

2011, 37(2): 0215-0223

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滞育激素受体基因表达的影响及基因的结构特征

王力刚¹ 宋海韬¹ 黄勇^{1,2} 汪生鹏^{1,2} 唐顺明^{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 家蚕二化性品种的卵滞育与否受上代环境影响, 25℃高温明催青将产滞育卵, 而15℃低温暗催青将产非滞育卵。为探究催青温度调控二化性家蚕滞育的分子机制, 对从家蚕卵巢细胞中克隆的家蚕滞育激素受体基因(*Bmdhr*)的5种cDNA进行生物信息学分析, 结果表明*Bmdhr*基因的5种cDNA由相同的mRNA转录本通过不同的剪接方式而来, 其中*Bmdhr* mRNA-1与*Bmdhr* mRNA-2编码的氨基酸序列相同, *Bmdhr* mRNA-4编码的氨基酸序列与家蚕滞育激素BmDHR-1的序列相似性达99.2%。将家蚕二化性品种秋丰的蚕卵用蛾区半分法分成2组, 分别以15℃暗催青和25℃明催青, 利用实时荧光定量PCR分析催青温度对家蚕不同发育时期及蚕体组织中*Bmdhr*基因mRNA转录的影响。结果显示:*Bmdhr* mRNA-1主要在蛹期卵巢中表达, 在对滞育激素最敏感的化蛹后4d时, 其转录水平急速上升至峰值, 并且高温催青的转录水平高于低温催青;*Bmdhr* mRNA-4主要在各发育时期的蚕体血液中表达, 特别是在高温明催青条件下, 其在蛹期血液中的转录水平是低温暗催青的7.7倍, 说明BmDHR-4可能是决定家蚕二化性品种卵滞育与否的关键因子之一;*Bmdhr* mRNA-5在化蛹后2~3d的卵巢中转录水平高, 且低温催青的转录水平高于高温催青, 化蛹后3d其转录水平开始下降, 至化蛹后4~5d 2种催青处理间的转录水平无显著差异。研究结果为阐明家蚕滞育的分子机制积累了实验数据。

关键词 家蚕; 滞育激素受体; 序列同源性; 催青温度; 基因表达; 实时荧光定量PCR

中图分类号 S881.2; Q78 文献标识码 A 文章编号 0257-4799(2011)02-0215-09

Influence of Incubation Temperature on Expression of Diapause Hormone Receptor Genes in Bivoltine *Bombyx mori* Variety and Structural Features of the Gene

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

Abstract Diapause of bivoltine silkworm (*Bombyx mori*) eggs is influenced by the living environment of their parental generation. When bivoltine silkworm eggs (parental generation) are incubated at 25℃ in lightness, the moths will lay diapause eggs. In contrast, when the eggs are incubated at 15℃ in darkness, the moths will lay non-diapause eggs. For probing into the molecular mechanism of how incubation temperature regulates diapause in bivoltine silkworm,

收稿日期: 2010-12-08 接受日期: 2011-01-04

资助项目: 国家自然科学基金项目(No. 31072083)。

作者简介: 王力刚(1986-), 男, 河北, 硕士研究生。

E-mail: mbst0820@yahoo.com.cn

通信作者: 沈兴家, 研究员, 博士生导师。

E-mail: shenxj63@yahoo.com.cn

bioinformatic analysis was carried out on the 5 cDNAs of diapause hormone receptor gene, namely *Bmdhr* cDNA-1 to *Bmdhr* cDNA-5, which were cloned from the ovary of *B. mori*. The results showed that these 5 cDNAs of *Bmdhr* gene were from the same mRNA transcript through different splicing patterns. Among them, *Bmdhr* cDNA-1 and

Bmdhr cDNA-2 encoded the same amino acid sequence. Amino acid sequence encoded by *Bmdhr* cDNA-4 had 99.2% identity with that of BmDHR-1. Eggs of bivoltine silkworm strain Qiufeng were divided into two groups with the half-egg-batch method. One group was incubated at 15 °C in darkness and the other at 25 °C in lightness, respectively. By using real-time fluorescent quantitative PCR, the influences of incubation temperature on the transcription of *Bmdhr* mRNA were analyzed in different developmental stages and in various tissues. The results showed that: *Bmdhr* mRNA-1 was expressed mainly in ovaries of pupae and its mRNA level quickly reached the peak level at day 4 after pupation during which the pupae were most sensitive to diapause hormone, and the peak mRNA level of the group incubated at 25 °C was significantly higher than that incubated at 15 °C. *Bmdhr* mRNA-4 was expressed mainly in hemolymph of silkworm at various developmental stages. Especially, its expression level from incubation at 25 °C in lightness was 7.7 times to that at 15 °C in darkness, implying that BmDHR-4 might be a key factor determining whether the next generation eggs fall into diapause. Expression level of *Bmdhr* mRNA-5 was high in ovaries of pupae at 2~3 d after pupation, and its mRNA level in the group incubated at 15 °C was higher than that incubated at 25 °C. Yet from 3 d the expression of *Bmdhr* mRNA-5 was reduced and up to 4~5 d there was no significant difference between the two groups. These results provide experimental data for elucidating the molecular mechanism of silkworm diapause.

Key words *Bombyx mori*; Diapause hormone receptor; Sequence homology; Incubation temperature; Gene expression; Real-time fluorescent quantitative PCR

昆虫发育过程中,通过某种环境因子刺激亲代能够使子代适应已经或即将发生的环境变化^[1]。滞育是其中最典型的一种受遗传和环境影响的生理特性,昆虫滞育的类型较多,其中胚胎滞育是比较典型的滞育方式^[2-4]。对昆虫滞育机制的研究有利于经济昆虫的开发利用和农林害虫的防治,因此,昆虫滞育的相关研究一直受到国内外研究者的广泛关注,而家蚕(*Bombyx mori*)则是研究滞育生理的重要模式昆虫。

家蚕是一种卵滞育型昆虫,其滞育发生在胚胎发育早期,受遗传性和环境的调控^[5-7]。在环境调控方面,二化性家蚕品种催青期不同的温度和光照节律会影响次代卵是否发生滞育,25 °C 高温明催青将产滞育卵,而 15 °C 低温暗催青将产非滞育卵^[5,8-10]。已有研究表明,家蚕二化性品种蚕卵 25 °C 明催青,孵化幼虫发育至蛹期 3.5 d 时,咽下神经节(SG)细胞大量分泌滞育激素(DH),并释放到血液,最终作用于卵巢中的卵母细胞^[3,11],导致次代蚕卵胚胎滞育^[12-16];而 15 °C 暗催青的个体发育到蛹期时 SG 分泌的 DH 比较少,血液中的 DH 水平在化蛹后呈下降趋势,其成虫产非滞育卵^[10,12,17-18]。大量的滞育激素与卵巢细胞中的滞育激素受体(BmDHR)结合,启动一系列基因的表达,如通过鸟苷酸环化酶使 cGMP 合成受阻,导致卵细胞膜上的海藻糖酶活性提高等,导致次代卵滞育^[17,19-22]。但是,环境因素影响家蚕滞育的分子机制尚未完

全明确。

Homma 等^[6]发现家蚕滞育激素受体基因(*Bmdhr*)在卵巢中表达。卵巢细胞内的滞育激素受体是滞育信号传导过程中的信号接受器,家蚕是否滞育决定于滞育激素能否成功地将滞育信号传递给滞育激素受体。因此,本实验对 *Bmdhr* 基因 5 种 cDNA 序列进行生物信息学分析,同时利用实时荧光定量 PCR 方法,分析家蚕二化性品种秋丰的蚕卵分别以 15 °C 低温暗催青和 25 °C 高温明催青后,各发育时期蚕体组织中 *Bmdhr* 基因 5 种 mRNA 的转录水平,探讨环境因素对家蚕滞育激素受体基因表达的影响,为研究家蚕滞育的分子机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料及主要试剂

供试家蚕二化性品种秋丰由本实验室保存,供试蚕卵为滞育活化卵。

主要试剂 RNAiso Plus、PrimeScript™ RT reagents Kit(Perfect Real Time)以及 SYBR® Premix Ex Taq™(Perfect Real Time)均为宝生物工程(大连)有限公司产品。

1.2 家蚕组织的获取及总 RNA 的提取

将已解除滞育的越年蚕卵每个卵圈一分为二(蛾区半分法),其中一份进行 15 °C 暗催青处理,另一份继续 4 °C 冷藏 20 d 后 25 °C 明催青处理。蚕卵孵化当日上午收集部分蚁蚕,用于总 RNA 提取。另

外,分别饲养对应的3个卵圈(各1/2圈)经2种不同催青处理的蚁蚕,于2~4龄期依据斑纹将雌雄分开,分别收集起蚕3~5头,作为蚕体材料;解剖5龄第3天幼虫、化蛹后1~5 d的蛹及羽化当日的成虫获取卵巢、血液和脂肪体。按RNAiso Plus说明书提取各发育时期蚕体和组织的总RNA,用1%琼脂糖凝胶电泳检测质量,测定 $D(260\text{ nm})/D(280\text{ nm})$ 值,−70℃保存备用。

1.3 *Bmdhr* 基因的生物信息学分析

从美国国家生物技术信息中心(NCBI)下载家蚕滞育激素受体基因*Bmdhr*的5个mRNA序列*Bmdhr* mRNA-1~*Bmdhr* mRNA-5(GenBank登录号:

AB164386~AB164390)。在家蚕基因组数据库(<http://sgp.dna.affrc.go.jp/KAIKObase/>)进行基因组精细图比对,使用DNASTAR(Lasergene)软件进行ORF(open reading frame)分析并将其推导为相应的氨基酸序列;跨膜区用TMHMM service v.2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)程序搜寻。

1.4 *Bmdhr* 基因的表达分析

1.4.1 PCR引物设计与合成 根据家蚕滞育激素受体基因*Bmdhr* mRNA-1、*Bmdhr* mRNA-3~*Bmdhr* mRNA-5的序列,并以*BmactinA3*为内参基因,设计5对特异性实时荧光定量PCR引物(表1),委托上海生工生物工程技术有限公司合成。

表1 家蚕滞育激素受体基因*Bmdhr*的实时荧光定量PCR引物序列

Table 1 Primer sequences of *Bombyx mori* diapause hormone receptor gene (*Bmdhr*) for real-time fluorescent quantitative PCR

引物 Primer	序列(5′-3′) Sequence (5′-3′)	目标 cDNA Target cDNA	T_m 值 / °C T_m value	产物长度 / bp Product length
1f	TGTTCTTGACTTACATCTCCG	<i>Bmdhr</i> cRNA-1, <i>Bmdhr</i> cRNA-2	60	146
1r	CTTGACGGCGGTATCATTGC		62	
3f	TCATCAAAATGTTGGATGAC	<i>Bmdhr</i> cRNA-3	54	152
3r	AGGTTAGTCTCGTTTCTGAT		56	
4f	ATGTTGGACGATTGTTTCA	<i>Bmdhr</i> cRNA-4	54	146
4r	TTTCTGATCGAGTTGCCTGA		58	
5f	GCCCAAAGAAATAGCTTACA	<i>Bmdhr</i> cRNA-5	56	157
5r	AGGGCGGTATGTACTTTCTA		58	
A3f	ATGGGACAGAAGGACTCGTA	<i>BmactinA3</i>	60	154
A3r	GACACGCAGCTCATTTGTA		60	

1.4.2 反转录PCR 用PrimeScript™ RT reagents Kit(Perfect Real Time)将各发育时期蚕体和组织总RNA进行反转录,获得单链cDNA。以稀释5倍的cDNA为模板,采用表1中的各对引物分别进行PCR扩增,反应条件如下:95℃ 3 min;95℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 45 s,共30个循环;72℃ 5 min。以1.5%琼脂糖凝胶电泳检测产物,并委托上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.4.3 实时荧光定量PCR 使用SYBR® Premix Ex Taq™(Perfect Real Time)试剂盒,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℃明催青组为对照,对*Bmdhr*基因5种mRNA进行定量分析,每个样品做3次重复实验。由荧光定量PCR仪Chromo 4(BIO-RAD)自带Opticon Monitor 3软件获得*Bmdhr*

和*BmactinA3*基因Real-Time PCR反应的临界循环数(*Ct*)值,以*BmactinA3*为参照基因,按公式 $E(\text{相对表达量}) = 2^{-(Ct_{Bmdhr} - Ct_{A3})}$ 计算相对表达量,并用SPSS 16.0(Statistical Program for Social Sciences 16.0)软件分析表达差异^[23]。

2 结果与分析

2.1 *Bmdhr* 基因序列分析

将*Bmdhr*基因的cDNA-1序列与家蚕基因组精细图进行比对,结果显示*Bmdhr* mRNA-1位于家蚕12号染色体(Scaffold: Bm_scaf84),全长约33.79 kb,包含7个外显子和6个内含子(图1)。将*Bmdhr* cDNA-2、cDNA-3、cDNA-4、cDNA-5的序列与家蚕基因组精细图进行比对,结果显示4种cDNA对应的mRNA均与*Bmdhr* mRNA-1位于基因组中的相同位置,由同一

种转录本 mRNA 以不同方式剪接而来。*Bmdhr* mRNA-2 与 *Bmdhr* mRNA-1 相比,剪切了第 6 外显子 447 bp 末尾的部分和第 7 外显子;*Bmdhr* mRNA-3 与 *Bmdhr* mRNA-1 相比,剪切了第 3 外显子;*Bmdhr* mRNA-4 也不含第 3 外显子,与 *Bmdhr* mRNA-3 不同的是没

有剪切掉第 3 内含子(GU-AG 型)末端的 14 bp 序列,使第 4 外显子增加了 14 bp,但是这个缺少 14 bp 的“内含子”也属于 GU-AG 型内含子;*Bmdhr* mRNA-5 包含第 1 外显子、第 2 外显子和第 2 内含子、第 3 外显子、第 3 内含子前端的 140 bp 序列。

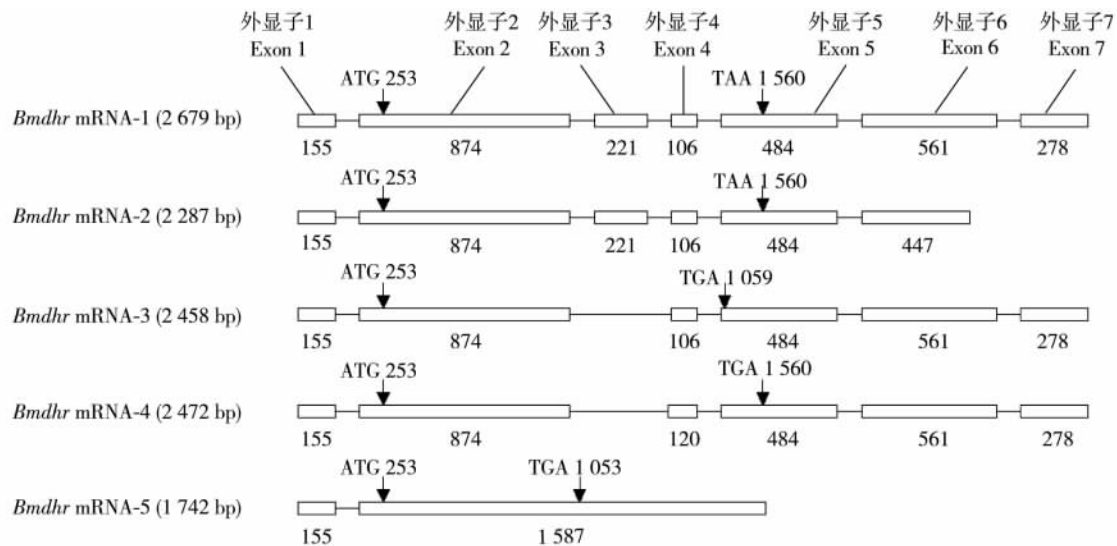


图 1 家蚕滞育激素受体基因 *Bmdhr* 5 种 mRNA 的序列结构特征

Fig. 1 Structural features of 5 mRNAs of *Bombyx mori* diapause hormone receptor gene (*Bmdhr*)

对 *Bmdhr* 基因的 5 个 ORF 分析表明,它们的 5'-UTR 相同,起始密码子位于 253 ~ 255 bp,处于第 2 外显子区域。*Bmdhr* mRNA-1 的 ORF 全长 1 311 bp,编码 436 个氨基酸的多肽,这与文献 [5] 的研究结果一致;*Bmdhr* mRNA-2 与 *Bmdhr* mRNA-1 的 ORF 有 1 个碱基的差别,但是二者编码的氨基酸序列相同,因此认为二者编码同一滞育激素受体 BmDHR-1;*Bmdhr* mRNA-3 的 ORF 全长 810 bp,编码 269 个氨基酸;*Bmdhr* mRNA-4 的 ORF 全长 1 104 bp,编码 367 个氨基酸;*Bmdhr* mRNA-5 的 ORF 全长 804 bp,编码 267 个氨基酸。将由基因的各 ORF 序列推导的氨基酸序列进行比对,BmDHR-3、BmDHR-4、BmDHR-5 与 BmDHR-1 的相似度分别为 96.3%、99.2%、97.0%,其中比较特殊的是,BmDHR-4 与 BmDHR-1 的 C 末端氨基酸序列完全相同。

跨膜区域分析显示,BmDHR-1 含有 7 个跨膜区域,其余 3 个滞育激素受体(BmDHR-3、BmDHR-4 和 BmDHR-5) 分别含 5 个跨膜区域。

2.2 *Bmdhr* 基因在幼虫期的表达分析

在蚁蚕至 4 龄幼虫期间,不论是高温催青还是低温催青,蚕体中 *Bmdhr* 基因 5 种 mRNA 表达量都较低(数据未列出),不同发育时期之间的表达差异很小(以低温催青组为例, $F = 0.330$, $P = 0.596 > 0.05$),且高温催青和低温催青无显著差异(以 4 龄幼虫中 *Bmdhr* mRNA-1 的表达为例, $F = 0.133$, $P = 0.734 > 0.05$)。

在 5 龄幼虫期的卵巢、脂肪体和血液中,2 个催青处理组间 *Bmdhr* mRNA-1、*Bmdhr* mRNA-3 和 *Bmdhr* mRNA-5 的表达无显著差异,以 *Bmdhr* mRNA-1 在 2 个催青处理组的 5 龄幼虫卵巢中的表达差异为例, $F = 0.107$, $P = 0.761 > 0.05$; *Bmdhr* mRNA-4 在卵巢和脂肪体中的表达量较低,高温催青组和低温催青组的差异显著,以该 mRNA 在 2 个催青处理组卵巢中的表达差异为例, $F = 8.489$, $P = 0.044 < 0.05$,而该 mRNA 在血液中表达量较高(图 2),并且高温催青组是低温催青组的 7.8 倍($F = 41.28$, $P = 0.003 < 0.01$)。

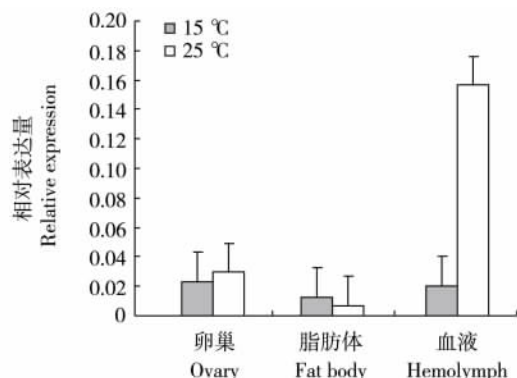


图2 不同温度催青后 *Bmdhr* mRNA-4 在5龄幼虫期家蚕不同组织中的表达水平

Fig. 2 Expression levels of *Bmdhr* mRNA-4 in various tissues of the 5th instar *Bombyx mori* larvae after incubation at different temperatures

2.3 *Bmdhr* 基因在蛹期的表达分析

化蛹后2 d, *Bmdhr* mRNA-1 在卵巢中的表达量较高,且低温催青组的表达量是高温催青组的4.2倍,差异达极显著水平($F = 252.329, P = 0.00009 < 0.01$);在脂肪体和血液中, *Bmdhr* mRNA-1 的表达量较低(图3)。说明 *Bmdhr* mRNA-1 主要在蛹期卵巢中表达,且受催青温度的影响,低温催青的表达量高于高温催青。

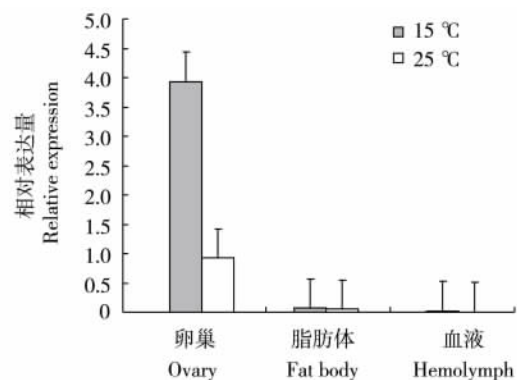


图3 不同温度催青后 *Bmdhr* mRNA-1 在化蛹后2 d家蚕不同组织的表达水平

Fig. 3 Expression levels of *Bmdhr* mRNA-1 in various pupal tissues at 2 d of pupation after incubation at different temperatures

Bmdhr mRNA-3 在高温和低温催青条件下的表达量均处于较低水平,2种处理间差异很小,以该 mRNA 在2个催青处理组蛹期卵巢中的表达差异为

例, $F = 2.323, P = 0.202 > 0.05$ 。 *BmDHR-3* 表达几乎不受催青温度影响,说明其在催青温度调控二化性家蚕品种滞育发生过程中不起主要作用。

Bmdhr mRNA-4 在蛹期卵巢和脂肪体中的表达量均较低,且高温催青组和低温催青组差异显著,以该 mRNA 在2个催青处理组蛹期卵巢中的表达差异为例, $F = 8.531, P = 0.043 < 0.05$; 但该 mRNA 在包括蛹期在内的3个发育时期蚕体血液中的表达量较高,且在蛹期高温催青组是低温催青组的7.7倍($F = 21.243, P = 0.001 < 0.01$),高温催青和低温催青处理组间的差异极显著(图4)。说明 *Bmdhr* mRNA-4 主要在血液中表达,并受催青温度调节,高温催青后的表达量较高。

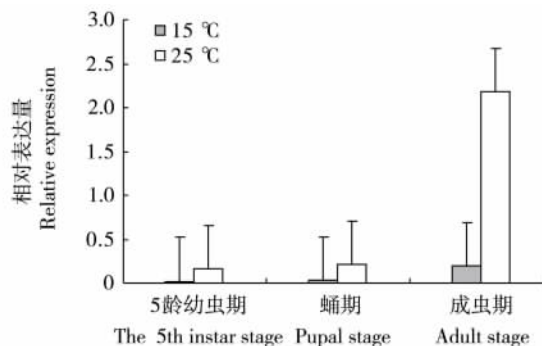


图4 不同温度催青后 *Bmdhr* mRNA-4 在5龄幼虫、蛹和雌蛾血液的表达水平

Fig. 4 Expression levels of *Bmdhr* mRNA-4 in hemolymph of 5th instar larvae, pupae and female adult after incubation at different temperatures

Bmdhr mRNA-5 在蛹期卵巢中的表达量较高,且低温催青组是高温催青组的4.15倍,差异达极显著水平($F = 130.179, P = 0.0003 < 0.01$);在脂肪体和血液中表达量较低,且2个催青处理组间差异很小,以该 mRNA 在2个催青处理组蛹体血液中的表达差异为例, $F = 4.285, P = 0.107 > 0.05$ (图5)。说明 *Bmdhr* mRNA-5 主要在蛹期卵巢中表达,且低温催青组的表达水平比高温催青组高。

在5龄幼虫期、蛹期至成虫的发育阶段,2种催青条件下家蚕卵巢和血液中 *Bmdhr* mRNA-1 和 *Bm-dhr* mRNA-5 的表达量均表现出在蛹期升至峰值,然后下降的特点。因此,进一步分析化蛹后1~5 d *Bmdhr* mRNA-1 和 *Bmdhr* mRNA-5 在卵巢和血液中的表达水平。

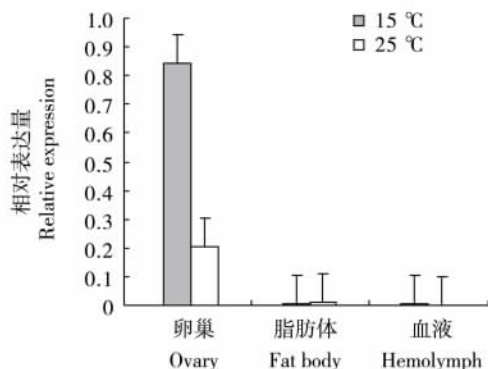


图5 不同温度催青后 *Bmdhr* mRNA-5 在化蛹后 2 d 家蚕不同组织的表达水平

Fig. 5 Expression levels of *Bmdhr* mRNA-5 in various tissues of pupae at 2 d after pupation after incubation at different temperatures

从图 6 可见: 在化蛹后 1 d 的卵巢中 *Bmdhr* mRNA-1 的表达量很低, 低温催青和高温催青处理无显著差异 ($F = 0.160, P = 0.709 > 0.05$); 在化蛹后 2 d 的卵巢中 *Bmdhr* mRNA-1 表达量快速上升, 至蛹期 4 d 达到高峰, 蛹期 5 d 又迅速下降, 其中在蛹期 2 d 和 3 d 的卵巢中, *Bmdhr* mRNA-1 的表达量低温催青处理组约是高温催青处理组的 4 倍, 差异极显著, 以化蛹后 3 d 该 mRNA 在 2 个催青处理组蛹体卵巢中的表达差异为例, $F = 711.004, P = 0.00001 < 0.01$; 至蛹期 4 d 时, 该 mRNA 在卵巢中的表达水平却是高温催青组高于低温催青组, 且差异显著 ($F = 9.221, P = 0.039 < 0.05$); 化

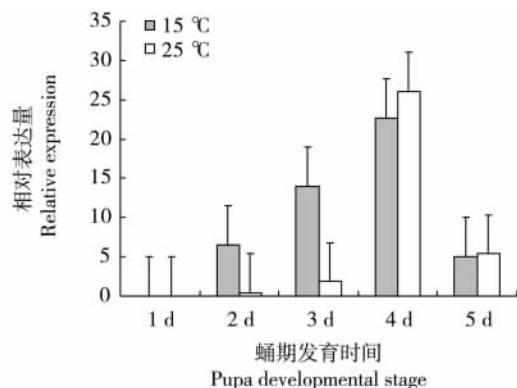


图6 不同温度催青后 *Bmdhr* mRNA-1 在蛹期卵巢中的表达水平

Fig. 6 Expression levels of *Bmdhr* mRNA-1 in pupal ovaries after incubation at different temperatures

蛹后 5 d, 该 mRNA 在卵巢中的表达水平在低温催青组和高温催青组之间无显著差异 ($F = 0.413, P = 0.555 > 0.05$)。

从图 7 可见: 在化蛹后 1 d 的蛹体血液中, *Bmdhr* mRNA-1 的表达量在低温催青和高温催青 2 个处理组均很低; 化蛹后 2 d, *Bmdhr* mRNA-1 的表达量在低温催青组快速上升, 至蛹期 3 d 时达到高峰, 而在高温催青组的表达量还是很低, 2 个催青处理组间差异显著 (以化蛹后 2 d 该 mRNA 在 2 个催青处理组蛹体血液中的表达差异为例, $F = 12.686, P = 0.024 < 0.05$), 而化蛹后 4 d, 该 mRNA 在 2 个催青处理组蛹体血液中的表达差异不显著 ($F = 4.328, P = 0.106 > 0.05$)。

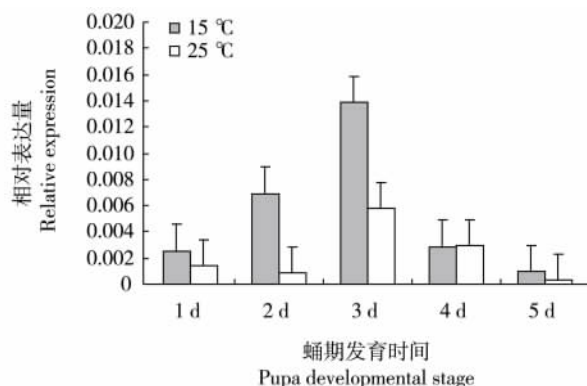


图7 不同温度催青后 *Bmdhr* mRNA-1 在蛹期血液中的表达水平

Fig. 7 Expression levels of *Bmdhr* mRNA-1 in pupal hemolymph after incubation at different temperatures

Bmdhr mRNA-5 在蛹期卵巢中的表达量高, 在血液中的表达量低。从图 8 可见: 化蛹后 1、2、3 d, 卵巢中 *Bmdhr* mRNA-5 在低温催青组的表达量分别是高温催青组的 2.8 倍、1.8 倍和 2.0 倍, 差异极显著, 以化蛹后 3 d 该 mRNA 在 2 个催青处理组蛹体卵巢中的表达差异为例, $F = 28.714, P = 0.006 < 0.01$; 而 2 个催青处理组在化蛹后 3 d 开始, 该 mRNA 表达水平下降, 其中低温催青组呈持续下降趋势, 而高温催青组在化蛹后 4 d 时表达量出现回升。在化蛹后 4 d 和 5 d 的蛹体卵巢中表达量无显著差异, 以化蛹后 4 d 该 mRNA 在 2 个催青处理组蛹体卵巢中的表达差异为例, $F = 3.396, P = 0.139 > 0.05$ 。

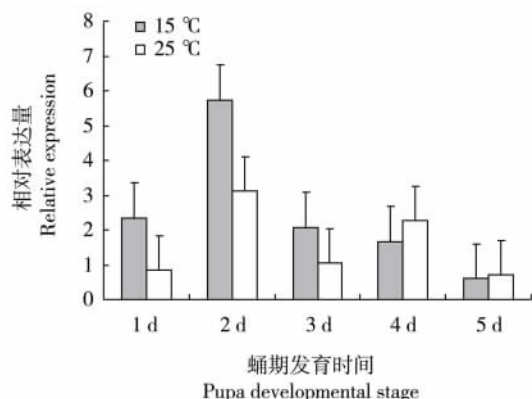


图8 不同温度催青后 *Bmdhr* mRNA-5 在蛹期卵巢中的表达水平

Fig. 8 Expression levels of *Bmdhr* mRNA-5 in pupal ovaries after incubation at different temperatures

从图9可见: 化蛹后2 d, 蛹体血液中 *Bmdhr* mRNA-5 的表达量低温催青组比高温催青组高, 但差异不显著; 化蛹后3 d, 血液中 *Bmdhr* mRNA-5 的表达量达到峰值, 且低温催青组比高温催青组的表达量低, 差异显著 ($F = 13.309, P = 0.022 < 0.05$); 化蛹后4 d, 血液中 *Bmdhr* mRNA-5 的表达量下降至很低水平, 且处理间无显著差异。说明 BmDHR-5 主要在化蛹后1~4 d的卵巢中表达, 并受催青温度调节。

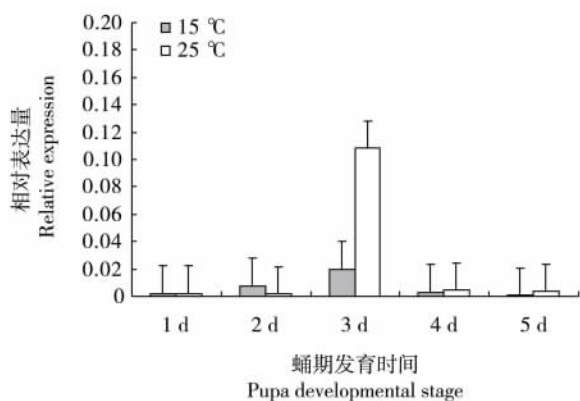


图9 不同温度催青后 *Bmdhr* mRNA-5 在蛹期血液中的表达水平

Fig. 9 Expression levels of *Bmdhr* mRNA-5 in pupal hemolymph after incubation at different temperatures

2.4 *Bmdhr* 基因在成虫期的表达分析

Bmdhr mRNA-1 在高温催青和低温催青2个处理组的成虫卵巢、脂肪体和血液中的表达量都较低, 且差异不显著, 以该 mRNA 在2个催青处理组成虫卵巢中的表达差异为例, $F = 0.104, P = 0.763 > 0.05$ 。 *Bmdhr* mRNA-3 在成虫组织的表达量处于较低水平, 2种催青处理间的差异很小。 *Bmdhr* mRNA-4 在成虫卵巢和脂肪体中的表达量较低, 且无显著差异, 在高温催青组成虫血液中的表达量是低温催青组的11.5倍 ($F = 25.803, P = 0.007 < 0.01$) (图4)。 *Bmdhr* mRNA-5 在高温催青和低温催青2个处理组雌蛾3种组织中的表达水平都较低, 且2个催青处理组间无显著差异, 以在成虫卵巢中的表达为例, $F = 0.703, P = 0.449 > 0.05$ 。

3 讨论

RNA 剪接是从 DNA 模板链转录出的最初转录产物中除去内含子, 并将外显子连接起来形成一个连续的 RNA 分子的过程。在 *Bmdhr* 基因表达的过程中, 5种 *Bmdhr* mRNA 是同一转录本的不同剪接方式的结果。其中, *Bmdhr* mRNA-3 与 *Bmdhr* mRNA-4 的序列仅有14 bp的差别, 而且 *Bmdhr* mRNA-4 的剪接方式比较特殊, 在第3内含子末端内部发生剪接, 使第4外显子上游增加了14 bp, 使得其开放阅读框移码, 即 BmDHR-4 的 C 末端氨基酸序列与 BmDHR-1 完全一致, 推测其与 BmDHR-1 在蛋白功能上有一定的相似之处。

本实验中 Real-time PCR 检测的结果显示: *Bmdhr* 基因在家蚕幼虫期的表达量都较低, 且高温和低温催青之间无显著差异; 蛹期 *Bmdhr* 则开始大量表达, 2个催青处理组之间出现显著差异, 说明 *Bmdhr* 基因不在幼虫期发挥作用, 这与在蛹期卵巢细胞对大量表达的滞育激素最敏感的结论^[24]相一致。

在家蚕卵母细胞中, BmDHR-1 是 G 蛋白偶联受体, 能够特异性识别滞育激素, 偶联 Gq 蛋白, 通过钙离子和蛋白激酶 C 参与激活下游滞育信号^[6]。在蛹期不同时期, 分别对产非滞育卵的蛹和在化蛹时摘除 SG 的产滞育卵的蛹注射滞育激素, 发现中期蛹的卵巢对外源滞育激素最敏感^[24]。高温催青组蛹的卵巢中, *Bmdhr* mRNA-1 的表达量在化蛹后2 d达到高峰, 而低温催青组则在第3天达到高峰^[6,25]。

本实验经 Real-time PCR 检测, *Bmdhr* mRNA-4 主要在蛹期卵巢中表达, 在蛹期 2 d 和 3 d 的表达水平低, 且低温催青组高于高温催青组; 但发育至对滞育激素最敏感的蛹期 4 d 时, 该基因的表达水平急速上升至最高, 且高温催青组显著高于低温催青组, 这与蛹期 3.5 d 时 SG 分泌大量滞育激素作用于卵巢中的卵母细胞的结论^[5,12]一致。

Bmdhr mRNA-4 主要在蛹期血液中表达, 且高温催青组的表达量高于低温催青组, 而在卵巢中表达量很低, 表明 BmDHR-4 的表达受催青温度调节, 主要在血液中与 DH 发生作用。Kitagawa 等^[17]发现高温催青组二化性家蚕品种蛹期血液中的 DH 水平较高, 而低温催青组则较低, 并认为 DH 分泌到血液中的速度是滞育是否发动的关键因素。DH 与滞育激素受体结合后, 海藻糖酶活性提高, 使血液中的海藻糖分解成葡萄糖, 葡萄糖进入卵母细胞进一步合成糖元, 最后在滞育卵中转化为山梨醇和甘油^[26]。本实验中, *Bmdhr* mRNA-4 在 2 个催青处理组蛹期血液中的表达差异与 DH 在血液中的水平差异相似, 推测 BmDHR-4 具有促进家蚕二化性品种卵滞育发生的作用, 可能是催青温度调控二化性家蚕是否产滞育卵的关键因子之一。

Bmdhr mRNA-5 主要在蛹期卵巢中表达, 且受催青温度的影响。该 mRNA 在 2 个催青处理组蛹期 2 d 蛹体卵巢中的表达水平达到峰值, 且低温催青组的表达量高于高温催青组; 而在对 DH 最敏感的蛹期 4 d 开始, 该 mRNA 在蛹体卵巢中的表达水平下降, 其中低温催青组呈持续下降趋势, 但高温催青组在蛹期 4 d 时该 mRNA 的表达量出现回升。是否由于高温催青组在蛹期 4 d 时 BmDHR-5 表达量的升高决定其所产子代蚕卵为滞育, 还是由于低温催青组蛹期 1~3 d BmDHR-5 的表达量高, 并与滞育激素结合减少了 BmDHR-4 与滞育激素结合的机会, 从而产生非滞育卵, 这些都有待于进一步的实验研究。

在成虫期, *Bmdhr* mRNA-4 在血液中表达量较高, 原因尚未清楚; 其余 3 种 *Bmdhr* mRNA 在各组织中的表达量都较低, 且 2 个催青处理组间无显著差异。

本研究比较了家蚕二化性品种秋丰在高温和低温催青条件下, 家蚕滞育激素受体基因的表达谱, 为阐明家蚕滞育的分子机制积累了新的实验数据。

参考文献 (References)

- [1] Mousseau T, Fox C. The adaptive significance of maternal effects [J]. Trends Ecol Evol, 1998, 13(10) : 403 - 407
- [2] Renfree M B, 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] 徐卫华. 昆虫滞育的研究进展 [J]. 昆虫学报, 1999, 42(1) : 100 - 107
- [5] Fukuda S. Function of the pupal brain and subesophageal ganglion in the production of non-diapause and diapause eggs in the silkworm [J]. Annot Zool Jap, 1952, 25(1) : 149 - 155
- [6] Homma T, Watanabe K, Tsurumaru S, et al. G protein-coupled receptor for diapause hormone, an inducer of *Bombyx* embryonic diapause [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 344(1) : 386 - 393
- [7] Hasegawa K. The diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori* [J]. Nature, 1957, 179(4573) : 1300 - 1301
- [8] 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
- [9] Fukuda S. The production of the diapause eggs by transplanting the subesophageal ganglion in the silkworm [J]. Proc Japan Acad, 1951, 27: 672 - 677
- [10] Kitagawa N, Shiomi K, Imai K, et al. Diapause hormone levels in subesophageal ganglia of uni-, bi- and poly-voltine races during pupal-adult development of *Bombyx mori*, and the effects of ouabain, an inhibitor of $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase, on the hormone levels [J]. J Insect Biotechnol Sericol, 2005, 74(2) : 57 - 62
- [11] Xu W, Sato Y, Ikeda M, et al. Stage-dependent and temperature-controlled expression of the gene encoding the precursor protein of diapause hormone and pheromone biosynthesis activating neuropeptide in the silkworm, *Bombyx mori* [J]. J Biol Chem, 1995, 270(8) : 3804 - 3808
- [12] Yamashita O. Diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*: structure, gene expression and function [J]. J Insect Physiol, 1996, 42(7) : 669 - 679
- [13] Ikeda M, Su Z, Saito H, et al. Induction of embryonic diapause and stimulation of ovary trehalase activity in the silkworm, *Bombyx mori*, by synthetic diapause hormone [J]. J Insect Physiol, 1993, 39(10) : 889 - 895
- [14] Katagiri N, Imai K, Yamashita O. Multiple gene expression up-regulated by diapause hormone in developing ovaries of the silkworm, *Bombyx mori* [J]. J Insect Biotechnol Sericol, 2001, 72(2) : 113 - 120
- [15] Su Z, Ikeda M, Sato Y, et al. Molecular characterization of ovary trehalase of the silkworm, *Bombyx mori* and its transcriptional acti-

- vation by diapause hormone [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1994, 1218(3): 366–374
- [16] Yamashita O, Hasegawa K, Seki M. Effect of the diapause hormone on trehalase activity in pupal ovaries of the silkworm, *Bombyx mori* L. [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1972, 18(3): 515–523
- [17] Kitagawa N, Shiomi K, Imai K, et al. Establishment of a sandwich ELISA system to detect diapause hormone, and developmental profile of hormone levels in egg and subesophageal ganglion of the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Zoolog Sci*, 2005, 22(2): 213–221
- [18] 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
- [19] Sato Y, Shiomi K, Saito H, et al. Phe-X-Pro-Arg-Leu-NH₂ peptide producing cells in the central nervous system of the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *J Insect Physiol*, 1998, 44(3/4): 333–342
- [20] Shiomi K, Kajiura Z, Nakagaki M, et al. Baculovirus-mediated efficient gene transfer into the central nervous system of the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *J Insect Biotechnol Sericol*, 2003, 72(3): 149–155
- [21] Sato Y, Nakazawa Y, Menjo N, et al. A new diapause hormone molecule of the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Proc Jpn Acad Ser B*, 1992, 68(5): 75–79
- [22] Shimizu I, Aoki S, Ichikawa T. Neuroendocrine control of diapause hormone secretion in the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *J Insect Physiol*, 1997, 43(12): 1101–1109
- [23] Pfaffl M. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J/OL]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(9): e45. (2010–05–01) [2010–12–07]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC55695/?tool=pubmed>
- [24] Yamashita O, Hasegawa K. Oöcyte age sensitive to the diapause hormone from the standpoint of glycogen synthesis in the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *J Insect Physiol*, 1970, 16(12): 2377–2383
- [25] 顾燕燕, 华荣胜, 周耐明, 等. 家蚕滞育激素受体基因 (*Bm-DHR*) 的分子克隆及定量分析 [J]. *蚕业科学*, 2008, 34(3): 417–423
- [26] Yamashita O, Yaginuma T. *Insects at low temperature* [M]. New York: Chapman and Hall, 1991: 424–445

诚征蚕丝学专业广告

《蚕业科学》是由中国科学技术协会主管, 中国蚕学会和中国农业科学院蚕业研究所主办的蚕丝学专业唯一的学术性期刊。20世纪90年代本刊即被美国《化学文摘》(CA) 收录, 近几年又先后作为中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)、《中国学术期刊综合评价数据库》、北京图书馆《中文核心期刊要目总览》、《中国农业核心期刊》等中、外重要检索刊物及数据库的入选期刊, 2006年又入选中国农业核心期刊。目前, 期刊的发行已遍及除西藏外, 包括台湾省在内的全国31个省(市)、自治区, 并与日本、法国、美国、巴西、印度、韩国以及东南亚等25个国家和地区的有关部门建立了期刊交换关系。2002、2004年, 本刊分别获第三届、第四届全国农业优秀期刊一等奖; 2007年获江苏省科技类期刊封面设计一等奖和编校质量三等奖。

本刊是内容丰富、信息量大、可读性强的专业学术期刊, 主要读者群为从事蚕丝业的科研人员、大专院校师生、生产技术人员和管理人员。在过去的10余年, 本刊以严谨的态度、诚实的信誉, 赢得了蚕业界广大读者的厚爱, 与蚕业界的科研院所及知名企事业单位建立了良好的长期合作关系。

《蚕业科学》设有广告专版。基于《蚕业科学》作为专业学术期刊的权威性, 以及期刊拥有广泛读者群的优势, 我们诚邀蚕业界的企事业单位在本刊刊登广告, 发布产品、技术和信息服务信息。我们将会以热忱、周到的服务为贵单位塑造优秀的文化及产品形象, 共同促进蚕业新产品、新技术的推广应用。

本刊除彩色封2、3、4外, 还有精美彩色与黑白插页供刊登广告选择。需要刊登广告的客户可电话联系我们, 洽商确定版位及价格以后, 我们将与您签定正式的刊登合同。

编辑部地址: 江苏省镇江市四摆渡中国农业科学院蚕业研究所

邮编: 212018 电话(传真): 0511-85616835

E-mail: CYKE@chinajournal.net.cn; canyekexue@126.com QQ: 849229965