

棉铃虫活化的蛋白激酶 C 受体 1 (*RACK1*) 基因的分子鉴定*

侯元春 尹新明 安世恒 杜孟芳**

(河南农业大学植物保护学院 郑州 450002)

摘 要 活化的蛋白激酶 C 受体 1 (receptor for activated C kinase 1, RACK1) 广泛分布于真核生物和原核生物中, 在生物体内具有极其重要的调节功能。本实验利用 RT-PCR 和 RACE 的方法扩增获得了棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) *RACK1* 基因全序列, 序列分析结果表明, 该基因开放阅读框为 957 bp, 编码 319 个氨基酸残基。5' 端非编码区长为 36 bp, 3' 端非编码区长为 112 bp。发育时相表达发现 *RACK1* 基因在棉铃虫的蜕皮时期大量表达, 进一步的激素处理实验发现, 蜕皮激素诱导 *RACK1* 基因表达, 保幼激素和饥饿抑制 *RACK1* 基因表达。这些研究结果为进一步研究 *RACK1* 基因的功能奠定基础。

关键词 棉铃虫, *RACK1* 基因, 分子鉴定, 激素调控

Molecular identification of *Helicoverpa armigera* receptor for activated C kinase 1 gene

HOU Yuan-Chun YIN Xin-Ming AN Shi-Heng DU Meng-Fang**

(College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract The receptor for activated C kinase 1 (RACK1) has an important regulatory function and is ubiquitous in plants and animals. The receptor for activated C kinase 1 cDNA of *Helicoverpa armigera* (Hübner) was isolated using the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE). Nucleotide sequence analysis revealed that the open reading frame (ORF) of *RACK1* was 957 bp in size and encoded 319 amino acid residues. A 3' untranslated region (UTR) of *RACK1* contained 112 nucleic acids and a 5' UTR contained 36 nucleic acids. Temporal expression analysis found that *RACK1* was up-regulated during molting. Hormone-challenge experiments revealed that *RACK1* was up-regulated by molting hormones and inhibited by a juvenile hormone analogue and starvation. These results provide a fountain for further study of the function of *RACK1*.

Key words *Helicoverpa armigera*, *RACK1*, molecular identification, hormonal regulation

活化的蛋白激酶 c 受体 1 (receptor for activated C kinase 1, RACK1) 属于一类含有 WD - 40 重复结构蛋白家族的亚家族, 广泛分布于真核生物和原核生物中 (Smith *et al.*, 2000)。RACK1 蛋白首先在 1991 年被发现, 进一步研究认为 RACK1 是活化的蛋白激酶 C 的受体, 作为一种重要的穿梭蛋白, 对 PKC 进行正确的定位 (Daria *et al.*, 1991; Ron *et al.*, 1994)。

除了作为 PKC 的受体外, 近年来的研究也发

现 RACK1 蛋白本身也是一个磷酸化蛋白, 是 Src 酪氨酸蛋白激酶的一种重要底物, 向下传递生长因子受体酪氨酸蛋白激酶的信号, 参与 Src 功能的调节和细胞生长的调节, 作为支架蛋白在多个信号转导途径中起重要作用, 例如模式生物拟南芥中, RACK1 在多种生理生化过程中起到重要的调节作用, 在脊椎动物中枢神经系统中参与多种信号通路的调控。在果蝇的早期胚胎发生过程中, 中胚层和内胚层的细胞中都有很强的表达 (Vani *et al.*, 1997;

* 资助项目: 河南省重点科技攻关 (092102110183) 和创新人才 (074200510018) 资助项目。

** 通讯作者, E-mail: dumengfang@sohu.com

收稿日期: 2011-03-18, 接受日期: 2011-05-26

Ashique *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2006) 等。

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* Hübner 是一种世界性农业害虫,危害棉花、玉米、小麦等多种农作物,广泛分布于非洲、亚洲、澳大利亚、太平洋和欧洲等地区。人们对其进行了大量的遗传和分子水平的研究,但目前尚未发现对其 *RACK1* 基因的研究。本试验采用 RT-PCR、RACE、荧光定量 PCR 的方法,对棉铃虫 *RACK1* 基因进行克隆,并研究其在不同发育期的表达和转录情况,为进一步探究该基因在棉铃虫体内的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫与试剂

棉铃虫为河南农业大学实验室饲养,温度(26 ± 1)℃,光周期 14 h/d。取不同发育时期的棉铃虫,立即放入离心管中,加入 RNAiso Reagent,然后置于 -40℃ 保存备用。pMD19-T 载体购自 TaKaRa 公司,大肠杆菌 JM109 为本实验室保存。总 RNA 抽提试剂(RNAiso Reagent)、3'-Full RACE 试剂盒、*rTaq* DNA 聚合酶、pMD19-T 载体、荧光定量试剂盒(SYBR Primer Script RT-PCR Kit)购自 TaKaRa 公司;反转录试剂盒(RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit)为 MBI 公司产品;DL2000 Marker 购自 Solarbio 公司;DNA 凝胶回收试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司;保幼激素类似物(methoprene acid)、蜕皮激素(20-羟基蜕皮酮 20-Hydroxyecdysone,简称 20E)均购自 Sigma 公司;其它均为国产或进口分析纯试剂。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 的提取 将 5 龄幼虫放入经 DEPC 处理过的 Eppendorf 管中匀浆,按照 TaKaRa RNAiso Reagent 试剂说明书提取总 RNA。

1.2.2 引物设计 对其它昆虫 *RACK1* 的核苷酸序列进行同源比对,在保守区设计并合成引物。本研究所用引物及其用途见表 1,引物由上海博尚生物技术有限公司合成。

1.2.3 RT-PCR 扩增棉铃虫 *RACK1* 基因片断

根据反转录试剂盒说明,以 5 龄幼虫总 RNA 为模板合成 cDNA 第 1 链,随后以合成的 cDNA 第 1 链为模板,利用 GP1 和 GP2 引物进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为:94℃ 变性 3 min;随后 40 个循环的扩增,扩增条件为 94℃ 1 min,60℃ 50 s,72℃ 1

min;最后 72℃ 10 min。

表 1 引物序列列表

Table1 Lists of the primer sequences

引物名称 Names	引物序列 Primer sequences
P1	5'-GATGTCCACAGTGACTGGG-3'
P2	5'-CTTTCAGATCCCAGATCT-3'
P3	5'-ACTGGCTGTGTGCTGCCTTC-3'
P4	5'-AAGATCTGGGATCTGGAAAG-3'
P5	5'-GCCATCGTTCAAGTCCCAGA-3'
P6	5'-GCCAGACTGACCAAGGTGG-3'
P7	5'-ACCTTACCAACTGCAAGCTG-3'
P8	5'-TGATGTCATTGTGGTCCA-3'
18SrRNA F	5'-CCGCTGAAACTCCTTCGTGC-3'
18SrRNA R	5'-TGTCGGTCCGAAGACCTCAC-3'

1.2.4 基因克隆和序列测定 利用 1% 琼脂糖凝胶电泳对上述 PCR 产物进行分析,并纯化目的片段,基因克隆参照 Sambrook 和 Russeu(2002)的方法进行。序列测定由大连宝生物工程有限公司完成。

1.2.5 引物 3'RACE 和 5'RACE 为了获得棉铃虫 *RACK1* 基因完整 cDNA 序列,根据上述获得的基因序列,设计合成基因特异性引物 P3 和 P4 并分别与 3'RACE 试剂盒中的 Outer Primer 和 Inner Primer 引物配对进行套式 PCR 扩增,设计合成基因特异性引物 P5 和 P6 分别与 5'RACE 试剂盒中的 Outer Primer 和 Inner Primer 引物配对也进行套式 PCR 扩增。3'RACE 和 5'RACE 反应条件参照试剂盒说明书进行。3'RACE 和 5'RACE 产物的电泳分析、基因克隆和序列测定方法同 1.2.4。

1.2.6 序列分析 核苷酸序列分析采用 ChromasPro 软件,氨基酸序列分析采用生物信息学在线工具 http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html,同源性比较采用 NCBI 中的 BLAST 工具,序列多重联配采用 ClustalW 和 Genedoc 软件。

1.2.7 实时荧光定量 PCR Real-time PCR 采用相对定量的方法计算,以棉铃虫 18SrRNA 为内参基因,在 Mastercycler® ep realplex real-time PCR 检测系统上进行操作,反应条件如下:95℃ 预变性 10 s,95℃ 15 s,55℃ 15 s,68℃ 20 s,共 40 个循环;

95℃ 15 s, 60℃ 15 s, 95℃ 15 s 用于记录溶解曲线。基因的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法 (Livak and Schmittgen, 2001) 计算。

1.2.8 *RACK1* 基因在棉铃虫幼虫不同发育期的表达 利用合成的不同发育期 (5 龄蜕皮期至化蛹后第 2 天) 棉铃虫幼虫 cDNA 第一链作为模板, 以 P7 和 P8 为引物进行 Real-time PCR 扩增, 以 18S rRNA 为内参基因。相对定量计算方法同 1.2.5。

1.2.9 激素对 *RACK1* 基因转录水平的影响 利用丙酮先将保幼激素类似物 (methoprene acid) 稀释至浓度为 $5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的 M1 溶液, 然后取 $1 \mu\text{L}$ M1 溶液稀释至终浓度为 $20 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的 M2 溶液 (冯从经等, 2004), 保幼激素注射量为 40 ng/头 。对照为丙酮溶液。

用 95% 酒精将蜕皮激素 (20-羟基蜕皮酮, 即 20-E) 稀释成 20E1 溶液, 然后取 $1 \mu\text{L}$ 20-E1 溶液, 加入 $200 \mu\text{L}$ ddH₂O, 获得终浓度为 $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 20E2 溶液 (Zou and Fingerman, 1999; Sun and Song, 2006), 蜕皮激素注射量为 100 ng/头 。对照为 0.5% 酒精。

注射时, 取 $2 \mu\text{L}$ 注射液注射 6 龄 2 d 的棉铃虫幼虫。分别取注射激素后不同时间段及对照幼

虫各 1 头提取 RNA。Real-time PCR 操作和计算方法 1.2.5。

1.2.10 饥饿处理 对 6 龄 2 d 棉铃虫幼虫进行饥饿处理, 处理时间分别为 6、12、24 h, 随后各取 1 头幼虫进行 RNA 提取。反转录与 Real Time PCR 反应按照试剂盒 (SYBR Primer Script RT-PCR Kit) 使用说明进行。Real-time PCR 操作和计算方法 1.2.5。

2 结果与分析

2.1 *RACK1* 基因序列的测定

对 PCR 片段 3'RACE 和 5'RACE 所获得的片段进行拼接, 得到 *RACK1* 基因的全长序列 (Genbank accession JF979035) (图 1)。序列分析发现, *RACK1* 基因全长 1 108 bp, 开放阅读框包含 957 个核苷酸, 预计编码 319 个氨基酸残基。同源性分析结果表明棉铃虫 *RACK1* 氨基酸序列与其它昆虫的 *RACK1* 氨基酸序列具有很高的一致性 (图 2), 高达 85% 以上, 其中与甜菜夜蛾和小菜蛾的一致性最高 (高达 98%)。 *RACK1* 在不同昆虫之间很高的一致性表现出其在进化过程中的保守性。

gttggtgcttagccgctcagcaagtttttcgtgaag

ATGACTGAAACACTGAAGCTTAGAGGAACCCCTCTGCGGCCACAATGGCTGGGTTACCCAAATTCGACCAACCCCTAAATACCCCTGACATGATT
M T E T L K L R G T L C G H N G W V T Q I A T N P K Y P D M I
TTGTCTTCTCCCGAGACAAAACCCCTCATCGTATGGAAGCTGACGAGACGAGACTAACTACGGTGTACCGCAGAAGCGTCTGTACGGTCA
L S S S R D K T L I V W K L T R D E T N Y G V P Q K R L Y G H
TCTCACTTCATCTCGGACGTTGTGCTCTCCAGTGACGGAACACTACGCTCTGTCTGGCTCCTGGGACAAGACCCCTGCGTCTGTGGGATCTTGCT
S H F I S D V V L S S D G N Y A L S G S W D K T L R L W D L A
GCCGGCAAGACCACCGCGTTCGAAGACCATACTAAGGATGTCTCTCCGTGGCGTTCTCAGTTGACAACCGTCAGATCGTGTCTGGTTCC
A G K T T R R F E D H T K D V L S V A F S V D N R Q I V S G S
CGAGACAAGACCATCAAGCTGTGGAACACACTGGCTGAGTGCAAGTACACCATCCAGGATGATGGCCACAGTGACTGGGTGTCTGCGTCCGC
R D K T I K L W N T L A E C K Y T I Q D D G H S D W V S C V R
TTCTCCCCCAACCATGCCAACCCCATCATCGTGTCTGCTGGTTGGGACCGCACCGTTAAGGTCTGGCACCTTACCAACTGCAAGCTCAAGATC
F S P N H A N P I I V S A G W D R T V K V W H L T N C K L K I
AACCACCTTGGTCACTCTGGCTACCTGAACACAGTCACCGTCTCCCTGATGGTTCCCTCTGCGCCTCCGGTGGCAAGGACATGAAGGCCATG
N H L G H S G Y L N T V T V S P D G S L C A S G G K D M K A M
CTCTGGGACTTGAACGATGGCAACATCTGCACACCCCTGGACCACAATGACATCATCACATCATTGTGCTTCTCGCCCAACAGATACTGGCTG
L W D L N D G K H L H T L D H N D I I T S L C F S P N R Y W L
TGTGCTGCCTTCGGACCTTCCATCAAGATCTGGGATCTGGAAGCAAGGAGATGGTTGAAGAGCTCAGGCCTGAGATCATCAACCAGACCCAG
C A A F G P S I K I W D L E S K E M V E E L R P E I I N Q T Q
ACCTCCAAGTCAGACCCACCCAGTGCTTGTCTCTGGCGTGGTCCACAGACGGTCAGACCCCTCTCGCTGGCTACTCCGACAACATCATCAGA
T S K S D P P Q C L S L A W S T D G Q T L F A G Y S D N I I R
GTCTGGCAGGTGTGAGTCTCAGCGCGATTAAGgagctaccgaaacttagtttcatatttttgtgctacttatcctgtaaactgctgactgt
V W Q V S V S A R
aaggattaataagagatggaattgttgactaaaaaaaaaaaaaaaa

图 1 棉铃虫 *RACK1* 基因核苷酸和氨基酸序列

Fig. 1 The nucleotide and amino acid sequences of *Helicoverpa aringeri* *RACK1*

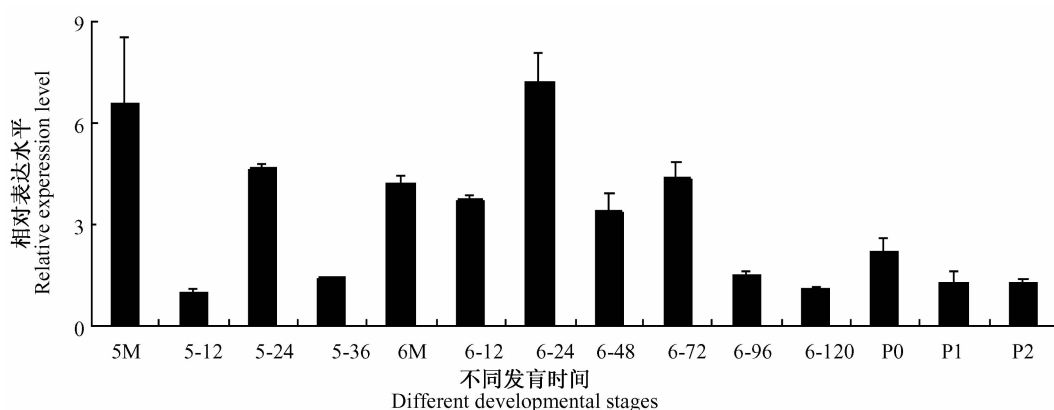
H. armi	: MNETQLRGCTLCHNGWVTOIATNPKYPMILSSSR---DKTLIVMKLTRD---TNYGVPQKRRLYGHSHFISDVVLSDDGNYA : 78
A. aegy	: MNETQLRGCTLCHNGWVTOIATNPKYPMILSSSR---DKTLIVMKLTRD---ASGCIPOKRRLYGHSHFISDVVLSDDGNYA : 78
A. gamb	: MNETQLRGCTLCHNGWVTOIATNPKYPMILSSSR---DKTLIVMKLTRD---LSYGIPOKRRLYGHSHFISDVVLSDDGNYA : 78
A. mell	: MNETQLRGCTLCHNGWVTOIATNPKYPMILSSSR---DKTLIVMKLTRD---AYGCIPOKRRLYGHSHFISDVVLSDDGNYA : 78
S. invi	: MNETQLRGCTLCHNGWVTOIATNPKYPMILSSSRGKYHKTTLIVMKLTRD---AYGCIPOKRRLYGHSHFISDVVLSDDGNYA : 81
H. salt	: MNETQLRGCTLCHNGWVTOIATNPKYPMILSSSR---DKTLIVMKLTRD---AYGCIPOKRRLYGHSHFISDVVLSDDGNYA : 78
N. vitr	: MNETQLRGCTLCHNGWVTOIATNPKYPMILSSSR---DKTLIVMKLTRD---AYGCIPOKRRLYGHSHFISDVVLSDDGNYA : 78
B. germ	: MNETQLRGCTLCHNGWVTOIATNPKYPMILSSSR---DKTLIVMKLTRD---TNYGVPQKRRLYGHSHFISDVVLSDDGNYA : 78
T. cast	: MNETQLRGCTLCHNGWVTOIATNPKYPMILSSSR---DKTLIVMKLTRD---TNYGVPQKRRLYGHSHFISDVVLSDDGNYA : 78
A. pisum	: MNETQLRGCTLCHNGWVTOIATNPKYPMILSSSR---DKTLIVMKLTRD---LNYGCIPOKRRLYGHSHFISDVVLSDDGNYA : 78
H. vire	: MNETQLRGCTLCHNGWVTOIATNPKYPMILSSSR---DKTLIVMKLTRD---TNYGVPQKRRLYGHSHFISDVVLSDDGNYA : 78
S. exig	: MNETQLRGCTLCHNGWVTOIATNPKYPMILSSSR---DKTLIVMKLTRD---TNYGVPQKRRLYGHSHFISDVVLSDDGNYA : 78
M. bras	: MNETQLRGCTLCHNGWVTOIATNPKYPMILSSSR---DKTLIVMKLTRD---TNYGVPQKRRLYGHSHFISDVVLSDDGNYA : 78
C. fumi	: MNETQLRGCTLCHNGWVTOIATNPKYPMILSSSR---DKTLIVMKLTRD---TNYGVPQKRRLYGHSHFISDVVLSDDGNYA : 78
B. betu	: MNETQLRGCTLCHNGWVTOIATNPKYPMILSSSR---DKTLIVMKLTRD---TNYGVPQKRRLYGHSHFISDVVLSDDGNYA : 78
P. xylo	: MNETQLRGCTLCHNGWVTOIATNPKYPMILSSSR---DKTLIVMKLTRD---TNYGCIPOKRRLYGHSHFISDVVLSDDGNYA : 78
B. mori	: MNETQLRGCTLCHNGWVTOIATNPKYPMILSSSR---DKTLIVMKLTRD---NNGYIPQKRRLYGHSHFISDVVLSDDGNYA : 78
G. mors	: MNETQLRGCTLCHNGWVTOIATNPKYPMILSSSR---DKTLIVMKLTRD---TNYGVPQKRRLYGHSHFISDVVLSDDGNYA : 79
D. mela	: MNETQLRGCTLCHNGWVTOIATNPKYPMILSSSR---DKTLIVMKLTRD---TNYGVPQKRRLYGHSHFISDVVLSDDGNYA : 79
H. armi	: LSGSWDKTLRLWDLAAGKTRREFEDHTKDVLVSAFSDNROIVSGSRDRTIKLWNTLAECKMTICDDGHSDDWVSCVRFSPNH : 160
A. aegy	: LSGSWDKTLRLWDLAAGKTRREFEDHTKDVLVSAFSDNROIVSGSRDRTIKLWNTLAECKMTICDDGHSDDWVSCVRFSPNH : 160
A. gamb	: LSGSWDKTLRLWDLAAGKTRREFEDHTKDVLVSAFSDNROIVSGSRDRTIKLWNTLAECKMTICDDGHSDDWVSCVRFSPNH : 160
A. mell	: LSGSWDKTLRLWDLAAGKTRREFEDHTKDVLVSAFSDNROIVSGSRDRTIKLWNTLAECKMTICDDGHSDDWVSCVRFSPNH : 160
S. invi	: LSGSWDKTLRLWDLAAGKTRREFEDHTKDVLVSAFSDNROIVSGSRDRTIKLWNTLAECKMTICDDGHSDDWVSCVRFSPNH : 163
H. salt	: LSGSWDKTLRLWDLAAGKTRREFEDHTKDVLVSAFSDNROIVSGSRDRTIKLWNTLAECKMTICDDGHSDDWVSCVRFSPNH : 160
N. vitr	: LSGSWDKTLRLWDLAAGKTRREFEDHTKDVLVSAFSDNROIVSGSRDRTIKLWNTLAECKMTICDDGHSDDWVSCVRFSPNH : 160
B. germ	: LSGSWDKTLRLWDLAAGKTRREFEDHTKDVLVSAFSDNROIVSGSRDRTIKLWNTLAECKMTICDDGHSDDWVSCVRFSPNH : 160
T. cast	: LSGSWDKTLRLWDLAAGKTRREFEDHTKDVLVSAFSDNROIVSGSRDRTIKLWNTLAECKMTICDDGHSDDWVSCVRFSPNH : 160
A. pisum	: LSGSWDKTLRLWDLAAGKTRREFEDHTKDVLVSAFSDNROIVSGSRDRTIKLWNTLAECKMTICDDGHSDDWVSCVRFSPNH : 160
H. vire	: LSGSWDKTLRLWDLAAGKTRREFEDHTKDVLVSAFSDNROIVSGSRDRTIKLWNTLAECKMTICDDGHSDDWVSCVRFSPNH : 160
S. exig	: LSGSWDKTLRLWDLAAGKTRREFEDHTKDVLVSAFSDNROIVSGSRDRTIKLWNTLAECKMTICDDGHSDDWVSCVRFSPNH : 160
M. bras	: LSGSWDKTLRLWDLAAGKTRREFEDHTKDVLVSAFSDNROIVSGSRDRTIKLWNTLAECKMTICDDGHSDDWVSCVRFSPNH : 160
C. fumi	: LSGSWDKTLRLWDLAAGKTRREFEDHTKDVLVSAFSDNROIVSGSRDRTIKLWNTLAECKMTICDDGHSDDWVSCVRFSPNH : 160
B. betu	: LSGSWDKTLRLWDLAAGKTRREFEDHTKDVLVSAFSDNROIVSGSRDRTIKLWNTLAECKMTICDDGHSDDWVSCVRFSPNH : 160
P. xylo	: LSGSWDKTLRLWDLAAGKTRREFEDHTKDVLVSAFSDNROIVSGSRDRTIKLWNTLAECKMTICDDGHSDDWVSCVRFSPNH : 160
B. mori	: LSGSWDKTLRLWDLAAGKTRREFEDHTKDVLVSAFSDNROIVSGSRDRTIKLWNTLAECKMTICDDGHSDDWVSCVRFSPNH : 160
G. mors	: LSGSWDKTLRLWDLAAGKTRREFEDHTKDVLVSAFSDNROIVSGSRDRTIKLWNTLAECKMTICDDGHSDDWVSCVRFSPNH : 161
D. mela	: LSGSWDKTLRLWDLAAGKTRREFEDHTKDVLVSAFSDNROIVSGSRDRTIKLWNTLAECKMTICDDGHSDDWVSCVRFSPNH : 161
H. armi	: ANPIIVSAGWDRIVKVVHLLNQCRLKTNHLEHSCYLNIVIVSPDGSLOC SGGKDCNALLWDLNDGKHLTLTHNDITLALCES : 242
A. aegy	: ANPIIVSAGWDRIVKVVHLLNQCRLKTNHLEHSCYLNIVIVSPDGSLOC SGGKDCNALLWDLNDGKHLTLTHNDITLALCES : 242
A. gamb	: ANPIIVSAGWDRIVKVVHLLNQCRLKTNHLEHSCYLNIVIVSPDGSLOC SGGKDCNALLWDLNDGKHLTLTHNDITLALCES : 242
A. mell	: ANPIIVSAGWDRIVKVVHLLNQCRLKTNHLEHSCYLNIVIVSPDGSLOC SGGKDCNALLWDLNDGKHLTLTHNDITLALCES : 242
S. invi	: ANPIIVSAGWDRIVKVVHLLNQCRLKTNHLEHSCYLNIVIVSPDGSLOC SGGKDCNALLWDLNDGKHLTLTHNDITLALCES : 245
H. salt	: ANPIIVSAGWDRIVKVVHLLNQCRLKTNHLEHSCYLNIVIVSPDGSLOC SGGKDCNALLWDLNDGKHLTLTHNDITLALCES : 242
N. vitr	: ANPIIVSAGWDRIVKVVHLLNQCRLKTNHLEHSCYLNIVIVSPDGSLOC SGGKDCNALLWDLNDGKHLTLTHNDITLALCES : 242
B. germ	: ANPIIVSAGWDRIVKVVHLLNQCRLKTNHLEHSCYLNIVIVSPDGSLOC SGGKDCNALLWDLNDGKHLTLTHNDITLALCES : 242
T. cast	: ANPIIVSAGWDRIVKVVHLLNQCRLKTNHLEHSCYLNIVIVSPDGSLOC SGGKDCNALLWDLNDGKHLTLTHNDITLALCES : 242
A. pisum	: ANPIIVSAGWDRIVKVVHLLNQCRLKTNHLEHSCYLNIVIVSPDGSLOC SGGKDCNALLWDLNDGKHLTLTHNDITLALCES : 242
H. vire	: ANPIIVSAGWDRIVKVVHLLNQCRLKTNHLEHSCYLNIVIVSPDGSLOC SGGKDCNALLWDLNDGKHLTLTHNDITLALCES : 242
S. exig	: ANPIIVSAGWDRIVKVVHLLNQCRLKTNHLEHSCYLNIVIVSPDGSLOC SGGKDCNALLWDLNDGKHLTLTHNDITLALCES : 242
M. bras	: ANPIIVSAGWDRIVKVVHLLNQCRLKTNHLEHSCYLNIVIVSPDGSLOC SGGKDCNALLWDLNDGKHLTLTHNDITLALCES : 242
C. fumi	: ANPIIVSAGWDRIVKVVHLLNQCRLKTNHLEHSCYLNIVIVSPDGSLOC SGGKDCNALLWDLNDGKHLTLTHNDITLALCES : 242
B. betu	: ANPIIVSAGWDRIVKVVHLLNQCRLKTNHLEHSCYLNIVIVSPDGSLOC SGGKDCNALLWDLNDGKHLTLTHNDITLALCES : 242
P. xylo	: ANPIIVSAGWDRIVKVVHLLNQCRLKTNHLEHSCYLNIVIVSPDGSLOC SGGKDCNALLWDLNDGKHLTLTHNDITLALCES : 242
B. mori	: ANPIIVSAGWDRIVKVVHLLNQCRLKTNHLEHSCYLNIVIVSPDGSLOC SGGKDCNALLWDLNDGKHLTLTHNDITLALCES : 242
G. mors	: ANPIIVSAGWDRIVKVVHLLNQCRLKTNHLEHSCYLNIVIVSPDGSLOC SGGKDCNALLWDLNDGKHLTLTHNDITLALCES : 243
D. mela	: ANPIIVSAGWDRIVKVVHLLNQCRLKTNHLEHSCYLNIVIVSPDGSLOC SGGKDCNALLWDLNDGKHLTLTHNDITLALCES : 243
H. armi	: ENRYWLCAGGSPSIKIWDLSREMVVELRPFIIINOTQTSRSDPPQCCLSLAWSTDGQTLAAGYSDNIRVMOQVSVSAR-- : 319
A. aegy	: ENRYWLCAGGSPSIKIWDLSREMVVELRPFIIINOTQTSRSDPPQCCLSLAWSTDGQTLAAGYSDNIRVMOQVSVSAR-- : 319
A. gamb	: ENRYWLCAGGSPSIKIWDLSREMVVELRPFIIINOTQTSRSDPPQCCLSLAWSTDGQTLAAGYSDNIRVMOQVSVSAR-- : 312
A. mell	: ENRYWLCAGGSPSIKIWDLSREMVVELRPFIIINOTQTSRSDPPQCCLSLAWSTDGQTLAAGYSDNIRVMOQVSVSAR-- : 317
S. invi	: ENRYWLCAGGSPSIKIWDLSREMVVELRPFIIINOTQTSRSDPPQCCLSLAWSTDGQTLAAGYSDNIRVMOQVSVSAR-- : 320
H. salt	: ENRYWLCAGGSPSIKIWDLSREMVVELRPFIIINOTQTSRSDPPQCCLSLAWSTDGQTLAAGYSDNIRVMOQVSVSAR-- : 319
N. vitr	: ENRYWLCAGGSPSIKIWDLSREMVVELRPFIIINOTQTSRSDPPQCCLSLAWSTDGQTLAAGYSDNIRVMOQVSVSAR-- : 317
B. germ	: ENRYWLCAGGSPSIKIWDLSREMVVELRPFIIINOTQTSRSDPPQCCLSLAWSTDGQTLAAGYSDNIRVMOQVSVSAR-- : 317
T. cast	: ENRYWLCAGGSPSIKIWDLSREMVVELRPFIIINOTQTSRSDPPQCCLSLAWSTDGQTLAAGYSDNIRVMOQVSVSAR-- : 318
A. pisum	: ENRYWLCAGGSPSIKIWDLSREMVVELRPFIIINOTQTSRSDPPQCCLSLAWSTDGQTLAAGYSDNIRVMOQVSVSAR-- : 319
H. vire	: ENRYWLCAGGSPSIKIWDLSREMVVELRPFIIINOTQTSRSDPPQCCLSLAWSTDGQTLAAGYSDNIRVMOQVSVSAR-- : 319
S. exig	: ENRYWLCAGGSPSIKIWDLSREMVVELRPFIIINOTQTSRSDPPQCCLSLAWSTDGQTLAAGYSDNIRVMOQVSVSAR-- : 319
M. bras	: ENRYWLCAGGSPSIKIWDLSREMVVELRPFIIINOTQTSRSDPPQCCLSLAWSTDGQTLAAGYSDNIRVMOQVSVSAR-- : 319
C. fumi	: ENRYWLCAGGSPSIKIWDLSREMVVELRPFIIINOTQTSRSDPPQCCLSLAWSTDGQTLAAGYSDNIRVMOQVSVSAR-- : 319
B. betu	: ENRYWLCAGGSPSIKIWDLSREMVVELRPFIIINOTQTSRSDPPQCCLSLAWSTDGQTLAAGYSDNIRVMOQVSVSAR-- : 320
P. xylo	: ENRYWLCAGGSPSIKIWDLSREMVVELRPFIIINOTQTSRSDPPQCCLSLAWSTDGQTLAAGYSDNIRVMOQVSVSAR-- : 319
B. mori	: ENRYWLCAGGSPSIKIWDLSREMVVELRPFIIINOTQTSRSDPPQCCLSLAWSTDGQTLAAGYSDNIRVMOQVSVSAR-- : 319
G. mors	: ENRYWLCAGGSPSIKIWDLSREMVVELRPFIIINOTQTSRSDPPQCCLSLAWSTDGQTLAAGYSDNIRVMOQVSVSAR-- : 318
D. mela	: ENRYWLCAGGSPSIKIWDLSREMVVELRPFIIINOTQTSRSDPPQCCLSLAWSTDGQTLAAGYSDNIRVMOQVSVSAR-- : 318

图 2 棉铃虫 *RACK1* 氨基酸与其它昆虫 *RACK1* 氨基酸的多重联配Fig. 2 Amino acid sequence alignment of *Helicoverpa armigera* *RACK1* and other insect *RACK1*s

黑色阴影表示氨基酸 100% 一致,灰色表示 80% 一致,白色表示 80% 以下一致。

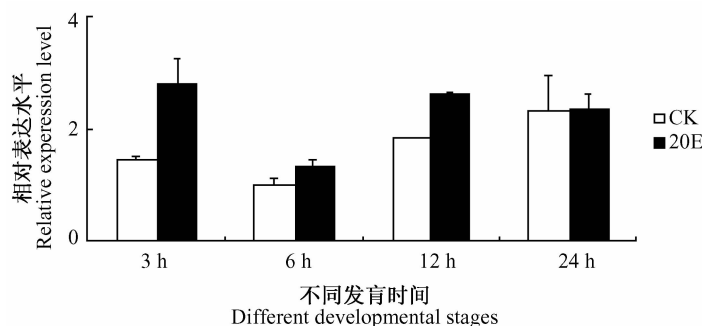
Amino acids 100% identity are in black box, 80% identity in grey box and identity below 80% in white box.

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (H. armi); 小菜蛾 *Plutella xylostella* (P. xylo); 甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (S. exig); 云杉卷叶蛾 *Choristoneura fumiferana* (C. fumi); 美国斑点蛾 *Biston betularia* (B. betu); 甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* (M. bras); 烟蚜夜蛾 *Heliothis virescens* (H. vire); 家蚕 *Bombyx mori* (B. mori); 德国蜚蠊 *Blattella germanica* (B. germ); 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (T. cast); 蜜蜂 *Apis mellifera* (A. mell); 丽蝇 *Nasonia vitripennis* (N. vitr); 印度跳蚊 *Harpegnathos saltator* (H. salt); 红火蚁 *Solenopsis invicta* (S. invi); 豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* (A. pisu); 伊蚊 *Aedes aegypti* (A. aegy); 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* (A. gamb); 刺舌蝇 *Glossina morsitans morsitans* (G. mors); 果蝇 *Drosophila melanogaster* (D. mela)。

图3 *RACK1* 基因的时序表达Fig. 3 The temporal expression analysis of *Helicoverpa armigera* *RACK1*

5M:5龄蜕皮期;5-12:5龄12h;5-24:5龄24h;5-36:5龄36h;6M:6龄蜕皮期;6-12:6龄12h;6-24:6龄24h;6-48:6龄48h;6-72:6龄72h;6-96:6龄96h;6-120:6龄120h;P0:化蛹期;P1:化蛹后第1天;P2:化蛹后第2天。

5M: molting stage of 5th instar; 5-12: 12 h larve of 5th instar; 5-24: 24 h larve of 5th instar; 5-36: 36 h larve of 5th instar; 6M: molting stage of 6th instar; 6-12: 12 h larve of 6th instar; 6-24: 24 h larve of 6th instar; 6-48: 48 h larve of 6th instar; 6-72: 72 h larve of 6th instar; 6-96: 96 h larve of 6th instar; 6-120: 120 h larve of 6th instar; P0: 0 h pupa; P1: 1 d pupa; P2: 2 d pupa.

图4 蜕皮激素对 *RACK1* 表达的影响Fig. 4 The effect of 20E on the *RACK1* expression

CK: 酒精对照 alcohol control; 20E: 蜕皮激素 molting hormone.

2.2 *RACK1* 基因在棉铃虫不同发育时期的转录表达

利用荧光定量 PCR 分析 *RACK1* 基因在棉铃虫不同时期的表达结果显示(图3), *RACK1* 基因总是在蜕皮过程中表达量升高, 暗示着 *RACK1* 基因可能参与棉铃虫的蜕皮过程。

2.3 蜕皮激素对 *RACK1* 基因转录的影响

利用蜕皮激素处理棉铃虫后检测 *RACK1* 基因的表达, 结果发现, 从处理 3 h 到 12 h 蜕皮激素均

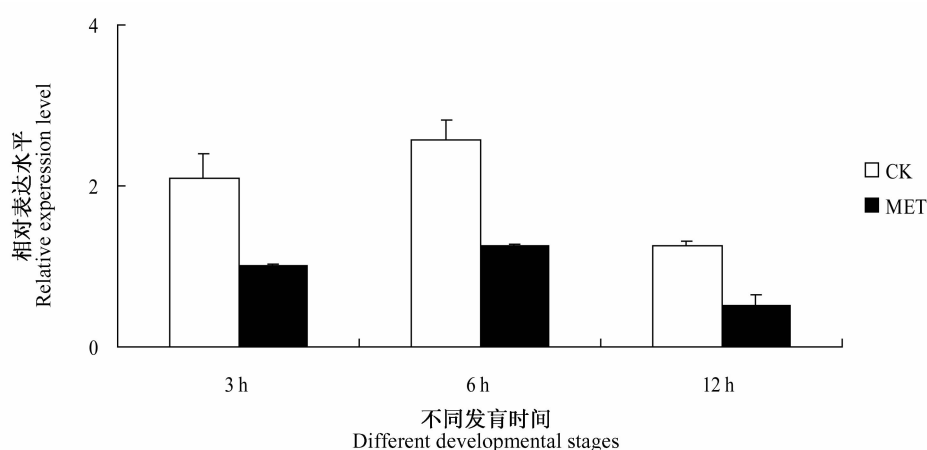
诱导 *RACK1* 的表达(图4)。

2.4 保幼激素对 *RACK1* 基因转录的影响

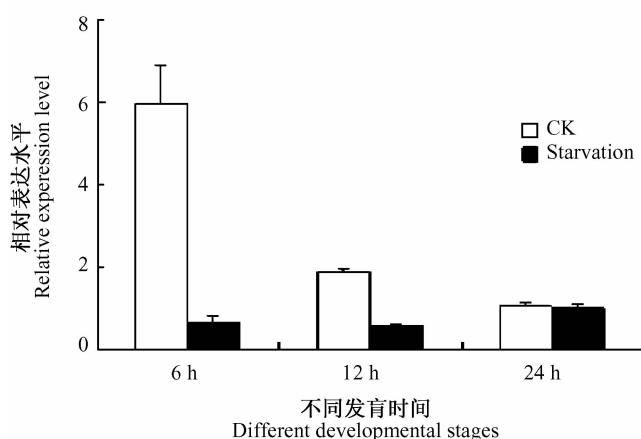
利用保幼激素类似物 methoprene 处理棉铃虫后检测 *RACK* 基因的表达, 结果发现, 从处理 3 h 到 12 h 蜕皮激素均显著抑制 *RACK1* 基因的表达(图5)。

2.5 饥饿对 *RACK1* 基因转录的影响

饥饿对棉铃虫 *RACK1* 基因转录的影响分析显示(图6), 在棉铃虫开始取食时对棉铃虫进行饥饿处理可以显著抑制 *RACK1* 的转录, 从饥饿 6 h

图 5 保幼激素对 *RACK1* 表达的影响Fig. 5 The effect of methoprene on the *RACK1* expression

CK: 丙酮对照 acetone control; MET: 保幼激素类似物 juvenile hormone analogue.

图 6 饥饿对 *RACK1* 基因转录的影响Fig. 6 The effect of starvation on *RACK1* expression

CK: 空白对照 blank control; Starvation: 饥饿处理 treatment with starvation.

开始一直持续到 12 h, *RACK1* 的转录明显被抑制。

3 讨论

RACK1 是 WD-40 蛋白家族中的一个成员, 是一种分子量为 36 ku 的 G 蛋白 β 亚单位的同族体 (Van der Voorn and Ploegh, 1992; Ron *et al.*, 1994)。 *RACK1* 作为 PKC 的受体蛋白在多个信号转导途径中起重要作用 (Chen *et al.*, 2006)。除了与 PKC 相互作用外, *RACK1* 还与酪氨酸激酶相互作用, 是 Src 酪氨酸蛋白激酶的一种重要底物, 向下传递生长因子受体酪氨酸蛋白激酶的信号, 可能调控细胞生长 (Chang, 2002)。在大鼠中,

RACK1 蛋白的表达与胚胎着床及蜕膜化过程密切相关 (郭淑华和潘志芳, 2006)。爪蟾 *RACK1* 基因在多种组织中都有很强的表达, 并且与头部的分化有关 (Kwon *et al.*, 2001)。在文昌鱼的胚胎发育过程中, *RACK1* 主要在分化中的神经管和体节胚层中表达, 在文昌鱼的体节和肌肉的分化, 以及某些成体组织中也发挥重要作用 (黄向炜等, 2007)。目前对 *RACK1* 基因的研究和认识越来越多, 研究者普遍认为 *RACK1* 基因在诸多重要的生物反应过程中担任中心角色。

本研究利用 RT-PCR 及 RACE 的方法克隆了 *RACK1* 基因, 序列分析结果显示出 *RACK1* 氨基酸

序列在昆虫中非常保守,其一致性高达 85% 以上,即使与一些哺乳动物如老鼠、人等的 *RACK1* 基因进行比对,其编码的氨基酸一致性也高达 80% 以上。这种高的一致性说明了 *RACK1* 基因在进化过程中是很保守的。

对于无脊椎动物的昆虫来说,蜕皮是一个生物学奇迹,也是目前昆虫生理生化研究的重点和难点。本研究分析了 *RACK1* 在棉铃虫中的时序的表达,发现该基因的表达与蜕皮激素的滴度变化相一致,推测可能是受蜕皮激素调控,进一步的激素处理也证实蜕皮激素诱导 *RACK1* 基因的表达,而保幼激素则抵消蜕皮激素对 *RACK1* 基因的诱导作用。实际上有研究表明蜕皮激素在作用的过程中激活 PKC 的活性(Sun and Song, 2006), PKC 要起作用必须要与 RACK1 结合,通过 RACK1 进行信号的传递,在本实验中 *RACK1* 基因的表达与蜕皮激素的滴度变化相一致也就不奇怪了。本实验尽管已经克隆了 *RACK1* 基因,并鉴定出了一些基本特性,但要阐明 RACK1 的详细功能还需进一步的研究。

参考文献 (References)

- Ashique AM, Kharazia V, Yaka R, Phamluong K, Peterson AS, Ron D, 2006. Localization of the scaffolding protein RACK1 in the developing and adult mouse brain. *Brain Res.*, 1069(1):31—38.
- Chang BY, Harte RA, Cartwright CA, 2002. RACK1: a novel substrate for the Src protein-tyrosine kinase. *Oncogene*, 21(50):7619—7629.
- Chen JG, Temple B, Liang J, Guo J, Alonso JM, Ecker JR, Jones AM, 2006. RACK1 mediates multiple hormone responsiveness and developmental processes in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.*, 57:2697—2708.
- Daria M, Hanita K, Jamie L, 1991. Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C. *PANS*, 88(9):3997—4000.
- Kwon HJ, Bae S, Son YH, Chung HM, 2001. Expression of the *Xenopus* homologue of the receptor for activated C-kinase 1 (RACK1) in the *Xenopus* embryo. *Dev. Genes Evol.*, 211(4):195—197.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($-\Delta\Delta C_T$) method. *Methods*, 25(4):402—408.
- Ron D, Chen CH, Caldwell J, Jamieson L, Orr E, Mochly-Rosen D, 1994. Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the beta subunit of G proteins. *PNAS*, 91(3):839—843.
- Sambrook J, Russeu DW, 2002. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd (ed.). NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 84—87.
- Smith NA, Singh SP, Wang MB, Stoutjesdijk PA, Green AG, Waterhouse PM, 2000. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature*, 407:319—320.
- Sun XP, Song QS, 2006. PKC-mediated USP phosphorylation is required for 20E-induced gene expression in the salivary glands of *Drosophila melanogaster*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 62(6802):116—127.
- Van der Voorn L, Ploegh HL, 1992. The WD - 40 repeat. *FEBS Lett.*, 307(2):131—134.
- Vani K, Yang G, Mohler J, 1997. Isolation and cloning of a *Drosophila* homolog to the mammalian RACK1 gene, implicated in PKC-mediated signaling. *BBA-Mol. Cell Res.*, 1358(1):67—71.
- Zou E, Fingerma M, 1999. Patterns of N-acetyl-beta-glucosaminidase isoenzymes in the epidermis and hepatopancreas and induction of N-acetyl-beta-glucosaminidase activity by 20 - hydroxyecdysone in the fiddler crab, *Uca pugnator*. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, 124(3):345—349.
- 冯从经,戴华国,符文俊,2004. 保幼激素类似物及蜕皮甾类对亚洲玉米螟幼虫酚氧化酶活性的影响. *昆虫学报*, 47(5):562—566.
- 郭淑华,潘志芳,2006. *RACK1* 在大鼠子宫中的表达. *山东大学学报*, 44(12):1209—1212.
- 黄向炜,张伟,李忻怡,张晓辉,李宝钧,毛炳宇,张红卫,2007. 文昌鱼 *RACK1* 基因在胚胎发育中的表达. *中国科学*, 37(3):287—292.