

赵 满,李丽芳,王友竹,等. 黄粉甲翅芽生长因子基因的克隆及表达分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(4):95-98.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.04.025

黄粉甲翅芽生长因子基因的克隆及表达分析

赵 满¹, 李丽芳¹, 王友竹¹, Elena N. Elpidina², 朱家颖¹

(1. 西南林业大学云南省森林灾害预警与控制重点实验室, 云南昆明 650224;

2. A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Moscow 119991, Russia)

摘要:翅芽生长因子(imaginal disc growth factor, IDGF)是一类调节昆虫发育和生长的因子。利用 RACE 克隆技术,克隆获得黄粉甲(*Tenebrio molitor*) IDGF 基因,其 cDNA 序列长 1 465 bp,开放阅读框为 1 296 bp,可编码 431 个氨基酸,预测理论分子量为 48.25 ku,等电点为 7.63。氨基酸序列同源比对分析发现,黄粉甲 IDGF 与赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)和蔗根非耳象(*Diaprepes abbreviatus*)的 IDGF 相似性分别为 89%、71%。系统发育树分析表明,黄粉甲 IDGF 与赤拟谷盗 IDGF 进化关系最近。荧光定量 PCR 分析表明,在不同发育阶段, IDGF 基因在幼虫 1 龄和 2 龄中的表达量明显高于其他发育阶段。在蛹期不同组织中, IDGF 基因在脂肪体中的表达量最高。被管氏肿腿蜂(*Scleroderma guani*)寄生后, IDGF 基因的转录水平未受影响,表明寄生不能调控该基因的转录表达。

关键词:翅芽生长因子;基因克隆;黄粉甲;序列分析;管氏肿腿蜂

中图分类号: S433.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)04-0095-04

翅芽生长因子(imaginal disc growth factor, IDGF)是一种可溶性多肽生长因子,因在黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)翅芽 C1.8 + 细胞中鉴定具有促进翅芽细胞的增殖和

收稿日期:2015-09-23

基金项目:国家自然科学基金(编号:31411130192、31260449);云南省中青年学术与技术带头人后备人才项目(编号:2013HB077);云南省高校森林有害生物科技创新团队项目。

作者简介:赵 满(1988—),女,云南昭通人,硕士研究生,主要从事昆虫生理生化与分子生物学研究。E-mail:691041481@qq.com。
通信作者:朱家颖,博士,副教授,主要从事昆虫生理生化与分子生物学研究。E-mail:jyzyhu001@gmail.com。

法,可除去蛋白质和色素物质,研究表明,酚/三氯甲烷法可提取高纯度的 DNA^[10]。在本试验中,酚/三氯甲烷法提取的基因组 DNA 得率最低, DNA 纯度居于第 3 位,可能与酶消化细胞壁时间不足、萃取不彻底有关。改进 CTAB 法提取的基因组 DNA 得率和纯度均居第 2 位,综合考虑是提取藏猪粪便芽孢杆菌基因组 DNA 的最优方法。CTAB 法提取的 DNA 经琼脂糖凝胶电泳检测和 16S rRNA 扩增表明,该法提取的 DNA 蛋白质污染少,降解不明显,产量稳定,重复性好,可做大量提取试验并应用于后续研究。试剂盒法操作简单,用时相对较短,所得 DNA 质量较为稳定,但价格昂贵,使用次数有限,不适合大量基因组 DNA 提取。不同方法出现的差异可能与不同方法裂解细菌细胞的效率及藏猪粪便中特异菌群组成有关。用 4 种方法提取同一份样品 DNA 的得率和纯度差异较大,说明对肠道菌群研究时采用不同 DNA 提取方法会影响对菌群多样性的分析,导致引入一些误差,因此,在研究不同动物肠道菌群时应选择合适的方法提取 DNA 以减少菌群分析误差。

参考文献:

[1] 贺寒冰,尹洛蓉,杨 肖,等. 藏猪和长白猪对口蹄疫疫苗的免疫

生长而得名^[1-2]。最初,科学家们在黑腹果蝇中通过同源性搜索和遗传分析发现存在一些类生长因子,如 *Spitz* 和 *Gurken* 的表皮生长因子(EGF)、纤维细胞生长因子(FGF)及转化生长因子- β (TGF- β)^[2-6]。但是,这些基因不具有生长因子所具备的促进有丝分裂活性,而仅是这些基因编码的分泌蛋白异常表达能导致细胞增生并抑制生长^[7-9]。然而,经细胞体外培养认为, IDGF 可能是作为胰岛素或类胰岛素的一个辅助因子而发挥生理功能^[10-11]。目前,遗传学研究发现, IDGF 参与调节果蝇的生长发育,在果蝇的胚胎卵黄细胞、胚胎和幼虫的脂肪体中显著表达,其蛋白分泌到血淋巴并运输到靶标

应答特性比较研究[J]. 四川动物,2011,30(4):517-521.

[2] 胡东兴,潘康成. 微生物制剂及其作用原理[J]. 中国饲料,2001(3):14-16.

[3] 何明清,程安春. 动物微生物学[M]. 成都:四川科学技术出版社,2004.

[4] 刘学剑. 饲用芽孢杆菌的研究和应用[J]. 广东饲料,2005(14):30-32.

[5] 黎春辉. 芽孢杆菌与部分抗菌中草药联合应用的研究[D]. 长沙:湖南农业大学,2008:1-7.

[6] 陈思媛,郭明璋,贺晓云,等. 用于分子生物学检测的粪便 DNA 的提取方法优化[J]. 农业生物技术学报,2013,21(12):1509-1517.

[7] Tang J N, Zeng Z G, Wang H N, et al. An effective method for isolation of DNA from pig faeces and comparison of five different methods [J]. Journal of Microbiological Methods, 2008, 75(3):432-436.

[8] 郑 刚,陈己任,胡博文,等. 基于 DGGE 分析的大鼠粪便及肠道细菌 DNA 提取方法研究[J]. 食品科学,2011,32(17):215-218.

[9] Orsini M, Romano - Spica V. A microwave - based method for nucleic acid isolation from environmental samples [J]. Lett Appl Microbiol, 2001, 33:17-20.

[10] 刘正旺,云美玲,钟江华,等. 提取陈旧血液标本中 DNA 的三种方法比较[J]. 中国热带医学,2012,12(3):321-323.

组织而发挥生理功能^[2]。本研究从黄粉甲(*Tenebrio molitor*)蛹中克隆得到 *IDGF* 基因的 cDNA 序列,并采用荧光定量 PCR 方法研究该基因在黄粉甲不同发育阶段、不同组织以及被管氏肿腿蜂(*Scleroderma guani*)寄生后的表达情况,为今后深入研究该基因的功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

供试昆虫参照 Zhu 等的方法^[12]进行饲养。黄粉甲幼虫用饲料和洁净白菜叶室温自然光条件饲养。利用黄粉甲蛹在人工气候箱[(25 ± 1) °C,相对湿度 75%]中繁育管氏肿腿蜂。管氏肿腿蜂成蜂用蘸透 20% 蜂蜜水的脱脂棉球提供营养。

1.2 *IDGF* 的克隆及分析

利用 Trizol 试剂法(Invitrogen)提取黄粉甲蛹总 RNA。采用分光光度法测定总 RNA 含量,并用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的质量。以提取的总 RNA 为模板,用 SMAR™ RACE cDNA amplification kit(Clontech)合成 cDNA 模板。依据实验室前期对黄粉甲 cDNA 文库测序获得 *IDGF* 片段序列,用 Primer Premier 5.0 设计 5' RACE(5' - CGAACGC-CAGACGATGTTTCGACAGAT - 3')和 3' RACE(5' - CGCAC-CCAACAACAAG CTGAT - 3')特异性引物。参照 RACE 试剂盒说明书,PCR 扩增获得 *IDGF* 基因的 3'端和 5'端序列。PCR 反应条件为:94 °C 预变性 2 min;94 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min 30 s,35 个循环;72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离,切取目的条带并纯化后送至上海杰李生物技术有限公司测序。

利用 Genetyx 软件将翅芽生长因子 *IDGF* 基因的核苷酸序列翻译成氨基酸序列,利用 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)进行信号肽预测,结构域采用 MotifScan (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan)进行预测,利用 ClustalX 1.83 和 MEGA 5.0 软件进行多序列比对和构建分子系统进化树^[13-14]。

1.3 荧光定量 PCR

参照 Zhu 等的方法^[15]收集黄粉甲不同发育阶段(幼虫 1~3 龄、蛹、成虫)、蛹不同组织(表皮、脂肪体、血细胞)及被管氏肿腿蜂寄生和未寄生(6、12、24、48 h)蛹样品进行总 RNA 提取,提取的总 RNA 使用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(Thermo)反转录合成 cDNA 模板。根据本次克隆获得的黄粉甲 *IDGF* cDNA 序列,设计荧光定量正向引物(5' - CCCAACGTTAACAGCTCT - 3')和反向引物(5' - CCT-GTCGATTAATTCGTA - 3'),以 18 S RNA 基因(5' - TTTCAAATGTCTGCCTTATC - 3'和 5' - TGTGGTAGC-CGTTTCTCA - 3')作为内参使用 Rotor Gene - Q 荧光定量 PCR 仪检测 *IDGF* 基因在黄粉甲不同发育阶段、不同组织以及寄生与未寄生后的表达情况,每个处理重复 3 次。PCR 反应条件为:95 °C 预变性 2 min;95 °C 变性 20 s,55 °C 退火 30 s,40 个循环。荧光定量 PCR 结果采用 2^{-ΔΔC_t}法^[16],数据显著性差异分析采用 SPSS 软件进行分析^[17]。

2 结果与分析

2.1 *IDGF* 基因的克隆及序列分析

克隆获得的黄粉甲 *IDGF* 基因 cDNA 长为 1 465 bp,开放阅读框框长为 1 296 bp,该基因可编码 431 个氨基酸,5'端非编码区 50 bp,3'端非编码区 119 bp(图 1)。其推导的氨基酸序列预测理论分子量为 48.25 ku,等电点为 7.63。SignalP 分析发现,该 *IDGF* 基因推导的氨基酸序列中存在信号肽序列(MKILICALLALAAVAA)。氨基酸序列同源性比对分析发现,黄粉甲 *IDGF* 与赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*) *IDGF* 的相似性为 89%,与蔗根非耳象(*Diaprepes abbreviatus*) *IDGF* 的相似性为 71%(图 2)。MotifScan 分析发现,该 *IDGF* 基因 cDNA 序列中存在 1 个 N-糖基化位点(NSSV²¹⁶⁻²¹⁹),1 个依赖 cGMP 和 cGMP 的蛋白激酶磷酸化位点(RKGT³⁶⁰⁻³⁶³),5 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点(TILE¹¹⁶⁻¹¹⁹、SVVD¹⁷⁶⁻¹⁷⁹、SKEE³²²⁻³²⁵、SYPE³²⁹⁻³³²、TLDD⁴⁰⁸⁻⁴¹¹),6 个 N-豆蔻酰化位点(GLD-LAW¹⁴²⁻¹⁴⁷、GLLLTL²⁰⁴⁻²⁰⁹、GAPNNK²⁷⁹⁻²⁸⁴、GIWVG³⁷⁶⁻³⁸¹、GNKASY³⁸⁸⁻³⁹³、GLCTGD⁴¹⁴⁻⁴¹⁹),5 个蛋白激酶 C 磷酸化位点(SDK¹⁸⁻²⁰、SYK⁶⁴⁻⁶⁶、TFR¹⁹⁹⁻²⁰¹、TPK²⁴²⁻²⁴⁴、SKR³⁵⁸⁻³⁶⁰),2 个酪氨酸激酶磷酸化位点(RNPKEADY²⁴⁵⁻²⁵²、RKFDE-NADY²⁶²⁻²⁷⁰),第 119 位点至第 137 位点是一个未知蛋白功能结构域,第 19 位点至第 410 位点氨基酸区域是 18 糖基水解酶家族的保守结构域。利用 MEGA 5.0 构建 NJ 系统发育树,结果显示黄粉甲 *IDGF* 与赤拟谷盗 *IDGF* 聚在一起,进化关系最近(图 3)。

2.2 *IDGF* 基因的表达特征

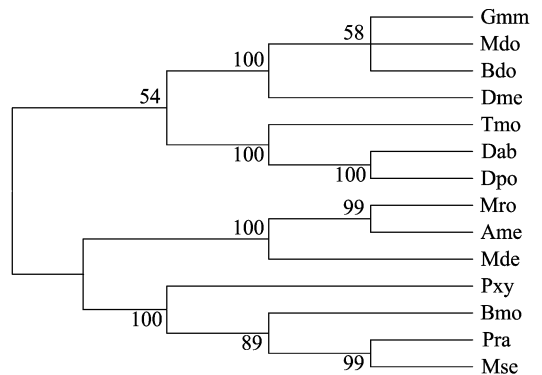
在不同发育阶段,*IDGF* 基因在幼虫 1 龄和 2 龄中的表达量明显高于其他发育阶段,成虫次之,蛹期表达量最低(图 4)。在蛹期不同组织中,*IDGF* 基因在脂肪体中的表达量最高,血细胞次之,而表皮中几乎没有表达(图 5)。被管氏肿腿蜂寄生后,*IDGF* 基因的表达不会发生显著变化,表明寄生未对该基因的表达产生调控作用(图 6)。

3 结论与讨论

通过 RACE 技术克隆获得的 *IDGF* 基因推导的氨基酸序列预测分子量为 48.25 ku,与先前报道的黑腹果蝇 *IDGF* 家族基因约为 50 ku 和菜粉蝶(*Pieris rapae*) *IDGF* 为 52 ku 大小相近^[1,18]。Varela 等在果蝇 *IDGF-2* 基因研究中发现其含有 18 糖基水解酶家族,黄粉甲 *IDGF* 基因氨基酸序列分析发现也存在 18 糖基水解酶家族保守结构域^[11]。

在果蝇 *IDGF* 研究中发现,*IDGF* 在果蝇胚胎卵黄细胞、胚胎和幼虫中均有表达,但在幼虫期表达显著^[1-2]。通过对意大利蜜蜂(*Apis mellifera*)工蜂幼虫不同日龄 *IDGF* 基因的表达特征研究表明,该基因在幼虫期表达显著^[19]。与这些研究结果相似,黄粉甲 *IDGF* 在幼虫 1 龄和 2 龄的表达量显著高于蛹和成虫阶段。在果蝇幼虫中,*IDGF* 基因在脂肪体中的显著表达^[2,20]。在菜粉蝶中,*IDGF* 在脂肪体和血细胞中均有表达,但脂肪体中的表达量明显高于血细胞中的表达量^[10,21]。同样,黄粉甲 *IDGF* 基因在脂肪体中显著表达,且明显高于血细胞中的表达量。管氏肿腿蜂寄生黄粉甲蛹后,*IDGF* 基因不受寄生所调控,这与 Asgari 等报道的菜粉蝶被微红盘绒茧蜂寄生和注射多份 DNA 病毒后 *IDGF* 基因的表达没有受到影响^[18]以及 Zhu 等所报道的菜粉蝶被蝶蛹金小蜂寄生后 *IDGF* 转录水平不受影响^[21]的结果相似。本研究结果表明,黄粉甲

图1 黄粉甲翅芽生长因子基因 cDNA 序列及推导的氨基酸序列



不同发育阶段	相对表达量
1L	~30
2L	~32
3L	~8
P	~1
A	~16

1L—1龄幼虫; 2L—2龄幼虫; 3L—3龄幼虫;
P—蛹; A—成虫

图4 黄粉甲不同发育阶段翅芽生长因子基因表达

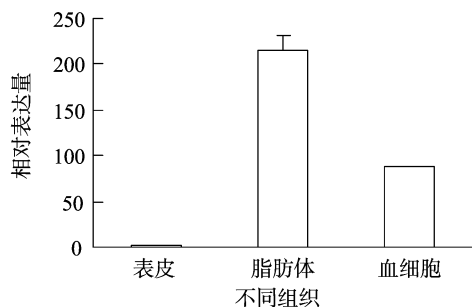


图5 黄粉甲蛹不同组织翅芽生长因子IDGF基因的表达

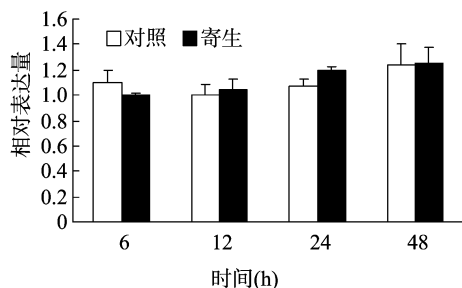


图6 管氏肿腿蜂寄生对黄粉甲翅芽生长因子基因转录的影响

IDGF 基因应不受寄生蜂所携带的寄生因子所调控。

参考文献:

- [1] Hipfner D R, Cohen S M. New growth factors for imaginal discs[J]. BioEssays, 1999, 21(9): 718 – 720.
- [2] Kawamura K, Shibata T, Saget O, et al. A new family of growth factors produced by the fat body and active on *Drosophila* imaginal disc cells[J]. Development, 1999, 126(2): 211 – 219.
- [3] Schweitzer R, Shaharabany M, Seger R, et al. Secreted spitz triggers the DER signaling pathway and is a limiting component in embryonic ventral ectoderm determination[J]. Genes & Development, 1995, 9(12): 1518 – 1529.
- [4] Neuman – Silberberg F S, Schüpbach T. The drosophila dorsoventral patterning gene gurken produces a dorsally localized RNA and encodes a TGF α – like protein[J]. Cell, 1993, 75(1): 165 – 174.
- [5] Sutherland D, Samakovlis C, Krasnow M A. Branchless encodes a drosophila FGF homolog that controls tracheal cell migration and the pattern of branching[J]. Cell, 1996, 87(6): 1091 – 1101.
- [6] Gelbart W M. The decapentaplegic gene: a TGF – β homologue controlling pattern formation in *Drosophila*[J]. Development, 1989, 107(Suppl): 65 – 74.
- [7] Capdevila J, Guerrero I. Targeted expression of the signaling molecule decapentaplegic induces pattern duplications and growth alterations in *Drosophila* wings[J]. The EMBO Journal, 1994, 13(19): 4459 – 4468.
- [8] Pignoni F, Zipursky S L. Induction of drosophila eye development by decapentaplegic[J]. Development, 1997, 124(2): 271 – 278.
- [9] Neumann C J, Cohen S M. Distinct mitogenic and cell fate specification functions of wingless in different regions of the wing[J]. Development, 1996, 122(6): 1781 – 1789.
- [10] Zhang J, Iwai S, Tsugehara T, et al. MbIDGF, a novel member of the imaginal disc growth factor family in *Mamestra brassicae*, stimulates cell proliferation in two lepidopteran cell lines without insulin[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2006, 36(7): 536 – 546.
- [11] Varela P F, Llera A S, Mariuzza R A, et al. Crystal structure of imaginal disc growth factor – 2. A member of a new family of growth – promoting glycoproteins from *Drosophila melanogaster*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(15): 13229 – 13236.
- [12] Zhu J Y, Yang P, Zhang Z, et al. Transcriptomic immune response of *Tenebrio molitor* pupae to parasitization by *Scleroderma guani*[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e54411.
- [13] Thompson J D, Gibson T J, Higgins D G. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX[M]//Current protocols in bioinformatics. New York: John Wiley and Sons, 2002: 1 – 22.
- [14] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731 – 2739.
- [15] Zhu J Y, Ze S Z, Stanley D W, et al. Parasitization by scleroderma guani influences expression of superoxide dismutase genes in tenebrio molitor[J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2014, 87(1): 40 – 52.
- [16] 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.
- [17] 贾丽艳, 杜强. SPSS 统计分析标准教程[M]. 北京: 人民邮电出版社, 2005.
- [18] Asgari S, Schmidt O. Isolation of an imaginal disc growth factor homologue from *Pieris rapae* and its expression following parasitization by *Cotesia rubecula*[J]. Journal of Insect Physiology, 2004, 50(8): 687 – 694.
- [19] 李华玮, 何金环, 郑鸣. 王浆高产蜜蜂工蜂幼虫发育期肽质量指纹图谱的建立[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2013, 41(3): 19 – 26.
- [20] Kirkpatrick R B, Matico R E, McNulty D E, et al. An abundantly secreted glycoprotein from *Drosophila melanogaster* is related to mammalian secretory proteins produced in rheumatoid tissues and by activated macrophages[J]. Gene, 1995, 153(2): 147 – 154.
- [21] Zhu J Y, Fang Q, Ye G Y, et al. Proteome changes in the plasma of *Pieris rapae* parasitized by the endoparasitoid wasp *Pteromalus puparum*[J]. Journal of Zhejiang University: Science, 2011, 12(2): 93 – 102.