

家蚕动力蛋白轻链 8 基因克隆及其对重力的响应 *

田宗成 蹇爱荣 续惠云 狄升蒙 张 维 瓮媛媛 商 澎 **

(空间生物实验模拟技术国防重点学科实验室, 西北工业大学特殊环境生物物理学研究所, 西北工业大学生命科学院, 西安 710072)

摘要 克隆家蚕动力蛋白轻链 8(dynein light chain 8, *Dlc8*)基因开放阅读框架并对其序列进行分析. 探讨 *Dlc8* 基因在家蚕胚胎、头、丝腺、中肠、皮肤、血液、脂肪和马氏管等组织中的分布. 在细胞水平, 应用 RT-PCR 和实时定量 RT-PCR 方法分析大梯度强磁场(large gradient high magnetic field, LGHMF)重力模拟环境(0 g、1 g、2 g)对家蚕 *Dlc8* 基因表达的影响. 在整体水平, 应用实时定量 RT-PCR 方法分析 *Dlc8* 基因在家蚕胚胎反转期和整个胚胎期对 LGHMF 模拟失重环境的响应. 克隆的家蚕 *Dlc8* 基因开放阅读框架长度为 270 bp, 编码 89 个氨基酸. 家蚕 *Dlc8* 基因推导的氨基酸序列与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、果蝇(*Drosophila melanogaster*)、线虫(*Caenorhabditis elegans*)、热带爪蟾(*Xenopus tropicalis*)、小鼠(*Mus musculus*)、人类(*Homo sapiens*)等 6 个物种 *Dlc8* 基因的氨基酸序列同源性分别为 67%、96%、91%、95%、92%、92%. 信号肽分析结果显示, 该蛋白质为非分泌蛋白, 不存在糖基磷脂酰肌醇锚定位点. 家蚕 *Dlc8* 分子质量与等电点分别为 10.34 ku 和 6.81. *Dlc8* 基因在家蚕的胚胎、头、丝腺、中肠、皮肤、血液、脂肪、马氏管中稳定表达. 在细胞水平, 家蚕 *Dlc8* 基因表达对重力变化较敏感, 对磁场变化不敏感. 在整体水平, *Dlc8* 基因在家蚕胚胎发育的不同时期对重力的响应不同. 整个胚胎发育期 *Dlc8* 基因在模拟失重条件下表达量与对照组接近. 家蚕 *Dlc8* 基因可以作为重力生物学效应研究的分子靶标. 该研究为深入探讨家蚕 *Dlc8* 基因重力生物学效应机制奠定了基础.

关键词 大梯度强磁场, 重力, 家蚕, 动力蛋白轻链 8

学科分类号 Q27, Q68

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00543

从地球表面出现原始生命至今已有 35 亿年的历史, 在这一历史进程中, 生物的演化都是在 1 g 重力场下完成的, 机体的结构、功能和行为已经完全适应这种重力环境, 一旦失去这种重力环境, 机体会发生怎样的改变, 对这个问题的回答将有助于揭示重力对生物的作用机制. 研究过程中涉及两方面的问题: 一方面是选择合适的重力环境, 目前多数研究集中在失重环境, 包括空间失重环境和模拟失重环境; 另一方面是选择合适的研究对象, 包括各种层次结构的生物体, 如细胞、植物、微生物和小动物等. 由于真实空间实验条件的限制, 在地面上进行模拟失重实验是非常重要的研究内容. 已应用的模拟装置有: 回转器^[1]、旋转细胞培养系统^[2]、随机回转器^[3]等. 对于高等生物, 可以通过尾吊大鼠模型^[4]和人体-6°头低位卧床模型^[5]等方法来模拟失重环境产生的特定生物效应. 可产生大梯度强磁场的超导磁体是近几年出现的新型模拟失重环境装置之一^[6], 已有研究表明, 这种装置能在一定程度上较好地模拟空间重力环境^[7~9].

在各种模式动物中, 家蚕的繁殖力强, 世代周期短, 遗传背景清楚, 而且家蚕基因组框架图已经完成^[10]. 科学家曾利用卫星成功进行了家蚕的搭载实验, 获得了重要研究数据^[11, 12]. 家蚕的这些特点使之很适合作为空间生命科学研究的材料.

动力蛋白轻链 8 (dynein light chain 8, *Dlc8*), 又名神经元一氧化氮合酶抑制剂 (proteinaceous inhibitor of neuronal nitric oxide synthase, *Pin*)^[13], 是一种高度保守的动力蛋白轻链亚单位, 在动力蛋白的装配和待运细胞器的募集过程中起主要作用^[14]. 模拟失重能引起一氧化氮合酶表达上调^[15], 而动力蛋白轻链 8 是一氧化氮合酶的抑制剂. 用离心机进行超重训练时发现 *Dlc8* 基因表达有下调趋势^[16]. 以上结

* 国家自然科学基金资助项目(30770526), 西北工业大学青年科技创新基金资助项目(W016213).

** 通讯联系人.

Tel: 029-88460391, E-mail: shangpeng@nwpu.edu.cn

收稿日期: 2008-07-29, 接受日期: 2008-10-20

果表明, 动力蛋白轻链 8 是一个重力相关基因, 有必要开展深入研究。

本项目克隆家蚕 *Dlc8* 基因完整开放阅读框架并对其序列进行分析, 研究 *Dlc8* 基因在不同动物及家蚕不同组织中的分布特点。在细胞水平研究了强磁重力环境对家蚕 *Dlc8* 基因表达的影响, 在整体水平探讨超导磁体产生的模拟失重环境对家蚕胚胎反转期及整个胚胎期 *Dlc8* 基因表达的影响, 为深入研究该基因的重力生物学效应机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和组织。家蚕 BmN 细胞由西南大学潘敏慧副教授提供。本研究所用家蚕品种为大造 (P50), 由中国农业科学院镇江蚕业研究所李木旺副教授提供。家蚕五龄幼虫第 5 天的头、丝腺、中肠、皮肤、血液、脂肪和马氏管等组织 cDNA 由中国科学院植物生理生态研究所黄勇平课题组提供。

1.1.2 试剂。Grace 培养基购自 Gibco 公司。胎牛血清购自 HyClone 公司。TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司。菌种 *E. coli* DH5 α , 由本室保存。pMD18-T Simple Vector、限制性内切酶、连接酶、Ex Taq、RT-PCR、实时定量 RT-PCR 等试剂购自 TaKaRa 公司 (中国大连)。

1.1.3 仪器设备。低温培养箱为 MIR-253 型 (日本 SANYO 公司), 实时荧光定量 PCR 扩增仪为 PTC-200 型 (美国 MJ 公司), 全自动凝胶成像系统为 Bio-Rad Gel DocTM XR 型 (美国 Bio-Rad 公司), 电泳仪为 DYY-6C 型 (北京市六一仪器厂)。

1.1.4 重力模拟环境。大梯度强磁场 (large gradient high magnetic field, LGHMF) 由西北工业大学自主设计, 日本 JASTEC 公司制造的超导磁体 (JMTA-16T50MF) 产生。与磁体配套的生物学实验装置由本实验室自行研制并已申请国家专利 (申请号: 200610104905.9)。大梯度强磁场能够提供三种强磁场下的表观重力环境, 即 0 g (12 T)、1 g (16 T)、2 g (12 T) 重力环境。家蚕 BmN 细胞的模拟重力效应实验分为 0 g、1 g、2 g 和正常对照组。家蚕胚胎发育期模拟失重效应实验分为 0 g 组和正常对照组 (control)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养。在正常地球重力环境下用 Grace 培养基培养 BmN 细胞 24 h, 培养基中添加 10% 的

胎牛血清, 培养温度为 27℃。收集细胞 (1×10^6) 并用 TRIzol 提取总 RNA, 用反转录试剂盒合成 cDNA 第一链, -20℃ 保存备用。

1.2.2 引物合成及序列扩增。由于家蚕 *Dlc8* 基因序列信息未知, 用果蝇的 *Dlc8* 基因序列在 BGI-Silkworm Genome Database 中进行 Blast, 找到 ID 号为 BP115156 的一段 EST 序列。经过分析, 发现这段 EST 序列理论上包含家蚕 *Dlc8* 基因完整开放阅读框架 (270 bp), 依据此序列合成引物, 引物序列为: F, CGCGGATCCATGTGTGATCGCA-AAGCAG; R, CCCAAGCTTCTAACCCTCTTAA-AGAGCAG。上下游引物中分别含有 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点, 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。用 1.2.1 中 cDNA 第一链作模板扩增家蚕 *Dlc8* 基因, 扩增条件为: 94℃ 变性 1 min, 49℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 30 个循环。将扩增得到的 *Dlc8* 基因克隆到 pMD18-T Simple Vector, 经 PCR 和酶切鉴定后测序。

1.2.3 序列分析。使用在线工具 http://www.expasy.ch/cgi-bin/pi_tool 计算该蛋白质的分子质量和等电点。使用 SignalP 3.0 Server 在线工具 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/> 预测蛋白质前体信号肽和 GPI 锚定位点。用 DNAMAN 5.0 分析家蚕与几种常见模式生物 *Dlc8* 基因推导氨基酸序列的保守性。

1.2.4 *Dlc8* 基因在家蚕各组织中分布。用 1.2.2 中的家蚕特异引物扩增家蚕胚胎及其五龄幼虫第 5 天的头、丝腺、中肠、皮肤、血液、脂肪、马氏管等组织的 cDNA, 分析该基因在这些组织中的分布特点。

1.2.5 家蚕 BmN 细胞中 *Dlc8* 基因对重力的响应。分别在 0 g、1 g、2 g 强磁重力环境和正常地球重力环境下培养细胞, 培养条件同 1.2.1。收集细胞 (1×10^6) 并用 TRIzol 提取总 RNA, 用反转录试剂盒合成 cDNA 第一链, -20℃ 保存备用。用 RT-PCR 和实时定量 RT-PCR 分析 4 种重力环境下家蚕 *Dlc8* 基因表达异同。其中选择家蚕 18 S 基因作内参, 实时定量 RT-PCR 扩增条件同 RT-PCR, 每个样品作 3 个重复, 用 *t* 检验进行统计学分析。

1.2.6 家蚕胚胎发育不同时期 *Dlc8* 基因对重力的响应。将浸酸处理的家蚕胚胎分别置入超导磁体中的模拟失重环境 (0 g) 和正常地球重力环境 (control) 中孵化, 孵化温度为 25℃, 湿度为 80%。每日分别从强磁重力环境和正常地球重力环境取一个蛾区

的家蚕胚胎速冻于液氮中,直至孵化期结束.家蚕胚胎发育期共8天,每组收集到8份样品.用液氮研磨家蚕胚胎并用 TRIzol 提取总 RNA,每个样品均取 1 μ g 总 RNA 用反转录试剂盒合成 cDNA 第一链, -20 $^{\circ}$ C 保存备用.用实时定量 RT-PCR 分析超导磁体中的模拟失重环境和正常地球重力环境下家蚕胚胎发育第4天和第5天的样品及等量混合样品中 *Dlc8* 基因表达异同,实时定量 RT-PCR 扩增条件同 1.2.2. 每个样品做3个重复,用 *t* 检验进行统计学分析.

2 结 果

2.1 *Dlc8* 基因的克隆与序列分析

2.1.1 *Dlc8* 基因的克隆及核酸序列分析.用反转录合成的 cDNA 第一链为模板,成功扩增到 *Dlc8* 基因开放阅读框架,产物大小为 270 bp. 用 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切质粒,阳性质粒送往上海生工生物工程技术服务有限公司测序.测序结果显示该开放阅读框架序列与家蚕基因(GenBank: BP115156)EST

序列同源性为 99%.

2.1.2 家蚕 *Dlc8* 基因推导氨基酸序列分析.

用 SignalP 3.0 Server 等在线工具预测蛋白质前体信号肽,结果显示,该蛋白质为非分泌蛋白,不存在糖基磷脂酰肌醇(glycosylphosphatidylinositol, GPI)锚定位点.家蚕 *Dlc8* 分子质量与等电点分别为 10.34 ku 和 6.81.

家蚕与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, NP_175635.1)、果蝇(*Drosophila melanogaster*, NP_477408.1)、线虫(*Caenorhabditis elegans*, NP_498422.1)、热带爪蟾(*Xenopus tropicalis*, NP_001005077.1)、小鼠(*Mus musculus*, NP_080832.1)、人类(*Homo sapiens*, EAW94483.1)等6个物种的 *Dlc8* 基因氨基酸序列变异程度非常低(图1),深色为7个物种完全相同的氨基酸. *Dlc8* 基因C端相对保守,变异主要发生在N端.与其他物种相比较,家蚕发生的明显变异只有一处,即第84位家蚕为脯氨酸(P),其他物种为亮氨酸(L).

<i>Homo_sapiens</i>	MCDRKA	6
<i>Mus_musculus</i>	MCDRKA	6
<i>Silkworm</i>	MCDRKA	6
<i>Xenopus_tropicalis</i>	MSEKKA	6
<i>Caenorhabditis_elegans</i>	MVDKKA	6
<i>Drosophila_melanogaster</i>	MSDKKA	6
<i>Arabidopsis_thaliana</i>	MSDGRKKSVNGGAPAQTLDDRRSSLPEVEASFPAGKRA	40
Consensus	a	
<i>Homo_sapiens</i>	VIKNADMSEEMQDSVECATCALEKYNIEKDIAAEIKKEF	46
<i>Mus_musculus</i>	VIKNADMSEEMQDSVECATCALEKYNIEKDIAAEIKKEF	46
<i>Silkworm</i>	VIKNADMSEEMQDAVDCATCALEKYNIEKDIAAEIKKEF	46
<i>Xenopus_tropicalis</i>	VIKNADMSEEMQDAVDCATCALEKYNIEKDIAAEIKKEF	46
<i>Caenorhabditis_elegans</i>	VIKNADMSEEMQDAVDCATCALEKYNIEKDIAAEIKKEF	46
<i>Drosophila_melanogaster</i>	VIKNADMSEEMQDAVDCATCALEKYNIEKDIAAEIKKEF	46
<i>Arabidopsis_thaliana</i>	VIKSADMKDDMKKEALETALSAREKYSVEKDIAENIKKEF	80
Consensus	vik adm mq a a ek ekdia ikkef	
<i>Homo_sapiens</i>	DKKYNETWHCIVGRNFGSYVHETTRHFYFYLGQVAIILF	86
<i>Mus_musculus</i>	DKKYNETWHCIVGRNFGSYVAHETTRHFYFYLGQVAIILF	86
<i>Silkworm</i>	DKKYNETWHCIVGRNFGSYVHETTRHFYFYLGQVAIILF	86
<i>Xenopus_tropicalis</i>	DKKYNETWHCIVGRNFGSYVHETTRHFYFYLGQVAIILF	86
<i>Caenorhabditis_elegans</i>	DKKYNETWHCIVGRNFGSYVHETTRHFYFYLGQVAIILF	86
<i>Drosophila_melanogaster</i>	DKKYNETWHCIVGRNFGSYVHETTRHFYFYLGQVAIILF	86
<i>Arabidopsis_thaliana</i>	DKKHGATWHCIVGRNFGSYVHETTRHFYFYLGQRAVILF	120
Consensus	dkk twhcvgrnfgsyv het hf yfyl q a lf	
<i>Homo_sapiens</i>	KSG	89
<i>Mus_musculus</i>	KSG	89
<i>Silkworm</i>	KSG	89
<i>Xenopus_tropicalis</i>	KSG	89
<i>Caenorhabditis_elegans</i>	KSG	89
<i>Drosophila_melanogaster</i>	KSG	89
<i>Arabidopsis_thaliana</i>	KSG	123
Consensus	ksg	

Fig.1 Comparison of deduced amino acid sequences of *Dlc8* gene

2.1.3 家蚕 *Dlc8* 基因推导氨基酸序列与常见物种 *Dlc8* 基因推导氨基酸序列亲缘关系.从 *Dlc8* 基因推导的氨基酸序列树状图(图2)可以看出,家蚕与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, NP_175635.1)、果蝇(*Drosophila melanogaster*, NP_477408.1)、线虫(*Caenorhabditis elegans*, NP_498422.1)、热带爪蟾

(*Xenopus tropicalis*, NP_001005077.1)、小鼠(*Mus musculus*, NP_080832.1)、人类(*Homo sapiens*, EAW94483.1)等6个物种的 *Dlc8* 基因氨基酸序列同源性分别为 67%、96%、91%、95%、92%、92%,人与小鼠的亲缘关系最近,相似性接近 100%.家蚕与果蝇相似性大于 95%,与家蚕相似

性最小的是拟南芥也接近 70%。Dlc8 基因推导氨基酸序列相似程度与物种亲缘关系程度相一致, 表明该蛋白质在不同物种中非常保守。

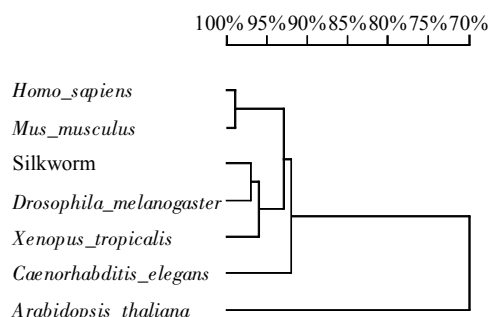


Fig. 2 Genetic relationships tree of deduced amino acid sequences of Dlc8 gene

2.2 Dlc8 基因在家蚕各组织中的分布

用家蚕 Dlc8 基因特异引物扩增家蚕胚胎及其五龄幼虫第 5 天的头、丝腺、中肠、皮肤、血液、脂肪、马氏管各组织的 cDNA, 都获得 270 bp 左右的条带, 和目标片段相符, 表明家蚕 Dlc8 基因在家蚕的胚胎、头、丝腺、中肠、皮肤、血液、脂肪、马氏管中能稳定表达(图 3)。

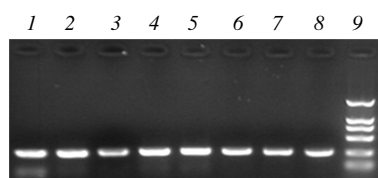


Fig. 3 Amplifying Dlc8 gene from different tissues of silkworm

1: Embryo; 2: Head; 3: Silk gland; 4: Midgut; 5: Cuticle; 6: Blood; 7: Fat; 8: Tuba Malpighii; 9: DL2000 marker.

2.3 Dlc8 基因对重力的响应

2.3.1 家蚕 BmN 细胞中 Dlc8 基因对不同重力环境的响应。

2 g 重力条件下, 家蚕 BmN 细胞中 Dlc8 基因表达下调, 磁体中 0 g、1 g 重力环境和磁体外正常重力条件下家蚕 Dlc8 基因表达差异不明显(图 4)。

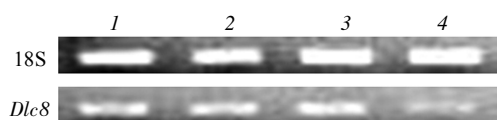


Fig. 4 Dlc8 gene expression analysis in BmN cell by RT-PCR

1: Control; 2: 0 g; 3: 1 g; 4: 2 g.

实时定量 RT-PCR 检测结果如图 5 所示, 磁体中的 0 g、1 g、2 g 重力条件与正常重力条件相比较, 家蚕 Dlc8 基因表达分别下调 33%、上调 10%、下调 79% ($P < 0.01$)。磁体中的 2 g 与 0 g、1 g 重力条件相比较, 家蚕 Dlc8 基因表达下调 66% ($P < 0.01$)和 81% ($P < 0.01$)。

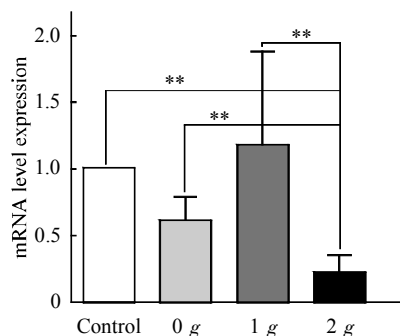


Fig. 5 Dlc8 gene expression analysis in BmN cell by real time RT-PCR

** $P < 0.01$.

2.3.2 Dlc8 基因在家蚕胚胎反转期对模拟失重环境的响应

提取家蚕胚胎发育至第 4 天和第 5 天(反转期)的总 RNA 后, 用实时定量 RT-PCR 分析模拟失重环境和正常地球重力环境下这两份样品中 Dlc8 基因表达异同。结果如图 6 所示。胚胎发育第 4 天, 模拟失重组与对照组相比较, Dlc8 基因表达量接近下调 10%(图 6a)。胚胎发育第 5 天, 即反转期, 模拟失重组与对照组相比较, Dlc8 基因表达量上调 100% ($P < 0.01$)(图 6b)。

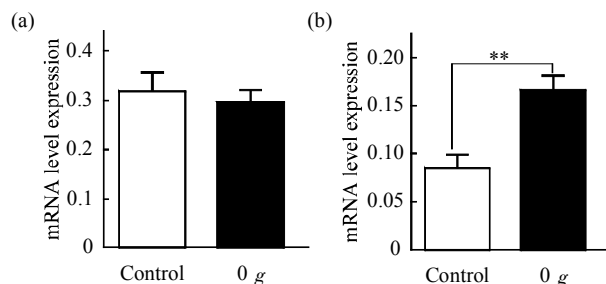


Fig. 6 Detection of genes expression in inverse period of silkworm embryo by real time RT-PCR

** $P < 0.01$. (a) The 4th silkworm embryo. (b) The 5th silkworm embryo.

2.3.3 家蚕胚胎发育期 Dlc8 基因对模拟失重环境的响应

提取家蚕胚胎发育不同时期(共 8 天)的总 RNA

反转录之后等量混合,用实时定量 RT-PCR 分析模拟失重环境和正常地球重力环境下家蚕胚胎发育混合样品中 *Dlc8* 基因表达异同.结果如图 7 所示,模拟失重组(0 g mix)与对照组(control mix)相比较,*Dlc8* 基因表达量接近下调 1%.

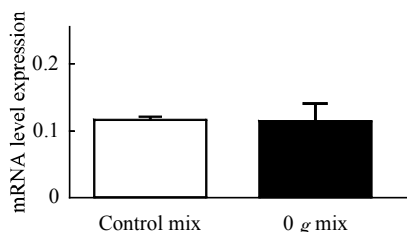


Fig. 7 Detection of genes expression in total embryo period of silkworm by real time RT-PCR
 $P > 0.05$.

3 讨 论

在拟南芥、线虫、家蚕、果蝇、热带爪蟾、小鼠、人类等 7 个物种中,*Dlc8* 基因的氨基酸推导序列相似性都大于 60%,表明 *Dlc8* 在不同物种高度保守,这一结果与文献报道有一致性。Githui 等^[10]发现恶性疟原虫中 *Dlc8* 基因的序列和功能域与人类直系同源物有着高度的相似性。*Dlc8* 基因在家蚕的胚胎、头、丝腺、中肠、皮肤、血液、脂肪、马氏管中稳定表达,表明 *Dlc8* 基因在家蚕不同组织中非常保守.不同物种及同一物种不同组织的保守性说明 *Dlc8* 可能是生命活动的基本构成元件.在不同物种中比较 *Dlc8* 基因的结构与功能,可丰富其生物进化分子机制方面的研究数据,也容易借鉴到人类.因此深入研究 *Dlc8* 基因的功能,对于提高航天员对空间重力环境的适应能力及人们理解重力影响地球表面生命质量的机制有重要意义.

本研究中,磁体中的 2 g 与 0 g 重力环境有共同的磁场强度(12T),扣除这种共同的磁场因素背景,观察到的效应可认为是单纯的重力效应.2 g 与 0 g 重力环境下的实验结果比较,家蚕 *Dlc8* 基因表达下调,这一结果与文献报道“用离心机进行超重训练时 *Dlc8* 基因表达有下调趋势^[17]”有一致性.研究结果一方面说明大梯度强磁场提供的超重环境与离心机提供的超重环境有相同的重力生物学效应,这一推论与文献报道有一致性,如草履虫在大梯度强磁场与离心机提供的超重环境有相同的游

泳方式^[18].另一方面说明,在细胞水平,家蚕 *Dlc8* 基因对重力变化较敏感,可以作为重力效应研究的分子靶标.磁体中 1 g(16T)重力环境与对照(1 g,正常地球磁场)相比较,表观重力水平相同,磁场不同,扣除共同的重力因素,可以认为是单纯的强磁场效应.在这两种环境中,家蚕 *Dlc8* 基因表达量接近,表明家蚕 *Dlc8* 基因对磁场变化不敏感.

家蚕胚胎发育中的反转期(已 1 期,一般为胚胎发育第 5 天)是对各种不良环境条件的敏感期^[19,20].在模拟失重条件下,胚胎发育第 4 天 *Dlc8* 基因表达量与对照组接近,而第 5 天上调.整个胚胎发育期 *Dlc8* 基因在超导磁体模拟失重条件下表达量与对照组接近.说明 *Dlc8* 基因在家蚕胚胎发育的不同时期对重力的响应不同.家蚕胚胎通过对不利环境的适应性调整,达到了 *Dlc8* 基因总体含量的稳定.这一现象的机制有待深入研究.*Dlc8* 基因是细胞分裂和能量运输的关键要素之一^[13,21].那么模拟失重条件下,胚胎期内 *Dlc8* 基因表达的变化是否影响细胞分裂及胚胎发育呢?已有研究证实,失重影响细胞分裂进程^[22].模拟失重培养条件下,胚胎体外发育受到明显的抑制,模拟失重不利于小鼠胚胎的体外发育^[23].模拟失重的作用,影响了鹌鹑胚胎原始生殖细胞的迁移,使睾丸内的生精小管数和精原细胞数减少^[24].种种迹象表明,*Dlc8* 基因可能是打开重力影响胚胎发育机制之门的一把钥匙.*Dlc8* 基因是重力敏感基因,有深入研究其机理的必要性.

总之,*Dlc8* 基因在不同物种及家蚕不同组织中非常保守,该基因在细胞水平和整体水平对重力变化都敏感,可以作为重力效应研究的分子靶标.

致谢 感谢中国科学院植物生理生态研究所黄勇平研究员在研究思路方面的指导及提供家蚕五龄幼虫各种组织 cDNA,西南大学潘敏慧副教授为本研究提供家蚕 BmN 细胞,中国农业科学院蚕业研究所李木旺副教授提供本研究所用家蚕胚胎,西北工业大学尹大川教授在超导磁体模拟失重环境理论及实验方面的指导与帮助.

参 考 文 献

- 1 Klaus D M. Clinostats and bioreactors. *Gravit Space Biol Bull*, 2001, **14**(2): 55~64
- 2 Slentz D H, Truskey G A, Kraus W E. Effects of chronic exposure to simulated microgravity on skeletal muscle cell proliferation and differentiation. *In vitro. Cell Dev Biol Anim*, 2001, **37**(3): 148~156

- 3 Uva B M, Masini M A, Sturla M, *et al.* Clinorotation-induced weightlessness influences the cytoskeleton of glial cells in culture. *Brain Res*, 2002, **934**(2): 132~139
- 4 Basso N, Bellows C G, Heersche J N M. Effect of simulated weightlessness on osteoprogenitor cell number and proliferation in young and adult rats. *Bone*, 2005, **36**(1): 173~183
- 5 Scheld K, Zittermann A, Heer M, *et al.* Nitrogen metabolism and bone metabolism markers in healthy adults during 16 weeks of bed rest. *Clinical Chemistry*, 2001, **47**(9): 1688~1695
- 6 Yin D C, Wakayama N I, Harata K, *et al.* Formation of protein crystals (orthorhombic lysozyme) in quasi-microgravity environment obtained by superconducting magnet. *J Cryst Growth*, 2004, **270**(1~2): 184~191
- 7 Babbick M, Dijkstra C, Larkin O J, *et al.* Expression of transcription factors after short-term exposure of *Arabidopsis thaliana* cell cultures to hypergravity and simulated microgravity (2-D/3-D clinorotation, magnetic levitation). *Adv Space Res*, 2007, **39**(7): 1182~1189
- 8 Qian A R, Zhang W, Weng Y Y, *et al.* Gravitational environment produced by superconducting magnet affects osteoblast morphology and functions. *Acta Astronaut*, 2008, **63**(7~10): 929~946
- 9 Glade N, Beaugnon E, Tabony J. Ground-based methods reproduce space-flight experiments and show that weak vibrations trigger microtubule self-organisation. *Biophysical Chemistry*, 2006, **121**(1): 1~6
- 10 Xia Q, Zhou Z, Lu C. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science*, 2004, **306**(5703): 1937~1940
- 11 Shi Z, Zhuang D, Ilyin E A. Space flight experiment on chinese silkworm on board the russian 10th biosatellite. *Adv Space Res*, 1998, **21**(8~9): 1145~1150
- 12 Shi Z, Zhuang D, Li D. Experimental studies of silkworm eggs on board recoverable satellite. *Space Medicine & Medical Engineering*, 1994, **7**(Suppl): 22~28
- 13 李莉萍, 罗超权, 刘 丽. 动力蛋白轻链 / 一氧化氮合酶抑制剂. 生命的化学, 2003, **23**(4): 270~272
Li L P, Luo C Q, Liu L. *Chemistry of Life*, 2003, **23**(4): 270~272
- 14 Beckwith S M, Roghi C H, Liu B, *et al.* The "8-Kd" cytoplasmic dynein light chain is required for nuclear migration and for dynein heavy chain localization in *Aspergillus nidulans*. *J Cell Biol*, 1998, **143**(5): 1239~1247
- 15 Qu L N, Yang T B, Yuan Y H, *et al.* Protein nitration increased by simulated weightlessness and decreased by melatonin and quercetin in PC12 cells. *Nitric Oxide*, 2006, **15**(1): 58~63
- 16 Githui E K, De Villiers E P, McArthur A G. Plasmodium possesses dynein light chain classes that are unique and conserved across species. *Infect Genet Evol*, 2008 Mar 28. doi: 10.1016/j.meegid.2008.03.002
- 17 梁雪清, 刘 丽, 王 烨, 等. 离心机训练对大鼠脑和心脏组织基因表达的影响. 中国生物化学与分子生物学报, 2001, **17**(6): 790~794
Liang X Q, Liu L, Wang Y, *et al.* *Chin J Biochem Mol Biol*. 2001, **17**(6): 790~794
- 18 Guevorkian K, Valles J M Jr. Swimming paramecium in magnetically simulated enhanced, reduced, and inverted gravity environments. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(35): 13051~13056
- 19 宋起图. 家蚕催青中胚胎环境敏感期的研究. 河北林学院学报, 1994, **9**(3): 232~235
Song Q T. *J Hebei Forestry College*, 1994, **9**(3): 232~235
- 20 丁裕斌, 潘敏慧, 肖仕全, 等. 家蚕原代细胞有丝分裂观察. 细胞生物学杂志, 2004, **26**(6): 623~626
Ding Y B, Pan M H, Xiao S Q, *et al.* *Chin J Cell Biol*, 2004, **26**(6): 623~626
- 21 Serohijos A W, Chen Y, Ding F, *et al.* A structural model reveals energy transduction in dynein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(49): 18540~18545
- 22 Grigoryan E N, Mitashov V I, Anton H J. Urodelean amphibians in studies on microgravity: effects upon organ and tissue regeneration. *Adv Space Res*, 2002, **30**(4): 757~64
- 23 吴婉丽, 高淑静, 江青艳. 模拟微重力条件下昆明小鼠早期胚胎体外发育及其 G6PD 基因表达. 航天医学与医学工程, 2006, **19**(5): 340~344
Wu C E, Gao S J, Jiang Q Y. *Space Medicine & Medical Engineering*, 2006, **19**(5): 340~344
- 24 马玉忠, 李赞东, 宋永宏, 等. 模拟微重力对鹌鹑胚胎原始生殖细胞及内脏器官发育的影响. 农业生物技术学报, 2001, **9**(1): 86~88
Ma Y Z, Li Z D, Song Y H, *et al.* *J Agricul Biotech*, 2001, **9**(1): 86~88

Cloning and Response to Gravity of The Silkworm Dynein Light Chain 8 Gene*

TIAN Zong-Cheng, QIAN Ai-Rong, XU Hui-Yun, DI Sheng-Meng,
ZHANG Wei, WENG Yuan-Yuan, SHANG Peng**

(Key Laboratory for Space Biosciences and Biotechnology, Institute of Special Environmental Biophysics, Faculty of Life Sciences,
Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China)

Abstract To study the changes of the silkworm dynein light chain 8 (*Dlc8*) gene expression pattern in different gravitational environments. The open reading frame sequence of *Dlc8* gene was amplified and analyzed. The distribution of *Dlc8* gene was investigated in embryo, head, silk gland, midgut, cuticle, blood, fat, tuba malpighii of silkworm respectively. The effects of simulated gravitational environments (0 g, 1 g, 2 g) produced by large gradient high magnetic field (LGHMF) on expression of the silkworm *Dlc8* gene were tested by RT-PCR and real time RT-PCR in BmN cells. Expression of the silkworm *Dlc8* gene in simulated weightless environment was tested by real time RT-PCR in inverse period and in total embryo period of silkworm. The *Dlc8* gene with 270 bp coding 323 aa was successfully amplified. The homology rates of amino acid sequences of *Dlc8* gene between silkworm and *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Xenopus tropicalis*, *Mus musculus*, *Homo sapiens* were 67%, 96%, 91%, 95%, 92%, 92%, respectively. Signal peptide analysis showed that *Dlc8* was not a secretion protein. There was not glycosyl-phosphatidyl inositol anchor site in *Dlc8* amino acid sequence. Molecular mass and isoelectric point of *Dlc8* were 10.34 ku and 6.81, respectively. *Dlc8* gene is conservative in embryo, head, silk gland, midgut, cuticle, blood, fat, tuba malpighii of silkworm. *Dlc8* gene is more sensitive to gravity than magnetic field in BmN cells. There are different responses to gravity on *Dlc8* gene expression in different period of silkworm embryo. There was no significant change of *Dlc8* gene expression between simulated weightless and control groups. The results showed that *Dlc8* gene could be the molecular target to study gravity bioeffect. This research may contribute to reveal the mechanism of gravity bioeffect of the silkworm *Dlc8* gene.

Key words large gradient high magnetic field, gravity, silkworm, dynein light chain 8

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00543

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30770526) and “Youth Science and Technology Innovation Fund” Program of Northwestern Polytechnical University (W016213).

**Corresponding author.

Tel: 86-29-88460391, E-mail: shangpeng@nwpu.edu.cn

Received: July 29, 2008 Accepted: October 20, 2008