

# 白蜡虫蜡酯合酶在昆虫细胞 *Sf9* 中的表达

亓倩, 于淑惠, 孙涛, 王雪庆, 刘博文, 杨璞, 陈晓鸣\*

(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)

**摘要:** [目的] 本研究欲利用 Bac-to-Bac 表达系统, 在 *Sf9* 细胞中表达 WS。[方法] 将 WS 编码序列克隆到质粒 pFast-Bac<sup>TM</sup> HT B 后, 转化大肠杆菌 DH10Bac<sup>TM</sup>, 经抗性和蓝白斑筛选, 获得重组杆粒 rBacmid/EpelWS。将 rBacmid/Epel-WS 转染 *Sf9* 细胞。[结果] 免疫荧光标记检测表明: WS 在受感染细胞的细胞质中表达。[结论] 本研究成功表达了白蜡虫 WS, 为白蜡虫 WS 的生化特性研究奠定了基础。

**关键词:** 白蜡虫; 蜡酯合酶; 载体构建; Bac-to-Bac 表达系统; *Sf9* 细胞系

中图分类号: S899.1

文献标识码: A

## Expression of *Ericerus pela* Wax Ester Synthase in *Spodoptera frugiperda Sf9* Cell Line

QI Qian, YU Shu-hui, SUN Tao, WANG Xue-qing, LIU Bo-wen, YANG Pu, CHEN Xiao-ming

(Research Institute of Resources Insects, Chinese Academy of Forestry, Key laboratory of Cultivating and Utilization of Resources Insects of State Forestry Administration, Kunming 650224, Yunnan, China)

**Abstract:** [Objective] Use Bac-to-Bac expression system to express WS in *Sf9* cell line. [Method] The WS coding sequence was cloned into plasmid pFastBac<sup>TM</sup> HT B, and then transformed *Escherichia coli* DH10Bac<sup>TM</sup>. After resistant and blue-white screening, the recombinant bacmid rBacmid/EpelWS were obtained. The rBacmid/EpelWS was transfected into *Sf9* cells. [Result] The Immunofluorescence analysis showed that the target protein was expressed in the cytoplasm of the infected cells. [Conclusion] The WS was expressed successfully, it lays the foundation for further research on the biochemical characteristics of WS of the *Ericerus pela*.

**Keywords:** *Ericerus pela*; wax ester synthase; Construction of expression vector; bac-to-bac expression vector system; *Sf9* cells lines.

白蜡虫 (*Ericerus pela* Chavannes.) 是一种具有重要经济价值的资源昆虫, 其 2 龄雄幼虫在女贞 (*Ligustrum lucidum* Ait.) 和白蜡树 (*Fraxinus chinensis* Roxb.) 等寄主植物上分泌的白蜡, 广泛地应用于化工、食品、医药、化妆品等行业<sup>[1-2]</sup>。白蜡的主要成分是二十六酸二十六酯, 是由蜡酯合酶 (wax synthase, WS) 催化二十六酸和二十六醇形成的酯<sup>[3]</sup>。前期工作鉴定到了白蜡虫 WS 的候选基因, 该基因在白蜡虫泌蜡高峰期 (二龄雄幼虫) 和雌成虫中表

达量显著高于其它虫态<sup>[4-6]</sup>。系统发育分析表明, 该基因与其酰基转移酶家族的成员单酰基甘油酰基转移酶 (monoacylglycerol acyltransferase, MGAT, 生成甘油二酯) 中 MGAT1、MGAT2、MGAT3, 二酰基甘油酰基转移酶 (diacylglycerol acyltransferase, DGAT, 生成甘油三酯) 中 DGAT2 和酰基辅酶 A 蜡醇酰基转移酶 (acyl-CoA wax alcohol acyltransferase, AWAT, 生成蜡酯) 中 AWAT1、AWAT2 聚为一支<sup>[4]</sup>, 推测白蜡虫 WS 为双功能酶, 但对白蜡虫 WS 的生化特性

收稿日期: 2015-11-15

基金项目: 林业公益性行业科研专项 201504302、201304808, 云南省应用基础研究重点项目 2013FA052, 国家自然科学基金 31572337, 国家 863 计划 2014AA021801。

作者简介: 亓倩 (1991—), 女, 硕士研究生, 主要从事昆虫分子生物学研究。

\* 通讯作者。

缺少进一步的研究<sup>[7-9]</sup>。体外获得大量白蜡虫 WS 是开展进一步功能研究的基础。

目前国内外对 WS 的研究采用了多种表达系统, Kalscheuer 在贝氏不动杆菌 ADP1 (*Acinetobacter baylyi* strain ADP1) 中 WS 的研究采用毕赤酵母表达系统<sup>[10]</sup>, 小鼠 WS 的研究采用哺乳动物细胞表达系统<sup>[7]</sup>。鲜见用昆虫-杆状病毒表达系统表达 WS 的文献报道。昆虫-杆状病毒表达系统具有完善的翻译后加工修饰系统、高效表达外源基因的能力、较易从无血清培养上清中纯化蛋白、无内毒素污染等优点, 现已成功表达近千种高价值蛋白<sup>[11]</sup>。这些蛋白可以来源于几乎任何组织或细胞(从细菌到高等动物的组织细胞), 也可以来自于细胞的任何位置(细胞核、细胞外或细胞质)<sup>[12]</sup>。本研究依据实验室前期获得的 *ws* 全长序列, 利用昆虫-杆状病毒表达系统对白蜡虫 WS 进行表达, 为进一步开展 WS 酶学特性研究奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试昆虫

本试验所用白蜡虫采自昆明, 饲养于中国林业科学研究院资源昆虫研究所。

### 1.2 试剂

限制性内切酶 *Hind* III、*Nco*I 购自 NEB 公司。T4 DNA 连接酶购自 Fermentas 公司。青霉素、链霉素、庆大霉素, 购自阿拉丁公司。Grace 培养基购自 GIBCO 公司、反转录试剂盒、Cellfectin<sup>®</sup> Reagent II 购自 Invitrogen 公司。质粒小量提取试剂盒(Plasmid Miniprep Kit 50-prep)、琼脂糖凝胶回收试剂盒(DNA Gel Extraction Kit 50-prep)购自 AXYGEM 公司。*E. coli* DH5 $\alpha$  菌株购自大连宝生物工程有限公司。*E. coli* DH10<sup>™</sup> 菌株和 pFastbac HT B 质粒由浙江大学祝增荣教授赠送。类胎牛血清购自兰洲民海生物有限公司。*Sf9* (*Spo-doptera frugiperda*) 昆虫细胞, 由中国林业科学研究院资源昆虫研究所丁伟峰老师赠送。

### 1.3 试验方法

1.3.1 白蜡虫 *ws* 编码区克隆 取白蜡虫虫体磨样, 提取总 RNA, 反转录为 cDNA, 根据前期获得的白蜡虫 *ws* 全长序列, 在编码框的两端设计特异引物 WSF: 5'-GTAATAAGCACTAGGATTGACATC-3', WSR: 5'-ATCAGTTTGTAGTGAACCAACCATAC-3'。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 设定程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 32 个循环;

72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 并切胶回收, 将纯化后的 *ws* 编码区 PCR 产物连接到 pGEM T-easy 载体上, 转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 用 M13 引物进行菌液检测, 选取阳性克隆送交南京金斯瑞公司测序验证。将获得的含有白蜡虫 *ws* 编码区序列的重组质粒命名为 pGEM/EpelWS。

1.3.2 载体构建 设计带 *Hind* III 和 *Nco* I 酶切位点的引物 NWSF: 5'-CATGCCATGGGAGTAATAAGCACTAGGATTG-3', HWSR: 5'-CCCAAGCTTATCAGTTTGTAGTGAACCAACCAT-3', 抽取含有 *ws* 编码序列目基因的重组质粒, 以抽取的质粒为模板进行 PCR 扩增, 电泳检测后用胶回收试剂盒回收纯化, 测序后, 用 *Hind* III 和 *Nco* I 对 PCR 产物进行双酶切, 凝胶电泳后回收酶切产物。

将 pFastbac<sup>™</sup> HT B 菌株接种于 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C、160 转 $\cdot$ min<sup>-1</sup> 震荡培养 12 h, 用质粒小提试剂盒抽取 pFastbac<sup>™</sup> HT B 质粒, 用 *Hind* III 和 *Nco* I 对 pFastbac<sup>™</sup> HT B 质粒进行双酶切, 用琼脂糖凝胶电泳后回收酶切产物。

将上述经双酶切的回收纯化产物与双酶切的质粒载体于 4 $^{\circ}$ C 连接过夜。连接产物转化 JM109 感受态细胞, 涂布于含有 100  $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup> Amp 的 LB 固体培养基上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 挑取合适的菌斑, 用含酶切位点的 *ws* 引物进行菌液检测。含有白蜡虫 *ws* 的编码序列的杆状病毒转移载体命名为 pFastBacHTb/EpelWS。选取正确的菌液分装到数个 1 mL 加 Amp 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 摇床培养过夜。

1.3.3 重组病毒杆粒的获得及鉴定 用质粒小量提取试剂盒提取 pFastBacHTb/EpelWS 质粒, 获得的质粒转化大肠杆菌 DH10Bac<sup>™</sup> 感受态细胞, 涂布于含 50  $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup> 卡那霉素、7  $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup> 庆大霉素、10  $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup> 四环素、100  $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup> X-gal、40  $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup> IPTG 的 LB 固体培养基上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 使重组质粒发生转座。挑取白色阳性菌斑过夜培养, 菌液分别用 *ws* 特异引物和 M13 引物组合(M13 47-F/WS-R, M13 48-R/WS-F, M13 47-F/M13 48-R) 进行检测。经鉴定为正确的杆粒命名为 rBacmid/EpelWS, 用质粒小提试剂盒提取 bacmid 备用。

1.3.4 重组 bacmid 转染昆虫细胞 *Sf9* 病毒扩增: 接种  $9 \times 10^5$  个细胞到 2 mL 六孔板中。在 27 $^{\circ}$ C 培养 1 h, 使细胞贴壁。制备含 *ws* 编码区片段的 Bacmid 与 Cellfectin Reagent II 复合物, 逐滴滴到细胞上, 在 27 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 5 h。去掉复合物混合液, 在每个

孔中加 2 mL 完全培养基,在 27°C 培养箱中培养 72 h。当细胞出现感染迹象时,收集含病毒的上清液,即为 P1 病毒液。取 6 孔板,接种  $2 \times 10^6$  细胞每孔,在每个孔中加入适量 P1 病毒,27°C 培养 48 h 后收集病毒上清,即得到 P2 病毒,按上述方法进行 P3 病毒的扩增。

**蛋白表达:**接种  $6 \times 10^6$  个细胞到 2 mL 六孔板中,待细胞贴壁后加入 100  $\mu$ L P3 病毒,27°C 培养箱孵育,72 h 后收获细胞。

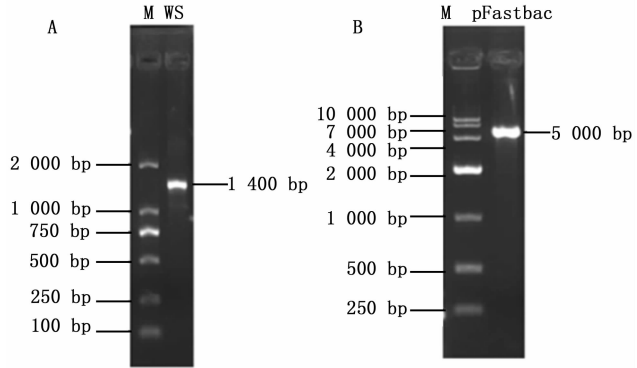
**1.3.5 免疫荧光标记** *Sf9* 细胞接种于十二孔板中,用重组病毒 rBacmid/EpelWS P3 感染 48 h 后,设为实验组,对照组为未感染 rBacmid/EpelWS 的 *Sf9* 细胞,二者分别用 PBS 洗细胞 3 遍,用含 3% BSA 的 PBS 4°C 封闭过夜。次日用 PBS 清洗细胞一遍后每孔加 100  $\mu$ L 用 PBS 1:300 稀释的一抗 (His-Tag Monoclonal Antibody, ABClone),4°C 过夜,用 4°C 预冷的 PBS 于摇床上清洗细胞 3 遍,每遍 5 min,每孔加 100  $\mu$ L 用 PBS 以 1:50 稀释的荧光标记的二抗 (Goat Anti-Mouse IgG/RBITC, ABClone),4°C 过夜。用 4°C 预冷的 PBS 清洗细胞 3 次,每次 5 min,用双蒸水洗 3 次,每次 5 min,每孔加 50  $\mu$ L DAPI 染核。漂洗后于荧光显微镜下观察拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 白蜡虫 *ws* 基因编码区的扩增及 pFastBacHTb 质粒提取

将 PCR 扩增后的 *ws* 编码区进行电泳检测,电

泳图片(图 1, A)中泳道 1 为 DNA 标记,DL2000,泳道 2 片段的大小约为 1 400 bp 左右,测序结果表明该片段即为目的片段,*ws* 编码区基因已经被成功扩增。提取的质粒用电泳检测,电泳图片(图 1, B)中泳道 2 片段的大小约为 5 000 bp,表明质粒已成功抽取。

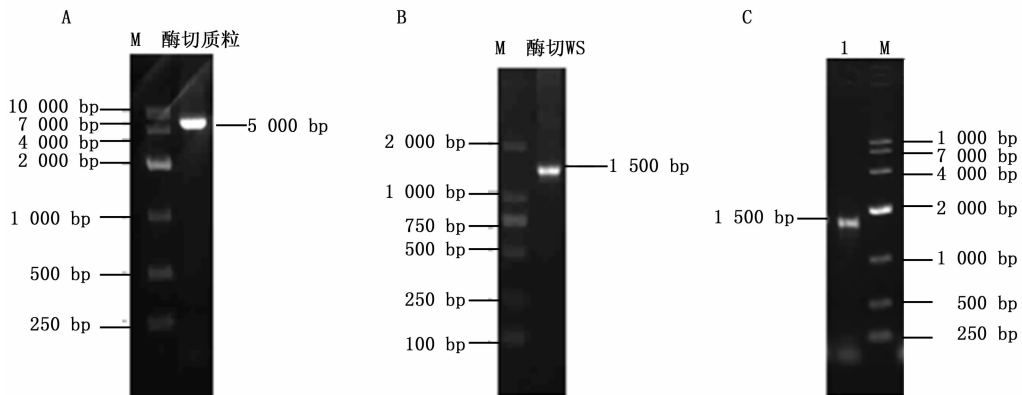


A: *wscDNA* 的 PCR 扩增; B: pFastbac 质粒

图 1 *ws* 编码区 cDNA 的 PCR 的扩增及载体抽取的鉴定结果

### 2.2 重组载体的鉴定

*ws* 编码区片段及质粒分别用 *Hind* III 和 *Nco* I 双酶切后跑电泳回收,回收产物电泳检测图像如图 2(A)、(B),依据片段大小可判断酶切后的质粒和 *ws* 编码区片段已被成功回收。用 T4 连接酶将酶切质粒和酶切 *ws* 编码区片段过夜连接后转化到 JM109 感受态细胞,用带酶切位点的引物进行检测,检测结果如图 2(C),泳道 1 片段大小约为 1 500 bp,证明重组载体已成功构建。



A: 酶切 pFastbac 质粒 B: 酶切 *ws* 编码区片段 C: 含 pFastBacHTb/EpelWS 的大肠杆菌菌液检测结果

图 2 *ws* 编码区重组载体的 PCR 电泳结果

### 2.3 重组病毒 Bacmid 的鉴定

抽取上述菌液中的重组质粒,转化大肠杆菌 DH10Bac<sup>TM</sup>,对转座后的菌落用 M13 引物和 *ws* 引物进行 PCR,电泳结果如图 3。依据条带大小判断,重

组 Bacmid: rBacmid/EpelWS 构建成功。用质粒小提试剂盒提取 rBacmid/EpelWS 质粒,并进行电泳检测,在 6 500 左右有条带,如图 3(B),证明 rBacmid/EpelWS 提取成功。

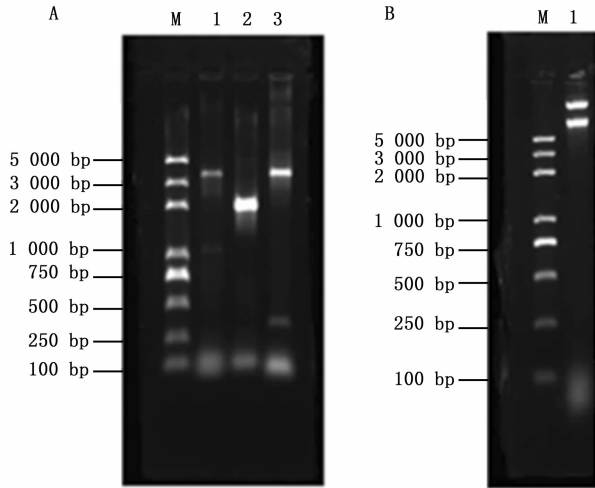
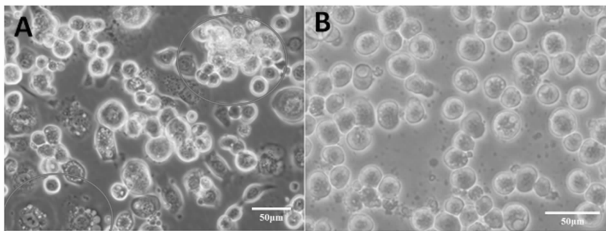


图3 rBacmid/EpelWS的鉴定  
A:用三对引物对含 rBacmid/EpelWS 的大肠杆菌菌液检测结果(三对引物所对应的泳道分别是:泳道 1:M13 47-F/WS-R,泳道 2:M13 48-R/WS-F,泳道 3:M13 47-F/M13 48-R) B:对 rBacmid/EpelWS 抽提结果的检测

图3 rBacmid/EpelWS的鉴定

## 2.4 显微镜观察细胞感染情况

用 P3 病毒感染 *Sf9* 细胞后 72 h 后,在光学显微镜下观察,显示受感染的细胞(图 4 A,试验组,加重组病毒)明显比对照细胞(图 4 B,对照组,加 1 mL Grace 培养基)细胞表面变得粗糙,细胞核变大,肿胀,畸形,体积变大,内容物增多,悬浮(如图 1A 中红圈内细胞尤为明显),初步判断,*Sf9* 细胞已经被病毒感染。



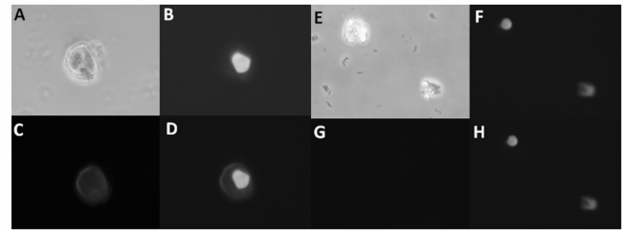
A:rBacmid/EpelWS 感染 72 h 后的 *Sf9* 细胞; B:对照组细胞

图4 光学显微镜下两组细胞生长情况

## 2.5 免疫荧光分析

被 rBacmid/EpelWS 感染 48 h 后的 *Sf9* 细胞和未受感染的对照组细胞经免疫荧光标记后,分别在普通白光,激发波长为 358 nm 的蓝光和激发波长为 540 nm 的红光下观察。结果如图 5: A、E 为白光下拍摄的细胞;B、F 显示,在 358 nm 的激发波长下两组细胞的细胞核均发出蓝色的光;C、D 显示,在 540 nm 的激发波长下, rBacmid/EpelWS 感染的细胞在细胞质中有红光发出;G、H 显示,未经 rBacmid/

EpelWS 感染的对照组细胞没有红光发出,证明在受感染细胞的细胞质中有 WS 表达,WS 在 *Sf9* 细胞中表达成功。



A、B、C、D:rBacmid/EpelWS 感染 48 h 后的 *Sf9* 细胞;E、F、G、H:对照组细胞。其中 A、E 在自然光下拍摄,B、F 在 358 nm 的激发波长下拍摄,C、G 在 540 nm 的波长下拍摄,D、H 为 358 nm 和 540 nm 两种波长的组合图片

图5 rBacmid/EpelWS 感染 48 h 后的 *Sf9* 免疫荧光检测图像

## 3 讨论与结论

目前,已有 12 个物种的 WS 被分离鉴定,并进行了功能验证。有些通过转入异源细胞中进行表达,利用产生的 WS 体外加底物合成蜡酯的方式进行功能验证,如 Kalscheuer 等人在香茅醇假单胞菌 (*Pseudomonas citronellolis*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) H1246 和大肠杆菌中表达了贝氏不动杆菌 WS<sup>[13-15]</sup>;小鼠 WS 在酿酒酵母、*Sf9* 昆虫细胞、人肾脏 HEK293 细胞中的表达等<sup>[7,16]</sup>;有些通过转基因的方式进行功能探究,如 Lardizabal 将希蒙得木 (*Simmondsia chinensis* (Link) Schneider) *ws* 转基因到拟南芥中,表达成功并得到含蜡酯的种子<sup>[17-21]</sup>。在昆虫中还没鉴定到 *ws* 基因,对白蜡虫这种产蜡重要经济昆虫的蜡酯合成分子机制也研究甚少,未有研究成果发表,仅有我们实验室前期对白蜡虫蜡酯合成关键酶之一 *far* 基因的部分研究。

本试验将白蜡虫 *ws* 编码区表达载体在 *Sf9* 中表达,因其同为昆虫细胞,在蛋白质翻译后修饰过程中有相似性,这是原核细胞及其他种类真核细胞所不能替代的。所用试剂 Cellfectin® Reagent II 是一种阳离子脂质体试剂,设计用于实现昆虫细胞的最佳转染,可稳定高效地转染 *Sf9*、*Sf21* 细胞,将收集的病毒感染处于对数期健康生长点 *Sf9* 细胞即可实现 WS 的表达。

试验中出现的问题有:通过免疫荧光的照片可见只有部分细胞表达出了 WS 蛋白,表达量很少,这也是真核表达中常见的现象。下一步酶活测定的试验中可以加大细胞和病毒量以获得更多的 WS。有研究表明,血清的存在能降低细胞膜的流动性,从而

抑制病毒吸附细胞,影响蛋白的表达<sup>[21]</sup>。初步表达时获得蛋白量较低的另一个原因可能是杆状病毒感染昆虫细胞后,细胞本身产生应激反应而表达产生蛋白酶,并随细胞裂解而释放出来,同时由于没有血清蛋白质如血清蛋白和巨球蛋白的保护,蛋白质水解的问题显得更为严重<sup>[22]</sup>。可以在后续试验中加入蛋白酶抑制剂和蛋白稳定剂来尝试解决这个问题。

白蜡虫提供了研究蜡酯合成的重要材料,本研究成功构建了*ws*编码区表达载体,并初步表达了WS,为后续酶活试验奠定了基础,为了解白蜡虫WS的生化特性以及白蜡虫泌蜡规律的研究提供分子生物学依据。

### 参考文献:

[1] 陈晓鸣,王自力,陈勇. 影响白蜡虫泌蜡主要气候因子及白蜡虫生态适应性分析[J]. 昆虫学报, 2007, 50(2): 136-143.

[2] 陈小平. 白蜡虫的研究进展[J]. 四川林业科技, 2007(1): 50-52.

[3] 谢映平,薛皎亮,张艳峰,等. 蚁虫蜡分泌物的化学研究进展[J]. 昆虫知识, 2004(6): 512-518.

[4] 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, 2007, 34(7): 695-703.

[5] Pu Yang, Jia-ying Zhu, Zhong-jun *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): 35719.

[6] Pu Yang, Xiao-Ming Chen, Wei-Wei Liu, *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.

[7] Jeffrey B Cheng, David W Russell. Mammalian wax biosynthesis: II. Expression cloning of wax synthase cDNAs encoding a member of the acyltransferase enzyme family [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(36): 37798-37870.

[8] Juan A. Villa, Matilde Cabezas, Fernando de la Cruz, *et al.* Use of limited proteolysis and mutagenesis to identify folding domains and sequence motifs critical for wax ester synthase/acylcoenzyme A: diacylglycerol acyltransferase activity [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 3(80): 1132-1141.

[9] 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, 2007, 34(7): 695-703.

[10] Kalscheuer R, Luftmann H, Steinb Chel A. Synthesis of Novel Lipids in *Saccharomyces cerevisiae* by Heterologous Expression of an Unspecific Bacterial Acyltransferase[J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70: 7119-7125.

[11] 曹建斌,范晓军,梁爱华. 杆状病毒及其应用[J]. 科技情报开

发与经济, 2007, 17(18): 131.

[12] 凌同. 昆虫杆状病毒表达系统的研究进展与应用[J]. 微生物学免疫学进展, 2014, 42(2): 70.

[13] Rainer Kalscheuer, Alexander Steinbuechel. A novel bifunctional wax ester synthase/acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase mediates wax ester and triacylglycerol biosynthesis in *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1 [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278: 8075-8082.

[14] Stefan Uthoff, Tim Stoveken, Nikolaus Weber, *et al.* Thio wax ester biosynthesis utilizing the unspecific bifunctional wax ester synthase/acyl coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase of *Acinetobacter* sp. strain ADP1 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, (2): 790-796.

[15] Tim Stöveken, Rainer Kalscheuer, Ursula Malkus, *et al.* The wax ester synthase/acyl coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase from *Acinetobacter* sp. strain ADP1: characterization of a novel type of acyltransferase [J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(4): 76-1369.

[16] Magdalena Miklaszewska, Adam Kawiński, Antoni Banas. Detailed characterization of the substrate specificity of mouse wax synthase [J]. Acta Biochimica Polonica, 2013(60): 209-215.

[17] Feng-Ling Li, Xue-Min Wu, Patricia Lam, *et al.* Identification of the wax ester synthase/acylcoenzyme A: diacylglycerol acyltransferase WSD1 required for stem wax ester biosynthesis in Arabidopsis [J]. Plant Physiology, 2008(148): 97-107.

[18] Shuobo Shi, Juan Octavio, Valle Rodríguez, *et al.* Functional expression and characterization of five wax ester synthases in *Saccharomyces cerevisiae* and their utility for biodiesel production [J]. Biotechnology for Biofuels, 2012(5): 7.

[19] Kathryn D Lardizaba, James G Metz, Tetsuo Sakamoto, *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): 645-655.

[20] Alex S. Rajangam, Satinder K. Gidda, Christian Craddock, *et al.* Molecular characterization of the fatty alcohol oxidation pathway for wax ester mobilization in germinated jojoba seeds [J]. Plant Physiology, 2013, 161(1): 72-80.

[21] Pollard M R, Mckeen T, Gupta L M. Studies on biosynthesis of waxes by developing jojoba seed: II. The demonstration of wax biosynthesis by cell-free homogenates [J]. Lipids, 1979, (14): 651-662.

[22] Brett M Barney, Rachel L Mann, Janet M. Ohlert. Identification of a residue affecting fatty alcohol selectivity in wax ester synthase [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(1): 396-399.

[23] 吴小锋,曹翠平,鲁兴萌. 昆虫杆状病毒表达系统中重组蛋白质的降解及其对策[J]. 蚕业科学, 2005, 31(4): 382-388.

(责任编辑:张玲)