



魏秋兰, 吴琼芳, 邓惠敏, 朱子丹. 家蚕 *BmChd64* 基因的克隆与表达定位分析 [J]. 环境昆虫学报, 2022, 44 (4): 850–858.

# 家蚕 *BmChd64* 基因的克隆与表达定位分析

魏秋兰, 吴琼芳, 邓惠敏, 朱子丹\*

(华南师范大学生命科学学院, 华南师范大学昆虫科学与技术研究所, 广东省昆虫发育生物学与应用技术重点实验室, 广州 510631)

**摘要:** Chd64 是含有钙结合蛋白同源 (Calponin homology, CH) 结构域的蛋白, 在果蝇蜕皮激素与保幼激素信号通路中发挥重要作用。本研究以家蚕 *Bombyx mori* 为研究对象, 利用 PCR 克隆了与果蝇 *Drosophila melanogaster* *DmChd64* 同源的 *BmChd64* 基因, 与表达载体 pET-28a 连接后, 成功获得体外原核表达的 *BmChd64* 蛋白, 并对其进行了亚细胞定位分析。家蚕 *BmChd64* 基因开放阅读框 (ORF) 的序列为 567 bp, 编码 188 个氨基酸, 预测分子量大小为 20.9 kDa, 理论等电点为 8.41, 编码的蛋白在第 27~130 个氨基酸处存在 CH 结构域。同源性比对与进化分析显示, *BmChd64* 与赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 和果蝇的 Chd 亲缘关系较近。qRT-PCR 结果显示, *BmChd64* 在家蚕 5 龄游走期的不同组织中均有表达, 且在翅原基中的表达趋势与家蚕体内蜕皮激素 (20-hydroxyecdysone, 20E) 滴度变化规律一致。亚细胞定位结果显示, *BmChd64* 在细胞核与细胞质中均有分布, 细胞核内荧光信号较强, 且在细胞核外围较弱, 推测细胞质中 *BmChd64* 也可入核, 最终定位在细胞核中。研究结果表明 *BmChd64* 可能主要通过 20E 信号通路调控翅原基等的变态发育, 这为进一步完善 20E 调控昆虫变态发育的分子机制提供了实验基础。

**关键词:** 家蚕; *BmChd64*; 蜕皮激素; 表达分析; 亚细胞定位

中图分类号: Q968.1; S433

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2022) 04-850-09

## Cloning, expression analysis and subcellular localization of *BmChd64* in silkworm, *Bombyx mori*

WEI Qiu-Lan, WU Qiong-Fang, DENG Hui-Min, ZHU Zi-Dan\* (Guangzhou Key Laboratory of Development Regulation and Application Research of Insects, SCNU-Institute of Insect Science and Technology, School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** Chd64 is a protein containing calponin homology (CH) domain, which plays a key role in the signal pathway of JH and 20E in *Drosophila melanogaster*. In this study, the *BmChd64* gene, which was homologous to *DmChd64* of *D. melanogaster*, was cloned by PCR. After connecting with the expression vector pET-28a, the prokaryotic expression of *BmChd64* protein *in vitro* was successfully obtained and its subcellular location analysis were carried out in *Bombyx mori*. The sequence of the open reading frame (ORF) of the *BmChd64* gene was 567 bp, which encoded 188 amino acids, the predicted molecular weight was 20.9 kDa and the theoretical isoelectric point was 8.41. The encoded protein had a CH domain at the 27<sup>th</sup> to 130<sup>th</sup> amino acids. The homology comparison and evolutionary analysis showed that *BmChd64* was closely related to *Tribolium castaneum* and *D. melanogaster*. The results of qRT-PCR showed that the gene was expressed in different tissues at wandering stage of the 5<sup>th</sup> instar larvae of the

基金项目: 广东省自然科学基金杰出青年基金 (2017A030306003); 国家自然科学基金面上项目 (31872969)

作者简介: 魏秋兰, 女, 1990 年生, 实验员, 研究方向为昆虫发育的分子机理与调控, E-mail: 452646537@qq.com

\* 通讯作者 Author for correspondence: 朱子丹, 博士, 讲师, 研究方向是昆虫生殖功能研究, E-mail: zhuzidanbb@163.com

收稿日期 Received: 2021-04-12; 接受日期 Accepted: 2021-05-26

silkworm, and the expression trend of *BmChd64* in the wing discs were consistent with the change of 20E titer in silkworm. The subcellular localization results showed that *BmChd64* was distributed both in the nucleus and the cytoplasm. The fluorescence signal in the nucleus was strong and it was weaker in the periphery of the nucleus. It was speculated that *BmChd64* which was located in the cytoplasm could enter the nucleus and finally locate in the nucleus. These data indicated that *BmChd64* may mainly regulate the metamorphosis of the wing discs through the 20E signaling pathway, providing an experimental basis for further improving the molecular mechanism of 20E regulating insect metamorphosis.

**Key words:** *Bombyx mori*; *BmChd64*; 20-hydroxyecdysone; expression analysis; subcellular location

昆虫是陆地上种类最多、数量最大且分布最广的生物。在长期自然演化过程中,昆虫形成了蜕皮与变态这一特殊且重要的发育特征,而这一特征主要受到蜕皮激素(20-hydroxyecdysone, 20E)和保幼激素(Juvenile hormone, JH)协同调控(Riddiford *et al.*, 2003; Jindra *et al.*, 2013)。20E与其受体复合物EcR-USP(Ecdysone receptor, EcR; Ultraspiracle, USP)结合后,启动一系列级联反应进而调控蜕皮与变态相关基因的表达,导致蜕皮与变态(Riddiford *et al.*, 2000; 2008; Yamanaka *et al.*, 2013)的发生。JH则与其受体MET/Tai(Methoprene, MET; Taiman, Tai)结合,启动其下游的初级反应基因*Kruppel homolog 1*(*Kr-h1*)表达,进而启动了JH级联信号通路,调控昆虫的生长与发育(Kayukawa *et al.*, 2012; 2017)。近年来许多研究逐步完善了20E与JH调控昆虫生长与变态的机制,但二者确切的互作机制有待深入阐释。Li等发现,果蝇钙调同源结构域蛋白Chd64(Calponin homology domain protein, 21-kDa Calponin-like protein, Chd64)可与JH反应元件(JH-response element, JHRE)结合,还可通过与核受体Methoprene-tolerant(Met)和USP互作响应JH诱导基因的转录表达(Li *et al.*, 2007)。另一个果蝇Chd蛋白DroVav被认为是信号转导蛋白与酪氨酸磷酸化的表皮生长因子受体(Dekel *et al.*, 2000)。棉铃虫*Helicoverpa armigera* Chd64同源蛋白HaCal响应20E诱导后以磷酸化形式进入细胞核,受JH analog methoprene(JHA)诱导后以非磷酸化形式与USP1互作进而参与调控20E或JH的信号级联(Liu *et al.*, 2011)

Chd64是一类含有CH结构域的蛋白。CH结构域一般含100~110个氨基酸残基,它是一类肌动蛋白结合结构域,最初发现于钙结合蛋白(Calponin)的氨基末端,后来发现在多种肌动蛋

白结合蛋白和信号转导蛋白中也存在CH结构域(Gimona *et al.*, 2002; Ferjani *et al.*, 2010)。根据蛋白序列的不同,含有CH结构域的蛋白质主要分为3类:氨基末端含单一CH结构域的蛋白质、由两个CH结构域串联形成丝状肌动蛋白结合结构域(F-actin-binding domain, ABD)的蛋白质及含两个ABD结构的蛋白质(Korenbaum and Rivero, 2002)。蛋白质中两个串联的CH结构域构成了肌动蛋白结合区,例如血影蛋白、肌动蛋白、肌球蛋白和纤维蛋白(Hartwig *et al.*, 1994; McGough *et al.*, 1998)。研究认为,大部分含CH结构域的蛋白质都能与肌动蛋白相结合或者参与细胞的信号转导(Banuelos *et al.*, 1998)。果蝇中含CH结构域的信号转导蛋白DroVav作为一个信号转导器在果蝇发育中发挥着关键作用(Dekel *et al.*, 2000)。Liu等发现在棉铃虫中含CH结构域的一类肌钙蛋白HaCal在20E和JH的通路网络中发挥重要作用,调节了相关基因的表达从而影响棉铃虫的生长发育(Fu *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011)。在赤拟谷盗和虾中,Chd64也在20E和JH调控的通路中发挥了重要作用(Sin *et al.*, 2014; Tarczewska *et al.*, 2015)。

基于Chd64蛋白在果蝇和棉铃虫生长发育中激素信号传导途径的重要作用,本论文克隆了鳞翅目模式昆虫同时也是重要经济昆虫家蚕中与果蝇DmChd64同源的*BmChd64*基因,并对该蛋白氨基酸序列进行生物信息学预测,同时利用实时荧光定量PCR(Quantitative Real-time PCR, qRT-PCR)检测了该基因在家蚕中的时空表达,并利用共聚焦显微镜进行了该蛋白的亚细胞定位分析,以期丰富家蚕等全变态昆虫变态发育分子调控机理的研究,为家蚕发育的人为调节与害虫的生物防治提供新的思路。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料和主要试剂

本研究选用的家蚕品系为大造, 蚕卵由广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所提供, 家蚕幼虫定时以桑叶饲喂, 于温度 26℃, 相对湿度 65% ~ 75%, 光周期 L:D = 12:12 条件下培养至成虫。大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、BL21、原核表达载体 pET-28a 及真核表达载体 pIE1-EGFP-N1 均由本实验室保存。Trizol Isolate 抽提试剂盒、pMD-18T 载体、DNA 限制性内切酶、T4 连接酶、Taq 酶、低分子量标准蛋白 marker、DNA marker、M-MLV 反转录试剂盒和实时荧光定量 PCR 试剂盒均购自 TAKARA 公司; 质粒提取和 DNA 胶回收试剂盒为 TianGen 产品; 实验所用其他试剂均为国产分析纯试剂; 实验涉及的引物合成和相关 DNA 测序委托华大基因公司完成。

本研究所用 BmN 细胞株来源于家蚕卵巢细胞, 为本实验室培养与保存, 细胞培养条件为 27℃ 恒温, 所用培养基为含有 10% 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) 的 Grace 培养基 (GIBCO, USA)。细胞每隔 3 d 以 1:3 的比例稀释培养基作继代培养。后均匀铺板于 24 孔细胞培养板, 待细胞密度长至 80% ~ 90% 时进行转染和后续实验。

### 1.2 家蚕总 RNA 的提取与 cDNA 合成

选取处于 5 龄游走期的家蚕, 脂肪体、中肠、表皮和翅原基组织; 取 5 龄至蛹期的家蚕, 隔天取翅原基组织, 并于液氮中速冻后研磨。按 Trizol Isolate 抽提试剂盒的说明提取家蚕组织的 RNA, 用紫外分光光度计和 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的纯度和浓度及质量, 然后按照 TAKARA 公司的 M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit (反转录试剂盒) 说明书, 反转录合成第一链 cDNA。

### 1.3 家蚕 *BmChd64* 基因的克隆及序列分析

以果蝇中的 *DmChd64* (Accession No: AAF47840) 为参照基因, 在 NCBI 上通过 Blast 分析对比出家蚕中对应的同源基因, 即 *BmChd64* (Accession No: NP\_001040372; 相似性: 81%; E-value:  $4e^{-109}$ )。根据序列设计 PCR 引物 (见表 1), 以家蚕 cDNA 为模版, 进行 PCR 扩增, 反应条件为: 95℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。反应结束后, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。参照 DNA 胶回收试剂盒的方法进行胶回收。将胶回收纯化后的 PCR 产物与 pMD18-T 载体连接, 转化到 DH5 $\alpha$  菌体中, 筛选阳性克隆进行测序。使用 DNASTAR 软件中的 Clustal Alignment Programme 对测序后的序列进行比对鉴定。基因序列比较与进化树构建使用 DNASTAR 软件的 Clustal W 方法。

表 1 本研究所使用到的引物

Table 1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5' - 3')	用途 Purpose
<i>BmChd64</i> -F	TCGAAATGGCAAACAACCGAG	基因克隆 Gene cloning
<i>BmChd64</i> -R	CAGTTTTACATGTGTCTCGTGTACC	
<i>BmChd64</i> -qRT-F	ACTCCGTCGTGATCTGCTTG	定量 PCR Quantitative real time-PCR
<i>BmChd64</i> -qRT-R	AGTTGATTCCGCTTTGGTTG	
<i>BmRp49</i> -F	CAGCGGTTCAAGGGTCAATAC	定量 PCR Quantitative real time-PCR
<i>BmRp49</i> -R	TACGGAATCCATTTGGGAGCAT	

### 1.4 家蚕 *BmChd64* 的原核表达和纯化

用 *Bam*H I 和 *Xho* I 对目的 DNA 片段和 pET-28a 载体进行双酶切, 反应体系为质粒 10  $\mu$ L, *Bam*H I 酶 1  $\mu$ L, *Xho* I 酶 1  $\mu$ L, 10  $\times$  K Buffer 3  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 5  $\mu$ L。反应条件为 37℃ 3 h。胶回收后将二者连接, 构建重组质粒 pET-28a-*BmChd64*,

将重组质粒转化到 BL21 菌体中, 加入最终浓度为 1 M IPTG 进行诱导表达, SDS-PAGE 检测表达情况。为了确定重组蛋白是否以可溶的形式表达, 收集经 IPTG 诱导的菌体后, 将菌体进行超声破碎, 分别收集沉淀和上清液, 在 12% 凝胶上进行 SDS-PAGE 检测。蛋白纯化按照 Ni-NTA His  $\cdot$  Bind

Resin (Novagen) 试剂盒的方法进行。取 1 mL  $\text{Ni}^{2+}$  柱于管中, 使用 2 倍体积蒸馏水洗 2 次, 2 倍体积  $1 \times \text{Charge}$  (50 mM  $\text{NiSO}_4$ ) 缓冲液洗 3 次, 2 倍体积  $1 \times \text{Binding buffer}$  (0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 5 mM Imidazole, pH7.9) 缓冲液洗 2 次, 将收集的上清液用 0.45  $\mu\text{M}$  的滤膜过滤后加入管中, 分别以 10 倍体积的  $1 \times \text{Binding buffer}$ 、6 倍体积的  $1 \times \text{Washing buffer}$  (0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 60 mM Imidazole, pH7.9) 和 6 倍体积的  $1 \times \text{Elute buffer}$  (0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 1 M Imidazole, pH7.9) 洗柱子, 离心收集上清, 该上清含纯化蛋白。用 SDS-PAGE 检查蛋白纯化效果。

### 1.5 *BmChd64* 在家蚕不同发育时期各组织中的表达分析

以家蚕各发育时期翅原基 cDNA 和 5 龄游走期翅原基、表皮、脂肪体和 中肠组织 cDNA 为模版, 以家蚕 *Rp49* (Gene ID: 778453) 作为内参基因, 参照 qRT-PCR 试剂盒的方法 (TAKARA, 大连), 采用 20  $\mu\text{L}$  体系, 10  $\mu\text{L}$  SYBR Premix Ex TaqTM, 上、下游引物各 0.8  $\mu\text{L}$ , 6.8  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O, 2  $\mu\text{L}$  DNA 模板。使用 7300 Real-time PCR System 进行 PCR 反应, PCR 反应程序如下: 95 $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 40 个循环, 循环条件为 95 $^{\circ}\text{C}$  3 s, 60 $^{\circ}\text{C}$  30 s。每个样品重复进行 3 次, 检测 *BmChd64* 的表达。为增加数据的可比性, 需提前检测目标基因和内标基因的扩增效率是否一致。然后采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法来确定每一个目标基因相对内标基因 *Rp49* 的相对表达量。用 Graphpad Prism 5 统计分析软件, 采用 ANOVA (多个处理间的两两比较) 或独立样本 *T* 测验 (两个样品间比较) 来进行处理间的差异比较分析。

### 1.6 *BmChd64* 的亚细胞定位

将 PCR 扩增得到的 *BmChd64* 的 ORF 片段插入到 pMD18-T 中, 用 *BamH* I 和 *Xho* I 进行双酶切后, 将目的 DNA 片段插入到真核表达载体 pIE1-EGFP-N1 上, 并通过双酶切验证重组质粒 pIE1-*BmChd64*-EGFP。

转染前一天, 加入完全培养基培养 BmN 细胞过夜, 至细胞密度 80% ~ 95% 时, 进行转染。转染时, 去除细胞培养皿中的完全培养基, 用无血清 (FBS) 的 Grace's Insect 培养基清洗细胞两次, 再加入适量的无 FBS 的 Grace's Insect 培养基到培养皿中, 然后加入 200  $\mu\text{L}$  转染混合物, 轻轻混匀, 培养 8 h 后, 更换含 10% FBS 的 Grace's Insect 培

养基, 继续培养。24 h 后, 通过激光共聚焦显微镜观察带有 GFP 标签的 *BmChd64*, 进行亚细胞定位。

## 2 结果与分析

### 2.1 *BmChd64* 基因克隆与序列分析

以家蚕 cDNA 为模版, 对 *BmChd64* 基因进行 PCR 扩增, 产物经 1% 凝胶电泳分离后在 500 ~ 700 bp 中间处显示出一条特异性条带 (图 1)。对该特异性 PCR 产物进行胶回收后与 pMD18-T 载体连接, 通过 PCR 检测阳性克隆。提取阳性克隆细胞的质粒进行 DNA 测序, 测序结果显示该 PCR 产物与 GenBank 的相应序列相同。

对克隆得到的 *BmChd64* 的 cDNA 序列进行分析。结果显示, 该基因开放阅读框 (ORF) 的碱基数为 567 bp, 编码 188 个氨基酸。*BmChd64* 蛋白的分子量大小为 20.9 kDa, 理论等电点为 8.41。该基因所编码的蛋白在第 27 ~ 130 个氨基酸处存在 CH 结构域 (图 2)。

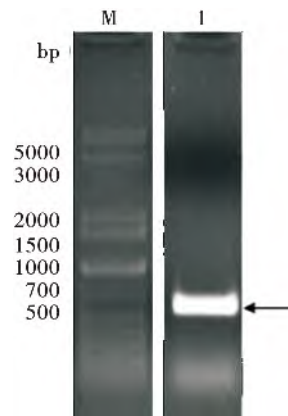


图 1 *BmChd64* 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of *BmChd64* gene

注: M, 5000 DNA 分子量标准; 1, *BmChd64* 基因的 PCR 扩增。Note: M, DL5000 DNA marker; 1, PCR amplification of *BmChd64* gene.

### 2.2 *BmChd64* 的同源性比对与进化分析

为了解 Chd64 蛋白在昆虫中的功能是否保守, 将家蚕 *BmChd64* 的氨基酸序列与埃及伊蚊 *Aedes aegypti*、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*、棉铃虫 *Helicoverpa armigera*、体虱 *Pediculus humanus corporis*、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*、黑腹果蝇 *D. melanogaster*、果蝇 *D. mojavensis* 及豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* 进行同源序列比对和相似性分

析。结果显示, BmChd64 与其它昆虫的同源氨基酸序列具有极高的相似性, 其中, 与赤拟谷盗的相似性最高为 84%, 与 DmChd64 的相似性为 80.9%。不同昆虫间同源氨基酸序列的高相似性(图 3 和表 2), 暗示了该基因在不同昆虫中的功能

较保守, 推测其在昆虫中可能发挥相似的功能。基于同源性构建了系统进化树, 结果显示, BmChd64 与鞘翅目赤拟谷盗的亲缘关系最近, 但与同为鳞翅目的棉铃虫的 HaCal 亲缘关系较远(图 4)。

```

1  ATATCGACCCTCGTGTGACTCGGACGCTGICCCGTTGACCCGCCGGCCTGTTTACATTCTGTACACA
67  GIGACTTCACCTICTACCGIGTCTGTGATTTATTIAAATAATTTATTAAATIGTTATTAGTTCGAA
133  ATGGCAAACAACCGAGCGACCAAATCAGGATTTGCAAGCTGAAGCCAGAGAAAGATCAACAGCAA
    M A N N R A T K S G F A A E A Q R K I N S K 22
199  TACAGCGAGGAGCTGGCCACGAGTCTTGGAAATGGATTGCGATGATCACCGGCGAACCAGAGAAC
    Y S E E L A H E S L E W I R M I T G E P E N 44
265  ACCTCAGGGGATATGGACAACITCTACGAAGTGCTTAAAGACGGCACTTCTGTGCAAGCTAGCC
    T S G D M D N F Y E V L K D G T L L C K L A 66
331  AACAACATCCACCCGAACATGATCAAAAAGATCAACACATCGTCGATGGCCTTCAAGTGCATGGAG
    N N I H P N M I K K I N T S S M A F K C M E 88
397  AATATCAACGCTTTCCTCGAAGCCGCAAGACAGTTGGGTGTACCGGCACAGGAAAACITTTCAAAC
    N I N A F L E A A R Q L G V P A Q E T F Q T 110
463  GTCGACCTGTGGGAGAGACAGAATCTCAACTCCGTCGTGATCTGCTGTCAGTCACTGGGCAGAAAG
    V D L W E R Q N L N S V V I C L Q S L G R K 132
529  GCTGGAACCTACGGGAAGCCGTCAATAGGACCGAAAGAAGCTGAGAAGAACGTGCGAAAACITCTCC
    A G T Y G K P S I G P K E A E K N V R N F S 154
595  GAGGAGCAGCTCCGGGCTGGTCAGGGAGTCATATCTTTCAGTACGGTTCAAATAAGGGCGCCAAC
    E E Q L R A G Q G V I S L Q Y G S N K G A N 176
661  CAAAGCGGAATCAACTTTGGTAAACACGAGACACATGTAAAACTGTCTAAACGTGCACATTTGAATG
    Q S G I N F G N T R H M *** 188
727  GCTTGTTACAAGCATGCTAGATGCTTCTAAGTCACTGTACTAAAATTTAGGCGCGAAAACTTCTAC
793  ATTCTTAATAACAGTCAATTCCTTACAAAAAGTCTGTACTTAGATTCCAATAA

```

图 2 *BmChd64* 核苷酸及其编码的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *BmChd64*

注: 阴影序列显示 CH 域。下划线, 5'非翻译区和 3'非翻译区; 红色字体, 起始密码子与终止密码子; \*\*\*, 翻译终止位点; 黄色底纹, CH 结构域。Note: Shadow sequence showed a CH domain. Underline, 5' untranslated region and 3' untranslated region; Red font, Start codon and stop codon; \*\*\*, Translation termination site; Yellow shading, CH domain.

表 2 不同昆虫 Chd64 蛋白的氨基酸序列相似性 (相似度 (%))

Table 2 Amino acid sequence identity of Chd64 protein from different insects (Identity)

	1	2	3	4	5	6	7	8
1		84.0	81.9	81.4	80.9	78.7	77.1	69.5
2			76.6	78.2	74.5	78.2	77.1	67.4
3				85.1	95.7	78.7	74.5	70.1
4					83.0	77.7	76.6	69.0
5						77.7	73.9	66.8
6							73.4	64.2
7								63.1
8								

注: 1, 家蚕; 2, 赤拟谷盗; 3, 果蝇; 4, 冈比亚按蚊; 5, 黑腹果蝇; 6, 豌豆蚜; 7, 体虱; 8, 棉铃虫。Note: 1, *B. mori*; 2, *T. castaneum*; 3, *D. mojavensis*; 4, *A. gambiae*; 5, *D. melanogaster*; 6, *A. pisum*; 7, *P. corporis*; 8, *H. armigera*.

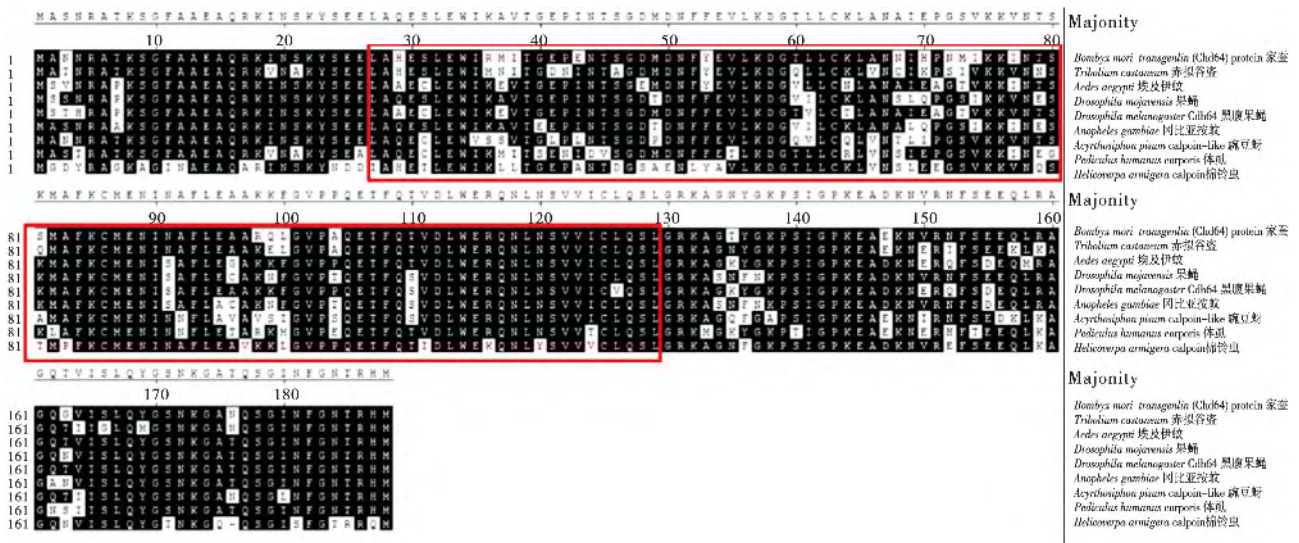


图3 不同昆虫的 Chd64 蛋白的氨基酸序列比对

Fig. 3 Amino acid sequence alignment of Chd64 protein from different insects

注: Chd64 蛋白来源及 GenBank 登录号。1, 家蚕 *Bombyx mori* transgenlin (Chd64) protein, NP\_001040372.1; 2, 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*, XP\_975100.1; 3, 埃及伊蚊 *Aedes aegypti*, XP\_001652323.1; 4, 果蝇 *Drosophila mojavensis*, XP\_015015904.1; 5, 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* Cdh64, NP\_001261398.1; 6, 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*, XP\_321834.4; 7, 豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum* calpain-like, NP\_001191867.1; 8, 体虱 *Pediculus humanus corporis*, XP\_002426427.1; 9, 棉铃虫 *Helicoverpa armigera* calpain, XP\_021189834.1。

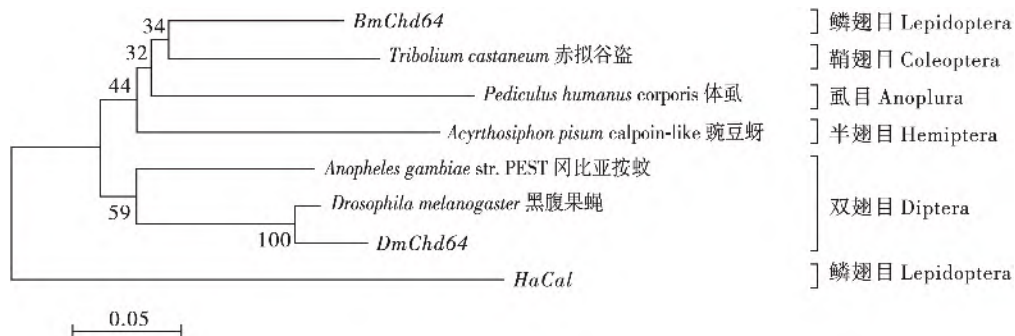


图4 *BmChd64* 与其它昆虫同源氨基酸序列的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of Chd64 protein from different insects

### 2.3 *BmChd64* 重组蛋白的表达与纯化

将重组质粒 pET-28a-*BmChd64* 转化到大肠杆菌, 在 37°C, 200 rpm 的培养条件下, 加入 IPTG 诱导蛋白表达, 以经 IPTG 诱导的 pET-28a 菌体蛋白作为对照。SDS-PAGE 检测结果显示, 在约 26 kDa 处出现一条特异性条带 (图 5-A, 泳道 2), 因 pET-28a 含有 2 个 His 标签, 每个标签蛋白为 3 kDa, 预测 *BmChd64* 蛋白的分子量为 20.9 kDa, 出现的条带与预测的 pET-28a-*BmChd64* 蛋白大小相近, 这表明 *BmChd64* 重组蛋白在原核系统中成功表达。将菌体经过超声波破碎后, 在上清和沉淀中都检测到重组蛋白 (图 5-A, 泳道 3 和 4), 表明重组蛋白以可溶的形式表达。蛋白纯化

后, 在小于 29 kDa 处出现纯化的特异性蛋白条带, 与预测的 pET-28a-*BmChd64* 蛋白约 26 kDa 大小一致 (图 5-B, 泳道 1 和 2)。

### 2.4 *BmChd64* 在家蚕各发育时期各组织中的表达分析

利用 qRT-PCR 分别分析了家蚕 5 龄游走期脂肪体、中肠、表皮和翅原基中 *BmChd64* 的表达量和 5 龄至蛹期的翅原基中 *BmChd64* 基因的 mRNA 的表达情况。结果显示, *BmChd64* 在家蚕 5 龄游走期的各组织都有一定的表达, *BmChd64* 在脂肪体中的表达量最低, 在翅原基中的表达量最高, 其次是表皮和中肠 (图 6), *BmChd64* 在翅原基的高表达暗示其与变态发育中翅原基的发育相关。

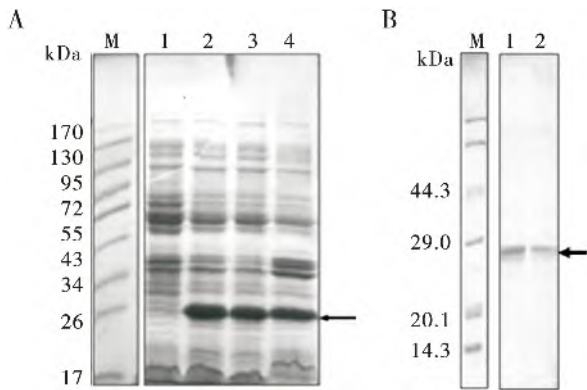


图5 BmChd64 重组蛋白表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of expression of BmChd64 protein  
注: A, BmChd64 重组蛋白诱导表达; M, 蛋白分子量标准; 1, 经 IPTG 诱导的 pET-28a 菌体蛋白; 2, 经 IPTG 诱导的菌体重组总蛋白; 3, 诱导的菌体重组蛋白上清; 4, 诱导的菌体重组蛋白沉淀。B, BmChd64 重组蛋白纯化; M, 蛋白分子量标准; 1、2, 纯化后 BmChd64 重组蛋白。  
Note: A, Induced expression of BmChd64 recombinant protein; M, Standard protein maker; 1, pET-28a bacterial protein induced by IPTG; 2, Recombinant total protein of pET-28a-BmChd64 induced by IPTG; 3, Supernatant recombinant protein of pET-28a-BmChd64 induced by IPTG; 4, Precipitate recombinant protein of pET-28a-BmChd64 induced by IPTG. B, Purification of BmChd64 recombinant protein; M, Standard protein maker; 1 and 2, BmChd64 recombinant protein after purification.

在翅原基中, *BmChd64* 在 5 龄末期和游走期都有较高水平的表达, 在蛹初期表达下降, 到蛹期 4 d 表达又升高, 至蛹末期表达量最高 (图 7)。*BmChd64* 在翅原基的表达模式与家蚕体内 20E 的滴度变化高度一致 (杨鑫华, 2010; Wang *et al.*, 2018), 暗示其在翅原基的表达可能与 20E 有关。

## 2.6 *BmChd64* 蛋白的亚细胞定位

蛋白质的功能与其亚细胞定位密切相关, 通过了解蛋白质的亚细胞定位信息, 可为探究蛋白质的生物学功能提供线索。为检测 BmChd64 在细胞内的定位, 本论文构建了绿色荧光蛋白 (GFP) 标记的 BmChd64 蛋白表达载体, 通过双酶切验证 pIE1-BmChd64-EGFP 载体构建成功。用构建好的 pIE1-BmChd64-EGFP 转染 BmN 细胞株, 并通过共聚焦显微镜检测荧光信号。结果显示, 转染了 EGFP 载体的细胞中, 荧光信号在细胞核和细胞质中均匀分布, 且细胞质比细胞核的绿色荧光更强。在转染了 BmChd64-pEGFP 载体的细胞中, 荧光信号虽在细胞核和细胞质中都有分布, 但围绕细胞

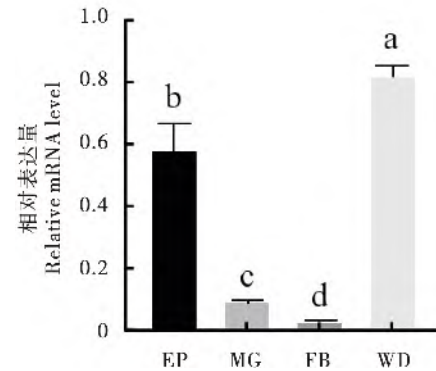


图6 qRT-PCR 检测 *BmChd64* 在脂肪体、中肠、表皮和翅原基中的表达

Fig. 6 qRT-PCR analysis of expression profiles of *BmChd64* in the fatbody, midgut, epidermis and wing disc  
注: EP, 表皮; MG, 中肠; FB, 脂肪体; WD, 翅原基。不同字母表示两者之间显著差异,  $P < 0.05$ 。  
Note: EP, Epidermis; MG, Midgut; FB, Fat body; WD, Wing disc. Different letters indicated significant differences,  $P < 0.05$ .

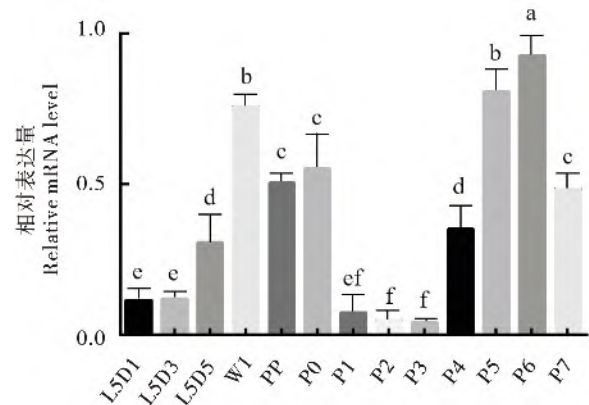


图7 qRT-PCR 检测 *BmChd64* 在翅原基中的表达

Fig. 7 qRT-PCR analysis of expression profile of *BmChd64* in the wing disc  
注: L, 幼虫期; D, 天; W, 游走期; PP, 预蛹期; P, 蛹期。数字表示在相应时期的天数。不同字母表示两者之间显著差异,  $P < 0.05$ 。  
Note: L, Larval stage; D, Day; W, Wandering; PP, Prepupal stage; P, Pupal stage. The numbers indicated the days in the corresponding stages. Different letters indicated significant differences,  $P < 0.05$ .

核的细胞质区域的荧光明显更暗, 出现一个暗圈, 而细胞核中荧光信号更强 (图 8-D, F), 暗示了细胞质中的 BmChd64 蛋白也可能入核, 其主要是在细胞核中起作用。

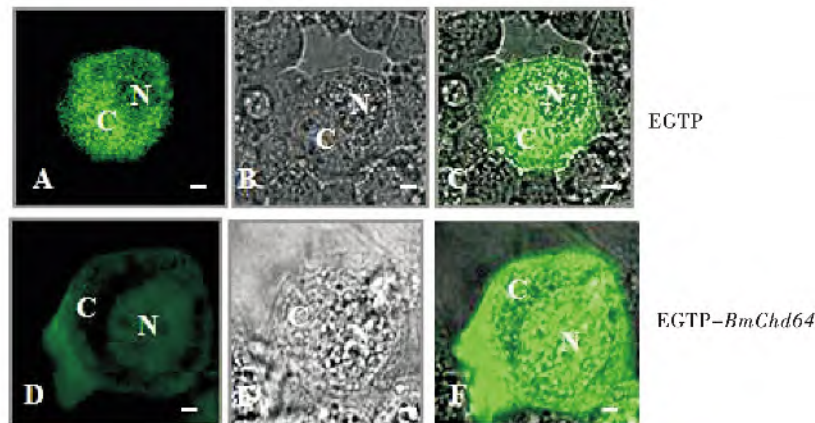


图 8 *BmChd64* 在 BmN 细胞中的定位

Fig. 8 Localization of *BmChd64* in BmN cells

注: A, BmN 转染 EGFP 质粒后绿色荧光图像; B, BmN 转染 EGFP 质粒后白光图像; C, BmN 转染 EGFP 质粒后荧光和白光 Merge 图像; D, BmN 转染 EGFP-*BmChd64* 质粒后绿色荧光图像; E, BmN 转染 EGFP-*BmChd64* 质粒后白光图像; F, BmN 转染 EGFP-*BmChd64* 质粒后荧光和白光 Merge 图像; N, 细胞核; C, 细胞质; 绿色荧光, 目的蛋白存在的位置。Note: A, Green fluorescence image after transfection of EGFP vector in BmN cells; B, White light image after transfection of EGFP vector in BmN cells; C, Fluorescence and white light Merge image after transfection of EGFP vector in BmN cells; D, Green fluorescence image after transfection of EGFP-*BmChd64* plasmid in BmN cells; E, White light image after transfection of EGFP-*BmChd64* plasmid in BmN cells; F, Fluorescence and white light Merge image after transfection of EGFP-*BmChd64* plasmid in BmN cells; N, Nuclei; C, Cytoplasm. The fluorescence presented the location of target gene.

### 3 结论与讨论

本研究成功克隆了家蚕的 *BmChd64* 基因, 该基因 cDNA 的开放阅读框为 567 bp, 编码 188 个氨基酸, 预测蛋白分子量大小为 20.9 kDa, 理论等电点为 8.41, 存在单个 CH 结构域, 与其它昆虫中已报道的 Chd64 蛋白含 CH 结构域一致 (Li *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2011; Kozłowska *et al.*, 2014; Tarczewska *et al.*, 2015)。同源性比对表明该基因编码的氨基酸序列与赤拟谷盗 *TcChd64* 和果蝇 *DmChd64* 同源性较高, 推测 *BmChd64* 与 *TcChd64* 和 *DmChd64* 的功能相似。*DmChd64* 的生物学功能已有研究证实, 其通过与 EeR/USP 和 Met 等蛋白结合, 共同调控 JH 应答基因的表达, 在介导果蝇 JH 和 20E 激素信号交流过程中发挥了关键作用 (Li *et al.*, 2007)。赤拟谷盗 *TcChd64* 蛋白的功能尚未有报道, Kozłowska 等对 *TcChd64* 蛋白序列进行分析发现, 其与 *DmChd64* 的相似性达 74%, 推测其与 *DmChd64* 的功能相似 (Kozłowska *et al.*, 2014)。因此, 本研究推测, *BmChd64* 可能与 *DmChd64* 一样, 参与了家蚕 JH 和 20E 的激素调控过程。

同时, 本研究利用 qRT-PCR 检测了 *BmChd64*

在家蚕不同组织中的表达。结果显示, *BmChd64* 在 5 龄游走期的多个组织都有一定量的表达, 其中 *BmChd64* 在翅原基中表达量最高, 其次是表皮和中肠, 表达量最低的是脂肪体, 该基因在翅原基中表达量最高, 表明该基因在翅原基的发育过程中有着重要的作用。在翅原基中, *BmChd64* 在 5 龄中后期的表达水平较低, 而到了 5 龄末期和游走期表达水平较高, 在蛹初期表达下降, 到蛹期 4 d 表达又升高, 至蛹末期表达量最高, 这一变化趋势与 20E 在家蚕体内的滴度变化 (杨鑫华, 2010; Wang *et al.*, 2018) 趋势相吻合。在棉铃虫中, 20E 诱导 HaCal 的快速磷酸化, HaCal 可通过 20E 或 JH 信号迅速转移到细胞核中与 USP1 相互作用, 同时 *HaCal* RNAi 可以抑制 20E 对 *USP1*、*PKC* 和 *HR3* 的诱导 (Liu *et al.*, 2011)。因此推测, *BmChd64* 可能在 20E 的作用下大量表达, 进而导致翅原基完成幼虫-蛹期的变态发育并促进 5 龄中后期的蛹翅向成虫翅转变。

研究蛋白质的亚细胞定位有助于更好地了解目的蛋白的作用机理和调控机制。本研究用构建好的 *BmChd64*-EGFP 转染家蚕 BmN 细胞株后通过共聚焦显微镜检测荧光信号, 荧光信号在细胞核和细胞质中都有分布, 但主要是分布在细胞核中。Liu 等发现在棉铃虫中, 含有 CH 结构域的蛋白



HaCal 磷酸化能迅速进入细胞核内与核内蜕皮激素受体复合物 EcR-USP 结合, 从而在 20E 和 JH 的通路网络中发挥重要作用 (Liu *et al.*, 2011)。因此推测家蚕 BmChd64 蛋白可能也与 HaCal 一样会被磷酸化, 而磷酸化影响了蛋白的亚细胞定位。Kozłowska 等利用 Kratky 图表明果蝇 DmChd64 和赤拟谷盗 TcChd64 蛋白很可能在两个末端都有内在的无序区域 (intrinsically disordered regions, IDRs), 这些区域可作为与各种因子进行多重相互作用的平台, 并为其调节功能奠定基础 (Kozłowska *et al.*, 2014)。BmChd64 与 DmChd64、TcChd64 同源性最高, 推测家蚕 BmChd64 蛋白可能也可与其它因子互作, 而与其它因子的互作也会影响 BmChd64 的亚细胞定位。综上所述, 家蚕 BmChd64 可能在 20E 的作用下参与调控家蚕翅原基的变态发育。

#### 参考文献 (References)

- Banuelos S, Saraste M, Carugo KD. Structural comparisons of calponin homology domains: Implications for actin binding [J]. *Structure*, 1998, 6 (11): 1419–1431.
- Dekel I, Russek N, Jones T, *et al.* Identification of the *Drosophila melanogaster* homologue of the mammalian signal transducer protein, Vav [J]. *FEBS Letters*, 2000, 472 (1): 99–104.
- Ferjani I, Fattoum A, Manai M, *et al.* Two distinct regions of calponin share common binding sites on actin resulting in different modes of calponin-actin interaction [J]. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 2010, 1804 (9): 1760–1767.
- Fu Q, Liu PC, Wang JX, *et al.* Proteomic identification of differentially expressed and phosphorylated proteins in epidermis involved in larval-pupal metamorphosis of *Helicoverpa armigera* [J]. *BMC Genomics*, 2009, 10: 600–2164–10–600.
- Gimona M, Djinovic-Carugo K, Kranewitter WJ, *et al.* Functional plasticity of CH domains [J]. *FEBS Letters*, 2002, 513 (1): 98–106. PMID: 11911887.
- Hartwig JH. Actin-binding proteins 1: Spectrin superfamily [J]. *Protein Profile*, 1994, 1 (7): 706–778.
- Jindra M, Palli SR, Riddiford LM. The juvenile hormone signaling pathway in insect development [J]. *Annual Review of Entomology*, 2013, 58: 181–204.
- Kayukawa T, Jouraku A, Ito Y, *et al.* Molecular mechanism underlying juvenile hormone-mediated repression of precocious larval-adult metamorphosis [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114 (5): 1057–1062.
- Kayukawa T, Minakuchi C, Namiki T, *et al.* Transcriptional regulation of juvenile hormone-mediated induction of *Krüppel homolog 1*, a repressor of insect metamorphosis [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109 (29): 11729–11734.
- Korenbaum E, Rivero F. Calponin homology domains at a glance [J]. *Journal of Cell Science*, 2002, 115 (18): 3543–3545.
- Kozlova T, Thummel CS. Steroid regulation of postembryonic development and reproduction in *Drosophila* [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2000, 11 (7): 276–280.
- Kozłowska M, Tarczewska A, Jakob M, *et al.* Calponin-like Chd64 is partly disordered [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9 (5): e96809.
- Li YP, Zhang ZL, Robinson GE, *et al.* Identification and characterization of a juvenile hormone response element and its binding proteins [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282 (52): 37605–37617.
- Liu PC, Wang JX, Song QS, *et al.* The participation of calponin in the cross talk between 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone signaling pathways by phosphorylation variation [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6 (5): e19776.
- McGough A. F-actin-binding proteins [J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 1998, 8 (2): 166–176.
- Nimi S, Sakurai S. Development changes in juvenile hormone and juvenile hormone acid titers in the hemolymph and *in vitro* juvenile hormone synthesis by corpora allata of the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Journal of Insect Physiology*, 1997, 43 (9): 875–884.
- Riddiford LM, Cherbas P, Truman JW. Ecdysone receptors and their biological actions [J]. *Vitamins and Hormones*, 2000, 60: 1–73.
- Riddiford LM, Hiruma K, Zhou XF, *et al.* Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 33 (12): 1327–1338.
- Riddiford LM. Juvenile hormone action: A 2007 perspective [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2008, 54 (6): 895–901.
- Sin YW, Kenny NJ, Qu Z, *et al.* Identification of putative ecdysteroid and juvenile hormone pathway genes in the shrimp *Neocaridina denticulata* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2015, 214: 167–176.
- Tarczewska A, Kozłowska M, Dobryzycki P, *et al.* Insight into the unfolding properties of Chd64, a small, single domain protein with a globular core and disordered tails [J]. *PLoS ONE*, 2015, 10 (9): e0137074.
- Thummel CS. Molecular mechanisms of developmental timing in *C. elegans* and *Drosophila* [J]. *Developmental Cell*, 2001, 1 (4): 453–465.
- Wang CF, Zhang Z, Sun W. Ecdysone oxidase and 3-dehydroecdysone-3 $\beta$ -reductase contribute to the synthesis of ecdysone during early embryonic development of the silkworm [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2018, 14 (11): 1472–1482.
- Yang XH. The 20E and JH III Titers and Expression of Ecdysone Receptors and Transcription Factor Related to 20E during Metamorphosis in Silkworm, *Bombyx mori* [D]. Guangzhou: South China Normal University, 2010. [杨鑫华. 家蚕变态发育期间 20E 和 JH III 水平及 20E 受体和相关转录因子的表达分析 [D]. 广州: 华南师范大学硕士论文, 2010.]