

学校代码: 10285

学 号: 20144221057

苏州大学
SOOCHOW UNIVERSITY

硕士学位论文

(学术学位)



家蚕*BmArrestin2*基因功能研究

BmArrestin2 gene function in silkworm, *Bombyx mori*

研究生姓名	梁子
指导教师姓名	薛仁宇
专业名称	生物化学与分子生物学
研究方向	基因功能
所在院部	医学部基础医学与生物科学学院
论文提交日期	2017年4月

苏州大学学位论文独创性声明

本人郑重声明：所提交的学位论文是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不含其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果，也不含为获得苏州大学或其它教育机构的学位证书而使用过的材料。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人承担本声明的法律责任。

论文作者签名： 梁x 日 期： 2017.4.13

苏州大学学位论文使用授权声明

本人完全了解苏州大学关于收集、保存和使用学位论文的规定，即：学位论文著作权归属苏州大学。本学位论文电子文档的内容和纸质论文的内容相一致。苏州大学有权向国家图书馆、中国社科院文献信息情报中心、中国科学技术信息研究所（含万方数据电子出版社）、中国学术期刊（光盘版）电子杂志社送交本学位论文的复印件和电子文档，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存和汇编学位论文，可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索。

涉密论文☐

本学位论文属 _____ 在 _____ 年 _____ 月解密后适用本规定。

非涉密论文☐

论文作者签名： 梁 日 期： 2017.4.13

导师签名： 薛 日 期： 2017.4.15

中文摘要

β -arrestin2 是一种广泛分布的蛋白，在哺乳动物中，它对 G 蛋白偶联受体介导的信号转导具有重要调节作用。 β -arrestin2 在进化上高度保守，从果蝇到小鼠到人都发现了 β -arrestin2 的同源基因。有关哺乳动物的 β -arrestin2 研究已经比较深入，但是在家蚕这一鳞翅目昆虫模式种中， β -arrestin2 的功能至今还没有报道过。本研究在成功克隆 *BmArrestin2* 的基础上，检测了该基因在家蚕不同组织、不同龄期的表达水平，筛查了 *BmArrestin2* 的相互作用蛋白，研究了调节 *BmArrestin2* 表达对家蚕部分信号通路关键基因的影响，探讨了 *BmArrestin2* 对培养细胞大小、周期、凋亡以及细胞对病毒感染的影响。研究结果为理解 *BmArrestin2* 的功能提供了新的线索。

1. *BmArrestin2* 的表达模式分析、亚细胞定位及其相互作用蛋白的筛选

利用荧光定量 PCR 分析 *BmArrestin2* 的表达模式，结果显示 *BmArrestin2* 在五龄三天卵巢中的表达量最高；进一步分析 *BmArrestin2* 在五龄三天家蚕不同组织中转录水平的结果显示，气管丛中 *BmArrestin2* mRNA 的丰度最高，其次是血细胞，在中肠和表皮中也有表达，在精巢中表达量最低。利用重组 *BmArrestin2* 免疫小鼠，制备了 *BmArrestin2* 蛋白的抗体。免疫荧光结果显示，*BmArrestin2* 主要分布在卵巢来源的 BmN 细胞的细胞质中。采用免疫共沉淀技术筛选 *BmArrestin2* 与家蚕 BmN 细胞的相互作用蛋白，质谱鉴定结果暗示 Actin、Yorkie3 (Yki3) 可能是 *BmArrestin2* 的相互作用蛋白。

2. 调节 *BmArrestin2* 表达对家蚕部分信号通路关键基因的影响

为了探讨 *BmArrestin2* 的功能，通过定量 PCR 研究了过表达 *BmArrestin2* 以及下调 *BmArrestin2* 对家蚕部分信号通路中一些关键基因表达水平的影响。结果显示，当 *BmArrestin2* 过表达时，Hippo 通路中 *kibra*、*ex* 表达水平上调；*wts*、*Bmpr* 表达水平无明显变化；*wnt*、*yki*、*cyce*、*iap*、*Fj*、*dpp*、*serr*、*myc*、*crb* 表达水平下调。在生长相关通路基因中，*GASP*、*NkAB*、*DYNE*、*PSLR* 表达水平上调；*JH*、*PCL*、*LSAM* 表达量无明显变化；而 *ECDY*、*CFAP*、*LACH*、*UMX* 表达水平下调。在天然免疫及凋亡相关通路中，*STAT*、*Tal*、*SPZ*、*APA*、*PGRP-LB*、*PGRP-LE* 表达水平

下调; *SURF*、*QCTY* 表达水平无明显变化。当通过 RNAi 下调 *BmArrestin2* 时, 所测基因的表达水平变化总体上与过表达 *BmArrestin2* 时结果相反。流式细胞仪检测结果显示, *BmArrestin2* 能够抑制细胞周期, 减小细胞体积, 对细胞的凋亡影响不明显, 表明 *BmArrestin2* 对 Hippo 信号通路、细胞周期通路, 天然免疫信号通路有调节作用。

3. *BmArrestin2* 对病毒感染细胞的影响

为了进一步鉴定 *BmArrestin2* 的功能, 研究了 *BmArrestin2* 对病毒感染细胞的影响。结果显示, 过表达 *BmArrestin2* 的细胞对 BmNPV、BmCPV 的感染性都增强; 抗体封闭内源性 *BmArrestin2* 可降低病毒对细胞的感染能力; 病毒感染可引起内源性 *BmArrestin2* 的表达水平降低。

关键词: 家蚕; *BmArrestin2*基因; 过表达; Hippo信号通路; 免疫信号通路; 病毒感染

作者: 梁子

指导教师: 薛仁宇

BmArrestin2* gene function in silkworm, *Bombyx mori

Abstract

Beta arrestin2 is one of the widely distributed protein, in mammals, it plays an important regulatory role in the desensitization, internalization and sensitive reaction of the G protein coupled receptor (G protein - coupled receptors, GPCRs) , it is also very important to cell proliferation and has the important status in gene transcription. Beta arrestin2 is highly conserved with homologs in many metazoans from *Drosophila* to mice to humans. Now, in this pattern of lepidoptera insects of the silkworm, the function of the beta arrestin2 has never been reported so far. This research obtained *BmArrestin2* gene, detected expression level of these genes in different tissues and diverse developmental stages of the silkworm , investigated the impact of overexpression *BmArrestin2* on the size, cycle and apoptosis of cultured cells as well as part of signaling pathways genes in silkworm. Discussed the *BmArrestin2* gene effects on virus infected cells.

1. The the expression profiling of the *BmArrestin2* gene of silkworm , subcellular localization and the interaction protein of BmArrestin2

In order to investigate the expression of *BmArrestin2* gene, real-time quantitative PCR was performed to analysis the expression levels of *BmArrestin2* gene in gonads in diverse developmental stages and in diverse tissues in the 3rd day of 5th instar. *BmArrestin2* in the ovarian tissue of 3rd day of 5th were the highest expression levels, in other diverse developmental stages were in a low volume. The abundance of *BmArrestin2* mRNA in the tracheal was the highest, was lower in the testis. In order to investigate the cellular localization features of BmArrestin2, BmArrestin2 protein antibodies were prepared. Immunofluorescence showed that BmArrestin2 in ovarian sources of BmN cells can express, and are mainly distributed in cytoplasm. In order to further study the function of *BmArrestin2*, CO-Immunoprecipitation was performed to detect the interaction protein of BmArrestin2 , the mass spectrum identification results suggest Actin and Yorkie3 (Yki3) may be the interaction proteins.

2. The effects on the cultured cells of silkworm after regulation of expression

on *BmArrestin2* gene

In order to research the function of *BmArrestin2* gene, we selected some signal pathway genes for quantitative detection. The results showed that when overexpression *BmArrestin2* gene, the expression level of Hippo pathway *kibra*, *ex* genes significantly decreased compared with control cells; *wt*s, *Bmpr* gene have no changes; *wnt*, *yki*, *cyce*, *iap*, *Fj*, *dpp*, *serr*, *myc*, *crb* gene expression level significantly increased. In the genetic pathways associated with growth, *GASP*, *NkAB*, *DYNE*, *PSLR* expression level significantly increased; *JH*, *PCL*, *LSAM* gene expression quantity has no obvious change; While *ECDY*, *CFAP*, *LACH*, *UMX* significantly decreased compared with control cells. In natural immune and apoptosis related pathways, *STAT*, *Tal*, *SPZ*, *APA*, *PGRP - LB*, *PGRP - LE* genes expression levels decreased while there was no significant alteration of the *SURF*, *QCTY* gene expression levels. After *BmArrestin2* gene silence, some genes expression levels were contrary to the results when overexpression. The volume and the cell cycle of cultured cells were decreased compared with control BmN cells, but have no obvious effect on apoptosis.

3. *BmArrestin2* effect on virus infected cells

In order to further identify *BmArrestin2* gene function, we detect the *BmArrestin2* effect on virus infected cells. The results showed that overexpression *BmArrestin2* cells can enhance the infection of BmNPV and BmCPV to cells. In order to further explore this mechanism, antibodies were added to cells in order to block endogenous *BmArrestin2*, and the results showed after blocking *BmArrestin2*, the infection of BmNPV to cells was decreased. We also find that the expression level of endogenous *BmArrestin2* can be decreased when infected BmNPV and BmCPV, we speculated that this phenomenon may be caused by the *BmArrestin2* regulation to the inherent cell immune.

Key word: *Bombyx mori*; *BmArrestin*; overexpression; Hippo signaling pathway; immune signaling pathway; virus infection.

Written by: Liang Zi

Supervised by: RenYu Xue

目 录

第一章 文献综述.....	1
1 β -arrestin2 的发现.....	1
2 β -arrestin2 的概述.....	1
3 β -arrestin2 的功能.....	2
3.1 β -arrestin2 对细胞增殖的影响.....	2
3.2 β -arrestin2 介导受体内吞.....	2
3.3 调节信号转录.....	3
4 β -arrestin2 与免疫调节细胞及其与细胞固有免疫的关系.....	4
5 果蝇和家蚕体内的 β -arrestin2.....	5
6 家蚕及家蚕病毒病.....	6
6.1 家蚕.....	6
6.2 家蚕病毒病.....	6
第二章 研究目的与研究内容.....	12
1 研究目的及意义.....	12
2 研究的主要内容.....	12
2.1 <i>BmArrestin2</i> 的表达模式分析、亚细胞定位及其互作蛋白的筛选.....	12
2.2 调节 <i>BmArrestin2</i> 的表达对家蚕其他主要通路基因表达及家蚕卵巢培养细胞的影响.....	12
2.3 调节 <i>BmArrestin2</i> 基因对 BmNPV, BmCPV 感染细胞的影响及其可能的机制.....	12
3 技术路线.....	12
第三章 家蚕 β -arrestin2 的表达模式分析、亚细胞定位及其互作蛋白的筛选.....	14
1 材料与方法.....	15
1.1 实验材料.....	15
1.2 常用仪器.....	18
1.3 实验方法.....	19

2 结果与分析.....	24
2.1 家蚕 β -Arrestin2 基因在性腺不同发育时期的表达水平.....	24
2.2 家蚕 β -Arrestin2 基因在五龄第三天家蚕不同组织中的表达水平.....	25
2.3 <i>BmArrestin2</i> 的克隆及序列测定.....	26
2.4 <i>BmArrestin2</i> 基因表达载体的构建.....	27
2.5 <i>BmArrestin2</i> 的诱导表达及其多抗特异性检测.....	28
2.6 <i>BmArrestin2</i> 的细胞定位.....	29
2.7 转基因载体的筛选与鉴定.....	30
2.8 稳定转化家蚕 BmN 细胞的筛选.....	31
2.9 <i>BmArrestin2</i> 互作蛋白的筛选.....	33
3.讨论.....	34
第四章 调节 β -arrestin2 对家蚕基因表达以及培养细胞生长的影响.....	37
1 材料与方法.....	38
1.1 实验材料.....	38
1.2 实验方法.....	39
2 结果与分析.....	41
2.1 过表达 <i>BmArrestin2</i> 基因对选择的家蚕基因表达水平的影响.....	41
2.2 Arrestin2-siRNA 干扰 BmN 细胞中 <i>BmArrestin2</i> 基因表达效果的检测.....	43
2.3 抑制家蚕 <i>BmArrestin2</i> 基因对选择的家蚕基因表达水平的影响.....	43
2.4 过表达 <i>BmArrestin2</i> 基因对家蚕卵巢细胞发育的影响.....	45
2.5 下调 <i>BmArrestin2</i> 基因对家蚕卵巢细胞发育的影响.....	48
第五章 调节 <i>BmArrestin2</i> 基因表达对 BmNPV、BmCPV 感染的影响.....	54
1.材料与方法.....	54
1.1 材料.....	54
1.2 实验方法.....	54
2 结果与分析.....	56
2.1 过表达 <i>BmArrestin2</i> 对 BmNPV、BmCPV 感染细胞的影响.....	56
2.2 抗体封闭对 BmNPV 感染细胞的影响.....	57
2.3 BmNPV、BmCPV 感染对 <i>BmArrestin2</i> 表达情况的变化.....	60

3.讨论.....	62
结 论.....	69
附 录.....	66
一、缩略词表.....	66
二、部分检测基因名称及登录序列号.....	67
三、pET-32a(+)及 pIZT-V5/His 质粒图谱.....	68
四 定量数据.....	69
致 谢.....	75

第一章 文献综述

1 β -arrestin2 的发现

β -arrestin2 最早是在 20 世纪晚期提纯 GRK2（后被称为 β -肾上腺受体激酶）的过程中发现的。人们发现 GRK2 减弱 β 2 肾上腺素能受体（ β 2AR）介导 G α s 活化的能力会随着 GRK2 纯度的提高而逐渐降低，但将视黄醛蛋白（S-抗原或 48kD 蛋白）重新加入纯化的 GRK2 时，它可以通过与视紫红质激酶的作用恢复 β 2AR 对受体的脱敏能力^[1,2,3]，这种视黄醛蛋白后被称为 arrestin。也有文献报道高浓度的 arrestin 能够增强 β ARK 介导的磷酸化抑制 β 2AR 功能的效果，但是相对于受体分子总量，还需要超过一百倍的 arrestin 才能与受体达到平衡。这些现象暗示着体内可能还存在一种与 β 2AR 具有高亲和力且与 arrestin 类似的蛋白^[4]。分子克隆证实确实存在这种同源蛋白并且分析出了两种假定的蛋白，因为它们与 arrestin 的同源性较高，并且能够调节 β 2AR，因此将它们分别命名为 β -arrestin1 和 β -arrestin2^[2]。

2 β -arrestin2 的概述

β -arrestin2 属于 arrestin/ β -arrestin 基因家族。小鼠体内的 β -arrestin2 为 1200bp，分子量约为 46300，比 arrestin 的分子量（45000）略大。Arrestin 和 β -arrestin2 的等电点分别为 6.15 和 7.62。 β -arrestin2 与 arrestin 的生物学活性非常相近^[4]，在一级结构上 β -arrestin2 与 arrestin 存在很高的同源性，两者间有 65%的氨基酸是一致的。用晶体学的方法分析 arrestin 的基本结构，发现 arrestin 的主要功能是由其结构中间的极性核心引起的，核心部位的氢键以及核心部位与 C 端尾巴的作用可以稳定 arrestin 的基本结构，并且将其锁定在一个非活性的状态。当 arrestin 与受体结合时，受体上带负电荷的磷酸酯打破了极性核心的构象并且释放出了 C 端尾巴，这一过程引起 arrestin N 端和 C 端结构域重定位，促进了 arrestin 与活化的磷酸化受体结合。arrestin 可以成为两种不对称分子的二聚体，也说明 arrestin 的构象是可塑的^[5]。 β -arrestin2 与 arrestin 的结构非常相似，但是却有很明显的底物特异性。 β -arrestin2 与 arrestin 在 C 端结构域有较大的差异，尽管在 C 端结构域中包含着预测出的受体结合结构域，但是目前仍不能确定这种差异是引起 β -arrestin2 与 arrestin 间产生显

著受体特异性的原因。Northern blot 检测小鼠 β -arrestin2 在各组织内的分布, 结果表明 β -arrestin2 可以在小鼠体内的各个组织中表达, 但是主要分布在中枢神经系统中^[4]。

3 β -arrestin2 的功能

3.1 β -arrestin2 对细胞增殖的影响

在 LNCaP 细胞系中, 下调 β -arrestin2 表达量能够增强细胞增殖, 提高 Src, ERK1/2 的活性, 增强 ERK1/2 和 EGFR 色氨酸-1110 的磷酸化。下调 β -arrestin2 表达也能够引起增殖抑制因子 *p21* 的表达量的下调, 说明 β -arrestin2 能够负调控促有丝分裂信号通路^[6]。在果蝇体内存在一种属于 β -arrestin 家族的 *Kurtz* (*Krz*) 参与调节生长发育相关的信号通路, 它能够将活化的色氨酸激酶受体 (RTKs) 和 Toll 受体家族上的信号传递给下游的 MAPK、ERK 和 NF- κ B 信号通路, 分析 *Krz* 突变体中 RTKs 和 Toll 受体靶基因表达量的变化发现 *Krz* 可以在早期胚胎发育中抑制这两条信号通路的活性。相互作用蛋白的研究发现 *Krz* 可以直接与未活化的 ERK 结合, 阻止其被上游激酶 MEK 激活。在 *Krz* 突变体中这两条信号通路的异常会引起胚胎形态的异常以及严重的发育缺陷^[7]。家蚕体内的 β -arrestin2 与哺乳动物体内的 β -arrestin2 具有高度同源性, 且与果蝇中的 *Kurtz* 同属 β -arrestin 家族, 因此推测家蚕体内的 β -arrestin2 也应具有类似功能。

3.2 β -arrestin2 介导受体内吞

G 蛋白偶联受体 (GPCRs) 是目前所知最大的一类细胞表面受体家族, 它能够帮助多种胞外信号分子进入胞内。 β -arrestin2 可以与 GPCRs 相互作用调节受体的内吞。受体的内吞对受体介导的信号通路具有重要作用^[8]。 β 2 肾上腺素受体是一类典型的 I 型 G 蛋白偶联受体, 它能在 G 蛋白偶联受体激酶 (GRKs)、 β -arrestin2 以及动力蛋白形成的复合体的介导下参与网格蛋白介导的内吞途径中, 受体在网格蛋白有被小泡上内化后去磷酸化并最终重新循环到膜上^[10,11]。分泌素受体是一类典型的 II 型 G 蛋白偶联受体, 它是 GRK 的底物, 这暗示着它可能与 β 2 肾上腺素受体相似, 也能够上述复合体的介导下内化。分泌素是分泌素受体的激动剂, 激动剂刺激能够引起受体内化^[12,13]。在 HEK293 细胞中, 分泌素的加入能够使在静息状态下分布在细胞质的 β -arrestin2 迅速转移到细胞膜被激活的 GPCRs 上, 随

后 β -arrestin2 与 GPCR 复合体移动到网格蛋白小窝 (CCCPs) 上内化, 推测这一过程与 β -arrestin2 结合 clathrin 的重链及 AP2 网格衔接蛋白复合体的 β 衔接蛋白亚族有关^[14,15]。H89 是一种常用的 PKA 抑制剂, 抑制 PKA 的活性可以抑制分泌素受体内化, 但过表达 β -arrestin2 时不仅能够挽救 H89 处理引起的分泌素受体内化减少的现象, 还能提高分泌素受体内化水平^[16,17]。 β -arrestin2 也可以与 E3 泛素连接酶 Mdm2 结合并且被其泛素化^[18]。人们发现, β -arrestin2 介导受体内吞过程中由激动剂刺激引起的泛素化是必须的, 但是引起这一现象的原因及泛素化的机制目前尚不了解。

3.3 调节信号转录

最近有研究发现 β -arrestin2 除了可以介导受体内吞, 还可以作为信号转导的支架蛋白以及效应器富集多种信号分子到受体上, 从而将 GPCRs 与各种信号通路联系起来^[19]。 β -arrestin2 至少可以通过两个途径来调节基因的表达。 β -arrestin2 可以由细胞质转移到细胞核, 在目的基因启动子区为转录因子提供支架, 从而直接调节转录; 或者直接在细胞质内与转录因子的调节因子结合, 改变它们的活性和亚细胞分布, 从而间接调节转录^[2]。 β -arrestin2 对信号转录的调节作用对其调节细胞生长、凋亡以及免疫通路有重要作用。

SRC 是一种酪氨酸激酶, 它存在于 Ras 依赖性激活的 MAPK 信号通路中, 当 β -arrestin2 与 β 2 肾上腺素受体和 SRC 结合时可以激活 MAPK 信号通路^[20]。由 β -arrestin2 介导的受体内吞可以起始胞内的二次信号转导。 β -arrestin2 与 MAPK 的 C-Jun 氨基端激酶 3 结合后富集上游的激酶比如凋亡信号调节激酶 1, MEK1 和 MEK4^[21], β -arrestin2 也作为支架蛋白与 Raf、MEK1、ERK 作用^[22]。 β -arrestin2 与这些因子作用形成支架蛋白复合体, 并且作为一个信号转导者引导信号分子由细胞膜转运到 MAPK、p53 和 NF- κ B 信号通路。ERKs 被 β 2 肾上腺素受体激活包括 G 蛋白依赖性的激活和 β -arrestin2 依赖性的激活两种途径。G 蛋白依赖性的 Erk 激活是快速、短暂的, 在几分钟内就可以达到最高水平, 同时伴随着激活的 Erk 转移到细胞核内促进基因的转录以及细胞增殖。与之相反, β -arrestin2 介导的 ERK1/2 的激活主要发生在细胞质中, 这一过程是慢且持续的, 需要 5-10min 达到最高水平, 能够持续超过 1h^[42], 且这一过程只对 β -arrestin2 的总量敏感, PKA 抑制剂在这一过程起不到抑制作用^[23]。 β -arrestin2 能够富集磷酸二酯酶 4 到受体上, 从而阻挡 β -arrestin2 与癌蛋白 MDM2 和 E3 泛素连接酶的作用, 降低促癌因子 p53 的活性^[24]。

β -2 肾上腺素受体引起 β -arrestin2 和受体的泛素化^[25], β -arrestin2 与 MDM2 的结合可以增强泛素化并引起内吞^[26]。在静息细胞中, MDM2 主要在细胞核中调节 p53 的活性, 从而抑制细胞凋亡。激动剂刺激后 MDM2 结合 β -arrestin2 的 N 端形成 β -arrestin2、MDM2 以及受体复合体, MDM2 被这一复合体滞留在细胞质内, 使其不能入核, 降低了核内 MDM2 的浓度; 同时, 这一复合体的形成抑制了 MDM2 的自我泛素化, 降低了 MDM2 对 p53 的降解, 增强了 p53 的转录, 促进了细胞凋亡^[27,28]。

转录因子 NF- κ B 家族由 p50, p25, REL, REL-A 和 REL-B 组成, 这些蛋白质二聚化成有功能的 NF- κ B, 参与调节细胞免疫以及细胞凋亡。在静息状态下, NF- κ B 二聚体与抑制蛋白 I κ B 结合被滞留在细胞质内, 当激动剂刺激后, I κ B 激酶 (IKK) 被激活, 它磷酸化 I κ B 的两个保守的丝氨酸残基, 并在 SCF-E3 泛素化酶复合体的作用下泛素化, 然后 I κ B 蛋白被降解, NF- κ B 二聚体得到释放。随后游离的 NF- κ B 通过各种翻译后的修饰作用而被进一步激活。活化的 NF- κ B 由细胞质转移到细胞核, 在核内与目的基因结合, 促进靶基因的转录。酵母双杂结果显示 β -arrestin2 可以直接与 I κ B 作用^[29], 两者结合后能够阻止 I κ B 的磷酸化、泛素化, 减少 I κ B 被蛋白酶降解, 从而抑制 NF- κ B 的活性并进一步抑制其目的基因的转录活性^[30]。在 HELA 细胞中, I κ B 上游的激酶 I κ B α , I κ B β 都能与 β -arrestin2 免疫共沉淀^[31], 因此, β -arrestin2 不仅能够直接稳定 I κ B 也能够通过与 I κ B 的激酶复合体作用调节 NF- κ B 的活性。最近有实验结果显示 β -arrestin2 通过与 I κ B 作用可以调节紫外照射引起的 NF- κ B 通路的激活^[32]。 β -arrestin2 参与调节 NF- κ B 信号通路, 暗示它在调节机体免疫功能上有重要作用。

4 β -arrestin2 与免疫调节细胞及其与细胞固有免疫的关系

自然杀伤细胞 (natural killer, NK) 是一种典型的免疫细胞^[33], 它可以非特异性的直接识别和杀伤肿瘤细胞或者病毒感染的靶细胞^[34], 是细胞固有免疫系统的重要组成部分。NK 细胞对靶细胞的杀伤作用依赖于其细胞表面存在着的一类 NK 激活性受体如 NKG2D 的调节, 研究证明 β -arrestin2 可以与 NK 细胞抑制性受体 KIR2DL1 结合, 影响 KIR2DL1 对酪氨酸磷酸酶 SHP-1 和 SHP-2 的招募, 这两种酪氨酸激酶可以将信号分子去磷酸化, 阻碍细胞内激活性信号进一步下传, 从

而抑制 NK 细胞的杀伤活力^[36]。另外,用鼠巨细胞病毒感染野生型和 β -arrestin2 敲除型小鼠,三天后收集这些小鼠的脾脏、肝脏,评估这些组织中巨细胞病毒载量发现 β -arrestin2 敲除型小鼠组织匀浆中的病毒滴度明显低于野生型小鼠,说明 β -arrestin2 的缺乏降低了小鼠对鼠巨细胞病毒的易感性^[36]。

巨噬细胞也是一种重要的免疫细胞。骨髓源性巨噬细胞(bone marrow-derived macrophages, BMM)的存活主要依赖于集落刺激因子-1,当这种刺激因子缺乏时,Toll 样受体激动剂也可以使 BMM 以一种因子非依赖性方式存活^[37]。但最近研究发现, β -arrestin2 可以减弱 Toll 样受体激动剂对巨噬细胞的促生存效应^[38]。

有文献报道, β -arrestin2 负调节腺病毒(adenovirus, Ad)诱发的固有免疫^[39]。在静脉注射 Ad5 后, β -arrestin2 敲除型小鼠体内的免疫反应相关基因的转录比野生型小鼠明显增高。因此推测 β -arrestin2 的过度表达会导致免疫调节异常^[40]。

5 果蝇和家蚕体内的 β -arrestin2

果蝇体内也含有 GPCRs 和 β -arrestin2。在果蝇体内已经鉴定出了 11 种能与 β -arrestin2 作用的 GPCRs,这些受体分别属于抗利尿激素、生长激素抑制素、速激肽、蛙皮素、促甲状腺激素释放因子和神经肽 Y 受体^[41],说明 β -arrestin2 在果蝇中也可以与 GPCRs 作用。果蝇中的 β -arrestin2 蛋白含有 401 个氨基酸^[43],并且对快速失活视紫红质非常重要^[44],但是目前对 β -arrestin2 在果蝇中调节信号转导的报道还不多。但已有文献报道果蝇中含有的与 β -arrestin2 同属非视觉 arrestin 蛋白的 Kurtz 对果蝇的生长发育以及神经相关功能都是至关重要的^[45-48],Krz 参与调节 Notch 信号通路,能够促进形成一种能在泛素依赖通路中调节缺口受体的退化的三聚物 Notch-Deltex-Krz^[49]。同时,Kurtz (Krz)还能够参与调节 Hedgehog 信号通路。实验发现在成虫发育期间完全清除成虫细胞中的 Krz 时,细胞的形态并没有明显变化,与之前实验发现的 Krz 突变体果蝇的形态学无异常结果一致^[45]。而过表达 Krz 时产生的表现型与缺失 Hedgehog 信号通路时一致。当过表达 Krz 时,Krz 通过一种网格蛋白构象改变依赖型的方式促进了 Smo 的内化和降解,从而抑制 Hh 信号通路,与脊椎动物中的结果相反,这一过程不依赖于 Gprk2 的激活。果蝇体内的 β -arrestin2 与 Krz 同属 β -arrestin 家族, β -arrestin2 是一个高度保守的蛋白且果蝇与家蚕具有相似性,因此暗示着家蚕体内的 β -arrestin2 可能也具有相似功能。

6 家蚕及家蚕病毒病

6.1 家蚕

家蚕是我国农村经济的重要组成部分，蚕的主要经济价值在于蚕丝，蚕丝的产量决定了经济效益，但是传统的育种方法已经很难使产丝量有明显的提高。家蚕在物质代谢等方面与人类有很大的相似性，而且家蚕的遗传背景清楚，饲养成本低，因此可以作为多种疾病的模型为人类疾病的研究提供依据^[50]。

6.2 家蚕病毒病

家蚕病毒病包括由家蚕核型多角体病毒 (BmNPV) 感染引起的核型多角体病，以及家蚕质型多角体病毒感染引起的质型多角体病。BmNPV 属杆状病毒科 (Baculoviridae) 杆状病毒属 (Baculovirus) 蚕核多角体毒种 (Bombyx mori nuclear polyhedrosis)，BmCPV 属呼肠弧病毒科 (Reoviridae) 质型多角体病毒属 (Cytoplasmic Polyhedrosis virus) 蚕质型多角体病毒属 (Bombyx mori Cytoplasmic Polyhedrosis virus)。BmNPV 及 BmCPV 经口服感染家蚕，病毒多角体被食下在中肠中碱性消化液的作用下裂解保护病毒粒子的多角体，释放出病毒粒子^[51]。

参考文献

- [1] Dewire S M, Ahn S, Lefkowitz R J, et al. β -Arrestins and Cell Signaling[J]. Annual Review of Physiology, 2007, 69(69):483-510.
- [2] 汪庆童, 魏伟. β -arrestin 的生物学研究进展[J]. 生理科学进展, 2008, 39(2):162-164.
- [3] Benovic J L, Kühn H, Weyand I, et al. Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein)[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1987, 84(24):8879-8882.
- [4] H Attramadal, J L Arriza, C Aoki, 等. β -arrestin2, a novel member of the arrestin/ β -arrestin gene family[J]. 1992, 267(25):17882-17890.
- [5] Hirsch J A, Schubert C, Gurevich V V, et al. A Model for Arrestin's Regulation: The 2.8 Å Crystal Structure of Visual Arrestin[J]. Cell, 1999, 97(2):257-269.

- [6] Georgios Kallifatidis. β -Arrestin-2 Counters CXCR7-Mediated EGFR Transactivation and Proliferation[J]. Molecular Cancer Research:mcr, 2016, 14(5):493.
- [7] Tipping M, Kim Y, Kyriakakis P, et al. β -Arrestin Kurtz inhibits MAPK and Toll signalling in Drosophila development.[J]. Embo Journal, 2010, 29(19):3222.
- [8] Claing A, Laporte S A, Caron M G, et al. Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins[J]. Progress in Neurobiology, 2002, 66(2):61.
- [9] Premont R T, Inglese J, Lefkowitz R J. Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors[J]. Faseb Journal, 1995, 9(2):175-182.
- [10] Zhang J, Barak L S, Winkler K E, et al. A central role for beta-arrestins and clathrin-coated vesicle-mediated endocytosis in beta2-adrenergic receptor resensitization. Differential regulation of receptor resensitization in two distinct cell types.[J]. Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(43):27005.
- [11] Ferguson S S, Barak L S, Zhang J, et al. G-protein-coupled receptor regulation: role of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins.[J]. Canadian Journal of Physiology & Pharmacology, 1996, 74(10):1095-110.
- [12] Shenoy S K, McDonald P H, Kohout T A, et al. Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin.[J]. Science, 2001, 294(5545):1307-1313.
- [13] Claing A, Laporte S A, Caron M G, et al. Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins[J]. Progress in Neurobiology, 2002, 66(2):61.
- [14] Goodman O B, Krupnick J G, Santini F, et al. β -Arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the β 2-adrenergic receptor[J]. Nature, 1996, 383(383):447-450.
- [15] Laporte S A, Oakley R H, Zhang J, et al. The β 2-adrenergic receptor/ β arrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(7):3712-3717.
- [16] Goretzki L, Mueller B M. Receptor-mediated endocytosis of urokinase-type

- plasminogen activator is regulated by cAMP-dependent protein kinase[J]. Journal of Cell Science, 1997, 110 (Pt 12)(110 (Pt 12)):1395.
- [17] Walker J K, Premont R T, Barak L S, et al. Properties of secretin receptor internalization differ from those of the beta(2)-adrenergic receptor.[J]. Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(44):31515-23.
- [18] Shenoy S K, Mcdonald P H, Kohout T A, et al. Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin.[J]. Science, 2001, 294(5545):1307-1313.
- [19] Lefkowitz R J, Shenoy S K. Transduction of Receptor Signals by β -Arrestins[J]. Science, 2005, 308(5721):512.
- [20] Luttrell L M, Ferguson S S G, Daaka Y, et al. Beta-Arrestin-Dependent Formation of β 2 Adrenergic Receptor-Src Protein Kinase Complexes[J]. Science, 1999, 283(5402):655-661.
- [21] Mcdonald P H, Chow C W, Miller W E, et al. β -Arrestin 2: A Receptor-Regulated MAPK Scaffold for the Activation of JNK3[J]. Science, 2000, 290(5496):1574.
- [22] Luttrell L M, Roudabush F L, Choy E W, et al. Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by β -arrestin scaffolds[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001, 98(5):2449-2454.
- [23] Shenoy S K, Drake M T, Nelson C D, et al. β -Arrestin-dependent, G Protein-independent ERK1/2 Activation by the β 2 Adrenergic Receptor[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(2):1261-1273.
- [24] Shenoy S K, Mcdonald P H, Kohout T A, et al. Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin.[J]. Science, 2001, 294(5545):1307-1313.
- [25] Shenoy S K, Mcdonald P H, Kohout T A, et al. Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin.[J]. Science, 2001, 294(5545):1307-1313.
- [26] Shenoy S K, Mcdonald P H, Kohout T A, et al. Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin.[J]. Science, 2001, 294(5545):1307-1313.

- [27] Wang P, Wu Y, Ge X, et al. Subcellular localization of beta-arrestins is determined by their intact N domain and the nuclear export signal at the C terminus[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(13):11648.
- [28] Ma L, Pei G. Beta-arrestin signaling and regulation of transcription[J]. Journal of Cell Science, 2007, 120(Pt 2):213.
- [29] Gao H, Sun Y, Wu Y, et al. Identification of beta-Arrestin2 as a G Protein-Coupled Receptor-Stimulated Regulator of NF- κ B Pathways[J]. Molecular Cell, 2004, 14(3):303-317.
- [30] D. Scott Witherow, Tiffany Runyan Garrison, William E. Miller, Robert J. Lefkowitz. β -Arrestin inhibits NF- κ B activity by means of its interaction with the NF- κ B inhibitor I κ B α [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(23):8603.
- [31] D. Scott Witherow, Tiffany Runyan Garrison, William E. Miller, Robert J. Lefkowitz. β -Arrestin inhibits NF- κ B activity by means of its interaction with the NF- κ B inhibitor I κ B α [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(23):8603.
- [32] Luan B, Zhang Z, Wu Y, et al. β -Arrestin2 functions as a phosphorylation-regulated suppressor of UV-induced NF- κ B activation[J]. Embo Journal, 2005, 24(24):4237-4246.
- [33] Liang B, Hara T, Wagatsuma K, et al. Role of hepatocyte-derived IL-7 in maintenance of intrahepatic NKT cells and T cells and development of B cells in fetal liver[J]. Journal of Immunology, 2012, 189(9):4444.
- [34] Lanier L L. NK cell recognition.[J]. Annual Review of Immunology, 2005, 23(1):225-274.
- [35] Pegram H J, Andrews D M, Smyth M J, et al. Activating and inhibitory receptors of natural killer cells[J]. Immunology & Cell Biology, 2010, 89(2):216-24.
- [36] Yu M C, Su L L, Zou L, et al. An essential function for beta-arrestin 2 in the inhibitory signaling of natural killer cells.[J]. Nature Immunology, 2008, 9(8):898.
- [37] Sester D P, Brion K, Trieu A, et al. CpG DNA activates survival in murine macrophages through TLR9 and the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway.[J].

- Journal of Immunology, 2006, 177(7):4473-4480.
- [38] Lattin J E, Greenwood K P, Daly N L, et al. Beta-arrestin 2 is required for complement C1q expression in macrophages and constrains factor-independent survival[J]. Molecular Immunology, 2009, 47(2-3):340-347.
- [39] Seregin S S, Appledorn D M, Patial S, et al. beta-Arrestins modulate Adenovirus-vector-induced innate immune responses: differential regulation by beta-arrestin-1 and beta-arrestin-2.[J]. Virus Research, 2010, 147(1):123-134.
- [40] Johnson E C, Bohn L M, Barak L S, et al. Identification of Drosophila neuropeptide receptors by G protein-coupled receptors-beta-arrestin2 interactions[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(52):52172-52178.
- [41] 彭爱妮, 闫福岭. β -arrestin 2 在免疫调节中的作用[J]. 免疫学杂志, 2014(2):170-174.
- [42] Reiter E, Lefkowitz R J. GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling.[J]. Trends in Endocrinology & Metabolism Tem, 2006, 17(4):159.
- [43] Smith D P, Shieh B H, Zuker C S. Isolation and structure of an arrestin gene from Drosophila.[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990, 87(3):1003-7.
- [44] Dolph P J, Ranganathan R, Colley N J, et al. Arrestin function in inactivation of G protein-coupled receptor rhodopsin in vivo[J]. Science, 1993, 260(5116):1910-6.
- [45] G Roman, J He, R L Davis. kurtz, a novel nonvisual arrestin, is an essential neural gene in Drosophila[J]. Genetics, 2000, 155(3):1281.
- [46] Ge H, Krishnan P, Liu L, et al. A Drosophila Nonvisual Arrestin Is Required for the Maintenance of Olfactory Sensitivity[J]. Chemical Senses, 2006, 31(1):49-62.
- [47] Liu L, Davis R L, Roman G. Exploratory Activity in Drosophila Requires the kurtz Nonvisual Arrestin[J]. Genetics, 2007, 175(3):1197-212.
- [48] Johnson E C, Tift F W, Mccauley A, et al. Functional characterization of kurtz, a Drosophila non-visual arrestin, reveals conservation of GPCR desensitization mechanisms.[J]. Insect Biochemistry & Molecular Biology, 2008, 38(11):1016-22.
- [49] Mukherjee A, Veraksa A, Bauer A, et al. Regulation of Notch signalling by

non-visual beta-arrestin[J]. Nature Cell Biology, 2005, 7(12):1191.

- [50] 郭睿. BmBDV、BmCPV反向遗传学系统的建立及不同抗性家蚕对BmCPV的感染应答[D]. 苏州大学, 2015.

第二章 研究目的与研究内容

1 研究目的及意义

β -arrestin 基因家族是一类在进化上具有高度保守性的重要的信号调控蛋白和典型的细胞骨架蛋白，具有多种功能。 β -arrestin2 参与调节受体的内吞和脱敏。 β -arrestin2 还能富集大量信号分子，从而将 GPCRs 与各条信号通路联系起来。 β -arrestin2 能由细胞质转移到细胞核中并与一些转录因子如 p300 和 CREB 结合从而促进转录；或者在细胞质中与一些转录因子的调节因子如 I κ B 和 MDM2 结合从而直接调节转录活性。这种由 β -arrestin2 参与的对转录的调节对细胞的生长、凋亡以及细胞免疫有重要作用。 β -arrestin2 可以通过多种途径调节免疫反应，在人体中， β -arrestin2 对免疫功能的调节可能会引起某些免疫相关疾病。

家蚕饲养简单、成本低、世代短、子代多、遗传背景清楚。家蚕中的 β -arrestin2 与哺乳动物中的 β -arrestin2 具有高度同源性，因此可以用家蚕代替哺乳动物作为疾病模型进行研究，降低研究成本。

了解家蚕体内的 β -arrestin2 及其与各种信号通路的关系可以为探究 β -arrestin2 对家蚕生长发育过程的影响，研究家蚕发育调控机制提供新的方向。

了解家蚕体内的 β -arrestin2 对病毒病感染细胞的影响以及 β -arrestin2 调节病毒感染细胞的机制能为保护家蚕免于病毒感染，提高经济效应提供新的方向。

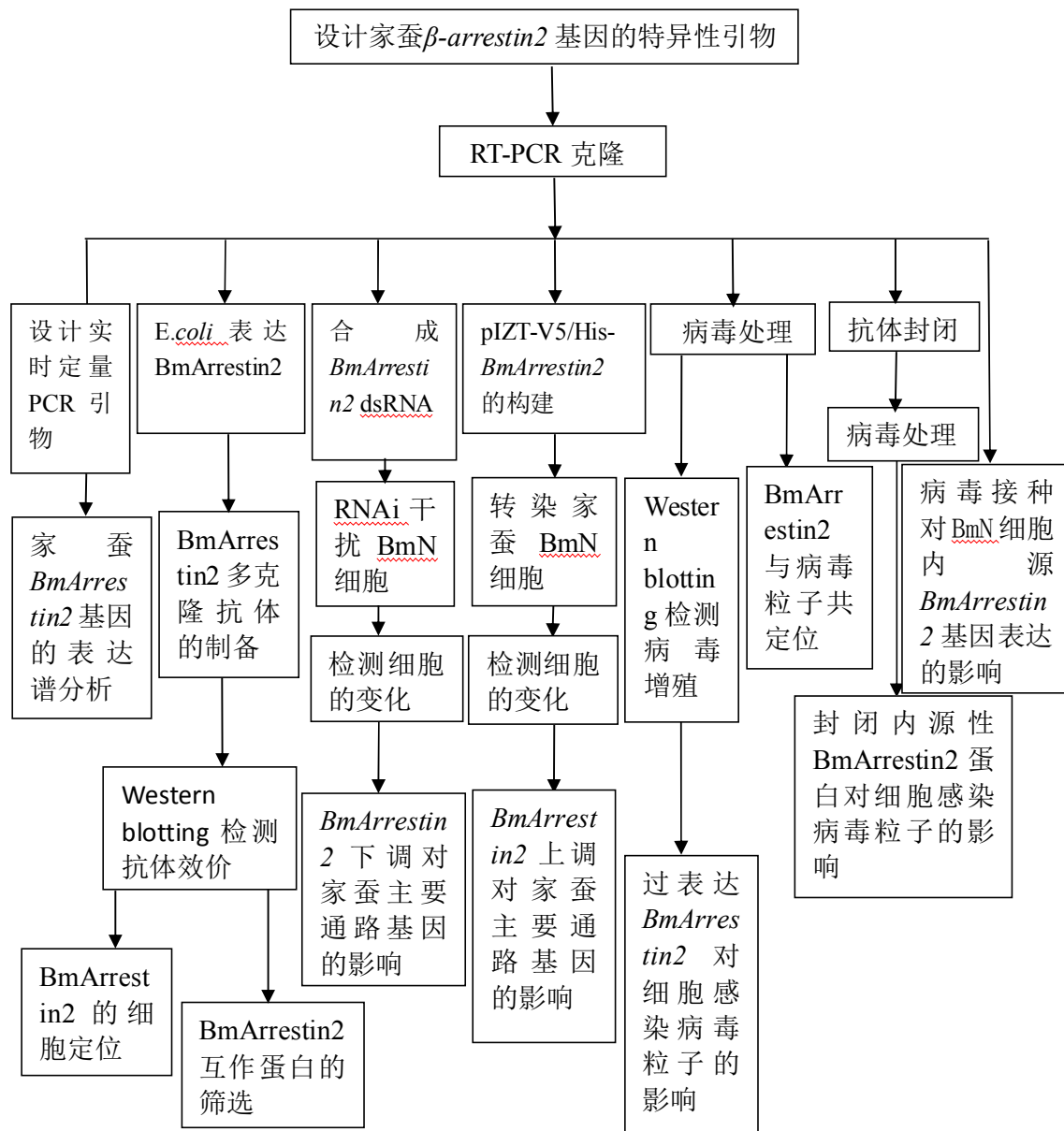
2 研究的主要内容

2.1 BmArrestin2 的表达模式分析、亚细胞定位及其互作蛋白的筛选

2.2 调节 BmArrestin2 的表达对家蚕其他主要通路基因表达及家蚕卵巢培育细胞的影响

2.3 调节 BmArrestin2 基因对 BmNPV, BmCPV 感染细胞的影响及其可能的机制

3 技术路线



第三章 家蚕 β -arrestin2 的表达模式分析、亚细胞定位及其互作蛋白的筛选

摘要：为了研究 β -arrestin2 的功能，首先利用特异性引物通过 RT-PCR 克隆家蚕 β -arrestin2 (*BmArrestin2*) 基因，通过荧光定量 PCR 分析 *BmArrestin2* 的表达模式，结果显示，*BmArrestin2* 在性腺发育的不同时期以在五龄三天卵巢中的表达量最高；在五龄三天家蚕组织中，气管丛中 *BmArrestin2* mRNA 的丰度最高。将 *BmArrestin2* 克隆进原核表达载体 pET-32a(+)中，在大肠杆菌中诱导表达，用重组蛋白免疫小鼠制备多克隆抗体。亚细胞定位结果显示，BmArrestin2 主要分布在家蚕卵巢细胞的细胞质中。采用免疫共沉淀技术筛选 BmArrestin2 与家蚕 BmN 细胞的相互作用蛋白，质谱鉴定结果暗示 Yorkie3 (Yki3) 可能是 BmArrestin2 的相互作用蛋白。

关键词：家蚕； β -arrestin2；表达谱；细胞定位；蛋白互作

β -arrestin2 在 G 蛋白偶联受体信号通路中有重要的调控作用，它不仅参与调节受体内吞和脱敏，还可以作为支架蛋白起始 G 蛋白偶联受体信号转导复合物的形成，从而将 G 蛋白偶联受体与其他信号通路联系起来^[1]。目前，有关哺乳动物的 β -arrestin2 基因研究报道较多，但对家蚕的 β -arrestin2 功能报道仍比较少。 β -arrestin2 在进化中具有高度保守性，暗示家蚕中的 β -arrestin2 也可能具有相似功能。本文利用实时定量 PCR 的方法分析了 *BmArrestin2* 的表达模式，为研究 *BmArrestin2* 的功能奠定了基础。蛋白在细胞中的定位对其发挥功能具有重要作用。在哺乳动物中， β -arrestin2 主要分布在细胞质中，激动剂刺激后可以向细胞膜或者细胞核转移^[2,3,4]。家蚕卵巢细胞系的细胞定位结果显示 BmArrestin2 主要分布在细胞质中，进一步暗示着 *BmArrestin2* 可能与哺乳动物中的 β -arrestin2 类似。研究某一蛋白的相互作用蛋白对研究其功能有重要作用，本文利用免疫共沉淀技术捕获家蚕卵巢细胞中与 BmArrestin2 相互作用的蛋白，旨在探讨 *BmArrestin2* 在家蚕细胞中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 载体、菌种与生物材料

载体：pMDTM19-T-easy vector 购自大连宝生物有限公司（TaKaRa）。

宿主菌：*E.coli* DH5 α ，由本实验室保存。

家蚕：品种为大造，由本实验室保存。

1.1.2 工具酶及试剂盒

克隆相关试剂均购自大连宝生物有限公司（TaKaRa）。反转录酶试剂盒，SYBR 为 Transgene 公司产品。蛋白 marker 为 Thermo 公司产品。6 $\times$ His 鼠源抗体是 Tiangen 公司产品。FITC 标记的羊抗鼠 IgG 是 TIANGEN 公司产品。

1.1.3 其他试剂

DTT、BSA、琼脂粉为 Biosharp 公司产品。AP 为上海金璐贸易有限公司产品。核酸染料 GelRed 为 Biotium 公司产品。丙烯酰胺（Acr）、聚丙烯酰胺（Bis）是 Fluka 公司产品。其余试剂均为国产分析纯。

1.1.4 主要实验试剂与配制

1.1.4.1 培养基的配制

LB 液体培养基

胰蛋白胨	10 g
酵母提取物	5 g
Nacl	10g

去离子水定容至 1L，每根试管 3 mL 分装，121 °C 高压湿热灭菌 30min。

LB 固体培养基

胰蛋白胨	10 g
酵母提取物	5 g
Nacl	10 g
琼脂粉	15 g

去离子水定容至 1 L，121°C 高压湿热灭菌 30 min，冷却至 50°C 左右时加入适量抗生素，铺制平板，4°C 保存。

1.1.4.2 抗生素溶液的配制

氨苄青霉素 (ampicillin, Amp⁺) : 1g 氨苄青霉素溶于 1mL 灭菌水中, 4℃ 贮存。

1.1.4.3 5 ×TBE 缓冲液

54 g Tris 碱, 27.5 g 硼酸, 800mL 去离子水充分溶解后, 加入 20 mL 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0), 定容至 1L, 工作液浓度为 0.5×。

1.1.4.4 6 ×核酸电泳缓冲液的配制

EDTA	6mL
甘油	36mL
二甲苯青	0.05g
溴酚蓝	0.05g

去离子水定容至 100mL, 室温贮存。

1.1.4.5 SDS-PAGE 相关溶液的配制

10 ×Tris-SDS 电泳缓冲液

Tris 碱	30.2 g
甘氨酸	144.0 g
10 % SDS (电泳级)	100 mL

800 mL 去离子水溶解后补水定容至 1000 mL, 室温储存, 工作液浓度为 1×。

2×SDS 凝胶加样缓冲液 (不含 DTT)

0.5mol/L Tris·Cl (pH6.8)	50 mL
SDS (固体干粉)	4 g
溴酚蓝	20 mg
甘油	20 mL

临用前加入 1 mol/L 二硫苏糖醇至终浓度为 200 mmol/L。

SDS-PAGE 凝胶

	12%分离胶 (5mL)	5%浓缩胶 (2mL)
	pH8.8, 1.5M Tris·Cl	pH6.8, 1M Tris·Cl
水	1.6 mL	1.4 mL
30% Arc/Bis	2.0 mL	0.33 mL
10% SDS	50 μL	0.02 mL
10% AP	50 μL	0.02 mL
TEMED	2 μL	0.002 mL
Tris·Cl	1.3 mL	0.25 mL

10 % SDS (m/v) : 10 g SDS 粉末溶解于 80 mL 去离子水中, 微热促溶, 定

容至 100 mL，室温贮存。

30%Arc/ Bis (29:1) : 29 g Arc、1 g Bis, 80 mL 去离子水完全溶解后定容至 100 mL, 0.45 μm 滤器避光过滤, 置于棕色瓶中, 4℃贮存。

10%AP: 0.1 g 过硫酸铵溶解于 1 mL 去离子水中, 4℃贮存。

1.5mol/L Tris·Cl (pH8.8) : 90.75g Tris·Cl 溶于 400mL 无菌水中, 用 1mol/L HCl 调节 pH 至 8.8, 加水定容至 500mL, 4℃保存。

0.5mol/L Tris·Cl (pH6.8) : 12g Tris·Cl 溶于 150mL 无菌水中, 用 1mol/L HCl 调节 pH 至 6.8, 加水定容至 200mL, 4℃保存。

考马斯亮蓝 R250 染色液: 1g 考马斯亮蓝 R250 溶于 450 mL 甲醇、450 mL 去离子水中, 充分溶解后倒入 100 mL 冰乙酸, 滤纸过滤, 室温保存。

脱色液: 450mL 甲醇、450mL 水、100mL 冰乙酸, 室温保存。

1.1.4.6 Western blotting 相关溶液的配制

转膜缓冲液 (湿转)

5.8 g Tris、2.9 g 甘氨酸、200mL 甲醇, 800 mL 去离子水完全溶解后补水至 1 L, 室温保存。

洗膜液 (PBST)

8g NaCl、0.2 KCl、3g Tris, 800 mL 去离子水完全溶解后补水至 1 L, 室温保存。

封闭液 (3% BSA)

3g BSA 溶于 100mL PBST 中, 4℃保存。

1.1.4.7 免疫荧光相关试剂的配制

1×PBS: NaCl 137mmol/L, KCl 2.7mmol/L, Na_2HPO_4 4.3mmol/L, KH_2PO_4 1.4mmol/L, pH=7.4。

4%多聚甲醛: 4 g 多聚甲醛溶于 80mL 1×PBS 中, 加热至 60℃, 完全溶解后定容至 100 mL, 4℃贮存。

透化液: 1 μL Triton-100 溶于 999 μL PBST 中, 配制成 0.1%透化液。

DAPI 染色液: 用 PBST 按 1:1000 稀释 DAPI 母液。

1.1.4.8 银染相关溶液的配制

固定液

无水甲醇	20mL
冰乙酸	5mL
双蒸水	补至 50mL

敏化液

无水甲醇	15mL
硫代硫酸钠	0.1g
无水乙酸钠	3.4g
双蒸水	补至 50mL

染色液：0.125g 硝酸银溶解于 50mL 双蒸水中，避光，现配现用。

显色液

无水碳酸钠	1.25g
甲醛	20 μ L
双蒸水	补至 50mL

终止液：0.2g 甘氨酸溶解于 50mL 双蒸水中，现配现用。

1.1.4.9 昆虫细胞 TC-100 培养基

19.4g TC-100 培养基粉末溶解于 800mL 去离子水中，调节 pH 值至 6.15-6.22，去离子水定容至 1L，0.22 μ m 滤膜过滤，4℃ 保存。使用前添加 10% 的胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)。

1.1.4.10 其它相关试剂

0.5 mol /L (pH 8.0) EDTA 缓冲液：186.1 g EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶于 800 mL 去离子水中，用 NaOH 调节溶液 pH 至 8.0，定容至 1 L，室温保存。

1mol/L IPTG：2.38g IPTG 溶于 10mL 无菌水中，0.22 μ m 滤器过滤后分装，-20℃ 保存。

1.2 常用仪器

仪器	型号	生产商
PCR 仪	TP-600	日本 TaKaRa 公司
恒温金属浴	K20	杭州奥盛仪器有限公司
1/10000 分析天平	BS124S	北京赛多利斯仪器系统有限公司
台式冷冻离心机	Z283K	德国 Hermle 公司
台式空气恒温振荡器	QL-901	海门其林贝尔仪器制造有限公司

仪器	型号	生产商
紫外透射分析仪	KH-UVI 型	上海康禾光电仪器有限公司
核酸电泳仪	Universal Hood II	美国 Bio-RAD 公司
电热鼓风干燥箱	CS101-3EB	重庆四达实验仪器有限公司
生化培养箱	SHP-250	上海精宏实验设备有限公司
pH 计	Delta320	梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司
优普超纯水机	UPT-III-5T	成都超纯科技有限公司
超声波清洗器	KQ-500DB 型	昆山市超声仪器有限公司
加热搅拌器	78-1	江苏金坛市荣华仪器制造有限公司
电热恒温水浴锅	H.H.S	上海医疗器械五厂
可调式恒温摇床	0410006	上海福玛实验设备有限公司
凝胶成像系统	GIS-2007	上海天能科技有限公司
立式压力蒸汽灭菌器	LDZX-50KB	上海申安医疗器械厂
荧光定量 PCR 仪	BIO-RAD CFX 96	美国 BIO-RAD 公司
超低温冰箱	ULT1786-6-V49	美国 Thermo Fisher 公司
96 孔板离心机	PlateSpin II	日本 KUBOTA 公司
蛋白电泳及转移系统	PowerPac Universal	美国 BIO-RAD 公司

1.3 实验方法

1.3.1 总 RNA 的提取

(1) 解剖家蚕，将所需组织于 PBS 中漂洗干净后，置于灭菌后预冷的研钵中研磨。

(2) 加入 1mL RNAiso plus 后匀浆，室温静置 5min。

(3) 4℃，12000 r/min 离心 5 min，吸取上清至新管。加入 200 μL 氯仿，振荡混匀后静置 5 min。

(4) 4℃，12000 r/min 离心 15 min，吸取上清至新管。加入与上清等体积的异丙醇，振荡混匀后静置 10 min。

(5) 4℃，12000 r/min 离心 10 min，弃上清。加入 1 mL 预冷的 75%乙醇洗涤沉淀。

(6) 4℃，12000 r/min 离心 5 min，吸净上清后于室温中自然干燥。

(7) 向离心管中加入 2 μL DNase I、2 μL 10×DNase I buffer、DEPC 水补足至 20 μL，37℃ 30 min 去除基因组 DNA，加入 2 μL EDTA 80℃ 5 min 灭活 DNase I。 -80 保存。

1.3.2 RNA 反转录成 cDNA

(1) 取 2 μ g 冰上溶化的总 RNA、1 μ L oligo (dT), RNase free water 补足至 8 μ L, 混匀, 65 $^{\circ}$ C, 5 min; 0 $^{\circ}$ C, 5 min。

(2) 加入 10 μ L R-Mix、1 μ L E-Mix、1 μ L Remover, 混匀。

(3) 42 $^{\circ}$ C, 30 min; 85 $^{\circ}$ C, 5 s。 -20 $^{\circ}$ C 贮存。

1.3.3 感受态细胞的制备

接种 3 μ L -80 $^{\circ}$ C 保存的 DH5 α 37 $^{\circ}$ C 活化 8-12h; 向新鲜培养基中接种 30 μ L 活化后的菌液 37 $^{\circ}$ C 震荡培养约 3 小时; 将培养液转入 1.5mL Eppendorf 管中, 冰置 10min; 4 $^{\circ}$ C, 5 000 r/min $\times$ 5min 或 3000r/min $\times$ 8min, 弃上清; 750 μ L 预冷的 75 mmol/L CaCl₂ 轻轻重悬细胞, 冰置 30 分钟; 4 $^{\circ}$ C, 5 000 r/min $\times$ 5min 或 3 000 r/min $\times$ 8min, 弃上清; 200 μ L 预冷的 75mmol/L CaCl₂ 轻轻重悬, 冰上放置至少 4 小时; 加入 20 μ L 无菌甘油混匀后 -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.3.4 聚合酶链式反应 (PCR)

反应体系 (25 μ L)

Buffer	2.5 μ L
Mg ²⁺	2 μ L
dNTPs(2.5mmol/L)	1 μ L
模板 DNA	1 μ L
Primer1(100pmol/L)	1 μ L
Primer2(100pmol/L)	1 μ L
Taq(5U/ μ L)	0.5 μ L
ddH ₂ O	16 μ L

PCR循环的过程为: 95.0 $^{\circ}$ C 预变性 5 min ; 95.0 $^{\circ}$ C 变性 50 s; 55 $^{\circ}$ C 复性 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 80 s, 扩增 30-35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

1.3.5 目的片段的分离和回收

(1) 切下含目的片段的琼脂糖凝胶称重。

(2) 按每 100 mg 琼脂糖加 300 μ L Buffer DE-A 的比例加入 Buffer DE-A。75 $^{\circ}$ C 融胶。

(3) 加 0.5 倍 Buffer DE-A 体积的 Buffer DE-B, 混合均匀。

(4) 将混匀的溶液移入吸附柱中, 12000 $\times$ g 离心 30 s。弃去收集管中的液体。

(5) 向吸附柱加入 500 μ L Buffer W1, 12000 $\times$ g 离心 30 s。弃收集管中的液体。

- (6) 向吸附柱加入 700 μL Buffer W2, 12000 $\times g$ 离心 30 s。弃收集管中的液体。
- (7) 重复步骤 6 一次
- (8) 弃去管内液体, 12000 $\times g$ 离心 1min。
- (9) 将吸附柱放入新的收集管, 滴加20-30 μL 预热的无菌水, 提高洗脱效率, 室温静置1 min, 12000 $\times g$ 离心1 min。 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.6 DNA 连接反应体系 (20 μL)

目的片段	5 μg
载体	0.5 μg
T4 DNA ligase	0.5 μL
10 $\times$ T4 ligase buffer	2 μL
ddH ₂ O	补至 20 μL

16 $^{\circ}\text{C}$ 连接至少四个小时。

1.3.7 连接产物的转化

将连接产物加入感受态细胞中, 冰水浴 30 min; 42 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴 90s; 冰水浴 5 min; 倒入 1 mL 液体培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 活化 1 h; 5000 r/min 离心 5min 后弃上清, 保留 100-200 μL 培养液均匀涂布在 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的固体培养基上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱培养 8h-12h。

1.3.8 DNA 的酶切反应体系 (20 μL)

DNA	2 μg
10 $\times$ buffer	2 μL
限制性内切酶	各 1 μL
ddH ₂ O	补至 20 μL

37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切至少 30min, 酶切产物用 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.3.9 SDS-PAGE 及 Western Blotting

具体操作参考《分子生物学实验手册》。

1.3.10 表达菌样品的制备

- (1) 将目的片段克隆进原核表达载体中, 转化进 BL21 (DE3) 感受态细胞, 筛选阳性克隆。
- (2) 诱导表达: 将 30 μL 活化后的菌液接种至新的液体培养基中, 加入 3 μL 相

应抗生素, 37℃ 震荡培养至对数生长期后, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 37℃ 诱导培养 4h。12000 r/min 离心 5min, 收集沉淀, 1×PBS 洗三遍, 弃上清。

(3) 制样: 向沉淀中加入 100uL 1×PBS 和 100uL 含 DTT 的 2×上样 Buffer, 沸水浴 5min, 样品-20℃保存。

1.3.11 制备多克隆抗体

将目的条带与生理盐水在灭菌预冷的研钵中研磨, 将研磨后的液体吸入 1.5mL Eppendorf 管中, 加入等体积的佐剂, 4℃ 振荡混匀 2h, 第一次免疫小鼠使用福氏不完全佐剂, 后三次使用福氏完全佐剂。连续四周皮下多点注射六周龄昆明小鼠, 每次注射蛋白量约 50μg/只, 注射体积不超过 300 μL/只。免疫结束后将昆明小鼠眼球摘除处死, 收集血液, 4℃ 静置过夜后低速离心, 上层淡黄色液体即为抗体。

Western Blotting 检测抗体效价。

1.3.12 免疫荧光

- (1) 用 1×PBS 清洗表面长有细胞的小圆片;
- (2) 适量 4%多聚甲醛固定液室温固定 15min; 弃去细胞固定液, 用 1×PBS 洗 3 次, 每次 5min;
- (3) 滴适量透化液 (0.1%的 Triton X-100, 用 PBST 稀释), 透化处理 5min; 弃去透化液, 用 PBST 洗 3 次, 每次 5 min;
- (4) 滴适量封闭液 (5%BSA), 37℃ 封闭 2 h;
- (5) 弃去封闭液, 滴入适量 1:50 稀释的一抗, 4℃ 孵育过夜;
- (6) 弃去一抗, 用 PBST 洗 3 次, 每次 5min; 滴入适量 1: 250 稀释的二抗, 37℃ 避光孵育 1 h;
- (7) 弃去二抗, 用 PBST 避光洗 3 次, 每次 5 min; 滴加适量 1: 1000 稀释的 DAPI, 室温避光孵育 10min;
- (8) 吸去 DAPI, PBST 清洗 10min;
- (9) 取出小圆片, 晾干后置于干净的载玻片上, 封片剂封片后用荧光显微镜 (TE2000U, Nikon) 观察。

1.3.13 RT-PCR

(1)反应体系 (20 μL)

Faststart universal SYBR Green Master	10 μL
---------------------------------------	-------

模板cDNA	1 μ L
引物	1 μ L
ddH ₂ O	8 μ L

(2) PCR 循环的过程为: 95.0℃ 10 min 后, 按 95.0℃ 15 s, 60.0℃ 1 min 扩增 40 个循环。荧光检测读板设置在 55.0℃ 45 s 阶段。PCR 反应结束后检测溶解曲线。

1.3.14 CO-IP

- (1)收集约 1×10^7 个细胞, 用预冷的 $1 \times$ PBS清洗细胞三次, 低速离心, 弃上清。
- (2)用预冷的 $1 \times$ PBS按10: 1的比例稀释 $10 \times$ Lysis buffer, 工作液终浓度为 $1 \times$ 。
- (3)向上述细胞沉淀中加入1mL $1 \times$ Lysis buffer, 4℃裂解30min。
- (4)4℃, 12000rpm/min离心30min, 小心吸取900 μ L上清, 并移至新管。
- (5)向上清中加入9 μ L PMSF、1 μ g抗体, 4℃混匀孵育过夜。
- (6)用700 μ L 预冷的 $1 \times$ PBS清洗18 μ L proteinA-Agarose, 4℃ 3000rpm/min离心3min, 弃上清, 此步骤重复六次。
- (7)将4℃抗体孵育过夜的混合液加入清洗后的 proteinA-Agarose中, 4℃孵育至少2h。
- (8)4℃ 12000rpm/min离心30s, 弃上清。
- (9)用预冷的 $1 \times$ PBS按10: 1的比例稀释 $10 \times$ IP至 $1 \times$, 向上述离心管中加入700 μ L $1 \times$ IP 清洗 proteinA-Agarose, 4℃ 12000rpm/min离心30s, 弃上清。此步骤重复六次。
- (10)向清洗后的proteinA-Agarose中加入40-50 μ L $1 \times$ Loading buffer, 混匀后95℃水浴5min, 12000rpm/min离心5min, 上清即为蛋白样品。

1.3.15 银染

- (1) 固定: 50mL固定液室温固定30min以上, 摇床转速60rpm-70rpm为宜。
- (2) 敏化: 敏化液摇床室温孵育30min。
- (3) 漂洗: 50mL双蒸水清洗凝胶三次, 每次5min。
- (4) 染色: 倒入染色液, 避光染色1-10min, 具体染色时间视胶的大小而定。
- (5) 漂洗: 倒入50mL双蒸水漂洗, 每次1min, 共两次。此步骤中漂洗时间不能过长。
- (6) 显色: 倒入显色液显色1-10min, 期间密切观察颜色变化, 胶上条带或者

斑点清楚即可。

(7) 终止：50mL终止液终止10min。

(8) 漂洗：50mL双蒸水漂洗三次，每次5min。

1.3.16 细胞转染

取 1×10^5 个生长状态良好的家蚕 BmN 细胞铺于培养皿或细胞瓶中，待细胞生长至 50%-80%左右时，将 $2\mu\text{g}$ 需转染的质粒或 siRNA 与 $98\mu\text{L}$ 无血清培养基混匀（A 液）； $2\mu\text{L}$ 脂质体与 $98\mu\text{L}$ 无血清培养基混匀（B 液）。将 A、B 液混合，轻轻吹打，室温静置 30min 以形成转染复合体。在静置期间，用无菌的 $1 \times \text{PBS}$ 清洗细胞三次。静置结束后，将转染复合体与 $800\mu\text{L}$ 无血清培养基混合，轻轻混匀后滴加入细胞中。 27°C 培养 4~6h 后更换新鲜完全培养基。

2 结果与分析

2.1 家蚕 β -Arrestin2 基因在性腺不同发育时期的表达水平

提取家蚕不同发育时期性腺的 mRNA，反转录成 cDNA，用 Rarr-2F（CGATGGAGTAGTGGTCGTTG）/Rarr-2R(CGACTTGTTCTTGTCCAATC)通过 Real-Time PCR 检测家蚕 β -Arrestin2 的相对表达水平。以家蚕肌动蛋白 A3 基因为内参，扩增引物为 semi-A3-F（CTG CGT CTG GAC TTG GC）/ semi-A3-R(CGA GGG AGC TGC TGG AT)，以五龄三天卵巢中 β -Arrestin2 表达量为参照，其他时期的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算。定量结果显示，家蚕 β -Arrestin2 基因在五龄三天卵巢组织中表达量最高，在性腺其他时期中的表达量都较低（图1）。

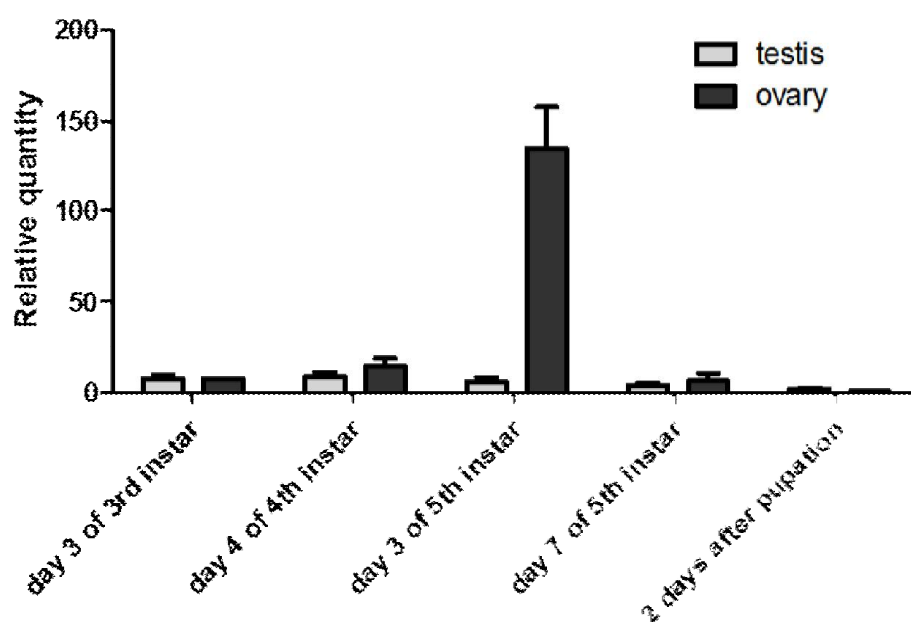


图 1 不同发育阶段性腺组织 β -Arrestin2 mRNA 的相对丰度

Fig. 1 The relative abundance of β -Arrestin2 mRNA in gonads in diverse developmental stage

2.2 家蚕 β -Arrestin2 基因在五龄第三天家蚕不同组织中的表达水平

不同发育时期性腺中家蚕 β -Arrestin2 基因表达量的检测发现，家蚕 β -Arrestin2 基因在五龄三天性腺中的表达量相对较高，因此为了进一步确定家蚕 β -Arrestin2 的表达模式，提取五龄三天家蚕精巢、卵巢、头、马氏管、血细胞、中肠、表皮、气管丛和丝腺的 mRNA，反转录成 cDNA，Real-Time PCR 检测家蚕 β -Arrestin2 基因的相对表达水平。设家蚕 β -Arrestin2 基因在卵巢组织中的表达量为 1，以各组织中 *Actin-3* 基因作内参，相对于卵巢组织，基因在不同组织中的相对表达水平用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算。结果显示家蚕 β -Arrestin2 基因在气管丛中表达量最高，其次是血细胞，在中肠和表皮中也有表达，在精巢中表达量最低（图 2）。

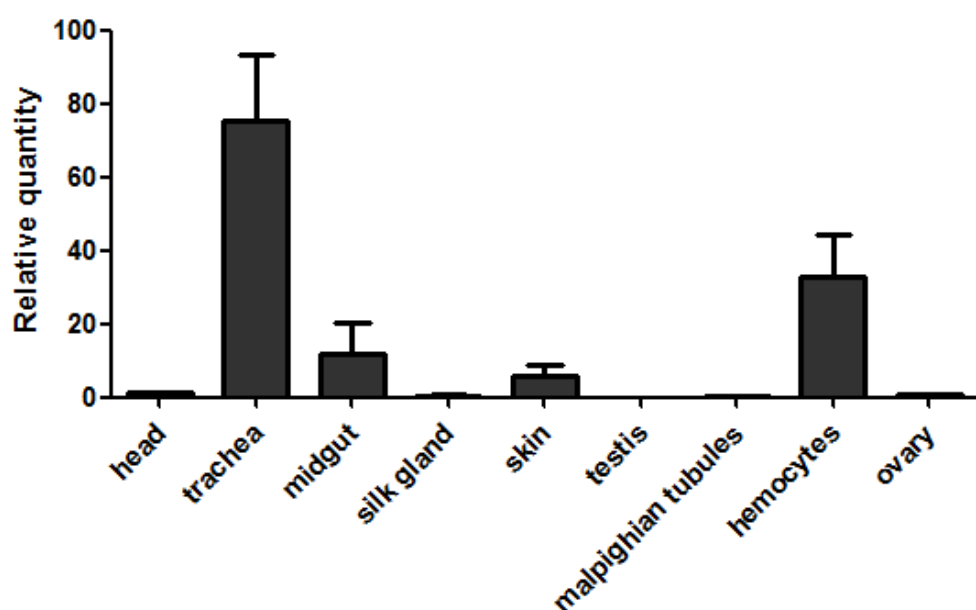
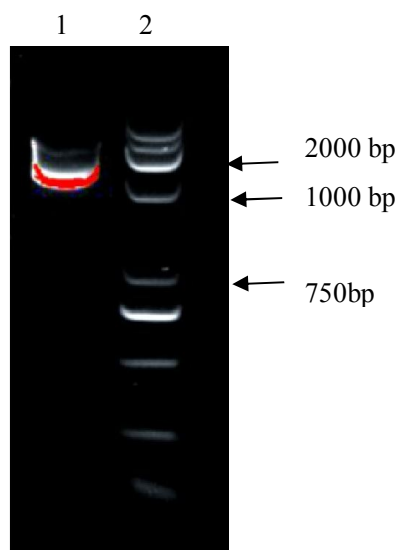


图 2 五龄第 3 天家蚕不同组织中 β -*Arrestin2* mRNA 的相对丰度

Fig. 2 The relative abundance of β -*Arrestin2* mRNA in diverse tissues in 3rd day of 5th instar

2.3 *BmArrestin2* 的克隆及序列测定

设计 *BmArrestin2* 的克隆引物 BmARR-2EI (GAATTCATGTTAGATCTTATATCTCTGGTG, 下划线为 *EcoR* I 酶切位点) /BmArr-2XX (CTCGAGTCTAGATTCGGGTTTCATTCATTCGAAGAC, 下划线为 *Xho* I 和 *Xba* I 酶切位点)。表达模式分析发现, 五龄三天的家蚕组织中 β -*Arrestin2* 表达量最高, 考虑家蚕的中肠组织体积大, 易于提取, 因此以五龄 3 天家蚕中肠组织 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 结果显示在 1.2Kb 处出现一条特异性条带(图 3), 将此目的条带割下, 用胶回收试剂盒回收纯化, 克隆进 pMDTM19-T 载体, 挑取阳性克隆, 摇菌后抽取质粒, PCR 及酶切鉴定。将阳性克隆送入上海生工生物工程有限公司进行序列测定。测序正确的重组载体命名为 pMD19T-*BmArrestin2*。

图 3 *BmArrestin2* 的 PCR 扩增

1: PCR production of *BmArrestin2*; 2: 100-5000bp DNA ladder

Fig.3 PCR amplification of *BmArrestin2*

Lane1: PCR product of *BmArrestin2*; Lane2: 100-5000bp DNA ladder

2.4 *BmArrestin2* 基因表达载体的构建

测序鉴定正确的 pMD19T-*BmArrestin2* 质粒用 *Xho* I 和 *Eco*R I 酶切，回收 1.2 kb 处的片段，将其克隆进同样酶切的 pET-32a(+) 中以构建重组质粒 pET-32a(+)-*BmArrestin2*，抽取重组质粒并用 *Xho* I 和 *Eco*R I 双酶切鉴定，结果显示可从重组质粒中能够切出一条约 1.2kb 的目的片段（图 4），证明 *BmArrestin2* 已成功克隆进 pET-32a(+) 原核表达载体。

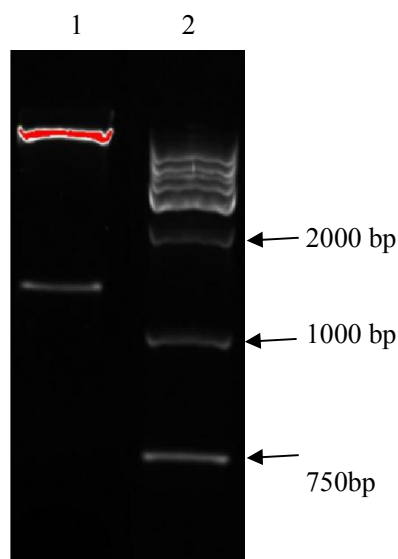


图 4 Pet-32a(+)-*BmArrestin2* 酶切鉴定

1: *Xho* I / *Eco*R I 双酶切 pET-32a(+)-*BmArrestin2*; 2: 2kb DNA ladder

Fig. 4 The identification of recombination plasmid pET-32a(+)-*BmArrestin2*

Lane 1: recombination plasmid pET-32a(+)-*BmArrestin2* was digested with *Xho* I / *Eco*R I ; Lane 2: 2kb DNA ladder

2.5 BmArrestin2 的诱导表达及其多克隆抗体特异性检测

将 pET-32a(+)-*BmArrestin2* 及 pET-32a(+) 分别转化表达菌 BL21 (DE3)，经 3 μ L IPTG 37 $^{\circ}$ C 诱导 4h 后，收集诱导表达总蛋白。SDS-PAGE 结果显示，在 62 kD 处出现特异性条带，与理论值相符（图 5A）。以鼠源的 6 $\times$ His 单克隆抗体作为一抗（1:10000 稀释），HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 作为二抗（1:10000 稀释）进行 Western blotting 检测，结果显示也在 62 kD 处显示出与理论值相符的特异性条带（图 5B），说明 BmArrestin2 已成功在大肠杆菌中表达。回收重组蛋白，免疫六周龄昆明小鼠，制备多克隆抗体，Western blotting 检测抗体的有效性。结果显示自制抗体（1:500 稀释）能特异性的结合原核表达的 BmArrestin2（图 5C）。

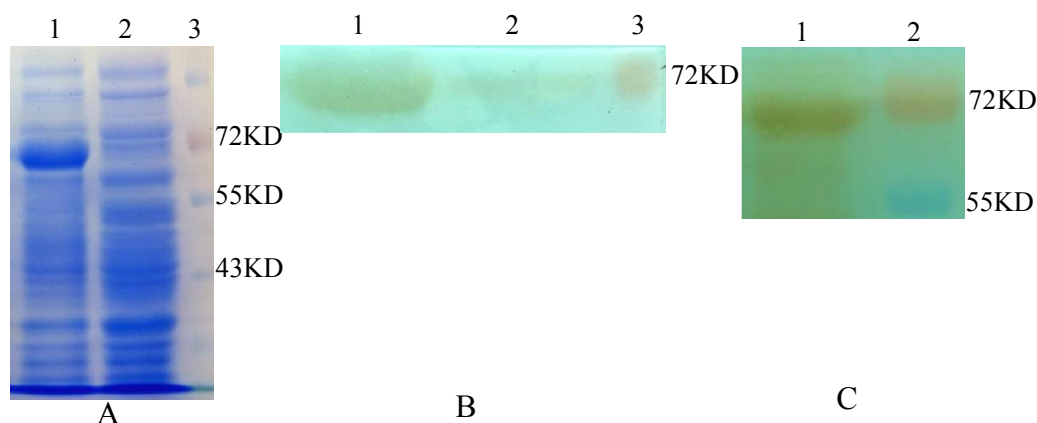


图 5 重组 BmArrestin2 蛋白的 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析

(A) SDS-PAGE 1: pET-32a(+)-*BmArrestin2* 转化菌+IPTG 2: pET-32a(+)转化菌+IPTG 3: 蛋白 Marker

(B) Western blotting (6×His 单克隆抗体为一抗) 1: pET-32a(+)-*BmArrestin2* 转化菌+IPTG 2: pET-32a(+)-*BmArrestin2* 转化菌 3: 蛋白 Marker

(C) Western blotting (BmArrestin2 多抗为一抗) 1: pET-32a(+)-*BmArrestin2* 转化菌+IPTG 2: 蛋白 Marker

Fig.5 The analysis of SDS-PAGE and Westen blotting of recombinant BmArrestin2

(A) SDS-PAGE Lane1: transformed *E.Coli* BL21(DE3) strain with pET-32a(+)-*BmArrestin2*+IPTG Lane2: transformed *E.coli* BL21(DE3) strain with pET-32a(+) +IPTG Lane 3: protein Marker

(B) Western blotting (primary antibody: 6×His) Lane1: transformed *E.coli* BL21(DE3) strain with pET-32a(+)-*BmArrestin2*+IPTG Lane2: transformed *E.coli* BL21(DE3) strain with pET-32a(+)-*BmArrestin2* Lane 3: protein Marker

(C) Western blotting (primary antibody: mouse anti- BmArrestin2) Lane 1: transformed *E.coli* BL21 (DE3) strain with pET-32a(+)-*BmArrestin2*+IPTG Lane 2: protein Marker

2.6 BmArrestin2 的细胞定位

了解家蚕 BmArrestin2 蛋白在细胞中的定位对研究其在家蚕中的功能有重要作用，因此在 BmN 细胞中进行 BmArrestin2 的定位实验。实验组一抗使用自制的 BmArrestin2 多克隆抗体，对照组使用未免小鼠血清；二抗使用 1: 300 稀释的 FITC

标记的山羊抗小鼠 IgG。封片后的样品共聚焦观察，被 FITC 染色的区域显示绿色荧光（图 6 A、A1），被 DAPI 染色的细胞核呈现强烈的蓝色荧光（图 6 B、B1）。孵育 BmArrestin2 自制抗体的实验组在细胞核和细胞质中都显示出了绿色荧光，但是细胞质中的荧光强度高于核中，说明 BmArrestin2 蛋白在卵巢来源的 BmN 细胞中能够表达，且主要分部在细胞质中（图 6C、C1）。

。

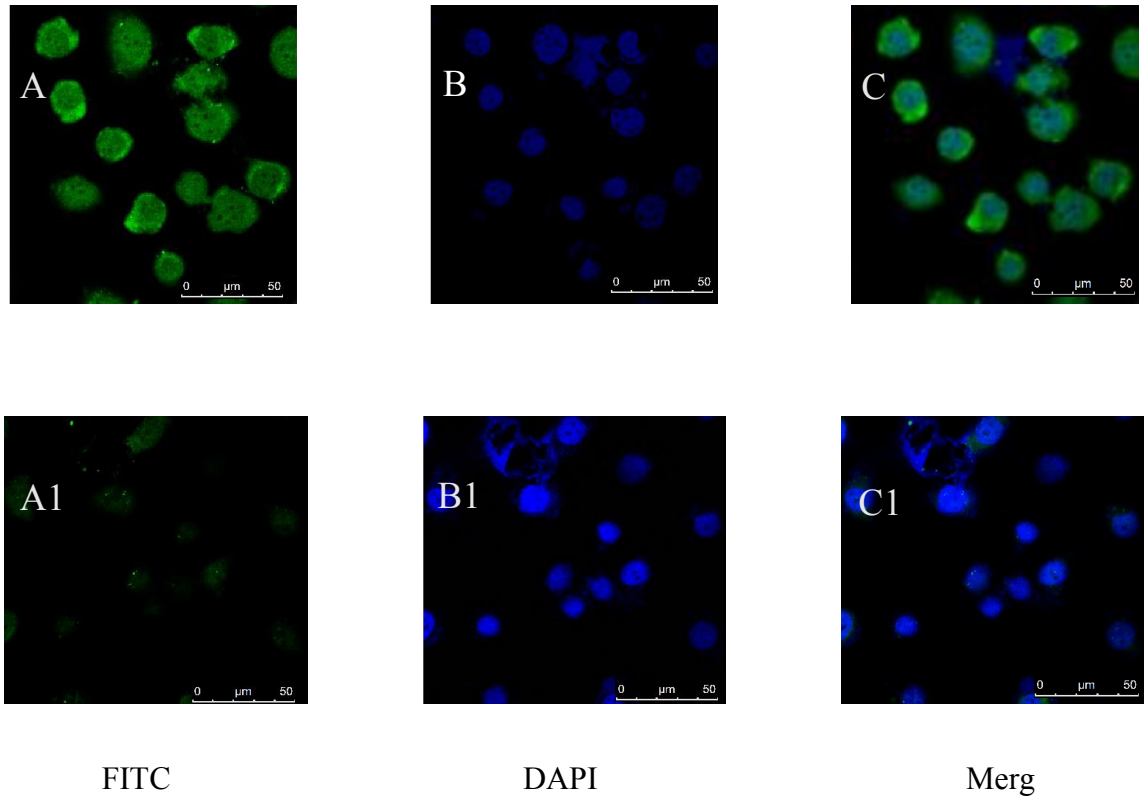


图 6 BmArrestin2 在 BmN 细胞中的定位

A、B、C：BmArrestin2 抗体孵育；A1、B1 和 C1：未免疫小鼠血清孵育
A、A1：绿色荧光激发；B、B1：紫外激发；C、C1：A+B、A1+B1
Fig. 6 The immunofluorescence of BmArrestin2 in BmN cell
A、B and C：Incubated with anti-BmArrestin2 antibody；A1、B1 and C1：Incubated with pre-immune serum A、A1：green excitation light；B、B1：UV excitation light；
C、C1：A+B、A1+B1

2.7 转基因载体的筛选与鉴定
将 pMD19T-BmArrestin2 质粒以及 pIZT-V5/His 质粒以 *EcoR* I / *Xba* I 37℃ 双酶

切 30min 后, 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 切下目的片段, 回收纯化后用 T4 DNA 连接酶 16℃ 连接过夜, 连接产物转化涂板, 博来霉素筛选阳性克隆, 抽取质粒后用 *EcoR* I / *Xba* I 双酶切鉴定, 结果显示重组质粒中可以酶切出一条约 1.2kb 的条带, 证明 *BmArrestin2* 已被成功克隆进 pIZT-V5/His 载体中, 该重组质粒命名为 pIZT-V5/His-*BmArrestin2* (图 7)。

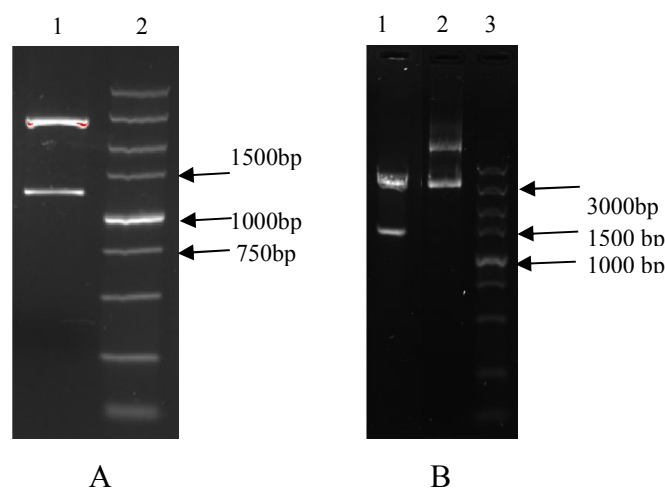


图 7 pMD19T-*BmArrestin2* 酶切及 pIZT-V5/His-*BmArrestin2* 酶切鉴定

(A) pMD19T-*BmArrestin2* 酶切; 1: *EcoR* I / *Xba* I 双酶切 pMD19T-*BmArrestin2*

2: DNA marker

(B) pIZT-V5/His-*BmArrestin2* 酶切; 1: *EcoR* I / *Xba* I 双酶切

pIZT-V5/His-*BmArrestin2* 2: pIZT-V5/His-*BmArrestin2* 3: DNA marker

Fig. 7 The identification of the recombination plasmid pMD19T-*BmArrestin2* and pIZT-V5/His-*BmArrestin2*

(A) The identification of recombination plasmid pMD19T-*BmArrestin2*; Lane1:

EcoR I + *Xba* I Lane2: DNA marker

(B) The identification of recombination plasmid pIZT-V5/His-*BmArrestin2*;

Lane1: *EcoR* I + *Xba* I Lane2: the plasmid Lane3: DNA marker

2.8 稳定转化家蚕 BmN 细胞的筛选

向转染 pIZT-V5/His-*BmArrestin2* 以及 pIZT-V5/His 质粒后的细胞中加入博来霉素至终浓度 200μg/μL, 正常传代培养 3 个月, 荧光显微镜观察发现大多数细胞均为绿色荧光细胞 (图 8)。为了进一步验证是否得到了稳定转化的细胞系, 分别提

取了这两种荧光细胞的 mRNA，反转录成 cDNA，通过定量 PCR 的方法检测 *BmArrestin2* 基因的表达水平。结果显示，转染 pIZT-V5/His-*BmArrestin2* 的细胞系中 *BmArrestin2* 基因的表达水平比转染 pIZT-V5/His 的细胞系提高了约 400 倍（图 9），说明已经获得了稳定转化的 pIZT-V5/His-*BmArrestin2* 以及 pIZT-V5/His-BmN 细胞系。

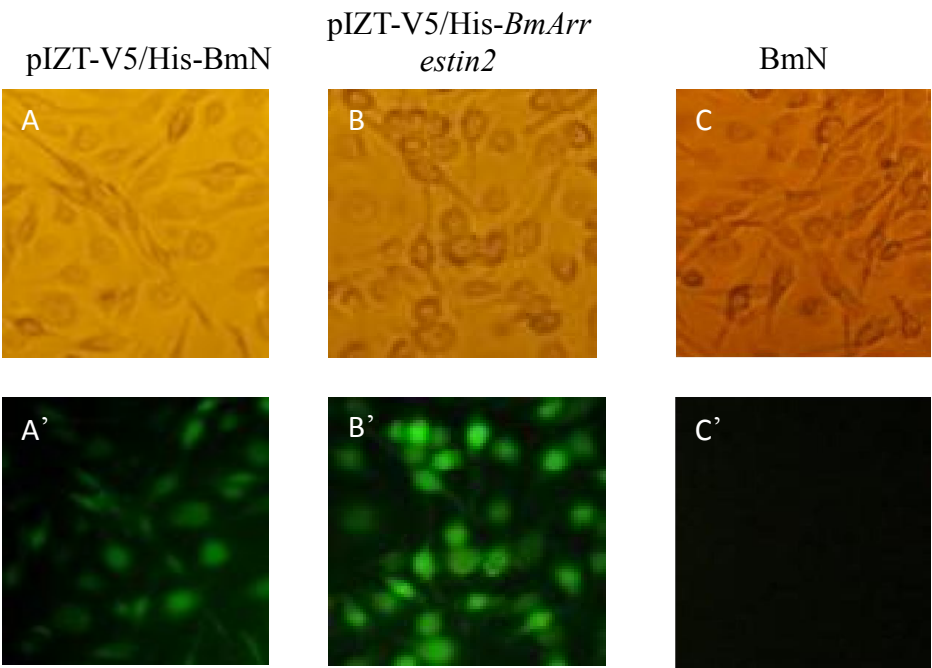


图 8 BmN 和两种转基因细胞系的荧光观察

（A）正常光源下的 pIZT-V5/His-BmN 细胞系；

（A'）蓝色荧光光源下的 pIZT-V5/His-BmN 细胞系

（B）正常光源下的 pIZT-V5/His-*BmArrestin2* 细胞系；

（B'）蓝色荧光光源下的 pIZT-V5/His-*BmArrestin2* 细胞系

（C）正常光源下的 BmN 细胞；（C'）蓝色荧光光源下的 BmN 细胞

Fig. 8 The fluorescence observation of wide type and transgenic BmN cells

（A）Transformed BmN cells with pIZT-V5/His in normal lighting;

（A'） Transformed BmN cells with pIZT-V5/His in fluorescence

（B） Transformed BmN cells with pIZT-V5/His-*BmArrestin2* in normal lighting;

（B'） Transformed BmN cells with pIZT-V5/His-*BmArrestin2* in fluorescence

（C） wide type BmN cells in normal lighting;

（C'） wide type BmN cells in fluorescence

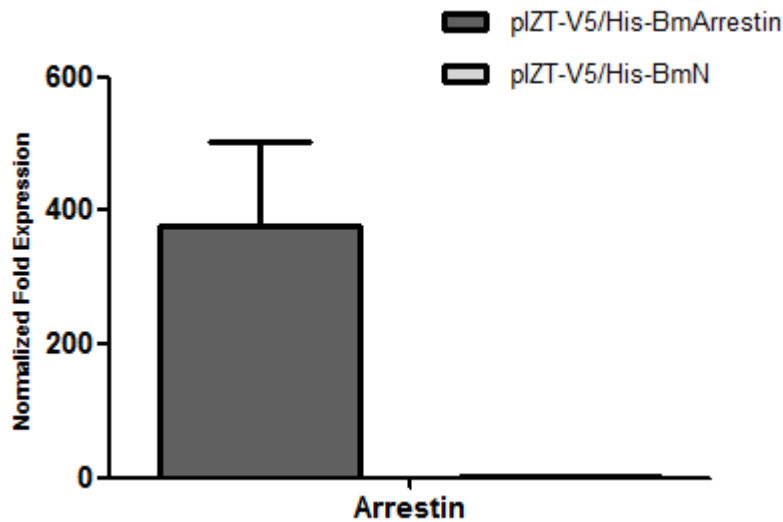


图 9 转基因细胞 BmArrestin2 mRNA 的相对丰度

Fig. 9 The relative abundance of BmArrestin2 in transgenic BmN cells

2.9 BmArrestin2 互作蛋白的筛选

为了筛选鉴定家蚕卵巢细胞中与 BmArrestin2 具有相互作用的蛋白，分别使用 6×His 标签的兔抗（实验组），以及等量的正常兔血清（对照组）与 pIZT-V5/His-BmArrestin2 细胞系进行免疫共沉淀。银染结果显示在 43-55KD 中间有一条差异带（图 10），质谱鉴定结果显示，从这条差异条带中可检测到 YKI3、Actin-4 和 Actin-3，提示这些蛋白可能是 BmArrestin2 的互作蛋白（表 1）。

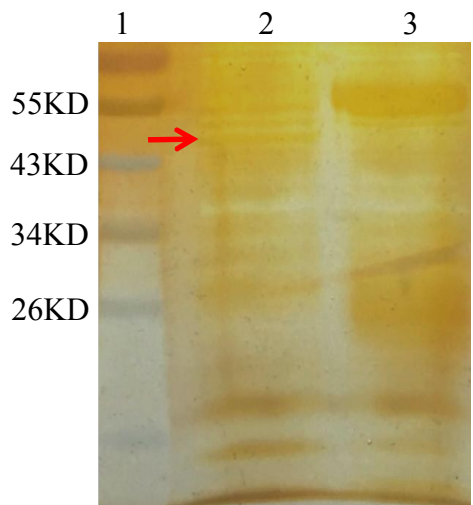


图 10 Co-IP 得到 proteinA-Agarose-抗体-蛋白-相互作用蛋白复合物的银染分析

1: 蛋白 maker 2: 6×His 抗体孵育 pIZT-V5/His-*BmArrestin2* 细胞系总蛋白 3: 正常兔血清孵育 pIZT-V5/His-*BmArrestin2* 细胞系总蛋白

Fig.10 The silver staining analysis of obtained complex of proteinA-Agarose-antibody-protein-interacting protein using co-immunoprecipitation
Lane1: protein Marker Lane2: anti-6×His antibody Lane3: normal rabbit serum

表 1 Co-IP 筛选获得的 BmArrestin2 互作蛋白的质谱鉴定

编号	蛋白名称
1	Actin-4 [Bombyx mori]
2	Actin-4 [Bombyx mori]
3	Actin-4 [Bombyx mori]
4	Actin-4 [Bombyx mori]
5	Actin A3 [Bombyx mori]
6	Actin-4 [Bombyx mori]
7	Actin-4 [Bombyx mori]
8	Actin-4 [Bombyx mori]
9	RecName: Full=Actin, cytoplasmic A3; Flags: Precursor
10	YKI3, partial4 [Bombyx mori]

3.讨论

根据表达谱分析发现，*BmArrestin2* 在气管丛中的相对表达量最高，因此 *BmArrestin2* 可能与家蚕气管丛的发育有关。有文献报道 β -arrestin1 和 β -arrestin2 双缺失的小鼠胚胎在出生后数小时内因为呼吸窘迫症状死亡。对新生小鼠胚胎肺部病理检测发现 β -arrestin1 和 β -arrestin2 双缺失小鼠肺部结构和生理指标方面成熟度延迟^[5]。气管丛在家蚕的呼吸系统中，*BmArrestin2* 在气管丛中表达量最高，暗示 *BmArrestin2* 可能对家蚕的呼吸也至关重要。昆虫体液免疫主要依赖抗菌肽的分泌，抗菌肽主要由表皮、血细胞和中肠等组织合成^[6]。昆虫的血液在昆虫的先天免疫系统中有重要作用^[7]。果蝇的血细胞是巨噬细胞样细胞，可以吞噬细菌和凋亡的细胞，还可以分泌细胞外基质组分和免疫肽^[8]。表达模式分析结果表明 *BmArrestin2* 在血，中肠，表皮中均有较高的表达量，提示 *BmArrestin2* 可能与免疫功能相关。已有报道称 β -arrestin2 在小鼠神经系统中广谱表达^[9]，在家蚕头部中也检测到了 *BmArrestin2* 的表达，暗示着 *BmArrestin2* 可能与家蚕神经系统的发育有关。*BmArrestin2* 在性腺不同发育时期的表达差异较大，以五龄 3 天的卵巢中表达量最

高。但目前已知的 β -arrestin2 功能中, 没有与性腺发育相关的功能被报道过。因此推测家蚕 BmArrestin2 可能有与其他物种不相同的作用。

在体外成功表达并且制备 BmArrestin2 的抗体有利于开展 BmArrestin2 的亚细胞定位及 BmArrestin2 功能的研究。由于大肠杆菌表达系统具有稳定、表达高效以及易于操作等优点, 因此被广大研究者使用^[10]。实验过程中, 考虑到 pET-28a (+) 载体含有的 6×His 标签小, 并且不容易影响表达蛋白的自身结构, 因此首先使用了 pET-28a (+) 载体拟对 BmArrestin2 全长蛋白进行表达, 但是预实验结果显示, 使用 pET-28a (+) 载体在大肠杆菌中诱导表达 BmArrestin2 有一定难度, 在实验过程中分别尝试了更改诱导温度, 诱导剂剂量以及诱导时间等均未成功诱导表达 BmArrestin2, 因此更换 pET-32a (+) 载体对 BmArrestin2 全长蛋白进行表达。

细胞亚定位的结果显示 BmArrestin2 主要分布在家蚕卵巢细胞的细胞质中, 这与文献报道中的一致, 推测家蚕 BmArrestin2 可能也具有相似的调节内吞和信号转导的功能。

广义的细胞骨架概念是细胞核骨架、细胞质骨架、细胞膜骨架和胞外基质所形成的网络体系, 胞质骨架中又含有微丝, 微管和中间纤维, 其中微丝主要由肌动蛋白 (actin) 构成。在哺乳动物中 β -arrestin2 是一种典型的细胞支架蛋白, 能够募集各种信号分子^[11]。免疫共沉淀的结果显示 BmArrestin2 能与 Actin 互作。在 Hippo 信号通路中, YKI 磷酸化后能被细胞支架蛋白滞留在细胞质内, 使其不能入核参与调控下游因子的转录, BmArrestin2 与 YKI3 的相互作用暗示 BmArrestin2 可能作为支架蛋白结合了磷酸化的 YKI3。

参考文献

- [1] Ma L, Pei G. Beta-arrestin signaling and regulation of transcription[J]. Journal of Cell Science, 2007, 120(Pt 2):213.
- [2] 汪庆童, 魏伟. β -arrestin 的生物学研究进展[J]. 生理科学进展, 2008, 39(2):162-164.
- [3] Goodman O B, Krupnick J G, Santini F, et al. β -Arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the β 2-adrenergic receptor[J]. Nature, 1996, 383(383):447-450.
- [4] Laporte S A, Oakley R H, Zhang J, et al. The β 2-adrenergic receptor/ β arrestin

- complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(7):3712-3717.
- [5] 张明凤. beta-arrestins缺失影响小鼠胚胎肺部发育成熟[D]. 中国科学院研究生院 中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所 中国科学院, 2008.
- [6] Hoffmann J A. The immune response of *Drosophila*. [J]. Nature, 2003, 426(6962):33.
- [7] Lemaitre B, Hoffmann J. The Host Defense of *Drosophila melanogaster* - Annual Review of Immunology, 25(1):697[J]. Insect Immunity Toll Imd Recognition Pathogens.
- [8] Brennan C A, Anderson K V. *Drosophila*: The Genetics of Innate Immune Recognition and Response[J]. Annual Review of Immunology, 2004, 22(1):457-483.
- [9] H Attramadal, J L Arriza, C Aoki, 等 . β -arrestin2, a novel member of the arrestin/ β -arrestin gene family[J]. 1992, 267(25):17882-17890.
- [10] Manning D S, Leong J C. Expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of infectious pancreatic necrosis virus[J]. Virology, 1990, 179(1):16-25.
- [11] Lefkowitz R J, Shenoy S K. Transduction of Receptor Signals by β -Arrestins[J]. Science, 2005, 308(5721):512.

第四章 调节 β -arrestin2 对家蚕基因表达以及培养细胞生长的影响

摘要:为了探讨 *BmArrestin2* 的功能,本研究检测了上下调 *BmArrestin2* 表达对 Hippo 信号通路上下游,生长相关通路以及免疫和凋亡相关通路基因表达量的影响;观察了 *BmArrestin2* 表达水平的变化对家蚕培养细胞的影响。结果显示:当 *BmArrestin2* 过表达时,Hippo 通路中 *kibra*、*ex* 表达水平上调;*wts*、*Bmpr* 的表达水平无明显变化;*wnt*、*yki*、*cyce*、*iap*、*Fj*、*dpp*、*serr*、*myc*、*crb* 表达水平下调。在生长相关通路基因中,*GASP*、*NkAB*、*DYNE*、*PSLR* 表达水平上调;*JH*、*PCL*、*LSAM* 表达水平无明显变化;而 *ECDY*、*CFAP*、*LACH*、*UMX* 表达水平下调。在天然免疫及凋亡相关通路中,*STAT*、*Tal*、*SPZ*、*APA*、*PGRP-LB*、*PGRP-LE* 表达水平下调;*SURF*、*QCTY* 表达水平无明显变化。当通过 RNAi 下调 *BmArrestin2* 表达量时,所测基因的表达水平变化总体上与过表达 *BmArrestin2* 时结果相反。流式细胞仪检测调节 *BmArrestin2* 表达对细胞大小,周期以及凋亡的影响,结果显示过表达 *BmArrestin2* 导致家蚕卵巢细胞体积变小、细胞周期变慢,但对细胞凋亡的作用不明显。

关键词: *BmArrestin2*; Hippo 信号; 免疫信号; 凋亡相关基因

在果蝇中,Hippo 信号通路的核心成分是由 HPO、SAV、WTS、MATS 和 YKI 组成的一个串联激酶^[1]。HPO 与 SAV 形成一个复合物磷酸化激活下游激酶 WTS。WTS 与 MATS 形成复合物磷酸化下游基因 *Yki*^[2],磷酸化的 YKI 失去调控下游信号分子的能力。*Mer*、*Ex* 和 *Kibra* 是 Hippo 信号通路的上游调控因子^[3]。*Ex* 的突变会造成果蝇翅的增生^[4]。*Mer* 最初作为人的肿瘤抑制因子被发现^[5],随后证明其在果蝇中也有类似功能^[6]。*Kibra* 与 *Mer* 类似,突变会导致组织的过度生长。*Kibra* 还可以与 *Mer-Ex* 复合体协同调节 Hippo 信号通路^[7]。Hippo 信号通路的下游基因包括生长因子 *Myc*^[8],细胞周期蛋白 *cyclins E* 以及包括 BMP、Wnt 在内的一些信号通路^[9]。

JAK/STAT、Toll、Imd 以及 RNAi 通路是昆虫体内与免疫相关的主要信号通路。

JAK/STAT 通路在进化上功能保守并且参与调节细胞增殖分化以及免疫调节等过程^[10,11]。当病毒感染昆虫时, JAK/STAT 通路被激活, 参与细胞免疫应答^[12,13]。目前已鉴定出的家蚕 JAK/STAT 信号通路的主要相关基因包括 *BmSTAT*、*BmHOP*、*BmSOCS* 等^[14]。在家蚕 Toll 通路中已经鉴定出了 11 个 Toll 相关受体和 2 个 Toll 类似物, 6 个类 Spz、11 个 PGRP, 两种编码 Dorsal 的 mRNA 以及 39 种 AMPs^[15]。免疫缺陷 (Imd) 通路类似于哺乳动物的肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 通路^[16], TNFR 通路在人类病毒感染性疾病中起着关键作用^[17]。Imd 通路中含有 *PGRP-LC* 和 *PGRP-LE*, 其中 PGRP-LE 作为识别蛋白介导 Imd 通路的活化^[18]。RNAi 通路是一种可以选择性地抑制基因表达的自然机制^[19,20], 在家蚕中已经鉴定出 RNAi 通路的同源蛋白 *BmDcr2*, *BmAgo2* 和 *BmR2D2*^[21]。

细胞凋亡是机体维持稳态的一种重要方式。*p53* 是一种重要的转录因子, 它主要通过下游靶基因的结合作用, 参与调节细胞增殖和细胞凋亡, 是一种抑癌因子和促细胞凋亡因子。*Apa* 是凋亡蛋白酶激活因子, 线粒体的内外膜之间的膜间腔内包含的细胞色素 C (cytochromeC, Cyt) 能够结合胞浆内的 *Apa*, 诱导其寡聚化并募集 pro-caspase-9 形成凋亡复合体^[22,23,24]。

为了研究 *BmArrestin2* 基因的功能, 本章通过定量 PCR 检测了上下调 *BmArrestin2* 基因表达对 Hippo 通路、生长相关通路、免疫通路和凋亡相关基因表达水平的影响, 研究了 *BmArrestin2* 基因表达水平的变化对家蚕培养细胞体积、周期及凋亡的影响。期望为理解 *BmArrestin2* 基因的功能提供线索。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 载体与生物材料

载体: pIZT-V5/His 载体为 Invitrogen 公司产品。

生物材料: 细胞来源于家蚕卵巢 BmN 细胞, pIZT-V5/His-*BmArrestin2* 以及 pIZT-V5/His-BmN 细胞系由本实验室保存。

1.1.2 工具酶及试剂盒

细胞凋亡检测试剂盒为博奥龙公司产品, 细胞周期检测试剂盒为碧云天公司产品。

1.1.3 其他试剂

本实验针对 *BmArrestin2* 设计的两种 siRNA 和对照 siRNA-GFP-274 由上海艾博思生物科技有限公司合成，三种 siRNA 的序列分别为：

LOC101742049-721 Sence 5'-GGUUGUGCAGCAUGUCGAAAU-3'
 Anti-sence 5'-UUCGACAUGCUGCACAACCAU-3'
 LOC101742049-256 Sence 5'-GGUGAUUGGACAAGAACAAGU-3'
 Anti-sence 5'-UUGUUCUUGUCCAAUCACCAU-3'
 siRNA-GFP-274 Sence 5'-GGCUACGUCCAGGAGCGCACC-3'
 Anti-sence 5'-UGCGCUCCUGGACGUAGCCUU-3'

1.2 实验方法

1.2.1 定量 PCR

根据家蚕 Hippo 信号通路上下游基因、JAK-STAT 信号通路相关基因、生长相关通路基因、细胞周期和凋亡相关通路基因序列设计定量引物，选择家蚕 *Actin* 基因作为内参，各引物的序列如下。

表1 定量PCR检测引物

引物名称	引物序列	检测基因
Re-Stat-1	ggagacggcaacgaagtttca	<i>BmStat</i>
Re-Stat-2	ttgggaacgttcgggtacaa	(signal transducer and activator of transcription)
Re-Wts2-1	tagaaaggcggcgagaag	<i>BmWts</i>
Re-Wts2-2	cgaccaccaatcgcaaagc	(warts)
RE-Kibra-1	ccgcgtgacgtcacacctg	<i>BmKibra</i>
RE-Kibra-2	tcgggcaaggcatctcacc	(kibra ortholog)
Re-Crb-1	gaacacgtgcattcaatgca	<i>BmCrb</i>
Re-Crb-2	aggaccgtcatctcgcaag	(Crumbs)
Re-Fj-1	gcggtgaaggtcctcgatga	<i>BmFj</i>
Re-Fj-2	cggcctcgtgatgaggactcc	(four-jointed)
RE-Serr-1	ctccatcatatggtagagt	<i>BmSerr</i>
RE-Serr-2	cgataggatatgtggtcagg	(serrate, Bm8 interacting protein precursor)
REex-1	cgaggcatgaccgatacgga	<i>Bmex</i>
REex-2	gcatctaatacatgagtgtg	(expanded)
REcat-1	gtcagtgaacgcacactgg	<i>Bmcat</i>
REcat-2	tctccgtggctcgttccacag	(catenin alpha)
RE-Dpp-1	gcacgtaccgacggagctcg	<i>BmDpp</i>
RE-Dpp-2	gagatcagcaccacgagctac	(decapentaplegic)

引物名称	引物序列	检测基因
RE-Wnt-1	cttgacaacaacgaagctgg	<i>BmWnt</i>
RE-Wnt-2	cctgaagctcggcagcctca	(<i>Bm. Wnt-1</i>)
RE-JH-1	aggagaccgggtattcgcac	<i>BmJH</i>
RE-JH-2	gtcaatgccgccttcatttc	(<i>Jheh-Ip4</i>)
RE-DYNE-1	tcgatcacagttaccggaag	<i>BmDYNE</i>
RE-DYNE-2	ctcaagttgtccagaagtccg	(<i>dynein</i>)
RE-UMX-1	cagtcggtatctacgcacgc	<i>BmUMX</i>
RE-UMX-2	cgcagttccacggcacacg	(<i>unconventional myosin-XV</i>)
RE-ECDY-1	ggagactcgtggactaacaac	<i>BmECDY</i>
RE-ECDY-2	tggtcgggtcaattgaagac	
RE-CFAP-1	caagtacgggtcccaattccagg	<i>BmCFAP</i>
RE-CFAP-2	gtagtacgttccggagtgtc	
RE-NKAB-1	aaggagcacatcaggaacatg	<i>BmNKAB</i>
RE-NKAB-2	gcctcgggtgaggtaggtactg	
RE-PCL-1	cacgaactggacgagtctgttg	<i>BmPCL</i>
RE-PCL-2	cgatacgtagatcgcgcag	(<i>Protein charybde-like</i>)
RE-SPZ-1	caggattcgcctcacagtcac	<i>BmSPZ</i>
RE-SPZ-2	cagttcgggatgcttctcgat	<i>spatzle-1 (SPZ1)</i>
RE-PGRP-LB-1	gaacagtgcagtagccgccatg	<i>BmPGRP-LB</i>
RE-PGRP-LB-2	cctcgatcgggtccatcctcg	(<i>peptidoglycan-recognition protein LB</i>)
RE-PGRP-LE-1	cactgcaacagaaagctgtag	<i>BmPGRP-LE</i>
RE-PGRP-LE-2	cgcaatatgccgatccgtcac	(<i>peptidoglycan-recognition protein LE</i>)
semi-A3-F	ctgcgtctggacttggc	<i>BmActin-3</i>
semi-A3-R	cgaggagctgctggat	(<i>BmActin-3</i>)

扩增条件参照第三章相关内容。

1.2.2 细胞大小的测定

(1) 消化：吸弃培养基，1×PBS 清洗细胞 3 次，加入 1mL 不含 EDTA 的胰蛋白酶处理 3-5min，当显微镜下观察到细胞出现间隙时即可向消化液中加入等量含 FBS 的培养基终止消化。

(2) 收集细胞：轻轻吹打细胞，收集混合液，4℃ 1000rpm/min 离心 5min，弃上清。

(3) 清洗：用预冷的 1×PBS 清洗收集的细胞，4℃ 1000rpm/min 离心 5min，弃上清。此步骤重复三次。

(4) 检测：用 1×PBS 重悬清洗后的细胞，调节其浓度为 1×10^6 个/mL，吸取 500μL

细胞悬液至流式管中，流式细胞仪（FC500，美国 Beckman Coulter）检测细胞相对大小。

1.2.3 细胞周期与细胞凋亡的测定

具体操作步骤参照试剂盒说明书。

2 结果与分析

2.1 过表达 *BmArrestin2* 基因对选择的家蚕基因表达水平的影响

提取 pIZT-V5/His-*BmArrestin2* 以及 pIZT-V5/His-BmN 的细胞系的 mRNA，反转录成 cDNA，通过定量 PCR 的方法检测过表达 *BmArrestin2* 对家蚕 Hippo 信号通路上下游基因、生长相关通路、免疫以及凋亡相关通路主要基因表达量的影响。实验结果显示，当 *BmArrestin2* 过表达时，Hippo 通路中 *kibra*、*ex* 表达水平上调；*wt*s、*Bmpr* 的表达水平无明显变化；*wnt*、*yki*、*cyce*、*iap*、*Fj*、*dpp*、*serr*、*myc*、*crb* 表达水平下调（图 1）。在生长相关通路基因中，*GASP*、*NkAB*、*DYNE*、*PSLR* 表达水平上调；*JH*、*PCL*、*LSAM* 表达量无明显变化；而 *ECDY*、*CFAP*、*LACH*、*UMX* 表达水平下调（图 2）。在天然免疫及凋亡相关通路的中，*STAT*、*Tal*、*SPZ*、*APA*、*PGRP-LB*、*PGRP-LE* 表达水平下调；*SURF*、*QCTY* 表达水平无明显变化（图 3）。

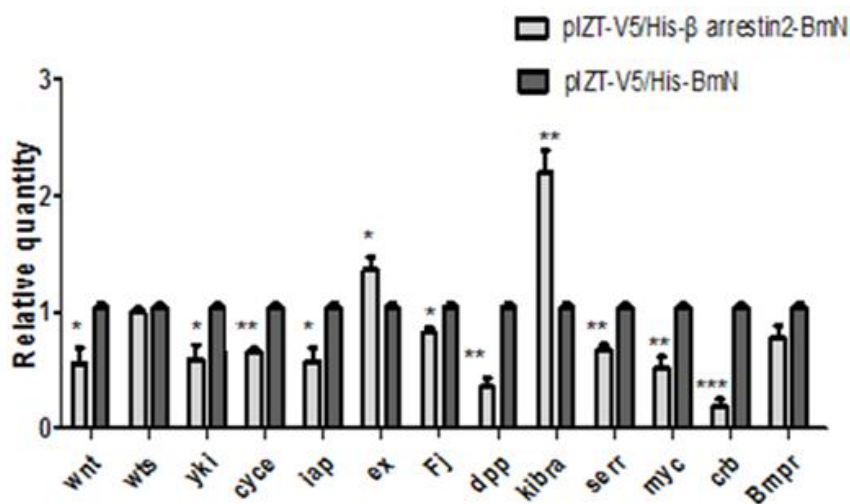


图 1 过表达 *BmArrestin2* 基因后家蚕 Hippo 通路上下游主要基因的相对表达丰度（实验组与 wt 对照进行比较，***p<0.001，**p<0.01，*p<0.05）

Fig. 1 The relative expression level of the main upstream and downstream genes in

Hippo pathway when overexpressing *BmArrestin2* (experimental group were compared with wild-type controls,*** $p<0.001$, ** $p<0.01$, * $p<0.05$)

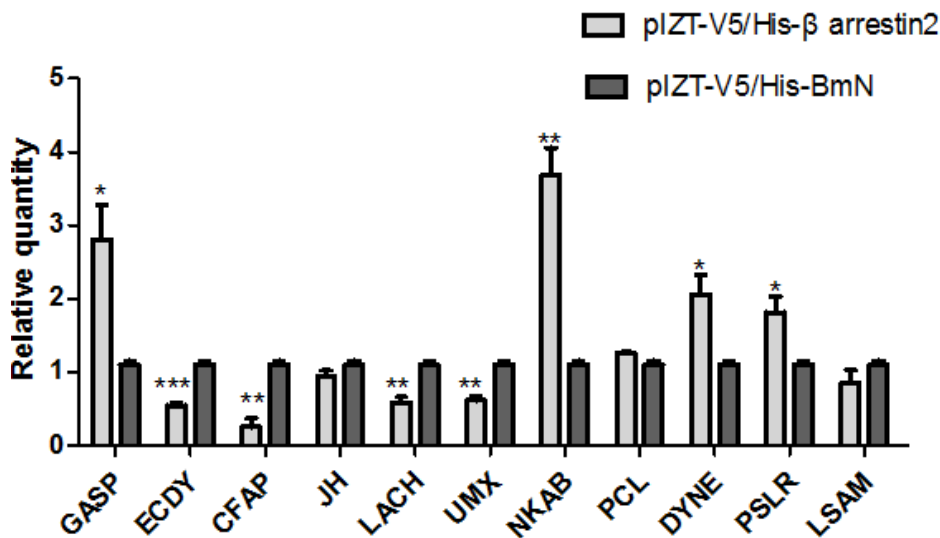


图 2 过表达 *BmArrestin2* 基因后家蚕生长相关通路主要基因的相对表达丰度 (实验组与 wt 对照进行比较, *** $p<0.001$, ** $p<0.01$, * $p<0.05$)

Fig. 2 The relative expression level of genes related to growth of silkworm when overexpressing *BmArrestin2* (experimental group were compared with wild-type controls,*** $p<0.001$, ** $p<0.01$, * $p<0.05$)

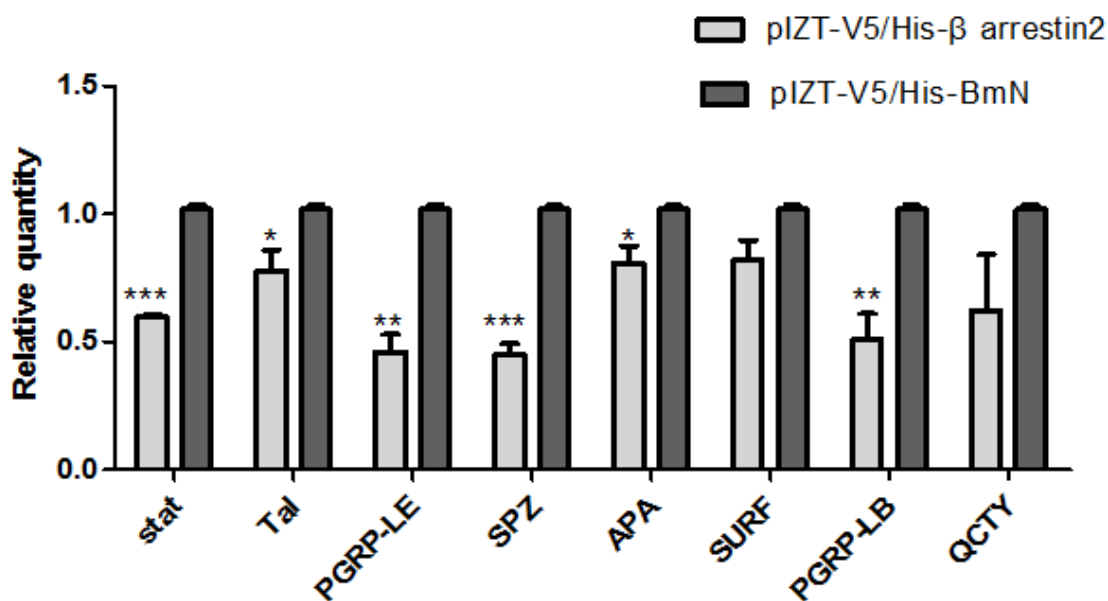


图 3 过表达 *BmArrestin2* 基因后免疫和凋亡通路的相对表达丰度 (实验组与 wt 对照进行比较, *** $p<0.001$, ** $p<0.01$, * $p<0.05$)

Fig. 3 The relative expression level of genes related to immune and apoptosis
(experimental group were compared with wild-type controls,*** $p<0.001$, ** $p<0.01$,
* $p<0.05$)

2.2 Arrestin2-siRNA 干扰 BmN 细胞中 *BmArrestin2* 基因表达效果的检测

将合成的 Arrestin2-siRNA 与 GFP-siRNA 分别转染 BmN 细胞, 48h 后提取细胞 mRNA 并反转录成 cDNA, 以转染 GFP-siRNA 的 BmN 细胞为对照, 通过定量 PCR 的方法检测两种 siRNA 对 *BmArrestin2* 基因干扰的效果(图 4)。实验结果显示, siRNA-Arrestin2-256 转染后, 所测基因的表达水平降低了 43%, 具有显著性差异, siRNA-Arrestin2-721 的沉默基因表达作用不明显。

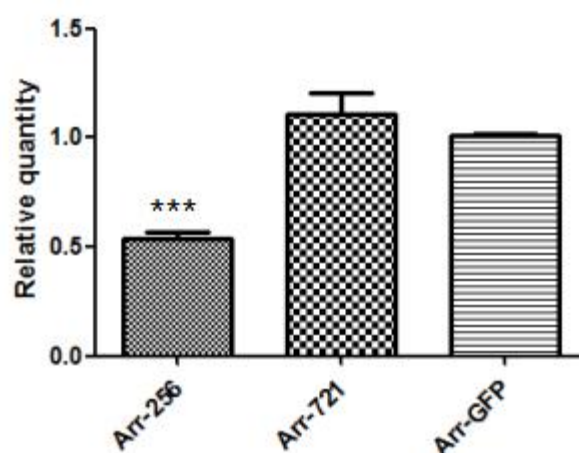


图 4 siRNA 对 *BmArrestin2* 基因的沉默效果

(实验组与 wt 对照进行比较, *** $p<0.001$, ** $p<0.01$, * $p<0.05$)

Fig.4 The relative abundance of *BmArrestin2* gene after the BmN cells were transfected with siRNAs (experimental group were compared with wild-type controls,*** $p<0.001$, ** $p<0.01$, * $p<0.05$)

2.3 抑制家蚕 *BmArrestin2* 基因对选择的家蚕基因表达水平的影响

将 siRNA-Arrestin2-256 和 siRNA-GFP 分别转染家蚕 BmN 细胞, 48h 后提取 mRNA, 反转录成 cDNA。通过定量 PCR 的方法检测抑制 *BmArrestin2* 表达对家蚕 Hippo 信号通路上下游, 生长相关通路, 免疫相关通路以及凋亡相关通路主要基因

表达量的影响。实验结果显示,当干扰 *BmArrestin2* 表达时, Hippo 通路中 *wt*s、*iap*、*Fj*、*serr* 表达水平上调; *wnt*、*kibra*、*cyce*、*cat*、*dpp*、*myc*、*crb*、*Bmpr* 的表达水平无明显变化; *ex* 表达水平下调(图 5)。在生长相关通路基因中, *CFAP*、*LACH* 表达水平上调; *JH*、*ECDY*、*DYNE*、*UMX*、*PCL*、*NkAB*、*LSAM* 表达量无明显变化(图 6)。在天然免疫及凋亡相关通路的中, *PGRP-LE*、*dcr* 表达水平上调; *STAT*、*Tal*、*SPZ*、*SURF*、*SUR*、*p53* 表达水平无明显变化(图 7)。

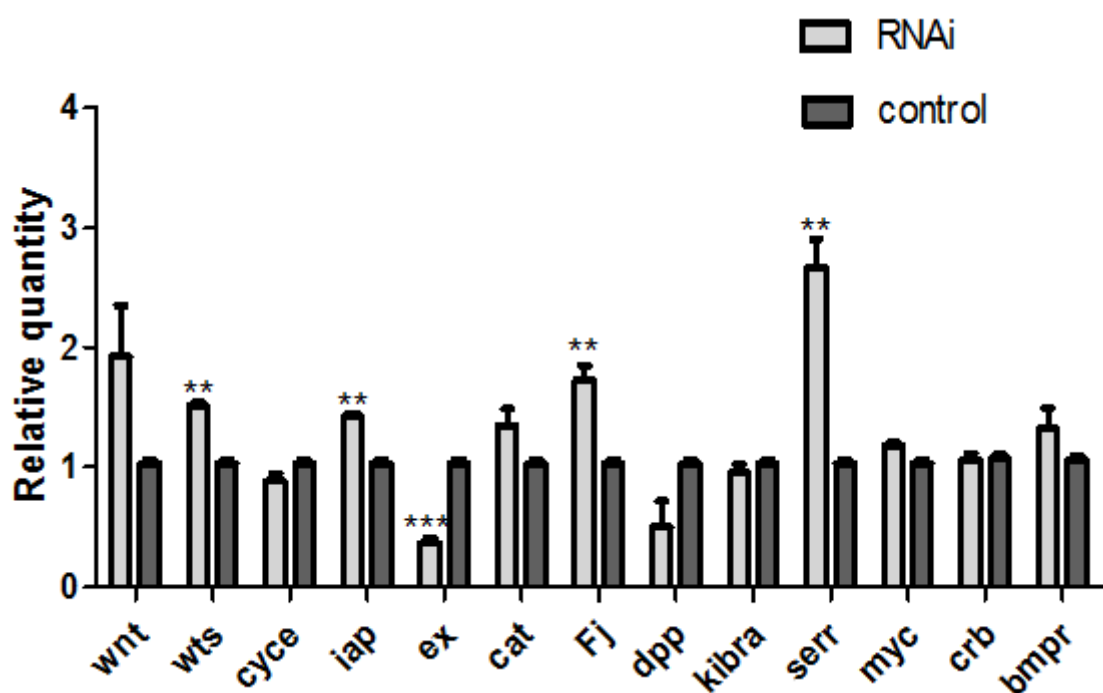


图 5 抑制 *BmArrestin2* 基因后家蚕 Hippo 通路上下游主要基因的相对表达丰度
(实验组与 wt 对照进行比较, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$)

Fig. 5 The relative abundance of the main upstream and downstream genes in Hippo pathway after RNA interference (experimental group were compared with wild-type controls, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$)

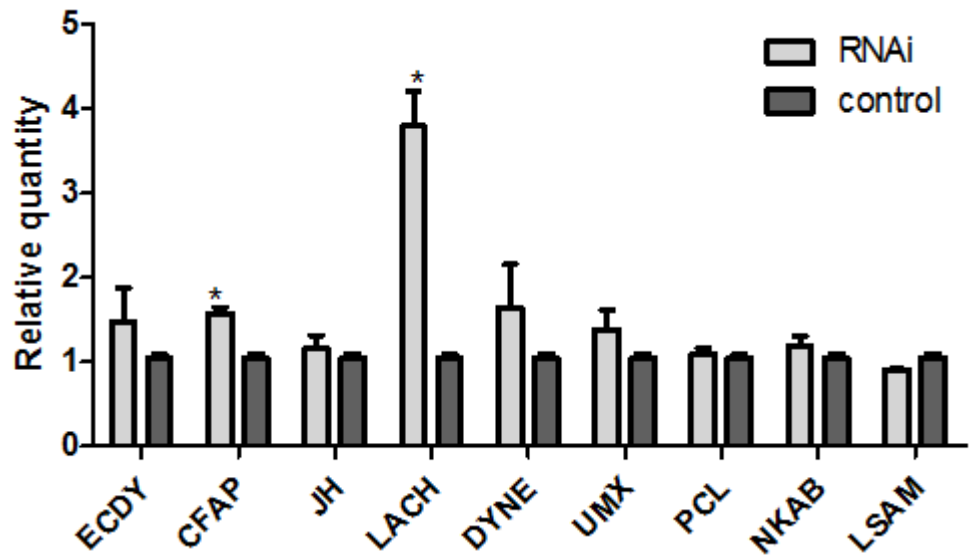


图 6 抑制 *BmArrestin2* 基因后家蚕生长相关通路主要基因的相对表达丰度（实验组与 wt 对照进行比较，*** $p<0.001$ ，** $p<0.01$ ，* $p<0.05$ ）

Fig. 6 The effects of of inhibiting Bmarrestin2 on expression level of the genes related to growth of silkworm (experimental group were compared with wild-type controls,*** $p<0.001$ ，** $p<0.01$ ，* $p<0.05$)

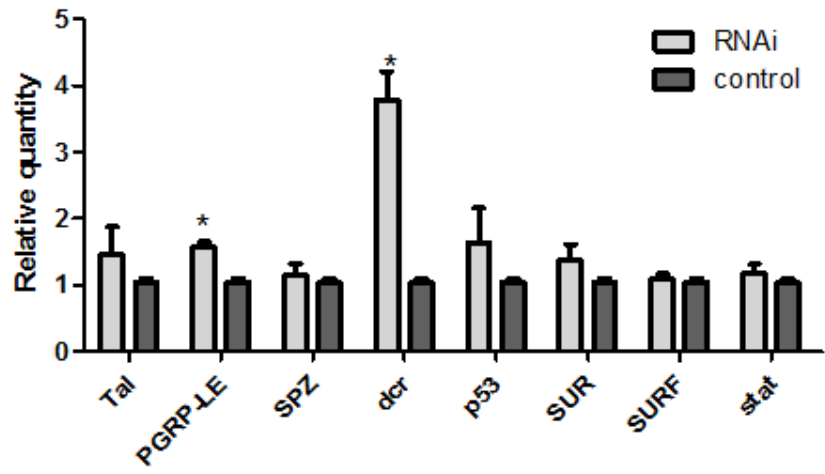


图 7 抑制 *BmArrestin2* 基因后家蚕免疫以及凋亡通路主要基因的相对表达丰度（实验组与 wt 对照进行比较，*** $p<0.001$ ，** $p<0.01$ ，* $p<0.05$ ）

Fig. 7 The relative abundance of the maingenes immune and apoptosis pathways after RNA interference (experimental group were compared with wild-type controls,*** $p<0.001$ ，** $p<0.01$ ，* $p<0.05$)

2.4 过表达 *BmArrestin2* 对家蚕卵巢细胞培育的影响

2.4.1 过表达 *BmArrestin2* 对家蚕卵巢细胞大小的影响

分别取 1×10^6 个pIZT-V5/His-*BmArrestin2*，pIZT-V5/His-BmN以及BmN细胞，流式细胞仪检测三种细胞的相对大小（图8）。结果显示pIZT-V5/His-*BmArrestin2*细胞系中较小细胞所占比例为56.99%，57.23%；pIZT-V5/His-BmN 细胞系中较小细胞所占比例48%，49.55%；BmN细胞系中较小细胞所占比例为41.33%，44.57%。三种细胞系比较发现pIZT-V5/His-*BmArrestin2*细胞系中较小细胞所占的比例最大，说明pIZT-V5/His-*BmArrestin2*细胞系中含有的小细胞比例最多，即细胞相对较小。（表1）。

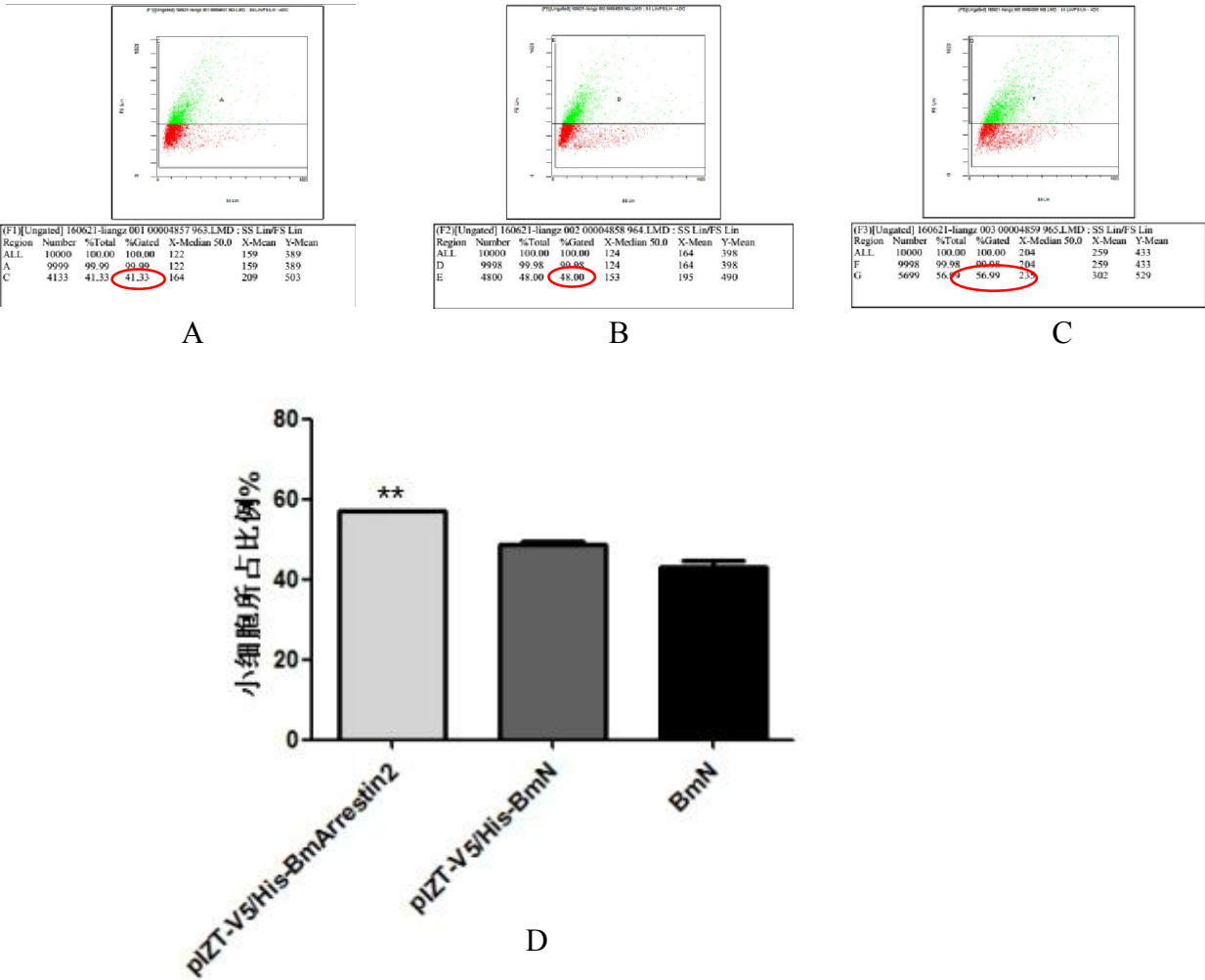


图 8 流式细胞仪分析野生型与稳定转定转化细胞系大小
(实验组与 wt 对照进行比较, *** $p<0.001$, ** $p<0.01$, * $p<0.05$)
A: BmN 细胞系 B: pIZT-V5/His-BmN 细胞系 C:
pIZT-V5/His-*BmArrestin2*-BmN 细胞系 D: 三种细胞系比较

Fig. 8 The cell size analysis of wide type and transgenic cells using DNA Flow Cytometry (experimental group were compared with wild-type controls,***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05)

A:BmN cells B:pIZT-V5/His-BmN cells C:pIZT-V5/His-*Bmarrsetin2*-BmN cells
D:The cell size comparison among three kinds of cells

表 1 野生型与稳定转定转化细胞系中小细胞所含比例比较(n=2)

细胞类型	pIZT-V5/His-BmN	pIZT-V5/His- <i>Bmarrsetin2</i> -BmN	BmN
较小细胞所占52比例 (%)	49.55	56.99	41.33
		57.23	44.57

2.4.2 过表达 *BmArrestin2* 基因对家蚕卵巢细胞生长周期的影响

取生长状态良好的 1×10⁶ 个 pIZT-V5/His-*BmArrestin2*, pIZT-V5/His-BmN 细胞同时传代, 48h 后无血清培养基同步化处理, 同步化 48h 后收集细胞, 流式细胞仪检测不同细胞系的细胞周期。结果显示, pIZT-V5/His-BmN 细胞系中处于 G1 期的细胞比例低于 pIZT-V5/His-*BmArrestin2* 细胞系; 处于 S 期+G2 期的细胞比例高于 pIZT-V5/His-*BmArrestin2* 细胞系, 说明 pIZT-V5/His-*BmArrestin2* 细胞系中处在增殖期的细胞数量比对照组少 (图 9、表 2)。

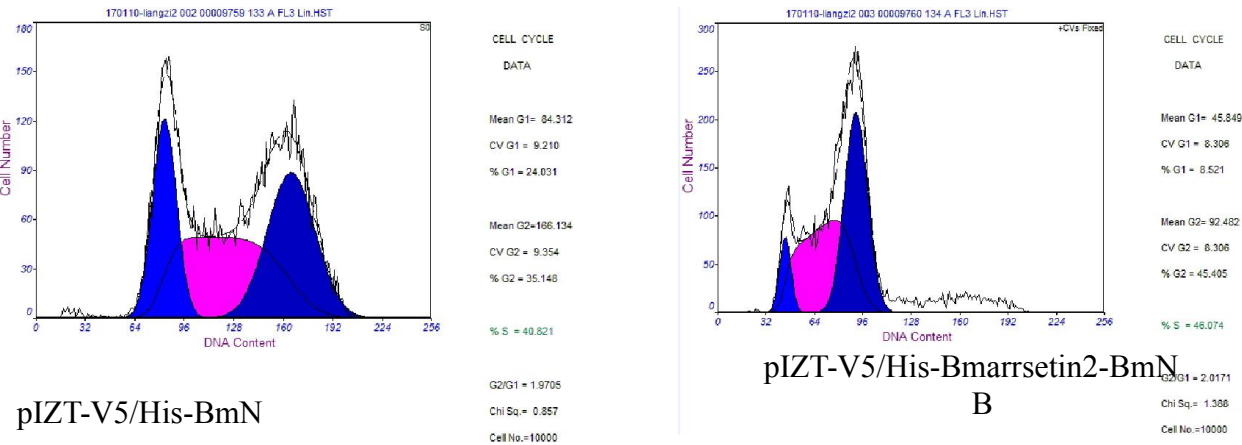


图 9 稳定转化细胞系周期

A:pIZT-V5/His-BmN 细胞系周期 B: pIZT-V5/His-Bmarrsetin2-BmN 细胞系周期
C: pIZT-V5/His-BmN 和 pIZT-V5/His-Bmarrsetin2-BmN 细胞系周期比较

Fig. 9 The cell cycles of transgenic cells

A:The cell cycles of pIZT-V5/His-BmN cells

B:The cell cycles of pIZT-V5/His-Bmarrsetin2-BmN cells

C:The cell cycles comparison between pIZT-V5/His-BmN cells and
pIZT-V5/His-Bmarrsetin2-BmN cells

表 2 稳定转基因系细胞周期

细胞类型	G1 期(%)	S 期 (%)	G2 期(%)	S 期+G2 期(%)
pIZT-V5/His-BmN	8.521	46.074	45.405	91.479
pIZT-V5/His- <i>BmArrestin2</i>	24.031	40.821	35.148	75.659
pIZT-V5/His-BmN	10.933	47.248	41.82	89.068
pIZT-V5/His- <i>BmArrestin2</i>	14.478	57.1	28.421	85.521
pIZT-V5/His-BmN	10.341	41.356	48.303	89.659
pIZT-V5/His- <i>BmArrestin2</i>	13.115	45.473	41.413	86.886

2.5 下调 *BmArrestin2* 基因对家蚕卵巢细胞培育的影响

2.5.1 下调 *BmArrestin2* 基因对家蚕卵巢细胞大小的影响

2 μ g siRNA-Arrestin2-256和siRNA-GFP分别转染BmN细胞，48h后更换无血清培养基同步化处理48h，流式细胞仪检测细胞的相对大小（图10）。结果显示 siRNA-Arrestin2-256处理后的细胞中较大细胞所占比例为57.31%，57.84%；GFP-siRNA处理后的细胞较大细胞所占比例为53.87%，52.46%（表3）。表明抑制 *BmArrestin2* 的表达导致细胞体积增大。

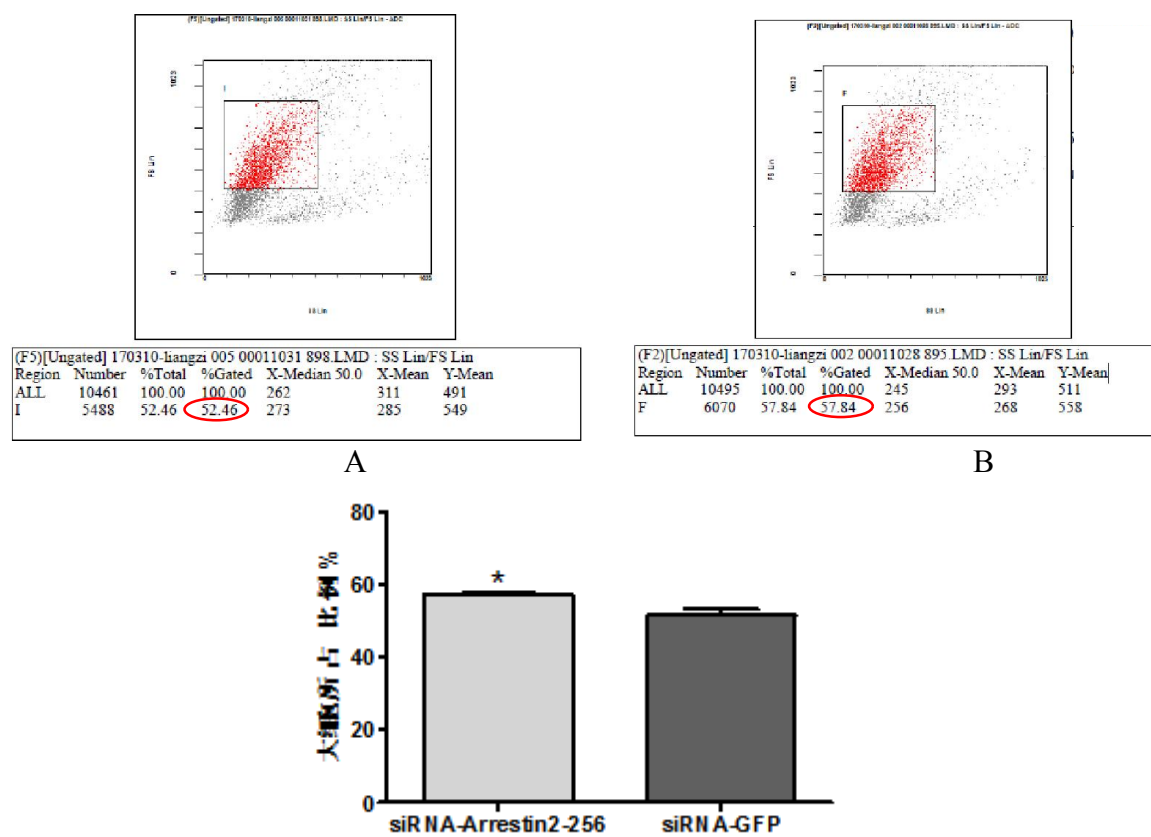


图 10 siRNA-Arrestin2-256 或 siRNA-GFP 处理后细胞大小(实验组与 wt 对照进行比较, ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05)

A:siRNA-Arrestin2-256 B: siRNA-GFP

Fig 10 The cell size analysis of siRNA-Arrestin2-256 or siRNA-GFP treatment cells using DNA Flow Cytometry (experimental group were compared with wild-type controls,***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05)

A:siRNA-Arrestin2-256 B: siRNA-GFP

表 3 siRNA-Arrestin2-256 或 siRNA-GFP 处理后总细胞数中大细胞所占比例 (%) (n=2)

细胞类型	Arrestin2-siRNA 干扰	GFP-siRNA 干扰
较大细胞所占比例 (%)	57.31	53.87
	57.84	52.46

2.5.2 下调*BmArrestin2*基因对家蚕卵巢细胞凋亡的影响

2ug siRNA-Arrestin2-256和siRNA-GFP分别转染BmN细胞，72h后收集细胞，流式细胞仪检测细胞凋亡。结果显示siRNA-Arrestin2-256处理后的细胞早期凋亡的比例与siRNA-GFP对照组相比降低，而晚期凋亡的比例与对照组相比没有太大变化（图11，表4）。

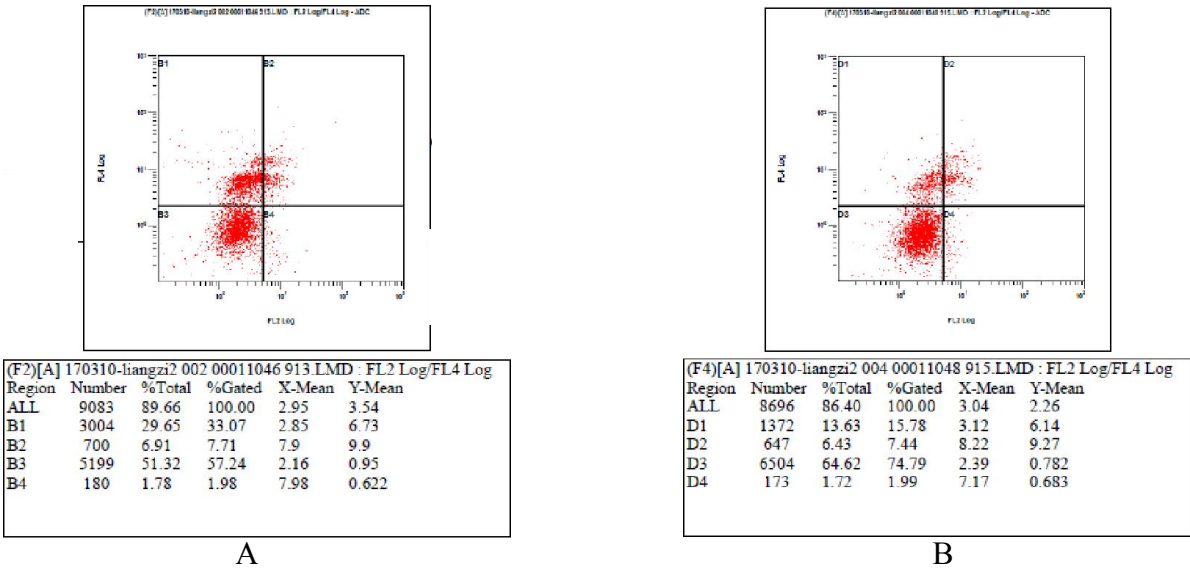


图 11 siRNA-Arrestin2-256 或 siRNA-GFP 处理后的细胞凋亡

A:siRNA-GFP B:siRNA-Arrestin2-256

Fig 11 The cell apoptosis after siRNA-Arrestin2-256 or siRNA-GFP treatment

A:siRNA-GFP B:siRNA-Arrestin2-256

表 4 siRNA-Arrestin2-256 或 siRNA-GFP 处理后的细胞凋亡

	siRNA-Arrestin2-256	siRNA-GFP
早期凋亡	6.43%	7.5%
	5.00%	6.91%
晚期凋亡	1.72%	1.72%
	1.60%	1.78%

3 讨论

Hippo 信号通路不仅在果蝇和哺乳动物中都有精准的调控且高度保守,在鳞翅目模式生物家蚕中同样存在。通过 real-time PCR 检测调节 *BmArrestin2* 表达量的变化对 Hippo 相关通路上下游基因的影响,结果显示高表达的 *BmArrestin2* 会引起 Hippo 信号通路中的 *yki* 及其下游因子的下调,包括生长因子 *Myc*, 细胞周期相关因子 *cyce*、促进细胞增殖的 Wnt 信号通路等。上游调控因子 *Ex*, *Kibra* 上调, *wts* 基因的表达无明显变化。WTS 是 NDR 家族蛋白激酶,它被磷酸化激活后与 MATS 形成复合物,磷酸化并抑制下游基因 *yki*^[25],磷酸化的 YKI 能与细胞骨架蛋白作用滞留于细胞质中,失去调控下游靶基因转录的功能。Hippo 信号通路通过负反馈调节机制更加精准的进行调控^[3], *Mer*、*Ex* 和 *Kibra* 可促进 *Wts* 的磷酸化水平,而 Hippo 信号通路下游因子会反过来抑制 *Mer* 和 *Ex* 的蛋白水平。 β -arrestin2 是一种典型的细胞骨架蛋白, *BmArrestin2* 过表达的细胞系中 *yki* 的表达量降低,且 *BmArrestin2* 能够与 YKI3 免疫共沉淀,因此推测 *BmArrestin2* 能够与磷酸化的 YKI 结合使其滞留在细胞质中,从而参与调节 Hippo 信号通路下游靶基因的转录。本研究发现,过表达 *Bmarrestin2* 的细胞系细胞体积变小,抑制 *Bmarrestin2* 表达导致细胞体积增大,推测与 *BmArrestin2* 抑制 *yki* 表达、*BmArrestin2* 能够与磷酸化的 YKI 结合使其滞留在细胞质有关。有文献报道 β -arrestin2 是生长发育的负调控因子,而且在培养过表达 *BmArrestin2* 的细胞系时也发现其生长速度较慢,因此检测了生长相关通路基因的表达量变化。结果显示,在过表达 *BmArrestin2* 的细胞系中,细胞周期相关因子 *cyce* 基因表达下调,流式细胞仪检测细胞周期结果也显示,过表达 *BmArrestin2* 可以增加 G1 期的细胞比例,减少 S+G2 期的细胞的比例,因此认为 *BmArrestin2* 可以影响细胞周期。qPCR 检测结果显示,与细胞免疫通路相关的基因 *STAT*、*Tal*、*SPZ*、*APA*、*PGRP-LB*、*PGRP-LE* 基因表达水平下调,表明 *BmArrestin2* 过表达可抑制 JAK/STAT、Toll、Imd 通路的活性。在抑制 *BmArrestin2* 表达时,细胞早期凋亡的比例、与凋亡相关基因 (*p53*、*SUR*) 的表达与对照差异不明显。文献报道哺乳动物以及果蝇中 β -arrestin2 参与调节生长发育以及细胞凋亡主要是通过调节与之相关的信号通路实现的,但是家蚕中的 *BmArrestin2* 对凋亡相关信号通路的调节能力较弱。

参考文献

- [1] Justice, R.W., Zilian, O., Woods, D.F., Noll, M. and Bryant, P.J. The *Drosophila* tumor suppressor gene *warts* encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. *Genes Dev.* 1995, 9: 534–546.
- [2] Dong, J., Feldmann, G., Huang, J., Wu, S., Zhang, N., Comerford, S.A., Gayyed, M.F., Anders, R.A., Maitra, A. and Pan, D. Elucidation of a Universal Size-Control Mechanism in *Drosophila* and Mammals. *Cell*, 2007, 130: 1120–1133 .
- [3] 钱莹. 家蚕 Hippo 信号通路主要基因的研究[D]. 苏州大学, 2014.
- [4] Boedigheimer, M. and Laughon, A. Expanded: a gene involved in the control of cell proliferation in imaginal discs. *Development*. 1993, 118: 1291–1301.
- [5] Gusella, J.F., Ramesh, V., MacCollin, M. and Jacoby, L.B. Neurofibromatosis 2: loss of merlin's protective spell. *Curr Opin Genet Dev*, 1996, 6: 87–92.
- [6] LaJeunesse, D.R., McCartney, B.M. and Fehon, R.G. Structural analysis of *Drosophila* merlin reveals functional domains important for growth control and subcellular localization. *J Cell Biol*, 1998, 141: 1589–1599.
- [7] Nolo, R., Morrison, C.M., Tao, C., Zhang, X. and Halder, G. The bantam microRNA is a target of the hippo tumor-suppressor pathway. *Curr Biol*, 2006, 16: 1895–1904.
- [8] Tapon, N., Harvey, K.F., Bell, D.W., Wahrer, D.C., Schiripo, T.A., Haber, D.A. and Hariharan, I.K. Salvador Promotes both cell cycle exit and apoptosis in *Drosophila* and is mutated in human cancer cell lines. *Cell*, 2002, 110: 467–478.
- [9] Cho, E., Feng, Y., Rauskolb, C., Maitra, S., Fehon, R. and Irvine, K.D. Delineation of a Fat tumor suppressor pathway. *Nat Genet*, 2006, 38: 1142–1150.
- [10] Brivanlou A H, Darnell J E. Signal Transduction and the Control of Gene Expression[J]. *Science*, 2002, 295(5556):813-818.
- [11] Hombria C G, Brown S. The Fertile Field of *Drosophila*, JAK/STAT Signalling[J]. *Current Biology*, 2002, 12(16):R569-75.
- [12] Arbouzova N I, Zeidler M P. JAK/STAT signaling in *Drosophila*: Insights into conserved regulatory and cellular functions[J]. *Development*, 2006, 133(14):2605-2616.
- [13] You Z, Xu D, Ji J, et al. JAK/STAT signal pathway activation promotes progression

- and survival of human oesophageal squamous cell carcinoma.[J]. Clinical and Translational Oncology, 2012, 14(2):143-149.
- [14] 彭景琨, 曹广力, 钱莹,等. 家蚕 JAK/STAT 信号通路相关基因克隆与分析[J]. 中国农业科学, 2012, 45(17):3592-3601.
- [15] Cheng T C, Xia Q Y, Ping-Zhen X U, et al. Identification and comparative analysis of immune-related genes and signaling pathways in the silkworm, *Bombyx mori*[J]. Acta Entomologica Sinica, 2009.
- [16] Leulier F, Rodriguez A, Khush R S, et al. The *Drosophila*, caspase Dredd is required to resist Gram-negative bacterial infection[J]. Embo Reports, 2000, 1(4):353-358.
- [17] Herbein G, O'Brien W A. Tumor necrosis factor (TNF)-alpha and TNF receptors in viral pathogenesis.[J]. Experimental Biology and Medicine, 2000, 223(3):241-257.
- [18] Jousset F X, Bergoin M, Revet B. Characterization of the *Drosophila* C virus[J]. Journal of General Virology, 1977, 34(2):269.
- [19] Ambros V. MicroRNA Pathways in Flies and Worms : Growth, Death, Fat, Stress, and Timing[J]. Cell, 2003, 113(6):673-676.
- [20] Cerutti H. RNA interference: traveling in the cell and gaining functions?[J]. Trends in Genetics, 2003, 19(1):39-46.
- [21] Zhu L, Tatsuke T, Li Z, et al. Molecular cloning of BmTUDOR-SN, and analysis of its role in the RNAi pathway in the silkworm, *Bombyx mori*, (Lepidoptera: Bombycidae)[J]. Applied Entomology and Zoology, 2012, 47(3):207-215.
- [22] Benedict M A, Hu Y, Inohara N, et al. Expression and Functional Analysis of Apaf-1 Isoforms[J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(12):8461.
- [23] 周瑞祥. 缺血性脑损伤后神经元凋亡相关基因表达的研究进展[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2002, 29(2):106-109.
- [24] 杨宾侠, 王永利. 缺血再灌注后脑细胞凋亡和 Caspase-3 蛋白的表达[J]. 郑州大学学报(医学版), 2003, 38(2):205-207.
- [25] Dong J, Feldmann G, Huang J, et al. Elucidation of a Universal Size-Control Mechanism in *Drosophila*, and Mammals[J]. Cell, 2007, 130(6):1120-1133.

第五章 调节 *BmArrestin2* 基因表达对 *BmNPV*、 *BmCPV* 感染的影响

摘要：为了进一步鉴定 *BmArrestin2* 基因的功能，研究了过表达 *BmArrestin2* 对病毒感染细胞的影响。Western blot 检测结果显示，过表达 *BmArrestin2* 的细胞对 *BmNPV*、*BmCPV* 的感染性都增强。qPCR 检测了病毒感染正常细胞后 *BmArrestin2* 表达量的变化，结果显示，病毒感染可引起内源性 *BmArrestin2* 的表达水平降低。同时，调查了抗体封闭 *BmArrestin2* 对病毒感染细胞的影响，发现抗体封闭降低病毒对细胞的感染能力，表明 *BmArrestin2* 参与病毒对细胞的感染。

关键词：*BmArrestin2*、病毒感染、受体、*BmCPV*、*BmNPV*

家蚕质型多角体病毒(*Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus, *BmCPV*)和家蚕核型多角体病毒(*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, *BmNPV*)是分别引起家蚕中肠型脓病和血液型脓病的病原。*BmNPV* 属于杆状病毒家族，是感染节肢动物的一种无脊椎病毒，具有一个 130Kbp 的环状双链 DNA 基因组^[1]。*BmCPV* 属呼肠弧病毒科质多角体病毒属，它的基因组由十个分子量不同但末端具有相似保守序列的 dsRNA 构成。*BmCPV* 病潜伏周期较长，死亡周期也较长^[2]。

根据文献报道， β -*arrestin2* 可以介导内吞并且可以降低细胞的固有免疫^[3-5]。本研究室的以往研究结果显示，*BmCPV* 可能通过内吞途径进入细胞；上一章的研究结果提示，*BmArrestin2* 对家蚕的天然免疫通路相关基因有调节作用。因此本章探讨调节 *BmArrestin2* 表达对细胞感染病毒的影响。

1. 材料与方法

1.1 材料

家蚕卵巢细胞系、核型多角体病毒 (*BmNPV*)、质型多角体病毒 (*BmCPV*) 由本实验室保存。

1.2 实验方法

1.2.1 *BmNPV*、*BmCPV* 多角体的扩增

取 4℃ 保存的病毒多角体，无菌水重悬调至浓度为 1×10^9 个/mL。将 BmNPV 及 BmCPV 多角体均匀涂抹在桑叶上，待桑叶晾干后添食五龄和三龄饲食后的家蚕，8h 后更换新鲜桑叶正常培养至有明显病症时，提取发病家蚕的组织，感染 BmCPV 的后部中肠用 PBS 清洗后四层纱布过滤，6000r/min 离心 10min 取上清，0.1%SDS 清洗沉淀。

1.2.2 BmNPV、BmCPV 病毒粒子的制备

(1) 裂解液的配制：将 0.1mol/L Na_2CO_3 与 0.1mol/L NaHCO_3 按 9:1 的比例配制成裂解液

(2) 裂解：向多角体中加入适量裂解液，混匀，37℃-40℃ 孵育至乳白色消失变澄清。

(3) PH 调节：将澄清后的溶液用 1mol/L HCl 中和至 pH 8.0。12000r/min 离心 10min，上清即为病毒粒子溶液。

1.2.3 BmNPV、BmCPV 病毒粒子感染细胞

待细胞铺满六孔板，加入制备的 BmNPV 及 BmCPV 病毒粒子，4℃ 放置 30min 后 26℃ 培养 30min，吸弃含有病毒粒子的培养基，用 1×PBS 洗三遍后 26℃ 继续培养 48h，1×PBS 洗细胞三次后收集细胞总蛋白，Western blot 分析细胞内含有的 BmNPV-ODV、BmCPV-S7 蛋白的量。检测病毒感染细胞后内源 *BmArrestin2* 表达量的变化时，4℃ 孵育 30min 后，在无菌操作台中每 5min 收集病毒粒子感染后的细胞，相同时间间隔收集未处理的对照组细胞，提取 mRNA，反转录成 cDNA 后 real-time PCR 检测 *BmArrestin2* 的变化。

1.2.4 检测大分子量的抗体能否进入活细胞

用不含 FBS 的培养基稀释抗体至终浓度为 50ug/mL，分别将稀释好的自制 BmArrestin2 抗体以及未免小鼠血清孵育活细胞 1h，吸弃含有抗体的培养基，1×PBS 洗三遍后 4%多聚甲醛固定细胞，5% BSA 封闭后孵育 1:300 倍稀释的 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG，1:1000 倍稀释的 DAPI 染核后，晾干，封片，共聚焦观察。

1.2.5 抗体封闭

将 BmArrestin2 抗体与未免小鼠血清分别以浓度为 25ug/mL，50ug/mL，100ug/mL 的浓度稀释到无血清培养基中，26℃ 孵育 1h 后吸取含有抗体的培养基，1×PBS 洗三次后加入含有病毒粒子的培养基，4℃ 放置 30min 后 26℃ 培养 30min，

吸弃含有病毒粒子的培养基, 用 $1\times$ PBS 洗三遍后 26°C 继续培养 48h, $1\times$ PBS 洗细胞三次后加入 RNAiso Reagent(TaKaRa)提取总 RNA, 定量 PCR 检测细胞中含有的 *Bm59* 基因及 *BmCPVs1* 基因的表达水平, 分析抗体封闭内源 *BmArrestin2* 对病毒感染细胞的影响。

1.2.6 病毒粒子标记

4°C 保存的病毒多角体用 0.1% (w/v) SDS 洗至少三遍, 6000 r/min, 10 min, 用无菌水悬浮多角体 ($10^5/\text{mL}$), 添食饥饿处理后的家蚕 (菁松 $\times$ 皓月), 8 h 后用新鲜桑叶饲养, 待家蚕出现明显发病现象, 剖蚕取中肠或血, 匀浆后用四层纱布过滤, 滤液 6000 r/min, 10 min, 取上清, 60000 r/min 超离 3 h, 获得病毒粒子沉淀。将病毒粒子溶解于 0.05 mol/L 碳酸氢钠溶液中 (pH8.5) 后, 与 $50\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的琥珀酰亚胺酯 A546 标记物黑暗条件下室温孵育 90 min, 4°C 避光透析过夜, 标记后的病毒粒子储存于 4°C 。

2 结果与分析

2.1 过表达 *BmArrestin2* 对 *BmNPV*、*BmCPV* 感染细胞的影响

为了研究过表达 *BmArrestin2* 对 *BmNPV*、*BmCPV* 感染细胞的影响, 分别用 *BmNPV*、*BmCPV* 接种 pIZT-V5/His-*BmArrestin2* 和 pIZT-V5/His-BmN 细胞系, Western blot 分析 48h 后细胞内含有的病毒蛋白水平, *BmNPV* 的病毒蛋白用 *BmNPV*-ODV 抗体检测, *BmCPV* 的病毒蛋白用 *BmCPV*-S7 抗体检测。结果显示, pIZT-V5/His-*BmArrestin2* 细胞系中检测到的 *BmNPV* 的 ODV 蛋白、*BmCPV* 的 S7 蛋白水平比 pIZT-V5/His-BmN 细胞系的高, 说明过表达的 *BmArrestin2* 对病毒感染有促进作用 (图 1)。

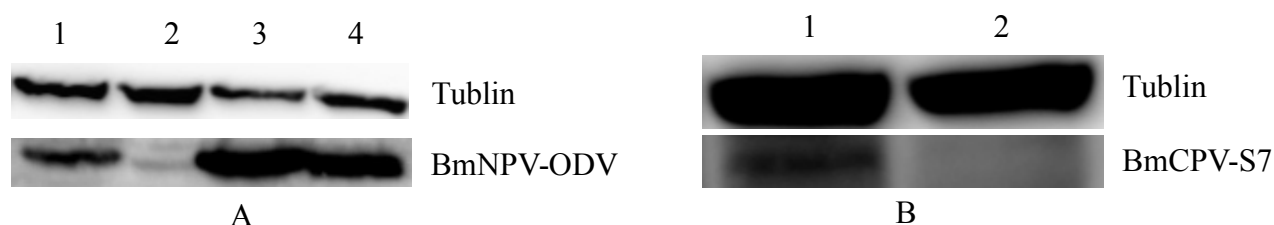


图 1 过表达 *BmArrestin2* 基因对 *BmNPV*、*BmCPV* 感染细胞的影响

A: 过表达 *BmArrestin2* 基因对 BmNPV 感染的影响

- 1: pIZT-V5/His-*BmArrestin2* 细胞系 BmNPV 感染 24h BmNPV-ODV 蛋白检测
- 2: pIZT-V5/His-BmN 细胞系 BmNPV 感染 24h BmNPV-ODV 蛋白检测
- 3: pIZT-V5/His-*BmArrestin2* 细胞系 BmNPV 感染 48h BmNPV-ODV 蛋白检测
- 4: pIZT-V5/His 细胞系 BmNPV 感染 48h BmNPV-ODV 蛋白检测

B: 过表达 *BmArrestin2* 基因对 BmCPV 感染的影响

- 1: pIZT-V5/His-*BmArrestin2* 细胞系 BmCPV 感染 48h BmCPV-S7 蛋白检测
- 2: pIZT-V5/His-BmN 细胞系 BmCPV 感染 48h BmCPV-S7 蛋白检测

Fig1 Effect of the infection of BmNPV and BmCPV when overexpression *BmArrestin2*A: Effect of the infection of BmNPV when overexpression *BmArrestin2*Lane1: BmNPV-ODV level after 24 hours of pIZT-V5/His-*BmArrestin2* cells

Lane2: BmNPV-ODV level after 24 hours of pIZT-V5/His-BmN cells

Lane3: BmNPV-ODV level after 48 hours of pIZT-V5/His-*BmArrestin2* cells

Lane4: BmNPV-ODV level after 48 hours of pIZT-V5/His-BmN cells

B: Effect of the infection of BmCPV when overexpression *BmArrestin2*Lane1: BmCPV-S7 level after 48 hours of pIZT-V5/His-*BmArrestin2* cells

Lane2: BmCPV-S7 level after 48 hours of pIZT-V5/His-BmN cells

2.2 抗体封闭对病毒感染细胞的影响

为研究封闭内源 *BmArrestin2* 对病毒感染细胞的影响, 首先要确定活的 BmN 细胞是否能够摄入大分子量的抗体。共聚焦观察结果显示, 自制的 *BmArrestin2* 抗体和未经免疫的小鼠血清孵育活细胞 1h 时, *BmArrestin2* 抗体、小鼠血清均能被活细胞摄入 (图 2)。

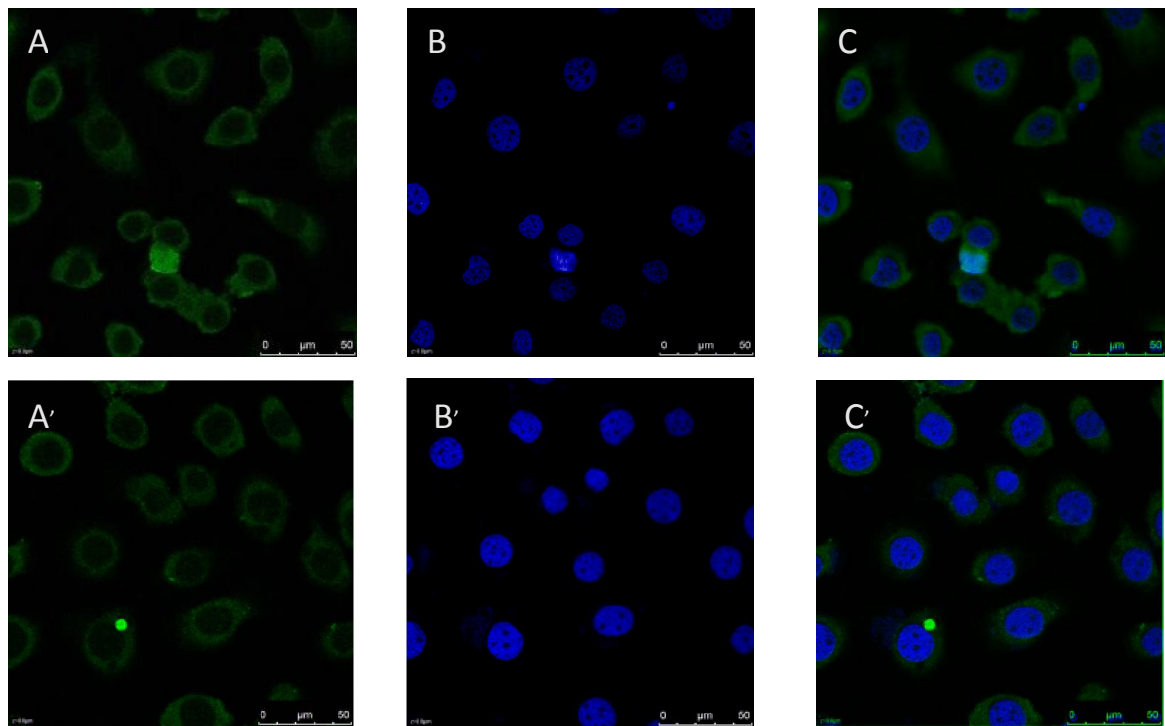


图 2 抗体封闭检测

A, B, C: BmArrestin2 多抗 A', B', C': 未免血清

A, A': FITC 标记羊抗鼠 IgG; B, B': DAPI; C, C': A+B, A'+B'

Fig. 2 Antibody blocking assay

A, B, C: anti-BmArrestin2 antibody A', B', C': Normal mouse serum

A, A': FITC-conjugated goat anti-mouse IgG; B, B': DAPI; C, C': A+B, A'+B'

将自制的 BmArrestin2 抗体与未经免疫的小鼠血清用不含 FBS 的培养基稀释成浓度为 25ug/mL 、 50ug/mL 和 100ug/mL 的混合液，封闭 BmN 细胞内源性的 BmArrestin2，BmNPV 及 BmCPV 病毒粒子感染封闭处理后的细胞，48h 后提取细胞总 RNA，定量 PCR 检测 BmNPV 的 *Bm59* 以及 BmCPV 的 *BmCPVs1* 基因的表达水平。结果显示，用 BmArrestin2 抗体封闭细胞内的 BmArrestin2 会降低病毒对细胞的感染能力（图 3，图 4）。

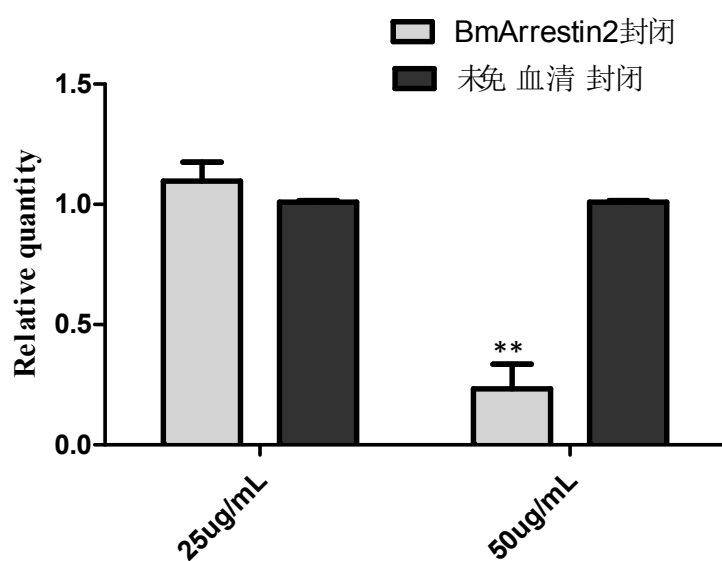


图 3 抗体封闭 BmArrestin2 对 BmNPV 感染细胞的影响（实验组与 wt 对照进行比较，*** $p<0.001$ ，** $p<0.01$ ，* $p<0.05$ ）

Fig3 Effect of antibody blocking BmArrestin2 on BmNPV infection (experimental group were compared with wild-type controls,*** $p<0.001$ ，** $p<0.01$ ，* $p<0.05$)

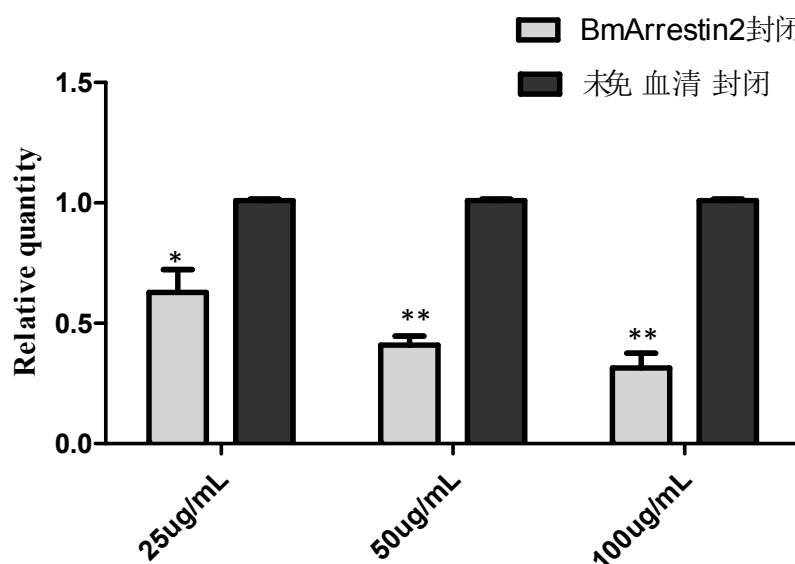


图 4 抗体封闭 BmArrestin2 对 BmCPV 感染细胞的影响（实验组与 wt 对照进行比较，*** $p<0.001$ ，** $p<0.01$ ，* $p<0.05$ ）

Fig4 ffect of antibody blocking BmArrestin2 on BmCPV infection (experimental group were compared with wild-type controls,*** $p<0.001$ ，** $p<0.01$ ，* $p<0.05$)

2.3 BmNPV、BmCPV 感染对 *BmArrestin2* 表达情况的影响

为了研究 BmNPV、BmCPV 感染对 *BmArrestin2* 基因表达量的影响, 接种 BmNPV、BmCPV 后, 按接种后 5min, 10min, 15min, 20min, 25min, 30min 收集细胞, 同设未接种对照组, 收集提取细胞的总 RNA, 定量分析不同时间段内 *BmArrestin2* 基因表达变化。结果显示接种 BmNPV、BmCPV 病毒粒子后 *BmArrestin2* 的表达量均下调 (图 5, 图 6)。

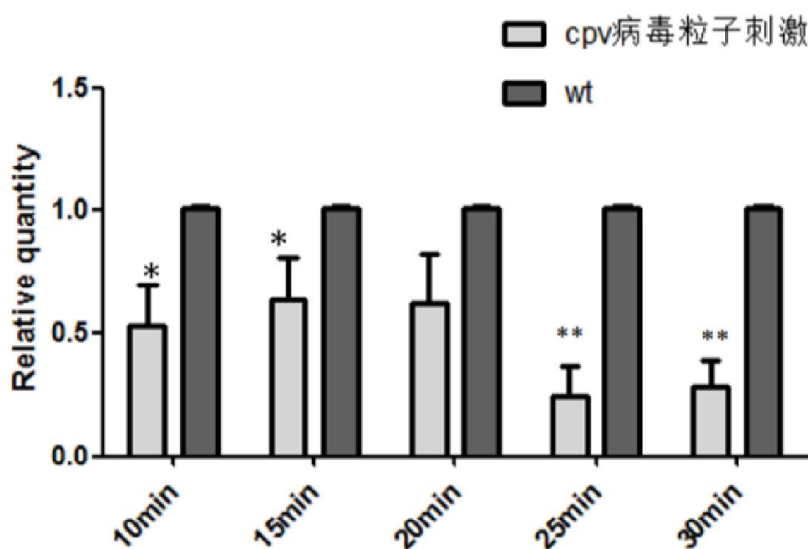


图 5 BmCPV 刺激对 *BmArrestin2* 表达水平的影响 (实验组与 wt 对照进行比较, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$)

Fig 5 The expression levels of *BmArrestin2* after infecting with BmCPV (experimental group were compared with wild-type controls, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$)

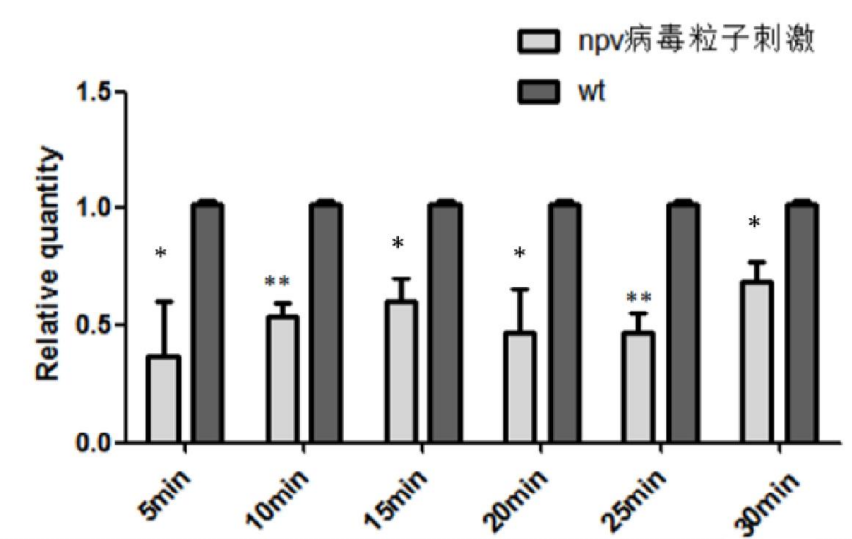
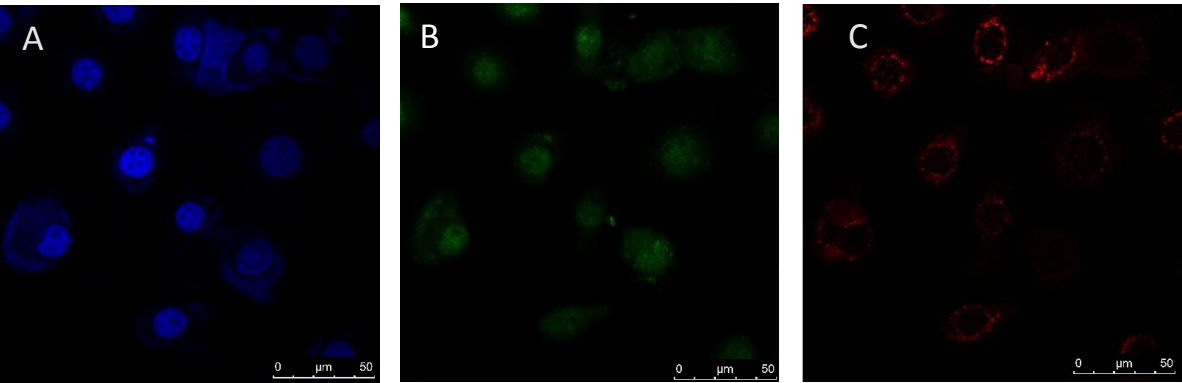


图 6 BmNPV 刺激对 *BmArrestin2* 表达水平的影响（实验组与 wt 对照进行比较，
*** $p<0.001$ ，** $p<0.01$ ，* $p<0.05$ ）

Fig 6The expression levels of *BmArrestin2* after infecting with BmCPV（experimental group were compared with wild-type controls,*** $p<0.001$ ，** $p<0.01$ ，* $p<0.05$ ）

2.4 BmNPV 与 BmArrestin2 蛋白的共定位

为了证明 BmArrestin2 能否与 BmNPV 互作而影响 BmNPV 的入侵，通过免疫荧光观察 BmArrestin2 蛋白与病毒粒子在细胞中的分布。将标记后的病毒粒子（红色）避光处理正常 BmN 细胞 15min，1×PBS 洗除游离病毒，实验组用自制的 BmArrestin2 小鼠血清孵育，对照组孵育未免小鼠血清，二抗使用 FITC 标记的羊抗鼠 IgG（绿色）。共聚焦显微镜观察结果结果， BmArrestin2 能与 BmNPV 病毒粒子共定位（黄色），说明 BmArrestin2 能与 BmNPV 病毒粒子互作（图 7）。



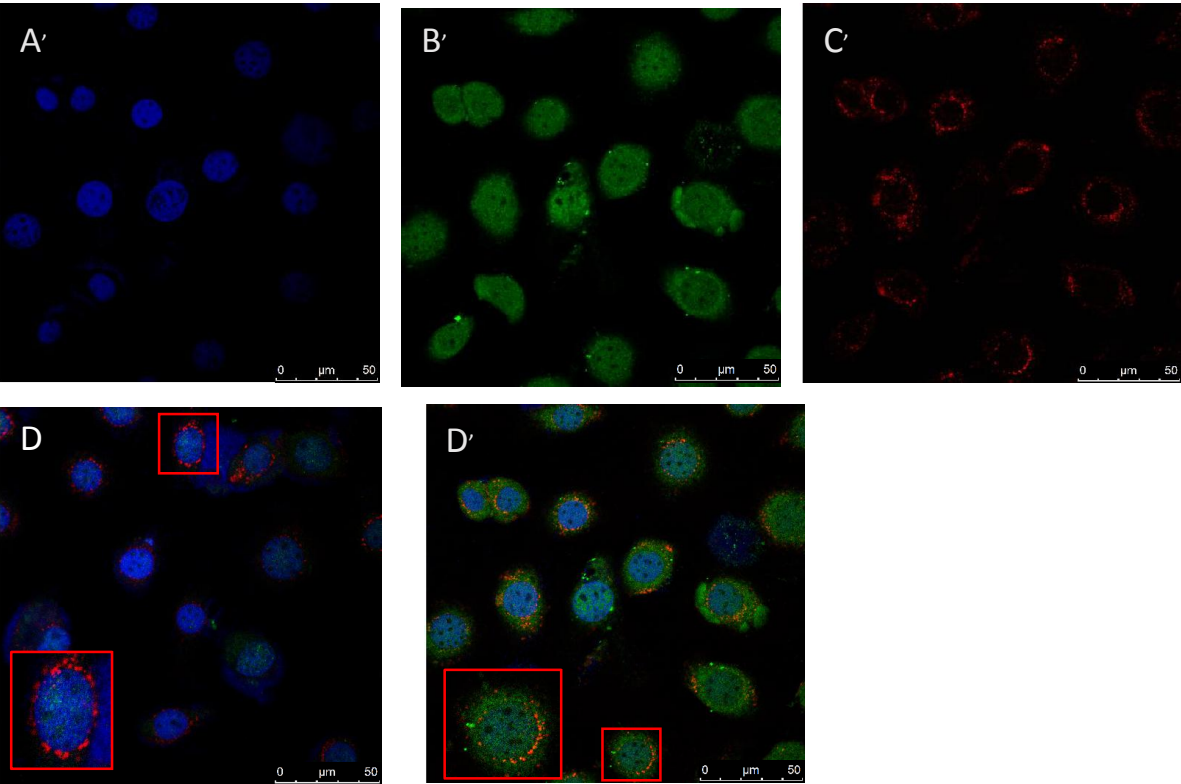


图 7 BmArrestin2 与 BmNPV 病毒粒子共定位

A, B, C, D: 未免血清; A', B', C', D': Bmarrestin2 抗体; A, A': DAPI;
B, B': FITC 标记羊抗鼠; C, C': BmNPV 病毒粒子; D, D': B+C, B+C';

Fig. 7olocalization of BmArrestin2 and BmNPV

A, B, C, D: normal mouse serum; A', B', C', D': anti-BmArrestin2 antibody;
A, A': DAPI; B, B': anti-mouse IgG-FITC antibody produced in goat; C, C': BmNPV;
D, D': B+C, B+C';

3.讨论

β-arrestin2 可以与 G 蛋白偶联受体作用调节内吞,它还是免疫信号通路的负调控因子,因此本研究探讨了过表达 *BmArrestin2* 是否会增加细胞对 BmNPV、BmCPV 的感染性。结果显示过表达 *BmArrestin2* 时细胞对两种病毒的感染性均有提高。抗体封闭实验结果显示, BmNPV 感染细胞时,抗体浓度为 25ug/mL 的实验组与对照组无明显差异,这可能是由于此时抗体浓度过低,不引起明显变化;当抗体浓度为 50ug/mL 时,孵育 BmArrestin2 抗体的实验组中 BmNPV 的增殖水平低于对照组,

说明抗体封闭细胞中的 BmArrestin2 蛋白会影响 BmNPV 对细胞的感染。BmCPV 感染细胞时,三种浓度的抗体封闭均能降低病毒对细胞的感染,且 BmCPV 对细胞的感染能力呈剂量依赖性降低。BmArrestin2 与病毒粒子共定位的结果显示,BmArrestin2 在部分位置能与 BmNPV 重叠,猜测 BmArrestin2 可以与 BmNPV 互作影响病毒的感染。细胞骨架影响病毒在细胞内的转运,因此 BmArrestin2 可能通过与细胞肌动蛋白互作影响 BmNPV 的转运。

根据文献报道,高表达 β -arrestin2 会影响哺乳动物细胞的固有免疫,猜测 BmArrestin2 在家蚕卵巢细胞中对病毒感染的影响也许与调节细胞固有免疫有关,qPCR 检测结果显示,病毒感染 30min 内 BmArrestin2 的表达水平下调,在前一章的实验中我们发现 BmArrestin2 的高表达会引起家蚕免疫通路相关基因下调,当 BmArrestin2 下调时免疫通路各基因有上调趋势,因此,病毒处理后引起 BmArrestin2 下调说明此时细胞内的免疫相关通路中相关基因会通过上调来抵制病毒入侵,也就是说当 BmArrestin2 过表达时引起的病毒对细胞感染性的增强有可能是由于其下调了免疫相关通路的活性,降低细胞固有免疫引起的。

BmCPV 病毒粒子是通过内吞作用进入家蚕卵巢细胞的,实验结果发现,高表达的 BmArrestin2 也能增加细胞对 BmCPV 病毒粒子的感染性,BmCPV 病毒粒子感染细胞检测 BmArrestin2 基因表达量的变化发现 BmCPV 感染细胞也能引起 BmArrestin2 基因的下调,暗示高表达的 BmArrestin2 增加细胞对 BmCPV 的易感性有一部分原因也是通过降低细胞固有免疫引起的,但是是否还通过促进 BmArrestin2 介导内吞的功能增加细胞对 BmCPV 的易感性还尚不明确。

参考文献

[1] Murphy F A. On target: “Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses — Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses” will be published in March 1995 by Springer-Verlag Wien New York[J]. Archives of Virology, 1995, 140(2):9-23.

[2] 浙江大学。家蚕病理学[M].北京:中国农业出版社,2001:58-69.

[3] Claing A, Laporte S A, Caron M G, et al. Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins[J]. Progress in Neurobiology, 2002, 66(2):61.

[4] Seregin S S, Appledorn D M, Patial S, et al. beta-Arrestins modulate Adenovirus-vector-induced innate immune responses: differential regulation by beta-arrestin-1 and beta-arrestin-2.[J]. Virus Research, 2010, 147(1):123-134.

[5] Johnson E C, Bohn L M, Barak L S, et al. Identification of Drosophila neuropeptide receptors by G protein-coupled receptors-beta-arrestin2 interactions[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(52):52172-52178.

结 论

1.已取得的结果

(1) 克隆了 *BmArrestin2* 基因,明确了它的表达模式,发现 *BmArrestin2* 主要分布在细胞质中。

(2) *BmArrestin2* 对 Hippo 信号通路、细胞周期通路,天然免疫信号通路有调节作用;过表达 *BmArrestin2* 能够减小细胞体积,减少处于增殖期的细胞数量。

(3) 过表达 *BmArrestin2* 能够增强细胞对病毒的感染性。

2.有待进行的研究

(1) *BmArrestin2* 对下游信号通路的调节是否是通过参与调节 Hippo 信号通路实现的还需要进一步明确;

(2) 还需确定 *BmArrestin2* 增加病毒感染细胞的具体机制。

附录

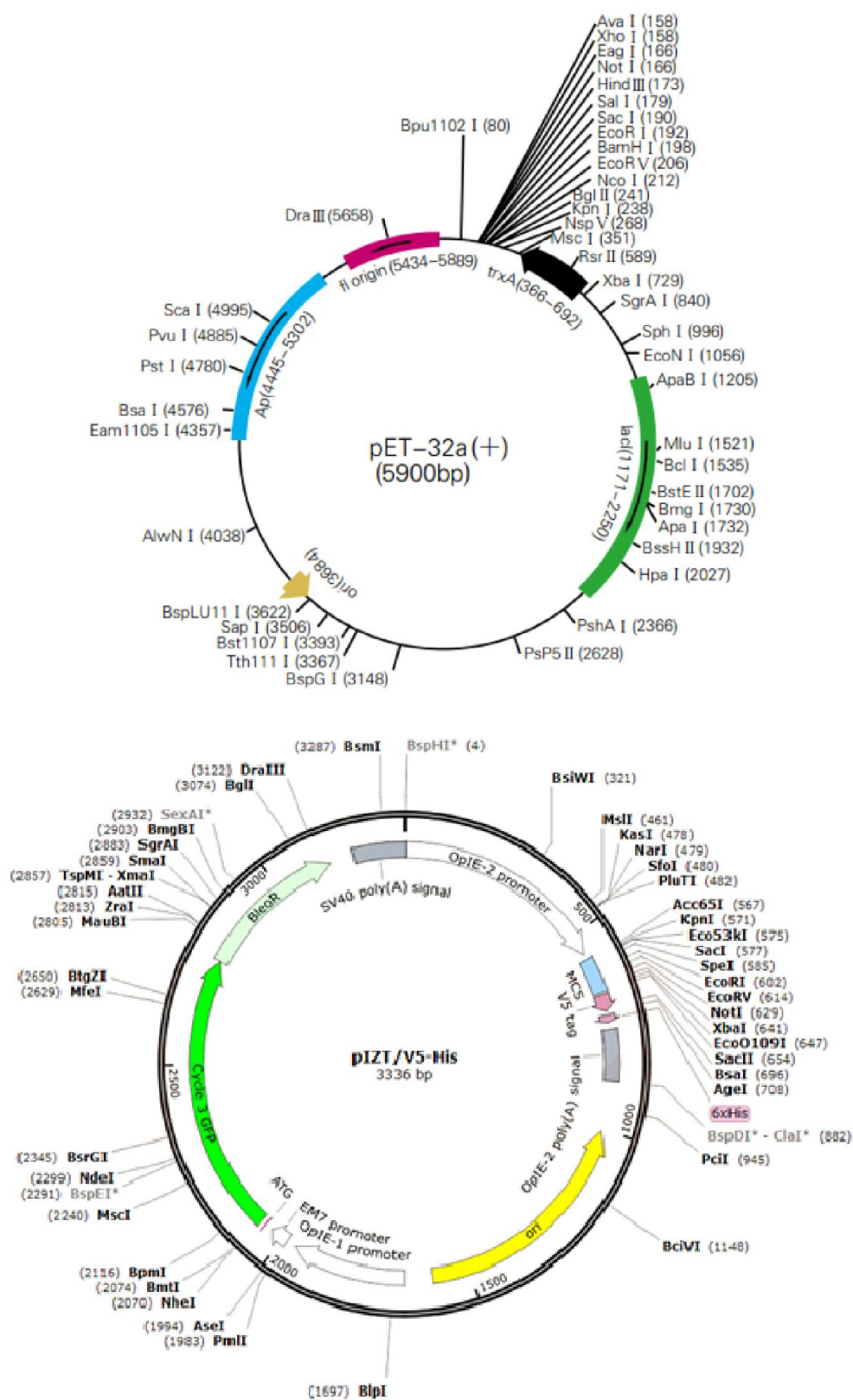
一、缩略词表

缩写	英文	中文
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol	三羟甲基氨基甲烷
Ap	Ammonium persulfate	过硫酸铵
DTT	1,4-dithiothreitol	二硫苏糖醇
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid	乙二胺四乙酸钠
Acr	Acrylamide	丙烯酰胺
Bis	N,N'-Methylene bisacrylamide	N,N'-亚甲基双丙烯酰胺
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基磺酸钠
SDS-PAGE	SDS polyacrylamide	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳
TEMED	Tetramethyl Ethylene Diamine	四甲基乙二胺
<i>E. coli</i> TG1/BL21	<i>Escherichia coli</i> .TG1/BL21	大肠杆菌 TG1/BL21
LB	Luria-Bertani	液体培养基
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactoside	异丙基- β -D-硫代半乳糖苷
PBS	Phosphate buffer solution	磷酸盐缓冲液
bp	Base pair	碱基对
kDa	Kilo Daltons	千道尔顿
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
PCR	DNA polymerase chain reaction	聚合酶链式反应

二、部分检测基因名称及登录序列号

基因缩写	英文名称	序列号	作用
<i>BmStat</i>	signal transducer and activator of transcription	NM_001163916.1	家蚕信号转导与转录激活因子
<i>BmWts</i>	warts	XM_004923502.2	家蚕丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶
<i>BmKibra</i>	kibra ortholog	XM_004922644.2	家蚕 Hippo 通路上游调节基因
<i>BmFj</i>	four-jointed	XM_012690205.1	高尔基体定位激酶
<i>BmSerr</i>	serrate, Bm8 interacting protein precursor	NM_001190840.1	家蚕 Bm8 互作蛋白
<i>Bmex</i>	expanded	XM_012693250.1	家蚕 Hippo 通路上游调节基因
<i>Bmcat</i>	catenin alpha	XM_012688678.1	家蚕连环蛋白 α
<i>BmDpp</i>	decapentaplegic	NM_001145329.1	果蝇的体节极性基因
<i>BmWnt</i>	Bm. Wnt-1	NM_001043850.1	发育相关基因
<i>BmJH</i>	Jheh-Ip4	NM_001166148.1	家蚕保幼激素环氧化物酶样蛋白 4
<i>BmDYNE</i>	dynein	XM_012689786.1	家蚕动力蛋白
<i>BmUMX</i>	unconventional myosin-XV	XM_012695785.1	非常规肌球蛋白-XV
<i>BmPCL</i>	Protein charybde-like	XM_004923883.2	Charybde 类似蛋白
<i>BmSPZ</i>	spatzle-1 (SPZ1)	NM_001114594.1	家蚕免疫相关基因
<i>BmPGRP-LB</i>	peptidoglycan-recognition protein LB	NW_004582011.1	家蚕免疫相关基因
<i>BmPGRP-LE</i>	peptidoglycan-recognition protein LE	NW_004582015.1	家蚕免疫相关基因

三、pET-32a(+)及 pIZT-V5/His 质粒图谱



四 定量数据

表 1 家蚕不同发育阶段性腺组织 β -Arrestin2 的表达水平 (n=3)

发育时期	Ct-目的基因			Ct-Actin			$2^{-\Delta\Delta t}$		
3 龄 3 天精巢	27.77	27.76	27.06	15.34	14.89	15.45	0.053	0.034	0.087
3 龄 3 天卵巢	28.72	26.87	28.96	16.03	18.47	16.98	0.044	0.768	0.067
4 龄 4 天精巢	26.89	28.20	27.98	14.64	16.39	15.76	0.060	0.072	0.057
4 龄 4 天卵巢	27.45	31.23	26.01	17.41	19.27	16.45	0.279	0.065	0.360
5 龄 3 天精巢	27.83	28.38	25.72	15.38	15.12	13.94	0.052	0.026	0.077
5 龄 3 天卵巢	27.74	27.43	26.85	19.54	19.41	18.76	1	1	1
5 龄 7 天精巢	25.02	28.02	28.79	14.69	15.20	15.63	0.228	0.035	0.029
5 龄 7 天卵巢	29.34	28.88	27.78	18.73	17.98	14.42	0.188	0.135	0.025
化蛹 2 天精巢	25.55	26.21	26.85	13.03	12.42	12.74	0.050	0.018	0.015
化蛹 2 天卵巢	26.60	28.09	28.07	13.54	12.77	13.18	0.034	0.006	0.008

表 2 五龄第 3 天家蚕不同组织中 β -Arrestin2 的表达水平 (n=3)

组织	Ct-目的基因			Ct-Actin			$2^{-\Delta\Delta t}$		
头	21.68	22.87	23.20	14.16	14.60	15.00	1.314	1.231	1.113
气管丛	29.32	28.45	27.34	28.17	25.96	24.60	109.51	67.64	48.840
中肠	26.50	31.33	30.37	22.91	24.48	30.84	20.112	3.294	451.94
丝腺	30.52	31.07	30.24	21.02	21.70	21.53	0.333	0.574	0.776
表皮	28.75	26.17	26.25	23.98	18.99	26.00	8.876	2.611	274.37
精巢	27.73	26.00	28.30	15.18	13.72	16.07	0.040	0.076	0.067
卵巢	27.22	26.91	27.32	19.30	18.34	18.97	1	1	1
马氏管	27.96	28.13	30.99	16.13	18.01	16.92	0.066	0.341	0.018
血	31.70	31.52	32.61	28.08	27.51	29.56	19.69	23.58	55.52

表 3 转基因细胞 *BmArrestin2* 的表达水平(n=3)

目的基因	Ct- <i>BmArrestin2</i>			Ct-Actin			$2^{-\Delta\Delta t}$		
pIZT-V5/His-BmN	32.01	31.35	19.34	26.00	26.86	18.10	1	1	1
pIZT-V5/His- <i>BmArrestin2</i>	25.64	22.53	28.07	28.26	25.25	17.64	393.89	148.39	587.45

表 4 过表达 *BmArrestin2* 基因后家蚕 Hippo 通路上下游主要基因的表达水平变化(n=3)

目的基因	Ct-目的基因			Ct-Actin			$2^{-\Delta\Delta t}$		
(wnt)	33.31	33.69	33.27	27.23	18.10	20.60	0.709	0.685	0.273

wt (wnt)	32.59	32.68	32.36	27.01	17.64	21.47	1	1	1
(wts)	24.58	24.70	23.01	18.04	18.52	20.60	1	1.053	0.946
wt (wts)	24.18	24.33	23.80	17.64	18.07	21.47	1	1	1
(yki)	21.79	19.11	19.7	12.74	11.7	12.02	0.384	0.596	0.806
wt (yki)	19.45	19.13	20.19	11.78	12.46	12.82	1	1	1
(cyce)	23.71	21.44	21.98	12.62	11.70	12.02	0.590	0.635	0.729
wt (cyce)	22.11	21.55	22.32	11.78	12.46	12.82	1	1	1
(iap)	24.72	24.17	24.23	12.62	11.70	12.02	0.779	0.385	0.570
wt (iap)	23.52	23.56	24.22	11.78	12.46	12.82	1	1	1
(ex)	28.20	27.32	27.64	27.23	18.10	18.08	1.447	1.505	1.132
wt (ex)	28.87	27.01	27.18	27.01	17.20	17.44	1	1	1
(Fj)	36.43	34.12	35.68	18.10	20.60	18.52	0.882	0.755	0.846
wt (Fj)	35.78	34.58	34.99	17.64	21.47	18.07	1	1	1
(dpp)	27.81	28.20	27.83	18.10	18.10	18.52	0.397	0.206	0.463
wt (dpp)	25.58	25.46	26.19	17.20	17.64	18.07	1	1	1
(kibra)	25.31	24.33	24.04	27.23	18.10	18.04	1.853	2.188	2.531
wt (kibra)	25.98	24.56	24.97	27.01	17.20	17.64	1	1	1
(serr)	23.94	23.67	23.44	18.10	18.10	18.52	0.757	0.665	0.596
wt (serr)	22.64	22.62	22.25	17.20	17.64	18.07	1	1	1
(myc)	21.86	30.09	31.93	12.02	18.10	18.52	0.309	0.648	0.588
wt (myc)	20.97	29.00	30.72	12.82	17.64	18.07	1	1	1
(crb)	33.19	33.30	34.09	18.04	18.52	18.08	0.152	0.311	0.132
wt (crb)	30.07	31.17	30.53	17.64	10.07	17.44	1	1	1
(Bmpr)	22.03	19.03	19.96	13.03	11.32	11.99	0.622	0.773	0.965
wt (Bmpr)	19.51	18.96	20.20	11.20	11.60	12.28	1	1	1

表 5 过表达 *BmArrestin2* 基因后家蚕生长相关通路主要基因的表达水平变化(n=3)

目的基因	Ct-目的基因			Ct-Actin			$2^{-\Delta\Delta t}$		
(GASP)	34.05	30.66	31.21	23.33	16.72	18.05	1.929	2.969	3.518
wt (GASP)	34.10	32.23	31.93	22.21	18.18	16.96	1	1	1
(ECDY)	32.41	28.96	28.96	14.99	12.81	12.81	0.455	0.549	0.624
wt (ECDY)	29.14	28.54	28.73	12.85	13.26	13.26	1	1	1
(CFAP)	20.07	14.60	30.63	10.84	11.20	16.72	0.148	0.486	0.117
Wt(CFAP)	17.58	13.86	29.00	11.10	11.50	18.18	1	1	1
(JH)	24.11	21.61	21.96	14.99	12.96	12.81	1.064	0.972	0.823
Wt(JH)	22.06	21.61	22.13	12.85	13.00	13.26	1	1	1
(LACH)	27.91	23.64	24.12	17.73	15.11	14.71	0.439	0.714	0.594
Wt(LACH)	23.94	23.36	23.89	14.94	15.31	15.23	1	1	1

(UMX)	22.49	22.30	24.01	15.23	14.71	18.17	0.694	0.637	0.512
Wt(UMX)	22.05	22.17	22.87	15.31	15.23	18.00	1	1	1
(NKAB)	21.34	23.16	21.52	17.73	22.97	18.05	3.706	3.041	4.316
Wt(NKAB)	21.48	24.00	22.54	14.94	22.21	16.96	1	1	1
(PCL)	25.74	28.42	24.61	16.72	18.17	15.23	1.218	1.258	1.287
Wt(PCL)	26.05	28.58	25.06	18.18	18.00	15.31	1	1	1
(DYNE)	28.22	28.28	28.67	18.17	11.92	18.05	2.136	1.561	2.488
Wt(DYNE)	29.15	28.44	28.90	18.00	18.04	16.96	1	1	1
(PSLR)	26.78	27.83	26.52	14.67	18.05	18.53	2.049	1.380	2.016
Wt(PSLR)	26.00	27.20	27.05	12.85	16.96	18.04	1	1	1
(LSAM)	25.38	26.71	23.30	18.17	18.05	15.23	0.883	0.532	1.148
Wt(LSAM)	25.03	24.71	23.59	18.00	16.96	15.31	1	1	1

表 6 过表达 *BmArrestin2* 基因后家蚕免疫以及凋亡通路主要基因的表达水平变化 (n=3)

目的基因	Ct-目的基因			Ct-Actin			$2^{-\Delta\Delta t}$		
(stat)	29.15	28.60	25.16	18.10	18.10	11.24	0.602	0.576	0.609
wt (stat)	27.52	27.34	24.67	19.02	17.64	11.47	1	1	1
(Tal)	23.21	21.90	22.64	15.58	10.84	11.20	0.852	0.864	0.619
wt (Tal)	24.46	21.95	22.25	17.06	11.10	11.50	1	1	1
(PGRP-LE)	24.59	22.54	22.77	12.97	15.58	11.27	0.594	0.400	0.389
Wt(PGRP-LE)	22.03	22.70	22.18	11.16	17.06	12.04	1	1	1
(SPZ)	31.21	28.10	28.40	13.17	15.58	11.27	0.482	0.362	0.503
Wt(SPZ)	28.15	28.11	28.18	11.16	17.06	12.04	1	1	1
(APA)	26.25	23.89	24.67	12.88	10.98	11.10	0.942	0.737	0.737
Wt(APA)	24.07	23.57	24.67	10.78	11.10	11.54	1	1	1
(SURF)	21.53	18.76	19.22	12.88	10.98	11.10	0.763	0.972	0.721
Wt(SURF)	19.04	18.84	19.19	10.78	11.10	11.54	1	1	1
(PGRP-LB)	33.52	23.58	30.18	13.17	15.58	11.27	0.442	0.372	0.707
Wt(PGRP-LB)	30.33	23.63	30.45	11.16	17.06	12.04	1	1	1
(QCTY)	23.07	19.89	20.08	12.16	10.38	10.32	0.222	0.972	0.673
Wt(QCTY)	19.15	20.38	20.02	10.41	10.60	10.83	1	1	1

表 7 转染 Arrestin2-siRNA 对 BmN 细胞 *BmArrestin2* 基因表达的影响 (n=3)

目的基因	Ct-目的基因			Ct-Actin			$2^{-\Delta\Delta t}$		
siRNA-GFP-274	29.45	30.69	29.77	19.49	23.70	20.64	1	1	1
siRNA-Arrestin2-721	31.19	32.34	30.17	21.28	25.34	21.42	1.034	0.989	1.298
siRNA-Arrestin2-256	30.4	31.45	29.89	19.34	23.66	19.94	0.467	0.576	0.565

表 8 抑制 *BmArrestin2* 基因后家蚕 Hippo 通路主要基因的表达水平变化 (n=3)

目的基因	Ct-目的基因			Ct-Actin			$2^{-\Delta\Delta t}$		
(wnt)	34.52	34.94	34.66	28.07	26.51	26.47	5.755	2.353	1.494
wt (wnt)	35.45	36.04	34.96	26.47	26.38	26.19	1	1	1
(wts)	20.57	20.85	20.80	28.05	26.93	27.05	2.907	1.474	1.547
wt (wts)	20.97	21.00	21.08	26.91	26.52	26.70	1	1	1
(cyce)	25.24	25.78	25.54	28.05	26.93	27.05	0.996	0.771	0.888
wt (cyce)	24.09	24.99	25.02	26.91	26.52	26.70	1	1	1
(iap)	20.55	20.63	20.60	28.07	26.51	26.47	3.386	1.394	1.453
wt (iap)	20.71	20.98	20.86	26.47	26.38	26.19	1	1	1
(ex)	20.53	24.60	22.97	18.58	22.79	19.12	0.429	0.294	0.380
wt (ex)	22.19	25.66	22.54	19.02	25.61	17.29	1	1	1
(cat)	29.18	30.61	32.98	20.60	18.10	18.10	1.489	2.181	1.214
wt (cat)	30.62	31.27	32.36	21.47	17.64	17.20	1	1	1
(Fj)	28.11	28.19	28.18	28.07	26.51	26.47	3.031	1.602	1.853
wt (Fj)	28.11	28.74	28.79	26.47	26.38	26.19	1	1	1
(dpp)	23.46	23.21	23.18	27.47	26.35	26.19	0.380	0.926	0.196
wt (dpp)	20.90	22.83	20.96	26.31	26.08	26.32	1	1	1
(kibra)	24.46	24.60	25.30	27.96	26.51	26.47	1.028	0.888	0.436
wt (kibra)	23.40	24.30	23.83	26.86	26.38	26.19	1	1	1
(serr)	26.26	18.01	17.79	29.21	27.77	26.25	2.904	2.436	1.205
wt (serr)	25.50	17.68	17.64	26.91	26.16	25.83	1	1	1
(myc)	22.85	22.28	22.17	26.18	26.02	25.66	1.239	1.510	1.168
wt (myc)	22.75	22.69	22.35	25.77	25.84	25.61	1	1	1
(crb)	24.04	23.39	23.41	27.77	26.25	26.12	1.898	1.117	1.003
wt (crb)	23.35	23.13	23.30	26.16	25.83	26.00	1	1	1
(Bmpr)	19.23	18.83	18.85	27.77	26.25	26.12	2.611	1.494	1.152
wt (Bmpr)	19.00	18.99	18.94	26.16	25.83	26.00	1	1	1

表 9 抑制 *Arrestin2* 基因后家蚕生长相关通路主要基因的表达水平变化 (n=3)

目的基因	Ct-目的基因			Ct-Actin			$2^{-\Delta\Delta t}$		
(ECDY)	26.06	25.85	25.83	29.66	27.27	27.36	4.626	1.057	1.879
wt (ECDY)	25.92	25.91	25.80	27.31	27.25	26.42	1	1	1
(CFAP)	21.37	19.92	21.72	27.47	26.35	26.19	5.351	1.505	1.647
Wt(CFAP)	21.44	20.49	21.50	26.31	26.08	26.24	1	1	1
(JH)	24.57	24.59	24.57	27.47	26.35	26.19	2.128	1.310	1.013
Wt(JH)	24.50	24.71	24.64	26.31	26.08	26.24	1	1	1

(LACH)	28.33	25.85	24.98	28.12	26.52	26.39	4.213	11.042	3.363
Wt(LACH)	28.47	28.75	26.65	26.19	25.96	26.30	1	1	1
(DYNE)	27.27	26.98	27.00	29.66	27.27	27.36	3.958	1.117	2.158
Wt(DYNE)	27.12	27.17	26.91	27.31	27.25	26.42	1	1	1
(UMX)	24.30	24.00	23.84	28.76	26.72	26.56	3.506	1.613	1.148
Wt(UMX)	24.06	24.15	24.06	26.71	26.18	26.58	1	1	1
(PCL)	21.38	21.29	21.24	28.12	26.52	26.39	3.771	1.618	1.017
Wt(PCL)	21.36	21.42	21.18	26.19	25.96	26.30	1	1	1
(NKAB)	19.29	19.40	19.42	28.12	26.52	26.39	3.567	1.305	1.068
Wt(NKAB)	19.19	19.22	19.43	26.19	25.96	26.30	1	1	1
(LSAM)	30.73	29.89	30.26	27.05	26.72	26.56	0.888	0.923	0.484
wt(LSAM)	30.22	29.23	29.23	26.71	26.18	26.58	1	1	1

表 10 抑制 *BmArrestin2* 基因后家蚕免疫以及凋亡通路主要基因的表达水平变化 (n=3)

目的基因	Ct-目的基因			Ct-Actin			$2^{-\Delta\Delta t}$		
(Tal)	24.83	25.17	25.16	28.14	27.16	26.86	2.361	1.717	1.013
wt (Tal)	24.87	24.99	25.34	26.94	26.20	27.02	1	1	1
(PGRP-LE)	23.21	23.17	23.54	28.14	27.16	26.86	0.795	0.765	0.241
Wt(PGRP-LE)	21.68	21.83	21.65	26.94	26.20	27.02	1	1	1
(SPZ)	23.93	24.15	24.21	28.05	26.93	27.05	2.203	1.094	1.042
Wt(SPZ)	23.93	23.87	23.92	26.91	26.52	26.70	1	1	1
(dcr)	22.94	23.43	23.40	28.05	26.93	27.05	3.340	1.515	1.356
Wt(dcr)	23.54	23.62	23.59	26.91	26.52	26.70	1	1	1
(P53)	25.36	25.50	25.19	28.14	27.16	26.86	2.639	1.585	1.086
Wt(P53)	25.56	25.21	25.08	26.94	26.20	26.76	1	1	1
SUR	20.94	21.00	20.87	28.13	27.15	27.07	4.184	1.414	1.038
Wt(SUR)	21.17	21.04	21.02	26.29	26.69	27.16	1	1	1
SURF	19.85	19.81	19.72	28.13	27.15	27.07	3.020	1.248	1.958
wt(SURF)	19.61	19.67	19.54	26.29	26.69	27.16	1	1	1
(stat)	29.15	28.60	30.54	18.10	18.10	18.08	0.602	0.576	0.105
wt (stat)	27.52	27.34	27.43	19.02	17.64	17.44	1	1	1

表 11 抗体封闭 *BmArrestin2* 对 *BmNPV* 感染细胞的影响 (n=3)

抗体浓度	Ct- <i>Bm59</i>			Ct-Actin			$2^{-\Delta\Delta t}$		
25ug/ml <i>BmArrestin2</i>	23.47	23.47	23.83	32.12	29.63	31.72	1.017	1.552	1.176
25ug/m 未免疫血清	23.17	23.49	23.31	31.80	29.01	30.96	1	1	1
50ug/ml <i>BmArrestin2</i>	23.39	23.05	23.05	30.51	29.34	30.94	0.115	0.145	0.438
50ug/m 未免疫血清	21.37	22.31	22.46	31.60	31.38	30.89	1	1	1

表 12 抗体封闭 *BmArrestin2* 对 *BmCPV* 感染细胞的影响 (n=3)

抗体浓度	<i>Ct-Bm59</i>			<i>Ct-Actin</i>			$2^{-\Delta\Delta t}$		
25ug/ml <i>BmArrestin2</i>	23.74	23.00	23.23	21.77	21.25	21.32	0.609	0.801	0.474
25ug/m 未免血清	22.60	22.32	22.02	21.35	20.89	21.18	1	1	1
50ug/ml <i>BmArrestin2</i>	22.46	24.82	23.24	20.70	21.11	21.23	0.447	0.267	0.371
50ug/m 未免血清	22.18	22.81	21.89	21.58	21.01	21.31	1	1	1
100ug/ml <i>BmArrestin2</i>	25.20	23.86	23.20	22.10	19.98	20.25	0.418	0.204	0.320
100ug/m 未免血清	22.39	23.14	22.04	20.55	21.55	20.73	1	1	1

表 13 *BmCPV* 刺激对 *BmArrestin2* 表达水平的影响 (n=3)

处理时间	<i>Ct-BmArrestin2</i>			<i>Ct-Actin</i>			$2^{-\Delta\Delta t}$		
Cpv-10min	25.99	26.58	23.88	27.45	26.88	23.72	0.867	0.380	0.340
Wt-10min	26.46	25.53	26.1	26.82	27.22	27.49	1	1	1
Cpv-15min	27.31	26.12	21.57	30.08	26.84	27.15	0.976	0.442	0.488
Wt-15min	24.69	26.13	20.81	27.5	28.02	27.42	1	1	1
Cpv-20min	26.73	26.63	22.69	27.88	27.63	25.34	0.244	0.901	0.724
Wt-20min	25.32	25.55	23.03	28.50	26.70	26.15	1	1	1
Cpv-25min	28.83	31.04	24.00	28.32	26.89	26.16	0.466	0.055	0.208
Wt-25min	26.43	25.77	22.10	27.02	27.15	26.52	1	1	1
Cpv-30min	25.35	26.45	28.07	28.79	26.57	23.50	0.197	0.147	0.493
Wt-30min	24.31	26.06	26.81	28.77	28.53	25.01	1	1	1

表 14 *BmNPV* 刺激对 *BmArrestin2* 表达水平的影响 (n=3)

处理时间	<i>Ct-BmArrestin2</i>			<i>Ct-Actin</i>			$2^{-\Delta\Delta t}$		
Npv-5min	31.08	26.33	29.34	26.54	27.82	27.30	0.142	1.635	0.607
Wt-5min	28.20	28.64	27.45	26.47	28.38	26.13	1	1	1
Npv-10min	29.77	27.76	28.49	26.45	28.19	26.01	0.628	0.557	0.417
Wt-10min	29.35	27.38	27.88	26.70	28.70	26.66	1	1	1
Npv-15min	30.55	27.19	30.45	26.64	26.40	27.16	0.643	0.752	0.420
Wt-15min	29.72	26.94	27.35	26.45	26.64	25.31	1	1	1
Npv-20min	28.09	28.45	29.51	26.24	28.32	26.33	0.479	0.792	0.137
Wt-20min	27.05	26.62	27.11	26.26	26.91	26.79	1	1	1
Npv-25min	30.36	26.15	30.65	26.38	27.26	28.21	0.055	0.550	0.397
Wt-25min	26.57	26.94	30.77	26.76	28.95	29.66	1	1	1
Npv-30min	29.87	25.87	28.53	27.10	25.85	26.89	0.812	0.522	0.726
Wt-30min	28.87	27.31	27.31	26.40	28.25	26.13	1	1	1

致 谢

时光荏苒，岁月如歌，三年的研究生生涯即将结束。依稀记得，本科期间对苏州大学的向往，也很庆幸自己能够在苏州大学读研究生。在这三年中，我的学业、科研工作、个人素质都得到了培养和锻炼，我也深切感受到自己是在老师、同学和亲朋好友的关爱凝聚下，才一步一步地走到今天。

首先，我要感谢我的恩师薛仁宇老师。这篇论文从课题设计，实验工作，论文撰写，一直到最后的论文反复修改，润色，薛老师始终认真负责地给予我深刻而细致地指导，帮助我开拓研究思路、精心点拨、热忱鼓励。在这三年中，薛老师不仅传授给我专业知识，实验技能，更多的是剖析和解决问题的能力以及思考方式，最重要的是薛老师对学术的热爱和严谨的态度都值得我学习。

同时，我要感谢贡成良老师和曹广力老师在科研以及生活上给予我的帮助和关怀，在两位老师身上我也学到了很多。贡老师对待科研以及生活一丝不苟的态度让我非常敬佩，每天经过办公室的时候他都在努力工作，他教会了我什么是热爱科研，热爱工作。曹老师是一位幽默风趣的老师，在他身上我学到最多的就是要豁达的面对生活。还要感谢胡小龙老师和冯永杰老师对我的指导和帮助，胡老师不仅仅是一位老师，更是一位平易近人的师兄，在实验和学术方面对我有很大的指导和帮助。冯老师每次辛苦帮我拍摄共聚焦的图片，认真仔细，有了你的帮助更能撑起实验数据的准确性。感谢三年中，给我们授课及给予过我帮助的老师

们。

其次我要感谢实验室的各位师兄、师姐、师弟、师妹们。感谢刘波师兄，郭睿师兄，江月师姐，王四妹师姐，刘伟师姐，张曦师姐，朱敏师姐，陆亚红师姐，孙振丽师姐，龚永昌师兄，感谢你们传授给我实验技巧，在我遇到问题的时候耐心讲解，让我更快的了解实验，并克服实验困难。还要感谢已经毕业的李艳梅师姐，在我需要帮助时提供给我的无私的帮助。感谢小伙伴匡苏兰，朱丽媛，陈菲，和我的舍友王安琪，丁召召，感谢你们三年来的陪伴，感谢你们听我唠唠叨叨，有了你们，三年来的生活变得多姿多彩。感谢可爱的师弟师妹余蕾，李坤，许健，张婷婷，蒋梦生，耿薇，王章艳，张明天，有了你们实验室总是充满欢乐。

感谢我的父母，从小为了让我有更好的生活让我有更深的造化每天都在外面辛苦打拼。尤其感谢我的母亲，为我付出了很多很多，在我遇到困难时，第一时间给她倾诉，总是给予我鼓励并帮助我克服困难。

正是由于老师、家人、朋友的鼓励和鞭策,使我能够顺利完成自己的学习任务 and 学位论文.谨以此文献给所有关心和帮助过我的老师、同学、朋友,以及养育我、关心我、支持我的父母和家人。

最后，谨向参加论文评阅和答辩的全体专家致以最诚挚的谢意！

梁 子

2017 年 4 月于独墅湖畔

苏州大学 硕士学位论文 (学术学位)

苏州大学研究生院统一印制