菊×明·虎基因组 DNA 中克隆了 *BmLSP* 的调控序列,该调控序列涵盖了第一内含子,第一外显子、启动子区及其上游区。在启动子上游调控区存在可能的顺式元件的序列,即失活的水手转座子元件和家蚕丝素轻链第一内含子的高度同源序列。

内含子是真核生物基因 DNA 中的间插序列,这些序列被转录成 RNA,但随即被剪辑掉而不翻译。内含子曾被认为是无意义的序列,但近十几年来越来越多的证据表明它也参与基因的表达调控。特别是第一内含子,存在有 DNA 复制、转录的调控元件 (Xie et al, 2002; Bhattacharyya et al, 1999)。Takiya 和 Martinez 等人根据实验结果推测家蚕丝素重链基因的第一内含子中含有对启动子转录起增强功能的调控元件 (Takiya et al, 1990, 1997; Martinez et al, 2004)。

在家蚕基因组中大约有上千个水手转座子元件,在丝素重链基因上游区也发现数个水手转座子元件,推测其参与了丝蛋白基因的表达调控 (Mita et al, 2004; Zhou et al, 2003)。虽然转座子被认为是自私基因,但最近有证据表明它参与其他正常基因的转录调控 (Bushman, 2004)。

为此,通过 PCR 技术与限制性内切酶酶切方法,以荧光素酶 (*luc*) 为报告基因,构建了一系列缺失不同调控元件的启动子报告质粒,在家蚕 BmN 细胞瞬时表达系统中对 *BmLSP* 的上游区、第一内含子等调控序列对 *BmLSP* 启动子活性的影响进行了研究。

如第一章所述,家蚕幼虫的发育受到保幼激素 (JH) 与蜕皮激素 (MH) 协调调控, *BmLSP* 的调控序列中含有可能的蜕皮激素响应元件。为此,在家蚕 BmN 细胞瞬时表达系统中,添加外源 JHA 或 MH,考察了激素对 *BmLSP* 启动子活性的影响。

5.1 材料与方法

5.1.1 试验材料

家蚕品种为苏·菊×明·虎,由中国农业科学院蚕业研究所保存;pUL220 含 *luc* 基因,由中国科学院上海生命科学院生物化学与细胞生物研究所馈赠 (雷等, 1992)。克隆所用的质粒载体为 pSK(+)(AmpR)、pGEM3Z(+)(AmpR),宿主菌 *E. coli* TG1 和 BmN 细胞均由农业部家蚕生物技术重点开放实验室保存。穿梭质粒 pSK-HSP70- β -*gal* 由本实验室构建保存 (Zhou et al, 2003)。蜕皮激素 20- β -羟基蜕皮酮 (MH) 为中国农业科学院蚕业研究所制备,保幼激素类似物 ZR512 (JHA) 由山东农业大学崔为正教授馈赠。各种限制性内切酶、High fidelity Taq 酶、T4DNA 连接酶、Lipofectin 及其他主要试剂购自 Invitrogen 公司。荧光素酶检测试剂盒为 Promega 公司产品。

5.1.2 报告质粒 pSK*BmLSP* (I)-*luc* 的构建

前一章获得的含有 *BmLSP* 全长启动子的质粒 DNA,经 *Bam*HI 酶切,与同样酶切获得的 *luc*

基因连接, 经 *Xba* I 酶切鉴定, 获得正确接入的 *luc* 基因的报告质粒 pSK*BmLSP* (*I*)-*luc*。报告质粒构建流程见图 5.1。

5.1.3 缺失不同调控元件的启动子的报告质粒构建

根据 *BmLSP* 启动子全长序列, 设计以下四条引物, 用于 PCR 法构建缺失第一内含子、缺失水手转座子元件的启动子。

Forwards 1: 5'-ATT CTA GAG AAG GTA GTG AAG CCC CTT-3',

Reverse 1: 5'-TTG GAT CCC TGC AAT GCA ATA TAC GGA AA-3',

Forwards 2: 5'-ATG TCT AGA CTA AGT ATA TTC ATA TGC ATG TAG-3',

Reverse 2: 5'-TAG GAT CCT GAC ACC CGA GGT ATG TTT GAT-3',

以 pSK-*BmLSP* (*I*) 为模板, 用 Forwards 1, Reverse 2 获得缺失第一内含子的 *BmLSP* 启动子, 克隆于 pSK 质粒, 构建了 pSK-*BmLSP* (*DI*);

以 pSK-*BmLSP* (*I*) 为模板, 用 Forwards 2, Reverse 1 获得缺失水手转座子元件的 *BmLSP* 启动子, 克隆于 pSK 质粒, 构建了 pSK-*BmLSP* (*DM*)

利用靠近家蚕丝素轻链基因同源区序列的 3' 端的 *Eco*R I 酶切位点, 酶切含有相应启动子的质粒 DNA, 获得缺失突变启动子:

用 *Eco*R I/*Bam*H I 酶切 pSK-*BmLSP* (*I*) DNA, 获得缺失水手转座子元件与缺失含家蚕丝素轻链基因同源区序列的启动子 *BmLSP*(*DMS*), 克隆于 pGEM3Z 质粒, 构建了 p3Z-*BmLSP*(*DMS*);

用 *Eco*R I/*Bam*H I 酶切 pSK-*BmLSP* (*DI*) DNA 获得缺失第一内含子、缺失上游区的水手转座子元件与缺失含家蚕丝素轻链基因同源区序列的启动子 *BmLSP*- (*DIMS*), 克隆于 pGEM3Z 质粒, 构建了 p3Z-*BmLSP* (*DIMS*)

缺失不同调控元件的启动子示意图见图 5.3。

从 pUL220 质粒中用 *Bam*H I 酶解获得荧光素酶基因 (*luc*), 分别亚克隆在上述质粒中, 位于启动子下游, 经 *Xba* I 酶切鉴定 *luc* 接入方向正确, 获得系列报告质粒。报告质粒构建流程见图 5.1、5.2。

5.1.4 质粒的提取、酶切、DNA 片段制备、连接与转化

均参照 Sambrook et al (1989) 方法进行。

5.1.5 家蚕细胞培养与转染

细胞培养方法参考 Summers (1987)。转染方法: 约为 5×10^5 个 BmN 细胞接种 12 cm² 培养瓶, 27℃ 贴壁培养过夜。倾去含 10% 胎牛血清 TC-100 培养基, 用无血清 TC-100 培养基洗细胞 2 次后, 每瓶加 1ml 无血清 TC-100 培养基。在 100 μ l 反应体系中加入 1 μ g 报告质粒 DNA 5 μ l 阳离子脂质体, 充分混匀, 27℃ 静置 15min 后, 逐滴加入培养瓶中, 边滴边混匀。细胞在无血清 TC-100 培养基 27℃ 培养 4-6 小时后, 倾去原培养基, 每瓶加 3ml 含 10% 胎牛血清 TC-100 培养基。激素处理的试验, 换液后立即添加相应量的激素。除激素处理外, 每个转染试验都以 0.5 μ g 穿梭质粒 pSK-HSP70- β -gal 作为内对照系统。以转染 pUL220-*luc* 的细胞作为空白对照。以上每种处理至少重复 3 次。

5.1.6 瞬时表达测定分析

48 hpt, 冰上收集细胞于 1.5mL Eppendorf 管中, 4 、 10000 × g , 离心 5 min , 去上清 , 沉淀用 1ml 1 × PBS 洗涤 2 次 , 沉淀用 400μL 1 × 细胞裂解液裂解 ; 裂解物冻融一次 , 离心后取上清测定 Luc 活力 (Idahl, et al , 1986) , 平行测定穿梭质粒校正系统 β-galactosidase 比活 (Jeffrey , 1992) 和总蛋白浓度 (Moos M. , 1995) , 以校正 Luc 的 cpm 值。

获得的数据用 SAS 软件 (SAS software , 1990) 进行处理统计 , 用 Sigma Plot 软件制图。

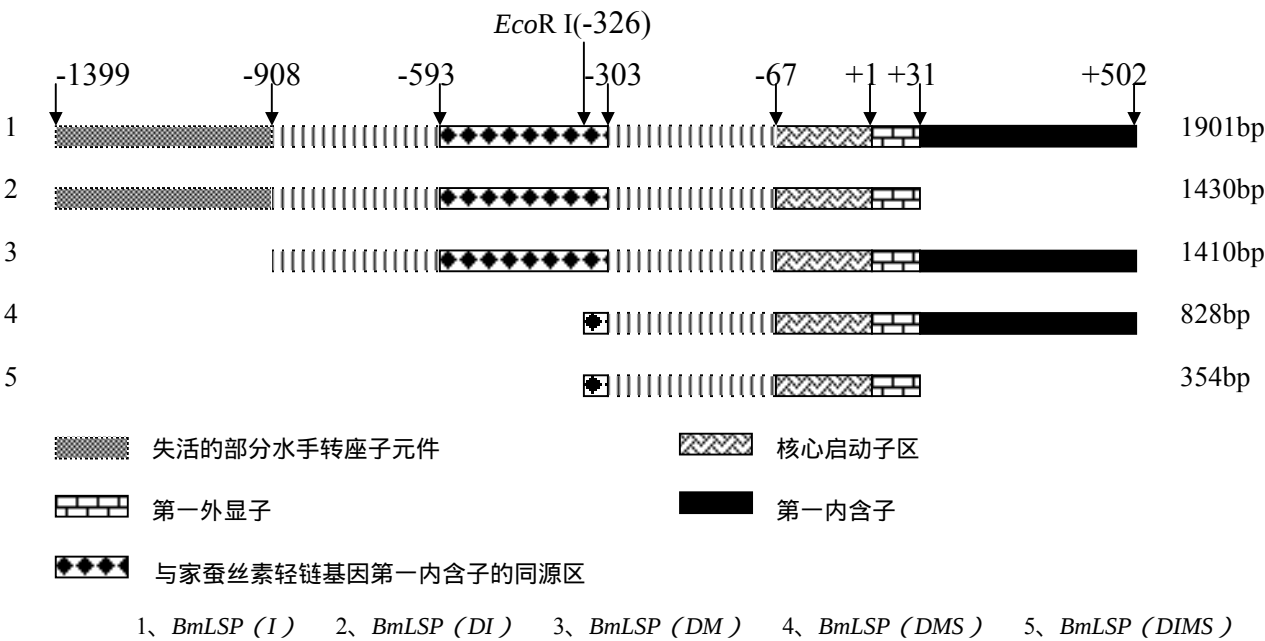
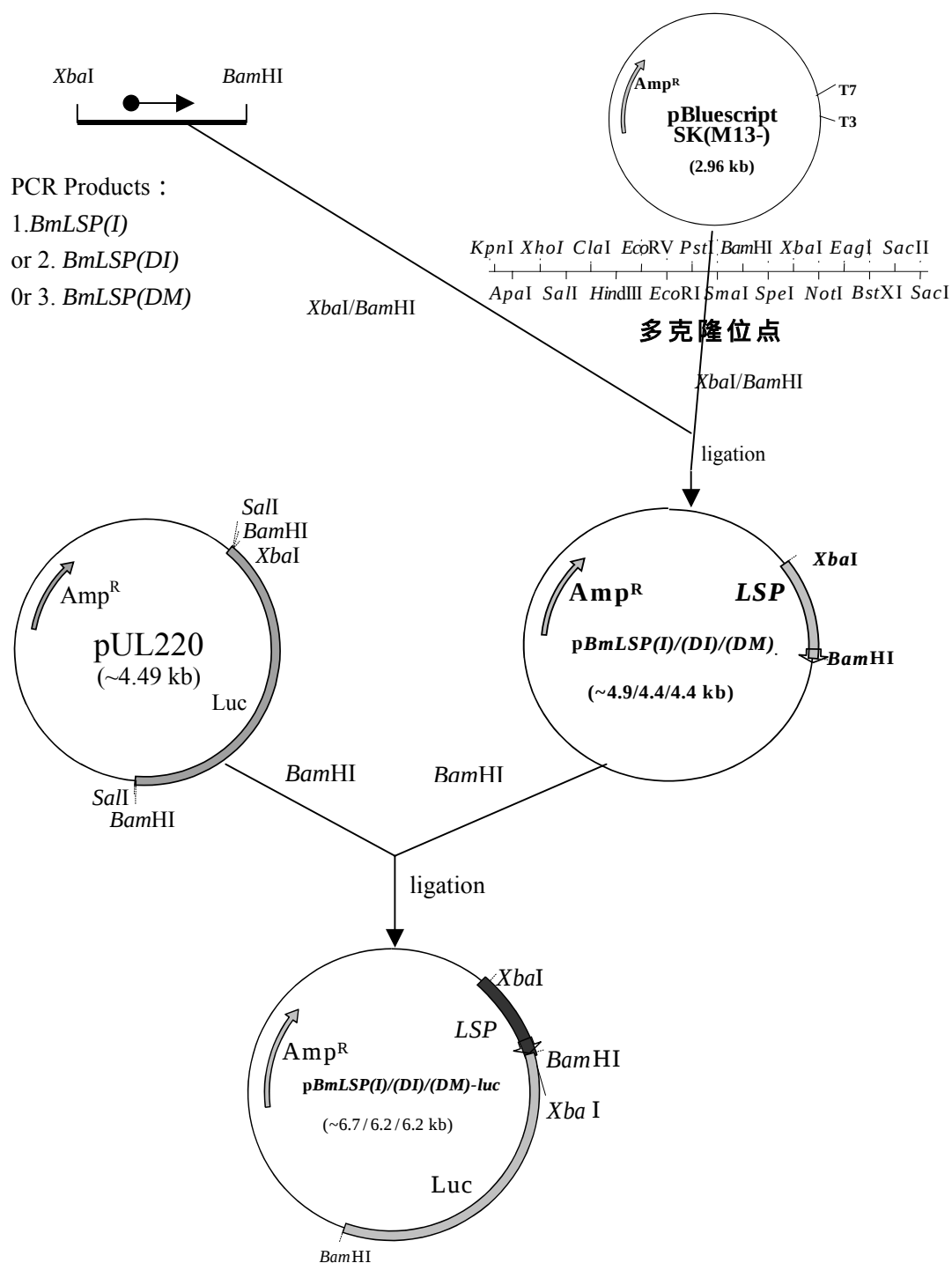
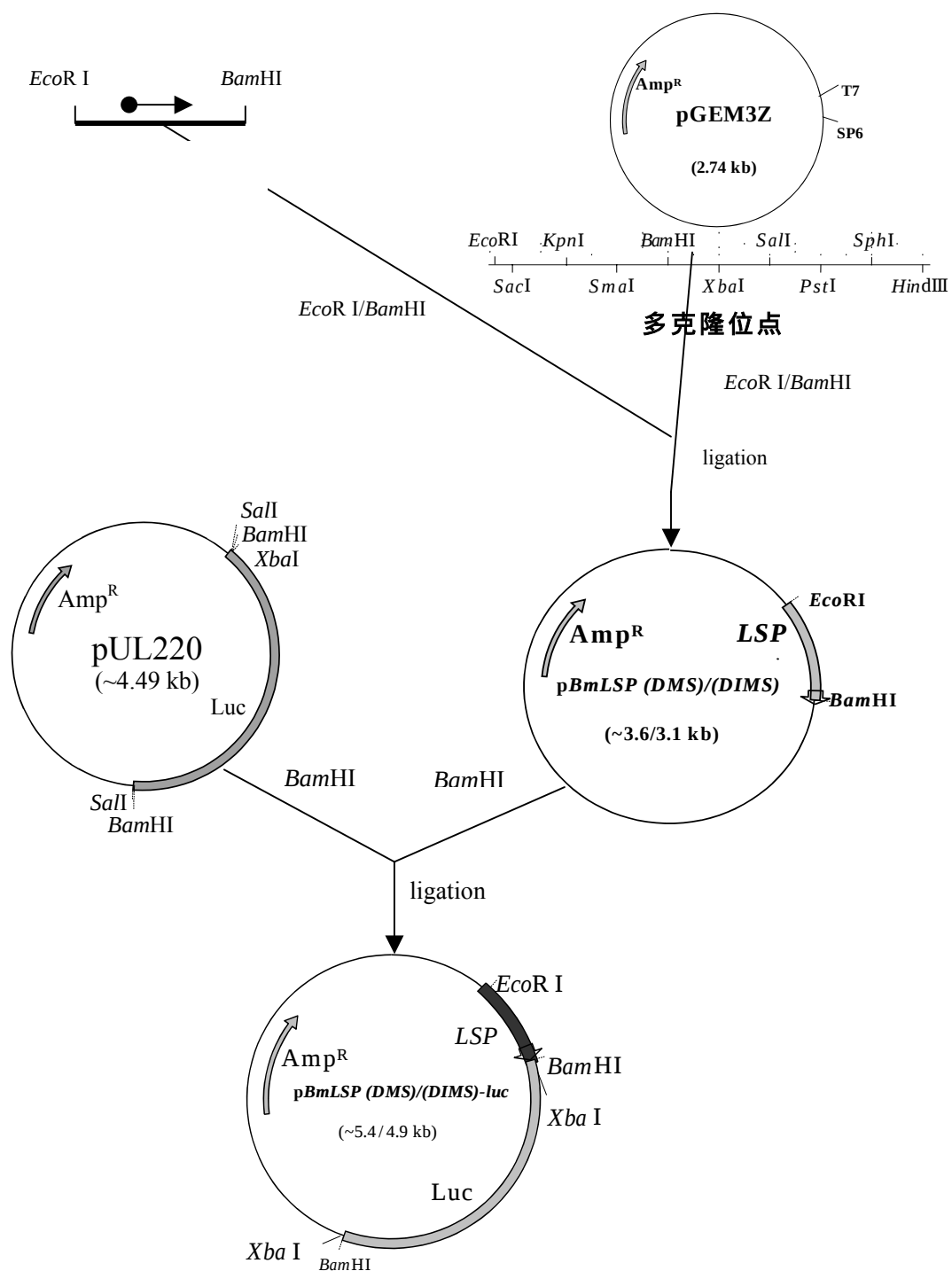


图 5.3 *BmLSP* 基因启动子与构建缺失突变启动子结构示意图

Fig 5.3 Schematic diagram of structure of *BmLSP* promoter and its deletions

图 5.1 质粒 *pBmLSP(I)/(DI)/(DM)-luc* 的构建图解Fig 5.1 Diagrammatic representation of the functional constructions *pBmLSP(I)/(DI)/(DM)-luc*

图 5.2 质粒 *pBmLSP (DMS)/(DIMS)-luc* 的构建图解Fig 5.2 Diagrammatic representation of the functional constructions *pBmLSP (DMS)/(DIMS)-luc*

5.2 结果和分析

5.2.1 缺失突变启动子的报告质粒的酶切鉴定

通过 PCR 法与酶切法获得系列缺失突变启动子及其报告质粒, 各过程经酶切鉴定正确 (见图 5.4、5.5), 可用于启动子特性研究分析。

5.2.2 BmN 细胞中 *BmLSP* (*I*) 启动子的转录活性

经 Lipofectin 包埋的报告质粒 pSK-*BmLSP* (*I*)-*luc* 转染 BmN 细胞, 48hpt 收集细胞, 经校正后的 20 微克细胞抽提物的 Luc 活力为 1083.05 ± 205.07 cpm, 不含 *BmLSP* 启动子的空载体 pUL220-*luc* Luc 活力仅为 16.63 ± 5.20 cpm, 这表明来源于卵巢细胞的 BmN 细胞可用于 *BmLSP* 启动子的功能分析。

5.2.3 第一内含子对 *BmLSP* 基因启动子活性影响

以 pSK-*BmLSP* (*I*)-*luc*、pSK*BmLSP* (*DI*)-*luc* 和 p3Z-*BmLSP* (*DMS*)-*luc*、p3Z-*BmLSP* (*DIMS*)-*luc* 两组报告质粒分别转染 BmN 细胞, 以考察第一内含子对 *BmLSP* 基因启动子活性影响。结果见图 5.6 (a)。含第一内含子的报告质粒 pSK-*BmLSP* (*I*)-*luc*、p3Z-*BmLSP* (*DMS*)-*luc* 的 Luc 活力分别为缺失第一内含子相对应的报告质粒 pSK-*BmLSP* (*DI*)-*luc*、p3Z-*BmLSP* (*DIMS*)-*luc* 的 5.80 ± 1.10 、 5.40 ± 1.09 倍(F Value=75.4, Pr>F=0.0001<0.01; F Value=64.67, Pr>F=0.0002<0.01)。这一结果暗示 *BmLSP* 基因的第一内含子中含有促进启动子转录活性的类似增强子的调控序列。

p3Z-*BmLSP* (*DIMS*)-*luc* 的 Luc 活力仅为 64.06 ± 5.98 cpm, 是所构建的报告质粒中活性最低的, *BmLSP* (*DIMS*) 启动子仅含有基础转录的元件, 推测 *BmLSP* 的主要转录调控元件存在于启动子侧翼序列。

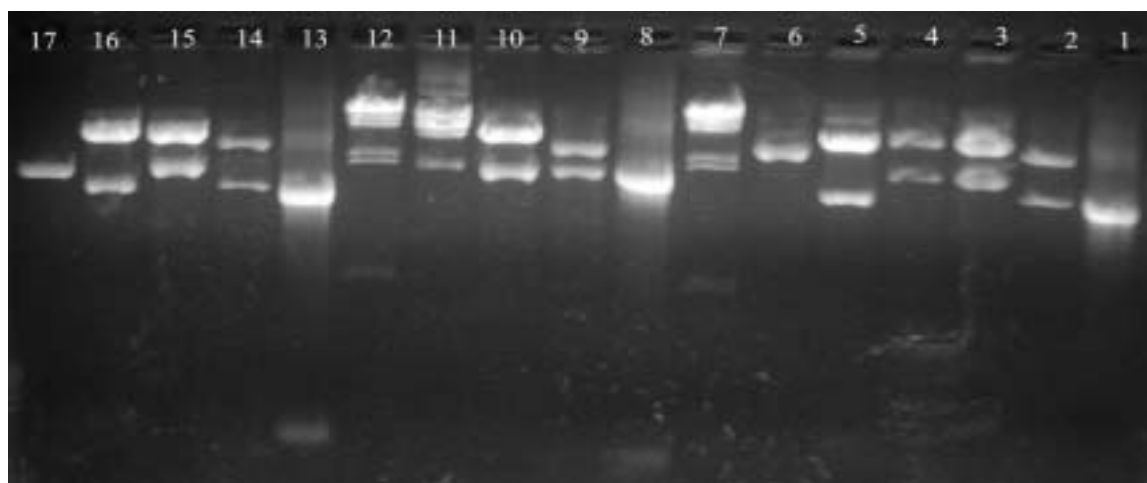


图 5.4 质粒 pSK- *BmLSP* (*DI*) λ pSK- *BmLSP* (*I*) λ pSK- *BmLSP* (*DM*) λ pSK- *BmLSP* (*DI*) -*luc*、pSK- *BmLSP* (*I*) -*luc* 和 pSK- *BmLSP* (*DM*) -*luc* 酶切鉴定

Fig 5.4 Restriction analysis of the pSK- *BmLSP* (*DI*) λ pSK- *BmLSP* (*I*) λ pSK- *BmLSP* (*DM*) λ pSK- *BmLSP* (*DI*) -*luc*、pSK- *BmLSP* (*I*) -*luc* and pSK- *BmLSP* (*DM*) -*luc*

1、8、13 分别为 *BmLSP* (*DI*) λ *BmLSP* (*I*) λ *BmLSP* (*DM*) PCR 片段；2、9、14 分别为 pSK- *BmLSP* (*DI*) λ pSK- *BmLSP* (*I*) λ pSK- *BmLSP* (*DM*) λ *Xba*I/*Bam*HI 双酶切；3、5 分别为 pSK- *BmLSP* (*DI*) -*luc* (正接) 被 *Bam*HI、*Xba*I 酶切；4、6 为 pSK-*BmLSP* (*DI*) -*luc* (反接) 被 *Bam*HI、*Xba*I 酶切；10、11 分别为 pSK- *BmLSP* (*I*) -*luc* (正接) 被 *Bam*HI、*Xba*I 酶切；15、16 分别为 pSK- *BmLSP* (*DM*) -*luc* (正接) 被 *Bam*HI、*Xba*I 酶切；17 为 *luc* 片段；7、12 为 DNA/*Hind* III Marker。

1,8,13 was PCR fragment of *BmLSP* (*DI*) λ *BmLSP* (*I*) λ *BmLSP* (*DM*) λ , respectively; pSK- *BmLSP* (*DI*) (2), pSK- *BmLSP* (*I*) (9) and pSK- *BmLSP* (*DM*) (14) were digested by *Xba*I/*Bam*HI; pSK- *BmLSP* (*DI*) -*luc*(cis) was digested by *Bam*HI (3) and *Xba*I (5); pSK- *BmLSP* (*DI*) -*luc*(reverse) was digested by *Bam*HI (4) and *Xba*I (6); pSK- *BmLSP* (*I*) -*luc* was digested by *Bam*HI (10) and *Xba*I (11); pSK- *BmLSP* (*DM*) -*luc* was digested by *Bam*HI (1) and *Xba*I (16); DNA/*Hind* III Marker(7,12)。

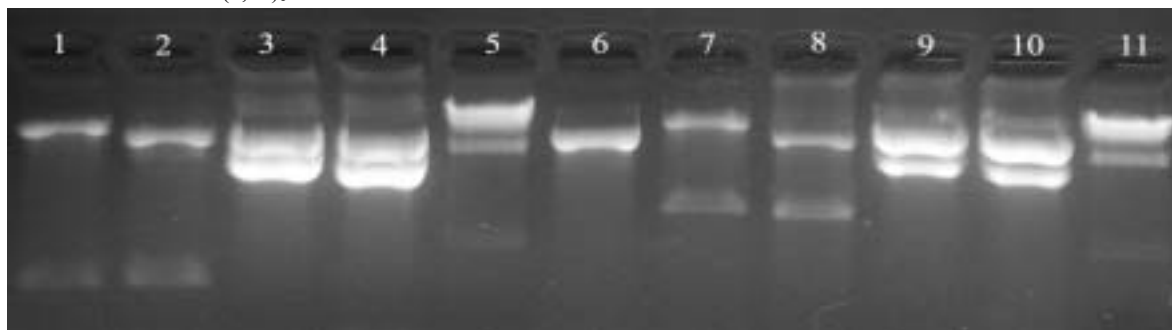
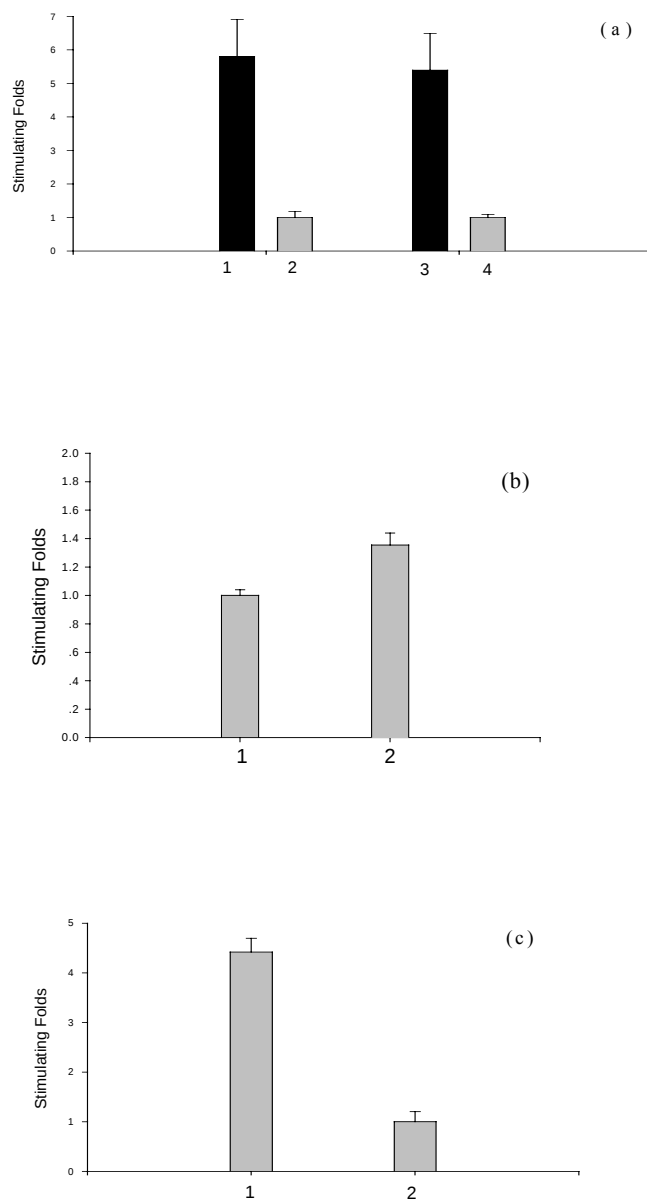


图 5.5 质粒 pSK- *BmLSP* (*DMS*) λ pSK- *BmLSP* (*DMIS*) λ pSK- *BmLSP* (*DI*) -*luc*、pSK- *BmLSP* (*I*) -*luc* 和 pSK- *BmLSP* (*DM*) -*luc* 酶切鉴定

Fig 5.5 Restriction analysis of the pSK- *BmLSP* (*DMS*) λ pSK- *BmLSP* (*DMIS*) λ pSK- *BmLSP* (*DI*) -*luc*、pSK- *BmLSP* (*I*) -*luc* and pSK- *BmLSP* (*DM*) -*luc*

1、2 分别为 pSK-*BmLSP* (*DI*) λ p3Z-*BmLSP* (*DMIS*) λ 被 *Eco*RI/*Bam*HI 双酶切；3、4 分别为 p3Z-*BmLSP* (*DMIS*) -*luc* 被 *Bam*HI、*Xba*I 单酶切；6 为 pGEM3Z 被 *Bam*HI 单酶切；7、8 分别为 pSK-*BmLSP* (*I*) λ p3Z-*BmLSP* (*DMS*) λ 被 *Eco*RI/*Bam*HI 双酶切；9、10 分别为 p3Z-*BmLSP* (*DMS*) -*luc* 被 *Bam*HI、*Xba*I 单酶切；5、10 为 λ DNA/*Hind* III Marker。

pSK-*BmLSP* (*DI*) (1) and p3Z-*BmLSP* (*DMIS*) (2) were digested by *Eco*RI/*Bam*HI; p3Z-*BmLSP* (*DMIS*) -*luc* was digested by *Bam*HI (3) and *Xba*I (4); pGEM3Z was digested by *Bam*HI (6); pSK-*BmLSP* (*I*) (7) and p3Z-*BmLSP* (*DMS*) (8) were digested by *Eco*RI/*Bam*HI; p3Z-*BmLSP* (*DMS*) -*luc* was digested by *Bam*HI (9) and *Xba*I (10); DNA/*Hind* III Marker(5,10)。

图 5.6 调控区对 *BmLSP* 基因启动子活性影响Fig 5.6 Effects of the regulation region on the *BmLSP* promoter activity

(a). 第一内含子: 1, 2, 3, 4 分别为 pSK-*BmLSP* (I)-*luc*, pSK-*BmLSP* (DI)-*luc*, p3Z-*BmLSP* (DMS)-*luc* 和 p3Z-*BmLSP* (DIMS)-*luc*. (b). 水手转座子元件: 1, 2 分别为 pSK-*BmLSP* (I)-*luc* 和 pSK-*BmLSP* (DM)-*luc*. (c). 含家蚕丝素轻链基因第一内含子同源区的序列: 1, 2 分别为 pSK-*BmLSP* (DM)-*luc*, pSK-*BmLSP* (DMS)-*luc*. 数据经穿梭质粒的 β -半乳糖苷酶活力、空载体 pUL220-*luc* 的 Luc 活力和总蛋白量校正. 数据为至少 3 次平行实验的平均值.

(a). The first intron: 1,2,3,4 were represented as pSK-*BmLSP* (I)-*luc*, pSK*BmLSP* (DI)-*luc*, p3Z-*BmLSP* (DMS)-*luc* and p3Z-*BmLSP* (DIMS)-*luc*, respectively. (b). The inactive MTE: 1,2 were represented as pSK-*BmLSP* (I)-*luc*, pSK-*BmLSP*(DM)-*luc*, respectively. (c). The EHIF: 1,2 were represented as pSK-*BmLSP*(DM)-*luc*, pSK-*BmLSP*(DMS)-*luc*, respectively. The data were normalized by the β -galactosidase activity of normalization plasmids, the luciferase activity of pUL220-*luc* and the amount of protein. The data were from at least three separately experiments.

5.2.4 启动子上游区对 *BmLSP* 基因启动子活性影响

BmLSP 基因 5'上游区存在家蚕丝素轻链基因第一内含子同源区 (-304~-593 bp) 和失活的部分水手转座子元件 (-908~-1399 bp)。用 PCR 技术与限制性内切酶酶切方法构建缺失失活的部分水手转座子元件、缺失含家蚕丝素轻链基因第一内含子同源区的序列的 *BmLSP* 基因启动子, 以考察上述序列对启动子活性的影响。

用报告质粒 pSK-*BmLSP* (*I*)-*luc*, pSK-*BmLSP* (*DM*)-*luc* 转染 BmN 细胞, 考察失活的部分水手转座子元件对 *BmLSP* 基因启动子活性影响。结果见图 5.6 (b)。缺失水手转座子元件的启动子活性比含水手转座子元件的提高 35.27%, 经 SAS 软件统计分析, 两者差异达极显著水平(F Value=42.50, $Pr>F=0.0029<0.01$)。表明失活的水手转座子元件对 *BmLSP* 基因启动子活性有一定的抑制作用。

用报告质粒 p3Z-*BmLSP* (*DMS*)-*luc*, pSK-*BmLSP* (*DM*)-*luc* 分别转染 BmN 细胞, 考察含家蚕丝素轻链基因第一内含子同源区的序列对 *BmLSP* 基因启动子活性的影响。含家蚕丝素轻链基因第一内含子同源区的序列的启动子活性是缺失的启动子活性的 4.42 ± 0.28 倍 (图 5.6 (c)) (F Value=349.87, $Pr>F=0.0001<0.01$)。表明含家蚕丝素轻链基因第一内含子同源区的序列中存在增强 *BmLSP* 基因启动子活性的调控序列。

5.2.5 各调控元件对 *BmLSP* 基因启动子活性影响的比较分析

为了比较分析各启动子的调控元件对 *BmLSP* 基因启动子活性影响, 将五个报告质粒同时分别转染 BmN 细胞, 测 Luc 活力 (见表 5.1)。结果与前述单独做的结果相似, 以 *BmLSP* (*I*) 启动子活性为 100%, *BmLSP* (*DI*), *BmLSP* (*DM*), *BmLSP* (*DMS*), *BmLSP* (*DIMS*) 启动子活性分别为 18.07%, 121.32%, 31.24%和 7.17%。

表 5.1 五种报告质粒在 BmN 细胞中的 Luc 活性

Table 5.1 Luciferase activity of the five reporter plasmids in BmN cells

报告质粒	pSK- <i>BmLSP</i> (<i>I</i>) - <i>luc</i>	pSK- <i>BmLSP</i> (<i>DI</i>)- <i>luc</i>	pSK- <i>BmLSP</i> (<i>DM</i>)- <i>luc</i>	p3Z- <i>BmLSP</i> (<i>DMS</i>)- <i>luc</i>	p3Z- <i>BmLSP</i> (<i>DIMS</i>)- <i>luc</i>
cpm	1154.28 ± 140.22	208.56 ± 45.69	1400.35 ± 180.46	360.59 ± 56.36	82.77 ± 10.34
%	100 ± 12.15	18.07 ± 3.96	121.32 ± 15.63	31.24 ± 4.88	7.17 ± 0.89

注: 数据经穿梭质粒的 β -半乳糖苷酶活力、空载体 pUL220-*luc* 的 Luc 活力 (18.26 ± 6.9 cpm) 和总蛋白量校正, 数据为 3 次平行实验的平均值。

Note: The data were normalized by the β -galactosidase activity of normalization plasmids, the luciferase activity of pUL220-*luc* (18.26 ± 6.9 cpm) and the amount of protein. The data were from at least three separately experiments.

5.2.6 外源昆虫激素对 *BmLSP* 基因启动子活性影响

家蚕幼虫的生长发育主要是保幼激素 (JH)、蜕皮激素 (MH) 两种激素相互作用, 从而导致家蚕发生眠、蜕皮以及化蛹 (吕鸿声, 1991)。BmLSP 为家蚕幼虫期特有, 且与蚕的蜕皮有关 (Fujiwara et al, 1991)。因此就保幼激素类似物 (JHA)、MH 两种昆虫外源激素在家蚕 BmN 细胞中对 *BmLSP* (*DM*) 启动子活性的作用进行了探讨。

BmN 细胞转染换液后添加 JHA, 使终浓度分别为 0、1、2、4、6、8 $\mu\text{g/ml}$ 。在 27 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48h 后收集细胞。1 $\mu\text{g/ml}$ JHA 处理, Luc 活力提高到对照的 2.97 ± 0.30 倍 (F Value=84.12, $\text{Pr}>\text{F}=0.0008<0.01$)。而 2、4、6 $\mu\text{g/ml}$ JHA 处理的 Luc 活力, 与对照无显著性差异 (F Value=2.03, $\text{Pr}>\text{F}=0.1844>0.05$), 8 $\mu\text{g/ml}$ JHA 处理的 Luc 活力仅为对照的 $34.72 \pm 16.87\%$, 达极显著差异 (F Value=25.92, $\text{Pr}>\text{F}=0.007<0.01$)。表明 JHA 对 *BmLSP* 启动子转录活性影响呈现剂量依赖效应 (图 5.7 (a))。

BmN 细胞转染换液添加 MH, 使终浓度分别为 0、1、2、4、6 $\mu\text{g/ml}$ 。在 27 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48h 后收集细胞。不同剂量的 MH 对 *BmLSP* 启动子转录活性的影响见图 5.7(b)。经 SAS 软件统计分析, 不同剂量的 MH 对 *BmLSP* 启动子在 BmN 细胞中转录活性没有显著影响 (F Value=0.56, $\text{Pr}>\text{F}=0.6958>0.05$)。

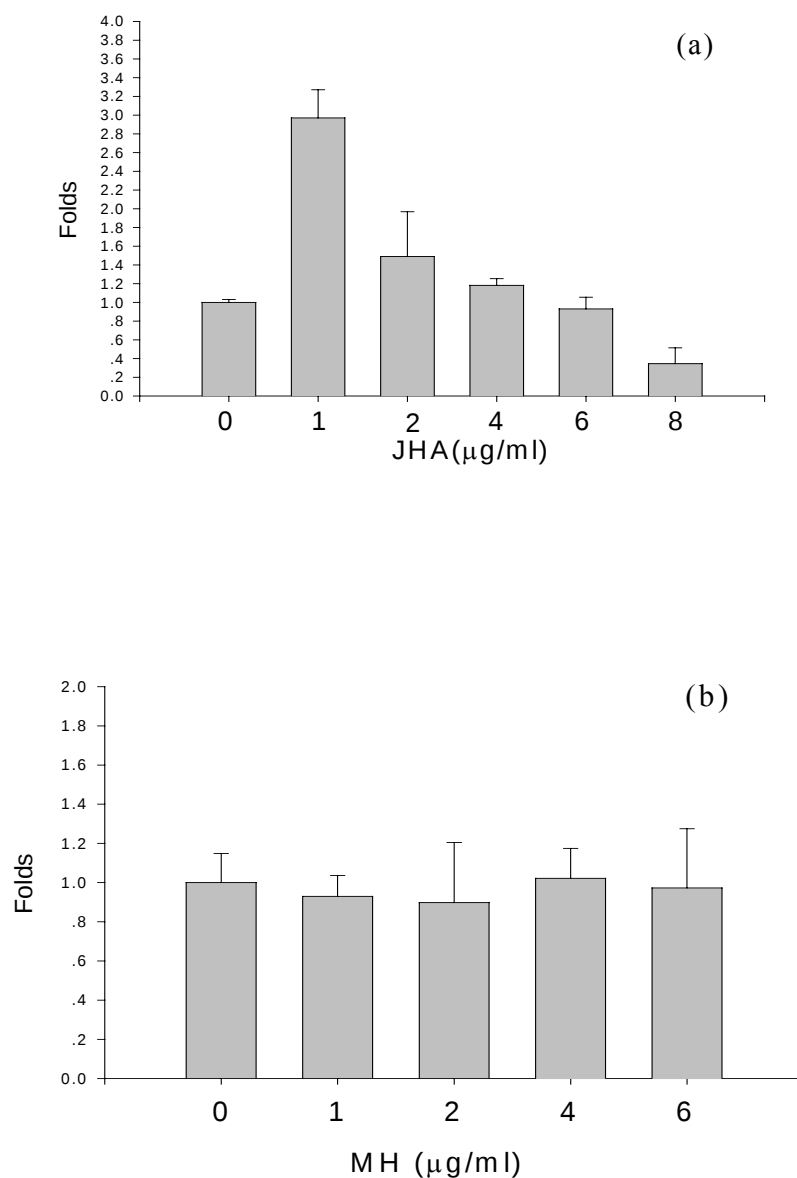


图 5.7 外源昆虫激素对 *BmLSP* 基因启动子活性影响

Fig 5.7 Effects of foreign insect hormones on the *BmLSP* promoter activity

(a) JHA , (b)MH. 数据经空载体 pUL220-*luc* 的 Luc 活力和总蛋白量校正, 以 0 µg/ml 激素处理的 Luc 活力为 1。数据为至少 3 次平行实验的平均值。

(a) JHA , (b)MH. The data were normalized by the luciferase activity of the pUL220-*luc* and the amount of protein. The data were from at least three separately experiments.

5.3 讨论

血清蛋白在幼虫的脂肪体细胞内合成, 具有组织特异性 (Mine et al, 1995)。BmN 细胞是来源于卵巢细胞而建立的细胞系, 可能还具有一定程度的全能性。Sakurai (1990) 曾用 BmN 细胞的抽提物在体外对血清蛋白基因转录进行研究, 表明基因能够真实有效地转录 (Sakurai et al, 1990)。本实验在 BmN 细胞中进行 *BmLSP* 基因启动子活性研究, 表明 *BmLSP* 启动子能在 BmN 细胞中有效转录。我们曾尝试在家蚕体内进行瞬时表达, 但脂质体包埋的报告质粒 DNA 可能无法进入脂肪体细胞, 从而没有检测出活性。

家蚕幼虫期发育主要受激素的调控 (吕, 1991; Riddiford, 1994)。每龄起蚕时体液中 JH 含量高, 随着食桑时间的延伸, JH 含量逐渐下降, 而 MH 含量增加, MH/JH 达到一定比例时进入眠期。人为使用过量的 JHA 或 MH 对蚕体生理有害 (吕, 1991)。 *BmLSP* 在龄期初期转录本高 (Fujiwara et al, 1991), 1 μ g/ml JHA 处理增强启动子活性暗示 *BmLSP* 启动子区域内含有 JH 的正响应元件。至于高浓度的 JHA 抑制 Luc 表达, 可能是由于高浓度 JHA 对细胞正常生理有一定的影响或其他不明原因所致。 *BmLSP* 启动子区虽然存在一个推定的蜕皮激素的负调控元件, 而本实验中 MH 对启动子的活性并没有影响, 这可能是该调控元件不起作用, 或者实验所用的 BmN 细胞中缺少 MH 调控该基因表达的信号传递过程的某个环节所致。

水手转座子元件属于 Δ 型转座子, 具有保守的 D, D34-37D (R) 阳性离子结合的功能基序, 广泛存在于无脊椎动物, 为宿主基因的突变提供了条件, 导致其基因组的多样性 (Daneil et al, 1997)。在转座子的插入后, 宿主 DNA 为了降低因水手转座子元件的流动性造成的损害, 在转座酶编码区发生碱基突变、缺失或移码, 无法正常编码转座酶, 从而使水手转座子元件无法转位到基因组其它位点。因而目前从基因组中发现的水手转座子元件绝大多数是失活的 (Allan et al, 2000; Kumaresan et al, 2004)。在家蚕基因组中大约有上千个水手转座子元件 (Mita et al, 2004; Kumaresan et al, 2004)。在丝素重链基因上游区也发现数个水手转座子元件, 推测其参与了丝蛋白基因的表达调控 (Zhou et al, 2003)。虽然转座子被认为是自私基因, 但最近有证据表明它参与其他正常基因的转录调控 (Bushman, 2004)。从本研究结果看, 失活的水手转座子元件对邻近的 *BmLSP* 基因的表达有一定的负调作用。

内含子是不连续基因转录后被剪除的 RNA 序列对应的 DNA 序列。虽然内含子曾被认为是无意义的序列, 但近年来越来越多的证据表明它也参与基因的表达调控。特别是第一内含子, 存在有 DNA 复制、转录的调控元件 (Xie et al 2002; Bhattacharyya et al, 1999)。Takiya 和 Martinez 等人根据实验结果推测家蚕丝素重链基因的第一内含子中含有对启动子转录起增强功能的调控元件 (Takiya et al, 1990, 1997; Martinez et al, 2004), 本研究中 *BmLSP* 第一内含子、位于 *BmLSP* 基因 5'上游区的含家蚕丝素轻链基因第一内含子同源区的序列, 都能提高 *BmLSP* 基因启动子转录表达活性, 表明这两部分序列中存在类似增强子的调控序列。但经网上相关的昆虫转录调控元件数据库检索, 没有发现类似增强子序列, 表明可能存在新的类似增强子序列, 有待进一步研究来确定。内含子与基因的时序性表达有关 (Bhattacharyya et al, 1999), *BmLSP* 基因的幼虫期特异性表达是否与内含子中的调控序列有关值得进一步探讨。

另外, *BmLSP* 的表达与丝素基因的表达是否存在一些关联呢? 从本次实验结果来看, 可能有

存在 JH 调控途径这个关联点, 即 JH 促进 *BmLSP* 的转录表达, 而抑制丝素基因的表达, 从而出现两者转录表达时期上相左, 即每龄期前段 *BmLSP* 基因表达量高, 而后期表达量少, 特别是在五龄后期, 几乎不转录表达, 而丝素基因的转录恰好相反, 每个龄期末段都表达, 五龄前表达量少, 仅供眠蚕固定位置之用, 而五龄后期大量表达。另一种可能途径是 *BmLSP* 与丝素基因的启动子调控序列中存在共同序列参与了它们协调表达, 如水手转座子元件 (*BmLSP* 与 *Fib-H* 共有), *BmLSP* 上游区的 *Fib-L* 第一内含子区同源序列。从本实验结果可知, 水手转座子元件对 *BmLSP* 基因表达存在一定抑制作用, 而与 *Fib-L* 第一内含子区同源的 *BmLSP* 上游区对 *BmLSP* 基因的表达调控起增强作用。Zhou 等人推测水手转座子元件参与了 *Fib-H* 基因的表达调控 (2000), *Fib-L* 第一内含子区含有大量的重复序列 (Kikuchi et al, 1992), 可能也参与调控 *Fib-L* 基因的表达。这些序列如何参与基因的调控, 以及是否参与了协调调控丝素基因、*BmLSP* 基因有序表达, 值得进一步实验研究予以阐明。

第六章 野桑蚕、家蚕 *HSC70-4 5'*侧翼区的克隆与序列分析

从果蝇染色体在热激、化学物质胁迫的条件下导致蓬松响应的现象,发现了编码热激蛋白的基因家族(Petersen et al,1985)。胁迫诱导的染色体蓬松导致热激蛋白基因(heat shock protein gene, *HSP*)的转录与表达,抑制其他正常蛋白的合成。随后发现几乎所有生物体的组织细胞对环境胁迫都会产生保守的响应,其中主要是几种热激蛋白的合成(Lindquist et al, 1988)。在大多数的物种中最主要与保守的胁迫响应蛋白是分子量为 70kd 的热激蛋白(*HSP70*), *HSP70* 基因是 *HSP70* 基因家族的一员。*HSP70* 基因家族包括胁迫应急蛋白(*HSP70s*)和常态发育中也稳定表达的热激同源蛋白(*HSC70s*) (Lizabeth et al., 1990; Pelham, 1986; Karouna-Renier, et al, 2003)。

HSP70s、*HSC70s* 主要是作为分子伴侣参与了蛋白质的折叠、跨膜运输、变性蛋白的重折叠、细胞蛋白的降解等细胞生命活动过程(Beckmann, et al, 1990; Deshaies, et al, 1988; Shei et al, 1992; Bercovich et al, 1997; Fink, 1999), 对细胞在常态条件下维持正常的细胞生命活动、在一定时间的胁迫条件下也能生存下来具有重要生物学意义。

果蝇 *HSC70-4* 基因是一种组成型基因,在所有的组织细胞中大量表达,*HSC70-4* 蛋白主要存在于细胞核周围胞质纤维的网格中(Lindquist et al, 1988)。Lee et al (2003) 从家蚕 r06 品种中克隆了 *HSC70-4* 基因的编码区与启动子区域,*BmHSC70-4* 是由 1 个内含子间隔的 2 个外显子组成,编码 649 个氨基酸残基,与果蝇和烟草天蛾的 *HSC70-4* 的同源性分别为 89%和 96%。用 RT-PCR 法检测发现,*BmHSC70-4* 基因在精巢、卵巢、丝腺、脂肪体、中肠以及血液淋巴等细胞组织中都有高量表达,且在 *BmN* 细胞中呈现对热激处理不敏感性,并对启动子转录活性进行了检测,发现其转录活性比杆状病毒 *ie-1* 的启动子高 2 倍左右。

本实验根据 r06 *BmHSC70-4* 基因 5'侧翼区的序列,设计一对引物,PCR 法从野桑蚕、家蚕苏·菊×明·虎基因组 DNA 中分别克隆了野桑蚕的 *BmandHSC70-4* 基因 5'侧翼区(The 5' flanking region of Heat Shock Cognate 70-4 gene, *Bombyx mandarina*, *BmandHSC70-45'FR*) 和家蚕苏·菊×明·虎的 *BmHSC70-4* 基因 5'侧翼区(The 5' flanking region of Heat Shock Cognate 70-4 gene, *Bombyx mori*, *BmHSC70-45'FR* (Suju×Minghu)), 进行了测序比较分析,推测了可能的顺式调控元件,以供进一步的启动子功能特性分析。

6.1 材料与方法

6.1.1 试验材料

见 4.1.1 和 3.1。

6.1.2 引物的合成

根据已报道的家蚕 r06 的 *BmHSC70-4* 序列(GenBank Acession NO AB084923)设计一对引物,分别导入 *EcoRI*、*BamHI* 限制性内切酶的酶切位点。由上海生物工程公司合成。

Forwards: 5'-AAG AAT TCC TGG GTT AGG CGC TCG TCG T-3'

Reverse: 5'-AAG GAT CCA GTC TTG TTA CTT GTT CTT AAA ACA-3'

6.1.3 野桑蚕、家蚕基因组 DNA 的提取

见 3.2.12。

6.1.4 PCR 法克隆野桑蚕、家蚕苏·菊×明·虎的 *HSC70-4* 基因 5'侧翼区片段及其纯化

分别以经碱变性后的野桑蚕、家蚕苏·菊×明·虎基因组 DNA 为模板, 94 预变性 2 min, 94 15 s, 53 1 min 45 s, 72 2 min, 35 个循环, 72 延伸 7 min。

PCR 产物经凝胶电泳分离目的大小片段, 用 glassmilk 法纯化、回收。

6.1.5 野桑蚕、家蚕苏·菊×明·虎的 *HSC70-4* 基因 5'侧翼区片段的亚克隆与测序

将 pGEM3Z 和回收的 PCR 产物分别用 *EcoR* / *BamH* 双酶切后, 经 T4DNA 连接酶连接, 转化于 *E. coli* TG1。筛选出重组质粒 p3Z-*BmandHSC70-4*、pSK-*BmHSC70-4* (Suju×Minghu), 具体克隆方法参考文献 (Sambrook, et al, 1989)。经酶切鉴定正确的重组质粒 DNA 用于测序。由大连宝生物技术有限公司测定序列。

6.1.6 序列分析与可能顺式调控元件的预测

用 DNASTAR、BLAST 和 MatInspector 软件进行序列分析, 同源序列检索与顺式调控元件的预测。

6.2 结果与分析

6.2.1 野桑蚕、家蚕苏·菊×明·虎的 *HSC70-4* 基因 5'侧翼区片段的扩增

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 (见图 6.1), 获得约 1.4 kb DNA 片段, 与 Lee(2003)报道的相应片段大小一致, 表明已经获得目的大小的片段。经相应的限制性内切酶酶切, 亚克隆到 pGEM3Z 质粒, 进行测序。

6.2.2 野桑蚕和家蚕苏·菊×明·虎的 *HSC70-4* 基因 5'侧翼区片段的测序结果与序列分析

BmandHSC70-45'FR、*BmHSC70-4* (Suju×Minghu) 5'FR 经 sp6 和 T7 测序后, 测得完整序列。结果见图 6.2。所测的序列已经登陆 GenBank, 序列号分别为 AY342387、AY339064。长度分别为 1469bp、1429bp, 涵盖了部分第一外显子和启动子区。两者的同源性和为 72.8%, 与相应家蚕 r06 的 *HSC70-4* 基因序列同源性分别为 76.4%、97.5%。

家蚕与野桑蚕之间差异主要以片段缺失为主, 分别有长度为 3、5、13、21bp 的片段缺失, 从而使家蚕与野桑蚕的 *HSC70-4* 同源性较低。

在 MatInspector 软件上检索, 在启动子区域内推测了可能存在的顺式作用元件有 6 个 GATA 盒、2 个 CAAT 盒和 2 个热激响应因子 (HSF) 结合元件, 具体位置见图 6.2。但没有发现经典的 TATA 盒与 GC 盒。

所获得的序列在 GenBank 上检索同源序列结果显示, *BmandHSC70-4*、*BmHSC70-4* (Suju×Minghu) 与其他热激蛋白基因的 5'侧翼区同源性很低, 从而无法检索出来。

6.3 讨论

HSC70-4 基因编码区在物种间的保守性较高 (Papadimitriou, et al, 1998), 家蚕 *Bm HSC70-4* 编码氨基酸残基与烟草天蛾 *HSC70-4*、粉纹夜蛾 *HSC70-4*, 黑腹果蝇 *HSC70-4*, *HSC70-1* 的同源性分别高达 97%, 96%, 89%, 82%。甚至与人 *HSC70*、*70-1* 的同源性达到 85%, 82% (Lee et al, 2003)。但其 5'侧翼区往往变化较大, 同源性较低 (Karouna-Renier, et al, 2003), 以致于在网上检索不到同源性高于 20% 的同源序列。野桑蚕与家蚕血缘关系比较近的两个物种, *HSC70-4* 基因 5'侧翼区同源性也仅为 72.8%, 而两者幼虫血清蛋白基因 (*BmLSP*) 的 5'侧翼区的同源性高达 96.4% (唐等, 2003)。

一般认为家蚕和野桑蚕是在至少 5000 年前从共同祖先原野桑蚕进化而来 (吕, 1991; Martinez et al, 2004), 在室内驯化, 由于饲养环境的变化, 人为地给予较为恒定的适合家蚕生长发育的温湿度, 象“宝宝”一样侍候, 温度骤变的可能性较在野外生长的野桑蚕小, 因而作为热激等逆环境条件的响应蛋白基因的调控区在进化上可能较为频繁, 而野桑蚕一直在野外风餐露宿, 在高度恶劣的环境选择压下, 可能与原野蚕的保持一致, 从而导致家蚕与野桑蚕的 *HSC70-4* 基因的 5'侧翼区同源性较低。

从推测的顺式作用元件来看, 在野桑蚕的 1 个 GATA 处有一碱基的突变, 其他的调控元件三者完全一致。令人不解的是在转录起始位点后非翻译的转录区, 第六碱基开始, 家蚕苏·菊×明·虎出现 TTATTG 五个碱基插入, 而野桑蚕与家蚕 r06 完全一致 (见图 6.2)。

本实验所克隆的野桑蚕和家蚕苏·菊×明·虎的 *HSC70-4* 基因 5'侧翼区涵盖了部分第一外显子、启动子区、HSF 以及其他一些功能元件, 可以供进一步的启动子功能分析。

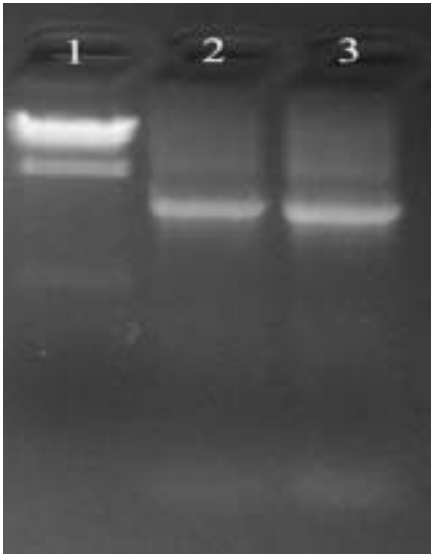


图 6.1 PCR 产物的电泳鉴定
Figure 6. 1 Identifications of PCR products by gel electrophoresis

1. 标准 DNA 分子量 Marker: λ DNA/ *Hind* 2. 野桑蚕 3. 家蚕苏·菊×明·虎
1. Marker: λ DNA/ *Hind* ,2. *Bombyx mandarina* 3. Suju×Minghu , *Bombyx mori*

图 6.2 野桑蚕 *HSC70-4* 基因 5'侧翼区 (M) 和家蚕苏·菊×明·虎的 *HSC70-4* 基因 5'侧翼区 (S) 序列及其与家蚕 R06 的 *HSC70-4* 基因 5'侧翼区 (R) 的比较

Figure 6.2 Nucleotide sequence of the *BmandHSC70-45'FR* (M), the *BmHSC70-45'FR* (Suju×Minghu) (S) and their alignments with *BmHSC70-45'FR* (R07) (R)

短线(-)表示缺失，园点(·)表示与野桑蚕 *HSC70-45'FR* 相同，方框区为推定的顺式作用元件。
Dashes represent deletions. Dots represent the same nucleotide as the *BmandHSC70-4P*. The rectangle shows the deduced *cis*-regulation elements.

见下一页

1	M	CCTGGGTTAG	GCGCTCGTCG	TTTTAATAAA	TTCATGTTTC	GTAATCTCTT	AATCTCAAAC	GATAGTGACT	GACAGACAAC
1	R				..T.....			..A...AG..	
1	S				..T.....			..A...GG..	
CAAT BOX									
81	M	TTGCATCTGA	CGAGGTCATG	AATCCAATCC	AATAGCTATT	GTATAATTG	ATCACTCTGA	TTGCGAGCAT	GGCAAAAACA
81	R						..A.....	..A.....	..T.....
81	S						..A.....	..A.....	
161	M	TTTAAGTACG	AAAATAAGCC	TATAAAGGAT	TTGGCTGTAT	GAGTTTTGAT	CTCTTTCGTT	ATTCAGTTGA	ACGAGAACAA
156	R	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
156	S	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GATA.1									
241	M	CAAAAAGTCT	ATGGCATATG	GTGTAGTGTT	GTATATAATT	TCAAA	CGATA AATAA	TTTAA	TTTATTTTAC
228	R						..C.....		
228	S						..C.....		
321	M	ACTCACTTAA	TTCTTAGTTA	CAATCTGAGA	CCTTGTTCTG	TCACGAAGCC	CGCTATAGAA	AGCAGAGTAA	TAATACACTT
307	R								
307	S								
401	M	GTCACCTGAC	ATTGGCGAAA	TCTAAAAGGA	AACGCCATAA	ACCCAATAGA	TAGATAGATG	TTTTACTTTC	AGTAAAGTTC
384	R								
384	S								
GATA.1 GATA.2 HSF.03									
481	M	AGATTATTTT	GAACCTTTTT	CTTGATAAAA	TAATGAACTT	TGATAAAA	TA	ATGTATGCAG	AATGCTAAAG
459	R							..C.....	..AGAGACTTC
459	S							..C.....	
561	M	TCCAAATATA	GTAATTTACA	GGCTACGACT	TTATGCTTTT	GTGGCTGATA	GTTTGTATT	TACCGAAAAA	ATATACATTA
539	R							..T.....	
539	S							..C...T.....	..C.....
641	M	CCTTACAGGT	AAGTTTTAGC	GCATTAAATA	GTAATATTCA	GCCACATTAT	TTTTAAAGCA	CGGGAAGGTA	TAGACATGCG
619	R	A.....		..T.....		..T.....		..A.....	
619	S	..C.....		..T.....		..T.....		..A.....	
GATA.3									
721	M	TAGAAGGCAT	AGATATGACT	ATACTATACA	TATAATTGGT	CTATAATGCC	TCCAAAGTGG	GAGTAATCCA	TGAAAACAAG
697	R								
695	S								
GATA.1									
801	M	AAGAACCATA	AATTATTGA	TAATATA	TAA	ATGTACATAC	ATGTGATAGC	ATTTTAGATT	TTTTTACTTT
777	R								
775	S								
881	M	ACATATTTTT	TTCTAAAATT	ACTTTTGATT	CTGATTGTG	TGATTTTGCA	ATAAGCAAGT	TTAGCTTCAA	GGCCAAAACA
857	R	..T..GG..							
855	S	..T.....							
961	M	GCATTTAACC	CTACAAACAA	TCCAAAATTC	TAGTTACAAT	GCCAAAAAAT	CCACTTCAGA	TAGTACCAAT	ATTTGAAATT
933	R							..G...C.....	..T.....
931	S	-----	-----					..G...C.....	..T.....
1041	M	TAAAAAAA-	TTGTGAATCG	TGTATGTTTT	CATATTATTA	TACACAGTTT	TTATTTAGGT	TTACTGTTTT	GTCGTAGAAT
996	R							..G.....	
994	S							..G.....	
1120	M	TTAACAACAA	TTTAAGAATT	TTATGCAAGG	TAAATTTTAT	TTTGGACTCG	ATTAATTAAA	ACACGAGGAC	ATCACTTTAG
1076	R		..C.....						
1074	S		..C.....						
CAAT BOX									
1200	M	ATATTGACGT	AGTATTTCTG	AATCCATAAT	ACGGCAACAG	CATTGACCAT	CCAACCAATA	GCCTTTCACT	GCGTCGAGCT
1156	R								
1154	S								
GATA.1 HSF.04									
1280	M	AGCTGTGTTT	TGATTGGATA	ATTGACGGAA	TGTTCCAGAA	TTTCCTAGTG	ACGTCTGAGC	TAGTGACGCA	TCGAGTATGT
1235	R								
1234	S								
TSP									
1360	M	ACTTCATGTA	CAAAAACGGA	ACTCGACGAT	TCGAATTG--	----AATCAT	TTACTGAAGA	GAAGCCGTCA	ATCGCGCACG
1315	R								
1314	S					TT ATTG			
1434	M	TTTGTGAGT	TGTTTTAAGA	ACAAGTAACA	AGACTG				
1389	R	..C.....							
1394	S	..C.....							

第七章 家蚕 *HSC70-4* 基因启动子的功能分析

HSC70-4 基因是热激蛋白 70 (*HSP70*) 的同源基因。一般来说, *HSP70* 在常态下表达量极低, 在胁迫条件下其转录与表达急剧增加, 而 *HSC70-4* 在常态下能稳定表达, 且表达量较高, 在胁迫条件下表达量提高往往不明显 (Craig, et al, 1983; Rybczynski, et al, 2000)。

Lee 等人 (2003) 用 RT-PCR 半定量法检测发现, *BmHSC70-4* 基因在精巢、卵巢、丝腺、脂肪体、中肠以及血液淋巴等细胞组织中都有高量表达, 且在 BmN 细胞中呈现对热激处理不敏感性, 并对启动子转录活性进行了检测, 发现其转录活性比杆状病毒 *ie-1* 的启动子高 2 倍左右。

最近有报道 *HSC70-4* 的表达受到氨基酸类似物、蛋白体抑制剂、20 羟基蜕皮酮、双丁酰基 cAMP、PTTH、保幼激素类似物 (JHA)、4-苯基丁酸钠、乙醇等因子的影响, 同时还受到各种细胞间信号影响 (Hunt, et al., 1999; Rybczynski, et al., 2000; Rubenstein, et al. 2000)。*HSC70* 基因的表达还受到生物体的发育时期、组织的类型、细胞的周期等因素的影响 (Craig, et al., 1983; Hung, et al., 1998; Hunt, et al., 1999; Rinehart, et al., 2000; Rybczynski, et al., 2000; Karouna-Renier, et al., 2003)。

因而本研究采用准确度与灵敏度高的 *luc* 作为报告基因, 对 *BmHSC70-4* 基因的启动子功能进行分析研究, 在细胞与家蚕体内瞬时表达系统, 考察了热激、冷激、外源昆虫激素处理对启动子转录活性的影响, 以及在五龄家蚕不同发育阶段的启动子活性变化规律。

7.1. 材料与方法

7.1.1 材料

见 3.1。

穿梭质粒 pSK-*ie1-β-gal-hr3* 由本实验室构建保存(周, 2002)。

7.1.2 方法

7.1.2.1 报告质粒的构建

从质粒 pUL220-*luc* 中用 *Bam*HI 限制性内切酶切下荧光素酶基因 (*luc*), 亚克隆到 pGEM3Z-*BmHSC70-4* 质粒, 位于启动子下游, *Xba*I 酶切鉴定 *Luc* 接入方向正确, 获得报告质粒 p3Z- *BmHSC70-4-luc*。构建流程见图 7.1。

7.1.2.2 质粒的提取、酶切、DNA 片段制备、连接与转化 均参照文献 (Sambrook et al, 1989) 进行。细胞培养方法参考 Summers, et al.(1987)。

7.1.2.3 报告质粒在细胞内的转染、激素处理、热激处理和瞬时表达

约为 5×10^5 个细胞接种 12 cm² 培养瓶, 27℃ 贴壁培养过夜。倾去含 10%胎牛血清 TC-100

培养基, 用无血清 TC-100 培养基洗细胞 2 次后, 每瓶加 1ml 无血清 TC-100 培养基。在 100 μ l 反应体系中加入 1 μ g 报告质粒 DNA 和 5 μ l 阳离子脂质体, 充分混匀, 27 $^{\circ}$ C 静置 15min 后, 逐滴加入培养瓶中, 边滴边混匀。细胞在无血清 TC-100 培养基 27 $^{\circ}$ C 培养 4-6 hr 后, 倾去原培养基, 每瓶加 3 ml 含 10%胎牛血清 TC-100 培养基。激素处理的试验, 换液后立即添加相应的激素。热激处理的试验, 在转染细胞培养 7 hr 后, 37 $^{\circ}$ C 热激 2 hr, 转至 27 $^{\circ}$ C 培养。除激素处理外的转染试验都以 0.5 μ g 穿梭质粒 pSK-*ie1*- β -*gal*-*hr3* DNA 作为内对照系统, 以转染 pUL220-*luc* 的细胞作为空白对照。按文中所转染时间收集细胞。以上每种处理至少有 3 个重复, 每批实验至少重复 3 次。

7.1.2.4 报告质粒在家蚕体内的转染、激素处理、热激处理、冷激处理和瞬时表达

在 20 μ l 反应体系中加入 1 μ g 报告质粒 DNA 与 5 μ l 阳离子脂质体, 充分混匀, 27 $^{\circ}$ C 静置 15 min 后。选择重量相近的 5 头蚕为一组, 每头家蚕注射 20 μ l DNA 脂质体转染液。每个处理 3 个重复, 每批实验至少重复 3 次。

激素处理: 在五龄饲食后 36 hr, 按文中要求剂量, MH 直接注射入家蚕体腔, JHA 体喷蚕体表, 处理 12 hr 后, 进行 DNA 转染。蒸馏水处理为对照区。转染 48hpt 时收集血淋巴细胞。

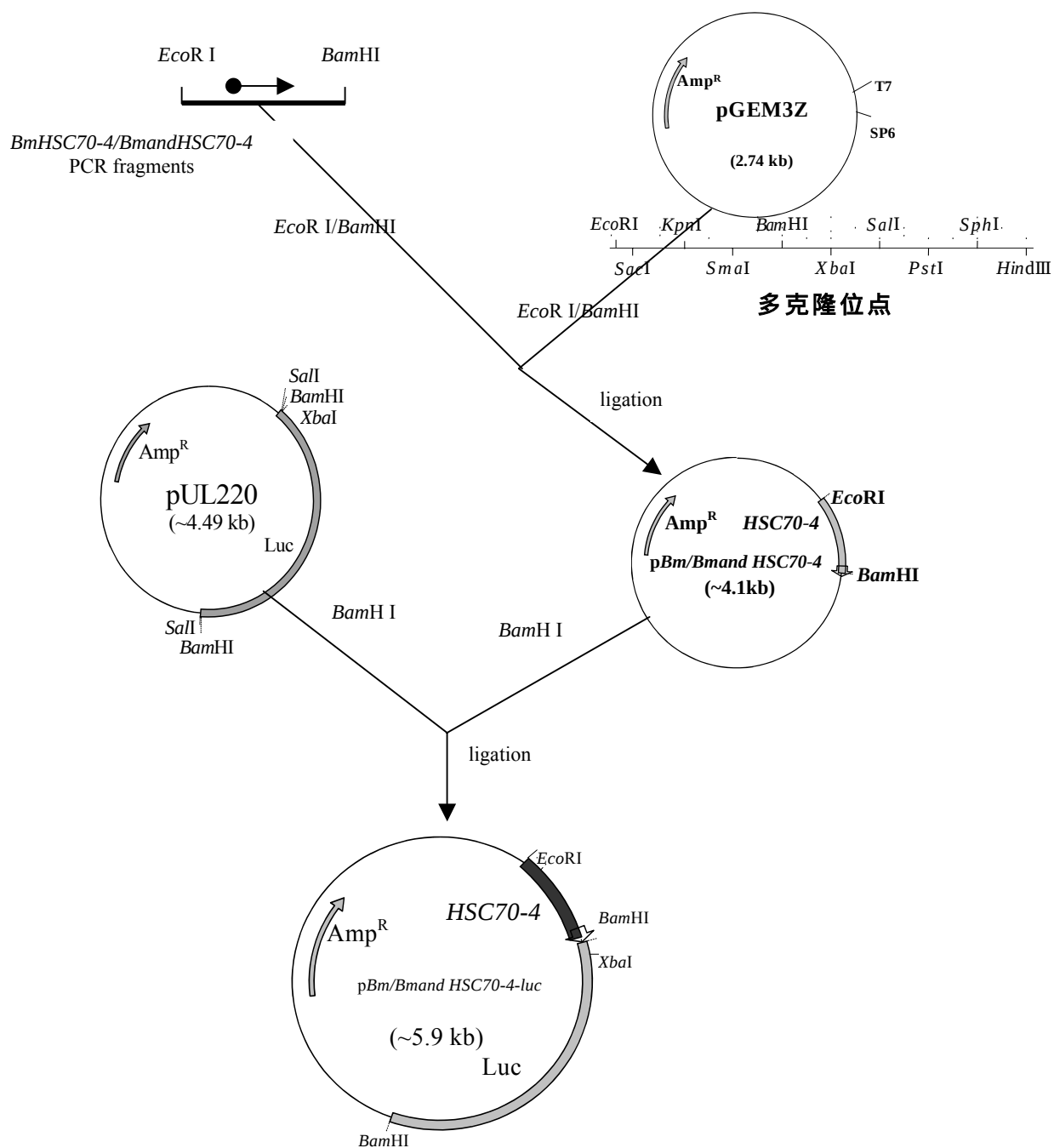
热激处理: 每头四/五龄家蚕在饲食后 24 hr, 注射 10/20 μ l 含由脂质体包埋的质粒 DNA 转染液, 质粒转染 30 hpt 后, 再在 37 $^{\circ}$ C 培养箱热激处理 2hr, 无热激处理为对照, 转染 36 hpt 时收集血淋巴细胞。

冷激处理: 每头五龄家蚕在饲食后 24 hr 注射 20 μ l 含由脂质体包埋的质粒 DNA 转染液, 质粒转染 30 hpt 后, 再在 -15 $^{\circ}$ C 冷藏箱冷激处理 15 min, 无冷激处理为对照, 转染 36 hpt 收集血淋巴细胞, 经处理后进行酶活力的测定。

7.1.2.5 细胞和蚕血淋巴抽提物的制备及 Luc 活力的测定

将细胞收集于 1.5mL Eppendorf 管中, 4 $^{\circ}$ C、10000g 离心 5 min, 去上清, 沉淀用 1ml 1 $\times$ PBS 洗涤 2 次, 沉淀用 400 μ L 1 $\times$ 细胞裂解液裂解, 裂解物冻融一次, 离心后取上清测定 Luc 活力 (Idahl, et al, 1986), 平行测定穿梭质粒校正系统 β -galactosidase 比活 (Jeffrey, 1992) 和总蛋白浓度 (Moos M., 1995), 以校正 Luc 的 cpm 值。每 5 头家蚕血淋巴收集于 1.5mL Eppendorf 管中, 抽提物的制备及 Luc 活力和总蛋白浓度测定的测定方法同细胞。

获得的数据用 SAS 软件进行处理统计, 用 Sigma Plot 软件制图。

图 7.1 质粒 *pBm/Bmand HSC70-4-luc* 的构建图解Fig 7.1 Diagrammatic representation of the functional constructions *pBm/Bmand HSC70-4-luc*

7.2. 结果与分析

7.2.1 报告质粒 p3Z-*BmHSC70-4-luc* 的酶切鉴定

通过 PCR 法与酶切法构建的报告质粒 p3Z-*BmHSC70-4-luc* ,各过程经酶切,都出现预期大小的目的条带,证明质粒构建过程正确(见图 7.2),可用于启动子功能研究分析。

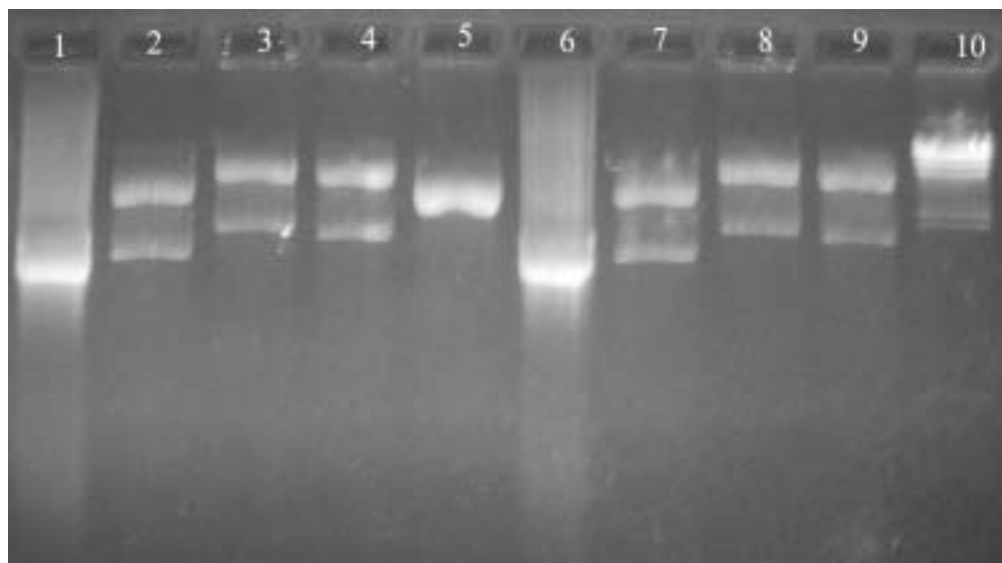


图 7.2 质粒 p3Z-*BmHSC70-4-luc* 和 p3Z-*BmandHSC70-4-luc* 酶切鉴定

Fig 7.2 Restriction analysis of the p3Z-*BmHSC70-4-luc* and p3Z-*BmandHSC70-4-luc*

注:1、6 分别为从野桑蚕、家蚕基因组 DNA 扩增的 *HSC70-4* 基因启动子 PCR 片段,2 为 p3Z-*MandHSC70-4* 被 *EcoRI*/*BamHI* 双酶切;3、4 分别为 p3Z-*MandHSC70-4-luc* 被 *BamHI*、*XbaI* 单酶切;5 为 pGEM3Z 被 *BamHI* 单酶切;7 为 p3Z-*BmHSC70-4* 被 *EcoRI*/*BamHI* 双酶切;8、9 分别为 p3Z-*BmHSC70-4-luc* 被 *BamHI*、*XbaI* 单酶切;10 为 λ DNA/*Hind III* Marker。

Note: 1,6 was PCR fragment of *BmandHSC70-4* and *BmHSC70-4* promoter from *Bombyx mandarina* and *Bombyx mori*, respectively; p3Z-*BmandHSC70-4* (2) and p3Z-*BmHSC70-4* (7) were digested by *EcoRI*/*BamHI*; p3Z-*BmandHSC70-4-luc* was digested by *BamHI* (3) and *XbaI* (4); p3Z-*BmHSC70-4-luc* was digested by *BamHI* (8) and *XbaI* (9); pGEM3Z was digested by *BamHI* (5); λ DNA/*Hind III* Marker(10)。

7.2.2 在常态下 *BmHSC70-4* 启动子的转录活性

在 BmN 细胞中,分别在转染换液后 6 hpt、12 hpt、18 hpt、24 hpt、36 hpt、48 hpt、60 hpt、72 hpt 收集细胞,以考察报告质粒 p3Z-*BmHSC70-4-luc* 的表达时相,在 6 hpt 虽然能检测到 Luc 的活性,但很微弱。随着转染时间的延长依次上升,到 48 hpt 时达到最高,60 hpt、72 hpt 与 48 hpt 持平。结果见图 7.3。

在异源的秋粘虫 sf21 细胞中,转染后 12 hpt 才检测到 *BmHSC70-4* 启动子的转录活性,经校正后的每微克细胞抽提物的 Luc 活力为 80 ± 18.18 cpm,24 hpt 为 1401.15 ± 117.97 cpm,48 hpt 为 1836.57 ± 1763.20 cpm 分别只有相应时间在 BmN 细胞中活力的 4.37%,8.50%和 10.77%。说明 *BmHSC70-4* 启动子虽然能在异源 sf21 细胞中转录,但比同源细胞中的活性低得多。

家蚕饲养至五龄饱食后 48hr,经阳离子脂质体包埋的 p3Z-*BmHSC70-4-luc* 转染液注射到家蚕

的体腔,在 48 hpt 收集蚕血淋巴细胞,经校正后的每 20 微克细胞抽提物的 Luc 活力为 7298.63 ± 1005.76 cpm。

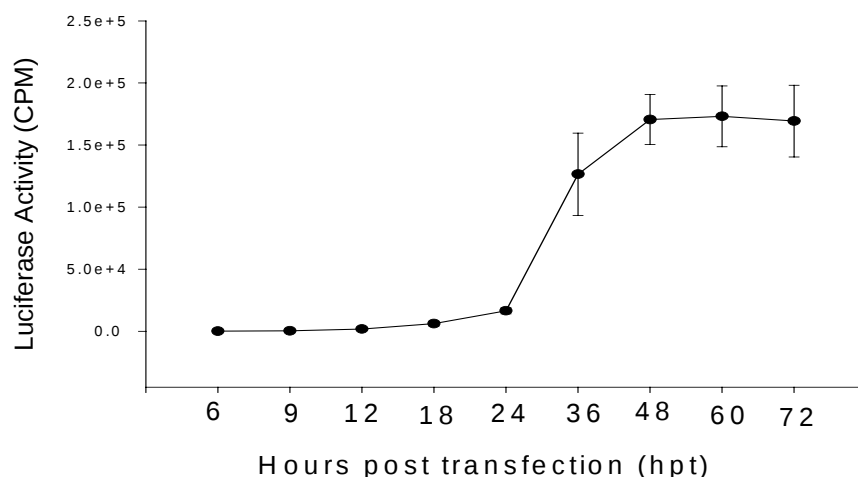


图 7.3 报告质粒 p3Z-BmHSC70-4-luc 在 BmN 细胞中的表达时相

Fig7.3 The profiles of luciferase activity in BmN cells transfected with p3Z-BmHSC70-4-luc.

Y 轴数据表示经校正后每微克细胞抽提液蛋白的 Luc 活力(每分钟光量子数表示);X 轴数据表示转染时间(hpt);每个转染时共转染穿梭质粒;转染 pUL220-luc 质粒细胞为空白对照;数据至少来自三次实验的平均值。

The luciferase activity is indicated on the Y axis as the counts per minute (cpm). The investigating time is presented on X axis as hour post-transfection (hpt). The β -gal normalizing system was introduced into each transfection. Each reaction contained 1 μ g of the protein extracted from BmN cells. The cells, transfected with pUL220-luc DNA, served as the blank control. The results represented average from three separate transfections.

7.2.3 热激处理对 *BmHSC70-4* 启动子在 BmN、Sf21 细胞和蚕体内的转录活性的影响

BmN 细胞转染换液后,培养 7hpt,37℃ 热激 2 hr 后移至常温 27℃ 培养。按热激后 0 hr、3 hr、9 hr、15 hr 收集细胞,以考察热激处理对 *BmHSC70-4* 启动子在 BmN 细胞中的转录活性的影响。结果如图 3 所示。*BmHSC70-4* 启动子转录活性热激处理后 0 hr、3 hr 比对照增加 4.22 ± 1.08 、 4.40 ± 0.57 倍。而热激处理后 9 hr、15 hr 没有显著差异 (F value=0.06, $Pr>F=0.8196>0.05$) (见图 7.4)。

在异源的秋黏虫 sf21 细胞中,热激效果更明显。热激处理后 0 hr、3 hr、9 hr、15 hr,*BmHSC70-4* 启动子转录活性分别增加 3.90 ± 0.14 、 5.05 ± 0.06 、 11.08 ± 0.57 和 3.90 ± 1.18 倍(见图 7.4)。

在四龄、五龄家蚕饲食后 24 hr 转染 DNA,转染后 30 hpt 时,37℃ 热激 2 hr 后移至正常条件下饲养,转染 36 hpt 时收集血淋巴细胞。在四龄家蚕体内,热激处理提高 *BmHSC70-4* 启动子的转录活性达 3.11 ± 0.88 倍;而五龄期热激处理后,*BmHSC70-4* 启动子转录活性,仅为对照的 $57.24 \pm 3.64\%$,显著低于对照,显示一定的抑制作用。

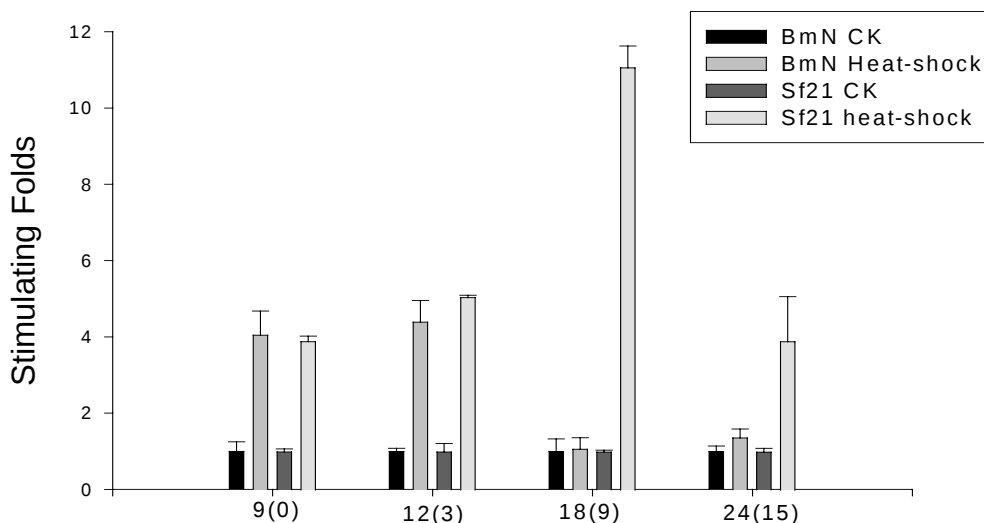


图 7.4 在 BmN 和 sf21 细胞中热激处理对 BmHSC70-4 启动子的影响

Fig 7.4 Effects of heat shock treatment on the transcriptional activity of *Bmhsc70-4* promoter in BmN cells and Sf 21 cells

Y 轴数据表示热激处理增加每微克细胞抽提液蛋白的 Luc 活力倍数 (对照设为 1.00); X 轴表示转染时间 (hpt), 括号内表示热激后的时间 (小时); 每个转染时共转染穿梭质粒; 转染 pUL220-luc 质粒细胞为空白对照; 数据至少来自三次实验的平均值。

The increments of luciferase activity is indicated on Y axis as stimulating folds by heat shock treatment over the cells without treatment which was arbitrarily set at 1.00. The investigating time is presented on X axis as hour(s) post-transfection (hpt) and hour(s) post-heat-shock in parentheses. The β -gal normalizing system was introduced into each transfection. The cells, transfected with pUL220-luc DNA, served as the blank control. Each reaction contained 1 μ g of the protein extracted from cells. The results represented the mean $\pm$ S.D. (error bars) from triplicate samples in three separate transfections.

7.2.4 冷激处理对 *BmHSC70-4* 启动子在五龄家蚕体内转录活性的影响

在五龄家蚕饲食后 24hr 转染, 转染后 30 hpt 后, 在 -15 $^{\circ}$ C 冷激 15 min 后移至正常条件下饲养, 转染 36 hpt 时收集血淋巴细胞。发现冷激处理的 Luc 活力与对照的没有显著差异 (F value=0.25, $Pr>F=0.6449>0.05$)。

7.2.5 *BmHSC70-4* 启动子在五龄家蚕不同发育阶段的转录活性

五龄家蚕饲食后 48hr 转染, 在转染后 12 hpt、24 hpt、36 hpt、48 hpt、60 hpt、72 hpt、84 hpt、96 hpt、108 hpt、120 hpt、132 hpt 收集蚕血液淋巴细胞, 其中转染后 108 hpt 为熟蚕, 132 hpt 为已经吐出部分蚕丝的蚕。

在五龄家蚕不同发育阶段, 报告质粒 p3Z-*BmHSC70-4-luc* 的表达活性见图 7.5。转染 12 hpt 检测到家蚕血淋巴细胞 Luc 的活力, 以后逐渐升高至 48 hpt, 20 μ g 细胞抽提物 Luc 的活力达 7298.63 ± 1005.76 cpm。48-72 hpt 基本保持一致, 72 hpt 到 96 hpt 逐渐升高至 16299.05 ± 2755.68

cpm, 到 108 hpt (熟蚕) 达到顶点, 为 37124.44 ± 6237.30 cpm。而吐丝后显著下降, 132 hpt (吐出部分蚕丝) 时 7815.05 ± 762.28 cpm。这结果表明 *BmHSC70-4* 启动子在蚕体内的转录活性随发育时间不同而有所波动, 且到熟蚕期达到最高, 吐丝后急速下降。

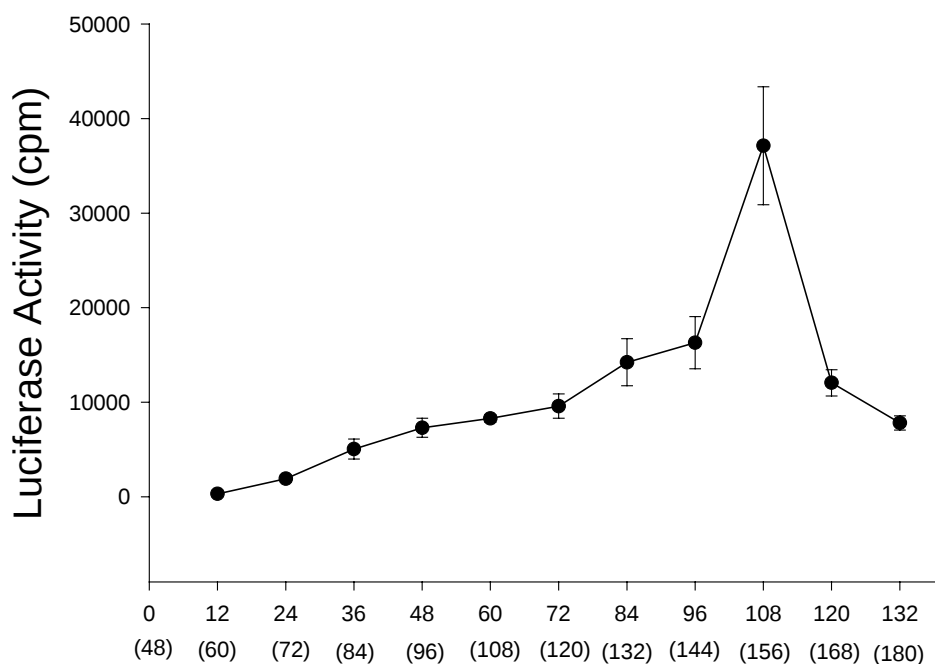


图 7.5 家蚕五龄不同发育阶段对 *BmHSC70-4* 启动子转录活性的影响

Fig 7.5 The change pattern of the transcriptional activity of *Bmhsc70-4* promoter during 5th instar stage in silkworm larvae.

Y 轴数据表示经校正后每 20 微克细胞抽提液蛋白的 Luc 活力 (每分钟光子数表示); X 轴表示转染时间 (hpt), 括号内表示五龄饲食后的时间 (小时); 108hpt 时, 家蚕进入熟蚕期; 转染 pUL220-*luc* 质粒细胞为空白对照; 数据至少来自三个平行实验的平均值。

The luciferase activity is indicated on the Y axis as the counts per minute (cpm). The investigating time is presented on X axis as hour(s) post-transfection (hpt) and hour(s) after 5th instar ecdysis in parentheses. At 108 hpt, the larvae enter wandering stage and start to spin silk. Three larval hemolymph were collected as a sample. The larva, transfected with pUL220-*luc* DNA, served as the blank control. Each reaction contained 20 μ g of the protein extracted from larval hemolymph cells. The results represented the mean $\pm$ S.D. (error bars) from triplicate samples in three separate transfections.

7.2.6 外源昆虫激素对 *BmHSC70-4* 启动子转录活性的影响

在五龄家蚕饲食后 36hr 用 50mg/kg, 100mg/kg, 150mg/kg JHA 三种浓度体涂蚕体背部, 空白对照用蒸馏水体涂。JHA 处理家蚕 12hr 后, 进行报告质粒 DNA 转染, 在常规条件下饲养, 转染 48 hpt 后, 收集蚕血淋巴细胞。经 SAS 软件统计分析 JHA 处理的 Luc 活力与对照没有差异 (F

value=0.22, Pr>F=0.8796>0.05)(表 7.1)。

在五龄家蚕体内，每头家蚕分别注射 0 (蒸馏水)、1、3、5 μg MH，12hr 后转染，转染 48 hpt 收集蚕血细胞，结果见图 7.6。低浓度 1、3 μg MH 处理分别提高启动子转录活性 2.68 ± 0.43 倍、 2.05 ± 0.52 倍，高浓度 5 μg MH 处理经 SAS 软件统计分析不影响其活性(F value=0.01, Pr>F=0.9608>0.05)。

JHA Concentrations (mg/Kg)	Mock(0)	50	100	150
Luciferase activity (cpm)	15566.14 $\pm$ 1996.36	15654.36 $\pm$ 2428.79	15510.64 $\pm$ 1813.58	16716.75 $\pm$ 2169.13

表 7.1 在五龄家蚕体内不同 JHA 浓度对 *BmHSC70-4* 启动子的转录活性的影响
Table 7.1 Effects of different dose of JHA on the transcriptional activity of *Bmhsc70-4* promoter in 5th instar silkworm larvae
经校正后每 20 微克细胞抽提液蛋白的 Luc 活力(每分钟光子数表示) ;48hpt 收集蚕血淋巴细胞 转染 pUL220-*luc* 质粒家蚕为空白对照；数据至少来自三次平行实验的平均值。

Luciferase activity is indicated as counts per minute (cpm). Three larval hemolymph were collected as a sample at 48 hpt. Each reaction contained 20 μg of the protein extracted from larval hemolymph cells. The larva, transfected with pUL220 DNA, served as the blank control. The results represented the mean $\pm$ S.D. from triplicate samples in three separate transfections.

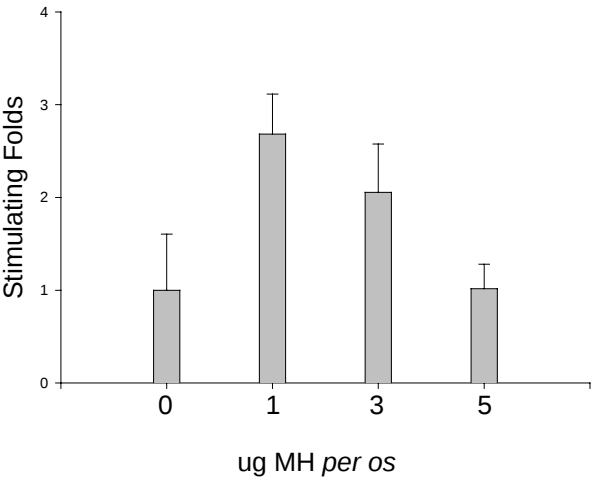


图 7.6 在五龄家蚕体内不同剂量 MH 处理对 *BmHSC70-4* 启动子的转录活性的影响
Fig 7.6 Effects of different dose of MH on the transcriptional activity of *BmHSC70-4* promoter in 5th instar silkworm larvae

Y 轴数据表示 MH 处理增加每 20 微克细胞抽提液蛋白的 Luc 活力倍数 (对照设为 1.00)；转染 pUL220-*luc* 质粒家蚕为空白对照；数据至少来自三次实验的平均值。
The increase of luciferase activity is indicated on Y axis as stimulating folds by MH treatment over the larvae without treatment, which was arbitrarily set at 1.00. Each reaction contained 20 μg of the protein extracted from larval hemolymph cells. The larva, transfected with pUL220-*luc* DNA, served as the blank control. The results represented average from three separate transfections.

7.3 讨论

HSC70-4 基因是一种组成型的基因,在常态下表达量比较高,其表达产物参与细胞的生命活动 (Craig, et al, 1983, Rybczynski, et al, 2000),本研究也证实了在常态下 *BmHSC70-4* 启动子有很高的活性。

在不同的发育阶段呈现出表达量的变化 (Craig, et al, 1983; Hung, et al, 1998; Hunt, et al, 1999; Rybczynski, et al, 2000; Karouna-Renier, et al, 2003)。在五龄期家蚕幼虫中, *BmHSC70-4* 启动子转录活性随着转染时间有所变动,到熟蚕时活性最高,开始吐丝后遽然下降。另外在虫蛹变态期, *BmHSC70-4* 启动子的活性虽然能检测到,但很弱。

这可能有三种原因:一是与蚕体内蛋白质合成特性有关,即五龄后期大量合成丝蛋白 (吕, 1991),需要大量的 *BmHSC70-4* 蛋白作为分子伴侣参与新合成的丝蛋白质的折叠、跨膜运输等生命过程,而在吐丝期丝蛋白合成几乎停止,因此 *BmHSC70-4* 的表达量也随之下降。

二是与体内的激素浓度变化有关,五龄期家蚕体内的 MH 逐渐升高,到熟蚕时达到最高,而后下降。这从本研究在五龄添加外源昆虫激素 MH (1-3 μ g/头蚕)导致活性显著升高的实验结果得以证实。

三是有可能报告质粒 DNA 在家蚕体内由于时间偏长而降解,导致吐丝后 Luc 活性遽然下降,为此,我们在五龄饲食后 120 hr (距熟蚕期 36 hr) 注射转染报告质粒 DNA,考察熟蚕、吐丝期的 Luc 活性,呈现相一致的结果。因而排除了这种可能性。

有些物种的 *HSC70-4* 基因对热激诱导不敏感,也有可能是该基因在常态下表达量高,从而使热激效果在高背景的条件下不易检测出来 (Rybczynski et al, 2000)。在 BmN 细胞中, Lee (2003) 采用 RT-PCR 半定量法,在 37 和 42 热激处理对 *BmHSC70-4* 转录并无影响。本研究用 Luc 作为报告基因,其灵敏度高,在 BmN 细胞和四龄家蚕幼虫体内,热激处理可以提高启动子转录活性达 3-4 倍。而在五龄家蚕幼虫体内,热激对启动子转录活性呈明显的抑制作用。这可能与家蚕四龄期耐高温性能比五龄期强 (吕, 1991) 有关,其机理有待于进一步研究。

HSC70-4 基因在物种间的保守性较高 (Papadimitriou et al, 1998),在异源的秋黏虫 sf21 细胞中 *BmHSC70-4* 启动子仍有相当的活性。有趣的是, *BmHSC70-4* 启动子在秋黏虫 sf21 细胞中热激效果比 BmN 细胞中更显著,高达十几倍。这可能在常态下异源的 sf21 细胞中的表达量较低,热激后激活了热激响应元件的反式作用因子,或者 sf21 细胞本身对热激较为敏感,从而提高了启动子的转录活性。

有报道冷激对 *HSC70-4* 基因的表达有诱导作用 (Rinehart et al, 2000),本研究也尝试了在家蚕幼虫 (-15, 15min) 中冷激处理对 *BmHSC70-4* 启动子转录活性的影响,发现在冷激对其没有显著的作用。

HSC70-4 参与蜕皮激素的受体初级装配,与蜕皮激素响应元件相结合的受体区域结合,然而在烟草夜蛾的前胸腺中, MH 抑制 *HSC70-4* 的表达 (Rybczynski et al, 2000)。在五龄家蚕幼虫体内,低剂量 MH 处理 (1-3 μ g/头蚕) 提高启动子的转录活性,而高剂量 MH 处理却没有作用。激素的作用存在一个阈值, MH 处理高于 3 μ g/头蚕时对 *BmHSC70-4* 启动子活性影响不显著。MH 处理的五龄家蚕为饲食后第 36 hr,处于内源 JH 下降、MH 上升阶段,养蚕生产中一般每头蚕体

喷外源 $1\text{ }\mu\text{g}$ JHA 或添食 $2\text{ }\mu\text{g}$ MH 均可明显提高茧丝蛋白产量 (吕, 1991), 这与本实验每头蚕注射 1 、 $3\text{ }\mu\text{g}$ MH 处理提高 *BmHSC70-4* 启动子转录活性是否有相关, 值得进一步探讨。

第八章 野桑蚕 *HSC70-4* 基因启动子的功能分析

如第六章所述,野桑蚕与家蚕血缘关系比较近的两个物种,*HSC70-4* 基因启动子区同源性仅为 72.8%。差异主要以片段缺失为主,分别有长度为 3、5、13、21bp 的片段缺失,从而使家蚕与野桑蚕的 *HSC70-4* 启动子区同源性较低。

一般认为家蚕是在至少 5000 年前从野桑蚕驯化而来 (Lu, 1991),随着饲养环境的变化,人为地给予较为恒定的适合蚕生长发育的温度,温度骤变的可能性较在野外生长的野桑蚕小,因而作为热激等逆境条件的响应蛋白基因的调控区在进化上较为频繁,从而导致同源性较低。但他们的功能是否也有所差异,目前还未查明。

因此,本研究以 *Luc* 为报告基因,正接于 *BmandHSC70-4* 的启动子下游,构建了报告质粒。由 lipofectin 介导转染细胞和家蚕幼虫,进行瞬时表达分析,考察了热激处理对启动子转录活性的影响。

8.1 材料与方法

8.1.1 材料

见 7.1.1。

8.1.2 方法

8.1.2.1 报告质粒的构建

从 pUL220 质粒中用 *Bam*HI 限制性内切酶切下荧光素酶基因 (*luc*),亚克隆到 p3Z-*BmandHSC70-4* 质粒,位于启动子下游,用 *Xba*I 酶切鉴定 *luc* 接入方向正确,获得报告质粒 p3Z-*BmHSC70-4-luc*。构建流程见图 7.1。

8.1.2.2 其他方法见 7.1.2。

8.2. 结果与分析

8.2.1 报告质粒 p3Z-*BmandHSC70-4-luc* 的酶切鉴定

通过 PCR 法与酶切法构建的报告质粒 p3Z-*BmandHSC70-4-luc*,各过程经相应的内切酶酶切鉴定正确 (见图 7.2),可用于启动子功能特性研究分析。

8.2.2 在常态下 *BmandHSC70-4* 启动子的转录活性

转染 p3Z-*BmandHSC70-4-luc* 48 hpt,收集 BmN 细胞和 sf21 细胞,每微克细胞抽提蛋白 *Luc* 的活性分别为 186524.7 ± 28365.2 cpm 和 17772.47 ± 2089.5 cpm。*BmandHSC70-4* 启动子活性在 BmN 细胞中比在 sf21 细胞中高 10 倍,这与 *BmHSC70-4* 启动子转录活性结果一致。就 *Luc* 的绝对值来说,两者也基本相同。

五龄饷食后 48 hr 经阳离子脂质体包埋的 p3Z-*BmandHSC70-4-luc* 转染液注射到家蚕的体腔。在转染后 48 hpt 收集蚕血液淋巴细胞, 20 μ g 细胞抽提蛋白 Luc 的活性为 8797.31 ± 2436.0 cpm。

8.2.3 热激处理对 *BmandHSC70-4* 启动子在 BmN、Sf21 细胞和蚕体内的转录活性的影响

BmN 细胞转染换液后, 培养 7 hr, 37 $^{\circ}$ C 热激 2 hr 后移至常温 27 $^{\circ}$ C 培养。按热激后 0 hr、3 hr、9 hr、15 hr 收集细胞, 以考察热激处理对 *BmandHSC70-4* 启动子在 BmN 细胞中的转录活性的影响。结果如图 8.1 所示。*BmandHSC70-4* 启动子转录活性热激处理后 0 hr、3 hr 比对照增加 3.89 ± 0.73 、 3.24 ± 0.37 倍。而热激处理后 9 hr、15 hr 没有显著差异。

在秋黏虫 sf21 细胞中, 热激效果更明显。热激处理后 0 hr、3 hr、9 hr、15 hr, *BmandHSC70-4* 启动子转录活性分别增加 4.09 ± 0.25 、 15.77 ± 1.79 、 10.52 ± 2.41 、 5.47 ± 2.47 倍 (见图 8.1)。这结果与 *BmHSC70-4* 基因启动子的结果相一致。

在四龄、五龄家蚕饷食 24 hr 后进行转染, 转染后 30 hpt, 37 $^{\circ}$ C 热激 2 hr, 然后移至正常条件下饲养, 转染 36 hpt 时收集血淋巴细胞。在四龄家蚕体内, 热激处理提高 *BmandHSC70-4* 启动子的转录活性达 2.01 ± 0.23 倍; 而五龄期热激处理后 *BmandHSC70-4* 启动子转录活性, 仅为对照的 $63.74 \pm 14.85\%$, 显著低于对照, 呈现一定的抑制作用。

8.3 讨论

家蚕与野蚕的 *HSC70-4* 基因的启动子区域存在一些差异, 但在细胞与家蚕体内的转录活性以及热激处理的响应作用基本一致, 说明突变区域不影响启动子的功能。在第 6 章推测的启动子区域可能的顺式作用元件有 6 个 GATA 盒、2 个 CAAT 盒和 2 个热激响应因子 (HSF) 结合元件。其中只有一个 GATA 区存在一碱基突变。从本实验结果来说, 家蚕与野蚕的 *HSC70-4* 启动子功能特性是一致的, 这一个 GATA 突变并不影响启动子特性。这有可能由于启动子区域存在另外 5 个 GATA 盒, GATA 盒是盈余的, 一个发生突变后由其他 GATA 盒起功能补偿了。相似的补偿现象在其他一些启动子的增强子类似序列也存在 (Ludwig et al, 1998; 2000)。由于启动子调控区一些元件是盈余的, 同时调控区的功能元件可以比较灵活地自由组合, 而且不影响启动子的特征这一事实, 导致了启动子调控区域在进化上变异性比编码区大得多的这一现象 (Arnosti, 2003)。

虽然家蚕与野蚕是在 5 千年前由共同的祖先进化而来 (吕, 1991), 分离后生存环境有很大差异, 但 *HSC70-4* 基因主要作为组成型基因, 其产物在生物体正常的生命活动中起到关键作用, 如分子伴侣的组成部分, 参与细胞骨架的运动, 以及细胞内运输与胞间转运等 (Beckmann, et al, 1990; Deshaies, et al, 1988; Shei et al, 1992; Bercovich et al, 1997; Fink, 1999), 因而在进化上它的转录调控的主要元件比较保守。

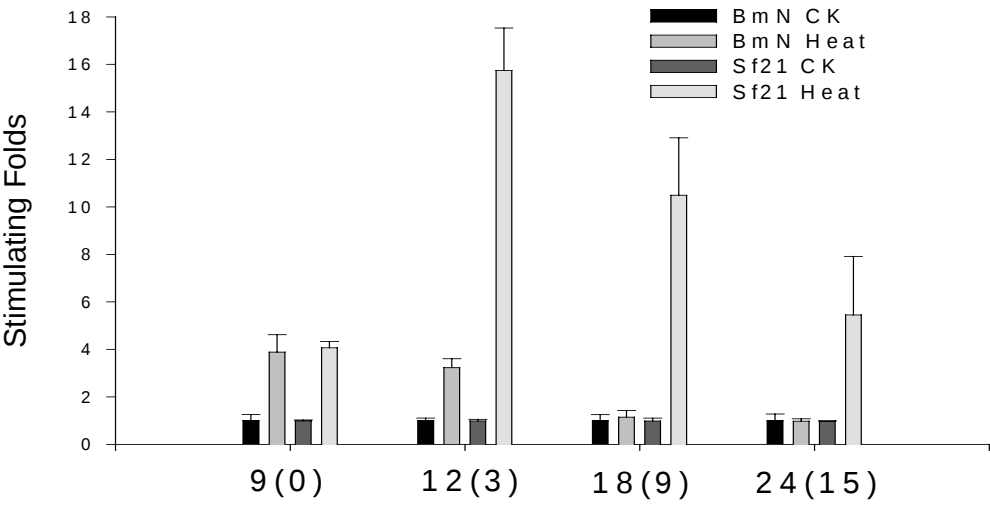


图 8.1 在 BmN 和 sf21 细胞中热激处理对 Bmand*HSC70-4* 启动子的影响

Fig 8.1 Effects of heat shock treatment on the transcriptional activity of *BmandHSC70-4* promoter in BmN cells and Sf 21 cells

Y 轴数据表示热激处理增加每微克细胞抽提液蛋白的 Luc 活力倍数（对照设为 1.00）；X 轴表示转染时间（hpt），括号内表示热激后的时间（小时）；每个转染时共转染穿梭质粒；转染 pUL220-luc 质粒细胞为空白对照；数据至少来自三次实验的平均值。

The increments of luciferase activity is indicated on Y axis as stimulating folds over the cells without heat shock which was arbitrarily set at 1.00. The investigating time is presented on X axis as hour(s) post-transfection (hpt) and hour(s) post-heat-shock in parentheses. The β -gal normalizing system was introduced into each transfection. The cells, transfected with pUL220 DNA, served as the blank control. Each reaction contained 1 μ g of the protein extracted from cells. The results represented the mean $\pm$ S.D. (error bars) from triplicate samples in three separate transfections.

第九章 BmNPV *hr3* 对家蚕、野蚕 *HSC70-4* 启动子活性的增强功能

昆虫杆状病毒同源区 (homologous regions, *hr*) 序列是分散在其基因组中的重复序列, 由不同数目的大约 70bp 高度保守的重复序列组成。每个重复区含有以 *EcoR* I 为中心的 30 bp 的回文序列, 回文序列的两侧则为约 20bp 的直接重复。在苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒 AcMNPV、家蚕核多角体病毒 BmNPV、云杉卷叶蛾核多角体病毒 (*Choristoneura fumiferana* multiple NPV, CfMNPV)、舞毒蛾核多角体病毒 (*Lymantria dispar* multiple NPV, LdMNPV) 和黄杉毒蛾核多角体病毒 OpMNPV 等已经研究过的杆状病毒都存在 *hr*。几乎所有同源区业已证明是病毒 DNA 复制起始点, 同时还对病毒的一些早期基因 (如 39K, p35, ie—N 等) 启动子以及外源 Actin 基因启动子的转录具有增强功能 (Guarino et al, 1986; Lu et al, 1997; 吕鸿声 1998; Gomi et al, 1999; Lo et al, 2002; Felipe et al, 2002; Viswanathan et al, 2003)。

张志芳 (1995) 从家蚕杆状病毒镇江株 (BmNPV ZJ8) 基因组 DNA PstI-K 片段中克隆到 *hr3* 并进行了序列测定。结果表明 *hr3* 具有杆状病毒同源重复区的结构特点: 含有 3 个 72 bp 重复序列, 各个片段含有一个为 *EcoR* I 位点为中心的 30 bp 不完全回文序列, 每个回文序列有 2~3bp 不对称碱基, 以中心 *EcoR* I 位点计两侧第 8 位碱基必不对称; 在回文序列的两侧对称位置还有一段可形成茎环结构的 13 bp 保守序列 TTTGAAAAACAAA, 且该茎环结构和回文序列的相对位置亦十分保守; 富含 A+T 达 70% 左右。

该片段对来源于 AcNPV 和 BmNPV 的 *ie-1*、*helicase*、*gp64* 基因的启动子具有增强功能, 同时也能增强来源于果蝇 *HSP70* 启动子的活性 (周, 2002; Zhou et al, 2002, 2003; Xiao et al, 2001; Chen et al, 2004)。

我们前两章结果证明了 *BmHSC70-4*、*BmandHSC70-4* 启动子是一个组成型与诱导型相结合的启动子, 在细胞和家蚕体内血淋巴细胞具有很高的转录活性。在 BmN 细胞中, *BmHSC70-4* 启动子活性比源于家蚕杆状病毒常用的极早期基因 *ie1* 启动子活性高 2 倍左右 (Lee et al, 2003), 因而 *BmHSC70-4*、*BmandHSC70-4* 启动子可以应用于家蚕转基因和细胞稳定表达体系中驱动目的基因的启动子。

如前述 BmNPV *hr3* 对杆状病毒基因启动子和外源启动子具有超强的增强子功能, 本文利用瞬时表达系统, 在细胞和家蚕体内, 就 BmNPV *hr3* 是否能增强 *BmHSC70-4*、*BmandHSC70-4* 启动子活性进行了探讨, 为 *BmHSC70-4/hr3*、*BmandHSC70-4/hr3* 启动子/增强子组合进一步应用打下基础。

9.1 材料与方法

9.1.1 材料

见 3.1

9.1.2 方法

9.1.2.1 报告质粒的构建

从质粒 pSK-*hr3* 中用 *Pst* I 限制性内切酶切下 *hr3* 片段，亚克隆到 p3Z-*BmHSC70-4-luc* 质粒和 p3Z-*BmandHSC70-4-luc*，位于 *luc* 下游。根据 *hr3* 片段内的 *EcoR* I 酶切位点和载体上的 *Hind* III 酶切位点鉴定 *hr3* 接入方向，获得报告质粒 p3Z-*BmHSC70-4-luc-hr3* (cis) / (reverse)，p3Z-*BmandHSC70-4-luc-hr3* (cis) / (reverse)。构建流程见图 9.1。

9.1.2.2 质粒的提取、酶切、DNA 片段制备、连接与转化 均参照文献 (Sambrook, 1989) 进行。细胞培养方法参考 Summers, *et al.* (1987)。

9.1.2.3 报告质粒在细胞内的转染和瞬时表达

见 7.1.2.3。

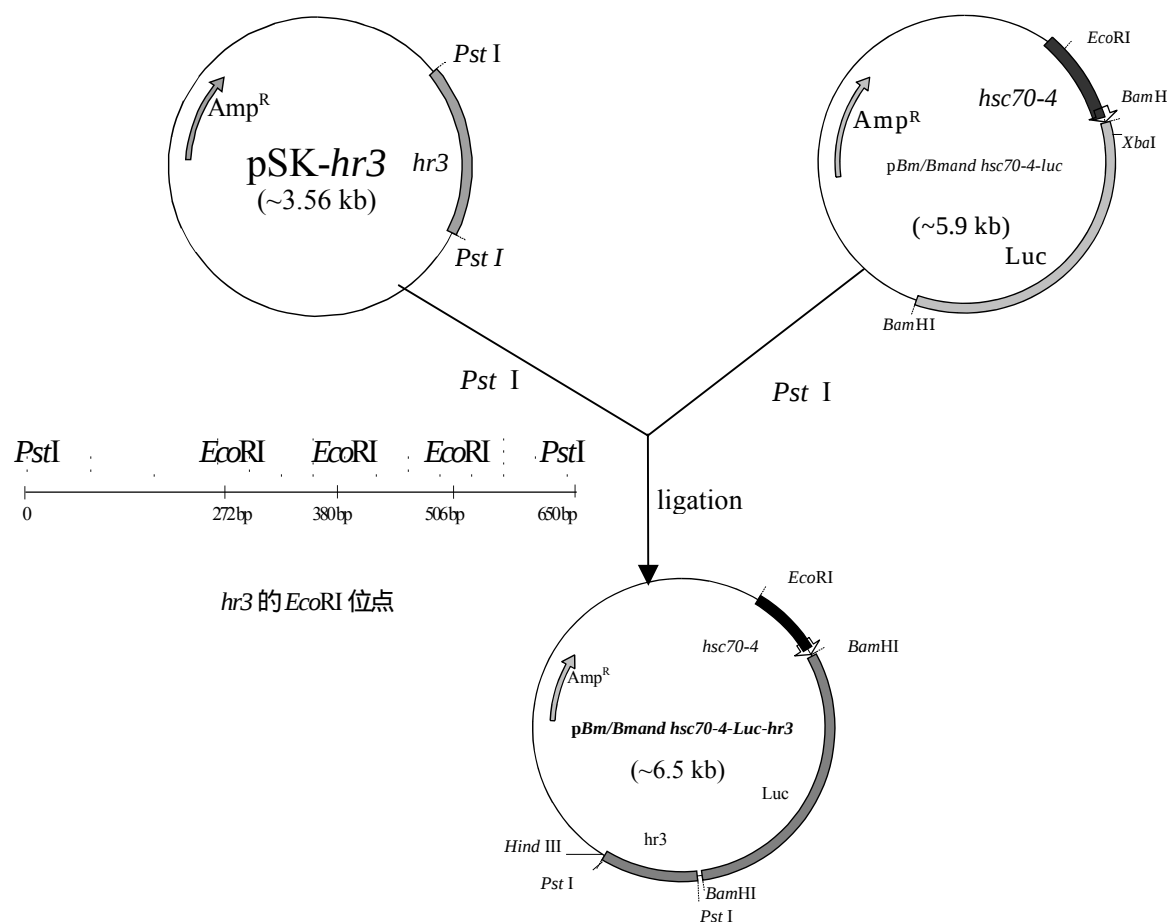
9.1.2.4 报告质粒在家蚕体内的转染、激素处理和瞬时表达

见 7.1.2.4。

9.1.2.5 细胞和蚕血淋巴抽提物的制备及 Luc 活力的测定

见 7.1.2.5。

获得的数据用 SAS 软件进行处理统计，用 Sigma Plot 软件制图。

图 9.1 质粒 *pBm/Bmand HSC70-4-luc-hr3* 的构建图解Fig 7.1 Diagrammatic representation of the functional constructions *pBm/Bmand HSC70-4-luc-hr3*

9.2.结果与分析

9.2.1 报告质粒的酶切鉴定

构建的报告质粒 *p3Z-Bm/Bmand HSC70-4-luc-hr3*，经 *Pst I* 单酶切鉴定，已经接入 *hr3* 片段，约 650bp。根据 *hr3* 片段内的 *EcoRI* 酶切位点和载体上的 *Hind III* 酶切位点鉴定 *hr3* 接入方向，以有切出 272bp 片段的为正接，没有 272bp 片段的为反接，获得正确的报告质粒 *p3Z-BmHSC70-4-luc-hr3* (cis) / (reverse), *p3Z-BmandHSC70-4-luc-hr3* (cis) / (reverse) (见图 9.2)，可用于瞬时表达分析。

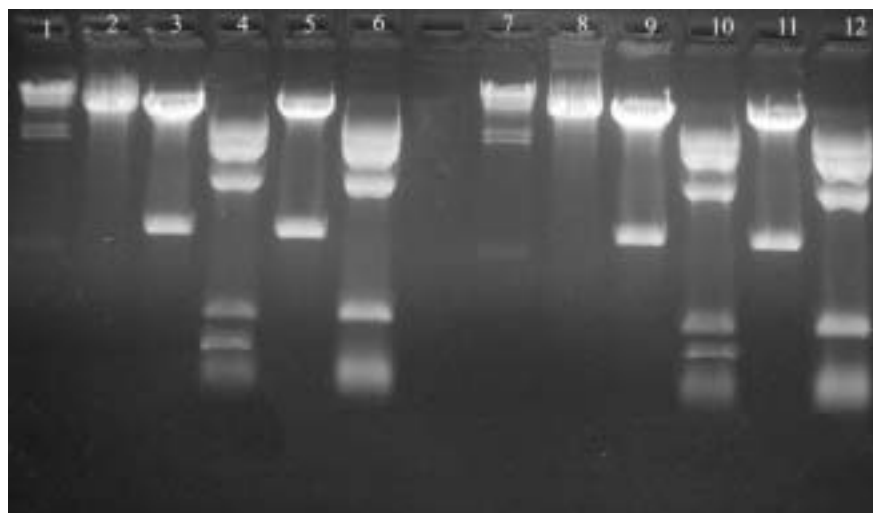


图 9.2 质粒 p3Z-BmHSC70-4-luc-hr3 和 p3Z-BmandHSC70-4-luc-hr3 酶切鉴定

Fig 7.2 Restriction analysis of the p3Z-BmHSC70-4-luc-hr3 and p3Z-BmandHSC70-4-luc-hr3

2 为 p3Z-BmHSC70-4-luc *Pst* I 单酶切；3、4 分别为 p3Z-BmHSC70-4-luc-hr3 (*cis*) 被 *Pst* I 单酶切，*EcoR* I/*Hind* III 双酶切；5、6 分别为 p3Z-BmHSC70-4-luc-hr3 (*reverse*) 被 *Pst* I 单酶切，*EcoR* I/*Hind* III 双酶切；8 为 p3Z-BmandHSC70-4-luc *Pst* I 单酶切；9、10 分别为 p3Z-BmandHSC70-4-luc-hr3 (*cis*) 被 *Pst* I 单酶切，*EcoR* I/*Hind* III 双酶切；11、12 分别为 p3Z-BmandHSC70-4-luc-hr3 (*reverse*) 被 *Pst* I 单酶切，*EcoR* I/*Hind* III 双酶切；1、7 分别为 λ DNA/*Hind* III Marker。

p3Z-BmHSC70-4-luc (2) and p3Z-BmandHSC70-4-luc (8) were digested by *Pst* I; p3Z-BmHSC70-4-luc-hr3(*cis*) was digested by *Pst* I (3) and *EcoR* I/*Hind* III (4); p3Z-BmHSC70-4-luc-hr3(*reverse*) was digested by *Pst* I (5) and *EcoR* I/*Hind* III (6); p3Z-BmandHSC70-4-luc-hr3(*cis*) was digested by *Pst* I (9) and *EcoR* I/*Hind* III (10); p3Z-BmandHSC70-4-luc-hr3(*reverse*) was digested by *Pst* I (11) and *EcoR* I/*Hind* III (12); λ DNA/*Hind* III Marker(1,7).

9.2.2 在 BmN 细胞内 *hr3* 对 *BmHSC70-4*、*BmandHSC70-4* 启动子转录活性的增强作用

经脂质体包埋的报告质粒 p3Z-BmHSC70-4-luc、p3Z-BmHSC70-4-luc-hr3(*cis*)、(*reverse*)，p3Z-BmandHSC70-4-luc、p3Z-BmandHSC70-4-luc-hr3 (*cis*)、(*reverse*)分别转染 BmN 细胞，转染换液后 24 hpt 收集细胞，测得 Luc 活力。从图 9.3 可以看出，*hr3* 能显著增加 *BmHSC70-4*、*BmandHSC70-4* 启动子的转录活性。正接时，分别提高 16.37 ± 2.00 、 17.17 ± 0.75 倍；反接时分别提高 17.06 ± 1.49 、 16.69 ± 2.36 倍。这说明 *hr3* 增强功能与其接入方向无关。

9.2.3 在家蚕体内 *hr3* 对 *BmHSC70-4*、*BmandHSC70-4* 启动子的转录活性增强作用

五龄饷食后 24 hr，每头蚕注射 $20 \mu\text{L}$ 经脂质体包埋的报告质粒到蚕血，常规饲养，48 hpt 收集血淋巴细胞。结果见图 9.3。在蚕体内，*hr3* 增加 *BmHSC70-4*、*BmandHSC70-4* 启动子的转录活性分别为 190.57 ± 111.36 、 242.19 ± 68.75 倍，比 BmN 细胞中增加倍数更显著。

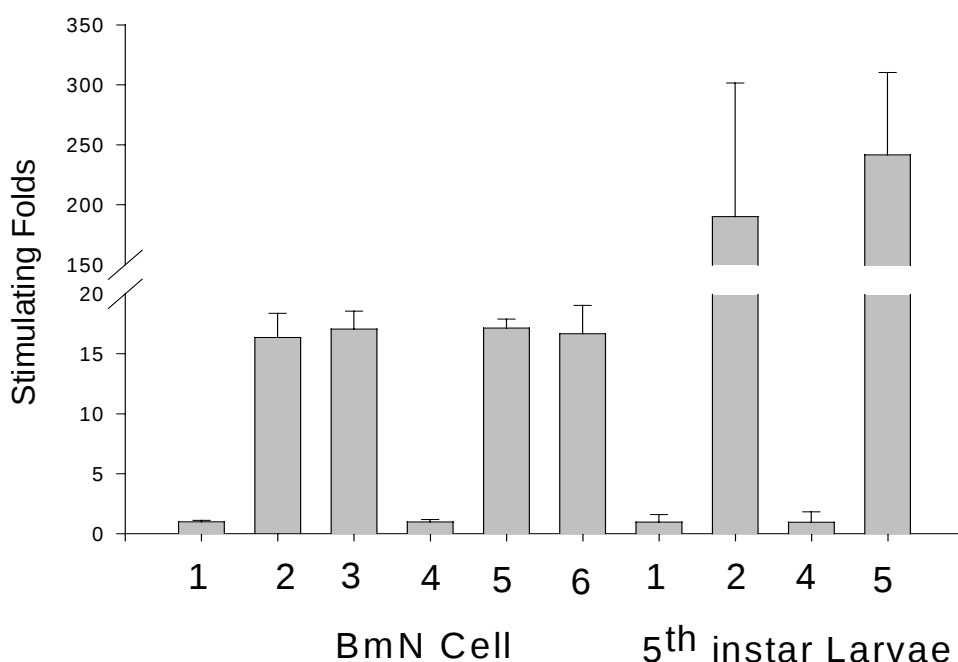


图 9.3 在体内、体外 *hr3* 增强 *BmHSC70-4* 和 *BmandHSC70-4* 启动子的转录活性
Fig 9.3 *hr3* enhancing the *BmHSC70-4* and *BmandHSC70-4* promoter activity *in vivo* and *in vitro*

Y 轴数据表示 *hr3* 增加每微克细胞抽提液蛋白的 Luc 活力倍数 (无 *hr3* 为对照, 设为 1.00); X 轴数据表示: 1, *pBmHSC70-4p-luc*; 2, *pBmHSC70-4-luc-hr3 (cis)*; 3, *pBmHSC70-4-luc-hr3 (reverse)*; 4, *pBmandHSC70-4-luc*; 5, *pBmandHSC70-4-luc-hr3(cis)*; 6, *pBmandHSC70-4-luc-hr3(reverse)*; 每个转染时共转染穿梭质粒; 转染 *pUL220-luc* 质粒细胞为空白对照; 数据至少来自 5 次不同转染实验的平均值。

The increase of luciferase activity is indicated on Y axis as stimulating folds by *hr3* over the cells/larva transfected with *pBmHSC70-4-luc* or *pBmandHSC70-4-luc*, which was arbitrarily set at 1.00. The number is presented on X axis as follow: 1, *pBmHSC70-4p-luc*; 2, *pBmHSC70-4-luc-hr3 (cis)*; 3, *pBmHSC70-4-luc-hr3 (reverse)*; 4, *pBmandHSC70-4-luc*; 5, *pBmandHSC70-4-luc-hr3(cis)*; 6, *pBmandHSC70-4-luc-hr3(reverse)*; The β -gal normalizing system was introduced into each BmN transfection. The larva, transfected with *pUL220-luc* DNA, served as the blank control. Each reaction contained 1 μ g of the protein extracted from BmN cells or hemolymph. The results represented average from five separate transfections.

9.2.4 家蚕五龄不同发育阶段对 *BmHSC70-4/hr3* 启动子组合转录活性的影响

为了考察家蚕五龄不同发育阶段对 *BmHSC70-4/hr3* 启动子组合转录活性的影响, 五龄饲食后 24 hr, 每头蚕注射 20 μ L 经脂质体包埋的报告质粒到蚕体腔, 12、24、36、48、72、84、96、108、120、132、144、156 hpt 收集血淋巴细胞。结果如图 9.4, 12 hpt 1 μ g 细胞抽提液的 Luc 活力为 3110 ± 613.71 cpm, 随着转染时间的增加也 Luc 活力渐增, 至 36 hpt 达 35613.33 ± 3541.16

cpm ,随后 Luc 活力在有限范围内波动 ,基本维持在同一水平 ,直至 132 hpt ,遽然升高 ,至 71793.33 ± 23838.13 cpm ,此时为熟蚕期即将到来。在熟蚕 (144 hpt) 时 Luc 活力猛增至 534604 ± 258578 cpm ,达最高。随着吐丝时间的延长 ,Luc 活力下降 ,至吐丝结束 (192 hpt) , Luc 活力仅为 98.67 ± 29.48 cpm。这与无 *hr3* 的质粒 *pBmHSC70-4-luc* 在五龄家蚕体内的转录活性的变化趋势一致 ,说明 *hr3* 只是增强其转录活性 ,并不改变 *HSC70-4* 启动子的转录特性。

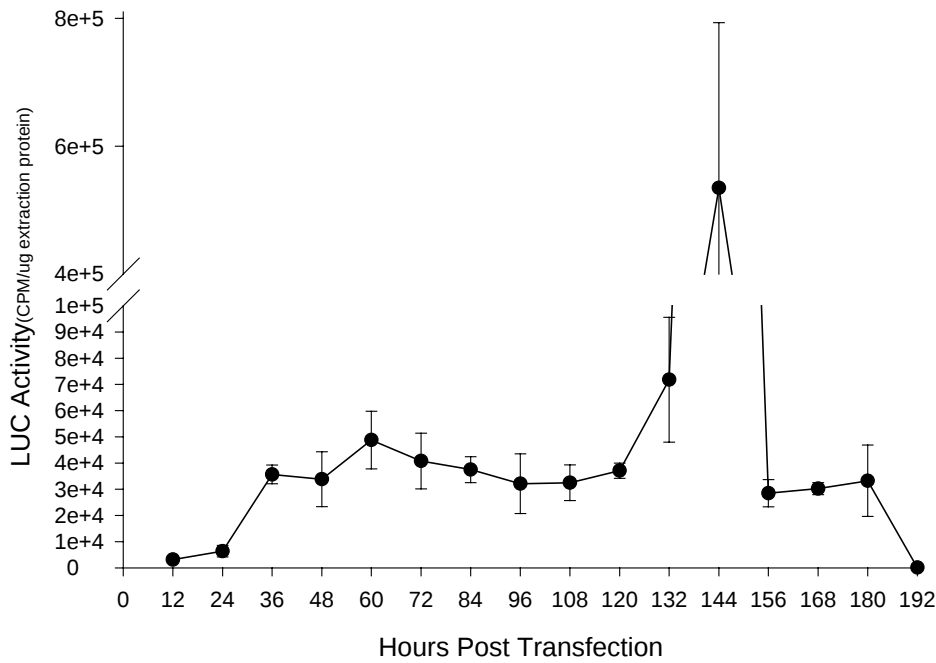


图 9.4 家蚕五龄不同发育阶段对 *BmHSC70-4/hr3* 启动子组合转录活性的影响

Fig 9.4 The change pattern of the transcriptional activity of *BmHSC70-4/hr3* promoter combination during 5th instar stage in silkworm larvae.

Y 轴数据表示经校正后每微克细胞抽提液蛋白的 Luc 活力(每分钟光量子数表示);X 轴表示转染时间(hpt);144hpt 时 ,家蚕进入熟蚕期 ;转染 *pUL220-luc* 质粒细胞为空白对照 ;数据至少来自三次实验的平均值。

The luciferase activity is indicated on the Y axis as the counts per minute (cpm). The investigating time is presented on X axis as hour post-transfection (hpt). At 144 hpt, the larvae enter wandering stage and start to spin silk. Each reaction contained 1 μ g of the protein extracted from larval hemolymph cells. The larva, transfected with *pUL220-luc* DNA, served as the blank control. The results represented average from three separate samples.

9.2.5 昆虫激素对 *BmHSC70-4/hr3* 启动子组合的活性的影响

从 9.2.4 结果可推测该组合与昆虫激素滴度有关 ,第 8、9 章结果表明 *BmHSC70-4*、

BmandHSC70-4 启动子转录活性受到 MH 滴度的影响。为此, 我们考察了激素处理对 *BmHSC70-4/hr3* 启动子组合活性的影响。

五龄饷食后 36 小时, 用 0 (蒸馏水) 50 mg/kg, 100 mg/kg, 150 mg/kg JHA 涂抹蚕的背部, 或者每头蚕注射 1、3、5、7 μ g MH, 12 hr 后, 注射 20 μ l 报告质粒包埋液至蚕体腔, 48 hpt 收集蚕血淋巴, 结果见图 9.5。1-7 μ g MH 的剂量对 *BmHSC70-4/hr3* 启动子组合转录活性都起到正调控作用, 5 μ g 处理 Luc 活力提高倍数最大, 达到 17.54 倍。这与 7.2.6.2 结果基本一致, 但似乎对 MH 感受剂量有所差异, 原因有待于进一步查明。而 JHA 处理对启动子组合活性没有显著差异, 这与没有 *hr3* 的 *BmHSC70-4* 启动子的一致。

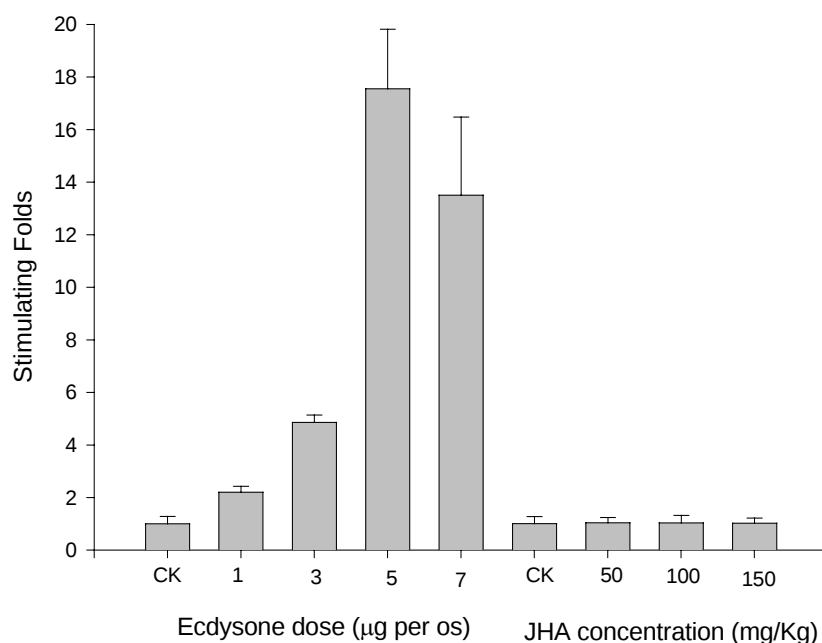


图 9.5 在五龄家蚕体内昆虫激素对 *BmHSC70-4/hr3* 启动子组合转录活性的影响

Fig 9.5 The effects of insect hormones on the transcriptional activity of *BmHSC70-4/hr3* promoter combination in 5th instar larva

Y 轴数据表示 MH 或 JHA 处理增加每微克细胞抽提液蛋白的 Luc 活力倍数 (对照设为 1.00); X 轴表示注射每头家蚕 MH 剂量, 或体涂蚕体表背部 JHA 浓度; 的转染 pUL220-*luc* 质粒家蚕为空白对照; 数据至少来自三次实验的平均值。

The increase of luciferase activity is indicated on Y axis as stimulating folds by MH/JHA treatment over the control which was arbitrarily set at 1.00. The dose of ecdysone is presented on X axis as injection per larva. The dose of JHA is presented on X axis as JHA concentration solution spreading the dorsal back of the larva. The larva, transfected with pUL220-*luc* DNA, served as the blank control. Each reaction contained 1 μ g of the protein extracted from larval hemolymph cells. The results represented average from three separate samples

9.3 讨论

hr3 是家蚕杆状病毒基因组中的一种重复序列, 具有复制起始位点与增强子的双重功能, 特

别其增强子的功能,近来研究表明,不仅对杆状病毒基因启动子,而且对很多非杆状病毒基因的外源基因启动子具有增强的作用(Chen et al, 2004; Lo, et al, 2002; Felipe et al, 2002; Viswanathan et al, 2003)。本文也证实了 *hr3* 对来源于家蚕、野桑蚕的 *HSC70-4* 启动子具有较强的增强作用。肖等人比较了 *hr3* 接在 *luc* 基因后面和 *helicase* 启动子前面的两种位置,发现后者的增强能力低于前者,认为 *hr3* 增强子功能存在位置效应(2001)。本研究比较了在 *luc* 后面的两种不同方向接入,结果表明接入方向不影响 *hr3* 增强功能。

HSC70-4 启动子由于其较强的转录活性,在所有组织都能表达,比常用于转基因家蚕的源于家蚕杆状病毒的 *ie-1* 启动子活性高出 2 倍(Lee et al, 2003),加上它能在家蚕熟蚕期高度表达活性,受 MH 正调控,是一个较为理想的转基因家蚕或细胞稳定表达体系的启动子。而从本研究结果显示 *hr3* 在细胞和家蚕体内都能增强 *BmHSC70-4*、*BmandHSC70-4* 转录活性,在家蚕体内高达 200 倍左右,说明该启动子/增强子组合更适合在细胞稳定表达系统或转基因家蚕中驱动目的蛋白基因的转录表达。

BmHSC70-4/hr3 启动子组合在蚕体内的表达时相以及昆虫激素对其活性影响结果表明,蜕皮激素具有显著地提高该启动子组合活性的能力。因而若该组合用于转基因家蚕时,可以添加蜕皮激素或在熟蚕期收集蚕体提取目的蛋白,以提高目的基因的表达产量。我们目前采用该启动子组合应用于细胞稳定表达系统和转基因家蚕的探索研究。

第十章 结论

本文从家蚕（苏·菊×明·虎）、野桑蚕基因组 DNA 克隆了 *LSP* 和 *HSC70-4* 基因启动子调控区，以 *luc* 为报告基因，经脂质体转染昆虫细胞或蚕体瞬时表达，对 *BmLSP* 和 *Bm/Bmand HSC70-4* 基因启动子的功能特性进行了分析，以及 *Bm/Bmand HSC70-4* /*BmNPV hr3* 启动子组合转录活性进行了研究，获得以下结果。

10.1 *Bm/Bmand LSP* 5'FR 克隆与 *BmLSP* 启动子功能特性分析结论

10.1.1 *Bm/Bmand LSP* 5'FR 克隆、序列分析结果

克隆的 *Bm* 和 *Bmand LSP* 5'FR 片段经测序分析，分别为 1901bp、1886bp，与朝·日×东·海的 *LSP* 基因的相应序列的同源性分别为 98.9%、96.4%；

克隆的片段涵盖了 *LSP* 的第一内含子、第一外显子、启动子区及其 5'上游区四部分；第一外显子区域三者完全相同；与朝·日×东·海的 *LSP* 基因第一内含子相比，*BmandLSP* 5'FR 第一内含子区域出现了 22 个碱基对缺失，同源性只有 91.6%，而 *BmLSP* 5'FR 的第一内含子区域完全相同，同源性达 100%。

Bm/Bmand LSP 5'FR 都有以下几种功能元件：-30~-24 bp 的 TATAAAA 为典型的 TATA 盒；-73~-67 bp TGATAAA 为数种昆虫脂肪体内组织特异性表达基因的共有序列。-70~-144 bp 之间含有 ATTTTCTT-27-ACGGCTGAT 推定的激素响应元件。

经 BLAST 检索，*Bm/Bmand LSP* 5'FR 上游发现了与家蚕 J139 的丝素轻链基因第一内含子区域（7639~7933 bp）同源序列、以及失活的部分水手转座子元件。

10.1.2 缺失突变 *BmLSP* 启动子的构建

根据 *BmLSP* 启动子全长序列，用于 PCR 法构建缺失第一内含子的 *BmLSP* (*DI*) 启动子、缺失水手转座子元件的 *BmLSP* (*DM*) 启动子。利用靠近家蚕丝素轻链基因同源区序列的 3' 端的 *EcoR* I 酶切位点，用 *EcoR* I/*BamH* I 酶切 pSK-*BmLSP* (*I*) DNA，获得缺失水手转座子元件与缺失含家蚕丝素轻链基因同源区序列的 *BmLSP* (*DMS*) 启动子、用 *EcoR* I/*BamH* I 酶切 pSK-*BmLSP* (*DI*) DNA 获得缺失第一内含子、缺失上游区的水手转座子元件与缺失含家蚕丝素轻链基因同源区序列的 *BmLSP* (*DIMS*) 启动子。

从 pUL220 质粒中用 *BamH* I 酶解获得荧光素酶基因 (*luc*)，分别亚克隆在上述质粒中，位于启动子下游，经 *Xba* I 酶切鉴定 *luc* 接入方向正确，获得系列报告质粒。

10.1.3 *BmN* 细胞可以用于分析 *BmLSP* (*I*) 启动子的转录活性

经 Lipofectin 包埋的报告质粒 pSK-*BmLSP* (*I*)-*luc* 转染 *BmN* 细胞 48 hpt 后收集细胞，经校正后的 20 微克细胞抽提物的 *Luc* 活力为 1083.05 ± 205.07 cpm，不含 *BmLSP* 启动子的空载体 pUL220-*luc* *Luc* 活力仅为 16.63 ± 5.20 cpm，这表明来源于卵巢细胞的 *BmN* 细胞可用于 *BmLSP* 启动子的功能分析。这与 *BmN* 细胞的抽提物在体外对血清蛋白基因能够真实有效地转录结果一致 (Sakurai et al, 1990)。

10.1.4 第一内含子增强 *BmLSP* 基因启动子转录活性

以 pSK-*BmLSP* (I)-*luc*、pSK*BmLSP* (DI)-*luc* 和 p3Z-*BmLSP* (DMS)-*luc*、p3Z-*BmLSP* (DIMS)-*luc* 两组报告质粒分别转染 BmN 细胞,以考察第一内含子对 *BmLSP* 基因启动子活性影响。结果表明含第一内含子的报告质粒 pSK-*BmLSP* (I)-*luc*、p3Z-*BmLSP* (DMS)-*luc* 的 LUC 活力分别为缺失第一内含子相对应的报告质粒 pSK-*BmLSP* (DI)-*luc*、p3Z-*BmLSP* (DIMS)-*luc* 的 5.80 ± 1.10 、 5.40 ± 1.09 倍(F Value=75.4, $Pr>F=0.0001<0.01$; F Value=64.67, $Pr>F=0.0002<0.01$)。这一结果暗示 *BmLSP* 基因的第一内含子中含有促进启动子转录活性的类似增强子的调控序列。

10.1.5 启动子上游区对 *BmLSP* 基因启动子活性的影响

用报告质粒 pSK-*BmLSP* (I)-*luc*, pSK-*BmLSP* (DM)-*luc* 转染 BmN 细胞,考察失活的部分水手转座子元件对 *BmLSP* 基因启动子活性影响。缺失水手转座子元件的启动子活性比含水手转座子元件的提高 35.27%,经 SAS 软件统计分析,两者差异达极显著水平(F Value=42.50, $Pr>F=0.0029<0.01$),表明失活的水手转座子元件对 *BmLSP* 基因启动子活性有一定的抑制作用。

用报告质粒 p3Z-*BmLSP* (DMS)-*luc*, pSK-*BmLSP* (DM)-*luc* 分别转染 BmN 细胞,考察含家蚕丝素轻链基因第一内含子同源区的序列对 *BmLSP* 基因启动子活性的影响。结果表明含家蚕丝素轻链基因第一内含子同源区的序列的启动子活性是缺失的启动子活性的 4.42 ± 0.28 倍 (F Value=349.87, $Pr>F=0.0001<0.01$),表明含家蚕丝素轻链基因第一内含子同源区的序列中存在增强 *BmLSP* 基因启动子活性的调控序列。

10.1.6 JHA 对 *BmLSP* 基因启动子活性的影响呈现剂量依赖效应

1 μ g/ml JHA 处理, Luc 活力提高到对照的 2.97 ± 0.30 倍(F Value=84.12, $Pr>F=0.0008<0.01$)。而 2、4、6 μ g/ml JHA 处理的 Luc 活力,与对照无显著性差异(F Value=2.03, $Pr>F=0.1844>0.05$), 8 μ g/ml JHA 处理的 Luc 活力仅为对照的 $34.72 \pm 16.87\%$,达极显著差异(F Value=25.92, $Pr>F=0.007<0.01$)。表明 JHA 对 *BmLSP* 启动子转录活性影响呈现剂量依赖效应。

10.1.7 MH 不影响 *BmLSP* 基因启动子活性

0、1、2、4、6 μ g/ml MH 处理,考察不同剂量的 MH 对 *BmLSP* 启动子转录活性的影响。结果经 SAS 软件统计分析,不同剂量的 MH 对 *BmLSP* 启动子在 BmN 细胞中转录活性没有显著影响(F Value=0.56, $Pr>F=0.6958>0.05$)。

10.2 *Bm/Bmand HSC70-45'*FR 片段克隆及启动子功能特性分析结论

10.2.1 *Bm/Bmand HSC70-45'*FR 片段克隆及其序列分析

BmandHSC70-4、*BmHSC70-45'*FR 片段长度分别为 1469bp、1429bp,涵盖了部分第一外显子和核心启动子区。两者的同源性和与相应家蚕 *r06* 的 *HSC70-4* 基因序列同源性分别为 76.4%、97.5%。家蚕与野桑蚕之间差异主要以片段缺失为主,分别有长度为 3、5、13、21bp 的片段缺失,从而导致 *HSC70-4* 同源性较低。

在 MatInspector 软件上检索,在 5'FR 区域内推测了可能存在的顺式作用元件有 6 个 GATA 盒、2 个 CAAT 盒和 2 个热激响应因子 (HSF) 结合元件,但没有发现经典的 TATA 盒与 GC 盒。从

推测的顺式作用元件来看,野桑蚕中有 1 个 GATA 处发生一个碱基的突变,其他的调控元件三者完全一致。

所获得的序列在 GenBank 上检索同源序列结果显示,*BmandHSC70-4*、*BmHSC70-4* 与其他热激蛋白基因的启动子区同源性很低,从而无法检索出来。

10.2.2 在常态下 *BmHSC70-4* 启动子在细胞和五龄蚕体内都呈现高转录活性

在 BmN 细胞中,分别在转染换液后 6 hpt、12 hpt、18 hpt、24 hpt、36 hpt、48 hpt、60 hpt、72 hpt 收集细胞,在 6 hpt 虽然能检测到 Luc 的活性,但很微弱。随着转染时间的延长依次上升,到 48 hpt 时达到最高,60 hpt、72 hpt 与 48 hpt 持平。

在异源的秋粘虫 sf21 细胞中,转染后 12hpt 才检测到 *BmHSC70-4* 启动子的转录活性,经校正后的每微克细胞抽提物的 Luc 活力为 80 ± 18.18 cpm,24 hpt 为 1401.15 ± 117.97 cpm,48 hpt 为 18367.57 ± 1763.20 cpm 分别只有相应时间在 BmN 细胞中活力的 4.37%,8.50%和 10.77%。说明 *BmHSC70-4* 启动子虽然能在异源 sf21 细胞中转录,但比同源 BmN 细胞中的活性低得多。

家蚕饲养至五龄饱食后 48hr,经阳离子脂质体包埋的 p3Z-*BmHSC70-4-luc* 转染液注射到家蚕的体腔,在 48 hpt 收集蚕血淋巴细胞,经校正后的每 20 微克细胞抽提物的 Luc 活力为 7298.63 ± 1005.76 cpm。

10.2.3 热激处理 BmN、Sf21 细胞和四龄蚕体能增加 *BmHSC70-4* 启动子的转录活性,而热激处理五龄蚕体却抑制其转录活性

BmN 细胞转染换液后,培养 7 hpt,37℃ 热激 2 hr 后移至常温 27℃ 培养。按热激后 0 hr、3 hr、9 hr、15 hr 收集细胞,以考察热激处理对 *BmHSC70-4* 启动子在 BmN 细胞中的转录活性的影响。*BmHSC70-4* 启动子转录活性热激处理后 0 hr、3 hr 比对照增加 4.22 ± 1.08 倍、 4.40 ± 0.57 倍。而热激处理后 9 hr、15 hr 没有显著差异 (F value=0.06, $Pr>F=0.8196>0.05$)。

在异源的秋粘虫 sf21 细胞中,热激效果更明显。热激处理后 0 hr、3 hr、9 hr、15 hr,*BmHSC70-4* 启动子转录活性分别增加 3.90 ± 0.14 、 5.05 ± 0.06 、 11.08 ± 0.57 和 3.90 ± 1.18 倍。

在四龄、五龄家蚕饱食后 24 hr 转染 DNA,转染后 30 hpt,37℃ 热激 2hr 后移至正常条件下饲养,转染 36hpt 时收集血淋巴细胞。在四龄家蚕体内,热激处理提高 *BmHSC70-4* 启动子的转录活性达 3.11 ± 0.88 倍;而五龄期热激处理后,*BmHSC70-4* 启动子转录活性,仅为对照的 $57.24 \pm 3.64\%$,显著低于对照,显示一定的抑制作用。

10.2.4 冷激处理五龄家蚕不影响 *BmHSC70-4* 启动子的转录活性

在五龄家蚕饱食后 24hr 转染,转染后 30 hpt 时,在-15℃ 冷激 15 min 后移至正常条件下饲养,转染 36 hpt 时收集血淋巴细胞。发现冷激处理的 Luc 活力与对照的没有显著差异 (F value=0.25, $Pr>F=0.6449>0.05$)。

10.2.5 五龄家蚕不同发育阶段影响 *BmHSC70-4* 启动子的转录活性

转染 12 hpt 检测到家蚕血淋巴细胞 Luc 的活力,以后逐渐升高至 48 hpt,20 μg 细胞抽提物 Luc 的活力达 7298.63 ± 1005.76 cpm。48-72 hpt 基本保持一致,72 hpt 到 96 hpt 逐渐升高至 16299.05 ± 2755.688 cpm,到 108 hpt (熟蚕)达到顶点,为 37124.44 ± 6237.30 cpm,而吐丝后显著下降,

132 hpt (吐出部分蚕丝) 时 7815.05 ± 762.28 cpm。这结果表明 *BmHSC70-4* 启动子在蚕体内的转录活性随发育时间不同而有所波动, 且到熟蚕期达到最高, 吐丝后急速下降。

10.2.6 外源昆虫激素对 *BmHSC70-4* 启动子转录活性的影响

在五龄家蚕饲食后 36 hr 用 50mg/kg, 100mg/kg, 150mg/kg JHA 三种浓度体涂蚕体背部, 空白对照用蒸馏水体涂, 或每头家蚕分别注射 0 (蒸馏水)、1、3、5 μ g MH。激素处理家蚕 12hr 后, 进行报告质粒 DNA 转染, 在常规条件下饲养, 转染 48 hpt 后, 收集蚕血淋巴细胞。经 SAS 软件统计分析 JHA 处理的 Luc 活力与对照没有差异 (F value=0.22, $Pr>F=0.8796>0.05$); 低浓度 1、3 μ g MH 处理分别提高启动子转录活性 2.68 ± 0.43 倍、 2.05 ± 0.52 倍, 高浓度 5 μ g MH 处理不影响其活性 (F value=0.01, $Pr>F=0.9608>0.05$)。

10.2.7 在常态下 *BmandHSC70-4* 启动子在细胞和五龄蚕体内都呈现高转录活性

转染 p3Z-*BmandHSC70-4-luc* 48hpt, 收集 BmN 细胞和 sf21 细胞, 每微克细胞抽提蛋白 Luc 的活性分别为 186524.7 ± 28365.2 cpm 和 17772.47 ± 2089.5 cpm。*BmandHSC70-4* 启动子活性在 BmN 细胞中比在 sf21 细胞中高 10 倍, 这与 *BmHSC70-4* 启动子转录活性结果一致。就 Luc 的绝对值来说, 两者也基本相同。

五龄饲食后 48 hr 经阳离子脂质体包埋的 p3Z-*BmandHSC70-4-luc* 转染液注射到家蚕的体腔。在转染后 48 hpt 收集蚕血液淋巴细胞, 20 μ g 细胞抽提蛋白 Luc 的活性为 8797.31 ± 2436.0 cpm。

10.2.8 热激处理 BmN、Sf21 细胞和四龄蚕体能增加 *BmandHSC70-4* 启动子的转录活性, 而热激处理五龄蚕体却抑制其转录活性

BmN 细胞转染换液后, 培养 7 hpt, 37 $^{\circ}$ C 热激 2hr 后移至常温 27 $^{\circ}$ C 培养。按热激后 0hr、3hr、9hr、15hr 收集细胞, 以考察热激处理对 *BmandHSC70-4* 启动子在 BmN 细胞中的转录活性的影响。结果如图 8.1 所示。*BmandHSC70-4* 启动子转录活性热激处理后 0hr、3hr 比对照增加 3.89 ± 0.73 、 3.24 ± 0.37 倍。热激处理后 9hr、15hr 没有显著差异。

而在秋黏虫 sf21 细胞中, 热激效果更明显。热激处理后 0 hr、3 hr、9 hr、15 hr, *BmandHSC70-4* 启动子转录活性分别增加 4.09 ± 0.25 、 15.77 ± 1.79 、 10.52 ± 2.41 、 5.47 ± 2.47 倍。这结果与 *BmHSC70-4* 基因启动子的结果相一致。

在四龄、五龄家蚕饲食 24 hr 后进行转染, 转染后 30 hpt, 37 $^{\circ}$ C 热激 2hr, 然后移至正常条件下饲养, 转染 36 hpt 时收集血淋巴细胞。在四龄家蚕体内, 热激处理提高 *BmandHSC70-4* 启动子的转录活性达 2.01 ± 0.23 倍; 而五龄期热激处理后 *BmandHSC70-4* 启动子转录活性, 仅为对照的 $63.74 \pm 14.85\%$, 显著低于对照, 呈现一定的抑制作用。

以上结果表明, 虽然 *BmHSC70-4*、*BmandHSC70-4* 启动子区域同源性仅为 72.8%, 却呈现一致的转录活性特征, 说明调控启动子转录活性的调控序列存在于共同含有序列, 或者是调控序列的盈余而导致个别突变的调控序列得到补偿。

10.3 *BmNPVhr3* 显著增强 *Bm/Bmand HSC70-4* 启动子活性

10.3.1 在 BmN 细胞内 *hr3* 显著增强 *Bm/BmandHSC70-4* 启动子转录活性, 且与其接入方向无关

经脂质体包埋的报告质粒 p3Z-BmHSC70-4-luc、p3Z-BmHSC70-4-luc-hr3(cis)、(reverse), p3Z-BmandHSC70-4-luc、p3Z-BmandHSC70-4-luc-hr3 (cis)、(reverse)分别转染 BmN 细胞, 转染换液后 24 hpt 收集细胞, 测得 Luc 活力。hr3 能显著增加 BmHSC70-4、BmandHSC70-4 启动子的转录活性。正接时, 分别提高 16.37 ± 2.00 、 17.17 ± 0.75 倍; 反接时分别提高 17.06 ± 1.49 、 16.69 ± 2.36 倍。这说明 hr3 增强功能与其接入方向无关。

10.3.2 在家蚕体内 hr3 更显著地增强 Bm/BmandHSC70-4 启动子的转录活性

五龄饷食后 24 hr, 每头蚕注射 $20 \mu\text{L}$ 经脂质体包埋的报告质粒到蚕血, 常规饲养, 48hpt 后收集血淋巴细胞。在蚕体内 hr3 增加 BmHSC70-4、BmandHSC70-4 启动子的转录活性分别为 190.57 ± 111.36 、 242.19 ± 68.75 倍, 比在 BmN 细胞中增强效果更显著。

10.3.3 五龄家蚕不同发育阶段影响 BmHSC70-4/hr3 启动子组合的转录活性

五龄饷食后 24 hr, 每头蚕注射 $20 \mu\text{L}$ 经脂质体包埋的报告质粒到蚕血, 12、24、36、48、72、84、96、108、120、132、144、156 hpt 收集血淋巴细胞。12 hpt 的 $1 \mu\text{g}$ 细胞抽提物的 Luc 活力为 3110 ± 613.71 cpm, 随着转染时间的增加 Luc 活力渐增, 至 36 hpt 达 35613.33 ± 3541.16 cpm, 随后 Luc 活力在有限范围内波动, 基本维持在同一水平, 直至 132 hpt, 遽然升高, 至 71793.33 ± 23838.13 cpm, 在熟蚕 (144 hpt) 时 Luc 活力猛增至 534604 ± 258578 cpm, 达最高。随着吐丝时间的延长, Luc 活力下降, 至吐丝结束 (192 hpt), Luc 活力仅为 98.67 ± 29.48 cpm。这与 BmHSC70-4 启动子在五龄家蚕体内的转录活性的变化趋势一致, 说明 hr3 只是增强其转录活性, 并不改变 HSC70-4 启动子的转录特性。

10.3.4 外源昆虫激素对 BmHSC70-4/hr3 启动子组合转录活性的影响

五龄饷食后 36 hr, 用 0 (蒸馏水)、50 mg/kg、100 mg/kg、150 mg/kg JHA 涂抹蚕的背部, 或者每头蚕注射 1、3、5、7 μg MH, 12 hr 后, 注射 $20 \mu\text{L}$ 报告质粒包埋液至蚕血腔, 48 hpt 收集蚕血淋巴。1-7 μg MH 的剂量对 BmHSC70-4/hr3 启动子组合转录活性都起到正调控作用, 5 μg 处理 Luc 活力提高倍数最大, 达到 17.54 倍。而 JHA 处理对启动子组合活性没有显著差异, 这与没有 hr3 的 BmHSC70-4 启动子的相一致。

以上结果显示 BmHSC70-4/hr3、BmandHSC70-4/hr3 启动子组合更适合在细胞稳定表达系统或转基因家蚕中驱动目的蛋白基因的转录表达。BmHSC70-4/hr3 启动子组合在蚕体内的表达时相以及昆虫激素对其活性影响结果表明, 蜕皮激素具有显著地提高该启动子组合活性的能力。因而若该组合用于转基因家蚕时, 可以添加蜕皮激素或在熟蚕期收集蚕体提取目的蛋白, 以提高目的基因的表达产量。我们目前采用该启动子组合应用于细胞稳定表达系统和转基因家蚕的探索研究。

参考文献

1. 雷向东, 宓怡德, 袁中一, 等. 萤火虫荧光素酶基因在家蚕中的表达. 科学通报, 1994, 39(9): 847-849
2. 吕鸿声. 昆虫病毒分子生物学, 第一版, 中国农业科技出版社, 北京, 1998
3. 吕鸿声. 昆虫病毒与昆虫病毒病. 北京: 科学出版社, 1981, 263-265
4. 吕鸿声. 中国养蚕学, 第一版, 上海科技出版社, 1991, 172-183
5. 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(21): 2261-2265 (中文版)
6. 肖庆利. 家蚕杆状病毒解旋酶基因启动子结构与功能分析及表达系统的应用. 中国农业科学院博士学位论文, 2001
7. 徐卫华. 家蚕滞育的分子机理 2: 蛹期滞育激素基因的表达与滞育决定. 遗传学报, 1999, 26(2): 107-111
8. 黄君霆. 家蚕基因组序列解读及其展望. 蚕业科学, 2004, 30: 1-5
9. 张志芳, 张颖, 吕鸿声, 李载平, 吴祥甫. 家蚕核型多角体病毒 DNA 复制起始点 hr3 的结构与功能. 中国科学(B辑), 1995, 25: 949-955
10. 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(1): 63-64
11. 周亚竟. 昆虫激素与 CTAB 对杆状病毒复制和相关基因启动子的影响. 华东理工大学博士学位论文, 2002
12. 朱江, 戴玉锦. 家蚕卵黄蛋白质分子生物学研究进展. 国外农学-蚕业, 1989(3): 4-11
13. Abrahamsen N, Martinez AA, Kjaer T et al. Cis-regulatory sequences leading to female-specific expression of yolk protein genes 1 and 2 in the fat body of *D melanogaster*. *Mol Gen. Genet.*, 1993, 237: 41-48
14. Agui N, Shimada T, Izumi S et al. Hormonal control of vitellogenin mRNA levels in the male and female housefly, *Musca domestica*. *J Insect Physiol.*, 1991, 37: 383-390
15. Allan R L, Courtney T, Isabel B et al. Self-inflicted wounds, template-directed gap repair and a recombination hotspot: effects of the mariner transposase. *Genetics*, 2000, 154: 647-656
16. Arnosti DN. Analysis and functional of transcriptional regulatory elements: Insights from *Drosophila*. *Annu. Rev. Entomol.*, 2003, 48: 579-602
17. Banerji J, Rusconi S, Schaffner W. Expression of a beta-globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell*, 1981, 27: 299-308
18. Beckmann RP, Mizzen LA, Welch WJ. Interaction of hsp70 with newly synthesized proteins: implication for protein folding and assembly. *Science*, 1990, 248: 850-853
19. Bello B, Couble P. Specific expression of a silk-encoding gene of *Bombyx* in the anterior salivary gland of *Drosophila*. *Nature*, 1990, 346(6283): 480-482
20. Bercovich B, Stancovski I, Mayer A, Blumenfeld N, Laszlo A, Schwartz AL and Ciechanover A. Ubiquitin-dependent degradation of certain protein substrates in vitro requires the molecular chaperone Hsc70. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272: 9002-9010
21. Beuken E, Vink C, Bruggeman CA. One step procedure for screening recombinant plasmids by size. *Biotechniques*, 1998, 24: 748-750
22. Bhattacharyya N, Banerjee D. Transcriptional regulatory sequences within the first intron of the chicken *apolipoprotein AI(apo AI)* gene. *Gene*, 1999, 234: 371-380

23. Binger LC, Willis JH. Identification of the cDNA, gene and promoter for a major protein from flexible cuticles of the giant silk moth, *Hyalophora cecropia*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 1994, 24: 989-1000
24. Blackwood EM, Kadonaga JT. Going the distance: a current view of enhancer action. *Science*, 1998, 281:60-63
25. Blumethal T, Zucker-Aprison E. Evolution and regulation of vitellogenin genes. *Mol. Biol. Invertebr Dev.*, 1987, 66:3-19
26. Braun RP, Wyatt GR. Modulation of DNA-binding proteins in *Locusta migratoria* in relation to juvenile hormone action. *Insect Mol. Biol.*, 1992, 1:99-107
27. Burke TW, Willy PI, Kutach AK, Buttler JE, Kadonaga JT, The DPE, a conserved downstream core promoter element that is functionally analogous to the TATA box. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1998, 63:75-82
28. Burtis KC, Coschigano KT, Baker BS et al. The doublesex proteins of *D melanogaster* bind directly to a sex-specific yolk protein gene enhancer. *EMBO J.*, 1991, 10:2577-2582
29. Bushman F. Gene regulation: Selfish elements make a mark. *Nature*, 2004, 429 (6989) : 253
30. Cai H, Lewine M. Modulation of enhancer-promoter interactions by insulators in the *Drosophila* embryo. *Nature*, 1995, 376:535-536
31. Cedric F, Susan RW. Mariner-like transposases are widespread and diverse in flowering plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, (99): 280~285
32. Chalkley GE, Verrijzer CP. DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: a TAF(II) 150 complex recognizes the initiator. 1999, *EMBO J.* 18:4835-4845
33. Chang HC, Newmyer SL, Hull MJ, Ebersold M, Schmid SL, Mellman I. Hsc70 is required for endocytosis and clathrin function in *Drosophila*. *J Cell Biol.*, 2002, 159(3):477-487
34. Chen Y, Yao B, Zhu ZZ, Yi YZ, Lin XA, Zhang ZF and Shen GF, A constitute super-enhancer: homologous region 3 of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *BBRC.*, 2004, 318(4):1039-1044
35. Cherbas L, Cherbas P. The arthropod initiator: the capsite consensus plays an important role in transcription. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 1993, 23:81-90
36. Couble P, Chevillard M, Moine A, Ravel-Chapuis P, Prudhomme JC. Structural organization of the P25 gene of *Bombyx mori* and comparative analysis of its 5' flanking DNA with that of the fibroin gene. *Nucleic Acids Res.*, 1985, 13(5):1801-1814
37. Daniel L H , Allan R L , Elena R L. Modern thoughts on an ancient mariner: function , evolution , regulation. *Annu. Rev. Genet. ,* 1997 , 31: 337-358
38. De Kort CAD, Koopmanschap AB, Nucleotide and deduced amino acid sequence of a cDNA clone encoding diapause protein1, an arylphorin-type storage hexamer of the Colorado potato beetle. *J Insect Physiol.*, 1994, 40 :527-535
39. Delaney S J, Smith DF, McClelland A, et al. Sequence conservation around the 5' ends of the larval serum protein 1 gene of *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Biol.*, 1986(189): 1~11
40. Deshaies RJ, Koch BD, Werner-Washburn M, EA Craig and Schekman RA. Subfamily of stress protein facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature*, 1988, 322:800-805
41. Durand B, Drevet J, Couble P. P25 gene regulation in *Bombyx mori* silk gland: two promoter-binding factors have distinct tissue and developmental specificities. *Mol. Cell Biol.*, 1992, 12(12):5768-5777
42. EA Craig, Ingolia TD and Manseau LJ. Expression of *Drosophila* heat-shock cognate genes during

- heat shock and development. *Dev. Biol.*, 1983, 99(2):418-426
43. Edwards GC, Braun RP, Wyatt GR. Induction of vitelogenin synthesis in *Locusta imigratoria* by the juvenile hormone analog, Pyriproxyfen. *J Insect Physiol.*, 1993, 39:609-614
44. Fatyol K, Illes K, Praznovszky T, Langridge WH, Hadlaczky G, Szalay AA. Molecular characterization of a stably transformed *Bombyx mori* cell line: identification of alternative transcriptional initiation sites of the A3 cytoplasmic actin gene. *Mol. Gen. Genet.*, 1998, 260(1):1-8
45. Felipe Alves CA, Ikeda M, Kobayashi M. Identification and characterization of *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus homologous repeated region. *Virus Genes*, 2002, 25(3):281-290.
46. Fink AL. Chaperone-mediated protein folding. *Physiological Rev.*, 1999, 79(2): 425-449
47. Fujii T, Sakuraki H, Izumi S et al. Structure of the gene for the arylphorin-type storage protein 2 of *Bombyx mori*. *J Bio. Chem.*, 1989, 264 :11020-11025
48. Fujiwara Y , Yamashita O. A larval serum protein of the silkworm , *Bombyx mori*:cDNA sequence and developmental specificity of the transcript. *Insect Biochem.*, 1991, 21(7): 735-742
49. Fujiwara Y , Yamashita O. Purification characterization and developmental changes in the titer of a new larval serum protein of the silkworm , *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* , 1990 , 20(7): 751-759
50. Fujiwara, Y , Yamashita O. Gene structure of *Bombyx mori* larval serum protein (BmLSP). *Insect Mol. Biol.*, 1992,1(2): 63-69
51. Fukuta M, Matsuno K, Hui CC, Nagata T, Takiya S, Xu PX, Ueno K, Suzuki Y. Molecular cloning of a POU domain-containing factor involved in the regulation of the *Bombyx* sericin-1 gene. *J Biol. Chem.*, 1993, 268(26):19471-19475
52. Gage L P. The *Bombyx mori* genome analysis by DNA reassociation kinetics. *Chromosoma*, 1974, 45, 27-42.
53. Garel A, Deleage G, Prudhomme JC. Structure and organization of the *Bombyx mori* sericin 1 gene and of the sericins 1 deduced from the sequence of the Ser 1B cDNA. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 1997, 27(5):469-477
54. Gerasimova TI, Corces VG. Chromatin insulator and boundaries: effects on transcription and nuclear organization. *Annu. Rev. Genet.*, 2001, 35:193-208
55. Gomi S, Majima K, and Maeda S. Sequence analysis of the genome of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus, *J. Gen. Virol.*, 1999 , 80: 1323-1337
56. Graham A, Papalopulu N, Krumlauf R. The murine and *Drosophilla* homobox gene complexes have common features of organization and expression. *Cell*, 1989,57:367-378
57. Harshman LG , James AA. Differential gene expression in insects: transcriptional control. *Annu. Rev. Entomol.*, 1998 , 43: 671-700
58. Haunerland NH. Insect storage proteins: gene families and receptors. *Insect Biochem. Mol. Biol.* , 1996, 26(8-9): 755~765
59. Hirose S, Suzuki Y. In vitro transcription of eukaryotic genes is affected differently by the degree of DNA supercoiling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 1988, 85(3):718-722.
60. Hiruma K, Hardie J, Riddiford LM. Hormonal regulation of epidermal metamorphosis *in vitro*, control of expression of a larval-specific cuticle gene. *Devel Biol.*, 1991,144:369-368
61. Hiruma K, Riddiford LM. Molecular mechanisms of cuticular melanization in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, (L)(Lepidoptera: Sphingidae). *Int. J. Embryol. Morpho.*, 1993,22:103-117
62. Horard B, Julien E, Nony P et al. Differential binding of the *Bombyx* silk gland-specific factor SGFB to its target DNA sequence drives posterior-cell-restricted expression. *Mol. Cell Biol.*, 1997,

- 17: 1572-1579
63. Horard B, Mange A, Pelissier B, Couble P. Bombyx gene promoter analysis in transplanted silk gland transformed by particle delivery system. *Insect Mol. Biol.*, 1994, 3(4):261-265.
 64. Hua YJ, Tanaka Y, Nakamura K et al. Identification of a prothoracicostatic peptide in the larval brain of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Bio. Chem.*, 1999, 274(44): 31169-31173
 65. Hui CC, Matsuno K, Suzuki Y. Fibroin gene promoter contains a cluster of homeodomain binding sites that interact with three silk gland factors. *J Mol. Biol.*, 1990, 213(4):651-670.
 66. Hui CC, Suzuki Y, Kikuchi Y, Mizuno S. Homeodomain binding sites in the 5' flanking region of the *Bombyx mori* silk fibroin light-chain gene. *J Mol. Biol.* 1990, 213(3):395-398.
 67. Hung JJ, Cheng TJ, Chang MD, Chen KD, Huang HL and Lai YK. Involvement of heat shock elements and basal transcription elements in the differential induction of the 70-kDa heat shock protein and its cognate by cadmium chloride in 9L rat brain tumor cells. *J Cell Biochem.*, 1998, 71(1):21-35
 68. Hunt CR, Parsian AJ, Goswami PC and Kozak CA.. Characterization and expression of the mouse Hsc70 gene. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1999 , 1444(3):315-25
 69. Iatrou K, Meidinger RG. Tissue-specific expression of silkworm chorion genes in vivo using *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus as a transducing vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1990, 87(10):3650-3654
 70. Idahl LA, Sandatom PE, Sehlin J. Measurements of serum glucose using the luciferin/luciferase system and a liquid scintillation spectrometer. *Analyt. Biochem.*, 1986, 155: 177 - 181
 71. Ikeda M, Su Z-H, Saito H et al. Induction of embryonic diapause and its stimulation of avarytrehalase activity in the silkworm, *Bombyx mori*, by synthetic diapause hormone. *J Insect Physiol.*, 1993, 39: 889-895
 72. Imamura M, Nakai J, Inoue S, Quan GX, Kanda T and Tamura T. Targeted gene expression using the GAL4/UAS system in the silkworm *Bombyx mori*. *Genetics*, 2003,165(3):1329-1340
 73. Ingraham JA, Chan R, Mangalam HJ et al. A tissue specific factor containing a homeodomain domain specifies a pituitary phenotype. *Cell*, 1988, 55:519-529
 74. Inoue S, Tanaka K, Arisaka F, Kimura S, Ohtomo K and Mizuno S. Silk fibroin of *Bombyx mori* is secreted, assembling a high molecular mass elementary unit consisting of H-chain, L-chain, and P25, with a 6:6:1 molar ratio. *J Biol. Chem.*, 2000, 275(51):40517-40528
 75. Jeffrey H.M. eds. Experiments Molecular Genetics, 11th printing, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1992
 76. Jones G, Sharp PA. Ultraspiracle: an invertebrate nuclear receptor for juvenile hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94(25):13499-13503.
 77. Julien E, Bordeaux MC, Garel A, Couble P. Fork head alternative binding drives stage-specific gene expression in the silk gland of *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2002, 32(4):377-387
 78. Kadono-Okuda K, Kuwano E, E Eto, et al. Inhibitory action of an imidazole compound on ecdysone synthesis in prothoracic glands of the silkworm, *Bombyx mori*.. *Dev. Growth Diff.*, 1987(29): 527-533
 79. Kadono-Okuda K, Kosegawa E, Mase K and Hara W. Linkage analysis of maternal EST cDNA clones covering all twenty-eight chromosomes in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.*, 2002, 11, 443-451
 80. Karouna-Renier NK, Yang WJ and Rao KR. Cloning and characterization of a 70 kDa heat shock

- cognate gene (HSC70) from two species of *Chironomus*. *Insect. Mol. Biol.*, 2003, 12(1):19-26
81. Kellum R, Schedl P. A position-effect assay for boundaries of higher order chromosomal domains. *Cell*, 1991, 64:941-950
82. Kiguchi K, Agui N. Ecdysteroid levels and developmental events during larval molting in the silkworm, *Bombyx mori*. *J Insect Physiol.*, 1981, 27: 805-812
83. Kiguchi K. Ecdysteroid levels and developmental events larvae moulting in the silkworm, *Bombyx mori*. *J Insect Physiol.*, 1986, 23: 242-247
84. Kikuchi Y, Mori K, Suzuki S, et al. Structure of the *Bombyx mori* fibroin light-chain-encoding gene: upstream sequence elements common to the light and heavy chain. *Gene*, 1992, 110(2): 151-158
85. Kimura K, Oyama F, Ueda H, Mizuno S, Shimura K. Molecular cloning of the fibroin light chain complementary DNA and its use in the study of the expression of the light chain gene in the posterior silk gland of *Bombyx mori*. *Experientia*, 1985, 41(9):1167-1171
86. Koopmanschap A, Lammers J, De Kort C. The structure of the gene encoding diapause protein1 of the Colorado potato beetle. *J Insect Physiol.*, 1995, 41 :509-518
87. Kravariti L, Lecanidou R, Rodakis GC. Sequence analysis of a small early chorion gene subfamily interspersed within the late gene locus in *Bombyx mori*. *J Mol. Evol.*, 1995, 41(1):24-33
88. Kravariti L, Thomas J, Sourmeli S, Rodakis GC, Mauchamp B, Chavancy G, Lecanidou R. The biolistic method as a tool for testing the differential activity of putative silkworm chorion gene promoters. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2001, 31(4-5):473-479
89. Kumaran AK, Ray A, Tertadian JA et al, Effects of juvenile hormone, ecdysteroids and nutrition on larval hemolymph protein gene expression in *Galleria mellonella*. *Insect Biochem.*, 1987, 17:1053-1058
90. Kumaresan G, Mathavan S. Molecular diversity and phylogenetic analysis of mariner-like transposons in the genome of the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.*, 2004, 13(3):259-271
91. Kusuda et al, The sequence around the 5' end of the fibroin gene from the wild silkworm, *Bombyx mandarina*, and comparison with that of the domesticated species, *B. mori*. *Mol. Gen. Genet.*, 1986, 203:359-364
92. Kutach AK, Kadonaga. The downstream promoter element DPE appears to be as widely used as the TATA box in drosophila core promoters. *Mol. Cell. Biol.*, 2000, 20:4754-4764
93. Lamp DJ, Willis JH. Characterization of a cDNA and gene encoding a cuticular protein from rigid cuticles of the giant silk moth, *Hyalophora cecropia*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 1994, 24: 419-435
94. Lecanidou R, Rodakis GC, Eickbush TH, Kafatos FC. Evolution of the silk moth chorion gene superfamily: gene families CA and CB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83(17):6514-6518
95. Lee TI, Young RA. Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu. Rev. Genet.*, 2000, 34 :77-137
96. Lee JM, Kusakabe T, Kawaguchi Y, Yasunaga-Aiki C, Nho S, Nakajima Y and Koga K. Molecular characterization of a heat shock cognate 70-4 promoter from the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of insect biotechnology and sericulture*, 2003, 72:33-39
97. Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 1992, 257: 967-971
98. Lindquist S, EA Craig. The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.*, 1988, 22:631-677
99. Elizabeth AP, John SD, Kang Z, Leslie S, Norbert P and EA Craig. Molecular and developmental

- characterization of heat shock cognate 4 gene of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.*, 1990, 10(6):3232-3238
100. Lo HR, Chou CC, Wu TY, Yuen JP and Chao YC. Novel baculovirus DNA elements strongly stimulate activities of exogenous and endogenous promoters. *J. Biol. Chem.*, 2002 , 277:5256-5264
101. Lu M, Farrell PJ, Johnson R and Iatrou K. A baculovirus (*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus) repeat element functions as a powerful constitutive enhancer in transfected insect cells. *J. Biol. Chem.*, 1997 , 272:30724-30728
102. Ludwig MZ et al. Evidence for stabilizing selection in a eukaryotic enhancer element. *Nature*, 2000,403:564-567
103. Ludwig MZ, Kreitman M. Functional analysis of eve stripe 2 enhancer evolution in *Drosophila*: rules governing conservation and change. *Development*, 1998, 125:949-958
104. Mackay TF. Quantitative trait loci in *Drosophila*. *Nat. Rev. Genet.*, 2001, 2:11-20
105. Mange A, Couble P, Prudhomme JC. Two alternative promoters drive the expression of the cytoplasmic actin A4 gene of *Bombyx mori*. *Gene*, 1996, 183(1-2):191-199
106. Mange A, Julien E, Prudhomme JC, Couble P. A strong inhibitory element down-regulates SRE-stimulated transcription of the A3 cytoplasmic actin gene of *Bombyx mori*. *Mol. Biol.*, 1997, 265(3):266-274.
107. Mange A, Prudhomme JC. Comparison of *Bombyx mori* and *Helicoverpa armigera* cytoplasmic actin genes provides clues to the evolution of actin genes in insects. *Mol. Biol. Evol.*, 1999, 16(2):165-172.
108. Martinez E, Givel F, Wahli W. A common ancestor DNA motif for invertebrate and vertebrate hormone response elements. *EMBO J*, 1991, 10: 263-268
109. Martinez L, et al. Sequence variability in the fibroin-H intron of domesticated and wild silk moths. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2004,34:343-352
110. Matsumoto N, Nakanishi Y, Natori S. Homologies of nucleotide sequences in the 5'-end region of two developmentally regulated genes of *Sarcophaga peregrina*. *Nucl. Acids Res.*, 1986(14): 2685-2698
111. Matsunami K, Kokubo H, Ohno K, Suzuki Y. Expression pattern analysis of SGF-3/POU-M1 in relation to sericin-1 gene expression in the silk gland. *Dev. Growth Differ.*, 1998, 40(6):591-597
112. Matsuno K, Hui CC, Takiya S, Suzuki T, Ueno K, Suzuki Y. Transcription signals and protein binding sites for sericin gene transcription in vitro. *J Biol. Chem.*, 1989, 264(31):18707-18713
113. Matsuno K, Takiya S, Hui CC, Suzuki T, Fukuta M, Ueno K, Suzuki Y. Transcriptional stimulation via SC site of *Bombyx* sericin-1 gene through an interaction with a DNA binding protein SGF-3. *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18(7):1853-1858
114. Memmel NA, Trewitt PM, Grzelak K, et al. Nucleotide sequence, structure and developmental regulation of Lhp82, a juvenile hormone suppressible hexamerin gene from the waxmoth, *Galleria mellonella*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 1994, 24:133-144
115. Memmel NA, Trewitt PM, Silhacek DL et al. Nucleotide sequence and structure the arylphorin gene from the waxmoth, *Galleria mellonella*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 1992, 22:333-342
116. Mestrl R , Schiller P , Amin J et al. Heat shock and ecdysterone activation of the *Drosophila melanogaster* hsp23 gene: a sequence element implied in developmental regulation. *EMBO J* , 1986 , 5: 1667~1673
117. Michaille JJ, Garel A, Prudhomme JC. Cloning and characterization of the highly polymorphic Ser2 gene of *Bombyx mori*. *Gene*, 1990, 86(2):177-184

118. Mine E, Sakurai H, Izumi S, et al. The fat body cell-free system for tissue-specific transcription of plasma protein gene of *Bombyx mori*. *Nucleic. Acids Res.*, 1995, 23(14): 2648~2653
119. Mita K., et al. The genome sequence of silkworm, *Bombyx mori*. *DNA Res.*, 2004, 11: 27-35
120. Mita, K., Morimyo, M., Okano, K. et al. The construction of an EST database for *Bombyx mori* and its application. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, 100, 14121-14126.
121. Moos M. Analysis of proteins. 1995. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K eds. *Short Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc
122. Mounier N, Gaillard J, Prudhomme JC. Nucleotide sequence of the coding region of two actin genes in *Bombyx mori*. *Nucleic. Acids Res.* 1987, 15(6):2781
123. Mounier N, Prudhomme JC. Isolation of actin genes in *Bombyx mori*: the coding sequence of a cytoplasmic actin gene expressed in the silk gland is interrupted by a single intron in an unusual position. *Biochimie.*, 1986, 68(9):1053-1061
124. Naar AM, Lemon BD, Tijian R. Transcriptional coactivator complex. *Annu. Rev. Biochem.*, 2001, 70:475-501
125. Nakata H, Izumi S, Tomino S. Structure and expression of a gene coding for a pupal cuticular protein of *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Acta*, 1992, 1132: 161-167
126. Nelson CR, Abert VR, Elsholtz HP et al. Activation of cell specific expression of rat growth hormone and prolactin genes by a common transcription factor. *Science*, 1988, 239:1400-14505
127. Nony P, Prudhomme JC, Couble P. Regulation of the P25 gene transcription in the silk gland of *Bombyx*. *Biol. Cell.*, 1995, 84(1-2):43-52
128. Ohbayashi F, Suzuki MG, Mita K, Okanoc K, Shimada T. A homologue of the *Drosophila* doublesex gene is transcribed into sex-specific mRNA isoforms in the silkworm, *Bombyx mori*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 2001, 128:145-158
129. Okamoto H, Ishikawa W, Suzuki Y. Structural analysis of sericin genes. *J Biol. Chem.*, 1982, 257(24):15192-15199
130. Papadimitriou E, Kritikou D, Mavroidis M, Zacharopoulou A and Mintzas AC. The heat shock 70 gene family in the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. *Insect. Mol. Biol.*, 1998, 7: 279-290
131. Pelham H. Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. *Cell*, 1986, 46:959-961
132. Peterson NS, Mitchell HK. 1985. Heat shock proteins. In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I.(Eds), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and pharmacology*, vol. 10. Pergamon Press, Oxford, pp. 347-360
133. Promboon A, Shimada T, Fujiwara H and Kobayashi M. Linkage map of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in the silkworm, *Bombyx mori*. *Genet. Res.*, 1995, 66: 1-7
134. Purnell BA, Emanuel PA, Gilmour DS. TFIID sequence recognition of the initiator and sequences farther downstream in *Drosophila* class II genes. *Genes Dev.*, 1994, 8:830-842
135. Reddy KD, Abraham EG and Nagaraju J. Microsatellites in the silkworm, *Bombyx mori*: abundance, polymorphism, and strain characterization. *Genome*, 1999, 42:1057-1065
136. Reisler E. Actin molecular structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1993, 5:41-47
137. Riddiford LM. Cellular and molecular actions of juvenile hormone I. General considerations and premetamorphic actions. *Adv. Insect Physiol.*, 1994, 24:213-274
138. Riddiford LM, Hiruma K. Hormone control of sequential gene expression in lipidopeteran epidermis. In *Molting and Metamorphosis*, 1990, ed. E Ohnishi, H Ishizaki, pp.207-222, Tokyo, Japan Sci Soc

139. Riddiford LM. 1985, Hormone action at the cellular level. In: Kerkut, G., Gilbert, L.I. (Eds.), Comprehensive insect biochemistry, physiology, and pharmacology, vol. 8. Pergamon Press, New York, pp. 37–84.
140. Riddiford LM. Cellular and molecular actions of juvenile hormone, I. General considerations and premetamorphic actions. *Advances in Insect Physiology*, 1994, 24: 213–274
141. Riddiford LM. 1996. Molecular aspects of juvenile hormone action in insect metamorphosis. In: Gilbert, L.I. Tata, JR, Atkinson, BG (Eds.), Metamorphosis: postembryonic reprogramming of gene expression in amphibian and insect cells. Academic Press, San Diego, pp. 223–251.
142. Riddiford LM, Ashburner M. Effects of juvenile hormone mimics on larval development and metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *General and Comparative Endocrinology*, 1991, 82:172–183.
143. Riddihough G, Pelham HRB. An ecdysone response element in the *Drosophila* hsp 27 promoter, *EMBO J.*, 1987, 6:3729–3734
144. Rinehart JP, Yocum GD and Denlinger DL. Developmental upregulation of inducible hsp70 transcripts, but not the cognate form, during pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2000, 30(6): 515–521.
145. Robertson HM, Asplund ML. Bmmar1: a basal lineage of the mariner family of transposable elements in the silkworm moth, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 1996, 26(8-9): 945–954
146. Romans P, Tu Z, Ke Z et al. Analysis of a vitellogenin gene of the mosquito, *Aedes aegypti* and comparisons to vitellogenins from other organism. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 1995, 26:939–958
147. Rubenstein RC, Zeitlin PL. Sodium 4-phenylbutyrate downregulates Hsc70: implications for intracellular trafficking of DeltaF508-CFTR. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2000, 278(2):C259–267
148. Rybczynski R, Gilbert LI. cDNA cloning and expression of a hormone-regulated heat shock protein (hsc70) from the prothoracic gland of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2000, 30: 579–589
149. Sakurai H, Fujii T, Izumi S et al. Structure and expression of a gene coding for sex-specific storage protein of *Bombyx mori*. *J Biol. Chem.*, 1988, 263 :7876–7880
150. Sakurai H, Fujii T, Izumi S, et al. Complete nucleotide sequence of gene for specific storage protein of *Bombyx mori*. *Nucl. Acids Res.*, 1988, 16: 7717–7718
151. Sakurai H, Izumi S, Tomino S. In vitro transcription of the protein genes of *Bombyx mori*. *B.B.A.*, 1990, 1087: 18–24
152. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
153. Sato H, Takeuchi Y, Takeda R et al. The core complementary sequence responsible for biological activity of the diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. *Peptides*, 1994:1173–1178
154. Shei Y, Thomas JO. The transport of proteins into the nucleus requires the 70kDa heat shock protein or its cytosolic cognate. *Mol. Cell. Biol.*, 1992, 12: 2186–2192
155. Shi J, Heckel DG and Goldsmith MR. A genetic linkage map for the domesticated silkworm, *Bombyx mori*, based on restriction fragment length polymorphisms. *Genet. Res.*, 1995, 66: 109–126.
156. Skeiky YA, Iatrou K. Synergistic interactions of silkworm chorion promoter-binding factors. *Mol. Cell Biol.*, 1991, 11(4):1954–1964
157. Spieth J, Nettleton M, Zucker-Aprison E et al. Vitellogenin motif conserved in nematodes and vertebrates. *J Mol. Evol.*, 1991, 32:429–438

158. Statistical Analysis System User's Guide , Version 6.12 , SAS , Institute Inc. Cary. North Carolina : Institute Inc. Cary. North Carolina , Vols. 1.2. 1990
159. Su Z-H, Ikeda M, Sato Y et al. Molecular characterization of ovary trehalase of the silkworm, *Bombyx mori* and its transcriptional activation by diapause hormone. *Biochim Biophys Acta*, 1994,218:366-374
160. Summers MD , Smith GE. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin , No. 1555 , 1987
161. Suzuki MG, Funaguma S, Kanda T, Tamura T, Shimada T. Analysis of the biological functions of a doublesex homologue in *Bombyx mori*. *Dev. Genes Evol.*, 2003, 213(7):345-354
162. Suzuki MG, Ohbayashi F, Mita K, Shimada T. The mechanism of sex-specific splicing at the doublesex gene is different between *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2001,31(12):1201-1211
163. Swevers L, Eystathioy T, Iatrou K. The orphan nuclear receptors BmE75A and BmE75C of the silkworm *Bombyx mori*: hormonal control and ovarian expression. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2002, 32(12):1643-1652
164. Takiya S, Kokubo H, Suzuki Y. Transcriptional regulatory elements in the upstream and intron of the fibroin gene bind three specific factors POU-M1, Bm Fkh and FMBP-1. *Biochem J.* 1997, 321 (Pt 3):645-653
165. Takiya S , Hui C C , Suzuki Y. A contribution of the core-promoter and its surrounding regions to the preferential transcription of the fibroin gene in posterior silk gland extracts. *EMBO J* , 1990 , 9(2): 489-496
166. Tamura T, et al. Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon-derived vector. *Nat. Biotechnol.*, 2000, 18(1):81-84
167. Tan YD, Wan C, Zhu Y, Lu C, Xiang Z and Deng HW. An amplified fragment length polymorphism map of the silkworm. *Genetics*, 2001, 157(3):1277-1284
168. Tanaka K, Inoue S, Mizuno S. Hydrophobic interaction of P25, containing Asn-linked oligosaccharide chains, with the H-L complex of silk fibroin produced by *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 1999, 29(3):269-276
169. Tang SM, Yi YZ, Shen XJ, Zhang ZF, Li YR and He JL. Functional analysis of the larval serum protein gene promoter from silkworm, *Bombyx mori*. *Chinese Science Bulletin*, 2003, 48(23):2611-2615
170. Tautz D. Evolution of transcriptional regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2000, 10:575-579
171. Tomita M, Munetsuna H, Sato T, Adachi T, Hino R, Hayashi M, Shimizu K, Nakamura N, Tamura T, Yoshizato K. Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons. *Nat Biotechnol.*, 2003 J;21(1):52-56
172. Tsujimoto Y, Suzuki Y. Structural analysis of the fibroin gene at the 5' end and its surrounding regions. *Cell*, 1979, 16(2):425-436
173. Ueno K, Hui CC, Fukuta M, Suzuki Y. Molecular analysis of the deletion mutants in the E homeotic complex of the silkworm *Bombyx mori*. *Development*, 1992, 114: 555-463
174. Viswanathan P, Venkaiah B, Kumar MS, Rasheedi S, Vrati S, Bashyam MD and Hasnain SE. The homologous region sequence (hr1) of Autographa californica multinucleocapsid polyhedrosis virus can enhance transcription from non-baculoviral promoters in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, 2003 , 278:52564-52571
175. Webb BA, Riddiford LM. Regulation of expression of arylphorin and female specific protein

- mRNA in the tobacco hornworm, *Manduca Sexta*. *Dev. Biol.*, 1988, 130:682-692
176. Willott E, Wang XY, Wells MA. cDNA and gene sequence of *Manduca Sexta* arylphorin, an aromatic amino acid-rich larval serum protein. *J Biol. Chem.*, 1989(264): 19052~19059
177. Wyatt GR, Braun RP, Zhang J, Priming effect in gene activation by juvenile hormone in locust fat body. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 1996, 32:633-640
178. Xiao QL, Zhang ZF, Yi YZ, He JL and Wu XF. Functional analysis of helicase gene promoter and homologous region 3 enhancer in *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2001 , 33:525-530
179. Xiao QL, Zhang ZF, Yi YZ, He JL and Wu XF. Identification of functional region of helicase gene promoter in *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2002, 34(5):560-564
180. Xie XZ , Wu NH. Isolation of tomato proteinase inhibitor II gene and the function of its intron. *Chin. Sci. Bull.*, 2002, 47(10): 830-833
181. Xu W-H et al. Molecular characterization of the gene encoding the precursor protein of DH-PBAN of the silkworm *Bombyx mori*, and its distribution in some insects. *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1261:83-89
182. Yamaguchi K, Kikuchi Y, Takagi T, Kikuchi A, Oyama F, Shimura K, Mizuno S. Primary structure of the silk fibroin light chain determined by cDNA sequencing and peptide analysis. *J Mol. Biol.*, 1989, 210(1):127-139
183. Yamamoto K, Chadarevian A, Pelligrini A. Juvenile hormone action mediated in male accessory glands of *Drosophila* by calcium and kinase. *Science*, 1988,239:916-919
184. Yamao M, Katayama N, Nakazawa H, Yamakawa M, Hayashi Y, Hara S, Kamei K, Mori H. Gene targeting in the silkworm by use of a baculovirus. *Genes Dev.*, 1999,13(5):511-516
185. Yamashita O, Yaginuma T, Hasegawa K. Hormonal and metabolic control of egg diapause of the silkworm, *Bombyx mori*. *Entomol. Gener.*,1981,7:195-211
186. Yasukochi, Y. A dense genetic linkage map of the silkworm, *Bombyx mori*, covering all chromosomes based on 1018 molecular markers. *Genetics*, 1998, 150, 1513-1525.
187. Zhou CZ, Confalonieri F, Esnault C, Zivanovic Y, Jacquet M, Janin J, Perasso R, Li ZG, Duguet M. The 62-kb upstream region of *Bombyx mori* fibroin heavy chain gene is clustered of repetitive elements and candidate matrix association regions. *Gene*, 2003, 312:189-195.
188. Zhou CZ, et al. Fine organization of *Bombyx mori* fibrion heavy chain gene. *Nucleic Acids Res.*, 2000, 28:2413-2419
189. Zhou YJ, Xiao QL, Zhang ZF, He JL and Zhang YX. Foreign insect hormone stimulating the transcription of the ie-1 promoter of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus *in vivo* and *in vitro*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2002 66(7): 1488-1494
190. Zhou YJ, Yi YZ, Zhang ZF, He JL Zhang YX and Wu XF. Promoter activities in the baculovirus envelope glycoprotein gp64 gene. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2003, 35(1):18-26

致 谢

本研究内容由国家自然科学基金项目 30271007 部分资助。

首先感谢导师李奕仁研究员和张志芳研究员,本论文是在导师悉心指导下得以完成。导师渊博的知识、丰富的工作经验、严谨的治学态度,这将使我在今后科研征途中终身受益。值此论文完成之际,我谨向两位恩师致以崇高的敬意与衷心的感谢!

本研究是在农业部家蚕生物技术重点开放实验室内完成。实验室是一个和睦、学术氛围浓厚的团体。实验室前任主任何家禄研究员在实验与生活上都给予大力支持;易咏竹副研究员给我实验及时提供细胞等材料;周亚竞博士、沈兴家博士、肖庆利博士、陈寅博士在实验具体操作给予大量指导;与中国科学技术大学客座张天翼博士之间实验内容交流,使我受益非浅;林旭媛博士、周庆祥硕士、朱中泽硕士、许光治硕士、客座王海清硕士、余招峰硕士、李爱玲硕士、张金卫先生、赵丽华女士等积极配合使实验工作顺利进行;杜厚琴女士默默无闻地为实验准备大量的材料和营造良好实验室环境。在此一并深表谢意!

感谢农业部蚕桑产业产品质量监督检验检测中心(镇江)叶夏裕研究员、李桂芳女士、陈涛副研究员、汪萍副研究员及其他同事们的积极配合,给予充足时间,使实验得以按时完成!

感谢中国农业科学院蚕业研究所的各级领导和科研处张健处长给予关心与支持!陈锡潮研究员、魏幼平研究员、胡丹明副研究员和方媛副研究员提供了诸多支持和帮助;沈中元副研究员、徐安英副研究员、赵巧玲副研究员、汪生鹏博士、桂仲争博士、李木旺博士和裘智勇硕士等在实验过程中给予帮助。在此一并感谢!

中国科学技术大学徐卫华教授在实验设计上给予指导,魏兆军博士和浙江大学张有做同学、焦峰博士在资料查阅上给予大力帮助。在此深表谢意!

感谢中国农业科学院研究生院的老师们!在北京学习的半年时间里,你们的教育,使我获得充分的基础知识来完成学位论文。

最后感谢我的父母,养育了我且用不同的方式一直支持我完成学业!感谢夫人刘莉萍和犬子在精神上的大力支持!

值此论文完成之际,谨祝所有关心、支持和帮助过我的老师、同事、朋友及其家人,身体健康、工作顺利、家庭幸福、心想事成!

唐顺明

2004 年 6 月于江苏省镇江市

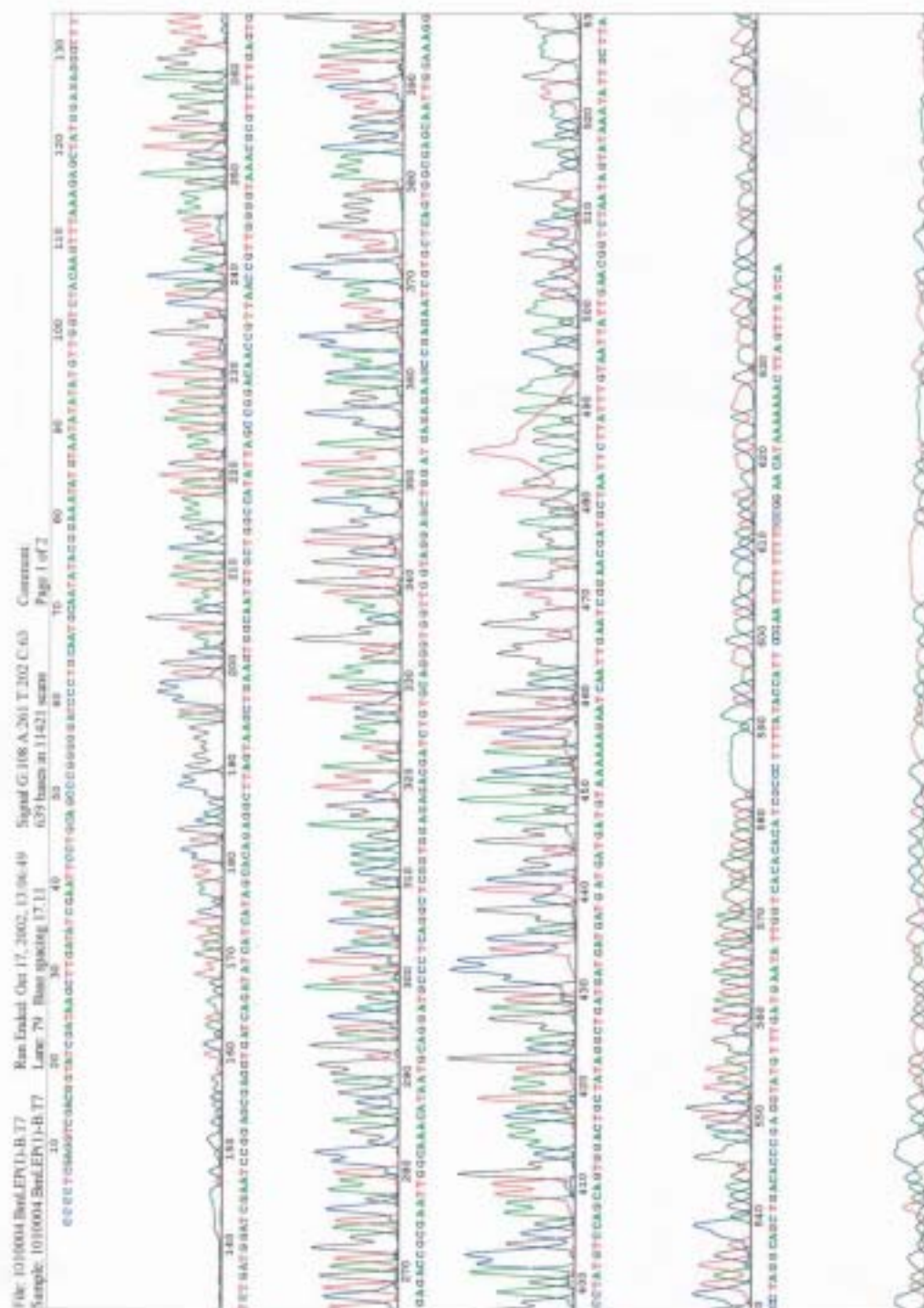
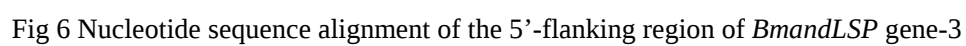
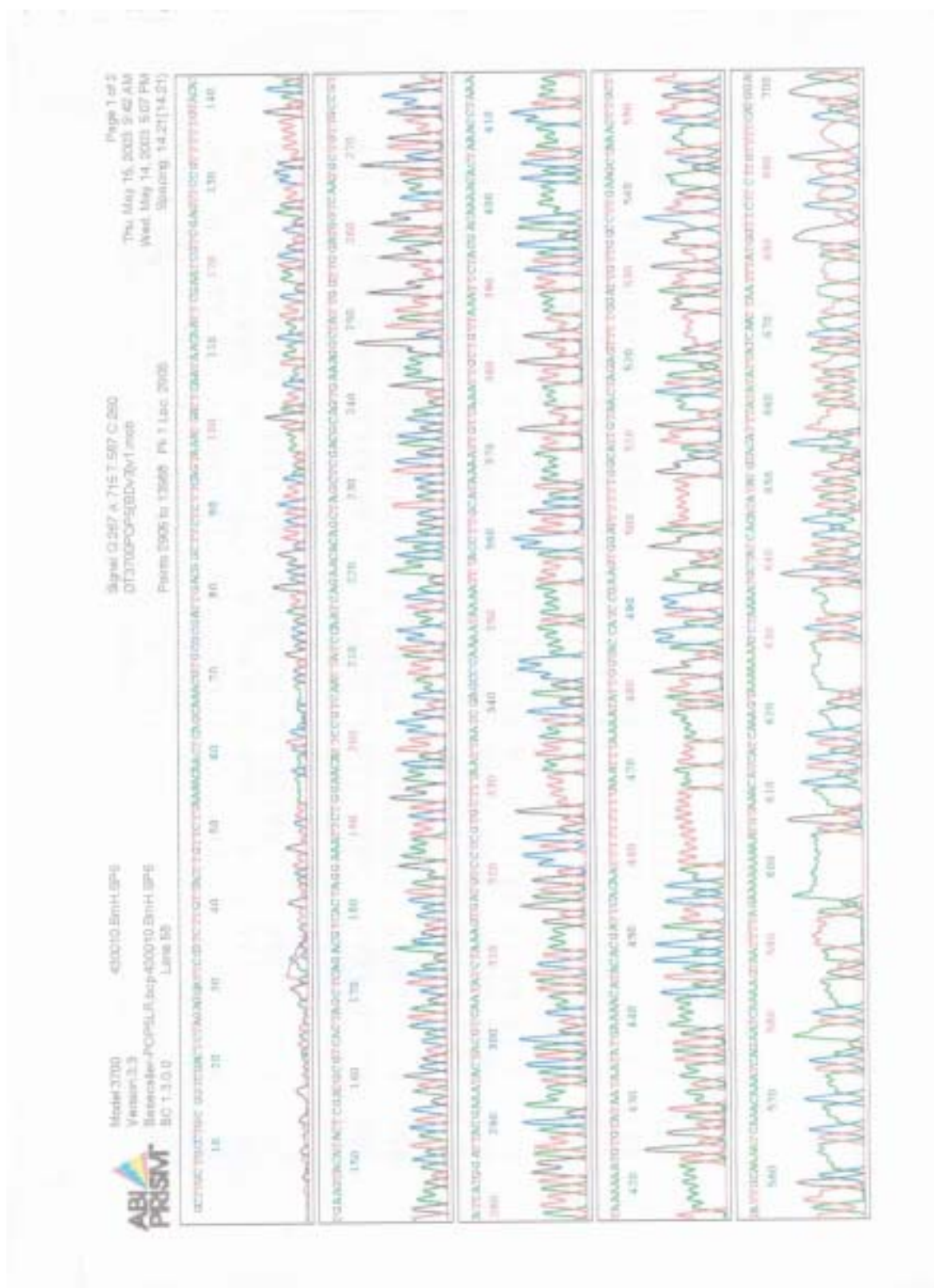


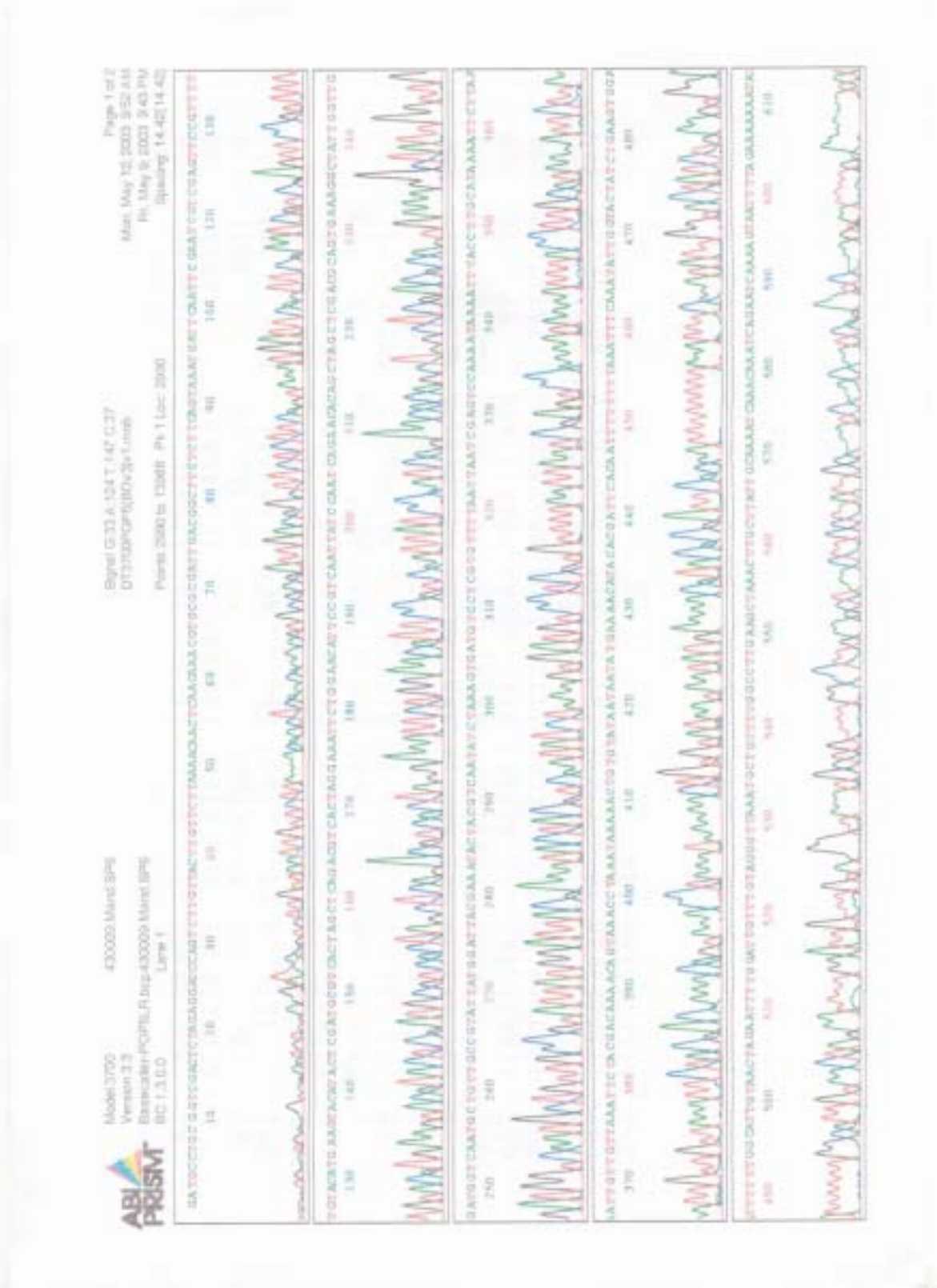
Fig 1 Nucleotide sequence alignment of the 5'-flanking region of *BmLSP* gene-1





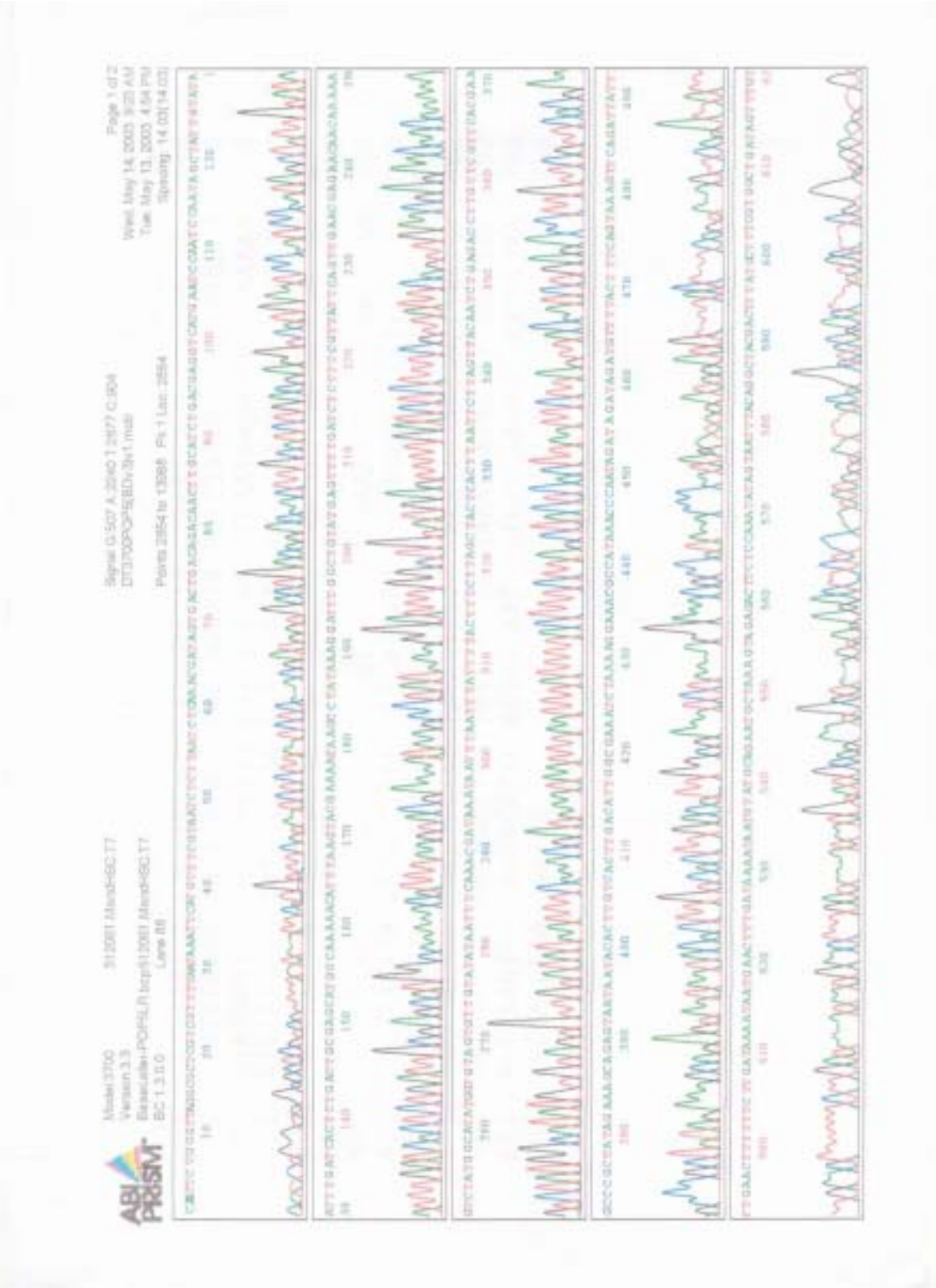
附图 7 测定的 *BmHSC70-4* 5' 侧翼区核苷酸序列-1

Fig 7 Nucleotide sequence alignment of the 5'-flanking region of *BmHSC70-4* gene-1



附图 9 测定的 *BmandHSC70-4* 5' 侧翼区核苷酸序列-1

Fig 9 Nucleotide sequence alignment of the 5'-flanking region of *BmandHSC70-4* gene-1



附图 10 测定的 *BmandHSC70-4* 5' 侧翼区核苷酸序列-2

Fig 10 Nucleotide sequence alignment of the 5'-flanking region of *BmandHSC70-4* gene-2

攻读博士期间发表论文统计

- 1、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 (21): 2261-2265 (中文版)
- 1、**Tang Shunming**, Yi Yongzhu, Shen Xingjia, Zhang Zhifang, Li Yiren & He Jialu, Functional analysis of the larval serum protein gene promoter from silkworm, *Bombyx mori*. *Chinese Science Bulletin*, 2003,48(23):2611-2615 (英文版)(SCI 收录)
- 2、唐顺明, 沈兴家, 张志芳, 李奕仁, 何家禄. 野桑蚕、家蚕 *LSP* 基因 5'侧翼区的克隆与序列分析. 蚕业科学, 2003, 29(2):142-147
- 3、唐顺明, 周亚竞, 张志芳, 李奕仁, 何家禄. 家蚕杆状病毒同源重复区对外源启动子的增强功能. 《浙江省生物化学与分子生物学会第八届会员代表大会暨江浙两省省际联合学术交流会》论文集, 290-294, 2002.11.16, 浙江宁波
- 4、**Tang Shunming**, Zhao Qiaoling, Xu Weihua, Yi Yongzhu, Zhang Zhifang, Li Yiren & He Jialu, Functional analysis on the promoter activity of the heat-shock-cognate 70-4 gene from *Bombyx mori*. 《华东六省一市生物化学与分子生物学会-2003 年学术交流会》论文摘要, 17-18, 2003.8.21-22, 上海
- 5、**Tang Shunming**, Yi Yongzhu, Shen Xingjia, Xu Weihua, Zhang Zhifang, Li Yiren & He Jialu, Promoter activity in the larval serum protein gene of *Bombyx mori*. 《华东六省一市生物化学与分子生物学会-2003 年学术交流会》论文摘要, 72-73, 2003.8.21-22, 上海
- 6、赵巧玲, 唐顺明, 张志芳, 何家禄. 野桑蚕、家蚕海藻糖酶基因 5'侧翼区的克隆与序列分析. 中国蚕业, 2003, 24(4):91-93
- 7、Shen Xingjia, Yi Yongzhu, **Tang Shunming**, Zhang Zhifang, Li Yiren, He Jialu & Wu Xiangfu. Functional analysis of promoter activity of *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene. 《华东六省一市生物化学与分子生物学会-2003 年学术交流会》论文摘要, 72-73, 2003.8.21-22, 上海
- 8、沈兴家, 唐顺明, 易咏竹, 赵巧玲, 张志芳, 李奕仁, 何家禄. 家蚕、野桑蚕海藻糖酶基因启动子的特性及其滞育激素的转录调节. 蚕业科学, 2004, 30(2) (已录用)
- 9、Xing-Jia Shen, Yong-Zhu Yi, **Shun-Ming Tang**, Zhi-Fang Zhang, Yi-Ren Li, Jia-Lu He, Xiang-Fu Wu. Characterization of Ecdysteroid UDP-Glucosyltransferase Gene Promoter from *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus. *International Journal of Industrial Entomology* (已录用)
- 10、Xing-Jia Shen, Yong-Zhu Yi, **Shun-Ming Tang**, Zhi-Fang Zhang, Yi-Ren Li, Jia-Lu He. The Ecdysteroid UDP-Glucosyltransferase Gene Promoter from *Autographa californica* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus. *Zeitschrift fur Naturforschung C* (德国, SCI 收录, 已录用)
- 11、唐顺明, 张志芳 等. 一种家蚕微孢子虫孢子快速染色鉴定的方法. 中国蚕业, 2002, 23(2):27-28
- 12、唐顺明, 张志芳 等. 用铬变素 2R 法对家蚕微孢子虫孢子染色的研究. 蚕业科学, 2002, 28(1):72-74
- 13、唐顺明, 李奕仁等. 蚕茧、生丝、坯绸中有害物质的检测试验. 中国蚕业, 2001, 22(3):72-73
- 14、唐顺明, 张有做 等. 柞蚕催青期胚胎发育阶段的蚕卵磷脂含量. 中国蚕业, 2001, 22 (4): 63-64
- 15、沈兴家, 李奕仁, 唐顺明 等. 春秋兼用耐氟蚕品种华峰₁(GW)×雪·A 的选配. 蚕业科学 2002, 28(1):52-55
- 16、沈兴家, 李奕仁, 唐顺明 等. 蚕品种国家审定标准及其合理性探讨. 中国蚕业 2002, 23(3):4-6
- 17、沈中元, 李奕仁, 唐顺明 等. 家蚕现行品种微孢子病抗性研究. 中国蚕业, 2003, 24(2):21-22

- 18、李爱玲, 徐安英, 沈兴家, 唐顺明, 张志芳, 潘沈元. 家蚕, 野桑蚕线粒体 *Cyt b* 基因片段序列分析及分子进化研究. 蚕业科学, 2004, 30(1): 80-84
- 19、汪萍, 李奕仁, 叶夏裕, 李桂芳, 陈涛, 沈兴家, 唐顺明. 全国桑蚕一代杂交种质量调查及行业标准实施评价. 蚕业科学, 2004, 30(1): 95-98

投稿中:

- 1、**Tang Shunming**, Zhao Qiaoling, Yi Yongzhu, Zhang Zhifang, and Li Yiren. Homologous region 3 from *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus enhancing the transcriptional activity of heat shock cognate 70-4 promoter from *Bombyx mori* and *Bombyx mandarina* *in vitro* and *in vivo*. Submitted to *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, (Japan)
- 2、**Tang Shunming**, Yi Yongzhu, Shen Xingjia, Zhang Zhifang, and Li Yiren. Characteristic Analysis of Heat-shock-cognate 70-4 Gene Promoter from Silkworm, *Bombyx mori* (*Bmhsc70-4*). Submitted to *Journal of Biosciences*, (India)

作者简历

唐顺明,男,汉族,助理研究员,1971年11月生,浙江省兰溪市人。1993年7月毕业于浙江农业大学蚕学专业,获得学士学位,同年被分配到中国农业科学院蚕业研究所工作。1997年9月考入中国农业科学院研究生院,在职攻读特种经济动物饲养专业硕士学位,2000年7月毕业并获得硕士学位。2001年9月开始在中国农业科学院研究生院在职攻读特种经济动物饲养专业博士学位。自参加工作以来,先后从事家蚕遗传育种、全国蚕品种鉴定、家蚕分子生物学、蚕业产品质量检测等工作,参加了国家科技攻关项目、国家自然科学基金项目、国家茧丝绸风险基金项目等资助的科研项目十余项,累计在学术期刊杂志上发表论文20余篇。