

2011, 37(5): 0914-0919

ISSN 0257-4799; CN 32-1115/S

E-mail: CYKE@chinajournal.net.cn

催青温度对家蚕二化性品种丙酮酸脱氢酶激酶基因(*BmPDK*)表达的影响

宋海韬¹ 王力刚¹ 黄勇^{1,2} 赵巧玲^{1,2} 沈兴家^{1,2*}(¹江苏科技大学, 江苏镇江 212003; ²中国农业科学院蚕业研究所, 农业部蚕桑遗传改良重点开放实验室, 江苏镇江 212018)

摘要 丙酮酸脱氢酶激酶(PDK)在生物体的新陈代谢中具有重要的生理功能。为了探讨家蚕(*Bombyx mori*) PDK 基因的表达特性,用蛾区半分法将二化性家蚕品种的活化越冬卵(丙₂期)分别以常温(25℃)光照和低温(15℃)黑暗催青,通过实时荧光定量 PCR 技术检测分析 2 种温度催青处理后家蚕不同发育阶段和不同组织的 *BmPDK* 表达水平。常温光照催青区 *BmPDK* 的表达水平表现出发育时期和组织差异:胚胎发育阶段 *BmPDK* 在己₄期的表达水平最高,其次是戊₂、己₃和己₅期;幼虫发育阶段 *BmPDK* 的表达水平在蚁蚕期极显著高于其它龄期,5 龄期在卵巢和精巢的表达水平高于其它组织;蛹期 *BmPDK* 的表达水平比其它发育时期低;成虫期的表达水平与胚胎发育末期相当,其中雌蛾的脂肪体和卵巢中 *BmPDK* 的表达水平较高。推测 *BmPDK* 在家蚕胚胎发育末期及产卵过程中有重要作用。催青温度影响 *BmPDK* 在家蚕各发育时期及卵巢组织中的表达水平:胚胎发育阶段戊₂期 *BmPDK* 的表达水平为常温催青区显著高于低温催青区,己₃~己₅期常温催青区 *BmPDK* 的表达呈低-高-低的趋势,而低温催青区则呈上升趋势;蚁蚕期 *BmPDK* 表达水平为低温催青区极显著低于常温催青区;蛹期和成虫期卵巢中,常温催青区 *BmPDK* 的表达水平极显著高于低温催青区。催青温度对二化性家蚕 *BmPDK* 的表达的影响主要出现在胚胎戊₂期、胚胎己₃期~蚁蚕期、蛹期、成虫期。

关键词 家蚕; 丙酮酸脱氢酶激酶; 基因表达; 催青温度; 荧光实时定量 PCR

中图分类号 S881.2; Q78 文献标识码 A 文章编号 0257-4799(2011)05-0914-06

Influence of Incubation Temperature on Expression of Pyruvate Dehydrogenase Kinase Gene in Bivoltine *Bombyx mori* Varieties

SONG Hai-Tao¹ WANG Li-Gang¹ HUANG Yong^{1,2} ZHAO Qiao-Ling^{1,2} SHEN Xing-Jia^{1,2*}(¹Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang Jiangsu 212003, China; ²Key Laboratory of Genetic Improvement of Silkworm and Mulberry, Ministry of Agriculture, The Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang Jiangsu 212018, China)

Abstract Pyruvate dehydrogenase kinases (PDKs) play important physiological roles in metabolism of organisms. To study the expression patterns of *Bombyx mori* PDK gene (*BmPDK*), half-batch method was employed to incubate the activated over-wintering eggs of bivoltine silkworm strain at normal temperature (25℃) with illumination and at low temperature (15℃) in darkness, respectively. Real-time fluorescent quantitative PCR was used to determine the expression levels of *BmPDK* gene at different developmental stages and in various tissues. The results showed that, in normal temperature and illuminated incubation group, *BmPDK* expression levels were varied with different stages and tissues. During embryonic developmental phase, the peak expression level of *BmPDK* was at head pigmentation stage, followed by those at late bulge stage, trachea coloring stage and body pigmentation stage. During larval developmental phase, the newly hatched larvae showed the highest expression level which was significantly higher than those of other stages. In the 5th instar larvae, the expression levels of *BmPDK* in ovary and testis were higher than other

收稿日期:2011-05-03 接受日期:2011-07-26

资助项目:国家自然科学基金项目(No. NSFC31072083)。

作者简介:宋海韬(1983-),男,吉林,硕士研究生。

E-mail: haitao9571@163.com

通信作者:沈兴家,研究员,博士生导师。

E-mail: shenxj63@yahoo.com.cn

tissues. In pupal stage, *BmPDK* expression level was lower than those of other developmental stages. And in adult stage, *BmPDK* gene expression level was close to that at the end of embryonic stage, and was relatively higher in fat body and ovary of female moths. It is suggested that *BmPDK* plays important roles during the late stages of embryonic development and during oviposition of moths. Incubation temperatures influenced the expression of *BmPDK* gene in all developmental stages and in ovarian tissue. In late bulge stage of embryo, *BmPDK* gene expression level was significantly higher in normal temperature group than in low temperature group. From trachea coloring stage to body pigmentation stage, the *BmPDK* gene showed a low-high-low expression pattern in normal temperature group, while it displayed an ascendant pattern in low temperature group. But in the newly hatched larvae, *BmPDK* gene expression level was significantly lower in low temperature group than in normal temperature group. In ovaries of pupa and adult, *BmPDK* gene expressed at extremely significantly higher levels in normal temperature group than in low temperature group. It was shown that the influence of incubation temperatures on expression of *BmPDK* gene occurs mainly at embryonic late bulge stage, trachea coloring stage to hatching stage, and at pupa and adult stages.

Key words *Bombyx mori*; Pyruvate dehydrogenase kinase (PDK); Gene expression; Incubation temperature; Fluorescent real-time quantitative PCR

家蚕(*Bombyx mori*)是经典遗传学研究的优良实验动物,是除果蝇(*Drosophila melanogaster*)以外遗传学研究最为详尽的昆虫。作为鳞翅目昆虫的典型代表和理想的生物学模型,家蚕的研究成果有助于我们理解动物生命活动的一般规律。

家蚕在漫长的进化历史中,形成了滞育机制来度过冬季外界的不利环境。业已明确家蚕的滞育受遗传和环境调控,二化性家蚕在常温(25℃)光照催青时产滞育卵,在低温(15℃)黑暗催青时产非滞育卵^[1-5]。子代卵是否发生滞育决定于二化性家蚕蛹期的咽下神经节(subpharyngeal ganglion, SG)合成和分泌滞育激素(diapause hormone, DH)量的多少^[6],其分子机制在于DH传递的信号改变了卵内的物质代谢^[7]。家蚕的滞育过程可以分为诱导、决定、发动、维持和解除5个阶段^[8],其中诱导和决定阶段在亲代完成。滞育诱导阶段是胚胎期的戊₃~己₅期,此阶段是环境条件诱导子代滞育的敏感时期。滞育决定阶段是指化蛹后3d到羽化这段时期,家蚕将滞育诱导阶段感受的环境信号转换为体内相应信号,体内信号再通过整个幼虫期传递到蛹期,使SG向血液大量分泌DH,血液将DH运送到卵巢,与卵母细胞膜上的滞育激素受体(*BmDHR*)结合,进而诱导海藻糖酶基因表达上调,海藻糖酶将血液中的海藻糖分解为葡萄糖的反应加快,更多葡萄糖通过细胞质膜进入卵母细胞,在卵母细胞中进一步合成为糖原,从而使滞育性蚕卵中储存更多糖原以促进滞育^[7,9-10]。在整个滞育过程中,糖代谢起了重要作用。

本实验室利用蛋白质双向电泳技术,研究了家蚕二化性品种秋丰的蚕卵在低温和常温催青条件下胚胎期蛋白质表达差异,发现了一些差异表达蛋白点^[11],其中包括在糖代谢中起到重要调控作用的丙酮酸脱氢酶激酶(pyruvate dehydrogenase kinase, PDK)。线粒体中的丙酮酸脱氢酶系(pyruvate dehydrogenase complex, PDC)是一组限速酶,催化丙酮酸氧化脱羧生成乙酰CoA,使糖代谢从糖酵解进入三羧酸循环并和氧化磷酸化生成ATP的过程紧密地连接起来,在细胞线粒体呼吸链能量代谢中起到关键作用^[12-19]。PDK通常以二聚体的形式存在,其有2个反向向外的大沟,刚好与PDC的E2亚基N端疏水结构域的大小和形状相吻合,它们相结合后促使PDK二聚体暴露出中心部位而与PDC的E1亚基相结合使其磷酸化,导致丙酮酸无法转化为乙酰CoA^[20]。由此可见,PDK作为PDC的负调控酶,在家蚕体内的糖代谢中起到极其重要的作用。但是,*BmPDK*是否与家蚕胚胎滞育形成有关尚不清楚。

本实验将家蚕二化性品种秋丰的蚕卵分别采用15℃黑暗和25℃光照催青,从RNA水平分析家蚕各发育时期和不同组织的*BmPDK*表达差异及催青温度对*BmPDK*表达的影响,为阐明*BmPDK*的功能积累实验数据。

1 材料与方法

1.1 材料及主要试剂

家蚕二化性品种秋丰由农业部蚕桑遗传改良

重点开放实验室保存。将即时浸酸解除滞育的蚕卵,采用蛾区半分法一份于 25℃光照条件下催青,另一份于 15℃黑暗条件下催青。卵期每日解剖蚕卵 2 次,在显微镜下观察确定其胚胎发育时期。从戊₁期到己₅期共 8 个时期,对每个时期常温、低温催青的蚕卵分别取 3 份样(0.1 g/份)。蚕卵孵化后用桑叶在常规条件下饲养。蚁蚕孵化当日上午取 3 份样(0.1 g/份),2~4 龄分别收集起蚕 3 份(3~5 头/份);解剖 5 龄 3 d 幼虫、化蛹后 2 d 的蛹及羽化当日的成虫,分别收集血液、脂肪体、卵巢和精巢 3 份(0.1 g/份)。样品于 -70℃保存备用。

RNAiso Plus(产品编号: D9108A)、PrimeScript™ RT reagents Kit(Perfect Real Time, 产品编号: DRR037A)以及 SYBR® Premix Ex Taq™(Perfect Real Time, 产品编号: DRR041A)均为宝生物工程(大连)有限公司产品。

1.2 蚕体及组织的总 RNA 提取与反转录反应

按照 RNAiso Plus 试剂盒说明书分别抽提蚕体及组织样品材料的总 RNA。将各样品材料 0.1 g 放在用液氮预冷的研钵中,加入 1 mL RNAiso Plus,冰上研磨至粉末状,室温静置融化,转移至 1.5 mL 离心管中,室温静置 5 min。再加入 0.2 mL 氯仿,振荡 15 s,室温静置 5 min。4℃下 12 000 g 离心 10 min,将上清液转移至另一新的 1.5 mL 离心管中,加入等体积的异丙醇,充分混匀,室温静置 10 min,4℃下 12 000 g 离心 10 min,弃上清,用 75% 乙醇洗 1 次,4℃下 12 000 g 离心 5 min,室温吹干沉淀,加入适量的 RNase-free H₂O 溶解沉淀,用凝胶电泳检测 RNA 质量,-70℃保存备用。

采用 PrimeScript™ RT reagents Kit(Perfect Real Time)将各样品材料的总 RNA 进行反转录,获得单链 cDNA。反应体系(15 μL): 5×PrimeScript™ buffer 3 μL, RT Enzyme Mix I 0.75 μL, 2.5 μmol/L Oligo dT Primer 0.75 μL, 10 mmol/L each dNTP Mixture 1 μL, 样品总 RNA 0.5 μL (500 ng), 加 RNase Free H₂O 9 μL。反转录反应条件: 37℃ 15 min, 85℃ 5 s。

1.3 引物设计与合成

根据家蚕 *BmPDK* 基因 cDNA 序列(GenBank 登录号: NM_001114643.1),用 Primer 5.0 软件设计 RT-PCR 引物 PdkF(CCCGATGCCCATAGTGTA) 和 PdkR(TTCCCGTTGACGAGGTTA)。以家蚕 *Bmactin*-

A3 基因为内参,引物为 A3F(CGGAATCGTCACTA-ACTGG) 和 A3R(GAGTGGGTATCCCTCGTAG)。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.4 *BmPDK* 基因表达的 RT-PCR 检测

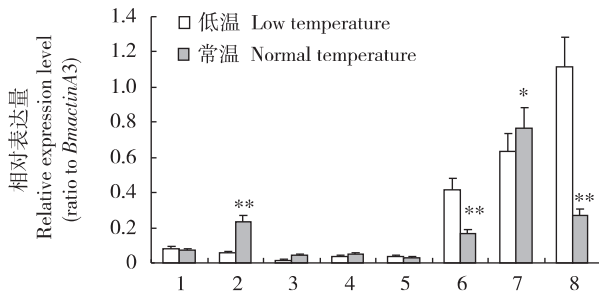
用 SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒,在 Bio-Rad Chromo 4 上按说明书进行 Real-Time PCR 反应。反应条件: 94℃ 5 s, 60℃ 10 s, 72℃ 10 s, 40 个循环。以 25℃明催青处理组为对照,对各样品 *BmPDK* 表达水平进行定量分析,每个样品做 3 次重复实验。由仪器自带 Opticon Monitor 3 软件获得 *BmPDK* 和 *BmactinA3* 基因 Real-Time PCR 反应的 *Ct* 值,以 *BmactinA3* 为参照基因,按公式 $E(\text{相对表达量}) = 2^{-(Ct_{BmPDK} - Ct_{A3})}$ 计算相对表达量,并用 SPSS 16.0 (Statistical Program for Social Sciences 16.0) 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC55695/?tool=pubmed>)分析表达差异^[21]。

2 结果与分析

2.1 胚胎期 *BmPDK* 基因的表达特性

常温(25℃,下同)催青条件下,戊₁~己₅期 *BmPDK* 的表达水平变化很大,差异显著(以己₄和己₂期为例, $F = 5.603$, $0.001 = P < 0.01$)。其中在己₄期的表达水平最高,其次是戊₂、己₃和己₅期,其它时期的表达水平极低。

常温催青和低温(15℃,下同)催青处理胚胎发育不同时期的 *BmPDK* 表达水平比较显示,催青温度对 *BmPDK* 的表达水平有显著影响。2 种催青温度处理戊₁、戊₃、己₁和己₂期 *BmPDK* 的表达水平均极低,但是戊₂期常温催青处理区 *BmPDK* 的表达水平大幅上升,极显著高于低温催青区($F = 3.726$, $0.001 = P < 0.01$),说明此时催青温度对 *BmPDK* 基因表达的调控已经开始。至己₃~己₅期,不论是常温催青还是低温催青 *BmPDK* 的表达均处于较高水平,但是低温和常温催青之间的差异显著。其中,己₃期常温催青区 *BmPDK* 的表达水平极显著低于低温催青区($F = 0.816$, $0.0004 = P < 0.01$),前者是后者的 2/5; 而己₄期则正好相反,常温催青区 *BmPDK* 的表达水平显著高于低温催青区($F = 0.837$, $0.045 = P < 0.05$),前者是后者的 1.2 倍; 己₅期常温催青区 *BmPDK* 的表达水平极显著低于低温催青区($F = 8.129$, $0.002 = P < 0.01$),前者是后者的 5/21(图 1)。



1. 戊₁ 2. 戊₂ 3. 戊₃ 4. 己₁ 5. 己₂ 6. 己₃ 7. 己₄ 8. 己₅

* 为 $P < 0.05$, 差异显著; ** 为 $P < 0.01$, 差异极显著。

图 2 ~ 5 同。

1. Full bulge stage 2. Late bulge stage 3. Shortening stage

4. Reversal stage 5. End reversal stage 6. Teachea colouring stage

7. Head pigmentation stage 8. Body pigmentation stage

* represents significant difference at $P < 0.05$ level;

** represents extremely significant difference at $P < 0.01$ level.

The same in Fig. 2 to 5.

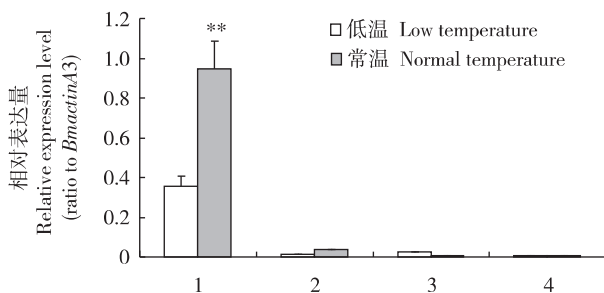
图 1 胚胎期不同催青温度下 *BmPDK* 基因表达水平比较

Fig. 1 A comparison on expression levels of *BmPDK* gene in embryonic stage under different incubation temperatures

2.2 幼虫期 *BmPDK* 基因的表达特性

2.2.1 不同时期的表达水平及催青温度的影响

1 龄 ~ 4 龄幼虫的 *BmPDK* 表达水平如图 2 所示: 常温催青区幼虫发育阶段 *BmPDK* 的表达水平变化很大, 其中 2 龄 ~ 4 龄幼虫体内 *BmPDK* 的表达水平很



1. 蚁蚕 2. 2 龄幼虫 3. 3 龄幼虫 4. 4 龄幼虫

1. Newly hatched larvae 2. The 2nd instar larvae

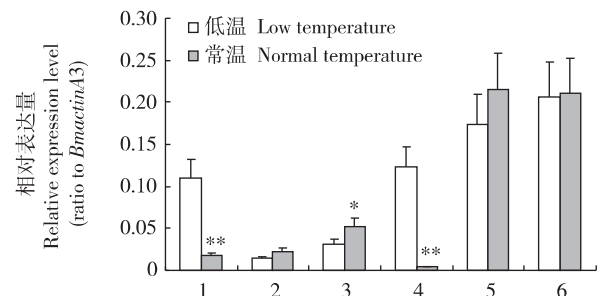
3. The 3rd instar larvae 4. The 4th instar larvae

图 2 胚胎期不同催青温度对 1 龄 ~ 4 龄幼虫 *BmPDK* 基因表达水平的影响

Fig. 2 Effect of incubation temperatures in embryonic stage on expression of *BmPDK* in larvae from newly hatched to the 4th instar

低。蚁蚕期 *BmPDK* 的表达水平极显著高于其它龄期(以蚁蚕和 3 龄幼虫为例, $F = 11.315$, $0.001 = P < 0.01$)。催青温度对 1 龄 ~ 4 龄幼虫 *BmPDK* 的表达水平也有显著影响。蚁蚕 *BmPDK* 的表达水平, 常温催青区是低温催青区的 2.7 倍, 差异显著 ($F = 8.129$, $0.019 = P < 0.05$); 2 龄 ~ 4 龄幼虫, 不论常温催青区还是低温催青区 *BmPDK* 的表达水平均很低。

2.2.2 5 龄幼虫雌雄个体不同组织的表达水平及催青温度的影响 常温催青区 5 龄幼虫精巢和卵巢中 *BmPDK* 的表达水平极显著高于血液和脂肪体组织(图 3; 以卵巢和脂肪体为例, $F = 13.109$, $0.001 = P < 0.01$)。胚胎期催青温度对 5 龄幼虫组织 *BmPDK* 基因的表达水平有影响, 且影响在雌雄个体间有差异(图 3)。2 种催青温度处理区 5 龄雌蚕血液中 *BmPDK* 基因的表达水平, 低温催青区是常温催青区的 5.5 倍, 差异极显著 ($F = 0.086$, $0.001 = P < 0.01$); 5 龄雄蚕血液中 2 种催青处理 *BmPDK* 的表达水平均很低, 且差异不显著。5 龄雌蚕脂肪体中 *BmPDK* 基因的表达水平总体较低, 常温催青区是低温催青区的 1.7 倍, 差异显著; 雄蚕脂肪体中 *BmPDK* 基因表达水平, 低温催青区是常温催青区的 31



1. 5 龄雌蚕血液 2. 5 龄雄蚕血液 3. 5 龄雌蚕脂肪体

4. 5 龄雄蚕脂肪体 5. 5 龄雌蚕卵巢 6. 5 龄雄蚕精巢

1. Hemolymph of female larvae of the 5th instar

2. Hemolymph of male larvae of the 5th instar

3. Fat body of female larvae of the 5th instar

4. Fat body of male larvae of the 5th instar

5. Ovary of female larvae of the 5th instar

6. Testis of male larvae of the 5th instar

图 3 胚胎期不同催青温度对 5 龄幼虫组织的 *BmPDK* 基因表达水平的影响

Fig. 3 Effect of incubation temperatures in embryonic stage on expression of *BmPDK* gene in larval tissues of the 5th instar

倍, 差异极显著 ($F = 8.665$, $0.003 = P < 0.01$)。5 龄幼虫卵巢和精巢组织中 *BmPDK* 的表达水平高于血液和脂肪体组织, 但卵巢和精巢之间差异不显著, 在卵巢和精巢中 2 种催青处理间的差异也不显著 (以精巢为例, $F = 0.023$, $0.888 = P > 0.05$)。

2.3 蛹期 *BmPDK* 基因的表达特性

对蛹期血液、脂肪体和生殖腺组织 *BmPDK* 基因表达的分析结果显示, 其总体表达水平很低, 明显低于其它发育时期 (图 4)。胚胎期催青温度对蛹期同一组织的 *BmPDK* 表达水平有影响, 且在雌雄个体生殖腺组织中的差异最明显。卵巢中 *BmPDK* 的表达水平, 常温催青区是低温催青区的 8.4 倍, 差异极显著 ($F = 6.019$, $0.005 = P < 0.01$); 精巢中 *BmPDK* 的表达水平, 低温催青区是常温催青区的 2.5 倍, 差异显著 ($F = 1.306$, $0.011 = P < 0.05$)。

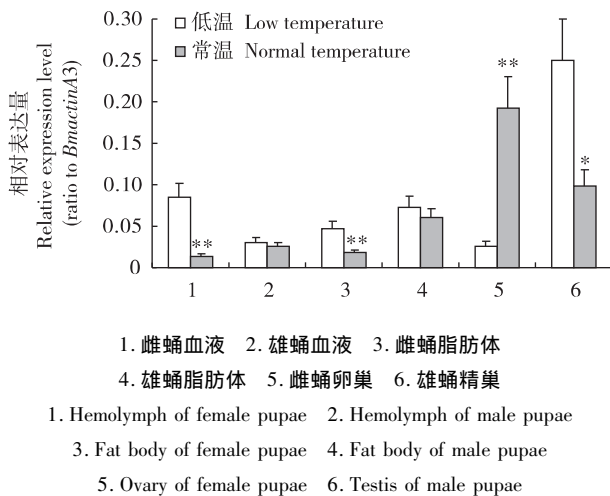


图 4 胚胎期不同催青温度对蛹期组织的 *BmPDK* 基因表达水平的影响

Fig. 4 Effect of incubation temperatures in embryonic stage on expression of *BmPDK* gene in tissues of pupa stage

2.4 成虫期 *BmPDK* 基因的表达特性

家蚕成虫期血液、脂肪体和生殖腺组织中 *BmPDK* 的表达分析结果如图 5 所示。常温催青区, 雌蛾脂肪体和卵巢中 *BmPDK* 的表达水平较高, 而在血液中的表达水平较低。胚胎期催青温度对成虫期同一组织的 *BmPDK* 表达有影响, 且影响程度在雌雄个体间有差异。雌蛾血液中 *BmPDK* 的表达水平, 常温催青区是低温催青区的 3 倍, 差异显著, 但其

它组织低; 雄蛾血液中 *BmPDK* 的表达水平很低, 2 种催青处理间差异不显著。雌蛾脂肪体中 *BmPDK* 的表达水平显著高于蛹期的脂肪体, 而且常温催青区的表达水平是低温催青区的 3.1 倍, 差异极显著 ($F = 1.947$, $0.004 = P < 0.01$); 雄蛾脂肪体中 *BmPDK* 的表达水平较低。雌蛾卵巢中 *BmPDK* 的表达水平较蛹期有显著提高, 常温催青区的表达水平是低温催青区的 5.3 倍, 差异极显著 ($F = 3.110$, $0.004 = P < 0.01$)。

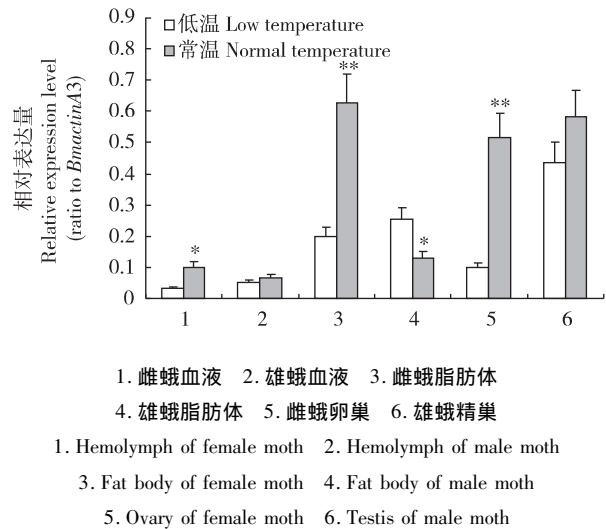


图 5 胚胎期不同催青温度对成虫期组织的 *BmPDK* 基因表达水平的影响

Fig. 5 Effect of incubation temperatures in embryonic stage on expression of *BmPDK* gene in tissues of adult stage

3 讨论

本实验对 *BmPDK* 的表达特性分析显示, 家蚕二化性品种不同发育时期 *BmPDK* 的表达水平存在差异, 而且胚胎期催青温度等对 *BmPDK* 的表达有显著影响。*BmPDK* 在胚胎发育阶段已₃、已₄、已₅期、蚁蚕期和成虫期高水平表达, 而在其它发育时期的表达量均很低, 提示 *BmPDK* 在家蚕胚胎发育末期及产卵过程中可能有重要生理功能。在胚胎发育阶段已₅期, 常温催青区 *BmPDK* 的表达量大幅下降, 而低温催青区的表达量则大幅上升。但是, 至蛹期和成虫期, 常温催青区 *BmPDK* 在卵巢中大量表达, 低温催青区 *BmPDK* 在卵巢中表达水平很低, 这与成虫期产滞育卵需要积累大量糖原的现象相吻

合。由此推测,催青条件(温度、光照)引起家蚕胚胎末期 *BmPDK* 表达水平的变化,这种信号可能传递到蛹和成虫的卵巢中,出现2种截然不同的情况:常温催青处理后,蛹和成虫卵巢中 *BmPDK* 的表达量显著提高,抑制 PDC 活性,阻止葡萄糖进入三羧酸循环,以保证糖原的合成量,促进子代形成滞育卵;而低温催青后,蛹和成虫卵巢中 *BmPDK* 的表达量极低,没有减少葡萄糖消耗的机制,以致没有原料形成足够的糖原,使子代卵缺乏进入滞育的物质基础,即促进子代形成非滞育卵。但是,家蚕 *BmPDK* 的表达水平变化是否直接影响子代卵滞育形成,还是由于催青条件诱导滞育(常温光照)或非滞育(低温黑暗)引起 *BmPDK* 基因表达水平发生变化,尚需进一步研究和证实。

参考文献 (References)

- [1] Morita A, Niimi T, Yamashita O. Physiological differentiation of DH-PBAN-producing neurosecretory cells in the silkworm embryo [J]. *J Insect Physiol* 2003 49(12): 1093–1102
- [2] Renfree M, Shaw G. Diapause [J]. *Annu Rev Physiol* 2000 62: 353–375
- [3] Denlinger D L. Regulation of diapause [J]. *Annu Rev Entomol* 2002 47: 93–122
- [4] 中国农业科学院蚕业研究所. 中国养蚕学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991: 164–171
- [5] Hasegawa K. The diapause hormone of the silkworm *Bombyx mori* [J]. *Nature* 1957 179: 1300–1301
- [6] Nakagaki M, Ryuzo T, Eiichi N, et al. Cell cycles in embryos in the silkworm *Bombyx mori*: G2 arrest at diapause stage [J]. *Dev Genes Evol* 1991 200(4): 223–229
- [7] Katagiri N, Kunio I, Okitsugu Y. Multiple gene expression up-regulated by diapause hormone in developing ovaries of the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *J Insect Biotech Sericol* 2001 70(2): 113–120
- [8] 黄君霆. 家蚕滞育分子机制的研究 [J]. *蚕业科学* 2003 29(1): 1–6
- [9] 冯家新. 蚕种繁育选集 [M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2004: 738–751
- [10] 吴大洋. 家蚕卵滞育过程中的生理代谢 [J]. *蚕学通讯* 1996 16(1): 19–22
- [11] 章扬, 裘智勇, 赵巧玲, 等. 二化性家蚕卵低温和常温催青的胚胎期蛋白质表达差异分析 [J]. *蚕业科学* 2010 36(3): 413–420
- [12] Wende A R, Huss J M, Schaeffer P J, et al. PGC-1 α co activates PDK4 gene expression via the orphan nuclear receptor ERR α : a mechanism for transcriptional control of muscle glucose metabolism [J]. *Mol Cell Biol* 2005 25(24): 10684–10694
- [13] Kim Y I, Lee F N, Choi W S, et al. Insulin regulation of skeletal muscle PDK4 mRNA expression is impaired in acute insulin resistant states [J]. *Diabetes* 2006 55(8): 2311–2317
- [14] Kwon H S, Harris R A. Mechanisms responsible for regulation of pyruvate dehydrogenase kinase 4 gene expression [J]. *Adv Enzyme Regul* 2004 44: 109–121
- [15] Tuganova A, Klyuyeva A, Popov K M. Recognition of the inner lipoyl-bearing domain of dihydrolipoyl transacetylase and of the blood glucose-lowering compound AZD7545 by pyruvate dehydrogenase kinase 2 [J]. *Biochemistry* 2007 46(29): 8592–8602
- [16] 张尧, 杨艳玲, 秦炯. 丙酮酸脱氢酶复合物缺陷与疾病 [J]. *临床儿科杂志* 2006 24(12): 956–958
- [17] Kolobova E, Tuganova A, Boulatnikov I, et al. Regulation of pyruvate dehydrogenase activity through phosphorylation at multiple sites [J]. *Biochem J* 2001 358(1): 69–77
- [18] 杨卓刚, 刘晓晴. 高等生物丙酮酸脱氢酶复合体活性调节机制 [J]. *生命的化学* 2008(3): 304–306
- [19] Patel M, Korotchkina L G. Regulation of the pyruvate dehydrogenase complex [J]. *Biochem Soc Trans* 2006 34(4): 217–222
- [20] 谭才邓. 植物丙酮酸脱氢酶系及其调节酶的研究进展 [J]. *广西轻工业* 2007(6): 7–9
- [21] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Res* 2001 29(9): e45