

粘虫核糖体蛋白 S7 cDNA 的克隆和表达分析^{*}

李 柯^{**}

(山西师范大学生命科学学院 临汾 041004)

摘 要 运用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆了粘虫 *Mythimna separata* (Walker) 核糖体蛋白 S7 基因(*RPS7*)的全长 cDNA 序列(GenBank 登录号: JN582331), 并对其进行生物信息学分析。结果表明, 粘虫 *RPS7* 全长 cDNA 序列为 762 bp, 包括 5' 非编码区 32 bp 和 3' 非编码区 67 bp。其开放阅读框(573 bp)编码 190 氨基酸肽链, 具有核糖蛋白 S7e 蛋白家族典型特征。该肽链理论分子量为 21.924 ku, 等电点为 9.82, 富含 4 种类型的特定功能位点。该蛋白序列与其他动物 RPS 蛋白序列具有 96.8% ~ 98.2% 高度同源性。应用荧光实时定量技术建立了粘虫脑部胚后发育 *RPS7* 表达模式。*RPS7* 表达量随胚后发育脑部重建呈现出动态变化, 这一结果显示 *RPS7* 是在转录水平上呈现发育性调节。

关键词 粘虫, 核糖体蛋白 S7, 克隆, 表达

Cloning and expression of a cDNA encoding ribosomal protein S7 in *Mythimna separata*

LI Ke^{**}

(College of Life Sciences, Shanxi Normal University, Linfen 041004, China)

Abstract A full-length cDNA of the ribosomal protein S7 (*RPS7*) gene was cloned from *Mythimna separata* (Walker) using RT-PCR and the RACE technique. The results show that the cloned cDNA (GenBank accession number: JN582331) contained 762 base pairs, a 5'-untranslated region (32 bp) and a 3'-untranslated region (67 bp). The open reading frame (573 bp) encodes a 190 amino acid peptide with a predicted molecular weight of 21.924 ku and a PI value of 9.82. The predicted protein is conserved in the coding region with 96.8% – 98.2% similarity at the amino acid level to *RPS7*s from other animals in which 4 typical ribosomal functional sites of the protein S7e family signature have been found. Real-time quantitative PCR revealed that *RPS7* transcript levels were coincident with the remodeling of the brain. The results suggest that *RPS7* was developmentally regulated at the level of transcription.

Key words *Mythimna separata*, *RPS7*, molecular cloning, gene expression

昆虫变态机制常期以来一直是广大学者感兴趣的课题。大量文献报道了变态昆虫脑细胞及神经髓质区在脑部胚后发育过程中的发育行为(Nordlander and Edwards, 1969; Boquet *et al.*, 2000; Dumstreit *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2004; Awasaki *et al.*, 2008; Groh and Rossler, 2008; Izergina *et al.*, 2009; Huetteroth *et al.*, 2010)。在变态过程中, 脑重建主要体现在神经母细胞增殖、神经元的分化及次级轴突束的产生、突触数量的增加及髓质区生长和定位等方面。

核糖体蛋白 S7(*RPS7*)为组成真核细胞核糖体小亚基 40S 蛋白成分之一。目前, 多种动物、细菌和植物的 *RPS7* cDNA 序列都有报道(Annino *et al.*, 1995; Wool *et al.*, 1995; Vierula, 1997; Higa *et al.*, 1999; Hou *et al.*, 2000; 周奕华等, 2001; Chen *et al.*, 2007; 侯怡铃等, 2009)。人类 *RPS7* 属于核糖体蛋白 S7e 蛋白家族。*RPS7* 功能的相关报道较少。MDM2 (murine double minute2) 是肿瘤抑癌基因 *p53* 关键的负调节因子(Brooks and Gu, 2006)。最近研究表明, 除了参与核糖体组成

^{*} 资助项目: 山西师范大学博士启动资金(833202)。

^{**} E-mail: like3515@126.com

收稿日期: 2011-08-29, 接受日期: 2011-11-02

外, RPS7 还通过参与 MDM2 与 *p53* 的相互作用来调节细胞分化和凋亡 (Zhu *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2007)。作者非常感兴趣 *RPS7* 在变态昆虫脑部胚后发育过程中的功能。因此, 本文以粘虫 *Mythimna separata* (Walker) 作为实验材料, 克隆获得粘虫 *RPS7* cDNA 序列, 并建立了粘虫脑部胚后发育 *RPS7* 表达模式, 旨在为核糖体蛋白 S7 的功能研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

虫源及饲养条件 粘虫由西北农林科技大学无公害农药研究中心提供。室内培养温度控制在 $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$, 光周期为 L:D = 14:10, 相对湿度 70% ~ 80%。幼虫以小麦苗进行饲喂。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成

任意选取 5 龄粘虫幼虫 4 头, 取其头部立即放入含有液氮的研钵中, 充分研磨后, 加入 RNAiso Plus (购自 TaKaRa 公司), 然后按照 TaKaRa 公司的 RNAiso Plus 使用说明书进行总 RNA 的提取。获得总 RNA 后, 立即使用 TaKaRa 公司扩增 cDNA 3' 末端全长试剂盒 (3'-full RACE core set) 和 5' 末端全长的试剂盒 (5'-full RACE core set) 在 10 μL 体系中反应合成含 3' 末端第一链 cDNA 和 5' 末端第一链 cDNA。为分析 *RPS7* 在脑部胚后发育过程中的表达模式, 作者选取了 11 个发育阶段, 包括 3 个幼虫阶段 (4 龄到 6 龄, L4 ~ L6), 1 个前蛹阶段 (PP), 6 个蛹阶段 (P0, P2, P4, P6, P8, P10) 和 1 个成虫阶段 (A0)。新形成的蛹记为 P0, 随后的发育天数记为 P1 ~ P10。刚形成的成虫记 A0。幼虫阶段选取蜕皮后第 2 天幼虫为实验材料。每个阶段设置 3 组, 每组取 3 ~ 5 头用作实时定量模板提取。选取的粘虫经 CO_2 麻醉后, 在冰上解剖出脑, 立即放入 RNAiso Plus 中, 然后按照 TaKaRa 公司的 RNAiso Plus 使用说明书进行总 RNA 的提取。提取的总 RNA 经检测合格后, 使用 TaKaRa 公司的反转录试剂盒 PrimeScript[®] RT reagent Kit 进行反转录成 cDNA 模板。

1.2.2 粘虫 *RPS7* 全长 cDNA 序列扩增策略 粘虫 *RPS7* 全长 cDNA 序列扩增策略见图 1。RPS7 3' 末端全长 cDNA 序列 Seq. 1 和 5' 末端全长 cDNA

序列 Seq. 2 均采用巢式 PCR 扩增技术。首先, 根据多种动物 RPS7 蛋白氨基酸序列的保守区域设计简并引物 A1、A2、B1 和 B2。引物 A1、A2 与 3' RACE 接头引物 3'-RACE outer、3'-RACE inner 用于 3' 末端全长 cDNA 序列 Seq. 1 的扩增, 引物 B1、B2 与 5' RACE 接头引物 5'-RACE outer、5'-RACE inner 用于 5' 末端全长 cDNA 序列 Seq. 2 扩增。将测序获得的 Seq. 1 和 Seq. 2 序列由 ContigEpress 软件组装后获得粘虫 *RPS7* 全长 cDNA 序列。

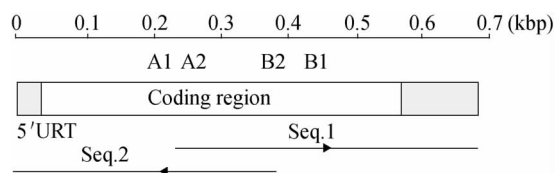


图 1 粘虫 *RPS7* 基因克隆策略

Fig. 1 The cloning strategy of *Mythimna separata* *RPS7* gene

1.2.3 粘虫 *RPS7* 3' 和 5' 末端全长的克隆和测序

通过 GenBank 数据库获得包括小菜蛾 *Plutella xylostella* (登录号: BAD26664)、家蚕 *Bombyx mori* (登录号: NP_001037261)、瓦氏袖蝶 *Heliconius erato* (登录号: ABS57442)、埃及伊蚊 *Aedes aegypti* (登录号: XP_001660169)、印鼠客蚤 *Xenopsylla cheopis* (登录号: ABM55455) 等物种的 RPS7 蛋白氨基酸序列, 根据这些序列的保守区域设计 2 对简并引物 A1、A2、B1 和 B2 (表 1)。引物 A1 和 A2 用于 3' 末端全长序列扩增。引物 A1 和 3'-RACE outer 以 3' 末端全长的第一链 cDNA 为模板进行第 1 轮扩增, 将稀释 1 000 倍的第 1 轮产物作为模板, 用引物 A2 和 3'-RACE inner 进行第 2 轮扩增获得片段 Seq. 1。引物 B1 和 B2 用于 5' 末端全长序列扩增, 引物 B1 和 5'-RACE outer 以 5' 末端全长 cDNA 的第一链为模板进行第 1 轮扩增, 将稀释 1 000 倍的第 1 轮产物做为模板, 用引物 B2 和 5'-RACE inner 进行第 2 轮扩增获得片段 Seq. 2。上述 2 片段第 1 轮扩增反应条件为: 94°C 预变性 3 min, 然后 94°C 变性 30 s, 52°C 退火 45 s, 72°C 延伸 1 min, 共 35 个循环, 最后 72°C 再延伸 10 min。第 2 轮巢式 PCR 反应条件为: 94°C 预变性 3 min; 然后 94°C 变性 30 s, 56°C 退火 50 s, 72°C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后 72°C 再延伸 10 min。PCR 产物

经确认后用 2% 的琼脂糖凝胶电泳分离纯化,然后连接到 pMD-19T 载体,转化感受态细胞 *E. coli*

DH5 α ,PCR 检测阳性克隆后送上海美季生物有限公司测序。

表 1 粘虫 *RPS7* 基因 cDNA 克隆及检测表达量引物序列
Table 1 Nucleotide sequence of primers for *Mythimna separata RPS7* cDNA

目的片段 Objective to fragment	引物名称 Primer name	引物序列(5'—3') Primer sequence (5'—3')
5'-RACE	A1	CATCTACGTGCCCCATGCCNAARYT
	A2	CCCATGCCCAAGCTGAARSMNTTYCA
3'-RACE	B1	AACACCAGGTCCTCCAGGATNGCRTCRTANAC
	B2	GGGTCTGCTTCTGGGTCTCTTGTGYYTTRTTNGC
Real-time	C1	ACCAACTCCGACCTGAAG
	C2	TCTCCAACGAACACAACG
'-Actin	D1	ATGTGCGACGACGATGTTG
	D2	CTCGTTGTAGAAGGTGTGG

注: R:A or G; Y:C or T; W:A or T; N:A or T or C or G;M:A or C; S:G or C.

1.3 生物信息学分析

通过 ExPASy (<http://www.expasy.org/>) 分析蛋白质分子量和等电点。采用 SOPMA 软件 (<http://npsa-pbil.ibcp.fr/>) 分析蛋白质的二级结构。运用 TMpred 软件 (<http://www.ch.embnet.org/>) 分析蛋白质跨膜区。用 MEGA 4.0 软件进行进化树的构建,进化距离分析采用的邻接法(NJ, neighbor-joining)。系统树的每个分支的统计学显著性分析以 bootstrap 进行检验,重复次数为 1 000 次。

1.4 粘虫 *RPS7* 基因的表达分析

利用实时荧光定量 real-time PCR 对 *RPS7* 在脑部胚后的 11 个不同发育阶段的表达水平进行研究。根据克隆所获得的 *RPS7* 序列,采用 Beacon Designer 7.0 软件设计实时定量引物(表 1)。本文采用粘虫管家基因 β -Actin 作为内参基因,内参引物序列见表 1 (李柯等,2010; Li *et al.*,2010)。定量 PCR 反应采用荧光染料 SYBR Green II 在 iQTM5 apparatus 定量 PCR 仪上进行。PCR 反应体系:SYBR Premix Ex TaqTM II (2x) 10 μ L,上游引物(10 μ mol/L)0.5 μ L,下游引物(10 μ mol/L)0.5 μ L,cDNA 模板 1 μ L,ddH₂O 8 μ L,总体系为 20 μ L。PCR 程序采用二步法反应程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火延伸 15 s, 共 40 循环;加上溶解曲线分析程序。每个样品重复测定 3 次。

本研究中,选用 6 龄幼虫脑 cDNA 模板作为制作标准曲线模板;模板的稀释倍数为 1 $\times$, 10 $\times$, 10² $\times$, 10³ $\times$, 10⁴ $\times$ 。所有样品 cDNA 模板稀释 15 倍后做为定量模板。本实验选 4 龄幼虫脑 cDNA 样品为参照组。*RPS7* 相对表达量通过公式 2^{- $\Delta\Delta C_T$} 法获得。将获得的数据输入 SPSS 13.0,通过单因素方差分析,用最小显著差数法(least-significant difference, LSD)进行检验,根据平均值 $\pm$ 标准误差绘图。

2 结果与分析

2.1 粘虫 *RPS7* PCR 扩增产物的检测

经过巢式 PCR 扩增,电泳结果显示,*RPS7* 3'-RACE 和 5'-RACE 扩增的产物大小约为 480 bp 和 400 bp(图 2),均与预期的片段大小一致。将 PCR 产物克隆到载体中进行测序。根据测序结果可知,该基因 3'和 5'末端全长序列扩增的产物长分别是 461 bp 和 355 bp。将以上 2 条片段测序结果在 NCBI 进行 BLAST 同源搜索,结果表明所得片段均与 *RPS7* 基因同源。

2.2 全长 cDNA 序列的获得及开放阅读框识别

将经过扩增、测序得到的 *RPS7* 5'末端全长序列和 3'末端全长序列通过 ContigExpress[®] 软件 (<http://www.invitrogen.com>) 拼接得到粘虫该基因全长 cDNA 序列长为 672 bp。采用 NCBI 上的在线工具 ORF Finder 进行开放阅读框(open

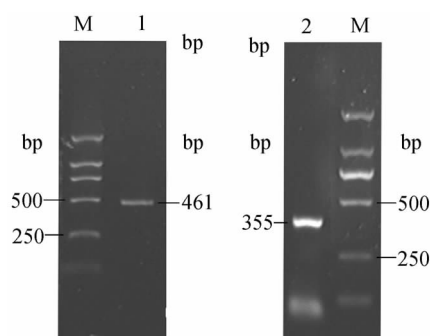


图2 粘虫 *RPS7* 基因的 PCR 扩增产物

Fig. 2 PCR products of *RPS7* in *Mythimna separata*

M. DNA marker DL2000; 1. 3'-RACE 巢式 PCR 产物;

2. 5'-RACE 巢式 PCR 产物。

M. DNA marker DL2000; 1. product of 3'-RACE nested

PCR; 2. product of 5'-RACE nested PCR.

reading frame, ORF) 识别, 结果如图 3。起始密码子 ATG 位于第 33 ~ 35 位核苷酸, 终止密码子 TAA 位于第 603 ~ 605 位核苷酸, 开放阅读框全长为 573 bp, 编码一个 190 氨基酸残基的蛋白质。5' 非翻译区 (5'-untranslated region, 5'-UTR) 的长度为 32 bp, 3' 非翻译区 (3'-untranslated region, 3'-UTR) 的长度为 67 bp。在 3'-UTR 中有典型的加尾信号 AATAAA, 可见 31 bp 长度的 PloyA 尾。采用 NCBI (The National Center for Biotechnology Information) 上的在线工具 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) 将翻译所得的蛋白质序列进行同源性搜索。结果发现, 粘虫与家蚕的 *RPS7* 蛋白一致性高达 98%。由此可判定该序列为粘虫 *RPS7* 基因的全长序列, 编码一个完整的 *RPS7* 蛋白质序列。基因序列已提交 GenBank, 登录号为 JN582331。

2.3 蛋白质结构和功能分析

通过在线工具 ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) 对由 cDNA 序列推测的 *RPS7* 蛋白质序列分析发现, 其理论分子量为 21.924 ku, 等电点为 9.82。Proscan 软件 (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_prosite.html) 分析该蛋白显示富含 4 种类型多个特定功能位点, 包括 2 个 cAMP 和 cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点 (81 ~ 84: KKFS; 174 ~ 177: KKLT)、4 个蛋白激酶 C 磷酸化位点 (2 ~ 4: STK; 84 ~ 86: SGK; 101 ~ 103: SHK; 177

~ 179: TGR)、5 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 (9 ~ 12: SAAE; 29 ~ 32: TNSD; 120 ~ 123: SVYD; 160 ~ 163: TTIE; 177 ~ 180: TGRE) 和酰胺化作用位点 (136 ~ 139: VGKR)。此外, 分析结果还显示一个核糖体蛋白 S7e 蛋白家族特征位点 (74 ~ 87: RLVRELEKKFSGKH)。通过 SOPMA (<http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin>) 软件分析二级结构分析预测表明该蛋白 α 螺旋占 43.68%, 无规则卷曲占 30.53%, 延伸链占 20%, (转角占 5.79%。运用 TMpred 软件 (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) 分析蛋白跨膜区, 分析结果表明其无跨膜区。

2.4 *RPS7* 进化树的构建

应用 Clustalx1.81 软件, 将粘虫 *RPS7* 基因的氨基酸序列与 GenBank 上已登录的小菜蛾

Plutella xylostella (登录号: BAD26664)、家蚕 *Bombyx mori* (登录号: NP_001037261)、瓦氏袖蝶 *Heliconius erato* (登录号: ABS57442)、白杨叶甲 *Chrysomela tremulae* (登录号: ACY71280)、*Timarcha balearica* (登录号: CAH04319)、印鼠客蚤 *Xenopus cheopis* (登录号: ABM55455)、埃及伊蚊 *Aedes aegypti* (登录号: XP_001660169)、切叶蚁 *Acromyrmex echinator* (登录号: EGI62327)、红火蚁 *Solenopsis invicta* (登录号: ADC34227)、非洲爪蟾 *Xenopus laevis* (登录号: NP_001084502) 11 种动物的氨基酸序列进行同源性比对分析后 (图 4), 运用 MEGA 4.0 软件构建了系统发育树 (图 5)。结果表明, 粘虫与小菜蛾 *RPS7* 同源性高达 98%, 与进化对上其它 10 种动物的 *RPS7* 同源性在 96.8% ~ 98.2% 之间。从系统发育树上可以看出, 本文克隆的粘虫 *RPS7* 与小菜蛾的 *RPS7* 有非常近的亲缘关系。

2.5 *RPS7* 在粘虫脑胚后不同发育阶段的转录水平

利用荧光定量 PCR 研究 *RPS7* 在粘虫脑部胚后 11 个不同发育阶段的转录水平 (图 6), 结果显示, *RPS7* 在幼虫期表达水平随龄期的增加而增加, 5 龄期脑中相对于 4 龄期脑中 *RPS7* 表达水平呈现出显著性增加。在前蛹期 *RPS7* 基因表达量相对减少。在蛹期, *RPS7* 表达量呈现出动态变化, 在蛹的前期 *RPS7* 表达量随日龄的增加呈现逐渐递增趋势, 在第 8 天表达量达到最大, 随所呈现

```

1  GAAAACTCTTCTCTCCTGTATAGTTCTCAAGATGAGTACTAAGATCATCAAAGCCAGCGCGGCGAGCCC
1  M S T K I I K A S A A E P
72  GATGCTCTCGAGACGTCGATCTCACAGGCCCTGGTGGAGTTGGAGAACCACTCCGACCTGAAGGCGCAACTT
14  D V F E T S I S Q A L V E L E T N S D L K A Q L
144  AGGGAGCTGTACATTACAAAGGCTAAGGAAATCGAACTGCACAACAAGAAAGTGGATCATCATCTACGTGCC
38  R E L Y I T K A K E I E L H N K K S I I I Y V P
216  ATGCCAAGCTAAAGGCATTCCAGAAGATCCAGATCAGGCTGGTGGTGAATTGGAAAAGAAAGTTTCAGTGGC
62  M P K L K A F Q K I Q I R L V R E L E K K F S G
288  AAACACGTTGTGTTTCGTTGGAGACGCAAGATTCTGCCAAGCCAGCCACAAGACGCGCTCGCCAAACAAA
96  K H V V F V G D R K I L P K P S H K T R V A N K
360  CAGAAGAGGCCAGATCTAGGACCCCTGACGTCAGTGTACGACGOCATCTGGAGGACCTCGTGTTCOCGCA
110  Q K R P R S R T L T S V Y D A I L E D L V F P A
432  GAGATCGTGGGCAAGGCATCCGATCAAGCTGGACGGCTCCAGCTGATCAAGGTGCACCTAGACAAGAAC
134  E I V G K R I R I K L D G S Q L I K V H L D K N
504  CAGCAGACTACTATTGAACACAAGGTTGACACCTTCCAGTGGTATACAAGAAGCTTACGGGGCGCGAAGTT
158  Q Q T T I E H K V D T F Q S V Y K K L T G R E V
576  ACCTTTGAATTCCCGAAACCTTACTTGTAACTTAGGAATATGACTTTAC[AATAAA]CCTAAAAAATAAAA
182  T F E F P E P Y L *
646  AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图3 粘虫 *RPS7* 基因全长 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

Fig.3 Nucleotide and deduced amino acid sequence of *Mythimna separata* *RPS7* cDNA

起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA)用“▲”和“*”标示;加尾信号 AATAAA 用[]标示;AMP 和 cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点用“_”标示;蛋白激酶 C 磷酸化位点用“□”标示;酪蛋白激酶 II 磷酸化位点用“□”标示;……… 酰胺化作用位点用“=”标示;核糖体蛋白 S7 蛋白家族特征位点用阴影部分标示。

The start and stop codons are marked marked “▲” and “*””; the polyadenylation signal AATAAA is marked []; AMP- and cGMP-dependent protein kinase sites are marked and with “_”; protein kinase C phosphorylation sites are marked with “□”; casein kinase II phosphorylation sites are marked with “□”; amidation site is marked with “=”; ribosomal protein S17 signature site is shaded.

递减趋势。

3 讨论

本研究运用 RT-PCR 和 RACE 技术,克隆获得了粘虫 *RPS7* 全长为 672 bp 的 cDNA 序列,其中包括 32 bp 的 5'-UTR、67 bp 的 3'-URT 和 573 bp 的开放阅读框。基于 *RPS7* 的 cDNA 序列演绎的蛋白质序列长 190 个氨基酸。在 NCBI 进行 Blast P 搜索结果显示,粘虫 *RPS7* 与其它动物的 *RPS7* 一样都属核糖体蛋白 S7e 蛋白家族。

完全变态昆虫胚后发育脑重建在时间和空间上是个高度复杂过程。在幼虫期,大多数脑神经

母细胞重新激活而增殖形成组成成虫脑的大多数次级神经元(Booker and Truman,1987; Prokop and Technau,1991)。伴随着神经母细胞的增殖,次级神经元形成初级神经束并延伸进入相应的髓质区,直到完成变态,次级神经元才完成它的突触和形态发生(Booker *et al.*,1996; Soares *et al.*,2004; Truman *et al.*,2004; Izergina *et al.*,2009)。总而言之,这些研究结果表明,神经母细胞增殖和分化随龄期的增加而增加,在末龄期到达最高峰;在蛹期,脑重建主要表现为不同的神经髓质区的分化、位置的定位及体积的增大。这些髓质区主要包括:附髓(the accessory medulla),蕈形体(the

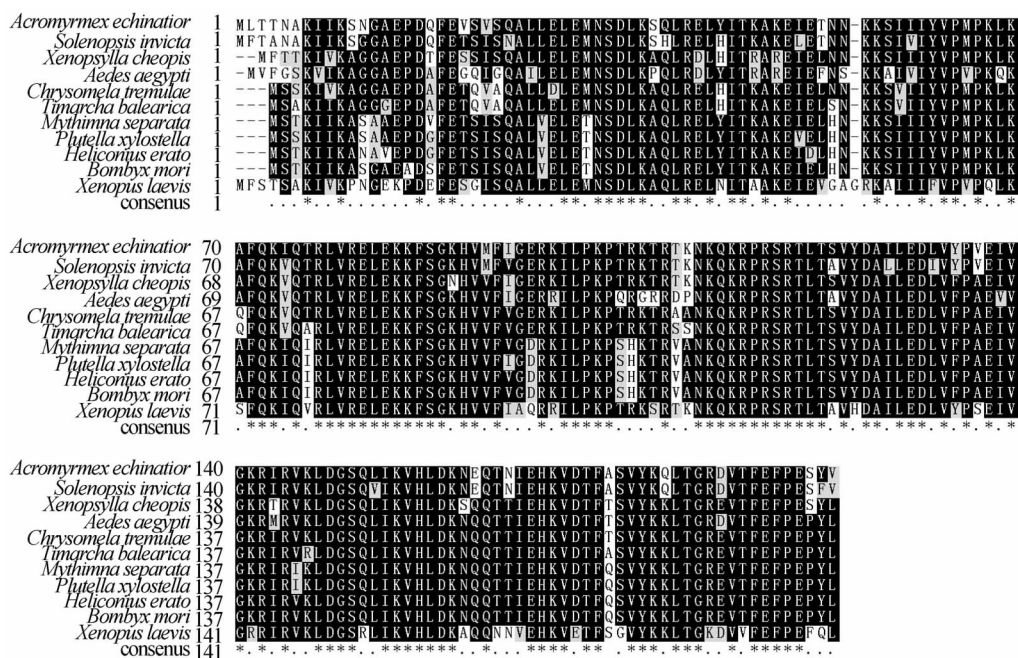


图4 粘虫 RPS7 氨基酸序列与其他 10 种不同物种的比对

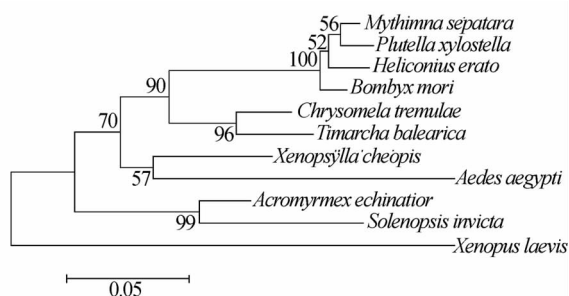
Fig. 4 Amino acid sequence alignments of RPS7 from *Mythimna separata* with orthologues from 10 other organisms

图5 基于 RPS7 氨基酸序列的粘虫和其他 10 种不同物种的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of RPS7 from *Mythimna separata* and 10 other organisms

mushroom bodies), 触角叶 (the antennal lobes), 中心复合体 (the central body) 和视叶 (the optic lobes)。这些髓质区体积在蛹期的前期急剧增加, 在蛹期的后期结束增加 (Nordlander and Edwards, 1969; Boquet *et al.*, 2000; Dumstrei *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2004; Awasaki *et al.*, 2008; Groh and Rossler, 2008; Izergina *et al.*, 2009; Huetteroth *et al.*, 2010)。RPS7 在脑胚后不同发育阶段的表达量呈现动态变化, 在幼虫期表达水平随龄期的增加而增加, 在蛹的前期 RPS7 表达量随日龄的增

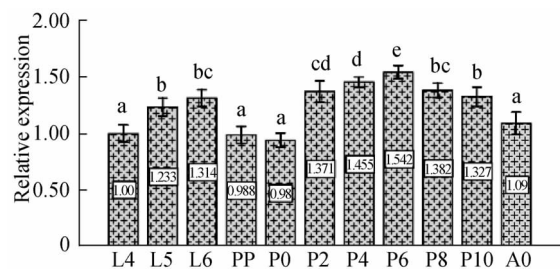


图6 RPS7 在粘虫脑部胚后 11 个不同发育阶段的表达

Fig. 6 Relative expression profiles determined by real-time PCR for *PRS7* mRNA in the brains at different stages during postembryonic development

L4, 4 龄幼虫; L5, 5 龄幼虫; L6, 6 龄幼虫; PP, 前蛹; P0, 新蛹化的蛹; P2, 2 日龄蛹; P4, 4 日龄蛹; P6, 6 日龄蛹; P8, 8 日龄蛹; P10, 10 日龄蛹; A0, 新羽化的成虫; 图中数值为平均值 $\pm$ 标准差 ($n = 3$); 不同小写英文字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

L4. forth-instar larvae; L5. fifth-instar larvae; L6. sixth-instar larvae; PP. prepupae (2-day-prepupae); P0. 0-day-old pupae; P2. 2-day-old pupae; P4. 4-day-old pupae; P6. 6-day-old pupae; P8. 8-day-old pupae; P10. 10-day-old pupae; A0. 0-day-old adults. All expression levels are shown relative to the level in the brains of the fourth-instar larvae. Data are mean $\pm$ SE ($n = 3$). Histograms with different letters indicate significantly different at 0.05 level.

加呈现逐渐递增趋势,在第 8 天表达量达到最大,随后呈现递减趋势。这种动态变化趋势与脑重建过程脑细胞行为一致,因此作者推测 *RPS7* 可能参与脑胚后发育重建。*RPS7* 在脑重建中的具体功能还需要进一步去证实。

本实验首次成功获得了粘虫 *RPS7* 的全长 cDNA 和建立了 *RPS7* 在粘虫脑部胚后发育的表达模式,是对昆虫核糖体蛋白研究的重要补充,为今后更多核糖体蛋白序列的获得及相关功能研究提供了基础资料。

致谢:感谢西北农林科技大学无公害农药研究中心张兴教授对粘虫虫源的惠赠!

参考文献 (References)

- Annilo T, Laan M, Stahl J, Metspalu A, 1995. The human ribosomal protein S7-encoding gene: isolation, structure and localization in 2p25. *Gene*, 165 (2):297—302.
- Awasaki T, Lai SL, Ito K, Lee T, 2008. Organization and postembryonic development of glial cells in the adult central brain of *Drosophila*. *J. Neurosci.*, 28 (51):13742—13753.
- Booker R, Babashak J, Kim JB, 1996. Postembryonic neurogenesis in the central nervous system of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. III. Spatial and temporal patterns of proliferation. *J. Neurosci.*, 29 (2):233—248.
- Booker R, Truman JW, 1987. Postembryonic neurogenesis in the CNS of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. I. Neuroblast arrays and the fate of their progeny during metamorphosis. *J. Comp. Neurol.*, 255 (4):548—559.
- Boquet I, Hitier R, Dumas M, Chaminade M, Preat T, 2000. Central brain postembryonic development in *Drosophila*: implication of genes expressed at the interhemispheric junction *J. Neurosci.*, 42 (1):33—48.
- Brooks CL, Gu W, 2006. p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. *Mol. Cell*, 21 (3):307—315.
- Chen D, Zhang Z, Li M, Wang W, Li Y, Rayburn E, Hill D, Wang H, Zhang R, 2007. Ribosomal protein S7 as a novel modulator of p53-MDM2 interaction: binding to MDM2, stabilization of p53 protein, and activation of p53 function. *Oncogene*, 26 (35):5029—5037.
- Dumstre K, Wang F, Nassif C, Hartenstein V, 2003. Early development of the *Drosophila* brain: V. Pattern of postembryonic neuronal lineages expressing DE-cadherin. *J. Comp. Neurol.*, 455 (4):451—462.
- Groh C, Rossler W, 2008. Caste-specific postembryonic development of primary and secondary olfactory centers in the female honeybee brain. *Arthropod. Structur. Dev.*, 37 (6):459—468.
- Higa S, Yoshihama M, Tanaka T, Kenmochi N, 1999. Gene organization and sequence of the region containing the ribosomal protein genes RPL13A and RPS11 in the human genome and conserved features in the mouse genome. *Gene*, 240 (2):371—377.
- Hou BK, Dang BY, Zhou YH, Chen ZH, 2000. Cloning and sequence analysis of the gene rps7 coding for chloroplast ribosomal protein CS7 from *Brassica napus*. *Acta Phytophysiological Sinica*, 26 (4):350—358.
- Huetteroth W, EI Jundi B, EI Jundi S, Schachtner J, 2010. 3D-reconstructions and virtual 4D-visualization to study metamorphic brain development in the sphinx moth *Manduca sexta*. *Front. Syst. Neurosci.*, 4:7.
- Izergina N, Balmer J, Bello B, Reichert H, 2009. Postembryonic development of transit amplifying neuroblast lineages in the *Drosophila* brain. *Neural Development*, 4:44.
- Li K, Xi GS, Yin H, Lain ZM, 2010. Molecular cloning, characterisation and expression analysis of a QM homologue in *Mythimna separata* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae). *Aust. J. Entomol.*, 50 (2):152—159.
- Nordlander RH, Edwards JS. 1969. Postembryonic brain development in the monarch butterfly, *Danaus plexippus* L. *Dev. Genes Evol.*, 162 (3):197—217.
- Prokop A, Technau GM, 1991. The origin of postembryonic neuroblasts in the ventral nerve cord of *Drosophila melanogaster*. *Development*, 111 (1):79—88.
- Soares PAO, Delabie JHC, Serrao JE, 2004. Neuropile organization in the brain of *Acromyrmex* (Hymenoptera, Formicidae) during the post-embryonic development. *Braz. Arch. Biol. Techn.*, 47:635—641.
- Truman JW, Schuppe H, Shepherd D, Williams DW, 2004. Developmental architecture of adult-specific lineages in the ventral CNS of *Drosophila*. *Development*, 131 (20):5167—5184.
- Vierula PJ, 1997. Cloning and characterization of a *Neurospora crassa* ribosomal protein gene, crps-7. *Curr. Genet.*, 31 (2):139—143.
- Wool IG, Chan YL, Gluck A, 1995. Structure and evolution of mammalian ribosomal proteins. *Biochem. Cell Biol.*, 73 (11/12):933—947.
- Zhu Y, Poyurovsky MV, Li Y, Biderman L, Stahl J, Jacq X, Prives C, 2009. Ribosomal protein S7 is both a regulator

- and a substrate of MDM2. *Mol. Cell*, 35 (3):316—326.
- 侯怡铃, 伍春莲, 侯万儒, 郝彦哲, 张田, 2009. 大熊猫核糖体蛋白亚基 RPS7 基因的克隆及序列分析. 第三军医大学学报, 31 (18):1740—1743.
- 李柯, 阴环, 奚耕思, 廉振民, 2010. 粘虫 β -Actin 基因 cDNA 的克隆、序列分析及表达量检测. 昆虫知识, 47 (6):1089—1094.
- 周奕华, 侯丙凯, 石东乔, 肖宇红, 石锐, 胡赞民, 陈正华, 2001. 杨树叶绿体 3' rps12 基因, rps7 基因和 ndhB 基因片段的克隆及序列分析. 中国生物化学与分子生物学报, 17 (5):606—616.