

家蚕品种金秋及其杂交亲本的蛋白质表达谱分析

余芳^{1,3}, 杨惠娟¹, 李建营¹, 丁农², 周仲华¹, 叶健¹, 张金卫², 段家龙³, 钟伯雄¹

(¹浙江大学动物科学学院, 杭州 310029; ²湖州市农业科学院, 浙江湖州 313000; ³安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036)

摘要:【目的】探讨家蚕杂交育成品种及其亲本蛋白水平的差异, 从蛋白水平分析育成品种的基因结构, 为阐明杂交育种成败的分子机理创造条件。【方法】采用蛋白质组研究技术, 分析杂交亲本及其育成品种的丝腺、血淋巴和中肠的蛋白质表达谱。【结果】3种组织器官中育成品种金秋与两个亲本的匹配蛋白斑点比例只达到70%左右, 剩余30%左右是各个品种的特异蛋白斑点; 在匹配蛋白斑点中, 还有9%~24%的蛋白表现上调和下调。这些特异蛋白可能是两个亲本的基因在杂交育成品种中产生了互作而形成的新蛋白, 也可能是对相同的蛋白进行了不同的修饰而获得的修饰蛋白。【结论】新品种的育成, 除了汇集亲本的优良基因外, 还有赖于基因互作产生的新功能蛋白的作用。

关键词: 家蚕; 蛋白质组; 杂交育种; 丝腺; 血淋巴; 中肠

Analysis of Protein Expression Patterns of Silkworm Jinqiu and Its Cross Parents

YU Fang^{1,3}, YANG Hui-juan¹, LI Jian-ying¹, DING Nong², ZHOU Zhong-hua¹, YE Jian¹, ZHANG Jin-wei², DUAN Jia-long³, ZHONG Bo-xiong¹

(¹College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029; ²Huzhou Academy of Agriculture Sciences, Huzhou 313000, Zhejiang; ³College of Life Science, Anhui University, Hefei 230036)

Abstract: 【Objective】 To explore the protein expression differences between the improved cross breeding race Jinqiu and its parents, the protein expression patterns were analyzed among them to discuss the gene construction and make a base for illuminating the mechanisms of successful cross breeding in silkworms. 【Method】 Protein samples from hemolymph, silk gland and midgut were isolated by technology of proteome research. 【Result】 The matched proteins between Jinqiu and its cross parents were both about 70% in the three kinds of tissue. The remaining 30% proteins were special to them, respectively. In the matched proteins there were also 9%-24% proteins were up-regulated or down-regulated expression. These special proteins may be the new proteins which come from the genic interaction of cross parents' genes in cross breeding or modifying proteins which produced from the different modifications of the same original proteins. 【Conclusion】 The results indicate that it is important for a successful of cross breeding a new breed relying on the actions of some new produced functional proteins from genic interaction in addition to marshaling excellent genes of cross parents.

Key words: Silkworm; Proteome; Cross breeding; Silk gland; Hemolymph; Midgut

0 引言

【研究意义】家蚕是重要的经济昆虫, 也是一种重要的模式生物。动植物育种方法主要有杂交育种、

系统选育和引种3种方法, 杂交育种是应用最广、成效最大的育种方法。开展家蚕杂交育成品种及其亲本的分子生物学比较研究, 有利于阐明杂交育种成败的分子机理, 为动植物杂交育种方法提供理论指导。【前

收稿日期: 2007-12-04; 接受日期: 2008-03-05

基金项目: 国家高技术研究发展计划“863”项目(2006AA10A118)、国家重点基础研究发展计划“973”项目(2005CB121003)、浙江省科技厅重点科研项目(2005C22046)

作者简介: 余芳(1983-), 女, 安徽临泉人, 硕士研究生, 研究方向为蚕桑蛋白质组学。Tel/Fax: 0571-86971302; E-mail: wyf62730@163.com。通讯作者钟伯雄(1958-), 男, 浙江宁波人, 教授, 博士, 研究方向为家蚕分子生物学。Tel/Fax: 0571-86971302, E-mail: bxzhong@zju.edu.cn

人研究进展】近年来, 家蚕杂交育种成效显著, 选育出了优质、高产的新品种, 如春用家蚕中系品种 923 和 925 及日系品种 928 和 9214^[1], 中秋用中系品种 921 及日系品种 922^[2], 夏秋用中系品种秋菊及日系品种新 6^[3]等。蚕茧产量是家蚕品种的重要经济性状, 蚕茧产量的高低与蚕丝蛋白合成分泌器官丝腺、营养物质运送组织血淋巴、及消化器官中肠三大重要组织器官的功能关系密切。研究已发现丝腺蛋白质组成对应不同蚕茧产量品种具有明显的品种特征性^[4], 对应丝腺细胞合成不同量丝蛋白的时期, 也具有明显的时期特征性^[5-8]。家蚕血淋巴蛋白质含量与全茧量、茧层量、茧层率等经济性状存在相关性^[9]。血淋巴和消化液蛋白水解酶的活力变化与蚕体消化、吸收和转化桑叶蛋白的生理进程基本一致^[10]。【本研究切入点】迄今为止, 家蚕杂交育种主要是根据育种者的经验、亲本的性状表现及大量的杂交选配进行, 虽有采用分子标记辅助育种的尝试, 但还没有成功育成新品种的报道。如何从分子水平确定杂交亲本的选配? 亲本及其杂交育成品种的分子水平有何差异? 也未见报道。【拟解决的关键问题】本研究拟采用蛋白质组研究技术, 分析杂交亲本及其育成品种的丝腺、血淋巴和中肠的蛋白质表达谱, 探讨育成品种及其杂交亲本蛋白水平的差异, 从该水平分析杂交育成品种的基因结构, 为阐明杂交育种成败的分子机理创造条件。

1 材料与方法

1.1 后部丝腺细胞蛋白样品制备

按钟伯雄等发明专利^[11]及颜新培等^[12]报道的方法, 剥取 5 龄第 3 天家蚕后部丝腺细胞, 后部丝腺细胞与蛋白裂解缓冲液 (8 mol·L⁻¹ 尿素、2 mol·L⁻¹ 硫脲、20 mmol·L⁻¹ Trisbase、30 mmol·L⁻¹ DTE [2, 3-Dihydroxybutane-1, 4-dithiol)、4% CHAPS 和 2% Pharmalyte (pH 3.5~10)] 按 1:10 质量/体积比 (mg·μl⁻¹) 的比例, 冰浴研磨 10 min, 室温放置 10 min 后, 低温超声波处理 2 min。25℃、15 000 r/min、10 min, 离心 2 次, 上清液为蛋白样品, -20℃ 保存备用。

1.2 血淋巴蛋白样品制备

取 5 龄第 3 天家蚕, 剪去尾角取血液于 1.5 ml 的离心管中, 血淋巴与蛋白裂解缓冲液 (同上) 按 1:10 (v/v, μl/μl) 的比例, 旋涡混匀 20 min, 室温放置 10 min, 低温超声波处理 2 min。25℃、15 000 r/min、10 min, 离心 2 次, 上清液为蛋白样品, -20℃ 保存备用。

1.3 中肠细胞蛋白样品制备

取 5 龄第 3 天家蚕中肠, 按上述后部丝腺细胞蛋白样品的制备方法制备中肠蛋白质样品。

1.4 蛋白样品定量

采用 Bradford 检测法^[13]。

1.5 蛋白双向电泳

第一向等电聚焦采用 IPGphor 等电聚焦仪 (Amersham Pharmacia 公司), 胶条为 pH 3~10 线性, 长 24 cm, 蛋白上样量 60 μg, 电泳程序设计为: 30 V 12 h, 200 V、500 V、2 000 V、4 000 V 各 1 h, 8 000 V 11h, 总电压时间为 95 060 V·h。

第二向 SDS-PAGE 的分离胶为 12.5%, 5W/块恒功率电泳 45 min, 再以 15W/块恒功率电泳, 至溴酚蓝指示线到达凝胶底边约 0.5 cm 处停止电泳。电泳后凝胶采用敏感型质谱兼容银染法染色^[14-15]。

1.6 图像扫描和图谱比较分析

用 Amersham Pharmacia 公司 Image scanner 双向电泳凝胶专用透射扫描仪扫描, 采用 Image Master 2D Platinum 6.0 图像分析软件进行点识别、背景消除、斑点匹配、差异蛋白分析。

2 结果与分析

2.1 蚕品种选育

以中系品种丰 1 为母本, 秋丰品种为父本, 采用杂交育种方法, 经过 7 年 14 代的选育, 育成了金秋品种。2007 年中秋蚕期饲养的茧层量成绩, 丰 1 为 0.344 g, 秋丰 0.386 g, 金秋 0.375 g, 介于两亲本之间, 接近高茧层量品种秋丰的水平, 生命力、产卵量等经济性状均优于两亲本 (数据未列出)。

2.2 蛋白双向电泳结果

丰 1、秋丰、金秋 3 个品种 5 龄第 3 天后部丝腺细胞蛋白样品双向电泳结果 (图 1) 显示蛋白斑点数目分别为 1 110、1 030、1 119, 大多均匀分布在 pI4~8.5、分子量在 20~80 kD; 血淋巴蛋白样品双向电泳图谱 (图 2) 可检测到的蛋白斑点数目分别为 771、757、722, 集中分布在 pI3.5~8、分子量在 20~95 kD 之间; 中肠蛋白样品电泳图谱中 (图 3) 蛋白斑点的数目分别为 966、907、928, 主要分布在 pI 4~8、分子量在 15~70 kD。

2.3 蛋白电泳图谱比较分析

使用蛋白质双向电泳图谱分析软件分别对 3 个品种的电泳图谱进行分析, 根据品种之间的关系, 蛋白斑点分为每一品种特有的特异蛋白斑点和品种之间能

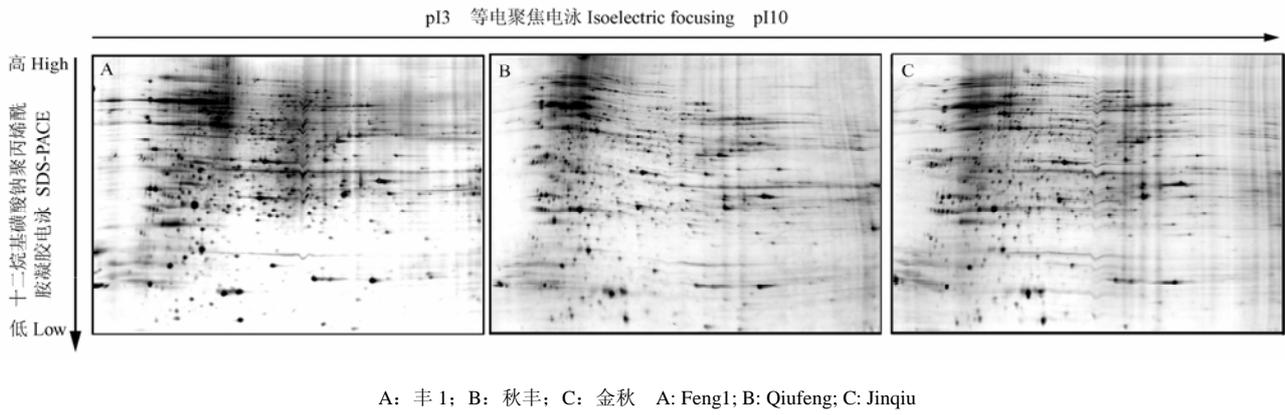


图1 家蚕5龄第3天幼虫后部丝腺蛋白质双向电泳图谱

Fig. 1 Protein two-dimensional electrophoresis patterns of posterior silk gland in 3th day of fifth instar larvae of silkworm

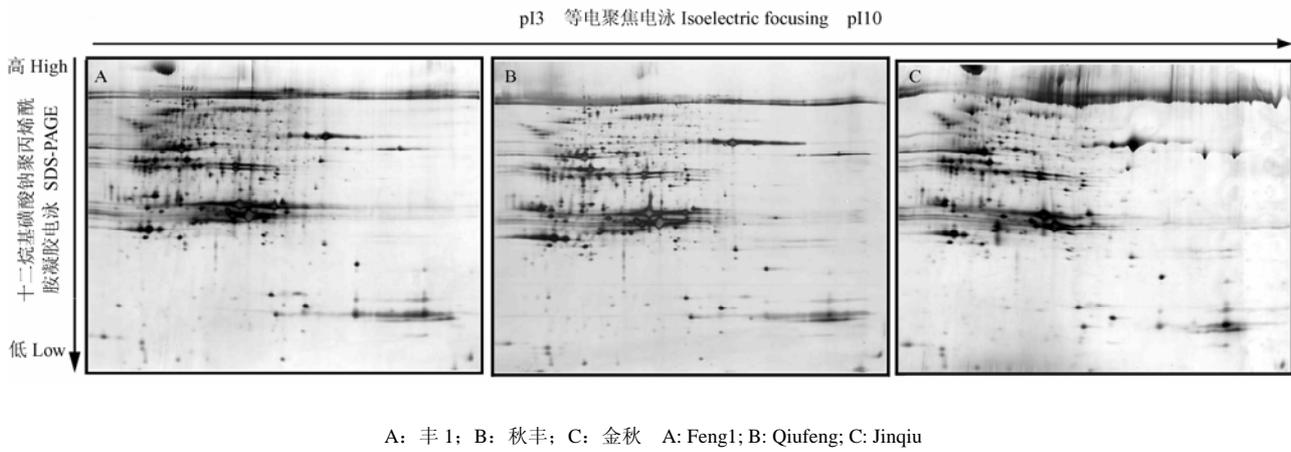


图2 家蚕5龄第3天幼虫血淋巴蛋白质双向电泳图谱

Fig. 2 Protein two-dimensional electrophoresis patterns of hemolymph in 3th day of fifth instar larvae of silkworm

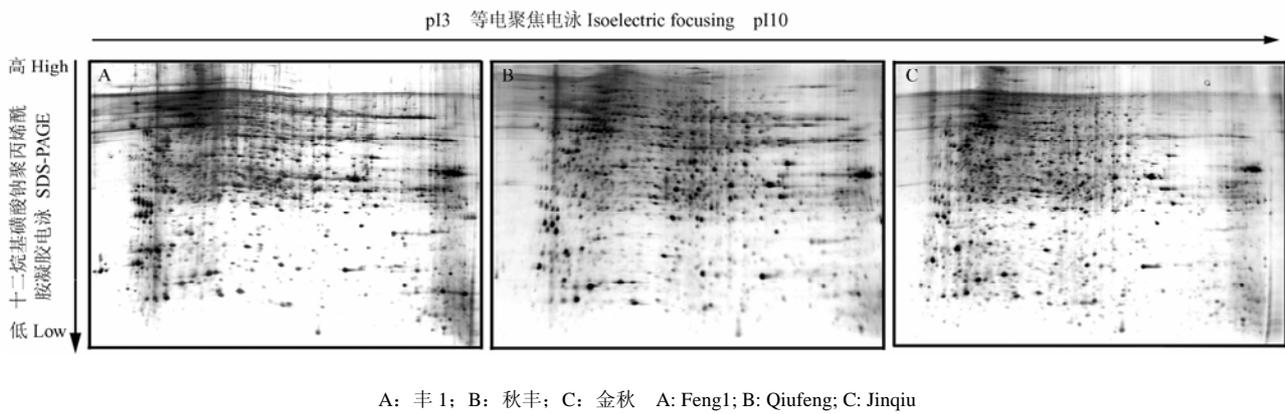


图3 家蚕5龄第3天幼虫中肠蛋白质双向电泳图谱

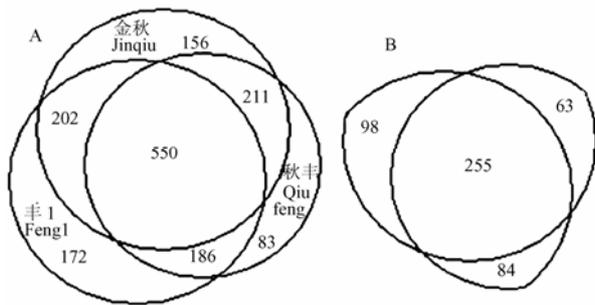
Fig. 3 Protein two-dimensional electrophoresis patterns of midgut in 3th day of fifth instar larvae of silkworm

够匹配、具有相同生物学功能的匹配蛋白斑点两种类型，匹配蛋白斑点还存在表达量 (Vol%) 有无明显差异两种类型。图 4-A 中 3 个圆彼此不相交部分分别表示丰 1、秋丰、金秋 3 个品种的后部丝腺特异蛋白斑点数，分别为 172、83、156 个；两两相交部分显示的是两品种间匹配的蛋白斑点数，3 个圆都相交部分表示 3 个品种间都匹配的蛋白斑点数，结果显示金秋与丰 1 匹配蛋白斑点数为 752 (550+202)，匹配率为 67.2029%，金秋与秋丰分别为 761 (550+211)、68.0071%，丰 1 与秋丰分别为 736 (550+186)、66.3063%；金秋、丰 1 和秋丰都匹配的匹配率为 50.6290% (表 1)。图 4-B 显示的是在品种间表达量相差两倍及其以上的匹配蛋白斑点数，也称为差异蛋白斑点的数目，可以看出在品种两两匹配的蛋白斑点中，金秋与丰 1 有 98 个差异蛋白斑点，金秋与秋丰有 63 个，丰 1 与秋丰有 84 个；在 3 个品种都匹配的蛋白斑点中，两个品种以上存在差异的蛋白斑点数达

255 个。

采用同样的方法对血淋巴及中肠分析结果见图 5、图 6 和表 1。

从蛋白斑点的匹配率 (表 1) 来看，3 个品种都匹配的蛋白斑点数超过任一品种蛋白斑点总数的一半，而两两之间的匹配蛋白斑点比率都在 70% 左右，3 种组织的蛋白斑点匹配具有相同趋势。金秋与丰 1 3 种组织中表达量上有差异的蛋白斑点数目均高于其与秋



A: 匹配蛋白斑点和特异蛋白斑点分析，其中相交的部分代表匹配蛋白斑点数，不相交部分代表特异蛋白斑点数；B: A 图中匹配蛋白斑点含量相差两倍以上差异蛋白斑点数。下同
A: The analysis of matched protein spots and particular protein spots, the crossing areas represent matched protein spot numbers and non-crossing areas represent particular protein spot numbers; B: the number of diversity protein spots having more than two times in the content of matched protein spots from A picture. The same as below

图 4 家蚕后部丝腺细胞蛋白质匹配分析

Fig. 4 The matching analysis of protein spots in the posterior silk gland cell of silkworm

表 1 家蚕品种匹配率分析

Table 1 Analysis of ratio to matched protein spots of silkworm breeds

	后部丝腺 Posterior silk gland (%)	血淋巴 Hemolymph (%)	中肠 Midgut (%)
金秋-丰 1 Jinqiu -Feng1	67.2029	72.9917	73.8147
金秋-秋丰 Jinqiu-Qiufeng	68.0071	71.3296	71.4440
丰 1-秋丰 Feng1-Qiufeng	66.3063	72.1268	69.8758
金秋-丰 1-秋丰 Jinqiu- Feng1-Qiufeng	50.6290	55.0667	54.7305

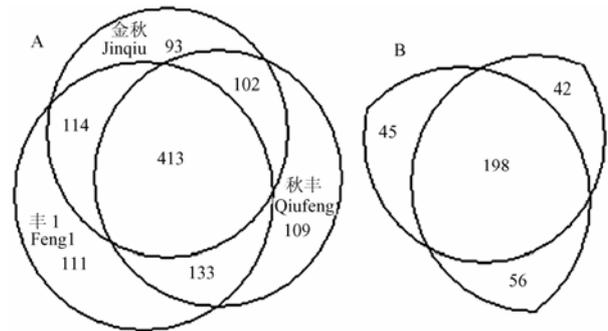


图 5 家蚕血淋巴蛋白质匹配分析

Fig. 5 The matching analysis of protein spots in hemolymph of silkworm

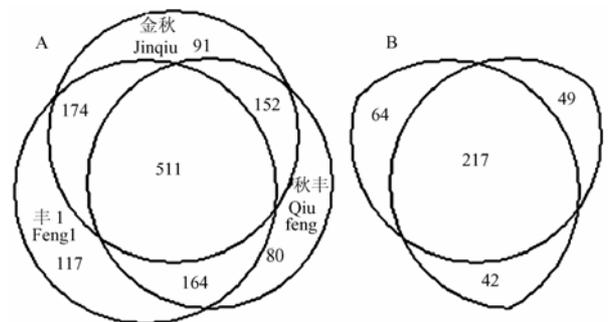


图 6 家蚕中肠细胞蛋白质匹配分析

Fig. 6 The matching analysis of protein spots in midgut cell of silkworm

丰间的差异蛋白斑点数（图 4-B、图 5-B、图 6-B）。

2.4 差异蛋白分析

特异蛋白是每一个品种特有的蛋白，是品种表现独特性状的分子基础。金秋品种与两亲本相比：后部丝腺和中肠的特异蛋白在酸性蛋白区的比率偏高，碱性蛋白区的比率偏低，尤其是中肠，其比率远远低于两亲本，只有 5.50%；而血淋巴的表现相反，酸性蛋白区的比率偏低，碱性蛋白区的比率偏高，甚至高达 30.11%（表 2）。

对差异蛋白含量分析得知，金秋品种比丰 1 品种蛋白含量差异达两倍以上上调蛋白占匹配蛋白数量的百分率高于金秋比秋丰上调的蛋白比率，在后部丝腺和中肠两种器官中，两者差异甚至达到 2 倍以上（表 3 第 3 列）。就上调蛋白的分布区域来看，金秋与丰 1 相比，中肠上调的蛋白在碱性蛋白区域所占整个中肠

上调蛋白的比率（17.45%）明显高于金秋比秋丰上调的蛋白比率（8.45%），达到 2 倍差异。除此以外，其它的比率两者基本相似。而就 3 种组织器官上调蛋白分布总体而言，酸性蛋白和中性蛋白区域的比率高于碱性蛋白区域。

由下调蛋白分析结果得知，金秋品种比丰 1 品种蛋白含量差异达两倍以上下调蛋白占匹配蛋白的数量比率与金秋比秋丰下调蛋白的比率相似（表 3 第 3 列），这一点与上调蛋白的结果不同。金秋比丰 1 下调的蛋白和金秋比秋丰下调的蛋白相比，在酸性、中性和碱性蛋白 3 个区域的分布的比率基本相似，只有后部丝腺的中性蛋白区域和中肠的酸性蛋白区域，前者比率明显高于后者，分别达 42.58% 和 41.09%，而后部丝腺和血淋巴的碱性蛋白区域，后者比率明显高于前者，分别达 25.00% 和 9.09%（表 4）。后部丝腺、

表 2 家蚕品种特异蛋白斑点数及等电点和分子量分析

Table 2 Analysis of particular protein spot numbers and their pI, MW of silkworm breeds

品种 Breed	蛋白斑点总数 Total no. of protein spots	pI3~6 区段内 的蛋白斑点数 No. of protein Spots in pI 3-6 (%)	相应分 子量 Relevant MW(kD)	pI6~8 区段 内的蛋白斑点数 No. of protein spots in pI 6-8 (%)	相应分 子量 Relevant MW(kD)	pI8~10 区段内的蛋 白斑点数 No. of protein spots in pI 8-10 (%)	相应分 子量 Relevant MW (kD)	
后部丝腺 Posterior silk gland	丰 1 Feng1	172	91(52.91)	17~92	57(33.14)	21~84	24(13.95)	16~88
	秋丰 Qiufeng	83	41(49.40)	13~96	21(25.30)	14~72	21(25.30)	12~61
	金秋 Jinqiu	156	94(60.26)	13~78	45(28.84)	30~75	17(10.90)	12~51
血淋巴 Hemolymph	丰 1 Feng1	111	69(62.16)	30~118	25(22.52)	18~96	17(15.32)	18~95
	秋丰 Qiufeng	109	76(69.73)	25~102	27(24.77)	20~96	6(5.50)	35~94
	金秋 Jinqiu	93	50(53.76)	13~125	15(16.13)	13~118	28(30.11)	17~100
中肠 Midgut	丰 1 Feng1	117	42(35.90)	16~117	33(28.20)	23~80	42(35.90)	15~90
	秋丰 Qiufeng	80	30(37.50)	20~85	36(45.00)	42~107	14(17.50)	26~92
	金秋 Jinqiu	91	51(56.04)	15~106	35(38.46)	12~84	5(5.50)	31~69

括号内数据为百分比 The data shown in the parenthesis represent percentage

表 3 金秋品种上调蛋白斑点分析

Table 3 Analysis of expressing-up protein spots of silkworm breeds

品种 Breed	上调斑点总数 Total no. of expressing-up protein spots (%)	pI3~6 区段内的 蛋白斑点数 No. of protein spots in pI 3-6 (%)	相应分 子量 Relevant MW(kD)	pI6~8 区段内 的蛋白斑点数 No. of protein spots in pI 6-8 (%)	相应分 子量 Relevant MW (kD)	pI8~10 区段内 的蛋白斑点数 No. of protein spots in pI 8-10 (%)	相应分 子量 Relevant MW(kD)	
后部丝腺 Posterior silk gland	金秋-丰 1 Jinqiu-Feng1	144(19.15)	64(44.44)	13~79	56(38.89)	13~86	24(16.67)	15~61
	金秋-秋丰 Jinqiu-Qiufeng	71(9.33)	24(33.80)	17~79	35(49.30)	14~78	12(16.90)	18~84
血淋巴 Hemolymph	金秋-丰 1 Jinqiu-Feng1	61(11.57)	34(55.74)	27~120	20(32.79)	15~96	7(11.47)	17~99
	金秋-秋丰 Jinqiu-Qiufeng	54(10.49)	24(44.44)	14~112	26(48.15)	15~96	4(7.41)	15~99
中肠 Midgut	金秋-丰 1 Jinqiu-Feng1	149(21.75)	65(43.62)	14~84	58(38.93)	13~79	26(17.45)	12~96
	金秋-秋丰 Jinqiu-Qiufeng	71(10.71)	41(57.75)	14~109	24(33.80)	13~111	6(8.45)	13~40

上调斑点总数 (%) 是指上调蛋白斑点数占金秋与丰 1 或秋丰匹配蛋白斑点总数的比例，每一区段内的蛋白斑点数 (%) 是该区段的上调蛋白斑点数占上调斑点总数的百分比

The expression-up protein spots number (%) represents the percent of the expression-up protein spots to the matched proteins between Jinqiu and Feng1 or between Jinqiu and Qiufeng. The proteins number (%) in one certain pI span represents the percentage of the expression-up proteins in this pI span to the whole expression-up proteins

表 4 家蚕品种下调蛋白斑点分析

Table 4 Analysis of expressing-down protein spots of silkworm breeds

品种 Breed	下调斑点总数 Total no. of expressing- down protein spots (%)	pI3~6 区段内 的蛋白斑点数 No. of protein spots in pI 3-6 (%)	相应分 子量 Relevant MW (kD)	pI6~8 区段内 的蛋白斑点数 No. of protein spots in pI 6-8 (%)	相应分 子量 Relevant MW (kD)	pI8~10 区段内 的蛋白斑点数 No. of protein spots in pI 8-10 (%)	相应分 子量 Relevant MW (kD)
后部丝腺 Posterior silk gland	金秋-丰 1 Jinqiu-Feng1 155(20.61)	72(46.45)	17~79	66(42.58)	27~77	17(10.97)	28~73
血淋巴 Hemolymph	金秋-秋丰 Jinqiu-Qiufeng 104(13.67)	55(52.88)	17~82	23(22.12)	19~72	26(25.00)	24~64
中肠 Midgut	金秋-丰 1 Jinqiu-Feng1 113(21.44)	78(69.03)	14~118	32(28.32)	13~95	3(2.65)	17~71
	金秋-秋丰 Jinqiu-Qiufeng 121(23.50)	90(74.38)	14~112	20(16.53)	18~92	11(9.09)	13~99
	金秋-丰 1 Jinqiu-Feng1 73(10.66)	30(41.09)	14~111	27(36.99)	28~80	16(21.92)	16~62
	金秋-秋丰 Jinqiu-Qiufeng 89(13.42)	20(22.47)	17~91	43(48.32)	17~86	26(29.21)	13~62

下调斑点总数(%)是指下调蛋白斑点数占金秋与丰 1 或秋丰匹配蛋白斑点总数的比例,每一区段内的蛋白斑点数(%)是该区段的下调蛋白斑点数占下调斑点总数的百分比

The expression-down protein spots number (%) represents the percent of the expression-down protein spots to the matched proteins between Jinqiu and Feng1 or between Jinqiu and Qiufeng. The proteins number (%) in one pI span represents the percentage of the expression-down proteins in this pI span to the whole expression-down proteins

血淋巴和中肠 3 种组织下调蛋白的整体分布和上调蛋白的分布类似,也是主要分布在酸性和中性蛋白区域,碱性蛋白区域较少。

3 讨论

杂交育种是将 2 个杂交亲本的基因通过杂交传递给 F_1 代,基因在 F_1 代及以后世代不断地交换、重组和分离,形成经济性质各异的不同品系,依靠合理的选择和留种育成新品种,新品种汇集了 2 个亲本的有利基因,汇集了通过交换、重组产生的新功能基因、以及新的基因调控模式。笔者的试验结果表明,3 种组织器官中新育成品种与两个亲本的匹配蛋白比例只达到 70% 左右,剩余 30% 左右是各个品种的特异蛋白,3 个品种都匹配的蛋白比率也只达到 50% 左右(表 1)。在匹配的蛋白斑点中,还有 9%~24% 的蛋白表现上调(表 3)和下调(表 4)。这些特异蛋白可能是两个亲本的基因通过交换、重组产生的新功能基因的产物,也可能是杂交育成品种中基因互作而形成的新蛋白,也可能是对相同的蛋白进行了不同的修饰而获得的修饰蛋白。新育成品种金秋表现的上下调蛋白可能也是基因互作这一原因引发了基因表达水平改变所致。

杂交育种成败一方面有赖于杂交亲本是否具有优良基因,另一方面有赖于分离世代及以后世代合理选择优良个体,并将优良个体的优良基因纯合固定。根据本研究结果笔者认为亲本基因是否能够产生正互作用,使杂交育成品种能够获得生物学功能优良的新蛋白或是已有蛋白的新修饰是杂交育种成败的另一关

键因素。从这一点来看可以明白,为什么到目前为止育种工作一定要通过实际的品种选配才能成功,而不能单单根据对亲本基因型的判断而断定育种的成败。本试验结果暗示了新品种的育成,除了汇集了亲本的优良基因外,还有赖于基因互作促使新功能蛋白的产生。所以笔者认为充分了解基因重组后的互作原理,将有利于把握杂交亲本的选择,加强对杂交育种工作的指导作用。

4 结论

4.1 丰 1、秋丰、金秋 3 个品种 5 龄第 3 天能检测到的蛋白斑点数,后部丝腺细胞分别为 1110、1030、1119,血淋巴分别为 771、757、722,中肠分别为 966、907、928,品种间蛋白斑点数差异不大,组织器官间蛋白斑点数差异显著。

4.2 后部丝腺、血淋巴和中肠每一种组织在 3 个不同品种间的匹配蛋白斑点比率大多在 70% 左右,另 30% 左右是各个品种的特异蛋白斑点;金秋品种与两亲本相比,后部丝腺和中肠的特异蛋白在酸性蛋白区的比率较高,碱性蛋白区的比率较低,而血淋巴的特异蛋白在酸性蛋白区的比率较低,碱性蛋白区的比率较高;在匹配蛋白斑点中,还有 9%~24% 的蛋白表现上调和下调。

4.3 根据本研究结果推测亲本基因是否能够产生正互作用,使杂交育成品种能够获得生物学功能优良的新蛋白或是已有蛋白的新修饰是杂交育种成败的另一关键因素。

References

- [1] 肖金树, 张友洪, 周安莲. 春用家蚕新品种 923-925 X 928-9214 的育成. 蚕业科学, 2005, 31(4): 474-477.
Xiao J S, Zhang Y H, Zhou A L. Breeding of the new silkworm variety 923-925X 928-9214 for spring rearing. *Acta Sericologica Sinica*, 2005, 31(4): 474-477. (in Chinese)
- [2] 张友洪, 肖金树, 周安莲. 中秋用家蚕新品种组名 921×922 的育成. 西南农业学报, 2007, 2(3): 538-541.
Zhang Y H, Xiao J S, Zhou A L. Breeding of the new silkworm variety 921×922 for autumn rearing. *Southwest China Journal of Agricultural Science*, 2007, 2(3): 538-541. (in Chinese)
- [3] 曹锦如, 叶爱红, 祝新荣, 吴海平. 夏秋用家蚕新品种秋菊×新 6 的育成. 蚕业科学, 2004, 30(3): 304-307.
Cao J R, Ye A H, Zhu X R, Wu H P. Breeding of the new silkworm variety Qiuju X Xin 6 for autumn rearing. *Acta Sericologica Sinica*, 2004, 30(3): 304-307. (in Chinese)
- [4] 鲁华云, 叶 键, 李建营, 钟伯雄. 家蚕不同品种后部丝腺蛋白质双向电泳图谱比较. 蚕业科学, 2006, 32(1): 114-117.
Lu H Y, Ye J, Li J Y, Zhong B X. Analysis of 2D-PAGE patterns of proteins in posterior silk gland from different silkworm varieties on 4th Day in 5th instar. *Acta Sericologica Sinica*, 2006, 32(1): 114-117. (in Chinese)
- [5] 吴卫成, 钟伯雄, 孟智启, 陈金娥, 颜新培, 叶 键, 沈飞英. 家蚕 4 眠期与 5 龄期后部丝腺细胞蛋白质组成分析. 蚕业科学, 2005, 31(3): 273-279.
Wu W C, Zhong B X, Meng Z Q, Chen J E, Yan X P, Ye J, Shen F Y. Composition analysis of protein from posterior silk gland of silkworm *Bombyx mori* between larvae of 4th molting stage and the 5th instar stage. *Acta Sericologica Sinica*, 2005, 31(3): 273-279. (in Chinese)
- [6] 吴卫成, 叶 键, 鲁华云, 李建营, 陈金娥, 孟智启, 倪春霄, 钟伯雄. 家蚕五龄第 1 天与第 4 天后部丝腺蛋白质双向电泳图谱比较. 中国农业科学, 2006, 39(7): 1495-1500.
Wu W C, Ye J, Lu H Y, Li J Y, Chen J E, Meng Z Q, Ni C X, Zhong B X. Analysis of two-dimensional gel electrophoresis patterns of protein from posterior silk gland of silkworm *Bombyx mori* on day 1 and day 4 in 5th instar stage. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39(7): 1495-1500. (in Chinese)
- [7] Wu W C, Gao Q K, Chen J E, Ye J, Qian Y W, Li J Y, Lu H Y, Meng Z Q, Ni C X, Zhong B X. Analysis of two-dimensional gel electrophoresis patterns of protein from posterior silk gland of silkworm (*Bombyx mori*) on day 1 and day 4 in 5th instar stage. *Agricultural Sciences in China*, 2007, 6(2): 249-254.
- [8] 沈飞英, 钟伯雄, 楼程富, 洪 波, 蒋振东, 苏松坤, 梁建设, 徐海圣. 家蚕 5 龄幼虫不同时期中部丝腺细胞蛋白质双向电泳分析. 蚕业科学, 2006, 32(1): 25-35.
Shen F Y, Zhong B X, Lou C F, Hong B, Jiang Z D, Su S K, Liang J S, Xu H S. Investigation on protein variety in middle silk gland cells of silkworm, *Bombyx mori*, during fifth instar stage. *Acta Sericologica Sinica*, 2006, 32(1): 25-35. (in Chinese)
- [9] 买买提依明, 吴丽莉, 新 平, 米日古丽, 卢 红, 刘燕林. 新疆家蚕血液蛋白质含量与茧质性状的相关性分析. 广西蚕业, 2006, 43(4): 7-9.
Maimaiti Y M, Wu L L, Xin P, Mi R G L, Lu H, Liu Y L. The analysis of pertinence between hemolymph protein content of silkworm, *Bombyx mori*, and the character of cocoon. *Guangxi Sericulture*, 2006, 43(4): 7-9. (in Chinese)
- [10] 屠 洁, 王国基. 家蚕 5 龄幼虫蛋白质代谢研究初探. 蚕业科学, 2005, 31(2): 221-223.
Tu J, Wang G J. Preliminary studies on the protein metabolism in 5th instar silkworm (*Bombyx mori*) larvae. *Acta Sericologica Sinica*, 2005, 31(2): 221-223. (in Chinese)
- [11] 钟伯雄, 时连根. 适合于分子生物学研究的家蚕丝腺细胞分离方法. 发明专利号: ZL 200310108382. 1
Zhong B X, Shi L G. Adapted to molecular biology research method of separating silk gland cell in silkworm. No. of Invention Pattern: ZL 200310108382. 1. (in Chinese)
- [12] 颜新培, 钟伯雄, 徐孟奎, 郭定国, 姚国华. 家蚕五龄后部丝腺蛋白质构成与茧层量的关系. 蚕业科学, 2003, 29(4): 344-348.
Yan X P, Zhong B X, Xu M K, Guo D G, Yao G H. The relation between the protein composition of posterior silk gland in the fifth instar larva of silkworm and cocoon shell weight. *Acta Sericologica Sinica*, 2003, 29(4): 344-348. (in Chinese)
- [13] 汪家政, 范 明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2001: 42-46.
Wang J Z, Fan M. *Proteomics Technic Handbook*. Beijing: Science Press, 2001: 42-46. (in Chinese)
- [14] Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*, 1996, 68(5): 850-858.
- [15] Yan J X, Wait R, Berkelman T, Harry R A, Westbrook J A, Wheeler C H, Dunn M J. A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis*, 2000, 21(17): 3666-3672.

(责任编辑 毕京翠)