

中华蜜蜂热休克蛋白 70 的克隆、表达及中蜂囊状幼虫病毒感染后表达差异分析*

岳金金** 马跃宇** 王琛 张溪研 费东亮 马鸣潇***

(锦州医科大学, 锦州 121000)

摘要 【目的】本研究旨在明确中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 热休克蛋白 70 (Heat shock protein 70, HSP70) 与中蜂囊状幼虫病毒 (Chinese sacbrood virus, CSBV) 的关系。【方法】首先根据 NCBI 上已公布的中华蜜蜂 HSP70 的全基因 (NO.MH122655.1) 序列, 设计特异性引物, 提取 3 日龄中华蜜蜂幼虫总 RNA, 通过 RT-PCR 方法获得 HSP70 基因, 并通过生物信息学软件进行分析; 其次将其克隆到原核表达载体 pET-32a 中, 转化入大肠杆菌 BL21 (DE3) 进行蛋白表达, 并制备重组蛋白, 将纯化的重组蛋白免疫小鼠制备多克隆抗体; 最后利用制备多克隆抗体作为一抗, 通过 Western-blot 方法检测 CSBV 感染中华蜜蜂前后 HSP70 在幼虫体内的变化。【结果】成功获取中华蜜蜂 HSP70 蛋白的全基因, 其核苷酸序列全长为 1 833 bp, 生物信息学分析后, 发现其编码蛋白存在 7 个抗原表位。利用原核表达系统, 成功获得大小约 87 ku 的重组蛋白 HSP70, 免疫小鼠后获得多克隆抗体, 经 Western-blot 分析能与标签蛋白发生特异性反应; 对感染 CSBV 前后蜜蜂体内 HSP70 蛋白检测发现感染后 HSP70 表达水平显著提高。【结论】通过原核表达系统, 成功表达中华蜜蜂 HSP70 基因和 HSP70 多克隆抗体, 并证实 CSBV 感染后影响中华蜜蜂体内 HSP70 蛋白表达量的改变, 为深入研究 HSP70 功能提供了帮助。

关键词 中华蜜蜂; 热休克蛋白 70; 多克隆抗体; 蛋白纯化; 中蜂囊状幼虫病毒

Cloning and expression of hot shock protein 70 in *Apis cerana cerana* after infection with Chinese sacbrood virus

YUE Jin-Jin** MA Yue-Yu** WANG Chen ZHANG Xi-Yan FEI Dong-Liang MA Ming-Xiao***

(Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China)

Abstract 【Objectives】To clarify the relationship between *Apis cerana cerana* heat shock protein 70 (HSP70) and Chinese sacbrood virus (CSBV). 【Methods】A specific pair of primers were developed for HSP70 based on the complete *A. cerana cerana* genome listed in NCBI (NO.MH122655.1). The HSP70 gene was amplified from 1-3 day old *A. cerana cerana* by RT-PCR using extracted total RNA as the template, then analyzed with bioinformatics tools. The resultant HSP70 was cloned into the prokaryotic expression vector pET-32a, then transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) for protein expression. The resultant recombinant protein was purified by affinity chromatography and the purified, recombinant, fusion protein was then injected into mice to create polyclonal antibodies as primary antibodies. Changes in the expression of HSP70 in larvae before, and after, CSBV infection of *A. cerana cerana* were detected using the Western-blot method. 【Results】A 1 833 bp HSP70 gene was successfully cloned, and a recombinant plasmid (pET-32a-HSP70) correctly constructed. Bioinformatics analysis revealed seven epitopes in the protein. Using a prokaryotic expression system, we obtained a recombinant fusion protein of HSP70 with a size of about 87 ku, which was purified and injected into mice to obtain polyclonal antibodies. Western-blot analysis indicated specific reactions with the tag protein. HSP70 expression significantly increased after CSBV infection.

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金面上项目 (31772760); 国家自然科学基金面上项目 (31972626)

**共同第一作者 Co-first authors, E-mail: 1462239630@qq.com; 790393245@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: lnjzmmx@163.com

收稿日期 Received: 2020-05-05; 接受日期 Accepted: 2020-12-25

[Conclusion] The HSP70 gene and HSP70 polyclonal antibody were successfully expressed through a prokaryotic expression system. HSP70 protein expression in the Chinese honeybee is affected by CSBV infection, a finding that promotes further research on the function of HSP70.

Key words *Apis cerana cerana*; heat shock protein 70; polyclonal antibody; protein purification; Chinese sacbrood virus

蜜蜂作为虫媒植物最重要的传粉者,是生态环境中不可或缺的一部分,但近年来我国的中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 种群数量不断下降,其中一个最为主要的因素是蜜蜂病毒的广泛流行 (Ai *et al.*, 2012)。蜜蜂囊状幼虫病 (Sacbrood disease, SBD) 是一种由蜜蜂囊状幼虫病毒 (Sacbrood virus, SBV) 引起的蜜蜂病毒病,具有分布广、传播快等特点 (Liu *et al.*, 2010; Fred, 2014)。感染中华蜜蜂的囊状幼虫病毒,称之为中华蜜蜂囊状幼虫病毒 (CSBV)。CSBV 是二十面体的小 RNA 病毒,大小为直径 26-30 nm,长约 8.8 kb 的单正链 RNA,基因组包含一个较大的开放阅读框 (Open reading frame, ORF) (Ghosh *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2011)。CSBV 主要对 1-3 日龄的幼虫感染性较强,导致化蛹不正常,感染后的幼虫,在外皮周围蜕皮液聚集形成囊状,虫体颜色发生改变由珍珠白变为浅黄色,死亡后为暗棕色,虫体变干形成两头尖的平底船形 (Bailey, 2015)。在危害蜜蜂的病毒中,以中蜂囊状幼虫病毒造成危害最为严重,甚至被养蜂人称为“蜂癌”,一旦发生不仅引起整个蜂群崩溃,也会对中华蜜蜂业造成毁灭性打击 (Freiberg *et al.*, 2012)。

相关研究表明,在蜜蜂抗病毒机制中热休克蛋白 (Heat shock protein, HSP) 家族发挥着重要作用,认为 HSP 家族可参与宿主的特异性及非特异性抗病毒免疫,通过与病毒肽结合成复合物可促进病毒抗原的呈现 (崔文华等, 2005)。在昆虫免疫机制中, HSP 家族不仅能够参与 MAPK 途径的抗病毒作用,而且能够通过促进双链 RNA (dsRNA) 复制参与宿主 RNAi 介导的抗病毒机制 (Lu *et al.*, 2016)。热休克蛋白家族是生物界普遍存在的一类高度保守的分子伴侣,根据其分子量大小可以将其分为 HSP100、HSP90、HSP70、HSP60、HSP40、小 HSP 家族和泛素等家族 (Morimoto *et al.*, 1990)。其中, HSP70 是

最保守、最重要的一类热休克蛋白,其在大多数生物体内含量也最多,它作为原核生物及真核生物的一种分子伴侣在蛋白质折叠、跨膜运输、转位、降解、装配、细胞骨架及核骨架稳定等基本功能方面发挥着重要作用 (陈伟等, 2019)。此外, HSP70 还参与病毒在宿主体内复制和产生过程 (Pastorino *et al.*, 2009)。研究表明,蜜蜂体内也存在 HSP70 蛋白,但目前对其结构和功能还不十分了解,研究也还不够深入。因此,本研究根据 NCBI 公布的中华蜜蜂 HSP70 基因序列,成功克隆得到编码中华蜜蜂 HSP70 蛋白完整的基因可读框,并对其基因序列和编码氨基酸进行生物学信息分析。在此基础上,构建了原核表达载体,诱导表达,获得重组蛋白 HSP70,用该蛋白免疫小鼠后制备鼠抗 HSP70 多克隆抗体,并利用多克隆抗体对 CSBV 感染后蜜蜂体内 HSP70 蛋白表达进行了初步检测,为深入研究中华蜜蜂 HSP70 的功能提供了帮助。

1 材料与方法

1.1 供试病料

CSBV 患病幼虫与健康中蜂幼虫由锦州医科大学生命科学研究院实验室保存; 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠购自北京维通利华实验动物有限公司,用于制备多克隆抗体。

1.2 主要仪器与试剂

总 RNA 提取试剂盒、2xTransTaq High Fidelity (HiFi) PCR SuperMix 和低分子量蛋白 Marker 购自北京全式金生物技术有限公司; 大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 感受态细胞、QuickCut Hind III、QuickCut Nco I 购自大连 TaKaRa 公司; 质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒购自 Axygen 公司; 蛋白纯化的 Ni 螯合柱试剂购自 GE 公司; His 标签单克隆抗体购自 Proteintech

技术有限公司, HPR 山羊抗小鼠 IgG 抗体购自北京博奥森生物技术有限公司。

超净工作台, -80 °C 超低温冰箱, 购自中国海尔公司; 恒温振荡培养箱, 美国 Bio-Rad 公司产品; 台式低速离心机, 美国 Sigma 公司产品; PCR 仪, 英国 HYBAID 公司产品; 低温连接仪, 购自上海天能科技有限公司。

1.3 中华蜜蜂 HSP70 基因的克隆与序列分析

以中华蜜蜂热休克蛋白 70 基因 (GenBank 号: NO.MH122655.1) 为目的基因, 设计特异性引物:

HSP70-F1: 5'-GCCCCATGGCTGCTAAAGC
ACCTGCAGTT-3';

HSP70-R1: 5'-GCAAGCTTTTAATACAAT
TTTGTGAC-3'。

按照总 RNA 提取试剂盒说明, 从 3-4 日龄健康中华蜜蜂幼虫中提取总 RNA 并进行反转录得到 cDNA。然后, 以 cDNA 为模板通过 PCR 对 HSP70 基因进行扩增。最后将扩增产物进行胶回收后送至苏州泓迅生物科技有限公司进行测序。

对测序结果通过 DNASTAR 子程序 Protean, 预测蛋白质的亲水性、柔韧性、表面可及性以及抗原指数, 同时分析 HSP70 蛋白存在 α 螺旋、 β 折叠和 β 转角, 预测其 B 细胞线性表位。此外, 推导出其编码氨基酸序列, 上传至 SWISS-MODEL 网络服务器 (<http://www.swissmodel.expasy.org/>), 预测其空间三级结构, 建立 HSP70 三级结构模型, 再使用 DiscoTope 2.0 网络服务器 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/DiscoTope/>) 预测其 B 细胞构象表位, 对其免疫原性进行评估, 为制备抗 HSP70 多克隆抗体提供理论参考。

1.4 中华蜜蜂 HSP70 基因原核表达与检测

首先, 将测序正确 HSP70 基因插入 pET-32a 载体, 经酶切鉴定并测序, 构建获得重组质粒 pET-32a-HSP70。然后, 将重组质粒转化至大肠杆菌感受态细胞 BL21(DE3) 中, 涂于含有氨苄的 LB 固体培养基上, 37 °C 进行培养, 12 h 后挑取

单个菌落于 LB 液体培养基中, 220 r·min⁻¹, 37 °C 使 OD 值达到 0.6-0.8, 分别在 37 °C, 220 r/min, IPTG 浓度为 0、0.1、0.25 和 0.5 mmol·L⁻¹ 条件下诱导表达。培养 8 h 后, 12 000 r·min⁻¹ 5 min 进行离心, PBS 溶解沉淀后进行超声破碎, 12 000 r·min⁻¹ 离心后分别收集沉淀与上清, 通过 SDS-PAGE 电泳进行鉴定。接着, 通过 Ni²⁺亲和层析柱对重组蛋白进行纯化, 纯化后蛋白经 SDS-PAGE 电泳后转膜, 再浸入含有 2% BSA 封闭液中, 室温下缓慢振荡封闭 2 h。最后, 以 His 标签抗体 (1:5 000) 作为一抗 4 °C 孵育过夜, 经 TBST 洗涤 5 次, 再加入山羊抗小鼠 IgG (1:4 000 二抗) 中室温作用 1 h, TBST 洗涤 5 次后, 洗膜后用 ECL 淋洗, 显影曝光。

1.5 抗中华蜜蜂 HSP70 蛋白多克隆抗体的制备

将纯化重组蛋白 roHSP70 免疫小鼠, 制备多克隆抗体。选取 6 周龄的雌性 BALB/c 小鼠 14 只, 随机分为 2 组, 分别为 PBS 组和 roHSP70 组。roHSP70 组小鼠首次免疫注射 150 μ g (120 μ L) 的重组蛋白和等体积的弗氏完全佐剂, 二免和三免注射 150 μ g (120 μ L) 的重组蛋白和等体积的弗氏不完全佐剂。注射方式采用皮下多点注射, PBS 组方法剂量同上。初次接种后每隔 2 周免疫一次, 每次免疫后将小鼠尾尖取血, 三免后 14 d 采用眼球采血方法取血, 分离血清于 -20 °C 保存备用。

1.6 CSBV、DWV 感染前后幼虫体内 HSP70 蛋白表达量的变化

用移虫针将 3 日龄的中华蜜蜂从巢脾中移出, 放到 48 孔培养板中, 放置在相对湿度为 94%、37 °C 的恒温恒湿培养箱中饲养。去除死亡 24 h 的幼虫后, 将剩下的幼虫平均分为两组, 分别是健康组和接毒组。健康组饲喂提前配好的幼虫饲料, 接毒组饲喂幼虫饲料和 CSBV 病毒混合液 (拷贝数为 1×10^6), 48 h 后收集幼虫。在实验过程中, 用 RT-PCR 方法检测死幼虫的 BQCV、ABPV、CBPV、DWV、KBV、IAPV 和 CSBV。

分别取健康幼虫与 CSBV 患病幼虫各 2 组溶于 PBS 中,用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒对其定量后将上述样品制样,以 HSP70 多克隆抗体作为一抗(1:1 000),二抗为山羊抗小鼠(1:4 000)进行 Western-blot 检测。

2 结果与分析

2.1 中华蜜蜂 HSP70 基因的克隆、原核表达载体构建与序列分析结果

通过 RT-PCR 的方法进行目的基因的扩增,经电泳结果显示大小为 1 833 bp 的目的片段(图 1)。对重组质粒 pET-32a 通过酶切鉴定后,在大小 1 833 bp 处存在目的条带(图 2),测序结果表明成功构建重组质粒。通过 SWISS-MODEL 对 HSP70 的三级结构进行预测,可以观察到三维结构中存在多个 α 螺旋、 β 折叠和 β 转角(图 3);使用 DNASTar 子程序 Protean 对 HSP70 的理化性质进行分析,发现 HSP70 存在 5 个亲水性较好区域,7 个表面可及性好区域,有 15 个抗原指数较高而柔韧性好的区域分布相对均匀;利用 SOPMA 对 HSP70 的二级结构进行分析,显示 α -螺旋占 43.04%, β -折叠占 18.66%, β -转角

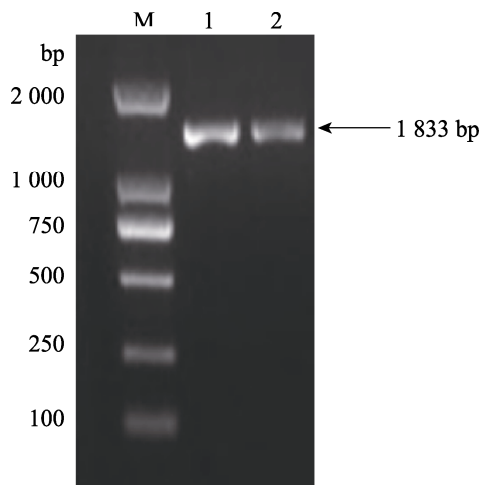


图 1 HSP70 基因的扩增

Fig. 1 Cloning of the HSP70 gene

M: DNA 分子量标准;

1, 2: HSP70 基因 PCR 扩增产物。

M: DNA molecular weight marker;

1, 2: HSP70 gene PCR amplification product.

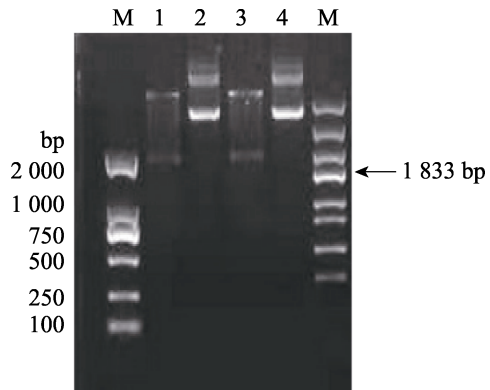


图 2 重组质粒的双酶切鉴定

Fig. 2 Double enzyme digestion identification of recombinant plasmid

M: DNA 分子量标准; 1: pET-32a-HSP70 双酶切鉴定;

2: pET-32a-HSP70 质粒对照。

M: DNA molecular weight marker;

1: pET-32a-HSP70 double enzyme digestion;

2: pET-32a-HSP70 plasmid control.

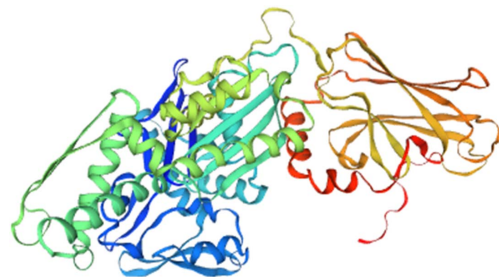


图 3 HSP70 蛋白的三级结构模型

Fig. 3 Tertiary structure model of HSP70 protein

占 7.04%, 无规卷曲占了 31.26%; 综合 DNASTar 对亲水性、柔韧性、表面可及性以及抗原指数的分析以及 SOPMA 对二级结构的分析, 预测到了 HSP70 的 16 个线性表位。通过 DiscoTope 2.0 服务器共预测到 88 个 B 细胞构象表位, 主要存在于位于氨基酸序列的 16 个区段, 详见表 1。结合 Protean 程序预测的线性 B 细胞表位区域, 可以发现 46-47、77-82、249-252、277-279、432-436、465-471、493-497 共有 7 个区段既包含于线性表位, 也包含于构象表位。

2.2 中华蜜蜂 HSP70 蛋白的表达与条件优化

将重组质粒转化至 BL21(DE3)感受态细胞中, IPTG 诱导后通过 SDS-PAGE 电泳检测蛋白的表达情况。结果显示: 在进行诱导表达后,

表 1 HSP70 B 细胞线性表位的预测
Table 1 B cell liner epitope prediction of Hsp70

预测方式 Forecast method	预测区域 Prediction area
DNAStar	21-24, 45-58, 67-89, 152-166, 184-207, 213-240, 244-293, 311-332, 354-371, 383-394, 415-439, 444-476, 493-547, 551-578, 582-602
SOPMA	1-5, 10-15, 31-35, 37-39, 52-57, 76-84, 89-91, 99-101, 108-115, 146-151, 175-178, 185-193, 202-205, 225-234, 249-256, 277-279, 326-332, 338-344, 357-364, 383-388, 396-400, 418-425, 431-436, 446-454, 464-473, 491-499, 506-509
综合预测 Comprehensive forecast	45-48, 76-84, 185-193, 202-205, 225-234, 249-256, 277-279, 326-332, 357-364, 383-388, 418-425, 431-436, 446-454, 464-473, 493-499, 506-509

pET-32a-HSP70 在沉淀中表达, 大小为 87 ku (图 4)。在不同浓度 IPTG 诱导条件下 pET-32a-HSP70 的表达量也存在差异, 当 IPTG 浓度达到 0.25 mmol·L⁻¹ 时, 表达效果最佳。

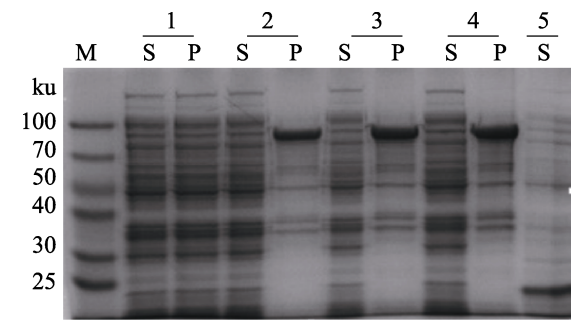


图 4 不同 IPTG 浓度下诱导重组蛋白 pET-32a-HSP70 表达
Fig. 4 pET-32a-HSP70 expression induced by different concentrations of IPTG

M: 低分子量标准蛋白质 marker; S: 上清; P: 沉淀; 1: IPTG 浓度为 0 mmol·L⁻¹ 条件下的诱导表达; 2: IPTG 浓度为 0.1 mmol·L⁻¹ 条件下的诱导表达; 3: IPTG 浓度为 0.25 mmol·L⁻¹ 条件下的诱导表达; 4: IPTG 浓度为 0.5 mmol·L⁻¹ 条件下的诱导表达; 5: 空载体。
M: Low molecular weight standard protein marker; S: Supernatant; P: Precipitate; 1: IPTG concentration 0 mmol·L⁻¹; 2: IPTG concentration 0.1 mmol·L⁻¹; 3: Induced expression of IPTG at 0.25 mmol·L⁻¹; 4: IPTG at 0.5 mmol·L⁻¹; 5: Empty vector.

2.3 重组蛋白的 Western-blot 检测结果

通过 Ni²⁺亲和层析柱进行 HIS-HSP70 融合蛋白的纯化后。对重组蛋白 pET-32a-HSP70 进行 Western-blot 检测, 结果显示: 经过蛋白纯化后, 大部分杂蛋白被去除, 在 87 ku 处得到较纯的重

组蛋白 (图 5)。

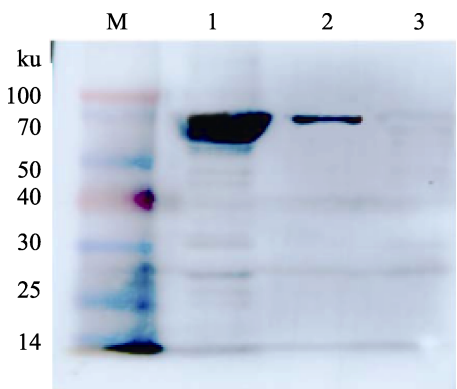


图 5 重组蛋白 pET-32a-HSP70 纯化
Fig. 5 Purification of recombinant protein pET-32a-HSP70

M: 低分子量标准蛋白质 marker; 1: IPTG 浓度为 0.25 mmol·L⁻¹ 条件下的诱导表达; 2: 重组蛋白 pET-32a-HSP70 纯化; 3: pET-32a 空载体。
M: The low molecular weight standard protein marker; 1: IPTG concentration at 0.25 mmol·L⁻¹; 2: Purification of recombinant protein pET-32a-HSP70; 3: pET-32a empty vector.

2.4 中华蜜蜂 HSP70 多克隆抗体的制备及检测结果

以免疫血清和 PBS 组血清为分别一抗 (1 : 1 000), 二抗为山羊抗小鼠 (1 : 4 000), 通过 Western-blot 检测重组蛋白 pET-32a-HSP70。结果显示: 重组蛋白免疫组在分子量大小 87 ku 处均存在明显目的带, PBS 组没有目的蛋白带大小的条带 (图 6)。免疫组在第 3 次免疫之后表达量无明显差异, 可以作为中蜂幼虫 HSP70 检测抗体使用。

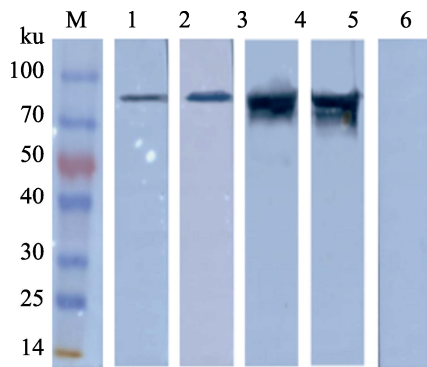


图 6 不同免疫阶段血清和 PBS 对照组血清检测重组蛋白 pET-32a-HSP70

Fig. 6 Detection of recombinant protein pET-32a-HSP70 in serum of different immune stages and PBS control group

M: 低分子量标准蛋白质 marker; 1: 以第一次免疫血清作为一抗检测重组蛋白 pET-32a-HSP70 的表达; 2: 以第 2 次免疫血清作为一抗检测重组蛋白 pET-32a-HSP70 的表达; 3: 以第 3 次免疫血清作为一抗检测重组蛋白 pET-32a-HSP70 的表达; 4: 以第 4 次免疫血清作为一抗检测重组蛋白 pET-32a-HSP70 的表达; 5: 以 PBS 免疫血清作为一抗检测重组蛋白 pET-32a-HSP70 的表达。

M: Low molecular weight standard protein marker; 1: The first immunized serum was used as the first antibody to detect the expression of recombinant protein pET-32a-HSP70; 2: The second immunized serum was used as the first antibody to detect the expression of recombinant protein pET-32a-HSP70; 3: The expression of recombinant protein pET-32a-HSP70 was detected with the third immunized serum as the first antibody; 4: The expression of the recombinant protein pET-32a-HSP70 with the fourth immunized serum as the first antibody; 5: Detection of the expression of recombinant protein pET-32a-HSP70 with PBS immunized serum as a primary antibody.

2.5 健康幼虫与患病幼虫体内热休克蛋白检测结果

将 3 组健康幼虫与患病幼虫进行 BCA 蛋白定量以后, 以第 3 次免疫血清作为一抗检测体内 HSP70 表达量差异。经抗 roHSP70 多克隆抗体作为一抗作用后, Western-blot 结果显示感染 CSBV 与健康幼虫蛋白样品在约 70 ku 处均出现特异性条带 (图 7), 但 70 ku 处蛋白灰度存在明显差异, 患病幼虫在 70 ku 处条带灰度明显优于健康幼虫的条带, 表明在患有 CSBV 的幼虫体内 HSP70 的表达存在上调。

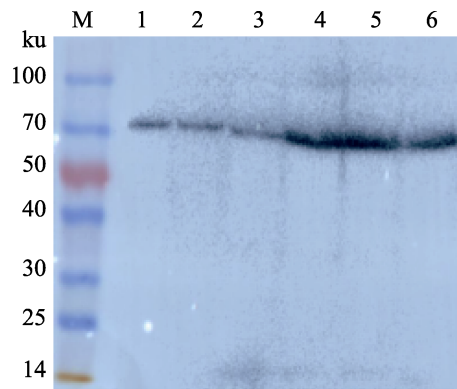


图 7 检测 3 组健康幼虫与患病幼虫体内热休克蛋白 70 表达量

Fig. 7 Detection of heat shock protein 70 expression in three groups of healthy and diseased larvae

M: 低分子量标准蛋白质 marker; 1, 2, 3: 健康幼虫体内热休克蛋白 70 的表达; 4, 5, 6: CSBV 患病幼虫体内热休克蛋白 70 表达。
M: Low molecular weight standard protein marker; 1, 2, 3: The expression of heat shock protein 70 in healthy larvae; 4, 5, 6: Expression of heat shock protein 70 in the infected larva of CSBV.

3 讨论

热休克蛋白作为一种应激蛋白广泛存在于原核生物与真核生物体内并起着重要作用。热休克蛋白具有细胞蛋白自稳、协同免疫、抗细胞凋亡、抗氧化等作用, 在抗肿瘤免疫及抗病毒免疫中具有重要的作用 (雷小文等, 2008)。而热休克蛋白 70 主要负责细胞内伴侣和细胞外免疫调节功能 (丁志辉和张红艳, 2009)。在各种昆虫的生长发育进化过程中, 都存在着特殊的发育方式, 同时需要面对极端生存条件, 因此维持体内蛋白质稳态作用的热休克蛋白对昆虫十分重要, 在昆虫的新陈代谢、环境适应、生长发育甚至种群进化过程中热休克蛋白都扮演着重要角色 (Norry *et al.*, 2007; Rinehart *et al.*, 2007; Morrow *et al.*, 2016)。

已经有研究表明, 昆虫的滞育伴随部分基因的表达下调, 也存在着部分基因的表达上调的情况, 其中, 热休克蛋白家族的指标备受关注, 因为已经有研究发现昆虫滞育过程中普遍存在热休克蛋白 70 表达上调的现象 (肖海军等, 2011;

Hao *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014), 陈伟等 (2019) 成功制备了棉铃虫 *Helicoverpa armigera* HSP70 多克隆抗体, 并证明棉铃虫在热激诱导的情况下 HSP70 表达量会上调。另外也有证明, 病毒侵染常诱导宿主 HSP70 基因的高水平表达, 表明 HSP70 基因在病毒侵染过程中可能发挥重要作用 (Aranda *et al.*, 1996; Escaler *et al.*, 2000; Guerrero *et al.*, 2002)。Jiang 等 (2014) 的实验表明, 水稻和本氏烟草在被水稻条纹病毒感染后, HSP70 的表达增加; 甜菜黄花病毒病侵染后, 伴随着病毒的不断增殖, HSP70 含量也不断增加 (王勇等, 2018)。通过刘巧巧等 (2018) 的研究表明, 在感染过程中产生大量病毒蛋白会导致细胞应激从而使 HSP70 表达上调, 并且 HSP70 可以促进寨卡病毒 (ZIKV) 在细胞中的复制增殖同时也可以促进 ZIKV 诱导的炎症反应。由此推测当蜜蜂幼虫感染 CSBV 后 HSP70 蛋白表达量会存在差异。

为了探究蜜蜂幼虫感染 CSBV 后 HSP70 蛋白表达量情况, 本研究首先进行基因克隆, 得到全长为 1 833 bp 的 HSP70 基因, 通过分析显示 HSP70 蛋白具有稳定的三级结构, 16 个线性 B 细胞表位和 16 个构象表位, 为制备抗体提供了理论依据。本研究以重组蛋白 pET-32a-HSP70 免疫小鼠制备 HSP70 多克隆抗体, Western-blot 发现健康幼虫和感染 CSBV 后幼虫体内 HSP70 含量确实存在差异, 患病幼虫在 70 ku 处条带灰度明显优于健康幼虫的条带灰度, 表明在患有 CSBV 的幼虫体内 HSP70 蛋白的表达确实存在上调。这一想法的证实, 可以为进一步研究该蛋白在中华蜜蜂的发育中的生理功能打下基础。由此我们推测 CSBV 感染幼虫可能导致了细胞应激, 从而使 HSP70 表达量上调。

综上所述, HSP70 在 CSBV 感染过程中存在重要作用, 我们的研究为 CSBV 的防控提供了新的思路。同时, HSP70 较为保守, 与其他蜜蜂品种的 HSP70 序列高度一致, 因此本实验制备的 HSP70 抗体也可以用于其他蜜蜂的研究, 为深入研究中华蜜蜂 HSP70 在感染病毒后的表达提供了支持。

参考文献 (References)

- Ai HX, Yan X, Han RC, 2012. Occurrence and prevalence of seven bee viruses in *Apis mellifera* and *Apis cerana* apiaries in China. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109(1): 160–164.
- Aranda MA, Escaler M, Wang D, Andrew J, 1996. Maule induction of HSP70 and polyubiquitin expression associated with plant virus replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(26): 15289–15293.
- Bailey L, 2015. Recent research on honeybee viruses. *Bee World*, 56(2): 55–64.
- Chen W, Li YJ, Hong MJ, Lin YX, Shi JW, Luo LQ, Qin FJ, 2019. Preparation and identification of polyclonal antibody of Hsp70 from *Helicoverpa armigera*. *Journal of Environmental Entomology*, 41(2): 352–357. [陈伟, 李玉娟, 洪敏晶, 林月霞, 施静雯, 罗利琼, 覃富健, 2019. 棉铃虫 Hsp70 的多克隆抗体制备及鉴定. 环境昆虫学报, 41(2): 352–357.]
- Cui WH, Chen LY, Chen SH, 2005. Correlation between heat shock protein and viral infection. *Chinese Journal of Birth Health & Heredity*, 13(6): 124–126. [崔文华, 陈立亚, 陈素华, 2005. 热休克蛋白与病毒感染的相关性. 中国优生与遗传杂志, 13(6): 124–126.]
- Ding ZH, Zhang HY, 2009. Protective effect of gastrointestinal mucosal chaperone of heat shock protein 70 and its immunoregulatory function. *Nanchang University Journals*, 49(1): 136–138. [丁志辉, 张红艳, 2009. 热休克蛋白 70 的胃肠黏膜分子伴侣保护作用及免疫调节功能. 南昌大学学报, 49(1): 136–138.]
- Escaler M, Aranda MA, Thomas CL, Maule AJ, 2000. Pea embryonic tissues show common responses to the replication of a wide range of viruses. *Virology*, 267(2): 318–325.
- Fred P, 2014. Honeybee trade is hotbed for carrying disease into wild. *New Scientist*, 221(2957): 16.
- Freiberg M, De JD, Message D, Cox-Foster D, 2012. First, report of sacbrood virus in honeybee (*Apis mellifera*) colonies in, Brazil. *Genetics & Molecular Research*, 11(3): 3310–3314.
- Ghosh RC, Ball BV, Willcocks MM, Carter MJ, 1999. The nucleotide sequence of sacbrood virus of the honey bee: An insect picorna-like virus. *Journal of General Virology*, 80(6): 1541–1549.
- Guerrero CA, Bouyssouade D, Zárate S, Isa P, López T, Espinosa R, Romero P, Méndez E, López S, Arias CF, 2002. Heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry. *Journal of Virology*, 76(8): 4096–4102.
- Hao YJ, Li WS, He ZB, Si FL, Ishikawa Y, Chen B, 2012. Differential gene expression between summer and winter diapause pupae of the onion maggot *Delia antiqua*, detected by suppressive subtractive hybridization. *Journal of Insect Physiology*, 58(11): 1063–1070.

- 1444–1449.
- Jiang SS, Lu YW, Li KF, Lin L, Zheng HY, Yan F, Chen JP, 2014. Heat shock protein 70 is necessary for rice stripe virus infection in plants. *Molecular Plant Pathology*, 15(9): 907–917.
- Lei XW, Tang C, Yue H, Yang FL, 2008. Newcastle disease attenuated La sota induces heat shock protein70 expression in Broilers. The 14th Symposium of the Poultry Disease Branch of the Chinese Society of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Poultry health Branch, Chinese Association of Animal and Veterinary Science. Yangzhou, Jiangsu Province. 139–140. [雷小文, 汤承, 岳华, 杨发龙, 2008. 新城疫弱毒 La sota 诱导肉鸡热休克蛋白 70 的表达. 中国畜牧兽医学会禽病学分会第十四次学术研讨会, 中国畜牧兽医学会禽病学分会. 江苏省扬州市. 139–140.]
- Liu QQ, Lai HZ, Liu T, Pu JY, Huang X, 2018. The role of heat shock protein 70 in Zika virus infection. *Journal of Tropical Medicine*, 18(6): 703–707. [刘巧巧, 赖宏智, 刘婷, 蒲洁莹, 黄曦, 2018. 热休克蛋白 70 在寨卡病毒感染中的作用. 热带医学杂志, 18(6): 703–707.]
- Liu X, Zhang Y, Yan X, Han R, 2010. Prevention of Chinese sacbrood virus infection in *Apis cerana* using RNA interference. *Current Microbiology*, 61(5): 422–428.
- Lu K, Chen X, Liu WT, Zhou Q, 2016. Characterization of heat shock cognate protein 70 gene and its differential expression in response to thermal stress between two wing morphs of *Nilaparvata lugens* (Stål). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 199: 47–53.
- Ma MX, Li M, Cheng J, Yang S, Wang SD, Li PF, Wigdahl B, 2011. Molecular and biological characterization of Chinese sacbrood virus LN isolate. *Comparative and Functional Genomics*, (3): 409386.
- Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C, 1990. The stress response, function of the proteins, and perspectives//Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C (eds.). *Stress Proteins in Biology and Medicine*. New York: Cold Spring Harbor Press. 1–36.
- Morrow G, Marie LP, Robert MT, 2016. *Drosophila melanogaster* mitochondrial Hsp22: A role in resistance to oxidative stress, aging and the mitochondrial unfolding protein response. *Biogerontology*, 17(1): 61–70.
- Norry FM, Sambucetti P, Scannapieco AC, Gomez FH, Loeschcke V, 2007. X-linked QTL for knockdown resistance to high temperature in *Drosophila melanogaster*. *Insect Molecular Biology*, 16(4): 509–513.
- Pastorino B, Boucomont-Chapeaublanc E, Peyrefitte CN, Belghazi M, Fusaï T, Rogier C, Tolou HJ, Almeras L, 2009. Identification of cellular proteome modifications in response to west Nile virus infection. *Molecular & Cellular Proteomics*, 8(7): 1623–1637.
- Rinehart JP, Li A, Yocum GD, Robich RM, Hayward Scott AL, 2007. Up-regulation of heat shock proteins is essential for cold survival during insect diapause. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(27): 11130–11137.
- Xiao HJ, Wei ZJ, Xue FS, 2011. Progress in heat shock proteins (Hsps) related to insect diapause. *Acta Entomologica Sinica*, 54(9): 1068–1075. [肖海军, 魏兆军, 薛芳森, 2011. 昆虫滞育关联热休克蛋白的研究进展. 昆虫学报, 54(9): 1068–1075.]
- Wang L, Yang S, Han L, Fan D, Zhao K, 2014. Phenotypic plasticity of HSP70s gene expression during diapause: Signs of evolutionary responses to cold stress among soybean pod borer populations (*Leguminivora glycinivorella*) in Northeast of China. *PLoS ONE*, 9 (10): 1–10.
- Wang Y, Ren YF, Li DX, Chen Z, 2018. The interaction of heat shock proteins and some components of plant viruses. *Journal of Applied and Environmental Biology*, 24(2): 415–424. [王勇, 任亚峰, 李冬雪, 陈卓, 2018. 热休克蛋白与植物病毒组分的互作机制研究进展. 应用与环境生物学报, 24(2): 415–424.]