

# 利用家蚕杆状病毒表达家蚕肌质网型钙离子 ATP 酶蛋白

王鑫, 李懿, 陈慧芳, 周小英, 谢康, 赵萍

家蚕基因组生物学国家重点实验室 西南大学, 重庆 400716

王鑫, 李懿, 陈慧芳, 等. 利用家蚕杆状病毒表达家蚕肌质网型钙离子 ATP 酶蛋白. 生物工程学报, 2015, 31(3): 421–430.

Wang X, Li Y, Chen HF, et al. Expression of sacro/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase from *Bombyx mori* by baculovirus expression system. Chin J Biotech, 2015, 31(3): 421–430.

**摘 要:** 肌质网型钙离子 ATP 酶 (Sacro/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, Serca) 负责将细胞中多余的  $\text{Ca}^{2+}$  转运并存储于内质网中, 从而维持细胞内适宜的  $\text{Ca}^{2+}$  环境。家蚕 Serca 创造的细胞内及细胞外  $\text{Ca}^{2+}$  平衡对家蚕正常生命活动的维持具有重要作用。由于 Serca 分子量较大并具有 10 次跨膜结构, 很难在大肠杆菌表达系统中表达。为了获得具有生物学活性的重组 Serca 蛋白, 利用 pFastBac Dual 载体构建了用于表达 *egfp* 和 *serca* 的双元杆状病毒表达载体, 转染细胞后获得重组病毒, 将重组病毒感染细胞后, 成功地在细胞中表达了 EGFP 和 Serca。通过荧光观察及 Western blotting 分析表明, 感染后细胞中 Serca 和 EGFP 表达模式一致, 从感染后 48 h 开始表达, 在感染后 96 h 表达量最大。对获得的重组蛋白进行酶活分析, 发现感染后 48 h 至 120 h 的细胞 Serca 酶活显著提高。表明具有生物学活性的 Serca 在此系统中成功获得表达, 为深入研究 Serca 蛋白的功能奠定了基础。

**关键词:** 家蚕, 杆状病毒, 基因表达, 双元表达系统, 肌质网型钙离子 ATP 酶, 酶活

## Expression of sacro/endoplasmic reticulum $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase from *Bombyx mori* by baculovirus expression system

Xin Wang, Yi Li, Huifang Chen, Xiaoying Zhou, Kang Xie, and Ping Zhao

State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Southwest University, Chongqing 400716, China

**Abstract:** Sacro/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Serca) is responsible for transporting  $\text{Ca}^{2+}$  into the endoplasmic

**Received:** June 26, 2014; **Accepted:** August 15, 2014

**Supported by:** National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2011AA100306), National Natural Science Foundation of China (Nos. 31201853, 31172157).

**Corresponding author:** Ping Zhao. Tel: +86-23-68250885; E-mail: zhaop@swu.edu.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2011AA100306), 国家自然科学基金 (Nos. 31201853, 31172157) 资助。

网络出版时间: 2014-09-23

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.140347.html>

reticulum and maintaining a suitable calcium environment in cells. The suitable calcium environment created by BmSerca is vital for the growth and development of silkworm. With a large molecular weight and 10 transmembrane domains, Serca is very difficult to express in *Escherichia coli* expression system. In order to obtain recombinant Serca with biological activity, pFastBac Dual vector was used to construct a binary baculovirus expression vector for expressing *egfp* and *serca* in cells. After transfection and infection, EGFP and Serca were expressed successfully in BmN-SWU1 cell line. Fluorescent observation revealed that the expression patterns of EGFP and Serca in infected cells were the same. Western blotting analysis showed that the recombinant proteins were about to express in cells 48 h post infection and highly expressed 96 h post infection.  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activities assays were used to evaluate the enzyme activities of recombinant Serca and found that the enzyme activities increased significantly after infection. The obtained data showed that this binary baculovirus expression system can be successfully used to express Serca with biological activity. The expression of Serca protein with this system is useful for further research on the function of Serca.

**Keywords:** silkworm, baculovirus, gene expression, binary expression system, sacro/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, enzyme activity

钙离子 ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 是细胞中作用最为广泛的信号之一。在鳞翅目模式昆虫家蚕的生命周期中, 钙离子参与了其重要的生长、发育、变态和生殖过程<sup>[1-3]</sup>。由于过量的  $\text{Ca}^{2+}$  会引起细胞毒性<sup>[4]</sup>, 在细胞中  $\text{Ca}^{2+}$  的含量受到精确调控。在这个过程中, 很多钙离子转运蛋白如肌质网型钙离子 ATP 酶 (Sacro/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, Serca) 发挥着很重要的作用。

Serca 定位于细胞内质网上, 利用水解 ATP 的能量将一个  $\text{Ca}^{2+}$  转运进内质网中, 同时将一个  $\text{H}^{+}$  由内质网转运到细胞质中<sup>[5-7]</sup>。目前有研究报道, Serca 与昆虫肌肉收缩、心脏节律及抵御冬季寒冷环境相关<sup>[8-9]</sup>。虽然 Serca 参与昆虫重要的生命活动, 但在家蚕中相关研究却很少。2012 年, 张松斗等对家蚕肌质网型钙离子 ATP 酶 (BmSerca) 时空表达特征进行了分析, 推测 BmSerca 可能参与了家蚕 PBAN 信号转导级联途径中  $\text{Ca}^{2+}$  的转运<sup>[10]</sup>。

我们前期分析发现, BmSerca 属于典型的 P 型 ATP 酶, 预测的相对分子量为 112.7 kDa, 具有 10 个跨膜结构域。由于其具有如此复杂的结

构, BmSerca 很难在大肠杆菌中进行表达, 这也为其功能的研究制造了很多障碍。昆虫杆状病毒表达载体系统是当今基因工程领域四大表达系统之一, 其具有安全性高、易于筛选、具有完备的翻译后加工修饰系统和高效表达外源蛋白的能力<sup>[11]</sup>。因此, 为了获得具有生物学活性的家蚕 Serca 重组蛋白, 本研究采用了家蚕杆状病毒表达系统对家蚕 Serca 进行了表达。首先, 我们克隆了增强型绿色荧光蛋白 *egfp* 基因和含有 6×His-tag 的家蚕 *serca* 基因, 将其构建进具有双启动子的 pFastBac Dual 载体中, 获得了重组供体质粒。通过转座作用构建整合表达 *egfp* 和 *serca* 的重组杆状病毒颗粒, 提取 Bacmid 后转染家蚕卵巢细胞系 BmN-SWU1, 通过观察 EGFP 的表达情况判定细胞中病毒颗粒扩增。收集感染后细胞培养基后, 感染细胞。感染后每 24 h 收集细胞, 对细胞总蛋白进行 SDS-PAGE 检测和 Western blotting 分析, 结果表明重组 Serca 表达模式与 EGFP 相同, 在感染后 48 h 的细胞中开始表达。对感染后的细胞匀浆进行酶活分析, 发现感染后细胞 Serca 酶活显著提高。

本研究可为家蚕 *Serca* 活性形式的获得及进一步阐明其功能奠定坚实的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒、菌株、细胞和试剂

供体质粒 pFastBac Dual 及昆虫细胞培养基 TC-100 购自 Invitrogen 公司。用于克隆的菌株 Trans1-T1 购自北京全式金公司。含有家蚕 Bacmid 和辅助质粒 (pMON7124) 的 DH10Bac 宿主菌由家蚕基因组生物学国家重点实验室保存。表达所用细胞系为家蚕基因组生物学国家重点实验室构建并保存的 BmN-SWU1 细胞系, 此细胞系来源于家蚕卵巢。胎牛血清购自 PAA 公司。转染试剂购自 Roche 公司。限制性内切酶 *Spe* I、*Xho* I、*Kpn* I、*Not* I、*Taq* 酶购自宝生物工程有限公司。T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司。引物合成及测序由上海生工生物工程公司完成。细菌培养使用的抗生素及测定酶活所用试剂 MOPS、蔗糖、PMSF、苯甲脒、蛋白酶抑制剂、EGTA、MgCl<sub>2</sub>、KCl、CaCl<sub>2</sub>、磷酸烯醇式丙酮酸、乳糖脱氢酶、丙酮酸激酶、NADH、TritonX-100、叠氮化钠及 ATP 均购自 Sigma 公司。

### 1.2 重组供体质粒的构建

首先利用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物 (表 1), 通过 PCR 分别从本实验室保存

的质粒中扩增得到 *egfp* 和含有 6×His-tag 的 *serca* 片段。对扩增得到的 *egfp* 片段和 *serca* 片段利用 *Kpn* I、*Xho* I 及 *Spe* I、*Not* I 分别进行双酶切, 经过切胶纯化后通过 T4 DNA 连接酶依次克隆到 pFastBac Dual 载体上, 获得含有 [P<sub>p10</sub>-*egfp*-HSVtk] 和 [P<sub>ph</sub>-*serca*-sv40] 两个表达框的重组供体质粒 (图 1)。

### 1.3 重组病毒的构建及重组蛋白的表达

病毒载体的构建及重组蛋白 *Serca* 的表达过程如图 1 所示。首先将重组载体转化入 DH10Bac 感受态细胞, 涂布于含有三抗 (50 μg/mL 卡那霉素、10 μg/mL 四环素、7 μg/mL 庆大霉素) 及 40 μg/mL IPTG 和 20 mg/mL X-gal 的 LB 平板上。37 °C 培养 48 h 后, 挑取白色菌落扩大培养, 进行菌液 PCR 鉴定。将经 PCR 验证正确的克隆接种于三抗的 LB 培养基中, 培养 48 h 后提取 Bacmid。利用脂质体介导的方法将 Bacmid 转染 BmN-SWU1 细胞。感染后 72 h 收集培养基, 为 P1 代病毒粒子, 取 250 μL P1 代病毒粒子加入细胞中, 感染 72 h, 收集 P2 代病毒粒子, 重复直到获得 P3 代病毒粒子后, 测定病毒滴度 (PFU/mL)。

以 PFU 及感染复数 (MOI=10) 计算表达所需病毒粒子含量, 将适量病毒感染细胞, 感染后每 24 h 通过荧光显微镜进行荧光观察。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')
<i>egfp-Xho</i> I-F	CCGCTCGAGATGGTGAGCAAGGGCGAG
<i>egfp-Kpn</i> I-R	CGGGGTACCTTACTACTTGTACAGCTCGTCCATG
<i>serca-Spe</i> I-F	GGACTAGTATGCACCATCACCATCACCATATGGAGGACGCTCACACG
<i>serca-Not</i> I-R	ATTTGCGGCCGCTTATAGTGGTCCGTAGATGATG

Underlined letters indicate restriction enzyme digestion sites; the dashed line represents the sequence of 6×His-tag.

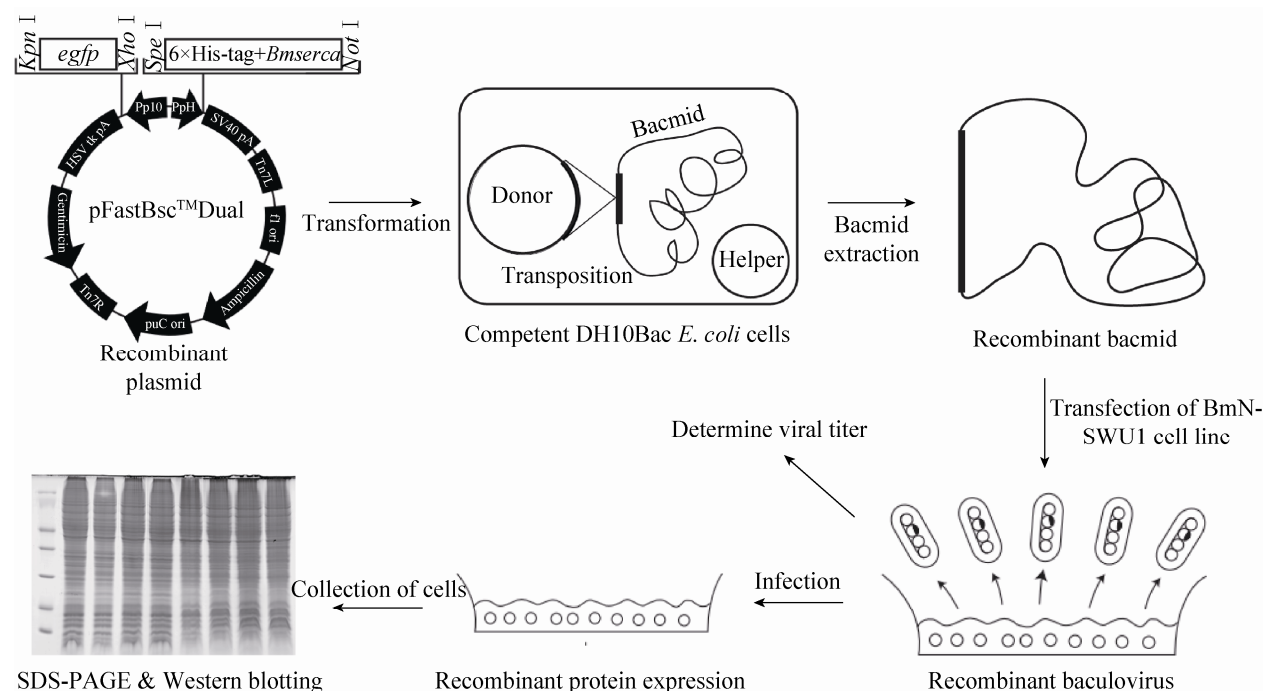


图1 家蚕杆状病毒表达系统表达外源蛋白流程图

Fig. 1 Diagram of the procedure for expression foreign protein by silk worm Bac-to-Bac expression system (Edited from the Bac-to-Bac Baculovirus Expression System user manual of Invitrogen).

#### 1.4 SDS-PAGE 及 Western blotting 分析

感染后每 24 h 收集细胞, 利用 Buffer A (20 mmol/L MOPS、0.25 mol/L 蔗糖、100  $\mu$ g/mL 苯甲脒、0.23 mmol/L PMSF 及 1 倍的蛋白酶抑制剂, pH 7.0) 重悬细胞后用玻璃小研棒将细胞充分裂解。5 000 r/min、4  $^{\circ}$ C 离心 10 min 后取上清, 利用 BCA 蛋白定量法对总蛋白进行定量。取 5  $\mu$ g 蛋白进行 SDS-PAGE, 电泳结束后利用考马斯亮蓝对胶块进行染色。

设计引物时, 我们在 Serca 的 N 端添加了 6 $\times$ His 的序列标签, 因此可以利用 Western blotting 对重组蛋白的表达情况进行分析。SDS-PAGE 后将蛋白通过半干转的方法转移到 PVDF 膜上, 以抗 6 $\times$ His-tag 单克隆抗体 (钟鼎生物) 作为一抗, HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG

(碧云天) 为二抗杂交后利用 ECL 显色液进行显色反应。另外, 选取  $\beta$ -Actin 作为内参。

#### 1.5 重组蛋白的酶活测定

Serca 酶活测定方法参考 Saborido 等<sup>[12]</sup>的方法, 首先以细胞中  $\beta$ -Actin 对酶活实验的蛋白质量进行均一化。将含有相同  $\beta$ -Actin 蛋白量的匀浆液加入到标准酶活测定溶液 (25 mmol/L MOPS、0.2 mmol/L EGTA、5 mmol/L  $MgCl_2$ 、100 mmol/L KCl、1 mmol/L  $CaCl_2$ 、5 mmol/L 叠氮化钠、0.6 mmol/L 磷酸烯醇式丙酮酸、2.4 U/mL 丙酮酸激酶、10 U/mL 乳酸脱氢酶、0.27 mmol/L NADH) 中。制备两管平行实验体系, 其中一管中额外加入 20 mmol/L  $CaCl_2$ 、10 mmol/L 叠氮化钠和 0.005% Triton X-100。然后将含有细胞匀浆的溶液于 37  $^{\circ}$ C 孵育 5 min。再向其中加入 ATP 使其终浓

度达到 4 mmol/L 以起始反应。3 min 后, 每隔 20 s 测定溶液 340 nm 处吸光度值, 拟合曲线后计算斜率差, 以消光系数  $\epsilon=6.22 \text{ (mmol/L}\cdot\text{cm)}^{-1}$  计算酶活。酶活单位定义为每分钟 1 g 组织匀浆水解的 ATP 的物质的量 ( $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{g})$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组供体质粒的构建

为了利用杆状病毒表达系统表达家蚕 Serca, 我们首先克隆了 *egfp* 和 *serca* 的 DNA 片段, 经过测序验证正确后, 将其依次克隆到 pFastBac Dual 载体上。双酶切结果表明, *egfp* 和 *serca* 成功连接到了供体质粒上 (图 2)。说明我们成功获得了含有两个表达框 [ $P_{p10}\text{-egfp}\text{-HSVtk}$ ] 和 [ $P_{ph}\text{-serca}\text{-sv40}$ ] 的重组供体质粒。

### 2.2 重组 Bacmid 的获得

将获得的重组质粒转化入 DH10Bac 感受态

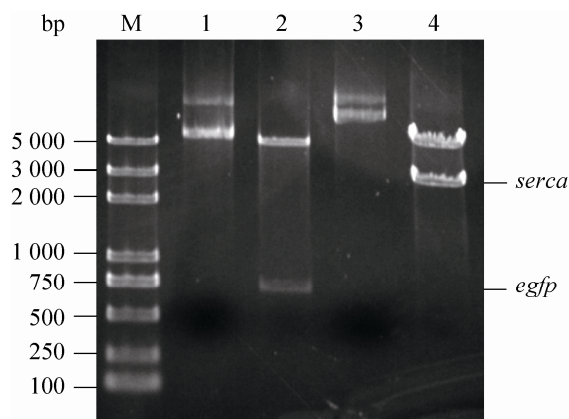


图 2 重组质粒的双酶切检测

Fig. 2 Double digestion of recombinant plasmids. M: DNA marker; 1: pFastBac-[ $P_{p10}\text{-egfp}\text{-HSVtk}$ ] vector; 2: double digestion (*Xho* I and *Kpn* I) product of pFastBac-[ $P_{p10}\text{-egfp}\text{-HSVtk}$ ] vector; 3: pFastBac-[ $P_{p10}\text{-egfp}\text{-HSVtk}$ ]-[ $P_{ph}\text{-serca}\text{-sv40}$ ] vector; 4: double digestion (*Spe* I and *Not* I) product of pFastBac-[ $P_{p10}\text{-egfp}\text{-HSVtk}$ ]-[ $P_{ph}\text{-serca}\text{-sv40}$ ] vector.

细胞后, 在辅助质粒表达的转座酶的作用下, 含有目的基因的片段通过转座作用插入家蚕 Bacmid 中。通过蓝白斑筛选与菌液 PCR 鉴定, 我们成功获得了含有目的片段的重组 Bacmid。

### 2.3 用于表达的重组病毒的获取

利用含有目的片段的 Bacmid 转染细胞后, 获得了 P1 代重组病毒, 通过重复感染, 扩增出 P3 代病毒。通过测定 P3 代病毒的滴度为  $1.2\times 10^8$ 。

### 2.4 感染后细胞的荧光显微观察

通过滴度计算所需的病毒量, 将其感染细胞后, 每隔 24 h 对细胞进行荧光显微观察, 结果如图 3 所示。在感染后 24 h, 荧光观察视野下, 只有很少的细胞发出绿色荧光, 表明此时只有少量细胞开始表达 EGFP。随着感染时间的延长, 大量细胞开始发出绿色荧光。在感染后 48 h, 约 50% 的细胞发出绿色荧光。感染后 72 h, 表达 EGFP 的细胞达到约 80%。而在感染后 96 h 和 120 h, 由于病毒的大量繁殖导致细胞状态异常甚至死亡, 很多细胞不能贴壁, 漂浮在培养基中。这些结果表明, EGFP 在感染后的细胞中成功表达, 并在感染后 72–120 h 表达量较大。

### 2.5 Serca 蛋白的表达和检测

用于表达 Serca 的启动子 *ph* 和用于表达 EGFP 的 *p10* 启动子均为晚期启动子, 为此, 通过荧光观察, 不仅可以判断病毒感染细胞的全过程, 也可以从侧面监测重组蛋白的表达情况。因此, 我们猜测 Serca 在细胞中的表达模式可能与 EGFP 相似。

将野生型病毒感染的细胞及重组病毒感染后 24 h、48 h、72 h、96 h 和 120 h 的细胞通过离心的方法收集, 充分裂解后离心提取上清。首先将蛋白样品进行 SDS-PAGE 检测, 发现感



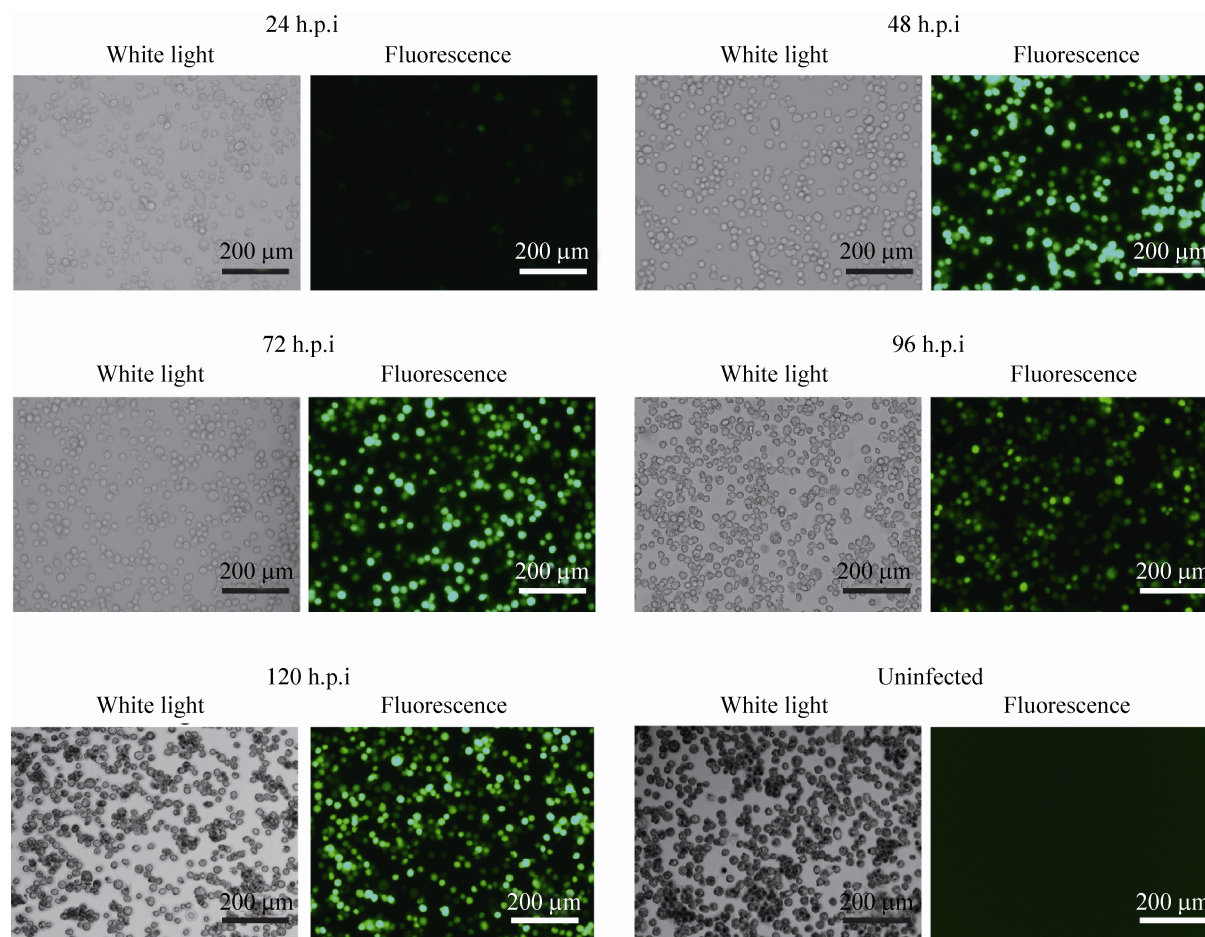


图 3 细胞感染后的荧光观察图

Fig. 3 Fluorescence micrographs of BmN-SWU1 cells infected by recombinant virus, h.p.i.= hours post infection.

染后的细胞总蛋白与未感染的细胞总蛋白模式上并无太大差异 (图 4)。由于细胞内蛋白比较丰富, 目的蛋白的表达量较低, 因此从胶块上并不能明显地看出 EGFP 和 Serca 的表达。

在我们前期的实验中发现, BmNs-SWU1 细胞中含有本底表达的 Serca, 若直接用 Serca 的抗体进行 Western blotting 检测, 重组 Serca 的表达情况不够明确, 故在设计引物时, 我们在 *serca* 片段的 5'端添加了 6×His-tag 标签, 因此, 可以利用 His 抗体对目的蛋白进行检测。Western blotting 结果显示, 感染后 48 h、72 h、

96 h 和 120 h 的细胞总蛋白中在约 110 kDa 处均检测到了明显的单一条带 (图 4), 分子量大小与预测的 Serca 的大小相一致, 说明家蚕 Serca 在感染后的细胞中成功地得到了表达。

利用  $\beta$ -Actin 蛋白作为内参蛋白, 我们可以对同时期表达的 Serca 蛋白进行粗略的定量分析。通过灰度比较, 发现家蚕 Serca 在感染后 48 h 之前开始表达, 并且随着感染时间的延长, 其表达量逐渐增加, 在 96 h 的表达量最大。这一表达模式与 EGFP 的表达模式相似。另外, 在感染后 120 h 的细胞中, 重组 Serca 的含量却

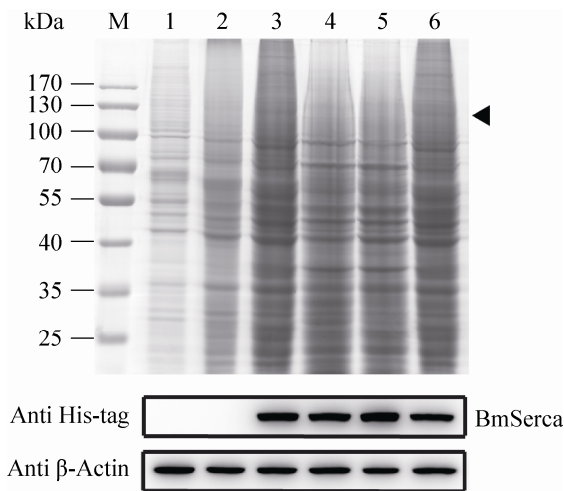


图 4 重组蛋白的表达检测  
Fig. 4 SDS-PAGE and Western blotting analysis of recombinant proteins. M: protein marker; 1: homogenates of wild type NPV infected cells; 2: homogenates of cells 24 h.p.i.; 3: homogenates of cells 48 h.p.i.; 4: homogenates of cells 72 h.p.i.; 5: homogenates of cells 96 h.p.i.; 6: homogenates of cells 120 h.p.i.; h.p.i.= hours post infection.

开始下降，这可能与细胞在感染的后期裂解死亡相关。以上的结果说明，我们利用这一双元表达系统成功地表达了家蚕 Serca 蛋白。

2.6 重组蛋白的酶活分析

参考 Saborido 等<sup>[12]</sup>的方法，我们首先利用小鼠肌肉组织匀浆作为阳性对照 (CT)，建立酶活测定体系。对小鼠肌肉匀浆进行酶活分析后，测得其 Serca 酶活为 40.26 μmol/(min·g) (图 5)，所得数值与 Saborido 等测得的酶活相似<sup>[12]</sup>，说明本酶活测定体系可以为后续研究所使用。

利用这一酶活测定体系，我们对感染后不同时期的细胞进行了裂解，抽提总蛋白并测定其 Serca 酶活，以野生型病毒感染的细胞作为阴性对照 (WT)。酶活测定结果如图 5 所示，感染后 24 h 细胞内酶活与阴性对照相比，酶活差异

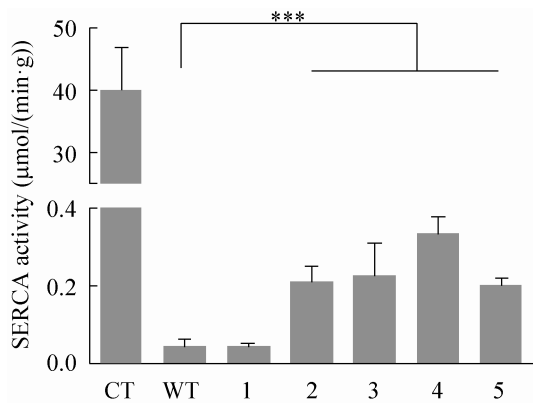


图 5 重组蛋白的酶活分析  
Fig. 5 Enzyme activity assays of recombinant proteins. CT: homogenates of rat muscles; WT: homogenates of wild type NPV infected cells; 1: homogenates of cells 24 h.p.i.; 2: homogenates of cells 48 h.p.i.; 3: homogenates of cells 72 h.p.i.; 4: homogenates of cells 96 h.p.i.; 5: homogenates of cells 120 h.p.i.; h.p.i.=hours post infection; \*\*\* *P* < 0.001 (Student's *t*-test).

不大，为 0.04 μmol/(min·g)。感染后 48 h，由于细胞开始表达 Serca 重组蛋白，细胞的酶活显著提高。随着感染时间的延长，细胞内重组蛋白增多，Serca 的酶活也增大，到感染后 96 h，细胞内的 Serca 酶活达到最大，为 0.33 μmol/(min·g)，从另一方面说明此时细胞内重组蛋白的表达量最高。而在感染后 120 h，细胞内 Serca 的酶活开始下降，这可能是由于感染后 120 h 细胞中重组蛋白量减少导致的。这一结果表明，我们利用家蚕杆状病毒表达系统成功地表达了具有生物学活性的重组 Serca 蛋白，并且在感染后 96 h，表达的重组蛋白量最大，酶活最高。

3 讨论

作为一种高效表达外源蛋白的真核生物表达系统，杆状病毒表达系统可以在不用筛选的情况下短时间内获得 100%纯度的重组病毒，通

过病毒感染昆虫细胞系或者昆虫幼虫从而快速获得大量的基因表达产物<sup>[11]</sup>, 目前已经利用此系统成功地表达了上千种功能蛋白<sup>[13-15]</sup>。

杆状病毒表达系统的另外一个优势在于可以容纳表达较大及结构较为复杂的外源蛋白。利用多元表达载体还可同时表达两个或者多个外源基因。因此, 杆状病毒表达系统成为了细胞内研究 P 型 ATP 酶功能的首选系统。近年, 研究者利用杆状病毒表达系统获得了具有生物学活性的钠钾 ATP 酶各亚单位, 并对其  $\alpha\beta$  复合体的结构、功能、装配、运输及亚单位进行了功能研究<sup>[16-18]</sup>。另外, 2002 年, 有研究者利用杆状病毒表达系统对 P 型 ATP 酶家族的另一成员人类铜转运 ATP 酶进行了表达及功能特征进行了很好的研究, 结果证实了哺乳动物铜转运 ATP 酶具有 P 型 ATP 酶家族成员的催化活性<sup>[19]</sup>。以上结果均说明杆状病毒表达系统十分适宜表达分子量较大, 具有多次跨膜结构的复杂蛋白。Serca 与钠钾 ATP 酶同属于 P 型 ATP 酶, 为此, 本研究利用家蚕杆状病毒表达系统对家蚕 *serca* 进行了表达, 获得了具有生物学活性的重组蛋白。本研究发现, 在细胞感染后 48 h, 重组蛋白开始表达, 在感染后 96 h 表达量最大。而进一步, 在细胞感染后 120 h, 重组蛋白的含量却降低了, 推测这可能与细胞在感染的后期裂解死亡相关。在 NPV 感染细胞的极晚期, NPV 病毒会利用细胞表达组织蛋白酶、几丁质酶等一系列的酶使细胞裂解<sup>[20]</sup>。在本实验中, 可能由于感染后 120 h 细胞裂解, 重组蛋白被释放到培养基中并快速被各种蛋白酶降解, 从而导致在此时期重组蛋白的含量降低。另外, 本研究中的目的蛋白在此系统中的表达水平较低, 只能采用 Western blotting 才能检测到目的蛋白, 其可

能原因在于, 首先 Serca 作为 10 次跨内质网膜的复杂蛋白, 可能使得细胞表达时重组蛋白的折叠受到压力, 导致表达量较低。其次, 本研究未有对感染条件进行摸索, 而是直接采用感染复数 MOI 为 10 的病毒感染细胞。2011 年有研究者对 PRG-1 蛋白在家蚕杆状病毒表达系统中的表达进行摸索后发现, 利用不同感染复数的重组感染细胞后, 重组蛋白的表达量差异较大<sup>[21]</sup>。因此, 若要获得表达量较大的重组蛋白可能还需要对感染的条件进行摸索。

2014 年, 李国辉等<sup>[22]</sup>创建了可视化的家蚕杆状病毒表达系统, 利用 *ie1* 启动子控制 *egfp* 基因表达, 成功地利用 EGFP 作为标签, 进而可以迅速判定病毒粒子的产生情况。本研究采用类似的方法, 利用双元表达载体, 引入 *egfp* 基因作为标记基因, 成功地构建了同时表达 EGFP 和 Serca 的重组病毒。本双元载体采用的启动子分别为 *p10* 和多角体基因 (*ph*) 启动子, 均为 BmNPV 来源的晚期启动子<sup>[20,23]</sup>。*P10* 蛋白比多角体蛋白的表达早几个小时<sup>[24]</sup>。由于所使用的启动子均在病毒感染的同一时期表达, 因此本研究中也可以通过观察 *p10* 启动子驱动的 *egfp* 的表达情况来判断病毒繁殖的情况。另外, 本研究发现, 在感染后的细胞中, EGFP 和 Serca 的表达模式一致, 因此本研究构建的双元杆状病毒表达系统还可利用 EGFP 的表达来监测目的蛋白的表达情况。

本研究成功构建了含有两个表达框 [*P<sub>p10</sub>-egfp*-HSVtk] 和 [*P<sub>ph</sub>-serca*-sv40] 的重组供体质粒, 利用此双元表达载体在家蚕 BmN-SWU1 细胞系中成功地表达了具有生物学活性的家蚕肌质网型钙离子 ATP 酶 Serca。同时, 本研究对重组 Serca 蛋白的酶活性进行了初步分析, 这对



于进一步研究 Serca 的具体功能奠定了坚实的基础, 也对杆状病毒表达系统的优化和应用研究具有十分重要的意义。

## REFERENCES

- [1] Birkenbeil H, Dedos SG.  $\text{Ca}^{2+}$  as second messenger in PTTH-stimulated prothoracic glands of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2002, 32(12): 1625–1634.
- [2] Hull JJ, Lee JM, Kajigaya R, et al. *Bombyx mori* homologs of STIM1 and Orai1 are essential components of the signal transduction cascade that regulates sex pheromone production. *J Biol Chem*, 2009, 284(45): 31200–31213.
- [3] Ohnishi A, Hull JJ, Kaji M, et al. Hormone signaling linked to silkworm sex pheromone biosynthesis involves  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II-mediated phosphorylation of the insect PAT family protein *Bombyx mori* lipid storage droplet protein-1 (BmLsd1). *J Biol Chem*, 2011, 286(27): 24101–24112.
- [4] Carafoli E, Santella L, Branca D, et al. Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2001, 36(2): 107–260.
- [5] Bublitz M, Musgaard M, Poulsen H, et al. Ion pathways in the sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. *J Biol Chem*, 2013, 288(15): 10759–10765.
- [6] Cahalan MD, Zhang SL, Yeromin AV, et al. Molecular basis of the CRAC channel. *Cell Calcium*, 2007, 42(2): 133–144.
- [7] Lukyanenko V, Gyorke I, Wiesner TF, et al. Potentiation of  $\text{Ca}^{2+}$  release by cADP-ribose in the heart is mediated by enhanced SR  $\text{Ca}^{2+}$  uptake into the sarcoplasmic reticulum. *Circ Res*, 2001, 89(7): 614–622.
- [8] Abraham DM, Wolf MJ. Disruption of sarcoendoplasmic reticulum calcium ATPase function in *Drosophila* leads to cardiac dysfunction. *PLoS ONE*, 2013, 8(10): e77785.
- [9] McMullen DC, Ramnanan CJ, Storey KB. In cold-hardy insects, seasonal, temperature, and reversible phosphorylation controls regulate sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA). *Physiol Biochem Zool*, 2010, 83(4): 677–686.
- [10] Zhang SD, Chen LJ, An SH, et al. Molecular identification of sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase gene involved in PBAN-stimulated pheromone production in *Bombyx mori*. *J Henan Agric Univ*, 2012, 46(5): 577–583 (in Chinese).  
张松斗, 陈丽君, 安世恒, 等. 家蚕性信息素腺体肌质网膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶基因的分子鉴定. *河南农业大学学报*, 2012, 46(5): 577–583.
- [11] Cao CP. Development of a novel BmNPV expression vector system using silkworm as bioreactor and the application [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2007 (in Chinese).  
曹翠平. 家蚕新型高效杆状病毒表达系统的开发和应用研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2007.
- [12] Saborido A, Delgado J, Megias A. Measurement of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity and E-type  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity in rat heart homogenates. *Anal Biochem*, 1999, 268(1): 79–88.
- [13] Bae JE, Toth TE. Cloning and kinetics of expression of Brucella abortus heat shock proteins by baculovirus recombinants. *Vet Microbiol*, 2000, 75(2): 199–204.
- [14] Chen W, Fu F, Tang SM, et al. Expression of human leptin in *Bombyx mori* using Bac-to-Bac baculovirus system. *Acta Sericol Sin*, 2011, 37(2): 325–329 (in Chinese).  
陈蔚, 付凡, 唐顺明, 等. 利用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统在家蚕中表达人瘦素蛋白. *蚕业科学*, 2011, 37(2): 325–329.
- [15] Bai LH, Hou SH, Jia H, et al. Bac to Bac expression and antigenicity identification of P72 gene of ASFV. *Chin Anim Husb Vet Med*, 2012, 39(3): 19–23 (in Chinese).  
柏丽华, 侯绍华, 贾红, 等. 非洲猪瘟 P72 基因在 Bac to Bac 系统中表达及抗原性鉴定. *中国畜牧兽医*, 2012, 39(3): 19–23.

- [16] Detomaso AW, Xie ZJ, Liu G, et al. Expression, targeting, and assembly of functional Na, K-ATPase polypeptides in baculovirus-infected insect cells. *J Biol Chem*, 1993, 268 (2): 1470–1478.
- [17] Laughery MD, Todd ML, Kaplan JH. Mutational analysis of  $\alpha$ - $\beta$  subunit interactions in the delivery of Na, K-ATPase heterodimers to the plasmamembrane. *J Biol Chem*, 2003, 278 (37): 34794–34803.
- [18] Laughery MD, Todd ML, Kaplan JH. Oligomerization of the Na, K-ATPase in cell membranes. *J Biol Chem*, 2004, 279 (35): 36339–36348.
- [19] Tsivkovskii R, Eisses JF, Kaplan JH, et al. Functional properties of copper-transporting ATPase ATP7B (the wilson's disease protein) expressed in insect cells. *J Biol Chem*, 2002, 277 (2): 976–983.
- [20] Xue J, Qiao N, Zhang W, et al. Dynamic interactions between *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus and its host cells revealed by transcriptome analysis. *J Virol*, 2012, 86(13): 7345–7359.
- [21] Hao BF, Shen XJ, Wang M, et al. Soluble expression of PRG-1 in BmN cells using *Bmbyx mori* nucleopolyhedrovirus Bac-to-Bac expression system. *Acta Sericol Sin*, 2011, 37(5): 0832–0836 (in Chinese).
- 郝碧芳, 沈兴家, 王猛, 等. 利用家蚕核型多角体病毒 Bac-to-Bac 表达系统在 BmN 细胞中可溶性表达 PRG-1 蛋白. *蚕业科学*, 2011, 37(5): 0832–0836.
- [22] Li GH, Wang P, Li MM, et al. Expression of ns1 gene from *Bombyx mori* bidensovirus by a novel baculovirus expression system. *Chin J Biotech*, 2014, 30(4): 625–635 (in Chinese).
- 李国辉, 王鹏, 李芒芒, 等. 创建可视化的家蚕杆状病毒表达系统表达家蚕二分浓核病毒非结构蛋白 NS1. *生物工程学报*, 2014, 30(4): 625–635.
- [23] Vlak JM, Klinkenberg FA, Zaal KJM, et al. Functional studies on the p10 gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus using a recombinant expressing a p10-galactosidase fusion gene. *J Gen Virol*, 1988, 69(4): 765–777.
- [24] Roelvink PW, vanMeer MMM, deKort CAD, et al. Dissimilar expression of *Autographa californica* multicapsid nuclear polyhedrosis virus polyhedron and p10 genes. *J Gen Virol*, 1992, 73(6): 1481–1489.

(本文责编 陈宏宇)