

研究论文

亚洲玉米螟幼虫体内保幼激素二醇激酶 cDNA 片段克隆与序列分析*

冯从经** 翟会峰

(扬州大学园艺与植物保护学院植物保护系 扬州 225009)

摘 要 为研究亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (Guenée) 幼虫体内保幼激素二醇激酶 (JHDK) 表达调控的分子机理, 根据不同昆虫保幼激素二醇激酶基因序列的保守区域, 设计合成简并引物, 采用 RT-PCR 技术从亚洲玉米螟 5 龄幼虫中扩增出一段 cDNA 片段, 大小为 189 bp, 编码 63 个氨基酸, 预测分子量为 6.78 ku, 理论等电点 pI 值为 4.57。该基因序列中含有保守的 GTP 结合蛋白特征指纹基序 $\Sigma 3$ 和 $\Sigma 1$ 。BlastP 分析结果表明: 该片段氨基酸序列与烟草天蛾 JHDK 氨基酸序列的一致性最高, 为 69%; 与家蚕和小菜蛾 JHDK 氨基酸序列的一致性分别为 55% 和 52%。构建系统发育树分析了 3 种鳞翅目昆虫 JHDK 进化关系, 结果显示: 亚洲玉米螟 cDNA 片段氨基酸序列与家蚕 JHDK 的亲缘关系最近, 与小菜蛾 JHDK 的亲缘关系最远。半定量 PCR 结果表明: JHDK 基因在中肠中表达量最高, 随着 5 龄幼虫的发育, JHDK 基因在血细胞、脂肪体和体壁组织中表达量有下降趋势, 但在中肠组织中表达量明显增强。

关键词 亚洲玉米螟, 保幼激素二醇激酶, 基因克隆, 序列分析, 半定量 PCR

Cloning and sequence analysis of cDNA fragment of juvenile hormone diol kinase from the larvae of Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis*

FENG Cong-Jing** ZHAI Hui-Feng

(Department of Plant Protection, College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract In order to explore the molecular mechanism controlling the expression and regulation of the juvenile hormone diol kinase (JHDK) in *Ostrinia furnacalis* (Guenée) larvae, sequences of conserved regions of the JHDK gene from different individuals were used to design degenerate primers and a cDNA fragment of 189 bp, encoding 63 amino acids, was amplified from 5th instar larvae by RT-PCR. This fragment had a predicted molecular weight of 6.78 ku and a pI value of 4.57. Two conserved fingerprint motifs of the GTP-binding proteins $\Sigma 3$ and $\Sigma 1$ in the JHDK gene were found. BlastP showed that the amino acid sequence of *O. furnacalis* JHDK (Of-JHDK) was most similar to that of *Manduca sexta* JHDK (69%) and its relative similarity to the *Bombyx mori* and *Plutella xylostella* JHDK was 55% and 52%. Phylogenetic analysis showed that Of-JHDK was most closely related to *B. mori* JHDK and least related to *P. xylostella* JHDK. Semi-quantitative PCR showed that the expression of JHDK in 5th instar larvae was highest in the midgut. JHDK expression increased in the midgut while decreasing in the hemocytes, fat body and integument tissue as larvae developed.

Key words *Ostrinia furnacalis*, juvenile hormone diol kinase, gene cloning, sequence analysis, semi-quantitative PCR

保幼激素 (juvenile hormone, JH) 是一类最重要的昆虫激素, JH 由昆虫咽侧体合成, 然后释放

进入血淋巴, 与保幼激素结合蛋白 (juvenile hormone binding protein) 结合后被转运至靶组织,

* 资助项目: 国家自然科学基金 (30971963)、扬州大学科技创新培育基金 (2010CXJ046, 2008CXJ028)、扬州大学“新世纪人才工程” 杨大人 (2010) 28 号]。

** 通讯作者, E-mail: fengcj@yzu.edu.cn

收稿日期: 2010-07-08, 接受日期: 2010-11-15

从而起到调控昆虫生长、发育、变态和生殖等功能 (Maxwell *et al.*, 2002b)。昆虫血淋巴中 JH 滴度是由 JH 的合成及代谢共同维持平衡的 (Gilbert *et al.*, 2000)。保幼激素的代谢由保幼激素酯酶 (juvenile hormone esterase, JHE)、保幼激素环氧水解酶 (juvenile hormone epoxide hydrolase, JHEH) 和保幼激素二醇激酶 (juvenile hormone diol kinase, JHDK) 等催化完成。其中, JHE 降解 JH 成为保幼激素酸 (juvenile hormone acid, JHa), JHEH 降解 JH 成为保幼激素二醇 (juvenile hormone diol, JHd), 再通过 JHE 降解 JHd 和 JHEH 降解 JHa 产生保幼激素酸二醇 (juvenile hormone acid diol, JHad) (李胜等, 2004)。在昆虫细胞质中还存在保幼激素二醇激酶 (juvenile hormone diol kinase, JHDK), JHDK 可以降解 JHd 成为保幼激素二磷酸 (juvenile hormone diol phosphate, JHdp), JHad 和 JHdp 是保幼激素的最终代谢产物 (Maxwell *et al.*, 2002a)。

迄今, 仅在烟草天蛾 *Manduca sexta* (Maxwell *et al.*, 2002a)、家蚕 *Bombyx mori* (Li *et al.*, 2005) 和小菜蛾 *Plutella xylostella* 中克隆了 JHDK 基因。Maxwell 等 (2002b) 从烟草天蛾 5 龄 1 日龄幼虫的马氏管中纯化得到 JHDK 蛋白, 发现 JHDK 蛋白是一个亚基相对分子量大小为 20 ku 的同源二聚体, 对保幼激素二醇具有底物特异性, 类似于 GTP 结合蛋白, 但相对 GTP 而言更偏爱 ATP 结合, 低浓度钙离子可以抑制其激酶活性。研究还发现果蝇 *Drosophila melanogaster* 的钙结合蛋白家族的 SCP2 蛋白 (sarcoplasmic calcium-binding protein-2, SCP2) 与烟草天蛾 JHDK 有较高同源性, 似乎是一种 JHDK (Maxwell *et al.*, 2002a)。目前, 昆虫保幼激素调控的分子机理尚未完全阐明, 有关昆虫体内 JHDK 蛋白的性质、功能及表达调控情况尚无深入研究。本研究首次进行了亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (Guenée) 幼虫 JHDK 基因的克隆, 获得了 JHDK 基因的一个 cDNA 片段 (GenBank 登录号: HM626514), 为通过 5'-RACE 和 3'-RACE 克隆 JHDK 基因全长序列, 进一步研究 JH 滴度调节的分子机理提供了基础。

1 材料与方法

1.1 实验昆虫

亚洲玉米螟幼虫是在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、相对湿度

>90% 和光周期 L:D = 14:10 的温室条件下采用半人工饲料进行饲养 (周大荣等, 1980), 以头壳宽度鉴别龄期, 饲养至 5 龄备用。

1.2 主要试剂

Trizol 试剂购自 Invitrogen (美国); DNA 胶回收试剂盒为百泰克 (Biotek) 生物公司产品; Taq 酶、dNTP、M-MLV 反转录酶、DNA marker 及 pMD18-T 载体购自宝生物工程 (大连) 有限公司 (TaKaRa)。引物合成和 DNA 测序由上海英骏 (Invitrogen) 公司完成。感受态细胞菌种 DH5 α 来自上海生工公司, 其它化学试剂为国产分析纯试剂。

1.3 实验方法

1.3.1 总 RNA 提取 5 头亚洲玉米螟 5 龄幼虫用无水乙醇擦洗虫体, 在液氮内速冻, 然后放在研钵中磨碎成细粉, 转移入玻璃匀浆器中; 加入 1 mL Trizol 试剂, 采用一步法抽提总 RNA。用 0.5 mL 经焦碳酸二乙酯 (diethyl pyrocarbonate, DEPC) 处理的水溶解 RNA, 并在 55 ~ 60 $^\circ\text{C}$ 静置 10 min, 然后在 Eppendorf 公司 BioPhotometer 分光光度计 (德国) 上测定 OD 值和纯度, -70 $^\circ\text{C}$ 低温冰箱保存备用。

1.3.2 简并引物设计 以 GenBank 中家蚕和小菜蛾保幼激素二醇激酶的氨基酸和核苷酸序列为参考, 采用 Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) 分析其同源性, 根据其中较为保守区域的氨基酸和核苷酸序列, 设计一对简并引物, 其中上游引物: 5'-GKCRABGAGTWCKYSACYGT-3'; 下游引物: 5'-GHARSTVGTCTGCGGAAGAKG-3'。

1.3.3 cDNA 第 1 链合成及 PCR 扩增 在无核酶的 Eppendorf 管内反转录 mRNA 合成 cDNA, 以合成的 cDNA 第 1 链为模板, PCR 反应总体积为 50 μL : 5 μL 10 $\times$ 缓冲液 (含 Mg^{2+} , 50 $\mu\text{mol/L}$), 各 4 μL 上下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$), 4 μL dNTP 混合液 (2 mmol/L), 5 μL 模板 cDNA, 26.5 μL 超纯水, 1.5 μL Taq 酶 (2 U)。PCR 扩增反应条件: 94 $^\circ\text{C}$ 预变性 3 min, 94 $^\circ\text{C}$ 1 min, 58 $^\circ\text{C}$ 30 s, 68 $^\circ\text{C}$ 45 s。循环 30 次, 然后 68 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。

1.3.4 PCR 产物克隆与测序 PCR 产物通过琼脂糖电泳分离目的基因片段, 按照 DNA 胶回收试剂盒的用户手册进行 PCR 产物的回收纯化, 纯化后 PCR 产物与 pMD18-T 载体连接, 然后转化大肠杆菌 DH5 α , 蓝白斑筛选, 随机挑取多个白色菌落, 通过菌落 PCR 鉴定阳性克隆, 由上海英骏公司测序。

1.3.5 序列分析 采用 DnaClub 软件对测序结果进行初步编辑和分析,对推导的氨基酸序列采用 BlastP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 和 Clustal W 在线软件进行同源性比较分析,参考序列均来自 NCBI,采用 ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) 预测蛋白质的理化性质,采用 GOR 在线工具完成氨基酸序列的二级结构预测 (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html)。以果蝇的钙结合蛋白家族的 SCP2 蛋白 (GenBank 登录号:NM_079657) 为外群,采用 MEGA4 系统树构建软件构建系统树,采用邻位相连算法 (neighbor-joining, NJ), 1 000 次自举 (bootstrapping) 进行进化树的可信度评估。

1.3.6 半定量 PCR 分析 将 10 头 1 日龄、3 日龄和 5 日龄的亚洲玉米螟 5 龄幼虫,分别剪破腹足收集血淋巴,4 ℃ 下 1 000 g 离心 10 min 后取血细胞沉淀。将解剖好的幼虫中肠、脂肪体和体壁组织放入 0.01 mol/L 的磷酸缓冲液 (PBS, pH 7.2) 充分洗涤。采用 Trizol 试剂按照上述方法抽提各组织中总 RNA,测定其浓度值,然后加入适量的 DEPC 处理后的 H₂O 将各组织抽提的总 RNA 浓度调节为 1.3 μg/μL。在无核酶的 Eppendorf 管内反转录 mRNA 合成 cDNA,以合成的 cDNA 第 1 链为模板,进行 PCR 扩增。根据作者已经克隆的亚洲玉米螟幼虫 JHDK 部分核苷酸序列,设计扩增 JHDK 片段的上游引物为:5'-GACTGTCCTCGCTTCCTT-3',下游引物:5'-ATTCGCCCATGAGATGC-3' (预测扩增片段大小为 95 bp);以亚洲玉米螟体内保守的核糖体蛋白 L8 (RPL8) 基因为内参基因,其上游引物为:5'-ACCGAGGTGCTAACCATCAACA-3',下游引物为:5'-ACGCCTCCTTCTTGCTGTCG-3' (预测扩增片段大小为 141 bp)。

PCR 反应体系为 20 μL:4 μL 5 × 缓冲液 (含 Mg²⁺, 50 μmol/L),各 1 μL 上下游引物 (10 μmol/L),1 μL dNTP 混合液 (2 mmol/L),1 μL 模板 cDNA,11.5 μL 超纯水,0.5 μL pfu 酶 (2 U)。PCR 反应的扩增条件:94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 10 s,循环 25 次,然后 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后,采用捷达科技凝胶成像系统拍照并分析各条带的积分光密度值,计算目标基因 JHDK 扩增条带与内参基因 RPL8 的积分光密度值之比。设置 3 个 PCR 反应重复。

1.4 数据分析

统计数据采用 SPSS 软件进行 *t* 测验和方差分析,数值采用平均数 ± 标准差 (mean ± SD)。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 抽提及 PCR 扩增产物鉴定

采用紫外分光光度法分析了从亚洲玉米螟 5 龄幼虫体内提取所得的总 RNA 的纯度和浓度,其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值为 1.97;OD₂₆₀/OD₂₃₀ 的比值为 1.81,总 RNA 浓度为 3.364 μg/μL。琼脂糖凝胶电泳显示:18S RNA 和 28S RNA 条带清晰,OD₂₆₀/OD₂₃₀ 的比值合理,说明提取的总 RNA 是完整的,纯度较好 (图 1)。采用简并引物对 5 龄亚洲玉米螟幼虫体内 JHDK 进行 RT-PCR 扩增,获得与预计大小相近的核苷酸片段 (图 2)。

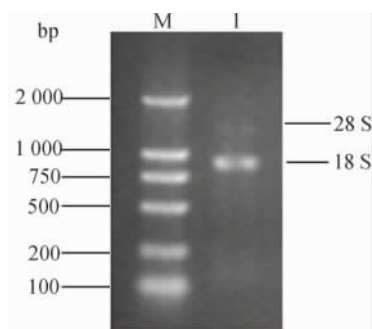


图 1 亚洲玉米螟 5 龄幼虫总 RNA 提取

Fig. 1 The abstraction of total RNA from the 5th instar larvae of *O. furnacalis*

M:标准分子量 DNA (DL2000); I:抽提的总 RNA
M:DNA marker (DL2000); I:total RNA

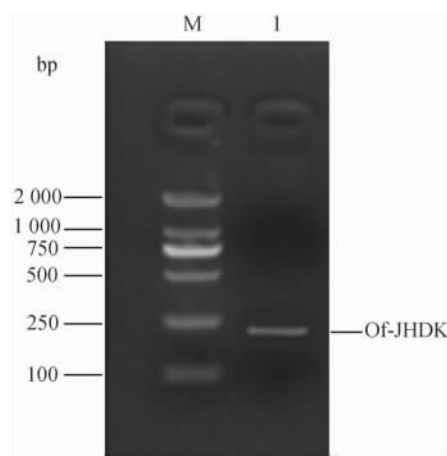


图 2 亚洲玉米螟幼虫 JHDK 基因 PCR 扩增产物
Fig. 2 PCR product of JHDK gene from larvae of *O. furnacalis*

M:标准分子量 DNA (DL2000); I:PCR 扩增产物
M:DNA marker (DL2000); I:PCR productem

2.2 亚洲玉米螟幼虫储存蛋白 cDNA 片段核苷酸序列

作者成功克隆一段长为 189 bp 的 cDNA 片段 (GenBank 登录号: HM626514), 该片段编码 63 个氨基酸 (图 3), 预测分子量为 6.78 ku, 理论等电点 pI 值为 4.57。在克隆的亚洲玉米螟 cDNA 片段的氨基酸序列中存在 JHDK 中保守的 3 个 GTP 结

合蛋白特征指纹基序中的两个 ($\Sigma 3$ 和 $\Sigma 1$), 分别是位于 14 ~ 17 位的 DKAE ($\Sigma 3$) 和位于 54 ~ 63 位的 GNFLFGKTSY ($\Sigma 1$)。利用 GOR 在线软件进行克隆片段的二级结构分析, 结果表明该片段在 15 ~ 25 位和 32 ~ 48 氨基酸存在两个 α 螺旋二级结构区域 (H1 和 H2) (图 3)。



图 3 亚洲玉米螟幼虫 JHDK cDNA 片段的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 3 The nucleotide and deduced amino acid sequences of the cloned cDNA fragment of JHDK gene from larvae of *O. furnacalis*

保守的 GTP 结合蛋白指纹基序用方框表示, 预测的 α 螺旋区域用下划线表示

The conserved fingerprint motifs of GTP-binding proteins ($\Sigma 3$ and $\Sigma 1$) are framed with rectangle and the predicted regions of α helix (H1 and H2) are underlined

2.3 亚洲玉米螟幼虫储存蛋白 cDNA 片段推导的氨基酸序列分析

根据该片段核苷酸序列推导得到氨基酸序列, 然后进行 BlastP 分析, 结果表明: 该片段氨基酸序列与 GenBank 中烟草天蛾 JHDK (GenBank 登录号: AJ430670) 氨基酸序列的一致性最高, 为 69%; 与家蚕 JHDK (GenBank 登录号: NM_001043615) 和小菜蛾 JHDK (GenBank 登录号: AB180433) 氨基酸序列的一致性分别为 55% 和 52%, 与果蝇钙结合蛋白 SCP2 (GenBank 登录号: NM_079657) 氨基酸序列的一致性为 49%。

利用 Clustal W 软件对亚洲玉米螟幼虫中克隆的 cDNA 片段推导的氨基酸序列与其它鳞翅目昆虫 3 种 JHDK 和果蝇 SCP2 的氨基酸序列进行比对分析, 结果表明: 亚洲玉米螟 cDNA 片段氨基酸序列与上述序列有较高的相似性 (图 4)。说明

在亚洲玉米螟幼虫体内克隆的 cDNA 片段是 JHDK 基因的部分核苷酸序列。

为更好地了解亚洲玉米螟 JHDK 基因的遗传学特性及与其他鳞翅目昆虫的亲缘关系, 本研究采用 MEGA4 软件, 以果蝇钙结合蛋白家族的 dSCP2 蛋白为外群, 利用上述氨基酸序列绘制了系统进化树。从图 5 中可以看出亚洲玉米螟 cDNA 片段氨基酸序列与家蚕 JHDK 的亲缘关系最近, 与烟草天蛾 JHDK 有较近的亲缘关系, 与小菜蛾 JHDK 的亲缘关系最远。

2.4 亚洲玉米螟幼虫体内 JHDK 基因表达情况分析

采用半定量 PCR 对 1 日龄、3 日龄和 5 日龄亚洲玉米螟幼虫体内的血细胞、脂肪体、中肠和体壁组织中 JHDK 基因表达情况进行了初步分析。结果表明: 在 4 种组织中都有 JHDK 基因表

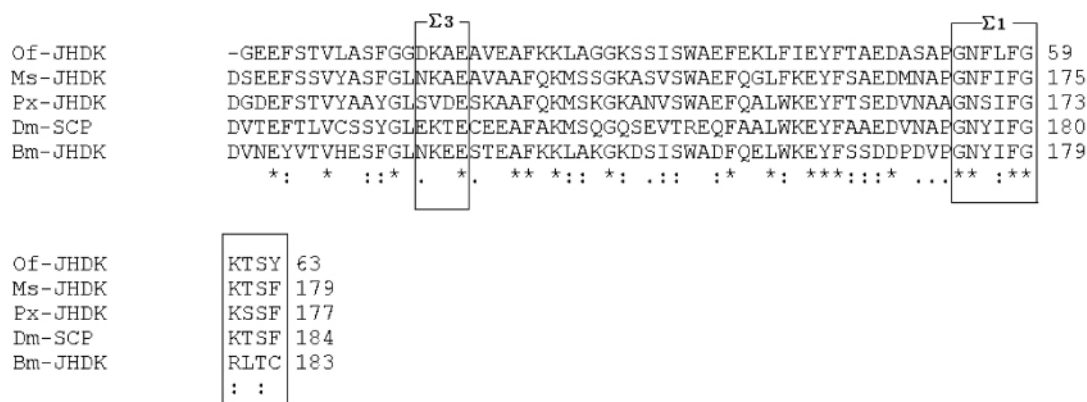


图4 亚洲玉米螟与鳞翅目主要几种昆虫 JHDK 氨基酸序列的 Clustal W 分析

Fig. 4 Comparison of the known JHDK amino acid sequences from several lepidopteran insects with the fragment of *O. furnacalis* JHDK by Clustal W

保守的 GTP 结合蛋白指纹基序用方框表示, “*”表示 5 个序列完全相同部分;

“·”表示观察到的保守替换; “.”表示观察到的半保守替换。

Fingerprint motifs of GTP-binding proteins ($\Sigma 3$ and $\Sigma 1$) are framed with rectangle ($\square$), and asterisks (*) mark the positions of amino acid residues conserved in all five sequences; “·” indicates conservative substitutions; “.” indicates semi-conservative substitutions.

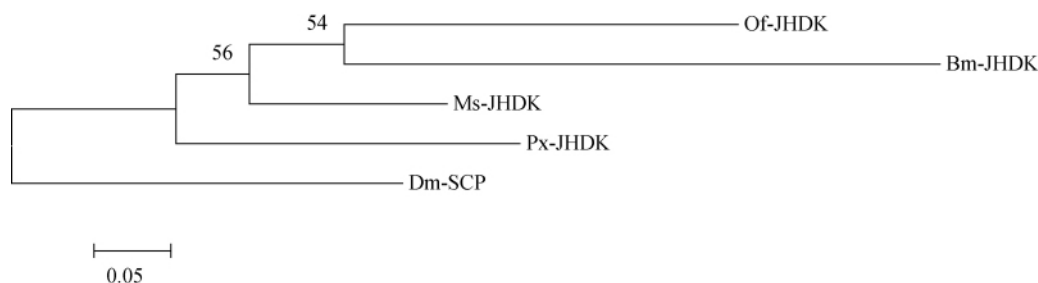


图5 基于邻位相连算法(neighbor-joining, NJ)建立的昆虫中 4 种 JHDK 氨基酸序列的有根系统树

Fig. 5 Neighbor-joining phylogenetic tree of JHDK amino acid sequences from four kinds of insects, based on Poisson-corrected protein distances

分支线上数值代表沿分支进化的百分率,采用邻位相连算法通过 1 000 次重复自举法分析测定了内部分支的值。

Bm-JHDK, 家蚕 (NM_001043615); Ms-JHDK, 烟草天蛾 (AJ430670); Px-JHDK, 小菜蛾 (AB180433);

Dm-SCP, 果蝇 (NM_079657); Of-JHDK, 亚洲玉米螟 (HM626514)。

Numbers at tree nodes refer to bootstrap values from 1 000 replications. Scale bar refers to a phylogenetic distance of 0.05 amino acid substitutions per site. Bm-JHDK, *B. mori* (NM_001043615); Ms-JHDK, *M. sexta* (AJ430670); Px-JHDK, *P. xylostella* (AB180433); Dm-SCP, *D. melanogaster* (NM_079657); Of-JHDK, *O. furnacalis* (HM626514).

达,中肠内表达量最高(图6)。随着 5 龄幼虫发育时间延长,JHDK 基因在血细胞、脂肪体和体壁组织中表达量有下降趋势,但在中肠组织中 JHDK 基因表达明显增强(表 1)。

3 讨论

JHDK 是细胞内一种可溶蛋白,可以将 JHd 降解为 JHdp, JHdp 是保幼激素的最终代谢产物。除

了烟草天蛾 JHDK 和家蚕 JHDK 有限的数据库外,目前在其他昆虫中尚没有关于 JHDK 的深入研究。Li 等(2005)克隆了家蚕的 JHDK 基因,发现家蚕 JHDK 的基因序列和结构与其他许多不同生物中钙结合蛋白相似,如 2SCP、2SAS、4CLN、1DVI 和 1AVJ (Protein Data Bank 编码)等,是一种潜在的 GTP 结合蛋白,家蚕 JHDK 基因属于钙结合蛋白超家族成员。尽管家蚕 JHDK 在 JH 降解途径中

起着非常重要的作用,但 JHDK 的转录水平表达似乎不受 JH 的调控。

在家蚕 JHDK 和烟草天蛾 JHDK 中都存在保守的 3 个 GTP 结合蛋白特征指纹基序(fingerprint motif),

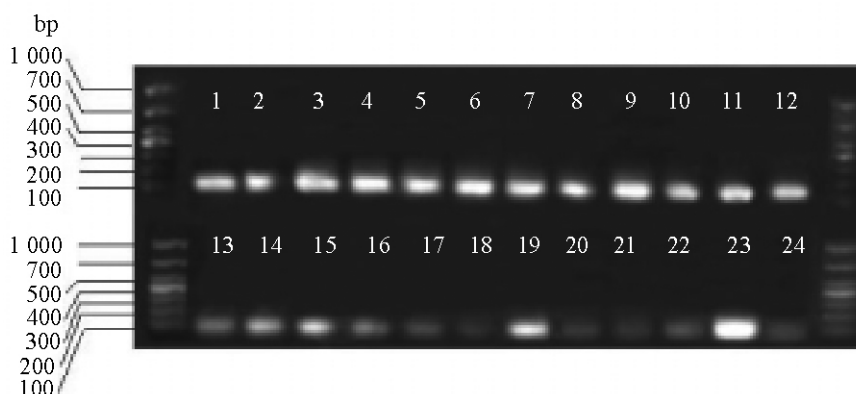


图 6 亚洲玉米螟幼虫体内 JHDK 基因表达的半定量 PCR 分析

Fig. 6 Semi-quantitative PCR analysis of the expression of JHDK gene from larvae of *O. furnacalis*

1~12 为 RPL8 基因分别在 1 日龄血细胞、1 日龄脂肪体、1 日龄中肠、1 日龄体壁、3 日龄血细胞、3 日龄脂肪体、3 日龄中肠、3 日龄体壁、5 日龄血细胞、5 日龄脂肪体、5 日龄中肠和 5 日龄体壁中表达情况; 13~24 为 JHDK 基因分别在 1 日龄血细胞、1 日龄脂肪体、1 日龄中肠、1 日龄体壁、3 日龄血细胞、3 日龄脂肪体、3 日龄中肠、3 日龄体壁、5 日龄血细胞、5 日龄脂肪体、5 日龄中肠和 5 日龄体壁中表达情况。

Lane 1 – Lane 12 showed the expression of RPL8 in 1 day hemocyte, 1 day fat body, 1 day midgut, 1 day integument, 3 days hemocyte, 3 days fat body, 3 days midgut, 3 days integument, 5 days hemocyte, 5 days fat body, 5 days midgut and 5 days integument, respectively. Lane 13 – Lane 24 showed the expression of JHDK in 1 day hemocyte, 1 day fat body, 1 day midgut, 1 day integument, 3 days hemocyte, 3 days fat body, 3 days midgut, 3 days integument, 5 days hemocyte, 5 days fat body, 5 days midgut and 5 days integument, respectively.

表 1 亚洲玉米螟幼虫体内不同组织中 JHDK 基因表达情况 ($M \pm SD, n = 3$)

Table 1 The expression of JHDK gene in different tissues from larvae of *O. furnacalis* ($M \pm SD, n = 3$)

	血细胞 Hemocyte	脂肪体 Fat body	中肠 Midgut	体壁 Integument
1 日龄 1 day	0.866 ± 0.026 Aa	0.973 ± 0.031 Aa	1.072 ± 0.042 Aa	0.858 ± 0.110 Aa
3 日龄 3 day	0.784 ± 0.003 Bb	0.725 ± 0.025 Bb	1.247 ± 0.102 Ab	0.688 ± 0.042 Ab
5 日龄 5 day	0.619 ± 0.015 Cc	0.718 ± 0.107 Bb	1.431 ± 0.048 Bc	0.624 ± 0.008 Bb

注: 同列数据后不同小写字母代表差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母代表差异极显著 ($P < 0.01$)。

Data with different small letters within a column are significantly different at 0.05 level, and with different capital letters within a column are significantly different at 0.01 level. The same below.

在氨基酸序列上依次为 $\Sigma 2$ 、 $\Sigma 3$ 和 $\Sigma 1$ (Li *et al.*, 2005)。作者克隆的亚洲玉米螟 cDNA 片段的氨基酸序列中不存在 $\Sigma 2$ (DXGXG), 但存在三个特征指纹基序中的其他两个 ($\Sigma 3$ 和 $\Sigma 1$), 分别是位于 14~17 位的 DKAE ($\Sigma 3$, NKXE, 其中 N 被 D 替换, N 和 D 相似), 以及位于 54~63 位的 GNFLFGKTSY ($\Sigma 1$, GXXXXGK (S/T))。在家蚕 JHDK 中包含 8 个 α 螺旋二级结构区域 (H1-H8), 烟草天蛾则存在 11 个 α 螺旋二级结构区域 (H1-H11) (Maxwell *et al.*, 2002a; Li *et al.*, 2005), 作者利用 GOR 在线软件进行亚洲玉米螟克隆片段的

二级结构分析, 结果表明该片段在 15~25 位和 32~48 位氨基酸存在两个 α 螺旋二级结构区域 (H1 和 H2)。综合以上结果表明: 作者已经克隆了亚洲玉米螟幼虫 JHDK 基因的部分序列。

目前, 未见有关亚洲玉米螟 JHDK 基因序列的获得与功能研究的报道。本文首次以亚洲玉米螟幼虫为实验材料, 利用 RT-PCR 的方法克隆了 JHDK 的一个 cDNA 片段, 生物信息学分析结果表明该片段是亚洲玉米螟 JHDK 基因序列的一部分, 这为将来克隆亚洲玉米螟 JHDK 的全长基因, 进一步研究 JH 滴度调节的分子机理提供了基础。

参考文献 (References)

- Gilbert LI, Granger NA, Roe RM, 2000. The juvenile hormone: historical facts and speculations on future research directions. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30: 617—644.
- 李胜, 蒋容静, 曹梅讯, 2004. 保幼激素的代谢. *昆虫学报*, 47(3): 389—393.
- Li S, Zhang QR, Xu WH, Schooley DA, 2005. Juvenile hormone diol kinase, a calcium-binding protein with kinase activity, from the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35: 1235—1248.
- Maxwell RA, Welch WH, Horodyski FM, Schegg KM, Schooley DA, 2002a. Juvenile hormone kinase II. Sequencing, cloning, and molecular modeling of juvenile hormone—selective diol kinase from *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.*, 277(24): 21882—21890.
- Maxwell RA, Welch WH, Schooley DA, 2002b. Juvenile Hormone Diol Kinase. I. Purification, characterization, and substrate specificity of juvenile hormone—selective diol kinase from *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.*, 277(24): 21874—21881.
- 周大荣, 王玉英, 刘宝兰, 剧正理, 1980. 玉米螟人工大量繁殖研究: I. 一种半人工饲料及其改进. *植物保护学报*, 7(2): 113—122.

从白蚁中分离到具有纤维素酶活的贪噬菌^{*}

吴 燕 迟绍丽 倪金凤^{**}

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘 要 以黄胸散白蚁 *Reticulitermes flaviceps* 后肠为材料,分离培养具有降解纤维素能力的微生物,以进一步了解白蚁后肠微生物的种类。通过以羧甲基纤维素钠(CMC-Na)为唯一碳源的富集及选择培养基培养、筛选,获得一株具有纤维素酶活的菌株 R3063。形态学鉴定、革兰氏染色观察及 16S rDNA 基因序列分析表明该菌株属于贪噬菌(*Variovorax* sp.)。目前尚未见贪噬菌具有纤维素酶活的报道。

关键词 白蚁,纤维素降解菌,纤维素酶,贪噬菌

Isolation of a strain of *Variovorax* sp. R3063 with cellulase activity from termite

WU Yan CHI Shao-Li NI Jin-Feng^{**}

(State Key Lab of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract A bacterial strain with cellulase activity was cultured from the hindgut suspension of the termite *Reticulitermes flaviceps* using a medium with sodium carboxymethyl cellulose (CMC-Na) as the sole carbon source. Phenotypic characterization, including morphology, gram-staining and growth and 16S rDNA gene sequence analysis indicate that the strain belongs to the genus *Variovorax*.

Key words termite, cellulose-degradation bacteria, cellulase, *Variovorax* sp.

纤维素是一种丰富的可再生资源,地球上每年光合作用可产生大于 100 亿吨的植物干物质,其中一半以上是纤维素和半纤维素(Leschine, 1995)。纤维素酶将纤维素降解为葡萄糖,进而发酵生产乙醇,能够缓解人类能源紧缺问题,也是解决化石能源危机,发展可再生能源重要途径之一。纤维素酶已广泛用于医药、饲料加工、果汁制取、造纸及纺织等多个领域,它的应用前景广阔(Ögel *et al.*, 2001; 李西波等, 2006)。扩大纤维素酶产生菌的筛选范围,对纤维素酶的应用有重要意义。目前分离的纤维素降解菌多来自真菌(木霉、曲霉)、细菌等(Wilson and Wood, 1992; Li, 1997)。

白蚁以木质纤维素为食,是热带和亚热带地区木质纤维素的重要分解者(Yamada *et al.*, 2005)。当前对白蚁的研究,多数集中于白蚁作为害虫的防治技术,关于白蚁超强降解纤维素机制

和功能的研究较少。白蚁后肠含有 300 多种共生微生物,包括原生动物、细菌、古菌等(Leadbetter and Breznak, 1996; 陈虹等, 2005)。白蚁依赖内源性纤维素酶和外源纤维素酶共同分解食入的木质材料,其中内源性纤维素酶主要由白蚁唾液腺和前肠上皮细胞分泌,外源纤维素酶由共生微生物产生(Breznak and Brune, 1994; Nakashima *et al.*, 2002; Hongoh *et al.*, 2008; Ohkuma, 2008)。共生微生物在白蚁降解纤维素中发挥着重要作用,目前从白蚁中分离到的木质纤维素降解菌有芽孢杆菌(*Bacillus*) (König, 2006)、螺旋菌(*Spirochaeta*) (Dröge *et al.*, 2006)、链霉菌(*Streptomyces*) (Tamburini *et al.*, 2004)、葡萄球菌(*Streptococcus*) (余金勇等, 2002; 何刚强等, 2009)等。本文首次报道从黄胸散白蚁 *Reticulitermes flaviceps* 中分离到具有降解纤维素能力的贪噬菌。

^{*} 资助项目:国家自然科学基金项目(30870085)、教育部留学回国人员科研启动基金。

^{**} 通讯作者, E-mail: jinfngni@sdu.edu.cn

收稿日期:2010-04-01, 接受日期:2010-08-26

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 白蚁 黄胸散白蚁取自浙江大学华家池校区,采集的白蚁放置在有盖的塑料器皿中,1 周左右喷洒 1 次水,实验室内饲养。

1.1.2 仪器和试剂 江南新兴解剖镜,OLYMPUS 显微镜,TaKaRa PCR 仪,E. Z. N. A.™ Bacterial DNA Kit (OMEGA),Taq 酶 (TRANS),刚果红,引物合成、PCR 产物测序(上海博尚生物科技)。

1.1.3 培养基 富集培养基 ① CMC1: KH_2PO_4 0.2%, MgSO_4 0.015%, 酵母粉 0.2%, CMC-Na 1%; ② CMC2: KH_2PO_4 0.2%, MgSO_4 0.015%, KNO_3 0.1%, CMC-Na 1%。选择培养基 ① 选择平板 1: 牛肉浸膏 0.15%, 蛋白胨 0.5%, CMC-Na 0.3%, NaCl 0.5%, 刚果红 0.1%, 琼脂 1.5%; ② 选择平板 2: 牛肉浸膏 0.15%, 蛋白胨 0.5%, CMC-Na 0.1%, NaCl 0.5%, 琼脂 1.5%。

1.2 解剖白蚁及白蚁后肠菌悬液制备

选取 2 头工蚁,放置冰上稍微冷冻使其活动性减弱,以便于操作。用 70% 的酒精擦拭解剖镜的载物台,然后在载物台上滴一滴 0.9% 生理盐水,用解剖镊子夹一头白蚁放在上面。按住头部,在尾部用镊子轻轻的往外拉,整个肠道即被拉出,截取后肠部分置于盛有无菌水的灭菌 Eppendorf 管中。经无菌水冲洗 2 次后,转入含约 200 μL 富集培养基 CMC1 或 CMC2 的 Eppendorf 管中,用无菌的解剖针搅动后肠使其内容物溢出,然后转入 10 mL 富集培养基 CMC1 或 CMC2 中混匀,此为白蚁后肠菌悬液。

1.3 纤维素降解菌的富集培养

取以上白蚁后肠菌悬液 5 mL 转入无菌的玻璃试管中,分别于 30 $^{\circ}\text{C}$ 、37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下振荡培养,培养 1~3 d 后,按 2% 的接种量,取 0.1 mL 菌液转接至 5 mL 新的富集培养基 CMC1 或 CMC2 中进行第 2 次富集培养。

1.4 用选择平板筛选纤维素降解菌

将富集培养后的菌液做系列稀释,选取合适倍数(本实验中稀释到 $10^4 \sim 10^5$ 倍)涂布于 CMC 选择平板,以平板上出现均匀的单菌落为准。平板分别于 30 $^{\circ}\text{C}$ 、37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 1~3 d。待长出单菌落后,用牙签点种在 CMC 选择平板上,每个单菌落点种两个平板,一个平板用于刚果红染色观

察,另一个作为保存平板。两个平板置于同样条件,分别于 30 $^{\circ}\text{C}$ 或 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 1~3 d。

刚果红染色方法:用 70% 乙醇将菌落洗掉,然后用 0.1% 刚果红浸染 30 min,再用 1M NaCl 水溶液脱色(20~30 min),观察菌落周围的透明圈有无,若有透明圈,则可初步断定具有纤维素降解活性。

1.5 纤维素降解菌的分离纯化

将选择平板上有透明圈的克隆划线分离,得到的单克隆进行刚果红染色,再重复上述划线分离步骤,直至得到稳定降解纤维素的单克隆。

1.6 菌株的鉴定

1.6.1 形态鉴定 菌落、菌体形态观察及革兰氏染色(杨革,2005)相结合进行形态学鉴定。

1.6.2 提取基因组 DNA 及 16S rDNA 序列分析

基因组 DNA 的提取按照 E. Z. N. A.™ Bacterial DNA Kit (OMEGA) 说明书操作,采用引物 27f 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 1492r 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' 扩增目的克隆(R3063)的 16S rRNA 基因。PCR 反应体系(50 μL): 10 $\times$ Taq buffer 5 μL , 2.5 mM dNTP 4 μL , 基因组 DNA 1 μL , 5U/ μL Taq 0.5 μL , 2 μM 27f 1 μL , 2 μM 1492r 1 μL , ddH₂O 37.5 μL 。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 30 s, 30 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳确认,得到约 1.5 kb 的产物送上海博尚生物技术有限公司测序。获得的序列在 NCBI/blast 中进行同源性比对(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>)。

2 结果与分析

2.1 纤维素降解菌的富集与分离纯化

本实验实际操作时,首先在富集培养基 CMC1 中富集培养 2 次,观察到培养基由澄清变浑浊,说明有微生物生长。然后涂布培养液于选择平板 1 上,待克隆长出再点种培养进行刚果红染色。不论是 30 $^{\circ}\text{C}$ 还是 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养,发现平板上的微生物种类不多,说明尽管肠道内微生物很多,但多数不能培养。刚果红染色法分析了约 400 个菌落,没有观察到透明圈。分析可能原因有下面两点: ① 所用的富集培养基 CMC1 中包含有机氮源酵母粉,它也作为碳源,提供非纤维素降解菌生长,从而纤维素降解菌不能优势富集,非目的菌也大量