

• 农业生物技术 •

## 整合素 BmIntegrin $\beta 2$ 的结构分析及其对家蚕血细胞的调控作用

赵二虎<sup>1,2,3,\*</sup>, 张奎<sup>1,2,3,\*</sup>, 苏晶晶<sup>1,4</sup>, 潘光照<sup>1,2,3</sup>, 李重阳<sup>1,2,3</sup>, 申利<sup>1,2,3</sup>, 杨丽群<sup>1,2,3</sup>, 崔红娟<sup>1,2,3</sup>

1 西南大学生物技术学院 家蚕基因组生物学国家重点实验室, 重庆 400716

2 重庆市蚕丝生物材料与再生医学工程技术研究中心, 重庆 400716

3 西南大学肿瘤生物医学与转化工程研究中心, 重庆 400715

4 威斯腾生物医药科技有限责任公司, 重庆 400039

赵二虎, 张奎, 苏晶晶, 等. 整合素 BmIntegrin  $\beta 2$  的结构分析及其对家蚕血细胞的调控作用. 生物工程学报, 2018, 34(10): 1620–1630.

Zhao EH, Zhang K, Su JJ, et al. Structure and function of BmIntegrin  $\beta 2$  in silkworm, *Bombyx mori*. Chin J Biotech, 2018, 34(10): 1620–1630.

**摘要:** 整合素是一类广泛分布于细胞表面的黏附分子受体, 是由  $\alpha$  和  $\beta$  两个亚基组成的异源二聚体跨膜蛋白, 其是细胞内外信号转导的中间桥梁。在鳞翅目昆虫细胞内, 整合素主要表达于血细胞, 参与昆虫细胞免疫反应进程。文中首先通过 RACE 技术等, 克隆获得 BmIntegrin  $\beta 2$  基因 cDNA 全长序列 2 434 bp; 并对其蛋白结构域进行了预测, 主要包括信号肽、一段较大的胞外域, 单次跨膜结构和较短的胞内域; 利用 qRT-PCR 技术检测了家蚕 4 龄 3 天和 5 龄 3 天的 BmIntegrin  $\beta 2$  各组织表达图谱, 结果显示其主要在血细胞和造血器官中高表达; 然后再经原核诱导表达、蛋白纯化及免疫动物后获得 BmIntegrin  $\beta 2$  抗体。通过对 BmIntegrin  $\beta 2$  蛋白功能作用的研究发现, BmIntegrin  $\beta 2$  抗体可显著地减少浆细胞的数量, 这从侧面说明 BmIntegrin  $\beta 2$  抗体可能抑制了浆细胞的延伸性和粘附能力。该结果不仅为 BmIntegrin  $\beta 2$  参与家蚕细胞的免疫反应奠定了基础, 还提供了一个新的研究视野。

**关键词:** 整合素, BmIntegrin  $\beta 2$ , 浆细胞, 粘附, 细胞免疫

**Received:** January 16, 2018; **Accepted:** May 23, 2018

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 81602479, 31802142, 31672496), Chongqing Research Program of Basic Research and Frontier Technology (Nos. cstc2017jcyjAX0028, cstc2016jcyjA0425), Venture & Innovation Support Program for Chongqing Overseas Returnees (No. cx2017014), China Postdoctoral Science Foundation (No. 2017M602408), Doctorial Start-up Fund of Southwest University (No. SWU118107), Chongqing University Innovation Team Building Program Funded Project (No. CXTDX201601010).

**Corresponding author:** Hongjuan Cui. Tel: +86-23-68251712; Fax: +86-23-68251128; E-mail: hcui@swu.edu.cn

\*These authors contributed equally to this study.

国家自然科学基金 (Nos. 81602479, 31802142, 31672496), 重庆市基础科学与前沿技术研究专项 (Nos. cstc2017jcyjAX0028, cstc2016jcyjA0425), 重庆市留学人员回国创业创新支持计划重点项目 (No. cx2017014), 中国博士后基金 (No. 2017M602408), 西南大学博士基金项目 (No. SWU118107), 重庆高校创新团队建设计划 (No. CXTDX201601010) 资助。

## Structure and function of BmIntegrin $\beta 2$ in silkworm, *Bombyx mori*

Erhu Zhao<sup>1,2,3,\*</sup>, Kui Zhang<sup>1,2,3,\*</sup>, Jingjing Su<sup>1,4</sup>, Guangzhao Pan<sup>1,2,3</sup>, Chongyang Li<sup>1,2,3</sup>, Li Shen<sup>1,2,3</sup>, Liqun Yang<sup>1,2,3</sup>, and Hongjuan Cui<sup>1,2,3</sup>

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

2 Chongqing Engineering and Technology Research Center for Silk Biomaterials and Regenerative Medicine, Chongqing 400716, China

3 Southwest University Engineering Research Center for Cancer Biomedical and Translational Medicine, Chongqing 400715, China

4 Western Biotechnology Corporation Ltd., Chongqing 400039, China

**Abstract:** Integrins are cell adhesion receptors, which consists of several transmembrane glycoproteins. They are widely distributed on the cell surface and involved in signal transduction pathways. As a heterodimer, each integrin is composed of one  $\alpha$  subunit and one  $\beta$  subunit. Integrins are mainly expressed on lepidopteran hemocytes and involved in cell immune response. The full-length cDNA sequence of *BmIntegrin  $\beta 2$*  was obtained by PCR and RACE, including 2 434 bp. BmIntegrin  $\beta 2$  was predicted to be a transmembrane protein. The *BmIntegrin  $\beta 2$*  expression profile was detected by qRT-PCR at L4D3 or L5D3 larval stage, and it was highly expressed in hemocyte and hematopoietic organ. Anti-BmIntegrin  $\beta 2$  polyclonal antibody was generated following prokaryotic expression, protein purification and animal immunization, which is highly specific and effective for recognizing BmIntegrin  $\beta 2$  protein through Western blotting. The results of plasmotocytes adhesion experiment showed that BmIntegrin  $\beta 2$  plays an important role on the adhesion and spreading of plasmotocytes to foreign surfaces. This study provides a foundation for further research of the biological function of *BmIntegrin  $\beta 2$*  gene.

**Keywords:** integrin, *BmIntegrin  $\beta 2$* , plasmotocytes, adhesion, cellular immunity

整合素蛋白家族 (Integrin family) 是一类广泛分布于细胞表面的黏附分子受体, 是由  $\alpha$  和  $\beta$  两个亚基组成的异源二聚体跨膜蛋白<sup>[1-2]</sup>。整合素 (或称整合蛋白) 参与细胞与细胞、细胞与细胞外基质 (Extracellular matrix, ECM) 之间以及细胞与病原体之间的相互作用, 是细胞内外信号转导的中间桥梁, 广泛参与细胞识别、细胞增殖分化、迁移侵袭和细胞衰老等一系列生理或病理过程<sup>[2-9]</sup>。目前在哺乳动物的整合素家族中, 已发现有 18 种  $\alpha$  亚基和 8 种  $\beta$  亚基, 能组成至少 24 种功能性的二聚体跨膜蛋白<sup>[10-12]</sup>; 果蝇的整合素家族则有 5 个  $\alpha$  亚基, 分别为  $\alpha$ PS1 (编码 mew 基因)、 $\alpha$ PS2 (编码 if 基因)、 $\alpha$ PS3 (编码 scb 基因)、 $\alpha$ PS4 和  $\alpha$ PS5; 2 个  $\beta$  亚基, 分别为  $\beta$ PS (编码 mys 基因) 和  $\beta$ v<sup>[13-14]</sup>; 果蝇整合素基因与果蝇的胚胎发育、肌肉收缩、肠道的形态发生以及细胞与细胞外基质间交流都有重要的作用<sup>[15-16]</sup>。

在鳞翅目昆虫大豆尺夜蛾 *Pseudoplusia*

*includens* 和烟草天蛾 *Manduca sexta* 中, 已经发现至少 3 个  $\alpha$  亚基和 1 个  $\beta$  亚基, 其整合素与昆虫免疫反应相关, 主要是参与病原的吞噬、形成结节和包被等<sup>[12,17-19]</sup>。而鳞翅目害虫甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 和烟夜蛾 *Helicoverpa assulta* 的整合素 *Integrin  $\beta$*  相关基因已经被鉴定, 并分别命名为 *SeINT* 和 *HaITGb1*, 其功能不仅与昆虫细胞内免疫反应有关, 还参与了其幼虫的生长发育<sup>[12,20]</sup>; 此外, *SeINT* 基因还对昆虫中肠的消化和吸收有着重要作用<sup>[21]</sup>。Zhang 等和孙亚兰对家蚕整合素 *BmIntegrin* 基因家族进行了初步的描述和鉴定, 研究结果显示家蚕整合素蛋白拥有 6 个  $\alpha$  亚基和 5 个  $\beta$  亚基<sup>[22-23]</sup>。尽管如此, 有关家蚕整合素的结构功能只有少量报道<sup>[22]</sup>, 而对于家蚕整合素  $\beta$  亚基蛋白的研究更是少之又少。因此, 笔者采用生物信息学分析及 RACE 技术, 克隆并鉴定 *BmIntegrin  $\beta 2$*  基因, 尝试构建 BmIntegrin  $\beta 2$  蛋白原核表达载体, 表达靶标蛋白, 制备多克隆抗体, 并分析其在家蚕血液免疫中的功能, 为进

一步研究家蚕整合素  $\beta$  亚基蛋白家族的功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

本研究主要采用中国本地家蚕品种大造作为实验对象,由西南大学家蚕基因资源库提供。质粒抽提试剂盒购自德国 Qiagen 公司。感受态细胞由 TaKaRa 的感受态制备试剂盒制备。各种限制性内切酶、PCR 酶、T4 DNA 连接酶、载体质粒和 DNA Marker 等均购自大连 TaKaRa 公司。TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司。逆转录试剂盒购自美国 Promega 公司。SMARTer RACE cDNA 扩增试剂盒购自美国 Clontech 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 总 RNA 的提取及 cDNA 合成

选取 4 龄 3 天和 5 龄 3 天的家蚕幼虫,解剖获得家蚕体壁组织、马氏管、头部、丝腺组织、精巢、卵巢、脂肪体、中肠组织、血细胞、翅原基等组织,在液氮中研碎,然后加入 TRIzol 试剂,并提取各组织的总 RNA;然后按照 Promega 逆转录试剂盒的方法步骤反转录合成各组织的 cDNA。

#### 1.2.2 *BmIntegrin $\beta$* 基因全长序列的获取

根据之前的文献报道<sup>[24-25]</sup>,设计基因特异 RACE 引物 GSP1、NGSP1、GSP2、NGSP2 (引物序列见表 1)。根据 RACE cDNA 扩增试剂盒的说明书,进行 5'和 3'的 RACE cDNA 扩增。然后将 PCR 产物进行电泳检测并回收进行克隆和转化,然后筛选出阳性克隆。最后,将阳性克隆送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,分析拼接后得到目的基因的 cDNA 全长序列。

#### 1.2.3 *BmIntegrin $\beta$* 的生物信息学分析

相关基因的序列均来自于 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 或家蚕基因组数据库 SilkDB (<http://www.silkdb.org>),并利用在线软件 SMART (<http://smart.emblheidelberg.de/>)、NCBI 保守结构域预测中心 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 等网站及 GeneDoc 和 Adobe Illustrator CS6 等软件进行生物信息学分析及作图。

#### 1.2.4 *BmIntegrin $\beta$* 基因的定量表达分析

基于家蚕基因组数据库,设计和合成 *BmIntegrin  $\beta$*  的荧光定量 PCR 引物(表 1),以前期获得的 4 龄 3 天和 5 龄 3 天的家蚕幼虫各组织

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

| Primer name                                  | Primer sequence (5'-3')            | Usage                  |
|--|------------------------------------|------------------------|
| Integrin $\beta$ 2-CDS-F                     | ATATCGCGTTACGTTATTGTGG             | PCR                    |
| Integrin $\beta$ 2-CDS-R                     | GTAAGATGGGTTTCGGAAATTCT            |                        |
| GSP1   | GTGTCTTGGGCAGAATGCGGTTTT           | 5' RACE PCR            |
| NGSP1  | GCCGGTGCAACGAGCCAAGGGAGA           |                        |
| GSP2   | TCCCTTGGCTCGTTGCACCGGCTG           | 3' RACE PCR            |
| NGSP2  | GCCCTGACAGTGGTTGGACAAAAG           |                        |
| Integrin $\beta$ 2-EcoR I-F                  | CCGGAATTCCTATAGAGCATTCCCGC         | Prokaryotic expression |
| Integrin $\beta$ 2-Xho I-R                   | CCGCTCGAGCTGTTTCTGATCCTAGTATTGCATT |                        |
| <i>BmIntegrin <math>\beta</math>2</i> -qRT-F | GTATTGATTGGCTTGCTGACTCTC           | qRT-PCR                |
| <i>BmIntegrin <math>\beta</math>2</i> -qRT-R | GCTTCTTCCACTTTCCTGTATTCC           |                        |
| GAPDH-F                                      | CATTCCGCGTCCCTGTTGCTAAT            | qRT-PCR                |
| GAPDH-R                                      | GCTGCCTCCTTGACCTTTTGC              |                        |

Underlined bases indicate restriction enzyme site of *EcoR* I (GAATTC) and *Xho* I (CTCGAG).

cDNA 为模板,以家蚕细胞甘油醛-3-磷酸脱氢酶 GAPDH 为内参基因,进行实时荧光定量 PCR 扩增分析。每个组织样品分别进行 3 次重复试验,收集目的基因和内参基因的 Ct 值进行统计学数据分析;以家蚕血细胞中 *BmIntegrinβ2* 的表达量为对照,利用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计算和分析其他组织中 *BmIntegrin β2* 的相对表达量。

### 1.2.5 *BmIntegrin β2* 蛋白的原核表达纯化与抗体制备

通过对基因的生物学分析,选取家蚕整合素 *BmIntegrin β2* 基因的特异性片段,然后进行 PCR 扩增并将扩增产物连接到 pET32a 空载体中,获得 pET32a-*BmIntegrin β2* 质粒。筛选获得阳性克隆质粒后,转化到感受态细胞 Rosseta 菌株中,挑取阳性的 pET32a-*BmIntegrin β2*/Rosetta 单菌落进行培养。根据文献<sup>[26-27]</sup>中的方法,向菌液中加入 1 mmol/L 的 IPTG,分别在 16 °C、25 °C 和 37 °C 的条件下,以 300 r/min 的转速进行菌液培养,其中 37 °C 组培养 5 h,25 °C 组培养 12 h,16 °C 组培养 24 h。裂解诱导好的菌液,分别收集上清和沉淀进行 SDS-PAGE,并用考马斯亮蓝染色进行拍照分析。

通过大量诱导 pET32a-*BmIntegrin β2*/Rosetta 菌表达目的蛋白,按照文献<sup>[27]</sup>所用的 Triton X-100 法提取和洗涤包涵体蛋白,然后用镍离子亲和柱进行纯化,并用含有相应浓度的咪唑平衡液洗脱目的蛋白;收集洗脱液进行 SDS-PAGE 实验分析蛋白纯化的情况。然后选取纯度高于 85% 的蛋白样品送至重庆威斯腾生物医药科技有限责任公司,制备多克隆抗体。

### 1.2.6 *BmIntegrin β2* 抗体的效价及其对家蚕血细胞的影响

采用间接 ELISA 法对所获得抗 *BmIntegrin β2* 血清,进行抗体效价的检测。第一步,首先在 96 孔酶标板中加入 100 μL 的抗原浓度为 2 μg/L 的包

被液,密封置于 2-8 °C 环境过夜;将包被好的酶标板取出揭开,并去除上清液,再用洗涤液洗 3 次。第二步,按照上面的类似的步骤再用封闭液 37 °C 封闭 1 h,并用洗涤液洗 3 次。第三步,将相应的抗体分别以 1 : 500、1 : 1 000、1 : 2 000、1 : 4 000、1 : 8 000、1 : 16 000、1 : 32 000、1 : 64 000、1 : 128 000 和 1 : 256 000 等比例分别稀释后,再各取 100 μL 加入封闭后的酶标板,置于 37 °C 环境孵育 1 h,并用洗涤液洗 3 次;以未稀释的阴性血清作阴性对照,以相应的阴性血清稀释液作空白对照。第四步,用稀释液以 1 : 30 000 比例稀释酶标二抗,然后每孔各加 100 μL 的酶标二抗稀释液,将酶标板置于 37 °C 环境孵育 1 h,并用洗涤液洗 3 次。第五步,按照 TMB 显色试剂盒的步骤进行显色,并测定出 450 nm 处的 OD 值。第六步,按照以上步骤将所获得的抗体在 1 周内反复进行 3 次重复试验,利用 SPSS 19.0 等软件计算和分析出 OD 值结果的变异系数。

参照之前文献<sup>[28]</sup>的方法,先将抗体制成 5、10、20 和 100 倍稀释液;然后从 5 龄 3 天幼虫的足部收集家蚕血细胞,将血细胞加入已配制好的梯度抗体稀释液中,约 106 个/mL,置于 4 °C 环境轻摇 30 min。将孵育好的细胞滴入 24 孔板中,25 °C 培养 30 min。最后用 4% 多聚甲醛室温固定 15 min,洗涤后置于显微镜下观察和拍照,统计分析浆细胞的数目。

## 2 结果与分析

### 2.1 家蚕整合素 *BmIntegrin β2* 基因的克隆与分析

通过前期生物信息学分析预测的结果,结合 PCR 技术,克隆了家蚕整合素 *BmIntegrin β2* 基因的部分 cDNA 序列,约为 1 700 bp (图 1A);以已知的部分 cDNA 序列为模板,利用 RACE 技术对该基因的 5'端和 3'端进行扩增,并分别获得了 5' RACE 和 3' RACE 的 PCR 片段产物 (图 1A)。

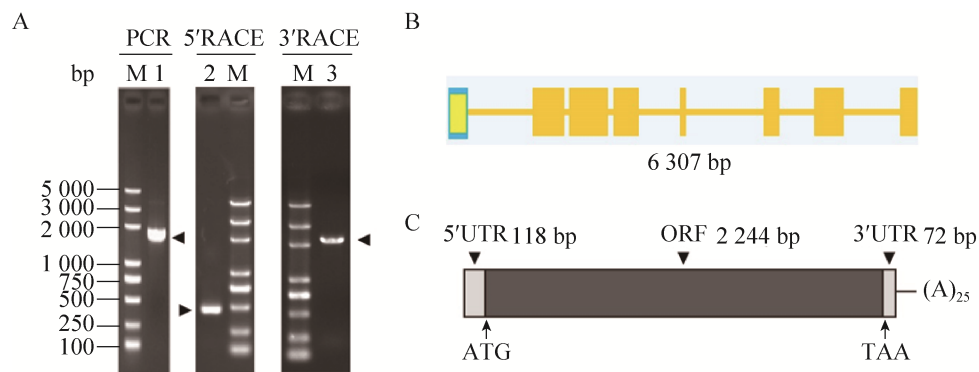


图1 家蚕 *BmIntegrin β2* 全长克隆及信息分析

Fig. 1 Cloning and bioinformatics of *BmIntegrin β2* in *Bombyx mori*. (A) Full-length cDNA was cloned by RACE method. M: marker; 1: PCR product of partial fragment; 2: 5' RACE PCR product; 3: 3' RACE PCR product. (B) The diagram of *BmIntegrin β2* complete genomic sequence. (C) The diagram of *BmIntegrin β2* complete cDNA sequence.

家蚕整合素 *BmIntegrin β2* 基因在家蚕基因组数据库中编号为 BGIBMGA006002, 定位于家蚕 4 号染色体, 基因全长为 6311 bp, 由 8 个外显子和 7 个内含子构成 (图 1B)。家蚕 *BmIntegrin β2* 基因的 cDNA 全长 2434 bp, 其中开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF) 的长度为 2244 bp, 5'端和 3'端非编码区分别为 118 bp 和 72 bp (图 1C)。

## 2.2 家蚕整合素 *BmIntegrin β2* 的结构分析

家蚕整合素 *BmIntegrin β2* 蛋白包含 747 个氨基酸 (Amino acid, aa), 预测蛋白分子量为 84.42 kDa, 等电点为 5.349。利用 SMART 和 SignalP 等生物信息学软件分析, 发现在该蛋白的前 19 个氨基酸组成一段信号肽区域, 第 28–435 位氨基酸区域为 INB 结构域 (Integrin beta subunits domain, INB), 第 133–137 位氨基酸区域为 MIDAS 金属离子结合序列 (Metal ion-adhesion motif, MIDAS), 第 460–502 位氨基酸区域和第 507–534 位氨基酸区域构成了 EGF 结构域 (Epithelial growth factor domain, EGF), 第 678–700 位氨基酸区域为跨膜区域 (Transmembrane domain, TM), 第 701–746 位氨基酸区域为较短的胞内域 (Cytoplasmic domain, CD) (图 2A)。总之, 家蚕

整合素 *BmIntegrin β2* 预测的结构主要包括信号肽、一段较大的胞外域 (Extracellular domain, ED), 单次跨膜结构和较短的胞内域 (图 2B)。

## 2.3 家蚕整合素 *BmIntegrin β2* 的表达分析

对 4 龄 3 天的家蚕幼虫各组织 *BmIntegrin β2* 基因的 mRNA 水平进行了分析, 结果显示 *BmIntegrin β2* 在家蚕血液细胞和翅原基中高度表达, 在头部、马氏管和中肠组织中则有少量的表达, 而在其他组织中几乎不表达 (图 3A)。同样的, 在 5 龄 3 天的家蚕幼虫中, *BmIntegrin β2* 在家蚕血液细胞和翅原基中依旧高度表达 (图 3B)。由于翅原基中包含家蚕的造血器官, 因此我们推测 *BmIntegrin β2* 基因在家蚕血液细胞中可能发挥着重要的作用。

## 2.4 *BmIntegrin β2* 蛋白的诱导表达及抗体制备

首先构建好带有 *BmIntegrin β2* 片段 (图 4A) 的 pET32a-*BmIntegrin β2* 重组质粒 (图 4B), 并将该质粒转入大肠杆菌中; 然后在带有 pET32a-*BmIntegrin β2* 重组质粒的大肠杆菌中加入 1 mmol/L 的 IPTG, 并分别在 16 °C、25 °C 和 37 °C 条件下进行重组蛋白的诱导表达。然后利用 SDS-PAGE 进行检测, 结果显示无论是 16 °C、25 °C 或 37 °C 条件

下诱导相应的时间, 细胞裂解后上清液中几乎没有检测到目的蛋白 (图 4C, 泳道 3、5 和 7), 而在所有的沉淀中都检测到了约 48 kDa 的目的蛋白 (图 4C, 泳道 4、6 和 8); 与其他条件相比, 在 37 °C 下目的蛋白表达量更高, 这说明此条件

下, Integrin 更容易形成包涵体。因此, 我们选择在 37 °C 条件下, 加入 1 mmol/L 的 IPTG 进行大规模表达 Integrin 蛋白。大规模诱导蛋白后, 通过  $\text{Ni}^{2+}$  离子亲和层析法, 得到纯度超过 95% 的家蚕整合素 Integrin  $\beta 2$  蛋白 (图 4D)。



图 2 家蚕整合素 BmIntegrin  $\beta 2$  的蛋白结构预测

Fig. 2 Protein structure prediction from BmIntegrin  $\beta 2$  sequence. (A) Nucleotide (above) and deduced amino acid sequences (below) of BmIntegrin  $\beta 2$  in silkworm, *Bombyx mori*. Pink box: signal Peptide; gray box: integrin beta subunits domain, INB domain; red underline: antigenic peptide fragments of BmIntegrin  $\beta 2$ ; green box: epithelial growth factor domain, EGF domain; blue box: transmembrane domain; Purple box: cytoplasmic domain; yellow Wireframe: metal ion-adhesion motif, MIDAS motif; red Wireframe: polyadenylation signal. The start codon and stop codon are marked red. (B) Conserved domains of BmIntegrin  $\beta 2$  in silkworm, *Bombyx mori*. SP: signal peptide; ED: N-terminal portion of extracellular region; TM: transmembrane segment; CD: cytoplasmic domain.

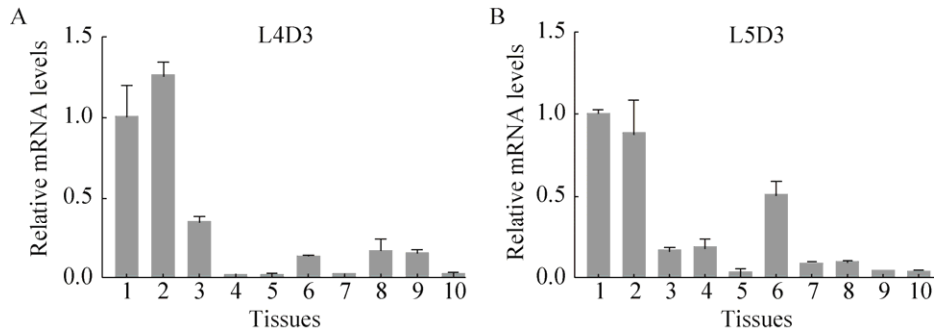


图3 家蚕整合素 *BmIntegrin β2* 在家蚕幼虫时期的各组织表达图谱

Fig. 3 Expression of *BmIntegrin β2* mRNA in the different tissues. (A) The expression of *BmIntegrin β2* mRNA in the different tissues of the 3rd day of 4th larvae. (B) The expression of *BmIntegrin β2* mRNA in the different tissues of 3rd day of 5th larvae. 1: hemocyte; 2: wing disc; 3: head; 4: epidermis; 5: fat body; 6: malpighian tubules; 7: silk gland; 8: midgut; 9: testis; 10: ovary.

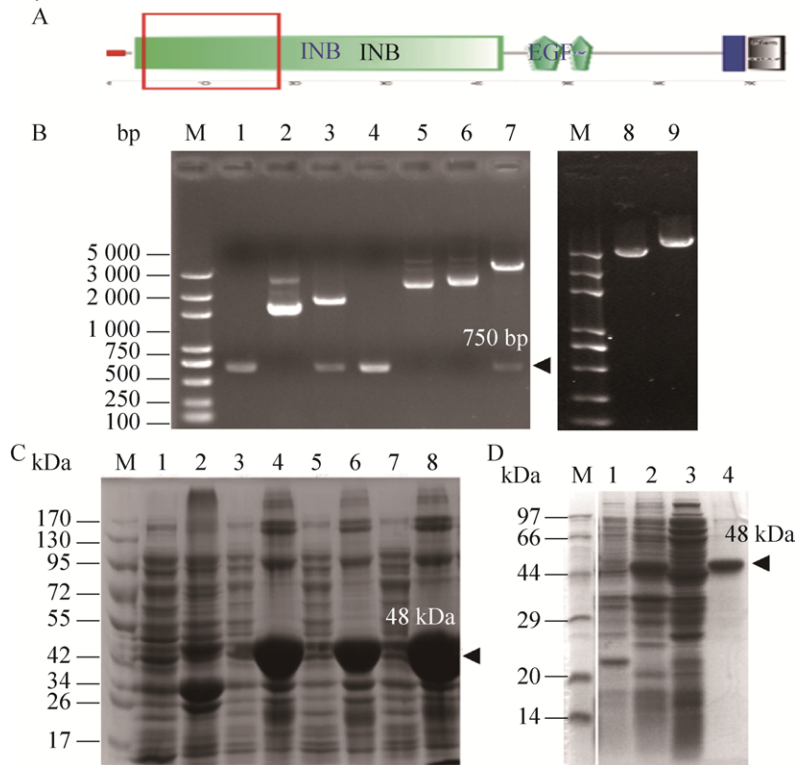


图4 *BmIntegrin β2* 蛋白的诱导表达与纯化

Fig. 4 Induction and purification of recombinant protein *BmIntegrin β2*. (A) Protein structure prediction from *BmIntegrin β2*. Red Wireframe: the antibody fragment. (B) The construction of the pET32a-Integrin  $\beta 2$  plasmid. M: DNA marker; 1: the PCR product of antibody fragment sequence; 2–3: the plasmid/Dual restriction enzyme digestion analysis of pMD19-*BmIntegrin β2*; 4: extraction of PCR product; 5: pET32a vector; 6–7: the plasmid/Dual restriction enzyme digestion analysis of pET32a-Integrin  $\beta 2$ ; 8–9: single restriction enzyme digestion analysis of pET32a vector/pET32a-Integrin  $\beta 2$ . (C) Induction of the *BmIntegrin β2* protein in *E. coli*. M: protein marker; 1–2: the soluble fraction/inclusion body of recombinant *E. coli* by 0 mmol/L IPTG at 16 °C for 24 h; 3–4: the soluble fraction/inclusion body of recombinant *E. coli* by 1 mmol/L IPTG at 16 °C for 24 h; 5–6: the soluble fraction/inclusion body of recombinant *E. coli* by 1 mmol/L IPTG at 25 °C for 12 h; 7–8: the soluble fraction/inclusion body of recombinant *E. coli* by 1 mmol/L IPTG at 37 °C for 5 h. (D) Purified *BmIntegrin β2* protein. M: protein marker; 1–2: the soluble fraction/inclusion body of recombinant *E. coli* by 1 mmol/L IPTG at 37 °C for 5 h; 3: the soluble fraction before/after purification.

## 2.5 BmIntegrin $\beta 2$ 的抗体效价及其对家蚕血细胞的调控作用

我们所设计的 BmIntegrin  $\beta 2$  重组蛋白抗原片段的氨基酸序列总长为 235 个氨基酸 (图 2A 和 4A); 具体为 BmIntegrin  $\beta 2$  蛋白的第 20–254 位氨基酸, 其中包括完整的 MIDAS 金属离子结合序列和部分的 INB 结构域 (图 2A 和 4A)。我们采用间接 ELISA 法, 对所获得的 BmIntegrin  $\beta 2$  抗体进行了抗体效价的检测, 结果显示 BmIntegrin  $\beta 2$  抗体效价高达 1 : 128 000 (表 2), 这说明所获得 BmIntegrin  $\beta 2$

抗体具有较高的抗体效价。另外, 所有稀释度的样品的变异系数在 0.929%–8.166% 之间 (表 2), 这也说明所获得 BmIntegrin  $\beta 2$  抗体的重复性和稳定性均良好。因此, BmIntegrin  $\beta 2$  抗体可为后续研究 BmIntegrin  $\beta 2$  蛋白功能提供抗体支持。

为了研究 BmIntegrin  $\beta 2$  蛋白在家蚕血液免疫中的作用, 我们通过采集家蚕的血液, 在体外用稀释 5 倍后的抗 BmIntegrin  $\beta 2$  血清对家蚕的循环血细胞进行孵育, 如图 5A 所示, 经抗 BmIntegrin  $\beta 2$  血清孵育过的循环血细胞中浆细胞的数量明显减

表 2 家蚕整合素 BmIntegrin  $\beta 2$  抗血清的效价检测

Table 2 Titer curve of anti-BmIntegrin  $\beta 2$  serum

| Dilution       | Test number/ $OD_{450}$ |       |       | Statistical analysis |       |        |
|----------------|-------------------------|-------|-------|----------------------|-------|--------|
|                | 1                       | 2     | 3     | $\bar{x}$            | $s$   | CV (%) |
| 1:500          | 1.432                   | 1.455 | 1.498 | 1.462                | 0.034 | 2.292  |
| 1:1 000        | 1.516                   | 1.533 | 1.505 | 1.518                | 0.014 | 0.929  |
| 1:2 000        | 1.408                   | 1.436 | 1.439 | 1.428                | 0.017 | 1.198  |
| 1:4 000        | 1.415                   | 1.396 | 1.431 | 1.414                | 0.018 | 1.239  |
| 1:8 000        | 1.433                   | 1.433 | 1.415 | 1.427                | 0.010 | 0.728  |
| 1:16 000       | 1.409                   | 1.388 | 1.418 | 1.405                | 0.015 | 1.096  |
| 1:32 000       | 1.411                   | 1.296 | 1.385 | 1.364                | 0.060 | 4.421  |
| 1:64 000       | 1.089                   | 1.255 | 1.211 | 1.185                | 0.086 | 7.257  |
| 1:128 000      | 0.987                   | 1.109 | 0.996 | 1.031                | 0.068 | 6.596  |
| 1:256 000      | 0.128                   | 0.116 | 0.109 | 0.118                | 0.010 | 8.166  |
| Negative serum | 0.158                   | 0.161 | 0.169 | 0.163                | 0.006 | 3.496  |

$OD_{450}$ : absorbance value at 450 nm;  $\bar{x}$ : average number;  $s$ : standard deviation; CV: coefficient of variation.

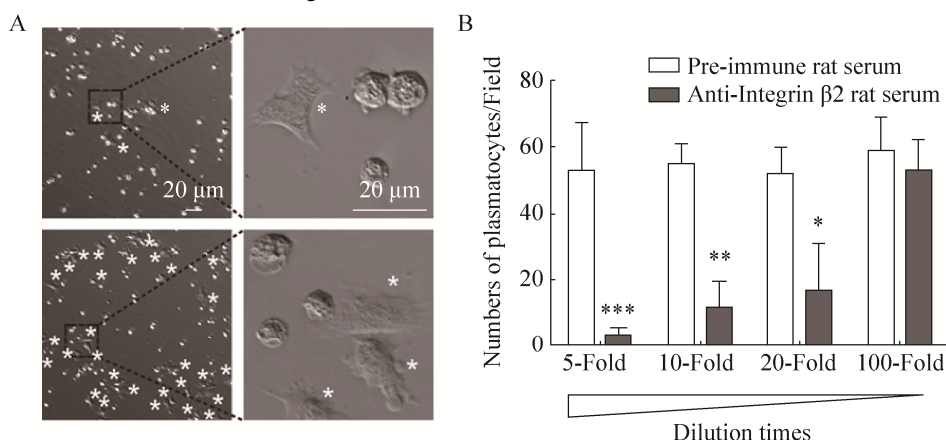


图 5 BmIntegrin  $\beta 2$  抗体对浆细胞数量的影响

Fig. 5 Effect of anti-BmIntegrin  $\beta 2$  serum on the plasmacytes number. (A) The analysis of the plasmacytes number after treated by pre-immune serum and anti-BmIntegrin  $\beta 2$  serum. Anti-BmIntegrin  $\beta 2$  serum was diluted to 5-Fold and cells marked with “\*” are plasmacytes. (B) Effects of gradient dilution anti-BmIntegrin  $\beta 2$  serum on the number of plasmacytes. Data represent the  $\bar{x} \pm s$  of at least three independent experiments. Statistical analysis was performed using the 2-tailed Student’s  $t$ -test, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .



少, 这从侧面说明 BmIntegrin  $\beta 2$  抗体可能抑制了浆细胞的延伸性和粘附能力。为了证实这一结果, 我们将抗 BmIntegrin  $\beta 2$  血清进行 5–100 倍的稀释后继续检测其对浆细胞数量的影响, 结果发现随着抗体浓度的逐步提高, 浆细胞的数量越来越少, 呈现出显著的剂量依赖效应。这也进一步表明 BmIntegrin  $\beta 2$  可能参与对浆细胞的延伸性和粘附能力的调控, 进而影响到家蚕血液的免疫反应。

### 3 讨论

昆虫的血液系统为开放式循环系统, 体腔内的所有组织器官均浸浴其中, 昆虫的血液系统不仅具有运输营养物质和代谢废物的能力, 还具有细胞免疫调节的功能。因此, 昆虫血细胞在先天性免疫反应中发挥重要的作用, 如吞噬作用、包裹作用、结节作用、黑化反应和抗菌肽分泌等<sup>[23,29]</sup>。传统的昆虫血细胞分类方法, 主要是根据组织化学染色、细胞形态和功能特征等对血细胞进行区分, 据此家蚕血细胞可分为 5 种类型, 即原血细胞 (Prohemocyte)、颗粒细胞 (Granulocytes)、浆细胞 (Plasmatocytes)、拟绦色细胞 (Oenocytoids) 和小球细胞 (Spherulocytes)<sup>[30-32]</sup>。在家蚕的血细胞类型中, 颗粒细胞和浆细胞是执行细胞免疫反应的主要血细胞类型, 其中家蚕浆细胞体积相对较大, 均大于其他类型的血细胞, 仅稍小于拟绦色细胞, 但拟绦色细胞没有粘附能力; 此外浆细胞还拥有非对称性伪足 (Pseudopod), 这也是浆细胞区别其他类型血细胞的主要特征之一<sup>[30-31,33]</sup>。浆细胞主要参与家蚕血液免疫中的包裹反应, 其可通过伸出非对称性伪足快速粘附到外源入侵物或创伤的表面进行免疫反应<sup>[33]</sup>。

整合素是一类广泛分布于细胞表面的黏附分子受体, 是由  $\alpha$  和  $\beta$  两个亚基组成的异源二聚体跨膜蛋白<sup>[1-2]</sup>。整合素参与细胞与细胞、细胞和细胞外基质 (Extracellular matrix, ECM) 之间以及

细胞与病原体之间的相互作用, 其是细胞内外信号转导的中间桥梁, 广泛参与细胞识别, 细胞增殖分化、迁移侵袭和细胞衰老等一系列生理或病理过程<sup>[2-9]</sup>。在鳞翅目昆虫细胞内, 例如甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 和烟夜蛾 *Helicoverpa assulta* 等, 整合素主要表达于血细胞, 参与其细胞内免疫反应。有关家蚕整合素的功能作用的报道相对较少, 我们实验室曾经对家蚕整合素基因 Integrin  $\alpha PS3$ <sup>[25]</sup>和 Integrin  $\beta 1$ <sup>[34]</sup>进行了研究, 发现其均高表达于家蚕循环血液细胞, 且都参与了家蚕血细胞执行的免疫反应过程。本研究中的 BmIntegrin  $\beta 2$  蛋白, 同样地属于跨膜糖蛋白整合素家族, 也高表达于家蚕循环血液细胞。我们通过 BmIntegrin  $\beta 2$  蛋白结构分析发现其蛋白结构中胞外域占据了很大的部分, 因而采用胞外域氨基酸的序列来制备 BmIntegrin  $\beta 2$  抗体。根据最终实验数据的分析结果, 我们推测 BmIntegrin  $\beta 2$  抗体可能通过与 BmIntegrin  $\beta 2$  蛋白胞外域部分结合, 竞争性地抑制了其整合素配体的结合, 从而阻断整合素信号转导的桥梁作用, 最终抑制了浆细胞的延伸性和粘附作用。目前家蚕整合素 BmIntegrin  $\beta 2$  在家蚕血液细胞免疫反应中具体的作用机制还不清楚, 但本研究获得的纯化的 BmIntegrin  $\beta 2$  抗体及所发现其对浆细胞粘附能力的影响, 为进一步研究 BmIntegrin  $\beta 2$  在昆虫细胞中的功能作用奠定了基础, 并提供了一个新的研究视野。

### REFERENCES

- [1] Vigneault F, Zaniolo K, Gaudreault M, et al. Control of integrin genes expression in the eye. *Prog Ret Eye Res*, 2007, 26(2): 99–161.
- [2] Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 2002, 110(6): 673–687.
- [3] Agerer F, Michel A, Ohlsen K, et al. Integrin-mediated invasion of *Staphylococcus aureus* into human cells requires Src family protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem*, 2003, 278(43): 42524–42531.

- [4] DeSimone DW, Stepp MA, Patel RS, et al. The integrin family of cell surface receptors. *Biochem Soc Trans*, 1987, 15(5): 789–791.
- [5] Douglass GG. Guided tissue regeneration and the role of the integrin family of cell surface adhesion receptors. *JNZ Soc Periodontol*, 1993(75): 18–21.
- [6] Cui L, Xu SM, Ma DD, et al. The role of integrin- $\alpha 5$  in the proliferation and odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *J Endodont*, 2014, 40(2): 235–240.
- [7] Kim BJ, Choi YS, Choi BH, et al. Mussel adhesive protein fused with cell adhesion recognition motif triggers integrin-mediated adhesion and signaling for enhanced cell spreading, proliferation, and survival. *J Biomed Mater Res A*, 2010, 94(3): 886–892.
- [8] Ozeki N, Kawai R, Hase N, et al.  $\alpha 2$  integrin, extracellular matrix metalloproteinase inducer, and matrix metalloproteinase-3 act sequentially to induce differentiation of mouse embryonic stem cells into odontoblast-like cells. *Exp Cell Res*, 2015, 331(1): 21–37.
- [9] Smolders SMT, Swinnen N, Kessels S, et al. Age-specific function of  $\alpha 5$ - $\beta 1$  integrin in microglial migration during early colonization of the developing mouse cortex. *GLIA*, 2017, 65(7): 1072–1088.
- [10] Barczyk M, Carracedo S, Gullberg, D. 2010. Integrins. *Cell Tissue Res*, 2011, 339: 269–280.
- [11] Van Der Flier A, Sonnenberg A. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res*, 2001, 305(3): 285–298.
- [12] Surakasi VP, Mohamed AA, Kim Y. RNA interference of  $\beta 1$  integrin subunit impairs development and immune responses of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *J Insect Physiol*, 2011, 57(11): 1537–1544.
- [13] Bökel C, Brown NH. Integrins in development: moving on, responding to, and sticking to the extracellular matrix. *Dev Cell*, 2002, 3(3): 311–321.
- [14] Lin GN, Zhang X, Ren J, et al. Integrin signaling is required for maintenance and proliferation of intestinal stem cells in *Drosophila*. *Dev Biol*, 2013, 377(1): 177–187.
- [15] Brower DL. Platelets with wings: the maturation of *Drosophila* integrin biology. *Curr Opin Cell Biol*, 2003, 15(5): 607–613.
- [16] Hynes RO, Zhao Q. The evolution of cell adhesion. *J Cell Biol*, 2000, 150(2): F89–F96.
- [17] Lavine MD, Strand MR. Haemocytes from *Pseudophasia includens* express multiple alpha and beta integrin subunits. *Insect Mol Biol*, 2003, 12(5): 441–452.
- [18] Zhuang SF, Kelo L, Nardi JB, et al. Multiple  $\alpha$  subunits of integrin are involved in cell-mediated responses of the *Manduca* immune system. *Dev Comp Immunol*, 2008, 32(4): 365–379.
- [19] Zhuang SF, Nardi JB, Kanost MR. An integrin, neuroglian, and a tetraspanin modulate adhesion in hemocytes of an insect *Manduca sexta*. *FASEB J*, 2005, 19(5): 1061–1062.
- [20] Park Y, Ahn SJ, Vogel H, et al. Integrin  $\beta$  subunit and its RNA interference in immune and developmental processes of the Oriental tobacco budworm, *Helicoverpa assulta*. *Dev Comp Immunol*, 2014, 47(1): 59–67.
- [21] Kim E, Park Y, Kim Y. A transformed bacterium expressing double-stranded RNA specific to integrin  $\beta 1$  enhances bt toxin efficacy against a polyphagous insect pest, *Spodoptera exigua*. *PLoS ONE*, 2015, 10(7): e0132631.
- [22] Zhang K, Xu M, Su JJ, et al. Characterization and identification of the integrin family in silkworm, *Bombyx mori*. *Gene*, 2014, 549(1): 149–155.
- [23] Sun YL. cDNA cloning and gene expression of integrin  $\beta$  subunits from *Bombyx Mori*[D]. Wuhan: Central China Normal University, 2009. (in Chinese) 孙亚兰. 家蚕整合蛋白  $\beta$  基因的克隆及其表达分析 [D]. 武汉: 华中师范大学, 2009.
- [24] Yu S, Su JJ, Xu M, et al. Identification and characterization of a novel hemocyte specific gene Bm04862 in silkworm, *Bombyx mori*. *Chin J Biotech*, 2016, 32(2): 241–249. (in Chinese) 余霜, 苏晶晶, 徐曼, 等. 家蚕血细胞特异表达新基因 Bm04862 的鉴定及表达. *生物工程学报*, 2016, 32(2): 241–249.
- [25] Tan J, Zhang K, Xu M, et al. Identification and subcellular localization of bmintegrin  $\alpha$  PS3 from silkworm (*Bombyx mori*). *Sci Agric Sin*, 2013, 46(22): 4808–4815. (in Chinese) 谈娟, 张奎, 徐曼, 等. 家蚕整合素基因 Bmintegrin  $\alpha$ PS3 的鉴定及亚细胞定位. *中国农业*

- 科学, 2013, 46(22): 4808–4815.
- [26] Su JJ, Chen SY, Zhang K, et al. Identification and expression analysis of cathepsin O gene in silkworm (*Bombyx mori*). *Sci Agric 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.
- [27] Tan P, Xu M, Liang HH, et al. Cloning, antibody preparation and subcellular localization of *BmGATA6* in silkworm (*Bombyx mori*). *Sci Agric Sin*, 2016, 49(2): 371–380. (in Chinese)  
谭鹏, 徐曼, 梁航华, 等. 家蚕 GATA 转录因子 BmGATA6 的克隆、多克隆抗体制备及组织细胞定位. *中国农业科学*, 2016, 49(2): 371–380.
- [28] Hu J, Zhao HF, Yu XQ, et al. Integrin  $\beta 1$  subunit from *Ostrinia furnacalis* hemocytes: molecular characterization, expression, and effects on the spreading of plasmatocytes. *J Insect Physiol*, 2010, 56(12): 1846–1856.
- [29] Zhang K. Identification of hemocyte-specific molecular markers and study on hematopoietic regulation mechanism in silkworm, *Bombyx mori*[D]. Chongqing: Southwest University, 2017. (in Chinese)  
张奎. 家蚕血细胞特异性分子标记鉴定及造血调控机制研究[D]. 重庆: 西南大学, 2017.
- [30] Yamashita M, Iwabuchi K. *Bombyx mori* prohemocyte division and differentiation in individual microcultures. *J Insect Physiol*, 2001, 47(4/5): 325–331.
- [31] Ling E, Shirai K, Kanekatsu R, et al. Classification of larval circulating hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori*, by acridine orange and propidium iodide staining. *Histochem Cell Biol*, 2003, 120(6): 505–511.
- [32] Tan J, Xu M, Zhang K, et al. Characterization of hemocytes proliferation in larval silkworm, *Bombyx mori*. *J Insect Physiol*, 2013, 59(6): 595–603.
- [33] Strand MR. The insect cellular immune response. *Insect Sci*, 2008, 15(1): 1–14.
- [34] Li CY, Zhang K, Shen L, et al. Cloning and expression of *Bmintegrin  $\beta 1$*  in silkworm *Bombyx mori*. *Chin J Biotech*, 2017, 33(12): 1955–1967. (in Chinese)  
李重阳, 张奎, 申利, 等. 家蚕整合素 *Bmintegrin  $\beta 1$*  基因的克隆及表达. *生物工程学报*, 2017, 33(12): 1955–1967.

(本文责编 郝丽芳)