

密级：

论文编号：

中国农业科学院 学位论文

蓖麻蚕体液胰凝乳蛋白酶抑制剂调查及其
基因克隆

**Studies on Polymorphism and Gene Cloning of
Chymotrypsin Inhibitors from Haemolymph of eri
silkworm, *Philosamia cynthia ricini***

硕 士 研 究 生：赵秀振

指 导 教 师：赵巧玲 研究员

申 请 学 位 类 别：农学硕士

专 业：特种经济动物饲养

研 究 方 向：蚕分子生物学

培 养 单 位：中国农业科学院研究生院

中国农业科学院蚕业研究所

提交日期 2007 年 6 月

Secrecy:

No.

Chinese Academy of Agricultural Sciences
Master Dissertation

**Studies on Polymorphism and Gene Cloning of
Chymotrypsin Inhibitors from the Haemolymph of eri
silkworm, *Philosamia Cynthia ricini***

Ms. Candidate: Zhao xiu-zhen

Advisor: Zhao qiao-ling (Professor)

Major: The Rearing of Special-type Economic
Animals

Specialty: Molecular Biology of Silkworm

Chinese Academy of Agricultural Sciences

June, 2007

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：

时间： 年 月 日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

论文作者签名：

时间： 年 月 日

导师签名：

时间： 年 月 日

中国农业科学院

硕士学位论文评阅人、答辩委员会名单表

论文题目		蓖麻蚕血液胰凝乳蛋白酶抑制剂调查及其基因克隆				
论文作者		赵秀振	专 业	特种经济动物饲养	研究方向	蚕分子生物学
指导教师		赵巧玲		培养单位（研究所）	蚕业研究所	
姓名		职称	硕(博)导师	单 位	专 业	签 名
评 阅 人	贡成良	教授	硕导□ 博导■	苏州大学	蚕分子生物学	
	李奕仁	研究员	硕导□ 博导■	中国农业科学院蚕业研究所	特种经济动物饲养	
答 辩 主 席	郭锡杰	研究员	硕导□ 博导■	中国农业科学院蚕业研究所	特种经济动物饲养	郭锡杰
答 辩 委 员	张国政	研究员	硕导■ 博导□	中国农业科学院蚕业研究所	蚕生物化学与分子生物学	张国政
	沈兴家	研究员	硕导□ 博导■	中国农业科学院蚕业研究所	蚕生物化学与分子生物学	沈兴家
	王文兵	副教授	硕导■ 博导□	江苏大学	昆虫和病毒基因、肿瘤基因	王文兵
	唐玉斌	副教授	硕导■ 博导□	江苏科技大学	环境工程	唐玉斌
			硕导□ 博导□			
			硕导□ 博导□			
			硕导□ 博导□			
会议记录（秘书）		任永利				
论文答辩时间地点		2007年6月14日下午，江苏省镇江市				

摘要

蛋白酶抑制剂在自然界中无处不在，它们以多种形式存在于动物、植物甚至微生物的各种组织中，主要的生理功能是防止不必要的蛋白水解。胰凝乳蛋白酶抑制剂（CI）是丝氨酸蛋白酶抑制剂的一种，对维持昆虫正常的生长发育起着重要的作用。同时也是昆虫体内非细胞免疫系统的重要组成部分。蓖麻蚕是我国三大产丝昆虫之一，对其体内胰凝乳蛋白酶抑制剂的研究不但有助于蓖麻蚕本身生理、生化的研究，也必将对其他野生鳞翅目昆虫生理、生化的研究产生重要意义。

本研究通过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和活性染色技术，对 20 个蓖麻蚕品种血液 CI 的种类和同一品种不同发育时期 CI 活性变化进行了调查。由于各种 CI 等电点不同，引起迁移速度有快慢，在碱性电泳中检测到 7 种 CI，定名为 E-CI1、E-CI2、E-CI3、E-CI4、E-CI5、E-CI6、E-CI7，等电点依次减小；在酸性电泳中检测到 2 种 CI，定名为 E-CIa、E-CIb。其中 E-CI1、E-CI2、E-CI3、E-CI6、E-CI7、E-CIa、E-CIb 为供试品种所共有，表明它们是蓖麻蚕生长发育所必需的。对同一蓖麻蚕品系不同发育时期血液 CI 的调查显示，随 5 龄期发育，CI 的活性有逐渐递增的趋势。

根据家蚕中编码成熟 CI-b1 的 cDNA 序列设计引物，利用 RT-PCR 技术，对 8 个蓖麻蚕品种的 CI 基因进行了克隆。结果在 8 个品种中克隆的基因相同，基因序列长为 189bp，预测编码 62 个氨基酸残基的成熟蛋白，对蛋白结构预测表明该蛋白有一个典型的 Kunitz 结构域。核苷酸序列同源性比较显示，克隆的序列包含了编码家蚕成熟 CI-b1 的完整核酸序列。

将蓖麻蚕 *E-CI* 基因克隆到表达载体 pET28a 中，转化大肠杆菌表达菌株 BL21（DE3），并用 IPTG 诱导重组蛋白表达，超声裂解后经 SDS-PAGE 检测，诱导的重组蛋白主要以包涵体的形式存在，融合蛋白的分子量大约为 15kD，最佳诱导时间为 8 小时。

关键词：蓖麻蚕，胰凝乳蛋白酶抑制剂，非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳，基因克隆

Abstract

Protein inhibitors of proteinases are ubiquitous. They present in multiple forms in numerous tissues of animals and plants, as well as in microorganisms. Their primary physiological function is the prevention of unnecessary proteolysis. Chymotrypsin inhibitor (CI) is one class of serine proteinase inhibitors, which play a major role in regulating the proteinase activity in the insect haemolymph. CI is essential to life, and multiple forms of CI are major factors in insect innate immune system. Eri silkworm, *Philosamia cynthia ricini*, is one of the three major spun silk insects in our country. The investigation on chymotrypsin inhibitors in their haemolymph will benefit to elucidate the physiological and biochemical process and relative research on other lepidopteran insects.

Using the method of acid and alkaline native polyacrylamide gel-electrophoresis followed by activity staining, the distribution of CI polymorphism in twenty strains of eri silkworm and the changes of CI activity in different developmented stages were investigated. Based on the different isoelectric points resulted in different migration rates, 7 types of CIs were detected by alkaline native-PAGE, which were designated as E-CI1, E-CI2, E-CI3, E-CI4, E-CI5, E-CI6 and E-CI7, respectively. Two types of CIs were detected by acid native-PAGE, which were designated as E-CIa and E-CIb. Among the detected CIs, 7 types including E-CI1, E-CI2, E-CI3, E-CI6, E-CI7, E-CIa and E-CIb existed in all tested strains, suggesting that they are essential to normal physiological actions of eri silkworm larvae. In different developmental stages the actimeity of CIs from the same strain revealed that CIs gradually increased along with the development of larvae in the fifth instar.

The specific primers were designed based on the sequence of cDNA encoding a mature CI-b1 in silkworm, *Bombyx mori*. The whole RNAs from 8 strains of eri silkworm were used as templates. *E-CI* genes were cloned by RT-PCR method. The sequence analyses of the 8 cloned *E-CI* genes showed that they were the same gene and 189bp in length, which encodes a putative mature protein of 62 amino acid residues. Prediction of protein profile reveaks this protein harbors a Kunitz domain. Cluster W alignment indicated that the nucleotide sequence of the cloned gene include the sequence of *Bombyx mori* which encode mature CI-b1.

Then the *E-CI* was subcloned to pET28a, the prokaryotic expression plasmids. The recombinant expression plasmid was constructed to express the recombinant protein in *E. coli* BL21. The result of SDS-PAGE indicated that the expressed protein is presented in the form of inclusion bodies. MW of the fusion protein induced was about 15 kD and the optimum inducing period was 8 hours.

Key word: Eri silkworm, *Philosamia cynthia ricini*, Chymotrypsin inhibitor, Native polyacrylamide gel-electrophoresis, Gene cloning

目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 蛋白酶抑制剂研究背景.....	1
1.2 蛋白酶抑制剂的研究进展.....	1
1.2.1 蛋白酶抑制剂的分类.....	1
1.2.2 蛋白酶抑制剂的研究与应用.....	2
1.2.2.1 蛋白酶抑制剂在动物中的研究与应用.....	2
1.2.2.2 植物蛋白酶抑制剂的研究与应用.....	3
1.2.2.3 昆虫蛋白酶抑制剂的研究与应用.....	4
1.3 胰凝乳蛋白酶抑制剂研究进展.....	5
1.3.1 胰凝乳蛋白酶.....	5
1.3.2 胰凝乳蛋白酶抑制剂.....	5
1.3.3 胰凝乳蛋白酶抑制剂的研究.....	6
第二章 研究的目的和意义.....	9
第三章 材料和方法.....	10
3.1 实验材料.....	10
3.1.1 蓖麻蚕品种.....	10
3.1.2 质粒和菌种.....	10
3.1.3 酶试剂及试剂盒.....	10
3.1.4 细菌培养基.....	10
3.1.5 常用溶液和缓冲溶液.....	10
3.1.6 主要实验仪器和设备.....	13
3.2 常规实验方法.....	14
3.2.1 蓖麻蚕血液的收集.....	14
3.2.2 RNA 提取.....	14
3.2.3 RT-PCR.....	14
3.2.4 碱法少量提取质粒 DNA.....	15
3.2.5 限制性内切酶反应.....	15
3.2.6 DNA 片段的分离与回收.....	16
3.2.7 DNA 的连接.....	16
3.2.8 质粒 DNA 的转化.....	16
3.2.9 重组质粒的鉴定.....	17
3.2.10 活性聚丙烯酰胺凝胶电泳.....	17

3.2.11 SDS-PAGE 电泳.....	17
第四章 蓖麻蚕血液中胰凝乳蛋白酶抑制剂多型性研究.....	19
4.1 材料与方法.....	19
4.1.1 材料及主要试剂.....	19
4.1.2 方法.....	19
4.2 结果与分析.....	20
4.2.1 蓖麻蚕血液中 CI 的种类.....	20
4.2.2 蓖麻蚕不同发育阶段血液 CI 活性的变化.....	21
4.2.3 蓖麻蚕与家蚕血液电泳图谱比较.....	22
4.3 讨论.....	23
第五章 蓖麻蚕血液中 CI 基因克隆及序列分析.....	25
5.1 材料和方法.....	25
5.1.1 实验材料、菌种、载体和试剂.....	25
5.1.2 方法.....	25
5.1.2.1 脂肪体总 RNA 的提取.....	25
5.1.2.2 引物设计.....	26
5.1.2.3 RT-PCR.....	26
5.1.2.4 目的片段的纯化和回收.....	26
5.1.2.5 重组载体的构建.....	26
5.1.2.6 序列分析.....	27
5.2 结果与分析.....	27
5.2.1 脂肪体 RNA 的提取.....	27
5.2.2 RT-PCR 扩增结果.....	27
5.2.3 基因克隆.....	28
5.2.4 序列分析.....	28
5.3 讨论.....	30
第六章 蓖麻蚕胰凝乳蛋白酶抑制剂基因的原核表达.....	32
6.1 材料和方法.....	32
6.1.1 实验材料.....	32
6.1.2 实验方法.....	32
6.1.2.1 重组表达载体的构建.....	32
6.1.2.2 重组蛋白的诱导表达及表达形式的检测.....	32
6.1.2.3 表达条件的优化.....	32
6.2 结果与分析.....	33
6.2.1 表达载体的构建.....	33
6.2.2 重组蛋白的诱导表达.....	33

6.2.3 蛋白表达量与表达条件的关系.....	33
6.3 讨论.....	34
第七章 全文结论.....	36
7.1 蓖麻蚕体液中胰凝乳蛋白酶抑制剂种类的调查.....	36
7.1.1 胰凝乳蛋白酶蛋白酶抑制剂的种类.....	36
7.1.2 发育时期的调查.....	36
7.1.3 与家蚕胰凝乳蛋白酶抑制剂的对比调查.....	37
7.2 胰凝乳蛋白酶抑制剂的基因克隆和序列分析.....	37
7.3 克隆基因的表达.....	37
参考文献.....	38
致 谢.....	42
作 者 简 历.....	43

英文缩略表

英文缩写	英文全称	中文名称
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid	二水乙二胺四乙酸二钠
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside	异丙基硫代-β-D 半乳糖苷
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基磺酸钠
DTT	DL-Dithiothreitol	二硫苏糖醇
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis	变性聚丙烯酰胺凝胶电泳
TE	Tris • CL and EDTA buffer	Tris • CL 和 EDTA 缓冲液
Native-PAGE	Native-Polyacrylamide Gel Electrophoresis	非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳
PI	Proteinase Inhibitor	蛋白酶抑制剂
CI	Chymotrypsin Inhibitor	胰凝乳蛋白酶抑制剂
TI	Trypsin Inhibitor	胰蛋白酶抑制剂
UTI	Urinary Trypsin Inhibitor	尿胰蛋白酶抑制剂
CPTI	Cowpea Trypsin Inhibitor	豇豆蛋白酶抑制剂
HIV	Human Immunodeficiency Virus	人类免疫缺陷病毒
RT-PCR	Reverse transcription-polymerase	反转录—聚合酶链式反应
PCR	Polymerase chain reation	聚合酶链式反应
min	minute	分钟
rpm	Revolutions per minute	转/分
μ L	microlitre	微升
m L	milimeter	毫升
sec	seconds	秒
h	hour	小时
OD	Optical density	吸光值
cDNA	Complement deoxyribonucleic acid	互补脱氧核糖核酸
mRNA	Message ribonucleic acid	信使核糖核酸
bp	Base pair	碱基对
kD	kilo Dalton	千道尔顿
Amp ^r	Ampicillin resistant	安苄青霉素抗性
Kan ^r	Kanamycin resistant	卡那霉素抗性

第一章 绪论

1.1 蛋白酶抑制剂研究背景

蛋白酶(Proteinases)几乎在所有的生物体内都发挥着重要作用。Hans[Hans et al,1975]认为蛋白酶不仅仅是一种消化酶,而且在组织和器官中具有更多的功能;他指出,蛋白酶对生物体是有益的,但也存在着危险性。为了避免这种危险的产生,机体自身形成许多调控机制,其中蛋白酶抑制剂(Proteinase Inhibitors, PI)是研究的最多、最广泛、最重要的一种调控机制。蛋白酶抑制剂与蛋白酶一样,是自然界含量最为丰富的蛋白种类之一,一般分子量都很小,广泛分布在动物、植物甚至微生物中[Laskowski et al,1980]。1936年 Kunitz 和 Northrop [Kunitz and Northrop et al,1936]首次从牛的胰脏(bovine pancreatic)中分离一种碱性蛋白酶抑制因子(basic pancreatic trypsin inhibitor,BPTI),之后又从大豆中分离了一种胰蛋白酶抑制因子,并将其纯化结晶,证明了两种均为蛋白质,由此揭开了蛋白酶抑制剂研究的序幕。

1.2 蛋白酶抑制剂的研究进展

1.2.1 蛋白酶抑制剂的分类

蛋白酶抑制剂是对蛋白水解酶有抑制活性的一种小分子蛋白质或多肽,是蛋白酶的一种基质,它能够与酶的活性部位和变构部位结合,形成稳定的复合物,从而抑制酶的催化活性或阻止酶原转化为有活性的酶。在生物体内一系列的生理、病理过程,如对凝血、纤溶、补体活化、感染、细胞迁移等方面发挥着关键性的调控作用,同时也是生物体内免疫系统的重要组成部分。迄今为止,根据蛋白酶抑制剂所作用的酶的活性基团的不同及其氨基酸序列的同源性,可将蛋白酶抑制剂分为四类[曲小华等,2003]:对胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶有抑制作用的丝氨酸(serine)蛋白酶抑制剂,对木瓜蛋白酶、无花果蛋白酶有抑制作用的巯基(cysteine)蛋白酶抑制剂,对胶原酶起抑制作用的金属(metallo)蛋白酶抑制剂,抑制胃蛋白酶的酸性(Aspartic)蛋白酶抑制剂。其中丝氨酸蛋白酶抑制剂在自然界中分布的最为广泛,因此对其研究的也最多,目前在其作用机理、氨基酸序列及X光晶体衍射图谱方面都研究的比较清楚。这类抑制剂的数量最多,根据序列同源性特别是活性中心的位置及半胱氨酸数目和二硫键所形成的架桥结构又被分为至少16个家族[Bode, et al,1992]。Bowman-Birk 家族、Kunitz 家族、PI-I 和 PI-II 家族研究的最多。Bowman-Birk 家族蛋白酶抑制剂是丝氨酸蛋白酶抑制剂的主要类型,它的分子内通常含有7对二硫键,具有两个相同或不同的蛋白酶作用的活性中心。目前应用最多的 Bowman-Birk 家族蛋白酶抑制剂基因是豇豆胰蛋白酶抑制剂基因(Cowpa Trypsin Inhibitor, *CpTI*),它有两个抑制活性中心,可同时竞争性抑制两个胰蛋白酶分子。Kunitz 家族蛋白酶抑制剂三维结构高度保守:由

一个明显的疏水核心、三对高度保守的二硫键架桥、三链 β -折叠和一个N端螺旋以及一个C端的 α -螺旋[袁春华,梁宋平, 2003]。PI-I和PI-II家族是一类创伤诱导类型表达的蛋白酶抑制剂[Plunkett G et al,1982]。其中PI-I家族包括马铃薯蛋白酶抑制剂I(Potato proteinase inhibitor I, PI-I),只有一个活性中心,主要抑制胰凝乳蛋白酶。PI-II家族包括马铃薯蛋白酶抑制剂II(potato proteinase inhibitor II, PI-II)和番茄蛋白酶抑制剂II(tomato proteinase inhibitor II, TI-II),有两个活性中心,可同时抑制胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶。

由于丝氨酸蛋白酶抑制剂的活性位点的突变频率比较高,所以导致抑制剂特性的变化,同时显示了这些突变体可能对机体的防御系统有重要的调节作用,因此,它们在哺乳动物、植物和昆虫中被研究的最多,并且在许多领域得以开发和应用。

1.2.2 蛋白酶抑制剂的研究与应用

1.2.2.1 蛋白酶抑制剂在动物中的研究与应用

高等动物的血液中存在多种蛋白酶抑制剂,每100 mL的血清中,各种蛋白酶抑制剂的总量超过200 mg[Laskowski et al,1980]。通常认为,血液中存在的高含量的抑制剂对血液的凝结和其他蛋白水解的形成进程如激素的产生、释放和补体的定位具有重要的作用。广谱的蛋白酶抑制剂可抑制体内广泛分布的丝氨酸蛋白酶活性,起到调节炎症细胞因子释放、抑制血细胞激活和白细胞跨内皮迁移、减少炎症细胞浸润以及组织毒性物质释放等作用,表现为多层次的抗炎效应。近年来的研究发现蛋白酶抑制剂能通过抗过氧化反应、抗蛋白水解、保存细胞能量、抑制炎症介质释放等多种方式发挥功效,减轻器官损伤和炎症损伤。

蛋白酶抑制剂具有抗炎抗感染的作用。在临床上应用最广的主要是胰蛋白酶抑制剂(Trypsin Inhibitor, TI),主要有:人尿胰蛋白酶抑制剂(Urinary Trypsin Inhibitor, UTI)、从牛肺或牛胰脏中提取的抑肽酶(Aprotinin)、及人工合成的假黄酸胍己苯酯及衍生物。其中UTI能抑制许多对急性胰腺炎起关键作用的酶,如胰蛋白酶、磷脂酶A、胰凝乳蛋白酶及弹性蛋白酶等,并能抑制溶酶体酶,稳定溶酶体膜,从而起到保护胰腺的作用;UTI还有抑制脑血管通透性增高的作用,防止脑血管破裂后迟发性脑血管痉挛,预防肺、脑缺血再灌注引起的损伤[凌贤龙, 1992]。动物脏器中提取的抑肽酶是一特异性的蛋白酶抑制剂,在临床上用于治疗胰腺炎,肺气肿,脑水肿,脑、肺、肠缺血再灌注损伤,心脏,子宫等术后出血,烧、烫伤外用及肿瘤的辅助性治疗[蔡祖花,2000]。

蛋白酶抑制剂有抗病毒感染的作用,可抑制HIV的成熟、感染新细胞及复制所必需的蛋白前体的裂解,阻止病毒前体多聚蛋白质的分裂,并干扰新的病毒颗粒的成熟,使HIV产生出不太成熟、无感染性的病毒颗粒,并导致病毒繁殖的停止,阻止病毒的几率约99%。同时由于病毒颗粒仍处于未成熟状态中,故可延迟在HIV细胞间的蔓延。人巨细胞病毒(HCMV)属B家族疱疹病毒,HCMV蛋白酶为丝氨酸蛋白酶类,在装配蛋白产生和病毒壳体成熟中有重要作用,所以HCMV蛋白酶抑制剂是最有前景的抗病毒类药物。

此外,蛋白酶抑制剂还可阻止发生新的感染病灶,延缓疾病的进展。主要表现在抗肿瘤方面,如从人尿中提取的胰蛋白酶抑制剂可与肿瘤细胞上的QTI受体结合,调节纤维蛋白酶的活性,从而抑制肿瘤细胞的浸润和转移。抑肽酶也可以作为肿瘤的辅助治疗药物。巯基蛋白酶抑制剂可对

胃癌体外侵袭转移具有抑制作用[沈洁等, 1999]。

在禽类的蛋清中也存在蛋白酶抑制剂——卵类粘蛋白和卵清蛋白酶抑制剂。卵类粘蛋白可抑制猪、羊和牛的胰蛋白酶的活性, 但对人的胰蛋白酶活性无抑制作用。卵清蛋白酶抑制剂可抑制牛和羊的胰蛋白酶及糜蛋白酶的活性。它们的存在可以防止蛋白质的分解, 阻止细菌在蛋中繁殖, 因而具有保护蛋黄和卵胚的作用。它们也是摄食生禽蛋后不易消化和易引起腹泻的原因。

1.2.2.2 植物蛋白酶抑制剂的研究与应用

来自植物天然的蛋白酶抑制剂基因本身就是植物对害虫及病原菌侵染的一种天然防御体系。早在 1947 年, Mickel 和 Standish 发现有些昆虫在取食大豆后就不能正常生长、发育。之后 Birk 从大豆中分离出一种抑制物, 证明是一种胰蛋白酶抑制剂, 这一发现启示人们蛋白酶抑制剂可以作为一种新的抗虫物质, 从此人们开始了对蛋白酶抑制剂抗虫的研究。

表 1.1 植物蛋白酶抑制剂及其转基因作物

Table 1.1 Proteinase inhibitors from plant and transgenic crops

蛋白酶抑制剂	靶标害虫	获得的转基因作物
C-II (大豆丝氨酸蛋白酶抑制剂)	鞘翅目、鳞翅目	烟草、马铃薯、番茄、油菜
Cme (大麦胰蛋白酶抑制剂)	鳞翅目	烟草
CMTI (南瓜胰蛋白酶抑制剂)	鳞翅目	烟草
CpTi (豇豆胰蛋白酶抑制)	鞘翅目、鳞翅目、直翅目	烟草、马铃薯、番茄、甘薯、水稻、油菜
MTI-2(芥菜丝氨酸蛋白酶抑制剂)	鳞翅目	烟草、拟南芥
CO-1 (水稻巯基蛋白酶抑制剂)	鞘翅目、同翅目	烟草、油菜
PI-IV(大豆丝氨酸蛋白酶抑制剂)	鳞翅目	烟草、马铃薯
PI-I(马铃薯蛋白酶抑制剂 I)	鳞翅目、直翅目	烟草
PI-II(马铃薯蛋白酶抑制剂 II)	鳞翅目、直翅目	烟草、水稻
SKTI,Kti3 (大豆 Kunitz 型蛋白酶抑制剂)	鳞翅目	烟草、马铃薯
TI-I、II(番茄蛋白酶抑制剂 I、II)	鳞翅目	烟草、番茄
GTP-I (海芋蛋白酶抑制剂)	鳞翅目	烟草

植物的叶片在正常情况下蛋白酶抑制剂的含量很低, 当它受到虫害或机械损伤时, 其含量可在几小时内明显增加, 主要是植物在受到虫害或病原菌侵害时, 诱导了某些组织产生蛋白酶抑制剂, 这些抑制剂能影响昆虫消化道内蛋白酶的分泌, 从而抑制害虫对植物组织的食用[Cordero,et al,1994], 是一类特殊的组织创伤诱导型表达蛋白酶抑制剂, 这种诱导表达贯穿着植物的一生, 但是它的诱导能力随着植物体的成熟日益减弱[Jongsma,et al 1995], 这是植物体在生长和繁殖之间所寻求的一种平衡。植物体幼小时, 虫害对它来说是致命的, 所以它只能合成大量的蛋白酶抑制剂, 如许多植物的种子、果实、以及一些块根、块茎中都含有大量的蛋白酶抑制剂。对食性比较专一的食草性害虫而言, 由于体内蛋白酶的单一, 容易受到蛋白酶抑制剂的作用, 而杂食性害虫, 其体内有多种蛋白水解酶, 不异受到蛋白酶抑制剂的抑制。Tanja 研究表明, 蛋白酶抑制剂影响昆虫神经系统、免疫系统和蜕皮过程, 因此蛋白酶抑制剂是最有优势的作物抗性基因。自

从 1987 年英国 Durham 大学 Hider 等人利用农杆菌叶盘转化法,首次将豇豆蛋白酶抑制剂(cowpea trypsin inhibitor CpTI)的 cDNA 转化到烟草植株中并获得抗虫转基因植物以来,到目前为止,至少有 15 种不同来源的蛋白酶抑制剂的 cDNA 被克隆。其中主要是丝氨酸蛋白酶抑制剂,因为许多昆虫尤其是鳞翅目昆虫肠道中主要的消化蛋白酶是丝氨酸蛋白酶。(表 1.1 列举了一些已被克隆的植物蛋白酶抑制剂基因和转基因植物)。实验证明这些转基因植株对昆虫都有明显的抗性。尤其是 CpTI 的抗虫效果最好,而且抗虫谱广,对鳞翅目、鞘翅目、直翅目等几乎所有的昆虫都有杀伤作用。SKTI (大豆的 Kunitz 型蛋白酶抑制剂)为多基因家族,可抑制不同来源的胰蛋白酶的活性,尤其是对鳞翅目有较强的抑制作用[李海燕等, 2000]。巯基蛋白酶抑制剂(TPI)对玉米根部害虫和根结线虫有明显的抑制作用。

1.2.2.3 昆虫蛋白酶抑制剂的研究与应用

昆虫作为地球上出现最早、种类最多的动物群体,在生态系统中占有重要的位置。在长期的进化过程中,它自身形成了独特的防御体系。由于昆虫体内没有高等动物所具有的淋巴细胞和免疫球蛋白,所以分解异物的酶,特别是蛋白酶及调控昆虫体内蛋白酶作用的蛋白酶抑制剂更是引起了人们的关注。

蛋白酶是所有昆虫体液中最重要生化酶类,其主要的功能是在昆虫的生长、发育、蜕皮和变态过程中参与蛋白质的降解和合成,而蛋白酶的活性又受蛋白酶抑制剂(PI)来调节。关于昆虫蛋白酶抑制剂研究的历史比较短,最初也只是对昆虫体液中粗提液的蛋白酶抑制因子进行调查,后来才渐渐用纯化的样品。Peanasky [Peanasky et al, 1960]报道了来自蛔虫(*Ascaris. Biochim*)体内的蛋白酶抑制剂。森田等[森田敏照, 吉川秀夫, 1961]在家蚕幼虫血液分离纯化了一种对胰凝乳蛋白酶和胰蛋白酶有抑制作用的蛋白酶抑制剂。Kang 等在黄果蝇(*Drosophila melanogaster*)体液中纯化了一种可抑制牛 α -胰凝乳蛋白酶和蚊成虫胰凝乳蛋白酶的蛋白酶抑制剂,但对胰蛋白酶没有抑制活性,pH 值和热稳定性都很高[Kang et al, 1974,1980]。Hanschke [Hanschke et al, 1975]实验证明在 7 个不同目昆虫血液中有蛋白酶抑制剂的存在,这些抑制剂中多数对注射到血液中的灭活菌有抑制作用,并且随着致死浓度的增加它们对胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、链酶蛋白酶 P 以及假单胞杆菌铜绿素胞外蛋白酶的抗性也增强,认为这些抑制剂可能是昆虫血液中抗菌防御系统的一种活性因子。麻蝇(*Sarcophaga peregrina*)中发现多种可以抑制血球半胱氨酸蛋白酶活性的蛋白酶抑制因子族[Suzuki et al 1985],并纯化了其中的一种抑制因子,发现该抑制因子在 3 龄幼虫蜕皮后及围蛹壳完成之后,有增加的倾向[Suzuki et al 1986]。烟草天蛾(*Manduca sexta*)幼虫中也存在多种抑制剂,两种分子量分别为 14000u 和 8000u 的抑制剂已经被纯化[Remesh et al, 1998],这两种抑制剂对 pH 和热稳定性都很高,N 端的氨基酸序列与牛胰蛋白酶抑制剂相同。Kanost [Kanost,1990]从烟草天蛾幼虫血液中纯化了四种丝氨酸蛋白酶抑制剂,这四种蛋白酶抑制剂中,一种对猪的胰肽酶和牛的胰凝乳蛋白酶有抑制作用,另外两种对胰凝乳蛋白酶有特异性的抑制作用,另一种则对胰蛋白酶的活性有特异的抑制性。这些蛋白酶抑制剂都是昆虫自身产生的调节性的抑制因子,对自身的酶有调节作用,将编码这些抑制剂的基因倒入作物中也能阻遏昆虫的正常的生理代谢,产生对害虫的抗性。目前已经成功转入作物中的昆虫蛋白酶抑制剂基因见(表 1.2)。

表 1.2 来源于昆虫的抗虫基因在植物中的表达
Table 1.2 Pest-resistant gene from insect expressing in plant

基因产物	靶标害虫	转基因植物
烟草天蛾中的反式糜蛋白酶抑制剂	同翅目	烟草、棉花
烟草天蛾中的反式弹性蛋白酶抑制剂	同翅目	苜蓿、棉花、烟草
α -反式胰蛋白酶 (α 1AT) 抑制剂	鳞翅目	马铃薯
烟草天蛾的反式胰蛋白酶抑制剂	同翅目	棉花、烟草
烟草天蛾的几丁质酶抑制剂	鳞翅目	烟草

1.3 胰凝乳蛋白酶抑制剂研究进展

1.3.1 胰凝乳蛋白酶

胰凝乳蛋白酶(Chymotrypsin) 又称糜蛋白酶、 α 胰乳酶、 α -糜蛋白酶，是胰腺分泌的一种蛋白水解酶，具有肽链内切酶的作用, 能切断蛋白质肽链中酪氨酸、苯丙氨酸的羧基端肽链, 专一水解芳香族氨基酸(酪氨酸、色氨酸、亮氨酸)或大的非极性脂肪族侧链的氨基酸的羧基形成的肽键。胰凝乳蛋白酶在生物体内首先合成无催化活性的胰凝乳蛋白酶原，具有5对二硫键的单肽链蛋白，当受到胰蛋白酶的作用后，Arg₁₅-Ile₁₆形成高活性的 π -胰凝乳蛋白酶, 这种高活性的 π -胰凝乳蛋白酶不稳定，它们再与其他的 π -胰凝乳蛋白酶作用，使另一分子的 π -胰凝乳蛋白酶失去两个二肽（Ser₁₄-Arg₁₅和Thr₁₄₇-Asn₁₄₈），形成稳定的 α -胰凝乳蛋白酶, A、B两链、B、C两链间各通过一对大的二硫键相连，其活性只有 π -胰凝乳蛋白酶的2/5，酶活性中心的氨基酸残基来自B、C两链（沈同，王镜岩，生物化学）。

胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶都可以消化溶解变性蛋白质，对未变性的蛋白质无作用，因此能分解炎症部位纤维蛋白的凝块, 促进血凝块、脓性分泌物及坏死组织的溶化分解, 从而净化创面, 促进组织新生和伤口愈合[实用药物手册，1982]，在临床上对抗炎、防止水肿、积血、扭伤水肿、术后浮肿、中耳炎、鼻炎等具有良好的作用。但胰凝乳蛋白酶比胰蛋白酶的能力强，毒性低，副作用小，所以在临床上具有更大的应用前景。

胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶都属于丝氨酸蛋白酶，在生物体的多种组织和器官中发挥重要作用，但如果不正常释放也会导致病理反应，为避免这种情况，有机体通过积累特异性的蛋白酶抑制剂来调节这些酶的作用。

1.3.2 胰凝乳蛋白酶抑制剂

胰凝乳蛋白酶抑制剂属于丝氨酸蛋白酶抑制剂，它的主要作用是停止、阻止或降低胰凝乳蛋白酶活性，根据胰凝乳蛋白酶抑制剂的结构和分子量，将其分为两大类：一类是小分子量的蛋白酶抑制剂，主要有 Kazal 型、Bowman-Birk 双头型和 Kunitz 类型；另一类是大分子量的蛋白酶

抑制剂,主要有 serpin 类型。

小分子量的胰凝乳蛋白酶抑制剂通常含有多个二硫键,结构非常稳定,通常是以单体或结构域的形式存在。Kazal 型抑制剂约有 50 个氨基酸残基,主要是对胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶起抑制作用[Lu SM et al,2001]。Bowman-Birk 双头型抑制剂有两个独立非重叠的活性位点,分别对胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶有抑制活性,这类抑制剂的核心区域有 18 个氨基酸残基是不可缺少的,序列中其余氨基酸残基的替换率相当高,显示了它们在机体防御中有重要调节作用。Kunitz 类型的蛋白酶抑制剂,在氨基酸序列中分散有数个半胱氨酸残基,形成几个二硫键,这种结构决定了它有较强的热稳定性和 pH 稳定性[Kunitz, 1947]。serpin 类型抑制剂主要是具有 serpin 结构域的丝氨酸蛋白酶抑制剂,这种类型的抑制剂分子量较大,一般为 40-50kD,由 350-500 个氨基酸组成,并具有高度保守的三级结构,具有活性的 serpin 类型抑制剂有多种构象,包含了一束 α 螺旋和 β 折叠形成多个结构域的交迭,活性中心环常位于肽链的 C 端,通常有 20 个氨基酸残基。这类抑制剂按活性来分类,主要有胰凝乳蛋白酶抑制剂、胰蛋白酶抑制剂、血浆酶抑制剂。它们通过调节一系列丝氨酸酶和半胱氨酸酶的活性而参与了许多基本的生命活动,例如纤溶、炎症反应、细胞迁移、细胞分化、细胞凋亡等 [Silverman et al 2001,Potempa et al 1994]。

1.3.3 胰凝乳蛋白酶抑制剂的研究

胰凝乳蛋白酶抑制剂由于分子量小,在生物体中广泛存在,在生物体的生理、生化以及大分子合成与代谢中发挥关键性的调控作用。胰凝乳蛋白酶及其抑制剂间的相互作用方式,为研究蛋白间相互作用提供了很好的模型,因此在很多领域得以开发和研究。

人的血浆中存在 α_1 -胰凝乳蛋白酶抑制剂,它具有调节噬中性粒细胞中弹性蛋白酶、组织蛋白酶 G 的活性,若 α_1 -胰凝乳蛋白酶抑制剂的水平降低,则会导致大量的疾病。如肺气肿、关节炎等。淀粉状蛋白沉淀是老年痴呆症的主要特点之一,引起这一病变的主要是 α_1 -胰凝乳蛋白酶抑制剂 (ACT),ACT 在体外影响淀粉状蛋白原纤维形成的速度,所以,ACT 可以用来诊断与老年性痴呆相关的神经变性。另外 ACT 在母乳早期含量很高,推测可能促进婴儿对母乳蛋白的消化。巨噬细胞刺激蛋白 (Macrophage stimulating protein,MSP) 是多效性生长和移动因子,在结构上与凝血系统的多种蛋白相关,MSP 作用于巨噬细胞、上皮细胞和造血细胞,使其发生多种重要的生理反应和变化,但 MSP 的活性形式需要 ACT 对其前体进行切割。在猪和老鼠中也发现了胰凝乳蛋白酶,它们多数是由几个基因编码多种蛋白,或是由一个共显性等位基因编码多种蛋白,显示了丰富的多态性。

在植物叶片、种子、块茎等许多部位都存在胰凝乳蛋白酶蛋白酶抑制剂,它们对植物具有保护作用,使植物免受病原菌和病虫害的伤害。目前已经在豆科、禾本科、葫芦科茄科等许多植物中获得了胰凝乳蛋白酶抑制剂。在黑眼豇豆中发现了对胰凝乳蛋白酶起作用的蛋白酶抑制剂 BPTI,这种抑制剂属于 Bowman-Birk 家族,是由 83 个氨基酸残基组成的一条肽链,在溶液中通常以单体存在[Franco et al,2003]。翼豆中的胰凝乳蛋白酶抑制剂 WCI (winged bean chymotrypsin inhibitor) 属于 Kunitz 家族,是一个由多基因家族编码的蛋白酶抑制剂,至少有七种蛋白酶抑制剂。其中 WCI-3 是种子中主要的胰凝乳蛋白酶抑制剂,另外还有 WCI-2。WCI 的 mRNA 和蛋白主要在不成熟的种子中积累,在茎和果皮中也有少量的 mRNA,成熟的种子中也会有少量的 WCI

的 mRNA 顺势积累,说明 WCI 的表达具有时空特异性[Habu ,et al,1992]。小麦的种子中含有多种胰凝乳蛋白酶抑制剂,其中低分子量的蛋白酶抑制剂 BWI-1c, BWI-2c, BWI-3c, BWI-4c 对 pH 值和温度都有很高的稳定性[Tsybina T, et al,2004]。从未成熟的小麦种子中分离出的 WSZ1 属于大分子的 serpin 类型胰凝乳蛋白酶抑制剂,由 398 个氨基酸残基组成,这种蛋白的基因已经从小麦未成熟种子的 cDNA 文库中得到了分离和鉴定。伤害处理的番茄和马铃薯叶片 [Plunkett et al, 1982]、烟草柱头 [Pearce et al,1993] 等部位可分离到马铃薯蛋白酶抑制剂 II。马铃薯的块茎中存在多种胰凝乳蛋白酶抑制剂,它们具有保护受伤的马铃薯免遭病原菌和真菌进一步侵食作用 [Valueva TA, et al,2003]。

昆虫的血液、中肠、脂肪体等许多器官中存在胰凝乳蛋白酶抑制剂。Kang[Kang ,Fuchs, 1980]通过亲合层析的方法从果蝇[*Drosophila melanogaster*]的幼虫体液中纯化了一种胰凝乳蛋白酶抑制剂,经过分析鉴定,这种抑制剂有很高的热稳定性,在 pH 值 2—12 的环境下仍然有很高的活性,对成熟的埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*) 胰凝乳蛋白酶和酵母胰凝乳蛋白酶有抑制作用。由于在果蝇体内没有发现胰凝乳蛋白酶,因此不能分析它的功能。在伊蚊 (*Aedes aegypti*) 的胸部也存在胰凝乳蛋白酶抑制剂[Yang ,et al,1972]。Spiro 从成熟的库蚊 (*Culex pipiens*) 中分离了一种胰凝乳蛋白酶抑制剂,这种抑制剂对蚊子幼虫体内的胰凝乳蛋白酶有活性。Houseman 报告了在舌蝇 (*Glossina morsitans* Westwood) 的中肠前部存在一种蛋白酶抑制剂,对舌蝇的消化酶有影响 [Houseman,1980]。飞蝗 (*Locusta migratoria*) 血液中液中存在两种胰凝乳蛋白酶抑制剂 PMP-D2 和 PMP-C,这两种抑制剂有 45% 的同源性,PMP-D2 由 35 个氨基酸残基组成,对胰凝乳蛋白酶以很弱的活性,PMP-C 由 36 个氨基酸残基组成,对胰凝乳蛋白酶和人的白细胞弹性蛋白酶有抑制活性。在另一种沙漠蝗体内也发现多种类似的胰凝乳蛋白酶抑制剂,这些抑制剂都有 6 个保守的半胱氨酸残基,活性位点附近的氨基酸的变化对抑制剂的活性有很大的影响[Hamdaoui, et al,1998]。在烟草天蛾幼虫体内存在多种胰凝乳蛋白酶抑制剂,Kanost[Kanost et al,1989]从其幼虫体液中纯化了四种蛋白酶抑制剂,其中有两种对胰凝乳蛋白酶显示特异性抑制作用。

自从 Morita 和 Kikkawa[Morita & Kikkawa, 1961] 第一个证明家蚕幼虫血液中存在蛋白酶抑制剂以来,家蚕胰凝乳蛋白酶抑制剂的研究进展很快。Eguchi[Eguchi et al, 1972,1974]等揭露了家蚕幼虫或蛹的血液能抑制预成虫中肠的蛋白酶。后来,他对 10 个家蚕品种的血液中蛋白酶抑制剂进行了调查,检测到四种真菌蛋白酶抑制剂 [Eguchi 1982]。Sasaki 分析了家蚕胰凝乳蛋白酶抑制剂的特性[Sasaki, 1978]。1984 年 Eguchi 等[Eguchi et al, 1984]通过凝胶电泳方法对 126 个家蚕品系血液蛋白酶抑制剂的多样性进行了调查,发现了 8 种 CI,通过遗传多样性分析认为在品种间存在着多型性。Shinohara 等(1993)对 6 个纯系家蚕品种和 3 个杂交品种血液中 CI 进行了分离和鉴定,在这些品种的血液中总共分离了 14 种 CI,根据分子量将它们分为三类: 8—13 kDa,40 kDa 和 42 kDa。并对其遗传特性进行了分析,表明 CI 在品种间具有共显性。藤井等对家蚕胰凝乳蛋白酶抑制剂进行了遗传分析,指出 CI-13 和 CI-13' 由 *Ict-A* 基因支配,CI-9 和 CI-10 由 *Ict-B* 基因,CI-b1、CI-b2、CI-1、CI-2、CI-2' 由 *Ict-H* 基因编码,CI-3 和 CI-4 由 *Ict-E* 基因编码,CI-6、CI-6'、CI-7、CI-8 由 *Ict-D* 基因编码。在其它鳞翅目绢丝昆虫如柞蚕、蓖麻蚕和天蚕也有发现胰凝乳蛋白酶抑制剂存在,而且稳定性都比较强,但与家蚕体液中存在的抑制剂种类不同。

总之,蛋白酶抑制剂在生物体中普遍存在,它的主要生理作用是防止生物体内不必要的蛋白

被水解，在生物体一系列的生理、病理、新陈代谢过程发挥关键性的调控作用，同时也是生物体免疫系统的重要组成部分。由于许多研究是以胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶作为研究的靶酶，所以发现的蛋白酶抑制剂多数是胰蛋白酶抑制剂和胰凝乳蛋白酶抑制剂。在昆虫体内这两种抑制剂都存在，但是胰蛋白酶抑制剂的活性较弱，所以研究的抑制剂以胰凝乳蛋白酶抑制剂最多。胰凝乳蛋白酶抑制剂有多种类型，其中 *spersin* 型和 *Kunitz* 型抑制剂研究的最多，由于这种类型的抑制剂分子量小，而且同一基因活性位点的突变频率很高，显示了它们具有丰富的多态性，是一种重要的生理、生化遗传标记。另外研究胰凝乳蛋白酶及其抑制剂之间的相互作用和关系，也将为蛋白和蛋白相互作用提供一种很好的模型。人们对其研究不仅是对生物学现象本身的了解，更希望这些研究能解决人类的某些问题，如对一些疑难疾病的诊疗和治疗，对农作物害虫的生物防治等。

第二章 研究的目的和意义

蓖麻蚕（*Philosamia cynthia ricini*）是除柞蚕外，我国生产天然丝的又一野生绢丝昆虫，属于鳞翅目、大蚕蛾科、柞蚕属，柞蚕种，蓖麻蚕亚种，其起源于印度东北部的阿萨姆地区，因食蓖麻而得名。我国于 1951 年首次由中科院上海生化研究所引进，自从引种以来，通过科研工作者的努力，我国已经育成了 50 多个具有地方特色的蓖麻蚕品种[苏伦安，野蚕学，1993]，大大丰富了我国蓖麻蚕品种的基因库。

蓖麻蚕和家蚕都是以人工饲育的方式进行传种接代，但蓖麻蚕有许多家蚕不可比拟的优良特性如：食性广、生长快、饲育时间短、个体大、抗逆性强、适应性广等，这与它长期野外驯化分不开的，在长期的进化过程中，形成了自身独特的防御体系。由于昆虫没有高等动物所具有的淋巴细胞和免疫球蛋白，因此体液中分解异物的酶及其抑制剂形成了昆虫独有的非细胞免疫系统。

昆虫体内蛋白酶抑制剂的研究，不仅对阐明昆虫生长发育和变态过程蛋白酶活性的调控机理有重要的意义，而且由于不同种类或同一种类不同品种间存在丰富的遗传多样性，因此成为昆虫中为数不多的生化遗传标记之一。对于鳞翅目昆虫而言，蛋白酶是维持其正常生理所必需的生化酶类，而许多农作物的害虫都属于鳞翅目，因此蛋白酶就成为杀虫剂的理想靶标，利用蛋白酶抑制剂作为生物防治的手段，也就成为取代传统害虫防治方法的一种新的害虫控制技术。本研究对所保存的 20 个蓖麻蚕体液中胰凝乳蛋白酶抑制剂种类及其发育时期抑制剂活性的变化进行了调查，希望能够推进我们对蓖麻蚕以及其他野生鳞翅目昆虫生理、生化以及防御体系的研究；同时对蓖麻蚕胰凝乳蛋白酶抑制剂的基因进行了克隆与表达，也必将促进蓖麻蚕在基因水平的研究。

第三章 材料和方法

3.1 实验材料

3.1.1 蓖麻蚕品种

20 个蓖麻蚕品种斑马 A、斑马 B、徐一、花蓝、南一、754、51 甲、51 乙、白黄、高一、印黄、闽 75、蓖栲 A、蓖栲 B、斑栲 A、斑栲 B、闽 A、闽 B、闽白、海黄由蚕业研究所品种资源组提供。

3.1.2 质粒和菌种

受体菌 *E.coli*: DH10B、BL21, 质粒 pGEM4Z、pET-28a、由农业部家蚕重点开放实验室保存。

3.1.3 酶试剂及试剂盒

*Bam*H I、*Hind* III 限制性内切酶, T4 DNA 聚合酶及其配套的缓冲液, dNTP MIX, RNA 提取及 RT-PCR 试剂盒, 均为 TaKaRa 公司产品。 α -chymotrypsin、N-acetyl-DL-phenylalanine- β -naphthyl ester、tetrazotized ortho-dianiside 购于 Sigma 公司, N, N'-dimethyl-formamide、Acrylamide、N, N-methylenebisacrylamide, TEMED 为进口分装产品; 其它试剂均为国产分析纯。

3.1.4 细菌培养基

1) LB 液体培养基:

10 g 蛋白胨、5 g 酵母抽提物、10 g 氯化钠、用去离子水溶解。8%的 NaOH 调 pH 至 7.0-7.5, 定容到 1 L。

2) LB 平板培养基: LB 液体培养基中加入 2%的琼脂粉, 120℃ 高压灭菌 20 min, 当温度降到 60℃ 左右, 加入适当浓度的抗生素, 铺板。

3.1.5 常用溶液和缓冲溶液

1) TE Buffer (pH8.0)

10 mmol/L Tris • CL(pH8.0), 1 mmol/L EDTA(pH8.0)

2) New Wash 洗液

20 mmol/L Tris • CL(pH7.4), 1 mmol/L EDTA(pH8.0), 100 mmol/L NaCl,与等体积的无水乙醇混合配置而成。

3) 6 mol/L NaI 溶液

将 0.75 g NaSO₃ 溶于 40 mL ddH₂O 中,加入 45 g NaI 搅拌至完全溶解,用 Whatman 滤纸或 NC 膜过滤,在冷暗处储存。

4) 1×PBS

NaCl	137 mmol/L
KCL	2.7 mmol/L
Na ₂ HPO ₄	4.3 mmol/L
KH ₂ PO ₄ (pH7.3)	1.4 mmol/L

5) 玻璃奶 (Glassmilk)

将 10 g 100 mg/mL Sigma S-5631 的 Silica 溶于 100 mL 1×PBS 中,沉淀 2 h, 2000 g 离心 2 min, 重复 2-3 次,最后将沉淀溶于 3 mol/L NaI 溶液中,使终浓度为 100 mg/mL, 4℃避光保存。

6) 50×TAE 核酸电泳缓冲液

Tris	242 g
0.5 M EDTA (pH8.0)	100 mL
冰醋酸	57.1 mL
定容到 1L。	

7) 凝胶上样缓冲液

25%甘油或 40%蔗糖, 0.25%溴酚兰, 0.25%二甲本青 FF。

8) 1 mol/LTris • CL

800 mL 蒸馏水中溶解 121.1 g Tris base,加入浓的 HCL 调 pH 值

pH	加入的 HCL (mL)
7.4	70 mL
7.6	60 mL
8.0	42 mL

溶液冷至室温后用浓盐酸调定 pH 值,加水定容到 1 L。高压灭菌。

9) 75mmol/L 的 CaCl₂ 溶液

1.654g CaCl₂ • 2H₂O 用 ddH₂O 定容到 150mL。

10) 碱法质粒抽提液的配制

Solution I : 50 mmol/L 葡萄糖, 25 mmol/L Tris • HCL, 10 mmol/L EDTA(pH8.0),混匀后高压灭菌。

Solution II : 0.2 mol/L NaOH , 1% SDS 。

Solution III: 3 mol/L NaAc(pH4.8)。

11) PPT Buffer

22 倍体积的异丙醇 , 1 倍体积的 5 mol/L KAc, 2 倍体积的双蒸水。

12) 考马斯亮蓝 R-250 染色液的配制

将 R-250 溶于甲醇中, R-250 0.05%, 甲醇 50%, 乙酸 10%, ddH₂O 40%, 混合 1 小时后, 用 Whatman 滤纸过滤。

13) 2×上样缓冲液

0.1 mol/L SDS 25 mL, 甘油 20% W/V 20 mL, SDS 4.0 g, DTT 3.1 g, 定容到 100mL, 混匀后分装到 1.5 mL Eppendorf 中 -20℃ 保存。

14) 4×Tris • CL 0.5 mol/L, pH6.8

Tris 碱 6.05 g, 溶于 40 mL 无菌水中, 用 1 mmol/L HCL 调 pH 至 6.8, 补加水至 100 mL, 0.45 μm 滤膜过滤。

15) 4×Tris • CL 1.5 mol/L, pH8.8

Tris 碱 91 g, 溶于 300 mL 无菌水中, 用 1 mmol/L HCL 调 pH 至 8.8, 补加水至 500 mL, 0.45 μm 滤膜过滤。

16) 5×电泳缓冲液

Tris 碱 15.1 g, 甘氨酸 72.0 g, SDS 5.0 g, 电泳前稀释至 1×工作液。

17) 脱色液

甲醇 3 V, 蒸馏水 3 V, 冰乙酸 1 V。

18) 15%的分离胶

ddH ₂ O	1.1 mL
30%丙烯酰胺	2.5 mL
1.5 mol/L 4×Tris • CL(pH8.8)	1.3 mL
10%SDS	0.05 mL
10%APS	0.05 mL
TEMED	0.002 mL
Total	5.0 mL

19) 1 mL 5% 浓缩胶

ddH ₂ O	680 μL
30%丙烯酰胺	170 μL
1.5 mol/L 4×Tris • CL(pH6.8)	130 μL
10%SDS	10 μL
10%APS	10 μL
TEMED	2 μL
Total	1 mL

20) Buffer A: 0.05 mol/L 磷酸钠盐溶液, pH 7.4。

Buffer B: 0.05 mol/L 磷酸钠盐溶液, pH 7.4, 含有 0.05 mol/L 的 NaCl 和 0.5%的 Triton X-100。

Buffer C: 0.05 mol/L 磷酸钠盐溶液, pH 7.4, 含 8M Urea。

21) DTT 1 mol/L

20 mL 0.01 mol/L 乙酸钠 (pH5.2) 溶解 3.09g DTT, 过滤后分装成小份-20℃ 保存备用。

22) IPTG 20% (m/v)

8 mL 超纯水溶解 2 g IPTG, 定容到 10 mL, 用滤器过滤除菌, 分成 100 μL, -20℃ 保存备

用。

23) SDS (20% m/v)

将 200 g SDS 溶解在 900 mL 蒸馏水中,加热到 68 °C 磁力搅拌器搅拌使其完全溶解,用 HCL 调 pH 值到 7.2, 最后定容到 1L, 室温放置备用。

24) EDTA (0.5mol/L, pH8.0)

186.1 g EDTA 加到 800 mL 蒸馏水中,用 NaOH 调 pH8.0 (约需 20 g NaOH 颗粒), 定容到 1 L, 分装后高压灭菌。

25) pH8.3 缓冲液的活性凝胶电泳储存液配制

A 溶液 (pH 8.9): 1 mol/L HCL 48 mL, Tris 36.6 g, TEMED 0.46 mL, 超纯水定容到 100 mL.

B 溶液 (pH 6.9): 1 mol/L H₃PO₄ 25.6 mL, Tris 5.7g, TEMED 0.23 mL, 超纯水定容到 100 mL.

C 溶液: 丙烯酰胺 30.0 g, 甲叉双丙烯酰胺 0.8 g, 超纯水定容到 100 mL

D 溶液: 丙烯酰胺 10.0 g, 甲叉双丙烯酰胺 2.5 g, 超纯水定容到 100 mL

E 溶液: 4.0 mg/mL 的核黄素溶液

F 电极缓冲液 (pH 8.3): Tris 6.0 g, Glycine 28.8 g, 蒸馏水定容到 1 L。使用时需稀释 10 倍。

G 溶液: 0.28% 的过硫酸铵溶液。

分离胶的配比: A : C : G : H₂O = 1 : 2 : 4 : 1

浓缩胶的配比: B : D : E : H₂O = 1 : 2 : 1 : 2

26) pH4.0 缓冲液的活性凝胶电泳储存液配制

A 溶液 (pH 4.3): 1 mol/L KOH 48 mL, 冰醋酸 17.2 mL, TEMED 4.0 mL, 超纯水定容到 100 mL

B 溶液 (pH 6.7): 1 mol/L KOH 48 mL, 冰醋酸 2.87 mL, TEMED 0.46 mL, 超纯水定容到 100 mL

C 溶液: 丙烯酰胺 30.0 g, 甲叉双丙烯酰胺 0.8 g, 超纯水定容到 100 mL。

D 溶液: 丙烯酰胺 10.0 g, 甲叉双丙烯酰胺 2.5 g, 超纯水定容到 100 mL。

E 溶液: 4.0 mg/mL 的核黄素溶液。

F 电极缓冲液 (pH 4.5): β-丙氨酸 31.2 g, 冰醋酸 8.0 mL, 蒸馏水定容到 1 L。使用时需稀释 10 倍。

G 溶液: 0.28% 的过硫酸铵溶液

分离胶的配比: A : C : G : H₂O = 1 : 2 : 4 : 1

浓缩胶的配比: B : D : E : H₂O = 1 : 2 : 1 : 2

3.1.6 主要实验仪器和设备

无菌超净台, 37°C 恒温培养箱, 37°C 恒温摇床, Milli-Q 超纯水净化仪 (Millipore 公司), Bio-Red 垂直电泳装置, 平行琼脂糖电泳装置 (北京六一厂), PTC-100TC 型 PCR 仪, Beckman L5-65B 超速离心机, 低温离心机, 可调式恒温水浴锅, 超声波破碎仪, CANON 数码相机, 高压灭菌锅, 岛津 UV-260 紫外分光光度计, 高性能计算机及 Gene 分析软件。

3.2 常规实验方法

3.2.1 蓖麻蚕血液的收集

用针刺破蓖麻蚕幼虫腹足，在冰上将血液收集到加有少量苯基硫脲的 1.5 mL Eppendorf 离心管中。用针刺破蛹复眼收集血液，5 000 r/min 4℃ 离心 10 min，上清保存于-20℃ 备用。

3.2.2 RNA 提取

- 1) 取蓖麻蚕脂肪体 0.1 g 于 5 mL 匀浆器中，加入 1 mL Trizol 抽提液。冰上充分研磨，转入 1.5 mL 离心管，室温放置 5 min。
- 2) 0.2 mL 的氯仿，轻轻混匀（振荡 15 S），室温 5 min。
- 3) 2000 rpm，4℃ 离心 15 min。
- 4) 将水相移入新的 1.5 mL 离心管中，加入等体积的异丙醇，混匀，室温放置 10 min。
- 5) 2000 g 4℃ 离心 15 min。
- 6) 上清加入 1 mL 预冷的 75%乙醇（稀释用的水要用 0.1%的 DEPC 水处理，经 120℃ 高压灭菌 20 min），7500 g，4℃ 离心 5min。
- 7) 去上清，在无菌通风装置中干燥 RNA 沉淀，加适量（约 30 μL）无 RNase 水溶解 RNA。
- 8) 测 OD 值，初步确定提取 RNA 质量和浓度，凝胶电泳测定 RNA 质量。
$$\text{RNA } (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = A_{260} \times 0.5 / \text{RNA 体积 } (\mu\text{L}) \times 40 \quad \text{OD}_{260/280} = 1.8-2.1$$
- 9) 做好标记，-20℃ 短期保存，-70℃ 可长期保存。

3.2.3 RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

A、RT

- 1) 配置反转录反应液（要在冰上操作）按以下组分顺序加入

MgCL ₂	4 μL
10×RNA PCR Buffer	2 μL
Rnase free ddH ₂ O	9 μL
dNTP Mixture (10mM)	2 μL
Rnase Inhibitor	0.5 μL
AMV R Transcription	1 μL(5U)
Oligod(T) Primer	1 μL
中肠 RNA	0.5 μL
总体积	20 μL

- 2) 30℃, 10 min

- 3) 42℃, 60 min

4) 70 °C, 15 min (灭活 AMV R Transcription)

5) 冰上 10 min

做好标记-20 °C短期保存, -70 °C长期保存。

B、PCR

1) 配置 PCR 反应液

MgCL ₂	6.0 μL
10×LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ free)	8.0 μL
灭菌水 ddH ₂ O	63.5 μL
LA Taq 酶	0.5 μL
Primer F/R	1.0/1.0 μL
模板	20.0 μL
Total	100.0 μL

2) PCR 反应条件

95°C	10 min	
94°C	30 sec	
55°C	1 min	} 35 cycle
72°C	1 min30 sec	
72°C	10 min	

3) 将反应管进 PCR 仪扩增, 反应结束后取出样品。进行电泳鉴定。

3.2.4 碱法少量提取质粒 DNA

培养过夜的转化质粒平板, 挑取单菌落, 接种于含有 Amp 或 Kan(50 μg/mL)3 mL LB 液体培养基中, 37°C摇床振荡培养过夜。取过夜培养液 1.5 mL 于 Eppendorf 中, 5000 rpm, 5 min, 收集菌体细胞, 真空吸去上清后, 向沉淀中加 150 μL Solution I, 振荡器混匀, 室温放置 5 min, 加 300 μL Solution II, 150 μL 氯仿, 轻轻混匀, 冰上放置 5 min。加 450 μL 的 Solution III, 充分混匀后, 冰浴 10 min 或更长的时间。4 °C, 12000 rpm 离心 5 min, 将上清转移到新的 1.5 mL 的 Eppendorf 中, 加入 0.6 倍体积的异丙醇, 冰浴 10 min 或更长时间。4 °C, 12000 rpm 离心 5 min, 去掉上清, 沉淀用 250 μL 的 TER 溶解, (TER: 1×TE 中含 20 μg/mL RNase), 37 °C 保温 20 min。再加入 300 μL 的 PPT 沉淀 Buffer, 4°C 沉淀 20 min, 12000 rpm, 5 min, 沉淀用 75% 的酒精洗一次, 37°C 烘干直到没有酒精味道, 用 100 μL 0.1×TE 溶解 DNA, -20°C 备用。

3.2.5 限制性内切酶反应

根据产品目录中推荐的各种酶反应条件, 反应体系中含质粒 DNA 1~2 μg, 1/10 体积的 10×缓冲液, 酶量为 2~4U/μg DNA, 反应体积一般为 20 μL, 在酶最适条件(一般为 37°C)反应 1~2 个小时, 之后用琼脂糖凝胶电泳检测酶切效果。

3.2.6 DNA 片段的分离与回收

1) 冻融法回收 DNA 片段

根据 DNA 片段的大小,选择适当浓度的琼脂糖凝胶进行电泳,当回收的目的 DNA 片段的与其他的片段分开后,在紫外灯下切下目的条带,放入 1.5mL 离心管中, -70℃放置 30 min, 之后再放在 37 °C温育 10 min, 使胶融化。重复 1~3 次, 最后 12000 rpm , 10 min, 将上清吸出, 放到一新的离心管中, -20 °C保存备用。

2) 低熔点胶回收 DNA 片段

选择合适的低熔点凝胶电泳 (3~5V/cm), 切下目的条带 DNA 片段, 置于 Eppendorf 管中, 加入 3 倍体积的 TE, 65 °C温育 10 min, 使胶融化, 加入等体积的 37 °C预热的饱和酚抽提一次, 上清再用酚/氯仿、氯仿各抽提一次, 加入 1/10 体积的 3mol/L NaAc(pH6.5), 再加 2 倍体积的无水乙醇沉淀回收 DNA。

3) 玻璃奶法纯化回收 DNA 片段

用普通琼脂糖凝胶进行电泳, 在紫外灯下切下目的条带, 称重后放入 Eppendorf 管中, 加入 3 倍体积的 (V/W) 6 mol/L NaI, 37 °C使凝胶溶解, 再加入 10 μ L 玻璃奶吸附 DNA, 室温放置 5min , 12000 rpm, 5 s, 去上清, 沉淀用 New Wash 溶液洗 3 次, 晾干后, 用 50 μ L 0.1 \times TE 溶解 DNA, 高速离心后, 将上清保存于-20℃备用。

3.2.7 DNA 的连接

连接总体积为 10 μ L 或 15 μ L, 外源片段与载体连接的摩尔比一般为 2~3 : 1, 5 \times T4 DNA 连接缓冲液 2 或 3 μ L。若为粘性末端连接, 加 T4 DNA 连接酶 1 μ L, 12~14 °C连接 8 小时以上; 若是平末端连接, 应加 2 μ L T4 DNA 连接酶, 18~22 °C连接过夜。

3.2.8 质粒 DNA 的转化

1) 感受态细胞制备

将保存在-70 °C的大肠杆菌菌种 (DH10B, BL21) 在 LB 平板培养基上复苏, 挑取单菌落接种于 3 mL 液体培养基中, 37 °C摇床 (转速为 207-216 转/分钟) 恒温培养 10 个小时, 取出 100 μ L 培养物接种于另一 3 mL 液体培养基中, 37 °C摇床 (转速为 207-216 转/分钟) 恒温培养 2~3 个小时, 使 OD 值为 0.6~0.8, 收集细胞, 4000~5000 rpm, 5 min, 去掉上清, 沉淀用 800 μ L 冷的 75 mM CaCl₂ 悬浮, 冰上静止 30 min。4000~5000 rpm, 5 min, 沉淀重悬浮于 200 μ L 75 mM CaCl₂ (含 15%的甘油), -70℃长期保存备用。

2) 转化

用 DH10B 制备的大肠杆菌感受态细胞转化。将质粒 DNA 20~100 ng 或连接混合物 5 μ L 加到 100 μ L 大肠杆菌感受态细胞中, 轻轻混匀, 冰育 30 min, 42 °C热休克 2 min, 迅速冰上冷刺激 2 min, 加 1 mL 37 °C 温育过的 LB 液体培养基, 37 °C摇床培养 1 h, 稍离心, 去掉部分上清, 留约 200 μ L, 涂布于含有相应抗生素的 LB 平板培养基上, 37 °C恒温培养过夜。

3.2.9 重组质粒的鉴定

1) 快速细胞破碎法

挑取多个单菌落转化子于 3 mL 加有抗生素的 LB 培养液中, 37 °C 培养过夜, 取 500 μ L 菌液于 1.5 mL Eppendorf 管中 12000 rpm, 10 s, 弃上清, 向沉淀中加入 30 μ L 缓冲液 (6%蔗糖, 0.1%溴酚蓝), 再加入 20 μ L 酚/氯仿 (1: 1 体积比), 将菌体弹起, 充分振荡, 12000 rpm, 5min, 取上清上样电泳, 观察结果初步筛选转化子。

2) 酶切鉴定

将选定的转化子的质粒 DNA 进行提取, 方法见 2.2.4。然后利用合适的核酸限制内切酶进行酶切, 琼脂糖凝胶电泳确定 DNA 片段的大小。

3.2.10 活性聚丙烯酰胺凝胶

3.2.10.1 活性胶的制备及电泳

3.3%的浓缩胶和 8.2%的分离胶参照 Davis (1964) (见 3.1.5) 方法配制。电泳装置组装好后, 先灌分离胶, 立即加入一水层覆盖, 待分离胶凝固后, 去掉水层, 加入浓缩胶, 立即插入样梳, 光照 30 min, 胶凝固后拔出样梳, 将未凝固的胶液冲洗干净即可上样电泳。将收集的蓖麻蚕血液分别在酸性 (pH 4.0)、碱性 (pH 8.3) 两种缓冲体系下进行电泳。碱性聚丙烯酰胺凝胶电泳电极缓冲液用 pH 8.3 的 Glycine-Tris, 0.05%的溴酚兰作为指示剂, 冰浴中电泳, 开始电流为 10mA, 当指示剂进入分离胶时, 改用 15mA 电泳 2 小时。酸性聚丙烯酰胺凝胶电泳电极缓冲液用 pH 4.0 的丙氨酸和冰醋酸的混合液, 以次甲基兰为指示剂。冰水浴中电泳, 开始电流为 10mA, 当指示剂进入分离胶时, 改用 15mA 恒流电泳 3~4 小时。

3.2.10.2 活性染色

经过 Native-PAGE 后, 凝胶中的 CI 活性采用 Jose Uriel [1968] 的方法来检验: 首先将剥离下的凝胶浸润在 0.05%的 α -胰凝乳蛋白酶溶液 (pH 7.4, 0.1 mol/L 的磷酸钠盐缓冲液) 中, 37°C 温浴 10 min, 然后倒掉酶液, 37°C 放置 30 min 后, 用清水水洗两次后加入基质和染色液的混合液, [Acetyl-DL-phenylalanine- β -naphthyl ester] 5 mg 溶于 2 mL 的 dimethyl-formamide 中作为基质溶液; 10 mg 的 tetrazotized ortho-dianiside 溶解在 20 mL 的 pH 7.4, 0.05 mol/L 的磷酸钠盐缓冲液作为染色液, 使用前以体积比 V (染色液): V (基质液) = 10:1 的比例混合, 室温放置 40~60 min, 除去基质和染色液的混合液, 用 2%的醋酸终止反应 30 min, 然后去掉醋酸, 将胶保存在水中。

3.2.11 SDS-PAGE 电泳

3.2.11.1 电泳前的准备

将电泳装置组装好后,按比例配制分离胶和浓缩胶见 3.1.5。先灌分离胶,将配置好的分离胶灌制到玻璃板间隙,立即覆盖一薄的水层,室温凝固 30 min,倒掉覆盖层,用去离子水清洗两次,去除为聚合的丙烯酰胺,尽可能吸干残留的水后,将配好的浓缩胶灌到聚合好的分离胶上,立即插入样梳,不要留有气泡,室温凝固 30 min,待胶凝固后即可上样电泳。

3.2.11.2 重组蛋白诱导表达

将含有待表达基因的片段亚克隆到表达质粒载体 pET28a 中,转化大肠杆菌 BL21,涂布于含有卡那霉素的平板培养基,37 °C 恒温培养过夜。挑取单菌落于含有卡那霉素的 LB 液体培养基中,37 °C 恒温培养过夜,通过快速细胞破碎法(见 2.2.9)以及少量提取质粒 DNA 方法(见 2.2.4)获得质粒 DNA。以限制性内切酶分析确证基因插入正确与否(见 2.2.5)。确定有目的基因的转化子的菌液 37°C 重新活化,当菌液的吸光度 $OD_{600}=0.4\sim0.6$ 时,加入 IPTG (使终浓度为 0.1mmol/L),诱导 8 个小时,收集菌体细胞。

3.2.11.3 电泳样品的处理及电泳

收集诱导的大肠杆菌细胞用 Buffer A 洗三次后 再用 Buffer A 重悬浮,于冰上超声破碎(5sec/30sec),至溶液澄清,4°C 10000g 离心 15min,将上清移至另一新的离心管中保存备用。沉淀用 Buffer A 洗两次后再用 Buffer B 重悬浮,4°C 10000g 离心 15min,沉淀再 Buffer A 洗两次,4°C 10000g 离心 15min,沉淀重悬浮于 Buffer C 中,4 °C 放置过夜,4°C 10000g 离心 15min,上清用于 SDS-PAGE 电泳。取 10 μ L 上清液与等体积的 2 \times SDS 上样 Buffer 混合,沸水变性 5 min,待冷却后,加样孔上样 15 μ L。打开电源,开始电流为 10 mA,当指示剂进入分离胶时,电流改为 15mA,直至指示剂迁移到距下端口 1cm 时,停止电泳,将胶卸下,进行染色和脱色。

3.2.11.4 电泳染色和脱色

将聚丙烯酰胺凝胶从玻璃板剥离,浸在至少 5 倍体积的 R-250 染色液中,摇床上室温染色至少 4 个小时,倒出染色液,加入脱色液脱色 4-8 小时,期间要换 3-4 次脱色液。脱色后的胶保存在水中。

第四章 蓖麻蚕血液中胰凝乳蛋白酶抑制剂多型性研究

蛋白酶(Protease)是昆虫体液中重要的生化酶类,主要功能是在昆虫的生长、发育、蜕皮和变态过程中参与蛋白质的降解与合成,而蛋白酶的活性又受到蛋白酶抑制剂(Protease Inhibitor, PI)的调节,通过 PI 的调节,提高昆虫自身的防御能力,并对病原微生物的侵入和繁殖进行抑制,是昆虫重要的防御因子之一。昆虫体内含有多种蛋白酶抑制剂,由于不少研究是以胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶作为被抑制的靶酶,所以在昆虫体内发现的蛋白酶抑制剂主要是胰蛋白酶抑制剂(Trypsin Inhibitor, TI)和胰凝乳蛋白酶抑制剂(Chymotrypsin Inhibitor, CI)。目前,在所研究的昆虫中,家蚕体液中蛋白酶抑制剂研究的最为系统和详细。研究表明家蚕的血液中的 TI 和 CI 都存在着多样性,但由于胰蛋白酶抑制剂在家蚕血液中活性很弱,所以研究的主要是胰凝乳蛋白酶抑制剂。在家蚕的体液中已经发现了至少 18 种胰凝乳蛋白酶抑制剂[李娟等, 2006],这些蛋白酶抑制剂在家蚕的生长发育和机体防御方面发挥重要的调控作用。而对蓖麻蚕血液中蛋白酶抑制剂的研究只有零星的报道, Eguchi 等[1982]对家蚕、柞蚕和蓖麻蚕血液中胰凝乳蛋白酶抑制剂的种类和特性进行了比较,指出蓖麻蚕血液中至少有五种胰凝乳蛋白酶抑制剂,实验表明具有相同分子量的胰凝乳蛋白酶抑制剂,蓖麻蚕胰凝乳蛋白酶抑制剂的热稳定性比家蚕强。蓖麻蚕和家蚕都是以人工饲育方式进行传种接代的,但是蓖麻蚕属于野生型,有着家蚕不可比拟的特性,尤其是抗逆性强、适应性广,蓖麻蚕长期的野外驯化形成了自身独有的生理、生化标记。为此,本研究对 20 个蓖麻蚕品种血液中胰凝乳蛋白酶抑制剂种类分布情况进行了调查。

4.1 材料与方法

4.1.1 材料及主要试剂

实验用蓖麻蚕品种 20 个、家蚕品种 7 个,均由本所保存。蓖麻蚕品种为斑马 A、斑马 B、徐一、花蓝、南一、754、51 甲、51 乙、白黄、高一、印黄、闽 75、蓖栲 A、蓖栲 B、斑栲 A、斑栲 B、闽 A、闽 B、闽白、海黄,家蚕品种为菁松×皓月、p50、三眠 A、NG1、白玉、雪松、C108。

主要试剂 α -chymotrypsin、N-acetyl-DL-phenylalanine- β -naphthyl ester、tetrazotized ortho-dianiside 为 Sigma 公司产品, N,N'-dimethyl-formamide、Acrylamide、N,N-methylenebisacrylamide、TEMED 为进口分装产品;其他试剂均为国产分析纯。

4.1.2 方法

4.1.2.1 蓖麻蚕血液的收集

见 (3.2.1)

4.1.2.2 Native-PAGE 和 CI 活性染色

见 (3.2.10)

4.2 结果与分析

4.2.1 蓖麻蚕血液中 CI 的种类

将采集的 20 个蓖麻蚕品种 5 龄第 5 天的血液，分别在酸性和碱性缓冲体系下进行聚丙烯酰胺凝胶电泳和活性染色，结果如图 4.1 和图 4.2。

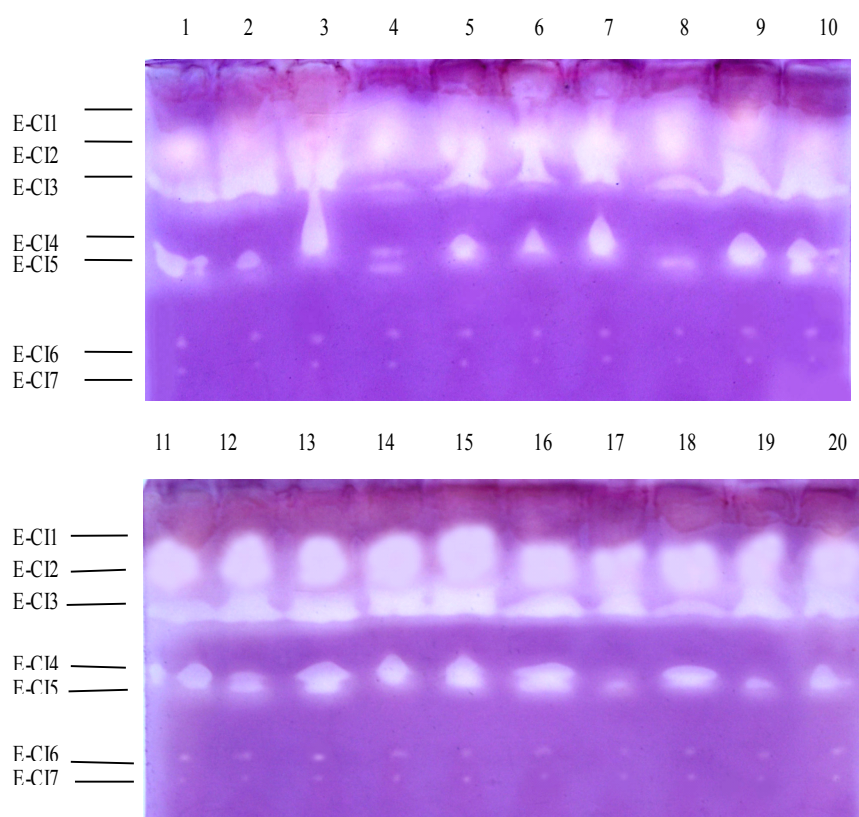


图 4.1 蓖麻蚕品种 5 龄第 5 d 血液的碱性 Native-PAGE 图

1. 闽 A 2. 白黄 3. 斑马 B 4. 51 甲 5. 印黄 6. 斑樗 B 7. 斑马 A 8. 闽 B 9. 51 乙 10. 花蓝 11. 徐一 12. 高一 13. 闽 75 14. 南一 15. 蓖樗 A 16. 754 17. 海黄 18. 蓖樗 B 19. 斑樗 A 20. 闽白

Fig.4.1 Native-PAGE electrophoretic patterns of haemolymph from eri silkworm strains run in the alkaline buffer

The samples of lane 1-20 are strains of MinA, Baihuang, BanmaB, No.51jia, Yinhuang, BanchuB, BanmaA, MinB, No.51yi, Hualan, Xuyi, Gaoyi, Min75, Nanyi, BichuA, 754, Haihuang, BichuB, BanchuA, and Minbai, respectively

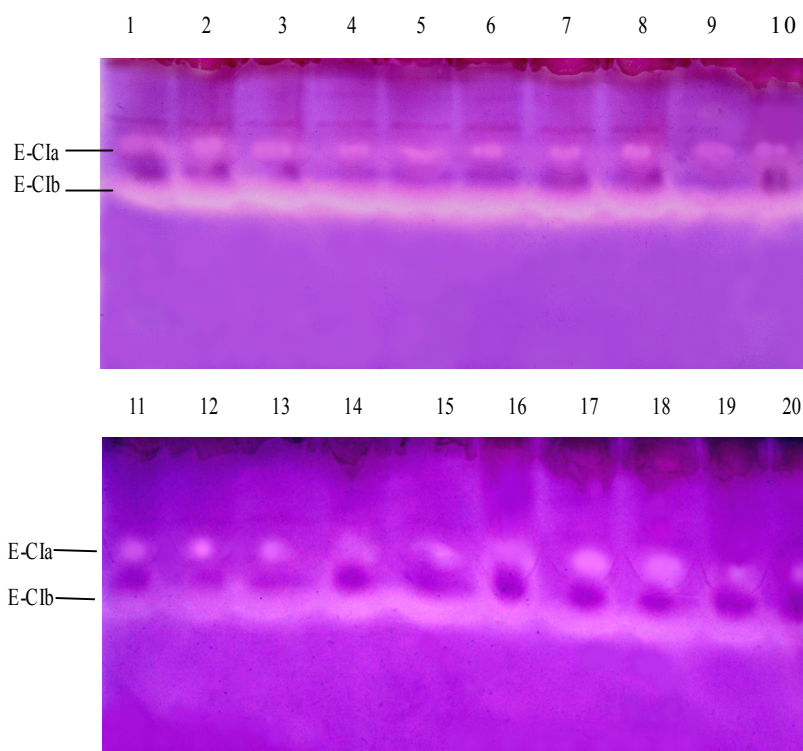


图 4.2 蓖麻蚕品种血液酸性 Native-PAGE 图

1. 51 甲 2. 印黄 3. 高一 4. 闽 75 5. 754 6. 白黄 7. 51 乙 8. 蓖栲 A 9. 斑栲 A 10. 斑马 B 11. 南一
12. 斑栲 B 13. 海黄 14. 斑马 A 15. 闽 B 16. 闽 A 17. 徐一 18. 蓖栲 B 19. 花蓝 20. 闽白

Fig.4.2 Native-PAGE electrophoretic patterns of haemolymph from eri silkmoth strains run in the acid buffer

The samples of lane 1-20 are strains of No.51jia, Yinhuang, Gaoyi, Min75, 754, Baihuang, No.51yi BichuA, BanchuA, BanmaB, Nanyi, BanchuB, Haihuang, BanmaA, MinB, MinA, Xuyi, BichuB, Hualan and Minbai, respectively

在活性染色条件下，由于胰凝乳蛋白酶对 N-acetyl-DL-phenylalanine- β -naphthyl ester 有水解作用，使之产生有色的物质，但酶-抑制剂复合物对其则没有水解活性，结果使凝胶染上颜色，而有抑制剂的地方就未被染上颜色，出现白色亮带，且白色亮带的浓淡反应了抑制剂的强弱。

图 4.1 显示在碱性凝胶电泳中，20 个品种中共检测到 7 条活性带，分别命名为 E-CI1、E-CI2、E-CI3、E-CI4、E-CI5、E-CI6、E-CI7，等电点依次减小。其中 E-CI1、E-CI2 和 E-CI3 等电点接近，在所有的品种中活性都很强；E-CI4 和 E-CI5 等电点极为接近，不同品种种呈现带型不同，闽 A、51 甲、花蓝、徐一、高一、闽 75、蓖栲 A、754、闽白品种中 E-CI4 和 E-CI5 带共同呈现，斑马 B、印黄、斑栲 B、斑马 A、51 乙、南一、蓖栲 B、只呈现 E-CI4 带，白黄、闽 B、斑栲 A、海黄只呈现 E-CI5 带；E-CI6 和 E-CI7 等电点较接近，两者活性都极弱。

图 4.2 显示在酸性凝胶电泳中，20 个品种都检测到 2 条活性带，分别命名为 E-CIa、E-CIb，这两种抑制剂在品种间活性强度比较一致，但 E-CIb 的活性明显强于 E-CIa。

4.2.2 蓖麻蚕不同发育阶段血液 CI 活性的变化

以斑马 A 为材料，收集 4 龄起蚕至 5 龄第 6 天（熟蚕）以及蛹期血液样品，分别碱性（pH 8.3）和酸性（pH4.0）两种缓冲体系中进行凝胶电泳并进行活性染色。酸性电泳结果如图 4.3（A），4

龄期没有检测到 E-CIa, 4 眠开始就能检测到活性, 且眠期活性强于 5 龄起蚕, 5 龄期活性呈上升趋势, 在第 4 天明显增强, 直到化蛹仍能检测到活性; E-CIb 从 4 龄第 2 天开始检测到活性, 眠期和 5 龄的变化规律与 E-CIa 相同。

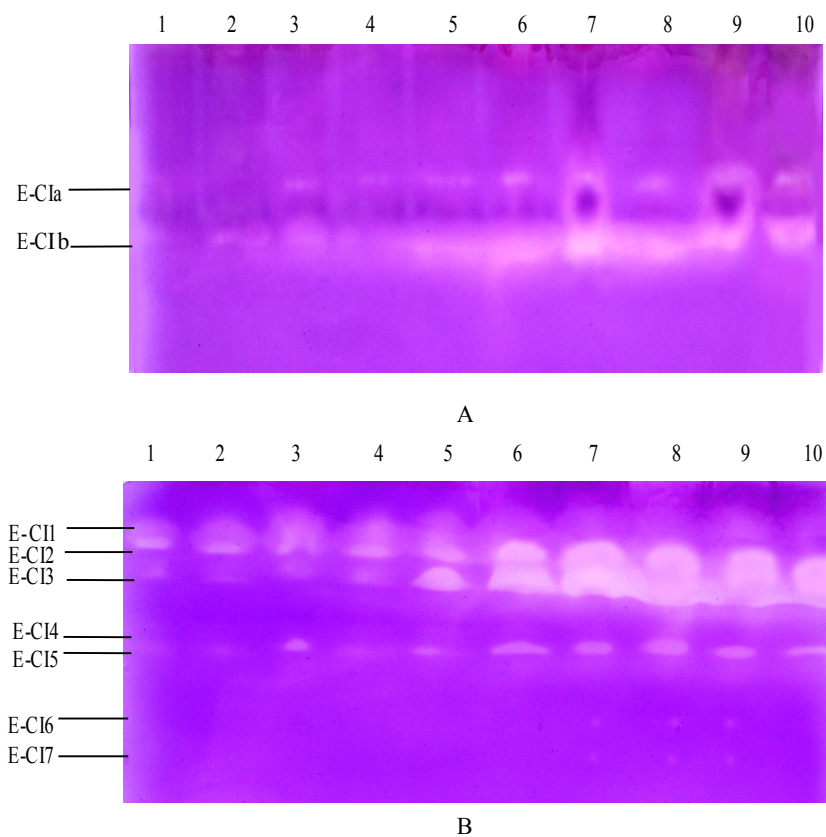


图 4.3 不同龄期血液凝胶电泳活性染色图, 其中 A 为斑马 A 酸性电泳图, B 为斑马 A 碱性电泳图

1-10, 分别表示斑马 A 四龄第 1-2d、四眠、5 龄第 1-6 d 幼虫及蛹期

Fig.4.3 Native-PAGE electrophoretic patterns of changes in chymotrypsin inhibitor activity of the haemolymph of eri silkworm strain BammaA during different developments.

A and B represent Native-PAGE gel pattern run in the acid and alkaline buffer, respectively

The samples of lane 1 to 10 are haemolymph from BanmaA first day and second day of the 4th instar, 4th molting stage, the day 1 to 6 of fifth instar, and pupal stage, respectively

碱性电泳结果如图 4.3 (B) 所示, E-CI1、E-CI2、E-CI3 和 E-CI4 从 5 龄第 3 天开始活性明显增强, 直到化蛹仍有较强的活性。E-CI6 和 E-CI7 的活性整个时期都很弱, 不易分辨。

4.2.3 蓖麻蚕与家蚕血液电泳图谱比较

如图 4.4 (A) 所示, 在酸性 Native-PAGE 中, 家蚕共检测到 4 条活性带 (CI-b1、CI-b2、CI-b3、CI-b4), 在蓖麻蚕中检测到 E-CIa、E-CIb 的等电点分别与 CI-b4、CI-b3 相同, 推测可能是 CI-b4、CI-b3 的同源物。

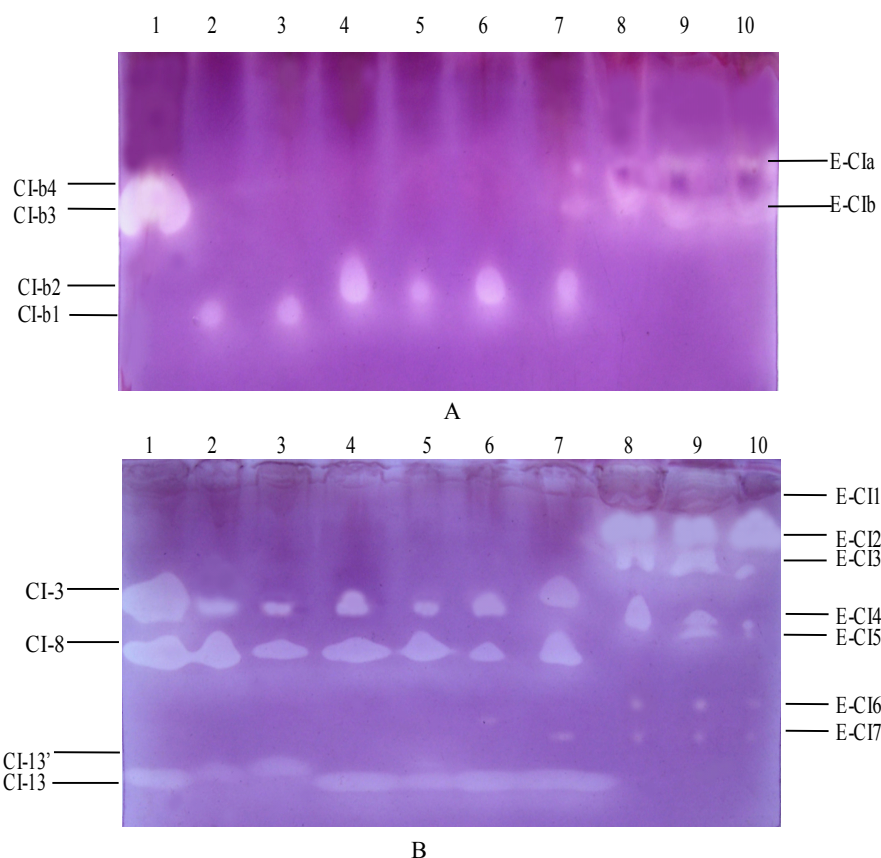


图 4.4 蓖麻蚕和家蚕血液 Native-PAGE 对比图
A 为酸性条件下电泳图, B 为碱性条件下电泳图
1-10 样品顺序 1. 三眠 A 2. P50 3. NG1 4. 白玉 5. 雪松
6. C108 7. 菁松×皓月 8. 斑马 B 9. 花蓝 10. 闽 75.

Fig.4.4 Comparison electrophoretic patterns of haemolymph chymotrypsin inhibitors from eri silkmoth and silkworm by Native-PAGE. A and B represent Native-PAGE gel pattern run in the alkaline buffer and acid buffer, respectively

The samples of lane 1 to 10 are SanmianA, P50, NG1, Baiyu, Xuesong, C108, Jingsong cross Haoyue, BanmaB, Hualan and Min75, respectively

碱性 Native-PAGE 图 4.4 (B) 所示, 列举的家蚕品种 p50 中共检测到 3 种 CI (CI-3、CI-8 和 CI-13), 蓖麻蚕 E-CI4 等电点与 CI-3 相同, 推测可能是 CI-3 的同源物。

4.3 讨论

本试验通过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和活性染色, 在 20 个蓖麻蚕血液中检测到 9 种 CI, 说明 CI 在蓖麻蚕品种中也具有多型性, 但与家蚕相比, 其多型性不如家蚕丰富, 可能与本试验采用的蓖麻蚕品种数量少、亲缘关系较近有关[中国养蚕学, 1990]。

所调查蓖麻蚕血液中 9 种 CI 类型, 即 E-CI1、E-CI2、E-CI3、E-CI6、E-CI7、E-CIa 和 E-CIb, 为调查品种所共有, E-CI4 和 E-CI5 等电点极为接近, 不同品种呈现带型不同, 有的品种呈现 E-CI4

或 E-CI5, 有的品种则 E-CI4 和 E-CI5 共同呈现。在 pH8.3 Native-PAGE 中, 不同的 CI 活性强度差异较大, 其中 E-CI1、E-CI2 和 E-CI3 在 20 个品种中都表现很强的活性; E-CI6 和 E-CI7 活性极弱。E-CI1、E-CI2、E-CI3、E-CI4 或 E-CI5 在 5 龄第 3 天开始活性明显增强, 直到化蛹仍有较强的活性, 表明它们的表达量与幼虫发育时期有关。在 pH4.0 Native-PAGE 中, E-CIa 和 E-CIb 在品种间没有明显差异。

碱性 Native-PAGE 中, 图 4.4 (B) 所示, 本实验列举的家蚕品种 p50 (lane2) 中检测到三种类型的 CI (CI-3、CI-8 和 CI-13), 与赵萍等[赵萍, 夏庆友, 藤井博等, 2003]检测到的结果相同。蓖麻蚕 E-CI4 等电点与 CI-3 相同, E-CI4 (或 E-CI5) 与 CI-3 (或 CI-4) 相对应, 家蚕 CI-3 和 CI-4 为等位基因控制, 推测 E-CI4 和 E-CI5 为等位基因所控制。E-CI1、E-CI2 和 E-CI3 等电点为中性, 与在所列举家蚕品种中抑制剂类型不相同, 是否可能与家蚕品种的 CI-1、CI-2 和 CI-2' 相对应, 更需进一步调查。在酸性 Native-PAGE 中, 在供试的家蚕品种中检测到四种类型的 CI, CI-b1、CI-b2、CI-b3 和 CI-b4, 图 4.4 (A) 所示, 与赵萍等[2003]研究结果一致, 在蓖麻蚕中检测到 E-CIa, E-CIb 的等电点分别与 CI-b4、CI-b3 相同, 推测可能是 CI-b4、CI-b3 的同源物。文献[赵萍, 2003]分析 CI-b3 和 CI-b4 可能是 CI-1 或 CI-2 和 CI-2', E-CIa、E-CIb 与 E-CI3、E-CI2、E-CI1 是否关联还需进一步研究。

第五章 蓖麻蚕血液中 CI 基因克隆及序列分析

蓖麻蚕是我国三大产丝昆虫之一，在我国的丝绸产业中占有重要的位置，作为已经开发利用的非桑蚕资源，目前在蚕业生产中也越来越受到重视，以往对蓖麻蚕的研究主要局限于饲料资源、生理习性、饲养技术、品种繁育、种质资源等方面，随着生物技术和分子生物学技术的发展，对蓖麻蚕的研究已经深入到了分子领域，尤其是果蝇(*Drosophila melanogaster*)[Asams et al, 2000]、按蚊(*Anopheles gambiae*)[Holt et al, 2000]和家蚕(*Bombyx mori*)[Xia QY et al, 2004]基因组全序列测定的完成，为昆虫基因水平的研究提供了平台，蓖麻蚕基因的研究也取得了很大的进展。主要有蓖麻蚕线粒体细胞色素氧化酶基因[魏兆军等 2002，陈复生等 2004]。刘朝良等[2003]对蓖麻蚕的卵黄原蛋白的 cDNA 进行了克隆。对激素（滞育激素、促前胸腺激素）基因的结构和功能的研究[Wei ZJ et al, 2004; Nagata et al 1999]。近年来对蓖麻蚕抗菌肽基因研究的比较多，如：lysozyme 基因、Attacin 基因、Hdd II 基因、Lebocin-like 基因等，通过诱导或体外实验证明这些基因在蓖麻蚕机体防御方面起着重要作用。昆虫体内的蛋白酶抑制剂也是机体防御的重要组成因子，但对蓖麻蚕体内蛋白酶抑制剂基因的研究还未见报道，前一章通过活性聚丙烯酰胺凝胶电泳和活性染色技术，在蓖麻蚕幼虫血液中发现了几种胰凝乳蛋白酶抑制剂，其中在酸性电泳中，检测到了两种胰凝乳蛋白酶抑制剂，E-CIa 和 E-CIb，与家蚕幼虫血液酸性电泳检出的 CIs 相比，E-CIa 与家蚕的 CI-b4，E-CIb 与 CI-b3 等电点相同。家蚕中 CI-b1、CI-b2、CI-1、CI-2、CI-2' 由 *Ict-H* 基因编码 [Fujii et al, 1996a, 1996b]。而 CI-b4、CI-b3 可能是 CI-1 或 CI-2 和 CI-2'，由此推测在酸性电泳中检测到的 E-CIa 和 E-CIb 的基因可能与 *Ict-H* 基因有某种关联，为此本研究对其基因进行了克隆。

5.1 材料和方法

5.1.1 实验材料、菌种、载体和试剂

材料来源：供试的8个品种的蓖麻蚕由本所品保组提供，分别是斑马B、花兰、闽75、闽B、蓖樗B、白黄、斑樗B、海黄。

菌种、载体和试剂：大肠杆菌菌株 DH10B 和载体 pGEM4Z 由本实验室保存，RT-PCR 试剂盒、*Bam*H I、*Hind* III、Taq 酶、T4 连接酶、 λ -*Hind* III、Trizol 均为 TaKaRa 公司产品，其他产品均为国产分析纯。PCR 引物由上海生物工程公司合成。

5.1.2 方法

5.1.2.1 脂肪体总 RNA 的提取

解剖5龄第四天蓖麻蚕幼虫，收集脂肪体保存于-70℃备用。

RNA的提取采用Trizol方法. 见 (3.2.2)

5.1.2.2 引物设计

引物设计: 参考NCBI上登录的编码成熟CI-b1的cDNA (登录号为AF361484) 设计引物P, 引物的5'端分别引入了酶切位点, 以便鉴定目的片段。

上游引物P_F 5' -CGGGGATCCGATAAGCCAACAACGAAGCCG-3'

下游引物P_R 5' -GACAAGCTTTTAGTTTATGCATTTCTGTTCGCA-3'

下划线部分为限制性内切酶*Bam*H I 和*Hind* III 特异性切割位点。

5.1.2.3 RT-PCR

RT-PCR方法完全按照TAKARA公司试剂盒提供的方法进行, PCR反应条件为: 95℃ 预变性 10 min, 94℃变性 30 s, 55℃ 退火1 min, 72℃ 延伸1 min 30 s, 35个循环, 72℃延伸10 min。详细步骤见3.2.3

5.1.2.4 目的片段的纯化和回收

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳进行目的片段的分离, 用 Glassmilk 纯化和回收。方法见 3.2.6

5.1.2.5 重组载体的构建

8个蓖麻蚕品种的RT-PCR纯化产物、pGEM4Z质粒DNA经*Bam*H I 和*Hind*III双酶切后, 低熔点胶回收目的片段, 用T₄DNA连接酶进行连接, 构建重组载体。具体反应体系如下:

核酸的酶切反应体系

ddH ₂ O	7.5 μL
10×BufferK	1.5 μL
<i>Bam</i> H I / <i>Hind</i> III	1/1 μL
RT-PCR 纯化产物	4 μL
Total	15 μL

质粒 DNA 酶切体系

ddH ₂ O	32 μL
10×BufferK	4 μL
<i>Bam</i> H I / <i>Hind</i> III	1/1 μL
质粒 DNA	2 μL
Total	40 μL

酶切-连接反应体系

连接 Buffer	1 μ L	
酶切好质粒 DNA	1 μ L	
酶切好的核酸 DNA	7 μ L	
T ₄ 连接酶	1 μ L	
Total	10 μ L	16℃连接过夜

取连接产物5 μ L, 转化感受态大肠杆菌DH10B细胞(感受态细胞的制备见2.2.8), 涂布于平板培养基, 37℃恒温培养过夜, 挑取单菌落于液体培养基中继续培养10h左右, 取少量菌液约500 μ L进行快抽(快抽方法见2.2.9), 经琼脂糖凝胶电泳检测后, 鉴定的菌液小批量提取质粒DNA(见2.2.4), 然后酶切鉴定。酶切反应体系如下:

ddH ₂ O	7.5 μ L	
10×BufferK	1.5 μ L	
<i>Bam</i> H I / <i>Hind</i> III	1/1 μ L	
质粒 DNA	4 μ L	
Total	15 μ L	37℃酶切 3 h

经1%的琼脂糖凝胶电泳检测后送上海生物工程公司测序。

5.1.2.6 序列分析

序列比较利用 NCBI 上的 Blastn 进行, 多序列比对; 用 EBI 上的 Clustalw 软件进行同源性比对。用 SMART 软件预测功能结构域。

5.2 结果与分析

5.2.1 脂肪体 RNA 的提取

Trizol法提取的8个蓖麻蚕品种脂肪体总RNA, 经1%的琼脂糖凝胶电泳检测, 结果见图5.1。图中可以明显看到三条带, 分别为28SrRNA、18SrRNA和5SrRNA。符合所要求的纯度, 可以进行反转录实验。

5.2.2 RT-PCR 扩增结果

按照试剂盒说明书提供的方法步骤, 合成第一链cDNA, 再以cDNA为模板, 用设计的引物进行PCR扩增, PCR产物经1%琼脂糖电泳检测, 结果见图5.2。根据Marker推测扩增的片段大约为200bp左右。

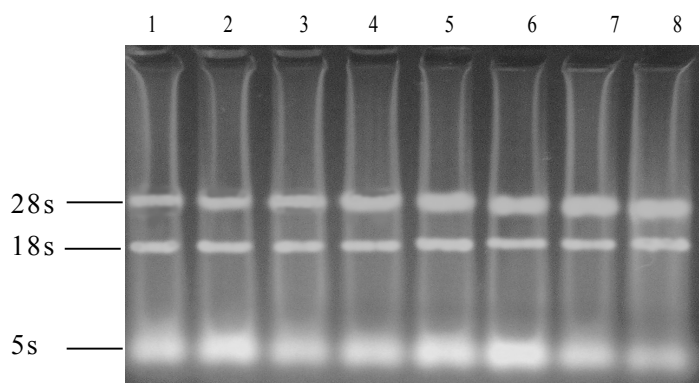


图5.1 八个蓖麻蚕品种RNA提取结果

1-8分别为 斑马B、花兰、白黄、闽75、蓖栲B、斑栲B、闽B、海黄

Fig 5.1 The extraction result of RNA from fatbody of eri silk worm

The samples of lane 1-8 are strains of BamaB, Hualan, Baihuang, Min75, BichuB, BanchuB, MinB, and Haihuang, respectively

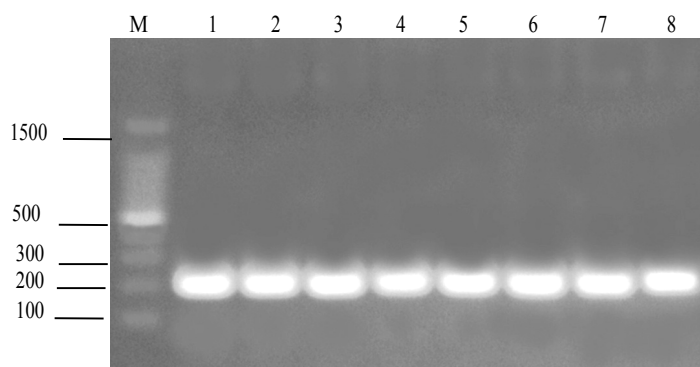


图5.2 8个蓖麻蚕品种RT-PCR电泳结果

M 核酸分子量标记 (bp). 1-8分别为斑马B、花兰、白黄、闽75、蓖栲B、斑栲B、闽B、海黄

Fig 5.2 The results of RT-PCR of eight strains eri silk worm

M. nucleic acid molecular weight marker (bp). The samples of lane 1-8 are strains of BanmaB, Hualan B, Haihuang, Min75, BichuB, BanchuB, MinB, and Haihuang, respectively

5.2.3 基因克隆

RT-PCR产物及质粒载体pGEM4Z分别用*Bam*HI 和*Hind*III双酶切, 连接后转化大肠杆菌DH10B感受态细胞, 通过筛选提取质粒DNA, 再通过*Bam*HI 和*Hind*III双酶切鉴定见图5.3, 得到了与PCR扩增结果相同大小的核酸片段, 说明蓖麻蚕的基因已经成功克隆到pGEM4Z载体中。

5.2.4 序列分析

酶切鉴定正确的的质粒送去测序, 测序结果通过在线Blastn软件进行同源性比对, 所克隆的8个蓖麻蚕品种的基因总开放阅读框为189bp, 将其命名为*E-CI*, 结果见图5.4, 由图可知, 克隆的

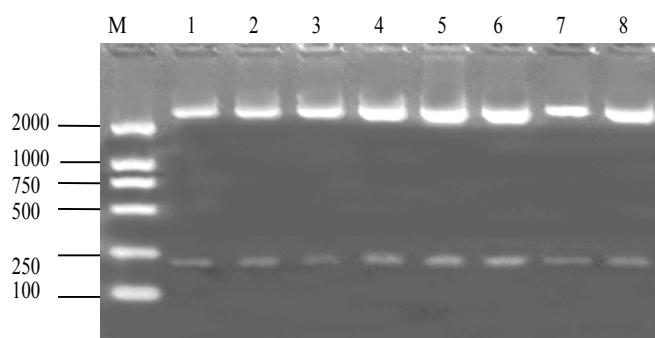


图5.3 8个蓖麻蚕品种的重组质粒酶切鉴定结果

M 核酸分子量标记 (bp). 1-8分别为斑马B、花兰、白黄、闽75、蓖栲B、斑栲B、闽B、海黄

Fig 5.3 Identification of the recombinant plasmid by enzyme digestion

M, nucleic acid molecular weight marker (bp). The samples of lane 1-8 are strains of BanmaB, Hualan, Baihuang,

Min75, BichuB, BanchuB, MinB, and Haihuang, respectively

bichuB	CGGGGATCCGATAAGCCAACAACGAAGCCGATATGCGAGCAGGCTTTGGCAATTCGGGCCCTTGTTTCGCCTACATT
min75	CGGGGATCCGATAAGCCAACAACGAAGCCGATATGCGAGCAGGCTTTGGCAATTCGGGCCCTTGTTTCGCCTACATT
banchuB	CGGGGATCCGATAAGCCAACAACGAAGCCGATATGCGAGCAGGCTTTGGCAATTCGGGCCCTTGTTTCGCCTACATT
banmaB	CGGGGATCCGATAAGCCAACAACGAAGCCGATATGCGAGCAGGCTTTGGCAATTCGGGCCCTTGTTTCGCCTACATT
minB	CGGGGATCCGATAAGCCAACAACGAAGCCGATATGCGAGCAGGCTTTGGCAATTCGGGCCCTTGTTTCGCCTACATT
hualan	CGGGGATCCGATAAGCCAACAACGAAGCCGATATGCGAGCAGGCTTTGGCAATTCGGGCCCTTGTTTCGCCTACATT
haihuang	CGGGGATCCGATAAGCCAACAACGAAGCCGATATGCGAGCAGGCTTTGGCAATTCGGGCCCTTGTTTCGCCTACATT
baihuang	CGGGGATCCGATAAGCCAACAACGAAGCCGATATGCGAGCAGGCTTTGGCAATTCGGGCCCTTGTTTCGCCTACATT
CI-b1	GATAAGCCAACAACGAAGCCGATATGCGAGCAGGCTTTGGCAATTCGGGCCCTTGTTTCGCCTACATT

bichuB	AAGCTATACTCGTACAATCAGAAGACGAAGAAGTGTGAAGAATTCATTTACGGAGGCTGCAAGGGGAAC
min75	AAGCTATACTCGTACAATCAGAAGACGAAGAAGTGTGAAGAATTCATTTACGGAGGCTGCAAGGGGAAC
banchuB	AAGCTATACTCGTACAATCAGAAGACGAAGAAGTGTGAAGAATTCATTTACGGAGGCTGCAAGGGGAAC
banmaB	AAGCTATACTCGTACAATCAGAAGACGAAGAAGTGTGAAGAATTCATTTACGGAGGCTGCAAGGGGAAC
minB	AAGCTATACTCGTACAATCAGAAGACGAAGAAGTGTGAAGAATTCATTTACGGAGGCTGCAAGGGGAAC
hualan	AAGCTATACTCGTACAATCAGAAGACGAAGAAGTGTGAAGAATTCATTTACGGAGGCTGCAAGGGGAAC
haihuang	AAGCTATACTCGTACAATCAGAAGACGAAGAAGTGTGAAGAATTCATTTACGGAGGCTGCAAGGGGAAC
baihuang	AAGCTATACTCGTACAATCAGAAGACGAAGAAGTGTGAAGAATTCATTTACGGAGGCTGCAAGGGGAAC
CI-b1	AAGCTATACTCGTACAATCAGAAGACGAAGAAGTGTGAAGAATTCATTTACGGAGGCTGCAAGGGGAAC

bichuB	GACAATCGTTTCGACACATTGGCCGAATGCGAACAGAAATGCATAAACTAAAAGCTTGTC
min75	GACAATCGTTTCGACACATTGGCCGAATGCGAACAGAAATGCATAAACTAAAAGCTTGTC
banchuB	GACAATCGTTTCGACACATTGGCCGAATGCGAACAGAAATGCATAAACTAAAAGCTTGTC
banmaB	GACAATCGTTTCGACACATTGGCCGAATGCGAACAGAAATGCATAAACTAAAAGCTTGTC
minB	GACAATCGTTTCGACACATTGGCCGAATGCGAACAGAAATGCATAAACTAAAAGCTTGTC
hualan	GACAATCGTTTCGACACATTGGCCGAATGCGAACAGAAATGCATAAACTAAAAGCTTGTC
haihuang	GACAATCGTTTCGACACATTGGCCGAATGCGAACAGAAATGCATAAACTAAAAGCTTGTC
baihuang	GACAATCGTTTCGACACATTGGCCGAATGCGAACAGAAATGCATAAACTAAAAGCTTGTC
CI-b1	GACAATCGTTTCGACACATTGGCCGAATGCGAACAGAAATGCATAAAG---

图 5.4 克隆的蓖麻蚕基因序列和家蚕CI-b1 mRNA的CLUSTAL W (1.83)比对结果 (阴影部分为引物序列, 有下划线部分为引进的酶切位点, *表示核酸序列一致)

fig 5.4 Alignment of cloned sequences from eri silkworm and *Bombyx mori* CI-b1 mRNA with Clustal W (1.83) (the part of shade is primer, where underlines indicate *Bam*H I and *Hind*III restriction enzyme sites, the identity of nucleic acid indicate with asterisks)

8个蓖麻蚕品种的核酸序列完全一样，除去插入的酶切位点和保护碱基序列，所克隆的序列包含了编码家蚕成熟CI-b1的核酸序列，显示了它们可能具有相同的基因。

用 DNASTar 软件将所测的核酸序列翻译成氨基酸，8 个蓖麻蚕品种中所克隆到的核酸序列编码 62 个氨基酸残基组成的蛋白，都有 6 个半胱氨酸残基，活性位点都为 AYI, 与家蚕 CI-b1 相同。

banchuB	DKPTTKPICEQAFGNSGPCF AYIK LYSYNQTKKKCEEFIYGGCKGNDNRFDTLAECEQKCIN 62
haihuang	DKPTTKPICEQAFGNSGPCF AYIK LYSYNQTKKKCEEFIYGGCKGNDNRFDTLAECEQKCIN 62
bichuB	DKPTTKPICEQAFGNSGPCF AYIK LYSYNQTKKKCEEFIYGGCKGNDNRFDTLAECEQKCIN 62
min75	DKPTTKPICEQAFGNSGPCF AYIK LYSYNQTKKKCEEFIYGGCKGNDNRFDTLAECEQKCIN 62
baihuang	DKPTTKPICEQAFGNSGPCF AYIK LYSYNQTKKKCEEFIYGGCKGNDNRFDTLAECEQKCIN 62
minB	DKPTTKPICEQAFGNSGPCF AYIK LYSYNQTKKKCEEFIYGGCKGNDNRFDTLAECEQKCIN 62
hualan	DKPTTKPICEQAFGNSGPCF AYIK LYSYNQTKKKCEEFIYGGCKGNDNRFDTLAECEQKCIN 62
banmaB	DKPTTKPICEQAFGNSGPCF AYIK LYSYNQTKKKCEEFIYGGCKGNDNRFDTLAECEQKCIN 62
CI-b1	DKPTTKPICEQAFGNSGPCF AYIK LYSYNQTKKKCEEFIYGGCKGNDNRFDTLAECEQKCIN 62

图 5.5 蓖麻蚕和家蚕 CI-b1 氨基酸序列的 Clustal W (1.83)对比对结果，加粗部分为活性位点，*表示氨基酸一致

Fig 5.5 Alignment of amino acid sequences of cloned eri silkworm genes and *Bombyx mori* CI-b1 with Clustal W the amino acids with bold was active site and indentity of amino acid are indicated with asterisks

使用网上在线 SMART 工具对蛋白功能结构域进行预测，结果见图 5.6，下面的刻度是标尺。后面加粗的标有 KU 的为预测的 Kunitz 结构域，因此所克隆的蛋白酶抑制剂属于 Kunitz 型蛋白酶抑制剂。

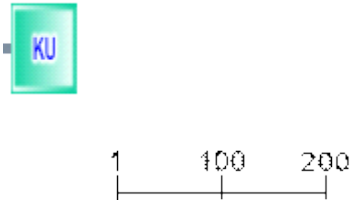


图 5.6 蛋白的功能结构域预测图

Fig 5.6 The profile of functional domain of predictive protein

5.3 讨论

脂肪体是昆虫幼虫、蛹、蛾的重要组织，是蛋白质合成、贮藏以及代谢的重要场所，与昆虫的发育、变态密切相关。徐豫松等（2000）对家蚕5龄起蚕至化蛹期蛋白质合成变化进行了研究，发现5龄第4天、第5天是蛋白合成速度最快的时期，而且合成的蛋白以分泌型蛋白为主，这些分泌型蛋白多数进入到血淋巴。沈以红等（2004）等用EST测序的方法对家蚕脂肪体基因表达的特征进行研究，表明脂肪体组织表达丝氨酸蛋白酶抑制剂、胰凝乳蛋白酶抑制剂CI-8及serpin-2等基因，对前两个基因表现为极高表达。本实验利用Trizol方法，成功的从8个蓖麻蚕品种幼虫5龄第4

天的脂肪体中提取了总RNA，利用RT-PCR技术从中克隆了蓖麻蚕的基因 *E-CI*，所克隆的核酸序列长189bp。通过序列比对分析，克隆的8个品种的核酸序列完全相同，它们都编码62个氨基酸残基的蛋白，都有6个半胱氨酸残基。对其功能结构预测表明，有一个明显的Kunitz型结构域，属于典型的Kunitz型蛋白酶抑制剂。

家蚕中 *Ict-H* 基因编码多种蛋白，如CI-b1、CI-b2、CI-1、CI-2、CI-2'，但这些蛋白的等电点不同。通过比对发现，克隆的 *E-CI* 序列包含了编码成熟CI-b1的核酸序列，说明蓖麻蚕的E-CIa和E-CIb蛋白的编码基因与CI-b1的编码基因 *Ict-H* 可能相同，虽然它们的等电点不同。

第六章 蓖麻蚕胰凝乳蛋白酶抑制剂基因的表达

前一章对 8 个蓖麻蚕品种的 CI 基因进行了克隆, 测序结果表明 8 个品种克隆的基因序列相同, 经过同源性比对, 它们与编码家蚕 CI-b1 成熟蛋白的核酸序列完全一样。为了进一步研究所克隆的基因编码的蛋白, 本实验对克隆的基因进行了原核诱导表达。

6.1 材料和方法

6.1.1 实验材料

菌种: 大肠杆菌表达菌株 BL21 (DE3) 和表达载体 pET28a 均由本实验室保存。 *Bam*H I、*Hind* III、*Taq* 酶、T4 连接酶、核酸 Maker、Protein Marker 为 TaKaRa 公司产品, 其他产品均为国产分析纯。

6.1.2 实验方法

6.1.2.1 pET28a/*E-CI* 重组表达载体的构建

将前一章已经构建好的重组载体 pGEM4Z/*E-CI* 经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切, 回收目的片段, 将其接入到用同样双酶切的转移载体 pET28a 中, 转化大肠杆菌 DH10B 感受态细胞, 培养过夜后, 挑取单菌落, 提取质粒 DNA, 酶切鉴定重组载体。

6.1.2.2 重组蛋白的诱导表达及表达形式的检测

重组体 pET28a/*E-CI* 和空载体分别导入大肠杆菌表达菌株 BL21 (DE3) 中, 平板培养后, 挑取单菌落于 3 mL 含有相应抗生素的 LB 液体培养基中, 37℃ 培养过夜, 按 1: 100 接种于 3 mL LB 液体培养基中 (含有卡那霉素), 摇床培养至 OD₆₀₀ 值 0.6-0.8 时, 加入 IPTG 使终浓度为 1 mmol/L, 并以没有加 IPTG 的做为对照。37℃ 继续培养, 收集菌体, 超声破碎后, 4℃ 10000 g 离心 15 min, 将上清保存于一新的离心管中待用。沉淀再进一步处理具体步骤见 3.2.11。然后将上清和处理后的沉淀样品用 15% 的 SDS-PAGE 进行检测。

6.1.2.3 表达条件的优化

将含有 pET28a/*E-CI* 的 BL21 菌液以 1: 100 的体积比接种于含卡那霉素的 LB 液体培养基中, 在添加 IPTG 后继续诱导 2、3、4、5、6、7、8、9、10 小时, 分别取样处理, 用 15% 的 SDS-PAGE 电泳分析。

6.2 结果与分析

6.2.1 表达载体的构建

通过测序鉴定正确的重组 pGEM4Z/*E-CI* 载体经 *Bam*H I 和 *Hind* III 切下目的片段, 纯化后与用同样两个酶切的 pET28a 表达载体连接, 经过转化、培养、筛选后, 纯化质粒 DNA, 酶切鉴定结果见图 6.1, 得到与 PCR 产物相同的片段, 说明蓖麻蚕 *E-CI* 基因已经成功重组到表达载体中。由于 pET28a 表达是在 T7 启动子的控制之下, 而在启动子的 N 端包含了一个 His 标签/thrombin/T7 标签构型, C 端也有一个可选择的 His 标签, 因此在表达载体的多克隆位点的上游有一段含有标签的序列, 上游序列为 MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGR, 所以表达的蛋白是一融合蛋白。

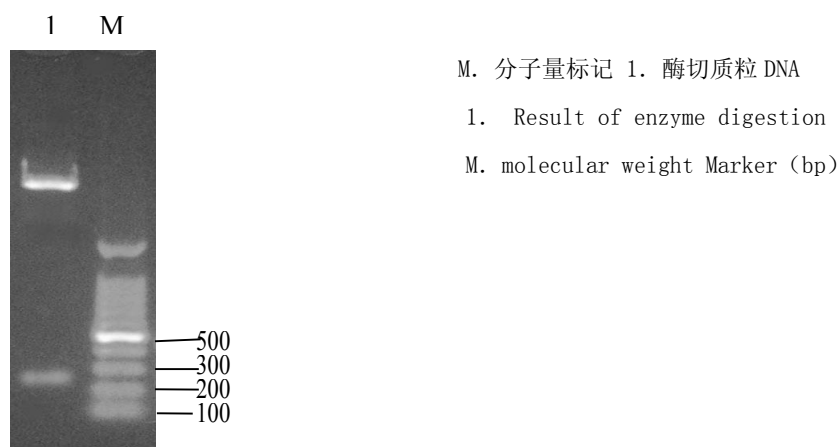


图 6.1 表达载体酶切鉴定图

Fig6.1 Identification of the recombinant plasmid by enzyme digestion

6.2.2 重组蛋白的诱导表达

重组的表达载体 pET28a 转化大肠杆菌表达菌株 BL21 (DE3), 重组菌经 IPTG 诱导后, 收集菌体经超声处理后进行 SDS-PAGE 分析, 结果见图 6.2, 与阴性对照相比, 有明显的重组蛋白表达条带 (图中箭头所指), 分子量为 15kD 左右, 与预测的相比要大些, 可能是诱导的蛋白在表达过程中受到了修饰, 比如糖基化, 具体原因还需要进一步实验验证。同时对超声破碎后的上清和沉淀进行对照电泳, 结果在超声裂解的上清中没有检测到诱导的蛋白条带, 而在沉淀中检测到很强的特异性蛋白条带, 表明重组蛋白主要以包涵体形式存在于沉淀中。

6.2.3 蛋白表达量与表达条件的关系

加 IPTG 诱导后随着时间的延长, 蛋白表达量逐渐增加 (见图 6.3), 当其在诱导后 8 h 时,

蛋白表达量达到最大，所以诱导的最佳时间为 8 个小时。

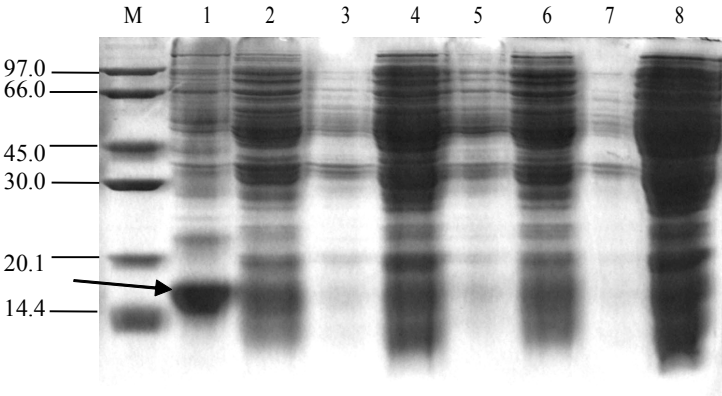
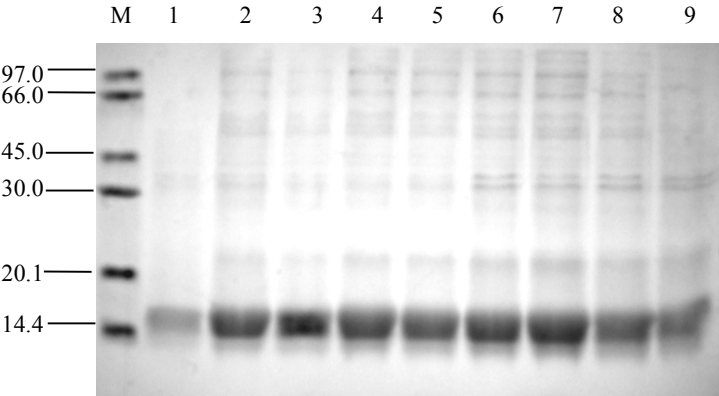


图6. 2诱导表达蛋白SDS-PAGE图

M. 蛋白分子质量标记 (kD), 1. 重组菌诱导的包涵体裂解液, 2. 重组菌诱导的超声裂解液上清, 3. 重组菌未诱导的包涵体裂解液, 4. 重组菌未诱导超声裂解液上清, 5. 对照诱导的包涵体裂解液, 6. 对照诱导的超声裂解液上清, 7. 对照未诱导包涵体裂解液, 8. 对照未诱导超声裂解液上清

Fig 6.2 SDS-PAGE Analysis of PER28a/E-CI expression

M. Protein MW standard(kD), 1.Inclusion bodies lysate of BL21(PET28a/E-CI) after induced by IPTG, 2. Supernatant of BL21(PET28a/E-CI) after induced by IPTG, 3.Inclusion bodies lysate of BL21(PET28a/E-CI) before induced by IPTG, 4. Supernatant of BL21(PET28a/E-CI) before induced by IPTG, 5. Inclusion bodies lysate of BL21(PET28a) after sonication induced by IPTG, 6. Supernatant of BL21(PET28a) after induced by IPTG, 7. Inclusion bodies lysate of BL21(PET28a) before induced by IPTG, 8. Supernatant of BL21(PET28a)before induced by IPTG.



4

图 6. 3 不同时间诱导表达结果

M. 蛋白分子量标记 (kD), 1-9 分别代表诱导时间为 2、3、4、5、6、7、8、9、10 小时

Fig 6.3 Expression of recombinant protein in *E coli* BL21 at defferent time

M. Protein MW marker(kD), The samples of 1-9 represent 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h, 8h, 9h, 10h induced by IPTG, respectively

6. 3 讨论

pET 原核表达质粒是最有效的原核表达系统之一，它利用噬菌体 T7 启动子与 T7 RNA 聚合酶之间作用的高度特异性及高效性，提高外源基因在细菌体中表达效率。本研究利用 pET28a 质

粒对克隆的蓖麻蚕 *E-CI* 基因进行诱导表达, 经 SDS-PAGE 检测, 与阴性对照相比, 成功诱导了重组蛋白的表达, 融合蛋白的分子量约为 15kD, 与预测的相比, 分子量偏大, 具体原因还需要进一步的实验验证。

对其表达形式检测表明, 表达的蛋白主要以包涵体的形式存在超声裂解液的沉淀中。通过蛋白表达条件的优化, 诱导蛋白在加 IPTG 后 8 小时表达量达到最高。

为了检测所诱导的融合蛋白与 α -胰凝乳蛋白酶的抑制特性, 对诱导的融合蛋白进行了酸性活性凝胶电泳和活性染色, 结果没有检测到明显的抑制条带, 推测其原因可能是与所用的表达菌株有关, 因为在家蚕中已经证明了菌株对重组 CI-b1 的活性有影响(He ningjia et al, 2004), 在蛋白表达过程中, 细菌细胞的胞质匀浆可能会影响表达蛋白二硫键的正确形成, 使蛋白不能正确折叠, 从而失去了活性。具体原因还有待于进一步的试验确证。

第七章 全文结论

蛋白酶抑制剂是对蛋白酶具有抑制活性的一类蛋白,蛋白酶抑制剂不但对昆虫的生长发育有调控作用,而且由于昆虫体内没有高等动物所具有的免疫球蛋白和淋巴细胞,因此蛋白酶抑制剂就显得尤为重要。已经有实验证明它是机体防御体系的重要参与因子,是昆虫非细胞免疫系统的重要组成部分。胰凝乳蛋白酶抑制剂在家蚕中是一种重要的生化标记,蓖麻蚕和家蚕都属于鳞翅目昆虫,但是蓖麻蚕属于野生型,有着自身独特的生理、生化标记,因此本实验对蓖麻蚕体液中的胰凝乳蛋白酶抑制剂种类分布进行了调查,同时对其中的一种抑制剂的基因进行了克隆和表达。通过试验得出以下结论。

7.1 蓖麻蚕体液中胰凝乳蛋白酶抑制剂种类的调查

7.1.1 胰凝乳蛋白酶抑制剂的种类

通过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和活性染色技术,对 20 个蓖麻蚕品种幼虫体液中的胰凝乳蛋白酶抑制剂进行了调查,电泳采用了碱性(pH8.3)和酸性(pH4.0)两种电泳缓冲体系对胰凝乳蛋白酶抑制剂种类进行了全面调查,结果在 20 个品种中共检测到 9 种胰凝乳蛋白酶抑制剂,分别命名为 E-CI1、E-CI2、E-CI3、E-CI4、E-CI5、E-CI6、E-CI7、E-CIa 和 E-CIb,在碱性电泳中检测到 E-CI1、E-CI2、E-CI3、E-CI4、E-CI5、E-CI6 和 E-CI7,随着迁移率不同,它们的等电点依次减小;酸性条件下检测到 E-CIa 和 E-CIb 两种抑制剂,它们的等电点极为接近,偏中性。其中 E-CI1、E-CI2、E-CI3、E-CI6、E-CI7、E-CIa 和 E-CIb 是所调查品种所共有的,表明他们是蓖麻蚕生长发育必需的抑制剂类型。E-CI4 和 E-CI5 的等电点极为接近,在有的品种中仅有 E-CI4,有的品种中仅有 E-CI5,有的品种则两种蛋白共同存在。说明在蓖麻蚕品种中,胰凝乳蛋白酶抑制剂也存在着多型性。

7.1.2 发育时期的调查

对蓖麻蚕 4 龄起蚕-蛹期的调查发现,在碱性电泳中,E-CI1、E-CI2、E-CI3 和 E-CI4 从 5 龄第 3 天开始活性明显增强,直到化蛹仍有较强的活性,说明这几种抑制剂的表达量与幼虫的发育时期有关。E-CI6 和 E-CI7 的活性整个时期都很弱,不易分辨。酸性电泳中 4 龄食桑期没有检测到 E-CIa,4 眠开始有活性,且眠期活性强于 5 龄起蚕,5 龄期活性呈上升趋势,在第 4 天明显增强,直到化蛹仍能检测到活性;E-CIb 从 4 龄第 2 天开始检测到活性,眠期和 5 龄的变化趋势与 E-CIa 相同。

7.1.3 与家蚕胰凝乳蛋白酶抑制剂的对比调查

与家蚕体液中胰凝乳蛋白酶抑制剂比较,在碱性电泳中蓖麻蚕 E-CI4 (或 E-CI5) 与家蚕的 CI-3 (CI-4) 的等电点相同,在家蚕中 CI-3 和 CI-4 由一对等位基因控制,推测 E-CI4 和 E-CI5 也可能由一对等位基因控制。E-CI1、E-CI2 和 E-CI3 等电点为中性,是否与家蚕的 CI-1、CI-2 和 CI-2' 相对应,还有待于进一步调查。

酸性电泳中,蓖麻蚕检测到两种抑制剂 E-CIa 和 E-CIb,分别与家蚕中检测到 CI-b4 和 CI-b3 相对应。推测他们可能是同源物。有文献报道 CI-b3 和 CI-b4 可能是 CI-1 或 CI-2、CI-2', E-CIa 和 E-CIb 是否与 E-CI1、E-CI2 和 E-CI3 有关还需要详细的实验验证。

7.2 胰凝乳蛋白酶抑制剂的基因克隆和序列分析

利用 Trizol 方法提取了蓖麻蚕 5 龄第 4 天脂肪体总 RNA,通过反转录实验合成了第一链 cDNA,以编码家蚕成熟的 CI-b1 序列设计引物,对 8 个蓖麻蚕品种的 CI 基因进行了克隆。结果 8 个品种中克隆的基因序列完全一样。克隆的完整阅读框由 189bp 组成,编码 62 个氨基酸残基的蛋白,其中有 6 个半胱氨酸残基,活性位点为 AYI。用 SMART 对其编码的蛋白进行功能预测,有一个明显的 Kunitz 结构域。通过 Clustal W 软件比对,在 8 个品种中克隆基因序列包含了编码家蚕成熟 CI-b1 核酸序列。推测蓖麻蚕中编码 E-CIa 和 E-CIb 的基因与家蚕中编码 CI-b1 的基因可能来源于同一个基因。

7.3 克隆基因的表达

pET 原核表达质粒是最有效的原核表达系统之一,它利用噬菌体 T7 启动子与 T7 RNA 聚合酶之间作用的高度特异性及高效性使得外源基因能在细菌体中高效率表达。本研究将克隆的蓖麻蚕的 CI 基因成功重组到 pET28a 表达载体中,在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中诱导重组蛋白表达。通过 SDS-PAGE 分析,与对照相比,诱导的蛋白主要是以包涵体的形式存在,且诱导的融合蛋白分子量大约为 15kD。

对重组蛋白诱导时间进行了优化,实验表明在加入 IPTG 诱导 8 小时时,重组蛋白的表达量达到峰值。

参考文献

1. 蔡祖花.胰蛋白酶抑制剂的临床研究概况. 中国生化药物杂志,2000,21(3):157.
2. 陈复生, 魏兆军, 李庆宝等. 蓖麻蚕线粒体 *cox2* 基因的克隆、序列测定和分子系统学分析. 蚕业科学,2004,30(1).
3. 李海燕,朱延明,马凤鸣. 植物基因工程的研究进展.东北农业大学学报, 2000,31(4),399-405.
4. 李娟, 赵萍, 代方银等. 家蚕血液胰凝乳蛋白酶抑制剂的多态性分布.昆虫学报, 2006, 49 (4): 550-555.
5. 凌贤龙.胰蛋白酶与胰腺疾病.国外医学消化系疾病分册,1992,12(3):139.
6. 刘朝良, 浦善太, 中垣雅雄.蓖麻蚕卵黄原蛋白 cDNA 的克隆及序列分析.激光生物学报,2003,12(1):12-17.
7. 曲小华,浦冠勤. 蛋白酶抑制剂的研究与应用. 蚕桑茶叶通讯,2003(1):19-21.
8. 萨姆布鲁克 JEF, 弗里奇 T, 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南[M], 第二版, 北京科学出版社.1992.
9. 森田敏照,吉川秀夫. 昆虫的蛋白质分解酶抑制物质.日动志,1961,70:53-54.
10. 上海第一医学院儿科医院编.实用药物手册[M].上海: 上海科技技术出版社, 1982.
11. 沈洁, 陈向荣. 胃癌细胞巯基蛋白酶表达异常及临床意义. 世界华人消化杂志,1999,7(2):147-149.
12. 沈同, 王镜岩. 生物化学. 北京:高等教育出版社,2000,第二版.
13. 沈以红, 程道军, 查幸福等. 家蚕脂肪体组织基因表达谱的研究 I .家蚕 5 龄幼虫脂肪体组织基因表达分析.蚕业科学,2004,30(1):24-27.
14. 苏伦安.野蚕学,农业出版社,1993.
15. 魏兆军, 赵巧玲, 张志芳等. 蓖麻蚕线粒体基因组细胞色素氧化亚基III的序列及分子进化分析. 昆虫学报,2002,45(2):193-197.
16. 徐豫松,徐俊良,川崎秀树. 家蚕脂肪体合成蛋白质变化的研究.蚕业科学,2000,26(4):239-243.
17. 袁春华,梁宋平. Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂结构与功能研究.生命科学研究,2003,7(2):110-115.
18. 赵萍, 夏庆友, 藤井博等. 家蚕不同品种与个体的血液胰凝乳蛋白酶抑制剂差异研究. 蚕业科学,2003,29(4):349-354.
19. 中国农业科学院蚕业研究所. 中国养蚕学[M].上海科技出版社, 1990: 867-892.
20. Adams M.D., Celniker S.E., Holt R.A., et al. . The genome sequence of *Drosophila melanogaster*.Science 2000, 287:2185-2195.
21. Bode W., Huber R. . Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinase.Eur J Biochem 1992, 204:433-451.
22. Cordero M.J., Raventos D., San S.B. . Expression of a maize proteinase inhibitor gene is induced in response to wounding and fungal infection: systemic wound response of a monocot gene. Plant J 1994, 6(2):141-150.

23. Davis B.J.. Disc electrophoresis II Method and application to human serum protein. *Ann N Y Acad Sci* 1964, 121(2):404-427.
24. Eguchi M. . Inhibition of the fungal protease by haemolymph protease inhibitors of the silkworm *Bombyx mori* L. *Appl Ent zool* 1982, 17(4):589-590.
25. Eguchi M., Furukawa S., Iwamoto A. . Proteolytic enzyme in the midgut of the pharate adult of the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Physiol* 1972, 18:2457-2467.
26. Eguchi M., Haneda I., Iwamoto A. . Properties of protease inhibitors from the haemolymph of silkworms *Bombyx mori*, *Antheraea pernyi* and *Philosamia Cynthia ricini*. *Comp Biochem Physiol* 1982, 71B(4):569-576.
27. Eguchi M. . Inhibition of the fungal protease by haemolymph protease inhibitors of the silkworm, *Bombyx mori*. *Appl. Ent. Zool* 1982, 17:589-590.
28. Eguchi M., Iwamoto A. . Hydrolysis of solubilized fibroin and silk proteins in the midgut of the pharate adult of *Bombyx mori*. *Insect Physiol* 1974, 21:577-588.
29. Eguchi M., Ueda K., Yamashita M. . Genetic variants of protease inhibitors against fungal protease and alpha-chymotrypsin from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem Genet* 1984, 22:1093-1102.
30. Eguchi M., Ueda K., Yamashita M. . Genetic variants of ptotease inhibitors against fungal protease and alpha-chymotrypsin from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem Genet* 1984, 22(11-12):1093-1102.
31. Franco O.L., Santos R.C., Batista J.A. . Effects of black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of *Anthonomus grandis*. *Phytochemistry* 2003, 63(3):343-349.
32. Fujii H., Aratake H., Doira H., Koga K. . Genetic analysis of hemolymph chymotrypsin inhibitors in the silkworm, *Bombyx mori*. *Seric Sci* 1996, 65(a):334-341.
33. Fujii H., Aratake H., Doira H., Koga K. . Genetic analysis of hemolymph chymotrypsin inhibitors-3 and 4 in the silkworm, *Bombyx mori*. *Seric Sci* 1996, 65(b):385-389.
34. Habu Y., Peyachoknagul S., Umemoto K. . Structure and regulated expression of Kunitz chymotrypsin inhibitor genes in winged bean. *J Biochemistry* 1992, 111(2):249-258.
35. Hamdaoui A., Watalev S., Devreese B. . Purification and characterization of a group of five novel peptide sirine protease inhibitors from ovaries of the desert locust, *Schistocerca gregatia*. *Eur J Biochem* 1998, 254(1):90-95.
36. Hanschke R., Hanschke M. . Occurrence and function of a proteinase inhibitor in .the hemolymph of insects. *Acta Biol Med Ger* 1975, 34(4):531-537.
37. He Ningjia., Fujii H., Kusakabe T., et al.. Overexpression in *Escherichia coli* and purification of recombinant CI-b1, a Kunitz-type chymotrypsin inhibitor of silkworm. *Protein expression and purification* 2004, 38:9-16.
38. Hergenbahn H.G., Hall M., Soderhall K. . Purification and characterization of an alpha2-macroglobulin-like ptoteinase inhibitor from plasma of the crayfish *pacifastacus leniusculus*.

- Biolchem 1988, 255(3):801-806.
39. Holt R.A., Chaturvedi K. . The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. Science 2000, 300:2033.
 40. Houseman J.G. . Anterior midgut ptoteinase inhibitor from *Glossina morsitans morsitans* Westwood (Diptera: Glossinidae) and its effects upon testse digestive enzymes.Can J.Zool 1980, 58:79-87.
 41. Jongsma M.A., Bakker P.L., Peters J., et al. . Adaptation of *spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibiton 1995, 92(17): 8041-8045.
 42. Kang S.H., Fuchs M.S. . Isolation of a chymotrypsin inhibitor from *Drosophila melanogaster* .Insect Biochem 1974, 4:1-8.
 43. Kang S.H., Fuchs M.S. . Purificaion and partial characterization of a protease inhibitor from *Drosophila melanogaster*.Biochim Biophys Acta 1980, 611(2):379-383.
 44. Kanost M.R. . Isolation and characterization of four serine proteinase inhibitors (serpins) from hemolymph of *Manduca Sexta*. Insect Biochem 1990, 20:141-147.
 45. Kanost M.R., Prasad S.V., Wells M.A. . Primary structure of a member of the serpin superfamily of proteinase inhibitors from an insect, *Manduca Sexta*,. J Biol chem 1989, 264:965-972.
 46. Krauss B., Dorn R.. Evolutiong of the trans-splicing *Drosophila locus* mod(*mdg4*) in several species of Diptera and Lepidoptera. Gene 2004, 331:165-176.
 47. Kunitz M. . Crystalline soybean trypsin inhibitor General properties. J Gen Physiol 1947, 30: 291-305.
 48. Kunitz M. . Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean.Science 1945, 101:668-669.
 49. Kunitz M., Northrop J.H. . Isolation from beef pancreas of crystalline trypsinngen, trypsin inhibitor and an inhibitor trypsin compound.J Gen Physiol 1936, 19:991-1007.
 50. Laskowski M.J., Kato I.. Protein inhibitors of proteineases.Annu Rev Biochem 1980, 49:593-626.
 51. Lu S.M., Lu W., Qasim M.A. . Predicting the reactivity of proteins from their sequence alone: Kazal family of protein inhibitors of serine proteinases. Proc Natl Acad Sci USA 2001, 98(4):1410-1415.
 52. Mickel C.E., Standish J. . University of Minnesota Agricultural Experimental Station Technical Bulletin 1947, 178:1-20.
 53. Morita T., Kikkawa H. . Protease inhibitors in insects.Zool, Mag 1961,70:53-54.
 54. Green N.W., Neurath H. . The Proteins.Academic Press.New York, 1954.
 55. Nagata K., Maruyama K., Kojima K.,et al. . Prothoracicotropic activity of SBRPs,the insulin-like peptides of the saturniid silkworm *Samia cynthia ricini*. Biochem Biophys Res Commun 1999, 266(2):575-578.
 56. Peansky R.J., Laskowski M. . Chymotrypsin inhibitor from *Ascaris*. Biochim Biophys Acta 1960, 37: 167-169.
 57. Pearce G., Johnson S., Ryan C A. . Purification and characterization from tobacco (Nicotiana

- tabacum) leaves of six small, wound inducible, protease isoinhibitors of the potato inhibitor II family. *Plant Physiol* 1993, 102(2):639~644.
58. Plunkett G., Senear D.F., Zuroske G., Ryan C.A. . Protease inhibitors I and II from leaves of wounded tomato plants:4 purification and properties. *Arch Biochem Biophys* 1982, 213(2):463~472.
59. Plunkett G., Senear D.F., Zurosle G., Ryan C.A. . Proteinase inhibitor I and II from leaves of wounded tomato plant purification and properties. *Arch Biochem Biophys* 1982, 213(2):463-472.
60. Potempa J., Korzus E., Travis J. . The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function and regulation. *J Biol Chem* 1994, 269(23):15957-15960.
61. Ramesh N., Sugumaran M., Mole J.E. . Purification and characterization of two trypsin inhibitors from the hemolymph of *Manduca sexta* larvae. *J Biol Chem* 1998, 263:11523-11527.
62. Sasaki T. . Chymotrypsin inhibitors from hemolymph of the silkworm *Bombyx moti*. *J Biochem* 1978, 84:267-276.
63. Shinohara T., Aso Y., Shirai K., et al. . Purification of chymotrypsin inhibitors from larval haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biosci Biotech Biochem* 1993, 57(7):1067-1071.
64. Silverman G.A., Bird P.I., Carrell R.W. et al. . The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem* 2001, 276(36):33293-33296.
65. Spiro K.A., Chen P.S. . Isolation of a chymotrypsin inhibitor from *Culex pipiens* by affinity chromatography. *Insect Biochem* 1977, 17:453-457.
66. Suzuki T., Natori S., Changes in the amount of sarcocystain A, a new cysteine proteinase inhibitor, during the development of adult *Sarcophaga peregrina*. *Insect Biochem* 1986, 16:589-595
67. Suzuki T., Natori S. . Purification and characterization of an inhibitor of the cysteine protease the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* larvae. *J. Biol Chem* 1985, 260:5115-5120.
68. Trybina T., Dunaevsky Y., Musolyamov A. . New ptotease inhibitors from buckwheat seeds: properties, partial amino acid sequences and possible biological role. *Biol Chem* 2004, 385(5):429-434.
69. Uriel J., Berges J, . Characrerization of natural Inhibitors of trypsin and chymotrypsin by electrophoresis in acrylamide-agarose gels. *Nature* 1968, 218:578-580.
70. Valueva T.A., revina T.A., Gvozdeva E.L. . Role of proteinase inhibitors in potato protection. *Bioorg Khim* 2003, 29(5):499-504.
71. Wei Z.J., Zhang T.Y., Sun J.S., et al. . Molecular cloning developmental expression and tissue distribution of the gene encoding DH, PBAN and other FXPRL neuropeptides in *Simia Cynthia ricini*. *Insect Physiol* 2004, 50(12):1151-1161.
72. Xia Q.Y., Zhou Z.Y., Lu C. et al. . A draft sequence for the genome of the domedicated silkworm(*bombyx mori*). *Science* 2004, 306:1937-1940.
73. Yang Y.J., Davies D.M. . A mosquito-chymotrypsin inhibitor in tissues of adult *Aedes aegypti*. *Comp Biochem, Physiol* 1972, 43B

致 谢

本论文是在导师赵巧玲研究员的悉心指导下完成的。导师渊博的知识、严谨治学的态度、务新求实的工作作风以及宽厚待人的原则，是我一生学习的榜样。三年的求学生涯中，导师不但在工作中给予了耐心、细致的指导，在生活中也给予了无微不至的关怀。师恩如山，在此论文完成之际，谨向恩师致以崇高的敬意和衷心的感谢！

本研究是在农业部家蚕重点实验室完成的，感谢实验室负责人沈兴家老师、唐顺明老师、汪生鹏老师在实验过程中给予的支持和帮助。感谢本课题组的夏定国老师、裘志勇老师在实验设计上给予的建议和帮助。感谢本研究所品种资源组的徐安英老师、张月华老师提供实验用蓖麻蚕材料。在实验准备过程中杜厚琴女士给予了极大帮助，在此一并表示感谢。

感谢中国感农业科学院蚕业研究所的各级领导以及科研处的张健处长、任永利老师对本研究的大力支持。

感谢中科院遗传发育所的高婷博士对实验给予的建议和帮助。在整个实验过程中，我的硕士同学李珍、路慧给予了很大的支持，在此对她们表示感谢。

特别感谢我的大学同学王素会和张洪娜好友在整个硕士期间在生活上给予的关心，在精神上给予的极大鼓舞和支持。

最后感谢我的爱人陈武林以及家人在精神上和物质上给予的鼓舞和大力支持。

没有大家的帮助，我的论文是无法完成的，它凝聚着大家的心血。值此论文完成之际，向所有关心、帮助、支持我的老师和同学们再次表示最衷心的感谢！祝你们身体健康，工作顺利！

作 者 简 历

赵秀振，女，汉族，1976年11月生，河北省唐山市迁西县人。

1996年9月-2000年7月就读于沈阳农业大学生物技术学院。

2000年8月-2001年8月工作于山东省栖霞市方山蚕种场。

2001年12月-2004年8月，在中国农业科学院品种资源研究所重点实验室从事实验研究。

2004年9月考入中国农业科学院研究生院，攻读特种经济动物饲养专业的硕士学位。

硕士期间发表的论文情况

1. 赵秀振，赵巧玲，唐顺明，沈兴家，徐安英，张国政，郭锡杰. 蓖麻蚕血液胰凝乳蛋白酶抑制剂种类的调查. 蚕业科学, 2007, 33 (1): 133-137.
2. 赵巧玲，唐顺明，易永竹，赵秀振，沈兴家，朱良均，张国政，郭锡杰. 家蚕 *C1b1* 基因启动子活性分析. 蚕业科学, 2006, 32 (4): 477-481.
3. 刘伟华，赵秀振，梁红，刘文献，胡赞民，李立会. 枯草杆菌果聚蔗糖酶基因转化小麦的研究. 中国农业科学, 2006, 39 (2): 231-236.