



家蚕尿苷磷酸化酶 1 的克隆与表达分析*

李 丹^{2**} 郑 茜² 蔡 苗² 赵 珊² 朱 勇^{1***}

(1. 农业农村部蚕桑生物学与遗传育种重点实验室, 重庆 400715; 2. 西南大学生物技术学院, 重庆 400715)

摘 要 【目的】通过对家蚕尿苷磷酸化酶 1 基因 (*BmUPase1*) 的克隆、原核表达、生物信息学分析及各组织和各时期的表达变化的研究, 为揭示其在家蚕 *Bombyx mori* 中发挥的作用奠定基础。【方法】以家蚕整蚕的 cDNA 为模板克隆获得 *BmUPase1* 基因的编码框序列。利用生物信息学软件分析序列特性。对该基因编码的蛋白质进行原核表达, 为后续制备抗体提供条件。通过 qPCR 对 *BmUPase1* 在家蚕各组织和各时期的表达量进行分析。【结果】*BmUPase1* 基因的完整 ORF 框序列全长 1 188 bp, 编码 395 个氨基酸, 分子式为 C₁₉₄₅H₃₀₇₄N₅₃₈O₅₉₁S₂₁, 分子量大小为 44.12 ku, 具有尿苷磷酸化酶 (UPase) 超家族的保守结构域 PNP_UDP_1。进化分析可知: 家蚕与斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*、棉铃虫 *Helicoverpa armigera*、小菜蛾 *Plutella xylostella*、夏威夷红蛱蝶 *Vanessa tameamea* 等亲缘关系最近。qPCR 结果显示 *BmUPase1* 基因在家蚕各个组织中都有表达, 说明 *BmUPase1* 对于家蚕的生长发育具有重要的作用。时期表达谱结果显示, *BmUPase1* 在家蚕化蛹、蛹期和蛾期的表达量升高, 推测其与家蚕化蛹及化蛾有关。pET28a-*BmUPase1* 重组载体在大肠杆菌 BL21 中成功表达, 与预测大小一致。【结论】本研究首次克隆了 *BmUPase1* 基因, 其在家蚕的各个组织和各个时期都有表达, 可能对家蚕的生长发育具有重要的作用。对其表达模式进行分析, 为进一步研究蛋白质的功能奠定基础。

关键词 家蚕; 尿苷磷酸化酶 1; 基因克隆

Cloning and expression of silkworm (*Bombyx mori*) uridine phosphorylase 1

LI Dan^{2**} ZHENG Xi² CAI Miao² ZHAO Shan² ZHU Yong^{2***}

(1. Key Laboratory of Sericulture Biology and Genetic Breeding in Ministry of Agriculture and Rural Science, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. College of Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract [Objectives] To investigate the characteristics of uridine phosphorylase in the silkworm by cloning, prokaryotic expression, bioinformatics analysis, and thereby lay a foundation for elucidating the molecular mechanism of UPase in this economically important species. [Methods] The CDS of *BmUPase1* was cloned using Dazao cDNA and analyzed with bioinformatic software. The gene was then inserted into the prokaryotic expression vector pET28a to create a recombinant plasmid pET28a-*BmUPase1*, which was then transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) to express *BmUPase1*. Real-time quantitative PCR was performed to profile the expression of the gene in different tissues and growth stages. [Results] Bioinformatics analysis showed that the *BmUPase1* gene has an ORF of 1 188 bp and encodes 395 amino acids. *BmUPase1* has one conserved domain, and its amino acid sequence identity is most similar to that of *Spodoptera litura* UPase (85.06 %). qPCR results indicate that the *BmUPase1* gene is expressed in all tissues and growth stages, which suggests that it plays an important role in silkworm growth and development. The pET28a-*BmUPase1* recombinant vector was successfully expressed in *E. coli* BL 21, and the expressed protein was of the predicted size. [Conclusion] The silkworm Uridine phosphorylase gene can be successfully cloned and expressed. The results of this study lay a foundation for further study of the function of this gene in silkworm development.

Key words silkworm; uridine phosphorylase 1; gene cloning

*资助项目 Supported projects: 重庆市商务委项目家蚕抗病品种的选育及推广研究 (kv2019438)

**第一作者 First author, E-mail: 1572746998@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhuy@swu.edu.cn

收稿日期 Received: 2019-05-14; 接受日期 Accepted: 2020-03-31

尿苷 (Uridine, Urd) 是一种天然的嘧啶核苷, 直接或间接参与细胞过程, 包括 RNA 和生物膜合成 (Connolly and Duley, 1999)、半乳糖代谢 (Cardini *et al.*, 1950, 1955), 具有影响生殖 (Persson *et al.*, 1991)、调节体温 (Peters *et al.*, 1987)、调节外周和中枢神经系统活动的功能 (Connolly *et al.*, 1993; Choi *et al.*, 2008)。在无糖的情况下, 尿苷作为碳水化合物代谢和核酸合成的必需前体, 除了直接参与嘧啶核苷酸的补救途径外, 还可以通过磷酸解产生核糖, 从而进入戊糖循环以满足细胞能量需求或形成磷酸核糖焦磷酸, 用于嘌呤核苷酸的生物合成 (Wice and Kennell, 1982)。在神经系统中, 尿苷可以作为睡眠功能的生理调节剂, 也可以在缺血和严重低血糖期间维持脑代谢 (Dagani *et al.*, 1984; Pizzorno *et al.*, 2002)。在临床上, 尿苷能用于治疗孤独症 (Page *et al.*, 1997) 和嘧啶缺乏的遗传性疾病, 如乳清酸性尿症 (Bercroft *et al.*, 1969)。此外, 血浆和组织中尿苷的水平对嘧啶类抗代谢药物和抗癌治疗的成功也至关重要; 许多临床前和临床研究表明, 外源性尿苷或 UPase 抑制剂 (如苄酰氯尿苷) 对内源性尿苷的保护, 可以挽救因氟嘧啶掺入而引起的 RNA 损伤, 从而提高治疗效果 (Groeningen *et al.*, 1989; Darnowski *et al.*, 1991; Pizzorno *et al.*, 1992)。

血浆和组织中尿苷的浓度受细胞转运机制和尿苷磷酸化酶 (Uridine phosphorylase, UPase) 活性的调节, 尿苷磷酸化酶 (UPase) 是嘧啶补救途径中的关键酶, 催化尿苷或 2'-脱氧尿苷可逆磷酸解为尿嘧啶和核糖 1-磷酸或 2'-脱氧核糖-1-磷酸。它普遍存在于原核生物、酵母、中等和高等生物中 (Safonova *et al.*, 2016)。该酶属于核苷磷酸化酶 I 超家族, 其成员对核苷底物显示出不同的特异性 (Tran *et al.*, 2011), 是迄今为止在尿苷稳态调节中鉴定到的最重要的磷酸化酶 (Cao *et al.*, 2005)。目前, 在脊椎动物中鉴定得到两种 UPase, UPase-1 在人类中首先被鉴定和识别, UPase-2 与 UPase-1 具有约 62% 的同源性, UPase-2 在人体中只在肾脏中表达, 在小鼠中主要在肝脏中表达, 在其他组织中不表

达或者低表达 (Koning *et al.*, 2003)。目前, 对 UPase-1 的研究较多。UPase 基因缺陷型小鼠尿苷和嘧啶核苷酸代谢发生显著的变化 (Cao *et al.*, 2005)。敲除 UPase 的小鼠会发生尿苷的积累和尿嘧啶的 DNA 损伤, 进而引起肿瘤的形成 (Cao *et al.*, 2016)。UPase 基因过表达的小鼠会导致血浆和组织尿苷浓度明显降低进而出现肝泡性脂肪变性 (Le *et al.*, 2013)。UPase-1 小鼠与野生型小鼠相比具有更浅和更短的睡眠, 增加了小鼠对 5-FU 的耐受性, 并降低了小鼠对戊巴比妥的敏感性 (Cao *et al.*, 2005)。Chaudhary 等 (2006) 鉴定出刚地弓形虫 UPase 的基因序列, 其基因全长 921 bp。Krungkrai 等 (2003) 发现疟原虫中存在嘧啶补救途径。Larson 等 (2010) 发现布氏锥虫 *Trypanosoma brucei* 有尿苷磷酸化酶。

目前, 对昆虫的尿苷磷酸化酶的结构、表达调控及功能等方面研究甚少。本文通过对家蚕尿苷磷酸化酶 1 基因 (*BmUPase1*) 的克隆、原核表达及生物信息学分析, 初步掌握尿苷磷酸化酶 (*UPase1*) 在家蚕不同组织、不同龄期的表达模式, 为进一步明确家蚕尿苷磷酸化酶的功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

供试虫源家蚕由西南大学生物技术学院提供。蚕种收蚁后, 1-5 龄幼虫置于人工气候箱中正常饲养。饲养条件设置为 25 °C 恒温、相对湿度 75%±5%、光周期 12 L : 12 D。每天饲喂 3 次新鲜桑叶。分别取不同龄期整蚕和 5 龄 3 d 家蚕各组织, 置于 -80 °C 的冰箱中保存。

1.2 试剂

RNA 提取试剂盒 RNAiso Plus 试剂盒 (TaKaRa)、PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa)、pMD19-T Vector Cloning Kit (TaKaRa)、DL2000 DNA Maker、T4 DNA Ligase、限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I 均购自大

连宝生物工程有限公司; 2×Taq Master Mix、NovoStart[®] SYBR qPCR SuperMix Plus 为近岸蛋白科技有限公司、E.Z.N.A.[®] Poly-Gel DNA Extraction Kit 试剂盒购自 OMEGA 公司、感受态细胞 DH5 α 、BL21 (DE3) 购自唯地生物工程有限公司; 原核表达载体 pET-28a 为本实验室保存; 其他试剂为国产分析纯试剂。

1.3 RNA 的提取及 cDNA 的合成

按照 RNAiso Plus 试剂盒 (TaKaRa) 说明书对家蚕各组织进行总 RNA 的提取, 并对 RNA 进行浓度和纯度的测定, 根据 PrimeScript[™] II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) 试剂盒说明书反转录合成 cDNA 第一链, 并利用家蚕内参基因 *BmActin3* 检测 cDNA 的质量, -20 °C 的冰箱中保存备用。家蚕的全组织 cDNA 模板用于目的基因的克隆, 不同组织、不同时期的 cDNA 用于 qPCR。

1.4 家蚕 *BmUPase1* 基因的克隆

通过 SlikDB 和 NCBI 数据库得到家蚕同源基因 *BmUPase1* 及其编码的氨基酸序列。使用 Primer Primer5.0 软件设计 *BmUPase1* 基因的引物 (表 1)。25 μ L PCR 反应体系: cDNA 模板 1 μ L, 上、下游引物各 1 μ L, 2×Taq Master Mix 12.5 μ L, RNase Free ddH₂O 9.5 μ L。反应条件: 95 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 35 s, 49 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 共进行 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。

用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 经染色后观察并保存实验数据。将目的片段进行切胶, 并根据 E.Z.N.A.[®] Poly-Gel DNA Extraction Kit 试剂盒进行 DNA 胶回收, 将回收产物连接到 pMD19T 载体上, 转化至 DH5 α 感受态细胞中, 经蓝白斑筛选鉴定, 挑取单一白色菌落至含 Amp (1 : 1 000) 的 LB 液体培养基中扩大培养。经菌液 PCR 鉴定, 取阳性克隆产物 100-200 μ L 送生工进行测序。将测序结果与数据库中鉴定出的 *BmUPase1* 基因片段序列通过 DNAMAN 软件进行比对。

1.5 家蚕 *BmUPase1* 基因序列分析及系统发育树的构建

利用 ORF Finder 对基因编码的开放阅读框进行预测。利用 DNAMAN 对 *BmUPase1* 编码的氨基酸进行分析和氨基酸的多序列比对。利用 ProtParam (<http://web.Expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>) 对蛋白的理化性质进行预测分析。利用 ProtScale (<http://web.Expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl>) 进行蛋白的亲疏水性分析。利用 SignalP4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 进行信号肽的分析。利用 TMHMM-2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 进行跨膜结构域的分析。利用 SMART 软件 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 进行蛋白功能结构域的分析。利用 MEGA5.0 和 Clustal.X 软件进行系统进化树的构建。

表 1 本实验所用引物
Table 1 Primers used in this study

基因名称 Gene name	引物序列 Primers sequences (5'-3')	引物用途 Use of primers
<i>BmUPase1</i>	F: CGCGGATCCATGTCATTCGATAACGACGAG R: CCGCTCGAGTTAATCATATGTCTCAGATTCCTG	基因克隆 Gene cloning
<i>BmActin3</i>	F: AACACCCCGTCCTGCTCACTG R: GGGCGAGACGTGTGATTCCT	
<i>BmUPase1</i>	F: CACTGTCCGATTGCGTAACCCTA R: GCAACTTGTGCCCTATCTCCGCCAT	荧光定量 Real-time quantitative PCR
<i>sw22934</i>	F: TTCGTACTGGCTCTTCTCGT R: CAAAGTTGATAGCAATTCCCT	

1.6 家蚕 *BmUPase1* 基因的原核表达

1.6.1 *BmUPase1* 基因的 PCR 扩增 根据家蚕 *BmUPase1* 的 ORF 序列设计 1 对特异性引物 *BmUPase1*-F 和 *BmUPase1*-R (表 1), 上游引物中有 *Bam* HI 酶切位点, 下游引物中有 *Xho* I 酶切位点, 并利用该引物进行 PCR 扩增。扩增产物进行凝胶电泳检测、回收纯化, 与 pMDTM-19T 载体链接, 转入大肠杆菌 DH5 α , 蓝白斑筛选, 菌落 PCR 鉴定正确后, 送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序。

1.6.2 *BmUPase1* 基因原核表达载体的构建 取测序成功的 pMD19-*BmUPase1* 菌液过夜培养, 提取质粒。根据设计的相应酶切位点对 T 载体质粒进行双酶切, 胶回收纯化后, 与经同样酶切的表达质粒载体 pET28a 用 T4 连接酶 16 °C 过夜连接, 构建表达质粒 pET28a-*BmUPase1*, 转化大肠杆菌克隆菌株 DH5 α 。菌落 PCR 鉴定正确后, 用质粒提取试剂盒提取质粒, 并转入表达菌株 BL21 (DE3) 大肠杆菌感受态细胞中, 用于原核表达。

1.6.3 *BmUPase1* 基因的原核表达 将上述中培养的 BL21 (DE3) 菌株进行菌落 PCR 鉴定正确后, 用质粒提取试剂盒提取质粒, 挑取酶切正确的重组质粒菌液和空载菌液以 1% 的比例分别接种于盛 5 mL LB 培养基的 10 mL 无菌离心管中并做好标记, 37 °C, 220 r/min 扩大培养; 待菌液 OD₆₀₀ 约为 0.6 时, 分别加入终浓度为 0.4 mmol·L⁻¹ 的 IPTG, 37 °C, 220 r/min 诱导表达 2、4、6 和 8 h, 8 000 g 常温离心 15 min, 弃培养基, 加入 1 mL PBS 重悬菌液, 进行 SDS-PAGE 电泳检测。

1.7 qPCR 检测

以家蚕各组织、各个龄期的 cDNA (反转录产物稀释 4 倍) 为模板, 以家蚕 sw22934 基因为内参基因 (表 1), 使用 2×NovoStart[®] SYBR qPCR SuperMix 试剂盒进行荧光定量 PCR。反应体系为 20 μ L: 2×NovoStart[®] SYBR qPCR SuperMix (2×) 10 μ L, ROX Reference Dye I (2×) 0.4 μ L, 上、下游引物各 0.5 μ L, cDNA 模板 1 μ L, RNase

Free Water 7.6 μ L。反应程序: 95 °C 预变性 1 min, 95 °C 变性 20 s, 60 °C 退火 1min, 反应 40 个循环, 所有样品重复 3 次。每个样品进行 3 个复孔。

1.8 数据分析

qPCR 结果采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法进行数据处理。所得结果均以平均数 $\pm$ 标准误差 (Mean $\pm$ SE) 表示, 并利用 Graph Pad Prism 6 进行作图。

2 结果与分析

2.1 家蚕 *BmUPase1* 基因克隆及序列分析

以“大造”品种 5 龄 3 d 的 cDNA 为模板, 对 *BmUPase1* 基因进行 PCR 扩增, 获得 *BmUPase1* 的特异性 CDS 序列 (图 1)。利用 ORF Finder 对所获得的序列进行分析, 结果显示, *BmUPase1* 基因的完整的 ORF 框序列全长 1 188 bp, 编码 395 个氨基酸 (图 2)。

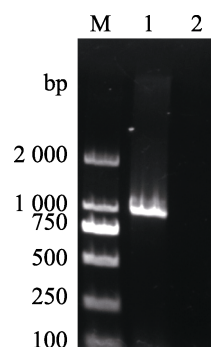


图 1 *BmUPase1* 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of *BmUPase1* gene

M: DNA 标准分子量; 1: *BmUPase1* 基因扩增产物;
2: 阴性对照。

M: DL2000 DNA marker; 1: PCR amplification of *BmUPase1* gene; 2: Negative control.

生物信息学分析结果显示 *BmUPase1* 蛋白的分子式为 C₁₉₄₅H₃₀₇₄N₅₃₈O₅₉₁S₂₁, 分子量大小为 44.12 ku, 理论等电点为 5.74。该蛋白由 22 种氨基酸组成, 其中含量最多的是缬氨酸 (Val), 含量最少的为色氨酸 (Trp)。不稳定系数为 36.24, 为稳定蛋白。脂溶脂数为 85.57, 总平均亲水指数为 -0.275, 故判断该蛋白为亲水性蛋白。无信号肽, 为非分泌蛋白, 且不具有跨膜区。

```

1  ATGTCATTGATAACGACGAGCTACGTGACGATTATTTAGTTGCTGTTATTACAAAAATGAACGCCACACCAACGGTATTATGCTGTT
91  M S F D N D E L R D D V L V A V I T K M N G H T N G I N A V
   CAATCACAGCCACTTGTTCACGTAATCTCAGAGGACATTGATAACGACGAGCAATTCAGGAAACCGATGGAACTCTGTAGGA
181  Q S Q A T C S R N P H R R T F D N D D E F Q E T D G I P V G
   GCCGACGACATTCGGTTAGATACCCAGATGGCACTGTCCGATTGCGTAACCTAACATTGAACATCATGGACCAAGATATTTCTACCAT
271  A D D N S V R Y P D G T V R L R N P N I E L M D Q D I L Y H
   TTGGCCCTTGGGAGCGGCTCCCATGATCTTGTGAGATGTTTGGAGACGTCAAGTTTGTGTCATGGGCGGAAACCCGAAACGATGGAA
361  L A L G S G S H D L V E M F G D V K F V C M G G T P K R M E
   CAATTCGCATACACAATCATGGCGGAGTAGGGCACAAGTTGCCCTTGTGGAACACACTGCAAGACATCAGTCATTTTCTTACAGATAC
451  Q F A Y T I M A E I G H K L P C G T T L Q D I S H F S Y R Y
   TCCATGTATAAGTTGCCCGGTAATTTCTATAAGTCACGGTATGGGCATACCTTCTGTCGGAATCTCTGTCAGGAAGTCATAAAGTTG
541  S M Y K V G P V L S I S H G M G I P S V G I L I H E V I K L
   ATGTACCACGCAAGTCCGTGATCTGTGTTCTCAGAAATCGGAACATGTGGTGGTATAGGCTACGAGGCGGTACGGTGTATTATTC
631  M Y H A K V R D P V F F R I G T C G G I G Y E G G T V V I S
   GATGAAGCGTCGATGGAGCCCTGAGGAATGTTCTAGAATGACAGTTTATGAGAAAATAGTTACGCTCCAGCGAAACTGGATCGCGGA
721  D E A V D G A L R N V L E L T V L G K I V Q R P A K L D R R
   TTAGTTAGGAGCTGAAAGCACTGGCGGATCCCGAAGACCCCTACGACACCGTGACCGGCAAAACAATGTGACGTCAGATTTCTATGAA
811  L V R E L K A L A D P E D P Y D T V T G K T M C T Y D F Y E
   GGACAAGGTGCTTTAGATGGTGCCCTTTTGTGATTTCACCGAACTGATAAGATGGAGTACTAGAGAGCATCCACAAAGCGCGGTGTT
901  G Q G R L D G A F C D F T E T D K M E Y L E S I H K A G V V
   AACATTGAGATGGAGTCCCTCTCTTTCGCGCCCTCACTATCACCGGCGCATTAAAGCAGCTGTGCTCTGCTTACTGTTTATGACAGA
991  N I E M E S L S F A A L T H H A G I K A A V V C V T V L D R
   TTGAAGGGTGATCAGGTTTATGCTCCTAAAGAAGTTTGGATGAGTGGCAACGCGTCCACGAAGCTTGTGTCGGTTACATTAAGAG
1081  L K G D Q V L A P K E V L D E W Q Q R P T K L V C R Y I K R
   TATCTTCAGGTGAAGGAAAAATCTCTTTAGATGGTCACGGTTCATTCGCGTGAAGAGTCCCGTCGATTAAGCTTGTGACGACGAGAA
1171  Y L Q V K G K I S L D G H G S I A V K S P R R F K L V Q Q E
      TCTGAGACATATGATTAA
      S E T Y D *

```

图2 *BmUPase1* 基因编码区核苷酸序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 2 Coding region nucleotide sequence and amino acid sequence of *BmUPase1*

黑色方框为起始密码子，黑色方框和星号为终止密码子。

The blank box is the initiation codon, and the asterisk indicates the termination codon.

BmUPase1 蛋白在第 108-359 位的氨基酸片段为 PNP-UDP-1 功能结构域，具有核苷磷酸化酶 I 家族典型结构特点。

2.2 家蚕 *BmUPase1* 蛋白的序列比对和系统进化分析

将克隆得到的家蚕蛋白序列与其他昆虫的蛋白序列进行序列比对。结果显示，家蚕 *BmUPase1* 蛋白序列与其他昆虫的氨基酸序列达到了很高的一致性，与夏威夷红蝶的相似性为 85.06%，与斜纹夜蛾和棉铃虫的相似性为 81.11%，与菜粉蝶的相似性为 79.75%，与小菜蛾的相似性为 78.54%。不同昆虫之间的蛋白质序列相似性不同，可能与尿苷磷酸化酶的功能有关（图 3）。利用 Mega 5.0 和 Clustal X2 对不同物种的 UPase 蛋白构建系统进化树，结果显示，选用的 10 个物种形成两个大的分支，家蚕与斜纹夜蛾、棉铃虫、小菜蛾、夏威夷红蛱蝶等亲缘关系最近（图 4）。

2.3 家蚕尿苷磷酸化酶基因 *BmUPase1* 的原核表达

将 *BmUPase1* 基因经酶切、连接形成重组质粒 pET28a-*BmUPase1*，将构建成功的 pET28a-

BmUPase1 转化到表达菌株 *E.coli* BL21 的感受态细胞中，37 °C、终浓度为 0.4 mmol·L⁻¹ 的 IPTG 诱导表达 2、4、6 和 8 h，SDS-PAGE 电泳检测结果如图 5 所示。结果表明 pET28a-*BmUPase1* 重组载体在 BL21 中表达了特异性条带，且在诱导 8 h 后表达量最高，分子量约为 44 ku，与预测的 44.12 ku 大小一致，而未诱导及诱导的空载体均未出现此条带，表明 *BmUPase1* 蛋白在大肠杆菌内成功表达。

2.4 家蚕 *BmUPase1* 基因不同组织表达特征分析

利用 qPCR 检测 *BmUPase1* 基因在家蚕 5 龄 3 d 幼虫各组织中的表达量如图 6。结果显示尿苷磷酸化酶在各个组织中都有表达，且在卵巢中表达量最高，在精巢中表达量次之，可能与家蚕的生殖发育相关性较大，在马氏管、中肠、头部中也有较高量的表达，但在其他组织中表达量相对较低（图 6）。说明尿苷磷酸化酶对于家蚕的生长发育可能具有重要的作用。

2.5 家蚕 *BmUPase1* 基因不同发育时期表达特征分析

利用 qPCR 检测 *BmUPase1* 基因在家蚕发育

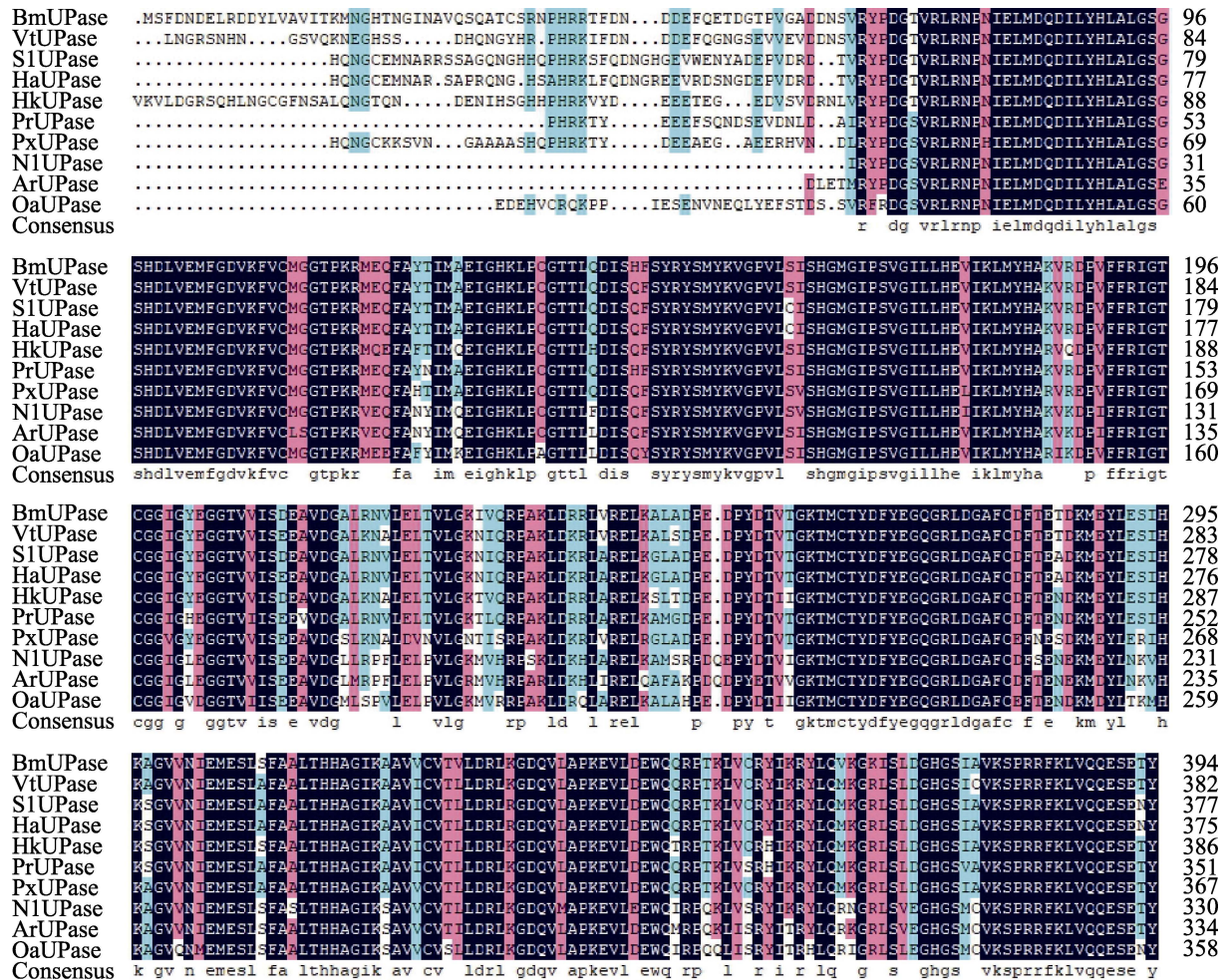


图 3 昆虫 UPase 蛋白多序列比对结果

Fig. 3 Multiple sequences alignment results of UPase proteins in insects

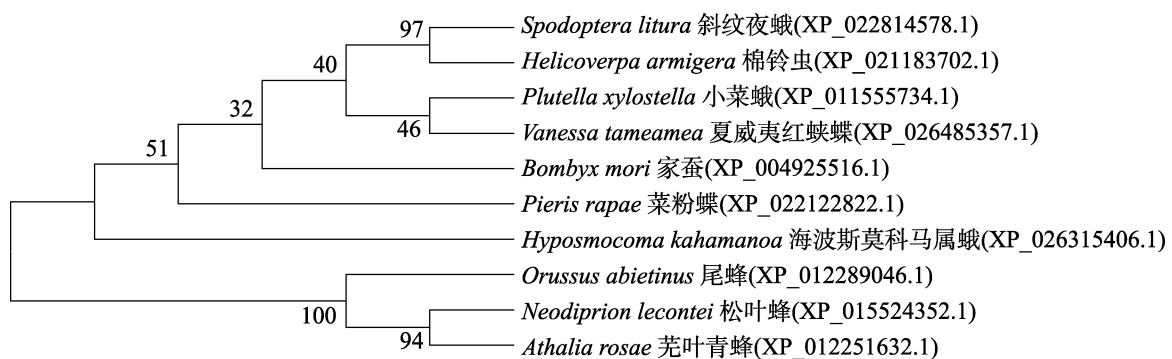


图 4 UPase 氨基酸序列系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of amino acid sequences of UPase

的各个时期的表达量, 结果显示 *BmUPase1* 在 4 龄 1 d 到 5 龄 7 d, 表达量都较低, 在缩短期表达量明显增高, 之后一直维持比较高的表达量 (图 7)。

3 讨论

尿苷是合成 RNA 和生物膜所必需的嘧啶核苷, 是调节正常生理过程和病理状态的关键因素

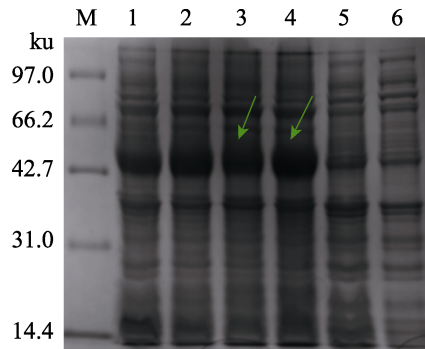


图 5 BmUPase1 重组蛋白原核表达

Fig. 5 Prokaryotic expression of BmUPase1 recombinant protein

M: 蛋白 marker; 1: pET28a-BmUPase1 诱导 2 h;
2: pET28a-BmUPase1 诱导 4 h; 3: pET28a-BmUPase1
诱导 6 h; 4: pET28a-BmUPase1 诱导 8 h;
5: pET28a-BmUPase1 未诱导 6 h; 6: pET28a 诱导。

M: Protein marker; 1: pET28a-BmUPase1 induced by
IPTG under 37 °C 2 h; 2: pET28a-BmUPase1 induced by
IPTG under 37 °C 4 h; 3: pET28a-BmUPase1 induced by
IPTG under 37 °C 6 h; 4: pET28a-BmUPase1 induced by
IPTG under 37 °C 8 h; 5: pET28a-BmUPase1 without
induction; 6: pET28a induced.

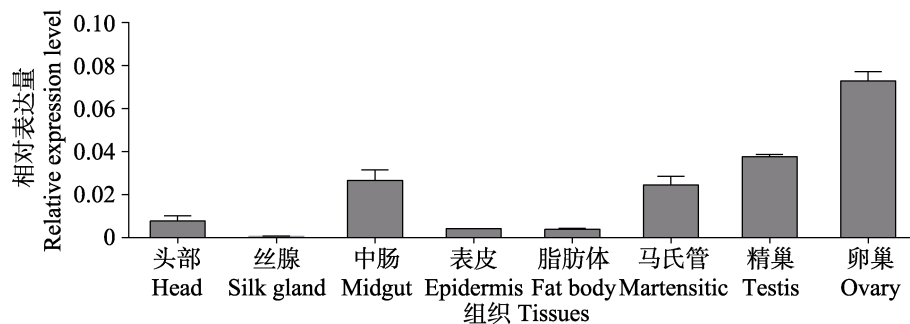


图 6 qPCR 检测家蚕不同组织中 BmUPase1 的表达

Fig. 6 Expression levels of BmUPase1 in different tissues of Bombyx mori by qPCR

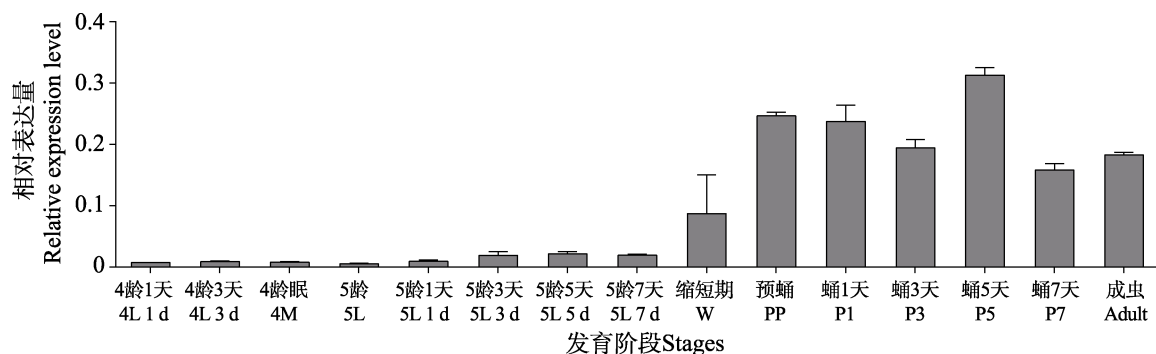


图 7 qPCR 检测家蚕不同时期 BmUPase1 的表达

Fig. 7 Expression levels of BmUPase1 in different stages of Bombyx mori by qPCR

4L: Fourth-instar larvae; 5L: Fifth-instar larvae; D: Day; 4M: Fourth-instar pre-molting; W: Wandering stage;

P: Pupal stage; P1: Day-1 pupa; P3: Day-3 pupa; P5: Day-5 pupa; P7: Day-7 pupa.

之一。而尿苷磷酸化酶 (UPase) 对于尿苷的稳定起着重要的作用。本研究首次克隆得到鳞翅目昆虫模式生物家蚕的 *BmUPase1* 基因的 ORF 框序列 (图 1)。经生物信息学分析可知家蚕 *BmUPase1* 蛋白具有 PNP-UDP-1 功能结构域, 符合 UPase 超家族的典型特征。家蚕 *BmUPase1* 蛋白序列与其他昆虫的氨基酸序列达到了很高的一致性, 与夏威夷红蝶的相似性为 85.06% (图 3), 意味着两者具有相似的功能。Liu 等 (1999) 克隆了人的 UPase, 并从人体正常组织和肿瘤组织中纯化了 UPase。Johansson (2003) 克隆了尿苷磷酸化酶-2 (UPase-2)。迄今为止, 已经鉴定了 2 种 UPase, 即尿苷磷酸化酶 (UPase) 和新型同种尿苷磷酸化酶-2 (UPase-2) (Cao *et al.*, 2016)。小鼠的 UPase 也得到了克隆和鉴定, 并通过用炎性细胞因子、肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素 1 α 和干扰素处理细胞, 进一步增强这些细胞系中尿苷磷酸化酶 mRNA 的表达 (Watanabe *et al.*, 1995)。在寄生虫、细菌和真

菌中, *UPase* 也得到了克隆与鉴定 (Kouni *et al.*, 1988; Walton *et al.*, 1989; Drabikowska, 1996; Koning *et al.*, 2003; Krungkrai *et al.*, 2003; Violot *et al.*, 2003; Chaudhary *et al.*, 2006; Tran *et al.*, 2011)。本研究不仅克隆得到了家蚕 *BmUPase1* 的序列, 而且成功构建了原核表达载体 pET28a-*BmUPase1*, 并转到感受态细胞 BL21 (DE3) 表达菌株中, 对表达产物的 SDS-PAGE 电泳结果显示的条带和预测的蛋白分子量大小一致, 大约为 44 ku (图 5), 表明 pET28a-*BmUPase1* 可以在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中稳定表达, 这为后期 *BmUPase1* 特异性抗体的制备以及其功能研究奠定了基础。

研究表明, 在哺乳动物中, 尿苷磷酸化酶在各组织中都有表达, 是参与调节血浆和组织尿苷稳态的主要酶 (Cao *et al.*, 2016)。本研究的结果表明 *BmUPase1* 在家蚕的各个组织都有表达 (图 6), 验证了 *UPase* 的重要作用, 暗示着 *UPase* 在家蚕生长发育中发挥重要的作用。时期表达谱结果显示, 在家蚕变态发育期间, *BmUPase1* 一直有较高量的表达 (图 7), 推测 *BmUPase1* 与家蚕的化蛹及化蛾的发育进程有关。

本研究克隆获得家蚕尿苷磷酸化酶的 CDS 序列, 分析了家蚕 *BmUPase1* 与其他昆虫 *UPase* 的亲缘关系, 利用原核表达系统对其编码的蛋白进行表达, 为后续蛋白水平的研究提供基础。并利用荧光定量 PCR 分析其在家蚕生长发育中的变化, 为进一步明确家蚕尿苷磷酸化酶在家蚕生长发育中的作用提供条件。

参考文献 (References)

- Bercroft DMO, Phillips LI, Simmonds A, 1969. Hereditary Orotic Aciduria: Long-term therapy with uridine and a trial of uracil. *Journal of Pediatrics*, 75(5): 885–891.
- Cao D, Leffert JJ, McCabe J, Kim B, Pizzorno G, 2005. Abnormalities in uridine homeostatic regulation and pyrimidine nucleotide metabolism as a consequence of the deletion of the uridine phosphorylase gene. *Journal of Biological Chemistry*, 280(22): 21169–21175.
- Cao Z, Ma J, Chen X, Zhou B, Cai C, Huang D, Zhang X, Cao D, 2016. Uridine homeostatic disorder leads to DNA damage and tumorigenesis. *Cancer Letters*, 372(2): 219–225.
- Cardini CE, Caputto R, Paladini AC, Leloir LF, 1950. Uridine diphosphate glucose: The coenzyme of the galactose–glucose phosphate isomerization. *Nature*, 165(4188): 191–192.
- Cardini CE, Leloir LF, Chiriboga J, 1955. Biosynthesis of sucrose. *Journal of Biological Chemistry*, 214(1): 149–155.
- Chaudhary K, Ting LM, Kim K, Roos DS, 2006. *Toxoplasma gondii* purine nucleoside phosphorylase: Biochemical characterization, inhibitor profiles, and comparison with the *Plasmodium falciparum* Ortholog. *Journal of Biological Chemistry*, 281(35): 25652–25658.
- Choi JW, Shin CY, Choi MS, Yoon SY, Ryu JH, Lee JC, Kouni MH, Ko KH, 2008. Uridine protects cortical neurons from glucose deprivation-induced death: Possible role of uridine phosphorylase. *Journal of Neurotrauma*, 25(6): 695–707.
- Connolly GP, Duley JA, 1999. Uridine and its nucleotides: Biological actions, therapeutic potentials. *Trends in Pharmacological Sciences*, 20(5): 218–225.
- Connolly GP, Harrison PJ, Stone TW, 1993. Action of purine and pyrimidine nucleotides on the rat superior cervical ganglion. *British Journal of Pharmacology*, 110(4): 1297–1304.
- Dagani F, Marzatico F, Curti D, Taglietti M, Benzi G, 1984. Influence of intermittent hypoxia and pyrimidinic nucleosides on cerebral enzymatic activities related to energy transduction. *Neurochemical Research*, 9(8): 1085–1099.
- Darnowski JW, Handschumacher RE, Wiegand RA, Goulette FA, Calabresi P, 1991. Tissue-specific expansion of uridine pools in mice: Effects of benzylacetyluridine, dipyrindamole and exogenous uridine. *Biochemical Pharmacology*, 41(12): 2031–2036.
- Drabikowska AK, 1996. Uridine phosphorylase from *hymenolepis diminuta* (cestoda): Kinetics and inhibition by pyrimidine nucleoside analogs. *Acta Biochimica Polonica*, 43(4): 733–741.
- Groeningen CJV, Peters GJ, Leyva A, Laurensse E, Pinedo HM, 1989. Reversal of 5-fluorouracil-induced myelosuppression by prolonged administration of high-dose uridine. *Journal of the National Cancer Institute*, 81(2): 157–162.
- Johansson M, 2003. Identification of a novel human uridine phosphorylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 307(1): 41–46.
- Koning HPD, Al-Salabi MI, Cohen AM, Coombs GH, Wastling JM, 2003. Identification and characterisation of high affinity nucleoside and nucleobase transporters in *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, 33(8): 821–831.
- Kouni MHE, Naguib FN, Niedzwicki JG, Iltzsch MH, Cha S, 1988.

- Uridine phosphorylase from schistosoma mansoni. *Journal of Biological Chemistry*, 263(13): 6081–6086.
- Krungkrai J, Prapunwatana P, Wichitkul C, Reungprapavut S, Krungkrai SR, Horii T, 2003. Molecular biology and biochemistry of malarial parasite pyrimidine biosynthetic pathway. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health*, 34(2): 32–43.
- Larson ET, Mudeppa DG, Gillespie JR, Mueller N, Napuli AJ, Arif JA, Ross J, Arakaki TL, Lauricella A, Titta GD, Luft J, Zucker F, Verlinde CLMJ, Fan E, Van Voorhis WC, Buckner FS, Rathod PK, Hol WGJ, Merritt EA, 2010. The crystal structure and activity of a putative trypanosomal nucleoside phosphorylase reveal it to be a homodimeric uridine phosphorylase. *Journal of Molecular Biology*, 396(5): 1244–1259.
- Le TT, Ziemba A, Urasaki Y, Hayes E, Brotman S, Pizzorno G, 2013. Disruption of uridine homeostasis links liver pyrimidine metabolism to lipid accumulation. *Journal of Lipid Research*, 54(4): 1044–1057.
- Liu M, Cao D, Russell R, Handschumacher RE, Pizzorno G, 1999. Expression, characterization, and detection of human uridine phosphorylase and identification of variant uridine phosphorolytic activity in selected human tumors. *Cancer Research*, 58(23): 5418–5424.
- Page T, Yu A, Fontanesi J, Nyhan WL, 1997. Developmental disorder associated with increased cellular nucleotidase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(21): 11601–11606.
- Persson BE, Sjöman M, Niklasson F, Ronquist G, 1991. Uridine xanthine and urate concentrations in prostatic fluid and seminal plasma of patients with prostatitis. *European Urology*, 19(3): 253–256.
- Peters GJ, Groenigen CJV, Laurensse EJ, Lankelma J, Pinedo HM, 1987. Uridine-induced hypothermia in mice and rats in relation to plasma and tissue levels of uridine and its metabolites. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 20(2): 101–108.
- Pizzorno G, Cao D, Leffert JJ, Russell RL, Zhang D, Handschumacher RE, 2002. Homeostatic control of uridine and the role of uridine phosphorylase: A biological and clinical update. *Biochim Biophys Acta*, 1587(2/3): 133–144.
- Pizzorno G, Wiegand RA, Lentz SK, Handschumacher RE, 1992. Brequinar potentiates 5-fluorouracil antitumor activity in a murine model colon 38 tumor by tissue-specific modulation of uridine nucleotide pools. *Cancer Research*, 52(7): 1660–1665.
- Safonova TN, Mordkovich NN, Veiko VP, Okorokova NA, Manuvera VA, Dorovatovskii PV, Popov VO, Polyakov KM, 2016. Concerted action of two subunits of the functional dimer of shewanella oneidensis MR-1 uridine phosphorylase derived from a comparison of the C212S mutant and the wild-type enzyme. *Acta Crystallographica Section D*, 72(2): 203–210.
- Tran TH, Christoffersen S, Allan PW, Parker WB, PisKur J, Serra I, Terreni M, Ealick SE, 2011. The crystal structure of *Streptococcus pyogenes* uridine phosphorylase reveals a distinct subfamily of nucleoside phosphorylases. *Biochemistry*, 50(30): 6549–6558.
- Violot S, Haser R, Sonan G, Georlette D, Feller G, Aghajari N, 2003. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of a psychrophilic cellulase from *pseudoalteromonas haloplanktis*. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography*, 59(7): 1256–1258.
- Walton L, Richards CA, Elwell LP, 1989. Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* uridine phosphorylase (udp) gene. *Nucleic Acids Research*, 17(16): 6741–6741.
- Watanabe SI, Hino A, Wada K, Eliason JF, Uchida T, 1995. Purification, cloning, and expression of murine uridine phosphorylase. *Journal of Biological Chemistry*, 270(20): 12191–12196.
- Wice BM, Kennell D, 1982. Ribose-1-P is the essential precursor for nucleic acid synthesis in animal cells growing on uridine in the absence of sugar. *Journal of Biological Chemistry*, 257(5): 2578–2583.