

棉铃虫中肠 cDNA 表达文库的免疫筛选及其克隆分析

李 杰¹, 张 霞³, 郭 巍^{1,2}, 刘小民¹, 李新娜¹, 赵 丹²

(1 河北农业大学 植物保护学院, 河北省农作物病虫害生物防治工程技术中心, 河北 保定 071000)

2 河北农业大学 生命科学院, 河北 保定 071000 3 河北省生物研究所, 河北 石家庄 050051)

摘要: 昆虫围食膜是保护其中肠的一道物理屏障, 破坏围食膜就可能使其中肠处于不正常的生理状态而最终导致死亡。本研究提取棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 围食膜蛋白, 成功制备棉铃虫围食膜蛋白多克隆抗体, 并对棉铃虫中肠 cDNA 表达文库进行免疫筛选, 共得到 385 个阳性克隆。对其中 26 个克隆进行鉴定并测序分析, 结果表明 19 个克隆为肠粘蛋白。过碘酸-希夫试剂 (PAS) 显色法检测棉铃虫围食膜蛋白组成, 发现围食膜蛋白大部分为糖蛋白。通过对棉铃虫中肠围食膜蛋白的分离鉴定, 为进一步分析棉铃虫围食膜蛋白的生理功能, 寻找生物防治新靶标, 开发新型高效生物杀虫剂提供理论依据。

关键词: 棉铃虫; cDNA 表达文库; 免疫筛选; 粘蛋白; PAS 显色

中图分类号: Q 785 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2010)02-0018-05

Immunoscreening and Sequence Organization of the *Helicoverpa armigera* cDNA Expression Library for cDNA Clones

LI Jie¹, ZHANG Xia³, GUO Wei^{1,2}, LIU Xiaomin¹, LIXinna¹, ZHAO Dan²

(1 College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Biological Control Centre of Plant

Diseases and Pests of Hebei Province, Baoding 071000, China 2 College of Life Science, Agricultural

University of Hebei, Baoding 071000, China 3 Biological Institute of Hebei, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract The peritrophic matrix (PM) is a physical barrier protecting the midgut. Destruction of peritrophic membrane can make the midgut in an abnormal physiological state, eventually leading to death. *Helicoverpa armigera* (Hübner) larval midgut cDNA expression library was immunoscreened with an anti-PM proteins polyclonal antiserum which has been successfully prepared by immunizing a rabbit. 385 positive clones were obtained from several screening. 26 purified cDNA clones of them were chosen for sequencing. The results showed that 19 cDNAs of the above 26 cDNA clones encoded insect intestinal mucin (IM). The PM protein composition was then analyzed, and the result showed that there were a lot of glycoproteins by PAS staining analysis. By isolating and identifying the PM proteins of *Helicoverpa armigera*, we could get a clear idea of the physiological function of PM protein. We could also hunt for novel target site in insect pest management and explore high efficient biological pesticide.

Key words *Helicoverpa armigera*; cDNA expression library; Immunoscreening; Mucin; PAS staining

早在 1762 年, Lyonet 在鳞翅目幼虫体内发现了包裹食物的膜结构。1890 年, Babian^[1]在不同的昆虫体内发现了类似结构, 并正式命名该结构为围食膜 (Peritrophic membrane, PM)。哺乳动物的粘蛋白存在于多种器官的上皮细胞的表面 (如脊椎动物的呼吸、消化和泌尿生殖管道内腔), 与其粘液层相

结合, 以保护其免受外来机械损伤和病原微生物的入侵。而昆虫中肠缺少粘液覆盖, 但其围食膜与哺乳动物的粘蛋白有很多相似的功能, 它可帮助昆虫消化食物, 并作为昆虫天然的物理屏障, 保护中肠上皮免受食物颗粒的物理损伤以及食物中氧化剂等成分的化学破坏, 避免微生物侵染, 隔离并过滤毒素

收稿日期: 2009-12-27

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (“973”计划) (2009CB118902); 国家自然科学基金项目 (30771447); 留学人员科技活动项目; 农业厅科技项目

作者简介: 李 杰 (1984-), 女, 山东章丘人, 硕士, 主要从事昆虫生化与分子生物学研究。

通讯作者: 郭 巍 (1971-), 女, 黑龙江绥化人, 教授, 博士生导师, 主要从事昆虫生化与分子生物学教学与研究。

等^[2-5]。因此,破坏昆虫的围食膜就可能使其中肠处于不正常的生理状态而最终导致死亡^[6,7]。因此作为昆虫中肠防御系统的围食膜是潜在的发展新型杀虫手段的新靶标。

构建 cDNA 表达文库,从中筛选克隆新基因是目前常用的分子生物学方法之一。通过对棉铃虫中肠 cDNA 表达文库的筛选,以得到与棉铃虫生物防治相关的功能基因,有利于寻找生防新靶标,并进一步揭示昆虫与病原微生物之间互作的分子机理。研究通过对棉铃虫中肠 cDNA 表达文库的筛选,得到一些编码棉铃虫围食膜蛋白的 cDNA 克隆,并对此进行测序及分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试昆虫 棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) 五龄幼虫,由本实验室饲养。

1.1.2 棉铃虫中肠 cDNA 表达文库 棉铃虫中肠 cDNA 表达文库由本实验室构建并保存。

1.1.3 菌株与质粒 大肠杆菌 XL1-Blue MRF', SOLR, UniZAP XR 载体, ExAssist interference-resistant helper phage 等均由 Stratagene 公司 ZAP-cDNA GigaPack III Gold Cloning Kit 提供。

1.1.4 主要培养基及试剂 LB 培养基; NZY 培养基; 0.7% 过碘酸; 0.2% 偏过硫酸钠; 希夫试剂; NBT, BCIP, 购自上海生工生物工程有限公司; 棉铃虫中肠特异性多克隆抗体,由河北省生物研究所制备; anti-rabbit IgG (Sigma), 购自博士德生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 棉铃虫围食膜蛋白的提取与多克隆抗体的制备 解剖棉铃虫五龄幼虫,取其围食膜,加入 Buffer I (500 mmol/L NaCl 2.5% SDS 5% β -mercaptoethanol), 水浴煮沸 5 min 2 次; 取上清,加入终浓度 10% TCA; 冰浴 30 min 以上, 13 000 r/min 离心 5 min, 弃上清; 37℃ 20 min 干燥后溶于 PBS 溶液中。

将棉铃虫围食膜蛋白送河北省生物研究所免疫家兔,制备抗血清。

1.2.2 棉铃虫中肠 cDNA 表达文库的检测 将保存于本实验室的棉铃虫中肠 cDNA 表达文库进行滴度测定。

取 1 μ L 棉铃虫文库噬菌体感染大肠杆菌 XL1-Blue MRF', 加入 50℃ 预热的 NZY Top Agar 混匀后倒入 NZY 平板中, 37℃ 倒置培养过夜, 依据以下公

式, 计算噬菌斑个数, 并计算滴度。

$$\text{噬菌斑个数} = \left[\frac{\text{噬菌斑数 (pfu)} \times \text{稀释倍数}}{\text{平板体积 (}\mu\text{L)}} \right] \times$$

1000 μ L/mL。

1.2.3 棉铃虫中肠 cDNA 表达文库的筛选 利用制备的棉铃虫围食膜多克隆抗体对棉铃虫中肠 cDNA 表达文库进行免疫筛选。将 cDNA 文库噬菌体以每 150 mm 平板约形成 5×10^4 个噬菌斑的密度铺平板, 42℃ 倒置培养约 4 h 至噬菌斑长出, 覆盖硝酸纤维素膜 (NC 膜) 并进行不对称 3 点位置标记, 倒置培养 3.5 h 取出 NC 膜, 以 3% BSA 封闭, 棉铃虫围食膜总抗体 (一抗) 结合、羊抗兔 IgG (二抗) 结合、NBT/BCIP 显色。挑取阳性噬菌斑于 500 μ L SM Buffer 中, 并加入 20 μ L 氯仿。

初筛阳性克隆后再复筛 1~2 次, 直至 NC 膜上全部斑点均为清晰阳性反应。将阳性噬菌体溶于 SM Buffer 中, 方法同上。

1.2.4 单克隆切除 已插入棉铃虫中肠 cDNA 片段的 UniZAP XR 载体感染 XL1-Blue MRF' 后, 用 ExAssist helper phage 超感染, 由辅助噬菌体提供的反式作用蛋白质自动识别载体上的 fl DNA 合成起始子并形成缺口, 合成至终止子之后被再次切割, 形成环形的 pBluescript 噬菌粒。这样就完成了 UniZAP XR 载体上 pBluescript cDNA 序列的体内删除作用。取上清 70℃ 下加热 20 min, 以杀死大肠杆菌细胞及 λ 噬菌体, 含插入片段的 pBluescript 噬菌粒则得以存活。感染大肠杆菌 SOLR 细胞, 并涂于含氨苄青霉素的 LB 平板。

1.2.5 阳性克隆的鉴定及序列测定与分析 从含氨苄青霉素的 LB 平板上挑取单克隆进行培养, 并进行 PvuII 酶切和 PCR 方法鉴定插入片段大小。

将鉴定后的阳性克隆送往上海生工测序部进行测序。测序结果利用 DNAMAN 软件和 NCBI Pfam、Expasy 网站进行序列分析。

1.2.6 棉铃虫围食膜糖蛋白的检测 参照曹佐武^[8]方法, 采用过碘酸-希夫 (PAS) 显色法对棉铃虫围食膜上的糖蛋白进行显色。

2 结果与分析

2.1 棉铃虫中肠 cDNA 文库滴度的测定

将棉铃虫中肠 cDNA 文库逐级稀释至 $10^2 \sim 10^7$ 倍, 计算各平板上的噬菌斑个数, 计算平均值。最终测得棉铃虫文库滴度 (扩增后) 为 8.75×10^8 pfu/mL, 原始文库滴度为 4.82×10^6 pfu/mL, 已超过要求克隆数 1.7×10^5 pfu/mL, 适用于目的克隆的筛

选。

2 2 棉铃虫中肠 cDNA 文库的免疫筛选与阳性克隆的鉴定、测序及分析

利用棉铃虫围食膜蛋白多克隆抗体对棉铃虫中肠 cDNA 表达文库进行了 11 次免疫筛选, 共得到

385 个阳性克隆, 插入片段大部分在 2 0 kb 以上, 挑选其中插入片段较大的 26 个克隆进行测序。测序结果利用 DNAMAN 软件和 NCBI 网站的 BlastP 进行序列分析, 分析结果如表 1 所示。

表 1 已测序棉铃虫围食膜蛋白序列比对与分析

Tab 1 A ligment and the structural characteristics of sequenced peritrophic membrane proteins of *Helicoverpa armigera*

序号 No.	名称 Clones	大小 /kb Size	相似蛋白 Similar protein	结构域 Domains	糖基化 Glycosylation
1	HS5	3.9	insect intestinal mucin 2 [<i>Helicoverpa armigera</i>]	2CBD, 2MD	O-linked, N-linked
2	HS6	4.6	insect intestinal mucin 2 [<i>Helicoverpa armigera</i>]	3CBD, 3MD	O-linked, N-linked
3	HS12	2.2	<i>Helicoverpa armigera</i> IM-46	2CBD, 2MD	O-linked, N-linked
4	HS14	4.0	insect intestinal mucin 2 [<i>Helicoverpa armigera</i>]	3CBD, 2MD	O-linked, N-linked
5	HS37	2.9	insect intestinal mucin 2 [<i>Helicoverpa armigera</i>]	3CBD, 2MD	O-linked, N-linked
6	HS53	2.0	<i>Helicoverpa assulta</i> 18S ribosomal RNA gene	—	—
7	HS60	3.3	cyclic AMP-regulated protein [<i>Bombyx mori</i>]	ADF, cofilin-like domains	—
8	HS78	2.7	insect intestinal mucin 2 [<i>Helicoverpa armigera</i>]	3CBD, 2MD	O-linked, N-linked
9	HT4	2.0	alpha-tubulin [<i>Nosema spodopterae</i>]	Tubulin	—
10	HT6	2.6	IM-46 [<i>Helicoverpa armigera</i>]	3CBD, 2MD	O-linked, N-linked
11	HT36	4.1	insect intestinal mucin 2 [<i>Helicoverpa armigera</i>]	2CBD, 1MD	O-linked, N-linked
12	HT8	2.4	Agonaute-2b [<i>Tribolium castaneum</i>]	PAZ domain, PIWI domain	N-linked
13	HT25	3.1	insect intestinal mucin 2 [<i>Helicoverpa armigera</i>]	2CBD, 2MD	O-linked, N-linked
14	HT25B	3.2	insect intestinal mucin 2 [<i>Helicoverpa armigera</i>]	1CBD, 1MD	O-linked, N-linked
15	HT48	2.6	insect intestinal mucin 2 [<i>Helicoverpa armigera</i>]	3CBD, 2MD	O-linked, N-linked
16	HT62	2.4	Agonaute-2b [<i>Tribolium castaneum</i>]	PAZ domain, PIWI domain	N-linked
17	HT72	3.1	insect intestinal mucin 1 [<i>Helicoverpa armigera</i>] 2DG-rich	5CBD, 1MD O-linked, N-linked	
18	HT73	3.2	IM-86 [<i>Helicoverpa armigera</i>]	1CBD, 1MD	O-linked, N-linked
19	HT80	3.0	IM-86 [<i>Helicoverpa armigera</i>]	5CBD, 2MD	O-linked, N-linked
20	HT85	2.4	<i>Helicoverpa armigera</i> hypothetical protein Llacc01000286 mRNA	—	—
21	HP2	2.7	IM-15 [<i>Helicoverpa armigera</i>]	5CBD, 1MD	O-linked, N-linked
22	HP3	3.2	carboxylesterase [<i>Bombyx mori</i>]	Esterase-lipase	N-linked
23	HH1	3.6	insect intestinal mucin 2 [<i>Helicoverpa armigera</i>]	3CBD, 3MD	O-linked, N-linked
24	HH2	4.0	insect intestinal mucin 2 [<i>Helicoverpa armigera</i>]	3CBD, 2MD	O-linked, N-linked
25	HH12	2.9	IM-46 [<i>Helicoverpa armigera</i>]	2CBD, 2MD	O-linked
26	HH13	3.2	peritrophin 1 [<i>Manestra configurata</i>]	3CBD, 1MD	O-linked, N-linked

2 3 部分测序克隆序列分析

经 NCBI 和 ExPASy Proteomics Server 等在线分析已测序氨基酸序列, 发现已测得共 26 个克隆中 73% 为几丁质结合蛋白 (含有几丁质结合功能域, Chitin binding domain, 简称 CBD), 并均含有大量 O-联糖基化位点和部分 N-联糖基化位点, 富含脯氨酸、丝氨酸和苏氨酸, 符合粘蛋白 (mucin) 的特点, 因此测序得到的 26 个 cDNA 均编码棉铃虫围食膜蛋白均为棉铃虫肠粘蛋白。经结构域分析显示, 棉铃虫肠粘蛋白具有相似的结构域特征, 将部分已测序克隆与已知序列 HaIM-46 (EU144130)、HaIM-86 (EU136045) 和 HaIM-2 (EU325543) 进行结构域比较、分析。

图 1 所示的 8 种棉铃虫围食膜粘蛋白由 2~ 11

个 CBDs 构成, 中间镶嵌着粘蛋白结构域 (Mucin domain MD), 半胱氨酸富集区位于 CBD 上, 都由空间上保守的六个半胱氨酸保守区组成 CX₁₃₋₁₅CX₅CX₁₁CX₁₂CX₇C, 这些保守区中的半胱氨酸形成二硫键, 以维持围食膜蛋白的稳定性。而高度 O-联糖基化的 MD 中, 不论是重复序列还是空间结构均差异很大, N-联糖基化位点的分布并不均匀, 可在任何位点出现。

在本研究中, HT72 除具有 5 个 CBD 和 1 个 MD 外, 还含有 2 个天冬氨酸-甘氨酸富集区 (D, G-rich DG), 序列 DGGNDGGNDGGN 重复 5 次, 这与 HaIM-86 结构域相似。HaIM-86 中, NDGG 重复达 20 次。DG 的功能还有待进一步研究。

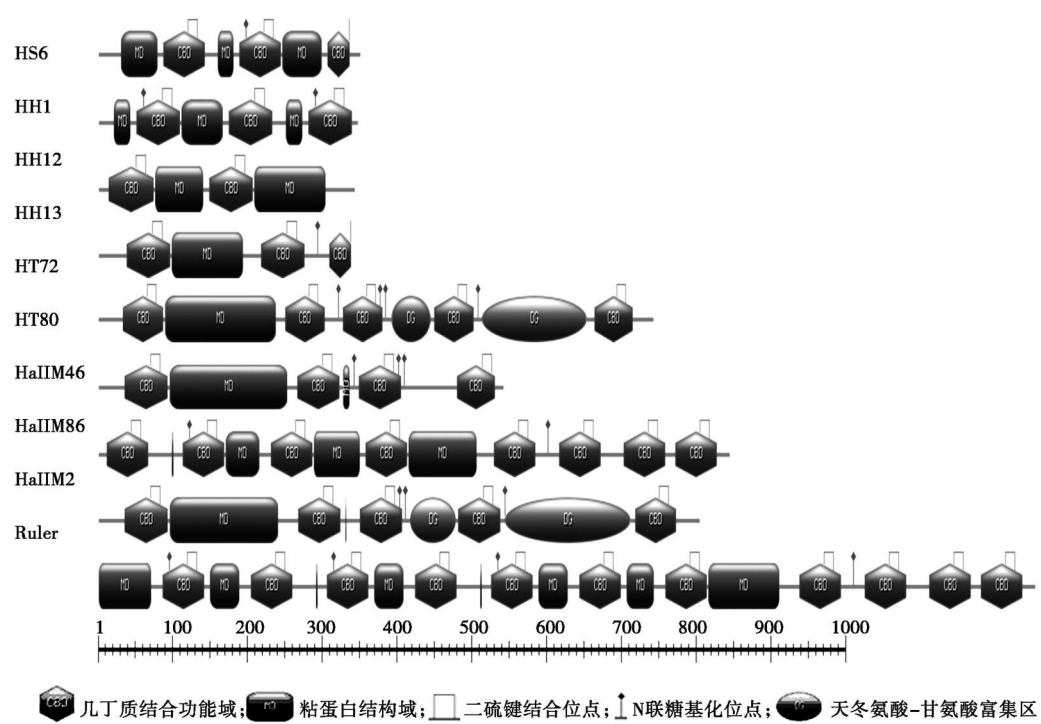
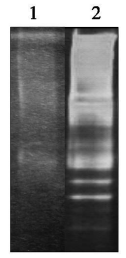


图 1 棉铃虫围食膜粘蛋白结构域分析

Fig 1 Diagrammatic representation of domain structures of *H. armigera* intestinal mucins

2 4 棉铃虫围食膜糖蛋白的检测

对棉铃虫围食膜进行糖蛋白检测,经 PAS 染色后大部分棉铃虫围食膜蛋白被染成洋红色。如图 2 所示,棉铃虫围食膜糖蛋白约占围食膜总蛋白的 75%,这与文库筛选结果一致。



1 PAS 染色; 2 银染。
1 PAS staining 2 Silver staining

图 2 棉铃虫围食膜 SDS-PAGE 图谱

Fig 2 SDS-PAGE analysis of *Helicoverpa armigera* peritrophic membrane

3 讨论

本研究通过从文库筛选得到的 cDNA 中随机挑选 26 个进行测序及分析,其中有 19 个编码肠粘蛋白。通过 PAS 染色研究表明棉铃虫围食膜蛋白中大部分为糖蛋白。哺乳动物的粘蛋白由上皮细胞分泌,是保护粘膜上皮的屏障。目前为止所研究的昆虫围食膜肠粘蛋白具有很多哺乳动物粘蛋白的分子特性,如它们通常都有高分子量,有很强的二硫键作用,具有高度糖基化的富含脯氨酸、丝氨酸和苏氨酸

的区域。在生物合成中,脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸是 O-糖基化的连接位点^[9]。与其相似,昆虫围食膜肠粘蛋白与哺乳动物的粘蛋白也有很多一致的功能,例如,润滑经过中肠的食物通道,阻止病菌侵染,以及减少消化蛋白酶对上皮细胞的影响等。

棉铃虫粘蛋白与已知的昆虫肠粘蛋白相比,它们均为富含脯氨酸、苏氨酸、丝氨酸的糖蛋白,由若干个 CBD 构成,中间镶嵌着高度糖基化的 MD,这是昆虫粘蛋白的共有特征,如图 3 所示。而 O-糖基化和半胱氨酸富集结构域的空间结构差异很大,N-糖基化位点的分布并不均匀,可在任何位点出现。

在已经发现的鳞翅目昆虫围食膜粘蛋白中,甜菜夜蛾肠粘蛋白 SeIM-8 除具有已知昆虫肠粘蛋白的氨基酸序列特征外,还含有一个独特的天冬氨酸富集区^[10]。该区域内序列 DDDKPGCNGNCPE 重复达 12 次,酸性氨基酸天冬氨酸含量为 24%,这是首次在昆虫蛋白中报道,其在围食膜蛋白结构中的作用尚未可知。在棉铃虫 IM86 中也发现具有天冬氨酸-甘氨酸富集区,是否与甜菜夜蛾的天冬氨酸富集区有相似功能尚待进一步研究。

比较不同昆虫之间的粘蛋白可以看出非 mucin 结构域特别保守而 mucin 结构域没有保守性。脯氨酸可通过破坏螺旋的形成和促进 β 转角和 β 片层的形成来影响蛋白质构象。大多数 O-糖基化发生在被推测是 β 转角的地方。富含丝氨酸和苏氨酸的串联重复 (TR) 是组成粘蛋白的特征性结构,串

连重复在长度上有相似的变化但不尽相同。但串联重复数目对 *O*-联糖基化的确切影响目前尚不清楚^[11]。不同昆虫的粘蛋白结构域之间具有相似性,其中 *T. ni*^[12] 和 *M. configurata* IM^[13] 的 MD 中的重复序列比较短,包括 4~8 个氨基酸,而且在结构上简单重复多达 25 次。相比而言, PxIM 的重复序列较长,由 27 个氨基酸组成,相对复杂,且重复频率低,仅发生 2~11 次^[10],而粘蛋白区域内部序列高

度重复。棉铃虫重复序列的氨基酸数目和重复次数均居中。

昆虫肠粘蛋白增加了其围食膜的致密性、坚韧性和半渗透性,故通过对棉铃虫中肠 cDNA 表达文库的免疫筛选,克隆得到编码新围食膜蛋白的基因,有利于进一步研究其结构、蛋白组分的功能以及形成机理,并为害虫生物防治提供新途径。

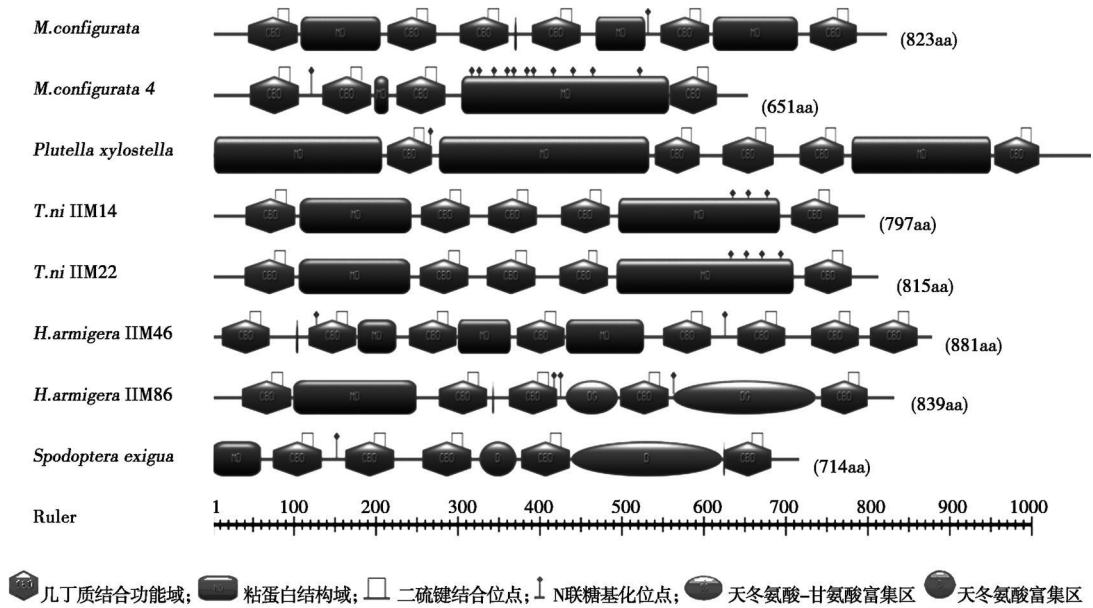


图 3 不同鳞翅目昆虫围食膜粘蛋白结构域分析

Fig 3 Structure analysis of mucins in different lepidoptera insects

参考文献:

- [1] Babiani E G. Etudes anatomiques et histologiques sur le tube digestif des Crytops [J]. Arch Zool Exp Gen, 1890 & 81-82
- [2] Lehane M J. Peritrophic matrix structure and function [J]. Annu Rev Entomol 1997, 42: 525-550
- [3] Peters W. Peritrophic membranes [M]. Springer New York, 1992
- [4] Telham R L, Wiffels G, Willadsen P. Peritrophic matrix proteins [J]. Insect Biochem Mol Biol 1999, 29(2): 87-101
- [5] Shi X, Chamankhah M, Vasa-Shah S, et al. Modeling the structure of the type I peritrophic matrix: characterization of a *Manestra configurata* intestinal mucin and a novel peritrophin containing 19 chitin binding domains [J]. Insect Biochem Mol Biol 2004, 34(10): 1101-1115
- [6] Wang P, Granados R R. Calyfluor disrupts the midgut defense system in insects [J]. Insect Biochem Mol Biol 2000, 30(2): 135-143
- [7] Zhu R, Liu K, Peng J, et al. Optical brightener M2R destroys the peritrophic membrane of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae [J]. Pest Manag Sci 2007, 63(3): 296-300
- [8] 曹佐武. 糖蛋白 PAGE 分离后的糖基显色法 [J]. 生物技术通报, 2006, 5: 87-89
- [9] 张倩, 杨振, 张艳贞, 等. 蛋白质糖基化修饰的研究方法及其应用 [J]. 生物技术通报, 2006, 1: 46-49
- [10] 张霞, 李国勋, 郭巍. 甜菜夜蛾粘蛋白 cDNA 基因的分子克隆与序列分析 [J]. 中国农业科学, 2008, 42(11): 3898-3904
- [11] 刘可人, 金美芳, 吴士良. O-糖基化位点预测及糖基化酶催化特点 [J]. 生命的化学, 2006, 26(1): 25-27
- [12] Wang P, Granados R R. Molecular cloning and sequencing of a novel invertebrate intestinal mucin cDNA [J]. J Biol Chem, 1997, 272(26): 16663-16669
- [13] Shi X, Chamankhah M, Vasa-Shah S, et al. Modeling the structure of the type I peritrophic matrix: Characterization of a *Mamestra configurata* intestinal mucin and a novel peritrophin containing 19 chitin binding domains [J]. Insect Biochem Mol Biol 2004, 34: 1101-1115