



# 双叉犀金龟表皮蛋白 TdCPR12611 与 TdCPR7854 的表达纯化及特性分析

叶长青, 包 涵, 刘 田, 杨 青\*

(大连理工大学生物工程学院, 辽宁大连 116024)

**摘要:**【目的】探析双叉犀金龟 *Trypoxylus dichotomus* 表皮蛋白的序列特征及生化性质。【方法】利用 RT-PCR 克隆双叉犀金龟表皮蛋白基因, 利用生物信息学方法分析表皮蛋白的结构特征及系统发育; 采用大肠杆菌 *Escherichia coli* 表达系统对双叉犀金龟表皮蛋白进行重组表达, 并通过金属离子螯合层析的方法对重组蛋白进行纯化; 采用体外结合实验检测双叉犀金龟表皮蛋白与  $\alpha$ -几丁质 ( $\alpha$ -chitin)、 $\beta$ -几丁质 ( $\beta$ -chitin)、壳聚糖 (chitosan) 和胶体几丁质 (colloidal chitin) 的结合能力; 观察确定蛋白液液相分离 (liquid-liquid phase separation, LLPS) 性质。【结果】克隆获得双叉犀金龟表皮蛋白基因 TdCPR12611 (GenBank 登录号: MT813021) 和 TdCPR7854 (GenBank 登录号: MT813022)。系统进化分析结果表明, TdCPR12611 与食粪金龟 *Onthophagus taurus* OtCP-1 的亲缘关系最近; TdCPR7854 与食粪金龟的 OtCP-acp20-1, OtCP-acp20-2 和 OtCP-acp20-3 的亲缘关系最为接近, 它们均属于 CPR\_RR-2 家族。原核表达和纯化获得重组表皮蛋白 TdCPR12611 和 TdCPR7854。两重组表皮蛋白与 4 种类型的几丁质具有不同结合能力, 其中有 41.4% 的 TdCPR12611 与壳聚糖结合, 而有 62.3% 的 TdCPR7854 与  $\beta$ -几丁质结合。TdCPR12611 具有内部较为无序的结构, 并能够在室温条件下自发团聚形成液液相分离现象, 而 TdCPR7854 不能。【结论】本研究测定分析了双叉犀金龟 CPR\_RR-2 家族表皮蛋白 TdCPR12611 与 TdCPR7854 的序列特征和与几丁质的结合特性。研究结果有利于加深人们对于昆虫表皮装配机制的了解, 为蛋白仿生材料开发提供思路。

**关键词:** 双叉犀金龟; 表皮蛋白; CPR 蛋白; RR-2 家族; 几丁质结合; 液液相分离; 仿生材料

**中图分类号:** Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2021)01-0019-11

## Expression, purification and characterization of the cuticular proteins TdCPR12611 and TdCPR7854 from *Trypoxylus dichotomus* (Coleoptera: Scarabaeidae)

YE Chang-Qing, BAO Han, LIU Tian, YANG Qing\* (School of Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian, Liaoning 116024, China)

**Abstract:** 【Aim】To explore the sequence characteristics and biochemical properties of cuticular proteins from *Trypoxylus dichotomus*. 【Methods】RT-PCR was used to clone cuticular protein genes of *T. dichotomus*, and the structural features and phylogeny of cuticular proteins were analyzed by bioinformatics methods. Recombinant cuticular proteins of *T. dichotomus* were expressed in *Escherichia coli* expression system, and purified by metal-chelating affinity chromatography. *In vitro* binding experiments were performed to detect the binding ability of cuticular proteins of *T. dichotomus* with

chitins including  $\alpha$ -chitin,  $\beta$ -chitin, chitosan and colloidal chitin. Liquid-liquid phase separation (LLPS) was observed and determined. 【Results】 Two cuticular protein genes *TdCPR12611* (GenBank accession no. : MT813021) and *TdCPR7854* (GenBank accession no. : MT813022) of *T. dichotomus* were cloned and obtained. Phylogenetic analysis results showed that *TdCPR12611* is closely related to *OtCP-1* from *Onthophagus taurus*, while *TdCPR7854* is closely related to *OtCP-acp20-1*, *OtCP-acp20-2*, and *OtCP-acp20-3* from *O. taurus*, all of which belong to the CPR\_RR-2 family. Recombinant *TdCPR12611* and *TdCPR7854* proteins were expressed by prokaryotic expression and purified. The two recombinant proteins had different binding abilities with four types of chitins, among which 41.4% of *TdCPR12611* could bind with chitosan, while 62.3% of *TdCPR7854* could bind with  $\beta$ -chitin. *TdCPR12611* was predicted to have a relatively disordered structure and could spontaneously coacervate at room temperature to form liquid-liquid phase separation, while *TdCPR7854* could not. 【Conclusion】 In this study we assayed and analyzed the sequence characteristics and chitin binding properties of two RR-2 cuticular proteins, *TdCPR7854* and *TdCPR12611* of *T. dichotomus*. The results not only deepen our understanding of insect cuticle assembly mechanism, but also provide ideas for the development of protein biomimetic materials.

**Key words:** *Trypoxylus dichotomus*; cuticular protein; CPR protein; RR-2 family; chitin binding; liquid-liquid phase separation; bionic material

仿生材料是材料学的重要研究方向,生物体各具特色的表面结构对于仿生材料的设计具有重要的借鉴意义。其中昆虫表皮凭借高强度、轻量型的特性,一直是仿生材料研究的热点。陈斌等(2000)通过研究蝉的表皮结构,设计出具有高强度高韧性的复合材料;Vincent 和 Wegst (2004)对昆虫表皮的硬度强度进行研究,提出了仿昆虫表皮的纤维复合材料设计方案。仿生表皮的研发应用为人造材料的性能优化提供重要的启示和指导。

昆虫表皮(外骨骼)对于其维持运动能力、对抗外部环境压力、抵御机械损伤以及免疫病原微生物侵害等方面具有至关重要的作用(Vincent and Wegst, 2004; Webster *et al.*, 2017; Deshoux *et al.*, 2018)。昆虫表皮是由上皮细胞分泌沉积而来,它覆盖虫体表面的组织器官,维持虫体的完整性(梁欣等, 2014),主要由几丁质以及多种类型的表皮蛋白组成。几丁质是 N-乙酰氨基葡萄糖聚合物,可以分为晶态几丁质、非晶态几丁质和脱乙酰几丁质(壳聚糖)等多种形式(Fukamizo and Kramer, 1985)。晶态几丁质根据其糖链排列方式的差异又可分为 $\alpha$ -几丁质(反平行)和 $\beta$ -几丁质(平行)等,非晶态几丁质是破坏晶体结构的胶体几丁质;晶态和非晶态几丁质都不溶于水。昆虫表皮蛋白种类繁多,目前主要被分为 12 个家族(Jasrapuria *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2015; Vannini *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2016; Cinege *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018),其中 CPR

(cuticular proteins that contain the R&R consensus)蛋白是所有表皮蛋白中含量最为丰富的家族(Liu *et al.*, 2018)。CPR 家族成员都含有较为保守的 R&R 基序,被认为与几丁质结合相关。根据 R&R 基序的差异,CPR 家族又被分为 3 个亚族,分别为 RR-1(主要分布于柔软表皮中)、RR-2(主要分布于坚硬表皮中)以及 RR-3(含量较少)(Andersen, 1998)。已有研究表明,CPR 家族表皮蛋白对于维持表皮完整性以及刚性韧性等方面具有关键作用(Arakane *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2019)。另外,种类丰富的 CPR 家族成员与不同类型的几丁质具有相互作用(Rebers and Willis, 2001; Togawa *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2010)。

双叉犀金龟 *Trypoxylus dichotomu* 的头部角突是由其表皮特化而来,它是一种天然的防御攻击武器,不仅能够产生强力的机械攻击,也能够将自身以及大脑承受的伤害降至最低,具有显著的抗断裂韧性和抗形变刚性。Lee 等(2017)利用聚焦离子束原位操作和测试的方法对双叉犀金龟头角突的机械性能进行研究,结果表明其头部角突具有很高的弹性模量及抗断裂拉伸强度。Zhang 等(2019)利用扫描电镜观察双叉犀金龟头角突发现其角质层是由高度有序的几丁质纳米纤维束排布构成,纤维束能够排列成环向层,层与层之间通过纤维涂层相互连接,相邻层之间旋转堆叠形成典型的胶合板结构,这种构造为头角突的刚性和韧性提供支撑;X 射线

能量色散光谱 (energy dispersive X-ray spectrum, EDS) 表明角中的蛋白由内向外逐渐富集并呈梯度变化, 且几丁质纳米纤维的取向也逐渐由环向往径向改变, 蛋白阶梯式变化与几丁质纳米纤维的重新定向进一步增强了角的刚韧程度; 此外, 拉曼光谱表明角的主要成分是几丁质和蛋白质。

因此, 本研究选择两个存在于双叉犀金龟头角突中的表皮蛋白作为研究对象, 首先克隆了编码两个表皮蛋白 TdCPR12611 和 TdCPR7854 的基因; 然后通过原核表达及金属离子亲和层析纯化的方法获得了两个目的蛋白, 并对其序列特征进行生物信息学分析; 对两个目的蛋白与不同类型几丁质结合能力的进行了检测; 观察比较两个目的蛋白形成液相分离性质的差异; 结合生物信息学分析结果对两个目的蛋白性质差异的原因进行了探讨, 旨在通过研究加深对昆虫表皮形成机制的了解, 为开发优质的仿生表皮材料提供思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

大肠杆菌 *Escherichia coli* 基因克隆菌株 DH5 $\alpha$  和蛋白表达菌株 BL21 (DE3)、PrimeSTAR<sup>®</sup> HS (Premix) 高保真酶、Premix Taq<sup>™</sup> (Ex Taq<sup>™</sup> Version 2.0)、Mighty TA-cloning Kit、RNAiso Plus RNA 提取试剂盒、PrimeScript<sup>™</sup> RT Reagent Kit 反转录试剂盒、限制性核酸内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I 以及 In-Fusion 连接酶购自 TaKaRa 公司; pET28a 质粒载体为实验室保存; 其他未标明试剂均为国产分析纯。

### 1.2 表皮蛋白基因克隆和测序验证

基于实验室早期通过对双叉犀金龟蛹末期的头部角突组织蛋白组与转录组测序数据, 将获得的氨基酸及核酸序列信息通过 Blast 及 CutProtFam-Pred 进行序列比对并分类, 筛选出两个属于 CPR\_RR-2 家族的表皮蛋白 TdCPR12611 和 TdCPR7854。利用 RNAiso Plus 试剂盒提取双叉犀金龟预蛹期头壳组织总 RNA, 利用 PrimeScript<sup>™</sup> RT Reagent Kit 反转录试剂盒合成 cDNA, 引物序列见表 1, PCR 反应体系 (50  $\mu$ L): cDNA 模板 1  $\mu$ L, Premix Taq<sup>™</sup> (2  $\times$ ) 25  $\mu$ L, T-12611/7854-F 和 T-12611/7854-R (10  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 22  $\mu$ L。反应条件: 98 $^{\circ}$ C 10 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 4 $^{\circ}$ C 保存。将 PCR 扩增产物连接到克隆载体 T-vector 上, 通过测序验证扩增片段的正确性。通过信号肽预测确定信号肽编码序列的分割点位置, 以 T-vector 为模板, 根据信号肽之后的片段设计连接引物 (表 1), 同时在序列两端引入 20 bp 左右的与表达载体序列一致的同源区域, 并在两端引入限制性内切酶的酶切位点, 在预测蛋白序列 N 末端加入 6  $\times$  His Tag, PCR 反应体系 (50  $\mu$ L): T-vector 模板 1  $\mu$ L, PrimeSTAR HS (2  $\times$ ) 25  $\mu$ L, pET28a-12611/7854-F 和 pET28a-12611/7854-R (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L。反应条件: 98 $^{\circ}$ C 10 s, 55 $^{\circ}$ C 5 s, 72 $^{\circ}$ C 5 s, 35 个循环; 4 $^{\circ}$ C 保存。利用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I 对表达体质粒 pET28a 进行双酶切, 通过 In-Fusion 同源重组的方法将携带目的基因的片段与切割好的载体连接成完整的表达质粒 pET28a-TdCPR12611 及 pET28a-TdCPR7854, 并进行测序验证。

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

引物 Primers	引物序列 (5' - 3') Primer sequences	用途 Purpose
T-12611-F	ATGATTACTAGTTGTGCTGTAGCGCT	
T-12611-R	TTATTGGTACTGGTAAATCACATTTCCTTTGG	基因克隆
T-7854-F	ATGTTCATCAAAGTCATCTTCATCACTTTC	Gene cloning
T-7854-R	TTACCATCCATGTCCCAACAGG	
pET28a-7854-F	ATCATCATCATATATGGGATTGGCAGATGTGCAAATTGGAGCC	
pET28a-7854-R	GGTGGTGGTCTCGAGTTACCATCCATGTCCCAACAGGCC	表达载体构建
pET28a-12611-F	ATCATCATCATATATGGCACCAGTAGAATCGGGCTTT	Construction of expression vector
pET28a-12611-R	GGTGGTGGTCTCGAGTTAAAATTGTATATTGTGCCCTCTGAGGAACGC	

### 1.3 TdCPR12611 及 TdCPR7854 蛋白的结构特征及系统发育分析

利用表皮蛋白序列在线分析软件 CutProtFam-Pred (<http://aias.biol.uoa.gr/CutProtFam-Pred/search.php>) 对双叉犀金龟表皮蛋白进行分类表征;

利用 SignalP-5.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行信号肽预测; 利用 ExPASy 数据库 (<https://web.expasy.org/protscale/>) 进行亲疏水性预测分析; 利用 PLAAC (<http://plaac.wi.mit.edu/>) 进行蛋白的内部无序性 (intrinsic disorder) 预

测;利用 CIDER (<http://pappulab.wustl.edu/CIDER/>)进行蛋白带电荷数分析,并对蛋白的每个残基的净电荷数(net charge per residue, NCFR)和带电残基分数(fraction of charged residues, FCR)进行计算。利用 BLAST(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)在线搜索工具将 TdCPR12611 和 TdCPR7854 氨基酸序列与 GenBank 数据库中的蛋白的序列进行比对,筛选出与之序列一致性最高的蛋白;利用 MEGA7 软件采用邻接(neighbor-joining)法对 47 种昆虫表皮蛋白进行系统进化树分析(500 次重复)。

#### 1.4 TdCPR12611 及 TdCPR7854 的原核表达及分离纯化

将测序验证无误后的表达质粒 pET28a-TdCPR12611 及 pET28a-TdCPR7854 转化入大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3),菌株活化后扩大培养到对数生长期  $OD_{600} = 0.5 \sim 0.6$ ,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG,37℃ 诱导 5 h 后离心收集细菌。加缓冲液(20 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl, pH 7.4)重悬后,利用高压匀浆破碎仪破碎细菌,离心去除细胞碎片沉淀,上清过镍离子亲和层析柱;用 AKTA 蛋白纯化仪对表达蛋白 TdCPR12611 进行洗涤(20 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl, 100 mmol/L 咪唑, pH 7.4)和洗脱(20 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl, 200 mmol/L 咪唑, pH 7.4),对表达蛋白 TdCPR7854 蛋白进行洗涤(20 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl, 100 mmol/L 咪唑, pH 7.4)和洗脱(20 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl, 250 mmol/L 咪唑, pH 7.4);最后用 SDS-PAGE 检测蛋白纯化的结果,并用 Western blot 进行验证。

#### 1.5 TdCPR12611 及 TdCPR7854 蛋白与几丁质结合实验

采用将蛋白与不同类型的几丁质混合结合并洗脱的方法(张薇薇等,2017),选择  $\alpha$ -几丁质( $\alpha$ -chitin)、 $\beta$ -几丁质( $\beta$ -chitin)、壳聚糖(chitosan)和胶体几丁质(colloidal chitin)4 种类型的几丁质与重组表达的表皮蛋白进行体外结合实验。具体实验操作如下:将纯化后的重组表达蛋白透析到结合缓冲液(20 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl, 100 mmol/L 咪唑, pH 7.4)中。构建 200  $\mu$ L 反应体系,使蛋白终浓度为 0.5 mg/mL,几丁质终浓度为 2 mg/mL。反应在室温(25℃)进行,两种蛋白与不同类型几丁质在 2 mL 离心管中持续颠倒混匀 2 h。反应结束后,12 000 r/min 离心 10 min,将上清取出记为未结合

几丁质的蛋白。在沉淀中加入相当于反应体系 5 倍体积的漂洗缓冲液(20 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl, 100 mmol/L 咪唑, pH 7.4),将沉淀重悬并颠倒混匀 5 min 进行漂洗后 12 000 r/min 离心 5 min 弃上清,重复漂洗 3 次。最后将沉淀放入烘箱中彻底干燥,加入 200  $\mu$ L 的结合缓冲液后对沉淀进行重悬,取同样体积的上清和沉淀重悬液进行 SDS-PAGE,检测蛋白与不同类型几丁质的结合情况。利用 Image J 灰度分析软件将 SDS-PAGE 结果进行灰度扫描量化,将用于结合实验的蛋白条带灰度值作为背景,进行反应体系上清液及沉淀重悬液蛋白条带相对灰度计算,用相对灰度值代表结合几丁质的蛋白占总蛋白的百分比,以此表征蛋白与几丁质的结合能力。利用 SPSS 22.0 对结合几丁质蛋白条带的灰度数据进行单因素方差分析及差异显著性分析(LSD 法)。

#### 1.6 TdCPR12611 及 TdCPR7854 蛋白液液的相分离性质观察

在对两蛋白分离纯化的过程中,发现 TdCPR12611 蛋白在浓度约为 15 mg/mL,缓冲液为 20 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl, pH 7.4 条件下,存在温度响应的液液相分离现象,而在相同条件下 TdCPR7854 不存在类似现象。将 TdCPR12611 蛋白溶液置于比色皿中,用肉眼观察在 4℃ 和 25℃ 下蛋白溶液产生液液相分离的宏观情况。用光学显微镜观察 400 倍(目镜 10 $\times$ ,物镜 40 $\times$ )放大倍数条件下 TdCPR12611 蛋白溶液形成相分离的微观情况。

## 2 结果

### 2.1 TdCPR12611 及 TdCPR7854 蛋白的结构特征

克隆获得双叉犀金龟表皮蛋白基因 TdCPR12611(GenBank 登录号: MT813021)和 TdCPR7854(GenBank 登录号: MT813022)序列。通过对 TdCPR12611 和 TdCPR7854 蛋白一级结构分析发现这两个蛋白具有许多相似点,它们均属于表皮蛋白 CPR 家族中 RR-2 亚族成员,其 N 端存在一段信号肽,为外泌型蛋白,且都存在一段与几丁质结合相关的结构域 R&R 基序(图 1)。但两者也存在许多差异,TdCPR12611 存在两段富含谷氨酰胺的区域(Q-rich region),蛋白中 Q 的含量很高,为 16.8%(52/309);而 TdCPR7854 则存在两段富含甘氨酸的区域(G-rich region),蛋白中 G 的含量很高,为 28.7%(52/181)。分析蛋白的疏水性发现,TdCPR12611 除了信号肽部分比较疏水外,该蛋白

整体为亲水性蛋白(图 1: A); TdCPR7854 的信号肽及第一段 G-rich region 较为疏水, 其余部分也为亲水性结构(图 1: B)。

分析蛋白的内部无序性发现, TdCPR12611 蛋白的信号肽部分以及 R&R motif 部分比较有序, 而

两段 Q-rich region 比较无序, 相对无序的部分可能对形成液液相分离做出贡献, 暗示该蛋白具有形成功能性结构的潜力。分析其每个氨基酸残基的带电荷数和带电残基分数可得, 两段 Q-rich region 几乎不带电荷, R&R motif 为正负电荷交替出现(图 2: A);

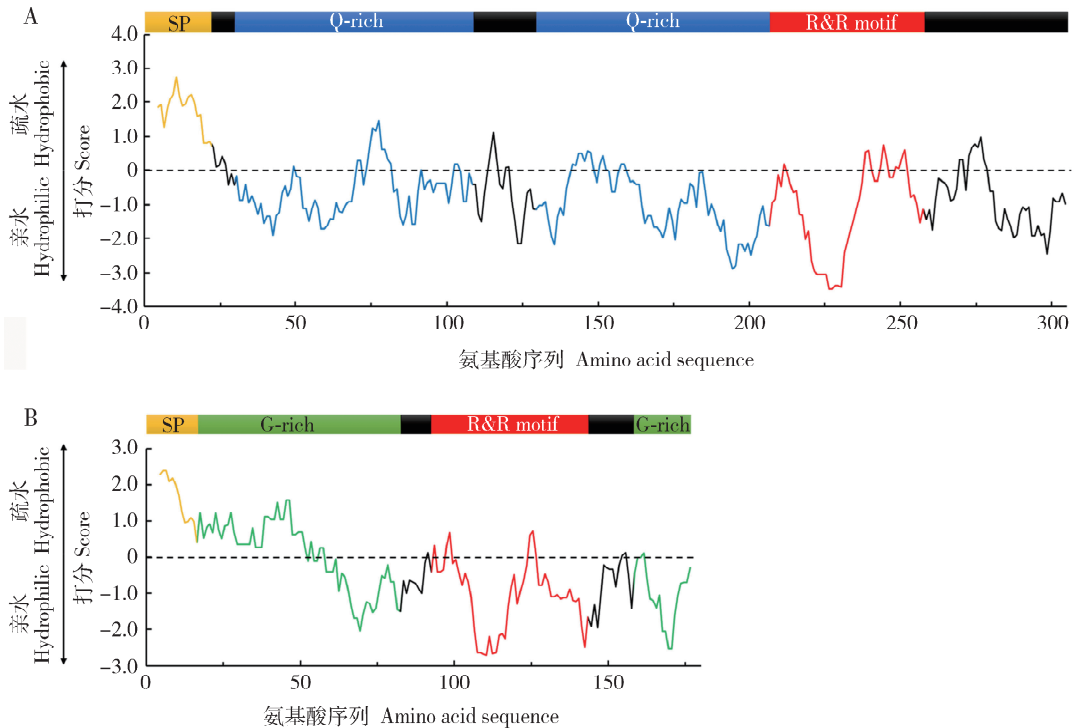


图 1 双叉犀金龟表皮蛋白 TdCPR12611 (A) 及 TdCPR7854 (B) 的结构组成及疏水性分析

Fig. 1 Structural composition and hydrophobicity analysis of the cuticular proteins TdCPR12611 (A) and TdCPR7854 (B) of *Trypoxylus dichotomus*

SP: 信号肽 Signal peptide; Q-rich: 富含谷氨酰胺的区域 Glutamine-rich region; R&R motif: 与几丁质结合相关的 R&R 基序 R&R domain associated with chitin-binding; G-rich: 富含甘氨酸的区域 Glycine-rich region. 图 2 同 The same for Fig. 2.

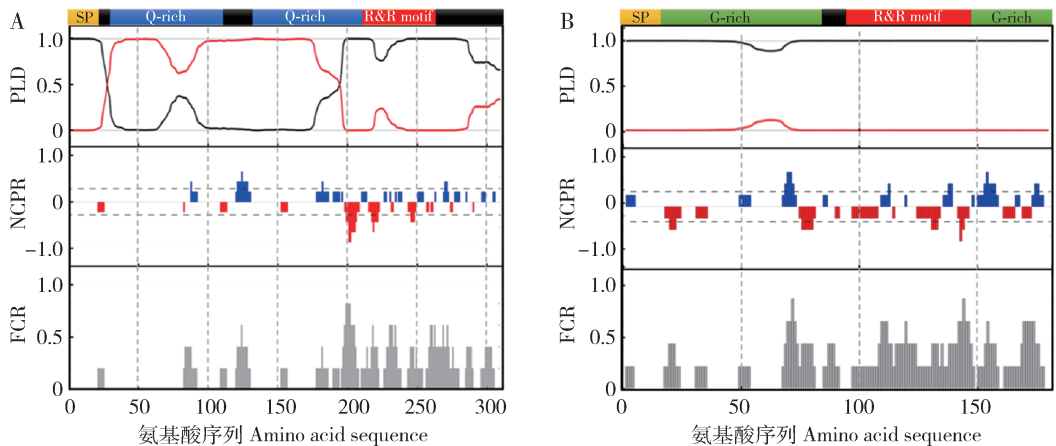


图 2 双叉犀金龟表皮蛋白 TdCPR12611 (A) 及 TdCPR7854 (B) 内部无序性分析

Fig. 2 Intrinsic disorder analysis of the cuticular proteins TdCPR12611 (A) and TdCPR7854 (B) of *Trypoxylus dichotomus*  
 PLD: 内部无序性预测值在 0.5 以上符合朊蛋白样结构, 为无序的结构, 红线为预测线, 黑线为背景线 Prediction of internal disorder, the predicted value above 0.5 conforms to prion protein-like structure, which is the disordered structure. The red line is the prediction line, and the black line is the background line. NCPR: 每个氨基酸残基的带电荷数分析, 其中蓝色为正电荷, 红色为负电荷 Net charge per residue, in which blue is positive charge and red is negative charge. FCR: 带电残基分数, 带电的氨基酸残基对于蛋白带电性的贡献比例 Charged residue fraction, the percentage of charged amino acid residues contributing to total protein charge.

而 TdCPR7854 蛋白整体都是较为有序的状态,且该蛋白整体为正负电荷交替出现状态(图 2: B)。推测静电相互作用可能是导致不同片段结构无序性差异的原因之一。

## 2.2 TdCPR12611 及 TdCPR7854 的系统发育分析

通过将 *TdCPR12611* (GenBank 登录号: MT813021) 和 *TdCPR7854* (GenBank 登录号: MT813022) 编码的氨基酸进行 BLAST 序列比对,结果表明: TdCPR12611 蛋白与食粪金龟 *Onthophagus taurus* cuticular protein 1 (GenBank 登录号: XP\_022920963.1)、光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis* cuticular protein 1 (GenBank 登录号: XP\_018577010.1)、北美萤火虫 *Photinus pyralis* cuticular protein ts15 (GenBank 登录号: XP\_031347513.1) 及边褐端黑萤 *Abcondita terminalis* cuticular protein hp65 (> KAF5297863.1) 的序列一致性较高,分别为 83%, 78%, 75% 和 75%; TdCPR7854 与食粪金龟 adult-specific cuticular protein ACP-20-like (GenBank 登录号: XP\_022914362.1) 和中欧山松大小蠹 *Dendroctonus ponderosae* adult-specific cuticular protein ACP-20-like (GenBank 登录号: XP\_019761647.1) 的序列一致性相对较高,分别为 46% 和 40%。将 47 种昆虫表皮蛋白进行系统进化树分析发现: TdCPR12611 与食粪金龟 RR-2 家族蛋白 OtCP-1 (GenBank 登录号: XP\_022920963.1) 的亲缘关系最近,在同一分支上; TdCPR7854 与食粪金龟 3 种不同类型的 adult-specific cuticular protein ACP-20-like 蛋白 OtCP-acp20-1 (GenBank 登录号: XP\_022914362.1)、OtCP-acp20-2 (GenBank 登录号: XP\_022920192.1) 和 OtCP-acp20-3 (GenBank 登录号: XP\_022903303.1) 的亲缘关系最为接近,它们均属于 CPR\_RR-2 家族(图 3)。

## 2.3 双叉犀金龟表皮蛋白 TdCPR12611 及 TdCPR7854 的表达及纯化

在带有 *TdCPR12611* 和 *TdCPR7854* 基因的克隆载体和表达载体测序鉴定无误后,对两个蛋白进行了原核细胞的诱导表达,经过镍离子亲和层析纯化后获得的目的蛋白,SDS-PAGE 和 Western blot 检测结果如图 4 所示。TdCPR12611 蛋白分子量约 35 kD (理论分子量 32.52 kD), TdCPR7854 蛋白分子量约 18 kD (理论分子量 17.62 kD), 从 SDS-PAGE 结果可以看出蛋白的纯度较高,可以作为后续实验的材料。Western blot 结果均为单一信号条带,说明蛋白确实是重组表达的蛋白,并且蛋白较为稳定没

有降解的现象。

## 2.4 TdCPR12611 和 TdCPR7854 蛋白与几丁质结合能力

利用 SDS-PAGE 检测 TdCPR12611 及 TdCPR7854 与不同类型几丁质的结合能力情况,灰度量化的结果表明 2 种蛋白与 4 种不同类型几丁质的结合能力均存在显著差异。TdCPR12611 仅有蛋白能够与  $\alpha$ -几丁质结合,蛋白主要存在于上清(未结合的蛋白)中;与  $\beta$ -几丁质和胶体几丁质的结合能力相近,约有 28.0% 的 TdCPR12611 蛋白结合,在沉淀(结合的蛋白)中存在部分蛋白;与壳聚糖的结合能力相对较强,41.4% 的 TdCPR12611 蛋白结合(图 5: A, B)。TdCPR7854 蛋白几乎不与  $\alpha$ -几丁质结合,约有 30.0% 的蛋白能够与壳聚糖和胶体几丁质结合,与  $\beta$ -几丁质存在较强结合能力,约有 62.3% 的蛋白结合(图 5: C, D)。

## 2.5 TdCPR12611 及 TdCPR7854 蛋白的液液相分离性质

肉眼观察两个蛋白溶液发现 TdCPR12611 蛋白在 4℃ 条件下是清澈透明的状态,随着温度升高到室温(25℃),蛋白溶液逐渐由澄清变浑浊;而 TdCPR7854 蛋白未出现类似现象。在室温下用光学显微镜观察两者的蛋白溶液,发现 TdCPR12611 蛋白出现团聚体(coacervate)现象,团聚体具有流动形变性,并能够相互融合形成更大的团聚体;而且团聚体形成与消失是可逆的,温度升高至室温团聚体形成,当温度降低到 4℃ 条件时团聚体会消失,蛋白溶液恢复澄清状态(图 6);而 TdCPR7854 蛋白则不具有这种性质。

## 3 讨论

本研究选择了双叉犀金龟头角突组织中表达含量较高的两种表皮蛋白 TdCPR12611 及 TdCPR7854 作为研究对象。生物信息学分析发现它们均属于昆虫表皮蛋白 CPR\_RR-2 家族成员,携带有保守的 R&R 结构域,这说明两者可能与几丁质具有相互作用。系统进化树分析表明两者与来源于食粪金龟中不同的 CPR\_RR-2 家族表皮蛋白亲缘关系较近。与几丁质体外结合实验表明,两种蛋白与不同类型的几丁质结合具有显著的差异,其中 TdCPR12611 与壳聚糖具有较强的结合能力, TdCPR7854 与  $\beta$ -几丁质的结合能力较强,这说明两蛋白在双叉犀金龟头角突的形成过程中可能发挥

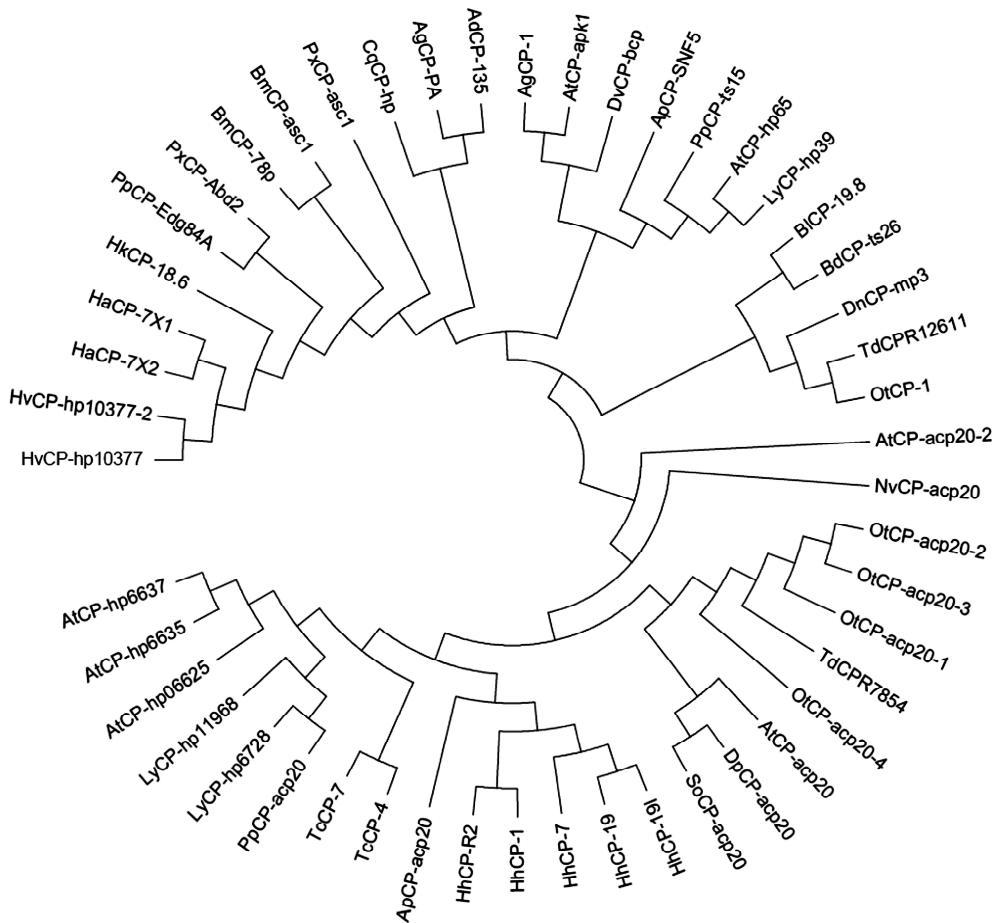


图3 邻接法构建的基于氨基酸序列的昆虫表皮蛋白系统进化树(500次重复)

Fig. 3 Phylogenetic tree of insect cuticular proteins by neighbor-joining method based on amino acid sequences (500 replicates)

蛋白来源物种及其 GenBank 登录号 Origin species of proteins and their GenBank accession numbers; TdCPR12611: 双叉犀金龟 *Trypoxylus dichotomus*, MT813021; TdCPR7854: 双叉犀金龟 *Trypoxylus dichotomus*, MT813022; OtCP-1: 食粪金龟 *Onthophagus taurus*, XP\_022920963.1; AgCP-1: 光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis*, XP\_018577010.1; PpCP-ts15: 北美萤火虫 *Photinus pyralis*, XP\_031347513.1; AtCP-hp65: 边褐端黑萤 *Abcondita terminalis*, KAF5297863.1; OtCP-acp20-1: 食粪金龟 *Onthophagus taurus*, XP\_022914362.1; OtCP-acp20-2: 食粪金龟 *Onthophagus taurus*, XP\_022920192.1; OtCP-acp20-3: 食粪金龟 *Onthophagus taurus*, XP\_022903303.1; LyCP-hp39: 扁萤 *Lamprigera yunnana*, KAF5299004.1; HkCP-18.6: 海波斯莫科马属蛾 *Hyposmocoma kahamanao*, XP\_026328431.1; AgCP-PA: 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*, XP\_556966.3; AdCP-135: 达氏按蚊 *Anopheles darlingi*, ETN63120.1; PxCP-asc1: 小菜蛾 *Plutella xylostella*, XP\_011550962.1; ApCP-SNF5: 白蜡窄吉丁 *Agilus planipennis*, XP\_018318748.1; AtCP-apk1: 小蜂窝甲虫 *Aethina tumida*, XP\_019877778.1; CqCP-hp: 致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus*, XP\_001865100.1; DnCP-mp3: 麦双尾蚜 *Diuraphis noxia*, XP\_015375949.1; DvCP-bcp: 玉米根虫 *Diabrotica virgifera*, XP\_028141552.1; BICP-19.8: 马来西亚实蝇 *Bactrocera latifrons*, XP\_018801521.1; HvCP-hp10377: 烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*, PCG64628.1; HaCP-7X2: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*, XP\_021196834.1; HvCP-hp10377-2: 烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*, PCG64627.1; HaCP-7X1: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*, XP\_021196833.1; BdCP-ts26: 橘小实蝇 *Bactrocera dorsalis*, XP\_011200150.1; BmCP-78p: 家蚕 *Bombyx mori*, NP\_001166682.1; BmCP-asc1: 野桑蚕 *Bombyx mandarina*, XP\_028026464.1; PpCP-Edg84A: 玉带凤蝶 *Papilio polytes*, XP\_013134319.1; PxCP-ABd2: 柑橘凤蝶 *Papilio xuthus*, NP\_001298788.1; DpCP-acp20: 中欧山松大小蠹 *Dendroctonus ponderosae*, XP\_019761647.1; LyCP-hp11968: 扁萤 *Lamprigera yunnana*, KAF5297637.1; TeCP-4: 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*, EFA04643.2; TeCP-7: 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*, XP\_008193006.2; AtCP-hp06625: 边褐端黑萤 *Abcondita terminalis*, KAF5307754.1; HhCP-1: 茶翅蜡 *Halyomorpha halys*, KAE8573268.1; PpCP-acp20: 北美萤火虫 *Photinus pyralis*, XP\_031344218.1; LyCP-hp6728: 扁萤 *Lamprigera yunnana*, KAF5275617.1; SoCP-acp20: 米象 *Sitophilus oryzae*, XP\_030749553.1; AtCP-acp20: 小蜂窝甲虫 *Aethina tumida*, XP\_019875905.1; NvCP-acp20: 大红葬甲 *Microphorus vespilloides*, XP\_017784612.1; AtCP-acp20-2: 小蜂窝甲虫 *Aethina tumida*, XP\_019875906.1; HhCP-191: 茶翅蜡 *Halyomorpha halys*, XP\_014279712.1; OtCP-acp20-4: 食粪金龟 *Onthophagus taurus*, XP\_022903303.1; HhCP-19: 茶翅蜡 *Halyomorpha halys*, XP\_014279718.1; ApCP-acp20: 白蜡窄吉丁 *Agilus planipennis*, XP\_025830566.1; AtCP-hp6635: 边褐端黑萤 *Abcondita terminalis*, KAF5307764.1; HhCP-7: 茶翅蜡 *Halyomorpha halys*, XP\_024217407.1; HhCP-R2: 茶翅蜡 *Halyomorpha halys*, KAE8573269.1; AtCP-hp6637: 边褐端黑萤 *Abcondita terminalis*, KAF5307766.1.

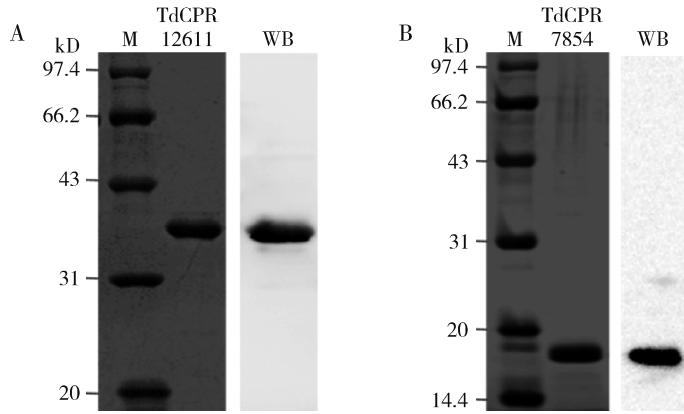


图4 纯化的双叉犀金龟重组表皮蛋白 TdCPR12611 (A) 和 TdCPR7854 (B) 的 SDS-PAGE 及 Western blot 检测

Fig. 4 SDS-PAGE and Western blot detection of the purified recombinant cuticular proteins TdCPR12611 (A) and TdCPR7854 (B) of *Trypoxylus dichotomus*

M: 蛋白低分子量标准 Low molecular weight protein marker; WB: Western blot.

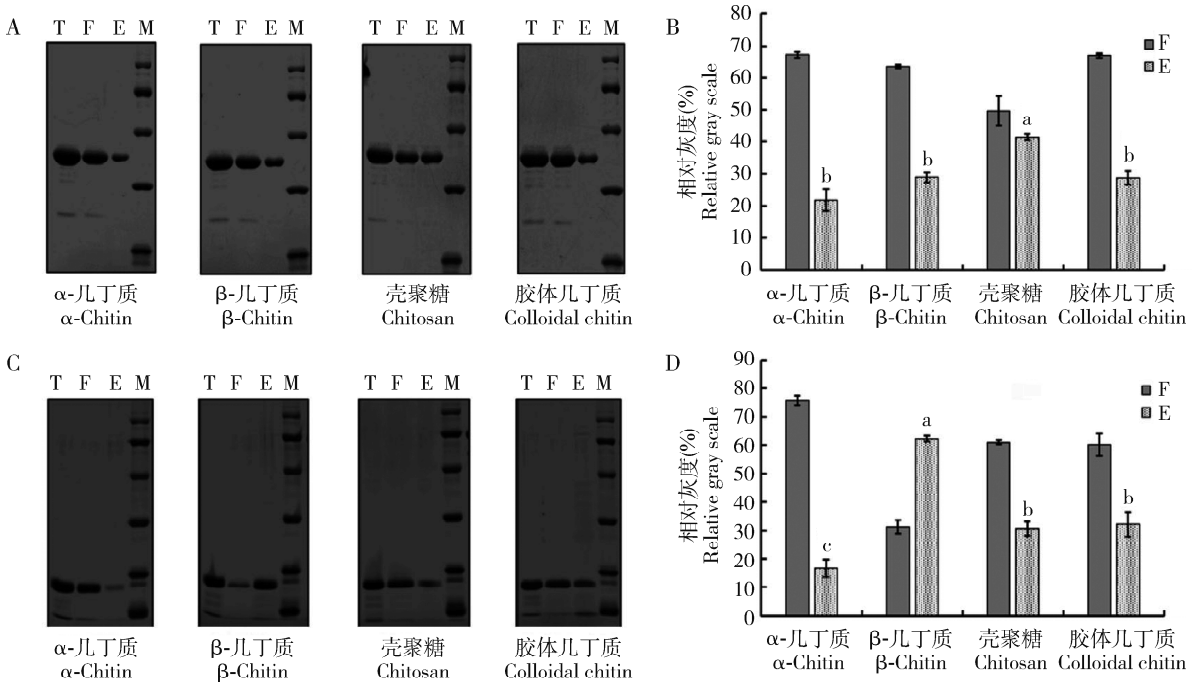


图5 双叉犀金龟表皮蛋白 TdCPR12611 (A, B) 和 TdCPR7854 (C, D) 与不同类型几丁质的结合能力

Fig. 5 Binding abilities of the cuticular proteins TdCPR12611 (A, B) and TdCPR7854 (C, D)

of *Trypoxylus dichotomus* with different types of chitin

A, C: SDS-PAGE; B, D: 灰度扫描量化结果 Gray scan quantization result. T: 用于结合实验的表皮蛋白样品 Cuticular protein sample for binding experiment; F: 反应体系上清液, 即未结合几丁质的蛋白 Supernatant of the reaction system, unbound protein with chitin; E: 反应体系沉淀重悬液, 即结合几丁质的蛋白 Sediment resuspension of the reaction system, bound protein with chitin; M: 蛋白低分子量标准 Protein low molecular weight marker. 图中灰色柱表示结合几丁质的蛋白占总蛋白的百分比, 每个处理 3 个技术重复。柱上不同小写字母表示与不同类型几丁质结合的蛋白的百分比 (平均值  $\pm$  标准误) 差异显著 ( $P < 0.05$ , LSD 法)。The gray column in the figure indicates the percentage of protein binding with chitin, and each treatment has three technical replicates. Different lowercase letters above bars represent significant differences in the percentage (mean  $\pm$  SE) of protein binding with different types of chitin ( $P < 0.05$ , LSD method).

重要作用, 能够帮助双叉犀金龟头角突形成坚硬的组织结构。这进一步说明 RR-2 家族表皮蛋白在昆虫表皮形成装配过程中发挥重要作用。同时, 由

于 RR-2 家族蛋白多存在于昆虫坚硬组织中 (刘晓健等, 2019), 因此推测两蛋白具有作为优良蛋白质仿生材料的潜力。已有研究证明蛋白质的正确折叠



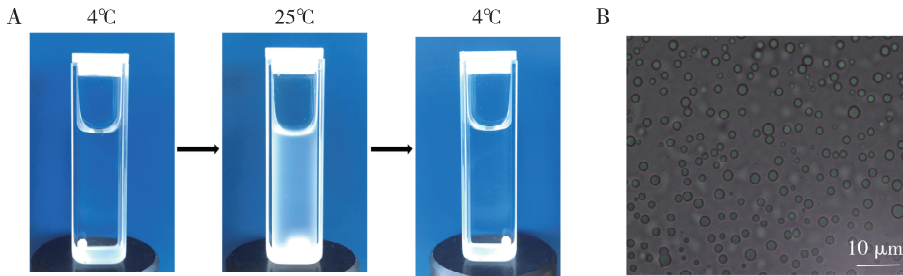


图6 双叉犀金龟表皮蛋白 TdCPR12611 液液相分离现象观察

Fig. 6 Observation of liquid-liquid phase separation of cuticular protein TdCPR12611 of *Trypoxylus dichotomus*

A: TdCPR12611 蛋白溶液在不同温度下的肉眼观察结果, 蛋白出现液液相分离现象随着温度改变是可逆的 The macroscopic observation of TdCPR12611 protein solution at different temperatures showed that the protein separation in liquid phase was reversible with the change of temperature; B: TdCPR12611 蛋白在室温条件下光学显微镜观察结果, 蛋白溶液中出现的圆球即为团聚体 TdCPR12611 protein was observed under light microscope at room temperature, and the globules in the protein solution were coacervates.

对几丁质材料的刚度有很大影响, 几丁质结合域 (chitin-binding domain, CBD) 的存在极大地影响了材料的最大应力和杨氏模量。例如天然材料鱿鱼的软骨中去除蛋白而保留几丁质骨架会造成软骨部分的最大应力损失 > 80%, 杨氏模量损失 > 90% (Montroni *et al.*, 2021)。含有两个纤维素结合模块 (cellulose-binding modules, CBM) 的工程蛋白与纳米纤维素复合制膜, 也能够显著提升纳米纤维素膜的极限拉伸强度、刚度及韧性 (Malho *et al.*, 2015)。TdCPR12611 蛋白具有能够与几丁质结合的结构模块, 实验表明该蛋白与壳聚糖具有较强的相互作用。因此, 推测 TdCPR12611 蛋白可能能够与几丁质复合, 形成具备优良性能的仿生材料。

实验过程中发现 TdCPR12611 蛋白能够在室温条件下自发团聚形成 LLPS, 与 Mohammadi 等 (2018) 利用蛛丝蛋白 ADF3 形成液体状的团聚体 (liquid-like coacervate, LLC) 的性质类似, 而 TdCPR7854 则不具备类似的性质。在研究弹性蛋白 (elastin) 和节肢弹性蛋白 (resilin) 温度响应相变过程中发现, 它们普遍存在一种 P-Xn-G 基序 (P: 脯氨酸; G: 甘氨酸; X: 任意一种氨基酸; n 为 0~4 整数), 作者认为这种基序是组成蛋白自身无序结构的框架 (Quiroz and Chilkoti, 2015)。而在 TdCPR12611 蛋白的序列中不存在类似的基序, 推测是不带电的极性氨基酸 Q 含量高, 分子内缺乏静电相互作用稳固蛋白结构, 使占主导地位的两段 Q-rich region 为低复杂度序列, 从而使整个蛋白呈现内部无序状态。而蛋白内部的无序性, 可以对形成液液相分离的现象做贡献 (Alberti *et al.*, 2019), 这可能是造成 TdCPR12611 蛋白能够形成 LLPS 的原因。团聚是

指将均质大分子溶液分离成两种不同的液相。在水溶液中团聚体被认为有利于组装生物大分子网络结构, 原因是团聚体具有很高的局部蛋白质浓度, 但它仍呈液体状且不溶于水, 这有利于在细胞外环境中高浓度地运输蛋白质。团聚体在低浓度下具有较低的粘度以及极低的界面自由能, 并且具有剪切稀释特征, 使其能够浸渍到纳米多孔骨架 (如几丁质-几丁质结合蛋白骨架结构) 之中。已有研究表明, 许多蛋白在形成具有功能性的结构之前都需要经历团聚体的过渡形式 (Mohammadi *et al.*, 2018), 如在研究贻贝类等海洋生物的粘附剂领域, 足丝蛋白首先经历液液相分离然后迅速固化达到粘附于固体表面的效果 (Stewart *et al.*, 2011; Waite, 2017); 鱿鱼喙在形成过程中, 一种富含组氨酸的 recDgHBP-1 蛋白也需要经历形成团聚体这一中间环节 (Tan *et al.*, 2015); 在弹性蛋白组装成具有功能性结构的过程中也涉及蛋白团聚步骤 (Muiznieks *et al.*, 2014)。TdCPR12611 蛋白在纯化后也存在形成团聚体的现象, 由此进一步推测该蛋白具有组装形成优良性能结构材料的潜力。

综上所述, 本研究比较了两种来源于双叉犀金龟头部角突中的表皮蛋白, 两者均属于 CPR 家族中的 RR-2 亚族成员, 它们均具有良好的亲水性, 但它们在内部无序性、形成液液相分离的性质及几丁质结合能力上均具有明显的差异, 其中 TdCPR12611 蛋白具备优良的性能及应用于仿生材料制备的潜力。本研究进一步表明了表皮蛋白 CPR 家族在昆虫表皮结构中承担着重要角色, 对研究昆虫表皮的形成过程有所启发, 并且为制备新型蛋白质仿生材料的原料选择方面提供了新依据。

## 参考文献 (References)

- Alberti S, Gladfelter A, Mittag T, 2019. Considerations and challenges in studying liquid-liquid phase separation and biomolecular condensates. *Cell*, 176(3): 419–434.
- Andersen SO, 1998. Amino acid sequence studies on endocuticular proteins from the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 28(5): 421–434.
- Arakane Y, Lomakin J, Gehrke SH, Hiromasa Y, Tomich JM, Muthukrishnan S, Beeman RW, Kramer KJ, Kanost MR, 2012. Formation of rigid, non-flight forewings (elytra) of a beetle requires two major cuticular proteins. *PLoS Genet.*, 8(4): e1002682.
- Chen B, Peng XH, Fan JH, 2000. Microstructure of natural biocomposites and research of biomimetic composites. *J. Comp. Mat.*, 17(3): 59–62. [陈斌, 彭向和, 范镜泓, 2000. 生物自然复合材料的结构特征及仿生复合材料的研究. *复合材料学报*, 17(3): 59–62]
- Cinege G, Zsámboki J, Vidal-Quadras M, Uv A, Csordás G, Honti V, Gábor E, Hegedús Z, Varga GIB, Kovács AL, Juhász G, Williams MJ, Andó I, Kurucz E, 2017. Genes encoding cuticular proteins are components of the Nimrod gene cluster in *Drosophila*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 87: 45–54.
- Deshoux M, Monsion B, Uzest M, 2018. Insect cuticular proteins and their role in transmission of phytoviruses. *Curr. Opin. Virol.*, 33: 137–143.
- Fukamizo T, Kramer KJ, 1985. Mechanism of chitin oligosaccharide hydrolysis by the binary enzyme chitinase system in insect molting fluid. *Insect Biochem.*, 15(1): 1–7.
- Jasrapuria S, Specht CA, Kramer KJ, Beeman RW, Muthukrishnan S, 2012. Gene families of cuticular proteins analogous to peritrophins (CPAPs) in *Tribolium castaneum* have diverse functions. *PLoS ONE*, 7(11): e4984411.
- Lee HT, Kim HJ, Kim CS, Gomi K, Taya M, Nomura S, Ahn SH, 2017. Site-specific characterization of beetle horn shell with micromechanical bending test in focused ion beam system. *Acta Biomater.*, 57: 395–403.
- Liang X, Chen B, Qiao L, 2014. Research progress in insect cuticular protein genes. *Acta Entomol. Sin.*, 57(9): 1084–1093. [梁欣, 陈斌, 乔梁, 2014. 昆虫表皮蛋白基因研究进展. *昆虫学报*, 57(9): 1084–1093]
- Liu BQ, Qiao L, He QY, Zhou Y, Ren S, Chen B, 2018. Genome-wide identification, characterization and evolution of cuticular protein genes in the malaria vector *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae). *Insect Sci.*, 25(5): 739–750.
- Liu W, Gray S, Huo Y, Li L, Wei T, Wang X, 2015. Proteomic analysis of interaction between a plant virus and its vector insect reveals new functions of hemipteran cuticular protein. *Mol. Cell. Proteomics*, 14(8): 2229–2242.
- Liu XJ, Liu WM, Zhao XM, Zhang JZ, Ma EB, 2019. Progress in the study of insect cuticle development and prospects for future research. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 56(4): 625–638. [刘晓健, 刘卫敏, 赵小明, 张建珍, 马恩波, 2019. 昆虫表皮发育研究进展及展望. *应用昆虫学报*, 56(4): 625–638]
- Malho JM, Arola S, Laaksonen P, Szilvay GR, Ikkala O, Linder MB, 2015. Modular architecture of protein binding units for designing properties of cellulose nanomaterials. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 54(41): 12025–12028.
- Mohammadi P, Aranko AS, Lemetti L, Cenev Z, Zhou Q, Virtanen S, Landowski CP, Penttilä M, Fischer WJ, Wagermaier W, Linder MB, 2018. Phase transitions as intermediate steps in the formation of molecularly engineered protein fibers. *Commun. Biol.*, 1: 86.
- Montroni D, Sparla F, Fermani S, Falini G, 2021. Influence of proteins on mechanical properties of a natural chitin-protein composite. *Acta Biomater.*, 120: 81–90.
- Muiznieks LD, Cirulis JT, van der Horst A, Reinhardt DP, Wuite GJ, Pomés R, Keeley FW, 2014. Modulated growth, stability and interactions of liquid-like coacervate assemblies of elastin. *Matrix Biol.*, 36: 39–50.
- Quiroz FG, Chilkoti A, 2015. Sequence heuristics to encode phase behaviour in intrinsically disordered protein polymers. *Nat. Mater.*, 14(11): 1164–1171.
- Rebers JE, Willis JH, 2001. A conserved domain in arthropod cuticular proteins binds chitin. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31(11): 1083–1093.
- Song TQ, Yang ML, Wang YL, Liu Q, Wang HM, Zhang J, Li T, 2016. Cuticular protein LmTwdll is involved in molt development of the migratory locust. *Insect Sci.*, 23(4): 520–530.
- Stewart RJ, Wang CS, Shao H, 2011. Complex coacervates as a foundation for synthetic underwater adhesives. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 167(1–2): 85–93.
- Tan Y, Hoon S, Guerette PA, Wei W, Ghadban A, Hao C, Miserez A, Waite JH, 2015. Infiltration of chitin by protein coacervates defines the squid beak mechanical gradient. *Nat. Chem. Biol.*, 11(7): 488–495.
- Tang L, Liang JB, Zhan ZG, Xiang ZH, He NJ, 2010. Identification of the chitin-binding proteins from the larval proteins of silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 40(3): 228–234.
- Togawa T, Nakato H, Izumi S, 2004. Analysis of the chitin recognition mechanism of cuticle proteins from the soft cuticle of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34(10): 1059–1067.
- Vannini L, Bowen JH, Reed TW, Willis JH, 2015. The CPCFC cuticular protein family: Anatomical and cuticular locations in *Anopheles gambiae* and distribution throughout Pancrustacea. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 65: 57–67.
- Vincent JFV, Wegst UGK, 2004. Design and mechanical properties of insect cuticle. *Arthropod Struct. Dev.*, 33(3): 187–199.
- Waite JH, 2017. Mussel adhesion – essential footwork. *J. Exp. Biol.*, 220(Pt 4): 517–530.
- Webster CG, Thillier M, Pirolles E, Cayrol B, Blanc S, Uzest M, 2017. Proteomic composition of the acrostyle: Novel approaches to identify cuticular proteins involved in virus-insect interactions. *Insect Sci.*, 24(6): 990–1002.
- Zhang J, Tan G, Zhang M, Jiao D, Zhu Y, Wang S, Liu Z, Liu D,

- Zhang Z, 2019. Multiscale designs of the chitinous nanocomposite of beetle horn towards an enhanced biomechanical functionality. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, 91: 278 – 286.
- Zhang WW, Dong ZM, Zhang Y, Zhang XL, Zhang SY, Zhao P, 2017. Expression pattern and chitin-binding mode analyses of cuticle protein BmCPAP3-G in the silkworm (*Bombyx mori*). *Sci. Agric. Sin.*, 50(9): 1723 – 1733. [张薇薇, 董照明, 张艳, 张晓璐, 张守亚, 赵萍, 2017. 家蚕表皮蛋白 BmCPAP3-G 的表达特征及其与几丁质的结合特性. 中国农业科学, 50(9): 1723 – 1733]
- Zhao X, Jia P, Zhang J, Yang Y, Liu W, Zhang J, 2019. Structural glycoprotein LmAbd-9 is required for the formation of the endocuticle during locust molting. *Int. J. Biol. Macromol.*, 125: 588 – 595.

(责任编辑: 马丽萍)