

家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂基因表达及其与茧层率的相关性研究

甘丽萍¹, 刘仁华¹, 龙菲菲², 张 进², 司马杨虎², 徐世清²

(1. 重庆三峡学院 生命科学与工程学院, 重庆 万州 404100; 2. 苏州大学 现代丝绸国家工程实验室, 江苏 苏州 215123)

摘要: 为研究家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂(Serpins)基因 *Spi1*、*Spi2* 与家蚕雌雄丝物质合成差异的关系, 应用 RT-PCR、实时定量 PCR 以及 Western blot 等方法, 比较了 6 个家蚕品种幼虫丝腺中丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 mRNA 和蛋白水平的表达情况, 并测定茧层率。结果显示, *Spi1* 基因在家蚕幼虫 5 龄中后期开始表达, 其中在中部丝腺(MSG)和后部丝腺(PSG)中的表达量都比较高, *Spi1* 基因在雄蚕的丝腺及中肠中持续表达时间均比雌蚕长, *Spi2* 在 MSG 以及头部和体壁有表达; Western blot 检测显示, SPI1 蛋白在雄性中从 4 龄眠期就有表达, 而雌性只在 5 龄末期有表达; *Spi1* 基因在雄性丝腺中表达和蛋白质翻译的持续时间均比雌性长; 品种之间, 菁松雌雄茧层率均较高, 与分子水平上其幼虫丝腺中 *Spi1* 基因表达量较高、SPI1 蛋白的表达显著高于其他品种相一致。表明家蚕丝物质合成效率与 *Spi* 基因在 mRNA 和蛋白水平上的表达量有关。

关键词: 家蚕; *Spi1* 基因; *Spi2* 基因; SPI1 蛋白; 茧层率

中图分类号: S881.2⁺1 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2014)02-0129-06

Gene Expression of Serine Protease Inhibitor (Serpins) Gene and Relationship with Ratio of Cocoon Shell in Silkworm, *Bombyx mori*

GAN Li-ping¹, LIU Ren-hua¹, LONG Fei-fei², ZHANG Jin², SIMA Yang-hu², XU Shi-qing²

(1. College of Life Science and Engineering, Chongqing Three Gorges University, Chongqing 404100, China;
2. National Engineering Laboratory for Modern Silk, Soochow University, Suzhou 215123, China)

Abstract: In order to ascertain molecular mechanism of serine protease inhibitor which is related to the differences of silk synthesis between the male and female of *Bombyx mori*, the mRNA and protein expression levels of serine protease inhibitor gene in larvae silkgland of different genders and varieties of *Bombyx mori* were investigated by RT-PCR, Real time PCR and Western blot. Meanwhile, the cocoon shell ratio was measured. It was showed that *Spi1* gene began to express in the late fifth instar larvae and had a high expression quantity in MSG and PSG, while *Spi2* was expressed in MSG, head and the body wall. The *Spi1* gene expression time of male silkworm was longer than that of female in silkgland and midgut. Western blot result showed that SPI1 was expressed from four molting stage in male whereas only expressed in the late fifth instars in female. However, the expression and protein translation of *Spi1* gene in silkgland of male silkworm lasted longer than that in silkgland of female. In varieties, the ratio of cocoon shell of Jingsong were high

收稿日期: 2013-10-10

基金项目: 重庆市教委项目(KJ131113); 重庆市科委项目(cstc2013jcyjA1202); 重庆三峡学院项目(12ZD11, 12ZZ31)

作者简介: 甘丽萍(1979-), 女, 甘肃张掖人, 副教授, 博士, 主要从事生物技术研究。E-mail: ganmei790717@163.com

in either male or female, which was consistent with the higher expression level of *Spil* in silk gland than other varieties, which basically reflected positive correlation between SPI1 protein and ratio of cocoon shell.

Key words: *Bombyx mori*; *Spil* gene; *Spi2* gene; SPI1; ratio of cocoon shell

家蚕是雌雄异体昆虫, 雄性蚕茧的茧层率比雌蚕茧高 2% 以上, 鲜茧出丝率比雌蚕茧高约 20%, 茧丝长显著高于雌蚕茧, 雄蚕茧丝的清洁度、茧丝纤度均方差等性状均显著优于雌蚕茧。专养雄性蚕比目前的雌雄混养可显著提高经济效益^[1], 实施雌雄茧分别缂丝、分别利用具有巨大的经济价值^[2-3]。5 龄是家蚕丝物质生产和积累的主要时期, 也是幼虫到蛹的过渡阶段, 90% 的丝蛋白都在这个时期合成。在丝腺特异表达的基因中有一类基因是丝氨酸蛋白酶抑制剂 (Serpins) 基因^[4]。Zou 等^[5]进行了家蚕 *Spi* 基因进化分析, 初步认为 *Spi* 基因的蛋白质产物可能在免疫防御中起到了一定的作用。5 龄中后期, 家蚕丝腺开始大量合成丝蛋白, SPI 开始大量分泌是维持正常丝腺细胞内环境的重要因素, 参与调控家蚕丝腺组织中蛋白酶的水解过程, 对保护丝蛋白在丝腺细胞中发生意外降解以及促进和保护茧丝纤维的形成有重要作用, 也可能通过抑制入侵昆虫或微生物所分泌蛋白酶的活性, 保护茧壳及蛹体^[6-8]。Nirmala 等^[9]克隆了 2 个家蚕丝腺特异表达的 *Spi* 基因 *Spil* 和 *Spi2*, 它们分别属于 Kazal 型和 Kunitz 型。Gan 等在使用家蚕性别与天然茧色性状差异系统所构建的家蚕茧色限性品种不同性别的丝腺与中肠标签文库中发现, *Spil* 和 *Spi2* 在雄性中表达量比在雌性中高^[10]。为了研究这类基因是否和茧层率有一定的关系, 本研究应用 RT-PCR、实时定量 PCR 测定了 *Spil* 与 *Spi2* 基因在不同组织、不同时期的 mRNA 水平表达情况, 并对比了 6 个生产品种中 *Spil*、*Spi2* 基因在 mRNA 水平和蛋白水平的表达情况, 同时与茧层率进行比较, 以期获得该类基因表达水平与家蚕幼虫丝物质生产之间的相关性, 为家蚕的高效养殖提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试品种 家蚕 Ysh (黄茧限性品种)、75 新 (斑纹限性品种)、锡方、菁松、C108 和 9213 共 6 个家蚕品种, 限性品种分雌雄, 由苏州大学生命科学学院遗传与发育生物学实验室保存。

1.1.2 试剂 DNA Marker、引物合成由上海生工生物工程技术服务有限公司提供, RNA 抽提试剂盒 Trizol plus、双链 cDNA 合成试剂盒、DNA 少量质粒抽提试剂盒、SYBR Premix Ex Taq (Perfect Real Time) 等购自大连宝生物公司 (TaKaRa); X-射线胶片 (柯达公司生产) 购自碧云天生物技术有限公司; SPI1 的多克隆抗体 (蛋白序列号 NP_001037044.1, 多肽序列: NH₂-KGSFPRYAYDSSSEDKC-CONH₂) 由百奇 (苏州) 生物有限责任公司制备合成; HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体购自上海优宁维公司; 其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.1.3 仪器 PCR 仪 (T-gradient) 由德国 Biometra 公司生产, 荧光定量 PCR (ABI7300) 由美国应用生物系统生产, SDS-PAGE 电泳仪、半干转膜由 Bio-Rad 公司生产, 凝胶成像系统 (GIS-2007) 购自上海天能科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 *Spil* 和 *Spi2* 的电子表达谱以及 RT-PCR 时空表达模式分析 电子表达谱: 利用 apEST 平台^[11], 对 *Spil* 和 *Spi2* 基因进行了以 EST 丰度为基础的电子表达谱的查询与分析。RT-PCR 时空表达模式: 家蚕黄茧限性品种 Ysh, 全龄 25 °C 自然光照环境, 幼虫桑叶育。根据幼虫血色, 选择 5 龄第 3 日雌雄蚕各 5 头, 分雌雄解剖分离 10 个组织, 包括体壁 (epidermis)、头 (head)、前部丝腺 (anterior silk gland, AMG)、中部丝腺 (middle silk gland, MSG)、后部丝腺 (posterior silk gland, PSG)、血淋巴 (hemocyte)、中肠 (midgut, MG)、马氏管 (malpighian tubule, MT)、性腺 (gonad) 和脂肪体 (fat body, FB), 进行基因组织表达谱的调查。同时, 从 3 龄眠期 (肉眼能根据脚色分辨雌雄个体) 到 5 龄第 7 日, 分雌雄分离丝腺、中肠进行时期表达谱调查。按照 TaKaRa 公司的 Trizol 试剂盒说明书提取所有组织总 RNA, 以 *actin3* 为内参基因, 研究 *Spil* 和 *Spi2* 基因在不同组织和不同时期的表达量^[12-14]。按照双链 cDNA 合成试剂盒说明合成 cDNA, PCR 扩增体系和反应程序参照上海生工生物工程技术服务有限公司 RT-PCR 试剂盒进行, 反应体系为 25 μL。反应程序为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 50 s, 55 °C 50 s, 72 °C 50 s, 30 个循环; 72 °C

延伸 10 min。扩增产物用琼脂糖凝胶电泳检测。

表 1 *Spil* 和 *Spi2* 的 PCR 扩增引物

基因名称	序列号	引物序列(5'-3')
<i>Spil</i>	NM_001043579.1	TTCACCTAACGCTAATCCTG
		TTCAACGCATTTGTCCT
<i>Spi2</i>	NM_001043582.1	GTCACCACCTCCAATGTCC
		GAGGCTCACTTGCGGTTT
<i>actin 3</i>	P04829.3	CTGCGTCTGGACTTGGC
		CGAGGGAGCTGCTGGAT

1.2.2 *Spil* 和 *Spi2* 在不同家蚕品种中的实时定量 PCR 表达 参照 1.2.1 方法,分离 5 龄 3 日家蚕 Ysh (黄茧限性品种,分雌雄)、75 新(斑纹限性品种,分雌雄)、锡方、菁松、C108、9213 丝腺组织,提取总 RNA。采用 SYBR Premix Ex Taq (Perfect Real Time)试剂盒进行测定,反应体系为 20 μ L。反应程序为:95 $^{\circ}$ C 变性 1 min;95 $^{\circ}$ C 5 s,55 $^{\circ}$ C 10 s,72 $^{\circ}$ C 10 s,45 个循环。反应过程由测定仪软件自动设定,每个样品重复 3 次。Real-time PCR 的数据用仪器自带的 Sequence Detection Software Version 1.3.1 软件处理,参照 Schefe 的方法进行扩增效率校正^[15]。以不同稀释浓度的组织 cDNA 为模板,制作 *spil*、*spi2* 及内参 *actin3* 基因的标准曲线。

1.2.3 SPI1 蛋白的免疫印迹检测(Western blot) 分

离 Ysh 品种 5 龄 3 日的脂肪体、血淋巴、中部丝腺、后部丝腺、生殖腺和中肠 6 个组织的蛋白质样品。取 4 龄眠期(4M)、5 龄 3 日(5L-3)、5 龄 7 日(5L-7) 3 个时间点雌雄的丝腺检测时期特异性和性别特异性。一抗为 SPI1 的多克隆抗体,二抗为 HRP 标记的羊抗兔 IgG(1:1 000),采用 ECL 发光显色胶片曝光法进行显色。同时,检测 Ysh(分雌雄)、75 新(分雌雄)、锡方、菁松、C108、9213 丝腺中 SPI1 蛋白的表达情况。

1.2.4 茧层率的测定 选取以上所述的 6 个供试品种,分雌雄在结茧期取 20 个蚕茧称总茧质量,蛹体取出后,称量茧层质量,计算茧层率。

1.3 数据处理

计算目的基因与内参基因 mRNA 产物的电泳条带的 OD₃₀₀ 比值,以平均值 \pm 标准差表示,用 SPSS 软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 *Spil* 和 *Spi2* 的电子表达谱及时空表达模式

apEST 软件检测结果显示,家蚕 *Spil* 和 *Spi2* 基因主要在丝腺表达,其中 *Spil* 在后部丝腺表达量比较高,而 *Spi2* 只在中部丝腺表达;从表达时期上看,这 2 个基因主要在 5 龄期表达(图 1)。

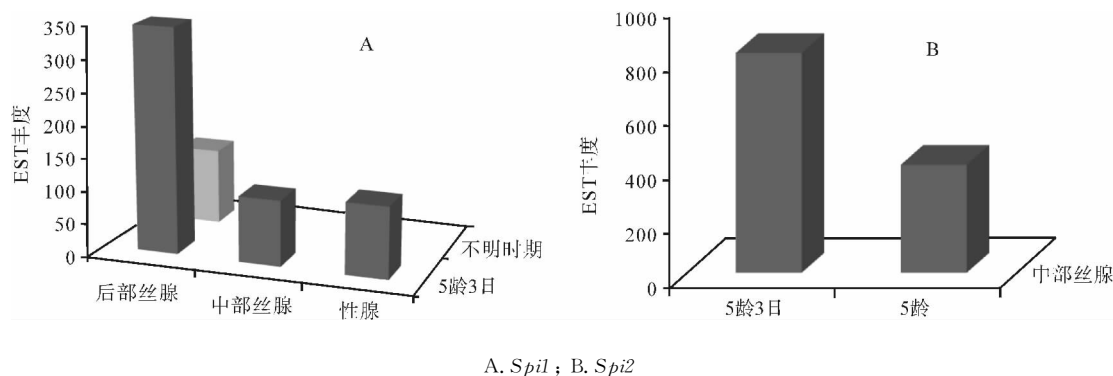
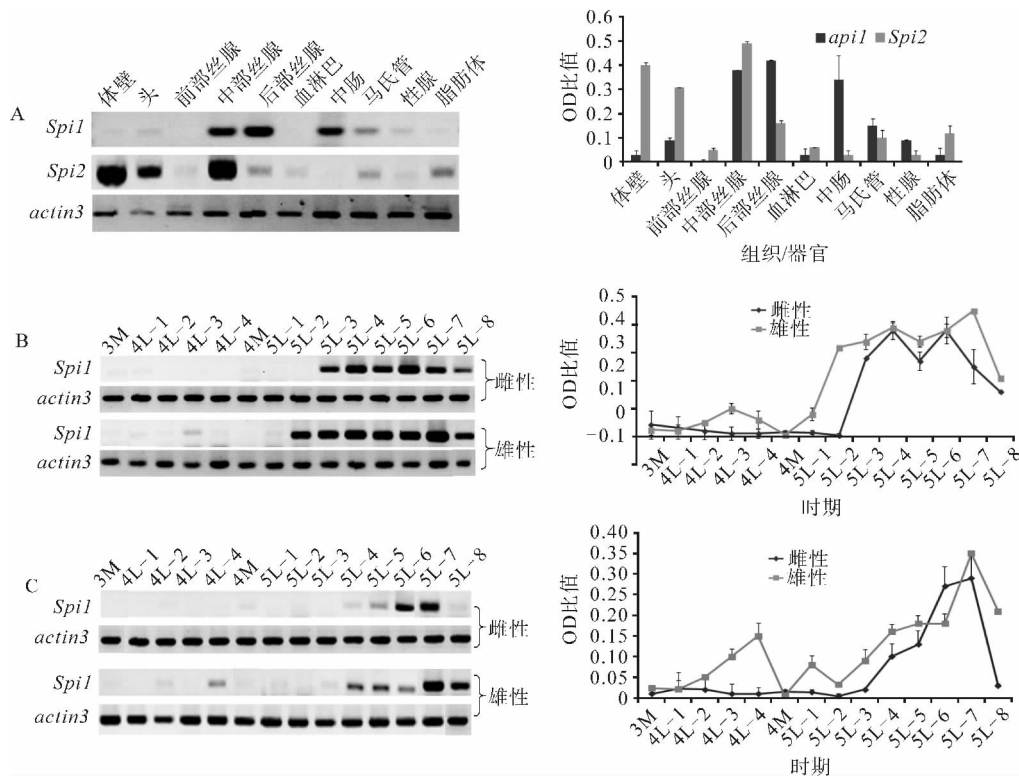


图 1 家蚕 *Spi* 基因的 apEST 表达谱

为了更好地验证 *Spil* 和 *Spi2* 在家蚕各组织不同发育时期的实际表达情况,检测了其在 Ysh 蚕品种雌雄 10 个组织中的表达谱,并研究了 *Spil* 基因在不同性别幼虫中从 3 龄眠期到 5 龄 8 日共 14 个时间点的表达量变化。如图 2 所示,*Spil* 基因在 MSG 和 PSG 有高量表达,在中肠中也有比较高的表达量;*Spi2* 基因在 MSG 和体壁中表达量最高,其

次为头部(图 2A)。*Spil* 基因在丝腺组织中的时期表达谱显示,该基因在雌性中从 5 龄 3 日开始表达;雄性从 5 龄 2 日开始表达,5 龄 7 日达到峰值并高于雌性。两者在熟蚕时(5L-8)表达下调(图 2B)。在中肠组织中,*Spil* 在 5 龄的中后期有表达,雄性的表达持续时间相对较长,在熟蚕期雌性不表达,而雄性有一定的表达量(图 2C)。



A. *Spil* 和 *Spi2* 的组织表达谱; B. *Spil* 在丝腺中的时期表达谱; C. *Spil* 在中肠中的时期表达谱; 左图是电泳图; 右图是换算的相应光密度比值; *actin3* 为内参基因; M 为眠期; 4L-1 为 4 龄 1 日, 其他同

图 2 *Spil* 和 *Spi2* 基因在 Ysh 品种雌雄幼虫的时空表达谱

Western blot 检测结果表明, 5 龄 3 日, SPI1 蛋白只在 Ysh 家蚕中部丝腺有表达(图 3); 从 3 个时期的丝腺组织检测中发现, 雌性在 5 龄 7 日有表达, 而雄性在 4 龄眠期、5 龄 3 日、5 龄 7 日均表达, 以 5 龄 7 日表达量最大(图 4)。



图 3 SPI1 蛋白在 Ysh 幼虫不同组织中的表达情况

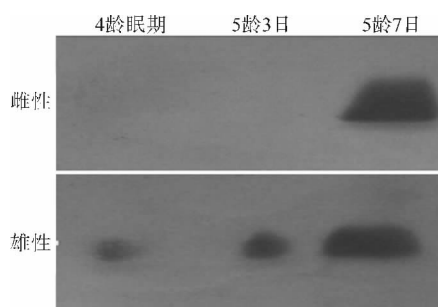
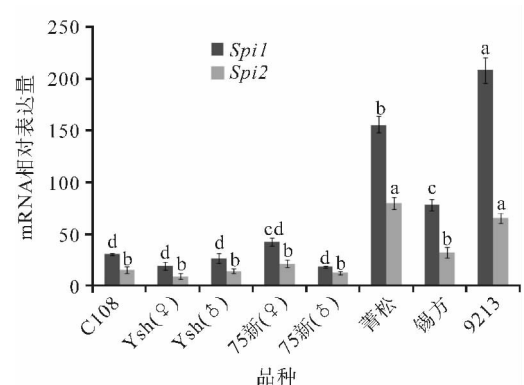


图 4 SPI1 蛋白在 Ysh 幼虫不同时期、不同性别中的表达情况

2.2 不同家蚕品种中 *Spil* 和 *Spi2* 基因的表达情况

Spil 和 *Spi2* 在不同家蚕品种丝腺组织中的定量表达结果显示, *Spil* 基因的表达水平均比 *Spi2* 高。 *Spil* 在 9213 中表达量最高, 其次为菁松和锡方, 两者差异显著, 均显著高于 Ysh 和 C108。 *Spi2* 在菁松和 9213 中表达量最高, 与其他品种之间差异均达到显著水平(图 5)。



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同

图 5 不同家蚕品种 *Spil* 和 *Spi2* 基因的定量表达情况

Western blot 检测结果表明, SPI1 蛋白在不同品种的 5 龄 3 日幼虫丝腺中均有表达。其中, 在菁松中的相对表达量显著高于其他品种, 而在 Ysh 雌性幼虫中表达量非常低, 与图 4 中雄性显著高于雌性基本一致。

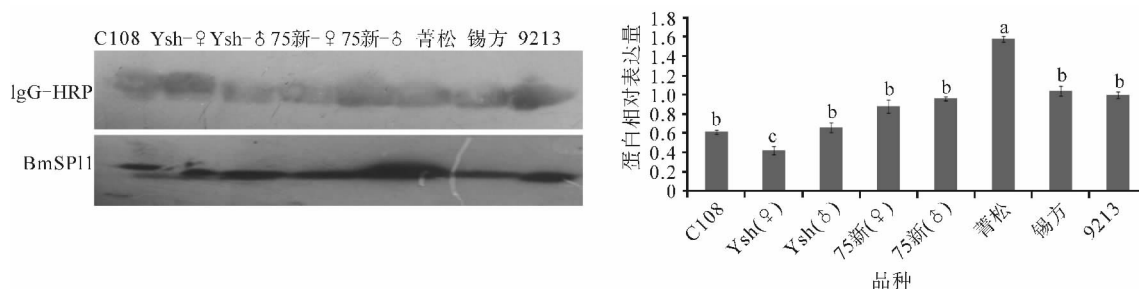


图6 不同家蚕品种 SPI1 蛋白的表达情况

2.3 不同家蚕品种的茧层率

从总茧质量来看,每个家蚕品种的雌茧质量均显著高于雄茧。雌茧中,C108与菁松茧质量高于其他品种,Ysh最低;雄茧中,锡方茧质量最高,显著高

于其他品种,菁松次之。从茧层率来看,剥去较重的雌蛹,雄性的茧层率显著高于雌性,C108不论是雌性还是雄性茧层率都最低,菁松、锡方、9213相对高于限性品种(图7)。

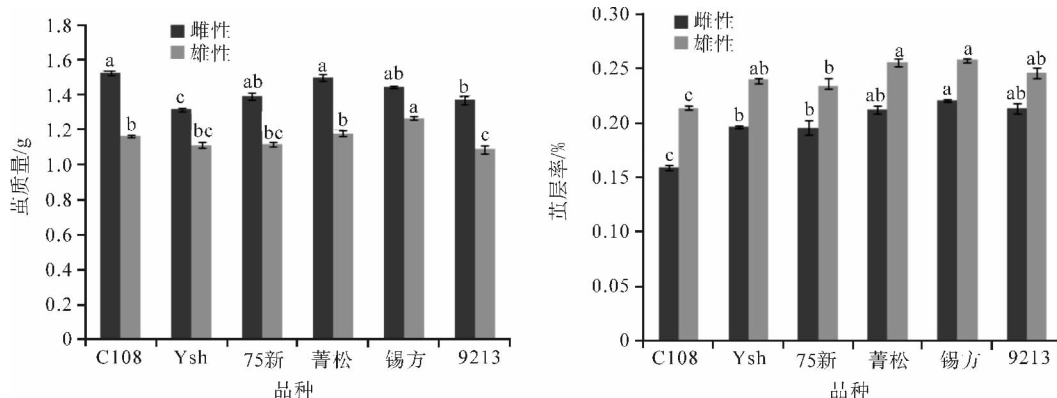


图7 不同家蚕品种的茧质量和茧层率

3 结论与讨论

本研究结果表明,*Spil* 基因的时空表达模式从分子水平上印证了 SPI 在 5 龄中后期大量分泌并参与丝物质的形成,同时在 mRNA 和蛋白水平都表明 *Spil* 在 5 龄雄性幼虫丝腺中高表达,推测与雄蚕丝物质合成效率较高有一定的关联。家蚕 *Spil2* 除了在 MSG 高表达之外,在体壁和头部也有表达,由此推测,其可能还在变态蜕皮过程中执行着某种未知的功能。王凌燕^[16] 对家蚕丝腺特异高量表达的 *BmSPIs5*、*BmSPIs6*、*BmSPIs8*、*BmSPIs13*、*BmSPIs14* 5 种丝氨酸蛋白酶抑制剂基因进行了组织特异性表达验证,发现它们在丝腺之外的其他组织都有不同表达。家蚕不同时期和组织间所需丝氨酸蛋白酶抑制剂种类的差异,体现了复杂的丝物质合成与储藏调控网络。

从不同品种来看,菁松不论雌雄,茧层率均较高;而在分子水平上,幼虫丝腺中 *Spil* 基因表达量仅次于 9213,而该蛋白的表达显著高于其他品种,

初步反应出 SPI1 蛋白质含量与茧层率的正相关性。但 *Spil* 基因高表达的 9213 品种并未检测出 SPI1 蛋白的高表达,这可能与取材性别有一定的关系,因为除了限性品种外,其他 4 个品种幼虫无法进行雌雄分辨,未分雌雄进行研究,所以品种之间的蛋白差异结果还不完善,有待于进一步深入验证。

参考文献:

- [1] 项美华,庄大桓,何家禄,等.雌雄蚕若干生理特性的研究[J].蚕业科学,1982,8(1):20-25.
- [2] 杜周和,刘俊凤,胡祚忠,等.家蚕限性品种雌雄茧丝质性状差异研究[J].丝绸,2007(8):28-29.
- [3] 虞晓华,刘毅飞.雌雄蚕茧茧质和丝质差异性分析[J].纺织学报,2005,26(4):36-38.
- [4] Engles L. Review and application of serine protease inhibition in coronary artery bypass graft surgery[J]. Am J Health Syst Pharm,2005,62(18suppl4):9-14.
- [5] Zou Z, Picheng Z, Weng H, et al. A comparative analysis of serpin genes in the silkworm genome[J]. Genomics,2009,93(4):367-375.

- [6] Kuriora A, Yamaxki M, Hirano H. Trypsin inhibitor polymorphism in the cocoon of the silkworm[J]. J Seric sci jpn, 1999, 68(5):397-403.
- [7] Abrams E W, Mihoulides W K, Andrew D J. Fork head and Sage maintain a uniform and patent salivary gland lumen through regulation of two downstream target genes, *PH4alPhaSGI* and *PH4alPhaSGZ* [J]. Development, 2006, 133(18):3517-3527.
- [8] Kurioka A, Yamazaki M, Hirano H. Primary structure and possible functions of a trypsin inhibitor of *Bombyx mori*[J]. Eur J Biochem, 1999, 259(1/2):120-126.
- [9] Nirmala X, Mita K, Vanisree V, et al. Identification of four small molecular mass proteins in the silk of *Bombyx mori*[J]. Insect Mol Biol, 2001, 10(5):437-445.
- [10] Gan L P, Wang Y, Xi J. Long SAGE analysis of genes differentially expressed in the midgut and silk gland between the sexes of the silkworm *Bombyx mori*[J]. African Journal of Biotechnology, 2012, 11 (49): 10994-11012.
- [11] Gan L P, Zhang W Y, Niu Y S, et al. Construction and application of an electronic spatiotemporal expression profile and gene ontology analysis platform based on the EST database of the silkworm, *Bombyx mori*[J]. Journal of Insect Science, 2010, 10:1-14.
- [12] 黎欢吉, 彭云武, 王代钢. SSR 与 ISSR 分子技术在家蚕研究中的应用[J]. 现代农业科技, 2007(14):168-169.
- [13] 王更先, 司马杨虎, 张升祥, 等. RNA 干扰沉默 *Bm-DHS* 基因对家蚕生长发育的影响研究初探[J]. 华北农学报, 2011, 26(2):13-16.
- [14] 孔卫青, 杨金宏. 家蚕 *BmNaPi* 基因的克隆表达与酵母穿梭表达质粒的构建[J]. 华北农学报, 2011, 26(3):51-55.
- [15] Schefe J H, Lehmann K E, Buschmann I R, et al. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: Current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula[J]. J Mol Med, 2006, 84(11):901-910.
- [16] 王凌燕. 家蚕丝腺特异高量表达丝氨酸蛋白酶抑制剂的研究[D]. 重庆:西南大学, 2009:49.