

柞蚕滞育关联蛋白基因 *dap2* 的表达特征及分子特性

杨晓丽^{1,2}, 毕臻乐^{1,2}, 舒特俊^{1,2}, 陈剑清^{1,2}, 张耀洲^{1,2}, 陈 健¹

(1. 浙江理工大学生命科学学院生物化学研究所, 杭州 310018; 2. 天津市国际生物医药联合研究院, 天津 300457)

摘 要: 滞育关联蛋白(DAP)在昆虫滞育进程中可能发挥重要作用。从 NCBI 获取柞蚕滞育关联蛋白基因 2 (*Antheraea pernyi* diapause-associated protein 2, *dap2*) 的序列, 序列分析表明该基因的 cDNA 全长 1 187 bp, ORF 为 874 bp, 编码 278 个氨基酸。NCBI 数据库氨基酸序列比对, DAP2 与烟草天蛾和家蚕的眼色素结合蛋白(ommin-binding protein, OBP) 同源性分别达到 57% 和 58%。通过荧光定量 PCR 和 Western blotting 方法, 分别检测柞蚕不同发育时期和五龄幼虫不同组织中 *dap2* 的转录表达水平, 结果表明 *dap2* 在滞育蛹中转录和表达水平最高; 在 5 龄幼虫不同组织中的分析表明其转录水平在脂肪体和血淋巴中最高, 在翻译水平上血淋巴中表达最高。分离纯化后, 对天然 DAP2 蛋白分子特性进行初步研究, 吸收光谱分析不能表明其携带色素, 去糖基化修饰分析表明其为糖蛋白, 双向电泳表明其可能存在三种不同程度的翻译后修饰, 推测其可能是柞蚕的一种眼色素结合蛋白(ommin-binding protein, OBP)。

关键词: 柞蚕; 滞育关联蛋白 2; 眼色素结合蛋白; 荧光定量 PCR; 免疫印迹分析

中图分类号: Q812 **文献标志码:** A

0 引 言

滞育是昆虫度过极端不良环境的选择, 以使种群得以延续^[1]。其主要特征是昆虫代谢活动显著降低, 发育停滞^[2]。昆虫滞育形态有卵、幼虫、蛹以及成虫, 不同滞育形态的滞育机制的研究也很广泛, 在研究幼虫和蛹滞育的机制时, 发现一些幼虫和成虫脂肪体和血淋巴中有一种或几种蛋白质, 在滞育昆虫中有着较高的滴度, 通常在滞育期合成, 滞育开始后逐渐增加, 并在滞育结束后逐渐消失, 推断其与滞育的发生及维持有密切关系^[3], 称这类蛋白为滞育关联蛋白(diapause-associated protein, DAP)。

迄今为止, 仅在西南玉米秆草螟、玉米茎蛀褐夜蛾、酸模叶甲和棉红铃虫中有关于 DAP 的报道^[4-5], 并且只停留在发现阶段, 其分子特征并没有相关报道, 且关于 DAP 在滞育进程中作用机制仅停留在一些推断性的假设^[6]。柞蚕以蛹滞育, 其体内 DAP

的研究尚属空白。本研究从 DAP2 着手, 通过实时荧光定量 PCR 及免疫印迹技术对该基因及其编码蛋白质在柞蚕各发育时期及五龄幼虫各组织中转录和蛋白质表达差异进行研究, 并通过生物信息学分析发现 DAP2 与烟草天蛾以及家蚕的眼色素结合蛋白(ommin-binding protein, OBP) 有着较高同源性。

OBP 是在昆虫着色和解毒途径中发挥作用的一类糖蛋白^[7]。最早发现于烟草天蛾^[8], 在家蚕, 日本柞蚕以及欧洲玉米螟等生物中有过报道^[9-11]。欧洲玉米螟 OBP 的研究表明其在滞育发生之前的血淋巴中浓度增加, 并将其和 DAP 一并作为鳞翅目滞育感应的生物标记物^[11]。但是 OBP 和昆虫滞育的内在关联以及 OBP 和 DAP 的关联尚不清楚。我们从柞蚕五龄幼虫血淋巴中分离纯化出 DAP2, 利用光谱学、糖基化分析及双向电泳技术对其分子特性进行研究, 发现其与 OBP 有类似性质, 为柞蚕滞

收稿日期: 2014-01-10

基金项目: 国家高技术研究发展计划“863”项目(2011AA100603)

作者简介: 杨晓丽(1988—), 女, 山西临汾人, 硕士研究生, 研究方向为生物反应器及蛋白质组学。

通信作者: 陈 健, E-mail: chj1999@126.com

育机制及其功能基因组的研究打下了基础。

1 试验

1.1 实验材料

E. coli TG1、BL21(DE3)菌株由本实验室保存,新西兰大白兔购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心,合格证号 SCXK-(军)2013-0013。

免疫蛋白印迹所用到的抗体制备:将 *dap2* 片段(不包含生物信息学预测的可能编码信号肽的序列)克隆至原核表达载体 pET28a(+),转化至 *E. coli* BL21(DE3),IPTG 诱导表达融合蛋白,通过镍柱亲和层析得到纯化的融合蛋白,并免疫新西兰大白兔得到抗血清,最后利用 ProteinA 对其纯化制备出多克隆抗体。抗体特异性检测表明所制备的抗体特异性良好。

1.2 *dap2* 基因及其编码蛋白质的生物信息学分析

通过 DNASTar 软件包分析 *dap2* 基因的 cDNA 序列与编码氨基酸序列及蛋白质分子量和等电点,分别利用 Signal P4.0 和 TargetP1.1 在线预测 DAP2 的信号肽及其在细胞内的定位,利用 SWISS-MODEL 预测 DAP2 的二级结构和高级结构,利用蛋白质分析系统 ExPASy 进行蛋白质功能位点等信息的在线分析。DNAMAN 软件进行多序列比对。

1.3 *dap2* 基因表达的实时荧光定量 PCR 检测

为了分析柞蚕发育过程及 5 龄幼虫不同组织中 *dap2* 基因的转录水平变化,用 Trizol 法提取柞蚕滞育蛹、非滞育蛹、蛾、卵、5 龄幼虫的总 RNA 和 5 龄幼虫的表皮、卵巢、脂肪体、血淋巴、中肠、马氏管、气管及丝腺等组织的总 RNA,用 DNase I 室温消化 30 min 去除基因组 DNA,依照 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 步骤合成 cDNA。在 Light Cycler® 480 II 荧光定量 PCR 仪上进行检测。用 primer5.0 软件设计 *dap2* 荧光定量 PCR 上游引物(5'-AAATGTTCTTTTGTCCCGTTCA-3')和下游引物(5'-ATGGTGTTCCTCCCAACTGCTA-3')以及内参 *βactin* 的荧光定量 PCR 的上游引物(5'-ACCAACTGGGACGACATGGAGAAA-3')和下游引物(5'-TCTCTCTGTTGGCCTTTGGGTTGA-3')。

1.4 DAP2 蛋白表达的 Western blotting 检测

为了分析 DAP2 在柞蚕发育过程及 5 龄幼虫不同组织中的表达变化情况,将“1.3”所述不同发育时

期蚕体及五龄幼虫各组织样品,分别用液氮研磨至粉末状,用适量的蛋白质提取裂解液(50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),150 mmol/L NaCl,5 mmol/L EDTA,1 mmol/L DTT,0.5% NP-40,0.5% NaDOC,使用前加入蛋白酶抑制剂 PMSF 至终浓度为 100 μg/mL)溶解,冰上放置 30 min,12 000 r/min,4℃离心 15 min,上清即为各样品的总蛋白溶液。用 BCA 法对总蛋白进行定量后 SDS-PAGE 分析,湿转法将总蛋白转移到 PVDF 膜上,5% BSA 室温封闭 2 h,DAP2 多克隆抗体(体积比 1:5 000),37℃孵育 2 h,TBST 洗涤 3 次后加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗(体积比 1:5 000),37℃孵育 1 h,TBST 洗涤 3 次,TBS 洗涤 2 次,DAB 暗处显色,观察结果。

1.5 DAP2 的纯化

5 龄幼虫足部剪开,将其血淋巴收集在 30 mL 离心管中,离心管置于冰上,血淋巴中加入 DTT(终浓度为 1 mmol/L)和 PMSF(终浓度为 100 μg/mL)。4℃,12 000 r/min 离心 15 min,去除不溶的物质。之后利用(NH₄)₂SO₄ 分级沉淀,参照 Ralph R 的方法^[8],将 90%(NH₄)₂SO₄ 沉淀物重悬,透析,3 kD 超滤管浓缩。以 PBS(pH7.4)为流动相,利用 AKTAexplorer 蛋白纯化系统,L superdex 200 层析柱分离,利用 SDS-PAGE 分析各蛋白吸收峰样品,收集含目的蛋白的吸收峰,浓缩。样品与平衡缓冲液 A(20 mmol/L Tris-Cl,pH8.0)混合,用 Hiprep 16/10 Q FF 阴离子交换柱处理,0~1 mol/L NaCl 梯度洗脱,SDS-PAGE 分析洗脱样品,收集含目的蛋白的样品,透析,浓缩。用 BandScan V5.0 软件测算 DAP2 的纯度。

1.6 DAP2 的分子特性

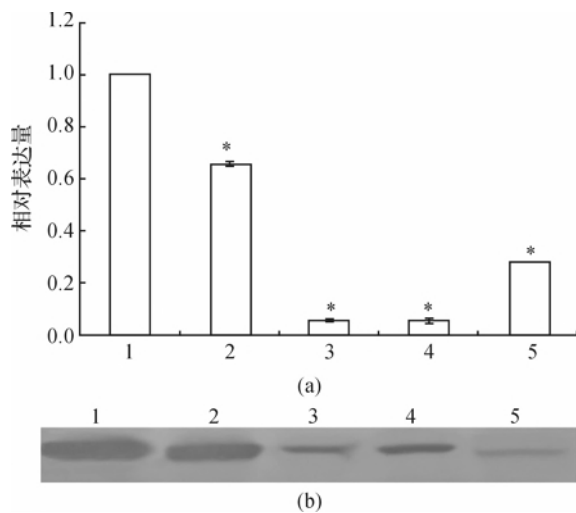
1.6.1 DAP2 的吸收光谱的测定

为了检测 DAP2 是否携带色团,对“1.5”中纯化到的 DAP2(0.12 mg/mL,溶于 PBS,pH7.4)进行波长扫描,设定扫描波长范围为 280~800 nm,具体步骤按照 Thermo Scientific Varioskan Flash 说明书操作。

1.6.2 N 连接的糖基化检测

以“1.5”中纯化得到的 DAP2(0.12 mg/mL,溶于 PBS,pH7.4)为作用底物,依照以下反应体系:8 μL 样品,1 μL 10×Glycoprotein Denaturing Buffer 混合后 100℃加热 10 min;加入 2 μL 10×G7 Reaction Buffer,2 μL 10% NP40,H₂O 和 500 U PNGaseF,37℃孵育 1 h。以不加 PNGaseF 组为对照

中的 *dap2* 转录水平进行分析,并通过 Western Blotting 检测柞蚕各发育时期 DAP2 蛋白的表达水平。如图 4(a) 所示, *dap2* 在滞育蛹期转录水平最高,其次是在非滞育蛹期和幼虫期,蛾期和卵期转录水平最低。DAP2 蛋白在滞育蛹期、非滞育蛹期表达量较高,其次在蛾期、卵期和五龄幼虫期表达量较低,其结果与各时期转录情况基本一致(图 4b)。



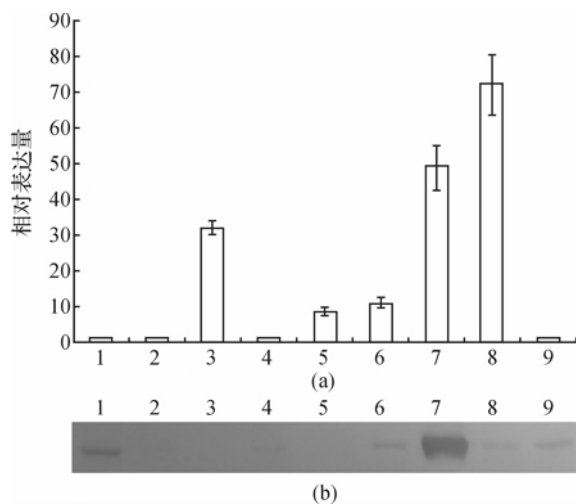
1:滞育蛹,2:非滞育蛹,3:蛾,4:卵,5:5龄幼虫

图4 柞蚕不同发育时期 *dap2* 基因的转录(a)

和蛋白质表达(b)分析

2.3 柞蚕5龄幼虫各组织中 *dap2* 转录和蛋白质表达分析

荧光定量 PCR 分析显示,柞蚕5龄幼虫各组织 *dap2* 的转录水平存在较大差异,其中脂肪体和血淋巴转录水平最高,马氏管,卵巢,气管中转录水平次之,头,丝腺,中肠,表皮中转录水平最低(图 5a)。



1:头,2:中肠,3:马氏管,4:丝腺,5:卵巢,

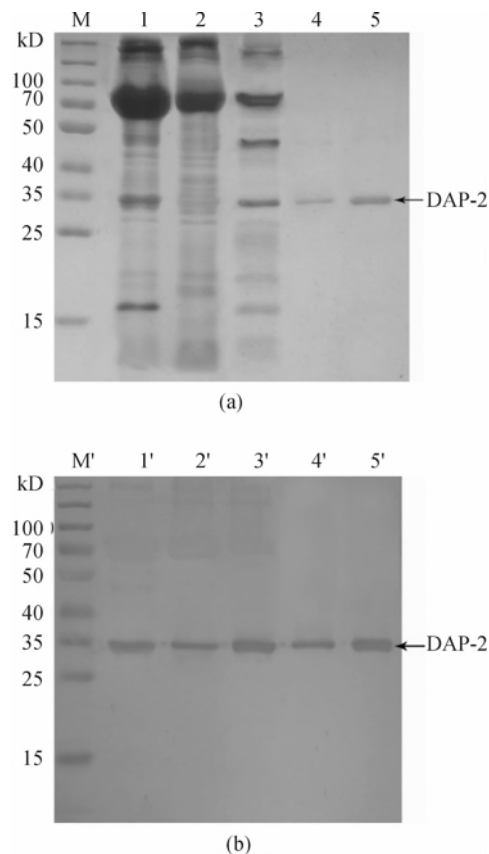
6:气管,7:血淋巴,8:脂肪体,9:表皮

图5 柞蚕5龄幼虫各组织中 *dap2* 基因转录(a)和蛋白质表达(b)水平

Western Blotting 检测结果表明,DAP2 在血淋巴中表达量最高,头部、丝腺、气管、脂肪体、表皮中表达量基本接近,中肠、马氏管、卵巢中几乎没有检测到该蛋白质的存在(图 5b)。

2.4 DAP2 蛋白的纯化及分子特性

DAP2 从5龄幼虫血淋巴中纯化,首先利用硫酸铵分级沉淀去除大部分的储存蛋白,90%硫酸铵沉淀目的蛋白的含量最多。样品透析浓缩后,经 L superdex 200 层析柱纯化,SDS-PAGE 分析如图 6 所示。最后,用阴离子交换柱 Hiprep 16/10 Q FF 处理,0~1 mol/L NaCl 梯度洗脱,SDS-PAGE 检测(图 6a)。纯化后的样品 Western Blotting(图 6b)分析,后用 BandScan V5.0 软件进行其纯度检测,达到 94%。

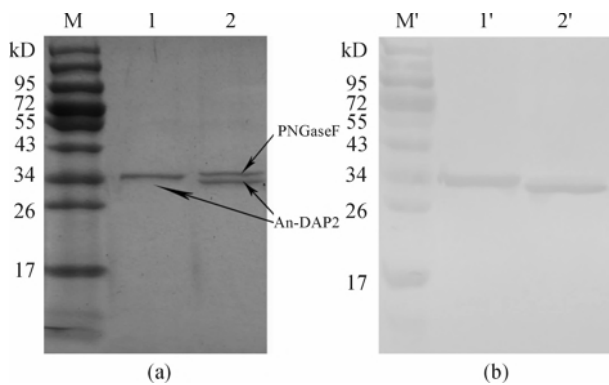


M:蛋白质分子量标准,1:5龄幼虫血淋巴,2:5龄幼虫血淋巴65%硫酸铵沉淀样品,3:5龄幼虫血淋巴90%硫酸铵沉淀样品,4:90%硫酸铵沉淀经 L-superdex 200 层析包含 DAP2 的洗脱样品,5:阴离子交换柱 Hiprep 16/10 Q FF 处理后包含 DAP2 的洗脱样品

图6 5龄幼虫血淋巴中 DAP2 蛋白的纯化 SDS-PAGE

(a)与 Western Blotting (b)分析

用 PNGaseF 特异性地切割 N-连接的寡糖链,结果如图 7 所示,对照组蛋白大小未发生变化,处理组蛋白大小减小 2 kD 左右。



M: 蛋白分子量标准, 1: DAP2 PNGaseF 酶切前,
2: DAP2 PNGaseF 酶切后

图 7 柞蚕 DAP2 糖链 PNGaseF 酶切 SDS-PAGE(a)
和 Western Blotting (b) 分析

纯化后的 DAP2 蛋白样品进行双向电泳, 在 34 kD 左右出现 3 个不同的点, 经质谱分析表明这三个蛋白点都是 DAP2 蛋白。如图 8 所示。

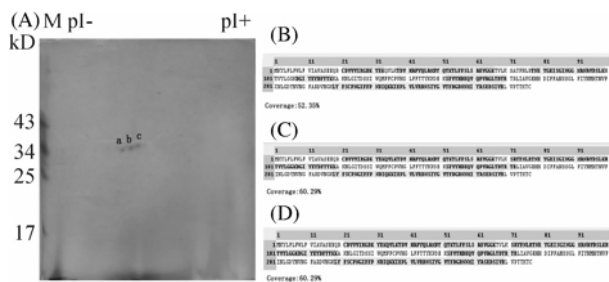


图 8 2-D 电泳分析及质谱分析

注: 质谱鉴定 (B)、(C)、(D) 分别对应 A 图 a、b、c 蛋白点

2.5 讨论

本研究对 *dap2* 基因进行生物信息学分析, *dap2* 基因 ORF 大小为 834 bp, 编码 277 个氨基酸残基, 预测蛋白质分子量为 31.39 kD, 等电点 6.01。多序列比对分析发现, DAP2 与烟草天蛾和家蚕眼色素结合蛋白 (OBP) 同源性可达到 56%, 57%, 推测其可能是一种眼色素结合蛋白。信号肽和跨膜区分析结果表明, DAP2 有存在信号肽的可能, 可能为分泌型蛋白, 这与其携带和转运色素功能相符^[12]。蛋白质高级结构预测提示其不含有 α 螺旋, 推测高含量的 β 折叠形成一个 β 桶, 内部可能形成一个眼色素绑定位点。

关于柞蚕 *dap2* 基因的研究尚未见报道, 本文对其表达特征进行了研究和阐述。有研究发现昆虫滞育期一些蛋白滴度较高, 非滞育期滴度较低或者不存在该类蛋白, 这类蛋白被称为 DAP^[13], 推测其与昆虫滞育相关^[14]。通过荧光定量 PCR 和 Western Blotting 技术对柞蚕各发育时期及 5 龄幼虫各组织中 *dap2* 转录及蛋白表达情况进行分析, 其结

果基本上是一致的。在滞育蛹中该基因及编码蛋白质的转录和表达水平最高, 且其它时期都有较低程度的转录和表达, 这与其它物种中滞育关联蛋白的表达特征相符, 表明其与柞蚕滞育有关。通过荧光定量 PCR 和 Western blotting 分别检测到 *dap2* 基因及编码蛋白质在柞蚕 5 龄幼虫各组织中转录水平最高的为脂肪体, 血淋巴中表达水平最高。由于柞蚕为开放性血液循环系统, 血液可以作为转运物质的载体^[15], 这表明 DAP2 同许多蚕体蛋白类似, 在脂肪体中转录并合成, 分泌到血淋巴中发挥作用^[16]。

从五龄幼虫血淋巴中纯化出 DAP2, 纯度可达 94%。通过对 DAP2 的全波长扫描分析, 只有 278nm 最大吸收峰未见其在可见光下有特异的吸收峰。有研究表明眼色素和眼色素结合蛋白的结合是短暂的^[10,17], 还有的研究仅在烟草天蛾幼虫 wandering 时期分离到的眼色素结合蛋白^[18]。本研究结果表明 DAP2 并未结合色素, 很有可能是纯化过程中色素已与其分离, 也有可能是我们纯化所用血淋巴并不来自幼虫 wandering 时期, 或许 DAP2 不是一种 OBP。利用 PNGaseF 特异性地切割 N-连接的寡糖链, 结果发现 PNGaseF 消化后的蛋白分子量明显减小, 经过对 DAP2 的氨基酸序列分析, 其中包含一个经典的 N-连接糖基化三联子序列 N-X (S)-S, 结合实验结果表明 DAP2 存在糖基化修饰, 这与之前的文献报道 OBP 为糖蛋白一致^[7]。糖基化对于蛋白稳定及活性有重要作用^[19], 但 DAP2 糖基化与其结构和功能的联系还有待进一步研究。蛋白质翻译后修饰是调节蛋白质生物学的关键步骤, 使其结构更复杂, 功能更完善^[20]。利用双向电泳技术, 在不同等电点处存在三个蛋白点, 结合质谱分析结果显示这三个蛋白点均为 DAP2, 这表明在柞蚕体内该蛋白存在多种翻译后修饰, 可能在滞育和携带转运色素方面提供更加精细的调节。

有文献报道 OBP 和 DAP 一样也可以作为昆虫滞育的生物标记物^[13]。OBP 通过运输色氨酸代谢产物在昆虫着色和解毒途径中发挥作用^[17], 然而对于 OBP 和滞育之间的联系尚不清楚。命名为 *dap2* 的基因编码的氨基酸序列与报道的 OBP 同源性高, 实验发现有类似 OBP 的性质, 表明 DAP2 与 OBP 可能存在着某种联系。此外, 开展柞蚕功能基因组研究, 具有研究资源的替代价值和潜在的医学意义。本实验对柞蚕 *dap2* 表达特征及蛋白的分子特性进行了初步研究, 为进一步阐明 DAP2 的生理功能奠

定基础。

3 结 论

检测 *dap2* 基因在柞蚕不同发育时期以及五龄幼虫不同组织中的转录和表达情况, 滞育蛹最高; 纯化出纯度高达 94% 的天然柞蚕 DAP2 蛋白; 研究了 DAP2 分子特性, 全波长扫描分析天然 DAP2 蛋白的可见光吸收光谱, 在可见光范围内未发现吸收峰; 糖基化修饰分析鉴定 DAP2 蛋白为糖蛋白; 双向电泳检测到三个蛋白点, 质谱分析表明其都是 DAP2 蛋白。

参考文献:

- [1] Lopes F L, Desmarais J A, Murphy B D. Embryonic diapause and its regulation[J]. *Reproduction*, 2004, 128 (6): 669-678.
- [2] Saunders D S. Insect photoperiodism; measuring the night[J]. *J Insect Physiol*, 2013, 59 (1): 1-10.
- [3] Wolschin F, Gadau J. Deciphering proteomic signatures of early diapause in *Nasonia*[J]. *PLoS One*, 2009, 4 (7): e6394.
- [4] De Loof A, De Wilde J. Hormonal control of synthesis of vitellogenic female protein in the Colorado beetle, *Leptinotarsa decemlineata*[J]. *J Insect Physiol*, 1970, 16 (7): 1455-1466.
- [5] Salama M S, Miller T A. A diapause associated protein of the pink bollworm *Pectinophora gossypiella* Saunders [J]. *Arch Insect Biochem Physiol*, 1992, 21 (1): 1-11.
- [6] 赵章武, 黄永平. 昆虫滞育及其调控机制[J]. *山西大学学报: 自然科学版*, 1995, 18(1): 105-118.
- [7] Sawada H, Tsusue M, Iino T. Identification of ommin in the integument of the silkworm, *Bombyx mori*[J]. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 1994, 375 (6): 425-427.
- [8] Yepiz-Plascencia G M, Ho C, Martel R R, et al. Molecular cloning and sequence of a novel ommochrome-binding protein cDNA from an insect, *Manduca sexta* [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268 (4): 2337-2340.
- [9] Sawada H, Yamahama Y, Mase K, et al. Molecular properties and tissue distribution of 30K proteins as ommin-binding proteins from diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*[J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2007, 146 (2): 172-179.
- [10] Saito H, Yamada H, Kato Y. Isolation and partial characterization of chromoprotein from the larval hemolymph of the Japanese oak silkworm (*Antheraea yamamai*)[J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 1998, 119 (4): 625-630.
- [11] Coates B S, Hellmich R L, Lewis L C. Two differentially expressed ommochrome-binding protein-like genes (*obp1* and *obp2*) in larval fat body of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*[J]. *J Insect Sci*, 2005, 5-19.
- [12] Xu W, Zhang Y, Wang Y, et al. Molecular mechanism of diapause in insect (I): expression of diapause hormone gene and incubation temperature in embryonic stage of *Bombyx mori*[J]. *Sci China C Life Sci*, 1998, 41 (4): 344-350.
- [13] Emerson K J, Bradshaw W E, Holzapfel C M. Complications of complexity: integrating environmental, genetic and hormonal control of insect diapause[J]. *Trends Genet*, 2009, 25 (5): 217-225.
- [14] Hahn D A, Denlinger D L. Energetics of insect diapause[J]. *Annu Rev Entomol*, 2011, 56 103-121.
- [15] Liu Q N, Zhu B J, Wang L, et al. Identification of immune response-related genes in the Chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi* by suppression subtractive hybridization[J]. *J Invertebr Pathol*, 2013, 114 (3): 313-323.
- [16] Miller S G, Leclerc R F, Seo S J, et al. Synthesis and transport of storage proteins by testes in *Heliothis virescens*[J]. *Arch Insect Biochem Physiol*, 1990, 14 (3): 151-170.
- [17] Sawada H, Nakagoshi M, Mase K, et al. Occurrence of ommochrome-containing pigment granules in the central nervous system of the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2000, 125 (3): 421-428.
- [18] Martel R R, Law J H. Purification and properties of an ommochrome-binding protein from the hemolymph of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* [J]. *J Biol Chem*, 1991, 266 (32): 21392-21398.
- [19] Ogier-Denis E, Bauvy C, Aubery M, et al. N-glycosylation modification of proteins is an early marker of the enterocytic differentiation process of HT-29 cells[J]. *Reprod Nutr Dev*, 1990, 30 (3): 325-330.
- [20] Suzuki T, Kitajima K, Inoue S, et al. N-glycosylation/deglycosylation as a mechanism for the post-translational modification/remodification of proteins[J]. *Glycoconj J*, 1995, 12 (3): 183-193.

Expression Features and Molecular Properties of Diapause-associated Protein Gene *dap2* of *Antheraea Pernyi*

YANG Xiao-li^{1,2}, BI Zhen-le^{1,2}, SHU Te-jun^{1,2}, CHEN Jian-qing^{1,2}, ZHANG Yao-zhou^{1,2}, CHEN Jian¹

- (1. Institute of Biochemistry, College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;
2. Tianjin International Joint Academy of Biotechnology & Medicine, Tianjin 300457, China)

Abstract: Diapause-associated protein (DAP) might play an important role in the diapause process of insects. The sequence of *Antheraea pernyi* diapause-associated protein 2, *dap2* is obtained from NCBI. Sequence analysis shows that the overall length of cDNA of this gene is 1187bp and that of ORF is 874bp and 278 amino acids are encoded. According to NCBI database amino acid sequence alignment, the homology of DAP2 with ommin-binding protein (OBP) of tobacco hornworm and silkworm respectively reaches 57% and 58%. The transcriptional expression level of *dap2* mRNA in different development stages of *antheraea pernyi* and different tissues of five-instar larvae is respectively tested with fluorescent quantitation PCR and western blotting method. The result shows that *dap2* has the highest transcriptional and expression level in diapause pupae. The analysis in different tissues of five-instar larvae shows that its transcriptional level is highest in fat body and hemolymph and its translational level is highest in hemolymph. Preliminary study is conducted on molecular characteristics of natural ApDAP2 protein after separation and purification. Absorption spectrum analysis cannot show that it carries pigment. Deglycosylation modification analysis shows that it is glycoprotein and dimensional electrophoresis shows that there might be posttranslational modification at three different degrees. It might be an ommin-binding protein (OBP) of *antheraea pernyi*.

Key words: *antheraea pernyi*; diapause-associated protein 2; ommin-binding protein; fluorescent quantitation PCR; western blotting method

(责任编辑: 许惠儿)

(上接第 720 页)

Therapeutic Effect of Recombinant Human Lactoferrin Expressed in Silkworm and Its Product on Ulcerative Colitis

ZHAO Hong-yu¹, ZHANG Yao-zhou^{1,2,3}, YU Wei¹, SHU Te-jun^{1*}, CHEN Jian-qing¹

- (1. School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;
2. Tianjin International Joint Academy of Biotechnology and Medicine, Tianjin 300457, China;
3. School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Lactoferrin (LF) plays an important role in anti-inflammation and participation in body immunity moderation. This paper constructs recombinant virus Bm-hLF containing human lactoferrin (hLF) through silkworm baculovirus expression system, inoculates silkworm chrysalis expression recombinant human lactoferrin (rhLF), tests the expression quantity of rhLF with ELISA method, detects its bacteriostatic activity through antibacterial experiment in vitro, establishes mouse ulcerative colitis (UC) model and explores the therapeutic effect of oral administration of rhLF silkworm chrysalis meal on UC. The result shows that the maximum expression quantity of rhLF can be 0.38 mg/mL silkworm chrysalis homogenate supernatant 120 h after silkworm chrysalis is infected with recombinant virus. rhLF silkworm chrysalis meal can inhibit the growth of *E. coli* TG1. Oral administration of rhLF silkworm chrysalis meal can greatly reduce the disease activity index (DAI) and myeloperoxidase (MPO) content of UC mice and reduce the damage of colon tissue inflammation. This study provides pharmacodynamic experimental reference for further development of a new and cheap UC oral drug.

Key words: recombinant human lactoferrin; silkworm pupa; antibacterial activity; oral administration; ulcerative colitis

(责任编辑: 许惠儿)