

· 农业生物技术 ·

# 家蚕 *BmAKR* 基因家族的鉴定及在蚕卵中的表达分析

龚竞<sup>1,2\*</sup>, 张伟<sup>1,2</sup>, 王清浪<sup>1,3</sup>, 朱子健<sup>2</sup>, 庞家欣<sup>1,3</sup>, 侯勇<sup>1,3</sup>

1 西南大学 资源昆虫高效养殖与利用全国重点实验室, 重庆 400715

2 西南大学蚕桑纺织与生物质科学学院, 重庆 400715

3 西南大学 前沿交叉学科研究院生物学研究中心, 重庆 400715

龚竞, 张伟, 王清浪, 朱子健, 庞家欣, 侯勇. 家蚕 *BmAKR* 基因家族的鉴定及在蚕卵中的表达分析[J]. 生物工程学报, 2023, 39(12): 4982-4995.

GONG Jing, ZHANG Wei, WANG Qinglang, ZHU Zijian, PANG Jiabin, HOU Yong. Genome-wide identification of the *BmAKR* gene family in the silkworm (*Bombyx mori*) and their expression analysis in diapause eggs and nondiapause eggs[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(12): 4982-4995.

**摘要:** 醛酮还原酶超家族(aldo-keto reductase super family, AKRs)具有广泛的底物特异性, 目前尚未见对昆虫 *AKR* 基因家族成员的系统鉴定报道。本研究采用生物信息学手段, 预测了家蚕 (*Bombyx mori*) *AKR* 基因的系统进化、理化性质、染色体定位、保守基序和基因结构, 通过转录组数据和实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR)分析了不同组织时期及不同发育状态蚕卵中 *BmAKR* 基因的表达水平, 并采用 Western blotting 检测了蚕卵中该蛋白的表达量。本研究共鉴定出 11 个 *BmAKR* 基因, 分布在 4 条不同的染色体上, 都具有 *AKR* 家族特有的( $\alpha/\beta$ ) 8 桶保守结构, 理化特征较为相似; 系统进化分析显示, 其可分为 2 个家族(*AKR1* 和 *AKR2*)。转录组数据分析显示, 家族成员基因在不同组织时期中的表达差异较大。进一步分析发现, 一部分 *BmAKR* 基因在非滞育卵的表达量显著高于滞育卵; 但 *BmAKR1-1* 在滞育卵中的表达量却显著高于非滞育卵。蛋白水平的检测发现 *BmAKR1-1* 在滞育卵和非滞育卵的差异变化趋势与 qRT-PCR 结果一致。综上所述, 本研究通过对家蚕 *BmAKR* 家族的鉴定和分析, 筛选出 *BmAKR1-1* 等作为调控蚕卵发育的候选基因, 以便后期对其进行深入研究。

**关键词:** 家蚕; *BmAKR* 基因家族; 滞育卵; 表达分析; 系统进化

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFD1201600); 国家自然科学基金(31872429); 重庆市自然科学基金(cstc2021jcyj-msxmX1166)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFD1201600), the National Natural Science Foundation of China (31872429), and the Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2021jcyj-msxmX1166).

\*Corresponding author. E-mail: gongjing@swu.edu.cn

Received: 2023-02-14; Accepted: 2023-05-23; Published online: 2023-05-30

# Genome-wide identification of the *BmAKR* gene family in the silkworm (*Bombyx mori*) and their expression analysis in diapause eggs and nondiapause eggs

GONG Jing<sup>1,2\*</sup>, ZHANG Wei<sup>1,2</sup>, WANG Qinglang<sup>1,3</sup>, ZHU Zijian<sup>2</sup>, PANG Jiabin<sup>1,3</sup>,  
HOU Yong<sup>1,3</sup>

1 State Key Laboratory of Resource Insects, Southwest University, Chongqing 400715, China

2 College of Sericulture, Textile and Biomass Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

3 Biological Science Research Center, Academy for Advanced Interdisciplinary Studies, Southwest University, Chongqing 400715, China

**Abstract:** The aldo-keto reductase super family (AKRs) has a wide range of substrate specificity. However, the systematic identification of insect AKR gene family members has not been reported. In this study, bioinformatics methods were used to predict the phylogenetic evolution, physical and chemical properties, chromosome location, conserved motifs, and gene structure of AKR family members in *Bombyx mori* (*BmAKR*). Transcriptome data or quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) were used to analyze the expression level of *BmAKR* genes during different organizational periods and silkworm eggs in different developmental states. Moreover, Western blotting was used to detect the expression level of the *BmAKR* in silkworm eggs. The results showed that 11 *BmAKR* genes were identified. These genes were distributed on 4 chromosomes of the silkworm genome, all of which had the ( $\alpha/\beta$ ) 8-barrel motif, and their physical and chemical characteristics were relatively similar. Phylogenetic analysis showed that the *BmAKR* genes could be divided into 2 subgroups (*AKR1* and *AKR2*). Transcriptome data analysis showed that the expression of *BmAKR* genes were quite different in different tissues and periods. Moreover, the expression analysis of *BmAKR* genes in silkworm eggs showed that some genes were expressed significantly higher in nondiapause eggs than in diapause eggs; but another gene, *BmAKR1-1*, was expressed significantly higher in diapause eggs than in nondiapause eggs. The detection of protein level found that the difference trend of *BmAKR1-1* in diapause eggs and non-diapause eggs was consistent with the results of qRT-PCR. In conclusion, *BmAKR1-1* was screened out as candidates through the identification and analysis of the *BmAKR* genes in silkworm, which may regulate silkworm egg development is worthy of further investigation.

**Keywords:** *Bombyx mori*; *BmAKR* gene family; diapause eggs; expression analysis; phylogenetic evolution

醛酮还原酶超家族(aldo-keto reductase super family, AKRs)是一个由 16 个家族(AKR1–AKR16)构成的超家族, 目前被报道的成员已经超过 190 个<sup>[1]</sup>, 广泛分布于原核生物和真核生物中,

包括真菌、植物、动物和人类等。AKRs 主要以 34–37 kDa 大小的单体可溶性蛋白存在, 该家族的酶的特征在于相同的蛋白质折叠——丙糖磷酸异构酶(triose-phosphate isomerase)或

( $\alpha/\beta$ ) 8 桶基序特征<sup>[2]</sup>。AKRs 以烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(磷酸) [nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate)] 为辅因子催化氧化还原反应<sup>[3]</sup>, 且具有广泛的底物特异性, 不仅催化醛和酮、单糖、酮类固醇和前列腺素的还原, 而且还催化羟基类固醇和多环芳烃的反式二氢二醇的氧化<sup>[4]</sup>。

AKRs 成员可被分为乙醛还原酶(aldehyde reductase)、醛糖还原酶(aldose reductase)和羟基类固醇脱氢酶(hydroxysteroid dehydrogenase)等。AKRs 的活性与多种疾病的发生发展密切相关, 在人类疾病如糖尿病、前列腺癌、乳腺癌、胶质瘤和神经母细胞瘤中过度表达受到广泛关注<sup>[5-7]</sup>。同时 AKRs 也是应激反应基因, 在亲电、渗透和氧化应激的反应中发挥重要作用。例如, *PpAKR1* 赋予拟南芥更高的耐盐性<sup>[8]</sup>; 将黏性旱生植物(*Xerophyta viscosa*)的 *ALDRXV4* 表达在烟草中, 该基因增强了烟草对干旱和盐分的抗性<sup>[9]</sup>, 推测 AKRs 可能参与植物对各种逆境胁迫的响应。在昆虫滞育的早期阶段, 已经观察到一些 AKRs 的表达量增加, 如醛糖还原酶和酮糖还原酶<sup>[10]</sup>, 这些酶类是参与山梨醇生成的关键酶, 山梨醇的积累可为昆虫度过外界不利环境做好准备。

家蚕(*Bombyx mori*)是鳞翅目蚕蛾科的代表性昆虫, 由野蚕(*Bombyx mandarina*)驯化而来, 作为一种重要的经济昆虫在我国已经有 5 000 年的饲养历史。同时, 家蚕是一种完全变态昆虫, 一生会经历卵、幼虫、蛹和成虫 4 个阶段。为了规避不良环境(高温、寒冷等), 家蚕的滞育卵产下后并不孵化, 表现为呼吸下降、代谢抑制、发育停滞, 同时抗逆性增加。滞育是一种保护生物体生存和发育的重要生物学机制, 发生在多种生物如鱼类、线虫、昆虫甚至哺乳动物中<sup>[11-14]</sup>。目前, 尚未见对家蚕 *BmAKR* 基因家族成员鉴定及其在滞育过程中对抗逆性影响的报道。

鉴于此, 本研究对家蚕 *BmAKR* 基因家族进

行全基因组鉴定, 对其系统发育、理化性质、保守基序、结构特征及组织时期表达模型等进行分析, 并通过调查滞育卵和非滞育卵中 *BmAKR* 基因家族成员的表达情况, 重点分析调控蚕卵发育的候选基因, 为后续研究该基因在蚕卵发育中的作用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

家蚕品种大造(Dazao)由西南大学蚕桑纺织与生物质科学学院家蚕育种实验室提供。对母代胚胎进行 25 °C 长光照、15 °C 黑暗催青分别获得滞育卵、非滞育卵<sup>[15]</sup>, 蚕卵产下后置于 25 °C 条件下保护, 采集以上 2 种蚕卵产后 0-9 d 材料, 用液氮速冻, 保存于 -80 °C 待用。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 *BmAKR* 家族成员的筛选与鉴定

在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载家蚕基因组及注释信息。通过使用 Pfam 数据库 (<http://www.pfam.xfam.org/>) 搜索 AKR 保守结构域 (PF00248)<sup>[16]</sup>, 利用 TBtools 软件筛选关键结构域<sup>[17]</sup>, 初步确定 *BmAKR* 家族的成员。将得到的蛋白序列通过 SilkDB3.0 (<https://silfdb.bioinfotoolkits.net/main/species-info/-1>)<sup>[18]</sup> 进行检索, 去除冗余, 将候选序列提交到 NCBI 保守结构域数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) 进一步筛选<sup>[19]</sup>, 最终获得 11 个 *BmAKR* 基因的氨基酸序列。*BmAKR* 预选蛋白的所有同源蛋白序列均满足 E-value 值  $< 1 \times 10^{-40}$ 。

#### 1.2.2 *BmAKR* 家族蛋白理化性质的分析

通过 ExPASy 在线数据库 (<http://web.expasy.org/>) 分析 *BmAKR* 家族成员的理论等电点、分子量大小、脂肪族指数、亲水性和不稳定性指数等理化特性<sup>[20]</sup>。通过 SilkDB3.0 预测 *BmAKR* 基因家族成员的亚细胞定位<sup>[18]</sup>。

### 1.2.3 *BmAKR* 家族染色体定位分析

在 NCBI 数据库中获取家蚕 *BmAKR* 基因家族各成员在染色体上的位置信息, 在加州大学圣克鲁兹分校(UCSC)基因组数据库中获取家蚕各染色体长度信息<sup>[21]</sup>, 将上述信息整理并上传至在线网站 MapGene2Chrom ([http://mg2c.iask.in/mg2c\\_v2.1/](http://mg2c.iask.in/mg2c_v2.1/)), 通过该网站在线绘制出家蚕 *BmAKR* 基因染色体定位图<sup>[22]</sup>。

### 1.2.4 *BmAKR* 家族的系统进化树及序列比对分析

为探究 AKRs 家族进化及系统发育关系, 从在线网站 NCBI 下载蛋白序列, 采用 MEGA 11 软件(<http://www.megasoftware.net/>)对人类(*Homo sapiens*)、小鼠(*Mus musculus*)、烟草天蛾(*Manduca sexta*)、草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)、棉铃虫(*Helicoverpa zea*)、野蚕(*Bombyx mandarina*)和家蚕等 18 个物种的 AKRs 家族蛋白序列进行系统进化分析, 并通过邻接比对(neighbor-joining)法以 1 000 重复算法构建系统进化树<sup>[23]</sup>。

利用 Jalview 软件绘制家蚕 *BmAKR* 家族各成员表达蛋白的多序列比对图<sup>[24]</sup>, 并对特征序列进行标记, 利用 NCBI 中 Batch CD-Search 工具分析 *BmAKR* 基因家族的蛋白结构域<sup>[25]</sup>, 并通

过 Adobe Illustrator 软件处理得到可视化图形。

### 1.2.5 *BmAKR* 家族保守基序以及基因结构分析

使用在线软件 MEME (<http://meme-suite.org/tools/meme>)预测 *BmAKR* 家族蛋白序列保守结构域<sup>[26]</sup>, 最大基序数设为 10, 宽度设置为 6–50。采用 GSDS2.0 在线网站(<http://gsds.gao-lab.org/>)绘制家蚕 11 个 *BmAKR* 家族成员的基因结构<sup>[27]</sup>, 对其外显子数/编码区(coding sequence, CDS)进行分析; 利用 TBtools 软件将保守基序和基因结构结果进行可视化。

### 1.2.6 转录组数据及 qRT-PCR 分析 *BmAKR* 家族基因表达模式

在家蚕基因组数据库 SilkDB 3.0 中获取家蚕 *BmAKR* 基因家族各组织时期表达数据, 按组织进行分类处理, 利用 Omic-share (<https://www.omicshare.com/tools/>)在线绘制热图, 以基因进行聚类, 选择列进行归一化处理。采用实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR)的方法进行检测, 利用家蚕 *BmTif-4A* 基因为内参<sup>[28]</sup>, 采用软件 Primer 5.0 设计引物, 每个样本设置 3 个重复<sup>[29]</sup>。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表 1)。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>BmAKR2-1</i>	CGGGAAGACCGTCACTCA	CGTAGGGCTGCCAGAACA
<i>BmAKR2-2</i>	CCACGTCAACTTAGTGCTTATG	GTCTCCAGGTAGTCGATCTTTT
<i>BmAKR2-3</i>	TCGTTCCTTCGGTATTTGA	GACTGTGCGTTTTCTCCTT
<i>BmAKR2-4</i>	CGAGGATTGACGATGAAC	GCACCGACTTGGGTAGAA
<i>BmAKR2-5</i>	CTCAAGGGATAGTTGTGGTG	TGTGGAGGGACTTCGGGAT
<i>BmAKR2-6</i>	TGCTGAAGGAAGGCACTAT	AGCCCATGACTACAACACC
<i>BmAKR2-7</i>	TCCCACTCTAACAGCACTCG	GCCGCTACCTCTTCAAAC
<i>BmAKR2-8</i>	ACTTCAACGAGGAGCAGC	AGACCAGACCGAGCGGAGTA
<i>BmAKR1-1</i>	TGACGAGGAGCAGGATACAA	TCCCGTTACATTCCAGAGC
<i>BmAKR1-2</i>	TGCCACCAGGAGGTAATCGT	GTCCACCTTCATAGTGCCGT
<i>BmAKR1-3</i>	TTAGAACTCCAGCTTAGTCGAC	CGGATTAACCTTCCCTTTGAC
<i>BmTif-4A</i>	CCGTATGCGAAAGGAAATCA	TTGGAAGGTAGAGAGGGAGG

### 1.2.7 Western blotting 检测 BmAKR 蛋白在滞育卵和非滞育卵中的表达

取产后 1–9 d 滞育卵和非滞育卵提取蛋白,并用 Bradford 法测定总蛋白浓度。将蛋白样品按 10  $\mu$ g/孔上样进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳结束后转膜,回收滤纸并将聚偏二氟乙烯膜轻轻放入封闭液中,60 r/min、室温孵育 2 h。加入一抗封闭液(含 1:20 000 体积比的 aldo-keto reductase 1C3/AKR1C3 一抗),室温低速旋转孵育 2 h,结束后,用含有 Tris-HCl、NaCl、Tween-20 三种物质的缓冲液(Tris buffered saline with Tween-20, TBST)洗膜 3 次,每次 10 min;加入二抗封闭液(含 1:20 000 体积比的山羊抗兔二抗),室温低速旋转孵育 1 h,结束后, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,再进行化学发光显影。使用软件 image J 扫描每个条带的灰度值,并以 tubulin 条带的灰度值为内参,计算 BmAKR 蛋白的表达量,实验重复 3 次。

### 1.2.8 统计分析

所有数据结果均使用平均值 $\pm$ 标准差表示,使用 GraphPad Prism 5.0 软件(GraphPad Software Inc.)对数据结果进行统计分析。同时,采用双因素方差分析(two-way analysis of variance, two-way ANOVA)方法来检验不同样品的显著性差异( $P < 0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 BmAKR 基因家族成员鉴定及蛋白理化性质分析

根据 AKRs 结构域模型在家蚕基因组中鉴定获得 11 个 BmAKR 基因家族成员。系统进化分析发现,11 个家蚕 BmAKR 基因可以分为 2 个家族,即 AKR1 和 AKR2 (图 1)。AKR1 含有 3 个基因;AKR2 包含其余 8 个基因,根据它们在染色体上的位置并参照人类 AKR 基因家族命名方式分别命名为 BmAKR1-1、BmAKR1-2、BmAKR1-3

和 BmAKR2-1–BmAKR2-8 (表 2)。其中, BmAKR1-1 与烟草天蛾的 MsAKR1B1 聚在一起(图 1), BmAKR1-2、BmAKR1-3 分别与野蚕的 BmaADH、BmaIE2-L 聚在一起,家蚕的 BmAKR2-1–BmAKR2-8 与其他物种的 AKR2E4 聚在一起。

理化性质分析结果表明, BmAKR 家族成员的氨基酸序列长度为 303–366 aa,相对分子质量在 33.454–42.466 kDa 之间。脂肪族指数分布较均匀,在 85.71–101.00 之间。等电点范围为 5.06–7.52,大部分在 7.00 以下,表明该家族成员大多为酸性蛋白。除了 BmAKR2-1 和 BmAKR2-4 以外,其他成员的不稳定系数均小于 40.00,说明大多数家蚕 BmAKR 蛋白较为稳定,不易降解。平均亲水系数均小于 0,说明家蚕 BmAKR 蛋白均为亲水性蛋白。亚细胞预测其均定位于细胞质(表 2)。

### 2.2 BmAKR 基因家族染色体定位分析

家蚕 BmAKR 基因家族染色体定位分析结果表明,11 个家族成员定位在 4 条染色体上(图 2)。其中,2 号染色体上最多,有 6 个成员,分别是 BmAKR2-1、BmAKR2-2、BmAKR2-3、BmAKR2-4、BmAKR2-5 和 BmAKR2-6;16 号染色体上有 2 个成员: BmAKR2-7 和 BmAKR2-8;24 号染色体上只有 1 个成员为 BmAKR1-1;25 号染色体上有 2 个成员,分别是 BmAKR1-2 和 BmAKR1-3。另外 2 号染色体上的 BmAKR2-1、BmAKR2-2 和 BmAKR2-3,以及 BmAKR2-4、BmAKR2-5,这两组串联排布的 AKR 家族基因的相似度分别达到了 61.82% 和 50.88%。

### 2.3 BmAKR 家族的氨基酸多序列比对分析

为了更清楚地分析家蚕 BmAKR 家族成员的蛋白序列关系,将家族蛋白序列进行比对分析。结果表明,所有成员都具有 AKR 家族特有的( $\alpha/\beta$ ) 8 桶保守结构(图 3),同时发现在 AKR1 和 AKR2 家族间存在差异:在  $\beta_4$  和  $\alpha_4$  结构域

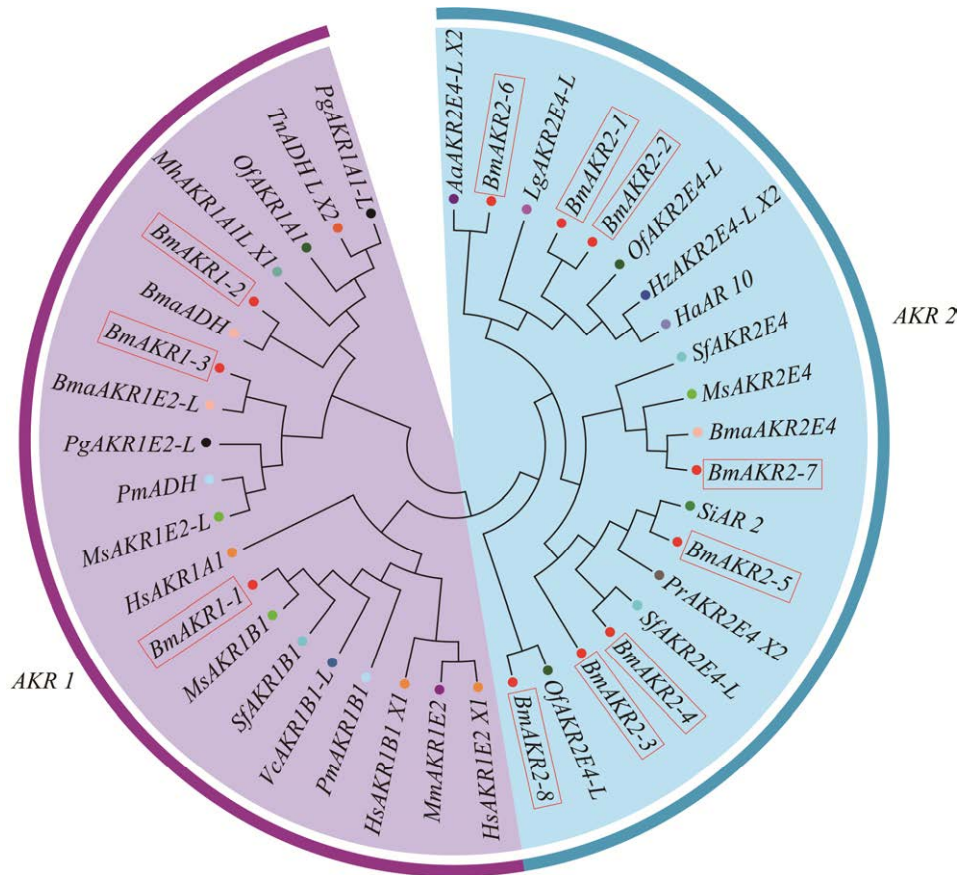


图 1 AKR 基因家族系统进化树

Figure 1 Phylogenetic tree of AKR gene family. Bm: *Bombyx mori*; Bma: *Bombyx mandarina*; Ms: *Manduca sexta*; Sf: *Spodoptera frugiperda*; Hz: *Helicoverpa zea*; Lg: *Leguminivora glycinivorella*; Pr: *Pieris rapae*; Si: *Streltzoviella insularis*; Of: *Ostrinia furnacalis*; Ha: *Helicoverpa assulta*; Pg: *Pectinophora gossypiella*; Mh: *Maniola hyperantus*; Tn: *Trichoplusia ni*; Hs: *Homo sapiens*; Mm: *Mus musculus*; Pm: *Papilio machaon*; Aa: *Aricia agestis*; Vc: *Vanessa cardui*.

表 2 *BmAKR* 基因家族成员鉴定

Table 2 Identification of *BmAKR* gene family members

Gene name	GeneID (SilkDB)	Protein ID (NCBI)	Chromosome No.	Protein length (aa)	Molecular weight (kDa)	pI	Aliphatic index	Average hydrophilic coefficient	Instability index	Subcellular localization
<i>BmAKR2-1</i>	BMSK0000998	XP_004933321.1	2	341	38.974	5.66	95.66	-0.302	40.79	Cytoplasm
<i>BmAKR2-2</i>	BMSK0000999	NP_001303998.1	2	353	39.800	5.06	90.23	-0.296	32.10	Cytoplasm
<i>BmAKR2-3</i>	BMSK0001000	XP_037871552.1	2	338	37.745	6.02	92.25	-0.245	25.74	Cytoplasm
<i>BmAKR2-4</i>	BMSK0001042	XP_037871489.1	2	340	38.892	5.79	97.21	-0.298	41.50	Cytoplasm
<i>BmAKR2-5</i>	BMSK0001043	BCN86447.1	2	331	37.229	7.52	101.00	-0.163	30.21	Cytoplasm
<i>BmAKR2-6</i>	BMSK0001056	XP_004926779.1	2	343	38.986	5.82	90.26	-0.308	35.01	Cytoplasm
<i>BmAKR2-7</i>	BMSK0009262	NP_001296537.1	16	308	33.454	5.46	94.38	-0.297	34.95	Cytoplasm
<i>BmAKR2-8</i>	BMSK0009596	XP_037872269.1	16	305	34.280	6.02	99.02	-0.263	33.75	Cytoplasm
<i>BmAKR1-1</i>	BMSK0014475	ADQ89807.1	24	303	34.168	6.12	96.90	-0.217	34.88	Cytoplasm
<i>BmAKR1-2</i>	BMSK0014846	XP_004921850.1	25	324	36.316	6.77	88.86	-0.337	36.41	Cytoplasm
<i>BmAKR1-3</i>	BMSK0014852	XP_021202876.1	25	366	42.466	7.21	85.71	-0.446	32.93	Cytoplasm

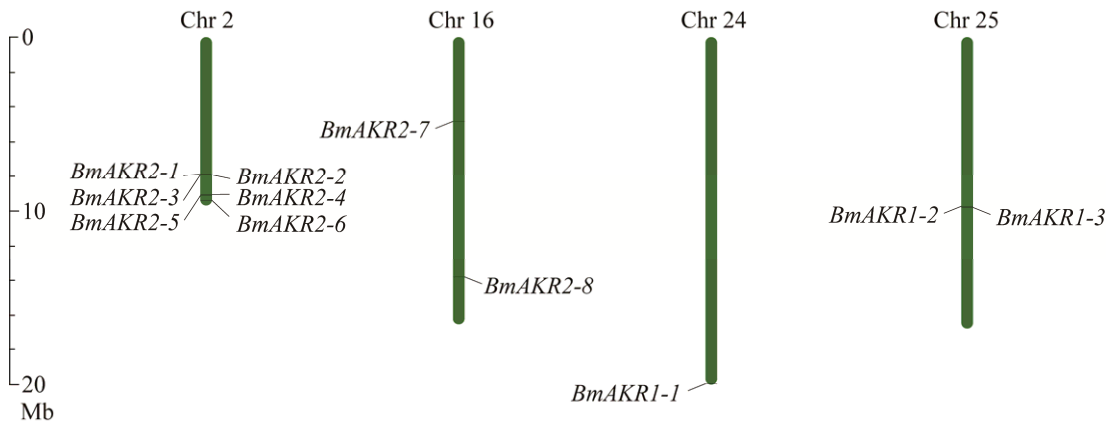


图 2 家蚕 *BmAKR* 基因家族染色体定位分析

Figure 2 Chromosomal location analysis of *BmAKR* gene family members.

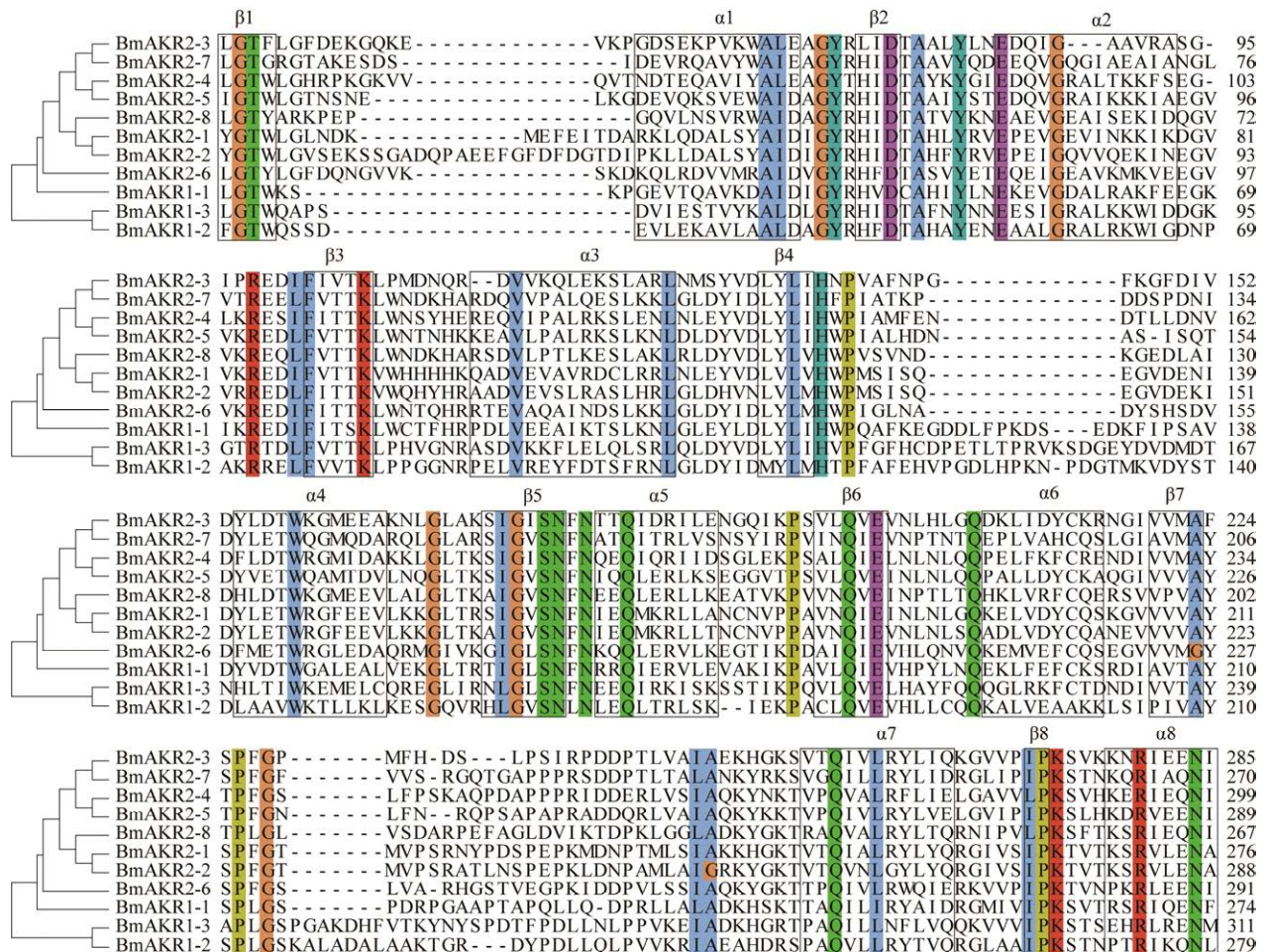


图 3 家蚕 *BmAKR* 家族氨基酸多序列分析

Figure 3 Multiple amino acid sequence analysis of *BmAKR* family members. The conserved  $(\alpha/\beta)_8$ -barrel motif of the AKRs was highlighted in black box, and the conserved amino acids in the columns were highlighted in different colors.

中间的氨基酸序列变化较大,与 AKR2 家族的序列相比,AKR1 家族成员会多出来 10–14 aa;此外,各成员在  $\beta 7$  和  $\alpha 7$  结构域中间序列差异也很大,BmAKR1-2 和 BmAKR1-3 的氨基酸序列不同于其他家族成员。

### 2.4 BmAKR 家族保守蛋白基序分析

基于 MEME 分析设置 10 个基序,分析了家蚕 *BmAKR* 基因编码的氨基酸序列,发现各个成员基序的位置保持一致,均按照 motif 6-motif 3-motif 4-motif 2-motif 5-motif 8-motif 1-motif 7-motif 10-motif 9 的顺序排列(图 4)。所有的 *BmAKR* 基因家族成员均含有 motif 1、motif 2、motif 3、motif 5 和 motif 6。AKR1 家族的基序高度保守,除了共同的基序外还包含 motif 4 和/或 motif 9。而 AKR2 家族中除了共

同的基序外,选择性地增加了 motif 7、motif 8 和 motif 10。其中,BmAKR1-2、BmAKR1-3 增加了 motif 9;BmAKR2-1–BmAKR2-8 增加了 motif 7;BmAKR2-1–BmAKR2-7 增加了 motif 8;BmAKR2-1–BmAKR2-2 增加了 motif 10,而这两个基因也聚为一小支。Motif 4 在除了 BmAKR2-3 以外的其他成员中都存在。

### 2.5 BmAKR 家族基因结构分析

对家蚕 *BmAKR* 家族成员进行基因结构分析,结果表明 *BmAKR* 都具有外显子,除了 *BmAKR2-1* 和 *BmAKR2-2* 基因的 3'端缺失非翻译区(untranslated region, UTR)外,其他成员两端都具有非翻译区(图 5)。*BmAKR* 家族基因的结构具有差异,其中,AKR1 家族外显子数为 6,AKR2 家族外显子数在 5–9 之间。

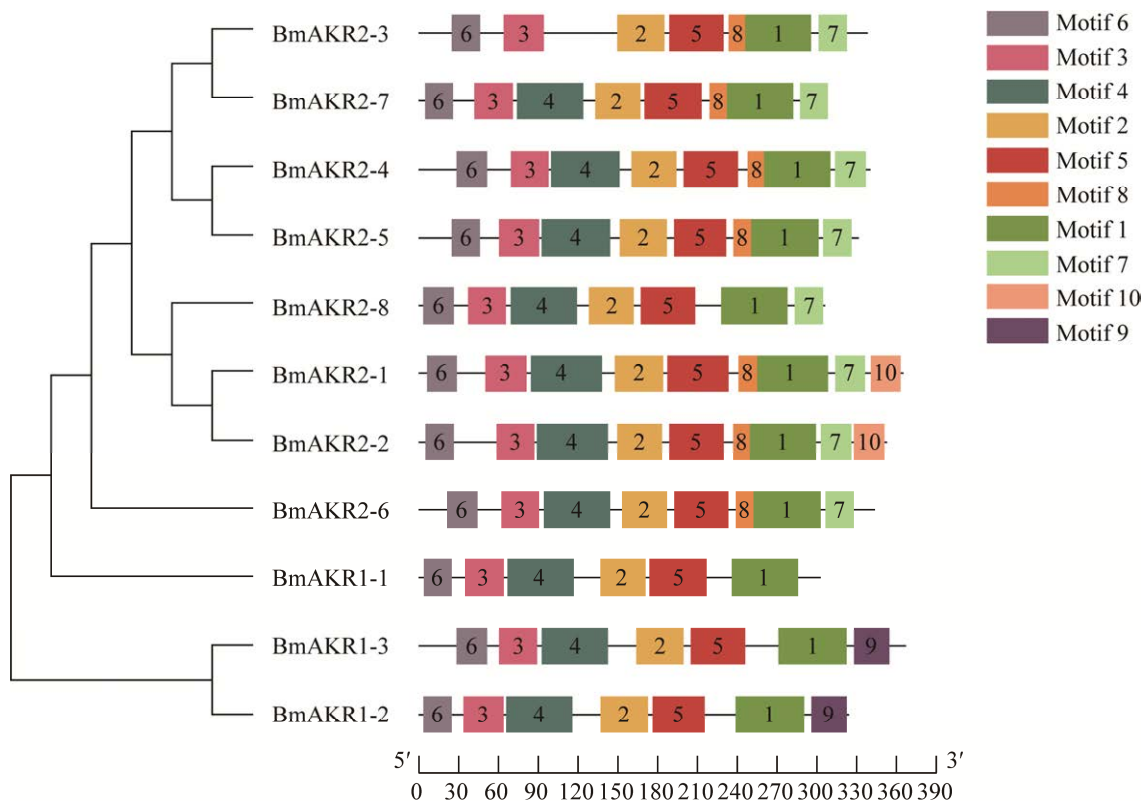


图 4 家蚕 *BmAKR* 蛋白保守基序分析  
Figure 4 Conserved motifs analysis of *BmAKR* proteins.



## 2.6 *BmAKR* 在不同组织器官和发育时期的表达模式分析

为了分析家蚕 *BmAKR* 基因家族在不同组织和发育阶段中的表达模式, 从 SilkDB 3.0 下载家蚕的转录组数据以获得家蚕幼虫表皮、气管、头和丝腺等多个组织的基因表达量, 通过

计算获得每千个碱基的转录每百万映射读取的片段 (fragments per kilobase of exon model per million mapped reads, FPKM) 值, 利用 Omic-share 在线绘制家族成员组织时期表达谱。结果表明, 该家族成员基因在不同时期和组织中的表达差异较大 (图 6): *BmAKR2-3* 和 *BmAKR2-7* 基因

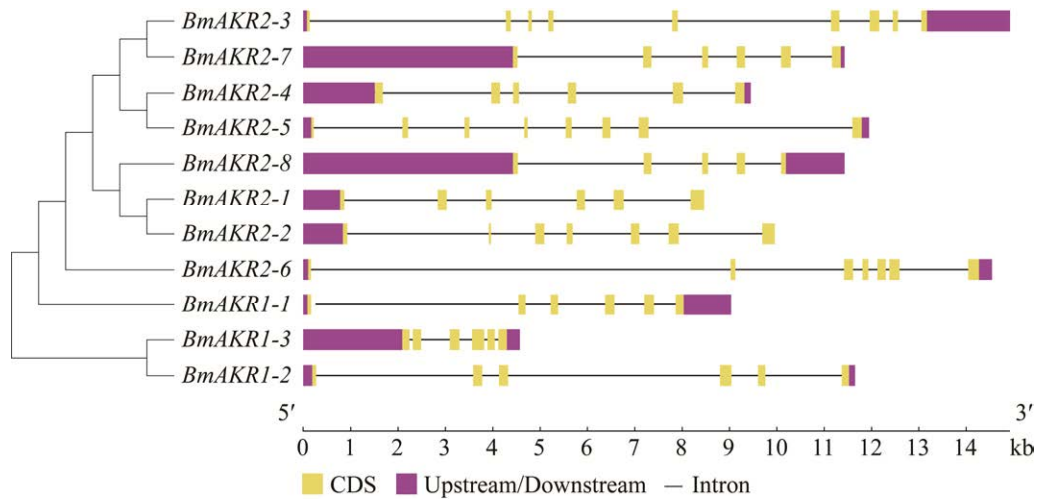


图 5 家蚕 *BmAKR* 基因结构分析

Figure 5 Structural analysis of *BmAKR* gene family members.

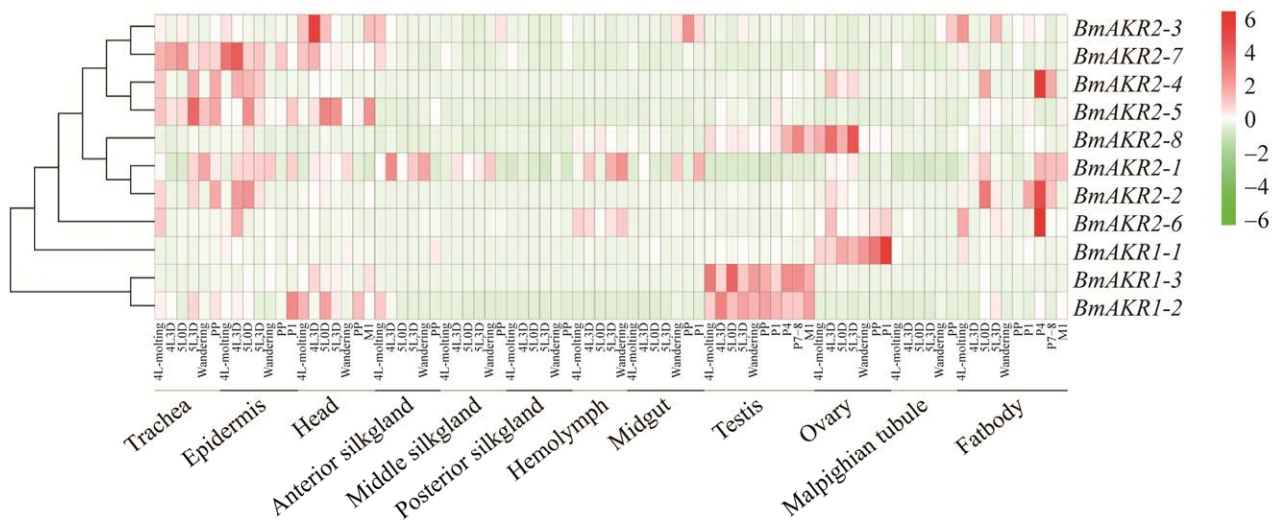


图 6 家蚕 *BmAKR* 基因家族在不同组织和发育阶段的表达模式热图

Figure 6 Heat map of expression pattern of *BmAKR* gene family members in different tissues and developmental stages. 4L-molting: Fourth-larval-molting; 4L3D: 4th-instar-day-3; 5L0D: 5th-instar-day-0; 5L3D: 5th-instar-day-3; Wandering: Wandering stage; PP: Pre-pupa; P1: Pupa-day-1; P4: Pupa-day-4; P7-8: Pupa-day-7-8; M1: Moth-day-1.

虽然聚在一起，但是 *BmAKR2-3* 主要在头部、中肠和马氏管表达，而 *BmAKR2-7* 主要在表皮和气管表达；*BmAKR2-4* 主要在脂肪体、气管、表皮和卵巢表达；*BmAKR2-5* 主要在气管、头部和表皮表达；*BmAKR2-8* 在卵巢和精巢表达；*BmAKR2-1* 在气管、表皮、头部、前部丝腺、中部丝腺、血淋巴和中肠的上簇表达；*BmAKR2-2* 主要在脂肪体和表皮表达；*BmAKR2-6* 在脂肪体、血淋巴和卵巢表达；*BmAKR1-1* 比较特异地在卵巢各时期表达，而 *BmAKR1-3* 则特异地在精巢各时期表达；*BmAKR1-2* 主要在精巢和头部各时期表达。

### 2.7 *BmAKR* 在滞育卵和非滞育卵中的表达分析

为探索家蚕 *BmAKR* 基因家族在蚕卵发育中的作用，采用 qRT-PCR 对滞育卵和非滞育卵中基因表达水平进行相对定量检测。结果显示，一部分基因(*BmAKR2-1*、*BmAKR2-2*、*BmAKR2-3*、*BmAKR2-4*、*BmAKR2-7*、*BmAKR2-8*、*BmAKR1-2* 和 *BmAKR1-3*)在非滞育卵的表达量显著高于滞育卵，并随着发育时间的进行不断增加，在产卵后 5–9 d 达到最高峰(图 7)，一部分基因(*BmAKR2-5* 和 *BmAKR2-6*)在滞育卵和非滞育卵中的表达量总体差异不大，个别时间点出现滞育卵或非

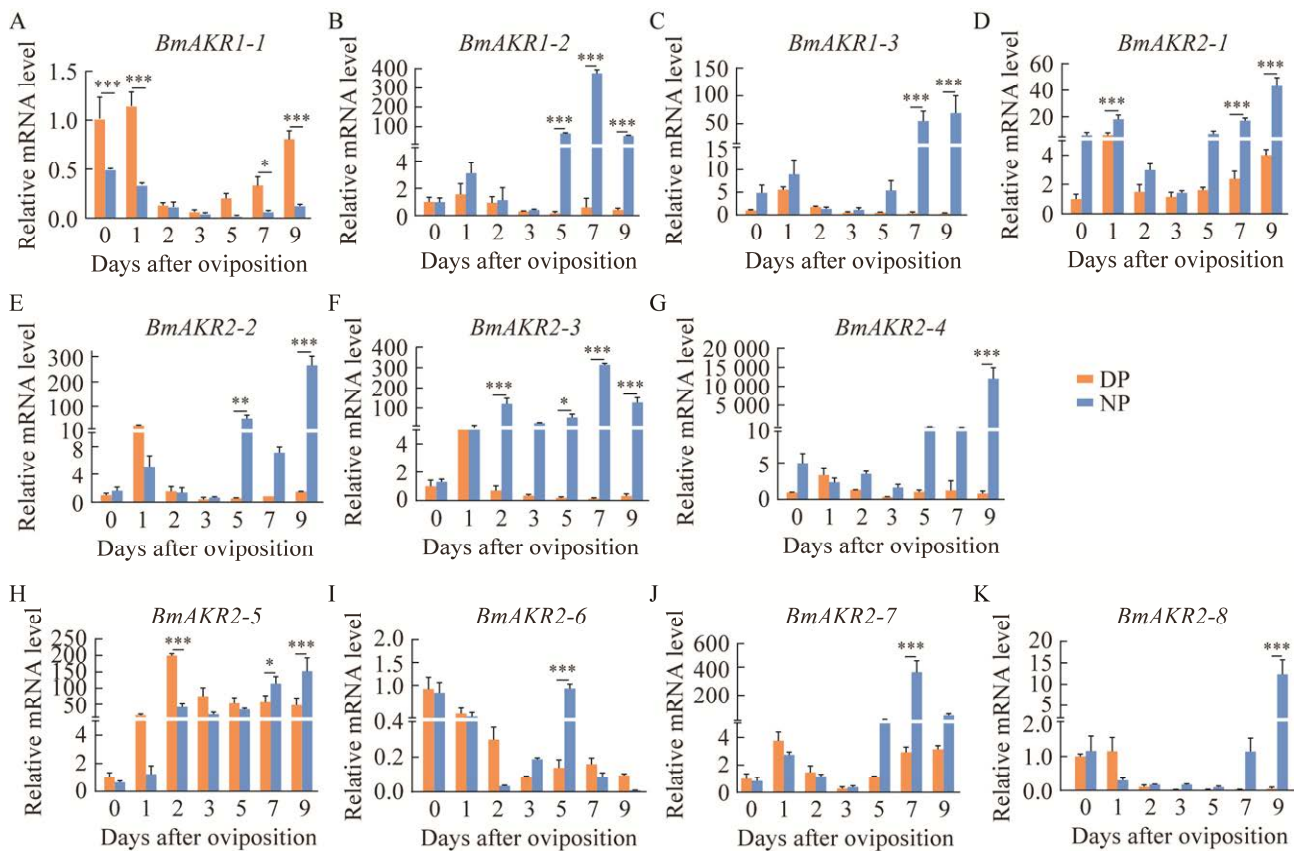


图 7 qRT-PCR 分析家蚕滞育卵和非滞育卵中 *BmAKR* 基因家族成员的表达

Figure 7 qRT-PCR analysis of gene expression of *BmAKR* gene family members in diapause eggs and nondiapause eggs. DP: Diapause eggs; NP: Nondiapause eggs. Relative gene expression was normalized against reference gene *Bmtif-4A* (BMSK0002090). Each point represented  $\bar{x} \pm s$  of three independent replicates. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$  indicated significant difference between two groups.

滞育卵表达量高；还有一个基因比较特别，*BmAKR1-1* 在滞育卵中的表达量显著高于非滞育卵，在滞育卵中产后 0-1 d 表达量最高，随后降低，在产后 5-9 d 又逐渐上升。

## 2.8 Western blotting 检测 BmAKR 蛋白在滞育卵和非滞育卵中的表达

为了进一步地检测 BmAKR 蛋白在滞育卵和非滞育卵中的表达情况，利用抗体对 BmAKR1-1 蛋白进行 Western blotting 分析。结果表明，BmAKR1-1 蛋白在产后 1-9 d 的滞育卵和非滞育卵中都有表达(图 8)，在滞育卵中的表达量高于非滞育卵，并在产后 5-9 d 差异显著；滞育卵中 BmAKR1-1 蛋白在产后 3 d 略微下降，随后又上升，而非滞育卵中 BmAKR1-1 蛋白呈下降趋势。以上结果与 qRT-PCR 检测结果一致，进一步说明了 BmAKR 蛋白在滞育卵和非滞育卵的表达存在差异。

## 3 讨论与结论

本研究在全基因组水平鉴定了 11 个家蚕 *BmAKR* 基因家族成员，由于醛酮还原酶家族的命名主要根据序列相似性而非功能，下载已有报道序列进行系统发育分析，将家蚕 *BmAKR* 基

因划分为 2 个家族，即 *AKR1* 和 *AKR2*<sup>[1]</sup>。*AKR1* 家族的 *BmAKR1-1*、*BmAKR1-2* 和 *BmAKR1-3* 分别与 *MsAKR1B1*、*BmaAD* 和 *HBmaAKR1E2* 聚在一起，其中，*AKR1B1* 属于醛糖还原酶，是家族 1 中的重要组成之一<sup>[4]</sup>；*AKR2* 家族的成员属于 *AKR2E4* 即 3-脱氢蜕皮激素 3b 还原酶 (3-dehydroecdysone 3b-reductase)<sup>[4]</sup>。

BmAKR 蛋白的理化性质相对稳定，亚细胞定位预测均位于细胞质中，符合该家族基因的特征<sup>[30]</sup>。染色体定位分析显示 *BmAKR* 基因分布在 4 条家蚕基因组的染色体上，其中 2 号染色体上的基因最多。保守基序分析发现所有 BmAKR 蛋白预测的 10 个保守基序顺序和位置基本一致，但家族之间基序的组成略有差异，同时，蛋白序列分析发现所有 BmAKR 蛋白都具有 ( $\alpha/\beta$ ) 8 桶保守结构，表明 *BmAKR* 基因在进化过程中相对保守。基因结构分析表明，同一家族的 *BmAKR* 成员外显子数在一定范围内，说明家族成员具有相似的基因结构。

转录组数据表明 *BmAKR* 基因家族成员在不同组织时期的表达具有特异性。其中，有些基因几乎特异地在性腺表达，例如 *BmAKR1-1* 在卵巢各时期表达，*BmAKR1-2* 和 *BmAKR1-3*

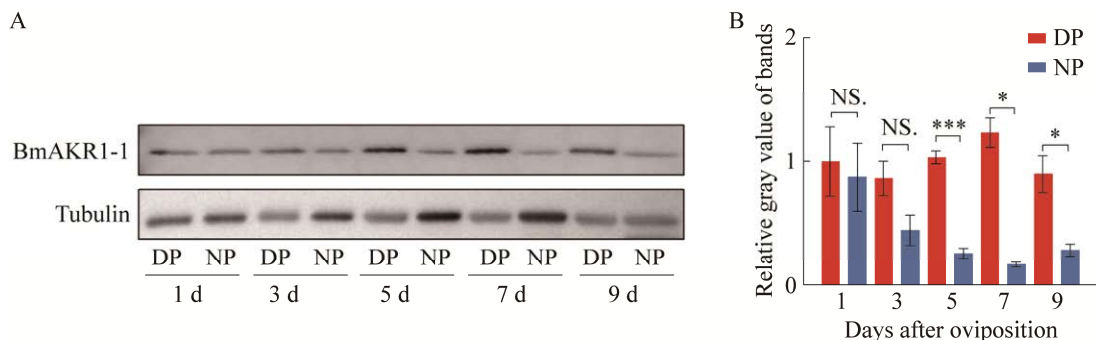


图 8 BmAKR 在家蚕滞育卵和非滞育卵中 Western blotting 检测(A)及灰度值分析(B)

Figure 8 Western blotting detection (A) and gray value analysis (B) of BmAKR in diapause and non-diapause eggs of silkworm. DP: Diapause eggs; NP: Nondiapause eggs. Each point represented  $\bar{x} \pm s$  of three independent replicates. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$  indicated significant difference between two groups. NS. indicated no significant difference between two groups.

在精巢各时期表达, *BmAKR2-8* 在精巢卵巢都有表达。而 *BmAKR2-1* 在性腺以外的各组织时期, 特别是上簇时表达, 之前报道表明 *BmAKR2-1* 在中肠和触角中高表达, 推测可能在减少桑叶的醛中起到解毒作用<sup>[31]</sup>。*BmAKR2-2*、*BmAKR2-4* 和 *BmAKR2-6* 主要在蛹期脂肪体表达, 可能参与家蚕蛹期糖代谢和甘油醛代谢等, 在滞育准备期起关键作用<sup>[32-33]</sup>。尽管 *BmAKR2-1* 和 *BmAKR2-2* 从序列上相似性很高从而聚在一起, 但是表达水平上差异很大。这些表达上的差异预示了该家族成员存在功能差异, 为进一步研究 *BmAKR* 家族提供了理论依据。

*BmAKR* 基因家族成员在不同发育状态的蚕卵中的表达同样具有特异性。通过 qRT-PCR 检测 *BmAKR* 基因在滞育卵和非滞育卵中的表达情况, 发现一类基因在非滞育卵中随着发育的进行逐渐升高, 并且同时期表达量显著高于滞育卵, 如 *BmAKR2-1*、*BmAKR2-2*、*BmAKR2-3*、*BmAKR2-4*、*BmAKR2-7* 和 *BmAKR2-8* 等, 这些基因大多数属于 3-脱氢蜕皮激素 3b 还原酶<sup>[4]</sup>。有研究表明 *BmAKR2-7* 对底物抑制剂 3-脱氢蜕皮酮有强烈活性, 这表明该酶在调节蜕皮激素中起作用<sup>[34-35]</sup>。而蜕皮激素正是非常重要的调控蚕卵发育的激素, 随着蚕卵的发育表达量逐渐上升<sup>[36]</sup>。另一类基因, 如 *BmAKR1-1*, 则在滞育卵中的表达量显著高于非滞育卵, 产后 1 d 后随着滞育的进入逐渐升高。转录组数据显示该基因在蛹期卵巢特异性高表达。通过 Western blotting 检测 *BmAKR1-1* 蛋白在蚕卵中的表达量, 发现该蛋白在滞育卵中的表达量显著高于非滞育卵, 表明在不同发育状态蚕卵中 *BmAKR1-1* 基因的转录水平和翻译水平具有一致性。更为重要的是, *BmAKR1-1* 属于醛糖还原酶, 是多元醇代谢通路中的限速酶, 将葡萄糖转化为山梨醇<sup>[37]</sup>, 而山梨醇正是蚕卵滞育过

程中蓄积的主要糖类物质<sup>[38]</sup>, 此外还发现抑制该基因的表达将导致家蚕体重减轻<sup>[39]</sup>。在无翅红蝽(*Pyrrhocoris apterus*)中, 滞育成虫的该酶的活性是非滞育成虫的 20 倍<sup>[10]</sup>。据此, 推断 *BmAKR1-1* 基因可能在进入滞育卵时的糖代谢过程中起到关键作用。

本文通过对家蚕 *BmAKR* 基因家族的全基因组分析, 从中鉴定了 11 个 *BmAKR* 基因, 其中 *AKR1* 有 3 个, *AKR2* 有 8 个, 并对其进行了相关生物信息学分析, 另外通过调查转录组数据和两种不同发育状态蚕卵的表达情况, 筛选出滞育卵和发育卵中差异基因, 为进一步研究这些基因在蚕卵发育中的功能提供了参考。

## REFERENCES

- [1] PENNING TM. The aldo-keto reductases (AKRs): overview[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2015, 234: 236-246.
- [2] JEZ JM, BENNETT MJ, SCHLEGEL BP, LEWIS M, PENNING TM. Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily[J]. *Biochemical Journal*, 1997, 326(3): 625-636.
- [3] JIN Y, PENNING TM. Aldo-keto reductases and bioactivation/detoxication[J]. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2007, 47: 263-292.
- [4] HYNDMAN D, BAUMAN DR, HEREDIA VV, PENNING TM. The aldo-keto reductase superfamily homepage[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2003, 143/144: 621-631.
- [5] PENNING TM, STECKELBROECK S, BAUMAN DR, MILLER MW, JIN Y, PEEHL DM, FUNG KM, LIN HK. Aldo-keto reductase (AKR) 1C3: role in prostate disease and the development of specific inhibitors[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2006, 248(1/2): 182-191.
- [6] TANG WH, MARTIN KA, HWA J. Aldose reductase, oxidative stress, and diabetic mellitus[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2012, 3: 87.
- [7] QU JY, LI J, ZHANG YM, HE RZ, LIU XT, GONG K, DUAN LL, LUO WH, HU Z, WANG GS, XIA CL, LUO DX. AKR1B10 promotes breast cancer cell proliferation and migration via the PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B

- signaling pathway[J]. *Cell & Bioscience*, 2021, 11(1): 1-13.
- [8] KANAYAMA Y, MIZUTANI R, YAGUCHI S, HOJO A, IKEDA H, NISHIYAMA M, KANAHAMA K. Characterization of an uncharacterized aldo-keto reductase gene from peach and its role in abiotic stress tolerance[J]. *Phytochemistry*, 2014, 104: 30-36.
- [9] KUMAR D, SINGH P, YUSUF MA, UPADHYAYA CP, DEB ROY S, HOHN T, SARIN NB. The *Xerophyta viscosa* aldose reductase (ALDRXV4) confers enhanced drought and salinity tolerance to transgenic tobacco plants by scavenging methylglyoxal and reducing the membrane damage[J]. *Molecular Biotechnology*, 2013, 54(2): 292-303.
- [10] KOSTÁL V, TOLLAROVÁ M, SULA J. Adjustments of the enzymatic complement for polyol biosynthesis and accumulation in diapausing cold-acclimated adults of *Pyrrhocoris apterus*[J]. *Journal of Insect Physiology*, 2004, 50(4): 303-313.
- [11] PODRABSKY JE, HAND SC. Physiological strategies during animal diapause: lessons from brine shrimp and annual killifish[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2015, 218(12): 1897-1906.
- [12] FIELENBACH N, ANTEBI A. *C. elegans* dauer formation and the molecular basis of plasticity[J]. *Genes & Development*, 2008, 22(16): 2149-2165.
- [13] ZHANG XS, WANG T, LIN XW, DENLINGER DL, XU WH. Reactive oxygen species extend insect life span using components of the insulin-signaling pathway[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(37): E7832-E7840.
- [14] SCHNEIDER C, KING RM, PHILIPSON L. Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells[J]. *Cell*, 1988, 54(6): 787-793.
- [15] YAMAHAMA Y, SENO K, HARIYAMA T. Changes in lipid droplet localization during embryogenesis of the silkworm, *Bombyx mori*[J]. *Zoological Science*, 2008, 25(6): 580-586.
- [16] MISTRY J, CHUGURANSKY S, WILLIAMS L, QURESHI M, SALAZAR GA, SONNHAMMER ELL, TOSATTO SCE, PALADIN L, RAJ S, RICHARDSON LJ, FINN RD, BATEMAN A. Pfam: the protein families database in 2021[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(D1): D412-D419.
- [17] CHEN CJ, CHEN H, ZHANG Y, THOMAS HR, FRANK MH, HE YH, XIA R. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [18] LU F, WEI ZY, LUO YJ, GUO HL, ZHANG GQ, XIA QY, WANG Y. SilkDB 3.0: visualizing and exploring multiple levels of data for silkworm[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(D1): D749-D755.
- [19] MARCHLER-BAUER A, ANDERSON JB, CHERUKURI PF, DEWEESE-SCOTT C, GEER LY, GWADZ M, HE SQ, HURWITZ DI, JACKSON JD, KE ZX, LANCZYCKI CJ, LIEBERT CA, LIU CL, LU F, MARCHLER GH, MULLOKANDOV M, SHOEMAKER BA, SIMONYAN V, SONG JS, THIESSEN PA, et al. CDD: a conserved domain database for protein classification[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(database issue): D192-D196.
- [20] GASTEIGER E, HOOGLAND C, GATTIKER A, DUVAUD S, WILKINS MR, APPEL RD, BAIROCH A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server[M]//*The Proteomics Protocols Handbook*. Totowa, NJ: Humana Press, 2005: 571-607.
- [21] HAEUSSLER M, ZWEIG AS, TYNER C, SPEIR ML, ROSENBLOOM KR, RANEY BJ, LEE CM, LEE BT, HINRICHS AS, GONZALEZ JN, GIBSON D, DIEKHANS M, CLAWSON H, CASPER J, BARBER GP, HAUSSLER D, KUHN RM, KENT WJ. The UCSC genome browser database: 2019 update[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(D1): D853-D858.
- [22] CHAO JT, KONG YZ, WANG Q, SUN YH, GONG DP, LV J, LIU GS. MapGene2Chrom, a tool to draw gene physical map based on Perl and SVG languages[J]. *Yi Chuan*, 2015, 37(1): 91-97.
- [23] TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38(7): 3022-3027.
- [24] WATERHOUSE AM, PROCTER JB, MARTIN DMA, CLAMP M, BARTON GJ. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(9): 1189-1191.
- [25] YANG MZ, DERBYSHIRE MK, YAMASHITA RA, MARCHLER-BAUER A. NCBI's conserved domain database and tools for protein domain analysis[J]. *Current Protocols in Bioinformatics*, 2020, 69(1): e90.
- [26] BAILEY TL, BODEN M, BUSKE FA, FRITH M, GRANT CE, CLEMENTI L, REN JY, LI WW, NOBLE WS. MEME Suite: tools for motif discovery and searching[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(suppl\_2): W202-W208.

- [27] HU B, JIN JP, GUO AY, ZHANG H, LUO JC, GAO G. GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server[J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(8): 1296-1297.
- [28] WANG GH, XIA QY, CHENG DJ, DUAN J, ZHAO P, CHEN J, ZHU L. Reference genes identified in the silkworm *Bombyx mori* during metamorphosis based on oligonucleotide microarray and confirmed by qRT-PCR[J]. *Insect Science*, 2008, 15(5): 405-413.
- [29] GONG J, TIAN S, ZHOU X, YANG H, ZHU Y, HOU Y. Transcriptional response of silkworm (*Bombyx mori*) eggs to O<sub>2</sub> or HCl treatment[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(12): 1838.
- [30] BARSKI OA, TIPPARAJU SM, BHATNAGAR A. The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification[J]. *Drug Metabolism Reviews*, 2008, 40(4): 553-624.
- [31] YAMAMOTO K, ENDO S. Novel aldo-keto reductase AKR2E9 regulates aldehyde content in the midgut and antennae of the silkworm (*Bombyx mori*)[J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2023, 112(1): e21979.
- [32] YAMAMOTO K, YAMAGUCHI M, ENDO S. Functional characterization of an aldose reductase (bmALD1) obtained from the silkworm *Bombyx mori*[J]. *Insect Molecular Biology*, 2020, 29(5): 490-497.
- [33] 陈艳荣, 朱娟, 蒋涛, 谭志承, 陈艳花, 唐顺明, 沈兴家. 一个二化性家蚕醛酮还原酶基因的克隆及序列与表达分析[J]. *蚕业科学*, 2019, 45(2): 187-194.  
CHEN YR, ZHU J, JIANG T, TAN ZC, CHEN YH, TANG SM, SHEN XJ. Cloning, sequence feature and expression pattern of an aldo-keto reductase gene from bivoltine silkworm, *Bombyx mori*[J]. *Science of Sericulture*, 2019, 45(2): 187-194 (in Chinese).
- [34] YAMAMOTO K, WILSON DK. Identification, characterization, and crystal structure of an aldo-keto reductase (AKR2E4) from the silkworm *Bombyx mori*[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2013, 538(2): 156-163.
- [35] YAMAMOTO K, OZAKIYA Y, UNO T. Localization of an aldo-keto reductase (AKR2E4) in the silkworm *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae)[J]. *Journal of Insect Science*, 2017, 17(5): 94.
- [36] WANG CF, ZHANG Z, SUN W. Ecdysone oxidase and 3-dehydroecdysone-3 $\beta$ -reductase contribute to the synthesis of ecdysone during early embryonic development of the silkworm[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2018, 14(11): 1472-1482.
- [37] SINGH M, KAPOOR A, BHATNAGAR A. Physiological and pathological roles of aldose reductase[J]. *Metabolites*, 2021, 11(10): 655.
- [38] CHINO H. Conversion of glycogen to sorbitol and glycerol in the diapause egg of the *Bombyx mori* silkworm[J]. *Nature*, 1957, 180(4586): 606-607.
- [39] WANG PY, BI SM, WEI WY, QIU ZY, XIA DG, SHEN XJ, ZHAO QL. Downregulation of aldose reductase is responsible for developmental abnormalities of the silkworm purple quail-like mutant (Q-L(P))[J]. *Gene*, 2018, 665: 96-104.

(本文责编 陈宏宇)