2 论文研究思路

（380字）

鳞翅目昆虫家蚕拥有特异性分化的蛋白合成分泌器官—丝腺，其蛋白质的合成及分泌能力非常强大，因此以其作为生物反应器来生产应用性的外源蛋白，是许多相关研究人员想要攻克的难关。由目前的研究可知，在丝腺发育退化的经典裸蛹品系Nd、Nd-s、Nd-FibH中，丝腺与正常发育的家蚕丝腺相比，短小且线条平直，不如正常丝腺的弯曲螺旋。裸蛹品系是筛选出来的不能正常吐丝结茧的品种，由此可知家蚕丝腺发育形态与其丝蛋白合成分泌能力相关。

本实验室设计了家蚕后部丝腺特异表达的丝素蛋白重链（Fib-H）类似蛋白Hpl编码基因序列Hpl，通过piggybac转座子的转基因技术将其转入家蚕后部丝腺高效表达，通过眼部荧光及丝腺荧光检测，确定建立了家蚕丝腺发育异常模型TBH。虽然Hpl基因与家蚕重链蛋白基因非常接近，但转入后却出现了丝腺发育异常且结成薄皮茧或裸蛹的TBH品系。有趣的是，本实验室利用同种方法建立的SER品系，将中部丝腺特异表达的Ser3基因转入后部丝腺表达，却未出现丝腺发育异常情况，并且丝蛋白合成分泌以及茧层率在一定程度上优于其野生型。因此，TBH家蚕可以作为研究家蚕丝腺发育与丝蛋白合成分泌模型。（454字）

2.1研究目的与意义

（480字）

家蚕丝腺具有合成大量内源蛋白并排出体外的特点，国内外将此作为生物反应器的研究日益增多，然而转入外源蛋白表达常常引起其内源蛋白的表达紊乱或者组织发育的异常。本实验室在此基础上构建转基因家蚕TBH，经实验室的前期研究者验证，TBH家蚕的转基因插入位点远离功能基因，则避免了piggyBac转座子随机插入功能区域影响功能基因表达的影响，可以作为研究家蚕生物反应器高效表达外源蛋白，以及探究家蚕丝腺形态与合成蛋白泌丝关系的优良模型。并且，可以从对TBH转基因品系的研究过程内容，进一步探究将转基因技术运用到家蚕丝腺生物反应器上的生物安全性。

此外，探究TBH家蚕在导入外源基因后丝腺形态异常的原因，能够为家蚕在导入外源蛋白表达效率低下或者产生丝腺异常，做进一步的解释。有望为进行家蚕丝腺生物反应器，高效产生外源功能蛋白提供参考和帮助。

2.2研究目标与内容

（122字）

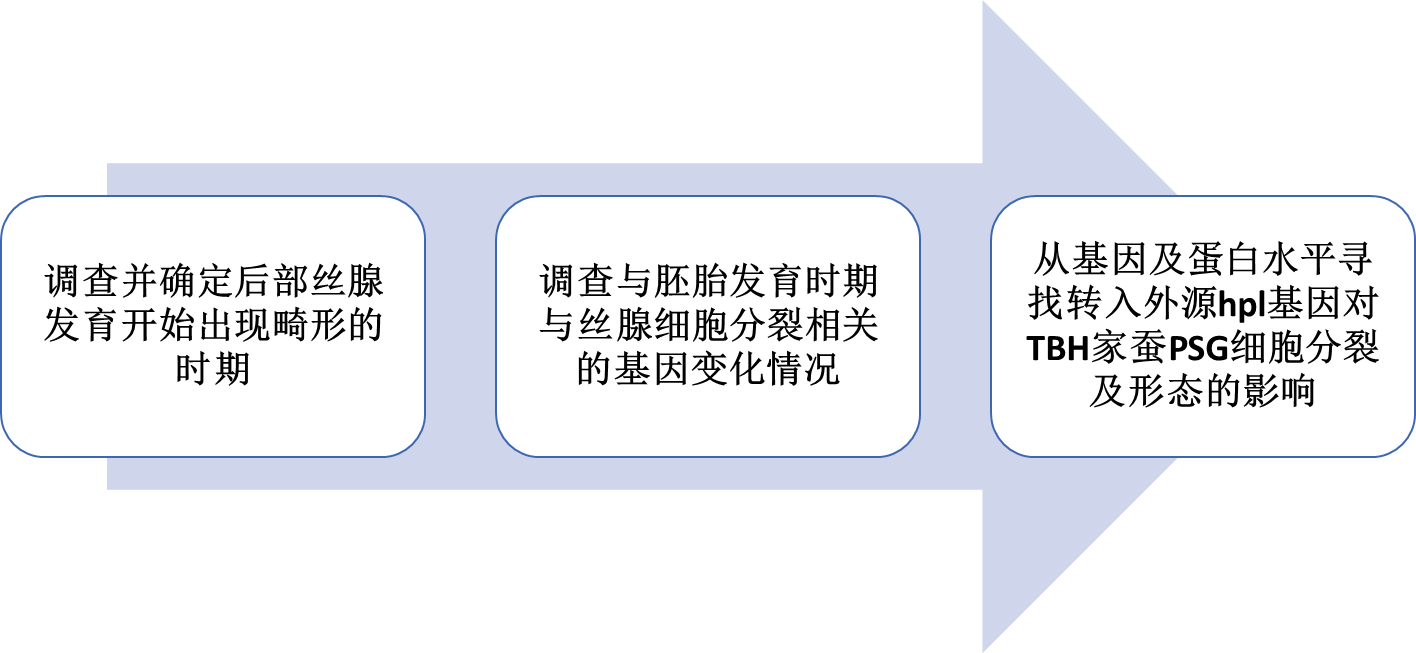
本文的研究目标是通过对转基因家蚕TBH各个时期丝腺发育形态的观察，找出其后部丝腺发育异常出现的时期，以及引起该发育异常的可能原因，并且探讨其丝腺发育异常对其产生薄皮茧或者裸蛹的影响。

本文的研究内容主要是调查转基因家蚕TBH的丝腺细胞分裂情况与其野生型WT的比较，探讨其组织发育、细胞分裂与丝腺组织、细胞形态对丝蛋白质合成和分泌的影响。同时，探究转入外源基因TBH使得其后部丝腺组织产生畸形的原因。（191字）

2.3研究技术路线

（截图）

本文研究技术路线如下所示。



3 实验材料与方法

3.1 家蚕品种

家蚕品系为N4，原种由苏州大学蚕桑研究所提供。

转基因品系TBH家蚕由本实验运用PiggyBac 转座子转基因技术，在日本信州大学中垣实验室王玉军博士协助下获得。TBH转基因家蚕后部丝腺转入一个重链相似蛋白基因Hpl，天蚕蛾的丝腺中有与丝素蛋白重链基因十分相似的序列。

转入Hpl基因的TBH家蚕，后部丝腺出现形态异常，与其野生型相比，粗短并呈现出“念珠”状小结。TBH家蚕在变态期几乎不吐丝或吐丝极少，最后形成裸蛹或者薄皮茧。

另外，本实验出现的SER家蚕，为本实验室在后部丝腺转入Ser3基因的另一转基因家蚕品系。

3.2主要试剂盒及试剂

3.3 主要仪器设备

3.4 总RNA提取

提取总RNA的试剂盒购买自Takara公司。

3.4.1丝腺组织RNA的提取

（1）组织匀浆：取出高温高压消毒后的研钵，将50-100 mg冰冻保存的待研磨丝腺组织放入其中，倒入适量液氮充分研磨。在其中迅速加入1 ml的TRIZOL，将组织匀浆转移到1.5 ml的离心管中，室温下（15-30 ℃）静置5 min。

（2）相分离：在离心管内加入0.2 ml的氯仿，剧烈震荡15 s，室温下（15-30 ℃）静置5分钟；然后在低温高速离心机2-8 ℃的条件下，以12000\* g的转速离心15 min。

（3）RNA沉淀：吸取上层水相到新的离心管中，加入0.5 ml异丙醇，室温下（15-30 ℃）静置10 min，然后在低温高速离心机2-8 ℃的条件下，以12000\* g的转速离心10 min，将离心管内上清液转入新的离心管，12000\* g，4 ℃，离心15 min。

（4）RNA洗涤：离心后弃上清液，加入75%浓度的乙醇1 ml，振荡器混匀后在低温高速离心机2-8 ℃的条件下，以7500\* g转速离心5 min。

（5）RNA再溶解：离心后再次弃上清液，在超净台内干燥RNA沉淀约5-10 min，注意不能使其完全干燥导致其溶解度降低。用无RNase水或0.5%溶度的SDS溶液重悬RNA沉淀，枪头反复吹打几次后，在55-60 ℃下静置10 min。

3.4.2蚕卵RNA的提取

提取蚕卵RNA的实验操作同上。

3.5 RNA反转录

（1）配置以下20 μl反应体系，根据计算值加入适当的RNA，使加入其中的RNA浓度≤1000 μg。

5x Prime Script Buffer 4 μl

Primer Script RT Enzyme 1 μl

Oligo dT Primer 1 μl

Random 6 mers 1 μl

Total RNA+RNase Free dH2O 13 μl

（2）加入对应浓度体积的RNA，振荡混匀后稍微离心将管壁液滴汇合，在金属浴37 ℃下孵育15 min后，85 ℃，5 s进行灭活操作，完成以上操作后在-20 ℃下保存，备用。

3.6 实时定量PCR

（1）配置以下20 μl反应体系，放入定量仪器中测定。

SYBR Premsx ExTaq（2\*） 10 μl

PCR Forward Primer（10 μm） 0.4 μl

PCR Reverse Primer（10 μm） 0.4 μl

Rox Reference Dye（50\*） 0.4 μl

dH2O 6.8 μl

Templete 2 μl

（2）按设定程序，95 ℃变性1 min，再95 ℃，5 s；55 ℃，10 s；72 ℃，10 s循环35次。

3.7 半定量PCR

（1）配置以下25 μl反应体系。

2\* Tag Master Mix 12.5 μl

PCR Forward Primer（10 μm） 1 μl

PCR Reverse Primer（10 μm） 1 μl

cDNA 1 μl

dH2O 9.5 μl

（2）PCR扩增DNA

设定程序，在各引物最适温度内循环。

（3）2%浓度琼脂糖凝胶配置：在分析天平上称取0.4 g琼脂糖干粉，加入20 ml已配置好的TAE溶液中，轻晃锥形瓶溶解，放入微波炉中加热至沸腾；取出后轻摇锥形瓶微降温后加入2 μl的Goldview染料，混匀后倒入电泳容器中，排除气泡后插入样孔梳等待冷凝。

（4）电泳：使电泳液没过电泳胶，拔出梳子后在孔内小心加入Maker以及样品（10 μl），确保样品不溢出样品孔；设定电泳程序后点击确认，电泳结束后用化学发光仪拍照进行数据分析。

3.8 蚕卵及丝腺组织解剖

（1）蚕卵解剖：配置浓度为5%的KOH溶液，在电炉上煮沸，关闭热源待溶液停止翻泡后将用纱布包好的散粒蚕卵浸入碱液中约10 s，再在温水中彻底冲洗2-3次；冲洗干净的蚕卵转移至温的PBS缓冲液中，用胶头滴管反复吸打，使蚕卵与卵壳分离，最后将吹打干净的家蚕胚胎收集至PBS缓冲液中备用。

（2）丝腺组织解刨：将家蚕背部朝上，用解剖针固定其头部以及尾部在解剖盘上，从尾部沿着背脉管小心剪开表皮，用解剖针固定扩大视野，避开中肠，去掉气管和马氏管，取出丝腺放于NaCl溶液中，后以PBS缓冲液冲洗干净备用。

3.9 DAPI染色

（1）胚胎染色：解剖胚胎的方法如3.8所示。取若干在4%多聚甲醛溶液中固定的19期、20期、27期胚胎，余下的保存在4 ℃冰箱当中保存备用。将胚胎置于PBS溶液中，水平摇床洗涤3次，每次10 min。去除PBS溶液，在离心管内加入稀释10倍的DAPI溶液1 ml，摇床上避光染色30 min后用PBS溶液进行洗涤。冲洗两次后，加入1 ml的PBS溶液洗涤3次，每次15min，洗涤时保持避光。

（2）组织染色：丝腺组织染色方法如上，因5龄家蚕的丝腺较大，故置于培养皿内染色。

3.10 免疫组化

（1）解剖与固定：胚胎以及组织解剖与固定的方法如3.8所示。

（2）细胞通透及封闭：去除保存组织的固定液，用1x的PBS冲洗三次，加入2 ml含0.1%脱氧胆酸钠和2%吐温20的PBS缓冲液，4 ℃通透2 h。去除细胞通透液后，加入封闭液冲洗两次，再加入1 ml封闭液，旋转混匀2 h，吸除封闭液后再冲洗一次。

（3）一抗孵育：去除封闭液后按1：500的比例加入抗体及一抗稀释液，4 ℃旋转混匀过夜。

（4）漂洗：加入封闭液冲洗胚胎和组织，上下翻转约10次后再重复一次，然后加入封闭液漂洗3次，每次15min。

（5）二抗孵育：以1：1000比例加入对应的二抗，室温孵育2 h。

（6）漂洗：重复步骤（5）。

（7）DAPI染色：以1：2000的比例将DAPI染液稀释于封闭液中，染色30 min后冲洗。

（8）荧光显微镜观察：丝腺组织清洗过后可直接在荧光下观察；后期胚胎由于背部发育良好，身体弯转程度较大，故可以在95%的甘油中浸泡过夜，使其舒展后再进行压片观察。

3.11 石蜡切片制备

（1）丝腺组织解刨：解剖步骤如3.8所示。

（2）组织固定：丝腺组织清洗干净后，转入4%的多聚甲醛溶液中使其浸泡，冰上固定40 min后放入4 ℃冰箱中保存备用。

（3）水洗：取出已固定好的组织块，用流动水冲洗30 min。

（4）脱水：梯度乙醇处理使组织脱水，50 %乙醇30 min→70 %乙醇30 min→80 %乙醇15 min→90 %乙醇15 min→95 %乙醇15 min→100 %乙醇15 min→100 %乙醇10 min。

（5）透明：用二甲苯洗2-3次，每次洗30 min。

（6）浸蜡：将组织材料放入已熔化石蜡中，浸渍2 h后移入第二份熔化石蜡中。且此此操作应该在高于石蜡熔点3 ℃的温箱中进行，以便石蜡能浸入组织内。

（7）包埋：浸渍结束的组织置入包埋盒内，放于4 ℃冰箱内使蜡块冷凝。

（8）切片：使用切片机对包埋组织的蜡块进行连续切片，厚度约为5 μm。切片结束后将蜡片先后放入冷水以及热水中，使其舒展，然后将舒展的组织切片平铺于蛋白甘油涂抹的载玻片上，在50 ℃的烘箱中烘6 h则完成。

3.12 HE染色

将石蜡切片放在37 ℃的培养箱中20 min，在切片表面的石蜡软化后用二甲苯处理2次，每次5 min，再用无水乙醇处理2次，每次5 min。梯度乙醇脱水90 %乙醇10 min→80 %乙醇10 min→70 %乙醇梯度10 min。蒸馏水洗涤2\*5 min去乙醇→苏木精染液染色5 min→流水冲洗30 s→50%乙醇2 min→1%盐酸乙醇10 s→70%乙醇30 s→碱乙醇2 min→80%乙醇2 min→90%乙醇2 min→伊红染液1 min→95%乙醇30 s\*3→无水乙醇2 min\*2→二甲苯2 min\*2→中性树胶封片。

3.13 转录组学

（1）蚕卵材料的准备

a.给产卵所用到的蚕种纸、蛾圈、吸水纸、报纸等在超净台内紫外灯下消毒；

b.蚕卵产下20-24h，将产在普通蚕种纸上的卵圈放到15%，45℃的HCl溶液中浸酸5min；

c.准备另一空烧杯，并在杯口覆盖经过100℃水煮沸（或紫外灯照射消毒）的纱布；浸酸结束后迅速将散落在烧杯内的蚕卵以及酸液用另一烧杯过滤；

d.将过滤的纱布和蚕卵放到无菌水（UP水）中冲洗至无酸液影响为止，可多次更换无菌水冲洗；

e.冲洗结束后，将纱布摊开置于事先消毒的培养皿内，使蚕卵在超净工作台上自然晾干；

f.将无菌室内的温度调成25℃，蚕卵放入消毒大养蚕盒内继续催青，蚕盒内贴上湿条保证蚕卵湿度；

g.蚕卵催青选取戊3期（产下3天）、己3期（产下7天）、己5期（产下9天）三个时间点，每个时间点称量0.5g放入EP管里，液氮速冻放入-80℃保存备用。

（2）组学测定