

·综述·

家蚕性别及其决定基因的研究进展

谢再东^{1,2b}, 李兵^{1,2a,2b}, 许雅香^{1,2a,2b}, 沈卫德^{1,2a,2b*}

(1. 现代丝绸国家工程实验室, 中国江苏 苏州 215123;
2. 苏州大学 a. 蚕桑研究所; b. 基础医学与生物科学学院, 中国江苏 苏州 215123)

摘要: 家蚕作为模式生物和鳞翅目昆虫的典型代表, 性别决定的分子机制是近年来的研究热点, 其分子机制的阐明将为家蚕的雄蚕饲养和害虫的生物防治打下基础. 主要对国内外家蚕性别决定、性染色体、家蚕性别决定基因的研究进展进行了综述, 并对家蚕性别调控研究中存在的问题进行了分析和展望.

关键词: 家蚕; 性别决定; 性染色体; 基因

中图分类号: S881.2

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2010)02-0177-07

Progresses on Sex and Determining Genes in *Bombyx mori*

XIE Zai-dong^{1,2b}, LI Bing^{1,2a,2b}, XU Ya-xiang^{1,2a,2b}, SHEN Wei-de^{1,2a,2b*}

(1. *The State Engineering Laboratory of Modern Silk, Suzhou 215123, Jiangsu, China*; 2. a. *Institute of Sericulture*;
b. *School of Basic Medicine and Biological Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, Jiangsu, China*)

Abstract: As a model and typical representative of Lepidoptera, molecular mechanism of sex-determination in silkworm is research hotspot in recent years, Moreover, an understanding of the sex-determination mechanism may provide foundation for man to raise male silkworm and control pests biologically. The progresses in sex-determination, sex-chromosomes, sex-determining genes of silkworm are reviewed at home and abroad. Several problems in current research and prospects in this field are discussed.

Key words: *Bombyx mori*; sex-determination; sex-chromosome; gene

(*Life Science Research*, 2010, 14(2): 177~183)

性别决定与分化是两性生物个体正常生存和发育不可缺少的环节,也是种族得以延续的物质基础,生物的许多性状都与性别有密切关系.不同种生物体有不同的性别决定机制,有的通过遗传差异来决定雌性或雄性,有的通过环境条件来决定性别,还有由遗传与环境互作决定的.

家蚕的性别是Z和W染色体来决定的,雌性个体为ZW,雄性为ZZ,W染色体是决定雌性个体所必须的,形成配子时,雌性个体产生含有Z和W两种雌配子,而雄性只产生含有Z一种雄配子,受精卵发育成的个体雌雄比为1:1.生物的染色体是连接个体和分子的桥梁,家蚕的性

别又是由染色体上的基因调控决定的,因此研究性别相关的基因成为研究家蚕性别调控的关键.

家蚕性别决定机制对于家蚕胚胎发生、性别分化、生殖等生理活动过程和机理的研究具有重要意义.对其性别决定遗传基础的深入研究,不但能丰富昆虫,特别是鳞翅目昆虫的性别遗传知识,而且对农业、林业害虫防治产生重要影响,为新型杀虫剂的开发研究提供靶基因.同时,雄蚕较雌蚕体质强健、抗病抗逆性强、蚕茧品质好,叶丝转化率高.研究发现:雄蚕茧的茧层率和鲜茧出丝率要比雌蚕茧高出约20%^[1,2].而在家蚕蚕种生产上,由于雄蛾体质强健、耐冷藏、交

收稿日期: 2009-08-25; 修回日期: 2009-10-28

基金项目: 国家重点基础研究发展计划“863”项目(2006AA10A118); 江苏省高校自然科学基金项目(07KJB230102)

作者简介: 谢再东(1984-),男,江苏海安人,硕士研究生,主要从事家蚕蛋白质组学研究, E-mail: sudaxzd@126.com; *通讯作者: 沈卫德(1950-),男,江苏启东人,苏州大学教授,博士生导师,主要从事动物资源与功能基因组学方面的研究, E-mail: shenwd@suda.edu.cn.

配时可以重复使用,所以在制种业上又希望提高雌蚕比例来达到提高蚕卵产量的目的.因此家蚕性别调控机理的研究将为蚕丝产业技术水平和生产效益的大幅度提高奠定理论和技术基础,促进我国蚕丝业健康、高效地发展.

目前家蚕性别调控的研究主要是运用比较基因组学的方法,依据果蝇性别决定级联网络上的基因在家蚕 EST 数据库中找同源基因.在家蚕基因组测序完成之前,初步研究了 *Dsx* (*Doublesex*)、*Sxl* (*Sex-lethal*) 和 *Fru* (*Fruitless*) 等基因.目前 Silkbase 数据库中大约有 20 000 条家蚕 EST 序列,并且提供所有 EST 序列的同源性分析结果、克隆之间的相似性以及和果蝇数据的比较结果等详细信息^[3].在家蚕基因组测序完成的背景下,国内外在家蚕性染色体和性别决定相关基因的研究上取得了丰硕的成果,本文就家蚕性别决定、性染色体、家蚕性别决定基因的研究概况作一综述.

1 家蚕的性别决定

家蚕性别首先是 1913 年 Tanaka 发现家蚕的遗传交换与果蝇相反,只发生在雄性而见于雌性^[4].Stautevant 根据此种现象提出雄蚕为同配性别,雌蚕为异配性别^[5].1916 年 Tanaka 发现了油蚕的伴性遗传,并且从遗传实验上证明了家蚕性染色体雄为同配型,雌为异配型^[6].谷津(1913 年)报道家蚕染色体数目,雌雄体细胞中均为 56,生殖细胞为 28,以后胜木(1918 年)、小熊(1919 年)、川口(1928 年)等均证实这一说法,且发现卵母细胞的染色体较精母细胞长大^[7],根据以上遗传学及细胞学两方面的研究确认家蚕性染色体为 ZW 型的生物.

2 家蚕的性染色体

2.1 Z 染色体

家蚕 Z 染色体上存在多种表型和重要经济性状的基因.目前研究主要通过分子标记技术对基因在 Z 染色体上进行定位.Suzuki 等研究发现 *T15.180a* 是家蚕 Z 染色体上的功能基因的一部分,并利用差异显示技术克隆了家蚕 *Bmkettin* 基因,采用三点杂交实验将其定位于 Z 染色体上^[8,9].Koike 等在以上的实验基础上,构建了 Z 染色体上一个 320 kb 的 BAC 克隆,除 *Bmkettin* 外,发现了 13 个新基因,在 320 kb 的区域,4 个编码

肌肉蛋白的基因:*Bmkettin*, *Bmtitin1*, *Bmtitin2*, *Bmprojectin*, 它们与 Z 染色体的 *Bmmiple* 基因是簇生的^[10].以上几个基因的研究均发现家蚕雄性中转录本的量大于雌性,证实家蚕剂量补偿的缺失.查幸福等利用微阵列数据库分析了家蚕 Z 染色体上大量的连锁基因在雌雄组织中表达水平的比值,进一步说明家蚕全面的缺失剂量补偿^[11].Fujii 等发现 Z 染色体连锁图谱中总距离 50 cM 包含 15 个形态性状的基因^[12].Yuji 研究构建了 1 018 个基因标记的连锁图谱覆盖了家蚕 27 个常染色体和 Z 染色体^[13].Nagaraja 等利用回交作图群体和 RAPD、SSR、FISSR 标记,以 *od* 隐性基因位点为锚定位点标记,构建了含有 16 个遗传标记总距离为 334.5 cM 的家蚕 Z 染色体连锁图谱,该距离表明这些标记遍布在 Z 染色体上^[14].牛宝龙采用实时定量 PCR 技术,证实 *BmTpi* 基因位于 Z 染色体上^[15].Miao 等通过 6 个 SSR 标记和一个 PCR 标记,把伴性赤蚁基因 *Sch* 定位到 Z 染色体^[16].Arunkumar 等研究家蚕的染色体发现:Z 染色体含有的睾丸特异基因较常染色体上的多.进一步分析睾丸特异性基因发现,对雄性有利的基因在 Z 染色体上的富集最初通过与常染色体易位或一些串联重复序列而发生^[17].目前主要通过 RAPD 等分子标记技术对家蚕性染色体进行一些研究,运用 RAPD 等分子标记技术在染色体上对基因进行定位,取得了令人满意的成果,但目前只研究了大约其 DNA 分子信息的 2%,许多重要基因的定位有待于进一步研究.

2.2 W 染色体

W 染色体决定家蚕雌性性别,但迄今为止还没有一个形态特征的基因定位在上面.Sahara 等利用家蚕的 W 染色体细菌人工染色体片段和雌性基因组 DNA 作为探针,进行 FISH 和 GISH.结果表明:W-BAC 探针能和家蚕的整个 W 染色体杂交.雌性基因组 DNA 探针产生的结果与染色体涂染结果相似,支持了 W 染色体能够促进转座子和其它重复序列在基因组中的发生和分散的观点^[18].Abe 已经鉴定了 12 个 W 特异的 RAPD 标记,用 W 特异性的 RAPD 标记序列从大肠杆菌嗜菌体和 BAC 克隆中发现 W 染色体主要由嵌套的转座元件组成,包含许多长末端重复和非长末端重复的反转座子、反转录子、DNA 转座子和它们的衍生物^[19].来自野蚕 W 染色体的序列也由嵌套的反转录转座子组成^[20].在 W 染色体发现

了全长拷贝的非长末端重复反转录转座子 BMC1, 类似于 line-1 元件, 它全长 5 091 bp, 包含 5 非编码区, 2 个可读框和 3 非编码区^[21]. Hasimoto 等通过染色体变异分析, 推测在家蚕 W 染色体上存在一个雌性化基因 *Fem*, 即只要有 W 染色体的存在, 无论 Z 染色体和常染色体的多寡, 个体均发育为雌^[22]. 日本东京大学的 Fujii 等通过 W 染色体上基因的易位或删除其部分基因的实验, 推测雌性化基因 *Fem* 位于 W 染色体的极限区. 最新的研究表明: 在这一区域, 存在许多潜在的 *Fem* 候选基因^[23]. Abe 等最终定位 *Fem* 基因的位置并确定在 W 染色体极限区 W-RIKISHI RAPD 序列是决定雌性性别所必须的^[24]; 并且证实了常染色体和 W 染色体的相互易位, 不管怎么缺失都不会影响 *Fem* 基因的表达, W 染色体上的这些缺失不会包含 *Fem* 基因^[25]. 王慧超等采用 RAPD-PCR 技术对同一品种家蚕雌雄个体基因组 DNA 进行分子标记筛选, 通过 450 种随机引物筛选到 1 条雌特异性的 DNA 片段 OPZ07-355 bp, 将该雌特异片段克隆到载体 pGEM-T 上, 并进行测序和同源性分析, 推测其可能来自于家蚕的 W 染色体^[26]. 虽然通过 FISH 及其衍生技术能够准确的鉴别出 W 染色体, 但 W 染色体上存在大量重复的反转座子元件, 还没有发现任何形态性状的基因, *Fem* 基因的推测距今已经有 70 多年, 但还没有精确定位.

3 家蚕性别决定基因的研究进展

3.1 *Sxl*

Sxl 是果蝇性别级联网络上的主开关基因, *Sxl* 蛋白质属于 RNA 结合蛋白质家族, 与 *Tra* (*Transformer*) mRNA 前体的剪接调节有关^[27], Niimi 等首次在家蚕中发现类似于果蝇的 *Sxl* 的同源体基因并把该基因定位在 16 号染色体上, 实验表明: 这一同源体基因在家蚕体组织中非性别依赖性表达, 推测这一同源体基因在体细胞中并不起性别决定作用^[28,29]. 查幸福等在家蚕中克隆了 *BmSxl* 基因的两种形式 *BmsxlPA* 和 *BmsxlPB* 的研究也支持以上观点, 但发现它们是性别差异性表达的, 组织表达研究发现: *BmsxlPA* 在家蚕幼虫多个组织器官中表达, 其中雄蚕的表达量明显高于雌蚕; 而 *BmsxlPB* 仅在生殖腺中, 雄蚕中表达量也明显高于雌蚕^[30]. 柳学广等克隆了家蚕和野桑蚕 *BmSxl* 基因, 研究家蚕 *BmSxl* 基因的时

空差异性表达发现: *BmSxl* 基因在卵的胚胎中活化启动时间与果蝇的 *Sxl* 基因相近; 性别差异性表达发现卵期雌雄表达也存在差异, *BmSxl* 基因在雌卵中特异性表达^[31]. 宋艳等克隆了野桑蚕 2 条 *Bmand-Sxl* 基因序列, 并且对其中一条进行了原核表达^[32]. 虽然 *Sxl* 不是家蚕级联网络的主开关基因, 但其到底是否在家蚕性别调控中起作用还需进一步研究.

3.2 *Snf* (*Sans-fille*)

果蝇 *Sxl* 转录除了受自身的调控外, 还受到 *Snf*, *Fl* (2)*d*, *Vir* 基因的调控. 赵敏等利用 EST 序列和基因组序列成功克隆了家蚕 *Snf* 基因, 与基因组比对发现有 5 个外显子, 通过 SMART 软件分析发现家蚕 *Snf* 基因和果蝇 *Snf* 基因的 RNA 识别基序 (RRM) 很相似, RT-PCR 分析表明: *Bmsnf* 在家蚕多个组织皆有表达, 不具有组织特异性^[33], 表明家蚕 *Snf* 很可能发挥了类似果蝇 *Snf* 的功能, 参与家蚕的性别调控.

3.3 *Tra-2* (*Transformer-2*)

果蝇中 *Sxl* 基因产物进一步调节下游的性别分化基因, 首先作用于 *Tra*, *Tra* 基因产物和 *Tra-2* 形成复合物识别雌特异性的外显子序列, 参与 *Dsx* pre-mRNA 的剪接. 但在家蚕 EST 数据库中没有发现与果蝇同源的 *Tra*, 只发现了 *Tra-2*, *Tra-2* 基因已在哺乳动物、鸟类及昆虫等多种生物中发现, 其编码的蛋白质含有一个 RNA 识别基序 (RRM)、两个富含精氨酸与丝氨酸富含结构域 (RS). 牛宝龙等克隆了该基因, 发现其在家蚕的雌性和雄性的整个周期中均表达, 家蚕 *Tra-2* 的 pre-mRNA 可以选择性剪接产生 6 种不同的 mRNA, 编码 6 种不同的 *Tra-2* 蛋白亚型, 并证明与果蝇 *Tra-2* 蛋白具有高度的组织相似性^[34]. 并且查幸福等鉴定了家蚕 *Bmtra2* 基因的 3 种 mRNA 形式, 分别命名为 *Bmtra2-PA*, *Bmtra2-PB* 和 *Bmtra2-PC*, 发现家蚕 *Bmtra2* 与果蝇 *Tra-2* 在基因结构和蛋白质相似程度方面都很保守. 由以上推测家蚕 *Bmtra2* 可能执行调控性别功能^[22].

3.4 *Rbp1*

Tra-2 和 *Rbp1* 二聚体形成复合物在果蝇 *Dsx* mRNA 成熟过程中也参与 pre-mRNA 的剪接. 王子龙等克隆了家蚕 *Bmrpb1* 基因, 其 N 端含有一个 RRM, C 端含有一个 RS 结构域, 氨基酸序列比对分析表明 *Bmrpb1* 与果蝇 *rbp1* 的氨基酸序列相似性达到 77%, 与基因组比对分析表明

Bmrpb1 由 5 个外显子和 4 个内含子组成. RT-PCR 结果表明: *Bmrpb1* 基因在所检测的家蚕雌雄各组织中均有表达. 荧光定量 PCR 分析表明: *Bmrpb1* 在家蚕雌雄中并无表达差异^[35]. 其进一步研究发现 *Bmrpb1* 前体 mRNA 可以选择性剪接成 4 种成熟的 mRNA, 分别为 *Bmrpb1-PA*、*Bmrpb1-PB*、*Bmrpb1-PC* 和 *Bmrpb1-PD*. 序列分析发现: *Bmrpb1-PA* 和 *Bmrpb1-PD* 包含 N 端的 RRM 并且包含 C 端 RS 结构域, 而 *Bmrpb1-PB* 和 *Bmrpb1-PC* 仅仅有 1 个 N 端的 RRM. RT-PCR 表明: *Bmrpb1-PA* 在所有的组织中, 并且在不同的发育时期均表达, 而 *Bmrpb1-PB* 在这些组织和不同的时期基本不表达. *Bmrpb1-PA* 和 *Bmrpb1-PB* 不存在性别差异表达, 而 *Bmrpb1-PC* 和 *Bmrpb1-PD* 难以检测^[36]. 潘敏慧等对家蚕 *Bmrpb1* 基因进行了荧光原位杂交研究, 发现该基因位于常染色体上且其在基因组中是单拷贝的, 这与果蝇的 *Rbp1* 基因相似^[37].

3.5 Fru

果蝇 *Tra* 和 *Tra-2* 复合物调控 *Dsx* pre-mRNA 的剪接同时也调控 *Fru* 基因 pre-mRNA 的剪接, 决定神经系统的性别. Ohbyaashi 等在 EST 数据库中已找到了其在家蚕中的同源体基因. 与果蝇的 *Fru* 一样, 家蚕 *Fru* 同源体产生了许多 mRNA 的同工型, 但还没有发现由家蚕基因同源体所产生的性别特异性的 mRNA 和蛋白质^[20].

3.6 Dsx

Tra/tra-2, *Rbp1* 组成的复合物调节下游性别分化基因 *Dsx*, *Dsx* 作为果蝇性别分化的末端的主开关基因. Ohbayashi 等分析家蚕 EST 时, 发现了家蚕的 *Dsx* 基因, Southern 印迹表明: 家蚕的 *Dsx* 在基因组中是单拷贝的. *Bmdsx* 转录本选择性剪接形成雄性和雌性特异的 mRNA, 这些性别特异性 mRNA 编码的多肽具有相同的氨基端序列但羧基端序列是性别特异的, 并且雄性特异性的 cDNA 缺少雌性的 713~961 的碱基^[38]. Suzuki 等进行序列分析进一步揭示了 *Bmdsx* pre-mRNA 的性别特异性剪接机制: *Bmdsx* 阅读框包含 5 个外显子, 外显子 3 和 4 特异性地组成到雌性 *Bmdsx* mRNA, 而外显子 2 连接到外显子 5 产生雄性特异性的 *Bmdsx* mRNA. 另外在含有 Hela 细胞核提取物的体外剪接显示雌性型 *Bmdsx* mRNA 出现缺失剪接^[39]. 他们进一步研究发现家蚕雌性中 *BmDSXF* 蛋白的表达导致雄特异性表

达的信息素结合蛋白基因表达的抑制而表达卵黄蛋白原基因, 证实 *BmDSXF* 蛋白绑定了卵黄蛋白原基因的转录起始位点 -95~ -89 bp 的 ACATTGT 的区域^[40]. 而家蚕雌性中 *BmDSXM* 蛋白的表达导致雌性特异性表达基因卵黄蛋白原的阻遏并且导致信息素结合蛋白的激活^[41]. 因此最终得出结论: *Bmdsx* 基因在家蚕性别决定级联过程中是处于末端的双开关基因.

3.7 Ix (Intersex)

果蝇中, *Dsx* 基因表达的蛋白和 *Ix* 基因、*Her* 基因的共同作用下, 诱导雌性分化. Mark 利用黑腹果蝇 *Ix* 的序列在家蚕 EST 数据库中进行 tblastn 比对鉴定了家蚕 *Ix* 基因, 并首次克隆了该基因^[42]. 后来查幸福等通过家蚕 EST 与基因组比对, 鉴定了家蚕 *Bmix* 的两种 mRNA 形式: *Bmix-PA* 和 *Bmix-PB*, *Bmix-PA* 具有 8 个外显子, *Bmix-PB* 有 7 个外显子, *Bmix-PB* 比 *Bmix-PA* 多了第 4 个外显子. 研究发现: *Bmix-PB* 在家蚕精巢和卵巢中都有表达, *Bmix-PA* 只在精巢中表达, 卵巢中不表达, 由此推测 *Bmix* 基因是性别差异表达基因, 可能在家蚕性别决定中起重要作用^[22].

3.8 性别分化过程中的末端基因

果蝇 *Dsx* 蛋白仅仅知道是调节卵黄原蛋白基因 *yp1*、*yp2*、*yp3* 的转录. 在家蚕中只发现了少数几个基因可能是性别决定基因的候选靶基因. 雌蚕中特异表达的蛋白中, 首先是编码卵黄原蛋白(卵黄蛋白的前体)基因, 被定位在常染色体上^[43,44]; 第 2 个是编码贮藏蛋白 SP1 的基因, SP1 位于第 23 号染色体上, 直到四龄幼虫, 在雌雄两性中都转录 SP1 基因, 而在 5 龄时却只在雌性中转录^[45]. 第 3 个是与果蝇的卵黄原蛋白基因同源的编码卵特异蛋白的 ESP 基因, ESP 基因位于第 19 号染色体上且只在卵巢的卵泡细胞中转录. 另一方面, 在雄蚕中也存在几种特异蛋白. 第 1 个是 Mita 等 1995 年分离出一种编码 Beta 微管蛋白的 cDNA, 通过 Northern 分析发现其表达产物是一种在蛹期特别活跃的精巢特异微管蛋白^[46]; 第 2 个是 Sandler 等发现雄蛾触角中有专一传送雌蛾发出的性信息素蚕醇的结合蛋白^[47].

3.9 性别决定基因的研究策略

目前, 依据果蝇性别决定网络上的基因在家蚕基因组数据库中找同源基因, 比较基因序列与果蝇的同源性, 分析其在各个组织的表达情况,

判断基因与家蚕性别调控的关系。在性别决定基因中,只有 *Dsx* 基因被证明是家蚕性别决定级联过程的候选基因,其余的基因是否与性别决定有关还有待于进一步研究。果蝇 *Sxl* 基因突变将引起雌性个体发生性别转换,家蚕 *Sxl* 基因突变的研究对于确定其在家蚕性别调控中的作用将有重要意义。同时调控 *Sxl* 基因的 *Snf* 基因在果蝇中突变将引起 *Sxl* 基因的转录物发生雄特异性拼接,导致果蝇胚胎死亡,家蚕中 *Snf* 基因突变是否也有致死作用,值得深入研究。家蚕 W 染色体虽然存在大量重复反转座子但 *Fem* 基因却是决定家蚕雌性性别所必须的, *Fem* 基因有可能执行类似于果蝇 *Sxl* 基因的功能,可能 *Fem* 基因遏制了 Z 染色体上的等位基因的表达,这些推测需要实验的验证。家蚕中缺少 *Tra* 基因,并且 *Bmdsx* 基因上雌性特异性内含子不显示弱 3' 剪接位点,且在雌性特异性外显子中也没有发现 *Tra/Tra-2* 结合位点相关序列,即使在其它区域也没有。虽然发现 *Dsx* 基因也是家蚕的末端双开关基因,但与果蝇相比, *Dsx mRNA* 剪接模式不同,家蚕雌是默认的,决定了从 *Tra-2* 性别分化基因开始,与果蝇的性别调控有较大的区别,因此家蚕中从 *Tra-2* 到 *Dsx* 之间的级联网络之间基因的研究就需要寻求新的解决方法。果蝇中,选择性剪接在性别调控级联网络中起着重要的作用,至少有 4 个关键基因 *Sxl*、*Tra*、*Dsx*、*Fru* 通过选择性剪接最终决定果蝇雄性、雌性性别特征的表达。目前在家蚕中只发现 *Dsx* 基因是性别决定级联过程的候选基因,同样是通过选择性剪接最终决定雌雄的分化,查幸福通过家蚕 EST 与基因组序列比对发现 277 个选择性剪接的形式,其中 74% 定位于编码蛋白的区域,改变蛋白质产物,而 26% 的位于非编码区^[48],预测在这些选择性剪接的形式中存在几个关键基因,在家蚕中从 *Fem* 到 *Dsx* 之间的级联反应中起着重要的作用,寻找需要大量的重复性工作。

4 展望

家蚕性别决定机制,从最初推测的 *Fem* 基因,到发现 *Dsx* 基因为末端双开关基因,这之间一系列参与家蚕性别决定的基因的分离和克隆以及调控网络,进展缓慢,至今仍然还在探索中。基因是遗传信息的载体,而蛋白质是生命活动的执行体,通过蛋白质的研究可了解基因的表达调

控模式。随着科学技术的飞速发展,家蚕蛋白质组的研究目前已经逐步展开并且取得可喜的成绩^[49],在一定程度上弥补了功能基因组研究的不足。但是关于性别差异蛋白质组研究较少,夏佳音等研究家蚕孤雌生殖蚁蚕和正常蚁蚕的总蛋白质的差异,得到与孤雌生殖相关的差异蛋白点,3 个差异蛋白为热休克相关蛋白,5' RACE 的方法克隆到 3 个差异蛋白的全基因序列,并对它们进行结构和特征分析^[50]。于威等研究家蚕孤雌生殖的总蛋白质,和正常家蚕卵总蛋白进行比较分析得出家蚕卵中可能与孤雌生殖相关的差异蛋白点,并得到了一个与家蚕蛋白折叠相关的钙结合蛋白 *ERp57*。根据已有的 cDNA 文库,从家蚕蛹中克隆得到的 *ERp57* 基因的 cDNA。利用各种生物信息学的方法和工具,对这个基因的核酸水平和蛋白质水平进行了详细的分析^[51]。毛立明等研究家蚕蛹期雌雄生殖腺蛋白质双向电泳,发现家蚕雌雄生殖腺的蛋白质差异,检测到多个特异性蛋白斑点,比较了雌雄共有蛋白斑点量值上的差异,并对它们的分布进行了统计分析^[52]。徐秋云等比较了温敏性品种雌雄蚁蚕可溶性蛋白质和难溶性蛋白质的双向电泳图谱,结果表明雌雄蚁体的蛋白组成存在差异^[53]。双向电泳、质谱分析和生物信息学等新技术有可能为将来研究家蚕性别调控提供一个新的研究路径。

参考文献(References):

- [1] 牛虹. 蚕桑生产新技术: 专养雄蚕[J]. 农村新技术(NIU Hong. Sericulture production of new technologies: male silkworm raising[J]. New Technology in Country), 2006, 1: 16-16.
- [2] 项美华, 庄大桓, 何家禄, 等. 雌雄蚕若干生理特性的研究[J]. 蚕业科学(XIANG Mei-hua, ZHUANG Da-huan, HE Jia-lu, et al. The research on a number of physiological characteristics in male and female silkworm[J]. Acta Sericologica Sinica), 1982, 8(1): 20-25.
- [3] 蔡明文, 房丽秀, 司马杨虎. 家蚕 EST 数据库的应用现状及展望[J]. 江苏蚕业(CAI Ming-wen, FANG Li-xiu, SIMA Yang-hu. Application actuality and prospect of EST library in the study of *Bombyx mori*[J]. Jiangsu Sericulture), 2007, 29(3): 9-12.
- [4] 向仲怀. 家蚕遗传育种学[M]. 北京: 农业出版社(XIANG Zhong-huai. Silkworm Genetics and Breeding Science [M]. Beijing: Agricultural Press), 1994. 24-35.
- [5] STURTEVANT A H. No crossing over in the female of the silkworm moth[J]. Am Naturalist, 1915, 49: 42-44.
- [6] TANAKA Y. Genetic studies on the silkworm[J]. J Coll Agric Sapporo, 1916, 7: 129-255.
- [7] 吕鸿声. 中国养蚕学[M]. 上海: 上海科学技术出版社(LÜ Hong-sheng. The Sericultural Science in China [M]. Shanghai:

- Shanghai Scientific and Technical Press), 1990. 229-245.
- [8] SUZUKI M G, SHIMADA T, KOBAYASHI M. Absence of dosage compensation at the transcription level of a sex-linked gene in a female heterogametic insect, *Bombyx mori*[J]. Heredity, 1998, 81(3): 275-283.
- [9] SUZUKI M G, SHIMADA T, KOBAYASHI M. Bm kettin, homologue of the *Drosophila* kettin gene, is located on the Z chromosome in *Bombyx mori* and is not dosage compensated [J]. Heredity, 1999, 82(2): 170-179.
- [10] KOIKE Y, MITA K, SUZUKI M G, *et al.* Genomic sequence of a 320 kb segment of the Z chromosome of *Bombyx mori* containing a kettin ortholog[J]. Mol Genet Genomics, 2003, 269: 137-149.
- [11] ZHA Xing-fu, XIA Qing-you, DUAN Jun, *et al.* Dosage analysis of Z chromosome genes using microarray in silkworm, *Bombyx mori*[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2009, 39(5): 315-321.
- [12] FUJII H, BANNO Y, DOIRA H, *et al.* Genetical Stocks and Mutations of *Bombyx mori*: Important Genetic Resources[M]. Fukuoka, Japan: Institute of Genetic Resources, Kyushu University, 1998.
- [13] YUJI Y. A dense genetic map of the silkworm, *Bombyx mori*, covering all chromosomes based on 1018 molecular markers[J]. Genetics, 2005, 150(4): 1513-1525.
- [14] NAGARAJA G M, MAHESH G, SATISH V, *et al.* Genetic mapping of Z chromosome and identification of W chromosome-specific markers in the silkworm, *Bombyx mori*[J]. Heredity, 2005, 95(2): 148-157.
- [15] 牛宝龙, 吕顺霖, 翁宏飏, 等. 家蚕 BmTpi 基因 Z 染色体定位[J]. 昆虫学报(NIU Bao-long, LÜ Shun-lin, WENG Hong-biao, *et al.* Localization of the Tpi gene on Z chromosome of the silkworm, *Bombyx mori* by real-time quantitative PCR[J]. Acta Entomologica Sinica), 2005, 48(4): 622-626.
- [16] MIAO Xue-xia, LI Wei-hua, LI Mu-wang, *et al.* Inheritance and linkage analysis of co-dominant SSR markers on the Z chromosome of the silkworm (*Bombyx mori* L)[J]. Genet Res, 2008, 90(2): 151-156.
- [17] ARUNKUMAR K P, MITA K, NAGARAJU J. The silkworm Z chromosome is enriched in testis-specific genes[J]. Genetics, 2009, 182(2): 493-501.
- [18] SAHARA K, YOSHIDO A, KAWAMURA N. W-derived BAC probes as a new tool for identification of the W chromosome and its aberrations in *Bombyx mori*[J]. Chromosoma, 2003, 112(1): 48-55.
- [19] ABE H, MITA K, YASUKOCHI Y, *et al.* Retrotransposable elements on the W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori* [J]. Cytogenet Genome Res, 2005, 110(1): 144-151.
- [20] ABE H, SUGASAKI T, TERADA T, *et al.* Nested retrotransposons on the W chromosome of the wild silkworm *Bombyx mandarina*[J]. Insect Molecular Biology, 2002, 11(4): 307-314.
- [21] ABE H, OHBAYASHI F, SHIMADA T, *et al.* A complete full-length non-LTR retrotransposon, BMC1, on the W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori*[J]. Genes Genet Syst, 1998, 73(6): 353-358.
- [22] HASIMOTO H. The role of the W chromosome in the sex determination of *Bombyx mori*[J]. Japan J Genetics, 1933, 8: 245-247.
- [23] FUJII T, SHIMADA T. Sex determination in the silkworm, *Bombyx mori*: A female determinant on the W chromosome and the sex-determining gene cascade[J]. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2007, 18(3): 379-388.
- [24] ABE H, FUJII T, TANAKA N, *et al.* Identification of the female-determining region of the W chromosome in *Bombyx mori*[J]. Genetica, 2008, 133(3): 269-282.
- [25] ABE H, SEKI M, OHBAYASHI F. Partial deletions of the W chromosome due to reciprocal translocation in the silkworm *Bombyx mori*[J]. Insect Molecular Biology, 2005, 14(4): 339-352.
- [26] 王慧超, 朱勇. 家蚕雌特异分子标记筛选、克隆及其序列分析[J]. 蚕业科学(WANG Hui-chao, ZHU Yong. *Bombyx mori*'s female-specific marker screening, cloning and the sequence analysis[J]. Acta Sericologica Sinica), 2004, 3(1): 34-37.
- [27] TRAUT W, NIIMI T, *et al.* Phylogeny of the sex-determining gene *Sex-lethal* in insects[J]. Genome, 2006, 49(3): 254-262.
- [28] OHBAYASHI F, SUZUKI M G, SHIMADA T, Sex determination in *Bombyx mori*[J]. Current Science, 2002, 83(4): 466-470.
- [29] NIIMI T, SAHARA K. Molecular cloning and chromosomal localization of the *Bombyx Sex-lethal* gene[J]. Genome, 2006, 49(3): 263-268.
- [30] 查幸福. 家蚕 (*Bombyx mori*) 性别决定网络及其关键基因 *BmSxl* cDNA 克隆和功能研究[D]. 重庆: 西南大学(ZHA Xing-fu. Study on Sex-determining Network, and cDNA Cloning and Function of the Key Gene BmSxl in *Bombyx mori* [D]. Chongqing: Southwest University), 2006.
- [31] 柳学广. 家蚕与野桑蚕的 sex-lethal 的比较研究[D]. 苏州: 苏州大学 (LIU Xue-guang. Studies on Sex-lethal Gene of *Bombyx mori* and *Bombyx mandarina*[D]. Suzhou: Soochow University), 2007.
- [32] 宋艳, 柳学广, 司马杨虎, 等. 野桑蚕 *Bmand-Sxl* 基因的克隆及原核表达[J]. 江苏蚕业(SONG Yan, LIU Xue-guang, SIMA Yang-hu, *et al.* Cloning and prokaryotic expression of Bmand-sxl in *Bombyx mandarina*[J]. Jiangsu Sericulture), 2009, 31(1): 14-18.
- [33] 赵敏, 刘劲, 朱虹, 等. 家蚕 sans fille 基因的分子克隆及序列分析[J]. 蚕业科学(ZHAO Min, LIU Jin, ZHU Hong, *et al.* Cloning and sequence analysis of the *Bombyx mori* snf gene[J]. Acta Sericologica Sinica), 2006, 32(1): 6-11.
- [34] NIU Bao-long, MENG Zhi-qi, TAO Yue-zhi. Cloning and alternative splicing analysis of *Bombyx mori* Transformer-2 gene using silkworm EST database[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2005, 37(11): 728-736.
- [35] 王子龙. 家蚕性别决定相关基因 *Bmrbp1* 的克隆及原核表达 [D]. 重庆: 西南大学 (WANG Zi-long. Cloning and prokaryotic expression of the *Bombyx mori* Bmrbp1 gene, related to the sex determination[D]. Chongqing: Southwest University), 2006.
- [36] WANG Z, ZHA X, HE N, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of Bmrbp1, the *Bombyx mori* homologue of the *Drosophila* gene rbp1 [EB/OL]. Mol Biol Rep, 2009-09-04.
- [37] 潘敏慧, 王强, 沈以红, 等. Bmrbp1 基因在家蚕染色体上的定位 (简报)[J]. 分子细胞生物学报 (PAN Min-hui, WANG Qiang, SHEN Yi-hong, *et al.* Mapping of Bmrbp1

- gene in silkworm chromosome[J]. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2007, 40(5): 365-370.
- [38] OHBAYASHI F, SUZUKI M G, MITA K, *et al.* A homologue of the *Drosophila* doublesex gene is transcribed into sex-specific mRNA isoforms in the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Comp Biochem and Physiol Part B*, 2001, 128(1): 145-158.
- [39] SUZUKI M G, OHBAYASHI F, MITA K, *et al.* The mechanism of sex-specific splicing at the doublesex gene is different between *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2001, 31(12): 1201-1211.
- [40] SUZUKI M G, FUNAGUMA S, KANDA T, *et al.* Analysis of the biological functions of a doublesex homologue in *Bombyx mori* [J]. *Dev Genes Evol*, 2003, 213(7): 345-354.
- [41] SUZUKI M G, FUNAGUMA S, KANDA T, *et al.* Role of the male BmDSX protein in the sexual differentiation of *Bombyx mori* [J]. *Evol Dev*, 2005, 7(1): 58-68.
- [42] SIEGAL M L, BAKER B S. Functional conservation and divergence of intersex, a gene required for female differentiation in *Drosophila melanogaster* [J]. *Dev Genes Evol*, 2005, 215(1): 1-12.
- [43] YANO K, SAKURAI M T, IZUMI S, *et al.* Vitellogenin gene of the silkworm, *Bombyx mori* structure and sex-dependent expression [J]. *FEBS Lett*, 1994, 356: 207-211.
- [44] YANO K, SAKURAI M T, WATABE S, *et al.* Structure and expression of mRNA for vitellogenin in *Bombyx mori* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1994, 1218(1): 1-10.
- [45] SAKURAI H, FUJII T, IZUMI S. Structure and expression of gene coding for sex-specific storage protein of *Bombyx mori* [J]. *Biol Chem*, 1988, 263(16): 7876-7880.
- [46] MITA K, NENOI M, MORIMYO M. Expression of the *Bombyx mori* beta-tubulin-encoding gene in testis [J]. *Gene*, 1995, 162(2): 329-330.
- [47] SANDLER B H, NIKONOVA L, LEAL W S. Sexual attraction in the silkworm moth: structure of the pheromone-binding-protein-bombykol complex [J]. *Chem Biol*, 2000, 7(2): 143-151.
- [48] ZHA X F, XIA Q Y. Detection and analysis of alternative splicing in the silkworm by aligning expressed sequence tags with the genomic sequence [J]. *Insect Molecular Biology*, 2005, 14(2): 113-119.
- [49] 王永强, 靳远祥, 何秀玲, 等. 家蚕蛋白质组研究现状与趋势 [J]. 蚕业科学 (WANG Yong-qiang, JIN Yuan-xiang, HE Xiu-ling, *et al.* The present situation and trend of proteome research in silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Acta Sericologica Sinica*), 2006, 32(4): 541-547.
- [50] 夏佳音, 龙晓辉, 陈健, 等. 家蚕孤雌生殖差异蛋白——热休克相关蛋白的生物信息学分析 [J]. 蚕业科学 (XIA Jiayin, LONG Xiao-hui, CHEN Jian, *et al.* Bioinformatics analysis of heat shock related proteins from differential protein spots associated with parthenogenesis in *Bombyx mori* [J]. *Acta Sericologica Sinica*), 2007, 33(4): 568-573.
- [51] 于威, 聂作明, 王丹, 等. 家蚕孤雌生殖相关蛋白 ERp57 基因的克隆和分析 [J]. 丝绸 (YU Wei, NIE Zuo-ming, WANG Dan, *et al.* Cloning and sequencing analysis of the parthenogenesis related ERp57 gene in *Bombyx mori* [J]. *Silk Monthly*), 2007(8): 23-27.
- [52] 毛立明, 林健荣, 赵峰, 等. 家蚕蛹期雌雄生殖腺蛋白质双向电泳比较分析 [J]. 昆虫学报 (MAO Li-ming, LIN Jian-rong, ZHAO Feng, *et al.* Comparison of proteins from the pupal gonads of silkworms (*Bombyx mori*) of both sexes by two dimensional electrophoresis [J]. *Acta Entomologica Sinica*), 2007, 50(6): 628-633.
- [53] 徐秋云, 林健荣, 毛立明, 等. 温敏性品种雌雄蚕蛋白质双向电泳图谱差异分析 [J]. 昆虫学报 (XU Qiu-yun, LIN Jian-rong, MAO Li-ming, *et al.* Differential analysis of two-dimensional gel electrophoresis profiles for the newly-hatched male and female larvae of a temperature-sensitive silkworm (*Bombyx mori*) variety [J]. *Acta Entomologica Sinica*), 2009, 52(3): 327-338.