



魏川川, 修江帆, 胡亚, 等. 家蝇 3 种丝氨酸蛋白酶抑制剂 *Serpin* 基因克隆、序列分析及表达模式 [J]. 环境昆虫学报, 2017, 39 (6): 1334–1341.

家蝇 3 种丝氨酸蛋白酶抑制剂 (*Serpin*) 基因的克隆、序列分析及表达模式

魏川川², 修江帆^{1*}, 胡亚¹, 尚小丽¹, 张迎春¹, 吴建伟¹

(1. 贵州医科大学基础医学院, 贵阳 550004; 2. 贵州省疾病预防控制中心, 贵阳 550004)

摘要: 对家蝇 3 种丝氨酸蛋白酶抑制剂 *Serpin* 基因 *SP2*、*SP13* 和 *SP16* 进行克隆、序列分析和时空表达模式检测。运用瑞士生物信息学研究所的蛋白分析专家系统 (ExPASy) 和美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 等有关的生物信息学分析工具, 预测和分析 3 条 *Serpin* 基因编码蛋白质的结构与生物学功能。以 RPS18 (核糖体 S18 蛋白) 为内参基因, 采用实时荧光定量 PCR (Real-Time PCR) 技术检测 3 条 *Serpin* 基因在家蝇不同发育时期, 以及家蝇 3 龄幼虫中脂肪体、唾液腺、中肠、马氏管和体壁的表达特征。*SP2*、*SP13*、*SP16* 基因序列的开放阅读框 ORF 全长分别为 1191 bp、1137 bp 和 1212 bp, 分别编码含 396、378 和 403 个氨基酸残基的蛋白质, 其理论分子量分别为 45315.3 Da、43701.5 Da 和 45011.5 Da, 等电点分别为 9.01、5.98 和 6.04, 蛋白质的 N 端都含有一段信号肽, 并具有 *Serpin* 基因的保守结构域, 属于 *Serpin* 家族。*SP2* 和 *SP16* 在蛋白质的 C 端含反应中心环 (Reactive center loop, RCL), 而 *SP13* C 端不含 RCL。时空表达模式分析结果显示, *SP2* 基因在 2 龄幼虫中的表达量最高, 而雄蝇的表达量与卵期相比有所下调; *SP13* 基因在蛹中的表达量最高, 1 龄幼虫和雌蝇中的表达量与卵期相近; *SP16* 基因在 2 龄幼虫和 3 龄幼虫中的表达量最高, 雄蝇与雌蝇的表达量与卵期相比有所下调。在家蝇 3 龄幼虫的各主要组织中, 以体壁为参照, *SP2* 基因在唾液腺表达水平最高, 其次是脂肪体, 中肠和马氏管均低于体壁; *SP13* 基因在马氏管和脂肪体中的表达水平最高, 中肠和唾液腺的表达量低于体壁; *SP16* 基因在唾液腺、中肠、脂肪体和马氏管的表达量均低于体壁。推测 *Serpin* 基因在家蝇个体发育和免疫调节中起不同作用。

关键词: 家蝇; 丝氨酸蛋白酶抑制剂; 克隆; 时空表达; 生物信息学

中图分类号: Q963

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2017) 06-1334-08

Cloning, sequence analysis and expression pattern of three serine protease inhibitor (*Serpin*) in *Musca domestica*

WEI Chuan-Chuan², XIU Jiang-Fan^{1*}, HU Ya¹, SHANG Xiao-Li¹, ZHANG Ying-Chun¹, WU Jian-Wei¹

(1. Basic Medical College, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 2. Guizhou Provincial Center for Disease Control and Prevention, Guiyang 550004, China)

Abstract: To probe into the cloning, sequence analysis and temporal expression patterns of three *Serpin* genes in *Musca domestica*. *SP2*, *SP13* and *SP16* genes were cloned from *M. domestica*, and their sequences was analyzed. Expert protein analysis system (ExPASy) of institute of biological information science in Switzerland and national center for biotechnology information (NCBI) from America, and relevant bioinformatics analysis tool were used to predict and analyze the structures and biological functions of three *Serpin* genes. The expression of *SP2*, *SP13* and *SP16* gene were detected by Real-time quantitative PCR (Real Time PCR) technique performed in differential developmental stages, and the expression features in

基金项目: 国家自然科学基金 (81360254); 黔科合 NY [2014] 3054 号; 黔科合 LH 字 [2014] 7076; 贵州省卫生计生委科学技术基金项目 (gzwjky2014-2-100)

作者简介: 魏川川, 男, 1987 年生, 贵州贵阳人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫分子生物学, E-mail: 752308241@qq.com

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

收稿日期 Received: 2016-08-08; 接受日期 Accepted: 2016-11-07

fat body, salivary glands, midgut, markov tube and body wall from three instar larvae of *M. domestica*, the RPS18 (ribosomal protein S18) as control. The full-length of *SP2*, *SP13* and *SP16* genes were 1191 bp, 1137 bp and 1212 bp, and they encoded 396 aa, 378 aa and 403 aa respectively. The predicted molecular weight of *SP2*, *SP13* and *SP16* were 45315.3 Da, 43701.5 Da and 45011.5 Da, and isoelectric point were 9.01, 5.98 and 6.04, respectively. All of them contained a signal peptide, and the C terminal of *SP2* and *SP16* contained a reactive center loop, while *SP13* had not. The spatial and temporal expression patterns showed that the expression of *SP2* gene was highest in the second instar larvae, but that was reduced compared with the egg stage, while the expression of *SP13* was highest in the pupa, and the expression of first instar larvae and female similar with the eggs. Besides, the expression of *SP16* gene was highest in the second instar larvae and third instar larvae, but the expression of male and female were reduced compared to the egg stage. The expression of these genes in the major organizations of third instar larvae in *M. domestica* showed that the expression of *SP2* was highest in the salivary glands, then in fat body, midgut and Markov tube were lower than that of body wall, the expression in body wall as control; while the expression of *SP13* gene was highest in the Markov tube and fat body, then was body wall, midgut and salivary glands. At last, the expression of *SP16* gene was highest in the body wall, then was fat body, salivary glands, midgut and Markov tube in that order. The results indicated that these genes play different roles in the individual development and immune regulation of *M. domestica*.

Key words: *Musca domestica*; serine protease inhibitor; cloning; temporal expression patterns; bioinformatics

丝氨酸蛋白酶抑制剂 (serine protease inhibitor, Serpin) 是蛋白酶抑制因子中最大也是最重要的超家族 (Singh and Jairajpuri, 2014)。Serpin 主要是通过使用自杀底物原理特异性地与靶酶形成稳定的共价复合物, 导致靶酶失活, 终止过度免疫应答反应, 对宿主本身起着免受损伤的作用。它们是一类单链蛋白质, 广泛存在于动物、植物和微生物体中, 是一族能折叠形成保守的空间三维结构且具有特异性的类自杀性底物抑制机制的蛋白酶抑制剂, 一般包含 350 – 500 个氨基酸残基, 序列同源性约为 30%, 疏水区的同源性为 70% (Ruby *et al.*, 2006) 左右。有抑制活性的 Serpin 是由蛋白主体和暴露在蛋白主体外的反应中心环 (reactive center loop, RCL) 组成的, Serpin 的核心结构域极为保守, 通常包含有 3 个 β -折叠和 8 – 9 个 α -螺旋, β -折叠命名为 sA-sC, α -螺旋命名为 hA-hI。RCL 位于 β 片层 A 和 C 之间, 暴露在 Serpin 的蛋白主体之外, 将其分为 20 个家族, 大多数是糖蛋白, 为丝氨酸蛋白酶抑制剂, 具有免疫调节活性 (黄薇和吴坤陆, 2010; 杨伟克等, 2014; 赵丽芳等, 2016); 另一些家族成员因失去了原有的丝氨酸蛋白酶抑制活性, 从而在动物体中行使结合蛋白的功能, 它是维持体内环境稳定的重要因素, 一旦平衡失调将会导致多种疾病产生, 任何影响其活性的因素也会造成严重的病理

性疾病 (张兵等, 2014; 李冰等, 2016)。如血液凝固、基质重建、纤溶、补体形成、蛋白质折叠、激素形成转运、细胞迁移分化、血压调节和肿瘤抑制等生理功能都与其相关 (Gatto *et al.*, 2013)。此外, 还参与机体多种天然免疫应答的调节。鉴于其重要的免疫调节与生理功能, 丝氨酸蛋白酶抑制剂一直倍受研究者的青睐, 同时如何将其更好地应用于医药也成为国际研究的热点。

家蝇 *Musca domestica* 属于双翅目 Diptera 蝇科 Muscidae 家蝇属 *Musca*, 孳生环境复杂, 携带有许多病原菌, 传播疾病, 且自身不会被感染, 是重要的媒介昆虫, 其强大的免疫防御机制日益引起研究者的关注。为深入研究家蝇这种独特免疫防御机制, 本研究对家蝇 3 种 *Serpin* 基因及其编码的蛋白质结构和特征进行了生物信息学分析, 并进行克隆、时空表达模式的研究, 这为进一步研究 *Serpin* 基因的生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试昆虫

家蝇, 由贵州医科大学寄生虫教研室保种、传代繁殖, 家蝇幼虫经麦麸进行饲养, 家蝇成虫以白糖和奶粉按 1:1 比例混合饲养, 另配无菌蒸

馏水饲养, 蒸馏水与白糖和奶粉的混合物应尽量分开, 避免其污染。饲养条件: 温度 28℃, 相对湿度 65%, 光照周期 10 L:14 D, 家蝇 3 龄幼虫均重 25.5 mg。

1.1.2 质粒和菌株

pMD18-T Vector 为克隆载体, 购于宝生物工程(大连)有限公司, Trans1-T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell 为克隆感受态细胞, 购于北京全式金生物技术有限公司, *E. coli*-DH5 α 由贵阳医学院病原生物学实验室常规保存。

1.1.3 主要试剂及设备

分子量标准 DNA marker DL2000, RNAiso Reagent (Total RNA 提取试剂), PrimeScriptTM One Step RT-PCR Kit, DNA 凝胶回收试剂盒质粒、氨苄青霉素、rTaq 酶、DNA 快速提取试剂盒(均购自宝生物大连 TaKaRa 公司); 胰蛋白胨(Tryptone)、酵母提取物(Yeast Extract)、琼脂粉、琼脂糖(sigma 公司); 溴化乙啶(EB)溶液、甘油(Glycerol)(贵州鼎国生物技术有限公司); 50 $\times$ TAE 电泳缓冲液(上海生工), PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser, SYBR Premix Ex TaqTM II, 焦碳酸二乙酯(DEPC), RNA 保护剂(大连宝生物 TaKaRa 公司); 氯仿、异丙醇、无水乙醇等(成都金山试剂公司); 固相 RNase 清除剂(Surface RNase Eraser)(北京天恩泽基因科技有限公司)。显微解剖镜(尼康); 超净工作台(苏州净化设备有限公司); PCR 扩增仪(德国 Eppendorf 公司); ABI7300 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司); Allegra 64R 冷冻高速离心机(美国 BECKMAN 公司); 超低温冰箱(日本三洋公司)。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取及 cDNA 合成

总 RNA 抽提按照 TAKARA 公司的 RNAiso PLUS 说明书进行操作, 包括家蝇不同发育时期和家蝇 3 龄幼虫不同组织间的 RNA 的提取。总 RNA 经电泳检测, GeneQuant 公司核酸定量分析仪测定 A_{260}/A_{280} 比值及浓度, 选取 A_{260}/A_{280} 的比值范围为 1.80–2.00 的样本, 以 1 μ g 总 RNA 为模板, 按照 cDNA 合成试剂盒说明书合成 cDNA 模板。

1.2.2 家蝇 *Serpin* 基因克隆的引物设计及基因扩增

根据家蝇的基因组序列筛选到 3 条家蝇 *Serpin* 基因编码序列的 ORF, GenBank 登录号分别为: XM_005177750.1、XM_005179781.1、XM_005187352.1,

利用 Primer 5.0 和 DNA Club 软件分别进行引物的设计, SP2F: 5'-ATGGGTACCAATGGTGAACCGCT-3', SP2R: 5'-TTACGTCGACATTCCGGCAAAAGTTCCC-3', SP13F: 5'-ATGGAAGTGTGAGTAAAGTAC-3', SP13R: 5'-TTACAATGATACAACATGGC-3', SP16F: 5'-ATGACTATAGCCCCCTCAGAAATGGC-3', SP16R: 5'-TCAAACTTTGAAACATGACCGGC-3', 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 循环参数为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s; 60℃ 退火 90 s; 72℃ 延伸 60 s, 35 个循环; 72℃ 总延伸 10 min。PCR 产物行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 鉴定产物特异性及分子量大小, 并用 DNA 凝胶回收试剂盒回收和纯化目的产物。将其纯化后的 PCR 产物亚克隆入 pMD18-T 载体, 阳性克隆送上海生工生物公司测序鉴定。

1.2.3 运用生物信息学分析软件对 *Serpin* 基因进行分析

利用瑞士生物信息学研究所的蛋白分析专家系统(Expert Protein Analysis System, ExPASy, <http://ca.expasy.org/>)提供的生物信息学工具分析家蝇 *Serpin* 基因的特点; 运用 NCBI Blast 对基因序列进行同源比对, 用 ProtParam 分析蛋白等电点、分子量; ProtScale 分析蛋白质的疏水性; Singl P4.1 进行信号肽预测; 免疫表位数据库分析资源 IEDB Analysis Resource 网站(http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input)分析抗原表位; 利用 EMBL-EBI 的在线分析工具 InterProScan 分析蛋白保守结构域以及活性位点; 利用 Clustal W 和 MEGA 5.1 软件进行序列同源比对以及采用邻接法构建 *Serpin* 基因分子系统进化树。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 引物的设计与基因扩增

采用 Primer 5.0 软件, 根据家蝇 3 种 *Serpin* 基因 cDNA 序列设计实时荧光定量 PCR 引物, 扩增片段大小分别为 162 bp、106 bp、257 bp, 以 RPS18 为内参基因, 扩增片段大小为 337 bp, SP2-F: 5'-CCAAATCAGGCAGTAAATG-3', SP2-R: 5'-CTCAGCAGGTATGGGTAAAT-3', SP13-F: 5'-GCTCTATTGTGGTGCCTAT-3', SP13-R: 5'-ATCCGATGTCATTTTGG-3', SP16-F: 5'-TCAACAACCTGGGTGGA-3', SP16-R: 5'-CAAGACTTTGGCATCGTAT-3', RPS18-F: 5'-AAGGGTGTGGGTGCGCCGTT-3', RPS18-R: 5'-GCAATGGGTTGGAGATGAT-3', 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。反应条件:

95℃ 35 s, 95℃ 5 s, 60℃ 35 s, 60℃ 30 s, 40 个循环。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 的结果分析

反应结束后确认 Real Time PCR 的扩增曲线和融解曲线, 收集数据进行分析, 采用比较 CT 值法, 确定特定荧光域值对应循环数的 CT 值, 对目标基因进行相对定量分析, 采用 SPSS 18.0 进行统计学分析。发育时期的结果以卵期作为参照进行对比, 组织的以体壁作为参照进行分析。

2 结果与分析

2.1 家蝇 *Serpin* 基因的扩增和克隆

现将筛选到的具有潜在免疫调节功能的 3 条 *Serpin* 基因序列, 通过设计合成的上、下游引物扩增出目的基因片段, 经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测, *SP2*、*SP13*、*SP16* 的 PCR 产物分别在 1191 bp、1137 bp、1212 bp 左右有一特异性条带 (图 1), 这与预期的片段大小相一致, 并进行了 TA 克隆, 挑选的阳性克隆经测序与目的基因序列相一致, 最终筛选的这 3 条 *Serpin* 基因序列分别为 *SP2*、*SP13*、*SP16*, 并且将其登陆到 GenBank, 获得的登录号分别为 KJ872511.1、KJ872490.1、KJ872492.1。

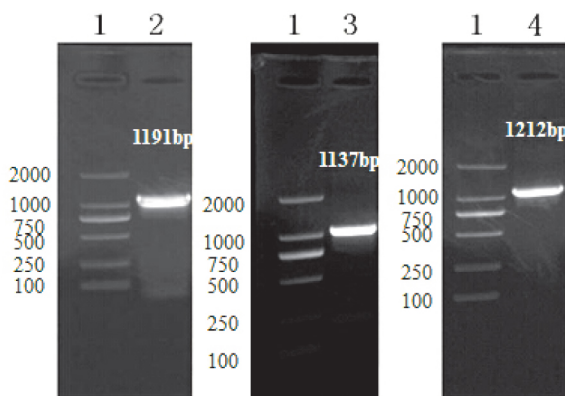


图 1 家蝇 3 种 *Serpin* 的琼脂糖凝胶电泳分析

Fig.1 Agarose gel analysis of three *Serpin* from housefly larvae 1, DL2000 DNA Marker; 2, *SP2* 的 PCR 产物; 3, *SP13* 的 PCR 产物; 4, *SP16* 的 PCR 产物。1, DL2000 DNA Marker; 2, The PCR product of *SP2*; 3, The PCR product of *SP13*; 4, The PCR product of *SP16*.

2.2 家蝇 *Serpin* 基因的生物信息学分析

通过 NCBI 的 Blastn 在线分析工具对家蝇 3 种

Serpin 基因的 cDNA 序列进行比对分析, 结果显示 3 种 *Serpin* 基因都属于 *Serpin* 超家族, 都具有 *Serpin* 基因的保守结构域, 并且 *Serpin2* 和 *Serpin16* 还具有中央反应环 RCL, 这是能够被靶酶特异性识别的位点。

蛋白质的理化性质: 家蝇 *SP2*、*SP13*、*SP16* 基因 cDNA 序列的 ORF 全长分别为 1191 bp、1137 bp、1212 bp, 分别编码 396、378、403 个氨基酸, 基因编码蛋白的理论分子量分别为 45315.3 Da、43701.5 Da、45011.5 Da, 等电点分别为 9.01、5.98、6.04。若其成熟肽 N 端为蛋氨酸时, 在哺乳动物红细胞体外表达的半衰期为 30 h, 在酵母和大肠埃希菌中体内表达的半衰期分别 > 20 h 和 10 h。*SP2* 蛋白的不稳定指数为 39.98, 低于域值 40, 说明该蛋白质在溶液中性质稳定; *SP13* 蛋白的不稳定指数为 41.73, 高于域值 40, 说明该蛋白质在溶液中性质不稳定; *SP16* 蛋白的不稳定指数为 30.52, 低于域值 40, 说明该蛋白质在溶液中性质稳定。*SP2*、*SP13*、*SP16* 蛋白的疏水指数分别为 84.77、92.65、84.76, 总亲水性分别为 -0.210、-0.200、-0.209, 蛋白质总体疏水性均较高。

运用 ExPASy 中的 Signal P4.1 在线分析可知, *SP2* 基因编码蛋白质的第 1 - 25 位氨基酸为信号肽, *SP13* 基因编码蛋白质的第 1 - 20 位氨基酸为信号肽, *SP16* 基因编码蛋白质的第 1 - 24 位氨基酸为信号肽, 均属于分泌型蛋白。

抗原表位分析: 运用 IEDB Analysis Resource 中 B Cell Epitope Prediction Tools 分析预测 3 种 *Serpin* 氨基酸序列的 B 细胞抗原表位结果显示, *SP2* 氨基酸序列中 4 个分值较高的线性表位分别位于 aa46 - aa53 (TESKSQNT)、aa70 - aa80 (GTNGETADEIE)、aa84 - aa96 (RQYNNGEADIPDK) 和 aa197 - aa216 (PIPAEGMQEKPFVSPTSRSV); *SP13* 氨基酸序列中 4 个分值较高的线性表位位于 aa21 - aa25 (NPVVE), aa67 - aa70 (GYTA), aa127 - aa130 (PFHS), aa336 - aa339 (ESDA); *SP16* 氨基酸序列中 9 个分值较高的线性表位分别位于 aa22 - aa33 (TTAGTIAPSEMA)、aa71 - aa79 (TGADGEAAQ)、aa90 - aa97 (GDKRQVAK), aa150 - aa160 (VNFHNSQETIQ)、aa165 - aa173 (WVEEQTENK)、aa179 - aa187 (QPGSVDGTT), aa233 - aa242 (KFQYGEFPKY)、aa335 - aa342 (PASQKVSD) 和 aa353 - aa360 (EAGSEAAA)。

SP2 与 SP16 两者之间在 aa71 – aa79 和 aa90 – aa96 序列均有明显表位, SP13 与 SP16 两者之间在 aa22 – aa25 和 aa336 – aa339 序列均有明显表位, 但是其氨基酸不一致, 仅个别氨基酸相同。

2.3 家蝇 *Serpin* 系统进化树的构建

从 NCBI 上下载各物种的已知功能的 *Serpin* 氨基酸序列, 其物种的来源主要有昆虫纲双翅目的果蝇 *Drosophila melanogaster*, 舌蝇 *Glossina morsitans morsitans* 及冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*, 鳞翅目的家蚕 *Bombyx mori* 及烟草天蛾 *Manduca sexta*, 鞘翅目的黄粉虫 *Tenebrio molitor* 及赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*, 还有哺乳纲啮齿目的小家鼠 *Mus musculus*。采用邻接法构建了系统进化树, 并

计算了它们之间序列的相似性, 利用 MEGA 5.1 软件对这些 *Serpin* 基因进行了分子系统学分析, 在构建系统进化树的基础上研究了家蝇 3 种 *Serpin* 的分类归属及其与其他物种 *Serpin* 之间的进化关系。从构建的系统进化树 (图 2) 的结果中显示, 家蝇 SP16 与果蝇的 *Serpin43Aa* 的遗传距离较近, 其次家蝇 SP13 的遗传距离也比较靠近果蝇的 *Serpin43Aa*; 而家蝇 SP2 与黄粉虫的 SPN40 和 SPN48 遗传距离较近。由于家蝇的 SP2、SP13、SP16 基因与其他物种报道的 *Serpin* 基因具有免疫和生理功能相关, 最终筛选了这 3 条具有潜在免疫调节功能的 *Serpin* 基因进行了相关研究。

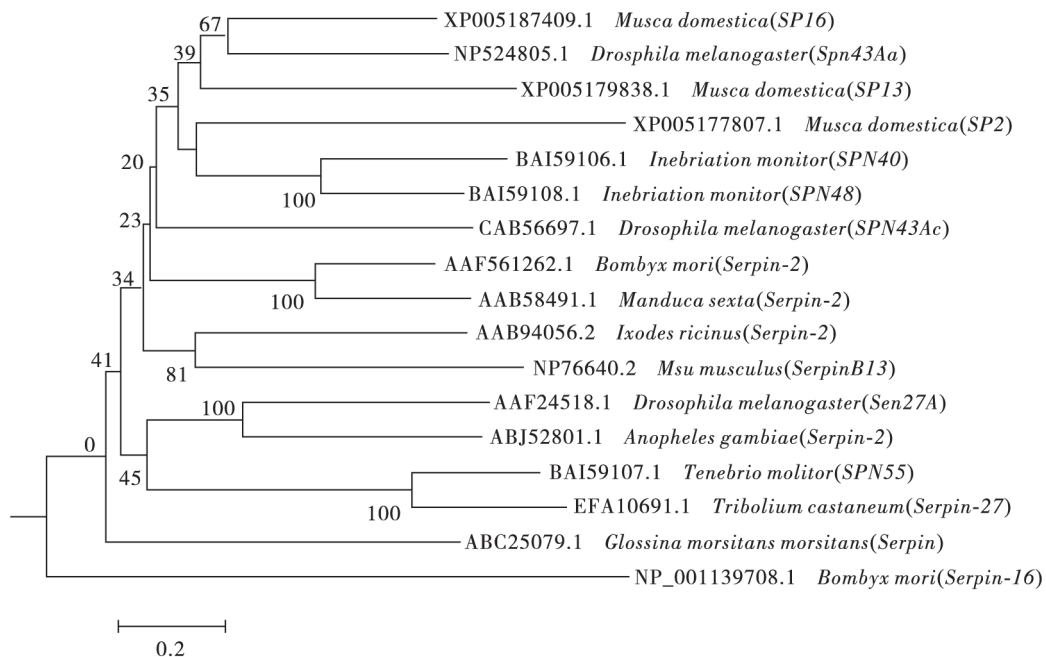


图 2 系统进化树分析

Fig. 2 Analysis of phylogenetic tree

2.4 家蝇 3 种 *Serpin* 基因时空表达的差异

2.4.1 家蝇 3 种 *Serpin* 基因在家蝇不同发育时期的表达情况

家蝇 3 种 *Serpin* 基因在家蝇卵、1 龄幼虫、2 龄幼虫、3 龄幼虫、蛹、雌蝇和雄蝇各生长发育阶段均显现出差表达。家蝇 SP2 基因在 2 龄幼虫中的表达量最高, 其表达量程度从大到小依次排列为: 2 龄幼虫 > 1 龄幼虫 > 3 龄幼虫 > 蛹 > 雌蝇 > 卵 > 雄蝇; 家蝇 SP13 基因在蛹期中的表达量最高, 其表达量程度从大到小依次排列为: 蛹 > 3 龄幼虫 > 雄蝇 > 2 龄幼虫 > 1 龄幼虫 > 雌蝇 > 卵; 家蝇 SP16 基因在 2 龄幼虫和 3 龄幼虫中的表达量

最高, 其表达量程度从大到小依次排列为: 2 龄幼虫 > 3 龄幼虫 > 蛹 > 1 龄幼虫 > 卵 > 雄蝇 > 雌蝇 (图 3)。

2.4.2 家蝇 3 种 *Serpin* 在家蝇 3 龄幼虫不同组织中的表达情况

家蝇 3 种 *Serpin* 基因分别在家蝇 3 龄幼虫主要组织中表达量情况, 以体壁作为参照, 家蝇 SP2 基因在唾液腺表达水平最高, 其在各组织表达量从大到小依次为: 唾液腺 > 脂肪体 > 体壁 > 中肠 > 马氏管; 家蝇 SP13 基因在马氏管和脂肪体中的表达水平最高, 在各组织表达量从大到小为: 马氏管 > 脂肪体 > 体壁 > 唾液腺 > 中肠; 家蝇

SP16 基因在体壁中的表达水平最高, 在各组织表达量从大到小依次为: 体壁 > 马氏管 > 中肠 > 唾液腺 > 脂肪体 (图 4)。

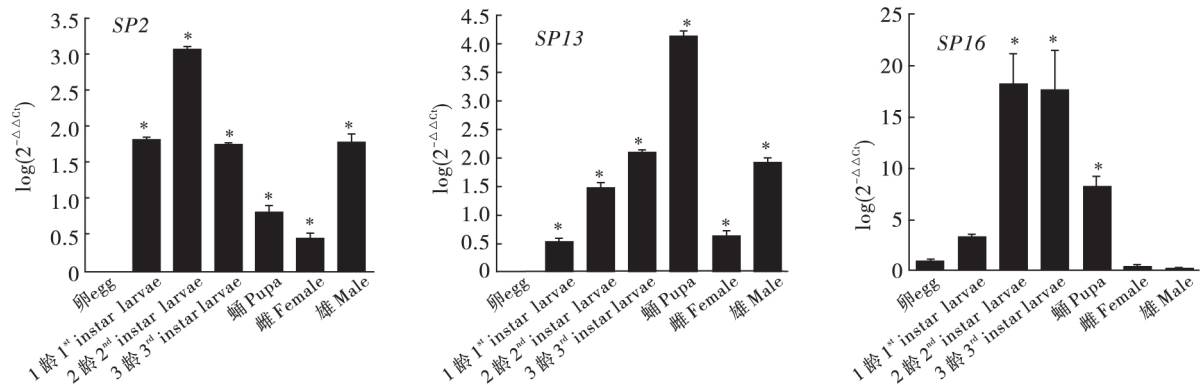


图 3 家蝇 3 种 *Serpin* 基因在生活史不同发育阶段的表达差异

Fig. 3 Variation in expression of three *Serpin* gene in the life cycle of housefly

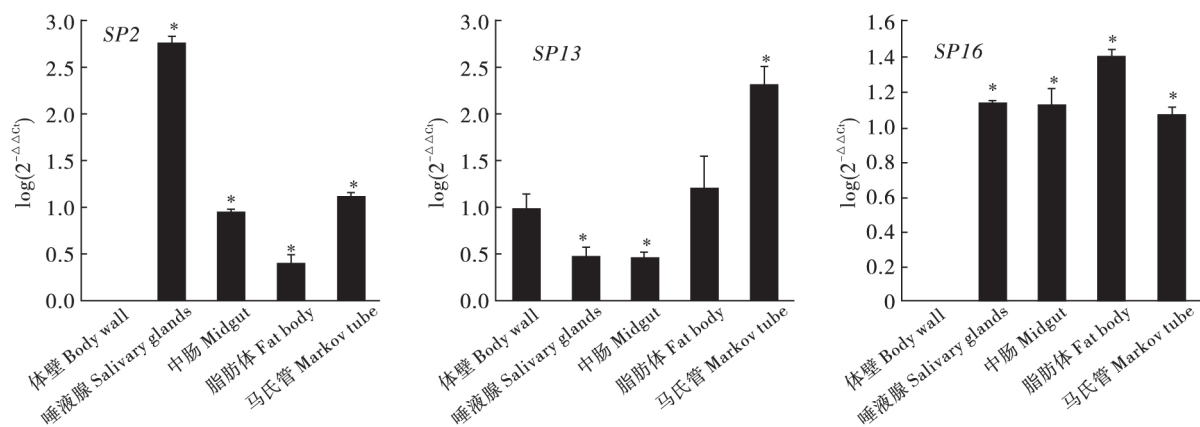


图 4 家蝇 3 种 *Serpin* 基因在 3 龄幼虫不同组织部位的表达差异

Fig. 4 Variation in expression of three *Serpin* gene in different tissues of housefly

3 结论与讨论

家蝇是一种世界性广泛分布的一类媒介昆虫, 孳生环境及其复杂, 鲜见病原微生物自身感染现象, 这将归功于其独特、强大的先天性免疫系统。而丝氨酸蛋白酶抑制剂 (Serine Protease Inhibitor, Serpin) 作为其调节先天性免疫系统的重要调控因子, 在免疫系统调控作用中发挥重要的作用。

本研究根据 NCBI 上公布的家蝇全基因组预测序列以及课题组前期工作中构建的家蝇 3 龄幼虫热胁迫 cDNA 文库 (刘红美等, 2010) 筛选出了 3 条具有潜在免疫调节功能的 *Serpin* 基因, 成功克隆了这些基因的 cDNA 序列, 并已上传登陆至 GenBank, 获得了相应的登录号。通过构建系统发育树对这些 *Serpin* 基因分析表明, 家蝇 *SP16* 和

SP13 与果蝇 *Serpin43Aa* 的亲缘关系最为接近, 果蝇 *Serpin43Ac* (Green *et al.*, 2000) 发挥作用的原理和果蝇 *Serpin43Aa* 是一致的, 而果蝇 *Serpin43Aa* 基因对于机体抵抗外界微生物感染中起到非常重要的作用, 当机体发生过度免疫时, 可通过抑制作用阻断 Toll 信号通路的信号传递, 进而终止过度的免疫反应, 从而避免机体损伤。家蝇 *SP2* 与黄粉虫 *SPN40* 和 *SPN48* 亲缘关系最为相近, 而鞘翅目昆虫黄粉虫中已经证实 *SPN40*、*SPN48* 和 *SPN55* 为黄粉虫天然免疫的重要负调控因子 (Jiang *et al.*, 2009)。这为以后研究家蝇 *SP2*、*SP13*、*SP16* 基因的生物学功能提供了很好的思路。

实时荧光定量 PCR (Yeonim *et al.*, 2014; Hideto *et al.*, 2015; 王玉倩和薛秀花, 2016) 结果表明, 家蝇 *SP2*、*SP13* 和 *SP16* 在家蝇的卵、

1 龄幼虫、2 龄幼虫、3 龄幼虫、蛹、雌蝇和雄蝇各生长发育阶段均有不同程度的表达。家蝇 *SP2* 基因在 2 龄幼虫表达量是最高, 其次是 1 龄幼虫和 3 龄幼虫, 在雄蝇阶段表达量是最低; 家蝇 *SP13* 基因在蛹期表达量是最高, 其次是雄蝇、3 龄幼虫和 2 龄幼虫, 在卵期、1 龄幼虫和雌蝇中表达量是最低; 家蝇 *SP16* 在 2 龄幼虫和 3 龄幼虫表达量是最高, 其次是蛹期和 1 龄幼虫, 在卵期、雌蝇和雄蝇中表达量是最低。 *Bmserpin-6* 基因在家蚕各个发育阶段均有表达, 在 4 龄眠期、5 龄 6 d、吐丝 48 h (化蛹前) 和化蛹 6 d 的转录水平较高, 在 5 龄 4 d、吐丝初期和蛹末期的转录水平较低 (俞燕芳等, 2010)。从以上结果分析表明, *Serpin* 基因在家蝇 2 龄幼虫和 3 龄幼虫中呈普遍的高表达, 而这两个时期也是家蝇整个生长发育时期最活跃、进食最多、生长最快的阶段, 推测 *Serpin* 基因可能参与了家蝇的个体生长发育, 由于进食很多且食物中或多或少存在有一些病原微生物, 家蝇幼虫却能正常生长, 推测家蝇 *Serpin* 基因在抵抗外来的微生物免疫防御过程中发挥着作用。这与本研究结果家蝇 *SP16* 与果蝇的 *Serpin43Aa* (Ambadapadi *et al.*, 2016) 的遗传距离较近, 且果蝇 *Serpin43Aa* 对于机体抵抗外界微生物感染中起到非常重要的作用相吻合。而家蝇 *SP13* 基因在蛹期呈现高表达量, 推测家蝇的 *SP13* 基因可能在其进行变态发育过程中起着相关作用。棉铃虫 *Haserpin* 的 mRNA 存在于各个组织, 但 *Haserpin* 在 6 龄变态时期表达量明显高于幼虫取食期, 这暗示 *Haserpin* 可能参与变态过程 (张凤霞, 2010)。

家蝇 *SP2*、*SP13* 和 *SP16* 在家蝇 3 龄幼虫不同组织马氏管、脂肪体、体壁、唾液腺和中肠中均有不同程度的表达。唾液腺是昆虫主要的消化器官, 也是昆虫接触食物的第一道防线, 其能分泌多种消化酶, 研究表明唾液腺在昆虫的免疫防御系统中扮演着重要的角色, 而家蝇属于杂食性的昆虫, 所进食的食物多含有病原微生物, 家蝇 *SP2* 基因在唾液腺中高表达, 说明可能其在家蝇的免疫防御系统中起着重要作用。家蚕 *Serpin16* 基因在幼虫丝腺的特异表达模式提示其可能与家蚕的吐丝过程密切相关, 推测该基因在维持丝腺稳定的泌丝环境中发挥重要作用 (董照明等, 2010)。体壁是昆虫直接接触环境的主要组织, 也是昆虫自我防御的重要屏障, 它是抵抗环境伤害的第一道防线, 而家蝇生活的环境非常复杂, 经常出没于

肮脏腐败之地, 将自身置身于不计其数的病原菌中, 却能安然无恙地生长繁殖, 这可能是由于家蝇体壁本身的防御机制以及家蝇强大的免疫防御系统的作用, 家蝇 *SP16* 基因在体壁中高表达, 推测家蝇 *SP16* 基因在对抗外来微生物免疫防御中起着重要作用。家蚕 *Bmserpin-6* mRNA 在 4 龄幼虫的头部、表皮、中肠、丝腺和脂肪体中有转录, 其中在表皮中高水平转录 (王彦云等, 2013)。然而, 家蝇 *SP2*、*SP13* 和 *SP16* 基因在中肠中表达量都普遍较低, 推测可能是由于在中肠内侧存在围食膜 (胡小龙和吴小锋, 2012; 姜姍彤等, 2012; Hu *et al.*, 2013; Kariu *et al.*, 2013; Jacob *et al.*, 2014) 的原因, 它是由中肠上皮细胞分泌的非细胞薄膜状结构, 根据分泌细胞在中肠所处的位置, 可将围食膜分为 I 型和 II 型, 主要成份由几丁质和蛋白质组成。因为围食膜是抵制外来微生物侵扰的一道天然屏障, 所以在昆虫发育过程中需要不停更新以保证围食膜的完整性和通透性, 从而使得昆虫在抵抗外来微生物侵袭的免疫防御过程中起着重要作用。

通过生物信息学分析, 有利于全面详细地了解家蝇 3 种 *Serpin* 蛋白的特性、结构、功能等信息; 实时荧光定量 PCR 结果分析, 推测家蝇 *SP2* 基因在家蝇生长发育过程中起着重要的作用; 家蝇 *SP13* 基因在家蝇生长发育过程, 尤其在蛹期进行变态发育过程中起着重要的作用; 家蝇 *SP16* 基因主要在免疫防御过程中起着重要的作用。这为以后对于该蛋白的后续研究具有一定的理论指导意义, 也为今后研究其生物学与免疫学功能打下坚实的基础。

参考文献 (References)

- Ambadapadi S, Munuswamy RG, Dong HZ, *et al.* Reactive center loop (RCL) peptides derived from serpins display independent coagulation and immune modulating activities [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291 (6): 2874–2887.
- Bmserpin6 and its regulation on prophenoloxidase activity and antimicrobial peptide expression [J]. *Science of Sericulture*, 2016, 42 (2): 237–242. 陈冰, 叶崇军, 孟艳, 等. 家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂 Bmserpin6 的原核表达及对酚氧化酶原活性和抗菌肽表达的调控作用 [J]. *蚕业科学*, 2016, 42 (2): 237–242.
- Dong ZM, Zhao P, Wang LY, *et al.* Expression pattern, in vitro recombination and expression of *Bombyx mori* serine protease inhibitor gene serpin16 [J]. *Science of Sericulture*, 2010, 36 (2): 236–242. 董照明, 赵萍, 王凌燕, 等. 家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 serpin16 的表达规律及体外重组表达 [J]. *蚕业科*

- 学, 2010, 36 (2): 236–242]
- Gatto M, Iaccarino L, Ghirardello A, *et al.* Serpins, immunity and autoimmunity: Old molecules, new functions [J]. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 2013, 45 (2): 267–280.
- Green C, Levashina E, McKimmie C, *et al.* The necrotic gene in *Drosophila* corresponds to one of a cluster of three serpin transcripts mapping at 43Ac [J]. *Genetics*, 2000, 156 (3): 1117–1127.
- Hideto T, Nanae O, Norikazu I, *et al.* Detection of bacteria and fungi in blood of patients with febrile neutropenia by real-time PCR with universal primers and probes [J]. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2015, 21 (3): 189–193.
- Huang W, Wu KL. Role of the serine protease inhibitor subfamily in the regulation of immune function [J]. *Chemistry of Life*, 2010, 30 (3): 417–420. [黄薇, 吴坤陆. 丝氨酸蛋白酶抑制剂亚家族在免疫调节中的作用 [J]. 生命的化学, 2010, 30 (3): 417–420]
- Hu XL, Wu XF. Research progress of structure and function of insect midgut peritrophic membrane [J]. *Science of Sericulture*, 2012, 38 (6): 1110–1117. [胡小龙, 吴小锋. 昆虫中肠围食膜构造和功能的研究进展 [J]. 蚕业科学, 2012, 38 (6): 1110–1117]
- Hu XL, Chen L, Yang R, *et al.* Molecular characterization of a peritrophic membrane protein from the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Molecular Biology Reports*, 2013, 40 (2): 1087–1095.
- Jacob V, Gary S, Gary GM. The peritrophic membrane of the gastropod *Megathura crenulata*: Structure, composition, and site of formation [J]. *Invertebrate Biology*, 2014, 133 (2): 136–145.
- Jiang R, Kim EH, Gong JH, *et al.* Three pairs of protease-serpin complexes cooperatively regulate the insect innate immune responses [J]. *JBC Papers*, 2009, 284 (51): 35652–35658.
- Jiang ST, Mao LY, Liu XY, *et al.* The natural barrier in insects – peritrophic membrane [J]. *Journal of Biology*, 2012, 29 (4): 70–73. [姜姍彤, 毛浪勇, 刘晓勇, 等. 昆虫体内的天然屏障—围食膜 [J]. 生物学杂志, 2012, 29 (4): 70–73]
- Kariu T, Smith A, Yang XL, *et al.* A chitin deacetylase-like protein is a predominant constituent of tick peritrophic membrane that influences the persistence of lyme disease pathogens within the vector [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8 (10): e78376.
- Liu HM, Zhang J, Wang Y, *et al.* Construction of cDNA library from *Musca domestica* larvae following heat stress and the EST sequencing [J]. *Immunological Journal*, 2010, 26 (9): 772–775. [刘红美, 张洁, 王贇, 等. 热胁迫后家蝇幼虫 cDNA 文库构建与随机 EST 测序分析 [J]. 免疫学杂志, 2010, 26 (9): 772–775]
- Ruby HL, Zhang QW, Gary AS, *et al.* An overview of the serpin superfamily [J]. *Genome Biology*, 2006, 7 (5): 1–11.
- Singh P, Jairajpuri MA. Structure function analysis of serpin superfamily: A computational approach [J]. *Protein and Peptide Letters*, 2014, 21 (8): 714–721.
- Wang YQ, Xue XH. Advance and application of real-time fluorescent quantitative PCR [J]. *Bulletin of Biology*, 2016, 51 (2): 1–6. [王玉倩, 薛秀花. 实时荧光定量 PCR 技术研究进展及其应用 [J]. 生物学通报, 2016, 51 (2): 1–6]
- Wang YY, He JM, Li GS, *et al.* An analysis on specific expression of *Bombyx mori* serine protease inhibitor gene Bmscrpin-6 [J]. *Science of Sericulture*, 2013, 39 (2): 257–260. [王彦云, 何渐鸣, 李国胜, 等. 家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 Bmscrpin-6 的特异性表达分析 [J]. 蚕业科学, 2013, 39 (2): 257–260]
- Yang WK, Dong ZP, Chen AL, *et al.* Roles of insect serine protease inhibitors in immunomodulation [J]. *Modern Agricultural Technology*, 2014, 8: 245–250. [杨伟克, 董占鹏, 陈安利, 等. 昆虫丝氨酸蛋白酶抑制剂在免疫调节中的作用 [J]. 现代农业科技, 2014, 8: 245–250]
- Yeonim C, Bo YJ, Tae SS, *et al.* Development of a highly sensitive one-tube nested real-time PCR for detecting *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease*, 2014, 80 (4): 299–303.
- Yu YF, Zha HX, Wang YY, *et al.* The expression profile of serine protease inhibitor gene serpin-6 in *Bombyx mori* at different developmental stages [J]. *Science of Sericulture*, 2010, 36 (2): 341–345. [俞燕芳, 查宏贤, 王彦云, 等. 家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 serpin-6 在不同发育时期的表达分析 [J]. 蚕业科学, 2010, 36 (2): 341–345]
- Zhang B, Zhao MY, Zhang R. The progress of serine protease inhibitor [J]. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University*, 2014, 31 (10): 836–842. [张兵, 赵明沂, 张嵘. 丝氨酸蛋白酶抑制剂的研究进展 [J]. 沈阳药科大学学报, 2014, 31 (10): 836–842]
- Zhang FX. Hormone Regulation and Expression Pattern of Hsp90, Thymosin and Serpin and during Development of *Helicoverpa armigera* [J]. Jinan: Shandong University, 2010: 43–51. [张凤霞. 棉铃虫 Hsp90、胸腺素和丝氨酸蛋白酶抑制因子在发育中的表达模式与激素调控 [J]. 济南: 山东大学, 2010: 43–51]
- Zhao LF, Tao ML, Pan GQ. Advances in serine protease inhibitors (serpin) superfamily [J]. *Science of Sericulture*, 2016, 42 (3): 532–540. [赵丽芳, 陶美林, 潘国庆. 丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族的研究进展 [J]. 蚕业科学, 2016, 42 (3): 532–540]