

文章编号:1001-1498(2016)04-0610-05

## 白蜡虫蜡酯合酶基因 cDNA 全长克隆及原核表达

刘博文, 王雪庆, 孙涛, 亓倩, 于淑惠, 杨璞, 陈晓鸣\*

(中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 国家林业局资源昆虫培育与利用重点实验室, 云南昆明 650224)

关键词:白蜡虫;蜡酯合酶;cDNA 全长基因;原核表达

中图分类号:S899.1

文献标识码:A

### Cloning and Prokaryotic Expression of Wax Synthase Gene of the Chinese White Wax Scale

LIU Bo-wen, WANG Xue-qing, SUN Tao, QI Qian, YU Shu-hui, YANG Pu, CHEN Xiao-ming

(Research Institute of Resources Insects, Chinese Academy of Forestry, Key laboratory of Cultivating and Utilization of Resources Insects of State Forestry Administration, Kunming 650224, Yunnan, China)

**Abstract:** [Objective] To obtain the full length cDNA sequence of the wax synthase (*ws*) gene of the white wax insect, *Ericerus pela* Chavannes, and heterologously express the enzyme in *Escherichia coli*. [Method] The 3' and 5' ends of the *ws* gene were obtained separately by using RACE, and the prokaryotic expression vector was constructed after the analysis of the full length cDNA sequence of the *ws* gene. Finally, the expression of WS in *Ericerus coli* BL21 was induced by IPTG. [Result] Sequence analysis showed that, the full-length cDNA of the *ws* gene was 1 518 bp, which included the 5'-UTR (untranslated region) with 94 bp, 3'-UTR with 68 bp, and the open reading frame with 1 356 bp. The gene was deduced to encode 452 amino acid residues with the putative protein molecular weight of 51.8 kDa, and the theoretical isoelectric point of 6.35. Western Blot result showed that, the WS enzyme was expressed successfully in *Ericerus coli*. [Conclusion] In this study, the full length cDNA of the *ws* gene of *Ericerus pela* was obtained, and this enzyme was successfully expressed in *Ericerus coli*, which provides references for the research on wax ester synthesis in other insects.

**Keywords:** *Ericerus pela*; wax synthase; full-length cDNA sequence; prokaryotic expression

白蜡虫(*Ericerus pela*)是我国特有的资源昆虫,泌蜡是白蜡虫二龄雄虫最为特化的性状<sup>[1]</sup>。白蜡虫分泌的白蜡在食品、医药、纺织等行业具有重要的经济价值<sup>[2]</sup>。白蜡的主要成分是 26 酸 26 酯<sup>[3]</sup>,已有研究表明,蜡酯的生物合成在动植物中存在保守途径<sup>[4]</sup>。蜡酯生物合成的第一步由脂酰辅酶 A 还原酶催化脂酰辅酶 A 转化为脂肪醇,第二步由蜡酯合酶(WS)催化脂肪醇和脂肪酸的酯化反应<sup>[5]</sup>。WS

是催化蜡酯合成过程最后一步的关键酶,是研究生物蜡酯合成的关键。

前期研究通过转录组测序及实时定量 PCR 分析,鉴定到了白蜡虫泌蜡的关键酶基因 *ws*,但从转录组中获得的序列只有编码区的一部分,无法进行进一步的基因功能研究<sup>[6]</sup>。为了解白蜡虫 *ws* 基因的序列特征,并开展基因功能、表达定位等研究,本研究采用 RACE 的方法扩增白蜡虫 *ws* 基因的 cDNA

收稿日期:2016-02-15

基金项目:国家 863 计划(2014AA021801);林业公益性行业科研专项(201504302、201304808);云南省应用基础研究重点项目(2013FA052);国家自然科学基金(31572337)

作者简介:刘博文(1990—),男,硕士研究生,主要从事分子生物学、资源昆虫研究。

\* 通讯作者。

全长,并在大肠杆菌中进行表达,为白蜡虫 WS 抗体制备以及功能研究奠定基础。

## 1 试验材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 供试昆虫 2013年4月至6月份期间,从资源昆虫研究所人工大棚的女贞树上采集白蜡虫雄虫幼虫。

1.1.2 试验试剂 SMARTer RACE cDNA Amplification kit 试剂盒购自美国 Clontech 公司。*Escherichia coli* JM109 感受态细胞、DL2000 及 DL10000 DNA Marker 购自大连宝生物工程有限公司。pGEM-T Easy Vector 试剂盒购自美国 Promega 公司。*Bam*HI、*Hind*III 限制酶购自美国 NEB 公司。pET-22b 表达载体、BL21 表达菌株购自美国 Novagen 公司。Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司。2 × Taq PCR Master Mix 购自北京天根生化科技有限公司。DNA 胶回收试剂盒、小量质粒抽提试剂盒购自杭州 Axygen 公司。Page Ruler plus Prestained Protein Ladder 蛋白 Marker 购自美国 Thermo 公司。溶菌酶、脱氧胆酸、PMSF、DEPC 购自上海生工生物工程有限公司。Immuno Blot PVDF 膜、Clarity Western ECL 购自美国 Bio-Rad 公司。Mouse His-tag monoclonal antibody、HRP goat anti-mouse IgG antibody 购自英国 Abcam 公司。

大肠杆菌细胞裂解缓冲液 I 配方、10% SDS-PAGE 分离胶及浓缩胶配方、Western Blot 转膜缓冲液配方、PBS、PBST 缓冲液配方见《分子克隆指南》<sup>[7]</sup>。

1.1.3 试验仪器 PCR 仪: C1000 Thermal Cycler (美国 Bio-Rad 公司); 小型垂直电泳槽: Mini-Protein Tetra System (美国 Bio-Rad 公司); 半干转膜仪: Trans-Blot Turbo Transfer System (美国 Bio-Rad 公司); 化学发光成像系统: ChemiDoc XRS (美国 Bio-Rad 公司)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 RNA 提取 将收集的 2 龄雄虫用 DEPC 处理过的灭菌 ddH<sub>2</sub>O 漂洗 3 次, Trizol 匀浆, RNA 提取方法按照 Trizol 试剂说明书操作。

1.2.2 3' RACE 按照 SMARTer RACE cDNA Amplification kit 试剂盒说明书操作, 合成用于 3' RACE 的模板, 3' RACE 上游特异性引物 3' RACE Primer F1 (5'-ACTTCGCTCACTTTATCCTC-3'), 下游引物为试剂盒中提供的通用引物。PCR 体系: 上下游引物各 0.2 μL (20 μmol · L<sup>-1</sup>), 模板 0.1 μL, 2 × Taq

PCR Master Mix 5 μL, 用 ddH<sub>2</sub>O 补至 10 μL。PCR 反应条件为: 94℃ 4 min, 94℃ 45 s, 50℃ 1 min, 72℃ 90 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。PCR 反应产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳下进行。在紫外灯下拍照, 并切下目的条带, 按照 DNA 胶回收试剂盒回收目的片段。按照 pGEM-T Easy Vector 试剂盒操作, 用 T4 连接酶将回收的目的片段与 pGEM-T Easy 载体 4℃ 过夜连接, 连接产物转化 JM109 感受态细胞。经菌液 PCR 检测筛选重组克隆测序。

1.2.3 5' RACE 利用 Primer Premier 5 设计 5' RACE 特异性引物 5' RACE Primer R1 (5'-CTTCGCTCACTTTATCCTCA-3')。按照试剂盒说明书操作合成 5' RACE 的模板, PCR、克隆同 3' RACE。

1.2.4 序列分析 通过 DNAMAN 软件拼接 3' 和 5' RACE 测序结果, 获得白蜡虫 *ws* 基因 cDNA 全长。利用 ClustalX2.0 进行多序列联配, 并用 MEGA5.1 制作进化树。在线软件 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>) 预测蛋白相对分子质量及等电点<sup>[8]</sup>, TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) 预测跨膜序列<sup>[9]</sup>, SignalP4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 预测信号肽<sup>[10]</sup>。

1.2.5 原核表达载体构建 针对基因编码框设计引物扩增 *ws* 基因编码框序列, 克隆方法同上, 重组质粒命名为 pGEM/EpelWS。在基因跨膜结构、信号肽、疏水性分析的基础上, 针对编码区的部分序列, 设计带有 *Bam*HI 和 *Hind*III 酶切位点的引物, 上游引物 *Bam*HI-F (5'-ATGACACTTTTGTTCCTTGGA-CAT-3'), 下游引物 *Hind*III-R (5'-TCTTTACACAGTTTGTAAACGTGGCAT-3')。以 pGEM/EpelWS 重组质粒为模板, 进行 PCR 扩增, PCR 反应条件同上, 切胶纯化。*Bam*HI 和 *Hind*III 37℃ 过夜双酶切回收的 PCR 产物及 pET-22b 载体。酶切产物电泳检测后分别切胶纯化, T4 连接酶 4℃ 过夜连接双酶切的目的片段和表达载体。连接产物转化大肠杆菌 DH5α, 挑选单菌落, 37℃, 160 r · min<sup>-1</sup> 过夜培养。采用 T7 引物进行菌液 PCR 检测, 挑选阳性重组克隆测序。重组质粒命名为 pET-22b/EpelWS。

1.2.6 IPTG 诱导原核表达 抽提 pET-22b/EpelWS 重组质粒, 转化大肠杆菌 BL21, 挑取阳性克隆, 接种于氨苄抗性的 (100 μg · mL<sup>-1</sup>) LB 液体培养基中, 37℃、160 r · min<sup>-1</sup> 摇床扩繁至 OD<sub>600</sub> ≈ 0.6。在每 1 mL 菌液中加入 IPTG 至终浓度为 1.0 mmol · L<sup>-1</sup>, 28℃、100 r · min<sup>-1</sup> 摇床中诱导 5 h。

1.2.7 蛋白提取及 SDS-PAGE IPTG 诱导后的菌液  $4\ 000 \times g$  离心 5 min, 弃上清, 加入  $150\ \mu\text{L}$  大肠杆菌细胞裂解缓冲液 I 重悬沉淀, 加入  $200\ \mu\text{L}$  溶菌酶 ( $10\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 和  $0.25\ \mu\text{L}$  PMSF ( $100\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 反复吸打, 冰浴 20 min。加入  $0.25\ \text{mg}$  脱氧胆酸, 室温下放置 30 min 且不时震荡以充分裂解细胞, 直至溶液不再粘稠, 测定总蛋白质浓度。抽提的总蛋白与  $5 \times$  Loading Buffer 沸水浴 5 min 变性, 取  $20\ \mu\text{g}$  样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。考马斯亮蓝染色过夜, 脱色, 拍照记录结果。

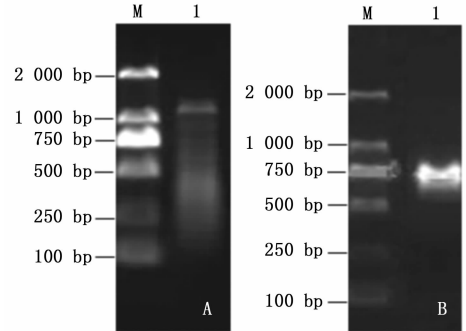
1.2.8 Western Blot 10% SDS-PAGE 电泳分离样品后, 在转膜缓冲液中浸泡凝胶、同胶大小的 PVDF 膜 30 min, 浸透滤纸。从下到上以 10 层滤纸、PVDF 膜、凝胶、10 层滤纸的顺序放置在半干转膜仪中, 恒压 25V 转膜 60 min。PVDF 膜用 PBS 缓冲液漂洗后, 在封闭液 (含 5% BSA 的 PBST 缓冲液) 中  $37^\circ\text{C}$  封闭 1 h, 后加入 Mouse His-tag monoclonal antibody (1:400)  $4^\circ\text{C}$  过夜孵育。用 PBS 溶液漂洗 PVDF 膜 3 次, 再加入 HRP goat anti-mouse IgG antibody (1:500), 在 PBS 溶液中室温放置 2 h。PBS 溶液漂洗 PVDF 膜后与 Clarity Western ECL 显色, 在化学发光成像系统中检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 白蜡虫 *ws* 基因 3' 及 5' RACE 结果

电泳检测 3' RACE 产物表明: 扩增片段大小在

1 000 bp 左右 (图 1A)。测序结果去除载体后片段大小为 1 001 bp, 序列联配表明该片段与已知序列重叠部分序列完全一致。电泳检测 5' RACE 产物表明: 扩增片段大小在 600 bp 左右 (图 1B)。测序结果去除载体后片段大小为 521 bp, 序列联配表明该片段与已知序列重叠部分序列完全一致。



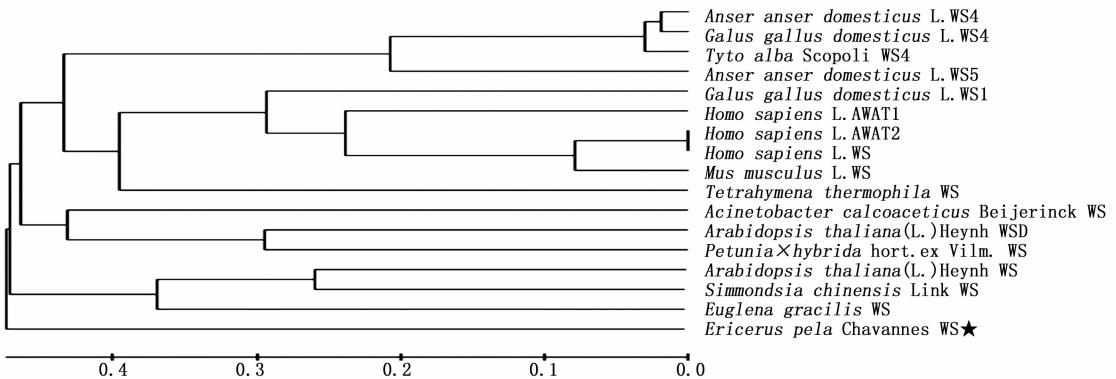
A: 泳道 1 为 3' RACE PCR 产物; B: 泳道 1 为 5' RACE PCR 产物; M 为 DL2000 DNA Marker

图 1 3' 及 5' RACE PCR 产物凝胶电泳图

### 2.2 序列分析

白蜡虫 *ws* 基因 cDNA 全长 1 518 bp, 含有 5' 端非编码区 94 bp 和 3' 端非编码区 68 bp, ORF 长度为 1 356 bp, 编码 452 个氨基酸, 预测的蛋白质分子量为 51.8 kDa, 等电点为 6.35, 具有亲水性。SignalP 分析白蜡虫 WS 在 N 端具有 1 个分泌型信号肽; TM-HMM 推测蛋白中存在一个跨膜区域。

白蜡虫 WS 与其他物种 WS 构建的进化树见图 2。

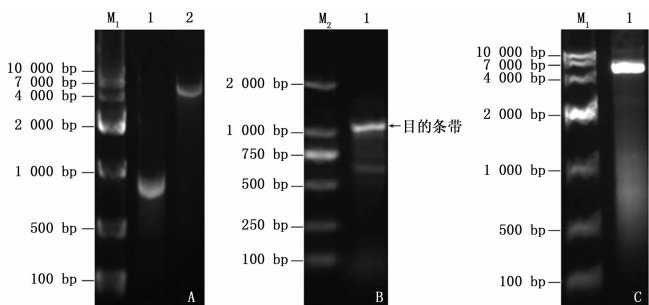


各物种 WS 氨基酸序列在 NCBI 的登录号如下: 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh WS: NP-200345.1); *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh WSD: NP-568547.1); 西门得木 (*Simmondsia chinensis* Link WS: AF149919); 细小裸藻 (*Euglena gracilis* WS: ADI60058.1); 灰鹅 (*Anser anser domesticus* L. WS4: JQ031643; *Anser anser domesticus* L. WS5: JQ031647); 家鸡 (*Gallus gallus domesticus* L. WS4: XP-419207.1; *Gallus gallus domesticus* L. WS1: XP-424082.2); 仓鸮 (*Tyto alba* Scopoli WS4: JQ031645); 人类 (*Homo sapiens* L. AWAT1: NP-001013597.1; *Homo sapiens* L. AWAT2: NP-001002254.1; *Homo sapiens* L. WS: AY605053); 小鼠 (*Mus musculus* L. WS: AY611031.1); 四膜虫 (*Tetrahymena thermophila* WS: XP-001027910); 不动杆菌 (*Acinetobacter calcoaceticus* Beijerinck WS: YP-045555.1); 碧冬茄 (*Petunia x hybrida* hort. ex Vilm. WS: AAZ08051.1)。

图 2 白蜡虫 WS 与不同物种 WS 氨基酸序列构建的系统进化树

### 2.3 pET-22b/EpWS 载体构建

电泳检测 *Bam*HI/*Hind*III 双酶切产物结果显示:空质粒在 5 000 bp 左右,针对编码区部分序列设计有限制酶引物扩增出的目的基因为 813 bp 左



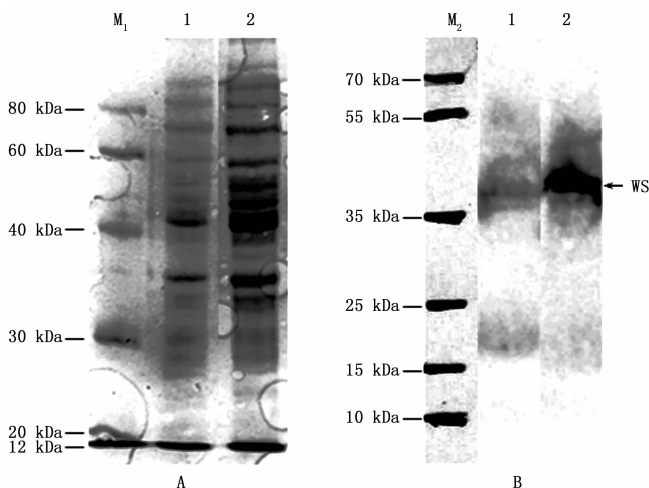
A:泳道 1 为双酶切后的目的基因;泳道 2 为双酶切后的 pET-22b 空载体;B:泳道 1 为菌液 PCR 扩增的目的条带;C:泳道 1 为成功构建的重组质粒 pET-22b/EpelWS;M<sub>1</sub>:DL10000 DNA Marker;M<sub>2</sub>:DL2000 DNA Marker

图3 *Bam*HI/*Hind*III 双酶切 pET-22b 质粒及目的基因、菌液 PCR 及 pET-22b/EpelWS 重组表达载体电泳检测

### 2.4 原核表达及 Western Blot 检测

SDS-PAGE 电泳检测结果见图 4A。Western Blot 检测表明:在 35 kDa 与 55 kDa 有目的蛋白表

达。IPTG 诱导的大肠杆菌 BL21 中 WS 有显著的特异性表达(图 4B)。



A:泳道 1 为未经 IPTG 诱导的空白对照;泳道 2 为经 IPTG 诱导的处理对照;M<sub>1</sub>:Protein Ruler I;B:泳道 1 为未经 IPTG 诱导的空白对照;泳道 2 为经 IPTG 诱导的处理对照;M<sub>2</sub>:Page Ruler plus Prestained Protein Ladder

图4 不同 IPTG 终浓度诱导大肠杆菌 BL21 表达目的蛋白的 SDS-PAGE 电泳图片及 Western Blot 检测结果

## 3 讨论

现有研究表明,根据已有的序列信息,WS 分为动物、植物和微生物 3 个不同的类群,三者 *ws* 基因序列相似性不高<sup>[11-21]</sup>。本研究进行的系统进化分析也表明,白蜡虫 WS 与其他物种的 WS 没有聚在一起。有研究认为,人和家鸡 WS 中存在 HPHG 保守位点,其他家禽 WS 存在(Y/F)YHG 的保守位点<sup>[4,12,19]</sup>,植物和不动杆菌中发现潜在的保守位点:

HHXXXDG<sup>[4,16,18,20]</sup>。本研究在白蜡虫中并未发现 WS 的保守位点,说明不同物种 *ws* 基因序列存在较大差异,白蜡虫 WS 需要更系统的研究。

SDS-PAGE 电泳结果显示:WS 在 28℃ 条件下诱导成功。对于不动杆菌 WS 的原核表达也发现,较高温度下过夜诱导并未导致菌死亡<sup>[22]</sup>。在不动杆菌中,WS 催化蜡酯合成,蜡酯是细菌能量的储存物质,因此,WS 的表达对于细菌的毒性可能不大。从 Western Blot 可以看出,在 IPTG 诱导下,白蜡虫 WS

的表达明显。已有研究表明,WS 属于可溶性蛋白,可大量存在于培养基中<sup>[22]</sup>。本试验仅检测了菌体中 WS 的表达情况,并未检测经过浓缩纯化的菌液上清中的 WS,可在后续实验中进一步探讨。

目前,昆虫 WS 的研究还没有报道,白蜡虫 *ws* 全长基因的克隆对其它昆虫的蜡酯合成研究具有参考价值,同时也为白蜡虫泌蜡机理研究奠定了基础。本研究中大量表达 WS 可用于抗体制备,分析组织特异性表达及亚细胞定位。

## 4 结论

本试验获得了白蜡虫 *ws* 基因 cDNA 全长 1 518 bp,*ws* 基因开放阅读框 1 356 bp,编码 452 个氨基酸。构建了原核表达载体 pET-22b/EpelWS,转化大肠杆菌 BL21,并通过 IPTG 诱导表达,Western Blot 检测结果证实 WS 成功表达。

## 参考文献:

- [1] 陈晓鸣,冯颖. 资源昆虫学概论[M]. 北京:北京科学出版社,2009:54-78.
- [2] 何晨柳,孔任秋,胡哈华. 产蜡酯聚球藻 PCC 7002 的构建[J]. 水生生物学报,2010,34(6):1202-1205.
- [3] 谢映平,薛皎亮,张艳峰,等. 蛭虫蜡分泌物的化学研究进展[J]. 昆虫知识,2004,41(6):512-518.
- [4] 杨璞,徐冬丽,陈晓鸣,等. 蜡酯合成途径及关键酶的研究发展[J]. 中国细胞生物学报,2012,34(7):695-703.
- [5] Turkish A R, Sturley S L. The genetics of neutral lipid biosynthesis: an evolutionary perspective[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009, 297(1): E19-27.
- [6] Yang P, Zhu J Y, Gong Z J, et al. Transcriptome analysis of the Chinese white wax scale *Eriocerus pela* with focus on genes involved in wax biosynthesis[J]. PLoS ONE, 2012, 7(4): e35719.
- [7] J 萨姆布鲁克, DW 拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 北京:科学出版社,2002:418-423;1256-1259;1570-1576.
- [8] Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, et al. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 31(13): 3784-3788.
- [9] Krogh A, Larsson B, von Heijne G, et al. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genome[J]. J Mol Biol, 2001, 305(3): 567-580.
- [10] Petersen T N, Brunak S, Von Heijne G, et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions[J]. Nat Methods, 2011, 8(10): 785-786.
- [11] Rottig A, Steinbuechel A. Acyltransferase in bacteria[J]. Microbiol Mol Bio Rev, 2013, 77(2): 277.
- [12] Biester E M, Hellenbrand J, Gruber J, et al. Identification of avian wax synthases[J]. BMC Biochem, 2012, 13(4): 4.
- [13] Biester E M, Hellenbrand J, Gruber J. Multifunctional acyltransferases from *Tetrahymena thermophila*[J]. Lipids, 2012, 47(4): 371-381.
- [14] Teerawanichpan P, Qiu X. Fatty acyl-CoA reductase and wax synthase from *Euglena gracilis* in the biosynthesis of mediumchain wax esters[J]. Lipids, 2010, 45(3): 263-273.
- [15] Klypina N, Hanson S F. *Arabidopsis thaliana* wax synthase gene homologues show diverse expression patterns that suggest a specialized role for these genes in reproductive organs[J]. Plant Science, 2008, 175: 312-320.
- [16] Li F L, Wu X M, Lam P, et al. Identification of the wax ester synthase/acyl-coenzyme A: Diacylglycerol acyltransferase WSD I required for stem wax ester biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 2008, 148(1): 97-107.
- [17] King A, Nam J W, Han J, et al. Cuticular wax biosynthesis in *petunia petals*: cloning and characterization of an alcohol-acyltransferase that synthesizes[J]. Planta, 2007, 226(2): 381-394.
- [18] Stoveken T, Kalscheuer R, Malkus U, et al. The wax ester synthase/acyl coenzyme A: diacylglycerol acyl-transferase from *Acinetobacter* sp. Strain ADP1: characterization of a novel type of acyltransferase[J]. J Bacteriol, 2005, 187(4): 1369-1376.
- [19] Cheng J B, Russell D W. Mammalian wax biosynthesis. II. Expression cloning of wax synthase cDNAs encoding a member of the acyltransferase enzyme family[J]. J Biol Chem, 2004, 279(36): 37798-37807.
- [20] Kalscheuer R, Steinbuechel A. A novel bifunctional wax ester synthase/acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase mediates wax ester and triacylglycerol biosynthesis in *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1 [J]. J Biol Chem, 2003, 278(10): 8075-8082.
- [21] Lardizabal K D, Metz J G, Sakamoto T, et al. Purification of a jojoba embryo wax synthase, cloning of its cDNA, and production of high levels of wax in seeds of transgenic *Arabidopsis*[J]. Plant Physiol, 2000, 122(3): 645-655.
- [22] Uthoff S, Stoveken T, Weber N, et al. Thio wax ester synthesis utilizing the unspecific bifunctional wax ester synthase/acyl coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase of *Acinetobacter* sp. strain ADP1 [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(2): 790-796.

(责任编辑:张玲)