

刘丽华,沈卫德,李 兵. 细胞周期蛋白家族基因在家蚕幼虫蜕皮过程中的表达[J]. 江苏农业科学,2016,44(5):45-47.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.05.011

细胞周期蛋白家族基因在家蚕幼虫蜕皮过程中的表达

刘丽华¹, 沈卫德^{2,3}, 李 兵^{2,3}

(1. 通化师范学院生物系, 吉林通化 134000; 2. 苏州大学基础医学与生物科学学院, 江苏苏州 215123;

3. 现代丝绸国家工程实验室, 江苏苏州 215123)

摘要:细胞周期蛋白(cyclin)是调控真核生物细胞有丝分裂的重要蛋白。以家蚕 1~5 龄幼虫的眠蚕和起蚕为材料,采用实时荧光定量 PCR 方法对家蚕 cyclin 家族基因(*CyclinA*、*CyclinB*、*CyclinB3*、*CyclinE*)在不同龄期幼虫蜕皮过程中的表达进行研究。结果显示,1 龄幼虫在眠期、起蚕期几乎均检测不到 *CyclinA*、*CyclinB*、*CyclinB3*、*CyclinE* 基因的表达,表明此时幼虫器官发育基本完成,细胞分裂迟缓。在起蚕期,*CyclinA*、*CyclinB*、*CyclinE* 基因表达量均随着幼虫的发育进程逐渐增加,表明细胞分裂过程加剧,促进家蚕个体的不断生长;眠期则没有规律性变化。在 2~5 龄幼虫中,*CyclinA*、*CyclinB*、*CyclinE* 基因表达量均为起蚕期高于眠期,眠期最重要的生理过程是细胞凋亡,因此眠期细胞周期蛋白家族基因表达水平较低,而 *CyclinB3* 基因在整个幼虫时期几乎不表达。本试验结果为细胞周期蛋白在家蚕蜕皮变态发育过程中的调控机制研究提供了参考。

关键词:家蚕;细胞周期蛋白;家族基因;幼虫;表达谱

中图分类号: Q786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)05-0045-02

细胞周期主要受细胞周期蛋白(Cyclin)、细胞周期蛋白依赖激酶(cyclindependent kinase, CDK)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子(cyclin dependent kinase inhibitor, CKI)在 G1/S 期和 G2/M 期 2 个限制点的调控^[1]。其中,CDK 是真核生物细胞周期调控的关键因子,依赖 Cyclin 发挥其功能。Cyclin 的表达具有典型的周期性和时相特异性,可作为调节亚基与相应的 CDK 形成复合物,并正调节 CDK 的活性。不同 Cyclin 在不同时相可通过相应的 CDK 促进完成细胞周期^[2]。

Cyclin 广泛存在于多种生物体内^[3-4],在哺乳动物细胞中已发现 20 多种细胞周期蛋白家族成员^[5],在家蚕体内已发现 6 种。*CyclinA*、*CyclinB*、*CyclinB3*、*CyclinE*、*CyclinL1*、*CyclinH* 均是家蚕细胞完成细胞周期必不可少的。有研究表明,*CyclinA* 在 S 期、G2 期到 M 期的转变过程中发挥作用^[6]; *CyclinB* 和 *CyclinB3* 同属于 B 型周期蛋白,是 M 期的限制因素^[7]; *CyclinE* 是 G1 期向 S 期转变中最重要的周期蛋白^[8]; *CyclinL1*、*H* 可能对细胞周期起调控作用^[9-10]。

家蚕属于完全变态发育昆虫,一生要经过卵、幼虫、蛹、成虫 4 个形态和机能完全不同的发育阶段^[11]。幼虫是摄取营养、快速生长的发育阶段,幼虫期每个龄期之间都要经历眠期和蜕皮的过程,不同发育阶段的细胞均要进行重组和分化,此过程必然受到 Cyclin 的调控。采用 RT-PCR 方法,在家蚕 1~5 龄眠蚕和起蚕不同发育时期,研究直接影响细胞增殖分化的家蚕 Cyclin 家族基因(*CyclinA*、*CyclinB*、*CyclinB3*、

CyclinE)在家蚕的转录特征。本试验结论为 Cyclin 在家蚕蜕皮变态发育过程中的调控机制研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 家蚕 供试家蚕品种为大造,由苏州大学蚕桑实验室保存,于(25±1)℃、相对湿度 60%~75%条件下,用新鲜桑叶饲育。分别取家蚕 1~5 龄眠蚕、起蚕各 10 头,雌雄各半,冻存于液氮中备用。

1.1.2 主要试剂 总 RNA 抽提试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司, M-MLV 反转录试剂盒、SYBR PrimeScript™ RT-PCR 试剂盒、其他化学试剂均购自宝生物工程(大连)有限公司。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 家蚕总 RNA 提取及 cDNA 制备 按照 Trizol 试剂盒说明书分别提取家蚕 1~5 龄眠蚕、起蚕的总 RNA,采用紫外分光光度计测定其纯度和质量浓度。采用 M-MLV 反转录试剂盒将提取的 1~5 龄眠蚕、起蚕总 RNA 分别反转录为 cDNA。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 按照 Real-Time PCR 的要求,采用 Primer 5.0 软件设计 *Actin3* 内参基因及 *CyclinA*、*CyclinB*、*CyclinB3*、*CyclinE* 基因的引物(表 1)。以合成的 cDNA 为模板,采用 SYBR PrimeScript™ RT-PCR 试剂盒对各基因进行实时荧光定量 PCR 扩增,具体步骤按照试剂盒说明书进行。反应体系为 20 μL,反应程序为:95℃变性 1 min;95℃ 15 s, 60℃ 31 s,40 个循环。反应过程由 ABI 7300 型测定仪软件自动设定,每个样品重复 3 次。

1.2.3 标准曲线的制作 分别将 *CyclinA*、*CyclinB*、*CyclinB3*、*CyclinE*、*Actin3* 基因以 10 倍梯度稀释为 6 个质量浓度梯度,进行 Real-Time PCR。以所得循环阈值(C_T 值)为纵轴,以

收稿日期:2015-04-10

基金项目:吉林省科技厅项目(编号:20130101100JC);通化师范学院项目(编号:201405)。

作者简介:刘丽华(1972—),女,吉林通化人,博士,副教授,主要从事动物资源与功能基因组研究。Tel:(0435)3208073;E-mail:liulihua209@163.com。

表 1 检测基因与内参基因的引物

基因名称	引物序列	产物长度 (bp)
<i>Actin3</i>	F:5′-CGGCTACTCGTTCCTACTACC-3′;R:5′-CCGTCGGGAAGTTCGTAAG-3′	147
<i>CyclinA</i>	F:5′-CTCTCAACACCCACCTCAC-3′;R:5′-CGCTGCTATTACTGAGGGT-3′	153
<i>CyclinB</i>	F:5′-TTGCGAGACCGATACCTTTG-3′;R:5′-AGATTGCTGCCGCTGCTA-3′	161
<i>CyclinB3</i>	F:5′-CATAAACTCCTTCTGGTGT-3′;R:5′-TAATCGTCAATAGGAAAAAG-3′	131
<i>CyclinE</i>	F:5′-CCCAAGACAATCCAGGCAA-3′;R:5′-AGAGCGGAGTCCACCCCA-3′	102

对应的模板拷贝数常用对数 (lgN) 为横轴作图,得到各基因扩增的标准曲线。

1.2.4 数据处理 采用 ABI 7300 型仪器自带的 Sequence Detection Software Version 1.3.1 软件处理 RT-PCR 的结果数据,并参照 Schefe 的方法^[12]进行效率校正。采用 SPSS 16.0 软件制作图表。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 纯度和质量浓度的测定

提取各组织总 RNA 的 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 比值均在 1.8~2.0,

表明所提取总 RNA 的纯度较高,无基因组、蛋白质、其他杂质污染。所提取总 RNA 的质量浓度为 1.1~2.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

2.2 Cyclin 家族基因在家蚕幼虫不同时期的表达

细胞周期蛋白家族基因在家蚕幼虫各发育时期的表达情况见图 1。1 龄幼虫在眠期、起蚕期几乎均检测不到 *CyclinA*、*CyclinB*、*CyclinB3*、*CyclinE* 基因的表达。在起蚕期, *CyclinA*、*CyclinB*、*CyclinE* 基因表达量均随着幼虫的发育进程逐渐增加,4 龄起蚕达到最大值,5 龄时稍有下降;眠期则没有规律性变化。在 2~5 龄, *CyclinA*、*CyclinB*、*CyclinE* 基因表达量均为起蚕期高于眠期,而 *CyclinB3* 基因在整个幼虫时期几乎不表达。

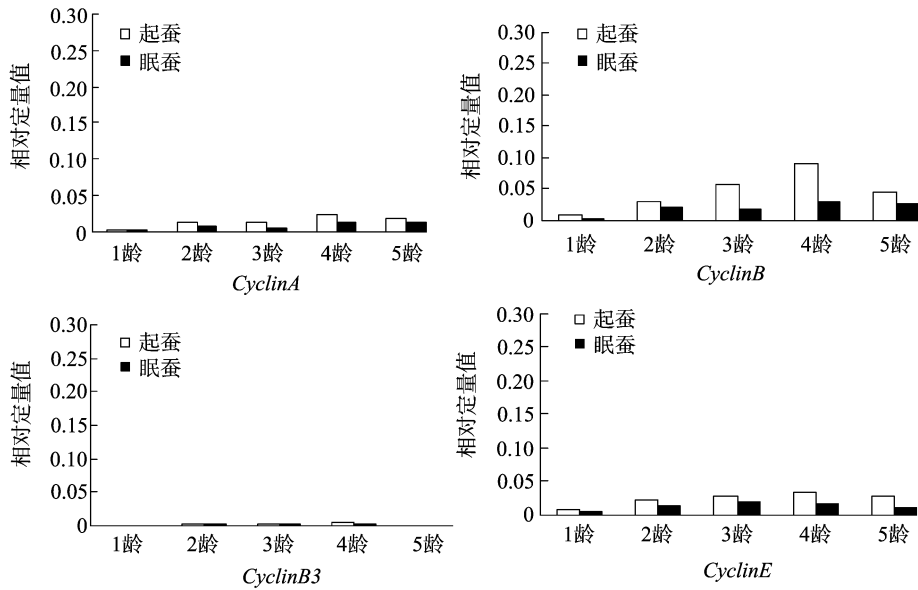


图1 家蚕 Cyclin 家族基因在幼虫不同发育时期的转录特征

3 结论与讨论

昆虫蜕皮是复杂的生理生化过程。已有研究表明,昆虫蜕皮、变态发育过程是在蜕皮激素与保幼激素的协同调控下,大量基因按照一定的时间、空间次序被诱导或抑制表达而实现的。从细胞周期蛋白家族基因表达的变化探讨蜕皮过程,可促进昆虫蜕皮分子机制的深入研究。

本研究结果显示,家蚕幼虫无论是眠蚕还是起蚕, *CyclinA*、*CyclinB*、*CyclinB3*、*CyclinE* 基因在 1 龄幼虫几乎均不表达。可见,家蚕由受精卵发育至 1 龄幼虫时,幼虫器官基本发育完成,因此细胞分裂迟缓,这与笔者前期试验中 Cyclin 家族基因在家蚕胚胎期的表达结果相同。与起蚕期相比, *CyclinA*、*CyclinB*、*CyclinB3*、*CyclinE* 基因在眠期的表达量均较低。可能的原因为,眠期的主要生理活动是蜕去旧表皮、形成

新表皮,此期维持生命活动所需的营养物质和能量主要由贮藏在脂肪体中的营养物质代谢产生;细胞凋亡是此期最重要的生理过程,因此 Cyclin 家族基因表达水平较低。在起蚕期, Cyclin 家族基因(*CyclinB3* 基因除外)表达水平随着幼虫龄期推进持续增加,表明细胞分裂过程加剧,促进家蚕个体不断生长;至 4 龄起蚕达到小高峰,之后稍有下降,家蚕生殖器官在 3 龄末至 4 龄初迅速发育,从而进入成熟期^[13]。笔者前期对 Cyclin 家族基因的定量研究表明,其在生殖细胞中均显著表达^[14],这可能是导致 *CyclinA*、*CyclinB*、*CyclinE* 基因表达量增加的原因。

CyclinB、*CyclinB3* 基因是家蚕细胞周期 M 期的限制因素。在本试验中, *CyclinB3* 基因在眠期和起蚕期几乎均不表达,表明 *CyclinB* 基因在幼虫蜕皮过程中起主导作用,而 *CyclinB*、*CyclinB3* 基因对细胞周期调控作用的不同之处有待进一步研究。

龚 丽,李云霞.一种新型 ATP-依赖型 ClpP 家族蛋白水解酶 *PlclpP* 基因的克隆、表达和酶学特性[J]. 江苏农业科学,2016,44(5):47-50.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.05.012

一种新型 ATP-依赖型 ClpP 家族蛋白水解酶 *PlclpP* 基因的克隆、表达和酶学特性

龚 丽,李云霞

(上海海洋大学食品科学与技术学院/农业部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估重点实验室,上海 201306)

摘要:运用基因克隆技术,以分离鉴定获得的蛋白水解酶高活性类芽孢杆菌(*Paenibacillus lautus*) CHN26 菌株的基因组 DNA 为模板,经克隆鉴定该菌株是一种新型 ATP-依赖型 ClpP 家族蛋白水解酶 *PlclpP* 基因,全长 585 bp,编码 194 个氨基酸,分子量约为 21 ku。采用大肠杆菌(*Eschericia coli*) pET 表达系统构建 *PlclpP* 基因表达质粒 pET-28-*PlclpP*,并在大肠杆菌 BL21 中实现了重组 PlClpP 蛋白的表达。利用组氨酸标签(His-tag)亲和纯化法获得 PlClpP 纯化蛋白,发现 PlClpP 可能与宿主菌未知伴侣分子形成蛋白复合物。PlClpP 复合物具有 ATP-依赖型酪蛋白水解酶活性,最适反应温度为 40 ℃、pH 值 7.0。表面活性剂强烈抑制 PlClpP 复合物的酶活性,而常规丝氨酸蛋白酶抑制剂对其活性没有抑制作用。本研究结果为蛋白酶新基因资源的开发、ClpP 家族蛋白酶的基础理论和应用研究奠定了基础。

关键词:ClpP 家族蛋白水解酶;类芽孢杆菌;基因;克隆;表达;酶学特性

中图分类号: Q789 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)05-0047-04

蛋白水解酶约占全球酶制剂市场的 60%,被广泛应用于食品、医药、洗涤剂、农业等领域^[1]。微生物是水解酶的主要来源,探索并开发微生物新基因资源,对于解决目前商品化酶制剂种类及来源较少、底物单一、价格昂贵等问题具有重要意义。

ClpP(caseinolytic peptidase)家族 ATP-依赖型伴侣分子相连(chaperone-linked)的酪蛋白水解肽酶广泛存在于原核

生物及真核生物中^[2],其利用 ATP 驱动蛋白底物解折叠并转位进入蛋白水解腔(chamber)中降解成小分子肽^[3]。1988 年,ClpP 蛋白酶首次被发现于大肠杆菌(*Eschericia coli*)中^[4]。此后的大量研究表明,大肠杆菌中 ClpP 蛋白酶(EcClpP)由蛋白水解核心 ClpP、依赖 ATP 的伴侣分子 ClpA 或 ClpX 组成,其蛋白水解腔由催化位点序列形成的 2 个反向同型七聚体环构成^[2]。在国外,ClpP 蛋白酶已商品化,而目前国内尚无涉及 ClpP 家族蛋白酶的研究报道。此外,有关类芽孢杆菌属(*Paenibacillus* spp.)中 *clpP* 基因功能的研究国内外均无报道。采用基因克隆技术,以笔者所在实验室分离鉴定获得的

收稿日期:2015-04-07

基金项目:上海市科学技术委员会项目(编号:09320503600)。

作者简介:龚 丽(1989—),女,上海人,硕士研究生,主要从事食品质量与安全研究。E-mail:emo_jun@163.com。

参考文献:

- [1] 詹启敏,陈 杰.细胞周期与肿瘤转化医学[J]. 中国肿瘤临床,2014,41(1):1-7.
- [2] Kirsch T, Nickel J, Sebald W. BMP-2 antagonists e-merge from alterations in the low-affinity binding epitope for receptor[J]. EMBO,2000,19(12):3314-3324.
- [3] Evans T, Rosenthal E T, Youngblom J, et al. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in seaurchin eggs that is destroyed at each cleavage division[J]. Cell,1983,33(2):389-396.
- [4] Lewin B. Driving the cell: M phase kinase, its partners, and substrates[J]. Cell,1990,61(5):743-752.
- [5] 韩世愈,王 娇.细胞周期蛋白在恶性肿瘤中的表达及其在肿瘤治疗中的作用[J]. 分子诊断与治疗杂志,2013,5(5):357-360.
- [6] Shigeo H, Masamitsu Y. Kinase independent activity of *Cdc2/CyclinA* prevents the S phase in the *Drosophila* cell cycle[J]. Genes Cells,1999,4:111-122.
- [7] 潘敏慧,洪开丽,陈向云,等. *BmCyclin B* 和 *BmCyclin B3* 是家蚕细胞周期进程所必需的[J]. 中国科学:生命科学,2013,43(3):

240-246.

- [8] 刘丽华,沈卫德,李 兵,等. siRNA-CyclinE 对家蚕细胞增殖的影响[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2013,41(4):21-25.
- [9] 范兰芬,钟杨生,林健荣. 家蚕细胞周期蛋白基因 *BmCcn1* 的克隆及表达分析[J]. 昆虫学报,2010,53(12):1325-1332.
- [10] 江 艳. *BmCycH* 基因及其在家蚕中表达特性的研究[D]. 杭州:浙江理工大学,2010.
- [11] 中国农业科学院蚕业研究所. 中国养蚕学[M]. 上海:上海科学出版社,1991:228-230.
- [12] Scheffe 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 C-T difference" formula[J]. Journal of Molecular Medicine - JMM,2006,84(11):901-910.
- [13] 向仲怀,黄君霆,夏建国. 蚕丝生物学[D]. 北京:中国林业出版社,2005:12-14.
- [14] 刘丽华,沈卫德,李 兵,等. 家蚕细胞周期蛋白家族基因在 5 龄幼虫组织中的表达谱分析[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2012,40(11):13-17.