

王明慧,毛钰霞,许雅香. 与家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂 serpin-3 相互作用蛋白的筛选[J]. 江苏农业科学,2015,43(1):37-40.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.01.011

与家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂 serpin-3 相互作用蛋白的筛选

王明慧^{1,2}, 毛钰霞^{1,2}, 许雅香^{1,2,3}

(1. 苏州大学基础医学与生物科学学院, 江苏苏州 215123; 2. 现代丝绸国家工程实验室/苏州大学, 江苏苏州 215123;
3. 苏州大学蚕桑研究所, 江苏苏州 215123)

摘要: 丝氨酸蛋白酶抑制剂超基因蛋白质家族, 参与调节昆虫体内多种生理反应。本研究在体外原核表达 6His-Bmserpin-3, 以此作为饵蛋白, 采用 His-pull down 技术及 SDS-PAGE 分析, 从家蚕血液中筛选出了能与 Bmserpin-3 结合的 2 个蛋白质, 分子量分别为 83.04、83.57 ku。对家蚕幼虫 *sp-2*、*sp-3* 在不同组织的表达变化分析可知, *sp-2* 在脂肪体、血淋巴中表达量比较高, *sp-3* 在精巢、脂肪体、血淋巴里表达量比较高。

关键词: 家蚕; pull-down; 蛋白相互作用

中图分类号: S881.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)01-0037-03

Serpin 全称为 serine protease inhibitor, 是一类能够抑制丝氨酸蛋白酶活性的超家族蛋白质, 参与调节生物体内多种生理反应, 包括血液凝集、纤维蛋白溶解、补体激活、免疫黑化、生长发育过程中组织构建等^[1-5]。Serpin 在昆虫各组织中均有分布, 对昆虫的生命活动起到重要作用, 目前关于家蚕 Serpin 的研究很多, 但是几乎没有关于家蚕 Serpin 相互作用蛋白方面的研究, 生物的生命活动主要体现在蛋白质水平, 许多蛋白是通过与其他蛋白相互作用来发挥作用的, 因此, 研究蛋白质相互作用能更好地理解生物的生命活动。本研究原核表达并纯化了 Bmserpin-3 蛋白, 应用 pull-down 及质谱技术筛选到 Bmserpin-3 的相互作用蛋白, 并通过荧光定量 PCR 技术初步探索了这 2 个基因的组织分布, 旨在为深入探讨 Bmserpin-3 的功能机制提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

家蚕品种为笔者所在研究室保存的大造, 正常桑叶育, 取 5 龄 4 d 幼虫的脂肪体, -70 °C 保存备用。Trizol RNA 提取及 M-MLV 反转录试剂等化学常规试剂均购自宝生物工程(大连)有限公司。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 重组表达载体的构建和鉴定

采用反转录的家蚕 5 龄 4 d 幼虫脂肪体的 cDNA 模板, PCR 扩增 *serpin-3* 基因。引物为 F: 5'-CTAGCTAGCAA-

CATAGATCCGAACACCCTAAG-3' (下划线为 *Nhe* I 酶切位点) 和 R: 5'-ACGCGTTCGACCTATAGTACTTTATAATC-CCCATCG-3' (下划线为 *Sal* I 酶切位点)。扩增条件是: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 30 s, 60.4 °C 退火 35 s, 72 °C 延伸 3 min, 33 个循环; 最后 72 °C 终延伸 10 min。将 PCR 扩增产物与 pET-28a(+) 进行双酶切, 然后再将其目的片段与 pET-28a(+) 连接, 转化至 *E. coli* Top10 中, 挑选阳性克隆进行酶切鉴定及测序检验。

1.3 重组表达载体的诱导表达

含家蚕 *serpin-3* 全长 cDNA 的阳性菌株在含 30 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中加入诱导剂异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)至终浓度为 0.5 mmol/L, 37 °C 诱导表达 6 h 后, 4 °C 5 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用 PBS 重悬, 在冰浴中超声破碎, 直到溶液变澄清。4 °C 5 000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀即得包涵体形式的 6His-Bmserpin-3。

1.4 重组蛋白的纯化、鉴定

4 °C 5 000 r/min 离心 20 min 收集细胞, 以 1:20 比例添加 0.01 mol/L PBS (pH 值为 8.0), 在 PBS 中悬浮细胞, 冰上超声后添加等量的蛋白 loading buffer, 蛋白样品煮沸 5 min, 5 000 r/min 离心 20 min。上清通过 SDS-PAGE (没有梳子) 来纯化, 锌染后, 将胶条切成 1 cm 的条带, 装到透析袋里, 4 °C 透析过夜。用 Bradford 法检测蛋白含量后, -20 °C 保存备用, 将纯化好的蛋白用 SDS-PAGE 来鉴定。

1.5 pull-down 筛选与 Bmserpin-3 重组蛋白相互作用蛋白

按照每 100 mg 组织加入 1 mL 裂解液的比例加入 RIPA 裂解液 (使用前数分钟加入 PMSF 使 PMSF 终浓度为 1 mmol/L), 通过强烈的涡旋使样品裂解充分, 5 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 储存于 -20 °C 冰箱中备用。用 10 mL binding buffer 平衡 250 μ L 树脂, 将纯化后的 Bmserpin-3 蛋白与树脂在 4 °C 下缓慢摇晃结合 5 h, 使 Bmserpin-3 蛋白与树脂充分结合, 让蛋白液流出, 用含 50 mmol/L 咪唑的 Tris 洗脱 Ni^{2+} 柱, 祛除未结合的 Bmserpin-3 蛋白, 将 1 mL 血液总

收稿日期: 2014-03-03

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项 (编号: CARS-22); 江苏高校优势学科建设工程项目。

作者简介: 王明慧 (1986—), 女, 山东滨州人, 硕士, 主要从事家蚕资源与功能基因组学研究。E-mail: wangminghui.219@163.com。

通信作者: 许雅香, 副教授, 主要从事家蚕资源与功能基因组学研究。

Tel: (0512) 65880260; E-mail: xuyaxiang@suda.edu.cn。

蛋白加入 Ni^{2+} 柱中,与 Bmserpin-3 蛋白复合物共同 4°C 孵育过夜,使血液内靶蛋白与 Bmserpin-3 蛋白结合,从而形成树脂-Bmserpin3-血液总蛋白的复合物,用含 50 mmol/L 咪唑的 Tris 洗脱 Ni^{2+} 柱,祛除未结合的血液总蛋白,用含 200 mmol/L 咪唑的 elution buffer 洗脱液,将 Bmserpin3-血液总蛋白复合物与树脂分离,收集洗脱液,12% SDS-PAGE 分析收集的洗脱液。

1.6 靶标蛋白基因的分布

表1 实时荧光定量 PCR 的检测基因、内参照基因的引物

基因名称	引物序列	T_m ($^\circ\text{C}$)
<i>Actin3</i>	F:5'-CGGCTACTCGTTCCTACTACC-3'; R:5'-CCGTCGGGAAGTTCGTAAG-3'	59.27
<i>Bmsp-2</i>	F:5'-TTAATTCCTGGCTGGGCTTGT-3'; R:5'-TTAGTTGGCTCACATCTTGG-3'	55.80
<i>Bmsp-3</i>	F:5'-GATTTTAGCGGGGCTTATTG-3'; R:5'-AGTCCTGGGGCAGCTTTGTAG-3'	55.80

2 结果与分析

2.1 重组表达载体的构建与鉴定

含有酶切位点 *Nhe*I、*Sal*I 的引物扩增 *serpin-3* 基因的 ORF,得到 1 300 bp 左右的条带,PCR 纯化的目的片段与 pET-28a(+)连接后,转化至 *E. coli* Top10 中,挑选阳性克隆进行酶切鉴定(图1),条带约 1 300 bp,表明重组质粒构建成功,命名为 pET-28a-Bmserpin-3。

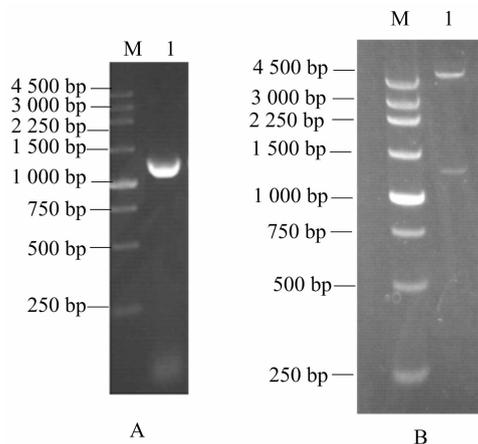


图1 pET-28a-Bmserpin-3 的菌落PCR鉴定(A)、*Nhe*I/*Sal*I 双酶切鉴定(B)

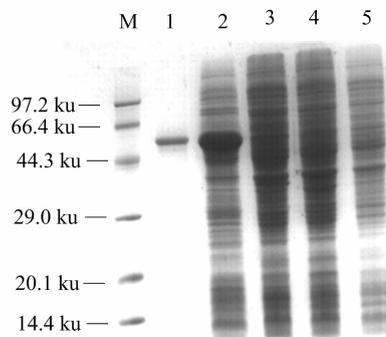
2.2 重组蛋白的纯化与鉴定

重组质粒转化至 *E. coli* BL21,经 IPTG 诱导表达重组 Bmserpin-3 蛋白,表达的蛋白多是以包涵体方式存在,用染料、透析的方式进行纯化,结果如图2所示,SDS 检测到 1 条单一的约 49 ku 的蛋白条带。

2.3 重组蛋白相互作用蛋白的鉴定

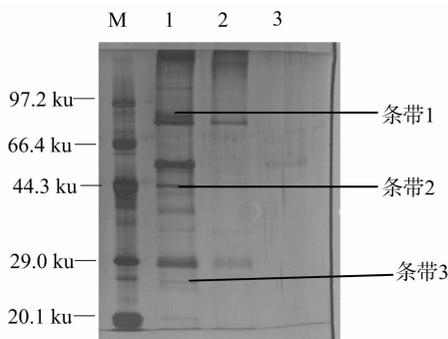
样品组内形成树脂-Bmserpin-3-血液总蛋白的复合物后,先用含 50 mmol/L 咪唑的 Tris 洗脱,祛除非特异性结合,然后用含 200 mmol/L 咪唑的 elution buffer 洗脱液使 Bmserpin-3-血液总蛋白复合物与树脂分离,收集样品,后期用 SDS-PAGE 分析(图3)。可见与 Bmserpin-3 相互作用的 3 条蛋白条带。从 SDS-PAGE 胶上将 3 条蛋白条带切下,放入 EP 管中,加入胰蛋白酶进行胶内酶切,然后用 LC-MS/MS 技术对获得的 3 条蛋白条带进行分析(图4)。鉴定出的蛋白是家蚕储存蛋白、性别特异储存蛋白 2,相关蛋白信息见表 2。

采用 Primer 5.0 软件,引物如表 1 所示。采用 SYBR PrimeScriptTM RT-PCR 试剂盒测定,具体步骤按照说明书进行,反应程序为:95 $^\circ\text{C}$ 预变性 1 min;95 $^\circ\text{C}$ 变性 15 s,60 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s,循环 45 次。反应体系为:SYBR[®] Premix Ex TaqTM (2 \times) 10 μL ,上游引物 0.4 μL ,下游引物 0.4 μL ,ROX Reference Dye II (50 \times) 0.4 μL ,DNA 模板 2 μL ,ddH₂O 6.8 μL 。反应过程由 ABI7300 荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems 公司)软件自动设定,每个样品重复 3 次。



M—蛋白分子质量标准;1—纯化的Bmserpin-3蛋白;2—诱导去信号肽的pET-28a-Bmserpin-3重组菌;3—未诱导去信号肽的pET-28a-Bmserpin-3重组菌;4—空载体pET-28a转化BL21菌;5—无质粒转化的BL21菌

图2 纯化重组蛋白 Bmserpin-3 的 SDS-PAGE 分析



M—蛋白 marker; 1—pull-down 试验样品组; 2—对照组1; 3—对照组2

图3 应用 pull-down 方法获得与 Bmserpin-3 相互作用蛋白

2.4 家蚕幼虫 Bmsp-2,3 在不同组织的表达变化

由图5可以看出,*sp-2*、*sp-3* 在各个组织都有分布,且 *sp-2* 在脂肪体、血淋巴中表达量比较高;*sp-3* 在精巢、脂肪体、血淋巴中表达量比较高。

4 结论与讨论

蛋白质是生物生命活动的重要体现者之一,几乎参与生物所有的生命过程、细胞活动。它在体内主要通过自身或其他蛋白质及核酸形成复合体来进行基因调节、免疫应答、信

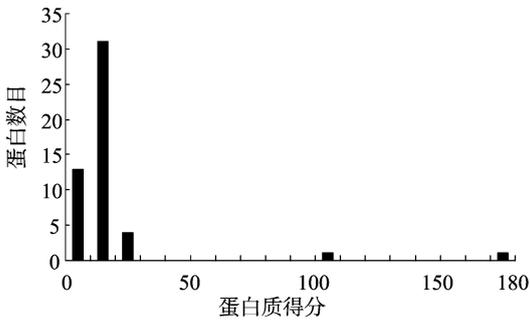
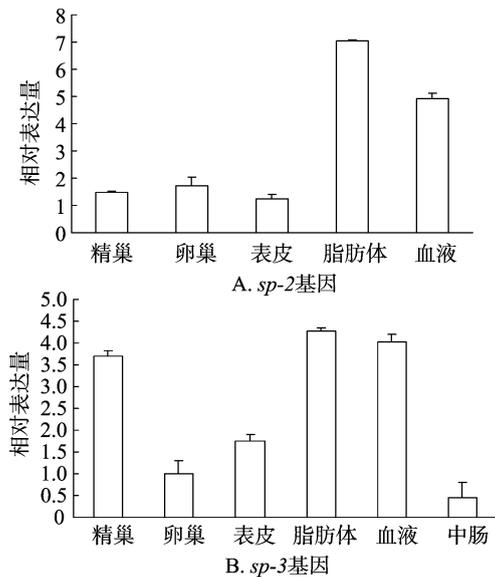


图4 质谱分析结果数据库检索结果

表2 相互作用蛋白相关信息

蛋白质名称	基因登录号	得分	等电点	分子量 (ku)
性别特异储存蛋白2	gi1124430725	101	5.70	83.57
家蚕储存蛋白	gi1379327811	178	5.90	83.04

图5 家蚕各个组织中 $sp-2$ 、 $sp-3$ 基因的 mRNA 相对表达量

号转导、细胞组装等生物学功能^[6-7]。通过研究蛋白质之间的相互作用可获得更多的细胞功能信息。目前蛋白质相互作用的主要研究方法有酵母双杂交技术、免疫共沉淀法、噬菌体展示技术、pull-down 技术、荧光共振能量转移(FRET)技术及生物信息学分析法等。已有学者利用 pull-down 方法鉴定已知的 2 种蛋白质间的相互作用,或采用少量 Ni^{2+} -NTA agarose beads 在 Eppendorf 管中进行小体积的 pull-down^[8-9]。笔者采用 Ni^{2+} -NTA agarose beads 柱使整个体系放大,更利于蛋白质的结合、洗脱,并结合质谱分析来筛选与 Bmserpin-3 相互作用的蛋白质。丝氨酸蛋白酶抑制剂在生物体内分布广泛,参与调节生物体内多种生理反应。研究发现,云杉卷叶蛾 serpin-1 在表皮中高表达,且在蜕皮期间的转录水平高于蜕皮期。烟草天蛾 serpin-1 mRNA 在 5 龄幼虫脂肪体中含量丰富,但在蜕皮、化蛹时 mRNA 水平骤然降低^[10]。冈比亚按蚊 serpin-2 与丝氨酸蛋白酶 CLIPB9 结合调节黑化反应,此外 CLIPB9 与 serpin2 的相互作用还影响雌性成虫寿命^[11]。果蝇 serpin27A 与 serpin28D 都参与了

先天性免疫反应,但果蝇 serpin28D 只参与由创伤引起的酚氧化酶激活产生的黑化,serpin27A 在酚氧化酶激活路径中调节病毒或病原菌引起的黑化^[12-13]。果蝇中 serpin43AC 参与了 toll 途径调节的先天性免疫反应^[14-15]。研究发现,冈比亚按蚊中 serpin10 在中肠上皮细胞聚集与疟疾病原体的传播有关^[16]。Serpins 家族在昆虫的表皮、头部、血淋巴、脂肪体、丝腺、中肠、精巢、卵巢中均有分布,对家蚕的各种生理活动起到调节作用^[17]。董照明等认为,serpin-16 在维持丝腺稳定的泌丝环境中发挥重要作用^[18]。查宏贤研究表明,家蚕 serpin-4 参与了先天性免疫反应^[19]。王彦云等证实 serpin-6 与家蚕表皮黑化、蜕皮变态、先天性免疫等生理过程有关^[20]。李国胜等推测 serpin-5 与家蚕的生殖生理有关,可能参加了家蚕的先天免疫反应^[21]。serpin-3 是以单体的形式发挥作用还是与伴侣分子一起作用或是与其他蛋白质形成复合物来发挥作用还不得而知。本研究选择适宜大分子量蛋白质的六聚组氨酸作为标签,构建了家蚕 serpin-3 六聚组氨酸蛋白,并以此为饵蛋白,采用 His-pull down 技术,从家蚕血液中调取了 2 个与该蛋白相互作用的蛋白。它们均是血液储存蛋白,同源性很高,与 β -芳基储存蛋白亚基(烟草天蛾)、芳基储存蛋白(棉铃虫)、血清储存蛋白 2(印度蚕)具有很高的同源性,功能也相似,主要是参与免疫、信号传导。对家蚕幼虫 $sp-2$ 、 $sp-3$ 在不同组织的表达变化分析可知, $sp-2$ 在脂肪体、血淋巴中表达量比较高, $sp-3$ 在精巢、脂肪体、血淋巴里表达量比较高。

参考文献:

- [1] Li W, Johnson D J, Esmo C T, et al. Structure of the antithrombin - thrombin - heparin ternary complex reveals the antithrombotic mechanism of heparin [J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2004, 11 (9): 857 - 862.
- [2] Kounnas M Z, Church F C, Argraves W S, et al. Cellular internalization and degradation of antithrombin III - thrombin, heparin cofactor II - thrombin, and alpha 1 - antitrypsin - trypsin complexes is mediated by the low density lipoprotein receptor - related protein [J]. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271 (11): 6523 - 6529.
- [3] Collen D, Lijnen H R. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis [J]. Blood, 1991, 78 (12): 3114 - 3124.
- [4] Carrell R W, Evans D L, Stein P E. Mobile reactive centre of serpins and the control of thrombosis [J]. Nature, 1991, 353 (6344): 576 - 578.
- [5] Travis J, Salvesen G S. Human plasma proteinase inhibitors [J]. Annual Review of Biochemistry, 1983, 52: 655 - 709.
- [6] Brinda K V, Vishveshwara S. Oligomeric protein structure networks: insights into protein - protein interactions [J]. BMC Bioinformatics, 2005, 6: 296.
- [7] 赵亚雪, 唐 赞. 蛋白质 - 蛋白质相互作用及其抑制剂研究进展 [J]. 生命科学, 2007, 19 (5): 506 - 511.
- [8] Sgarra R, Furlan C, Zammiti S, et al. Interaction proteomics of the HMGA chromatin architectural factors [J]. Proteomics, 2008, 8 (22): 4721 - 4732.
- [9] Lee W J, Kim D U, Lee M Y, et al. Identification of proteins interacting with the catalytic subunit of PP2A by proteomics [J]. Proteomics, 2007, 7 (2): 206 - 214.

覃益民,张静茹,叶锦,等. 康氏木霉内切 β -葡聚糖苷酶的分离纯化及酶学性质[J]. 江苏农业科学,2015,43(1):40-43.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.01.012

康氏木霉内切 β -葡聚糖苷酶的分离纯化及酶学性质

覃益民,张静茹,叶锦,甘冠萍,覃振央
(广西大学化学化工学院,广西南宁 530004)

摘要:康氏木霉 GIMP3.444 经摇瓶发酵,获得分泌到胞外的纤维素酶,粗酶液经 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀、Sephacryl S200 凝胶过滤层析、DEAE Sepharose FF 离子交换层析及 Octyl Separose CL-4B 疏水层析分离纯化出一种内切型的 β -葡聚糖苷酶,SDS-PAGE 电泳鉴定为单一条带,BIO-RAD 分析相对分子量为 61.8 ku。该内切 β -葡聚糖苷酶的最适反应温度为 55 $^\circ\text{C}$,最适反应 pH 值为 4.4,作用于羧甲基纤维素钠时,Lineweaver-Burk 法求得 K_m 、 V_{\max} 分别为 4.81 mg/mL、2.48 mg/(min·mL)。

关键词:康氏木霉;内切 β -葡聚糖苷酶;分离纯化;酶学性质

中图分类号: Q556+.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)01-0040-04

植物纤维由纤维素、半纤维素和木质素三大部分组成并共同构成了植物细胞壁的主要成分,是最丰富的天然可再生生物资源,纤维素通过纤维素酶水解转化为可发酵性糖,继而转化为燃料乙醇及相关化学品的研究越来越引起人们的关注^[1]。纤维素酶是一类能够将纤维素降解为葡萄糖的多组分酶系的总称,由内切 β -葡聚糖苷酶(EG)、外切 β -葡聚糖苷酶(CBH)和 β -葡萄糖苷酶 3 类酶组成。尽管大量研究已表明,只有在这 3 种主要成分酶的协同作用下,纤维素分子最终才能被降解成葡萄糖。但是各成分酶是如何协同起作

用的,学者们的看法还不尽相同^[2],近来人们还发现了一些不具有纤维素酶活性的蛋白也能与纤维素酶起协同作用,并最终促进纤维素的降解^[3-5]。因此,无论是对纤维素酶系各成分酶的协同作用机理,还是对纤维素酶系与其他非酶蛋白的协同增效作用的更深入了解,都将会为提高纤维素酶的催化效率提供重要理论基础。康氏木霉 GIMP 3.444 是一株产纤维素酶系的真菌菌株^[6],笔者从该菌株中分离纯化出一种纤维素酶协同增效蛋白。为进一步研究该增效蛋白对纤维素酶各成分酶的协同作用机理,需获得该菌株产的纤维素酶系各组分纯酶。因此,本研究对康氏木霉 GIMP3.444 分泌的内切 β -葡聚糖苷酶进行分离纯化,并研究其酶学性质。

收稿日期:2014-03-27

项目基金:国家自然科学基金(编号:21276053);广西壮族自治区生物炼制重点实验室培育基地开放课题(编号:GXBF11-04)。

作者简介:覃益民(1962—),男,广西贵港人,博士,副教授,主要从事生物加工与分离方面的研究。Tel:(0771)3233718;E-mail:qym6289@sina.com。

1 材料与与方法

1.1 菌株

康氏木霉(*Trichoderma koningii*) GIMP 3.444 购于广东省微生物菌种保藏中心,现保存于广西大学化学化工学院生物

[10] Kanost M R, Prasad S V, Huang Y, et al. Regulation of serpin gene-1 in *Manduca sexta* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1995, 25(2):285-291.

[11] An Chunju, Budd A, Kanost M R, et al. Characterization of a regulatory unit that controls melanization and affects longevity of mosquitoes [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2011, 68(11):1929-1939.

[12] Scherfer C, Tang H P, Kambris Z, et al. *Drosophila* serpin-28D regulates hemolymph phenoloxidase activity and adult pigmentation [J]. *Developmental Biology*, 2008, 323(2):189-196.

[13] Nappi A J, Christensen B M. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions; Applications to insect innate immunity [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 35(5):443-459.

[14] Green C, Levashina E, Mckimmie C, et al. The necrotic gene in *Drosophila* corresponds to one of a cluster of three serpin transcripts mapping at 43A1.2 [J]. *Genetics*, 2000, 156(3):1117-1127.

[15] Levashina E A, Langley E, Green C, et al. Constitutive activation of toll-mediated antifungal defense in serpin-deficient *Drosophila*

[J]. *Science*, 1999, 285(5435):1917-1919.

[16] Danielli A, Kafatos F C, Loukeris T G. Cloning and characterization of four *Anopheles gambiae* serpin isoforms, differentially induced in the midgut by *Plasmodium berghei* invasion [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(6):4184-4193.

[17] 刘衬丽,王东,李兵,等. 家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 *serpin-6* 的克隆、序列分析和组织表达 [J]. *昆虫学报*, 2009, 52(1):1-9.

[18] 董照明,赵萍,王凌燕,等. 家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 *serpin16* 的表达规律及体外重组表达 [J]. *蚕业科学*, 2010, 36(2):236-242.

[19] 查宏贤. 家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂 *Serpin4* 的基因克隆、表达及多克隆抗体制备 [D]. 苏州:苏州大学,2011.

[20] 王彦云,何浙鸣,李国胜,等. 家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂 *Bmserpin-6* 的特异性表达分析 [J]. *蚕业科学*, 2013, 39(2):257-260.

[21] 李国胜,王彦云,王明慧,等. 家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂 5 的多克隆抗体制备及组织表达分析 [J]. *蚕业科学*, 2013, 39(2):261-265.