

用差异显示技术寻找家蚕诱导前后特异表达的基因*

刘振义 屈贤铭

(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

摘 要 分别抽取诱导和未诱导家蚕(*Bombyx mori*)蛹脂肪体总 RNA 进行 DDRT-PCR 反应。产物于非变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳展开,得到的差异条带扩增后大多可以在 2% 琼脂糖凝胶上得到一条以上的带。Northern blot 证明为阳性的一条带克隆后得到 6 个阳性转化子,SSCP 证明它们含有相同的插入片段。对其中之一进行测序,结果显示片段长 241bp,没有发现同源性较高的基因。对此基因的进一步研究有望揭示它在昆虫免疫反应中可能扮演的角色。

关键词 家蚕,免疫反应,差异显示

分类号 Q552 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)01-0059-63

昆虫免疫反应正越来越引起人们极大的兴趣。对此过程的深入研究具有重要意义。一方面,昆虫在免疫反应过程中合成的各种抗菌蛋白(肽)大多具有广谱抗菌活性,可用转基因技术增强农作物的抗病性^[1];另一方面,最近的研究揭示昆虫免疫反应和哺乳动物急性期反应以及昆虫的背腹极性发育在信号传递途径上具有较大的相似性,在某种程度上提示脊椎动物和昆虫的免疫系统可能是从一个共同的祖先进化而来^[2]。

在对昆虫免疫反应进行研究的过程中,往往涉及到某些新基因的寻找鉴定。传统的研究方法大都从蛋白质的分离纯化入手,难度较大。1992 年 Liang 等报道的差异显示技术(mRNA differential display)^[3]提供了一种寻找差异表达基因的全新方法,具有灵敏、快速等特点。本文采用此技术对大肠杆菌诱导前后的家蚕蛹基因的差异表达进行了初步的研究,得到了一个全新的基因片段。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 家蚕和菌株:家蚕“春雷镇珠”由中国农科院镇江蚕业研究所张国政先生惠赠。大肠杆菌 *E. coli* DH 5 α 系本实验室保存。

1.1.2 工具酶:RNase-free DNase、M-MLV Reverse Transcriptase 购自 Promega 公司;Taq DNA polymerase 购自 Perkin Elmer 公司;限制酶 *Hind*III 购自 GIBCO BRL 公司;pGEM-7Zi(+)/*Hae*III DNA Markers、RNasin 购自华美生物工程公司。

1.1.3 试剂盒:TRIzolTM Reagent 购自 GIBCO BRL 公司;pGEM-T Vector System 购自

* 国家高技术研究发展计划项目(No. 101-01-02-03)。

收稿日期:1997-09-22,修回日期:1998-09-29。

Promega 公司;柱离心式胶纯化试剂盒、柱离心式 PCR 产物纯化试剂盒购自华顺公司。

1.1.4 同位素: α -³⁵S-dATP (>3000Ci/mmol) 购自 Amersham 公司; α -³²P-dATP (>3000Ci/mmol) 购自北京亚辉生物医学工程公司。

1.1.5 其他: dNTP 购自 Sangon 公司;杂交用尼龙膜 Zeta-Probe 购自 Bio-Rad 公司。

1.1.6 引物的合成: 锚定引物 H-T₁₁G (5' AAGCTTTTTTTTTTTTG3')、H-T₁₁C (5' AAGCTTTTTTTTTTTTC3') 和随机引物 H-AP₁ (5' AAGCTTGATTGCC3')、H-AP₂ (5' AAGCTTCGACTGT3') 由 Sangon 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 家蚕的培养及家蚕蛹的诱导: 培养家蚕至化蛹,随机分成两批,其中一批于翅芽端部附近的腹部节间膜处注射约 10⁶ 个大肠杆菌 *E. coli* DH 5 α 进行免疫诱导。此两批蚕蛹同时置于 25℃ 培养约 16h 后解剖,分别取脂肪体组织,立即置于液氮中备用。

1.2.2 家蚕蛹脂肪体总 RNA 提取: 用 GIBCO BRL 公司 TRIzol™ Reagent 进行,1% 甲醛变性凝胶电泳鉴定 RNA 的完整性;Beckman Du-7500 型分光光度计测量 RNA 浓度。

1.2.3 总 RNA 中 DNA 杂质的去除: 参考文献[4],略作修改。反应缓冲液采用 0.5 × M-MLVRT Buffer, 75℃ 5min 终止反应。

1.2.4 DDRT-PCR 反应: 参考文献[3]进行,略作修改。逆转录反应采用的锚定引物分别为 H-T₁₁C 或 H-T₁₁G,反应温度 35℃,时间 60min。PCR 反应中 Mg²⁺ 浓度 2.5mmol/L,随机引物为 H-AP₁ 或 H-AP₂,dNTP 终浓度 2 μ mol/L,1 μ L α -³⁵S-dATP(放射比活度 >3000Ci/mmol),2.5u Taq DNA 聚合酶。循环参数为:首轮反应,94℃ 3min,40℃ 1min,72℃ 1min;后续循环,94℃ 30s,40℃ 1min,72℃ 1min,38 次;末轮反应,94℃ 30s,40℃ 1min,72℃ 5min。为降低放射性污染,用 Parafilm 膜封住管口。

1.2.5 差异片段的显示、回收及重扩增: 分别取 10 μ L PCR 产物,与 2 μ L 加样缓冲液混合后上样于 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶,1 × TBE、1800V 恒压电泳至溴酚蓝迁移至凝胶底部。电泳结束后,凝胶干燥器 80℃ 真空抽干 2h。揭下保鲜膜, -70℃ 放射自显影 2~3d 即可得到差异显示的指纹图谱。将凝胶上对应差异条带处切下,加入 100 μ L 重蒸水,盖紧管口,沸水浴 30min 以洗脱 DNA。以此 DNA 为模板,采用与上步 PCR 反应基本相同的条件(但不加 α -³⁵S-dATP,dNTP 终浓度为 20 μ mol/L)进行重扩增,以增加差异条带的量。将重扩增产物进行电泳,用柱离心式胶纯化试剂盒对不同的片段进行分离纯化备用。

1.2.6 差异条带的鉴定: 探针标记采用 PCR 直接掺入法,条件与重扩增时基本相同,但以 α -³²P-dATP 代替非放射性标记的 dATP,循环次数降为 30 次,模板为经纯化的差异片段。PCR 标记反应产物用柱离心式 PCR 产物纯化试剂盒进行简单的纯化以去除引物、未掺入的 dNTP 混合物,加入 0.1 倍体积 1mol/L NaOH 37℃ 变性 10min,即可作为探针备用。电泳时 RNA 用量为 30 μ g。转膜、Northern blot 等操作基本参考 Bio-Rad 公司 Zeta-Probe™ Blotting Membrane 说明书进行,主要操作参数为:65℃ 预杂交 5min;65℃ 杂交过夜;65℃ 于 1mmol/L EDTA、40mmol/L NaHPO₄ (pH 7.2)、5% SDS 洗膜至背景放射强度较低时显影。

1.2.7 差异片段的克隆: 采用 pGEM-T Vector 对差异片段进行克隆,抽提质粒, *Hind*III 酶切鉴定。

1.2.8 SSCP 法对阳性克隆插入片段进行同一性分析^[5]: 阳性克隆质粒酶切产物中加入等体积甲酰胺,沸水浴变性 10min 后立即冰浴。115mm×145mm 大小 6% 非变性聚丙烯酰胺(含 5% 甘油)凝胶、0.5×TBE 100V 电泳约 4~5h。电泳过程中以风扇吹拂凝胶表面以散热。电泳结束后采用银染法进行染色^[6]。

1.2.9 DNA 测序和同源性比较: DNA 测序委托中科院上海植物生理研究所采用 ABI 自动测序仪进行;DNA 同源性比较委托美国 CyberSyn 公司(上海)进行。

2 结果和讨论

2.1 家蚕免疫反应的诱导

家蚕蛹在受伤或受到外来细菌感染的情况下,总会发生一系列的免疫反应,产生种类繁多的抗菌肽(蛋白)保护其免于受到进一步的伤害。包括纯水在内的多种物质都可以诱导家蚕蛹免疫反应的发生,实验中采用注射 10^6 个大肠杆菌/蚕蛹进行诱导,以期取得较好的免疫诱导效果。

由于家蚕蛹免疫反应的中枢是脂肪体组织,抗菌肽(蛋白)的产生和免疫反应的调控都在此进行,故选择脂肪体作为研究对象。此外,由于家蚕蛹的免疫反应在诱导后 12~24h 内 mRNA 的转录达到峰值,实验中在诱导后 16h 将家蚕蛹解剖。为减轻不同家蚕蛹个体间的基因表达差异对差异显示造成的影响,在抽提总 RNA 时所用的脂肪体为多个家蚕蛹脂肪体的混合物。

2.2 家蚕蛹脂肪体总 RNA 的抽提及 DNA 杂质的去除

电泳结果和 OD_{260}/OD_{280} 证明 RNA 完整纯净,但由于采用本法得到的 RNA 中会不可避免的含有痕量的 DNA 杂质,它们的存在会严重影响差异显示的效果,故必须在进行差异显示前对其进行消化。Liang 等^[8]采用传统的方法,对 DNA 进行消化后以酚/氯仿进行抽提纯化,易造成 RNA 的降解和定量不准确。实验中参考文献^[4]的方法,直接于 $0.5\times$ 逆转录酶缓冲液中对 DNA 进行消化,消化完毕通过加热灭活 DNase,产物可直接用于逆转录反应而无需纯化,避免了前法的缺点。

2.3 差异显示反应

参考文献^[9]设计随机引物和锚定引物各两个[见“材料”部分],两两配对进行差异显示反应,结果如图 1 所示。

孟祥文等^[10]认为提高 Mg^{2+} 浓度有助于引物和模板的复性和增加模板的稳定性,在较高 Mg^{2+} 浓度下(4mmol/L),差异显示的效果较好;但我们在实验中却发现当 Mg^{2+} 浓度达到 4mmol/L,退火温度为 40℃ 时,差异

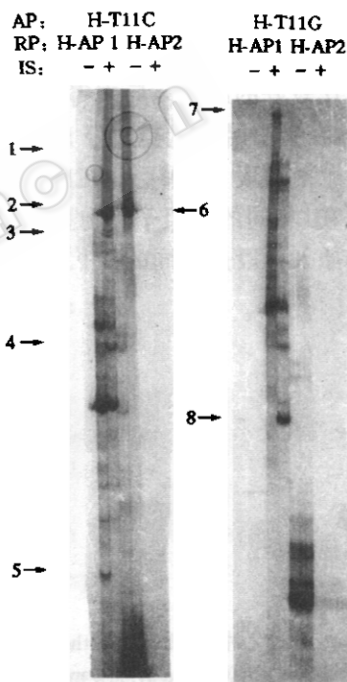


图 1 诱导前后家蚕脂肪体细胞 mRNA 的差异显示

Fig. 1 Differential display of mRNA from induced and non-induced *Bombyx mori* pupa fat body tissues

+ ;Stand for induced; - ;Stand for non-induced; AP: Anchor primer; RP: Random primer; IS: Induction status

显示的带型模糊一片,难以分辨。可能不同的 Taq 酶对 Mg^{2+} 浓度的需求不同是造成这一矛盾的原因。

2.4 差异条带的回收及重扩增

实验中发现,8 条差异条带中的 6 条可被重扩增,并且大多可得到 1 条以上的带(结果未出示)。正如文献[11]所报道,非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳虽然可避免变性聚丙烯酰胺凝胶电泳中互补单链迁移率不同所造成的带型复杂性,但得到的差异带中却更容易包含几种片段。

2.5 差异片段的鉴定

对其中的几个差异片段[片段 3、片段 8 重扩增产物的大片段(8L)及小片段(8S)]的 Northern blot 杂交结果显示只有片段 8L 是阳性的(图 2)。需要指出的是,由于通过差异显示技术得到的片段往往 AT 含量较高^[12],在对差异显示所得到的片段进行鉴定时,对杂交条件的适当调整是很重要的。对片段 8L 的杂交实验发现,若洗膜条件严格按照 Bio-Rad 公司说明书进行时,根本没有杂交信号出现。我们在适当降低了洗膜条件后则得到了比较好的结果。后来得到的片段 8L 的序列结果证明 AT 含量高达 68%。

2.6 差异片段的克隆及 SSCP 分析

对片段 8L 采用 pGEM5zf 载体进行克隆,通过酶切鉴定得到 6 个含有插入片段大小同 8L 相同的重组子。为鉴定它们的序列同一性,进行了 SSCP 实验,结果证明它们含有的插入片段是相同的(图 3)。

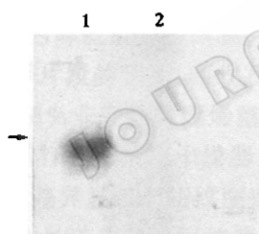


图 2 片段 8L 的 Northern blot 结果

Fig. 2 Result of Northern blot of fragment 8L

1. Induced RNA; 2. Non-induced RNA

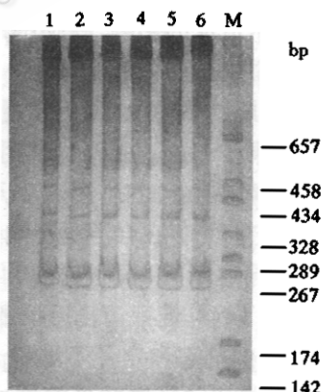


图 3 片段 8L 的 6 个阳性克隆的 SSCP 分析

Fig. 3 SSCP analysis of six positive clones of fragment of 8L.

2.7 片段 8L 的测序结果及同源性比较

片段 8L 的测序结果(图 4)表明其长为 241bp, 含有 1 段 poly(A), 对此片段的同源性分析没有发现与之有较高同源性的基因, 说明它可能代表一新基因。对此新基因的进一步研究目前正在进行中。

昆虫免疫反应虽然较哺乳动物简单,但仍涉及到一系列基因的复杂的表达调控。寻找并鉴定这些基因对研究昆虫的免疫反应无疑具有重要的意义。差异显示技术自从问世以来,已经被越来越多的分子生物学工作者所采用^[13]。本实验采用此技术对诱导前后的家蚕蛹脂肪体 mRNA 表达差异进行了初步研究,成功地得到了一些有差异的条带,并得到

	10	20	30	40	50
1	AAGCTTGATT	GCCACACAGA	TTTTTGAAC	AAATAAATCT	ATTGTTTATT
51	CAATTAAAAT	ATTGTGCTTT	AACTCTAATA	GTCCGGTCTA	TTTACACATT
101	CAAGTTTACA	TAAATTCCCA	TAAAGCTGAA	TATTGGCATA	GTTGTTCAAA
151	ACATCATTAT	AAAGAAAATC	TCAAAAAGTC	TCATCGTTCC	GAGGTGTGCT
201	<u>AAAAAATTTGG</u>	CACGGGGTCA	AAGGTCAAAA	AAAAAAAGCT	T

图 4 片段 8L 的核苷酸顺序

Fig. 4 The nucleotide sequence of fragment 8L

The underlined tri-nucleotide is the supposed terminator of the cloned gene

了其中一个片段的核苷酸序列,为以此片段为探针进一步筛选 cDNA 文库或者以 5'RACE 方法扩增全长 cDNA 进而全面搞清其在免疫反应过程中可能扮演的角色打下了基础。

参 考 文 献

- [1] 贾士荣,屈贤铭. 马铃薯抗菌肽基因工程,北京:农业科技出版社,1996.
- [2] D. Hultmark. *Nature*, 1994, **367**:116~117.
- [3] Liang P., A. B. Pardee. *Science*, 1992, **257**:967~971.
- [4] A. Rashtchian. *PCR methods and Applications*, 1994, **4**:S83~S91.
- [5] Zhao S., S. L. Ooi, Yang F-C, A. B. Pardee. *Biotechniques*, 1996, **20**:400~404.
- [6] B. J. Bassam, G. Caetano-Anolles, P. M. Gresshoff. *Anal. Biochem*, 1991, **196**:80~83.
- [7] D. Hultmark. *Trends Genet*, 1993, **9**:178~184.
- [8] Liang P., L. Averboukh, A. B. Pardee. *Methods in Molecular Genetics*, 1994, **5**:3~16.
- [9] Liang P., Zhu W., Zhang X. *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 1994, **22**:5763~5764.
- [10] 孟祥文,李 璞. 国外医学遗传学分册,1995, **18**:117~121.
- [11] Ito T., Kito K., Adati N *et al.* *FEBS Letters*, 1994, **351**:231~236.
- [12] Liang P., L. Averboukh, K. Keyomarsi *et al.* *Cancer Research*, 1992, **52**:6966~6968.
- [13] Liang P., A. B. Pardee. *Current Opinion in Immunology*, 1995, **7**:274~280.

Searching for New Genes Involved in Immune Reactions of *Bombyx mori* Through Differential Display*

Liu Zhenyi Qu Xianming

(Shanghai Research Center of Biotechnology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233)

Abstract Total RNAs of induced and non-induced *Bombyx mori* pupa fat bodies are purified respectively and then subjected to DDRT-PCR. After displayed on native polyacrylamide gels, eight differentially expressed bands are retrieved and reamplified, most of which include more than one band when visualized in 2% agarose gels. One fragment proved to be positive in Northern blot is cloned and six positive recombinants are proved to have the same insert by SSCP. Sequencing result shows it is 241bp long and no homologies are found. Further studies may reveal it possible role in insect immune reactions.

Key words *Bombyx mori*, immune reaction, differential display

* Supported by Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development (No. 101-01-02-03)