

2011, 37(2): 0193-0199
ISSN 0257-4799; CN 32-1115/S
E-mail: CYKE@chinajournal.net.cn

家蚕新的卵色相关基因 *Bmwh2* 的克隆及组织表达与功能研究

栗凤鹏¹ 王雪芳¹ 吴金美^{1,2}

(¹江苏科技大学生物技术学院, 江苏镇江 212018; ²中国农业科学院蚕业研究所, 江苏镇江 212018)

摘要 腺苷三磷酸结合盒转运蛋白(ATP-binding cassette transporter, ABC 转运蛋白)是古老而庞大的家族,广泛分布于从细菌到人类各种生物体中,主要利用 ATP 水解释放的能量实现多种底物的跨膜主动转运。通过 RT-PCR 扩增、克隆测序了家蚕 ABC 转运子 *Bmwh2* 完整的开放阅读框。用生物信息学方法分析发现, *Bmwh2* 有 14 个外显子和 13 个内含子, 编码 689 个氨基酸残基, 分子质量 77.38 kD, 等电点 8.42; *Bmwh2* 含有 1 个核苷酸结合结构域和 6 个 α 螺旋构成的跨膜结构域, 为半转运子, 属于家蚕 ABC 转运子超家族 G 亚族成员。利用半定量 RT-PCR 方法分析 *Bmwh2* 在家蚕 5 龄第 3 天幼虫不同组织的表达水平, 以精巢中的相对表达量最高。用合成的 siRNA 显微注射胚胎发育时期的蚕卵, 对 *Bmwh2* 进行干涉研究, 获得了白卵和嵌合体的干涉表型。根据实验结果, 推测 *Bmwh2* 可能参与家蚕浆液膜色素前体的转运。

关键词 家蚕; *Bmwh2* 基因; ABC 转运子; RNA 干涉; 蚕卵; 色素

中图分类号 S881.2; Q78 文献标识码 A 文章编号 0257-4799(2011)02-0193-07

Cloning, Tissue Expression and Functional Study of a New Egg Colour Related Gene *Bmwh2* from Silkworm, *Bombyx mori*

LI Feng-Peng¹ WANG Xue-Fang¹ WU Jin-Mei^{1,2*}

(¹ College of Biotechnology, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang Jiangsu 212018, China; ² The Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang Jiangsu 212018, China)

Abstract ATP-binding cassette (ABC) transporter proteins constitute one of the most ancient and largest protein super-families and are widely distributed in various organisms from bacteria to human. The ABC transporters require energy from adenosine triphosphate (ATP) hydrolysis to transport various substrates across cellular membranes. The complete open reading frame (ORF) of *Bombyx mori* ABC transporter encoded in *Bmwh2* gene was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and sequenced. Bioinformatic analysis showed that the *Bmwh2* cDNA has 14 exons and 13 introns, which codes for 689 amino acid residues with pI 8.42 and a predicted molecular mass of 77.38 kD. *Bmwh2* protein is a half-transporter with one cytosolic nucleotide binding domain (NBD, also called ATP-binding cassettes) and one transmembrane domain (TMD) that consists of 6 α -helices. It belongs to subfamily G of the *Bombyx mori* ABC transporter superfamily. Semi-quantitative RT-PCR analysis to the expression of *Bmwh2* gene in different tissues of the 3rd day larvae of the 5th instar indicated that the highest expression level was in testis. A number of white eggs and chimeric RNAi (RNA interference) phenotypes were obtained by microinjecting synthesized siRNA corresponding to the *Bmwh2* gene into *Bombyx mori* eggs at embryonic development stage. Based on the above results, it is suggested that *Bmwh2* may be involved in transportation of the precursors of serosal pigments in silkworm egg.

Key words *Bombyx mori*; *Bmwh2* gene; ATP-binding cassette transporter; RNA interference; Silkworm egg; Pigment

收稿日期: 2010-12-30 接受日期: 2011-01-13

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, 博士, 研究员。

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

腺苷三磷酸结合盒转运蛋白(ATP-binding cassette transporter, ABC 转运蛋白)超家族由于含有一个腺苷三磷酸(ATP)的结合盒(ATP-binding cassette

transporter, ABC) 而得名。ABC 转运蛋白是膜整合蛋白,它利用水解 ATP 的能量对溶质中各种生物分子进行跨膜转运,其转运的底物包括糖、氨基酸、金属离子、多肽、蛋白质、细胞代谢产物和药物等^[1]。ABC 转运子是一类保守性很强的转运子,在生物体中以全分子转运子或半分子转运子的形式存在,全分子转运子由 2 个跨膜结构域(transmembrane domain, TMD) 和 2 个核苷酸结合结构域(nucleotide binding domain, NBD) 构成,半分子转运子依赖形成同源或异源二聚体发挥作用。每个半分子转运子包括 1 个跨膜结构域和 1 个核苷酸结合结构域,每个跨膜结构域一般由 6 个 α 螺旋构成,它们形成一个跨膜通道以实现底物分子的跨膜运输,同时参与底物的识别过程。ABC 转运蛋白的 NBD 位于细胞质内,在核苷酸结合结构域内有一个长约 200 个氨基酸的非常保守的序列,包含 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) 等一些小的保守区域^[2]。根据 ABC 转运蛋白结构域构成和氨基酸序列的同源性,ABC 转运子被分成几个亚家族,哺乳动物中发现 7 个 ABC 转运子亚族(ABCA-ABCG)^[3],而在果蝇(*Drosophila melanogaster*)^[4]、斑马鱼(*Danio rerio*)^[5]等多种生物体基因组序列中发现了 ABC 转运子的第 8 个亚族——ABCH。ABC 转运蛋白参与了生物体内各种生理功能的调节,如维持细胞内外的渗透压平衡、抗原呈递、细胞分化、细菌免疫,以及胆固醇和脂质的运输等等^[1]。研究发现人类基因组的 48 个 ABC 转运蛋白的家族成员中,有 17 个与胆囊纤维症、脑白质肾上腺萎缩症、高密度脂蛋白缺乏症、动脉粥样硬化等疾病密切相关^[4-6]。果蝇中发现的一些 ABC 转运蛋白家族成员,如 White 通过与 Scarlet 或 Brown 蛋白形成异源二聚体,主要参与体内眼色素前体的转运,与眼色的形成密切相关^[7-9]。

家蚕正常型卵色品种刚产下的卵为黄白色,约 20 h 后逐渐变深,最后呈黑褐色或鼠灰色。浆液膜色素与眼色素属于同类,由色氨酸经甲酰犬尿氨酸、犬尿氨酸形成 3-羟犬尿氨酸,再进一步形成眼色素。家蚕卵色突变丰富多彩,主要有各种红色卵、白色卵、褐色卵等,其中家蚕的白色卵突变是由于浆液膜中缺乏色素所致。在家蚕中,存在很多因眼色素合成与积累受阻而引起的眼色和卵色的突变系统,

这些突变系统是研究突变基因与生化代谢途径关系的良好材料,同时也为筛选出人眼可见的性状基因作为转基因的标志基因提供了素材。2000 年 Abraham 等^[10]通过比较基因组学和 RT-PCR 的方法在家蚕中分离出了 3 条与果蝇 White 基因类似的部分 cDNA 序列片段,并将其命名为 *Bmwh1*、*Bmwh2*、*Bmwh3*。随后的研究表明,*Bmwh3* 与 *Bmw-3* 基因位于相同染色体的同一位点,编码一种依赖于 ATP 的跨膜转运蛋白,参与了眼色素前体和尿酸的转运,与白眼、白卵和油蚕的形成有关^[11-14]。目前关于 *Bmwh2* 基因的功能尚不清楚,而对 *Bmwh2* 等 ABC 转运子的研究,将有助于进一步阐述家蚕色素或色素前体转运的过程和分子机制,有助于筛选理想的外源基因导入家蚕基因组的基因型选择标记基因,也有助于为其它昆虫的色素代谢机制研究提供参考。

本项研究对家蚕 *Bmwh2* 基因进行克隆和生物信息学分析,并采用半定量 RT-PCR 方法分析该基因在家蚕不同组织中的表达情况,通过 siRNA 干涉初步探讨该基因的功能,为下一步深入研究其功能机制奠定基础。

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。pMD18-T 载体购自 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 RNAisoTM Plus 购自 TaKaRa 公司,MLV 反转录酶和各种限制性内切酶均购自 Promega 公司,小抽试剂盒购自 Ax-ygene 生物公司,Ex Taq HS 酶和 PCR 产物胶回收试剂盒均购自 TaKaRa 公司,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 家蚕总 RNA 的提取

取家蚕 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 NAisoTM Plus 试剂盒分别提取 RNA,操作步骤按照说明书进行,采用 Oligo(dT)₁₈ 和 MLV 反转录酶反转录合成 cDNA 第 1 链,参照说明书进行。

1.3 *Bmwh2* 基因的克隆及序列测定

根据 *Bmwh2* 基因序列(GenBank 登录号:

HQ896030) 设计引物: *Bmwh2*-F (5'-GAATTTAAAG-TAAACCACCGCGCTTGA-3') 和 *Bmwh2*-R (5'-ACG-GCTGTTGATTTCCGGTTTGA-3')。引物设计采用 NCBI 在线设计。以全蚕 RNA 反转录的 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 (50 μ L): 10 \times PCR buffer 5 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 4 μ L, 10 μ mol/L 上、下游引物各 1 μ L, cDNA 模板 3 μ L, 5 U/ μ L Ex *Taq* HS 酶 0.5 μ L, ddH₂O 35.5 μ L。PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 循环 30 次; 72 $^{\circ}$ C 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。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 TA 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物工程技术有限公司进行测序验证。

1.4 *Bmwh2* 基因的生物信息学分析

利用 GenBank 的 BLASTN 和 BLASTP 工具进行核酸序列和蛋白序列的相似性分析; 用 Sim4 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/sim4.php>) 对基因外显子和内含子进行分析; 用 ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) 和 ProtScale (<http://www.expasy.ch/20%tools/protscale.html>) 分别对 *Bmwh2* 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, 用于同源性的序列从 NCBI 下载。多序列比对利用 ClustalX 软件, 采用 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。

1.5 *Bmwh2* 基因的组织表达谱分析

设计 1 对特异性引物 *Bmwh2*-sqF (5'-CGTG-TACCAGGGCAGCACCG-3')、*Bmwh2*-sqR (5'-TGT-GAGCGAACAGCCGACAGG-3'), 取家蚕 5 龄第 3 天幼虫各组织 RNA 1 μ g 进行反转录合成 cDNA, 以家蚕 *eTIF4A* 基因 (GenBank 登录号: DQ443290.1) 作为内参^[15] (*eTIF4*-F: 5'-CTGCAATCCAGCAACG-CGCA-3', *eTIF4*-R: 5'-AGCCAATCCACCTTGCGA-CGG-3'), 进行半定量 RT-PCR 分析。反应体系 50 μ L, 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 59 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 循环 25 次; 72 $^{\circ}$ C 10 min,

4 $^{\circ}$ 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 公司产品) 检测分析。

1.6 *Bmwh2* 干涉实验

1.6.1 *Bmwh2* 干涉序列的制备 根据 *Bmwh2* 基因的测序结果, 由广州市锐博生物科技有限公司设计合成 si*Bmwh2* 干涉序列 (正义链: 5'-GCUA-CAUCAUGCAGGAUAAAdTdT-3', 反义链: 3'-dTdT-CGAUGUAGUACGUCCUAUU-5'), 选用王根洪等^[14] 设计的 si*Bmwh3* (2)-3'm2 (正义链: 5'-GGCAA-GACCGUGGUCUCG-3', 反义链: 3'-UUCCCGUUCU-GGCACCAGACG-5', 按常规设计的 siRNA 正义链 3'端引入 2 个错配碱基得到的 siRNA) 作为阳性对照。把目的片段的 siRNA 和阳性对照稀释至 0.266 g/L, 具体操作参照公司说明书, -20 $^{\circ}$ C 避光保存。

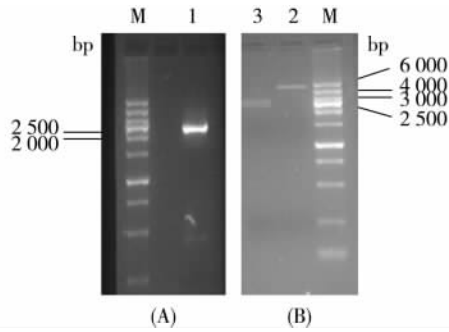
1.6.2 蚕卵准备及显微注射 将产后 10~12 h 的蚕卵, 用质量分数为 15.5% 的盐酸溶液 (含 2% 福尔马林) 于 46 $^{\circ}$ C 浸泡 5 min 以解除滞育, 把同一蛾产下的卵均分成 3 份, 用双面胶将蚕卵固定于载玻片上, 用微量注射仪分别注射 si*Bmwh3* (2)-3'm2、si*Bmwh2* 和灭菌的去离子水 (ddH₂O), 注射体积 20 nL 左右。注射后立即放入灭菌的培养皿中 (内放灭菌棉以保持湿度), 置于 25 $^{\circ}$ C 条件下催青, 使蚕卵正常发育。

1.6.3 注射后的 siRNA 表型观察 在蚕卵注射后的第 2 天开始统计未着色卵、嵌合体卵和深褐色卵的数量, 以后每天观察记录未着色卵及嵌合体卵出现情况, 并记录卵色的变化情况。

2 结果与分析

2.1 *Bmwh2* 基因的克隆及序列测定

以 5 龄第 3 天幼虫全蚕 cDNA 为模板, 使用 *Bmwh2*-F/*Bmwh2*-R 引物进行 PCR 扩增, 得到大小为 2.3 kb 的片段 (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, 用 *Eco*R V 单酶切和 *Xba* I /*Hind* III 双酶切鉴定 (图 1-B), 对鉴定正确的阳性克隆进行测序。结果表明, 克隆得到的片段为 *Bmwh2* 基因, 与预测的基因序列基本相同。



M. Wide Range DNA marker 1. PCR 扩增产物
 2. 含有外源片段重组质粒的 *EcoRV* 酶切产物
 3. 含有外源片段重组质粒的 *Xba I / Hind III* 酶切产物
 1. PCR amplification product 2. Recombinant plasmid DNA containing foreign fragment digested with *EcoRV*
 3. Recombinant plasmid DNA containing foreign fragment digested with *Xba I* and *Hind III*

图1 *Bmwh2* 基因的 PCR 扩增产物 (A) 与重组质粒酶切产物 (B) 电泳图谱

Fig. 1 Electrophoretograms of PCR amplification product of *Bmwh2* gene (A) and enzymatic digestion product of recombinant plasmid (B)

2.2 *Bmwh2* 基因的生物信息学分析

克隆的 *Bmwh2* 片段包括完整的 ORF, 全长为 2 327 bp, 共编码 689 个氨基酸, Sim4 分析该基因的外显子、内含子结构显示其具有 14 个外显子和 13 个内含子, 外显子/内含子边界处均符合 GT-AG 规则(图 2)。利用测序结果在家蚕基因组数据库^[16]中进行 BLASTN 检索, 发现 *Bmwh2* 与 BGIBMGA-005202 和 BGIBMGA005201 中大部分序列完全相同, 通过对基因所在的 scaffold 分析表明, BGIBMGA005202 和 BGIBMGA005201 位于同一个 scaffold(nscaf2825) 上的相邻位置, *Bmwh2* 的核苷酸序列在 scaffold 上的位置包括 BGIBMGA005202 和 BGIBMGA005201 的核苷酸所在的区域。 *Bmwh2* 的 mRNA 前半部分序列(33 ~ 279 bp) 与 BGIBMGA-005201 的 mRNA(68 ~ 314 bp) 完全相同, *Bmwh2* 的 mRNA 后半部分序列(280 ~ 2 070 bp) 与 BGIBMGA-005202 的 mRNA 对应序列完全相同。我们推测家蚕 *Bmwh2* 在家蚕基因组数据库中可能被装配成了 2 个相邻的基因。

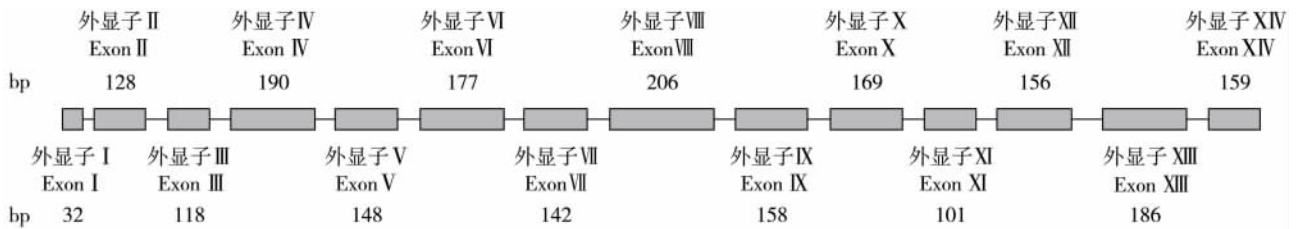


图2 *Bmwh2* 基因的结构示意图

Fig. 2 Schematic diagram of *Bmwh2* gene structure

ProtParam 预测 *Bmwh2* 蛋白的分子质量为 77. 38 kD, 等电点为 8. 42。ProtScale 对氨基酸序列进行疏水性分析, 预测结果显示, *Bmwh2* 蛋白疏水性最大值为 3. 444, 最小值为 -2. 822, 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 *Bmwh2* 蛋白具有 1 个核苷酸结合结构域和 1 个有 6 个 α 螺旋构成的跨膜结构域(图 3), 是 ABC 转运子 G 亚族成员。

目前, ABC 转运子已在许多物种的基因组中被发现, 如在果蝇基因组中发现 65 个, 在按蚊(*Anopheles sinensis*) 基因组中发现 44 个, 在人类基因组中发现 48 个。通过对家蚕基因组数据库分析, 初步确定家蚕基因组数据库中可能存在 47 个 ABC 转

运子, 其中 ABCG 亚族可能存在 8 个成员。运用 ClustalX 软件对不同物种与 *Bmwh2* 同源的序列进行比对, 构建进化树(图 4), 发现 *Bmwh2* 与蜜蜂(*Apis mellifera*)、金小蜂(*Nasonia vitripennis*) 的同源氨基酸序列在进化关系上比其它昆虫更为接近(与蜜蜂 XP_397486. 2 的氨基酸序列相似性达 74. 9%); 与果蝇的进化关系次之, 其中 *Bmwh2* 与果蝇 CG3164(GenBank 登录号: NP_722605) 的氨基酸序列相似性最高, 而不是果蝇 White(GenBank 登录号: AAF45826) 的氨基酸序列, 后者与 *Bmwh3* 相似性最高。通过对部分昆虫和哺乳动物 ABC 转运蛋白分析发现, 它是一类广泛存在的转运子。



方框内的序列分别为 Walker A、Signature C 和 Walker B 结构域, 阴影为跨膜区域 (TM)。Walker A and B as well as the Signature C motifs are framed. Transmembrane domain (TM) are shaded.

图 3 预测的 *Bmwh2* 基因编码氨基酸序列

Fig. 3 Deduced amino acid sequence encoded by *Bmwh2* gene

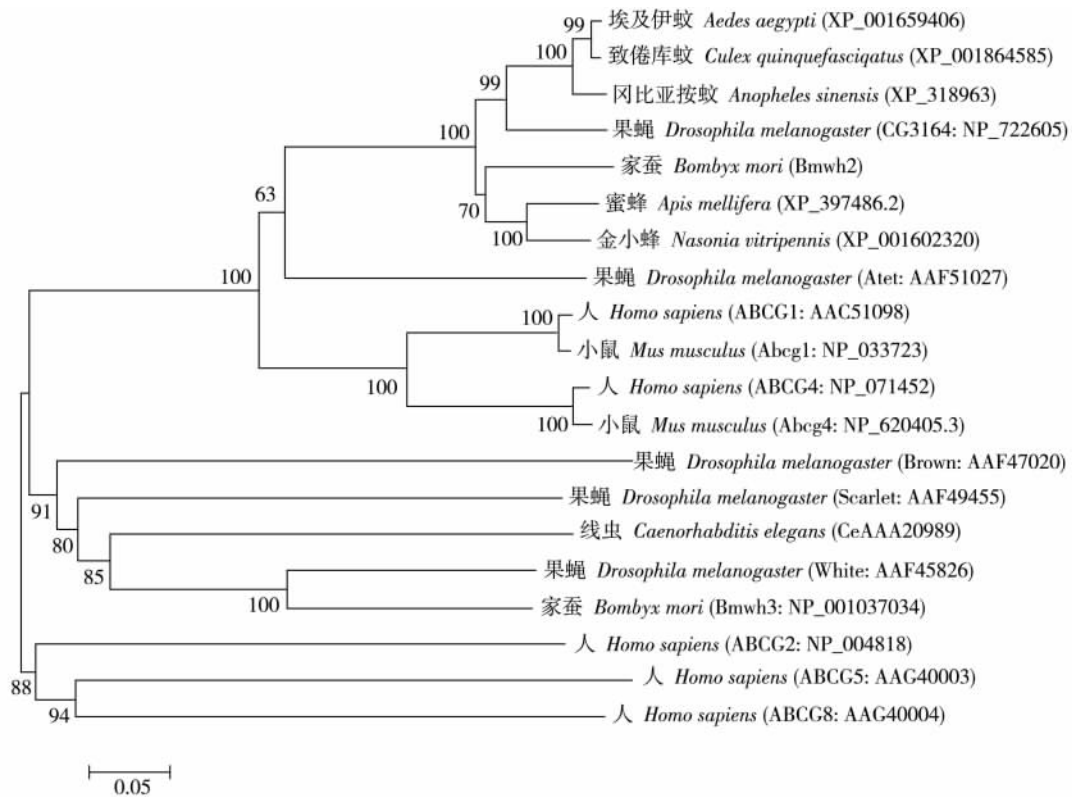


图 4 基于 *Bmwh2* 与其它物种同源氨基酸序列的系统发生树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of *Bmwh2* and homologous proteins from other species

2.3 *Bmwh2* 基因在家蚕不同组织的表达

以 *Bmwh2*-sqF/*Bmwh2*-sqR 为引物, 以 *eTIF4A* 为内参, 对家蚕 5 龄第 3 天幼虫组织的 cDNA 进行 RT-PCR, 反应结束后各取 10 μ L 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。结果表明, *Bmwh2* 在精巢中的相对表达量最高, 在表皮、后部丝腺和马氏管中的相对表达量最低(图 5)。通过在家蚕基因组数据库中检索发现, *Bmwh2* 编码的氨基酸序列与数据库中的 BGIBMGA005202 的编码氨基酸序列的相似性为 97.4%, 与 BGIBMGA005201 编码氨基酸序列的相似性为 45.5%。通过与家蚕 5 龄第 3 天幼虫组织表达谱比较发现, *Bmwh2* 与 BGIBMGA005202 在家蚕各组织的表达情况基本一致。

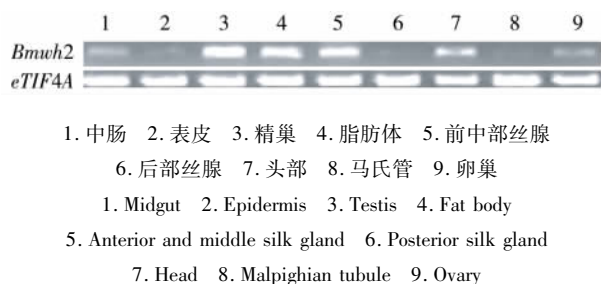
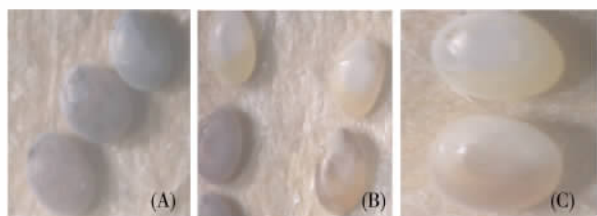


图 5 *Bmwh2* 基因在家蚕 5 龄第 3 天幼虫组织的表达图谱

Fig. 5 Expression profile of *Bmwh2* gene in various tissues of day 3 of the 5th instar *Bombyx mori* larvae

2.4 *Bmwh2* siRNA 对蚕卵表型的影响

自产卵高峰期后 10 ~ 20 h, 向供试蚕卵注射 si*Bmwh2* 和 si*Bmwh3*(2)-3'm2, 结果卵色加深时间都有不同程度的延迟。注射后 2 d, 观察到了干涉现象(图 6), 未着色卵、嵌合体卵和深褐色卵的数量统



A. 注射水 B. 注射 si*Bmwh2* C. 注射 si*Bmwh3*(2)-3'm2
A. Injecting ddH₂O B. Injecting si*Bmwh2*
C. Injecting si*Bmwh3*(2)-3'm2

图 6 正常蚕卵注射 siRNA 物质后产生的表型变化

Fig. 6 Phenotypic changes after injecting siRNA substances into normal *Bombyx mori* eggs

计结果(表 1)表明, 在产卵高峰期后 10 ~ 20 h 内注射 si*Bmwh2* 和 si*Bmwh3*(2)-3'm2 均产生了白卵、嵌合体卵和深褐色卵, 其中: 注射 si*Bmwh2* 的白卵产生率为 16.81%, 嵌合体卵产生率为 21.12%; 注射 si*Bmwh3*(2)-3'm2 的白卵产生率为 23.39%, 嵌合体卵产生率为 36.29%; 注射 ddH₂O 的白卵产生率为 1.40%, 嵌合体卵产生率为 0。实验结果说明注射 si*Bmwh2* 和 si*Bmwh3*(2)-3'm2 产生白卵、嵌合体卵的效果非常显著。

表 1 正常蚕卵注射 siRNA 物质后的干涉效果统计

Table 1 A statistics on the effect of interference after injection of siRNA substances into normal *Bombyx mori* eggs

注射物质 Injected substance	注射卵的数量 / 粒 Number of eggs injected	卵色统计数量 / 粒 Number of eggs with various colors		
		白卵 White	嵌合体卵 Chimeric	深褐色卵 Dark brown
si <i>Bmwh2</i>	232	39	49	144
si <i>Bmwh3</i> (2)-3'm2	124	29	45	50
ddH ₂ O	215	3	0	212
不注射 No injection	200	0	0	200

3 讨论

本研究采用 RT-PCR 技术克隆得到了 *Bmwh2* 基因 cDNA 序列, 利用生物信息学方法分析该基因包含 14 个外显子与 13 个内含子。功能预测显示其氨基酸序列具有 6 个 α 螺旋组成的跨膜结构域和 1 个核苷酸结合结构域, 是 ABC 转运蛋白 G 亚族成员。通过对数据库中基因所在的 scaffold 分析表明, BGIBMGA005202 和 BGIBMGA005201 位于同一个 scaffold(nscf2825) 上的相邻位置, *Bmwh2* 的核苷酸序列在 scaffold 上的位置包括 BGIBMGA005202 和 BGIBMGA005201 的核苷酸序列所在的区域。*Bmwh2* 基因在家蚕基因组数据库中可能被装配成了 2 个相邻的基因。半定量 RT-PCR 方法分析表明, *Bmwh2* 基因在家蚕 5 龄第 3 天幼虫精巢中的相对表达量最高, 在头部、中肠、前中部丝腺、脂肪体、卵巢和表皮中均有不同程度的表达。通过对 *Bmwh2* 基因预测的氨基酸序列在家蚕基因组数据库中检索发现, *Bmwh2* 编码的氨基酸序列与数据库中的 BGIBMGA005202 的编码氨基酸序列的相似性为 97.4%, 与 BGIBMGA005201 编码氨基酸序列的相

似性为 45.5%。对家蚕 5 龄第 3 天幼虫组织表达谱比较发现, *Bmwh2* 与 BGIBMGA005202 在家蚕各组织的表达情况基本一致。

siRNA 介导的 RNAi 由于其序列短、特异性高、易获得、成本低已成为研究基因功能的有效手段^[17]。本研究通过体外转录合成 siRNA 介导的方式对胚胎发育时期的蚕卵进行干涉实验, 根据 Hohjoh 等^[18]的报道, 在 siRNA 正义链 3' 端错配 2 个碱基可以明显提高 siRNA 的干涉效率, 因此我们选用王根洪等^[14]设计的干涉效果显著的 siBmwh3 (2) -3'm2 作为阳性对照。实验结果表明, 注射 siBmwh2 获得了一定数量的干涉表型, 且干涉效果显著, 说明设计的 siBmwh2 干涉序列对 *Bmwh2* 基因的干涉是有效的。家蚕的白色卵突变是由于浆液膜中缺乏色素所致, 因此, 推测 *Bmwh2* 是一个新的参与家蚕浆液膜色素前体转运的基因, 采用 siRNA 干涉 *Bmwh2* 基因, 导致 *Bmwh2* 蛋白参与的浆液膜色素前体的转运出现障碍, 最终形成白卵。但是, 关于 *Bmwh2* 参与转运家蚕浆液膜色素前体的过程和机制目前仍然不清楚。

目前, 家蚕 ABC 转运蛋白的研究相对较少, 与果蝇 White 蛋白同源性最高的 *Bmwh3* 是最早被研究的家蚕 ABC 转运子。研究表明, *Bmwh3* 参与了眼色素前体和尿酸的转运, 与白眼、白卵和油蚕的形成有关, 其有望作为转基因筛选的标记基因。*Bmwh2* 和 *Bmwh3* 均为 ABCG 亚族成员, 需要与本身或其它半分子转运蛋白形成同源或异源二聚体才能发挥作用, 目前关于它们是如何形成二聚体, 从而实现色素前体的转运机制尚不清楚。通过对 *Bmwh2* 等 ABC 转运子的研究, 有助于进一步阐述白卵形成的分子基础, 有助于为家蚕和其它物种中 ABC 转运子功能的研究提供参考, 并能筛选出肉眼可见的转基因的标志基因提供帮助。

致谢 在研究过程中, 中国农业科学院蚕业研究所唐顺明老师在蚕卵的显微注射方面给予了很大的帮助, 沈中元、汪生鹏和徐安英等多位老师在家蚕等实验材料方面给予了大力支持, 在此表示衷心感谢!

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] Gottesman M M, Ambudkar S V. Overview: ABC transporters and human disease [J]. J Bioenerg Biomembr, 2001, 33(6): 453 - 458
- [7] Dreesen T D, Johnson D H, Henikoff S. The brown protein of *Drosophila melanogaster* is similar to the white protein and to components of active transport complexes [J]. Mol Cell Biol, 1988, 8(12): 5206 - 5215
- [8] Sullivan D T, Bell L A, Sullivan D T, et al. Purine transport by Malpighian tubules of pteridine-deficient eye color mutants of *Drosophila melanogaster* [J]. Biochem Genet, 1979, 17(5/6): 565 - 573
- [9] Tearle R G, Belote J M, Howells A J, et al. Cloning and characterization of the *scarlet* gene of *Drosophila melanogaster* [J]. Genetics, 1989, 122(3): 595 - 606
- [10] Abraham E G, Sezutsu H, Tamura T, et al. Identification and characterization of a silkworm ABC transporter gene homologous to *Drosophila* White [J]. Mol Gen Genet, 2000, 264(1/2): 11 - 19
- [11] Quan G X, Kanda T, Tamura T, et al. Induction of the *white egg3* mutant phenotype by injection of the double-stranded RNA of the silkworm *white* gene [J]. Insect Mol Biol, 2002, 11(3): 217 - 222
- [12] Kōmoto N, Quan G X, Sezutsu H, et al. A single-base deletion in an ABC transporter gene causes White eyes, White eggs, and translucent larval skin in the silkworm *w^{-3oe}* mutant [J]. Insect Biochem Mol Biol, 2009, 39(2): 152 - 156
- [13] 刘春, 帅小蓉, 程廷才, 等. 家蚕胚胎发育时期的 RNA 干涉研究 [J]. 生物化学与物物理进展, 2004, 31(4): 322 - 327
- [14] 王根洪, 刘春, 夏庆友, 等. siRNA 介导的家蚕 ABC 转运蛋白相关基因的干涉研究 [J]. 蚕业科学, 2005, 31(2): 117 - 120
- [15] Wang G H, Xia Q Y, Zhu L. 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
- [16] Xia Q Y, Zhou Z Y, Lu C, et al. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*) [J]. Science, 2004, 306(5703): 1937 - 1940
- [17] 王逢会, 霍满鹏. 小干涉 RNA 介导的 RNA 干涉机制及其应用的研究进展 [J]. 延安大学学报: 自然科学版, 2007, 26(2): 75 - 77
- [18] Hohjoh H. Enhancement of RNAi activity by improved siRNA duplexes [J]. FEBS Lett, 2004, 557(1-3): 193 - 198