



研究论文

Research Article

家蚕 3-羟酰辅酶 A 脱氢酶基因全长 cDNA 克隆及其在质型多角体病毒感染家蚕的差异表达

王秀¹, 吴萍^{1,2}, 高坤^{1,2}, 覃光星^{1,2}, 刘挺^{1,2}, 郭锡杰^{1,2}

1 江苏科技大学, 镇江, 212003

2 中国农业科学院蚕业研究所, 镇江, 212018

✉ 通讯作者: guoxijie@126.com ✉ 作者

昆虫分子生物学研究, 2012年, 第1卷, 第1篇 doi: 10.5376/imbr.cn.2012.01.0001

收稿日期: 2012年04月01日

接受日期: 2012年06月6日

发表日期: 2012年06月7日

本文首次发表在《基因组学与应用生物学》(2012年第31卷第2期102-108页)上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

建议最佳引用格式:

引用格式(中文):

王秀等, 2012, 家蚕 3-羟酰辅酶 A 脱氢酶基因全长 cDNA 克隆及其在质型多角体病毒感染家蚕的差异表达, 昆虫分子生物学研究(online) Vol.1 No.1 pp.1-7 (doi: 10.5376/imbr.cn.2012.01.0001)

引用格式(英文):

Wang et al., 2012, Cloning of 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase Gene and Its Differential Expression in Silkworms Infected with *Bombyx mori* Cytoplasmic Polyhedrosis Virus, Kunchong Fenzi Shengwuxue Yanjiu (online) Vol.1 No.1 pp.1-7 (doi: 10.5376/imbr.cn.2012.01.0001)

摘要 家蚕质型多角体病毒是家蚕的重要病毒病原之一, 往往给养蚕业生产造成极大危害。我们以前的研究运用基因芯片技术在感染质型多角体病毒的家蚕中肠中鉴定出一个差异表达的3-羟酰辅酶A脱氢酶蛋白基因(*Bombyx mori* 3-hydroxyacyl-coA dehydrogenase protein gene-*Bm3HAD*)。本研究利用cDNA末端快速扩增技术(RACE)克隆了该基因, 其全长cDNA序列为1 168 bp, 包含一个83 bp 5'端非翻译区序列(5'-UTR)、一个930 bp的开放阅读框(ORF)和一个155 bp的3'端非翻译区序列(3'-UTR); 基因结构分析发现该基因由5个外显子和4个内含子组成。RT-PCR结果显示该基因在家蚕中肠、脂肪体、血液、丝腺及生殖体中均有表达。荧光定量PCR结果表明该基因在BmCPV感染初期为上调表达, 随着病毒感染的进展该基因的表达水平逐渐降低, 并转变为下调表达。研究结果为进一步研究BmCPV对家蚕致病的分子机制提供了有益的信息。

关键词 家蚕; 质型多角体病毒; 3-羟酰辅酶A脱氢酶; 差异表达

Cloning of 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase Gene and Its Differential Expression in Silkworms infected with *Bombyx mori* Cytoplasmic Polyhedrosis Virus

Wang Xiu¹, Wu Ping^{1,2}, Gao Kun^{1,2}, Qin Guangxing^{1,2}, Liu Ting^{1,2}, Guo Xijie^{1,2}

1 Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang, 212003;

2 Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang, 212018

✉ Corresponding author, guoxijie@126.com ✉ Authors

Abstract Silkworm (*Bombyx mori*) cytoplasmic polyhedrosis virus (BmCPV) is a main viral pathogen for silkworm and always causes severe damage to commercial sericultural production. In our previous study, a differentially expressed gene, *Bm3HAD*, was identified in the midgut of silkworm larvae infected with BmCPV by using microarray analysis. In this study, the full-length cDNA of *Bm3HAD* gene was cloned and analyzed with rapid amplification of complementary DNA ends (RACE). This gene is 1 168 bp and has a 83 bp 5'-untranslated region (5'-UTR), a 930 bp open reading frame (ORF) and a 155 bp 3'-UTR. Gene structure analysis indicates that this gene has five exons and four introns. RT-PCR analysis revealed that *Bm3HAD* was expressed in all the tissues tested, including midgut, hemocyte, fat body, silk gland and gonad. Real-time quantitative PCR detection revealed that relative expression of *Bm3HAD* in the midgut of infected silkworm was up-regulated in the early stage of infection, but gradually decreased as the infection progressed and then became down-regulated. The results are informative for exploring the molecular mechanism involved in the infection of silkworm with BmCPV.

Keywords Silkworm (*Bombyx mori*); Cytoplasmic polyhedrosis virus; 3-hydroxyacyl-coa dehydrogenase protein; Differential expression



3-羟酰辅酶A脱氢酶是一类氧化还原酶, 主要参与线粒体脂肪酸氧化过程。这类酶催化线粒体脂肪酸氧化的第三步, 将3-羟酰基-辅酶A脂类转移到相应的3-酮脂酰CoA脂类上。3-羟酰辅酶A脱氢酶属于线粒体三功能蛋白(MTP)的一部分, 其中包含烯酰辅酶A水合酶和硫解酶活性(Carpenter et al., 1992; Uchida et al., 1992)。根据 β 氧化中脂肪酸的碳链长度, 3-羟酰辅酶A脱氢酶可分为长链3-羟酰辅酶A脱氢酶、中链3-羟酰辅酶A脱氢酶和短链3-羟酰辅酶A脱氢酶。迄今为止, 研究最为深入的是3-羟酰辅酶A脱氢酶活性的缺失。长链3-羟酰辅酶A脱氢酶的活性的缺失是由于线粒体三功能蛋白部分突变导致酶活性的降低或丧失, 例如, G985A基因和G1528C基因的突变(IJlst et al., 1997)。然而, 短链3-羟酰辅酶A脱氢酶活性的缺失涉及*Schad*基因的突变(Eaton et al., 2003)。经临床研究表明, 3-羟酰辅酶A脱氢酶活性的缺乏主要导致低血糖症(den Boer et al., 2002)。

家蚕质型多角体病毒(*Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus, BmCPV)属呼肠孤病毒科(Reoviridae)。其基因组由 10 节段 dsRNA 组成, 根据基因组 dsRNA 电泳谱, 目前把质型多角体病毒分成 12 个电泳型, 家蚕质型多角体病毒为 I 型。该病毒是家蚕的主要病毒病原之一, 常给养蚕业带来巨大的经济损失(Ikeda et al., 2001; Qanungo et al., 2002)。目前, 有关家蚕对 BmCPV 的防御机制的研究报道很少。以寻找家蚕感染质型多角体病毒相关应答基因为前提, 正确理解病毒对家蚕感染致病的分子机制, 对家蚕质型多角体病的防控及蚕药的研发具有重要的意义。

本实验室利用基因芯片(gene chip)技术分析家蚕感染 BmCPV 相关基因时, 检测到了 3-羟酰辅酶 A 脱氢酶蛋白基因的表达下调(Wu et al., 2011)。本研究克隆了家蚕的 3-羟酰辅酶 A 脱氢酶蛋白基因的全长 cDNA, 将其命名为 *Bm3HAD*, 分析了基因结构, 并运用荧光定量 PCR 方法检测了该基因在正常家蚕及 BmCPV 感染家蚕中肠组织中的差异性表达, 为深入研究该基因在家蚕对 BmCPV 感染应答调控中的作用奠定了基础。

1 结果与分析

1.1 *Bm3HAD* 基因的 5'端与 3'端克隆

根据家蚕 *Bm3HAD* 基因 EST 序列, 以合成的第一链 cDNA 为模板, 应用 RACE 方法, 克隆获得该基因 EST 序列的 5'端和 3'端 RACE 产物, 1%琼脂

糖凝胶电泳检测结果, 测序结果证明为目的序列。由图 1A 和图 1B 可看出, *Bm3HAD* 5'端与 3'端扩增结果良好, 5'扩增片段约为 250~500 bp, 3'扩增片段约为 1 000 bp。

1.2 *Bm3HAD* 基因的序列与结构分析

1.2.1 *Bm3HAD* 基因全长 cDNA 序列分析

利用 RACE 技术克隆获得 *Bm3HAD* 基因, 该基因全长 cDNA 为 1 168 bp, 其中包含 83 bp 的 5'非翻译区和 155 bp 的 3'非翻译区, 开放阅读框 930 bp, 编码 310 个氨基酸(图 2)。GenBank 登录号为 HQ833817。

1.2.2 *Bm3HAD* 基因结构分析

应用 Blastn (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.gov/blastn>)将克

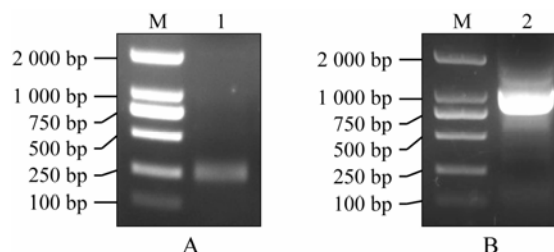


图 1 *Bm3HAD* 基因的 3' 端与基因的 5'端的 PCR 扩增结果
注: M: DNA Marker; 1: 5'端扩增产物

Figure 1 Amplification result of the 5' end of *Bm3HAD*

Note: M: DNA Marker; 1: 5' end product

隆获得的家蚕 *Bm3HAD* 基因全长 cDNA 序列与家蚕基因组数据库进行比对, 发现该序列位于登录号为 BABH01027674.1 的家蚕基因组序列内。根据比对结果, 从该序列中提取了 12 794~19 585 bp 的序列片段, 对 *Bm3HAD* 基因进行结构分析。结果表明该基因包含 5 个外显子, 4 个内含子, 第 5 外显子为最大, 长度 368 bp, 第 3 外显子最小, 为 83 bp, 见图 3。外显子与内含子交界处均符合“GT-AG”剪切规则。外显子的大小与位置见表 1。

1.2.3 蛋白质一级结构分析

采用 ProtParam 软件(www.expasy.ch/tools/protparam.html)对 *Bm3HAD* 基因编码的蛋白质进行一级结构预测, 结果表明家蚕 *Bm3HAD* 基因编码 310 个氨基酸, 其分子量约为 33.6 KD, 等电点为 9.0, 不稳定指数为 21.34, 提示该蛋白为一个稳定蛋白。在家蚕 *Bm3HAD* 基因编码的蛋白质氨基酸组成中, 相对较多的氨基酸包括 Lys (32 个, 10.3%)、Val (29 个, 9.4%)、Ala (26 个, 8.4%)和 Gly (26 个, 8.4%), 氨基酸组成如表 2 所示。



表 1 *Bm3HAD* 基因的外显子特性

Table 1 Characteristics of exons in *Bm3HAD*

外显子 Exon	外显子在 <i>Bm3HAD</i> cDNA 的位置(bp) The position of the exon in the cDNA of <i>Bm3HAD</i> (bp)	外显子在家蚕基因组上的位置(bp) The position of the exon in the BABH01027674.1 (bp)	外显子长度(bp) Exon size (bp)
1	6~200	12 794~12 988	195
2	201~476	13 263~13 538	276
3	477~559	15 336~15 417	83
4	560~775	18 080~18 295	216
5	776~1 143	19 218~19 585	368

表 2 家蚕 *Bm3HAD* 蛋白的氨基酸组成

Table 2 Amino acid components of *Bm3HAD* protein from silkworm

氨基酸 Amino acid	数量 Number	比例(%) Ratio (%)	氨基酸 Amino acid	数量 Number	比例(%) Ratio (%)
Ala (A)	26	8.4	Arg (R)	9	2.9
Asn (N)	14	4.5	Asp (D)	16	5.2
Cys (C)	3	1.0	Gln (Q)	9	2.9
Glu (E)	18	5.8	Gly (G)	26	8.4
His (H)	4	1.3	Ile (I)	17	5.5
Leu (L)	25	8.1	Lys (K)	32	10.3
Met (M)	10	3.2	Phe (F)	12	3.9
Pro (P)	11	3.5	Ser (S)	23	7.4
Thr (T)	15	4.8	Trp (W)	2	0.6
Tyr (Y)	8	2.6	Val (V)	29	9.4
Pyl (O)	0	0.0	Sec (U)	0	0.0

1.2.4 氨基酸序列同源性比对

根据家蚕 *Bm3HAD* 蛋白氨基酸序列, 经NCBI 上的Blastp 软件比对分析, 获得不同物种的同源序列。家蚕 *Bm3HAD* 编码的氨基酸序列与谷蛀虫 (*Tribolium castaneum*) *3HAD* (XP_973042.1) 有71% 的相似性, 与豌豆蚜 (*Acyrtosiphon pisum*) 的两个 *3HAD* 蛋白(NP_001155916.1 和 BAH70529.1) 的相似性均为66%。利用MEGA 3.1 软件构建了几种昆虫 *3HAD* 的系统进化树, 如图4所示。

1.3 *Bm3HAD* 基因在不同组织中表达分析

用荧光定量 PCR 方法检测发现, *Bm3HAD* 基因在家蚕的中肠、血液、脂肪体、丝腺及生殖体中都有表达, 但表达水平不同, 在中肠组织中的表达量最高, 在血淋巴中的表达量为最低。在 *BmCPV* 感染 48 h 后, 该基因在蚕体各组织中表现出差异表达, 在脂肪体和血淋巴中该基因被上调表达, 而在中肠、丝腺和生殖体中该基因均被下调表达, 见图 5。

1.4 *Bm3HAD* 基因在 *BmCPV* 感染家蚕中肠的表达差异

家蚕中肠组织的荧光定量 PCR 结果表明, 在健康对照蚕中肠组织中, *Bm3HAD* 基因的表达水平逐渐提高。而在 *BmCPV* 感染蚕中肠组织, *Bm3HAD* 基因在感染后 24 h 的表达水平呈现上调趋势, 然后逐渐降低, 至感染后 48 h 即呈现下调表达, 至感染后 72 h 该基因表达水平的下调幅度更为显著; 此时该基因在正常中肠组织的表达水平显著高于 *BmCPV* 感染中肠组织中的表达水平, *Ct* 值分别为 24.69 ± 0.04 和 22.79 ± 0.19 , 正常蚕中肠中该基因的表达水平是 *BmCPV* 感染中肠中的 8.2 倍(图 6)。

2 讨论

质型多角体病毒(cytoplasmic polyhedrosis virus, CPV)属呼肠孤病毒科(Reoviridae)。家蚕质型多角体病毒(*BmCPV*)感染家蚕中肠上皮组织并在柱状细胞的细胞质中繁殖, 形成包裹病毒粒子的包涵体。基因组由 10 节段双链 RNA 分子组成(Watanabe et al., 2002; Sun et al., 1982)。关于昆虫对病原物的免疫机制, 目前研究较为广泛和深入的是昆虫对细菌及真菌的免疫与应答。但有关昆虫对病毒感染的应答反应及其分子机制的研究尚无突破性进展。本



```

1 ACATGGGAATTAAGTTTTACTGTTAATATTTTTTATAATTTATTCTATTTTATAAGC
61 CTAACTTATAAATAGATTTCGAAAATGATGTCAGITTTAAAGTTATCGTAAGAAATTTTTCAA
1 M M Q F K V I V R N F S
121 GTTCCTCTGCAATGCAAAGTGCTATCAAGAATGTAACGGTTATTGGAGGTGGTCTAATGG
13 S S S A M Q S A I K N V T V I G G G L M
181 GCTCCGGCATAGCCCAGGTATCTGCCCAAGCAGGACAGAATGTTACCCTGGTTGACGTCA
33 G S G I A Q V S A Q A G Q N V T L V D V
241 GCAATGATGCTTTGGCTAAAGCCAAGAAGAGCATTGGCACAACCTCAGCAGGGTCGCAA
53 S N D A L A K A K K S I G T N L S R V A
301 AGAAGATGTACAAAGATAACCCCAAGAAGGAGAGAAATTTGTGAATGACTCACYAGGAA
73 K K M Y K D N P Q E G E K F V N D S X G
361 GGATTAATACTGCAACTGATGCAGCAGAGGCTTCCAAATCTGCTGATCTGGTTGTTGAGG
93 R I N T A T D A A E A S K S A D L V V E
421 CTATTGTTGAAAATATTGAAGTGAAGCATAAATTGTTTAAAGCAGCTTGATGGCGTAGCTC
113 A I V E N I E V K H K L F K Q L D G V A
481 CAAGTCACACTATTTTCGCATCAAACACGCTCTTCTCTATCTATAAATGAAATTGCATCCG
133 P S H T I F A S N T S S L S I N E I A S
541 TCGTAAAAAGGAAAGACAAAATTTGGTGGTCTTCAATTTCTCAATCCGGTCCCGTGTATGC
153 V V K R K D K F G G L H F F N P V P V M
601 GTTTGCTAGAGGTCGTCAAAGGCAGTGAGACATCGGAAGCTACATACAAAACCTATGATGG
173 R L L E V V K G S E T S E A T Y K T M M
661 AGTGGGAAAGTCGGTCCGCAAGACCTGTATCACTTGCAAGGACACCCCTGGTTTCGTTG
193 E W G K S V G K T C I T C K D T P G F V
721 TGAATAGACTGTTGGTGCCTTACATATGTGAAGCCATTAGGTTGTACGAAAGAGGAGATG
213 V N R L L V P Y I C E A I R L Y E R G D
781 CATCAGCTCGAGACATTGATATAGCAATGAAGCTCGGGCGCTGGCTACCCCATGGGTCCAC
233 A S A R D I D I A M K L G A G Y P M G P
841 TAGAACTGGCCGACTAGTTGGCTTAGACACAAACAAGTTTATCTTGGATGGCTGGCACA
253 L E L A D Y V G L D T N K F I L D G W H
901 AGAAGTTTCCGGATCAGCAACTCCTCAAACCTGTACCCTTGCTAGAAAAGCTTGTGCTG
273 K K F P D Q Q L L K P V P L L E K L V A
961 AAGGAAAATTAGGTGTGAAGACTGGGGAAGGTTTCTACAAATACGAAAAGAAAATAATATT
293 E G K L G V K T G E G F Y K Y E K K
1 021 ATTAAGCATAAACAACAACATTAGACTTAAGACATATACACTGTGTTTTTAGTTATATT
1 081 TTATATTCAGAAATCAATATAATATCAAAAATTTTAATAGAATAAATTATATTTCAAGTT
1 141 TTAAGAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAA
    
```

图 3 *Bm3HAD* 基因全长 cDNA 序列及其推导氨基酸序列

Figure 3 Full-length cDNA sequence of *Bm3HAD* gene and its deduced amino acid sequence

注: 加尾信号(AATAAA)用下划线标注; 起始密码子与终止密码子分别用方框标注

Note: Polyadenylation signal (AATAAA) is underlined; Start codon and stop codon are boxed

研究的目的是为探索 *BmCPV* 感染家蚕的分子机制提供相关依据。

本研究利用 RACE 技术, 在家蚕中肠中克隆获得一个 3-羟酰辅酶 A 脱氢酶(*Bm3HAD*)基因, 该基因全长 cDNA 序列为 1 168 bp, 其中 ORF 为 930 bp, 编码 310 个氨基酸的蛋白质, 分子量为 33.6 kD; 该基因由 5 个外显子和 4 个内含子组成。利用生物信息学软件对该基因进行分析, 该基因属于 NADB-Rossmann superfamily 和 3HAD superfamily。因此, 将该基因命名为 *Bm3HAD* (*Bombyx mori* 3-hydroxyacyl-coA dehydrogenase, *Bm3HAD*)。物种同源性分析表明, *Bm3HAD* 与其它所知物种的 3-羟酰辅酶 A 脱氢酶蛋白相比同源性较高, 尤其是与谷蛀

虫的同源性最高。系统进化分析显示, *Bm3HAD* 与谷蛀虫 3-羟酰辅酶 A 脱氢酶(XP_973042.1)聚为一类, 说明 *Bm3HAD* 与谷蛀虫 3-羟酰辅酶 A 脱氢酶具有相似的功能。荧光定量 PCR 结果表明, *Bm3HAD* 在感染病毒后 24 h 表现上调表达, 然而随着病情的进展, 其表达水平逐渐降低, 并表现为下调表达, 至感染后 72 h, 该基因在感染蚕中肠中的表达量与在正常蚕中肠中的表达量相比, 其表达量降低 8.2 倍。该基因的表达量趋势与本实验室基因芯片分析的趋势一致。*Bm3HAD* 基因在 *BmCPV* 感染蚕中肠中的表达水平随着病毒感染的进展而逐渐降低, 由上调表达逐渐转变为下调表达, 而在健康对照蚕中肠组织该基因的表达水平在相对应的时间段内却呈



现逐渐提高的趋势。*Bm3HAD* 基因在 *BmCPV* 感染蚕中肠中表达水平的这种变化, 暗示 *Bm3HAD* 基因可能与 *BmCPV* 感染家蚕的进程有关。

脂肪酸是机体重要的能量资源, 脂肪酸由不同长度的碳链组成, 它分为长链脂肪酸、中链脂肪酸和短链脂肪酸。当脂肪酸不能提供机体所需要的能量时, 会导致机体产生脂肪酸病症。3-羟酰辅酶 A 脱氢酶是脂肪酸氧化过程中一种重要的酶, 该酶主要起将 3-羟酰基-辅酶 A 脂类转移到相应的 3-酮脂酰 CoA 脂类上的作用, 其中伴随能量的产生, 缺乏该酶会阻断脂肪酸产生能量供给机体。近年来研究发现, 3-羟酰辅酶 A 脱氢酶是三联功能性蛋白(TFP)的一部分, 三联功能性蛋白(TFP)的部分突变会导致 3-羟酰辅酶 A 脱氢酶活性缺乏(Carpenter et al., 1992)。因此, 长链 3-羟酰辅酶 A 脱氢酶的 G985A 基因和短链 3-羟酰辅酶 A 脱氢酶的 Schad 基因突变等三联功能性蛋白(TFP)亚单位的突变导致 3-羟酰辅酶 A 脱氢酶活性缺乏(IJlist et al., 1994; Molven et al., 2004)。1990 年 3-羟酰辅酶 A 脱氢酶缺乏方面的研究被报道后(Wanders et al., 1990), 3-羟酰辅酶 A 脱氢酶缺乏研究的生物学和临床价值被人们所关注。近年来, 3-羟酰辅酶 A 脱氢酶缺乏的临床研究较为广泛。儿童 3-羟酰辅酶 A 脱氢酶缺乏会导致低血糖症甚至眼部和神经的并发症。但是, 昆虫 3-羟酰辅酶 A 脱氢酶的研究相对较少, 3-羟酰辅酶 A 脱氢酶的相关生物学特点和功能尚不清楚, 特别是其在家蚕对 *BmCPV* 感染的应答反应中的作用有待今后深入研究。

本文首次报道了在家蚕中肠中克隆获得的一个 3-羟酰辅酶 A 脱氢酶基因(*Bm3HAD*)。但是, 该基因在家蚕体内的功能仍不清楚。目前, 研究该基因唯一的线索来自于该基因与谷蛀虫 3-羟酰辅酶 A 脱氢酶蛋白等较高的同源性, 但是还没有实验依据证明该基因的表达产物具有 3-羟酰辅酶 A 脱氢酶的活性。3-羟酰辅酶 A 脱氢酶是一类氧化还原酶, 在线粒体脂肪酸氧化过程中, 该酶不但有促进脂肪氧化作用, 而且还涉及脂肪氧化中能量的产生。当家蚕被 *BmCPV* 感染后, 家蚕体内免疫机制启动, *Bm3HAD* 表达量出现上调趋势, 随着病情的进展, 其表达水平逐渐降低, 脂肪酸氧化过程受到损害, 最后 *Bm3HAD* 表达活性表现显著下调趋势, 导致家

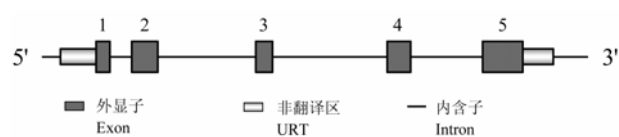


图 3 家蚕 *Bm3HAD* 基因结构示意图

Figure 3 Gene structure of *Bm3HAD*

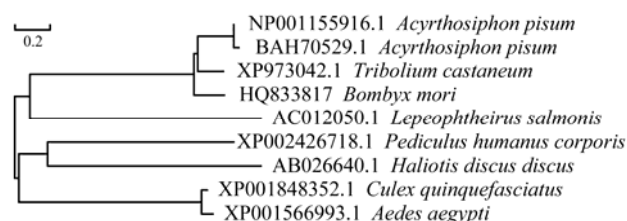


图 4 几种昆虫 3HAD 同源序列的系统进化树

Figure 4 Phylogenetic tree of 3HAD homologous sequences from several insects

蚕代谢失调, 发生一系列生理和病理变化。关于 *Bm3HAD* 与家蚕对 *BmCPV* 感染应答反应有关的功能还有待于今后进一步的研究。

3 材料与方法

3.1 材料及主要试剂

供试家蚕品种 P50 由中国农业科学院国家蚕种质资源保存中心馈赠。*BmCPV* 多角体悬浮液(浓度为 1×10^9 /mL)由中国农业科学院蚕业研究所家蚕病理研究室保存。

主要试剂: Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司, PrimeScriptTM RT reagent kit、SYBR premix Ex TaqTM kit 购自 TaKaRa 公司, SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit、Advantage 2 PCR Kit 购自 Clontech 公司, pGEM-T Easy 载体购自 Promega 公司, UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒购自上海生物工程有限公司。

3.2 *BmCPV* 病毒接种

家蚕 P50 在标准温度和光照条件下饲养至五龄起蚕。将 200 头 P50 家蚕分为 2 组各 100 头, 一组经口添食接种 *BmCPV* 作为试验组, 另一组添食灭菌水作为对照组。将 *BmCPV* 多角体悬浮液用灭菌水稀释至多角体浓度 1×10^8 /mL, 取多角体稀释液 100 μ L 均匀涂布在大小约 15 cm^2 (3 $\text{cm} \times 5 \text{cm}$) 的桑叶片上, 将 40 片涂布病毒液的桑叶喂饲试验组 5 龄起蚕, 待添毒叶食尽后改饲正常叶, 折合每头蚕约食下 4×10^6 个病毒多角体。对照组 5 龄起蚕以涂抹同样体积灭菌水的桑叶饲喂。



3.3 家蚕组织器官材料的收集

分别于接种 BmCPV 后 24 h、48 h 和 72 h, 将感染 BmCPV 组和对照组家蚕幼虫在冰上解剖, 分别收集血淋巴、中肠、脂肪体、生殖体以及丝腺。血淋巴样品立即加入到适量的 Trizol 中, 其它组织则用生理盐水(RNase-free 水配制)漂洗, 用滤纸吸除水滴后迅速投入到液氮中冰冻, 然后放入-70℃冰箱保存备用。

3.4 家蚕各组织器官总 RNA 提取

按照 Trizol 试剂盒说明书步骤, 分别用 Trizol 试剂提取感染 BmCPV 组和对照组家蚕的生殖体、血淋巴、丝腺、脂肪体及中肠组织总 RNA。用分光光度计检测各种组织样品总 RNA 浓度和纯度, 最后放入-70℃保存备用。

3.5 扩增引物设计

根据本实验室基因芯片实验筛选获得的 *Bm3HAD* 基因 EST 序列为模板, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计目的基因 PCR 特异性引物。5' RACE 引物序列为 5'-AGCCCA TTAGACCACCTCCAATAACC-3', 3' RACE 引物序列为 5'-CTCAGCAGGGTCGCAAAGAAGATGTA-3'。荧光定量 PCR 正向引物序列为 5'-AGGT GGTCTAATGGGCTCCG-3', 反向引物序列为 5'-GGTTTGTGCCAATGCTCTTC-3'; 内参照 β -actin 基因的正向引物序列为 5'-AATGGC TCCGGTATGTGC-3', 反向引物序列为 5'-TTGCTCTGTGCCTCGTCT-3'。

3.6 *Bm3HAD* 基因的 5'端与 3'端 RACE 扩增及产物纯化

按照 SMART™ RACE cDNA Amplification kit 试剂盒说明书, 以 1 μg 家蚕中肠组织 RNA 为模板反转录 cDNA 第一链。用 Tricine-EDTA 缓冲液稀释合成的 cDNA 第一链, 按照 SMART™ RACE Advantage cDNA PCR 试剂盒说明书, 扩增 *Bm3HAD* 基因的 5'端与 3'端序列。

5'端 RACE 反应体系(25 μL): 5'端 cDNA 模板 1.25 μL, dNTP Mix 0.5 μL, 50×Advantage 2 polymerase Mix 0.5 μL, 5'端特异性引物 0.5 μL, 10×advantage 2 PCR Buffer 2.5 μL, PCR-Grade water 17.25 μL, UPM (10×) 2.5 μL。3'端 RACE 体系(25 μL): 3'端 cDNA 模板 1.25 μL、3'端特异性引物 0.5 μL, 其余组分与 5'端 RACE 体系同。

PCR 反应程序: 94℃预变性 2 min, 94℃变性 30 s, 60℃退火 30 s, 72℃延伸 10 min, 30 个循环。取 10 μL 扩增产物在 1%琼脂糖凝胶上电泳检测目的条带。

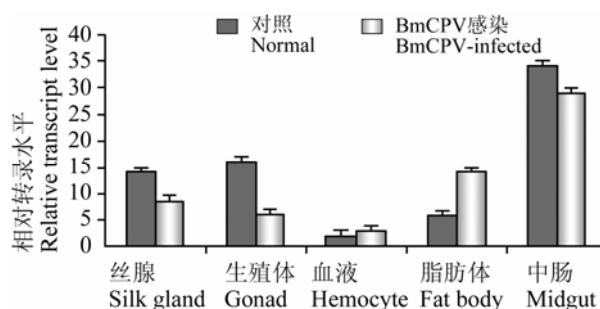


图 5 *Bm3HAD* 在蚕体各组织的相对表达水平及 BmCPV 感染导致的差异表达

Figure 5 Relative expression analysis of *Bm3HAD* in different tissues and its differential expression in BmCPV-infected silkworm.

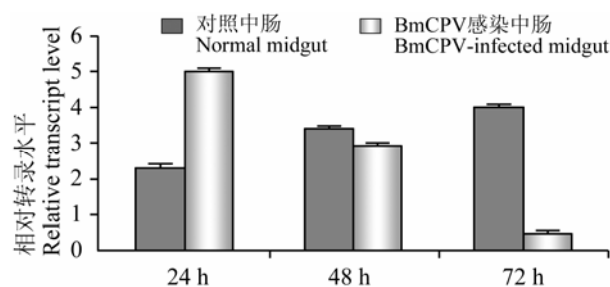


图 6 *Bm3HAD* 在 BmCPV 感染中肠的相对表达水平

Figure 6 Relative transcript level of *Bm3HAD* in BmCPV-infected midgut of silkworm

按照胶回收试剂盒说明书步骤回收目的条带, 与 pGEM-T Easy 载体连接, 并转化 DH10B 感受态细胞进行蓝白斑筛选, 挑取有插入片段的阳性克隆进行测序。

3.7 *Bm3HAD* 的生物信息学分析

克隆获得的 cDNA 片段经测序后, 利用 NCBI 上的在线软件 Vecscreen (screen sequence for vector contamination) 去除载体序列。用 Blastx 和 Blastn (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.gov/>) 进行同源性搜索, 利用 DNAMAN 拼接软件将获得的 5'端序列、3'端序列及该基因的 EST 序列拼接成 *Bm3HAD* 基因的全长 cDNA 序列。利用 Blastn 将 *Bm3HAD* 基因的全长 cDNA 序列与家蚕基因组比对, 获得该基因全长 cDNA 所在家蚕基因组序列的登录号为: BABH01027674.1, 分析基因序列结构; 采用 ExPASy (expert protein analysis system) 的 ProtParam 软件预测该基因编码蛋白质的一级结构。



3.8 *Bm3HAD* 基因的组织表达分析

利用Primer scriptTM RT reagent试剂盒, 按照说明书步骤反转录家蚕各组织cDNA, 以反转录获得的各组织cDNA为模板进行RT-PCR分析。按照SYBR premix Ex TaqTM试剂盒说明书进行荧光定量PCR。荧光定量PCR反应体系(20 μ L): 10.0 μ mol/L正、反向引物各0.4 μ L, cDNA模板1 μ L, 2 \times SYBR Premix Ex TaqTM 10 μ L, ddH₂O 8.2 μ L。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 10 s; 95 $^{\circ}$ C 7 s, 60 $^{\circ}$ C 20 s, 共40个循环。每个定量反应重复3次。用相对定量法, 以 β -actin为内标基因, 以Ct值衡量*Bm3HAD*基因和 β -actin基因在每个样品的表达水平, Δ Ct作为计算*Bm3HAD*基因相对于 β -actin基因的差异表达水平, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算*Bm3HAD*基因的相对表达量, 分析*Bm3HAD*基因在病毒感染蚕和正常蚕各组织中的相对转录水平(Livak and Schmittgen, 2001)。

作者贡献

本论文署名作者中王秀负责该论文实验的设计、操作及文章的撰写; 吴萍负责前期的基因芯片检测、提供本文所研究基因的 EST 序列并指导实验的设计; 高坤、覃光星和刘挺负责试验中的病毒保存、接种及家蚕饲养; 郭锡杰为本论文的通讯作者, 全权负责本论文实验设计、实验过程及文章撰写的指导。

致谢

本研究由国家自然科学基金项目(No.30972143)和江苏省自然科学基金项目(BK2010353)资助。感谢两位匿名评审人对本文提出的评审意见。

参考文献

Carpenter K., Pollitt R.J., and Middleton B., 1992, Human liver long-chain 3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase is a multifunctional membrane-bound beta-oxidation enzyme of mitochondria, *Biochem Biophys Res Commun*, 183(2): 443-448

den Boer M.E., Wanders R.J., Morris A.A., IJlst L., Heymans S.A., and Wijburg F.A., 2002, Long-Chain 3-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: clinical presentation and follow-up of 50 patients, *Pediatrics*, 109(1): 99-104

Eaton S., Chatziandrou I., Krywawych Pen S., Clayton P.T., and Hussain K., 2003, Short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency associated with hyperinsulinism: a novel glucose-fatty acid cycle, *Biochemical Society*, 31(Pt 6): 1137-1139

IJlst L., Oostheim W., Ruiten J.P., and Wanders R.J., 1997, Molecular basis of long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: Identification of two new mutations, *SSIEM and Kluwer Academic Publishers*, 20(3): 420-422

IJlst L., Wanders R.J., Ushikubo S., Kamijo T., and Hashimoto T., 1994, Molecular basis of long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: identification of the major disease-causing mutation in the α -subunit of the mitochondrial trifunctional protein, *Biochim Biophys Acta*, 1215(3): 347-350

Ikeda K., Nagaoka S., Winkler S., Kotani K., Yagi H., Nakanishi K., Miyajima S., Kobayashi J., and Mori H., 2001, Molecular characterization of *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus genome segment 4, *Journal of Virology*, 75(2): 988-995

Livak K.J., and Schmittgen T.D., 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, *Methods*, 25(4): 402-408

Molven A., Matre G.E., Duran M., Wanders R.J., Rishaug U., Njolstad P.R., Jellum E., and Sovik O., 2004, Familial Hyperinsulinemic hypoglycemia caused by a defect in the SCHAD enzyme of mitochondrial fatty acid oxidation, *DIABETES*, 53(1): 221-227

Qanungo K.R., Kundu S.C., Mullins J.I., and Ghosh A.K., 2002, Molecular cloning and characterization of *Antheraea mylitta* cytoplasmic polyhedrosis virus genome segment 9, *Journal of General Virology*, 83(Pt 6): 1483-1491

Sun Y.K., Wu A.Z., Dai R.M., and Shen X.R., 1982, Synthesis of structural proteins in a cell free system directed by silkworm cytoplasmic polyhedrosis virus mRNA synthesized in vitro, *Scientia Sinica*, (5): 684-690

Uchida Y., Izai K., Orii T., and Hashimoto T., 1992, Novel fatty acid β -oxidation enzymes in rat liver mitochondria II. Purification and properties of enoyl-coenzyme A (CoA) hydratase / β -hydroxy-acyl-CoA dehydrogenase/ β -ketoacyl-CoA thiolase trifunctional protein, *Journal of Biological Chemistry*, 267(2): 1034-1041

Wanders R.J., IJlst L., Gennip van A.H., Jakobs C., Jager de J.P., Dorland L., Sprang van F.J., and Duran M., 1990, Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: identification of a new inborn error of mitochondrial fatty acid β -oxidation, *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 13(3): 311-314

Watanabe H., 2002, Genetic resistance of the silkworm, *Bombyx mori* to viral diseases, *Current Science*, 83: 439-446

Wu P., Wang X., Qin G.X., Liu T., Jiang Y.F., Li M.W., and Guo X.J., 2011, Microarray analysis of gene expression profile in the midgut of silkworm infected with cytoplasmic polyhedrosis virus, *Molecular Biology Reports*, 38(1): 333-34