

肖圣燕, 李镇刚, 冉瑞法, 等. 家蚕微孢子虫 SWP25 基因 BmN 细胞表达质粒的构建及表达[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(5): 1023-1028.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.05.011

家蚕微孢子虫 SWP25 基因 BmN 细胞表达质粒的构建及表达

肖圣燕¹, 李镇刚¹, 冉瑞法¹, 黄平¹, 朱峰¹, 沈中元^{2,3}

(1. 云南省农业科学院蚕桑蜜蜂研究所, 云南 蒙自 661101; 2. 江苏科技大学, 江苏 镇江 212003; 3. 中国农业科学院蚕业研究所, 江苏 镇江 212018)

摘要: 本研究旨在构建含家蚕微孢子虫孢壁蛋白基因 SWP25 的家蚕卵巢细胞 (BmN) 表达质粒, 检测该基因在宿主细胞中的表达, 为在细胞水平筛选与家蚕微孢子虫孢壁蛋白 SWP25 相互作用的宿主蛋白奠定基础。利用家蚕核型多角体病毒 Bac-to-Bac 表达系统, 将家蚕微孢子虫孢壁蛋白基因 SWP25 和报告基因 EGFP 克隆到杆状病毒转移载体 pFastBac1 中, 转化 BmDH10Bac 感受态细胞并筛选阳性重组质粒用于转染 BmN 细胞。经 PCR 技术鉴定, 成功获得重组杆状病毒质粒 vBm^{EGFP-SWP25}。在转染成功的细胞中可观测到绿色荧光信号。使用 Western blot 方法在感染重组病毒的家蚕 BmN 细胞中检测到大小约 55 000 的重组蛋白条带, 与理论值一致, 表明家蚕微孢子虫孢壁蛋白基因 SWP25 在 BmN 中成功表达。

关键词: 家蚕微孢子虫; 孢壁蛋白 SWP25 基因; Bac-to-Bac 表达系统; 重组质粒; 转染; 融合蛋白表达

中图分类号: S884.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)05-1023-06

Construction of the eukaryotic expression plasmid containing SWP25 gene of *Nosema bombycis* and its expression in silkworm BmN cell

XIAO Sheng-yan¹, LI Zhen-gang¹, RAN Rui-fa¹, HUANG Ping¹, ZHU Feng¹, SHEN Zhong-yuan^{2,3}

(1. Institute of Sericulture and Apiculture, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Mengzi 661101, China; 2. Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212003, China; 3. The Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China)

Abstract: This study aims to construct the eukaryotic expression plasmid containing SWP25 gene of *Nosema bombycis* and detect its expression in host cells (BmN) for further researches on screening host protein interacting with SWP25. The SWP25 and EGFP genes were inserted into the baculovirus transfer vector pFastBac1 to convert BmDH10Bac cells and to screen positive recombinant plasmid for transfecting BmN cells. Successful achievement of the recombinant vBm^{EGFP-SWP25} bacmid was identified by PCR technique. A fluorescence signal was observed in the transfected BmN cells. Western-blot analysis revealed a protein band of approximately 55 000 in vBm^{EGFP-SWP25} transfected BmN cells, which was consistent with the deduced molecular weight of the egfp-SWP25 fusion protein. It was concluded that SWP25 had been successfully expressed in BmN cells.

Key words: *Nosema bombycis*; spore wall protein; Bac-to-Bac baculovirus expression system; recombinant plasmid; transfection; expression of fusion protein

收稿日期: 2016-02-15

基金项目: 云南省农业科学院蚕桑蜜蜂研究所青年创新基金项目 (QC2015001)

作者简介: 肖圣燕 (1989-), 女, 山东泰安人, 硕士, 研究实习员, 主要从事桑树资源与育种研究。 (Tel) 15187388921; (E-mail) shengyanxiao1989@163.com

通讯作者: 沈中元, (Tel) 0511-85616665; (E-mail) szysri@163.com

微孢子虫 (Microsporidia) 是一类细胞内寄生的真核微生物, 分布范围十分广泛, 包括人在内的几乎所有动物都可能被微孢子虫寄生^[1-2]。自 1857 年法

国学者 Nägeli 首次在鳞翅目昆虫家蚕体内发现家蚕微孢子虫 (*Nosema bombycis*) 至今, 被发现的微孢子虫约有 160 个属, 超过 1 400 种^[3-4]。家蚕微孢子虫是引起家蚕微孢子病的主要病原体, 可以通过胚胎垂直传播, 是家蚕唯一的法定检疫对象。成熟孢子是微孢子虫唯一可以在细胞外存活的形式, 其外有厚厚的孢子壁。微孢子虫的孢子壁主要由富含几丁质的孢子内壁和以蛋白质为主的孢子外壁组成^[5]。坚硬的孢子壁不但可以抵抗各种外界压力, 而且在维持微孢子虫孢内渗透压的平衡中也起着重要作用^[6-8]。孢壁蛋白是微孢子虫孢子壁的主要成分, 在微孢子虫的侵染和孢子黏附的过程中扮演着重要的角色^[5,9]。

迄今, 研究人员已报道了 9 种非家蚕微孢子虫的孢壁蛋白, 包括肠脑炎微孢子虫 (*Encephalitozoon intestinalis*) 孢壁蛋白 SWP1、SWP2 和 EiEnP1^[9-10], 兔脑炎微孢子虫 (*Encephalitozoon cuniculi*) 孢壁蛋白 SWP1、EcEnP1、EcEnP2 和 EcCDA^[11-13], 海伦脑炎微孢子虫 (*Encephalitozoon hellem*) 孢壁蛋白 EhSWP1a 和 EhSWP1b^[14]。其中成熟的孢子外壁蛋白 5 种, 内壁蛋白 2 种, 质膜蛋白 1 种, 而孢壁蛋白 EiEnP1 在孢子内壁外壁以及极膜层均有分布。虽然关于家蚕微孢子虫孢壁蛋白的研究起步较早, 但其研究很长时间停留在对初期的孢壁蛋白组分的分析等方面。直到 2008 年, Wu 等^[15]利用蛋白质组学方法以及基质辅助激光解析串联飞行时间质谱技术 (MALDI-TOF MS) 和液相色谱-质谱联用技术/质谱技术 (LC-MS/MS), 共获得了 14 种假定的家蚕微孢子虫孢壁蛋白或肽段。随后, 鉴定出 5 种孢壁蛋白, 包括 3 种外壁蛋白 (SWP5、SWP26、SWP32) 和 2 种内壁蛋白 (SWP25、SWP30)^[16-17]。

内壁蛋白 SWP25 位于家蚕微孢子虫孢子壁的内壁, 含有 20 个氨基酸的信号肽以及能够参与孢子黏附的肝素结合基序 (Heparin binding motif, HBM), 推测 HBMs 存在于孢子内壁区域。在孢子黏附和宿主感染试验中, 外源的孢壁蛋白 SWP25 对孢子黏附的抑制作用并不明显, 推测 SWP25 可能不是主要的孢子黏附因子或者细胞表面的黏附配体。然而, 由于 SWP25 具有肝素结合基序结构, 这或许使它可以通过该结构与孢子内壁的几丁质多糖相互作用^[18]。本研究拟利用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统^[19]在家蚕细胞中表达 SWP25, 融合增强型绿色

荧光蛋白, 为在宿主细胞水平筛选与 SWP25 存在相互作用的家蚕蛋白奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料和主要试剂

家蚕微孢子虫 (镇江株) 由中国农业科学院蚕业研究所家蚕生理与病理研究室保存, 家蚕卵巢细胞系 BmN 由农业部蚕桑遗传与改良重点开放实验室传代培养与保存, 杆状病毒表达系统 Bac-to-Bac 由浙江大学张传溪教授惠赠, pBI-EGFP 载体由福建农林大学张冲博士惠赠。

Gibco[®] 胎牛血清 (FBS) 与 DNA 转染试剂 Cellfectin[®] II Reagent 购自 Invitrogen 公司, 弱性细胞裂解液和 Western blot 所用抗体 (一抗为 GFP-tag 抗体, 二抗为 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG) 购自碧云天生物技术有限公司, HRP-DAB 显色试剂盒购自博凌科为生物科技有限公司, *rTaq* 酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA marker、PMD-18T 试剂盒等分子生物学操作试剂购自宝生物工程有限公司。测序工作由生工生物工程股份有限公司完成。

1.2 DNA 的制备及基因克隆

家蚕微孢子虫基因组的提取参考 Dong 等的方法^[5]。根据 GeneBank 上登录的 SWP25 基因序列 (登录号: EF683102.1) 设计引物。SWP25-F: 5'-CGGAATTCAAGAACCCTTTCTGTATTTCG-3' (下划线为 *Eco* R I 酶切位点, CG 为保护性碱基), SWP25-R: 5'-GCAAGCTTTTATTTCATAACATCTAAC-3' (下划线为 *Hind* III 酶切位点, GC 为保护性碱基)。根据增强型绿色荧光蛋白 EGFP 基因序列设计片段表达引物。EGFP-F: 5'-CAGGATCCATGGTGAGCAAGG-3' (下划线为 *Bam* H I 酶切位点, CA 为保护性碱基), EGFP-R: 5'-CGGAATTCCTTGTACAGCTCGT-3' (下划线为 *Eco* R I 酶切位点, CG 为保护性碱基)。以提取的家蚕微孢子虫基因组 DNA 为模板, 用引物 SWP25-F 和 SWP25-R 扩增家蚕微孢子虫孢壁蛋白基因 SWP25 (不含信号肽序列)。以含有 EGFP 基因的质粒载体 (pBI-EGFP) 为模板, 用引物 EGFP-F 和 EGFP-R 扩增得到 EGFP 基因。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后切胶、纯化、回收, 并克隆到 pMD18-T 质粒上, 分别获得 pMD18-T-SWP25 质粒和 pMD18-T-EGFP 质粒, 测序验证其序列的正确性。

1.3 重组家蚕杆状病毒质粒的构建

同时用 *Bam* H I/*Eco* R I 双酶切 pMD18-T-*EGFP* 和 pFastBac1, 将目的基因 *EGFP* 克隆到 pFastBac1 上, 即得到质粒 pFastBac1-*EGFP*。随后同时用 *Eco* R I/*Hind* III 双酶切 pMD18-T-SWP25 及 pFastBac1-*EGFP*, 将目的基因 *SWP25* 克隆到 pFastBac1-*EGFP* 中, 构建重组转移质粒 pFastBac1-*EGFP*-

SWP25, 构建过程如图 1 所示。

用阳性重组质粒 pFastBac1-*EGFP*-*SWP25* 转化含有重组病毒 Bacmid 的大肠杆菌 BmDH10Bac 感受态细胞, 发生转座作用的 Bacmid 由于 *LacZ* 基因被插入而失活, 使得带有重组病毒 Bacmid 的菌落生长为白色, 挑选正确的白色菌落培养, 用碱法抽提重组病毒 DNA, 并用 M13F/M13R 通用引物进行 PCR 扩

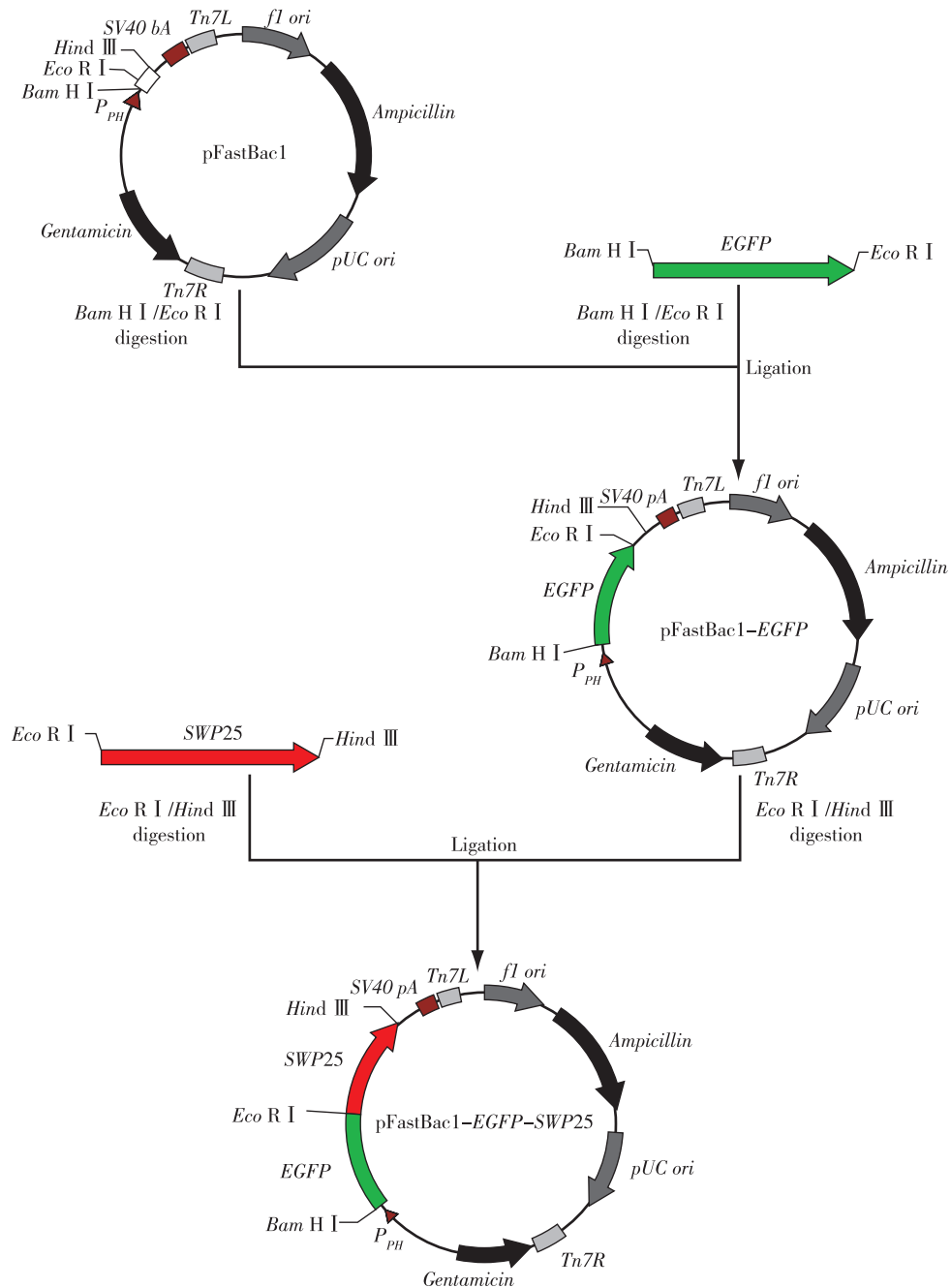


图 1 重组转移质粒 pFastBac1-EGFP-SWP25 的构建

Fig.1 Construction of the recombinant transfer plasmid pFastBac1-EGFP-SWP25

增,以确定转座是否成功。pFastBac1-EGFP 质粒转化 BmDHI0Bac 菌株,获得不含目的基因的杆状病毒质粒,作为对照组。最终获得试验组 vBm^{EGFP-SWP25} 与对照组 vBm^{EGFP} 杆状病毒质粒。

1.4 细胞转染及荧光检测

将试验组与对照组的病毒质粒按照 Invitrogen 公司脂质体 (Cellfectin[®] II Reagent) 转染说明书将其转染 BmN 细胞。感染 3~4 d 后在倒置荧光显微镜下观察,收集有绿色荧光的细胞上清液,对 BmN 细胞进行第 2 轮感染。

1.5 SDS-PAGE 及 Western blot 分析

将 BmN 细胞于 6 孔板中经 2 轮感染获得高浓度的病毒,再以高滴度病毒感染 BmN 细胞生产蛋白,2~3 d 后收集细胞,于 4 ℃ 下 13 000 r/min 离心 15 min,取上清液,用质量分数为 12% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 进行分离,转到聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜上,室温封闭 1~2 h,一抗 GFP-tag 抗体和二抗 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 分别以 1:2 000 及 1:25 000 的比例孵育。最终用 HRP-DAB 显色试剂盒显色,分析检测目的蛋白的表达。

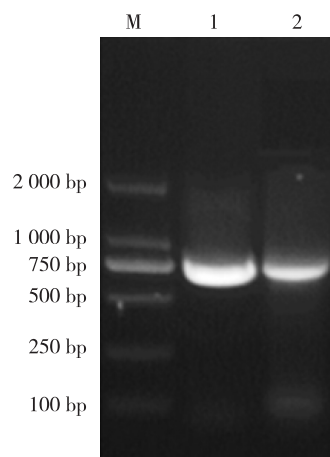
2 结果与分析

2.1 SWP25 及 EGFP 基因的克隆

为了在家蚕培养细胞中表达 SWP25 蛋白,采用常规 PCR 方法,以家蚕微孢子虫 DNA 为模板扩增获得 748 bp 的 SWP25 基因,并以 pBI-EGFP 载体为模板扩增获得 736 bp 的 EGFP 基因(图 2)。

2.2 重组杆状病毒的构建与鉴定

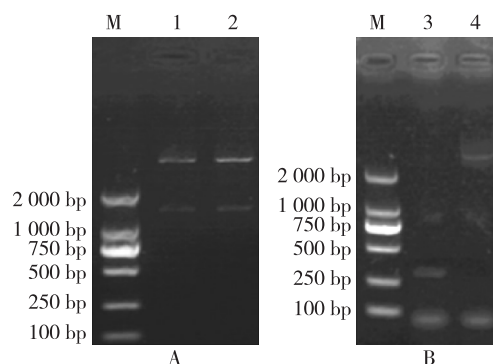
为了构建杆状病毒重组转移载体 pFastBac1-EGFP-SWP25,依次将 EGFP 基因和 SWP25 基因插入到供体质粒 pFastBac1 中,其中 SWP25 位于 EGFP 基因的下流,构建的重组质粒经双酶切后,显示出大小约 1 500 bp 的条带,与理论值相符。证明重组转移载体 pFastBac1-EGFP-SWP25 构建成功(图 3A)。同时,对照组只将 EGFP 基因插入到供体质粒中,构建获得重组转移载体 pFastBac1-EGFP。将上述重组转移载体分别转化 *E. coli* BmDHI0Bac 感受态细胞后,以 M13F/M13R 通用引物经 PCR 扩增鉴定白色菌落。结果在 3 700 bp 左右的地方出现明显条带,而阴性对照(蓝色菌落)在 300 bp 处有一明显条带,表明 EGFP-SWP25 已成功转座到重组的 Bacmid 病毒上(图 3B)。



1:SWP25 基因的 PCR 产物,2:EGFP 基因的 PCR 产物,M:DL2000 marker ladder。

图 2 SWP25 及 EGFP 基因的扩增

Fig.2 Amplification of SWP25 and EGFP



A:重组转移质粒的酶切电泳鉴定,1、2 分别表示 pFastBac1-EGFP-SWP25 由 Bam H I 和 Hind III 双酶切结果;B:重组杆状病毒质粒的 M13F/M13R 的 PCR 鉴定,3:阴性对照组,4:阳性试验组;M:DL2000 marker ladder。

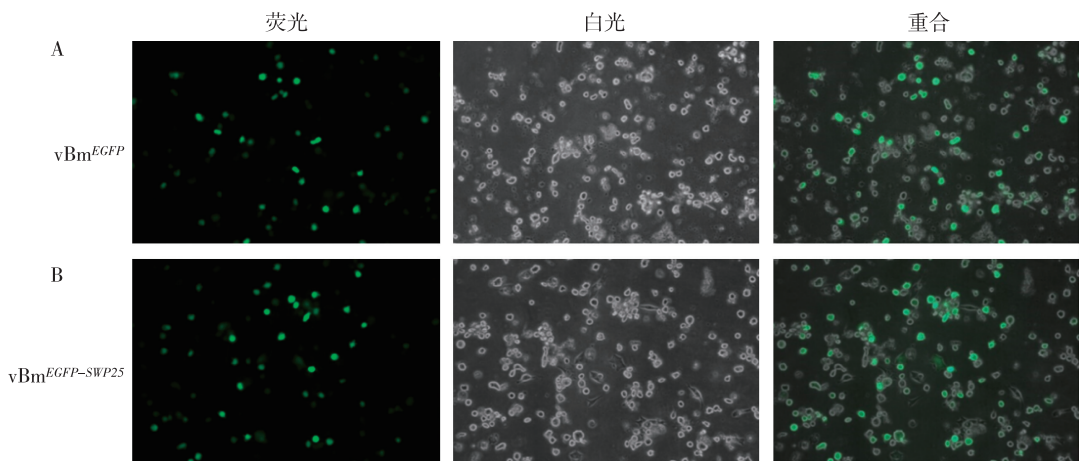
图 3 杆状病毒表达质粒的构建

Fig.3 Construction of the baculovirus expression plasmid

2.3 EGFP-SWP25 融合蛋白在 BmN 细胞中的表达

重组杆状病毒 vBm^{EGFP-SWP25} 和 vBm^{EGFP} 转染家蚕 BmN 细胞,被感染的细胞出现明显病变:细胞核变大,胞内出现不规则的颗粒,细胞逐渐从细胞瓶瓶壁上脱离而漂浮于培养基中。倒置荧光显微镜 IX-71 (×200) 观察后发现,所表达的重组蛋白在细胞内发出明显绿色荧光(图 4)。

采用 SDS-PAGE 和 Western blot 方法对 EGFP-SWP25 融合蛋白以及 EGFP 蛋白的表达情况进行检测,结果显示在感染 vBm^{EGFP-SWP25} 的细胞中检测到

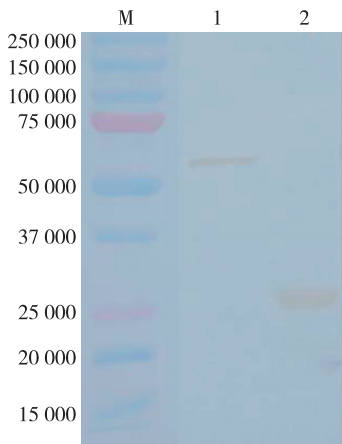


A:家蚕 BmN 细胞转染 vBm^{EGFP};B:家蚕 BmN 细胞转染 vBm^{EGFP-SWP25}。

图 4 融合蛋白在家蚕 BmN 细胞中的表达

Fig.4 Expression of the target protein in BmN cells of silkworm

大小约55 000的清晰蛋白条带,分子质量与预期的相符(图 5)。同时,在感染 vBm^{EGFP} 的细胞中也同样检测到 EGFP 蛋白的表达,分子量大小约为27 000 (图 5)。由此可以判定孢壁蛋白 SWP25 在家蚕 BmN 细胞内已获得成功表达。



M:蛋白分子量标准;1:病毒 vBm^{EGFP-SWP25};2:病毒 vBm^{EGFP}。

图 5 感染杆状病毒的 BmN 细胞中 EGFP-SWP25 重组蛋白与 EGFP 蛋白的 Western blot 分析

Fig.5 Western blot analysis of EGFP-SWP25 fusion protein and EGFP in BmN cells infected with recombinant bacmid baculoviruses

3 讨 论

寄生虫侵入宿主体后,能否到达寄生部位,能否在其体内生存、发育并使宿主发病,主要取决于宿

主和寄生虫之间的相互作用。最近的研究结果表明,在微孢子虫的侵染过程中,孢子激活前先与宿主细胞发生黏附,微孢子虫通过特殊的机制黏附在宿主细胞表面,使其感染的概率更高^[9,20]。孢壁是微孢子虫最先且最直接与宿主细胞接触的部分,孢壁蛋白又是微孢子虫孢壁的主要组成成分,并在微孢子虫孢子与宿主间的相互作用中扮演着重要角色,因此孢壁蛋白是否存在将直接影响孢子的发芽,进而影响微孢子虫对宿主的侵染能力^[21-23]。孢壁蛋白 SWP25 分布在家蚕微孢子虫内壁,可能是一种潜在

的微孢子虫黏附蛋白。由于微孢子虫物种的特殊性,许多功能基因的研究方法,如转基因、基因敲除、RNAi 干涉等至今无法应用于微孢子虫的研究中,以至于孢壁蛋白以及其他重要功能蛋白在侵染过程中的作用机理仍不甚明了。已有研究结果表明微孢子虫孢壁蛋白 SWP26 与家蚕类海龟蛋白相互作用^[24]。本研究利用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统^[25]成功构建了 SWP25 和 EGFP 基因的重组杆状病毒,并在 BmN 细胞系中表达了此重组蛋白。利用微孢子虫天然宿主细胞表达其特定蛋白,不仅可以使要表达的目的蛋白更接近于天然活性,而且也

参考文献:

[1] LI Y, WU Z, PAN G, et al. Identification of a novel spore wall

- protein (SWP26) from microsporidia *Nosema bombycis* [J]. International Journal for Parasitology, 2009, 39(4): 391-398.
- [2] DIDIER E S, SNOWDEN K F, SHADDUCK J A. Biology of microsporidian species infecting mammals [J]. Adv Parasitol, 1998, 40: 283-320.
- [3] CORRADI N, HAAG K L, POMBERT J, et al. Draft genome sequence of the daphnia pathogen octosporea bayeri: insights into the gene content of a large microsporidian genome and a model for host-parasite interactions [J]. Genome Biology, 2009, 10(10): 106.
- [4] WEISS L M. T cell response and persistence of the microsporidia [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2012, 36(3): 748-760.
- [5] FENG Z, SHEN Z, XIAO S, et al. Expression and localization of the spore wall protein SWP26 of *Nosema bombycis* in the silkworm BmN cell line [J]. Agricultural Sciences, 2013, 4(2): 79-84.
- [6] FRIXIONE E, RUIZ L, CERBON J, et al. Germination of *Nosema algerae* (Microsporidia) spores: conditional inhibition by D₂O, ethanol and Hg²⁺ suggests dependence of water influx upon membrane hydration and specific transmembrane pathways [J]. J Eukaryot Microbiol, 1997, 44(2): 109-116.
- [7] SHADDUCK J A, POLLEY M B. Some factors influencing the in vitro infectivity and replication of *Encephalitozoon cuniculi* [J]. J Protozool, 1978, 25(4): 491-496.
- [8] KOUDELA B, KUCEROVA S, HUDCOVIC T. Effect of low and high temperatures on infectivity of *Encephalitozoon cuniculi* spores suspended in water [J]. Folia Parasitol (Praha), 1999, 46(3): 171-174.
- [9] SOUTHERN T R, JOLLY C E, LESTER M E, et al. EnP1, a microsporidian spore wall protein that enables spores to adhere to and infect host cells in vitro [J]. Eukaryotic Cell, 2007, 6(8): 1354-1362.
- [10] HAYMAN J R, HAYES S F, AMON J, et al. Developmental expression of two spore wall proteins during maturation of the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis* [J]. Infect Immun, 2001, 69(11): 7057-7066.
- [11] BOHNE W, FERGUSON D J, KOHLER K, et al. Developmental expression of a tandemly repeated, glycine- and serine-rich spore wall protein in the microsporidian pathogen *Encephalitozoon cuniculi* [J]. Infect Immun, 2000, 68(4): 2268-2275.
- [12] PEUVEL-FANGET I, POLONAI S, BROSSON D, et al. EnP1 and EnP2, two proteins associated with the *Encephalitozoon cuniculi* endospore, the chitin-rich inner layer of the microsporidian spore wall [J]. International Journal for Parasitology, 2006, 36(3): 309-318.
- [13] BROSSON D, KUHN L, PRENSIER G, et al. The putative chitin deacetylase of *Encephalitozoon cuniculi*: a surface protein implicated in microsporidian spore-wall formation [J]. FEMS Microbiol Lett, 2005, 247(1): 81-90.
- [14] POLONAI S, MAZET M, WAWRZYNIAK I, et al. The human microsporidian *Encephalitozoon hellem* synthesizes two spore wall polymorphic proteins useful for epidemiological studies [J]. Infection and Immunity, 2010, 78(5): 2221-2230.
- [15] WU Z, LI Y, PAN G, et al. Proteomic analysis of spore wall proteins and identification of two spore wall proteins from *Nosema bombycis* (Microsporidia) [J]. Proteomics, 2008, 8(12): 2447-2461.
- [16] 潘国庆, 谭小辉, 党晓群, 等. 家蚕微孢子虫孢壁蛋白 SWP25、SWP30、SWP32 的表达谱分析 [J]. 蚕业科学, 2009(2): 328-332.
- [17] 李治. 家蚕微孢子虫 (*Nosema bombycis*) 孢壁蛋白 SWP5 的研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2012.
- [18] WU Z, LI Y, PAN G, et al. SWP25, a novel protein associated with the *Nosema bombycis* endospore [J]. Journal of Eukaryotic Microbiology, 2009, 56(2): 113-118.
- [19] 耿朝晖, 郜鹏, 刘莹, 等. 用 Bac-to-Bac 杆状病毒系统表达人生长激素 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2002(1): 59-63.
- [20] MCINTIRE W G, NASS G D, DREYER A S. Parental role perceptions of Ghanaian and American adolescents [J]. Journal of Marriage and the Family, 1974, 36(1): 185-189.
- [21] ENRIQUEZ F J, WAGNER G, FRAGOSO M, et al. Effects of an anti-exospore monoclonal antibody on microsporidian development in vitro [J]. Parasitology, 1998, 117(6): 515-520.
- [22] SAK B, SAKOVA K, DITRICH O. Effects of a novel anti-exospore monoclonal antibody on microsporidian development in vitro [J]. Parasitol Res, 2004, 92(1): 74-80.
- [23] ZHANG F, LU X, KUMAR V S, et al. Effects of a novel anti-exospore monoclonal antibody on microsporidian *Nosema bombycis* germination and reproduction in vitro [J]. Parasitology, 2007, 134(11): 1551-1558.
- [24] ZHU F, SHEN Z, HOU J, et al. Identification of a protein interacting with the spore wall protein SWP26 of *Nosema bombycis* in a cultured BmN cell line of silkworm [J]. Infection, Genetics and Evolution, 2013, 17: 38-45.
- [25] MOTOHASHI T, SHIMOJIMA T, FUKAGAWA T, et al. Efficient large-scale protein production of larvae and pupae of silkworm by *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus bacmid system [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 326(3): 564-569.

(责任编辑: 王妮)