

## 家蚕 *BmBrat* 基因的克隆与鉴定

梁航华, 高洪燕, 徐曼, 谭鹏, 崔红娟

西南大学 家蚕基因组生物学国家重点实验室, 重庆 400716

梁航华, 高洪燕, 徐曼, 等. 家蚕 *BmBrat* 基因的克隆与鉴定. 生物工程学报, 2016, 32(3): 375–384.

Liang HH, Gao HY, Xu M, et al. Cloning and characterization of *BmBrat* in silkworm, *Bombyx mori*. Chin J Biotech, 2016, 32(3): 375–384.

**摘 要:** NHL 家族蛋白具有调控细胞增殖与分化的功能, 在哺育动物中被广泛研究。本文克隆得到家蚕 NHL 蛋白家族成员 *BmBrat* 基因, 通过 RACE 技术获得该基因 cDNA 全长序列为 3 614 bp, 其 ORF 为 2 580 bp, 编码 859 个氨基酸, 预测其蛋白分子量为 94.3 kDa, 等电点为 6.65。利用 RT-PCR 技术检测其在五龄 3 d 家蚕各组织表达情况, 结果表明其在幼虫各组织均有表达, 包括丝腺、中肠、脂肪体、马氏管等, 且卵巢和头部表达量最高; 胚胎时期表达谱分析显示其在胚胎发育第 4 天和第 5 天有高量表达。经原核表达、蛋白纯化及免疫小鼠后获得家蚕 *BmBrat* 多克隆抗体, 且 Western blotting 及免疫荧光检测显示该抗体可以特异检测家蚕 *BmBrat* 蛋白; 免疫荧光结果表明 *BmBrat* 蛋白定位于家蚕血细胞胞质中, 为进一步研究 *BmBrat* 基因的生物学功能奠定了基础。

**关键词:** 家蚕, *BmBrat* 基因, 表达谱, 抗体制备, 亚细胞定位

## Cloning and characterization of *BmBrat* in silkworm, *Bombyx mori*

Hanghua Liang, Hongyan Gao, Man Xu, Peng Tan, and Hongjuan Cui

State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Southwest University, Chongqing 400716, China

**Abstract:** NHL proteins, which play important roles in regulation of cell proliferation and differentiation, have been

**Received:** July 17, 2015; **Accepted:** November 14, 2015

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 81201551), the Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (No. 20130182110003), the Natural Science Foundation of Chongqing (No. CSTC2013jcyjys0007), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (Nos. XDJK2013B020, SWU111014).

**Corresponding author:** Hongjuan Cui. Tel: +86-23-68251713; Fax: +86-23-68251128; E-mail: Hongjuan.cui@gmail.com

国家自然科学基金 (No. 81201551), 高等学校博士学科点专项科研基金 (No. 20130182110003), 重庆市科委自然科学基金 (No. CSTC2013jcyjys0007), 中央高校基本科研业务费专项资金 (Nos. XDJK2013B020, SWU111014) 资助。

extensively studied on mammals. Here, we cloned a member of NHL protein family namely *BmBrat* in silkworm. The full-length cDNA sequence of *BmBrat* was obtained by means of the rapid amplification of cDNA ends (RACE), including 3 614 bp. The ORF is 2 580 bp long, encoding a protein with 859 amino acid residues. The molecular weight is 94.3 kDa and the isoelectric point (pI) is 6.65. The *BmBrat* expression profile was detected by RT-PCR at L5D3 larval stage, and it was expressed in all tissues, including silk gland, midgut, fat body and malpighian tubule. However, it was highly expressed in ovary and head. The expression profile was also detected at different stage of embryo development, and reached a peak at the 4th and 5th days of the embryonic period. Anti-*BmBrat* polyclonal antibody was generated following prokaryotic expression, protein purification and mice immunization, which is highly specific and effective for recognizing *BmBrat* protein through Western blotting and immunofluorescence staining. Subcellular localization of *BmBrat* in hemocytes revealed that it was specifically expressed in cytoplasm. This study provides a foundation for further research of the biological function of *BmBrat* gene.

**Keywords:** *Bombyx mori*, *BmBrat* gene, expression profile, antibody preparation, subcellular localization

NHL 家族的名字源于发现的 3 个成员: NCL-1、HT2A 和 LIN-41, 这 3 个因子与 RNA 代谢有关系, 可能参与转录后基因的表达调控<sup>[1]</sup>。研究表明, NHL 家族的成员均含有 3 个保守的基序: 1 个 RING、1 个或是 2 个 B-box 和 1 个 coiled-coil<sup>[2]</sup>。在调节 Brat (Brain tumor) 蛋白的活性中 NHL 结构起了至关重要的作用<sup>[3]</sup>。*Brat* 本身是一类肿瘤抑制基因, 但同时也是一个控制细胞增殖的候选基因, 属于 NHL 蛋白家族的成员<sup>[4]</sup>。在果蝇神经系统中, *Brat* 的表达在很大程度上限制了胚胎时期周围神经系统、腹神经索和脑的发育<sup>[5]</sup>。在干细胞发生系统中, *Brat* 与 Prospero、Numb 等作为细胞命运决定因子, 促进细胞命运的变化<sup>[6]</sup>。Numb 是一种膜结合蛋白, 参与 Notch 信号通路的调控<sup>[7]</sup>。在神经前体细胞分裂期间, Numb 聚集到细胞的一端, 与细胞膜结合形成新月板, 细胞分裂期间通过不对称分裂进入神经母细胞中, Numb 蛋白结合  $\alpha$ -泛素介导蛋白质活性调节因子 Sanpodo 抑制 Notch 蛋白<sup>[8-9]</sup>。Notch 信号通路在神经母细胞的增殖分化过程中起着至关重要的作用。Notch 信号通路受到抑制可以使细胞从自我更新逐渐

开始分化分裂<sup>[10]</sup>。而 Prospero 是转录调节蛋白, 在胚胎和幼虫的神经母细胞中均存在, 最终在分化的胶质细胞中持续表达<sup>[11]</sup>, 在决定细胞命运和细胞增殖调控中 Prospero 作为 Brat 下游的一个调控因子起着关键的作用。研究 Brat 在细胞分化和增殖中的作用, 能为干细胞的分化提供理论依据。在人与哺乳动物中 brat 的同源蛋白是 TRIM 蛋白家族, 它们在发育、分化和宿主细胞的抗病毒防御以及癌症中都起到作用。TRIM 家族是 NHL 结构域的一个亚群, 该亚群包含哺乳动物的 TRIM2、TRIM3、TRIM32 和 TRIM71 等, 包括果蝇中的 Brat、Mei-p26、Abba 和 Wech, 以及秀丽隐杆线虫中的 Ncl-1、Nhl-1、Nhl-3 和 Lin41<sup>[12]</sup>, 其中 TRIM3 是一个肿瘤抑制因子, 能结合到 cdk 抑制因子 p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, 通过隔绝 p21 并阻止它积累 Cyclin D1-CDK4 抑制癌症的发生<sup>[13-14]</sup>。在小鼠中降低 TRIM3 的表达将增加并加速血小板生长因子 (PDGF, platelet-derived growth factor) 引起的神经胶质瘤发生率<sup>[15]</sup>。

家蚕是我国重要的经济昆虫, 同时也越来越多地作为无脊椎模式动物进行研究。目前家

蚕 *BmBrat* 基因未见报道,本研究利用 RACE 技术获得 *BmBrat* 基因全长,通过诱导大肠杆菌原核表达获得重组蛋白进而制备抗体,为更深入研究 *Brat* 基因在细胞增殖分化与个体发育中的作用奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验所用家蚕品种为大造,由西南大学家蚕基因库提供。蚕卵在 25 °C 相对湿度 60%–80% 下催青,孵化后幼虫在 25 °C 下桑叶饲养。感受态细胞购自全式金公司。质粒提取试剂盒购自 Omega 公司。胶回收试剂盒购自 Axygen 公司。Trizol 试剂和 RACE 试剂盒购自 Invitrogen 公司。PMD19-T simple 载体、限制性内切酶、*Taq* 酶和 T4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司。反转录试剂购自 Promega 公司。引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。多聚甲醛为上海生工生物工程公司产品。DAPI 和抗荧光猝灭剂为碧云天生物技术公司产品。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

取各发育时期的蚕卵和 5 龄 3 d 幼虫的头、体壁、血液、中肠、精巢、卵巢、马氏管、脂肪体等组织器官,除血液直接加入 Trizol 外,其他组织经液氮研磨后加入 Trizol,按照 Invitrogen 公司 Total RNA 操作指南提取总 RNA。利用琼脂糖电泳和紫外分光光度计分别检测 RNA 产物的完整性、纯度和浓度。使用 DNA 酶在 37 °C 消化 30 min 后,依照反转录试剂盒说明书反转录获得 cDNA。

#### 1.2.2 RACE 法扩增全长序列

设计基因特异 RACE 引物 GSP1、NGSP1、

GSP2、NGSP2,引物序列见表 1。随后按照 RACE 试剂盒进行 5'RACE 和 3'RACE 扩增。扩增产物经 1% 琼脂糖电泳后,回收目的条带,连接到 PMD19-T simple 载体上,转化后提取阳性克隆,测序后进行拼接,获得 *BmBrat* 基因全长 cDNA 序列。

#### 1.2.3 蛋白序列分析

拼接得到的序列在 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 网站进行 ORF 预测以及氨基酸序列翻译。使用 Swiss-model (<http://swissmodel.expasy.org>), SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>), SignalP 4.1 Serve (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>), ExPasy (<http://www.expasy.org/tools/>) 等在线软件预测蛋白结构域、分子量和等电点等信息。

#### 1.2.4 表达谱分析

分别以家蚕 5 龄 3 d 各组织及胚胎各发育时期 cDNA 为模板对 *BmBrat* 进行半定量 PCR 检测,检测引物为 *BmBrat* (引物序列见表 1),以肌动蛋白 3 (*BmActin3*) 为内参<sup>[16]</sup>。PCR 总反应体系为 25  $\mu$ L: 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5  $\mu$ L, 2.5 mmol/L dNTPs 2  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L 上、下游引物各 0.5  $\mu$ L, HiFi-*Taq* 酶 0.2  $\mu$ L, 模板 1  $\mu$ L, 加灭菌的双蒸水至总体积为 25  $\mu$ L。反应条件为: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 30 s、55 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 90 s, 共 28 个循环; 72 °C 延伸 10 min; 4 °C 保存。扩增产物经 1% 琼脂糖电泳, EB 染色, Bio-Rad 凝胶成像系统成像进行分析。

#### 1.2.5 原核表达、蛋白纯化及抗体制备

用软件预测 *BmBrat* 的抗原特异性,截取部分片段设计引物 *Bmbrat*-P2 (引物序列见表 1),

表 1 引物列表

Table 1 Primer list

Primer names	Primer sequences (5'-3')
GSP1	GTGTCTTGGGCAGAATGCGG TTTT
NGSP1	GCCGGTGCAACGAGCCAAGG GAGA
GSP2	TCCCTTGGCTCGTTGCACCGG CTG
NGSP2	GCCCTGACAGTGGTTGGACA AAAG
BmBrat -F	GGTGCCAACTCAATAGGT
BmBrat -R	AATGGCGAAGTAGACTGG
Bmbrat-P2-EcoR1-F	CCGGAATTCCAAGTTCAGTAT CACAAGGCA
Bmbrat-P2-Xho1-R	CCGCTCGAGAAGCAGTCAGT GAGTATGGG

将扩增产物连接到 pET-32a 载体上, 获得 pET32a-BmBrat 重组质粒。将重组质粒 pET32a-BmBrat 转化到 Rosetta 感受态细胞, 获得单菌落并扩大培养, 分别用 0.6 mmol/L IPTG 在 15 °C 诱导 12 h 及 37 °C 6 h 后, 收集菌液, 超声裂解离心分离上清和沉淀, 然后进行 SDS-PAGE 检测目的蛋白。考马斯亮蓝染色分析蛋白在上清和沉淀中的表达情况, 最终选择 37 °C 大规模诱导。振荡培养至  $OD_{600}=0.6$ , 用 0.6 mmol/L IPTG 37 °C 诱导表达 6 h 后, 收集菌体, 用 PBS 重悬, 裂解后超声破碎收集沉淀, 尿素溶解后用 0.45  $\mu$ m 滤膜抽滤进行 Ni 离子亲和柱纯化, 使用不同咪唑浓度的洗脱液进行梯度洗脱, 收集洗脱液后用 SDS-PAGE 分析蛋白纯化情况。注射重组蛋白前利用谷胱甘肽稀释还原法对其进行复性, 加 PBS 将蛋白浓度稀释至 0.5 mg/mL, 加入氧化型谷胱甘肽 (GSH) 至终浓度为 2 mmol/L, 同时加入还原性谷胱甘肽 (GSSG) 至终浓度为 10 mmol/L, 4 °C 复性过夜, PBS 透析, PEG2000 浓缩<sup>[17]</sup>。使用纯化复性好的重组蛋白注射健康的成年雄性昆明小鼠 3 只, 每只小鼠注射前剪尾尖取血,

收集约 50  $\mu$ L 正常血清, 作为阴性对照, 室温静置后离心收集上清, 上清与甘油以 1 : 1 的比例混合后于 -80 °C 保存。小鼠进行免疫时每只腹腔注射 5 次蛋白, 第一次与弗式完全佐剂等体积混合, 后 4 次均与弗式不完全佐剂等体积混合, 所用蛋白量依次为 50、70、90、110 和 120  $\mu$ g, 前 3 次间隔 10 d 进行免疫, 后 2 次间隔 14 d 免疫, 最后 1 次免疫 1 周后, 摘眼球取血, 室温静置 2 h, 3 000 r/min 离心 10 min 将血清取出, 加入 0.02% 的  $\text{NaN}_3$  后, -80 °C 中保存。

### 1.2.6 BmBrat 抗体特异性检测

将原核表达并纯化得到的重组蛋白作为样品, 进行 Western blotting 检测免疫血清的特异性。蛋白经 SDS-PAGE 电泳及转膜后, 于 5% 的牛奶封闭液中, 室温缓慢摇荡封闭 2 h。分别将免疫血清和免疫前血清以 1 : 1 000 稀释后于 4 °C 孵育过夜。之后将膜用 TBST 洗 3 次, 每次 15 min, 用 1 $\times$ TBST 稀释二抗 (1 : 5 000), 将 PVDF 膜浸没于二抗液中, 室温缓慢摇荡 2 h。再次用 TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 用 ECL 显色液进行显色及用成像仪进行曝光。家蚕胚胎细胞系 BME-SWU3 铺到有爬片的 24 孔板中, 爬片过夜。使用 4% 多聚甲醛固定 15 min, 0.5% Triton-100 打孔 15 min。室温条件下用 10% 山羊血清封闭 2 h 后分别用免疫前血清和抗 BmBrat 的免疫血清, 4 °C 孵育过夜。孵育完二抗漂洗后 DAPI 染色, 使用抗荧光猝灭剂封片, 在荧光显微镜下观察检测。

### 1.2.7 血细胞定位 BmBrat

将家蚕血细胞用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 加入 1% Triton-100 静置 10 min 后 PBS 漂洗。用 10% 山羊血清封闭液室温封闭 2 h, 之后分别用免疫前血清和抗 BmBrat 的免疫血清 4 °C 孵育

过夜。孵育完二抗漂洗后 DAPI 染色,使用抗荧光猝灭剂封片,在荧光显微镜下观察检测。

## 2 结果

### 2.1 家蚕 *BmBrat* 基因全长克隆与分析

从 NCBI 下载不同物种的 *Brat* 基因序列,并在家蚕基因组数据库进行 Blast 分析以确定家蚕同源基因。以家蚕 5 龄 3 d 的头部 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。通过 RACE 技术,得到了 3' 端的序列和 5' 端的序列,连接到 pMD19T-simple

载体测序,拼接后获得了 3 614 bp 全长序列,包括 239 bp 的 5'UTR 和 795 bp 的 3'UTR,预测得到其 ORF 为 2 580 bp,编码 859 个氨基酸残基,蛋白分子量为 94.3 kDa,等电点为 6.65 (图 1A-1C)。通过在线预测软件进行结构域分析,家蚕的 *Brat* 蛋白质序列中存在 1 个保守的 RING 结构域,2 个 B-BOX 结构域、1 个保守的 BBC 结构域和 3 个连续的 NHL 结构域 (图 1C)。利用 SignalP 4.1 Server 预测,发现在 N 端区域没有信号肽 (图 1D)。

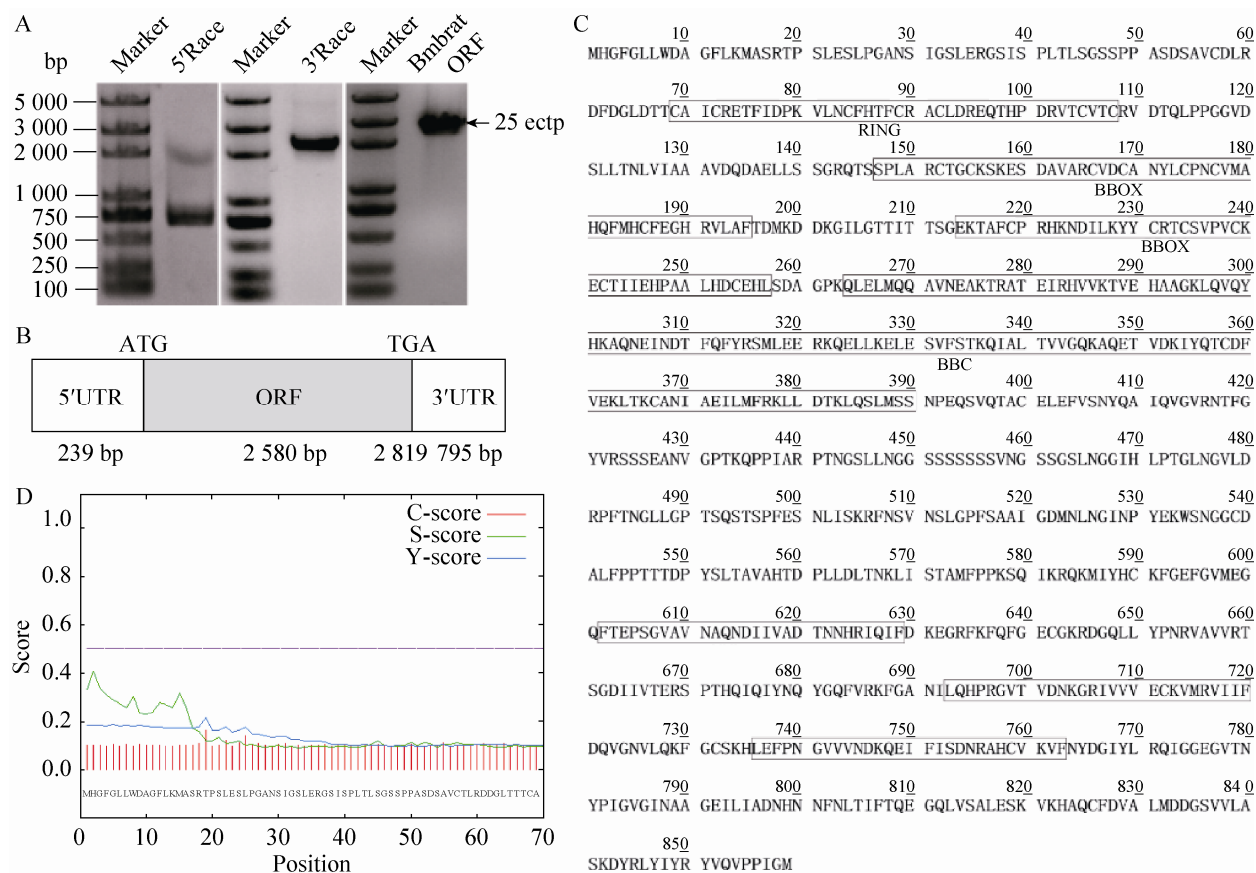


图 1 *BmBrat* 全长克隆及信息分析

Fig. 1 Cloning and bioinformatic analysis of *BmBrat*. (A) Full-length cDNA was cloned by RACE method. (B) Diagram of *BmGATA6* complete cDNA sequence was analyzed. (C) Analysis of *BmGATA6* protein domain and amino acid sequence was presented. (D) *BmBrat* protein signal peptide was predicted.

## 2.2 *BmBrat* 基因在家蚕胚胎及幼虫各组织表达谱

分别以等量的家蚕胚胎期 1–9 d 和幼虫 5 龄 3 d (L5D3) 各组织的 cDNA 为模板, 以肌动蛋白 3 (Actin3) 为内参进行半定量 PCR 检测该 *BmBrat* 基因的表达情况。结果显示 *BmBrat* 在胚胎 4 d、5 d 的时候高量表达, 之后其表达量开始逐步下降 (图 2B); 而在 L5D3 幼虫各组织中均有表达, 其中卵巢和头表达量最高, 其次是丝腺、中肠、精巢和脂肪体, 马氏管和表皮中 *BmBrat* 表达量相对较低 (图 2A)。

## 2.3 *BmBrat* 的原核诱导表达

PCR 扩增得到 777 bp 的片段用于构建原核表达载体 (图 3A-a), 结构如图 3B 所示。将载体经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切验证, 有 777 bp 的片段出现 (图 3A-b), 与预期结果相符, 表明已成功构建重组表达质粒 pET32a-*BmBrat*。在 37 °C 和 15 °C 温度下诱导表达重组蛋白, SDS-PAGE 电泳检测发现 *BmBrat* 重组蛋白都属

于包涵体, 且在 37 °C 诱导条件下, 重组蛋白的表达量要比 15 °C 条件下产生的多 (图 3C), 于是后续采用 37 °C 的条件下进行 *BmBrat* 重组蛋白大量诱导。根据重组蛋白上的 6×His 标签进行 Western blotting 检测, 证明其确实为目的蛋白 (图 3D-a)。经不同浓度的咪唑洗脱液进行梯度洗脱后, 对流出液进行 SDS-PAGE 分析 (图 3D-b), 结果表明 200 mmol/L 与 500 mmol/L 咪唑洗脱液中只有目的蛋白大小的单一条带, 而没有其他杂带, 满足后续实验要求。

## 2.4 抗 *BmBrat* 血清检测

在完成 5 次免疫后, 通过摘除小鼠眼球的方法, 获取免疫血清。使用重组蛋白通过 Western blotting 分析免疫血清的特异性。结果显示, *BmBrat* 免疫血清能特异性地识别大肠杆菌诱导产生的重组 *BmBrat* 蛋白 (图 4B)。随后又以小鼠免疫前的正常血清作为对照, 利用免疫血清对家蚕细胞系 BME-SWU3 进行免疫荧光检测。对照组中无荧光信号, 但是实验组细胞中可以检测到 *BmBrat* 蛋白的表达 (图 4A)。以上结果说明我们所制备的 *BmBrat* 抗体可以特异性识别 *BmBrat* 蛋白, 可为后续研究 *BmBrat* 基因的功能提供抗体支持。

## 2.5 *Bmbrat* 蛋白在家蚕血细胞定位

前面的实验结果显示 *BmBrat* 在家蚕细胞系中有表达, 为了进一步了解 *BmBrat* 的表达情况及其可能发挥的作用, 我们对其在家蚕血细胞中的定位进行了分析。免疫荧光结果显示, 与使用阴性血清的对照组相比, 实验组中可以明显检测到荧光信号, 即家蚕血细胞中有 *BmBrat* 蛋白的表达, 并且该蛋白只表达于部分血细胞的细胞质中 (图 5)。

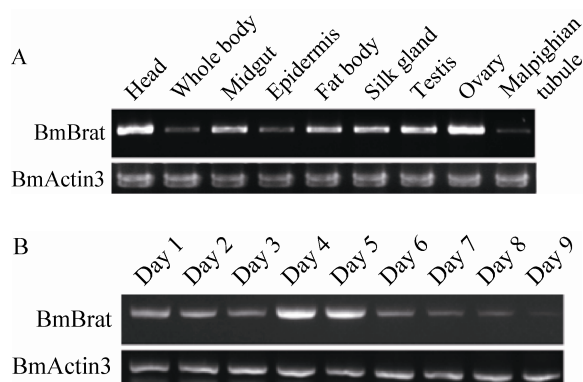


图 2 *BmBrat* 在 5 龄 3 d 各组织 (A) 以及胚胎发育时期 (B) 表达谱检测

Fig. 2 Expression profile of *BmBrat* was detected. (A) Expression of *BmBrat* in different tissues at L5D3 was showed. (B) Expression of *BmBrat* at embryonic period from Day 1 to Day 9 was analyzed.

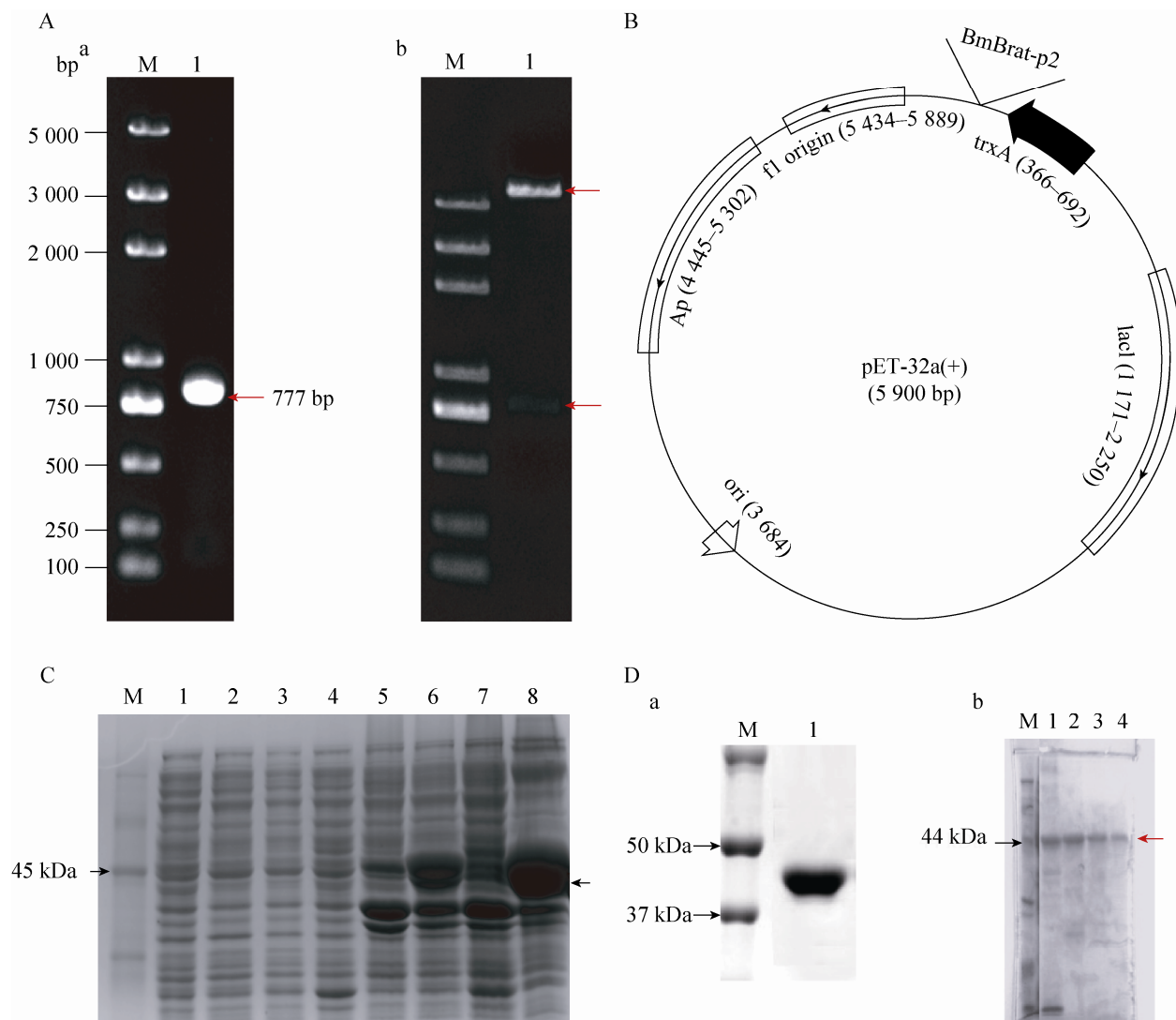


图3 重组蛋白 pET32a-BmBrat 的诱导表达与纯化

Fig. 3 Induction and purification of recombinant protein pET32a-Bmbrat. (A) Construction of the BmBrat prokaryotic expression vector. (a) M: DNA marker; 1: PCR products. (b) M: DNA marker; 1: pET32a-BmBrat plasmid digested with *EcoR* I and *Xho* I. (B) Structure of BmBrat prokaryotic expression vector. (C) The recombinant Bmbrat protein was induced with IPTG at 15 °C or 37 °C. M: protein marker; 1,5: the induction of BmBrat with 0 mmol/L IPTG at 15 °C in supernatant and cell pellet respectively; 2,6: the induction of BmBrat with 0.6 mmol/L IPTG at 15 °C in supernatant and cell pellet respectively; 3,7: the induction of BmBrat with 0 mmol/L IPTG at 37 °C in supernatant and cell pellet respectively; 4,8: the induction of BmBrat with 0.6 mmol/L IPTG at 37 °C in supernatant and cell pellet respectively. (D) a) Detection of recombinant BmBrat protein by His tag antibody. b) Purification of the BmBrat recombinant protein. M: protein marker; 1: 100 mmol/L imidazole; 2: 120 mmol/L imidazole; 3: 200 mmol/L imidazole; 4: 500 mmol/L imidazole.



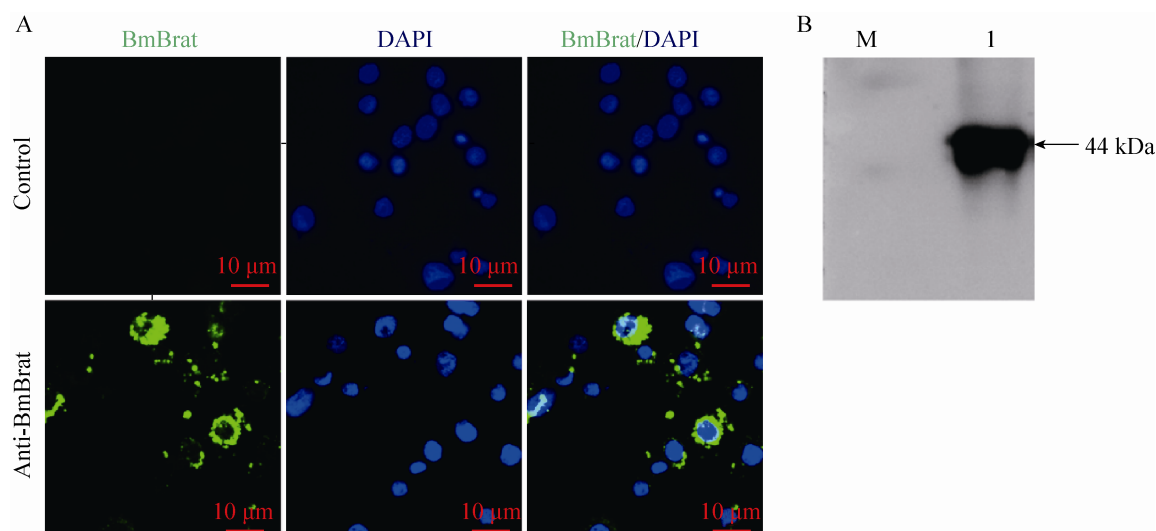


图 4 抗 **BmBrat** 血清检测

Fig. 4 Detection of anti-BmBrat serum. (A) BmBrat protein in silkworm cell line BME-SWU3 was detected by Immunofluorescence with anti-BmBrat serum and negative control. (B) Recombinant BmBrat protein was detected by Western blotting with anti-BmBrat serum. M: protein marker; 1: the purified recombinant BmBrat protein.

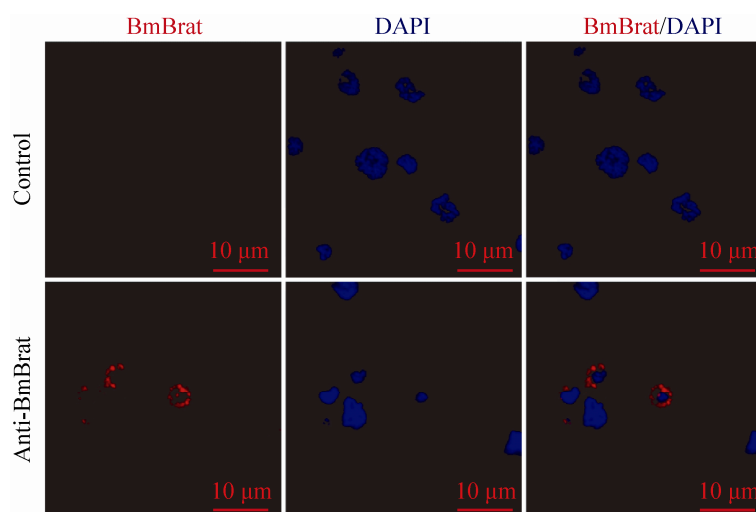


图 5 **Bmbrat** 蛋白在家蚕血细胞中定位分析

Fig. 5 Subcellular localization of BmBrat protein was analyzed in hemocytes with immunofluorescence staining.

### 3 讨论

本实验首先通过在 NCBI 和家蚕数据库中检索, 获得家蚕中 *Brat* 同源基因 *BmBrat*。利用 RACE 技术得到该基因的全长。通过信息学分

析, 发现该基因编码的蛋白有 4 个相对保守的结构域, 从 N 端到 C 端分别是 1 个 RING、2 个 B-Box 和 1 个 BBC 结构域, 具有典型的 NHL 结构域, 暗示其可能在细胞的增殖分化中发挥功能<sup>[2]</sup>。对 *BmBrat* 在家蚕胚胎时期的表达谱分



析中发现,该基因表达量在第4、5天达到高峰,之后逐天下降。蚕卵的催青期约需10 d,其间胚胎发育时期依次分为最长期、肥厚期、突起发生期、突起发达前期、突起发达后期、缩短期、反转期、反转终了期、气管显现期、点青期、转青期,之后便孵化收蚁<sup>[18]</sup>。其中前6天即到反转期属于胚胎的器官形成时期,而4、5 d时处于突起发达期和缩短期,是器官形成的高峰,这一时期该基因高表达,到了第6天后器官发育基本完成,这时该基因的表达也出现了显著下降。这表明 *BmBrat* 与家蚕胚胎发育过程中器官形成有关。而5龄3 d幼虫各组织表达谱分析发现,该基因在各组织中均有明显表达,且在生殖腺和头部表达量最高,这表示 *BmBrat* 在家蚕各组织的发育与生长中具有一定的功能。研究表明,在果蝇中 *Brat* 在正在分化的生殖细胞中有多种功能。已知生殖干细胞的维持是受 Dpp 信号途径<sup>[19]</sup>和翻译抑制因子 Nanos (Nos)/Pumilio (Pum) 所调控的<sup>[20]</sup>。在卵巢中, Pum-Nos 调节 *Brat* 的 mRNA 水平,限制其在包囊干细胞中的表达<sup>[21]</sup>。增大 Dpp 信号,能够促进 Pum-Nos 对 *Brat* mRNA 生成的抑制作用<sup>[22]</sup>。在分裂过程中, Dpp 信号途径沉默, Dpp 信号的减少使 Nos 下调,从而促进 *Brat* 的表达,与 Pum 形成新的复合物抑制了 Dpp 信号途径中的 Mad 和 *dMyc* mRNAs,降低了包囊干细胞对 Dpp 信号的反应能力,促进细胞分化<sup>[23]</sup>,使这个子细胞变成分化的包囊干细胞,另一个子细胞继续接受 Dpp 自我更新的信号<sup>[24]</sup>。家蚕 *BmBrat* 是否具有类似功能还有待进一步研究。另外,利用我们自制的 *BmBrat* 抗体在家蚕血细胞中对 *BmBrat* 蛋白进行亚细胞定位,发现该蛋白只存在于部分血细胞中,且只在细胞质中表达。家蚕血细胞有原血球细胞 (Prohemocyte)、小球细

胞 (Spherule cell)、拟绛色细胞 (Oenocytoid)、颗粒细胞 (Granular cell) 和浆细胞 (Plasmacyte) 5类<sup>[25]</sup>, *BmBrat* 只在部分细胞中表达,其是否与血细胞的分化有关也值得进一步研究。后续我们将利用不同种类血细胞的特异性分子标记,探索该蛋白具体存在于哪一类或几类血细胞中,有助于更好地揭示其功能。综上所述, *BmBrat* 作为一个新基因至今鲜有报道,功能尚不清楚,猜测其与细胞增殖分化相关。本研究成功制备了 *BmBrat* 多克隆抗体,为后续实验提供了抗体工具。

## REFERENCES

- [1] Loedige I, Filipowicz W. TRIM-NHL proteins take on miRNA regulation. *Cell*, 2009, 136(5): 818–820.
- [2] Petrer F, Meroni G. TRIM proteins in development. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 770: 131–141.
- [3] Marchetti G, Reichardt I, Knoblich JA, et al. The TRIM-NHL protein Brat promotes axon maintenance by repressing *src64B* expression. *J Neurosci*, 2014, 34(41): 13855–13864.
- [4] Loedige I, Stotz M, Qamar S, et al. The NHL domain of BRAT is an RNA-binding domain that directly contacts the *hunchback* mRNA for regulation. *Genes Dev*, 2014, 28(7): 749–764.
- [5] Sonoda J, Wharton RP. *Drosophila* Brain Tumor is a translational repressor. *Genes Dev*, 2001, 15(6): 762–773.
- [6] Lee CY, Wilkinson BD, Siegrist SE, et al. Brat is a Miranda cargo protein that promotes neuronal differentiation and inhibits neuroblast self-renewal. *Dev Cell*, 2006, 10(4): 441–449.
- [7] Cotton M, Benhra N, Le Borgne R. Numb inhibits the recycling of Sanpodo in *Drosophila* sensory organ precursor. *Curr Biol*, 2013, 23(7): 581–587.
- [8] Hutterer A, Knoblich JA. Numb and  $\alpha$ -Adaptin regulate Sanpodo endocytosis to specify cell fate in *Drosophila* external sensory organs. *EMBO Rep*, 2005, 6(9): 836–842.

- [9] Berdnik D, Török T, González-Gaitán M, et al. The endocytic protein  $\alpha$ -Adaptin is required for numb-mediated asymmetric cell division in *Drosophila*. *Dev Cell*, 2002, 3(2): 221–231.
- [10] Wang W, Liu WK, Wang Y, et al. Notch signaling regulates neuroepithelial stem cell maintenance and neuroblast formation in *Drosophila* optic lobe development. *Dev Biol*, 2011, 350(2): 414–428.
- [11] Reichert H. *Drosophila* neural stem cells: cell cycle control of self-renewal, differentiation, and termination in brain development. *Results Probl Cell Differ*, 2011, 53: 529–546.
- [12] Sardiello M, Cairo S, Fontanella B, et al. Genomic analysis of the TRIM family reveals two groups of genes with distinct evolutionary properties. *BMC Evol Biol*, 2008, 8(1): 225.
- [13] Liu Y, Raheja R, Yeh N, et al. TRIM3, a tumor suppressor linked to regulation of p21<sup>Waf1/Cip1</sup>. *Oncogene*, 2014, 33(3): 308–315.
- [14] Boulay JL, Stiefel U, Taylor E, et al. Loss of heterozygosity of TRIM3 in malignant gliomas. *BMC Cancer*, 2009, 9(1): 71.
- [15] Chen G, Kong J, Tucker-Burden C, et al. Human *Brat* ortholog *TRIM3* is a tumor suppressor that regulates asymmetric cell division in glioblastoma. *Cancer Res*, 2014, 74(16): 4536–4548.
- [16] Cheng DJ, Qian WL, Meng M, et al. Identification and expression profiling of the BTB domain-containing protein gene family in the silkworm, *Bombyx mori*. *Int J Genomics*, 2014, 2014: 865065.
- [17] Luo HX, Li M, Wang YJ. Refolding of inclusion body. *Biotechnol Bull*, 2007, (5): 96–98 (in Chinese).
- 罗惠霞, 李敏, 王玉炯. 包涵体蛋白复性的几种方法. *生物技术通报*, 2007, (5): 96–98.
- [18] Zhejiang Agricultural University. *Sericultural Science*. 2nd Ed. Beijing: China Agriculture Press, 1981: 55–60 (in Chinese).  
浙江农业大学. 养蚕学. 2版. 北京: 中国农业出版社, 1981: 55–60.
- [19] Xie T, Spradling AC. *Decapentaplegic* is essential for the maintenance and division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Cell*, 1998, 94(2): 251–260.
- [20] Forbes A, Lehmann R. Nanos and Pumilio have critical roles in the development and function of *Drosophila* germline stem cells. *Development*, 1998, 125(4): 679–690.
- [21] Muraro N I, Weston AJ, Gerber AP, et al. Pumilio binds *para* mRNA and requires Nanos and Brat to regulate sodium current in *Drosophila* motoneurons. *J Neurosci*, 2008, 28(9): 2099–2109.
- [22] Li Y, Minor NT, Park JK, et al. Bam and Bgcn antagonize *Nanos*-dependent germ-line stem cell maintenance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(23): 9304–9309.
- [23] Harris E, Pargett M, Sutcliffe C, et al. Brat promotes stem cell differentiation *via* control of a bistable switch that restricts BMP signaling. *Dev Cell*, 2011, 20(1): 72–83.
- [24] Ohlstein B, Mckearin D. Ectopic expression of the *Drosophila* Bam protein eliminates oogenic germline stem cells. *Development*, 1997, 124(18): 3651–3662.
- [25] Beaulaton J. Hemocytes and hemocytogenesis in silkworms. *Biochimie*, 1979, 61(2): 157–164.

(本文责编 郝丽芳)