

白蜡虫 $\beta 1$ -微管蛋白基因 cDNA 克隆及序列分析

杨 璞¹, 陈晓鸣^{1*}, 朱家颖², 丁伟峰¹, 刘魏魏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. 西南林业大学保护生物学院, 云南省森林灾害预警与控制重点实验室, 云南 昆明 650224)

摘要:采用 RACE 和 RT-PCR 对白蜡虫雌成虫 $\beta 1$ -微管蛋白基因进行了克隆, 获得的 cDNA 全长序列为 1 492 bp, 完整开放阅读框为 1 341 bp, 编码 447 个氨基酸残基, 包含 β 微管蛋白的保守区域和 GTP 结合位点, 理论分子量约为 50.20 Kda, 等电点为 4.75。同源性分析表明: 所获得的 $\beta 1$ -微管蛋白与其它昆虫的 β 微管蛋白基因在氨基酸水平上是高度同源的, 该基因 cDNA 序列已经递交到 Genbank, 获得的登录号为 JF731244。

关键词:白蜡虫; 微管蛋白; RACE; 氨基酸

中图分类号: S899.1

文献标识码: A

cDNA Cloning and Sequence Analysis of $\beta 1$ -Tubulin from Chinese White Wax Scale *Ericerus pela* Chavannes (Homoptera: Coccidae)

YANG Pu¹, CHEN Xiao-ming¹, ZHU Jia-ying², DING Wei-feng¹, LIU Wei-wei¹

(1. Research Institute of Resource Insects, Chinese Academy of Forestry, The Key laboratory of Cultivating and Utilization of Resource Insects of State Forestry Administration, Kunming 650224, Yunnan, China; 2. Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control of Yunnan Province, Faculty of Conservation Biology, Southwest Forestry University, Kunming 650224, Yunnan, China)

Abstract: A full-length cDNA of $\beta 1$ -tubulin gene from *Ericerus pela* was obtained by using RACE and RT-PCR methods. The size of $\beta 1$ -tubulin gene is 1492 bp, which contains an open reading frame of 1 344 bp that encoding 447 amino acid residues with 50.20 kda molecular weight and 4.75 isoelectric point. The putative amino acid sequences contain conserved sequences of $\beta 1$ -tubulin and the GTP-binding site. The phylogenetic analysis showed that $\beta 1$ -tubulin gene of *E. pela* shares high identity with β -tubulin homologues from other insects. The sequences of $\beta 1$ -tubulin gene of *E. pela* were submitted to GenBank and the accession number was assigned JF731244.

Key words: *Ericerus pela*; tubulin; RACE; amino acid

微管是细胞骨架和纺锤体的重要组成部分, 对于细胞分裂和昆虫的生殖具有重要作用。微管是由 α 和 β 微管蛋白组成的异源二聚体, 是细胞骨架的重要组成部分, 参与许多细胞功能, 包括维持细胞形态、细胞内运输、信号转导、鞭毛和纤毛的运动、染色体运动等^[1-5]。微管蛋白由多基因家族编码, 微管蛋白的合成具有细胞类型的特异性, 不同组织、不同

发育时间会编码不同的微管蛋白, 实现不同的微管功能^[6-7], 但是对某一微管蛋白的特定功能还了解很少。

从目前研究结果看, 昆虫中的微管蛋白也是由 α 和 $\beta 2$ 种微管蛋白基因编码的, 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, 2 种微

收稿日期: 2011-01-29

基金项目: 国家自然科学基金委青年基金(31000983); 云南省应用基础研究基金(2010ZC235)和中国林业科学研究院资源昆虫研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(7-015-3)资助

作者简介: 杨 璞(1979—), 男, 博士, 助理研究员, 主要从事白蜡虫分子生物学研究. E-mail: zjuyangpu@yahoo.cn.

* 通讯作者.

管蛋白都含有 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。两种基因在昆虫纲中是高度保守的,它们之间存在着高度的保守性,但两种基因却是异源的,同一种昆虫 α 和 β 微管蛋白氨基酸序列间的同源性差异较大^[1, 8-11]。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的微管蛋白家族研究得并不多,尤其是我国资源昆虫在这方面的研究基本非常少。

白蜡虫 (*Ericerus pela* Chavanness) 是我国一种具有重要经济价值的资源昆虫,所分泌的白蜡作为高级动物蜡在医药、食品、机械制造和化妆品配料等方面有重要用途^[12]。从分子水平研究其生长发育、蜕皮、雌雄二型等生物学过程对于该虫的进一步利用具有重要学术意义。本研究根据白蜡虫 cDNA 消减文库中得到的 EST (expressed sequence tag) 序列,设计特异引物,采用 RACE (rapid amplification of cDNA ends) 和 RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 技术克隆了白蜡虫 $\beta 1$ -微管蛋白基因的 cDNA 全长序列,进而对该序列进行分析,为深入研究 $\beta 1$ -微管蛋白基因在白蜡虫生长发育、进化及其生殖等方面的机制提供依据。

1 材料与方 法

1.1 供试虫源

所用白蜡虫为采自昆明资源昆虫研究所人工大棚内女贞树上的雌成虫。

1.2 总 RNA 的提取及 cDNA 第 1 链的合成

RNA 提取采用 TRIzol 试剂 (Invitrogen, 美国),按照说明书操作提取白蜡虫雌成虫总 RNA,1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性,紫外分光光度计测定其浓度和纯度。第 1 链 cDNA 合成采用 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech),取 0.5 μg 总 RNA 按照试剂盒操作,合成第 1 链 cDNA 模板。

1.3 3' RACE 和 5' RT-PCR 扩增

根据已获得的 $\beta 1$ -微管蛋白 EST 序列设计特异引物,分别进行 3' RACE 和 5' RT-PCR 扩增。3' RACE 扩增使用 3' -GSP (5' -TGTCTGGAGTCAC-TACCTGTCTACG-3') 和 NUP (5' -AAGCAGTGG-TATCAACGCAGAGT-3') 引物组合,以合成的第 1 链 cDNA 为模板进行扩增,扩增体系为:2 \times Taq PCR MasterMix (天根) 25 μL ,上下游引物 (20 μmol

$\cdot \text{L}^{-1}$) 各 3 μL , cDNA 3 μL , ddH₂O 补至 50 μL 。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 50 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 31 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。根据其它昆虫 β 微管蛋白基因的 mRNA 序列设计 5' 端扩增的上游引物,使用 5' -F (5' -TGGTCCAATA-AGTGATGAAGAAAC-3') 和 5' -GSP (5' -TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3') 引物组合,以合成的第 1 链 cDNA 为模板扩增,反应体系和反应程序同前。

1.4 克隆和测序

PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后,紫外灯下切下相应条带,按照 Axygen 凝胶回收试剂盒 (爱思进,杭州) 操作,最后加入 25 μL 加热的 ddH₂O 洗脱。取 4 μL 纯化产物与 1 μL T 载体连接,按照 pGEM-T easy 载体连接试剂盒 (Promega, 上海) 操作,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜连接。42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴热激 60 s 转化大肠杆菌 DH5- α 感受态细胞,涂平板后通过蓝白斑筛选以及菌液 PCR 检测阳性重组克隆。菌液送交南京金斯瑞公司测序。

1.5 序列分析

测序结果采用 DNASTar 进行拼接,并与 NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库进行 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 比对,利用 DNAMAN 推导得到氨基酸序列,利用在线软件 ExPASy Proteomics Server (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html) 计算蛋白的等电点和分子量,用 clustalx1.83 对白蜡虫 $\beta 1$ -微管蛋白与其它昆虫 β -微管蛋白的氨基酸序列比对,分析序列同源性,并用软件 MEGA4.1 构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 cDNA 全长序列分析

提取的 RNA 见图 1A,5' 扩增长度为 1 117 bp,3' 扩增长度为 792 bp (图 1B),拼接后获得的白蜡虫 $\beta 1$ -微管蛋白基因的 cDNA 全长序列为 1 492 bp,包括开放阅读框 (open reading frame, ORF) 1 341 bp,5' 末端非翻译区 (Untranslated regions, UTR) 3 bp,3' 末端非翻译区长度为 148 bp。DNAMAN 分析其 ORF 编码 447 个氨基酸,预测分子量约为 50.20 Kda,等电点为 4.75。氨基酸序列分析结果发现:白蜡虫 $\beta 1$ -微管蛋白含有 2 个典型的 β -微管蛋白保守区: NNWAKGHY 和 RKAFLHWYTGEGMDEMEFTE;

1 个 GTP 结合位点:GGGTGSG;1 个转录后调控信号:MREI(图 1)。

2.2 β 1-微管蛋白序列相似性分析

经同源性分析表明:白蜡虫 β 1-微管蛋白与其它昆虫核酸序列一致性在 77%~84%,氨基酸序列一致性在 96%~99.8%,与木槿曼粉蚧 (*Maconellicoccus hirsutus*) 氨基酸序列一致性最高,达 99.8%,仅有一个氨基酸存在差别。系统树分析结果显示:白蜡虫 β 1-管蛋白与木槿曼粉蚧 β 1-管蛋白亲缘关系最近。

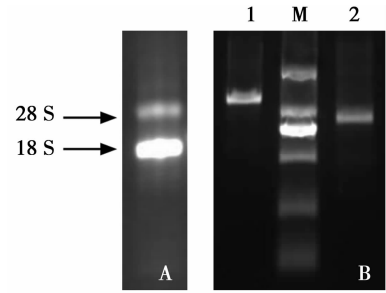


图 1 RNA、3' RACE 和 5' RT-PCR 电泳图

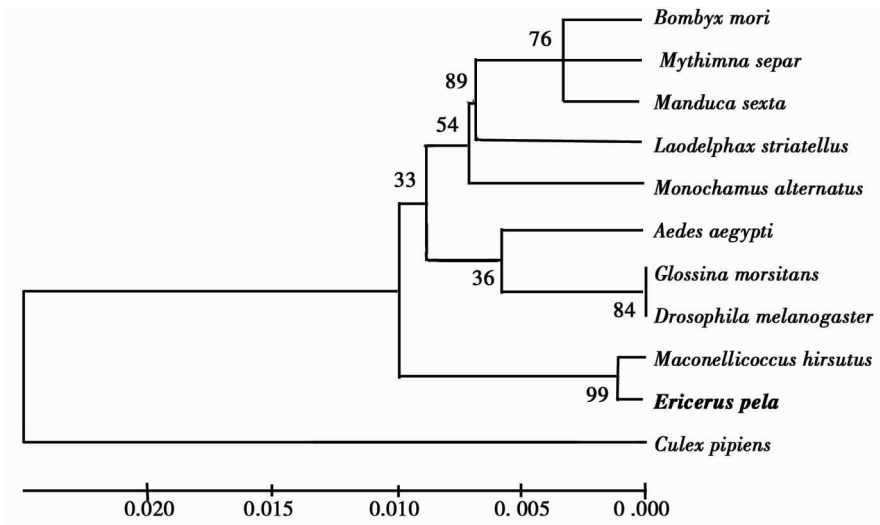
A 为提取的白蜡虫总 RNA 电泳图;B 中泳道 1 为 5' RT-PCR 扩增产物的电泳图,泳道 2 为 3' RACE 扩增产物的电泳图,Marker 依次为:2 000、1 000、750、500、250、100 bp。

```

1  AAAATGAGGAAATCGTACATCTGCAAGCCGGTCAATCGCGTAATCAAATCGGAGCTAAAGTTTGGGAAATCATCTCGGACGAGCACGGC
1  M R E I V H L Q A G Q C G N Q I G A K F W E I I S D E H G
91  ATTGACGCTACTGGAACCTATCATGGCGACTCCGATTTGCAGCTGGAAGAATAAAATGTGTACTACAATGAAGCTTCAGGAGGTAAATAT
30  I D A T G T Y H G D S D L Q L E R I N V Y Y N E A S G G K Y
181  GTTCCACGTGCCATACTGGTGCATCTGGAACCAGGTACTATGGATTACGTTCCGCGTGGACCATTCCGGTCAGATATTCCGCCCTGATAAT
60  V P R A I L V D L E P G T M D S V R A G P F G Q I F R P D N
271  TTTGTATTCCGACAATCGGGAGCCGGTAAACAATTGGGCCAAAGGACATTACACCGAGGGTCCGAGTTAGTCGACTCCGTTTGGATGTT
90  F V F G Q S G A G NNWAKGHY T E G A E L V D S V L D V
361  GTTAGGAAAGAAGCCGAAAGTTGTGATTGCTTGAAGTTTCCAACCTTACACATCTTTGGTGGTGTACCGGATCCGGTATGGGCACC
120  V R K E A E S C D C L Q G F Q L T H S L GGGTGSG M G T
451  TTGCTTATTTCAAAGATCAGAGAAGAATACCCCGACAGAATCATGAACACGTACTCCGTTGTACCTTCGCCAAAAGTATCCGACACAGTA
150  L L I S K I R E E Y P D R I M N T Y S V V P S P K V S D T V
541  GTTGAACCGTACAATGCCACGTTATCAGTTCACCAACTCGTTGAAAACACCGATGAAACGTACTGCATAGATAACGAAGCCCTATACGAC
180  V 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
631  ATTTGTTTTCAGAACGTTGAACTTACGACGCCACCTACGGTGAACCTCTCGTATCCCTGACCATGTCTGGAGTCACTACCTGT
210  I C F R T L K L T T P T Y G D L N H L V S L T M S G V T T C
721  CTACGATTTCCCGCCAACTGAACGCCGATTTGCGTAAACTGGCCGTAAACATGGTTCCCTTCCACGTTTACACTTCTCATGCCGGGG
241  L 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
811  TTCGCTCCACTACCTCGAGAGGTAGTCAACAGTACAGAGCACTACCGTTCCTGAATTAACGCAACAGATGTTGATGCCAAGAACATG
270  F 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
901  ATGGCCGCTGTGATCCAGACACGGAAGGTACCTAACCGTCGCCGCCGTATTCCGAGGACGTATGTCGATGAAGGAAGTCGACGAACAA
300  M A A C D P R H G R Y L T V A A V F R G R M S M K E V D E Q
991  ATGTTGAACATCCAAAACAAGAACAGCAGCTACTTCGTCGAGTGGATCCCAACAACGTTAAGACCCCGTTTGTGATATFCCACCACGA
330  M L N I Q N K N S S Y F V E W I P N N V K T A V C D I P P R
1081  GGATTGAAGATGTCAGCCACTTTCATCGGCAACTCGACCGCCATCCAAGAATTATTCAAACGTATCTCCGAGCAGTTCACCGCCATGTTT
360  G L K M S A T F I G N S T A I Q E L F K R I S E Q F T A M F
1171  AGAAGAAAAGCTTTCTTACATTGGTACACCGGTGAGGATGGATGAGATGGAATTCACCTGAAGCCGAATCCAACATGAACGATCTGGTA
390  R RKAFLHWYTGE G M D E M E F T E A E S N M N D L V
1261  TCCGAATACCAACAATACCAAGAAGCTACTGCCGACGAAGATGCCGAATTCGAAGACGAACAAGAACAAGAGGTCGATGAAAACATAAT
420  S E Y Q Q Y Q E A T A D E D A E F E D E Q E Q E V D E N *
1351  TCCACTTTAAACGTAACGCTTATTTAATATTTTTTCCAGCCTGAATTTTTCCCTTTTTATTTTTTTTTTTTATATGTATTTGTATTTAG
1441  AAAATAGAAACTGATTTACCATATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
    
```

起始密码子 ATG 黑体显示,终止密码子 TAA 用 * 号标出,MREI 保守区用下划线标出,GTP 结合位点 GGGTGS 加框显示,阴影部分为 β -微管蛋白保守区:NNWAKGHY 和 RKAFLHWYTGE G M D E M E F T E。

图 2 白蜡虫 β 1-微管蛋白基因 cDNA 序列和推测的氨基酸序列



各物种在 NCBI 的登录号分别是: *Bombyx mori* [AB011069], *Mythimna separata* [EU234504], *Manduca sexta* [AF030547], *Laodelphax striatellus* [AY479977], *Monochamus alternatus* [EU373305], *Aedes aegypti* [DQ833528], *Glossina morsitans* [DQ377071], *Drosophila melanogaster* [NM079071], *Maconellicoccus hirsutus* [EF070480], *Culex pipiens* [DQ401465]

图3 基于 β 1-微管蛋白氨基酸序列系统进化树分析

3 讨论

微管蛋白在整个真核生物界是高度保守的,各个同型微管蛋白间有80%~95%的序列相似性,其差别主要集中在C-末端^[2,14-15]。本研究在比较了多种昆虫 β 微管蛋白基因的mRNA序列,利用N端的MREI保守序列来设计5'端引物,避免了5'-RACE的繁琐过程,成功获得了白蜡虫 β 1-微管蛋白5'端序列。所获得的序列包含完整的开放阅读框和3'端全部碱基序列,但缺乏起始密码子上游的部分序列,然而研究结果并不影响该基因包含的全部447个氨基酸信息。序列分析表明,本研究获得的序列的确为 β -微管蛋白基因序列。

同源性分析表明:白蜡虫 β 1-微管蛋白与其它昆虫氨基酸序列相似性很高,但核酸序列差异较大,显示不同物种间 β 微管蛋白在进化上具有保守性,这可能意味着其功能的保守性。本研究对白蜡虫与其它 β 微管蛋白氨基酸序列分析表明:白蜡虫与木槿曼粉蚧亲缘关系最近,这与分类学上白蜡虫与木槿曼粉蚧亲缘关系较近符合,其后续工作将继续克隆白蜡虫的其它微管蛋白基因的cDNA序列,利用微管蛋白的保守性对昆虫以及昆虫与其它动物的进化关系进行分析。

本研究克隆了白蜡虫1个微管蛋白基因,也是我国传统资源昆虫中第一个被克隆的 β 微管蛋白,

而在在黑腹果蝇(*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^[15-17];在家蚕(*Bombyx mori*)中有3种 α 微管蛋白和4种 β 微管蛋白基因被鉴定出来^[18],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^[19],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^[20],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^[21];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^[22-23]。因此,对于白蜡虫体内其它的微管蛋白及其功能还需要进行大量研究。

参考文献:

- [1] 樊东,秦松柏,朴冬花,等. 二化螟 β 1-微管蛋白基因cDNA序列的克隆与序列分析[J]. 生物技术通报, 2008, 34(4): 130-135
- [2] 于奎峰,李红亮,杨璞,等. 稻水象甲卵巢内 β 1-微管蛋白基因cDNA全长的克隆及其定量表达分析[J]. 中国水稻科学, 2010, 24(6): 575-580
- [3] Yang P, Zhou W W, Zhang Q, et al. Differential gene expression profiling in the developed ovaries between the parthenogenetic and bisexual female rice water weevils, *Lissorhoptrus oryzophilus* Kuschel (Coleoptera: Curculionidae)[J]. Chinese Science Bulletin, 2009,

54; 3822 – 3829

- [4] Li M, Yang Q, Song J Z. Three tubulin genes of *Trichoderma harzianum*: alpha, beta and gamma[J]. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2010, 53(4): 811 – 816
- [5] Hetland T E, Hellesylt E, Flørenes V A, et al. Class III β -tubulin expression in advanced-stage serous ovarian carcinoma effusions is associated with poor survival and primary chemoresistance[J]. Human Pathology, 2011, (待发表)
- [6] Jensen-Smith H C, Eley J, Steyger P S, et al. Cell type-specific reduction of beta tubulin isotypes synthesized in the developing gerbil organ of Corti[J]. Journal of Neurocytology, 2003, 32(2): 185 – 197
- [7] Woo K, Jensen-Smith H C, Luduena R F, et al. Differential synthesis of beta-tubulin isotypes in gerbil nasal epithelia[J]. Cell and Tissue Research, 2002, 309(2): 331 – 335
- [8] Kirschner M, Mitchison T. Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis[J]. Cell, 1986, 45: 329 – 342
- [9] Yen T J, Gay D A, Pachter J S, et al. Autoregulated changes in stability of polyribosome-bound beta-tubulin mRNAs are specified by the first 13 translated nucleotides[J]. Molecular and Cellular Biology. 1988, 8(3): 1224 – 1235
- [10] Yen T J, Machlin P S, Cleveland D W. Autoregulated instability of beta-tubulin mRNAs by recognition of the nascent amino terminus of beta-tubulin[J]. Nature, 1988, 334(6183): 580 – 585
- [11] Cleveland D W. Autoregulated control of tubulin synthesis in animal cells[J]. Current Opinion in Cell Biology, 1989, 1(1): 10 – 14
- [12] 陈晓鸣, 冯 颖. 资源昆虫学概论[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 29 – 39
- [13] Luduena R F. Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications[J]. International Review of Cytology, 1998, 178: 207 – 275
- [14] Carpenter E J, Huzil J T, Luduena R F, et al. Homology modeling of tubulin: influence predictions for microtubule's biophysical properties[J]. European Biophysics Journal, 2006, 36(1): 35 – 43
- [15] Michiels F, Falkenburg D, Müller 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(6): 387 – 395
- [16] 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 (B2t8) reveal both an ancient divergence in metazoan isotypes and structural constraints for beta-tubulin function[J]. Molecular Cell Biology, 1987, 7(6): 2231 – 2242
- [17] Goldstein L S B, Gunawardena S. Flying through the *Drosophila* cytoskeletal genome[J]. Journal of Cell Biology, 2000, 150(2): F63 – F68
- [18] Kawasaki H, Sugaya K, Guo X Q, et al. Analysis of α - and β -tubulin genes of *Bombyx mori* using an EST database[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2003, 33(1): 131 – 137
- [19] Mita K, Neno M, Morimyo M, et al. *Bombyx mori* beta-tubulin gene specifically expressed in testis[J]. Gene, 1995, 162, 329 – 330
- [20] 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]. Journal of Sericultural Science of Japan, 1998, 67(1): 43 – 50
- [21] Hachouf-Gheras S, Besson MT, Bosquet G. Identification and developmental expression of a *Bombyx mori* alpha-tubulin gene[J]. Gene, 1998, 208(1): 89 – 94
- [22] Raff E C, Fackenthal J D, Hutchens J A, et al. Microtubule architecture specified by a beta-tubulin isoform[J]. Science, 1997, 275(5296): 70 – 73
- [23] 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]. Molecular and Cellular Endocrinology, 1998, 141: 141 – 151