

维生素 C 对中华蜜蜂死亡率及其铜锌超氧化物歧化酶基因表达的影响

刘俊峰^{1,2}, 吴小波¹, 王子龙¹, 曾志将¹

(1. 江西农业大学蜜蜂研究所, 江西南昌 330045; 2. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 海南海口 571101)

摘要:本研究以中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*)为试验材料,通过笼养的方法饲养刚出房的中华蜜蜂,并饲喂不同剂量的维生素 C(vitamin C, VC),检测其对中华蜜蜂死亡率及铜锌超氧化物歧化酶(Acc-SOD1)mRNA 相对表达量的影响。结果表明,随着 VC 添加剂量的升高,中华蜜蜂的死亡率显著下降($P < 0.05$),Acc-SOD1 相对表达量呈下降趋势,但差异不显著($P > 0.05$)。

关键词:中华蜜蜂;维生素 C;铜锌超氧化物歧化酶;基因表达

中图分类号:Q969.557.1

文献标识码:A

文章编号:1671-7236(2013)08-0039-03

维生素 C(vitamin C, VC)是动物机体生长发育过程中必需的水溶性维生素之一,也是机体抗氧化体系中重要的抗氧化剂和自由基清除剂(Arrigoni 等,2002;Padayatty 等,2003)。近年来,对蜜蜂抗氧化系统的探索也成为科学研究的热潮,日粮中添加维生素 A 均能提高意大利蜜蜂幼虫的抗氧化能力(冯倩倩等,2011,2012),适量的蛋白质水平和复合维生素也能提高中华蜜蜂抗氧化能力及增加寿命(刘俊峰等,2011a,2011b,2011c)。

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是机体内重要的抗氧化酶,是唯一可清除超氧阴离子自由基($O_2 \cdot^-$)的清除剂,SOD 催化 $O_2 \cdot^-$ 为 H_2O_2 ,有效地降低过多活性氧自由基对生物体的毒害。铜锌超氧化物歧化酶(Cu/Zn-SOD, Acc-SOD1)在机体内广泛分布,是 SOD 家族中最重要的成员(Bowler 等,1992;Arhontaki 等,2002),SOD1 可作为判定中华蜜蜂机体营养状况的重要指标(刘俊峰等,2012)。目前为止,有关 VC 对蜜蜂抗氧化的研究较少,对中华蜜蜂铜锌超氧化物歧化酶的研究更是鲜有报道。鉴于此,本试验使用不同剂量的 VC 饲喂给刚出房的中华蜜蜂,探讨 VC 对中华蜜蜂死亡率及 Acc-SOD1 表达的影响。

收稿日期:2013-01-16

作者简介:刘俊峰(1986—),男,江西人,硕士,研究实习员,主要从事蜜蜂饲养与营养研究工作。

通信作者:吴小波(1983—),男,江西人,讲师,主要从事蜜蜂科学研究工作。E-mail:wuxiaobo21@163.com

基金项目:江西省青年科学基金项目(20122BAB214019);国家公益性行业(农业)科研专项(200903006)。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试昆虫 中华蜜蜂取自江西农业大学蜜蜂研究所饲养的蜂群。

1.1.2 试剂及仪器 总 RNA 提取试剂盒 Trizol、pEasy-T3 载体、X-Gal、IPTG 和 RNA 酶抑制剂均购自全式金公司;DL2000 DNA Marker、M-MLV 反转录酶及 SYBR Green II 荧光定量试剂均购自 TaKaRa 公司;dNTP、LA-Taq DNA 聚合酶均购自 PUEX 公司。普通离心机(飞鸽 KA-1000 型,上海安亭科学仪器厂公司)、台式冷冻离心机(Eppendorf 5810R)、移液器(Eppendorf 公司)、Real-Time PCR System (Bio-Rad 公司)。

1.1.3 试验分组 使用 3 群群势相近的中华蜜蜂蜂群,并控制蜂王产卵,收集同一日龄出房工蜂约 900 只,随机分成 3 组,每组 3 群重复,共 9 群。A 组对照组饲喂纯糖水,B 组在糖水中添加 50 mg/kg VC,C 组在糖水中添加 500 mg/kg VC,饲养于木盒(20 cm×15 cm×22 cm,糖:水为 2:1),并放置在 33℃、75%的生化培养箱培养 10 d。

1.1.4 样品采集 试验结束后,分别统计每个试验群工蜂的死亡率,并随机取成活工蜂 2 只个体作为 1 个样品,3 个重复,液氮速冻,转至 -80℃保存,待检测 Acc-SOD1 基因 mRNA 相对表达量。

1.2 RNA 提取及 cDNA 第 1 链合成

1.2.1 RNA 的提取 每个样品经液氮研磨后,使用 Trizol 法提取蜜蜂样品 RNA,所有操作均按照试剂盒说明书进行,RNA 最后溶于 30 μL RNA-free

的 DEPC 水中,紫外分光光度计测定总 RNA 浓度和纯度后,放入 80 °C 保存。

1.2.2 cDNA 第 1 链合成 用反转录试剂盒对总 RNA 进行反转录,反应体系为 50 μL:8 μL 总 RNA,10 μL Buffer,8 μL dNTP,1.5 μL M-MLV,3 μL Oligo dT,1 μL RNA 酶 Inhibitor,18.5 μL DEPC 水。反转录反应条件为:体系混匀后,42 °C 反应 60 min,75 °C 灭活 5 min。反转录产物保存于 20 °C。

1.3 荧光定量 PCR 引物的设计及 PCR 反应

1.3.1 荧光定量 PCR 引物的设计 分别以 GenBank 已登录的中华蜜蜂 *β-actin* 基因(登录号:HM640276.1)及中华蜜蜂 *Acc-SOD1* 基因(登录号:JN700517.1)作为内参基因与目的基因,采用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,设计出中华蜜蜂内参基因引物及 *Acc-SOD1* 基因引物分别为 *Acc-β-actin-Q-F*、*Acc-β-actin-Q-R*、*Acc-SOD1-Q-F* 及 *Acc-SOD1-Q-R*,引物序列见表 1。

表 1 中华蜜蜂 *Acc-SOD1* 基因及内参基因引物

引物名称	引物序列(5'→3')
<i>Acc-SOD1-Q-F</i>	AAACTATTCAACTTCAAGGACC
<i>Acc-SOD1-Q-R</i>	CACAAGCAAGACGAGCACC
<i>Acc-β-actin-Q-F</i>	GGCTCCCGAAGAACATCC
<i>Acc-β-actin-Q-R</i>	TGCGAAACACCGTCACCC

1.3.2 荧光定量 PCR qRT-PCR 反应体系 为 20 μL:5 μL 反转录产物,上、下游引物各 0.4 μL,4.2 μL H₂O,10 μL SYBR Green II。PCR 扩增程序为:94 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 40 s,40 个循环;72 °C 延伸 10 min,最后以每 5 s 上升 0.5 °C 的速度从 61 °C 到 95 °C。记录溶解曲线,每个反转录样品重复 3 次。使用仪器为 Bio-Rad 公司 iCycler iQ。反应结束后收集目的基因与内参基因的 Ct 值,数据分析方法参考 Liu 等(2002)的介绍。

1.4 数据分析 采用 SPSS 17.0 软件对原始数据 Sqrt 方法转换后,再进行 One-way ANOVA 方差分析,多重比较采用邓肯氏(Duncan)法,以 $P < 0.05$ 为差异显著性水平。

2 结果与分析

2.1 不同剂量 VC 对中华蜜蜂死亡率的影响 VC 对中华蜜蜂死亡率的影响结果见图 1。由图 1 可知,随着 VC 剂量的增加,中华蜜蜂的死亡率逐渐下降,且饲喂 50 及 500 mg/kg VC 组的死亡率显著低于对照组($P < 0.05$),而 50 与 500 mg/kg VC 组之

间的死亡率无显著差异($P > 0.05$)。

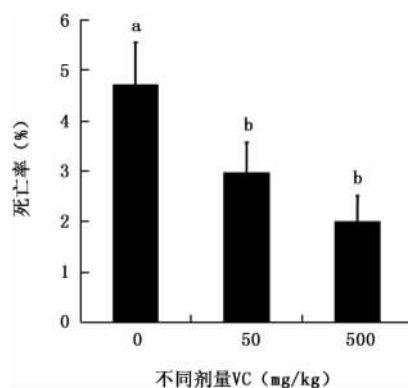


图 1 不同剂量 VC 对中华蜜蜂死亡率的影响

注:肩标相同字母表示差异不显著($P > 0.05$);肩标不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。下同。

2.2 不同剂量 VC 对中华蜜蜂 *Acc-SOD1* 基因 mRNA 相对表达量的影响 荧光定量 PCR 结果见图 2。由图 2 可知,随着 VC 剂量的增加,中华蜜蜂 *Acc-SOD1* 基因 mRNA 的相对表达量呈下降趋势,但组间差异均不显著($P > 0.05$)。

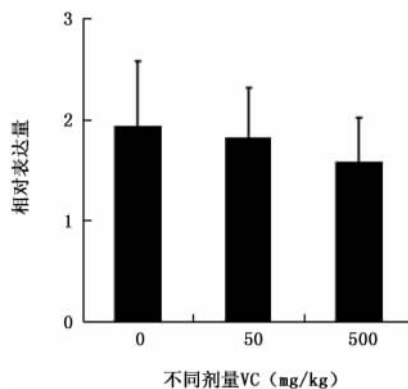


图 2 不同剂量 VC 对中华蜜蜂 *Acc-SOD1* 基因 mRNA 表达量的影响

3 讨论

昆虫机体中存在一类由 VC、VE、硫辛酸、谷胱甘肽及类胡萝卜素等非酶类抗氧化物质组成的一道非酶类抗氧化系统(Shosuke,2004)。其中,VC 不仅作为自由基清除剂,且能与超氧阴离子自由基($O_2 \cdot^-$)、过氧化氢(H_2O_2)与羟自由基($OH \cdot$)结合,反应生成抗坏血酸自由基,它也可以清除单线态氧,从而保护机体免受内源性氧自由基的损伤,还能还原被氧化的 VE,并协同 VE 发挥抗氧化作用(Bottje 等,1997;向瑞平等,2005)。本试验研究结果发现,在糖水中添加 VC 之后,蜜蜂的死亡率明显下降,这也说明给蜜蜂饲喂 VC 能提高蜜蜂的抗氧化性,且 VC 对其他昆虫体现积极的抗氧化作用已

被证实(Cappelozza等,2005;张书玲等,2011)。

蜜蜂与其他昆虫一样,抗氧化系统包括抗氧化酶类抗氧化剂及非酶类抗氧化剂2类。SOD是机体内广泛存在的一种重要的催化过氧化氢(H_2O_2)分解的酶,以氧自由基连锁反应前体物超氧阴离子自由基($O_2 \cdot^-$)为唯一底物(Weirich等,2002;Parker等,2004)。Acc-SOD1在意大利蜜蜂机体内分布最为广泛(肖培新等,2010),在中华蜜蜂不同发育时期、不同组织中具有表达特性(刘俊峰等,2012)。本研究结果发现,添加50或500 mg/kg剂量的VC能显著降低中华蜜蜂工蜂的死亡率,但对Acc-SOD1基因mRNA的表达量没有影响,可能是抗氧化系统中VC与其SOD酶活性呈负相关,各抗氧化系统之间可以相互协调并达到平衡(王群等,2004),虽然在动物机体中补充VC后,可以提高SOD活性,但是不能改变该基因mRNA及蛋白质的表达量,可能是翻译后修饰在发挥作用(Sadi等,2008),需作进一步验证。

参 考 文 献

- 王群,丁银娣,赵云龙,等. 维生素C对中华绒螯蟹雄性生殖的影响[J]. 动物学杂志,2004,39(2):1~5.
- 冯倩倩,胥保华,李成成,等. 维生素A对意大利蜜蜂群势、封盖子量及抗氧化性的影响[J]. 动物营养学报,2011,23(6):971~975.
- 冯倩倩,杨维仁,胥保华,等. 不同水平维生素A对意大利蜜蜂春繁阶段群势及幼虫抗氧化性的影响[J]. 中国农业科学,2012,45(17):3584~3591.
- 刘俊峰,刘光楠,颜伟玉,等. 三种人工饲料对中华蜜蜂春繁的影响[J]. 江西农业大学学报,2011a,33(1):137~140.
- 刘俊峰,吴小波,何旭江,等. 中华蜜蜂越冬阶段维生素和氨基酸的营养需要量[J]. 动物营养学报,2011b,23(10):1756~1761.
- 刘俊峰,吴小波,颜伟玉,等. 饲料蛋白水平对中华蜜蜂春繁性能及幼虫抗氧化性能的影响[J]. 江西农业大学学报,2011c,33(5):960~964.
- 刘俊峰,刘亭亭,王欢,等. 中华蜜蜂铜锌超氧化物歧化酶基因的克隆、序列分析及表达特征[J]. 动物营养学报,2012,24(8):1512~1519.
- 向瑞平,孙卫东,王小龙,等. 日粮添加VE和VC对肺动脉高压综合征患鸡自由基代谢的影响[J]. 中国兽医学报,2005,25(1):73~77.
- 吴小波,姚明印,林永增,等. 激光诱导击穿光谱技术对工蜂体质微量元素的初步分析[J]. 中国畜牧兽医,2012,39(12):219~221.
- 张书玲,董丽军,王瑞强. 亚硝酸钠对果蝇寿命和生育力影响及维生素C对其拮抗作用研究[J]. 中国农学通报,2011,27(2):400~404.
- 肖培新,吴在富,刘昭华,等. 意大利蜜蜂不同发育时期抗氧化酶基因mRNA表达量的研究[J]. 昆虫学报,2010,53(11):1202~1206.
- Arhontaki K, Eliopoulos E, Goulielmos G, et al. Functional constraints of the Cu, Zn superoxide dismutase in species of the drosophila melanogaster subgroup and phylogenetic analysis[J]. Journal of Molecular Evolution, 2002, 55(6): 745~756.
- Arrigoni O, De Tullio M C. Ascorbic acid: Much more than just an antioxidant [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2002, 1569(1~3): 1~9.
- Bottje W G, Erf G F, Bersi T K, et al. Effect of dietary dl-alpha-tocopherol on tissue alpha-and gamma-tocopherol and pulmonary hypertension syndrome (ascites) in broilers[J]. Poultry Science, 1997, 76:1506~1512.
- Bowler C, Montagu M V, Inze D. Superoxide dismutase and stress tolerance[J]. Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology, 1992, 43: 83~116.
- Cappelozza L, Cappelozza S, Saviane A, et al. Artificial diet rearing system for the silkworm *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae): Effect of vitamin C deprivation on larval growth and cocoon production[J]. Applied Entomology and Zoology, 2005,40(3):405~412.
- Liu W H, Saint D A. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics[J]. Analytical Biochemistry, 2002, 302(1): 52~59.
- Padayatty S J, Katz A, Wang Y H, et al. Vitamin C as an antioxidant: Evaluation of its role in disease prevention[J]. Journal of the American College of Nutrition, 2003, 22(1): 18~35.
- Parker J D, Parker K M, Keller L. Molecular phylogenetic evidence for an extracellular Cu Zn superoxide dismutase gene in insects[J]. Insect Molecular Biology, 2004, 13(6): 587~594.
- Sadi G, Yilmaz Ö, Güray T. Effect of vitamin C and lipoic acid on streptozotocin-induced diabetes gene expression: mRNA and protein expressions of Cu-Zn SOD and catalase[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2008, 309: 109~116.
- Shosuke K. Vitamin C: Basic metabolism and its function as an index of oxidative stress [J]. Current Medicinal Chemistry, 2004, 11: 1041~1064.
- Weirich G F, Collins A M, Williams V P. Antioxidant enzymes in the honey bee, *Apis mellifera* [J]. Apidologie, 2002, 33: 3~14.

Effect of Vitamin C on Mortality Rate and Gene Expression of Copper/Zinc Superoxide Dismutase of *Apis cerana cerana*

LIU Jun-feng^{1,2}, WU Xiao-bo¹, WANG Zi-long¹, ZENG Zhi-jiang¹

霍阿基亚型羊驼显性白毛调控基因外显子 2 的克隆与序列分析

高荣琨¹, 李建平³, 曲海娥², 江倩², 陈伟², 王莹², 张巧灵²

(1. 山西农业大学动物科技学院, 山西太谷 030801; 2. 吉林大学动物医学学院, 吉林长春 130062;

3. 吉林农业大学动物科学技术学院, 吉林长春 130118)

摘要:羊驼作为一种高品质毛皮经济动物,对其毛色的研究可以为提高羊驼经济价值提供理论依据。本试验应用 RT-PCR 技术克隆羊驼显性白位点基因(KIT)第 2 外显子(exon2),并与其他动物相应区域进行同源性比较,结果发现其序列与牛和山羊的同源性较高,可达到 96%,其编码的氨基酸更高,达 98%;而与人和家鼠的同源性较低,只有 78%和 57%。该研究结果为加快霍阿基亚型羊驼育种进展提供了理论依据。

关键词:霍阿基亚羊驼;毛色;显性白毛调控基因;序列分析

中图分类号:Q785

文献标识码:A

文章编号:1671-7236(2013)08-0042-04

显性白毛调控基因(KIT)编码肥大细胞生长因子受体,对黑色素细胞的形成、成熟及增殖迁移有重要作用。随着生命科学和分子生物学技术的发展,可以直接在分子水平上进行毛色的研究,并提出了控制毛色的 3 个等位基因: I、I^p、i,其中 I 调控显性白毛色,并证明编码肥大/干细胞生长因子受体的 KIT 基因等同于 I 基因。肥大/干细胞生长因子受体属酪氨酸激酶受体(RTKs)家族能表达黑色素细胞前体(邓素华等,2000),其配体为“青灰细胞生长因子”(steel cell growth fact, SCF),存在分泌型和膜结合型 2 种形式,分泌型决定黑色素细胞前体的迁移,而膜结合型决定黑色素细胞前体的存活。如 KIT

发生异位表达或 SCF 转换产物扰乱了 SCF 在通道的扩散,黑色素细胞的迁移模式将随之改变,从而导致哺乳动物毛根中缺乏黑色素细胞及其前体物呈现白毛色。虽然对 KIT 基因的研究已比较成熟,但对特种经济动物羊驼 KIT 基因及其调控机理的研究还很少。本试验研究羊驼 KIT 基因的部分编码序列,并与其他动物进行同源性比较,旨在为羊驼毛色的进一步研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料 试验所用组织采自山西省晋中市榆次区“中华羊驼养殖基地”。

1.2 主要试剂 Trizol RNA 提取试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司;RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公司;UNIQ-10 柱式胶回收试剂盒、pGEM-T Easy Vector、IPTG、X-gal、EcoR I 和 DNA 连接酶均购自上海生工生物工程技术有限公司。

1.3 羊驼皮肤总 RNA 的提取 活体取羊驼皮肤组织样置于液氮中速冻,并于-80℃保存。取 100 mg 组织样于液氮中研磨,用 Trizol Gibco BRL 法提取总

修回日期:2013-05-02

作者简介:高荣琨(1972—),男,山西人,硕士生,讲师,研究方向:预防兽医。

通信作者:张巧灵(1975—),女,副教授,博士生。E-mail: zql2323@yahoo.com.cn

基金项目:国家自然科学基金(30800807、31072097);中国博士后科学基金(20100471261)。

(1. Honeybee Research Institute, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China;

2. Environment and Plant Protection Institute, Haikou 571101, China)

Abstract: In this experiment, the effect of different concentration vitamin C on the mortality rate of bees after vitamin C treating and the expression level of copper/zinc superoxide dismutase (Acc-SOD1) mRNA using quantitative Real-time (qRT)-PCR of *Apis cerana cerana* was studied. The results showed that, with the increasing of the vitamin C concentration, the mortality rate of bees decreased significantly ($P < 0.05$), but the expression level of Acc-SOD1 was no significantly changed ($P > 0.05$).

Key words: *Apis cerana cerana*; vitamin C; copper/zinc superoxide dismutase; gene expression