

马 强, 刘方燕, 党晓群, 等. 家蚕微孢子虫类枯草杆菌蛋白酶 *Nbslp2* 的保守性及转录活性分析[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(19): 150–153. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.19.033

家蚕微孢子虫类枯草杆菌蛋白酶 *Nbslp2* 的保守性及转录活性分析

马 强¹, 刘方燕², 党晓群³, 孙厚良¹, 李国利¹, 熊 书¹, 潘国庆², 周泽扬^{2,3}

(1. 重庆三峡医药高等专科学校, 重庆万州 404120; 2. 西南大学家蚕基因组生物学国家重点实验室, 重庆北碚 400716;

3. 重庆师范大学生命科学学院, 重庆沙坪坝 400047)

摘要:为研究家蚕微孢子虫类枯草杆菌蛋白酶 *Nbslp2* 的保守性及转录活性, 采用生物信息学相关软件对微孢子虫类枯草杆菌蛋白酶 *slp2* 基因共线性、多重序列及系统进化进行比对分析, 并通过 Western blot 分析 *Nbslp2* 在家蚕微孢子虫、柞蚕微孢子虫及纳卡变形微孢子虫中的表达特征, 以验证其保守性; 进一步以感染家蚕微孢子虫不同天数的家蚕中肠组织为材料, 利用 RT-PCR 检测 *Nbslp2* 的转录活性。共线性、多重序列比对及系统进化分析发现, *Nbslp2* 在微孢子虫基因组中的位置较保守, Western blot 结果显示 *Nbslp2* 抗体在柞蚕微孢子虫总蛋白中杂交出 2 条带, 而在纳卡变形微孢子虫没有杂交条带, 说明 *Nbslp2* 相对保守, 并且可将 *Nbslp2* 作为区分柞蚕微孢子虫和纳卡变形微孢子虫的靶标; RT-PCR 结果显示 *Nbslp2* 在感染家蚕微孢子虫后 72 h 检测到转录活性, 进一步推测 *Nbslp2* 可能在家蚕微孢子虫感染家蚕早期发挥作用, 为分子水平深入研究 *Nbslp2* 的功能奠定理论基础。

关键词:家蚕微孢子虫; 表达特征; 定位; 功能; 保守性; 转录活性; 共线性; 多重序列比对; 系统进化

中图分类号:S884.2⁺1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)19-0150-04

微孢子虫(microsporidia)能够感染宿主并且通过自由孢子形式进行传播, 是一类细胞内专性寄生的单细胞真核生物, 至今已发现并报道的微孢子虫种类已经超过 1 300 种, 分别被归入 160 多个属, 能够广泛寄生于几乎所有的无脊椎动物和脊椎动物, 包括人类^[1-2]。家蚕微孢子虫(*Nosema bombycis*)是 1857 年 Nageli 首次从蚕体内鉴定出的人类历史上第 1 种微孢子虫, 它能引起家蚕微孢子虫病, 这种病害曾在 19 世纪给欧洲、美国以及亚洲的蚕业生产造成严重损失, 直到现在这种病害也常有发生^[3-4]。由于它的危害性巨大, 一直以来都很受关注, 在许多养蚕国家和地区, 家蚕微孢子虫被列为蚕业生产上唯一的法定检疫对象。

微孢子虫作为专性的细胞内寄生生物, 其生活史的完成必须严格依赖于宿主提供的营养和能量。家蚕微孢子虫是家蚕微孢子虫病的病原, 其侵染和致病机理目前仍不清楚。普遍的观点认为, 家蚕微孢子虫通过释放蛋白酶, 水解寄主细胞内容物, 掠夺宿主营养物质, 完成其在宿主家蚕细胞内的增殖^[5-6]。因此, 分泌性蛋白酶被认为是致病性真菌重要的毒力因子。这些蛋白酶不仅参与孢子的入侵过程, 还可以与宿

主的免疫系统相互作用。类枯草杆菌蛋白酶(subtilisin-like protease, SLP)为丝氨酸蛋白酶家族成员, 广泛存在于细菌、真菌和寄生虫等生物中。近年研究表明, 类枯草杆菌蛋白酶与病原性细菌、真菌的致病性相关^[7-8], 在真菌孢子形成、蛋白质降解及细胞自噬等方面起着非常重要的作用^[9-11]。随着家蚕微孢子虫基因组测序的完成, 通过序列比对发现在家蚕微孢子虫中也存在类枯草杆菌蛋白酶。因此, 笔者推测家蚕微孢子虫可能在入侵过程中会分泌类枯草杆菌蛋白酶, 通过降解昆虫体壁帮助其入侵宿主细胞。基于此, 本研究在已鉴定报道的 3 个类枯草杆菌蛋白酶基因(*Nbslp1*、*Nbslp2-1* 和 *Nbslp2-2*)的基础上^[12], 分析了第 2 个类枯草杆菌蛋白酶基因 *Nbslp2* 的保守性及转录情况, 为进一步研究该基因在家蚕微孢子虫中的定位和功能探索提供重要的依据。

1 材料与方法

1.1 材料及主要试剂和仪器

家蚕微孢子虫 CQ1 分离株由西南大学蚕病研究室分离获得, 保存于中国兽医微生物菌种保藏管理中心(CVCC, 保藏号为 CVCC102059)。

Trizol、琼脂糖购于 Invitrogen 公司; 乙二胺四乙酸钠(EDTA)购于 USB 公司; DNase I、RNase Inhibitor、dNTP、Oligo(dT)、Taq 酶和 DL2000 DNA Marker 购于 TaKaRa 公司; 羊抗鼠 IgG-HRP、玻璃珠(150~212 μm)购自 Sigma 公司; PVDF 膜购自 Roche 公司; EasySee Western Marker 购自北京全式金生物技术有限公司; 焦碳酸二乙酯(DEPC)和 3-(N-吗啉)丙磺酸购于生工生物工程上海(股份)有限公司; 三氯甲烷购于重庆化学试剂有限公司; 甲醛购于重庆北碚化学试剂厂。所需要的特异性引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

收稿日期: 2017-04-06

基金项目: 重庆三峡医药高等专科学校苗圃工程项目(编号: 2014mpxz1); 重庆市基础与前沿研究计划(编号: cstc2014jcyjA80019)。

作者简介: 马 强(1986—), 男, 云南玉溪人, 硕士, 讲师, 主要从事微生物功能基因组学研究。Tel: (023)58556819; E-mail: cjmaqiang@163.com。

通信作者: 周泽扬, 教授, 博士生导师, 主要从事微生物学及家蚕分子生物学研究。Tel: (023)68251088; E-mail: zyzhou@swu.edu.cn。

1.2 家蚕微孢子虫 *Nbslp2* 的多重序列比对及共线性分析

根据笔者所在实验室构建的家蚕微孢子虫全基因组数据库,结合 NCBI 公共数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中兔脑炎微孢子虫 (*Encephalitozoon cuniculi*)、蜜蜂微孢子虫 (*Nosema ceranae*)、肠脑炎微孢子虫 (*Encephalitozoon intestinalis*) 以及肠道微孢子虫 (*Enterocytozoon bieneusi*) 的基因组数据,利用 ClustalX 软件对 *slp2* 的同源基因序列进行多重序列比对,用 Boxshade 对比对后的结果进行修正。同时分析 *slp2* 在几种微孢子虫数据库中的基因座位信息、基因长度、垂直同源基因的对应关系,利用在线软件 <http://microbe.swu.edu.cn/cgi-bin/synten> 进行共线性图谱的绘制。此外,分别选择真菌、细菌、顶复亚门、微孢子虫门几个代表物种,对各物种中的 *slp2* 的同源序列进行多序列比对,将多序列比对结果使用 MEGA 5.0 程序构建系统发生树,设置信度为 1 000。

1.3 家蚕微孢子虫 *Nbslp2* 的保守性分析

利用 Western blot 分析家蚕微孢子虫类枯草杆菌蛋白酶 *Nbslp2* 在家蚕微孢子虫 (*N. bombycis*)、柞蚕微孢子虫 (*N. antheraeae*) 以及纳卡变形微孢子虫 (*Vairimorpha necatrix*) 中的表达特征,以验证其保守性,分别取 1×10^9 纯化的上述 3 种微孢子虫孢子沉淀,加 400 μ L PBS (pH 值 7.3) 重新悬浮,同时分别称取 0.4 g 玻璃珠加到 3 管孢子悬液中,加入 PMSF,4 $^{\circ}$ C 涡旋振荡 6 h,然后 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,得到 3 种微孢子虫的孢子总蛋白,之后将提取获得的 3 种孢子总蛋白定量后进行 SDS-PAGE,转 PVDF 膜,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液 (现用现配) 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜,之后用 TBST 溶液洗涤封闭液,重复 3 次,然后加入制备的抗血清 anti-NbSLP2 (1:6 000) 作为一抗,室温孵育 1 h。辣根酶标记山羊抗鼠 IgG (1:8 000) 为二抗,37 $^{\circ}$ C 孵育

1 h, ECL 发光系统检测,暗室内 X 胶片显影 Western blot 检测结果。

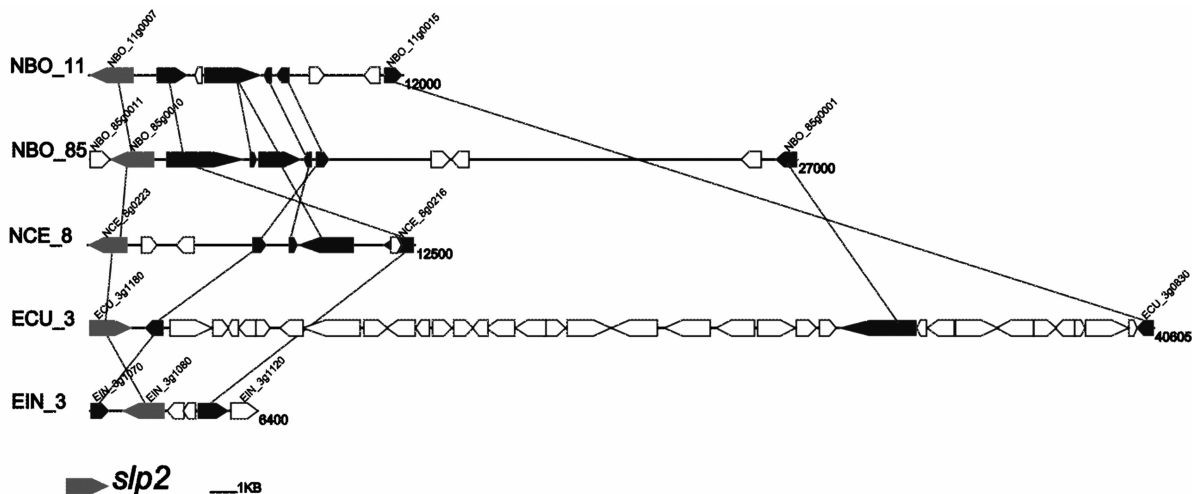
1.4 家蚕微孢子虫 *Nbslp2* 的转录活性分析

利用 RT-PCR 分析家蚕微孢子虫类枯草杆菌蛋白酶 *Nbslp2* 的转录特征。取感染家蚕微孢子虫 1~10 d 的家蚕中肠组织,加入 1.0 mL Trizol,液氮研磨,转入 1.5 mL EP 管,混匀,静置 5 min 后加入 200 μ L 三氯甲烷,4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min。取上层水相移入 EP 管,加入等体积的异丙醇,混匀,室温静置 10 min,低温离心,加入 1 mL 预冷的 0.1% DEPC 水配制的 75% 乙醇洗涤沉淀,空气中干燥 RNA 沉淀 15 min,加入 20 μ L RNase-Free ddH₂O 将沉淀溶解。琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察,判断 RNA 的完整性。将提取的家蚕微孢子虫总 RNA 反转录为 cDNA,并以此 cDNA 为模版,设计家蚕微孢子虫类枯草杆菌蛋白酶 *Nbslp2* 的引物, *slp2*-F: 5'-GGATCCATGCTGTTTCTTCTTAT-3' 和 *slp2*-R: 5'-GTCGACTCAATTACATGTATTGTAG-3'; 以家蚕微孢子虫 β -tubulin 基因作为内参, Tub-F: 5'-TGGACGCCATTAGACAAG-3' 和 Tub-R: 3'-TCTAAAGACAGCAGCCAC-3' 进行 PCR 扩增,扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s、55 $^{\circ}$ C 退火 1 min、72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 25 个循环。

2 结果与分析

2.1 家蚕微孢子虫 *Nbslp2* 的共线性分析

Nbslp2 在家蚕微孢子虫基因组中有 2 个拷贝,该基因家族在微孢子虫染色体/scaffold 上的位置相对保守 (图 1),且 *Nbslp2* 在 *Nosema* 属的微孢子虫基因组中的排布比在 *Encephalitozoon* 属的位置更具线性关系。



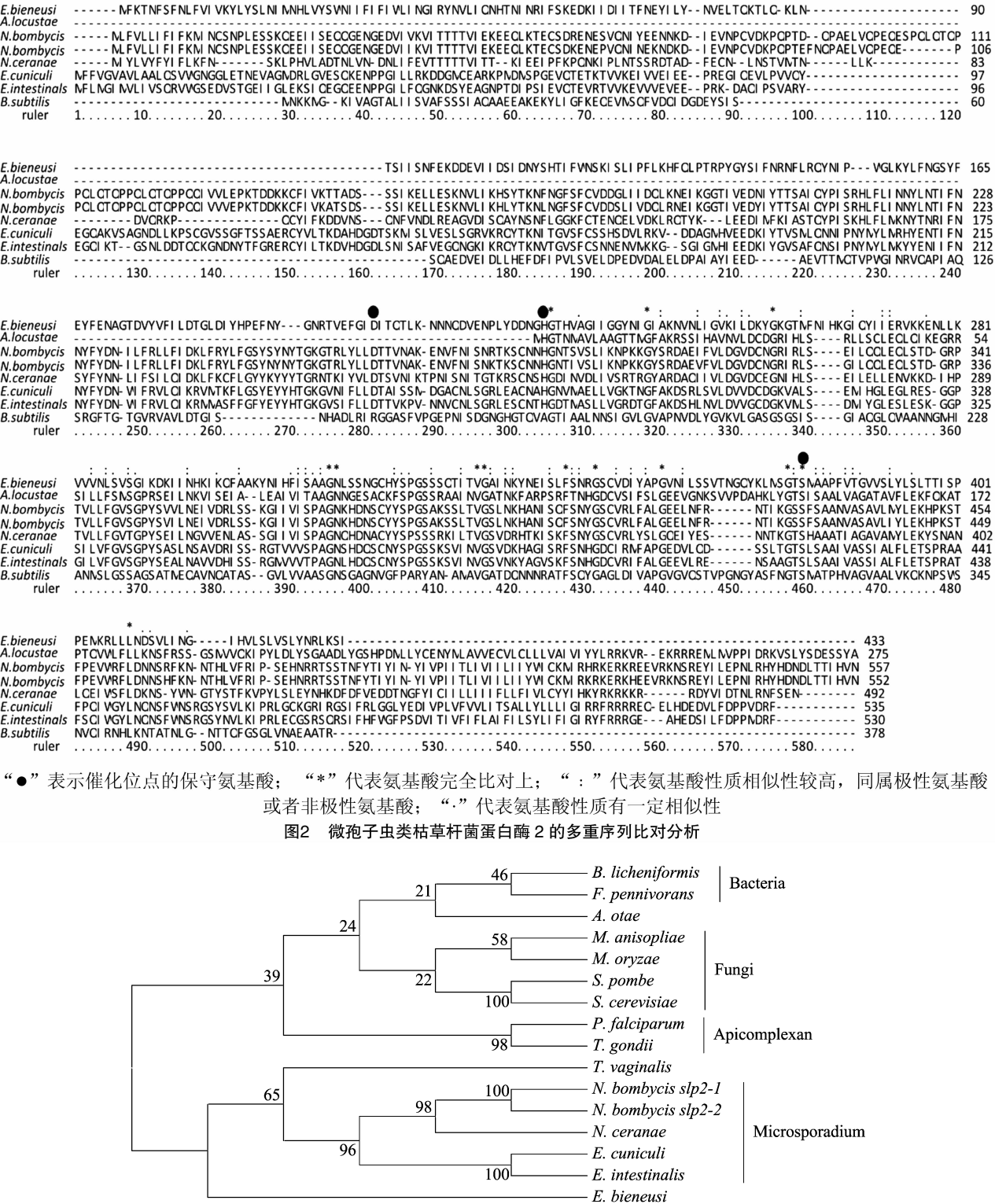
相同颜色的表示垂直同源基因, 灰色的表示 *slp2* 基因
图1 微孢子虫类枯草杆菌蛋白酶基因 *slp2* 共线性分析

2.2 家蚕微孢子虫 *Nbslp2* 的多重序列比对分析

采用 ClustalX 软件对 *Nbslp2* 与其他微孢子虫、细菌、真菌、寄生虫等其他物种的同源基因进行多重序列比对,结果显示, *Nbslp2* 序列中都具备行使类枯草杆菌蛋白酶催化功能的保守氨基酸位点 (图 2), 分别是 Asp282、His304、Ser460。不同微孢子虫种间 *slp2* 的氨基酸序列相似度较高。

2.3 家蚕微孢子虫 *Nbslp2* 的系统进化分析

为了进一步分析家蚕微孢子虫 *slp2* 基因与其他物种中同源基因的进化关系,以它们的蛋白质序列构建了邻接法进化树。系统进化树的结果 (图 3) 表明,家蚕微孢子虫类枯草杆菌蛋白酶 *Nbslp2* 与蜜蜂微孢子虫 (*N. ceranae*)、兔脑炎微孢子虫微孢子虫 (*E. cuniculi*)、肠脑炎微孢子虫 (*E. intestinalis*) 聚为一支,且亲缘关系较近,暗示 *slp2* 在微孢子虫基因组中的进化较为保守。



“●”表示催化位点的保守氨基酸；“*”代表氨基酸完全比对上；“:”代表氨基酸性质相似性较高，同属极性氨基酸或者非极性氨基酸；“.”代表氨基酸性质有一定相似性

图2 微孢子虫类枯草杆菌蛋白酶 2 的多重序列比对分析

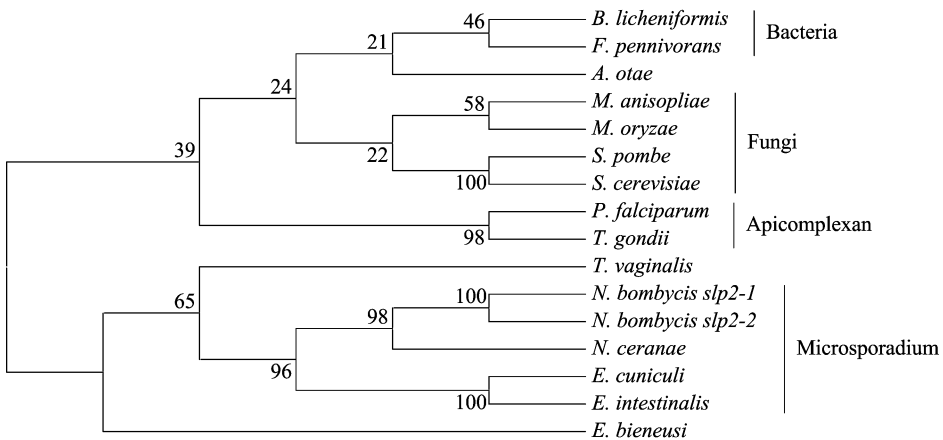


图3 微孢子虫类枯草杆菌蛋白酶 Nbslp2 同源基因系统进化分析

2.4 家蚕微孢子虫类枯草杆菌蛋白酶 Nbslp2 基因的保守性分析

通过 Western blotting 从蛋白水平分析 Nbslp2 在家蚕微孢子虫 (*N. bombycis*)、柞蚕微孢子虫 (*N. antheraeae*) 以及纳卡变形微孢子虫 (*Vairimorpha necatrix*) 中的表达特征,结果如图 4 所示。Nbslp2 在家蚕微孢子虫和柞蚕微孢子虫中有表达,

且在柞蚕微孢子虫中检测到 2 条大小位置不一的条带,而在纳卡变形微孢子虫中未检测到杂交信号,因此,可将 Nbslp2 作为区分上述 3 种微孢子虫的靶标。

2.5 家蚕微孢子虫类枯草杆菌蛋白酶 Nbslp2 基因的转录活性分析

利用 RT-PCR 研究家蚕微孢子虫类枯草杆菌蛋白酶

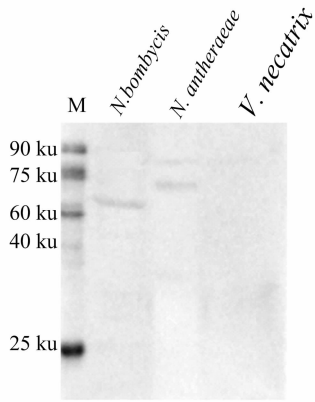


图4 家蚕微孢子虫 *Nbslp2* 的保守性分析

Nbslp2 基因在感染家蚕后的转录情况。结果如图 5 所示, *Nbslp2* 在感染家蚕微孢子虫后 72 h 检测到转录活性, 并且该转录活性会随着感染时间的延长有逐渐减弱的趋势, 说明 *Nbslp2* 可能在家蚕微孢子虫感染家蚕早期发挥作用。

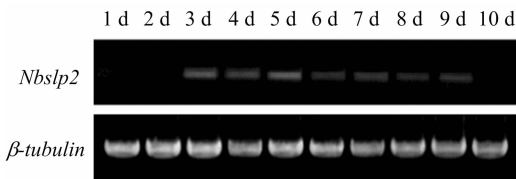


图5 家蚕微孢子虫类枯草杆菌蛋白酶 *Nbslp2* 的转录分析

3 结论与讨论

自 1954 年第 1 个枯草杆菌分泌的蛋白酶被鉴定以来^[13], 国内外学者对 subtilisin 进行了深入而广泛的研究, 截止到目前为止 NCBI 中已收录了 17 868 条蛋白质序列, 11 135 条基因序列, 其中 389 个 subtilisin 的三维结构已被解析。本研究主要是在已鉴定的 3 个家蚕微孢子虫类枯草杆菌蛋白酶基因 *Nbslp1*、*Nbslp2-1* 和 *Nbslp2-2* 基础上, 结合家蚕微孢子虫基因组数据库和生物信息学方法对其中的 *Nbslp2-1* (*Nbslp2*) 基因序列进行生物信息学分析。通过共线性、多重序列比对以及系统进化分析发现, *Nbslp2* 在 *Nosema* 属微孢子虫基因组中的位置较为保守。通过 Western blotting 对 *Nbslp2* 的保守性进一步分析发现, 在家蚕微孢子虫 (*N. bombycis*) 和柞蚕微孢子虫 (*N. anthracae*) 有该蛋白的存在, 而在纳卡变形微孢子虫 (*V. necatrix*) 中没有, 因此, 可以利用 *Nbslp2* 作为区分家蚕微孢子虫和纳卡变形微孢子虫的分子靶标。同时, 免疫印迹的结果还显示, *Nbslp2* 抗体在柞蚕微孢子虫中出现 2 个杂交信号, 且大小位置不一, 以此可以作为区分家蚕微孢子虫和柞蚕微孢子虫的靶标。因此, 可将 *Nbslp2* 作为蚕业生产上潜在的检测靶标。

研究人员对兔脑炎微孢子虫中 2 个类枯草杆菌蛋白酶 (*slp1* 和 *slp2*) 转录活性分析后发现, 由芽体分化为母孢子的过程中它们的转录水平上调 3 倍^[14]; 同样对家蚕微孢子虫在感染家蚕不同时期 *Nbslp1* 的转录活性进行检测, 发现 *Nbslp1* 在家蚕微孢子虫感染家蚕 1 d 后就有转录, 暗示其可能在感染初期发挥作用^[12]; 据此推测家蚕微孢子虫类枯草杆菌蛋白

酶 *Nbslp2* 在微孢子虫的增殖发育过程中可能也发挥重要作用。随后的转录活性检测发现, *Nbslp2* 在感染家蚕微孢子虫后 72 h 检测到转录, 并且该转录活性会随着感染时间的延长有逐渐减弱的趋势, 这一结果暗示着 *Nbslp2* 可能在家蚕微孢子虫感染家蚕早期发挥重要作用。鉴于上述的预测和分析结果, 后续将开展对 *Nbslp2* 基因的研究。

参考文献:

- [1] Cali A, Kotler D P, Orenstein J M. *Septata intestinalis* N. G., N. Sp., an intestinal microsporidian associated with chronic diarrhea and dissemination in AIDS patients [J]. The Journal of Eukaryotic Microbiology, 1993, 40(1): 101–112.
- [2] Corradi N, Keeling P J. Microsporidia: a journey through radical taxonomical revisions [J]. Fungal Biology Reviews, 2009, 23(1/2): 1–8.
- [3] Nageli K W. Über die neue krankheit der seidenraupe und verwandte organismen [J]. Botanische Zeitung, 1857, 15: 760–761.
- [4] Weiss L, Becnel J. Microsporidia: pathogens of opportunity [M]. John Wiley & Sons Inc., 2014: 166–187.
- [5] 王英, 张锡林. 半胱氨酸蛋白酶在寄生虫与宿主的相互关系中的作用 [J]. 国外医学: 寄生虫病分册, 2001, 28(4): 145–149.
- [6] 柴国祚, 周金林. 寄生虫金属蛋白酶研究进展 [J]. 中国兽医寄生虫病, 2006, 14(1): 26–31.
- [7] Guerrero F D, Davey R B, Miller R J. Use of an allele-specific polymerase chain reaction assay to genotype pyrethroid resistant strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) [J]. Journal of Medical Entomology, 2001, 38(1): 44–50.
- [8] Zhang Y J, Feng M G, Fan Y H, et al. A cuticle-degrading protease (CDEP-1) of *Beauveria bassiana* enhances virulence [J]. Biocontrol Science and Technology, 2008, 18(6): 551–563.
- [9] Hoffman B, Breuil C. Disruption of the subtilase gene, albin1, in *Ophiostoma piliferum* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(7): 3898–3903.
- [10] Bitencourt T A, Macedo C, Franco M E, et al. Transcription profile of *Trichophyton rubrum* conidia grown on keratin reveals the induction of an adhesin-like protein gene with a tandem repeat pattern [J]. BMC Genomics, 2016, 17(1): 249.
- [11] Li Z J, Zhao M Y, Dawuti G, et al. Action of *Euphorbia humifusa* effective fraction on membrane biosynthesis and the gene expression of proteases MEP and SUB of *Trichophyton rubrum* [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2014, 49(2): 273–276.
- [12] Dang X, Pan G, Li T, et al. Characterization of a subtilisin-like protease with apical localization from microsporidian *Nosema bombycis* [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2013, 112(2): 166–174.
- [13] Guntelberg A V, Ottesen M. Purification of the proteolytic enzyme from *Bacillus subtilis* [J]. Comptes Rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg Série Chimique, 1954, 29(3/4): 36–48.
- [14] Rönnebaum K, Wagener J, Gross U, et al. Identification of novel developmentally regulated genes in *Encephalitozoon cuniculi*: an endochitinase, a chitin-synthase, and two subtilisin-like proteases are induced during meront-to-sporont differentiation [J]. The Journal of Eukaryotic Microbiology, 2006, 53(Suppl 1): S74–S76.