

草地贪夜蛾组织蛋白酶 L 的基因克隆、 原核表达及多克隆抗体制备

程杏安¹, 林贤伟¹, 蒋旭红¹, 刘展眉¹, 钟国华^{2,*}, 胡美英^{2,*}

(1. 仲恺农业工程学院天然产物化学研究所, 广州 510225; 2. 华南农业大学昆虫毒理研究室, 广州 510642)

摘要:【目的】克隆草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 的组织蛋白酶 L (cathepsin L, CatL) 基因, 分析该基因的序列特征并制备该酶多克隆抗体, 为探析其生理功能奠定基础。【方法】根据甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 的组织蛋白酶 L 基因开放阅读框 (ORF) 序列两端直接设计引物克隆草地贪夜蛾组织蛋白酶 L 基因。利用生物信息学软件分析该基因的序列特征, 利用 ClustalX2 软件进行同源比对和进化分析, 利用同源建模预测该酶三维结构。通过原核表达重组蛋白, 多次免疫新西兰大白兔制备该酶多克隆抗体。【结果】克隆获得了草地贪夜蛾的组织蛋白酶 L 基因 *SfCatL* (GenBank 登录号: HQ110065), ORF 序列长 1 035 bp, 编码 344 个氨基酸, 预测 N-末端含有长度为 16 个氨基酸残基的信号肽序列, 去除信号肽序列后, 预测成熟蛋白分子量为 36.8 kD, 等电点为 6.69。SfCatL 氨基酸序列与其他 13 个物种的组织蛋白酶 L 氨基酸序列比较有 53.7%~96.8% 的一致性, 与甜菜夜蛾组织蛋白酶 L 氨基酸序列一致性最高, 达 96.8%。同源建模预测表明, SfCatL 折叠成紧密而稳定的元宝状结构, 含 3 个对结构有稳定作用的二硫键, 亲水性氨基酸主要包被在蛋白的表面。原核表达、纯化 SfCatL 蛋白制备抗血清, 其效价超过 1:40 000, Western blot 鉴定结果表明抗血清与草地贪夜蛾 Sf9 细胞 SfCatL 蛋白能够特异性结合。【结论】获得了草地贪夜蛾 *SfCatL* 完整 ORF 序列, 分析了其特征, 经原核表达、纯化获得高纯度的融合蛋白, 成功获得多克隆抗体。本研究为进一步研究该基因的功能并开发组织蛋白酶抑制剂类杀虫剂提供理论依据。

关键词: 草地贪夜蛾; 组织蛋白酶 L; 基因克隆; 原核表达; 抗体

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2018)04-0410-13

cDNA cloning, prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of cathepsin L in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

CHENG Xing-An¹, LIN Xian-Wei¹, JIANG Xu-Hong¹, LIU Zhan-Mei¹, ZHONG Guo-Hua^{2,*}, HU Mei-Ying^{2,*} (1. Institute of Natural Product Chemistry, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China; 2. Laboratory of Insect Toxicology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Aim】The objective of this study is to clone cathepsin L gene from Sf9 cells of *Spodoptera frugiperda*, to analyze its sequence features and to obtain the polyclonal antibody, so as to provide a theoretical basis for further studying the function of the gene in this insect. 【Methods】Cathepsin L gene was cloned directly by using the specific primers which were designed based on the open reading frame

基金项目: 国家自然科学基金项目(21406274, 201376281); 广东省大学生科技创新培育专项基金(攀登计划)(K1178350111); 国家级大学生创新训练项目(201711347012); 广东省大学生创新训练项目(201711347055)

作者简介: 程杏安, 男, 1981 生, 广东肇庆人, 博士, 副教授, 研究方向天然产物化学, E-mail: anzai_28@163.com

* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: guohuazhong@scau.edu.cn; humy@scau.edu.cn

收稿日期 Received: 2017-08-09; 接受日期 Accepted: 2018-01-22

(ORF) sequence of cathepsin L gene of *S. exigua*. The sequence characteristics of this gene were analyzed by using bioinformatics, and the deduced amino acid sequences of the gene were aligned using the ClustalX2 program. The three-dimensional structure of cathepsin L was modeled by homology modeling method. Finally, the anti-rabbit polyclonal antibody was produced by immunizing rabbit based on the prokaryotic expression of the gene. 【Results】 A cathepsin L gene named *SfCatL* (GenBank accession no.: HQ110065) was cloned from Sf9 cells of *S. frugiperda*, with the ORF of 1 035 bp in length, encoding 344 amino acids with the predicted N-terminal hydrophobic region of 16 amino acid residues displaying the characteristic features of a signal peptide. The predicted molecular weight (MW) and isoelectric point (pI) of SfCatL without signal peptide are 36.8 kD and 6.69, respectively. SfCatL has 53.7%–96.8% amino acid sequence identity with the cathepsin L proteins from other 13 species, showing the highest amino acid sequence identity (96.8%) with the cathepsin L protein from *S. exigua*. The three-dimensional structure of SfCatL showed that SfCatL folds into a shape of fortune cookie and contains three disulfide bonds, which are responsible for the stability of the structure. Hydrophilic amino acids are mainly coated on the surface of protein. After prokaryotic expression, the SfCatL protein was purified to produce the antiserum of SfCatL, whose titer reached 1:40 000 by ELISA assay. Western blot assay indicated that the antiserum could specifically bind with the SfCatL protein from Sf9 cells. 【Conclusion】 The complete ORF of *SfCatL* was cloned, and its sequence features were analyzed. The SfCatL recombinant protein was prepared and purified, and finally the polyclonal antibody was acquired. This study provides a theoretical basis for further study of the gene function and the development of cathepsin inhibitor insecticides.

Key words: *Spodoptera frugiperda*; cathepsin L; gene cloning; prokaryotic expression; antibody

组织蛋白酶 cathepsins 是溶酶体重要的水解酶类,包括若干亚家族,如 L, B, H, O, S, T, K, V 和 F 等 (<http://www.expasy.ch/enzyme/enzyme-byclass.html>),其以酶原形式被合成后,在内体或溶酶体的酸性环境中经蛋白水解而加工为活化的成熟酶(Nishimura *et al.*, 1998),参与蛋白质的降解,为机体提供可循环利用的氨基酸原料,并在各种生理和病理过程中发挥重要的作用(罗梅等, 2012)。昆虫组织蛋白酶通过其蛋白降解活性和维持正常的细胞程序性死亡(programmed cell death, PCD),即细胞凋亡,在昆虫生长发育和代谢过程中起着非常重要的作用。在外源营养缺乏的条件下,昆虫发育的胚胎必须从卵储存物中获取所需的营养,组织蛋白酶,尤其是组织蛋白酶 L (cathepsin L, CatL) 作为重要的消化蛋白酶(Cristofolletti *et al.*, 2003),在这一过程中通过分解氨基酸组分高度丰富的卵黄蛋白提供营养物质,从而参与胚胎发生过程(Zhao *et al.*, 2005; 罗梅等, 2012)。许多研究证实 CatL 参与了昆虫胚前期卵子发生以及卵子发生过程中某些卵细胞的退化,如玉米象 *Sitophilus zeamais* 体内 CatL 同源基因大量分布于卵母细胞和滋养细胞中,表明玉米象体内 CatL 参与了卵子的成熟过程

(Matsumoto *et al.*, 1997)。淡色库蚊 *Culex pipiens pallens* 产卵前的卵子细胞解体过程中,也出现 CatL 的活化(Uchida *et al.*, 2001)。卵子退化是一种细胞凋亡(Uchida *et al.*, 2004),因此说明 CatL 等组织蛋白酶参与了卵细胞的凋亡。

昆虫变态发育是一个存在大量组织降解与重建的关键发育过程。此期间,组织蛋白酶参与了幼虫组织的逐步分解,使成虫组织从成虫盘中重新发育分化形成。在麻蝇 *Sarcophaga* 由幼虫到蛹的变态过程中,发现组织蛋白酶 B 同源物参与了脂肪体的解体(Kurata *et al.*, 1992)。地中海实蝇 *Ceratitis capitata* 幼虫变态过程中同样发现组织蛋白酶 early meatmorphosis aspartyl proteinase (EMAP) 参与脂肪体组织解体的现象,而且此过程中 EMAP 介导了脂肪体细胞的凋亡从而导致了脂肪体的解体(Rabossi *et al.*, 2004)。这类过程中 CatL 也表现得极其活跃,家蚕 *Bombyx mori* 的丝腺变态发育中发生组织解体,CatL 参与了这种变态过程的细胞凋亡(Shiba *et al.*, 2001)。王政等(2015)研究也发现草地贪夜蛾 *Spodoptera exigua* 组织蛋白酶 L (SfCatL) 在印楝素诱导的 Sf9 细胞凋亡中起到重要促进作用,进一步证实 CatL 与昆虫细胞凋亡密切相关(Wang *et al.*,

2015)。棉铃虫 *Helicoverpa armigera* CatL 还参与其幼虫的蜕皮和变态发育过程的脂肪体解离,而且用组织蛋白酶 L 抑制剂 CUK148 和 E64d 注入棉铃虫体内,导致 5-6 龄幼虫蜕皮和发育延迟(刘建, 2006)。可见,以抑制剂抑制组织蛋白酶活性,会干扰昆虫正常发育,达到防治害虫的目的,组织蛋白酶可能成为害虫防治的重要靶标蛋白,尤其是 CatL 在昆虫体内含量丰富,功能多样,已在多种昆虫中被研究,包括双翅目、鞘翅目、半翅目和鳞翅目等,其基因序列被克隆和深入分析,如棉蚜 *Aphis gossypii* (Deraison *et al.*, 2004), 长虹猎蝽 *Rhodnius prolixus* (Lopez-Ordoñez *et al.*, 2010), 棉铃虫 (Wang *et al.*, 2010), 家蚕(李懿等, 2015)等,这些研究为进一步探索 CatL 的功能奠定基础。综上所述,CatL 作为昆虫生长发育过程的重要酶类,干扰或抑制 CatL 活性,会导致昆虫发育过程中正常的细胞凋亡或正常蜕皮以及营养供应发生异常,从而抑制昆虫的生长发育,达到害虫防治的目的,因此 CatL 可成为农业害虫防治的靶标。因此,研究各种农业害虫的组蛋白酶基因及其相关功能,对新农药开发有重要理论指导意义。本研究拟以草地贪夜蛾卵巢离体细胞系 Sf9 为材料,克隆其 CatL 基因并进行序列分析,研究其原核表达特性和制备特异性抗体,以期为深入研究该基因的功能,开发组织蛋白酶抑制剂类杀虫剂等提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞系及主要试剂、仪器和软件

草地贪夜蛾 *S. frugiperda* Sf9 细胞系由中山大学生命科学学院生物防治重点实验室惠赠,本实验室传代培养和保存。

基因工程菌大肠杆菌 *Escherichia coli* trans1-T1 感受态细胞和 pEASY-T1 克隆载体购自北京全式金生物技术有限公司;ExTaq DNA 聚合酶(10 U/ μ L)、dNTPs(each 10 mmol/L)购自东盛生物公司;凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒抽提试剂盒、基因组 DNA 小样抽提试剂盒、MD 底物显示试剂盒购自天根生化科技有限公司;AMV 反转录酶(10 U/ μ L)、限制性内切酶 *Bam*H I, *Not* I, *Sal* I 和 *Nde* I 以及 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司;RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司;Ni-NAT agarose 购自 Promega 公司;蛋白质浓缩管(1 kD)购自 Millipore 公司;96 孔酶标板购自 Corning 公司;蛋白透析袋、辣根酶标

记山羊抗小鼠 IgG, TMB 显色液 OCT 包埋剂和 ELESIA 试剂盒购自北京鼎国昌盛生物技术责任有限公司;引物合成和测序均由上海英骏生物技术有限公司和北京华大基因研究院完成。其他常规试剂采用进口分装或国产分析纯。

主要仪器及分析软件:RC-2C 高速低温离心机(Sorval 公司);DU-640 核酸蛋白检测仪(Beckman 公司);PCR 仪(Bio-Rad 公司);Power Pac1000 电泳仪(Bio-Rad 公司);Tanon-4200 凝胶成像系统(上海天能科技有限公司);Discovery Studio 2.1 分析软件购自创藤科技有限公司。

1.2 PCR 引物的设计与合成

根据美国国家生物技术信息中心(NCBI)公布的棉铃虫、烟夜蛾 *Helicoverpa assulta* 和甜菜夜蛾 3 种夜蛾科昆虫组织蛋白酶 L 基因 cDNA 序列,借助 NCBI 的 BLAST 程序以及 DNASTar 软件 PrimerSelect 程序进行辅助分析,发现三者的 ORF 序列保守性很强,同源性在 90% 以上。同时,前人研究表明用棉铃虫组织蛋白酶 B 基因 ORF 序列两端直接设计引物能够克隆出同属夜蛾属的烟夜蛾组织蛋白酶 B 基因 ORF 序列(赵艳艳等, 2008)。本研究 Sf9 细胞源于草地贪夜蛾,而草地贪夜蛾与甜菜夜蛾同属灰翅夜蛾属,所以本研究基于甜菜夜蛾组织蛋白酶 L 基因 ORF 序列两端设计引物:SexiCL P1: 5'-ATGAAGGGCGTAGCGTTCTG-3'(正向引物);SexiCL P2: 5'-CTACACGAGGGGTAGGAGGC-3'(反向引物)。

1.3 总 RNA 和 DNA 的提取

Sf9 细胞总 RNA 和基因组 DNA 的提取均参照对应的试剂盒说明和步骤进行。

1.4 cDNA 合成

根据 TaKaRa 公司 AMV 反转录酶使用说明,在 PCR 管中加入 1.3 节提取总 RNA 3 μ L, Oligo(dT) 20 (50 μ mol/L) 1 μ L, dNTPs (each 10 mmol/L) 1 μ L, RNase free H₂O, 补加到 10 μ L, 置于 PCR 仪中 65 $^{\circ}$ C 保持 5 min, 取出于冰上急冷 3 min, 再在 PCR 管中加入 5 \times Reverse Transcriptase Buffer 4 μ L, RNase inhibitor (40 U/ μ L) 0.5 μ L, PrimeScriptTM RTase (10 U/ μ L) 1 μ L, RNase free H₂O 补加到 20 μ L, 置于 PCR 仪中 42 $^{\circ}$ C 保持 60 min, 70 $^{\circ}$ C 保持 15 min, 返回 4 $^{\circ}$ C 停止, 完成后直接用于 PCR 扩增或 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.5 草地贪夜蛾组织蛋白酶 L 基因 ORF 序列的克隆与分析

以 1.4 节反转录合成的 cDNA 为模板, 利用所

设计的引物 SexiCLP1 和 SexiCLP2 进行 PCR 扩增, 反应体系 (25 μL): cDNA 模板 1 μL ; ExTaq DNA 聚合酶 0.5 μL ; 10 \times ExTaq Buffer 2.5 μL ; dNTPs (10 mmol/L) 2.5 μL ; 正反向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μL ; ddH₂O 补至 25 μL 。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物, 出现一条 1 000 bp 左右的条带, DNA 回收试剂盒纯化 PCR 产物, 送上海英俊生物技术有限公司进行序列测定, 测定结果用 NCBI 的 BLAST 程序与甜菜夜蛾的组织蛋白酶 L 基因序列进行比对分析, 确定目的基因片段序列。将所获的 PCR 产物切胶回收克隆到 pEASY-T1 克隆载体上构建 *SfCatL*-pEASY-T1 重组质粒, 将重组质粒转化到 trans1-T1, 挑取阳性克隆先进行菌落 PCR 鉴定, 再提取质粒进行 PCR, 鉴定均能够扩增出 1 000 bp 左右条带的为含有重组质粒的真阳性克隆。把阳性克隆菌液送测序, 测序结果用 NCBI 的 BLAST 程序和 DNASTar 软件比对分析, 获得目的基因 ORF 全长序列。对所测定的序列进行整理, 采用 NCBI 的 BLAST 程序, SignalP 3.0, ClustalX2 等生物信息学软件对目的基因 ORF 序列进行分析, 采用 DNASTar 构建进化树。

1.6 同源建模草地贪夜蛾组织蛋白酶 L 三维结构

(1) *SfCatL* 模板蛋白的确定: 采用蛋白质多序列比对程序 BLAST 对草地贪夜蛾组织蛋白酶 L 氨基酸序列在 PDB 蛋白结构数据库中进行序列相似性搜索, 与模板蛋白相似性达到 30% 以上可确定为同源蛋白, 用于三维结构的建模。(2) 序列联配: 采用 Discovery Studio/Homology 中的 ClustalW 程序对目的蛋白与模板蛋白序列进行比对, 然后根据晶体结构知识手动调整序列联配结构, 以确定建模蛋白的结构保守区 (structural conserved regions, SCRs) 和 Loop 区, 尽量避免在二级保护区引入 Gap。(3) 蛋白质三维结构的建模和动力学优化: 在序列比对基础上, 利用 Discovery Studio 软件中的 Homology 模块中的 Modeler 程序构建目的蛋白三维结构。每次 Modeler 计算构建 10 个模型。建模后对各模型以 PDF total energy 进行排序, 选取能量最低的构象作为目的蛋白的初始三维结构。为了获得蛋白更接近其在溶液环境中的构象, 利用 Discovery Studio 软件包的 Standard Dynamics Cascade 程序对目的蛋白的初始三维结构模型进行分子力学和分子动力学优化, 以获得蛋白更接近其在溶液环境的构象。

1.7 草地贪夜蛾组织蛋白酶 L 基因编码区内含子的确定

为了明确目的基因编码区内是否存在内含子, 根据已获得的的目的基因 ORF cDNA 序列两端设计对应的特异性引物, 正向引物 SCLP1: 5'-ATGAAGGGCGTAGCGGTTCTG-3' 和反向引物 SCLP2: 5'-CTACACGAGGGGTAGGAGGC-3', 以 S9 细胞基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应体系和反应条件与 1.5 节一致。PCR 条带与基因克隆过程的 PCR 产物电泳检测结果比较, 如结果一致, 将 PCR 产物送测序, DNASTar 软件比对分析, 如扩增产物序列与对应目的基因 ORF 序列一致, 表明目的基因编码区没有内含子。

1.8 草地贪夜蛾组织蛋白酶 L 基因的原核表达

在目的基因 ORF 的成熟肽序列的 N 和 C 两端设计一对特异性引物, 上游引物 5' 端含有 *Nde* I 酶切位点及保护碱基, 下游引物 5' 端含 *Sal* I 酶切位点及保护碱基, SCL-S: 5'-gtacatatgATGTCCTGCTC-GACCTCGTCCGG-3'; SCL-A: 5'-gtagtcgac CTACAC-GAGGGGGTAGGAGGC-3'。以 1.4 节合成的 S9 细胞 cDNA 为模板进行 PCR 扩增 (反应体系和条件与 1.5 节一致), 目的片段经 *Nde* I 和 *Sal* I 双酶切, 切胶回收后, 插入到同样经 *Nde* I 和 *Sal* I 双酶切 pET28a 载体, 构建重组表达质粒并转化感受态细胞 BL21 (DE3) 后, 筛选阳性重组子, 提取质粒进行酶切鉴定, 正确的重组质粒命名为 pET28a-*SfCatL*, 送至华大基因进行测序。将阳性克隆在 LB/Amp 培养基中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 OD₆₀₀ 为 0.6 ~ 1.0 时, 加入 IPTG 至 1 mmol/L 进行诱导表达。抽提菌体蛋白后, 用 15% SDS-PAGE 电泳检测。蛋白纯化采用 QIAGEN 的 Ni-NTA 纯化试剂盒进行纯化。

1.9 草地贪夜蛾组织蛋白酶 L 原核表达蛋白的可溶性分析

从平板上挑取转化了阳性重组 pET-28a (+)-*SfCatL* 的 BL21 (DE3) 单菌落, 分别接种到 5 mL LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 200 r/min, 过夜培养。次日以 1:100 (v/v) 将过夜菌接种到 3 瓶 (10 mL/瓶) LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 200 r/min, 培养至 A₆₀₀ = 0.8 时 (约 2 h), 做 3 种处理 (不加 IPTG 诱导, 加入终浓度 0.2 mmol/L IPTG, 加入终浓度 0.6 mmol/L IPTG), 之后置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 170 r/min, 培养 4 h。同时接种空质粒 pET-28a (+) 转化的菌株, 不做诱导, 作为阴性对照。

将诱导表达的 10 mL 菌液, 4 000 r/min 离心

15 min 收集沉淀。微量量取 450 μL Buster, 50 μL Tris-HCl (pH 8.0) 和 10 μL Lysozyme, 均匀混合后取 200 μL 加入到收集的 SfCatL 重组菌体沉淀中, 重悬菌体, 在脱色摇床上缓慢摇动 15 min 裂解菌体, 取 5 μL 破碎后的菌液加入到 50 μL Bradford 中, 根据蓝色深浅, 快速目测菌体破碎效率, 之后加入 2 μL DNase (终浓度为 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 1 μL 1 mol/L MgCl_2 , 缓慢摇动 5 min 消化 DNA, 14 000 r/min 离心 10 min, 分别收集上清和沉淀, 沉淀用 200 μL 超纯水重悬待用。各取 10 μL 上清及沉淀溶液进行 SDS-PAGE 进行电泳, 考马斯亮蓝 G-250 染色, 脱色液体脱色, 观察蛋白胶分析重组表达蛋白可溶性。

1.10 抗原的制备

(1) SfCatL 重组菌体培养: 从转化的平板上挑取单菌落接种到 10 mL LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16 h, 次日以 1:100 (v/v) 转接到 1 000 mL LB 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养到 $A_{600} = 0.6$ 时加入终浓度为 0.2 mmol/L IPTG, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16 h。(2) 细胞破碎: 4 000 r/min 离心 20 min, 收集诱导后的菌体, 用 20 mL 菌体重悬液 (pH 7.0, 0.05 mol/L PBS, 1 mmol/L EDTA, 0.05 mol/L NaCl) 重悬菌体。75% 强度工作 10 s, 间隔 5 s, 90 s 破碎细菌, 细胞匀浆用 Bradford 检测破碎效率, 50 μL Bradford 加入 5 μL 匀浆, Bradford 从棕褐色变为亮蓝色说明菌体破碎彻底。(3) 电洗脱纯化 SfCatL 蛋白: 收集到的细胞匀浆加入 2 \times 上样缓冲液, 进行 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色 30 min, 250 mmol/L KCl 脱色去掉背景, 将目标蛋白条带切割下来放置在 10 kD 透析袋中, 放入电洗脱缓冲液洗脱至蛋白胶从蓝色变为白色为止。取出透析袋中的溶液, 按照 1:10 体积比加入预冷的丙酮, 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀 2 h, 在于 4 $^{\circ}\text{C}$ 14 000 r/min, 离心 30 min, 收集到的沉淀即为目标蛋白。(4) 蛋白浓度测定。收集到的蛋白洗脱液, 用 Bradford 试剂盒测定蛋白质浓度。

1.11 抗血清制备与检测

把制备好的目的蛋白浓缩成 0.5 mg/mL 作为新西兰兔免疫抗原。从新西兰兔耳根取血制备阴性血清, 然后将 100 μg 抗原/兔溶入 1 mL 磷酸缓冲溶液, 在 1 mL 福氏不完全佐剂中加入分枝杆菌制成完全佐剂, 并加入 1 mL 抗原溶液, 剧烈震荡使之充分乳化。准备两只成年新西兰大白兔, 在 4 个不同部位分别各注射约 500 μL 抗原溶液, 间隔 4~6 周注射抗原, 并在注射后的 7~10 d 收集血液, 与注射前收集的血液进行比较, 检查是否产生抗体。待确定

产生抗体后准备大量收集血液。将收集的血液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中放置 30 min, 再在 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜。用药铲将血凝块从管壁上拨落, 将血液转移至塑料离心管中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 14 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液即为抗血清, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.12 酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定多克隆抗体效价

以 10 ng/mL 的人 IgG 包被 ELISA 板各孔, 洗涤后每孔内加入酶标抗人 IgG 抗体, 保温后洗涤, 加底物显色, 终止酶反应后, 测每孔吸光度。控制反应条件, 使各孔读数在吸光度 0.8 左右, 且单孔读数与平均值的偏差小于 10%, 确定 ELISA 板的性能。目的蛋白 (0.5 mg/mL) 用 50 mmol/L 碳酸盐缓冲液 (pH 9.0) 分别以 1:250, 1:500 和 1:1 000 稀释后, 包被于 96 孔酶标板, 每孔上样量为 100 μL , 放置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱包被过夜。PBST 洗涤 3 次, 5 min/次。每孔加入 50~100 μL 含 1% BSA 的 PBS 缓冲液, 室温放置 2~3 h, PBST 洗涤 3 次。将 SfCatL 抗血清 (一抗) 进行系列稀释, 从 1:1 000~1:320 000 设定了 7 个稀释梯度 (2 倍递增), 每个梯度设定 2 个重复, 上述酶标板上每孔加入 100 μL 对应的稀释血清, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次后, 加入 HRP 酶标二抗 (1:2 000), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1~2 h。洗涤后加入底物显色剂, 室温避光处理 15 min。每孔加入 2 mol/L 的浓硫酸, 终止反应, 最后在酶标仪上, 以 492 nm 波长检测 OD 值, 收集并分析数据。

1.13 Western bolt 检验抗体特异性

以 1.10 节培养的 SfCatL 重组菌体 10 mL 提取总蛋白, 同时以课题组正开展的印楝素诱导昆虫细胞自噬凋亡机理研究的实验样品, 印楝素诱导 48 h 和空白对照 (未作诱导处理) 的 Sf9 细胞为材料, 分别提取总蛋白, SDS-PAGE 胶电泳, 再将蛋白从 SDS-PAGE 胶上转移到硝酸纤维素膜上, 然后用封闭液 (PBST + 5% 脱脂奶粉) 封闭过夜, 再与所制备的兔抗血清室温反应 1.5 h, 用 PBST 洗膜 3 次后, 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 (1:500, v/v), 室温反应 1.5 h 后洗膜 3 次, 最后将硝酸纤维素膜置于含有二氨基联苯胺 (DAB) 的显色液中显色至条带清晰, 将膜放入蒸馏水中终止显色反应。

2 结果

2.1 草地贪夜蛾的组织蛋白酶 L 基因克隆

本研究抽提 Sf9 细胞总 RNA, 凝胶电泳检测可

见到清晰 18S rRNA 带型(图 1: A), 结果表明 RNA 抽提质量较好, 未发生明显降解; RT-PCR 获得 S9 细胞总 cDNA, 以其为模板, 利用 SexiCLP1 和 SexiCLP2 引物进行扩增, 获得 1 000 bp 左右的片段序列(图 1: B), 序列测定, 并用 NCBI 的 BLAST 程序进行序列比对分析, 发现所获的扩增片段分别与甜菜夜蛾 CatL 基因序列一致性高达 90%, 表明所得即为草地贪夜蛾组织蛋白酶 L 基因序列, 并将其命名为 *SfCatL*。

为了获得 *SfCatL* 基因 ORF 全长序列, 将所获的 PCR 产物切胶回收克隆到 pEASY-T1 克隆载体上构建 *SfCatL*-pEASY-T1 重组质粒, 将重组质粒转化到

大肠杆菌 trans1-T1, 挑取阳性克隆提取质粒进行 PCR 鉴定, 扩增出 1 000 bp 左右条带(图 2: A), 再对所提质粒以 *Bam*H I 和 *Not* I 进行双酶切鉴定, 理论上酶切后的产物由两部分构成, 一部分是外源片段, 另一部分约为 4 kb 大小的质粒线性片段。由酶切电泳图 2(B) 可知, 质粒双酶切后出现 1 000 bp 和 4 kb 两部分序列片段, 与预测的结果相一致。证明为含有重组质粒的真阳性克隆。把阳性克隆菌液送测序, 序列比对分析表明与上述扩增的目的片段序列一致, 即得到 *SfCatL* 基因 ORF 全长序列 (GenBank 登录号: HQ110065), 长 1 035 bp, 编码 344 个氨基酸。

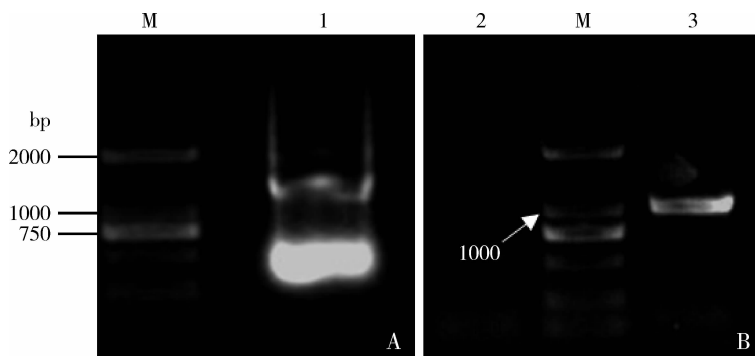


图 1 S9 细胞总 RNA(A) 和 *SfCatL* PCR 产物(B)

Fig. 1 Total RNA (A) from S9 cells and PCR product of *SfCatL* gene (B)

M: DNA Marker DL2000; 1: 总 RNA Total RNA; 2: ddH₂O 为模板 ddH₂O as the template; 3: *SfCatL* PCR 产物 PCR product of *SfCatL*.

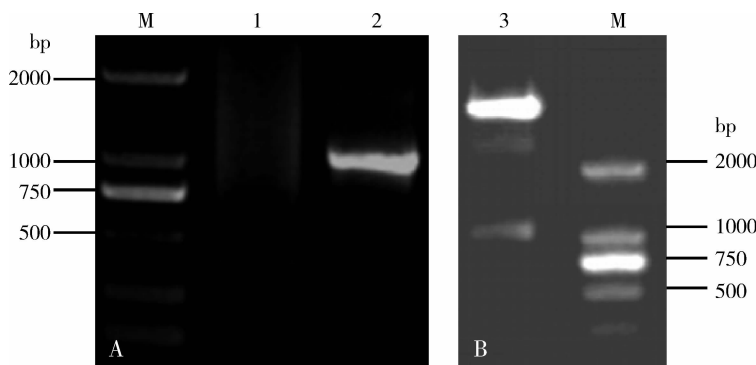


图 2 *SfCatL*-pEASY-T1 重组质粒 PCR(A) 和酶切(B) 鉴定

Fig. 2 PCR (A) and restriction digestion (B) identification of the recombinant plasmid *SfCatL*-pEASY-T1

M: DNA Marker DL2000; 1: ddH₂O 作为模板 ddH₂O as the template; 2: 重组质粒作为模板 *SfCatL*-pEASY-T1 as the template; 3: 酶切产物 Product of restriction digestion.

2.2 *SfCatL* 氨基酸序列同源性分析

运用 DNASTar 和 ClustalX2 软件对 *SfCatL* 与其他物种 CatL 氨基酸序列进行同源性比对分析, 结果表明包括草地贪夜蛾在内的 14 个物种的组织蛋白酶 L 的氨基酸序列共有 104 个保守氨基酸残基位点, 其中 7 个保守的半胱氨酸残基 (Cys, C) 位点, 进

一步说明作为半胱氨酸酶类的组织蛋白酶其半胱氨酸残基在物种进化中非常保守。14 个物种的 CatL 中保守性最强的氨基酸残基为甘氨酸 (Gly, G), 有 22 个保守位点, 其次为酸性氨基酸 (Asp, D), 有 10 个保守位点 (图 3), Gly 也是本研究中 *SfCatL* 氨基酸序列含量最丰富的氨基酸残基。遗传距离分析表

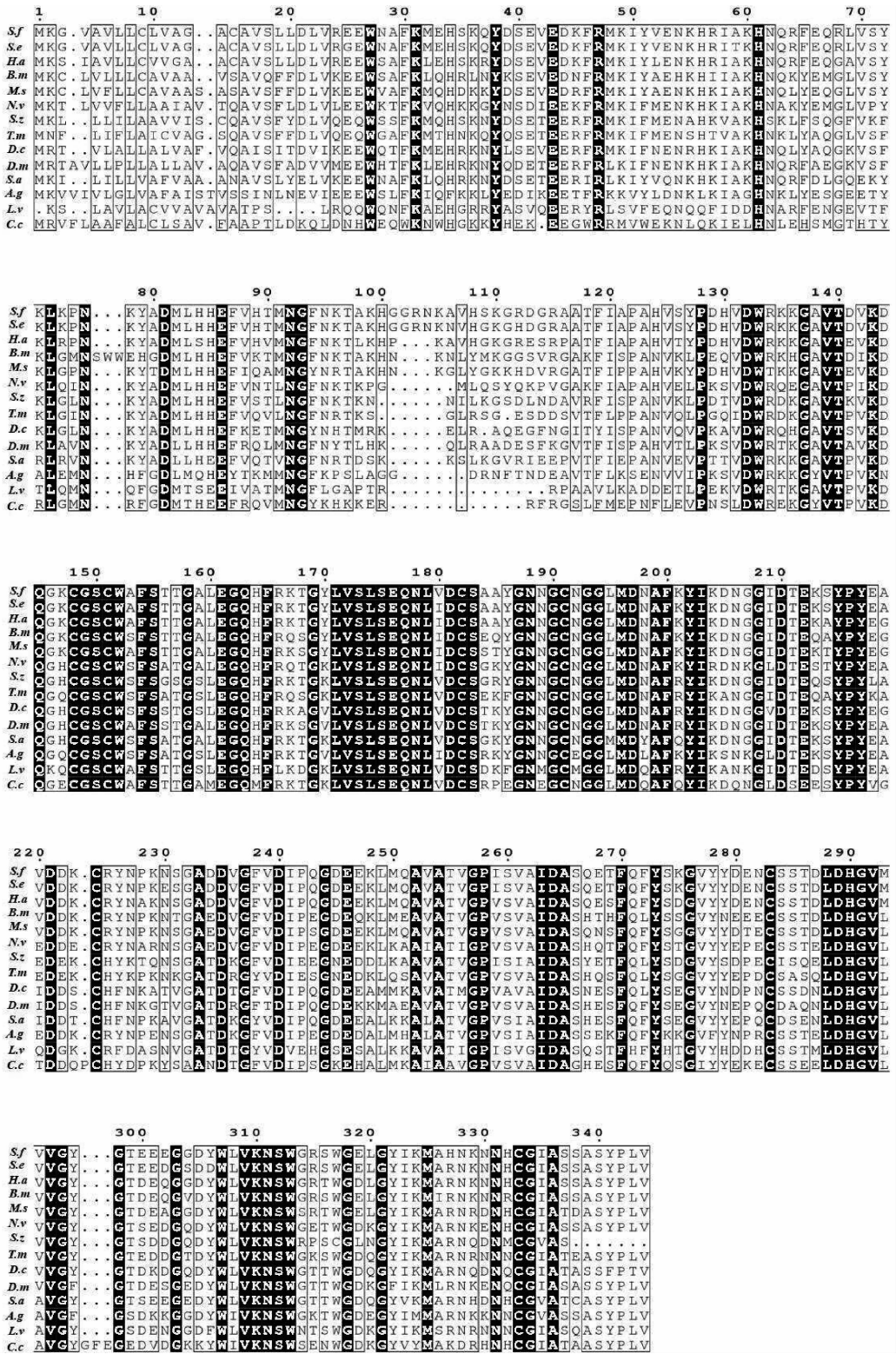


图3 SfCatL与其他物种CatL蛋白氨基酸序列比对

Fig. 3 Amino acid sequence alignment of SfCatL with cathepsin L proteins from other species

黑色为完全保守氨基酸残基 Completely conservative amino acid residues are in black. 蛋白来源及GenBank 登录号 Origin species of proteins and their GenBank accession numbers; *S. f.*: 草地夜蛾 *Spodoptera frugiperda* (HQ110065); *S. e.*: 甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (ABK90824.1); *H. a.*: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (XP021184888.1); *B. m.*: 家蚕 *Bombyx mori* (NP001037464.2); *M. s.*: 烟草天蛾 *Manduca sexta* (CAX16635.1); *N. v.*: 丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis* (XP008209259.1); *S. z.*: 玉米象 *Sitophilus zeamais* (BAA24444.1); *T. m.*: 黄粉虫 *Tenebrio molitor* (AAP94046.1); *D. c.*: 麦种蝇 *Delia coarctata* (ACR56863.1); *D. m.*: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (AAB18345.1); *S. a.*: 埃及伊蚊 *Stegomyia aegypti* (XP_001655999.2); *A. g.*: 棉蚜 *Aphis gossypii* (CAD33266.1); *L. v.*: 南美白对虾 *Litopenaeus vannamei* (CAA68066.1); *C. c.*: 鲤鱼 *Cyprinus carpio* (BAD08618.1).

明, SfCatL 与甜菜夜蛾的 CatL 氨基酸序列一致性最高, 达 96.8%, 其次是棉铃虫 CatL (一致性为 89.7%), 与棉蚜 CatL 的氨基酸序列一致性最低 (58.7%); 14 个物种中与鲤鱼 *Cyprinus carpio* CatL 的氨基酸序列一致性最低 (53.7%)。系统进化树将 14 个物种的 CatL 氨基酸序列分为五大类 (图 4): 第 1 类主要为鳞翅目昆虫的 CatL, 本研究中的 SfCatL 也聚到这类, 与同属的甜菜夜蛾 CatL 氨基酸序列一致性最高。膜翅目的丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis* 也聚到第 1 类。鳞翅目各昆虫间 CatL 相对距离根据科属的不同差异较大, 同属距离

最近, 不同属或不同科距离较远。第 2 类为半翅目和鞘翅目; 第 3, 4 和 5 类分别为棉蚜、对虾 *Litopenaeus vannamei* 和鲤鱼。

2.3 SfCatL 三维结构特征

由图 5 可知, SfCatL 三维结构共有 Cys166-Cys208 等 3 个二硫键。SfCatL 三维结构亲疏水性氨基酸分析表明, SfCatL 折叠成紧密而稳定的元宝状结构, 中间呈现一个凹槽, SfCatL 亲水性氨基酸主要包被在蛋白的表面 (如图 5 固体状表面), 而疏水性氨基酸主要分布在蛋白三维结构的内部 (白色网状表面), 形成一个疏水性空穴。

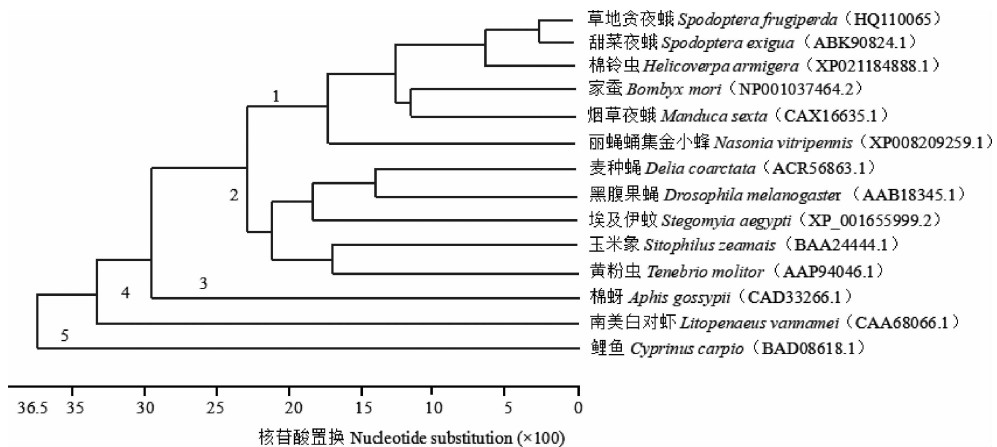


图 4 基于氨基酸序列构建的 14 个物种的 CatL 的系统进化树 (邻接法)

Fig. 4 Phylogenetic tree constructed based on the amino acid sequences of cathepsin L proteins of 14 species (Neighbor-Joining method)

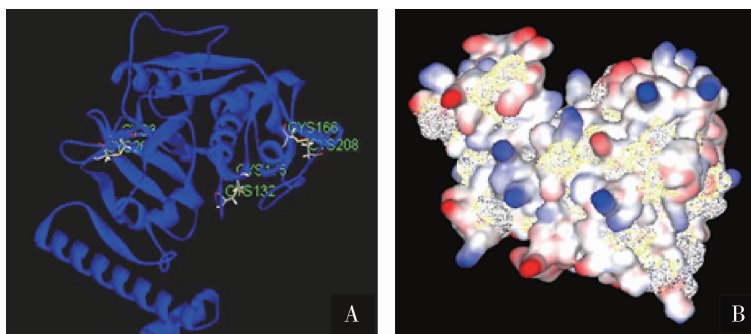


图 5 SfCatL 三维结构模型 (A) 和亲疏水性三维结构模型 (B)

Fig. 5 Three-dimensional model (A) and the hydrophobic/hydrophilic model (B) of SfCatL

2.4 SfCatL 编码区内含子分析及其成熟肽序列的 PCR 扩增

以基因组 DNA 为模板, 分别利用 SCLP1 和 SCLP2 引物进行 PCR 扩增。扩增产物在 1 000 bp 左右有条带 (图 6: A), 与基因克隆过程的 PCR 产物电泳检测结果一致, 而且将 PCR 产物送测序, 序

列比对分析表明扩增产物序列与对应的 SfCatL ORF 序列一致, 表明 SfCatL 编码区没有内含子。为了构建原核表达载体, 以 S19 细胞总 RNA 反转所获得 cDNA 为模板, SCL-S 和 SCL-A 为引物, 扩增 SfCatL 编码区成熟肽序列片段, PCR 产物与 SfCatL 大小相符合 (图 6: B), 表明获得了成熟肽序列片段。

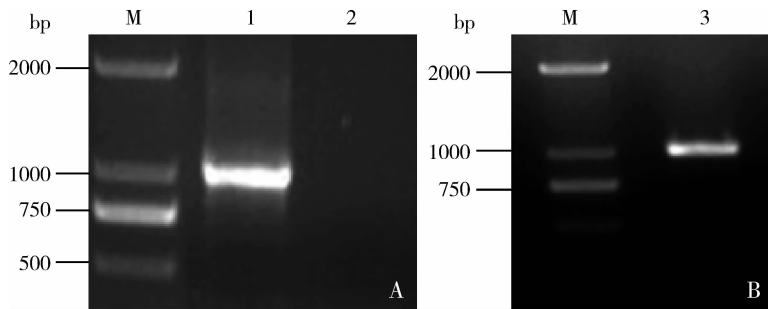


图6 *SfCatL* 编码区内含子分析(A)及其成熟肽序列 PCR 扩增(B)

Fig. 6 Intron analysis in coding region (A) and PCR amplification of mature peptide sequence (B) of *SfCatL*

M: DNA Marker DL2000; 1: 基因组 DNA 为模板 Genomic DNA as the template; 2: ddH₂O 为模板 ddH₂O as the template; 3: *SfCatL* 编码区的 PCR 扩增产物 PCR product of the coding region of *SfCatL*.

2.5 原核表达载体的构建和克隆鉴定

扩增获得 *SfCatL* 成熟肽核酸序列, 构建 pET-28a(+)-*SfCatL*, 经 PCR 检测获得 1 000 bp 左右的条带(7: A), 与理论大小基本相符合。挑选的 pET-28a(+)-*SfCatL* 阳性转化子经质粒小提后分别用 *Sal* I 和 *Nde* I 进行双酶切鉴定, 出现 1 000 bp 和 5

kb 两部分序列片段(7: B), 与预测的结果相一致。将 PCR 和酶切鉴定正确的 *SfCatL* 转化子进行核酸测序和分析, 结果表明 *SfCatL* 编码区成熟肽序列片段为 987 bp, 结果与克隆所得的核酸序列相吻合。核酸序列翻译结果显示, *SfCatL* 成熟肽含有 327 个氨基酸, 分子量为 36.8 kD, 等电点为 6.69。

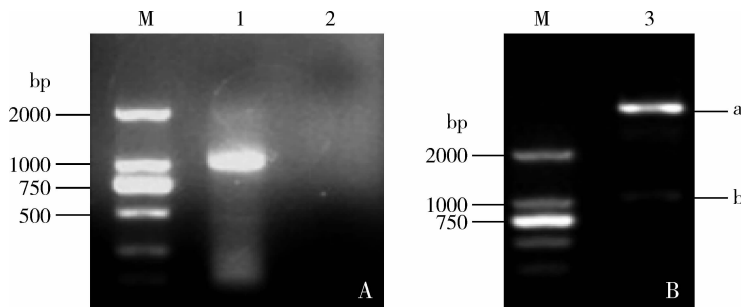


图7 pET-28a(+)-*SfCatL* 重组质粒 PCR(A)和双酶切鉴定(B)

Fig. 7 PCR identification (A) and restriction enzyme digestion (B) of the recombinant plasmid pET-28a(+)-*SfCatL*

M: DNA Marker DL2000; 1: 重组质粒作为模板 pET-28a(+)-*SfCatL* as the template; 2: pET-28a(+)作为模板 pET-28a(+) as the template; 3: 酶切产物 Product of restriction digestion; a: 载体片段 Vector fragment; b: 目的片段 Target fragment.

2.6 *SfCatL* 基因在大肠杆菌中的诱导表达

重组菌株经 0.6 mmol/L IPTG 28℃ 诱导培养表达后, 总蛋白样品中出现 40 kD 左右的蛋白条带(图 8), 大小与预测相符, 而对照的样品中未出现类似条带, 表明 IPTG 也能够有效诱导 *SfCatL* 重组蛋白在大肠杆菌内表达。

2.7 *SfCatL* 原核表达蛋白的可溶性分析

蛋白质可溶性分析表明(图 9), *SfCatL*(约 37 kD)蛋白在上清没有目标蛋白带, 而沉淀中有明显目标蛋白带, 说明 *SfCatL* 在大肠杆菌表达系统中主要以不可溶的包涵体形式存在, 0.2 mmol/L IPTG 诱导产生的靶蛋白显著多于 0.6 mmol/L IPTG 诱导产生的蛋白。

2.8 抗原的制备

抗原制备过程中收集菌体采用超声波破碎法将细胞匀浆, 得到的菌体总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 切胶获取目标条带, 采用电洗脱法, 在电场作用下, 将带负电的目标蛋白从凝胶中纯化出来, 纯化产物的电泳结果显示 *SfCatL* 蛋白在 40 kD 左右(图 10), 回收效率较好, 2 L LB 培养的重组菌, 收集到包涵体, 纯化回收得到的 *SfCatL* 蛋白约为 3 mg, 能够满足用于动物免疫所需的抗原。

2.9 抗血清制备与特异性鉴定

制备的抗血清采用间接酶联免疫吸附法包被相应的抗原, 测定抗原的包被浓度与血清的效价, 测定值如表 1 所示, 固定 *SfCatL* 抗血清稀释比, 随着包

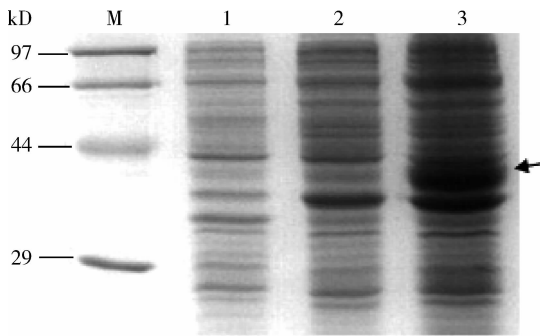


图 8 重组 SfCatL 蛋白表达检测

Fig. 8 Identification of expression of the recombinant SfCatL protein

M: 蛋白质分子量标准 (97 - 14 kD) Protein molecular weight marker (97 - 14 kD); 1: 空质粒 pET-28a(+) 蛋白 Protein of pET-28a(+) (CK); 2: 未诱导 pET-28a(+) -SfCatL 总蛋白 Total protein of pET-28a(+) -SfCatL non-induced by IPTG; 3: 0.6 mmol/L IPTG 诱导 4 h 的 pET-28a(+) -SfCatL 总蛋白 Total protein of pET-28a(+) -SfCatL induced by 0.6 mmol/L IPTG for 4 h.

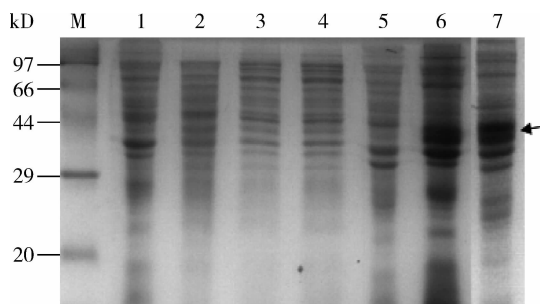


图 9 SfCatL 蛋白可溶性分析

Fig. 9 Analysis of dissolubility of SfCatL protein

M: 蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker; 1: 空质粒 pET-28a(+) 蛋白 Protein of pET-28a(+) (CK); 2: 未诱导 pET-28a(+) -SfCatL 表达可溶性蛋白 Soluble protein of pET-28a(+) -SfCatL non-induced by IPTG; 3: 0.2 mmol/L IPTG 诱导 4 h 的 pET-28a(+) -SfCatL 可溶性蛋白 Soluble protein of pET-28a(+) -SfCatL induced by 0.2 mmol/L IPTG for 4 h; 4: 0.6 mmol/L IPTG 诱导诱导 4 h 的 pET-28a(+) -SfCatL 可溶性蛋白 Soluble protein of pET-28a(+) -SfCatL induced by 0.6 mmol/L IPTG for 4 h; 5: 未诱导 pET-28a(+) -SfCatL 表达不可溶性蛋白 Insoluble protein of pET-28a(+) -SfCatL non-induced by IPTG; 6: 0.2 mmol/L IPTG 诱导 4 h 的 pET-28a(+) -SfCatL 不可溶性蛋白 Insoluble protein of pET-28a(+) -SfCatL induced by 0.2 mmol/L IPTG for 4 h; 7: 0.6 mmol/L IPTG 诱导诱导 4 h 的 pET-28a(+) -SfCatL 不可溶性蛋白 Insoluble protein of pET-28a(+) -SfCatL induced by 0.6 mmol/L IPTG for 4 h.

被 SfCatL 抗原的浓度越低 (稀释度从 1:250 ~ 1:1000), 测定的吸光值逐渐增加; SfCatL 抗血清做 40000 倍稀释后, 吸光度大于 0.1, 说明 SfCatL 抗血清具有很高的效价。为了鉴定所制备 SfCatL 抗血清的特异性, 以 Western blot 法检测抗血清对大肠杆

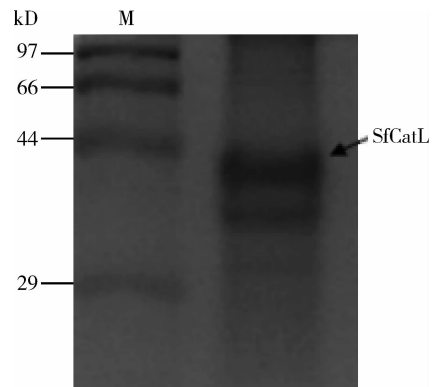


图 10 纯化 SfCatL 蛋白的 SDS-PAGE 电泳

Fig. 10 SDS-PAGE analysis of the purified recombinant protein of SfCatL

菌 pET28 表达的重组 SfCatL 蛋白的识别, 结果显示 (图 11: A): 重组菌体总蛋白样品中, 出现 40 kD 左右的唯一一条带, 与 His 和 SfCatL 形成的融合蛋白基本一致。继而本研究以课题组正开展的印楝素诱导昆虫细胞自噬凋亡机理研究的样品为材料, 取印楝素诱导 48 h 处理组和空白实验组 (对照) Sf9 细胞分别提取总蛋白, 以所制备的兔抗 SfCatL 血清, 运用 Western blot 技术分析样品中 SfCatL 蛋白的表达情况。结果 (图 11: B) 显示, 48 h 和对照的 Sf9 细胞总蛋白经过兔抗 SfCatL 血清和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 孵育显色后, 在理论大小 (37 kD) 处出现唯一且清晰的条带, 而且随着印楝素诱导时间的增加 Sf9 细胞 SfCatL 蛋白呈增加趋势, 符合预测结果, 综合表明制备的抗体既能识别大肠杆菌重组表达的 SfCatL 融合蛋白, 同时也能特异性识别天然草地贪夜蛾 SCL 蛋白, 故所制备的抗血清可用于草地贪夜蛾 SfCatL 基因功能的相关研究。

表 1 间接 ELISA 检测 SfCatL 抗体效价
Table 1 Detection of the antibody titer of SfCatL using indirect ELISA method

| 抗血清稀释梯度 Dilution gradient of antiserum | OD ₄₉₂ 值 OD ₄₉₂ value | | |
|---|---|----------------|----------------|
| | 1:250 * | 1:500 * | 1:1000 * |
| 1:1000 | 0.224 ± 0.003 | 0.266 ± 0.003 | 0.331 ± 0.029 |
| 1:10000 | 0.538 ± 0.029 | 0.547 ± 0.005 | 0.594 ± 0.018 |
| 1:20000 | 0.587 ± 0.021 | 0.622 ± 0.033 | 0.64 ± 0.016 |
| 1:40000 | 0.201 ± 0.011 | 0.199 ± 0.073 | 0.304 ± 0.008 |
| 1:80000 | 0.052 ± 0.054 | 0.047 ± 0.017 | 0.087 ± 0.001 |
| 1:160000 | 0.02 ± 0.002 | -0.001 ± 0.008 | 0.009 ± 0.005 |
| 1:320000 | 0 | -0.017 ± 0.005 | -0.018 ± 0.001 |

* SfCatL 稀释比 Dilution ratio of SfCatL.

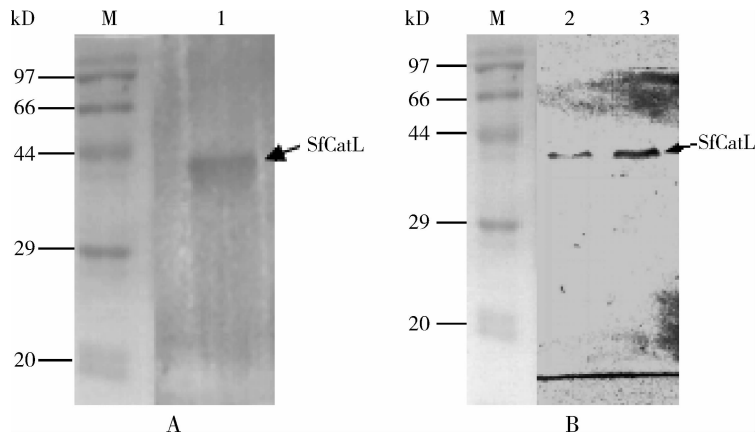


图 11 Western blot 检测抗血清对重组蛋白 SfCatL(A) 和 Sf9 细胞 SfCatL 蛋白(B) 的特异性

Fig. 11 Specificity identification of the antiserum against SfCatL recombinant protein (A) and SfCatL protein from Sf9 cells (B) by Western blotting

M: 蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker; 1: 大肠杆菌表达 SfCatL 重组蛋白 Recombinant protein SfCatL expressed in *Escherichia coli*; 2: 空白对照 Blank control; 3: 印楝素诱导 Sf9 细胞 48 h 的 SfCatL 蛋白 SfCatL expressed in Sf9 cells after induction by azadirachtin for 48 h.

3 讨论

CatL 基因在物种内和物种间的保守性都非常强,其在棉铃虫、烟夜蛾和甜菜夜蛾 3 种夜蛾科昆虫中同源性达 90% 以上。有研究根据棉铃虫 Cathepsin B 基因 ORF 序列两端直接设计引物能够克隆出同属的烟夜蛾 Cathepsin B 基因 ORF 序列(赵艳艳等, 2008)。本研究中的 Sf9 细胞是从草地贪夜蛾卵巢中分离获得的细胞系,而甜菜夜蛾与草地贪夜蛾同属灰翅夜蛾属,所以甜菜夜蛾与草地贪夜蛾 CatL 基因的同源性更高,利用甜菜夜蛾的 CatL 基因 ORF 序列两端设计引物很可能直接克隆出草地贪夜蛾的 CatL 基因 ORF 序列。本研究证明这种通过生物信息学知识查找高同源性昆虫物种基因序列来设计引物直接克隆目标昆虫的对应基因的方法有很大的可行性。这种方法与传统的运用 3' 和 5' RACE 法分段获得目的基因 cDNA 序列的方法相比,更节省实验成本和时间。

纯化原核表达蛋白是成功制备抗血清的关键环节之一,是当前高效纯化原核表达可溶性 His 标签融合蛋白的常用 Ni 柱纯化方法,该方法容易得到高纯度蛋白,操作简便,然而原核表达蛋白经常存在包涵体,即表达产物蛋白质分子不能正确折叠而相互凝集形成不溶性的多肽聚集微粒—包涵体(杨亚东等, 1994)。包涵体中的蛋白必须经过变性使其成为可溶物,再经过重折叠复性处理方可部分恢复生物活性(张庶民和祁自柏, 1995),因此,原核表达中

包涵体的存在虽然不影响蛋白用于制备特异性抗血清,但给蛋白纯化增加了不同程度的复杂性,研究者需要通过变性、复性等方法处理包涵体,获得可溶性融合蛋白,再用凝血酶裂解融合蛋白,经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳或 Ni⁺ 柱(Ni-NTA)层析分离才能得到目的蛋白(Zhao *et al.*, 1998; 苏晶晶等, 2015)。本研究 *SfCatL* 基因在大肠杆菌中能够大量表达,蛋白可溶性分析表明 SfCatL 融合蛋白同样以不溶性包涵体形式存在为主。为了制备高纯度的免疫抗原 SfCatL,本研究采用了 SDS-PAGE 结合透析袋电洗脱法纯化方案,首先运用 SDS-PAGE 电泳对原核表达产物进行包涵体初步分离纯化,把目的蛋白与大部分杂蛋白分离,切胶回收目的蛋白,进而采用透析袋电洗脱法对目的蛋白进一步除杂,纯化得到适用于动物免疫的高纯度蛋白。该方法操作简单、方便、耗费少经济实用,被广泛用于包涵体目的蛋白的纯化(黄轶等, 2003)。

制备昆虫组织蛋白酶特异性抗体,有助于研究该酶在昆虫体内的合成部位、组织分布及其时空表达情况,深入研究该酶的作用功能。研究者利用 DEAE-纤维素和 DEAE-Toyopearl 离子交换层析法直接从棉铃虫中纯化 Cathepsin B 作为动物免疫抗原,制备该酶的抗血清,尽管由于免疫原纯度有限,难以得到高特异性抗体,但基本能用于分析该酶在虫体组织的分布及合成部位(徐夏莲等, 2001),为了获得其高特异性的抗体,通过构建 Cathepsin B 原核表达载体在大肠杆菌中高表达该酶,然后纯化免疫抗原制备抗血清,所得抗血清不仅可以识别重组表达

的棉铃虫 Cathepsin B,而且可以识别棉铃虫卵巢匀浆液中的棉铃虫 Cathepsin B(安晓萌等,2004)。杨晓梅等(2004)进一步制备了该酶的单克隆抗体,这些抗体制备研究有力推动了 Cathepsin B 在棉铃虫个体发育过程的功能研究,如胚胎发育和变态发育等(杨晓梅等,2005)。苏晶晶等(2015)也通过研究家蚕 Cathepsin O 基因原核表达特征,制备该酶的高效价多克隆抗体并以免疫印迹检测证实该抗体能识别家蚕重组表达的 Cathepsin O。本研究成功制备了草地贪夜蛾 SfCatL 特异性抗血清并以免疫印迹检测证实该抗体能特异性识别草地贪夜蛾细胞 SfCatL,结果将有助于系统而深入研究该酶在昆虫生长发育、代谢及农药杀虫机理中的作用功能。

参考文献 (References)

- An XM, Shao HL, Du XJ, Zhao XF, Wang JX, 2004. Preparation and identification of the polyclonal antibodies from recombinant cathepsin B of *Helicoverpa armigera*. *Entomol. Knowl.*, 41(2): 132–136. [安晓萌, 邵红莲, 杜欣军, 赵小凡, 王金星, 2004. 棉铃虫组织蛋白酶B多克隆抗体制备及鉴定. 昆虫知识, 41(2): 132–136]
- Cristofolletti PT, Ribeiro AF, Deraison C, Rahbé Y, Terra WR, 2003. Midgut adaptation and digestive enzyme distribution in a phloem feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *J. Insect Physiol.*, 49(1): 11–24.
- Deraison C, Darboux I, Duportets L, Gorojankina T, Rahbe Y, Jouanin L, 2004. Cloning and characterization of a gut-specific cathepsin L from the aphid *Aphis gossypii*. *Insect Mol. Biol.*, 13(2): 165–177.
- Huang Y, Hua C, Xu JY, Lu SM, Xu L, 2003. Application of dialysis bag electro elution method in protein recovery and purification. *J. Nanjing Milit. Med. Coll.*, 25(1): 33–34. [黄轶, 华超, 徐江英, 卢是明, 许琳, 2003. 透析袋电洗脱法在蛋白质回收和纯化中的应用. 南京军医学院学报, 25(1): 33–34]
- Kurata S, Saito H, Natori S, 1992. The 29-kDa hemocyte proteinase dissociates fatbody at metamorphosis of *Sarcophaga*. *Dev. Biol.*, 153(1): 115–121.
- Li Y, Zhou XY, Li ZL, Li JW, Chen SD, Guo C, Hou Y, Zhao P, 2015. Identification and expression pattern of cathepsin family in silkworm (*Bombyx mori*). *Chin. J. Biotechnol.*, 31(12): 1728. [李懿, 周小英, 黎治浪, 李建伟, 陈世达, 郭超, 侯勇, 赵萍, 2015. 家蚕组织蛋白酶基因家族的鉴定及表达特征分析. 生物工程学报, 31(12): 1728]
- Liu J, 2006. Investigation of Physiological Function of Cysteine Proteinase From Lysosome. PhD Dissertation, University of Science and Technology of China, Hefei. [刘建, 2006. 溶酶体半胱氨酸蛋白酶生理功能的研究. 合肥: 中国科技大学博士学位论文]
- Lopez-Ordoñez T, Rodríguez MH, de la Cruz Hernández-Hernández F, 2010. Characterization of a cDNA encoding a cathepsin L-like protein of *Rhodnius prolixus*. *Insect Mol. Biol.*, 10(5): 505–511.
- Luo M, Dong ZY, Bin SY, Liao HZ, Lin JT, 2012. Molecular cloning, prokaryotic expression and expression at different developmental stages of cathepsin B gene in mealybug *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae). *Acta Entomol. Sin.*, 55(3): 276–283. [罗梅, 董章勇, 宾淑英, 廖泓之, 林进添, 2012. 扶桑绵粉蚧组织蛋白酶B基因的克隆、原核表达和不同发育阶段表达分析. 昆虫学报, 55(3): 276–283]
- Matsumoto I, Emori Y, Abe K, Arai S, 1997. Characterization of a gene family encoding cysteine proteinases of *Sitophilus zeamais* (maize weevil) and analysis of the protein distribution in various tissues including alimentary tract and germ cells. *J. Biochem.*, 121(3): 464–476.
- Nishimura Y, Kawabata T, Kato K, 1998. Identification of latent procathepsins B and L in microsomal lumen; characterization of enzymatic activation and proteolytic processing *in vitro*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 261(1): 64–71.
- Rabossi A, Stoka V, Puizdar V, Turk V, Quesada-Allué LA, 2004. Novel aspartyl proteinase associated to fat body histolysis during *Ceratitis capitata* early metamorphosis. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 57(2): 51–67.
- Shiba HJ, Uchida D, Kobayashi H, Natori M, 2001. Involvement of cathepsin B- and L-like proteinases in silk gland histolysis during metamorphosis of *Bombyx mori*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 390(1): 28–34.
- Su JJ, Chen SY, Zhang K, Yu S, Li YT, Liang HH, Zhao YZ, Yao HJ, Cui HJ, 2015. Identification and expression analysis of cathepsin O gene in silkworm. *Scient. Agric. Sin.*, 48(22): 4564–4573. [苏晶晶, 陈思源, 张奎, 余霜, 李钰添, 梁航华, 赵羽卒, 晁会娟, 崔红娟, 2015. 家蚕组织蛋白酶O(BmCatO)基因鉴定及表达分析. 中国农业科学, 48(22): 4564–4573]
- Uchida K, Nishizuka M, Ohmori D, Ueno T, Eshita Y, Fukunaga A, 2004. Follicular epithelial cell apoptosis of atretic follicles within developing ovaries of the mosquito *Culex pipiens pallens*. *J. Insect Physiol.*, 50(10): 903–912.
- Uchida K, Ohmori D, Ueno T, Nishizuka M, Eshita Y, Fukunaga A, Kominami E, 2001. Preoviposition activation of cathepsin-like proteinases in degenerating ovarian follicles of the mosquito *Culex pipiens pallens*. *Dev. Biol.*, 237(1): 68–78.
- Wang LF, Chai LQ, He HJ, Wang Q, Wang JX, Zhao XF, 2010. A cathepsin L-like proteinase is involved in moulting and metamorphosis in *Helicoverpa armigera*. *Insect Mol. Biol.*, 19(1): 99–111.
- Wang Z, Cheng XA, Meng QQ, Wang PD, Shu BS, Hu QB, Hu MY, Zhong GH, 2015. Azadirachtin-induced apoptosis involves lysosomal membrane permeabilization and cathepsin L release in *Spodoptera frugiperda* S9 cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 64: 126–135
- Xu XL, Zhao XF, Wang JX, 2001. Distribution and biosynthesis sites of cathepsin B in *Helicoverpa armigera*. *Zool. Res.*, 22(3): 242–245. [徐夏莲, 赵小凡, 王金星, 2001. 棉铃虫组织蛋白酶B组织分布与合成部位研究. 动物学研究, 22(3): 242–245]
- Yang XM, Hou LJ, Dong DJ, Wang JX, Zhao XF, 2005. Expression

- and variations in activity of cathepsin B-like proteinase during the ontogenetic process of the cotton boll worm; *Helicoverpa armigera*. *J. Shandong Univ. (Nat. Sci.)*, 40(5): 119 - 124. [杨晓梅, 侯立静, 董杜鹃, 王金星, 赵小凡, 2005. 组织蛋白酶 B 在棉铃虫个体发育过程中的表达及活性研究. 山东大学学报(理学版), 40(5): 119 - 124]
- Yang YD, Lu CY, Wang GC, Yang H, Zhu XJ, Zhou AR, Tang J, Ma DL, Li DZ, 1994. Isolation and bioactivity recovery of recombinant human VEGF from the procaryotic expression products in *E. coli*. *Chin. High Technol. Lett.*, 1(s1): 28 - 31. [杨亚东, 卢传义, 王贵春, 杨鸿, 朱小君, 周爱儒, 汤健, 马大龙, 李岱宗, 1994. 制备性 SDS-PAGE 纯化大肠杆菌表达的重组人 VEGF. 高技术通讯, 1(s1): 28 - 31]
- Zhang SM, Qi ZB, 1995. Formation and purification of inclusion bodies proteins during expression of gene engineering. *Prog. Microbiol. Immunol.*, 23(1): 52 - 54. [张庶民, 祁自柏, 1995. 基因工程表达蛋白包涵体的形成和纯化. 微生物学免疫学进展, 23(1): 52 - 54]
- Zhao XF, An XM, Wang JX, Dong DJ, Du XJ, Sueda S, Kondo H, 2005. Expression of the *Helicoverpa* cathepsin B like proteinase during embryonic development. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 58(1): 39 - 46.
- Zhao XF, Wang JX, Wang YC, 1998. Purification and characterization of a cysteine proteinase from eggs of the cotton boll worm, *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 28(4): 259 - 264.
- Zhao YY, Liu JB, Luo MH, Guo XR, Yuan GH, 2008. Cloning, sequence analysis and prokaryotic expression of cathepsin B gene from *Helicoverpa assulta* (Guenée) (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomol. Sin.*, 51(11): 1121 - 1128. [赵艳艳, 刘建兵, 罗梅浩, 郭线茹, 原国辉, 2008. 烟夜蛾组织蛋白酶 B 酶原基因的克隆、序列分析和原核表达. 昆虫学报, 51(11): 1121 - 1128]

(责任编辑: 马丽萍)