

家蚕分泌型磷脂酶 A2 基因的鉴定和表达模式分析

熊江涛¹, 张振茹¹, 王隔敏¹, 高波³, 陈萍^{1,2*}

1 西南大学蚕桑纺织与生物质科学学院, 重庆 400715

2 资源昆虫高效养殖与利用全国重点实验室, 重庆 400715

3 重庆市黔江区林业局, 重庆 409000

熊江涛, 张振茹, 王隔敏, 高波, 陈萍. 家蚕分泌型磷脂酶 A2 基因的鉴定和表达模式分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(4): 1225-1236.

XIONG Jiangtao, ZHANG Zhenru, WANG Gemin, GAO Bo, CHEN Ping. Identification and expression pattern analysis of a secretory phospholipase A2 gene in *Bombyx mori*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(4): 1225-1236.

摘要: 磷脂酶 A2 (phospholipase A2, PLA2)广泛分布于动物、植物和微生物, 参与许多生理活动。本实验室先前鉴定和研究了 1 个家蚕分泌型 PLA2 (*Bombyx mori sPLA2-1-1*)基因功能。最近, 从家蚕基因组鉴定到 4 个新的 sPLA2 基因(*BmsPLA2-1-2*、*BmsPLA2-2*、*BmsPLA2-3*、*BmsPLA2-4*), 预测的氨基酸都具有 sPLA2 超家族结构域、金属离子结合位点和高度保守的催化位点等 sPLA2 的典型特征。本研究完成了 *BmsPLA2-4* 基因的克隆、体外表达和表达模式分析。*BmsPLA2-4* 全长为 585 bp, 体外表达经 Ni 纯化获得重组蛋白大小约 25 kDa。qRT-PCR 分析表明, *BmsPLA2-4* 在 5 龄第 1 天的表达量最高。组织表达谱分析表明, *BmsPLA2-4* 在中肠的表达量最高, 其次是体壁和脂肪体。Western blotting 分析结果与 qRT-PCR 一致。用大肠杆菌和金黄色葡萄球菌感染 5 龄第 1 天幼虫后, *BmsPLA2-4* 基因的表达量在 24 h 显著升高。本研究为后续研究提供了理论基础和有价值的实验数据。

关键词: 家蚕; *BmsPLA2-4* 基因; 基因克隆; 组织时期表达谱

资助项目: 2023年重庆市茧丝绸发展专项资金(20230219210331481)

This work was supported by the 2023 Chongqing Cocoon Silk Development Special Fund Project (20230219210331481).

*Corresponding author. E-mail: chenping1918@swu.edu.cn

Received: 2023-09-25; Accepted: 2024-01-15; Published online: 2024-01-19

Identification and expression pattern analysis of a secretory phospholipase A2 gene in *Bombyx mori*

XIONG Jiangtao¹, ZHANG Zhenru¹, WANG Gemin¹, GAO Bo³, CHEN Ping^{1,2*}

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

2 State Key Laboratory of Resource Insects, Chongqing 400715, China

3 The Forestry Bureau of Qianjiang District, Chongqing 409000, China

Abstract: Phospholipase A2 (PLA2) is widely distributed in animals, plants, and microorganisms, and it plays an important role in many physiological activities. In a previous study, we have identified a secretory PLA2 in *Bombyx mori* (*BmsPLA2-1-1*). In this study, we further identified four new *sPLA2* genes (*BmsPLA2-1-2*, *BmsPLA2-2*, *BmsPLA2-3*, and *BmsPLA2-4*) in *B. mori* genome. All four genes exhibits the characteristic features of *sPLA2*, including the *sPLA2* domain, metal binding sites, and highly conserved catalytic domain. This study completed the cloning, *in vitro* expression, and expression pattern analysis of the *BmsPLA2-4* gene in *B. mori*. The full length of *BmsPLA2-4* is 585 bp, and the recombinant protein obtained through prokaryotic expression has an estimated size of 25 kDa. qRT-PCR analysis revealed that the expression level of *BmsPLA2-4* reached its peak on the first day of the fifth instar larval stage. Tissue expression profiling analysis showed that *BmsPLA2-4* had the highest expression level in the midgut, followed by the epidermis and fat body. Western blotting analysis results were consistent with those of qRT-PCR. Furthermore, after infecting fifth instar 1-day-old larvae with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, the expression level of the *BmsPLA2-4* gene significantly increased in 24 h. The findings of this study provides a theoretical basis and valuable experimental data for future related research.

Keywords: *Bombyx mori*; *BmsPLA2-4*; gene cloning; tissue period expression profile

磷脂酶 A2 (phospholipase A2, PLA2)最早是从眼镜蛇毒液和响尾蛇毒液中发现的,后来的研究显示它广泛分布于病毒、细菌、植物和动物等主要生物类群^[1-5]。PLA2 作为催化酶,从磷脂 sn-2 位水解磷脂,产生溶血磷脂和游离脂肪酸^[1],这两种代谢物是重要的第二信使前体,如溶血磷脂可转化为血小板活化因子,花生四烯酸衍生成前列腺素(prostaglandin, PG)、白细胞三烯(leukotrienes, LT)和环氧二十碳三烯酸(epoxy eicosatrienoic acid, EET)等多种 C20 多不饱和脂肪酸类活性物质^[6]。因此,PLA2 作为这些生物活性物质形成的限速酶,被归为各

种内源性和外源性调控因子改变生理状态的分子靶标^[6-8]。临床上,PLA2 与类风湿关节炎、心血管和神经系统疾病以及肿瘤等有关,具有重要的医学研究价值^[9-14]。

PLA2 是一个庞大的酶家族,包含 16 个不同的群和许多亚群^[8]。根据结构、酶学性质和进化关系,可以分为分泌型 PLA2 (secretory PLA2, sPLA2)、细胞质 PLA2 (cytosolic PLA2, cPLA2)、不依赖 Ca²⁺的 PLA2 (Ca²⁺-independent PLA2, iPLA2)、血小板活化因子乙酰水解酶(platelet-activating factor acetylhydrolase, PAF-AH)、PLA 酰基转移酶(PLA acyltransferase, PLAAT)、

溶酶体 PLA2 和 α/β 水解酶(α/β hydrolase enzymes, ABHD)^[15]。sPLA2 的分子量较小,一般为 14–18 kDa,含 5–8 个二硫键,有一个结合 Ca^{2+} 的组氨酸活性位点,该位点与天冬氨酸结合形成 His/Asp 二联体^[16–20]。sPLA2 的基因数目因昆虫种类而异,如黑腹果蝇中有 5 个,长红猎蝽中有 5 个,赤拟谷盗中有 6 个,而甜菜夜蛾中仅仅 1 个^[21–25]。本课题组先前克隆鉴定了一个家蚕 sPLA2 基因(*BmsPLA2-1-1*),并发现 *BmsPLA2-1-1* 与免疫黑化有关^[26]。本文在家蚕基因组中鉴定到 4 个新的 sPLA2 基因,并对其中的 *BmsPLA2-4* 基因进行了体外表达、蛋白纯化和表达谱分析,所获结果为后续深入研究提供了实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所使用的家蚕为多化性的大造品系 D9L,由本实验室保存。蚕卵在温度 25 °C,相对湿度 70%–80% 条件下催青。幼虫饲养条件:温度 28 °C、12 h 光照/12 h 黑暗、湿度 70%–80%。收集不同时期、不同处理组家蚕,解剖获得马氏管、精巢、卵巢、表皮、丝腺、脂肪体、中肠和血淋巴等组织,–80 °C 保存。

1.2 试剂

大肠埃希菌 BL21(DE3)和质粒 PET-28a(+)均由本实验室保存。大肠杆菌 DH5 α 购自擎科生物科技有限公司。Trizol、2 \times Taq Master Mix、2 \times super-Fidelity Master Mix 和反转录试剂盒购自江苏溥博生物科技有限公司。2 \times SP Qpcr Mix 购自重庆葆光生物技术有限公司。多功能 DNA 纯化回收试剂盒购自博迈德, pMD19-T Vector、T4 DNA 连接酶和限制性内切酶购自宝生物工程(大连)有限公司。上样缓冲液 3 \times Gelstain Red Prestain 购自苏州恒宇生物科技有限公司。测序

和所有引物的合成均在擎科生物科技有限公司完成。RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、一抗稀释液、 α -tubulin (TUBA4A)和二抗购自碧云天生物技术有限公司。PAGE 凝胶快速制备试剂盒(10%)和三色预染蛋白 Marker 购自雅酶生物医药科技有限公司。*BmsPLA2-4* 多克隆抗体由迅检(重庆)生命科技有限责任公司制备。

1.3 家蚕 sPLA2 基因鉴定、进化树构建及序列比对分析

将 *BmsPLA2-1-1* 的序列在 NCBI 中用 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 工具进行氨基酸序列的同源性搜索,使用在线工具 SMART^[27] (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 对获得序列进行分析,删除不符合 sPLA2 家族结构域的序列。使用 ClustalX2^[28]和 DNAMAN 软件将筛选到的蛋白质序列反复进行多序列比对,删除多余的重复序列。对鉴定得到的家蚕 sPLA2 蛋白进行多序列比对,利用 MEGA 11^[29] 构建进化树,Adobe Illustrator 软件对进化树进行美化 and 注释。

采用在线网站(<https://services.healthtech.dtu.dk/service/TMHMM-2.0/>)^[30] 预测蛋白跨膜结构域。运用在线工具 NCBI Conserved Domains^[31] (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 分析结构域,使用在线工具 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测信号肽。

使用 ClustalX2 软件对家蚕、黑腹果蝇、赤拟谷盗和烟草天蛾的 sPLA2 氨基酸序列比对分析,序列比对结果的美化利用 Esript (<https://esript.ibcp.fr/ESript/cgi-bin/ESript.cgi>) 网站,PowerPoint 软件对结果注释。

1.4 *BmsPLA2-4* 基因的克隆及原核表达载体的构建

采用 Primer 5.0 软件^[32]设计 *BmsPLA2-4* 基

因(GenBank 登录号: XM_004928778.4)的 ORF 特异性 PCR 扩增引物“*BmsPLA2-4-KL*”(表 1), 进行克隆。

用 Primer 5.0 软件设计原核表达引物“*BmsPLA2-4-YH*”(表 1), 以逆转录合成的 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 条件: 94 °C 4 min; 94 °C 40 s, 52 °C 45 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。将 *BmsPLA2-4* 基因片段进行纯化, 并与 pMD-19 Vector 载体连接, 转化挑选阳性克隆, 经过公司测序, 最后得到 cDNA 序列, 将测序正确的阳性菌液扩大培养, 提取重组质粒“pMD19-T-S4”, -20 °C 保存备用。利用亚克隆手段在 pMD19-T-S4 载体中 *BmsPLA2-4* 片段两端引入酶切位点 *EcoR* I 和 *Xho* I, 将引入酶切位点的载体与 pET28a(+)空载分别进行双酶切。酶切后的目的片段与线性化载体 pET28a(+)用 T4 DNA 连接酶在 16 °C 下过夜连接, 然后转化到 DH5 α 感受态细胞中, Kan⁺抗性筛选阳性克隆, 提取质粒送北京擎科生物科技有限公司进行测序, 验证重组载体“pET28a-S4”是否构建成功。

1.5 *BmsPLA2-4* 蛋白的诱导表达和多克隆抗体的制备

将测序正确的重组载体 pET28a-S4 转入 BL21(DE3)菌株中, 筛选阳性克隆。在阳性

BL21(DE3)菌液中加入异丙基硫代 β -D-半乳糖苷(isopropylthio β -D-galactoside, IPTG)进行诱导, 大量表达 *BmsPLA2-4* 重组蛋白。收集菌体沉淀后超声破碎, 离心后分别收取各诱导条件下的上清和沉淀, 进行 SDS-PAGE 凝胶检测。然后用 LE buffer 过夜溶解超声破碎后的菌体沉淀, 利用 Ni-NTA 亲和层析柱对目的蛋白进行亲和层析纯化。将纯化后的蛋白进行 SDS-PAGE 检测。用纯化的重组 *BmsPLA2-4* 蛋白免疫新西兰大白兔, 获得免疫血清, 将血清纯化后, 运用 Western blotting 法鉴定多克隆抗体的特异性, 采用 ELISA 间接法测定抗体的效价。

1.6 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

五龄家蚕幼虫血淋巴直接加入 Trizol, 其他组织(马氏管、精巢、卵巢、表皮、丝腺、脂肪体和中肠)用液氮研磨成粉末后加入 Trizol, 提取总 RNA。最后用 M-MLV 反转录酶系统反转录 RNA 以获得 cDNA 模板。

1.7 qRT-PCR 检测

采用 Primer 5.0 软件设计目的基因 *BmsPLA2-4* 的 qRT-PCR 引物 *qBmsPLA2-4* 和内参基因 *Bmactin A3* (NCBI 序列号: NM_001126254)的引物 *qBmactin A3* (表 1)。以上述 cDNA 为模板进行 qPCR, 检测目的基因中的表达情况。扩增条件: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 62 °C 30 s, 60 °C 30 s, 共

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

| Primer name | Primer sequence (5'→3') | Size (bp) |
|-----------------------|---------------------------------|-----------|
| <i>BmsPLA2-4-KL-F</i> | ATGTATAAAGTCTGTAGTTTATGTAC | 585 |
| <i>BmsPLA2-4-KL-R</i> | TCAATAGTTACTCACGTCGAA | |
| <i>BmsPLA2-4-YH-F</i> | CCGGAATTCATGTGGGTGATGACAGACGTAG | 522 |
| <i>BmsPLA2-4-YH-R</i> | CCGCTCGAGTCAATAGTTACTCACGTCGAA | |
| <i>qBmsPLA2-4-F</i> | TCTCCACGATGCGAACAGC | 135 |
| <i>qBmsPLA2-4-R</i> | CATTTCTCTTGAACCAACCTCC | |
| <i>Bmactin A3-F</i> | ATGCAAAAGGAAATCACACGTC | 99 |
| <i>Bmactin A3-R</i> | GATCGATCCACCGATCCATACG | |

40 个循环; 72 °C 10 min。以家蚕 *Bmactin A3* 为内参, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[33] 进行数据处理。

1.8 Western blotting (WB) 分析

取家蚕组织放入提前预冷好的研钵中充分研磨, 加入苯基硫脲抑制黑化, 按照 RIPA 裂解液说明书提取总蛋白, 用 BCA 测定总蛋白浓度。将各样品蛋白稀释到相同浓度后 100 °C 变性 10 min, 上样 20 mL (蛋白总量 40 μg), 在 200 mA 恒流下进行 PAGE 电泳, 转膜 45 min 至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉室温摇床孵育封闭 2 h, TBST 缓冲液漂洗 3 次, 每次 15 min (室温摇床), 一抗和二抗孵育后, ECL 显色液显色。

1.9 病原微生物制备及蚕体注射

液体培养基活化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*), 分别取 5 mL 菌液, 4 000×g 离心 10 min 后, 收集沉淀, 溶解于 PBS (pH 7.4) 缓冲液中, 调节 OD_{600} 至 0.7。

用制备的 *E. coli* 溶液和 *S. aureus* 溶液分别注射 5 龄 1 d 健康家蚕, 每头蚕注射 5 μL, 注射后于 0、3、6、24 h 收集中肠用于 RNA 提取分析, 每个时间点取 10 头家蚕, 每组设置 3 个生物学重复, 对照组为同等条件下注射 PBS。

2 结果与分析

2.1 部分昆虫 sPLA2 的系统进化及序列比对分析

通过 BLAST 比对, 本文从家蚕基因组搜索到 4 个新的 sPLA2 同源物。用 5 个家蚕 sPLA2 基因与黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*)、赤拟谷盗 (*Tribolium castaneum*) 和烟草天蛾 (*Manduca sexta*) 中已经研究报道的 sPLA2 基因的氨基酸序列构建进化树 (图 1A)。进化分析显示, 17 个 sPLA2 被聚为三大支: 果蝇的 3 个

sPLA2 聚为一支, 赤拟谷盗的 5 个 sPLA2 聚成一支, 家蚕与烟草天蛾的 sPLA2 聚成一支。在家蚕与烟草天蛾聚集支中, 烟草天蛾的 4 个 sPLA2 和家蚕的 3 个 sPLA2 (XP_012548107.2、XP_004929036.2、XP_004929038.1) 分别以物种聚集紧密相邻的 2 个簇, *BmsPLA2-3* 和 *BmsPLA2-4* 依次分布在这个聚集支的外围。参照赤拟谷盗的命名方式^[24], 把家蚕这 5 个 sPLA2 分别命名为 *BmsPLA2-1-1* (XP_012548107.2)、*BmsPLA2-1-2* (XP_004929036.2)、*BmsPLA2-2* (XP_004929038.1)、*BmsPLA2-3* (XP_004929039.1) 和 *BmsPLA2-4* (XP_004928835.1)。

昆虫 sPLA2s 基因的氨基酸序列分析结果显示: 5 个 *BmsPLA2* 基因的氨基酸都具有 sPLA2 超家族结构域、金属离子结合位点和高度保守的催化位点等 sPLA2 的典型特征, 它们含有 10 个半胱氨酸残基, 通常可以形成 5–8 个二硫键。家蚕 5 个 sPLA2 序列的一致性为 77.65%, 其中首先聚集的 *BmsPLA2-1-1* 与 *BmsPLA2-1-2* 的相似度高达 93.72%, 而分布位置较远的 *BmsPLA2-1-1* 与 *BmsPLA2-4* 序列相似性为 53.81% (图 1B), 结果与进化分析一致。

BmsPLA2-4 基因的编码序列 (coding sequence, CDS) 长度为 585 bp 核苷酸序列, 编码 194 个氨基酸, 有信号肽结构, 无跨膜结构域, 在第 51–174 个氨基酸位有 PA2c 功能结构域, 属于 S 型磷脂酶蛋白家族。本研究进行了该基因的体外表达、蛋白纯化和表达谱分析。

2.2 *BmsPLA2-4* 基因克隆及重组蛋白的表达纯化

以 *BmsPLA2-4-KL* 为引物, 提取家蚕中肠组织 RNA 并立即逆转录合成 cDNA, 以该 cDNA 为模板对 *BmsPLA2-4* 的 ORF 序列进行 PCR 扩增 (图 2A), 鉴定发现克隆所得片段与 NCBI 预测序列一致。

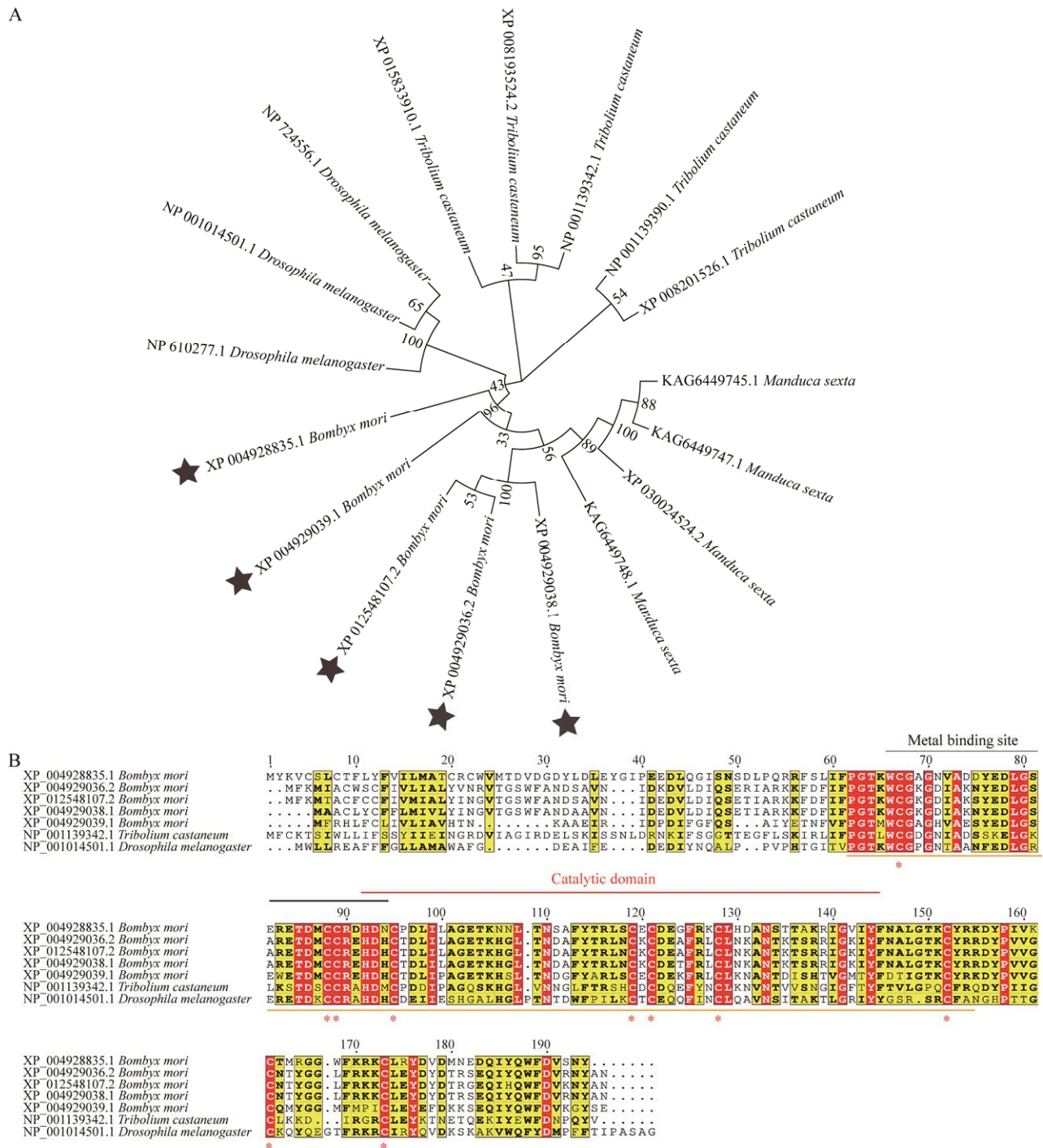


图1 昆虫sPLA2的系统进化及序列比对分析 A:昆虫sPLA2基因的系统发育进化树. B:昆虫sPLA2蛋白的多重序列比对分析

Figure 1 The phylogenetic analysis and sequence alignment of insect sPLA2. A: Phylogenetic tree of insect sPLA2 genes. *BmsPLA2-1-1*: XP_012548107.2, *BmsPLA2-1-2*: XP_004929036.2, *BmsPLA2-2*: XP_004929038.1, *BmsPLA2-3*: XP_004929039.1, *BmsPLA2-4*: XP_004928835.1. B: Multiple sequence alignment analysis of insect sPLA2 proteins. The conserved cysteine residues are marked with asterisks, and the yellow dashed region represents the conserved region.

BmsPLA2-4 蛋白分子量大小为 22.47 kDa, 去掉信号肽片段后为 19.88 kDa, 加上 pET28a-S4 重组载体的标签序列, 大小约为 26.02 kDa。将 pET28a-S4 重组质粒转化到大肠埃希菌 BL21(DE3)

内, 在不同温度和转速下进行小量诱导表达, 经 SDS-PAGE 凝胶检测, 发现 37 °C 条件下沉淀中重组蛋白表达量最高(图 2B), 说明该蛋白在包涵体中表达。对 *BmsPLA2-4* 重组蛋白进行大

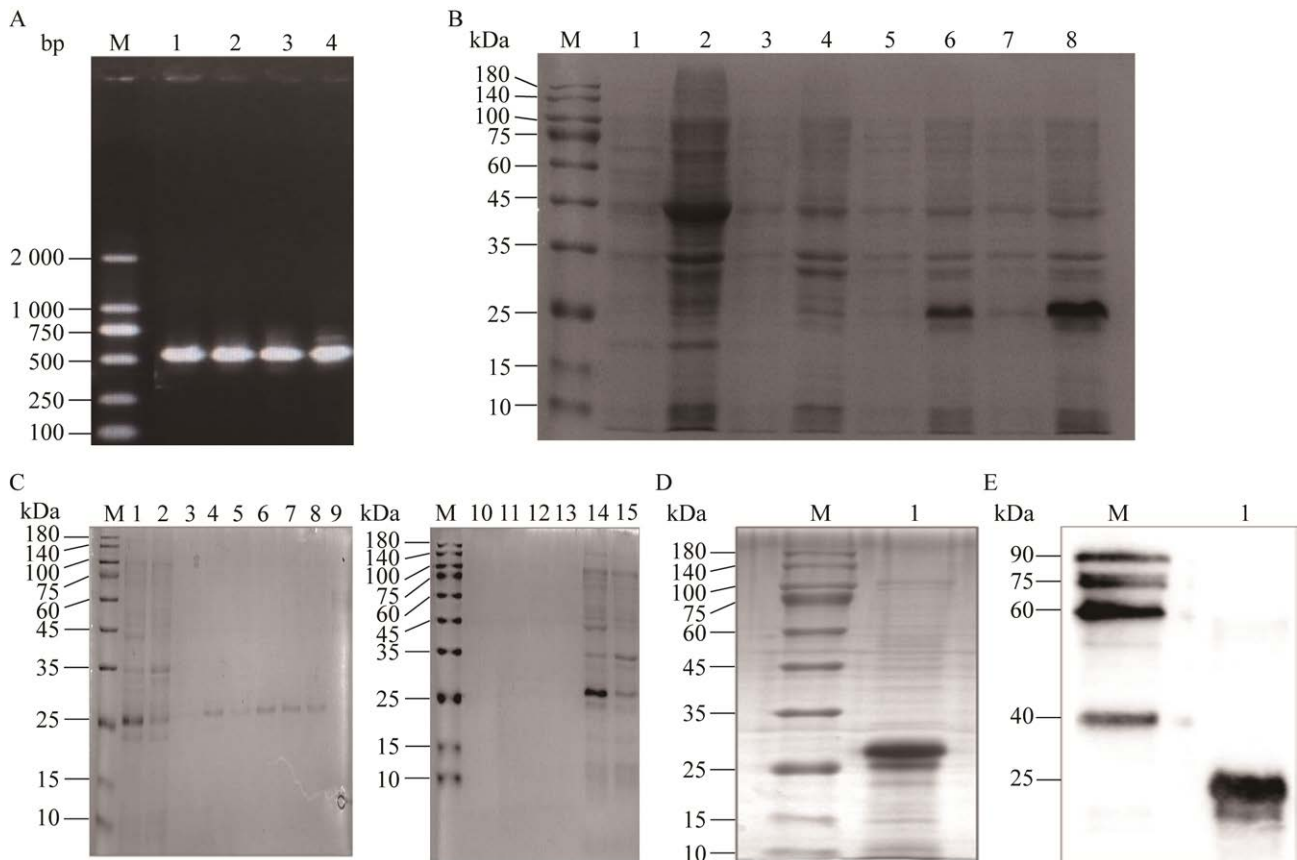


图 2 *BmsPLA2-4* 基因克隆及重组蛋白的表达纯化 A: *BmsPLA2-4* 基因 PCR 扩增. B: 重组蛋白的原核表达. C: 不同浓度咪唑流穿液 SDS-PAGE 分析. D: *BmsPLA2-4* 蛋白的浓缩. E: 免疫原 Western blotting 验证

Figure 2 Cloning and expression of the *BmsPLA2-4* gene and purification of the recombinant protein. A: PCR amplification of the *BmsPLA2-4* gene. M: DL2000 marker; 1-4: *BmsPLA2-4*. B: Prokaryotic expression of the recombinant protein. M: 180 kDa marker; 1: pET28a(+) empty vector supernatant; 2: pET28a(+) empty vector pellet; 3: Induced supernatant at 16 °C; 4: Induced pellet at 16 °C; 5: Induced supernatant at 28 °C; 6: Induced pellet at 28 °C; 7: Induced supernatant at 37 °C; 8: Induced pellet at 37 °C. C: SDS-PAGE analysis of the imidazole buffer at different concentrations. M: 180 kDa marker; 1: Protein loading buffer; 2: Flow-through; 3: 25 mmol/L imidazole; 4: 50 mmol/L imidazole; 5: 75 mmol/L imidazole; 6: 100 mmol/L imidazole; 7: 150 mmol/L imidazole; 8: 200 mmol/L imidazole; 9: 250 mmol/L imidazole; 10: 300 mmol/L imidazole; 11: 400 mmol/L imidazole; 12: 500 mmol/L imidazole; 13: 1 mol/L imidazole; 14: Protein loading buffer; 15: Flow-through. D: Concentration of the *BmsPLA2-4* protein. M: 180 kDa marker; 1: *BmsPLA2-4* protein. E: Validation of the protein through western blotting analysis. M: 90 kDa marker; 1: Validation of the immunogen.

量表达后,收集菌体沉淀,超声破碎。取上清过柱,用不同浓度咪唑洗脱并收集各组洗脱液检测。结果显示,100 mmol/L的咪唑浓度能将重组蛋白有效地洗脱下来(图 2C)。浓缩并纯化100 mmol/L咪唑洗脱液,*BmsPLA2-4*重组蛋白纯度达到85%以上,浓度大于0.5 mg/mL,符合抗体制备要求(图 2D)。送至重庆迅检生命科技有限责任公司制备抗体。WB验证,结果显示,符合预期条件,可用于后续实验(图 2E)。

2.3 *BmsPLA2-4* 基因的表达模式分析

qRT-PCR检测5龄幼虫各个时期*BmsPLA2-4*基因的表达,结果发现,*BmsPLA2-4*基因在各个时间均有表达,其中5龄1d时表达量最高,表达量至少是5龄2-7d的2倍以上(图 3A)。5龄1d幼虫各个组织的表达检测结果显示,*BmsPLA2-4*基因在中肠组织中转录水平最高,其次是体壁和脂肪体(图 3B)。

提取家蚕免疫组织(血淋巴、脂肪体和肠)的蛋白进行WB检测,结果显示,条带颜色从深到浅依次为肠、脂肪体和血淋巴,表达量

与mRNA水平一致(图 3C)。

2.4 *BmsPLA2-4* 基因对病原微生物的响应

分别用*E. coli*和*S. aureus*两种病原微生物感染5龄1d家蚕幼虫,检测0、3、6、24h时*BmsPLA2-4*基因在中肠组织的表达量。结果显示,与对照组相比,细菌感染3h和6h时,*BmsPLA2-4*表达量出现下调,而在24h时,*BmsPLA2-4*表达量显著升高(图 4),表明*BmsPLA2-4*基因能够响应病原微生物胁迫。

3 讨论与结论

分泌型磷脂酶A2(*sPLA2*)是最早鉴定的磷脂酶A2^[1]。在黑腹果蝇、赤拟谷盗和烟草天蛾等昆虫中的*sPLA2*已有研究报道^[21,24,34]。本实验室先前从家蚕中克隆了*sPLA2*基因(*BmsPLA2-1-1*)^[26]。在本研究中,本文从家蚕基因组鉴定了4个新的*sPLA2*基因。序列分析显示,这4个*sPLA2*基因的蛋白都具有PA2c功能结构域、5-8个二硫键、金属离子结合位点以及高度保守的His/Asp二联体等典型*sPLA2*特征,且它们的分子量介

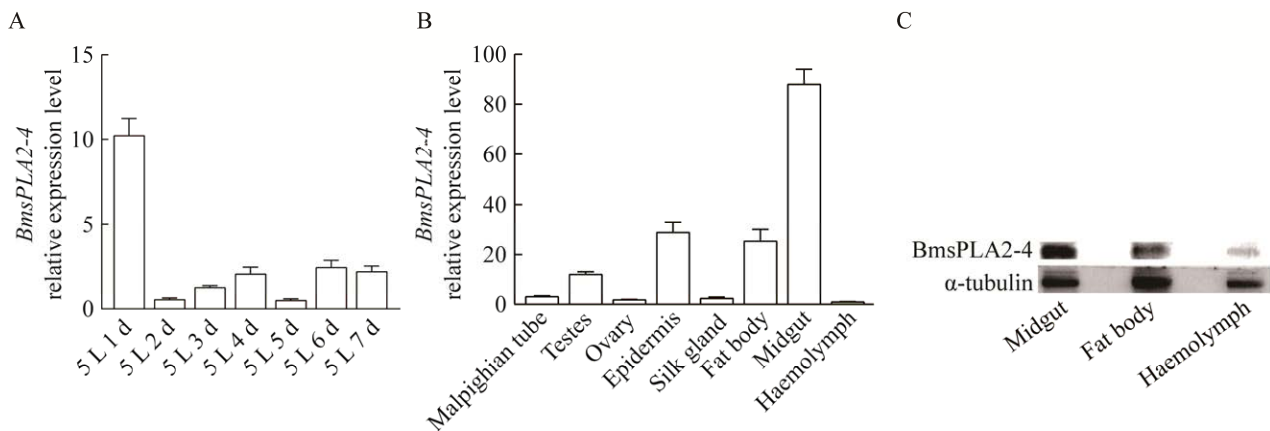


图 3 *BmsPLA2-4* 基因的表达情况 A: *BmsPLA2-4* 基因的时期表达谱. B: *BmsPLA2-4* 基因的组织表达谱. C: 不同组织的 *BmsPLA2-4* 蛋白表达情况

Figure 3 Expression profile of the *BmsPLA2-4* gene. A: Temporal expression pattern of the *BmsPLA2-4* gene. B: Tissue-specific expression pattern of the *BmsPLA2-4* gene. C: The expression of *BmsPLA2-4* protein in different tissues.

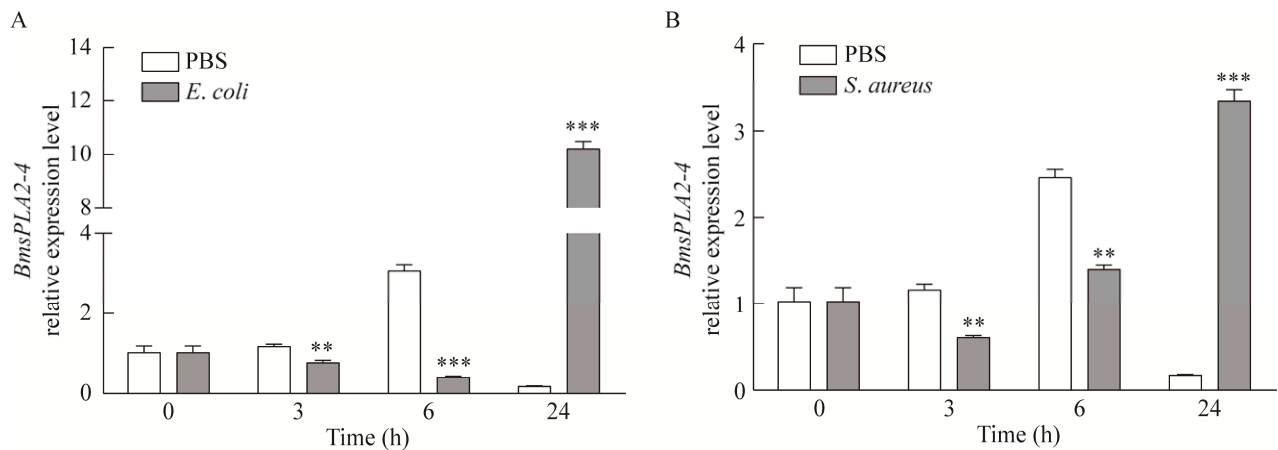


图4 病原微生物刺激后 *BmsPLA2-4* 基因的表达情况 A: 大肠杆菌刺激后 *BmsPLA2-4* 基因的表达量. B: 金黄色葡萄球菌刺激后 *BmsPLA2-4* 基因的表达量

Figure 4 The expression of the *BmsPLA2-4* gene in response to pathogenic microbe stimulation was investigated. A: The expression level of *BmsPLA2-4* gene after stimulation by *E. coli* was examined. B: The expression level of *BmsPLA2-4* gene was investigated in response to stimulation by *S. aureus*. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

于 13–19 kDa 之间, 拥有 sPLA2 的小分子量特征。进化分析结果显示, sPLA2 按物种关系聚集成支。在鳞翅目聚集支中, *BmsPLA2-4* 分布在烟草天蛾与家蚕聚集簇的最外围, 表明 *BmsPLA2-4* 氨基酸序列与鳞翅目其他 sPLA2 的相似性较低, 可能存在功能歧化。

sPLA2 在果蝇中肠和脂肪体组织中高度表达^[35]。在蝼蛄(*Amblyomma americanum*)中, sPLA2 在脂肪体和表皮高表达, 经大肠杆菌处理后, sPLA2 表达量显著上升^[36]。在本实验中, *BmsPLA2-4* 在家蚕幼虫中肠高量表达, 表达量至少是其他组织的 2.5 倍, 但在血淋巴表达量较低, 与先前报道的 *BmsPLA2-1-1* 在血淋巴高量表达不一致^[26], 可能是发育时期不同所致。

在昆虫免疫方面, sPLA2 与烟草天蛾(*Manduca sexta*)和甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)的血细胞结节数和脂肪体体积相关^[37-40]。当烟草天蛾被病原微生物感染后, 其脂肪体和血细胞中的 sPLA2 活性显著升高^[41]。注射 PLA2 抑

制剂地塞米松后, 舞毒蛾(*Lymantria dispar*)对病毒的易感性显著升高^[42]。韭菜蛾(*Acrolepiopsis sapporensis*)受到细菌攻击后, sPLA2 基因的表达水平显著升高, 当干涉 sPLA2 基因后, 其免疫反应受到显著抑制^[43]。靶向抑制 sPLA2 后, 多种鳞翅目昆虫的免疫反应受到削弱^[37]。甜菜夜蛾的 sPLA2 与细胞免疫反应相关^[44]。本实验室先前研究证明了 *BmsPLA2-1-1* 参与了家蚕血淋巴的免疫黑化^[26]。本研究用 *E. coli* 和 *S. aureus* 两种微生物感染 5 龄 1 d 幼虫, 结果显示, 革兰氏阴性细菌和革兰氏阳性细菌感染都会导致幼虫中肠组织中 *BmsPLA2-4* 表达在感染早期 3–6 h 时出现下调, 而在感染 24 h 时表达量显著升高, 表明 *BmsPLA2-4* 与家蚕免疫有关。因此可以推测, 在家蚕感染初期(3–6 h), *BmsPLA2-4* 因抵抗病原微生物有所消耗, 随后家蚕免疫系统逐渐启动并增强 *BmsPLA2-4* 基因的表达, 以对抗病原体。本研究为后续深入研究提供了实验依据和启示, 但相关作用机理需要进一步探究。

REFERENCES

- [1] DENNIS EA, CAO J, HSU YH, MAGRIOTI V, KOKOTOS G. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention[J]. *Chemical Reviews*, 2011, 111(10): 6130-6185.
- [2] VALENTIN E, GHOMASHCHI F, GELB MH, LAZDUNSKI M, LAMBEAU G. On the diversity of secreted phospholipases A2: cloning, tissue distribution, and functional expression of two novel mouse group II enzymes[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(44): 31195-31202.
- [3] ISHIZAKI J, SUZUKI N, HIGASHINO KI, YOKOTA Y, ONO T, KAWAMOTO K, FUJII N, ARITA H, HANASAKI K. Cloning and characterization of novel mouse and human secretory phospholipase A2s[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(35): 24973-24979.
- [4] TISCHFIELD JA. A reassessment of the low molecular weight phospholipase A2 gene family in mammals[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(28): 17247-17250.
- [5] VALENTIN E, KODURI RS, SCIMECA JC, CARLE G, GELB MH, LAZDUNSKI M, LAMBEAU G. Cloning and recombinant expression of a novel mouse-secreted phospholipase A2[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(27): 19152-19160.
- [6] MURAKAMI M. Novel functions of phospholipase A2s: overview[J]. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2019, 1864(6): 763-765.
- [7] JENKO-PRAŽNIKAR Z, PETAN T, PUNGERČAR J. Ammodytoxins efficiently release arachidonic acid and induce apoptosis in a motoneuronal cell line in an enzymatic activity-dependent manner[J]. *NeuroToxicology*, 2013, 35: 91-100.
- [8] SCHALOSKE RH, DENNIS EA. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2006, 1761(11): 1246-1259.
- [9] GHOSH M, TUCKER DE, BURCHETT SA, LESLIE CC. Properties of the group IV phospholipase A2 family[J]. *Progress in Lipid Research*, 2006, 45(6): 487-510.
- [10] NEVALAINEN TJ, GRAHAM GG, SCOTT KF. Antibacterial actions of secreted phospholipases A2. Review[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2008, 1781(1/2): 1-9.
- [11] WU YZ, PERNET E, TOUQUI L. Modulation of airway expression of the host bactericidal enzyme, sPLA2-IIA, by bacterial toxins[J]. *Toxins*, 2023, 15(7): 440.
- [12] PENG ZX, CHANG YX, FAN JH, JI WD, SU CQ. Phospholipase A2 superfamily in cancer[J]. *Cancer Letters*, 2021, 497: 165-177.
- [13] KHAN SA, ILIES MA. The phospholipase A2 superfamily: structure, isozymes, catalysis, physiologic and pathologic roles[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(2): 1353.
- [14] MURAKAMI M, SATO H, TAKETOMI Y. Updating phospholipase A2 biology[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(10): 1457.
- [15] MURAKAMI M, SATO H, TAKETOMI Y. Modulation of immunity by the secreted phospholipase A2 family[J]. *Immunological Reviews*, 2023, 317(1): 42-70.
- [16] CUPILLARD L, KOUMANOV K, MATTÉI MG, LAZDUNSKI M, LAMBEAU G. Cloning, chromosomal mapping, and expression of a novel human secretory phospholipase A2[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(25): 15745-15752.
- [17] SCOTT DL, WHITE SP, OTWINOWSKI Z, YUAN W, GELB MH, SIGLER PB. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A2[J]. *Science*, 1990, 250(4987): 1541-1546.
- [18] SCOTT DL, OTWINOWSKI Z, GELB MH, SIGLER PB. Crystal structure of bee-venom phospholipase A2 in a complex with a transition-state analogue[J]. *Science*, 1990, 250(4987): 1563-1566.
- [19] WERY JP, SCHEVITZ RW, CLAWSON DK, BOBBITT JL, DOW ER, GAMBOA G, GOODSON JR T, HERMANN RB, KRAMER RM, McCLURE DB, MIHELICH ED, PUTNAM JE, SHARP JD, STARK DH, TEATER C, WARRICK MW, JONES ND. Structure of recombinant human rheumatoid arthritic synovial fluid phospholipase A2 at 2.2 Å resolution[J]. *Nature*, 1991, 352: 79-82.
- [20] GELB MH, JAIN MK, HANEL AM, BERG OG. Interfacial enzymology of glycerolipid hydrolases:

- lessons from secreted phospholipases A2[J]. Annual Review of Biochemistry, 1995, 64: 653-688.
- [21] RYU Y, OH Y, YOON J, CHO W, BAEK K. Molecular characterization of a gene encoding the *Drosophila melanogaster* phospholipase A2[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gen Structure and Expression, 2003, 1628(3): 206-210.
- [22] MAJEROWICZ D, CALDERÓN-FERNÁNDEZ GM, ALVES-BEZERRA M, de PAULA IF, CARDOSO LS, JUÁREZ MP, ATELLA GC, GONDIM KC. Lipid metabolism in *Rhodnius prolixus*: lessons from the genome[J]. Gene, 2017, 596: 27-44.
- [23] SHRESTHA S, KIM Y. Biochemical characteristics of immune-associated phospholipase A2 and its inhibition by an entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*[J]. Journal of Microbiology, 2009, 47(6): 774-782.
- [24] SHRESTHA S, PARK Y, STANLEY D, KIM Y. Genes encoding phospholipases A2 mediate insect nodulation reactions to bacterial challenge[J]. Journal of Insect Physiology, 2010, 56(3): 324-332.
- [25] VATANPARAST M, AHMED S, HERRERO S, KIM Y. A non-venomous sPLA2 of a lepidopteran insect: its physiological functions in development and immunity[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2018, 89: 83-92.
- [26] LI T, WANG GM, HE W, LI GQ, WANG CY, ZHAO JM, CHEN P, GUO MW, CHEN P. A secreted phospholipase A2 (*BmsPLA2*) regulates melanization of immunity through *BmDDC* in the silkworm *Bombyx mori*[J]. Insect Science, 2023, 30(6): 1579-1594.
- [27] LETUNIC I, KHEDKAR S, BORK P. SMART: recent updates, new developments and status in 2020[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(D1): D458-D460.
- [28] LARKIN MA, BLACKSHIELDS G, BROWN NP, CHENNA R, McGETTIGAN PA, McWILLIAM H, VALENTIN F, WALLACE IM, WILM A, LOPEZ R, THOMPSON JD, GIBSON TJ, HIGGINS DG. Clustal W and Clustal X version 2.0[J]. Bioinformatics, 2007, 23(21): 2947-2948.
- [29] TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11[J]. Molecular Biology and Evolution, 2021, 38(7): 3022-3027.
- [30] KROGH A, LARSSON B, von HEIJNE G, SONNHAMMER EL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes[J]. Journal of Molecular Biology, 2001, 305(3): 567-580.
- [31] WANG JY, CHITSAZ F, DERBYSHIRE MK, GONZALES NR, GWADZ M, LU SN, MARCHLER GH, SONG JS, THANKI N, YAMASHITA RA, YANG MZ, ZHANG DC, ZHENG CJ, LANCZYCKI CJ, MARCHLER-BAUER A. The conserved domain database in 2023[J]. Nucleic Acids Research, 2023, 51(D1): D384-D388.
- [32] 任亮, 朱宝芹, 张轶博, 王海燕, 李尘远, 苏玉虹, 巴彩凤. 利用软件 Primer Premier 5.0 进行 PCR 引物设计的研究[J]. 锦州医学院学报, 2004, 25(6): 43-46.
- REN L, ZHU BQ, ZHANG YB, WANG HY, LI CY, SU YH, BA CF. The research of applying primer premier 5.0 to design PCR primer[J]. Journal of Jinzhou Medical College, 2004, 25(6): 43-46 (in Chinese).
- [33] LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [34] RANA RL, STANLEY DW. *In vitro* secretion of digestive phospholipase A(2) by midguts isolated from tobacco hornworms, *Manduca sexta*[J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 1999, 42(3): 179-187.
- [35] LI QJ, DONG XL, ZHENG WW, ZHANG HY. The *PLA2* gene mediates the humoral immune responses in *Bactrocera dorsalis* (Hendel)[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2017, 67: 293-299.
- [36] LYU B, LI JJ, NIEMEYER B, ANDERSON D, BEERNTSEN B, SONG QS. Identification, structural modeling, gene expression analysis and RNAi effect of putative phospholipase A2 in the lone star tick *Amblyomma americanum*[J]. Ticks and Tick-Borne Diseases, 2024, 15(1): 102256.
- [37] STANLEY D. The non-venom insect phospholipases A2[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2006, 1761(11): 1383-1390.
- [38] USCIAN JM, STANLEY-SAMUELSON DW. Phospholipase A2 activity in the fat body of the tobacco hornworm *Manduca sexta*[J]. Archives of

Insect Biochemistry and Physiology, 1993, 24(4): 187-201.

- [39] PARK Y, KIM Y. Eicosanoids rescue *Spodoptera exigua* infected with *Xenorhabdus nematophilus*, the symbiotic bacteria to the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*[J]. Journal of Insect Physiology, 2000, 46(11): 1469-1476.
- [40] PARK Y, KIM Y. *Xenorhabdus nematophilus* inhibits p-bromophenacyl bromide (BPB)-sensitive PLA2 of *Spodoptera exigua*[J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2003, 54(3): 134-142.
- [41] PARK JA, KIM Y. Toll recognition signal activates oenocytoid cell lysis via a crosstalk between plasmacyte-spreading peptide and eicosanoids in response to a fungal infection[J]. Cellular Immunology, 2012, 279(2): 117-123.
- [42] STANLEY D, SHAPIRO M. Eicosanoid biosynthesis inhibitors increase the susceptibility of *Lymantria dispar* to nucleopolyhedrovirus LdMNPV[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2007, 95(2): 119-124.
- [43] HRITHIK MTH, HONG J, KIM Y. Identification of four secretory phospholipase A2s in a lepidopteran insect, *Acrolepiopsis sapporensis*, and their functional association with cellular immune responses[J]. Frontiers in Endocrinology, 2023, 14: 1190834.
- [44] PARK Y, KIM Y, TUNAZ H, STANLEY DW. An entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, inhibits hemocytic phospholipase A2 (PLA2) in tobacco hornworms *Manduca sexta*[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2004, 86(3): 65-71.

(本文责编 陈宏宇)