参考文献(References)

Becnel JJ, 1997. Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press. 337—352.

程家安，祝增荣，2006. 2005 年长江流域稻区褐飞虱暴发成灾原因分析. 植物保护，32(3):1-4.

Geng BW, Zhang RJ, 2004. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* var. *acridu* to the deveolpmental stages of brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stål) and *Sogatella furcifera* (Horváth). *Insect Science*, 11(2):89—97.

季香云，杨长举，2003. 白僵菌的致病性与应用. 中国生物防治，19(2):82—85.

Hajek AK, Leger RJ, 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annu. Rev. Entomol.*, 39(1):293—322.

李庚午，1994. 不同固定剂对扫描电镜生物制样效果的探讨. 河南师范大学学报，22(1):69—72.

林华峰，黄 勃，李增智，胡萃，1998. 白僵菌在松毛虫体上宿存侵染的电镜扫描观察. 菌物系统，17(4):342—347.

Liu Z, Lei ZR, Hua BZ, Wang HH, Liu TX, 2010. Germination behavior of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) nymphs. *J. Entomol. Sci.*, 45(4):323—334.

Lord JC, Howard RW, 2004. A proposed role for the cuticular fatty amides of *Liposcelis bostrychophila* (Psocoptera: Liposcelidae) in preventing adhesion of entomopathogenic fungi with dry-conidia. *Mycopathologia*, 158(2):211—217.

马新颖，陈雪芬，金建忠，2000. 粉虱拟青霉对黑刺粉虱的侵染过程. 中国病毒学，15(S1):145—147.

Maketon M, Sawangwan P, Sawatwarakul W, 2007. Laboratory study on the efficacy of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota: Hyphomycetes) in controlling *Coptotermes gestroi* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Entomologia Generalis*, 30(3):203—218.

蒲蛰龙，李增智，1996. 昆虫真菌学. 安徽: 安徽科学技术版社. 323—326.

Smith RJ, Pekrul S, Grula EA, 1981. Requirement for sequential enzymatic activities for penetration of the integument of the corn earworm (*Heliotis zea*). *J. Invertebr. Pathol.*, 38(3):335—344.

Toledo AV, Remes Lenicov AMM, López Lastra CC, 2010. Histopathology caused by the entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, in the adult planthopper, *Peregrinus maidis*, a maize virus vector. *Journal of Insect Science*, 10(35):1—10.

王海川，尤民生，1999. 绿僵菌对昆虫的入侵机理. 微生物学通报，26(1):71—73.

翟锦彬，黄秀梨，1997. 球孢白僵菌在棉铃虫表皮上萌发的研究. 微生物学报，37(2):154—158.

应用昆虫学报 *Chinese Journal of Applied Entomology* 2011,48(5):1417—1424

研究论文

甘蓝夜蛾两种不同类型几丁质脱乙酰基酶基因的克隆与组织特异性表达*

姚 磊** 樊 东*** 王晓云 高艳玲

(东北农业大学农学院 哈尔滨 150030)

摘 要 几丁质脱乙酰基酶(chitin deacetylase,CDA)是昆虫几丁质降解酶中的一种酶,可以将几丁质转化为壳聚糖,在昆虫几丁质代谢中具有重要作用。本研究以甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* 5 龄幼虫虫体为材料提取总 RNA,利用 RT-PCR 和 RACE 技术,分别扩增得到甘蓝夜蛾的 2 类不同几丁质脱乙酰基酶基因的 cDNA 序列。其中一种 CDA 含有 2 036 个碱基,包括一个 1 617 个碱基的开放读码框,编码一个含 539 个氨基酸的蛋白,分子量约为 61.5 ku,作者定义其为 cDNA 1;另一种 CDA 含有 1 312 个碱基,包括一个 1 173 个碱基的开放阅读框,编码一个含 390 个氨基酸的蛋白,分子量约为 44.1 ku,作者定义其为 cDNA 2。cDNA 1 推导的氨基酸序列具有几丁质脱乙酰基酶典型的 3 个功能区,分别是几丁质结合区、催化区和低密度脂蛋白受体区,属于 CDA 第 1 组的成员。cDNA 2 推导的氨基酸序列只有几丁质催化区,属于 CDA 第 5 组的成员。利用 RT-PCR 进行该基因的 mRNA 水平上的表达表明几丁质脱乙酰基酶 cDNA 1 在幼虫取食期的唾腺、中肠、脂肪体组织表达,在体壁和马氏管中不表达,在预蛹期和蛹期表达;cDNA 2 只在幼虫期的中肠表达,在其他组织及时期都不表达。获得的基因 cDNA 序列已经登录 GenBank 并获得登录号,cDNA 1 登录号为 HQ680620,cDNA 2 登录号为 HQ680621。

关键词 甘蓝夜蛾,几丁质脱乙酰基酶,克隆,序列分析,组织表达

Molecular cloning and tissue-specific expression of two different chitin deacetylase cDNA sequences from *Mamestra brassicae*

YAO Lei** FAN Dong*** WANG Xiao-Yun GAO Yan-Ling

(Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract Chitin deacetylase (CDA) is a kind of chitin-degrading enzyme found in insects that can turn chitin into chitosan and plays an important role in insects' chitin metabolism. Total RNA was isolated from the fifth instar larvae of *Mamestra brassicae*. Two CDA cDNA sequences were cloned by RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE). One cDNA sequence was 2 036 base pairs in length and contained an open reading frame of 1 617 base pairs coding for a polypeptide of 539 amino acid residues with a predicted molecular weight of 61.5 ku. This cDNA sequence was designated as cDNA 1. The other cDNA sequence was 1 312 base pairs in length and contained an open reading frame of 1 173 base pairs coding for a polypeptide of 390 amino acid residues with a predicted molecular weight of 44.1 ku. This cDNA sequence was designated as cDNA 2. The deduced amino acid sequence of cDNA 1 contained a polysaccharide deacetylase domain, a chitin-binding peritrophin-A domain (ChBD) and a low-density lipoprotein receptor class A domain (LDLa). This sequence was a member of chitin deacetylase group I. The deduced amino acid sequence of cDNA 2 only contained a polysaccharide deacetylase domain. This sequence was a member of Chitin deacetylase group V. These two CDAs belong to two different CDA groups. Transcript analysis on two CDA sequences during various developmental stages and in

* 资助项目:黑龙江省博士后科研启动金(LBH-Q09171)、哈尔滨市科技创新人才研究专项资金项目(RC2006QN002027)。

**E-mail: yaolei22619@163.com

***通讯作者,E-mail: dnfd@163.com

收稿日期:2010-12-08,接受日期:2011-03-25

different tissues was determined by RT-PCR. The results showed that cDNA 1 was expressed in salivary glands, the midgut and fat bodies in feeding stage, but not expressed in prepupal and pupal stage. cDNA 2 was only expressed in the midgut in feeding stage. These cDNA sequences have been deposited in Genbank with accession numbers HQ680620 for cDNA 1 and HQ680621 for cDNA 2.

Key words *Mamestra brassicae*, chitin deacetylase, cloning, sequence analysis tissue-specific expression

几丁质脱乙酰基酶(chitin deacetylase,简称CDA,E.C.3.2.1.41),是几丁质降解酶成员之一,它可以将几丁质转化为壳聚糖。CDA 来源广泛,在真菌、酵母和昆虫等都发现 CDA 的存在,能够催化几丁质和壳聚糖中 β-1,4 糖苷键连接的 N-乙酰基葡糖胺的乙酰胺基的水解(Dixit *et al.*,2008; Zhao *et al.*, 2010)。

目前粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni*、棉铃虫 *Helicoverpa armigera*、蓓带夜蛾 *Mamestra configurata* 等几种昆虫的 CDA 基因被克隆并对其活性和功能进行了初步研究(Guo *et al.*,2005; Campbell *et al.*,2008; Toprak *et al.*,2008),研究结果表明几丁质脱乙酰基酶基因都与中肠围食膜有关。蓓带夜蛾 CDA 的作用是参与改变围食膜中的几丁质的物理和化学性质,而这一生化活动不仅改变几丁质的纤维结构,而且对围食膜蛋白的结合程度、围食膜的完整性和孔隙率产生影响。赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 中的 9 个 CDA 基因中的 TcCDA6 到 TcCDA9 都只在肠道中表达(Dixit *et al.*,2008),这表明 CDA 在肠道生理活动中发挥着一定的作用。该酶的存在并不只局限在围食膜中,在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中,克隆得到 2 个具有能编码具有典型 CDA 功能域的 CDA,且都与限制气管的延长有关联(Wang *et al.*, 2006)。

已在昆虫中发现 5 类 CDA 的存在,如:棉铃虫中克隆得到 4 个 CDA 基因,分别属于 2 个不同的 CDA 类型(Campbell *et al.*,2008);赤拟谷盗中克隆的 9 个 CDA 分属于 5 类不同的 CDA(Arakane *et al.*,2009)。

害虫的生物防治中,CDA 已被证明是杀虫剂的潜在靶标,在害虫的生物防治中可以说是个多功能工具,它改变昆虫表皮几丁质让真菌病原体便于渗透,以及改变自己的细胞壁防御上,可能有双重作用(Nahar *et al.*,2004)。

甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* 属于鳞翅目夜蛾科昆虫,多食性害虫,属于北方种类,主要发生区域在我国长江以北,主要危害十字花科蔬菜,也能在茄果类和瓜类上为害(张履鸿等,1993)。本研究主要对甘蓝夜蛾 2 种不同类型的几丁质脱乙酰基酶基因的 cDNA 序列进行了克隆,获取 2 条基因全长并对基因在 RNA 水平的表达进行了研究,为该基因的进一步研究和利用打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试昆虫 供试昆虫为甘蓝夜蛾,利用黑光灯在田间诱集成虫,室内饲以 5% 蜂蜜水使其产卵并用新鲜白菜叶做饲料喂养到不同发育阶段备用。

1.1.2 主要试剂及菌株 TRIzol® Reagent 为 Invitrogen 公司产品,反转录酶 M-MLV Reverse Transcriptase、克隆载体 PMD18-T、低熔点琼脂糖、琼脂糖凝胶回收试剂盒、*Taq* plus DNA 聚合酶等购自 Takara 公司,其余试剂为进口或国产分析纯;受体菌 DH5α 由作者所在研究室保存。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取 将昆虫不同发育阶段虫体和分解的不同组织分别转移到研磨器中,按每 100 mg 虫体加入 TRIzol® Reagent 1 mL 进行研磨,提取 RNA,具体步骤参见 TRIzol 试剂盒使用说明,提取的 RNA 放入 -80℃ 冰箱中备用。

1.2.2 第一链 cDNA 的合成 以 5′-ATC GAT GGT CGA CGC ATG CGG ATC C GGA TCC AAA GCT TGA ATT CGA GCT CT(T)$_{17}$-3′为 cDNA 合成引物,利用反转录酶 M-MLV Reverse Transcriptase 合成第一链 cDNA,具体参照 M-MLV 反转录酶使用说明。

1.2.3 利用 RT-PCR 技术克隆基因 cDNA 序列片段 比较棉铃虫(EU325568)、苜蓿夜蛾 *Heliothis viriplaca*(GU188855)2 种昆虫几丁质脱乙酰基酶基因的 cDNA 序列,设计 1 对适用于克隆 cDNA 1 的引物:CDA1:5′-TTC TAC GTC AGC CAC GAG TAC AC-3′和 AntiCDA1:5′-TG GTG

AGG ATG AAC TTG TAC CAT -3′。以合成的 cDNA 为模板,以 CDA1 和 AntiCDA1 为引物扩增几丁质脱乙酰基酶 cDNA 1 序列的特异片段。

比较蓓带夜蛾(EU660852)、棉铃虫(GQ411190)2 种昆虫几丁质脱乙酰基酶基因的 cDNA 序列,设计 1 对适用于克隆 cDNA 2 的引物:CDA2:5′-CAACGATGACGAACGCTTCT-3′和 Anti CDA2:5′-CTAAGTACCTACCTTACTGT-3′;以合成的 cDNA 为模板,以 CDA2 和 anti CDA2 为引物扩增几丁质脱乙酰基酶 cDNA 2 序列的特异片段。

二者 PCR 反应条件均为:94℃预变性 5 min;94℃,30 s;52℃,30 s;72 ℃,1 min,30 个循环;72℃延伸 10 min,PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后,将 PCR 产物回收,与 PMD18-T vector 连接、转化、筛选、鉴定。连接正确的重组子由上海生工生物工程公司进行序列测定。克隆得到的 cDNA 的部分序列,用以设计 5′和 3′RACE 引物,克隆 cDNA 的全长序列。

1.2.3.1　利用 RACE 技术克隆 cDNA 全长序列　克隆 cDNA 1 基因 3′端序列引物:首轮 PCR:cDNA 1 Ro:5′-TGC GCG CTC CTT ACC TTC GAG TCG G-3′和 Ro:5′-ATC GAT GGT CGA CGC ATG CGG ATC C-3′;次轮 PCR:cDNA 1 Ri:5′-CGT GAG ATG CCC TGT CAA CTA CCC-3′和 Ri:5′-GGA TCC AAA GCT TGA ATT CGA GCT CT-3′。克隆 cDNA 2 基因 3′端 cDNA 序列的克隆引物:首轮 PCR:cDNA 2 Ro:5′-AGT ACG ACT GCA CCT GGC CCA CTA CAT-3′和 Ro;次轮 PCR:cDNA 2 Ri:5′-CTA CAT CCC ACA CAA ACC CTG GAC TAT-3′和 Ri。PCR、电泳、回收、测序等反应同 1.2.3。

利用 TaKaRa 5′-Full RACE Kit,根据试剂盒中的 5′-RACE outer primer 和 inner primer 分别设计克隆 cDNA 1 和 cDNA 2 基因 5′端序列的引物。引物序列分别为 cDNA 1 outer primer:5′-GCA CAT CCT GGC AAA TAC TCG T-3′,cDNA 1 inner primer:5′-ACT CGA AGG TAA GGA GCG CGC ACA CCC ACT ACA -3′;cDNA 2 outer primer:5′-CAT TAC CCG TCA TTT GGA GGA AG-3′,cDNA 2 inner primer:5′-CAA AGT GAG CCA TTT GAA TCT TCT GGT CTC CAA A -3′,具体方法按照宝生物 5′-RACE 试剂盒说明进行。

1.2.3.2　序列分析　利用 Clone 软件对获得的 cDNA 序列进行翻译;利用 ExPASy 网站(http://us.expasy.org/tools/dna.html)的蛋白分析软件推导得到的氨基酸序列的分子量、等电点;利用 NCBI 上的 Conserved domain search 软件和 ExPASy 网站的蛋白结构域分析软件 ScanProsite 进行功能域的预测;利用 Informax 软件包的 AlignX 软件进行同源性百分数计算;利用 DNAMAN 软件进行氨基酸序列的聚类分析。

1.2.4　CDA 基因的时空表达研究　利用 RT-PCR 法,进行虫体不同生长发育时期、不同组织几丁质脱乙酰基酶在 RNA 水平的表达研究。分别提取 5 龄幼虫的马氏管、唾腺、中肠、体壁、脂肪体、无中肠虫体以及预蛹期虫体、蛹期虫体的总 RNA,DNA 酶处理。扩增 cDNA 1 的特异性引物为 CDA1 和 AntiCDA1;扩增 cDNA 2 的特异性引物为 CDA2 和 AntiCDA2。以 Actin 作为对照,引物为 Actin:5′-AGC AAG AGA GGT ATC CTC AC-3′和 Anti Actin:5′-ATC TCC TGC TCG AAG TCG AG-3′。PCR 反应条件:94℃预变性 5 min;94℃,30 s;52℃,30 s;72 ℃,40 s,25 个循环;72℃延伸 10 min,PCR 产物均经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析。

2　结果与分析

2.1　CDA cDNA 序列的获得

利用 RT-PCR 和 RACE 技术扩增出甘蓝夜蛾 CDA cDNA 全长序列 2 条,得到的 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列用 Blast 软件搜索,找到一致性较高的序列均为昆虫几丁质脱乙酰基酶 cDNA 或氨基酸序列,2 条 cDNA 序列已经登录 Genbank 并获得登录号分别为 HQ680620 和 HQ680621。

cDNA 1 序列全长 2 036 个碱基,含有 57 个碱基和 362 个碱基的 5′和 3′非编码区,包括一个 1 617个碱基的开放读码框,编码 539 个氨基酸组成的多肽,分子量 61.5 ku,多肽的等电点为 5.02。该基因的 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列见图 1。

cDNA 2 序列全长 1 312 个碱基,含有 63 个碱基和 76 个碱基的 5′和 3′非编码区,包括一个1 173 个碱基的开放读码框,编码 390 个氨基酸组成的多肽,分子量 44.1 ku,多肽的等电点为 5.14。该基因的 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列见图 2。

```
1       ATTCGCGGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCGATGGAAACTGTTGTGATCCCGTC
58    ATGGCGCGCTACGCCCGTGTCGCTACTCTGGCCGCGTGTCTCTTGTTCGCCTGCGCGAA
1     M  A  R  Y  A  R  V  A  T  L  A  A  C  L  L  F  A  C  A  N
118   GCCGATAGCCACAGATGGCGGCGGCAGGCTGACGATTCTGCGAAGAAAGACGACAGCTTG
21    A  D  S  H  R  W  R  R  Q  A  D  D  S  A  K  K  D  D  S  L
178   GAGGTAGAGCTATGCAAGGACAAGGACGCCGGCGAGTGGTTCCGCCTGGTGGCGGGCGAT
41    E  V  E  L  C  K  D  K  D  A  G  E  W  F  R  L  V  A  G  D
238   GGCGACAACTGTCGCGACGTCATCCAGTGCACCGCCTCGGGTATCCAAGCCATTCGTTGT
61    G  D  N  C  R  D  V  I  Q  C  T  A  S  G  I  Q  A  I  R  C
298   CCAGCTGGTTTATACTTCGATATCGAGAAACAGACTTGTGACTGGAAAGACGCTGTCAAA
81    P  A  G  L  Y  F  D  I  E  K  Q  T  C  D  W  K  D  A  V  K
358   AACTGCAAATTGAAGAATAAGGAGCGTAAAATAAAGCCATTGTTGTACACTGAAGAGCCG
101   N  C  K  L  K  N  K  E  R  K  I  K  P  L  L  Y  T  E  E  P
418   TTGTGTCAGGATGGTTTCCTCGCGTGCGGTGACTCCAACTGCATCGAGCGCGGACTCTTC
121   L  C  Q  D  G  F  L  A  C  G  D  S  N  C  I  E  R  G  L  F
478   TGTAACGGCGAAAAGGATTGCGCAGACGGCTCCGACGAGAACTCTTGCGACATCGACAAC
141   C  N  G  E  K  D  C  A  D  G  S  D  E  N  S  C  D  I  D  N
538   GACCCCAACAGGGCTCCGCCATGTGACGCGTCGCAGTGCGTGCTGCCTGACTGCTTCTGT
161   D  P  N  R  A  P  P  C  D  A  S  Q  C  V  L  P  D  C  F  C
598   TCCGAGGACGGCACCGTGATCCCCGGCGACCTGCCCGCCAGAGACGTGCCCCAGATGATC
181   S  E  D  G  T  V  I  P  G  D  L  P  A  R  D  V  P  Q  M  I
658   ACCATCACCTTCGATGATGCTATCAATAACAACAACATCGAACTTTACAAAGAGATCTTC
201   T  I  T  F  D  D  A  I  N  N  N  N  I  E  L  Y  K  E  I  F
718   AACGGAAAACGTAAAAACCCCAACGGTTGCGACATTAAAGCCACATACTTTATTTCGCAC
221   N  G  K  R  K  N  P  N  G  C  D  I  K  A  T  Y  F  I  S  H
778   AAATACACAAACTACTCAGCCGTTCAGGAAGTTCACAGAAAAGGACACGAAATCGCTGTA
241   K  Y  T  N  Y  S  A  V  Q  E  V  H  R  K  G  H  E  I  A  V
838   CACTCTATCACGCACAACGATGACGAACGCTTCTGGAGCAACGCTACCGTTGACGATTGG
261   H  S  I  T  H  N  D  D  E  R  F  W  S  N  A  T  V  D  D  W
898   GGCAAGGAGATGGCTGGCATGCGCGTCATCATCGAGAAGTTCTCTAACATCACAGATAAC
281   G  K  E  M  A  G  M  R  V  I  I  E  K  F  S  N  I  T  D  N
958   AGCGTAGTGGGCGTGCGCGCTCCTTATCTCCGAGTCGGTGGAAACAACCAGTTCACCATG
301   S  V  V  G  V  R  A  P  Y  L  R  V  G  G  N  N  Q  F  T  M
1018  ATGGAAGAACAAGCTTTCCTGTATGACAGTACCATAACCGCTCCCCTCTCCAACCCTCCT
321   M  E  E  Q  A  F  L  Y  D  S  T  I  T  A  P  L  S  N  P  P
1078  CTATGGCCCTACACAATGTACTTCAGAATGCCTCACCGCTGCCATGGAAACCTCCAGAGC
341   L  W  P  Y  T  M  Y  F  R  M  P  H  R  C  H  G  N  L  Q  S
1138  TGCCCCACTAGGAGCCACGCCGTGTGGGAGATGGTAATGAATGAACTTGACCGTCGCGAG
361   C  P  T  R  S  H  A  V  W  E  M  V  M  N  E  L  D  R  R  E
1198  GACCCCACCAACGACGAGTACTTGCCAGGATGTGCCATGGTTGACTCTTGTTCCAACATT
381   D  P  T  N  D  E  Y  L  P  G  C  A  M  V  D  S  C  S  N  I
1258  TTGACCGGAGATCAGTTCTACAACTTCCTTAACCACAACTTTGACCGTCACTACGATCAG
401   L  T  G  D  Q  F  Y  N  F  L  N  H  N  F  D  R  H  Y  D  Q
1318  AACCGCGCTCCATTGGGTCTGTACTTCCACGCCGCTTGGCTCAAGAACAACCCCGAATTC
421   N  R  A  P  L  G  L  Y  F  H  A  A  W  L  K  N  N  P  E  F
1378  TTAGAGGCTTTCCTATACTGGATTGACGAAATTCTCTCAAGTCACAACGACGTATACTTT
441   L  E  A  F  L  Y  W  I  D  E  I  L  S  S  H  N  D  V  Y  F
1438  GTAACGATGACACAAGTAATCCAGTGGATCCAAAACCCCCGTACTGTAACTGAAGCCAAG
461   V  T  M  T  Q  V  I  Q  W  I  Q  N  P  R  T  V  T  E  A  K
1498  AACTTCGAGCCCTGGAGGGAAAAGTGCTCCGTTGAAGGTTACCAAGCCTGTTGGGTACCC
481   N  F  E  P  W  R  E  K  C  S  V  E  G  Y  Q  A  C  W  V  P
1558  CACTCTTGCAAGCTCACCTCCAAGGAGGTTCCCGGTGAGACCATCAACCTGCAGACGTGT
501   H  S  C  K  L  T  S  K  E  V  P  G  E  T  I  N  L  Q  T  C
1618  GTGAGATGCCCCGTCAACTACCCCTGGTTGAACGACCCCACGGGCGACGGCCATTACTAG
521   V  R  C  P  V  N  Y  P  W  L  N  D  P  T  G  D  G  H  Y  *
1678  TAGAGCCATGATCTCACGTCTCTCGTGCTCTAAGTAGTTCATATAAAATCGAATGAGTCA
1738  TTTGCATGGATAACATAGGCGCAGTCAAAATATTCAGTAACTGAACTTCATTATCTAAGT
1798  AAACCAAACTTTTCTCAACTGCGATTATGTTGTCCAGTAATTCTCAAATGTACCGGGTCA
1858  TAATCCCGTCCGTAGCATAAGTACCTACCTTACTGTATGTAATATAGACTCACATAAATA
1918  TTTAATAGGTCTGTTTAATAGTTTATGTGATTTTCTAATGTAAGTCTGTTTTATAAATTT
1978  ATAAAAAATAAAAAAATCTAAAAATTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAA
```

图 1　甘蓝夜蛾几丁质脱乙酰基酶基因 CDA cDNA 1 序列和推测的氨基酸序列

Fig. 1　cDNA and deduced amino acid sequence of CDA cDNA 1 from *Mamestra brassicae*

图中起始密码子 ATG 和终止密码子 TAG 加粗表示;左侧数字代表核苷酸核氨基酸序列位置;几丁质结合区以黑色背景表示;几丁质催化区用灰色背景表示;低密度脂蛋白受体 A 类结构域(LDLa)用双下划线表示;信号肽用单下划线表示;N 位糖基化位点加边框表示。* 表示对应核苷酸序列是终止密码子。The initial codon ATG and termination codon TAG are indicated in bold, the numbers on the left are for nucleotide sequence and amino acid sequence, chitin binding Peritrophin-A domain is high lighted in black, polysaccharide deacetylase domain is high lighted in grey, low-density lipoprotein receptor class A(LDLa) domain is double-underlined, the putative signal peptide of the deduced amino acid sequence is underlined, and putative N-glycosylation sites are boxed. * indicates that corresponding nucleotide sequence is stop codon. The same for Fig. 2.

2.2　CDA 氨基酸序列分析

蛋白结构域分析结果表明,发现 cDNA 1 推导的氨基酸序列具有 CDA 所具有的 3 个明显结构区:几丁质结合区 Chitin binding Peritrophin-A domain(42 – 104),几丁质催化区 polysaccharide deacetylase domain(197 – 353),低密度脂蛋白受体区 low-density lipoprotein receptor class A domain (LDLa)(121 – 157)。cDNA 2 推导的氨基酸序列只有几丁质催化区(69 – 218)。

SignalP 3.0 进行信号肽分析时发现 cDNA 1 推导的氨基酸的 21 和 22 位之间存在一个信号肽切割位点;cDNA 2 推导的氨基酸在 18 和 19 位之间存在一个信号肽切割位点。

利用 NetNGlyc 1.0 Server 进行 N 位糖基化位点分析时发现,cDNA 1 的氨基酸序列中存在 3 个 N 位糖基化位点,分别为 244 NYSA、274 NATV、296 NITD;cDNA 2 的氨基酸序列中也存在 3 个 N 位糖基化位点,分别为 91 NSSG、180 NASF、361 NSSH,证明这 2 个蛋白序列均属于糖蛋白,在昆虫体内需要经过糖基化作用才能有效发挥酶活性。

2.3　同源性分析

对登录 GenBank 的 15 种昆虫 CDA 的 cDNA 序列,甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* HQ680620 \ HQ680621,棉铃虫 *Helicoverpa armigera* EU325568 \ GQ411189 \ EF600051 \ GQ411190 \ GQ411191,苜蓿夜蛾 *Heliothis viriplaca* GU188855,蓓带夜蛾 *Mamestra configurata* EU660852,埃及伊蚊 *Aedes aegypti* XM_001656773,冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* XM_320597,意大利蜜蜂 *Apis mellifera* XM_391915,黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* NM_168811,赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* NM_001102476,粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* AY966402 的氨基酸序列进行序列比对和聚类分析(图 3)。

聚类分析表明,cDNA 1 氨基酸序列与棉铃虫 GQ411189 \ EU325568,苜蓿夜蛾 GU188855 CDA 氨基酸序列关系比较密切,一致性分别为 98.5%,97.4%,96.3%;cDNA 2 氨基酸序列与蓓带夜蛾 EU660852 CDA 氨基酸序列首先聚类,氨基酸序列一致性达 97.4%,然后与棉铃虫 GQ411190 \ EF600051 聚类,一致性分别为 72.8%,72.6%,再与棉铃虫 GQ411191 和粉纹夜蛾 AY966402 聚类,一致性分别为 61.9% 和 64.3%,最后与其他目昆虫相聚类。聚类分析结果表明本研究所克隆 2 条基因分别属于 2 种不同的 CDA 类型。

2.4　CDA 时空表达结果

时空表达结果表明,CDA cDNA 1 在幼虫取食期的唾腺、中肠、脂肪体等组织以及去中肠虫体、预蛹期和蛹期虫体表达(图 4: A),在体壁和马氏管中不表达;在 CDA cDNA 2 基因中,只在幼虫期的中肠表达,在其他组织及时期都不表达,表现出其较强的组织特异性(图 4: B)。

3　讨论

目前国外对 CDA 的研究已经相当深入,甚至已经发展到了分子水平,国内还处刚刚起步阶段,昆虫中对 CDA 研究更是落后于真菌和细菌且 CDA 在昆虫中的功能还不十分明确,系统地从分子水平研究昆虫几丁质脱乙酰基酶及其调控因子对于了解几丁质代谢的机制及其调控途径有重要意义。目前已有粉纹夜蛾、棉铃虫等几种昆虫的 CDA 基因被克隆并对其活性和功能进行了初步研究,且在昆虫中发现有 5 组 CDA 存在。

本研究克隆了甘蓝夜蛾几丁质脱乙酰基酶(CDA)的 2 个 cDNA 全长序列,结构域分析和序

```
1                                                                                ATT
4     CGCGGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCGATGGAAAACTCTCTGGTAGATCTAGCAGA
64    ATGAAGTTTCTTGGTTTACTAGCACTACTGCTGGTTGCTTCGGCAGCCATTGCCGACGAT
1     M  K  F  L  G  L  L  A  L  L  L  V  A  S  A  A  I  A  D  D
124   TCTTCTTCAGAAGAGGAAGCGGGCCTGAAGGAAGCGGAAGAATGCACTCCTGATACTGTG
21    S  S  S  E  E  E  A  G  L  K  E  A  E  E  C  T  P  D  T  V
184   TGTGAACTGCCTAATTGCAGATGTTCGAGTACTAACATCCCTGGAGGATTGCAGCCTAGA
41    C  E  L  P  N  C  R  C  S  S  T  N  I  P  G  G  L  Q  P  R
244   GATACACCACAGTTTGTCACAGTCACATTCGACGACGGCATCAACATCAACAACATCCTC
61    D  T  P  Q  F  V  T  V  T  F  D  D  G  I  N  I  N  N  I  L
304   ACATACCGTAATACTCTTTACAACCGTCGCAACTCCAGTGGCTGCCCCGCCGGAGCCACT
81    T  Y  R  N  T  L  Y  N  R  R  N  S  S  G  C  P  A  G  A  T
364   TTCTACGTCAGCCACGAGTACACAAACTATGTCATCGTCAATGAATTGTACAACCAAGGC
101   F  Y  V  S  H  E  Y  T  N  Y  V  I  V  N  E  L  Y  N  Q  G
424   TTTGAAATTGCTCTACACTCCATCACTCACCAGACCCCACAGACTTACTGGTTTGAAGCT
121   F  E  I  A  L  H  S  I  T  H  Q  T  P  Q  T  Y  W  F  E  A
484   ACCAAAGAAGATATGAAGAGGGAATTTGGAGACCAGAAGATTCAAATGGCTCACTTTGCA
141   T  K  E  D  M  K  R  E  F  G  D  Q  K  I  Q  M  A  H  F  A
544   AACATTCCTTATGAATCCATCAAGGGTCTCCGCATTCCCTTCCTCCAAATGACGGGTAAT
161   N  I  P  Y  E  S  I  K  G  L  R  I  P  F  L  Q  M  T  G  N
604   GCCAGCTTTGAAATCATGAAAGAATATGGCTTGGAGTACGACTGCACCTGGCCCACTACA
181   A  S  F  E  I  M  K  E  Y  G  L  E  Y  D  C  T  W  P  T  T
664   TCCCACACAAACCCTGGACTATGGCCTTACACCCTGGACTACGCTTCCACCCAGGACTGC
201   S  H  T  N  P  G  L  W  P  Y  T  L  D  Y  A  S  T  Q  D  C
724   ATTGTTCCTCCTTGCCCGACTGCGTCCTTCCCTGGAACATGGGTTAAACCTCTGGTAACC
221   I  V  P  P  C  P  T  A  S  F  P  G  T  W  V  K  P  L  V  T
784   TGGTCTGATCTTCAGGGAGTTGCTTGCTCGTTTGTGGATGCATGTTTCTTCATCCCCGAC
241   W  S  D  L  Q  G  V  A  C  S  F  V  D  A  C  F  F  I  P  D
844   CGCGCCGACGAAGATGCATGGTACAAGTTCATCCTCACCAACTTCGAGAGGCACTACTTG
261   R  A  D  E  D  A  W  Y  K  F  I  L  T  N  F  E  R  H  Y  L
904   GGTAACCGCGCTCCCTTCGGCTTCTTCGTCCACGAGGCTTTCTTGTCAGCTTTCCCTGCC
281   G  N  R  A  P  F  G  F  F  V  H  E  A  F  L  S  A  F  P  A
964   GTTCGTGGTGCCTTCGTCCGTTTCTTGGATTTGATCAACAACCTTCCTGATACTTTCATG
301   V  R  G  A  F  V  R  F  L  D  L  I  N  N  L  P  D  T  F  M
1024  GTGAACTCCCACGAAGTTATTGACTGGGTCAAGAACTCCGTTCCAATTGATAAGTACAAG
321   V  N  S  H  E  V  I  D  W  V  K  N  S  V  P  I  D  K  Y  K
1084  GCCCAAGGCTGCCGTAGATTCAACCCCAGAGCCTGCGTTGCTAGAAGCTGCGGTCCTCTT
341   A  Q  G  C  R  R  F  N  P  R  A  C  V  A  R  S  C  G  P  L
1144  AACTCTAGCCACAATGGAATGGACTACTGGATGCAAATCTGTAACGTTTGCCCCCGTGTC
361   N  S  S  H  N  G  M  D  Y  W  M  Q  I  C  N  V  C  P  R  V
1204  TACCCATGGCTCGGCAACCCTCTTGGGCAGTAAATCTAAGACCGAATAAGTTTAATAATAAAT
381   Y  P  W  L  G  N  P  L  G  Q  *
1264  ATAGATTTCGATCTAAATAAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

图 2　甘蓝夜蛾几丁质脱乙酰基酶基因 CDA cDNA 2 序列和推测的氨基酸序列

Fig. 2　cDNA and deduced amino acid sequence of CDA cDNA 2 from *Mamestra brassicae*

列比对结果表明它们分别属于 CDA 的不同类型，cDNA 1 属于 CDA 家族中的第 1 组(group I)，cDNA 2 属于 CDA 家族中的第 5 组(group V)，后续的研究工作将继续克隆甘蓝夜蛾及其他鳞翅目昆虫的中的其他几个组的几丁质脱乙酰基酶基因，并着重对克隆的基因进行表达、活性测定和功

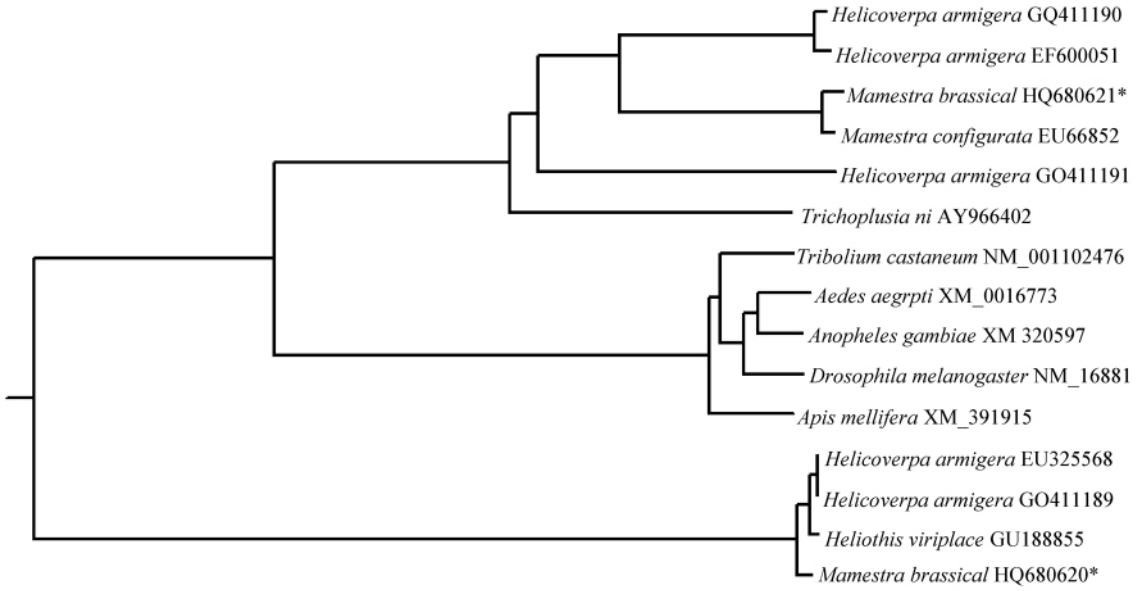

图 3　登录 Genbank 的昆虫 CDA 聚类分析

Fig. 3　Phylogenetic tree of insects' CDA which have been deposited in GeneBank

带* 为本研究克隆基因。The insect with "* "is the target insect.

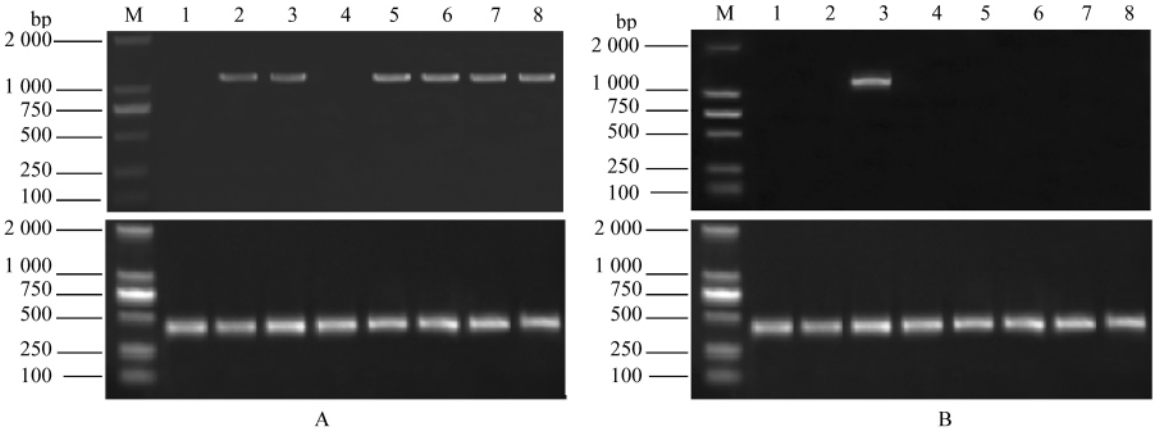

图 4　甘蓝夜蛾 CDA 基因在各个组织和发育阶段的表达

Fig. 4　mRNA expression at different tissue and developmental stages of CDA from *Mamestra brassicae*

A: CDA cDNA1; B: CDA cDNA2; M: DL2 000 Marker; 1: 马氏管 Malpighian tubules; 2: 唾腺 salivary glands, 3: 中肠 midgut; 4: 体壁 integument; 5: 去中肠虫体 carcass without midgut; 6: 脂肪体 fat body; 7: 预蛹期虫体 pre-pupal stage; 8: 蛹期虫体 pupal stage。图上部条带为 CDA 的 PCR 产物,下部条带为 Actin 的 PCR 产物。Upper band: CDA mRNA PCR product, lower band: Actin mRNA PCR product.

能鉴定,为进一步实践应用创造条件。

在 CDA 催化下可使昆虫几丁质产生壳聚糖,壳聚糖对围食膜可能具有重要功能,如:壳聚糖的存在可以调节几丁质的柔韧性和硬度(Luschnig *et al.*,2008)、壳聚糖具有抗菌功能(Nahar *et al.*,2004)、可能在几丁质的修饰过程中通过调控几丁质脱乙酰基作用反应的速度及脱乙酰基作用反应的程度(产生不同葡糖胺残基的壳聚糖),从而在

生长发育中起着重要作用(郝威等,2010)等,因此破坏昆虫 CDA 代谢将影响昆虫的多种代谢功能,在未来的害虫生物防治中 CDA 有可能成为又一靶标位点。

参考文献(References)

Arakane Y, Dixit R, Begum K, Park Y, Specht CA, Merzendorfer H, 2009. Analysis of functions of the chitin deacetylase gene family in *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39(5/6): 355—365.

Campbell PM, Cao AT, Hines ER, East PD, Gordon KH, 2008. Proteomic analysis of the peritrophic matrix from the gut of the caterpillar, *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38(10): 950—958.

Dixit R, Arakane Y, Specht CA, Richard C, Kramer KJ, Beeman RW, Muthukrishnan S, 2008. Domain organization and phylogenetic analysis of proteins from the chitin deacetylase gene family of *Tribolium castaneum* and three other species of insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38(4) 440—451.

Guo W, Li G, Pang Y, Wang P, 2005. A novel chitin-binding protein identified from the peritrophic membrane of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35(11): 1224—1234.

郝威,何旭玲,徐豫松,2010. 家蚕几丁质脱乙酰基酶基因结构及 mRNA 选择性剪接与表达差异的研究,蚕业科学,36(6):921—929.

Luschnig S, Bätz T, Armbruster K, Krasnow MA, 2006. Serpentine and vermiform encode matrix proteins with chitin-binding and deacetylation domains that limit tracheal tube length in *Drosophila*. *Curr. Biol.*, 16(2): 186—194.

Nahar P, Ghormade V, Deshpande MV, 2004. The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisopliae*: Possible edge to entomopathogenic fungi in the biological control of insect pests. *J. Invertebr. Pathol.*, 85(2): 80—88.

Toprak U, Baldwin D, Erlandson M, Gillott C, Hou X, Coutu C, Hegedus DD, 2008. A chitin deacetylase and putative insect intestinal lipases are components of the *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae) peritrophic matrix. *Insect Mol. Biol.*, 17(5): 573—585.

Wang S, Jayaram SA, Hemphälä J, Senti KA, Tsarouhas V, Jin H, Samakovlis C, 2006. Septate-junction-dependent luminal deposition of chitin deacetylases restricts tube elongation in the *Drosophila* Trachea. *Curr. Biol.*, 16(2): 180—185.

Zhao Y, Park RD, Muzzarell RAA, 2010. Chitin deacetylases: Properties and applications. *Mar. Drug.*, 8(1): 24—46.

张履鸿,李国勋,赵奎军,1993. 农业经济昆虫学. 哈尔滨:哈尔滨船舶工程学院出版社. 231.

应用昆虫学报 *Chinese Journal of Applied Entomology* 2011,48(5):1425—1430

杨扇舟蛾颗粒体病毒 fgf 基因的分析*

梁振普 许 锋 张小霞** 尹新明

(河南农业大学生命科学学院 郑州 450002)

摘 要 根据杨扇舟蛾颗粒体病毒(*Clostera anachoreta* Granulovirus,ClanGV)的全基因组序列,分析其基因组含有3个杆状病毒成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor,FGF)的同源 ORFs。通过生物信息学软件及在线工具对 ClanGV-FGFs 进行了分析,包括同源性、一级结构、二级结构和进化分析等。分析结果显示,测序得到的3个 ClanGV-FGFs 转录方向不同,但都属于病毒转录早期基因;三者同源性相差较大;进化分析显示,ClanGV-FGF-3 和 NPV 的 FGFs 进化关系较近,而 ClanGV-FGF-1 和 ClanGV-FGF-2 则与其它 GV 相应的 FGF 进化关系更近。

关键词 杨扇舟蛾颗粒体病毒,成纤维细胞生长因子(FGF),序列分析

Sequence analysis of fgf genes of *Clostera anachoreta* Granulovirus

LIANG Zhen-Pu XU Feng ZHANG Xiao-Xia** YIN Xin-Ming

(College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract Based on the whole genome of *Clostera anachoreta* Granulovirus (ClanGV), the Fibroblast Growth Factor (FGF) genes of ClanGV were analyzed using biosoftware and online tools. The Results show that three ClanGV-FGFs, which are all early expression genes, had different transcription directions. These ClanGV-FGFs had low sequence homologies but shared a similar functional domain common to all identified FGFs. Evolutionary analysis proves that ClanGV-FGF-3 has a close relationship to NPV-FGFs, however, ClanGV-FGF-1 and ClanGV-FGF-2 are closer to GV-FGF-1 and GV-FGF-2 respectively.

Key words *Clostera anachoreta* Granulovirus, Fibroblast Growth Factor (FGF), sequence analysis

杆状病毒是一类具有囊膜包裹的双链环状 DNA 病毒,其基因组大小为 80~180 kb,在自然界中以节肢动物作为专一性宿主进行感染和传播。杆状病毒又分为颗粒体病毒(granulovirus,GV)和核型多角体病毒(nuclear polyhedrosis virus,NPV)(洪健和周雪平,2006)。杆状病毒可以有效地侵染多种农林害虫,近年来作为一种主要的生物杀虫剂正在被广泛的研究使用。

杨扇舟蛾,又名杨树天社蛾,属于鳞翅目 Lepidoptera、舟蛾科 Notodontidae、扇舟蛾属 *Clostera*。杨扇舟蛾专一的侵害杨树,严重时可以将杨树叶子吃光,对生态造成极大地破坏。杨扇舟蛾颗粒体病毒(*Clostera anachoreta* granulovirus, ClanGV)可以侵染杨扇舟蛾,造成虫体的死亡、液化,然后再释放出病毒粒子。

成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)是一类通过与细胞膜特异性受体结合发挥作用,调节细胞生长的蛋白分子,最早在牛脑和脑垂体中发现(Armelin,1973)。在哺乳动物中,FGF 家族在促进胚胎发育、有丝分裂的发生、细胞生长和分化、组织形成与修复、炎症、血栓形成、肿瘤发生与转移等生理及病理过程中起重要作用。Ayres 等(1994)在 AcMNPV 中首次发现了与 FGF 蛋白家族同源的病毒 FGF(vFGF),后来的研究证明 FGF 在杆状病毒中普遍存在。Katsuma 等(2004, 2006a, 2006c)研究发现 BmNPV-FGF N 端的2个糖基化位点 Asn44 和 Asn171 对其分泌是至关重要的;并通过实验观察到缺失 FGF 的重组病毒与野生型病毒相比,BmNPV 出芽病毒(BV)产量下降。通过生物测定实验发现 *fgf* 缺失型病毒的传

* 资助项目:国家自然科学基金(30700540、30901152)、教育部新世纪优秀人才支持计划项目。

**通讯作者,E-mail: lzpbio@126.com

收稿日期:2011-02-11,接受日期:2011-03-31