

陈敬祥, 程 杰, 林 同. 松墨天牛 dynamin-1-like protein 基因的鉴定及表达分析[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(3): 524-532.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2017.03.007

## 松墨天牛 dynamin-1-like protein 基因的鉴定及表达分析

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 GTP 酶超基因家族中 dynamin-1-like protein 基因在昆虫中的表达特性, 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 dynamin-1-like protein 基因, 命名为 *MaDLP1* (GenBank: KU245763)。该序列长为 2 133 bp, 编码 710 个氨基酸。由此预测的蛋白质二级结构主要由  $\alpha$  螺旋与无规则卷曲组成, 其次是  $\beta$  片层与  $\beta$  转角; *MaDLP1* 基因编码蛋白质, 定位于细胞核。通过 DNAMAN 软件比对发现 *MaDLP1* 与赤拟谷盗的 DLP1 同源性最高, 为 82%, 且存在 3 个保守酶域; 用 Clustal X 和 MEGA4.0 构建系统发育树, 显示松墨天牛与赤拟谷盗处在同一分支。RT-qPCR 分析结果显示, *MaDLP1* 在各虫态不间断表达, 幼虫期在 5 龄幼虫中表达量最高, 化蛹期间表达量先上升后下降, 羽化期间表达量表现为先上升后下降, 并在初羽化的成虫中表达量达到最大值; *MaDLP1* 在幼虫和成虫头部表达量较高, 且在幼虫脂肪体中表达最高; 成虫的足、翅、触角和卵巢中也都有表达。说明 *MaDLP1* 的表达与松墨天牛的完全变态发育相关。

**关键词:** 松墨天牛; dynamin-1-like protein; cDNA 文库; RT-qPCR

**中图分类号:** S763.38 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)03-0524-09

## Identification and expression of dynamin-1-like protein gene from *Monochamus alternatus*

CHEN Jing-xiang, CHENG Jie, LIN Tong

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

**Abstract:** To characterize the expression of dynamin-1-like protein gene of GTPase supergene family in insects, the gene named *MaDLP1* (GenBank: KU245763) was screened from the cDNA library of *Monochamus alternatus*. The sequence of *MaDLP1* was 2133 bp in length, encoding 710 amino acids. The predicted secondary structure of *MaDLP1* was mainly composed of alpha helix and random curl, followed by the beta turn and beta

sheet. Subcellular localization of the gene was in nucleus. Amino acids sequence multiple alignment analysis of *MaDLP1* showed the highest homology with *Tribolium castaneum* (82%) and there are three conservative enzyme domains. Phylogenetic tree built by Clustal X and MEGA4 indicated *M. alternatus* with *T. castaneum* were in the same branch. RT-qPCR re-

收稿日期: 2016-11-25

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, 硕士研究生, 研究方向为昆虫分子生物学。(Tel) 13424049618; (E-mail) 2441430459@qq.com

通讯作者: 林 同, (E-mail) lintong@scau.edu.cn

vealed that *MaDLP1* expression may be associated with holometabolous development of *M. alternatus*; expression level peaked in the fifth instar larvae at larval phase, fell after rose in larval-pupal and eclosion phases, and reached the maximum amount in pupa-adult. The expression level was higher in the heads of larvae and adults, and was the highest in fat body.

**Key words:** *Monochamus alternatus*; dynamin-1-like protein gene; cDNA library; RT-qPCR

松墨天牛(*Monochamus alternatus*),又名松天牛、松褐天牛,鞘翅目(Coleoptera),天牛科(Cerambycidae),墨天牛属(*Monochamus*)。在中国大部分地区均有分布,是林业上重要的蛀干害虫,能危害以马尾松为主的多种松科植物,幼虫阶段主要钻蛀树干和大枝条,取食其韧皮部与木质部,成虫阶段不仅啃食健康松树嫩枝嫩皮,而且其体内携带的松材线虫会从伤口侵入,最终会使松树产生极其严重的病害——松材线虫萎蔫病(*Bursaphelenchus xylophilus*),该病会导致整株松树呈现枯萎或“火烧状”,严重影响森林生态与经济<sup>[1-4]</sup>。

发动蛋白(Dynamins)属于三磷酸鸟苷酶(*GTPase*)超基因家族成员,广泛分布于真核生物各个部位<sup>[5]</sup>,参与各种与膜动力相关的生理进程,例如:线粒体裂解与融合、内吞作用、胞质分裂和运输囊泡出芽<sup>[6]</sup>。发动蛋白基本功能是调控细胞膜囊泡循环,同时对线粒体与质体细胞器维护是必需的<sup>[6-7]</sup>。包括昆虫在内所有动物都拥有3种发动蛋白类型,经典发动蛋白(The classical dynamin, Dyn)、类发动蛋白1蛋白(Dynamin-like protein 1, DLP1)和视神经萎缩蛋白1(Optic atrophy 1, Opa1)<sup>[7]</sup>。研究结果表明,DLP1蛋白与过氧化物酶体和线粒体的裂解相关<sup>[8-10]</sup>,DLP1蛋白在细胞质基质、过氧化物酶体和线粒体三者之间的迁移是细胞膜裂解的必要条件<sup>[11]</sup>。同时也有研究结果表明发动蛋白对不同病毒在动物寄主间传播是必需的<sup>[12-13]</sup>。DLP1蛋白可能参与了蚜虫所致植物病毒侵染与传播过程<sup>[14]</sup>,绿僵菌初始侵染昆虫进程<sup>[15]</sup>和锥虫寄生寄主细胞的初期阶段<sup>[16]</sup>。

本研究从松墨天牛 cDNA 文库<sup>[17]</sup>中克隆出 *DLP1* 基因同源序列,经 Blast 在线同源性比对分析,推测其为 *DLP1* 基因。首次对其进行序列、不同组

织和部位及不同时空动态表达模式分析,旨在揭示 *DLP1* 基因在松墨天牛整个完全变态发育进程和体内的表达特性,为开展昆虫 *DLP1* 基因研究提供分子信息和参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料与主要试剂

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 23~26 ℃,相对湿度为 70%~75%,幼虫给予人工饲料,成虫提供新鲜的一、二年生马尾松枝条。总 RNA 提取试剂盒(E.Z.N.A.<sup>TM</sup> Total RNA Kit II)购自 OMEGA 公司,反转录试剂盒(PrimeScript<sup>®</sup> RT reagent Kit With gDNA Eraser)和实时荧光定量试剂盒(SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup>)购自 TaKaRa 公司。

### 1.2 RNA 的提取及反转录

选取 30 头 3 龄幼虫,25 头 2 日龄成虫进行处理(清洗、消毒、麻醉)后,解剖并获取幼虫头、体壁、马氏管、脂肪体,成虫头部(去触角)、胸部、腹部、卵巢、触角、足、翅,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-70 ℃低温冰箱中保存备用。选取松墨天牛各虫态虫体(包括卵、1~5 龄幼虫、过渡态蛹、1~10 日龄蛹、过渡态成虫、1~3 日龄成虫)各 3 头用上述相同的方法(不解剖)进行处理并保存。

用总 RNA 提取试剂盒(E.Z.N.A.<sup>TM</sup> Total RNA Kit II)提取上述各虫态及其组织或部位的总 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-70 ℃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)说明书操作步骤进行第 1 链 cDNA 的合成,cDNA 用于 qPCR 的反应模板,置于-20 ℃保存备用。

### 1.3 基因克隆

根据已构建好的松墨天牛 cDNA 文库克隆出 *Dynamin-1-like protein* 基因完整编码序列。

### 1.4 序列分析及系统发育树构建

用 NCBI 在线工具 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 搜索开放阅读框 (ORF), ProtScale 程序分析疏水性, SignalP 4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽, NetPhos 3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 预测磷酸化修饰位点, NetOGlyc 4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) 分析 N-糖基化修饰, SubLoc v1.0 软件 (<http://www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/SubLoc/>) 分析亚细胞定位, TMHMM 分析蛋白质跨膜结构 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), COILS Server ([http://embnet.vital-it.ch/software/COILS\\_form.html](http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)) 预测卷曲螺旋, SOPMA 软件 ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred\\_sopma.pl](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl)) 预测二级结构, SWISSMODEL 软件 (<http://beta.swiss-model.expasy.org/>) 预测三级结构和同源建模。从 NCBI 数据库中在线检索昆虫 DLP1 蛋白编码序列, 并下载昆虫的 DLP1 蛋白编码序列, 用于多序列同源性比对 (采用 DNAMAN 软件) 和系统发育树 (NJ 法) 的构建 (采用 Clustal X 和 MEGA 4.0 软件)。

### 1.5 荧光定量 PCR

用 RT-qPCR (SYBR Green) 检测基因的表达量。所用引物: 上游 (Forward): 5'-CGAGAACTTGGTGGCTATTG-3'; 下游 (Reverse): 5'-TCTTAGGGCGAGAGGGTCTA-3'。SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> 实时荧光定量试剂盒反应体系 (20.0  $\mu$ l): SYBR Premix 10.0  $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 7.2  $\mu$ l, 上下游引物各 0.4  $\mu$ l, cDNA 2.0  $\mu$ l。反应程序: 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95  $^{\circ}$ C 解链 10 s, 60  $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 共 40 个循环。在 Light Cycler 480 荧光定量 PCR 仪上进行 RT-qPCR 反应, 每个 cDNA 样品做 3 次重复, 设置 ddH<sub>2</sub>O 为试验阴性对照, 反应结束后分别采集目标基因和内参基因 ( $\beta$ -actin) 的 *Ct* 平均值, 定量结果使用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算。用 Excel 和 SPSS 18.0 软件的 Duncan's 单因素方差分析法 (ANO-

VA) 对 RT-qPCR 数据进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因序列及其编码氨基酸序列分析

从本课题组前期构建的松墨天牛 cDNA 文库中筛选出 1 条具有完整编码序列 (Coding sequence, CDS) 的基因, 在 NCBI 中运用 Nucleotide Blast 程序进行不同物种间核苷酸序列比对, 结果鉴定为松墨天牛 Dynamin-1-like protein 基因, 命名为 MaDLP1 (GenBank: KU245763), 其 CDS 长度为 2 133 bp, 共编码 710 个氨基酸残基, 预测的编码蛋白质分子量为 80 080, 等电点 *pI* 为 6.23, 不稳定系数为 48.80, 脂肪系数为 100.34。磷酸化修饰位点和 N-糖基化修饰位点预测苏氨酸磷酸化位点 20 个, 丝氨酸磷酸化位点 35 个, 酪氨酸磷酸化位点 3 个, N-糖基化修饰位点 4 个 (图 1)。用 ProtScale 程序进行 MaDLP1 蛋白的疏水性分析, 发现该蛋白氨基酸大部分为亲水性的, 说明此蛋白质为亲水蛋白质。通过 SignalP 4.1 Server 软件在线预测信号肽的有无, 结果表明该蛋白质无信号肽。运用 TMHMM Server v2.0 软件在线进行跨膜结构的预测, 结果表明该蛋白质为跨膜蛋白, 包括 2 个由外到内和 2 个从内到外的螺旋结构。通过 SubLoc v1.0 软件在线预测 MaDLP1 蛋白在细胞中的位置, 结果表明定位在细胞核的可能性最大, 为 84%, 据此推测 MaDLP1 蛋白定位于细胞核中。

### 2.2 高级结构

运用 SOPMA 在线软件对 MaDLP1 蛋白进行卷曲螺旋预测, 结果表明该蛋白的二级结构由  $\alpha$  螺旋、无规则卷曲、 $\beta$  片层和  $\beta$  转角组成, 所占比例分别为 53.66%、26.76%、12.96%、6.62%。由此可以推测 MaDLP1 蛋白的二级结构元件主要由  $\alpha$  螺旋和无规则卷曲构成。采用蛋白质同源建模法, 将松墨天牛 MaDLP1 蛋白氨基酸序列提交 SWISS-MODEL 进行蛋白质三级结构预测, 结果同样显示此编码蛋白质主要由  $\alpha$  螺旋与无规则卷曲组成, 该预测分析结果与其二级结构预测的结果一致 (图 2)。

```

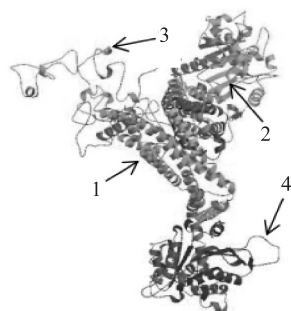
1 ATGGAGGCACTAATTCAGTAATTAATAAATGCAAGATGTATCAACACCGTAGGATCGGACTCGATCCACTACCACAAATCATAGTTTAGGATCCCAGAGT
1 M E A L I P V I N K L Q D V F N T V G S D S I H L P Q I I V L G S Q S
106 TCAGGGAAGAGTTCTGTGATTGAGAGTTTGGTGGGCAATCGTTTTTACCAAGGGTACCGGAATGTTACCAGACGACCTTAATTTGCAACTAGTTTACTGC
36 S G K S S V I E S L V G K S F L P R G T G I V T R R P L I L Q L V Y C
211 CCAAAAGATGATAAAGAACATCGTAATGCTAGAGATGGAACGTGTTGAAGTTGAGGAATGGGGTGCTTTTACATGCAAAGGATAGGGTATACAGGGATTTGAC
71 P K D D K E H R N A R D G T V E V E E W G V F L H A K D R V Y R D F D
316 GATATTAGAGTCGAAATCGAGGAAGAACAGCTCGTATGGCTGGATCTAATAAGGGGATTTGTCGGAACCTATTAACCTGAAAAATTTTCCACGAGAGTAGTC
106 D I R V E I E E E T A R M A G S N K G I C S E P I N L K I Y S T R V V
420 AATTTGACTTTGGTGACTTACCTGGAATCACCAGGTACCTGTGGGGGATCAACCTCCAGATATCGAACAACAAATTCGAGAACTAGTTTAAAAATATATCGCA
141 N L T L V D L P G I T K V P V G D Q P P D I E Q Q I R E L V L K Y I A
526 AACCTAATCGATAATTTAGCTGTAGTCACCGCAAAATACAGACATGGCAACATCGGAAGCTTAGCTATCGCAAAAGATGTAGACCCGACGGTCGTAGAAT
176 N P N S I I L A V V T A N T D M A T S E S L A I A K D V D P D G R R T
631 TTAGCTGTAGTCACCAAAATAGATTTAATGGATGCAGGAACCGACGTATTGATATTTGTGTGGCAGAGTGATCCAGTGAAACTGGGAATAATCGGTGTTGIG
211 L A V V T K L D L M D A G T D A I D I L C G R V I P V K L G I I G V V
736 AATAGTCAACAAGATATTATGAATAATAAAGTATTAAAGGAATCGCTTAAAGATGAAGCTACGTTTTCGAAAGCAATACCCCTACTTAGCTGCAAGAAAC
246 N R S Q Q D I M N N K S I K E S L K D E A T F L Q S K Y P T L A A R N
841 GGCACGCTTACCTAGCAAAAACTTTAAATAGATTACTCATGCACCATATAAGAGACTGCTTACCTGACTTGAAGACCGGGTAAATCTTATGATATCTCAGTAC
281 G T P Y L A K T L N R L L M H H I R D C L P D L K T R V N L M I S Q Y
946 CAATCTCTCCTCAATCTTACGGAGAAGATATTTCCGATAAAAGTAAACGTTGCTGCAATAATAACTAAATTTGCTTCTGCGTATTGTCGACTATTGAAGGT
316 Q S L L N S Y G E D I S D K S K T L L Q I I T K F A S A Y C S T I E G
1051 ACGGCTAGGAATATTGAGACTACGGAGCTGTGTGGTGGGCTAGGATATGTTATATTTCCACGAAACTTTCGGTAGAACACTGGATCCATACCTCTTTAGCC
351 T A R N I E T T E L C G G A R I C Y I F H E T F G R T L D S I H P L A
1156 GGTGTGAGTAAATGGACATACTAACAGCCATAAGAAACGCAATGGTCCAGCTCCGGCTCTGTTTACCAGAAAGTGTCATTGAACTACTAGTCAAGCGGCAA
386 G L S K M D I L T A I R N A N G P R P A L F V P E V S F E L L V K R Q
1261 ATTAGAAGTTGGAAGAGCCATCTTAAGATGTGTAGATTGATACATGAGGAATGCAAAGGATTATACAGCATTGTGGAAGTGAAGTGCAGCAAGAAATGCTG
421 I R R L E E P S L R C V E L I H E E M Q R I I Q H C G S E V Q Q E M L
1366 CGTTTCCAAAACATAACGAAAAATTTAGATGTGGTTACTCAACTTTTGGAGCGCAGACTACCTACTACTAATGTTATGGTCGAGAAGTTGGTGGCTATTGAG
456 R F P K L Y E K I V D V V T Q L L R R R L P T T N V M V E N L V A I E
1471 CTCGCTTATTAATACGAAACATCCCGATTTTACAAAGAGATCGCGATGGTTCTCTACTATGATAAAATCCGGTGACGGTTCTAGACCCCTCGCCCTAAGAGT
491 L A Y I N T K H P D F Y K E I A M V P T M I K S G D G S R P S R P K S
1576 ATGTACGGTAAATATCAAGCAGAGCAACAGGAATGAGTCGTTCTTCGAGCAATCCCGAGCTGAACACGATGATGCCACCCTTGGGTTTCAACCTGACCTCT
526 M Y G K Y Q A E Q Q E L S R S S S N P Q L N H D D A T T W V S N L T S
1681 GTCCAAAATGGGAGAGAAAACGATATCGACCACTTAATAACTTACCGGATAGCGCAAGACGACGAGTTGAGAAACGCTTGTAGCCCCAGAAACCCGTAAT
561 V Q N G R E N D I D H V N N L P D S A K T D E L R N V L S P Q K P V N
1786 TTGTTACCGCAAGTACCTATAACAGTAACAGTTACAGAAAGCTTTCTGAAACGAGGAGCATGATTGCGAAATTATCGAGCGTTTAATTAATTCGTACTTCTAC
596 L L P Q V P I N S N S Y R K L S E N E E H D C E I I E R L I K S Y F Y
1891 ATAGTAAGGAATCTATTTCAGGATACAGTACCAAGGCAGTGTGCACTTCTTAGTAACTTCGTCAAGGATAATTGTCAGTCCGAGTTGGTTACCCACCTCTAC
631 I V R K S I Q D T V P K A V M H F L V N F V K D N L Q S E L V T H L Y
1996 AAGCCGACAACGAGATCAACTCTAGACGAGTCTGAACATATTGCTCAGAGACGTAAGGAGCTGCTGATATGTTGAAGCACTCCAGAGGCATCGCTCATC
666 K A D N A D Q L L D E S E H I A Q R R K E A A D M L K A L Q R A S L I
2101 ATTAGTGAGATCCGTGAGACACATATGTGGTAA
701 I S E I R E T H M W *

```

丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)、酪氨酸(Tyr)磷酸化位点分别以斜体、圆形、方形标注;N-糖基化位点以三角形标注;终止密码子TAA用星号标注。

图1 *MaDLP1* 基因碱基序列及其编码的蛋白质氨基酸序列

Fig.1 The sequences of *MaDLP1* gene and amino acids



图中1、2、3、4分别表示 $\alpha$ 螺旋、 $\beta$ 片层、 $\beta$ 转角、无规则卷曲。

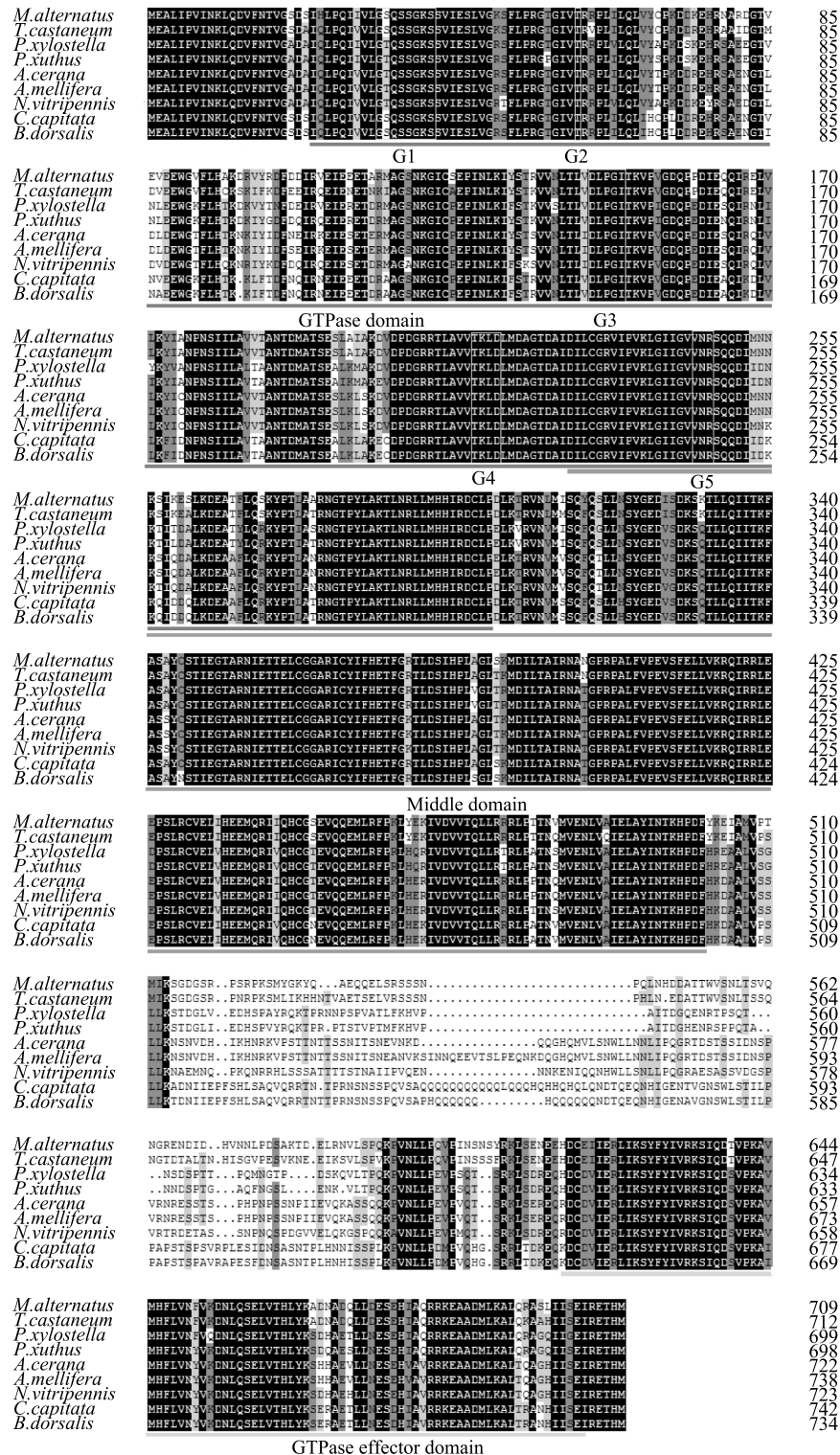
图2 *MaDLP1* 三维结构预测

Fig.2 Three-dimensional structure of *MaDLP1*

## 2.3 同源序列比对及系统发育树

*MaDLP1* 与赤拟谷盗 *DLP1* 蛋白同源性最高,为82%,与鳞翅目、双翅目、膜翅目的其他7种昆虫同源性在74%~76%。通过 *MaDLP1* 与其他8种昆虫的序列比对发现:*MaDLP1* 蛋白存在3个保守域,分别是279个氨基酸的GTP酶域(GTPase domain)、274个氨基酸的中间域(Middle domain)和88个氨基酸的GTP酶效应域(GTPase effector domain),其中GTP酶域包含5个保守位点:*G1*( $G^{32}$  SQSSGKS<sup>39</sup>)、*G2*( $T^{69}$ )、*G3*( $D^{146}$  LPGL<sup>150</sup>)、*G4*( $T^{215}$  KLD<sup>218</sup>)、*G5*( $V^{245}$  NR<sup>247</sup>) (图3)。





*M. alternatus*: 松墨天牛 (KU245763); *T. castaneum*: 赤拟谷盗 (XP\_001815130.1); *P. xylostella*: 小菜蛾 (XP\_011560767.1); *P. xuthus*: 柑橘凤蝶 (XP\_013175183.1); *A. cerana*: 中华蜜蜂 (XP\_016921511.1); *A. mellifera*: 意大利蜜蜂 (XP\_006570768.1); *N. vitripennis*: 丽蝇蛹集金小蜂 (XP\_016839551.1); *C. capitata*: 地中海实蝇 (XP\_004531240.1); *B. dorsalis*: 东方果实蝇 (XP\_011212548.1)。

图3 *MaDLPI* 与 8 种昆虫 *DLPI* 氨基酸序列同源性比对

Fig.3 Amino acid sequence alignment of *DLPI* from *M. alternatus* and other insects

基于 Clustal X 和 MEGA 4.0 软件构建的系统发育树分析结果表明:松墨天牛与同为鞘翅目的赤拟谷盗

处于同一分支,遗传距离最近,与同源性分析的结果一致(图 4)。

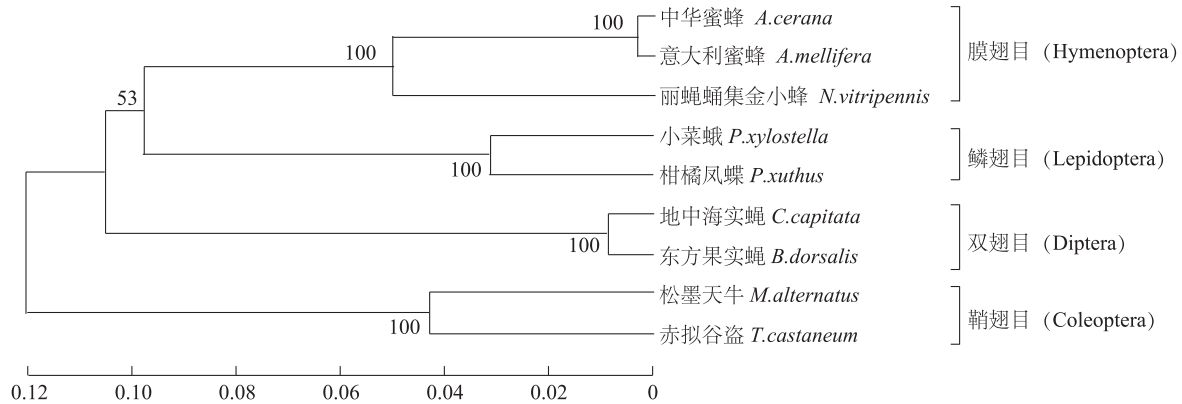


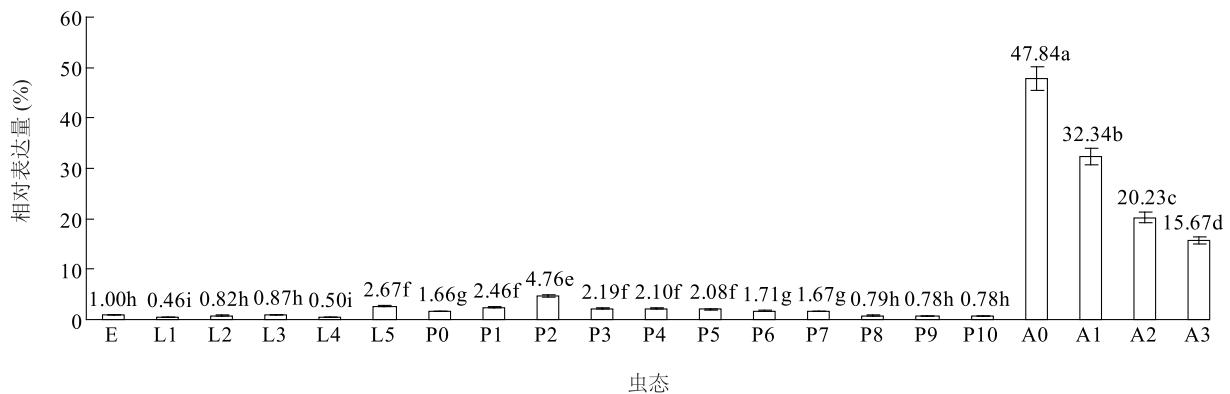
图 4 基于昆虫 DLP1 氨基酸序列构建的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic relationships based on DLP1 amino acids from insects

## 2.4 *MaDLP1* 基因的表达

由图 5 可知, *MaDLP1* 在松墨天牛各虫态中不间断表达。幼虫期表达量在 1 龄幼虫(L1)中最低,为卵的 0.46 倍,并在 5 龄幼虫(L5)中达到最大值,为卵的 2.67 倍;化蛹期间表达量表现为先上升后下降,在 2 日龄蛹(P2)中的表达量最高,为卵的 4.76 倍,在 10 日龄蛹(P10)中表达量最低,为卵的 0.78 倍;羽化阶段表达量表现为先上升后下降,在过渡态成虫(A0)中迅速增加到最大值,为卵的 47.84 倍,之后 1 日龄成虫(A1)中的表达量迅速下降为 32.34

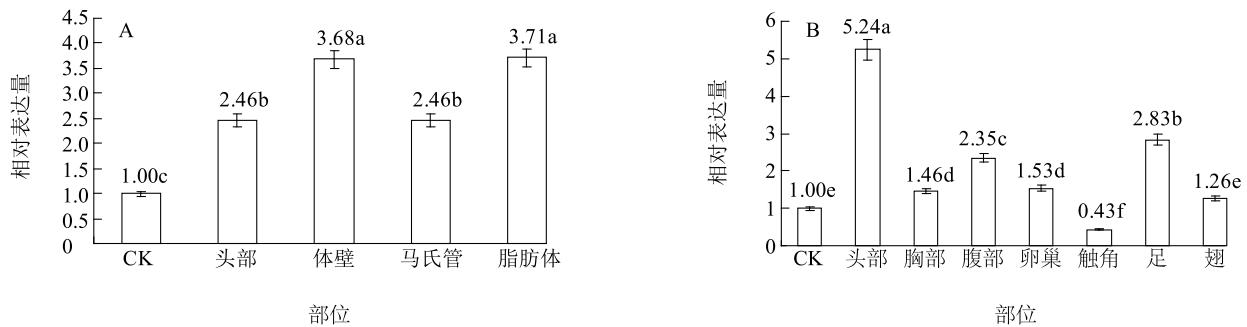
倍。 *MaDLP1* 在幼虫头、体壁、马氏管和脂肪体中的表达量分别为对照的 2.46、3.68、2.46 和 3.71 倍,头部与马氏管之间,体壁与脂肪体之间表达差异均不显著( $P>0.05$ ) (图 6A)。 *MaDLP1* 在成虫各部位中均有表达,其中在头部表达量最高,为对照的 5.24 倍,胸部与卵巢中的表达量表现差异不显著( $P>0.05$ )。在附属器官足、翅、触角中的表达量分别为对照的 2.83、1.26、0.43 倍,三者表现差异显著( $P<0.05$ ) (图 6B)。



图中不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ );E:卵;L1~L5:幼虫 1 龄~5 龄;P0:过渡态蛹;P1~P10:蛹 1 日龄~10 日龄,A0:过渡态成虫,A1~A3:成虫 1 日龄~3 日龄。

图 5 *MaDLP1* 基因在松墨天牛各虫态中的表达

Fig.5 The expression level of *MaDLP1* in each development stage of *M.alternatus*



不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图 6 *MaDLPI* 基因在松墨天牛幼虫 (A) 和成虫 (B) 不同部位中的表达

Fig.6 The expression level of *MaDLPI* in the larvae (A) and adults (B) of *M. alternatus*

### 3 讨论

与其他同属于 *GTP* 酶超基因家族成员不同,发动蛋白基因 (*Dynamins*) 最具特色的是存在 3 个酶域:大约 300 个氨基酸的 *GTP* 酶域、中间域和 *GTP* 酶效应域。后 2 个结构域除了参与该蛋白齐聚反应的发生,还对 *GTP* 酶活性有一定调控作用<sup>[6]</sup>。尽管不同的发动蛋白基因在蛋白质分子量上有差别,但大部分都包括除 3 个保守酶域以外,还包括 5 个保守 *GTP* 酶位点 (*G1~G5*)<sup>[18]</sup>。通过氨基酸同源比对及保守区域分析发现:*MaDLPI* 蛋白含有 3 个保守酶域,包括 279 个氨基酸的 *GTP* 酶域、274 个氨基酸的中间域和 88 个氨基酸的 *GTP* 酶效应域。其中 *GTP* 酶域同样包含有 5 个保守 *GTP* 酶保守位点:*G1* 位点 (*G<sup>32</sup>SQSSGKS<sup>39</sup>*) 在 *ATP* 酶中也能找到,其作用主要是调节核酸磷酸盐化过程<sup>[19]</sup>; *G2* 位点 (*T<sup>59</sup>*) 中的保守苏氨酸和 *G3* 位点 (*D<sup>146</sup>LPGI<sup>150</sup>*) 中的保守氨基酸残基同  $Mg^{2+}$  结合且和 *GTP* 水解相关<sup>[20]</sup>; *G4* 位点 (*T<sup>215</sup>KLD<sup>218</sup>*) 与发动蛋白亲和力有关<sup>[6,8]</sup>; *G5* 位点 (*V<sup>245</sup>NR<sup>247</sup>*) 参与蛋白与核糖的结合过程<sup>[6]</sup>。因此,从保守的 3 个酶域以及 5 个保守位点 (*G1~G5*) 中可以推测 *MaDLPI* 属于 *GTP* 酶超基因家族蛋白。

过氧化物酶体是单膜细胞器,普遍存在于真核生物的各类细胞中,尤其在肝脏和脂肪组织中大量存在<sup>[21]</sup>。在哺乳动物细胞中,该细胞器里至少包括 50 种不同的酶,这些酶的功能各异,主要与长链脂肪酸的  $\beta$  氧化、过氧化氢解毒作用、胆汁酸和缩醛磷

脂等生物合成相关<sup>[22-23]</sup>。Li 等<sup>[24]</sup> 通过 RNAi 技术使小白鼠肝脏内 *DLP1* 表达下降,结果表明 *DLP1* 蛋白活性的下降抑制了过氧化物酶体分解。在对幼虫的各组织表达分析中发现 *MaDLPI* 在脂肪体中表达最高,并且哺乳动物的肝脏与昆虫脂肪体在功能上相似,由此可推测 *MaDLPI* 与昆虫脂肪体中的过氧化物酶体形成相关。

Kahsai 等<sup>[25]</sup> 在对果蝇头部神经肽调控运动行为中研究发现:利用 RNAi 技术或高温处理发动蛋白的同源物 *Shibire*,使其表达沉默后,发现突触囊泡迅速消失,导致囊泡在突触间的转运中断。说明发动蛋白同源物 *Shibire* 与突触囊泡形成密切相关。在昆虫完全变态或不完全变态发育全程中,头部神经中枢一直处于运转状态,神经递质的传递需要突触囊泡,故头部需要产生大量的囊泡用于神经递质的传递。有研究表明哺乳动物中 *DLP1* 也与突触囊泡形成有关<sup>[26]</sup>。本研究结果表明,*MaDLPI* 在幼虫和成虫头部大量表达,分别为对照的 2.46 倍、5.24 倍,而昆虫的主要神经系统存在于其头部,因此推测 *MaDLPI* 参与了松墨天牛头部神经中枢突触囊泡的形成,从而影响神经递质传递过程。

发动蛋白广泛存在于包括昆虫在内的真核生物中<sup>[27]</sup>。*DLP1* 蛋白调控线粒体形态建成,线粒体裂解与融合动态过程异常会影响线粒体功能,如能量代谢、 $Ca^{2+}$  运输、活性氧产生、细胞凋亡<sup>[28-29]</sup>。*MaDLPI* 表达模式分析结果显示在松墨天牛卵、幼虫期、蛹期和成虫中不间断表达,幼虫期表达量在 1

龄到 4 龄幼虫中低于卵中表达水平,但在 5 龄幼虫中表达量升高,为卵的 2.67 倍,5 龄幼虫为即将进入蛹期做好准备,需要线粒体不断通过裂解与融合动态过程来提供大量能量,并蜕下最后一次皮变成蛹。暗示 *MaDLP1* 可能参与松墨天牛 5 龄幼虫的相关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>[30]</sup>。因此,像线粒体、过氧化物酶体、脂肪体等组织和细胞器都会被破坏,从而导致 *MaDLP1* 在 5 龄幼虫变成蛹时表达下降。在蛹期里包括神经系统在内的各个系统不断进行重构,羽化时相关系统重构基本完成,之后逐渐完善<sup>[31]</sup>。本研究中,在 2 日龄蛹中 *MaDLP1* 表达量有所增加,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>[26]</sup>。在初羽化的成虫中其表达量达到了峰值,而后逐渐下降,推测与 *MaDLP1* 相关的过氧化物酶体、线粒体及脂肪体在初羽化成虫中基本发育完全,之后逐渐发育完善有关。在初蛹化的一日龄蛹中表达量下降,在初羽化的成虫中其表达量达到了峰值,而后急剧下降,表明 *MaDLP1* 对松墨天牛的完全变态发育可能发挥着重要的作用。

## 参考文献:

- [1] 张心团,赵和平,樊美珍,等. 松墨天牛生物学特性的研究进展[J]. 安徽农业大学学报,2004,31(2):156-157.
- [2] 王文琪.赣北松墨天牛成虫发生及产卵规律[J].江苏农业科学,2015,43(4):170-172.
- [3] MAMIYA Y, ENDA N. Transmission of *Bursaphelenchus lignicolus* (Nematoda: Aphelenchoididae) *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae)[J]. *Nematologica*, 1972, 18(2):159-162.
- [4] 蔡紫玲,陈敬祥,林 同. 松墨天牛葡萄糖-6-磷酸异构酶基因克隆及序列分析[J]. 南方农业学报,2016,47(5):657-661.
- [5] ROMANI P, PAPI A, IGNESTI M, et al. Dynamin controls extracellular level of Awd/Nme1 metastasis suppressor protein[J]. *Nauyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2016, 389(11):1-12.
- [6] PRAEFCKE G J, MCMAHON H T. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2004, 5(2):133-147.
- [7] MIYAGISHIMA S Y, KUWAYAMA H, URUSHIHARA H, et al. Evolutionary linkage between eukaryotic cytokinesis and chloroplast division by dynamin proteins[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(39):15202-15207.
- [8] WANG W, WANG X, FUJIOKA H, et al. Parkinson's disease-associated mutant VPS35 causes mitochondrial dysfunction by recycling DLP1 complexes[J]. *Nature Medicine*, 2016, 22(1):54-63.
- [9] WANG X, YAN M H, FUJIOKA H, et al. LRRK2 regulates mitochondrial dynamics and function through direct interaction with DLP1[J]. *Human Molecular Genetics*, 2012, 21(9):1931-1944.
- [10] WANG X, SU B, FUJIOKA H, et al. Dynamin-Like protein 1 reduction underlies mitochondrial morphology and distribution abnormalities in fibroblasts from sporadic alzheimer's disease patients[J]. *American Journal of Pathology*, 2008, 173(2):470-482.
- [11] ITOYAMA A, MICHYUKI S, HONSHO M, et al. Mff functions with Pex11pb and DLP1 in peroxisomal fission[J]. *Biology Open*, 2013, 2(10):998-1006.
- [12] CHERRY S, PERRIMON N. Entry is a rate-limiting step for viral infection in a *Drosophila melanogaster* model of pathogenesis[J]. *Nature Immunology*, 2004, 5(1):81-87.
- [13] MARSH M, HELENIUS A. Virus entry: open sesame[J]. *Cell*, 2006, 124(4):729-740.
- [14] NAKABACHI A, MIYAGISHIMA S, O'BROCHTA D, et al. Expansion of genes encoding a novel type of dynamin in the genome of the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*[J]. *Insect Molecular Biology*, 2010, 19(S2):165-173.
- [15] MANALIL N S, JUNIOR TEO V S, BRAITHWAITE K, et al. Comparative analysis of the *Metarhizium anisopliae* secretome in response to exposure to the greyback cane grub and grub cuticles[J]. *Fungal Biology*, 2010, 114(8):637-645.
- [16] BARRIAS E S, CARVALHO T M U D, SOUZA W D. Trypanosoma cruzi: entry into mammalian host cells and parasitophorous vacuole formation[J]. *Frontiers in Immunology*, 2013, 4:186.
- [17] 韦春梅,罗琳琳,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] NIEMANN H H, KNETSCH M L W, SCHERER A, et al. Crystal structure of a dynamin GTPase domain in both nucleotide-free and GDP-bound forms[J]. *Embo Journal*, 2001, 20(21):5813-5821.
- [19] SARASTE M, SIBBALD P R, WITTINGHOFFER A. The P-loop - a common motif in ATP- and GTP-binding proteins[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1990, 15(11):430-434.
- [20] VETTER I R, WITTINGHOFFER A. The guanine Nucleotide-binding switch in three dimensions[J]. *Science*, 2001, 294(5545):1299-1304.
- [21] BOCOS C, GOTTLICHER M, GEARING K, et al. Fatty acid activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) [J]. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 1995, 53(53):467-473.
- [22] WANDERS R J, WATERHAM H R. Peroxisomal disorders: the



- single peroxisomal enzyme deficiencies.[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2006, 1763(12):1707-1720.
- [23] ISLINGER M, CARDOSO M J, SCHRADER M. Be different - the diversity of peroxisomes in the animal kingdom[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2010, 1803(8):881-897.
- [24] LI X, GOULD S J. The Dynamin-like GTPase DLP1 is essential for peroxisome division and is recruited to peroxisomes in part by PEX11 \* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(19):17012-17020.
- [25] KAHSAI L, MARTIN J R, WINTHER A M. Neuropeptides in the *Drosophila* central complex in modulation of locomotor behavior [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2010, 213(13):2256-2265.
- [26] 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.
- [27] KONOPKA C A, SCHLEEDE J B, SKOP A R, et al. Dynamin and cytokinesis [J]. *Traffic*, 2006, 7(3):239-247.
- [28] CHAN D C. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development [J]. *Cell*, 2006, 125(125):1241-1252.
- [29] WANG X, SU B, LEE H G, et al. Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease [J]. *Journal of Neuroscience the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 2009, 29(28):9090-9103.
- [30] MOCZEK A P. Pupal remodeling and the development and evolution of sexual dimorphism in horned beetles [J]. *American Naturalist*, 2007, 168(6):711-729.
- [31] WILLIAMS D W, TRUMAN J W. Remodeling dendrites during insect metamorphosis [J]. *Journal of Neurobiology*, 2005, 64(1):24-33.

(责任编辑:陈海霞)