



张姝, 胡蓉, 黄健, 等. 家蝇 β -葡萄糖苷酶基因的克隆及重组表达 [J]. 环境昆虫学报, 2017, 39 (4): 930–939.

家蝇 β -葡萄糖苷酶基因的克隆及重组表达

张姝¹, 胡蓉², 黄健^{1*}, 吴建伟^{2*}, 国果², 付萍², 修江帆², 尚小丽²

(1. 贵州医科大学临床基础检验学教研室, 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学人体寄生虫学教研室 贵阳 550004)

摘要: 克隆家蝇内源性 β -葡萄糖苷酶 (β -glucosidase, BG) 基因并建立原核表达体系, 检测其表达产物的活性, 了解家蝇内源性 BG 酶特点, 为进一步解释家蝇极强环境适应能力和发现新的种群控制措施提供分子生物学基础。以草地贪夜蛾等结构信息相对完整且研究较为透彻的 6 种代表性昆虫的 BG 酶基因序列为参照对象, 利用同源克隆结合 RACE-PCR 的方法, 从家蝇 cDNA 中克隆得到 BG 酶基因的全长 cDNA 序列并对其进行生物信息学分析。分别采用原核表达载体 pET-28a(+) 构建原核表达体系并在大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 中诱导表达 BG 酶基因的融合蛋白。采用七叶苷平板显色法和 DNS 法检测表达体系融合蛋白的酶活性, 并对其性质进行初步的分析。家蝇体内克隆得到了长度为 1933 bp 的家蝇 BG 酶基因全长 cDNA 序列, 推导其为 562 个氨基酸残基组成的蛋白多肽。重组原核质粒经诱导表达后, 在 65 kDa 附近均出现特异性蛋白条带, 证实重组质粒成功表达。重组表达的家蝇 BG 酶兼具内切 β -1,4-葡聚糖酶、外切 β -1,4-葡聚糖酶和 BG 的酶活性。家蝇 BG 酶是一种新的多功能纤维素酶, 是昆虫纤维素酶研究的重要补充。

关键词: 家蝇; β -葡萄糖苷酶; 克隆; 异源性表达; 酶活性

中图分类号: Q963; S433.89

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2017) 04-0930-10

Cloning and recombinant expression of β -glucosidase gene from *Musca domestica*

ZHANG Shu¹, HU Rong², HUANG Jian^{1*}, WU Jian-Wei^{2*}, GUO Guo², FU Ping², XIU Jiang-Fan², SANG Xiao-Li² (1. Department of Clinical Laboratory, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 2. Department of Parasitology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

Abstract: Endogenous β -glycosidase (BG) gene of *Musca domestica* was cloned to construct a prokaryotic expression system, and the activities of expression products were detected. The characteristics of endogenous BG were explored to provide molecular and biological bases for further explaining the strong adaptive capacity of *M. domestica* to the environment and taking new measures for population control. Using the BG gene sequences of 6 representative, well-studied insects such as *Spodoptera frugiperda* as references, the whole-length cDNA sequence of BG gene that was cloned from cDNA of *M. domestica* was subjected to bioinformatics analysis by homology-based cloning in combination with RACE-PCR. Afterwards, pET-28(+) vector was used to construct a prokaryotic expression system that was transformed into *E. coli* BL21/DE to induce expressions of recombinant proteins. The BG activities of different recombinant proteins were detected by the aesculin plate method and DNS method, and their characteristics were preliminarily analyzed. Whole-length cDNA sequence (1933 bp) of BG gene was cloned from

基金项目: 贵州省教育厅培育项目 [(2009) 0137]; 国家科技支撑计划课题 (2011BAC06B12); 国家自然科学基金 (30960343); 国家教育部博士点专项基金 [(2008) 220]

作者简介: 张姝, 女, 1980 年生, 博士, 副教授, 研究方向为昆虫免疫学, E-mail: 418611579@qq.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: 31712463@qq.com

收稿日期 Received: 2017-05-22; **接受日期** Accepted: 2017-07-14

M. domestica, and deduced to be a polypeptide comprising 562 amino acid residues. After induced expression of recombinant prokaryotic plasmid, a specific band appeared at about 65 kDa, verifying that the recombinant plasmid was successfully expressed. The recombinant BG of *M. domestica* simultaneously had the activities of endo- β -1,4 glucanase (EC 3.2.1.4), exo- β -1,4-glucanase (EC 3.3.1.91) and BG (EC 3.2.1.21). BG from *M. domestica* is a novel multifunctional cellulase, as an important supplement for studies on inst cellulases.

Key words: *Musca domestica*; β -glucosidase; clone; heterogenous express; enzymatic activity.

家蝇 *Musca domestica*, 蝇科、家蝇属, 属于双翅目, 繁殖力极强, 是生态环境中的分解者 (Shah *et al.*, 2016; Sackton *et al.*, 2017)。观察家蝇在不同生理状态下对食物中纤维素利用情况的研究中, 课题组发现饲养家蝇后的饲料比饲养前的质地松软, 饲养后的饲料中粗纤维含量较饲养前显著降低, 且发现家蝇能够产生内源性纤维素酶 (张姝等, 2013; 胡蓉等, 2016)。但家蝇的纤维素酶的分子结构不清楚, 国内外其他研究团队也未有报道。因此, 对家蝇内源性纤维素酶的分子结构进行研究, 不但为深入阐明家蝇在复杂孳生环境中的生理基础和生态功能提供基础数据, 而且有望通过对家蝇纤维素酶基因进行改造分子、沉默或阻断家蝇内源性纤维素酶基因从而达到抑制或干扰家蝇纤维素酶活性, 为家蝇生态控制提供一条新的途径。 β -葡萄糖苷酶 (β -Glucosidase) 是纤维素酶重要组成部分, 能催化水解芳香基或羟基与糖基原子团之间的糖苷键生成葡萄糖, 可以消除纤维二糖对纤维素酶的负反馈作用, 在农业副产品的降解、利用过程中发挥着关键作用 (张文庆等, 2008; James *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2016; Seddigh *et al.*, 2016)。综上所述, 本研究以家蝇为供试昆虫, 选择纤维素酶体系中限速酶-BG 酶为研究标示分子, 根据与其亲缘关系相近物种的 BG 酶氨基酸序列的保守片段设计简并引物, 对家蝇内源性 BG 酶进行基因克隆、生物信息学分析、进行原核重组表达及其表达产物的活性检测, 了解家蝇纤维素酶系的独特性, 为发现新的、有效纤维素酶体系提供基础数据, 并为进一步解释家蝇的极强环境适应能力以及新的种群控制措施提供分子生物学基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试昆虫

家蝇由贵州医科大学人体寄生虫教研室保存。

养蝇房恒温 25℃, 光周期 12 L: 12 D, 成虫以水、奶粉和白糖喂食, 幼虫以麦麸和水为食料。

1.1.2 主要试剂

质粒 pMD19-T Vector、PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit、Ex Taq 酶、MiNiBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver. 3.0 回收试剂盒、dNTP Mixture、TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver. 3.0、Primer START™ HS DNA Polymerase (TaKaRa); 大肠杆菌表达载体 pET-28a (+)、T4DNA ligase、EcoRI 和 XhoI 限制性内切酶 (NEB); 水杨苷、羧甲基纤维素钠、微晶纤维素 (Sigma); 定性滤纸 (杭州特种纸业有限公司); 3,5-二硝基水杨酸 (DNSA, Genview)。

1.1.3 主要仪器

PCR 扩增仪 (德国 Eppendorf 公司); 稳压稳流电泳仪 (美国 GE 公司); 紫外分光光度计 (美国 GE 公司); Millipore 0.22 μ m/0.45 μ m 滤器 (美国); Milli-Q 超纯水仪 (法国 Millipore Pharmacia 公司); CT15RE 高速冷冻离心机 (HITACHI 公司); μ -Quant 酶标分光光度计 (美国 Bio-Tek 公司); 超声波破碎仪 (中国新芝公司)。

1.2 方法

1.2.1 简并引物设计及筛选

从 NCBI 数据库搜索昆虫 BG 酶基因核苷酸序列, 确定 6 个具有代表性的 BG 酶基因, 分别是草地贪夜蛾 (AF052729.1), 马德拉蜚蠊 (AAL40863), 大黄粉虫 (AF312017.1), 台湾乳白蚁 (JN565079.1), 黑翅大白蚁 (GU591172.1), 大斑蝶 (AGBW01002988.1)。登陆 BLOCK Maker 网站, 对上述 6 个序列进行比对, 寻找到高度保守的连续核苷酸序列区。从 BLOCK Maker Results 网页直接登陆 COPEHOP 数据库进行引物设计。参数为: Maximum core degeneracy: 64; Targetclamp temperature: 60℃; Genetic code: standard; Codon usage table: Platicthys flesus。用 Primer Premier 5.0、DNAMAN、

Oligo 6.0 软件进行引物优化。

1.2.2 总 RNA 提取及第一链 cDNA 的合成

取 5 μg 采用 Trizol 法提取的家蝇 3 龄幼虫的总 RNA, 按照 Invitrogen 的 SuperScriptTM III Reverse Transcriptase 试剂盒说明进行逆转录, 合成 cDNA。反应产物于 4℃ 保存备用。

1.2.3 RT-PCR 扩增家蝇 BG 酶基因保守区域

以反转录的 cDNA 为模板, 使用 TaKaRa 公司的 Prime STAR HS DNA Polymerase 和简并引物组合对进行 PCR 扩增, 同时以不加模版作为阴性对照。反应体系为 25 μL 。反应条件: 98℃ 10 sec, 65 – 55℃ 15 sec, 72℃ 30 sec, 30 个循环。RT-PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 进行琼脂糖凝胶回收试剂盒回收纯化后。进行蓝白斑筛选, 挑取阳性克隆送上海生工测序。

1.2.4 家蝇 BG 酶基因 5'RACE 扩增

根据家蝇 β -葡萄糖苷酶 cDNA 的保守区域采用 Primer 5.0 软件设计用于 5'末端扩增的基因特异性引物 GSP1、GSP2 和 GSP3。按照 5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 试剂盒说明书进行家蝇 BG 酶基因的 5'RACE 扩增。用 GSP1 合成第一链 cDNA, 使用引物 GSP2 和试剂盒所带的桥连铆钉引物 AAP 对已经加尾的家蝇 cDNA 进行 PCR 第一轮扩增。将第一次的 PCR 产物用特异引物 GSP3 和试剂盒里面带的桥连通用扩增引物 AUAP 进行巢式 PCR 第二轮扩增。PCR 反应条件均为: 95℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 30 s, 57℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 2 min, 进行 34 个循环; 最后 72℃ 再延伸 10 min, 4℃ 进行保存。获得的片段采用与方法 1.2.4 相同的步骤进行回收、连接、转化和验证。

1.2.5 家蝇 BG 酶基因的 3'RACE 扩增

根据 Clontech 的 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒说明书构建了家蝇 BG 酶基因的 3'RACE 片段。第一轮 PCR 采用 3'GSP1 和 UPM 引物, 第二轮巢氏 PCR 采用 3'GSP2 和 NUP 引物进行扩增, 作为模板第一轮 PCR 产物稀释 50 倍; RACE-PCR 扩增的程序均为: 预变性 94℃, 5 min; 然后 30 个循环 94℃, 30 s, 50℃, 30 s, 72℃, 1 min。获得的片段采用与方法 1.2.4 相同的步骤进行回收、连接、转化和验证。

1.2.6 家蝇 BG 酶基因全长 cDNA 的获得

应用 contig Express 和 DNAMAN 软件将获得保守区域、3'端和 5'端进行序列拼接, 最终获得全长

cDNA。利用 NCBI 的在线工具 ORF Finder 查找其开放阅读框 (ORF)。采用 Premier 5.0 软件对拼接的序列进行引物设计, 通过 PCR 扩增进行家蝇 cDNA 的基因验证。扩增产物检测、克隆及测序方法同 1.2.3。

1.2.7 基因核酸序列及其所编码氨基酸序列的生物信息学分析

测序得到的序列运用 NCBI 的 BLAST 程序 (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) 进行分析。用 Premier 5.0 软件进行家蝇 BG 酶基因全长氨基酸序列推导。采用 DNAMAN 预测其分子量和等电点等基本性质。利用生物信息学网站 ExPASy (Expert Protein Analysis System <http://www.expasy.org/>) 中的 TMpred 对 MAF-1 进行跨膜区分析, 用 SignalP 4.0 Server 进行信号肽分析, 用 PSORT II server 进行亚细胞定位分析, 用 SMART 进行功能域的预测, 用 SOPMA 进行二级结构的预测分析。利用 PredictProtein 分析家蝇 BG 酶基因的功能位点。最后, 利用 ExPASy 中的 3D-pssm (Phyre Version 0.2) 模建家蝇 BG 酶基因的三维空间结构图。

1.2.8 原核表达体系与鉴定

1.2.8.1 家蝇 BG 酶基因成熟肽引物的设计与合成

根据家蝇 BG 酶肽序列和大肠杆菌的表达载体 pET-28a(+) 多克隆位点, 用 Primer 5.0 软件进行引物设计。上游引物 MDbg-F, 含有 *EcoRI* 酶切位点及保护碱基; 下游引物 MDbg-R, 含有 *XhoI* 酶切位点及保护性碱基, 引物均委托上海生工技术有限公司合成。用 *EcoRI* 和 *XhoI* 酶对 pET-28a(+) 载体及含目的 DNA 片段的 PCR 产物进行双酶切, 用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收酶切产物。将上述回收的 pET-28a(+) 线性载体质粒与从 pMD19-T 切下来的重组质粒用 T4-DNA 连接酶进行连接, 转化 BL21 感受态细胞。挑取阳性克隆进行菌落 PCR 鉴定后, 提取质粒进行酶切鉴定, 并送质粒至 TaKaRa 公司测序。

1.2.8.2 的 pET-28a(+) -bg-1 连接产物转化宿主菌感受态细胞

分别取两种重组质粒 10 μL 加入到 100 μL 的 *E. Coli* BL21 感受态细胞, 转化产物涂于含 25 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 LB 平板上, 37℃ 培养 12 – 14 h。挑取阳性克隆后摇菌培养 12 h 后, 用引物 MDbg-F 和 MDbg-R 进行 PCR 扩增, 将 PCR 产物送到上海生物技术有限公司进行测序。将鉴定正确

的质粒命名为 $pET-28a(+)-bg-1-BL21/DE$ 。

1.2.8.3 重组蛋白的诱导表达

取的 $pET-28a(+)-bg-1-BL21$ 于卡那霉素抗性平板上划单克隆, 37℃ 培养过夜。挑单克隆菌落接种于 5 mL 含有 50 $\mu g/mL$ 卡那霉素 LB 液体培养基中, 37℃、250 rpm 恒温振荡培养过夜, 将空表达载体转入宿主菌中, 做为阴性对照, 同时做空宿主菌的空白对照。加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L 进行诱导表达。将重组菌单克隆按上述方法接种扩大培养, 按照 HisTag 融合蛋白纯化操作手册进行纯化, 浓缩蛋白通过 SDS-PAGE 鉴定并使用分光光度计测定浓度, 分装后 -80℃ 保存备用。

1.2.9 重组家蝇 BG 酶的活性鉴定

采用七叶苷平板显色法: I 液: 称取 4 g 琼脂置于 100 mL, pH 值 5.6, 0.2 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲溶液中, 高温灭菌 20 min, 冷却至 55℃。II 液: 新鲜配制含质量浓度 0.2 g 七叶灵和 0.6 g $FeCl_3$ 。用 ddH_2O 定容至 100 mL 后, 水浴加热到 50℃。将以上 2 种溶液混合并立即倒入培养皿中, 制备平板。冷却, 打孔 (孔径为 0.3-0.6 cm, 相互间的两孔距离要适宜), 分别将稀释相应浓度的 100 μL 重组蛋白加入到小孔中。封好培养皿, 置于 37℃ 培养箱中保温 48 h 后, 观察显色反应。

1.2.10 重组家蝇 BG 酶融合蛋白底物特异性

采用 DNSA 法测定, 在离心管中分别加入 1% 水杨苷、2% 乳糖、30 Mm 纤维二糖、1% 蔗糖、1% 麦芽糖、1% 羧甲基纤维素钠、1% 微晶纤维素 90 μL 后加入 30 μL 重组蛋白, 混匀后在 50℃ 水浴条件下反应 60 min, 立即加入 0.3 mL DNSA 显色剂终止反应, 在沸水浴显色 5 min, 冷却至室温后, 用 0.1 M 醋酸-醋酸钠缓冲液定容至 5 mL。设阴性对照 (以缓冲液代替酶液)。于紫外分光光度计测 OD_{540} 值, 每一个样品 3 个生物重复, 每组做 3 个重复。计算方法与按照文献进行计算 (张姝等, 2013)。

2 结果与分析

2.1 简并引物设计和保守区域的扩增

将筛选出的 32 对简并引物进行 PCR 扩增和 1% 琼脂糖凝胶电泳, 其中有 1 对引物 (表 1) 的扩增产物特异性最好。电泳结果显示其片段大小约为 402 bp, 与预计相符, 无非特异性条带出现

(图 1)。将该片段进行双向测序, 测序结果进行 BLAST 比对, 显示该序列属于糖苷水解酶第一家族, 与草地贪夜蛾、大白斑蝶、黑翅大白蚁、台湾乳白蚁、黄粉虫、马德拉蜚蠊 β -葡萄糖苷酶氨基酸序列的同源性较高, 达到 70% 以上。因此认定在家蝇体内成功克隆了 BG 酶基因的保守区域。

表 1 筛选出上下游引物
Table 1 The sense and anti-sense primer screened

引物名称 Primers	引物序列 (5'-3') Primer sequence	简并度 Degeneracy
β -glu-F	GACAARGGVGARTcvatytggga	32
β -glu-R	GGYTCRTTRACvgtsgtcca	64

注: 引物由 5'端非简并夹板区 (大写字母) 和 3'端核心简并区 (小写字母) 组成。其中 $R = A/G$, $Y = C/T$, $S = C/G$, $V = A/C/G$ 。Note: The primer is constituted by 5' non-degenerate consensus clamp (capital letters) and 3' degenerate core (lowercase letter), $R = A/G$, $Y = C/T$, $S = C/G$, $V = A/C/G$ 。

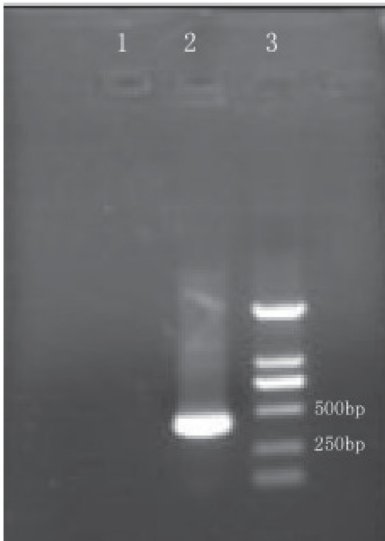


图 1 家蝇 BG 酶基因保守区域 PCR 的琼脂糖凝胶电泳
Fig. 1 The conserved domain of *Musca domestica* BG gene
注: 1, 阴性对照; 2, 家蝇 BG 酶基因保守区域 PCR 产物; 3, DL2000 DNA 分子标准。Note: 1, negative control.; 2, the conserved domain of *M. domestica* BG gene; 3, DL2000 DNA Marker.

2.2 家蝇 BG 酶的 3'RACE

家蝇 3 龄幼虫采用 Clontech SMART RACE cDNA Kit 经过 2 次 PCR 反应后, 扩增引物见 (表 2), 反应产物经电泳检测在 1000 bp 和

2000 bp 之间可见一条明显的特异性条带 (图 2), 经测序鉴定为 1475 bp 核苷酸序列。用 DNAMAN 和 NCBI 中 Blast 软件将 3'RACE 所得序列与家蝇保守区域序列进行拼接和比对, 有连续的 117 bp 核苷

酸序列与保守区域的序列重合。因此认为通过上述实验方法在家蝇幼虫体内成功获得了家蝇 β -葡萄糖苷酶基因的 3'末端片段。

表 2 家蝇 β -葡萄糖苷酶 cDNA 扩增过程中所用引物

Table 2 The primers used for amplification β -glycosidase gene cDNA in *Musca domestica*

引物名称 Primers	引物序列 (5'-3') Primer sequence
5'CSP1	GGCTATATGAATCAGGTCAGTACGGCAG
5'CSP2	CCACAGAGATTGCAGGAACTGGGCGGT
5'UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGC
5'NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
3'GSP1	GGCCAGGATATCGAGA
3'GSP2	TCGCGCACCATTGTAACATCG
3'GSP3	CACCATTCGAACGATCGGCAA
3'AAP	CTAATACGACTCACTATAGGGC
3'AUAP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
MDG-F	CATGTCGTTAATAAAATTCATACG
MDG-R	TTACTTCAAATATTTGGCTAAAGC
MDbg-F	GGAATTGCAATCTGCC CCCGCCCT GAGGT
MDbg-R	CCTCGAGTTACTTCAAATATTTGG

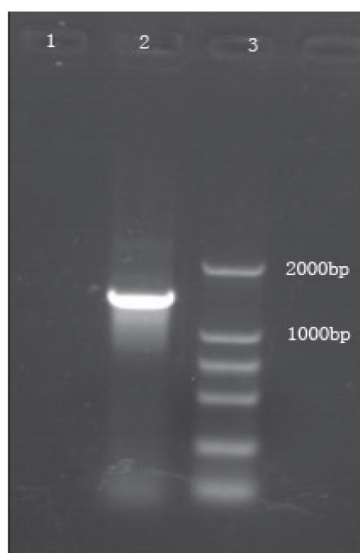


图 2 家蝇 BG 酶 3'RACE 产物电泳图

Fig. 2 The conserved domain of *Musca domestica* BG gene 3'RACE
注: 1, 第一次 PCR 产物; 2, 第二次 PCR 产物; 3, DL2000 DNA 分子标准。Note: 1, 3'RACE product of the first PCR; 2, 3' RACE product of the second PCR; 3, Marker DL2000.

2.3 家蝇 BG 酶基因的 5'RACE

进行两轮扩增, 扩增引物见 (表 2), 在 315 bp 处获得一特异性条带 (图 3)。经测序鉴定为 315 bp 核苷酸序列。运用 NCBI 对该 cDNA 序列进行 Blast 分析, 测序结果显示的该序列具有起始密码子为完整的 5'端序列。用 DNAMAN 和 NCBI 中 Blast 软件将 5'RACE 所得序列与家蝇 BG 保守区域的序列进行拼接和比对, 有 73 个核苷酸与保守区域序列完全吻合。因此认为成功获得了家蝇 BG 酶基因的 5'末端片段。

2.4 家蝇 BG 酶基因的全长 cDNA

用软件将家蝇 BG 酶基因保守区域、5'端和 3'端序列进行序列拼接, 去除重复区域, 获得全长 cDNA 序列为 1933bp。该基因在 5'非翻译区中有 34 个核苷酸, 紧接着为 1689 个核苷酸的开放性阅读框 (ORF), 其中起始密码子 ATG 位于 35 - 37 bp, 终止密码子 TAA 位于 1721 - 1723 bp, 随后为 210 个核苷酸的 3'非翻译区, 最后为 21 个核苷酸的 polyA 尾巴。ORF 编码 562 个氨基酸。以家蝇 3 龄幼虫总 RNA 为模板扩增家蝇 BG 酶基因完

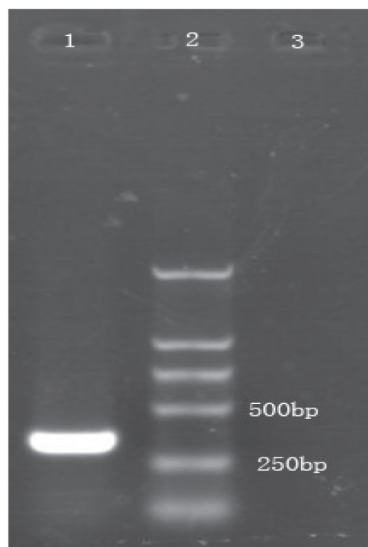


图3 家蝇 BG 酶 5'RACE 产物电泳图

Fig. 3 Electrophoresis pattern of 5'RACE product

注: 1, 第二次 PCR 产物; 2, MakerDL-2000 分子标准; 3, 第一次 PCR 产物。Note: 1, 5'RACE product of the first PCR; 2, Maker DL2000; 3, 5' RACE product of the sond PCR.

整 cDNA, 扩增引物见 (表 2), 扩增产物经电泳检测, 在 2000 bp 附近有特异条带出现 (图 4), 测序得到 1689 bp 的核苷酸序列, 与软件分析全长 cDNA 序列一致, 与其它昆虫 BG 酶同源性很高。证实成功获得了家蝇 BG 酶基因。将其登录到 GenBank, 获得登录号: JX460804。

2.5 家蝇 BG 酶基因核酸序列及其所编码氨基酸序列的生物信息学分析

2.5.1 家蝇 BG 酶蛋白的基本性质分析

运用 ExPASy 中 ProtParam 进行蛋白质性质分析显示, 家蝇 BG 酶成熟肽的理论分子量为 65020.6 Da, 等电点为 8.16, 原子总数为 9038, 分子式为 $C_{2941}H_{4441}N_{801}O_{835}S_{20}$, 在组成的家蝇 BG 酶的氨基酸中, 丝氨酸 Ser 所占比例最高, 达到 8.0%, 其次是亮氨酸 Leu (7.5%)、甘氨酸 Gly (6.9%)、精氨酸 Arg (6.4%)、天冬酰胺 Asn (5.9%)、缬氨酸 val (5.7%), 半胱氨酸 Cys 所占比例最低, 为 0.5%, 带正电荷为 59, 负电荷为 61, 消光系数为 142795, 蛋白质性质稳定, 半衰期大于 20h。脂肪族指数: 76.83, 为亲水性蛋白。运用 BioEdit 作蛋白质的疏水区域分析显示, 在 N 端位置有一个典型的疏水性区域, 大约在 540 -

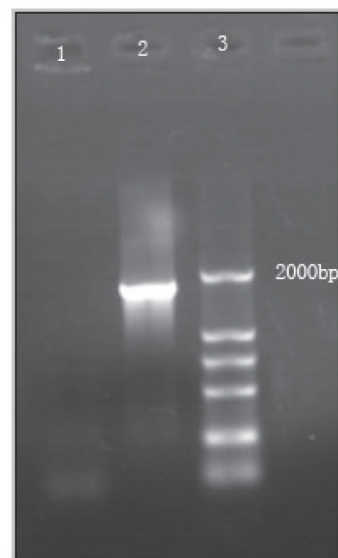


图4 家蝇 BG 酶全长 cDNA 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of product from BG gene

注: 1, 阴性对照; 2, 家蝇 bg-1 基因; 3, DL2000 分子标准。Note: 1, negative control. 2, *Musca domestica* bg-1 gene; 3, DL2000 DNA Marker.

560 位氨基酸之间。运用 ExPASy 中的 TMpred 对家蝇 BG 酶氨基酸序列进行跨膜区分析, 结果表明, 该蛋白可能有两个跨膜区域, 在该蛋白的第 1 至 27 个氨基酸内, 出现较弱的跨膜信号, 方向由膜内向膜外, 在第 541 至 561 位氨基酸出现较强的跨膜信号, 方向由膜外向膜内。用 singIP 4.0 分析可见, 家蝇 BG 酶蛋白具有信号肽, 且剪切位点可能位于第 28 与第 29 位氨基酸之间。与跨膜区域分析的结果相吻合。用 TargetP 进行亚细胞定位分析可见, 目的蛋白是在胞内合成后分泌到胞外 (图 5 - 图 6)。

2.5.2 家蝇 BG 酶的二级结构分析

采用 ExPASy 的 Smart 数据库对家蝇 BG 酶基因成熟肽的结构域进行分析, 其功能结构域可能是第 32 位氨基酸和第 501 位氨基酸之间的序列。利用 Prosite 预测蛋白氨基酸结构功能位点, 发现其在位点 329 - 337 (VYVTENGVS) 处含有糖基水解酶家族 1 (GHF4) 的功能位点。通过 YinOYangV1.2 分析其可能的 O-糖基化位点分别为: Thr 26, Ser 126, Ser 266, Thr 300, Thr 348, Thr 378, Thr 411, Thr 484, Thr 525, Thr 526, Ser 527, 没有发现 N-糖基化修饰 (图 7 - 图 8)。

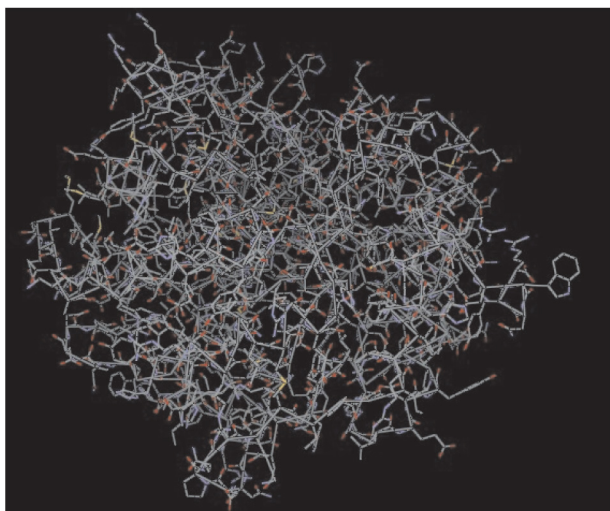


图 8 家蝇 BG 酶三级结构

Fig. 8 The tertiary structure prediction for *Musca domestica* BG



图 9 重组质粒 pET-28a(+)-bg-l 双酶切鉴定

Fig. 9 Restriction enzyme digestion identification of pET-28a(+)-bg-l

注: 1, 重组表达质粒 pET-28a(+)-bg-l 双酶切鉴定结果; 2, 阴性对照; 3, Marker III DNA 分子标准。Note: 1, The enzyme digestion product of pET-28a(+)-bg-l by *EcoR* I and *Xho* I; 2, negative control; 3, Marker III DNA Marker.

与目的条带 (BG 酶基因成熟肽分子量与 His 标签分子量之和) 的大小相符, 表明家蝇 BG 酶基因在大肠杆菌中稳定的表达。且重组质粒转化菌经裂解后的上清中有可溶性的重组 BG 酶融合蛋白, 包涵体中也有大量重组 BG 酶融合蛋白的表达 (图 10)。

2.8 重组家蝇 BG 酶的活性鉴定和底物特异性

将重组家蝇 BG 酶加入醋酸-醋酸钠缓冲液进行稀释, 并各取 100 μ L 分别加入七叶苷固体平板培养基的小孔中, 至 37 $^{\circ}$ C 培养箱 24 h 后, 出现黑

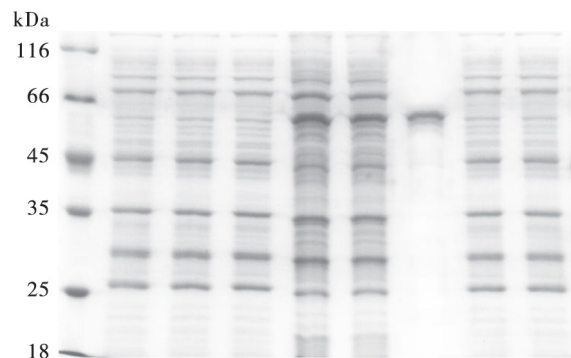


图 10 重组 BG 酶融合蛋白的 SDS-PAGE 结果

Fig. 10 SDS-PAGE analysis of the BG fusion protein

注: 1, 蛋白分子量标准; 2, pET28a(+)-bg-l 未诱导; 3, pET28a(+)-bg-l 诱导; 4, 重组蛋白未诱导; 5, 大量诱导表达后菌液沉淀; 6, 大量诱导表达后菌液上清; 7, 纯化的 MDBG-1 蛋白; 8, 未经诱导的 BL21 全菌液; 9, 经诱导表达后的 BL21 全菌液。Note: 1, Protein Marker; 2, pET-28a(+)-bg-l transformants without IPTG induction; 3, pET-28a(+)-bg-l transformants with IPTG induction; 4, Supernatant of pET-28a(+)-bg-l without IPTG induction; 5, Supernatant of pET-28a(+)-bg-l induced by IPTG; 6, Precipitation of pET-28a(+)-bg-l induced by IPTG; 7, Purified fusion protein of pET-28a(+)-bg-l; 8, pET-28a(+)-bg-l transformants without IPTG induction; 9, pET-28a(+)-bg-l transformants with IPTG induction.

色的透明圈。由此可见, 其是具有 β -葡萄糖苷酶活性的重组蛋白。通过 DNS 显色法检测到两种原核表达体系表达的融合蛋白均具有 BG 酶、外切- β -1, 4-葡聚糖酶、内切- β -1, 4-葡聚糖酶三种酶活性 (表 3)。

表 3 原核表达体系对不同底物的酶活性

Table 3 The activities of renatured protein to different substrates

底物 Substrate	BG 酶蛋白比活力 (IU/mg) BG protein activity
蔗糖 Sucrose	2.588 $\pm$ 0.018
乳糖 Lactose	4.010 $\pm$ 0.225
水杨苷 Salicin	10.198 $\pm$ 0.414
麦芽糖 Maltose	0.405 $\pm$ 0.024
纤维二糖 Cellobiose	0.298 $\pm$ 0.023
微晶纤维素 Avicel	2.577 $\pm$ 0.258
羧甲基纤维素钠 Carboxymethylcellulose sodium	1.763 $\pm$ 0.150

3 结论与讨论

家蝇, 家蝇科、家蝇属, 属于双翅目, 其分布广泛, 杂食性, 极强的环境适应性, 其与环境木质纤维素接触密切, 可以通过内源性纤维素酶 (胡蓉等, 2013) 消化纤维素作为食物来源, 为自身提供能量。在陆生植物纤维素的生态循环和生物转化中做出贡献的同时也成为了传播疾病的主要媒介昆虫。因此对家蝇内源性纤维素酶的分子结构进行研究, 不但可以深入阐明家蝇适应复杂孳生环境的生理基础和生态功能, 而且有望通过对家蝇纤维素酶基因进行分子改造或沉默从而使家蝇纤维素酶活性受抑或丧失, 为家蝇生态控制提供新的途径 (张姝等, 2013)。

BG 酶作为纤维素酶系的限速酶, 在昆虫消化纤维素的过程中发挥着关键作用。研究表明几乎所有的昆虫体内都具有 BG 酶, 仅是由于生存环境的改变, BG 酶基因就可能被抑制或沉默 (Hirofumi Watanabe and Gaku Tokuda, 2010; Sharma *et al.*, 2016), 同时对目前已知的昆虫 BG 酶基因序列进行同源性分析, 发现其在昆虫的种属间存在很高的同源性, 较为保守 (Shelomi *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2016)。根据这一特点, 人们进一步发现和证实其它昆虫也具有 BG 酶基因, 因此本课题以它作为研究家蝇纤维素酶的突破口并展开研究。

早期对 BG 酶的克隆是通过构建 cDNA 文库进行活性筛选的方式获得的。随着 PCR 技术的应用, 利用种属保守区域进行扩增, 成功克隆了许多 BG 酶基因 (Jun *et al.*, 2016; 朱世馨等, 2016)。本研究采用程序化设计简并引物的方法, 先将数据库 (NCBI) 上找到的若干与家蝇亲缘关系较近的昆虫 BG 酶氨基酸序列进行 BlockMaker, 得到其连续氨基酸序列保守区后再用 CODEHOP 设计多条简并引物, 通过夹板区温度进行筛选, 再使用生物软件 DNAMAN 对上、下游引物的匹配情况进行二次筛选, 之后再利用 Oligo 6.0 对引物进行发夹结构、二聚体、退火温度第三次筛选和分析获得最合适的引物对。此法所设计的简并引物简并度相对较低, T_m 值较高, 获得 PCR 产物特异性增加, 假阳性率低, 本实验扩增出来的产物进行电泳, 未出现非特异的条带。为下一步的实验成功奠定

扎实的基础。再结合 RACE-PCR 的方法, 成功克隆了家蝇的 BG 酶基因序列, 有助于在分子水平上对家蝇 BG 酶的结构和作用机制进行分析, 同时为后续重组表达家蝇 BG 酶提供了可能, 也为今后的定向进化等技术手段提高酶的活性或者改进酶的催化性质奠定基础。

大肠杆菌 *Escherichia coli* 表达系统是第一个用于重组蛋白的表达系统, 同时也是应用最为广泛的经典表达系统。它通过全基因组测序, 具有遗传背景清楚、培养操作简单、遗传稳定, 生长周期短, 成本低, 可以快速大规模地生产目的蛋白等优点, 因而被美国 FDA 批准为安全的基因工程受体菌。本研究对已克隆家蝇 BG 基因进行大肠杆菌异源表达, 构建原核表达系统, 成功构建了家蝇 BG 酶的高效、稳定的原核表达载体, 通过 IPTG 诱导, 得到了相对分子质量为 65 kDa 的重组 BG 酶。对了解家蝇 BG 基因结构的完整性, 生物学信息推导结果的正确性进行验证, 有益于对家蝇 BG 基因在适宜的宿主中进行表达以及基因改造等提供技术储备。

BG 酶根据底物特异性分为三类: 第一类 BG 酶专一性地水解芳香基糖苷, 如对-硝基- β -D-葡萄糖苷等类似物。第二类 β -葡萄糖苷酶专一性地水解纤维二糖, 也叫纤维二糖酶。第三类 β -葡萄糖苷酶能够水解多种糖苷类衍生物以及纤维二糖、纤维寡糖等, 称为广底物型 β -葡萄糖苷酶 (Margolles *et al.*, 1997; Vrie *et al.*, 1999; Stricker *et al.*, 2008)。第三类 β -葡萄糖苷酶能裂解 C-O 糖苷键, C-S 键, C-F 键等, 对底物的糖基部分结构专一性较低, 但对所有底物中, BG 酶对纤维二糖的活性是最强。家蝇 BG 酶融合蛋白的酶底物特异性实验显示其能够水解纤维二糖、乳糖、蔗糖等, 证实其是一种广底物型 BG 酶, 广泛的底物范围以及特殊的底物水解能力使其具有非常好的工业应用前景。在研究中, 发现家蝇 BG 酶蛋白除了具有 BG 酶活性以外, 还具有水解羧甲基纤维素钠和微晶纤维的能力。这说明家蝇 BG 酶随着对栖息环境和取食特性的适应, 进化成了一个多功能的纤维素酶, 在没有其他两种纤维素酶参与下完成纤维素降解或进一步增强家蝇纤维素酶体系对纤维素水解能力。

参考文献 (Reference)

Anish R, Raham MS, Rao M. Application of cellulases from an

- alkalothermophilic *Thermomonospora* sp. in biopolishing of denims [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2007, 96 (1): 48–56.
- Hu R, Zhang S, Wu JW, et al. Histological research on the third instar larva of *Musca domestica* with paraffin stion [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2013, 35 (6): 832–837. [胡蓉, 张姝, 吴建伟, 等. 家蝇 3 龄幼虫石蜡切片的组织学研究 [J]. *环境昆虫学报*, 2013, 35 (6): 832–837]
- Hu R, Zhang S, Huang Y, et al. Expression of *Musca domestica* β -glucosidase in the organs besides digestive system of III instar larvae [J]. *Journal of Regional Anatomy and Operative Surgery*, 2016, 25 (7): 473–477. [胡蓉, 张姝, 黄悦, 等. 家蝇 β -葡萄糖苷酶在 III 龄幼虫消化系统以外器官的表达 [J]. *局解手术学杂志*, 2016, 25 (7): 473–477]
- James R, Ketudat C, Asim E. β -Glucosidases [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2010, 67: 3389–3405.
- Jun-Jie, M. O, Liang JX, Han Q, et al. Cloning of peroxidase gene in taro [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2016, 43 (9): 37–43. [莫俊杰, 梁钾贤, 胡汉桥, 等. 芋头过氧化物酶基因克隆 [J]. *广东农业科学*, 2016, 43 (9): 37–43]
- Margolles CE, Ihnen M, Penttila M. Expression patterns of ten hemicellulase genes of the filamentous fungus *Trichoderma reesei*, on various carbon sources [J]. *Journal of Biotechnology*, 1997, 57 (1–3): 167–179.
- Sackton TB, Lazzaro BP, Clark AG. Rapid expansion of immune-related gene families in the house fly, *Musca domestica* [J]. *Molecular Biology & Evolution*, 2017, 34 (4): 857–872.
- Seddigh S, Darabi M, Structural and phylogenetic analysis of α -glucosidase protein in insts [J]. *Biologia*, 2016, 70 (6), 812–825.
- Shah RM, Azhar F, Shad SA, et al. Effects of different manures on attraction and reproductive behaviors of common house fly, *Musca domestica* [J]. *Parasitology Research*, 2016, 115 (9): 1–14.
- Sharma A, Tewari R, Rana SS, et al. Cellulases: Classification, methods of determination and industrial applications [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2016, 179 (8): 1–35.
- Singh G, Verma AK, Kumar V. Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of β -glucosidases [J]. *Biotech.*, 2016, 6 (1): 3.
- Shelomi M, Heckel DG, Pauchet Y. Ancestral gene duplication enabled the evolution of multifunctional cellulases in stick insects (Phasmatodea) [J]. *Inst. Biochemistry & Molecular Biology*, 2016, 71: 1–11.
- Stricker AR, Mach RL, Graaff LH. Regulation of transcription of cellulases-and hemicellulases-encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 78 (2): 211.
- Vries RP, Broeck HC, Dekkers E, et al. Differential expression of three α -galactosidase genes and a single β -galactosidase gene from *Aspergillus niger* [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1999, 65 (6): 2453.
- Watanabe H, Tokuda G. Cellulolytic systems in insects [J]. *Annual Review of Entomology*, 2010, 55 (1), 609–613.
- Zhang S, Hu R, Wu JW, et al. Changes of *Musca domestica* β -glycosidase gene expression and enzyme activity after being induced by feeding crude fibre [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2013, 35 (2): 157–164. [张姝, 胡蓉, 吴建伟等. 家蝇取食粗纤维后 β -葡萄糖苷酶活性与基因表达量的变化 [J]. *环境昆虫学报*, 2013, 35 (2): 157–164]
- Zhang S, Hu R, Wu JW, et al. Analysis on the components and enzymatic activity of cellulase in digestive organs from *Musca domestica* larvae [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2013, 35 (1): 55–60 [张姝, 胡蓉, 吴建伟, 等. 家蝇幼虫消化器官中纤维素酶的组成及酶活性分析 [J]. *环境昆虫学报*, 2013, 35 (1): 55–60]
- Zhang WQ, Wang YS, Wang J, et al. Insect resources and social & economic development [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2008, 30 (4): 357–360. [张文庆, 汪延生, 王娟等. 昆虫资源与社会经济发展 [J]. *环境昆虫学报*, 2008, 30 (4): 357–360]
- Zhou, MB, Zheng Y, Liu ZD. Into the rapid elongation of *Phyllostachys heterocycla*, var. *pubescens* [J]. *Trees*, 2016, 30 (4): 1259–1274.
- Zhu SX, Geng XY, Wang JC, et al. Cloning and bioinformatics analysis of *Apis mellifera ligustica* spin *hsp90* gene [J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Agriculture)* 2016, 34 (3): 28–34. [朱世馨, 耿昕颖, 王家祯, 等. 利用 codehop 克隆蜜蜂 *Hsp90* 基因及生物信息分析 [J]. *上海交通大学学报 (农业科学版)*, 2016, 34 (3): 28–34.