

家蚕、野桑蚕海藻糖酶基因启动子的特性 及其滞育激素的转录调节

沈兴家 唐顺明 易咏竹 赵巧玲 张志芳 李奕仁 何家禄

(农业部家蚕生物技术重点开放实验室, 中国农业科学院蚕业研究所, 镇江 212018)

摘要 以 pGEM-3Z 为载体, 分别构建了家蚕 (*Bombyx mori*) 和野桑蚕 (*Bombyx mandarina*) 海藻糖酶基因启动子控制的荧光素酶基因报告质粒, 利用昆虫细胞瞬时表达系统进行启动子特性分析, 并就家蚕滞育激素对海藻糖酶基因启动子转录活性的调节作用进行了研究。结果表明: 家蚕和野桑蚕海藻糖酶基因启动子在家蚕 Bm5 细胞、Sf21 细胞中都有转录活性, 但是活性都很低; 家蚕滞育激素在体外条件下对家蚕海藻糖酶基因启动子活性的调节有明显的剂量效应, 13~33 nmol/L 时有明显的增强作用, 由此推测来自家蚕卵巢的 Bm5 细胞可能存在与滞育激素作用的受体。

关键词 家蚕 野桑蚕 海藻糖酶基因 启动子 滞育激素

中图分类号 S881.2 S885.9 文献标识码 A 文章编号 0257-4799(2004)02-0147-04

海藻糖是由 2 个葡萄糖分子组成的双糖, 广泛存在于细菌、酵母、植物和无脊椎动物体内, 是昆虫的主要血糖, 具有供给能量和提供生物大分子合成底物等功能^[1-3]。海藻糖酶 (α -glucoside-1-glucosylhydrolase) 是唯一能够水解海藻糖的酶, 通过水解海藻糖为各种组织器官提供葡萄糖。海藻糖酶由海藻糖酶基因 (*trehalase*) 编码, 在果蝇、蝗虫和家蚕等昆虫中海藻糖酶有两种类型, 一种为可溶型, 另一种为膜固定型, 它们是由同一基因表达而形成的两种不同产物。家蚕海藻糖酶基因的表达受滞育激素 (Diapause hormone, 简写: DH) 的诱导调控^[4], 膜固定型酶存在于卵巢等多种组织的向血液面的膜内。卵母细胞通过位于膜内的海藻糖酶, 将血液中海藻糖降解成葡萄糖, 然后吸收到细胞内, 最后合成糖元, 从而导致蚕卵的滞育^[1-3]。因此, 研究海藻糖酶基因是解明家蚕滞育机理的一条重要途径。前文已报道从家蚕苏·菊×明·虎、野桑蚕基因组中分别克隆到海藻糖酶基因的 5' 侧翼区 1 857、1 853 bp 的片段, 涵盖第一外显子和启动子区, 两者的同源性为 94.2%^[5]。本试

验以荧光素酶基因 (*luciferase*, *luc*) 为报告基因、pGEM-3Z 为载体, 构建了海藻糖酶基因启动子控制的 *luc* 基因报告质粒, 利用昆虫细胞瞬时表达系统进行启动子特性分析, 并就家蚕滞育激素对海藻糖酶基因启动子转录活性的调节作用进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

瞬时表达系统用来自家蚕卵巢的 Bm5 细胞和秋粘虫胚胎的 Sf21 细胞, 由本实验室保存。pUL220-*luc* (含 *luciferase*) 由中国科学院生物化学和细胞生物学研究所提供^[6]。TC-100 昆虫细胞培养基、FBS、Lipofectin 试剂等均为 Invitrogen 公司产品。荧光素酶 (LUC) 检测试剂盒 (E4030) 为 Promega 公司产品。家蚕滞育激素类似物 (DH) 由中国科学技术大学徐卫华教授馈赠。含家蚕“苏·菊×明·虎”、野桑蚕 (镇江) 基因组海藻糖酶基因 5' 侧翼片段的重组质粒 p3Z-BmTre、p3Z-BmandTre^[5], 穿梭质粒 pSK-hsp70-LacZ 由本实验室先前构建保存^[7-9]。

荧光素酶活性、总蛋白含量分别在 Beckman LS—6000TA 液体闪烁仪和 DG3022A 型酶联免疫检测仪上测定。

1.2 报告质粒的构建

前文报道了苏·菊×明·虎和野桑蚕海藻糖酶

收稿日期: 2004-03-01

资助项目: 国家自然科学基金项目 (编号 30271007)。

作者简介: 沈兴家 (1963—), 男 (汉), 浙江, 博士研究生, 副研究员。

Tel: 0511-5628519 E-mail: shenxj@sricaa.com

通讯作者: 张志芳, 研究员, 博士生导师。

Tel: 0511-5616659, E-mail: zsf@public.zj.js.cn

基因 5'侧翼区片段的 PCR 扩增及亚克隆,获得含有海藻糖酶基因 5'侧翼片段的 pGEM-3Z 重组质粒 p3Z-BmTre(苏·菊×明·虎)、p3Z-BmandTre(野桑蚕)^[5]。本文将上述 pGEM-3Z 重组质粒经酶切鉴定和序列验证后,按照 Smbrook 等^[10]的方法,用 BamH I 酶解含荧光素酶基因(*luc*)的 pUL220-*luc* 以分离 *luc* 基因片段,分别再亚克隆到重组质粒 p3Z-BmTre 和 p3Z-BmandTre 的海藻糖酶基因启动子下游,构建报告质粒 p3Z-BmTre-*luc* 和 p3Z-BmandTre-*luc* 用于瞬时表达分析。

1.3 细胞的培养与转染

昆虫细胞的常规培养参照 Summers 等^[11]的方法进行,细胞转染参照 Tang 等^[7-9]的方法进行。以 $5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 密度将 Bm5 细胞接种于 12 cm² 的瓶中,27℃培养过夜。在 50 μL 反应体系中,用 7.5 μL Lipofectin、1 μg 报告质粒 DNA 和 0.5 μg 穿梭质粒 pSK-*hsp70-LacZ* 混合制成转染液。倾去旧培养基,用无血清 TC-100 培养基洗细胞 2 次,再加 1 mL 无血清 TC-100 培养基,逐滴加入转染液,4~5 h 后用 3 mL 含 10%FBS 的 TC-100 培养基替换旧培养基。以 pUL220-*luc* 转染的细胞为空白对照。DH 处理试验中,在更换培养基后立即(每瓶 3 mL 培养基)加入一定量的 20 μmol/L 的 DH,以不加 DH 处理为对照。细胞均在更换培养基后 48 h 收集,每个处理重复 3~4 次。

1.4 细胞抽提物的制备及荧光素酶活力的测定

在 4℃、9 000 g 下离心 5 min 收集细胞,用试剂盒(E4030, Promega)制备细胞液裂解, -20℃和室温下冻融 1 次,4℃离心除去细胞碎片。荧光素酶活力按照 Idahl 等^[12],β-半乳糖苷酶(β-gal)比活性和总蛋白含量按照 Zhou 等^[7-9]的方法进行测定。

荧光素酶活力经空白对照、总蛋白含量和穿梭质粒β-gal 比活矫正后,取平均值。数据分析和作图分别在 Statistical Analysis System (SAS)和 Sigma Plot 软件上完成。

2 结果与分析

2.1 报告质粒的瞬时表达

分别用报告质粒 p3Z-BmandTre-*luc* 和 p3Z-BmTre-*luc* 转染 Bm5、Sf21 细胞进行瞬时表达,48 h 后收集细胞,测定细胞抽提物荧光素酶的活性。结果如表 1 所示。两种报告质粒在来源家蚕卵巢的

Bm5 和秋粘虫胚胎的 Sf21 细胞中都有荧光素酶基因表达,说明家蚕、野桑蚕海藻糖酶基因启动子在 Bm5 和 Sf21 细胞中都有转录活性,但活性都比较低。

表 1 家蚕、野桑蚕海藻糖酶基因启动子控制的荧光素酶基因的瞬时表达

Table 1 Transient expression of luciferase gene driven by promoter of trehalase gene from *Bombyx mari* or *Bombyx mandarine*

报告质粒 Reporter plasmids	pSK-BmTre- <i>luc</i>		p3Z-BmandTre- <i>luc</i>	
细胞 Cell lines	Bm5	Sf21	Bm5	Sf21
荧光素酶活力 Luciferase activities	188.0±22.6	73.3±1.9	61.3±1.9	50.0±2.0
(cpm per μg)				

表中数据为 3 次独立试验并经空白对照、β-半乳糖苷酶比活性和总蛋白校正后的平均值。空载体 pUL220-*luc* 转染的 Bm5 细胞和 Sf21 细胞(空白对照)的荧光素酶活性分别为 15.7 cpm±4.0 cpm、13.3 cpm±6.1 cpm。

The data shown in the table are the average of three separate experiments after being nomlized by blank control, β-gal activities and total protein of cell extract. Luciferase activity of pUL220-*luc* transfected Bm5 cells and Sf21 cells(blank control)were 15.7 cpm±4.0 cpm and 13.3 cpm±6.1 cpm, respectively.

2.2 滞育激素的调控作用

为了考察滞育激素对家蚕海藻糖酶基因启动子活性的调控作用,在报告质粒 pSK-BmTre-*luc* DNA 转染 Bm5 细胞 4~5 h 并更换培养基后,在每瓶细胞(3 mL)中加入 2、3、4、5 μL 的 20 μmol/L DH 溶液(终浓度分别为 13、20、27、33 和 50 nmol/L)进行瞬时表达分析。试验以报告质粒转染而无 DH 处理的细胞为阳性对照、pUL220-*luc* 转染且无 DH 处理的细胞为空白对照。结果显示,DH 浓度在 13~27 nmol/L 范围内荧光素酶活性随 DH 剂量增高而增加,以对照区(DH=0)为 100 活性指数标准,则 DH 浓度为 13、20 和 27 nmol/L 处理区的荧光素酶活性指数分别为 139.7±24.2、230.9±49.2、231.4±77.6,显著或极显著高于对照区($F=302.82, p=0.0001<0.01$; $F=42.29, p=0.0029<0.01$; $F=17.16, p=0.0144<0.05$)。但是当 DH 浓度升高至 33 nmol/L 时,荧光素酶活性指数为 123.5±25.0,增加不显著($F=5.27, p=0.0834>0.05$);DH 浓度为 50 nmol/L 时,荧光素酶的活性指数为 (98.0±16.6)%,无显著变化($F=0.08, p=0.79>0.05$)。说明 DH 对家蚕海

藻糖酶基因启动子活性的调节呈现明显的剂量效应, 浓度在 13 ~ 27 nmol/L 范围内对海藻糖酶启动子活性有显著的增强作用(图 1)。

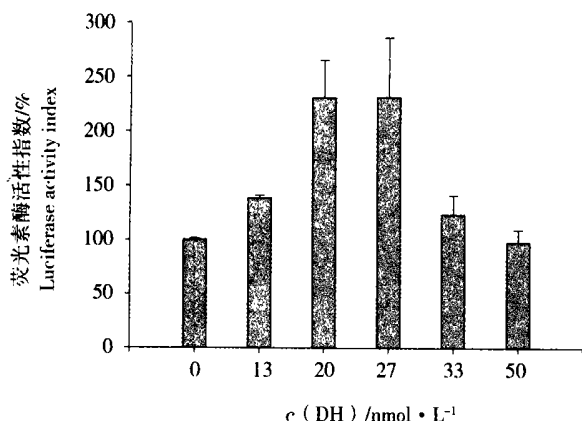


图 1 家蚕滞育激素对家蚕海藻糖酶基因启动子活性的调控作用

Fig. 1 Regulation of diapause hormone on the promoter

activity of trehalase from *Bombyx mori*

图中显示在各 DH 浓度下荧光素酶活性与对照

(100%) 的相对值, 线段表示标准差(S. D.)

The data showed the average luciferase activities of three separate treatments relative to the control (DH = 0) serving as 100%. The figure was completed by Sigma Plot software. The bar indicates the standard deviation from three separate treatments of each concentration

3 讨论

本试验所用家蚕苏·菊×明·虎、野桑蚕的海藻糖酶基因启动子为其 5' 侧翼区涵盖第一外显子和启动子区的片段^[3], 其中的启动子区各有 2 个潜在的 TATA 盒和 2 个潜在的 GATA 盒^[13, 14]。以 pGEM-3Z 为载体, 分别构建家蚕苏·菊×明·虎、野桑蚕海藻糖酶基因启动子控制的荧光素酶基因报告质粒, 利用昆虫细胞瞬时表达系统进行了启动子特性分析, 并就家蚕滞育激素对海藻糖酶基因启动子转录活性的调节作用进行了初步研究。

昆虫海藻糖酶基因与哺乳动物、细菌海藻糖酶基因之间存在很高的同源性序列^[2, 15], 即海藻糖酶基因在进化上是比较保守的, 调控其表达的顺式作用元件也比较保守。家蚕海藻糖酶基因是一种非组织特异性表达基因, 可以在卵巢、中肠、马氏管和脂肪体等多种组织中表达, 而且蛹期中肠细胞中海藻

糖酶基因转录本 mRNA 的含量约为卵巢细胞的 60 倍^[3]。因此, 以家蚕、野桑蚕海藻糖酶基因启动子构建的报告质粒, 在家蚕 Bm5 和 Sf21 细胞中都有转录活性。另一方面, 由于野桑蚕、家蚕海藻糖酶基因启动子核苷酸序列有高度同源性(94.2%)^[5], 所以它们在异源的 Sf21 细胞系中的转录活性非常相近且都很低。家蚕海藻糖酶基因启动子在同源的家蚕卵巢的 Bm5 细胞中的转录活性明显高于其在异源的秋粘虫胚胎的 Sf21 细胞中的转录活性, 而野桑蚕海藻糖酶基因启动子的转录活性在 Bm5 细胞中仍然很低, 这可能是由于野桑蚕海藻糖酶基因启动子核苷酸序列与家蚕之间仍存在着一定的差异(同源性 94.2%), 即对于野桑蚕海藻糖酶基因启动子来说, Bm5 细胞仍属异源细胞。

家蚕卵巢是家蚕 DH 的靶器官。在家蚕体内由咽下神经节的神经分泌细胞合成的 DH, 通过心侧体、咽侧体释放到血淋巴中, 诱导卵巢中海藻糖酶基因的表达, 从而导致蚕卵的滞育^[2, 16, 17]。本试验中 DH 的作用呈现明显的剂量效应, 即在浓度 13 ~ 33 nmol/L 范围内都有显著的增强调节作用, 其中以 20 ~ 27 nmol/L 增强作用最大, 使海藻糖酶基因启动子转录活性增加约 1.3 倍, 这一 DH 浓度与 Su 等^[3]体内试验结果一致。但是, 在体外 DH 对家蚕海藻糖酶基因启动子转录活性的增强作用比在体内条件下低^[3], 其原因可能与启动子区段的长度和细胞的特性有关。上述结果表明源于家蚕卵巢的 Bm5 细胞, 可能仍具有家蚕体内卵巢细胞的某些特性, 如 DH 作用受体等。因此, 当用 DH 处理时, 观察到 DH 对家蚕海藻糖酶基因启动子转录活性的影响, 但是究竟是什么样的受体以及它与海藻糖酶基因启动子的结合位点(顺式作用元件)等还有待进一步研究。

参 考 文 献

- Ikeda M, Su Z H, Saito H, et al. Induction of embryonic diapause and stimulation of ovary trehalase activity in the silkworm *Bombyx mori* (J). *J Insect Physiol*, 1993, 39: 889—895
- Su Z H, Ikeda M, Sato Y, et al. Structure of trehalase gene of the silkworm *Bombyx mori* and phylogenetic relationship of trehalases (J). *J Seric Sci Jpn* 1997, 66(6): 457—464
- Su Z H, Ikeda M, Sato Y, et al. Molecular characterization of ovary trehalase of silkworm *Bombyx mori* and transcriptional activation by diapause hormone (J). *Biochim Biophys Acta*, 1994, 1218: 366—374

- 4 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: 515—523
- 5 赵巧玲, 唐顺明, 张志芳, 等. 野桑蚕、家蚕海藻糖酶基因 5' 侧翼区的克隆与序列分析(J). 中国蚕业, 2003, 24(4): 91—93
- 6 雷向东, 宓怡德, 袁中一, 等. 萤火虫荧光素酶基因在家蚕中的表达(J). 科学通报, 1994, 39(9): 847—849
- 7 Zhou Y J, Xiao Q L, Zhang Z F, et al. Foreign insect hormone stimulating the transcription of the β -1 promoter of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus in vivo and in vitro (J). Biosci Biotech Biochem, 2002, 66(7): 1488—1494
- 8 Zhou Y J, Yi Y Z, Zhang Z F, et al. Cetyltriethylammonium bromide stimulating transcription of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus gp64 gene promoter mediated by viral factors (J). Cytotechnology, 2003, 41: 37—44
- 9 Tang SM, Yi Y Z, Shen X J, et al. Functional analysis of the larval serum protein gene promoter from silkworm, *Bombyx mori* (J). Chin Sci Bull, 2003, 48: 2611—2615
- 10 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual(M). 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 21—105
- 11 Summers M D, Smith G E. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures (M). Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No 1555, 1987. 10—18, 38—46
- 12 Idahl L A, Sandstrom P E, Sehlin J. Measurements of serum glucose using the luciferin/ luciferase system and a liquid scintillation spectrometer(J). Anal Biochem, 1986, 155: 177—181
- 13 Zhu Q, Dabi T, Lamb C. TATA box and initiator functions in the accurate transcription of a plant minimal promoter in vitro(J). Plant Cell, 1995, 7(10): 1681—1689
- 14 Fang R, Olds L C, Santiago N A, et al. GATA family transcription factors activate lactase gene promoter in intestinal Caco-2 cells(J). Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001, 280(1): G58—67
- 15 Su Z H, Sato Y, Yamashita O. Purification, cDNA cloning and Northern blot analysis of trehalase of pupal midgut of silkworm, *Bombyx mori*(J). Biochim Biophys Acta, 1993, 1173: 217—224
- 16 Yamashita O. Diapause hormone of silkworm, *Bombyx mori*: structure, expression and function(J). J Insect Physiol, 1996, 42: 669—679
- 17 徐卫华, 张元琪, 王盈, 等. 昆虫滞育的分子机理— I . 家蚕胚子发育期的温度条件与滞育激素基因表达(J). 中国科学 C 辑, 1998, 28: 154—159

Characterization of Trehalase Gene Promoters From Silkworm, *Bombyx mori* and *Bombyx mandarina* and Transcriptional Regulatory Effects of Diapause Hormone on Them

SHEN Xingjia TANG Shunming YI Yongzhu ZHAO Qiaoling
ZHANG Zhifang LI Yiren HE Jialu

(Key Laboratory of Silkworm Biotechnology, Ministry of Agriculture; Sericultural Research Institute,
Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018)

Abstract By using pEGM-3Z as vectors, the reporter plasmids were constructed with a *luciferase* gene under the control of *trehalase* gene promoters from *Bombyx mori* and *Bombyx mandarina* respectively for transient expression in insect cell lines. Meanwhile, the regulatory effect of diapause hormone(DH) on the transcriptional activity of *trehalase* gene promoter was studied. Both *trehalase* gene promoters from *B. mori* and *B. mandarina* showed low but significantly transcriptional activities in Bm5 cell line and Sf21 cell line. The artificial synthesized DH of *Bombyx mori* revealed a typical dose-dependent pattern on *trehalase* gene promoter activity in vitro, i. e. in the concentration of 13 ~ 33 nmol/L DH enhanced the promoter activity significantly. Thus we deduce that there are possibly DH receptors in the ovary-derived Bm5 cell line.

Key words *Bombyx mori* *Bombyx mandarina* *Trehalase* Promoter Diapause hormone