

## 家蚕 Notch 信号通路基因的表达研究

李丹丹, 黄蕾, 王立方, 刘宗才\* (中英·南阳洛桑昆虫生物学联合实验室, 河南南阳 473061)

**摘要** [目的]研究家蚕 Notch 信号通路基因的表达情况。[方法]在实验室前期工作的基础上,用特异引物对家蚕的 Notch 信号通路上下游基因进行克隆,并对这些基因在家蚕 5 龄幼虫不同组织部位的表达进行研究。[结果]这些基因在各组织的表达量不同,其中 *fringe* 和 *groucho* 在家蚕头部表达量较多,在丝腺、精巢、卵巢中的表达量较少;*notch* 在家蚕尾部表达量较少,在其他组织中表达量无明显差别。[结论]该研究为进一步研究家蚕 Notch 信号通路奠定了基础。

**关键词** 家蚕; Notch 信号通路; 基因; 表达谱

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)19-08447-02

## Study on Expression of Notch Signaling Pathway Genes in Silkworm

LI Dan-dan et al (China-UK-NYNU-RRes Joint Laboratory of Insect Biology, Nanyang Normal University, Nanyang, Henan 473061)

**Abstract** [Objective] The aim was to study the expression of Notch signaling pathway genes in silkworm. [Method] Based on the previous studies, genes of Notch signaling pathway in silkworm were cloned by the specific primers, and the expression profiles of them in different tissues of the fifth instar larvae were analyzed. [Result] The expression patterns of Notch signaling pathway genes were different, in which *fringe* and *groucho* accumulated more in head of the silkworm and with little expression in silk gland, testis and ovary. While *notch* had relatively less expression in tail but with constructive expression in other tissues. [Conclusion] The study laid a basis on the further research of Notch signaling pathway.

**Key words** Silkworm; Notch signaling pathway; Gene; Expression profiles

Notch 信号通路广泛存在于从果蝇、线虫到脊椎动物的各种生物体中,在进化上高度保守,一个完整的 Notch 信号通路由 Notch 受体、Notch 配体、CSL DNA 结合蛋白及其他的效应物和 Notch 的调节分子组成。Notch 信号转导过程包括 Notch 受体与配体的结合、Notch 受体的酶切活化、可溶性 NICD 转移至细胞核并与 CSL DNA 结合蛋白相互作用等过程。Notch 信号途径调控多种细胞的发育、增殖、分化和凋亡。在果蝇和线虫中,Notch 信号通路精确调控细胞分化起始过程,对胚胎发育中器官发生和形态建成起重要作用<sup>[1]</sup>。研究表明,活化 Notch 信号通路可抑制或延迟发育过程中的分化,并通过侧向抑制阻止邻近细胞采取同样的分化程序。Notch 信号通路功能失常与一些发育紊乱、神经退行性疾病和癌症有关。Notch 信号通路及其配体的突变可导致心脏、骨骼、造血和神经等多种系统的发育缺陷<sup>[2]</sup>。Notch 信号途径及其调控的深入研究对于揭示自然生命现象和病理变化具有重要意义。

目前,在果蝇中发现的 Notch 配体有 Delta 和 Serrate 2 种,这些配体都是单次跨膜糖蛋白,细胞膜外含数量不等的 EGFR, N 端有一个富含半胱氨酸的 DSL 基因序列,Delta 和 Serrate 配体通过反式放大作用可放大 Notch 信号。Fringe 是定位于高尔基体的 N-乙酰葡萄糖基转移酶,可将 N-乙酰氨基葡萄糖基团加至与 Notch 胞外区特异 EGFR 结合的 O-连接岩藻糖上<sup>[3]</sup>,阻止配体诱导的蛋白裂解,从而抑制 Notch 的活化。*fringe* 基因的缺失可导致果蝇翅膀边界发育异常<sup>[4]</sup>。果蝇的核内蛋白 Groucho 是一个非 bHLH 蛋白,可与 DNA 结合蛋白 bHLH E(sp1)/HES 相互作用,协同抑制转录<sup>[5]</sup>。

家蚕作为人类最早驯化的动物之一,具有重要的经济价值,同时其在研究昆虫变态发育及农林害虫防治中也发挥着重要的作用。为研究 Notch 信号通路在家蚕个体发育过程中的作用,该研究首先借鉴果蝇中已发现的 Notch 信号通路相关基因,在家蚕基因组中搜索到相应的 *fringe*、*groucho*、*notch* 等基因,利用 PCR 法对家蚕 Notch 信号通路的基因进行克隆,并用半定量 RT-PCR 法研究家蚕 5 龄幼虫各组织 Notch 信号通路基因的表达谱,从而为家蚕 Notch 信号通路的研究奠定基础。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

**1.1.1 供试材料。**所用家蚕品种为大造 P50,用桑叶饲养,在 5 龄第 3 天解剖头、胸、尾、背板、腹板、丝腺、精巢和卵巢 8 个部位,迅速投入液氮中速冻保存。

**1.1.2 所用引物。**试验所用引物如表 1 所示,由奥科生物技术有限公司合成。

表 1 PCR 扩增所用引物

| 引物名称              | 序列(5'-3')             |
|-------------------|-----------------------|
| <i>notch</i> -F   | TGATTGCTCTTTGTTTCAGC  |
| <i>notch</i> -R   | TACTCTGATCTCGCATAACG  |
| <i>fringe</i> -F  | GCAGCTGTGCTGTTAGCCTT  |
| <i>fringe</i> -R  | TGTGTCGGTGAAGAACCATG  |
| <i>groucho</i> -F | ATGTATCCGAGTGGGGCGCTA |
| <i>groucho</i> -R | TGCTGCTGATGCTCTTGCGA  |
| <i>actinA3</i> -F | ATTACTAAGGTGTGCTCG    |
| <i>actinA3</i> -R | CCAGTTAGTGACGATTCC    |

**1.2 方法** RNA 提取采用 Trizol (Invitrogen) 法。反转录使用 promega 反转录试剂盒,半定量 RT-PCR 所用引物如表 1 所示,PCR 条件为 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C/58 °C 30 s, 72 °C 30 s, 25 个循环。以 *actinA3* 为内参基因。

## 2 结果与分析

**2.1 Notch 信号通路基因的克隆** 通过 PCR 法,从家蚕头部 RNA 反转的 cDNA 中克隆 *fringe*、*groucho* 和 *notch* 基因,产

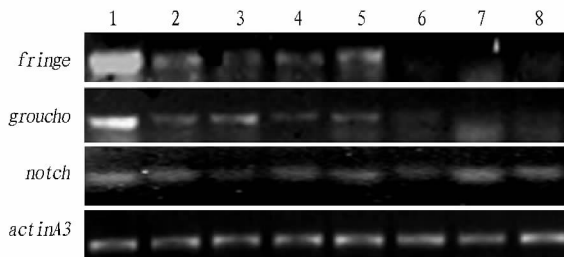
**基金项目** 国家自然科学基金(311100938)。

**作者简介** 李丹丹(1982-),女,河南南阳人,讲师,博士,从事昆虫生理生化与分子生物学研究。\*通讯作者,副教授,从事植物与昆虫互作生物学研究, E-mail: lidannytc@126.com。

**收稿日期** 2013-05-17

物经奥科公司测序正确,表明为目的基因。

**2.2 Notch 信号通路基因在家蚕不同组织中的表达谱** 利用 *actinA3* 作为内参基因,对家蚕 *fringe*、*groucho* 和 *notch* 在 5 龄幼虫不同组织的表达谱进行研究,结果如图 1 所示,由图可见,Notch 信号通路基因在家蚕 5 龄幼虫各组织中的表达量不同。*fringe* 在家蚕头部表达量较多,在丝腺、精巢、卵巢中的表达量较少;*groucho* 在家蚕头部表达量较多,在丝腺、精巢和卵巢中的表达量较少;*notch* 在家蚕尾部表达量较少,在其他组织中表达量无明显差别。神经组织为 Notch 信号最活跃的部位,*fringe* 和 *groucho* 2 个基因在头部的高表达也表明 Notch 信号通路在神经组织中的重要性。而在丝腺、精巢和卵巢中,*fringe* 和 *groucho* 2 个基因参与的调控可能较弱。



注: M. DL2000 Marker; 1~8 分别是头、胸、尾、腹板、背板、丝腺、精巢、卵巢各个基因的扩增结果。

图 1 各个组织 Notch 信号通路基因的扩增结果

### 3 讨论

Notch 参与了果蝇发育过程中的许多事件。如在果蝇中,Notch 的功能最先确认为控制胚胎神经外胚层细胞分化为表皮细胞,进一步研究表明 Notch 的功能还包括控制中胚层、生殖细胞、眼睛、翅膀及刚毛的正常发育<sup>[6-7]</sup>。越来越多的证据表明,Notch 通路可能贯穿果蝇的整个生命周期,在成年果蝇神经系统的多种功能中发挥重要作用<sup>[8]</sup>。该研究在家蚕 5 龄幼虫中分析了 Notch 信号通路上下游基因的组织表达谱,发现 *fringe* 和 *groucho* 2 个基因在家蚕头中大量表达,在其他组织中较少,尤其在丝腺、精巢、卵巢中较少。激活的 Notch 信号通路在中枢神经系统的发育过程中,在维持神经

(上接第 8446 页)

逐渐增加,药后 9 d 药效达到 50.51%,药后 11 d 药效达到 66.96%,超过藜芦碱药后 11 d 药效 9 个百分点;藜芦碱药后 1 d 防效仅为 23.33%,药后 3 d 防效已超过 50%,为 50.96%;除虫菊药后 1 d 的防效达 97.79%,比藜芦碱药后 1 d 的防效高出 1 倍多,差异极显著;药后 3 d 防效高达 100%,是苦参碱药后 3 d 防效的 5 倍多,是藜芦碱药后 3 d 防效的 2 倍,且持效期到 11 d 还是 100%,差异极显著。

**2.2 药残检测** 药后 7 d,藜芦碱、除虫菊、苦参碱农残量分别为 5.2%、7.9% 和 9.5%,3 种药剂农药残留均未超出 10%,符合健康食品要求。

### 3 结论与讨论

0.5% 藜芦碱可溶性液剂、0.3% 双梅立美 - 苦参碱乳油、5% 天然除虫菊素 3 种植物源药剂对葡萄叶蝉均有明显防治效果。其中,除虫菊素具有快速杀虫效果,还可杀死虫

干细胞的未分化状态和自我更新中起重要作用<sup>[9]</sup>,所以头部 Notch 信号通路基因的表达量较高。家蚕丝腺是核内复制组织,其内的基因组无有丝分裂和核分裂,它的细胞分裂仅限于胚胎阶段,在整个幼虫发育过程中不再分裂<sup>[10]</sup>,而 Notch 信号通路可延迟或抑制分化,所以 Notch 信号通路基因在家蚕丝腺中的表达量较少。精巢发育的同时伴随精子的发生,这一过程中经有丝分裂、减数分裂和细胞分化不成熟的雄性生殖细胞,最终发育为成熟的精子,此过程 Notch 信号通路被抑制,从而有利于精子的形成,所以精巢中的 Notch 信号通路基因表达量较少<sup>[11]</sup>。以上结果表明,在分化程度较高的组织中,Notch 信号通路对细胞命运的决定作用可能会相应减弱。通过对家蚕 Notch 信号通路的研究,有利于进一步了解 Notch 信号通路的作用机制,为人类退行性疾病及癌症研究提供更多可借鉴的理论依据。

### 参考文献

- [1] ZWEIDLER-MCKAY P A, PEAR W S. Notch and T cell malignancy [J]. *Semin Cancer Biol*, 2004, 14 (5): 329 - 340.
- [2] KAGEYAMA R, OHTSUKA T, SHIMOJO H, et al. Dynamic Notch signaling in neural progenitor cells and a revised view of lateral inhibition [J]. *Nat Neurosci*, 2008, 11 (11): 1247 - 1251.
- [3] MOLONEY D J, PANIN V M, JOHNSTON S H, et al. Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch [J]. *Nature*, 2000, 406 (6794): 369 - 375.
- [4] CORREIA T, DAPAYANNOPOULOS V, PANIN V, et al. Molecular genetic analysis of the glycosyltransferase Fringe in *Drosophila* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100 (11): 6404 - 6409.
- [5] FISHER A L, CAUDY M. Groucho proteins: transcriptional corepressors for specific subsets of DNA - binding transcription factors in vertebrates and invertebrates [J]. *Genes Dev*, 1998, 12 (13): 1931 - 1940.
- [6] JOHSTON L A, EDGAR B A. Wingless and Notch regulate cell cycle arrest in the developing *Drosophila wing* [J]. *Nature*, 1998, 394: 82 - 86.
- [7] GO M J, EASTMAN D S, ARTAVANIS - TSAKONAS S. Cell proliferation control by Notch signaling in *Drosophila* development [J]. *Development*, 1998, 125: 2031 - 2037.
- [8] CHITNIS A B. Control of neurogenesis - lessons from frog, fish and flies [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 1999, 9: 18 - 25.
- [9] GREENBERG D A, JIN K. Turning neurogenesis up a Notch [J]. *Nat Med*, 2006, 12 (8): 884 - 885.
- [10] BALUCHAMY S, KARUMATHIL P G. Expression of cyclin E in endometotic silk - gland cells from mulberry silkworm [J]. *Gene*, 2000, 257: 77 - 85.
- [11] SARGE K D, CULLEN K E. Regulation of hsp expression during rodent spermatogenesis [J]. *Cell Mol Life Cmls*, 1997, 53 (2): 191 - 197.

卵,在调查期间未见叶蝉数量有增加;药后 3 d 可全部杀死葡萄叶蝉,药效达 100%,持续到 11 d 药效未减弱。苦参碱和藜芦碱在药后 1 d 药效均不明显,但随着时间的推移,药后 9 d 防效均有明显增加。因此,在每年开春葡萄出土后可选生物碱、藜芦碱防控葡萄叶蝉。当虫情严重时,尤其是葡萄成熟采摘期时应首选除虫菊素,既可有效防治葡萄叶蝉,又可减少化学农药的使用,降低农药残留,达到绿色食品要求。

### 参考文献

- [1] 沙月霞,樊仲庆,王国珍,等. 葡萄斑叶蝉种群消长动态及防治药剂的筛选 [J]. *植物保护*, 2011, 37 (3): 152 - 156.
- [2] 马德英,许克田,王慧卿,等. 新疆葡萄斑叶蝉若虫的发育起点温度和有效积温 [J]. *昆虫知识*, 2004, 41 (5): 431 - 433.
- [3] 王慧卿,李晶,栾丰刚,等. 吐鲁番地区葡萄斑叶蝉天敌资源调查及主要天敌控害作用初步研究 [J]. *新疆农业科学*, 2011, 48 (2): 296 - 300.
- [4] 俞飞飞,孙其宝,陆丽娟. 不同植物源农药对巨峰葡萄病害的防治效果 [J]. *安徽农业科学*, 2010, 38 (16): 8486 - 8487, 8542.
- [5] 段永春,白小宁. 4 种植物源杀虫剂在茶树假眼小绿叶蝉防治中的应用 [J]. *中国植保导刊*, 2011, 31 (9): 80 - 84.