研究论文

棉铃虫 β-微管蛋白基因 cDNA 序列的克隆与序列分析*

闫 硕** 刘小侠 韩娜娜 倪 慧 孙洁茹 张青文***

(中国农业大学 农学与生物技术学院昆虫系 北京 100193)

摘 要 β-微管蛋白是构成细胞骨架的重要组成性蛋白,对昆虫的蜕皮、器官形成等生长发育阶段均能产生重要影响。本文以棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 3 日龄成虫为材料,利用 RACE 末端扩增技术克隆得到棉铃虫的 β-微管蛋白基因的 cDNA 序列。序列分析表明:棉铃虫 β-微管蛋白基因的 cDNA 序列包含 1 775 个碱基,包括一个 1 347 个碱基的开放阅读框,编码 448 个氨基酸组成的多肽。GenBank 登录号:JF767013。同源性分析表明,棉铃虫的微管蛋白基因与本研究所比对其它昆虫的 β-微管蛋白基因具有高度的同源性,达到 90% 左右。本研究克隆得到棉铃虫的 β-微管蛋白基因的 cDNA 序列,对进一步深入研究该基因功能有重要意义。

关键词 棉铃虫, cDNA 克隆, 微管蛋白, 序列分析

Molecular cloning and sequence analysis of β-tubulin in *Helicoverpa armigera*

YAN Shuo** LIU Xiao-Xia HAN Na-Na NI Hui SUN Jie-Ru ZHANG Qing-Wen***

(Department of Entomology, College of Agriculture and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract β-tubulin is an important component of the cytoskeleton affecting aspects of insect development such as molting and organofaction. Total RNA was isolated from third-day adults of *Helicoverpa armigera* (Hübner). A β-tubule cDNA sequence was cloned by rapid amplification of cDNA ends (RACE). Sequence analysis indicates that the β-tubule cDNA sequence is 1 775 bp, including an open reading frame of 1 347 bp encoding a polypeptide of 448 amino acid residues. The GenBank accession number is JF767013. Phylogenetic analysis shows that the homology of amino acid sequences was about 90%, compared with other insect tubulins. The molecular cloning of the β-tubulin gene is important for further study of the function of this gene.

Key words *Helicoverpa armigera*, cDNA cloning, β-tubulin, sequence analysis

在真核细胞中,微管蛋白是构成细胞骨架的重要组成性蛋白。具体来说,α、β-微管蛋白通过非共价键以头尾相连的方式聚合成异二聚体,进而形成原纤丝,由 13 条原纤丝纵向排列构成的圆柱状中空结构就称为微管,每条原纤丝还含有少量的 γ 微管蛋白(李建农和蒋建东,2003;樊东等,2008a,2008b;于奎峰等,2010),微管、微丝和中间纤维一起构成了动态的蛋白网络结构。微管蛋白的功能具有细胞类型特异性,可能在不同的生长发育阶段以及不同的组织细胞中表达,执行着不同的生理功能(Woo *et al.*, 2002; Jensen-Smith *et al.*,2003)。根据已有的研究,微管蛋白的功能多样,其中最主要包括维持细胞形态、参与胞内运输、依靠其极性参与细胞运动、调节细胞分裂及信

* 资助项目:公益性行业(农业)科研专项(201103012)。

**E-mail:yanshuoccx@ yahoo. com. cn

***通讯作者,E-mail:zhangqingwen@ 263. net

收稿日期:2011-04-19,接受日期:2011-06-25

号传导等。β－微管蛋白对昆虫的蜕皮、器官形成等生长发育阶段均产生重要影响。

棉铃虫 *Helicoverpa armigera*(Hübner)是鳞翅目夜蛾科害虫,广泛分布在中国及世界各产棉地区,我国棉区和蔬菜种植区均有发生,危害严重(张青文等,2007)。棉铃虫 β－微管蛋白的研究对在分子水平上进行棉铃虫生长发育、蜕皮以及抑制器官功能等方面的研究提供了基础,并且对于棉铃虫的防治工作也具有一定的学术和现实意义。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

供试棉铃虫由中国农业大学有害生物综合治理实验室提供,幼虫采自河北邯郸。饲养温度 26℃,光周期 L∶D =16∶8。幼虫 3 日龄后单管饲养,长期室内用人工饲料饲养(吴坤君, 1985);成虫羽化后饲喂 10% 蜂蜜水。

1.2　试剂

RNA 提取试剂盒 RNeasy Mini Kit、反转录酶 Omniscript RT Kit 为德国 Qiagen 公司产品;克隆载体 pEASY-T1 Cloning Vector、大肠杆菌感受态细胞、DNA 聚合酶 Trans Taq-T 购自北京全式金生物技术有限公司;DNA 胶回收试剂盒 Gel Extraction Kit 为 Omega 公司产品;RCAE 试剂盒 First Choice RLM-RACE 为 Ambion 公司产品;PCR 引物为上海生工生物工程公司产品。其它试剂为国产 AR 级或进口分装 AR 级产品。

1.3　供试昆虫总 RNA 的提取及反转录成 cDNA

棉铃虫总 RNA 的提取参照 RNA 提取试剂盒说明,加入 DNA 酶消化处理。使用 NanoDrop2000 测定 OD_{280} 和 OD_{260},测定总 RNA 的浓度及质量,1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性。提取的总 RNA 放入 －80℃冰箱中备用。取 2 μg 总 RNA 进行反转录(参照试剂盒说明),将混合体系于 PCR 仪中 37℃温浴 1 h,cDNA 样品于 －20℃保存。

1.4　利用简并引物克隆基因的部分序列

比较家蚕 *Bombyx mori*(GenBank:DQ311244)、二化螟 *Chilo suppressalis*(GenBank:EU429675)、烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*(GenBank:U75868)、烟草天蛾 *Manduca sexta*(GenBank:AF030547)、粘虫 *Mythimna separata*(GenBank:EU234504)5 种鳞翅目昆虫的 β－微管蛋白基因的 CDS 序列,根据保守区域分别设计上下游引物,分别为:WF1 和 WR1(表 1)。

表 1　所用引物序列

Table 1　Oligonucleotide primer sequences

引物用途 Application of primer	引物名称 Primer	引物序列(5′－3′) Sequence(5′－3′)
片段克隆	WF1	ATHTCYGACGAGCAYGGNATC
Gene segment cloning	WR1	ACCAGGTCGTTCATGTTGCTC
3′RACE 克隆	WF2	ATCTCCGACGAGCACGGCATC
3′RACE cloning	WF3	GAGGAATATCCCGACAGAATTATGAA
5′RACE 克隆	WR1	ACCAGGTCGTTCATGTTGCTC
5′RACE cloning	WR2	GCCATCATGTTCTTGGCGTCG

PCR 反应体系 20 μL:2 μL PCR10 × Buffer,1 μL cDNA 模板,1.6 μL dNTP(2.5 mmol/L),0.4 μL 上下游引物(10 μmol/L),0.2 μLDNA 聚合酶(5U/ uL),14.4 μL ddH_2O。PCR 反应程序:94℃,5 min;94℃,30 s,55℃,30 s,72℃,80 s,35 个循环;72℃,10 min;4℃停止。PCR 反应结束后,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测目的条带。将目的条带切胶回收,与克隆载体 pEASY-T1 Cloning Vector 连接(按照载体说明书操作),然后转化到大肠杆菌中,菌落在含有 X-gal 和 IPTG 的 AMP 培养基上铺板,37℃培养过夜。次日进行蓝白斑筛选,随机选取 5 个阳性克隆样品送至北京六合华大基因科技股份有限公司测序。

1.5　利用 RACE 技术克隆基因的 3′和 5′端序列

对提取的总 RNA 进行 3′RACE 处理(按照试

剂盒说明),将混合体系于 PCR 仪 37℃温浴 1 h,于 -20℃保存。5′RACE 处理也按照试剂盒进行,包括:CIP 处理、终止 CIP 反应并酚仿抽提、TAP 反应、5′RACE 接头连接并逆转录。

根据得到的 β-微管蛋白基因的部分序列设计克隆 3′端序列的上游引物 WF1、WF2 和克隆 5′端序列的下游引物 WR1 和 WR2(表 1)。利用试剂盒中的引物 3′RACE outer、3′RACE inner、5′RACE outer、5′RACE inner,通过巢式 PCR 扩增基因的 3′端和 5′端序列,PCR 反应条件经过优化,均为:94℃,3 min;94℃,30 s,55℃,30 s,72℃,80 s,35 个循环;72℃延伸 7 min;4℃停止。扩增完成后用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。检测结果正确后,测序。

1.6 序列分析

利用在线站点 NCBI(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)进行序列的比对分析;使用 PBIL 的在线分析工具 SOPMA 对氨基酸序列的二级结构进行预测(http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html);蛋白质分子量等电点经 ExPASy 在线分析工具 Computepl/Mw tool(http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html)预测;对氨基酸序列使用 EMBnet 的在线分析工具 TMpred 进行跨膜区预测(http://www.ch.embnet.org/software /TMPRED form.html);利用 PBIL 的在线分析工具 PROSITE SCAN 对蛋白质功能位点进行分析(http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_prosite.html);3D 结构的构建基于 2004 年 Nettles 等人的研究,利用 SWISS MODEL WORKSPACE(http://swissmodel.expasy.org)在线分析工具完成(Guex and Peitsch, 1997;Schwede *et al.*, 2003;Nettles *et al.*, 2004;Arnold *et al.*, 2006);利用 CLUSTALX1.81 和 MEGA 4.0 软件构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 β-微管蛋白基因 cDNA 序列的克隆

利用 5′RACE 技术,经过序列拼接得到包括完整开放读码框在内的 cDNA 序列。通过 NCBI 上的 Blast 软件在线搜索,检索到的同源性高的 CDS 序列均为 β-微管蛋白,所以可以下结论:我们克隆得到了 β-微管蛋白基因的全序列。棉铃虫 β-微管蛋白基因的 cDNA 序列包含 1 775 个碱基,其中包含 5 个碱基的 5′非编码区和 423 个碱基的 3′非编码区,包括一个 1 347 个碱基的开放阅读框,编码 448 个氨基酸组成的多肽,该基因的 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列见图 1。序列已经登录 GenBank 并获得登录号为:JF767013。

2.2 β-微管蛋白基因 cDNA 序列及推导的氨基酸序列分析

经过分析发现,在 cDNA1746-1751 位碱基位置含有多聚腺苷酸信号序列,是终止信号。β-微管蛋白基因的 α 螺旋(alpha helix, Hh)约占 46.65%,延伸链(extended strand, Ee)约占 13.84%,β 转角(beta turn, Tt)约占 4.46%,随机卷曲结构(random coil, Cc)约占 35.04%。3D 结构的构建基于模型 1tvkB(2.89A)完成(图 2),与其序列一致性达到 97.183%,Evalue:0.00e-1,预测结果可靠准确。棉铃虫 β-微管蛋白氨基酸序列包含 2 个典型的保守区 NNWAKGHY 和 RKAFLHWYTGEGMDEMEFTE、MREI 保守区和 GTP 核苷酸结合位点。理论推测的蛋白分子量(Mw)50.37 ku,等电点(pI)4.82。跨膜区预测显示棉铃虫 β-微管蛋白氨基酸序列在 137~153 位有 1 个长 17 个氨基酸的跨膜螺旋结构,跨膜区有显著的由外向内的趋向性。

2.3 基于 β-微管蛋白氨基酸序列的系统发育树的构建及同源性分析

从构建的系统发育树中发现,α、β-微管蛋白氨基酸序列聚为两大类别,棉铃虫 β-微管蛋白与其他物种 β-微管蛋白的同源性很高。棉铃虫 β-微管蛋白氨基酸序列与鳞翅目昆虫烟草天蛾、家蚕、二化螟及粘虫聚在一类,这可能是因为棉铃虫隶属于鳞翅目,亲缘关系较近的缘故,其中与人的 β-微管蛋白亲缘关系最远,以上结果与传统分类布局大体一致。分支点置信度值都比较高,证明聚类结果可靠。而该基因与其它物种的 α-tubulin 氨基酸序列同源性都很低,在 50% 以下(图 3)。

3 讨论

β-微管蛋白最早在 1968 年与 α-微管蛋白同时被发现(Weisenberg *et al.*, 1968),随后又相

继发现微管蛋白的另外几个家族,关于微管蛋白及其家族蛋白间相互作用的研究越来越多。在昆虫中,一些物种的微管蛋白基因已经被克隆并做了一定的研究。在黑腹果蝇中有 4 种 β－微管蛋白基因被克隆(Michiels *et al.*, 1987; Rudolph *et al.*,1987; Goldstein and Gunawardena,2000),家蚕和埃及伊蚊中有 4 种,粘虫、烟草天蛾、烟芽夜蛾、臭虫、二化螟等物种中各有 1 种。由于模式昆虫的基因组测序已经完成,微管蛋白各个家族及其相互作用的研究也随之深入(Kawasakia *et al.*, 2003)。有研究显示微管蛋白还在昆虫的孤雌生殖中起重要作用,在蚜虫孤雌生殖研究中发现,在未受精情况下微管可形成星体参与有丝分裂(Riparbelli *et al.*,2005),稻水象甲在进行孤雌生殖中发现微管蛋白基因的上调表达(Yang *et al.*, 2009)。家蚕 β－微管蛋白的功能研究的比较深入,利用原位杂交的方法发现其中一种 β－微管蛋白与翅芽的形成有一定关联(Quan *et al.*, 1998),另一种在蛹期睾丸中表达活跃(Mita *et al.*,1995)。微管蛋白是许多药物的作用位点,微管蛋白的变化可能导致药物作用的改变(沈绍华和叶欣,2006),有研究表明微管蛋白结构的变化可能导致癌细胞对有丝分裂抑制剂产生抗性(Cheung *et al.*,2010),也有研究表明微管蛋白与昆虫的蜕皮有关,可以利用微管蛋白的特点筛选微管蛋白抑制剂,从而达到防治害虫的目的。

本文成功克隆得到了棉铃虫 β－微管蛋白基因的全序列。氨基酸序列分析表明:棉铃虫 β－微管蛋白氨基酸序列包含 MREI 保守区、GTP 核苷酸结合位点(GGGTGSG)以及 2 个保守区(NNWAKGHY 和 RKAFLHWYTGEGMDEMEFTE)。其中 MREI 是转录后调控信号,GTP 核苷酸结合位

```
1      ACAAAATGAGGGAAATCGTGCATATCCAGGCCGGTCAATGCGGTAACCAGATTGGAGCCA
1            M  R  E  I  V  H  I  Q  A  G  Q  C  G  N  Q  I  G  A
61     AGTTCTGGGAGATCATCTCCGACGAGCACGGCATCGACCCCACCGGCGCCTACCATGGCG
20     K  F  W  E  I  I  S  D  E  H  G  I  D  P  T  G  A  Y  H  G
121    ACTCGGACCTGCAGCTGGAGCGCATCAACGTGTACTACAATGAGGCCTCCGGCGGCAAGT
40     D  S  D  L  Q  L  E  R  I  N  V  Y  Y  N  E  A  S  G  G  K
181    ACGTGCCGCGCGCCATCCTCGTCGACCTGGAGCCCGGCACCATGGACTCGGTGCGCTCGG
60     Y  V  P  R  A  I  L  V  D  L  E  P  G  T  M  D  S  V  R  S
241    GCCCCTTCGGACAGATCTTCCGGCCGGACAACTTCGTGTTCGGACAGTCCGGCGCCGGCA
80     G  P  F  G  Q  I  F  R  P  D  N  F  V  F  G  Q  S  G  A  G
301    ACAACTGGGCCAAGGGTCACTACACCGAGGGAGCCGAACTAGTCGATTCAGTATTAGACG
100    N  N  W  A  K  G  H  Y  T  E  G  A  E  L  V  D  S  V  L  D
361    TCGTACGCAAGGAAGCAGAGTCATGTGATTGCCTCCAAGGGTTCCAACTCACACACTCGC
120    V  V  R  K  E  A  E  S  C  D  C  L  Q  G  F  Q  L  T  H  S
421    TCGGCGGCGGCACTGGTTCCGGAATGGGCACACTTCTTATCTCCAAAATCAGAGAGGAAT
140    L  G  G  G  T  G  S  G  M  G  T  L  L  I  S  K  I  R  E  E
481    ATCCCGACAGAATTATGAACACATACTCAGTTGTACCTTCGCCCAAAGTGTCAGACACAG
160    Y  P  D  R  I  M  N  T  Y  S  V  V  P  S  P  K  V  S  D  T
541    TAGTAGAACCTTACAACGCCACACTATCAGTCCACCAGTTAGTAGAAAACACAGACGAGA
180    V  V  E  P  Y  N  A  T  L  S  V  H  Q  L  V  E  N  T  D  E
601    CCTACTGTATCGACAATGAGGCATTATACGACATCTGCTTCCGCACGCTCAAACTATCCA
200    T  Y  C  I  D  N  E  A  L  Y  D  I  C  F  R  T  L  K  L  S
661    CACCCACGTACGGCGACCTGAACCACCTGGTGTCGCTGACCATGTCCGGCGTGACGACGT
220    T  P  T  Y  G  D  L  N  H  L  V  S  L  T  M  S  G  V  T  T
721    GTCTGCGGTTCCCTGGCCAGCTGAATGCGGATCTCCGCAAGCTGGCTGTCAACATGGTGC
```

```
240     C  L  R  F  P  G  Q  L  N  A  D  L  R  K  L  A  V  N  M  V
781     CGTTCCCACGTCTGCACTTCTTCATGCCCGGCTTCGCTCCCCTGACATCTCGCGGCAGCC
260     P  F  P  R  L  H  F  F  M  P  G  F  A  P  L  T  S  R  G  S
841     AGCAGTACCGCGCCCTCACCGTGCCCGAGCTCACGCAGCAGATGTTCGACGCCAAGAACA
280     Q  Q  Y  R  A  L  T  V  P  E  L  T  Q  Q  M  F  D  A  K  N
901     TGATGGCGGCGTGCGACCCGCGCCACGGCCGCTACCTGACCGTGGCCGCCATCTTCCGAG
300     M  M  A  A  C  D  P  R  H  G  R  Y  L  T  V  A  A  I  F  R
961     GCCGCATGTCCATGAAGGAGGTGGACGAGCAGATGCTCAACATCCAGAACAAGAACTCGT
320     G  R  M  S  M  K  E  V  D  E  Q  M  L  N  I  Q  N  K  N  S
1021    CATACTTCGTGGAATGGATCCCCAACAACGTGAAGACCGCCGTGTGCGACATCCCACCTC
340     S  Y  F  V  E  W  I  P  N  N  V  K  T  A  V  C  D  I  P  P
1081    GCGGCCTCAAGATGGCAGCCACGTTCATCGGCAACTCCACCGCCATCCAGGAGCTGTTCA
360     R  G  L  K  M  A  A  T  F  I  G  N  S  T  A  I  Q  E  L  F
1141    AGCGCATCTCGGAGCAGTTCACCGCTATGTTCAGGCGCAAGGCTTTCTTGCACTGGTACA
380     K  R  I  S  E  Q  F  T  A  M  F  R  R  K  A  F  L  H  W  Y
1201    CCGGCGAGGGCATGGACGAGATGGAGTTCACGGAGGCGGAGAGCAACATGAACGACCTGG
400     T  G  E  G  M  D  E  M  E  F  T  E  A  E  S  N  M  N  D  L
1261    TGTCCGAGTACCAGCAGTACCAGGAGGCCACCGCCGACGAGGACGCCGAGTTCGACGAGG
420     V  S  E  Y  Q  Q  Y  Q  E  A  T  A  D  E  D  A  E  F  D  E
1321    AGCAGGAGCAGGAGCTGGACGAGCACCACTAGAGGGGGGGACGGTGCCGCACATAGTACA
440     E  Q  E  Q  E  L  D  E  H  H  *
1381    TTGCCATGTATTTACTCGTTACTTTACGTTTAAGTAACATTAATGATTCCTACGATGTGT
1441    TTTGAATGAAAAGACATGCTTTCTAACTTTTAACAGAACGCACGACTAAAACCCCGGATA
1501    TGACGTTACTTGCGACTCGTGGGCATATTTATGTAATTGTATACATATACATTCCTAGTG
1561    ATCCATGCCTGGCCTCGTTGAGACAAGATCTGAACATTTCTTTAAGGCTGATAGACACTC
1621    TTTATGTATTTATGATAAAGTCAGGATGTCTCCAAACATGGGCATACAAGAAAGATTATA
1681    GAGTGCTTCAATAACCGAAGTTTTATTACGATTAAAATTGTTTTCAAGATTAATTTAATG
1741    TATATAATAAAGATTTTATTTAAAAAAAAAAAAA
```

图 1　棉铃虫 β－微管蛋白 cDNA 序列(GenBank:JF767013)以及推导的氨基酸序列

Fig. 1　cDNA sequence and inferred amino acid sequence of the β-tubulin gene in *Helicoverpa armigera*

起始密码子 ATG 和终止密码子 TAG 加粗表示,多聚腺苷酸信号序列(AATAAA,位于 3′非翻译区)用下划线标出,MREI 保守区、GTP 核苷酸结合位点(GGGTGSG)以及 2 个 β－微管蛋白保守区(NNWAKGHY 和 RKAFLHWYTGEGMDEMEFTE)涂黑表示。

The start codon ATG and stop codon TAG are indicated with bold and asterisk. AATAAA are underlined. Conserved motif of MREI, NNWAKGHY, RKAFLHWYTGEGMDEMEFTE, nudeotide binding site (GGGTGSG) are outlined in gray.

点是 α、β 2 种微管蛋白结合的必要结构。克隆得到的基因保守区与其他昆虫物种是基本一致的,氨基酸序列相当保守,与家蚕、烟草天蛾、粘虫的同源性高达 99%,与二化螟的同源性达到 96%,与其他昆虫的 β－微管蛋白氨基酸序列同源性在 90% 左右,与哺乳动物 β－微管蛋白氨基酸序列同源性也很高。虽然 β－微管蛋白氨基酸序列比较保守,但构建进化树显示鳞翅目物种间同源性更高,棉铃虫与家蚕、烟草天蛾、粘虫只有 6 个氨基酸的差异,与二化螟有 10 个氨基酸的差异。可见这种基因在昆虫纲乃至整个生物界都是很保守的,在长期的物种进化演变中受到很小的影响,利用这种保守性可以对昆虫乃至整个生物界进行进化关系的分析。

由于 β－微管蛋白是细胞骨架的基本成分,所以在细胞中表达稳定,利用这一特点,β－微管

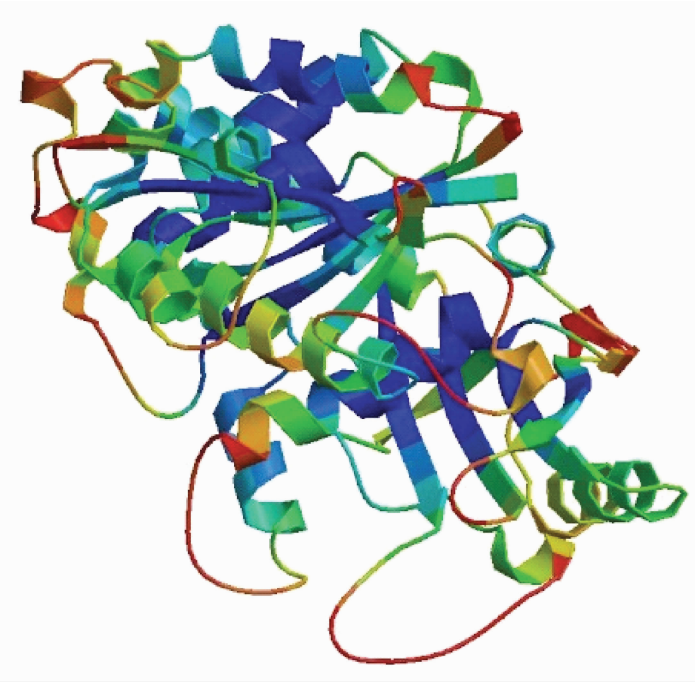

图 2　棉铃虫 β－微管蛋白三维结构带状图

Fig. 2　The ribbon models of *Helicoverpa armigera* beta-tubulin gene

红色条带表示蛋白的 C 末端,蓝色表示 N 末端,不同颜色表示不同的蛋白结构层次。

The red colour represents C-terminal, and the blue represents N-terminal. The different colour shows different lay.

蛋白还可以作为实时荧光定量 PCR 的内参基因使用,而棉铃虫的内参基因现在克隆的很少,只有 β-actin (GenBank: EU527017)、核糖体蛋白 L13 (GenBank:DQ875220)和延伸因子 EF (GenBank: U20129)(Cho *et al.*,1995)。本文克隆得到了棉铃虫的 β－微管蛋白基因,为棉铃虫的定量 PCR 提供了一种可靠的内参基因。

在鳞翅目昆虫家蚕中已经克隆并鉴定了 4 种 β－微管蛋白基因,在其他昆虫物种中也存在多个 β－微管蛋白基因表达的现象。本文只克隆得到了棉铃虫的一种 β－微管蛋白基因,后续工作将继续克隆棉铃虫的其他 β－微管蛋白基因,进而深入研究每个 β－微管蛋白基因的表达及功能。棉铃虫 α－微管蛋白基因(GenBank:JQ069957)现已成功克隆,β－微管蛋白基因的克隆为研究 2 种微管蛋白的相互作用提供了可能。由于微管蛋白对昆虫的生长发育、变态、蜕皮等生命过程有着举足轻重的作用,加之微管蛋白又是许多药物的作用位点,所以通过微管蛋白的深入研究,可以从一定水平上探讨害虫耐药性的产生,同时为我们提供了一种防治害虫的新思路,对于棉铃虫耐药性不断加剧的今天来说,存在着一定的现实意义。

参考文献(References)

Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T, 2006. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22 (2): 195—201.

Cheung CH, Wu SY, Lee TR, Chang CY, Wu JS, Hsieh HP, Chang JY, 2010. Cancer cells acquire mitotic drug resistance properties through beta I-tubulin mutations and alterations in the expression of beta-tubulin isotypes. *PLoS ONE*, 5(9):e12564.

Cho S, Mitchell A, Regier JC, Mitter C, Poole RW, Friedlander TP, Zhao S, 1995. A highly conserved nuclear gene for low-level phylogenetics: elongation factor-1 alpha recovers morphology-based tree for heliothine moths. *J. Mol. Biol. Evol.*, 12(4):650—656.

Goldstein LSB, Gunawardena S, 2000. Flying through the *Drosophila* cytoskeletal genome. *J. Cell Biol.*, 150(2): F63—F68.

Guex N, Peitsch MC, 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis*, 18(15):2714—2723.

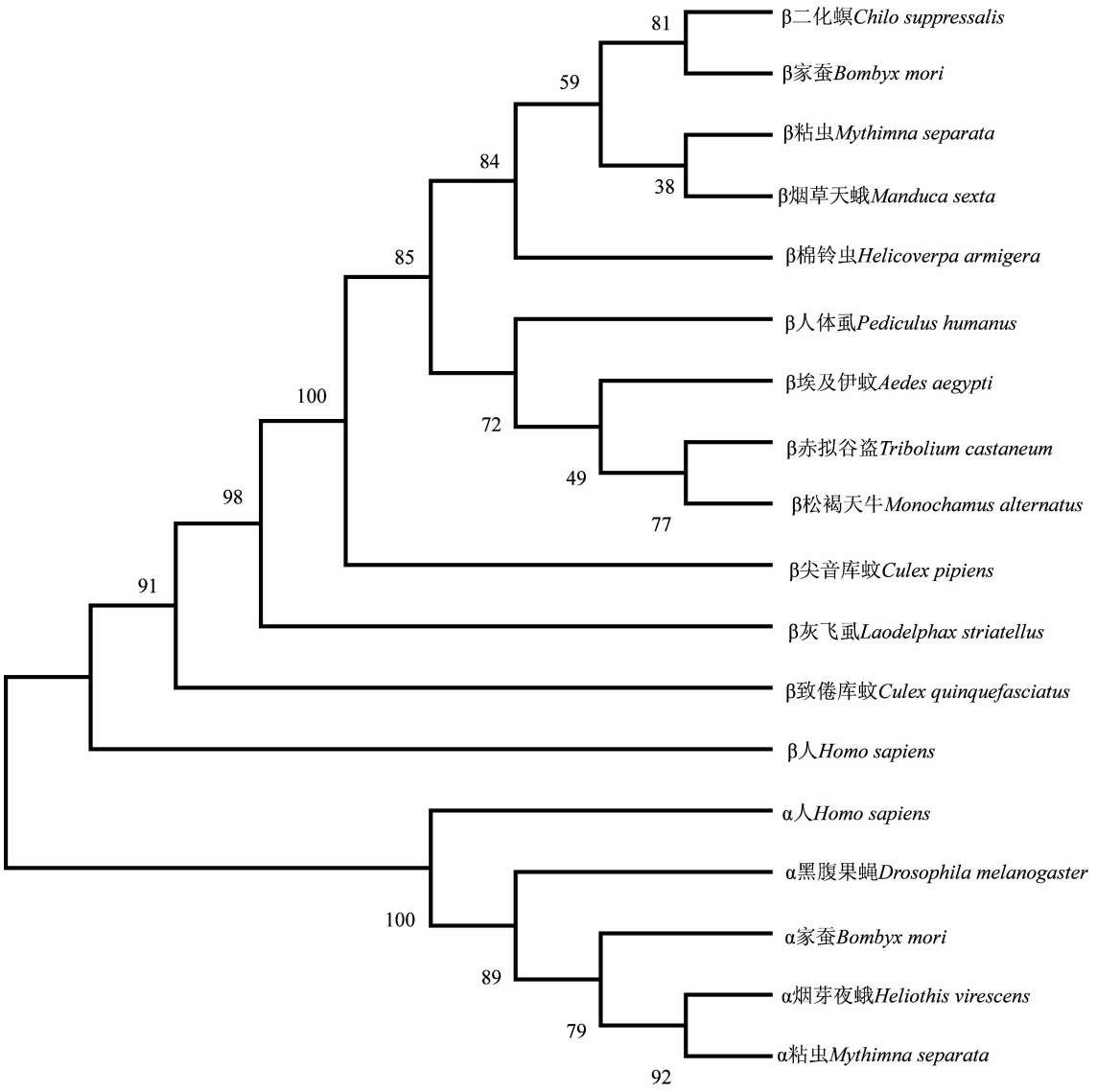

图 3 基于 α、β－微管蛋白氨基酸序列的 Neighbor-Joining 系统树（分支点数值为置信度值）

Fig. 3 Neighbor-Joining tree based on β-tubulin amino acid sequence

(bootstrap supporting values are shown at branch nodes)

Jensen-Smith HC, Eley J, Steyger PS, Ludueña RF, Hallworth R, 2003. Cell type-specific reduction of beta tubulin isotypes synthesized in the developing gerbil organ of Corti. *J. Neurocytol.*, 32(2):185—197.

Kawasakia H, Sugaya K, Quana GX, Nohata J, Mita K, 2003. Analysis of α-and β-tubulin genes of *Bombyx mori* using an EST database. *J. Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33(1):131—137.

Michiels F, Falkenburg D, Müeller AM, Hinz U, Otto U, Bellmann R, Glätzer KH, Brand R, Bialojan S, Renkawitz-Pohl R, 1987. Testis-specific beta-2 tubulins are identical in *Drosophila melanogaster* and *D. hydei* but differ from the ubiquitous beta-1 tubulin. *J. Chromosoma*, 95(6):387—395.

Mita K, Nenoi M, Morimyo M, Tsuji H, Ichimura S, Sawai M, Hamana K, 1995. Expression of the *Bombyx mori* β-tubulin-encoding gene in testis. *J. Gene*, 162(2):329—330.

Nettles JH, Li H, Cornett B, Krahn JM, Snyder JP, Downing KH, 2004. The binding mode of epothilone A on alpha, beta-tubulin by electron crystallography. *Science*, 305(5685):866—869.

Quan GX, Kanke E, Kawasaki H, 1998. Isolation and particular expression of a new β-tubulin gene in wing discs

during metamorphosis of *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 67(1):43—50.

Riparbelli MG, Tagu D, Bonhomme J, Callaini G, 2005. Aster self-organization at meiosis: a conserved mechanism in insect parthenogenesis. *J. Dev. Biol.*, 278(1):220—230.

Rudolph JE, Kimble M, Hoyle HD, Subler MA, Raff EC, 1987. Three *Drosophila* beta-tubulin sequences: a developmentally regulated isoform (β3), the testis-specific isoform (β2), and an assembly-defective mutation of the testis-specific isoform (B2t8) reveal both an ancient divergence in metazoan isotypes and structural constrains for beta-tubulin function. *J. Mol. Cell Biol.*, 7(6):2231—2242.

Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC, 2003. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucl. Acids Res.*, 31(13):3381—3385.

Weisenberg RC, Borisy GG, Taylor EW, 1968. The colchicine-binding protein of mammalian brain and its relation to microtubules. *J. Biochemistry*, 7(12):4466—4479.

Woo K, Jensen-Smith HC, Ludueña RF, Ludueña RF, Hallworth R, 2002. Differential synthesis of beta-tubulin isotypes in gerbil nasal epithelia. *J. Cell Tissue Res.*, 309(2):331—335.

Yang P, Zhou WW, Zhang Q, Cheng JA, Zhu ZR, Way MO, 2009. Differential gene expression profiling in the developed ovaries between the parthenogenetic and bisexual female rice water weevils, *Lissorhoptrus oryzophilus* Kuschel (Coleoptera: Curculionidae). *J. Chin. Sci. Bull.*, 54(20):3822—3829.

樊东, 秦松柏, 朴冬花, 许艳丽, 2008a. 二化螟 β1 微管蛋白基因 cDNA 序列的克隆与序列分析. 生物技术通报, (4):130—135.

樊东, 秦松柏, 朴冬花, 许艳丽, 2008b. 三种鳞翅目夜蛾科昆虫 α - 微管蛋白基因的克隆与 mRNA 表达水平. 昆虫知识, 45(4):542—548.

李建农, 蒋建东, 2003. 微管的生物学特性与药物研究. 药学学报, 38(4):311—315.

沈绍华, 叶欣, 2006. 微管蛋白与多药耐药. 国际肿瘤学杂志, 33(2):104—108.

吴坤君, 1985. 棉铃虫的紫云英 - 麦胚人工饲料. 昆虫学报, 28(1):22—29.

于奎峰, 李红亮, 杨璞, 崔旭红, 祝增荣, 商啥武, 2010. 稻水象甲卵巢内 β1 - 微管蛋白基因 cDNA 全长的克隆及定量表达分析. 中国水稻科学, 24(6):575—580.

张青文, 梁广文, 李正越, 国立耘, 刘小侠, 蔡青年, 洪晓月, 雷朝亮, 孟瑞霞, 师光禄, 徐环李, 2007. 有害生物综合治理学. 北京:中国农业大学出版社. 158—169.