胞内共生菌 *Wolbachia* 内噬菌体相关尾蛋白基因的分子克隆及特征分析

康琳 孙磊 喻红 周伟国 赵寿元 李昌本*

(复旦大学生命科学院遗传学研究所, 遗传工程国家重点实验室, 上海 200433. * 联系人, E-mail: cbenli@yahoo.com)

摘要 *Wolbachia* 是一种广泛存在于各种节肢动物体内经母系细胞质遗传的胞内共生菌. 它能够改变宿主的生殖和发育行为, 引起细胞质不亲和(cytoplasmic incompatibility, CI)、孤雌生殖、雌性化和雄性致死等现象, 但是其间的分子生物学机理迄今尚不清楚. 采用 RDA (representational difference analysis, 代表性差异分析)和 LM-PCR (ligation-mediated PCR)等方法, 通过研究 *Wolbachia* 不同品系基因组之间的差异, 从来自果蝇 *Drosophila melanogaster* CantonS 的 *Wolbachia* (wMelCS)中克隆到了噬菌体相关尾蛋白基因 *prtp* (phage-related tail protein), 同时从果蝇 *Drosophila melanogaster* yw67c23 中的 *Wolbachia* (wMel)中克隆到了同源基因. 通过研究 *prtp* 在不同 *Wolbachia* 品系间的表达, 发现 PrTP 可能不直接参与 CI 过程. 体外果蝇 S2 细胞的瞬时转染实验结果证明了 *prtp* 基因内双向核定位序列(bipartite nuclear localization signal sequence, NLS)的功能, *prtp* 基因的存在为噬菌体介导的基因水平转移(horizontal gene transfer, HGT)提供了直接证据, 并提示其在 *Wolbachia* 的生殖特性中可能扮演重要的角色.

关键词 *Wolbachia* 噬菌体相关尾蛋白基因 *prtp* 细胞质不亲和(CI) 代表性差异分析(RDA) 核定位序列(NLS) 基因水平转移(HGT)

Wolbachia 是在节肢动物体内发现的一种立克次氏体(Rickettsia) α -原细菌, 在宿主中经母系细胞质遗传给下一代. 最近研究表明, *Wolbachia* 是迄今为止已知的分布范围最广的胞内共生菌之一, 约 20%~76% 的昆虫感染了这种细菌^[1,2]. 这类微生物能够改变宿主的生殖和发育行为, 包括细胞质不亲和(cytoplasmic incompatibility, CI), 孤雌生殖(parthenogenesis), 雌性化(feminization)和雄性致死(male-killing)等现象^[3], 从而导致感染有 *Wolbachia* 的宿主在整个种群中具有生殖优势. 所谓 CI 现象就是感染了 *Wolbachia* 的雄虫与未感染 *Wolbachia* 雌虫交配, 或者感染了不同 *Wolbachia* 品系的雌雄虫间的交配, 均不产生后代或者产生数目很少的后代, 前者称为单向细胞质不亲和, 后者称为双向细胞质不亲和. “修饰-拯救”模型是迄今为止被普遍接受的关于 CI 机理的模型: 即 *Wolbachia* 修饰了宿主的精子, 只有当卵细胞中存在相同或相近品系的 *Wolbachia* 时才能拯救这种修饰作用.

通过上述生殖优势, *Wolbachia* 无需经过水平转移就能在整个种群中迅速传播开来. 目前已有报道, *Wolbachia* 可以作为携带目的基因(如在人、畜或植物中传播病原体载体的抗性基因)的载体, 在整个

媒介昆虫中传播开来^[4,5].

尽管对于 *Wolbachia* 感染这一现象和相关的种群遗传学都已进行了较为深入的研究, 但是有关这种微生物与其宿主相互作用分子机理的探索刚刚起步. 在本文中, 我们运用基因组代表性差异分析方法(representational difference analysis, RDA)^[6] 研究了具有不同 CI 表型的 *Wolbachia*, 其中含有核定位序列的一段 DNA 片段引起了我们极大的兴趣, 暗示该基因在 *Wolbachia* 与宿主的相互作用中扮演重要的角色, 而后我们分别从 wMelCS 和 wMel 克隆了编码噬菌体相关尾蛋白的全长序列, 并对其核苷酸序列和相应的氨基酸序列进行了分析. 进而研究了 *prtp* 基因在不同 *Wolbachia* 品系之间的拷贝数和表达情况, 通过果蝇 S2 细胞的体外瞬时转染验证了该基因内核定位序列的功能, 为 *Wolbachia* 的分子生物学研究增添了新的实验数据, 为探索 *Wolbachia* 与其宿主相互作用的分子机理提供了新的视角.

1 材料与方法

(i) 材料. 感染了 *Wolbachia* 的果蝇品系包括: *Drosophila simulans* Riverside (DSR), *Drosophila simulans* DSW/Mau (Mau), *Drosophila simulans* Noumea (R3A), *Drosophila melanogaster* CantonS (DM)和 *Drosophila*

melanogaster yw67c23 (YW). 对应各果蝇品系所感染的 *Wolbachia* 分别缩写为: *w*Ri, *w*Ma, *w*No, *w*MelCS 和 *w*Mel. 其中 *w*Ri, *w*No, *w*Mel 能够引起强烈的 CI 现象, 而 *w*Ma 和 *w*MelCS 则不表现 CI 现象^[7]. 经四环素去除 *Wolbachia* 的上述果蝇品系分别缩写为 DSRT, MauT, R3AT, DMT 和 YWT(由澳大利亚昆士兰大学的 S. L. O'Neill 教授提供).

(ii) 果蝇总 DNA 的制备. 取大约 100 只果蝇成虫冻存于 -70℃ 待用, 将果蝇在液氮中研磨成粉末, 迅速将其转移至 2~3 倍体积的 Holmes-Bonner 缓冲液中(0.1 mol/L Tris-HCl, pH7.5; 0.35 mol/L NaCl; 10 mmol/L EDTA, pH8.0; 2% SDS; 7 mol/L Urea), 匀浆并剧烈振荡, 酚/氯仿抽提至无中间相, 乙醇沉淀, 而后酚/氯仿重复抽提一次, 重悬于 TE 缓冲液中(10 mmol/L Tris-HCl, pH8.0; 1 mmol/L EDTA, pH8.0).

(iii) *prtp* 基因全长 DNA 的克隆. RDA 分析步骤参见文献[6], 其中感染了 *w*Ri(具有强烈 CI 表型)的果蝇 DSW/DSR 的基因组 DNA 作为检测子(*tester*), 感染了 *w*Ma(无 CI 表型)的果蝇 DSW/Mau 的基因组 DNA 作为驱赶子(*driver*). 将从 RDA 分析中获得的产物克隆到 pGEM-T 载体(Promega)中测序, 所得序列进行 BLASTX 分析^[8]. 对于与编码噬菌体相关尾蛋白基因同源的序列片段, 运用 LM-PCR 的方法获得其旁侧序列^[9].

(iv) Southern 杂交检测. 为了测定 *prtp* 基因的拷贝数, 10 μg 果蝇总 DNA 经 *Eco*R I 酶切(*prtp* 基因内不含有 *Eco*R I 的酶切位点), 0.7% 琼脂糖凝胶电泳分离后在碱性条件下经毛细管转移至尼龙膜(HybondTM-N⁺ nucleic acid transfer membranes, Amersham), 将转有 DNA 的膜于 80℃ 烘烤 2 h. 于 42℃ 在预杂交液(6 × SSC, 5 × Denhardt, 0.5% SDS, 100 μg/mL 变性鲑精 DNA, 50% 甲酰胺)中预杂交 2 h. 按照随机引物 DNA 标记试剂盒(Boehringer Mannheim)将[α-³²P] dATP 标记 *prtp* 的编码区序列(PCR 引物: 11-Orf-F: 5' -GGAATTCAAGGCAATAGAGAAACCGAG-3'; 11-Orf-R: 5' -CCGCTCGAGTCAATAAAATGTCTCTAC-3'), 并将标记探针直接加入预杂交液中, 杂交过夜, 而后将膜在 2 × SSC, 0.1% SDS 溶液中室温洗涤 30 min, 在 0.1 × SSC, 0.5% SDS 溶液中于 68℃ 洗涤 20 min, 并重复两次. 杂交膜用富士医用 X 射线于 -70℃ 曝光 24 h, 检测信号.

(v) DNA 检测引物. 按照果蝇 RP49 的部分片

段序列设计的引物(RP49-F: 5' -ATGACCATCCGC-CCAGCATAC-3'; RP49-R: 5' -CTTGGAGCGCTC-GACAATCTC-3')^[10]作为检测果蝇总 DNA 抽提质量的阳性探针. *Wolbachia* 外壳蛋白通用引物 81F/691R (81F: 5' -TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3'; 691R: 5' -AAAAATTAAACGCTACTCCA-3')^[7]作为检测果蝇总 DNA 中是否有 *Wolbachia* 的探针. 相应的 PCR 反应(25 μL 反应体系): 2.5 μL 10 × 缓冲液, 2.5 mmol/L MgCl₂, 0.25 mmol/L dNTP 和 500 nmol/L 引物. 变性 94℃, 退火 55℃ 和延伸 72℃ 各 1 min, 35 个循环.

(vi) RNA 的抽提. 果蝇总 RNA 的抽提参照华舜公司的 RNAeX Reagent 试剂盒说明书, 所得总 RNA 用 RNase-free DNase I (TaKaRa)提纯待用.

(vii) RT-PCR 检测. 以 1 μg 总 RNA 为模板, 采用 Promega ImProm-IITM Reverse Transcription System 于 42℃ 反应 1.5 h, 反转录第一链 cDNA. 以反转录产物(ssDNA)为模板, 以 11-Orf-F/11-Orf-R 为引物, 进行 PCR 扩增, 反应的退火温度 60℃, 其余条件同(v). 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测 *prtp* 的转录产物.

(viii) 在瞬时转染果蝇 S2 细胞中检测 *prtp* 内 NLS 的功能. (1) 构建绿色荧光融合蛋白载体 pEGFP-C1/11NLS. *prtp* 内包含 NLS 序列的区段经由引物(11-G-F: 5' -GGAATTCCAAGGCAATAGAGAAACCGAG-3'; 11-G-R: 5' -CGGGATCCACCAAGTTGACCACCACTTG-3' (分别含有 *Eco*R I 和 *Bam*H I 识别位点, 下画线表示)) PCR 扩增后, 产物经 *Eco*R I 和 *Bam*H I 双酶切, 连接于载体 pEGFP-C1 (Clontech Laboratories Inc), 并测序验证序列的一致性. (2) 细胞培养与转染. 果蝇 S2 细胞株(由美国耶鲁大学许田教授提供)在 22~24℃ 以完全 M3 培养基(1 × 标准 M3 培养基, JRH Bioscience; 12.5% 胎牛血清 FCS, Hyclone; 1 × penicillin-streptomycin-fungizone, JRH Bioscience; 1 × BPYE (2.5 g Bacto-peptone, DIFCO; 1 g TC-yeastolate, DIFCO)). 转染前一天, 将 1 × 10⁶ S2 细胞铺于含 4 mL 完全 M3 培养基的 60 mm 培养皿, 转染前 3 h 更换为不含抗生素的培养基, 依照生命技术公司(Life Technologies)磷酸钙转染试剂盒的步骤, 分别以 10 μg 质粒 pEGFP-C1/11NLS 和 pEGFP-C1 DNA 转染细胞 24 h, 更换完全培养基, 继续培养 24 h, 用共聚焦显微镜(LEICA TCSNT)观察绿色荧光蛋白(激发波长: 507 nm, 发射波长: 488 nm), 并对转染细胞进行断层扫描, 光切片厚度为 1 μm.

(ix) *prtp* 基因在数据库中的分析. *prtp* 基因序列在 www.ncbi.nlm.nih.gov 中进行可读框分析, 运用 BLAST, BlastP 和 ClustalW(www.ebi.ac.uk) 进行 *prtp* 基因的核酸和蛋白质的序列同源性比较分析, 运用 Pfam HMM (<http://pfam.wustl.edu/hmmsearch.shtml>) 和基序扫描(<http://hits.isb-sib.ch>)进行蛋白质基序的分析, 运用 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)进行跨膜区域的分析, 使用 DNA star 进行蛋白质的分子量及等电点的分析.

2 结果

2.1 *prtp* 基因的克隆

自 1993 年以来, RDA 被广泛用于寻找基因组之间差异的研究. 鉴于 *Wolbachia* 无法在体外直接培养, 我们应用 RDA 分析具有不同 CI 表型的 *Wolbachia* 基因组之间的差异: 以感染了能诱导 CI 的 *wRi* 的果蝇 DSW/DSR 基因组 DNA 作为检测子, 感染了 *wMa*, 但无 CI 表型的果蝇 DSW/Mau 基因组 DNA 作为驱赶子. 在实验过程中, 成功地分离到了几段 DNA 片段, 并将其克隆到载体 pGEM-T 上进行测序, 而后将序列片段进行 BLASTX 分析, 其中的一段序列显示与编码噬菌体相关尾蛋白 PrTP 的基因有较高的同源性, 以此为基础, 我们应用 LM-PCR 在不同品系的 *Wolbachia* 内获得了该片段的旁侧序列.

2.2 *prtp* 的 DNA 序列及其编码的氨基酸序列的特征

运用 LM-PCR 获得了大约 2.2 kb 的 DNA 片段, 为了避免 *Taq* 聚合酶引入的误差, 我们对 3 个独立的克隆分别进行了测序. 同时应用 BlastP 分析了对应氨基酸的可读框, 应用 ClustalW 进行了多序列比对, 并在相关的数据库网站上进行了功能分析.

从 *wMelCS* 克隆到的 *prtp* 相关序列全长 2205 bp (GenBank 登录号为: AY043263)包含 5' 和 3' 的旁侧序列, 其可读框编码 680 个氨基酸, 分子量为 74.699 kD, 等电点为 9.34. 来自 *wMel* 的同源基因(GenBank 登录号为: AF420275)与前者具有 99% 的一致性, 其编码的蛋白包含 680 个氨基酸, 分子量为 74.582 kD, 等电点为 9.40. 表 1 列出了来自 *wMel* 和 *wMelCS* 的 PrTP 的不同氨基酸残基. 它们的 G+C 含量均为 36%.

Pfam HMM 分析显示 PrTP 含有 4 个重要的功能域: GlutR (19 ~ 134 aa), 以 NADPH 为辅助因子^[11]; SOR_SNZ (135 ~ 249 aa), 这一家族的许多成员都是参与维生素 B6/吡哆醛 5-磷酸生物合成途径的酶^[12];

表 1 来自 *wMelCS* 和 *wMel* 的 PrTP 不同氨基酸的比较

氨基酸位点	PrTP (AY043263)	PrTP (AF420275)
187	F	S
198	I	V
341	F	L
371	E	K
490	A	V
520	T	A
583	L	H
678	T	A

RTX (250 ~ 623 aa), 属于细菌毒素家族(包括溶细胞素和细胞毒素), 这一家族成员的 N 端包括氨基乙酸的重叠序列和溶红血球素-Ca-结合位点^[13]; 磷酸化酶(295 ~ 308 aa). SMART 分析显示 PrTP 包含 3 段跨膜区域: 440 ~ 462, 474 ~ 493, 497 ~ 519 aa; 趋化感应域 (chemotaxis sensory transducer, 114 ~ 339 aa) 在细菌的趋化反应中对引诱物或排斥物作出可逆的甲基化反应.

已知碱性区域在发挥 NLS 的功能中占有重要的作用^[14], 基序扫描分析指出, PrTP 的 N 端包含两段碱性区域(**KRDALHSFNEEVRKSGRN**)(黑体所示)(32 ~ 49 aa), 为双向 NLS, 由 10~22 残基分隔两段碱性氨基酸片段(图 1). 同时, ScanProsite (<http://us.expasy.org/cgi-bin/scanprosite>)指出 PrTP 包含两段亮氨酸拉链结构: LVSDQHKLGGSSIEVLKGKYGKL (53~74 aa) 和 LKVAVGLGYGFTLLGSTIFSL (451 ~ 472 aa).

PrTP	32 KRDALHSFNEEVRKSGRN 49
nucleoplasmin	559 KRPAATKKAGQAKKKK 595
pRb	561 KRSAEGSNPPKPLKKLR 577
c-Jun	259 KRMRNRLAASKCRKRK 274
p53	305 KRALPNNNTSSSPQPKKK 321

图 1 PrTP 的双向 NLS 区域的比较
PrTP 的双向 NLS 区域与相应的 nucleoplasmin(核浆素), pRb, c-Jun 和 p53 区域的比较

基于 N 端的碱性区域和亮氨酸拉链结构是 DNA 结合的特征功能域^[15]以及 *Wolbachia* 所特有的引起宿主生殖方式改变的性质, 我们推测 PrTP 在介导 *Wolbachia* 和宿主的相互作用中可能扮演重要的角色.

通过 BlastP 分析, PrTP 与来自 *Xylella fastidiosa* (strain 9a5c)的噬菌体相关尾蛋白存在 26% 的一致性, 49% 的相似性(GenBank 登录号为: NP_298020, NP_299760); 与来自 *Salmonella typhimurium* LT2 的噬菌体 186 的 orfG 蛋白存在 21% 的一致性, 41% 的相似性(GenBank 登录号为: NP_461625); 与来自 *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Typhi 编码的噬菌体尾蛋白存在 23% 的一致性, 43% 的相似性(GenBank 登录号为: NP_457167)(图 2). 上述比对结果指出

919

PrTP 可能最初来源于噬菌体.

2.3 prtp 在分子水平上的分析结果

运用[α-³²P] dATP 标记的 *prtp* 全长 DNA 序列进行 Southern 杂交以确定不同 *Wolbachia* 品系内 *prtp* 基因的拷贝数. 结果如图 3 所示: wMel 和 wMelCS 均含有一份 *prtp* 基因; 尽管图 3 结果显示 wRi 含有 3 条阳性条带, 但是我们没有从 wRi 中得到 *prtp* 基因的全长序列, 不过这些条带显示它们与 *prtp* 基因有着很高的同源性; 同时, 我们没有在其他 *Wolbachia* 品系中找到对应的同源基因或片段. 在这一实验中, 以 *RP49* 序列片段的引物^[10]作为检测总 DNA 质量的阳性对照, *Wolbachia* 的通用引物 81F/691R 作为检测基因组 DNA 中是否存在 *Wolbachia* 的对照. 因此, Southern 杂交的阴性结果表明这些 *Wolbachia* 品系中的确不含有 *prtp* 的同源基因.

同时, 我们运用 RT-PCR 研究了 *prtp* 在不同 *Wolbachia* 品系中的表达情况, 结果如图 4 所示, 除了未在 wRi 中检测到条带外, 其余结果与 Southern 杂交的结果一致.

为了验证 NLS 序列是否参与了 *Wolbachia* 的核定位功能, 我们将含有 NLS 的部分 *prtp* 序列克隆到载体 pEGFP-C1 中, 瞬时转染果蝇的 S2 细胞. 带有 NLS 的载体 pEGFP-C1/11NLS 表达的绿色荧光融合蛋白显著地定位在 S2 细胞的核上(图版 I, 附本刊

图 3 不同品系 *Wolbachia* 的 *prtp* 的 Southern 杂交分析
1 示 DSR, 2 示 DSRT, 3 示 R3A, 4 示 R3AT, 5 示 YW, 6 示 YWT, 7 示 DM, 8 示 DMT, 9 示 Mau, 10 示 MauT. 各品系 *Wolbachia* 所对应的果蝇总 DNA 经 *EcoR* I 酶切, 并以 wMelCS 的 *prtp* 的全长 DNA 为探针进行检测

后), 共聚焦显微镜断层扫描结果显示, 这些绿色荧光均匀地分布在核内; 作为对照, 单独的 EGFP 蛋白分布在整个细胞中. 这一体外实验表明 PrTP 可能参与了 *Wolbachia* 与宿主细胞核的相互作用.

图 4 不同果蝇品系总 RNA(经 RNase-free DNase I 消化)的 RT-PCR 电泳图谱
M 示 DL2000, 1 示 DSR, 2 示 DSRT, 3 示 YW, 4 示 YWT, 5 示 R3A, 6 示 R3AT, 7 示 DM, 8 示 DMT, 9 示 Mau, 10 示 MauT, 11 示 Blank

3 讨论

研究表明噬菌体有可能通过下述途径参与进化: 病毒因子的转移或噬菌体的基因片段整合到宿主的染色体上^[16]. 我们的研究结果表明 *prtp* 与植物病原体 *Xylella fastidiosa* 的噬菌体相关尾蛋白基因存在着较高的相似性; 但与最近在 *Wolbachia* 基因组中发现的类噬菌体遗传因子——噬菌体 WO^[17]的同源性很低; 且与 *Wolbachia* 亲源关系很近的胞内共生菌 *Rickettsia conorii* 和 *Rickettsia prowazekii*^[18]内的噬菌体相关基因的同源性也不高. 经 NCBI 网站的 BlastP 分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> 和 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>), *prtp* 可能来源于双链 DNA 病毒——Caudovirales, 是广泛的基因水平转移(extensive horizontal gene transfer, HGT)的直接证据.

Wolbachia 能够引起宿主的多种生殖异常, 并且不同的 *Wolbachia* 品系可能对应不同的生殖异常表型^[19]. 由于这些异常生殖表型与 *Wolbachia* 品系之间在 *Wolbachia* 的进化系统发生树上不存在对应关系而呈随机分布, 推测可能是某些运动遗传因子如质粒和噬菌体等参与并引发和传递了这种异常表型^[17,19,20]. *prtp* 基因的克隆和特征分析显示在 *Wolbachia* 和噬菌体间存在着基因水平转移, 同时在 *prtp* 中含有 DNA 结合域(N 端的碱性区域和亮氨酸拉链结构), 提示其与宿主的基因组 DNA 相互作用的可能性. 我们的体外实验表明 PrTP 与 EGFP 构成的融

合蛋白显著定位于果蝇 S2 细胞的核内,且在核内是均匀分布的.由此可以推测 PrTP 可能介导了 *Wolbachia* 基因组或某些基因与宿主细胞核的结合,进而导致宿主中各种生殖表型的出现.

由于 *Wolbachia* 无法在体外直接培养,为了克服这一障碍,我们运用 RDA 方法从具有不同 CI 表型的 *Wolbachia* 中获得了 *prtp* 的片段,进而运用 LM-PCR 试图从不同 *Wolbachia* 品系中得到其旁侧序列.然而,来自 Southern 杂交和 RT-PCR 的结果表明 PrTP 可能与 CI 现象没有直接的关系: *wRi*, *wNo* 和 *wMeI* 均可诱导 CI,但未在 *wNo* 中检测到 *prtp* 的同源基因或片段;同时 *wMeICS* 不能诱导 CI 现象,但其基因组中含有 *prtp*.目前 PrTP 与 CI 现象之间的关系仍不甚清楚,进一步的研究仍在进行中.

至于为什么 *wRi* 基因组中含有 *prtp* 3 段同源片段,一种解释是: *wRi* 是迄今为止所发现的拥有最大基因组的 *Wolbachia* 品系,它可能在进化过程中完成更多的基因重复复制^[21].第二种解释是:与其他 *Wolbachia* 品系相比, *wRi* 与特定的线粒体 DNA 相关联,表明它在进化历程中出现得较晚^[22~24].上述两个方面暗示 *wRi* 可能在宿主、*Wolbachia* 和噬菌体的进化历程中占有特殊的地位, *wRi* 和噬菌体的基因水平转移过程以及 *wRi* 与宿主的相互作用过程正在研究中.

致谢 S. L. O'Neill 教授为本工作提供了果蝇品系,许田教授提供了果蝇 S2 细胞株,蔡丽君、马喜芝提供了昆虫材料,程秋应博士、应蓓蓓老师和张晓宁对本工作进行了有益的讨论,特此致谢.本工作为国家自然科学基金(批准号:39800085)和美国 McKnight Foundation 资助项目.

参 考 文 献

1 Werren J H, Windsor D, Guo L R. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. *Proc R Soc Lond B*, 1995, 262: 197~204

2 Jeyaprakash A, Hoy M A. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Mol Biol*, 2000, 9: 393~405

3 Werren J H. Biology of *Wolbachia*. *Annu Rev Entomol*, 1997, 42: 587~609

4 Beard C B, O'Neill S L, Tesh R B, et al. Modification of arthropod vector competence via symbiotic bacteria. *Parasitol Today*, 1993, 9: 179~183

5 Sinkins S P, Curtis C F, O'Neill S L. The potential application of inherited symbiont systems to pest control. In: O'Neill S L, Hoffmann A A, Werren J H, eds. *Influential Passengers: Inherited Microorganisms and Arthropod Reproduction*. Oxford: Oxford University Press, 1997. 155~175

6 Lisitsyn N, Lisitsyn N, Wigler M. Cloning the differences between

two complex genomes. *Science*, 1993, 259: 946~951

7 Zhou W, Rousset F, O'Neill S L. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc R Soc Lond B*, 1998, 265: 509~515

8 Altschul S F, Madden T L, Schaffer A A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25: 3389~3402

9 Braig H R, Zhou W, Dobson S L, et al. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *J Bacteriol*, 1998, 180: 2373~2378

10 Hauser F, Nothacker H P, Grimmekhuijzen C J. Molecular cloning, genomic organization and developmental regulation of a novel receptor from *Drosophila melanogaster* structurally related to members of the TSH, FSH, LH/CG receptor family from mammals. *J Biol Chem*, 1997, 272: 1002~1010

11 Kannangara C G, Gough S P, Bruyant P, et al. tRNA(Glu) as a cofactor in delta-aminolevulinic acid biosynthesis: steps that regulate chlorophyll synthesis. *Trends Biochem Sci*, 1988, 13: 139~143

12 Braun E L, Fuge E K, Padilla P A, et al. A stationary-phase gene in *Saccharomyces cerevisiae* is a member of a novel, highly conserved gene family. *J Bacteriol*, 1996, 178: 6865~6872

13 Makino K, Ishii K, Yasunaga T, et al. Complete nucleotide sequences of 93 kb and 3.3 kb plasmids of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 derived from Sakai outbreak. *DNA Res*, 1998, 5: 1~9

14 Craggs G, Kellie S. A functional nuclear localization sequence in the C-terminal domain of SHP-1. *J Biol Chem*, 2001, 276: 23719~23725

15 Sato N, Ohta N. DNA-binding specificity and dimerization of the DNA-binding domain of the PEND protein in the chloroplast envelop membrane. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29: 2244~2250

16 Miao E A, Miller S I. Bacteriophages in the evolution of pathogen-host interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 9452~9454

17 Masui S, Kamoda S, Sasaki T, et al. Distribution and evolution of Bacteriophage WO in *Wolbachia*, the endosymbiont causing sexual alternation in Arthropods. *J Mol Evol*, 2000, 51: 491~497

18 Ogata H, Audic S, Renesto-Audiffren P, et al. Mechanisms of evolution in *Rickettsia conorii* and *R. prowazekii*. *Science*, 2001, 293: 2093~2098

19 Stouthamer R, Breeuwer J A, Hurst G D. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annu Rev Microbiol*, 1999, 53: 71~102

20 Van Meer M M, Witteveldt J, Stouthamer R. Phylogeny of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* based on the *wsp* gene. *Insect Mol Biol*, 1999, 8: 399~408

21 Sun L V, Foster J M, Tzertzinis G, et al. Determination of *Wolbachia* genome size by pulsed-field gel electrophoresis. *J Bacteriol*, 2001, 83: 2219~2225

22 Hale L R, Singh R S. A comprehensive study of genic variation in natural populations of *Drosophila melanogaster*. IV. Mitochondrial DNA variation and the role of history vs selection in the genetic structure of geographic populations. *Genetics*, 1991, 129: 103~117

23 Turelli M, Hoffmann A A, Mckechnie S W. Dynamics of cytoplasmic incompatibility and mtDNA variation in natural *Drosophila simulans* populations. *Genetics*, 1992, 132: 713~723

24 Rousset F, Soliganc M. Evolution of single and double *Wolbachia* symbioses during speciation in the *Drosophila simulans* complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 6389~6393

1

2

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2002-47-12-916>

NLS 在瞬时转染的果蝇 S2 细胞内的功能检测. 1 示 EGFP/11NLS 在 S2 细胞核内的荧光分布. (a) 可见光视野, (b) 荧光视野. 红色的箭头示细胞核. 2 示 EGFP 在整个 S2 细胞内的荧光分布. (a) 可见光视野, (b) 荧光视野, 红色的箭头示整个细胞. 标尺示 10 μ m