

利用荧光差异显示技术分离的家蚕抗 NPV 相关基因 *s3a*

徐家萍^{1,2}, 陈克平^{1*}, 姚勤¹, 徐庆刚¹, 刘晓勇¹, 高贵田¹

(1. 江苏大学生命科学研究院, 江苏镇江 212013; 2. 安徽省农业科学院蚕桑研究所, 合肥 230061)

摘要:通过荧光差异显示技术,分析了家蚕 *Bombyx mori* 对 BmNPV 抗性品系 NB、感性品系 306 和近等基因系 306NNZZ 添毒和未添毒处理区的基因表达的差异。根据差异显示的结果克隆了一条 702 bp 长度的 cDNA 片段,并用 Northern blot 进行了验证。该序列经过 NCBI EST 库的同源性比较获得了电子延伸。延伸后的序列用特异引物进行 RT-PCR 扩增获得了一条 782 bp 的序列,拼接后基因 cDNA 序列全长为 827 bp,推导的氨基酸序列与草地夜蛾 *Spodoptera frugiperda* S3A 同源性最高达 97.7%;其次是烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* S3A,同源性为 94.0%;与黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* S3A 同源性为 75.3%。比较结果显示这是一个新的家蚕基因,定名为家蚕 *s3a* 基因。本实验获得的 *s3a* 基因在家蚕感性和抗性品系以及添毒处理和未添毒处理中都具有差异表达,其中在抗性品系和近等基因系中的表达高于感性品系,在添毒处理中的表达高于未添毒组。因此推测它是一个与家蚕抗 BmNPV 相关的新基因。

关键词:家蚕; BmNPV; 基因; *s3a*; 抗性; 荧光差异显示

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2005)03-0347-06

Fluorescent differential display analysis of the gene *s3a* related to NPV resistance in *Bombyx mori* L.

XU Jia-Ping^{1,2}, CHEN Ke-Ping^{1*}, YAO Qin¹, XU Qing-Gang¹, LIU Xiao-Yong¹, GAO Gui-Tian¹ (1. Institute of Life Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China; 2. Institute of Sericulture, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230061, China)

Abstract: Using fluorescent differential display (FDD) technique, the differential expression of genes related to BmNPV resistance in highly resistant strain NB, highly susceptible strain 306 and near isogenic line 306NNZZ of the silkworm, *Bombyx mori* L. was analyzed. Based on the differential display bands, a 702 bp fragment named C18₇₀₂ was cloned and confirmed by Northern blot hybridizations. The sequence was then electrically extended based on homology comparison with NCBI ESTs, and further confirmed by RT-PCR using specific primers. A novel gene was characterized and revealed to encode a putative BmS3A protein. The gene had 97.7% homology to *Spodoptera frugiperda* S3A, 94% homology to *Heliothis virescens* S3A and 75.3% homology to *Drosophila melanogaster* S3A, and was named *B. mori s3a* (*Bms3a*). It had higher expression in the highly resistant strain and near isogenic line than in the highly susceptible silkworm strain, and it also had higher expression in BmNPV treated strains than untreated strains. The results suggested that *Bms3a* is involved in silkworm BmNPV resistance.

Key words: *Bombyx mori*; BmNPV; gene; *s3a*; resistance; fluorescent differential display

家蚕核型多角体病毒 (*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, BmNPV) 是昆虫病毒史上首先发现的病毒 (吕鸿声, 1998), 它是一种环状双链 DNA 的核型多角体病毒。由 BmNPV 引起的家蚕核型多角体病毒病是养蚕业三大病毒病中危害最为严重的一

种, 该病在世界养蚕国家时有暴发, 传染极强, 难以控制。家蚕抗 NPV 品种间存在较大的差异, 经典的遗传学实验表明家蚕对 NPV 抗性受常染色体上一对显性主基因和性染色体上微效修饰基因控制 (陈克平等, 1991, 1996)。尽管多年来对家蚕抗 NPV 的

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30370773); 江苏大学高级人才基金 (1291180009)

作者简介: 徐家萍, 女, 1968 年生, 安徽省天长市人, 副研究员, 博士研究生, 研究方向为分子生物学, E-mail: jiapingxu@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: jiapingxu@163.com

收稿日期 Received: 2004-10-19; 接受日期 Accepted: 2005-01-14

研究有了一些进展,选育出了几个抗性的品系,找到了家蚕抗 NPV 的相关分子标记(Yao *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2003)。BmNPV 在家蚕体内感染的途径也有报道(Rahman *et al.*, 2004),最近有报道从家蚕中肠消化液中分离出丝氨酸蛋白酶和脂肪酶并证明其具有抗病毒活性,找到了 *serine* 和 *lipase* 基因(Ponnuvel *et al.*, 2003; Nakazawa *et al.*, 2004)。但是,由于家蚕对 NPV 的抗性是由主效基因和微效基因的协同作用,确定家蚕对 BmNPV 的抗性主基因仍然是一个崭新的课题。因此,我们通过组配近等基因系,利用荧光差异显示(fluorescence differential display, FDD)的方法继续寻找与抗性相关的家蚕新基因。

1 材料和方法

1.1 家蚕品系及近等基因系的组配

选择家蚕对 BmNPV 抗性品系 NB(LC₅₀ = 8.25 个多角体/mL),感性品系 306(LC₅₀ = 4.95 个多角体/mL),并以 306 为轮回亲本,以 NB 为抗性基因供体亲本,经过 8 代回交后,再经 3 代自交,隔代 BmNPV 添毒筛选,保留抗性基因,育成了近等基因系 306NNZZ(简称为 NN,LC₅₀ = 8.23 个多角体/mL)。对 3 个品系用人工饲料饲育至 5 龄起蚕,每个品系设添毒处理组(BmNPV, T3 株)和未添毒对照组(蒸馏水),分别编号为 NB₁ 和 306₁, NN₁ 和 NB₂ 及 306₂ 和 NN₂。以 50 头家蚕为一实验区,处理区添毒量 2 mL,每毫升含 1.8×10^8 个多角体;对照区添食蒸馏水 2 mL。添毒后 48 h,每区分别取 30 头家蚕的中肠,以消除遗传背景差异。另设相同的添毒处理组和未添毒对照组作为 4 天后的发病率调查。

1.2 组织总 RNA 提取

分别提取家蚕抗性品系、感性品系和近等基因系 6 组材料的中肠总 RNA。RNA 抽提用 Trizol 试剂(Invitrogen)液氮研磨后,每 100 mg 中肠组织加入 1 mL Trizol 试剂匀浆后转入 1.5 mL 离心管中,加入 200 μ L 氯仿,200 μ L 酸性酚,4°C 12 000 \times g 离心 10 min,取上清液,加入等体积的异丙醇沉淀 RNA,沉淀后的 RNA 溶于焦碳酸二乙酯(DEPC)水中。-70°C 保存。

1.3 cDNA 第 1 链合成

取 35 μ g RNA 经 DNase-I(Promega)消化后取 0.2 μ g RNA 反转录,反转录和 PCR 反应操作均按 GenHunter RNAspectra 试剂盒说明书进行。反转录体系:2 μ mol/L H-T(11)A(G/C)锚定引物,5 \times RT 缓

冲液 4 μ L,250 μ mol/L dNTPs 1.6 μ L,加 DEPC 水至 19 μ L。进行如下反应:65°C 5 min,立即冰上,加入 1 U MMLV 反转录酶,37°C 60 min,75°C 5 min。

1.4 荧光差异显示

以 3 种荧光锚定引物和 9 种随机引物(HAP9 ~ HAP18)作不同组合,进行 PCR 反应,其中荧光锚定引物与逆转录所用 H-T(11)N 锚定引物一致,所用荧光为绿色荧光。在 PCR 体系中依次加入:10 \times PCR 缓冲液 2.0 μ L,250 μ mol/L dNTPs 1.6 μ L,2 μ mol/L 荧光锚定引物 2.0 μ L,2 μ mol/L 随机引物 2 μ L,逆转录产物 2 μ L,Taq 酶(Quagen)1 U,加水至 20 μ L。反应条件为:92°C 30 s,40°C 2 min,72°C 1 min,40 个循环,72°C 7 min。

1.5 差异条带的获得与二次扩增

PCR 反应结束后,其产物在 5% 变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳 4 h(1 500 V)。电泳结束后,用荧光成像扫描仪(FMBIO II)对凝胶进行 505 nm 波段荧光扫描。依据扫描图像定位切取差异条带,置 50 μ L 水中,100°C 水浴 20 min,取 2 μ L,用于二次 PCR 扩增。扩增引物和扩增条件同上。

1.6 Northern blot 验证差异条带

将 NB₁、NB₂、306₁、306₂、NN₁ 和 NN₂ 家蚕中肠提取的 RNA 30 μ g 转膜,以 α -P³² 同位素标记的差异 cDNA 探针与膜杂交,杂交结果扫描分析。

1.7 序列测定及同源性分析

用低熔点胶法回收的差异片段,克隆入 TaKaRa 公司 pMD-18T 载体中,转化大肠杆菌 DH5 α ,提取质粒,测定序列。应用 Blast 程序将所得到的测序结果与 GenBank 数据库和 Silkbase 数据库进行同源性比较,从中选取同源性较高的片段进行序列拼接表达分析。

1.8 拼接序列设计引物进行 PCR 扩增

杂交阳性条带 C18₇₀₂ 经过同源性比较后拼接,根据拼接后序列设计引物进行 RT-PCR 再次扩增。cDNA 合成同前,PCR 体系:10 \times PCR 缓冲液 2.0 μ L,2.5 mol/L dNTPs 2.0 μ L,1 μ mol/L oligodT(18) 1.0 μ L,逆转录产物 1 μ L,Taq 酶(TaKaRa)1 U,加水至 25 μ L。反应条件为:92°C 30 s,62°C 1 min,72°C 1 min,35 个循环,72°C 7 min。

2 结果与分析

2.1 抗性品系、感性品系和近等基因系的抗性鉴定

NB₁、306₁ 和 NN₁ 每区以每毫升 1.8×10^8 个多角

体的浓度添毒 2 mL,对照区采用感性品系 306 用蒸馏水添食,发病率调查结果表明,只有 306₁ 区平均发病率为 98%,其他各区发病率均为 0,说明取材用的抗性品系 NB,感性品系 306 以及近等基因系 NN 对 BmNPV 的感受性的确存在很大差异,通过 8 代回交,再经 3 代自交后构建的近等基因系 NN 已带有纯合的 NB 抗性基因。

2.2 荧光差异显示结果及 Northern blot 验证

以 3 种荧光锚定引物和 9 种随机引物(HAP9 ~ HAP18)作 27 个组合,对 NB₁、NB₂、306₁、306₂、NN₁ 和

NN₂ 6 个材料进行 FDD-PCR 研究,获得了 36 条差异带,其中 C18₇₀₂ 片段为差异带(图 1:A)。

从所得到的差异片段中选取 18 条,进行 Northern blot 验证,结果条带(条带大小 702 bp)显示与 FDD 具有一致的结果(图 1:B):即抗性品系和近等基因系(NB₁、NB₂、NN₁ 和 NN₂)表达水平较高,而感性品系(306₁ 和 306₂)表达水平较低,其中添毒区(NB₂、NN₂ 和 306₂)表达水平又高于未添毒区(NB₁、NN₁ 和 306₁)。这一结果暗示家蚕抗 NPV 基因与 C18₇₀₂ 表达是密切相关的。

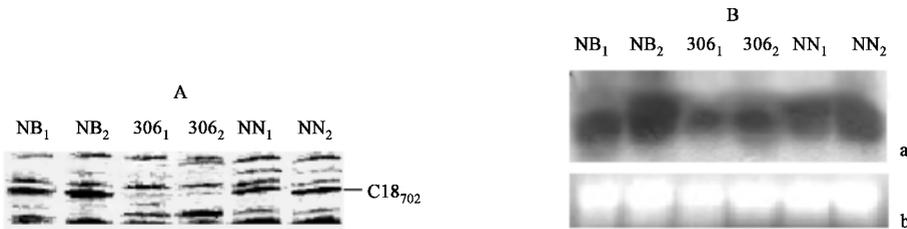


图 1 荧光差异显示及 Northern blot 杂交结果

Fig. 1 The results of fluorescent differential display and Northern blot hybridization

A: 荧光差异显示结果, C18₇₀₂ 片段为差异带 FDD pattern, and the line indicates the C18₇₀₂ fragment; B: Northern blot 杂交结果 Northern blot hybridization. a: 杂交信号在 NB₁、NB₂、306₁、306₂、NN₁ 和 NN₂ 中的表达 Hybridizational signals of NB₁, NB₂, 306₁, 306₂, NN₁ and NN₂; b: 28S rRNAs 作为上样量参照 rRNAs as a control for equal loading.

2.3 差异片段的序列测定和同源性分析

将条带 C18₇₀₂ 进行克隆测序,得到一个长 702 bp 的序列(图 2),并将该序列与 GenBank 数据库和

Silkbase 数据库进行同源性比较,结果显示条带 C18₇₀₂ 在 EST 数据库中有较高的同源性,其中 C18₇₀₂ 的前 1 bp ~ 590 bp 的序列与 GenBank 中 AV405804

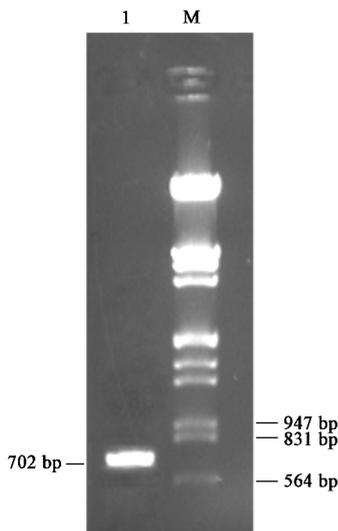


图 2 FDD 差异条带 C18₇₀₂ 再扩增结果

Fig. 2 The result of the re-amplification of FDD differential band C18₇₀₂

M: 分子量标准 Marker; 1. PCR 产物 PCR production of C18₇₀₂.

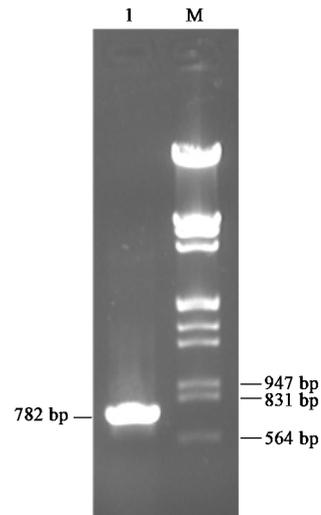


图 3 特异引物 RT-PCR 扩增结果

Fig. 3 The result of RT-PCR amplified by specific primers

M: 分子量标准 Marker; 1. RT-PCR 扩增产物

RT-PCR production of specific primers.

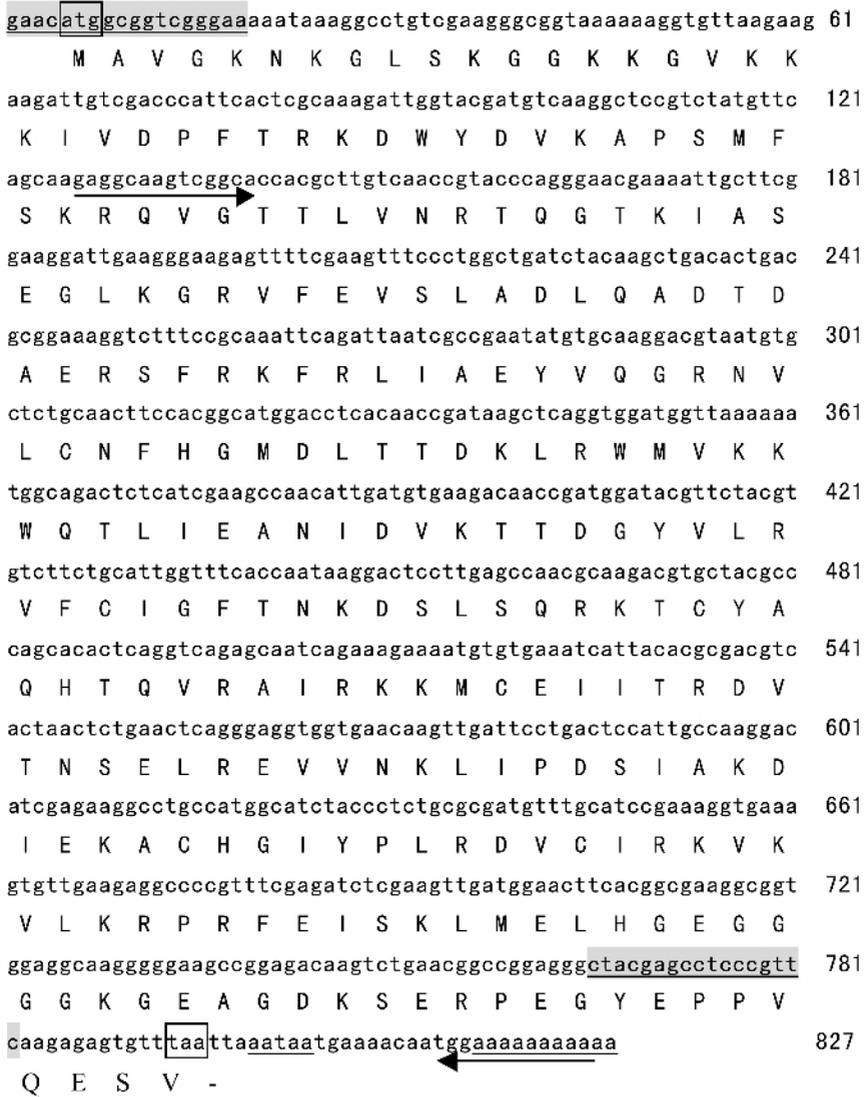


图4 家蚕核糖体 s3a cDNA 序列及推导的氨基酸序列

Fig. 4 *Bombyx mori* ribosomal protein s3a cDNA sequence and deduced amino acid sequence

起始密码子 atg 和终止密码子 taa 用方框标记,加尾信号 aataa 和 poly(A)以下划线标记,箭头指向区域序列(125nt-827nt)是 FDD 差异片段 C18₇₀₂ 序列。阴影部分为特异引物序列。The first codon and the stop codon are denoted by box. The polyadenylation signal, aataa, and the poly(A) tail (11 adenine residues) in the 3' untranslated region of cDNA are underlined. The sequence arrowhead area from 125nt to 827nt is FDD sequence. The two shaded sequences are specific primers.

序列(*Bombyx mori* wing disk C108 5th-instar day-3 larva *Bombyx mori* cDNA clone wdV30257 T3, mRNA sequence)的 130 bp ~ 719 bp 的序列具有 100% 的同源性,进行序列拼接获得 831 bp 的序列,且有一完整的开放阅读框。根据此序列设计一对引物:正向(Forward): 5'-GAACATGGCGGTCGGGAA-3' 和反向(Reverse): 5'-GAACGGGAGGCTCGTAG-3',扩增结果获得一条 782 bp 大小的条带(图 3),再克隆测序,序列结果表明与电子延伸的序列一致,再加上 3' 端差显的序列共 827 bp,序列结果和推导的氨基酸序列

见图 4。该序列已在 GenBank 上登录,登录号为 AY705974,命名为 *Bms3a*,开放阅读框起始于第 5 个碱基并以第 794 个碱基 TAA 终止。序列包含的多聚核苷酸加尾信号 AATAA,以及 11 个碱基的 Poly(A)尾巴和 20 个碱基的 3'非翻译区序列。从推导的氨基酸序列来看,它的分子量是 29 753.49 D,包含 55 个碱性氨基酸和 33 个酸性氨基酸,推测的等电点是 9.66。

2.4 氨基酸序列同源性比较分析

在 NCBI 数据库中对其翻译的氨基酸序列进行

同源性比对,显示与下列核糖体蛋白 S3A 蛋白的同源性分别为: AAL26579 (草地夜蛾 *Spodoptera frugiperda*), 93%; AAK59927 (烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*), 90%; CAA66861 (冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*), 70%; P55830 (黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*), 70%。应用 DNAsstar 软件对这 5 种同源性相近物种的 S3A 蛋白的氨基酸序列进行 Clustal W 分析,结果(表 1、图 5)表明: BmS3A 与 Sfs3A 同源性最高达 97.7%,其次是 HvS3A,同源性为 94.0%,与 DmS3A 同源性为 75.3%。

表 1 以 Clustal W 分析 5 种同源性相近物种的 S3A 蛋白遗传距离(%)

Table 1 Pair distances of Untitled Clustal W among 5 species (Percent similarity in upper triangle)

	AgS3A	HvS3A	DmS3A	BmS3A	Sfs3A
AgS3A	-	71.6	74.5	74.9	73.9
HvS3A		-	71.2	94.0	96.0
DmS3A			-	75.3	74.6
BmS3A				-	97.7

Sf: 草地夜蛾 *Spodoptera frugiperda*; Hv: 烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*; Ag: 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*; Dm: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*; Bm: 家蚕 *Bombyx mori*; 图 5 同 The same for Fig. 5.

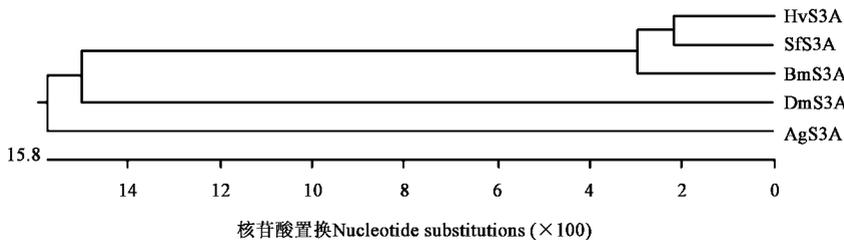


图 5 5 种同源性相近物种的 S3A 蛋白系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of S3A among 5 different species

3 讨论

Sfs3a 和 *Hvs3a* 都是从鳞翅目害虫中获得的基因,家蚕也为鳞翅目昆虫,其基因具有同源相似性。*Bms3a* 推测编码蛋白与 *Sfs3a* 和 *Hvs3a* 编码蛋白具有较高的同源性显示可能是同一类基因。S3A 蛋白是位于大小核糖体亚基的接触面上,该部位是核糖体结合翻译启动因子 2 (eIF2), eIF3, eIF2, Met-tRNA, Phe-tRNA 以及 mRNA 的位置, S3A 水平的变化影响到核糖体翻译功能的启动 (Westermann *et al.*, 1979; Tushinski and Warner, 1982; Tolan *et al.*, 1983)。有研究表明由于核糖体蛋白 S3A 的降解抑制核糖体翻译功能的启动,阻碍了参与细胞生命活动的蛋白的合成,从而导致细胞凋亡 (孙阿萍等, 2002)。Song 等 (2002) 认为人类 S3A 和 Bcl-2 共同作用抑制 PARP [poly(ADP-ribose) polymerase] 的活性从而抑制细胞凋亡,在缺少 S3A 的情况下, Bcl-2 不能抑制 PARP 的活性。细胞凋亡作为利他性自杀行为是昆虫抗病毒感染的重要机制 (Koyama *et al.*, 1998)。因此,我们推测家蚕在受到 BmNPV 攻击后,由于病毒的感染刺激,家蚕体内出现与之相抗争的细胞凋亡反应,表现出自身防卫现象。从本实验结果来看,抗性品种和近等基因系(其遗传背景为感性

品系的 99.9% 的相似性,唯有抗性基因表达的不同,也为抗性品系) C18₇₀₂ 具有比感性品种表达量高的现象,同时添毒后也出现 C18₇₀₂ 表达量升高的现象,这是一个比较可靠的证据。Iwanaga 等 (2000) 研究发现家蚕蛹接种 BmNPV 病毒 48 h 后脂肪体出现程序性死亡的降解现象,即在 48 h 时出现最强 DNA 梯度, 72 h 后就检测不到这种现象了。我们的实验取样也是在家蚕接种 BmNPV 48 h,与细胞凋亡的相关基因出现高水平的表达现象,与此结果是相互吻合的。本实验通过荧光差异显示技术,成功地获得了与家蚕抗 BmNPV 相关的 *Bms3a* 基因。

另外,在对哺乳动物的研究中, Cordeiro-da-Silva 等 (2001) 通过注射 *Leishmania major* RPS3a 结合蛋白到老鼠的体内发现 rLmS3arp 能够优先诱导 B 细胞的活性,说明 rLmS3arp 通过直接或间接作用于 B 细胞、T 细胞和胞浆分泌,参与免疫调节过程,对 TH1 和 TH2 免疫反应起平衡作用。这是寄生虫与脊椎动物宿主研究互作的典型例子,对于昆虫病毒与宿主的关系可以提供借鉴和参考。

致谢 本研究 Northern blot 部分实验得到中国科技大学生命科学学院徐卫华教授和魏兆军博士生的指导和帮助,在此表示感谢!

参 考 文 献 (References)

- Chen KP, Lin CQ, Wu DX, 1991. Resistance of the conserved silkworm strains to nuclear polyhedrosis virus disease. *Acta Sericologica Sinica*, 17(1):45-46. [陈克平, 林昌麒, 吴冬秀, 1991. 家蚕保存种对核型多角体病的抵抗力. *蚕业科学*, 17(1):45-46]
- Chen KP, Lin CQ, Yao Q, 1996. Studies on the resistance to NPV and its heredity regularity in the silkworm (*Bombyx mori* L.). *Acta Sericologica Sinica*, 22(3):160-164. [陈克平, 林昌麒, 姚勤, 1996. 家蚕对核型多角体病的抗性及其遗传规律的研究. *蚕业科学*, 22(3):160-164]
- Chen KP, Yao Q, Wang Y, Cheng JL, 2003. Genetic basis of screening of molecular markers for nuclear polyhedrosis virus resistance in *Bombyx mori* L. *Int. J. Indust. Entomol.*, 7:5-10.
- Cordeiro-da-Silva A, Borges MC, Guilvard E, Ouaiissi A, 2001. Dual role of the *Leishmania major* ribosomal protein S3a homologue in regulation of T- and B-cell activation. *Infection and Immunity*, 69(11):6588-6596.
- Iwanaga M, Kang WK, Kobayashi M, Maeda S, 2000. Baculovirus infection blocks the progression of fat body degradation during metamorphosis in *Bombyx mori*. *Archives of Virology*, 145(9):1763-1771.
- Koyama AH, Irie H, Fukumori T, Hata S, Iida S, Akari H, Adachi A, 1998. Role of virus-induced apoptosis in a host defense mechanism against virus infection. *J. Med. Invet.*, 45(1-4):37-45.
- Lu HS, 1998. *Molecular Biology of Insect Viruses*. Beijing: China Agricultural Sciencetech Press. 1-15. [吕鸿声, 1998. *昆虫病毒分子生物学*. 北京: 中国农业科技出版社. 1-15]
- Nakazawa H, Tsuneishi E, Ponnuel KM, Furukawa S, Asaoka A, Tanaka H, Ishibashi J, Yamakawa M, 2004. Antiviral activity of a serine protease from the digestive juice of *Bombyx mori* larvae against nucleopolyhedrovirus. *Virology*, 321(1):154-162.
- Ponnuel KM, Nakazawa H, Furukawa S, Asaoka A, Ishibashi J, Tanaka H, 2003. A lipase isolated from the silkworm *Bombyx mori* shows antiviral activity against nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virology*, 77:10725-10729.
- Rahman MM, Gopinathan KP, 2004. Systemic and *in vitro* infection process of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Virus Research*, 321:154-162.
- Song D, Sakamoto S, Taniguchi T, 2002. Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase activity by Bel-2 in association with the ribosomal protein S3a. *Biochemistry*, 41(3):929-934.
- Sun AP, Ma HX, Zheng HS, 2002. The RPS3a level in the process of cellular apoptosis. *Heilongjiang Medicine and Pharmacy*, 25(1):1-2. [孙阿萍, 马洪星, 郑寒松, 2002. 细胞凋亡过程中核糖体蛋白 S3a 水平变化的研究. *黑龙江医药科学* 25(1):1-2]
- Tolan DR, Hershey JWB, Traut RR, 1983. Cross-linking of eukaryotic initiation factor eIF-3 to the 40S ribosomal subunit from rabbit reticulocytes. *Biochimie*, 65:427-436.
- Tushinski RJ, Warner JR, 1982. Ribosomal proteins are synthesized preferentially in cells commencing growth. *J. Cell Physiol.*, 112:128-135.
- Westermann P, Heumann W, Bommer UA, 1979. Cross-linking of initiation factor eIF-2 to proteins of the small subunit of rat liver ribosomes. *FEBS Lett.*, 97:101-104.
- Yao Q, Li MW, Wang Y, Wang WB, Lu J, Dong Y, Chen KP, 2003. Screening of molecular markers for NPV resistance in *Bombyx mori* L. (Lep., Bombycidae). *J. Appl. Entomol.*, 127:134-136.

(责任编辑:黄玲巧)