

农业生物技术

家蚕 B 类清道夫受体 *BmSCR8* 基因的克隆及表达

赵羽卒, 张奎, 唐梅, 徐曼, 李重阳, 潘光照, 申利, 崔红娟, 杨丽群

西南大学 家蚕基因组生物学国家重点实验室, 重庆 400716

赵羽卒, 张奎, 唐梅, 等. 家蚕 B 类清道夫受体 *BmSCR8* 基因的克隆及表达. 生物工程学报, 2016, 32(10): 1408–1421.
Zhao YZ, Zhang K, Tang M, et al. Cloning and expression of scavenger receptor class B *BmSCR8* in silkworm *Bombyx mori*.
Chin J Biotech, 2016, 32(10): 1408–1421.

摘要: B 类清道夫受体在动脉粥样硬化及其他心血管疾病的形成或抑制, 机体免疫防御, 凋亡细胞清除等生理过程中起着重要的作用。克隆了家蚕 B 型清道夫受体家族的一个成员 *BmSCR8* 基因, 通过 RACE 技术获得 *BmSCR8* 的 cDNA 全长为 2 668 bp, 其 ORF 为 1 704 bp, 编码 567 个氨基酸, 通过在线预测其蛋白分子量为 63.87 kDa, 等电点为 6.06。采用 RT-PCR 方法得到了 *BmSCR8* 的时空表达谱, 结果表明 *BmSCR8* 在家蚕各组织以及血液各时期均有表达, 且在脂肪体中表达量最高, 变态发育时期表达量较高。原核表达获得 *BmSCR8* 重组蛋白, 并经由蛋白纯化、免疫小鼠后制备得到家蚕 *BmSCR8* 多克隆抗体。同时构建了 *BmSCR8* 真核表达载体并转染家蚕胚胎细胞系。免疫荧光及过表达结果显示 *BmSCR8* 主要定位于细胞膜上, Western blotting 结果显示免疫小鼠后所得到的抗血清可特异性识别 *BmSCR8* 蛋白。

关键词: 家蚕, *BmSCR8*, 表达谱, 多克隆抗体, 亚细胞定位

Received: January 12, 2016; **Accepted:** June 15, 2016

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2012CB114603), National Natural Science Foundation of China (No. 81201551), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. XDJK2013B020), Disciplinary Team Program of the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. 2362015XK09), Postgraduate Technology Innovation Program of Chongqing (No. CYB2015067), Basic Research Specialized Funds of Southwest University (No. XDJK2015D021).

Corresponding author: Liqun Yang. Tel: +86-23-68251712; E-mail: cysylq@swu.edu.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2012CB114603), 国家自然科学基金 (No. 81201551), 中央高校基本科研业务费专项资金 (No. XDJK2013B020), 中央高校基本科研业务费专项资金学科团队项目 (No. 2362015XK09), 重庆市研究生科研创新项目 (No. CYB2015067), 西南大学基本科研业务费专项资金 (No. XDJK2015D021) 资助。

Cloning and expression of scavenger receptor class B *BmSCR8* in silkworm *Bombyx mori*

Yuzu Zhao, Kui Zhang, Mei Tang, Man Xu, Chongyang Li, Guangzhao Pan, Li Shen, Hongjuan Cui, and Liqun Yang

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

Abstract: Scavenger receptor class B is involved in various indispensable physiological processes, like the formation and inhibition of atherosclerosis or other cardiovascular diseases, innate immune defense and the removal of apoptotic cells. Here, we cloned *BmSCR8*, a member of scavenger receptor class B in silkworm. We obtained the full-length cDNA sequence of *BmSCR8* by rapid amplification of cDNA ends (RACE), including 2 668 bp. The ORF of *BmSCR8* is 1 704 bp, encoding 567 amino acids. Online software prediction indicated that the molecular weight of *BmSCR8* is 63.87 kDa and the isoelectric point (pI) is 6.06. The space-time expression profile of *BmSCR8* was detected by reverse transcription PCR (RT-PCR), which implicated that *BmSCR8* is extensively expressed in each tissue and at each stage of blood. In addition, *BmSCR8* is highest expressed in fat body of silkworm, and is highly expressed in metamorphosis periods. Anti-*BmSCR8* polyclonal antibody was generated through prokaryotic expression, protein purification and mice immunization. Simultaneously, we constructed *BmSCR8* eukaryotic vector and then transfected embryonic cell line of silkworm. Immunofluorescence and overexpression showed that *BmSCR8* expressed specifically in membrane. Western blotting demonstrated that *BmSCR8* protein can be specifically recognized by anti-serum generated after mice immunization.

Keywords: *bombyx mori*, *BmSCR8*, expression profile, polyclonal antibody, subcellular localization

清道夫受体 (SR) 是一类细胞膜糖蛋白, 能够识别并结合诸如氧化低密度脂蛋白、细菌、凋亡细胞等多聚阴离子配体^[1-5]。根据美国国立卫生研究院 15 位清道夫受体领域专家的讨论研究, 清道夫受体包括 10 种不同的亚类 (A-J)^[5]。其中 B 类清道夫受体 (SR-B) 包括 CD36、SR-B I 及其剪切变体 SR-B II 和 LIMP II (Lysosomal integral membrane protein II) 4 个成员^[1,5-7]。SR-B 主要参与到动脉粥样硬化、炎症反应、宿主防御、血管生成、凋亡细胞清除等生理过程^[7-12]。本研究中的 *BmSCR8* 即为家蚕中 CD36 基因的同源基因之一。1976 年, Okumura 等^[13-14]发现一种血小板膜表面糖蛋白并将其命名为糖蛋白 IV (G IV), 即 CD36。在昆

虫中, 关于 CD36 研究主要集中在果蝇里。目前, 果蝇中了解到的 CD36 同源基因主要有 3 个。Croquemort (Catcher of death) 基因, 主要介导吞噬并且在凋亡细胞的清除中发挥作用^[15]; *ninaD* 基因, 在果蝇中参与类胡萝卜素的转运过程^[16]; SNMP (Sensory neuron membrane protein), 表达于触角的嗅觉感觉神经 (OSNs), 在果蝇中参与信息素的探测^[17-18]。在家蚕中, B 类清道夫受体 (SR-B) 家族基因均具有 CD36 结构域。目前, 有关家蚕 SR-B 家族的研究较少, 2008 年 Tanaka 等在对家蚕全基因组中免疫相关基因进行鉴定时, 分析获得了 13 个家蚕 SR-B 基因^[19]。2010 年, Sakudoh 等证实了家蚕的黄茧基因 C (Yellow cocoon) 编码 Cameo2 蛋白——B

类清道夫受体家族 (SR-B) 的一个成员^[20]。随后, 该课题组又鉴定得到了另一个与 β -胡萝卜素转运相关的蛋白 SCR15, 该蛋白由 Fresh (F) 基因编码, 与 Cameo2 蛋白的氨基酸相似性为 26%^[21]。Dong 等^[22-23]克隆得到了家蚕 B 类清道夫家族的两个成员: SCR1 和 SCR4, 在对其功能的初步探索中, 推测这两个基因均能结合大肠杆菌和金黄色葡萄球菌。家蚕作为中国最主要的经济昆虫之一, 同时也是鳞翅目昆虫的典型代表。对家蚕 *BmSCR8* 基因的研究, 一方面, 可将家蚕作为模式生物进一步丰富对 SR-B 家族基因的功能研究; 另一方面, 也可以弄清 *BmSCR8* 在家蚕中发挥的具体作用以及该基因参与的相关的生理活动, 丰富对家蚕功能基因的研究。本文通过 RACE 技术克隆得到了家蚕 B 类清道夫受体家族的一个成员 *BmSCR8*, 并对其基因结构特征、时空表达谱和亚细胞定位进行了分析研究。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大造 (P50), 取自西南大学家蚕基因资源库。幼虫在 27 °C, 相对湿度 80% 的条件下常规桑叶饲养。RNA 提取试剂盒购自 Omega 公司。HiFi 酶、限制性内切酶、载体 PMD19-T、DNA marker、Solution I 连接酶为 TaKaRa 公司产品。质粒提取试剂盒购自 Qiagen 公司。胶回收试剂盒购自 Axygen 公司。RACE 试剂盒、转染试剂均购自 Invitrogen 公司。引物由华大基因合成。多聚甲醛购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。抗荧光猝灭剂和 DAPI 为碧云天公司产品。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取及 cDNA 合成

各组织材料通过解剖 5 龄 3 d 家蚕得到, 包括头、表皮、中肠、丝腺、脂肪体、马氏管、精卵巢和血液。同时取 4 龄 3 d 起各时期家蚕血液, 将 Trizol 直接加入血细胞中进行裂解, 其他组织先在液氮中研磨为粉末后再加入 Trizol, 利用反转录试剂盒反转得到 cDNA 模板。

1.2.2 RACE 法扩增 *BmSCR8* 的全长序列

从 SilkDB (<http://www.silkdb.org/silkdb/>) 下载预测的 *BmSCR8* 的 mRNA 序列, 根据预测的 mRNA 序列设计扩增 *BmSCR8* 基因的特异引物 (表 1)。以家蚕 5 龄 3 d 脂肪体 cDNA 为模板扩增 *BmSCR8* 基因的部分序列, 克隆及测序验证后, 根据该序列设计特异引物 (表 1) GSP1、GSP2、NGSP1 和 NGSP2。根据 GeneRacerTM RACE Ready cDNA Kit 说明书 (Invitrogen) 扩增 3' 和 5' 端。经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测回收扩增产物, 进行 T 克隆, 测序后拼接得到 *BmSCR8* 的 cDNA 序列。

1.2.3 *BmSCR8* 蛋白序列分析

在通过 RACE 法获得 *BmSCR8* 基因全长 cDNA 序列后, 通过在线软件 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 对 *BmSCR8* 的 ORF 序列进行预测并得到其所翻译的氨基酸序列。运用在线软件 TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)、SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)、Protein isoelectric point calculator (<http://isoelectric.ovh.org/>)、SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)、Expasy (<http://www.expasy.org/tools/>) 预测蛋白的分子量、等电点、结构域等信息, 并对其内含子外显子情况进行

分析。

1.2.4 *BmSCR8* 蛋白进化分析

根据 RACE 得到的 *BmSCR8* 基因的 ORF, 得到其编码的氨基酸全长, 在 NCBI 中进行比对后下载了 16 个物种的同源序列, 通过 Clustalx 软件比对其序列, 导入 MEGA 6 软件以 NJ 法构建进化树。

1.2.5 *BmSCR8* 表达谱分析

以家蚕 5 龄 3 d 各组织和 4 龄 3 d 到熟蚕各时期血液 cDNA 为模板对 *BmSCR8* 进行 RT-PCR 检测, 内参为肌动蛋白 3 (*BmActin3*), 引物序列列于表 1。PCR 体系: 模板 0.1 μg , 20 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ 上下游引物各 0.5 μL , 10 \times HiFi 缓冲液 2.5 μL , 2.0 mmol/L, dNTPs 2 μL , HiFi 酶 0.2 μL , 双蒸水补齐至 25 μL 。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min 40 s, 共 25 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 12 $^{\circ}\text{C}$ 保存。各取 5 μL PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 分析得到表达谱。

1.2.6 *BmSCR8* 原核表达

根据 *BmSCR8* 全长序列及生物信息学分析选取特异性片段, 设计带有 *BamH* I、*Xho* I 酶切位点的特异引物序列, 引物序列见表 1。进行 PCR 扩增, 并将扩增得到片段构建到原核表达载体 pET-28(a) 中, 即为 pET-28(a)-*BmSCR8*。转化后经卡那霉素抗性筛选后挑取阳性克隆, 摇菌提取质粒, 转化 Rosseta 感受态, 接种单菌落于含卡那霉素的 LB 培养基中培养 12 h 后, 分别转接 100 μL 于 4 份卡那霉素抗性的 10 mL LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 摇菌至 OD_{600} 值为 0.8–1.0 时, 其中 3 份加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 1 份不加 IPTG 作为对照, 分别在 16 $^{\circ}\text{C}$ 、25 $^{\circ}\text{C}$ 、37 $^{\circ}\text{C}$, 220 r/min 的条件下进行培养。其中 16 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h, 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16 h, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 8 h。离心弃上清收集菌体, 并用 PBS 清洗菌体数次, 以 PBS 重悬菌体后置于冰上进行超声破碎直至菌液透亮为止。离心分别收集上清和沉淀, 取 20 μL 蛋白加入 5 μL

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

Primer names	Primer sequences (5'–3')
BmSCR8-F	ACCGTGCCAGGCTGTACTA
BmSCR8-R	ATTTCTGCGGGCGTTTT
GSP1	GTCGTCATATCCCCACAGAAACCTGT
NGSP1	GCCATCCCTCACTTGCTCCCAGTTA
GSP2	TGGAAGAGACCATTTGACTTATTG
NGSP2	CGCTACAAGATGCCGGTGAATGTT
BmSCR8-YH-F (<i>BamH</i> I)	CGGGATCCAATACAATCAACGATGCTATCTTAT
BmSCR8-YH-R (<i>Xho</i> I)	CCCTCGAGtGGTCGAGAAAGTTCCGTGG
BmSCR8-CDS-F (<i>Hind</i> III)	CCCAGCTTATGGAAAATCTCAACGGC
BmSCR8-CDS-R (<i>Xho</i> I)	CCGCTCGAGAGAGCTATCTTGGTTCTTTGTT

SDS-PAGE 上样缓冲液 (5×) 沸水浴 30 min 变性, 采用 5% 浓度浓缩胶与 10% 浓度分离胶进行 SDS-PAGE 电泳。考马斯亮蓝染色分析。分别接 100 μL 于 4 份卡那霉素抗性的 10 mL LB 培养基中, 37 °C、220 r/min 摇菌至 OD_{600} 值为 0.8–1.0 时, 其中 3 份分别加入终浓度为 0.05 mmol/L、0.1 mmol/L、0.2 mmol/L 的 IPTG, 1 份不加 IPTG 作为对照, 在 16 °C、220 r/min 条件下进行培养。收集菌体后依次进行超声破碎, 收集上清、沉淀, SDS-PAGE 电泳、考染检测。最终发现优化条件后, 蛋白始终诱导在沉淀中。比较条件后最终选择 16 °C、24 h、220 r/min、IPTG 终浓度为 1 mmol/L 的条件进行大规模诱导。

1.2.7 *BmSCRB8* 蛋白纯化

接菌培养至 OD_{600} 值介于 0.8 到 1.0 之间时, 在 16 °C、220 r/min 的条件下用 1 mmol/L IPTG 诱导表达 24 h。收集菌体, 50 mmol/L Tris-HCl 重悬后, 高压破碎收集沉淀。尿素溶解后用 0.45 μm 滤膜抽滤进行 Ni 离子亲和柱纯化, 使用不同浓度咪唑进行梯度洗脱, 收集洗脱液后用 SDS-PAGE 分析蛋白纯化情况。考马斯亮蓝染色后选择条带单一梯度进行透析、浓缩后加入 30% 甘油于 -80 °C 保存蛋白。用纯化好的重组蛋白免疫昆明鼠, 腹腔注射。共 5 次, 蛋白量依次为 50、70、100、120、140 μg, 其中前 3 次间隔为 10 d, 第 4 次 15 d, 第 5 次 21 d。在第 5 次免疫小鼠 3 d 后摘取小鼠眼球取血, 通过梯度离心最终得到抗血清, 加入 30% 甘油后分装保存于 -80 °C。

1.2.8 *BmSCRB8* 过表达载体构建及细胞转染

根据 *BmSCRB8* 全长设计特异性过表达引物, 引物序列见表 1。扩增得到 *BmSCRB8* 全长 ORF 序列片段, 将该片段连接至 PIZ-OpIE2-EGFP 载

体, 转化后挑取阳性克隆测序验证。该过表达质粒命名为 PIZ-OpIE2-*BmSCRB8*-EGFP。在 24 孔板内放入 24 孔细胞培养板盖玻片, 细胞铺板后用无抗 Grace 培养基培养家蚕胚胎细胞系, 待细胞生长达到对数期时, 进行质粒转染。将 0.5 μg 质粒加入 100 μL 无抗无血清的 Grace 培养基中, 混匀, 加入 1.5 μL 脂质体, 轻柔混匀, 室温孵育 30 min。将质粒-脂质体混合液加入 24 孔板中, 培养 6 h 后换正常培养基。转染 3 d 后用 4% 多聚甲醛固定 15 min, Hoechst 染核 10 min, 封片, 共聚焦观察。

1.2.9 免疫荧光检测 *BmSCRB8* 亚细胞定位

4 龄眠时期家蚕解剖取脂肪体, PBS 洗后以 4% 多聚甲醛固定 30 min, 0.3% Triton X-100 打孔 30 min, 用含有 10% 山羊血清的 1% BSA 在 37 °C 条件下进行封闭, 4 °C 孵育一抗 (即 *BmSCRB8* 抗血清 1:500 稀释) 过夜。PBS 洗一抗后室温避光孵育二抗 (1:2000 稀释) 2 h。PBS 洗二抗后用 Hoechst 染核, 室温避光 2 h。挑取组织到滴加了抗荧光淬灭剂的载玻片上, 盖上盖玻片, 于 4 °C 避光压片过夜。封片, Olympus FV1000 共聚焦荧光显微镜观察 *BmSCRB8* 的细胞定位情况。

1.2.10 Western blotting 检测 *BmSCRB8* 抗血清特异性

以原核表达并纯化得到的重组蛋白作为样品, 通过 Western blotting 实验检测抗血清的特异性。通过 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白, 转移蛋白至 PVDF 膜上用 5% BSA 室温封闭 2 h, 4 °C 孵育一抗 (即 *BmSCRB8* 抗血清) 过夜, 一抗 1:5000 稀释。TBST 洗一抗后孵育二抗, 1:10000 稀释, 室温 2 h。TBST 洗二抗后曝光。

表 2 *BmSCR8* 抗血清效价Table 2 Titer of *BmSCR8* anti-serum

The diluted multiples of antibody	OD_{450} (Absorbance value at 450 nm)		
	1	2	3
1:500	1.632	1.598	1.614
1:1 000	1.561	1.573	1.568
1:2 000	1.543	1.552	1.539
1:4 000	1.531	1.523	1.528
1:8 000	1.508	1.519	1.496
1:16 000	1.492	1.503	1.487
1:32 000	1.458	1.471	1.476
1:64 000	1.406	1.425	1.412
1:128 000	1.308	1.297	1.316
1:256 000	0.167	0.153	0.149
Negative serum	0.178	0.142	0.160

2 结果与分析

2.1 家蚕 *BmSCR8* 基因全长克隆与分析

根据数据库预测结果,以家蚕 5 龄 3 d 脂肪体的 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增,克隆得到长度为 1 612 bp 的中间序列。根据克隆得到的序列,通过 RACE 技术扩增得到 5' 末端序列和 3' 末端序列,分别为 541 bp 和 1 441 bp,拼接得到长为 2 668 bp 的 *BmSCR8* 全长序列(图 1A)。序列提交 GenBank,登录号为 KU866108。其中含有一个长度为 1 704 bp 的开放阅读框(ORF),

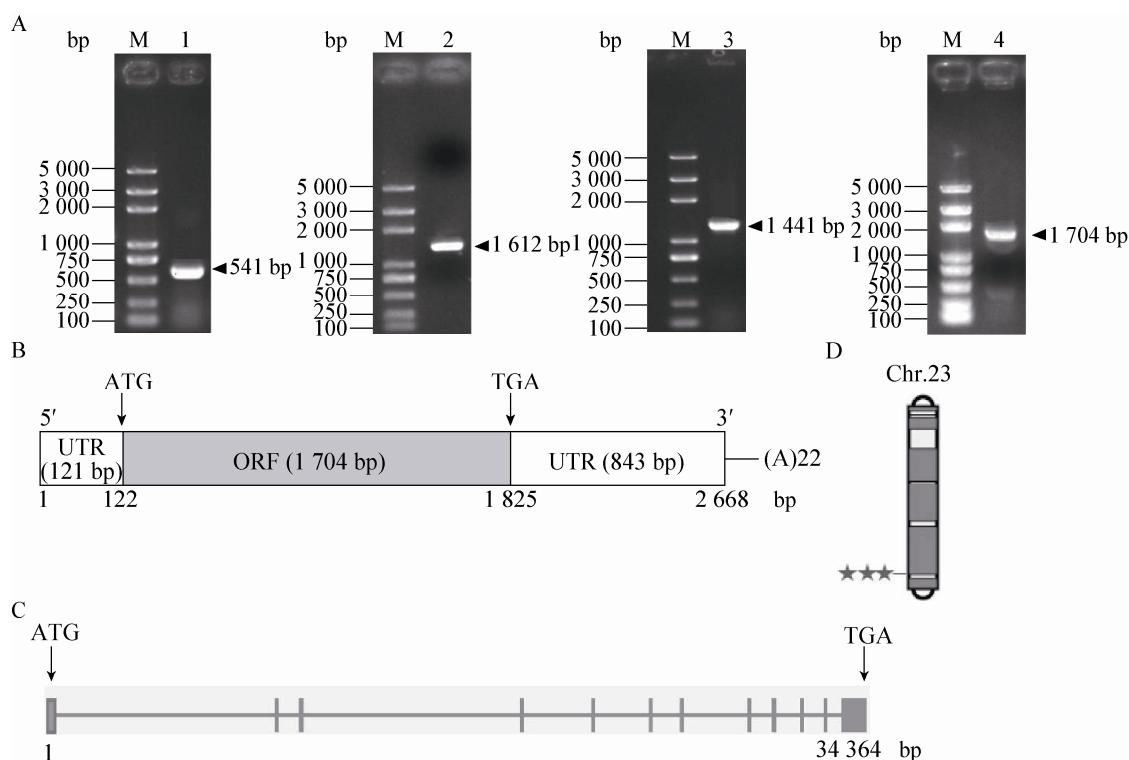
图 1 家蚕 B 型清道夫受体 *BmSCR8* 的克隆及分析

Fig. 1 Cloning and analysis of *BmSCR8*. (A) 1% agar gel analysis of *BmSCR8* PCR product. M: DNA marker; 1: 5'RACE product; 2: PCR product of intermediate sequence; 3: 3'RACE product; 4: PCR product of coding sequence. (B) The diagram of the *BmSCR8* complete cDNA sequence. ATG: initiator codon; TGA: termination codon; UTR: untranslated regions; ORF: open reading frame. (C) The analysis of the *BmSCR8* complete genomic sequence; the length of horizontal lines represent the length of exon; the width of vertical lines represent the length of intron; ATG: initiator codon; TGA: termination codon. (D) Chromosomal localization of *BmSCR8*.

编码 567 个氨基酸, 通过在线软件预测得到其蛋白分子量为 63.87 kDa, 等电点 (PI) 为 6.06; 同时还包括 121 bp 长的 5'非编码片段 (5'-UTR) 和 843 bp 长的 3'非编码片段 (3'UTR) (图 1B)。在线数据库分析结果显示, *BmSCRB8* 基因位于 23 号染色体 (图 1D), 为多外显子基因, 基因全长 34 364 bp, 其中包括 12 个外显子和 11 个内含子 (图 1C)。

2.2 家蚕 B 类清道夫受体 *BmSCRB8* 蛋白结构分析

通过在线网站 TMHMM Server v.2.0 ([http://](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/)

www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/), SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>), 分析发现 *BmSCRB8* 在 76–98、522–544 存在两个典型的跨膜结构域, 两个胞内区域 1–75、545–567 (图 2A) 和一个胞外区域 99–521 (CD36 结构域) (图 2B)。利用 NetNGlyc 1.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 和 NetPhos 2.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 进行预测, 发现该蛋白有 4 个 N-糖基化位点以及 27 个磷酸化位点, 其中包括 11 个 Ser、9 个 Thr 和 7 个 Tyr (图 2C)。

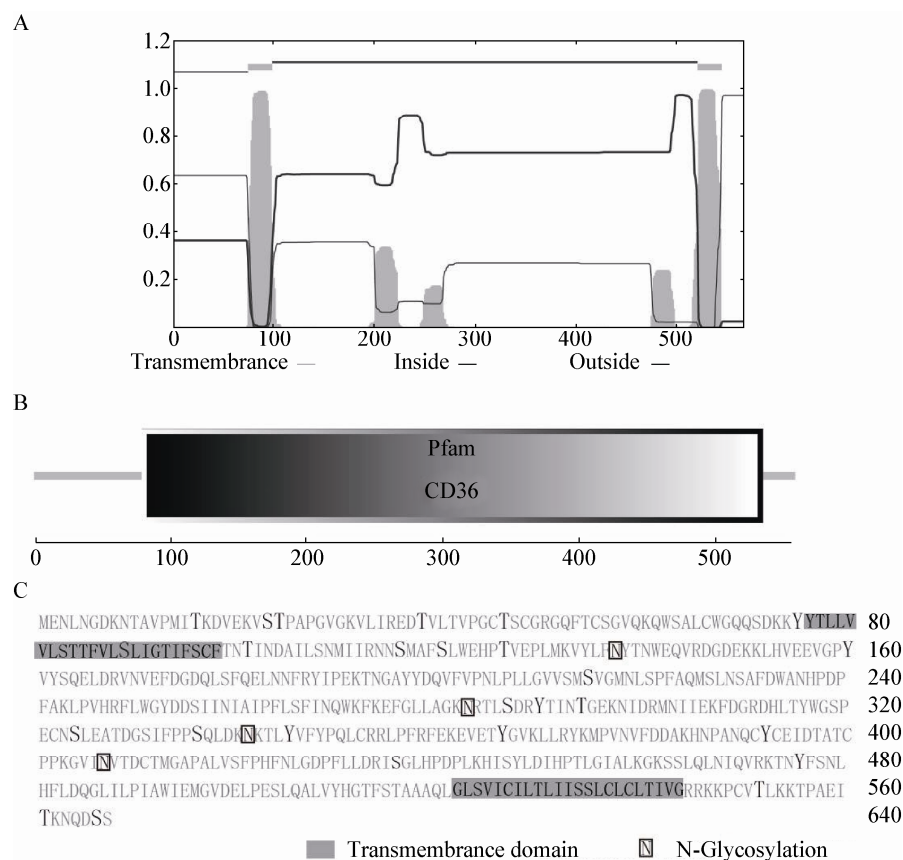


图 2 家蚕 *BmSCRB8* 蛋白结构分析

Fig. 2 Analysis of the *BmSCRB8* protein. (A) Structure prediction of the *BmSCRB8* protein. (B) CD36 domain of *BmSCRB8*. (C) Phosphorylation sites and N-Glycosylation sites of *BmSCRB8*; enlarged black font represent phosphorylation sites.

2.3 同源与进化分析

对 16 种与 *BmSCRB8* 具有同源序列的物种进行聚类分析, 结果如图 3 所示。从进化树来看, 家蚕 *BmSCRB8* 与同为鳞翅目的小菜蛾的 B 类清道夫受体最为接近。

2.4 家蚕 *BmSCRB8* 的时空表达分析

利用 RT-PCR 技术, 以 5 龄 3 d 家蚕各组织, 包括头、表皮、中肠、丝腺、脂肪体、马氏管、精巢、卵巢和血液的 cDNA 作为模板分析 *BmSCRB8* 在各组织中的表达情况。结果显示 *BmSCRB8* 在以上组织中均有表达, 且在脂肪体中表达量最高, 精卵巢次之 (图 4A)。为进一步

分析 *BmSCRB8* 基因在家蚕幼虫各时期的表达情况, 我们获取从 4 龄 3 d 到熟蚕时期的脂肪体 cDNA 作为模板, RT-PCR 结果显示 *BmSCRB8* 从 4 龄 3 d 到熟蚕时期持续性表达, 且在变态发育时期, 即 4 龄眠和上簇时期高表达 (图 4B)。

2.5 *BmSCRB8* 的原核表达

选择家蚕 *BmSCRB8* 蛋白 99–521 aa 段序列, 设计特异性引物进行 PCR 扩增, 引物序列见表 1。经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后将该片段连接到 PMD19-T 载体上进行测序, 得到正确的 *BmSCRB8* 序列。将该片段克隆到 pET-28a (+) 载体上, 经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切, 出现

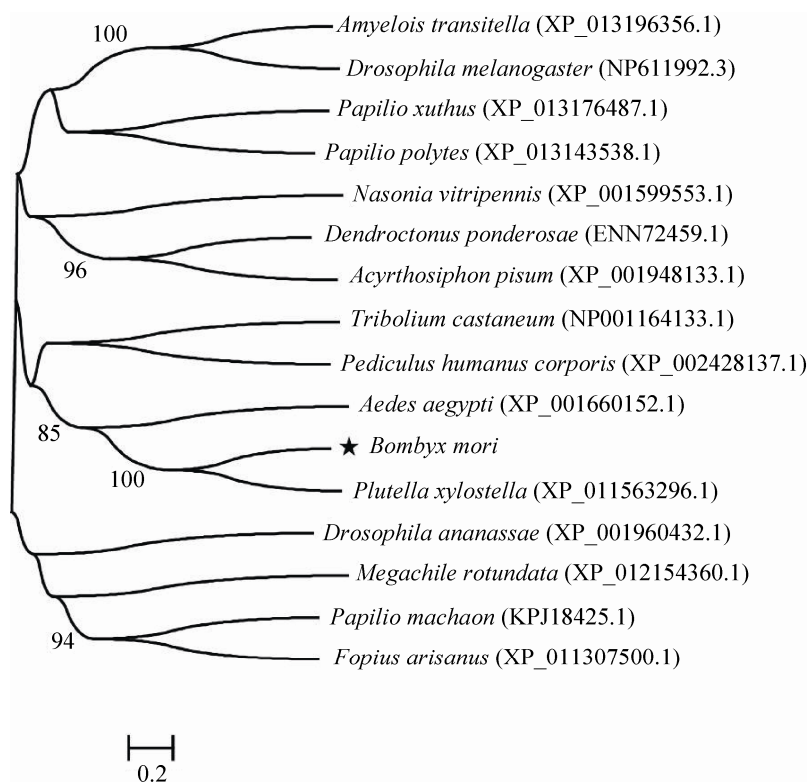


图 3 家蚕 *BmSCRB8* 进化分析

Fig. 3 The phylogenetic tree of *BmSCRB8*.

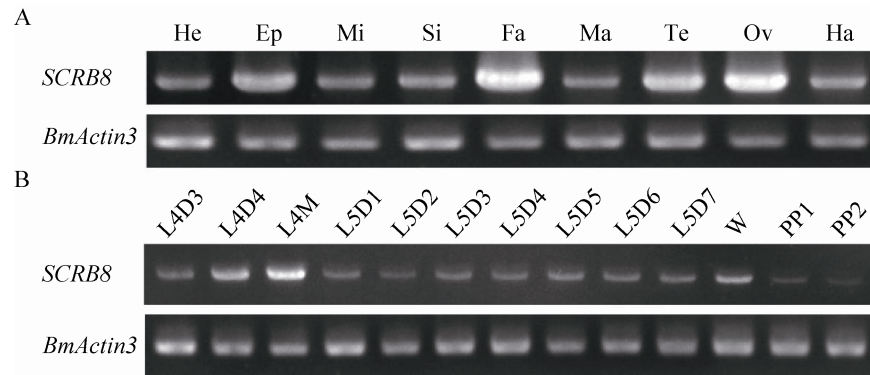


图4 家蚕 *BmSCR8* 在家蚕幼虫各组织及脂肪体各时期的时空表达谱

Fig. 4 The space-time expression profile of *BmSCR8* in different tissues and at different stages. (A) The expression profile of *BmSCR8* in different tissues from the 3rd of 5th larval. He: Head; Ep: Epidermis; Mi: Midgut; Si: Silk gland; Fa: Fat body; Ma: Malpighian tubules; Te: Testis; Ov: Ovary; Ha: Haemocyte. (B) The expression profile of *BmSCR8* in different stages of fat body from the 3rd day of the 4th larval to the 2nd day of spinning. L4D3: 3rd day of 4th larval; L4D4: the 4th day of the 4th larval; L4M: molting period of the 4th larval; L5D1: the 1st day of 5th larval; L5D2: 2nd day of the 5th larval; L5D3: the 3rd day of the 5th larval; L5D4: the 4th day of the 5th larval; L5D5: the 5th day of the 5th larval; L5D6: 6th day of the 5th larval; L5D7: the 7th day of the 5th larval; W: wondering stage; PP1: the 1st day of prepupa; PP2: the 2nd day of prepupa.

935 bp 的特异性片段 (图 5A), 成功获得重组表达质粒 pET-28a(+)-*BmSCR8*。转化 Rosseta 表达菌株, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 16 °C 诱导 24 h, 得到原核表达产物。SDS-PAGE 电泳结果显示, 获得 41 kDa 大小的 pET-28a(+)-*BmSCR8* 重组蛋白, 其中 *BmSCR8* 片段为 36.1 kDa, 该蛋白存在于两个跨膜区域中间, 且以包涵体形式存在 (图 5B)。并且优化表达条件后, *BmSCR8* 蛋白始终存在于包涵体中 (图 5C)。

2.6 *BmSCR8* 的蛋白纯化及抗体制备

大规模诱导产生包涵体蛋白后, 通过 Ni²⁺ 亲和层析法纯化蛋白, 得到纯度 >99% 的 *BmSCR8* 重组蛋白。用纯化的家蚕 *BmSCR8* 重组蛋白免疫昆明鼠, 获得鼠源抗血清。将纯化得到的重组蛋白进行 SDS-PAGE 电泳后, 以免疫得到的抗血清作为一抗进行孵育后在 41 kDa

附近得到单一条带 (图 5D), 表明我们得到较为特异性的 *BmSCR8* 抗血清。

2.7 *BmSCR8* 蛋白的亚细胞定位

通过 PCR 扩增得到 *BmSCR8* 的全长 ORF 片段, 克隆到 PIZ-OpIE2-EGFP 载体上, 将该质粒命名为 PIZ-OpIE2-*BmSCR8*-EGFP (图 6A)。分别用 PIZ-OpIE2-EGFP 和 PIZ-OpIE2-*BmSCR8*-EGFP 转染家蚕胚胎细胞系 72 h 后, 固定细胞, Hoechst 染核, 通过共聚焦显微镜进行观察, 结果显示对照质粒转染细胞后整个细胞均匀分布着 EGFP 阳性信号, 而在重组质粒转染的细胞中, EGFP 信号则特异性地表达于细胞膜上, 反映出 *BmSCR8* 蛋白定位于细胞膜上 (图 6B)。

2.8 *BmSCR8* 抗血清检测

以纯化得到的重组蛋白作为抗原, 通过 ELISA 技术测定 *BmSCR8* 抗血清效价, 见表 2。

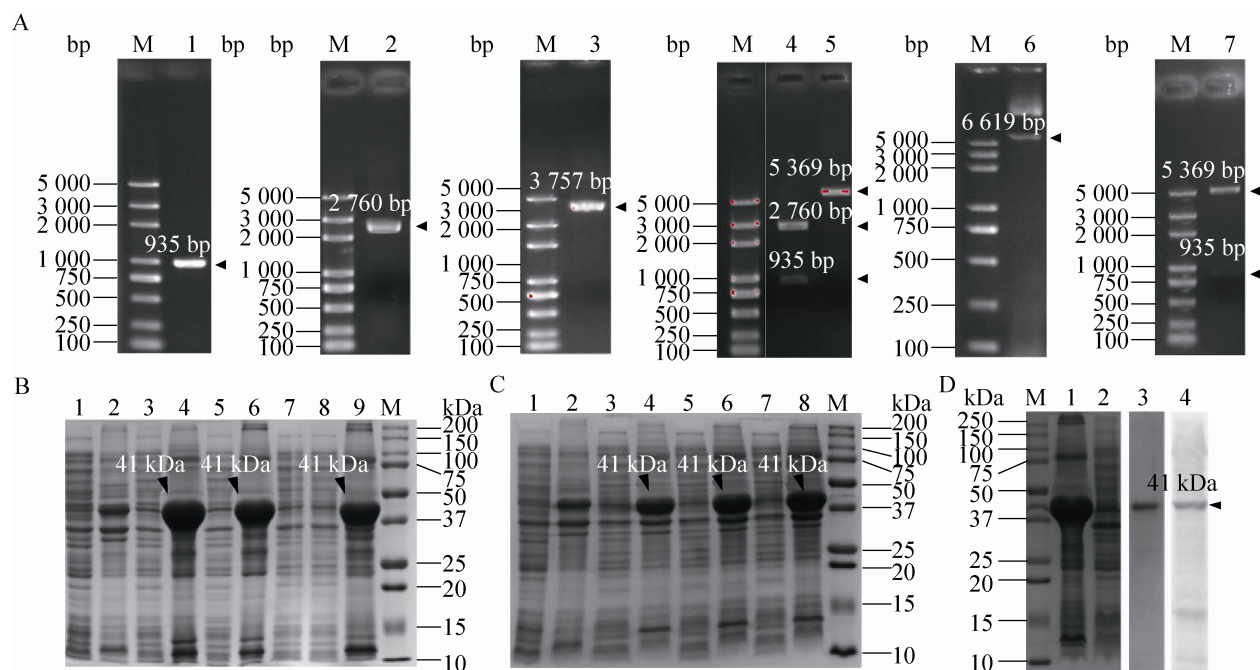


图 5 家蚕 *BmSCRB8* 原核表达、蛋白纯化及抗体制备

Fig. 5 The prokaryotic expression and protein purification of *BmSCRB8* and the preparation of anti-*BmSCRB8*. (A) The construction of the pET-28a(+)-*BmSCRB8* plasmid. M: marker; 1: PCR product of *BmSCRB8*; 2: PMD 19-T-*BmSCRB8* plasmid; 3: pET-28a(+) empty vector; 4: restriction enzyme digestion of PMD 19-T-*BmSCRB8* plasmid; 5: restriction enzyme digestion of pET-28a(+) plasmid; 6: pET-28a(+)-*BmSCRB8* plasmid; 7: restriction enzyme digestion of pET-28a(+)-*BmSCRB8* plasmid; (B) The temperature gradient induction of *BmSCRB8* recombinant protein (The concentration of IPTG is 1 mmol/L). M: marker; 1: non-induced supernatant (IPTG free); 2: non-induced sediment (IPTG free); 3: the soluble fraction induced at 16 °C; 4: the inclusion body induced at 16 °C; 5: the soluble fraction induced at 25 °C; 6: the inclusion body induced at 25 °C; 7,8: the soluble fraction induced at 37 °C; 9: the inclusion body induced at 37 °C; (C) The concentration of IPTG induction of *BmSCRB8* recombinant protein (16 °C, 24 h). M: marker; 1: non-induced supernatant (IPTG free); 2: non-induced sediment (IPTG free); 3: the soluble fraction induced by 0.05 mmol/L IPTG; 4: the inclusion body induced by 0.05 mmol/L IPTG; 5: the soluble fraction induced by 0.1 mmol/L IPTG; 6: the inclusion body induced by 0.1 mmol/L IPTG; 7: the soluble fraction induced by 0.2 mmol/L IPTG; 8: the inclusion body induced by 0.2 mmol/L IPTG; (D) The purification of *BmSCRB8* recombinant protein and the preparation of the *BmSCRB8* anti-serum. M: marker; 1: the inclusion body induced by 1 mmol/L IPTG at 16 °C for 24 h; 2: the soluble fraction induced by 1 mmol/L IPTG at 16 °C for 24 h; 3: the purified inclusion body; 4: the detection of purified protein by the *BmSCRB8* anti-serum.

取家蚕 5 龄 3 d 到 5 龄 6 d 脂肪体，提取蛋白后进行 Western blotting 分析，结果显示在 63.87 kDa 附近有单一条带，表明我们自制的抗血清能够特异性识别 *BmSCRB8* 蛋白 (图 7A)。

随后，取家蚕 4 龄眠时期的脂肪体进行免疫荧光，结果显示 *BmSCRB8* 蛋白特异性表达于细胞膜上 (图 7B)，与过表达结果相一致，进一步证明了 *BmSCRB8* 抗血清的特异性。

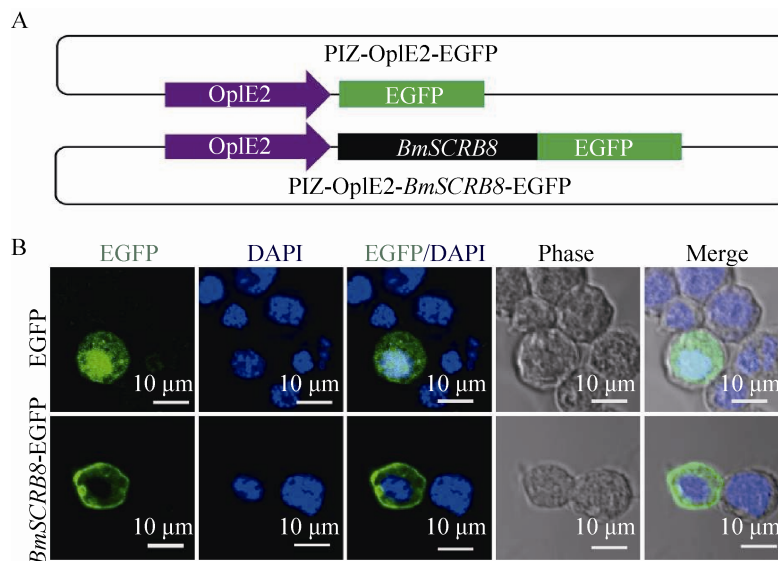


图 6 家蚕胚胎细胞系中 **BmSCR8** 蛋白的亚细胞定位

Fig. 6 The subcellular localization of BmSCR8 in embryonic cell line. (A) PIZ-OplE2-EGFP vector; PIZ-OplE2-BmSCR8-EGFP vector. (B) The cells transfected with PIZ-OplE2-EGFP and PIZ-OplE2-BmSCR8-EGFP respectively.

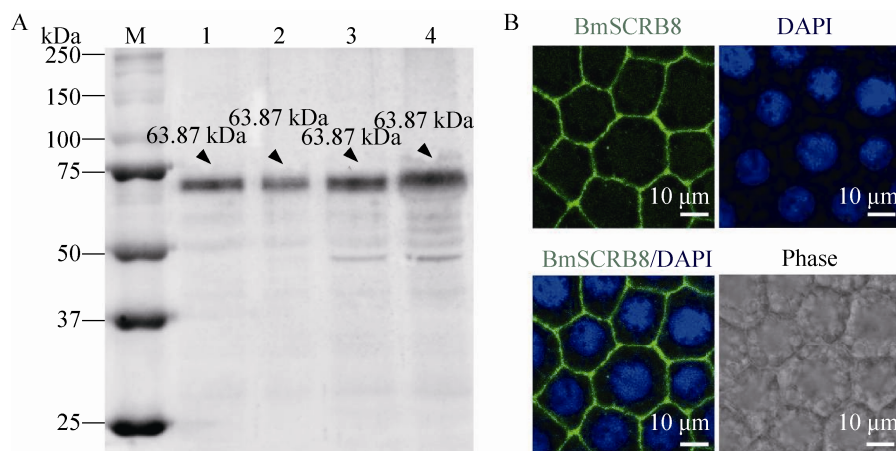


图 7 **BmSCR8** 抗血清检测

Fig. 7 The detection of the BmSCR8 anti-serum. (A) Detection of BmSCR8 anti-serum by Western blotting. M: marker; 1: the fat body in 3rd day of 5th larval; 2: the fat body in 4th day of 5th larval; 3: the fat body in 5th day of 5th larval; 4: the fat body in 6th day of 5th larval. (B) Detection of BmSCR8 anti-serum by immunofluorescence.

3 讨论

B 类清道夫受体 (SR-B) 是一类跨膜的细

胞表面糖蛋白, 其主要表达于巨噬细胞、血管上皮细胞、脂肪细胞等, 参与到诸如动脉粥样硬化、炎症反应、宿主防御、血管生成、凋亡

细胞清除等生理过程中^[24]。目前而言,SR-B 的研究主要集中于哺乳动物中,此外。昆虫中对于果蝇 SR-B 的研究相对较多,多集中于对 SR-B 在类胡萝卜素转运、信息素探测等生理过程中的功能^[16-18,25]。在家蚕中,关于 SR-B 的功能鲜有报导。现有的研究提到 SR-B 在宿主防御方面的功能,也有部分研究针对于家蚕黄茧的形成,即类胡萝卜素的转运^[19,21,23]。开展对家蚕 *BmSCRB8* 基因的研究,一方面可将家蚕作为模式生物,更为方便地进行体内基因编辑,对 SR-B 进行深入研究,为哺乳动物的研究提供参考借鉴;另一方面也能进一步丰富对家蚕功能基因的研究,为害虫防治提供理论依据。本文通过 PCR 和 RACE 技术克隆得到家蚕 *BmSCRB8* 基因的全长对其编码的蛋白序列进行分析后发现,*BmSCRB8* 为具有 CD36 结构域的两次跨膜糖蛋白,为典型的 SR-B 家族成员。同时也对 *BmSCRB8* 蛋白重要的功能位点(磷酸化、糖基化)进行了预测,该蛋白有 4 个 N-糖基化位点和 27 个磷酸化位点,包括 11 个 Ser、9 个 Thr 和 7 个 Tyr。这些位点能够指导后续的功能研究。

在昆虫中,脂肪体相当于哺乳动物中的肝脏并且在昆虫的生长发育和变态过程中发挥极其重要的作用^[26]。有研究表明,昆虫中脂肪体能在宿主免疫防御过程中快速产生抗菌肽进而参与到免疫应答中^[27],此外,昆虫脂肪体还能参与到代谢中,合成血淋巴相关蛋白^[28-29],也能间接参与到免疫防御活动中^[30-31]。对家蚕 5 龄 3 d 各组织的表达谱进行分析发现,*BmSCRB8* 基因在各组织中均有明显表达,且在脂肪体中表达量最高。而从家蚕 4 龄 3 d 到熟蚕时期的表达谱显示,*BmSCRB8* 在各时期持续性表达,且在变态发育时期(即眠期和上簇时期)表达

量较高。推测 *BmSCRB8* 可能参与到家蚕免疫反应中。

本研究构建了 PIZ-OpIE2-*BmSCRB8*-EGFP 过表达质粒并转染家蚕胚胎细胞系共聚焦显微镜观察,转染了 PIZ-OpIE2-*BmSCRB8*-EGFP 的细胞有荧光蛋白信号表达于细胞膜上。我们进一步构建了原核表达载体 pET-28(a)-*BmSCRB8*,并诱导其在大肠杆菌中高量表达,经纯化获得 *BmSCRB8* 原核表达蛋白,免疫昆明鼠后获得抗 *BmSCRB8* 血清,通过免疫荧光进一步表明 *BmSCRB8* 蛋白定位于脂肪体细胞膜,与过表达结果相互验证。暗示家蚕 *BmSCRB8* 蛋白可能有与哺乳动物相似的功能,作为一个跨膜糖蛋白参与到细胞膜内外的物质、能量、信号的运输与传递。促进细胞对修饰过的脂质分子的摄取,以及在与胞外配体结合后激活相关信号转导,进而参与到噬菌、炎症反应等生理过程。Western blotting 结果证明我们得到了较为特异的 *BmSCRB8*,为进一步对家蚕 *BmSCRB8* 基因的研究提供了重要的检测依据。

REFERENCES

- [1] Murphy JE, Tedbury PR, Homer-Vanniasinkam S, et al. Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors. *Atherosclerosis*, 2005, 182(1): 1-15.
- [2] González-Lázaro M, Dinglasan RR, de la Cruz Hernández-Hernández F, et al. *Anopheles gambiae* Croquemort SCRBO2, expression profile in the mosquito and its potential interaction with the malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2009, 39(5/6): 395-402.
- [3] Jones RS, Minogue AM, Connor TJ, et al. Amyloid- β -induced astrocytic phagocytosis is mediated by CD36, CD47 and RAGE. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2013, 8(1): 301-311.

- [4] Plüddemann A, Mukhopadhyay S, Gordon S. The interaction of macrophage receptors with bacterial ligands. *Expert Rev Mol Med*, 2006, 8(28): 1–25.
- [5] PrabhuDas M, Bowdish D, Drickamer K, et al. Standardizing scavenger receptor nomenclature. *J Immunol*, 2014, 192(5): 1997–2006.
- [6] Neculai D, Schwake M, Ravichandran M, et al. Structure of LIMP-2 provides functional insights with implications for SR-BI and CD36. *Nature*, 2013, 504(7478): 172–176.
- [7] Baranova IN, Vishnyakova TG, Bocharov AV, et al. Class B scavenger receptor types I and II and CD36 mediate bacterial recognition and proinflammatory signaling induced by *Escherichia coli*, lipopolysaccharide, and cytosolic chaperonin 60. *J Immunol*, 2012, 188(3): 1371–1380.
- [8] Erdman LK, Cosio G, Helmers AJ, et al. CD36 and TLR interactions in inflammation and phagocytosis: implications for malaria. *J Immunol*, 2009, 183(10): 6452–6459.
- [9] Kim E, Tolhurst AT, Qin LY, et al. CD36/fatty acid translocase, an inflammatory mediator, is involved in hyperlipidemia-induced exacerbation in ischemic brain injury. *J Neurosci*, 2008, 28(18): 4661–4670.
- [10] Seizer P, Schiemann S, Merz T, et al. CD36 and macrophage scavenger receptor a modulate foam cell formation *via* inhibition of lipid-laden platelet phagocytosis. *Semin Thromb Hemost*, 2010, 36(2): 157–162.
- [11] Stewart CR, Stuart LM, Wilkinson K, et al. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol*, 2010, 11(2): 155–161.
- [12] Cai L, Ji AL, de Beer FC, et al. SR-BI protects against endotoxemia in mice through its roles in glucocorticoid production and hepatic clearance. *J Clin Invest*, 2008, 118(1): 364–375.
- [13] Okumura T, Jamieson GA. Platelet glycoprotein. I. Orientation of glycoproteins of the human platelet surface. *J Biol Chem*, 1976, 251(19): 5944–5949.
- [14] Okumura I, Lombart C, Jamieson GA. Platelet glycoprotein. II. Purification and characterization. *J Biol Chem*, 1976, 251(19): 5950–5955.
- [15] Franc NC, Dimarcq JL, Lagueux M, et al. Croquemort, a novel drosophila hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity*, 1996, 4(5): 431–443.
- [16] Voolstra O, Kiefer C, Hoehne M, et al. The *Drosophila* class B scavenger receptor NinaD-I is a cell surface receptor mediating carotenoid transport for visual chromophore synthesis. *Biochemistry*, 2006, 45(45): 13429–13437.
- [17] Nichols Z, Vogt RG. The SNMP/CD36 gene family in Diptera, Hymenoptera and Coleoptera: *Drosophila melanogaster*, *D. pseudoobscura*, *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti*, *Apis mellifera*, and *Tribolium castaneum*. *Ins Bio Mol Biol*, 2008, 38(4): 398–415.
- [18] Benton R, Vannice KS, Vosshall LB. An essential role for a CD36-related receptor in pheromone detection in *Drosophila*. *Nature*, 2007, 450(7167): 289–293.
- [19] Tanaka H, Ishibashi J, Fujita K, et al. A genome-wide analysis of genes and gene families involved in innate immunity of *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2008, 38(12): 1087–1110.
- [20] Sakudoh T, Iizuka T, Narukawa J, et al. A CD36-related transmembrane protein is coordinated with an intracellular lipid-binding protein in selective carotenoid transport for cocoon coloration. *J Biol Chem*, 2010, 285(10): 7739–7751.
- [21] Sakudoh T, Kuwazaki S, Iizuka T, et al. CD36 homolog divergence is responsible for the selectivity of carotenoid species migration to the silk gland of the silkworm *Bombyx mori*. *J Lipid Res*, 2013, 54(2): 482–495.
- [22] Dong ZP. Clone, Identification and study on the function of class B scavenger receptor genes in silkworm, *Bombyx mori* [D]. Chongqing: Southwest University, 2011 (in Chinese).
董占鹏. 家蚕 B 型清道夫受体 (class B scavenger receptor) 基因的克隆鉴定及功能研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2011.
- [23] Dong ZP, Chai CL, Dai FY, et al. Expression pattern and tissue localization of the class B scavenger receptor *BmSCRBO4* in *Bombyx mori*.

- Insect Sci, 2015, 22(6): 739–747.
- [24] Benard EL, Roobol SJ, Spaink HP, et al. Phagocytosis of mycobacteria by zebrafish macrophages is dependent on the scavenger receptor Marco, a key control factor of pro-inflammatory signalling. *Dev Comp Immunol*, 2014, 47(2): 223–233.
- [25] Kiefer C, Sumser E, Wernet MF, et al. A class B scavenger receptor mediates the cellular uptake of carotenoids in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(16): 10581–10586.
- [26] Price GM. Protein and nucleic acid metabolism in insect fat body. *Biol Rev*, 1973, 48(3): 333–372.
- [27] Aggrawal K, Silverman N. Peptidoglycan recognition in *Drosophila*. *Biochem Soc Trans*, 2007, 35(Pt6): 1496–1500.
- [28] Zhang WB, Zhou QM, Zhang K, et al. Integrin-mediated signaling pathway and its research advances in insects. *Sci Sericult*, 2015, 41(1): 159–165 (in Chinese).
- 张维博, 周其明, 张奎, 等. 整合素介导的信号通路及在昆虫领域的研究进展. *蚕业科学*, 2015, 41(1): 159–165.
- [29] Su JJ, Chen SY, Zhang K, et al. Identification and expression analysis of cathepsin O gene in silkworm (*Bombyx mori*). *Sci Agr Sin*, 2015, 48(22): 4564–4573 (in Chinese).
- 苏晶晶, 陈思源, 张奎, 等. 家蚕组织蛋白酶 O (BmCatO) 基因鉴定及表达分析. *中国农业科学*, 2015, 48(22): 4564–4573.
- [30] Arrese EL, Soulages JL. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annu Rev Entomol*, 2010, 55: 207–225.
- [31] Tan J, Zhang K, Xu M, et al. Identification and subcellular localization of *Bmintegrin αPS3* from silkworm (*Bombyx mori*). *Sci Agr Sin*, 2013, 46(22): 4808–015 (in Chinese).
- 谈娟, 张奎, 徐曼, 等. 家蚕整合素基因 *Bmintegrin αPS3* 的鉴定及亚细胞定位. *中国农业科学*, 2013, 46(22): 4808–4815.

(本文责编 陈宏宇)