

30K 蛋白对家蚕细胞及幼虫存活的作用^{*}

唐 平^{1,2**} 李 兵³ 沈卫德³ 陈劲频¹ 王文兵^{1***}

(1. 江苏大学生命科学研究院 镇江 212013; 2 江苏科技大学生物与环境工程学院 镇江 212018

3. 苏州大学生命科学研究院 苏州 215123)

Influence of 30K protein in *Bombyx mori* on survival BmN cells and larvae. TANG Ping^{1,2**}, LI Bing³, SHEN Wei-De³, CHEN Jing-Ping¹, WANG Wen-Bing^{1***} (1. *Institute of Life Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China*; 2 *School of Biology & Environment Engineering, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212018, China*; 3 *School of Life Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, China*)

Abstract The 30K protein was successfully expressed in the *Bombyx mori* L. (Bm) cells by baculovirus system. *B. mori* cells and larvae were infected with the recombinant baculovirus (Bm/r-30K), respectively. The viability of cells and larvae were assayed at various times post-infection and BmPAK6 was used as a control. The viability of BmN cells infected with baculovirus (Bm/r-30K) was higher than that of the cells infected with BmPAK6 virus, the viability and surviving time of *B. mori* larvae were increased as well. The results indicate that over-expression of the *B. mori* 30K gene contributes to increase the surviving time of BmN cells and larvae.

Key words *Bombyx mori*, 30K protein, baculovirus, expression, longevity

摘 要 利用杆状病毒表达系统在家蚕 *Bombyx mori* L 细胞 BmN 中表达家蚕 30K 蛋白,以亲本病毒 BmPAK6 为对照,将重组病毒 Bm/r-30K 分别感染 BmN 细胞及家蚕幼虫,观察其感染后不同时间的凋亡及存活率。与对照相比,重组病毒感染后的 BmN 细胞的存活率明显高于对照组,并且感染的家蚕幼虫存活时间也较长,表明体内过量表达家蚕 30K 蛋白有助于延长其细胞及幼虫的存活。

关键词 家蚕, 30K 蛋白, 杆状病毒, 表达, 生长

昆虫杆状病毒表达系统已广泛用于表达重组蛋白^[1,2],然而杆状病毒感染昆虫细胞后会导致细胞的死亡^[3]。因此,虽然高密度昆虫细胞成为杆状病毒感染后高效表达外源基因、获得大量的重组蛋白的基础,细胞的存活率及寿命却是影响包含外源基因的杆状病毒复制的重要因素^[4]。家蚕 *Bombyx mori* L 血清具有抑制昆虫细胞凋亡的作用^[5]。在昆虫细胞培养基中添加家蚕血清,可以通过抑制宿主细胞的凋亡而提高杆状病毒表达系统中重组蛋白的产量^[6]。家蚕的血清还可以抑制哺乳动物的凋亡,表明家蚕血清包含有抑制凋亡的成分^[7,8]。研究表明家蚕血清中抑制凋亡的成分包括 30 kD 和 70 kD 两类蛋白质,对其中抑制凋亡作用最强的蛋白质进行质谱分析,该蛋白与一种功能未知的低分子脂蛋白同源性高达 95%,分子量约为 30 kD^[9]。细胞凋亡的研究已表明 Bcl-2 家族及抑制凋亡蛋白家族 (inhibitor of apoptosis

protein, IAP) 具有抗凋亡作用,而家蚕 30K 蛋白的氨基酸序列与 Bcl-2 家族、IAP 家族蛋白等没有任何同源性^[10]。本试验在前期报道的基础上^[11],构建了含有克隆鉴定的家蚕 30K 基因的重组杆状病毒转移载体 pFastBacHTb-30KC19,利用 Bac-to-Bac 方法获得了家蚕 30K 重组病毒。以亲本病毒为对照,将 30K 重组病毒感染家蚕细胞及幼虫,研究 30K 蛋白的体内表达对家蚕细胞及幼虫的作用,为进一步研究 30K 蛋白的抑制凋亡机制提供参考。

^{*} 973 课题: 家蚕生物工程及基因组应用的拓展研究 (2005CB121005), 江苏省教育厅 高校科学研究项目: 家蚕细胞凋亡的关键基因克隆和鉴定 (02KJD18003) 和江苏大学自然科学创新预研基金项目 (04CX08)。

^{**} E-mail: jstangping@yahoo.com.cn

^{***} 通讯作者, E-mail: wenbingwang@ujs.edu.cn

收稿日期: 2007-05-17; 修回日期: 2007-07-23

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和细胞:感受态 DH10Bac 受体菌和昆虫细胞 BmN 由中国科学院上海生物化学与细胞研究所吴祥甫组馈赠;重组杆状病毒转座载体 pFastBacHTb-30KC19、大肠杆菌 DH5 α 由江苏大学生命科学研究组保存;家蚕(青松 $\times$ 皓月由中国农业科学院蚕业研究所提供。

1.1.2 试剂:限制性内切酶和缓冲液;RNase A 和 Taq DNA 聚合酶为 TaKaRa 公司产品;昆虫细胞培养基 Tc-100 和 His 单抗购自 Sigma 公司;胎牛血清 FBS 购自 Gibco 公司;蛋白分子量标准购自上海华舜生物工程公司;羊抗鼠 IgG 和 TCL 发光剂购自 Pierce 公司;其它常规试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 重组 Bacmid 穿梭载体的获得:取已构建的重组转移载体 pFastBacHTb-30KC19 1 μ L 加入到 150 μ L *E. coli* DH10Bac 感受态细胞中进行转化,取 150 μ L 涂布于含有 X-gal(1 mg/L)、IPTG(0.8 mg/L)、庆大霉素(7 μ g/mL)、卡那霉素(50 μ g/mL)、四环素(10 μ g/mL)的 LB 平板上,37 $^{\circ}$ C 温箱倒置培养 36~48 h,挑取白色单菌落,用碱法提取重组病毒 DNA,以 pUC M13 引物(Forward: 5'-CGCCAGGGTTTCCCAGTCACGAC-3', Reverse: 5'-AGCGGATAACAATTTCACACGGGA-3'),进行 PCR,鉴定重组杆状病毒 Bacmid-30KC19,扩增条件为:93 $^{\circ}$ C 变性 3min 后,进入以下循环:94 $^{\circ}$ C 45s, 55 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C, 5min, 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min;蓝色菌落作为对照。

1.2.2 Bacmid-30KC19 DNA 转染家蚕细胞:将提取的重组 Bacmid-30KC19 DNA 在脂质体的介导下转染昆虫细胞 BmN, 28 $^{\circ}$ C 培养 3 d 后观察细胞病变。细胞出现明显病变后,进行数次重复感染。收集细胞并煮沸裂解细胞,用 30K C19 基因的上游引物和下游引物进行 PCR 鉴定,同时用 Bacmid 转染的 Bm-N 细胞作为对照,进一步鉴定重组病毒 Bm/r-30KC19。

1.2.3 表达产物的聚丙烯酰胺变性凝胶电泳(SDS-PAGE)和 Western blotting 分析:将重组病毒 Bm/r-30KC19 感染的细胞转移到 Eppendorf 管中,3 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加 PBS 洗 2 次后加入 5 倍体积的昆虫细胞裂解缓冲液,混匀,室温裂解 1 min,10 000 r/min 离心 5 min,取上清 10 μ L,并加入 10 μ L SDS 上样电泳缓冲液(2 $\times$),100 $^{\circ}$ C 加热 3~5 min。经 SDS-PAGE 电泳后染色,观察特异表达的蛋白带。并将分离的蛋白转移至 PVDF 膜上,进行 Western-blotting 分析。一抗为 His(1:2 000)单抗,二抗为羊抗鼠 IgG(1:2 500),TCL 显色,以病毒 BmPAK6 为对照。

1.2.4 家蚕细胞及幼虫存活率测定:将细胞用台盼蓝染色 2~3 min,用血球计数板在光学显微镜下计数活或死细胞的数目,死细胞可吸收台盼蓝而呈现出蓝色,活细胞不被染色,镜下呈无色透明状。细胞存活率为活细胞数目除以总细胞数目的百分数。以 MOI 为 1 的重组 Bm/r-30KC19 病毒感染 BmN 细胞,每隔 24 h 计数,计算家蚕细胞的存活率。取 5 龄起蚕时幼虫,分为 2 组,每组 30 只。一组经微量注射器注射 BmPAK6 亲本病毒,另一组注射重组 Bm/r-30KC19 病毒。浓度均为 5×10^7 pfu/mL,注射剂量为 5 μ L/头,每隔 12 h 观察并统计幼虫死亡头数,计算家蚕幼虫的存活率。每组试验重复 3 次,数据均采用 SAS 5.0 数据分析软件包进行分析。

2 结果与分析

2.1 重组的 Bacmid-30KC19 的鉴定

挑取白色菌落,提取病毒基因组 DNA,以 pUC M13 引物进行了 PCR。发生重组的病毒,理论长度应为 2 430 bp 加上插入的 30KC19 基因长度,合计为 3.2 kb 左右;若未发生重组,产物长度为 300 bp 左右。电泳结果表明 30KC19 在 DH10Bac 受体菌中发生了转座(图 1)。

2.2 重组 Bacmid30KC19 DNA 转染家蚕细胞

重组 Bacmid-30KC19 DNA 转染昆虫细胞 BmN 后,在感染的细胞培养液中加入 X-gal,培

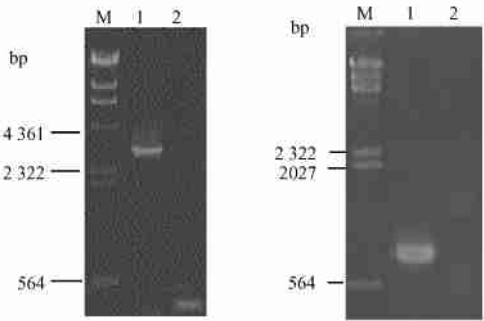


图 1 重组病毒 Bacmid-30KC19 的 PCR 鉴定(左)

图 2 重组病毒 Bm/r-30KC19 的 PCR 鉴定(右)

M. DNA 分子量标准 Marker (λ DNA/*Hind* III)

- 1 重组的 Bacmid-30KC19 的 PCR 产物
- 2 Bacmid 的 PCR 产物

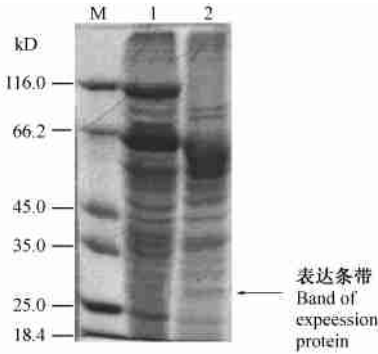


图 3 SDS-PAGE 检测 30K 蛋白在

BmN 细胞中的表达

- M. 标准分子量蛋白 1 感染 BmPAK6 收集的细胞总蛋白
2 感染 Bm/r-30KC19 收集的细胞总蛋白

养液未变蓝色,初步说明感染细胞的是重组病毒。以重组病毒 DNA 为模板,无插入片段的 Bacmid DNA 作为对照,用 30KC19 基因上游引物和下游引物进行 PCR 扩增,可见 1 条 770 bp 左右的条带(图 2)。将重组病毒命名为 Bm/r-30KC19。

2.3 表达产物的 SDS-PAGE 和 Western-blotting 检测

以亲本病毒 BmPAK6 感染的细胞为对照,用重组杆状病毒 Bm/r-30KC19 感染昆虫细胞 BmN。培养 72 h 后,收获感染的细胞。通过 SDS-PAGE 和 Western-blotting 对重组病毒的表达结果进行检验。结果显示,含重组病毒 Bm/r-30KC19 的表达产物在 32 kD 处出现 1 条特异条带,结果与预期的结果相符,而 BmPAK6 感染的细胞有 Lac Z 蛋白带的出现,说明 30KC19 DNA 基因在 BmN 细胞中得到了表达(图 3 和 4)。

2.4 家蚕细胞及幼虫存活率测定分析

以 MOI 为 1 的重组病毒 Bm/r-30K 及亲本病毒 BmPAK6 分别感染昆虫细胞 BmN 后,24 h 及 48 h 时 2 组细胞的存活率无明显差异,72 h、96 h 及 120 h 时经重组病毒 Bm/r-30K 感染组细胞存活率显著高于对照组 ($P < 0.05$) (图 5),表明重组 30K 蛋白在宿主细胞表达可提高细胞的存活率;以重组病毒 Bm/r-30K 感染家蚕幼虫

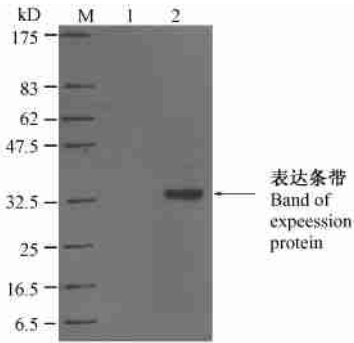


图 4 Western-blotting 验证 30K

蛋白在家蚕细胞中的表达

- M. 标准分子量蛋白 1 感染 BmPAK6 的细胞总蛋白
2 感染 Bm/r-30KC19 的细胞总蛋白

后,120 h 出现死亡,168 h 存活率为 50%左右,196 h 全部死亡,以同滴度的亲本病毒 BmPAK6 感染家蚕幼虫后,96 h 出现死亡,144 h 存活率为 50%左右,180 h 全部死亡。在相同时间内,感染重组病毒 Bm/r-30K 的家蚕幼虫的存活率明显高于对照组 ($P < 0.05$) (图 6)。结果表明,含 30K 基因重组病毒感染的宿主的存活时间可延长。

3 讨论

家蚕 30K 蛋白含量在胚胎关键发育期 II 达到最高,此后随着胚胎的发育而每天减少直至消失;家蚕 30K 蛋白合成始于 5 龄初期家蚕的脂肪体中,从 5 龄的第 3 天起,30K 蛋白从脂

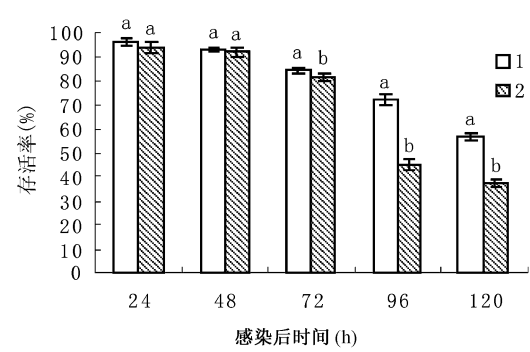


图 5 细胞感染 Bm/r-30KC19 和 BmPAK6 后存活率比较
1 Bm/r-30KC19 2 BmPAK6

注 图中标有的 a, b 表示 BmN 细胞感染病毒后不同时间存活率在 $P < 0.05$ 水平上差异显著。

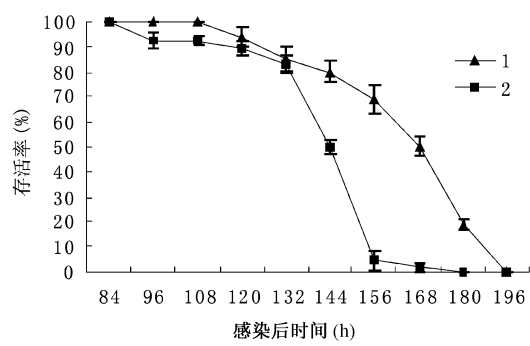


图 6 家蚕幼虫感染 Bm/r-30KC19 和 BmPAK6 后存活率及存活时间比较
1 Bm/r-30KC19 2 BmPAK6

肪体中消失,大部分转移到了血淋巴中;由幼虫向成虫的发育中,30K 蛋白又从血淋巴转移并贮存在脂肪体^[12,13],表明 30k 蛋白在家蚕发育过程中非常重要,并且可能具有多种功能。

Bac-to-Bac 昆虫杆状病毒表达系统是一种快速、高效真核表达系统,该系统利用转座子 Tn7 的位点特异性,大大简化并加快了病毒重组的过程^[14,15]。本文作者通过将家蚕 30K 基因引入杆状病毒表达的重组载体,利用 Bac-to-Bac 昆虫杆状病毒表达系统在昆虫 BmN 细胞中进行家蚕 30K 蛋白表达,经 SDS-PAGE 和 Western-blotting 检测,在约 32 kD 处有 1 条明显的特异表达蛋白带。同时,以重组病毒感染 BmN 细胞

及家蚕幼虫,计算其感染后不同时间的细胞的死亡率, BmN 细胞的存活率明显高于对照亲本病毒 BmPAK6,家蚕幼虫存活时间延长,同时期的死亡率下降,表明体内过量表达家蚕 30K 蛋白有助于病毒感染后宿主的生长。Park 等报道将大肠杆菌中表达的家蚕 30K 蛋白纯化后作为昆虫细胞培养基的一种成分,可抑制细胞的凋亡^[16]。提示家蚕 30K 蛋白无论是体内表达还是体外添加都具有延长宿主生长的作用,对于提高杆状病毒表达系统中重组蛋白的产量、深入了解 30K 蛋白与凋亡的关系具有重要的意义。

致 谢 感谢日本静冈大学 Park E. 教授和浙江大学张传溪教授提供用于转座的 BmPak6 Bacmid 和受菌体。

参 考 文 献

- 1 吕鸿声. 昆虫病毒分子生物学. 北京: 中国农业科学出版社. 1998. 547~580.
- 2 Oker-Blom C., Airenne K. J., Grabherr R. *Brief Funct Gen. Proteom.*, 2001, **2**(3): 244~253.
- 3 Dai X., Shi X., Pang Y., Su D.J. *Gen. Virol.*, 1999, **80**: 1 841~1 845.
- 4 Yamaji H., Tagai S., Fukuda H. *J. Biosci Bioeng.*, 1999, **87** (5): 636~641.
- 5 Won J. R., Eun J. K., Tai H. P. *Biotech. Prog.*, 1999, **15**: 1 028~1 032.
- 6 Rhee W. J., Kim E. J., Park T. H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, **295**(4): 779~783.
- 7 Kim E. J., Park H. J., Park T. H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, **308**(3): 523~528.
- 8 Klener P. J., Andera L., Klener P., Necase E., Zivny J. *Folia Biol.*, 2006, **52**: 34~44
- 9 Kim E. J., Rhee W. J., Park T. H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, **285**: 224~228.
- 10 Kim E. J., Rhee W. J., Park T. H. *Biotechnol. Prog.*, 2004, **20**: 324~329.
- 11 唐平, 王文兵, 李兵, 陈劲频, 沈卫德. 蚕业科学, 2006, **32**(2): 169~173.
- 12 Ogawa N., Kishimoto A., Asano T., Izumi S. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2005, **35**(3): 217~229.
- 13 Zhong B. X., Li J. K., Lin J. R., Liang J. S., Su S. K., et al. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 2005, **37**(5): 355~361.
- 14 曹翠平, 吴小锋. 昆虫学报, 2004, **47**(6): 837~843.
- 15 刘永平, 王方海, 苏志坚, 李广宏, 庞义. 昆虫知识, 2006, **43**(1): 1~5.
- 16 Park H. J., Kim E. J., Koo T. Y., Park T. H. *Enzyme Microbial. Technol.*, 2003, **33**: 466~471.