

黏虫体内两种微管蛋白基因 cDNA 序列的克隆与序列分析

樊 东^{1,2}, 秦松柏¹, 朴冬花², 许艳丽^{1*}

(1. 中国科学院东北地理与农业生态研究所, 哈尔滨 150081; 2. 东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030)

摘要 以黏虫 4 龄幼虫为材料提取总 RNA, 利用 RT-PCR 和 cDNA 末端快速扩增技术 (RACE), 分别扩增得到该虫的 α 和 β 微管蛋白基因的 cDNA 序列各 1 条。其中 α 微管蛋白基因的 cDNA 序列 1 443 个碱基, 包括一个 1 353 个碱基的开放阅读框, 编码一个含 450 个氨基酸的蛋白, 分子量约为 50.0ku。氨基酸的 142~148 位存在一个微管蛋白标志信号片段 GGGTGSG, 在氨基酸序列的 C-端有一个酪氨酸残基, N-端存在一个对转录后调控非常重要的保守区 MRECI 序列, 以上特点与其他昆虫 α 微管蛋白氨基酸序列相同。黏虫 β 微管蛋白基因 cDNA 序列含 1 906 个碱基, 开放读码框 1 344 个碱基, 编码氨基酸 447 个, 分子量约为 50.2ku, 等电点 4.75。1~4 个氨基酸 MREI 为 β 微管蛋白转录后调控信号, 140~146GGGTGSG 位同样存在一个微管蛋白标志信号片段。序列比对表明, 克隆的 α 和 β 微管蛋白基因与其他昆虫的 α 和 β 微管蛋白基因在核苷酸和氨基酸水平上都是高度同源的, 黏虫与家蚕 (*Bombyx mori*) α 微管蛋白的氨基酸序列同源性达到 99.3%, 与其他 3 种夜蛾科昆虫 α 微管蛋白的氨基酸序列同源性更是达到 100%。黏虫与家蚕 β 微管蛋白的氨基酸序列同源性达到 98.7%, 与烟草天蛾 β 微管蛋白的氨基酸序列同源性达到 99.6%。两个基因的 cDNA 序列已经登录 GenBank 并获得登录号分别为 EU100016 和 EU234504。

关键词 黏虫; α 微管蛋白; β 微管蛋白; 克隆; 序列分析

中图分类号 Q 785, S 433.4

Cloning and sequence analysis of two types of tubulin genes from the armyworm, *Mythimna separata* Walker

Fan Dong^{1,2}, Qin Songbai¹, Piao Donghua², Xu Yanli¹

(1. Northeast Institute of Geography and Agricultural Ecology, Chinese Academy of Sciences, Harbin 150040, China; 2. Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract Total RNA was isolated from the forth instar larvae of the armyworm, *Mythimna separata* Walker. An α and a β tubulin cDNA sequences were cloned by RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE). The α tubulin cDNA sequence is 1 443 bp, which contains an open reading frame of 1 353 bp and encodes a polypeptide of 450 residues with a predicted molecular weight of about 50.0ku. There is a tubulin signature sequence GGGTGSG at the sites 142~148 of the deduced amino acid sequence. The C-terminal tyrosine residue is conserved. The MRECI domain, probably implicated in the autoregulated post-transcriptional mechanism, is found at the N-terminus. The β tubulin cDNA sequence is 1 906 bp, containing an open reading frame of 1 344 bp and encoding a polypeptide of 447 residues with a predicted molecular weight of about 50.2ku. There is a tubulin signature sequence GGGTGSG at the sites 140~146 of the deduced amino acid sequence, too. The MREI domain, a beta-tubulin mRNA autoregulation signal, is found at the N-terminus. The α and β tubulin cDNAs and the deduced amino acid sequences share high level of homology with those from other insects. The identity of the α tubulin amino acid sequence from *M. separata* with that of *Bombyx mori* is 99.3%, and with that of other three Noctuidae insects, 100%. The identity of the β tubulin amino acid sequence from *M. separata* with that of *Bombyx mori* is 98.7%, and with that of *Manduca sexta*, 99.6%. The α and β tubulin cDNA sequences have been deposited in GenBank under accession Nos. EU100016 and EU234504, respectively.

Key words *Mythimna separata* Walker; α tubulin; β tubulin; cloning; sequence analysis

细胞的基本组成成分微管是由 α 和 β 两种微管蛋白组合而成的异源二聚体。微管蛋白参与许多细

胞功能,包括维持细胞形态、细胞内运输、鞭毛和纤毛的运动、染色体运动和细胞分裂等。微管抑制剂可通过干扰细胞分裂中纺锤体的形成,使细胞停滞在有丝分裂中期,阻断细胞分裂增殖;同时,由于微管是信号转导和物质运输的通道,干扰微管的形成可影响与凋亡相关的信号转导通路,引起细胞凋亡。针对微管参与细胞的分裂增殖和细胞内物质运输等多种生物学特性,阻断微管功能的抗微管药物广泛应用于医学领域,比较熟知的有抗肿瘤、细胞核型诊断试剂、抗痛风、抗寄生虫及农业上的杀虫剂等方面^[1-2]。根据昆虫微管蛋白的不同结构和功能筛选对昆虫微管有效的抑制剂来控制昆虫的生长发育或不同器官的有效功能的发挥来达到控制害虫的目的,在未来的害虫综合治理中具有广泛的应用前景。

虽然目前已经有许多高等真核生物的微管蛋白的基因序列被克隆出来,但对包括昆虫在内的无脊椎动物的微管蛋白家族研究得却很少^[3]。从目前昆虫中昆虫微管蛋白基因研究结果看,昆虫中的微管蛋白也是由 α 和 β 两种微管蛋白基因编码的。在黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)中已经有4种 α 微管蛋白和5种 β 微管蛋白基因被克隆出来,它们表达于昆虫的不同发育阶段和不同的组织中^[4-6]。在家蚕中有4种 β 微管蛋白和3种 α 微管蛋白基因被鉴定出来^[7],其中1种 β 微管蛋白基因是在化蛹期间的睾丸中特异表达的^[8],1种 β 微管蛋白基因与翅芽的形成有关,其表达受蜕皮激素的调控^[9],1种 α 微管蛋白基因与翅芽的发育和细胞的有丝分裂密切相关^[10]。在烟芽夜蛾(*Heliothis virescens*)和烟草天蛾(*Manduca sexta*)中也各克隆出1种 β 微管蛋白基因。其中从烟草天蛾的前胸腺中鉴定出的 β 微管蛋白基因是1种特异表达的 β 微管蛋白基因,发现它与昆虫蜕皮有关^[11-12]。目前研究结果统计表明, α 微管蛋白含有可以编码450个氨基酸的开放读码框,而 β 微管蛋白含有可以编码447个氨基酸的开放读码框;在微管蛋白氨基酸的结构域上, α 和 β 两种分子都含有GGGTGSG结构域,是微管蛋白标志信号片段,该区域是GTP核苷酸结合位点; α 和 β 微管蛋白氨基酸序列N-端的转录后调控信号序列不同, α 微管蛋白为MRECI序列,而 β 微管蛋白为MREI序列;两种基因在昆虫纲中是高度保守的,同一种昆虫或不同种昆虫 α 微管蛋白氨基酸序列之间同源性较高,同一种昆虫或不同种昆虫 β 微管蛋白氨基酸序列之间同源性也较高,而同一种昆虫或不同种昆虫的 α 和 β 微管蛋白氨基酸序列间的同源性则差异较大。

黏虫(*Mythimna separata* Walker),属鳞翅目夜蛾科,此虫广布于旧北区东部,印度和澳大利亚等28个国家和地区,为多食性、暴发性、危害性大的害虫,从分子水平研究其生长发育等生物学过程对于该虫的防治具有重要意义。本文采用RT-PCR和cDNA末端快速扩增技术,以黏虫总RNA为材料,克隆了可以编码450个氨基酸的 α 微管蛋白基因的cDNA序列和1个可以编码447个氨基酸的 β 微管蛋白基因的cDNA序列。这2种类型微管蛋白基因序列的获得为筛选微管蛋白抑制剂、研究 α 和 β 微管蛋白之间的聚合作用、研究昆虫之间在分子水平上的进化关系奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 昆虫材料、菌株、质粒与试剂

利用黑光灯在田间诱集黏虫成虫,室内饲以5%蜂蜜水使其产卵并用天然饲料喂养到4龄幼虫备用;RNA提取试剂盒TRIzol® Reagent为Invitrogen公司产品、反转录酶M-MLV Reverse Transcriptase、克隆载体pGEM-T easy Vector、低熔点琼脂糖购自Promega公司;DNA胶回收试剂盒购自TaKaRa公司;Taql plus DNA聚合酶为上海生工生物工程公司产品,受体菌JM109由本实验室保存,其余试剂为进口或国产分析纯。

1.2 昆虫总RNA的提取

黏虫总RNA的提取参照RNA提取试剂盒说明,每100 mg虫体加入TRIzol® Reagent 1 mL。提取的总RNA放入-86℃冰箱中备用。

1.3 利用RT-PCR技术克隆基因的5'端

比较家蚕(*Bombyx mori*) (GenBank登录号NM_001043419)、甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*) (GenBank登录号为EU100017)、小地老虎(*Agrotis ipsilon*) (GenBank登录号为EU100018)3种昆虫 α 微管蛋白基因的序列,在5'端起始密码子ATG的上游和1214碱基处设计1对引物: α Tub-5'-GATCAA AATGCGTGA GTG CAT CTC-3'和Anti α Tub-5'-CTC ACC GAC GTA CCA GTG CAC GAA-3'。

比较家蚕(*B. mori*) (GenBank登录号NP_001036887)、烟草天蛾(*M. sexta*) (GenBank登录号为O17449)2种 β 微管蛋白基因A序列,在5'端起始密码子ATG的上游和1300碱基处设计1对引物: β Tub-5'-G CTC GCA CAA AAT GAG GGA AAT CGT-3'和Anti β Tub-5'-CTC ATC GAC CTC CTT CAT GGA CAT-3'。

以 Oligo (dt) 3site adapter primer: 5' - GAC TCG AGT CGA CAT CGA (T)₁₇ - 3' 为 cDNA 合成引物,合成的 cDNA 片段以 α Tub 和 Anti α Tub 扩增 α 微管蛋白 cDNA 序列的特异片段,以 β Tub 和 Anti β Tub 扩增 β 微管蛋白 cDNA 序列的特异片段。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 3min; 94 °C, 30 s; 58 °C, 1 min; 72 °C, 2 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物回收,与 pGEM-T easy vector 连接、转化、筛选、鉴定,方法按 Sambrook 和 Russell^[13] 进行。连接正确的重组子由上海生工生物工程公司进行序列测定。

1.4 利用 3'RACE 技术克隆基因的 3' cDNA 序列

根据得到的 α 微管蛋白 5' 序列设计 1 个克隆基因 3' 端的上游引物 α Tub1 - 5' - GGC CAG ATG CCC ACA GAC AAG ACC - 3'。利用 α Tub、 α Tub1 和 3 site adapter primer: 5' - GAC TCG AGT CGA CAT CGA - 3' 通过巢式 PCR 扩增 α 微管蛋白基因的 3' 端。根据得到的 β 微管蛋白 5' 序列设计 1 个克隆基因 3' 端的上游引物 β Tub1 - 5' - TGA CCT CAA CCA CCT GG - 3'。利用 β Tub、 β Tub1 和 3 site adapter primer 通过巢式 PCR 扩增 β 微管蛋白基因的 3' 端,方法同 1.3。

1.5 序列分析

利用 ExPASy 网站 (<http://us.expasy.org/tools/dna.html>) 的蛋白分析软件对获得的 cDNA 序列进行翻译,推导得到氨基酸序列。推导得到的氨基酸序列的分子量、等电点及结构域预测也可以通过 ExPASy (<http://us.expasy.org/>) 的相关蛋白分析工具获得。利用 ClustalW 软件进行多序列比较及同源性百分数计算。序列比对的昆虫来自于 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 中与克隆基因氨基酸序列同源性较高的昆虫。

2 结果与分析

2.1 α 和 β 微管蛋白基因 cDNA 序列的获得

利用 RT-PCR 技术扩增出黏虫的 α 和 β 微管蛋白基因 5' 端部分 cDNA 序列(图 1 的 2 和 4),得到的 PCR 产物经序列测定,在 GenBank 上用 Blast 软件搜索,找到同源性较高的序列均为昆虫 α 和 β 微管蛋白 cDNA 序列,初步断定这两段 cDNA 序列属于昆虫 α 和 β 微管蛋白全长 cDNA 序列的一部分。利用获得的 5' 端序列设计的引物,采用 3' RACE 方法克隆得到了这两个基因的 3' 端(图 1 的

1 和 3),经过序列拼接得到基因包括完整开放读码框在内的 cDNA 序列。克隆得到的黏虫的 α 和 β 微管蛋白 cDNA 序列已经登录 GenBank 并获得登录号分别为: α 微管蛋白基因登录号为 EU100016, β 微管蛋白基因登录号为 EU234504。

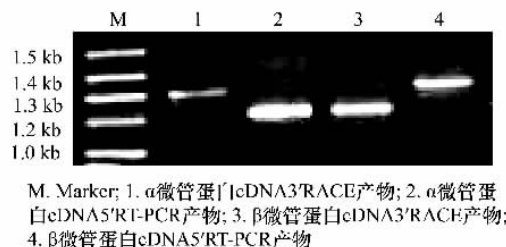


图 1 黏虫 α 和 β 微管蛋白 cDNA 序列 PCR 扩增电泳结果

黏虫 α 微管蛋白基因的 cDNA 序列 1443 个碱基,含有 5 个碱基和 85 个碱基的 5' 和 3' 非编码区,包括一个 1 353 个碱基的开放读码框,编码 450 个氨基酸组成的多肽,分子量 50.0ku,在 1408~1413 碱基位置含有多聚腺苷酸信号(polyadenylation signal)AATAAA(图 2)。多肽的等电点为 5.01,该基因的 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列见图 2。

黏虫 β 微管蛋白基因的 cDNA 序列 1906 个碱基,含有 11 个碱基和 551 个碱基的 5' 和 3' 非编码区,包括一个 1 344 个碱基的开放读码框,编码 447 个氨基酸组成的多肽,分子量 50.2 ku,在 1833~1839 碱基位置含有多聚腺苷酸信号(polyadenylation signal)。多肽的等电点为 4.75,该基因的 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列见图 3。

2.2 α 和 β 微管蛋白基因 cDNA 序列和氨基酸序列分析

利用 ExPASy 网站的蛋白分析软件 ScanProsite 对获得的 α 和 β 微管蛋白基因 cDNA 序列推导的氨基酸序列进行分析,结果发现在 α 微管蛋白氨基酸序列的 142~148 位存在一个微管蛋白信号片段 GGGTGSG, β 微管蛋白 140~146 位的 GGGTGSG 同样是一个微管蛋白标志信号片段,这个片段是 GTP 核苷酸结合位点,是 α 和 β 两种分子结合所必须的结构^[14]。在 α 微管蛋白氨基酸序列的 C 一端有一个酪氨酸残基,它在序列的酪氨酸化和去酪氨酸化(tyrosination and detyrosination)过程中有重要作用^[15]。 α 微管蛋白氨基酸序列 N 一端的 MRECI 序列和 β 微管蛋白氨基酸序列的 N 一端的 MREI 为微管蛋白转录后调控信号^[16-18]。

1
6
1
96
31
186
61
276
91
366
121
456
151
546
181
636
211
726
241
816
271
906
301
996
331
1086
361
1176
391
1266
421
1356
451

CAAAT
ATGCGTGAGTGCATCTCAGTACACGTTGGACAAGCCGGAGTCCAGATCGGTAATGCCTGCTGGGAATTATACTGCCTTGAGCATGGGAATC
M R E C I S V H V G Q A G V Q I G N A C W E L Y C L E H G I
CAGCCTGATGGCCAGATGCCACAGAACACCGTGGGCGGTGGTATGACTCCTTCAACACCTTCTTACGCGAGACCGGTGCCGGCAAG
Q P D G M P T D K T V G G G D D S F N T F S E T G A G K
CACGTCCCCAGGGCTGTGTTCGTGCACTTGAACCCACTGTAGTTGATGAGGTCCGCACTGGAACATACAGACAGTTGTTTCATCCAGAA
H V P R A V F V D L E P T V G V D E V R T G T Y R Q L F H P E
CAACTTATCATGGTAAGGAAGATGCGGCCAACAACTACGCGCTGGAGCACTACCACTCGGCAAGAAATCGTAGACTAGTCTGACCTGAC
Q L I T G K E D A A N N Y A R G H Y T I G K E I V D L V L D
CGCATCCGCAAGCTCGCCGACCACTGCACTGGCTGCAAGGCTTCTTATCTTCCACTCCTTCGGTGGAGGTACCGGATCCGGTTTACC
R I R K L A D Q C T G L Q G F L I F H S F G G G T G S G F T
TCCCTCCTCATGAGCGACTCTCCGTGGACTACGGCAAGAAGTCCAAGTGGAGTCCGCACTTACCCGGCGCTCAGGTGTCCACCGCC
S L L M E R L S V D Y G K K S K L E F A I Y P A P Q V S T A
GTGCTGGAGCCCTACAACCTCCATCTCACCACGCAACACCCTGGAGCACTCCGACTGCGCCTTATGGTCGACAAACGAGGCCATCTAC
V V E P Y N S I L T T H T T L E H S D C A F M V D N E A I Y
GACATCTGCCCGCAACCTCGACATCGAGTCCGCCCTTACCAACCTGAACCGTCTCATCGGGCAGATCGTGTCTCTCAATCAGGCC
D I C R R N L D I E R P T Y T N L N R L I G Q I V S I T A
TCCTGCGCTTCGACGGCGCCCTCAAGCTGCACTCACCAGTTCAGACCAACTTGGTGCCCTACCCCGATCCACTTCCCTCTGGT
S L R F D G A L N V D L T E F Q T N L V P Y P R I H F P L V
ACATACGCCCCGTCATCTCTGCCGAGAAGGCTTACCACGAGCAGCTGTGCTGGCTGAGATCACCAACGCTTGTCTCGAGCCCGCCAC
T Y A P V I S A E K A Y H E Q L S V A E I T N A C F E P A N
CAGATGGTCAAGTGCAGCCCCCGCCACGGAAGTACATGCGCTGTGATGTTGTACCGTGGAGACGTCGTGCCAAGGACGTGAACGCC
Q M V K C D P R H G K Y M A C C M L Y R G D V V P K D V N A
GCCATCGCTACCATCAAGACCAAGCGTACCATCCAGTTCGTGGACTGGTGTCTTACCGGTTTCAAGGTGGGCATCAACTACCAGCCCCCG
A I A T I K T K R T I Q F V D W K P T G K V G I N Y Q P P
ACCGTCGTGCCCGCGGCACTTGCCCAAGGTGCAGCGTCCGCTGTGATGTTGTCCACACCCACCGCATCGCCGAGGCTCGGCTCGC
T V V P G D L A K V Q R A V C M L S N T T A I A E A W A R
CTGGACCACAAGTTCGACCTGATGTACGCCAAGCGCGCTTCGTGCACTGGTACGTGGTGAGGGTATGGAGGAGGGAGAGTTCTCCGAG
L D H K F D L M Y A K R A F V H W Y V G E G M E E G E F S E
GCGGTGAGGATCTGGCTGCCCTGGGAAGGACTACGAAGAGGTCCGATGGACTGGGCGAGGGGAGGGGAGCCGAGGAGTAC
A R E D L A A L E K D Y E E V G M D S A E G E G E G A E E
TAAAGCTGAACCTGTTCACTGAGCACTCGCACCGATACATTCGGGTGACATGAATATAAAAAACAATTATGTTGTAATAAAAAAAAAAAAAA
*

起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA 加粗表示,多聚腺苷酸信号序列(AATAAA, 位于 3'非翻译区)用双下划线标出,
MRECI 保守区、GTP 核苷酸结合位点(GGGTGS)、C-端的酪氨酸残基涂黑表示

图2 黏虫 α 微管蛋白 cDNA 序列(GenBank 登录号 EU100016)和推导的氨基酸序列

1
12
1
102
31
192
61
282
91
372
121
462
151
552
181
642
211
732
241
822
271
912
301
1002
331
1092
361
1182
391
1272
421
1356
1446
1536
1626
1716
1806
1896

GCTCGCAAAA
ATGAGGGAATCGTGCATATTCAGGCCGACAACTGCGGTAACAGATTGGAGCCAAGTTCTGGGAGATCATCTCCGACGAGCCGCGATC
M R E I V H I Q A G Q C G N Q I G A K F W E I I S D E H G I
GACCCACTGCGGCTTACCATTGGCGACTCAGACCTGCGAGTGGAGCGCATCAACGTTTACTCAATGAGGCTCCGAGGCAAGTACGTG
D P T G A Y H G D S D L Q L E R I N V Y N E A S G K Y V
CCCCGCGCCATCTAGTCGATCTCGAGCCCGGACCATGGACTCGGTGCGCTCGGACCCCTTCGGACAGATCTTCCGACCTGACAACCTC
P R A I L V D L E P G T M D S V R S G P F G Q I F R P D N F
GTTTTCGGACAGTCCGGAGCCGTAACAACCTGGGCTAAGGGTCACTACACAGAGGGCGCCGAGCTTGTGGATTCCGCTCTTGGATGTCCT
V F G Q S G A G N N W A K G H Y T E G A E L V D S V L D V V
CGCAAGGAAGCAGATCATGTACTGCTTCAAGGATTTCACTACACACTCTCTCGCGCGGCGACTGGTTCCGGAATGGGCACTT
R K E A E S C D C L Q G F Q L T H S L G G G T G S G M G T L
CTTATCTCCAAATCAGAGAGGAATATCCCGACAGAATTATGAACATACACTCAGTTGTACCTTCGCTAAAGTGTGAGACACAGTAGTA
L I S K I R E E Y P C D R I M T Y S V V P S P K V S D A T G V V
GAACCTTACAACGCCACATCAGTCCACCGTAGTAGTAAACACAGACGAGACCTACTGTATCGACACAGAGGCTTTATACGACATC
E P Y N A T L S V H Q L V E N T D E T Y C I D N E A L Y D I
TGCTTCCGACGCTCAAACTATCCACACCCACGTACGGCGACCTCAACCACCTGGTCTCCCTCACCATTGTCCGGCTGACGACGTGTCTG
P F R T L K L S T P T Y G D L N H L V S L T M S G V T C T C L
CGGTTCCTTCCGAGCTGAATCGGGAATCTCCGCAAGTGGCGGTCAACATGGTGGCGCTTCCGACCTCTCCATCTCTTCATGCCCGGTT
R F P G Q L N A D L R K L A V N M V P F P R L H F F M P G G
GCTCCCTGACATCTCGCGGACGCCAGCAGTACCGCGCCCTACCGTGCCGAGTCCAGCAGCAGATGTCGACGCCAAGAACATGATG
A P L T S R G S Q Q Y R A L T V P E L T Q Q M F D A K N M M
GCGGCTCGGACCGCGGCCACGCGCTACCTGACCGTGGCGGCTTCCGTGGCGGATGTCATGAAGGAGTGGACGAGCAGATG
A A C D P R H G R Y L T V A A I T F R G R M S M K E V D E Q M
CTCAACATCAGAACAGAAGTCTGCTACTTCTGTAAGTGGATCCGGAACACGTGAAGACCGCGCTGTGCGACATCCCACTCCGCGG
L N I Q N K N S Y F V E W I P N N V K T A V D I P P R G
CTCAAGATGGCGGCCAGTTTATCGGCACTCCACCGCCATCCAGGAGCTGTTCAGCGCATCTCGGAGCAGTTCACCGCTATGTTACG
L K M A T A T T F I G N S T A I Q E L F K R I S E Q F T A M F R
CGCAAGGGATTCTTGTGATTTGTACATGGCGAGGGCATGGACGAGATGGAGTTCACCGAGGCGGAGAGCAACATGAACGACCTGTGCTG
R K A F L H W Y T G E G M D E M E F T E A E S N M N D L V S
GAGTACCAGCAGTACCAGGAGCCACCGGACGAGGACGCGGATTCGACGAGGAGGCGGAGCAGGAGATCGAGGACAACTAA
E Y Q Q E A T C D E D A E F D E A E Q E I E D N *
ACACTACCCAGCCCGTCCACACCCCAACACCCCTGCTCCCGATCCGAGCGTCCGCGCGCTCGCACGGGACGCTCTTTTGT
TTGCATTAGTATTTCCGGTAACTGTGGGACTTATTATGTTACGTAGGAGGTACCTCCCGTGGGAGCTGGGGTTTACATTTCCCG
GGGGGGGATTCTTACCGAAGGGGACTTCCGATGTTTATGGCTGAACAGGTTTCCCGAGGCGGAGGCGGCGCTCCCGCTGCCCGCC
CAGCCGAGTGCATCGACCCCTGATGACACAAAGGAAAAATTTTTTTTGAAGGGGTGAATATTTTTTAATGCCTAAGTTTAAAT
TTAATATTTGCTTTGATATCTGACAAATGTGTTATTCATGGCTTTTTTAAATAAGAAGTTAGTACAACATTTGGAATCGGTCAA
GGTTTTTAATTATTATTCAGGGGGTAAATAACTCAAGGATTTTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAA

起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA 加粗表示,多聚腺苷酸信号序列(AATAAA, 位于 3'非翻译区)用双下划线标出,
MREI 保守区、GTP 核苷酸结合位点(GGGTGS)涂黑表示

图3 黏虫 β 微管蛋白 cDNA 序列(GenBank accession No. EU234504)和推导的氨基酸序列

2.3 α 和 β 微管蛋白 cDNA 序列和氨基酸序列同源性分析

把克隆的两种微管蛋白 cDNA 序列及推导得到的氨基酸序列分别在 GenBank 中的 Blast 搜索, 结果在 GenBank+EMBL+DDBJ+PDB 数据库中显示同源性较高的序列均为昆虫 α 和 β 微管蛋白基因。同源性结果如表 1 和表 2 所示, 氨基酸序列的同源性比较分析表明: 克隆的黏虫 α 微管蛋白氨基

酸序列与甜菜夜蛾、小地老虎、八字地老虎几种夜蛾科昆虫 α 微管蛋白氨基酸序列间的同源性高达 100%, 与其他昆虫 α 微管蛋白基因氨基酸序列的同源性也达到 96% 以上; 黏虫与家蚕 β 微管蛋白的氨基酸序列同源性达到 98.7%, 与烟草天蛾 β 微管蛋白的氨基酸序列同源性达到 99.6%。黏虫的 α 和 β 微管蛋白氨基酸序列的同源性差异较大, 只有 39.4%。

表 1 昆虫 α 微管蛋白基因氨基酸(上三角)和核苷酸(下三角)序列的同源性¹⁾ %

核苷酸	氨基酸											
	Bmatub	Dmatub	Tcatub	Ctatub	Amatub	Aaatub	Lsatub	Maatub	Msatub ²⁾	Ayatub	Acatub	Seatub
Bmatub	—	98.4	98.7	99.1	98.9	98.9	97.1	98.9	99.3	99.3	99.3	99.3
Dmatub	85.5	—	99.3	99.3	99.1	99.1	97.6	99.6	99.1	99.1	99.1	99.1
Tcatub	82.0	82.0	—	99.6	98.9	99.3	97.3	99.8	99.3	99.3	99.3	99.3
Ctatub	80.0	79.3	82.0	—	99.3	99.8	97.8	99.8	99.3	99.3	99.3	99.3
Amatub	77.0	77.2	78.6	81.2	—	99.1	97.3	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1
Aaatub	84.6	88.1	83.1	82.9	79.0	—	97.6	99.6	99.1	99.1	99.1	99.1
Lsatub	82.3	83.0	80.4	79.6	77.3	83.1	—	97.6	97.3	97.3	97.3	97.3
Maatub	83.1	83.1	84.6	80.6	79.5	84.0	82.7	—	99.6	99.6	99.6	99.6
Msatub ²⁾	88.7	88.3	81.4	78.9	76.1	85.7	84.0	84.6	—	100.0	100.0	100.0
Ayatub	88.0	88.2	81.4	78.4	76.6	85.4	83.7	84.5	97.4	—	100.0	100.0
Acatub	87.5	87.3	81.1	78.6	77.1	85.2	83.6	85.1	96.6	97.0	—	100.0
Seatub	88.8	88.1	81.3	78.6	76.3	86.0	83.8	84.2	95.7	95.4	94.4	—

- 1) Bmatub: 家蚕 (*Bombyx mori*) α 微管蛋白, GenBank 登录号 NM_001043420; Dmatub: 黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) α 微管蛋白 alpha-Tub84B, GenBank 登录号 NM_057424; Tcatub: 赤拟谷盗 (*Tribolium castaneum*) α 微管蛋白, GenBank 登录号 XM_961314; Ctatub: 摇蚊 (*Chironomus tentans*) α 微管蛋白, GenBank 登录号 AF272829; Amatub: 意大利蜜蜂 (*Apis mellifera*) α 微管蛋白, GenBank 登录号 XM_391936; Aaatub: 埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*) α 微管蛋白, GenBank 登录号 DQ440241; Lsatub: 灰飞虱 (*Laodelphax striatellus*) α 微管蛋白, GenBank 登录号 AY508717; Maatub: 松褐天牛 (*Monochamus alternatus*) 微管蛋白, GenBank 登录号 EU073050; Ayatub: 小地老虎 (*Agrotis ipsilon*) α 微管蛋白, GenBank 登录号 EU100018; Acatub: 八字地老虎 (*Agrotis c-nigrum*) α 微管蛋白, GenBank 登录号 EU100015; Seaturb: 甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) α 微管蛋白, GenBank 登录号 EU100017。
- 2) 由本研究克隆的黏虫 (*Mythimna separata*) α 微管蛋白, GenBank 登录号 EU100016。

表 2 昆虫 β 微管蛋白基因氨基酸(上三角)和核苷酸(下三角)序列的同源性¹⁾ %

核苷酸	氨基酸											
	Bmβtub	Dmβtub	Tcβtub	Amβtub	Aaβtub	Lsβtub	Maβtub	Msβtub ²⁾	Agβtub	Cpβtub	Gmβtub	Maβtub
Bmβtub	—	97.3	97.8	97.8	97.3	97.8	98.7	98.7	97.1	93.3	97.5	97.5
Dmβtub	85.9	—	99.1	98.7	99.6	97.5	98.2	97.8	99.3	94.9	99.8	98.9
Tcβtub	82.4	81.7	—	99.1	99.6	98.0	98.7	98.2	99.3	94.6	98.9	99.8
Amβtub	80.6	80.7	79.3	—	98.7	98.0	98.7	98.2	98.7	93.7	98.4	98.9
Aaβtub	82.6	85.3	83.0	80.8	—	97.5	98.2	97.8	99.8	95.1	99.3	99.3
Lsβtub	82.0	84.0	80.4	79.8	84.2	—	99.1	98.7	97.3	93.7	97.8	97.8
Maβtub	88.3	87.1	83.2	79.8	83.3	83.2	—	99.6	98.0	94.2	98.4	98.4
Msβtub ²⁾	87.3	87.2	81.8	79.7	82.7	83.9	91.2	—	97.5	94.0	98.0	98.0
Agβtub	83.4	87.4	82.6	79.8	87.2	82.3	85.1	85.3	—	94.9	99.1	99.1
Cpβtub	80.8	84.3	79.6	77.7	85.8	80.6	82.4	82.3	86.9	—	94.9	94.6
Gmβtub	78.0	79.5	79.8	78.8	81.3	77.8	77.5	77.7	78.6	74.8	—	98.7
Maβtub	82.1	82.1	83.0	81.0	83.5	82.7	81.9	81.6	81.0	78.3	80.7	—

- 1) Bmβtub: 家蚕 (*B. mori*) β 微管蛋白, GenBank 登录号 NM_001043422; Dmβtub: 黑腹果蝇 (*D. melanogaster*) β 微管蛋白 alpha-Tub84B, GenBank 登录号 NM_079071; Tcβtub: 赤拟谷盗 (*T. castaneum*) β 微管蛋白, GenBank 登录号 XM_962174; Amβtub: 意大利蜜蜂 (*A. mellifera*) β 微管蛋白, GenBank 登录号 XM_392313; Aaβtub: 埃及伊蚊 (*A. aegypti*) β 微管蛋白, GenBank 登录号 XM_001655975; Lsβtub: 灰飞虱 (*L. striatellus*) β 微管蛋白 GenBank 登录号 AY479977; Msβtub: 烟草天蛾 (*M. sexta*) β 微管蛋白, GenBank 登录号 AF030547; Agβtub: 冈比亚按蚊 (*Anopheles gambiae*) β 微管蛋白, GenBank 登录号 XM_309765; Cpβtub: 淡色库蚊 (*Culex pipiens pallens*) β 微管蛋白, GenBank 登录号 DQ401465; Gmβtub: 刺舌蝇 (*Glossina morsitans morsitans*) β 微管蛋白, GenBank 登录号 DQ377071; Maβtub: 松褐天牛 (*Monochamus alternatus*) β 微管蛋白, GenBank 登录号 EU373305。
- 2) 本研究克隆的黏虫 (*M. separata*) β 微管蛋白, GenBank 登录号 EU234504。

3 讨论

氨基酸序列分析表明,黏虫与甜菜夜蛾、小地老虎、八字地老虎几种夜蛾科昆虫的 α 微管蛋白的氨基酸序列之间的同源性达到100%,其与鳞翅目家蚕、鞘翅目赤拟谷盗的氨基酸序列只有3个氨基酸的差别,与双翅目黑腹果蝇有4个氨基酸的差异,与包括人类在内的脊椎动物的同源性也在94%左右;同样黏虫与家蚕和烟草天蛾的 β 微管蛋白的氨基酸序列同源性达到98.7%和99.6%,与烟草天蛾只有2个氨基酸的差异,与家蚕有6个氨基酸的差异,可见这两种基因在昆虫乃至整个动物的进化中是高度保守的,利用这种保守性可以对昆虫以及昆虫与其他动物的进化关系进行分析。另外,对于昆虫 α 和 β 微管蛋白基因的序列及其结构特点的比较研究将为研究昆虫的细胞发生以及通过微管蛋白筛选特异性昆虫抑制剂提供重要根据。

本文只克隆了黏虫体内 α 和 β 微管蛋白的cDNA序列各1条,在虫体不同发育阶段表达的初步研究表明,在幼虫的不同发育阶段以及蛹期两个基因在RNA水平都是表达的(资料未列出),但在不同组织中的表达存在一定差异,目前的研究集中在虫体不同发育阶段和不同组织中两个基因的表达差异,同时通过筛选cDNA文库结合RACE方法在黏虫体内筛选这两类基因中其他不同分子结构和功能的基因,为全面了解微管蛋白的功能以及实际应用奠定基础。

参考文献

- [1] Giannakakou P, Sackett D, Fojo T. Tubulin/microtubules, still a promising target for new chemotherapeutic agents[J]. J Natl Cancer Inst, 2000, 92(3):182-183.
- [2] 李建农,蒋建东. 微管的生物学特性与药物研究[J]. 药理学报,2003,38(4):311-315.
- [3] Wen Jianguo, Yan Jian, Xu Jia, et al. Cloning and characterization of a $\beta 3$ tubulin cDNA from the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus*[J]. Biochemical Genetics, 2005, 43:59-64.
- [4] Michiels F, Falkenburg D, Mueller A M, et al. Testis-specific beta-2 tubulins are identical in *Drosophila melanogaster* and *D. hydei* but differ from the ubiquitous beta-1 tubulin[J]. Chromosoma, 1987, 95:387-395.
- [5] Rudolph J E, Kimble M, Hoyle H D, et al. Three *Drosophila* beta-tubulin sequences: a developmentally regulated isoform ($\beta 3$), the testis specific isoform ($\beta 2$), and an assembly-defective mutation of the testis specific isoform reveal both an ancient divergence in metazoan isotypes and structural constraints for beta-tubulin function[J]. Mol Cell Biol, 1987, 7: 2231-2242.
- [6] Goldstein L S B, Gunawardena S. Flying through the *Drosophila* cytoskeletal genome[J]. J Cell Biol, 2000, 150:F63-F68.
- [7] Hideki K, Kimihiko S, Guo-Xing Q, et al. Analysis of α - and β -tubulin genes of *Bombyx mori* using an EST database[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2003, 33:131-137.
- [8] Mita K, Neno M, Morimyo M, et al. *Bombyx mori* beta-tubulin gene specifically expressed in testis[J]. Gene, 1995, 162, 329-330.
- [9] Quan G X, Kanke E, Kawasaki H. Isolation and particular expression of a new β -tubulin gene in wing discs during metamorphosis of *Bombyx mori*[J]. J Seric Sci Jpn, 1998, 67:43-50.
- [10] Hachouf-Gherras S, Besson M T, Bosquet G. Identification and developmental expression of a *Bombyx mori* α -tubulin gene[J]. Gene, 1998, 208:89-94.
- [11] Raff E C, Fackenthal J D, Hutchens J A, et al. Microtubule architecture specified by a β -tubulin isoform[J]. Science, 1997, 275:70-73.
- [12] Rybczynski R, Gilbert L I. Cloning of a beta1 tubulin cDNA from an insect endocrine gland;developmental and hormone-induced changes in mRNA expression[J]. Mol Cell Endocrinol, 1998, 141:141-151.
- [13] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 3rd edition. New York: Cold Spring Harbor-laboratory Press, 2001: 26-118,611-627.
- [14] Kirschner M, Mitchison T. Beyond self-assembly from microtubules of morphogenesis[J]. Cell, 1986, 45:329-342.
- [15] Bulinski J C, Gundersen G G. Stabilization and post-translational modification of microtubules during cellular morphogenesis[J]. BioEssays, 1991, 13:285-293.
- [16] Yen T J, Gay D A, Pachter J S, et al. Autoregulated changes in stability of polyribosome-bound β -tubulin mRNAs are specified by the first 13 translated nucleotides[J]. Mol Cell Biol, 1988a, 8:1224-1235.
- [17] Yen T J, Machlin P S, Cleveland D W. Autoregulated instability of β -tubulin mRNAs by recognition of the nascent amino terminus of β -tubulin[J]. Nature, 1988b, 334: 580-585.
- [18] Cleveland D W. Autoregulated control of tubulin synthesis in animal cells[J]. Curr Opin Cell Biol, 1989, 1:10-14.