

遗传 HEREDITAS (Beijing) 19 (增刊): 83~85 1997

## · 研究简报 ·

# 家蚕人工授精与精子超低温保存研究 (简报)<sup>①</sup>

桂慕燕 陈元霖

刘治伟 吴维光

(厦门大学细胞生物学研究室, 厦门 361005)

(华南农业大学亚太地区蚕桑培训中心, 广州 510642)

家蚕 (*Bombyx mori* L.) 是一种很重要的经济昆虫, 也是优良的实验生物。家蚕的人工授精及精子保存研究开展蚕的发育和生殖生物学、遗传育种学、转基因蚕等研究的重要方法。但是在现有的科学文献中, 有关家蚕及其它绢丝昆虫人工授精及精子保存的研究很少报道<sup>[1~4]</sup>, 所以, 有必要进行更深入的研究。

## 1 材 料 和 方 法

### 1.1 人工授精

本研究从交配 30~40min 后的雌蛾交配囊中吸取精液, 经生理溶液 (Tris 3.0g、葡萄糖 1.25g、柠檬酸 1.68g、加双蒸水定容到 100ml) 稀释后, 取精子密度不同的精液进行人工授精: 精液从处女蛾的交配孔注入体内, 注入体积为每蛾 0.01~0.015ml。实验蛾的产卵、孵化在常规条件下进行。实验表明, 不同品种家蚕持续交配 30~40min, 雌蛾交配囊中的精液未发现凝结现象, 容易吸取。交配囊中的精液体积平均为 2~3.5 $\mu$ l/蛾, 约含 150~206 万精子。将精液原液分别作 5、10、15 倍的稀释, 每 15 $\mu$ l 稀释精液约含 180、90、60 万精子。

### 1.2 精子保存

早期研究指出: 家蚕精子用 5% 葡萄糖溶液稀释 (1:2), 并保存在 0 $^{\circ}$ C 条件下, 大多数精子可存活 20 天, 最长的存活期不超过 50 天; 用牛精子的冷冻稀释液稀释家蚕精液, 然后在液氮或干冰中保存, 解融后的精子虽然可以很好地保存其活力, 但这种精子进行人工授精则未获得受精卵<sup>[5]</sup>。我们经过比较, 选择了一种兔精子的冷冻稀释液来稀释家蚕精液, 精液和稀释液的比例为 1:3, 在经液氮处理后不仅可以保持精子正常的活力, 且用这种精液进行人工授精, 可获得约 7% 的受精蛾 (即产出受精卵的个体), 在受精蛾产出的总卵数中, 受精卵率为 77% (414/538)<sup>[6]</sup>。为了改进家蚕精子超低温保存效果, 我们比较了防冻剂成份对精子受精力的影响, 对经液氮处理后的精子受精力及它们后代的生命力进行了试验观测。我们以鲜精人工授精试验中采用的家蚕精液稀释液 A 液为母液, 添加不同的防冻试剂, 配制不同组分的冷冻稀释液:

A 液: Tris 3.0g、葡萄糖 1.25g、柠檬酸 1.68g、加双蒸水至 100ml。

B 液: A 液 94ml+甘油 1ml+二甲亚砜 (DMSO) 5ml。

C 液: A 液 77ml+甘油 7ml+卵黄 16ml+青霉素、链霉素各  $1 \times 10^5$  U。其中卵黄用新鲜鸡蛋黄经超声波处理 40min 后 4000rpm 离心 1h, 取上清液, 使用当天加入。

## 2 结 果 与 分 析

### 2.1 人工授精

用含不同精子密度的精液进行人工授精 (注射量约 15 $\mu$ l/蛾) 的效果比较如表 1。从表 1 可见, 随着精液中精

① 国家自然科学基金资助的课题。葛小荆、刘宗波、廖富华同志参加部分工作。

子密度的增加, 受精蛾率和受精卵率也相应地提高, 用稀释 5 倍的精液进行人工授精, 其受精蛾率虽稍低于自然交配, 但受精蛾产出卵的受精卵率和自然交配蛾相当。为了进一步验证上述的实验结果, 我们又重复进行了用稀释 5 倍的精液作人工授精的试验, 结果列于表 2。

表 1 不同精子密度精液授精效果比较

稀释倍数	实验蛾数 (只)	受精蛾数 (只)	受精蛾率 (%)	受精卵率 (%)
15×	19	6	31.6	5.07
10×	89	23	25.8	23.9
5×	44	38	86.4	90.8
自交对照	11	11	100	90.9

表 2 家蚕的人工授精试验

试验时间 (年、月)	供试蛾数 (只)	受精蛾率 (%)	受精卵率 (%)
1993. 6	44 (11)	86.4 (100)	90.8 (90.9)
1993. 9	8 (6)	87.5 (83.3)	99.6 (96.4)
1994. 4	12 (14)	83.3 (100)	94.6 (99.7)
合计	64 (31)	85.9 (96.8)	92.6 (95.7)

\*括号内数字为自交对照。

从表 2 可见, 用稀释 5 倍的鲜精进行人工授精, 无论是从受精蛾率还是受精卵率来看都获得令人满意的结果。应该特别指出的是, 人工授精效果与母蛾产卵行为关系甚大: 授精后母蛾产卵顺利速度快, 往往受精卵率也高; 产卵速度迟缓, 受精卵率低, 甚至产出的均为不受精卵。

## 2.2 精子保存

家蚕精液和冷冻稀释液分别按 1:4 的比例稀释后用于进行人工授精, 具体方法同前文<sup>[6]</sup>, 结果见表 3。稀释液中添加低浓度防冻剂, 对家蚕精子的受精力并无明显的影响。不同品种的家蚕精液经 B 液稀释 5 倍后, 吸入塑料冻管, 封口粉封口, 置 4℃平衡 1~4h, 然后放在离液氮面 2~5cm 处预冷 5~7min, 投入液氮内冷冻。从液氮中取出的精液迅速投入自来水 (23~28℃) 中解融。用解融的精液进行授精, 所得结果如表 4 所示。含甘油-二甲亚砜的稀释液对经液氮处理的家蚕精子受精力有一定的保护作用。试验组中受精蛾率平均可达 90.9%, 受精卵率平均可达 83.3%, 少数受精蛾的产卵数及其受精卵率与自交对照几乎没有差异。受精蛾个体间受精卵率的差异, 同鲜精授精试验一样, 与母蛾的产卵行为有关: 产卵顺利、速度快, 往往受精卵率也高。

对经液氮处理的家蚕精子人工授精子代进行饲养观察, 结果表明, 这些子代的生长发育正常 (表 5)。

表 3 防冻剂成份对家蚕精子受精力的影响

稀释液	实验蛾数 (只)	产卵蛾数 (只)	受精蛾数 (只)	受精卵率 (%)	受精卵 (%)
B	17	16	12	75.0	82.01
C	27	25	19	76.0	80.23
A (对照)	17	17	13	76.5	89.56

表 4 经液氮处理的家蚕精子受精力试验

试验时间 (年、月)	蚕品种	供试蛾数 (只)	受精蛾数 (只)	受精蛾 (%)	受精卵 (%)	孵化卵 (%)
1994. 4	加木王	13	2	15.4	24.9	74.1
1994. 4	782	6	1	16.7	83.3	60.0
1994. 4	广蚕×782	11	10	90.9	71.3	9.7
1994. 9	夏协	39	10	25.6	19.8	29.2

表5 经液氮处理的家蚕精子受精后代饲养结果

饲养组别	蚕数 (头)	虫蛹统一生命率 (%)	茧 质 调 查	
			全茧量 (g) $\bar{X} \pm S$	茧层量 (g) $\bar{X} \pm S$
冻 精	60	90.0	0.702 $\pm$ 0.085	0.073 $\pm$ 0.0107
鲜精对照	60	89.3	0.695 $\pm$ 0.087	0.075 $\pm$ 0.0125
自交对照	60	90.0	0.708 $\pm$ 0.089	0.075 $\pm$ 0.0098

## 参 考 文 献

- 1 Omuro S. Artificial insemination of *Bombyx mori*. Jour. Facul. Agr., Hokkaido Imp. Univ. Sapporo., 1936, 38 (10): 135~150
- 2 须贝悦治. 人工授精と生殖细胞の冷冻保存. 蚕丝科学と技术, 1991, 30 (2): 56~59
- 3 钱惠田等. 蚕的人工授精 (初报). 广西蚕业通讯, 1981, 4: 50~55
- 4 陈元霖等. 家蚕和蓖麻蚕人工授精初步研究. 厦门大学学报 (自然科学版), 1993, 32 (增刊1): 9~15
- 5 田村俊树等. 家蚕精子的冻结保存. 国外农学——蚕业, 1986, 3: 29~31
- 6 桂慕燕等. 家蚕精子保存的初步研究. 厦门大学学报 (自然科学版), 1993, 32 (增刊1): 16~19  
1997-05-15 收稿, 1997-08-16 修回.

*Nodal* 基因第一内含子对 *nodrl* 基因表达的影响

周迅蕾 吴鹤龄

(北京大学生命科学院细胞生物及遗传学系, 北京 100871)

*nodal* 基因是小鼠胚胎发育至原肠胚期于原条顶端原结处表达的一个基因。客观存在与胚胎的中胚层的胚层的形成以及左右体轴的决定有关。*nodal* 基因表达具有严格的时间和空间限制, 对于 *nodal* 基因第一内含子在基因表达调控中的作用是有一定科学意义的。

本文以 RNA 酶保护法 (RPA) 分析了 413-d 杂合子细胞 3563 及正常 ES 细胞 CCE 中 *nodal* mRNA 的表达量, 以 mGAP 为 mRNA 含量的内源对照, 实验表明, 当 3563 细胞与 CCE 细胞 mGAP 的 mRNA 含量相同时, CCE *nodal* mRNA 表达量是 3563 *nodal* mRNA 表达量的 2~3 倍。推测逆转录病毒 NPSVmos<sup>-1</sup> 在 *nodal* 第一内含子中插入破坏了 *nodal* mRNA 的表达。

以 *nodal* cDNA 为探针, 从小鼠 129sv 基因组文库中筛选出一个长 18kb 的 *nodal* 基因组克隆, 绘制了所得克隆的限制性内切酶图谱; 将 *nodal* 基因完整的第一内含子及其不同片段亚克隆到报告基因荧光素酶基因前面, 以脂质体法瞬时转化 F9 细胞, 结果表明, *nodal* 基因第一内含子及其 5' 端 2.4kb 片段对报告基因的表达有明显的增强作用。采用序列缺失的方法剖析此 2.4kb 片段, 表明在第一内含子的 5' 侧有一个 220bp 的片段具有增强子的功能, 可以明显地提高报告基因在 F9 细胞中的表达水平。意外的是, 该片段还显示了启动子活性, 这个启动活性可能是假象, 仅仅是其中所含增强子的表现。但也存在着这样的可能性: 即 *nodal* 基因由一个以上的启动子控制, 编码不同形式的蛋白。

本文表明, *nodal* 第一内含子中 5' 末端有一段 220bp 的序列, 对 *nodal* 基因功能有增强子作用, 并列出了该 220bp 的序列。