激素和限食处理对家蚕 SPs 与 Serpins 基因表达的影响*

甘丽萍[1**] 刘仁华[1] 龙菲菲[2] 张 进[2] 徐世清[2]

（1. 重庆三峡学院 生命科学学院，万州 404000；2. 苏州大学 现代丝绸国家工程实验室，苏州 215123）

摘 要 **【目的】** 为了调查激素和限食处理对家蚕幼虫丝氨酸蛋白酶（SPs）与丝氨酸蛋白酶抑制剂（Serpins）基因表达的影响。**【方法】** 使用 RT-PCR、实时定量 PCR 以及 Western-blot 的方法研究了部分 SPs、Serpins 基因在 mRNA 和蛋白质水平上的表达情况，以及 20-羟基蜕皮酮（20-hydroxyecdysone，20E）、保幼激素类似物（JHA）和限食处理后 SPs 与 Serpins 家族基因的变化。**【结果】** 调查的基因在 mRNA 和蛋白质水平上的表达情况一致，SPs 基因在中肠中特异表达，5 龄中期达到顶峰，而 Serpins 基因主要在丝腺中表达，5 龄中后期的表达较高；20E 处理 5 龄 3 日家蚕幼虫，SPs 和 Serpins 基因呈现不同的调控趋势，JHA 对这两类基因的表达具有类似的正调控作用，激素对基因的调控主要与发育时期及激素剂量有关；*Spi1* 基因在幼虫饥饿处理后出现下调比 *Spp* 晚，暗示 Serpins 受取食的直接影响比 SPs 慢，也说明了食物供需对丝腺的反应迟于对中肠的影响。SPs 和 Serpins 基因的这种组织表达特异性，为它们参与相应组织中的特异性转录调控提供了佐证，而发育时期表达差异和激素及限食处理后调控变化体现了基因执行功能上的时序性和特殊性。**【结论】** 家蚕丝物质合成效率与 SPs 及 Serpins 基因在 mRNA 和蛋白水平上的表达有关，这将有助于更好地理解家蚕丝物质形成和积累的调控机理。

关键词 家蚕，丝氨酸蛋白酶，丝氨酸蛋白酶抑制剂，激素和限食处理，基因表达

The expression of serine proteinases (SPs) and serine protease inhibitor (Serpins) genes in silkworms, *Bombyx mori*, treated with hormones and subject to food restriction

GAN Li-Ping[1**] LIU Ren-Hua[1] LONG Fei-Fei[2] ZHANG Jin[2] XU Shi-Qing[2]

(1. College of Life Science and Engineering, Chongqing Three Gorges University, Chongqing 404000, China;
2. National Engineering Laboratory for Modern Silk, Soochow University, Suzhou 215123, China)

Abstract **[Objectives]** To investigate the effects of hormone treatment and food restriction on the gene expression of serine proteases (SPs) and serine protease inhibitors (Serpins) in *Bombyx mori*. **[Methods]** mRNA expression and protein levels of SPs and Serpin genes were tested by RT-PCR，Real time PCR and western blot，in silkworms treated with 20-hydroxyecdysone (20E), juvenile (JHA) hormones and food restriction. **[Results]** mRNA expression was consistent with protein levels. SPs were especially expressed in the midgut of mid-fifth instar, however Serpins were mainly expressed in the silk glands, achieving a higher level in the late fifth instar. SPs and Serpin genes displayed different regulatory trends in the fifth and third instar silkworm larvae treated with 20E and JHA. Hormone regulatory effect was mainly influenced by developmental stages and dosage. The expression of the *Spi1* gene was down regulated after food restriction, in addition this process occurred later than for the *Spp* gene, which implies that food restriction directly affects Serpins. It also illustrates that the silk glands respond faster to food supply than the midgut. The tissue specificity of SPs and Serpins demonstrates that they participate in

* 资助项目：重庆市教委科学技术研究项目（KJ131113）；重庆市科委项目（cstc2013jcyjA1202）；重庆三峡学院项目（12ZD11）

**通讯作者，E-mail: ganmei790717@163.com

收稿日期：2014-02-26，接受日期：2014-06-05

tissue-specific transcriptional regulation. Both SPs and Serpins were differentially expressed in different developmental stages in response to either hormone treatment or food restriction. **[Conclusion]** These findings on the function and specificity of SP and Serpins further understanding of the mechanism of silk formation and accumulation.

Key words *Bombyx mori*, serine proteinases (SPs), Serine protease inhibitor (Serpins), hormone and food restriction treatment, gene expression

昆虫丝氨酸蛋白酶（Serine proteinases，SPs）及其同系物（Serine proteinase homologs，SPHs）在动物消化、纤维溶解、细胞与体液免疫、生殖、胚胎发育和组织重建方面发挥着重要的功能（Jiang and Kanost，2000；Kim *et al.*，2002；Krem and Dicera，2002；Li *et al.*，2004）。鳞翅目昆虫幼虫的中肠中，SPs 在蛋白水解过程中发挥作用。家蚕有其物种特异性的 SPs，目前在家蚕 *Bombyx mori* 中已经鉴定出了 143 个 SPs 和 SPHs 基因，其中 64 个 SPs/SPHs 基因至少在一个组织中有转录活性，而中肠是表达最高的组织，部分基因只在中肠表达（Zhao *et al.*，2010）。反映了它们独特的食物消化特征以及丰富的合成丝物质氨基酸的能力，同时还证实了部分基因与病原菌侵染后的免疫抗性相关。丝氨酸蛋白酶抑制剂（Serine proteinase inhibitors，Serpins）是种类最多、分布最广泛的蛋白酶抑制剂超家族（Sasaki and Kobayashi，1984；Sasaki，1991）。目前在几乎所有的物种中都发现了 Serpins，并已鉴定出了上千个 Serpins 基因。为了防止蛋白酶对丝蛋白的降解，家蚕丝腺组织特异表达了各种类型的蛋白酶抑制剂，通过对蛋白酶活性的抑制，防止蛋白酶对丝蛋白的降解（Kuriora *et al.*，1999；Engles，2005；Abrams *et al.*，2006）。Nirmala 等（2001）克隆了两个家蚕丝腺特异表达的 Serpins 基因 *Spi1* 和 *Spi2*，并证实其表达存在时空差异。在丝腺特异表达的基因中有一群基因是 Serpins 基因，这些 Serpins 基因是否都有防止丝蛋白非正常降解的作用还不能确定（刘春，2006；王凌燕，2009）。在生物体内，SPs 完成催化反应的使命后，激活的 SPs 需要迅速地被屏蔽功能，从循环中移除。Serpins 中的许多成员通过抑制 SPs 的同功酶来参与 SPs 的活性调控，保持体内环境的平衡（Irving *et al.*，2000）。了解它们之间的互做关系，对了解蚕体内代谢平衡有着重要的价值。

家蚕等鳞翅目昆虫的生长和发育主要由蜕皮激素（Moulting hormone，MH）和保幼激素（Juvenile hormone，JH）协调调控（Bitra and Palli，2009）。MH 与 JH 两者之间的平衡和比例决定了昆虫不同发育阶段的转换，成百上千的基因在这个数级网络中表达。昆虫 JH 类似物（JH analogs，JHA）和 MH 调节家蚕的生长发育和增产蚕丝的作用已为生产实践所证实。MH 和 JH 在家蚕幼虫不同时期以不同的方式相互配合、相互制约地对丝腺细胞和脂肪细胞进行调节控制，从而影响家蚕消化管和丝腺中的丝蛋白质合成。适度的能量限制（Calorie restriction，CR），能够延长实验室的啮齿动物的寿命（Guarente，2005），在家蚕的 CR 影响发育进程的研究，已经证实一些基因会在过量饲喂时上调表达，而在限制饲喂时下调表达（Li *et al.*，2009）。

在我们已构建的黄茧限性品种幼虫雌雄 SAGE 文库中发现（Gan *et al.*，2012），有一些 SPs 和 Serpins 基因在雌雄之间出现显著差异表达。调查在幼虫生长发育过程中这些基因的时序性表达和组织差异性，以及受激素调控和限食的调控反应，将有助于更好地理解家蚕丝物质形成和积累的调控机理。本文根据已经鉴定的 SPs/SPHs 基因家族（Zhao *et al.*，2010），选择中肠特异表达的 10 个 SPs/SPHs 基因，同时在 silkDB 上筛选了丝腺特异表达的 4 个 Serpins 基因，进行了在 mRNA 和蛋白质水平上的表达情况以及激素和限食处理后这些基因在 mRNA 水平上雌雄之间的变化调查，探讨激素处理后个体表型变化、激素浓度、限食时间及基因调控之间

的关系。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　供试品种　家蚕黄茧限性品种 Ysh，全龄 25℃自然光照环境，幼虫桑叶育。由苏州大学生命科学学院遗传与发育生物学实验室保存饲养。

1.1.2　试剂　DNA Marker、引物合成由上海生物工程技术服务有限公司提供，RNA 抽提试剂盒 Trizol plus、双链 cDNA 合成试剂盒、DNA 少量质粒抽提试剂盒、SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time) 等购自大连宝生物公司（TaKaRa，Japan）。X-射线胶片（柯达公司生产）购自碧云天生物技术研究所。多克隆抗体由百奇（苏州）生物有限责任公司制备合成。HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体购自上海优宁维公司， 实验中所用其它试剂均为进口或国产分析纯级。

1.1.3　仪器　PCR 仪（T-gradient）由德国 Biometra 公司生产，荧光定量 PCR（ABI7300）由美国应用生物系统生产，SDS-PAGE 电泳仪、半干转膜由 Bio-rad 公司生产，凝胶成像系统（GIS-2007）购自上海天能科技有限公司。

1.2　方法

1.2.1　SPs 与 Serpins 在 mRNA 和蛋白上的表达量（1）RT-PCR 调查：根据 Ysh 幼虫血色，选择 5 龄第 3 日（5th-instar day-3 larva，5L-3）雌雄蚕各 5 头，分雌雄解剖分离 10 个组织，包括体壁（Epidermis，Ed）、头（Head，H）、前部丝腺（Anterior silkgland，AMG）、中部丝腺（Middle silkgland，MSG）、后部丝腺（Posterior silkgland，PSG）、血淋巴（Hemocyte，He）、中肠（Midgut，Mg）、马氏管（Malpighian tubμle，MT）、生殖腺（Gonad，Gn）和脂肪体（Fat body，FB），进行基因组织表达谱的调查。同时，从 3 龄眠期（肉眼能根据脚色分辨雌雄个体）到 5 龄第 7 日，分雌雄分离丝腺、中肠进行时期表达谱的调查。按照 TAKARA 公司的 TRIzol 试剂盒说明书提取所有组织总 RNA，以 *actin3* 为内参基因，调查基因 SPs 家族基因 *Spp* 及 *Ctlp* 和 Serpins 家族基因 *Spi1* 和 *Spi2* 在不同组织和时期的表达量（引物见表 1）。按照双链 cDNA 合成试剂盒合成 cDNA，PCR 体系和扩增反应程序参照上海生工 RT-PCR 试剂盒，反应体系为 25 μL，反应程序为：94℃预变性 3 min，94℃ 50 s、55℃ 50 s、

表 1　家蚕部分 SPs 和 Serpins 基因及引物
Table 1　Genes of SPs and Serpins of *Bombyx mori*

基因 Genes	序列号 Accession	基因名 (silkDB) Gene name on silkDB	Unigene 号 Unigene	探针 Probe	引物（正向/反向） Primers (sense/anti-sense)
Serine protease precursor (*Spp*)	NM_001043361.1	BGIBMGA014524-TA	Bmo.601	sw22515	GTCACCACCTCCAATGTCC GAGGCTCACTTGGCGTTT
Chymotrypsin-like serine protease (*Ctlp*)	NM_001046965.1	BGIBMGA010584-TA	Bmo.2476	sw03707	CCGTTCAAGGCGGCAGTGTATC CAAACCGGCGCAGAATTTGTTA
Kazal-type serine proteinase inhibitor 1 (*Spi1*)	NM_001043579.1	BGIBMGA004832-TA	Bmo.143		TTCACTAACGCTAATCCTG TTCAACGCATTTGTCCT
Silk proteinase inhibitor 2 (*Spi2*)	NM_001043582.1	BGIBMGA011481-TA	Bmo.142		GTCACCACCTCCAATGTCC

72℃ 50 s，30 个循环，终延伸 72℃ 10 min。扩增结果用琼脂糖凝胶电泳检测。（2）免疫印迹检测（Western blot）：分离 Ysh 品种 5 龄 3 日的脂肪体（FB）、血淋巴（He）、中部丝腺（MSG）、后部丝腺（MSG）、生殖腺（Gn）、中肠（MG）6 个组织的蛋白样品。取 4 龄 2 日（4L-2），4 眠期（4M），5 龄 3 日（5L-3）和 5 龄 7 日（5L-7）4 个时间点分雌雄的丝腺和中肠检测时期特异性和性别特异性(蛋白序列见表 2)。采用 ECL 发光显色胶片曝光法。一抗为多克隆抗体（表 2）。 二抗为 HRP 标记的羊抗兔 IgG，工作浓度为 1∶1 000。

1.2.2 激素处理与调查方法 家蚕黄茧限性品种 Ysh，全龄 25℃自然光照环境，幼虫桑叶育。20-羟基蜕皮酮（20-hydroxyecdysone，20E），纯度 99.6%。20E 粉末首先以少量无水乙醇配成 20%（w/v）的原液，进一步用 Grace 昆虫培养液稀释至浓度 4 μg/μL。保幼激素类似物 Methoprene 由日本大冢化学株式会社购买，原液浓度 1.25 μg/μL，–20℃遮光保存备用。

（1）MH 处理：在 5 龄第 3 日，选择 Ysh 品种体型大小相近的幼虫，分成 3 组，A 组每条幼虫背面节间膜处注射 5 μL 的灭菌水，B 组每条幼虫注射 5 μg（5μL）的 20E 溶液，C 组每条幼虫注射 10 μg（5μL）的 20E 溶液。每组处理 20 头幼虫，重复 3 次。处理后 6、12、24、48 h 分离中肠和丝腺组织迅速加入液氮中冷冻研磨，提取总 RNA，–70 ℃保存备用。

（2）JHA 处理： 蚕品种和处理时间与 MH 处理相同，处理方法是在每条幼虫的背中线处涂抹 15 μL（1.25 μg/μL） Methoprene 溶液，对照为涂抹 15 μL 的灭菌水，处理后取材方法同（1）。

参考 silkDB 网站，选择中肠特异表达的 SP/SPH 基因 10 个，丝腺特异表达的 Serpin 基因 4 个，用于进行激素处理后的调查（引物见表 3）。前者在中肠组织中检测，后者在丝腺组织中检测。调查方法为 Real Time-PCR。采用 SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time)试剂盒进行测定，反应体系为 20 μL。反应程序为：95 ℃变性 1 min；95 ℃ 5 s、55 ℃ 10 s、72 ℃ 10 s，45 个循环。反应过程由测定仪软件自动设定，每个样品重复 3 次。Real-Time PCR 的结果数据用仪器自带的 Sequence Detection Software Version 1.3.1 软件处理，参照 Schefe 等（2006）的方法进行效率校正。用不同稀释浓度的组织 cDNA 为模板，制作 *Spi1* 基因和 *Spi2* 及内参 *Actin3* 基因的标准曲线。所测数据根据以下公式计算：C(T) = a × lg(copy) + b，a 值根据不同基因和不同 PCR 片段而不同。

1.2.3 限食处理方法 家蚕黄茧限性品种 Ysh，全龄 25℃桑叶育。从 5 龄 3 日开始，分别在 24、48、72 h 调查全程饲喂和全程饥饿处理，以及饥饿 12 h 复喂 12 h、饥饿 24 h 复喂 24 h，饥饿 36 h 复喂 36 h 情况下分雌雄解剖分离丝腺和中肠。提取总 RNA，–70℃保存备用。选择 *Spp* 基因（中肠组织中检测）和 *Spi1* 基因（丝腺组织中检测）调查，检测方法同 1.2.2。

表 2 家蚕 SPP 和 SPI1 的多克隆抗体
Table 2 Polyclonal antibody of SPP and SPI1 of *Bombyx mori*

蛋白名称 Protein	序列号 Accession	多肽序列 Polypeptide sequence	纯度系数 Purity coefficient/ Value (1-5)	分子量 Molecular weight (u)
Serine protease precursor (SPP)	NP_001036826.1	NH2-AEEPIELDYHIKIGC-CONH2	99.7 /4.0	31 977.22
Kazal-type serine proteinase inhibitor 1 (SPI1)	NP_001037044.1	NH2-KGSFPRYAYDSSEDKC-CONH2	97.86 /4.4	29 721.51

表 3　10 个 SPs/SPHs 基因和 4 个 Serpins 基因及其 Real Time-PCR 引物
Table 3　10 SPs/SPHs genes and 4 Serpin genes and primers for Real Time-PCR

家族 Family	名称 Name	NCBI 上的比对结果 Best NCBI BLAST results	引物（正向/反向） Primers (sense/anti-sense)
SPs/SPHs	*Sph4*	gb|ABU98624.1|protease [*Helicoverpa armigera*]	ACATTCCGTAACGCCAGT
			GAGCAAGCCATAGGTAGG
	Sph10	emb|CAL92020.1|chymotrypsinogen-like protein 1 [*Manduca sexta*]	GCTTACGGCAGTGCTTTTA
			CTTCAGCCTTGCGAATCCT
	Sp25	gb|ABR88238.1|chymotrypsin-like protease C8 [*Heliothis virescens*]	GGCTGAAGGTATTCCCGCT
			AGAGGACCCGCACACTGAG
	Sp36	gb|AAX39408.1| serine protease [*Bombyx mandarina*]	TTGCGGTGCCAAGAAGTGT
			AATGGGAAGCGGAGACGAC
	Sp42	gb|ABU98619.1|protease [*Helicoverpa armigera*]	ATCATAAGCCGCATCACG
			GACGAGACCAGCCACGAA
	Sp43	gb|AAC36150.1| chymotrypsinogen-like protein [*Plodia interpunctella*]	ATCATACGAAGGCACCACA
			CTACTAAAGGACCACCCGA
	Sph44	gb|AAK81696.1| trypsin-like protein [*Galleria mellonella*]	GTTCAAGGCGGCAGTGTATC
			CCGGCGCAGAATTTGTTAT
	Sp66	gb|AAB66878.1| trypsin [*Anopheles stephensi*]	ACATTCCGTAACGCCAGT
			GAGCAAGCCATAGGTAGG
	Sph138	ABF51402 Trypsin-like protease	TCCCCAAGCCTGAAGATGA
			ACTGAGCCTCCGCAGACAA
	Sp141	ref|NP_001040178.1| chymotrypsinogen	GCTTACGGCAGTGCTTTTA
			CTTCAGCCTTGCGAATCCT
Serpisns	*Spi6*	XP_535853.2Protease inhibitor 12) [*Canis familiaris*]"	CGACTCATACCGCCCGTACAAG
			CAAGACGACCGAAATACCACCT
	Spi10	AAV91425.1protease inhibitor 3 [Lonomia obliqua]"	GCTTACGAATTATCGGTCTC
			CCCATCCGTTTATTGTGTCT
	Cpi	NM_001113274.1 Carboxypeptidase inhibitor	GCAGGGAAGGTGGTTTGTGT
			GCTTCCGACATCTGGTCTCTT
	Spi2	NM_001043579.1 Kazal-type serine proteinase inhibitor 1	TTGCTGCCAATAAAGACGGG
			CCTCAGGAAGGACATGAACA

1.2.4　数据统计与分析　计算目的基因与内参基因 mRNA 产物的电泳条带的 D（300 nm） 值比值，以平均值±标准差表示，用 SPSS 软件进行单因素方差分析，$P<0.05$ 表示差异显著，$P<0.01$ 表示差异极显著。以 Real-time PCR 统计出的相对表达值为基础数据，用 MATLAB R2009a 软件进行单向基因聚类。

2　结果与分析

2.1　SPs 与 Serpins 在 mRNA 和蛋白水平上的表达量

2.1.1　SPs 的表达　*Spp* 和 *Ctlp* 基因在调查的 Ysh

的 10 个组织中，只在中肠组织有表达（图 1：A）。*Spp* 不同时期的中肠组织表达谱表明，在调查的 14 时间点 *Spp* 都有表达。3 龄眠期相对较低，而 4 龄起蚕后增高，5 龄起蚕进食到第 3 日表达量达到了高峰，5 龄中后期开始降低。*Spp* 在雌性 4 眠以及 5 龄的后期（5L-5 到 5L-8）中的表达量高于雄性（图 1：B）。

在 5 龄 3 日的 6 个组织中检测到 SPP 蛋白只在中肠组织中表达（图 2：A）。在 4 个时间点的中肠组织中的检测结果表明，该蛋白在 4 眠期没有表达，4 龄 2 日表达量比较高，5 龄 3 日表达量达到顶峰，5 龄 7 日又降低（图 2：B）。在 4 龄 2 日和 5 龄 3 日分雌雄的中肠组织检测中没有发现性别间有显著差异（图 2：C）。

2.1.2 SPi 的表达量 *Spi1* 基因在 MSG 和 PSG 有高量表达，在中肠和马氏管也有比较高的表达量；*Spi2* 基因在 MSG 和体壁中表达量最高，其次为头部（图 3：A）。*Spi1* 基因在丝腺组织中的时期表达谱表明，该基因在雌性丝腺中从 5 龄第 3 日开始表达，在雄性丝腺中从 5 龄第 2 日开始表达，5 龄 7 日达到峰值并高于雌性。两者在熟蚕时（图注：5L-8）又下调表达（图 3：B）。而在中肠组织检测也是在 5 龄的中后期有表达，雄性的表达持续时间相对较长，在熟蚕期的雌性中不表达，而雄性中还有一定的表达量（图 3：C）。

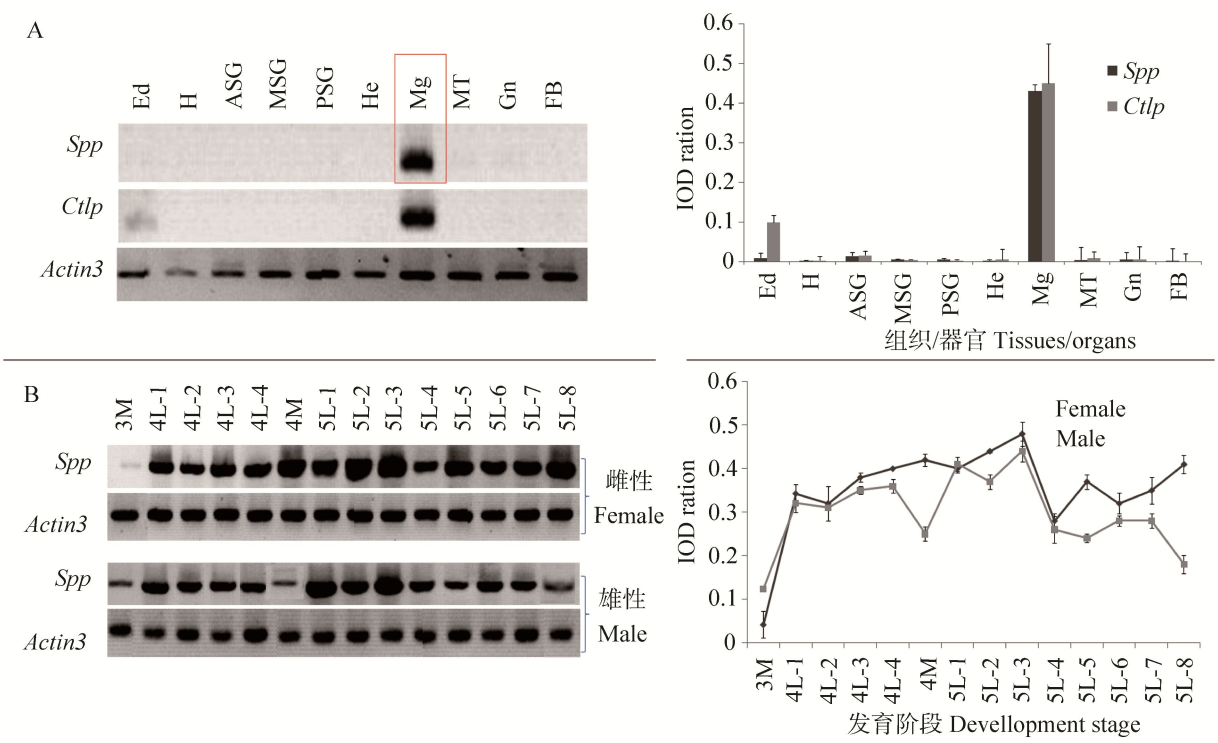

图 1 RT-PCR 方法检测的家蚕 *Spp* 和 *Ctlp* 基因在 Ysh 雌雄幼虫中的时空表达谱

Fig. 1 The spatio-temporal expression profile of *Spp* and *Ctlp* was measured by RT-PCR between the sexes in larva of Ysh

A. *Spp* 和 *Ctlp* 的组织表达谱；B. *Spp* 的时期表达谱。左边是电泳图，右边是换算出的密度值。*Actin3* 为内参基因(A 图中 Ed-体壁；H-头；ASG-前部丝腺；MSG-中部丝腺；PSG-后部丝腺； He-血淋巴；Mg-中肠； MT-马氏管；Gn-生殖腺；FB-脂肪体。B 图中 L 为龄期；M 为眠期)。

A. Tissues expression profile of *Spp* and *Ctlp*; B. Development stage expression profile of *Spp*. The left is electropherogram and the right is diagram based on integrated optical density (IOD) from electropherogram. *Actin 3* is used as a control. Ed-Epidermis; H-Head; ASG-Anterior silk gland; MSG-Middle silk gland; PSG-Posterior silk gland; He-Hemocyte; Mg-Midgut; MT-Malpighian tubule; Gn-Gonad; FB-Fat body. L shows instar of larval; M shows molt.

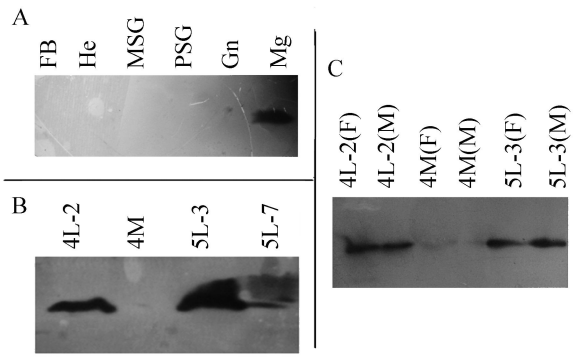

图 2 SPP 蛋白在 Ysh 幼虫不同组织（A）、不同时期（B）和不同性别间（C）的表达

Fig. 2 SPP protein expression in tissues (A), stage (B) and between the sexes (C)

A 图中 FB-脂肪体；He-血淋巴；MSG-中部丝腺；PSG-后部丝腺；Gn-生殖腺；Mg-中肠。B 和 C 图中 L 为龄期，M 为眠期；括号内的 M 为雄性，F 为雌性。

FB-Fat body; He-Hemocyte; MSG-Middle silk gland; PSG-Posterior silk gland; Gn-Gonad; Mg-Midgut. L shows instar of larval, M shows molt; M of brackets shows male, F of brackets shows female.

另外，*Spp* 基因是在 5 龄前期的中肠中表达较高，在 4 龄眠期和 5 龄末期都降低（图 1：B），而 *Spi1* 基因在 5 龄的前中期的中肠中表达量都很低，在 5 龄的第 7 日达到了峰值（图 3：C）。可见，*Spp* 基因与 *Spi1* 基因之间的表达存在一定的消长关系。

在 Ysh 5 龄 3 日的 6 个组织中 West-blot 检测表明，SPI1 只在中部丝腺有表达（图 4：A），在 3 个时期的检测结果中发现，SPI1 的表达有显著的性别差异，在雌性中只有 5 龄 7 日有表达，而雄性在 4 龄眠期，5 龄 3 日和 5 龄 7 日都有表达， 5 龄 7 日最显著（图 4：B）。

2.2 激素处理后的基因表达变化

以 Real-time PCR 统计出的相对表达值为基础数据，用 MATLAB R2009a 软件进行单向基因聚类。

2.2.1 20E 处理对 SPs/SPHs 基因和 Serpins 基因表达的影响 注射 20E 后 24 h（5 龄第 4 日），家蚕幼虫头部出现一个新的眠三角，体侧有 2 条明显的蜕黑线。

20E 处理后，10 个 *SPs* 基因在中肠中的表达结果显示，*Sph10*，*Sp25*，*Sp36*，*Sp42*，*Sp43*，*Sp66* 在处理后 6 h 的雌蚕中肠中有短暂的升高表达趋势，12 h 后在高浓度处理区的雌性中表达量有了明显的下降。*Sph44* 和 *Sph138* 的表达情况与其它基因不太一样，在 20E 处理后有上升的趋势，特别是处理后 6 h。*Sp141* 和 *Sph4* 没有明显的规律（图 5：A）。

在 20E 处理后 12 h 和 24 h，*Cpi* 和 *Spi2* 基因在每头注射 2 个浓度的雌蚕和雄蚕的丝腺中都有比较显著的上调表达，而高浓度 20E 处理，没有呈现出对 SPs/SPHs 基因表达相似的上调作用。*Spi6* 和 *Spi10* 基因在高浓度 20E 处理 24 h 后的雌雄性幼虫丝腺中，都出现了显著的下调（图 5：B），20E 呈现抑制效应。

2.2.2 JHA 处理对 SPs/SPHs 基因和 Serpins 基因表达的影响 涂抹 JHA 的个体没有外型上的变化，但在对照组正常结茧后处理组还处于幼虫生长状态，不能正常结茧，5 龄经过了 14 d 后，开始陆续死亡，最长的 5 龄存活了 23 d。

JHA 处理后 6 h，SPs/SPHs 基因 *Sp25*，*Sp42*，*Sp142*，*Sp4*，*Sp141* 在雄性中肠中有了短暂的下调表达，24 h 后所有的调查基因在雄性中肠中的上调表达开始占优势。48 h 后，*Sph44*，*Sph10*，*Sp25*，*Sp36*，*Sp42* 和 *Sp43* 6 个基因在雌雄都有了很显著的上调，但其它基因变化不显著（图 6：A）。

在 JHA 处理 6 h 后，雌雄丝腺组织中 4 个 Serpins 基因中都有了上调表达；24 h 后，*Spi6* 和 *Spi10* 表现为下调表达，而 *Cpi* 基因和 *Spi1* 基因表现为上调表达。48 h 后，4 个基因都出现了上调表达，最显著的为 *Spi6*（图

* 资助项目：重庆市教委科学技术研究项目（KJ131113）；重庆市科委项目（cstc2013jcyjA1202）；重庆三峡学院项目（12ZD11）

**通讯作者，E-mail: ganmei790717@163.com

收稿日期：2014-02-26，接受日期：2014-06-05

6：B）。

2.3 限食处理后的基因表达变化

在 CR 模型中发现，饥饿处理 36~48 h 后的个体生长缓慢，复喂刚开始进食缓慢，至少需要 12 h 才能恢复正常进食。超过 5 d 不进食，幼虫开始死亡。通过 Real -time PCR 结果统计分析，CR 模型中各种处理的雌雄之间差异不显著，图 7

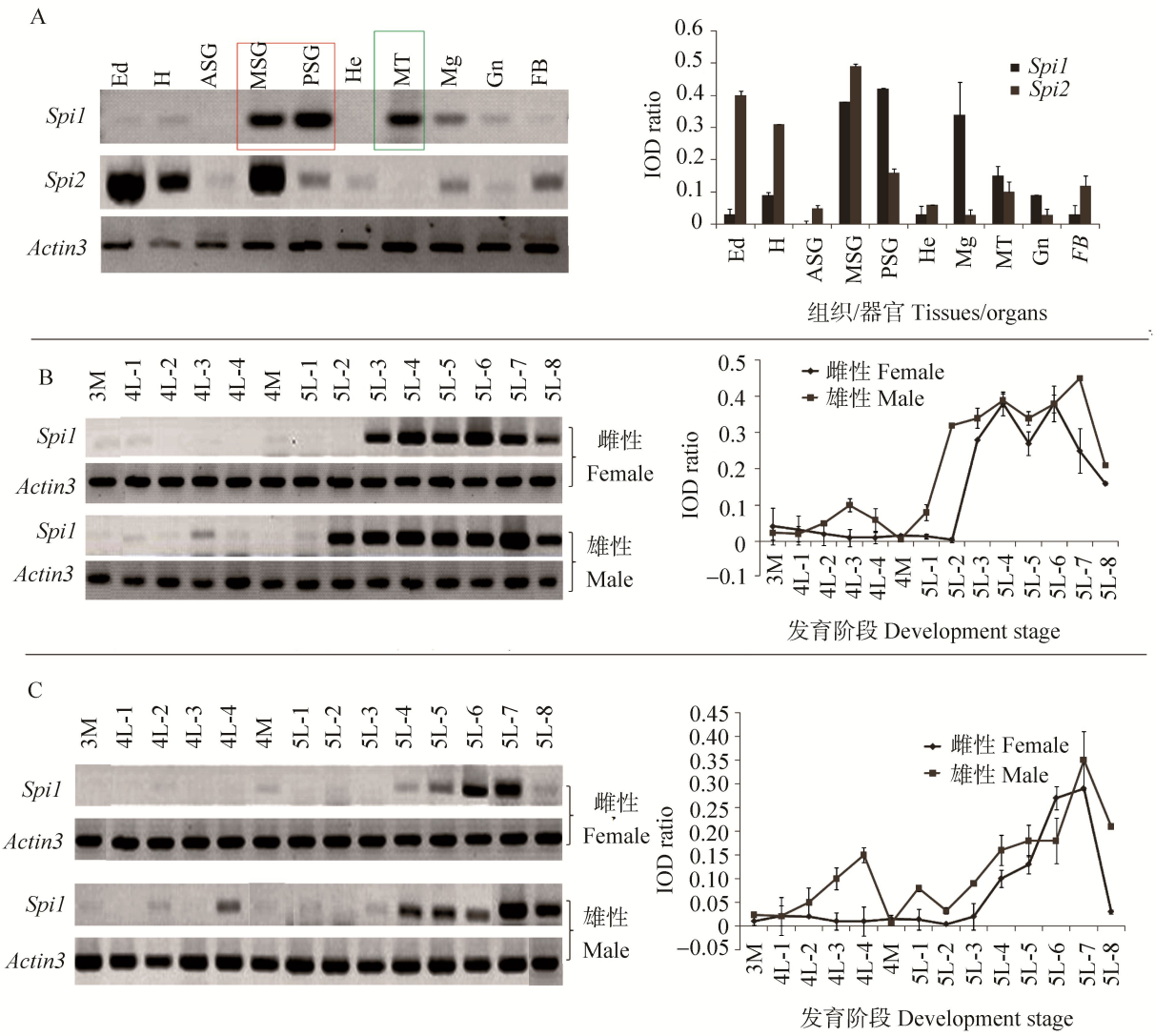

图 3 RT-PCR 方法检测的 *Spi1* 和 *Spi2* 基因在 Ysh 品种雌雄幼虫的时空表达谱

Fig. 3 The spatio-temporal expression profile of *Spi1* and *Spi2* that measured by RT-PCR between the sexes in larva of Ysh

A. *Spi1* 和 *Spi2* 的组织表达谱；B. *Spi1* 在丝腺中的时期表达谱；C. *Spi1* 在中肠中的时期表达谱。左边是电泳图，右边是换算出的密度值。*Actin 3* 为内参基因。A 图中 Ed-体壁；H-头；ASG-前部丝腺；MSG-中部丝腺；PSG-后部丝腺；He-血淋巴；Mg-中肠；MT-马氏管；Gn-生殖腺；FB-脂肪体。B 和 C 图中 L 为龄期；M 为眠期。

A. Tissues expression profile of *Spi1* and *Spi2*; B. Stage expression profile in silk gland of *Spi1*; C. Development stage expression profile in midgut of *Spi1*. The left is electropherogram and the right is diagram based on integrated optical density (IOD) from electropherogram. *Actin 3* is used as a control. Ed- Epidermis; H- Head; ASG-Anterior silk gland; MSG-Middle silk gland; PSG-Posterior silk gland; He-Hemocyte; Mg-Midgut; MT-Malpighian tubule; Gn-Gonad; FB-Fat body. L shows instar of larval; M shows molt.

为雌雄平均后的结果，*Spp* 基因在饥饿 12 h 后开始就出现下调表达，在 24，48 和 72 h 的持续饥饿处理下，正常饲养和饥饿之间的差异比较显著，复喂时有一定的提高，但饥饿和复喂之间没有达到显著差异。而 *Spi1* 的表达在 24 h 内的饥饿和复喂处理条件下没有明显的变化，在 48 h 和 72 h 后饥饿和复喂都有一定程度的下降，但它们之间没有差异。

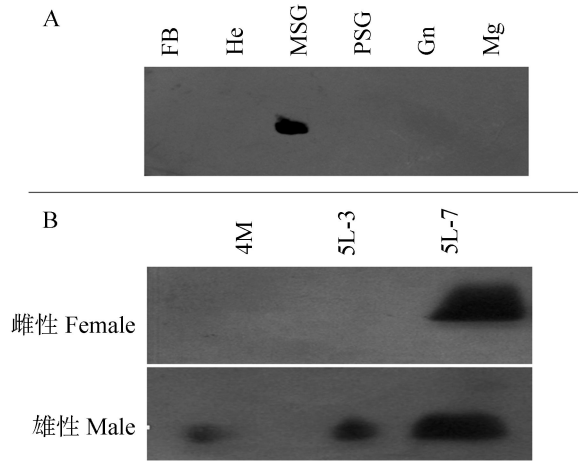

图 4　SPI1 蛋白在 Ysh 幼虫不同组织（A）、不同时期与不同性别间（B）的表达

Fig. 4　SPI1 protein expression in tissues (A), stages and sexes (B)

A 图中 FB-脂肪体；He-血淋巴；MSG-中部丝腺；PSG-后部丝腺；Gn-生殖腺；Mg-中肠。B 图中 L 为龄期；M 为眠期。

FB-Fat body; He-Hemocyte; MSG-Middle silk gland; PSG-Posterior silk gland; Gn-Gonad;.Mg-Midgut. L shows instar of larval; M shows molt.

3　结论与讨论

3.1　SPs 和 Serpins 基因在 mRNA 和蛋白质水平上的表达一致，性别表达有差异

Spp 基因和 SPP 蛋白都特异性的在中肠表达。SPP 蛋白在 4 眠期的缺失推测是由于蜕皮激素上升到一定程度，抑制了丝氨酸蛋白酶的分泌，而 *Spp* 基因的 mRNA 翻译成蛋白质的时差导致了 SPP 蛋白质的检测不能同步，但具体的原因还有待于进一步分析。*Spi1* 基因在家蚕后部丝腺、中部丝腺和中肠中表达，SPI1 蛋白反应主要在中部丝腺发生，与 Kuriora 等（1999）认为后部丝腺中 *Spi1* 基因的转录产物可能未翻译成有活性的蛋白质形态相关。SPI1 蛋白主要出现在 5 龄末期幼虫，这印证了丝蛋白质在此时积累到了最高峰，在吐丝前需要 Serpin 保护不被蛋白酶降解，而雄性比雌性持续表达时间长，为是否与雄蚕丝物质的产量和质量具有优势相关提供了一点线索。

3.2　MH 和 JHA 对 SPs/SPHs 和 Serpins 基因有不同的调控机制

家蚕的生长发育和丝蛋白的合成受蜕皮激素的控制。在 5 龄第 3 日进行了 20E 注射家蚕，调查的大部分 SPs/SPHs 基因，在中肠组织中有明显的下调表达。表明在 5 龄中期进行 MH 的处理，丝蛋白合成会受到影响。Serpins 基因在 20E 处理后基因表达情况不同，推测与它们的特异表达部位丝腺有关，即 20E 处理对不同组织中的基因表达量的影响不同，而不同类别的基因感受激素浓度的敏感性也不同。

HA 处理后，家蚕幼虫 5 龄后不能结茧，最长的存活了 23 d。经 JHA 诱导后永久幼虫 5 龄有存活 30 d 以上的报道，丝腺细胞发育正常，始终无组织解离迹象（崔为正等，1993），说明 JHA 有维持丝腺细胞正常结构与功能的作用。JHA 需在 5 龄中期处理，才能对丝蛋白合成有关的酶系产生明显的调控作用，并表现出延长合成丝蛋白的时间。本研究在 5 龄中期进行 JHA 的刺激，对 SPs/Serpins 基因短期内有抑制作用，此后呈现上升趋势。与对相关蛋白质的表达一致（戴祝英等，1982）。JHA 和 MH 对丝腺生长及 PSG 中的各种物质合成的影响，主要与发育时期及激素剂量有关，生产中需根据饲养的需要确定激素处理的时间与剂量。

3.3 限食对 SPs/SPHs 和 Serpins 基因的敏感性不同，暗示对家蚕组织影响有差异

Spp 基因的表达水平在饥饿处理的早期（12 h 后）就有了明显的下调，从生理学的角度分析，进食中断后，中肠中消化蛋白质的丝氨酸蛋白酶分泌减少（Li *et al.*，2009），相应的基因转录水平也有明显的下降。*Spi1* 基因在饥饿 48 h 和 24 h 饥饿配合 24 h 复喂时，与正常饲喂相比开始有下调表达。可以认为 Serpins 基因对食物的供缺反应比较慢，耐受性比较强。对家蚕来说，超过 1 日的饥饿再复喂，对食物的消化能力的需要更长时间来弥补。烟草天蛾 *Manduca sexta* 中 *Ctlp* 基因在饥饿时表达急速下降，免疫水平上也证实了饥饿时 CTLP 蛋白不表达（Zhang *et al.*，2010）。斜纹夜蛾 *S. litura* 中 *Ctlp2* 基因在饥饿时下调，而复喂时该基因转录的 mRNA 和翻译的蛋白水平又上调（Broehan *et al.*，2008）。本研究在时期表达谱中发现 *Spp* 基因在 3 龄眠期的表达相对比较低，而 4 龄起蚕后增高，可见进食会迅速刺激蛋白酶分泌，同时 *Spp* 基因也激活表达，该基因主要是在幼虫饲喂过程中参与了食物蛋白的消化过程，受到食物供缺的瞬时调控。丝腺特异表达基因 *Spi1* 感受食物的供缺反应比较慢，可能的原因是丝腺组织是丝蛋白的储藏组织，处于食物蛋

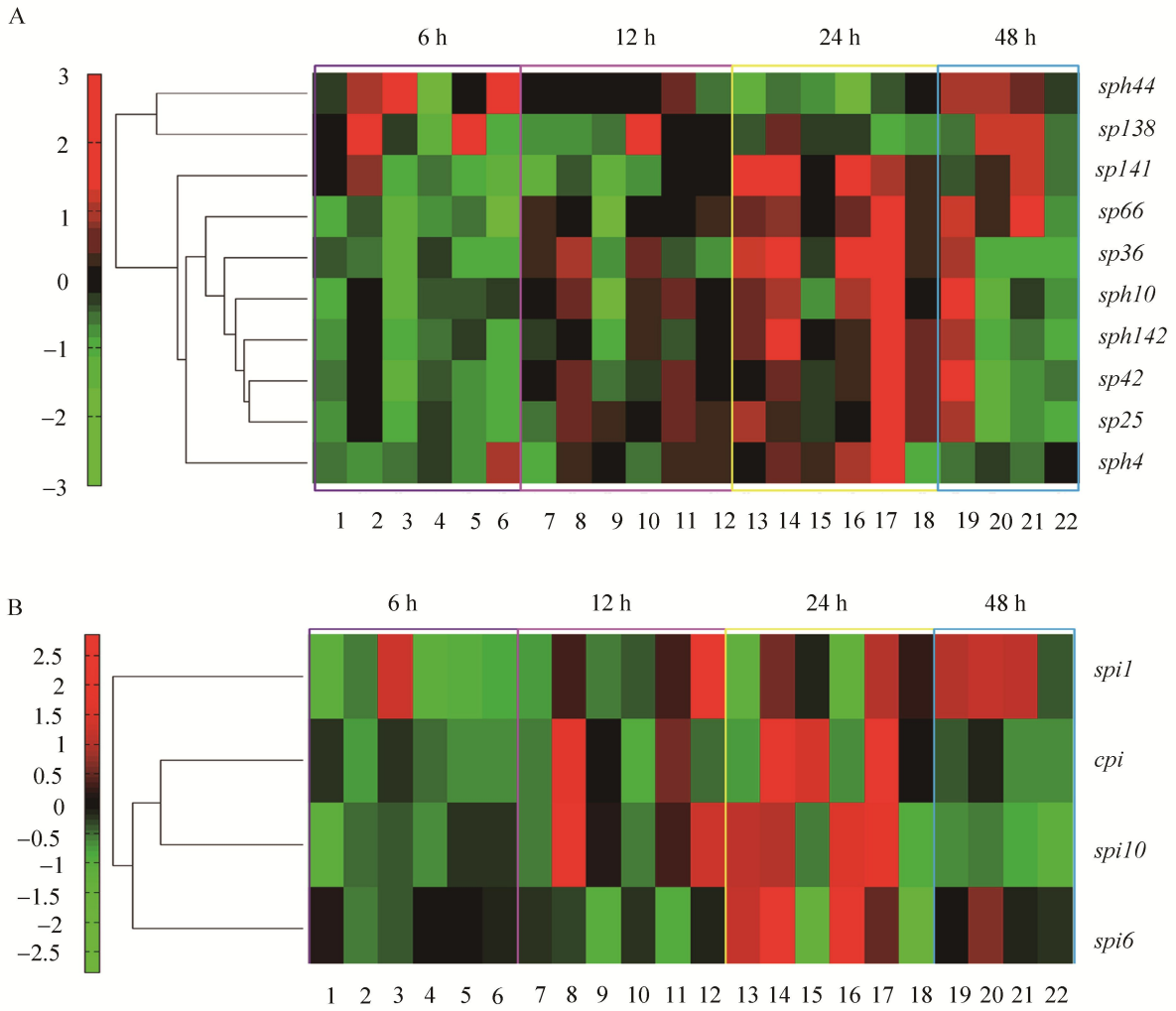

图 5　中肠中 10 个 SPs/SPHs 基因（A）和丝腺中 4 个 Serpins 基因（B）在 20E 处理后的组织表达变化

Fig.5　Tissue expression of 10 SPs/SPHs genes in midgut (A) and 4 Serpins genes (B) in silkgland after treated by 20E

红色、黑色、绿色分别表示基因在高、中、低水平表达，基因横向排列，组织纵向排列。1~6，7~12，13~18 分别为组织 CK 雌，5 μg /雌，10 μg /雌，CK 雄，5 μg /雄，10 μg /雄，19-22 为 CK 雌，10 μg /雌，CK 雄，10 μg /雄。

The red, black, green colors indicate genes that are expressed at high, middle and low levels, respectively. Genes are aligned horizontally, and the tissues are shown vertically. 1-6, 7-12, 13-18 showed CK (Female), 5 μg /larva (Female), 10 μg /larva(Female), CK(Male), 5 μg/one (Male), 10 μg/one (Male), 19-22 showed CK (Female), 10 μg/one (Female), CK (Male), 10 μ /one (Male).

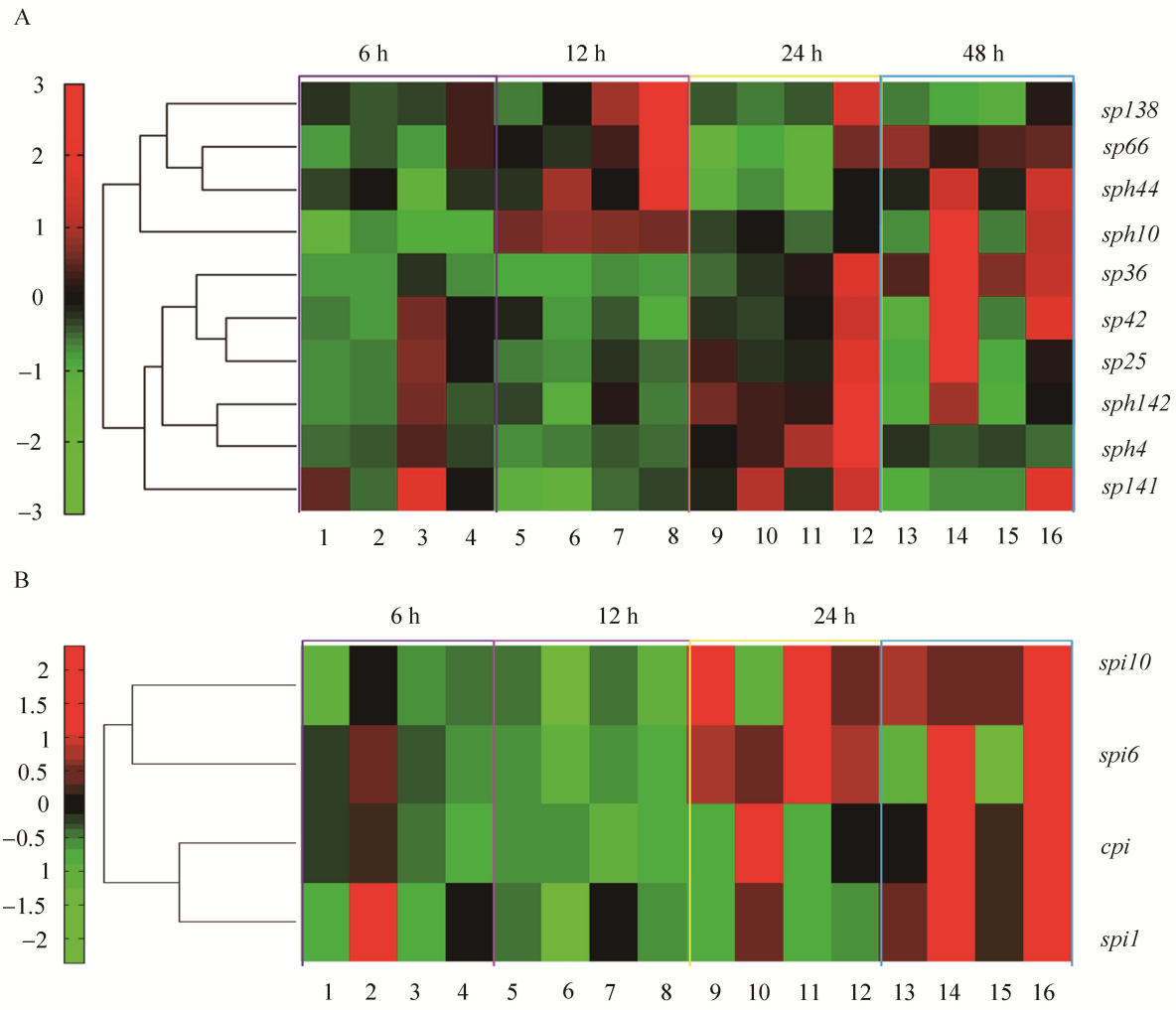

图 6　中肠中 10 个 SPs/SPHs 基因（A）和丝腺中 4 个 Serpins 基因（B）在 JHA 处理后的组织表达变化

Fig.6　Tissue Expression of 10 SPs/SPHs genes in midgut (A) and 4 Serpins genes (B) in silkgland after treated by JHA

图中红色、黑色、绿色分别表明基因在高、中、低水平表达，基因横向排列，组织纵向排列。1~4，5~8，9~12，13~16 分别为组织 CK 雌，18.75 μg /雌，CK 雄，18.75 μg /雄。

The red, black，green colors indicate genes that are expressed at high, middle and low levels, respectively. Genes are aligned horizontally, and the tissues are shown vertically.1-4, 5-8 ,9-12,13-16 showed tissue of CK (Female), 18.75 μg/one (Female), CK (Male), 18.75 μg/one (Male).

白消化转运路径的下游。适当的限食有利于刺激家蚕的中肠发生应急反应，而较长时间的食物紧缺对丝物质相关基因的表达有抑制作用，丝物质合成也顺势会受到影响。

20E 与 Jh 协同对昆虫生殖发挥调节作用(周娇等，2013)。20E 诱导昆虫的蜕皮、变态，而 JH 决定昆虫蜕皮的性质（周树堂等，2012）。尽管昆虫蜕皮激素生物合成途径特别是由 7-脱氢胆固醇转化为三脱氧蜕皮酮之间的“ 黑箱 ”中的酶促转化步骤有了较为深刻的理解。但昆虫蜕皮激素生物合成这一研究领域中依然有不少问题需要澄清（王升和李胜，2012），激素调控与昆虫内分泌紧密相关，而内分泌干扰效应在害虫控制中具有较高的应用价值，了解不同昆虫中激素的分子作用机制，将会为开发生物农药奠定理论基础。

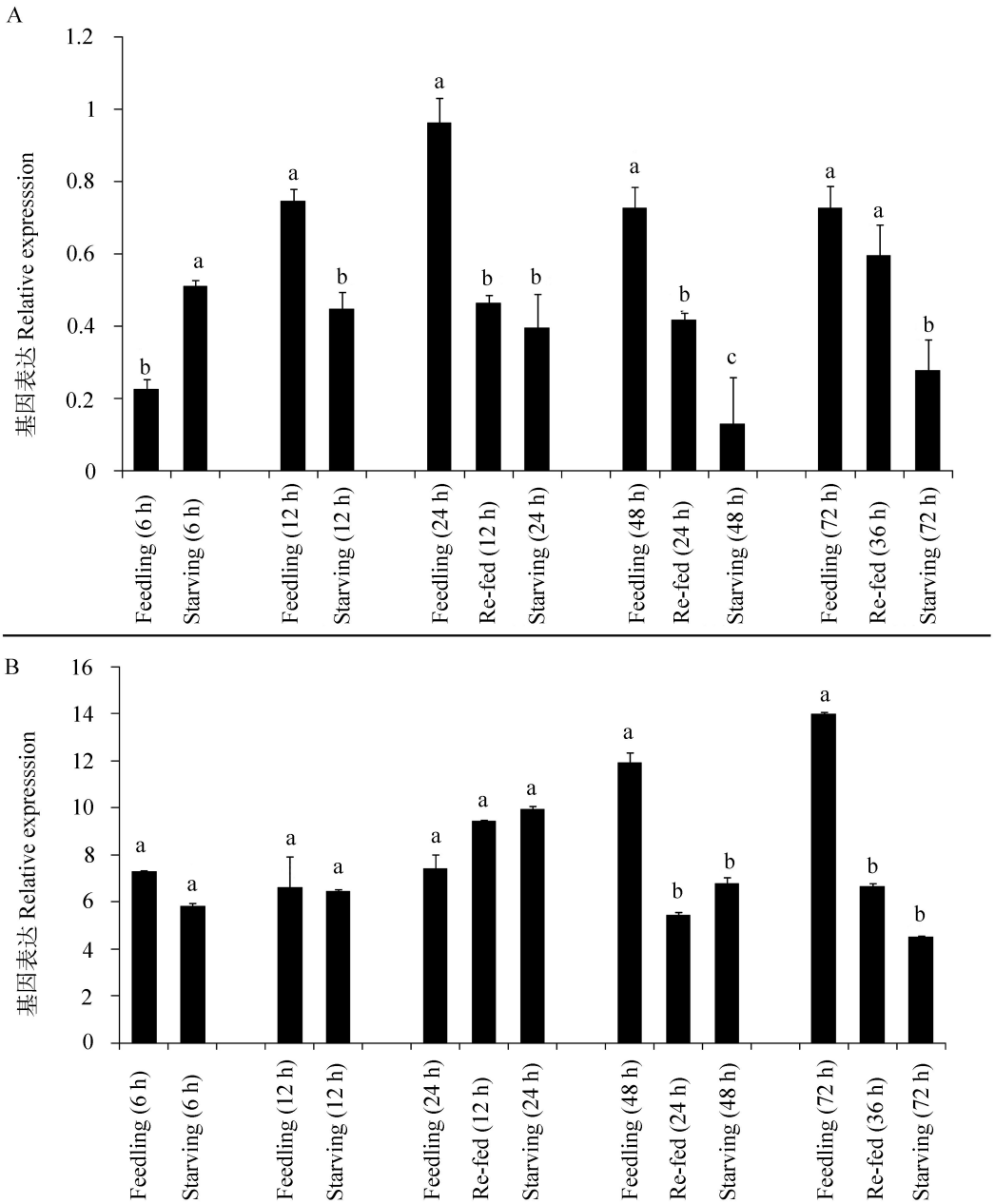

图 7　限食处理后 *Spp*（A）和 *Spi1*（B）基因的表达

Fig. 7　Expression of *Spp* (A) and *Spi1* (B) after food restriction

Feeding 表示饲喂，Starving 表示饥饿，Re-fed 表示复喂。

Feeding shows feeding, Starving shows starving, Re-fed shows re-feeding.

参考文献 (References)

Abrams EW, Mihoulides WK, Andrew DJ, 2006. Fork head and sage maintain a uniform and patent salivary gland lumen through regulation of two downstream target genes, PH4alPhaSGI and PH4alPhaSGZ. *Development*, 133 (18): 3517–3527.

Bitra K, Palli SR, 2009. Interaction of proteins involved in ecdysone and juvenile hormone signal transduction. *Arch. Insect Biochem*., 70(2): 90–105.

Broehan G, Kemper M, Driemeier D, Vogelpohl I, Merzendorfer H, 2008. Cloning and expression analysis of midgut chymotrypsin-like proteinases in the tobacco hornworm. *Insect Physiol*., 54(8): 1243–1252.

Engles L, 2005. Review and application of serine protease inhibition in coronary artery bypass graft surgery. *Am. J. Health Syst. Pharm*., 62(18supp14): 9–14.

Guarente L, 2005. Calorie restriction and SIR2 genes: towards a mechanism. *Mech. Ageing. Dev*., 126(9): 923–928.

Irving JA, Pike RN, Lesk AM, Whisstock JC, 2000. Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. *Genome Res*., 10(12): 1845–1864.

Jiang H, Kanost MR, 2000. The clip-domain family of serine proteinases in arthropods. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 30(2): 95–105.

Kim MS, Baek MJ, Lee MH, Park JW, Lee SY, Soderhall K, Lee BI, 2002. A new easter-type serine protease cleaves a masquerade-like protein during prophenoloxidase activation in *Holotrichia diomphalia* larvae. *J. Biol. Chem*., 277(42): 39999–40004.

Krem MM, Dicera E, 2002. Evolution of enzyme cascades from embryonic development to blood coagulation. *Trends Biochem. Sci*., 27(2): 67–74.

Kuriora A, Yamaxki M, Hirano H, 1999. TryPsin inhibitor Polymorphism in the cocoon of the silkworm. *J. Seric. Scijpn*., 68(5): 397–403.

Li H, Oppert B, Higgins RA, Huang F, Zhu KY, Buschman LL, 2004. Comparative analysis of proteinase activities of *Bacillus thuringiensis*-resistant and susceptible *Ostrinia nubilalis*. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 34(8): 753–762.

Li Y, Chen K, Yao Q, Li J, Wang Y, Liu H, Zhang C, Huang G, 2009. The effect of calorie restriction on growth and development in silkworm, *Bombyx mori*. *Arch. Insect Biochem. Physiol*., 71(3): 159–172.

Gan LP, Xi J, Niu YS, Qin HY, Sima YH, Xu SQ, 2012. LongSAGE analysis of differentially expressed genes in the midgut and silkgland of yellow cocoon color sex-limited silkworm, *Bombyx mori*. *Afr. J. Biotechnol.*, 11(49): 10994–11012.

Nirmala X, Mita K, Vanisree V, Žurovec1 M, Sehnal1 F, 2001. Identification of four small molecular mass proteins in the silk of *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol*., 10(5): 437–445.

Sasaki T, Kobayashi K, 1984. Isolation of two novel proteinase inhibitors from hemolymph of silkworm larva, *Bombyx mori*. *J. Biochem*., 95(4):1009–1117.

Sasaki T, 1991. Patchwork-structure serpins from silkworm (*Bombyx mori*) larval hemolymph. *Eur. J. Biochem*., 202(2): 255–261.

Schefe JH, Lehmann KE, Buschmann IR, Unger T, Funke-Kaiser H, 2006. Quantitativereal-time RT-PCR data analysis: current concepts and thenovel‘gene expression's CT difference’formula. *J. Mol. Med.*, 84(11): 901–910.

Zhang C, Zhou D, Zheng S, Liu L, Tao S, Yang L, Hu S, Feng Q, 2010. A chymotrypsin-like serine protease cDNA involved in food protein digestion in the common cutworm, Spodoptera litura: Cloning, characterization, developmental and induced expression patterns, and localization. *J. Insect Physiol*., 56 (7): 788–799.

Zhao P, Wang GH, Dong ZM, Duan J, Xu PZ, Cheng TC, Xiang ZH, Xia QY, 2010. Genome-wide identification and expression analysis of serine proteases and homologs in the silkworm *Bombyx mori*. *BMC Genomics.*, 11: 405.

崔为正, 张友英, 刘发余, 徐俊良, 1992．保幼激素和蜕皮激素的不同剂量与在家蚕不同发育时期处理的生物效应. 江苏蚕业, (3): 5−9. [Cui WZ, Zhang YY, Liu FY, Xu JL, 1992. The effects of different dose of juvenile hormone ecdysing hormone on development in different stage of silkworm and biological effect. Jiangsu Sericulture, (3): 5–9]

戴祝英, 庄大桓, 项美华, 许廷森, 1982．β蜕皮素对家蚕丝腺成长及合成甘氨酸、丙氨酸有关酶系的调节控制. 昆虫学报, 25(2): 121−127. [Dai ZY, Zuang DH, Xiang MH, Xu TS, 1982. Effect of ecdysone on the growth of the silkgland and the regulation of transaminase activity to synthesize clycine and alanine in *Bombyx mori* L. Acta Entomologia Sinica, 25(2): 121–127]

刘春, 2006．家蚕丝腺表达谱及丝素结构基因转录调控研究. 博士学位论文. 重庆:西南大学. [Liu C, 2006. The expression profiling silk gland and genetic transcription research of silk worm, Doctoral Dissertation. Chongqing: Southwest University].

王凌燕, 2009．家蚕丝腺特异高量表达丝氨酸蛋白酶抑制剂的研

究. 硕士学位论文. 重庆: 西南大学. [Wang LY, 2009. Tissue-specific and high-;eve; expression of silk gland serine protease inhibitors in the silkworm, *Bombyx mori*. Master Thesis. Chongqing: Southwest University]

王升, 李胜, 2012. 昆虫蜕皮激素生物合成及其神经肽调控. 应用昆虫学报, 49(3): 573 – 577. [Wang S, Li S, 2012. Insect ecdysteroids biosynthesis and its regulation by neuropeptides. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(3): 573-577.]

周娇, 李娟, 翁强, 骆有庆, 2013. 蜕皮激素对昆虫生长及生殖过程的调控. 应用昆虫学报, 50(5): 1413−1418. [Zhou J, Li J, Weng Q, Luo YQ, 2013. The regulation of ecdysteroid on insect growth and productive processes. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50(5): 1413-1418.]

周树堂, 郭伟, 宋佳晟, 2012. 保幼激素的分子作用机制研究. 应用昆虫学报, 49(5): 1087−1094. [Zhou ST, Guo W, Song JS, 2012. Molecular mechanisms of juvenile hormone action. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(5): 1087-1094.]