

Polycomb 家族基因 *BmSu(z)12* 在家蚕幼虫中的表达研究

邢秋婷, 郭兴国, 邢万静, 阚云超, 乔惠丽* (南阳师范学院河南省伏牛山昆虫生物学重点实验室, 河南南阳 473061)

摘要 [目的] 研究家蚕 Polycomb 蛋白家族基因 *BmSu(z)12* 在家蚕幼虫中的表达情况。[方法] 根据家蚕基因组预测的 *BmSu(z)12* 基因序列, 设计特异引物, 利用 qRT-PCR 对该基因在家蚕不同龄期幼虫中的表达进行研究。[结果] *BmSu(z)12* 基因在 5 龄幼虫蜕皮后 2 d 和变态前 2 d 有较高表达, 而在 1~5 龄取食中期表达量较低, 表达特征具有一定的规律性。[结论] *BmSu(z)12* 基因在家蚕幼虫生长发育中具有重要作用, 该研究为进一步研究家蚕 SU(Z)12 蛋白的功能奠定基础。

关键词 家蚕; polycomb 蛋白; *Su(z)12* 基因; 表达

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)27-09286-02

Study on Expression of Polycomb Group Gene *BmSu(z)12* in Silkworm Larvae.

XING Qiu-ting, GUO Xing-guo, XING Wan-jing, QIAO Hui-li et al (Henan Key Laboratory of Insect Biology in Funiu Mountain, Nanyang Normal University, Nanyang, Henan 473061)

Abstract [Objective] The aim was to study the expression of polycomb group gene *BmSu(z)12*, in silkworm larvae. [Method] Based on the predicted *BmSu(z)12* gene sequence in the genome of silkworm, the specific primers were designed. qRT-PCR was applied to analyze the expression of *BmSu(z)12* in different instar larvae of silkworm. [Result] The expression level of *BmSu(z)12* was high in the first and the last 2 days of the 5th newly molted larvae, low expression was observed in the eating larvae of each instar. It showed regular expression patterns in the different developmental stages of larva. [Conclusion] *BmSu(z)12* may have important roles in the development of the silkworm larvae, the study will provide fundamental knowledge for further investigation of SU(Z)12 protein function in silkworm.

Key words Silkworm; Polycomb protein; *Su(z)12* gene; Expression

Polycomb 蛋白复合体 (Polycomb Group Proteins, PcG) 是通过组蛋白进行甲基化修饰来调控靶基因的表达遗传调控因子, 广泛存在于果蝇、线虫、小鼠、人和拟南芥等各种生物体中, 在进化上高度保守。PcG 蛋白家族最初在果蝇中被发现, 主要包含 2 个核心蛋白复合体, 即 PRC1 (Polycomb Repressive Complex 1) 和 PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2), 其中 PRC2 在转录抑制起始阶段发挥作用, PRC1 主要维持处于阻抑状态染色质的稳定性^[1-4]。在果蝇中, PRC1 是由 PC、PH、PSC 和 dRing 组成的一个蛋白复合体, PRC2 主要包括 ESC、E(Z)、Rpd3、SU(Z)12 和组蛋白结合蛋白 p55/RbAp48^[5-6]。在哺乳动物中, PRC1 由 HPC、HPH、Bmi1/Mel18 和 Ring1A/B 组成, PRC2 由 EED、EZH2、SU(Z)12、RbAp48 和 AEBP2 组成, 其中 PRC2 催化核心组蛋白的甲基化, 而甲基化的组蛋白为 PRC1 复合体识别和结合提供位点^[7]。

近年来, PcG 蛋白作为转录水平上的表观遗传修饰因子和细胞命运的调节子受到越来越多研究者的关注。在生物生长发育和病变过程中, PcG 蛋白通过形成多复合体, 作用于染色体上的不同位点, 致使染色体变构, 以期调控基因表达^[8]。PcG 蛋白的主要作用靶标是 Hox 基因簇, Hox 基因在决定细胞的定向分化与增殖、调控机体组织器官发育方面起决定性作用。其中 PRC2 主要参与 H3K27 的甲基化修饰来抑制靶基因的表达, 而 SU(Z)12 是 PRC2 蛋白复合体发挥其内在的组蛋白甲基转移酶 (Histone methyltransferase, HMTase) 活性所必需的成分之一, 其 VEFS 结构域在果蝇、人和拟南芥中高度保守, 目前发现 SU(Z)12 在胚胎发育、细胞

周期、细胞增殖和分化的调控中起着极其重要的作用^[9-12]。

家蚕作为人类最早驯化的动物之一, 是我国重要的特色经济昆虫, 且作为鳞翅目昆虫的模式生物, 在研究昆虫变态发育及农林害虫防治中也发挥着重要作用, 同时家蚕具有大量的 Hox 基因。笔者根据家蚕基因组中预测的 *BmSu(z)12* 基因序列, 利用 PCR 法对家蚕 *BmSu(z)12* 基因 VEFS 结构域进行克隆, 并利用 qRT-PCR 研究 *BmSu(z)12* 在家蚕不同龄期幼虫的表达情况, 从而为进一步研究家蚕中 *BmSu(z)12* 的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 以家蚕品种大造 P50 作为试验材料, 用新鲜的桑叶饲养。分别取 1~4 龄幼虫和 5 龄每天的整蚕, 解剖去中肠并用 DEPC 水冲洗。所有样品迅速置于无 RNA 酶的离心管中, 液氮速冻后于 -80 °C 冰箱保存备用。

1.2 引物 PCR 扩增所用引物序列 (5'~3') *BmSu(z)12*-F: GAGTTCCTAGAGCTGGACGA; *BmSu(z)12*-R: GAGCATCT-GAACGGTCT; *BmactinA3*-F: ATGTGCGACGAAGAAGTTGC; *BmactinA3*-R: GTCTCCTACGTACGAGTCCT。由奥科生物技术有限公司合成。

1.3 家蚕幼虫 RNA 提取及 *BmSu(z)12* 基因克隆 采用 Trizol (Invitrogen) 法, 提取家蚕幼虫整蚕样品 RNA, 利用 PrimeScript II 反转录试剂盒 (TaKaRa) 反转录为 cDNA 后, 以其为模板进行后续试验。

根据家蚕基因组中预测的 *BmSu(z)12* 基因序列 BGIB-MGA011842-PA 设计引物。以家蚕 5 龄第 1 天幼虫 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 15 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 循环 30 次; 72 °C 延伸 10 min。将纯化后的扩增产物与 pMD19-T simple 连接后, 转化至大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 α , 挑取阳性克隆, 进行测序验证。

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31201754, 31172158)。

作者简介 邢秋婷 (1989 -), 女, 河南南阳人, 硕士研究生, 研究方向: 昆虫生理生化和分子生物学。* 通讯作者, 讲师, 从事昆虫生理生化和分子生物学研究。

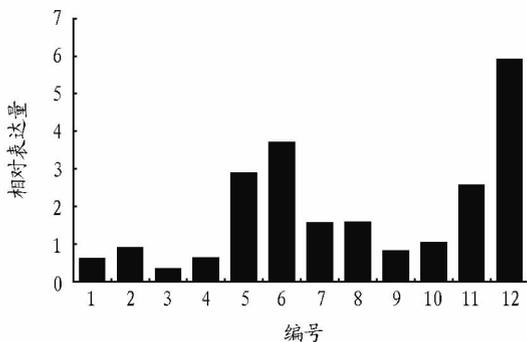
收稿日期 2014-07-20

1.4 *BmSu(z)12* 基因在不同龄期幼虫中表达的 qRT-PCR 分析 qRT-PCR 检测的内参基因为家蚕 *BmactinA3* (GenBank 登录号: U49854)。 *BmactinA3* 和 *BmSu(z)12* 引物序列见“1.2”。反应检测仪为 Bio-Rad 公司的 CFX96 系统, qRT-PCR 扩增程序: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 15 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 40 个循环, 溶解曲线在 65 ~ 95 °C 用来判定产物特异性。每个样品设 3 个重复, *BmSu(z)12* 基因 mRNA 的相对表达量用 $2^{-\Delta Ct}$ 表示, 其中 $\Delta Ct = Ct(\text{目的基因}) - Ct(\text{内参基因})$ 。

2 结果与分析

2.1 *BmSu(z)12* 基因片段的克隆 通过 PCR 方法, 从家蚕幼虫 RNA 反转录的 cDNA 中克隆 *BmSu(z)12* 基因 423 bp 的片段, 产物经奥科公司测序正确, 表明为目的基因。

2.2 *BmSu(z)12* 基因在家蚕幼虫不同时期的表达分析 采用 qRT-PCR 方法对 *BmSu(z)12* 在家蚕不同龄期幼虫的表达情况进行定量检测, 结果见图 1。由图 1 可知, *BmSu(z)12* 基因在家蚕 1~4 龄的幼虫中表达量较低, 而在 5 龄各时期样品中的表达量相对较高, 并呈一定的规律。在刚蜕皮后的 5 龄第 1 天、第 2 天和进入变态前的 5 龄第 7 天、第 8 天表达量较高, 而在 5 龄中期 (第 3、4、5、6 天) 的表达量较低。



注: 1~4 分别为 1、2、3、4 龄幼虫; 5~12 分别为 5 龄第 1~8 天幼虫。

图 1 家蚕 *BmSu(z)12* 基因在 1~5 龄幼虫中的表达

3 讨论

PcG 蛋白家族通过催化组蛋白 H3 的 27 位赖氨酸的甲基化水平来调控靶基因表达, 并广泛参与到发育、增殖、分化及肿瘤发生等重要的生命过程。SU(Z)12 本身没有甲基转移酶活性, 但其对 PRC2 复合体的功能具有重要作用。研究表明, 在过表达 SU(Z)12 的果蝇突变体中可以检测到 H3K27me3 的甲基化程度明显增加, 而敲除 SU(Z)12 的突变体中 H3K27me3 完全消失^[13]。该试验在家蚕幼虫中克隆获得 PcG 蛋白 PRC2 复合体中的重要组分 *BmSu(z)12* 基因的 VEFS 结构域, 将其编码氨基酸序列与其他物种的同源序列进行比对, 发现其与果蝇和人类 *Su(z)12* 分别有 72% 和 52% 的序列相似性。 *BmSu(z)12* 家蚕幼虫的 qRT-PCR 结果显示, *BmSu(z)12* 基因在 5 龄幼虫中蜕皮后 2 d 和变态前 2 d 表达量较高, 而在 1~5 龄取食中期表达量较低, 该表达特征具有一定的规律性。因为在幼虫蜕皮后和变态前家蚕各组织都处于组织重构状态, 新的组织细胞将准备进行分化; 而

到取食中期, 家蚕体内组织功能回归正常, 分化过程放缓, 表明 *BmSu(z)12* 基因在家蚕幼虫生长发育中起着重要作用。研究发现, 在果蝇 SU(Z)12 突变体中发现果蝇产下的卵不能正常发育^[13]; 家蚕中 *Su(z)12* 在胚胎发育早期大量表达, 晚期逐渐降低^[14], 表明该蛋白在胚胎发育过程中也发挥功能; 在哺乳动物细胞中敲除 SU(Z)12 后导致细胞形态变小, 进一步表明 SU(Z)12 可能在细胞分化中发挥作用^[15]; 最近的研究发现, *Su(z)12* 在不同人类肿瘤中表达明显上调, 因此可能是一种新的肿瘤基因治疗的分子靶点^[16-18]。家蚕属于完全变态发育昆虫, 幼虫期每个龄期之间都要经历眠和蜕皮的过程, 不同阶段发育过程中细胞的重组和分化都非常重要。因此通过对 *BmSu(z)12* 在幼虫中表达特征的研究, 将为进一步研究家蚕 SU(Z)12 蛋白的功能提供理论依据。

参考文献

- [1] MULLER J, HART C M, FRANCIS N J, et al. Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex [J]. Cell, 2002, 111(2): 197-208.
- [2] SHAO Z, RAIBLE F, MOLLAAGHABABA R, et al. Stabilization of chromatin structure by PRC1, a Polycomb complex [J]. Cell, 1999, 98(1): 37-46.
- [3] BROWN J L, MUCCI D, WHITELEY M, et al. The Drosophila Polycomb group gene pleiohomeotic encodes a DNA binding protein with homology to the transcription factor YY1 [J]. Mol Cell, 1998, 1(7): 1057-1064.
- [4] KONUMA T, OGURO H, IWAMA A. Role of the polycomb group proteins in hematopoietic stem cells [J]. Dev Growth Differ, 2010, 52(6): 505-516.
- [5] OTTE A P, KWAKS T H. Gene repression by polycomb group protein complexes: a distinct complex for every occasion [J]. Curr Opin Genet Dev, 2003, 13(5): 448-454.
- [6] SCHWARTZ Y B, PIRROTTA V. Polycomb complexes and epigenetic states [J]. Curr Opin Cell Biol, 2008, 20(3): 266-273.
- [7] HERNANDEZ-MUNOZ I, TAGHAVI P, KUIJL C, et al. Association of BMI1 with polycomb bodies is dynamic and requires PRC2/EZH2 and the maintenance DNA methyltransferase DNMT1 [J]. Mol Cell Biol, 2005, 25: 11047-11058.
- [8] GIL J, BERNARD D, PETERS G. Role of polycomb group proteins in stem cells e12 renewal and cancer [J]. DNA Cell Biol, 2005, 24: 117-125.
- [9] BRAKEN A P, HELIN K. Polycomb group proteins; navigators of lineage pathways led a stray in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(11): 773-784.
- [10] OKTABA K, GUTIERREZ L, GAGNEUR J, et al. Dynamic regulation by Polycomb group protein complexes controls pattern formation and the cell cycle in Drosophila [J]. Dev Cell, 2008, 15(6): 877-889.
- [11] PLATH K, FANG J, MLYNARCZYK-EVANS S K, et al. Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation [J]. Science, 2003, 300(5616): 131-135.
- [12] MAGER J, MONTGOMERY N D, DE VILLENA F P, et al. Genome imprinting regulated by the mouse Polycomb group protein [J]. Eed Nat Genet, 2003, 33(4): 502-507.
- [13] CHEN S, BIRVE A, RASMUSON-LESTANDER A. In vivo analysis of Drosophila SU(Z)12 function [J]. Mol Genet Genomics, 2008, 279(2): 159-170.
- [14] LI Z, TATSUKE T, SAKASHITA K, ZHU L, et al. Identification and characterization of Polycomb group genes in the silkworm, *Bombyx mori* [J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(5): 5575-5588.
- [15] CAO R, ZHANG Y. SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex [J]. Mol Cell, 2004, 15(1): 57-67.
- [16] LI H, CAI Q, WU H, et al. SUZ12 promotes human epithelial ovarian cancer by suppressing apoptosis via silencing HRK [J]. Mol Cancer Res, 2012, 10(11): 1462-1472.
- [17] SATO T, KANEDA A, TSUJI S, et al. PRC2 overexpression and PRC2-target gene repression relating to poorer prognosis in small cell lung cancer [J]. Sci Rep, 2013, 3: 1911.
- [18] KIRMIZIS A, BARTLEY S M, FARNHAM P J. Identification of the Polycomb Group Protein SU(Z)12 as a potential molecular target for human cancer therapy [J]. Mol Cancer Ther, 2003, 2(1): 113-121.