

## 家蚕溶茧酶基因的克隆、序列分析及原核表达

吴玉丹<sup>1</sup>, 王文兵<sup>3</sup>, 李兵<sup>1,2</sup>, 王东<sup>1</sup>, 沈卫德<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>苏州大学医学部基础医学与生物科学学院, 江苏苏州 215123; <sup>2</sup>现代丝绸国家工程实验室, 江苏苏州 215123;

<sup>3</sup>江苏大学生命科学研究院, 江苏镇江 212013)

**摘要:** 【目的】获得家蚕溶茧酶基因的全长序列, 实现溶茧酶基因在大肠杆菌中的融合表达。【方法】利用 cDNA 末端扩增技术 (RLM-RACE) 克隆了家蚕溶茧酶基因 cDNA 序列 (GenBank 登录号: EF428980)。【结果】家蚕溶茧酶基因 cDNA 序列全长 1 047 bp, 其中 780 bp 的蛋白质编码区可编码 260 个氨基酸, 预测蛋白质分子量为 27.6 kD, 等电点 (pI) 为 8.89。家蚕溶茧酶基因包含 4 个内含子。用 Signal P 3.0 Server 程序分析家蚕溶茧酶基因, 预测其从第 1~22 位为信号肽序列。SMART 分析结果预测其第 34~254 位氨基酸序列具有类胰蛋白的丝氨酸蛋白酶活性。重组质粒 pET-32a-Cocoonase 转化 *E. coli* BL21 进行原核表达, SDS-PAGE 分析结果表明, 家蚕溶茧酶基因以融合蛋白形式表达, 相对分子量为 48 kD。【结论】本研究成功地克隆、表达了家蚕溶茧酶基因, 分析和预测了它的结构和功能, 为其进一步的生物学功能研究及其应用奠定了基础。

**关键词:** 家蚕; 溶茧酶基因; cDNA 片段末端扩增; 序列分析; 原核表达

## Cloning and Expression of the Cocoonase Gene from *Bombyx mori*

WU Yu-dan<sup>1</sup>, WANG Wen-bing<sup>3</sup>, LI Bing<sup>1,2</sup>, WANG Dong<sup>1</sup>, SHEN Wei-de<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup> School of Basic Medicine and Biological Sciences, Medical College of Soochow University, Suzhou 215123, Jiangsu; <sup>2</sup> The State Engineering Laboratory of Modern Silk, Suzhou 215123, Jiangsu; <sup>3</sup> School of Life Science, Jiangsu University, Zhenjiang 212013)

**Abstract:** 【Objective】 This study was carried out to obtain and analyze the sequence of the Cocoonase gene from *Bombyx mori*, and to produce the fusion protein of the Cocoonase gene in *E. coli*. 【Methods】 The cDNA sequence of the Cocoonase gene from *Bombyx mori* was determined using RLM-RACE method (GenBank accession No. EF428980). 【Results】 The full-length cDNA is 1 047 bp with a 780 bp open reading frame (ORF), which encodes a protein of 260 amino acids. The protein is about 27.6 kD and its pI value is 8.89. From genomic DNA, there are four introns and five exons within the open reading frame of the Cocoonase gene. Amino acid sequence analysed by Signal P 3.0 Server showed that there is a signal peptide of 22 amino acids at the N-terminal. Prediction of protein functional domain indicated that the trypsin-like serine protease domain of the Cocoonase is from 34 to 254 amino acid. The recombinant pET-32a-Cocoonase was constructed and introduced into *E. coli* BL21 to express a Trx-His-linked protein by IPTG. The result of SDS-PAGE demonstrated that the expression products migrated at a size of 48 kD. 【Conclusion】 The Cocoonase gene from *Bombyx mori* was successfully cloned and expressed. Furthermore, the structure and function of this gene were analyzed and predicted.

**Key words:** *Bombyx mori*; Cocoonase gene; RLM-RACE; Sequence analysis; Prokaryotic expression

## 0 引言

【研究意义】家蚕和果蝇都是昆虫研究的模式生物<sup>[1]</sup>。这两种生物基因组序列的解析为功能基因的研究提供了强有力的支持<sup>[2,3]</sup>。与果蝇相比, 家蚕具有一

些独特的生理现象。家蚕是完全变态昆虫, 其世代的完成要经历卵、幼虫、蛹和成虫 4 个阶段<sup>[4]</sup>。而溶茧酶基因的表达具有独特的时空性, 即只在成虫初期的特定组织中表达。蚕蛾要想从“作茧自缚”的状态中解脱出来, 就需要该蛋白<sup>[5]</sup>的帮助, 因此, 该基因可

收稿日期: 2007-06-19; 接受日期: 2007-12-17

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (“973” 计划) 项目 (2005CB121005); 国家自然科学基金项目 (30471309)

作者简介: 吴玉丹 (1982-), 男, 河南南阳人, 硕士研究生, 研究方向为家蚕分子生物学。Tel: 0512-65880264; E-mail: bluesky05168@163.com。  
通讯作者沈卫德 (1950-), 男, 江苏启东人, 教授, 研究方向为动物资源与基因组学。Tel: 0512-65880182; E-mail: shenwd@suda.edu.cn

以作为成虫期的典型表达基因。其表达的蛋白质参与的生理过程大致如下：羽化时先由口腔吐出含溶茧酶的弱碱性液体，使蚕茧先端茧层湿润而松解，继而用胸足拨开已松解的茧丝，得以脱茧而出，这是绢丝类昆虫具有代表性的生理过程。以上是研究溶茧酶基因的生物价值，另外从经济角度考虑，中国是蚕业大国，每年大量生产蚕丝的同时也产生了大量的废丝废茧等，如果能用溶茧酶消化废丝废茧制备抗氧化肽，对减轻环境的污染，增加其附加值，促进中国蚕业的可持续性发展，有一定的积极意义。而且，作为溶茧酶天然底物的蚕丝蛋白是一种优良的高分子材料<sup>[6]</sup>，在多种领域有着广泛的用途<sup>[7-9]</sup>，特别是把丝蛋白水解成水溶性的由特殊氨基酸组成的小分子生物活性肽，在医疗卫生和日用化妆品等领域有着重要的应用价值<sup>[10-12]</sup>。因此，利用溶茧酶分解蚕丝蛋白生产小分子生物活性肽成为近年来的研究热点之一。【前人研究进展】对于部分绢丝类昆虫溶茧酶来源的研究，迄今有两种不同的观点。在对柞蚕溶茧酶来源研究的基础上，美国学者 Kafatos 等认为，溶茧酶来源于营封闭茧蚕蛾的下颚<sup>[13]</sup>；日本学者江口正治等在家蚕蛾的中肠和嗦囊液中检测到具有水解丝胶和丝素活性的酶，认为除下颚外，溶茧酶还来源于中肠和嗦囊<sup>[14]</sup>。国内学者所做的相关试验表明：家蚕溶茧酶的来源不是嗦囊，溶茧酶可能来源于下颚和中肠<sup>[15]</sup>。另外，由于蚕丝降解产物特别是丝肽的用途日益扩大，国内外对丝肽的生产技术也进行了广泛的研究。刘冬等报道，利用碱性蛋白酶 Alcalase 和 Flavourzyme 500MG 酶水解丝蛋白，可以得到良好的效果<sup>[16]</sup>。但是对于丝素蛋白的生物降解，相对来说比较困难。通常所说的溶茧酶（Cocoonase），一种是 Kafatos 等人发现于家蚕成虫的消化系统，可以水解丝素和丝胶的蛋白质<sup>[17]</sup>；另一种是 Sumida 等人从预蛹将要解体的丝腺中提取的酶，其对丝素有降解活性<sup>[18]</sup>。但它的水解底物必须是水溶的丝素，应用时往往先要将丝素蛋白溶于锂盐，最后溶解在 5 mol·L<sup>-1</sup> 的尿素溶液中才能进行酶解反应。【本研究切入点】目前，国内外学者对柞蚕蛾和天蚕蛾下颚表面的溶茧酶结晶颗粒的酶学性质做了较为详细的研究<sup>[19,20]</sup>，而有关家蚕溶茧酶基因序列的克隆与表达的研究甚少，溶茧酶基因只有部分序列得以公布（GenBank 登陆号：AB257565）。【拟解决的关键问题】本研究以公布的溶茧酶基因部分序列为基础，利用 cDNA 末端快速扩增技术（rapid amplification of cDNA Ends, RACE）克隆了家蚕溶茧酶 5'端和 3'端序

列，得到了家蚕溶茧酶基因完整的编码区序列（GenBank 登录号：EF428980），分析了其 cDNA 序列和基因组序列，并在大肠杆菌中进行了表达，为今后对溶茧酶的进一步研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

家蚕和大肠杆菌 TOP10 由本实验室培养保存。克隆载体 pUCm-T vector、T4 DNA Ligase、Trizol 购自上海生工生物工程服务有限公司；质粒抽提试剂盒和凝胶回收试剂盒为上海申能博彩生物科技有限公司产品；cDNA 合成试剂盒、cDNA 5'-Full RACE Core Set 试剂盒、DNA molecular weight marker、dNTP、限制性内切酶、TaqDNA 聚合酶、反应缓冲液及其它化学常规试剂均购自宝生物工程（大连）有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取 参照文献[21]、[22]的方法，取刚破茧而出的家蚕蛾的头部，放入研钵中，添加液氮充分研磨后再加入 1 ml Trizol，转入 1.5 ml eppendorf 管，室温静置 5 min；然后加入 200  $\mu$ l 氯仿，振荡混匀 2 min，室温静置 10 min；4 $^{\circ}$ C，12 000 $\times$ g 离心 10 min，上清转入新的 eppendorf 管中，加入 0.5 ml 异戊醇，颠倒混匀，静置 10 min；4 $^{\circ}$ C，12 000 $\times$ g 离心 10 min，弃上清，加入 1 ml 经 DEPC 水配置的 75%乙醇洗 RNA 沉淀，室温晾干；将沉淀溶于 20  $\mu$ l DEPC 水中，-70 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2 引物设计与合成 根据在 NCBI 搜索到的溶茧酶部分序列（GenBank 登陆号：AB257565），以及 mRNA 的 3'末端具有天然 poly（A）尾巴的特性，并按照 5'RACE 试剂盒的要求用 Primer 5.0 软件设计引物（表）。

表中所列的引物中，N 为兼并碱基，指代 A、T、G、C；P 表示 5'端磷酸化；下划线表示 BamH I 和 Hind III 酶切位点；阴影表示起始密码和终止密码。上述引物均由上海生工生物工程服务有限公司合成。

1.2.3 第一链 cDNA 合成 按照购自宝生物公司的 cDNA 合成试剂盒要求，以家蚕蛾总 RNA 为模板，Cocoonase-P3 为引物，在 M-MLV 反转录酶的作用下合成 cDNA 的第一链，即 3'RLM-RACE cDNA，置 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.4 RT-PCR 验证目的片段并克隆 25  $\mu$ l PCR 体系中含 10 $\times$ Buffer 2.5  $\mu$ l，25 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> 2  $\mu$ l，10 mmol·L<sup>-1</sup> dNTP mix 1  $\mu$ l，cDNA 模板为 5  $\mu$ g，5 U· $\mu$ l<sup>-1</sup> Taq

表 引物序列

Table Primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Sequences of the primers(5'→3')
Cocoonase-P1	GAGATTAGCATTAACAA AGT
Cocoonase-P2	CTGACAGGAGTCCTTTCCGC
Cocoonase-P3	ACGACTCACTATAGGGCNTTTTTTTTTTTT
Cocoonase-P4	ACGACTCACTATAGGGC
CORT	(P)GCATTTCATCGTCGG
COA1	TGTATTTCGGATGAGCCACC
COS1	AAGGCTCTTCGGTTCCTGAC
COA2	TCG AACCTCCGCATTGGAAGT
COS2	ACGCTAAGGGCTGTGCACGTTG
COW1	GCTGGATCCATG GAA AAGTTGTATCTGTT
COW2	ATTAAGCTTTTATAGGCCCGCCGTTG

酶 0.3  $\mu\text{L}$ , 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cocoonase-P1、Cocoonase-P2 引物各 1  $\mu\text{L}$ 。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min, 然后 94 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。取 40  $\mu\text{L}$  PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳回收特异性扩增片段, 并克隆至 pUCm-T 载体中, 挑取阳性克隆进行序列分析<sup>[23]</sup>。

1.2.5 家蚕溶茧酶基因 cDNA 3' 末端扩增和克隆 若上一步的克隆片段测序结果与 GenBank 上登陆号为 AB257565 的结果一致, 说明该 cDNA 模板中含有溶茧酶基因。则仍以 1.2.3 步合成的 cDNA 为模板, 以 Cocoonase-P1、Cocoonase-P4 为引物, 根据 3'RACE 原理扩增家蚕溶茧酶基因 cDNA 末端<sup>[24]</sup>。

1.2.6 家蚕溶茧酶基因 cDNA 5' 末端扩增和克隆 以 1.2.1 步骤的总 RNA 为模板, 使用 5' 末端磷酸化标记的 CORT 引物进行反转录反应, 合成 1st Strand cDNA。使用 RNase H 分解 Hybrid DNA-RNA 中的 RNA 链。

然后用 T4 RNA Ligase 使单链 cDNA 进行环化或形成首尾连接物。以该连接液为模板, 用引物 COA1 和 COS1 进行第一次 PCR 反应。取 1  $\mu\text{L}$  稀释 10 倍的第一次 PCR 扩增产物, 用引物 COA2 和 COS2 进行第二次 PCR 扩增。

1.2.7 溶茧酶基因编码区片段的克隆 根据所测定的家蚕溶茧酶基因 5' 端和 3' 端 cDNA 部分编码区序列, 以 1.2.3 合成的第一链 cDNA 为模板, 用引物 COW1 和 COW2 进行 PCR 扩增。反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min, 然后 94 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 57 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  90 s,

30 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。

1.2.8 原核表达载体 pET-32a-Cocoonase 的构建及其在大肠杆菌中的表达与 SDS-PAGE 分析 以鉴定正确的 pUCm-T-Cocoonase 质粒为模板, 用 *Bam*H I 和 *Hind*III 双酶切, 将目的基因亚克隆至 pET-32a 载体上。把重组的原核表达质粒转化大肠杆菌 BL21 后, 挑取单个菌落接种 3 ml LB 培养基 ( $\text{Amp}^+$ ) 中, 37 $^{\circ}\text{C}$  继续振荡培养 2.5 h 后 (OD 值大约为 0.5 左右), 加 IPDG 至终浓度为 0.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 37 $^{\circ}\text{C}$  继续振荡培养 5 h。收集菌体进行 SDS-PAGE 分析, 分离胶和浓缩胶配制参照 TaKaRa 商品目录上的方法, 浓度分别为 15% 和 5%。电泳完毕后用考马斯亮蓝 R250 进行染色 20 min, 然后脱色直至蛋白质条带清晰可见为止。

1.2.9 Western Blot 检测 将待检测样品经 SDS-PAGE 转移至硝酸纤维素膜后, 用 3% BSA 封闭, 然后在 6 $\times$ His 一抗中 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h, 用含 0.5% Tween-20 的 PBS 洗膜 45 min; 加 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 二抗同样孵育 2 h; 用含 0.5% Tween-20 的 PBS 洗膜 45 min, 最后用 DAB 显色, 拍照保存<sup>[25]</sup>。

1.2.10 数据库和序列分析 家蚕全基因组数据库由 NCBI 提供, 多序列比对采用 ClustalW (1.82) (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) 软件。DNAMAN 序列分析软件将 DNA 序列翻译成蛋白质序列, 并对翻译的序列进行分析<sup>[26]</sup>; 用 BLAST 软件将测序得到的家蚕溶茧酶基因全长 cDNA 序列与家蚕全基因组数据库进行比对, 并用 sim4 程序 (<http://gamay.univ-perp.fr/analyse-seq/sim4>) 分析家蚕溶茧酶基因的内含子和外显子序列。信号肽查找用 Signal P 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 程序分析。蛋白质功能预测应用软件 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 完成。

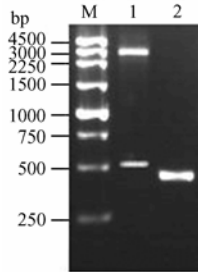
1.2.11 推导的蛋白质二级结构预测分析 根据 ExPASy proteomics tools 系统中的 GOR I 蛋白质二级结构模型预测软件做蛋白质二级结构预测分析 ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/np\\_sa-automat.pl?page=npsa\\_gor4.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/np_sa-automat.pl?page=npsa_gor4.html))。

## 2 结果与分析

### 2.1 目的片段的验证

根据在 NCBI 搜索到的溶茧酶部分序列 (GenBank 登陆号: AB257565) 设计引物, 通过 RT-PCR 方法扩增出了与预期大小基本一致的 DNA 条带, 大小约为 500 bp (图 1)。切胶回收该片段, 将其与 pUCm-T

载体连接。挑选阳性克隆，抽提质粒，经 *Pst* I 单酶切及 1%琼脂糖凝胶电泳检测，出现 2 条 DNA 条带，其中目的泳带带有约 60 bp 的载体序列，与预期大小基本一致（图 1）。送交生物公司的测序结果与 GenBank 上的结果一致，说明该 cDNA 模板中含有溶茧酶基因。



M: DNA marker; 1: 带有目的片段的 pUCm-T 载体酶切结果/*Pst* I; 2: PCR 产物 (1%琼脂糖凝胶电泳)  
M: 250 bp DNA ladder(TaKaRa); 1: Restriction analysis of the recombinant pUCm-T vector; 2: PCR product(separated in a 1% agarose gel)

图 1 家蚕溶茧酶基因部分序列的 RT-PCR 产物及重组质粒的酶切鉴定

Fig. 1 RT-PCR result of the partial cds from *Bombyx mori* *Cocoonase* gene and restriction analysis of the recombinant vector

2.2 用 RLM-RACE 法扩增家蚕溶茧酶基因 cDNA 末端

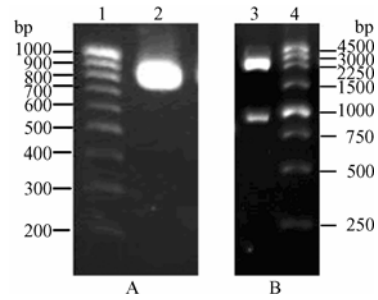
虽然 GenBank 上公布了家蚕溶茧酶的部分编码区序列，但该基因的 5'端和 3'端序列并不清楚。利用 RLM-RACE 方法，可以克隆和分析家蚕溶茧酶 5'端和 3'端序列。

以合成的 cDNA 为模板，以 *Cocoonase*-P1、*Cocoonase*-P4 为引物进行 RT-PCR 反应可扩增出蚕溶茧酶 3'端序列，大小约为 900 bp（图 2-A）。切胶回收该片段，将其与 pUCm-T 载体连接。挑选阳性克隆，抽提质粒，经 *Pst* I 单酶切及 1%琼脂糖凝胶电泳检测，出现 2 条 DNA 条带，其中目的泳带带有约 60 bp 的载体序列，与预期大小基本一致（图 2-B）。

按照 cDNA 5'-Full RACE Core Set 试剂盒扩增出蚕溶茧酶 5'端序列大小约为 300 bp（图 3）。经酶切鉴定，出现 2 条 DNA 条带，其中目的泳带带有约 60 bp 的载体序列，与预期大小基本一致（图 3）。

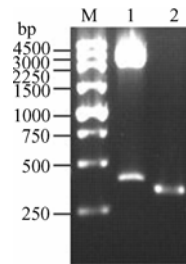
2.3 家蚕溶茧酶基因编码区片段的克隆及全序列分析

根据所测定序列，设计引物，以合成的 3'RLM-RACE cDNA 为模板，PCR 扩增，得到家蚕溶



A: 3'RACE-PCR 产物 (1.7%琼脂糖凝胶电泳); 1: DNA marker; 2: 用 3'RACE 法扩增出的 3'端片段。B: 3'RACE 产物酶切鉴定 (1%琼脂糖凝胶电泳); 3: DNA marker; 4: 带有目的片段的 pUCm-T 载体酶切结果/*Pst* I  
A: The product of 3'RACE(separated in a 1.7% agarose gel); 1: 250 bp DNA ladder(TaKaRa); 2: 3'RLM-RACE PCR. B: Identification of recombinant vector pUCm-T-3'RACE by digestion of the restriction enzyme *Pst* I (separated in a 1% agarose gel); 3: 250 bp DNA ladder(TaKaRa); 4: Restriction analysis of the recombinant pUCm-T vector

图 2 用 RLM-RACE 法分析家蚕溶茧酶基因 3' 端片段  
Fig. 2 Mapping of 3'end regions of the *Cocoonase* gene from *Bombyx mori* using RLM-RACE

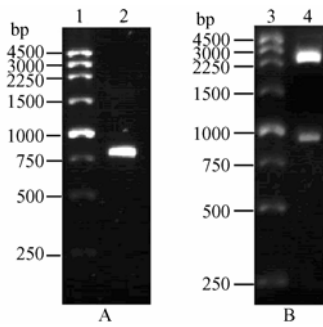


M: DNA marker; 1: 带有目的片段的 pUCm-T 载体酶切结果/*Pst* I; 2: 用 5'RACE 法扩增出的 5'端片段 (1%琼脂糖凝胶电泳)  
M: 250 bp DNA ladder(TaKaRa); 1: Identification of recombinant vector pUCm-T-5'RACE by digestion of the restriction enzyme *Pst* I; 2: 5'RLM-RACE PCR(separated in a 1% agarose gel)

图 3 用 RLM-RACE 法分析家蚕溶茧酶基因 5'端片段  
Fig. 3 Mapping of 5'end regions of the *Cocoonase* gene from *Bombyx mori* using RLM-RACE

茧酶基因编码区片段，大小约为 780 bp（图 4-A）。切胶回收该片段，将其与 pUCm-T 载体连接。挑选阳性克隆，抽提质粒，经 *Pst* I 单酶切及 1%琼脂糖凝胶电泳检测，出现 2 条 DNA 条带，其中目的泳带带有约 60 bp 的载体序列，与预期大小基本一致（图 4-B）。

分析结果表明，家蚕溶茧酶基因全长 cDNA 序列有 1 047 bp（包括 polyA 尾上连续的 12 个碱基 A，GenBank 登录号：EF428980），该序列包括 54 bp 的 5'端非编码区（5'U TR）、780 bp 的蛋白质编码区、



A: 家蚕溶茧酶基因编码区 PCR 产物 (1%琼脂糖凝胶电泳); 1: DNA marker; 2: PCR 产物; B: PCR 产物酶切鉴定 (1%琼脂糖凝胶电泳); 3: DNA marker; 4: 带有目的片段的 pUCm-T 载体酶切结果/*Pst* I  
A: PCR Product from coding regions of Cocoonase gene(separated in a 1% agarose gel); 1: 250 bp DNA ladder(TaKaRa); 2: PCR product; B: Identification of recombinant vector pUCm-T-Cocoonase by digestion of the restriction enzyme *Pst* I (separated in a 1% agarose gel); 3: 250 bp DNA ladder(TaKaRa); 4: Restriction analysis of the recombinant pUCm-T vector

图 4 家蚕溶茧酶基因编码区 PCR 产物及重组质粒的酶切鉴定

Fig. 4 PCR product from coding regions of *Bombyx mori* Cocoonase gene and restriction analysis of the recombinant vector

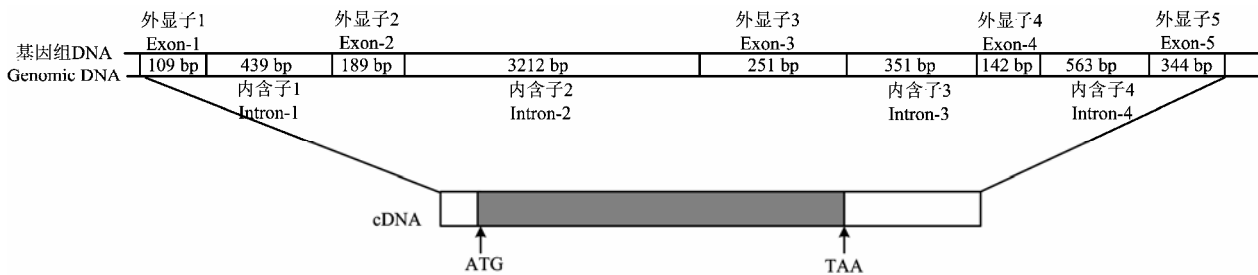


图 5 家蚕溶茧酶基因的结构示意图

Fig. 5 Schematic representation of the Cocoonase gene from *Bombyx mori*

肽酶在 Cys<sup>22</sup>-Thr<sup>23</sup> 切割前肽原产生 25 kD 的溶茧酶。SMART 分析结果预测其从第 34~254 位氨基酸序列具有类胰蛋白的丝氨酸蛋白酶活性 (trypsin-like serine protease)。

## 2.5 家蚕溶茧酶基因的诱导表达和目的蛋白的 Western blotting 分析

经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切重组质粒 pET-32a-Cocoonase, 电泳结果显示 (图 7): 家蚕溶茧酶基因 cDNA (约 780 bp) 序列片段已成功克隆进 pET-32a 载体中。

在本试验中, 根据 pET-32a 载体的图谱特征, 由

终止密码子 TAA 和 210 bp 的 3'端非编码区。该序列可编码 260 个氨基酸的蛋白质, 预测蛋白质分子量为 27.6 kD, 等电点 (pI) 为 8.886。

为分析家蚕溶茧酶基因的结构, 将 cDNA 序列与 NCBI 的家蚕全基因组数据库里的序列比对, 结果显示, 家蚕溶茧酶基因包含 4 个内含子, 其两端大致符合 GT-AG 法则 (图 5) [27]。

## 2.4 家蚕溶茧酶氨基酸序列分析

在家蚕溶茧酶基因编码的 260 个氨基酸组成中, 最多的是赖氨酸 (Lys)、丝氨酸 (Ser) 和甘氨酸 (Gly), 分别有 28 个、27 个、26 个, 大约各占 10.4%。不带电荷的极性氨基酸有 84 个, 占 32.3%, 其中天冬酰胺 (Asn) 有 12 个, 占 4.6%; 非极性氨基酸有 78 个, 占 30%, 其中丙氨酸 (Ala) 有 21 个, 占 8%。带正电荷的氨基酸 (赖氨酸 Lys 和精氨酸 Arg) 有 33 个; 而带负电荷的氨基酸 (天冬氨酸 Asp 和谷氨酸 Glu) 有 24 个 (图 6)。

用 Signal P 3.0 Server 程序分析家蚕溶茧酶, 预测其从第 1~22 位为信号肽序列 (singal peptide), 信号

构建的重组载体 pET-32a-Cocoonase 表达的家蚕溶茧酶蛋白与硫氧化还原蛋白-组氨酸标签蛋白 (Trx-His) 融合, 在宿主菌中一般呈可溶性表达。图 8 显示含重组质粒的单克隆细菌诱导表达后, SDS-PAGE 电泳检测大约在分子量 48 kD 处明显有 1 条表达量很高的蛋白条带。由于推导的溶茧酶蛋白成熟肽部分为 238 个氨基酸, 其 N-端疏水区是一个由 22 个氨基酸编码的真核信号肽序列, 因此, 所表达的 Cocoonase 是开放阅读框为 260 个氨基酸的蛋白质, 分子量约为 27.6 kD, 再加上载体 T7 启动子下游的硫氧还蛋白-组氨酸 (Trx-His) 标签基因所编码的 Trx-His 蛋白约 20.4 kD,

GTTGAGCTTGGAAATATTTTCATGAGTTCCTCACCTGTGCGCCGGATCGAAACTGAAATG  
M  
GAAAAAGTTGTATCTGTTTATTGTTTTCTTTCATGTGCCTTATTACTGAAAGATGTT  
E K L Y L F I V F L S C A L L L K D V  
ACATGTACGGATTCTGAGGCGTTATCCAAAGACGAGGAAAAGATAGTAGGAGGCGAA  
T C T D S E A L S K D E E K I V G G E  
GAGATTAGCATTAACAAAGTTCCGTACCAAGCGTATCTTTTGCTCCAAAAAGATAAC  
E I S I N K V P Y Q A Y L L L Q K D N  
GAATACTTCCAATGCGGAGGTTCGATTATTAGCAAACGTCACATCCTCACGGCGGCA  
E Y F Q C G G S I I S K R H I L T A A  
CATTGTATTGAAGGTATTTCCAAAGTAACGGTGCATCGGAAGCTCAAATTCCTAAT  
**H** C I E G I S K V T V R I G S S N S N  
AAAGGAGGCACCGTTTATACAGCGAAATCAAAGGTGGCTCATCCGAAATACAATTCCG  
K G T A K S K V A H P K Y N S  
AAAACAAAAACAACGATTTTCGCCATTGTCACCGTGAACAAAGACATGGCGATCGAT  
K T K N N **D** F A I V T V N K D M A I D  
GGAAAACTACTAAAAATCATTACTTTAGCCAAAGAAGGCTCTTCGGTTCCTGACAAA  
G K T T K I I T L A K E G S S V P D K  
ACGAAACTATTGGTTTCCGGGTGGGGAGCTACAAGCGAAGGTGGTTCTTCAAGTACA  
T K L L V S G W G A T S E G G S S S T  
ACGCTAAGGGCTGTGCACGTTCAAGCTCATTCCGACGATGAATGCAAGAAATATTT  
T L R A V H V Q A H S D D E C K K Y F  
CGTAGTTTGACATCTAATATGTTCTGCGCCGGGCCCTGAAGGCGGAAAGGACTCC  
R S L T S N M F C A G P P E G G K D S  
TGTCAGGGTGATTCCGGTGGTCCAGCTGTTAAGGGCAATGTCCAAGTGGTGTGGTC  
C Q G D **S** G G P A V K G N V Q L G V V  
TCSTTTGGTGTGCGCTGCGCTCGCAAGAATAACCCTGGTATCTATGCTAAAGTAAGT  
S F G V G C A R K N N P G I Y A K V S  
GCTGTGCAAAATGGATAAAATCAACGGCGGGCCTATAAATACGAATTAGTCAAAAT  
A A A K W I K S T A G L \*  
TTAACTTGAGTTTCAAACATTGCAATGTATGTATTACCAATTTTTTTGTTATTACTC  
TTGAATGCGCGTACTTTTGTAGTACTCATTATCTCAGTGCACATATCATACGTAATAC  
TTTGAAACTCAAGTTCAGAGAGAATTTGTGTAGCTTAAAGTTTTAA**ATAAA**AGGCACT  
GTTTACCTAAAAAAAAAAAAAGCCCTATAGTGAGTCGT

家蚕溶茧酶信号肽序列用下划线标出；预测的蛋白质催化部位用黑色阴影标出；各引物序列用斜体下划线标出，由上到下依次是引物 COW1, COP1, COA2, COA1, COS1, COS2, CORT, COP2, COW2, COP3 的位置；基因 3'端转录终止序列用黑体下划线标出  
The N-terminal signal peptide is displayed in underlined. All catalytic sites are present in bold-faced font and shade. The primers of Cocoonase gene are underlined and in italics. They are COW1, COP1, COA2, COA1, COS1, COS2, CORT, COP2, COW2, COP3 sequentially. The putative polyadenylation signal at the 3'-UTR is underlined and in bold-faced font

图 6 家蚕溶茧酶基因 cDNA 序列和推导的编码区氨基酸序列

Fig. 6 Cocoonase cDNA of *Bombyx mori* and deduced amino acid sequences

得到的融合蛋白分子量约为 48 kD。

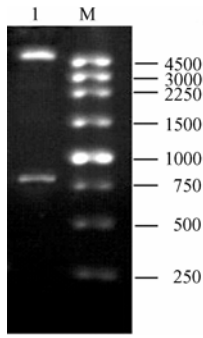
为了进一步确定家蚕 Cocoonase 是否在大肠杆菌中成功表达，用 Anti-His 抗体和辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠 IgG 进行了 Western Blot 检测。首先将含融合蛋白 Cocoonase 的菌体样品、含 pET-32a 空载体的菌体样品和 BL21 菌体经 SDS-PAGE 电泳分离转膜以后，再用一抗和二抗处理，最后用 DAB 显色。图 8 结果表明，在预期的约 48 kD 大小位置出现较明显的黑色条带（黑色箭头所指处），而对照 BL21 菌和空 pET-32a 转化 BL21 菌后对应位置都没有检测到条带，进一步证明了家蚕溶茧酶蛋白得到了成功表达。

另外，在空 pET-32a 转化 BL21 菌所对应泳道约 20.4 kD 位置检测到一条清晰的条带，这是载体上 T7 启动子下游的硫氧化还原蛋白-组氨酸 (Trx-His) 标签基因所编码的 Trx-His 蛋白所生成的蛋白条带。

2.6 推导的蛋白质二级结构预测分析

将所克隆的 cDNA 片段推导的蛋白质氨基酸序列输入 GOR secondary structure prediction 蛋白质二级结构模型预测软件分析结果见图 9。

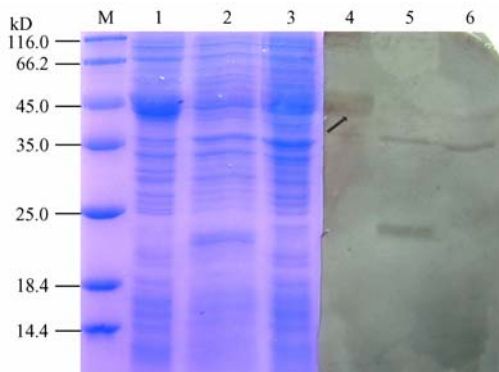
如图 9 所示，家蚕溶茧酶蛋白的二级结构，是由其少量分布在整个蛋白内的 α-螺旋结构、大量的无规则卷曲和扩展链结构组成，其中 α-螺旋结构有 36 个，



M: DNA marker; 1: 带有目的片段的 pET-32a 载体酶切结果/ *Bam*H I + *Hind*III (1%琼脂糖凝胶电泳)  
 M: 250 bp DNA ladder(TaKaRa); 1: Restriction analysis of the recombinant pET-32a vector(separated in a 1% agarose gel)

图 7 家蚕溶茧酶基因重组表达载体 pET-32a-Cocoonase 的双酶切鉴定

Fig. 7 Identification of recombinant expression vector pET-32a-Cocoonase containing the *Cocoonase* gene from *Bombyx mori* by double-digestion of restriction enzymes



M: 蛋白质 Marker; 1: 经 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> IPTG 诱导的 pET-32a-Cocoonase 的表达; 2: 空载体 pET-32a 转化 BL21 菌后的表达; 3: 无质粒转化的 BL21 菌的表达; 4: pET-32a-Cocoonase 表达产物的 Western Blot; 5: 空载体 pET-32a 转化 BL21 菌后的 Western Blot; 6: 无质粒转化的 BL21 菌的 Western Blot  
 M: Protein molecular weight marker; 1: Expression of pET-32a-Cocoonase, induced by 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> IPTG; 2: Expression of pET-32a; 3: Expression of BL21; 4: Western Blot of pET-32a-Cocoonase; 5: Western Blot of pET-32a; 6: Western Blot of BL21

图 8 在 BL21 宿主菌中表达的溶茧酶蛋白的 SDS-PAGE 分析和 Western Blotting 检测

Fig. 8 SDS-PAGE analysis and Western Blotting detection of the Cocoonase production expressed in BL21

占 13.85%，而扩展链和无规则卷曲各占 34.62%、51.54%。

```
MEKLYLFLIVFLSCALLLKDVTCTDSEALSKDEKIVGGEEISINKVPIYAYLLQLQKNEYFQCGGSIISK
cccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
RHILTAHCIEGISKVTVRIRIGSSNSKGGTVYAKSKVAHPKYNKTKNNDFALVTVNKDMAIDGKTKI
chhhhhcccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
ITLAKEGSSVPDKTKLLVSGWGATSEGGSSSTTLRAVHVQAHSDDACKYFRSLTSMFCAGPPEGKDS
eeeecccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
CQDGGGPAVKGNVQLGVVSGVGCARKNNPGIYAKVSAAAKWIKSTAGL
cccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
```

h: 表示 α-螺旋; e: 表示扩展链; c: 表示无规则卷曲  
 h is Alpha helix, e is Extended strand, c is Random coil

图 9 家蚕溶茧酶蛋白二级结构预测

Fig. 9 Secondary structure prediction of the *Cocoonase* protein from *Bombyx mori*

### 3 讨论

家蚕溶茧酶是一种在家蚕发育过程中必不可少的分泌物。如果家蚕羽化成蛾后不能分泌溶茧酶，就难以破茧而出，更谈不上交配产卵，繁衍后代。因此，溶茧酶的分泌对保证家蚕的世代交替能顺利进行起着重要的作用。所以在基因层次上对溶茧酶分子结构的研究，对揭示溶茧酶与丝蛋白间的反应机理，深层次认识家蚕发育的生理生化过程，都有着重要的生物学价值。

另外，作为溶茧酶天然底物的蚕丝蛋白早已应用到食品、医药、生物技术等诸多领域，为提高人们的生活质量发挥着不可替代的作用。而且近年来，随着小分子生物活性肽的重要价值日益为人们所重视，其制备方法也成为新的研究热点。利用溶茧酶水解蚕丝蛋白制备小分子生物活性肽，不仅拓宽了蚕丝蛋白的应用范围，而且也小分子生物活性肽的制备提供了新的途径，有着很高的应用价值和广阔的市场前景。

虽然溶茧酶有着很高的研究价值，但目前报道的针对家蚕溶茧酶基因克隆和表达的研究还很少，只有溶茧酶部分序列可供参考。本文利用 cDNA 末端快速扩增技术克隆了家蚕溶茧酶 5'端和 3'端基因序列，克隆的溶茧酶基因在大肠杆菌中得到成功表达，另外还克隆了家蚕溶茧酶基因前约 2 400 bp 的 DNA 片段，这在应用领域大量生产溶茧酶蛋白以及对家蚕溶茧酶基因及其启动子的进一步研究打下了良好的基础<sup>[28]</sup>。在本试验中所表达的家蚕溶茧酶是与硫氧化还原蛋白融合的表达产物，需要经肠激酶 (EK) 切割后进行分离纯化，其纯化产物是否具有生物活性，能否溶解天然丝素等问题尚不清楚，有待进一步研究。

## 4 结 论

家蚕溶茧酶基因全长 cDNA 序列有 1 047 bp (GenBank 登录号: EF428980), 该序列包括 54 bp 的 5'端非编码区(5'UTR)、780 bp 的蛋白质编码区、终止密码子 TAA 和 210 bp 的 3'端非编码区。该序列可编码 260 个氨基酸的蛋白质, 预测蛋白质分子量为 27.6 kD, 等电点 (pI) 为 8.886。与家蚕基因组比对后发现该基因包含 4 个内含子; 原核表达结果表明家蚕溶茧酶基因以融合蛋白形式表达, 相对分子量约为 48 kD。

## References

- [1] Traut W, Niimi T, Ikeo K, Sahara K. Phylogeny of the sex-determining gene Sex-lethal in insects. *Genome*, 2006, 49(3): 254-262.
- [2] 向仲怀. 中国家蚕基因组与 21 世纪丝绸之路. *蚕业科学*, 2003, 29(4): 321-322.  
Xiang Z H. Silkorm genome project and the silk road in the 21th century in China. *Science of Sericulture*, 2003, 29(4): 321-322. (in Chinese)
- [3] 程道军, 夏庆友, 周泽扬, 鲁成, 向仲怀. 家蚕 cDNA 文库构建及大规模 EST 测序. *蚕业科学*, 2003, (4): 335-339.  
Cheng D J, Xia Q Y, Zhou Z Y, Lu C, Xiang Z H. cDNA libraries construction and large-scale ESTs sequencing of the silkworm. *Science of Sericulture*, 2003, (4): 335-339. (in Chinese)
- [4] 向仲怀, 黄君霆, 夏建国, 鲁成. *蚕丝生物学*. 北京: 中国林业出版社, 2005: 29-58.  
Xiang Z H, Huang J T, Xia J G, Lu C. *Biology of Sericulture*. Beijing: China Forestry Press, 2005: 29-58. (in Chinese)
- [5] Selman K, Kafatos F C. Differentiation in the cocoonase producing silkmoth galea: Ultrastructural studies. *Developmental Biology*, 1975, 46(1): 132-150.
- [6] Eun S G, David J F, Samuel M H, Richard J S. Silk microspheres for encapsulation and controlled release. *Journal of Controlled Release*, 2007, 117(3): 360-370.
- [7] 王玉军, 柳学广, 徐世清. 家蚕丝蛋白生物材料新功能的开发及应用. *丝绸*, 2006, 6: 44-48.  
Wang Y J, Liu X G, Xu S Q. Exploit and application of new biologic material function of *Bombyx mori* silk protein. *Silk Monthly*, 2006, 6: 44-48. (in Chinese)
- [8] Wang X Q, Esther W, Akira M, Lorenz M, Li C M, David L K. Evidence for an immune function of lepidopteran silk proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 352(2): 317-322.
- [9] Wang S P, Guo T Q, Guo X Y, Huang J T, Lu C D. *In vivo* analysis of fibroin heavy chain signal peptide of silkworm *Bombyx mori* using recombinant baculovirus as vector. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 341(4): 1203-1210.
- [10] Shiomi K, Fujiwara Y, Yasukochi Y, Kajiura Z, Nakagaki M, Yaginuma T. The pitx homeobox gene in *Bombyx mori*: Regulation of DH-PBAN neuropeptide hormone gene expression. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 2007, 34(2): 209-218.
- [11] Sakano D, Li B, Xia Q, Yamamoto K, Fujii H, Aso Y. Genes encoding small heat shock proteins of the silkworm, *Bombyx mori*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2006, 70(10): 2443-2450.
- [12] Taniai K, Lee J H, Lee I H. *Bombyx mori* cell line as a model of immune-system organs. *Insect Biochem Molecular Biology*, 2006, 15(3): 269-279.
- [13] Kafatos F C, Tartakoff A M, Law J H. Cocoonase. I. Preliminary characterization of a proteolytic enzyme from silk moths. *The Journal of Biological Chemistry*, 1967, 242(7): 1477-1487.
- [14] Eguchi M, Iwamoto A. Effect of cocoonases in the midgut, crop and maxillae of silkworm *Bombyx mori*. *Journal Sericult Science Japan*, 1975, 44(5): 314-320.
- [15] 王厚伟, 张翠红, 崔为正, 刘小龙, 周元聪, 蔡幼民, 牟志美. 家蚕蛾溶茧酶分泌器官及蛾吐液的研究. *蚕业科学*, 2005, 31(2): 136-141.  
Wang H W, Zhang C H, Cui W Z, Liu X L, Zhou Y C, Cai Y M, Mou Z M. Studies on secretory organs of cocoonase and silkmoth-vomiting fluid of silkworm, *Bombyx mori*. *Science of Sericulture*, 2005, 31(2): 136-141. (in Chinese)
- [16] 刘冬, 李世敏. 丝素酶法生产工艺条件研究. *食品与发酵工业*, 2002, 28(2): 41-44.  
Liu D, Li S M. Study on technical conditions of silkworm cocoon fibroin hydrolysed with enzymes. *Food and Fermentation Industries*, 2002, 28(2): 41-44. (in Chinese)
- [17] Kafatos F C, Law J H, Tartakoff A M. Cocoonase II. Substrate specificity, inhibitor, and classification of the enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 1967, 242(7): 1488-1494.
- [18] Sumida M, Takimoto S, Ukai M, Matsubara F. Occurrence of fibroinase in degenerating silk gland in the pharate adult of the silkworm, *Bombyx mori*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1993, 105, 239-245.
- [19] 王继红, 田晶, 徐龙权. 柞蚕蛾出茧前吐液中的水解酶. 大



- 连轻工业学院学报, 2001, 20(3): 183-185.
- Wang J H, Tian J, Xu L Q. Hydrolytic enzyme in spit liquor of tussah. *Journal of Dalian Institute of Light Industry*, 2001, 20(3): 183-185. (in Chinese)
- [20] Tao W, Li M Z, Zhao C X. Structure and properties of regenerated *Antheraea pernyi* silk fibroin in aqueous solution. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2007, 40(5): 472-478.
- [21] 浙江农业大学. 蚕体解剖生理学(第二版). 北京: 农业出版社, 1989: 18-22.  
Zhejiang Agricultural University. *Anatomical Physiology of the Bombyx mori (2nd edition)*. Beijing: Agriculture Press, 1989: 18-22. (in Chinese)
- [22] J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔, 黄培堂等译. 分子克隆实验指南(第三版). 北京: 科学出版社, 2002: 518-532.  
Sambrook J, Russell D W. Translated by Huang P T et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd edition)*. Beijing: Science Press, 2002: 518-532. (in Chinese)
- [23] 赵晓瑜, 李继刚. 实用分子生物学技术. 北京: 化学工业出版社, 2006: 52-64.  
Zhao X Y, Li J G. *Practical Technology of Molecular Biology*. Beijing: Chemical Industry Press, 2006: 52-64. (in Chinese)
- [24] 黄留玉, 王恒樑, 史兆兴, 苏国富. PCR 最新技术原理、方法及应用. 北京: 化学工业出版社, 2005: 50-57.  
Huang L Y, Wang H L, Shi Z X, Su G F. *Newest Technology Principle, Methods and Application of the Polymerase Chain Reaction*. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 50-57. (in Chinese)
- [25] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法与技术(第二版). 北京: 高等教育出版社, 1997: 403-407.  
Zhang L X, Zhang T F, Li L Y. *Methods and Technology of the Biochemical Test (2nd edition)*. Beijing: High Education Press, 1997: 403-407. (in Chinese)
- [26] S.米塞诺, S.A.克拉维茨著. 欧阳红生等译. 生物信息学方法指南. 北京: 科学出版社, 2005: 56-71.  
Misener S, Krawetz S A. Translated by Ouyang H S et al. *Bioinformatics Methods and Protocols*. Beijing: Science Press, 2005: 56-71. (in Chinese)
- [27] T. A. 布朗著. 袁建刚等译. 基因组 2. 北京: 科学出版社, 2006: 220-229.  
Brown T A. Translated by Yuan J G. *Genomes 2*. Beijing: Science Press, 2006: 220-229. (in Chinese)
- [28] Shirai H, Kamimura M, Fujiwara H. Characterization of core promoter elements for ecdysone receptor isoforms of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem Molecular Biology*, 2007, 16(2): 253-264.

(责任编辑 王红艳)