

2011, 37(4): 0614-0622

ISSN 0257-4799; CN 32-1115/S

E-mail: CYKE@chinajournal.net.cn

## 家蚕三磷酸腺苷结合盒转运子 B 亚族基因 *Abcb6* 的克隆与序列分析及组织表达

栗凤鹏<sup>1,2</sup> 吴金美<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup>江苏科技大学生物技术学院, 江苏镇江 212018; <sup>2</sup>中国农业科学院蚕业研究所, 江苏镇江 212018)

**摘要** 三磷酸腺苷结合盒转运子 B 亚族成员 ABCB6( ATP-binding cassette transporter subfamily B member 6, ABCB6) 是一个重要的半分子转运子, 在哺乳动物中主要参与细胞内卟啉类化合物的转运和铁离子平衡的调节。利用人的 ABCB6 蛋白的氨基酸序列在家蚕 EST 数据库中进行 TBLASTN 检索, 将检索到的 EST 序列进行电子延伸和重叠群拼接, 根据拼接结果设计引物进行 RT-PCR 扩增, 成功克隆了家蚕 *Abcb* 亚族基因第 1 个成员 *BmAbcb6* 的完整开放阅读框。用生物信息学方法检测发现, *BmAbcb6* 有 16 个外显子和 15 个内含子, 编码 850 个氨基酸残基, 分子质量 96.35 kD, 等电点 8.23; *BmAbcb6* 含有 1 个核苷酸结合结构域和 10 个  $\alpha$  螺旋构成的跨膜结构域, 属家蚕 *Abcb* 亚族成员。半定量 RT-PCR 方法分析 *BmAbcb6* 在家蚕 5 龄第 3 天幼虫不同组织中均有较高表达, 其中以精巢中的表达水平最高。研究结果为进一步分析该基因的功能奠定了基础。

**关键词** 家蚕; 三磷酸腺苷结合盒转运子; ABCB6; 组织表达; 序列分析

中图分类号 S881.2; Q78 文献标识码 A 文章编号 0257-4799(2011)04-0614-09

## Molecular Cloning, Sequence Analysis and Tissue Expression of ATP-binding Cassette Transporter Subfamily B Member 6 Gene *Abcb6* in the Silkworm, *Bombyx mori*

LI Feng-Peng<sup>1,2</sup> WU Jin-Mei<sup>1,2\*</sup>(<sup>1</sup> College of Biotechnology, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang Jiangsu 212018, China; <sup>2</sup> The Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang Jiangsu 212018, China)

**Abstract** ATP-binding cassette subfamily B member 6, ABCB6, is a important half-molecule transporter. In mammals, ABCB6 is shown to be functionally active in cellular efflux of certain porphyrins from cells and to be involved in regulation of iron homeostasis. The amino acid sequence of human ABCB6 protein was used to conduct TBLASTN search against silkworm (*Bombyx mori*) EST database. The obtained ESTs were extended *in silico* and assembled into a consensus sequence, based on which primers were designed for RT-PCR amplification. As a result, the intact open reading frame of *BmAbcb6*, the first silkworm *Abcb* subfamily gene, was cloned successfully. Bioinformatics analysis showed that *BmAbcb6* has 16 exons and 15 introns, encoding 850 amino acid residues with a predicted molecular mass of 96.35 kD and pI 8.23. *BmAbcb6* protein contains one nucleotide binding domain and one transmembrane domain containing 10  $\alpha$ -helices. Semi-quantitative RT-PCR analysis showed that *BmAbcb6* gene was highly expressed in various tissues of the 5th-instar day-3 larvae of silkworm, with highest expression in testis. This result paves the way for better understanding the function of *BmAbcb6* gene.

收稿日期: 2011-01-21 接受日期: 2011-02-28

资助项目: 江苏科技大学归国博士创新基金项目( No. 352110503)。

作者简介: 栗凤鹏(1982-), 男, 硕士研究生。

通信作者: 吴金美, 研究员。

Tel: 0511-85628310, E-mail: jwuus@hotmail.com

**Key words** *Bombyx mori*; ATP-binding cassette transporter; ABCB6; Tissue-specific expression; Sequence analysis

三磷酸腺苷结合盒(ATP-binding cassette, ABC)转运蛋白家族由于含有一个三磷酸腺苷(ATP)的结合盒而得名。ABC转运蛋白通过利用结合并水解ATP释放的能量对溶质中多种生物分子进行跨膜转运<sup>[1]</sup>。它在生物体中以半分子转运子或全分子转运子的形式存在,每个半分子转运子包括1个跨膜结构域(transmembrane domain, TMD)和1个核苷酸结合结构域(nucleotide binding domain, NBD),每个跨膜结构域一般由6个 $\alpha$ 螺旋构成,形成一个跨膜通道以实现底物分子的跨膜运输,并参与底物的识别过程。半分子转运子依赖形成同源或异源二聚体发挥作用;全分子转运子由2个跨膜结构域和2个核苷酸结合结构域构成。ABC转运蛋白的NBD位于细胞质内,每个核苷酸结合结构域有一个长约200个氨基酸的非常保守的序列,包含了3个保守区域,分别为Walker A(P-loop)、Walker B和特征基序C(也称Signature基序或特征基序S)<sup>[2]</sup>。根据ABC转运蛋白结构域构成和氨基酸序列的同源性,ABC转运子被分成了几个亚家族。哺乳动物中已发现7个ABC亚族(ABCA—ABCG)<sup>[3]</sup>,而在果蝇(*Drosophila melanogaster*)<sup>[4]</sup>、斑马鱼(*Danio rerio*)<sup>[5]</sup>等多种生物体基因组序列中已发现了ABC转运子的第8个亚族——ABCH。

哺乳动物中ABC转运子B亚族成员分为全分子转运蛋白(ABCB1、ABCB4、ABCB5和ABCB11)和半分子转运蛋白(ABCB2、ABCB3、ABCB6、ABCB7、ABCB8、ABCB9和ABCB10)<sup>[6]</sup>,共11个成员。它们具有独特的亚细胞分布,ABCB1、ABCB2、ABCB3、ABCB4、ABCB5、ABCB9和ABCB11分布于有内质网衍生的细胞器膜上,而ABCB6、ABCB7、ABCB8和ABCB10分布于线粒体膜上<sup>[7]</sup>。人ABCB6最初被称为MTABC3(mammalian mitochondrial ABC protein 3),是酵母中一个分布于线粒体内膜上的ABC转运蛋白的同源蛋白,主要参与了血红素亚铁离子相关化合物从线粒体内到细胞质的转运和铁离子的平衡调节<sup>[8]</sup>。Masashi等<sup>[9]</sup>的研究表明:ABCB6主要分布在内质网衍生的细胞器膜上,尤其是高尔基体上。也有研究表明ABCB6存在于线粒体的外膜中,调控亚铁血红素的数量,可以把卟啉分子(构成生命体的重要分子)转运到线粒体中<sup>[10]</sup>,在线粒体内部,卟啉分子可以转化为亚铁血红素,在红

细胞运输氧气、肝细胞分解毒素以及细胞从营养物吸取能量的过程中起到关键的作用<sup>[11]</sup>。Krishnamurthy等<sup>[12]</sup>的研究表明,ABCB6和多药耐药蛋白ABCG2是细胞内卟啉类化合物平衡调节的两个主要成员。Effertth等<sup>[13]</sup>在研究青蒿琥酯对细胞凋亡机制的诱导作用中发现,ABCB6参与对肿瘤细胞的杀伤。目前,关于ABCB6在哺乳动物中精确的亚细胞定位仍缺乏统一的认识,对其功能的研究仍需要进一步的深入,尤其在昆虫中,关于该基因功能的研究报道较少。

本研究采用生物信息学技术,根据人ABCB6的氨基酸序列检索家蚕EST数据库,用DNASTAR软件包内的Seqman软件对获得的家蚕EST序列进行拼接、延伸,电子克隆了家蚕*BmAbcb6*基因序列,经过RT-PCR扩增、TA克隆测序获得*BmAbcb6*基因完整的开放阅读框(ORF)序列,通过对该基因的序列结构及组织表达分析,为进一步研究该基因的生理功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及主要试剂

供试家蚕品种为苏·菊×明·虎,由中国农业科学院蚕业研究所生理病理研究室提供。质粒载体pMD18-T购自TaKaRa公司,大肠杆菌(*E. coli*)DH10B菌株由本实验室保存。RNA抽提使用的RNAiso™ Plus、M-MLV反转录酶、LA Taq HS酶和PCR产物胶回收试剂盒均购自TaKaRa公司,各种限制性内切酶均购自Promega公司,质粒小抽试剂盒购自Axygene生物公司,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

### 1.2 *BmAbcb6*基因的电子克隆

以人ABCB6基因编码的氨基酸序列(GenBank登录号:NP\_005680.1)作为质询序列进行同源性检索,用TBLASTN程序检索NCBI(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)家蚕EST数据库,下载具有ABC转运蛋白保守区域Walker A、Walker B和Signature C,且E值符合 $E \leq 1e-30$ 的EST序列,再以这条序列为种子序列使用BLASTN程序检索NCBI中的家蚕EST数据库,将检索到的EST序列用DNASTAR进行电子延伸,重复检索、延伸步骤直到不能延伸为止,得到家蚕*Abcb6*(*BmAbcb6*)转运子的mRNA序列。

### 1.3 家蚕总 RNA 的提取和 cDNA 模板的制备

取 5 龄第 3 天幼虫全蚕以及头部、表皮、前中部丝腺、后部丝腺、中肠、脂肪体、马氏管、精巢和卵巢组织,用 RNAiso™ Plus 试剂盒分别提取 RNA,反转录合成 cDNA 第 1 链,采用 Oligo(dT) 18 和 M-MLV 反转录酶,具体操作参照说明书进行。

### 1.4 *BmAbcb6* 基因 ORF 的克隆及序列测定

根据电子克隆 *BmAbcb6* 序列(GenBank 登录号:HQ896031)在 NCBI 上设计引物 *BmAbcb6*-F(5'-CGCGACGTTTTGAATTAGCCGGC-3') 和 *BmAbcb6*-R(5'-ACGACTTGTCCCACGAACCATTTCC-3'),以全蚕 RNA 反转录的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μL):10 × PCR buffer 5 μL,2.5 mmol/L dNTP 4 μL,10 μmol/L 上、下游引物各 1 μL,cDNA 模板 2 μL,5 U/μL LA *Taq* 酶 0.5 μL,ddH<sub>2</sub>O 36.5 μL。PCR 扩增条件为:94 °C 预变性 4 min;94 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 3 min 循环 30 次;72 °C 10 min。PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色后,使用凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物,将回收的 DNA 片段与 pMD18-T 载体连接,进行蓝白斑筛选,挑取阳性克隆,抽取重组质粒进行酶切鉴定。把鉴定正确的菌液送交上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序验证。

### 1.5 *BmAbcb6* 基因的序列分析

运用 BLASTN 程序将克隆的 *BmAbcb6* 的完整 ORF 在家蚕基因组数据库(<http://silkworm.genomics.org.cn/>)进行比对,分析基因的结构和拷贝数,以 Sim4(<http://pbil.univ-lyon1.fr/sim4.php>)对基因外显子和内含子进行分析,用 NCBI 在线程序预测编码的氨基酸序列,SignalP 3.0 预测信号肽序列,ProtParam 和 ProtScale 分别对 *BmAbcb6* 蛋白的理化性质和疏水性进行分析,用 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)和 TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)对其功能域和跨膜结构进行预测,从 NCBI 下载其它物种的同源序列进行多序列比对,采用 ClustalX (Version 1.83) 软件进行序列的一致性排列,用 MEGA 4.0 软件中的邻位对接法(Neighbor-joining)进行 2 000 次重复随机抽样(Bootstrap)构建系统发育进化树。

### 1.6 *BmAbcb6* 基因的组织表达谱分析

设计 1 对特异性引物 *BmAbcb6*-sqF(5'-GGAG-GGGGTACCGCGGAAT-3') 和 *BmAbcb6*-sqR(5'-CCG-

GCAAGTAAGCCGCTGCA-3'),引物设计采用 NCBI 在线设计。取家蚕 5 龄第 3 天幼虫各组织 RNA 1 μg 进行反转录合成 cDNA,以家蚕 *eTIF4A* 基因(GenBank 登录号:DQ443290.1)作为内参<sup>[14]</sup>(*eTIF4A*-F:5'-TGGTGGGCACTCCAGCTCGT-3',*eTIF4A*-R:5'-AG-CCAATCCACCTTGGACGG-3'),进行半定量 RT-PCR 分析。反应体系 25 μL。反应条件:94 °C 预变性 4 min;94 °C 30 s,59 °C 30 s,72 °C 1 min 循环 30 次;72 °C 10 min,4 °C 保存。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色后,用凝胶图像仪(Bio-Rad 公司)检测分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 *BmAbcb6* 基因的电子延伸

以人 ABCB6 转运蛋白的氨基酸序列作为质询序列进行同源性检索,用 TBLASTN 程序检索 NCBI 家蚕 EST 数据库,得到一条 EST(GenBank 登录号:AV403895),以该 EST 序列为种子序列在 NCBI 中检索家蚕 EST 数据库,对获得的 EST 序列用 DNASTAR 进行电子延伸,重复检索、延伸步骤后获得 3 174 bp 的重叠群序列,提交到 NCBI 网站提供的 ORF finder 在线程序分析该序列的开放阅读框。结果表明,该序列包含 1 个完整的 ORF(2 553 bp)、5' 端非翻译区(102 bp)和 3' 端非翻译区(519 bp)。

### 2.2 *BmAbcb6* 基因 ORF 的克隆及序列测定

以 5 龄第 3 天全蚕 cDNA 为模板,使用 *BmAbcb6*-F/*BmAbcb6*-R 为引物进行 PCR 扩增,产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,在 3 kb 左右出现 1 条特异条带,与预期的片段大小相符(图 1-A)。用凝胶回收试剂盒回收目的片段,然后与 pMD18-T 载体连接,通过蓝白斑筛选出阳性克隆,用试剂盒抽提重组质粒,进行 *Sal* I、*Pst* I 单酶切、*Xba* I/*Xho* I 双酶切和菌液 PCR 验证(图 1-B),对鉴定正确的阳性克隆进行测序,将测序得到的片段与电子克隆获得的基因序列进行比较,结果表明两者几乎完全一致,由此克隆得到 *BmAbcb6* 基因完整的 ORF 序列(103 ~ 2 655 nt)。

### 2.3 *BmAbcb6* 基因的序列分析

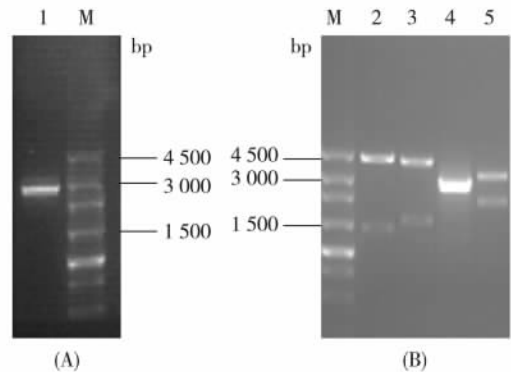
用获得的 cDNA 序列,以 BLASTN 程序检索家蚕基因组数据库<sup>[15]</sup>,发现 *BmAbcb6* 基因位于 8 号染色体的 scaffold2828 上,在基因组中只有 1 个拷贝,用 Sim4 程序将 *BmAbcb6* 基因的 cDNA 序列与家蚕

基因组序列比对 结果显示该基因具有 16 个外显子和 15 个内含子,外显子/内含子边界处均符合 GT-AG 规则(图 2)。在该基因的 mRNA 2 864 nt 和 3 139 nt 处,分别有 aattaaa 和 aataaaa 加尾信号,共编码 850 个氨基酸(图 3),核苷酸序列与家蚕基因组数据库中的 BGIBMGA005473-TA 序列几乎完全相同。

ProtParam 预测 BmAbcb6 蛋白分子质量为 96.35 kD,等电点为 8.23,N 端预测有 41 个氨基酸的信号肽,切割位点位于 Gly41 和 Thr42 间。用 ProtScale 软件对氨基酸序列进行疏水性分析预测显示,BmAbcb6 蛋白疏水性最大值为 2.4,最小值为 -2.543,蛋白质氨基酸序列的疏水和亲水区域交错排列。用 SMART 程序和 TMHMM 预测结果表明与人 ABCB6 蛋白一样,BmAbcb6 蛋白具有 1 个核苷酸结合结构域和 1 个由 10 个  $\alpha$  螺旋构成的跨膜结构域,是家蚕 ABC 转运子 B 亚族成员。

通过 NCBI 的 Blastp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 程序进行在线蛋白质序列比对,结果表明 *BmAbcb6* 与蜜蜂(*Apis mellifera*)、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)、赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)、致倦库蚊(*Culex quinquefasciatus*)、冈比亚按蚊(*Anopheles gambiae*)、丽蝇蛹集金小蜂(*Nasonia vitripennis*)、果蝇(*Drosophila melanogaster*) 中相应的 ABC 转运蛋白序列的相似性较高,分别为 69.8%、65.9%、65.9%、65.7%、65.3%、65.2% 和 62.0%,由此可以看出 *BmAbcb6* 与其它昆虫的 ABC 转运蛋白序列相似性较高,其序列相当保守(图 4)。用 *BmAbcb6* 编码的氨基酸序列与人、蜜蜂、冈比亚按蚊、埃及伊蚊、丽蝇蛹集金小蜂、赤拟谷盗、致倦库蚊、果蝇、豌豆蚜(*Acyrtosiphon pisum*)、非洲爪蟾(*Xenopus tropicalis*)、小鼠(*Mus musculus*)、大鼠(*Ra-*

*tus norvegicus*)、线虫(*Caenorhabditis elegans*)、牛(*Bos taurus*)、斑马鱼(*Danio rerio*) 中可能的 ABCB 亚族成员进行聚类分析,结果发现 *BmAbcb6* 与蜜蜂、埃及伊蚊、赤拟谷盗、致倦库蚊、冈比亚按蚊、丽蝇蛹集金小蜂、果蝇和豌豆蚜的可能的 ABCB 亚族成员聚在一起,亲缘关系较近,而与哺乳动物的 ABCB 亚族成员亲缘关系相对较远(图 5)。



M. 250 bp ladder marker  
 1. PCR 扩增产物  
 2. 含有外源片段重组质粒的 *Sal* I 酶切产物  
 3. 含有外源片段重组质粒的 *Pst* I 酶切产物 4. 菌液 PCR 产物  
 5. 含有外源片段重组质粒的 *Xba* I /*Xho* I 酶切产物  
 1. PCR amplification product 2. Recombinant plasmid containing foreign fragment digested with *Sal* I  
 3. Recombinant plasmid containing foreign fragment digested with *Pst* I  
 4. PCR product of bacterial suspension  
 5. Recombinant plasmid containing foreign fragment digested with *Xba* I and *Xho* I

图 1 家蚕 *Abcb6* 基因的 PCR 扩增(A)与重组质粒酶切产物(B)电泳图谱

Fig. 1 PCR amplification of *BmAbcb6* gene (A) and identification of recombinant plasmid using restriction enzymatic digestion (B)

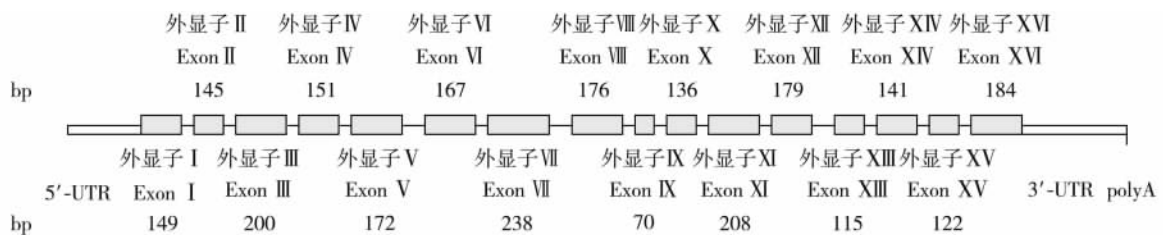


图 2 家蚕 *Abcb6* 基因的结构示意图

Fig. 2 Schematic structure of *BmAbcb6* gene

1 gattccacaatatttttgttacattcgcgacgttttgaattagccggcatgtgtgaaattgctgatgcaaagtgaatagcagtgttaag  
BmAbcb6-F →

91 ccaagagtaatcatgatgaagtattgtcctccaaatgtgacacttggagagatatgggtggatcacggcatatcacaatgtttcatggag  
M M K Y C P P N V T L G E I W V D H G I S Q C F M E

181 accgtatctgctgtgttcataggtggattcctattggctcttgggaaccacaaatgttatttacaaaagacatgccactgaggtgatg  
T V S A V F I G G F L L V L G T T Q I V I Y K R H A T E V M

271 gatgtccgatcatcgaagctttttggagttcagatgtttttactctcttagtaccagtgttggctgtaataaggtttctgttacaagca  
D V R S S K L F G V Q M F F T L L V P V L A V I R F L L Q A

361 ttattgttcaaaagtggttgtgtgatggttatatggtagttgcattaacagttactctggtagtatttccactgtcggcctacttagcg  
L L F K S G C V Y G Y M V V A L T V T L V V F P L S A Y L A

451 atcctcgagaggaggttcttattaccgtcctgctcctagaggtcacggttttgtactcttggtttttgggctatgatattcgtatcg  
I L E R R F L L P S V P P R G H G F V L L V F W A M I F V S

541 gagaatttatcatttttgaatatcaacaagaaggatgggtggcacttgaaaaatctcaagatcgccctcgaaatgtcattgttctgctc  
E N L S F L N I N K E G W W W H L K N L Q D R L E M S L F V

631 ggtcgttacgtgctgtgatgataatgttctgctcggatgaaggcgcgggcatcatgcaccacttcgactacttagaggacgaacac  
G R Y V S C M I M F V L G M K A P G I M H H F D Y L E D E H

721 gaaggccgaaggaatatacagccacgcatgacaacagatcgacgttcagaaatgtatttacgaaattgcgcacactcctaccgttctcg  
E G R R N I Q P R D D N R S T F R N V F T K L R T L L P F L

811 tggccgaagaagaatttcactcctcaactctatgtgctcatatgtatactggctctcatcgctggaagagctatcaatttatacgtcct  
W P K K N F I L Q L Y V L I C I L A L I A G R A I N L Y V P

901 atatacaacagctgatatttaacagcatatcggaaccgctctcctcctccgctgggatctggattgatatatgtgtttttcaagttc  
I Y N R L I F N S I S E P P L S F R W D L V L I Y V F F K F

991 ctccaaggaggggttaccgcggaatgggtttatgaataaatgcgttctgtttttgtggatcaaggtccaacaatacaccacaagagag  
L Q G G G T G G M G L L N N M R S F L W I K V Q Q Y T T R E

1081 ttggagctggaactgttcaagcatctccatgacttgcctttacgctggcatttgtctcgcgaaaaccggagaagtctcagggtgatggac  
L E L E L F K H L H D L P L R W H L S R K T G E V L R V M D

1171 cgaggaacggattccataaacaatctcctctcgtacattctgttctctatcactccaacgctgggtggatattttgggtggcagctcatctac  
R G T D S I N N L L S Y I L F S I T P T L V D I L V A V I Y

1261 tttgtcacggcgttcaatatttggttcggactgatcgtttttactacaatgatcctgtatattatcgcaacaatagccgtgacggaatgg  
F V T A F N I W F G L I V F T T M I L Y I I A T I A V T E W

1351 cgcaagaagttccaacgtcgcgatgaatctcgcgactacgagcagaaggctcgcctcggctcactctctgttgaactacgagactgttaaa  
R T K F Q R R M N L A D Y E Q K A R S V D S L L N Y E T V K

1441 tattacggagcggatcttatgaagtgatgtcttatagagaagccatccttaattatcagaaagaagagtttaaatcattgttcacatta  
Y Y G A E S Y E V M S Y R E A I L N Y Q K E E F K S L F T L

1531 aacattttgaacaccattcaaaatcatcatctgcagcggcttacttccgggttcgttgcctctcgtgtcgttgggtggatgaagacggct  
N I L N T I Q N I I I C S G L L A G S L L C V S L V V K T A

1621 gaattcactgtcgggtgactacgctttgttcgctcgtacatagtgacagctttacgttcccttgaattgggttcggaacatattacagagct  
E F T V G D Y A L F A S Y I V Q L Y V P L N W F G T Y Y R A

```

1 711  atacagaagaatttcgtggacatggagaacatgttcgacctgctgagggtggattcggacgtgcgcgacgcggccggggcgcccgagctg
      I Q K N F V D M E N M F D L L R V D S D V R D A A G A P E L
1 801  gtggtgcgggcgggcgagtcgagttcaagcacgtgtccttcggatacggctccgagaggctcgtccttaacaacatcagttttaaaatc
      V V R R G G V E F K H V S F G Y G S E R L V L N N I S F K I
1 891  gctcccgaagcacagttgcattggtcgggcccagggcggggaaaatcgacgataatgcgtctgttattccgtttttacgacgtgaac
      A P G S T V A L V G P S G A G K S T I M R L L F R F Y D V N
1 981  gagggcgccgtgctggtggacgagcaggacgtgctgcaccgtcacgcaggctcgtgctgcgccaacatcgcgctcgtgccgaggacacg
      E G A V L V D E Q D V R T V T Q A S L R A N I G V V P Q D T
2 071  gtgcttcaacaacaccgtcagatacaacatcaatacgaagattgaacgcgcccgccgctgatataatctgccccaagaacgagc
      V L F N N T V R Y N I Q Y G R L N A P A A D I I S A A K N A
2 161  gacattcacgaccgaataactgacgtttcccgacgcttacgacacgcaggttgagaaaagggccttcggctgagcgggtggcgagaagcaa
      D I H D R I L T F P D A Y D T Q V G E R G L R L S G G E K Q
2 251  agaatagctattgcacgaacgatcttaaaagatcccgcattgtcctgctcgatgaagctacttctgctgtagacacgaacacagaaga
      R I A I A R T I L K D P A I V L L D E A T S A L D T N T E R
2 341  aatattcaagccgcttggcagcagtgctgcgcaacagaactacccttataaattgcacacaggctctcaacgatcattcatgccgacgaa
      N I Q A A L A R V C A N R T T L I I A H R L S T I I H A D E
2 431  atactggtccttaaggacggtgagattatcgaacgtggaacacatgaagccctcctagcgcaggccgggttctacgcgtccatgtggcaa
      I L V L K D G E I I E R G N H E A L L A Q A G F Y A S M W Q
2 521  cagcaactcgagaatcgaacagcaacgtaacaacgatgatgacgtcagcggcggaaggaacaacaaccagaggagccaaatcgctc
      Q Q L E N R N S N G N N D D D V S G G E G N N N Q R S Q I V
2 611  gcgcccgtgttcggtcacggccatggtcattggtcattaaacggttttagaaaatcaatcagggtactaggaaatggttcgtgg
      A P V F G H G H G H G H G H * ← BmAbcb6-R
2 701  gacaagtcgtttaatatcgtatttagtaggtagttgactgttgcgtttttattgaataccctacaatttcataagaagttttgaagg
2 791  gagaaaaatgagtatcgtgacgcacgtgagctttgacgctatgtaatttttagtgcgctctctttcaagcgtgaaatataaaaaatacaa
2 881  tttctgagtaataaccatcagtcacttacttattgcttgacacggacttgacaaatcgctttcaagatgaaagcatttgactgatatt
2 971  tttattaaggatggcgcaatattatattttgtgtagttatacagtgaaataggtgatgtgtacattaatagacattg
3 061  tgctggtgtaaatgtgaaatgtaccttctagtattaatcacggtgacgataaattttgttctgtttcagtgctatctaataaaacttgtt
3 151  ttttttctaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

箭头为 RT-PCR 扩增引物, 方框内氨基酸序列依次为 Walker A、Signature C 和 Walker B, 双下划线部分为多聚腺苷酸信号序列 (aataaa/aattaaa) 阴影部分为信号肽, \* 为终止密码子。

Primer sequences for RT-PCR are shown with arrowed lines.

The framed amino acids indicate Walker A, Signature C and Walker B domain in turn.

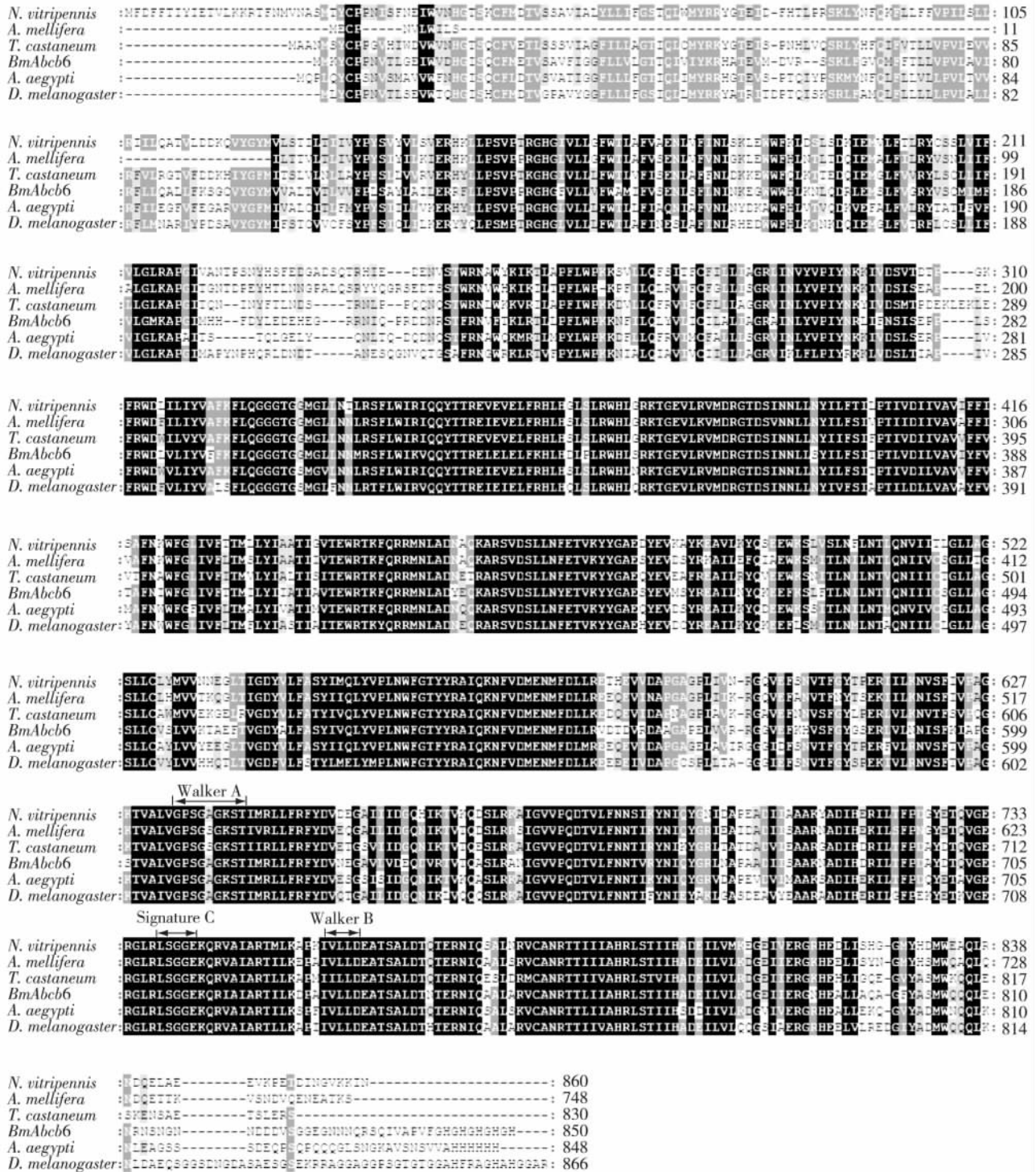
The polyadenylation signal sequence (aataaa/aattaaa) is double underlined.

The signal peptide is shaded in gray. \* indicates the stop code.

图 3 家蚕 *Abcb6* 基因的 cDNA 序列及编码的氨基酸序列

Fig. 3 cDNA sequence and its encoded amino acid sequence of *BmAbcb6* gene





丽蝇蛹集金小蜂 *N. vitripennis* ( gi: 156547994) ; 蜜蜂 *A. mellifera* ( gi: 110766368) ; 赤拟谷盗 *T. castaneum* ( gi: 189238261) ; 埃及伊蚊 *A. aegypti* ( gi: 157117982) ; 果蝇 *D. melanogaster* ( gi: 21357907) 。

黑色阴影表示完全保守氨基酸 灰色阴影表示强保守性氨基酸。

The black shadow represents full conserved amino acids , and the grey shadow represents strong conserved amino acids.

图 4 家蚕与其它昆虫 ABCB 亚族成员同源蛋白的氨基酸保守序列比较

Fig. 4 A comparison on conserved amino acids of homologous protein sequences from ABCB subfamily members in *Bombyx mori* and other insect species

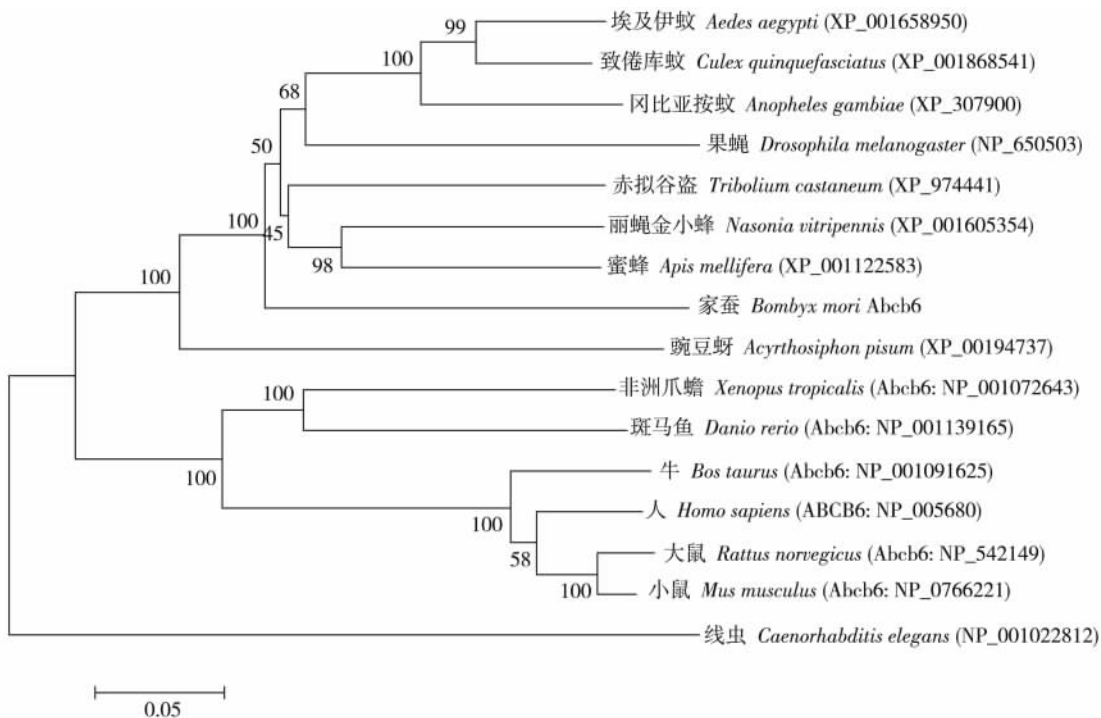
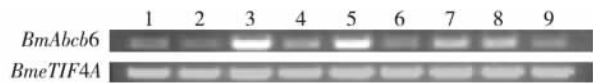


图 5 家蚕 *Abcb6* 蛋白与其它昆虫同源蛋白序列的系统发生树

Fig. 5 Phylogenetic tree of BmAbcb6 with its homologous proteins from other insect species

2.4 *BmAbcb6* 在家蚕 5 龄第 3 天幼虫不同组织的表达

以 *BmAbcb6*-sqF/*BmAbcb6*-sqR 为引物,以家蚕 *eTIF4A* 为内参,对 5 龄第 3 天幼虫组织的 cDNA 进行 RT-PCR,反应结束后各取 5  $\mu$ L 产物在 1.0% 琼脂糖凝胶中进行电泳检测。结果表明,*BmAbcb6* 在家蚕 5 龄第 3 天幼虫不同组织中均有表达,以精巢表达水平最高(图 6)。



- 1. 中肠 2. 表皮 3. 精巢 4. 脂肪体 5. 前中部丝腺
- 6. 后部丝腺 7. 头部 8. 马氏管 9. 卵巢
- 1. Midgut 2. Epidermis 3. Testis 4. Fat body
- 5. Anterior and middle silk gland
- 6. Posterior silk gland 7. Head
- 8. Malpighian tubule 9. Ovary

图 6 家蚕 *Abcb6* 基因在 5 龄第 3 天幼虫各组织的表达图谱

Fig. 6 Expression profile of *BmAbcb6* gene in various tissues of the 5th-instar day-3 larvae of the silkworm, *Bombyx mori*

3 讨论

本研究利用生物信息学及分子生物学方法,成功克隆了家蚕 ABC 转运子 B 亚族第 1 个成员 *BmAbcb6* 基因。该基因在家蚕基因组中只有 1 个拷贝,有 16 个外显子。和哺乳动物的 ABCB6 一样,*BmAbcb6* 具有 1 个核苷酸结合结构域和 10 个  $\alpha$  螺旋构成的跨膜结构域,是半分子转运蛋白。系统发育分析表明,*BmAbcb6* 与蜜蜂、埃及伊蚊、赤拟谷盗、致倦库蚊、冈比亚按蚊、丽蝇蛹集金小蜂、果蝇和豌豆蚜中可能的 ABCB 亚族成员聚在一簇,亲缘关系相对较近,而与哺乳动物的 ABCB 亚族成员亲缘关系相对较远。半定量 RT-PCR 检测家蚕 5 龄第 3 天幼虫各组织表达谱表明,*BmAbcb6* 在家蚕 5 龄第 3 天各组织中都有表达,且在精巢中的表达水平相对最高,这与家蚕基因组数据库中 BGIBMGA005473-TA 在 5 龄第 3 天幼虫各组织的表达谱一致。

人 ABCB6 主要位于线粒体膜上,但对于其分布于内膜或外膜目前还存在一些争议。Krishnamurthy 等<sup>[12]</sup>的研究表明,ABCB6 分布于线粒体的外膜中,可以把卟啉分子转运到线粒体中,参与亚铁血红素



的合成, ABCG2 主要位于细胞质膜上, 在缺氧的情况下, ABCG2 的合成上调, 将细胞内过量的卟啉类化合物转运到细胞外, 从而实现细胞内卟啉类化合物平衡调节。Lynch 等<sup>[16]</sup>和 Chavan 等<sup>[17]</sup>研究发现, 在过氧化物、氰化物 and 致癌物质亚砷酸钠存在的情况下可诱导细胞内 ABCB6 的大量表达, 从而增加细胞质内亚铁血红素和血红蛋白的浓度, 血红蛋白浓度的提高有利于胁迫条件下增强对细胞的保护作用。Mitsuhashi 等<sup>[18]</sup>通过 Northern blot 分析表明, ABCB6 在大鼠的各个组织中均有表达, 其中在精巢、肾和小脑中表达相对较高。序列分析发现, 果蝇中与 BmAbcb6 相似性最高的蛋白为重金属离子耐受因子家族成员, 关于这些蛋白的功能研究还没有报道。我们推测 BmAbcb6 位于线粒体膜上, 可能参与了家蚕体内一些重要物质的转运和铁离子平衡的调节, 也可能与一些胁迫条件下细胞解毒作用的调节相关。由于 BmAbcb6 是半分子转运蛋白, 只有与本身或其它 ABC 转运蛋白形成同源或异源二聚体才能进行物质转运, 但目前关于家蚕 ABCB 亚族其它成员的研究还没有报道, 对于 BmAbcb6 在家蚕中的功能及其作用机制仍需要进一步研究证实。

#### 参考文献 (References)

- [1] 王华丙, 张振义, 包锐, 等. ABC 转运蛋白的结构与转运机制 [J]. 生命的化学 2007, 27(3): 208 - 210
- [2] 吴转斌, 吴金美. ABC 转运子 G 亚族与人类疾病 [J]. 江苏大学学报: 医学版 2008, 18(3): 861 - 866
- [3] Higgins C F. ABC transporters: from microorganisms to man [J]. Annu Rev Cell Biol, 1992, 8: 67 - 113
- [4] Dean M, Hamon Y, Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily [J]. J Lipid Res, 2001, 42(7): 1007 - 1017
- [5] Dean M, Annilo T. Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates [J]. Annu Rev Genomics Hum Genet 2005, 6: 123 - 142
- [6] Sturm A, Cunningham P, Dean M. The ABC transporter gene family of *Daphnia pulex* [J]. BMC Genomics 2009, 170(10): 1 - 18
- [7] Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily [J]. Genome Res, 2001, 11(7): 1156 - 1166
- [8] Mitsuhashi N, Miki T, Senbongi H, et al. MTABC3, a novel mitochondrial ATP-binding cassette protein involved in iron homeostasis [J]. Biol Chem 2000, 275(23): 17536 - 17540
- [9] Masashi T, Yoshikazu E, Yuichiro K, et al. Human ABC transporter isoform B6 (ABCB6) localizes primarily in the Golgi apparatus [J]. Biochem Biophys Res Commun 2008, 369(2): 369 - 375
- [10] Krishnamurthy P C, Du G, Fukuda Y, et al. Identification of a mammalian mitochondrial porphyrin transporter [J]. Nature 2006, 443(7111): 586 - 589
- [11] Paterson J K, Shukla S, Black C M, et al. Human ABCB6 localizes to both the outer mitochondrial membrane and the plasma membrane [J]. Biochemistry 2007, 46(33): 9443 - 9452
- [12] Krishnamurthy P, Schuetz J D. The role of ABCG2 and ABCB6 in porphyrin metabolism and cell survival [J]. Curr Pharm Biotechnol 2010, 12(4): 647 - 655
- [13] Efferth T, Benakis A, Romero M R, et al. Enhancement of cytotoxicity of artemisinins toward cancer cells by ferrous iron [J]. Free Radic Biol Med 2004, 37(7): 998 - 1009
- [14] Wang G H, Xia Q Y, Cheng D J, et al. Reference genes identified in the silkworm *Bombyx mori* during metamorphosis based on oligonucleotide microarray and confirmed by qRT-PCR [J]. Insect Sci, 2008, 15(5): 405 - 413
- [15] Xia Q Y, Wang J, Zhou Z Y, et al. The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori* [J]. Insect Biochem Mol Biol 2008, 38(12): 1036 - 1045
- [16] Lynch J, Fukuda Y, Krishnamurthy P, et al. Cell survival under stress is enhanced by a mitochondrial ATP-binding cassette transporter that regulates hemoproteins [J]. Cancer Res 2009, 69(13): 5560 - 5567
- [17] Chavan H, Oruganti M, Krishnamurthy P. The ATP binding cassette transporter ABCB6 is induced by arsenic and protects against arsenic cytotoxicity [J]. Toxicol Sci 2011, 120(2): 519 - 528
- [18] Mitsuhashi N, Miki T, Senbongi H, et al. MTABC3, a novel mitochondrial ATP-binding cassette protein involved in iron homeostasis [J]. Biol Chem 2000, 275(23): 17536 - 17540