

## 农业生物技术

# 家蚕前部丝腺特异表皮蛋白 Bm11721 的鉴定及表达

谢康, 王鑫, 陈慧芳, 李懿, 宋倩茹, 赵萍

家蚕基因组生物学国家重点实验室 西南大学, 重庆 400716

谢康, 王鑫, 陈慧芳, 等. 家蚕前部丝腺特异表皮蛋白 Bm11721 的鉴定及表达. 生物工程学报, 2016, 32(1): 64-73.

Xie K, Wang X, Chen HF, et al. Identification and expression patterns of anterior silk gland specific cuticle protein Bm11721 in the silkworm (*Bombyx mori*). Chin J Biotech, 2016, 32(1): 64-73.

**摘要:** 家蚕的丝腺是其丝蛋白合成和分泌的器官, 根据其形态和功能的不同分为前部、中部和后部丝腺, 前部丝腺不具有合成丝蛋白的能力, 是丝蛋白构象发生转变的场所。剪切力在丝蛋白构象转变中起到重要的作用, 其在家蚕前部丝腺主要由前部丝腺逐渐变细的管腔结构和富含几丁质及表皮蛋白的坚硬的内壁提供。鉴定家蚕前部丝腺新的几丁质结合蛋白, 并调查其在家蚕幼虫不同组织的表达特征。通过几丁质亲和层析的方法在前部丝腺筛选并鉴定到一个新的具有几丁质结合功能的表皮蛋白 Bm11721, 其编码基因编号为 BGIBMGA011721 (GenBank Accession No. NM-001173285.1)。利用原核表达系统成功表达了该蛋白, 通过 Ni-NTA 亲和层析的方法获得了 Bm11721 的重组蛋白并制备了多克隆抗体。组织表达分析发现无论是转录水平还是蛋白水平 Bm11721 均只在前部丝腺特异表达, 且 Bm11721 蛋白在 5 龄期的前部丝腺中恒定表达。免疫荧光定位结果显示 Bm11721 蛋白定位在前部丝腺的内膜中, 推测其可能与前部丝腺的机械硬度有关, 为丝蛋白的构象转变提供剪切力。

**关键词:** 家蚕, 前部丝腺, 几丁质结合蛋白, 组织特异性表达, 免疫荧光定位

**Received:** March 20, 2015; **Accepted:** June 5, 2015

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 31472154), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2011AA00306), PhD Start-up Foundation of Southwest University (No. swu113113).

**Corresponding author:** Ping Zhao. Tel: +86-23-68250885; E-mail: zhaop@swu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31472154), 国家高科技研究发展计划 (863 计划) (No. 2011AA00306), 西南大学博士启动基金 (No. swu113113) 资助。

网络出版时间: 2015-07-08

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20150708.0946.001.html>

# Identification and expression patterns of anterior silk gland specific cuticle protein Bm11721 in the silkworm (*Bombyx mori*)

Kang Xie, Xin Wang, Huifang Chen, Yi Li, Qianru Song, and Ping Zhao

Southwest University, State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Chongqing 400716, China

**Abstract:** The silk gland of silkworm is the organ of silk protein synthesis and secretion. According to the morphological and functional differences, silk gland can be divided into anterior silk gland (ASG), middle silk gland (MSG) and posterior silk gland (PSG). ASG is the place for silk proteins conformation changes although it cannot synthesize silk proteins. ASG has narrow luminal structures and rigid wall which consists of chitin and cuticle proteins so that it can provide the shearing force which plays an important role in the silk protein conformation changes. The objective of this study is to identify the new chitin binding proteins in ASG of silkworm (*Bombyx mori*), and to analyze their expression patterns in different tissues. We identified a cuticle protein with chitin binding domain Bm11721 (GenBank Accession No. NM-001173285.1) by chitin affinity chromatography column. We also expressed the recombinant protein as inclusion body using the prokaryotic expression system, and then successfully purified the recombinant protein by nickel affinity chromatography column to generate the polyclonal antibodies. The expression patterns analysis in various tissues showed that both in transcriptional and protein levels Bm11721 was specifically expressed in ASG. Furthermore, the expression level of Bm11721 protein was unchanged during the 5th instar. Immunofluorescence analysis revealed that Bm11721 was located in the ASG inner membrane. It is proposed that Bm11721 is a component of inner membrane and probably provides the shearing force for conformational changes.

**Keywords:** *Bombyx mori*, anterior silk gland, chitin binding protein, tissue expression profile, immunofluorescence localization

家蚕 *Bombyx mori* 是鳞翅目昆虫的模式生物，也是具有重要经济价值的昆虫。家蚕吐丝结茧时，其丝腺中的丝蛋白会经历一个从液态丝蛋白向固态丝纤维的转变过程<sup>[1]</sup>。家蚕的前部丝腺是丝蛋白由液态向固态转变的场所，在丝蛋白转变的过程中，前部丝腺腺腔提供的摩擦剪切力对丝蛋白的转变起着至关重要的作用<sup>[2]</sup>。丝腺壁由底膜（亦称外膜）、腺细胞及内膜三层构成<sup>[3]</sup>。家蚕丝腺内膜主要由表皮蛋白和几丁质组成，且前部丝腺内膜较厚<sup>[4]</sup>。前部丝腺较厚的内膜结构一方面可以为丝蛋白的转变提供剪切力，另一方面也可以保护腺细胞免受剪切力的伤害<sup>[5]</sup>。

在昆虫体内，表皮蛋白主要是几丁质结合蛋白，它们与几丁质一起参与形成昆虫的表皮的角质层。1988年 Robers 和 Riddiford 首次提出表皮蛋白的 R&R 保守结构域<sup>[6]</sup>。对二级结构的保守结构域研究发现，具有 R&R 保守结构域的蛋白质能与几丁质结合。具有 R&R 保守结构域的蛋白质家族可以分为 RR-1、RR-2 和 RR-3 三个亚族<sup>[7-8]</sup>。RR-1 亚族表皮蛋白的保守区 C 端有许多芳香氨基酸<sup>[9]</sup>。Hamodrakas 等研究表明芳香氨基酸对几丁质结合起着重要作用<sup>[10]</sup>。RR-2 亚族与坚硬型角质层有关，其保守区富含组氨酸，且赖氨酸的位置非常保守。Rebers 和

Willis 的研究表明,RR-2 亚族的 R&R 保守区的作用是作为几丁质的结合域<sup>[11]</sup>。RR-3 亚族只在昆虫蜕皮后期的角质层中有发现<sup>[8]</sup>。

随着家蚕基因组框架图及基因组精细图谱的完成<sup>[12-13]</sup>,对家蚕表皮蛋白的鉴定及功能研究也随之展开。梁九波等运用生物信息学的方法对家蚕表皮进行了广泛分析,通过保守的基序检索家蚕基因组,得到 163 条表皮蛋白序列<sup>[14]</sup>。Fu 等采用 LC-MS 的方法对家蚕幼虫的表皮和气管以及成虫的鳞毛进行蛋白质组学的分析,共鉴定到 41 个表皮蛋白,且在成虫鳞毛中首次鉴定到了 7 个表皮蛋白<sup>[15]</sup>。Tang 等通过蛋白质组学的方法对家蚕表皮中几丁质结合蛋白进行筛选,共鉴定到 9 个表皮蛋白,并首次证明了体外重组的 BmorCPR56 和 BmorCPT1 蛋白能够与几丁质结合<sup>[16]</sup>。家蚕的前部丝腺是丝蛋白构象发生转变的场所。Yi 等对家蚕前部丝腺进行了蛋白质组学的分析,发现前部丝腺存在大量的表皮蛋白<sup>[17]</sup>。另外也有报道发现家蚕前部丝腺内含有大量几丁质<sup>[18]</sup>,那么,家蚕的前部丝腺内的表皮蛋白是否与几丁质结合?是否参与了丝蛋白在前部丝腺内构象的转变?这些问题都需要回答。

本研究对家蚕前部丝腺特异的几丁质结合蛋白进行筛选,并对鉴定得到的新表皮蛋白 Bm11721 进行原核表达和制备抗体,同时对该蛋白进行表达情况分析及组织定位,以期为进一步研究前部丝腺表皮蛋白在丝蛋白构象转变中的作用奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

实验用的二化性家蚕品种-大造 (p50) 由

西南大学家蚕基因资源库提供。幼虫在 (25±1) °C、相对湿度 60%、自然光照条件下用桑叶进行饲喂。待供试家蚕饲养至幼虫期 5 龄第 3 天时,于冰冻条件下取头部、表皮、中肠、马氏管、脂肪体、生殖腺、前部丝腺、中部丝腺和后部丝腺,并迅速液氮冷冻置于-80 °C 保存。

宿主菌大肠杆菌 Trans1 T1 和 BL21 (DE3) 购自北京全式金公司;pMD19-T-simple vector 克隆载体购自 TaKaRa 公司;pET28a 表达载体由本实验室保存;Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、IPTG、Ampicilline、Kanamycin 购自 Promega 公司;引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成;其他未标明试剂均为国产分析纯。

### 1.2 Bm11721 的筛选与鉴定

采用 Tang 等<sup>[16]</sup>报道的表皮蛋白抽提方法提取家蚕前部丝腺总蛋白,将液氮研磨的前部丝腺组织材料先用含有 15 mmol/L NaCl 的 20 mmol/L PBS 溶液 (pH 7.4) 连续抽提 3 次,抽提蛋白液分别标记为 P1、P2、P3;再用含 2% (W/V) SDS 的 20 mmol/L PBS 溶液 (pH 7.4) 连续抽提 3 次,抽提蛋白液分别标记为 S1、S2、S3,每次抽提完后于室温下 12 000 r/min 离心收集上清,用 SDS-PAGE 检测<sup>[19]</sup>。将 SDS 抽提后的蛋白溶液合并,选用截留量为 10 kDa 的超滤管超滤去除 SDS,待溶液中 SDS 含量小于 0.1% (W/V) 即可用于几丁质亲和层析柱结合实验。将去除 SDS 的蛋白溶液于室温下与几丁质珠孵育 30 min 后收集流出液,接着用 2 倍柱体积洗涤缓冲液 (pH 7.4, 20 mmol/L HEPES, 1 mol/L NaCl) 漂洗,重复漂洗 5 遍,最后用 8 mol/L 尿素进行洗脱,并收集各流出组分。将 8 mol/L 尿素洗脱管组分浓缩 10 倍后用 12% 的 SDS-PAGE 检测,并

从胶上切取目的蛋白进行 MALDI-TOF/TOF 质谱鉴定。

### 1.3 *Bm11721* 的组织表达特征分析

利用总 RNA 提取试剂盒 (Omega 公司产品), 提取家蚕 5 龄第 3 天幼虫各组织器官及从 5 龄第 1 天到熟蚕期整蚕的总 RNA, 并利用 M-MLV 反转录酶 (Promega 公司产品) 合成 cDNA 第一链。基于家蚕基因组数据库, 设计 *Bm11721* (GenBank Accession No. NM-001173285.1) 的引物, 引物序列见表 1 (①-②)。以家蚕 5 龄第 3 天幼虫各组织器官的 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增。反应条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 40 s, 46 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 30 s, 25 个循环; 72 °C 再延伸 10 min。选择家蚕持家基因 *BmActin3* 为内参基因, *BmActin3* 的引物序列见表 1 (③-④)。反应程序为 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 40 s, 53 °C 退火 35 s, 72 °C 延伸 40 s, 共 25 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。对 PCR 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色观察。

基于 *Bm11721* 的 ORF 序列, 设计其荧光定量 PCR 引物, 引物见表 1 (⑦-⑧); 内参基因为

sw22934, 引物见表 1 (⑨-⑩)。以家蚕幼虫 5 龄期整蚕 cDNA 为模板, 进行荧光定量 PCR (Real-time PCR), 反应总体积为 20 μL (SYBR 预混液 10 μL, 10 μmol/L 上下游引物各 0.8 μL, ROX 染料 0.4 μL, cDNA 模板 2 μL, 灭菌水 6 μL), 反应条件为: 95 °C 预变性 30 s, 之后进行 40 个循环, 每个循环为 95 °C 变性 3 s, 60 °C 退火 30 s, 其中每个样品进行 3 次重复实验, 收集目的基因  $C_t$  值和内参基因  $C_t$  值进行数据分析。

### 1.4 *Bm11721* 的克隆及 *Bm11721* 蛋白的原核表达纯化与抗体制备

基于家蚕基因组数据库, 设计 *Bm11721* 的克隆引物, 引物序列见表 1 (⑤-⑥)。以家蚕大造 5 龄第 3 天前部丝腺 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 扩增条件同 1.3。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳进行分离、割胶回收纯化后, 克隆到 pMD19-T-simple 载体中 (命名为 *Bm11721*-pMD19-T-simple), 转化入大肠杆菌 Trans T1 菌株, 挑选单克隆, 并进行菌液 PCR 检测、双酶切鉴定和测序验证。将 pET28a 质粒载体与 *Bm11721*-pMD19-T-simple 重组质粒的 *EcoR* I、

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')
① <i>Bm11721</i> -F	ATGTACAAAATCGTATTTTTCC
② <i>Bm11721</i> -R	TCACTTGAGGGCGACGAATGGA
③ <i>BmActin3</i> -F	AACACCCCGTCCTGCTCACTG
④ <i>BmActin3</i> -R	GGGCGAGACGTGTGATTTCCCT
⑤ <i>Bm11721</i> - <i>EcoR</i> I-F	CGCGA <u>ATT</u> CCCCAGCGCCATCGTGGCAGC
⑥ <i>Bm11721</i> - <i>Xho</i> I-R	GCGCTCGAGTCACTTGAGGGCGACGAATG
⑦ <i>Bm11721</i> qPCR-F	CGGTGCTCACTGCCACAA
⑧ <i>Bm11721</i> qPCR-R	GCTGCGTAGCGAGCGTAT
⑨ sw22934-F	TTCGTACTGGCTCTTCTCGT
⑩ sw22934-R	CAAAGTTGATAGCAATTCCT

Underlined letters indicate restriction enzyme digestion sites.

*Xho* I 双酶切产物, 进行割胶回收纯化, 构建 *Bm11721*-pET28a 重组表达质粒, 经菌液 PCR、双酶切验证后, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株, 同时转化 pET28a 质粒。用终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG 于 37 °C 诱导表达 4 h, 收集诱导后的菌体, 用结合缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, pH 8.0) 重悬, 超声破碎, 离心, 分别收集菌体沉淀和上清, 用 12% SDS-PAGE 检测蛋白的表达。利用镍柱亲和层析的方法对体外表达的重组蛋白进行纯化, 通过咪唑梯度浓度洗脱得到较纯的重组蛋白, 并送至南京钟鼎生物技术有限公司制备多克隆抗体。

### 1.5 *Bm11721* 的组织表达特征分析及免疫荧光定位

利用蛋白提取裂解液 (尿素 8 mol/L, 3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐 0.033 mol/L, DTT 0.026 mol/L) 抽取家蚕 5 龄第 3 天、第 5 天和上簇期各组织及 5 龄第 1 天到熟蚕期的前部丝腺总蛋白。将总蛋白进行 SDS-PAGE 分析, SDS-PAGE 上样量为 10 μg, 之后用制备的 *Bm11721* 多克隆抗体进行 Western blotting 检测。Western blotting 条件如下: 5% 的脱脂奶粉封闭 1 h; 1% 的脱脂奶粉稀释的一抗孵育 1.5 h, 一抗稀释比例分别为 1:20 000; 1% 的脱脂奶粉稀释的辣根过氧化物酶标记山羊抗兔的二抗孵育 1.5 h, 二抗稀释比例为 1:40 000。选取新鲜的 5 龄第 3 天前部丝腺组织, 于 4% (W/V) 多聚甲醛室温固定 2 h 后, 包埋于 O.C.T 冷冻切片包埋剂 (Sakura, USA) 中, -30 °C 冷冻 1 h 后于冷冻切片机 (Leica CM1950, Germany) 切取 7 μm 厚切片。切片于室温晾片 15 min 后用含有 0.3% (V/V) Triton X-100 的 10 mmol/L PBS (pH 7.4) 洗涤缓冲液漂洗 10 min, 然后用封闭液 (10 mmol/L PBS, 10%

(V/V) 羊胎血清, 10% (W/V) BSA) 于室温封闭 2 h, 一抗和 Cy3 标记的山羊抗兔 (碧云天, 中国) 均按 1:1 000 的稀释比例用抗体稀释液 (10 mmol/L PBS, 10% (W/V) BSA) 稀释, 依次室温孵育 1.5 h 并洗涤后, 用 DAPI (碧云天, 中国) 染细胞核 10 min 漂洗后封片。荧光显微镜 (尼康, 日本) 下观察并拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 前部丝腺中几丁质结合蛋白的筛选与鉴定

家蚕前部丝腺含有大量的几丁质结合蛋白, 我们分别通过 PBS 和 2% SDS 连续抽提前部丝腺蛋白 (图 1A), 之后对变性蛋白通过去除 SDS 复性后, 过几丁质亲和层析柱, 利用 8 mol/L 尿素对几丁质亲和层析柱进行洗脱, 将 8 mol/L 尿素洗脱组分浓缩 10 倍后得到大量几丁质结合蛋白 (图 1B)。对图 1B 箭头所示的条带蛋白切胶并进行 MALDI-TOF/TOF 质谱鉴定, 鉴定结果表明该蛋白在 SilkDB 数据库中注释基因编号 BGIBMGA011721, 含有 149 个氨基酸残基。该蛋白的编码基因蛋白质编码区 (CDS) 全长 450 个碱基。对该蛋白信号肽进行在线预测, 结果显示该蛋白含有一个 17 个氨基酸残基的信号肽; 功能域预测结果显示该蛋白是一个尚没有功能域注释的假定表皮蛋白。

### 2.2 *Bm11721* 基因的克隆、原核表达、重组蛋白的纯化及多克隆抗体制备

为了对该蛋白进行深入的研究, 我们首先对其编码基因进行了克隆, 通过 TA 克隆并送公司测序验证, 我们成功地克隆了这个基因的 CDS 片段。然后, 我们构建了包含该基因片段的原核表达载体, 利用大肠杆菌表达系统对该蛋白进行了原核表达。由于 pET28a 表达载体上

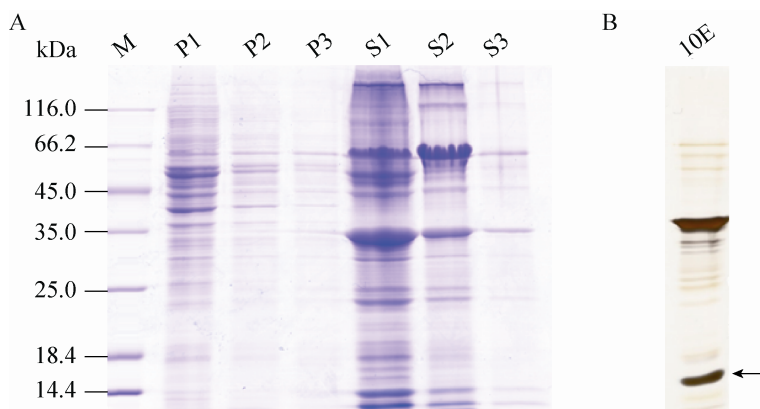


图1 家蚕前部丝腺蛋白的 SDS-PAGE 分析和 Bm11721 的筛选

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of proteins extracted from silkworm ASG and Bm11721 screening. (A) Protein extraction. M: marker; P1–P3: the ASG proteins extracted by 20 mmol/L PBS; S1–S3: the proteins extracted by 2% SDS. (B) Bm11721 screening. 10E: chitin binding proteins were obtained from concentrated eluted fractions by 8 mol/L urea.

带有一段 His 标签的序列, 该段序列包含 36 个氨基酸残基, 大小约为 4 kDa。SDS-PAGE 结果表明, Bm11721 重组蛋白以包涵体形式高量表达, 表观分子量约为 20 kDa (图 2), 这与预测并加上标签的大小基本一致。为了得到纯化的重组蛋白以制备抗体, 利用镍柱亲和层析的方法对体外表达的重组蛋白进行纯化, 通过咪唑梯度浓度洗脱, 最终在 100 mmol/L 咪唑浓度下洗脱得到了纯度为 95% 的重组蛋白 (图 3), 共得到 18 mg 重组蛋白。将得到的重组蛋白送往南京钟鼎生物技术有限公司制备多克隆抗体, 最终获得了效价大于 500 000 的多克隆抗体。

### 2.3 Bm11721 的组织表达特征分析及免疫荧光定位

利用 RT-PCR 的方法, 检查了家蚕 *Bm11721* 基因在家蚕 5 龄第 3 天各个组织的表达情况。凝胶电泳结果显示, 在前部丝腺泳道出现了单一的条带, 此条带的分子量与 *Bm11721* 基因的理论分子量一致, 说明 *Bm11721* 基因只在前部

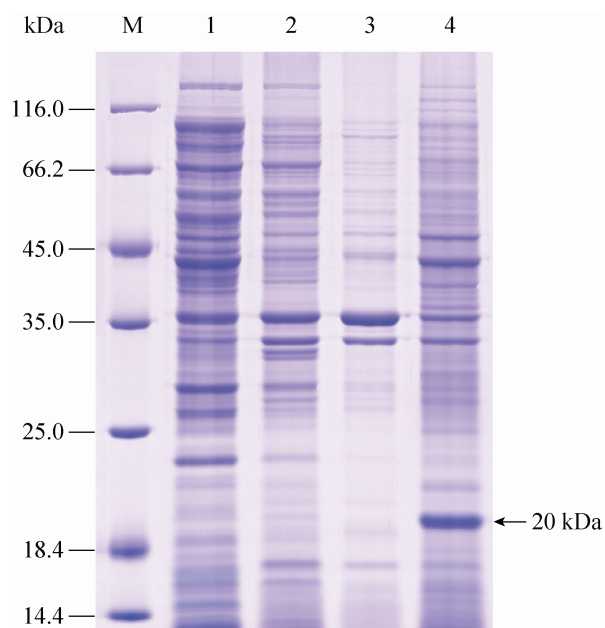


图2 Bm11721 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of recombinant Bm11721 protein. M: protein marker (standard); 1: supernatant of control cells (pET28a); 2: supernatant of recombinant cells (Bm11721-pET28a); 3: precipitation of control cells (pET28a); 4: precipitation of recombinant cells (Bm11721-pET28a).

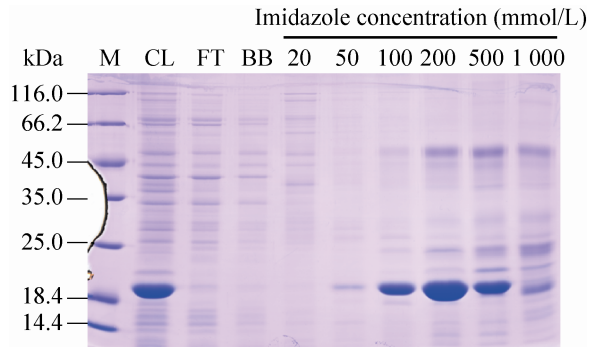


图3 **Bm11721** 重组蛋白镍柱纯化 SDS-PAGE 分析  
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of recombinant Bm11721 protein purified by Nickel column. M: protein marker (standard); CL: precipitate of recombinant *E. coli* after ultrasonic treatment; FT: flow-through; BB: binding buffer.

丝腺特异表达, 在其他组织中均不表达 (图 4)。

为了进一步验证 Bm11721 蛋白的表达情况, 我们抽提了家蚕 5 龄第 3 天、第 5 天和上蔴期各组织器官的总蛋白, 用制备的 Bm11721 多克隆抗体进行 Western blotting 检测。结果显示, Bm11721 也只在前部丝腺高量特异表达, 这与 mRNA 结果一致 (图 5)。利用荧光定量 PCR 的方法检查了 *Bm11721* 基因在家蚕 5 龄期幼虫中的表达情况, 结果显示 *Bm11721* 基因的表达量在 5 龄期幼虫中呈现逐渐下降的趋势 (图 6A)。同时我们也检

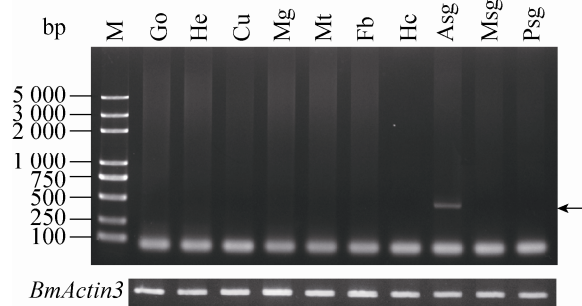


图4 **Bm11721** 基因在不同组织中的表达谱  
Fig. 4 Expression profile of *Bm11721* in different tissues. M: trans2K plus DNA marker; Go: gonad; He: head; Cu: cuticle; Mg: midgut; Mt: malpighian tube; Fb: fat body; Hc: hemocyte; Asg: anterior silk gland; Msg: middle silk gland; Psg: posterior silk gland.

测了该蛋白 5 龄期在前部丝腺表达情况, 结果显示, Bm11721 在 5 龄期前部丝腺的表达量基本趋于稳定 (图 6B)。

为了确定该蛋白在前部丝腺发挥功能的具体位置, 我们选取了家蚕幼虫 5 龄第 3 天的前部丝腺对该蛋白进行了免疫荧光定位。家蚕前部丝腺由外膜、腺细胞、细胞膜、内膜、腺腔、丝胶和丝素几部分构成<sup>[4]</sup> (图 7A 仿自蚕体解剖

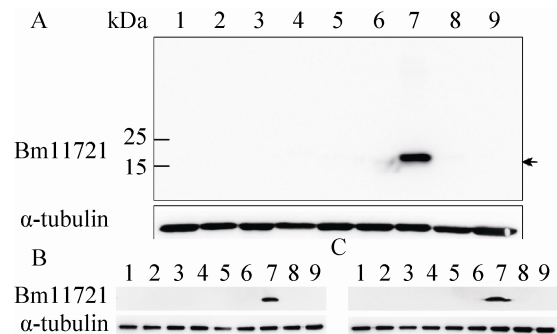


图5 **Bm11721** 蛋白的组织表达谱

Fig. 5 Tissue expression profile of Bm11721 protein. (A) 3rd day of 5th instar. (B) 5th day of 5th instar. (C) wandering stage. 1: head; 2: cuticle; 3: midgut; 4: malpighian tube; 5: fat body; 6: gonad; 7: anterior silk gland; 8: middle silk gland; 9: posterior silk gland.

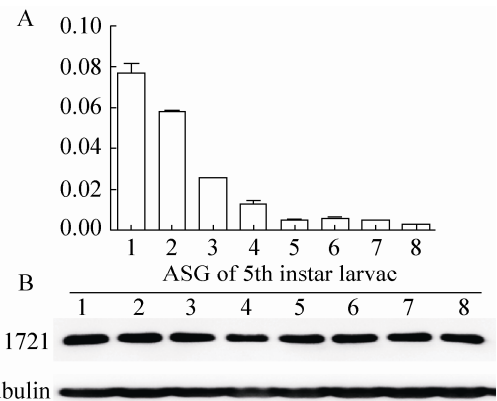


图6 **Bm11721** 的时期表达谱

Fig. 6 Expression profile of Bm11721 during 5 instar. (A) Expression profile of *Bm11721* gene during 5 instar. (B) Expression profile of Bm11721 protein during 5 instar. 1-7: 1st-7th day of 5th instar larvae; 8: 0 day after wandering.

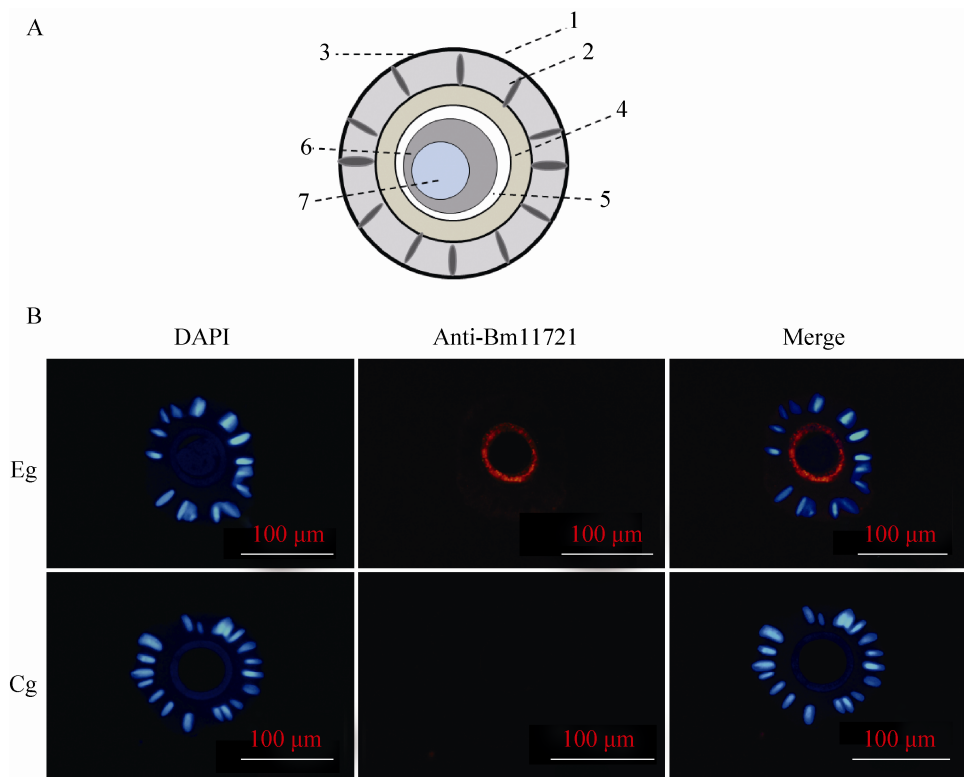


图7 Bm11721 蛋白在前部丝腺的免疫荧光定位分析

Fig. 7 Immunofluorescence analysis of Bm11721 protein in ASG. (A) The transverse schematic diagram of anterior silk gland, picture was cited from anatomy and physiology of silkworm. 1: epicardial; 2: glandular cells; 3: membrane; 4: endometrial; 5: luminal; 6: sericin; 7: fibroin. (B) Immunofluorescence localization of Bm11721. Eg: experimental group; Cg: control group. The nuclei are labeled blue with DAPI and Bm11721 are lable in red.

生理学,1-7),免疫荧光定位结果显示,Bm11721 蛋白定位在前部丝腺的内膜(图7B)。

### 3 讨论

家蚕作为重要的经济性昆虫,最大的经济价值在于其能够生产出具有优良性能的蚕丝。丝腺是丝蛋白合成和分泌的场所,根据其形态和功能的不同可分为前部、中部和后部丝腺。家蚕的前部丝腺是丝蛋白由液态向固态转变的场所,在丝蛋白转变的过程中,前部丝腺腺腔提供的摩擦剪切力对丝蛋白的转变起着至关重要的作用<sup>[2]</sup>。本研究通过几丁质亲和层析的方法对家蚕前部丝腺几丁质结合蛋白进行筛选,并

用 MALDI-TOF/TOF 的方法鉴定到一个新的几丁质结合蛋白,将其命名为 Bm11721。通过 RT-PCR 和 Western blotting 分别对其在 5 龄第 3 天各组织 mRNA 和蛋白表达情况进行了分析,并同时对其在 5 龄第 5 天和熟蚕期 Bm11721 蛋白的各组织表达情况进行 Western blotting 检测。结果表明,Bm11721 无论是在 mRNA 转录水平还是在蛋白质水平均只在前部丝腺特异表达。5 龄期是丝蛋白高速合成,并在 5 龄后期构象发生转变的时期,本研究结果显示 *Bm11721* 基因在 5 龄期的相对表达量呈现下降趋势,而 Bm11721 蛋白在 5 龄期的前部丝腺中表达量降低并不明显,且基本趋于稳定。推测可能是由于该蛋白



是前部丝腺重要的结构蛋白,虽然 mRNA 的表达量有所下降,但蛋白水平却有一个不断累积更新的过程,故表达量基本趋于稳定,这也暗示该蛋白在丝蛋白构象的转变过程中可能起到一定的作用。

研究表明,一些昆虫表皮蛋白能通过它们的亲水区与几丁质结合,形成几丁质-蛋白质复合物,保证体壁的机械作用<sup>[20]</sup>。家蚕丝腺壁由底膜(亦称外膜)、腺细胞及内膜三层构成,内膜主要由表皮蛋白和几丁质组成,且前部丝腺的内膜较厚。本研究结果表明 Bm11721 蛋白定位在前部丝腺的内膜,提示其可能与几丁质一起参与了前部丝腺内膜的形成,可能与前部丝腺的机械硬度有关。和蜘蛛的纺丝管道一样,家蚕前部丝腺是一对含有大量几丁质并逐渐变细的管道<sup>[18]</sup>。正是这个逐渐变细并含有大量几丁质的管腔结构为丝蛋白构象的转变提供了原始的剪切力。丝蛋白从中部丝腺进入到前部丝腺后,随着前部丝腺管腔的逐渐变细,纺丝管道所提供的剪切力逐渐变大,当到达一个临界点后丝蛋白开始脱水并发生凝聚,丝蛋白的构象也随之发生改变<sup>[2]</sup>。而在前部丝腺中剪切力的提供主要是由于纺丝管道的逐渐变细的特殊结构,几丁质和几丁质结合蛋白所形成的内膜结构保证了前部丝腺为剪切力的提供所需要的机械硬度<sup>[17]</sup>,这也有力地保证了前部丝腺细胞能为丝蛋白构象转变提供剪切力。研究表明蜘蛛丝纤维产生过程中剪切力能够诱导丝蛋白从液态的蛋白质凝胶转变成最终的固态丝纤维<sup>[21-22]</sup>。有研究者对重组的蜘蛛大壶状腺丝蛋白体外施加剪切力,能够诱导重组蛋白的凝胶化<sup>[23-24]</sup>。Holland 等通过对家蚕 5 龄第 7 天丝腺溶出蛋白施加剪切力,发现凝胶蛋白发生有序的排列并

呈丝原纤维状,表明天然的丝蛋白受到剪切力的诱导时,能够发生自组装成丝原纤维<sup>[25]</sup>。前部丝腺内膜是与丝蛋白直接接触的结构,为丝蛋白的构象转变提供了剪切力的同时也保护了前部丝腺细胞免受剪切力的破坏<sup>[5]</sup>。对前部丝腺内膜几丁质结合蛋白的研究,也为在体内条件下研究剪切力对丝蛋白构象转变的影响提供了新的参考。

本研究在家蚕前部丝腺筛选并鉴定到一个新的几丁质结合蛋白,对该蛋白基因进行了克隆、表达并制备了多克隆抗体,通过组织和时期表达分析及免疫荧光定位分析,发现该蛋白只在前部丝腺特异表达,在 5 龄期家蚕前部丝腺中表达量趋于稳定,并且定位在前部丝腺的内膜。推测这个蛋白可能通过与几丁质结合,为丝蛋白的构象转变提供了剪切力。

## REFERENCES

- [1] Xiang ZH, Huang JT, Xia JG, et al. Biology of Sericulture. Beijing: China Forestry Publishing House, 2005: 296-304 (in Chinese). 向仲怀, 黄君霆, 夏建国, 等. 蚕丝生物学. 北京: 中国林业出版社, 2005: 296-304.
- [2] Tetsuo A, Kosuke U, Yasumoto N, et al. Some observations on the structure and function of the spinning apparatus in the Silkworm, *Bombyx mori*. Biomacromolecules, 2007, 8(1): 175-181.
- [3] Wang X, Li Y, Xie K, et al. Ca<sup>(2+)</sup> and endoplasmic reticulum Ca<sup>(2+)</sup>-ATPase regulate the formation of silk fibers with favorable mechanical properties. J Insect Physiol, 2015, 73: 53-59.
- [4] Wu ZD. Anatomy and Physiology of Silkworm. Beijing: China Agriculture Press, 1989: 114 (in Chinese). 吴载德. 蚕体解剖生理学. 北京: 中国农业出版社, 1989: 114.
- [5] Dong ZM, Zhao P, Wang C, et al. Comparative

- proteomics reveal diverse functions and dynamic changes of *Bombyx mori* silk proteins spun from different development stages. *J Proteome Res*, 2013, 12(11): 5213–5222.
- [6] Rebers E, Riddiford M. Structure and expression of a *Manduca sexta* larval cuticle gene homologous to *Drosophila* cuticle genes. *J Mol Biol*, 1988, 203: 411–423.
- [7] Iconomidou A, Willis H, Hamodrakas J. Is beta-pleated sheet the molecular conformation which dictates formation of helicoidal cuticle? *Insect Biochem Mol Biol*, 1999, 29: 285–292.
- [8] Andersen O. Studies on proteins in post-ecdysial nymphal cuticle of locust, *Locusta migratoria*, and cockroach, *Blaberus craniifer*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2000, 30(7): 569–577.
- [9] Charles P, Bouhin H, Quennedey B, et al. cDNA cloning and deduced amino acid sequence of a major, glycine-rich cuticular protein from the coleopteran *Tenebrio molitor*. Temporal and spatial distribution of the transcript during metamorphosis. *Eur J Biochem*, 1992, 206(3): 813–819.
- [10] Hamodrakas J, Willis H, Iconomidou A. A structural model of the chitin-binding domain of cuticle proteins. *Insect Biochem Mol Biol*, 2002, 32(11): 1577–1583.
- [11] Rebers E, Willis H. A conserved domain in arthropod cuticular proteins binds chitin. *Insect Biochem Mol Biol*, 2001, 31(11): 1083–1093.
- [12] Xia Q, Zhou Z, Lu C, et al. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science*, 2004, 306(5703): 1937–1940.
- [13] The International Silkworm Genome Consortium. The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2008, 38: 1036–1045.
- [14] Liang JB, Liu BL, Zhan ZG, et al. Bioinformational analysis of cuticular genes of silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Sericol Sin*, 2008, 34(3): 405–416 (in Chinese).
- 梁九波, 刘碧朗, 占智高, 等. 家蚕表皮蛋白基因的生物信息学分析. *蚕业科学*, 2008, 34(3): 405–416.
- [15] Fu Q, Li P, Xu YM, et al. Proteomic analysis of larval integument, trachea and adult scale from the silkworm, *Bombyx mori*. *Proteomics*, 2011, 11: 3761–3767.
- [16] Tang L, Liang JB, Zhan ZG, et al. Identification of the chitin-binding proteins from the larval proteins of silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2010, 40: 228–234.
- [17] Yi QY, Zhao P, Wang X, et al. Shotgun analysis of the *Bombyx mori* anterior silk gland: an insight into the biosynthetic fiber spinning process. *Proteomics*, 2013, 13(17): 2657–2663.
- [18] Gwilym D, David K, Fritz V. Chitin in the silk gland ducts of the spider *Nephila edulis* and the silkworm *Bombyx mori*. *PLoS ONE*, 2013, 8(8): 1–7.
- [19] Schagger H. Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc*, 2006, 1(1): 16–22.
- [20] Andersen O, Hojrup P, Roepstorff P. Insect cuticular proteins. *Insect Biochem Mol Biol*, 1995, 25(2): 153–176.
- [21] Vollrath F, Knight P. Liquid crystalline spinning of spider silk. *Nature*, 2001, 410: 541–548.
- [22] Knight P, Knight M, Vollrath F. Beta transition and stress-induced phase separation in the spinning of spider dragline silk. *Int J Biol Macromol*, 2000, 27: 205–210.
- [23] Je're'mie L, Thierry L, Martin G, et al. Hydrodynamical properties of recombinant spider silk proteins: effects of pH, salts and shear, and implications for the spinning process. *Biopolymers*, 2013, 99(9): 582–593.
- [24] Lukas E, John H, Markus H, et al. The role of salt and shear on the storage and assembly of spider silk proteins. *J Struct Biol*, 2010, 170: 413–419.
- [25] Holland C, Urbach S, Blair L. Direct visualization of shear dependent silk fibrillogenesis. *Soft Matter*, 2012, 8: 2590–2594.

(本文责编 陈宏宇)