



## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和细胞 pET28a 质粒(DE3) 为 Novagen 公司产品; pMD18T - vector 为 TaKaRa 公司产品; 大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、BL21 由江苏大学生命科学研究院保存。

1.1.2 试剂 限制性内切酶和缓冲液; T4 DNA Ligase、Taq DNA 聚合酶为 TaKaRa 公司产品; RNase A 为上海生物工程有限公司产品; M - MLV 试剂盒、Rnase free DNase 购自 Promega 公司; 蛋白分子量标准购自上海华舜生物工程公司; His 单抗购自 SIGMA 公司, 羊抗鼠 IgG 和 TCL 发光剂购自 Pierce 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 家蚕抗凋亡蛋白 *iap* 基因片段的获得 取 0.1 g - 70℃冻存的蚕体, 按照 Ivtrogen 公司 Trizol reagent 的产品说明书提取总 RNA。Rnase free Dnase 去除基因组 DNA。cDNA 第一链的合成按 M - MLV 试剂盒操作说明书的程序进行。基于 IAP 蛋白的 cDNA<sup>[5]</sup> (GenBank Accession No.: AF281073) 设计引物 P1 与 P2。

P1 5' - GAAGGATCCATGGAGTTGACGA  
AAGTT - 3'

P2 5' - GAAGAATTCTCACGAGAAGTAG  
AGCCG - 3'

P1 中引入了 BamHI 位点, P2 中引入了 EcoRI 位点。引物由上海生工基因有限公司合成。将上述引物扩增获得的目的片段通过 BamHI 与 EcoRI 双酶切位点插入 pMD18T 载体中, 构建成重组质粒 pMD18T - *iap*。

1.2.2 DNA 的测序 DNA 测序由江苏大学生命科学研究院实验室 (Backmen CEQ™ 8000 Genetic Analysis system) 及上海吉泰生物公司完成。DNASTar 5.0 分析软件进行序列分析, 并在 NCBI 数据库中进行同源性比较。

1.2.3 原核表达载体的构建及鉴定 用 BamHI 和 EcoRI 双酶切鉴定 pMD18T - *iap* 重组质粒, 酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳, 用 PCR 片段回收试剂盒回收小片段 *iap* cDNA 片段。用 BamHI 和 EcoRI 双酶切表达载体 pET28a 片段与回收的 *iap* cDNA 片段在 T4 DNA 连接酶作用下 16℃过夜, 连接产物转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞。筛选带目的片段的重组质粒, 用 BamHI 和 EcoRI 双酶切鉴定。

1.2.4 融合蛋白的诱导表达 将鉴定正确的 *iap* 原核表达质粒转化到大肠杆菌 BL21 感受态细胞中, 挑取单菌落过夜培养后以 1 : 100 (v/v) 比例接种于含卡那霉素的 LB 培养液中, 振摇至吸光值 (OD600 nm) 为 0.6 ~ 1.0 后, 加入异丙基硫代 -  $\beta$  - D - 半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度为 1 mmol/L, 37℃, 230 r/min 继续振摇 3 ~ 6 h, 诱导表达目的蛋白。同时设 BL21 空白菌对照和 IAP 原核表达质粒转化菌未诱导对照。

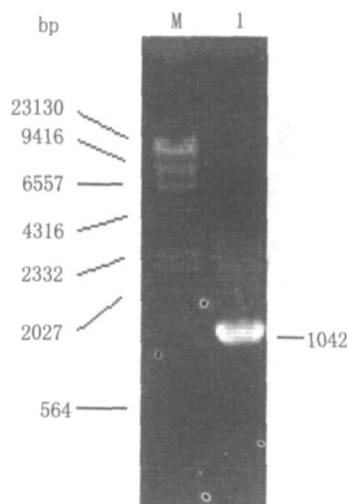
1.2.5 表达产物的 SDS - PAGE 分析 分别取加 IPTG 诱导的培养液及未加 IPTG 诱导的对照培养液 1.5 mL, 于 4℃, 4000 r/min 离心 10 min, 弃上清, PBS 洗涤 2 次, 加入 PBS 100  $\mu$ L, 再加入等体积的 2 $\times$ SDS 上样缓冲液和终浓度为 100 mmol/L 的 DTT, 煮沸 10 min, 离心, 上清即蛋白样品, 于 10% 聚丙烯酰胺凝胶进行 SDS - PAGE 检测, 80V 电泳 3 h, 电泳后染色, 观察特异表达的蛋白带。

1.2.6 表达产物的 Western Blotting 鉴定 取下 SDS - PAGE 胶, 将胶体上的蛋白质转印到硝酸纤维素膜 (NC) 上, 进行 Western Blotting 分析。一抗为 His (1 : 2000) 单抗, 二抗为羊抗鼠 IgG (1 : 2500), 利用辣根过氧化物酶显色剂的化学荧光方法使 X - 感光胶片成像来检测相关蛋白的位置。

## 2 结果与分析

### 2.1 Bm - *iap* 基因片段的扩增

经 RT - PCR 反应, 从家蚕细胞总 RNA 中扩增出一条特异的 DNA 片段, 其大小为 1041 bp (图 1), 编码 293 个氨基酸, 推测其分子量约为 38.8 kDa。



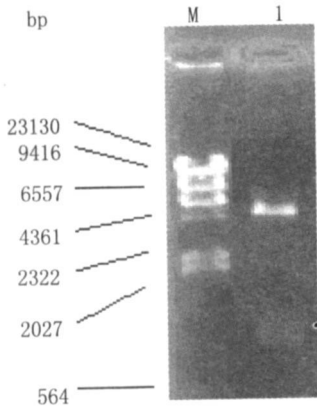
M. DNA 分子量标准 Marker ( $\lambda$ DNA/Hind III Marker);

1. RT - PCR 产物

图 1 家蚕 *iap* 基因的 RT - PCR 扩增的结果

2.2 家蚕 IAP 原核表达载体的构建及鉴定

pMD18T-*iap* 用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切得到目的片段,与线性化的 pET28a(+)连接后得到重组质粒 pET28a(+)-*iap*,通过 PCR 和酶切进行鉴定,发现酶切产物和 PCR 产物在约 1041 bp 处有一条特异的条带(图 2),证实重组质粒构建成功。

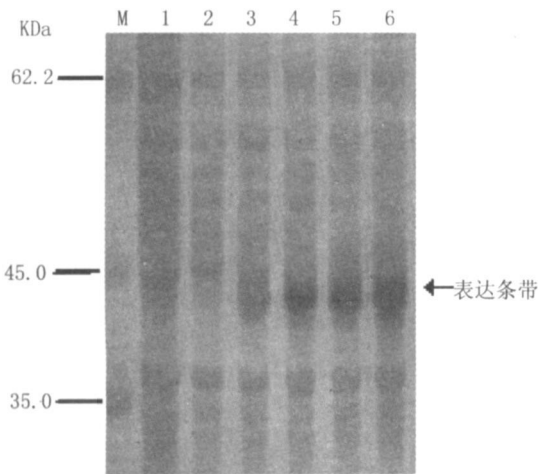


M. DNA 分子量标准; 1. PCR 产物; 2. *Bam*H I and *Eco*R I 酶切重组质粒 pET28a(+)-*iap*

图 2 重组转移质粒 pET28a(+)-*iap* 的 PCR 鉴定

2.3 SDS-PAGE 分析鉴定表达产物

将大肠杆菌中诱导表达 0, 1, 2, 3, 4h 的菌体裂解上样液,进行 SDS-PAGE 电泳分析,发现在 38.8 kDa 左右出现一条特异的蛋白条带。该蛋白在诱导前的菌体中并不存在,在诱导表达 1~4h 之间,发现在诱导 3h 时表达量最大(图 3)。同时还做了将 pET28a(+)分别不诱导和诱导 3h,实验同样发现 pET28a(+)-*iap* 诱导表达 3h 比未诱导的及空载体在 38.8 kDa 左右多出特异条带,初步说明了



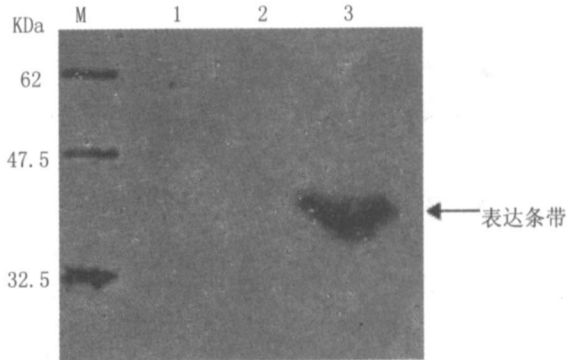
M. 蛋白分子量标准样品; 1. pET28a 诱导前; 2. pET28a-*iap* 诱导 0h; 3. 诱导 1h; 4. 诱导 2h; 5. 诱导 3h; 6. 诱导 4h

图 3 SDS-PAGE 分析表达产物

*iap* 基因在大肠杆菌中成功表达(图 3)。

2.4 Western Blotting 分析鉴定表达产物

Western Blotting 检测结果表明,重组质粒 pET28a(+)-*iap* 能被 His 抗体检测到一条 38.8 kDa 的蛋白条带,说明 *iap* 基因在大肠杆菌中与 6×His 融合表达(图 4)。



M. 蛋白分子量标准样品 1. pET28a 诱导 3h; 2. pET28a-*iap* 诱导 0h; 3. pET28a-*iap* 诱导 3h

图 4 Western Blotting 分析表达产物

3 讨论

以家蚕为材料,克隆了细胞抗凋亡因子 *iap* 基因,其长度为 1041 bp,编码 256 个氨基酸。用内切酶 *Bam*H I 和 *Eco*R I 切割 T 载体中的 *iap* 目的片段,并将此片段与经相同酶切的表达载体 PET28a 进行连接,转化到感受态的大肠杆菌 DH5α 后,筛选带目的片段的重组质粒。然后将重组质粒 PET28a-*iap* 转化到 BL21 受体菌中。通过 IPTG 诱导表达后,SDS-PAGE 和 Western Blotting 证实了在 38.8 kDa 左右有一特异条带,与预测的蛋白质分子量大小一致,说明该蛋白在大肠杆菌中表达量较高,为进一步研究其功能以及其在细胞凋亡中的作用奠定了基础。

参考文献:

[1] Zhang C H, Roberson. A triplet of nucleases proteins (NP42-50) is activated in human Jurkat cells under going apoptosis[J]. Cellular Immunol, 1995, 165: 161-167.  
[2] Demura T, Fukuda H. Novel vascular cell specific genes whose expression is regulated temporally and apatially during vascular system development[J]. Plant Cell, 1994, 6: 967-981.  
[3] Kim E J, Park T H. Anti apoptosis engineering[J]. Biotechnol Bioprocess Eng, 2003, 8: 76-82.

(下转第 53 页)

齐苗后,注意通风炼苗并做到及时间苗和病虫草害防治。苗情较弱时,结合除草浇施少量稀粪水;棉苗旺长时,可喷少量矮壮素,培育壮苗,努力实现大壮苗移栽。

### 2.3 适时移栽,合理密植

一般5月中旬左右移栽。异优7号属早熟多铃型杂交棉,要充分发挥其增产潜力,在一熟棉、油菜茬及上等肥力棉田种植,每公顷2.8万~3.0万株;肥力水平较低的棉田,每公顷3.2万~3.4万株。

### 2.4 科学施肥,促早发稳长,为建立最佳群体结构奠定基础

该品种结铃性强,成铃率高,上桃快,前期生长较弱,后期生长稳健,耐肥、抗倒,霜前花率高(85%)。在整个生育期要做到前期早施、勤施、轻施提苗肥,促早发;中期稳施蕾肥,早施、重施花铃肥;后期适当补施盖顶肥,防止早衰。要求每公顷基施饼肥750kg、腐熟猪牛粪15000kg、棉花专用肥750kg、磷肥750kg;追施碳铵500kg、尿素450kg、钾肥150kg。

### 2.5 酌情化控,协调生长

该品种株型紧凑、叶片小,植株受光良好,进行适当化控,可显著提高产量。一般化控3次,用缩节胺 $60\sim 70\text{ g/hm}^2$ ,其中初花期 $10\sim 15\text{ g}$ ,盛花期 $20\sim 25\text{ g}$ ,打顶后 $25\sim 30\text{ g}$ 。当棉株前期长势偏弱时,在加强田间管理促进棉株生长的基础上,可选用“九二〇”等植物生长调节剂加快棉株的恢复和生长。

### 2.6 适当选留叶枝,增加结铃

在棉花初蕾期选留发育平衡,行间生长的1~2个叶枝,以弥补其群体发育起点不足的矛盾。同时要掌握在立秋前后摘除叶枝和主茎的顶心,以促进果枝生长,加快现蕾、开花、结铃速度。

### 2.7 综合防治病虫,保蕾增铃

坚持“以预防为主,综合防治”的植保方针,根据当地病虫预测预报,随时掌握棉田虫情、病情。苗期视天气状况以25%多菌灵可湿性粉剂600~800倍液防治立枯病2次,40%氧化乐果700~1000倍液防治棉蚜1~2次;蕾、铃期以75%甲胺磷700~800倍液、40%氧化乐果600~700倍液、50%水胺硫磷500倍液及75%猎手1000倍液配合分3次防治棉铃虫、斜纹夜蛾及棉红蜘蛛;后期(处暑前后)喷施1次50%百菌清800倍液防叶斑病及角斑病,以免叶片早衰,确保增产增收。

### 参考文献:

- [1] 潘群斌,蔡立旺.苏棉22的选育及栽培技术[J].中国棉花,2002,29(11):30.
- [2] 叶鹏盛,谭永久,蔡应繁,等.棉花新品种川棉65的选育[J].作物杂志,2003(1):54.
- [3] 汤玉煌,高俊山,刘克锋,等.高产杂交棉新品种开棉五号的选育[J].中国棉花,2003,30(9):28.
- [4] 刘文萍,赵文革,刘建平,等.特早熟棉区棉花双膜覆盖栽培早熟增产效应及生理基础[J].华北农学报,2000,15(2):78-80.
- [5] 孙学振,施培,单世华,等.留营养枝棉花群体干物质积累分配规律研究[J].华北农学报,2000,15(3):77-81.
- [6] 王启亮.棉花花铃期田间管理技术[J].河南农业科学,2004(5):77.
- [7] 杨青华.棉花异常生育诊断与调控II.棉花徒长及其控制[J].河南农业科学,2002(2):13-15.
- [8] 杨修身,王振宇,牛郑花.高产稳产棉花杂交种豫杂0568及其栽培技术[J].河南农业科学,2006(4):62.
- [9] 徐显,万艳霞.抗虫、抗病、高产棉花杂66的选育[J].华北农学报,2003,18(院庆专辑):86-87.

(上接第49页)

- [4] Wyllie A H. Glucocorticoid induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation [J]. Nature, 1980, 284: 555-559.
- [5] Huang Q, Deveraux Q L, Maeda S, *et al.* Evolutionary conservation of apoptosis mechanisms lepidopteran and baculoviral inhibitor of apoptosis proteins are inhibitors of mammalian caspase9 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(4): 1427-1432.
- [6] Seshagiri S, Miller L K. Baculovirus inhibitors of apoptosis (IAPs) block activation of

- Sf caspase1 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 13606-13611.
- [7] Qihong Huang, Quinn L Deveraux, Susumu Maeda, *et al.* Cloning and characterization of an inhibitor of apoptosis protein (IAP) from *Bombyx mori* [J]. Biochimica Biophysica Acta, 2001, 1499: 191-198.
- [8] Rudel T. Caspase inhibitors in prevention of apoptosis [J]. Herz, 1999, 24: 236-241.
- [9] Nataga S. Apoptosis by death factor [J]. Cell, 1997, 88: 355-365.