

家蚕几丁质去乙酰化酶 BmCDA2 的基因表达和免疫定位

何允^{1,3}, 陈怡菲^{1,3}, 王清浪^{1,3}, 张自钰^{1,3}, 董浩南^{1,3}, 申太霞^{1,3}, 侯勇^{1,3}, 龚竞^{1,2*}

- 1 西南大学 家蚕基因组生物学国家重点实验室, 重庆 400715
- 2 西南大学 蚕桑纺织与生物质科学学院, 重庆 400715
- 3 西南大学 前沿交叉学科研究院生物医学研究中心, 重庆 400715

何允, 陈怡菲, 王清浪, 张自钰, 董浩南, 申太霞, 侯勇, 龚竞. 家蚕几丁质去乙酰化酶 BmCDA2 的基因表达和免疫定位[J]. 生物工程学报, 2023, 39(4): 1655-1669.

HE Yun, CHEN Yifei, WANG Qinglang, ZHANG Ziyu, DONG Haonan, SHEN Taixia, HOU Yong, GONG Jing. Gene expression and immunolocalization of chitin deacetylase BmCDA2 in silkworm[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(4): 1655-1669.

摘要: 几丁质的去乙酰化修饰与昆虫的发育变态密切相关, 几丁质去乙酰化酶(chitin deacetylase, CDA)是这个过程中的关键酶。家蚕(*Bombyx mori*)是鳞翅目昆虫的代表性昆虫, 目前对家蚕 CDAs 的研究较少。为了更好地揭示 BmCDAs 对家蚕变态发育的作用, 本研究采用生物信息学分析、蛋白表达纯化以及免疫荧光定位等方法对表皮中高量表达的 BmCDA2 进行了研究。结果发现, BmCDA2 有两种 mRNA 拼接形式 BmCDA2a 和 BmCDA2b, 分别在幼虫眠期和化蛹期表皮高量表达, 两个基因均有几丁质去乙酰化酶催化结构域(catalytic domain)、几丁质结合结构域(chitin binding domain)和低密度脂蛋白受体结构域(low density lipoprotein receptor domain); Western blotting 结果显示, 该蛋白在表皮存在, 荧光免疫定位发现 BmCDA2 蛋白随着幼虫新表皮的生成而逐渐增多, 推测 BmCDA2 可能参与了幼虫新表皮的形成。该结果丰富了家蚕 CDAs 的生物学功能信息, 也为其他昆虫 CDA 的研究提供一些有价值的参考。

关键词: 家蚕; 几丁质去乙酰化酶 2; 原核表达; 免疫荧光定位

资助项目: 国家自然科学基金(31872429); 重庆市自然科学基金(cstc2021jcyj-msxmX1166)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31872429) and the Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2021jcyj-msxmX1166).

*Corresponding author. E-mail: gongjing@swu.edu.cn

Received: 2022-06-14; Accepted: 2022-07-28; Published online: 2022-08-03

Gene expression and immunolocalization of chitin deacetylase BmCDA2 in silkworm

HE Yun^{1,3}, CHEN Yifei^{1,3}, WANG Qinglang^{1,3}, ZHANG Ziyu^{1,3}, DONG Haonan^{1,3}, SHEN Taixia^{1,3}, HOU Yong^{1,3}, GONG Jing^{1,2*}

1 State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Southwest University, Chongqing 400715, China

2 College of Sericulture, Textile and Biomass Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

3 Biological Science Research Center, Academy for Advanced Interdisciplinary Studies, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Deacetylation of chitin is closely related to insect development and metamorphosis. Chitin deacetylase (CDA) is a key enzyme in the process. However, to date, the CDAs of *Bombyx mori* (BmCDAs), which is a model Lepidopteran insect, were not well studied. In order to better understand the role of BmCDAs in the metamorphosis and development of silkworm, the BmCDA2 which is highly expressed in epidermis was selected to study by bioinformatics methods, protein expression purification and immunofluorescence localization. The results showed that the two mRNA splicing forms of *BmCDA2*, namely *BmCDA2a* and *BmCDA2b*, were highly expressed in the larval and pupal epidermis, respectively. Both genes had chitin deacetylase catalytic domain, chitin binding domain and low density lipoprotein receptor domain. Western blot showed that the BmCDA2 protein was mainly expressed in the epidermis. Moreover, fluorescence immunolocalization showed that BmCDA2 protein gradually increased and accumulated with the formation of larval new epidermis, suggesting that BmCDA2 may be involved in the formation or assembly of larval new epidermis. The results increased our understandings to the biological functions of BmCDAs, and may facilitate the CDA study of other insects.

Keywords: *Bombyx mori*; chitin deacetylase 2; prokaryotic expression; immunofluorescence localization

家蚕是鳞翅目蚕蛾科的代表性昆虫，由野蚕驯化而来，作为一种重要的经济昆虫在我国已经有 5 000 年的饲养历史。同时，家蚕是一种完全变态昆虫，一生会经历卵、幼虫、蛹和成虫 4 个阶段，不同发育阶段昆虫外部形态和内部器官结构功能都会发生极大的变化^[1]。蜕皮是昆虫一个关键的发育过程^[2-3]。昆虫身体的外表皮是一种细胞分泌物，它不会随虫体的增长而增长^[4]。家蚕幼虫阶段分为 5 个龄期，每次在新旧龄期交替的时候旧表皮蜕去，新表皮

生成；末龄幼虫上簇结茧后将完成从幼虫到蛹的变态发育，如果不能正常蜕皮，轻则影响生长发育进程，严重的情况将直接导致蚕体死亡。

家蚕表皮主要是由角质层蛋白和几丁质微纤维组成^[5]。几丁质广泛存在于甲壳类动物、昆虫和真菌中^[6]。对昆虫而言，几丁质是其表皮、中肠围食膜、脂肪体基底膜、翅原基基底膜、丝腺基底膜等的主要结构成分，在昆虫的外骨骼系统和营养基质中扮演重要的角色^[7]。而几丁质微纤维是由几丁质前体经过去乙酰化修饰而形成^[8]，去乙酰化

程度的差异将决定昆虫表皮的溶解性和软硬程度。这个过程受到几丁质去乙酰化酶(chitin deacetylase, CDA)的作用^[9]。该酶具有一个保守的结构区域——几丁质去乙酰化酶催化结构域(catalytic domain, CDA), 并与根瘤菌结节蛋白(Nod)具有显著的相似性。除此之外, 一些 CDA 还可能具有几丁质结合结构域(chitin binding domain, ChBD)和低密度脂蛋白受体结构域(low density lipoprotein receptor domain, LDLa)。基于系统发育分析和结构域的存在将昆虫的 CDAs 分为 5 类: 第 1 类和第 2 类含有以上 3 种结构域; 第 3 类和第 4 类有 CDA 和 ChBD 结构域, 但没有 LDLa 结构域; 而第 5 类只含有 CDA 结构域^[10-11]。

近年来, 在许多昆虫中发现了 CDA 的存在, 包括冈比亚按蚊(*Anopheles gambiae*)^[10]、意蜂(*Apis mellifera*)^[10]、赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)^[10]、黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)^[12-13]等。不同的 CDA 在不同的组织中行使着不同的功能: 在表皮中 CDA 通过修饰表皮几丁质纤维束, 来维持表皮结构的完整, 从而维持了昆虫的正常生长和发育^[14-15]。与中肠围食膜相关的 CDA 只在摄食的幼虫中肠组织中被检测到, 当幼虫在后期停止摄食时, 这种蛋白质在中肠组织中消失^[16]; 推测该蛋白可能参与了消化酶的固定化, 从而保护肠道免受寄生虫的侵袭, 并拦截凝集素等毒素对昆虫的伤害^[16-17]。

家蚕中一共鉴定到 8 个 CDA 基因: *BmCDA1*–*BmCDA8*。之前报道仅对 *BmCDA7* 进行了研究^[18], 发现该酶在中肠的围食膜中表达, 可能会引起围食膜通透性的改变。在前期研究中, 我们发现 *BmCDA2* 基因特异地在表皮中表达, 同时受到蜕皮激素(20-hydroxyecdysone, 20E)的诱导^[19], 推测 *BmCDA2* 与家蚕蜕皮、变态的生物学过程有关。为了更好地揭示 *BmCDAs* 在家蚕变态发育中起到的作用, 本研

究以 *BmCDA2* 为切入点, 研究 *BmCDA2* 序列特征, 并对 *BmCDA2* 蛋白进行原核表达纯化以及免疫荧光定位, 探索 *BmCDA2* 的生物学功能, 该结果为家蚕变态发育机制研究提供了新思路, 为其他昆虫 CDA 的研究提供一些有价值的参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验昆虫

本实验的家蚕品种大造(Dazao)由西南大学前沿交叉学科研究院生物研究中心提供。幼蚕孵化后在温度为(25±1) °C 的培养箱中生长发育, 并采用新鲜的桑叶饲喂。取家蚕 5 龄第 3 天幼虫各组织和 4 龄起至蛾期的表皮作为材料, 保存在–80 °C 冰箱待用。

1.1.2 试剂耗材

总 RNA 提取用 MiniBEST Universal RNA 提取试剂盒, 反转录 cDNA 采用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒, PCR 体系所用 DNA 聚合酶为 PrimeSTAR® Max DNA Polymerase, 以上试剂均购自 TaKaRa 公司。pMD19-T 载体与原核表达载体 pET-28a 为西南大学前沿交叉学科研究院生物研究中心保存。胶回收试剂盒 Gel Extraction Kit 购自 Omega Bio-Tek 公司, 卡纳青霉素购自生工生物工程(上海)股份有限公司, 大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)和 Trans1-T1 感受态菌株均购自北京全式金生物技术股份有限公司。T4 DNA 连接酶与限制性内切酶 *Xho* I 和 *Hind* III 均购自 NEB, IPTG 购自 BBI, 考马斯亮蓝 R-250 购自北京索莱宝科技有限公司, Bradford 蛋白浓度测定试剂盒(去垢剂兼容型)与 DAPI 染色液购自上海碧云天生物技术有限公司, 封闭用羊血清购自北京中杉金桥生物技术有限公司, FITC 标记 WGA (几丁质染色液)

购自 Sigma, 引物合成和测序均由华大基因科技有限公司完成, 抗体由武汉金开瑞生物工程有限公司制备。

1.2 方法

1.2.1 基因 qRT-PCR 检测和克隆鉴定

利用报道过的 *BmCDA2* 基因序列在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 以及 SilkBase (<http://silkbases.ab.a.u-tokyo.ac.jp/cgi-bin/>) 进行检索, 检索之后用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计 *BmCDA2a* 和 *BmCDA2b* 荧光定量 PCR 引物、*BmCDA2a* 添加限制性内切酶位点 *Xho* I、*Hind* III 的克隆引物和内参引物 sw22934^[20] (表 1)。

以家蚕 4 龄第 1 天、4 龄第 2 天、4 龄第 3 天、4 龄眠、5 龄起蚕、5 龄第 1 天、5 龄第 3 天、5 龄第 5 天、5 龄第 7 天、预蛹、化蛹后第 1 天、蛹 3 天、蛹 5 天的表皮的 cDNA 为模板开展荧光定量 PCR(qRT-PCR)分析。qRT-PCR 反应程序设定: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 3 s, 60 °C 延伸 30 s, 40 个循环。反应结束后, 对数据进行收集和分析。

在 *BmCDA2a* 表达载体构建实验中, 以家蚕 4 龄表皮 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。循环参数为: 98 °C 预变性 2 min; 98 °C 变性 15 s, 55 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min。然后产物经 1.2% 琼脂糖电泳

后检测产物大小。对目的 DNA 片段切胶回收, 再与 pMD19-T 载体连接, 将连接产物转化到 *E. coli* Trans1-T1 感受态细胞中, 通过菌液 PCR 筛选阳性克隆并进行测序鉴定。

1.2.2 蛋白的生物信息学分析

利用 SignalP 5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>) 预测 *BmCDA2a* 和 *BmCDA2b* 蛋白质的信号肽区域, PROSITE (<https://prosite.expasy.org/>) 预测磷酸化位点和糖基化位点, 蛋白质保守结构域数据库 (conserved domain database, CDD) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/>) 预测结构域, ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 对蛋白亲疏水性进行预测。以 *BmCDA2* 为检索序列, 采用 NCBI BLAST 工具收集部分真菌、细菌、家蚕和其他节肢动物中的 CDA 序列, 在 DNAMAN 中进行氨基酸多序列比对, 在 TBtools 软件中进行建树, 建树方法为最大似然法, 检验 5 000 次。利用在线网站 Robetta (<https://robetta.bakerlab.org/>) 对蛋白质 *BmCDA2a* 和 *BmCDA2b* 的三维结构进行预测, 并用 PyMOLWin 软件作图并导出。

1.2.3 原核表达载体构建

将测序正确的重组载体和 pET-28a 原核表达载体用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Hind* III 双酶切

表 1 本文所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Use
BmCDA2a-F'	GAGAACAGCGTCACCAGGCTC	qRT-PCR
BmCDA2a-R'	TTGTCAACATTACAGCACCG	
BmCDA2b-F'	AGATAACTTGCCCGTCTGGATT	qRT-PCR
BmCDA2b-R'	AGGTAGGACGCACTGGTTAGGA	
sw22934-F	TTCGTA ^{CTGGCTCTTCTCGT}	qRT-PCR
sw22934-R	CAAAGTTGATAGCAATTCCT	
BmCDA2a-F	CCGCTCGAGTCTCGTGTGAAGCGACAAGATG	ORF cloning and vector construction
BmCDA2a-R	CCCAAGCTTTCACCTTCTTAACGTTGTATCCTT	

Restriction sites are highlighted with underline.

后, 酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 分别切胶回收 *BmCDA2a* 和 pET-28a 目的 DNA 片段。回收产物用 T4 DNA 连接酶连接过夜, 后转化至 *E. coli* Trans1-T1 感受态细胞, 采用菌液 PCR 和双酶切验证, 将阳性克隆送到华大基因科技有限公司测序。结果正确后菌液扩大培养提取质粒, 质粒命名为: pET-28a-BmCDA2a, 保存在 -20°C 备用。

1.2.4 蛋白表达纯化及抗体制备

将测序正确的重组质粒 pET-28a-BmCDA2a 和空载质粒分别转化至原核表达菌株 *E. coli* BL21(DE3) 中, 涂板挑取单克隆菌落到 $2\times\text{YT}$ 液体培养基(kana 抗性), 37°C 、220 r/min 扩大培养, 至 OD_{600} 为 0.6–1.0 之间, 加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG 进行诱导; 以 pET-28a 空载作为对照。室温下 8 000 r/min 离心 10 min, 弃上清留菌体, 沉淀用 Binding Buffer 1 (20 mmol/L Tris-HCl, 200 mmol/L NaCl, pH 8.0) 重悬。液氮冻融冰上超声破碎离心, 分别收集上清和沉淀, 沉淀用等体积 Binding Buffer 1 重悬。利用浓度为 12% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 对上清组分和沉淀组分进行电泳分析, 电泳结束后进行考马斯亮蓝染色分析。

对包涵体蛋白进行纯化。取含有 8 mol/L 尿素的 Binding buffer 2 (8 mol/L 尿素, 20 mmol/L Tris-HCl, 200 mmol/L NaCl, pH 8.0), 加入到收集的沉淀中, 用磁力搅拌器低速搅拌过夜, 使沉淀充分溶解。12 000 r/min 室温离心 20 min, 收集上清。采用镍柱亲和层析进行蛋白纯化, 采用含有 20、50、100、200、500 mmol/L 和 1 mol/L 浓度的咪唑溶液进行洗脱。将收集到的原液、流穿液、梯度洗脱的收集液进行 SDS-PAGE 分析。将收集到的重组蛋白样品进行浓缩, 并采用制备型电泳及切胶电洗脱的方法回收蛋白:

SDS-PAGE 电泳结束后, 用考马斯亮蓝染色切胶置于 PBS 缓冲液中, 利用磁力搅拌器低速搅拌, 每 8 h 更换一次缓冲液, 更换 3 次, 透析袋内溶液即为重组蛋白, 收集袋内溶液, 蛋白电泳检测纯度, 并测定蛋白浓度; 浓度纯度达到要求后, 送公司制备抗体: 选用无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级健康雌性 4 月龄的日本大耳兔, 经过免疫 3–4 次, 每次免疫时间 2–3 周, 制备抗血清, 用亲和层析柱进行抗体纯化。

1.2.5 家蚕组织 Western blotting 检测及免疫荧光定位

取家蚕 5 龄第 3 天各组织提取蛋白, 并用 Bradford 法测定总蛋白浓度。将各组织蛋白样品按 20 μg /孔上样进行 SDS-PAGE, 电泳结束后转膜, 回收滤纸并将 PVDF 膜轻轻放入封闭液中, 60 r/min、 37°C 孵育 1 h 封闭。加入一抗封闭液 (含 1:20 000 体积比的 BmCDA2 一抗), 37°C 低速旋转孵育 1 h, 结束后, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; 加入二抗封闭液 (含 1:40 000 体积比的山羊抗兔二抗), 37°C 低速旋转孵育 1 h, 结束后, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。进行化学发光显影。

在免疫荧光定位实验中, 将家蚕 4 龄幼虫蜕皮各时期的表皮进行组织切片, 置于免疫组化孵育盒中, 室温下晾干 20 min, 滴加 PBST 浸润组织 5–10 min。向组织切片表面滴加封闭液 (1 \times PBS+1%BSA+1/10 体积羊血清), 使其完全浸没组织, 室温封闭 2 h。分别用一抗稀释液 (含 1:1 000 体积比的 BmCDA2 一抗) 和二抗稀释液 (含 1:500 体积比的 Cy3 标记的山羊抗兔二抗) 对其进行孵育。然后在避光条件下进行几丁质染色液与 DAPI 染色液染色, 封片后在荧光显微镜下观察拍照。

2 结果与分析

2.1 *BmCDA2a* 和 *BmCDA2b* 的时期表达特征分析

基于已知昆虫的 *CDA2* 序列信息, 通过同源比对在 NCBI 中获得家蚕 *CDA2* 的两个不同转录本, 分析发现与其他昆虫中类似, 这两个转录本也是可变剪切体, 将其分别命名为 *BmCDA2a* 和 *BmCDA2b*。分析发现, *BmCDA2a* mRNA 由 exon 1、exon 2、exon 3、exon 5 和 exon 6, 5 个外显子剪接形成, 缺少 exon 4 (图 1A); *BmCDA2b* mRNA 由 exon 1、exon 2、exon 4、exon 5 和 exon 6, 5 个外显子剪接形成, 缺少 exon 3。两个转录本均为外显子遗漏类型, 在 5' 端和 3' 端完全相同, 差异仅表现在序列中间的第 3 个外显子不同。

利用 qRT-PCR 技术, 对家蚕不同时期 *BmCDA2a*、*BmCDA2b* 在表皮的表达情况进行

检测, 结果显示: 在 4 龄与 5 龄的幼虫期, *BmCDA2a* 的表达水平较高, 且眠期蜕皮时的表达水平为最高表达之后逐渐回落 (图 1B); 而 *BmCDA2b* 表达量在幼虫的眠期和蛹期较高, 其中蛹期 *BmCDA2b* 的表达水平高于 *BmCDA2a*, 且在化蛹后有下降趋势。推测 *BmCDA2a* 在家蚕幼虫和蛹期的表皮中发挥作用, 而 *BmCDA2b* 主要在眠期和蛹期的表皮中发挥作用。

2.2 *BmCDA2* 蛋白聚类进化分析

为了研究 *BmCDA2* 与其他物种中 *CDA* 的进化关系, 选取真菌、细菌、家蚕和其他节肢动物中的 *CDA* 序列进行多序列比对。结果显示, *BmCDA2a* 和 *BmCDA2b* 都包含 ChBD、LDL_a 和 CDA 这 3 个结构域 (图 2), 它们之间的区别仅在于由第 3 外显子和第 4 外显子构成的 ChBD 的 20 个氨基酸残基不同, 推测 *BmCDA2a* 和 *BmCDA2b* 在与几丁质结合时可能存在差

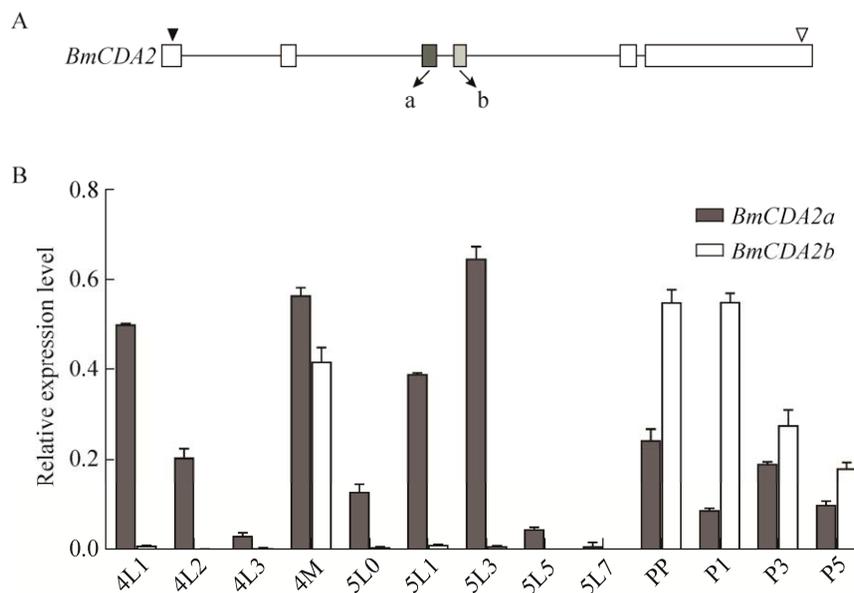


图 1 *BmCDA2a* 和 *BmCDA2b* 基因结构和时期表达分析

Figure 1 Analysis of gene structure and expression pattern of *BmCDA2a* and *BmCDA2b*. 4L1: Day 1 of 4th instar larvae; 4L2: Day 2 of 4th instar larvae; 4L3: Day 3 of 4th instar larvae; 4M: 4th molt; 5L0: Newly molted 5th instar larvae; 5L1: Day 1 of 5th instar larvae; 5L3: Day 3 of 5th instar larvae; 5L5: Day 5 of 5th instar larvae; 5L7: Day 7 of 5th instar larvae; PP: Pre-pupa; P1: Day 1 of pupa; P3: Day 3 of pupa; P5: Day 5 of pupa.

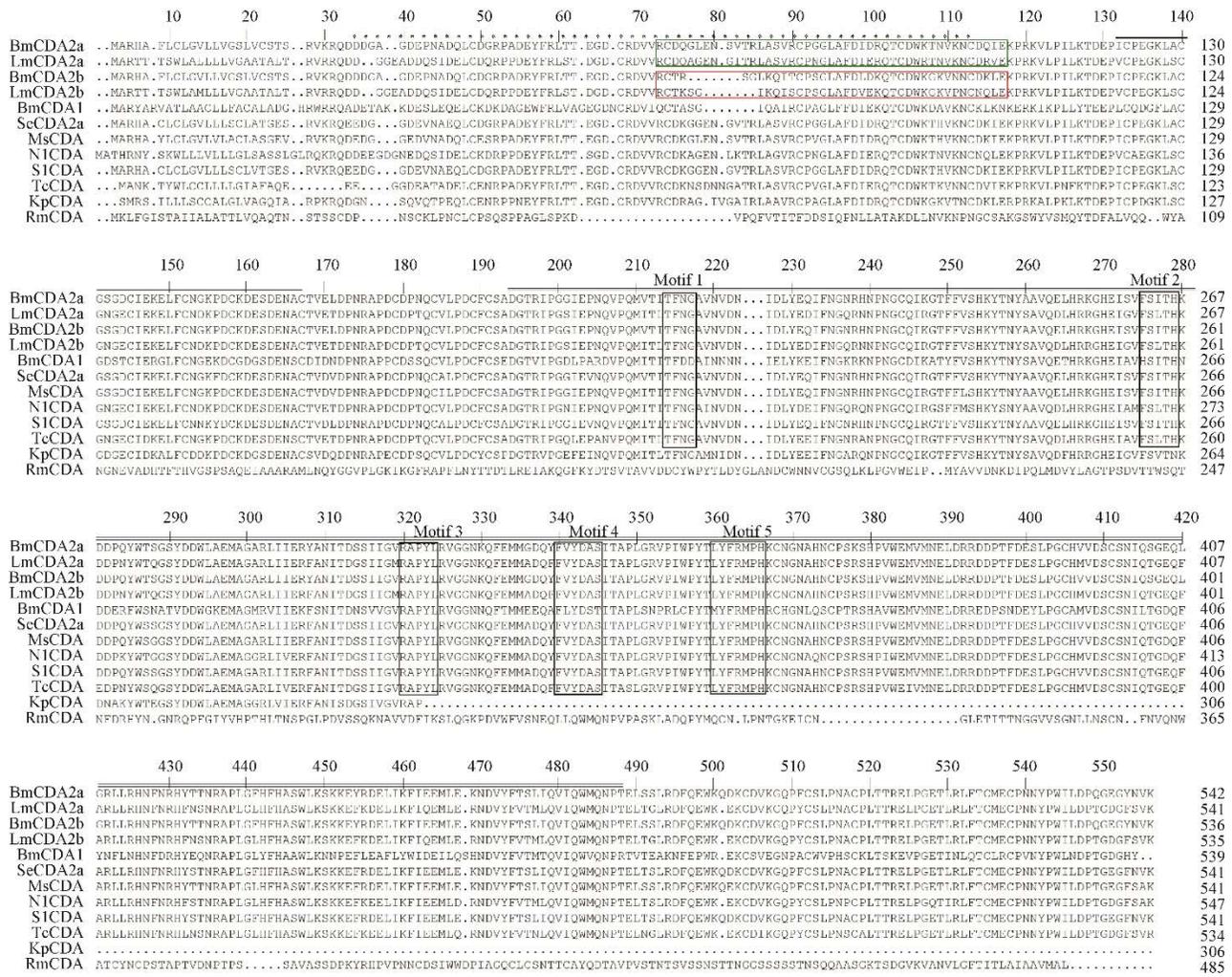


图 2 不同生物 CDA2 氨基酸序列的多重序列比对

Figure 2 The multiple alignment of CDA2 amino acid sequences in different organisms. The chitin binding domain was highlighted in asterisk, low density lipoprotein receptor domain was highlighted in line, and catalytic domain was highlighted in double lines; The 3rd exon was highlighted in green box, the 4th exon was highlighted in red box, and the motifs were highlighted in black boxes; Bm: *Bombyx mori*; Lm: *Locusta migratoria*; Se: *Spodoptera exigua*; Ms: *Manduca sexta*; Nl: *Nilaparvata lugens*; Sl: *Spodoptera litura*; Tc: *Tribolium castaneum*; Kp: *Klebsiella pneumoniae*; Rm: *Rhizopus microsporus*.

异, 从而导致二者发挥功能的差异; BmCDA2a、BmCDA2b 与其他节肢动物的 CDA 相比较, CDA 结构域的 motif 1-5 区域相对保守, 而对于细菌和真菌来讲, motif 1-3 区域保守, motif 4-5 区域不保守。进化分析表明, 家蚕 BmCDA2a、BmCDA2b 蛋白与鳞翅目昆虫几丁质去乙酰酶亲缘关系最近, 首先与甜菜夜蛾聚

在了一起, 然后与其他节肢动物聚为一支, 几丁质去乙酰酶在细菌真菌各聚为一支(图 3)。

2.3 BmCDA2 蛋白序列分析

BmCDA2a 蛋白预测的分子量为 61.54 kDa, 等电点 pI 为 5.04, 具有 8 个潜在磷酸化修饰位点, 一个潜在的糖基化修饰位点; BmCDA2b 蛋白预测的分子量为 60.86 kDa, 等电点 pI

为 5.27, 磷酸化修饰位点和糖基化修饰位点跟 BmCDA2a 蛋白一致(表 2)。亲疏水性分析发现, BmCDA2a 蛋白和 BmCDA2b 蛋白亲水氨基酸在整个肽链中的分布占比较多, 疏水氨基酸相对较少, 分别占总氨基酸的 70.65% 和 29.35%, 在第 10 位氨基酸分值最高为 3.167, 在第 440 位氨基酸分值最低为 -3.200 (图 4A、4B)。而两者在 65-87 区域亲/疏水性

有较大差异, 此区域其氨基酸亲/疏水分值最低峰都在第 68 位氨基酸, BmCDA2a 为 -1.489, BmCDA2b 则为 -1.333; 最高峰都在第 85 位氨基酸, BmCDA2a 为 1.056, BmCDA2b 为 1.322; 并且从 68-85 位两者氨基酸亲/疏水分值都呈上升趋势, 但 BmCDA2b 的上升趋势更剧烈, 这些差异可能导致两种蛋白的功能产生差异。

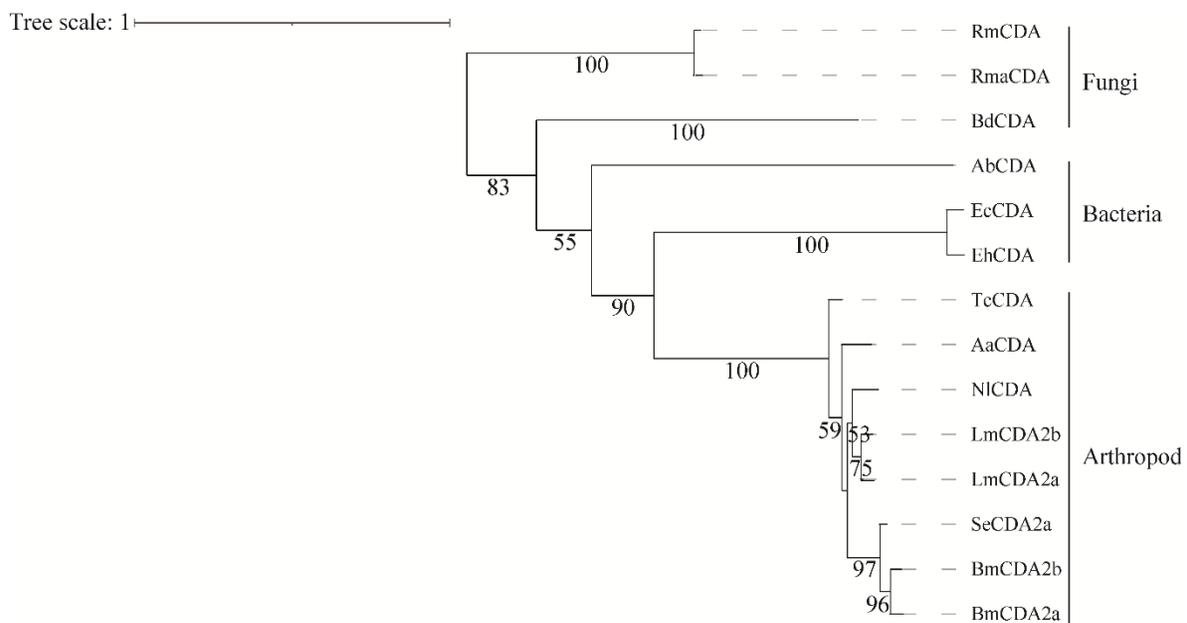


图 3 节肢动物、真菌和细菌的 CDA 系统进化树

Figure 3 Phylogenetic trees of CDA from arthropods, fungi and bacteria. Rm: *Rhizopus microsporus*; Rma: *Rhizopus microsporus* ATCC 52813; Bd: *Batrachochytrium dendrobatidis*; Ab: *Acinetobacter baumannii*; Ec: *Escherichia coli*; Eh: *Enterobacter hormaechei*; Se: *Spodoptera exigua*; Tc: *Tribolium castaneum*; Lm: *Locusta migratoria*; Ni: *Nilaparvata lugens*; Aa: *Aedes albopictus*; Bm: *Bombyx mori*.

表 2 BmCDA2a、BmCDA2b 的蛋白性质

Table 2 Comparison of basic information of BmCDA2a and BmCDA2b

Protein property	Protein name	
	BmCDA2a	BmCDA2b
Protein serial No. (NCBI)	NP_001103795.1	NP_001103796.1
mRNA length (nt)	2 153	2 135
Amino acid length (aa)	543	537
Molecular weight (kDa)	61.54	60.86
Theoretical pI	5.04	5.27
Phosphorylation modification site	T55, T265, S277, T384, S437, S478, T507, T520	T55, T259, S271, T378, S431, S472, T501, T514
Glycosylation modification site	N297	N291

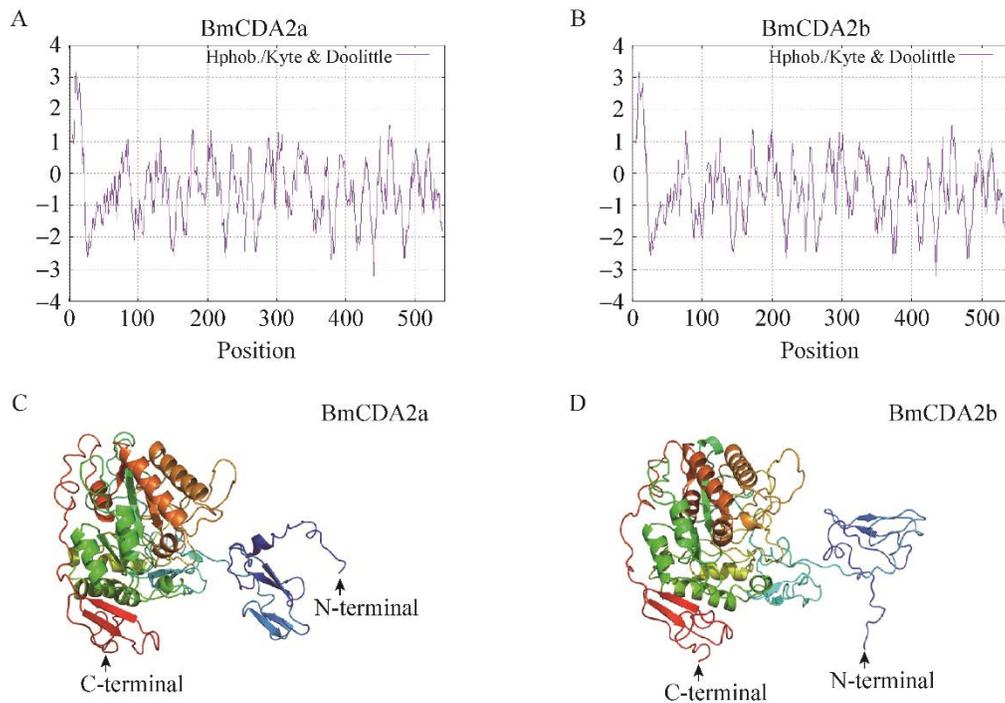


图 4 BmCDA2a (A、C) 和 BmCDA2b (B、D) 蛋白亲/疏水性分析和预测蛋白三维结构

Figure 4 Hydrophilic/hydrophobic analysis and three-dimensional structure of BmCDA2a (A, C) and BmCDA2b (B, D) proteins. The abscissa is the sequence position and the ordinate is the scale value of the amino acid (>0 means hydrophobicity, <0 means hydrophilicity).

利用 Robetta 在线网站和 PyMOLWin 软件对家蚕两个 CDA2 蛋白的三维结构进行全长预测, 结果如图 4 所示, BmCDA2a 与 BmCDA2b 的蛋白三维结构中的主要空间结构由 α -螺旋、 β 旋转角和无规则卷曲构成(图 4C、4D), 整体上较为相似; 根据多序列比对结果可知, 两个 CDA2 蛋白间的差异序列位于 N 端的 ChBD 结构域, 三维结构预测显示 BmCDA2a 有 4 个折叠和一个螺旋, BmCDA2b 有 2 个折叠, 两者差异较大。蛋白结构的差异可能导致两个蛋白的功能分化, 在家蚕不同发育时期发挥的功能有差异。

2.4 BmCDA2a 基因的克隆与分析

对 BmCDA2a 进行克隆表达分析。以家蚕品种大造 4 龄表皮的 cDNA 为模板, 用带有限制性内切酶位点的引物进行 PCR 扩增, PCR 产物的大小采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。结果显示,

在 1 000 bp 和 2 000 bp 之间有一条特异性条带, 和预期片段相符(图 5A)。对该 PCR 产物进行切胶回收, 连接 pMD19-T 载体后转化 *E. coli*, 筛选出阳性克隆进行测序, 得到 CDS 长度为 1 632 bp, 编码 543 个氨基酸, 具备信号肽区域、磷酸化修饰位点和糖基化修饰位点(图 5B)。比对结果表明, BmCDA2 基因克隆序列和家蚕 SilkDB 数据库预测基因序列一致。

2.5 重组质粒 pET-28a-BmCDA2a 的构建和鉴定

将克隆成功的质粒, 利用限制性内切酶 *Xho* I、*Hind* III 将 BmCDA2a 基因片段重组到 pET-28a 原核表达载体中, 筛选重组成功的菌株。对筛选阳性的质粒进行双酶切鉴定, 结果显示, 阳性质粒酶切后出现目的基因大小的片段, 同时双酶切后的载体片段和空质

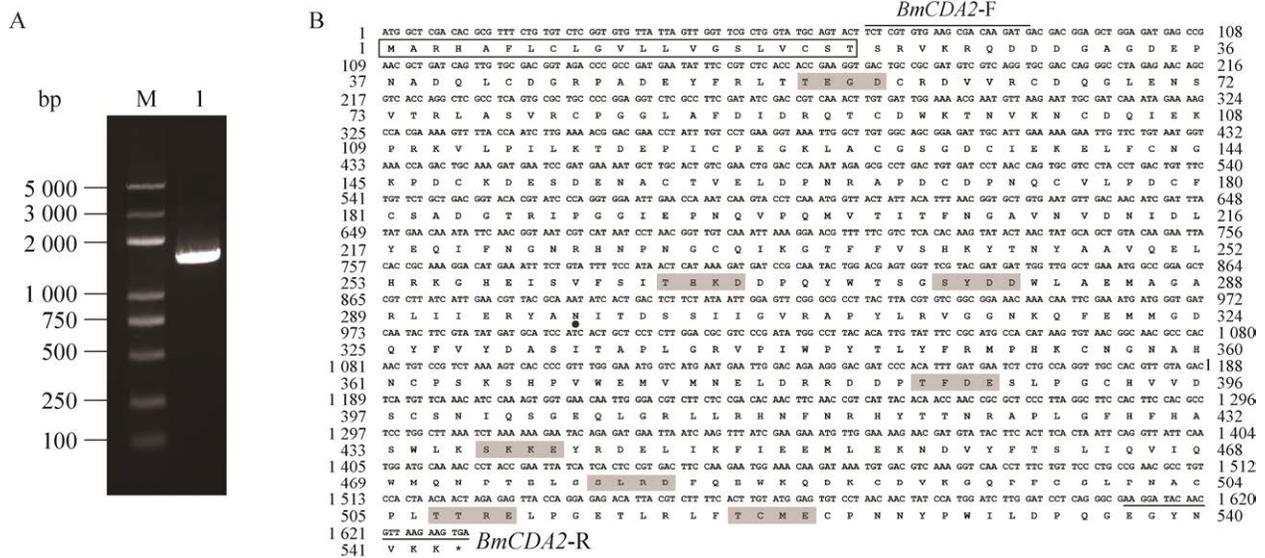


图 5 家蚕 *BmCDA2a* 基因的克隆(A)及分析(B)

Figure 5 Cloning and analysis of *BmCDA2a* gene. A: PCR amplification of the *BmCDA2a* gene. B: The ORF sequence of *BmCDA2a* gene and its deduced amino acids, the signal peptide region was highlighted in the black box, phosphorylation modification sites were highlighted in grey, and glycosylation modification site was highlighted in dot.

粒 pET-28a 的大小一致(图 6)。然后将该阳性质粒进行测序验证,结果表明,序列与克隆序列相同,说明成功构建 pET-28a-*BmCDA2a* 表达载体。

2.6 *BmCDA2a* 蛋白表达、纯化及抗体制备

为了获取 *BmCDA2a* 蛋白,将表达载体 pET28a-*BmCDA2a* 转至大肠杆菌 BL21(DE3)中,通过 IPTG 在不同温度下的诱导,使大肠杆菌表达 *BmCDA2a* 蛋白。结果显示,将获取的蛋白通过超声破碎并通过 SDS-PAGE 分析,检测到 *BmCDA2a* 蛋白主要在 16 °C 和 37 °C 沉淀组分中约 64 kDa 处出现特异性的清晰条带(图 7),而空载对照菌株 16 °C 和 37 °C 上清组分中均无条带出现,说明诱导的重组 *BmCDA2a* 蛋白主要以包涵体的形式存在。且 37 °C 条件下,蛋白表达量更高。

在确定最佳诱导条件之后,进行重组表达载体 pET28a-*BmCDA2a* 表达菌株的扩大培养。将收集到的沉淀溶解后,通过 Ni 柱亲和层析的

方法对 pET28a-*BmCDA2a* 表达菌株表达的蛋白

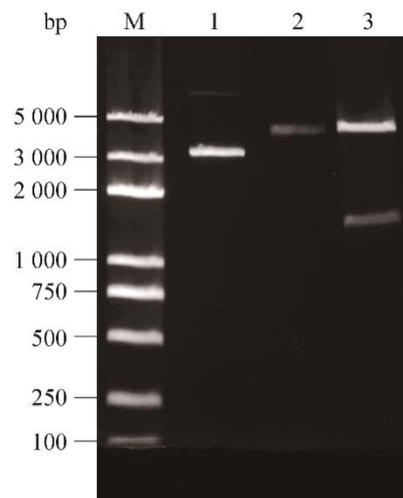


图 6 *BmCDA2a* 双酶切检测

Figure 6 *BmCDA2a* gene detection of restriction enzyme digestion. M: DNA Marker; 1: Empty plasmid of pET-28a; 2: pET-28a was digested by enzyme (*Xho* I, *Hind* III); 3: Digestion (*Xho* I, *Hind* III) of recombinant vector (pET28a-*BmCDA2a*).

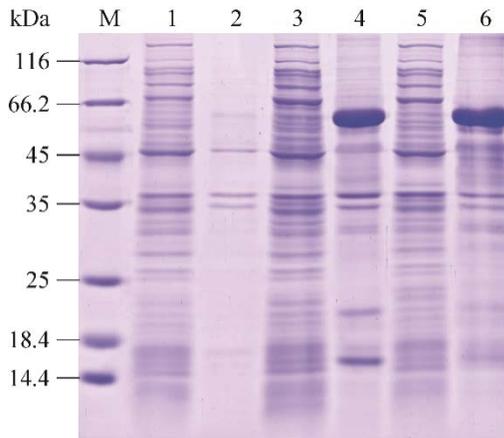


图7 pET28a-BmCDA2a 原核表达检测

Figure 7 Expression of recombinant pET28a-BmCDA2a detected by SDS-PAGE. M: Protein marker; 1: Supernatant of pET-28; 2: Precipitation of pET-28; 3: Supernatant of pET28a-BmCDA2a induced at 16 °C for 20 h; 4: Precipitation of pET28a-BmCDA2a induced at 16 °C for 20 h; 5: Supernatant of pET28a-BmCDA2a induced at 37 °C for 4 h; 6: Precipitation of pET28a-BmCDA2a induced at 37 °C for 4 h.

进行初步纯化 (图 8A), 结果显示, Ni 柱亲和层析主要在 100、200 和 500 mmol/L 咪唑的条

件下被洗脱下来。在此基础上, 采用蛋白切胶回收的方法进一步纯化目的蛋白。通过切胶回收、电洗脱、透析、浓缩等方法, 将纯化的蛋白进行 SDS-PAGE 检测, 结果显示约在 64 kDa 处有一条清晰且周围未见明显杂带的蛋白条带 (图 8B), 与目的蛋白条带位置相符, 凝胶成像系统分析蛋白纯度大于 90%, 经定量分析, 获得的纯化后的蛋白浓度为 0.8 mg/mL。将纯化的 BmCDA2a 蛋白制备抗体, 成功得到血清效价超过 1:50 000 的多克隆抗体。对抗体进行亲和层析纯化后, 与抗原进行 Western blotting 检测, 在约 64 kDa 处有特异性识别条带, 说明该抗体可用于后续实验。

2.7 BmCDA2 组织 Western blotting 检测

利用制备的抗体对家蚕 5 龄第 3 天各组织中 BmCDA2 的表达情况进行检测, 结果显示, BmCDA2 蛋白在表皮中大量积累, 头部具有十分微弱的信号, 而在中肠、脂肪体、卵巢、精巢、马氏管以及丝腺中几乎不能检测到该蛋白的存在 (图 9)。

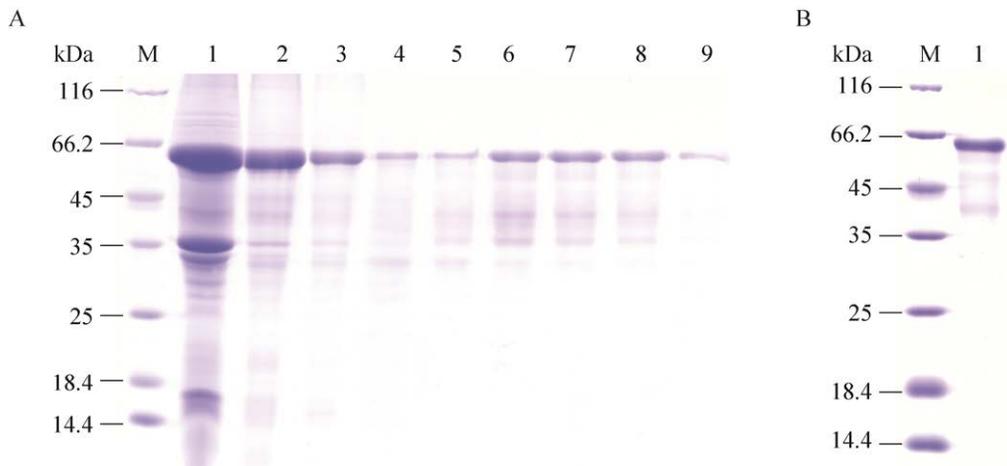


图8 pET28a-BmCDA2a 蛋白纯化

Figure 8 Purification of recombinant pET28a-BmCDA2a. A: Affinity chromatography of recombinant pET28a-BmCDA2a. M: Protein marker; 1: Original solution; 2: Flow-through; 3: Pooled washing fractions; 4, 5, 6, 7, 8, 9: Elution with 20 mmol/L, 50 mmol/L, 100 mmol/L, 200 mmol/L, 500 mmol/L, and 1 mol/L imidazole, respectively. B: SDS-PAGE detection of recombinant pET28a-BmCDA2a. M: Protein marker; 1: Recombinant BmCDA2a protein after purification.

2.8 BmCDA2 免疫荧光定位

为了进一步探究 BmCDA2 在家蚕蜕皮期表皮中的定位情况, 利用免疫荧光技术, 对家蚕 4 龄幼虫蜕皮各时期的 BmCDA2 蛋白进行定位。检测结果显示, BmCDA2 与几丁质共定位到家蚕表皮中, 且 4 龄幼虫眠期 6 h 就可以明

显观察到新表皮的出现(图 10, A1–A4)。随着新表皮的不断形成, 新表皮上的 BmCDA2 蛋白逐渐增多, 并由弥散变得集中(图 10, A2–D2, A4–D4), 直到完全褪去旧表皮变成 5 龄起蚕, 暗示着 BmCDA2 可能参与了新表皮形成, 在家蚕蜕皮变态发育过程中有着十分重要的作用。

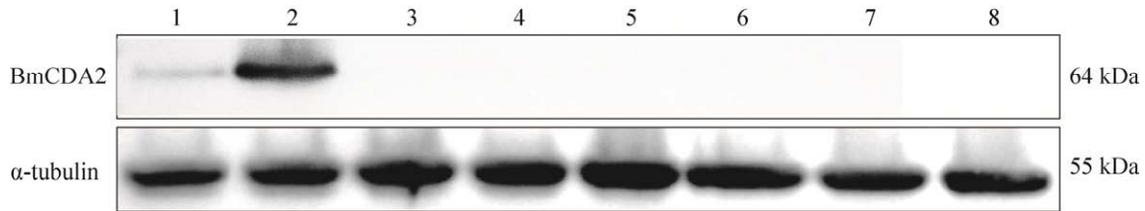


图 9 BmCDA2 在不同组织中的 Western blotting 检测

Figure 9 Western blotting analysis of BmCDA2 in different tissues. 1: Head; 2: Epidermis; 3: Midgut; 4: Fat body; 5: Ovary; 6: Testis; 7: Malpighian tubule; 8: Silk gland.

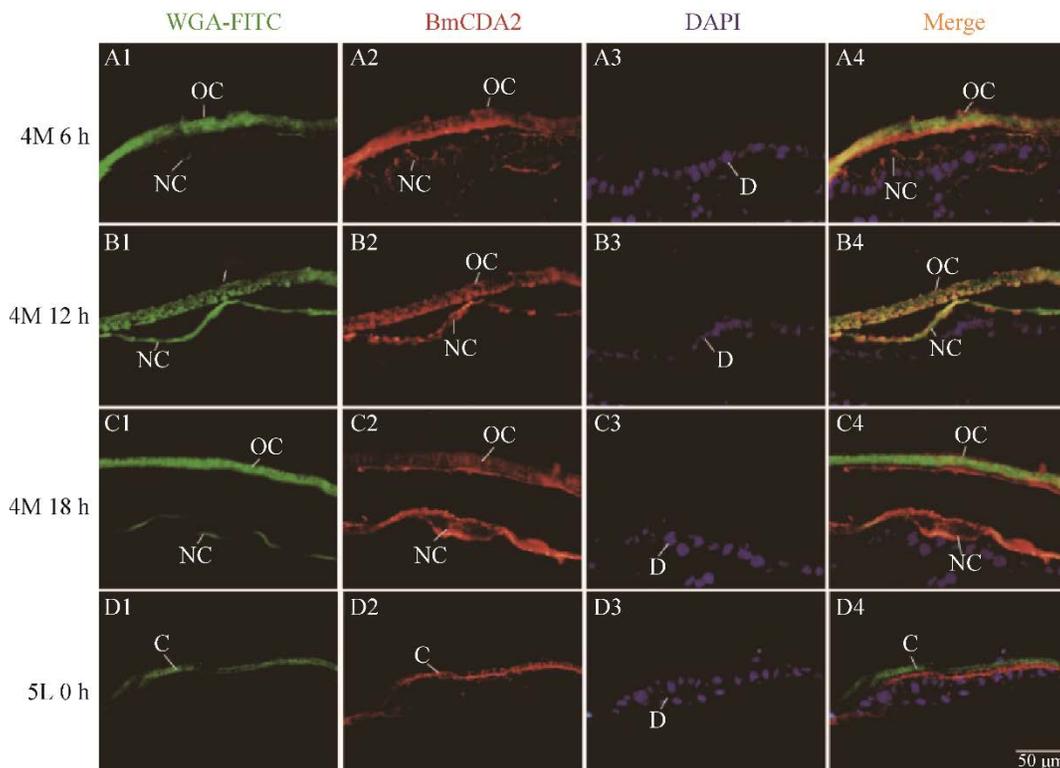


图 10 BmCDA2 在 4 龄幼虫眠期家蚕表皮中的免疫荧光定位

Figure 10 Localization of BmCDA2 by immunofluorescence in epidermis from silkworm on 4th molt. Green fluorescence: Chitin; Red fluorescence: BmCDA2; Blue fluorescence: Nucleus; Merge: Overlay signals; 4M 6 h: 6 h of 4th molt; 4M 12 h: 12 h of 4th molt; 4M 18 h: 18 h of 4th molt; 5L 0 h: Newly molted larvae; OC: Old cuticle; NC: New cuticle; C: Cuticle.

3 讨论与结论

CDA 属于碳水化合物酯酶家族 4 (carbohydrate esterase family 4), 是一类金属酶^[10]。能催化脱去几丁质分子中 N-乙酰葡萄糖胺链上的乙酰基, 当几丁质去乙酰化到一定程度, 则变为壳聚糖 (chitosan)^[21]。研究者最早是在粉纹夜蛾的中肠围食膜中发现了昆虫的 CDA^[16], 该蛋白具有 CDA 结构域, 并且具有很强的几丁质结合能力。CDA2 在果蝇^[12-13]、云杉蚜虫 (*Choristoneura fumiferana*)^[22] 和苹果蠹蛾 (*Cydia pomonella*)^[23] 等昆虫中均发现有两种不同的 mRNA 拼接形式产生两种蛋白。该现象在家蚕中同样存在, 产生 *BmCDA2a* 和 *BmCDA2b* 两种拼接形式, 仅在序列的第 3 个和第 4 个外显子存在差异。蛋白序列分析发现 *BmCDA2a* 和 *BmCDA2b* 蛋白都有 CDA 结构域、ChBD 结构域和 LDLa 结构域, 属于典型的第 2 类 CDAs 蛋白, 差异导致 ChBD 结构域的 20 个氨基酸残基不同^[24]。有趣的是, *BmCDA2a* 主要在幼虫眠期高量表达, *BmCDA2b* 主要在化蛹期高量表达。关于昆虫幼虫和蛹表皮几丁质去乙酰化程度差异还未曾有报道, 但有研究表明, CDA2 在果蝇中会参与表皮的形成^[12-13], 因此, 我们推测 CDA2 两种剪接形式编码的蛋白可能分别在幼虫和蛹阶段与不同修饰程度几丁质结合, 参与不同发育阶段的表皮形成组装。

组学研究发现蜕皮液中具有 BmCDAs, 暗示着几丁质去乙酰化酶在家蚕蜕皮过程中的关键作用^[25]。Western blotting 分析发现, *BmCDA2* 较为特异地在表皮大量表达, 与转录水平的检测结果一致^[19]。昆虫为了保证正常的发育和变态, 通常会在保幼激素 (juvenile hormone) 与蜕皮激素的协调作用下, 尤其是在蜕皮激素的调控下完成蜕皮^[26-28]。已有研究表明, 经过 20E

处理后 *BmCDA2* 在个体和细胞水平均表现为上调表达^[19]。由此推测 *BmCDA2* 可能受激素的调控参与了幼虫蜕皮过程, 在其他昆虫如赤拟谷盗中也有相似的报告^[29]。免疫荧光定位实验结果发现, *BmCDA2* 几乎是分泌在整个几丁质层, 表现出与几丁质强烈的结合作用, 随着新表皮的形成逐渐增多、积累, 由此认为 *BmCDA2* 可能在蜕皮激素的指导下参与了幼虫新表皮的形成或几丁质装配。

有研究表明, 果蝇的 CDA 敲除以后发现两种几丁质去乙酰化酶 CDA1、CDA2 (serpentine, vermiform) 能够限制气管长度^[12-13], 在褐飞虱中对于 CDA 进行 RNA 双链干扰可以使褐飞虱致死^[30]。已有研究发现, 对家蚕的 *BmCDA2* 进行干涉后虽然蚕蛹能正常变态蜕皮, 但是化蛹时间明显推迟^[19], 由此推断 *BmCDA2* 主要参与了这一时期的蜕皮过程, 可能对新表皮的几丁质进行去乙酰化修饰, 从而调节皮肤通透性和软硬度, 以满足家蚕发育变态的需要。基因组编辑在昆虫功能研究中已经得到广泛应用, 在后期工作中, 我们将利用编辑技术敲除 *BmCDA2* 基因, 并希望能够通过特异地编辑第 3 外显子和第 4 外显子, 以研究不同剪切形式基因的功能。

综上所述, 本研究成功地对 *BmCDA2* 蛋白进行了原核表达和定位研究, 该结果丰富了家蚕 CDAs 家族的生物学功能研究内容, 为研究昆虫几丁质代谢关键基因的筛选提供了理论依据, 为研究昆虫变态发育提供了一种新思路; 在本研究中我们发现该蛋白在原核表达中是以沉淀形式存在, 为了进一步开展其活性分析, 后期我们将尝试采用酵母系统表达, 以获得有活性的蛋白进行深入研究; 并利用荧光素酶表达系统研究蜕皮激素和蜕皮激素下游重要转录因子对该基因启动子的调控作用。

REFERENCES

- [1] 黄君霆, 朱万民, 夏建国. 中国蚕丝大全[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1996: 278-280.
HUANG JT, ZHU WM, XIA JG. Complete Works of Sericultural Technology in China[M]. Chengdu: Sichuan Scientific & Technical Publishers, 1996: 278-280 (in Chinese).
- [2] SONG Y, VILLENEUVE DL, TOYOTA K, IGUCHI T, TOLLEFSEN KE. Ecdysone receptor agonism leading to lethal molting disruption in arthropods: review and adverse outcome pathway development[J]. Environmental Science & Technology, 2017, 51(8): 4142-4157.
- [3] MESCE KA, FAHRBACH SE. Integration of endocrine signals that regulate insect ecdysis[J]. Frontiers in Neuroendocrinology, 2002, 23(2): 179-199.
- [4] 王荫长, 王洪平. 昆虫生理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 7.
WANG YC, WANG HP. Insect Physiology[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2004: 7 (in Chinese).
- [5] 谢康, 王鑫, 陈慧芳, 李懿, 宋倩茹, 赵萍. 家蚕前部丝腺特异表皮蛋白 Bm11721 的鉴定及表达[J]. 生物工程学报, 2016, 32(1): 64-73.
XIE K, WANG X, CHEN HF, LI Y, SONG QR, ZHAO P. Identification and expression patterns of anterior silk gland specific cuticle protein Bm11721 in the silkworm (*Bombyx mori*)[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2016, 32(1): 64-73 (in Chinese).
- [6] RINAUDO M. Chitin and chitosan: properties and applications[J]. Progress in Polymer Science, 2006, 31(7): 603-632.
- [7] MOUSSIAN B, SCHWARZ H, BARTOSZEWSKI S, NÜSSLEIN-VOLHARD C. Involvement of chitin in exoskeleton morphogenesis in *Drosophila melanogaster*[J]. Journal of Morphology, 2005, 264(1): 117-130.
- [8] GUMIENNA M, GÓRNA B. Antimicrobial food packaging with biodegradable polymers and bacteriocins[J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2021, 26(12): 3735.
- [9] TSIGOS I, MARTINO A, KAFETZOPOULOS D, BOURIOTIS V. Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology[J]. Trends in Biotechnology, 2000, 18(7): 305-312.
- [10] DIXIT R, ARAKANE Y, SPECHT CA, RICHARD C, KRAMER KJ, BEEMAN RW, MUTHUKRISHNAN S. Domain organization and phylogenetic analysis of proteins from the chitin deacetylase gene family of *Tribolium castaneum* and three other species of insects[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2008, 38(4): 440-451.
- [11] MERZENDORFER H, ZIMOCH L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases[J]. The Journal of Experimental Biology, 2003, 206(Pt 24): 4393-4412.
- [12] WANG SQ, JAYARAM SA, HEMPHÄLÄ J, SENTI KA, TSAROUHAS V, JIN HN, SAMAKOVLIS C. Septate-junction-dependent luminal deposition of chitin deacetylases restricts tube elongation in the *Drosophila* trachea[J]. Current Biology: CB, 2006, 16(2): 180-185.
- [13] LUSCHNIG S, BÄTZ T, ARMBRUSTER K, KRASNOW MA. *serpentine* and *vermiform* encode matrix proteins with chitin binding and deacetylation domains that limit tracheal tube length in *Drosophila*[J]. Current Biology, 2006, 16(2): 186-194.
- [14] YU HZ, LIU MH, WANG XY, YANG X, WANG WL, GENG L, YU D, LIU XL, LIU GY, XU JP. Identification and expression profiles of chitin deacetylase genes in the rice leaf folder, *Cnaphalocrocis medinalis*[J]. Journal of Asia-Pacific Entomology, 2016, 19(3): 691-696.
- [15] YU RR, LIU WM, LI DQ, ZHAO XM, DING GW, ZHANG M, MA EB, ZHU KY, LI S, MOUSSIAN B, ZHANG JZ. Helicoidal organization of chitin in the cuticle of the migratory locust requires the function of the chitin Deacetylase2 enzyme (LmCDA2)[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2016, 291(47): 24352-24363.
- [16] GUO W, LI GX, PANG Y, WANG P. A novel chitin-binding protein identified from the peritrophic membrane of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2005, 35(11): 1224-1234.
- [17] CAMPBELL PM, CAO AT, HINES ER, EAST PD, GORDON KHJ. Proteomic analysis of the peritrophic matrix from the gut of the caterpillar, *Helicoverpa armigera*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2008, 38(10): 950-958.
- [18] ZHONG XW, WANG XH, TAN X, XIA QY, XIANG ZH, ZHAO P. Identification and molecular characterization of a chitin deacetylase from *Bombyx mori* peritrophic membrane[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(2): 1946-1961.
- [19] ZHANG ZY, YAN JM, LIU Q, ZHANG YH, GONG J, HOU Y. Genome-wide analysis and hormone

- regulation of chitin deacetylases in silkworm[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(7): 1679.
- [20] WANG GH, XIA QY, CHENG DJ, DUAN J, ZHAO P, CHEN J, ZHU L. Reference genes identified in the silkworm *Bombyx mori* during metamorphosis based on oligonucleotide microarray and confirmed by qRT-PCR[J]. Insect Science, 2008, 15(5): 405-413.
- [21] YOUNES I, RINAUDO M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications[J]. Marine Drugs, 2015, 13(3): 1133-1174.
- [22] QUAN GX, LADD T, DUAN J, WEN FY, DOUCET D, CUSSON M, KRELL PJ. Characterization of a spruce budworm chitin deacetylase gene: stage- and tissue-specific expression, and inhibition using RNA interference[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2013, 43(8): 683-691.
- [23] 石国良, 武强, 杨念婉, 黄聪, 刘万学, 钱万强, 万方浩. 苹果蠹蛾几丁质脱乙酰基酶 2 的基因克隆、表达模式和分子特性[J]. 中国农业科学, 2021, 54(10): 2105-2117.
- SHI GL, WU Q, YANG NW, HUANG C, LIU WX, QIAN WQ, WAN FH. Gene cloning, expression pattern and molecular characterization of chitin deacetylase 2 in *Cydia pomonella*[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2021, 54(10): 2105-2117 (in Chinese).
- [24] 郝威, 何旭玲, 徐豫松. 家蚕几丁质脱乙酰基酶基因结构及 mRNA 选择性剪接与表达差异的研究[J]. 蚕业科学, 2010, 36(6): 921-929.
- HAO W, HE XL, XU YS. Gene structure, mRNA alternative splicing and expression pattern of chitin deacetylases in silkworm, *Bombyx mori*[J]. Science of Sericulture, 2010, 36(6): 921-929 (in Chinese).
- [25] QU MB, MA L, CHEN P, YANG Q. Proteomic analysis of insect molting fluid with a focus on enzymes involved in chitin degradation[J]. Journal of Proteome Research, 2014, 13(6): 2931-2940.
- [26] GILBERT LI, RYBCZYNSKI R, WARREN JT. Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway[J]. Annual Review of Entomology, 2002, 47: 883-916.
- [27] TRUMAN JW, RIDDIFORD LM. The morphostatic actions of juvenile hormone[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2007, 37(8): 761-770.
- [28] JINDRA M, PALLI SR, RIDDIFORD LM. The juvenile hormone signaling pathway in insect development[J]. Annual Review of Entomology, 2013, 58: 181-204.
- [29] ARAKANE Y, DIXIT R, BEGUM K, PARK Y, SPECHT CA, MERZENDORFER H, KRAMER KJ, MUTHUKRISHNAN S, BEEMAN RW. Analysis of functions of the chitin deacetylase gene family in *Tribolium castaneum*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2009, 39(5/6): 355-365.
- [30] XI Y, PAN PL, YE YX, YU B, ZHANG CX. Chitin deacetylase family genes in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae)[J]. Insect Molecular Biology, 2014, 23(6): 695-705.

(本文责编 郝丽芳)