

doi: 10.3969/j.issn.1674-0858.2016.03.18

小菜蛾 PGRP-SA 的体外表达及介导酚氧化酶活力的研究

张玉清, 许小霞, 郑志华, 余 静, 高延富, 欧阳莉娜, 金丰良*

(华南农业大学农学院昆虫学系, 广东省生物农药创制与应用重点实验室, 广州 510642)

摘要: 肽聚糖识别蛋白 (Peptidoglycan Recognition Proteins, PGRPs) 是可以识别肽聚糖和含肽聚糖的细菌的一类模式识别受体, 在介导酚氧化酶级联反应中起着重要的作用。本研究以实验室克隆的小菜蛾 *PxPGRP-SA* (GenBank No. EU399240) 为基础, RT-PCR 克隆了其开放阅读框 (ORF), 在原核细胞中获得了高效重组表达, 利用 GST 一步纯化的融合蛋白免疫新西兰大白兔, 制备了抗血清, 滴定效价为 1:51200。Western blot 检测表明 *Micrococcus luteus* 和 *Serratia marcescens* 可以显著提高 *PxPGRP-SA* 在小菜蛾血淋巴中的含量。为了检测 *PxPGRP-SA* 与酚氧化酶 PO 的活力关系, 本研究将 *PxPGRP-SA* 连接到真核表达载体 pMT/Bip/V5/HisA 构建真核表达质粒 pMTAPGRP, 转染果蝇 S2 细胞中, 获得稳定的细胞系, 硫酸铜诱导获得表达后用 anti-V5 纯化获得重组蛋白 *PxPGRP-SA*。将重组蛋白 *PxPGRP-SA* 与 *M. luteus* 和 *S. marcescens* 分别温育后, 可以显著提高小菜蛾血浆中 PO 的活力。本研究结果阐明了重组蛋白 *PxPGRP-SA* 在小菜蛾体 PO 级联反应中的功能, 为进一步研究 *PxPGRP-SA* 在小菜蛾体内免疫信号通路中的功能奠定了基础。

关键词: 小菜蛾; 肽聚糖识别蛋白; 酚氧化酶; 细胞表达

中图分类号: Q963; S433.4

文献标志码: A

文章编号: 1674-0858 (2016) 03-0571-10

The research of PGRP-SA's expression *in vitro* and its involving in phenoloxidase activity from *Plutella xylostella*

ZHANG Yu-Qing, XU Xiao-Xia, ZHENG Zhi-Hua, YU Jing, Gao Yan-Fu, OUYANG Li-Na, JIN Feng-Liang* (Key Laboratory of Bio-Pesticide Creation and Application of Guangdong Province, Department of Entomology, College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstracts: Peptidoglycan Recognition Protein (PGRPs) are one family of pattern recognition receptors, which can recognize peptidoglycan, or bacteria containing peptidoglycan, and are playing an important role in mediating the phenoloxidase activity. In this study, based on the sequence encoding short type PGRP (GenBank No. EU399240) which was obtained from *Plutella xylostella* in our lab, the open reading frame (ORF) sequence of *PxPGRP-SA* was amplified by RT-PCR and cloned into prokaryotic plasmid. The fusion protein was highly expressed in prokaryotic cell and purified by GST tag. The purified fusion protein was immunized the New Zealand white rabbit to prepare the antiserum. The titre of the prepared antiserum is 1:51200. Western blot revealed that microbes including *Micrococcus luteus* and *Serratia marcescens* can induce the expression of protein *PxPGRP-SA* in *P. xylostella*. In order to clarify whether the protein *PxPGRP-SA* is involving in the activating of prophenoloxidase (PPO) in *P. xylostella*. In the present study, *PxPGRP-SA* sequence is ligated into eukaryotic expression vector pMT/BiP/V5/HisA, and was transiently transfected into *Drosophila* S2 cells and the stable cell lines containing recombinant *PxPGRP-SA* plasmid

基金项目: 国家自然科学基金 (30900943, 1071734); 广州市科技计划项目 (201509010023)

作者简介: 张玉清, 男, 1990 年生, 硕士研究生, 研究方向为昆虫免疫学。

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

收稿日期 Received: 2016-01-12; **接受日期** Accepted: 2016-02-11

were induced by CuSO_4 . Recombinant protein PxPGRP-SA was purified from S2 cells by V5 tag. When the recombinant protein PxPGRP-SA was incubated with two microbes *M. luteus* and *S. marcescens* separately, the PO activity was increased significantly. This study illustrates the function of the recombinant protein PxPGRP-SA takes a vital role was involved in activating the PPO in *P. xylostella*, and our results, lay the foundation for the further research of PxPGRP-SA owning the immune function of signaling pathways in *P. xylostella*.

Key words: *Plutella xylostella*; Peptidoglycan Recognition Protein (PGRPs); Phenoloxidase (Po); cell expression

在昆虫天然免疫系统中, 模式识别受体 (Pattern Recognition Receptors, PRRs) 识别非己异物是免疫反应的第一步。PRRs 由有限数量的胚系基因编码, 进化上十分保守, 对生物体的生存极为重要, 其与病原微生物表面的病原体相关分子模式 (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs) 的相互识别和作用启动天然免疫应答的关键 (Kang *et al.*, 1998; Ochiai and Ashida, 1999; Werner *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2002)。

肽聚糖识别蛋白 (Peptidoglycan Recognition Proteins, PGRPs) 是昆虫体内重要的一类 PRRs, 首次在家蚕血淋巴中发现并纯化, 此蛋白能够专一性结合革兰氏阳性菌细胞壁肽聚糖 (Peptidoglycans, PGN) (Yoshida *et al.*, 1996)。PGRPs 可识别不同种类的细菌病原体, 它与 PGN 有高度粘附性, 可识别 PGN 和含 PGN 的细菌, 进而激活 Toll 或 Imd 信号途径产生抗菌肽, 在免疫应答中发挥重要的识别和调节功能 (Yoshida *et al.*, 1996; Kang *et al.*, 1998)。对于外来入侵的病原物而言, 昆虫免疫的识别位点是细菌细胞壁上的肽聚糖。果蝇的天然免疫系统能够通过 PGRPs 区分 Lys 和 DAP (Diaminopimelic Acid, DAP) 型的肽聚糖 (Ferrandon *et al.*, 2007)。革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的肽聚糖组成不同, 在革兰氏阳性菌的细胞壁中肽聚糖在细菌细胞壁的外层, 是 Lys 类型; 而革兰氏阴性菌最外层不是肽聚糖而是脂多糖, 由脂质 A、核心多糖和 O 抗原三部分组成, 但是它们不会激活 Imd 途径, 真正激活 Imd 途径的是细胞壁中的 DAP 型肽聚糖 (Leulier *et al.*, 2003; Kaneko *et al.*, 2004)。

昆虫 PGRPs 蛋白在识别细菌侵染时, 除激活 Toll 或 Imd 信号途径产生抗菌肽外, 也会激活酚氧化酶原级联反应抵御细菌的侵染。酚氧化酶 (phenoloxidase, PO) 以无活性的酶原形式 - 酚氧化酶原 (prophenoloxidase, PPO) 存在于昆虫血淋

巴、中肠和表皮等组织, 当病原生物入侵时, 通过特异性丝氨酸蛋白酶的级联反应 (PPO 级联) 被活化, 参与机体的免疫防御反应 (时超美, 2000)。果蝇体内, DmPGRP-LE 在幼虫中过量表达可以激活 Imd 途径和酚氧化酶原级联反应 (Takehana *et al.*, 2002); PGRP-SA 和-SD 结合 Lys-PG 诱导 Toll 途径, 而且 PGRP-SA 也参与酚氧化酶原级联反应 (Charroux *et al.*, 2009)。在黄粉虫 *Tenebrio molitor* 中 PGRP-SA 家族识别 Lys 类型 PGN, 并激活酚氧化酶原级联反应和 Toll 途径 (Park *et al.*, 2007)。家蚕的 PGRP-S 能够识别 PGN 和革兰氏阳性菌, 并能激活酚氧化酶原级联反应, 在表皮、血淋巴及组织中产生黑色素, 包裹微生物从而限制其感染 (刘晨, 2013)。PGRPs 在昆虫天然免疫应答中发挥着重要的识别和调节功能, 可以识别侵染的微生物, 直接或间接激活酚氧化酶原级联反应, 但机理尚不清楚。为探讨 PGRPs 在害虫免疫系统中对 PO 的激活机理, 本研究根据实验室已经获得小菜蛾 *P. xylostella* 的一种短型 PxPGRP-SA (GenBank No. EU399240) 全长 cDNA 序列为基础, 在原核细胞中高效表达了 PxPGRP-SA 的 ORF, 获得了抗血清。在果蝇 S2 细胞中高效表达并纯化了重组蛋白 PxPGRP-SA, 重组蛋白与诱导因子混合能显著提高 PO 的活力。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫和细胞

小菜蛾 *Plutella xylostella* L. 由华南农业大学生物防治教育部工程研究中心保存, 光周期为 L:D = 14 h: 10 h, 温度 $27^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, 相对湿度 60% - 70%。供试昆虫细胞, 果蝇 S2 细胞系 (*Drosophila melanogaster* Schneider S2), 由中山大学生命科学院学院张文庆教授惠赠, 果蝇 S2 细胞的培养条件: 培养基为含 10% 热灭活胎牛血清的 Schneider

S2 专用培养基 (Gibco, USA), 并添加 1% 青霉素链霉素溶液, 在 27℃ 恒温培养箱中培养。

1.2 质粒与菌株

克隆载体 pMD18-T, 购自宝生物工程 (大连) 有限公司, 真核表达载体 pMT/BiP/V5-His A 和 pCoBlast 质粒由美国密苏里州立大学 Xiaoqiang Yu 教授惠赠。原核表达载体 pGEX4T-1 及大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 和 BL21, 枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*, 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*, 藤黄微球菌 *Micrococcus luteus* 和粘质沙雷氏菌 *Serratia marcescens* 由本实验室保存。

1.3 主要试剂药品

Blasticidine S 购自 InvivoGen 公司, 热灭活胎牛血清和 Schneider S2 专用培养基购自 Gibco 公司, 限制性内切酶 *Eco*RI、*Sal*I、*Hind* III、*Bgl* II、*Ex*Taq、dNTP Mixture、DL2000 Marker 购自 New England Biolab (NEB) 公司; 质粒抽提试剂盒、凝胶回收试剂盒购自 Omega 公司, GST 融合蛋白纯化树脂购自 GE Healthcare 公司。DES Inducible/Secreted 试剂盒结合购自 Invitrogen 公司, 标准低分子量蛋白购自 Pharmacia 公司。CM-Sephrose CL-6B 柱购自 Amersham Biosciences 公司; DNA marker、*Ex* Taq 购自 Takara 公司; 硫酸铜、DEPC、IPTG、EB Free 均购自 Sigma 公司, 其他的试剂均为国产分析纯。

1.4 小菜蛾 PGRP 基因的原核表达

根据小菜蛾 *PxPGRP-SA* 基因的 ORF (open reading frame) 序列设计一对特异性引物, 引物序列 (*PxPGRP-SA-F* *Eco*RI: GTTGAATTCATGACGTTGTCTTTTGGCGTG, *PxPGRP-SA-R* *Sal*I: GCGGTCGACCTTGTGTTTTTAATCTTATCA), 为了便于将 PCR 产物亚克隆到表达载体 pGEX4T-1 上, 在上游引物设计了 *Eco*RI 酶切位点, 下游引物中有 *Sal*I 酶切位点。PCR 产物用 *Eco*RI 和 *Sal*I 双酶切, 经胶回收纯化, 与经同样双酶切的表达质粒 pGEX4T-1 连接, 构建表达质粒 pGEX4T-PxPGRP-SA 并转化入 BL21 (DE3) 大肠杆菌感受态细胞中。将酶切和测序鉴定正确的单克隆于 2 mL LB 培养基中 (含 50 μ g/mL 氨苄青霉素) 过夜培养, 次日以 1:100 稀释继续 37℃ 培养, 当 A₆₀₀ = 0.8 时, 加入终浓度为 0.5 mM 的 IPTG (Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside) 诱导目的蛋白的表达。28℃ 培养 4 h 后, 12000 rpm, 4℃ 离心收集培养物, 弃上清。沉淀物用细菌裂解液 (1.5% 十二烷基氨酸

钠, 1 mM PMSF, 1% TritonX-100, 1 mg/mL 溶菌酶), 冰上裂解 30 min 后, 间歇超声至菌液清亮; 12000 rpm, 4℃ 离心收集离心收集上清, 按照 GE 公司 GST Fusion Protein Spin Purification Kit 说明书, 纯化过程包括填柱、结合和洗涤。填柱: 0.5 mL 的 GST 珠子悬液, 静置 30 min, 待其沉降完全, 10 倍柱体积的 PBS 清洗柱子; 结合: 将裂解上清液上柱; 洗涤: 10 倍柱体积 wash buffer 清洗纯化柱, 然后 3 倍柱体积 elution buffer 洗脱蛋白, 利用 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 检测蛋白的纯化情况。经透析、冷冻干燥并最终溶解于 PBS (pH7.4) 使其终浓度为 1 mg/mL, 置于 -80℃ 冰箱保存。

1.5 多克隆抗体的制备及其纯化

参照 Sambrook (1989) 的方法进行。免疫接种前先取耳静脉血样作为阴性对照。以纯化融合蛋白 GST-PxPGRP-SA 作为抗原, 取抗原约 600 μ g, 与等体积的弗氏完全佐剂混合均匀, 完全乳化后, 于兔背部分 20-30 个点皮下注射。两周后, 取抗原约 600 μ g, 与等体积的弗氏不完全佐剂混合均匀, 完全乳化后, 注射加强针。共加强 3 次, 每次间隔 2 周。在每次注射加强针后, 耳静脉取血 3 mL 检测抗体水平。第 3 次注射加强针后 10 d 内颈动脉取血。将新鲜采集的血液置 37℃ 中作用 30 min 至 1 h, 使血液凝固, 将血凝块与容器周边划开, 然后转移至 4℃ 中过夜。使血凝块收缩, 在 4℃ 下用 10000 g 离心 10 min, 取其上清。将抗体分装保存, 置于 -70℃ 保存。

利用正辛酸-硫酸铵分部沉淀法纯化抗体。取一份抗血清加入 4 份 60 mM (pH4.0) 的醋酸 Buffer, 用 NaOH 调节 pH 为 4.5。以每毫升稀释液中加入 25 μ L 正辛酸的比例, 搅拌 30 min。4℃, 10000 g 离心。弃沉淀, 取上清液通过定性滤纸过滤, 加入 5 倍体积的 1 $\times$ PBS, 调节 pH 为 7.4, 然后在冰浴下按每毫升混合液加 0.27 g 硫酸铵, 继续搅拌 30 min。4℃, 9000 g 离心 15 min, 收集沉淀, 溶解于 1 $\times$ PBS 中, 透析至无 NH₄⁺, 冷冻干燥, -70℃ 保存。

1.6 小菜蛾 PGRP 在 S2 细胞中的表达及纯化

根据小菜蛾 *PxPGRP* 基因的 ORF 序列设计一对特异性引物, 为了便于将 PCR 产物亚克隆到真核表达载体 pMT/BiP/V5-His A 上。上游引物中引入酶切位点 *Bgl* II, 下游引物中引入 *Eco*RI 酶切位点, 引物序列: (*PGRP-SA-F* *Bgl* II: GTTAGATCTA

TGACGTTGTCTTTTGGCGTG, PGRP-SA-R *EcoRI*: GCGGAATTCCTTGTGTGTTTTTAATCTTATCA)。PCR 产物用 *Bgl*II 和 *EcoRI* 双酶切, 经割胶回收纯化后, 与经同样双酶切的表达质粒 pMT/BiP/V5-His A 连接, 构建表达质粒 pMTAPxPGRP-SA 并转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 挑斑并进行酶切和测序鉴定。

将传至 4 代的 S2 细胞, 用 6 孔细胞培养板 (Falcon, USA) 以 $1.5 - 2.5 \times 10^6$ 细胞/孔接种于 2 mL 含 10% 胎牛血清 Schneider S2 培养基中。27℃ 过夜培养细胞直到细胞长至 70% 汇合。加 2 mL Schneider S2 培养基 (无血清无抗生素) 在 6 孔板中, 每孔加 8×10^5 S2 细胞, 把细胞放置在室温 45 min。用 100 μ L 的 Schneider S2 培养基 (无血清无抗生素) 稀释 1 μ g 的质粒 DNA, 用移液枪充分混匀后, 置于室温下培养 5 min。将 3 μ L 的脂质体加入到 100 μ L 的 Schneider 培养基 (无血清无抗生素) 用移液枪充分混匀后, 在室温下培养 5 min。把稀释的质粒 DNA 和脂质体轻轻混匀后, 在室温静止 45 min。把混合物逐滴加入到 6 孔板后, 置于 27℃ 培养箱中培养 8 h 更换培养基 (含 10% 血清和 1% 青霉素链霉素溶液) 在 27℃ 培养 24 h 后, 利用 SDS-PAGE 和 Western blot 检测瞬时转染效果。

为了纯化重组蛋白 PxPGRP-SA, 利用 DES Inducible/Secreted 试剂盒结合 pCoBlast 来筛选稳定的细胞系 pMTAPxPGRP-SA。为了构建稳定的细胞系, 质粒 pCoBlast 和质粒 pMTAPxPGRP-SA 共转染到 S2 细胞中, 转染 48 h 后, 离心细胞, 除去上清, 用加有 25 mg/mL Blastidicine S hydrochloride 完全培养基重悬细胞, 培养 1 个星期, 抗性克隆就可以出来。在 75 cm² 的细胞培养瓶中加入终浓度为 250 mM 的硫酸铜诱导蛋白。连续收集 10 d 诱导 24 h 后培养基上清, 并每次添加新鲜的培养基到 75 cm² 的细胞培养瓶中。为了纯化蛋白, 把所有收集的培养基上清混合在一起, 常温下 1000 g 离心 10 min, 收集上清, 除去细胞碎片。上清分别用截留 10 kDa 的超滤离心柱 10000 g 超滤离心 10 min, 收集滤过部分, 然后用截留 3 kDa 的超滤离心柱 10000 g 超滤离心 10 min, 弃滤过部分, 收集未滤过部分。经超滤收集到的液体用 0.1 M 的乙酸钠透析过夜, 直接上样预先经乙酸钠 (pH5.0, 0.1 M) 平衡的 CM-Sepharose CL-6B 柱, 然后以 150 mL 平衡液对 150 mL 1 M 的乙酸钠缓冲液 (pH5.0) 作梯度展开, 梯度结束后, 再用

300 mL, 1 M 乙酸钠 (pH5.0) 洗脱, 流速为 0.2 mL/min, 每 1 min 收集一管, 收集合并各活性峰, 并进行 Western blot 检测。

1.7 PxPGRP-SA 在血淋巴中的 Western blot 检测

分别将革兰氏阳性菌 *M. luteus* 和革兰氏阴性菌 *S. marcescens* 接种至新鲜的 LB 培养基, 37℃, 240 rpm 摇荡培养至对数生长期, 10000 g 离心 10 min, 去掉上清收集菌体, PBS 洗两次, 热灭活后用 PBS 稀释至 2.0×10^7 CFU/mL 备用。选取同一批次内龄期一致、发育良好的 4 龄第 1 天的小菜蛾幼虫作为实验材料, 分别注射 1 μ L *M. luteus* (2.0×10^7 CFU/mL) 和 1 μ L *S. marcescens* (2.0×10^7 CFU/mL), 每组处理 10 头虫。24 h 收集虫体血淋巴, 测定总蛋白浓度, 进行 SDS-PAGE 和 Western blot 检测。

1.8 酚氧化酶的活力测定

参考 Amparyup 等 (2009); Sumathipala and Jiang (2010) 的方法, 以 dopamine 为底物, 检测重组蛋白 PxPGRP-SA 对血淋巴中的酚氧化酶的诱导作用。具体操作如下: 提取正常健康的 4 龄幼虫小菜蛾的血淋巴, 用 buffer E (20 mM Tris-HCl, pH8.0, 1 mM CaCl₂, 0.001% Tween-20) 稀释 10 倍, 将稀释 10 倍的血淋巴 5 μ L 分别与 1 μ L 纯化的 PxPGRP-SA 重组蛋白 (0.5 μ g/ μ L) 和 4 种微生物刺激剂包括 1 μ L *B. subtilis* (2×10^5 cells), 1 μ L *M. luteus* (2×10^5 cells), 1 μ L *S. aureus* (2×10^5 cells) 和 1 μ L *S. marcescens* (2×10^5 cells)。对照是稀释的血淋巴分别于 buffer E, 诱导剂, 或者是重组蛋白 PxPGRP-SA 温育, 实验组是稀释的血淋巴、激活剂和重组蛋白 PxPGRP-SA 共同温育, 总体积定容至 24 μ L, 在 25℃ 温育 60 min 后, 在 96 孔板中加入 200 μ L dopamine (2 mM dopamine 溶于 50 mM Na₃PO₄ pH6.5) 中, 利用酶标仪测定波长为 470 nm 时的吸收值。一个酶活单位 (U) 定义是产生 PO 活力的, 提高 0.001 吸收率 units/min。

1.9 Western blot

Western blot 参照 Sambrook 等 (1989) 的方法稍作修改进行。具体操作如下: 首先用封闭液 (TBST + 5% 的脱脂奶粉) 封闭 2 h, 接着与一抗 (用 TBST 按 1:5000 的比例稀释) 室温反应 1 h, 用 PBST (50 mM potassium phosphate, pH7.2; 150 mM NaCl; 0.05% Tween 20) 洗膜 3 次, 然后加入 PBST 稀释的羊抗兔 IgG-AP (1:5000), 室温

反应 1 h, 用 PBST 洗膜 3 次, 将两种显色底物 (H_2O_2 和 鲁米诺) 1 : 1 等体积混合 (一般各 400 $\mu\text{L}/\text{membrane}$), 在暗室中将 X 光片, 覆盖在膜的上面, 夹好夹子, 曝光 90 min, 显影、定影。

1. 10 数据统计与分析

实验数据的分析、处理与绘图采用 SPSS 19 和 Sigma plot 12.3; 计算平均值和标准误, 采用一维方差分析 (One-Way ANOVA) 中的最小显著差法 (LSD) 分析, 多重比较采用 Duncan 氏检验法, 差异显著性水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 PxPGRP-SA 在原核细胞中的高效表达

根据本实验室获得的 *PxPGRP-SA* 全长 cDNA 序列 (GenBank No: EU399240) 设计特异性引物进行 PCR 扩增, PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 结果表明获得了大小约为 588 bp 的单一片段, 与预期的大小一致 (图 1A)。将酶切 (图 1B) 和测序鉴定正确的原核表达质粒 pGEX4T-PxPGRP-SA, 转化感受态宿主菌 BL21, 37 $^{\circ}\text{C}$, IPTG (0.5 mM) 诱导 4 h, SDS-PAGE 电泳检测到约 48 kDa 左右的蛋白条带 (图 2)。大量诱导 pGEX4T-PxPGRP-SA 工程菌, 离心后收集菌体, 加入裂解液后经超声破碎, 离心收集上清。所得蛋白粗提液使用 GST Fusion Protein Spin Purification Kit 一步纯化了融合蛋白, SDS-PAGE 电泳检测到约 48 kDa 条带处有与预期分子量大小的融合蛋白, 结果如图 (3A)。Western blot 进一步确认了经诱导高效表达的蛋白为重质粒 pGEX4T-PxPGRP-SA 上含有 GST 纯化标签的融合蛋白 PxPGRP-SA, 结果如图 3B。

2.2 多克隆抗体 anti-PxPGRP-SA 的制备及抗体效价检测

利用纯化的融合蛋白免疫新西兰大白兔, 制备了抗血清 anti-PxPGRP-SA。为了检测抗体的效果, 本实验利用酶联免疫吸附反应 (ELISA) 方法测定了多克隆抗体的效价。对抗体进行倍比稀释, 与 2 pmol 融合蛋白孵育后显示, 抗体的效价较高, 1 : 51200 稀释的抗体也能呈现出效果 (表 1)。而免疫前血清在 1 : 1000 或 1 : 4000 与抗原孵育与空白对照比 OD 值没有变化。

利用 Western blot 检测纯化后的多克隆抗体 anti-PxPGRP-SA 对重组蛋白的特异性 (图 4)。由图可知小菜蛾多克隆抗体 anti-PxPGRP-SA 能识别 1 ng 重组蛋白 PGRP-SA, 说明多克隆抗体特异性强。

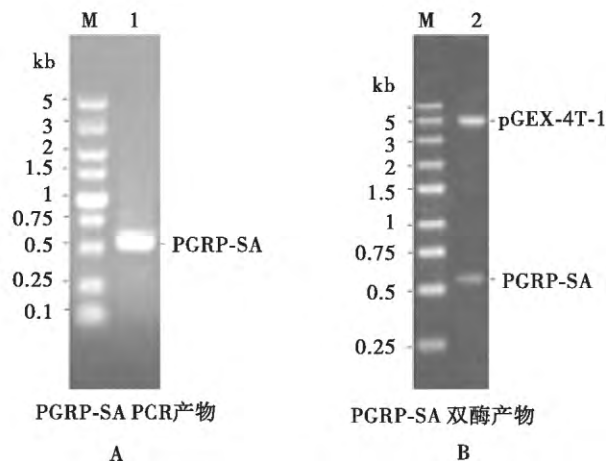


图 1 PGRP-SA PCR 产物的获得及酶切鉴定

Fig. 1 PCR and double enzyme digestion analysis of PGRP-SA. Note: A, PCR product of PGRP-SA; 1, PCR product; M, DNA marker; B, Double enzyme digestion of plasmid; 2, Recombinant plasmid digestion.

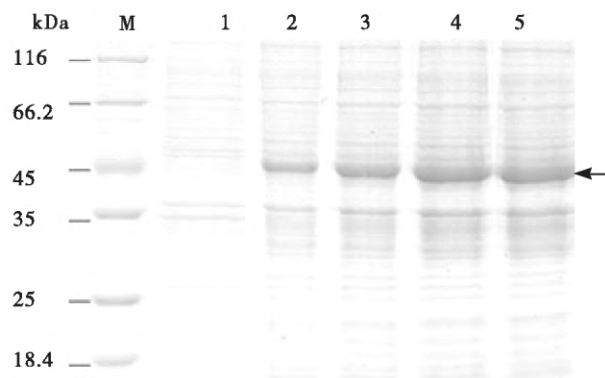


图 2 PGRP-SA 在原核细胞 BL21 中表达的 SDS-PAGE 检测

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of expressional

PxPGRP-SA in *E. coli* BL21

注: PxPGRP-SA 蛋白在大肠杆菌中 BL21 中表达的 SDS-PAGE; M, 标准分子量; 1, 为未诱导的对照菌株; 2, 3, 4, 5, 分别为用 IPTG (0.5 mM) 诱导培养 1, 2, 3, 4 h 的菌株, 箭头表示诱导出的融合蛋白。Note: SDS-PAGE analysis of expressional PxPGRP-SA in *E. coli* BL21; M, Protein standard molecular weight markers; 1, Pellet of lysate of expressed bacteria before IPTG was induced; 2, 3, 4, 5, Pellet of lyaste of expressed bacteria after IPTG (0.5 mM) had been induced for 1, 2, 3 and 4 h, respectively. The arrow indicates induced fusion protein.

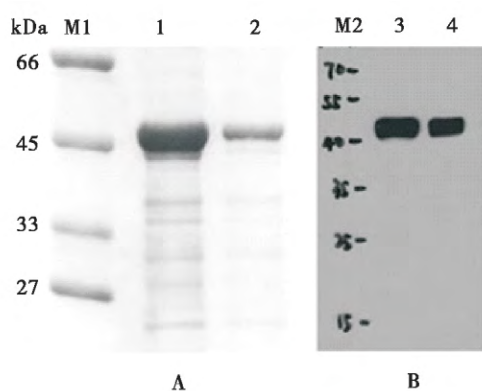


图3 纯化蛋白 PGRP-SA 的 SDS-PAGE 电泳 (A) 和 Western blot (B) 分析

Fig.3 SDS-PAGE and Western blot analysis of the purified fusion protein

注: M1, 标准分子量; 1, 2 μg 纯化后的融合蛋白 SDS-PAGE; 2, 0.5 μg 纯化后的融合蛋白 SDS-PAGE; 3, 4, *anti*-PxPGRP-SA 抗体检测 0.5 μg PGRP-SA 融合蛋白。Note: M1, Protein standard molecular weight markers; 1 and 2, SDS-PAGE analysis of purified fusion protein 2 and 0.5 μg separately; 3 and 4, Polyclonal antibody *anti*-PxPGRP-SA analysis of 0.5 μg fusion protein.

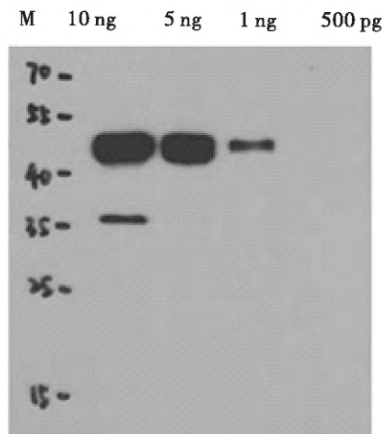


图4 多克隆抗体 *anti*-PxPGRP-SA 的 Western blot 分析

Fig.4 Western blot analysis of the polyclonal antibody of *anti*-PxPGRP-SA

注: 15% SDS-PAGE 电泳分析不同浓度 (10, 5, 1 ng 和 500 pg) 的纯化重组蛋白 PxPGRP-SA, 用多克隆抗体进行 Western blot 检测, 一抗和二抗分别 1 : 5000 稀释。Note: Purified recombinant proteins PxPGRP-SA (10, 5, 1 ng and 500 pg) were separated in a 15% SDS-PAGE gel and then detected with an *anti*-PGRP-SA antibody, both of the primary antibody and secondary antibody were diluted to 1 : 5000.

表1 PxPGRP-SA 抗体效价的 ELISA 检测

Table 1 Titer of PxPGRP-SA polyclonal antibody detected by ELISA

空白对照 CK	阴性对照 Negative control					阳性 Positive test sample					
	1 : 1K	1 : 4K	1 : 1K	1 : 4K	1 : 8K	1 : 16K	1 : 32K	1 : 64K	1 : 128K	1 : 256K	1 : 512K
0.0465	0.0477	0.0418	1.2179	1.1447	1.1038	1.0513	1.0304	0.9338	0.8176	0.6158	0.4592
0.0388	0.0504	0.0452	1.2117	1.0987	1.0007	0.9416	0.08174	0.6163	0.4729	0.3067	

注: 1 : 1K (1K 指 1000) 等表示不同稀释比的抗体与 2 pmol 重组蛋白孵育。阴性对照, 表示蛋白与免疫前血清孵育; 阳性, 表示用 PGRP-SA 重组蛋白免疫 4 次后的血清。Note: Different dilution ratio of *anti*-PxPGRP-SA polyclonal antibody was incubated with 2 pmol purified fusion protein PxPGRP-SA. Negative control, indicates pre-immune serum; positive test sample, indicates *anti*-PxPGRP-SA serum incubated with PxPGRP-SA protein.

2. 3 PxPGRP-SA 在血淋巴中的检测

为了从蛋白水平检测 PxPGRP-SA 在小菜蛾受到两种微生物 (*M. luteus* 和 *S. marcescens*) 诱导后的表达情况, 取诱导后 24 h 后的血淋巴, 进行 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 检测 (图 5), 制备的抗血清 *anti*-PxPGRP-SA 可以识别小菜蛾血淋巴的 PxPGRP-SA。结果显示 PxPGRP-SA 未经诱导, 在血淋巴中含量相对较低。在遭受微生物 (*M. luteus* 和 *S. marcescens*) 诱导后, 含量显著升高, 表明 PxPGRP-SA 是诱导型表达并在血淋巴中起着

重要免疫功能。

2. 4 PxPGRP-SA 在 S2 细胞中的高效表达

将筛选成功稳定细胞系 pMTAPxPGRP-SA 转染果蝇 S2 细胞 48 h 后, 1000g 10 min 离心分别收集上清和沉淀, 进行 SDS-PAGE 电泳检测 (图 6A), 结果显示重组蛋白 PxPGRP-SA 转染 S2 细胞 48 h 后, 可以在 S2 细胞中高表达并分泌到上清。为了进一步获得大量的重组蛋白, 筛选了一个稳定表达的细胞系, 进而对其表达的上清进行纯化, 结果如图 6B。通过 V5 一步纯化, 可以获得单一的

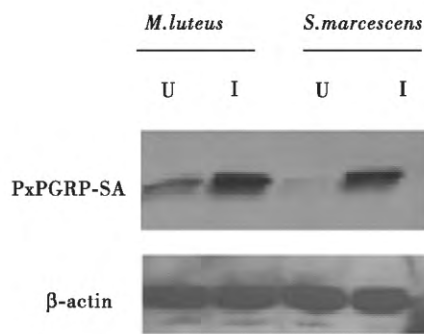


图5 PxPGRP-SA 蛋白在小菜蛾血淋巴中含量的 Western blot 检测

Fig. 5 Western blot analysis of PxPGRP-SA in the hemolymph after induction

注: 两种微生物 *M. luteus* 和 *S. marcescens* 分别诱导小菜蛾 24 h 后, 提取其血淋巴, 对 4 μg 总蛋白进行 15% SDS-PAGE 电泳和 Western blot 检测。以 anti-PxPGRP-SA 为一抗, 一抗和二抗 1:5000 稀释; β -actin 作为内参对照。U, 未诱导的血淋巴; I, 诱导的血淋巴。Note: Plasma were extracted from *M. luteus* and *S. marcescens* induced *P. xylostella* at 24 h, 4 μg total protein were separated in an 15% SDS-PAGE gel and detected with anti-PxPGRP-SA antibody, both the primary antibody and the secondary antibody were diluted to 1:5000 respectively. β -actin was as control. U, Uninduced plasma; I, induced plasma.

重组蛋白。以制备的多克隆抗体 anti-PxPGRP-SA 对其纯化的重组蛋白进行 Western blot 检测 (图 6C), 结果在 23 kDa 有一条明显的表达带, 而且表达的蛋白与 anti-PxPGRP-SA 有阳性的杂交带。

2.7 重组蛋白 PxPGRP-SA 对酚氧化酶活力的检测

为了检测重组 PxPGRP-SA 蛋白对酚氧化酶原的激活作用, 本实验利用 4 种微生物作为激活剂 (elicitor)。取正常健康的 4 龄小菜蛾血淋巴, 分别与重组蛋白 PxPGRP-SA (1 μL , 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 1 μL *B. subtilis* (2×10^5 cells), 1 μL *M. luteus* (2×10^5 cells), 1 μL *S. aureus* (2×10^5 cells) 和 1 μL *S. marcescens* (2×10^5 cells) 温育 1 h 后, 进行酚氧化酶活力的测定 (图 7), 结果显示单独的血淋巴中, 酚氧化酶的活力很低 (图 7A-1, 7B-1, 7C-1, 7D-1)。在血淋巴中单独加入了 4 种微生物激活剂后, 酚氧化酶的活力急剧提高 (图 7A-2, 7B-2, 7C-2, 7D-2); 而在血淋巴中加入重组的 PxPGRP-SA 后, 酚氧化酶的活力也迅速提高 (图 7A-3, 7B-3, 7C-3, 7D-3); 在血淋巴中同时加入了激活

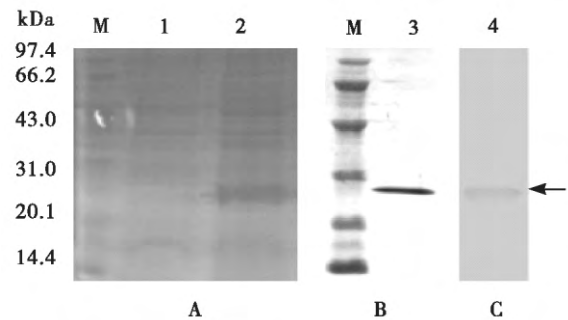


图6 重组蛋白 PxPGRP-SA 的 SDS-PAGE 电泳与 Western 印迹分析

Fig. 6 SDS-PAGE and Western-blot analysis of recombinant protein PxPGRP-SA.

注: M, 蛋白标准分子量; 1, 重组蛋白在沉淀中的表达; 2, 重组蛋白在上清中的表达; 3, 纯化的重组蛋白; 4, 多克隆抗体抗体检测重组蛋白。Note: M, Molecular weight marker; 1, recombinant protein PxPGRP-SA was expressed in lysate; 2, recombinant protein PxPGRP-SA was expressed in supernatant; 3, purified recombinant protein PxPGRP-SA; 4, Western blot was detected by using anti-PxPGRP-SA antibody.

剂和重组蛋白 PxPGRP-SA 后, 酚氧化酶的活力也急剧提高 (图 7A-4, 7B-4, 7C-4, 7D-4)。相比较而言, *M. luteus* 和重组蛋白混合 PxPGRP-SA, 与单独加入激活剂和重组的 PxPGRP-SA 相比较, 可以显著提高血淋巴中酚氧化酶的活力, 而且, 酚氧化酶的活力高于两者活力简单的之和 (图 7D-4)。而且 *M. luteus* 和重组蛋白混合对酚氧化酶活力的提高要高于其它 3 种微生物 (*B. subtilis*, *S. aureus* 和 *S. marcescens*)。

3 结论与讨论

PGRPs 家族成员从昆虫到哺乳动物高度保守, 在 C 端有一个大约 165 个氨基酸组成的 PGRP 结构域, 结构域在识别外源物时起着至关重要的作用, 不同 PGRP 结构域可以区分识别不同种类微生物 (Royet, 2004; Blanco *et al.*, 2008)。PGRPs 被划分为长型 (L) 和短型 (S) 两种形式, 目前在家蚕中发现有 6 个长型和 6 个短型, 果蝇中有 6 个长型和 7 个短型, 冈比亚按蚊有 4 个长型和 3 个短型 (Werner *et al.*, 2000; Paskewitz *et al.*, 2006; Tanaka *et al.*, 2008)。PGRPs 还可以根据是否具有酶活性位点分为有酰胺酶催化活性和无酰胺酶催

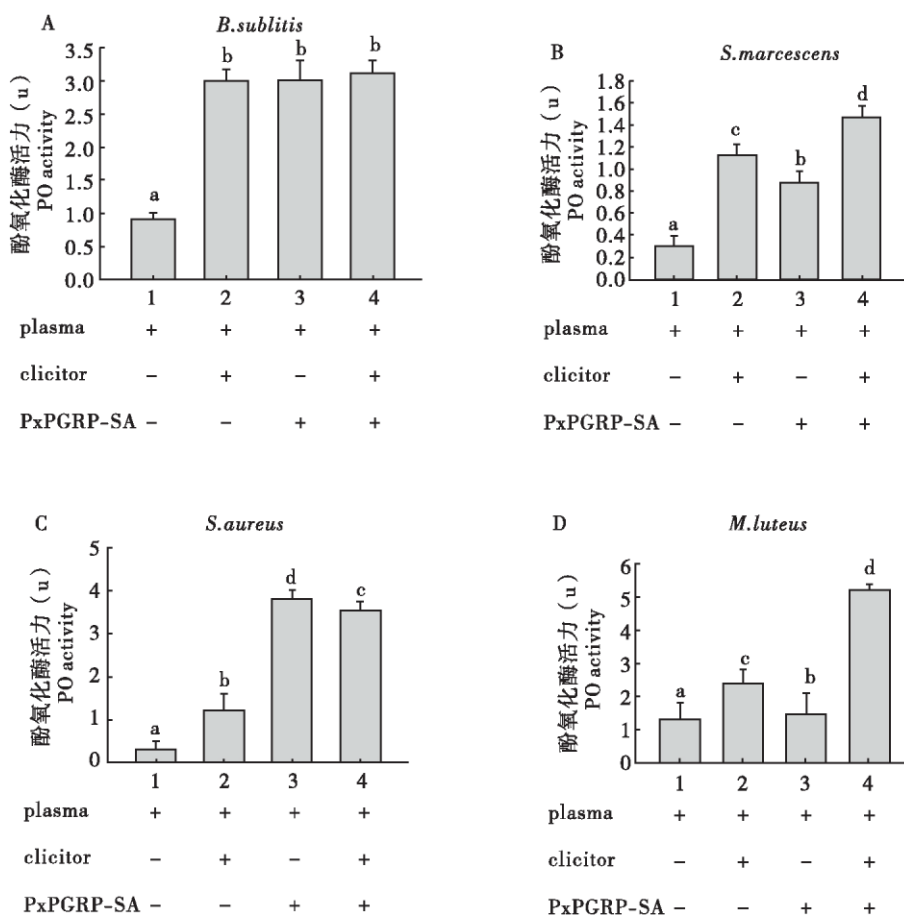


图 7 重组蛋白 PxPGRP-SA 对血淋巴酚氧化酶的活力诱导测定

Fig. 7 The measure of activity of PO were induced by recombinant protein PxPGRP-SA

注: 酚氧化酶的活力测定, 误差线代表平均值 $\pm$ SE ($n=3$), 字母表示差异显著水平 ($P < 0.05$)。1, 血淋巴; 2, 血淋巴 + 微生物激活剂; 3, 血淋巴 + 重组蛋白 PxPGRP-SA; 4, 血淋巴 + 微生物激活剂 + 重组蛋白。Note: PO activity was measured, bar as mean $\pm$ SE ($n=3$), means with different letters are statistically different ($P < 0.05$) (Duncan's Multiple Range Test) among treatments. 1, plasma; 2, plasma plus elicitor; 3, plasma plus recombinant protein PGRP-SA; 4, plasma plus elicitor and recombinant protein PGRP-SA.

化活性两种类型 (Dziarski and Gupta, 2006), 具有酰胺酶活性的 PGRPs 可以直接将细菌表面肽聚糖裂解, 从而下调 Toll 途径和 Imd 途径, 不具有酰胺酶活性的 PGRPs 作为受体参与其它免疫反应 (Zaidman-Remy *et al.*, 2006)。果蝇中已有 13 个 PGRPs 被鉴定出来, 至少可以转录 17 种蛋白, 其中 7 个是缺少跨膜结构的短型 PGRPs, 如 PGRP-SA、-SB1、-SB2、-SC1a、-SC1b、-SC2 和 -SD, 预测这些蛋白具有分泌功能; 还有 6 个可能跨膜的长型 PGRPs, 如 PGRP-L、-LB、-LC、-LD、-LE 和 -LF, 预测他们具有跨膜结构 (Kang *et al.*, 1998; Werner *et al.*, 2000; Tanaka *et al.*, 2008)。短型的 PGRP 主要存在于血淋巴、表皮和脂肪体中, 有时存在中肠的上皮细胞和血细胞中; 而长

型的 PGRP 则主要存在于血细胞中。其中有些 PGRPs 是组成性表达, 也有一些 PGRPs 是诱导性表达, 在细菌感染或注射肽聚糖 (Peptidoglycan, PGN) 可上调其表达 (Blanco *et al.*, 2008)。通过基因组和转录组的分析, 小菜蛾中已有 9 个 PGRPs 基因 (You *et al.*, 2013; You *et al.*, 2015)。笔者以前克隆了一个小菜蛾短型的 PGRP 基因全长, 氨基酸比对与小菜蛾基因组的 PGRP-S 及其它鳞翅目昆虫的 PGRP-SA 同源性很高, 因此将该基因命名为 PxPGRP-SA。本研究中, 分别注射了两种微生物 (*M. luteus* 和 *S. marcescens*) 诱导小菜蛾 4 龄幼虫 24 h 后, Western blot 检测表明, 两种微生物诱导后血淋巴中的 PxPGRP-SA 的含量显著高于健康幼虫血淋巴中 PxPGRP-SA 的含量, 结果表

明(图5) 本研究中的小菜蛾 PxPGRP-SA 属于诱导型表达,并分泌到血淋巴中。

GST(谷胱甘肽-S-转移酶)融合表达系统是大肠杆菌表达系统中较为常用的一种,GST 分子伴侣的存在使表达的下流目的蛋白的纯化操作更加简便、快速、高效和可靠。为了快速获得纯净的高含量的 PxPGRP-SA 蛋白作为抗原,并研究 PxPGRP-SA 在小菜蛾免疫系统中的功能。本研究将 PxPGRP-SA 蛋白编码与 GST 融合并在大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) 中进行了高效融合表达。GST 的存在提高了 PxPGRP-SA 的表达量和可溶性并便于运用 GST 亲和柱纯化,本研究运用 GST 亲和柱一步快速纯化了融合蛋白 GST-PxPGRP-SA,运用此纯化的融合蛋白 GST-PxPGRP-SA 免疫新西兰大白兔,获得了滴定效价为 1:51200 的抗血清 anti-PxPGRP-SA,Western blot 检测表明,anti-PxPGRP-SA 能够识别在 S2 中细胞表达的重组蛋白,表明所表达的重组蛋白仍保持原有蛋白质的免疫原性(图6)。

在昆虫的血淋巴中,酚氧化酶原被合成并且以无活性的形式存在,但当给昆虫体内注射(或自然感染)微生物或者寄生虫时,酚氧化酶原很快就会转变成有活性的 PO,然后由 PO 催化所形成的黑色素对昆虫的生长起到保护性的作用,使得机体免受外来物质的侵袭,这是昆虫保护自己的一种很有效的防御反应(Pauwels *et al.*, 2011)。为了探讨 PxPGRP-SA 对小菜蛾血淋巴中酚氧化酶级联反应中的功能,为了更好的保持 PxPGRP-SA 的活性和功能,本研究构建了 PxPGRP-SA 真核表达载体 pMTAPxPGRP-SA,并在果蝇 S2 细胞中进行了高效表达,并筛选了含有 PxPGRP-SA 的稳定细胞系,运用 V5 纯化的重组蛋白 PxPGRP-SA 与 4 种不同微生物分别混合可以明显激活小菜蛾血淋巴中酚氧化酶的活力(图7)。相比较而言,藤黄微球菌 *M. luteus* 与重组蛋白 PxPGRP-SA 混合可以显著提高血淋巴中酚氧化酶的活力(图7D-4),这个结果与前人报道一致(Jiang *et al.*, 2003; Sumathipala and Jiang, 2010)。本研究结果表明, PxPGRP-SA 可以识别侵染的细菌,并能激活酚氧化酶活性防御侵染的细菌。

参考文献 (References)

Amparyup P, Charoensapsri W, Tassanakajon A. Two prophenoloxidases are important for the survival of *Vibrio harveyi* challenged shrimp

Penaeus monodon [J]. *Dev. Comp. Immunol.*, 2009, 33 (2): 247-256.

Blanco GA, Malchiodi EL, De MMC. Cellular clot formation in a sipunculan worm: Entrapment of foreign particles, cell death and identification of a PGRP-related protein [J]. *J. Invertebr. Pathol.*, 2008, 99 (2): 156-165.

Charroux B, Rival T, Narbonne-Reveau K, *et al.* Bacterial detection by *Drosophila* peptidoglycan recognition proteins [J]. *Microbes and Infection*, 2009, 11 (6-7): 631-636.

Dziarski R, Gupta D. The peptidoglycan recognition proteins (PGRPs) [J]. *Genome Biol.*, 2006, 7 (8): 232.

Ferrandon D, Immler J, Hetru C, *et al.* The *Drosophila* systemic immune response: Sensing and signalling during bacterial and fungal infections [J]. *Nature Reviews Immunol.*, 2007, 7 (11): 862-874.

Jiang H, Wang Y, Yu X, *et al.* Prophenoloxidase-activating proteinase-3 (PAP-3) from *Manduca sexta* hemolymph: A clip-domain serine proteinase regulated by serpin-IJ and serine proteinase homologs [J]. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2003, 33 (10): 1049-1060.

Kaneko T, Goldman WE, Mellroth P, *et al.* Monomeric and polymeric gram-negative peptidoglycan but not purified LPS stimulate the *Drosophila* IMD pathway [J]. *Immunity*, 2004, 20 (5): 637-649.

Kang D, Lu G, Lundstrom A, *et al.* A peptidoglycan recognition protein in innate immunity conserved from insects to humans [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95 (17): 10078-10082.

Leulier F, Parquet C, Pili-Floury S. The *Drosophila* immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition [J]. *Nature Immunol.*, 2003, 4 (5): 478-484.

Liu C. Recombinant Expression and Functional Analysis of Silkworm PGRP-S5 [J]. Northwest A&F University, 2013. [刘晨. 家蚕 PGRP-S5 基因的重组表达和功能分析 [J]. 西北农林科技大学, 2013]

Ochiai M, Ashida M. A pattern recognition protein for peptidoglycan. Cloning the cDNA and the gene of the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *J. Bio. Chem.*, 1999, 274 (17): 11854-11858.

Park J, Kim C, Kim J, *et al.* Clustering of peptidoglycan recognition protein-SA is required for sensing lysine-type peptidoglycan in insects [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, 104 (16): 6602-6607.

Paskewitz SM, Andreev O, Shi L. Gene silencing of serine proteases affects melanization of Sephadex beads in *Anopheles gambiae* [J]. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2006, 36 (9): 701-711.

Pauwels K, De Meester L, Decaestecker E, *et al.* Phenoloxidase but not lytic activity reflects resistance against *Pasteuria ramosa* in *Daphnia magna* [J]. *Biology letter*, 2011, 7 (1): 156-159.

Royet J. *Drosophila melanogaster* innate immunity: An emerging role for peptidoglycan recognition proteins in bacteria detection [J]. *Cell. Mol. life Sci.*, 2004, 61 (5): 537-546.

Sambrook J, Fritsch E. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd ed [M]. 1989, 82372.

Shi CM. The activation of insects prophenoloxidase and its role in

- immune [J]. 2000, 5: 310–314. 时超美. 昆虫酚氧化酶原活化及其在免疫中的作用 [J]. 昆虫知识, 2000, 5: 310–314]
- Sumathipala N, Jiang H. Involvement of *Manduca sexta* peptidoglycan recognition protein-1 in the recognition of bacteria and activation of prophenoloxidase system [J]. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2010, 40 (6): 487–495.
- Takehana A, Katsuyama T, Yano T, et al. Overexpression of a pattern-recognition receptor, peptidoglycan-recognition protein-LE, activates imd/relish-mediated antibacterial defense and the prophenoloxidase cascade in *Drosophila* larvae [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99 (21): 13705–13710.
- Tanaka H, Ishibashi J, Fujita K, et al. A genome-wide analysis of genes and gene families involved in innate immunity of *Bombyx mori* [J]. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2008, 38 (12): 1087–1110.
- Werner T, Liu G, Kang D, et al. A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster* [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97 (25): 13772–13779.
- Yoshida H, Kinoshita K, Ashida M. Purification of peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271 (23): 13854–13860.
- You M, Yue Z, He W, et al. A heterozygous moth genome provides insights into herbivory and detoxification [J]. *Nat. Genet.*, 2013, 45 (2): 220–225.
- You Y, Xie M, Ren N, et al. Characterization and expression profiling of glutathione S-transferases in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) [J]. *BMC genomics*, 2015, 16: 1343.
- Yu XQ, Zhu YF, Ma C, et al. Pattern recognition proteins in *Manduca sexta* plasma [J]. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2002, 32 (2): 1287–1293.
- Zaidman-Remy A, Herve M, Poidevin M, et al. The *Drosophila* amidase PGRP-LB modulates the immune response to bacterial infection [J]. *Immunity*, 2006, 24 (4): 463–473.