

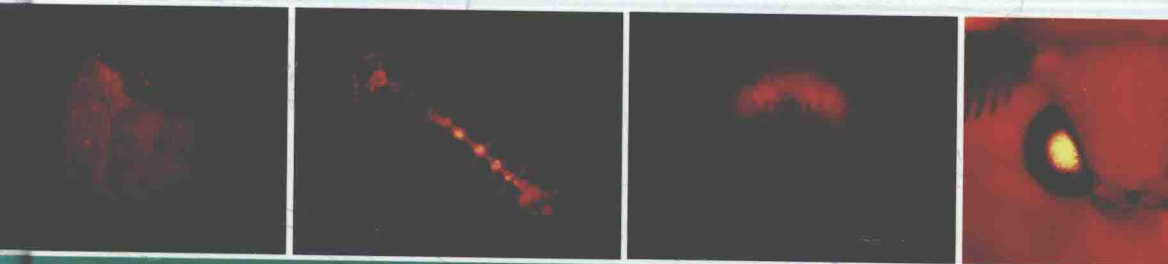


“十三五”国家重点图书出版规划项目

赵爱春 | 向仲怀
主编

家蚕

转基因技术及应用



TRANSGENIC SILKWORM
TECHNIQUES
AND APPLICATIONS



上海科学技术出版社



“十三五”国家重点图书出版规划项目

家蚕 转基因技术及应用

TRANSGENIC SILKWORM
TECHNIQUES
AND APPLICATIONS

赵爱春 | 向仲怀
主编



上海科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

家蚕转基因技术及应用 / 赵爱春, 向仲怀主编. —上海:
上海科学技术出版社, 2017. 12

ISBN 978-7-5478-3751-1

I. ①家… II. ①赵…②向… III. ①家蚕—转基因技术
IV. ①S881

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2017)第 258173 号

家蚕转基因技术及应用

赵爱春 向仲怀 主编

上海世纪出版(集团)有限公司 出版、发行
上海科学技术出版社
(上海钦州南路 71 号 邮政编码 200235 www.sstp.cn)

上海中华商务联合印刷有限公司印刷

开本 787×1092 1/16 印张 33.25 插页 4
字数: 550 千字

2017 年 12 月第 1 版 2017 年 12 月第 1 次印刷

ISBN 978-7-5478-3751-1/S·160

定价: 198.00 元

本书如有缺页、错装或损坏等严重质量问题,
请向工厂联系调换

内容提要

本书是当今国内外较为系统、全面地介绍家蚕转基因理论研究、技术方法和应用以及安全管理的学术专著。

本书出版将为研究人员利用转基因技术改良家蚕,推动家蚕转基因技术的发展及其在基因功能研究、生物反应器开发、新型蚕丝材料创制、安全转基因体系建立等领域的研究和应用提供有益参考。另外,家蚕是转基因研究和应用最为深入的昆虫之一,其科研成果可为广大科技工作者开展昆虫转基因研究提供理论、方法及实践的补益。

书中内容共分 12 章,分别介绍了家蚕转基因的技术路线,家蚕转基因的载体构建,外源基因导入技术,转基因家蚕的内外源基因整合、功能检测,基因定点突变家蚕的鉴定与筛选,家蚕转基因中特异序列捕获技术、基因特异性表达调控技术、条件基因打靶技术和基因组编辑技术,转基因家蚕素材创新、滞育性蚕品种转基因体系的建立,转基因家蚕的安全管理和安全评价等。

编委会

主编

赵爱春 向仲怀

编委

赵爱春 龙定沛 徐汉福 潘敏慧

郝占章 李春峰 向仲怀



左起：郝占章 李春峰 潘敏慧 向仲怀 赵爱春 徐汉福 龙定沛

序 一

家蚕是我国十分重要的经济昆虫。远古时期蚕桑生产技术的发明、发展与应用,使我国纺织产业领先于世界上其他国家数千年。这些源自昆虫的纺织品,是中华文明的瑰宝和享誉世界的东方“名片”。丝绸贸易活动形成了古代丝绸之路经济圈,对我国社会和世界经济的发展历史产生了重大影响。进入 21 世纪,高科技的创新已成为影响世界各国产业竞争力的核心要素。在农业领域,生命科学前沿技术的突破产生了转基因技术,所培育的转基因玉米、棉花、大豆等作物品种已在世界范围内广泛应用,促进了现代农业的快速发展。

作为长期从事家蚕研究的杰出科学家,向仲怀院士及其团队一直引领我国蚕桑科学研究和技术创新的发展方向。他们从 20 世纪 80 年代以来,一直致力于家蚕转基因技术的研究工作,突破了一系列技术难点,建立了高效、成熟的家蚕转基因技术平台,并获得了具有生产应用价值的转基因家蚕系列品系。由赵爱春教授和向仲怀院士主编的《家蚕转基因技术及应用》一书,凝聚了家蚕转基因研究的科学知识和多项最新成果,包括家蚕转基因的载体构建、家蚕的遗传转化、家蚕基因组编辑技术、转基因家蚕的培育、转基因家蚕生物反应器和转基因家蚕的安全性评价等。全书内容丰富、系统性强、信息量大,反映了国际家蚕转基因技术的最新发展水平,是目前世界上第一部概述家蚕转基因技术的理论基础、方法与应用的专著。本书的出版为我国家蚕和昆虫学科研工作者提供了一本高水平的专业性工具书,对推动我国家蚕和昆虫学的科技创新具有重要价值。

向仲怀院士是我非常敬重的老一辈农业科学家。他为人正派、谦逊睿智、虚怀若谷,为我国蚕研究辛勤耕耘数十载。他十分重视生命科学前沿技术的发展,不仅在家蚕遗传育种与家蚕基因组学研究方面取得了突出的成绩,还为国家培养了一大批优秀的高水平科技人才,建立了一支由老中青科学家相结合、具有世界领先水平的家蚕科技创新团队。该书的出版不但展示了家蚕转基因技术的发展,还反映了向仲怀院士科研团队对科学前沿的执着探索、提携后人和不断传承的精神风貌。

孔 明

中国农业科学院研究员

中国工程院院士

2017年7月16日

序 二

《家蚕转基因技术及应用》是目前世界上第一部关于家蚕转基因的学术专著。该书全面、系统地向读者展示了家蚕转基因的原理、实验技术和应用展望。该书的出版发行,必定对推动蚕业科学和蚕业生产发展起到不可估量的重要作用。

《家蚕转基因技术及应用》是西南大学向仲怀研究团队继《蚕的基因组》《家蚕微孢子虫基因组生物学》《桑树基因组》之后,在蚕丝科学基础研究方面的又一重要著作,同时也是对昆虫转基因研究的重大贡献。毫无疑问,本书内容必将应用于蚕丝科学的基础研究和应用研究的最重要的前沿领域,促进这些方面的研究取得新突破。

家蚕转基因技术将给家蚕生物学基础研究和蚕丝应用研究带来新的光明前景。例如,利用家蚕转基因技术,可以鉴定未知基因的功能、探索已知基因的新功能;利用家蚕转基因技术探讨蚕丝蛋白质的合成分泌机制、家蚕变态和激素调节的分子机制、家蚕性别决定和调控的分子生物学机制;利用家蚕转基因技术已经建立家蚕绢丝腺生物反应器,可以生产各种具有生物活性的有用蛋白质;家蚕转基因技术为分子育种开创了新局面,可以预期,利用家蚕转基因技术能够制定精准育种目标、缩短育种周期,使蚕生产出各种新型茧丝,创造新的种质资源;利用家蚕转基因技术可望深入研究家蚕抗病性、抗逆性的分子机制;利用家蚕转基因技术可望创建人类疾病研究、药物筛选、检测化学毒物的家蚕动物模式;等等。

和其他的基础研究成果一样,家蚕转基因研究“现在还是万里长征第一步,途中有许多艰巨的工作要完成”。“任何一种理论,从基础研究到实际应用



往往有一个过程。无条件地都要求立竿见影,是不合理的,也不公平。任何浮躁情绪,都不是科学态度。”(吕鸿声,2013)。

毋庸讳言,在转基因过程中,外源基因引起宿主基因表达变化(异位表达和过量表达等)、外源基因插入宿主基因组带来宿主基因之间相互作用的变化以及生长发育的变化等都需要进一步探讨,外源基因进入非转基因系统以及转移到近缘种等问题也还需要深入研究,等等。

发展世界蚕丝科学理论和技术任务,历史性地落到了中国科学工作者的肩上。当今蚕桑产业正处在向多元化转型发展的历史时期,也是产业技术体系重建的发展阶段,需要突破性的理论和技术推动。家蚕转基因技术即是其中之一。

要促使蚕业科学深度融入生命科学,家蚕的基础生物学研究和生命科学研究有着密切的关系。家蚕是世界上第一个利用杂交优势的农业动物,也是世界上最早开展“基因操作”或“染色体工程”的动物。Tazima(1941,1951)和Strunnikov(1957)分别独立地用辐射和实验生物学方法,将目的基因易位到另外的染色体,获得雌雄幼虫斑纹限性或卵色限性的蚕品种;Strunnikov(1969)进一步运用辐射将隐性致死基因易位到W染色体,并结合实验生物学方法创造了雌蚕死在卵期、只有雄蚕孵化而能够只养雄蚕的蚕品种。

家蚕的自然变异很多,人工诱变容易。目前保存的基因突变系有500个以上,包括卵、幼虫、蛹、茧和蛾在形态、生理、生化等方面的各种变异体,是进行生命科学研究的好材料;家蚕的生活周期较短,一个世代40~50天,采用人工孵化技术可以随时饲养,一年之中可以连续饲养5个世代,继代容易;家蚕除

用桑叶作饲料外,可以配制人工饲料在没有桑叶的冬季或任何时候、任何地区饲养,一个约 20 平方米的房间采用匾架进行多层饲养,一次可饲养 2 万~3 万头;繁殖容易,繁殖的方式可以人为控制,如采用实验生物学方法可以令雌蛾进行单性生殖(parthenogenesis)、双精雄核发育(dispermic androgenesis)等,产下的卵可以完全是雌蚕或完全是雄蚕,或者产下全部个体基因型完全相同的后代(parthenoclonal),或者遗传上完全纯合的雌蚕、雄蚕;一个雌蛾产卵 400~700 粒,一个雄蛾可以和多个雌蛾交配;蚕体大小适中,5 龄幼虫如人小手指大小,雌雄个体容易区分,可以方便地摘取器官、组织做体外实验。如蜕皮激素(ecdysone)是从 50 万头蚕分离、精制、确定化学结构的,家蚕素(bombixin)是从 60 万个家蚕头分离获得纯样品的,滞育激素(diapause hormone)是摘取 240 万个蚕蛾头分离、精制、确定化学结构的,促前胸腺激素(PTTH)是摘取 100 万个蚕幼虫头分离、精制、确定化学结构的,等等。

殷切期望不同学科的研究者对家蚕产生兴趣,用家蚕为材料进行生命科学的相关研究。

家蚕转基因研究也“需要动员不同学科的力量,分工协作,从不同角度……深入研究,共创蚕业科学未来,推动蚕业生产发展”(吕鸿声,2013)。

本书执笔者是从事家蚕转基因研究的一线科学工作者。值得欣慰的是,通过他们艰苦卓绝的长期研究,目前已经建立了高效的第三代蚕卵显微注射操作平台,建立了以实用蚕品种为受体的转基因体系,建立了以 *Fib-H* 启动子为基础的高效绢丝腺外源基因表达系统,涌现了一批掌握显微注射技术的优秀研究人员,获得了实用型家蚕转基因绿色茧品系。有志于家蚕转基因研究

和昆虫转基因研究的科学工作者,能及时获得《家蚕转基因技术及应用》一书作为参考,真是难得的机遇。

受向仲怀之约,试作序。

黄君霆

中国农业科学院蚕业研究所研究员

2017年6月20日

前言

1982年“超级老鼠”问世,从此转基因动物研究成为世人关注的热点。昆虫转基因研究首先在果蝇上取得突破,其后在棉铃虫、蚊子、家蚕、赤拟谷盗等昆虫中相继取得成功,建立了以转座子介导和胚胎显微注射为主的昆虫转基因技术体系,至今已在40多种昆虫中成功应用。昆虫转基因技术日臻成熟和完善,在昆虫功能基因组研究、药物筛选、害虫遗传防治和表型改造等众多领域均有典型的应用报道。

家蚕转基因研究经历了一个漫长的探索过程。如果从Nawa(1971)的报道算起,至今已逾半个世纪。然而,真正的突破始于田村(2000)以*PiggyBac*为载体,以*EGFP*为报告基因,通过胚胎早期显微注射获得稳定遗传表达绿色荧光蛋白的转基因家蚕系统。这一经典方法,发展成为当今获得转基因家蚕最为有效的技术体系,为研究者广泛采用。

我国对家蚕转基因的探索始于20世纪80年代,其中陈元霖(1981)、李振刚(1986)分别以柞蚕和家蚕为材料做了最早的探索。到20世纪90年代,虽然从之者众,但并无突破性进展。在此期间,本研究室对家蚕转基因十分关注,并一直在不断探索,先后有周泽扬教授、鲁成教授带领研究生在家蚕转基因平台建立和技术方面做了许多可贵的探索性研究,但真正的突破得益于我们与日本信州大学的长期合作与交流。早在1982年,我曾在该校纤维学部家蚕遗传与发生学研究室学习,其后一直与该研究室保持着人员交往、学术交流等密切的合作关系。该研究室在家蚕转基因研究方面成果丰硕,如将蜘蛛丝基因成功转入家蚕丝腺表达,得到了含蜘蛛丝的蚕丝。本研究室赵爱春等4人先后在日本信州大学的研究室做家蚕转基因研究并取得博士学位。2006年

赵爱春博士学成归来,作为我的博士后研究生继续家蚕转基因研究。我为之提了3个任务:一是建立高效、实用的研究平台;二是建立适于国情的技术体系;三是开展研究,培养队伍。经两年多的努力,我们建立了高效的第三代显微注射操作平台;建立了以实用蚕品种为受体的转基因技术体系;培养了一批掌握显微注射技术的人员;获得了实用型转基因家蚕绿色茧品系,并获农业部批准进入安全评价试验阶段。随着家蚕转基因技术体系的建立,得以规范性用于新育种材料的创新、基因功能锁定等研究,同时使转基因技术不断提升。

本书是以家蚕转基因技术体系的建立与材料创新为主线的阶段性研究总结,以图对家蚕转基因研究有所帮助。另外,也是为了进一步融入昆虫转基因研究的强大队伍中。2012年,本研究室徐汉福博士到美国马里兰大学生物技术与科学研究所昆虫转基因中心从事昆虫转基因的学习与研究,在包含家蚕在内的昆虫转基因领域,从深度和广度上均有更深的了解与提升。2013年徐汉福博士回国后,提出了参照马里兰大学的模式建立包括家蚕在内的开放性昆虫转基因研究平台。其任务:一是开展相关研究,二是促进开放合作,三是接受委托服务。我十分赞赏这种开放合作的态度与运行模式,也相信这种模式对提高我国家蚕乃至昆虫转基因研究和应用水平都很有益处。因此,本书也是为了总结和交流家蚕转基因研究成果,并促进与昆虫研究的融合,更多的是向昆虫学科学习。

本书经三年多时间的编写和不断修改,数易其稿,今天能够成册付梓,实为不易。本书内容共12章,包括家蚕与家蚕转基因的概述、家蚕的遗传转化、转基因家蚕的应用、家蚕细胞转基因技术及应用、转基因家蚕的安全评价与安

全管理等内容。第一章家蚕与家蚕转基因,系统概述了家蚕转基因的特点、家蚕转基因的早期研究以及现状和发展;第二至第六章详细叙述了家蚕遗传转化的方法和技术体系;第七至第十章归纳总结了转基因家蚕的应用成果;第十一章概述了用家蚕细胞进行转基因研究的技术与方法;第十二章概述了转基因生物的安全评价与安全管理的法规、程序和内容,并对家蚕转基因研究的安

全管理做了讨论。因此可以说,本书是当今国内外对家蚕转基因的相关理论、技术、方法、应用和安全管理介绍最为系统、全面的专著。

当今蚕桑产业正处于向多元化转型发展的历史时期,也是产业技术体系重建的发展阶段,迫切需要突破性的技术推动。转基因技术是当今农业核心技术之一。国家对转基因技术实行“加快研究、推进运用、规范管理、科学发展”的十六字开放政策。2015年11月美国批准了转基因三文鱼上市申请。这是世界上第一例商品化转基因动物,其生长速度比普通三文鱼快一倍以上。我相信,这无疑是对我们认识和推进转基因动物商品化研究的一个促进。希望本书的出版能够对从事家蚕转基因研究和学习的同仁有所裨益;更希望我们广大的研究者应用转基因技术在当今蚕业转型中取得历史性突破,为开拓蚕业发展的新时代做出新贡献。

本书出版深得上海科学技术出版社的高度重视与大力支持,经申报被列入国家“十三五”重点图书出版规划项目;又蒙荣廷昭院士、陈剑平院士大力推荐,获得国家出版基金资助。中国农业科学院副院长吴孔明院士、中国农业科学院蚕业研究所黄君霆研究员百忙中为本书作序,对本书增色添辉。戴景锐院士也对本书出版给予诸多鼓励与指导。谨此对上海科学技术出版社和荣廷

昭院士、陈剑平院士、吴孔明院士、黄君霆研究员、戴景锐院士等表示深深的感谢。

本书执笔者都是从事家蚕转基因的一线研究者,虽经三年多努力,但难免有遗憾和不足之处,恳请读者批评指正。

何中怀 谨识

2017年1月20日于蚕学宫

2017年8月3日修改于仙女山

目 录

第一章 家蚕与家蚕转基因

第一节 家蚕	3
第二节 家蚕转基因	5
一、家蚕转基因的特点 / 6	
二、家蚕转基因的早期研究 / 7	
三、家蚕转基因研究现状与发展 / 13	
参考文献	19

第二章 家蚕转基因的载体构建

第一节 目的基因的获得	29
一、从基因组 DNA 文库获取目的基因 / 30	
二、从 cDNA 文库获取目的基因 / 31	
三、通过 PCR 技术分离目的基因 / 32	
四、利用电子克隆获取目的基因 / 34	
五、人工合成目的基因 / 35	
第二节 启动子的选择	37
一、组成型启动子 / 37	

二、诱导型启动子 / 44	
三、组织特异性启动子 / 47	
四、家蚕 RNA 聚合酶Ⅲ启动子 / 60	
第三节 标记基因	64
一、荧光蛋白基因 / 64	
二、荧光素酶基因 / 68	
三、抗性筛选基因 / 69	
四、其他可视化标记基因 / 72	
第四节 调控元件	74
一、内含子 / 74	
二、增强子 / 75	
三、非翻译区 / 77	
四、绝缘子 / 78	
五、其他调控元件 / 79	
第五节 家蚕转基因常用载体	81
一、转座载体 / 82	
二、基因打靶载体 / 92	
三、人工核酸酶表达载体 / 95	
四、其他类型载体 / 96	
第六节 转基因载体构建流程	96
一、pSL-FibH-EGFP-LBS 中间载体的构建 / 97	
二、piggyBac 重组转座载体的构建 / 100	
参考文献	101

第三章 家蚕外源基因导入技术

第一节 胚胎显微注射技术	139
一、家蚕胚胎显微注射仪器的诞生与发展 / 139	
二、家蚕胚胎显微注射操作流程 / 143	