

## 家蚕 FXPRL 神经肽前体基因的体外转录\*

徐卫华<sup>1</sup> 张刘宾<sup>1</sup> 程联胜<sup>1</sup> 刘 兢<sup>1</sup> 徐厚熔<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(中国科学技术大学分子生物学和细胞生物学系 合肥 230027)

<sup>2</sup>(安徽农业大学蚕学系 合肥 230036)

**关键词** 滞育激素,性信息素合成激活肽, mRNA, 体外转录, 家蚕

**分类号** Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)02-0244-47

昆虫滞育激素(Diapause hormone:DH)、性信息素合成激活肽(Pheromone biosynthesis activating neuropeptide:PBAN)是诱导昆虫滞育和性信息素(Sex pheromone)合成的两个重要神经肽<sup>[1,2]</sup>。DH和PBAN的C末端均为FXPRL(苯丙-X-脯-精-亮),这两个神经肽和另外3个FXPRL神经肽家族的食道下神经肽共同由一个前体基因编码,所以改称DH-PBAN基因或DH-PBAN cDNA<sup>[3,4]</sup>。家蚕的DH-PBAN基因是昆虫中发现的一个基因编码多个神经肽的首例,该前体基因转录后的加工、剪接的分子机理是倍受瞩目的研究内容。为了获得大量的DH-PBAN mRNA,我们选择了适当的载体,克隆DH-PBAN基因,在体外大量合成DH-PBAN mRNA。体外合成昆虫促前胸腺激素 mRNA 国外已有成功的报道<sup>[5]</sup>,本文报道的是体外DH-PBAN mRNA合成。

### 1 材料和方法

#### 1.1 昆虫材料

二化性家蚕品种中36×日36按常规方法饲养,在显微镜下解剖蛹龄第3天的食道下神经节,-70℃冷藏备用。

#### 1.2 RNA纯化和RT-PCR反应

参考Chomczynski等人的方法<sup>[6]</sup>,纯化总RNA。取总RNA1μg和oligo dT混合保育,再加反转录缓冲液、dNTP、DTT、反转录酶AMV(Promega),42℃,1h反应,合成第一链cDNA。取第一链cDNA作模板,引物P1(5'-ACAAAATGTATAAAACC-3')和P2(5'-GGACCCATAATTCGTTTA-3')、PCR反应缓冲液、dNTP、Taq DNA聚合酶(Promega)作DNA扩增。扩增条件是93℃,1min;55℃,50s;72℃,1min,共30个周期。PCR产物通过琼脂糖凝胶电泳回收。

#### 1.3 DH-PBAN cDNA的克隆

回收的PCR产物先用Klenow酶处理,再接上NotI接头,用NotI限制酶消化接上NotI接头的PCR产物,和含有T7 RNA聚合酶识别的启动子的质粒载体(pBluescript KS)共连接。然后转化感受态大肠杆菌XL1,大量纯化重组质粒DNA,用NotI酶切、电泳作初步鉴定。

#### 1.4 DH-PBAN cDNA的核苷酸序列测定

采用双脱氧末端终止法作核苷酸序列测定,按Pharmacia公司的T7测序盒说明操作,[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dATP是北京亚辉生物医学工程公司产品。

\*中国科学院“九五”生物学特别资助基金(财政部专项:STZ-2-08)、中国科学院“九五”基础性研究青年基金(JQ-6-01)和国家教委回国留学人员基金资助项目。

收稿日期:1997-12-01,修回日期:1998-12-21。

### 1.5 DH-PBAN mRNA 的体外转录

取纯化的重组质粒 DNA 1.5 $\mu$ g, 用 *Bam*HI 切断 DH-PBAN cDNA 3' 末端的下游, 使作为合成 mRNA 的模板成为线状, 然后用蛋白酶 K 处理。除去蛋白酶 K 后在 4 种 rNTP、DTT、RNasin、缓冲液及 T7RNA 聚合酶(Promega)存在下<sup>[7]</sup>, 37 $^{\circ}$ C 保育 30 min。

反应完毕, 用无 RNase 的 DNase I 消化作为模板的质粒 DNA, 酚/氯仿抽提 2 次, 在乙酸铵的存在下, 用乙醇沉淀合成的 DH-PBAN mRNA。最后用 50  $\mu$ L 超纯水溶解 RNA 沉淀, 测定  $OD_{260}$  值。

### 1.6 Northern 杂交分析

取纯化出的家蚕蛹食道下神经节总 RNA 25 $\mu$ g、体外合成的 DH-PBAN mRNA 10pg 和 100pg, 在含有甲醛的 1% 琼脂糖凝胶中电泳, 然后转移到杂交膜(Hybond N<sup>+</sup>) 上。用 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP 作标记上述克隆得到的 DH-PBAN cDNA 作探针<sup>[7]</sup>。杂交液为: 5 $\times$  SSPE (180 mmol/L NaCl, 10 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH7.7), 1mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA)、50% 甲酰胺、5 $\times$  Denhardt 溶液、0.1% SDS、100 $\mu$ g/mL 鲑精 DNA。杂交反应在 42 $^{\circ}$ C 下进行, 保育 24h。杂交反应完成后, 2 $\times$  SSPE/0.1% SDS 洗脱数次, 膜干燥后, 置 X 光片上 -70 $^{\circ}$ C 曝光 24 h 以上。

## 2 结 果

### 2.1 DH-PBAN cDNA 的克隆

DH-PBAN cDNA 的扩增和克隆如图 1 所示。

用蒸馏水作为 PCR 模板的阴性对照没有出现任何条带(泳道 3), 而第一链 cDNA 作为 PCR 模板的反应结果出现预期大小的特异性条带(泳道 2), 说明 PCR 反应不存在交叉污染。按前述的克隆策略, 将 PCR 产物克隆进载体, *Not*I 酶切得到期望的结果(图 1B)。

利用 T7 引物作 DNA 序列测定, 证实 DH-PBAN cDNA 的 5' 端在近 T7 启动子端, 结果如图 2 所示。完整的 DH-PBAN cDNA 阅读框架包含在里面, DH-PBAN cDNA 5' 端和 3' 端非翻译区大部分被去除, 测序结果和我们基因组测序结果完全一致<sup>[4]</sup>。

### 2.2 DH-PBAN mRNA 的体外转录

根据测序结果, 选择 T7 RNA 聚合酶来体外合成 DH-PBAN mRNA。体外转录得到的 DH-PBAN mRNA 经紫外分光光度计测定  $OD_{260}/OD_{280} = 0.254/0.12$ , 正符合 2/1 的理论值, 说明 DH-PBAN mRNA 纯化结果比较理想, 计算出共转录 5.5 $\mu$ g DH-PBAN mRNA。

取 DH-PBAN mRNA 作电泳观察, 在分子量 3.5 kb 左右的地方没有任何条带, 说明作为模板的质粒 DNA 双链(包含 DH-PBAN cDNA)已被酶解, 体外转录成功。

### 2.3 Northern 杂交分析

以家蚕食道下神经节中提取的总 RNA 作为对照, 用 <sup>32</sup>P 标记的 DH-PBAN cDNA 作探针进行 Northern 杂交分析, 结果如图 3 所示。

因为体外转录是单一或纯的 DH-PBAN mRNA, 故电泳加样仅用 10pg 和 100pg 两种浓度。从家蚕蛹期食道下神经节中抽出的总 RNA 则用 25 $\mu$ g 作为对照。来自蛹体的 DH-PBAN mRNA 是完整长, 比体外转录的 DH-PBAN cDNA 阅读框架要稍大一些, Northern 杂交清楚地表明体外转录的 mRNA 确为

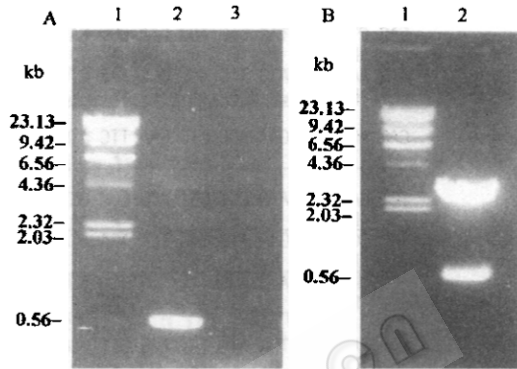


图 1 DH-PBAN cDNA 的扩增(A)和克隆(B)

A. Lane 1: Molecular weight marker; Lane 2: First stranded cDNA was added to PCR; Lane 3: No template was added to PCR.  
B. The PCR product was ligated into pBluescript KS(+) cloning vector. Lane 1: Molecular weight marker; Lane 2: Recombinant plasmid DNA was digested by *Not*I.

```

ACA AAA ATG TAT AAA ACC AAC ATT GTT TTC AAC GTT TTA GCT TTG GCA 48
      M Y K T N I V F N V L A L A
TTG TTC AGT ATT TTC TTC GCG AGT TGC ACG GAT ATG AAG GAT GAA AGC 96
      L F S I F F A S C T D M K D E S
      DH
GAC AGA GGA GCT CAC AGT GAG CGG GGC GCT CTC TGG TTC GGC CCC AGA 144
      D R G A H S E R G A L W F G P R
CTC GCG AAG CGA TCA ATG AAG CCA TCC ACT GAA GAT AAC AGG CAA ACC 192
      L G K R S M K P S T E D N R Q T
TTC CTG AGG CTG CTC GAG GCG GCT GAT GCC CTC AAA TTT TAC TAC GAC 240
      F L R L L E A A D A L K F Y Y D
CAG CTA CCT TAC GAG AGG CAA GCC GAT GAA CCG GAA ACC AAA GTA ACA 288
      Q L P Y E R Q A D E P E T K V T
AAG AAG ATC ATC TTC ACC CCC AAA CTC GGG AGG ACG GTC GCC AAA CCC 336
      K K I I F T P K L G R T V A K F
      α β
CAG ACG CAT GAA AGC CTC GAA TTC ATC CCC CGG CTC GGA AGG CGG CTC 384
      Q T H E S L E F I P R L G R R L
      PBAN
TCT GAG GAC ATG CCT CGT ACG CCA GCT GAC CAG GAA ATG TAC CAA CCT 432
      S E D M P R T P A D Q E M Y Q P
GAC CCC GAA GAA ATG GAG TCA AGA ACA AGA TAC TTC TCG CCC AGG CTG 480
      D P E E M E S R T R Y F S P R L
GGG GCG ACC ATG AGC TTT TCG CCC AGA CTG GGA AGG GAG CTT TCG TAC 528
      G R T M S F S P R L G R E L S Y
      γ
GAT TAC CCA TCA AAA TAT AGG GTT GCC AGA AGC GTT AAC AAG ACA ATG 576
      D Y P S K Y R A R S V N K T M C
GAC AAC TAA ACG AAT TAT GGG TCC 600
      D N

```

图2 家蚕滞育激素-性信息素合成激活肽 cDNA

DH, PBAN,  $\alpha$ -SGNP,  $\beta$ -SGNP and  $\gamma$ -SGNP are indicated by underline, respectively. The primers for RT-PCR are indicated by box.

DH-PBAN mRNA。且除了 DH-PBAN mRNA 外,不存在其它任何条带,再次说明纯化出的 DH-PBAN mRNA 中不含有作为模板的 DH-PBAN cDNA。

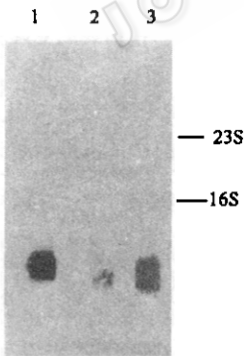


图3 体外合成的 DH-PBAN mRNA 的 Northern 杂交

Total RNA was extracted from subesophageal ganglion, as a control (lane 1). 10 pg and 100 pg of synthetic DH-PBAN mRNA were loaded on each lane (lane 2, 3) and hybridized with radiolabeled DH-PBAN cDNA.

### 3 讨论

在原核生物或哺乳动物,一个基因编码多个功能蛋白已为世人所知<sup>[8]</sup>,但在昆虫界家蚕的 DH-PBAN 基因是首例。所以推定这个基因的转录、翻译有其独特的机理<sup>[4]</sup>。因此大量获取 DH-PBAN mRNA,研究转录、翻译的机理是一项有重要意义的课题。我们将 DH-PBAN cDNA 克隆进适当的载体,在体外大量合成 DH-PBAN mRNA, Northern 杂交分析说明体外合成产物确为 DH-PBAN mRNA。本实验以 1 $\mu$ g 模板合成出 5.5 $\mu$ g 的 DH-PBAN mRNA。如果从家蚕的食道下神经节纯化出 5  $\mu$ g 的 DH-PBAN mRNA,需要解剖、收集 5 万头左右的家蚕食道下神经节,而且无法将 DH-PBAN mRNA 从总 mRNA 中分离出来。所以在体外快速、简便地得到目的 mRNA,利用无细胞体系可以在体外大量合成 DH-PBAN 前体蛋白,为今后研究 DH-PBAN 前体多肽的加工、剪接的机理、神经肽的空间结构等工作奠定了基础。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] A. K. Raina, H. Jaffe, T. G. Kempe *et al.* *Science*, 1989, **244**: 796~797.
- [ 2 ] K. Imai, T. Kono, Y. Nakazawa *et al.* *Proc. Jpn. Acad.* 1991, Ser. **B67**: 98~101.
- [ 3 ] 徐卫华, 佐藤行洋, 山下兴亚. *遗传学报*, 1995, **22**: 178~184.
- [ 4 ] W-H Xu, Sato Y, Ikeda M *et al.* *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, **1261**: 83~89.
- [ 5 ] T. Adachi-Yamada, M. Iwami, H. Kataoka *et al.* *Eur J. Biochem.*, 1994, **220**: 633~643.
- [ 6 ] P. Chomczynski, N. Sacchi. *Anal Biochem.*, 1987, **162**: 156~159.
- [ 7 ] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 1989, 10, 13, 18, 82, Cold Spring Harbor Lab. Press. New York.
- [ 8 ] D. R. Lynch, S. H. Snyder. *Ann. Rev. Biochem.*, 1986, **55**: 773~799.

***In vitro* Transcription of the Gene Encoding  
Precursor Protein of FXPRL Neuropeptide in the Silkworm, *Bombyx mori*\***

Xu Weihua<sup>1</sup> Zhang Liubin<sup>1</sup> Cheng Liansheng<sup>1</sup> Liu Jing<sup>1</sup> Xu Hourong<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(Department of Molecular Biology and Cell Biology, University of Science and Technology of China, Hefei 230027)

<sup>2</sup>(Department of Sericulture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

**Abstract** Embryonic diapause and sex pheromone biosynthesis in *Bombyx* are respectively induced by diapause hormone(DH) and pheromone biosynthesis activating neuropeptide(PBAN), which are produced in the suboesophageal ganglion from a precursor protein. Using the RT-PCR method, the DH-PBAN cDNA was cloned into pBluescript KS vector containing T7 RNA polymerase binding site to synthesize non-specific RNA. 5.5  $\mu$ g of DH-PBAN mRNA was synthesized per microgram of template DNA *in vitro*. Northern hybridization analysis suggested that the synthetic mRNA is the DH-PBAN mRNA.

**Key words** Diapause hormone, pheromone biosynthesis activating neuropeptide, mRNA, *in vitro* transcription, *Bombyx mori*

---

\* This Work was Supported by the Special Foundation for Scientific Research from the Chinese Academy of Sciences (Grant Nos:STZ-2-08, JQ-6-01), and by the Ministry of Education Foundation for Scientists Returned.