

中华蜜蜂 *AcNPC2b* 的原核表达和鉴定*

党晓群^{1,2**} 黄钰彬^{1,2} 李 颜^{1,2} 李小青^{1,2}

王程程^{1,2} 周泽扬^{1,2,3***} 许金山^{1,2}

(1. 重庆师范大学生命科学学院, 重庆 401331; 2. 重庆市媒介昆虫重点实验室, 重庆 401331;

3. 微孢子虫感染与防控重庆市重点实验室, 重庆 400715)

摘 要 【目的】 中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* (简称中蜂), 其胞内胆固醇转运体 *AcNPC2a* 能够识别并结合几种微生物的细胞壁, *AcNPC2* 存在于该蜂触角, 参与嗅觉通讯, 关于 *AcNPC2b* 的功能尚未见报道。

【方法】 通过对中华蜜蜂 *AcNPC2b* 基因进行原核表达, 以纯化的重组蛋白免疫小鼠, 制备多克隆抗血清; 利用荧光定量 PCR 和免疫印迹检测 *AcNPC2b* 的转录活性及蛋白水平, 通过微生物结合测定对 *AcNPC2b* 的功能进行探索。**【结果】** 中蜂 *AcNPC2b* 含有信号肽和 ML 结构域, 具有 3 个二硫键, 与果蝇 *Drosophila melanogaster* *DmNPC2b* 聚为一个亚枝。荧光定量 qRT-PCR 检测发现, 感染中蜂囊状幼虫病毒 (Chinse sacbrood virus, 简称 CSBV) 的幼虫体内 *AcNPC2b* 基因的表达呈现出先微弱下调再持续上调的趋势。获得了约 16 ku 的重组蛋白 *AcNPC2b* 并制备了多克隆抗体, 免疫印迹结果表明, 中蜂 *AcNPC2b* 蛋白在工蜂头、胸与中肠中的表达量最高, 触角、马氏管与脂肪体中次之。*AcNPC2b* 蛋白在正常与感染 CSBV 病毒的中蜂幼虫中均有表达, 且在感染 CSBV 的中蜂幼虫中有微弱上调。重组蛋白 *AcNPC2b* 微生物结合测定实验结果显示中蜂 *AcNPC2b* 重组蛋白均能与活的大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、芽孢杆菌以及白僵菌结合。**【结论】** 正常与感染 CSBV 病毒的中蜂幼虫体内 *AcNPC2b* 基因转录水平和 *AcNPC2b* 蛋白的表达含量存在差异, 重组蛋白 *AcNPC2b* 具有识别并结合病原菌的能力, 为后续深入研究 *AcNPC2b* 蛋白的分子功能奠定了一定理论基础。

关键词 中华蜜蜂; *NPC2b* 蛋白; 原核表达; 免疫印迹; 结合实验

Identification and prokaryotic expression of the *AcNPC2b* gene in *Apis cerana cerana*

DANG Xiao-Qun^{1,2**} HUANG Yu-Bin^{1,2} LI Yan^{1,2} LI Xiao-Qing^{1,2}

WANG Cheng-Cheng^{1,2} ZHOU Ze-Yang^{1,2,3***} XU Jin-Shan^{1,2}

(1. College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China; 2. Key Laboratory of Vector Insects, Chongqing 401331, China; 3. Chongqing Key Laboratory of Microsporidia Infection and Control, Chongqing 400715, China)

Abstract 【Objectives】 To investigate the expression of the *Apis cerana* Niemann-Pick disease type C2b (*AcNPC2b*) gene, an intracellular cholesterol transporter that can recognize and bind to the cell walls of several microorganisms. **【Methods】** The *AcNPC2b* gene was expressed in a prokaryotic bacteria and the purified recombinant protein obtained used to immunize mice to prepare polyclonal antiserum. The transcriptional and translational activity of *AcNPC2b* in various tissues were then detected by fluorescent quantitative PCR and western blotting, respectively. Finally, the function of *AcNPC2b* was investigated using a microbial binding assay. **【Results】** *AcNPC2b* contains signal peptide and ML domains with 3 disulfide bonds. A phylogenetic tree shows that *AcNPC2b* and the *DmNPC2b* gene of *Drosophila melanogaster* cluster on the same

*资助项目 Supported projects: 重庆市自然科学基金面上项目 (cstc2019jcyj-msxmX0564); 现代农业产业技术体系建设专项资金资助 (CARS-44); 国家自然科学基金项目 (31770160); 重庆市教委科学技术研究项目 (KJQN202000521); 重庆市留学人员回国创业创新支持计划项目 (cx2019137)。

**第一作者 First author, E-mail: dangxiaoqun@126.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: zyzhou@cqnu.edu.cn

收稿日期 Received: 2021-04-30; 接受日期 Accepted: 2021-08-04

sub-branch. qRT-PCR indicates that AcNPC2b gene expression is generally weakly down-regulated, then continuously up-regulated, in CSBV-infected larvae. A recombinant protein of about 16 ku was obtained. Western blotting results indicate that the AcNPC2b protein is most highly expressed in the head, thorax and midgut, followed by the antennae, Malpighian tubules and fat body. Immunoblotting indicates that the AcNPC2b protein was slightly up-regulated in CSBV-infected larvae compared to healthy larvae. The microbial binding assay showed that the recombinant protein rAcNPC2b protein binds directly to *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Beauveria bassiana*, which suggests that it plays a role in pathogen recognition and the immune response. **[Conclusion]** There were differences in both the transcription and translation of AcNPC2b between healthy and CSBV infected larvae. A recombinant AcNPC2b protein was able to recognize and bind to pathogenic bacteria. These results provide a theoretical foundation for subsequent in-depth study of the molecular function of the AcNPC2b protein.

Key words *Apis cerana cerana*; NPC2b; prokaryotic expression; western blotting; binding assay

蜜蜂作为自然界最重要的授粉昆虫, 具有巨大的经济价值与生态价值。中华蜜蜂囊状幼虫病病毒 (Chinese sacbrood virus, CSBV) 可导致中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* (简称中蜂) 蜂群群势变弱 (张雪琦等, 2020)。研究发现, 中蜂胞内胆固醇转运蛋白 1AcNPC1 可能与 CSBV 病毒感染有关 (刘永梅等, 2020)。胞内胆固醇转运体 NPC2 (NPC intracellular cholesterol transporter 2) 通常与 NPC1 协作共同参与胆固醇的转运 (Infante *et al.*, 2008)。NPC2 也因其蛋白结构具有与 MD-2 相关的脂质识别 (MD-2-related lipid recognition, ML) 结构域家族典型的 ML 结构域, 而被认定为 ML 蛋白家族新成员。在家蚕 *Bombyx mori* 的 BmNPC2 蛋白能直接与 β 葡聚糖结合, 说明 BmNPC2 在病原的识别过程中发挥了功能作用 (Miyake *et al.*, 2005)。家蚕血淋巴中纯化出来的 NPC2 同源蛋白——BmPP 能在体外有效地促进家蚕核型多角体病毒 (*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, BmNPV) 在细胞中增殖, 研究人员在培养基中加入重组 BmPP 蛋白, 能使细胞中 BmNPV 的病毒量提高 6 000-10 000 倍 (Kanaya and Kobayashi, 2000)。BmPP 能够增强 BmNPV 对鳞翅目昆虫细胞的侵染能力, 同时还能提高 BmNPV 在细胞中的增殖效率 (Iatrou and Sweyers, 2005)。同年, 发现 BmNPC2 能促进 BmNPV 在细胞中增殖 (Miyake *et al.*, 2005)。中蜂重组蛋白 AcNPC2a 能直接与活的大肠杆菌、苏云金芽孢杆菌和白僵菌的细胞壁结合, 表

明 AcNPC2a 蛋白在病原识别与先天免疫中发挥着一定的作用 (Lee *et al.*, 2014)。据报道, NPC2 蛋白可通过控制细胞内胆固醇的水平间接影响披膜病毒和高吞噬原生动物对宿主细胞的侵染和蚕食 (Bolaños *et al.*, 2016)。以上研究结果表明, 宿主 NPC2 蛋白在病原的识别以及免疫信号通路中发挥重要作用。

中蜂基因组中有 3 条 NPC2 基因序列, 分别为 AcNPC2a (KJ633823)、AcNPC2 (XM_017050206) 和 AcNPC2b (XM_017056830)。其中, AcNPC2a 能够识别并结合几种微生物的细胞壁, 可能与机体的先天免疫系统相关 (Lee *et al.*, 2014), AcNPC2 存在于中蜂触角中, 可能参与机体的嗅觉通讯 (黄钰彬等, 2020)。关于 AcNPC2b 的功能特征还未见报道。为了研究 AcNPC2b 的功能, 本研究通过体外原核表达、多克隆抗体制备、转录活性分析以及微生物结合测定等实验对中蜂 AcNPC2b 蛋白进行功能初探, 为后续深入研究 AcNPC2b 蛋白的分子功能奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

中蜂工蜂和幼虫均采自重庆师范大学生命科学学院资源昆虫及其病原微生物学研究室实验蜂场, 其中工蜂冻存于 -80 °C 冰箱; CSBV 病毒粒子分离自重庆市沙坪坝区中梁山患囊状幼虫病的中蜂蜂群。大肠杆菌 *Escherichia coli*

与金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 由重庆师范大学资源昆虫及其病原微生物学研究室提供; 枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 与球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 由西南大学家蚕基因组生物学国家重点实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 引物合成与荧光定量 根据 GenBank 中登录的中蜂 *AcNPC2b* 基因序列设计特异性引物, 用于扩增中蜂 *AcNPC2b* 基因, 引物序列设计如下: 上游引物 *AcNPC2-F*: CGGAATTCATGAGGGGAACCAATTCTCGT, 下游引物 *AcNPC2-R*: CCCAAGCTTTCAATTGGTGATCTTCGCTG, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。收集正常和感染 CSBV 病毒 12、24、48 和 72 h 的中蜂幼虫, 采用 Trizol 法提取总 RNA, 反转录为 cDNA, 并通过 qRT-PCR 检测 *AcNPC2b* 基因在 CSBV 感染过程中的转录水平。体系如下: Green Master 2×conc. 10 μ L, 正反向引物各 1 μ L, ddH₂O 7 μ L, 并加入 1 μ L 相应的 cDNA 混匀, 每个样品重复 3 次, 并进行 3 次生物学重复。反应程序为: 预变性 95 $^{\circ}$ C, 10 min; 变性 95 $^{\circ}$ C, 10 s, 退火温度 55 $^{\circ}$ C, 10 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C, 20 s, 25 个循环。

1.2.2 目的基因 *AcNPC2b* 的获取以及重组质粒 pCzn I -*AcNPC2b* 的构建 以 cDNA 为模板, PCR 扩增 *AcNPC2b* 基因。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定以及纯化回收后, 与 pMD19-T 载体连接, 连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞中, 筛选阳性克隆并提取质粒, 重组质粒经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定后, 送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。测序正确的重组质粒 pMD19-*AcNPC2b* 亚克隆至 pCzn I 载体。

1.2.3 *AcNPC2b* 蛋白的原核表达纯化及抗血清的制备 将验证成功的质粒 pCzn I -*AcNPC2b* 转入大肠杆菌 *Actric-Express*TM 感受态细胞中。挑取单克隆菌进行 IPTG 诱导表达。纯化步骤参照 Ni-NAT Superflow Cartridge (QIAGEN) 操作说明书。纯化的蛋白作为抗原免疫云南昆明雌性小鼠, 制备多克隆抗血清。

1.2.4 中蜂各组织总蛋白的提取以及免疫印迹

检测 实验蜂场随机取中蜂工蜂 20 头, 体表消毒后于灭菌 ddH₂O 中按照触角、头、胸、中肠、马氏管、脂肪体共 6 个组织进行解剖分离, 称取 0.025 g 各组织于玻璃珠中进行总蛋白的提取。同时, 提取正常中蜂幼虫与感染 CSBV 病毒幼虫的总蛋白, 分别以多克隆抗体 Anti-*AcNPC2b* 与 HRP 标记的羊抗鼠(稀释比为 1:1 000)为一抗和二抗进行免疫印迹分析。该实验进行 3 次生物学重复。

1.2.5 重组蛋白 *AcNPC2b* 的复性及微生物结合实验 将重组蛋白 *AcNPC2b* 进行复性, 同时活化大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌以及球孢白僵菌。具体方法参照(Lee *et al.*, 2014)。

1.3 数据处理

将实验所得数据利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法对中华蜜蜂幼虫 *AcNPC2b* 进行相对定量分析, 使用 Microsoft Office Excel 2007 处理 Cq 值并进行统计分析, 用 Excel 作图。健康中蜂幼虫和感染 CSBV 中蜂幼虫中 *AcNPC2b* 的蛋白水平用免疫印迹图在 SensiCapture 中测得灰度值后再使用 Excel 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 中华蜜蜂 *AcNPC2b* 基因序列生物信息分析与转录活性分析

中蜂 *AcNPC2b* 基因序列可编码 154 个氨基酸, 含有一个 ML 结构域。多重序列比对分析如图 1 所示, 各个物种的 NPC2 同源序列相似度较高, *AcNPC2*、*AcNPC2a* 和 *AcNPC2b* 均含有 6 个半胱氨酸, 在序列中部, *AcNPC2a* 具有“QY”保守氨基酸, 而对应位置 *AcNPC2* 和 *AcNPC2b* 则具有“PF”保守氨基酸; 在 C 端, *AcNPC2a* 具有“CFKIPAKV”保守氨基酸, 而 *AcNPC2* 则是“CVLIPARI”, *AcNPC2b* 为“CFEVPKAI”。*AcNPC2b* 与 *AcNPC2a* 的相似性为 29%, *AcNPC2b* 与 *AcNPC2* 的相似性为 31%, *AcNPC2* 与 *AcNPC2a* 的相似性为 33%。系统进化分析表明, NPC2 蛋白序列在不同物种之间的同源性非常高, 所有序列聚类为两个大的亚枝, 中蜂编码

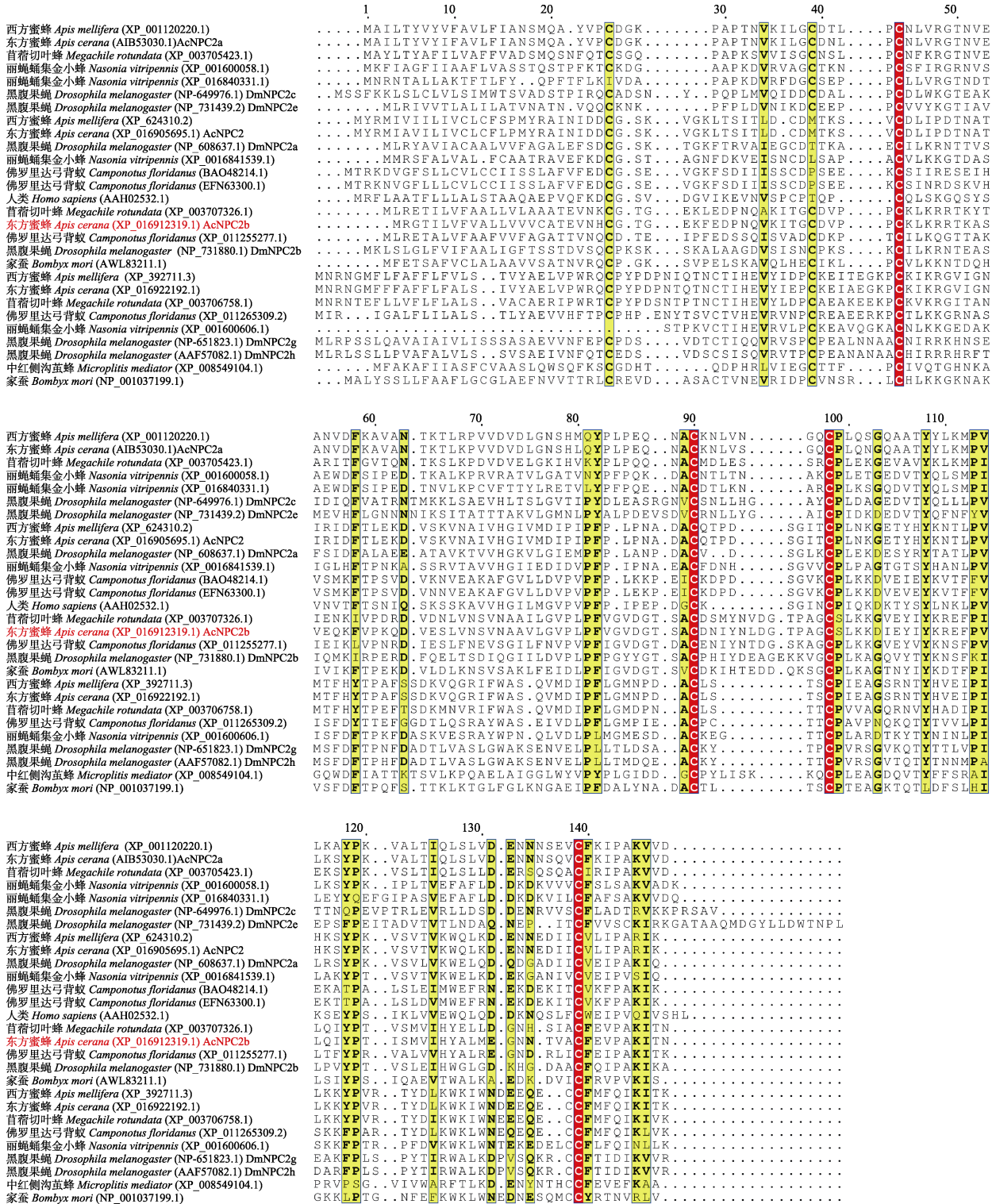


图 1 中华蜜蜂 AcNPC2b 多重序列比对
 Fig. 1 Multiple sequences alignment of AcNPC2b

红色框表示所分析物种 NPC2 序列中的氨基酸高度一致；黄色框表示所分析物种中氨基酸相似度高于 50%。

序列名称中红色字体为本研究中的中华蜜蜂 AcNPC2b。

Red frame indicates that amino acids of NPC2b from species analyzed shared highest identity; yellow frame indicates that amino acids of NPC2b from species analyzed shared identity more than 50%.

The red word indicates AcNPC2b sequences analyzed in this study.

的 3 个 NPC2 蛋白和 1 个 ML 家族同源蛋白与西方蜜蜂 *Apis mellifera* (简称西蜂) 聚为一枝, 说明中蜂与同为膜翅目的西蜂的 NPC2 同源序列进化关系最近。中蜂 AcNPC2b 与果蝇 *Drosophila melanogaster* DmNPC2b 聚为一个亚枝 (图 2), 暗示它们可能行使着相似的生物学功能。

为探究 AcNPC2b 蛋白是否与 CSBV 侵染有关, 对正常中蜂幼虫进行了 CSBV 病毒的添食感染实验。荧光定量 qRT-PCR 检测发现, AcNPC2b 基因在正常的中蜂幼虫与感染 CSBV 病毒的中蜂幼虫体内转录水平存在差异 (图 3)。

2.2 中华蜜蜂 AcNPC2b 的原核表达及多克隆抗体制备

通过 PCR 及分子克隆, 成功构建 pMD19-T-

AcNPC2b, 并将其亚克隆至重组表达质粒 pCzn I -AcNPC2b 并导入 Acrtic Express 感受态细胞中进行诱导表达, SDS-PAGE 电泳检测发现, 重组蛋白主要以包涵体的形式表达 (图 4)。随后对重组蛋白 AcNPC2b 进行大量诱导表达并纯化, 将纯化后的重组蛋白作为抗原免疫昆明雌性小鼠以制备相应的多克隆抗体 Anti-AcNPC2b。免疫印迹分析发现, 在 16 ku 左右处检测到单一的杂交信号条带 (图 5), 说明重组蛋白 AcNPC2b 的多克隆抗体制备成功。

2.3 AcNPC2b 蛋白在中华蜜蜂各组织中的表达检测

中华蜜蜂各组织总蛋白提取结果如图 6 所示, 蛋白条带较为丰富。以多克隆抗体 Anti-

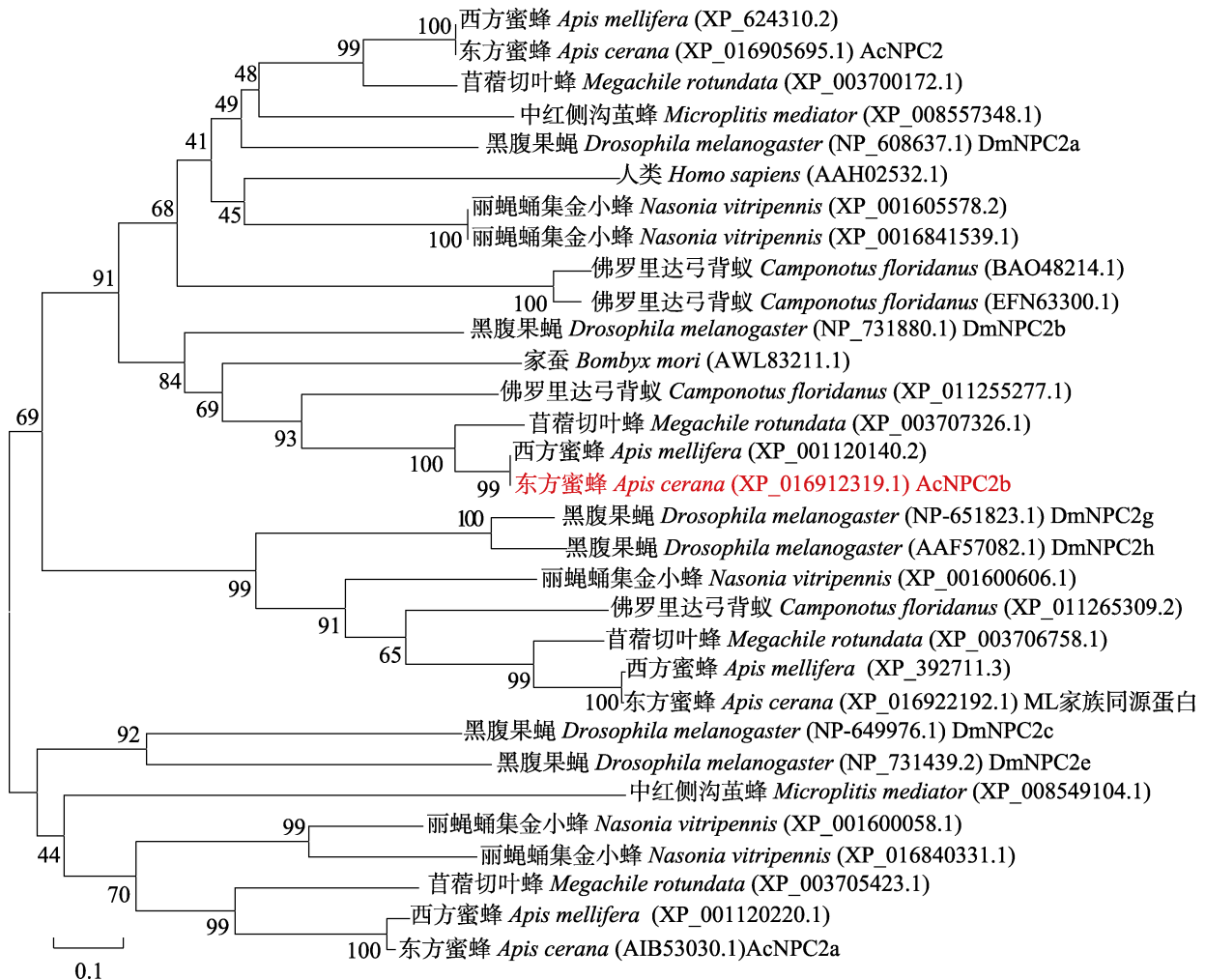


图 2 中华蜜蜂 AcNPC2b 同源蛋白系统进化分析

Fig. 2 Phylogenetic tree of AcNPC2b proteins among different species

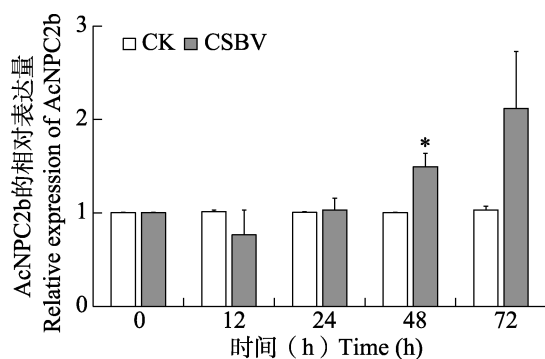


图 3 qRT-PCR 检测 AcNPC2b 在中华蜜蜂幼虫体内的转录水平

Fig. 3 qRT-PCR analysis of AcNPC2b transcription level in the larvae of *Apis cerana cerana*

CK 表示正常中蜂幼虫组, CSBV 表示感染中蜂囊状幼虫病毒 CSBV 幼虫组。*表示与正常幼虫相比, AcNPC2b 在感染 CSBV 的幼虫中转录水平差异显著 ($P < 0.05$)。

CK indicates the healthy larvae of *A.c.cerana*, CSBV indicates the CSBV-infected larvae of *A.c.cerana*.

* indicates that the transcriptional level of AcNPC2b from the CSBV-infected larvae is difference compared with the healthy larvae ($P < 0.05$).

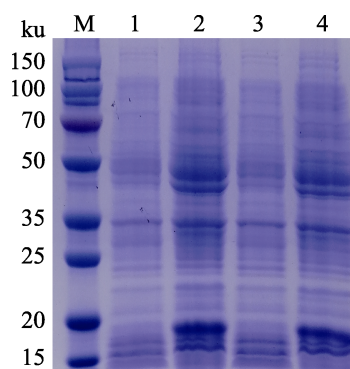


图 4 重组蛋白 AcNPC2b 诱导表达 SDS-PAGE 检测

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the expression of the recombinant protein AcNPC2b

M: 双色预染蛋白 marker; 1: 重组菌 pCzn I -AcNPC2b 未加 IPTG 诱导的总蛋白; 2: 重组菌 pCzn I -AcNPC2b 加 IPTG 诱导 15 h 的总蛋白; 3: 重组菌 pCzn I -AcNPC2b 加 IPTG 诱导 15 h 超声破碎后上清蛋白; 4: 重组菌 pCzn I -AcNPC2b 加 IPTG 诱导 15 h 超声破碎后沉淀蛋白。

M: Pre-staining protein marker; 1: Total protein released from the recombinant bacteria of pCzn I -AcNPC2b which was cultured without IPTG; 2: Total protein released from the recombinant bacteria of pCzn I -AcNPC2b which was cultured with IPTG inducing for 15 h; 3: The supernatant protein from the recombinant bacteria of pCzn I -AcNPC2b which was cultured with IPTG inducing for 15 h and treated by ultrasonic; 4: The pellet protein from the recombinant bacteria of pCzn I -AcNPC2b which was cultured with IPTG inducing for 15 h and treated by ultrasonic.

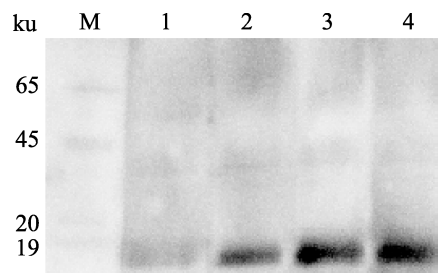


图 5 多克隆抗体 Anti-AcNPC2b 免疫印迹分析

Fig. 5 Immuno-blotting analysis of AcNPC2b

M: ECL marker; 1: 阴性血清对照;

2-4: Anti-AcNPC2b 与重组蛋白 AcNPC2b 杂交。

M: ECL marker; 1: Negative serum; 2-4: Anti-AcNPC2b serum immuno hybridized with the recombinant AcNPC2b.

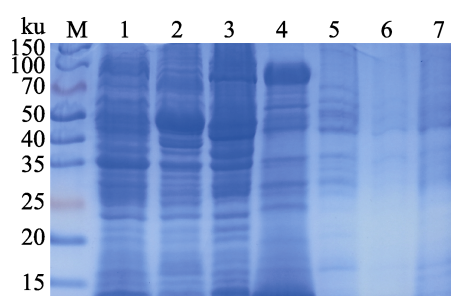


图 6 中华蜜蜂成蜂各组织总蛋白 SDS-PAGE 检测

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of total protein from the various tissues of *Apis cerana cerana*

M: 双色预染蛋白 marker; 1: 中蜂工蜂总蛋白;

2: 中蜂头部总蛋白; 3: 中蜂胸部总蛋白;

4: 中蜂中肠总蛋白; 5: 中蜂马氏管总蛋白;

6: 中蜂脂肪体总蛋白; 7: 中蜂触角总蛋白。

M: Pre-staining protein marker; 1: Total protein of worker bee; 2: The head protein of worker bee; 3: The thorax protein of worker bee; 4: The mid-gut protein of worker bee; 5: The malpighian tubule protein of worker bee; 6: The fat body protein of worker bee; 7: The antenna protein of worker bee.

AcNPC2b 为一抗进行免疫杂交, 结果显示中蜂 AcNPC2b 蛋白在头、胸与中肠中的表达量最高, 其次为触角、马氏管与脂肪体 (图 7)。此外, 中肠组织还在 20 ku 左右处杂交到一条明显的信号条带, 推测中肠中还有其它 NPC2 蛋白同系物的存在。正常与感染 CSBV 的中蜂幼虫总蛋白如图 8 所示, 蛋白条带完整性良好、丰度较高。Western blotting 检测结果显示, AcNPC2b 蛋白在正常与感染 CSBV 的中蜂幼虫中均有表达, 且在感染 CSBV 的中蜂幼虫中有微弱上调 (图 9), 但不具有显著性。

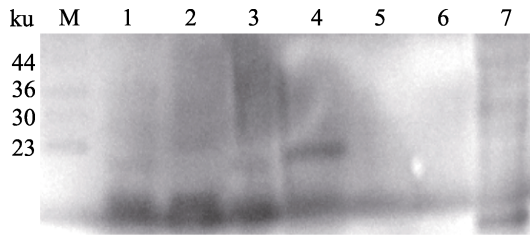


图 7 免疫印迹检测 AcNPC2b 蛋白在成蜂各组织中表达水平

Fig. 7 Immuno-blotting analysis of AcNPC2b in various tissues of *Apis cerana cerana*

M: ECL marker; 1: 中蜂工蜂总蛋白与 AcNPC2b 的抗体杂交; 2: 中蜂头部总蛋白与 AcNPC2b 的抗体杂交;

3: 中蜂胸部总蛋白与 AcNPC2b 的抗体杂交;

4: 中蜂中肠总蛋白与 AcNPC2b 的抗体杂交;

5: 中蜂马氏管总蛋白与 AcNPC2b 的抗体杂交;

6: 中蜂脂肪体总蛋白与 AcNPC2b 的抗体杂交;

7: 中蜂触角总蛋白与 AcNPC2b 的抗体杂交。

M: ECL marker; 1: Anti-AcNPC2b serum immuno hybridized with total protein of worker bee;

2: Anti-AcNPC2b serum immuno hybridized with the head protein of worker bee; 3: Anti-AcNPC2b serum immuno hybridized with the thorax protein of worker bee;

4: Anti-AcNPC2b serum immuno hybridized with the mid-gut protein of worker bee; 5: Anti-AcNPC2b serum immuno hybridized with the malpighian tubule protein of worker bee; 6: Anti-AcNPC2b serum immuno hybridized with the fat body protein of worker bee; 7: Anti-AcNPC2b serum immuno hybridized with the antenna protein of worker bee.

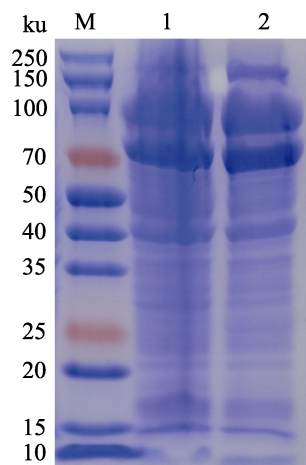


图 8 中华蜜蜂幼虫和感染 CSBV 幼虫总蛋白 SDS-PAGE 检测

Fig. 8 SDS-PAGE analysis of total protein in larvae of *Apis cerana cerana*

M: 双色预染蛋白 marker; 1: 感染 CSBV 幼虫总蛋白; 2: 正常幼虫总蛋白。

M: Pre-staining protein marker; 1: Total protein of CSBV-infected larvae; 2: Total protein of the healthy larvae.

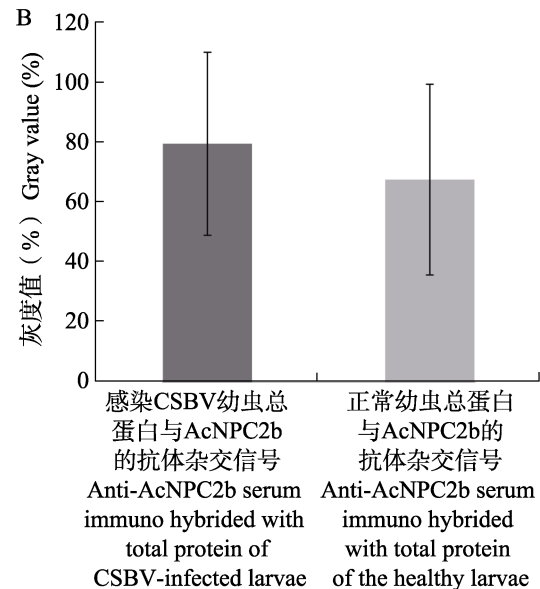
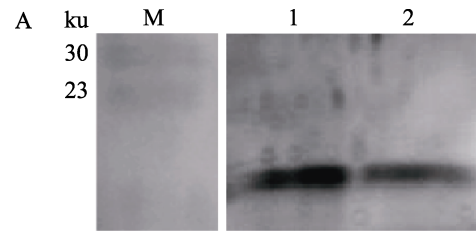


图 9 免疫印迹检测 AcNPC2b 在健康幼虫及感染 CSBV 幼虫中表达水平

Fig. 9 Immuno-blotting analysis of AcNPC2b in both *Apis cerana cerana* larvae and CSBV-infected larvae

A. AcNPC2b 的抗体与健康幼虫及感染 CSBV 幼虫总蛋白的杂交; M: ECL marker; 1: 感染 CSBV 幼虫总蛋白与 AcNPC2b 的抗体杂交; 2: 正常幼虫总蛋白与 AcNPC2b 的抗体杂交。

B. AcNPC2b 的抗体与健康幼虫及感染 CSBV 幼虫总蛋白杂交信号的灰度值统计。

A. Anti-AcNPC2b hybridized with total protein of both *Apis cerana cerana* larvae and CSBV-infected larvae. M: ECL marker; 1: Anti-AcNPC2b serum immuno hybridized with total protein of CSBV-infected larvae; 2: Anti-AcNPC2b serum immuno hybridized with total protein of the healthy larvae; B. Gray value analysis of immuno-blotting signal of AcNPC2b in both *Apis cerana cerana* larvae and CSBV-infected larvae.

2.4 AcNPC2b 蛋白复性及与微生物结合测定

为了研究 AcNPC2b 蛋白是否能与细菌和真菌的细胞壁成分结合, 将大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、芽孢杆菌以及白僵菌 4 种微生物与复性后的重组蛋白 AcNPC2b 进行孵育, 检测结果如图 10 所示, 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、芽孢杆菌以及白僵菌与 AcNPC2b 蛋白孵育后的上清液

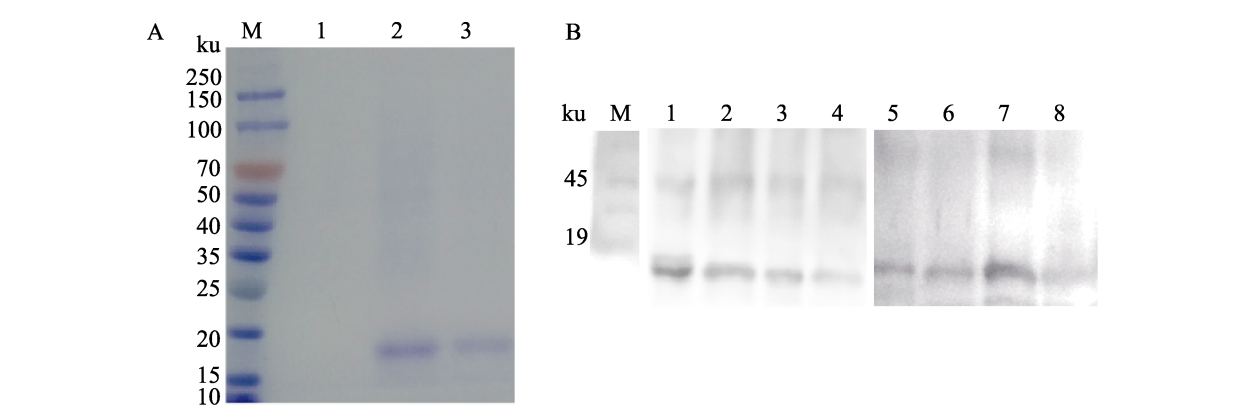


图 10 重组蛋白 AcNPC2b 与微生物结合能力的免疫印迹检测
Fig. 10 Western blotting analysis of microbial binding ability of recombinant AcNPC2b

A. 复性重组蛋白 AcNPC2b SDS-PAGE 检测; M: 多色预染蛋白 marker; 1-3: 复性的重组蛋白 AcNPC2b; B. 重组蛋白 AcNPC2b 与微生物结合能力的免疫印迹检测。M: ECL marker; 1: AcNPC2 抗体与大肠杆菌+AcNPC2b 沉淀液杂交; 2: AcNPC2b 抗体与大肠杆菌+AcNPC2b 上清液杂交; 3: AcNPC2b 抗体与金黄色葡萄球菌+AcNPC2b 沉淀液杂交; 4: AcNPC2b 抗体与金黄色葡萄球菌+AcNPC2b 上清液杂交; 5: AcNPC2b 抗体与“芽孢杆菌+AcNPC2b”沉淀液杂交; 6: AcNPC2b 抗体与芽孢杆菌+AcNPC2b 上清液杂交; 7: AcNPC2b 抗体与白僵菌+AcNPC2b 沉淀液杂交; 8: AcNPC2b 抗体与白僵菌+AcNPC2b 上清液杂交。

A. Detection of renaturation protein of of recombinant AcNPC2b with SDS-PAGE; M: Pre-staining protein marker; 1-3: Renaturation protein of of recombinant AcNPC2b; B. Western blotting analysis of microbial binding ability of recombinant AcNPC2b. M: ECL marker; 1: Anti-AcNPC2b serum immuno hybridized with the pellet of *E. coli* + AcNPC2b; 2: Anti-AcNPC2b serum immuno hybridized with the supernatant of “*E. coli* + AcNPC2b”; 3: Anti-AcNPC2b serum immuno hybridized with the pellet of *S. aureus* + AcNPC2b; 4: Anti-AcNPC2b serum immuno hybridized with the supernatant of *S. aureus* + AcNPC2b; 5: Anti-AcNPC2b serum immuno hybridized with the pellet of *B. subtilis* + AcNPC2b; 6: Anti-AcNPC2b serum immuno hybridized with the supernatant of *B. subtilis* + AcNPC2b; 7: Anti-AcNPC2b serum immuno hybridized with the pellet of *B. bassiana* + AcNPC2b; 8: Anti-AcNPC2b serum immuno hybridized with the supernatant of *B. bassiana* + AcNPC2b.

和沉淀液均在 16 ku 处杂交到免疫信号条带, 并且与上清液相比沉淀液杂交的免疫信号更强, 表明中蜂 AcNPC2b 蛋白与细菌和真菌的细胞壁成分均能发生结合, 暗示 AcNPC2b 蛋白在中蜂识别病原与免疫过程中起到一定的作用。

3 讨论

中蜂作为中国本土的优良蜂种, 具有良好的授粉广谱性。然而西蜂的引入使中蜂的分布区急剧缩小, 尤其是西蜂可携带多种病原物, 并在中蜂蜂群中迅速地传播, 严重威胁了中蜂的生存与繁殖。其中, 最具威胁的病原物便是中蜂囊状幼虫病病毒 CSBV, 其传播速度快、范围广, 一旦在中蜂蜂群中暴发, 便会造成中蜂大面积死亡, 几度使中蜂濒临灭绝 (张雪琦等, 2020)。

NPC2 蛋白是一类定位于细胞晚期胞内体/溶酶体基质中的小分子可溶性蛋白, 主要负责胆

固醇等脂类的结合与转运 (Storch and Xu, 2009), 属于 ML 家族, 在昆虫化学通讯 (郑瑶, 2017)、宿主对病原的识别以及免疫信号通路中发挥重要作用 (Shi *et al.*, 2012; Lee, 2014)。中蜂基因组中共有 3 条 NPC2 基因序列, 本研究首次对这 3 条序列进行了详细分析, 发现 AcNPC2b、AcNPC2a 和 AcNPC2 在序列上虽然都含有 6 个保守的半胱氨酸, 但氨基酸序列仍差异较大, AcNPC2 与 AcNPC2a 的相似性最高 (33%), AcNPC2b 与 AcNPC2a 的相似性最低 (29%)。系统进化树显示, 这 3 个蛋白与西蜂同源蛋白各聚为一支, 暗示这 3 个蛋白可能行使不同功能。而 AcNPC2b 与果蝇 DmNPC2b 聚在一个亚枝, 说明该蛋白在功能上可能发挥类似于 DmNPC2b 的作用。Shi 等 (2012) 的研究表明果蝇 DmNPC2b 与 DmNPC2a 为同一个亚组, DmNPC2a 在免疫通路 Imd 途径中发挥作用。据此, 我们推测 AcNPC2b 可能在免疫通路中发挥

作用。对于表达分布情况进行分析, AcNPC2a 主要在中蜂工蜂的表皮和脂肪体中表达 (Lee *et al.*, 2014), 与机体的先天免疫有关, AcNPC2 主要在中蜂雄蜂的触角内表达量最高, 其次是哺育蜂, AcNPC2a 可能具有与气味结合蛋白相似的功能 (黄钰彬等, 2020), 而中蜂 AcNPC2b 蛋白在中蜂工蜂头、胸与中肠中的表达量最高。中蜂 3 个 NPC2 蛋白的分布差异性再次暗示的这 3 个蛋白的功能有所不同。

基于本实验室前期研究发现, 中蜂 AcNPC1 可能与中蜂囊状幼虫病毒 CSBV 存在互作, 而 NPC1 和 NPC2 在胆固醇转运中的协同作用, AcNPC2b 基因的表达是否受到 CSBV 的影响? 荧光定量数据显示, 感染 CSBV 的幼虫体内 AcNPC2b 基因的表达在 CSBV 感染 48 h 时显著上调, 并且 AcNPC2b 蛋白在感染 CSBV 的中蜂幼虫中也有微弱上调。这与 Hu 等 (2006) 发现家蚕感染 BmNPV 后 NPC2 同源蛋白 BmPP 转录上调的结果一致, 推测 CSBV 的感染可能诱导了 AcNPC2b 基因的变化。为了进一步研究中蜂 NPC2 蛋白在病原感染过程中的作用, 本文通过原核表达中蜂 AcNPC2b 蛋白, 获得了有活性的重组蛋白 AcNPC2b 和多克隆抗体 Anti-AcNPC2b。微生物的结合测定实验显示重组蛋白 AcNPC2b 与细菌和真菌的细胞壁均存在结合, 暗示中蜂 AcNPC2b 蛋白在病原识别方面确实起着一定作用。我们下一步将获得活性更高的重组蛋白 AcNPC2b, 进行肽聚糖结合等功能性实验, 结合 RNA 干扰深入探究 AcNPC2b 蛋白的分子功能。

参考文献 (References)

- Bolaños J, Betanzos A, Javier-Reyna R, García-Rivera G, Huerta M, Pais-Morales J, González-Robles A, Rodríguez MA, Schnoor M, Orozco E, 2016. EhNPC1 and EhNPC2 proteins participate in trafficking of exogenous cholesterol in *Entamoeba histolytica* trophozoites: Relevance for phagocytosis. *PLoS Pathogens*, 12(12): e1006089.
- Huang YB, Li Y, Dang XQ, Zhou ZY, 2020. Identification and analysis of *Apis cerana cerana* forager antennae proteomics. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 57(5): 1120–1130. [黄钰彬, 李颜, 党晓群, 周泽扬, 2020. 中华蜜蜂采集蜂触角蛋白质的质谱鉴定及分析. 应用昆虫学报, 57(5): 1120–1130.]
- Hu ZG, Chen KP, Yao Q, Gao GT, Xu JP, Chen HQ, 2006. Cloning and characterization of *Bombyx mori* PP-BP a gene induced by viral infection. *Acta Genetica Sinica*, 33(11): 975–983.
- Iatrou K, Swevers L, 2005. Transformed lepidopteran cells expressing a protein of the silkworm fat body display enhanced susceptibility to baculovirus infection and produce high titers of budded virus in serum-free media. *Journal of Biotechnology*, 120(3): 237–250.
- Infante RE, Wang ML, Radhakrishnan A, Kwon HY, Brown MS, Goldstein JL, 2008. NPC2 facilitates bidirectional transfer of cholesterol between NPC1 and lipid bilayers, a step in cholesterol egress from lysosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(40): 15287–15292.
- Kanaya T, Kobayashi J, 2000. Purification and characterization of an insect haemolymph protein promoting *in vitro* replication of the *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Journal of Genetic Engineering & Biotechnology*, 14(1): 125–131.
- Lee KS, Park HG, Deng YJ, Bo YK, Kyung SS, Choi YS, Yoon HJ, Li MS, Jin BR, 2014. Molecular characterization of a Niemann-Pick disease type C2 protein from the honeybee *Apis cerana*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 17(3): 555–560.
- Liu YM, Shi HX, Li Y, Ma ZG, Wang LL, Xu JS, Zhou ZY, Dang XQ, 2020. Prokaryotic expression, polyclonal antibody preparation and functional characterization of the Niemann-Pick type C1 protein AcNPC1 of *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae). *Acta Entomologica Sinica*, 63(11): 1314–1324. [刘永梅, 史红霞, 李颜, 马振刚, 王林玲, 许金山, 周泽扬, 党晓群, 2020. 中华蜜蜂 NPC1 蛋白 AcNPC1 的原核表达、多克隆抗体制备及功能鉴定. 昆虫学报, 63(11): 1314–1324.]
- Miyake S, Yamano Y, Morishima I, 2005. Promoting protein, a silkworm hemolymph protein promoting *in vitro* replication of nucleopolyhedrovirus, binds to beta-glucans. *Bioence Biotechnology & Biochemistry*, 69(10): 2012–2014.
- Shi XZ, Zhong X, Yu XQ, 2012. Drosophila melanogaster NPC2 proteins bind bacterial cell wall components and may function in immune signal pathways. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 42(8): 545–556.
- Storch J, Xu Z, 2009. Niemann-Pick C2 (NPC2) and intracellular cholesterol trafficking. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791(7): 671–678.
- Zhang XQ, Sun LP, Zhao DX, Li JL, 2020. Progress in research on pathogenic factors of the Chinese sacbrood virus and the potential of Chinese herbal medicine to control this disease. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 57(4): 806–813. [张雪琦, 孙丽萍, 赵冬香, 李继莲, 2020. 中华蜜蜂囊状幼虫病发病及防治研究进展. 应用昆虫学报, 57(4): 806–813.]
- Zheng Y, 2017. Functional characterization of a Niemann-Pick type C2 protein in the parasitoid wasp *Microplitis mediator* (Hymenoptera: Braconidae). Master dissertation. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. [郑瑶, 2017. 中红侧沟茧蜂 NPC2 蛋白的功能特性. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院.]