

白蜡虫泌蜡初期全长转录组测序及 FAR 在雌雄虫中蛋白表达分析*

赵遵岭¹, 吴国星², 高 熹², 于淑惠³, 杨 斌⁴, 朱家颖⁴, 杨 璞^{1**}

(1. 中国林业科学研究院 资源昆虫研究所, 国家林业局资源昆虫培育与利用重点实验室, 云南 昆明 650224;

2. 云南农业大学 植物保护学院, 云南 昆明 650201; 3. 昆明学院 农学与生物技术学院, 云南 昆明 650214;

4. 西南林业大学 生物多样性保护学院, 云南省森林灾害预警与控制重点实验室, 云南 昆明 650224)

摘要:【目的】了解白蜡虫[*Ericerus pela* (Chavannes)]二龄雄虫泌蜡初期的基因表达, 鉴定参与白蜡合成的脂酰辅酶 A 还原酶 (fatty acyl-CoA reductase, *far*) 基因, 并明确 FAR 在白蜡虫雌雄虫中的蛋白表达情况。

【方法】采用三代全长转录组测序, 分析白蜡虫二龄雄虫泌蜡初期表达的基因, 筛选获得与白蜡虫泌蜡相关的 *far* 基因; 对关注的 1 个 FAR 制备单克隆抗体, 通过 Western-blot 分析该 FAR 在白蜡虫雌雄虫中的表达情况。

【结果】对白蜡虫泌蜡初期的二龄雄虫成功进行了转录组测序, 共获得 81 个 *far* 基因, 筛选获得与白蜡虫泌蜡一致的 6 个基因, 本研究关注的 *far* 基因命名为 *far3*; 成功制备了 FAR3 的单克隆抗体, 通过单克隆抗体分析了 FAR3 在白蜡虫雌雄虫中的表达情况, 证实 FAR3 在二龄雄虫中大量表达, 在雌虫中有微量表达。

【结论】本研究通过对泌蜡初期的白蜡虫二龄雄虫进行三代全长转录组测序获得了与白蜡虫泌蜡相关的 *far* 基因; 通过制备的 FAR3 单克隆抗体证实了 FAR3 在二龄雄虫分泌白蜡期高量表达, 这为白蜡虫其他 *far* 基因功能研究以及探索白蜡虫泌蜡分子机理奠定了基础。

关键词: 白蜡虫; 白蜡合成基因; 脂酰辅酶 A 还原酶; 转录组测序; 抗体制备; 表达分析

中图分类号: Q 78; S 899.1

文献标识码: A

文章编号: 1004-390X (2019) 05-0762-10

Full-length Transcriptome Sequencing of *Ericerus pela* at the Early Stage of Wax Secretion and Protein Expression Analysis of FAR in Males and Females

ZHAO Zunling¹, WU Guoxing², GAO Xi², YU Shuhui³, YANG Bin⁴,
ZHU Jiaying⁴, YANG Pu¹

(1. Research Institute of Resource Insects, Chinese Academy of Forestry, Key Laboratory of Cultivating and Utilization of Resource Insects of State Forestry Administration, Kunming 650224, China; 2. College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 3. School of Agronomy and Life Sciences, Kunming University, Kunming 650214, China; 4. Key Laboratory of Forestry Disaster Warning and Control in Yunnan Province, College of Biodiversity Conservation Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

Abstract: [Purpose] To understand the gene expression during the early stage of wax secretion in

收稿日期: 2019-04-15

修回日期: 2019-04-24

网络首发时间: 2019-09-30 10:31:25

*基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (CAFYBB2017ZB005); 国家自然科学基金项目 (31572337); 国家林业局林业公益性行业科研专项经费重大项目 (201504302)。

作者简介: 赵遵岭 (1993—), 女, 山东济南人, 在读硕士研究生, 主要从事昆虫分子生物学研究。

E-mail: zhaozl_blue@163.com

**通信作者 Corresponding author: 杨璞 (1979—), 男, 河南开封人, 博士, 研究员, 主要从事昆虫分子生物学研究。E-mail: zjuyangpu@aliyun.com

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20190930.0837.002.html>



the second-instar males *Ericerus pela*, and to identify the fatty acyl-CoA reductase (*far*) gene involved in wax synthesis and the protein expression of FAR in females and males. [Method] Three generations of full-length transcriptome sequencing were used to analyze the genes expression of the second instar males of *E. pela* during the early stage of wax secretion, and the *far* genes related to wax secretion of *E. pela* were identified; monoclonal antibodies were prepared from a concerned FAR. The expression of the FAR in females and males was analyzed by using Western-blot. [Result] The third generations sequencing of full-length transcriptome was successfully performed on the second-instar males during the early stage of wax secretion of *E. pela*, a total of 81 *far* genes were obtained, and 6 *far* genes with expression profile consistent with the wax secretion of the insect were identified. One of the *far* genes was selected and named *far3*. The monoclonal antibody of FAR3 was successfully prepared. And the expression of FAR3 in males and females was analyzed by using the monoclonal antibody, it was confirmed that FAR3 was highly expressed in males during the second larval stage and slightly expressed in females. [Conclusion] In this study, the *far* genes related to wax secretion were obtained by three generations of full-length transcriptome sequencing of the second-instar males of *E. pela* during the early stage of wax secretion. The high expression of FAR3 in the second instar males during the wax secretion stage was confirmed by using the monoclonal antibodies of FAR3, which laid a foundation for the functional study of other *far* genes of *E. pela* and the exploration of the molecular mechanism of wax secretion of *E. pela*.

Keywords: *Ericerus pela*; genes responsible for wax synthesis; fatty acyl-CoA reductase; transcriptome sequencing; antibody preparation; expression analysis

白蜡虫 (*Ericerus pela*) 是中国一种传统养殖的独特资源昆虫, 其二龄雄幼虫分泌的白蜡熔点高、光泽好、理化性质稳定、隔水防热、润滑保湿, 被广泛应用于纺织蜡染、食品包装、精密仪器润滑固封、医药以及化妆品等行业^[1-7]。白蜡虫雌雄二型, 雌虫经卵、幼虫 (一龄定叶期、二龄定杆期)、成虫三阶段发育成熟, 在寄主树上营固定寄生生活, 其体壁会发育成高度角质化的几丁质外壳, 起到防御天敌和病原菌、维持体内水分、保护虫体远离阳光灼伤等作用; 雄虫则经过卵、幼虫 (一龄定叶期、二龄定杆期)、蛹 (前蛹、真蛹)、成虫等阶段发育成熟, 在一龄幼虫时有较少蜡丝分泌, 到二龄时大量分泌蜡丝形成蜡被覆盖虫体, 在体壁角质化程度很弱的雄虫外围形成一保护层, 起到防御天敌、隔绝外界不良气候等作用, 维持虫体的正常生理代谢^[8-10]。泌蜡高峰期主要集中在雄虫的二龄前期和中后期^[4]。泌蜡也是蚧科昆虫最显著的特点, 泌蜡量可达虫体总质量的 58%~98%, 是介壳虫在暴露的生存环境中进化形成的特殊适应机制^[11]。

目前已明确, 在动植物中蜡酯的合成途径是

保守的, 脂酰辅酶 A 还原酶 (fatty acyl-CoA reductase, FAR) 是该途径的关键酶之一, FAR 以酰基化的脂肪酸为底物, 催化脂酰辅酶 A 还原为相应脂肪醇, FAR 催化生成的脂肪醇是生物体内脂肪醇的主要来源^[5,10,12-14]。实验室前期对白蜡虫泌蜡高峰期的二代转录组数据进行分析 and 实时定量 PCR 检测, 筛选出了一些参与白蜡虫泌蜡的 *far* 候选基因^[10]。但由于白蜡成分较多, 还有一些成分对应的 *far* 并没有被鉴定。而且 *far* 基因在泌蜡高峰期之前 (泌蜡初期) 应该已经大量表达; 此外, 二代测序获得的基因全长序列较少, 不利于基因的分析; 而基于 PacBio 的三代转录组测序可以获得更多全长基因以及更全面的基因转录情况, 有效避免了二代测序中基因片段较多的情况, 更方便进行基因功能研究^[15-20], 因此, 本研究选取泌蜡初期的二龄雄虫进行三代全长转录组测序, 筛选在泌蜡初期已经大量表达的 FAR, 尽量获得所有参与白蜡合成的 FAR 酶基因。

在同一物种内存在多个 *far* 基因, 它们在生物体内表达部位不同, 参与的生理过程不同, 也可能多个 *far* 基因参与相同的生理过程^[21-23]。由

于 FAR 的定位和参与的生理功能紧密相关,因此,对 FAR 进行表达特点分析,在一定程度上可以说明其参与的生理功能。前期采用荧光定量 PCR 分析 *far* 基因转录情况发现:*far* 基因主要在白蜡虫二龄雄虫表达,在雄虫的其他一些时期以及雌虫的一些发育阶段也有表达。由于基因转录和蛋白表达可能不完全一致,通过抗体进行 FAR 蛋白表达分析更能反映 FAR 的表达特点。

为全面了解白蜡虫参与泌蜡的 FAR 基因,明确参与泌蜡 FAR 在白蜡虫雌雄虫中的表达情况,本研究拟采用三代全长转录组测序获得更多的 FAR 全长,与前期转录组数据进行比较,筛选参与白蜡虫泌蜡的 FAR 候选基因,对关注的 FAR 通过免疫小鼠制备单克隆抗体,利用该单克隆抗体初步分析该 FAR 在白蜡虫雌雄虫中的表达情况。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验所用昆虫为白蜡虫泌蜡初期二龄雄虫,采集于云南省昆明市中国林业科学研究院资源昆虫研究所人工大棚所种女贞 (*Ligustrum lucidum*) 树上。

1.2 白蜡虫二龄雄虫总 RNA 提取和 PacBio ISO-Seq 转录组测序

收集的白蜡虫二龄雄虫置于 1.5 mL 离心管中,依照 Trizol 试剂盒 (Invitrogen, 美国) 操作说明提取总 RNA,并以此为模板,按照 Clontech SMARTer PCR cDNA Synthesis Kit 操作说明合成第 1 链 cDNA,利用第 1 链 cDNA 通过 PCR 扩增合成第 2 链 cDNA,之后,二次 PCR 扩增双链 DNA,将此样品用于 SMRTbell 建库,之后将 BluePippinTM 片段选择的文库与不分片段的文库混合,进行后续转录组测序,一般片段选择范围不大于 4 kb。

将 Pacific Biosciences Sequel 下机后获得的数据采用 SMRT analysis 套件进行如下操作:插入片段识别 (reads of insert, ROI),各条插入片段通过下机 subreads 数据来识别,之后整合生成 consensus 形式的插入片段序列;Reads 分类 (classify),将插入片段序列去 ployA 接头,然后对插入片段进行分类,包括嵌合 (chimeric)、非嵌合 (nonchimeric)、全长 (full-length)、非全长 (non-full-length)

序列分类;Reads 聚类 and 校正 (cluster, quvier),采用 ICE (iterative clustering and error correction) 算法对 Isoforms 进行 de novo 预测,通过 Quiver 算法校正 Isoforms,最后输出 high QV 和 low QV 的 Isoforms,其中,Isoforms 长度小于 3 k、3~6 k 以及 5~10 k 的文库中 Quvier 质量值分别>0.99、>0.98、>0.95 的都分类为 high QV。

之后使用 cd-hit 对聚类 and 纠错后的转录本进行去冗余操作,将各个文库中高质量的全长序列合并在一起,对转录本 NT、NR、KOG、KEGG 和 SwissProt 的注释使用 Blast 进行,GO 注释通过 Blast2GO 以及 NR 注释结果进行,InterPro 注释则采用 InterProScan5 进行。

转录本的 CDS 预测使用 TransDecoder 进行,首先对 Unigene.fa 采用 TransDecoder.LongOrfs 搜索开放读码框,将长读码框序列进行提取,之后利用 Diamond Blastp 根据序列相似性将 Unigene.fa 比对到 SwissProt 数据库上,对 Blast 结果在 Pfam 数据库中采用 Hmmscan 筛选,最后 Unigene.fa 编码序列的预测通过 TransDecoder.Predict 进行。

1.3 单克隆抗体制备

1.3.1 抗原来源

从转录组中鉴定与白蜡虫泌蜡相关的 *far* 基因,并与以前研究结果进行分析比较,将本研究关注的 1 条 FAR 命名为 *far3* 基因,通过比对转录组 Isoform 和 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 的结果克隆 CDS 部分,进行原核表达^[24],以前期诱导表达获得的目的蛋白为单克隆抗体制备的抗原。

1.3.2 抗原纯化

取 *far3* 基因已构建好的原核表达菌株诱导表达目的蛋白,对该目的蛋白进行复性,通过透析方式纯化蛋白,采用 SDS 质控方式确定抗原纯化质量。

1.3.3 动物免疫与 ELISA 检测免疫效价

将 1.3.1 节中提纯的抗原分 2 次共免疫 8 只小鼠,每只进行 3 次免疫,第 1 批次免疫小鼠编号为:1-左、1-右、1-中、1-无,第 2 次免疫小鼠分别为:2-左、2-右、2-中、2-无。第 1 次免疫在每只小鼠皮下注射抗原 (50 μ g,完全弗佐与 PBS 以 1:1 比例混合溶解),经历 3 d 免疫反应时间后,在小鼠皮下注射抗原 (50 μ g,不完全弗佐与 PBS 以 1:1 比例混合溶解) 进行二次免疫,

再次免疫反应 3 d 时间, 重复二次免疫操作。对经历 3 次免疫的小鼠抽取血清, 采用间接 ELISA 手段检测免疫效价。

1.3.4 单克隆抗体筛选

采用半固体和液体相结合的方式经历 5~10 d 进行细胞融合, 构建杂交瘤细胞, 利用间接 ELISA 手段检测培养融合细胞的上清液, 选择检测的效价和亲和力均较高的细胞株进行下一步亚克隆, 同样采取间接 ELISA 检测亚克隆细胞株效价, 选取效价与亲和力均较高的细胞株再次进行亚克隆, 收集二次亚克隆上清, 通过抗原重组蛋白进行 Western-blot 验证, 操作如下: 将抗原重组蛋白进行 10% SDS-PAGE 电泳, 转膜, 孵育抗体, 一抗为收集的细胞株亚克隆上清, 二抗为山羊抗小鼠 IgG H&L (HRP)(ABCam, 美国), 洗膜后将超敏化学发光试剂 (Affinity, 美国) A 液与 B 液等量混合滴于膜上, 在 ChemiDoc XRS 仪 (Bio-Rad, 美国) 中观察。

对 Western-blot 筛选成功的以及间接 ELISA 检测二次亚克隆细胞培养上清为全阳性的细胞株扩大培养, 获得可以稳定分泌阳性抗体的细胞定株, 并进一步扩大培养, 鉴定该上清亚型。

1.3.5 小鼠腹水纯化

选取 1.3.3 节中获得的细胞注射到小鼠上进行腹水制备, 获得的腹水进行如下操作进行纯化: 采用 ProteinG (GE Healthcare) 进行亲和层析, 对 ProteinG 选用 10 倍于柱床体积的 ddH₂O 和 1% NaAc 均以 1 mL/min 流速冲洗 1.5 h, 对待纯化样品选用 0.22 μm 过滤膜过滤, 并加入 40 mL 的 1% NaAc, 以 0.5 mL/min 的流速进行上样, 反应 3.5 h, 之后, 采用 1% NaAc 以 1 mL/min 流速冲洗层析柱, 至再没有蛋白流出; 选用 3.5% 冰乙酸冲洗层析柱, 收集洗脱产物至无蛋白流出, 并使用饱和的碳酸钠调节收取的洗脱产物的 pH 至中性, 通过 10 ku 超滤管浓缩蛋白, 并将其放入 5 L PBS 缓冲液中进行过夜透析, 次日更换新鲜 PBS 溶液, 第 2 天换液 1 次, 收取最终样品。将腹水纯化获得的抗体进行 SDS 质控监测和以抗原重组蛋白为包被源进行间接 ELISA 检测。

1.3.6 白蜡虫雌雄虫蛋白表达分析

选取白蜡虫成熟未育卵的雌虫和泌蜡期的二龄雄虫抽提蛋白, 通过 Western-blot 进行蛋白表达分析, 操作同上。

2 结果与分析

2.1 三代全长转录组测序基础数据结果

利用 PacBio Sequel 平台对白蜡虫样本进行测序, 建立 1 个 PacBio ISO-Seq 文库, 共获得聚合酶读取 (Polymerase Reads) 序列 610 775 条, N50 长度为 46 230 bp。测序共获得 Subreads 9 583 278 条, 平均长度为 1 548.68 bp, N50 长度为 1 768 bp。在 SMRTbell 测序中得到了 1 199 884 781 bp、590 087 reads CCS (reads of insert) 数据量, 插入片段平均长度为 2 033 bp, 平均读取质量为 0.94, Passes 数量为 12。经 reads 聚类 and 纠正后, 共获得 Isoforms 131 414 条, 平均长度为 1 817 bp, N50 为 2 020 bp (图 1)。

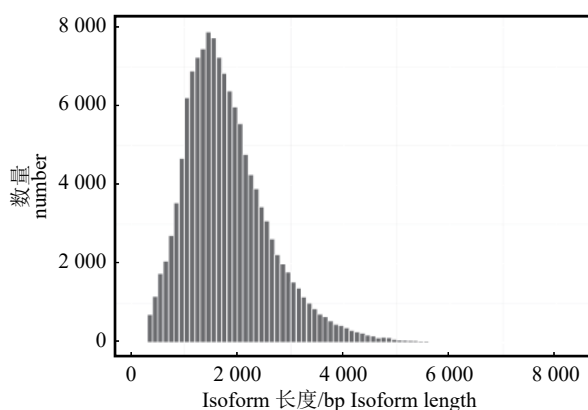


图 1 去冗余后转录本的长度分布图

Fig. 1 The length distribution of isoform

2.2 转录本功能注释

131 414 条 Isoforms 转录本中共有 76 603 条转录本被注释到 Nr (69 613 条)、Nt (16 141 条)、Swissprot (58 226 条)、KEGG (58 857 条)、KOG (57 292 条)、Interpro (55 633 条) 以及 GO (27 583 条) 七大数据库中, 有 3 400 条 Isoforms 在每一数据库中均得到注释 (表 1)。

2.2.1 Nr 功能注释

在 Nr 数据库中有 69 613 条 Isoforms 被注释, 其中有 14.25% 被注释到烟粉虱 (*Bemisia tabaci*) 上, 9.86% 被注释到内华达古白蚁 (*Zootermopsis nevadensis*) 上, 另有 8.52% 与 4.52% 被分别注释到褐飞虱 (*Nilaparvata lugens*) 与桃蚜 (*Myzus persicae*) 上 (图 2)。

2.2.2 KOG 功能注释

在 KOG 数据库中共有 57 292 条 Isoforms 被注释, 分别注释到 25 个功能分类中, 其中, 在

表 1 功能注释结果汇总

Tab. 1 Function annotation results summary

	基因总数 total	非冗余蛋白 数据库 Nr	非冗余核酸 数据库 Nt	swissprot	京都基因与基因组 百科全书 KEGG	真核生物同源 蛋白簇 KOG	iterpro	基因本体 GO	共有数量 intersection	注释总数 overall
数量 number	131 414	69 613	16 141	58 226	58 857	57 292	55 633	27 583	3 400	76 603
百分比/% percentage	100	52.97	12.28	44.31	44.79	43.60	42.33	20.00	2.59	58.29

注: Intersection指被七大数据库中所有数据库注释上的转录本总数及比例; overall指被七大数据库中任意一个数据库注释上的转录本总数及比例。
Note: Intersection means the total number and proportion of transcripts annotated on all databases in the seven databases; overall means the total number and proportion of transcripts annotated by any of the seven databases.

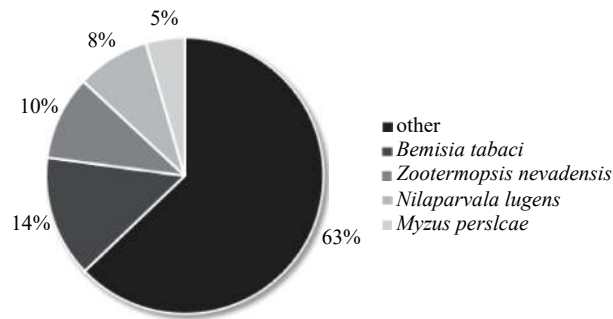


图 2 Nr 库注释物种分布图

Fig. 2 Species distribution annotated in Nr library

一般功能预测分类中被注释到的 Isoforms 最多, 其次依序为信号转导机制、翻译后修饰/蛋白质周转/伴侣、转录、未知功能分类、碳水化合物运输与代谢、RNA 处理与修饰等, 在细胞活性功能分类注释最少。

2.2.3 GO 功能注释

Isoforms 在 GO 数据库中共有 27 583 条被注释到, 分为 GO 生物过程、分子功能和细胞组成三大分支中。在生物过程分支内 26 个小功能分类中以细胞过程和代谢过程分类中注释最多; 细胞组成分类中以膜、膜部分、细胞、细胞部分得到注释的 Isoforms 最多; 在分子功能分支下催化活性与 binding 被注释的 Isoforms 最多, 并且是 GO 所有小功能分类中被注释最多的 (图 3)。

2.2.4 KEGG 功能注释

KEGG 注释 Isoforms 分布包含了细胞过程、环境信息处理、遗传信息处理、人类疾病以及代谢和有机系统等五大方面, 以代谢分类中注释的 Isoforms 最多。代谢分类中以 Global and overview maps 注释的 Isoforms 最多, 其次为碳水化合物代谢和脂质代谢。环境信息处理分支下以信号转导 Isoforms 被注释最多。细胞过程以运输和代谢小功能分类注释到的 Isoforms 最多, 遗传信息处理以翻译注释最多, 有机系统中以内分泌系统和免疫系统注释的 Isoforms 最多 (图 4)。

2.3 far 基因鉴定与筛选

本三代全长转录组测序共获得 81 个 far 基因, 其中 13 个基因的 FPKM 值在 1.0 以上, 明显高于其他 far 基因。对这 13 个基因与前期的 10 个表达谱数据进行分析比较, 发现有 6 个基因的表达谱与白蜡虫泌蜡较为一致, 其中 1 个表达量非常高, 且表达谱与白蜡虫泌蜡特点非常一致的 far 基因, 与前期筛选的 far3 基因片段重叠部分一致, 将全长转录组中该 far 基因命名为 far3。去冗余后发现该基因有 3 个不同的 Isoform。

2.4 抗原纯化

对前期已构建好的 far3 原核表达菌株诱导表达目的蛋白, 提取该蛋白作为抗原并进行纯化。经 SDS 质控检测, 结果如图 5 所示: 纯化获得的抗原质量浓度约为 0.8 mg/mL, 纯度为 80 %, 可以进行下一步免疫试验。

2.5 免疫效价间接 ELISA 检测结果

经过间接 ELISA 检测免疫的 8 只 Balb/c 小鼠, 其血清抗体效价在不同稀释度平行变化, 在较低稀释度时, 免疫效价大于 1, 且空白对照均小于 0.2, 因此, 每只免疫小鼠血清都满足要求, 可以进行下一步抗体筛选试验。

2.6 单克隆抗体筛选

对融合后的杂交瘤细胞定株进行亚型检测, 其中编号为 3B10 1C1、2C3 2D7、1C11 3E5、6F10 3H6 和 2B8 4G5 等定株为 IgG1 亚型, 2B4 2D2 定株为 IgG2b 亚型, 3B9 3F8 和 5F8 4A7 定株为 IgG2a 亚型。选取 3B10 1C1 与 1C11 3E5 定株的细胞培养上清原液, 以及空白 SP2/0 培养上清原液、无关杂交瘤细胞株的培养上清原液对抗原重组蛋白进行 Western-blot 验证, 其中, 3B10 1C1 和 1C11 3E5 杂交瘤细胞培养上清均与抗原重组蛋白结合, 其蛋白条带与目的蛋白大小相同 (图 6)。由上结果, 选择 3B10 1C1 杂交瘤细胞定株扩大培养以及后续腹水制备试验。

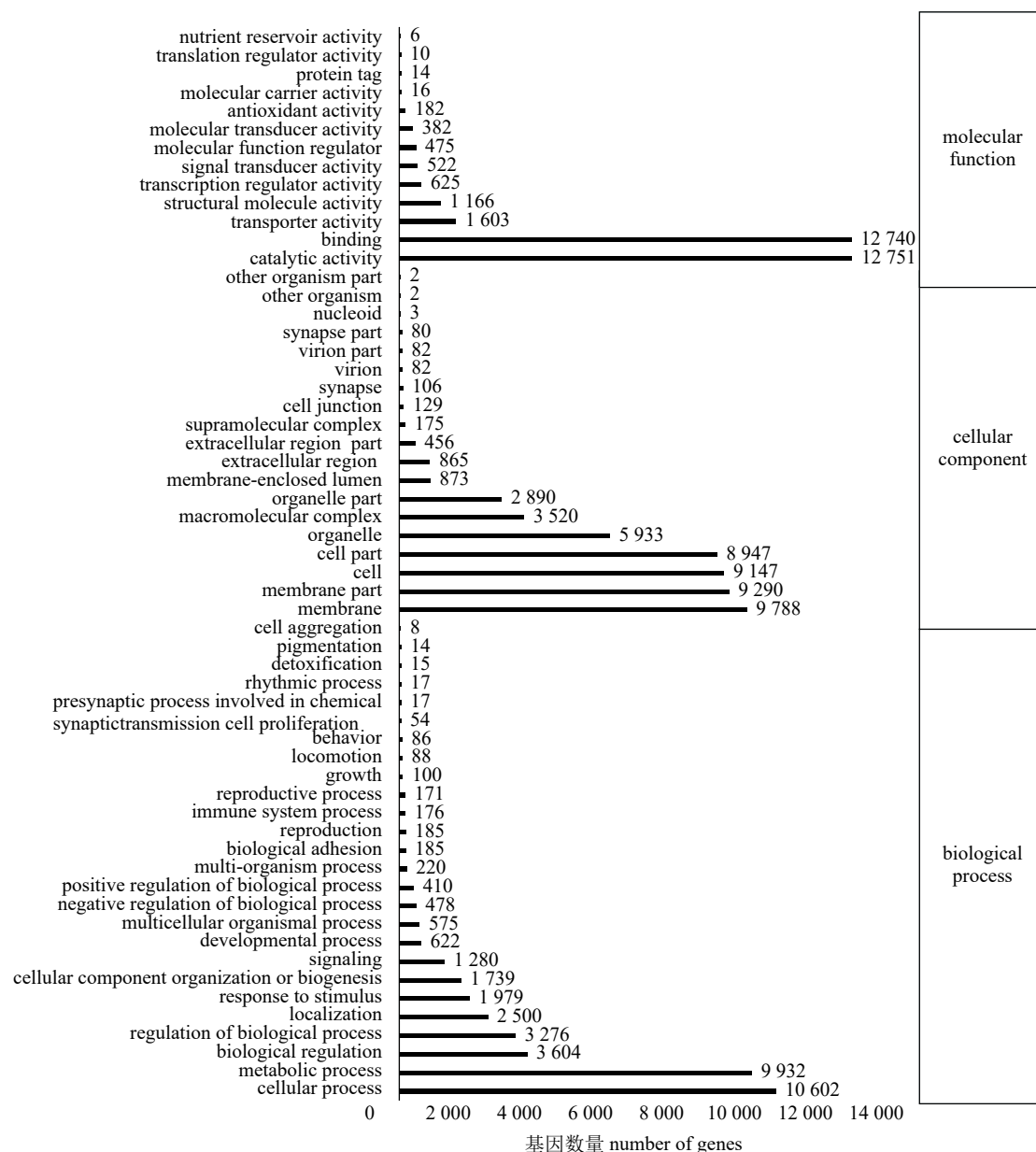


图 3 GO 功能注释信息分布图

Fig. 3 GO function annotation information distribution diagram

2.7 腹水纯化及抗体效价检测

对腹水纯化后获得 3B10 1C1 抗体, 通过 SDS 质控检测, 其质量浓度约为 7.5 mg/mL, 纯度 90%, 经效价检测结果显示具有较高亲和力 (图 7), 证明抗体制备成功。

2.8 白蜡虫雌雄虫中蛋白表达分析

选取 3B10 1C1 杂交瘤细胞以及 GAPDH 内参抗体分别与白蜡虫定杆雌虫和雄虫内源蛋白进行 Western-blot 验证, 其中, 3B10 1C1 杂交瘤细胞定株的培养上清与雌虫、雄虫内源蛋白都有结合, 且雄虫偏多, 而内参抗体未与雌虫或雄虫蛋

白有结合 (图 8), 同时说明 FAR3 的抗体制备成功。

3 讨论

与二代测序相比, 依靠 PacBio 平台进行的三代转录组测序, 获得片段长, 转录本大部分可以被测通, 经分析可以直接获得全长转录本, 能更全面地了解基因转录情况, 方便进行基因功能研究。由于蛋白表达是在基因转录之后, 在白蜡虫泌蜡初期白蜡合成的基因已经大量转录。所以本次转录组测序对象为白蜡虫泌蜡初期的二龄雄虫, 在测序技术上选用了 PacBio 平台进行三代全

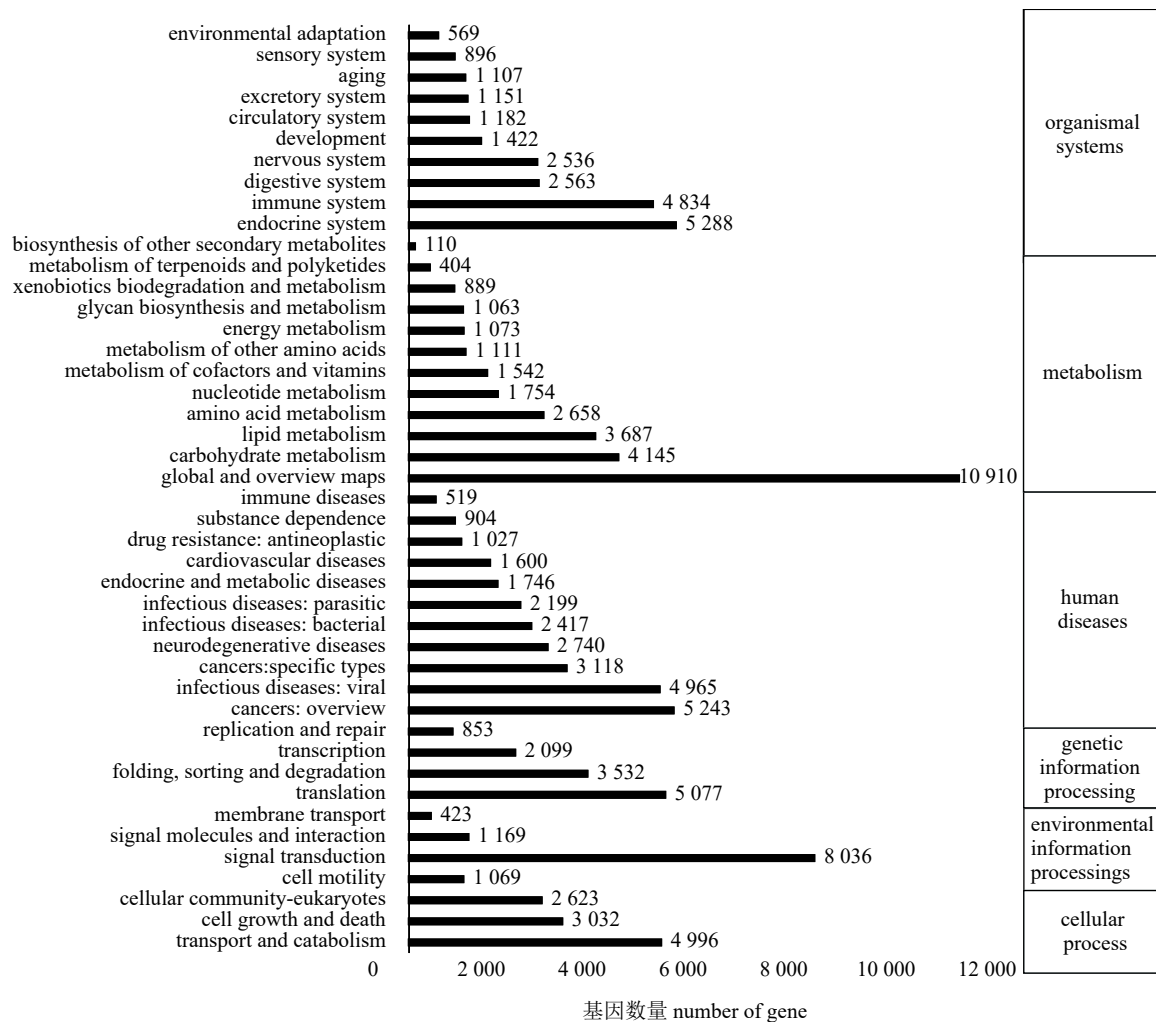


图 4 KEGG 功能注释信息分布图

Fig. 4 KEGG function annotation information distribution diagram

转录组测序, 获得更多的全长, 有利于基因的统计和表达动态分析。在本次转录组测序中获得去冗余后的 Isoform 131 414 条, 平均长度为 1 817 bp, N50 为 2 020 bp, 说明本次转录组数据获得良好, 并可进行功能基因的筛选。

far 基因在生物体内普遍存在, 但参与的生理功能不同。拟南芥已鉴定的 8 个基因中 *far3* 参与根茎叶角质层蜡的形成, *far1*、*far4* 和 *far5* 则在根内皮细胞中参与软木脂的合成^[21,23]。在希蒙得木 (*Simmondsia chinensis*) 中主要鉴定到参与希蒙得木油的合成的 *far*^[25]; 而家蚕 (*Bombyx mori*)、欧洲玉米螟 (*Ostrinia nubilalis*) 以及意大利蜜蜂 (*Apis mellifera*) 等昆虫中鉴定到的 *far* 参与信息素的合成^[26-28]。在昆虫中, FAR 的研究主要集中在性信息素合成方面^[26-29], 而昆虫蜡酯合成的 FAR 基因相关信息较少。实验室在前期转录组分析发

现在白蜡虫中多达 40 多种 *far*, 筛选获得有 5 种 *far* 极可能参与白蜡的分泌。本研究以经济昆虫白蜡虫泌蜡初期雄虫为研究对象, 通过三代全长转录组测序共获得 81 个白蜡虫 *far* 基因, 远远高于二代测序的泌蜡高峰期的转录组获得的 *far* 基因。经筛选发现有 6 个基因的表达谱与白蜡虫泌蜡较为一致, 其中 1 个 *far* 基因与前期筛选的 *far3* 基因片段重叠部分序列一致, 分析认为该基因可能是白蜡虫泌蜡的关键酶基因之一, 因此, 将全长转录组中该 *far* 基因名为 *far3*, 并对其功能特点进行初步探索。

far 生理功能与其在物种中的表达部位密切相关。如对家禽 2 种 *far* 在不同组织中的表达量进行荧光定量 PCR 分析, 结果显示在尾脂腺中 *far1* 表达最高, 在大脑组织中 *far2* 表达量最高^[30]。另通过免疫荧光技术确定了果蝇 (*Drosophila*

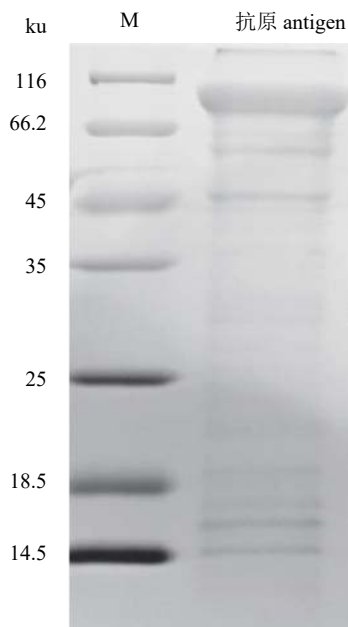
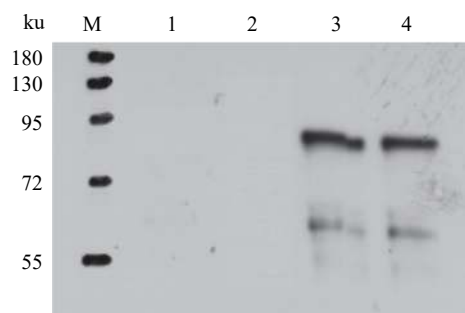


图 5 抗原纯化 SDS 质控结果

Fig. 5 SDS quality control results of antigen purification



注: M 为 Marker; 泳道 1. 无关杂交瘤细胞株培养上清原液; 泳道 2. SP2/0 培养上清原液; 泳道 3. 杂交瘤细胞培养上清 1C11 3E5 原液; 泳道 4. 杂交瘤细胞培养上清 3B10 1C1 原液。

Note: M was Marker; Lane 1. supernatant solution for culture of unrelated hybridoma cell lines; Lane 2. SP2/0 culture supernatant solution; Lane 3. supernatant 1C11 3E5 concentrate of hybridoma cell culture; Lane 4. hybridoma cell culture supernatant 3B10 1C1 concentrate.

图 6 杂交瘤细胞株培养上清 Western-blot 验证抗原重组蛋白结果

Fig. 6 Western-blot validation of recombinant antigen protein with supernatant of hybridoma cell line

melanogaster) Waterproof 基因表达的 *far* 定位于胚胎气管部位, 其表达时期伴随了整个气管发育过程^[31]。一般采用荧光定量 PCR 方式对基因表达情况进行分析, 但基因表达可能与蛋白表达不是同步的, 不能直接反映蛋白的表达情况, 通过抗体则可以直接分析蛋白的表达情况。此外, 比较多克隆抗体而言, 单抗具有更强的特异性。因此, 本研究利用原核表达的蛋白为抗原免疫小鼠制备 *far3* 的抗体, 通过抗体特异性的免疫结合分

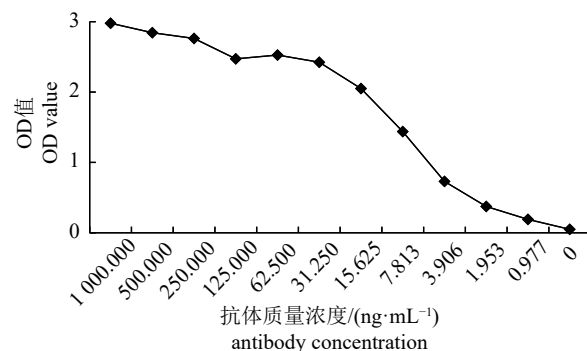
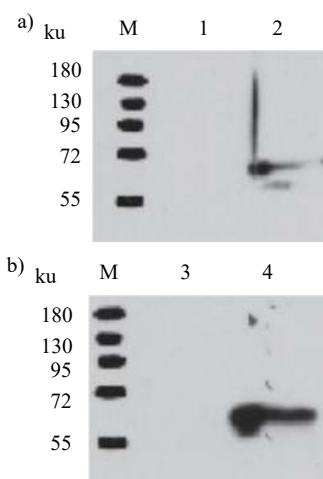


图 7 间接 ELISA 法检测抗体效价

Fig. 7 Detection of antibody titer by indirect ELISA



注: M 为 Marker; 泳道 1、3 一抗为 GAPDH 内参抗体; 泳道 2、4 一抗为杂交瘤细胞培养上清 3B10 1C1 原液。

Note: M was Marker; Lane 1 and 3 were endogenous reference antibodies of GAPDH; Lane 2 and 4 were endogenous protein of 3B10 1C1 in supernatant of hybridoma cell culture.

图 8 杂交瘤细胞株培养上清 Western-blot 验证雌 (a) 雄 (b) 虫内源蛋白结果

Fig. 8 Western-blot analysis of hybridoma cell lines was performed to the results of endogenous proteins in female (a) and male (b)

析白蜡虫定杆时期雌虫和雄虫的 *far3* 的表达情况, 该结果显示: 雌虫中 FAR3 表达较少, 雄虫中 FAR3 大量表达, FAR3 的蛋白表达与白蜡虫泌蜡特点一致。单克隆抗体的成功制备以及虫体内源蛋白的表达分析确定 FAR3 在虫体内表达, 为进一步免疫荧光明确 FAR3 的组织表达部位奠定了基础。

本研究通过对泌蜡初期的白蜡虫二龄雄虫进行三代全长转录组测序获得了与白蜡虫泌蜡相关的 *far3* 基因, 确定 FAR3 在二龄雄虫分泌白蜡期高量表达, 这为白蜡虫其他 *far* 基因功能研究以及探索白蜡虫泌蜡分子机理奠定了基础, 也为其

他昆虫的类似研究提供了一定的参考价值。

[参考文献]

- [1] 吴次彬. 白蜡虫及白蜡生产[M]. 北京: 中国林业出版社, 1989.
- [2] 龙村倪. 中国白蜡虫的养殖及白蜡的西传[J]. 中国农史, 2004, 23(4): 18. DOI: [10.3969/j.issn.1000-4459.2004.04.003](#).
- [3] 何晨柳, 孔任秋, 胡晗华. 产蜡酯聚球藻 PCC7002 的构建[J]. 水生生物学报, 2010, 34(6): 1202. DOI: [10.3724/SP.J.1035.2010.01202](#).
- [4] 陈晓鸣. 白蜡虫自然种群生态学[M]. 北京: 科学出版社, 2011.
- [5] 杨璞, 徐冬丽, 陈晓鸣, 等. 蜡酯合成途径及关键酶的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2012, 34(7): 695.
- [6] YANG P, CHEN X M, LIU W W, et al. Transcriptome analysis of sexually dimorphic Chinese white wax scale insects reveals key differences in developmental programs and transcription factor expression[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 8141. DOI: [10.1038/srep08141](#).
- [7] YU S H, YANG P, SUN T, et al. Identification and evaluation of reference genes in the Chinese white wax scale insect *Ericerus pela*[J]. Springerplus, 2016, 5(1): 791. DOI: [10.1186/s40064-016-2548-z](#).
- [8] 陈晓鸣, 冯颖. 资源昆虫学概论[M]. 北京: 科学出版社, 2009.
- [9] STÖVEKEN T, KALSCHUEER R, MALKUS U, et al. The wax ester synthase/acyl coenzyme A: diacylglycerol acyl transferase from *Acinetobacter* sp. Strain ADP1: characterization of a novel type of acyl transferase[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(4): 1369. DOI: [10.1128/JB.187.4.1369-1376.2005](#).
- [10] YANG P, ZHU J Y, GONG Z J, et al. Transcriptome analysis of the Chinese white wax scale *Ericerus pela* with focus on genes involved in wax biosynthesis[J]. PLoS One, 2012, 7(4): e35719. DOI: [10.1371/journal.pone.0035719](#).
- [11] 谢映平, 薛皎亮, 郑乐怡. 蛭科昆虫的蜡分泌物超微结构和化学成分[M]. 北京: 中国林业出版社, 2006.
- [12] LARDIZABAL K D, METZ J G, SAKAMOTO T, et al. Purification of a jojoba embryo wax synthase, cloning of its cDNA, and production of high levels of wax in seeds of transgenic *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2000, 122(3): 645. DOI: [10.1104/pp.122.3.645](#).
- [13] METZ J G, POLLARD M R, ANDERSON L, et al. Purification of a jojoba embryo fatty acyl-coenzyme A reductase and expression of its cDNA in high erucic acid rapeseed[J]. Plant Physiology, 2000, 122(3): 635. DOI: [10.2307/4279138](#).
- [14] CHENG J B, RUSSELL D W. Mammalian wax biosynthesis. I. Identification of two fatty acyl-coenzyme A reductases with different substrate specificities and tissue distributions[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(36): 37789. DOI: [10.1074/jbc.M406225200](#).
- [15] SUN W, YOU X, GOGOL-DÖRING A, et al. Ultra-deep profiling of alternatively spliced *Drosophila dscam* isoforms by circularization-assisted multi-segment sequencing[J]. The EMBO Journal, 2013, 32(14): 2029. DOI: [10.1038/emboj.2013.144](#).
- [16] SHARON D, TILGNER H, GRUBERT F, et al. A single-molecule long-read survey of the human transcriptome[J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(11): 1009. DOI: [10.1038/nbt.2705](#).
- [17] ZHANG W, CICLITIRA P, MESSING J. PacBio sequencing of gene families—a case study with wheat gluten genes[J]. Gene, 2014, 533(2): 541. DOI: [10.1016/j.gene.2013.10.009](#).
- [18] TILGNER H, GRUBERT F, SHARON D, et al. Defining a personal, allele-specific, and single-molecule long-read transcriptome[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(27): 9869. DOI: [10.1073/pnas.1400447111](#).
- [19] THOMAS S, UNDERWOOD J G, TSENG E, et al. Long-read sequencing of chicken transcripts and identification of new transcript isoforms[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e94650. DOI: [10.1371/journal.pone.0094650](#).
- [20] XU Z, PETERS R J, WEIRATHER J, et al. Full-length transcriptome sequences and splice variants obtained by a combination of sequencing platforms applied to different root tissues of *Salvia miltiorrhiza* and tanshinone biosynthesis[J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2015, 82(6): 951. DOI: [10.1111/tpj.12865](#).
- [21] ROWLAND O, ZHENG H Q, HEPWORTH S R, et al. *CER4* encodes an alcohol-forming fatty acyl-coenzyme A reductase involved in cuticular wax production in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2006, 142(3): 866. DOI: [10.1104/pp.106.086785](#).
- [22] LI F L, WU X M, LAM P, et al. Identification of the wax ester synthase/acyl-coenzyme A: diacylglycerol acyl-transferase WSD1 required for stem wax ester biosynthesis in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2008, 148(1): 97. DOI: [10.1104/pp.108.123471](#).
- [23] DOMERGUE F, VISHWANATH S J, JOUBÈS J, et al. Three *Arabidopsis* fatty acyl-coenzyme A reductases, FAR1, FAR4, and FAR5, generate primary fatty alcohols associated with suberin deposition[J]. Plant Physiology, 2010, 153(4): 1539. DOI: [10.1104/pp.110.158238](#).
- [24] 赵遵岭, 王雪庆, 杨璞. 白蜡虫 *far3* 基因 cDNA 全长克隆、原核表达和酶活分析[J]. 四川动物, 2019, 38(2): 149. DOI: [10.11984/j.issn.1000-7083.20180328](#).
- [25] KALSCHUEER R, STÖVEKEN T, LUFTMANN H, et al. Neutral lipid biosynthesis in engineered *Escherichia coli*: jojoba oil-like wax esters and fatty acid butyl esters[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(2): 1373. DOI: [10.1128/AEM.72.2.1373-1379.2006](#).
- [26] MOTO K, YOSHIGA T, YAMAMOTO M, et al. Pheromone gland-specific fatty-acyl reductase of the silkworm, *Bombyx mori*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,

- 2003, 100(16): 9156. DOI: [10.1073/pnas.1531993100](https://doi.org/10.1073/pnas.1531993100).
- [27] ANTONY B, FUJII T, MOTO K, et al. Pheromone-gland-specific fatty-acyl reductase in the adzuki bean borer, *Ostrinia scapularis* (Lepidoptera: Crambidae)[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2009, 39(2): 90. DOI: [10.1016/j.ibmb.2008.10.008](https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2008.10.008).
- [28] TEERAWANICHPAN P, ROBERTSON A J, QIU X. A fatty acyl-CoA reductase highly expressed in the head of honey bee (*Apis mellifera*) involves biosynthesis of a wide range of aliphatic fatty alcohols[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2010, 40(9): 641. DOI: [10.1016/j.ibmb.2010.06.004](https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.06.004).
- [29] LIÉNARD M A, HAGSTRÖM A K, LASSANCE J M, et al. Evolution of multicomponent pheromone signals in small ermine moths involves a single fatty-acyl reductase gene[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(24): 10955. DOI: [10.1073/pnas.1000823107](https://doi.org/10.1073/pnas.1000823107).
- [30] HELLENBRAND J, BIESTER E M, GRUBER J, et al. Fatty acyl-CoA reductases of birds[J]. BMC Biochemistry, 2011, 12: 64. DOI: [10.1186/1471-2091-12-64](https://doi.org/10.1186/1471-2091-12-64).
- [31] MARTIN H. J. J, RALF P, DIETMAR R, et al. The fatty acyl-CoA reductase waterproof mediates airway clearance in *Drosophila*[J]. Developmental Biology, 2014, 385(1): 23. DOI: [10.1016/j.ydbio.2013.10.022](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.10.022).

责任编辑: 何承刚