

桔小实蝇 14-3-3 基因的克隆和表达谱分析

申建梅, 胡黎明, 宾淑英, 林进添

(仲恺农业工程学院 外来有害生物预警与控制研究所, 广东 广州 510225)

[摘要] **【目的】**克隆桔小实蝇 14-3-3 蛋白的基因(*Bactrocera dorsalis* 14-3-3, *Bdor*14-3-3), 研究 *Bdor*14-3-3 mRNA 在不同组织和不同发育时期的表达情况, 探索其是否参与了桔小实蝇的发育过程。**【方法】**采用反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)和快速扩增 cDNA 末端(RACE)技术克隆 *Bdor*14-3-3; 采用实时荧光定量 PCR(real-time PCR)方法, 研究 *Bdor*14-3-3 mRNA 在桔小实蝇不同组织及不同发育时期的相对表达量。**【结果】**克隆获得了 *Bdor*14-3-3 基因, 其编码区长度为 747 bp, 编码 248 个氨基酸残基。氨基酸序列一致性分析表明, 在昆虫纲中, 桔小实蝇与刺舌蝇 14-3-3 蛋白的序列一致性最高, 为 98.8%, 与豌豆蚜的序列一致性最低, 为 85.4%。实时荧光定量 PCR 分析表明, *Bdor*14-3-3 mRNA 在桔小实蝇不同组织和发育时期都有表达; 在雌虫头(去除触角)和翅中的相对表达量均较高, 分别是触角的 1.39 和 1.44 倍; 在雄虫胸和后足中的相对表达量均较高, 分别是前足的 1.28 和 1.23 倍。在蛹的早期发育过程中 *Bdor*14-3-3 mRNA 表达量逐渐升高, 到 7 d 蛹期相对表达量达到最高峰, 是 10 d 蛹的 4.91 倍。**【结论】**克隆获得了 *Bdor*14-3-3 基因, 其表达的 14-3-3 蛋白可能参与了桔小实蝇的变态发育过程, 尤其在蛹的发育过程中 *Bdor*14-3-3 可能发挥着重要作用。

[关键词] 桔小实蝇; 14-3-3 蛋白; 基因克隆; 实时定量 PCR

[中图分类号] S436.661.2; Q965.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2011)07-0097-08

Cloning and expression pattern analysis of 14-3-3 in *Bactrocera dorsalis* (Hendel)

SHEN Jian-mei, HU Li-ming, BIN Shu-ying, LIN Jin-tian

(Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Institute for Management of Invasive
Alien Species, Guangzhou, Guangdong 510225, China)

Abstract: **【Objective】**To determine whether *Bdor*14-3-3 was involved in its development, cDNA cloning and the expression levels of *Bdor*14-3-3 were studied. **【Method】**Rapid amplification cDNA ends (RACE) method and reverse transcription PCR (RT-PCR) method were used to clone 14-3-3 gene. The temporal and spatial expression levels of *Bdor*14-3-3 mRNA were investigated by real-time quantitative RT-PCR method. **【Result】**The sequencing results showed that the full-length of open reading frame in *Bdor*14-3-3 is 747 bp in length, encoding 248 amino acid residues. The putative amino acid shared the highest similarity (98.8%) with 14-3-3 from *Glossina morsitans*, and the lowest sequence identity (85.4%) with 14-3-3 from *Acyrtosiphon pisum* in insecta. The result of real-time PCR indicated that *Bdor*14-3-3 expressed in all tissues and the whole developmental stages. The relative expression level of *Bdor*14-3-3 in female head and wings was about 1.39 and 1.44 folds of that in female antenna, respectively. And the relative expression level of *Bdor*14-3-3 in male thorax and hind legs was 1.28 and 1.23 folds of that in male front legs, respectively. The relative expression level of *Bdor*14-3-3 was gradually increased from 1d-old pupa to

* [收稿日期] 2011-02-23

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30971923); 仲恺农业工程学院校级科研基金项目(G3100003)

[作者简介] 申建梅(1979—), 女, 山西文水人, 讲师, 博士, 主要从事昆虫分子生物学研究。E-mail: jmshe@eyou.com

[通信作者] 林进添(1963—), 男, 广东广州人, 教授, 主要从事昆虫生物防治研究。E-mail: linjintian@163.com

7 d-old pupa. *Bdor*14-3-3 expression level in 7 d-old pupa was about 4.91 times of that in 10 d-old pupa. **【Conclusion】** *Bdor*14-3-3 gene was cloned. *Bdor*14-3-3 may be involved in the metamorphosis development and played an important role in the development of pupae.

Key words: *Bactrocera dorsalis* (Hendel); 14-3-3 protein; gene cloning; real-time PCR

桔小实蝇(*Bactrocera dorsalis* (Hendel)), 属双翅目(Diptera)实蝇科(Tetriphtidae), 该虫寄主范围广, 可危害 40 多种 250 多种水果和蔬菜, 是重要的检疫性害虫之一^[1-3]。目前, 桔小实蝇的防治主要以化学农药为主, 但由于频繁使用化学农药, 某些地区桔小实蝇野外种群已对有机磷杀虫剂、拟除虫菊酯和阿维菌素等农药产生了严重的抗药性^[4-5]。因此, 寻找新的药物作用靶标, 设计新型昆虫行为调控剂, 是桔小实蝇综合治理(IPM)及解决其抗药性的重要措施之一。

14-3-3 蛋白是目前发现参与代谢途径最多的蛋白之一, 该蛋白能与超过 100 种蛋白相互作用而发挥不同的生理功能^[6-7]。14-3-3 蛋白通过激活或抑制重要信号分子(如蛋白激酶 C 和 Raf-1 蛋白), 从而调控细胞信号传导途径^[8-12]。另有研究表明, 14-3-3 蛋白在细胞程序化死亡的多个通路中与一些调节因子相互作用, 可调控细胞凋亡的发生进程^[13]。14-3-3 蛋白作为一种分子伴侣或激活因子, 除了与蛋白激酶、细胞凋亡因子、细胞周期调节蛋白相互作用外, 还与受体类蛋白、酶类、细胞骨架蛋白、G-蛋白及其调节因子、支架蛋白、基因转录调控蛋白等相互作用, 在生物体的各种生理代谢途径中发挥着重要作用^[14-18]。14-3-3 蛋白的功能多样性与所参与代谢途径的重要性, 决定了该蛋白有可能被作为药物分子的靶标, 来影响或调控生物体内的某些代谢过程^[19]。

目前, 有关 14-3-3 蛋白的研究大多集中于哺乳动物上, 而对其在昆虫中的表达方式及生理功能研究较少。为了更好地从分子生物学角度研究 14-3-3 蛋白在昆虫发育中的具体功能, 从而为设计以 14-3-

3 蛋白为靶标的昆虫行为调控剂提供科学依据。本研究以桔小实蝇为材料, 采用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆桔小实蝇 14-3-3 蛋白基因(*Bdor*14-3-3), 利用实时荧光定量 PCR 技术分析其表达情况, 并对该蛋白的三维结构进行了同源建模, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试昆虫 桔小实蝇由仲恺农业工程学院昆虫学实验室提供, 采用人工饲料饲养^[20]。待桔小实蝇发育到性成熟时期, 分别收集其触角、头(去除触角)、胸、前足、中足、后足、翅、腹节和生殖节 9 个不同组织。同时收集卵; 1, 2, 3 龄幼虫; 1, 4, 7, 10 d 蛹以及羽化 5 min 内的雌、雄成虫, 样品迅速放入液氮冷冻后保存于-70℃冰箱备用。

1.1.2 试剂 RNA 提取试剂盒购于 Omega 公司, 3'-RACE 和 5'-RACE 试剂盒购于 Invitrogen 公司, pMD20-T 克隆载体、反转录系统、Ex Taq DNA 聚合酶及 SYBR Premix Ex Taq 荧光试剂均购于 TaKaRa 公司, 核酸琼脂糖凝胶回收试剂盒购于 TIANGEN 公司。

1.2 桔小实蝇 RNA 的提取与反转录

按照 RNA 提取试剂盒使用说明书, 提取桔小实蝇不同组织、不同发育时期的总 RNA。提取的总 RNA 经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测后, 按照反转录系统说明书, 以 Oligo-dT(序列见表 1)为引物进行反转录获得 cDNA, 以其作为 PCR 和荧光定量 PCR 的模板。

表 1 引物的名称及其序列
Table 1 Name and sequence of primers

引物 Primer	引物序列(5'-3')Primer sequence	引物 Primer	引物序列(5'-3')Primer sequence
Oligo-dT	GGCCGGCCTTTTTTTTTTTT	GeneRacer 5'NestedPrimer	GGACACTGACATGGACTGAAGGAGA
1433-1	CTNAGGGAAATYTGYTACGAAG	1433ORF1	ATGTCAACAGTCGACAAAGAGG
1433-2	CGCRTCATCGAACGCCTGYTTNGC	1433ORF2	TTAGTTGTCAACCACCTCCTGTG
1433-51	TTCCTTCTCCACGCGCTCTGTAC	1433QF	GCGTGGAGAAGGAAGTGAAGGA
1433-52	TCGCGGGCGAGCTGTTGTTTTT	1433QR	CTGAGGGTTTGGCGGATGGTCC
1433-31	TATTATGAGATTCTGAATTCTCC	BactF	CGTTTCCGTTGCCAGAATTCC
1433-32	TCCAGACAAAGCTTGCCAACTGGC	BactR	TCAGCAATACCTGGGTACATG
GeneRacer 5'Primer	CGACTGGAGCAGGAGCACTGA		

1.3 引物设计与合成

根据 GenBank 中登录的双翅目昆虫 14-3-3 蛋白的核酸序列,设计 1 对简并引物(1433-1/1433-2)进行 PCR 扩增,用于克隆 *Bdor*14-3-3 cDNA 片段。根据 PCR 测序结果设计了 5'-RACE (1433-51、1433-52 和 GeneRacer 5'Primer、GeneRacer 5'NestedPrimer) 及 3'-RACE 反应引物(1433-31、1433-32 和 Oligo-dT),分别用于 *Bdor*14-3-3 基因的 5'端和 3'端扩增。再根据序列拼接结果设计 1 对特异性引物(1433ORF1 和 1433ORF2) 用于扩增 *Bdor*14-3-3 阅读框区域。所有引物均由广州英骏生物技术有限公司合成,其序列见表 1。

1.4 PCR 扩增与 RACE 反应

取合成的 cDNA 2 μ L 为模板,加入 10 $\times$ Ex Taq DNA 聚合酶反应缓冲液 5 μ L (含 Mg^{2+}),10 mol/L 引物 1433-1、1433-2 各 1 μ L,2.5 mmol/L dNTP 4 μ L,5 U/ μ L Ex Taq DNA 聚合酶 0.25 μ L,最后加 ddH₂O 至 50 μ L,混匀离心(3 000 r/min 5 s)后,放入 PCR 仪扩增。PCR 反应程序为:94 $^{\circ}$ C 变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,66 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 保温 10 min。

RACE 反应(5'-RACE 和 3'-RACE)参照 3'-RACE 和 5'-RACE 试剂盒说明书进行,扩增产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,回收目的片段。

1.5 PCR 和 RACE 产物的克隆与序列测定

将 PCR 及 RACE 产物经回收纯化后与 pMD-20-T 克隆载体连接,将连接产物转化到感受态大肠杆菌 DH5 α 中,进行蓝白斑和氨苄青霉素筛选,重组质粒经扩大培养,提取质粒 DNA 送交广州英骏生物技术有限公司测序。

1.6 序列分析与系统进化树构建

利用 Blast 在 NCBI 网站进行序列相似性比对分析,采用 Megalign 程序中的 Clustal W 方法进行序列进化关系分析,采用 Swiss-Model 软件对蛋白三维结构进行同源建模。

1.7 实时荧光定量 PCR

1.7.1 引物设计 在 *Bdor*14-3-3 基因阅读框区设计多对特异性引物用于实时荧光定量 PCR 反应,根据 Livak 等^[21]的方法,对设计的特异性荧光定量引物进行了筛选,获得符合要求(具有扩增特异性和与参照基因的扩增效率一致性)的特异性引物 1433QF、1433QR,用于后续的实时荧光定量 PCR 反应。本研究以 *actin* 基因作为内参基因,其引物为 BactF、BactR。引物 1433QF、1433QR、BactF、

BactR 序列见表 1。

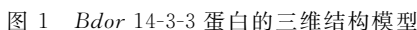
1.7.2 实时荧光定量 PCR 反应条件 荧光定量 PCR 反应体系为 25 μ L,其中 SYBR Premix Ex Taq 12.5 μ L,10 μ mol/L 上、下游引物各 0.5 μ L,cDNA 模板 1 μ L,ddH₂O 10.5 μ L,混匀,离心(3 000 r/min 5 s),放入 PCR 仪扩增。PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 30 s;95 $^{\circ}$ C 5 s,65 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环。试验以 ddH₂O 为阴性对照,每个样本重复 3 次。试验所用仪器为 Bio-Rad 公司的 iQ5。反应结束后收集循环数阈值(Cycle threshold, C_T 值),采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 *Bdor*14-3-3 基因的克隆及 14-3-3 蛋白序列与结构分析

以桔小实蝇 cDNA 为模板,以 1433-1、1433-2 为简并引物进行扩增后,得到了 300 bp 左右的特异条带。序列分析结果发现,扩增所得序列与其他昆虫的 14-3-3 基因相似性最高,推测所获得的序列是桔小实蝇 14-3-3 cDNA 片段的一部分。根据所得的 cDNA 部分片段设计 2 对特异引物(1433-51、1433-52 和 1433-31、1433-32)分别进行基因 5'端和 3'端序列的扩增,测序拼接后得到 747 bp 的 *Bdor*14-3-3 cDNA 全长序列。为验证以上 PCR、3'-RACE 和 5'-RACE 片段是来源于同一个基因,本研究用 1 对特异性引物(1433ORF1 和 1433ORF2),扩增得到了 1 条 747 bp 的特异性条带,测序结果与拼接序列一致。*Bdor*14-3-3 cDNA 编码区长度为 747 bp,编码由 248 个氨基酸组成的 *Bdor*14-3-3 蛋白,其分子质量约为 28 ku,等电点为 4.71。

在 PDB 库中同源搜索发现,*Bdor*14-3-3 蛋白与人 14-3-3 蛋白 1qjbB 相似性最高,因此本研究进一步以 1qjbB 为模板,对 *Bdor*14-3-3 蛋白三维结构进行同源建模,结果见图 1。由图 1A 可看出,*Bdor*14-3-3 蛋白三维模型由 9 个 α 螺旋组成,9 个 α 螺旋的氨基酸残基位置依次为: α_1 . 6~18 位; α_2 . 21~34 位; α_3 . 41~69 位; α_4 . 80~106 位; α_5 . 115~133 位; α_6 . 145~162 位; α_7 . 168~183 位; α_8 . 188~203 位; α_9 . 214~231 位。各螺旋反向近平行排列,彼此间被一短环间隔,其中 α_3 和 α_4 的氨基酸序列最长,分别包含 29 和 27 个氨基酸。由图 1B 可见,各 α 螺旋以“纵向围栏”的形式在蛋白中间形成一个 Y 轴方向贯穿的“U”型空腔,其中 α_3 、 α_5 、 α_7 和 α_9 构成空腔“内壁”; α_1 、 α_2 、 α_4 、 α_6 和 α_8 构成空腔“外壁”。



A. *Bdor* 14-3-3 X→Y 方向三维模型; B. *Bdor* 14-3-3 X→Z 方向三维模型, 2 条曲线标示“内外壁”的位置

Fig. 1 Three dimensional model of *Bdor*14-3-3 protein

A. Three-dimensional model observed from $X \rightarrow Y$ direction; B. Three-dimensional model observed from $X \rightarrow Z$ direction;

“inner and outer wall” position were marked with White lines in figure B

将推导的 *Bdor*14-3-3 蛋白氨基酸序列与来源 14-3-3 蛋白进行比对分析,结果见图 2。

于刺舌蝇、人、罗非鱼、斑节对虾、旋毛虫等物种的

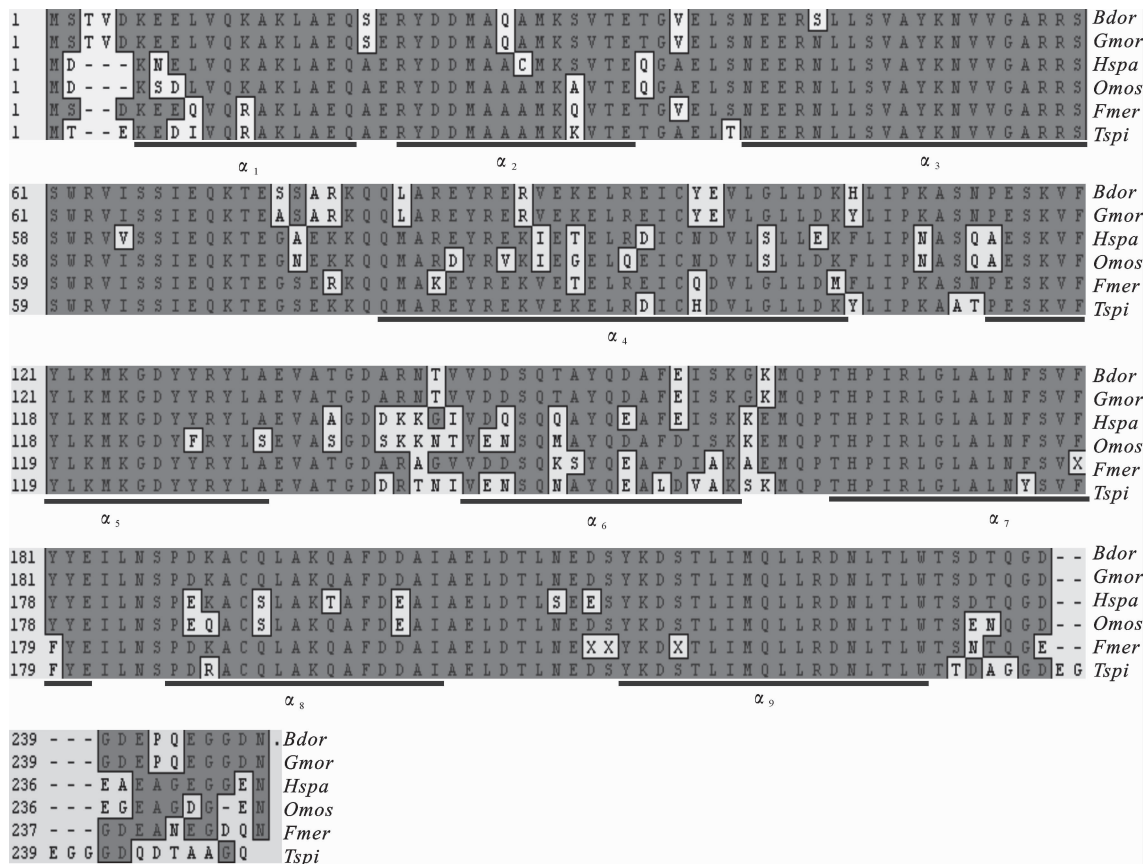


图 2 桔小实蝇与其他物种 14-3-3 蛋白氨基酸序列的比对

Bdor. 桔小实蝇; *Gmor.* 刺舌蝇; *Hspa.* 人; *Omos.* 罗非鱼; *Fmer.* 墨吉对虾; *Tspi.* 旋毛虫; 横线表示 *Bdor*14-3-3 蛋白的 α 螺旋位置

Fig. 2 Amino acid sequence alignment between *B. dorsalis* and other species

Bdor. *Bactrocera dorsalis*; *Gmor.* *Glossina morsitans*; *Hspa.* *Homo sapiens*; *Omos.* *Oreochromis mossambicus*; *Fmer.* *Fenneropenaeus merguensis*; *Tspi.* *Trichinella spiralis*; *Bdor*14-3-3 was marked with blanked rectangle; nine α -helixes were underlined

由图 2 可知,14-3-3 蛋白在供分析的分类地位较远的物种之间保守性非常强,各序列之间有较高的相似性;14-3-3 蛋白在 α_3 、 α_5 、 α_7 及 α_9 4 个螺旋区域的序列保守性比 α_1 、 α_2 、 α_4 、 α_6 及 α_8 5 个螺旋区域高。对 *Bdor*14-3-3 蛋白 $\alpha_1 \sim \alpha_9$ 9 个区域进行等电点预测,结果表明, α_3 、 α_5 、 α_7 和 α_9 4 个螺旋区的等电点分别为 10.4、8.63、7.15 和 4.15, α_1 、 α_2 、 α_4 、 α_6 和 α_8 5 个螺旋区的等电点分别为 3.87、4.36、5.13、3.99 和 4.15。由此可见,该 *Bdor*14-3-3 蛋白外表面

显示酸性,内壁 α_3 、 α_5 和 α_7 区域显示碱性,而 α_9 区域显示酸性。

为研究 14-3-3 蛋白在不同物种之间的进化关系,本研究从 GeneBank 中选取脊椎动物门、线虫动物门、节肢动物门(其中昆虫纲包括双翅目、膜翅目、鳞翅目、同翅目 4 个目)的 14-3-3 蛋白序列,采用 Megalin 软件中的 Clustal W 方法构建系统进化树,结果如图 3 所示。

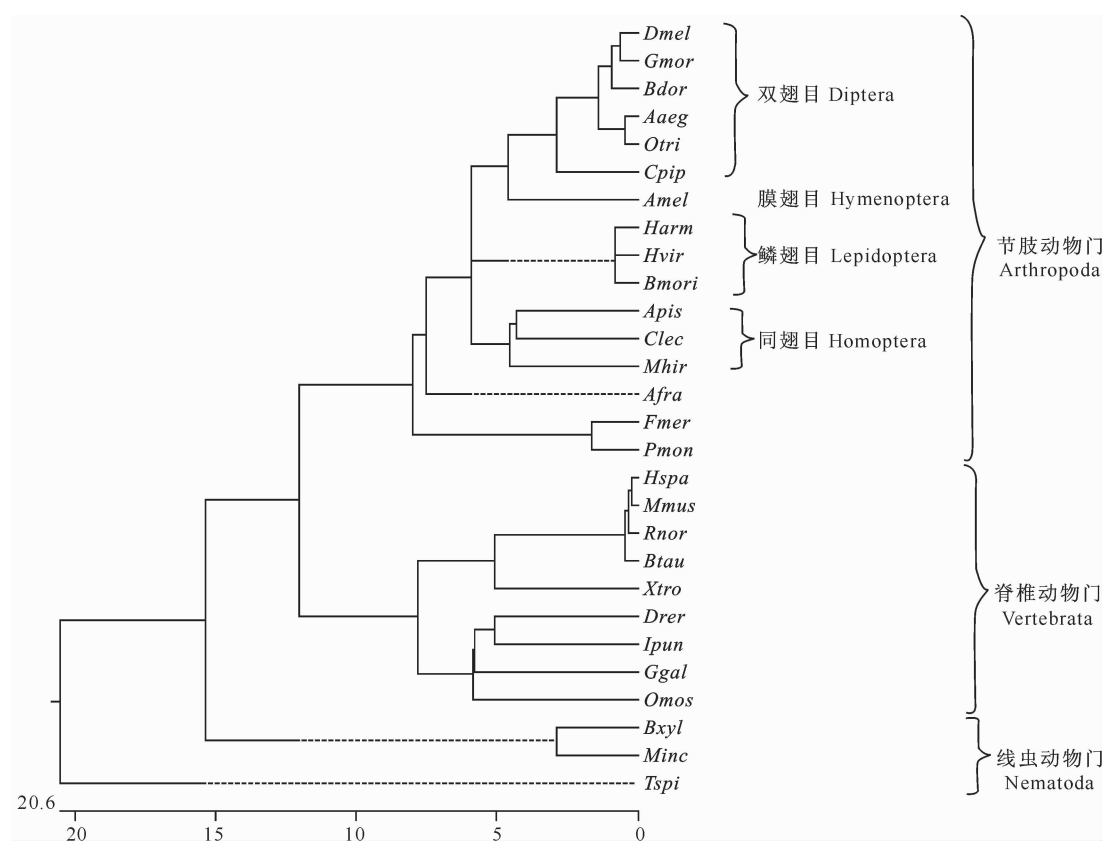


图 3 不同物种 14-3-3 蛋白的系统进化树

Dmel. 黑腹果蝇; *Gmor.* 刺舌蝇; *Bdor.* 桔小实蝇; *Aaeg.* 埃及伊蚊; *Otri.* 三齿骚扰蚊; *Cpip.* 淡色库蚊; *Amel.* 意大利蜜蜂; *Harm.* 棉铃虫; *Hvir.* 烟芽夜蛾; *Bmori.* 家蚕; *Apis.* 豌豆蚜; *Clec.* 臭虫; *Mhir.* 木槿曼粉蚧; *Afra.* 卤虫; *Fmer.* 墨吉对虾; *Pmon.* 斑节对虾; *Hsap.* 人; *Mmus.* 家鼠; *Rnor.* 褐家鼠; *Btau.* 牛; *Xtro.* 爪哇蟾蜍; *Drer.* 斑马鱼; *Ipun.* 斑点叉尾鲷; *GGal.* 鸡; *Omos.* 吴郭鱼; *Bxyl.* 松材线虫; *Minc.* 根结线虫; *Tspi.* 旋毛虫

Fig. 3 Phylogenetic relationships of 14-3-3 protein in different species

Dmel. *Drosophila melanogaster*; *Gmor.* *Glossina morsitans*; *Bdor.* *Bactrocera dorsalis*; *Aaeg.* *Aedes aegypti*; *Otri.* *Ochlerotatus triseriatus*; *Cpip.* *Culex pipiens*; *Amel.* *Apis mellifera*; *Harm.* *Helicoverpa armigera*; *Hvir.* *Heliothis virescens*; *Bmori.* *Bombyx mori*; *Apis.* *Acyrtosiphon pisum*; *Clec.* *Cimex lectularius*; *Mhir.* *Macronellus hirsutus*; *Afra.* *Artemia franciscana*; *Fmer.* *Fenneropenaeus merguensis*; *Pmon.* *Penaeus monodon*; *Hsap.* *Homo sapiens*; *Mmus.* *Mus musculus*; *Rnor.* *Rattus norvegicus*; *Btau.* *Bos taurus*; *Xtro.* *Xenopus tropicalis*; *Drer.* *Danio rerio*; *Ipun.* *Ictalurus punctatus*; *GGal.* *Gallus gallus*; *Omos.* *Oreochromis mossambicus*; *Bxyl.* *Bursaphelenchus xylophilus*; *Minc.* *Meloidogyne incognita*; *Tspi.* *Trichinella spiralis*

由图 3 可知,节肢动物门和脊椎动物门的 14-3-3 蛋白分为 2 个大类;在脊椎动物中,哺乳动物聚为一个亚类;昆虫纲的 14-3-3 蛋白聚为 4 个亚类,分别对应昆虫的双翅目、膜翅目、鳞翅目和同翅目。双翅目中,桔小实蝇与同属蝇科的刺舌蝇、黑腹果蝇聚为一类,但淡色库蚊与同属蚊科的埃及伊蚊、三齿

骚扰蚊却未聚为一类,表明 14-3-3 蛋白家族在体现保守性的同时也表现出一定的进化性。该进化树较好地反映了 14-3-3 蛋白家族在不同目生物之间的进化关系。进一步的序列一致性分析表明,*Bdor14-3-3*与吴郭鱼的序列一致性最低,为 77.9%。在昆虫纲中,*Bdor14-3-3*与刺舌蝇的序列一致性最高,为 98.8%,与豌豆蚜的序列一致性最低,为 85.4%。

2.2 *Bdor14-3-3* 基因的表达谱分析

以桔小实蝇雄虫前足中的 *Bdor14-3-3* mRNA 表达量作为基准表达量,对其不同组织中的 *Bdor14-3-3* mRNA 含量进行分析,结果见图 4。由

图 4 可知,*Bdor14-3-3* mRNA 在桔小实蝇雌雄虫的不同组织中都有表达,但表达量有一定的差异;在雌桔小实蝇中,*Bdor14-3-3* mRNA 在翅中的相对表达量最高(是触角的 1.44 倍),其次是头部(是触角的 1.39 倍),生殖节中的表达量最低(是触角的 0.21 倍);*Bdor14-3-3* mRNA 在雄虫胸和后足中的相对表达量均较高,分别是其前足含量的 1.28 和 1.23 倍。

另外,以 10 d 蛹中 *Bdor14-3-3* mRNA 表达量为基准表达量,对不同发育时期 *Bdor14-3-3* mRNA 的表达量进行分析,结果见图 5。

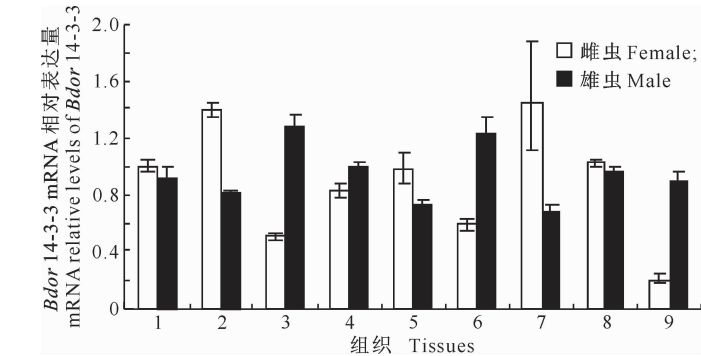


图 4 不同组织中 *Bdor14-3-3* mRNA 的相对表达量

1. 触角;2. 头(去除触角);3. 胸;4. 前足;5. 中足;6. 后足;7. 翅;8. 腹节;9. 生殖节

Fig. 4 Relative level of the *Bdor14-3-3* mRNA in different tissues

1. Antenna;2. Head (missing antenna);3. Thorax;4. Fore legs;5. Middle legs;6. Hind legs;7. Wings;8. Visceral segment;9. Genital segment

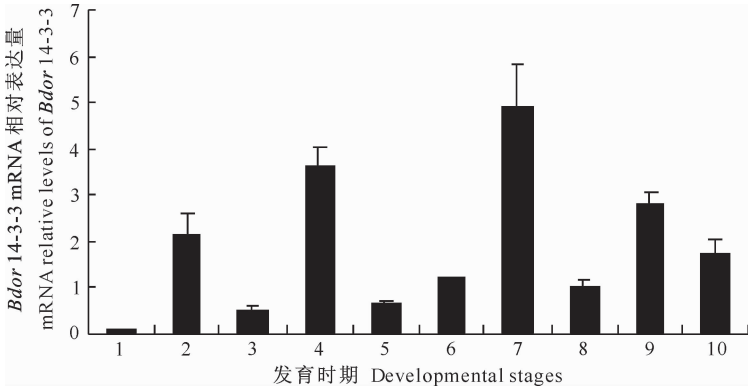


图 5 不同发育时期 *Bdor14-3-3* mRNA 的相对表达量

1. 卵;2. 1 龄幼虫;3. 2 龄幼虫;4. 3 龄幼虫;5. 1 d 的蛹;6. 4 d 的蛹;7. 7 d 的蛹;8. 10 d 的蛹;9. 新羽化雌虫;10. 新羽化雄虫

Fig. 5 Development profile of *Bdor14-3-3* mRNA expression

1. Eggs;2. 1st instar;3. 2st instar;4. 3st instar;5. 1 d-old pupa;6. 4 d-old pupa;7. 7 d-old pupa;
8. 10 d-old pupa;9. Newly-emerged female;10. Newly-emerged male

由图 5 可知,*Bdor14-3-3* mRNA 几乎在昆虫发育的各个时期都有表达,但不同发育时期的 mRNA 相对表达量存在一定差异,其中在卵期表达量最低,在 1 龄和 3 龄幼虫期 mRNA 相对表达量均较高,分别是基准表达量的 2.11 和 3.61 倍。在蛹的发育过

程中,*Bdor14-3-3* mRNA 相对表达量逐渐升高,到 7 d 蛹期 *Bdor14-3-3* mRNA 相对表达量达到最高峰,是 10 d 蛹的 4.91 倍。10 d 蛹中,*Bdor14-3-3* mRNA 的相对表达量出现低谷,但从 10 d 蛹到成虫发育过程中 *Bdor14-3-3* mRNA 相对表达量有升高

的趋势。

3 讨 论

自 1967 年 14-3-3 蛋白被首次发现以来,研究者们从其他生物中也陆续分离到了该类蛋白,但对其生理功能却鲜见报道。1987 年,Ichimura 等^[22]研究发现,14-3-3 蛋白可以作为丝氨酸/酪氨酸羟化酶的活化因子,调节神经递质的合成途径,从此掀起了人们对该蛋白功能研究的浪潮。后续的大量研究表明^[14-18],14-3-3 蛋白在多种不同的信号传导途径中发挥着重要作用。

Aitken 等^[23]对 14-3-3 基因家族分析后认为,该基因的结构域在植物、节肢动物、脊椎动物甚至在微生物中具有很高的保守性,因此推测该基因在生命的早期活动中就发挥着重要作用,其进化分离甚至早于动物、植物及微生物之间的进化分离。本研究对来自动物界节肢动物门、脊椎动物门、线虫动物门中的 28 个物种的 14-3-3 蛋白进行聚类分析,结果表明,各序列间具有高度的保守性;同时各氨基酸序列的聚类关系较好地反映了各物种的分类地位,该蛋白在具有高度保守性的同时也具有一定的进化性。Wang 等^[24]对 14-3-3 蛋白家族进行多重比对,发现该蛋白 α_3 、 α_5 、 α_7 和 α_9 4 个螺旋所在区域的保守性高于其他区域。本研究选取桔小实蝇、刺舌蝇、人、罗非鱼、斑节对虾及旋毛虫等分类地位差异较大物种的 14-3-3 蛋白进行多重比对,结果发现, α_3 、 α_5 、 α_7 和 α_9 区域保守性高于其他区域,这与 Wang 等^[24]的研究结果一致。

研究表明,果蝇 14-3-3 基因可转录成长度分别为 1.0、1.9 和 2.9 kb 3 种形式的 mRNA,而这 3 种转录子具有不同的表达模式:2.9 kb mRNA 仅表达于头部,而另外 2 种则在体躯各部都有表达;1.0 kb 转录子在卵巢中的表达量最高,且有可能只在雌虫中表达;1.9 kb mRNA 是在卵期表达量最高的一种 mRNA,且当卵发育 6~15 h 时表达水平最高;三者的共同规律是在胚胎时期表达量最高,在幼虫和蛹期表达量下降,而发育到成虫期时 3 种转录子的表达量又有所升高^[23-25]。本研究发现,*Bdor14-3-3* 在昆虫的各个组织中都有表达,这种表达方式与果蝇 14-3-3 基因的 1.0、1.9 kb mRNA 2 种转录本相似。另外本研究还发现,*Bdor14-3-3* mRNA 在卵期的相对表达量最低,而在 1、3 龄幼虫和 7 d 蛹及成虫中的相对表达量较高。这种表达方式与果蝇 14-3-3 基因的 3 种转录子表达方式有较大差异,笔

者推测这是由于 *Bdor14-3-3* 与上述发现的 14-3-3 蛋白属于不同亚型所致。本研究还发现,在桔小实蝇蛹的发育过程中,*Bdor14-3-3* mRNA 的表达量逐步增强,且在 7 d 蛹中的表达量明显高于其他各个时期,推测可能是在蛹的发育过程中,*Bdor14-3-3* 参与了细胞有丝分裂、细胞分化等组织重构活动,这期间可能是 *Bdor14-3-3* 蛋白发挥其生理功能的主要时期。

本研究克隆获得 *Bdor14-3-3* 基因,分析了该基因编码蛋白的氨基酸序列特征,并利用荧光定量 PCR 技术对其在不同组织和不同发育时期的差异表达进行了分析,推测 *Bdor14-3-3* 在昆虫变态发育,特别是在蛹的发育中发挥着重要的作用。在后续的研究中可根据 14-3-3 蛋白的三维结构进行药物设计,以调控昆虫的生长发育,为害虫的综合防治奠定基础。

[参考文献]

- [1] Nakahara S, Kobashigawa Y, Muraji M. Genetic variations among and within populations of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae), detected by PCR-RFLP of the mitochondrial control region [J]. Journal of Applied Entomology and Zoology, 2008, 43(3): 457-465.
- [2] Alyokhin A V, Mille C, Messing R H, et al. Selection of pupation habitats by oriental fruit fly larvae in the laboratory [J]. Journal of Insect Behavior, 2001, 14(1): 57-68.
- [3] 潘志萍, 李敦松, 黄少华, 等. 球孢白僵菌对桔小实蝇致病力的测定 [J]. 华中农业大学学报, 2006, 25(5): 518-519.
Pan Z P, Li D S, Huang S H, et al. Susceptibility of *Bactrocera dorsalis* (Hendel) to the Hyphomycete Fungus *Beauveria bassiana* Vuillemin [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2006, 25(5): 518-519. (in Chinese)
- [4] Hsu J C, Feng H T. Insecticide susceptibility of the oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis* (Hendel)) (Diptera: Tephritidae) in Taiwan [J]. Chinese Journal of Entomology, 2000, 20: 109-118.
- [5] 章玉苹, 曾 玲, 陆永跃, 等. 华南地区桔小实蝇抗性动态监测 [J]. 华南农业大学学报, 2007, 28(3): 20-23.
Zhang Y P, Zeng L, Lu Y Y, et al. Monitoring of insecticide resistance of *Bactrocera dorsalis* adults in south China [J]. Journal of South China Agricultural University, 2007, 28(3): 20-23. (in Chinese)
- [6] Moore B E, Perez V J. Physiological and biochemical aspects of nervous integration [M]//Carlson F D. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall, 1967: 343-359.
- [7] Yaffe M B. How do 14-3-3 proteins work? -Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis [J]. FEBS Letters, 2002, 513(1): 53-57.
- [8] Isobe Y, Hiyane Y, Ichimura T, et al. Activation of protein ki-

- nase C by the 14-3-3 proteins homologous with Exol protein that stimulates calcium-dependent exocytosis [J]. FEBS Letters, 1992, 308: 121-124.
- [9] Tanji M, Horwitz R, Rosenfeld G, et al. Activation of protein kinase C by purified bovine 14-3-3: Comparison with tyrosine hydroxylase activation [J]. Journal of Neurochemistry, 1994, 63(5): 1908-1916.
- [10] Fu H, Xia K, Pallas D C, et al. Interaction of the protein kinase Raf-1 with 14-3-3 Proteins [J]. Science, 1994, 266 (5182): 126-129.
- [11] Rommel C, Radziwill G, Lovric J, et al. Activated Ras displaces 14-3-3 protein from the amino terminus of c-Raf-1 [J]. Oncogene, 1996, 12(3): 609-619.
- [12] Ahn N G. The MAP kinase cascade: Discovery of a new signal transduction pathway [J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 1993, 127(1): 201-209.
- [13] Nomura M, Shimizu S, Sugiyama T, et al. 14-3-3 interacts directly with and negatively regulates pro-apoptotic Bax [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278 (3): 2058-2065.
- [14] Zhai J, Lin H, Shamim M, et al. Identification of a novel interaction of 14-3-3 with p190RhoGEF [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(44): 41318-41324.
- [15] van Hemert M J, Steensma H Y, van Heusden G P. 14-3-3 protein; key regulator of cell division, signaling and apoptosis [J]. Bioassays, 2001, 23(10): 936-946.
- [16] Tzivion G, Shen Y H, Zhu J. 14-3-3 proteins; bringing new definitions to scaffolding [J]. Oncogene, 2001, 20 (44): 6331-6338.
- [17] Fu H, Subramanian R R, Masters S C, et al. 14-3-3 proteins; structure, function, and regulation [J]. Annual Review Pharmacology Toxicology, 2000, 40: 617-647.
- [18] Roberts M R. Regulatory 14-3-3 protein-protein interactions in plant cells [J]. Current Opinion Plant Biology, 2000, 3(5): 400-405.
- [19] Kawabe T. G2 checkpoint abrogators as anticancer drugs [J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2004, 3(4): 513-519.
- [20] 袁盛勇, 孔 琼, 肖 春, 等. 桔小实蝇成虫人工饲料的筛选 [J]. 华中农业大学学报, 2006, 25(4): 371-374.
- Yuan S Y, Kong Q, Xiao C, et al. Introduction to two kinds of artificial diets for mass rearing of adult *Bactrocera dorsalis* (Hendel) [J]. Journal of Huazhong Agriculture University, 2006, 25(4): 371-374. (in Chinese)
- [21] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [22] Ichimura T, Isobe T, Okuyama T, et al. Brain 14-3-3 protein is an activator protein that activates tryptophan 5-monooxygenase and tyrosine 3-monooxygenase in the presence of Ca^{2+} , calmodulin-dependent protein kinase II [J]. FEBS Letters, 1987, 219(1): 79-82.
- [23] Aitken A, Collinge D B, van Heusden B P, et al. 14-3-3 proteins; a highly conserved, widespread family of eukaryotic proteins [J]. Trends in Biochemical Sciences, 1992, 17(12): 498-501.
- [24] Wang W F, Diane C. Shakes molecular evolution of the 14-3-3 protein family [J]. Journal of Molecular Evolution, 1996, 43 (4): 384-398.
- [25] Swanson K D, Ganguly R. Characterization of a *Drosophila melanogaster* gene similar to the mammalian genes encoding the tyrosine/tryptophan hydroxylase activator and protein kinase C inhibitor proteins [J]. Gene, 1992, 113(2): 183-190.