

家蚕 3-羟基异丁酸脱氢酶基因克隆及其在模拟失重环境中的表达模式分析

田宗成¹, 周博², 蹇爱荣¹, 续惠云¹, 狄升蒙¹, 赵云坡², 章玉萍², 刘佳¹, 黄勇平², 商澎¹

1 西北工业大学生命科学院 空间生物实验模拟技术国防重点学科实验室 特殊环境生物物理学研究所, 西安 710072

2 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 上海 200032

摘要: 采用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆了家蚕 3-羟基异丁酸脱氢酶(*hibadh*) 基因全长 cDNA(GenBank 登录号 EU719652) 并对其序列进行了分析, 用 RT-PCR 方法检测了 *hibadh* 基因在家蚕 5 龄幼虫不同组织中的分布, 最后用 real-time RT-PCR 方法分析了整个胚胎期家蚕 *hibadh* 基因在模拟失重环境中的表达模式。克隆的 *hibadh* 基因 cDNA 全长 1074 bp, 包含 1 个能编码完整 Hibadh 长度为 969 bp 的开放阅读框。家蚕 *hibadh* 基因与伯霍尔德杆菌、果蝇、蜜蜂、热带爪蟾、小鼠、人类等 6 个物种 *hibadh* 基因推导的氨基酸序列同源性分别达到 46%、43%、48%、44%、45%、45%。Hibadh 蛋白为分泌蛋白, 不存在糖基磷脂酰肌醇锚定位点, 分子量和等电点分别为 34.1 kD 和 9.14。*hibadh* 基因在家蚕 5 龄幼虫的头、丝腺、中肠、皮肤、血液、脂肪体、马氏管等组织中稳定表达。模拟失重环境中家蚕 *hibadh* 基因在胚胎发育的不同时期表达量不同, 胚体突起发生期和反转期 *hibadh* 基因表达量分别上调 2.3 倍($P<0.05$)和 4.6 倍($P<0.01$), 气管形成期 *hibadh* 基因表达量下调 7.6 倍($P<0.01$), 其余时间段 *hibadh* 基因表达量没有明显变化。整个胚胎发育期内, 模拟失重组与对照组相比较 *hibadh* 基因总表达量下调 2.6 倍($P<0.05$)。在模拟失重环境中, 家蚕 *hibadh* 基因的表达模式与家蚕整体的响应模式有相似之处但不尽相同。基因对环境反应的灵敏度高于有机体整体对环境反应的灵敏度。该研究有利于进一步探讨 *hibadh* 基因的重力生物学机制。

关键词: 家蚕, 3-羟基异丁酸脱氢酶, RACE (Rapid amplification of cDNA ends), 失重

Cloning of Silkworm 3-Hydroxyisobutyrate Dehydrogenase Gene and Its Expression Patterns Analysis in Simulated Weightless Environment

Zongcheng Tian¹, Bo Zhou², Airong Qian¹, Huiyun Xu¹, Shengmeng Di¹, Yunpo Zhao², Yuping Zhang², Jia Liu¹, Yongping Huang², and Peng Shang¹

1 Key Laboratory for Space Biosciences and Biotechnology, Institute of Special Environmental Biophysics, Faculty of Life Sciences, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China

2 Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China

Abstract: The full length cDNA of silkworm *hibadh* gene was cloned by RT-PCR and RACE (Rapid amplification of cDNA ends)

Received: June 6, 2008; **Accepted:** October 20, 2008

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30770526) and Youth Science and Technology Innovation Foundation of Northwestern Polytechnical University (No. W016213).

Corresponding author: Peng Shang. Tel: +86-29-88460391; Fax: +86-29-88491671; E-mail: shangpeng@nwpu.edu.cn

国家自然科学基金(No. 30770526), 西北工业大学青年科技创新基金(No. W016213)资助。

technique. The *hibadh* gene and its deduced amino acid sequences were analyzed. The tissue distribution of *hibadh* gene in 5th instar silkworm larvae was tested by RT-PCR. The expression patterns of *hibadh* gene in simulated weightless environment were analyzed by real time RT-PCR. The results showed that the full length *hibadh* cDNA sequence was 1074 bp in length, including an open read frame of 969 bp encoding the entire coding region of Hibadh (GenBank accession No. EU719652). The deduced amino acid sequence similarities of *hibadh* between silkworm and *Burkholderia ambifaria*, *Drosophila melanogaster*, *Apis mellifera*, *Xenopus tropicalis*, *Mus musculus*, *Homo sapiens* were 46%, 43%, 48%, 44%, 45%, 45%, respectively. Signal peptide analysis showed that Hibadh was a secretory protein. There wasn't glycosyl-phosphatidyl inositol anchor site in Hibadh amino acid sequence. Molecular weight and isoelectric point of Hibadh were 34.1 kD and 9.14 respectively. The RT-PCR tests indicated that the *hibadh* gene expressed in head, silk gland, midgut, cuticle, blood, fat body, tuba malpighii of the 5th instar silkworm larvae. There were different expression patterns of *hibadh* gene during different silkworm embryo period in simulated weightless environment. Simulated weightlessness resulted in the expression of silkworm *hibadh* gene up regulated 2.3-fold ($P<0.05$), up regulated 4.6-fold ($P<0.01$), down regulated 7.6-fold ($P<0.01$), down regulated 2.6-fold ($P<0.05$) during apophysis formation period, inverse period, trachea formation period, and whole embryo period, respectively. There was no significant change of *hibadh* gene expression during other period of silkworm embryo between simulated weightless and control groups. There were different response patterns to simulated weightless environment between *hibadh* gene and whole body of silkworm. Gene showed much higher sensitivity compared to whole body in response to environment. This study is useful for the further research on the gravity biological mechanism of *hibadh* gene.

Keywords: silkworm, 3-Hydroxyisobutyrate dehydrogenase, RACE (Rapid amplification of cDNA ends), weightlessness

地球生物的演化都是在 $1 \times g$ 重力场下完成的, 机体的结构、功能和行为已经完全适应这种重力环境, 一旦失去这种重力环境, 机体的基因组、转录组、蛋白质组、代谢组、表型组等都可能发生相应变化, 有的是生理性适应, 有的可能是病理性变化, 重力生物学研究的目的是利用正效应或将负面影响降到最低程度。

空间搭载实验表明家蚕卵是研究重力生物学机制较好的模型^[1-3], 已有的研究结果为深入研究多种分子机制提供了可供参考的表型。随着我国航天事业的发展, 家蚕卵的地基实验一方面可以解释前期空间搭载实验现象, 另一方面为未来的空间搭载实验奠定基础。家蚕胚胎期是研究重力生物学机制较好的时期, 因为这一时期生命活动最为活跃, 细胞事件最为频繁, 参加的基因数目最多。黄健华等^[4]推测家蚕在卵、幼虫、蛹或成虫等 4 个不同发育时期的基因表达数目分别为 33 300、20 000、20 000、20 000 个, 其中家蚕卵期的基因数目远大于其他 3 个时期。用这一时期的材料揭示的重力生物学效应机制可能最为丰富。家蚕基因组序列数据已公布, 但是其中 NCBI 登录了大约 11 198 条 EST 序列, 只有 1938 条基因取得了命名, 许多基因有待于获得全长信息并进行命名和注释。家蚕 3-羟基异丁酸脱氢酶基因就属于此类基因。

3-羟基异丁酸脱氢酶 (3-Hydroxyisobutyrate dehydrogenase, Hibadh) 是缬氨酸代谢过程中的关键

酶, 它可以将依赖 NAD^+ 的 3-羟基异丁酸可逆地氧化为甲基丙二酸半醛^[5]。大鼠 *hibadh* 基因成熟 mRNA 有 2000 nt, 1038 bp 的读码框架编码 346 个氨基酸^[6]。Hibadh 是一种二聚物酶, 对 NADH 抑制作用敏感, 这可能与缬氨酸代谢的短期生理调控有关^[7]。Neratur 等^[8]测定了嗜热栖热菌 Hibadh 的晶体结构并解析了该酶的活性位点。Hibadh 广泛分布于酵母、细菌和哺乳动物组织^[9,10]。在 3 种支链氨基酸 (亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸) 中, 由于缬氨酸在代谢过程中释放一个碳原子而显得非常重要。一个组织能否分解或释放 3-羟基异丁酸完全依赖 Hibadh 含量^[11]。在对 Hibadh 的监控中发现, 丙二酸血症、大脑功能紊乱、甲基丙二酸血症等病人血清和尿中 3-羟基异丁酸含量升高^[12-14]。如果 3-羟基异丁酸水平失衡, 缬氨酸代谢紊乱, 可能导致有机体死亡。遗传性的 Hibadh 缺乏症未见文献报道^[15]。

Hibadh 作为代谢组中的一个关键分子, 其同工酶 α -羟丁酸脱氢酶 (α -HBD) 已经显示出明显的超重力学效应^[16,17], 那么在失重状态下 Hibadh 会发生怎样的改变呢? 带着这个问题, 本实验用末端 RACE 方法扩增了家蚕 *hibadh* 全长基因并对其序列进行了初步分析, 最后用 real-time RT-PCR 方法检测了整个胚胎期家蚕 *hibadh* 基因在模拟失重环境中的表达。该研究为深入探讨 *hibadh* 基因的重力生物学机制奠定了基础。研究家蚕 *hibadh* 基因在模拟失重环境中的表达规律, 有助于其他失重相关基因表达规

律的研究, 同时也可作为研究正常重力环境中 *hibadh* 基因表达改变引起的生物学效应提供思路。

1 材料与方法

1.1 材料及主要试剂

1.1.1 实验材料

家蚕品系 p50 由西南大学馈赠。

1.1.2 菌株

大肠杆菌(*E. coli*)Top10, 由中国科学院上海生命科学院植物生理生态研究所黄勇平课题组提供。

1.1.3 工具酶及主要试剂

Trizol 试剂盒、RACE 试剂盒购自 Invitrogen 公司; 限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I、T4 DNA Ligase 购自 Promega 公司; *Ex Taq* DNA polymerase, *rTaq* DNA polymerase, pMD 18-T 载体购自 TaKaRa 公司; 反转录试剂盒购自 Toyobo 公司; 引物由赛百胜生物技术公司合成; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自 Qiagen 公司, 质粒抽提试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司。

1.1.4 模拟失重环境

大梯度强磁场(Large gradient high magnetic field, LGHMF) 由西北工业大学自主设计, 日本 JASTEC 公司制造的超导磁体(JMTA-16T50MF)产生。与磁体配套的生物学实验装置由本实验室自行研制并已申请国家专利(申请号: 200610104905.9)。大梯度强磁场能够提供 3 种强磁场下的表观重力环境, 即 $0 \times g$ 、 $1 \times g$ 、 $2 \times g$ 重力环境, 实验分为 $0 \times g$ 和正常对照组。

1.2 实验方法

1.2.1 末端 RACE 方法克隆全长家蚕 *hibadh* 基因

用 Trizol 试剂盒提取家蚕卵总 RNA 并进行反转录, 依据本课题组前期研究从 SSH 方法获得的 *hibadh* 基因部分序列信息, 设计家蚕 *hibadh* 基因特异性引物, 引物序列为: *hibadh* 5' primer, 5'-TCAGGACAGGTGGCTAAACT-3'; *hibadh* 3' primer, 5'-CAGCACGTCCAACAGAACC-3'。RACE 通用引物序列如下:

GeneRacer 5' primer: 5'-CGACTGGAGCACGA GGACTGA-3'

GeneRacer 5' nested primer: 5'-GGACTGAC ATGGACTGAAGGAGTA-3'

GeneRacer 3' primer: 5'-GCTGTCAACGATACG

CTACGTAACG-3'

GeneRacer 3' nested primer: 5'-CGCTACGTAA CGGCATGACAGTG-3'。以 *hibadh* 3' primer 为反向引物, GeneRacer 5' primer 为正向引物, 反转录产物稀释 20 倍后作为模板, 首先 95°C 5 min; 95°C 30 s, 72°C 2 min, 5 个循环; 95°C 30 s, 70°C 2 min, 5 个循环; 95°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 2 min, 35 个循环; 72°C 10 min。接下来进行巢氏 PCR, 以 *hibadh* 3' primer 为反向引物, GeneRacer 5' nest primer 为正向引物, 条件如下: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 60°C 30 s, 68°C 2 min, 35 个循环; 最后 68°C 10 min。产物切胶回收, 连接转化回收片段, 挑取克隆测序可得到 5' 端序列。3'RACE 末端序列扩增方法与 5'RACE 末端序列扩增条件相比, 只需将 GeneRacer 5' primer 替换为 GeneRacer 3' primer, 将 GeneRacer 5' Nested primer 替换为 GeneRacer 3' Nested primer, 将 *hibadh* 3' primer 替换为 *hibadh* 5' primer, 其他扩增条件相同。将 PCR 产物连接到 pMD 18-T 载体, 用 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切鉴定之后, 送上海 sunny 公司测序。

1.2.2 家蚕 *hibadh* 核酸及氨基酸序列分析

将 5' RACE 和 3' RACE 测序结果在 NCBI 上进行 Contig 分析, 使用在线工具 <http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php> 拼接成长全序列。将所得到的基因全长 cDNA 序列在 NCBI 上 ORF finder 翻译成蛋白质序列。经过初步注释, 将基因序列提交 GenBank。使用在线工具 http://www.expasy.ch/cgi-bin/pi_tool 计算该蛋白的分子量和等电点。使用在线工具 <http://www.expasy.org/cgi-bin/prosite/ScanView.cgi> 对家蚕 *Hibadh* 氨基酸家族进行初步分析, 使用 SignalP 3.0 Server 在线工具 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/> 预测蛋白质前体信号肽和 GPI 锚定位点。与 NCBI 上公布的其他物种的 *Hibadh* 氨基酸序列做同源性比较, 用 DNAMAN5.0 软件处理, 初步建立家蚕和其他物种 *Hibadh* 蛋白间的遗传关系树。

1.2.3 各组织表达情况检测

提取家蚕五龄幼虫的第 5 天的头、丝腺、中肠、皮肤、血液、脂肪体、马氏管等组织总 RNA, 反转录获得 cDNA, 用 1.2.1 中家蚕 *hibadh* 基因特异性引物做 PCR 检测。PCR 扩增条件为: 首先 94°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 1 min, 共 30 个循环; 最后 72°C 保持 5 min。

1.2.4 家蚕 *hibadh* 基因在模拟失重环境中的表达

将浸酸处理的家蚕卵分别置入超导磁体中的模拟失重环境(0 × g)和正常地球重力环境(Control)中孵化, 孵化温度为 25°C, 湿度为 80%。每天分别从模拟失重环境和正常地球重力环境取一个蛾区的家蚕卵(一个样品)速冻于液氮中, 直至孵化期结束, 每种重力环境获得 8 份样品。用液氮研磨家蚕胚胎并用 Trizol 提取总 RNA, 每个样品均取 1 μg 总 RNA 用反转录试剂盒合成 cDNA 第一链, -20°C 保存备用。用 1.2.1 中家蚕 *hibadh* 基因特异性引物做 real-time RT-PCR 检测。用家蚕 G3PDH 基因做内参, 序列为: G3PDH 5' primer, 5'-GGCAGATAAACAGCCAAAGAAC-3'; G3PDH 3' primer, 5'-GGAACAGCAACAACATTAGAAGG-3'。PCR 条件: 94°C 1 min; 94°C 30 s, 55°C 15 s, 72°C 15 s, 共 45 循环。每次循环结束后在 80°C 检测荧光强度。产物长度为 120 bp。反应结束后, 做融解曲线对产物的特异性进行分析。每个样品做 3 个重复, 用 Graphpad prism 软件分析每一天实验组与对照组基因表达差异, *P*<0.05 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 家蚕 *hibadh* 基因的克隆

用 *hibadh* 3' primer 和 GeneRacer 5' Nested Primer 进行 5'RACE, 得到了 840 bp 的 PCR 产物; 用 *hibadh* 5' primer 和 GeneRacer 3' Nested Primer 引物进行 3'RACE, 得到了 350 bp 的 PCR 产物(图 1)。

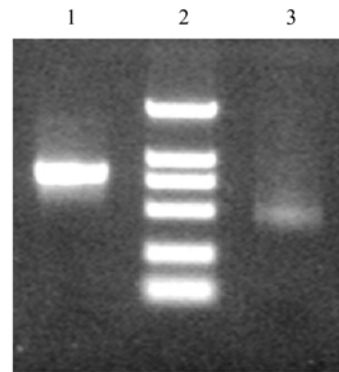


图 1 *hibadh* 基因末端 RACE 的 PCR 产物
Fig. 1 RACE PCR products of *hibadh* gene ends
1: RACE PCR products of *hibadh* gene 5' ends; 2: DL2000 marker; 3: RACE PCR products of *hibadh* gene 3' ends

```

cagttgctctgcccgcacacgcccgcacgctaaattaaagaaaaacaattcaaa
60 atggccgcgcccacaatttaagcactcagttttgtacacagccgccagacggcgctatagttctaacaccgacaagaatgtggctttc
M A A R T I L S T Q C L Y T A A R R A Y S S N T D K N V A F
150 ctggcctcggaaacatgggaggggttcagctgctgcaacttggtt aaaaagggttccacagttcgcgctacgatccttccaaagatgca
L G L G N M G G F M A A N L V K K G F T V R G Y D P S K D A
240 ctgaacgcagcggccaagaacggagtgacgccagccaactccattgctgcagccgttgatggagtcgacgtggtcgtttccattatgacc
L N A A A K N G V T P A N S I A A A V D G V D V V V S I L T
330 agcaataaagctgctcgcagctgtacctgggcaagatggcgttggctcatgcgaaaaaaggatcgcttctgatcgattcagctaca
S N K V V L D V Y L G K D G V V A H A K K G S L L I D S S T
420 atagatccgaatgttccaaacagatcttccctatagccctagagaaaggctgggatccacagatgcacctgtatctggaggagtcag
I D P N V P K Q I F P I A L E K G L G F T D A P V S G G V M
510 ggtgctcagaacgctacctggccttcatggcggaggtcgtaaa gaagacttogaaggcccttccctctcctcaaaagtatggagct
G A Q N A T L A F M A G G R K E D F E R P L P L L K V M G A
600 aaacagttccactgcggagagatcggtcaggacaggtggctaa gctgaccaacaat atgttgatgggcatcaccggaatggctacagct
K Q F H C G E I G S G Q V A K L T N N M L M G I T G M A T A
690 gagtgcataaacatggcattaaaatgggactcgaaccgaaggttctgttggacgttgaacaactcatcagctcgtcttggctgacc
E C M N M G I K M G L E P K V L L D V L N N S S A R S W S T
780 gaggtgactgtccagtcocccgactggtgctacagctccgtcg agtagaatacgatggcgcttcaaaaacgaacttatggttaag
E V Y C P V P G L V P T A P S S R N Y D G G F K N E L M V K
870 gacttagaattagccagtgccatggcgttgggtattcgttcgocg atcccattggcgctgctgcgaactcagctctaccgcatcgtgcag
D L E L A S G M A L G I R S P I P L G A V A T Q L Y R I V Q
960 tccagggctacggccagaagacttctcgttctctccagcta ctgaaagaagaaaacaaaaattag 1028
S R G Y G Q K D F S F V F Q L L K E E N K N *
aattaaaactgtctgaatcattaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
    
```

图 2 家蚕 *hibadh* 基因的 cDNA 全长序列
Fig. 2 Full-length cDNA sequence of silkworm *hibadh* gene

2.2 家蚕 *hibadh* 基因的序列分析

将测序结果在 NCBI 上进行 Contig 分析, 发现

5'RACE 和 3'RACE 两段序列的确为同一个基因, 2 个 RACE 序列有 120 bp 的重叠区, 用 NCBI 上的

CAP3 Sequence Assembly Program 进行拼接, 成功的获得了全长为 1074 bp 的家蚕 *hibadh* 基因; 用 NCBI 上的 ORF finder 找到编码 323 个氨基酸的开放读码框架。在该序列的 5' 端存在 59 bp 的非翻译区 (UTR), 中间为 969 bp 的开放阅读框 (ORF), 3' 端非翻译区 (UTR) 长度为 46 bp, 其中包括 24 bp 的 poly(A) 尾巴 (图 2)。将该序列提交后获得的 GenBank 登录号为: EU719652。

2.3 家蚕 *Hibadh* 氨基酸序列分析

2.3.1 家蚕 *Hibadh* 氨基酸序列比较

家蚕 *Hibadh* 含有 323 个氨基酸, 属于 *Hibadh* 家族。应用 SignalP 3.0 Server 等在线工具预测蛋白质前体信号肽, 结果显示该蛋白为分泌蛋白, 不存在糖基磷脂酰肌醇 (Glycosylphosphatidylinositol, GPI) 锚定位点。家蚕 *Hibadh* 的分子量 (Mw) 和等电点 (pI) 分别为 34.1 kD 和 9.14。

家蚕与伯霍尔德杆菌 (*Burkholderia ambifaria*;

YP_776268.1)、果蝇 (*Drosophila melanogaster*; NP_611373.1)、蜜蜂 (*Apis mellifera*; XP_623606.2)、热带爪蟾 (*Xenopus tropicalis*; NP_001025604.1)、小鼠 (*Mus musculus*; BAC37162.1)、人类 (*Homo sapiens*; NP_689953.1) 等 6 个物种的 *Hibadh* 氨基酸序列比对结果如图 3, 深色背景的为 7 个物种完全相同的氨基酸, 浅色背景的为 7 个物种中 5 至 6 个物种相同的氨基酸, 无色背景的为 7 个物种中变异较大的氨基酸。家蚕 *Hibadh* 蛋白的 NAD 结合域 (26 位至 186 位) 与其他 6 个物种相比较非常保守。

2.3.2 家蚕与常见物种 *Hibadh* 蛋白亲缘关系

根据 NCBI 公布的其他物种的 *Hibadh* 氨基酸序列, 用 DNAMAN5.0 建立了 *Hibadh* 氨基酸序列的遗传关系树 (图 4)。从图中看出, 家蚕与伯霍尔德杆菌 (*Burkholderia ambifaria*; YP_776268.1)、果蝇 (*Drosophila melanogaster*; NP_611373.1)、蜜蜂 (*Apis mellifera*; XP_623606.2)、热带爪蟾 (*Xenopus tropicalis*;

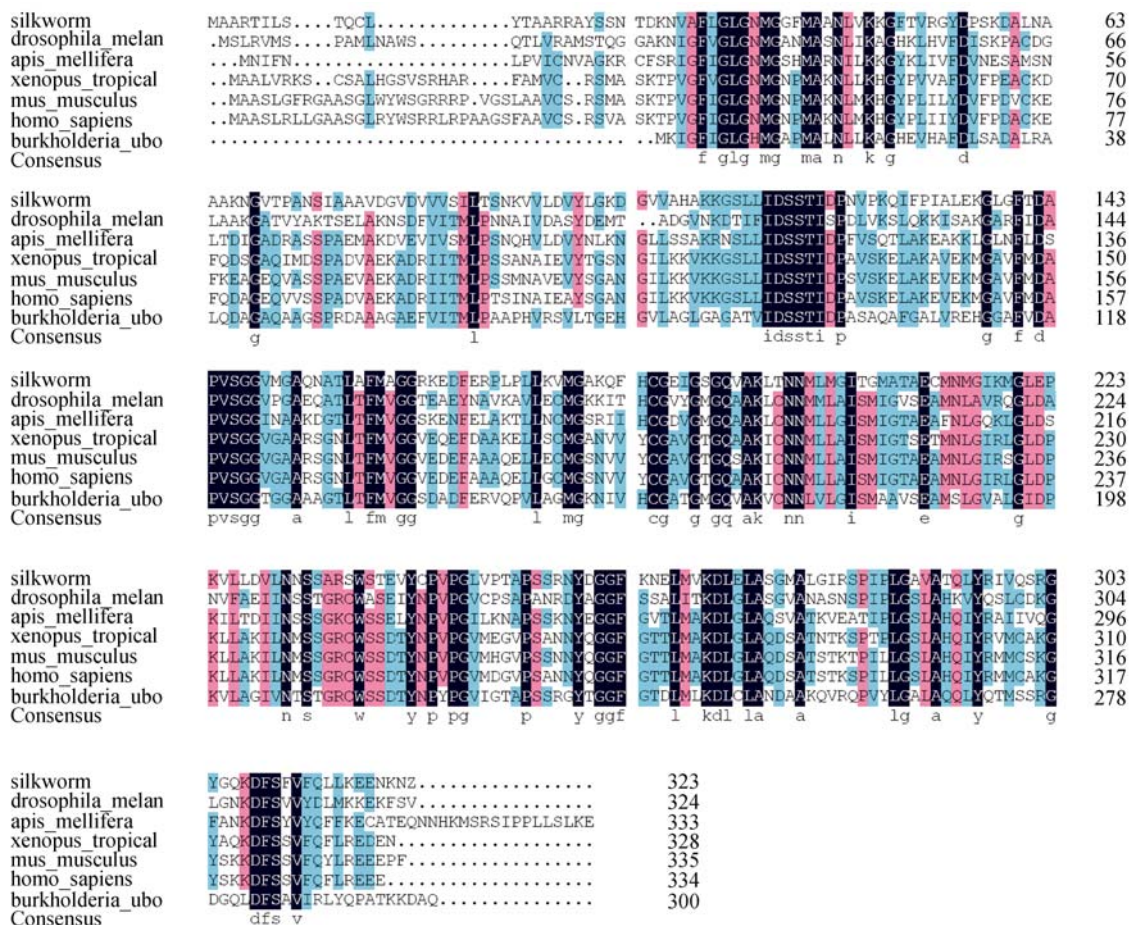


图 3 *Hibadh* 氨基酸序列比较
Fig. 3 Comparison of amino acid sequences of *Hibadh*

NP_001025604.1)、小鼠(*Mus musculus*; BAC37162.1)、人类(*Homo sapiens*; NP_689953.1)等 6 个物种的 *Hibadh* 氨基酸序列同源性分别为 46%、43%、48%、44%、45%、45%。人与小鼠的氨基酸同源性极高,相似性大于 90%,其次是热带爪蟾,相似性大于 80%,亲缘关系最远的是家蚕和果蝇,相似性大于 40%,说明 *Hibadh* 在不同物种中非常保守。

2.4 家蚕 *hibadh* 在各组织中分布

提取家蚕五龄幼虫第 5 天的头、丝腺、中肠、皮肤、血液、脂肪体、马氏管等组织的总 RNA 后,进行 RT-PCR 检测,都获得 120 bp 左右的条带,和目标片段相符,且亮度相当,表明家蚕 *hibadh* 基因在家蚕的头、丝腺、中肠、皮肤、血液、脂肪体、马氏管等组织中能稳定表达(图 5)。

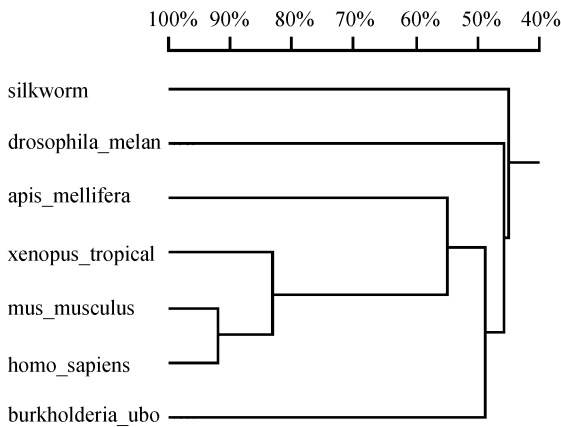


图 4 *Hibadh* 氨基酸序列的遗传关系树

Fig. 4 Genetic relationships tree based on deduced amino acid sequences of *Hibadh*

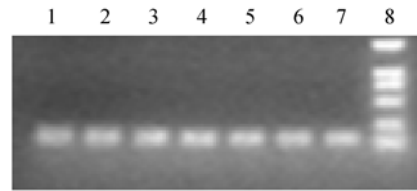


图 5 家蚕各组织 *hibadh* 基因表达检测

Fig. 5 Amplify *hibadh* gene from different tissue of silkworm

1: head; 2: silk gland; 3: midgut; 4: cuticle; 5: blood; 6: fat body; 7: tuba malpighii; 8: DL2000 marker

2.5 模拟失重环境对家蚕胚胎期不同时间段 *hibadh* 基因表达的影响

经 real-time RT-PCR 验证发现,模拟失重组与对照组 *hibadh* 基因表达量的比值在胚胎发育第 1、2、3、4、5、6、7、8 天分别为(1:1)、(1.8:1)、(2.3:1)、(1:1)、(4.6:1)、(1.2:1)、(1:7.6)、(1.3:1)。模拟失重环境中, *hibadh* 基因表达量在胚胎发育第 3 天上调 2.3 倍($P < 0.05$) (图 6A)、第 5 天上调 4.6 倍($P < 0.01$) (图 6B)、第 7 天下调 7.6 倍($P < 0.01$) (图 6C),其余时间段 *hibadh* 基因表达量没有统计学差异。表明模拟失重环境中家蚕 *hibadh* 基因在胚胎发育的不同时期表达量不同,胚体突起发生期和反转期 *hibadh* 基因表达量上调,气管形成期 *hibadh* 基因表达量下调。

2.6 模拟失重环境对家蚕胚胎期 *hibadh* 基因总表达量的影响

整个胚胎发育期 8 d 样品总 RNA 等量混合之后经 real-time RT-PCR 验证发现,模拟失重组(0 × g mix)与对照组(Control mix)相比较 *hibadh* 基因表达量下调 2.6 倍(图 7),有统计学意义($P < 0.01$)。

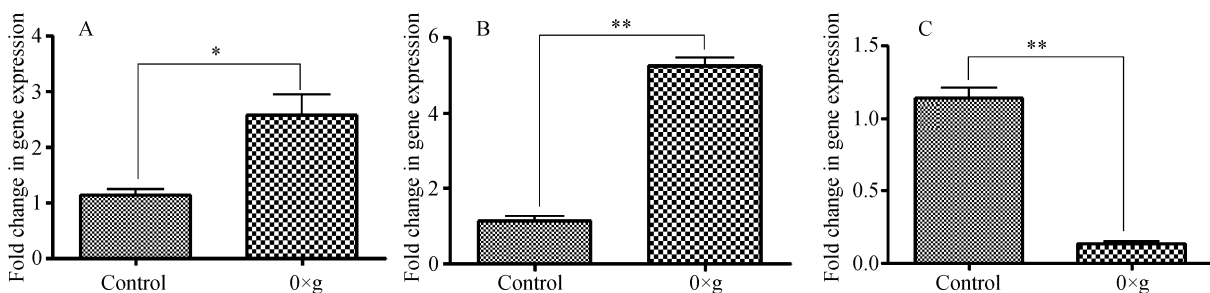


图 6 用 real-time RT-PCR 方法检测模拟失重环境中家蚕胚胎发育不同时期 *hibadh* 基因的表达量

Fig. 6 Detection of silkworm *hibadh* gene expression during different embryonic development period in simulated weightless environment by real-time PCR

A, B, C represented fold change in *hibadh* gene expression corresponding to the time of embryogenesis accomplishing 3rd day, 5th day, 7th day, respectively

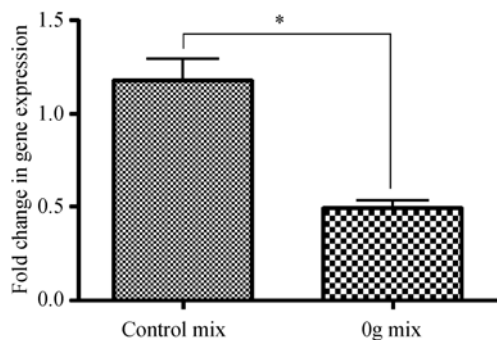


图 7 用 Real time RT-PCR 检测模拟失重环境中家蚕胚胎期 *hibadh* 基因总表达量

Fig. 7 Detection of total *hibadh* gene expression during silkworm embryo period in simulated weightless environment by real time PCR
* $P < 0.01$

3 讨论

hibadh 基因在家蚕多种组织中稳定表达, 说明该基因可能是家蚕生命活动的基本构成元件。从氨基酸序列比较图和遗传关系树可以看住, 亲缘关系较近的物种, 其蛋白同源性也相对较高, 符合生物进化的规律。*hibadh* 分布的广泛性和进化的保守性说明它在生命现象中担任重要角色, *Hibadh* 是必需氨基酸-缬氨酸代谢过程中的关键酶, 也是为数不多能在肝脏以外组织中起催化作用的酶^[18]。被屠宰之后, 牛胸最长肌中 *Hibadh* 含量立即上升, 表明肌肉中的能量代谢发生过代偿性升高^[19]。该现象进一步说明 *Hibadh* 在肌肉中能独立发挥作用。在培养的神经细胞内表达 *Hibadh*, 有可能开创大脑直接能量来源的新途径^[20]。深入研究家蚕 *hibadh* 基因对失重的表达模式有可能借鉴到人类。

胚胎发育是家蚕体内一系列生理生化反应的体现, 是控制胚胎发育的基因有序表达的结果。失重环境中家蚕 *hibadh* 基因在胚胎发育的不同时期表达量不同。整个胚胎发育期中, *hibadh* 基因在胚体突起发生期和反转期高表达, 在气管形成期低表达。胚体突起发生期中, 腹肢突起逐渐形成, 肌肉组织合成量增加, 说明失重可能通过合成肌肉需求量的增加诱导了 *hibadh* 基因的表达。这对航天员长期空间飞行肌肉萎缩机理的探讨有借鉴意义。胚体突起发生期内, 基因表达对环境刺激敏感的现象未见文献报道。反转期是家蚕胚胎发育中的一个重要时期, 因为通过这一时期, 卵黄物质由开放的胸背部进入

胚胎内部, 在背部合拢后, 胚胎内部的一些组织和器官才能形成, 该时期是家蚕胚胎对环境刺激敏感的时期之一^[21]。气管形成期是大量卵蛋白被消耗、转化和酯酶同工酶谱带发生转变的重要时期。许多关于蚕卵呼吸的测定结果也都说明, 这一时期的代谢活动非常剧烈。宋起图^[22]因此认为气管形成期也是家蚕胚胎期中对外界环境刺激敏感的时期之一。此外, 细胞的运动器官是感受重力变化的重要组织成分^[23]。气管形成期中, 胚体外缘开始出现刚毛, 刚毛能提供重力信号的转导^[24], 失重可能导致气管形成期中 *hibadh* 基因的表达量失代偿性降低, 第 8 天失重组 *hibadh* 基因的表达量与对照组间差距缩小印证了这一推测。由于功能不同, 每种基因在胚胎发育不同时期对环境刺激的响应不同。一般的环境敏感时期是针对整体表型而言。从本研究结果看, 在模拟失重环境中, 家蚕基因的表达模式与家蚕整体的响应模式有相似之处但不尽相同。在整体的环境敏感时期某些基因表达变化幅度一般较大, 另外在整体对环境反应不明显的时期, 某些基因表达变化幅度可能也大。基因对环境反应的灵敏度高于有机体整体对环境反应的灵敏度。能引起家蚕胚胎期 *hibadh* 基因总量下调, 说明模拟失重可能是一种不利因素, 至于这种变化能否自修复, 或积累到何种程度能引起家蚕表型的改变, 都是需要深入探讨的问题。

Hibadh 是必需氨基酸-缬氨酸代谢过程中的关键酶。失重可能通过对能量代谢途径的调整改变了 *hibadh* 基因的表达模式。尽管 *hibadh* 基因的重力生物学研究未见文献报道, 但其同工酶 α -羟丁酸脱氢酶对超重和失重都有明显的力学响应。佟文革等^[16]在研究正负加速度暴露对大鼠心肌酶、超氧化物歧化酶和丙二醛含量的影响时发现, +Gz 和 \pm Gz 交替组与 +1 Gz 对照组比较, α -羟丁酸脱氢酶明显上调 ($P < 0.01$), 郭素红等^[17]研究不同方式加速度暴露对大鼠心肌损伤程度的影响时发现, +8Gz 及 $\pm 8Gz$ 暴露组与对照组比较, α -羟丁酸脱氢酶 (α -HBD) 显著增加 ($P < 0.01$)。家蚕 *hibadh* 基因对超重的力学响应有待进一步研究, 它与同工酶功能的重要性和对重力反应的灵敏性说明有深入研究的必要性。

综上所述, 该研究用末端 RACE 方法成功克隆家蚕 *hibadh* 基因的 cDNA 全长序列, 获得的

GenBank 登录号为 EU719652。Hibadh 在多个物种及家蚕不同组织中比较保守。失重环境中家蚕 *hibadh* 基因在胚体突起发生期和反转期表达量上调,在气管形成期表达量下调。在模拟失重环境中,家蚕基因的表达模式与家蚕整体的响应模式有相似之处但不尽相同。基因对环境反应的灵敏度高于有机体整体对环境反应的灵敏度。该研究有利于进一步探讨 *hibadh* 基因的重力生物学机制。

REFERENCES

- [1] Shi Z, Zhuang D, Ilyin EA. Space flight experiment on Chinese silkworm on board the Russian 10th biosatellite. *Adv Space Res*, 1998, **21**(8/9): 1145–1150.
- [2] Shi Z, Zhuang D, Li D. Experimental studies of silkworm eggs on board recoverable satellite. *Space Med Med Eng*, 1994, **7**: S22–S28.
- [3] Furusawa T, Kotani E, Ichida M, *et al.* Embryonic development in the eggs of the silkworm, *Bombyx mori*, exposed to the space environment. *Biol Sci Space*, 2001, **15**: S177–S182.
- [4] Huang JH, Miao XX, Jin WR, *et al.* Serial analysis of gene expression in the silkworm, *Bombyx mori*. *Genomics*, 2005, **86**(2): 233–241.
- [5] Lee SH, Davis EJ. Amino acid catabolism by perfused rat hindquarter. The metabolic fates of valine. *Biochem J*, 1986, **233**(3): 621–630.
- [6] Rougraff PM, Zhang B, Kuntz MJ, *et al.* Cloning and sequence analysis of a cDNA for 3-Hydroxyisobutyrate dehydrogenase. *J Biol Chem*, 1989, **264**(10): 5899–5903.
- [7] Rougraff PM, Paxton R, Kuntz MJ, *et al.* Purification and characterization of 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase from rabbit liver. *J Biol Chem*, 1988, **263**(1): 327–331.
- [8] Lokanath NK, Ohshima N, Takio K, *et al.* Crystal structure of novel NADP-dependent 3-Hydroxyisobutyrate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB8. *J Mol Biol*, 2005, **352**(4): 905–917.
- [9] Bannerjee D, Sanders LE, Sokatch JR. Properties of purified methylmalonate semialdehyde dehydrogenase of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*, 1970, **245**(7): 1828–1835.
- [10] Hasegawa J. Distribution in organisms and stereospecificity of b-hydroxyisobutyrate dehydrogenase. *Agric Biol Chem*, 1981, **45**: 2899–2901.
- [11] Letto J, Brosnan ME, Brosnan JT. Valine metabolism: gluconeogenesis from 3-hydroxyisobutyrate. *Biochem J*, 1986, **240**(3): 909–912.
- [12] Congdon PJ, Haigh D, Smith R, *et al.* Hypermethioninaemia and 3-hydroxyisobutyric aciduria in an apparently healthy baby. *J Inher Metab Dis*, 1981, **4**(2): 79–80.
- [13] Landaas S. Accumulation of 3-hydroxyisobutyric acid, 2-methyl-3-hydroxyisobutyric acid and 3-hydroxyisovaleric acid in ketoacidosis. *Clin Chim Acta*, 1975, **64**(2): 143–154.
- [14] Ko FJ, Nyhan WL, Wolff J, *et al.* 3-Hydroxyisobutyrate aciduria: an inborn error of valine catabolism. *Pediatr Res*, 1991, **30**(4): 322–326.
- [15] Rougraff PM, Paxton R, Kuntz MJ, *et al.* Purification and characterization of 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase from rabbit liver. *J Biol Chem*, 1988, **263**(1): 327–331.
- [16] Tong WG, Jiang LP, Yao P, *et al.* Effect of alternated + Gz and - Gz exposures on plasma myocardium enzyme, superoxide dismutase and malondialdehyde in rats. *Chin J Aerospace Med*, 2003, **14**(3): 140–142.
佟文革, 姜丽萍, 姚萍, 等. 正负加速度交替暴露对大鼠心肌酶、超氧化物歧化酶和丙二醛含量的影响. *中华航空航天医学杂志*, 2003, **14**(3): 140–142.
- [17] Guo SH, Yuan ZH, Li Y, *et al.* The harmful effect of alternated \pm Gz exposures on heart. *J Jilin Med Coll*, 2006, **27**(2): 74–76.
郭素红, 袁忠海, 李艳, 等. 不同方式加速度暴露对大鼠心肌损伤程度的影响. *吉林医药学院学报*, 2006, **27**(2): 74–76.
- [18] Shi RF, Yuan HP. Metabolism and motion of branched chain amine acid. *J Shanghai Phys Educ Inst*, 2003, **27**(5): 65–67.
史仍飞, 袁海平. 支链氨基酸代谢与运动. *上海体育学院学报*, 2003, **27**(5): 65–67.
- [19] Jia X, Hildrum KI, Westad F, *et al.* Changes in enzymes associated with energy metabolism during the early post mortem period in longissimus thoracis bovine muscle analyzed by proteomics. *J Proteome Res*, 2006, **5**(7): 1763–1769.
- [20] Murin R, Schaer A, Kowtharapu BS, *et al.* Expression of 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase in cultured neural cells. *J Neurochem*, 2008, **105**(4): 1176–1186.
- [21] Chai CL, Lu C. Comparison of early embryogenesis between silkworm and drosophila from both morphology and gene content level. *Hereditas*, 2006, **28**(9): 1173–1179.
柴春利, 鲁成. 从形态学不同到基因水平差异: 家蚕与果蝇早期胚胎发育比较. *遗传*, 2006, **28**(9): 1173–1179.
- [22] Song QT. Studies on sensitive period of silkworm embryo to environment during body pigmentation stage of silkworm. *J Hebei For Coll*, 1994, **9**(3): 232–235.
宋起图. 家蚕催青中胚胎环境敏感期的研究. *河北林学院学报*, 1994, **9**(3): 232–235.
- [23] Rossa MD. The influence of gravity on structure and function of animals. *Adv Space Res*, 1984, **4**(12): 305–314.
- [24] Hoban-Higgins TM, Alpatov AM, Wassmer GT, *et al.* Gravity and light effects on the circadian clock of a desert beetle, *Trigonoscelis gigas*. *J Insect Physiol*, 2003, **49**(7): 671–675.