

## 家蚕 *hsp24.3* 基因的克隆及功能研究

刘彬斌<sup>1,2</sup>, 柴春利<sup>1</sup>, 王先燕<sup>1</sup>, 黄飞飞<sup>1</sup>, 鲁成<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>西南大学生物技术学院蚕学与系统生物研究所, 重庆 400715; <sup>2</sup>四川农业科学院蚕业研究所, 四川南充 637000)

**摘要:**【目的】对家蚕 *hsp24.3* 基因 (*Bmhs24.3*) 的功能进行研究, 为选育抗逆境家蚕品种提供基础材料和理论依据。【方法】在对家蚕基因组进行生物信息学分析的基础上, 对家蚕低分子量热激蛋白基因 *Bmhs24.3* 进行克隆, 然后利用家蚕的芯片数据对 *Bmhs24.3* 基因在 5 龄第 3 天幼虫不同组织中的表达模式进行分析, 并利用半定量 RT-PCR 技术, 分别对 *Bmhs24.3* 基因在正常情况下和热刺激条件下家蚕 5 龄幼虫不同发育时期 (1~6 d) 后部丝腺中的表达状况以及 10 个不同家蚕品种 5 龄第 3 天幼虫丝腺中的表达情况进行了检测; 最后将 *Bmhs24.3* 基因进行原核表达, 获得重组蛋白 rBmHSP24.3, 并进一步对该重组蛋白的功能进行了体外验证。【结果】*Bmhs24.3* 基因的编码区 (CDS) 长度为 633 bp, 编码 210 个氨基酸, 为单外显子基因; RT-PCR 检测发现该基因在家蚕的体壁、脂肪体以及丝腺组织中有较高水平表达, 在其它组织中的表达不明显; 同对照相比, 不同家蚕品种以及不同发育时期的 5 龄幼虫在热刺激后, 其后部丝腺中的 *Bmhs24.3* 基因的表达显著升高。经 Native-PAGE 和 SDS-PAGE 分析表明, 在高温条件下, 表达获得的重组蛋白 rBmHSP24.3 能与硫氰酸酶形成稳定的复合物, 使底物蛋白免受热刺激胁迫而变性, 从而起着分子伴侣的作用。【结论】重组蛋白 rBmHSP24.3 在体外具有分子伴侣的功能, 推测该蛋白在家蚕体内同样具有分子伴侣的功能, 在家蚕的抗逆境适应过程中起重要作用。

**关键词:** 家蚕; 低分子量热激蛋白 (sHSP); 分子伴侣

## Cloning and Functional Study of *Bombyx mori hsp24.3* Gene

LIU Bin-bin<sup>1,2</sup>, CHAI Chun-li<sup>1</sup>, WANG Xian-yan<sup>1</sup>, HUANG Fei-fei<sup>1</sup>, LU Cheng<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Sericulture and System Biology, College of Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400716;

<sup>2</sup>Sericultural Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Nanchong 637000, Sichuan)

**Abstract:** 【Objective】 The function of *Bombyx mori hsp24.3* gene was studied to provide a theoretical basis for raising *Bombyx mori* varieties with adverse resistance. 【Method】 Based on bioinformatic analysis of *Bombyx mori*'s genome database, the *Bmhs24.3* gene has been cloned; Using the silkworm's microarray-based, the expression model of this gene in multiple silkworm tissues on day 3 of the fifth instar was analyzed. The expressional level analysis by using RT-PCR revealed that the *Bmhs24.3* expressed in *Bombyx mori* silk gland on day 3 of the fifth instar in different varieties or on days 1 to 6 of the fifth instar in P50 under normal raising condition and heat stimulating condition. The expression level of *Bmhs24.3* increased remarkably after heat stimulation. Finally, through recombinant expression, the recombinant protein rBmHSP24.3 was obtained and validated the function of this recombinant protein. 【Result】 The CDS of the *Bmhs24.3* gene is 633 base pairs with no intron in it revealed by ESTs and coding 210 amino acids. This gene expressed in skin, fat body and silk gland of silkworm. The expression level in fat was remarkably different between male and female. Compared to the expression level of the *Bmhs24.3* under normal condition, the expression level increased remarkably after heat stimulation. The interactions of recombinant protein rBmHSP24.3 with Rhodanese under stress conditions were further analyzed. Both Native-PAGE and SDS-PAGE results demonstrated that the recombinant protein rBmHSP24.3 could form a stable complex with Rhodanese like a chaperone. Native-PAGE showed that the complex was detected, also free Rhodanese and recombinant protein rBmHSP24.3 could be observed. In order to verify the component of the complex, the complex was collected and applied to SDS-PAGE. Both proteins were detected in same lane, reasoning out the formation of the

收稿日期: 2007-12-20; 接受日期: 2008-04-07

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (30330460), 国家“973”计划项目 (2005CB121000), 国家科技攻关项目 (2005BA711A07)

作者简介: 刘彬斌 (1979—), 女, 四川江油人, 硕士, 研究方向为家蚕分子生物学。Tel: 023-68251753; E-mail: fishman120@163.com。通讯作者 鲁成 (1957—), 男, 重庆长寿人, 教授, 研究方向为家蚕遗传育种。Tel: 023-68250793, E-mail: lucheng@swu.edu.cn

complex. Taken together, the interactions of recombinant protein rBmHSP24.3 with Rhodanese is a reversible interaction under heat stimulation. This experiment has proved that the recombinant protein rBmHSP24.3 was fully functional as a chaperone. It represented protection of proteins from irreversible aggregation. 【Conclusion】 The recombinant protein rBmHSP24.3 is fully active as a chaperone *in vitro*. It is concluded that the rBmHSP24.3 plays a role like a chaperone *in vivo* of *Bombyx mori*, and also shoulders an important role under adversity.

**Key words:** *Bombyx mori*; sHSPs; Chaperone

## 0 引言

【研究意义】低分子量热激蛋白 (small heat shock proteins, sHSP) 在生物界中广泛存在, 几乎在所有的生物个体中都有表达。许多因素如温度、重金属、辐射、疾病等都能引起此类蛋白的大量表达<sup>[1-3]</sup>。早期的研究表明, sHSP 的含量与生物体耐热性呈正相关, 能够提高生物体的应激能力和在逆境中的存活率<sup>[4]</sup>。sHSP 的表达是有机体对多种内外环境条件的胁迫产生应激反应并进行自我保护的重要物质基础<sup>[5]</sup>。sHSP 具有多种生物功能, 不仅可增强细胞对逆境的耐受能力和恢复能力, 行使分子伴侣的功能<sup>[6-8]</sup>; 还与生物的正常生长、发育与分化、细胞内信号传导和育性的转化有关<sup>[9-10]</sup>。因此研究低分子量热激蛋白功能对了解有机体的抗逆境反应机制和生长发育调控机制具有重要的理论意义和实践价值。【前人研究进展】目前, 对 sHSP 的研究已深入到结构、性质、功能等各个面。其研究主要集中在: (1) 作为分子伴侣协助细胞内肽链的折叠; (2) 参与主要组织相容性复 (major histocompatibility complex, MHC) I 型的分子呈递; (3) 使抗原通过内吞作用进入靶细胞; (4) 肿瘤免疫和分子疫苗开发<sup>[11]</sup>。对昆虫热激蛋白家族的研究已经深入到热激蛋白在昆虫体内作为分子伴侣、诱导生物体耐热性和稳定细胞骨架的生物学功能水平<sup>[12]</sup>。对家蚕 sHSP 研究虽然起步较晚, 但对家蚕突变性状遗传背景以及遗传多样性的相关研究丰富了人们对家蚕热激蛋白的认识。李斌等在对自然突变肾型卵 (*ki*) 胚胎致死的 FDD (fluorescent differential display, FDD) 分析过程中克隆了 2 个家蚕 sHSPs 基因; 孙卫忠等对 *Bmshp20.8A* 进行了体外表达和荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 的研究<sup>[13-14]</sup>; 李斌等详细研究了家蚕 (*Bombyx mori*) 热激蛋白基因 *Bmshp19.9*、*Bmshp20.1*、*Bmshp21.4*、*Bmshp23.7*、*Bmshp20.8A* 和 *Bmshp20.8B* 在家蚕体内的表达, 并对这些基因在蚕体内的生物学功能进行了推测<sup>[15-17]</sup>。【本研究切入点】国内外对家蚕 sHSP 的研究主要集中在

基因克隆、基因表达特性以及生物信息学分析方面, 而对其体外表达和功能仅仅基于表达特性基础上的推测, 缺乏进一步的实验验证。【拟解决的关键问题】本试验主要集中在对 *Bmshp24.3* 基因在家蚕不同组织和热刺激后的表达特性以及该基因体外表达蛋白质功能方面的研究, 意在了解 *Bmshp24.3* 基因在家蚕不同组织和热刺激条件下是否具有表达特性以及该基因的体外表达重组蛋白是否具有分子伴侣的特征, 从而更好地了解这类蛋白质家族在蚕体内的生物学功能, 服务于家蚕抗性方面的研究。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 主要数据库及软件

1.1.1 数据库 果蝇、人类、老鼠、和已知的家蚕 sHSP 氨基酸序列下载自美国国立生物技术信息中心 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。在 NCBI 中登录的所有家蚕的 EST 序列, 共 184 520 条组建为本地的 EST 库。基因组序列为蚕学与系统生物学研究所 2003 年与中国科学院北京基因组研究所采用鸟枪法共同测定<sup>[18]</sup>。

1.1.2 软件 相似性搜索采用从 NCBI 下载的 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) <sup>[19]</sup> 工具; 蛋白质保守区预测网站: <http://smart.embl-heidelberg.de/>。

### 1.2 材料

家蚕大造品种 (P50) 品种由西南大学家蚕基因库提供; 对 5 龄第 1~6 天的家蚕大造品种 (P50), 分别进行热刺激, 将蚕置于 45℃ 饲养 35 min, 24℃ 饲养 2 h, 然后取其后部丝腺。常规饲养 (未热刺激) 家蚕作对照。对不同品种的 5 龄第 3 天家蚕幼虫进行了处理, 方法同前面一致。

### 1.3 RT-PCR 分析

用 RNA 试剂盒 Trizol (Promega) 试剂提取后部丝腺组织的总 RNA。cDNA 第一链采用 Oligo (dT) 15 和 AMV 反转录酶 (Promega) 按操作说明合成。根据预测 *Bmshp24.3* 序列, 应用 Primer5 软件设计引

物, 得到上游引物 5'-GGATCCATGTCAATTTTGCC ATACGTGTAC-3'、下游引物 5'-CAAGCTTCTACAC AGCGACAGCTGAAGGCTCC-3' (画线部分是限制性酶切位点), 以经逆转录合成的后部丝腺组织的 cDNA 第一链作为模板, 家蚕 *Actin3* 基因 (上游引物: 5'-AACACCCCGTCCTGCTCACTG-3'; 下游引物: 5'-GGGCGAGACGTGTGATTCCT-3') 作为内参照来检测、调节家蚕丝腺组织 cDNA 的浓度, 使其浓度趋于一致并进行半定量 RT-PCR。PCR 反应体系 (25  $\mu$ l 的总体积): 15  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, 2.5  $\mu$ l 10 $\times$ PCR 缓冲液, 2.0  $\mu$ l 25 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 2  $\mu$ l 10 mmol·L<sup>-1</sup> dNTP, 1  $\mu$ l 10 mmol·L<sup>-1</sup> 上游引物, 1  $\mu$ l 10 mmol·L<sup>-1</sup> 下游引物, 2  $\mu$ l cDNA, 1U Taq 酶。反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2min, 30 个循环扩增 (94 $^{\circ}$ C 30 s、60 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 1 min), 72 $^{\circ}$ C 延伸反应 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存, 扩增结束后, PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

#### 1.4 家蚕组织芯片数据

家蚕组织芯片数据<sup>[20]</sup>是在家蚕基因组范围内, 分析目前已知和预测的家蚕基因在 5 龄 3 天各个组织的表达情况。它能在没有实验支持的情况下提供家蚕基因的表达情况。芯片扫描和数据采集采用北京博奥生物公司的 LuxScan 10K-A 双通道激光共聚焦扫描仪对杂交后的芯片进行扫描, 配套软件 Linuxscan 进行图象采集。采用 GenePix Pro 4.0 图象分析软件 (Axon Instruments 公司) 对芯片图象进行分析, 把图象信号转化为数字信号, 以列表形式输出结果。芯片数据的归一化处理, 首先对总体的荧光强度值进行矫正, 使各张芯片的总荧光强度接近该批芯片总荧光强度的平均值。采用 Lowess 方法进行芯片内数据的归一化处理。

#### 1.5 *Bmhsp24.3* 克隆及序列测定

用家蚕丝腺基因组作为扩增模板进行 PCR 扩增, PCR 反应体系和程序同上。扩增产物用上海华舜胶回收试剂盒进行 DNA 回收, 将回收的 DNA 片段与 pMD18-T 载体连接, 进行 TA 克隆, 对重组克隆 *Bmhsp24.3*-pMD18-T 进行酶切和 PCR 鉴定, 并送往上海英骏公司进行测序验证。

#### 1.6 原核表达载体的构建及诱导表达

对重组克隆 *Bmhsp24.3*-pMD18-T 和原核表达载体 pET-50b (+) 质粒进行纯化, 分别用 *Bam*H I 和 *Hind*III 进行双酶切, 然后对酶切后的目的片段纯化, 用 T<sub>4</sub> DNA 连接酶连接后转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株, 筛选获得 *Bmhsp24.3*-pET-50b (+) 的重组菌。用终浓度为 1 mmol·L<sup>-1</sup> 的 IPTG 对重组菌诱导表达 6 h

后, SDS-PAGE 检测, 考马斯亮蓝 R-250 染色检测蛋白表达情况。

#### 1.7 重组蛋白 Western blot 检测以及功能鉴定

重组蛋白与 T7.Tag 单克隆抗体做 Western blot 检测, 其中一抗稀释 500 倍, 二抗稀释 10 000 倍, 二抗为碱性磷酸酶标样抗兔抗体, NBT/BCIP 显色。选择硫氰酸酶作为底物蛋白, 通过分析高温条件下, 重组蛋白与硫氰酸酶的交互作用, 鉴定重组蛋白的功能。选用甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 作为内参。

#### 1.8 SDS-PAGE

SDS-PAGE 参考文献<sup>[21]</sup>采用垂直电泳槽 (伯乐), 配制 12.5% 分离胶 (pH 8.8) 和 5% 浓缩胶 (pH 6.8)。电泳缓冲液为 Tris-甘氨酸缓冲液 (pH 8.3), 上样 5~10  $\mu$ l, 电泳时采用恒流 15 mA, 电泳结束后用考马斯亮蓝 R-250 染色 30 min, 脱色液脱色 4~6 h。

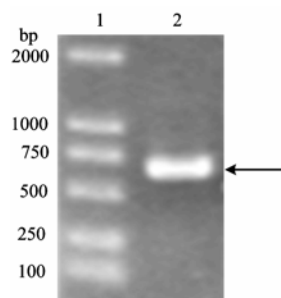
#### 1.9 Native-PAGE

参照 Davis 的方法<sup>[22]</sup>进行。在未变性条件下, 配制 8.5% 分离胶和 3.3% 浓缩胶, 电泳缓冲液为 Tris-甘氨酸缓冲液。0.05% 溴酚兰 (CBP) 作为指示剂, 上样 5~10  $\mu$ l。电泳时采用恒流 15 mA, 电泳结束后用考马斯亮蓝 R-250 染色 30 min, 脱色液脱色 4~6 h。

## 2 结果与分析

### 2.1 *Bmhsp24.3* 的克隆和序列分析

在前期的研究中, 笔者从家蚕基因组数据中共鉴定出了 14 种低分子量热激蛋白<sup>[15]</sup>。进一步设计了 *Bmhsp24.3* 的特异性引物, 以家蚕丝腺 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果表明在 600 bp 处有单一、明亮的条带, 与预测相符 (图 1)。进一步对该片段进行克隆和测序,



1: DL2000 分子量标准; 2: 目的片段; 箭头表示目的片段所在  
1: DL2000 marker; 2: Targeted fragment; Arrow indicated the targeted fragment

图 1 *Bmhsp24.3* PCR 扩增产物

Fig. 1 Agarose gel analysis of PCR product

发现该基因有一个长为 633 bp 完整的开放阅读框(图 2), 编码 210 个氨基酸。在 NCBI 的检索结果表明该蛋白序列与果蝇的 1 (2) efl (CG4533-PA) 蛋白最为相似, 相似性为 40%。根据家蚕热激蛋白的命名规则, 初步确定该序列为家蚕基因 *Bmhs*p24.3。通过蛋白质保守区预测网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), 发现该蛋白质与众多热激蛋白一样, 含有一个由 80~100 个氨基酸残基组成的  $\alpha$ -晶体蛋白结构域(图 3), 然而具有  $\alpha$ -晶体蛋白结

构域的热激蛋白质有一个显著的特征, 就是在逆境条件下能与其它蛋白质结合阻止蛋白质变性, 维持蛋白质的正常构象起到分子伴侣的作用, 因此推测该重组蛋白可能具有分子伴侣的特性。

2.2 *Bmhs*p24.3 的表达情况

借助于新近完成的家蚕组织芯片数据<sup>[20]</sup>, 对 *Bmhs*p24.3 在家蚕 5 龄幼虫不同组织中的表达进行了分析。结果表明 *Bmhs*p24.3 在家蚕的体壁、脂肪体和丝腺组织中高量表达, 在其它组织中表达不明显或基

```

AAGAAGCAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGG
TGCCGCGCGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCCGGATCC
MTG TCA ATT TTG CCA TAC GTG TAC GAT TTG GAG AGA CCA TTT CGT
      P1
M S I L P T V T A L G A P P A
CTG ATG GAT CGA GAA CTC TTC GGC CCG CAG GAT TTC TAC AGG ATG
L M A A G L P G P G A P T A M
TCG CCT TTC AAC CAA TCG ATG CAT CGT GAC CGC TAC AGA ATG TCT
S P P A G S M H A A A T A M S
CCG TAC AAT CAA TTT CGC GAC GTC TTT GAA CCG CAG TTT TAC AGA
P T A G P A A V P G P G P T A
CCC TCG GAA AAT ACT TTG CGA CAA ATA GAA AAC GTA ATG AAA CCG
P T G A T L A G I G A V M L P
ATC GAG CAG CTG ACT TCG GCG ATG AAT CAA ATG GCG CTT CAG GAG
I G G L T S A M A G M A L G G
ATG GGC TCT AAA ATC ACA TCC AAC GAC GAG AAG TTT CAG GTC AAT
M G S L I T S A A G L P G V A
ATC GAC GTA CAA CAT TTT TCA CCG GAT GAA ATA AAT GTG AAG GTA
I A V G H P S P A G I A V L V
GTC GAC GGA CAC GTC GTG GTG GAA GGG AAA CAC GAG GAG AAG CAG
V A G H V V V V G G L H G G L G
GAT CAG CAC GGG TAT GTG TCG AGA CAG TTC ATC AGA CGA TAC GCG
A G H G T V S A G P I A A T A
CTA CCA CAA GGC TGT TTA CCA GAC ACG GTG GAA TCG AAG CTC TCT
L P G G C L P A T V G S L L S
TCT GAC GGT GTC CTG ACG GTC ACT GCA CCT AAG GTG CTA GCC TTA
S A G V L T V T A P L V L A L
CCT TCG ACT GGT GAA AAG ATT GTT CCA ATA ACA CAT ACT CCT CCT
P S T G G L I V P I T H T G P
GTG ATG AAG AAG GTC GGA TCT CAG GAG CCT TCA GCT GTC ACT GTG TAC
      P2
V M L L V G S G G P S A V T V *
AAGCTTGCGGCCACTCGAGCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAACAA
AGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCC
TTGGGCCTCTAAACGGGCTTTGACGGGTTTTTTCTGAAAAGGAGGAACATA

```

图中 P1、P2 处表示上游引物和下游引物位置, 星号表示终止密码子  
The P1, P2 position represented the upward primer and downward primer, respectively, stop codon was indicated by asterisk

图 2 家蚕 *Bmhs*p24.3 的克隆序列及推导的氨基酸序列

Fig. 2 The nucleotide sequence by *in silico* cloning and deduced amino acid sequences of *Bmhs*p24.3 in silkworm

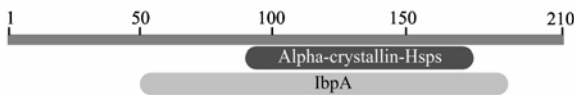


图 3 rBmHSP24.3 蛋白功能结构域

Fig. 3 The CD-dromain of rBmHSP24.3

本不表达。其中, 该基因在雌、雄脂肪体内的表达差异显著(图 4)。

2.3 *Bmhs*p24.3 在热刺激条件下的表达分析

利用半定量 RT-PCR 技术, 对 *Bmhs*p24.3 在正常情况下和热刺激条件下家蚕 5 龄幼虫不同发育时期(1~6 d) 后部丝腺中的表达状况进行检测, 结果表

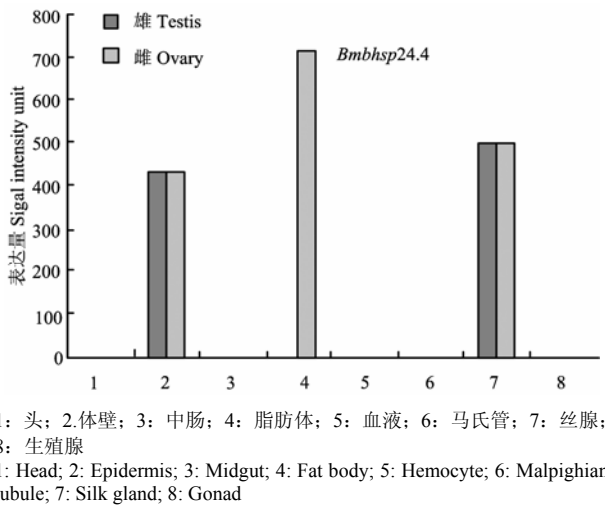
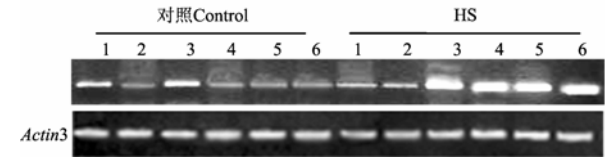


图 4 *Bmhsp24.3* 基因组织表达情况

Fig. 4 The expression of *Bmhsp24.3* in larval tissues

明，在正常条件下，*Bmhsp24.3* 在 5 龄幼虫后部丝腺的整个发育期都有表达，其中以 5 龄第 1 天和 5 龄第 3 天的表达量较高。在热刺激条件下，*Bmhsp24.3* 的表达量增加，以 5 龄第 3~6 天的表达量增加尤为显

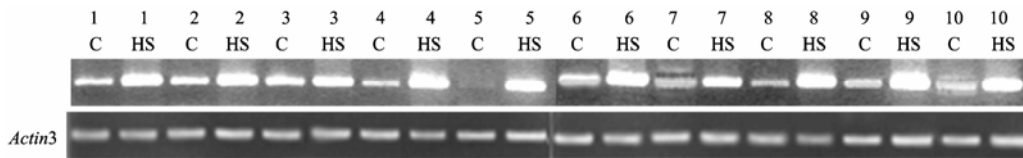
著 (图 5)。笔者进一步对 10 个不同家蚕品种 5 龄第 3 天幼虫丝腺组织中该基因在正常及热刺激条件下的表达情况进行了检测，结果表明，在正常条件下，*Bmhsp24.3* 表达量在不同品种间存在差异，但在热刺激后，表达量均剧增，在品种间的差异不明显 (图 6)。



1~6 泳道所用样品分别为 5 龄幼虫发育第 1 天至第 6 天的后部丝腺组织。Control: 常规饲养家蚕取其后部丝腺组织作对照; HS: 分别将大造 5 龄 1~6 天蚕于 45℃ 热刺激 35 min, 然后于 24℃ 饲养 2 h, 取其候补丝腺组织  
The 1 to 6 lanes' samples were isolated from 1 to 6 day of 5th instar larvae's posterior division silk gland after non-heat and heat-shock treatment. Control: Controls bred at 24°C; HS: Heat shock treated with 45°C for 35min, and kept at 24°C for 3h

图 5 家蚕大造品种 5 龄幼虫后部丝腺 *Bmhsp24.3* 的表达

Fig. 5 Detection of *Bmhsp24.3* in posterior division silk gland during the 5th instar of larvae with non-heat and heat-shock



1~10 依次代表家蚕品种 09-210、12-265、17-171、06-051、18-081(+), 02-230、18-125、18-021、19-440、06-040; HS: 将家蚕 5 龄第 3 天幼虫于 45℃, 热刺激 35min, 然后于 24℃ 饲养 2h, 取其候补丝腺组织; C: 常规饲养家蚕取其后部丝腺组织作对照  
1 to 10 were the *B. mori* varieties of 09-210, 12-265, 17-171, 06-051, 18-081(+), 02-230, 18-125, 18-021, 19-440 and 06-040 in turn; HS: We bred 3 day 5th instar larvae with 45°C for 35min, then kept at 24°C for 3h, then extracted their posterior division silk gland; C: Bred 3 day 5th instar larvae at 24°C and extracted their posterior division silk gland as controls

图 6 不同家蚕品种 5 龄第 3 天后部丝腺的表达情况

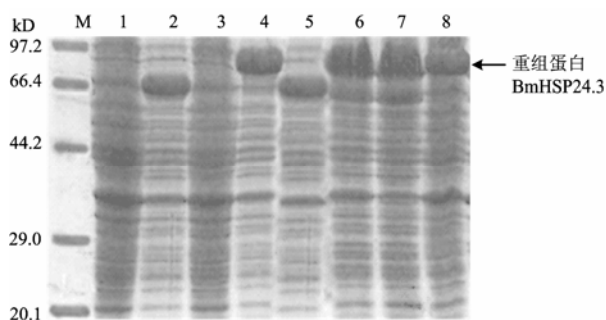
Fig. 6 Amount of *Bmhsp24.3* expression in posterior division silk gland in different varieties during 3 day of the 5th instar of *B. mori* larvae with non-heat and heat-shock

2.4 *Bmhsp24.3* 的原核表达及 Western Blot 检测

使用 1 mmol·L<sup>-1</sup> 浓度的 IPTG 的对构建的表达重组质粒 pET-50b-Bmhsp24.3 进行诱导 (诱导时间为 6 h), 然后对表达产物进行 SDS-PAGE 分析 (图 7), 结果发现, 同空白对照相比较, 在 80 kD 处有一条浓亮的目的条带 (如图 7 泳道 4 所示), 与该重组蛋白的预测大小基本一致。结果表明, 该蛋白主要以包涵体的形式存在。为了获得可溶性的重组蛋白, 笔者进行了表达条件的优化, 对培养条件进行优化的过程中

发现, 重组质粒在生长阶段温度为 18℃, IPTG 终浓度为 0.25 mmol·L<sup>-1</sup>、长时间诱导的条件下, 得到大量可溶性蛋白组分, 有利于进行重组蛋白功能的研究 (如图 7 泳道 7 所示)。

进一步对获得的重组蛋白 rBmHSP24.3 进行了 Western blot 检测, 使用内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 作为空白对照。结果表明, 该重组蛋白可与 T7·tag 单克隆抗体特异性结合形成了一条比较明显的条带, 说明获得的重组蛋白 rBmHSP24.3 是目的



箭头表示重组蛋白 rBmHSP24.3; M: 蛋白质分子量标准; 1: 空载体转未诱导的产物; 2: 空载体诱导的产物; 3: pET-50b-Bmhsp24.3 未诱导的产物; 4: 诱导表达总蛋白; 5: 空载体诱导的产物可溶组分; 6、7: 诱导表达蛋白的可溶组分; 8: 诱导表达蛋白的不溶组分

The arrow indicated the recombinant protein rBmHSP24.3; M: protein marker; 1: The pET-50b vector, non-induced; 2: The pET-50b vector, induced; 3: The recombinant plasmid pET-50b-Bmhsp24.3, non-induced; 4: TCP of the recombinant protein rBmHSP24.3; 5: The dissolve part of vector protein; 6 and 7: The dissolve part of the recombinant protein pET-50b-Bmhsp24.3; 8: The non-dissolve part of the recombinant protein pET-50b-Bmhsp24.3

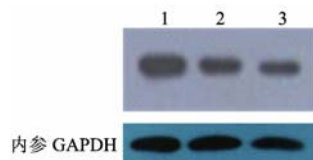
图7 重组表达质粒 pET-50b-Bmhsp24.3 在 *E. coli* BL21 (DE3) 中表达的 SDS-PAGE

Fig. 7 Recombinant protein pET-50b-Bmhsp24.3 produced by BL21 (DE3) cells analyzed by SDS-PAGE

蛋白 (图 8)。

### 2.5 BmHSP24.3 重组蛋白的功能鉴定

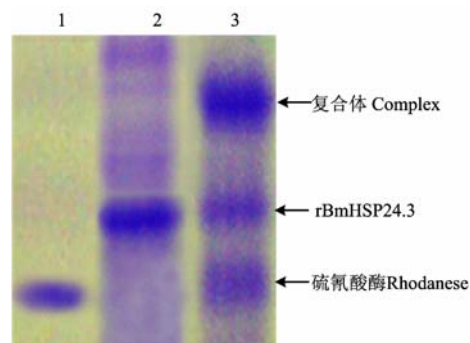
为了分析重组蛋白 rBmHSP24.3 与底物结合的稳定性, 按 1:1 的比例混合重组蛋白质和硫氰酸酶, 在 44°C 培养混合物 30 min, 然后用 Native-PAGE 电泳检测高温混合物的蛋白组分。电泳结果表明重组蛋白 rBmHSP24.3 与硫氰酸酶在高温条件下可形成稳定的复合物, 另外也检测到重组蛋白和硫氰酸酶单体的存在 (图 9)。为了确定复合体的蛋白组分, 进一步对该复合体进行了 SDS-PAGE 电泳检测。结果表明, 该复合体是由重组蛋白 rBmHSP24.3 和硫氰酸酶组成 (图 10)。两个试验结果都表明重组蛋白 rBmHSP24.3



1: 细胞总蛋白; 2: 细胞总蛋白的可溶组分; 3: 细胞总蛋白的不溶组分  
1: Total cell protein; 2: The dissolve part of total cell protein; 3: The non-dissolve part of total cell protein

图8 重组蛋白 rBmHSP24.3 的 Western blot 分析

Fig. 8 Western blot analysis of recombinant protein rBmHSP24.3

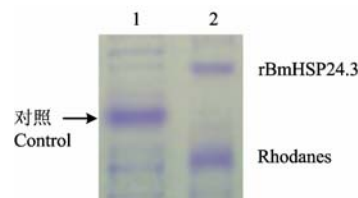


1: 硫氰酸酶 (Rhodanese); 2: 重组蛋白 rBmHSP24.3; 3: 重组蛋白与硫氰酸酶

1: Rhodanese; 2: rBmHSP24.3; 3: rBmHSP24.3 and Rhodanese

图9 Native-PAGE 电泳检测重组蛋白 rBmHSP24.3 与硫氰酸酶的结合实验

Fig. 9 Native-PAGE of complexes of recombinant protein rBmHSP24.3 and Rhodanese



1: 重组蛋白 rBmHSP24.3 与硫氰酸酶的复合物; 2: 对照 (空载体表达蛋白的可溶组分, 约 50 kD)

1: The complex of rBmHSP24.3 and Rhodanese; 2: Control (the dissolve part of vector protein, about 50 kD)

图10 SDS-PAGE 电泳检测重组蛋白 rBmHSP24.3 与硫氰酸酶复合物

Fig. 10 Complexes of recombinant protein rBmHSP24.3 and Rhodanese analyzed by SDS-PAGE

具有分子伴侣的特性, 能在高温条件下使底物蛋白质免受不可逆的聚集。

## 3 讨论

目前的研究结果表明重组蛋白 rBmHSP24.3 具有分子伴侣的特征, 将 *Bmhsp24.3* 的整个编码区克隆到表达载体上并在大肠杆菌中过量表达, 通过蛋白质印迹反应, 表达蛋白能与抗体发生特异反应, 该重组蛋白与果蝇的 1(2) *efl* (CG4533-PA) 蛋白质最为相似 (identities = 40%)。重组蛋白 rBmHSP24.3 表现出分子伴侣的特征是由于它有能力抑制高温诱导的硫氰酸酶变性, 使硫氰酸酶保持正确的折叠形式, 在逆境消

失后, 重组蛋白 rBmHSP24.3 能将硫氰酸酶释放出来, 说明重组蛋白 rBmHSP24.3 与底物蛋白之间发生了可逆性的结合反应。

家蚕组织芯片数据<sup>[20]</sup>分析结果, *Bmhsp24.3* 基因在家蚕体壁, 脂肪体以及丝腺组织中有表达, 其中只在雌性的脂肪体中高表达。推测该基因对蚕体能量的储存和雌性生殖生长方面的生命活动起到某种作用。

*Bmhsp24.3* 基因在丝腺组织中的基本表达量及应激表达量各不相同, 推测该基因在保护细胞与组织抵御外界环境刺激起着重要作用。

sHSP 蛋白质家族的聚集状态以及折叠方式还不清楚, 一般情况下重组蛋白以聚集的形式表达, 直接影响功能的鉴定。一些研究报道, 推测 sHSP 家族的聚集状态、与底物结合的方式以及自身的多聚化程度与该蛋白质家族本身的功能结构域有关(功能结构域包括  $\alpha$ -晶体结构、一段较长的 N-端可变区和一段较短的 C-末端区域), 还可能与本身的 C-末端延伸区有关, C-末端延伸区与稳定 sHSP 单体性和自身以及与底物蛋白的可溶性有关<sup>[23]</sup>。正如试验所遇到的体外表达 rBmHSP24.3 以包涵体的形式存在, 不利于蛋白功能的研究。然而在许多应用中需要目的蛋白以可溶及活性形式存在。在通常情况下, 降低蛋白合成速率, 如降低诱导培养温度、延长诱导时间、降低诱导剂的浓度等等, 都会使目的蛋白的可溶性增加。为了得到可溶性重组蛋白质, 笔者对表达条件进行了优化, 通过选择不同的表达载体、调节质粒的生长温度、诱导因子的浓度以及诱导的时间等诸多影响因素, 发现重组质粒在生长阶段温度为 18℃, IPTG 终浓度为 0.25 mmol·L<sup>-1</sup>、长时间(过夜)诱导的条件下, 得到大量可溶性蛋白组分。与此同时, 在研究重组蛋白 rBmHSP24.3 功能时, 发现该蛋白以单聚体的形式存在, 推测该重组蛋白末端可能具有某些特殊的结构域, 其 C-末端和  $\alpha$ -晶体结构的组成情况需要进一步的研究。

sHSP 在行使功能时是否需要三磷酸腺苷(ATP)的辅助作用一直是一个争议<sup>[24-25]</sup>, 通常认为 sHSP 在行使功能时不需要 ATP 辅助作用<sup>[26-27]</sup>。有研究报道, 某些 sHSP[如 GroEL (36) 和 BiP (40)]在额外加入 ATP 时其功能并未增强<sup>[28]</sup>, 在 ATP 存在时, 蛋白质会与腺嘌呤核苷酸结合, 导致蛋白质类型发生变化, 从而削弱蛋白质与底物蛋白的交互作用<sup>[28-29]</sup>, 与此同时, 有人认为 ATP 水解作用能够诱导蛋白质构象发生变化<sup>[28]</sup>, 增强它们作用潜力。在这里, 笔者通过试验推理得到重组蛋白 rBmHSP24.3 行使功能不需要 ATP 的

辅助作用, 在没有 ATP 作用下, 该蛋白能正常行使它的功能。总的来说, 可能有些特殊功能的晶体蛋白需 ATP 的辅助作用, 如眼睛中的晶体蛋白, ATP 浓度能影响晶体蛋白的活性<sup>[24]</sup>, 受 ATP 诱导的晶体蛋白, 能够正确地行使其最佳生理功能。

## 4 结论

首次克隆得到家蚕 *hsp24.3* 基因, 分析了该基因的组织表达特性, 并对其重组表达蛋白质 rBmHSP24.3 的功能进行了初步的研究, 初步鉴定出这个基因所编码的蛋白质具有分子伴侣的特征, 有助于了解这类蛋白质家族在蚕体内的生物学功能。

## References

- [1] Baek S H, Min J N, Park E M, Han M Y, Lee Y S, Lee Y J, Park Y M. Role of small heat shock protein HSP25 in radio resistance and glutathione-redox cycle. *Cell Physiology*, 2000, 183: 100-107.
- [2] Treweek T M, Lindner R A, Mariani M, Carver J A. The small heat-shock chaperone protein, alpha-crystallin, does not recognize stable molten globule states of cytosolic proteins. *Biochimica Biophysica Acta*, 2000, 1481: 175-188.
- [3] Mazurov V V, Solovieva M E, Leshchenko V V, Kruglov A G, Edelweiss E F, Yakubovskaya R I, Akatov V. Small heat shock protein hsp27 as a possible mediator of intercellular adhesion-induced drug resistance in human larynx carcinoma HEp-2 cells. *Bioscience Reports*, 2003, 23: 187-197.
- [4] 候瑞贤, 张兴国, 毕喜红, 郭素英, 孙涌栋, 苏承刚. 热激因子结合蛋白(HSBP)研究进展. *西南园艺*, 2005, 33: 89-91.  
Hou R X, Zhang X G, Bi X H, Guo S Y, Sun Y D, Su C G. Progress in heat shock factor-binding proteins(HSBP1). *Southwest Horticulture*, 2005, 33: 89-91. (in Chinese)
- [5] 陈亚琼, 肖调江, 周浙昆. 热激蛋白与生物环境适应及进化的关系. *自然科学进展*. 2006, 16(9): 1066-1073.  
Chen Y Q, Xiao D J, Zhou Z K. The biological adaptation and evolution of heat shock protein. *Progress in Natural Science*, 2006, 16(9): 1066-1073. (in Chinese)
- [6] Haslbeck M, Braun N, Stromer T, Richter B, Model N, Weinkauff S, Buchner J. Hsp42 is the general small heat shock protein in the cytosol of *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 2004, 23(3): 638-649.
- [7] Jeremic A, Kelly M, Cho S J, Stromer M H, Jena B P. Reconstituted fusion pore. *Biophysica Journal*, 2003, 85(3): 2035-43.
- [8] Basha E, Lee G J, Demeler B, Vierling E. Chaperone activity of

- cytosolic small heat shock proteins from wheat. *European Journal of Biochemistry*, 2004, 271(8): 1426-1436.
- [9] Yahara I. The role of HSP90 in evolution. *Genes to Cells*, 1999, 4: 375-379.
- [10] Pratt B W. The role of the hsp90-based chaperone system in signal transduction by nuclear receptors and receptors signaling via MAP kinase. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 1997, 13(37): 297-326.
- [11] 黄惠芳, 马 飞. 热激蛋白分子进化研究. 厦门大学学报(自然科学版), 2004, 43(Suppl.): 166-170.  
Huang H F, Ma F. The molecular evolution of heat shock protein. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2004, 43(Suppl.): 166-170. (in Chinese)
- [12] 王海鸿, 雷仲仁. 昆虫热休克蛋白的研究进展. 中国农业科学, 2005, 38(10): 2023-2034.  
Wang H H, Lei Z R. Current developments of heat shock proteins in insect. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38(10): 2023-2034. (in Chinese)
- [13] 李 斌. 家蚕分子连锁图谱的构建和低分子量热激蛋白基因的克隆与特异表达[D]. 重庆: 西南农业大学博士学位论文, 2001.  
Li B. Construction of the molecular linkage map and isolation, identification and particular expression of small heat-shock genes in silkworm, *Bombyx mori*. Chongqing: Doctor's Degree Paper of Southwest Agricultural University, 2001. (in Chinese)
- [14] 孙卫忠, 李 斌, 王彦文, 柴春利, 刘彬斌, 鲁 成, 向仲怀. 家蚕 Bmhs20.8A 基因体外表达及荧光原位杂交研究. 蚕业科学, 2007, 33: 14-19.  
Sun W Z, Li B, Wang Y W, Chai C L, Liu B B, Lu C, Xiang Z H. *In vitro* expression and fluorescence in-situ hybridization of the HSP20.8 gene of *Bombyx mori*. *Science of Sericulture*, 2007, 33: 14-19. (in Chinese)
- [15] Sakano D, Li B, Xia Q Y, Yamamoto K, Hiroshi F J. Genes encoding small heat shock protein of the silkworm, *Bombyx mori*. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*, 2006, 70: 60176-1-8.
- [16] 李 斌, 夏庆友, 藤井博, 伴野丰, 鲁 成. 低分子量热激蛋白 Bmhs19.9 基因的表达. 农业生物技术学报, 2005, 13(2): 195-201.  
Li B, Xia Q Y, Hiroshi F, Yutaka B, Lu C. Expression of the small heat-shock protein *Bmhs19.9* gene in silkworm(*Bombyx mori*). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2005, 13(2): 195-201. (in Chinese)
- [17] 李 斌, 夏庆友, 藤井博, 伴野丰, 鲁 成. 低分子量热激蛋白的进化研究. 蚕业科学, 2004, 30(3): 260-266.  
Li B, Xia Q Y, Hiroshi F, Yutaka B, Lu C. Phylogenesis and Evolution of the small heat-shock proteins. *Science of Sericulture*, 2004, 30(3): 260-266. (in Chinese)
- [18] Xia Q, Zhou Z, Lu C. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science*, 2004, 306(5703): 1937-1940.
- [19] Altschul S F, Madden T L, Schaffer A A, Zhang J H, Zhang Z, Miller W, Lipman D J. Gapped blast and psi-blast: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25: 3389-3402.
- [20] Xia Q Y, Cheng D J, Duan J, Wang G H, Cheng T C, Zha X F, Liu C, Zhao P, Dai F Y, Zhang Z, He N J, Zhang L, Xiang Z H. Microarray-based gene expression profiles in multiple tissues of the domesticated silkworm, *Bombyx mori*. *Genome Biology*, 2007, 8: R162 (doi: 10.1186/gb-2007-8-8-r162).
- [21] 奥斯博, 步伦特, 金斯顿. 精编分子生物学实验指南. 北京: 中国科学出版社, 1998.  
Ausubel F M, Blunt A, Vardinon N, Kaplan G. *Current Protocols in Molecular Biology*. Beijing: China Science Press, 1998. (in Chinese)
- [22] Davis G E, Manthorpe M, Engvall E, Varon S. Isolation and characterization of rat schwannoma neurite-promoting factor: evidence that the factor contains laminin. *Journal of Neuroscience*, 1985, 5(10): 2662-71.
- [23] Chang Y, Li X M, Rao Z H. A preliminary study on functional domains of small heat shock protein HSP16.3. *Progress in Natural Science*, 2004, 14(1): 21-25.
- [24] Muchowski P J, Clark J I. ATP-enhanced molecular chaperone functions of the small heat shock protein human alphaB crystallin. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*, 1998, 95(3): 1004-1009.
- [25] Biswas A, Das KP. Role of ATP on the interaction of alpha-crystallin with its substrates and its implications for the molecular chaperone function. *Journal Biological Chemistry*, 2004, 279(41): 42648-42657.
- [26] Haslbeck M. sHsps and their role in the chaperone network. *Cell Molecular Life Sciences*, 2002, 59(10): 1649-1657.
- [27] Horwitz J. Alpha-crystallin. *Experimental Eye Research*, 2003, 76(2): 145-53.
- [28] Rawat U, Rao M. Interactions of chaperone alpha-crystallin with the molten globule state of xylose reductase. Implications for reconstitution of the active enzyme. *Journal Biological Chemistry*, 1998, 273(16): 9415-9423.
- [29] Veinger L, Diamant S, Buchner J, Goloubinoff P. The small heat-shock protein IbpB from *Escherichia coli* stabilizes stress-denatured proteins for subsequent refolding by a multichaperone network. *Journal Biological Chemistry*, 1998, 273(18): 11032-11037.

(责任编辑 毕京翠)