

柞蚕 Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制剂 *ApKTSPI* 基因克隆及表达特征分析*

王磊** 邱建烽 钱岑 朱保建 刘朝良***

(安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036)

摘要 【目的】克隆柞蚕 (*Antheraea pernyi*) Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制剂 (*ApKTSPI*) 基因的 cDNA 序列并进行序列分析, 研究 *ApKTSPI* 基因的组织表达分布及病原物免疫刺激后的表达模式, 原核表达 *ApKTSPI*。【方法】利用 RACE-PCR 方法扩增柞蚕 *ApKTSPI* 基因全长 cDNA, 生物信息学软件进行序列分析, 利用实时定量 PCR 检测柞蚕 *ApKTSPI* 基因的组织分布及免疫刺激后的表达模式, 利用 pET-28a 载体在大肠杆菌 BL21 中融合表达 *ApKTSPI*。【结果】柞蚕 *ApKTSPI* 基因的 cDNA 全长 568 bp, 开放阅读框编码 96 个氨基酸, 含一个 Kazal 结构域。*ApKTSPI* 基因在柞蚕 5 龄幼虫脂肪体中特异性高表达, 在核型多角体病毒、大肠杆菌和白僵菌免疫刺激后表达量都能上调, 但上调的程度和时间都不同。*ApKTSPI* 在大肠杆菌中成功诱导表达。【结论】获得了柞蚕 *ApKTSPI* 基因的 cDNA 全长, 并研究了 *ApKTSPI* 基因的表达模式, 为进一步研究其在柞蚕免疫中的功能及作用机理奠定了基础。

关键词 柞蚕, Kazal, 基因克隆, 表达特征

Molecular cloning and expression profiles of a Kazal-type serine protease inhibitor gene in *Antheraea pernyi*

WANG Lei** QIU Jian-Feng QIAN Cen ZHU Bao-Jian LIU Chao-Liang***

(College of life science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract [Objectives] To clone full-length cDNA of a Kazal-type serine proteinase inhibitor in *Antheraea pernyi* (*ApKTSPI*), to analyze its expression level in tissue and in fat bodies after a pathogen's immune-challenge, and to get it expressed in *Escherichia coli*. [Methods] *ApKTSPI* cDNA was amplified using the RACE-PCR method and the expression pattern analyzed using quantitative real time PCR. The *ApKTSPI* gene was inserted into the pET-28a vector. Recombinant plasmids were transfected into *E. coli* BL21, and the *ApKTSPI* protein was expressed with IPTG induction. [Results] The full-length cDNA of *ApKTSPI* was 568 nucleotides long and contained a 291 nucleotide ORF encoding a 96-residue amino acid sequence. The *ApKTSPI* gene was especially high expressed in fat bodies of the 5th larval instar. The *ApKTSPI* gene in fat bodies was up-regulated after challenging the immune system with NPV, *E. coli* or *Beauveria bassiana*. However, the degree and timing of up-regulation were different for each of the three pathogens. The recombinant *ApKTSPI* protein was successfully expressed in *E. coli*. [Conclusion] The *ApKTSPI* gene was successfully cloned and expressed in *E. coli*, and *ApKTSPI* may be involved in innate immune reactions against pathogens.

Key words *Antheraea pernyi*, Kazal, gene cloning, gene expression

蛋白酶抑制剂广泛存在于所有生物中, 在生命发育及生理过程中发挥重要作用。蛋白酶抑制

* 资助项目: 国家自然科学基金项目 (31301715); 安徽省自然科学基金项目 (1308085QC60); 安徽农业大学引进和稳定人才项目 (YJ2013-8)

**E-mail: wanglei20041225@163.com

***通讯作者, E-mail: cyschx@163.com

收稿日期: 2014-01-24, 接受日期: 2014-03-18

剂可以分为丝氨酸 (Serine) 蛋白酶抑制剂、半胱氨酸 (Cysteine) 蛋白酶抑制剂、天冬氨酸 (Aspartic) 蛋白酶抑制剂以及金属蛋白酶抑制剂等几大类。Kazal 型蛋白酶抑制剂属于丝氨酸蛋白酶抑制剂家族, 首先由 Kazal 从胰腺分泌胰蛋白酶抑制剂 (PSTI) 中分离到, 后命名为 Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制剂, 最初研究主要集中在脊椎动物如哺乳动物和鸟类。从 1990 年才在无脊椎动物有报道, 后陆续在虾类、吸血的昆虫、家蚕、蜗牛和蝗虫等中发现 (Rimphanitchayakit and Tassanakajon, 2010)。Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制剂在结构上具有保守的明显特征, 由一个或多个能结合蛋白酶的 Kazal 结构域组成。典型的 Kazal 结构域由 40~60 个氨基酸残基组成, 其中包括 6 个半胱氨酸残基形成 3 对结构域内二硫键 (1-5、2-4、3-6) 以稳定蛋白结构 (郑青亮等, 2006; Wang *et al.*, 2008)。

Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制剂主要通过调节丝氨酸蛋白酶活性来参与生理作用, 在无脊椎动物中被报道参与了抗凝血、生殖、抗菌以及免疫应答等功能 (Rimphanitchayakit and Tassanakajon, 2010)。在欧洲医蛭 *Hirudo medicinalis* 以及一些吸血昆虫 (如长红锥蝽 *Rhodnius prolixus*) 中分离到的 Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制剂可以抑制血液凝集, 以便于吸血昆虫取食 (Friedrich *et al.*, 1993; Schlott *et al.*, 2002)。罗氏沼虾 *Macrobrachium rosenbergii* 雄性生殖系统中的 Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制剂 (MRPINK) 能够抑制精子明胶水解酶 (Sperm gelatinase) 活性, 可能参与了雄性的生殖过程 (Li *et al.*, 2008)。从大蜡螟 *Galleria mellonella* 丝腺 (GmSPI2) 以及家蚕蛹中 (BmSPI2) 获所得到的 Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制剂, 可以抑制细菌和真菌的枯草杆菌蛋白酶 (Subtilisin) 和蛋白酶 K, 推测可能用于抑制外来微生物的蛋白酶以保护蚕茧免受病原物的侵染 (Nirmala *et al.*, 2001a, 2001b)。在中国对虾 *Fenneropenaeus chinensis* 的血细胞中鉴定到一个双 Kazal 结构域的 Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制剂 (KPI), RT-PCR 结果显示受到免疫刺激后其表达量上调, 说明可能参与宿主的免疫反应 (Kong *et al.*, 2009)。

柞蚕 *Antheraea pernyi* Guérin-Méneville 是鳞翅目大蚕蛾科柞蚕属的一种野生绢丝昆虫, 主要分布于我国辽宁、山东、河南、吉林、黑龙江、内蒙古等省区, 同时日本、韩国、印度等亚洲国

家也有少量分布 (Huang *et al.*, 2002)。柞蚕茧丝的产量仅次于桑蚕丝产量, 是优质的天然纺织原料, 同时柞蚕蛹还作为食品而广受欢迎。本研究利用前期抑制性消减杂交文库获得的柞蚕 Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制剂 (ApKTSPI) 基因片段 (Liu *et al.*, 2013), 设计引物 RACE-PCR 克隆了 ApKTSPI 基因全长, 对序列进行了分析, 研究了该基因在柞蚕不同组织的 mRNA 表达情况, 并分别研究了细菌、真菌和病毒 3 种不同病原物免疫刺激后 ApKTSPI 基因在柞蚕脂肪体中的表达模式, 同时利用大肠杆菌对 ApKTSPI 进行了体外重组表达, 为进一步研究该蛋白酶抑制剂在柞蚕免疫应答中功能和作用机理奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试昆虫: 柞蚕品种为“克青”。幼虫孵化后用新鲜的麻栎 (*Quercus acutissima* Caruth.) 叶喂养, 1~3 龄小蚕期采用塑料袋育, 4~5 龄大蚕期采用插枝育 (刘朝良等, 2004)。

供试菌种: 大肠杆菌 (DH5 α)、柞蚕核型多角体病毒 (Nuclear polyhedrosis virus, NPV) 和白僵菌 (*Beauveria bassiana*) 都来源于作者实验室保存的菌种。

供试试剂: Trizol 试剂购于 Invitrogen 公司。DNA marker、BamH I 和 Xho I 核酸内切酶、T4 DNA Ligase、pMD19-T 载体试剂盒、PrimescriptTM First-Strand cDNA Synthesis、5'-Full RACE Kit、3'-Full RACE Core 和 SYBR Premix Ex TaqTM II 为 TaKaRa 公司产品。DNA 纯化回收试剂盒和质粒提取试剂盒为 Axygen 公司产品。DNase 为 Promega 公司产品。其他生化试剂为上海生物工程产品。

1.2 总 RNA 提取

柞蚕各组织样品或处理后的脂肪体样品在研钵中加入液氮磨碎, 按照 Trizol 试剂说明书提取。利用微量核酸定量仪 (NanoDrop 1000 Spectrophotometer) 检测总 RNA 的纯度和浓度。

1.3 ApKTSPI cDNA 3'端和 5'端序列扩增

根据抑制性消减杂交文库获得的柞蚕 ApKTSPI 基因部分片段的序列信息, 利用 Primer

5' 软件设计特异的 3'-RACE 和 5'-RACE 引物 (表 1)。根据 5'-Full RACE Kit 和 3'-Full RACE Core 说明书分别制备第一链 cDNA 用于扩增 *ApKTSP1* 3' 端和 5' 端序列。5'-RACE-PCR 反应程序为 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 40 s, 60°C 退火 40 s, 72°C 延伸 90 s, 共 34 个循环, 接着 72°C 延伸 10 min。3'-RACE-PCR 反应程序为 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 60 s, 共 34 个循环, 再 72°C 延伸 10 min。PCR 扩增产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 切胶回收后与 pMD19-T 载体相连, 转化大肠杆菌 DH5 α 后, 挑选阳性克隆送上海生工测序。

1.4 *ApKTSP1* 序列分析

将所有测得的 *ApKTSP1* 5'-RACE、中间部分序列以及 3'-RACE 的 cDNA 序列经 DNASTar 软

件进行拼接, 并寻找开放阅读框 (ORF), 将其翻译成氨基酸序列。采用 SignalP3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/>) 在线预测信号肽序列。利用在线 BLAST 程序 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 寻找并下载 *ApKTSP1* 同源序列。蛋白质分子量和等电点预测都在 ExPasy (http://web.expasy.org/compute_pi/) 分析。蛋白质三级结构预测在 Swiss model server (<http://swissmodel.expasy.org/repository/>), 所有参数都为默认值, 并利用 PDB view 下的 POV-Ray 功能进行了重新绘制。利用 Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) 进行多重序列比对, 由 MEGA 4.1 软件以邻近法 (NJ 法) 构建系统进化树。

表 1 本研究中所用到的引物
Table 1 Primers used in the study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	目的 Purpose
ApKTSP1-5'	AACGCACACGCTGCCAAAGGACT	5'-RACE
ApKTSP1-3'	TCCTTTGGCAGCGTGTGCGTTAT	3'-RACE
ApKTSP1-SP	CGCGGATCCCGTCCGGAGAAATCCGACCTG	原核表达 Recombinant expression
ApKTSP1-AP	CCGCTCGAGTTAAGAAAGGCGAATTCCATC	
qApKTSP1-SP	ATTTTGGCGTCTTGTTTCGT	
qApKTSP1-AP	TCCGCAATGTGTCTTTGTGT	定量 PCR Real-time PCR
qAp18S-SP	CGATCCGCCGACGTTACTAC	
qAp18S-AP	GTCCGGGCCTGGTGAGATT	

下划线表示酶切位点。Restriction sites are underlined.

1.5 实时定量 PCR 检测 *ApKTSP1* 的 mRNA 表达水平

根据 *ApKTSP1* 序列在 Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>) 在线设计实时定量 PCR 引物 qApKTSP1-SP 和 qApKTSP1-AP (表 1)。同时, 设计柞蚕 18S 内参基因的实时定量 PCR 引物 qAp18S-SP 和 qAp18S-AP (表 1)。取 1 μ g 总 RNA, 加入无 RNase 的 DNase

处理 30 min, 以去除可能污染的基因组 DNA。利用 PrimeScriptTM Master Mix 进行反转录, 合成第一链 cDNA 用于定量 PCR 模板。反转录程序为 37°C 孵育 15 min, 85°C 孵育 5 s, 接着 4°C 保存备用。实时定量 PCR 反应体系为 20 μ L, 包括 SYBR Premix Ex TaqTM II 10 μ L, 10 μ M 引物各 1 μ L, cDNA 模板 1 μ L (20 ng), 灭菌蒸馏水 7 μ L。实时定量 PCR 反应程序为: 95°C 变性 30 s; 95°C 5 s, 60°C 30 s, 40 个循环。对样品进行了

10 倍梯度稀释测得 ApKTSPI 基因引物和内参基因 18S 引物扩增效率。PCR 结束后进行溶解曲线分析, 以保证单一的扩增产物。利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算(Livak and Schmittgen, 2001)检测 ApKTSPI mRNA 的相对表达量, 并以柞蚕 18S rRNA 基因 mRNA 的表达量做内参进行归一化处理(Liu *et al.*, 2013)。每个样品至少重复 3 次, 用 DPS software (version 9.50)(Tang and Zhang, 2012)进行单因素统计分析, 所有数据表示为 mRNA 相对表达量(平均值 \pm 标准差)。

1.6 ApKTSPI 基因在柞蚕不同组织的表达分析

分别取 5 龄第 3 天的柞蚕幼虫的各个组织(表皮、丝腺、脂肪体、中肠、马氏管和血细胞), 提取总 RNA 后按照 1.5 方法进行实时定量 PCR, 检测 ApKTSPI 基因在柞蚕不同组织的表达情况。

1.7 柞蚕免疫刺激处理后 ApKTSPI 基因表达模式分析

取 5 龄第 3 天的柞蚕幼虫进行免疫刺激处理, 利用微量注射器分别将注射大肠杆菌(DH5 α , 10 μ L, 10^6 个细胞)、柞蚕核型多角体病毒(NPV, 10 μ L, 10^6 个多角体)和白僵菌(*B. bassiana*, 10 μ L, 10^6 个细胞)注射到 5 龄第 3 天的柞蚕幼虫体内, 用凡士林封口, 以注射等体积生理盐水的幼虫作为对照。在注射 0.5、3、6、12 和 24 h 后分别收集幼虫的脂肪体, 提取总 RNA 后按照 1.5 方法进行实时定量 PCR, 检测 ApKTSPI 基因在不同免疫刺激后的表达模式。

1.8 ApKTSPI 基因的原核表达

以柞蚕脂肪体 cDNA 为模板, 设计引物

ApKTSPI-SP 和 ApKTSPI-AP(表 1), 采用 PCR 扩增 ApKTSPI 成熟蛋白(不含信号肽)核苷酸序列, 在设计引物时两端引入 BamH I 和 Xho I 酶切位点, 对 PCR 产物进行胶回收。PCR 回收产物与 pET28a 表达载体质粒分别用 BamH I 和 Xho I 双酶切, 采用 T4 DNA ligase 将酶切后的目的片段与同样酶切的 pET-28a 载体相连接, 并将连接产物转化至 *E. coli* Trans 5 α 感受态细胞, 挑取阳性克隆并菌落 PCR 验证, 并且对重组质粒进行序列测定。将插入序列正确且无突变无移码的重组表达载体转入 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞。含阳性克隆菌株在含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中 37 $^{\circ}$ C 震荡培养到 OD₆₀₀=0.6 时, 加入不同浓度 IPTG 诱导表达, 此后培养温度调整为 30 $^{\circ}$ C, 继续培养 5 h 后收集菌液。同时设置不加 IPTG 的菌液作为对照。菌液超声裂解后用 12% SDS-PAGE 检测重组蛋白表达情况。

2 结果与分析

2.1 ApKTSPI 基因克隆与序列分析

通过 5'-RACE 和 3'-RACE 都获得了单一的条带(图 1), 经过测序和序列拼接得到了 568 bp 的 ApKTSPI cDNA 全长, 该序列包含 291 bp 的开放阅读框(ORF), 编码 96 个氨基酸, 含 54 bp 5'非编码区和 223 bp 3'非编码区(GenBank 登录号: KJ546374)(图 2)。SignalP 3.0 预测 ApKTSPI 前 18 个氨基酸(MKATTLIIFAVLFVAVNC)为信号肽, 为分泌型蛋白。预测该蛋白分子质量为 10.52 ku, 理论等电点为 8.89。多重序列比对发现, 柞蚕 ApKTSPI 与其他鳞翅目昆虫保守性高,

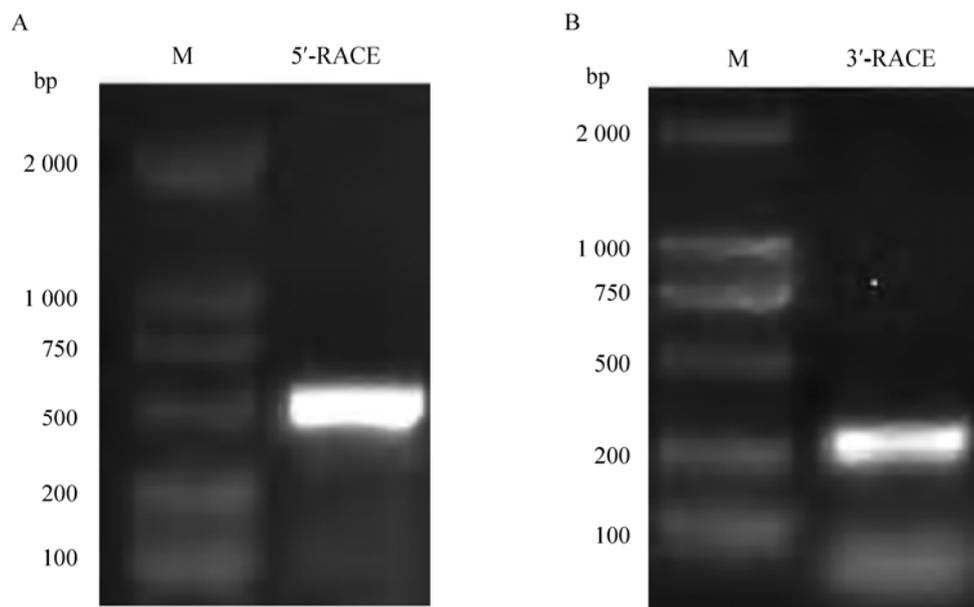


图 1 柞蚕 *ApKTSP1* 基因 RACE-PCR 扩增结果
 Fig. 1 RACE-PCR amplification of *ApKTSP1* gene

M: 标准分子量 (DL2000); 5'-RACE: 5'-RACE PCR 扩增产物; 3'-RACE: 3'-RACE PCR 扩增产物。
 M: DNA marker ladder (DL2000); 5'-RACE: PCR product of 5'-RACE; 3'-RACE: PCR product of 3'-RACE.

```

1      GAAAATATTGCCAGTCCACCTTGTGTGATAGACGCGGTTTGTCTTGTGGTAAAAATGAAG
1      M K
61     GCTACAACCTTGGATTATTTTTGCGGTCTTGTTCGTGGCTGTTAACTGCCGTCGGGAGAAA
3      A T T L I I F A V L F V A V N C R P E K
121    TCCGACCTGAAGCAGGTAAAAGCGGAAGCGGCACGTAAGAAAGCCTGTCTTCATGATTGC
23     S D L K Q V K A E A A R K K A [C] L H D [C]
181    ACCAACATTAATTCAGCCGATCTGCGCCAGTAAAGATGGCGACAAGCCAAAGTCCCTTT
43     T N I K F Q P I [C] A S K D G D K P K S F
241    GGCAGCGTGTGCGTTATGAATAATTATAATTGCGAACACAAAGACACATTGCGGAAAATC
63     G S V [C] V M N N Y N [C] E H K D T L R K I
301    AGCGACGGCGAGTGCCTGGCTCCGATGGAATTCGCCTTTCTTAATTCCTTGTCTCTAC
83     S D G E [C] A G S D G I R L S *
361    CCACAAATCGTCAATCTAATTTGTTCTTATTCTTATATTCAAGACATGACATGTTTTTTT
421    TCTATAATTTTATTACTTAGAATGTTAATCTAGATATAGTTATGTCATATAAGAGCTCG
481    GTTCAATATTGCTTTAGAAGTAAATTTTCATATTTAAGGATATAACGTATGTTAATTGTA
541    AAGCATAACAGCCACGAACAAGAC
    
```

* 资助项目: 国家自然科学基金项目 (31301715); 安徽省自然科学基金项目 (1308085QC60); 安徽农业大学引进和稳定人才项目 (YJ2013-8)

**E-mail: wanglei20041225@163.com

***通讯作者, E-mail: cyschx@163.com

收稿日期: 2014-01-24, 接受日期: 2014-03-18

图 2 柞蚕 *ApKTSP1* 基因 cDNA 序列及推导的氨基酸序列
Fig. 2 cDNA and deduced amino acid sequence of *ApKTSP1* gene

信号肽序列用下划线表示, 启动子 ATG 和终止子 TAA 加粗, 保守半胱氨酸残基加方框, GenBank 登录号为 KJ546374。
 Signal peptides are underlined; ATG and TAA are bold; Conserved cysteine residues are indicated by boxes; GenBank Accession No. KJ546374.

与印度柞蚕 *Antheraea mylitta* 相似性为 95.83%, 与家蚕 *Bombyx mori*、烟草天蛾 *Manduca sexta*、柑橘凤蝶 *Papilio xuthus*、黑脉金斑蝶 *Danaus plexippus* 和罗奴霉素毛虫 *Lonomia obliqua* 的相似性分别为 72.92%、69.79%、78.12%、70.83%

和 68.42% (图 3)。系统进化树分析柞蚕与印度柞蚕 *A. mylitta* 聚为一类, 亲缘关系最近, 其次是罗奴霉素毛虫 *L. obliqua*, 而与半翅目、双翅目及鳞翅目昆虫的亲缘关系较远 (图 4)。柞蚕 *ApKTSP1* 蛋白序列的 3D 模型构建基于家白蚁

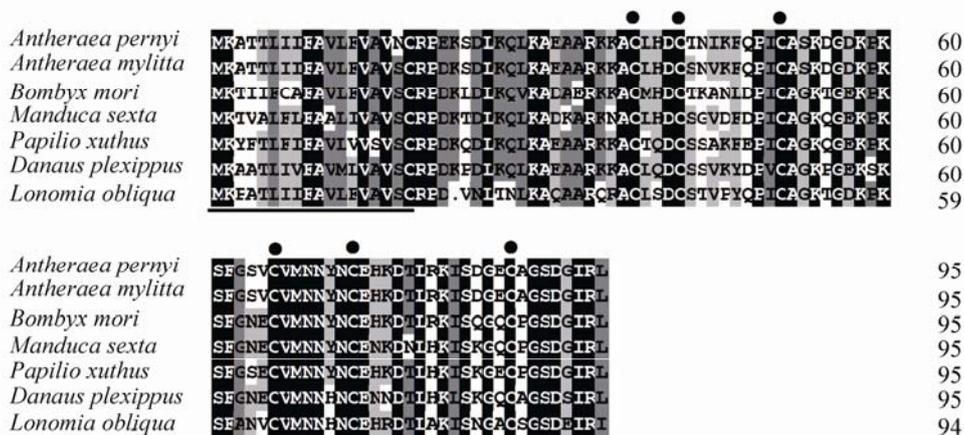


图 3 柞蚕 *ApKTSP1* 与鳞翅目 *Kazal* 型丝氨酸蛋白酶抑制剂的序列比对

Fig. 3 Amino acid sequence of *ApKTSP1* with *kazal*-type serine proteinase inhibitor in Lepidoptera

信号肽序列用下划线表示, 保守半胱氨酸残基上加圆点。括号内号码为对应物种 *Kazal* 型丝氨酸蛋白酶抑制剂序列的 GenBank 登录号。Signal peptides are underlined; Conserved cysteine residues are indicated by dot. The GenBank accession numbers of *Kazal*-type serine proteinase inhibitor are shown in the brackets.

柞蚕 *Antheraea pernyi* (KJ546374); 印度柞蚕 *Antheraea mylitta* (ABG72727); 家蚕 *Bombyx mori* (NP_001040250); 烟草天蛾 *Manduca sexta* (AAF16698); 柑橘凤蝶 *Papilio xuthus* (BAM17894); 黑脉金斑蝶 *Danaus plexippus* (EHJ63285); 罗奴霉素毛虫 *Lonomia obliqua* (AAV91449).

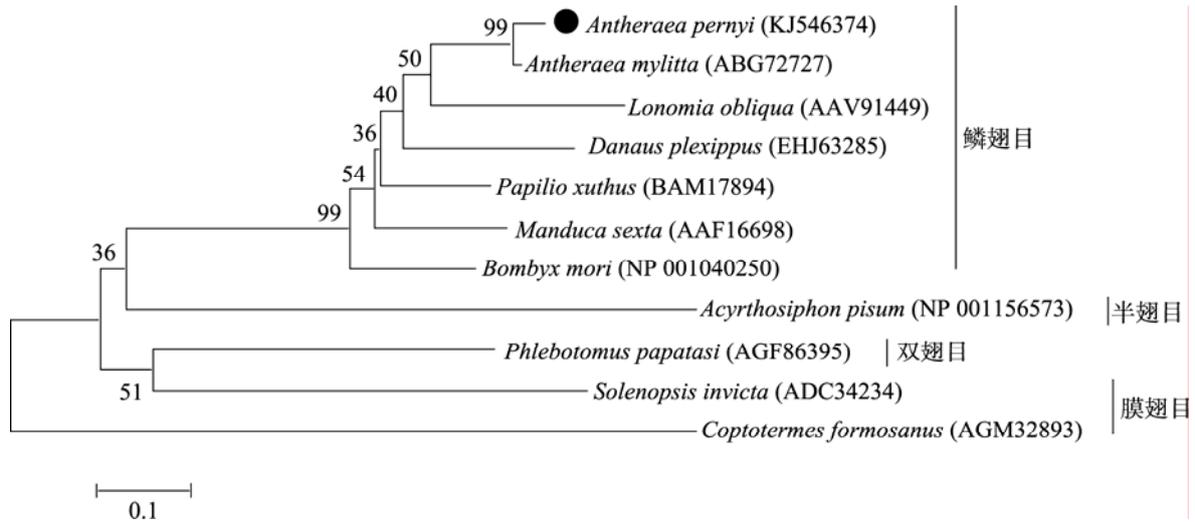


图 4 不同昆虫 Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制剂的系统发育进化树
 Fig. 4 Phylogenetic relationship of Kazal-type serine proteinase inhibitor in insects

Coptotermes formosanus Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制剂 (Kazal-type serine protease inhibitor, CfKTSPi) 三维构象模型 (2m25.1) 完成。三维构象模型结果显示, ApKTSPi 由一个中心螺旋和 2 个折叠组成 (图 5), 发现其与家白蚁 CfKTSPi 结构相似, 说明 Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制剂结构保守。

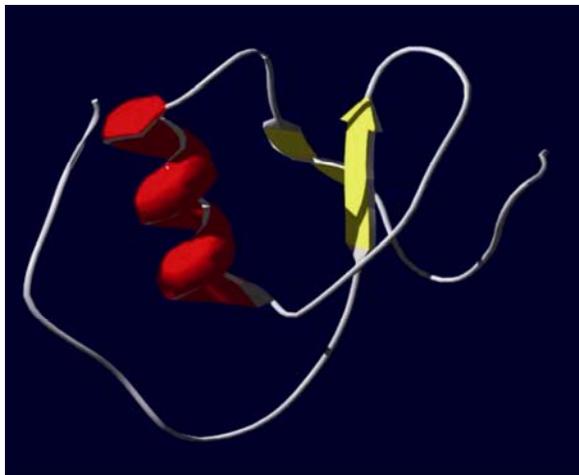


图 5 Swiss-Model 预测 ApKTSP 三维结构
 Fig. 5 Predictive 3D structure of ApKTSP by Swiss-Model

红色代表螺旋, 黄色代表折叠, 灰色代表其他。
 Red for helix; Yellow for strand; Gray for others.

2.2 ApKTSPi 基因在柞蚕幼虫组织的表达分布

通过实时定量 PCR 检测柞蚕 5 龄幼虫不同组织 ApKTSPi 基因的表达水平, 10 倍梯度稀释测得 ApKTSPi 基因引物和内参基因 18S 引物扩增效率分别为 92.15%和 93.43%, 两对引物溶解曲线都只有对应的单峰, 没有出现二聚体杂峰, 符合定量 PCR 要求。定量 PCR 结果表明该基因在柞蚕 5 龄幼虫的脂肪体中特异性的高表达, 其次是马氏管, 而在表皮、血细胞、丝腺和中肠中表达量相对较低 (图 6)。

2.3 免疫刺激后 ApKTSPi 基因在柞蚕幼虫脂肪体中的表达

分别用柞蚕核型多角体病毒 (NPV)、细菌 (*E. coli*) 和真菌 (*B. bassiana*) 3 种不同的病原

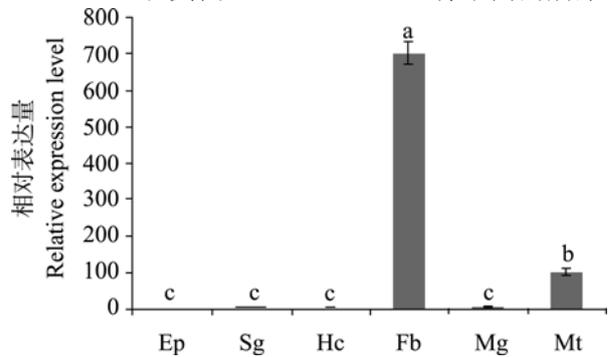


图 6 ApKTSPi 基因在柞蚕 5 龄幼虫组织的表达水平
 Fig. 6 Tissue distribution of ApKTSPi gene in 5th larval of *Antheraea pernyi*

Ep: 表皮 Epidermis; Sg: 丝腺 Silk gland; Hc: 血细胞

Hemocytes; Fb: 脂肪体 Fat body; Mg: 中肠 Midgut;

Mt: 马氏管 Malpighian tubule.

表皮的表达值设为 1; 图中数据为平均值 \pm 标准误; 标有不同字母表示 5%显著性差异 ($P<0.05$, 采用 Tukey 多重比较检验法比较)。

ApKTSPI mRNA in epidermis is designated as the calibrator; The bars represent the mean \pm SE; Histograms with different letters indicate significant different at 0.05 level ($P<0.05$) by Tukey's multiple-range test.

物免疫刺激柞蚕 5 龄幼虫, 利用实时定量 PCR 检测柞蚕 5 龄幼虫脂肪体中 *ApKTSPI* 基因的表达情况。注射 NPV 后 0.5 h, 柞蚕脂肪体中 *ApKTSPI* 基因表达显著升高 130 倍达到最高, 后表达量降低, 但注射后 3~6 h 仍维持较高表达水平, 12 h 后表达量显著降低 (图 7: A)。柞蚕幼虫注射 *E. coli* 后, 从第 3 小时开始脂肪体中

ApKTSPI 基因表达量升高, 在第 6 小时达到最高, 从 12 h 后表达量显著降低 (图 7: B)。注射 *B. bassiana* 后, 柞蚕脂肪体中 *ApKTSPI* 基因表达从 0.5 h 开始就显著升高, 在第 3 小时达到最高, 后表达量显著降低 (图 7: C)。3 种病原物都能够使柞蚕脂肪体 *ApKTSPI* 基因表达量升高, 但诱导表达模式不同。

2.4 *ApKTSPI* 的原核表达

经测序分析, 重组质粒 pET28a-*ApKTSPI* 构建成功, 插入序列正确, 无碱基突变, 并且目的基因的阅读框与表达载体的阅读框一致。SDS-PAGE 结果显示, 在 0.2、0.4 和 1.0 mmol/L IPTG

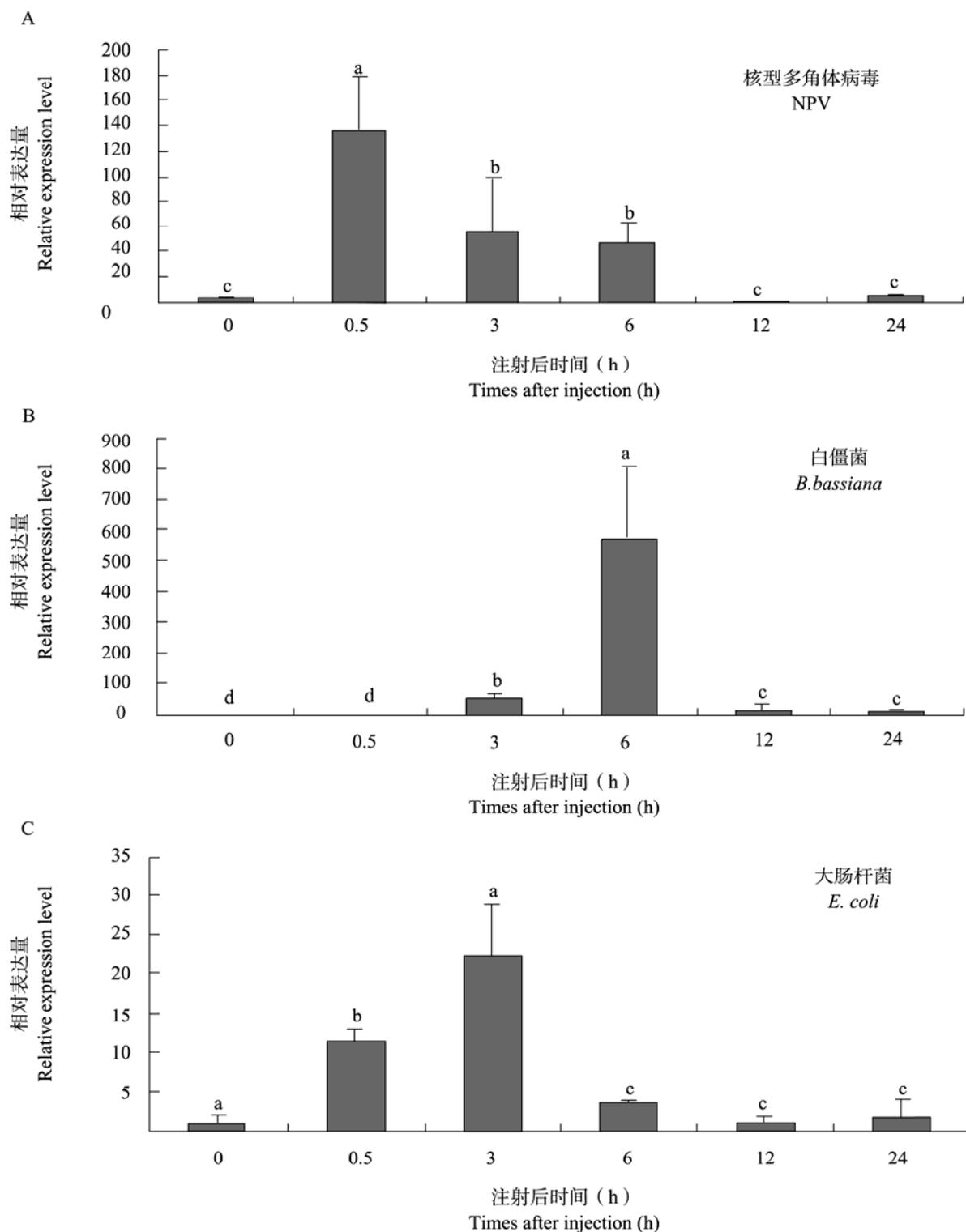


图7 核型多角体病毒 (A)、白僵菌 (B) 和大肠杆菌 (C) 免疫刺激后柞蚕脂肪体 *ApKTSPI* 基因的表达模式

* 资助项目：国家自然科学基金项目 (31301715)；安徽省自然科学基金项目 (1308085QC60)；安徽农业大学引进和稳定人才项目 (YJ2013-8)

**E-mail: wanglei20041225@163.com

***通讯作者, E-mail: cyschx@163.com

收稿日期: 2014-01-24, 接受日期: 2014-03-18

Fig. 7 Induced expression of *ApKTSPI* gene in *Antheraea pernyi* fat bodies after NPV (A), *B. bassiana* (B) and *E. coli* (C) immune-challenged

脂肪体处理 0 h 的表达值设为 1; 图中数据为平均值 ± 标准误差; 标有不同字母表示 5% 显著性差异 ($P < 0.05$, 采用 Tukey 多重比较检验法比较)。

ApKTSPI mRNA in fat body treated at 0 hour is designated as the calibrator; The bars represent the mean ± SE; Histograms with different letters indicate significant different at 0.05 level ($P < 0.05$) by Tukey's multiple-range test..

诱导下, 在分子量为 15 ku 处有一条诱导表达条带, 而未诱导的菌未出现目的条带, 表明重组 *ApKTSPI* 表达成功, 并且在 0.2 mmol/L IPTG 时 *ApKTSPI* 表达量最高 (图 8)。

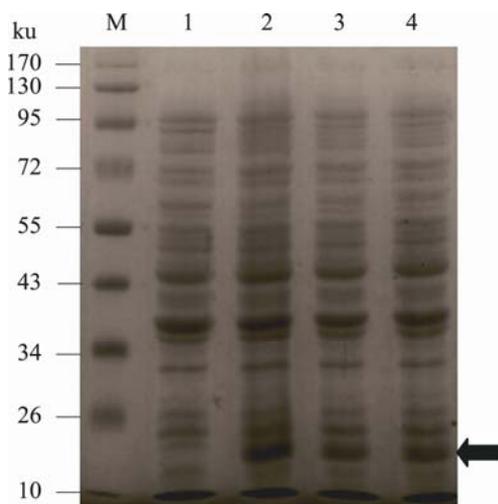


图 8 柞蚕 *ApKTSPI* 原核表达

Fig. 8 Prokaryotic expression of *ApKTSPI* in *E. coli*

M: 标准蛋白; 1: 未诱导对照; 2: 0.2 mmol/L IPTG 诱导; 3: 0.4 mmol/L IPTG 诱导; 4: 1.0 mmol/L IPTG 诱导。

M: Protein molecular weight marker; 1: Control without IPTG; 2: Induced by 0.2 mmol/L IPTG; 3: Induced by 0.4 mmol/L IPTG; 4: Induced by 1.0 mmol/L IPTG.

3 讨论

Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制剂在很多生物中都有报道, 通过与蛋白酶相互作用抑制蛋白酶活性而参与了很多的生理功能。在昆虫中也有一些报道, 主要是在家蚕、大蜡螟中 (Zheng *et al.*, 2007; Rimphanitchayakit and Tassanakajon, 2010;)。本研究克隆了柞蚕 Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制剂 *ApKTSPI* 基因 (GenBank 登录号: KJ546374), 含有 1 个典型的 Kazal 结构域, 氨基酸序列与同属的印度柞蚕蛋白酶抑制剂 (GenBank 登录号: ABG72727) 相似性最高, 而与其他目昆虫的相似性较低。印度柞蚕蛋白酶

抑制剂是通过细菌免疫刺激后筛选到的差异表达基因, 表明其可能参与了对细菌的免疫反应 (Gandhe *et al.*, 2006)。本研究所得到的 *ApKTSPI* 也是通过构建细菌免疫刺激抑制消减杂交差显文库获得的, 也暗示其可能参与了柞蚕对细菌的免疫反应。

定量 PCR 结果表明 *ApKTSPI* 基因在柞蚕脂肪体特异性的高表达, 而在其他组织中表达量低。昆虫的脂肪体既是重要的中间代谢组织, 又是重要的免疫反应器官, 分泌合成了多种与分子免疫相关的蛋白。大蜡螟和家蚕的丝腺和表皮组织中都报道了特异性高表达的 Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制剂, 而在昆虫中未见有 Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制剂在脂肪体特异性的高表达 (Rimphanitchayakit and Tassanakajon, 2010; 郑青亮等, 2010)。埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 的唾液腺中存在特异性高表达的 Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制剂 AaTI, 具有抗凝血作用 (Watanabe *et al.*, 2010)。在克氏原螯虾 *Procambarus clarkii* 中, 有 2 个 Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制剂 (hcPcSPI1 和 hcPcSPI2) 主要在血细胞中表达, 而 hcPcSPI3 和 hcPcSPI4 在肝胰腺中表达最高, 以不同的方式参与了克氏原螯虾的免疫反应 (Li *et al.*, 2009, 2010)。

病原微生物在入侵生物时经常利用表面蛋白酶作为致病因子来突破宿主的免疫防线 (Christeller, 2005)。为了防止病原微生物的入侵, 宿主产生一些蛋白酶抑制剂与病原物的蛋白酶相互作用抑制其酶活性。本研究通过实时定量 PCR 发现, 核型多角体病毒、细菌和真菌都能促进 *ApKTSPI* 基因的表达, 但上调表达的时间模式不同, 结果说明 *ApKTSPI* 可能参与了柞蚕对核型多角体病毒、细菌和真菌的免疫反应。斑节对虾 *Penaeus monodon* 的 SPIPm2 能抑制枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的活性 (Donpuksa *et al.*, 2009)。中国对虾 *F. chinensis* 在感染白斑综合征病毒 (WSSV) 后, 血细胞中 KPI 表达量上升 (Kong *et al.*, 2009)。海湾扇贝 *Argopecten irradians* 和栉孔扇贝 *Chlamys farreri* 体内都发现在鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 感染后, Kazal

型丝氨酸蛋白酶抑制剂的表达量都上升 (Zhu *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008)。

本研究在大肠杆菌中成功的表达了柞蚕 Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制剂 ApKTSPI, 为下一步制备抗体, 在体外研究 ApKTSPI 的活性与功能奠定了基础。柞蚕是野外放养绢丝昆虫, 受到很多病原物的侵扰, 本研究发现 ApKTSPI 参与了柞蚕对病原物的免疫应答反应, 并且具有广谱性, 下一步将研究 ApKTSPI 在柞蚕免疫中的作用机理, 为进一步理解昆虫免疫和为柞蚕抗病育种提供帮助。

参考文献 (References)

- Christeller JT, 2005. Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability. *FEBS J.*, 272(22): 5710–5722.
- Donpuđa S, Tassanakajon A, Rimphanitchayakit V, 2009. Domain inhibitory and bacteriostatic activities of the five-domain Kazal-type serine proteinase inhibitor from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.*, 33(4): 481–488.
- Friedrich T, Kroger B, Bialojan S, Lemaire HG, Hoffken HW, Reuschenbach P, Otte M, Dodt J, 1993. A Kazal-type inhibitor with thrombin specificity from *Rhodnius prolixus*. *J. Biol. Chem.*, 268(22): 16216–16222.
- Gandhe AS, Arunkumar KP, John SH, Nagaraju J, 2006. Analysis of bacteria-challenged wild silkworm, *Antheraea mylitta* (Lepidoptera) transcriptome reveals potential immune genes. *BMC Genomics*, 7: 184.
- Huang YJ, Kobayashi J, Yoshimura T, 2002. Genome mapping and gene analysis of *Antheraea pernyi* nucleopolyhedrovirus for improvement of baculovirus expression vector system. *J. Biosci. Bioeng.*, 93(2): 183–191.
- Kong HJ, Cho HK, Park EM, Hong GE, Kim YO, Nam BH, Kim WJ, Lee SJ, Han HS, Jang IK, Lee CH, Cheong J, Choi TJ, 2009. Molecular cloning of Kazal-type proteinase inhibitor of the shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immun.*, 26(1): 109–114.
- Li XC, Wang XW, Wang ZH, Zhao XF, Wang JX, 2009. A three-domain Kazal-type serine proteinase inhibitor exhibiting domain inhibitory and bacteriostatic activities from freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Dev. Comp. Immunol.*, 33(12): 1229–1238.
- Li XC, Zhang RR, Sun RR, Lan JF, Zhao XF, Wang JX, 2010. Three Kazal-type serine proteinase inhibitors from the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* and the characterization, function analysis of hcPcSPI2. *Fish Shellfish Immun.*, 28(5): 942–951.
- Li Y, Ma WM, Dai JQ, Feng CZ, Yang F, Ohira T, Nagasawa H, Yang WJ, 2008. Inhibition of a novel sperm gelatinase in prawn sperm by the male reproduction-related Kazal-type peptidase inhibitor. *Mol. Reprod. Dev.*, 75(8): 1327–1337.
- Liu QN, Zhu BJ, Wang L, Wei GQ, Dai LS, Lin KZ, Sun Y, Qiu JF, Fu WW, Liu CL, 2013. Identification of immune response-related genes in the Chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi* by suppression subtractive hybridization. *J. Invertebr. Pathol.*, 114(3): 313–323.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Nirmala X, Kodrik D, Žurovec M, Sehnal F, 2001a. Insect silk contains both a Kunitz-type and a unique Kazal-type proteinase inhibitor. *Eur. J. Biochem.*, 268(7): 2064–2073.
- Nirmala X, Mita K, Vanisree V, Žurovec M, Sehnal F, 2001b. Identification of four small molecular mass proteins in the silk of *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.*, 10(5): 437–445.
- Rimphanitchayakit V, Tassanakajon A, 2010. Structure and function of invertebrate Kazal-type serine proteinase inhibitors. *Dev. Comp. Immunol.*, 34(4): 377–386.
- Schlott B, Wohner J, Icke C, Hartmann M, Ramachandran R, Guhrs KH, Glusa E, Flemming J, Gorlach M, Grosse F, Ohlenschläger O, 2002. Interaction of Kazal-type inhibitor domains with serine proteinases: biochemical and structural studies. *J. Mol. Biol.*, 318(2): 533–546.
- Tang QY, Zhang CX, 2013. Data Processing System (DPS) software with experimental design, statistical analysis and data mining developed for use in entomological research. *Insect Sci.*, 20(2): 254–260.
- Wang B, Zhao J, Song L, Zhang H, Wang L, Li C, Zheng P, Zhu L, Qiu L, Xing K, 2008. Molecular cloning and expression of a novel Kazal-type serine proteinase inhibitor gene from Zhikong scallop *Chlamys farreri*, and the inhibitory activity of its recombinant domain. *Fish Shellfish Immun.*, 24(5): 629–637.
- Watanabe RM, Soares TS, Morais-Zani K, Tanaka-Azevedo AM, Maciel C, Capurro ML, Torquato RJ, Tanaka AS, 2010. A novel trypsin Kazal-type inhibitor from *Aedes aegypti* with thrombin coagulant inhibitory activity. *Biochimie*, 92(3): 933–939.
- Zheng QL, Chen J, Nie ZM, Lv ZB, Wang D, Zhang YZ, 2007. Expression, purification and characterization of a three-domain Kazal-type inhibitor from silkworm pupae (*Bombyx mori*). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 146(2):

- 234–240.
- Zhu L, Song LS, Chang YQ, Xu W, Wu LT, 2006. Molecular cloning, characterization and expression of a novel serine proteinase inhibitor gene in bay scallops (*Argopecten irradians*, Lamarck 1819). *Fish Shellfish Immun.*, 20(3): 320–331.
- 刘朝良, 王磊, 汪泰初, 朱保建, 董胜张, 2004. 不同饲养方式对柞蚕生长发育的影响. *安徽农业大学学报*, 31(2): 186–189. [LIU CL, WANG L, WANG TC, ZHU BJ, DONG SZ, 2004. Effects of different breeding styles on *Antheraea pernyi*'s growth. *Journal of Anhui Agricultural University*, 31(2): 186–189.]
- 郑青亮, 盛清, 张耀洲, 2006. Kazal 型蛋白酶抑制剂结构与功能研究进展. *生物工程学报*, 22(5): 695–700. [ZHENG QL, SHENG Q, ZHANG YZ, 2006. Progresses in the structure and function of kazal-type proteinase inhibitors. *Chinese Journal of Biotechnology*, 22(5): 695–700.]
- 郑青亮, 须苏菊, 周方平, 吕正兵, 张耀洲, 2010. 家蚕 Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 BmSPI3 的克隆与表达特征分析. *蚕业科学*, 36(3): 496–502. [ZHENG QL, XU SJ, ZHOU FP, LU ZB, ZHANG YZ, 2010. Molecular cloning and expression profile of a kazal-type serine protease inhibitor gene (BmSPI3) from *Bombyx mori*. *Science of Sericulture*, 36(3): 496–502.]