

具有蛋白酶体 $\beta 7$ 亚基功能的棉铃虫 HaPro $\beta 7$ 基因的克隆与序列结构及表达研究

王更先^{1,2}, 司马杨虎¹, 张升祥³, 徐世清¹

(1. 苏州大学 现代丝绸国家工程实验室 苏州大学 基础医学与生物科学学院, 江苏 苏州 215123; 2. 邯郸学院 生物科学系, 河北 邯郸 056005;

3. 山东农业大学 林学院 山东 泰安 271018)

摘要:以棉铃虫中肠总 RNA 为模板, 利用快速扩增 cDNA 末端(RACE)技术克隆了棉铃虫蛋白酶体 $\beta 7$ 亚基基因的 cDNA 序列, 并对所得基因进行了序列分析。结果表明: 棉铃虫蛋白酶体 $\beta 7$ 亚基基因的 cDNA 序列亚基全长 1 007 bp, 命名为 HaPro $\beta 7$ (GeneBank 登陆号: FJ378902), 包含 1 个 846 bp 的完整开放读码框(ORF)序列, 编码蛋白质为 281 个氨基酸残基, 预测分子量 30.07 kD, 等电点为 8.04。HaPro $\beta 7$ 蛋白质在 40~229 氨基酸残基位置为蛋白酶体 $\beta 7$ 亚基的保守区域。Clustal W 进行多序列比对发现, HaPro $\beta 7$ 编码蛋白质与果蝇等昆虫蛋白酶体 $\beta 7$ 具有 63% 以上的同源性, 蛋白酶体 $\beta 7$ 的保守区域高度一致。邻近(NJ)法分子进化分析也显示, HaPro $\beta 7$ 编码蛋白质与其它生物蛋白酶体 $\beta 7$ 进化上同源。基因表达谱分析结果表明, HaPro $\beta 7$ 在体壁、中肠和生殖腺中表达量较高, 在头部表达量最少。

关键词: 棉铃虫; 蛋白酶体; 克隆; HaPro $\beta 7$ 基因; RACE

中图分类号: S 435.622⁺.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)24-0138-05

蛋白酶体是一种具有多种蛋白水解功能的大分子复合物, 在细胞内蛋白质的降解过程中起重要作用, 在真核生物、细菌和古细菌中普遍存在^[1-3]。它主要通过泛素(Ubiquitin, UB)依赖和非 UB 依赖 2 种途径对蛋白质进行降解^[4]。在真核生物中, 最普遍的蛋白酶体形式是 26S 蛋白酶体, 包含 1 个 20 S 核心颗粒和 2 个 19 S 调节颗粒。所有的 20 S 核心颗粒都是由 4 个堆积的七元环所组成, 2 个外环由 7 种不同的 α 亚基组成, 2 个内环由 7 种不同的 β 亚基组成^[5]。 α 和 β 亚基在结构上具有同源性, 其中 α 亚基为结构性蛋白, 而 β 亚基则发挥主要的催化作用^[6]。在昆虫领域特别是果蝇, 人们对蛋白酶体的结构及功能进行了深入的研究, 目前已证明蛋白酶体在蛋白质质量控制、细胞凋亡、热休克应答、缺氧型免疫应答、配子形成和转录因子调控等生理方面起着重要的作用^[7-8]。

果蝇 Pro $\alpha\beta 21$ 基因属于显性温敏性致死突变基因

(Dominant temperature-sensitive lethal mutants, DTS), 因此通常被称为 DTS7, 是由于蛋白酶体 $\beta 2$ 亚基第 170 位的甘氨酸(Glycine, G)突变为精氨酸(Arginine, R)造成的^[9]。这个突变体的表型为突变杂合体在 29℃ 饲养, 会造成腹部组织细胞增值降低、头部翻转失灵等生理缺陷, 最后在蛹期死亡, 在 25℃ 饲养正常生长发育。当温度大于等于 22℃ 时, 突变双杂合体会在幼虫早期死亡。遗传学和生物化学证据表明, 该表型是由于突变影响到了蛋白酶体的功能所造成的^[10]。据报道可以在活的生物体内利用显性温敏性致死突变的性质来操纵蛋白酶体的功能, 同时改变温度也会影响生物体的存活。这为害虫防治提供了一个很好的思路。在这方面目前已创建了 UAS-Pro $\alpha 261$ 和 UAS-Pro $\alpha 21$ 等转基因系统^[11-13]。

棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)是一种世界性农业害虫, 可危害多种果树和蔬菜。人们在遗传及分子水平上对其进行了广泛而又着有成效的研究。该试验以果蝇 Pro $\alpha 21$ 为质询序列, 利用 RACE 技术获得了棉铃虫蛋白酶体 $\beta 7$ 亚基的全长 cDNA 序列, 并分析了其核苷酸和氨基酸序列及基因表达谱, 为进一步研究该基因在棉铃虫中是否具有温敏性致死突变体进而用来进行害虫防治奠定了分子基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

棉铃虫卵购自江苏省农科院, 在苏州大学实验室饲

第一作者简介: 王更先(1981-), 男, 山东汶上人, 博士, 现从事分子遗传与基因工程的教学与研究工作。E-mail: gengxianwang@sina.com。

通讯作者: 徐世清(1963-), 男, 博士, 教授, 现从事分子遗传及发育生物学的教学与科研工作。E-mail: szsqxu@suda.edu.cn。

基金项目: 国家重点基础研究发展“973”计划资助项目(2005CB121005)。

收稿日期: 2010-10-25

养 饲养温度(25±1)℃, 光周期 14 h : 10 h(光照 : 黑暗), 选取 6 龄第 2 天的幼虫中肠用于试验。总 RNA 提取使用 RNAiso Reagent 试剂(购于 TaKaRa 公司)。cDNA 末端快速扩增(RACE)采用 TaKaRa 公司的 5'-Full RACE 试剂盒。pMD19-T 载体, 反转录酶 M-MLV, RNase-free ddH₂O, Oligo (DT), RNase Inhibitor 及 PCR 产物回收试剂盒等购自大连宝生物公司(TaKaRa 公司)。Taq 酶和引物购自上海生工生物工程有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 的提取 取棉铃虫 6 龄 2 d 不同组织。在研钵中液氮冷却、研磨, 参照 RNAiso Reagent 试剂盒说明书方法提取总 RNA。RNA 质量用 DU-730 核酸/蛋白质分析仪(Beckman Coulter USA)检测。

1.2.2 EST 序列获得与 RACE 引物设计 根据 Genbank 登录的果蝇 *Proα321* 基因蛋白氨基酸序列对棉铃虫 EST 库进行 BLAST 分析, 获得一条同源 EST 序列(GenBank 登录号: BU038863), 包含 Poly A 尾巴。利用 Primer 5 软件设计该序列基因特异性引物用于扩增 其中 H5S: 5'-CAGTCTCTGCAACTCTTTATTGCGA -3'; H5A: 5'-CACCACAACAATTCATATTGCCTGCC -3', 分别作为 5'RACE 引物和巢式 PCR 引物。

1.2.3 cDNA 末端扩增 按照 TaKaRa 公司的 5'-Full RACE 试剂盒说明书进行。用试剂盒中提供的逆转录酶和引物对总 RNA 进行反转录得到第一链 cDNA。以此 cDNA 为模板, 用引物 H5S 和试剂盒中 5'RACE 引物 进行 5 端第 1 次扩增 反应条件为: 94℃预变性 3 min, 94℃30 s, 59℃30 s, 72℃50 s, 30 个循环。终延伸 72℃10 min。扩增产物稀释 10 倍后用引物 H5A 和试剂盒中的 5'RACE 巢式引物进行第 2 次 PCR 扩增 (nested-PCR), 反应条件为: 94℃预变性 3 min, 94℃30 s, 60℃30 s, 72℃50 s, 30 个循环。终延伸 72℃10 min。第 2 次扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测、回收目的片段。

1.2.4 RACE 产物的克隆、鉴定及序列测定 回收 RACE 第 2 次 PCR 扩增产物, 用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 回收特异性扩增片段, 连接到载体 pMD19-T, 转化大肠杆菌 DH5α 蓝白斑筛选挑取阳性菌落, 培养后提取质粒, BamH I 和 Hind III 酶切鉴定为阳性克隆后测序。

1.2.5 生物信息学分析 使用 NCBI 的 ORF Finder 服务器(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf>)分析 ORF, 推导氨基酸序列; 蛋白质分子量、等电点及基本性质分析用 Protparam (<http://au.expasy.org/tool/protparam.html>) 预测; 蛋白质功能域的预测使用在线 SMART 程序(<http://smart.embl-heidelberg.de>); 蛋白质同源检索使用 Blast 在线分析软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)

在 Genebank 中进行; 多序列比对采用 Clustal W 软件; MEGA3.1 邻近法(NJ 法)构建系统进化树。

1.2.6 基因表达谱分析 以 6 龄 2 d 幼虫不同组织反转录合成的第 1 链 cDNA 为模板(引物 H3S: 5'-CCCTA-CAGCACTAAAACC -3'; H3A: 5'-CCACCAAGAAC-TAAAGCAG -3'), 棉铃虫 *Actin* 3 基因(正向引物: 5'-CGCGACCTCACAGACTACCT -3'; 反向引物: 5'-GGC-CAGACTCATCGTACTCCT -3')为内参, 采用 RT-PCR 方法调查 HaPrq37 基因表达情况。产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳 30 min 后, 用凝胶自动成像系统 Tanon 2500 观察拍照, 并用 Tanon GIS(Gel Image System)软件进行量化分析。

2 结果与分析

2.1 cDNA 序列的 RACE 扩增及拼接

以棉铃虫 6L-2d 中肠 RNA 为模板, 依据 RACE 试剂盒程序, 反转录合成 5'端带有接头序列的第一链 cDNA。用基因特异性引物(H5S, H5A)和试剂盒中所带引物进行 5'RACE 扩增, 扩增产物进行电泳检测(图 1-1 泳道)。将该片段连接到载体 pMD19-T, BamH I 和 Hind III 酶切鉴定筛选的重组质粒, 酶切出 1 条相同长度的片段(图 1 的 2 泳道), 说明得到阳性克隆。将阳性克隆测序与电子克隆的 EST 序列拼接, 得到棉铃虫 cDNA 序列, 命名为 *HaPrq37*。

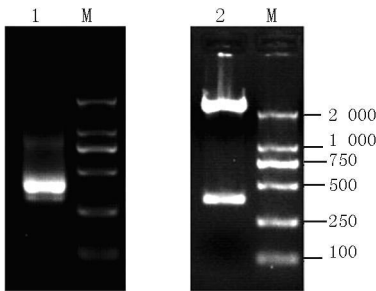


图 1 *HaPrq37* 基因 5' RACE 扩增和重组质粒酶切结果

注 M 为 Marker; 1 为 *HaPrq37* 基因 5'RACE 产物; 2 为 BamH I 和 HindIII 酶切重组质粒。

2.2 棉铃虫 *HaPrq37* 基因的核苷酸序列分析

HaPrq37 基因(Genebank 登录号: FJ378902) cDNA 序列全长为 1 007 bp, 有 1 个长 846 bp 的完整开放读码框(ORF: 83-928), 编码 281 个氨基酸残基序列。编码区的第 4 位为 G, 符合 kozak 规则, 在 963~969 处有典型的加尾信号 AATAAA (图 2)。

2.3 棉铃虫 *HaPrq37* 基因氨基酸序列分析

Protparam 程序分析显示, 棉铃虫 *HaPrq37* 基因编码蛋白质的分子量为 30.07 kD, 等电点为 8.04。对所获序列的推导编码蛋白利用 SMART 在线程序进行功能域预测表明 *HaPrq37* 蛋白质的 40~229 氨基酸残基为蛋

```

1  aacgat ttgctt gcag taata caa attcggtt tataa cca cataa taa cttc attt atca aataa agaa
76  cgaaga tATG GCTT CCAT CC TTGT AC CAGA AGTCC AGCT CCAG GATT CT CAT TTTGA GAACTGCC AA CG AAATGC
1  M A S I L V P E V P A P G F S F E N C Q R N A
151 ATTCT TGGCCA ACAA GGTAT CC GG CCCT CA CAGCAA CTAA AACGGT ACCAC CAT TGTGGG TAATA ATCTTC GC
24  F L A N K G F P A P T A T K T G T T I V G I I F A
226 CGATGG TGTAAT TCTT GGGGCC GACAC CAGGG CTAC TG AAAA TACT GTTG TATCT GACAAA AACTGCC AAAAAT
49  D G V I L G A D T R A T E N T V V S D K N C Q K I
301 ACATTA CT TGGC AGGCAA TGTATT GTTG GTGC CGGC AC CGCT GCTG ATACC GAGATG AC TA CACA AACTGT
74  H Y L A G N M Y C C G A G T A A D T E M T T Q T V
376 CGCATC GCGATT AGAG TTGC AGAG ACTG CATCT GGGC GACAGT CC TG TGAG AC GG CG GCGACT TTATTG AA
99  A S Q L E L Q R L H T G R T V P V E T A A T L L K
451 GCGTAT GCTG TTTCC GTTACCA AGGCTAC AT TGGT GC TG CT TT AG TTCT TGGT GTGT TGAC AGAA CTGG TCTCA
124  R M L F R Y Q G Y I G A A L V L G G V D R T G P H
526 TATCTACT GCATTT ACC TCAT GGTAT CAGT TGAT AAATTA CCATAT GCAACA ATGG GTTCT GGTTCC CTGG CTGC
149  I Y C I F N P H G S V D K L P Y A T M G S G S L A A
601 CATG CAGT GTTGA AGCTGG GTTG GAAG CCAA ACATGA AC GAGG AAGA AGAAAA AACTGG TCCGTG CATG TCAAT
174  M A V F E A G W K P N M N E E E G K K L V R D A I
676 TGTCTG TGTATCT TCAATG ATCT GGGCTC AGGT TCCA ATGTGG ACCTGT GTGTC ATTTGT GGCACT GGAC CTGC
199  A A G I F N D L G S G S N V D L C V I C G P A
751 TCAGTACC TCAGG ACTATG AGGA AGCCAA TTGTA AGGTAG GAAG CAAG GCTCATACAG ATATGCTCTGG GCAC
224  Q Y L R T Y E E A N V K G R K Q G S Y R Y A L G T
826 TACAGCGG TGCTGA AACA CCGTGT CATTC CCGTGA GGTG AC GT CAGTGA ACATCTGCTGTCC CCAAC CCGTGA
249  T A V L K R V I P L E V T S V N I C C Q P M E
901 AGTGAACCTTCACAC AGTCGC CGTTAA cttccatgaaatgtataa ttccttcagt tctaaa ataaatgtatca
274  V E P S H S R R *
976 tttttttctt aaaaaa aaaaaa aaaaaa aa

```

图2 *HaProβ7* 基因全长 cDNA 及其编码氨基酸序列

注: 下划线表示保守区域; 双下划线表示 poly A 加尾信号; 斜体为 poly A 尾巴。

Bm	1	—MASALVPEIPVPGFSFENFORNAFLAQKGFPAKATKTGTTIVGILYADGVILGADTRATENTVVSQKNCCKIHYLAS
Ha	1	—MASILVPEVPAPGFSFENCRRNAPLANKGFPAITATKTGTTIVGILFADGVILGADTRATENTVVSQKNCCKIHYLAG
Tc	1	—MSVLCPPIAPPGFSFANCRRNATLESKGFPPKATKTGTTIVGITYKGVILGADTRATEDTIVVSQKNCCKIHYLAS
Nv	1	—MSVLCPPIAPPGFSFELCORNALLAKKGYPAKKAQKTGTTIVGILYKGVILGADTRATGSGIVADKSKCKIHYLAK
Cq	1	MTLTIDVARDLEAPGFSFENCRRNAQLVKQGFVAPKMIKTGTTIVGILYKGVILGADTRATEGPIVADKNCCKIHYLAK
Aa	1	—MMIDLARNPEAPGFSFENCRRNAQLVKQGFVAPKMIKTGTTIVGILYKGVILGADTRATEGPIVADKNCCKIHYLAK
Clustal Consensus	1	: : : ***** : * * * * : * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * : * * * * *
Bm	79	NMYCCGAGTAADTEMITQSVASQLELQRLHITGRIVPVETAATLLKRMFLRYQGHIGAALVLGGVDRTGPHIYCIYPHGSV
Ha	79	NMYCCGAGTAADTEMITQVASQLELQRLHITGRIVPVETAATLLKRMFLRYQGYIGAALVLGGVDRTGPHIYCIYPHGSV
Tc	78	NMYCCGAGTAADTECTTQMLSSQLELHRLFTNTRPRVATANQLKQYLFRYQGYIGAALVLGGVDRTGPHIYCIYPHGST
Nv	79	NMYCCGAGTAADTEMITEMSSQLELHRLNIGRIVPVVTASKULKQLFRYQGHIGAALVLGGVDNSGPHIYCIYPHGSV
Cq	81	NMYCCGAGTAADTEMITMLASNLHRLNIGRIVPVVANTMLKQFLFRYQGHISAAVLVLGGVDNTGSYIYCIYPHGST
Aa	79	NMYCCGAGTAADTEMITMLASNLHRLNIGRIVPVVAANTMLKQFLFRYQGYSAALVLGGVDNTGSYIYCIYPHGST
Clustal Consensus	53	***** : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * *
Bm	159	DKLPYATMGSGSLAAMVFBAGWKRDMNEEGKLVIRDAIAAGIFNDLGSNSVDLCVIRNTGPAQLRTTYEANKVGRK
Ha	159	DKLPYATMGSGSLAAMVFBAGWKPNNNEEGKLVIRDAIAAGIFNDLGSNSVDLCVIRNTGPAQLRTTYEANKVGRK
Tc	158	DKLPYATMGSGSLAAMVFBESRWKPDLEEGKLVIRDAIAAGIFNDLGSNSVDLCVIRNTGPAQLRTTYEANKVGRK
Nv	159	DTLQYATMGSGSLAAMVFBESRWKPDLEEGKLVIRDAIAAGIFNDLGSNSVDLCVIRNTGPAQLRTTYEANKVGRK
Cq	161	DKLPYATMGSGSLAAMVFBESRWKPDLEEGKLVIRDAIAAGIFNDLGSNSVDLCVIRNTGPAQLRTTYEANKVGRK
Aa	159	DKLPYATMGSGSLAAMVFBESRWKPDLEEGKLVIRDAIAAGIFNDLGSNSVDLCVIRNTGPAQLRTTYEANKVGRK
Clustal Consensus	116	* * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * *
Bm	239	QGSVRYALGTTAVLKQRVIPLEVESILVRPTFAFQPMDEVPQTSR—
Ha	239	QGSVRYALGTTAVLKQRVIPLEVTSVNIC—CPQPMVEPSSHRR
Tc	237	QSSVQYKGTITAVLKSKVIKVDVVDVAH—PIEAEQMDTA—
Nv	238	QGSVRYKRGTTAVLKSKVIRPVIVIDEAVR—RVEPEMDTSS
Cq	240	SLNVEYKGTITAVLGSKSFKIDVTEECVR—TLIPEGGVESMDTA—
Aa	238	TLNVEYKGTITAVLGSKSFKIDVTEECVR—TLIPVGGVESMDTA—
Clustal Consensus	172	* * : * * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * :

图3 *HaProβ7* 基因蛋白质与其它物种同源蛋白氨基酸多序列比对

注: Bm, 家蚕; Ha, 棉铃虫; Tc, 赤拟谷盗; Nv, 丽蝇蛹集金小蜂; Cq, 致倦库蚊; Aa, 埃及伊蚊; 所有物种都保守的序列为星号

标记, 所有物种都相似的序列为冒号标记, 大部分昆虫种相似的序列用实点标记。

白酶体 $\beta 7$ 亚基的保守区域(图2), 表明棉铃虫 *HaProβ7* 编码的蛋白质属于蛋白酶体 $\beta 7$ 亚基蛋白家族。蛋白质同源性分析发现, *HaProβ7* 蛋白质与家蚕(*Bombyx mor-*

i)、赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)、丽蝇蛹集金小蜂(*Nasonia vitripennis*)、致倦库蚊(*Culex quinquefasciatus*)和埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)的蛋白酶体 $\beta 7$ 亚基的同

源性分别为 90%、75%、68%、73%和 63%。从 Clustal W 多序列比对结果(图 3)可以看出, 棉铃虫 *HaProβ7* 蛋白与其它物种中相关蛋白的氨基酸序列保持高度一致。用 MEGA3.1 邻近法(NJ 法)利用 8 个物种蛋白酶体 β7 亚基蛋白序列构建系统进化树, 结果表明, 棉铃虫与其它昆虫(致倦库蚊、丽蝇蛹集金小蜂、家蚕)聚为一枝, 与脊椎动物门(斑马鱼、人、小鼠、牛)进化关系较远(图 4)。

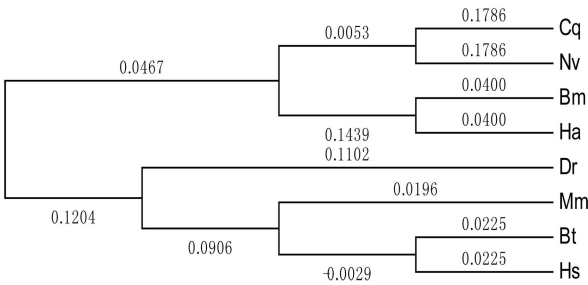


图 4 *HaProβ7* 基因蛋白质与其它物种同源蛋白的系统进化树

注: Cq: 致倦库蚊; Nv: 丽蝇蛹集金小蜂; Bm: 家蚕; Ha: 棉铃虫; Dr: 斑马鱼; Mm: 小鼠; Bt: 牛; Hs: 人。

2.4 棉铃虫 *Haproβ7* 基因的表达谱分析

利用半定量 RT-PCR 分析方法, 以棉铃虫 *Actin3* 基因为内参对照, 分析了 *Haproβ7* 基因在棉铃虫 6 L-2 d 的体壁、中肠、头部和生殖腺等组织中的表达变化。由图 5 可知, *Haproβ7* 在体壁、中肠和生殖腺中表达量较高, 而在头部表达量相对最少。

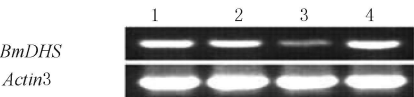


图 5 *HaProβ7* 基因在不同组织的表达变化
注: 1. 体壁; 2. 中肠; 3. 头部; 4. 生殖腺。

3 讨论

根据 Genbank 登录的果蝇 *Proβ21* 蛋白氨基酸序列对棉铃虫 EST 库进行 BLAST 分析, 利用 RACE 技术获得了编码蛋白酶体 β 亚基的新成员 *HaProβ7* 基因, *HaProβ7* 编码 281 氨基酸残基序列, 理论分子量 30.07 kD, 与典型的真核细胞蛋白酶体亚基的分子量在 21 ~ 32 kD 相一致^[14]。α 和 β 亚基在结构上具有同源性, β1-β7 亚基之间更加具有同源性。它们具有同一的 β 亚基保守区域^[9]。试验利用果蝇蛋白酶体 β2 亚基点突变温敏致死基因 *Proβ21* 编码的蛋白序列为质询序列克隆了棉铃虫的 β7 亚基基因 *HaProβ7* 正好印证了这一点。

对 *HaProβ7* 编码蛋白质序列同源性和系统进化树分析显示蛋白酶体 β 亚基在昆虫纲的各物种间具有极高的同源性, 分子进化关系具有物种特异性, 在所分析的物种中昆虫聚为一群, 然后再和其它物种聚为一群,

同已知的物种系统发生关系完全一致。这为研究昆虫的分子进化和物种进化关系提供了有益的参考。

蛋白酶体已被证明是一种具有多种蛋白水解功能的大分子复合物, 在细胞内蛋白质的降解过程中起重要作用^[1]。试验通过半定量 RT-PCR 检测了 *HaProβ7* 不同组织的表达情况, 结果表明在体壁、中肠和生殖腺中表达量较高, 而在头部表达量最少。这可能是因为头部的蛋白质代谢活动没有其它所检测的组织旺盛所造成的。

该试验首次克隆了鳞翅目昆虫棉铃虫蛋白酶体的核心部分(20 S 蛋白酶体)β 亚基 *HaProβ7* 基因, 为进一步研究蛋白酶体亚基在鳞翅目昆虫中是否存在温敏性致死突变迈出了第一步, 同时也为研究鳞翅目昆虫中的蛋白酶体系统作用机制奠定了理论基础。

参考文献

[1] Peters J M. Proteasomes, protein degradation machines of the cell [J]. Trends Biochem Sci., 1994, 19(9): 377-382.
[2] Tamura T, Nagy I, Lupas A, et al. The first characterization of a eubacterial proteasome, the 20S complex of Rhodococcus [J]. Curr. Biol., 1995, 5 (7): 766-774.
[3] Seemüller E, Lupas A, Stock D, et al. Proteasome from Thermoplasma acidophilum; a threonine protease [J]. Science, 1995, 268(5210): 579-582.
[4] Chung C H, Baek S H. Deubiquitinating enzymes: their diversity and emerging roles [J]. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1999, 266(3): 633-640.
[5] Coux O, Tanaka K, Goldberg A L. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes [J]. Annu. Rev. Biochem., 1996, 65: 801-847.
[6] Tongaonkar P, Chen L, Lambertson D, et al. Evidence for an interaction between ubiquitin-conjugating enzymes and the 26S proteasome [J]. Mol. Cell Biol., 2000, 20(13): 4691-4698.
[7] Mykles D L. Intracellular proteinases of invertebrates: calcium-dependent and proteasome/ubiquitin dependent systems [J]. Int. Rev. Cytol., 1998, 184: 157-289.
[8] Mykles D L. Structure and functions of arthropod proteasomes [J]. Mol. Biol. Rep., 1999, 26: 103-111.
[9] Smyth K A, Belote J M. The dominant temperature sensitive lethal mutant DTS7 of *Drosophila melanogaster* encodes an altered 20S proteasome β-type subunit [J]. Genetics, 1999, 151: 211-220.
[10] Speese S D, Trotta N, Rodesch C K, et al. The ubiquitin proteasome system acutely regulates presynaptic protein turnover and synaptic efficacy [J]. Curr. Biol., 2003, 13: 899-910.
[11] Belote JM, Fortier E. Targeted expression of dominant negative proteasome mutants in *Drosophila* [J]. Genesis, 2002, 34: 80-82.
[12] Heniche J K, Ang D, Bier E, et al. Involvement of an SCF-Smb complex in timely elimination of E2F upon initiation of DNA replication in *Drosophila* [J]. BMC Genet., 2003(4): 9.
[13] Henchoz S, De Rubertis F, Pauli D, et al. The dose of a putative ubiquitin-specific protease affects position-effect variegation in *Drosophila melanogaster* [J]. Mol. Cell Biol., 1996, 16: 5717-5725.
[14] Lia G D, Li J L, Mugt hin M, et al. Molecular cloning of a gene coding a 20S proteasome β subunit from *Plasmodium falciparum* [J]. International Journal for Parasitology, 2000, 30(6): 729-733.

不同激素水平对百合愈伤组织诱导研究

林 海, 张 芳, 郝 慧 敏

(鹤壁职业技术学院, 河南 鹤壁 458030)

摘 要:以百合根状茎、幼茎、叶片、离体胚为外植体, 4 种激素 2, 4-D、NAA、6-BA、ZT 采用 $L_9(3^4)$ 正交实验处理, 对愈伤组织诱导的条件进行研究。结果表明: 6-BA 和 2, 4-D 在诱导百合愈伤组织中作用极为显著, 4 种激素对愈伤组织的诱导作用大小依次为: 6-BA > 2, 4-D > NAA > ZT, 初步断定百合愈伤组织诱导的最佳激素配比是: 2, 4-D 0.2 mg/L + NAA 0.9 mg/L + 6-BA 1.0 mg/L + ZT 0.25 mg/L; 根茎和幼茎作为外植体更易诱导愈伤组织形成; 暗培养较光暗交替培养褐化率低。

关键词: 百合; 愈伤组织; 诱导; 条件

中图分类号: S 682.2⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)24-0142-04

百合 (*Lilium candidum* L.) 是百合科百合属多年生草本球根植物, 主要应用价值在于观赏, 其球根含丰富淀粉质, 有些品种可作为蔬菜食用和药用。百合花素有“云裳仙子”之称。由于其外表高雅纯洁, 天主教以百合花为玛利亚的象征。百合的鳞茎由鳞片抱合而成, 有“百年好合”、“百事合意”之意, 中国人自古将其视为婚礼必不可少的吉祥花卉。以食用价值著称于世的我国兰

州百合, 最早记载在甘肃省平凉县志中, 迄今已有 450 多年。兰州百合个大、味甜, 既可作点心, 又可作菜肴; 宜兴的卷丹制成百合汤是夏日消暑佳品。百合还可制作成百合干、百合粉, 在国际市场上价格很高。同时, 中医认为百合性微寒平, 具有清火、润肺、安神的功效, 其花、鳞状茎均可入药, 是一种药食兼用的花卉。到目前为止, 百合仍然是中药中的常用药材。由于百合需求的大幅增长, 目前人工种植的百合产量远远不能满足市场的需求, 且百合喜湿润、光照, 要求肥沃、富含腐殖质、土层深厚、排水性极为良好的砂质土壤, 多数品种宜在微酸性至中性土壤中生长, 对种植地的选择也颇为重要, 不

第一作者简介: 林海 (1970-), 男, 硕士, 副教授, 现主要从事森林动物研究与教学工作。E-mail: hnlinhai@163.com.

收稿日期: 2010-10-14

Cloning, Sequence Structure and Expression of *HaProβ7* Gene with Proteasome

β7 Subunit Function in the *Helicoverpa armigera*

WANG Geng-xian^{1,2}, SIMA Yang-hu¹, ZHANG Sheng-xiang³, XU Shi-qing¹

(1. State Key Laboratory of Modern Silk, Department of Applied Biology, Medical College Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215153; 2. Department of Biological Science Handan College, Handan, Hebei 056005; 3. College of Forestry, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018)

Abstract: By using total RNA which was extracted from midgut of *Helicoverpa armigera* and rapid amplification of cDNA ends (RACE) technology, the full-length cDNA encoding Proteasome *β7* Subunit was cloned, then further analyzed the gene sequence. The results showed that the full-length cDNA sequence was named as *HaProβ7* (GeneBank accession number: FJ378902). It was 1 007 bp nucleotide long, contained an ORF (846 bp) and encoded 281 amino acids with their predicted mass 30.07 KD and isoelectric point 8.04. The deduced amino acid showed that a proteasome *β7* subunit domain between 40 to 229 amino-acid residue. It had more than 63% identity to other insects such as *Drosophila melanogaster*. The proteasome *β7* subunit conservative regions were very similar with each other. Molecular evolution by Neighbor Joining method indicated that *HaProβ7* had homologous with other proteasome *β7* subunit of species. Sequence alignment analysis showed that the cloned gene was proteasome *β7* subunit gene. The results of gene expression profiling analysis showed that *Haproβ7* had high expression in body wall, midgut, gonad, but low expression in head.

Key words: *Helicoverpa armigera*; proteasome; cloning; *HaProβ7* gene; RACE