

家蝇泛素编码区 cDNA 序列的克隆及在原核细胞中的表达

金丰良¹, 许小霞¹, 张文庆², 任顺祥^{1,*}

(1. 华南农业大学资源环境学院昆虫学系/教育部生物防治工程中心, 广州 510642;

2. 中山大学昆虫学研究所/有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广州 510275)

摘要: 泛素-蛋白酶体途径(ubiquitin-proteasome pathway)是具有高度选择性的蛋白质降解途径,该途径对细胞内蛋白的选择性降解起着重要作用。本研究根据 GenBank 已登录的真核生物泛素(ubiquitin)编码框的氨基酸序列,设计一对简并引物,RT-PCR 克隆了家蝇 *Musca domestica* 泛素基因的编码区 cDNA 序列,并进行了测序。序列分析表明,该编码区的长度为 228 bp,编码 76 个氨基酸,命名为 *Mdubi*,GenBank 登录号为 DQ115796。同源性比较发现,*Mdubi* 氨基酸序列与其他真核生物泛素编码框同源性可达 94% 以上。RT-PCR 检测表明,*Mdubi* 在家蝇不同组织中均高效表达,且不受大肠杆菌 *Escherichia coli* 刺激的影响,是遍在性表达。为进一步研究 *Mdubi* 的结构和功能,将 *Mdubi* 克隆到原核表达载体 pQE30 上,构建重组质粒 pQE30-UBI,转化大肠杆菌 M15 感受态细胞,在 IPTG 诱导下进行了高效表达,SDS-PAGE 检测表明 *Mdubi* 在大肠杆菌中可表达相对分子质量为 9.6 kD 的可溶性融合蛋白;Western blot 分析表明表达产物能与 Ni-NTA 螯合物特异性的结合,表明表达的 *Mdubi* 为 N 端带有 6His 标签的融合蛋白。利用 Ni²⁺-NTA 亲和柱一步纯化了 *Mdubi*,以该融合蛋白免疫新西兰大白兔制备了抗 *Mdubi* 血清。本研究成功克隆了家蝇泛素的编码序列,并在原核细胞中得到了表达,为进一步研究泛素在家蝇体内的作用机制奠定了基础。

关键词: 家蝇;泛素;克隆;原核表达;抗血清

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2008)05-0473-07

Cloning and prokaryotic expression of the cDNA sequence encoding ubiquitin from *Musca domestica*

JIN Feng-Liang¹, XU Xiao-Xia¹, ZHANG Wen-Qing², REN Shun-Xiang^{1,*} (1. College of Natural Resources and Environments/Engineering Research Centre of Biological Control, Ministry of Education, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. State Key Laboratory of Biocontrol, College of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Ubiquitin-proteasome pathway is the most important and highly selective proteolytic pathway which plays an important role in degrading the intracellular proteins selectively. The cDNA sequence encoding ubiquitin from *Musca domestica* was cloned by RT-PCR and sequenced. Sequence analysis showed that the length of this ORF is 228 bp, encoding 76 amino acids, which was named *Mdubi* and registered in GenBank with accession no. DQ115796. Multiple sequence alignment indicated that *Mdubi* was very similar to the homologous proteins of other eukaryotic species and it shared more than 94% amino acid sequence identity with ubiquitins from other eukaryotic species. The expression of *Mdubi* transcript was quantified by the semi-quantitative RT-PCR, and the results demonstrated that the expression of *Mdubi* was ubiquitous and not influenced by stimulation of *Escherichia coli*. The *Mdubi* was inserted into expression vector pQE30 *in vitro* and transformed into *E. coli* M15. The M15 strain, containing *Mdubi* recombinant plasmid, expressed a 9.6 kD protein with 6His tag at N-terminus in agreement with the expected molecular weight after the induction

基金项目:国家重点基础研究发展规划(“973”计划)项目(2006CB102005);国家“十五”攻关项目(2004BA509B0604)

作者简介:金丰良,男,1975年生,山东青州人,博士后,主要从事昆虫免疫工作,E-mail:jflb@yaho.com.cn

* 通讯作者 Author for correspondence; Tel.: 020-85288313; Fax: 02085280292; E-mail: rensxcn@yahoo.com.cn

收稿日期 Received: 2007-11-20; 接受日期 Accepted: 2008-03-07

with IPTG. The fusion protein was purified by Ni^{2+} -NTA column and used to raise antiserum. The successful cloning and expression of the coding sequence of *M. domestica* ubiquitin provided a basis for further study on its function.

Key words: *Musca domestica*; ubiquitin; cloning; prokaryotic expression; antiserum

研究者从兔胸腺中分离到一种小分子蛋白质, 后来发现其广泛存在于各种真核生物中, 且不同种属来源的这种蛋白质具有类似的结构、功能和免疫学作用, 故命名为泛素(ubiquitin) (Goldstein *et al.*, 1975)。泛素一般由 76 个氨基酸组成, 分子量约为 8.6 kD, 是真核生物内高度保守的一种多肽。从不同种属的真核生物得到的泛素的一级结构几乎相同, 三维构象也基本相似(Vijay-Kumar *et al.*, 1987)。真核细胞中编码泛素的基因有两种类型(Jentch *et al.*, 1991; 左萱等, 2005): 第一类是多聚泛素基因(poly-ubiquitin gene), 在染色体中多个泛素单体基因首尾重复相连表达的泛素多聚体; 第二类是泛素融合基因, 该基因的表达产物比泛素大得多, 是一个泛素分子的 C-末端连接着一段由 52 或 76~81 个氨基酸残基组成的延伸肽(C-terminal extension peptide, CEP), 这是一种融合蛋白质。这一类基因的表达受环境的胁迫, 胞内代谢状况和细胞周期等多种因素的调节。

研究表明, 泛素主要通过 ATP 依赖性的泛素-蛋白水解酶复合体通路(ubiquitin-proteasome pathway, UPP) 高效并高度选择性地对胞质和胞核内蛋白进行部分或完全降解。此外, 泛素作为分子伴侣参与核糖体的生物发生、细胞内吞及其他多种生理功能(Glickman and Ciechanover, 2001)。泛素是分子伴侣家族中的一员, 可以起到增加翻译水平和稳定蛋白的作用。泛素特异性蛋白酶(ubiquitin-specific processing proteases, UBPs) 广泛存在于酵母等真核生物, 可以有效地酶解泛素融合蛋白, 与其他用于酶解融合蛋白的特异性蛋白酶如 Factor X 和 Thrombin 相比, UBPs 具有更高的酶活力和更强的特异性。近年来的研究发现, 将外源基因与泛素基因融合后, 不仅可以防止表达产物被降解, 极大地提高外源基因的表达量, 而且表达的融合蛋白在离体或体内条件下, 经泛素特异性蛋白酶在泛素分子 C-末端切割后, 可以释放出完整而有活性的外源蛋白(Gellissen *et al.*, 2000; 孙超等, 2001; Einhauer *et al.*, 2002; 左萱等, 2005; Xu *et al.*, 2007)。该项被称为“泛素融合技术 ubiquitin fusion technique”的技术已开始应用于多种外源基因的表达和转基因植物的研究领域

中。

国内外已经报导了草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* (Guarino, 1990)、烟草天蛾 *Manduca sexta* (Bishoff and Schwartz, 1990)、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (Barrio *et al.*, 1994)、家蚕 *Bombyx mori* (Yun *et al.*, 2000)、斜纹夜蛾 *S. litura* (Li *et al.*, 2003) 及德国小蠊 *Blattella germanica* (于航等, 2004) 等 6 种昆虫的泛素基因的编码区序列, 但对卫生昆虫家蝇 *Musca domestica* 至今还未见关于泛素及相关蛋白的报导。为研究泛素的结构和功能, 以及进一步为泛素作为分子伴侣的研究奠定基础, 本研究根据已知真核生物泛素的氨基酸序列, 设计一对简并引物, 利用 RT-PCR 对家蝇泛素 cDNA 序列进行了克隆, 并对其在原核细胞中的表达、抗血清的制备和组织特异性表达进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 昆虫、菌株与质粒: 家蝇幼虫由本实验室养虫室提供, 为人工饲料饲养的健康幼虫。大肠杆菌 *Escherichia coli* Top10 为本实验室保存; 大肠杆菌 M15 和 pQE30 表达载体购自 Qiagen 公司; pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 主要试剂: RNA 抽提 Trizol 试剂盒及反转录试剂盒购自 Invitrogen 公司, 各种限制性内切酶和 T_4 DNA 连接酶购自 Promega 公司, ExTaq DNA 聚合酶、核酸分子量标准、蛋白分子量标准及各种抗生素购自 TaKaRa 公司, 6 × His-tag 表达和纯化试剂盒(QIA expressionist™) 购自 Qiagen 公司, 完全弗氏佐剂和不完全弗氏佐剂购自 GibcoBRL 公司, 其余试剂均为国产分析纯。斜纹夜蛾泛素蛋白抗体(anti-Splubi) 和斜纹夜蛾泛素蛋白(Splubi) 由中山大学昆虫学研究所李朝飞博士馈赠。

1.2 方法

1.2.1 简并引物的设计和合成: 根据真核生物泛素蛋白 N 末端和 C 末端高度保守的氨基酸序列 MQIFVKLTIG 和 VLRLRG, 设计一对简并引物, 正向引物(UbiF): 5'- ATGCARATHTTYGTNAARAC-3';

反向引物(UbiR)：5'-CCNCCNCKNARNCKIARIAC-3'。引物由上海 Invitrogen 生物有限公司合成,使用前用 ddH₂O 稀释至 10 μmol/L。

1.2.2 家蝇 3 龄幼虫总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成 将家蝇 3 龄幼虫放到无菌研磨皿中,液氮条件下碾成粉末,在液氮挥发完全前加入 Trizol,按照 Invitrogen 公司的 Trizol kit 说明书进行,2 μg 总 RNA 模板和 20 ng oligo(dT)₁₈ 混合,按 Invitrogen 公司 cDNA 合成 Kit 说明书合成 cDNA 第一链。

1.2.3 家蝇泛素编码框的扩增和序列分析：RT-PCR 反应条件：50 μL 体系中含有 10 × PCR buffer (含 20 mmol/L Mg²⁺) 5 μL, dNTP mixtures (各 2.5 mmol/L) 4 μL, UbiF (10 μmol/L) 2 μL, UbiR (10 μmol/L) 2 μL, cDNA 2 μL, ExTaq DNA polymerase (5 U/μL) 0.5 μL ddH₂O 34.5 μL；RT-PCR 反应体系样品先 94℃ 预变性 5 min,然后按下述条件进行 PCR 扩增反应：94℃、30 s, 55℃、40 s, 72℃、30 s, 30 个循环后 72℃、10 min,扩增完毕后置 4℃ 终止反应。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳纯化后,连入 pMD18-T 载体,连接产物转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞,蓝白斑筛选阳性转化子,将 BamH I 和 Hind III 双酶切鉴定正确的转化子送上海英骏生物技术有限公司测序。序列同源性比对和相似性搜索用在线生物学软件 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> 进行,多序列比对采用在线生物学软件 <http://www.ebi.ac.uk/clustalw> 进行；采用 ClustalW 程序 MEGA4.0 软件(Tamura *et al.*, 2007),以 UPGMA 法构建系统关系。

1.2.4 家蝇泛素的组织表达差异性分析：家蝇幼虫经生理盐水洗涤,75% 酒精消毒后,用微量注射器注射热灭活的大肠杆菌 Top10,在高温消毒的培养皿中饲养(金丰良等,2006)。按照 Invitrogen 公司的 Trizol 方法抽提大肠杆菌 Top10 诱导不同时间的家蝇总 RNA 及家蝇 3 龄幼虫脂肪体、体壁、中肠和马氏管不同组织的 RNA,通过半定量 RT-PCR 方法,以组成型表达的 β-actin 基因作为内参照,以引物(AF：5'-CCGAGGTACCCCATGAACACG-3' 和 AR：5'-GGAAGGCAACATACATGGCGGG-3')进行 PCR 扩增以调整各 cDNA 模板的浓度。在相同模板浓度的条件下,用家蝇泛素基因特异性引物(5'-cgtgaaaaccttgactggca-3' 和 5'-gacaatgtacgaccattctcc-3')进行 PCR 扩增,以检测家蝇泛素基因在家蝇不同组织及在大肠杆菌诱导下的表达差异。

1.2.5 家蝇泛素在原核细胞中的表达和纯化：根据序列比对正确的家蝇泛素 ORF 编码序列设计一

对特异性引物,引物如下：OF：5'-CGA GGATCC atgcagatttcgtgaaacct-3'；OR：5'-ACCAAGCTT-gccaccgcgcagcgaaggacc-3'。为了便于将 PCR 产物亚克隆到表达载体上,在引物中设计了酶切位点(斜体序列)。上游引物中有 BamH I 酶切位点,下游引物中有 Hind III 酶切位点。PCR 产物用 BamH I 和 Hind III 双酶切,经割胶回收纯化后,与经 BamH I / Hind III 同样双酶切的 pQE30 载体连接,构建重组表达载体 pQE-UBI,并转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞,挑取酶切和测序鉴定正确的单克隆,抽提质粒并转化大肠杆菌 M15 感受态细胞,于 10 mL LB 培养基中(含 100 μg/mL 氨苄青霉素和 25 μg/mL 的卡那霉素)过夜培养,次日以 1:100 稀释继续 37℃ 培养,当 A₆₀₀ 达到 0.5 后,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导目的蛋白的表达,37℃ 诱导 5 h,4℃,12 000 r/min 离心 1 min,收集菌体,并用裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 50 mmol/L NaCl, 0.5% Triton X-100, 2 mg/mL 溶菌酶)裂解细胞沉淀,经超声及高速离心后,上清液经过 Ni²⁺-NTA 柱分离和纯化融合蛋白,纯化方法按照 Qiagen 公司的 pQE 系统操作手册进行。

1.2.6 抗血清的制备：参考 Sambrook 等(1989)的方法进行。免疫接种前,采取血样作为对照。以纯化的泛素蛋白作为抗原。基础免疫取抗原约 100 μg,与等体积的弗氏完全佐剂混合,乳化后,在兔背部,分 20~30 点皮内注射。2 周后,加强第一次(皮下注射),共加强 3 次,每次间隔两周左右。在每次加强后 7~10 天,采血 3~5 mL 检测抗体水平。3 次加强后,颈动脉取血。血液置 37℃,2 h,然后置于 4℃ 冰箱,过夜,次日离心,8 500 r/min 5 min,收集血清,100:1 加入叠氮钠(0.01%),混匀,ELISA 测定血清效价后置 -70℃ 保存。

1.2.7 SDS-PAGE 电泳及 Western blot 分析：SDS-PAGE 电泳和 Western blot 分析参照文献(Sambrook *et al.*, 1989)进行,SDS-PAGE 电泳结束后,电转移至硝酸纤维素(NC)膜(Amersham, Φ0.22 μm)。用封闭液(PBST + 5% 的脱脂奶粉)封闭 2 h,接着与一抗(用 PBST 按 1:500 的比例稀释)室温反应 1 h,用 PBST 洗膜 3 次；然后加入 PBST 稀释的羊抗兔-IgG-AP(1:500),室温反应 1 h,用 PBST 洗膜 3 次；最后将 NC 膜置于含有 NBT 和 BCIP 的显色液中显色至条带清晰,将膜放入蒸馏水中漂洗终止显色反应。取出晾干,拍照。

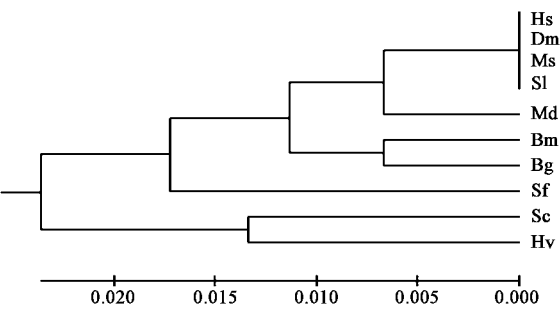


图4 UPGMA 法构建家蝇与其他真核生物泛素氨基酸序列的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of reported ubiquitins by UPGMA

2.3 家蝇泛素基因组织表达的差异性

采用 RT-PCR 方法分析家蝇泛素在家蝇 3 龄幼虫脂肪体、体壁、中肠和马氏管各组织中的表达,结果如图 5。从图 5 可以看出,在家蝇各组织中可以检测到一条大小约为 230 bp 的明亮条带,表明 Mdubi 在各组织中均处于高水平表达。对家蝇 3 龄幼虫在细菌诱导不同时间下 RT-PCR 检测,结果如图 6,由图可以看出,在未经大肠杆菌诱导和经大肠杆菌诱导不同时间都可以检测到一条大小约为 230 bp 的明亮片段,且没有明显差异,表明家蝇 UBI 在家蝇体内的表达不受大肠杆菌刺激的影响。

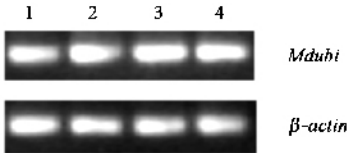


图5 家蝇泛素在家蝇 3 龄幼虫不同组织中的表达分析

Fig. 5 Expression analysis of Mdubi in different tissues of 3rd instar larva of Musca domestica

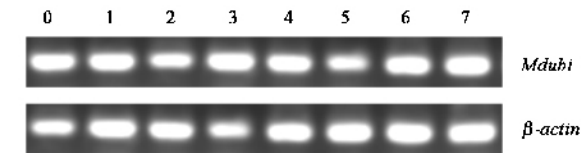


图6 大肠杆菌诱导不同时间后家蝇 3 龄幼虫体内家蝇泛素的表达

Fig. 6 The time-course expression of Mdubi in 3rd instar larva of Musca domestica in different hours after stimulated by Escherichia coli

2.4 家蝇泛素在原核细胞中的融合表达

将测序鉴定正确的表达质粒 pQE-Mdubi 转化大肠杆菌 M15,经浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导,得到了目的蛋白的表达。SDS-PAGE 和 Western blot 分析表明,含有 pQE-Mdubi 的大肠杆菌 M15 在 IPTG 诱导下表达了一条大约 9.6 kD 的蛋白条带,与推测的大小一致,如图 7 :A。Western blot 显示,该蛋白带能与斜纹夜蛾泛素蛋白抗体发生特异性反应,表明它是表达的家蝇泛素蛋白,如图 7 :B。用识别融合蛋白质中组氨酸接头的 Ni²⁺-NTA 偶联抗体检测显示在预期大小处有阳性反应带出现,表明所表达的蛋白 N 末端带有 6His 的融合蛋白。以 6 × His-tag 纯化试剂盒一步纯化了 N 末端带有 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,如图 8 所示。

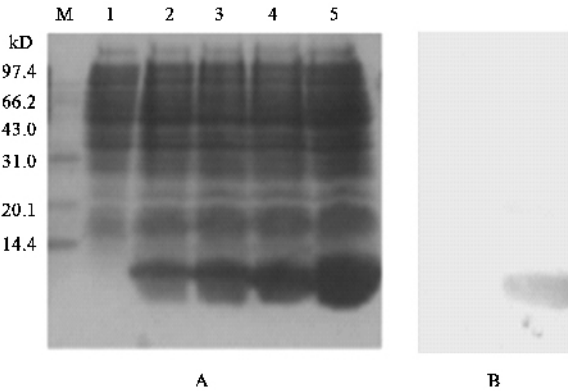


图7 家蝇泛素基因在大肠杆菌 M15 中表达的 SDS-PAGE 与 Western blot 分析

Fig. 7 SDS-PAGE (A) and Western blot (B) analysis of Mdubi expressed in Escherichia coli M15

2.5 泛素抗体的制备与检测

以纯化的融合蛋白 Mdubi 为抗原免疫新西兰大白兔,ELISA 测定效价,免疫 70 天时可诱导产生抗体滴度为 1:6 400 的抗融合蛋白血清。以这种融合蛋白抗体为一抗,羊抗兔-IgG-AP 为二抗进行 Western 印迹检测,结果显示,家蝇泛素抗体不仅能与家蝇泛素的融合蛋白呈阳性反应,而且能与 S.

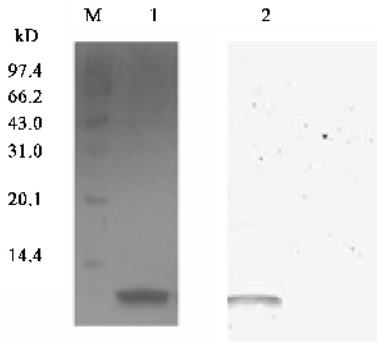


图 8 纯化的家蝇泛素融合蛋白的 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 分析

Fig. 8 SDS-PAGE and Western blot analysis of the purified recombinant Mdubi protein

M:标准分子量 Protein standard molecular weight markers; 1:纯化的家蝇泛素蛋白的 SDS-PAGE 电泳 SDS-PAGE analysis of purified Mdubi protein; 2: Ni^{2+} -NTA 聚合物检测纯化的家蝇泛素蛋白 Western blot analysis of purified Mdubi protein using Ni^{2+} -NTA conjugate.

litura 泛素蛋白呈阳性反应,如图 9。表明所表达的融合蛋白保持原有泛素的免疫原性。

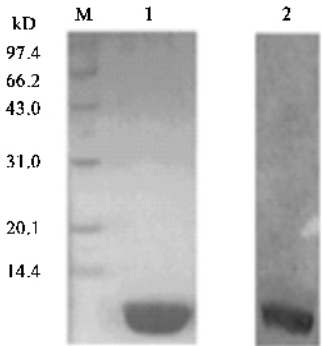


图 9 *Mdubi* 抗体的 Western blot 分析

Fig. 9 Western blot analysis of anti-Mdubi using Splubi as the template

M:标准分子量 Protein molecular weight marker; 1:纯化的斜纹夜蛾泛素蛋白 SDS-PAGE 分析 SDS-PAGE analysis of purified Splubi; 2:家蝇泛素抗体检测斜纹夜蛾泛素蛋白 Western blot analysis of anti-Mdubi using Splubi as the template.

3 讨论

自从 20 世纪 80 年代初以来,泛素及泛素-蛋白酶体通路一直是生物学领域的研究热点之一。近年来,大量的研究结果表明,泛素除了与靶蛋白共价结合参与细胞内蛋白的选择性降解外,还参与细胞周

期调控、DNA 修复、信号传导、转录调控、细胞凋亡以及机体免疫等多种生命活动过程 (Glickman and Ciechanover, 2001)。昆虫是世界上最大的生物种群,为适应环境的压力,在长期的进化过程中形成了较强的适应机制,研究表明泛素蛋白在调节昆虫适应外界环境的过程中起着调节作用 (李存玺和王永潮, 1998)。为研究昆虫泛素的结构和功能,本文根据已知真核生物泛素的氨基酸序列,设计一对简并引物克隆了家蝇 3 龄幼虫泛素编码序列。序列分析表明,家蝇泛素与其他真核生物泛素的氨基酸序列仅有 1 ~ 3 个氨基酸的不同,除了第 52 位赖氨酸改变为精氨酸之外,所有其他已知与泛素功能相关的位点在家蝇泛素序列中均保守存在。

研究表明,泛素基因在昆虫的中肠、脂肪体、马氏管、飞行肌等组织中具有高水平的表达 (Bishoff and Schwartz, 1990; Barri *et al.*, 1994)。本研究利用半定量 RT-PCR 对 *Mdubi* 在家蝇不同组织及细菌诱导下的表达进行了检测,结果表明, *Mdubi* 在家蝇中肠、脂肪体、马氏管和体壁中具有高水平的表达,且不受细菌刺激的影响,与以上结果一致,表明泛素在昆虫生命过程中具有重要作用。

作为胞内重要的蛋白质降解体系,泛素系统在免疫信号转导过程中发挥着重要作用 (金伟军等, 2008)。目前,对泛素系统调控免疫细胞信号转导的研究主要集中于两个环节:其一是泛素系统通过识别某些酪氨酸磷酸化的免疫细胞膜受体使其降解,以确保细胞发生适度的免疫应答;另一方面则是泛素系统调控转录因子 NF- κ B 活化。研究表明,在果蝇体内,泛素-蛋白酶体途径通过降解免疫缺失 (immune deficiency, *imd*) 的 Relish 蛋白而促进了果蝇体内抗菌肽基因的激活和表达 (Khush *et al.*, 2002)。本研究在原核细胞中高效表达了家蝇泛素基因,并制备了抗血清,为进一步研究在外界刺激诱导下,通过 *Imd* 信号传导途径调控家蝇体内抗菌肽的转录和表达提供了分子检测手段,并为进一步开发家蝇体内丰富的抗菌物质奠定了基础。

参考文献 (References)

Barrio R, del Arco A, Cabrera HL, Arribas C, 1994. Structure and expression of the *Drosophila* ubiquitin-80-amino acid fusion protein-gene. *Biochem. J.*, 302: 237 - 244.

Bishoff ST, Schwartz LM, 1990. Characterization of a ubiquitin-fusion gene from the tobacco hawk moth, *Manduca sexta*. *Nucleic Acids Res.*, 18 (20): 6 039 - 6 043.

Einhauser A, Schuster M, Wasserbauer E, Junghauer A 2002. Expression

and purification of homogenous proteins in *Saccharomyces cerevisiae* Based on ubiquitin-FLAG fusion, *Protein Expr. Purif.*, 24 : 497 – 504.

Ennahar S, Sonomoto K, Ishizaki A, 1999. Class II a bacteriocins from lactic acid bacteria : antibacterial activity and food preservation. *J. Biosci. Bioeng.*, 87 : 705 – 716.

Gellissen G, 2000. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54 : 741 – 750.

Glickman MH, Ciechanover A, 2001. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway : destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.*, 82 (2) : 373 – 428.

Goldstein G, Scheid M, Hammerling U, Schlesinger DH, Niall HD, Boyse EA, 1975. Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72 : 11 – 15.

Guarino LA, 1990. Identification of a viral gene encoding a ubiquitin-like protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87(1) : 409 – 413.

Jentsch S, Seufert W, Hauser HP, 1991. Genetic analysis of the ubiquitin system. *Biochem. Biophys. Acta*, 10 : 127 – 135.

Jin FL, Xu XX, Zhao SW, Gu DX, Zhang WQ, 2006. Cloning and expression of a *Musca domestica* defensin gene in *Pichia pastoris*. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 45(3) : 86 – 89. [金丰良, 许小霞, 赵仕炜, 古德祥, 张文庆, 2006. 家蝇防御素 defensin cDNA 的克隆及在毕赤酵母中的表达. 中山大学学报 (自然科学版), 45(3) : 86 – 89]

Khush RS, Cornwell WD, Uram JN, Lemaitre B, 2002. A ubiquitin proteasome pathway represses the *Drosophila* immune deficient signaling cascade. *Curr. Biol.*, 12(20) : 1 728 – 1 737.

Jin WJ, Yao XC, Lu MQ, Zhang LX, 2008. Structure, effect and regulation of the ubiquitin-proteasome system. *Bulletin of Science and Technology*, 24(1) : 29 – 34. [金伟军, 姚祥春, 吕美巧, 张礼星, 2008. 泛素-蛋白酶体系统的结构、作用和调控机制. 科技通报, 24(1) : 29 – 34]

Li CX, Wang YC, 1998. Ubiquitin-proteasome pathway. *Chinese Science Bulletin*, 43(18) : 1 905 – 1 910. [李存玺, 王永潮, 1998. 泛素-蛋白水解酶复合体通路. 科学通报, 43(18) : 1 905 – 1 910]

Li ZF, Gong YX, Shi YX, Pan LJ, Pang Y, 2003. Cloning and expression of *Spodoptera litura* ubiquitin gene. *Entomologia Sinica*, 10(1) : 27 – 34.

Sambrook KJ, Fritsch EF, Maniatis T, 1989. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sun C, Chen XZ, Huan LD, Peng XX, 2001. Fusion expression of a peptide antibiotic-apidaecin gene in *Lactococcus lactis*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 17(1) : 20 – 23. [孙超, 陈秀珠, 还连栋, 彭学贤. 2001. 多肽抗生素 apidaecin 基因在乳酸乳球菌中的融合表达. 生物工程学报, 17(1) : 20 – 23]

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S, 2007. MEGA4 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 24 : 1 596 – 1 599.

Vijay-Kumar S, Buggs CE, Wilkinson KD, Vierstra RD, Hatfield PM, Cook WJ, 1987. Comparison of the three-dimensional structures of yeast and oat ubiquitin with human ubiquitin. *J. Biol. Chem.*, 262 : 6 396 – 6 399.

Xu XX, Jin FL, Yu XQ, Ren SX, Hu J, Zhang WQ, 2007. High-level expression of the recombinant hybrid peptide cecropinA (1 – 8) magainin2 (1 – 12) with an ubiquitin fusion partner in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.*, 55 : 175 – 182.

Yu H, Jin FL, Xu XX, Yang X, Gu DX, Zhang WQ, 2004. Cloning and sequence analysis of an ubiquitin gene of *Blattella germanica*. *Acta Entomologica Sinica*, 47(4) : 522 – 525. [于航, 金丰良, 许小霞, 杨杏, 古德祥, 张文庆, 2004. 德国小蠊泛素基因的克隆及序列分析. 昆虫学报, 47(4) : 522 – 525]

Yun EY, Goo TW, Hwang JS, Kang SW, 2000. *Bombyx mori* ubiquitin mRNA. GenBank Accession No. AF308163.

Zuo X, Wang DM, Zhou P, 2005. Fusion expression of cloned gene products with ubiquitin. *Chinese Journal of Tropical Agriculture*, 25(4) : 75 – 79. [左萱, 王冬梅, 周鹏, 2005. 泛素与融合表达. 热带农业科学, 25(4) : 75 – 79]

(责任编辑：赵利辉)