

网络出版时间:2016-05-03 14:05 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2016.06.005  
网络出版地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20160503.1405.010.html>

# 细胞周期蛋白家族基因在家蚕胚胎期的表达分析

刘丽华<sup>1</sup>, 沈卫德<sup>2</sup>, 李 兵<sup>2</sup>, 秦佳梅<sup>1</sup>, 刘 涛<sup>1</sup>

(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)

**[摘要]** 【目的】研究家蚕细胞周期蛋白家族基因(*CyclinA*、*CyclinB*、*CyclinB3*、*CyclinE*、*CyclinL1*)在滞育卵与即时浸酸处理的滞育卵发育过程中的转录活性,为家蚕胚胎发育及细胞周期调控机制研究提供参考。【方法】以家蚕品种大造为试材,取产后1~8 d的滞育卵及产后20 h即时浸酸的非滞育卵,提取其RNA反转录成cDNA,采用实时荧光定量PCR方法分析家蚕Cyclin家族基因在胚胎发育过程中的转录水平。【结果】在即时浸酸处理的家蚕非滞育卵中均能检测到Cyclin家族基因的表达,但不同发育阶段Cyclin家族基因表达量差异很大,在发育开始的1~3 d, Cyclin家族基因变化显著,说明此期细胞分裂频繁,正处于组织和器官活跃形成时期。在胚胎发育晚期,除*CyclinL1*外的其他基因表达量都很低,表明此时幼虫器官发育几近完成,因此细胞分裂迟缓。而滞育卵从蛾体产下经过3 d后,细胞分化停滞于G2期,Cyclin家族基因也进入沉默状态。【结论】Cyclin家族基因在家蚕胚胎发育过程中具有重要的调控作用。

**[关键词]** 家蚕; 细胞周期蛋白; 胚胎发育; 基因表达谱

**[中图分类号]** S882.4

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2016)06-0029-05

## Expression of Cyclin family genes during embryonic stage of *Bombyx mori*

LIU Li-hua<sup>1</sup>, SHEN Wei-de<sup>2</sup>, LI Bing<sup>2</sup>, QIN Jia-mei<sup>1</sup>, LIU Tao<sup>1</sup>

(1 Department of Biology, Tonghua Normal University, Tonghua, Jilin 134000, China;

2 School of Basic Medicine and Biological Sciences, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215123, China)

**Abstract:** 【Objective】The transcriptional activities of Cyclin family genes (*CyclinA*, *CyclinB*, *CyclinB3*, *CyclinE*, and *CyclinL1*) during development of diapause and non-diapause eggs of *Bombyx mori* were studied to provide reference for embryonic development and control mechanism of cell cycle in *B. mori*. 【Method】The total RNA was isolated from 1—8 d diapause and 20 h non-diapause eggs of *B. mori* (Dazao) and was reversely transcribed into cDNA. The transcription levels of Cyclin family genes during embryonic development stage were measured using real-time fluorescence quantitative PCR. 【Result】All of the Cyclin family genes were detected in non-diapause eggs. The Cyclin family genes expression levels varied widely at different embryonic development stages. At 1—3 d, Cyclin family genes changed significantly, indicating that the cell division was frequent at this phase, and it was during the formation stage of tissues and organs. Expressions of all genes except *CyclinL1* were low in late embryonic development stage, indicating that the larval organ development was almost complete at this time. Three days after the lay of diapause eggs, the differentiation stagnated at the G2 phase, and Cyclin family genes were in silenced state. 【Conclusion】The Cyclin family genes play an important role in regulation at embryonic development stage.

**Key words:** *Bombyx mori*; Cyclin; embryonic development; gene expression

〔收稿日期〕 2014-10-29

〔基金项目〕 吉林省科技厅项目(20130101100JC);吉林省教育厅项目(2013493)

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

细胞周期是细胞生命活动的基本过程,分为 G1、S、G2、M 4 个时期。细胞周期受细胞周期蛋白(Cyclin)、细胞周期蛋白依赖激酶(Cyclin-dependent kinase, CDK)和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子(Cyclin dependent kinase inhibitor, CKI)的共同调控<sup>[1]</sup>,其中 CDK 是真核生物细胞周期调控的关键因子,依赖细胞周期蛋白发挥其功能,细胞周期蛋白周期性的积累与分解从时空上特异地调控 CDK 的活性,从而推动细胞周期向前推进,这一过程在生物界高度保守<sup>[2]</sup>。

Cyclin 广泛存在于多种生物体内<sup>[3-4]</sup>,在哺乳动物细胞中发现了 20 多种细胞周期蛋白家族成员<sup>[5]</sup>,在家蚕体内报道了 5 种,即 CyclinA、CyclinB、CyclinB3、CyclinE 和 CyclinL1。研究表明,CyclinA 在 S 期和 G2 期到 M 期转变过程中发挥作用<sup>[6]</sup>,CyclinB 和 CyclinB3 同属于 B 型周期蛋白,是 M 期的限制因素<sup>[7]</sup>,CyclinE 是 G1 期向 S 期转变的周期蛋白<sup>[8]</sup>,CyclinL1 对细胞转录起调控作用<sup>[9]</sup>。

家蚕既是一种重要的经济昆虫,又是鳞翅目的模式昆虫,一生要经过卵、幼虫、蛹和成虫 4 个形态和机能完全不同的发育阶段<sup>[10]</sup>。在家蚕胚胎发育过程中,受精卵的分裂和分化必然受到细胞周期蛋白的调控。本研究采用 RT-PCR 方法检测了家蚕 CyclinA、CyclinB、CyclinB3、CyclinL1、CyclinE 基因在产后 1~8 d 的滞育卵及即时浸酸处理后的滞育卵中的转录表达水平,旨在为家蚕胚胎发育及细胞周期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,饲育温度(25±1)℃,RH 60%~

75%,新鲜桑叶饲育。取产后 1~8 d 的滞育卵,同时另取产后 20 h 的滞育卵进行即时浸酸处理,使其打破滞育状态继续发育,于浸酸处理后 1~8 d 取样,冻存于液氮中备用。

1.1.2 主要试剂 总 RNA 抽提试剂盒 Trizol-A,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 试剂盒及其他化学试剂,均购自宝生物工程(大连)有限公司。引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

### 1.2 方 法

1.2.1 胚胎发育时期蚕卵总 RNA 的提取及 cDNA 制备 按照 Trizol-A 试剂盒说明书分别提取 1~8 d 滞育卵及即时浸酸蚕卵总 RNA,用紫外分光光度计测定其纯度和浓度。用 M-MLV 反转录试剂盒将提取的不同胚胎发育时期的总 RNA 分别反转录成 cDNA 备用。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 根据 NCBI 中家蚕 CyclinA (GenBank 登录号: NM001160187)、CyclinB (GenBank 登录号: D84452)、CyclinB3 (GenBank 登录号: EU074796)、CyclinL1 (GenBank 登录号: NM001161717)、CyclinE (GenBank 登录号: 619696) 基因序列,采用 Primer5.0 软件,按照 Real-time PCR 要求设计 Actin3 内参照基因和 CyclinA、CyclinB、CyclinB3、CyclinE、CyclinL1 基因的引物对(表 1),并由生工生物工程(上海)有限公司合成。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,具体操作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 测定仪软件自动设定,每个样品重复 3 次。

表 1 实时荧光定量 PCR 的检测基因和内参照基因的引物

Table 1 Primer pairs for real-time fluorescent quantitative PCR and internal reference genes

基因名称 Target gene	引物序列 Primer sequence	产物长度/bp Length of product
Actin3	F:5'-CGGCTACTCGTTCACTACC-3' R:5'-CCGTCGGAAAGTTCTGTAAG-3'	147
CyclinA	F:5'-CTCTAACACCCACCTCAC-3' R:5'-CGCTGCTATTACTGAGGGT-3'	153
CyclinB	F:5'-TTGCGAGACCGATACTTTG-3' R:5'-AGATTGCTGCCGCTGCTA-3'	161
CyclinB3	F:5'-CATAAAACTCCTCTGGTGT-3' R:5'-TAATCGTCAATAGGGAAAAG-3'	131
CyclinE	F:5'-CCCAAGACAATCCAGGCAA-3' R:5'-AGAGGCAGTCCACCCCA-3'	102
CyclinL1	F:5'-TACAAAGGTTTACTACTCG-3' R:5'-GATTACATCTCTTATTCTGC-3'	119

1.2.3 标准曲线的制作 分别将 *CyclinA*、*CyclinB*、*CyclinB3*、*CyclinE*、*CyclinL1* 和 *Actin3* 基因以 10 倍梯度稀释成 6 个浓度梯度, 进行 Real-time PCR, 以所得循环阈值(*Ct* 值)为纵轴(*y*), 对应的模板拷贝数的常用对数( $\lg N$ )为横轴(*x*)作图, 即得各基因扩增的标准曲线。

1.2.4 数据处理 RT-PCR 结果数据用 ABI 7300 仪器自带的 Sequence detection software version 1.3.1 软件进行处理与分析, 并参照 Schefé 等<sup>[11]</sup>的方法进行效率校正。图表采用 SPSS16.0 软件制作。

## 2 结果与分析

### 2.1 实时荧光定量反应标准曲线绘制

由图 1 可以看出, 家蚕 Cyclin 家族各个基因曲线的相关系数  $R^2$  均大于 0.99, 表明其线性关系非常好。

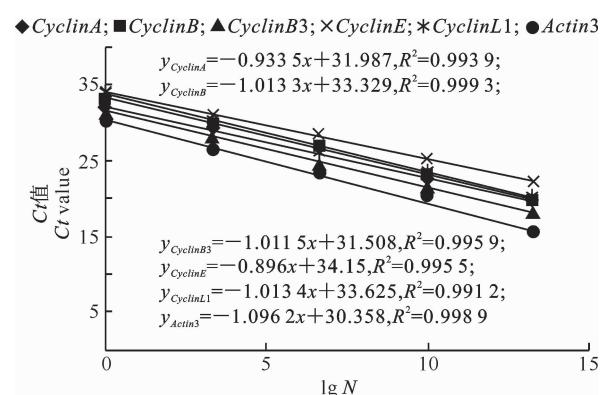


图 1 家蚕细胞周期蛋白家族基因的实时荧光定量 PCR 标准曲线

Fig. 1 Standard curves of Cyclin family genes of *Bombyx mori* for real-time fluorescence quantitative PCR

2.2 家蚕 Cyclin 家族基因在非滞育卵中的表达 对不同发育时期即时浸酸蚕卵的 Cyclin 家族基因 mRNA 转录情况进行检测, 结果如图 2 所示。

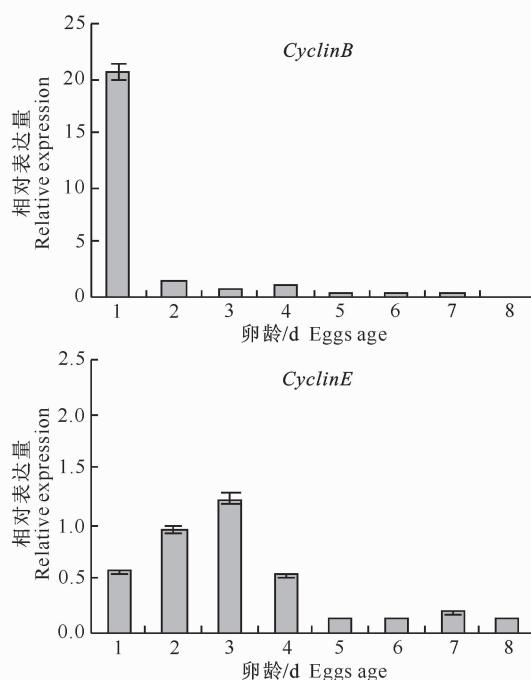
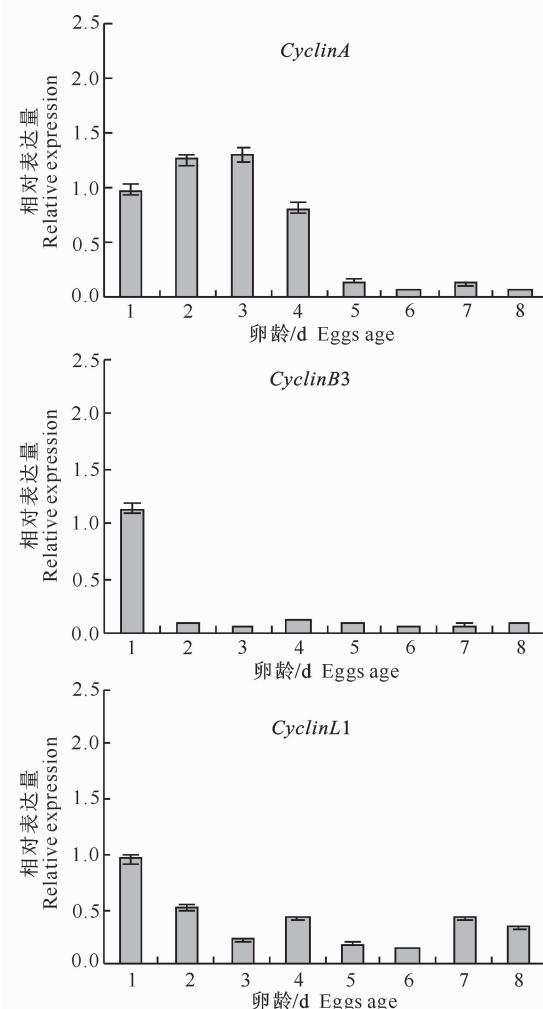


图 2 Cyclin 家族基因在非滞育蚕卵中的转录检测

Fig. 2 Transcript expression of Cyclin family genes in non-diapause eggs

由图 2 可知, Cyclin 家族基因在整个胚胎发育阶段都有表达。产后 1 d, *CyclinB* 基因表达量远远高于其他基因的表达量, 揭示刚解除滞育的细胞经催青后大部分处于 G2 期; 2 d 时, *CyclinB* 基因表达量迅速下降, 而 *CyclinE*、*CyclinA* 基因表达量迅速升高, 表明胚胎细胞从 G2 期经过 G1 期快速进入 S 期, 一直持续到第 3 天, 此期细胞分裂频率较高; *CyclinB3* 基因在前 4 d 的表达水平明显低于 *CyclinB* 基因, 推测虽然 *CyclinB* 及 *CyclinB3* 基因都是细胞周期 M 期的限速因素, 但在即时浸酸蚕卵发育过程中, *CyclinB* 基因对细胞周期及增殖的影响较大。4 d 后, *CyclinE*、*CyclinA*、*CyclinB*、*Cy-*

*clinB3* 基因表达保持相对稳定, 表达量都很低, 表明此时幼虫器官发育几近完成, 因此细胞分裂较为迟缓。在本试验中, 随着胚胎发育的推进, *CyclinL1* 基因的表达水平与其他细胞周期蛋白家族基因完全不同, 呈现出先降低后升高的趋势, 发育到 4 d 时出现了一个小高峰, 然后又呈降低趋势, 至 7 d 后又开始升高, 推测其在卵发育的不同阶段对不同基因起调控作用。

### 2.3 家蚕 Cyclin 家族基因在滞育卵中的表达

采用荧光定量 PCR 方法对家蚕 Cyclin 家族基因在滞育卵中的转录表达进行分析, 结果如图 3 所示。

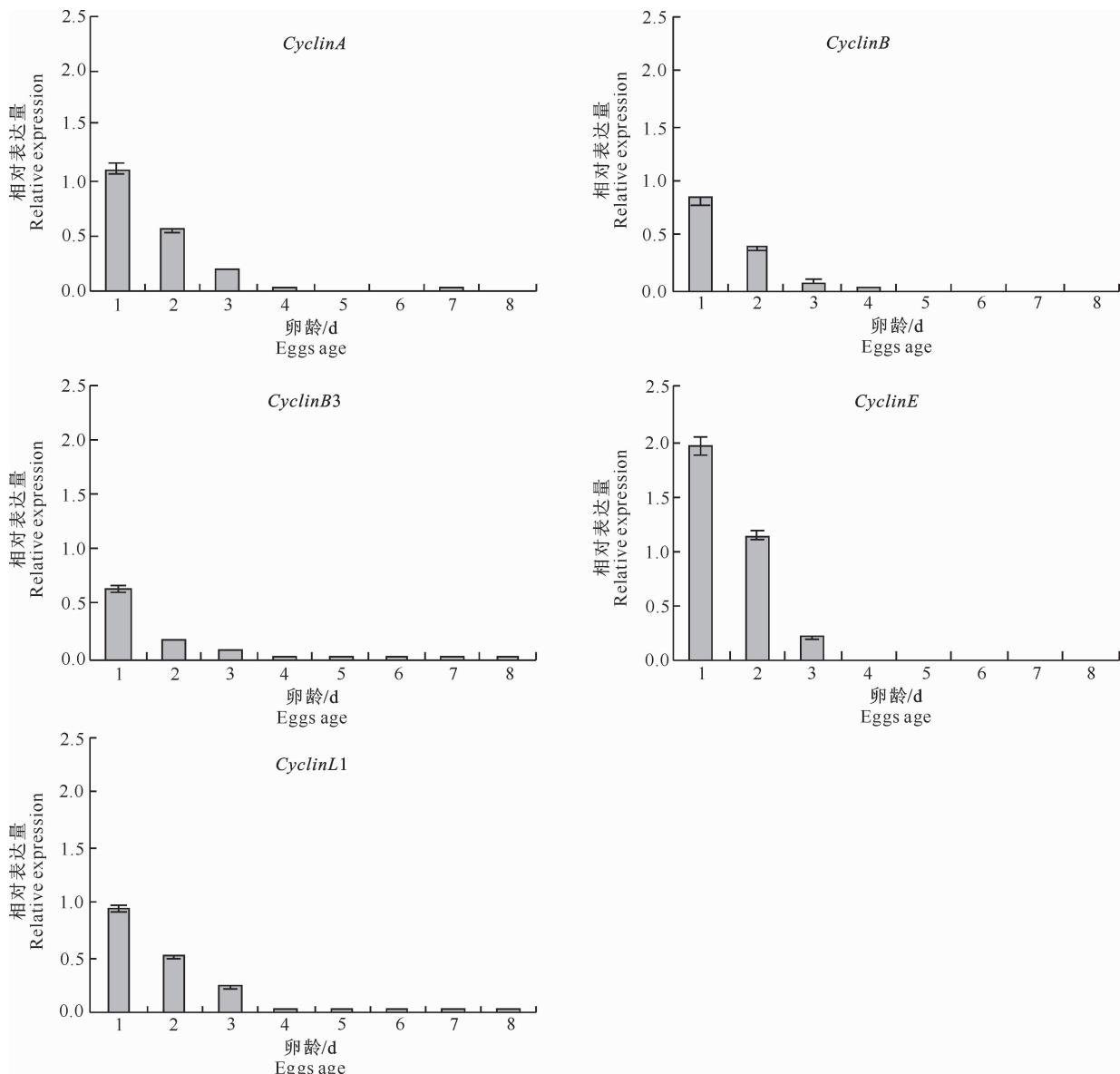


图 3 Cyclin 家族基因在滞育蚕卵中的转录检测

Fig. 3 Transcript expression of Cyclin family genes in diapause eggs

由图3可知,随着发育时间的延长,*CyclinA*、*CyclinB*、*CyclinB3*、*CyclinE*、*CyclinL1*基因表达量逐渐降低,3 d后几乎检测不到其表达,揭示此时细胞已停止分裂。

### 3 讨 论

胚胎发育一直是生命科学的研究主题之一。家蚕催青期胚胎发育是蚕体内一系列生理生化反应的体现。受精卵经过一系列的分裂和分化最终形成不同形态和功能的细胞,然后进一步构建各种组织和器官,最后构成一个胚胎有机体,其中许多调控机制在胚胎发育阶段就已经决定<sup>[12]</sup>。因此,研究胚胎发育调控机制对于阐明生物的生长、发育和起源进化具有重要意义。

家蚕由受精卵发育到1龄幼虫的过程中,正是细胞进行大量分裂和分化的时期,这一时期是探索细胞分裂分子调控机制的理想期。本试验在即时浸酸后,对蚕卵发育过程中Cyclin家族基因mRNA表达水平进行跟踪分析,结果表明,Cyclin家族基因在胚胎发育阶段都有表达,这与张春冬等<sup>[13]</sup>的研究结果相同。但在胚胎发育的不同阶段,Cyclin家族基因表达水平相差很大,在卵开始发育的1~3 d,Cyclin家族基因变化显著,说明此期时细胞分裂频繁,正处于组织和器官活跃形成时期。4 d后,*CyclinE*、*CyclinA*、*CyclinB*、*CyclinB3*基因表达保持相对稳定;而到胚胎发育晚期所有的基因表达量都很低,表明在此时幼虫器官的发育几近完成,因此细胞分裂比较迟缓。

本试验同时对Cyclin家族基因在滞育蚕卵发育过程中的表达水平进行了分析,结果发现,在胚胎发育3 d后,已经检测不到Cyclin家族基因的表达。Nakagaki等<sup>[14]</sup>研究表明,滞育蚕卵在滞育激素作用下,胚胎细胞在产后3 d分裂变慢并停滞于细胞分裂的G2期。本试验结果表明,当滞育卵的细胞分化停滞于G2期后,Cyclin家族基因也进入沉默状态。但蚕卵从蛾体产下3 d后,其体内生理生化代谢仍在继续进行<sup>[15]</sup>。推测家蚕胚胎进入滞育后关闭了某些基因,只保留生命体基本代谢所需的基因,以维持机体物质能量消耗,而至于保留了哪些基因的活性,还有待于进一步研究。

### [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):1-6.
- Zhan Q M,Chen J.Clee cycle and tumor translational medicine [J]. Chin J Clin Oneol,2014,41(1):1-6. (in Chinese)
- [2] Murray A W. Recycling the cell cycle cyclins revisited [J]. Cell,2004,116:221-234.
- [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):357-359.
- Han S Y,Wang J. The expression of cyclins and clinic value in malignant tumors [J]. J Mol Diagn Ther,2013,5(5):357-359. (in Chinese)
- [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.*BmCyclinB*和*BmCyclinB3*是家蚕细胞周期进程所必需的[J].中国科学,2013,43(3):240-246.
- Pan M H,Hong K L,Chen X Y,et al.*BmCyclinB* and *BmCyclinB3* are required for cell cycle progression in the silkworm, *Bombyx mori* [J]. Science China,2013,43(3):240-246. (in Chinese)
- [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):22-25.
- Liu L H,Shen W D,Li B,et al.Influence of siRNA-CyclinE to the distribution of the BmN cell proliferation [J]. Journal of Northwest A&F University(Naturac Science Edition),2013,41(4):22-25. (in Chinese)
- [9] 范兰芬,钟杨生,林健荣.家蚕细胞周期蛋白基因*BmCcnL1*的克隆及表达分析[J].昆虫学报,2010,53(12):1325-1332.
- Fan L F,Zhong Y S,Lin J R. Cloning and expression analysis of the cyclin gene *BmCcnL1* in the silkworm *Bombyx mori* [J]. Journal of Insect Science,2010,53(12):1325-1332. (in Chinese)
- [10] 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.
- Chinese Academy of Agricultural Sciences,Sericultural Research Institute. The sericultural science in China [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press,1991: 228-230. (in Chinese)
- [11] 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,2006,84:901-910.
- [12] Lall S,Patel N H. Conservation and divergence in molecular mechanisms of axis formation [J]. Annual Review of Genetics,2001,35(1):407-437.

(下转第45页)

- Li H R, Sun R, Li Q M, et al. Preparation of compound Oxytetracycline hydrochloride injection [J]. Journal of Northwest A&F University(Nat Sci Ed), 2013, 41(3): 55-60. (in Chinese)
- [16] 中华人民共和国农业部. 关于发布兽药稳定性试验技术规范(试行)的通知:农牧发[1999]13号 [S]. 1999-07-15.

Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Circular on issuing technical standards of veterinary drug stability testing(for trial implementation): Agriculture and Animal Husbandry Promulgated[1999] Thirteenth [S]. 1999-07-15. (in Chinese)

(上接第33页)

- [13] 张春冬,谈娟,赵丹红,等. 家蚕周期蛋白A基因(*BmcyclinA*)的克隆和表达谱分析 [J]. 蚕业科学, 2009, 35(4): 761-767.  
Zhang C D, Tan J, Zhao D H, et al. Molecular cloning and expression pattern analysis of cyclinA gene in the silkworm, *Bombyx mori* [J]. Acta Sericologica Sinica, 2009, 35(4): 761-767. (in Chinese)
- [14] Nakagaki M, Takei R, Nagashima E, et al. Cell cycles in en-

bryos of the silkworm, *Bombyx mori* G2-arrest at diapause stage [J]. Rouxs Archives of Developmental Biology, 1991, 200(4): 223-229.  
[15] 吴大洋. 家蚕卵滞育过程中的生理代谢 [J]. 蚕学通讯, 1996 (1): 19-22.  
Wu D Y. Metabolisms in silkworm eggs during diapause process [J]. Newsletter of Sericultural Science, 1996 (1): 19-22. (in Chinese)