

柞蚕微孢子虫长极丝型孢子总蛋白的鉴定及功能分析*

龚娟娟, 许金山, 李 治, 党晓群, 周泽扬, 王林玲

(重庆师范大学 生命科学学院, 重庆 401331)

摘要:柞蚕(*Antheraea pernyi* Guerin-Meneville)是中国北方重要的吐丝经济昆虫,柞蚕微孢子虫(*Nosema antheraeae*)引起的柞蚕微孢子虫病是柞蚕产业毁灭性的病害。本研究采用梯度 Percoll-NaCl 溶液分离纯化柞蚕微孢子虫,提取柞蚕微孢子虫总蛋白,胰蛋白酶消化,然后通过 LC-MS/MS 精确获得各肽段分子量,经数据库比对后共鉴定到 610 个蛋白。对鉴定到的蛋白质进行 GO 蛋白质功能分析,发现孢子时期参与大分子复合物及结构分子活性的蛋白的较多,而参与细胞催化 and 绑定功能、细胞过程及代谢过程的表达蛋白的所占的比例明显低于预测基因的的比例。研究认为这一结果主要与孢子期的微孢子虫脱离宿主细胞,生理不活跃,处于相对静止的时期,没有能量和物质来源有关;微孢子虫通过降低细胞活动和物质代谢,从而适应所处的环境。

关键词:柞蚕微孢子虫;孢子期;蛋白质;功能分析;GO 分类

中图分类号:Q51;Q959.115⁺.92

文献标识码:A

文章编号:1672-6693(2014)03-0026-05

微孢子虫(Microsporidia)是一类专性寄生于细胞内的原生动动物,已报道的微孢子虫有 1 200 多种,分别属于 144 个属,可以感染包括昆虫、鱼类和人类在内的几乎所有的动物^[1]。微孢子虫由孢子壁、极囊以及双核组成,它的生活史可分为繁殖期、孢子形成期、侵染期等 3 个时期;同时微孢子虫在生活史过程中具有孢子二型性,即感染早期的短极丝型孢子和感染后期的长极丝型孢子^[2]。短极丝型孢子内壁较薄,可在宿主细胞内发芽,形成二次感染体,感染相邻接的孢子和组织,扩大宿主体内的感染范围;而在感染后期形成的长极丝型孢子则具备有较厚的孢子壁,即使从宿主脱离后较长时间仍有生活力^[3-4],是宿主个体间感染的主要形态。

柞蚕(*Antheraea pernyi* Guerin-Meneville)是一类以柞树叶为食料的经济类吐丝结茧昆虫,隶属于鳞翅目(Lepidoptera)大蚕蛾科(Saturniidae),是中国北方重要的经济昆虫。柞蚕主要的病害有柞蚕脓病、柞蚕微孢子虫病、空胴病、柞蚕寄蝇病(蝇蛆病)、线虫病等^[5-7]。其中由柞蚕微孢子虫(*Nosema antheraeae*)引起的柞蚕微孢子虫病率逐年上升,严重威胁柞蚕丝产业,被列为蚕种的法定检疫对象。柞蚕微孢子虫呈双核,表现出孢子二型性,具有典型的 *Nosema* 属特征,在蚕体内的发育有 5 个形态即孢原质、裂殖体、产孢体、孢子母细胞和孢子^[8-9];长极丝型孢子可以脱离柞蚕组织存在于环境中,被柞蚕食入后以孢子发芽的形式弹出极丝,通过极丝将孢原质注入到柞蚕细胞,从而感染柞蚕,引起柞蚕微孢子虫病^[10]。

SSUrRNA 和 ITS 构建的进化树表明柞蚕微孢子虫和家蚕微孢子虫(*Nosema bombycis*)具有较近的亲缘关系^[11-12],脉冲电泳试验推断柞蚕微孢子虫细胞核约有 15 条染色体,分子量为 390~960 kD,基因组大小约为 9.3 Mb^[13]。本实验室曾对柞蚕微孢子虫进行了全基因组测序,全基因组大小约为 7.6 Mb,其中 3 118 个基因预测具有编码框^[14],有功能注释的预测基因有 1 539 个。

本文主要研究柞蚕微孢子虫长极丝型孢子表达的总蛋白质,通过 GO 分类进行柞蚕微孢子虫孢子时期表达蛋白的功能分析,以便对柞蚕微孢子虫的相关研究提供蛋白质方面的基础数据。

1 材料与方法

1.1 柞蚕微孢子虫纯化

取患病柞蚕蛹,在研钵中充分研磨,用 Percoll 纯化柞蚕微孢子虫孢子^[15-17],并做了一些改进,即用 Percoll 原

* 收稿日期:2014-03-05 修回日期:2014-03-26 网络出版时间:2014-5-8 14:38

资助项目:国家 863 项目(No. 2012AA101301-3);国家自然科学基金(No. 31001037);教育部科学技术重点项目(No. 210180)

作者简介:龚娟娟,女,研究方向为动物学,E-mail:ghijackie@126.com;通讯作者:王林玲,E-mail:wanglinling2005@163.com

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20140508.1438.006.html

液与 1.5 mol/L NaCl 溶液按体积比 9 : 1 配制母液,然后用 0.15 mol/L NaCl 溶液按需要稀释母液,采用 25%、50%、75%、90%、100% 的 Percoll-NaCl 溶液不连续密度梯度离心,4 °C、15 000 g 持续 30 min。

Percoll 密度梯度铺制方法为:取 15 mL 离心管,将 100% 的 Percoll-NaCl 溶液置于离心管底部,然后按上述密度梯度由高到低逐渐向上缓慢加入离心管铺制而成,每个梯度加 2 mL 溶液。

加样过程为:用移液枪加样,枪头和离心管成 50°,慢慢将样品沿管壁铺到梯度离心液液面上,样品量 1 mL。Percoll 密度梯度离心后观察分层现象,用长吸管小心吸取各层溶液置于离心管中,用生理盐水洗涤 3 次,除去 Percoll 液,最后用无菌水悬浮,显微镜检查观察各条带层的微孢子虫情况。

1.2 柞蚕微孢子虫计数

将收集的样品经生理盐水洗涤数次后,用无菌水稀释至适当的倍数,充分摇匀,将溶液滴在血球计数板上,盖上盖片,在 640 倍光学显微镜下观察、计数。

1.3 柞蚕微孢子虫蛋白质提取

取虫体密度为 1×10^9 个/mL 的微孢子虫悬浮液,12 000 g、4 °C 离心 15 min,弃上清,于沉淀中加入 200 μ L SDT 溶液(4% SDS,0.1 mol/L Tris-HCl,pH 值为 8.0);沸水浴 15 min,超声裂解,最后 4 °C、14 000 g 离心 45 min,并收集上清。上清即为柞蚕微孢子虫总蛋白。

1.4 柞蚕微孢子虫总蛋白 SDS-PAGE 电泳

将制备好的蛋白样品用 12% 分离胶、6% 浓缩胶进行 SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝 R-250 染色。

1.5 柞蚕微孢子虫总蛋白的 LC-MS/MS 分析

首先对总蛋白进行酶切,即总蛋白样品中加入 2.5~10 ng/ μ L Trypsin 溶液,于酶解原液中加入 100 μ L 抽提液(60% ACN/0.1% TFA),超声 15 min,冻干。第二步为毛细管高效液相色谱。配置溶液 A(0.1% 甲酸的水溶液)和 B(0.1% 甲酸的乙腈水溶液,乙腈为 84%)。色谱柱以 95% 的 A 液平衡后,样品由自动进样器上样至 Trap 柱。色谱梯度为:0~50 min,B 液线性梯度从 4% 到 50%,50~54 min;然后从 50% 到 100%,54~60 min;最后维持在 100%。最后是质谱数据采集,即多肽和多肽的碎片的质量电荷比按照每次全扫描(Full scan)后采集 20 个碎片图谱(MS2 scan)。

1.6 柞蚕微孢子虫总蛋白 GO 分类

采用 Mascot 软件在 SwissProt 蛋白数据库中进行同源检索,利用 tBlastn 检索柞蚕微孢子虫全基因组数据库(未公布)的 DNA 序列,然后进行 GO 分类。

2 结果

2.1 柞蚕微孢子虫孢子分离纯化

目前分离纯化微孢子虫孢子的常用方法有差速离心法、蔗糖(CsCl)密度梯度离心法和 Percoll 密度梯度离心法。Jouvenaz^[15]、Fumarola^[17] 等人研究认为 Percoll 是一种有效的微孢子虫孢子纯化介质。周成等人^[18] 比较了蔗糖密度梯度离心法和 Percoll 密度梯度离心法对家蚕微孢子虫孢子的纯化效果,结果显示 Percoll 法纯化效果更好,纯化条件为 25%、50%、75%、100% 的 Percoll 不连续梯度,12 000 g 离心 20 min,梯度间形成清晰的条带层,纯净微孢子虫孢子聚集在管底两层。本文在此基础上加以改进,采用 25%、50%、75%、90%、100% 的 Percoll-NaCl 溶液进行微孢子虫的分离纯化。

Percoll 溶液具有自行分层的特性,样品在非连续密度梯度 Percoll-NaCl 溶液中,经 4 °C 15 000 g 离心 30 min 后,在离心管中形成明显条带层(图 1A),从上到下依次为 25%、50%、75%、90%、100% 的 Percoll-NaCl 溶液层。对各层沉淀进行镜检发现,图 1A 中底层黑色箭头所指处的沉淀中微孢子虫浓度高,而且杂质含量少(图 1B)。因此,采用上述方法分离纯化得到浓度及纯度很高的柞蚕微孢子虫。

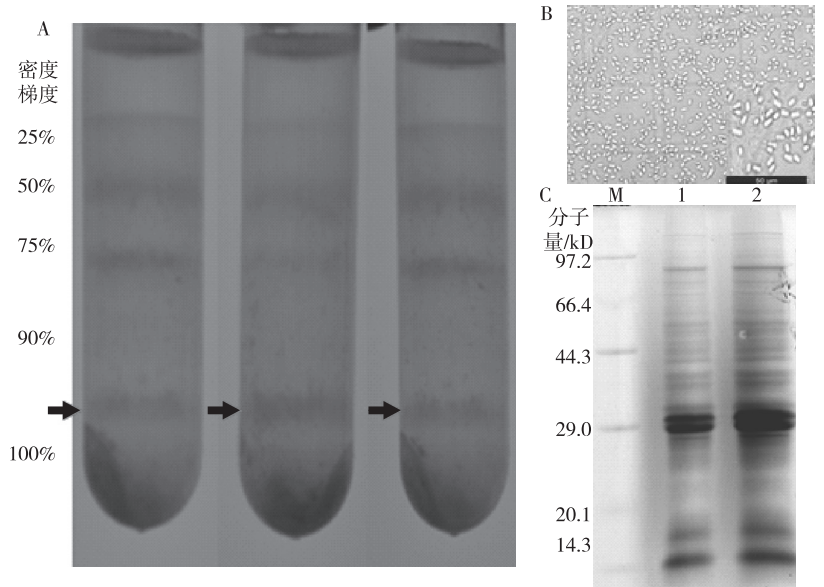
2.2 柞蚕微孢子虫总蛋白 SDS-PAGE 电泳

图 1C 所示为柞蚕微孢子虫总蛋白 SDS-PAGE 电泳图,从图中可以看到 15 条以上蛋白条带,分子量大小分布在 20~100 kD,其中在 29~90 kD 处的蛋白条带清晰可见,且蛋白丰度较高,特别是 29 kD 处蛋白浓度最高。

2.3 柞蚕微孢子虫总蛋白的 LC-MS/MS 质谱鉴定和蛋白功能分析

柞蚕微孢子虫蛋白提取液通过 LC-MS/MS 质谱分析,质谱数据在西南大学蚕学研究所柞蚕微孢子虫基因组数据库中搜索,共鉴定到得 610 个蛋白。将鉴定到的柞蚕微孢子虫孢子时期总蛋白质和基因组预测蛋白进行

了 GO 分类的蛋白质功能分析,结果如图 2 所示。柞蚕微孢子虫有功能注释的预测蛋白有 1 539 个,经质谱鉴定的 610 个孢子时期表达的蛋白。从图中可以看到,在细胞组成方面,参与了细胞及细胞部分的基因分别预测到 585 和 569 个,分别占基因组预测数的 38%和 37%;而参与这两部分的基因经质谱鉴定,分别鉴定到了 232 和 226 个,分别占质谱鉴定到的基因数的 36%和 37%。在分子功能方面,预测到有 1 048 个基因,质谱鉴定到 300 个基因;预测到 42%的基因参与细胞催化功能,质谱鉴定到该部分基因只有 36%;在发挥的分子功能方面,预测到 924 和 900 个基因分别参与了细胞过程及代谢过程,分别占该部分预测基因的 59%和 50%,而质谱鉴定到参与这两部分的基因分别为 280 和 244 个,分别占质谱结果的 42%和 40%,分别比预测的基因少 17%和 10%。另一方面,有些基因质谱鉴定到的比例较基因组预测到的比例要高,如细胞组成中的大分子复合物,基因组预测的基因占 16%,而质谱鉴定到的基因占到了 20%;另外,分子功能中参与结构分子活性的基因,质谱鉴定到 10%的基因,而基因组预测到的基因只有 5%。



注: A:Percoll-NaCl溶液密度梯度分离柞蚕微孢子虫,黑色箭头所示为孢子沉淀; B:A图黑色箭头所示的孢子沉淀镜检结果; C:柞蚕微孢子虫总蛋白SDS-PAGE电泳图, M为Marker, 1为上样量5 μL, 2为上样量10 μL。

图 1 柞蚕微孢子虫纯化、镜检及总蛋白 SDS-PAGE 电泳

Fig. 1 The purification, microscopy and total protein SDS-PAGE electrophoresis of *N. antheraeae*

质谱鉴定到的比例较基因组预测到的比例要高,如细胞组成中的大分子复合物,基因组预测的基因占 16%,而质谱鉴定到的基因占到了 20%;另外,分子功能中参与结构分子活性的基因,质谱鉴定到 10%的基因,而基因组预测到的基因只有 5%。

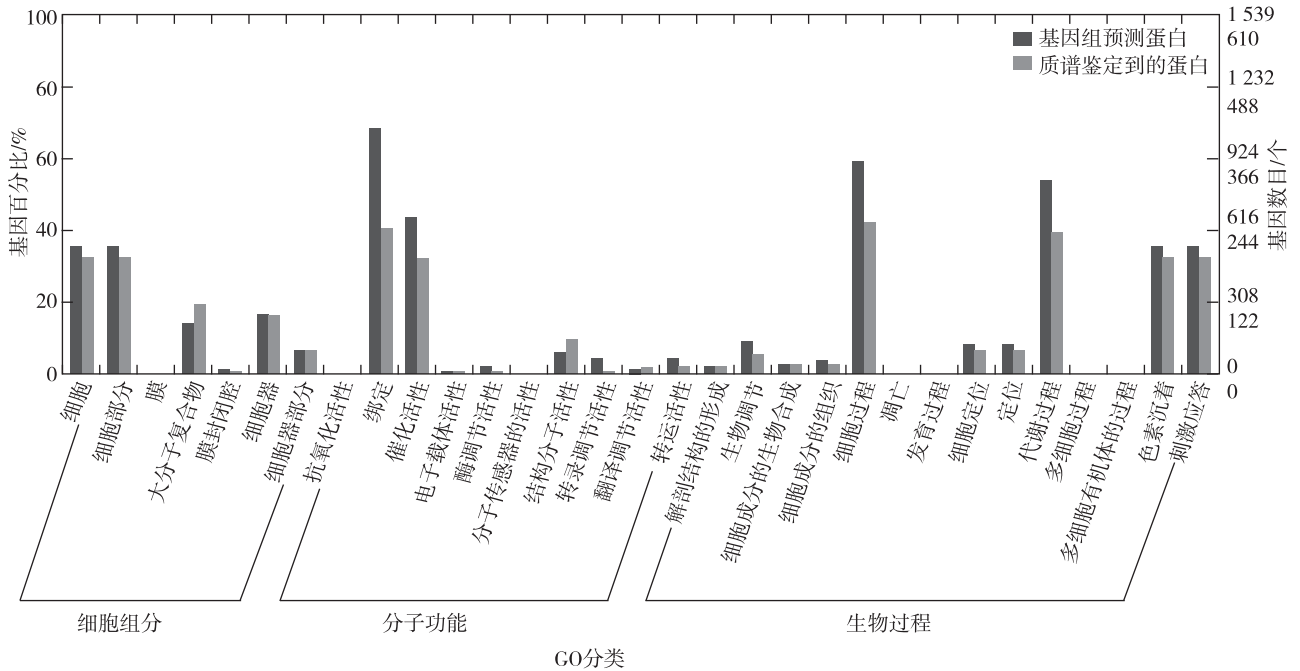


图 2 柞蚕微孢子虫孢子时期蛋白质的 GO 功能分析结果

Fig. 2 The analysis of GO protein function in the spores period of *N. antheraeae*

3 讨论

GO 分析对实验结果有提示的作用,通过差异基因的 GO 分析,可以找到富集差异基因的 GO 分类条目,寻

找不同样品的差异基因可能和哪些基因功能的改变有关。本研究主要以柞蚕微孢子虫总蛋白为出发点,研究预测基因与表达蛋白基因之间的关系。由图 2 可以首先看到,GO 注释的大分子复合物基因约占 16%,质谱鉴定到的基因占到了 20%,它们的蛋白表达量较高。这主要是由于柞蚕微孢子虫体内的大分子复合物通常以有机物为多数,例如蛋白质、糖类、脂类等;它们是生物体的重要能源物质,控制着细胞的生命活动。参与绑定及催化活性的基因分别占 GO 注释基因的 70%和 42%,而质谱鉴定到的这两部分基因分别占质谱结果的 40%和 38%。参与绑定及催化活性的表达的蛋白占总蛋白的比例比预测蛋白占总预测蛋白的比例低,这是由于孢子寄生在宿主体内并从中摄取营养,在一个生活周期的孢原质(芽体)、裂殖体(游走体)、产孢体、孢子母细胞和孢子阶段中,裂殖体、产孢体及孢子母细胞均在蚕的组织细胞内寄生;当孢子处于独立于宿主生活时,孢子体内的变化就会降到最低,以度过极端环境。所以这时参与绑定及催化活性的基因处于不活跃时期,表达量相对较低。其次,基因组预测到参与细胞及代谢过程的基因分别为 924 和 900 个,分别占基因与预测基因的 59%和 50%;质谱鉴定到的这两部分基因分别为 280 和 244 个,分别占质谱鉴定结果的 42%和 40%。这是因为微孢子是严格的胞内寄生物,在它的各个发育时期本身都不具有线粒体,它营寄生生活的营养来源完全依赖于宿主细胞的线粒体来供给,必须借助于宿主的代谢系统^[20];而分离纯化的微孢子处于孢子期,具备较厚的孢子被膜,孢子处于相对不活跃状态,因而各部分蛋白的表达相对较低,这也是微孢子虫对环境的一种巧妙适应方式。

参考文献:

- [1] 辽宁省蚕业科学研究所. 中国柞蚕[M]. 辽宁:辽宁科学技术出版社,2003.
Science of Sericulture of Liaoning Institute. China tussah[M]. Liaoning:Liaoning Science and Technology Press,2003.
- [2] Rock W X. Dimorphic development of *Nosema bombycis* spores in gut epithelium of larvae of the silkworm, *Bombyx mori* [J]. Japanese Silkworm Hybrid, 1991, 60: 246-256.
- [3] Bigliardi E, Sacchi L. Cellbiology and invasion of the Microsporidia[J]. Microbes Infect, 2001, 3(5): 373-379.
- [4] 张志芳, 吴祥莆. 昆虫杆状病毒复制的分子生物学[J]. 国外农学—蚕业, 1994(4): 17-21.
Zhang Z F, Wu X P. Baculovirus molecular biology[J]. Foreign Agronomy—Sericulture, 1994(4): 17-21.
- [5] 朱绪伟, 刘彦群, 李喜升, 等. 利用 DNA 条形码探讨云南野柞蚕的分类地位[J]. 蚕业科学, 2008, 34(3): 424-428.
Zhu X W, Liu Y Q, Li X S, et al. Taxonomy status of wild oak silkworm in Yunnan revealed by DNA barcoding[J]. Sericultural Science, 2008, 34(3): 424-428.
- [6] 孔杰, 李艳秀. 黑龙江省柞蚕主要病害及其综合防治[J]. 北方蚕业, 2007, 28(1): 5-6.
Kong J, Li Y X. Main Disease and integrated control of tussah of Heilongjiang province[J]. The North Sericultural, 2007, 28(1): 5-6.
- [7] Keeling P. Five questions about Microsporidia[J]. PLoS Pathog, 2009, 5(9): e1000489.
- [8] 黄国坤, 秦利, 张弛, 等. 天蚕、柞蚕及种间杂种 F1 代卵壳的超微形态学研究[J]. 沈阳农业大学学报, 1996, 27(4): 306-310.
Huang G K, Qin L, Zhang C, et al. Ultramicroscopic structure of the egg shell of giant silkworm and oak silkworm and their f1 hybrids[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 1996, 27(4): 306-310.
- [9] 秦利. 中国柞蚕学[M]. 北京:中国科学文化出版社, 2003.
Qin L. Chinese tussah[M]. Beijing: Scientific Culture Press of China, 2003.
- [10] Kawarabata T. Biology of microsporidians infecting the silkworm, *Bombyx mori*, in Japan[J]. Insect Biotechnol Sericology, 2003, 72(1): 1-3216.
- [11] Wang L L, Chen K P, Zhang Z, et al. Phylogenetic analysis of *Nosema antheraeae* (Microsporidia) isolated from Chinese oak silk worm, *Antheraeae pernyi* [J]. Eukaryot Microbio, 2006, 53(4): 310-313.
- [12] 王林玲. 柞蚕微孢子虫核糖体基因及家蚕, 柞蚕微孢子虫蛋白质组以及侵染家蚕中肠的比较蛋白质组学研究[D]. 江苏镇江:江苏大学, 2007.
Wang L L. The ribosomal RNA gene of *Nosema Antheraeae* and the proteomics analysis on *Nosema Bombycis* and *Nosema Antheraeae*, and comparative proteomics studies in midgut of *Bombyx mori* infected microsporida [D]. Zhenjiang, Jiangsu: Jiangsu University, 2007.
- [13] Xu J, Wang L, Tang F, et al. The nuclear apparatus and chromosomal DNA of the microsporidian *Nosema antheraeae* [J]. Journal of Eukaryotic Microbiology, 2011, 58(2): 178-180.
- [14] 刘宗林, 许金山, 周泽扬. 四种 de novo 组装软件对柞蚕微孢子虫全基因组组装结果的比较[J]. 蚕学通讯, 2012, 3(32): 1-5.
Liu Z L, Xu J S, Zhou Z Y. A comparative study of four de novo genomic assembly softwares for the assembly of full sequenced genome of *Nosema Antheraeae* [J]. Newsletter of Sericultural Science, 2012, 3(32): 1-5.
- [15] Jouvenaz D P. Percoll: an effective medium for cleaning microsporidian spores[J]. Journal of Invertebrate Pathol-

ogy, 1981, 37(3):319.

[16] 朱荣建,唐伟,安楠. 菜蛾变形孢子虫孢子分离纯化方法研究[J]. 林业勘查设计, 2009(1):96-99.

Zhu R J, Tang W, An N. The method in isolation and purification of *Nosema* sp, a microsporidian pathogen isolated from *Plutella xylostella* [J]. Forest Investigation Design, 2009(1):96-99.

[17] Fumarola D, Antonaci S, Jirillc E, et al. Percoll density gradient centrifugation[J]. International Journal of Clinical & Laboratory Research, 1982, 12(3):485-491.

[18] 周成,潘国庆,万永继,等. 家蚕微孢子虫 *N. bombycis* 分离纯化方法的优化[J]. 蚕学通讯, 2002, 22(1):7-9.

Zhou C, PAN G Q, Wan Y J, et al. Optimization of the procedures of isolation and purification of *Nosema bombycis* in silkworm [J]. Newsletter of Sericultural Science, 2002, 22(1):7-9.

[19] 常建华. 波谱原理及解析[M]. 北京:科学出版社, 2012: 299-301.

Chang J H. Spectrum principle and parsing[M]. Beijing: Science Press, 2012:299-301.

[20] 张志芳,沈中元,何家禄. 微孢子虫研究进展[J]. 蚕业科学, 2000, 26(1):38-44.

Zhang Z F, Shen Z Y, He J L. The recent advancements in microspora[J]. Science of Sericulture, 2000, 26(1):38-44.

Animal Sciences

Identification and Functional Analysis of a Long Pole Tussah of the Total Protein of *Nosema antheraeae*

GONG Juan-juan, XU Jin-shan, LI Zhi, DANG Xiao-qun, ZHOU Ze-yang, WANG Lin-ling

(College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: *Antheraea pernyi* Guerin-Meneville is a very important economic insect in northern China, pebrine disease caused by *Nosema antheraeae* is a devastating disease. In this study, gradient Percoll-NaCl solutions were used to separate and purify the *N. antheraeae*. The total protein of *N. antheraeae* was extracted and digested by trypsin, and then get the exact segment molecular weight of each peptide by LC-MS/MS, more than 610 proteins were obtained against database. GO protein function analysis was carried out; much protein is participating macromolecular complexes and structure. The proportion of catalytic activity, binding, cellular process and metabolic process were lower than the proportion of predicted genes. We considered mainly because it departs from the host cell in spore stage, cell physiology is inactive. Therefore, *N. antheraeae* adapted to the harsh environment by reducing the cell activities and material metabolism.

Key words: *Nosema antheraeae*; spore stage; protein; functional analysis; GO analysis

(责任编辑 方 兴)