



东亚飞蝗 *hunchback* 基因在卵子形成和胚胎发育过程中的原位表达

何正波^①, 陈斌^①, 曹月青^②, 蔡志华^①, 冯国忠^①, 李廷景^①, 夏玉先^②

① 重庆师范大学生命科学学院, 重庆高校生物活性物质工程研究中心, 昆虫与分子生物学研究所, 重庆 400047;

② 重庆大学生物工程学院, 基因工程研究中心, 重庆 400044

* 联系人, E-mail: zhengbohe@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-02-06; 接受日期: 2009-06-09

国家自然科学基金(批准号: 30700435)和重庆市自然科学基金(批准号: 2007BB1227)资助项目

摘要 *hb(hunchback)* 基因是昆虫胚胎前后轴模式形成的关键基因. 对东亚飞蝗 (*Locusta migratoria manilensis*, Meyen) *hb* 基因的功能已有报道, 但其表达模式还不清楚. 为了研究 *hb* 基因在东亚飞蝗卵子形成和胚胎发育过程中的时空表达情况, 本研究采用免疫组化方法在蛋白质水平上检测了 *hb* 基因的时空表达模式. 在卵子形成过程中, *hb* 基因局限在卵细胞核区中表达, 随着卵子的发育逐渐移至卵细胞的后端; 卵受精后, 核区里的 Hb 蛋白向外扩散, 在卵后端形成浓度梯度; 胚盘期, *hb* 基因在胚盘中央呈带状表达; 胚盘分化为原头和原躯干后, 表达条带变宽, 并呈现出梯度表达, 该表达区域将形成颌、胸部的部分体节; 随着腹节开始形成, *hb* 基因在颌胸部的表达逐渐减弱, 而在腹部后端的“生长区”表达, 并呈现出不连续性. 经比较, *hb* 基因在昆虫颌胸部的表达较为保守, 而在卵子形成过程中和腹部的表达具有较大的变异性. 与黑腹果蝇等长胚带昆虫相比, 东亚飞蝗 *hb* 基因在体节形成的基因级联调控中具有更重要、更直接的调控作用.

关键词

东亚飞蝗
hunchback
抗体制备
胚胎发育
表达模式

昆虫具有较为保守的身体模式(body patterning), 但其体节形成过程却具有多样性^[1,2]. 昆虫的胚胎可以分为长胚带(long germband)、中胚带(intermediate germband)和短胚带(short germband)3 种类型. 其中, 长胚带是进化上较为高等的类型, 所有的体节在胚盘时期同时形成; 而中胚带和短胚带(以下统称为短胚带)是进化上较为低等的种类, 在胚盘时期仅形成前端的部分体节, 其余体节随着胚带的延长逐渐形成^[2,3].

对黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)胚胎发育的分子调控机制已经研究的非常透彻, 其前后轴模式的形成是通过母体基因、间隙基因、对控基因、体节极性基因和同源异型基因等基因群的级联调控实

现的^[1,4,5]. 长胚带和短胚带昆虫体节形成的不同说明其形成的分子基础存在着差异. 例如, 对控基因(如 *even-skipped*)在不同类型昆虫中的表达模式有差异^[6], 说明处于其上游的调控基因在长胚带和短胚带昆虫体节形成中可能起着不同的作用^[6,7].

hb(hunchback) 基因既是母体基因又是间隙基因, 编码含锌指结构的转录因子, 调控下游的间隙基因、对控基因的表达^[8-13]. 黑腹果蝇 *hb* 基因的突变使颌部、胸部和腹部 1~2 腹节全部缺失, 腹部第 7 和 8 两个腹节发生融合^[14]. Schröder^[15]采用 parental RNAi (pRNAi) 方法抑制鞘翅目昆虫赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*) *hb* 基因的表达, 其除上颚以外的颌部、胸部体节完全缺失, 但腹部却没有受到影响. 膜翅目昆

虫丽蝇蛹集金小蜂(*Nasonia vitripennis*)*hb* 基因突变体 *headless* 使其除上唇以外的头部体节、颌部和胸部体节全部缺失, 腹部第 7~第 10^[16,17]。半翅目昆虫美洲脊胸长椿(*Oncopeltus fasciatus*)*hb* 基因的 pRNAi 表型没有删除颌部、胸部任何体节, 而是颌部、胸部体节向腹部特征转变, 即发生了同源转化现象^[2]。直翅目昆虫双斑蟋(*Gryllus bimaculatus*)*hb* 基因的 pRNAi 不但使其胸部第 1 和 2 对胸足之间的部分区域缺失, 还使其颌部、胸部的其余体节向腹部特征转变^[18]。与长胚带的黑腹果蝇相比, *hb* 基因在短胚带的双斑蟋和美洲脊胸长椿中表现出不规范的间隙基因的功能, 说明昆虫在从短胚带向长胚带进化的过程中, *hb* 基因的功能由不规范逐渐进化到规范的间隙基因的功能^[2,18]。

尽管 *hb* 基因的功能在不同进化水平的昆虫中不同, 但其表达模式却具有一定的保守性^[6]。进一步比较不同类型、不同进化水平尤其是较为低等昆虫 *hb* 基因的表达模式和功能, 对于研究 *hb* 基因和昆虫体节形成的演化具有重要意义。东亚飞蝗属较低等的渐变态昆虫, 其胚胎发育属于典型的短胚带发育类型, 其已逐渐成为研究昆虫进化发育生物学、神经生物学等的模式物种^[19]。本研究组早前克隆了东亚飞蝗的 *hb* 基因, 并用 pRNAi 方法研究了 *hb* 基因的功能, 其共产生了 3 种表型, 其中表型 的颌部、胸部完全缺失, 腹部缩短并缺失了 3~4 个腹节, 最严重的表型

仅形成了前头部, 包括触角、复眼和上唇, 其余部分全部缺失^[7]。但东亚飞蝗 *hb* 基因在卵子形成和胚胎发育过程中的表达模式尚不清楚。本研究制备了 *hb* 基因的多克隆抗体, 在蛋白质水平研究了 *hb* 基因在卵子形成和胚胎发育过程中的表达模式。

1 材料与方法

1.1 实验动物

东亚飞蝗, 室内饲养种群, 光照周期 12 : 12 h(L : D)。BALB/C 小鼠购自第三军医大学实验动物中心。

1.2 主要试剂

含 *hb* 全长 cDNA 的质粒 pMD-hb, 用于原核表达 Hb 蛋白的质粒 pET30a(+), 大肠杆菌 BL21 和

JM109 等均由本实验室保存。BugBuster Protein Extraction Reagent, Ni-NTA His Bind Kit 为 Merck 公司产品。碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)和辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗鼠 IgG 购自 Sigma 公司。Engrailed 单克隆抗体 4D9 购自 Developmental Studies Hybridoma Bank。AP 和 HRP 底物显色试剂盒购自北京鼎国生物技术有限公司。分子克隆常用工具酶购自大连宝生物公司, 其他试剂均为国产试剂。

1.3 *hb* 的原核表达和纯化

将 *hb* 基因编码框中 *Xho* 酶切位点到终止密码子间共 464 个氨基酸的肽段进行原核表达。用 PCR 方法在编码框末端引入 6 个组氨酸和 *Hind* 酶切位点, 回收 PCR 产物, 用 *Hind*, *Xho* 对 PCR 产物和表达载体 pET30a(+)进行双酶切, 分别回收纯化目的片段, 16℃过夜连接, 将连接产物转化 JM109 感受态菌株。进行 PCR 和酶切鉴定, 挑选阳性克隆送上海生工公司用 T7 通用引物进行测序, 筛选出插入方向和序列均正确的阳性菌, 提取质粒转化 BL21 感受态菌株。表达工程菌 BL21 构建好以后, 优化诱导温度、诱导时间、IPTG 剂量等表达条件。按照试剂盒说明用镍亲和层析柱纯化融合蛋白。

1.4 Hb 多克隆抗体的制备

将纯化的蛋白与弗氏完全佐剂按 1 : 1 混匀, 皮下多点注射 BALB/C 小鼠, 初次免疫后每 2 周加强免疫 1 次, 末次免疫后第 7 天眼球取血, 免疫血清于 -70℃保存。

1.5 Western blot

Hb 融合蛋白与 Hb 多克隆抗体的 Western blot 分析按文献^[20]方法进行。

1.6 胚胎的收集

蝗虫交尾后收集其卵块, 详细记录每一个卵块的产卵时间, 将卵置于 30℃温度保湿培养, 每隔 1 h 取样 1 次, 置于 10 mL 离心管。胚胎的发育用产卵后的时间(hour after egg lay, hAEL)来描述, 以刚产下的卵记为 0 hAEL。

1.7 胚胎制备

胚胎的制备方法根据 Patel^[21]的方法稍做修改: 将胚胎用 10% 的 NaClO 处理 5 min, 去除卵壳; 用蒸馏水冲洗胚胎两次; 加入 5 mL PEM-FA 固定液 (PIPES 100 mmol/L, EGTA 2.0 mmol/L, MgSO₄ 1.0 mmol/L, formaldehyde 10%) 和 5 mL 庚烷, 轻轻摇动离心管约 30 min; 用移液枪尽可能去除下层固定液, 加入 5 mL 甲醇, 剧烈摇动离心管 30~60 s, 卵黄膜破裂, 固定好的胚胎沉到离心管的底部; 倒掉庚烷和甲醇, 用 100% 的甲醇冲洗胚胎 3 次, 每次 1 min, 然后进行免疫组化染色。

1.8 胚胎免疫组织化学染色

(1) 单抗染色. 将制备好的胚胎转移到 10 mL 离心管; 分别加入 5 mL 甲醇和 5 mL PBT(1×PBS, 0.1% Triton X-100), 水平摇床 100 r/min 摇 10 min; 去掉上清液, 加入 5 mL PBT, 轻摇 30 min; 重复 2 次; 加入 1 mL 封闭液室温封闭 2 h; 去掉封闭液, 加入 500 μL 抗血清(用抗体稀释液按 1:100 的比例稀释一抗), 4℃ 孵育过夜; 将一抗转移到另一个 1.5 mL 离心管, 4℃ 保存; 加入 5 mL PBT, 轻摇 30 min, 重复步骤 2 次; 加入 500 μL 碱性磷酸酶标记的二抗(用抗体稀释液按 1:1000 的比例稀释二抗), 4℃ 孵育过夜; 加入 5 mL PBT, 轻摇 30 min, 重复 3 次; 加入 10 mL BCIP/NBT 显色液, 避光显色 5~15 min, 阳性显色为蓝黑色, 蒸馏水冲洗; 甲基绿复染液复染, 蒸馏水冲洗, 加入 70% 的甘油, 即可用解剖镜观察。

(2) 双抗染色. 单抗染色结束后, 去掉染色液, 加入 5 mL PBT, 轻摇 30 min, 重复 2 次; 加入 1 mL 封闭液室温封闭 2 h; 去掉封闭液, 加入 500 μL Engrailed(En)单克隆抗体 4D9(用抗体稀释液按 1:50 的比例稀释一抗), 4℃ 孵育过夜; 加入 5 mL PBT, 轻摇 30 min, 重复步骤 2 次; 加入 500 μL 辣根过氧化物酶标记的二抗, 4℃ 孵育过夜; DAB 显色. 其余步骤同单抗染色。

1.9 卵巢管的固定与染色

取未受精雌蝗, 在 PBS 缓冲溶液中解剖出卵巢, 分离出卵巢管. 将卵巢管放入 5 mL PEM-FA 固定液中, 室温固定 20 min; 去掉固定液, 加入 5 mL PBT,

轻摇 30 min, 重复 2 次; 封闭和染色方法同 1.8 小节。

1.10 显微观察

染色后, 用 Nikon SMZ1500 体式显微镜观察并照相; 图像采集为 Nikon Nis elements BR 3.0 软件。

2 结果

2.1 Hb 融合蛋白的表达与鉴定

为表达 Hb 蛋白, 首先将 *hb* cDNA 片段克隆至 pET30 表达载体中. 重组表达载体 pET-hb 经测序验证正确后, 将该重组表达载体转化大肠杆菌 BL21 中, 对 BL21 工程表达菌株进行表达条件的优化, 确定理想表达条件. 提取细菌总蛋白, 用镍亲和层析柱纯化融合蛋白, 得到较纯的重组蛋白, 但仍有一些微弱的杂带. 切下靶蛋白条带回收, 洗脱后经 PAGE 电泳和考马斯亮蓝染色发现在回收产物中几乎没有其他蛋白杂带的存在(图 1). 将纯化的融合蛋白经 PAGE 电泳, 用 Histag 单克隆抗体进行 Western blot 分析, 检测到与纯化融合蛋白大小一致的单一条带(图 1). 表明纯化的确实是 Hb 的融合蛋白, 可以用来进一步制备 Hb 的多克隆抗体。

2.2 多克隆抗体的制备与特异性鉴定

用纯化的融合蛋白免疫小鼠, 3 次免疫后经小鼠眼球取血, 待血液室温凝固后于 4℃ 放置过夜, 吸取渗出的血清, 以 1:100 稀释. 用蛋白裂解液提取刚产下的卵和表达菌体的总蛋白, 进行 PAGE 电泳. 用稀释的抗 Hb 多克隆抗体进行 Western blot, 结果在这 2 组蛋白提取物中均能特异地检测到蛋白带, 与预期大小一致, 且无其他任何杂带(图 2). 表明获得的免疫血清能够特异性识别 Hb 蛋白, 也无交叉反应。

2.3 *hb* 在卵子形成过程中的表达

将卵巢管固定后用 Hb 多克隆抗体染色, 结果显示东亚飞蝗 *hb* 基因在卵细胞的核区表达(图 3). 在卵巢管的生殖区, 卵原细胞形成卵母细胞, *hb* 基因在卵母细胞的核区表达(图 3(A)); 在生殖区的卵母细胞和刚进入生长区的卵母细胞中, 核区位于中央(图 3(A)); 随着卵母细胞的逐渐成熟, 卵黄不断沉积, 细胞体积逐渐增大, 核区由中央逐渐向细胞的后极移动(图 3(B)和(C)).

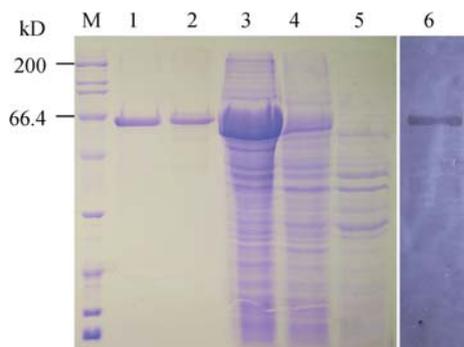


图 1 Hb 融合蛋白的 SDS-PAGE 电泳与 Western blot 分析
泳道 M: 蛋白 Marker; 泳道 1: 回收的融合蛋白; 泳道 2: 镍亲和层析洗脱的融合蛋白; 泳道 3: 优化表达条件后的菌体裂解物; 泳道 4: 未优化表达条件的菌体裂解物; 泳道 5: 转化空载体的菌体裂解物; 泳道 6: 融合蛋白的 Western blot 分析

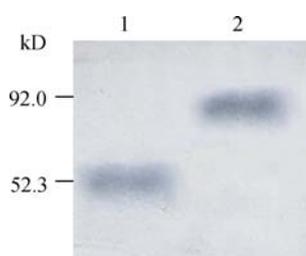


图 2 BL21 原核表达菌株和刚产的卵总蛋白的 Western blot 分析

泳道 1: 原核表达菌株总蛋白的免疫印迹分析;
泳道 2: 刚产卵总蛋白的免疫印迹分析

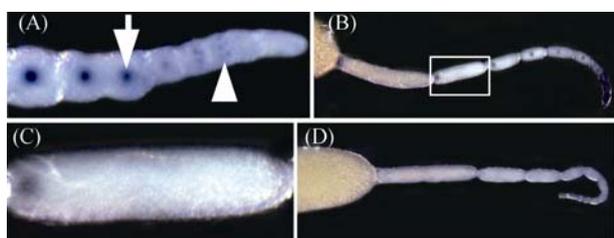


图 3 *hb* 基因在东亚飞蝗卵子形成过程中的表达

(A) 生殖区中 *hb* 的表达, 三角形示 *hb* 在生殖区中的表达, 箭头示 *hb* 在位于细胞中央的核区表达; (B) 生长区中 *hb* 在核区表达, 核区不断向后极移动; (C) B 中方框内细胞的放大图; (D) 阴性对照

2.4 *hb* 在胚胎发育过程中的表达

在刚产下的卵里, *hb* 基因仅在卵的后端约 15% 的区域内表达(图 4(A)). 囊胚形成后, 胚原基在卵后端的腹面开始形成, *hb* 基因在胚原基形成的地方表达量增加(图 4(B)). 在约 32 hAEL 时, 胚盘形成, *hb* 基因

在胚盘的中央呈带状表达(图 4(C)).

42 hAEL 时, 胚盘已分为原头和原躯干两部分, *hb* 基因在胚胎的中部成带状表达, 而原头和原躯干的后部不表达(图 4(D)). 随着胚胎的发育, 躯干部分开始伸长, *hb* 基因的表达也逐渐增强(图 4(E)和(G)), 到约 50 hAEL 时原躯干为原头长的 2 倍, *hb* 基因的表达带变深变宽, 并且呈现出表达水平不同的区域(图 4(H)). 采用体节标记基因 *en* 和 *hb* 基因的抗体进行双染, 证明表达较强的区域对应颌部, 将形成上颚、下颚和下唇, 后面次弱区域的边界处将形成胸部第一节(图 4(I)). 随后颌部和胸部区域 *hb* 基因的表达逐渐减弱, 腹部体节开始形成. 72 hAEL 时, 腹部后端出现一条强的表达条带(图 4(J)), 随着腹节的不断形成, 该表达条带分开为 3 个条带, 用 En 和 Hb 抗体双染确认这 3 个条带分别对应腹部的第 7~9 腹节(图 4(K)); 随后在第 9 腹节后再形成一个表达带(图 4(L)), 即第 10 个腹节(图 4(M)).

随着体节的形成, 头部、颌部和胸部体节上的附肢原基开始生长, 并通过分节形成相应的附肢. *hb* 在胸足和触角等附肢上也呈条带表达(图 4(N)), 说明 *hb* 基因可能也参与调控附肢的分节.

hb 基因还在东亚飞蝗胚胎的神经系统表达, 在胚胎上成“点”状(图 4(J))或典型的“箭头”形表达(图 4(L)和(N)), 每个点就是一个神经元细胞.

3 讨论

hb 基因是昆虫早期胚胎模式形成的关键基因. 目前为止, 对东亚飞蝗 *hb* 基因的表达模式还不清楚. 本研究采用免疫组化方法在蛋白质水平上研究了东亚飞蝗 *hb* 基因在卵子形成和胚胎发育过程中的时空表达模式. 用 *hb* 基因已经研究的几种昆虫中, 蝗虫、赤拟谷盗和双斑蟋是典型的短胚带昆虫, 黑腹果蝇、丽蝇蛹集金小蜂等是长胚带昆虫. 将蝗虫 *hb* 基因的表达模式和功能与黑腹果蝇等昆虫进行比较可以为昆虫体节形成的演化提供理论依据.

3.1 母体 *hb* 基因以蛋白质形式提供

hb 基因既是母体基因又是合子基因. 东亚飞蝗母体 *hb* 基因在卵子形成过程中以蛋白质的形式存在

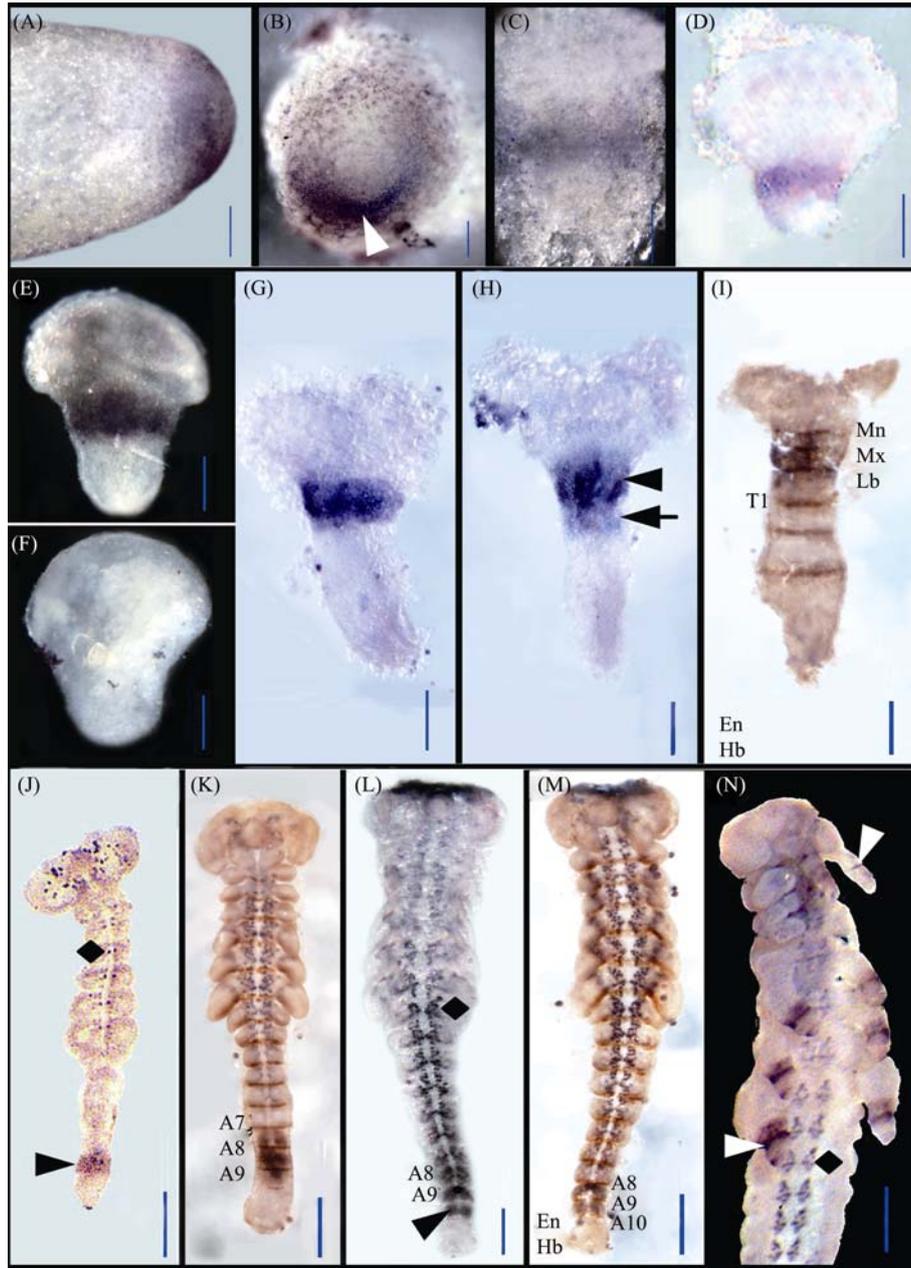


图 4 *hb* 基因在东亚飞蝗胚胎发育过程中的表达

(A) *hb* 基因在卵后端梯度表达; (B) *hb* 基因在胚原基的表达; (C) *hb* 基因在 32 hAEL 胚盘的表达; (D) *hb* 基因在 42 hAEL 胚胎的中部成带状表达; (E) *hb* 基因在 44 hAEL 胚胎的表达; (F) 阴性对照, 与(E)为同一时期胚胎; (G) *hb* 基因在 46 hAEL 胚胎中部的表达增强; (H) *hb* 基因在 50 hAEL 胚胎中部呈现梯度表达, 三角形示表达强的区域、箭头示表达弱的区域; (I) 与 H 为同一时期的胚胎, Engrailed 和 Hb 抗体双染, 棕红色为 En 抗体染色、蓝黑色为 Hb 抗体染色; (J) *hb* 基因在 72 hAEL 胚胎的表达, 三角形示腹部后端的强表达条带, 菱形示 *hb* 基因在神经细胞中的表达; (K) *hb* 基因在 90 hAEL 胚胎的表达, Engrailed 和 Hb 抗体双染确定腹部后端的表达条带形成第 7~第 9 腹节; (L) *hb* 基因在 4 天胚胎的表达, 三角形示第 9 腹节后形成一个新的表达条带, 菱形示 *hb* 基因在神经索上呈“箭头”状表达; (M) *hb* 基因在 4 天胚胎的表达, Engrailed 和 Hb 抗体双染确定新形成的条带为腹部第 10 腹节; (N) 三角形示 *hb* 基因在触角和附肢的表达, 菱形示 *hb* 基因在神经索上呈“箭头”状表达. (A) 卵前端朝左; (B) 卵后部正视图; (C)~(N) 胚胎头部朝上. Mn: 颚; Mx: 下颚; Lb: 下唇; T: 胸节; A: 腹节; En: Engrailed; Hb: Hunchback. 标尺: C 为 100 μ m; A, B, D, E, F, G, L, N 为 200 μ m; H, I, J, K, M 为 250 μ m

(图 3), 与沙漠蝗等蝗虫母体 *hb* 的表达情况一致^[6]。但在黑腹果蝇卵子形成过程中, *hb* 基因仅以 mRNA 的形式均匀地分布在卵细胞内^[8]; 丽蝇蛹集金小蜂、赤拟谷盗和双斑蟋等昆虫的母体中 *hb* 基因均以 mRNA 的形式分布^[2,15-17]。由此可见, 母体 *hb* 基因的表达在不同昆虫间具有较大的差异性, 与昆虫的进化关系或长、短胚带类型似乎没有一致性。果蝇母体 *hb* mRNA 在滋养细胞中转录, 通过胞质间桥转运到卵母细胞, 但不翻译, 说明果蝇母体 *hb* 基因受翻译调控^[8]; 蝗虫属于无滋式昆虫, *hb* mRNA 很可能是在卵母细胞核中转录^[6], 不同于果蝇母体 *hb* 基因的翻译调控机制。

在东亚飞蝗刚产下的卵里, *hb* 在卵后端约 15% 的区域内表达, 而在卵的前端无表达(图 4(A)); 囊胚形成后, 胚原基在卵后端的腹面开始形成, *hb* 基因在胚原基形成的地方表达量增加(图 4(B)), 约 32 hAEL 时, 胚盘形成, *hb* 基因在胚盘的中央呈带状表达(图 4(C)), 与沙漠蝗等蝗虫 *hb* 基因的表达情况完全一致, 仅在胚胎的发育速率上有差异而已。Patel 等人^[6]发现在沙漠蝗刚产下的卵里检测不到 *hb* mRNA, 说明卵后端分布的 Hb 为母体提供, 随着细胞化囊胚的形成, 合子 *hb* 基因才开始表达。

黑腹果蝇母体 *hb* 基因可能与头部体节形成有关; 丽蝇蛹集金小蜂母体 *hb* 基因能够指导早期胚胎前端的合子 *hb* 基因的表达, 与前后轴的模式形成没有关系^[17]。用 embryo RNAi(eRNAi)抑制双斑蟋合子 *hb* 基因与用 pRNAi 同时抑制母体和合子 *hb* 基因获得的表型在种类和数量上均无明显差异, 其母体 *hb* 基因的功能还有待进一步研究^[18]。蝗虫母体 *hb* 基因在卵子形成过程中开始表达, 但仅局限于核区内, Patel 等人^[6]认为, 蝗虫母体 Hb 蛋白与前后轴的形成没有关系, 而是在于区分胚胎与胚外组织。分别用 pRNAi 和 eRNAi 抑制东亚飞蝗 *hb* 基因, 两种方法产生的表型在种类和数量上也没有差异(未发表数据), 进一步证实了蝗虫母体 Hb 蛋白与前后轴的形成没有关系。

3.2 *hb* 基因在在颌胸部梯度表达

随着东亚飞蝗胚带的延长, *hb* 基因在颌胸部带状表达, 并呈现出明显的强弱梯度, 该表达区域将形成颌部和前胸部的体节(图 4(H)和(I))。东亚飞蝗 *hb*

基因在胚胎颌胸部的表达情况与黑腹果蝇、双斑蟋、沙漠蝗和赤拟谷盗等一致^[6,18], 说明 *hb* 基因在颌胸部的表达具有保守性。

黑腹果蝇合子 *hb* 基因突变使其下唇和 3 个胸部体节缺失^[14,22], 赤拟谷盗 *hb* 基因的 pRNAi 使其下唇、下唇和胸部完全缺失^[15]。东亚飞蝗 *hb* 基因的 pRNAi 产生了 3 种表型, 其中表型 的颌部、胸部完全缺失, 产生了一个大的间隙, 最严重的表型 仅形成了前头部, 包括触角、复眼和上唇, 其余部分全部缺失^[7]。与黑腹果蝇等昆虫 *hb* 基因的突变表型相比, 东亚飞蝗 *hb* pRNAi 表型要严重得多, 可能有以下原因: (1) 昆虫从短胚带向长胚带演化的过程中, *hb* 基因的部分功能逐渐为其他基因所替代, 如 *bicoid* 基因; (2) 蝗虫 *hb* 可能比黑腹果蝇 *hb* 调控更多的下游基因, 如东亚飞蝗 *hb* 有 2 个氮端锌指因子, 而黑腹果蝇没有氮端锌指因子; (3) 与黑腹果蝇相比, 可能基因的补偿作用或其他基因与 *hb* 基因的协同作用关系不同^[17]; (4) 蝗虫与黑腹果蝇在早期体节形成机制方面可能存在差异, 而且这些差异的产生可能与基因级联调控中的上游基因有关^[23,24], 如蝗虫 *hb* 基因在体节模式形成中可能有着更直接的作用^[6,25]; 另外, 在沙漠蝗中, 成对法则基因 *even-skipped* 和 *fushi-tatazu* 同源基因的表达不是成对模式^[23,24]。

尽管 *hb* 基因在不同昆虫颌胸部的表达具有保守性, 但其在颌胸部的功能却表现出较大的差异性。例如, *hb* 基因在黑腹果蝇、赤拟谷盗和丽蝇蛹集金小蜂的颌胸部表现为间隙基因的功能^[14-17,22], 但美洲脊胸长椿的 pRNAi 表型没有删除颌部、胸部任何体节, 而是颌部、胸部体节向腹部特征转变^[2], 双斑蟋的 pRNAi 仅使胸部第 1 和 2 对胸足之间的部分区域缺失, 颌部、胸部的其余体节也向腹部特征转变^[18]。在系统发育较为高等的黑腹果蝇和赤拟谷盗等昆虫中, *hb* 在其颌、胸部表现为典型的间隙基因的功能, 而在低等的美洲脊胸长椿和双斑蟋中, *hb* 却表现出不规范的间隙基因的功能, 这种现象可能是因为 RNAi 不彻底造成的, 也可能反映了 *hb* 基因的功能由不规范向规范逐渐演化的过程^[2,18]。然而, 东亚飞蝗 *hb* 基因的 RNAi 表型却没有发现同源转化现象, 而是呈现出典型的间隙基因的功能, 出现这种差异的原因还有待进一步研究。

3.3 *hb* 基因在腹部不连续表达

随着东亚飞蝗颌胸部体节的形成, 腹部开始分节, *hb* 基因在颌胸部区域的表达逐渐减弱, 而在腹部后端呈带状表达, 该表达区域称为“生长区”(growth zone), 表达呈现出非连续性(图 4(J)和(K)). Patel 等人^[6]发现 *hb* 基因在沙漠蝗腹部后端出现一条表达条带, 为腹部的第 4 和第 5 腹节, 随着第 4 和第 5 腹节条带的逐渐减弱, 在后部区域又出现了另外一条表达条带, 并且表达逐渐增强, 该条带为腹部的第 7 和第 8 腹节. 没有发现东亚飞蝗 *hb* 基因在腹部的表达对应第 4 和第 5 腹节的条带, 该结果与 *hb* 基因在双斑蟋腹部的表达情况相似^[18]. 与直翅目昆虫不一样, *hb* 基因在赤拟谷盗和美洲脊胸长椿腹部生长区连续表达^[2], 说明 *hb* 基因在直翅目昆虫腹部的非连续性表达可能是一种较为古老的模式.

蝗虫 *hb* 基因的 RNAi 造成腹部严重缩短, 并且缺失了 3~4 个腹节或整个腹部缺失^[7]. 与 *hb* 基因在腹部的表达一致, 说明 *hb* 基因是腹部伸长生长和分节所必需的调控基因. 同蝗虫类似, 双斑蟋 *hb* 在腹部的表达也不连续, RNAi 之后腹部缺失了 7 个腹节^[18]. 与此相反, 赤拟谷盗和美洲脊胸长椿 *hb* 在腹部连续表

达, 但仅美洲脊胸长椿的 RNAi 表型有腹部缩短的现象, 而赤拟谷盗 *hb* RNAi 却没有使腹部缩短或腹节缺失^[2]. 这些现象说明 *hb* 在不同昆虫腹部的功能也具有多样性.

生长区是腹部后端的胚原基区域, 细胞分裂旺盛, 使腹部不断伸长, 腹节不断增加^[2]. 关于生长区细胞的增殖是如何形成腹节的, 目前为止仍了解不多. 除了 *hb* 基因在生长区表达外, 还有其他基因也在生长区表达, 如 *caudal* 等, 基因在生长区各自的作用以及彼此之间的相互关系是腹部正常发育的关键问题. 因此, 比较研究这些基因在生长区的表达模式及其协调机制将有助于阐明生长区作用和腹节形成的机制.

东亚飞蝗母体 *hb* 基因在卵子形成过程中仅在核区中表达, 合子 *hb* 基因在胚胎的颌胸部呈带状梯度表达, 在胚胎后端的生长区呈非连续性表达, 这种非连续性表达可能是一种较为古老的表达模式. 经比较, *hb* 基因在昆虫颌胸部的表达较为保守, 而在卵子形成过程中和腹部的表达具有较大的变异性. 与黑腹果蝇等长胚带昆虫相比, 东亚飞蝗 *hb* 基因在体节形成的基因级联调控中具有更重要、更直接的调控作用.

参考文献

- 1 Davis G K, Patel N H. Short, long, and beyond: molecular and embryological approaches to insect segmentation. *Annu Rev Entomol*, 2002, 47: 669—699[DOI]
- 2 Liu P Z, Kaufman T C. *hunchback* is required for suppression of abdominal identity, and for proper germband growth and segmentation in the intermediate germband insect *Oncopeltus fasciatus*. *Development*, 2004, 131: 1515—1527[DOI]
- 3 Sander K, Gutzzeit H, Jäckle H. Insect embryogenesis: morphology, physiology, and genetical and molecular aspects. In: *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*, Vol. 1(ed. Kerkut G A and Gilbert L I). Oxford: Pergamon Press, 1985. 319—385
- 4 Rivera-Pomar R, Jackle H. From gradients to stripes in *Drosophila* embryogenesis: filling in the gaps. *Trends Genet*, 1996, 12(11): 478—483[DOI]
- 5 St Johnston D, Nüsslein-Volhard C. The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell*, 1992, 68: 201—219[DOI]
- 6 Patel N H, Hayward D C, Lall S, et al. Grasshopper *hunchback* expression reveals conserved and novel aspects of axis formation and segmentation. *Development*, 2001, 128: 3459—3472
- 7 He Z B, Cao Y Q, Wang Z K, et al. Role of *hunchback* in segment patterning of *Locusta migratoria manilensis* revealed by parental RNAi. *Dev Growth Differ*, 2006, 48: 439—445[DOI]
- 8 Tautz D, Lehmann R, Schnürch H, et al. Finger protein of novel structure encoded by *hunchback*, a second member of the gap class of *Drosophila* segmentation genes. *Nature*, 1987, 327: 383—389[DOI]
- 9 Simpson-Brose M, Treisman J, Desplan C. Synergy between the *hunchback* and *bicoid* morphogens is required for anterior patterning in *Drosophila*. *Cell*, 1994, 78: 855—865[DOI]
- 10 Casares F, Sánchez-Herrero E. Regulation of the *infraabdominal* regions of the bithorax complex of *Drosophila* by gap genes. *Devel-*

- opment, 1995, 121: 1855—1866
- 11 Tautz D, Sommer R. Evolution of segmentation genes in insects. *Trends Genet*, 1995, 11: 23—27
 - 12 Wu X, Vasisht V, Kosman D, et al. Thoracic patterning by the *Drosophila* gap gene, *hunchback*. *Dev Biol*, 2001, 237: 79—92[DOI]
 - 13 Clyde D E, Corado M S, Wu X, et al. A self-organizing system of repressor gradients establishes segmental complexity in *Drosophila*. *Nature*, 2003, 426: 849—853[DOI]
 - 14 Lehmann R, Nüsslein-Volhard C. *hunchback*, a gene required for segmentation of anterior and posterior regions of the *Drosophila* embryo. *Dev Biol*, 1987, 119: 402—417[DOI]
 - 15 Schröder R. The genes *orthodenticle* and *hunchback* substitute for *bicoid* in the beetle *Tribolium*. *Nature*, 2003, 422: 621—625[DOI]
 - 16 Pultz M A, Pitt J N, Alto N M. Extensive zygotic control of the anteroposterior axis in the wasp *Nasonia vitripennis*. *Development*, 1999, 126: 701—710
 - 17 Pultz M A, Westendorf L, Gale S D, et al. A major role for zygotic *hunchback* in patterning the *Nasonia* embryo. *Development*, 2005, 132: 3705—3715[DOI]
 - 18 Mito T, Sarashina I, Zhang H, et al. Non-canonical functions of *hunchback* in segment patterning of the intermediate germ cricket *Gryllus bimaculatus*. *Development*, 2005, 132: 2069—2079[DOI]
 - 19 Dong Y, Friedrich H M. Nymphal RNAi: systemic RNAi mediated gene knockdown in juvenile grasshopper. *BMC Biotechnol*, 2005, 5: 25[DOI]
 - 20 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金顿 R E, 等. 颜子颖, 王海林, 译. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 1998. 414—422
 - 21 Patel N H. Imaging neuronal subsets and other cell types in whole mount *Drosophila* embryos and larvae using antibody probes. In: *Methods in Cell Biology*, Vol. 44 (ed. Goldstein L S B and Fyrberg E A). San Diego: Academic Press, 1994. 445—487
 - 22 Jurgens G, Wieschaus E, Nüsslein-Volhard C, et al. Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch Dev Biol*, 1984, 193: 283—295
 - 23 Dawes R, Dawson I, Falciani F, et al. *Dax*, a locust Hox gene related to *fushi-tarazu* but showing no pair-rule expression. *Development*, 1994, 120: 1561—1572
 - 24 Patel N H, Ball E E, Goodman C S. Changing role of *evens-skipped* during the evolution of insect pattern formation. *Nature*, 1992, 357: 339—342[DOI]
 - 25 Ho K, Dunin-Borkowski O M, Akam M. Cellularization in locust embryos occurs before blastoderm formation. *Development*, 1997, 124: 2761—2768