

马尾松毛虫腺苷酸转移酶基因的克隆与分析

翁宏飏¹, 牛宝龙¹, 何丽华¹, 沈卫锋¹, 王守先^{1,2}, 吾中良³, 蒋平³, 孟智启¹

(¹浙江省农业科学院蚕桑研究所昆虫分子生物学实验室, 杭州 310021; ²浙江林学院, 浙江临安 311300; ³浙江省林业有害生物防治检疫局, 杭州 310020)

摘要: 【目的】克隆马尾松毛虫腺苷酸转移酶基因。【方法】采用 RACE 方法克隆基因, 利用软件分析推导蛋白的保守结构域, 并与已报道的其它 8 种昆虫腺苷酸转移酶进行比较, 并构建系统树, 用 southern 法分析该基因在单倍体基因组中的拷贝数。【结果】获得马尾松毛虫腺苷酸转移酶基因全长 cDNA (GenBank 登录号: EF194157), 该基因无内含子, 在烟草天蛾 (*M. sexta*)、棉铃虫 (*H. armigera*)、家蚕 (*B. mori*) 蜜蜂 (*A. mellifera*)、绿蝇 (*L. cuprina*)、果蝇 (*D. melanogaster*)、蚊子 (*A. gambiae*) 等昆虫间高度保守。基因组酶切后呈单一 Southern 杂交带。【结论】马尾松毛虫腺苷酸转移酶基因高度保守, 在基因组中单拷贝存在。

关键词: 松毛虫; 腺苷酸转移酶; 克隆

Cloning and Primary Study of Adenine Nucleotide Translocase Gene in *Dendrolimus punctatus*

WENG Hong-biao¹, NIU Bao-long¹, HE Li-hua¹, SHEN Wei-feng¹, WANG Shou-xian^{1,2}, WU Zhong-liang³, JIANG Ping³, MENG Zhi-qi¹

(¹Laboratory of Entomo-Molecular Biology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021; ²Zhejiang Forestry University, Lin'an 311300, Zhejiang; ³Forest Pest Control and Quarantine Bureau of Zhejiang Province, Hangzhou 310020)

Abstract: 【Objective】 A complementary DNA clone encoding the adenine nucleotide translocases in *Dendrolimus punctatus* has been identified. 【Method】 RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) method was used to get the complete cDNA sequence. The sequence was analyzed with software. 【Result】 The full length of adenine nucleotide translocases cDNA was cloned. (GenBank accession number: EF194157). The sequence contains a single open reading frame that encodes a polypeptide 300 amino acids in length. This polypeptide shows extensive similarities to the known eukaryotic translocase polypeptides, the similarity being greatest (up to 80% identity) to the Lepidoptera ADP/ATP translocases. 【Conclusion】 Adenine nucleotide translocases of *Dendrolimus punctatus* has homology with that of other insects. Southern blot analysis suggests that a single copy of this gene is present per haploid genome.

Key words: *Dendrolimus punctatus*; Adenine nucleotide translocases; Clone

0 引言

【研究意义】线粒体是细胞内主要的 ATP 生产中心, 在细胞凋亡、信号转导的发生过程中起着非常重要的作用。腺苷酸转移酶 (adenine nucleotide translocase, ANT) 是真核细胞的线粒体内膜上的转运蛋白家族成员^[1-3], 在线粒体内膜上分布最为丰富, 约占细胞线粒体内膜总蛋白的 10%^[1], 作为重要代谢物的载体, 参与线粒体的各种活动^[3]。马尾松毛虫是中

国重要的经济林害虫, 开展松毛虫腺苷酸转移酶研究, 有利于解析害虫生命代谢网络、了解 ANT 保守结构在昆虫进化中的意义, 同时对新农药的研制具有一定的指导作用。【前人研究进展】ANT 蛋白由两个完全相同, 分别含一个 ATP/ADP 结合位点的亚基组成, 通过其构象的变化, 实现细胞质中 ADP 和线粒体内 ATP 间的跨膜交换^[2,4,5], 是生物体内能量产生与能量消耗的重要连接^[6], 生物体大约 1/2~1/3 的基础电子传递由 ANT 催化, 是保持细胞内能量代谢的关键成

收稿日期: 2006-12-26; 接受日期: 2007-06-04

基金项目: 浙江省科技厅重点计划项目 (2004C22037)

作者简介: 翁宏飏 (1970-), 男, 浙江衢州人, 副研究员, 博士, 研究方向为昆虫遗传学。Tel: 0571-86404173; E-mail: wenghb2006@126.com。
通讯作者孟智启 (1953-), 男, 浙江杭州人, 研究员, 研究方向为昆虫分子生物学。Tel: 0571-86404173; E-mail: csswsjz@zaas.org

分^[7,8]。ANT 虽非组成线粒体内膜上通透转换孔洞的必要成分,但与内质网与线粒体之间的 Ca^{2+} 离子转移有关,参与线粒体 Ca^{2+} 离子内环境平衡^[9,10]。近来的研究表明,ANT 在细胞凋亡诱导过程中有重要作用^[11,12],是各种细胞凋亡因子或凋亡抑制因子的作用靶位^[13~16],细胞内具氧化活性的细胞凋亡诱导因子通过氧化 ANT 蛋白的巯基基团,诱导线粒体肿胀和线粒体内的 SOD、细胞色素 C 的释放^[17],而细胞色素 C 则可激活细胞凋亡代谢阶梯^[4,18]。大多数真核生物至少有 2 个不同的基因编码 ANT 蛋白^[7],在从真菌到哺乳动物的已经研究中,ANT 蛋白无论在一级还是在高级结构上均高度保守,都含有 3 个典型的穿膜结构域。

【本研究切入点】目前已从多种昆虫、哺乳动物、真菌及植物中克隆了 *ant* 基因,但未见有关松毛虫 (*Dendrolimus punitatus*) *ant* 基因及蛋白的报道。松毛虫属全变态昆虫,蛹期发生着幼虫组织器官的凋亡、解离,及成虫组织器官的形成等剧烈的发育变化。【拟解决的关键问题】本研究利用 *ant* 基因编码序列的保守性,参考多种鳞翅目昆虫的 *ant* 基因序列,设计兼并引物,对松毛虫脂肪体 mRNA 进行 RT-PCR,获得松毛虫 *ant* 基因的全长 cDNA 序列,分析编码蛋白的保守结构,及在 8 种昆虫中的亲缘关系,并利用 Southern 法分析 *ant* 基因在松毛虫基因组中的拷贝数,研究结果丰富了腺苷酸转移酶蛋白序列信息,并为进一步了解松毛虫蛹变态机制提供前期的研究基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 虫源 从浙江省永康采集马尾松毛虫蛹,实验室传代饲养扩大种群。实验室条件下,以消毒后的新鲜马尾松松针饲养马尾松毛虫幼虫至化蛹,饲养温度 27℃,光周期为 D:L=16:8。

1.1.2 试剂 克隆用细菌 *E. coli* TG1 为浙江省农业科学院昆虫分子生物学实验室保存;T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、克隆载体 pMD-T 为 TaKaRa 公司产品;反转录试剂盒为 TOYOBO 公司产品;特异引物由上海生工生物工程公司合成;mRNA 分离纯化系统 (PolyAT tract mRNA isolation system) 为 Promega 公司产品;RACE 试剂盒为 Invitrogen 产品; N^+ 尼龙膜、预杂交液、杂交液购自鼎国生物技术公司;DIG-11-dUTP、Digoxigenin 检测试剂盒购自 Roche 公司。

1.2 松毛虫蛹脂肪体总 RNA 的提取

参照文献^[19],取化蛹后 4~5 d 的马尾松毛虫蛹

脂肪体组织 0.5 g,加入 10 ml Trizol 冰浴匀浆,然后加入终浓度为 30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的糖元混匀,室温下放置 5 min。加入 2 ml 氯仿,剧烈混合 3 min,4℃ 下 12 000 r/min 离心 15 min。将上清液移至无菌且无 RNase 的离心管中,加入 2 倍体积乙醇,-20℃ 放置 10 min,4℃ 下 12 000 r/min 离心 5 min。弃上清液,以 75% 乙醇洗涤沉淀 2 次,稍干后,用无 RNase 的灭菌水溶解沉淀。

1.3 松毛虫全长 cDNA 的克隆

1.3.1 RT-PCR 引物设计 从 GenBank 数据库中获得 3 种鳞翅目昆虫 *ant* 基因的编码序列,家蚕 (*Bombyx mori*), AY227000.1;烟草天蛾 (*Maduca sexta*) AY186577.1;棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) AY253868.1,根据序列保守性,设计基因保守区的 RT-PCR 引物 Dp ANT F 和 Dp ANT R。

Dp ANT F: 5'-TCGCKAARGATTTCCTGGCTGTGGG-3';

Dp ANT R: 5'-SAGGARGTTGGAGAAGGCTCCCTTG-3'。

1.3.2 RT-PCR 的 cDNA 第一链合成 cDNA 的合成按反转录试剂盒说明书步骤进行。

1.3.3 RT-PCR RT-PCR 在 Eppendorf PCR 仪上进行。扩增体系为 50 μl ,其扩增体系组成为 10 \times PCR 缓冲液 5.0 μl ,0.5 μl dNTP (10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$),0.2 μl Taq DNA 聚合酶 (1 U),1.0 μl Dp ANT R (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),4.0 μl Dp ANT F (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),2 μl cDNA,用超纯水补足 50 μl 。扩增程序为:94℃ 1 min,60℃ 1 min,72℃ 1 min,36 个循环后 72℃ 延伸 10 min。获得长约 750 bp 的片段,以 T 载体法克隆 PCR 产物,阳性克隆子送上海英骏生物技术有限公司测序。测序结果经 BLAST 检索序列数据库,确定所克隆序列为松毛虫 *ant* 基因编码序列。

1.3.4 脂肪体 mRNA 的分离纯化 mRNA 分离纯化按 PolyAT tract mRNA Isolation System 的说明书进行。mRNA 溶于 100 μl 无 RNase 的纯水中。

1.3.5 3'-RACE 和 5'-RACE 为了获得全长 cDNA 序列,利用 RACE 法克隆 3' 和 5' 端的序列。具体步骤按 GeneRacer Kit (Invitrogen) 的说明书进行。3'-RACE 的引物分别为序列特异的正向引物 ANT3 和试剂盒提供的通用反向引物,PCR 扩增后得到长约 400 bp 的片段,PCR 产物回收后经 T 载体克隆后,测序确定与已克隆的 *ant* 基因编码区序列有重叠,从而获得 3' 端序列。ANT3: 5'-GTACGTAGGCGYATGATGATGCAGTC-3'。

5'-RACE 的引物分别为试剂盒提供的正向引物和序列特异的反向引物 Dp AR。PCR 结束后,以 1 μl PCR 产物为模板,进行巢式 PCR。引物分别为试剂盒提供的正向巢式 PCR 引物和序列特异的反向巢式引物 Dp ANT5。巢式 PCR 得到 420 bp 产物,经克隆、测序后证实该片段与 *ant* 基因编码区 5'端有重叠,从而获得 5'端序列。

Dp AR: 5'-AGAACTGCGTATTCTTTGTCGACGCC-3';

Dp ANT5: 5'-CTTGCTTGACTTGTCTTGAAGGCG-3'。

1.4 Southern 杂交

1.4.1 基因组 DNA 的提取和纯化 解剖大龄松毛虫幼虫的丝腺,洗净后在预冷的研钵中加液氮快速研磨成为粉末状,加抽提缓冲液(10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH 8.0; 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA pH 8.0; 0.5% SDS),混匀后转入离心管中,加蛋白酶 K 至终浓度 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$,56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温 3~5 h 后离心,上清液用酚:氯仿:异戊醇=25:24:1(v:v:v)、氯仿各抽提 1 次,上清液用 2 倍体积冰无水乙醇沉淀 DNA,沉淀用 70%乙醇洗涤 2 次,加 TE 溶解;加 RNA 酶 H 至终浓度 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 2 h 以消化 RNA,再用酚:氯仿:异戊醇=25:24:1(v:v:v)、氯仿各抽提 1 次后,用 2 倍体积冰无水乙醇沉淀 DNA,沉淀用 70%乙醇洗涤 2 次,加 TE 溶解,电泳检查 DNA 质量,经分光光度计(Beckman DU640)检测浓度和纯度。

1.4.2 基因组 DNA 的限制性内切酶酶解 取 60 μg 高分子量基因组 DNA,分别以 *EcoR* V、*Pst* I、*Apa* I、*Bam* H I、*Hind* III 酶切过夜,酶切产物经无水乙醇沉淀后,溶于 30 μl 超纯水。4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,0.7%的琼脂糖凝胶缓慢(<1 v/cm)电泳过夜。

1.4.3 转膜 按《分子克隆实验指南》^[20],用毛细管转移法将变性后的 DNA 从琼脂糖凝胶转移到 N⁺尼龙膜上。

1.4.4 DIG 标记探针的制备 以含松毛虫 *ant* 序列的重组质粒为模板,Dp ANT F、Dp ANT R 为引物,反应体系中,标记核苷酸 DIG-11-dUTP:dTTP 为 1:2,PCR 扩增制备松毛虫 *ant* 基因的探针。

1.4.5 杂交及检测 按《分子克隆实验指南》^[20]中核酸杂交操作步骤进行探针杂交。杂交检测按试剂盒的说明书操作。

1.5 数据分析

cDNA 序列登录 GenBank。用 Dnaman 软件进行

同源性分析和序列拼接,将 DNA 序列转换成氨基酸序列。在 GenBank 数据库中 BlastX 搜索同源性序列,所需参数均采用默认值,并利用 Phylip 软件的 protdist 程序计算进化距离,replicate 参数设为 1000,分析 8 种昆虫 ANT 蛋白的进化关系。将氨基酸序列输入 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi> 上用 CDDv2.11-17402PSSMs,分析松毛虫 ANT 蛋白保守结构域。

2 结果与分析

2.1 松毛虫 *ant* 基因的克隆和分析

用 *ant* 基因保守区引物 Dp ANT F 和 Dp ANT R,RT-PCR 的扩增后获得约 800 bp 的产物,经 T-vector 克隆测序。测序结果经 BLAST 检索序列数据库发现,该序列与家蚕、棉铃虫、烟草天蛾 *ant* 基因的同源性为 85%,确定该片段为松毛虫 *ant* 基因的编码序列。分别利用该序列 3'和 5'区设计特异的 3'-RACE 正向引物 ANT3 和 5'-RACE 反向引物 Dp AR,及反向巢式引物 Dp ANT5。3'和 5'-RACE 分别获得 380 bp 和 420 bp 的 PCR 产物,克隆测序发现,序列与松毛虫 *ant* 编码序列有重叠,为 *ant* 基因 mRNA 的 5'和 3'序列,3 个序列经软件拼接后得到松毛虫 *ant* 基因完整的 cDNA 序列(图 1)。GenBank 登录号:EF194157。

分析松毛虫 *ant* cDNA 全序列,发现仅有 1 个 ORF,起始密码子在 133 位,终止密码子在 1033 位,推测编码蛋白含有 300 个氨基酸,预测其相对分子量为 32.9 kD,等电点(pI)为 10.06。输入 <http://www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/SubLoc/> 预测该蛋白为线粒体蛋白(Reliability index: RI=6; Expected accuracy = 97%)。保守结构功能域分析,发现该推测编码蛋白序列与目前已知的蛋白质结构功能域数据库中许多物种的腺苷酸转移酶具有相似的结构功能域,在其第 10~103 位、第 112~208 位及第 224~300 位分别为线粒体穿膜结构域(图 1)。按 cDNA 序列设计引物,以基因组 DNA 为模板,进行扩增,PCR 产物序列与 cDNA 一致,表明松毛虫 *ant* 基因无内含子。

2.2 不同物种间 *ant* 基因的同源性分析

将松毛虫 *ant* 基因(EF194157)与同为鳞翅目昆虫的家蚕(*Bombyx mori*, AY227000.1)、烟草天蛾(*Manduca sexta*, AY186577.1),棉铃虫(*Helicoverpa armigera*, AY253868.1)及蜜蜂(*Apis mellifera*, NM_001010975)、绿蝇(*Lucilia cuprina*, AF218587)、果蝇(*Drosophila melanogaster*, AAB31734)、蚊子

1 AGATTCAA AAAATCAGGGTTCGTTTCGTTGTTTCCAAATCAGTGTGTGCCGTAGTTC

61 ACCTCGTCGACAACGAGGTAATCACCCAGTCCCGACCTCGCAGATAGATCAAATGTGCA

121 AAGGCTTAGCCGATGCGGTGCGCTGCGAGTTCGACGATTTTCGCCAAGGATTTCTGGCT

1 M R S R C R S T I F A K D F L A

181 GGTGGCATCTCTGCCGCGGTGTCCAAGACCGCCGTCGACCCATCGAGCGCGTCAAGTTG

17 G G I S A A V S K T A V A P I E R V K L

241 CCGCTTCAAGTGCAGCATGTGAGCAAACAGATCGCCGACAGCCAGCGTTACAAGGGCATC

37 P L Q V Q H V S K Q I A A D Q R Y K G I

301 GTCGACGCTTTCGTCGCGATCCCGAGGGGCAAGGGCTTCTTTCATTCTGCGCTGGTAAC

57 V D A F V R I P R G Q G L L S F W R G N

361 CTCGCCAAGCATCATAGTGTCTCCCGACAGCGCGCTCAACTTCGCGCTTCAAGGACAAG

77 L A N V I R C F P T Q A L N F A F K D K

421 TACAAGCAGGTGTTCTCGGTGGCGTGCACAAGAATACGCAAGTTCGCGCTTATTTGCGG

97 Y K Q V F L G G V D K N T Q F W R Y F A

481 GGAATCTGCGATCTGGTGGTCCCGCTGGAGCGACCTCGCTGCTTGTATACCCCTC

117 G N L A S G G P A G A T S L C F V Y P L

541 GACTTCGCCCGTACCGTCTCGCCGCGGATGTTGAAAAGGCGATGGTCAGCGGAATTC

137 D F A R T R L A A D V G K G D G Q R E F

601 TCCGGCCTCGGCAACTGCGCTCACAAGATCTTCAAGTCAAGTGGCCTTACAGGCTGTAC

157 S G L G N C L T K I F K S D G L T G L Y

661 AGGGGTTTGGGATATCCGTACAGGTATTATCATCTACCGTGGCGCATACTTTGGTTTC

177 R G F G V S V Q G I I I Y R A A Y F G F

721 TACGACACAGCCCGCGCATGTTGCCCGACCCCAAGAACACCCCATCGTCATCAGCTGG

197 Y D T A R G M L P D P K N T P I V I S W

781 GCCATCGAAAAACCGTCACCACAGTTCGCCGCGCATCTTTCATATCCGTTTCGATACAGTA

217 A I E K T V T T V A G I I S Y P F D T V

841 CGTAGCGTATGATGATGACGAGTTCGCGAGCCAGAGTGACATGCTGTACAAGAACACA

237 R R R M M M Q S G R A K S D M L Y K N T

901 CTGCATTGCTGGCCACCATCGCCAAGACAGAGGGTGGTGGTCTTCTTCAAGGGAGCC

257 L H C W A T I A K T E G G G A F F K G A

961 TTCTCCAATGCTCTCAGAGGACAGGTGGTGGCTTGTGCTTATATGATGAGATC

277 F S N V L R G T G G A F V L V L Y D E I

1021 AAGAAGCTCCTCTAAACATATTGTAAGAATGTTACCATTACTTAACATAAATGTGATTC

297 K K L L *

1081 AATCACACAGCCACTCCCTCAATCTTGTATTAATAGACGCGAAAAAGAAATCTAGTAAC

1141 TTATTTTGTAGTAAATAAGTGTATACATTGATTCAAAAAAAAAAAGTGCACCAAAAC

1201 GTGGCTTGGCAGCAATC

下划线部分为探针的 PCR 引物区, 点线为 Poly A, 终止密码子用*标出, 方框内为蛋白序列的线粒体穿膜结构域, 下划虚线为 poly A 区
 The deduced amino acid sequence is showed under the nucleotide sequence, the primers of probe are underlined, the asterisk indicates the stop codon, and the square frames represent the mitochondrial carrier protein conserved domains, the poly A is showed by dotted lines, sequence data has been submitted to GenBank under accession number EF194157

图 1 松毛虫 *ant* 基因的结构
 Fig. 1 Structure of *Dp ant* gene

(*Anopheles gambiae*, AY227001) 等昆虫进行同源比较发现, 在核酸水平上一致性很高。其与家蚕和烟草天蛾的一致性最高 (85%), 与蜜蜂的最低但也达到 72%, 其余均在 80% 左右。氨基酸序列的一致性在 80% 以上, 同源性都在 90% 左右 (图 2)。从 Phylip 软件构建的 8 种昆虫 ANT 系统发育树可以看出, 4 种鳞翅目昆虫的 ANT 蛋白亲缘关系较近, 可归为一类, 而其中家蚕和烟草天蛾的亲缘关系更近; 双翅目的果蝇、绿蝇的分化较晚, 而蚊子 ANT 蛋白分化最早, 蜜蜂 ANT 的进化介于鳞翅目昆虫与双翅目昆虫之间 (图 2), 在 4 种鳞翅目昆虫中, 松毛虫与其余 3 种昆虫的遗传关系最远。

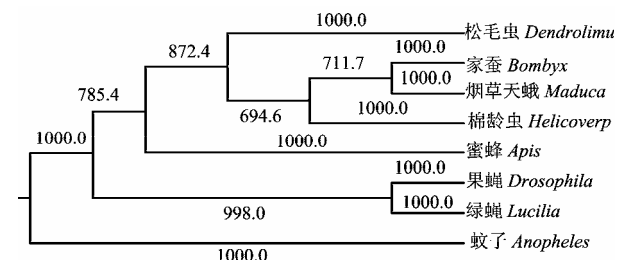


图 2 昆虫 ANT 的系统发育树
 Fig. 2 Phylogenetic tree of insects ANT

2.3 Southern 杂交分析

基因组 DNA 的 Southern 杂交分析松毛虫 *ant* 基因在单倍体基因组中的拷贝数。基因组 DNA (60 μg) 分别以 *Bam*H I (BI)、*Eco*R V (EV)、*Hind*III (H III)、*Pst*I (PI) 和 *Apa*I (AI) 完全酶切, 电泳后转 N⁺尼龙膜, 以 Dig 标记的松毛虫 *ant* 基因编码序列为探针, 进行 Southern 杂交, 结果 5 种限制性内切酶均产生单一条带 (图 3), 表明在松毛虫单倍体基因组中, *ant* 基因单拷贝存在。

3 讨论

细胞凋亡是生物体生命过程中不可或缺的组成部分, 正常的生命体一方面通过细胞分裂产生新的细胞, 一方面又通过程序性细胞凋亡来清除无用的组织细胞。全变态昆虫的蛹期, 是一个过渡期, 衔接幼虫期和成虫期的发育, 实现幼虫发育向成虫发育的转变, 体内经历着幼虫组织器官的凋亡解离和成虫组织器官的形成。20 世纪 90 年代后期至今, 随着对线虫和哺乳动物细胞凋亡机制研究的深入, 对果蝇、家蚕等昆

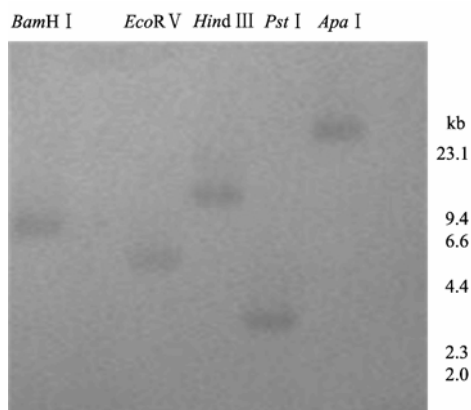


图 3 松毛虫基因组 Southern 分析

Fig. 3 Southern blot analysis of *Dendrolimus punctatus* genomic DNA

虫细胞凋亡的遗传调控级联系统的研究也取得了重要进展, 先后鉴定了多个细胞凋亡调控网络中的级联反应基因^[21]。

本研究以马尾松毛虫蛹为材料, 根据 *ant* 基因的保守性, 设计引物, 并利用 3'-、5'-RACE 方法获得松毛虫 *ant* 基因的全长 cDNA 序列, 分析推导的氨基酸序列发现, 该 cDNA 序列可编码含典型穿膜结构的 ANT 蛋白, 与果蝇 ANT2 和家蚕 ANT 蛋白的同源性分别达 93% 和 96%, 说明该 ANT 蛋白在 3 个物种中高度保守。Southern 杂交表明本研究克隆松毛虫 *ant* 基因在单倍体基因组中单拷贝存在。

ant 基因研究表明, 在不同的染色体位点上存在编码 ANT 蛋白的同功基因, 这些同功基因具有相似的结构, 编码区序列同源率为 77%~79%, 氨基酸序列同源率达 98%, 而且不同物种间, 同功基因编码的 ANT 蛋白的相似性也高达 94%~98%, 但这些基因在 5'非编码区序列及启动子元件的组成上有较大差异, 因而具有不同的组织特异转录方式^[6,22]。大多数哺乳动物含有 3 个不同 ANT 蛋白, 对应于 3 个不同的基因。ANT 蛋白的表达不仅仅由生长活动调节, 而且具有组织专一特性。Sp1 因子可抑制 *ant2* 启动子的转录活性^[23], 而 *ant1* 则由 TGF- β 1 因子调控^[24]。果蝇基因组中有两个 *ant* 基因, 分别称为 *SesB* 和 *ant2*, 两者在核酸水平和蛋白水平的一致性分别为 72% 和 78%。果蝇 *ant* 基因在基因组中呈串联重复, 并从相同启动子转录, 通过不同的剪接方式获得各自的 mRNA^[7]。近来研究发现, 在果蝇 ANT 基因 5'侧翼区, 存在有 3 个可能的 DNA 复制相关序列 (DRE), 转录调节因

子通过与 DRE 位点结合, 正向调控 *ant* 基因的转录^[25]。在本研究中, 仅克隆获得一个与果蝇 *ant2* 基因高度同源的马尾松毛虫 *ant* 基因, 这可能是因为设计 RACE 引物时, 仅以 3 种鳞翅目昆虫 *ant* 基因序列作为参考序列, 而这 3 个 *ant* 基因序列均与果蝇 *ant2* 高度同源。同时, 用于 cDNA 合成的 mRNA 仅来源于化蛹后 4~5 d 的马尾松毛虫蛹脂肪体组织, 而 *ant* 基因的表达具有组织特异性, 因而不能排除存在其它的松毛虫 *ant* 基因。利用克隆的 cDNA, 结合松毛虫基因组序列, 可进一步分析松毛虫 *ant* 基因 5'上游区域内的表达调控元件, 研究其表达调控方式。松毛虫蛹变态过程中, 作为线粒体内膜上的主要穿膜蛋白, ANT 蛋白是否参与幼虫组织的细胞凋亡过程, *ant* 是否属于细胞凋亡调控网络中的级联反应基因, 有待进一步研究。

4 结论

克隆的马尾松毛虫 *ant* 基因 cDNA 全长 1 217 bp, 其中起始密码子 ATG 位于 133~135 bp, 终止密码子 TAA 位于 1 033~1 035 bp, 阅读框全长 900 nt, 编码 300 个氨基酸。马尾松毛虫与家蚕、烟草天蛾、棉铃虫、蜜蜂、绿蝇、果蝇、蚊子等昆虫的 ANT 蛋白在进化上高度保守。马尾松毛虫 *ant* 基因无内含子, 在单倍体基因组中单拷贝存在。

References

- [1] Santamaria M, Lanave C, Saccone C. The evolution of the adenine nucleotide translocase family. *Gene*, 2004, 333: 51-59.
- [2] Bof M, Brandolin G, Satre M, Klein G. The mitochondrial adenine nucleotide translocator from *Dictyostelium discoideum*, functional characterization and DNA sequencing. *European Journal of Biochemistry*, 1999, 259: 795-800.
- [3] Brand M D, Pakay J L, Ocloo A, Kokoszka J, Wallace D C, Brookes P S, Cornwall E J. The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content. *Biochemical Journal*, 2005, 392: 353-362.
- [4] Carroll A K, Clevenger W R, Szabo T, Ackermann L E, Pei Y, Ghosh S S, Glasco S, Nazarbachi R, Davis R E, Anderson C M. Ectopic expression of the human adenine nucleotide translocase, inform 3(ANT-3). Characterization of ligand binding properties. *Mitochondrion*, 2005, 5: 1-13.
- [5] Thuswaldner S, Lagerstedt J O, Rojas-Stutz M, Bouhidel K, Der C, Leborgne-Castel N, Mishra A, Marty F, Schoefs B, Adamska I, Persson B L, Spetea C. Identification, expression, and functional

- analyses of a thylakoid ATP/ADP carrier from *Arabidopsis*. *Journal of Biochemistry*, 2007, 282: 8848-8859.
- [6] Doerner A, Pauschinger M, Badorff A, Noutsias M, Giessen S, Schulze K, Bilger J, Rauch U, Schultheiss H P. Tissue-specific transcription pattern of the adenine nucleotide translocases isoforms in humans. *FEBS Letters*, 1997, 414: 258-262.
- [7] Zhang Y Q, Roote J, Brogna S, Davis A W, Barbash D A, Nash D, Ashburner M. Stress sensitive B encodes an adenine nucleotide translocase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 1999, 153: 891-903.
- [8] Brustovetsky N, Klingenberg M. Mitochondrial ADP/ATP carrier can be reversibly converted into a large channel by Ca^{2+} . *Biochemistry*, 1996, 35: 8483-8488.
- [9] Kokoszka J E, Waymire K G, Levy S E, Sligh J E, Cai J Y, Jones D P, MacGregor G R, Wallace D C. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature*, 2004, 427: 461-465.
- [10] Wieckowski M R, Szabadkai G, Wasilewski M, Pinton P, Duszynski J, Rizzuto R. Overexpression of adenine nucleotide translocase reduces Ca^{2+} signal transmission between the ER and mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 348: 393-399.
- [11] Halestrap A. Biochemistry: a pore way to die. *Nature*, 2005, 434: 578-579.
- [12] Kantrow S P, Tatro L G, Plantadosi C A. Oxidative stress and adenine nucleotide control of mitochondrial permeability transition. *Free Radical Biology and Medicine*, 2000, 28(2): 251-260.
- [13] Garcia N, Martinez-Abundis E, Pavon N, Correa F, Chavez E. Copper induces permeability transition through its interaction with the adenine nucleotide translocase. *Cell Biological International*, 2007, 25: 1-7.
- [14] Mönkkönen H, Auriola S, Lehenkari P, Kellinsalmi M, Hassinen I E, Vepsäläinen J, Mönkkönen J. A new endogenous ATP analog (AappI) inhibits the mitochondrial adenine nucleotide translocase (ANT) and is responsible for the apoptosis induced by nitrogen-containing bisphosphonates. *British Journal of Pharmacology*, 2006, 147: 437-445.
- [15] Atlante A, Bobba A, de Bari L, Fontana F, Calissano P, Marra E, Passarella S. Caspase-dependent alteration of ADP/ATP translocator triggers the mitochondrial permeability transition which is not required for the low-potassium-dependent apoptosis of cerebellar granule cells. *Journal of Neurochemistry*, 2006, 97: 1166-1181.
- [16] Klingenberg M. Transport viewed as a catalytic process. *Biochimie*, 2007, 24: 1-7.
- [17] Li Q, Sato E F, Kira Y, Nishikawa M, Utsumi K, Inoue M. A possible cooperation of SOD1 and cytochrome c in mitochondria-dependent apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 2006, 40(1): 173-181.
- [18] Kunji E R. The role and structure of mitochondrial carriers. *FEBS Letters*, 2004, 564: 239-244.
- [19] 陈大福, 牛宝龙, 翁宏飏, 孟智启, 吕顺霖. 利用 EST 库资源克隆家蚕腺苷酸转移酶基因. *蚕业科学*, 2004, 30(2): 151-156.
- Chen D F, Niu B L, Weng H B, Meng Z Q, Lü S L. Cloning of adenine nucleotide translocase gene from *Bombyx mori* based on EST database. *Science of Sericulture*, 2004, 30(2): 151-156. (in Chinese)
- [20] 萨姆布鲁克, 弗里奇, 曼尼阿蒂斯著. 金冬雁, 黎孟枫译. 分子克隆实验指南(第 2 版). 北京: 科学出版社, 1993.
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Translated by Jin D Y, Li M Y. *Molecular Cloning A Laboratory Manual (2nd ed)*. Beijing: Science Press, 1993. (in Chinese)
- [21] 钟仰进, 曾林, 黄志君, 刘吉平, 邓小娟, 杨婉莹, 曹阳, 顾世红. 家蚕蛹变态期丝腺组织的退化与细胞凋亡特征. *昆虫学报*, 2005, 48: 319-324.
- Zhong Y J, Zeng L, Huang Z J, Liu J P, Deng X J, Yang W Y, Cao Y, Gu S H. Characteristics of degeneration and apoptosis of silk gland during the larval-pupal metamorphosis in the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomologica Sinica*, 2005, 48: 319-324. (in Chinese)
- [22] Doerner A, Olesch M, Giessen S, Pauschinger M, Schultheiss H P. Transcription of the adenine nucleotide translocase isoforms in various types of tissues in the rat. *Biochimica et iophysica Acta*, 1999, 1417: 16-24.
- [23] Zaid A, Hodny Z, Li R, Nelson B D. Sp1 acts as a repressor of the human adenine nucleotide translocase-2 (ANT2) promoter. *European Journal of Biochemistry*, 2001, 268: 5497-5503.
- [24] Law A K, Gupta D, Levy S, Wallace D C, McKeon R J, Buck C R. TGF β -1 induction of the adenine nucleotide translocator 1 in astrocytes occurs through Smads and Sp1 transcription factors. *BMC Neurosci*, 2004, 13: 1-14.
- [25] Young S K, Meong J S, Dong J Y, Masamitsu Y, So Y P, Mi A Y. Transcriptional regulation of the *Drosophila* ANT gene by the DRE/DREF system. *Genes to Cells*, 2007, 12: 569-579.

(责任编辑 赵利辉, 毕京翠)