

# 小菜蛾泛素延伸蛋白基因的克隆与原核表达

李晓梅 陈 永 李 瑞 钟国华

华南农业大学昆虫毒理研究室,广州 510642

**摘要** 利用 RT-PCR 和 RACE 技术,以小菜蛾(*Plutella xylostella*)3 龄幼虫的 cDNA 为模板,克隆获得泛素延伸蛋白基因 *Px-ubi* (GenBank No. FJ527489),核苷酸序列全长 537 bp,其中开放阅读框全长 387 bp,编码 129 个氨基酸残基,预测分子质量为 16.7 ku,等电点为 9.1,与已知真核生物泛素延伸蛋白的同源性为 92%~98%。RT-PCR 结果显示 *Px-ubi* 在小菜蛾不同生长发育时期均有表达,其中卵期、3 龄期和预蛹期含量较高,而成虫期含量较低。同源建模显示, *Px-ubi* 的 3D 结构主要由 1 个  $\alpha$  螺旋、4 个  $\beta$  折叠以及  $\beta$  转角和不规则卷曲组成,4 个  $\beta$  折叠两两反向平行排列在  $\alpha$  螺旋的一侧。将该基因重组到表达载体 pET-32a(+) 中,获得重组载体 pET32a-Px-ubi,并转入原核细胞中表达。SDS-PAGE 和 Western blot 分析表明,经 IPTG 诱导后, *Px-ubi* 能在大肠杆菌 BL21 中高效表达,电泳检测到 1 条约 16.7 ku 的外源蛋白,与预测的蛋白分子质量吻合。

**关键词** 小菜蛾; 泛素; 基因; 克隆; 原核表达

**中图分类号** Q 966; S 433.4    **文献标识码** A

**文章编号** 1000-2421(2011)01-0054-07

泛素(ubiquitin)是一种广泛存在于真核细胞中的小分子质量蛋白质,其基本功能是通过泛素-蛋白水解酶复合体通路(ubiquitin proteasome pathway, UPP)高效并高度选择性降解蛋白质<sup>[1-2]</sup>。泛素最初的研究主要集中在高等动植物中,而对昆虫泛素研究较少。近年来,对多种昆虫泛素的基因结构、蛋白分子结构、功能途径等的研究结果显示,泛素在昆虫细胞周期、细胞凋亡、信号转导、免疫应答调控等多种生理功能中有重要作用<sup>[3-14]</sup>。小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.)是十字花科蔬菜的主要害虫。笔者在研究小菜蛾生长发育对温度、食料等环境因素变化适应性的基础上,利用 RT-PCR 和 RACE 技术,克隆得到小菜蛾泛素延伸蛋白基因(*P. xylostella* ubiquitin-52aa extension protein, *Px-ubi*),并测定了其序列和表达特征,旨在为进一步研究 *Px-ubi* 在昆虫体内的功能及作用机制提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试昆虫与主要试剂

供试昆虫小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.)由笔者所在实验室长期人工饲养提供的敏感种群。

**菌种及质粒:** 基因工程菌 DH5 $\alpha$  由笔者所在实验室保存; pMD<sub>20</sub>-T Easy 载体质粒系统购自 Promega 公司; 表达载体 pET-32a(+)由华南农业大学任顺祥教授实验室惠赠。

**主要试剂及工具酶:** RNA 提取试剂盒、AMV 反转录酶、rTaq DNA 聚合酶、凝胶 DNA 回收试剂盒等均为 TaKaRa 公司产品; Tris-饱和酚购自上海生工生物工程公司; Gene Racer Kit 购自 Invitrogen 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 总 RNA 的提取与 cDNA 第 1 链的合成

取小菜蛾 3 龄幼虫加液氮磨成粉末,使用 Omega plant RNA kit 试剂盒,按照说明书提取 RNA,最后用 10  $\mu$ L 经 DEPC 水处理的无 RNA 酶的双蒸水溶解沉淀,直接用于 RT-PCR 或 -80  $^{\circ}$ C 保存。参照 TaKaRa 的 AMV 反转录酶说明书合成 cDNA 第 1 链,用于 PCR 扩增或 -20  $^{\circ}$ C 保存。

### 1.3 引物的设计与合成

参照已报道的鳞翅目昆虫泛素 cDNA 序列,根据保守序列设计简并引物 PXubiF1 和 PXubiR1 进行 PCR 扩增; 根据测序结果设计上游引物 3'PXubi 1,与 Oligo(dT)<sub>16</sub> 组合用于 3'-RACE 的扩增; 根据

3'-RACE 测序结果设计 2 条特异性引物(5'PXubi 1 和 5'PXubi 2), 配合 GeneRacer Kit 提供的正向引物用于 5'-RACE 扩增。采用小菜蛾核糖体蛋白 L32 为内参基因, 设计小菜蛾泛素基因的特异性引物 RT-ubi 1 和 RT-ubi 2 进行荧光定量 PCR。为了便于将该基因克隆到表达载体上进行表达, 在引物中分别引入了 *Bam*H I 和 *Hind*III 酶切位点(*Mub* 1 和 *Mub* 2)。

PXubiF1 5'-GARAATGTNAARGCMAAAATCCAGGA-3'  
 PXubiR1 5'-AATCATTTGTCACAGTTGTTGACTTC-3'  
 3'PXubi 1 5'-TTAACCTTCAGCTTCTT-3'  
 5'PXubi 1 5'-GGGTACGCCATCCTCCAGCTGTT-3'  
 5'PXubi 2 5'-GCAACGATAACCTCCTCTAAAGCCTC-3'  
 RT-ubi 1 5'-CGTTGTTTACTGAGGCA-3'  
 RT-ubi 2 5'-CACCAAGTGAAGGATAGATT-3'  
 L32F 5'-TGCTCCCCAACGGCTTCC-3'  
 L32R 5'-CGATGGCCTTGCCTCT-3'  
 Mub 1 5'-CGGGATCCATGCAGATCTCGTGAAGAC-3'  
 Mub 2 5'-CCAAGCTTCTACTTCAGCTTCTTGG-3'

#### 1.4 RACE 反应

3'-RACE 反应: PCR 反应总体积为 50  $\mu$ L, 包括小菜蛾 cDNA 模板 2  $\mu$ L, rTaq DNA Polymerase (5 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L, 10  $\times$  rTaq Buffer (Mg<sup>2+</sup> Free) 5  $\mu$ L, dNTPs 4  $\mu$ L, Oligo (dT)<sub>16</sub> (10 umol/L) 2  $\mu$ L, 3'PXubi1(10 umol/L) 2  $\mu$ L, 灭菌 ddH<sub>2</sub>O 补至 50  $\mu$ L。PCR 反应程序: 94  $^{\circ}$ C 变性 3 min; 接着进行 35 个循环, 循环条件为 94  $^{\circ}$ C 30 s, 58  $^{\circ}$ C 45 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应结束后用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 回收目的片段。

5'-RACE 反应: 按照 Invitrogen GeneRacer<sup>TM</sup> 步骤说明, 合成 cDNA 第 1 链, 根据 3'PXubi1 端 RACE 获得的 cDNA 下游序列, 分别设计 2 条特异性引物进行巢式 PCR 扩增, 即可得到 cDNA 上游序列。PCR 反应程序: 94  $^{\circ}$ C 30 s, 58  $^{\circ}$ C 45 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min 后进行 35 个循环, 72  $^{\circ}$ C 10 min。反应结束后用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 回收目的片段。

#### 1.5 RACE 产物的克隆、鉴定及测序

RACE 产物经电泳回收纯化后, 链接到 pMD<sub>20</sub>-T Easy 载体, 然后转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 挑取单个的白色菌落, 接种于 3 mL 含 Amp 的 LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}$ C 振摇培养过夜, 分别抽质粒 DNA 用于 PCR 鉴定。选择经 PCR 鉴定为阳性的重组质粒进行序列测定。

#### 1.6 序列分析

应用 DNA Star 软件将所得 DNA 序列翻译成

蛋白质序列, 使用 DNA Star 软件中 Clustal W 多重序列比较不同昆虫和哺乳动物泛素延伸蛋白的同源性。使用 MEGA 3.1 软件构建系统发育树。

#### 1.7 同源建模

通过分子模拟与设计软件 Discovery Studio 2.0 (Accelrys Software Inc.) 的 Blast Search 程序 (DS Server) 搜寻模板蛋白序列, 使用 Align Multiple Sequencesc 对模板蛋白序列与所得的小菜蛾泛素延伸蛋白序列进行联配, 所得结果再以 Build Homology Models 进行同源建模, 研究小菜蛾泛素延伸蛋白 3D 结构, 使用 Verify Score、Ramachandran Plot 评价同源建模结果的合理性。

#### 1.8 不同时期表达差异性的定量分析

分别提取小菜蛾卵期、1~4 龄幼虫、蛹期、雌性成虫、雄性成虫的 RNA, 反转成 cDNA 作为备用, 通过荧光定量 qRT-PCR 方法, 用小菜蛾泛素延伸蛋白基因特异性引物 RT-ubi 1 和 RT-ubi 2, 结合小菜蛾核糖体蛋白 L32 基因作为内参照进行 PCR 扩增。定量 PCR 扩增条件为 95  $^{\circ}$ C 预变性 10 s 后进行 40 个循环。每个循环为 60  $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 20 s。扩增反应结束后, 继续从 62  $^{\circ}$ C 加热到 95  $^{\circ}$ C 做融解曲线。每个样品设 3 个重复。

#### 1.9 重组表达载体的构建

将重组的 pMD<sub>20</sub>-T/Pxubi 经 *Bam*H I 和 *Hind*III 双酶切后, 回收目的片段与经同样酶切的原核表达载体 pET-32a(+) 连接, 在 T4 连接酶的作用下于 16  $^{\circ}$ C 下放置过夜。转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 过夜培养, 然后进行重组质粒的双酶切鉴定。

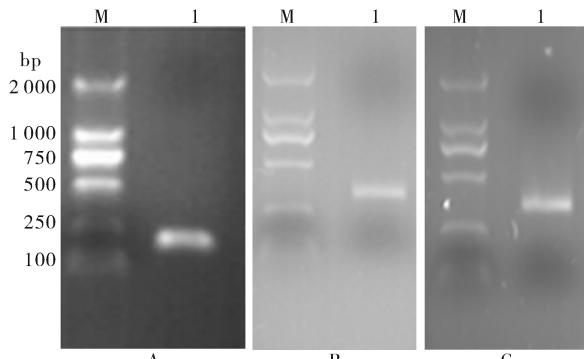
#### 1.10 外源基因的诱导表达及 Western blot 检测

提取初步鉴定的质粒, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 然后涂平板过夜培养, 挑取含 pET32a-Pxubi 的表达宿主单菌落接种到含 Amp (30  $\mu$ g/mL) 的 LB 培养液中, 37  $^{\circ}$ C 下活化过夜后按 1% 接种, 取 150  $\mu$ L 接种到 15 mL 含 Amp 的 LB 中, 37  $^{\circ}$ C 下培养到  $D_{600} = 0.6 \sim 0.8$  时, 加入诱导剂 IPTG 至终浓度分别为 0.2、0.6、1.0 mmol/L, 于 28  $^{\circ}$ C 进行 IPTG 浓度梯度的诱导表达。收集诱导时间为 4 h 的菌液, 用 50  $\mu$ L TE 重悬, 超声波破碎, 加入 50  $\mu$ L 2  $\times$  SDS 凝胶上样缓冲液, 沸水煮 10 min 后进行 SDS-PAGE 电泳分析。将 SDS-PAGE 电泳的目的蛋白条带转移到硝酸纤维素膜上, 封闭后以 Anti-His Antibody 为一抗, 羊抗鼠为二抗与之反应, 最后用 HRP-DAB 第 5 显色试剂盒显色。

## 2 结果与分析

### 2.1 Px-ubi 的克隆

以小菜蛾 3 龄幼虫的 cDNA 为模板, PXubiF1 和 PXubiR1 为引物对小菜蛾泛素基因进行 PCR 扩增, 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 可见约 200 bp 的电泳条带(图 1-A), 回收纯化后, 与 pMD<sub>20</sub>-T 载体连接, 构建重组质粒, 挑取转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  后的白色菌落, 进行培养, 抽提质粒, 以质粒为模板进行 PCR 鉴定。利用 NCBI 网站上 Blast 程序对测序结果进行同源性比较, 结果表明, 该片段与已知昆虫泛素基因高度同源。据此设计特异性引物, 进行 3'-RACE 扩增, 得到 1 条 326 bp 的下游序列(图 1-B)。根据 3'-RACE 获得的片段, 设计特异性引物用于 5'-RACE 扩增, 得到 1 条 304 bp 的上游序列(图 1-C)。对小菜蛾泛素基因的 3 个 cDNA 片段进行序列分析, 将重复区域去除, 拼接得到小菜蛾泛素延伸蛋白完整序列。



A. 中间片段 216 bp Middle segment 216 bp; B. 3'-RACE 片段 326 bp 3'-RACE product 326 bp; C. 5'-RACE 片段 304 bp 5'-RACE product 304 bp; M. DNA Marker DL 2000; 1. 3 龄幼虫 cDNA 为模板 3rd instar larva cDNA as template.

图 1 小菜蛾 Px-ubi 基因的全长 cDNA 克隆

Fig. 1 Full length cDNA amplification products of *P. xylostea*

### 2.2 目的片段测序及序列分析

序列测定与分析结果表明, 该序列全长共 537 bp, 其中编码区序列长为 387 bp, 上游 5' 非编码区 27 个核苷酸和下游 3' 非编码区 123 个核苷酸, 在 3' 非编码区下游有标志性的 PolyA 尾巴结构。翻译区编码 1 个长为 129 个氨基酸残基的蛋白前体(图 2), 分子质量为 16.7 ku, 等电点为 9.1。通过与 GenBank 的核苷酸序列进行 Blast 比对, 得到的基因为 ubiquitin-52aa extension protein 基因, 是由

泛素蛋白与核糖体 L40 蛋白融合形成的泛素延伸蛋白。这是泛素在真核生物中存在的一种形式, 命名为 *Px-ubi*, GenBank 登录号为 FJ527489。

使用 DNA Star 软件中 Clustal W 多重序列比较程序对目前已知的部分泛素延伸蛋白基因序列进行同源性比较。结果表明, 参与泛素-蛋白水解酶复合体形成的 4 个功能位点 Lys-29、Lys-48、Lys-63 和 Gly-76 是绝对保守的(图 3)。*Px-ubi* 与鳞翅目昆虫泛素延伸蛋白的一致性均在 95% 以上, 与黑腹果蝇的泛素延伸蛋白的一致性为 94%, 与人、小鼠和黑猩猩的泛素延伸蛋白的一致性也超过 90%。甜菜夜蛾、家蚕、草地贪夜蛾、烟夜蛾和烟青虫泛素核糖体 L40 在 76 个氨基酸后融合了 53 个氨基酸, 而小菜蛾、人类、小家鼠、黑腹果蝇和黑猩猩在 76 个氨基酸后融合了 52 个氨基酸。使用 MEGA 3.1 软件构建小菜蛾泛素延伸蛋白同源序列系统发育树, 结果表明 *Px-ubi* 与甜菜夜蛾、草地贪夜蛾、家蚕、烟青虫的亲缘关系更近, 且与它们的分类地位完全一致(图 4)。

### 2.3 Px-ubi 的同源建模

蛋白的同源建模首先必须得到合适的模板蛋白。使用 Discovery Studio 2.0 软件包中的 Blast Search(DS Server)搜索, 综合同源性、研究目标等实际情况, 本文采用与 *Px-ubi* 同源性较高的人类泛素蛋白作为同源模板蛋白, 将其序列与 *Px-ubi* 的序列进行联配, 结果表明, 二者氨基酸序列一致性为 65.5%, 二者相似性较好(图 5), 以 Verify Score、Ramachandran Plot 评价, 均说明以人类泛素蛋白为模板进行 *Px-ubi* 的 3D 结构的同源建模可靠。联配结束后, 以 Build Homology Models 程序模拟构建 *Px-ubi* 的 3D 结构(图 6)。同源模建结果表明, *Px-ubi* 主要由 1 个  $\alpha$  螺旋(红色)、4 个  $\beta$  折叠(蓝色)以及  $\beta$  转角(绿色)和不规则卷曲(白色)组成, 4 个  $\beta$  折叠两两反向平行排列在  $\alpha$  螺旋的一侧, 这与泛素的基本模型差异不大, 也符合泛素在不同物种中比较保守的规律。

### 2.4 Px-ubi 不同时期表达的差异性

采用 qRT-PCR 的方法分析 *Px-ubi* 在小菜蛾卵期、1~4 龄幼虫、预蛹期、蛹期、雌成虫、雄成虫的表达, 结果表明 *Px-ubi* 存在于小菜蛾生活史中的各个时期, 其中卵期、3 龄幼虫和预蛹期含量较高, 成虫含量较低。*Px-ubi* 表达差异具有的相应功能正在研究中。

1								aac	acg	tgt	ttt	tac	tga	ggc	aac	aat	27
28	atg	cag	atc	ttc	gtg	aag	acc	ctt	acg	ggc	aag	acc	atc	acc	ctt	gag	75
1	M	Q	I	F	V	K	T	L	T	G	K	T	I	T	L	E	16
76	gtg	gag	gct	tcc	gac	acc	atc	gga	aat	gtc	aaa	gcc	aag	atc	cag	gac	123
17	V	E	A	S	D	T	I	G	N	V	K	A	[K]	I	Q	D	32
124	aag	gag	ggt	atc	ccc	ccc	gac	cag	cag	cga	ctg	atc	ttc	gct	ggt	aaa	171
33	[K]	E	G	I	P	P	D	Q	Q	R	L	I	F	A	G	K	48
172	cat	ctg	gag	gat	ggc	cgt	acc	ctg	tcc	gac	tac	aac	atc	cag	aag	gaa	219
49	Q	L	E	D	G	R	T	L	S	D	Y	N	I	Q	[K]	E	64
220	tct	atc	ctt	cac	ttg	gtg	ttg	agg	ctt	aga	gga	ggt	atc	gtt	gag	cct	267
65	S	I	L	H	L	V	L	R	L	R	G	[G]	I	V	E	P	80
268	tct	ctc	cgc	atc	ttg	gcc	cag	aag	tac	aac	tgc	gac	aag	atg	atc	tgc	315
81	S	L	R	I	L	A	Q	K	Y	N	C	D	K	M	I	C	96
316	cgc	aag	tgc	tac	gtc	cgc	ctc	cac	ccc	cgt	gct	acc	aac	tgt	cgc	aag	363
97	R	K	C	Y	A	R	L	H	P	R	A	T	N	C	R	K	112
364	acc	aag	tgc	gga	cac	acc	aac	aac	ctc	cgc	ccc	aag	aag	aag	ctg	aag	411
113	T	K	C	G	H	T	N	N	L	R	P	K	K	K	L	K	128
412	tag	acg	aat	aca	tcc	ttt	caa	cgt	ttt	att	cct	aag	act	tac	caa	tgt	459
129	-	stop															
460	cgt	caa	aaa	ttg	ttg	tgc	aac	aac	tgc	tct	aaa	tta	ata	aag	taa	cat	507
508	ctt	tat	gtt	aaa													

图 2 小菜蛾 *Px-ubi* cDNA 的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

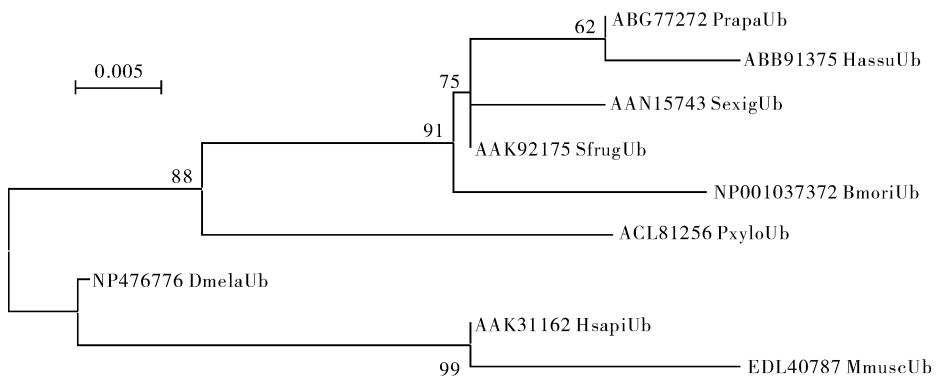
Fig. 2 cDNA and predicted amino acid sequence of *Px-ubi* gene of *P. xylostella*

Prapa: *Pieris rapae*; Hassu: *Helicoverpa assulta*; Sexig: *Spodoptera exigua*; Sfrugk: *S. frugiperda*; Bmori: *Bombyx mori*;

Pxylo; *Plutella xylostella*; Hsapi; *Homo sapiens*; Mumsc; *Mus musculus*; Ptrog; *Pan troglodytes*; Dmela; *Drosophila melanogaster*.

图 3 不同生物泛素延伸蛋白同源性的比对(箭头所指为保守的赖氨酸 K 和甘氨酸 G)

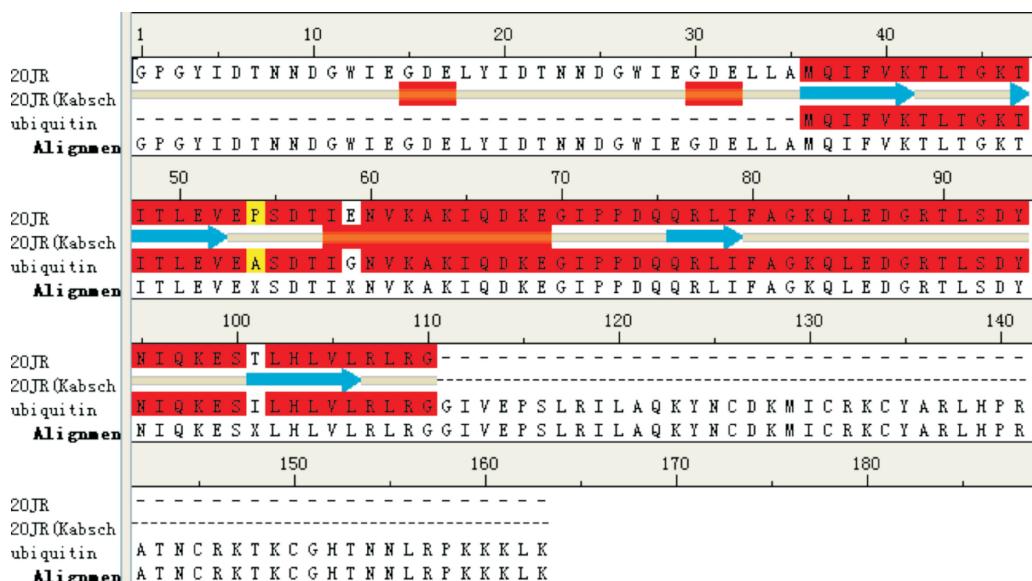
Fig. 3 Alignment of amino acid sequences for ubiquitin extension protein from different species (arrows indicate conservative lysine K and glycine G)



PrapaUb: *Pieris rapae*; HassuUb: *Helicoverpa assulta*; SexigUb: *Spodoptera exigua*; SfrugUb: *S. frugiperda*; BmoriUb: *Bombyx mori*; PxyloUb: *Plutella xylostella*; HsapiUb: *Homo sapiens*; MumscUb: *Mus musculus*; PtrogUb: *Pan troglodytes*; DmelaUb: *Drosophila melanogaster*.

Fig. 4 不同来源的泛素氨基酸序列系统发育树

Fig. 4 Neighbor joining phylogeny of ubiquitin extension protein from different species



红色表示氨基酸一致,黄色表示氨基酸比较同源,白色则表示氨基酸相似性比较差。Red, yellow and white indicate that the identity of amino acid is consistent, relative and irrelevant respectively.

图 5 *Px-ubi* 与人类泛素蛋白氨基酸序列联配的结果

Fig. 5 The sequence alignment of *Px-ubi* with human ubiquitin

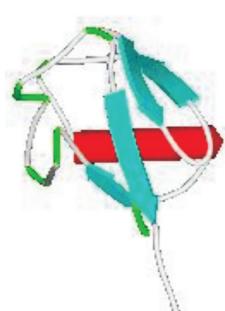
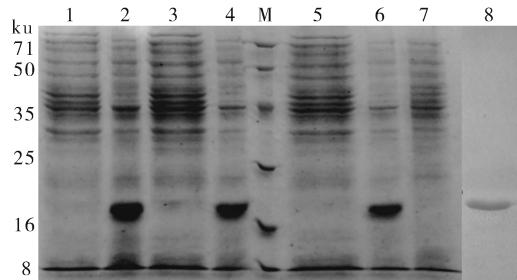


图 6 *Px-ubi* 的三维结构模型

Fig. 6 3D structure of *Px-ubi*

## 2.5 *Px-ubi* 的表达与 Western blot 检测

用 *Bam*H I 和 *Hind* III 对 pET-32a/*Pxubi* 双酶切, 鉴定结果显示分子质量大小正确。将得到的 *Px-ubi* 基因 cDNA 片段连接到 pET-32a(+) 表达载体上, 选用浓度分别为 0.2、0.6、1 mmol/L 的 IPTG 在 28 °C 诱导 4 h, 进行 SDS-PAGE(图 7)。IPTG 诱导融合蛋白表达时, 可产生 16.7 ku 左右的特异蛋白条带, 而经 IPTG 诱导的空质粒则没有相应的条带, 说明表达产物融合了目的蛋白, 并以 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导时表达量最大。

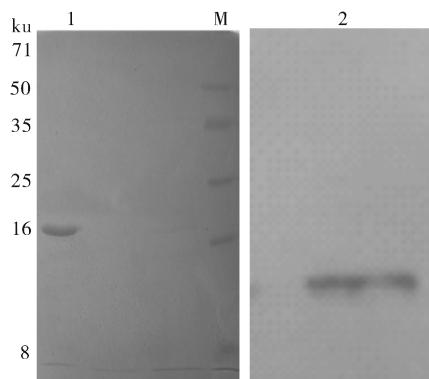


M. Marker; 2,4,6. 分别是 IPTG 浓度为 0.2、0.6、1 mmol/L 诱导的含有目的蛋白的表达载体 *Px-ubi* was induced by IPTG at concentrations of 0.2, 0.6, 1.0 mmol/L; 1,3,5. 分别是 IPTG 浓度为 0.2、0.6、1 mmol/L 诱导的未含有目的蛋白的空质粒 pET-32a(+) was induced by IPTG at concentrations of 0.2, 0.6, 1.0 mmol/L; 7. 未经 IPTG 诱导的表达载体 Non-induced by IPTG; 8. Western blot 分析 Western blot assay.

图 7 *Px-ubi* 在 pET-32a(+) 上的表达 (28 °C, IPTG 诱导)

Fig. 7 Expression of *Px-ubi* in pET32a(+) induced by different concentrations IPTG at 28 °C

Western blot 试验证实 *Px-ubi* 重组蛋白可以被组氨酸特异性单抗所识别, 表明 *Px-ubi* 以带有组氨酸标签的融合蛋白形式表达。以 6×His-tag 纯化试剂盒进一步纯化了 N 端带有 6×His-tag 的融合蛋白, SDS-PAGE 和 Western blot 显示纯化的蛋白为单一纯净的条带, 证实重组蛋白可以被组氨酸特异性单抗所识别, 表明泛素延伸蛋白以带有组氨酸标签的融合蛋白形式表达(图 8)。



M. Marker; 1. SDS-PAGE; 2. Western blot.

图 8 纯化 *Px-ubi* 的 SDS-PAGE 检测与 Western blot 分析

Fig. 8 Detection of purified *Px-ubi* by SDS-PAGE and Western blot assay

### 3 讨 论

泛素及其信号通路一直是生物学领域的研究热点, 但对昆虫泛素研究相对较少。笔者利用 RT-

PCR 和 RACE 技术, 克隆获得小菜蛾泛素延伸蛋白基因 *Px-ubi*, 并分析了其表达特征, 研究表明 *Px-ubi* 在卵期、3 龄期和预蛹期含量最高, 通过原核表达获得了分子质量约为 16.7 ku 的重组蛋白, 这些结果可为进一步研究小菜蛾 *Px-ubi* 的功能及作用机制提供理论依据。

*Px-ubi* 与其他物种的泛素的同源性相当高, 体现了泛素的高度保守性。笔者分析了 *Px-ubi* 与其他真核生物泛素基因的进化关系, 结果表明泛素在各种真核生物中的相似性达到 90% 以上, 具有很强的保守性, 不同物种泛素的差别, 主要体现在融合氨基酸的位置(或数量)方面, 如 *Px-ubi* 核糖体 L40 蛋白在 76 个氨基酸后融合了 52 个氨基酸(*Px-ubi* 准确名称以 *P. xylosteala* ubiquitin-52aa extension protein 更为准确)<sup>[3]</sup>, 而有些昆虫泛素则在之后融合了 53 个氨基酸, ubi-52 和 ubi-53 的氨基酸序列具有一定差别, 推测可能是不同分子进化途径产生的 2 类基因。笔者通过对 *Px-ubi* 的同源建模, 发现其蛋白结构非常保守, 与其他物种(包括人类)的泛素蛋白 3D 结构几乎完全相同, 进一步说明泛素在不同生物中具有很高的保守性。

真核细胞生物泛素的编码基因可分为 2 类: 第 1 类为多聚泛素基因 (polyubiquitin gene), 由多个基因首尾相连, 形成多个泛素基因的重复序列; 第 2 类基因称泛素延伸蛋白 (ubiquitin extension protein, UBE)<sup>[1]</sup>, 主要在细胞快速增长时表达, 其表达产物是一个泛素分子的 C-末端连接 52~53 或 76~81 个氨基酸组成的扩展肽, 此扩展肽经特殊的酶切, 形成 80S 核糖体的组分。本试验获得的 *Px-ubi* 是 UBE 基因, 这暗示 *Px-ubi* 可能在小菜蛾生理过程中承担某种不可或缺的角色。本试验利用荧光定量 qRT-PCR 的方法检测了 *Px-ubi* 在小菜蛾不同时期的表达, 结果表明 *Px-ubi* 在卵期、3 龄幼虫和预蛹期的含量相对较高, 在成虫期的含量相对较低。事实上, 小菜蛾在卵期正是胚胎发生剧烈变化的时候, 细胞快速增长以形成各种组织器官, 而 3 龄幼虫则正是小菜蛾老熟幼虫准备化蛹之时, 由幼虫向蛹的变化过程中新旧器官交替, 此时也正是细胞快速增长之时。同理, 小菜蛾在预蛹期也是真正形成蛹之前最后的剧烈变化, 此时亦需要形成多种新器官。所以, 本试验测定的 *Px-ubi* 的表达规律符合 UBE 基因的特点。泛素主要的功能是选择性降解蛋白质, 通过对蛋白表达水平的调控来实现对

细胞周期<sup>[11]</sup>、细胞生长与凋亡<sup>[12]</sup>、细胞信号传导<sup>[13]</sup>、转录催化、离子通道、免疫应答等重要生理过程起调控作用。小菜蛾是世界性重要害虫之一,分布广、危害重、抗逆性强,在长期的进化过程中对环境因素形成了极强的适应能力,推测 *Px-ubi* 在调节其生长发育以适应外界环境的过程中可能起重要作用<sup>[14]</sup>,其研究将极具现实意义和应用价值。

## 参 考 文 献

- [1] CIECHANOVER A. The ubiquitin proteolytic system and pathogenesis of human diseases: a novel platform for mechanism-based drug targeting[J]. Biochemical Society Transaction, 2003, 31(2): 474-481.
- [2] HOWLLER D, DIKIC I. Targeting the ubiquitin system in cancer therapy[J]. Nature, 2009, 458: 438-444.
- [3] HECTOR L C, ROSA B, CARMEN A. Structure and expression of the *Drosophila* ubiquitin-52-amino-acid fusion-protein gene[J]. Biochemistry, 1992, 286: 281-288.
- [4] 牛国栋,张海元,张忠信.甜菜夜蛾泛素延伸蛋白基因 cDNA 的 3'RACE-PCR 扩增及其克隆和表达[J].昆虫学报,2004,47(2):166-170.
- [5] 陈正凯,陆小平.野蚕泛素基因的克隆与原核表达[J].蚕业科学,2007,33(2):297-301.
- [6] 于航,金丰良,许小霞,等.德国小蠊泛素基因的克隆及序列分析[J].昆虫学报,2004,47(4):522-525.
- [7] 涂洪涛,安世恒,郭线茹,等.烟夜蛾泛素延伸蛋白基因的克隆与表达[J].农业生物技术学报,2006,14(6):884-888.
- [8] 张宇宏,林同,张琪,等.棉卷叶野螟泛素基因的克隆、序列分析及原核表达[J].昆虫学报,2008,51(9):910-915.
- [9] 金丰良,许小霞,张文庆,等.家蝇泛素编码区 cDNA 序列的克隆及在原核细胞中的表达[J].昆虫学报,2008,51(5):473-479.
- [10] PICKART C M. Back to the future with ubiquitin[J]. Cell, 2004, 116(2): 181-190.
- [11] 金伟军,姚祥春,张礼星.泛素-蛋白酶体系统的结构、作用和调控机制[J].科技通报,2008,24(1):29.
- [12] GRABBE C, DIKIC I. Going global on ubiquitin[J]. Science, 2008, 322(5903): 872.
- [13] 肖兰博,李力力,曹亚.泛素在信号转导中的作用[J].生命的化学,2007,27(6):527-530.
- [14] 李存玺,王永潮.泛素-蛋白水解酶复合体通路[J].科学通报,1998,43(18):1905-1910.

## Cloning and expression profile of ubiquitin extension protein from *Plutella xylostella*

LI Xiao-mei CHEN Yong LI Xun ZHONG Guo-hua

Laboratory of Insect Toxicology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

**Abstract** Ubiquitin is a small protein that widely exists in all eukaryote whose basic function is through the ubiquitin-proteasome pathway (UPP) to let the targeting protein degradation effective and highly selectivity. A cDNA fragment encoding ubiquitin-52aa extension protein from the third instar larvae of *Plutella xylostella* was amplified through RT-PCR and RACE method. The ubiquitin-52aa extension gene in *P. xylostella*, named *Px-ubi*, was 537 bp in total length and 387 bp in ORF. It encoded a peptide of 129 amino acid residues (GenBank No. FJ527489), in which the relative quality of molecules is 16.7 ku and the isoelectric point is 9.1. Multiple sequence alignment indicated that *Px-ubi* was similar to the homologous proteins of other eukaryotic species and it shared 92% to 98% amino acid sequence identity with other species. The theoretical three dimensional structure of *Px-ubi* was displayed by homology modeling. Through the RT-PCR, it was found that *Px-ubi* was expressed at different times in the *P. xylostella*, and its content was higher in the egg stage, third instar larvae and pre-pupal stage than in the adult stage. The *Px-ubi* was then inserted into expression pET-32a (+) and transformed into *E. coli* DE3. Western blotting indicated that the *Px-ubi* was expressed successfully in the BL21 strain of *Escherichia coli* induced with IPTG. The results provide some helpful information for the further study of the function of ubiquitin gene in insect.

**Key words** *Plutella xylostella*; ubiquitin; gene; cloning; expression profile

(责任编辑:陈红叶)