

• 动物及兽医生物技术 •

家蚕蜕皮液羧肽酶 A 的表征及免疫荧光定位分析

张育浩, 程悦静, 杨领振, 王清浪, 龚竞, 侯勇*

西南大学 西部(重庆)科学城种质创制大科学中心, 重庆 400715

张育浩, 程悦静, 杨领振, 王清浪, 龚竞, 侯勇. 家蚕蜕皮液羧肽酶 A 的表征及免疫荧光定位分析[J]. 生物工程学报, 2023, 39(12): 4950-4964.

ZHANG Yuhao, CHENG Yuejing, YANG Lingzhen, WANG Qinglang, GONG Jing, HOU Yong. Characterization and immunofluorescence localization analysis of carboxypeptidase A in molt fluid of silkworm[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(12): 4950-4964.

摘要: 蜕皮是许多变态发育昆虫的一种重要生理现象, 昆虫通过蜕皮液中的酶对旧表皮进行分离。已有相关蛋白组学的研究证明, 家蚕蜕皮液中具有一种含量丰富的羧肽酶 A (*Bombyx mori*-carboxypeptidase A, Bm-CPA), 目前对其作用功能尚不清楚。为了更好地了解 Bm-CPA 在家蚕蜕皮发育过程的作用, 本研究通过生物信息学分析、实时荧光定量 PCR、抗体制备、免疫荧光染色和毕赤酵母表达等方法对 Bm-CPA 进行了研究。结果显示, Bm-CPA 具有保守的 M14 锌羧肽酶结构域和糖基化位点, 并且受蜕皮激素(20-hydroxyecdysone, 20E)调控, 在眠期和上簇期的表皮中大量表达; 免疫荧光染色显示 Bm-CPA 在眠期的表皮中富集, Bm-CPA 抑制剂会导致幼虫因无法蜕皮而死亡; 通过毕赤酵母表达系统在体外成功获得大量的重组 Bm-CPA 蛋白。这些结果为深入了解家蚕蜕皮发育过程提供了一定的参考。

关键词: 家蚕; 羧肽酶 A; 免疫荧光定位; 毕赤酵母表达

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFD1201600); 重庆市自然科学基金(cstc2020jcyj-cxttX0001)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFD1201600) and the Natural Science Foundation of Chongqing, China (cstc2020jcyj-cxttX0001).

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

Received: 2023-04-04; Accepted: 2023-07-14; Published online: 2023-08-15

Characterization and immunofluorescence localization analysis of carboxypeptidase A in molt fluid of silkworm

ZHANG Yuhao, CHENG Yuejing, YANG Lingzhen, WANG Qinglang, GONG Jing, HOU Yong*

Integrative Science Center of Germplasm Creation in Western China (Chongqing) Science City, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Molting is an important physiological phenomenon of many metamorphosis insects, during which the old and new epidermis are separated by enzymes present in the molting fluid. Various proteomic studies have discovered the presence of *Bombyx mori* carboxypeptidase A (Bm-CPA) in the molting fluid of silkworm, but its function remains unclear. In order to better understand the role of Bm-CPA in the molting process of silkworm, Bm-CPA was analyzed by bioinformatics analysis, real-time fluorescence quantitative PCR, antibody preparation, immunofluorescence staining, and expression in *Pichia pastoris*. The results showed that Bm-CPA had a conserved M14 zinc carboxypeptidase domain and glycosylation site. Its expression was regulated by ecdysone 20E, and large expression was observed in the epidermis of the upper cluster stage. Immunofluorescence staining showed that Bm-CPA was enriched in the epidermis during the molting stage, and the inhibitor of Bm-CPA led to the larval death due to the inability to molt. We also successfully obtained a large number of recombinant Bm-CPA proteins by *Pichia pastoris* expression *in vitro*. These results may facilitate further understanding the molting development process of silkworm.

Keywords: *Bombyx mori*; carboxypeptidase A; immunofluorescence localization; *Pichia pastoris* expression

家蚕(*Bombyx mori*)属于鳞翅目完全变态发育昆虫,同时也具有较高经济价值。在其生长过程中会经历卵-幼虫-蛹-成虫 4 个阶段,当每个发育阶段完成时,为了满足自身生长的需要,内部器官和外部组织会经历剧烈的变化,蜕皮就是形态变化表现最为明显的现象之一。昆虫在蜕皮过程中往往伴随着新表皮的合成与旧表皮的降解,在这个过程中,新旧表皮之间会合成分泌一种液体称为蜕皮液,其中含有的蛋白酶能够将旧表皮中的几丁质和蛋白质分解成多糖和氨基酸供昆虫再次吸收利用^[1-2]。

近年来,蜕皮液的蛋白组学研究显示,昆虫

蜕皮液中包含有多种蛋白酶以及蛋白酶抑制剂,并已被证明参与到昆虫的蜕皮过程^[3-4]。在烟草天蛾、东亚飞蝗中,鉴定到丝氨酸蛋白酶参与了表皮的合成与降解^[5-6];在赤拟谷盗的蜕皮液中鉴定到几丁质酶,能够降解旧表皮的几丁质层^[7-8]。家蚕蜕皮液的蛋白组学鉴定结果显示,家蚕蜕皮液中有 12 种与几丁质代谢相关的酶、35 种丝氨酸蛋白酶、15 种肽酶和 38 种蛋白酶抑制剂^[9]。通过对这些蛋白酶的基因表达模式和生物信息学分析表明,许多蛋白酶参与了家蚕表皮蛋白和几丁质的降解。其中包含了一种含量较高的羧肽酶 A (carboxypeptidase A, CPA),被称为

Bm-CPA (*Bombyx mori*-carboxypeptidase A)。

已有的研究表明,昆虫体内的羧肽酶往往起到调节昆虫生长发育的作用。有研究人员发现,在果蝇中羧肽酶 D 的突变导致果蝇翅膀发育不全^[10];在埃及伊蚊的脂肪体中加入蜕皮激素(20-hydroxyecdysone, 20E)诱导后,卵黄原羧肽酶的转录水平显著增加^[11];在亚洲飞蝗中干涉羧肽酶上游相关的转录因子 Lm-HR39,出现 85%蜕皮异常、翅膀发育缺陷等^[12],证明羧肽酶对于变态发育期的昆虫维持正常的发育有着重要的作用。

家蚕基因组中一共鉴定到 48 个羧肽酶基因,包含 34 个金属羧肽酶(BmMCP1-BmMCP34)和 14 个丝氨酸羧肽酶(BmSCP1-BmSCP14)^[13]。而对于蜕皮液中鉴定到高量表达的 Bm-CPA 还尚未有明确报道其相关作用,由于其在眠期表皮中具有较高的表达量,推测其与家蚕的蜕皮过程中表皮降解有关^[13]。

本课题组前期对家蚕蜕皮液中的胰蛋白酶型的丝氨酸蛋白酶 p37k 进行了分析,并且证明其能够水解家蚕表皮中含有 CPAP3 型结构域的表皮蛋白^[14],这种表皮蛋白结合在几丁质层,在家蚕蜕皮过程中被降解。为了更深入地了解家蚕蜕皮过程,完善家蚕蜕皮液对表皮的降解机制,本研究通过分析 Bm-CPA 的序列特征、时期表达特征,并对 Bm-CPA 进行抗体制备、免疫荧光定位和体外真核表达等实验,为探索 Bm-CPA 的功能、研究鳞翅目昆虫及其他变态发育昆虫的蜕皮发育过程提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验昆虫

本实验中使用的家蚕品种为大造(DaZao),由西南大学前沿交叉学科研究院生物学研究中

心提供。饲养温度为 25 °C,湿度 70%±3%,使用适龄新鲜桑叶喂养。

1.1.2 试剂耗材

实验所用提取 RNA 药品 Trizol 购自英杰生命技术有限公司;反转录使用 M-MLV 试剂盒购自普洛麦格生物技术有限公司;荧光定量 PCR 采用 SYBR qPCR SuperMix 试剂盒购自苏州近岸蛋白质科技股份有限公司;PCR 体系所用 DNA 聚合酶为 2×PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase 购自宝日医生物技术有限公司;胶回收试剂盒采用 Gel Extraction Kit 购自 Omega 公司;清洁回收试剂盒购自 Axygen 公司;超纯质粒提取试剂盒购自 QIAGEN 公司;组织蛋白提取采用 RIPA 裂解液,蛋白浓度测定采用 Bradford 试剂盒、HE 染色试剂盒、PBS 缓冲液、4%多聚甲醛溶液,细胞核染色采用 DAPI 染色液,Cy3 标记的山羊抗兔抗体均购自上海碧云天生物技术有限公司;樱花冷冻包埋剂购自 SAKURA 公司;保幼激素、几丁质染色采用 FITC 标记的 WGA 染色液购自默克公司;细胞培养采用 Gibco[™] Grace 培养基、Western blotting (WB)曝光显色液购自赛默飞世尔科技有限公司;商业化羧肽酶 A 抑制剂(CPA inhibitor)购自 MedChemexpress 公司;蜕皮激素 20E、博来霉素、卡那霉素抗生素购自生工生物工程(上海)股份有限公司;T4 DNA 连接酶,限制性核酸内切酶 *EcoR* I、*Not* I 和 *Pme* I 均购自纽英伦生物技术(北京)有限公司;大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)和 Trans1-T1 感受态细胞均购自武汉全式金公司;实验中使用的 BmE 细胞系(家蚕胚胎干细胞)和 pET28a 质粒、毕赤酵母表达载体 pPICZ α A、野生型酵母株 X-33 均由本实验室保存;所用引物合成及测序工作由生工生物工程(上海)股份有限公司完成;抗体制备由金开瑞生物公司完成。

1.2 方法

1.2.1 Bm-CPA 的生物信息学分析

在 SilkDB 3.0 数据库中 (<https://silfdb.bioinfotoolkits.net/>) 下载 Bm-CPA 的相关序列信息。通过在线网站 SMART 对 Bm-CPA 的结构域信息进行预测 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)。序列信号肽通过 SignalP 5.0 在线预测 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)。利用软件 BioXM 计算 Bm-CPA 的等电点与理论分子量大小并进行相关的序列比对工作。序列中修饰位点由 ExPASy 在线网站的 Prosite 进行预测 (<https://prosite.expasy.org/>)。

为了比较 Bm-CPA 序列与其他物种中羧肽酶 A 的相似性, 在 NCBI 数据库中 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>) 下载棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) 羧肽酶 A (Ha-CPA)、库蚊 (*Culex quinquefasciatus*) 羧肽酶 A (Cq-CPA)、人体虱 (*Pediculus humanus corporis*) 羧肽酶 A (Phc-CPA) 和人 (*H. sapiens*) 羧肽酶 A (Hsa-CPA) 序列, 通过软件 ClustalX 和 GENEDOC 进行多序列比对分析。

1.2.2 组织 RNA 提取及表达特征分析

通过 Primer 5.0 软件设计 Bm-CPA 荧光定量引物、添加 *EcoR* I、*Not* I 限制性内切酶位点的克隆引物和内参引物 sw22934 (表 1)。

从蚁蚕开始取材家蚕表皮组织, 前 3 龄食桑期和眠期各一次, 4 龄期每隔 24 h 取材一次, 5 龄期隔天取材 1 次, 取至蛹期第 5 天。同时, 选取生长至 5 龄第 3 天、上簇第 1 天的家蚕个体, 分别取材头、表皮、中肠、马氏管、卵巢、精巢、丝腺、气管丛、翅原基和脂肪体, 单次取材个体数 5 头, 取材 3 次。使用 Trizol 法提取 RNA 并逆转录成 cDNA 进行荧光定量 PCR 研究。反应程序设定为: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 3 s, 60 °C 延伸 30 s, 40 个循环; 反应结束后收集数据分析。

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

| Primer name | Primer sequence (5'→3') |
|------------------------------|---|
| Bm-CPA-D-F | GTAAATCAGACAACAAAGCCGT |
| Bm-CPA-D-R | GATAAAGTAAGTGACGGTTGCG |
| sw22934-F | TTCGTAAGTGGCTCTTCTCGT |
| sw22934-R | CAAAGTTGATAGCAATTCCT |
| Bm-CPA-F (<i>EcoR</i> I) | <u>CCGGAATTCT</u> CACTCTGATCAATG AACT |
| Bm-CPA-R (<i>Not</i> I) | ATT <u>TGCGGCCGCTT</u> CCTTGATAACT TGGCTAG |

The underline is the restriction enzyme site.

1.2.3 Bm-CPA 原核表达载体构建及纯化

以表皮 cDNA 为模板, 使用扩增引物对 Bm-CPA 进行扩增, 反应程序为: 98 °C 预变性 2 min; 98 °C 变性 10 s, 58 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 40 s, 共 32 个循环; 72 °C 终延伸 3 min。将扩增产物进行 1% 的琼脂糖核酸电泳, 切胶回收目的条带。将目的条带和 pET28a 载体质粒进行双酶切, 纯化回收后通过 T4 DNA 连接酶进行连接, 产物转化至感受态细胞中, 通过菌液 PCR 筛选阳性菌株进行测序, 将测序验证正确的菌株提取质粒, 命名为 pET28a-Bm-CPA。

将获得的 pET28a-Bm-CPA 质粒转化大肠杆菌 (*E. coli*) BL21(DE3) 感受态细胞, 挑取单菌落接种在含有卡那抗性的 2YT 培养基中进行培养, 37 °C、230 r/min 培养 5 h, 测定 $OD_{600}=0.7$ 时, 加入异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷 (isopropyl-β-D-thiogalactoside, IPTG) 至终浓度为 1 mmol/L 诱导表达 5 h。将空载 pET28a 作为对照, 收集诱导完成的菌体用 500 μL 结合缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, pH 7.0) 进行重悬并超声破碎, 破碎后的样品进行 4 °C、12 000×g 离心 15 min, 收集上清, 沉淀使用等量的结合缓冲液再次溶解。制备好的样品加入蛋白 5× 上样缓冲液 100 °C 加热 5 min, 进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳检测, 检测结束后利用

考马斯亮蓝染色分析。

对大量表达的包涵体进行纯化, 接种阳性菌株大量诱导培养, 8 500×g、4 °C 收菌 15 min, 加入 100 mL 结合缓冲液重悬菌体, 高压破碎机以 1.5×10^8 Pa 压力, 反复破碎 3 个循环, 14 000×g、4 °C 离心 20 min 后收沉淀, 用含有 8 mol/L 尿素的结合缓冲液溶解过夜, 溶解后的溶液以 14 000×g、4 °C 离心 20 min, 弃沉淀, 将上清收集后过 0.45 μm 滤膜, 准备进行镍柱纯化。

以 0.8 mL/min 的流速进行蛋白挂柱操作, 分别使用含有 20、50、100、200、500、1 000 mmol/L 咪唑的结合缓冲液进行梯度洗脱, 收集洗脱液并制备蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳检测。将含有目的蛋白的洗脱液使用孔径大小为 14 kDa 的透析袋进行透析脱盐, 送至武汉金开瑞生物公司进行兔多克隆抗体的制备。

1.2.4 Bm-CPA 的免疫荧光定位及 Western blotting 检测

取材饲喂至 4 龄眠期 6 h 和 18 h 的表皮, 用 PBS 润洗后进行冷冻包埋, 使用冷冻切片机调整厚度为 8 μm 进行切片。在样品区滴加 1 mL 的封闭液(含有 10% 羊血清+1% BSA 的 1×PBS)封闭 2 h, 分别用 Bm-CPA 一抗液(抗体稀释比例 1:2 000)和花青素荧光染料(sulfo-cyanine 3, Cy3)标记的山羊抗兔二抗液(抗体稀释比例 1:1 000)进行孵育, 在避光条件下用异硫氰酸荧光素酯(fluorescein 5-isothiocyanate, FITC)标记的小麦胚芽凝集素(wheat germ agglutinin, WGA)染色液对几丁质层进行染色, 滴加含有 1/3 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色液的 PBS 溶液进行细胞核染色, 随后封片在荧光显微镜下观察。

Western blotting 检测各组织蛋白样品中 Bm-CPA 的表达情况, 对提取的蛋白样品用 Bradford 试剂盒测定浓度, 以每孔 20 μg 进行

上样电泳, 电泳完成后进行转膜, 封闭在含有 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液中 2 h, 随后进行抗体孵育。一抗、二抗溶液均为含有 1% 脱脂奶粉的 TBST 溶液, 一抗溶液中含有 Bm-CPA 兔多克隆抗体, 按照 1:8 000 比例进行稀释, 二抗中含有山羊抗兔抗体, 抗体稀释比例为 1:6 000, 孵育完成加显色液在暗室中进行曝光采集图像。

1.2.5 Bm-CPA 真核表达载体构建及纯化

载体构建方法同 1.2.3, 将扩增获得的 Bm-CPA 片段与酵母表达载体 pPICZα A 进行双酶切后连接, 挑取单菌落进行测序, 获得阳性菌株。使用超纯质粒提取试剂盒进行质粒提取, 对提取的质粒使用 *Pme* I 进行单酶切线性化, 设定电转参数为 1 500 V, 25 μF, 200 Ω 进行时长为 8 ms 的电击转化, 涂布在含有博来霉素抗性的 YPDS 平板上, 29 °C 避光培养 3 d。挑取单菌落测序获得阳性重组菌株。

将获得的阳性重组菌株接种在含有卡那抗生素的 BMGY 生长培养基中, 29 °C、250 r/min 培养至 $OD_{600}=5$, 收菌转移至 BMMY 诱导培养基中进行 72 h 诱导表达。诱导完成后以 8 500×g、4 °C 收菌 15 min, 取上清液进行蛋白镍柱纯化操作, 梯度咪唑浓度洗脱后进行蛋白胶电泳检测。

1.2.6 羧肽酶 A 抑制剂对家蚕的影响

饲喂家蚕生长至上簇期, 待家蚕 5 龄第 7 天体内杂物排泄殆尽后, 开始注射 CPA 抑制剂, 设置不同的抑制剂浓度梯度(1、5、10 mmol/L)进行处理。注射量每头蚕 10 μL, 注射间隔 24 h 后再次进行补注 1 次。对照组注射相同体积浓度的二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶液。剖开蚕茧观察吐丝完成后的家蚕化蛹蜕皮情况并拍照记录。取材 5 龄第 3 天的家蚕表皮, 体外孵育蜕皮液、CPA 抑制剂, 25 °C 孵育 12 h, 孵育完成后用 PBS 缓冲液进行清洗, 随后进行冷冻包埋切片, 使用苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染

色试剂盒进行染色观察。

1.2.7 激素处理 BmE 细胞和家蚕个体

将正常生长状态下的 BmE 细胞中的培养基用吸管吸弃, 每瓶加入 5 mL 新鲜 Grace 培养基(含有血清和抗生素), 轻柔吹打悬浮形成细胞悬液。准备干净的 6 孔细胞培养板, 将细胞悬液按照每孔 500 μ L 的量加入, 在培养箱中培养。5 h 后, 分别添加 2 μ g 的蜕皮激素(20-hydroxyecdysone, 20E)溶液和保幼激素类似物(juvenile hormone, JHA)溶液, 作为诱导处理组, 使用相同体积浓度的 DMSO 溶液作为对照组, 添加至 BmE 细胞中, 每组 3 个重复, 待培养 24 h 后进行检测。

对生长至 5 龄第 5 天的家蚕分别注射 5 μ g 的蜕皮激素(20E)溶液和保幼激素类似物 JHA 溶液, 相同体积浓度的 DMSO 作为对照组, 注射 24 h 后提取表皮蛋白进行定量 PCR 和 Western blotting 检测 Bm-CPA 的表达量。

2 结果与分析

2.1 Bm-CPA 序列信息分析

在 SilkDB 数据库中下载 Bm-CPA 的相关序列信息, 序列编号为 BGIBMGA008910, 序列全长 1 440 bp, 编码 479 个氨基酸, 预测翻译后的蛋白分子量(molecular weight, Mw)为 54 kDa, 等电点(isoelectric point, pI)为 5.75。通过相关在线网站的结构分析和位点预测, 结果表明 Bm-CPA 中含有 1 个负责胞外分泌的信号肽(Met 1-Ser 20)、1 个羧肽酶激活肽结构域(Trp 94-Glu 164)和 1 个锌羧肽酶结构域(Tyr 187-Glu 464)。对 Bm-CPA 的位点信息进行预测, 共预测到 Bm-CPA 具有 1 个潜在的酰胺化位点、3 个 N 型糖基化修饰位点以及 5 个潜在的磷酸化位点(图 1)。

```

1 ATGGGATCCAAGAGGCAACCGTGGTGTCTTGGCGGCCCTAACCGTCTCAGCTCACTCTGATCAAT
1 M G S K R Q T V V L F L A A L T V V L S S P L I N
76 GAACTACAGCCCGGAGAAGAATGGCCACAACGCAATTCGGTAAGACAACCGGTAGCTGATGACCAACAGACAG
26 E L Q P G E E W P Q R N S V R Q P V A D D Q T E Q
151 ACACTGACAGAGGACTTCTCACTGACGATCCGCCCCAGCCGAGTGTGAAGATGCAATAATAGTAGCGAAA
51 T L T E D F S T D D P A P A A V V E D A I I V A K
226 ACAATTGAACGGCATCATGAGCCGAAAAAATGATTACTCCGGTTCACAGTGGCAAGTTTCAACTACAAA
76 T I E R D H E P K K I D Y S G S V Q V S T A K
301 TCTGGAGCTCGTCAAGTAATCGGAAGACTTCGAGCAAGAAACCTGATTTCTACTGGGGGGGAATCAGTCTCT
101 S G A R Q V I G R L R R R N L I S T W G G N Q S S
376 GTGGACATCTTATCAACCGAATGTCGTAGAAAATTATCACAGTGTTTTCAAAAGAGAGACATAGACTACAAC
126 V D I L I K P N V V E N I T R V F K R E S I D Y N
451 GTGCTGATAGAAGATTACAAAAGAGGATCAATGAGAAAATCCGCGCTAGATAACGATGAAATGAACGTCAA
151 V V I E D L Q K R I N E E N P P L D N D E I E L Q
526 GACAGACAGGTCACCGAATGACATGGAACAGTATCACAGATAGAACAGATTTACCGCTTTATGGATTACTTG
176 D R R G H R M T W K Q Y H R L E D I Y G F M D Y L
601 GCAAAACCTTCTCTCATCAGTGTGAAATCAATAGGAAATCTTGAAGTGCAGATCTTATAGATCACTC
201 A K I Y P S I I S V K S I G K S F E G R D L K I L
676 CGCATATCAACGGTAATCAGACAACAGCCGTTTCATCGACGGGGTATCCAGCTCGTGAATGGATG
226 R I S N G K S D N K A V F I D G G I H A R E W I S
751 CCCGCAACCCCTACTTACTTCTACAGTGTGCTGAGTATTCGATGGAATCGACATATTAAGGCGATC
251 P A T V T Y F I Y Q F A E Y F D V E S D D I K G I
826 GACTGGTATTCATCGCGTGTGAAATCCAGATGATGATACACATCCGTTGATCGTCTTTGGAGAG
276 D W Y F M P V V N P D G Y E Y T H T V D R L W R K
901 AACAGAAAGCTGGTTACCGTCTGCACTGGTACTGATCTCAACAGAACTTGGACATATTGGGGAGGCAA
301 N R K P G Y R A C T G T D L L N R N F G H H W G G K
976 GCGCATCAACAGTCCGTCAGTGAATATATGTTGAAGTATGCCTTTCAGAACAGAAAGGTAGCTTTA
326 G A S N S P C S E I Y R G S N A F S E P E I L A L
1 051 TCTGAATTTATAAATCAAGCGCGTACTTCCGCATATGTTACATACCATAGCTATGCTCAATACATGCT
351 S E F I K S S A A N F S A Y V T Y H S Y G Q Y M L
1 126 TATCCATGGGATATGATAATGCAGTCCCTCAGACTACAGGATTTAGATATCTTGGAAAAAGATGGCAAG
376 Y P W G Y D N A V P P D Y K D L D N L G K K M A E
201 GCAATCTCAAGACCGGTGTTCTCAATCAAGTGGTTCATCTAGTGGTCTCTTCTACCTGAGCAGGTGGC
401 A I S K T G G S Q Y Q V G S S S G L L Y P A A G G
1 276 TCAGATGACTGGGGAATCACAAGGAATCAAATCTTACACTATTGAAGTGTAGTACAGACAGGAGTTATGGT
426 S D D W A K S Q G I K Y S Y T I E L S D T G R Y G
1 351 TTTGTTCTACATGTTCAATGTTACCCGTTGTAAGGAAATTTAGCTGCTGAGGGTCTGCTGACGCAA
451 F V L P T S F I V P V A K E N L A G L R V L A S Q
1 426 GTTATCAAGGAATA
476 V I K E *

```

图1 Bm-CPA 序列分析 黑色方框代表信号肽区. 黑直线表示区段是羧肽酶激活肽结构域. 黑色虚线是锌羧肽酶结构域. 双实线是锌离子结合区段. 灰色区域是预测的磷酸化位点. 三角代表的是预测的酰胺化位点. 黑色圆点表示的是预测的 N 型糖基化位点

Figure 1 Analysis of Bm-CPA sequence. The black box represents the signal peptide. The black underline represents the domain of carboxypeptidase activating peptide. The broken line of black is the zinc carboxypeptidase domain. The double line is the zinc ion binding region. The gray area is the predicted phosphorylation site. The triangle represents the predicted amination sites. The black dots indicate the predicted N-type glycosylation sites.

为了更好地了解 Bm-CPA 的序列特征, 通过软件 ClustalX 对 Bm-CPA 与不同物种的羧肽酶 A 序列进行保守性分析, 结果显示: 棉铃虫羧肽酶 A 与其相似性最高, 达到了 59%, 人的羧肽酶 A 与其相似性也达到了 39%, 且 Bm-CPA 在锌羧肽酶结构域具有较强的保守性, 尤其在锌离子结合区段的保守性更高, 而在信号肽(Met1-Ser20)以及羧肽酶激活肽结构域(Trp94-Glu164)仅与棉铃虫的羧肽酶 A 有着较高的相似程度, 与其他动物尤其是人的相似程度较低。在糖基化位点(Asn360)以及磷酸化位点(Ser343)上有较高的保守性, 而在糖基化位点(Asn122; Asn137)以及其他潜在的磷酸化位点则保守性较低(图 2)。

2.2 Bm-CPA 原核表达纯化

为了进一步探究 Bm-CPA 的功能, 通过构建原核表达载体对 Bm-CPA 进行重组表达, 将扩增获得的 *Bm-CPA* 片段通过双酶切连接至 pET28a 载体, 重组的表达载体命名为 pET28a-Bm-CPA。

提取 pET28a-Bm-CPA 重组质粒转化至大肠杆菌原核表达株 BL21(DE3)中, 对测序正确的单菌进行小量诱导表达检测, 结果显示: 在 37 °C 诱导 5 h 和 16 °C 低温诱导 20 h 的条件下, 实验组诱导沉淀的蛋白样中明显比对照的空载沉淀多出一条约 55 kDa 大小的蛋白条带(如图 3A 箭头所示), 与 Bm-CPA 融合 His 标签后的大小相似, 且 37 °C 的诱导表达量显著高于 16 °C,

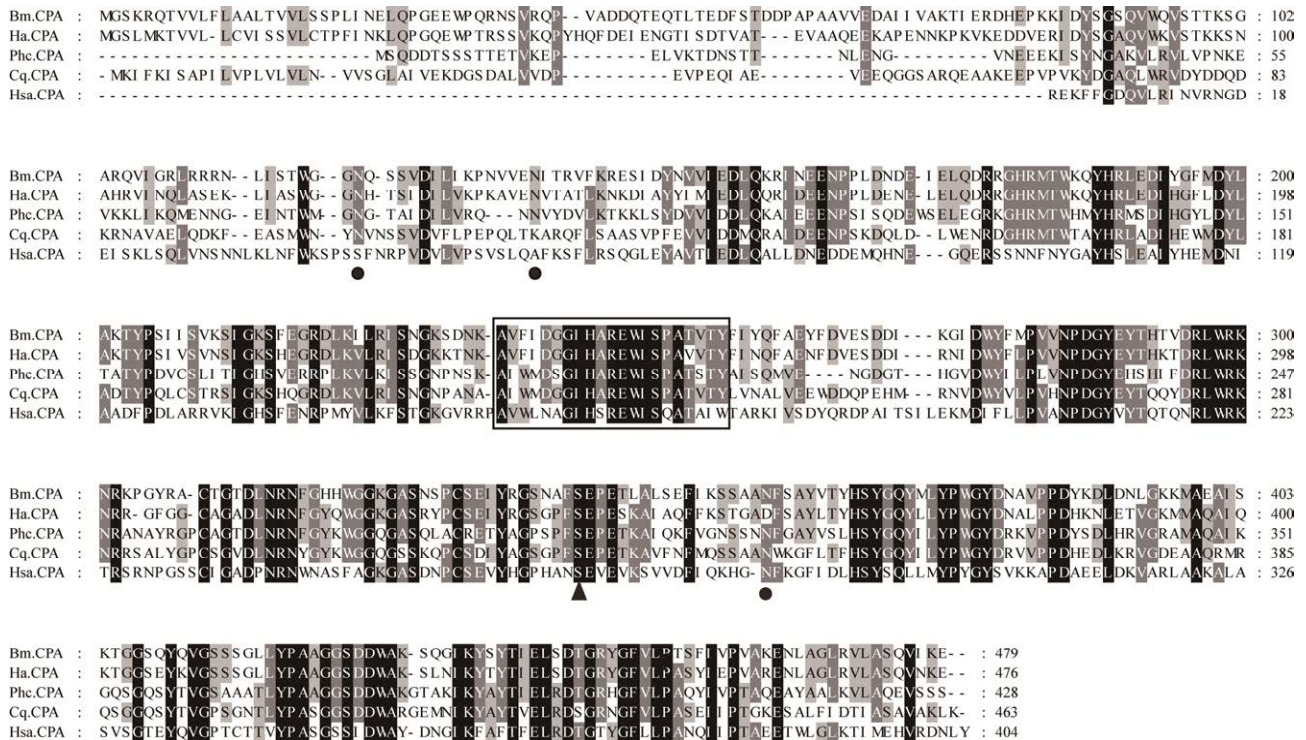


图 2 Bm-CPA 多序列比对 圆点表示糖基化位点, 线框为 Bm-CPA 的锌离子结合区段, 三角形为保守的磷酸化位点

Figure 2 Multiple sequence alignment of Bm-CPA. The dots indicate N-type glycosylation sites. The wire frame shows the zinc ion binding region of Bm-CPA. The triangle is the predicted phosphorylation site.

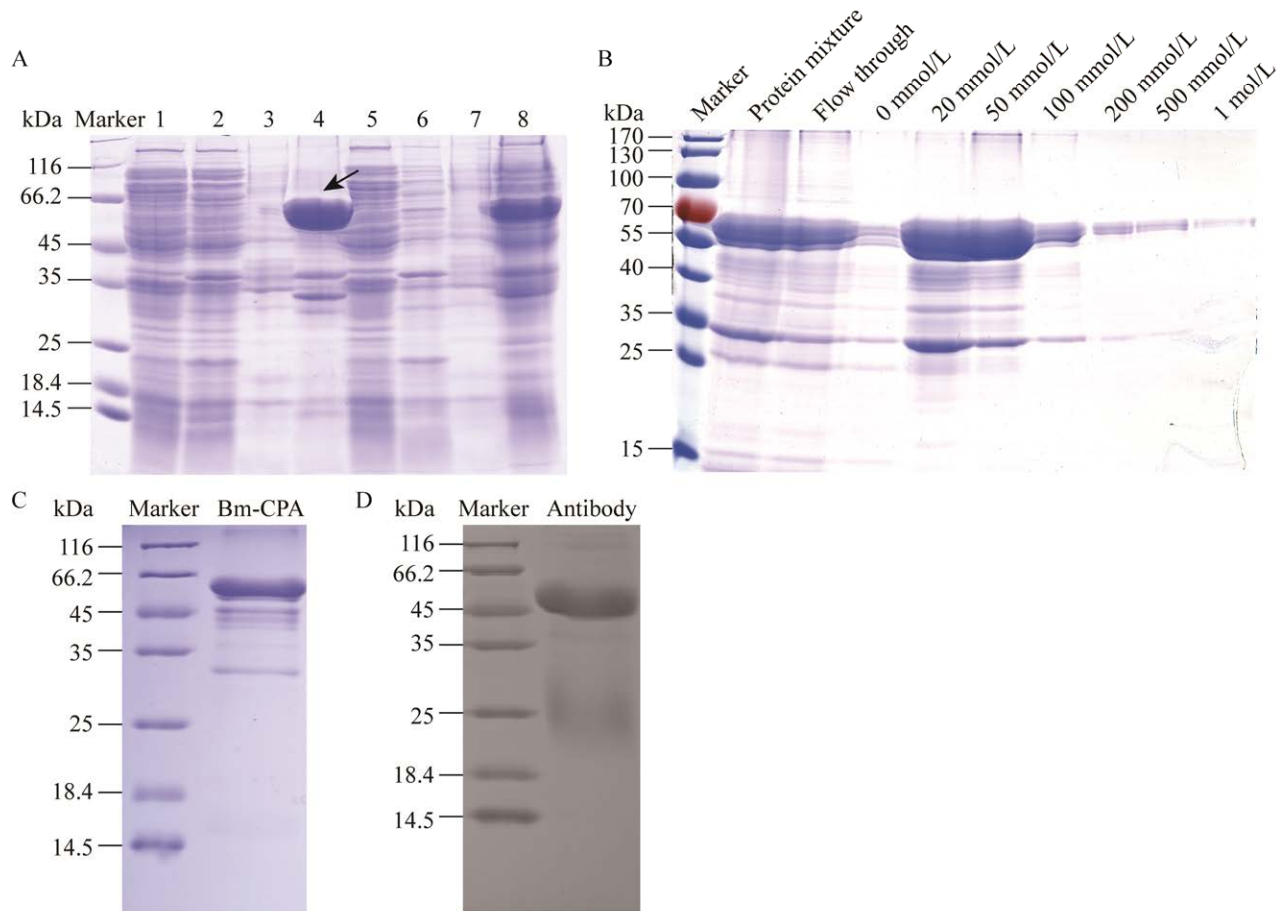


图 3 Bm-CPA 原核表达纯化与抗体制备 A: Bm-CPA 不同温度条件下诱导表达. 泳道 1-4: 37 °C 诱导条件; 泳道 5-8: 16 °C 诱导条件; 1&5: 对照上清; 2&6: 实验组上清; 3&7: 对照沉淀; 4&8: 实验组沉淀. B: Bm-CPA 大量表达纯化检测. C: 纯化后透析检测. D: 抗体检测

Figure 3 Prokaryotic expression, purification and antibody preparation of Bm-CPA. A: Expression of Bm-CPA at different temperature. Induced at 37 °C (lane 1-4) or 16 °C (lane 5-8); The supernatant of the control group (1&5) and the experimental group (2&6); The precipitation of the control group (3&7) and the experimental group (4&8). B: Purification of Bm-CPA by NTA column. C: Bm-CPA after dialysis in 100 mmol/L NaCl and 20 mmol/L Tris-HCl. D: Antibody detection of Bm-CPA.

表明 Bm-CPA 能够在 37 °C 条件下经过诱导以包涵体的形式大量表达。将菌株在该条件下进行放大培养表达, 结果显示: 目的蛋白 Bm-CPA 在 37 °C 下能够正常表达, 且经过镍柱纯化, Bm-CPA 主要在含有 20 mmol/L 和 50 mmol/L 浓度的咪唑洗脱液中被成功洗脱(图 3B)。随后对收集的蛋白进行透析浓缩, 透析后的蛋白浓度与盐浓度均符合抗体制备要求, 将其通过干

冰送至武汉金开瑞进行 Bm-CPA 的兔多克隆抗体制备, 制备结果显示制备成功, 可以正常使用(图 3C、3D)。

2.3 Bm-CPA 表达特征

为了探究 Bm-CPA 在家蚕各组织中的表达情况, 对家蚕 5 龄第 3 天和上簇第 1 天的各组织进行转录水平分析, 各组织的 qPCR 检测结果显示, 家蚕 Bm-CPA 在 5 龄第 3 天的转录水

平整体低于上簇第 1 天, Bm-CPA 能够在表皮、翅原基中高量表达, 且在上簇第 1 天的表皮中表达量明显高于其他组织; 利用制备的抗体进行 Western blotting 检测显示, 在蛋白水平上, Bm-CPA 在 5 龄第 3 天仅能够从翅原基中

检测到微弱表达, 而上簇第 1 天的表皮和翅原基中都可以检测到表达存在(图 4A、4B)。

为了探究 Bm-CPA 在表皮中的表达模式, 对家蚕不同时期的表皮组织 RNA 进行定量 PCR 实验, 结果表明: 从 1 龄蚁蚕开始, 家蚕

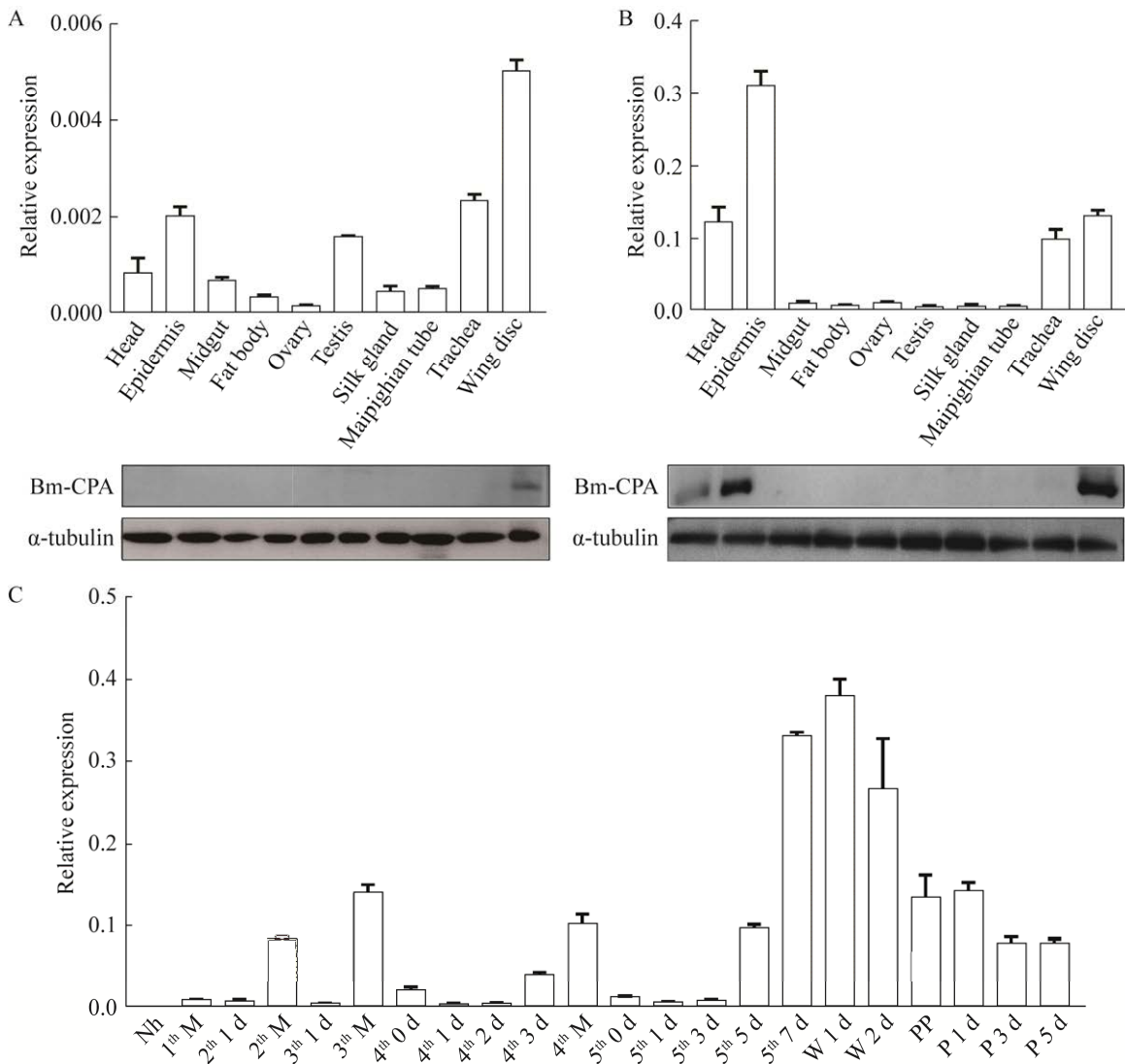


图 4 Bm-CPA 的组织表达特征分析 A: 家蚕 5 龄第 3 天各组织 Bm-CPA 转录水平. B: 家蚕上簇 1 d 各组织 Bm-CPA 转录水平. C: 家蚕 Bm-CPA 在表皮中的时期表达分析. Nh: 蚁蚕; 1th-5th: 1 龄到 5 龄蚕; W: 上簇期; PP: 预蛹期; P: 蛹期; 0 d: 起蚕未进食; 1 d、2 d、3 d、5 d、7 d: 第 1、2、3、5、7 天; M: 眠期

Figure 4 Analysis of tissue expression of Bm-CPA. A: Transcriptional analysis of Bm-CPA in tissues at day 3 of the 5th instar. B: Transcriptional analysis of Bm-CPA in different tissues at day 1 of wandering stage. C: Transcriptional analysis of Bm-CPA in epidermis at different developmental stages. Nh: Newly-hatched silkworm; 1th-5th: The 1th to 5th instar silkworm; W: Wandering stage; PP: Prepupal stage; P: Pupal stage; 0 d: Just molting silkworm hasn't been eating; 1 d, 2 d, 3 d, 5 d, 7 d: Day1, 2, 3, 5, 7; M: Molting stage.

摄食期 Bm-CPA 维持较低的表达量, 而在家蚕每龄眠期的表皮中 Bm-CPA 则会高量表达, 在上簇第 1 天表达量达到峰值, 随着化蛹蜕皮的完成表达量逐步降低, 且 1 龄到 4 龄期家蚕表皮中 Bm-CPA 的表达量整体低于 5 龄期家蚕(图 4C)。显示出随着家蚕龄期眠起的生长变化, Bm-CPA 的表达具备一定的规律性。

在家蚕的变态发育过程中, 蜕皮激素 20E 和保幼激素 JH 是最为重要的 2 个调控激素, 其中, 保幼激素 JH 主要维持了昆虫正常状态下的生长发育, 在每个龄期的过程中大量分泌, 并在下个龄期来临前迅速下降, 相反, 蜕皮激素 20E 则是在 2 个龄期过渡的过程中大量产生, 启动并调节昆虫的变态和蜕皮过程。在家蚕个体和 BmE 细胞中分别添加蜕皮激素 20E 和保幼激素 JH 进行诱导, 诱导结果显示: Bm-CPA 在添加 20E 处理的细胞和表皮中表达量有显著的上升, 而在添加了 JH 的处理组中细胞实验无显著性变化, 而在个体中有下降趋势, 证明蜕皮激素 20E 能够上调 Bm-CPA 的表达, 蛋白水平的检测也显示了同样的结果(图 5)。

2.4 Bm-CPA 免疫荧光定位

由于 Bm-CPA 在家蚕眠期的表皮中有较高的表达量, 而眠期表皮会在短暂的时间内发生剧烈的变化。为了确定 Bm-CPA 在家蚕眠期表皮中的定位情况, 对 4 龄眠期的表皮进行冷冻切片染色, 结果显示: 在家蚕进入眠期 6 h, Bm-CPA 能够在表皮层检测到微弱荧光, 随着家蚕眠期的逐步增长, 在眠后 18 h 的表皮中, 能够清晰观察到新旧表皮的分层, 新表皮逐渐增厚, Bm-CPA 在表皮层能够检测到明显的荧光强度(图 6), 表明 Bm-CPA 定位在表皮层, 且随着眠期程度的加深, 在蜕皮前含量逐步富集增多, 暗示 Bm-CPA 参与了家蚕的蜕皮过程。

2.5 Bm-CPA 对家蚕蜕皮的影响

为了探究 Bm-CPA 在家蚕蜕皮过程中的功能, 用商业化的羧肽酶 A 抑制剂(CPA inhibitor)对上簇期家蚕进行注射, 观察对其化蛹蜕皮的影响情况(图 7)。注射结果显示, 经过 CPA 抑制剂处理的家蚕与对照组相比, 出现化蛹延迟的现象, 并且随着注射的 CPA 抑制剂浓度提升, 延迟化蛹个体数明显提升, 且最终由于未

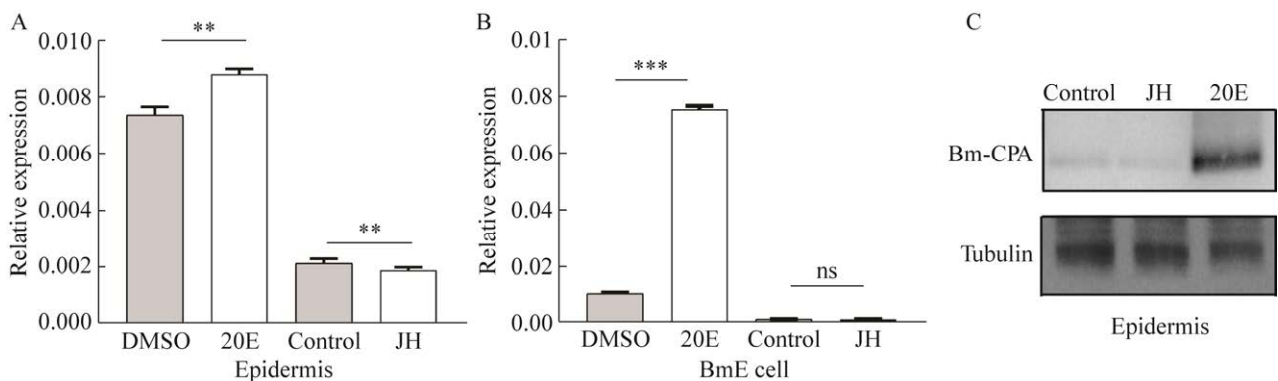


图5 激素处理对 Bm-CPA 的影响 20E: 蜕皮激素; JH: 保幼激素; DMSO: 二甲基亚砜; Control: 丙酮; ns: 无显著性差异(t 检验, **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$)

Figure 5 Effect of hormone treatment on the expression of Bm-CPA. 20E: 20-hydroxyecdysone; JH: Juvenile hormone; DMSO: Dimethyl sulfoxide; Control: Dimethyl ketone; ns: No significant difference (Student's t -test, **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$).

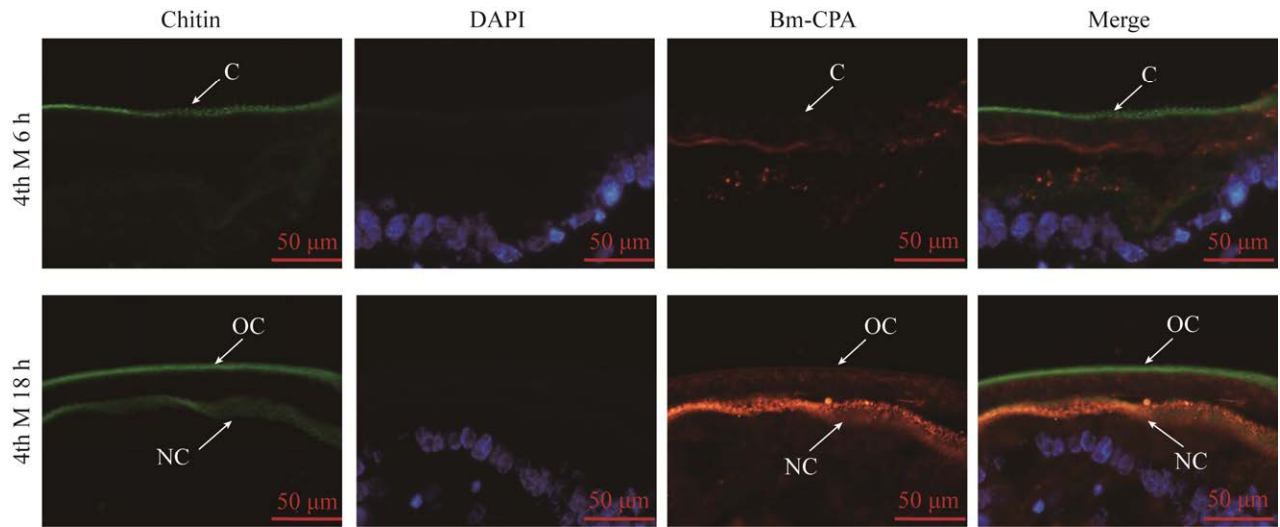


图 6 Bm-CPA 在表皮的免疫荧光定位 FITC 标记显示绿色荧光：几丁质；DAPI 染色显示蓝色荧光：细胞核；Cy3 标记显色红色荧光：Bm-CPA 蛋白；Merge：组合信号；C：表皮；OC：旧表皮；NC：新表皮；4th M：4 龄眠期

Figure 6 Immunofluorescence localization of Bm-CPA in epidermis. FITC labeled shows green fluorescence: Chitin; DAPI staining shows blue fluorescence: Nucleus; Cy3 labeled shows red fluorescence: Bm-CPA protein; Merge: Superposition of fluorescent; C: Epidermis; OC: Old epidermis; NC: New epidermis; 4th M: The 4th instar of molt.



图 7 不同浓度 CPA 抑制剂处理上簇期家蚕对化蛹蜕皮的影响

Figure 7 Effect of treating with different concentrations of CPA inhibitor at wandering stage on pupation molting.

能成功蜕皮化蛹而死亡的个体数也随之增加。该结果暗示, Bm-CPA 在家蚕蜕皮过程中对旧表皮的降解有着重要的作用。

为此, 取材正常生长期的家蚕表皮进行体外孵育实验, 结果显示: 当表皮在经过蜕皮液孵育后, 表皮的内皮层被降解消化, 表皮整体厚度明显变薄, 而在蜕皮液中添加了 CPA 抑制剂后, 孵育的表皮与正常表皮相比无明显变化(图 8), 进一步证明 Bm-CPA 参与了表皮的降解消化。

2.6 Bm-CPA 酵母表达

为了更好地在体外了解 Bm-CPA 的功能, 探究其活性形式, 采用毕赤酵母表达系统进行可溶性蛋白的表达。将成功筛选到的 pPICZ α A-Bm-CPA 酵母重组阳性株进行大量表达纯化, 结果显示: Bm-CPA 在大量表达中, 表达出两条分子量大小为 60 kDa 和 66 kDa 左右的主条带, 洗脱浓度从 50 mmol/L 咪唑浓度至 1 mol/L 咪唑浓度均有洗脱条带, 且 50 mmol/L 浓度下洗脱条带主要接近于 66 kDa, 而在 500 mmol/L 洗

脱的条带大小主要约为 60 kDa, 使用 Bm-CPA 抗体进行 Western blotting 检测, 这两条带均为 Bm-CPA (图 9)。随后使用 Protease Fluorescent Detection 试剂盒对获得的表达产物进行相对酶活测定, 结果并未发现活性反应产生。

3 讨论与结论

羧肽酶 A 是一种常见的肽链外切酶, 广泛应用于生产中, 对哺乳动物羧肽酶 A 的结构研究表明, 羧肽酶 A 首先以酶原的形式进行合成分泌, 经过胰蛋白酶的切割而激活, 主要通过锌羧肽酶结构域对蛋白羧基端的氨基酸残基进行降解执行功能^[15-17]。在昆虫体内羧肽酶往往在中肠消化道中存在, 进食后表达量显著上升, 主要起到消化食物、调节生长发育的功能^[18]。本研究发现的羧肽酶 A 在家蚕表皮中存在, 且在表皮组织中高量表达, 暗示与中肠中参与消化的羧肽酶功能不同。有研究报道, 在棉铃虫表皮中也检测到羧肽酶 A 存在, 其受到 20E 的调控上调表达, 参与到棉铃虫的蜕皮变态过程^[19];

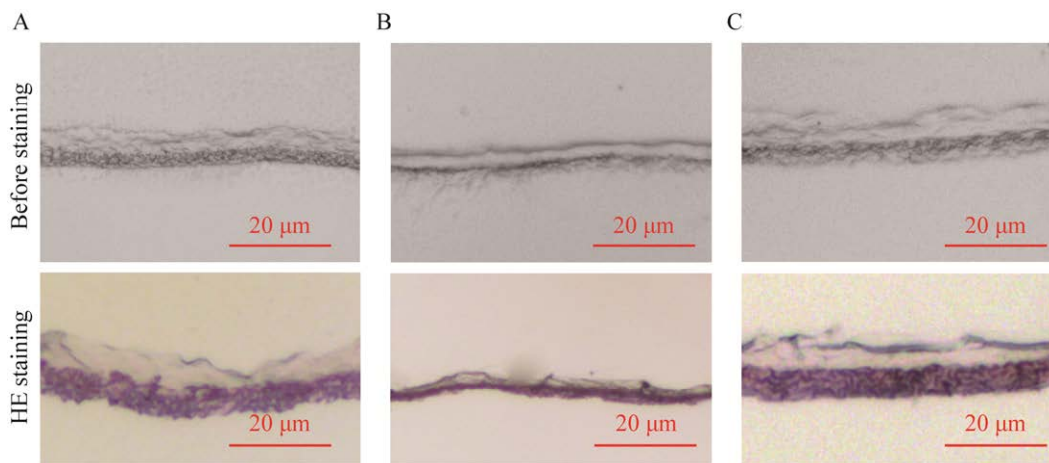


图 8 表皮体外孵育染色 A: 表皮未处理. B: 表皮与蜕皮液孵育. C: 表皮与蜕皮液和 CPA 抑制剂孵育

Figure 8 The epidermis was incubated and stained *in vitro*. A: Epidermis untreated. B: Epidermis incubated with molting fluid. C: Epidermis incubated with molting fluid and CPA inhibitor.

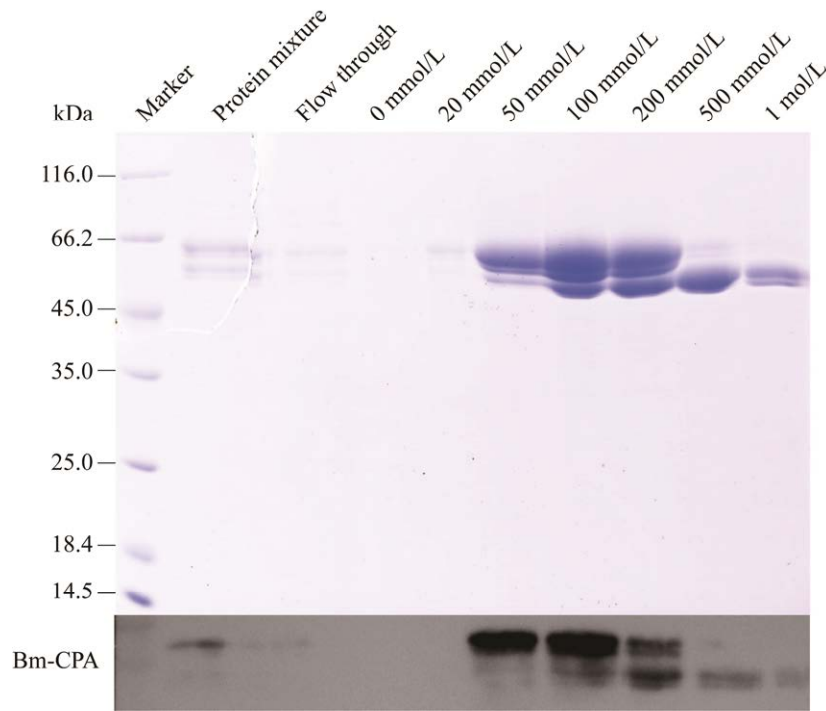


图9 Bm-CPA 毕赤酵母大量表达 Ni-NTA 纯化

Figure 9 Bm-CPA expressed in *Pichia pastoris* in large quantities and purified by Ni-NTA.

研究学者对棉铃虫蜕皮液羧肽酶 A 进化树分析显示, 其与 Bm-CPA 单独聚为一支, 说明二者在进化关系上比较接近, 推测功能上也更为相似^[19]。在亚洲飞蝗中干扰掉羧肽酶的上游转录因子则会导致个体出现蜕皮异常, 翅膀发育缺陷^[12], 暗示其羧肽酶对昆虫变态发育至关重要。

蜕皮过程是由昆虫蜕皮腺分泌蜕皮液协助完成, 蛋白酶被分泌至蜕皮液中。但是蛋白酶从表皮中合成后如何转运到蜕皮液, 在蜕皮液中活性是否被激活, 又是如何被调控, 这一过程值得思考。有组学研究鉴定到蜕皮液中还存在很多其他类型的酶类, 包括胰蛋白酶、组织蛋白酶等, 推测 Bm-CPA 在家蚕将要蜕皮前, 经过蜕皮激素 20E 诱导合成并分泌至蜕皮液中, 经过蜕皮液中的胰蛋白酶进行切割激活从而参与到表皮的降解, 行使功能后, 再通过降

解或者受抑制剂调节失去活性保证新表皮的正常合成。已经有大量报道研究分析了羧肽酶在哺乳动物中的激活机制, 在进行多序列比分析时发现, 相对于保守的羧肽酶活性结构域, Bm-CPA 在激活结构域变化明显^[16,20], 因此深入探究 Bm-CPA 的激活机制有助于对昆虫中相关蛋白酶功能的认识。

研究发现, 在原核表达实验中 Bm-CPA 以包涵体的形式存在, 无法很好地对其激活以及作用方式进行探究, 利用酵母表达系统, Bm-CPA 以可溶性的蛋白进行表达, 且具有极高的表达量, 虽在本研究中并未检测到活性, 可能是由于 Bm-CPA 具有前肽的保护未被激活^[21], 酵母高量表达的特征为后续的性质及激活机制研究奠定了基础。此外, 在预测的蛋白序列中, Bm-CPA 还存在着许多糖基化、磷酸化修饰位点, 这些位点在酵母表达中能够很好地体现出

来以便进一步研究。

在利用酵母表达系统对 Bm-CPA 表达的过程中发现, 其实际表达分子量要大于理论分子量且有两条大小相近的条带产生, 由于酵母表达对糖基化的修饰具有一定的偏好性, 结合序列分析的结果, 猜测 Bm-CPA 有可能因为糖基化的修饰导致其表达分子量增加。同时, 在 Bm-CPA 的信息分析中发现, 在锌羧肽酶结构域中存在 2 个潜在的糖基化位点, 推测可能修饰产生的糖链包裹 Bm-CPA 的活性位点使其无法与底物蛋白相结合, 从而影响活性的发挥。同时在实验过程中还发现, 利用酵母表达纯化的 Bm-CPA 蛋白进行免疫抗体实验, 血清中并未有相应的效价产生, 更加深了对糖基化修饰的糖链包裹 Bm-CPA 蛋白从而影响其相关活性功能这一猜测的认识。

综上所述, 本研究对 Bm-CPA 进行了表达分析, 初步了解其在家蚕体内发挥的作用, 该结果为研究家蚕蜕皮期间的变态发育过程提供了一定的参考。同时, 后期准备利用基因编辑手段对 Bm-CPA 进行敲除, 探究其对家蚕个体的影响以及相关表皮蛋白的变化, 为农业害虫防治提供生物学靶标。

REFERENCES

- [1] MERZENDORFER H, ZIMOCH L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases[J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2003, 206(Pt 24): 4393-4412.
- [2] ZHU QS, ARAKANE Y, BEEMAN RW, KRAMER KJ, MUTHUKRISHNAN S. Functional specialization among insect chitinase family genes revealed by RNA interference[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(18): 6650-6655.
- [3] QU MB, MA L, CHEN P, YANG Q. Proteomic analysis of insect molting fluid with a focus on enzymes involved in chitin degradation[J]. *Journal of Proteome Research*, 2014, 13(6): 2931-2940.
- [4] ZHANG J, LU AR, KONG LL, ZHANG QL, LING EJ. Functional analysis of insect molting fluid proteins on the protection and regulation of ecdysis[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(52): 35891-35906.
- [5] SAMUELS RI, CHARNLEY AK, REYNOLDS SE. A cuticle-degrading proteinase from the molting fluid of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1993, 23(5): 607-614.
- [6] WEI Z, YIN YP, ZHANG BS, WANG ZK, PENG GX, CAO YQ, XIA YX. Cloning of a novel protease required for the molting of *Locusta migratoria manilensis*[J]. *Development, Growth & Differentiation*, 2007, 49(7): 611-621.
- [7] CHAUDHARI SS, ARAKANE Y, SPECHT CA, MOUSSIAN B, KRAMER KJ, MUTHUKRISHNAN S, BEEMAN RW. Retroactive maintains cuticle integrity by promoting the trafficking of Knickkopf into the procuticle of *Tribolium castaneum*[J]. *PLoS Genetics*, 2013, 9(1): e1003268.
- [8] CHAUDHARI SS, ARAKANE Y, SPECHT CA, MOUSSIAN B, BOYLE DL, PARK Y, KRAMER KJ, BEEMAN RW, MUTHUKRISHNAN S. Knickkopf protein protects and organizes chitin in the newly synthesized insect exoskeleton[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(41): 17028-17033.
- [9] LIU HW, WANG LL, TANG X, DONG ZM, GUO PC, ZHAO DC, XIA QY, ZHAO P. Proteomic analysis of *Bombyx mori* molting fluid: insights into the molting process[J]. *Journal of Proteomics*, 2018, 173: 115-125.
- [10] SIDYELYEVA G, BAKER NE, FRICKER LD. Characterization of the molecular basis of the *Drosophila* mutations in carboxypeptidase D[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(19): 13844-13852.
- [11] DEITSCH KW, CHEN JS, RAIKHEL AS. Indirect control of yolk protein genes by 20-hydroxyecdysone in the fat body of the mosquito, *Aedes aegypti*[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1995, 25(4): 449-454.
- [12] ZHAO XM, QIN ZY, ZHANG J, YANG Y, JIA P, YANG Q, MA EB, ZHANG JZ. Nuclear receptor hormone receptor 39 is required for locust moulting by regulating the chitinase and carboxypeptidase genes[J]. *Insect Molecular Biology*, 2019, 28(4): 537-549.
- [13] YE JH, LI Y, LIU HW, LI JF, DONG ZM, XIA QY, ZHAO P. Genome-wide identification and

- characterization of carboxypeptidase genes in silkworm (*Bombyx mori*)[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(8): 1203.
- [14] HOU Yong, YANG LZ, XU SP, ZHANG YH, CHENG YJ, LI Y, GONG J, XIA QY. Trypsin-type serine protease p37k hydrolyzes CPAP3-type cuticle proteins in the molting fluid of the silkworm *Bombyx mori*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2021, 137: 103610.
- [15] NEURATH H. Proteolytic processing and physiological regulation[J]. Trends in Biochemical Sciences, 1989, 14(7): 268-271.
- [16] VENDRELL J, CUCHILLO CM, AVILÉS FX. The tryptic activation pathway of monomeric procarboxypeptidase A[J]. Journal of Biological Chemistry, 1990, 265(12): 6949-6953.
- [17] MAKINEN MW, WELLS GB, KANG SO. Structure and mechanism of carboxypeptidase A[J]. Advances in Inorganic Biochemistry, 1984, 6: 1-69.
- [18] EDWARDS MJ, MOSKALYK LA, DONNELLY-DOMAN M, VLASKOVA M, NORIEGA FG, WALKER VK, JACOBS-LORENA M. Characterization of a carboxypeptidase A gene from the mosquito, *Aedes aegypti*[J]. Insect Molecular Biology, 2000, 9(1): 33-38.
- [19] SUI YP, LIU XB, CHAI LQ, WANG JX, ZHAO XF. Characterization and influences of classical insect hormones on the expression profiles of a molting carboxypeptidase A from the cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*)[J]. Insect Molecular Biology, 2009, 18(3): 353-363.
- [20] CHAPUS C, KERFELEC B, FOGLIZZO E, BONICEL J. Further studies on the activation of bovine pancreatic procarboxypeptidase A by trypsin[J]. European Journal of Biochemistry, 1987, 166(2): 379-385.
- [21] BOON L, UGARTE-BERZAL E, VANDOOREN J, OPDENAKKER G. Protease propeptide structures, mechanisms of activation, and functions[J]. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 2020, 55(2): 111-165.

(本文责编 郝丽芳)