

# 松墨天牛 ADP 核糖基化因子 1 基因的序列及表达特性分析

陈敬祥,程杰,林同\*

(华南农业大学 林学与风景园林学院,广东 广州 510640)

**摘要:**为了探讨 Ras 基因超家族中 ADP 核糖基化因子 1 基因(*ARF1*)在昆虫生长发育进程中以及在温度胁迫下的表达特性,以松墨天牛为研究对象,从已构建的 cDNA 文库中筛选到松墨天牛 *ARF1* 基因,命名为 *MaARF1* (GenBank:KY368168),对其进行序列分析以及不同虫态和不同温度胁迫下的表达特性分析。结果显示,*MaARF1* 基因编码区序列长为 549 bp,编码 182 个氨基酸。预测蛋白质二级结构主要由  $\alpha$  融合与  $\beta$  片层组成,其次是无规则卷曲和  $\beta$  转角。通过 DNAMAN 软件比对发现,*MaARF1* 与赤拟谷盗 *ARF1* 蛋白氨基酸序列完全一致,二者同源性为 100%,且存在 1 个十四酰基化位点( $G^2$ )和 5 个保守域( $G_1$  box— $G_5$  box)。通过 RT-qPCR 分析表明,*MaARF1* 的表达量与松墨天牛的完全变态发育相关,各虫态不间断表达,幼虫期在 2 龄幼虫(L2)、5 龄幼虫(L5)中表达量较高,蛹化期间(L5—P0)表达量表现为上升趋势,并在第 2 天蛹(P2)中达到最大值,羽化期间(P10—A0)表达量表现为下降趋势;*MaARF1* 在不同温度胁迫下均有表达,低温与高温都会导致表达量下调,温度越高或越低,表达量下调越显著。因此,*MaARF1* 可能主要影响松墨天牛蛹化和羽化这 2 个变态发育关键点,从而影响整个变态发育历程,同时其也可能参与了松墨天牛体内依赖温度的  $Ca^{2+}$  信号途径。

**关键词:**松墨天牛;ADP 核糖基化因子 1;温度胁迫;变态发育;表达特性;RT-qPCR

**中图分类号:**S763.38   **文献标志码:**A   **文章编号:**1004-3268(2017)07-0057-07

## Sequence and Expression Analysis of ADP-ribosylation Factor 1 Gene from *Monochamus alternatus*

CHEN Jingxiang, CHENG Jie, LIN Tong\*

(College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** To explore the expression characteristics of ADP-ribosylation factor 1 gene (*ARF1*) from Ras supergene family in the process of insect development and under temperature stress, *ARF1* gene was filtrated from cDNA library of *Monochamus alternatus*, as the research object, and was named *MaARF1* (GenBank:KY368168), whose sequence and expressional characteristic in each insect state or under different temperature stress were analyzed in this study. The results showed that the coding sequence of *MaARF1* was 549 bp in length, encoding 182 amino acids. The predicted secondary structure of *MaARF1* was mainly composed of alpha helix and beta sheet, followed by random curl and beta turn. Amino acids sequence multiple alignment analysis of *MaARF1* showed the highest homology with *Tribolium castaneum* (100%) and there were one myristoylation ( $G^2$ ) and five conservative domains ( $G_1$  box— $G_5$  box). By RT-qPCR technology, gene expression analysis showed that *MaARF1* expression level was associated with holometabolous development of *M. alternatus* and it was expressed in each insect state, continuously. The expression level was relatively higher in second and fifth instar larvae, showed a rising trend in larval-pupal stage, a downward trend during eclosion, and reached the maximum amount in the following day of

收稿日期:2017-01-01

基金项目:国家自然科学基金项目(31470653);广东省自然科学基金项目(2015A030313416)

作者简介:陈敬祥(1993-),男,湖北荆州人,在读硕士研究生,研究方向:昆虫分子生物学。E-mail:2441430459@qq.com

\*通讯作者:林同(1969-),男,黑龙江通河人,教授,博士,主要从事昆虫分子生物学研究。E-mail:lintong@scau.edu.cn

pupa. *MaARF1* under different temperature stress was expressed, low temperature and high temperature would lead to lower expression level, when the temperature was higher or lower, falling of expression level was more significant. Therefore, *MaARF1* may mainly affect two key metamorphosis point, nymphosis and eclosion, so as to affect the entire development process in *M. alternatus*, and it may also be involved in the  $\text{Ca}^{2+}$  signaling pathways depending on the temperature.

**Key words:** *Monochamus alternatus*; ADP-ribosylation factor 1; temperature stress; metamorphosis; expression characteristics; RT-qPCR

ADP 核糖基化因子 (ADP-ribosylation factors, ARFs) 为小分子三磷酸鸟苷 (GTP) 结合蛋白, 属于 Ras 蛋白超家族成员<sup>[1-2]</sup>。ARFs 在生物体中广泛表达, 目前, 细菌、酵母、植物、无脊椎动物、脊椎动物等生物中的 ARFs 均已被鉴定<sup>[3]</sup>。在哺乳动物中, 有 6 种不同分子量的 ARFs 亚型 (ARF1、ARF2、ARF3、ARF4、ARF5 和 ARF6) 得到鉴定<sup>[4]</sup>。果蝇中有 3 种 ARFs 亚型 (ARF I、ARF II 和 ARF III) 被鉴定<sup>[5]</sup>。不管是哺乳动物还是果蝇, 研究表明, ARFs 在其生长发育期以及各个组织中均有表达<sup>[6]</sup>。ARFs 与 ARF 类似蛋白除了在真核生物和原核生物中影响胞吐与内吞作用途径中的细胞内囊泡运输外<sup>[7]</sup>, 还在一些寄生性的原生动物中起着重要作用, 如 ARF 类似物与利什曼虫 (*Leishmania*) 鞭毛完整性有关<sup>[8]</sup>。作为 ARF 基因家族成员之一的 *ARF1* 主要调控细胞内囊泡运输, 特别地, *ARF1* 在逆向轴浆运输途径中对囊泡形成至关重要<sup>[9]</sup>。其介导埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*) 体内与外壳蛋白 I (coat protein I, COP I) 囊泡运输相关的功能, 如调控受体前往细胞膜的靶向作用、调控可溶性蛋白的分泌作用等<sup>[10]</sup>。对埃及伊蚊注射 *ARF1* 的 dsRNA 后, 分析卵巢组织提取物发现, 卵黄蛋白原积累变少<sup>[11]</sup>。*ARF1* 蛋白还参与生物体内线粒体的裂解和融合这一动态平衡过程, 此功能独立于囊泡运输作用。在秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*)、哺乳动物、酵母细胞中, *ARF1* 的缺失会导致体内线粒体形态及活性的异常<sup>[12]</sup>。而且, *ARF1* 蛋白被证实是一种活化信号分子, 能提高相应酶的活性, 如磷脂酶 D、磷脂酰肌醇激酶<sup>[13]</sup>, *ARF1* 也与依赖于温度的  $\text{Ca}^{2+}$  信号途径相关<sup>[14]</sup>, 表明 *ARF1* 蛋白不仅参与运输, 而且充当一种与温度相关的信号转换器。

松墨天牛 (*Monochamus alternatus*) 是林业上重要的蛀干害虫, 在我国大部分地区均有分布, 能危害以马尾松为主的多种松科植物, 幼虫、成虫及其体内携带的松材线虫 (*Bursaphelengus xylophilus*) 都会对松科植物造成危害, 严重时可导致整株植物死亡<sup>[15-16]</sup>。为了探讨 *ARF1* 在松墨天牛整个完全变态发育进程中的表达特点以及温度是否会影响其表

达, 从松墨天牛 cDNA 文库<sup>[17]</sup> 中筛选出 *ARF1* 基因序列并进行生物信息学分析, 然后研究其在不同时空及温度胁迫下的表达特性, 为深入开展昆虫 *ARF1* 基因研究以及解析温度胁迫下该基因在昆虫体内充当的功能角色提供分子信息和参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 松墨天牛 *ARF1* 基因筛选及其编码氨基酸序列分析

从已构建好的松墨天牛 cDNA 文库<sup>[17]</sup> 中筛选出 *ARF1* 基因完整编码序列, 在 NCBI 网站上运用 Nucleotide Blast 程序进行鉴定。

用 NCBI 在线工具 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 搜索 *ARF1* 基因开放阅读框 (ORF), ProtScale 程序分析其编码蛋白的疏水性, SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测编码蛋白的信号肽, NetPhos 3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 预测编码蛋白的磷酸化修饰位点, NetOGlyc 4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) 分析编码蛋白的 N - 糖基化修饰位点, TM-HMM 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 分析编码蛋白的跨膜结构, SOPMA 软件 ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred\\_sopma.pl](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl)) 预测编码蛋白的二级结构, SWISS - MODEL 软件 (<http://beta.swiss-model.expasy.org/>) 预测编码蛋白的三级结构并进行同源建模。

### 1.2 *ARF1* 蛋白氨基酸序列同源性比对

从 NCBI 数据库中在线检索不同物种 *ARF1* 蛋白氨基酸序列, 下载后用 DNAMAN 软件进行多序列同源性比对。

### 1.3 试验材料及其处理

松墨天牛幼虫采自广州市从化区风云岭森林公园, 在避光的人工气候箱内饲养至蛹、成虫, 饲养条件: 温度为  $(25 \pm 1.0)^\circ\text{C}$ , 相对湿度为  $75\% \pm 5\%$ , 对幼虫给予人工饲料<sup>[18]</sup> 进行饲养, 为成虫提供新鲜的 1、2 年生马尾松枝条。

虫态样品处理: 选取松墨天牛各虫龄虫体 3 头

进行清洗、消毒、麻醉,用磷酸盐缓冲液冲洗后,将样品分别置于无菌去酶的 EP 管中,立即液氮冷冻,放入 -80 °C 低温冰箱中保存备用。温度胁迫后虫态样品处理:各选取 5 龄幼虫 3 头分别置于 45、35、25、15、5、-5、-15 °C 下进行处理,1 h 后直接将其置于 -80 °C 低温保存。

#### 1.4 RNA 的提取及反转录

用总 RNA 提取试剂盒(E. Z. N. A<sup>TM</sup> Total RNA Kit II, OMEGA 公司)提取上述松墨天牛样本的总 RNA,具体操作按该试剂盒说明书进行。用 1% 琼脂糖凝胶电泳与微量紫外分光光度计(Nanodrop 2000)分别检测其质量和浓度,检测合格后放入 -80 °C 超低温冰箱保存备用。按反转录试剂盒(PrimeScript<sup>®</sup> RT Reagent Kit with gDNA Eraser, TaKaRa 公司)说明书的操作步骤进行单链 cDNA 的合成,将 cDNA 稀释 10 倍后用作实时荧光定量 PCR(qPCR)的反应模板,置于 -20 °C 保存备用。

#### 1.5 qPCR 分析

通过 qPCR(SYBR Green 法)检测 *ARF1* 基因的表达量。*ARF1* 基因扩增的上游引物为 5' - CT-CATCTTCGCCAACAAACA - 3',下游引物为 5' - GT-GCCCTGGATGTACCAAGTT - 3';内参基因  $\beta$ -actin 扩增的上游引物为 5' - CTCTGCTATGTAGCCCTT-GACTT - 3',下游引物为 5' - GGAGTTGTAG-GTGGTTTCGTG - 3'。采用实时荧光定量试剂盒(SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup>, TaKaRa 公司)操作,反应体系(20  $\mu$ L):SYBR Premix 10  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 7.2  $\mu$ L、上下游引物各 0.4  $\mu$ L、cDNA 2  $\mu$ L。反应程序:95 °C 预变性 5 min; 95 °C 解链 10 s, 60 °C 退火、延

伸 20 s,共 40 个循环。在 LightCycler 480 荧光定量 PCR 仪上进行 qPCR 反应,每个 cDNA 样品做 3 个复孔,设置 ddH<sub>2</sub>O 为阴性对照,反应结束后分别采集目标基因(*ARF1*)和内参基因( $\beta$ -actin)的 Ct 平均值,使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法进行相对定量分析。用 SPSS 18.0 软件的单因素方差分析法(ANOVA)对 qPCR 数据进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 松墨天牛 *ARF1* 基因序列及其编码氨基酸序列分析

从前期构建的松墨天牛 cDNA 文库中筛选出一个具有完整编码序列(CDS)的基因,在 NCBI 网站上运用 Nucleotide Blast 程序进行不同物种间核苷酸序列比对后,将其鉴定为松墨天牛 *ARF1* 基因,命名为 *MaARF1*(GenBank: KY368168),其 CDS 长度为 549 bp,共编码 182 个氨基酸残基,预测的蛋白质分子质量为 20.65 ku, pI 为 6.15,脂肪系数为 95.93,不稳定系数为 21.52,预测其为稳定蛋白。磷酸化修饰位点和 N-糖基化修饰位点预测结果表明,苏氨酸磷酸化位点有 4 个,丝氨酸磷酸化位点有 3 个,酪氨酸磷酸化位点有 3 个,N-糖基化修饰位点有 1 个(图 1)。用 ProtScale 程序进行 *MaARF1* 蛋白的疏水性分析发现,该蛋白质氨基酸大部分为亲水性,说明此蛋白质为亲水蛋白;通过 SignalP 4.1 Server 软件在线预测结果表明,该蛋白质无信号肽;运用 TMHMM 2.0 Server 软件在线预测发现,该蛋白质无跨膜结构,表明其为非跨膜蛋白。

1	ATGGGGATGTGTTGCTAATTATTAAGGCCCTTCGGCAAAAAGAAATGAGAATA
1	M G N V F A N L F K G L F G K K E M R I
61	TGATGGTAGGATTAGATGCTGCTGGTAAACCACAATTATATAAACTTAAATTAGGA
21	L M V G L D A A G K T T I L Y K L K L G
121	GAAATTGTTACAACATTCCAACATCGGGTTAATGTCGAAACTGTAGAATATAAGAAC
41	E I V T T I P T I G F N V E T V E Y K N
181	ATCAGCTTACCGGTGGATGTAGGTGGTCAGGACAAAATTAGGCCGTGTGGAGACAC
61	I S F T V W D V G G Q D K I R P L W R H
241	TATTTCAAATACACAGGGCTAATCTCGTAGTTGACAGCAACGACAGGGAGCGTATA
81	Y F Q N T Q G L I F V V D S N D R E R I
301	GGGGAGGCAGAACAGCAGAGCTGATGAGGATGCTGGCCGAGGACGAGCTGAGAGATGCCGTC
101	G E A K D E L M R M L A E D E L R D A V
361	CTGCTCATCTCGCCAACAAACAGGATTGCGAACAGCAATGAACGCGGCCAAATCACC
121	L L I F A N K Q D L P N A M N A A E I T
421	GACAAGTTAGGGTGCACCTCCCTGAGGAACCGCAACTGGTACATCCAGGCCACGTGCGCG
141	D K L G L H S L R N R N W Y I Q A T C A
481	ACCAGCGCGACGGTCTACGAAGGCCGGACTGGCTGTCCAACCAGTAAAGAATGCC
161	T S G D G L Y E G L D W L S N Q L K N A
541	AACCGTTAA
181	N R

丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)、酪氨酸(Tyr)磷酸化位点分别以方形、圆形、三角形标注;  
N-糖基化位点以箭头标注;起始密码子(ATG)与终止密码子(TAA)用黑体加粗标注

图 1 *MaARF1* 基因序列及其编码的氨基酸序列

## 2.2 松墨天牛 ARF1 蛋白的高级结构分析

运用 SOPMA 在线软件对 MaARF1 蛋白进行预测,结果表明,该蛋白质的二级结构由  $\alpha$  螺旋、 $\beta$  片层、无规则卷曲、 $\beta$  转角组成,分别占 39.01%、28.02%、20.88%、12.09%,由此可以推测, MaARF1 蛋白的二级结构元件主要由  $\alpha$  螺旋和  $\beta$  片层构成。采用蛋白质同源建模法,将 MaARF1 蛋白氨基酸序列提交 SWISS-MODEL 进行蛋白质三级结构预测,结果同样显示,此蛋白质主要由  $\alpha$  螺旋与  $\beta$  片层组成。同时该蛋白质包括 3 个效应结构域,即 Switch 1、interswitch、Switch 2,且 N 端与 C 端各有 1 个  $\alpha$  螺旋(图 2)。

## 2.3 松墨天牛 ARF1 蛋白的同源序列比对

分析表明, MaARF1 与赤拟谷盗 ARF1 蛋白氨基酸序列完全一致,二者同源性最高,为 100%;与同为鞘翅目的红斑尼葬甲同源性也非常高,为 99%;与鳞翅目、双翅目、膜翅目、半翅目的其他 9 种

昆虫同源性均在 96%~98%;此外,与人的 ARF1 蛋白同源性也达到了 96%。通过 MaARF1 与其他物种(包括 11 种昆虫和人)的序列比对(图 3)发现, MaARF1 蛋白存在 5 个保守域:  $G_1$  box ( $G^{24}$ -LDAAGKT<sup>31</sup>)、 $G_2$  box ( $T^{48}$ )、 $G_3$  box ( $D^{67}$ VGG<sup>70</sup>)、 $G_4$  box ( $N^{126}$ KQD<sup>129</sup>)、 $G_5$  box ( $C^{159}$ AT<sup>161</sup>)。氨基酸序列第 2 位甘氨酸( $G^2$ )为十四酰基化位点,该位点在各 ARF 中高度保守。

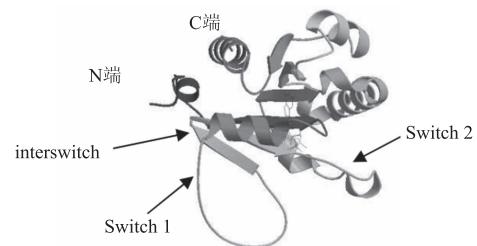


图 2 MaARF1 蛋白三级结构预测

<i>M. alternatus</i>	MGNVEANLFKGKEMRILMVGLDAAGKTTILYKLKLGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNISFTV	65
<i>T. castaneum</i>	MGNVEANLFKGKEMRILMVGLDAAGKTTILYKLKLGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNISFTV	65
<i>N. vespilloides</i>	MGNVEANLFKGKEMRILMVGLDAAGKTTILYKLKLGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNISFTV	65
<i>S. calcitrans</i>	MGNFAANLFKGKEMRILMVGLDAAGKTTILYKLKLGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNISFTV	65
<i>B. dorsalis</i>	MGNFEGNLFKGKEMRILMVGLDAAGKTTILYKLKLGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNISFTV	65
<i>P. polytes</i>	MGNMFANLFKGKEMRILMVGLDAAGKTTILYKLKLGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNISFTV	65
<i>A. mellifera</i>	MGNMFATLFKGKEMRILMVGLDAAGKTTILYKLKLGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNISFTV	65
<i>M. rotundata</i>	MGNMFATLFKGKEMRILMVGLDAAGKTTILYKLKLGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNISFTV	65
<i>C. lectularius</i>	MGNMFATLFKGKEMRILMVGLDAAGKTTILYKLKLGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNISFTV	65
<i>H. halys</i>	MGNMFATLFKGKEMRILMVGLDAAGKTTILYKLKLGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNISFTV	65
<i>D. citri</i>	MGNMFATLFKGKEMRILMVGLDAAGKTTILYKLKLGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNISFTV	65
<i>B. tabaci</i>	MGNMFATLFKGKEMRILMVGLDAAGKTTILYKLKLGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNISFTV	65
<i>H. sapiens</i>	MGNMFATLFKGKEMRILMVGLDAAGKTTILYKLKLGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNISFTV	65
<b>G1 box</b>		
<i>M. alternatus</i>	WDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGL	130
<i>T. castaneum</i>	WDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGL	130
<i>N. vespilloides</i>	WDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGL	130
<i>S. calcitrans</i>	WDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGL	130
<i>B. dorsalis</i>	WDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGL	130
<i>P. polytes</i>	WDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGL	130
<i>A. mellifera</i>	WDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGL	130
<i>M. rotundata</i>	WDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGL	130
<i>C. lectularius</i>	WDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGL	130
<i>H. halys</i>	WDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGL	130
<i>D. citri</i>	WDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGL	130
<i>B. tabaci</i>	WDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGL	130
<i>H. sapiens</i>	WDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGL	130
<b>G2 box</b>		
<i>M. alternatus</i>	FVVDSNDRERICEAEKDELMRML	181
<i>T. castaneum</i>	FVVDSNDRERICEAEKDELMRML	181
<i>N. vespilloides</i>	FVVDSNDRERICEAEKDELMRML	181
<i>S. calcitrans</i>	FVVDSNDRERICEAEKDELMRML	181
<i>B. dorsalis</i>	FVVDSNDRERICEAEKDELMRML	181
<i>P. polytes</i>	FVVDSNDRERICEAEKDELMRML	181
<i>A. mellifera</i>	FVVDSNDRERICEAEKDELMRML	181
<i>M. rotundata</i>	FVVDSNDRERICEAEKDELMRML	181
<i>C. lectularius</i>	FVVDSNDRERICEAEKDELMRML	181
<i>H. halys</i>	FVVDSNDRERICEAEKDELMRML	181
<i>D. citri</i>	FVVDSNDRERICEAEKDELMRML	181
<i>B. tabaci</i>	FVVDSNDRERICEAEKDELMRML	181
<i>H. sapiens</i>	FVVDSNDRERICEAEKDELMRML	181
<b>G3 box</b>		
<i>M. alternatus</i>	PNAMNAAEITDKLGLHSLR	181
<i>T. castaneum</i>	PNAMNAAEITDKLGLHSLR	181
<i>N. vespilloides</i>	PNAMNAAEITDKLGLHSLR	181
<i>S. calcitrans</i>	PNAMNAAEITDKLGLHSLR	181
<i>B. dorsalis</i>	PNAMNAAEITDKLGLHSLR	181
<i>P. polytes</i>	PNAMNAAEITDKLGLHSLR	181
<i>A. mellifera</i>	PNAMNAAEITDKLGLHSLR	181
<i>M. rotundata</i>	PNAMNAAEITDKLGLHSLR	181
<i>C. lectularius</i>	PNAMNAAEITDKLGLHSLR	181
<i>H. halys</i>	PNAMNAAEITDKLGLHSLR	181
<i>D. citri</i>	PNAMNAAEITDKLGLHSLR	181
<i>B. tabaci</i>	PNAMNAAEITDKLGLHSLR	181
<i>H. sapiens</i>	PNAMNAAEITDKLGLHSLR	181
<b>G4 box</b>		
<i>M. alternatus</i>	GDGLYEGLDWLSN	181
<i>T. castaneum</i>	GDGLYEGLDWLSN	181
<i>N. vespilloides</i>	GDGLYEGLDWLSN	181
<i>S. calcitrans</i>	GDGLYEGLDWLSN	181
<i>B. dorsalis</i>	GDGLYEGLDWLSN	181
<i>P. polytes</i>	GDGLYEGLDWLSN	181
<i>A. mellifera</i>	GDGLYEGLDWLSN	181
<i>M. rotundata</i>	GDGLYEGLDWLSN	181
<i>C. lectularius</i>	GDGLYEGLDWLSN	181
<i>H. halys</i>	GDGLYEGLDWLSN	181
<i>D. citri</i>	GDGLYEGLDWLSN	181
<i>B. tabaci</i>	GDGLYEGLDWLSN	181
<i>H. sapiens</i>	GDGLYEGLDWLSN	181
<b>G5 box</b>		
<i>M. alternatus</i>	QIKNAN	
<i>T. castaneum</i>	QIKNAN	
<i>N. vespilloides</i>	QIKNAN	
<i>S. calcitrans</i>	QIKNAN	
<i>B. dorsalis</i>	QIKNAN	
<i>P. polytes</i>	QIKNAN	
<i>A. mellifera</i>	QIKNAN	
<i>M. rotundata</i>	QIKNAN	
<i>C. lectularius</i>	QIKNAN	
<i>H. halys</i>	QIKNAN	
<i>D. citri</i>	QIKNAN	
<i>B. tabaci</i>	QIKNAN	
<i>H. sapiens</i>	QIKNAN	

*M. alternatus* 松墨天牛(KY368168); *T. castaneum* 赤拟谷盗(XP\_968387.1); *N. vespilloides* 红斑尼葬甲(XP\_017780667.1);

*S. calcitrans* 厥螯蝇(XP\_013111218.1); *B. dorsalis* 东方果实蝇(XP\_011201936.1); *P. polytes* 玉带凤蝶(XP\_013145319.1);

*A. mellifera* 西方蜜蜂(XP\_392990.2); *M. rotundata* 苜蓿切叶蜂(XP\_003702087.1); *C. lectularius* 温带臭虫(XP\_014254201.1);

*H. halys* 茶翅蝽(XP\_014273936.1); *D. citri* 柑橘木虱(XP\_017297928.1); *B. tabaci* 烟粉虱(XP\_018914035.1);

*H. sapiens* 人(NP\_001649.1)。保守的十四酰基化位点用三角形表示;  $G_1$  box— $G_5$  box 表示 MaARF1 蛋白的 5 个保守域

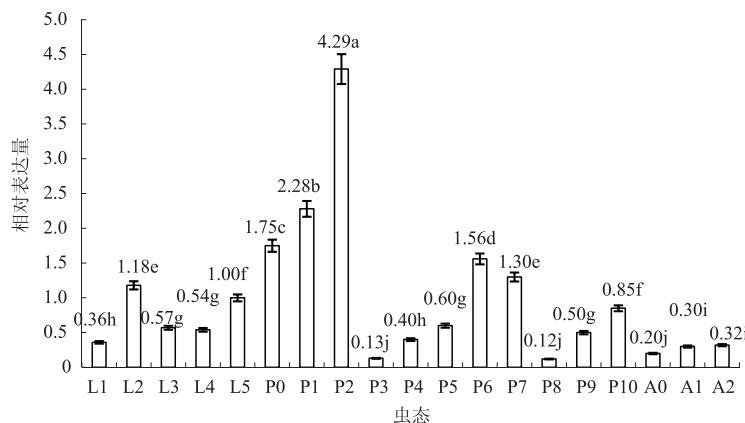
图 3 MaARF1 蛋白与其他物种 ARF1 蛋白氨基酸序列同源性比对

## 2.4 MaARF1 基因的表达分析

从图 4 可以看出, *MaARF1* 在松墨天牛各虫态中不间断广泛表达。幼虫期, 表达量在 1 龄幼虫 (L1) 中最低, 为对照 (5 龄幼虫) 的 0.36 倍, 在 2 龄幼虫 (L2) 中达到最大值, 为对照的 1.18 倍; 化蛹期间 (L5—P0) 表达量呈现上升趋势, 由 5 龄幼虫 (L5) 的 1.00 倍上升到过渡态蛹 (P0) 的 1.75 倍, 并在第 2 天蛹 (P2) 中达到最大值, 为对照的 4.29 倍; 羽化期间 (P10—A0) 表达量呈现下降趋势, 由第 10 天蛹 (P10) 的 0.85 倍迅速降低为过渡态成虫 (A0) 的

0.20 倍, 之后在第 1 天 (A1)、第 2 天 (A2) 成虫中有所上升, 分别为对照的 0.30、0.32 倍。

从图 5 可以看出, *MaARF1* 在不同温度胁迫下均有表达。其在适宜生长温度 (25 °C) 下表达量最大, 在低于 25 °C 的 15、5、-5、-15 °C 胁迫下, 表达量逐渐下降, 分别为对照 (25 °C) 的 0.34、0.20、0.08、0.02 倍, 各胁迫温度下表达量差异均达显著水平。在高于 25 °C 的 35、45 °C 胁迫下, *MaARF1* 表达量也呈下降趋势, 分别为对照 (25 °C) 的 0.06、0.05 倍, 两者之间差异不显著。



L1 ~ L5: 幼虫 1 ~ 5 龄; P0: 过渡态蛹; P1 ~ P10: 蛹第 1 ~ 10 天; A0: 过渡态成虫; A1 ~ A2: 成虫第 1 ~ 2 天。

图中数据为平均值 ± 标准误, 柱上不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 下同

图 4 *MaARF1* 基因在松墨天牛各虫态中的表达量

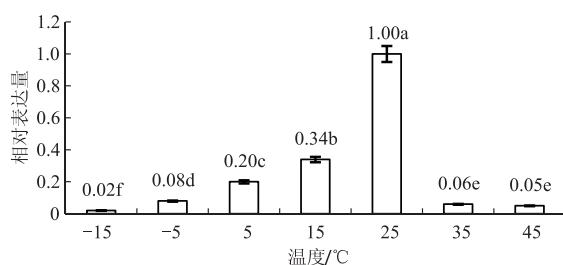


图 5 不同温度胁迫下 *MaARF1* 基因的表达量

## 3 结论与讨论

与其他同属于 Ras 蛋白超家族的成员不同, ARFs 的 N 端存在 1 个两性的  $\alpha$  螺旋, 这对于 ARFs 的生物学功能至关重要<sup>[19]</sup>。ARFs 在生物进化过程中处于高度保守状态, 如 N 末端的第 2 位甘氨酸被十四酰基化修饰, 该修饰不仅与 ARFs 的细胞膜融合相关, 而且还能起到调控核苷酸交换的作用<sup>[20]</sup>。ARF 的高级结构也是高度保守的, 含有 Switch 1、interswitch、Switch 2 三个效应结构域, 其中 interswitch 结构由  $\beta$ 2、 $\beta$ 3 片层连接组成<sup>[21]</sup>。它们构象的变化与 GTP 和 GDP 结合相关, 同时 ARF 的 N 端呈两性, 为构象变化创造了条件。当 N 端的两性  $\alpha$  螺旋发

生延伸, interswitch 结构中会有 2 个氨基酸残基也随之迁移, 从而能实现 ARFs 的非活性构象 (GDP-ARF 复合体) 转换成活性构象 (GTP-ARF 复合体)<sup>[22]</sup>。通过氨基酸同源比对及保守区域分析发现, 除了上述 N 端两性的  $\alpha$  螺旋、十四酰基化修饰位点 ( $G^2$ ) 和 3 个效应结构域 (Switch 1、interswitch、Switch 2) 外, *MaARF1* 还存在 5 个与 GTP 解离和结合的保守域<sup>[23]</sup> ( $G_1$  box— $G_5$  box), 其中 GTP 结合相关位点中,  $G_2$  box ( $T^{48}$ )、 $G_3$  box ( $D^{67} VGG^{70}$ ) 保守域被认为是  $Mg^{2+}$  结合位点, 调控 GTP 与  $Mg^{2+}$  的结合;  $G_4$  box ( $N^{126} KQD^{129}$ )、 $G_5$  box ( $C^{159} AT^{161}$ ) 保守域与鸟嘌呤环的结合有关。GTP 解离相关位点为  $G_1$  box ( $G^{24} LDAAGKT^{31}$ ), 在正常的 Ras 蛋白超家族成员中, 该保守域的第 3 位甘氨酸对 GTP 解离起着决定性的作用, 如果该位点的甘氨酸被其他氨基酸置换, 会导致 GTP 的解离作用受到强烈抑制。但在 ARF 家族所有成员中, 该位点上的氨基酸是天冬氨酸, GTP 的解离作用受抑制, 这也证实了 ARFs 蛋白没有 GTP 酶活性<sup>[24]</sup>。*MaARF1* 蛋白与 12 种不同物种 ARF1 蛋白的同源性高达 96% ~ 100%, 另外, 结合其具有保守的 N 端两性  $\alpha$  螺旋、十四酰基化修饰位

点( $G^2$ )、3个效应结构域(Switch 1、interswitch、Switch 2)、5个与GTP解离和结合的保守域( $G_1$  box— $G_5$  box),可以推测MaARF1属于Ras蛋白超家族下的ARF家族成员。

ARF1作为ARF家族成员之一,其主要功能是调控生物体囊泡运输<sup>[9]</sup>,囊泡运输与ARF所处结合状态有关,ARF存在2种结合状态:GDP-ARF复合体和GTP-ARF复合体<sup>[25]</sup>。GTP-ARF复合体会使ARF处于激活态,招募COP I聚集在细胞膜表面,形成COP I出芽小泡来运输蛋白质受体或者可溶性蛋白,随后GTP水解成GDP,形成GDP-ARF复合体,使ARF处于钝化状态,最终导致COP I小泡的分解,完成一次运输<sup>[10,26]</sup>。Isoe等<sup>[11]</sup>在研究埃及伊蚊体内与吸血性相关的COP I囊泡运输作用是否受ARF1和ARF4的调控中发现,给予埃及伊蚊糖分饲养,通过RNAi技术单独注射ARF1或ARF4的dsRNA(1 000 ng),并未导致虫体显著死亡;但同时注射ARF1(500 ng)和ARF4(500 ng)时,虫体死亡速度加快,并且死亡率显著升高;给予埃及伊蚊血液饲养,通过RNAi技术抑制COP I基因的表达后虫体也会出现相似的死亡。这些结果表明,ARF1和ARF4两者均与吸血性埃及伊蚊中肠组织中COP I囊泡运输有关。COP I囊泡运输直接取决于GTP的合成与水解速度,而与之相关的酶在合适温度下才能最大程度地发挥其活性,所以囊泡运输的快慢取决于温度。通过对不同温度胁迫下MaARF1表达分析可知,MaARF1在低于或者高于正常生长温度(25℃)时,随温度下降或升高,其表达量呈下降趋势。推测温度的下降或升高直接影响GTP水解酶与合成酶的活性,从而影响囊泡运输,导致MaARF1的表达量降低。Leber等<sup>[27]</sup>研究表明,ARF1在Ca<sup>2+</sup>信号传导方面有潜在的激活作用。ARF1还与依赖温度的Ca<sup>2+</sup>信号途径相关,且随着温度升高,ARF1的表达量下降<sup>[14]</sup>。破坏酵母的ARF1可能会产生对寒冷比较敏感的arf1突变体<sup>[28]</sup>。因此,推测MaARF1可能还参与松墨天牛体内依赖温度的Ca<sup>2+</sup>信号途径。

ARF1蛋白广泛存在于包括昆虫在内的真核生物中<sup>[3]</sup>。Ackema等<sup>[12]</sup>研究ARF1蛋白与线粒体形态和功能的关系表明,其与生物体内线粒体的裂解和融合这一动态平衡相关,并且独立于囊泡运输功能,ARF1的缺失会导致线粒体形态及活性的异常。MaARF1的表达模式研究结果显示,该基因在松墨天牛幼虫期、蛹期和成虫中不间断表达。幼虫期,MaARF1在5龄幼虫中的表达量较之前升高,分析

其原因,5龄幼虫为松墨天牛末龄幼虫,而后蜕皮进入蛹期,这一期间需要通过线粒体的裂解与融合动态过程来提供大量能量,暗示MaARF1可能参与松墨天牛5龄幼虫体内线粒体的裂解与融合。5龄幼虫蜕皮变成蛹,原来昆虫组织和器官被破坏,逐渐形成新的成虫的组织、器官<sup>[29]</sup>。因此,像线粒体之类的组织和细胞器都会被破坏,各种参与蛹中组织、细胞器构成的蛋白质以及各种调节自身功能的激素、神经递质、细胞因子、酶等都需要囊泡的运输功能,MaARF1可能调控了蛹期各种组织、器官形成所需的囊泡运输。MaARF1在第2天蛹中的表达量达到峰值,可能是此时进行神经系统发育,会有大量的突触囊泡形成用于神经递质传递<sup>[30]</sup>。在初羽化的成虫中其表达量迅速下降,而后稍有上升,推测MaARF1主要调控松墨天牛蛹期的囊泡运输。MaARF1在初蛹化的第1天蛹中表达量上升,在初羽化的成虫中表达量迅速下降,而后缓慢上升,这表明MaARF1可能主要影响松墨天牛蛹化和羽化这2个变态发育关键点,从而影响整个完全变态发育历程。

#### 参考文献:

- [1] Boman A L, Kahn R A. Arf proteins: The membrane traffic police? [J]. Trends in Biochemical Sciences, 1995, 20(4):147-150.
- [2] Donaldson J G, Klausner R D. ARF: A key regulatory switch in membrane traffic and organelle structure [J]. Current Opinion in Cell Biology, 1994, 6(4):527-532.
- [3] Hannan F, Evans P D. A locust type 1 ADP-ribosylation factor (lARF1)\* is 100% identical in amino acid sequence to *Drosophila* ARF1 despite obvious DNA sequence divergence [J]. Insect Molecular Biology, 2000, 9(6):559-563.
- [4] Kahn R A, Kern F G, Clark J, et al. Human ADP-ribosylation factors. A functionally conserved family of GTP-binding proteins [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1991, 266(4):2606-2614.
- [5] Murtagh J J, Lee F J, Deak P, et al. Molecular characterization of a conserved, guanine nucleotide-dependent ADP-ribosylation factor in *Drosophila melanogaster* [J]. Biochemistry, 1993, 32(23):6011-6018.
- [6] 王磊,宿红艳,王昌留,等. ADP核糖基化因子的结构及其功能机制[J].细胞生物学杂志,2007,29(5):675-681.
- [7] Xie X, Tang S C, Cai Y, et al. Suppression of breast cancer metastasis through the inactivation of ADP-ribosylation factor 1 [J]. Oncotarget, 2016, 7(36):58111-58120.

- [8] Cuvillier A , Redon F , Antoine J C , et al. LdARL-3A , a *Leishmania promastigote*-specific ADP-ribosylation factor-like protein, is essential for flagellum integrity [J]. *Journal of Cell Science*, 2000, 113 (11) :2065-2074.
- [9] Kirchhausen T. Three ways to make a vesicle [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2000, 1(3) :187-198.
- [10] Guo Y , Walther T C , Rao M , et al. Functional genomic screen reveals genes involved in lipid-droplet formation and utilization [J]. *Nature*, 2008, 453 (7195) :657-661.
- [11] Isoe J , Stover W , Miesfeld R B , et al. COP I-mediated blood meal digestion in vector mosquitoes is independent of midgut ARF-GEF and ARF-GAP regulatory activities [J]. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 2013, 43 (8) :732-739.
- [12] Ackema K B , Hench J , Böckler S , et al. The small GTPase Arf1 modulates mitochondrial morphology and function [J]. *The EMBO Journal*, 2014, 33 (22) :2659-2675.
- [13] Duan Y , Li J , Zhang Z , et al. Characterization of ADP ribosylation factor 1 gene from *Exopalaemon carinicauda* and its immune response to pathogens challenge and ammonia-N stress [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 55 (3) :123-130.
- [14] Todd P A C , Mccue H V , Haynes L P , et al. Interaction of ARF-1.1 and neuronal calcium sensor-1 in the control of the temperature-dependency of locomotion in *Cae-norhabditis elegans* [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6:30023.
- [15] 张心团,赵和平,樊美珍,等.松墨天牛生物学特性的研究进展(综述)[J].安徽农业大学学报,2004, 31 (2) :156-157.
- [16] Mamiya Y , Enda N. Transmission of *Bursaphelenchus lignicolus* (Nematoda: Aphelenchoididae) by *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) [J]. *Nematologica*, 1972, 18(2) :159-162.
- [17] 韦春梅,罗淋淋,吴华俊,等.松墨天牛幼虫cDNA文库的构建及EST分析[J].基因组学与应用生物学,2014,33(1):113-120.
- [18] 徐金华,黄秀凤,徐华潮,等.松墨天牛室内人工饲养及其生物学特性观察[J].浙江林业科技,2009,29 (4) :86-88.
- [19] Cook W J , Smith C D , Senkovich O , et al. Structure of *Plasmodium falciparum* ADP ribosylation factor 1 [J]. *Acta Crystallographica*, 2010, 66 (11) :1426-1431.
- [20] Liu Y , Kahn R , Prestegard J. Structure and membrane interaction of myristoylated ARF1 [J]. *Structure*, 2009, 17 (1) :79-87.
- [21] Pasqualato S , Renault L , Cherfils J. Arf, Arl, Arp and Sar proteins: A family of GTP-binding proteins with a structural device for ‘front-back’ communication [J]. *EMBO Reports*, 2002, 3 (11) :1035-1041.
- [22] Ménétrey J , Macia E , Pasqualato S , et al. Structure of Arf6-GDP suggests a basis for guanine nucleotide exchange factors specificity [J]. *Nature Structural Biology*, 2000, 7 (6) :466-469.
- [23] Saitoh O , Oshima T , Agata K , et al. Molecular cloning of a novel ADP-ribosylation factor (ARF) expressed in planarians [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1996, 1309 (3) :205-210.
- [24] Hanai A , Ohgi M , Yagi C , et al. Class I Arfs (Arf1 and Arf3) and Arf6 are localized to the Flemming body and play important roles in cytokinesis [J]. *Journal of Biochemistry*, 2016, 159 (2) :201-208.
- [25] Zhang N , Yin P , Zhou L , et al. ARF1 activation dissociates ADRP from lipid droplets to promote HCV assembly [J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2016, 475 (1) :31-36.
- [26] Styers M L , O'Connor A K , Grabski R , et al. Depletion of beta-COP reveals a role for COP-I in compartmentalization of secretory compartments and in biosynthetic transport of caveolin-1 [J]. *American Journal of Physiology*, 2008, 294 (6) :1482-1498.
- [27] Leber W , Skippen A , Fivelman Q L , et al. A unique phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase is activated by ADP-ribosylation factor in *Plasmodium falciparum* [J]. *International Journal for Parasitology*, 2009, 39 (6) :645-653.
- [28] Stearns T , Kahn R A , Botstein D , et al. ADP ribosylation factor is an essential protein in *Saccharomyces cerevisiae* and is encoded by two genes [J]. *Molecular & Cellular Biology*, 1990, 10 (12) :6690-6699.
- [29] Moczek A P. Pupal remodeling and the development and evolution of sexual dimorphism in horned beetles [J]. *The American Naturalist*, 2006, 168 (6) :711-729.
- [30] Yoon Y , Pitts K R , Mcniven M A. Mammalian dynamin-like protein DLP1 tubulates membranes [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2001, 12 (9) :2894-2905.