

家蚕微孢子虫丝氨酸蛋白酶抑制剂蛋白 *serpin* 基因 NbSPN106 的鉴定

陶美林¹, 潘国庆¹, 胡怀翠¹, 周泽扬^{1,2*}

(¹西南大学蚕学与系统生物学研究所, 重庆 400716)

(²重庆师范大学生命科学院, 重庆 400047)

摘要:【目的】*Serpin* 在病原与宿主互作中起着重要的作用。本研究旨在分析在家蚕微孢子虫中的丝氨酸蛋白酶抑制剂蛋白(Serpin)的结构特征, 原核克隆表达以及 Western blotting 检测。【方法】基于家蚕微孢子虫全基因组序列, 同源序列比对搜索获得 *serpin* 基因序列。利用在线软件分析基因的序列特征, ClustalX 对氨基酸序列进行多重序列比对。构建含有 GST 标签的 pGEX4T1-NbSPN106 原核重组表达载体, 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 诱导表达并进行纯化。纯化的重组蛋白免疫小鼠, 制备抗体, 并与家蚕微孢子虫总蛋白进行 Western blotting 免疫杂交。【结果】比对搜索在家蚕微孢子虫基因组中发现一个新的 *serpin* 基因 NbSPN106。NbSPN106 蛋白序列长度为 384 aa, N 端具有信号肽, 编码一个 42 kDa 左右的成熟蛋白。多重序列比对说明 NbSPN106 具有保守的 *serpin* 位点, 可能具有抑制功能。免疫杂交在家蚕微孢子虫总蛋白检测到一条 45 kDa 左右的特异条带。【结论】生物信息学分析以及免疫杂交结果说明在家蚕微孢子虫中存在 NbSPN106。这是在微孢子虫中首次报道发现 *serpin* 基因。对研究家蚕微孢子虫与宿主家蚕的互作具有一定的参考价值。

关键词: *serpin*; 家蚕微孢子虫; 微孢子虫

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2009) 06-0726-07

Serpin 是丝氨酸蛋白酶抑制剂的简称, 是最大的、分布最广泛的蛋白酶抑制剂超家族^[1-2]。目前在所有的物种(真核生物、细菌、病毒、古细菌)都发现了 *serpin* 基因, 迄今为止已经鉴定了 1544 个 *serpin* 基因。*Serpin* 分为抑制型和非抑制型两大类。抑制型 *serpin* 在细胞内和细胞外都起作用。细胞外 *serpin* 在控制血浆中的催化进程中扮演着重要的角色, 它们的蛋白产物调控蛋白酶介导的一系列生命进程, 包括炎症反应^[3]、纤维蛋白溶解^[4]、补体激活、食物消化、受精、细胞凋亡、胚胎发育^[5]、血液凝集^[6] 以及免疫调节^[7-8] 和细胞凋亡控制^[9]。除了这些液

相反应, *serpin* 还在细胞相互作用、细胞运动等起着重要的作用, 比如, *Maspin* 抑制乳癌和其他肿瘤的转移^[10], 纤溶酶原激活物抑制物 PAI-1 (plasminogen activator inhibitor) 阻断平滑肌细胞的迁移^[11], PAI-2 能防止由 TNF- α 诱导的细胞凋亡^[12]。细胞内 *serpin* 的功能一般是细胞保护和抵御细胞溶解蛋白酶。非抑制性 *serpin* 扮演着其它的功能, 例如荷尔蒙转运体 SERPIN6、SERPIN7, 血压调节因子 SERPIN8^[13] 及分子伴侣 HSP47^[14-15] 等。

微孢子虫 (Protozoan: Microsporidia) 是一类细胞内专性寄生的单细胞真核生物, 广泛寄生于无脊椎

基金项目: 科技部“973”重点项目(2005CB121000); 重庆市科技攻关计划项目(CSTC.2006AA5019)

* 通信作者。Tel: + 86-23-68251088; Fax: + 86-23-68251228; E-mail: zyzhou@cqnu.edu.cn

作者简介: 陶美林(1978-), 男, 江西南城人, 博士研究生, 主要从事分子生物学与功能基因组学研究。E-mail: taomgp@163.com

收稿日期: 2009-02-06; **修回日期:** 2009-03-30

动物和脊椎动物, 包括人类; 是经济昆虫、鱼类、兔类、产毛动物、啮齿类及灵长类的常见病原。家蚕微孢子虫 (*Nosema bombycis*) 是微孢子属的典型种, 寄生于家蚕而引发家蚕微孢子虫病导致毁灭性病害, 因此对于家蚕微孢子虫的研究是蚕业界的研究热点和难点, 但目前国内外有关家蚕微孢子虫的分子生物学研究极为薄弱, 缺乏对家蚕微孢子虫的深刻认识。

目前, 本实验室采用霰弹测序法, 利用 2 kb 随机片段 DNA 文库, 进行了家蚕微孢子虫基因组测序分析, 完成近 25 万个测序反应, 获得了 6 倍家蚕微孢子虫基因组的 DNA 序列和 4000 余基因信息。本文通过生物信息学检索, 从中鉴定了一个新的家蚕微孢子虫 *serpin* 基因 NbSPN106。PCR 扩增从家蚕微孢子虫基因组中获得了该基因, 对其序列进行了分析, 并将该片段插入到表达载体 pGEX4T-1 进行原核克隆和表达, 并制备了多克隆抗体, Western blotting 检测了天然 NbSPN106 蛋白的表达, 这为下一步研究 NbSPN106 的活性以及作用机制奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 孢子的分离和培养: 家蚕微孢子虫由本研究室分离, 保存于中国兽医微生物菌种保藏管理中心 (CVCC), 保藏号为 CVCC102059。取 10^8 个/mL 家蚕微孢子虫均匀涂布于桑叶上, 自然晾干后添食家蚕 3 龄起蚕。于 5 龄第 4、5 天收集丝腺, 用匀浆器研磨, 加 0.9% 的生理盐水, 4 层纱布过滤, 收集滤液。将滤液在 4℃ 采用 $10 \times g$ 和 $100 \times g$ 差速离心, 得到粗提液。粗提液经 Percoll 密度梯度, $33000 \times g$ 、40 min 离心进行精制纯化, 收集底层沉淀即为纯化的孢子, 4℃ 保存。

1.1.2 主要试剂与仪器: pMD18-T vector kit、*Bam*HI、*Not* I、T4 DNA 连接酶、RNA 酶、DL2000 DNA plus marker、X-gal、IPTG、氨苄青霉素均购自宝生物工程(大连)有限公司; PVDF 膜、*Taq* DNA 聚合酶、dNTP、蛋白酶 K 均购自 Promega 公司; DNA 胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司; PCR 引物合成与测序由上海生工公司完成。HiTrap affinity columns 购自 Amersham 公司。

1.2 *serpin* 基因的鉴定

从 MEROPS 网站 (<http://merops.sanger.ac.uk/>) 下载蛋白酶及抑制剂数据库 pepunit.lib 和 protease.lib^[16]。以这两个数据库与家蚕微孢子虫基因组数

据库作 BLASTP 检索, 采用 $E < 10^{-5}$ 作为检索标准。同时, 从 PFAM 网站 (<http://pfam.janelia.org/>) 下载 *serpin* 种子及全长序列, 将这些序列与家蚕微孢子虫基因组数据库比对搜索 *serpin* 序列, 采用 $E < 10^{-3}$ 作为检索标准。其次, 以两种方法比对检索得到的 *serpin* 候选基因反向再与 NCBI 的 nr 库进行 BLASTP 检索, 进一步完成序列的验证工作。

1.3 家蚕微孢子虫基因组的提取

采用 CTAB 法提取家蚕微孢子虫 DNA: 取 100 μ L 纯化的微孢子虫液研磨; $3700 \times g$ 、5 min 离心后弃上清; 沉淀用 2% 的 CTAB 溶液 400 μ L 重悬, 用枪头反复吹打; 加 20 μ L 蛋白酶 K (20 mg/mL) 混匀后 55℃ 保温过夜; 酶消化后的抽提液离心取上清, 300 μ L 酚/氯仿抽提, 在振荡器上振荡均匀, 然后 $18000 \times g$ 、10 min 离心取上清; 然后加 300 μ L 室温保存的 100% 异丙醇, 然后置于 4℃ 1 h 以上, $18000 \times g$ 、5 min 离心弃上清; 70% 乙醇洗涤 1~2 次, 30~50 μ L 1 倍 TE 溶液溶解。

1.4 序列分析

家蚕微孢子虫 NbSPN106 序列与文献报道的一些典型的 *serpin* 基因用 ClustalX 作多序列比对。以人的 α 1-antitrypsin 作为模板序列, 分析家蚕微孢子虫 *serpin* 基因的序列特征。比对结果用 Boxshade 修正, 阈值设为 0.7。使用在线软件 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 对信号肽进行预测, Expasy (http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html) 预测所克隆基因编码蛋白质的分子量和等电点等基本性质, PFAM (<http://pfam.janelia.org/>) 预测蛋白质结构域, 并对糖基化位点和磷酸化位点进行在线预测 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>)。

1.5 重组表达载体的构建

根据基因组比对搜索的结果, 采用引物设计软件 Oligo 6.0 和 Primer 5.0 设计带有 *Bam*HI 和 *Not* I 酶切位点的引物, 去除信号肽编码序列。NbSPN106-F: 5' GCGGATCCCCTGATGCAAAAAATGATTC 3' 与 NbSPN106-R: 5' TAGCGGCCGCTTATTCTTTAATTATTCCA GTGT3' 进行 PCR 扩增, PCR 产物及载体 pGEX4T-1 用 *Bam*HI 和 *Not* I 双酶切。酶切产物回收后, 用 T4 DNA 连接酶对两者进行连接, 构建重组表达载体 pGEX4T-1-NbSPN106。对重组表达质粒进行 PCR 和 *Bam*HI、*Not* I 双酶切鉴定, 并测序(上海生工)鉴定。

1.6 重组蛋白的诱导表达

将重组质粒转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞, 挑取含重组质粒的单菌落至 2 mL LB 液体培养基(含

Amp 50 $\mu\text{g/mL}$)中 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养;次日以 1:100 的接种量接种入新鲜的 LB 培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 震荡培养至 $OD_{600} = 0.4 \sim 0.8$;加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 30 $^{\circ}\text{C}$ 进行诱导;诱导后的菌体超声波后,23000 \times g 离心 30 min,分别收集上清和沉淀,12.5%的 SDS-PAGE 电泳检测表达产物的存在形式。

1.7 重组蛋白的纯化

根据 HiTrap affinity columns (Amersham)操作说明进行亲和柱纯化。待总蛋白吸附以后,用 Binding buffer (140 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na_2HPO_4 , 1.8 mmol/L KH_2PO_4 , pH7.3)充分清洗亲和柱。然后用 Elution buffer (50 mmol/L Tris-Cl, 10 mmol/L reduced glutathione, pH 8.0)洗脱,收集洗脱液,并用 Bradford 法测定蛋白含量。

1.8 多克隆抗体制备及 Western blotting 分析

将纯化好的重组蛋白作为抗原免疫 3 只昆明小鼠,具体步聚为:蛋白质与等体积弗氏完全佐剂混匀,皮下注射小鼠,0.1 mg 蛋白/只小鼠(一免);一免 2 周后进行二免,蛋白质与等体积弗氏不完全佐剂混匀,皮下注射小鼠,0.1 mg 蛋白/只小鼠;二免 2 周后进行三免,蛋白质与等体积弗氏不完全佐剂混匀,皮下注射小鼠,0.1 mg 蛋白/只小鼠;三免 8~10 d 后采血,分离血清。0.1 mL/管分装, - 20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。ELISA 检测抗体效价。同时取注射 PBS buffer 的小鼠血清作阴性对照。将 1.0×10^9 家蚕微孢子虫采用液氮研磨提取其总蛋白,经 12.5%的 SDS-PAGE 分离,然后转移到 PVDF 膜上,用 1:200 稀释的重组抗体为一抗,HRP 标记的兔抗鼠抗体作为二抗。用 DAB 显影方法鉴定免疫识别的蛋白质。

2 结果

2.1 序列分析

通过生物信息学分析,我们鉴定了一个新的丝氨酸蛋白酶抑制剂基因,在家蚕微孢子虫基因组中的编号为 NB0106-0130,因此我们将其命名为 NbSPN106。NbSPN106 基因长度为 1155 bp,编码一个 384 氨基酸的蛋白。分别利用在线软件 SignalP v3.0、PFAM、CBS 对 NbSPN106 基因信号肽、结构域、糖基化位点和磷酸化位点进行预测。结果显示 NbSPN106 具有一个完整的 *serpin* 保守结构域,在 N 端具有 19 个氨基酸长度的信号肽,同时具有潜在的糖基化位点和磷酸化位点。预测成熟蛋白分子量和等电点分别是 42.7 kDa 和 pH5.6。BLASTP 比对说明,家蚕微孢子虫 NbSPN106 氨基酸序列与其他种

类的 *serpin* 相似性较低,在 21%~28%之间,与目前唯一报道的真菌 *serpin* 基因 *celpin*^[17]也只有 32%的相似性。尽管如此,NbSPN106 序列仍具有典型的 *serpin* 基因序列特征(图 1)。

Serpins 的三级结构包含一些对功能起重要作用的保守区域^[18-20],包括 shutter、breach 和 hinge 区^[21]。Shutter 上的关键残基如 hB 区的 Ser56、breach 区的 Trp194 在 NbSPN106 中也都存在。RCL 上的 hinge 区序列可以帮助鉴定 Serpin 属于抑制型还是非抑制型^[22],NbSPN106 的 hinge 区 P15-P12 高度保守,这说明 NbSPN106 可能具有抑制功能。此外,在 Irving 报道的 51 个保守的氨基酸残基中^[1],Phe147、Gly167、Phe190、Lys191、Phe198、Phe208、Met221、Lys290、Leu299、Gly307、Leu383、Phe384 等在 NbSPN106 也高度保守。

2.2 表达载体的构建和鉴定

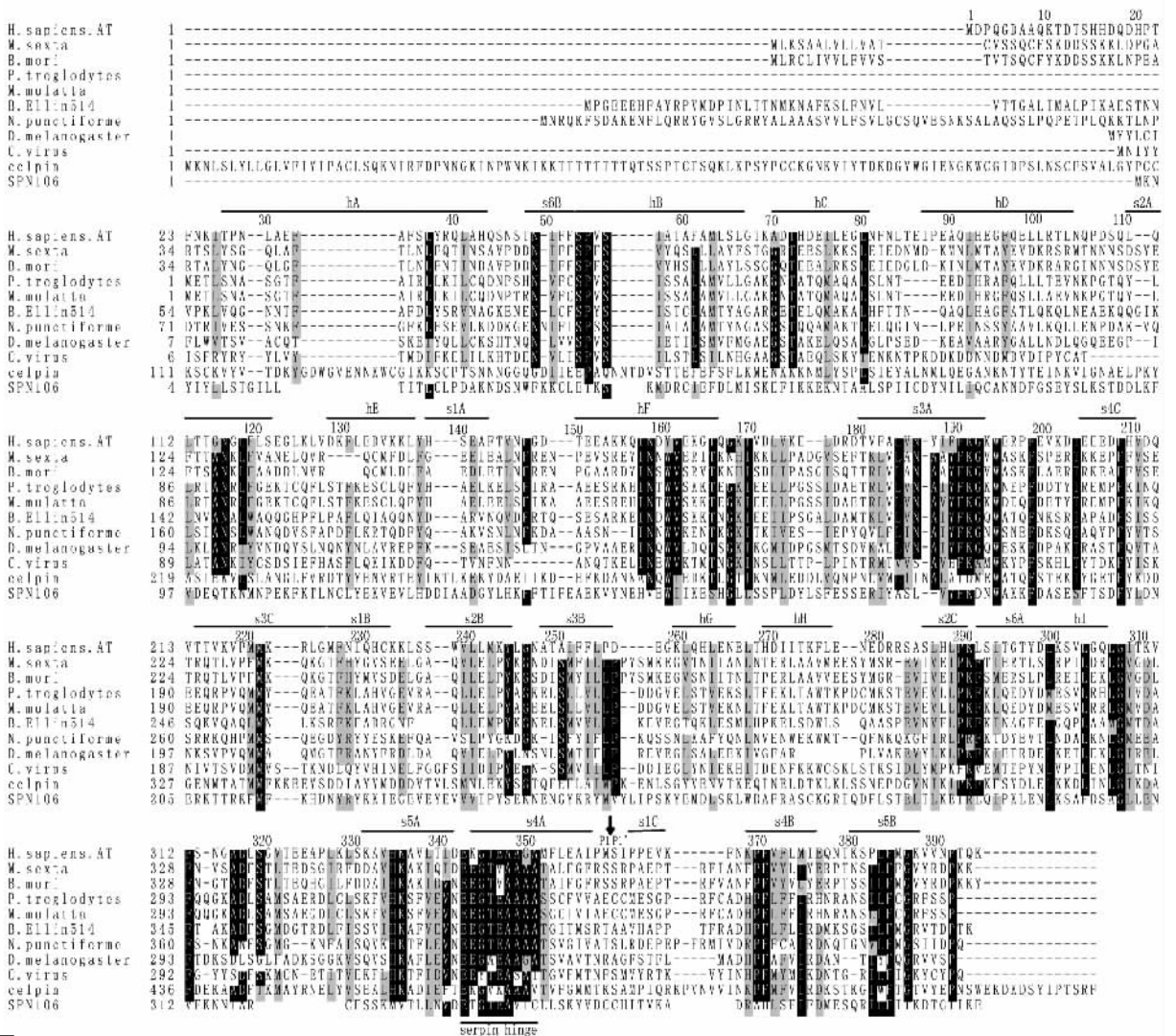
根据 NbSPN106 的核酸序列,设计特异引物进行 PCR 扩增。以基因组 DNA 为模板,得到了长度大约为 1100 bp 的目的片段,经连接、转化、阳性质粒的筛选后进行测序。重组质粒经 *Bam*HI 和 *Not* I 双酶切及 PCR 验证均获得了与预期大小相符合的片段。将测序的结果与我们从基因组中预测的片段进行比对,结果显示这个克隆片段与基因组的预测完全一致。将其登录到 GenBank 中(登录号为: FJ705061)。

2.3 重组蛋白的诱导表达与纯化

将已验证的 pGEX4T1-NbSPN106 重组表达质粒转入表达菌 *E. coli* BL21 + (DE3),在 30 $^{\circ}\text{C}$ 经 IPTG 诱导表达。将菌体溶于适量的结合缓冲液中,经超声波破碎,高速离心后分别取上清和沉淀 SDS-PAGE 电泳检测。在离心上清及沉淀中,都检测发现 66 kDa 左右的重组蛋白。上清经过 GSTrapFF 柱亲和纯化后,所获得的目的蛋白带比较纯,可用于作为制备抗体的抗原(图 2)。

2.4 Western blotting 分析

将提取的家蚕微孢子虫总蛋白经 SDS-PAGE 电泳后转 PVDF 膜与抗体进行免疫印迹反应(Western blotting),并以小鼠阴性血清作为对照,同时将蛋白质 Marker 转膜后考染作为对照。结果如图 3 所示:表明,抗体 anti-NbSPN106 与 45 kDa 大小的蛋白质有很强免疫反应,而对照组没有免疫反应发生;说明尽管所制备的抗体为多克隆抗体,但仍然有很好的抗原特异性。



1 家蚕微孢子虫 NbSPN106 与其他物种 Serpin 蛋白氨基酸序列多重序列比对

Fig. 1 Alignment between *serpins* from *N. bombycis* and selected members of the *serpin* superfamily. Human α 1-antitrypsin with "template" numbering and assignment of secondary structures of the cleaved form is included as the top sequence. The alignment of sequences was made with Clustalx (version 1.83) and shaded with BOXSHADE 3.21 (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). Residues that are identical or similar in seven or more of the ten *serpins* are shaded in grey. The scissile bond is marked with an arrow. Accession numbers are: *Homo sapiens* α 1-antitrypsin (1QLP), *Manduca sexta* serpin6 (AAV91026), *Drosophila melanogaster* serpin1 (CAB63096), *Pan troglodytes* serpine proteinase inhibitor (XP_001160054), *bacterium Ellin514* serpin (ZP_02968432), *Nostoc punctiforme* serpin (YP_001865171), *Macaca mulatta* serine proteinase inhibitor (XP_001091156), *Bombyx mori* serpin6 (NP_001103823), *Coupox virus* CPXV217 protein (NP_619997).

3 讨论

在长期的进化过程中, 侵染有机体采用了一系列特异的策略来逃避宿主的防御体系^[23-25]。鉴于 Serpin 在生命进程的调节能力, 病原体自身有可能编码 *serpin* 基因, 利用它们来抵御宿主的防御功能。例如, 牛痘病毒编码的 *serpin* 基因产物 CmA 是一个活性很强的半胱氨酸蛋白酶白介素-1 β 转移酶抑制剂^[9,26-27], 而白介素-1 β 转移酶在白介素-1 β (IL-1 β) 前体转化为有活性的炎症调控因子 (IL-1 β) 起着重

要的作用^[28]。此外, CmA 能够抑制 Fas-, 保护感染细胞避免 Fas-诱导的细胞凋亡^[29-31]。

家蚕微孢子虫有可能采用相同的策略来抵御宿主家蚕的免疫功能。Wolfson 等^[32] 研究发现包括家蚕在内的大多数鳞翅目昆虫消化道内 pH 为中性到碱性, 主要含有丝氨酸蛋白酶, 在生长发育中起着重要作用。家蚕微孢子虫被家蚕吞食后, 沿着消化道入侵小肠上皮细胞, 在入侵过程中, 微孢子虫处于一个宿主蛋白酶含量丰富的环境中, 这将对微孢子虫的生存和繁殖产生不利的影响。为了保证自身的生

存,微孢子虫分泌出分泌型 Serpin 蛋白,与家蚕中肠内的丝氨酸蛋白酶作用形成酶-抑制剂复合物,抑制蛋白水解酶的活性,干扰其免疫系统。同时扰乱昆虫的正常代谢,最终导致昆虫发育不正常甚至死亡。

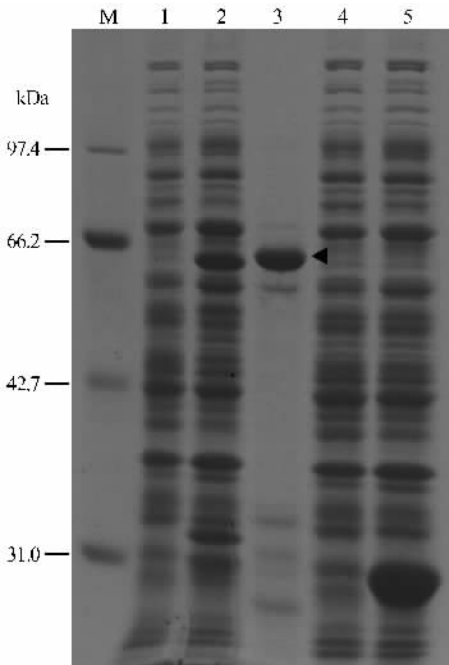


Fig.2 NbSPN106 诱导表达 SDS-PAGE 检测

Fig.2 Recombinant expression of NbSPN106 detected by SDS-PAGE. M: Protein marker. 1: pGEX4T1-NbSPN106 expression protein without IPTG. 2: Induced supernatant by ultrasonic treatment. 3: Purification of pGEX4T1-NbSPN106 expression protein. 4: pGEX-4T-1 expression control without IPTG. 5: pGEX-4T-1 expression control induced by IPTG. The recombinant protein was denoted by arrow.

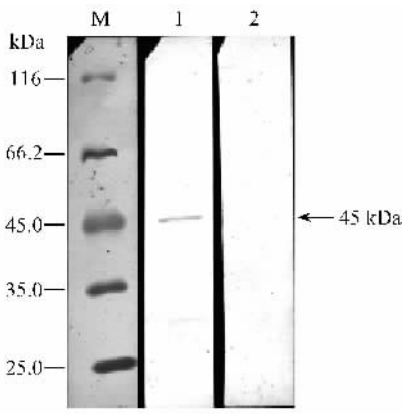


Fig.3 NbSPN106 蛋白抗体 anti-NbSPN106 与家蚕微孢子虫总蛋白的免疫印迹分析

Fig.3 Immunoblotting with anti-NbSPN106 against total protein of *Nosema bombycis*, the protein of 45 kDa in size was detected. M: Protein Marker. 1: Immunoblotting reactivity of the antirecombinant NbSPN106 antiserum (1:200 dilution) with a 45 kDa *N. bombycis* protein band. 2: Immunoblotting reactivity of mouse sera (1:200 dilution) as negative control.

本文以家蚕微孢子虫为材料,利用家蚕微孢子虫的基因组信息,通过比较分析,首次报道了家蚕微孢子虫的 *serpin* 基因,并进行了原核克隆表达、鉴定与分析。Western blotting 表明,家蚕微孢子虫总蛋白中存在 45 kDa 左右的 NbSPN106 蛋白。家蚕微孢子虫的 NbSPN106 与其他物种的 Serpin 蛋白相似性较低,但是进一步的序列比较分析说明, NbSPN106 与其具有一定的同源性,即具有典型的 Serpin 蛋白保守位点。从结构域上分析, NbSPN106 具有一个完整的结构域;其 N 端具有一个信号肽,预示 NbSPN106 为分泌型蛋白,执行胞外功能。此外,我们正在对家蚕微孢子虫 NbSPN106 蛋白在体外的功能及其作用的靶标作积极地探索。

参考文献

- [1] Irving JA, Pike RN, Lesk AM, et al. Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. *Genome Research*, 2000, 10 (12): 1845 - 1864.
- [2] Rawlings ND, Morton FR, Kok Y, et al. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36 (Database issue): D320 - D325.
- [3] Travis J, Salvesen GS. Human plasma proteinase inhibitors. *Annual Review of Biochemistry*, 1983, 52: 655 - 709.
- [4] Collen D, Lijnen HR. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood*, 1991, 78 (12): 3114 - 3124.
- [5] Pak SC, Kumar V, Tsu C, et al. SRP-2 is a cross-class inhibitor that participates in postembryonic development of the nematode *Caenorhabditis elegans*: initial characterization of the clade L serpins. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279 (15): 15448 - 15459.
- [6] Carrell RW, Evans DL, Stein PE. Mobile reactive centre of serpins and the control of thrombosis. *Nature*, 1991, 353 (6344): 576 - 578.
- [7] Ligoxygakis P, Roth S, Reichhart JM. A serpin regulates dorsal-ventral axis formation in the *Drosophila* embryo. *Current Biology*, 2003, 13 (23): 2097 - 2102.
- [8] Levashina EA, Langley E, Green C, et al. Constitutive activation of toll-mediated antifungal defense in serpin-deficient *Drosophila*. *Science*, 1999, 285 (5435): 1917 - 1919.
- [9] Ray CA, Black RA, Kronheim SR, et al. Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell*, 1992, 69 (4):

- [10] Zou Z, Maslowicz A, Hendrix MJ, et al. Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells. *Science*, 1994, 263 (5146): 526 – 529.
- [11] Stefansson S, Lawrence DA. The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin alpha V beta 3 binding to vitronectin. *Nature*, 1996, 383 (6599): 441 – 443.
- [12] Dickinson JL, Bates EJ, Ferrante A, et al. Plasminogen activator inhibitor type 2 inhibits tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis: evidence for an alternate biological function. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270 (46): 27894 – 27904.
- [13] Potempa J, Korzus E, Travis J. The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269 (23): 15957 – 15960.
- [14] Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, et al. The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins: evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276 (36): 33293 – 33296.
- [15] Clarke EP, Cates GA, Ball EH, et al. A collagen-binding protein in the endoplasmic reticulum of myoblasts exhibits relationship with serine protease inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266(26): 17230 – 17235.
- [16] Carlton JM, Hirt RP, Silva JC, et al. Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science*, 2007, 315 (5809): 207 – 212.
- [17] Steenbakkers PJ, Irving JA, Harhangi HR, et al. A serpin in the cellulosome of the anaerobic fungus *Piromyces* sp. strain E2. *Mycological Research*, 2008, 112 (Pt 8): 999 – 1006.
- [18] Huber R, Carrell RW. Implications of the three-dimensional structure of alpha 1-antitrypsin for structure and function of serpins. *Biochemistry*, 1989, 28 (23): 8951 – 8966.
- [19] Harrop SJ, Jankova L, Coles M, et al. The crystal structure of plasminogen activator inhibitor 2 at 2.0 Å resolution: implications for serpin function. *Structure*, 1999, 7 (1): 43 – 54.
- [20] Whisstock JC, Pike RN, Jin L, et al. Conformational changes in serpins: II. The mechanism of activation of antithrombin by heparin-dagger. *Journal of Molecular Biology*, 2000, 301 (5): 1287 – 1305.
- [21] Stein PE, Carrell RW. What do dysfunctional serpins tell us about molecular mobility and disease? *Nature Structural Biology*, 1995, 2 (2): 96 – 113.
- [22] Hopkins PC, Carrell RW, Stone SR. Effects of mutations in the hinge region of serpins. *Biochemistry*, 1993, 32 (30): 7650 – 7657.
- [23] Behnke JM, Barnard CJ, Wakelin D. Understanding chronic nematode infections: evolutionary considerations, current hypotheses and the way forward. *International Journal for Parasitology*, 1992, 22 (7): 861 – 907.
- [24] Maizels RM, Bundy DA, Selkirk ME, et al. Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. *Nature*, 1993, 365 (6449): 797 – 805.
- [25] Allen JE, Maizels RM. Immunology of human helminth infection. *International Archives of Allergy and Immunology*, 1996, 109 (1): 3 – 10.
- [26] Komiyama T, Ray CA, Pickup DJ, et al. Inhibition of interleukin-1 beta converting enzyme by the cowpox virus serpin CrmA: an example of cross-class inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269 (30): 19331 – 19337.
- [27] Komiyama T, Quan LT, Salvesen GS. Inhibition of cysteine and serine proteinases by the cowpox virus serpin CRMA. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1996, 389: 173 – 176
- [28] Howard AD, Palyha OC, Griffin PR, et al. Human IL-1 beta processing and secretion in recombinant baculovirus-infected Sf9 cells is blocked by the cowpox virus serpin *crmA*. *Journal of Immunology*, 1995, 154 (5): 2321 – 2332.
- [29] Enari M, Hug H, Nagata S. Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis. *Nature*, 1995, 375 (6526): 78 – 81.
- [30] Miura M, Friedlander RM, Yuan J. Tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by a CrmA-sensitive cell death pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92 (18): 8318 – 8322.
- [31] Tewari M, Telford WG, Miller RA, et al. CrmA, a poxvirus-encoded serpin, inhibits cytotoxic T-lymphocyte-mediated apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270 (39): 22705 – 22708.
- [32] Wolfson JL, Murdock LL. Diversity in digestive proteinase activity among insects. *Journal of Chemical Ecology*, 1990, 4 (160): 1089 – 1102.

Identification of a new serpin gene (NbSPN106) from *Nosema Bombycis*

Meilin Tao¹, Guoqing Pan¹, Huaicui Hu¹, Zeyang Zhou^{1,2*}

⁽¹⁾ The Key Sericultural Laboratory of Agricultural Ministry, Southwest University, Chongqing 400716, China)

⁽²⁾ College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 400047, China)

Abstract: [Objective] Serpins from pathogens have been implicated in evasion of the host immune system. We identified a new serpin protein (NbSPN106), analyzed its sequences, and detected using Western blotting. [Methods] *Nosema bombycis* proteins with an expect score less than 1×10^{-5} were checked against MEROPS database (<http://merops.sanger.ac.uk>) by Local Alignment Search Tool search and confirmed with Database of Protein Families and HMMS. Multiple sequence alignments were performed using the ClustalX. The sequence encoding the mature protein was amplified by PCR, cloned into the pGEX4T-1 vector and expressed in *Escherichia coli*. Specific antiserum generated against the recombinant protein was used in immunoblot assay. [Results] A new serpin gene, named NbSPN106, was identified form *Nosema Bombycis* genome. The coding sequence of this gene is 1155 bp length with a putative signal peptide and contains the conserved serpin sequences. A specific band of approximately 45 kDa was recognized by the anti-NbSPN106 serum. [Conclusions] The finding of serpins in *Nosema bombycis* raises new questions about their possible role in pathogenicity, which deserves further studies.

Keywords: Serpin; *Nosema bombycis*; microsporidia

(本文责编: 张晓丽, 谷志静)

Supported by the Major Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2005CB121003) and the Chongqing Key Scientific and Technological Break-through Project (CSTC, 2006AA5019)

* Corresponding author. Tel: +86-23-68251088; Fax: +86-23-68251228; E-mail: zyzhou@cqnu.edu.cn

Received: 6 February 2009 / Revised: 30 March 2009

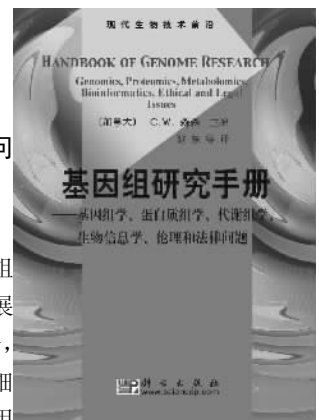
科学出版社新书推介(2009-03)

基因组研究手册——基因组学、蛋白质组学、代谢组学、生物信息学、伦理和法律问题 (翻译版)

(加拿大)C.W. 森森 主编 谢东 等译 978-7-03-023119-2 ¥95.00 2009年3月出版

内容简介: 本书旨在为读者引入“组学”的各种基本概念,了解其基本内容,介绍各种常用的“组学”技术,并结合对实例的引用和阐述,展示“组学”的应用及前景。同时,就“组学”的迅猛发展所带来的社会伦理问题,进行了开放性的讨论。基于上述目的,本书分为四个部分:第一部分,关键的生物,对“组学”进行了概括介绍;第二部分,基因组和蛋白质组技术,结合应用实例,详细地介绍了基因组学和蛋白质组学的技术发展;第三部分,生物信息学,对这一在组学研究和应用中不可或缺的工具进行了细致全面的阐述;第四部分,伦理、法律和社会问题,归纳和展示了由“组学”的迅速发展所带来的不可避免的社会问题,并开展了多方面、多视角的讨论。

本书可供分子生物学、生物技术、医药卫生,以及生命科学领域相关科研、技术人员,研究生和高年级本科生参考使用。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址 北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编:100717

联系人:周文宇 联系电话:010-64031535

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com> 欢迎致电索要书目 <http://journals.im.ac.cn>