

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

牛国栋, 张海元, 张忠信*

(中国科学院武汉病毒研究所分子病毒学重点实验室, 武汉 430071)

摘要: 根据已知的草地夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 的泛素延伸基因 5' 端核苷酸序列设计引物, 应用 3'RACE-PCR 技术, 从甜菜夜蛾 *S. exigua* 脂肪体组织总 RNA 中反转录扩增泛素基因的 cDNA 片段。扩增得到的片段全长 513 bp, 3' 末端有 123 bp 的非翻译区, 翻译区编码一个长为 129 个氨基酸残基的蛋白质, 预测分子量为 14.8 kD。同源分析表明, 此 cDNA 序列为 ubiquitin-53aa extension protein(ubi-53) 基因, 在泛素蛋白后融合了一个核糖体 L40 蛋白(ribosomal L40 protein)。用 MagAlign 和 Genedoc 软件对 cDNA 编码的氨基酸序列进行了同源性分析, 结果表明: 甜菜夜蛾的 ubi-53 基因与真核生物家蚕 *Bombyx mori*、草地夜蛾、果蝇 *Drosophila melanogaster* 和人 *Homo sapiens* 泛素的同源性分别为 96.9%、98.5%、95.3% 和 93.0%, 与甜菜夜蛾核型多角体病毒 (SeNPV) 泛素的同源性为 78.8%, 说明真核生物的泛素基因与核型多角体病毒的泛素基因可能存在不同的分子进化途径。将甜菜夜蛾的 ubi-53 基因克隆到原核表达载体 pET-28a 上, 转化至 BL21(DE3) 中, 用 IPTG 进行诱导表达, 用异源泛素单克隆抗体进行 Western blot 检测, 证明原核表达蛋白是目的蛋白。

关键词: 甜菜夜蛾; 3'RACE-PCR; 泛素延伸基因; 分子进化; 原核表达

中图分类号: Q965 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2004)02-0166-05

Amplification with 3'RACE-PCR, cloning and prokaryotic expression of ubiquitin extension protein cDNA of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae)

NIU Guo-Dong, ZHANG Hai-Yuan, ZHANG Zhong-Xin* (Key Laboratory of Molecular Virology, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

Abstract: To identify the nucleotide sequence of ubiquitin cDNA in *Spodoptera exigua*, a 513 bp cDNA fragment encoding ubiquitin-53aa extension protein from *S. exigua* lipid was amplified with 3'RACE (rapid amplification of cDNA ends) PCR with primers designed on the N-terminal amino acid sequence of *S. frugiperda* ubiquitin extension gene, and the amplified fragment was cloned and sequenced. The ubiquitin-53aa extension gene (ubi-53) in *S. exigua* was 513 bp in length, including 123 bp of 3' untranslated region and 390 bp of encoding region. The encoding region encoded a peptide of 129 amino acid residues, in which there was an ubiquitin fused with a ribosomal L40 protein. A comparison of the deduced amino acid sequence with those of *Bombyx mori*, *S. frugiperda*, *Drosophila melanogaster*, *Homo sapiens*, SeNPV and BmNPV showed that the amino acid homology rates were 96.9%, 98.5%, 95.3%, 93.0%, 78.8% and 77.2% respectively. This suggests *ube* genes in eukaryotes may have a different evolution way from its host viruses. The fragment containing ubi-53 gene was inserted into pET-28a expressive vector, and the expression was induced by IPTG in *E. coli* BL21(DE3). The fusion protein was identified by Western blot using a mouse monoclonal antibody against bovine ubiquitin.

Key words: *Spodoptera exigua*; 3'RACE-PCR; ubiquitin-53aa extension protein; molecular evolution; prokaryotic expression

泛素是一种小分子蛋白, 几乎存在于所有真核生物中, 在部分真核生物病毒中也存在, 在已完成全基因组序列分析的杆状病毒中都存在。泛素不仅通过泛素-蛋白水解酶复合体通路(ubiquitin proteasome

基金项目: 国家“863”项目(2001AA246014); 中国科学院农办重大项目(NK 十五-B-07-04)

作者简介: 牛国栋, 男, 1977 年 8 月生, 主要研究方向为病毒分子生物学, Tel.: (027) 87198103; E-mail: gniu@uiuc.edu

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: zhangzx@pentium.whiof.ac.cn

收稿日期 Received: 2003-01-13; 接受日期 Accepted: 2003-05-12

pathway, UPP)(Ciechamover, 1994)途径参与蛋白质的降解和细胞周期调控,而且还通过多种途径参与基因转录的调控。泛素蛋白具有极其保守的氨基酸序列。现已对人、果蝇和家蚕中的几种多聚泛素 ubi-52、ubi-53 和 ubi-80 基因进行了分子进化和功能方面的研究。真核生物泛素在细胞周期调控、细胞凋亡调控及 mRNA 转录调控等重要生命活动中都具有功能。目前,泛素的研究主要在高等动物和高等植物中进行,对昆虫泛素基因的研究还较少。

昆虫杆状病毒泛素基因结构和功能的研究,国内外已有一些报道(Haas *et al.*, 1996),我们也对甜菜夜蛾核型多角体病毒(*Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus, SeNPV)泛素基因进行了研究(牛国栋等, 2003),为了进一步研究鳞翅目昆虫泛素基因与昆虫病毒同家族基因的进化关系及昆虫泛素基因在细胞生理和病理变化中的功能,我们利用 3'RACE-PCR 方法,从甜菜夜蛾幼虫脂肪体和血淋巴组织的总 RNA 中扩增出鳞翅目昆虫泛素延伸基因(ubiquitin-53aa extension protein)cDNA,并对其进行了克隆、测序、表达、检测和进化分析。

1 材料和方法

1.1 甜菜夜蛾、菌株及质粒

甜菜夜蛾由中国科学院武汉病毒研究所实验动物中心提供,大肠杆菌 BL21(DE3)、质粒 pET-28a 和大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保存。

1.2 甜菜夜蛾血淋巴和脂肪体中总 RNA 的提取

选用 5 龄甜菜夜蛾幼虫,取血淋巴 200 μ L,脂肪体 200 μ g,脂肪体在冰上用研磨器研磨碎,立即用 RNA-Solv 试剂(Omega 公司)提取,提取后的总 RNA 加入 DNase I, 37 $^{\circ}$ C 降解 DNA 1 h,提取步骤按照试剂说明书进行。总 RNA 的提取质量通过甲醛变性电泳鉴定。

1.3 用 3'RACE-PCR 方法扩增泛素延伸基因的 cDNA

1.3.1 引物设计: 根据草地夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 的泛素延伸基因序列(GenBank 登录号: AY072292), 分别设计了基因特异性引物(gene-specific primer, GSP)、接头引物(adaptor primer, AP)和通用接头引物(universal adaptor primer, UAP), 3 条引物的序列如下:

GSP: 5'-GCCGGATCCATGCAGATCTTCGTAAAA-ACCCTCA-3', 特异性引物 5'端的 ATG 上游加入了

*Bam*H I 酶切位点; AP: 5'-GGCGAAGCTTGTCTGACG AATTCT-TTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'; UAP: 5'-GGCGAA GCTTGTG-CACGAATTC-3', 接头引物和通用接头引物加入了 *Hind*III、*Sal* I 和 *Eco*R I 三个酶切位点。

1.3.2 反转录产生 cDNA 模板: 取 4 μ L 总 RNA (3 μ g), 加 1 μ L 500 μ g/mL 接头引物(AP)、6 μ L 含焦碳酸二乙酯(DEPC)的超纯水和 1 μ L 10 mmol/L 的 4 种 dNTP 混合液, 65 $^{\circ}$ C 温浴 10 min, 冰上快速冷却后依次加入 4 μ L 5 $\times$ 反转录缓冲液、2 μ L 0.1 mmol/L 二硫苏糖醇(DTT)和 1 μ L RNase 抑制剂, 轻柔地混合均匀后, 42 $^{\circ}$ C 温浴 2 min; 加入 1 μ L (200 U) 的反转录酶(SuperScript II RNase H-Reverse Transcriptase)(Gibco), 42 $^{\circ}$ C 温浴 50 min; 70 $^{\circ}$ C 温浴 15 min 终止反应, 加 0.5 μ L 的 RNase H 消化模板 mRNA。

1.3.3 扩增 cDNA: 第一次循环体系组成为: 5 μ L 10 $\times$ 扩增缓冲液, 4 μ L 4 种 dNTP 混合液, 2 μ L 10 μ mol/L 通用接头引物(UAP), 2 μ L 10 μ mol/L 特异性引物(GSP), 2 μ L 模板 cDNA, 0.25 μ L 高保真 DNA 聚合酶(Pyrobest DNA polymerase)(TaKaRa)和 36 μ L ddH $_2$ O。扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 35 个循环, 终延伸 72 $^{\circ}$ C 10 min; 第二次循环时, 将第一次循环扩增产物 Tris-EDTA 缓冲液(TE)稀释 20 倍, 取 1 μ L 稀释产物按以上程序扩增。

1.4 3'RACE-PCR 产物的克隆和测序

第二次扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 365 nm 紫外光下, 从凝胶上将分子大小约为 500 bp 的带切下, DNA 回收试剂盒回收。回收的 DNA 与 pGEM-T 载体(Promega)连接, 构建的质粒命名为 pGEM-T-ube。构建的质粒对 DH5 α 感受态细胞转化, 转化细胞在含有抗生素和 X-gal 的平板上进行蓝白斑筛选, 挑取白斑细胞, 培养后提取质粒 DNA 酶切鉴定, 对鉴定为正确的阳性克隆进行测序, 序列测定由上海博亚公司完成, 序列分析用 DNASTAR 等软件进行分析。

1.5 融合基因在大肠杆菌中的表达

用 *Bam*H I 和 *Sal* I 对 pGEM-T-ube 双酶切, 切下的 cDNA 片段与同样双酶切的 pET-28a 连接, 连接反应及转化实验均按照常规的方法, 重组表达质粒命名为 pET-ube, 对其中插入 DNA 片段测序。然后转化 BL21(DE3)细胞, 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达目的蛋白, 表达蛋白经 15% SDS-PAGE 分析。另外以不同的时间诱导目的蛋白表达, 以获取最佳的蛋白诱导条件。

1.6 融合蛋白的 Western blot 鉴定

BL21 细胞表达融合蛋白, Western blot 进行鉴定, 第一抗体为小鼠抗牛源泛素的单克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology, Inc), 第二抗体为碱性磷酸酶标记的羊抗鼠二抗(上海华美公司), 显色反应用 NBT/BICP 显色试剂盒(上海华美公司), Western blot 实验步骤按照常规方法进行。

2 结果与分析

2.1 甜菜夜蛾泛素延伸基因 cDNA 序列分析

从昆虫组织中提取总 RNA, 经反转录获得 DNA, 利用 3' RACE-PCR 方法扩增鳞翅目昆虫的泛素延伸基因。首轮扩增中, 用基因特异性引物(GSP)和通用接头引物(UAP)进行 PCR, 得到一个较弱的约 500 bp 的片段, 与预计的泛素延伸基因大小相吻合, 相应的阴性对照没有扩增。用基因特异性引物和通用接头引物对首轮扩增产物进行第二次 PCR, 得到一条较亮的约 500 bp 的带, 但也出现了多条在 100 ~ 500 bp 之间的非特异性带。虽然对 PCR 的条件进行多次优化, 仍然没有消除这些非特异性带。对第二次 PCR 扩增得到的 500 bp 的带进行回收, 与 pGEM-T 载体相连, 转化 DH5 α , 得到含 3' RACE-PCR 产物的克隆。

对克隆的 cDNA 进行序列测定, 结果见图 1。克

隆的 cDNA 片段全长 513 bp, 其中 3' 非翻译区有 123 个核苷酸, 翻译区编码一个长为 129 个氨基酸残基的蛋白前体, 蛋白质分子量约 14.8 kD, 在 3' 非编码区下游有一个 AATAAA 的多聚(A)加尾序列。通过与 GenBank 的核苷酸序列进行 Blast 比较, 我们得到的基因为 ubiquitin-53aa extension protein 基因, 命名为 Se-ubi53。该基因序列已被 GenBank 数据库接受, 登录号为 AY149883。

使用 Genedoc 软件对不同病毒泛素及昆虫和人的泛素延伸蛋白进行同源性比较, 结果见图 2。图中表明真核生物泛素蛋白中, 参与泛素-蛋白复合体形成的 4 个保守性功能位点 Lys-29、Lys-48、Lys-63 和 Gly-76 绝对保守。杆状病毒泛素中这 4 个位点也绝对保守, 但杆状病毒泛素的第 15 ~ 31 和第 51 ~ 57 位氨基酸残基变化较大(牛国栋等, 2003)。甜菜夜蛾、草地夜蛾和家蚕泛素核糖体 L40 蛋白在 76 个氨基酸后融合了 53 个氨基酸, 而果蝇和人则在泛素之后融合了 52 个氨基酸。氨基酸序列同源性比较结果表明, ubi-52 与 ubi-53 有多个氨基酸残基的变化: ubi-52 氨基酸序列中第 19 位、77 位、87 位和 113 位分别为 Ala、Thr、Met 和 Thr, 而 ubi-53 的第 19 位、77 位、87 位和 113 位分别为 Pro、Ile、Gln 和 Lys。ubi-52 与 ubi-53 的氨基酸序列具有一定差别, 我们推测 ubi-52 与 ubi-53 可能是不同分子进化途径产生的两类基因。

```

atg cag atc ttc gta aaa acc ctc acg ggt aaa gcc atc acc ctc gag gtg gag gcc tca
M Q I F V K T L T G K A I T L E V E A S
gac acc att gaa aat gtg aag gca aag atc cag gac aaa gag gga atc cca cca gac cag
D T I E N V K A K I Q D K E G I P P D Q
caa cgt ctt atc ttc gct ggt aaa cag ttg gaa gat ggc cgc aca ctc tct gat tac aac
Q R L I F A G K Q L E D G R T L S D Y N
atc caa aag gaa tcc aca ctc cac ttg gtg ctc agg ctg aga gga ggt acc att gag cct
I Q K E S T L H L V L R L R G G T I E P
tcc ctc cgt att ttg gcc atg aag tac aac tgt gac aaa atg att tgc cgc aag tgc tat
S L R I L A M K Y N C D K M I C R K C Y
gct cgc ctt cac ccc cgt gct acc aac tgc cgc aag acc aag tgt gga cac acc aac aac
A R L H P R A T N C R K T K C G H T N N
ctg cgc ccc aag aag aag ctg aag gat taaattatttttttttcaattgcatagcat
L R P K K K L K D stop
taccagttaccattctacaatttgctattcatttaattaagatgacaaaattaataaaa
atgtaacagcattaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图 1 甜菜夜蛾 ubi-53 3' UTR cDNA 的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1 3' UTR ubi-53 cDNA nucleotide and deduced amino acid sequence of *Spodoptera exigua*

.....上为引物序列 These with dots below are the primer sequence; ——上黑体为多聚(A)序列 These underlined are the poly(A) sequence.

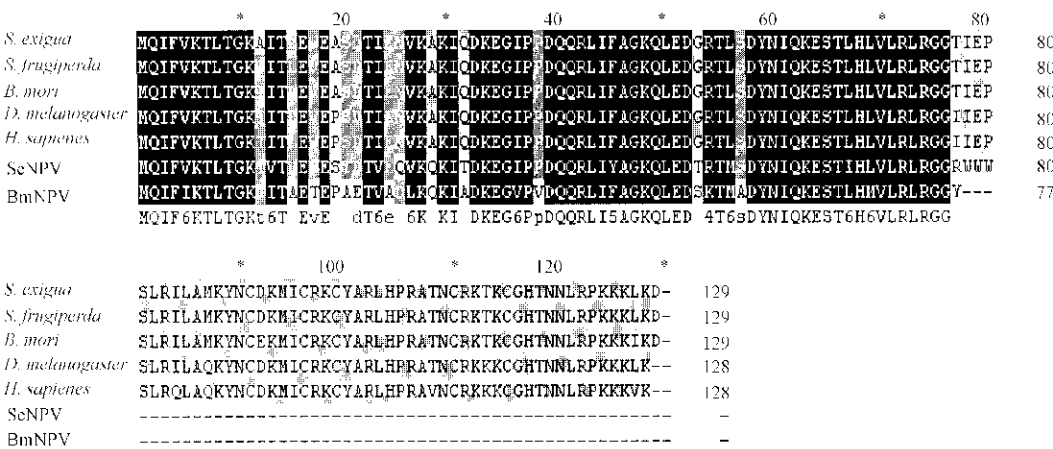


图 2 用 Genedoc 软件分析不同来源的泛素基因氨基酸序列同源性

Fig. 2 Alignment of ubiquitins from different species

黑色代表 100% 同源性 The black shadow represents 100% identity; 灰色代表 80% 同源性 The gray shadow represents 80% identity.

2.2 同源性比较

Se-ubi53 为泛素蛋白与核糖体 L40 蛋白融合体。根据开放阅读框所推测的氨基酸序列,使用 MagAlign 软件,对 Se-ubi53 与不同昆虫和哺乳动物的泛素延伸基因(Ube)编码的氨基酸序列进行同源

性比较。结果见表 1。甜菜夜蛾泛素延伸蛋白与双翅目昆虫泛素(Dm-Ube)的同源性为 95.3%,与鳞翅目昆虫泛素(Bm-Ube、Sf-Ube)的同源性为 96.9% 和 98.5%,与人类泛素的同源性为 93.0%。

表 1 用 MagAlign 软件分析不同来源的泛素蛋白的同源性(%)

Table 1 Alignment of ubiquitins from different species (%)

	<i>S. frugiperda</i>	<i>B. mori</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>H. sapiens</i>	SeNPV	BmNPV
<i>S. exigua</i>	98.5	96.9	95.3	93.0	78.8	72.7
<i>S. frugiperda</i>		97.7	96.1	93.8	80.0	74.0
<i>B. mori</i>			94.6	93.0	80.0	74.0
<i>D. melanogaster</i>				96.9	80.0	75.3
<i>H. sapiens</i>					80.0	75.3
SeNPV						74.0

2.3 泛素蛋白在大肠杆菌中的诱导表达

用 BamH I 和 Sal I 对 pGEM-T-ube 双酶切,将得到的 ube 基因 cDNA 片段连接到 pET-28a 表达载体上,用双酶切鉴定分子大小正确。选用浓度为 1.0 mmol/L 的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG),分别诱导 0 h、1 h、2 h、3 h、4 h 和 5 h,原核表达的结果见图 3。由图 3 看出,IPTG 诱导融合蛋白表达时,诱导时间 1 h,融合蛋白的表达量已经达到很高水平,随着时间延长,蛋白的表达量并没有太大的变化。

2.4 Western blot 检测目的蛋白

原核表达的蛋白经 SDS-PAGE,使用牛源泛素的单克隆抗体进行 Western blot 检测(图 4),出现一条特异性的抗原-抗体结合带,根据分子量的大小推测,这条带的分子量与目的蛋白的分子量相同,从而证明原核系统中表达的目的蛋白是泛素蛋白。

3 讨论

真核生物中的泛素延伸基因(ube)分为两类:一类 C 末端与 52 或 53 个氨基酸的蛋白质融合,这类融合的蛋白与核糖体 L40(ribosomal L40)有很高的同源性;另一类与 76~80 个氨基酸的蛋白质融合,这类融合的蛋白质与核糖体 S27A 蛋白(ribosomal S27A)有很高的同源性(Hector et al., 1992)。Mitsuru 等(2000)对多聚泛素(polyubiquitin)基因进行了分子进化的研究,发现根据 3'UTR 序列同源性可以把多聚泛素分成 UbB 和 UbC 两类,这两类基因在种之间是协同进化关系。我们对病毒、昆虫及哺乳动物 ube 基因的 3'UTR 序列进行了分析,没有发现

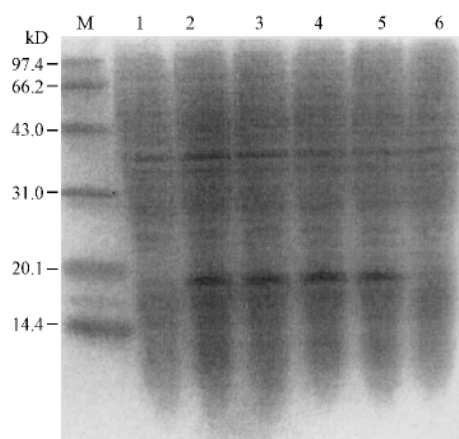


图3 IPTG 诱导持续时间对蛋白表达的影响

Fig. 3 Fusion protein expression induced by IPTG in different hours

M. 标准分子量蛋白 Marker; 1~5. pET-ube 由 1.0 mmol/L IPTG 分别诱导 1, 2, 3, 4, 5 h pET-ube induced by 1.0 mmol/L IPTG in 1, 2, 3, 4, 5 hours respectively; 6. 对照质粒 pET-28a pET-28a induced by 1.0 mmol/L IPTG in 4 hours.

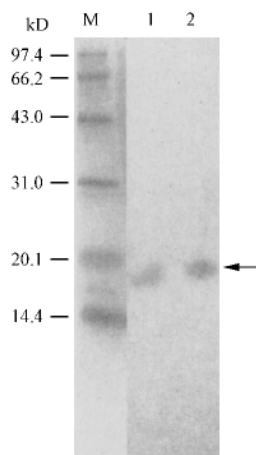


图4 Western blot 检测目的蛋白

Fig. 4 Detecting the target protein using mouse monoclonal antibody

M. 标准分子量蛋白 Marker; 1~2. 克隆泛素延伸基因的表达 Expression of two pET-ube clone.

类似的种间协同进化关系。对杆状病毒与其宿主昆虫的泛素进行氨基酸序列同源性比较,发现 SeNPV 与其宿主甜菜夜蛾泛素的同源性为 78.8%, BmNPV 与其宿主家蚕泛素的同源性为 74.0%。对杆状病毒之间的泛素进行氨基酸序列同源性分析,结果显示,病毒之间的泛素的氨基酸序列同源性在 62% ~ 84% 之间(牛国栋等, 2003)。泛素蛋白在昆虫中的同源性比杆状病毒间的同源性具有更高保守性,这

种同源性差异反映出病毒泛素基因和宿主泛素基因在分子进化过程中存在较大差异。我们推断杆状病毒及其宿主中的泛素基因之间并没有很近的亲缘关系,杆状病毒泛素基因进化可能经历了一条与宿主昆虫泛素基因不同的分子进化途径。

我们首次报道了甜菜夜蛾泛素延伸基因(ubi-53)的 cDNA 序列,并对其进行了克隆、原核表达和 Western blot 检测。我们根据草地夜蛾的泛素延伸基因序列直接设计引物,采用了 3' RACE-PCR 技术,从鳞翅目昆虫血淋巴和脂肪体组织的总 RNA 中成功地扩增到 ubi-53 基因及其 3' UTR 的 cDNA。采用自己设计的接头引物和通用接头引物,可以满足反转录扩增 mRNA 和扩增目的基因的要求。这一方法的建立为今后直接从鳞翅目昆虫组织中分离重要基因并进行其功能的研究提供了一条可行的途径。在我们的实验中,扩增产物的量比较少,而且二次扩增的非特异性带较多,这一问题可以通过加长特异性引物的长度和设计简并性引物解决。

本研究以不同来源泛素基因编码氨基酸序列同源性为依据,分析了甜菜夜蛾泛素延伸基因与其他真核生物泛素基因的进化关系,分析了杆状病毒与其宿主昆虫泛素基因的进化关系。我们认为,杆状病毒泛素虽然与宿主泛素具有很高的同源性,但它们可能经历了不同的分子进化途径,因而出现较大差异,杆状病毒泛素可能具有独特的生物学功能。这不仅为今后进行昆虫泛素基因功能研究奠定了基础,而且在以宿主昆虫泛素基因为对照,对杆状病毒泛素特异功能的研究中也具有意义。

参考文献 (References)

- Ciechanover A, 1994. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell*, 79: 13 - 21.
- Haas AL, Katzung DJ, Reback PM, Guarino LA, 1996. Functional characterization of the ubiquitin variant encoded by the baculovirus *Autographa californica*. *Biochemistry*, 35(17): 5 385 - 5 394.
- Hector LC, Rosa B, Carmen A, 1992. Structure and expression of the *Drosophila* ubiquitin-52-amino-acid fusion-protein gene. *Biochemistry*, 286: 281 - 288.
- Mitsuru N, Sachiko I, Kazuei M, 2000. Interspecific comparison in the frequency of conserved evolution at the polyubiquitin gene locus. *J. Mol. Evol.*, 51: 161 - 165.
- Niu GD, Zhang XX, Zhang ZX, 2003. Cloning and prokaryotic expression of ubiquitin gene of *Spodoptera exigua* multi-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. *Virologica Sinica*, 18(1): 44 - 48. [牛国栋, 张小霞, 张忠信, 2003. SeMNPV 泛素基因的克隆和原核表达. 中国病毒学, 18(1): 44 - 48]

(责任编辑: 黄玲巧)