

葱蝇 *PDK1* 基因的克隆及生物信息学分析*

申 力, 郝友进, 罗钱春, 陈 斌

(重庆师范大学 昆虫与分子生物学研究所 重庆市动物生物学重点实验室, 重庆 401331)

摘要:3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1(3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1, PDK1) 是磷脂酰肌醇 3-激酶(Phosphatidylinositol-3 kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(PKB/Akt) 信号通路中一个关键的激酶。该通路在人(*Homo sapiens*)、黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)、秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*) 中是一条保守的通路, 通过激活下游的因子对代谢、细胞分化、寿命等产生重要调节作用。本研究基于葱蝇(*Delia antiqua*) 转录组数据通过生物信息学分析从其中鉴定出 *PDK1* 基因 4 条 Unigene 序列, 并通过 PCR 技术克隆了 *PDK1* 基因的全长 cDNA, 命名为 *DaPDK1*, 其全长为 3 215 bp, 开放阅读框长 2 730 bp, 编码 909 个氨基酸。采用生物信息学的方法, 推测该基因编码的蛋白质相对分子质量为 100.3 kD, 等电点为 8.53。该蛋白第 87~109 氨基酸是跨膜区, 第 284~627 和 744~833 氨基酸是两个保守结构域 STKc 和 PH。同源性分析表明 *DaPDK1* 蛋白与地中海实蝇(*Ceratitis capitata*) *PDK1* 蛋白氨基酸序列相似性最高(一致率为 53.1%, 相似率为 63.2%)。本研究结果有望为进一步研究葱蝇 PI3K/Akt 信号通路中 *PDK1* 基因的特性及功能奠定基础。

关键词:葱蝇; *PDK1* 基因; 克隆; 生物信息学分析

中图分类号:Q96

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2014)01-0030-07

磷脂酰肌醇 3-激酶(Phosphatidylinositol-3 kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(PKB/Akt) 信号通路具有很高的保守性, 目前在人类(*Homo sapiens*)、小鼠(*Mus musculus*)、黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*) 和秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*) 中都有发现^[1]。胰岛素、胰岛素样生长因子-1(IGF-1) 与细胞膜受体结合, 导致了与受体相联系的 PI3K 的激活, PI3K 磷酸化内膜脂成分 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇(Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PIP2) 形成 3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇(PIP3), PDK1 和 Akt 的两者共同 PH 结构域(Pleckstrin homology domain) 与 PIP3 结合定位到细胞膜, 进而 PDK1 使 Akt 磷酸化激活^[2]。Akt 一旦激活, 进一步激活下游的因子, 如糖原合成酶 3、叉头转录因子、S6 蛋白激酶等, 从而对糖、脂肪和蛋白质的代谢, 细胞分化、增殖和凋亡, 生殖能力和寿命等产生调节作用^[3]。所以, PDK1 可以通过 Akt 发挥功能^[4]。在秀丽隐杆线虫和黑腹果蝇中, 抑制保守的 PI3K/Akt 信号通路, 下游因子 FoxO 蛋白无法被磷酸化而转移到细胞核中, 进而激活和滞育相关下游基因的表达, 包括脂肪积累、抗氧化和寿命延长等^[5-7]。最近在研究尖音库蚊(*Culex pipiens*) 滞育调控分子机理中也进一步被证实^[8]。

滞育(Diapause) 是昆虫在特定时期发育停滞的现象, 是对不利环境的一种适应性。滞育主要特征表现为新陈代谢降低、脂肪含量增高、抗性增强等^[9]。葱蝇是双翅目(Diptera)、花蝇科(Anthomyiidae)、地种蝇属(*Delia*) 昆虫, 同时具有冬滞育和夏滞育, 且出现在蛹期头外翻之后的同一发育点^[10]。研究发现 PI3K/Akt 信号通路通过对 FoxO 负调控在昆虫滞育调控起了重要的作用, 而葱蝇 *PDK1* 作为 PI3K/Akt 信号通路的关键性酶, 目前与滞育的关系还不清楚。

本研究基于葱蝇转录组克隆了 *DaPDK1* 基因的全长 cDNA 序列, 通过生物信息学分析方法对该基因及所编码蛋白质的理化特性、同源性等进行分析; 并运用邻接法(Neighbor-joining method, NJ) 构建了系统发育树。本研究旨在为揭示 *DaPDK1* 基因的特性及功能奠定基础, 且希望对进一步阐明保守 PI3K/Akt 信号通路在葱

* 收稿日期:2013-10-14 修回日期:2013-11-21 网络出版时间:2014-01-16 08:16

资助项目:美国国立卫生研究院 NIH 项目(No. R01AI095184);国家自然科学基金(No. 31071968;31372265);重庆市科技攻关重点项目(No. CSTC2012GG-YYJSB80002);“两江学者”计划专项经费;重庆市科委项目(No. CSTC2011BB1002)

作者简介:申力,女,研究方向为昆虫分子生物学,E-mail: 924202345@qq.com;通讯作者:陈斌,E-mail: c_bin@hotmail.com

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20140116.0816.003.html>

蝇滞育调控方面的作用提供帮助。

1 材料与amp;方法

1.1 葱蝇饲养与取样

葱蝇为本实验室饲养的种群。成虫饲养在温度(23±1)℃、16 h 光照:8 h 黑暗的光周期、相对湿度 50%~70%条件下;葱蝇非滞育幼虫和蛹饲养在温度(18±0.2)℃以及amp;与成虫饲养相同的光周期和相对湿度条件下^[11]。研究中收集非滞育一龄、二龄、三龄末期幼虫用于 *DaPDK1* 基因克隆的总 RNA 的提取。

1.2 主要试剂

菌株:大肠杆菌 DH5α 为本实验室保存。酶和试剂:RNA 提取试剂 Trizol Reagent(Invitrogen 公司);RevertAidTMFirst Strand cDNA Synthesis Kit 逆转录试剂盒(Fermentas 公司);pMD 19-T、rTaq DNA 聚合酶、dNTPs、Marker(TaKaRa 公司);DNA 胶回收试剂盒(上海生工);其它试剂:国产分析纯。

1.3 RNA 的提取及 cDNA 合成

取非滞育一龄、二龄、三龄末期幼虫 3 头,液氮中研磨成粉,按操作说明用 Trizol 试剂提取总 RNA,并溶解于无菌水中,通过 1%的琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 检测完整性和浓度后保存于-80℃。按照 RevertAidTMFirst Strand cDNA Synthesis Kit 逆转录试剂盒的方法取 3 μg 总 RNA 合成第一链 cDNA,保存于-20℃,用于 *DaPDK1* 基因克隆。

1.4 葱蝇 PDK1 基因中间片段 cDNA 的克隆

引物设计:基于葱蝇转录组数据库,从其中鉴定出 *DaPDK1* 基因 4 条 Unigene 序列,分别为 Unigene14525 (362 bp)、15595 (404 bp)、9811 (1 062 bp)和 6008 (1 008 bp)。它们编码的氨基酸序列与黑腹果蝇 PDK1 蛋白(GeneBank 登录号:NP-728471.2)相似度分别为 78%、82%、80%

和 64%。根据这 4 条 Unigene,利用 Primer 5 软件分别设计了 4 条特异性引物用于中间片段扩增(表 1)。中间片段(1)扩增:首先利用特异性引物 PDK(1)F 和 PDK(1)R 进行 PCR 扩增,具体条件为:94℃变性 3 min;94℃变性 30 s,62℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,35 个循环;72℃延伸 10 min。PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳分离,根据 DNA 胶回收试剂盒方法回收目的片段,连接到 pMD19-T 载体中,然后转化 DH5α 感受态细胞,经 Amp 抗性筛选后,挑取白斑菌落进行 PCR 验证,取阳性克隆送华大基因科技股份有限公司进行测序。

中间片段(2)扩增:首先利用特异性引物 PDK(2)F 和 PDK(2)R 进行 PCR 扩增,具体条件为:94℃变性 3 min;94℃变性 30 s,57℃退火 30 s,72℃延伸 40 s,35 个循环;72℃延伸 10 min。PCR 产物回收及测序与中间片段(1)相同。

1.5 生物信息学分析

基因及蛋白质特性预测:开放阅读框的搜索及相应氨基酸序列的翻译是由 DNAMAN 软件完成;利用 BioEdit 及 CodonW 软件对 cDNA 序列的碱基组成及密码子使用频率进行分析;通过软件 ExPASy (<http://www.expasy.org/>)预测蛋白的理论分子量和等电点;使用 ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)对蛋白的氨基酸序列和其它蛋白的氨基酸序列进行多重比对,并利用软件 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)对蛋白的保守结构域进行分析;利用 NPS (NetworkProtein, Analysis <http://npsa-pbil.ibcp.fr>)的 Proscan 对蛋白进行功能位点预测;利用软件 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)对蛋白的跨膜区进行分析;使用 SignalP4.0 软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)进行信号肽预测;使用软件 SPro4.0 (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>)和 SWISS-MODEL (<http://swiss-model.expasy.org/>)对蛋白的二级结构、三级结构进行预测。

同源性与系统发育关系分析主要通过 EMBOSS Needle (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/)软件对蛋白的氨基酸序列与该家族其它蛋白的氨基酸序列进行同源性比对,然后采用邻接法(Neighbor-Joining)以秀丽隐杆线虫的同源 PDK1 蛋白序列为外群,用 MEGA5 软件分析 *DaPDK1* 蛋白序列与其它昆虫 PDK1 蛋白序列的系统发育关系,1 000 次重复计算自展分析值。

表 1 本研究中所用到的引物
Tab. 1 Primers used in the study

引物名称	引物序列(5'-3')
PDK(1)F	5'-TGGTCATGGGCACATCGACAACAG-3'
PDK(1)R	5'-CAGCGAACGCAGATCCTGGAATGT-3'
PDK(2)F	5'-TGCATCGTGATTGAAGCCCG-3'
PDK(2)R	5'-GGTGGCAGACCAGACATCATT-3'

表 2 葱蝇 PDK1 基因核酸序列相对同义密码子使用率统计
Tab. 2 Relative synonymous codon usage (RSCU) of *DaPDK1* gene

密码子	RSCU	密码子	RSCU	密码子	RSCU	密码子	RSCU
UAA	0.00	CAC	0.20	CCA	1.13	AGG	0.00
CUG	0.69	AAC	0.30	GCC	1.75	CCU	0.87
GUG	0.72	UCG	0.71	GCA	0.68	AAU	1.70
ACG	0.55	UAC	0.48	GAC	0.29	CAU	1.80
UUG	1.97	CAG	0.51	GGG	0.19	ACC	0.88
CGU	3.27	GAG	0.18	GUU	2.05	AAA	1.45
CGC	1.23	GGC	0.74	CCC	1.22	UUU	1.19
UGC	0.89	GCG	0.51	CCG	0.78	GGU	2.42
AUC	0.42	GAU	1.71	UCC	1.55	UGU	1.11
GUC	0.51	GUU	2.05	CUU	0.30	UCU	0.52
GUA	0.72	AGU	1.03	CUC	0.10	AGC	0.45
UUC	0.81	GCU	1.07	GAA	1.82	CUA	0.39
UCA	1.74	CGA	0.41	ACU	0.60	UUA	2.56
GGA	0.65	CGG	0.00	ACA	1.97	UAG	0.00
AUA	1.26	AUG	1.00	CAA	1.49	AGA	1.09
AAG	0.55	UGG	1.00	UAU	1.52	UGA	0.00

2.2.4 葱蝇 PDK1 蛋白功能位点预测 利用 Proscan 软件, 预测 DaPDK1 蛋白 8 种类型特定的功能位点, 包括 18 个 N-糖基化位点(N-glycosylation site), 2 个 cAMP-和 cGMP- 依赖蛋白激酶磷酸化位点(cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site), 14 个蛋白激酶 C 磷酸化位点(Protein kinase C phosphorylation site), 12 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点(Casein kinase II phosphorylation site), 1 个酪氨酸激酶磷酸化位点(Tyrosine kinase phosphorylation site), 11 个 N-豆蔻酰化位点(N-myristoylation site), 1 个蛋白激酶 ATP-绑定区信号位点(Protein kinases ATP-binding region signature), 1 个丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶激活信号位点(Serine/Threonine protein kinases active-site signature)(表 4)。

表 3 葱蝇 PDK1 基因所编码的氨基酸一级结构预测
Tab. 3 Predition of primary structure analysis of *DaPDK1* gene

一级结构特征	预测结果
分子式	C ₄₃₃₁ H ₆₈₉₇ N ₁₂₅₃ O ₁₃₉₉ S ₁₃
分子量/kD	100.3
等电点	8.53
负电荷残基(Asp+Glu)/个	93
正电荷残基(Arg+Lys)/个	101
不稳定系数	55.36
脂肪系数	67.24

DaPDK1	MKCKSWSNKT	NNFVVRRLKS	TKNTGQQQQP	TTSNCATAAQ	QPQQQQYYLS	NCCSSTMPAM	PKEKATAVSL	TENNFSSELKY
DmPDK1	MKCKSWSNKT	NNYVVRKIKS	IKINGTQQQL	QLFGSGASGI	AAAAVITVAS	DCGEN	-----C	SSNGTEHQII
AaPDK1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AgPDK1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DaPDK1	KELATSAAVV	AATAATAAAA	AAIATTATVP	ATTTTMAATT	GQRRIQQNSSS	TIHPIHIIHIII	QQQRNLCCGG	NASASPTAEV
DmPDK1	FNIAITTTAT	SATEATMPAM	AKEKASATVS	LTGHNSFRDIN	-----LKDLAVV	VEAASRLIIHQ	Q-----NVC	CGCG AVSSTENNNN
AaPDK1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AgPDK1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DaPDK1	N---MRNKFMT	NGHSSPLTAA	MAGQNSSSSP	NMSPQRLSTA	STISNTSSNN	SSCCRIRYNQ	TSNGMVMGTS	TTDCAAPQPP
DmPDK1	SRYGSSSKYLT	NGHTSPLAAA	VAS---NSSSVA	CSLQQYQND	-----IRQQT	EILDMLRQQH	QQGYGSQQ	-----
AaPDK1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AgPDK1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DaPDK1	PSSATLTICS	SANSNSSSSS	LNSLNPTST	PPSLAVTPPK	KSPKDFLFGK	FIGEGSFSNV	YLGVDITTKR	EYAIKVCEKR
DmPDK1	-----	QQQQPQQQQE	QQQQQEQSQS	QQQLQNAPPR	RSPNDFLFR	YIGEGYSIV	YLAVIDHSRR	EYAIKVCEKR
AaPDK1	-----	-----MGTSAE	ENKYAGNTR	-----AR	RSANDFMFGK	LIGEGSFSV	YLAQDVHTSK	EWAVKVCEKR
AgPDK1	-----	-----STNTIVMD	SNRSKTPSS	-----GHR	LNPNDIFYGK	MLGEGSFSCV	YLAKEVHTSK	KYAIKVCEKR
DaPDK1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DmPDK1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AaPDK1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AgPDK1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DaPDK1	QILREHKQEV	IRREVERVMN	MTNVPGFVNL	SCTFQDLRSL	FFVMTYAKNG	DLPLYINKVG	SFDVDSTRHY	AAELVLACEQ
DmPDK1	QILREHKQEV	IRREVERVMN	MTNVPGFVNL	SCTFQDLRSL	FFVMTYAKNG	DLPLYINKVG	SFDVDSTRHY	AAELVLACEQ
AaPDK1	QILREHKQEV	IRREVERVMN	MTNVPGFVNL	SCTFQDLRSL	FFVMTYAKNG	DLPLYINKVG	SFDVDSTRHY	AAELVLACEQ
AgPDK1	QILREHKQEV	IRREVERVMN	MTNVPGFVNL	SCTFQDLRSL	FFVMTYAKNG	DLPLYINKVG	SFDVDSTRHY	AAELVLACEQ
DaPDK1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DmPDK1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AaPDK1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AgPDK1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DaPDK1	MHRRNIVHRD	LKPENILLDE	DMHTLIADFG	SVKMLTADEK	QQVNAFLMSG	GIDLTKKVRS	QSGGSLGDYY	ADDDDDVLD
DmPDK1	MHRRNVVHRD	LKPENILLDE	DMHTLIADFG	SAKVMTAHER	ALATEHCSE	QRRS	NSD	EDDESDRL
AaPDK1	MHANNIHRD	LKPENILLDD	KFHTMIADFG	SSRIDGTTN	-----	-----	-----	-----
AgPDK1	MHDMATLHRD	LKPENILLDE	RMHLIADFG	SSKL.DYKEED	EDEEEQADSG	-----	-----	C EEKKDAPSSP
DaPDK1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DmPDK1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AaPDK1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AgPDK1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DaPDK1	GQQQNEDDEE	NDSTESSNDT	AGSGGDEIDS	PRARRQQPRY	QRRRRGSFVG	TAQYVSPEVL	QNAPITPAAD	LWALGCIITYQ
DmPDK1	-----NEDEDFVD	RDSEFLDDGD	DEQQQEEMDS	PRHR---QRRY	NRHRKASFVG	TAQYVSPEVL	QNGPITPAAD	LWALGCIITYQ
AaPDK1	-----DNVS	SDEKE---E	SASESDEQAS	PSQR-----	-----KRRSFVG	TAQYVSPEIL	KGKDSKASD	IWSFGCILIYQ
AgPDK1	TMSTARKHAQ	RVLGAEYDD	DTDDNGEDAP	PATR-----	PPNKRRSFVG	TAQYVSPEIL	TLTGPSSPASD	LWSYGCITLYQ
DaPDK1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DmPDK1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AaPDK1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AgPDK1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DaPDK1	MMSGLPPFRG	ANDVYIFKEI	IACNLDFPQG	FDKDAEDLVK	KLLKLNPAER	LGAQDLNGRY	ESIRSHPFVK	TIDFELVRQQ
DmPDK1	MTAGLPPFRG	SNVYVIFKEI	LDCAVDFPQG	FDKDAEDLVR	KLLRVDPDRD	LGAQDEFGY	ESTRAHPFFA	GIDWQTLRQQ
AaPDK1	MTAGFPFPFG	PNDYLIFQKI	TKLELTFPND	FDHTAADLIV	KLLVLNPQKR	LGVDKDS-PY	DSIRNHKFL	GIDFLSIRKM
AgPDK1	MVCGVSPFRA	ASEYLIFKMI	LRCQVSYADS	FDHTAKDLVT	RLHLLEQAKR	LGARDSP-RY	RTIRQHAFPE	GIDFELHRQQ
DaPDK1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DmPDK1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AaPDK1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AgPDK1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DaPDK1	TPPPIYYPYL	D---LKEE---	-EDFKICENL	EPGLDEKQMT	RLLGWELGCM	SDDDISDKKK	TVKNSQKSSS	TTTSNTIAK
DmPDK1	TPPPIYYPYL	G---VSQDEDF	RSSYTVPGLD	EPGLDERQIS	RLLSAELGVG	-----	SSV AMPVKRSTAK	-----
AaPDK1	PPPFILISALL	SGECKTKEST	LDVYDFPDNI	KPGLDNEQIT	RLLGQDWLKI	G-----	APST	ESNSLVDKI
AgPDK1	PAPMPSTAF	T---VLNN---	-ETVHFPEGM	QPLGLDDRQIT	RLNRAGTGRV	F-----	-----S	LTRSLGLSLK
DaPDK1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DmPDK1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AaPDK1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AgPDK1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DaPDK1	NSFDLSDAEK	HKRLELQKTD	KWNVFADGEV	ILKKGFYNKR	KG---LFARRR	MFLLTGCPRI	IYIDPVQMVK	KGEIPWSPEL
DmPDK1	NSFDLSDAEK	HKRLELQKTD	KWNVFADGEV	ILKKGFYNKR	KG---LFARRR	MFLLTGCPRI	IYIDPVQMVK	KGEIPWSPEL
AaPDK1	LKIPASDEFK	SSWLEEQKSD	MWHSFAEGEL	ILKKGFYNKR	KGALYVPRKR	MLLLTTGPKL	IYIDPVQMVK	KGEIPWNEKL
AgPDK1	FFKTYEEAFK	N---DPGPVS	LWQPFADGDE	ILKGYIYKR	KG---LFARRR	MLLLTKRPRL	IYIDPVTMVK	KGEIPWTSLS
DaPDK1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DmPDK1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AaPDK1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AgPDK1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DaPDK1	RAEAKNFKIF	FVHTPNRTYY	LDDPEGFLE	WVAAIKKMHN	LTYNQITNS	TQHTTSSNS	RNVLNTNTSS	SSVTKTSAA
DmPDK1	RAEYKNFKIF	FVHTPNRTYY	LDDPEGYAII	WSEAIENMRK	LAYGDPSSTS	AVSCSSGSSN	SLAVISNSSA	ASSNSPTVK
AaPDK1	RAEAKNFKIF	FVHTPNRTYY	LDDPEGFLE	WVAAIKKMHN	LTYNQITNS	TQHTTSSNS	RNVLNTNTSS	SSVTKTSAA
AgPDK1	SVEAKNFKIF	YVNTPNRIYY	LEDPEGFALK	WCDTITDVHR	KAPLNSENN	-DTTTKTTSN	SLVQKE---	-----
DaPDK1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DmPDK1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AaPDK1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AgPDK1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DaPDK1	SASSTSSASS	STATRTTIPH	KTSSLLTAPL	SILKTASN	-----	-----	-----	-----
DmPDK1	RSSPVNAPQA	STASDNRTL	GSTR---TGTS	PSKKTASK	-----	-----	-----	-----
AaPDK1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AgPDK1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

注: DaPDK1: 葱蝇 PDK1; DmPDK1: 黑腹果蝇 PDK1; AaPDK1: 埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*) PDK1; AgPDK1: 冈比亚按蚊 (*Anopheles gambiae*) PDK1。 “-”表示相同氨基酸, “-”和 “=” 分别表示 STKc 和 PH 两个结构域。

图 3 葱蝇 PDK1 蛋白氨基酸序列与其它 3 种昆虫 PDK1 蛋白氨基酸序列比较

Fig. 3 Alignment of DaPDK1 protein with PDK1 proteins of another 3 insects

2.2.5 葱蝇 PDK1 蛋白的跨膜区分析 根据 HMM 软件的预测,葱蝇 PDK1 蛋白的 87~109 位的氨基酸之间形成一个跨膜区(封三彩图 4),说明该蛋白可能属于膜结合蛋白,预测该蛋白可能与膜的某物质结合,参与到信号传递过程中。

表 4 葱蝇 PDK1 蛋白功能位点预测
Tab. 4 Predicted prosites of DaPDK1

位点名称	模式类型	氨基酸序列	随机概率
N-糖基化位点	N-{P}-[ST]-{P}	74~77:NFSE;127~130:NSSS;151~154:NASA;183~186:NSSS;203~206:NTSS;207~210:NNSS;208~211:NSSC;217~220:NQTS;253~256:NSSS;265~268:NTST;347~350:NLSC;489~492:NDST;496~499:NDTA;807~810:NRTY;831~834:NLTY;839~842:NTST;856~859:NNTN;859~862:NSSS	5.138e-03
cAMP-和 cGMP-依赖蛋白激酶磷酸化位点	[RK](2)-x-[ST]	522~525:RRGS;691~694:KKKT	1.572e-03
蛋白激酶 C 磷酸化位点	[ST]-x-[RK]	7~9:SNK;20~22:SIK;280~282:SPK;305~307:TTK;306~308:TKR;384~386:STR;429~431:SVK;453~455:TKK;508~510:SPR;620~622:SIR;689~691:SDK;694~696:TVK;698~700:SQK;732~734:TDK	1.482e-02
酪蛋白激酶 II 磷酸化位点	[ST]-x(2)-[DE]	69~72:SLTE;228~231:STTD;280~283:SPKD;306~309:TKRE;351~354:TFQD;434~437:TADe;463~466:SLGD;494~497:SSND;501~504:SGGD;684~687:SDDD;719~722:SDAE;833~836:TYNE	1.482e-02
酪氨酸激酶磷酸化位点	[RK]-x(2,3)-[DE]-x(2,3)-Y]	366~373:KNGDLLPY	4.074e-04(最小值) 4.083e-04(最大值)
N-豆蔻酰化位点	G-{EDRKHPFYW}-x(2)-[STAGCN]-{P}	148~153:GCGNAS;150~153:GNASAS;181~186:GQNS-SS;222~227:GMVMGT;226~231:GTSTTD;293~298:GSFSNV;301~306:GVDITT;449~454:GIDLTk;461~466:GGSLGD;479~484:GQQQNE;524~529:GSFVGT	1.397e-02
蛋白激酶 ATP-绑定区信号位点	[LIV]-G-{P}-G-{P}-[FYWMGSTNH]-[SGA]-{PW}-[LIV-CAT]-{PD}-x-[GSTACLIVMFY]-x(5,18)-[LIVMFY-WCSTAR]-[AIVP]-[LIVM FAGCKR]-K	290~313:IGEGSFSNVYLGVDITTKREYAIK	6.722e-08(最小值) 6.810e-08(最大值)
丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶激活信号位点	[LIVMFYC]-x-[HY]-x-D-[LIVMFY]-K-x(2)-N-[LIVMFYCT](3)	404~416:IVHRDLKPENILL	4.192e-08

2.2.6 葱蝇 PDK1 蛋白的信号肽预测 根据 SingalP 软件,对 PDK1 蛋白的信号肽位置进行预测,发现不存在信号肽,说明该蛋白为分泌蛋白。

2.2.7 葱蝇 PDK1 蛋白的二级结构及三级结构预测 通过软件 SSPro4.0 预测 PDK1 蛋白二级结构,分析表明无规则卷曲是该蛋白二级结构最多的结构原件,约为 54.24%,α-螺旋和延伸链分别占 29.70%和 16.06%。

经 SWISS-MODEL 搜索,人类 PDK1 蛋白(PDB 编号:1w1h.pdb)与 DaPDK1 蛋白氨基酸序列相似性达 48.28%,被选作同源建模的模板,预测得到 DaPDK1 蛋白的三级结构(封三彩图 5)。

2.2.8 葱蝇 PDK1 蛋白序列的同源性分析与系统发育关系分析 将 DaPDK1 基因 cDNA 编码的氨基酸序列与 PDK1 蛋白质家族氨基酸序列进行同源性比对,结果表明 DaPDK1 与地中海实蝇 PDK1 氨基酸序列相似性最高(一致率为 53.1%,相似率为 63.2%),其次是黑腹果蝇、豌豆长管蚜(*Acyrtosiphon pisum*),一致率分别是 49.5%、33.1%(表 5)。

选择了代表性的 11 个(包括 DaPDK1)氨基酸序列(表 5),使用线虫 PDK1 作为外群构建了系统发育树,并用 Bootstrap 1 000 次重复对其分支作了统计检测(图 6)。结果表明葱蝇 PDK1 与地中海实蝇的 PDK1 最近,Bootstrap 值达 51%,聚成一支。双翅目、鳞翅目(Lepidoptera)、虱目(Anoplura)、半翅目(Hemiptera)和膜翅目(Hymenoptera)昆虫的 PDK1 形成不同分支,Bootstrap 值大于 50%。

3 讨论

本实验根据葱蝇转录组的 Unigene 序列,克隆了葱蝇 PDK1 基因 cDNA 序列(DaPDK1),它的全长为 3 215 bp,开放阅读框 2 730 bp,编码 909 个氨基酸。该蛋白包含 2 个保守结构域,一个是位于 C 端与 PIP3 结合的 PH 结构域,另一个是位于 N 端行使激活 Akt 的激酶结构域 STKc,这证明了 DaPDK1 蛋白属于 PDK1 家族。同源性分析表明,DaPDK1 蛋白与地中海实蝇与黑腹果蝇 PDK1 蛋白的一致率分别为 52.1%和 49.5%。与其它昆虫 PDK1 蛋白的一致率在 29.3%~33.1%之间,这说明了 PDK1 蛋白在几种昆虫中的亲缘关系。采用 NJ 法构建系统发育树,DaPDK1 蛋白和地中海实蝇的 PDK1 蛋白亲缘关系最近,双翅目、鳞翅目、虱目、半翅目和膜翅目昆虫 PDK1 蛋白形成不同的分支。

寿命的延长、抗逆性增强是昆虫滞育的特点,且是滞育成功的关键^[12]。研究表明 PI3K/Akt/FoxO 信号通路在调控尖音库蚊成虫滞育中起着重要的作用,FoxO 通过调控超氧化物歧化酶-2(Superoxide dismutase-2, sod-2)和过氧化氢酶(Catalase)两个抗氧化酶基因来保护滞育成虫免受氧化应激的破坏^[12]。该信号通路在模式生物秀丽隐杆线虫和黑腹果蝇调控作用都是很保守的,上调 *FoxO* 基因可以延长虫体寿命并且和耐寒、抗紫外和抗氧化相关基因上调表达相关^[13-14]。

葱蝇以蛹滞育的形式来度过炎热的夏季和寒冷的冬季,冬滞育蛹和夏滞育蛹具备很强的耐寒和抗高温的能力。葱蝇夏滞育的蛹从化蛹到成虫羽化需要 32 d,冬滞育需要 116 d,而非滞育的蛹则需 18 d,明显滞育蛹期寿命延长^[15]。PI3K/Akt/FoxO 可能对葱蝇滞育期寿命、抗性等的调控起着重要的作用,因此,本研究克隆并通过生物信息学分析了葱蝇 PI3K/Akt 信号通路关键基因 *PDK1*,为研究该保守通路在调控葱蝇滞育机理提供基础资料。

参考文献:

[1] Kandel E S, Hay N. The regulation and activities of the multifunctional setrine/threonine kinase Akt/PKB[J]. Experimental Cell Research,1999,253(1):210-229.

[2] Cantrell D A. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways [J]. Journal of Cell Science, 2001, 114 (Pt8): 1439-1445.

[3] Sarbassov D D, Guertin D A, Ali S M, et al. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex[J]. Science,2005,307(5712):1098-1101.

[4] 刘革修. 3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1 结构和功能[J]. 生命科学,2005,17(5):387-391.

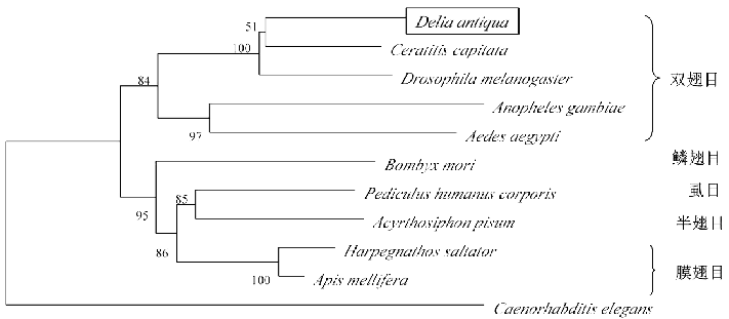
[5] Liu G X.The structure and function of the 3-phosphoinositide dependent protein kinase 1[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2005,17(5):387-391.

[5] Barthel A,Schmoll D,Unterman T G. FoxO proteins in insulin action and metabolism[J]. Trends in Endocrinology and Metabolism,2005,16(4):183-189.

[6] Arking R. Multiple longevity phenotypes and the transition

表 5 葱蝇 PDK1 蛋白与 10 种其它昆虫及线虫 PDK1 蛋白的一致率和相似率
Tab. 5 The homologs of PDK1 proteins from another insect species and *C. elegans* and their identity and similarity to DaPDK1 protein

物种	GenBank 登录号	一致率/%	相似率/%
地中海实蝇 <i>C. capitata</i>	XP_004525330.1	53.1	63.2
黑腹果蝇 <i>D. melanogaster</i>	NP_728471.2	49.5	61.6
豌豆长管蚜 <i>A. pisum</i>	XP_001951019	33.1	44.7
意蜂 <i>Apis mellifera</i>	XP_394208.4	33.1	42.8
印度跳蚁 <i>Harpegnathos saltator</i>	EFN80387.1	33.1	42.6
家蚕 <i>Bombyx mori</i>	XP_004931453	30.9	42.3
冈比亚按蚊 <i>A. gambiae</i>	XP_321653	30.5	40.1
埃及伊蚊 <i>A. aegypti</i>	XP_001652653	30.0	40.0
人虱 <i>Pediculus humanus corporis</i>	XP_002429719.1	29.3	38.7
线虫 <i>C. elegans</i>	NP_001024742.1	23.3	38.8



注:使用秀丽隐杆线虫同源 PDK1 序列作为外群,大于 50%的 Bootstrap 值标记在树的分支节点上,各种中文名及其 PDK1 序列的基因库登录号见表 5。

图 6 11 种物种 PDK1 的邻接(N-J)树

Fig. 6 The Neighbor-Joining (N-J) tree of 11 species PDK1

- from health to senescence[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2005, 1057: 16-27.
- [7] Oh S W, Mukhopadhyay A, Dixit B L, et al. Identification of direct DAF-16 targets controlling longevity, metabolism and diapause by chromatin immunoprecipitation[J]. Nature Genetics, 2006, 38(2): 251-257.
- [8] Sim C, Denlinger D L. Insulin signaling and FoxO regulate the overwintering diapause of the mosquito *Culex pipiens* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008, 105(18): 6777-6781.
- [9] 卓德干, 李照会, 门兴元, 等. 昆虫滞育研究进展[J]. 山东农业科学, 2010(8): 86-90.
Zhuo D G, Li Z H, Men X Y, et al. Advances in research of insect diapause[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2010 (8): 86-90.
- [10] Chen B, Monteiro A, Kayukawa T. Molecular analysis of diapause and thermal-stress response in the onion maggot, *Delia antiqua* [J]. Entomological Research, 2007, 37 (Suppl): 19-20.
- [11] 陈斌, 黎万顺, 冯国忠, 等. 葱蝇的实验室饲养、生物学特性及滞育诱导[J]. 重庆师范大学学报: 自然科学版, 2010, 27(2): 9-13.
Chen B, Li W S, Feng G Z, et al. Laboratory rearing biological characteristics and diapause induction of the onion maggot, *Delia antiqua* [J]. Journal of Chongqing Normal University: Natural Science, 2010, 27(2): 9-13.
- [12] Sim C, Denlinger D L. Catalase and superoxide dismutase-2 enhance survival and protect ovaries during overwintering diapause in the mosquito *Culex pipiens* [J]. Insect Physiol, 2011, 57(5): 628-634.
- [13] Gershman B, Puig O, Hang L, et al. High-resolution dynamics of the transcriptional response to nutrition in *Drosophila*: a key role for dFoxO [J]. Physiological Genomics, 2007, 29(1): 24-34.
- [14] Murphy C, McCarroll S, Bargmann C, et al. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature, 2003, 424 (6946): 277-283.
- [15] 黎万顺, 陈斌, 何正波. 葱蝇非滞育、冬滞育和夏滞育蛹发育和形态特征比较[J]. 昆虫学报, 2012, 55(7): 816-824.
Li W S, Chen B, He Z B. Comparison of the developmental and morphological characteristics of non-, winter- and summer-diapausing of the onion maggot, *Delia antiqua* (Diptera: Anthomyiidae) [J]. Acta Entomologica Sinica, 2012, 55(7): 816-824.

Animal Sciences

Cloning and Bioinformatic Analysis of the *PDK1* Gene in the Onion Maggot, *Delia antiqua*

SHEN Li, HAO You-Jin, LUO Qian-Chun, CHEN Bin

(Institute of Entomology and Molecular Biology, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) is a key kinase in PI3K/Akt signaling pathway, which is conserved through *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*, and plays an important role in metabolism regulation cell differentiation and longevity. Four Unigenes encoding putative *PDK1* were identified bas on the transcriptome data of *Delia antiqua*. Specific primers were designed and the full length cDNA of *PDK1* (named as *DaPDK1*) was cloned by PCR technology. Its full length is 3 215 bp and the ORF is 2 730 bp, encoding 909 amino acids with the molecular weight of 100.3 kD and pI of 8.53. The deduced amino acid sequence was predicted to contain a transmembrane region ranging from the locus 87 to 106, and STKc domain and PH domain separately from 284 to 627 and from 744 to 833. Sequence similarity analysis showed that *DaPDK1* shared 53.1% identity with *PDK1* of *Ceratitidis capitata*. This study provided a basis for further research on the characteristics and function of the *PDK1* in the PI3K/Akt signaling pathway.

Key words: *Delia antiqua*; *PDK1* gene; cloning; bioinformatics analysis

(责任编辑 方 兴)