

小地老虎隐花色素基因 *cryptochrome1* 和 *cryptochrome2* 的克隆及 mRNA 表达分析^{*}

程 鹏^{1,2**} 徐蓬军² 高希武¹ 肖海军² 付晓伟² 吴孔明^{2***}

(1. 中国农业大学农学与生物技术学院 北京 100193; 2. 植物病虫害生物学国家重点实验室 中国农业科学院植物保护研究所 北京 100193)

摘 要 隐花色素 (*cryptochrome*, *cry*) 是一类广泛存在于生物体内的蓝光和近紫外光受体, 介导生物对蓝光的一系列反应并能导引生物钟。本研究利用 RT-PCR 和 RACE 方法获得了小地老虎 *Agrotis ypsilon* *cry1* 和 *cry2* 基因, 分别命名为 *Aycry1* 和 *Aycry2*。*Aycry1* 基因 (GenBank No. JQ616846) 读码框 1 587 bp, 编码 528 个氨基酸, 预测分子量 60.5 ku, 等电点 6.68。*Aycry2* 基因 (GenBank No. JQ616847) 读码框 2 439 bp, 编码 812 个氨基酸, 预测分子量 92.1 ku, 等电点 8.45。保守区分析表明: *Aycry1* 和 *Aycry2* 均含有 FAD 结合位点的 PHR 区域和 C 末端保守区域。氨基酸序列比对分析表明, 小地老虎的 *AyCRY1* 和 *AyCRY2* 分别与其它鳞翅目昆虫的 *CRY1* 和 *CRY2* 有很高的一致性, 其中与棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 的一致性最高, 分别为 89.5% 和 73.8%。NJ 聚类分析结果表明昆虫含有两类 *CRY*, 即 *CRY1* 和 *CRY2*, 它们可分别以目为单位进行聚类, 其中 *AyCRY1* 和 *AyCRY2* 分别与其它鳞翅目昆虫的 *CRY1* 和 *CRY2* 聚到一起。以室内饲养的小地老虎为材料, 以 3 h 为间隔检测了 *Aycry1* 和 *Aycry2* 的 24 h 昼夜表达变化, 结果表明这 2 个基因均表现出一定的昼夜节律性。*Aycry1* 和 *Aycry2* 表达趋势白天高于晚上, 表达峰值出现在 ZT7 (Zeitgeber time)。方差分析其昼夜波动差异不显著。

关键词 小地老虎, 隐花色素, 基因表达

Molecular cloning and mRNA expression analysis of *cryptochrome* genes of the black cutworm *Agrotis ypsilon*

CHENG Peng^{1,2**} XU Peng-Jun² GAO Xi-Wu¹ XIAO Hai-Jun²
FU Xiao-Wei² WU Kong-Ming^{2***}

(1. College of Agriculture and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China;
2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection,
Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract *Cryptochrome* (*cry*) are blue and UV light photoreceptors and also act as an integral component of circadian clocks. In this study, two black cutworm (*Agrotis ypsilon*) *cryptochrome* genes, named *Aycry1* (GeneBank No. JQ616846) and *Aycry2* (GeneBank No. JQ616847), were cloned and characterized by RT-PCR and SMART RACE strategy. Their AUG-initiated ORFs (open reading frames) were 1 587 bp and 2 439 bp in length and encoded polypeptides were comprised of 528 and 812 amino acids respectively. Conserved domain analysis suggests that both *Aycry1* and *Aycry2* contain two basic conserved domains, the PHR region, which provides FAD binding sites, and the C-terminal conserved domain. Phylogenetic analysis indicates that insect *CRY*s are divided into two subgroups, *CRY1* and *CRY2*, and *AyCRY1* and *AyCRY2* cluster with Lepidopteran *CRY1* and *CRY2* genes, respectively. Diel fluctuation of both *Aycry1* and *Aycry2* mRNA levels was determined by quantitative PCR analysis. The mRNA levels of both *Aycry1* and

* 资助项目: 国家 973 项目 (2012CB1141004)。

**E-mail: ahjx_cp@163.com

***通讯作者, E-mail: kmwu@ippcaas.cn

收稿日期: 2012-03-01, 接受日期: 2012-04-12

Aycry2 were higher during the day than at night peaking at ZT7.

Key words *Agrotis ypsilon*, *cryptochrome*, mRNA expression

生物节律是指生物的生理和行为与环境保持同步的周期性节律,其中以 24 h 为运转周期的生物节律称为近日节律或昼夜节律 (circadian rhythm),是一种常见的生物钟现象,受基因遗传的调控(韦芳和王正荣,2008;俞波等,2011)。在果蝇中目前已确认的生物钟基因包括 *timeless*、*period*、*clock*、*cycle*、*dbt*、*vri*、*cryptochrome* 等 (Young, 2000)。其中隐花色素 (*cryptochrome*, *cry*) 编码的 CRY 蛋白是一种普遍存在于动植物和细菌中的蓝光、紫外光 (UV-A) 受体,参与动植物生物钟的光导引过程;其核苷酸序列、氨基酸序列及三维结构与 DNA 光解酶具有较高的相似性 (Sancar, 2003)。DNA 光解酶能够利用蓝光修复紫外线诱导的嘧啶二聚体,而 *cry* 基因无光解酶活性 (Todo, 1999; Cashmore, 2003; Lin and Shalitin, 2003; Sancar, 2003)。DNA 光解酶分为两类:CPD 光解酶修复环丁烷嘧啶二聚体,6,4-DNA 光解酶修复嘧啶-嘧啶酮二聚体;*cry* 和这两类光解酶一起组成 DNA 光解酶/隐花色素超家族 (Kanai *et al.*, 1997; Cashmore *et al.*, 1999)。根据其序列相似性,*cry* 家族基因可分为 3 个亚家族:植物 *cry*, 动物 *cry* 和 *cry*-DASH (Lin and Todo, 2005)。

昆虫在长期进化过程中形成两类 CRY,即 CRY1 和 CRY2,其中 CRY1 具有感受蓝光的活性,CRY2 类似于脊椎动物 CRY,无感受光的活性,但具有转录抑制活性 (Yuan *et al.*, 2007)。根据所含 CRY 的类型,昆虫中至少存在 3 种调控生物钟的机制:以果蝇 *Drosophila melanogaster* 为代表的只含有 CRY1 的生物钟调控机制、以蜜蜂 *Apis mellifera* 为代表的只含有 CRY2 的生物钟调控机制和以鳞翅目昆虫为代表的含有 CRY1 和 CRY2 的生物钟调控机制 (Yuan *et al.*, 2007; Tomioka and Matsumoto, 2010)。近年来,研究者以果蝇、蜜蜂及美洲斑蝶 *Danaus plexippus* 为研究对象,阐述了 *cry* 基因在上述物种中生物钟调控的可能分子机制 (Emery *et al.*, 1998; Busza *et al.*, 2004; Rubin *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2008)。

蛾类昆虫大多在晚上活动为害,与以上物种处于的生态位不同,因此可能具有不同的生物节律和调控机制。目前,关于蛾类 *cry* 基因功能及调

控生物钟的研究很少,已知含有 *cry* 基因的蛾类物种有家蚕 *Bombyx mori*、甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae*、柞蚕 *Antheraea pernyi*、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*、棉铃虫等 (Merlin *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2007; 倪慧等, 2011; 王文栋等, 2011)。小地老虎隶属夜蛾科,主要在夜间活动,危害幼苗,食性杂,危害包括棉花、玉米等多种农作物;是地老虎中分布最广、危害最重的种类,具有迁飞等复杂的生活习性 (向玉勇和杨茂发, 2008)。本研究克隆了小地老虎 *cry* 基因,并分析了其昼夜表达规律。以期为探索小地老虎生物钟的调控机制,进一步了解昆虫生物钟的多样性,以及利用昆虫生物节律控制害虫提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用小地老虎为作者所在实验室饲养,该品系 2006 年采自中国农业科学院植物保护研究所廊坊中试基地,室内人工饲养,饲养条件参照陆琼等 (2009) 稍作改动:25℃, 75% RH, 光周期 L: D = 14: 10。

RNA 提取试剂 Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司, SMART RACE 试剂盒购自 Clontech 公司, 大肠杆菌 DH5 α 购自 Biomed 公司, 胶回收试剂盒购自 Axygen 公司, MMLV 反转录酶购自 Promega 公司, 荧光定量 PCR 试剂购自 Takara 公司, Taqman 探针由 Takara 公司设计合成,其他试剂为国产分析纯。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成

按照试剂使用说明,取小地老虎成虫,全虫去翅后液氮研磨,采用 Trizol 法提取总 RNA,用 50 μ L 无 RNase 水溶解,以 OD260/OD280 检测质量及浓度并取 2 μ L 总 RNA 模板加上 20 ng oligo (dT),按 Promega 公司试剂说明书合成 cDNA 第一链。根据小地老虎 actin 序列 (GenBank No. EU601172) 设计引物 actinF/actinR (表 1),用该引物检测 cDNA 模板质量及总 RNA 有无 DNA 污染,反应条件为预变性 94℃ 4 min, 35 个循环,循环条件是 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s。

1.3 引物设计

表 1 实验所用的 PCR 引物
Table 1 Listing of primers used in this study

引物 Primers	序列 Sequences (5' - 3')	扩增片段 Amplicon
CRY1F1	GAYGGAGARACWGCHGGTAC	<i>cryI</i> 基因 cDNA 中间片段
CRY1R1	MGCCCACTCGCCMGAGTCCA	
CRY1F2	TTCGAGCARGAYTGYGAGCC	
CRY1R2	CCVGCRCASACCGACCAATC	
CRY13RF1	TCAAGTTTGGTAGCCTGCCCGAGTGC	<i>cryI</i> 基因 3'末端
CRY13RF2	CTGCACTGCGGTTTGATGTCTTTCA	
CRY15RR1	AGCACTCGGGCAGGCTACCAAACTT	<i>cryI</i> 基因 5'末端
CRY15RR2	GACAGTCTCGGGCTCCCACAGATATG	
CRY1QF	GAGAGTCAAGTTTCGGAAG	<i>cryI</i> 引物探针
CRY1QR	CCTCAGGAAGGTCTCATG	
CRY1PROBE	CTGCCTGAATGCTTCTACAATGAGTT	
CRY2F1	AAGCACAYYGTVCACTGGTT	
CRY2R1	ACCCAYGGCTCRTC DATGTA	<i>cry2</i> 基因 cDNA 中间片段
CRY2F2	GTYGGCATYAATAAATGGAG	
CRY2R2	AGCCACATCCACATSCCAGC	
CRY2QF	CTACCACTTGACAGAATTGTA	
CRY2QR	TCGCTAATGCTTCTTGATTG	<i>cry2</i> 引物探针
CRY2PROBE	AACGAGTAAGACCACCGCTGT	
AYCRY1-F	CCTCGATCGCCACAATGC	
AYCRY1-R	ACCATCTCCACATCAGC	
AYCRY2-F	CGCAATGTGTGTAAATAC	全长引物
AYCRY2-R	GATTATAAACATGATCCAC	
actinF	CATCTACGAGGGTTACGC	
actinR	CATCTGTTGGAAGGTGGA	
QactinF	CTCCCTCGAGAAGTCCTACGAA	actin 检测模板引物
QactinR	GGCAACGGAACCTCTCGTTA	
ACTINPROBE	TCCCGACGGTCAGGTCATCACCA	

1.4 小地老虎 *cryI* 基因的克隆

以小地老虎 cDNA 为模板,利用简并引物 CRY1F1 和 CRY1R1(表 1)进行 Touch-down PCR,反应条件为 94℃ 4 min,后面 5 个循环,循环条件是 94℃ 30 s,65℃ 30 s,72℃ 1 min;再后面 5 个循环,循环条件是 94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 1 min;再后面 30 个循环,循环条件是 94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min;最后 72℃ 10 min。扩增产物用 CRY1F2 和 CRY1R2 进行巢式 PCR,PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测出与预期大小一致的目的条带,回收片段并进行 TA 克隆测序,将纯化产物连接至 pEASY-T 质粒载体(Transgen 公司),转化至感受态大肠杆菌 DH5 α ,随后进行蓝白斑筛选;挑选白斑,菌落 PCR 检测为阳性后,送公司测序。*cry2* 基因扩增采用同样的方法。

根据上述克隆获得的 *cry* 片段序列,分别设计特异性引物,按照 SMART RACE 试剂盒说明书,进行 3' RACE (CRY13RF1 和 CRY13RF2) 和 5' RACE (CRY15RR1 和 CRY15RR2)。

1.5 序列分析

用 Clustal W 软件进行多序列比对和同源性分析(Thompson *et al.*, 1994)。通过在线工具(http://web.expasy.org/compute_pi/)进行蛋白质等电点和分子量分析。用 HUMMOP 进行跨膜区分析,Signal P 进行信号肽分析,Clustal W 软件和 MEGA 5.0 软件进行聚类分析(Tamura *et al.*, 2011)。

1.6 Real-time PCR 分析

为了检测小地老虎 *cry* 基因的 24 h 表达节

律,本研究以 L:D = 14:10 光周期下饲养的 3 日龄小地老虎为材料,取成虫去翅,每隔 3 h 取一次样,每个取样点 4 个样本(雌雄各 2 头)。根据已知的小地老虎 *actin* 基因序列及本研究扩增获得的 *Aycry1* 和 *Aycry2* 序列设计引物及探针,采用 Taqman 探针法检测 *Aycry1* 和 *Aycry2* 的昼夜节律性表达, *Aycry1* 探针为 CRY1QF/R 和 CRY1PROBE, *Aycry2* 探针为 CRY2QF/R 和 CRY2PROBE,荧光定量 PCR 采用 20 μ L 体系,使用 ABI Prism® 7500 荧光定量 PCR 仪, TaKaRa 公司的 *Premix Ex Taq*TM 荧光定量试剂盒,各反应成分的含量为加入 10.0 μ L *Premix Ex Taq*TM (2 $\times$) 反应液,正向和反向引物各 0.4 μ L (10 μ mol $\cdot$ L⁻¹), 探针 0.8 μ L (10 μ mol $\cdot$ L⁻¹), 模板 cDNA 1 μ L, ROX Reference Dye II (50 $\times$) 0.4 μ L, 加水至 20 μ L。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 30 s;95 $^{\circ}$ C, 15 s, 60 $^{\circ}$ C, 34 s, 45 个循环。空白对照模板以水代替 cDNA,每个样品重复 3 次。实时荧光定量 RT-PCR 采用相对定量法,依据各样品和其对应的 *Actin* 的 Ct 值,参照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算相对表达量 (Livak and Schmittgen, 2001)。用 STATA9.0 进行统计分析 (ANOVA),采用 Bonferroni 法进行多重比较,分析不同时间是否存在显著差异。

2 结果与分析

2.1 小地老虎 *cry1* 基因全长 cDNA 的克隆及序列分析

为验证总 RNA 中有无 DNA 污染及 cDNA 的质量,本研究根据小地老虎 *actin* 基因的已知序列,设计引物扩增一长度为 574 bp 的目的片段,结果表明以 cDNA 为模板能成功扩增出目的片段,而以总 RNA 为模板则无法扩增出目的条带,表明提取的总 RNA 及反转录获得的 cDNA 可满足后续实验 (图 1)。

利用简并引物、巢式 PCR 及 SMART RACE 方法,从小地老虎体内克隆获得全长 *cry1* 基因和 *cry2* 基因,分别命名为 *Aycry1* 和 *Aycry2*。 *Aycry1* 基因编码区长 1 587 bp, 编码 528 个氨基酸, 预测分子量为 60.5 ku, 等电点 6.68 (图 2)。 *Aycry2* 基因编码区长 2 439 bp, 编码 812 个氨基酸, 预测分子量为 92.1 ku, 等电点 8.45 (图 3)。 *Aycry1* 和 *Aycry2* 已提交 NCBI, GenBank 号分别为 JQ616846 和 JQ616847。

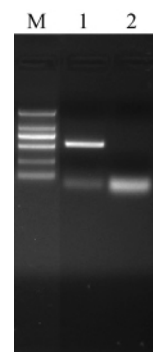


图 1 模板检测,以 cDNA 和总 RNA 为模板扩增 *actin* 基因

Fig. 1 Detection of template by amplifying *actin*

M: marker; 1: cDNA; 2: total RNA.

2.2 序列比对及聚类分析

与已知的拟南芥 *Arabidopsis thaliana*、果蝇 6-4DNA 光解酶及小鼠 *Mus musculus* CRY 的氨基酸序列比对结果表明, *AyCRY1* 和 *AyCRY2* 均含有保守的 PhrB 结构域 (分别位于氨基酸 46 ~ 405 和 102 ~ 471), PhrB 结构域中的多个功能位点高度保守 (图 4)。分析发现 *AyCRY1* 和 *AyCRY2* 无信号肽序列和跨膜区。

Clustal W 比对结果表明, *AyCRY1* 和 *AyCRY2* 与其它昆虫的 CRY1 和 CRY2 均有较高的一致性, 与鳞翅目昆虫同源性分别大于 76.5% 和 65.3%。其中与棉铃虫 CRY1 和 CRY2 的一致性最高, 分别为 89.5% 和 73.8%。

以斑马鱼 *Danio rerio* 和非洲爪蟾 *Xenopus laevis* 的 *cry-DASH* 基因为外群, 通过 Clustal W 软件和 MEGA 5.0 软件, 对 48 个已知昆虫的 CRY 和 *AyCRY* 氨基酸序列进行 NJ 聚类分析, 结果表明: 昆虫的 CRY1 和 CRY2 基因分成两支, CRY1 和 CRY2 分别能以目为单位进行聚类, 但半翅目类群的豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* 和点蜂缘蝽 *Riptortus pedestris* 分成两支, 而本研究所获得的 *AyCRY1* 与其它鳞翅目昆虫的 CRY1 聚到一起, *AyCRY2* 与其他鳞翅目昆虫的 CRY2 聚到一起 (图 5)。

2.3 *Aycry1* 和 *Aycry2* 的 mRNA 表达分析

本研究采用 Taqman 探针法检测了长光照条件 (L:D = 14:10) 下饲养的 3 日龄小地老虎成虫 *Aycry1* 和 *Aycry2* 的昼夜波动规律, 结果表明 *Aycry1* 和 *Aycry2* 的表达均有明显的节律性。白天 *Aycry1* 和 *Aycry2* 的表达量均显著高于晚上, 二者峰值都

```

ACATGGGGGGTTTTCGAAGTTTATCTGTTTAAATTTAGACGTGTAGGATAATTTAAA 60
CITTAATAATAAGTGTGTGGTGGCAGCTATTGGAATTAATTTGCAAGTCCAAAAATTACTCATAGGAGAAATGGGAATAAAGTAAAGTGGGATCTGCTGTTTACTGTTTACAAG 180
GTATAACCTCGATCGCCACAATGCTTGGTGGCAGTGTCTTGGTTCCGGCAGGGTTCGCTGTCATGACAACCCGTCCTACATGCTGCATTAGAAGAGAAGGTTTCCCTTCTTC 300
M L G G S V L W F R H G L R L H D N P S L H A A L E E K G F P F F 33
CCCATATTTATCTTCGATGGAGAACTGCGGTACAAAGCTGGTGGGTACAAACCGTATGCGGTATCTTCTGGAAGCTCTAGATGACCTGGACAACAGGTTCAAGAAGTATGGAGGAAGA 420
P I F I F D G E T A G T K L V G Y N R M R Y L L E A L D D L D N Q F K K Y G G R 73
CTGATCATGCTGAAGGGAAACCGAATGCTGTTTAGGAGACTTTGGGAGGAGTTTGGCATCCGTAACCTCTGCTTGAACAAGATTGCGAGCCAGTGTGGCGCCTCGCGATGACAGT 540
L I M L K G K P N V V F R R L W E E F G I R K L C F E Q D C E P V W R A R D D S 113
GTGAAGGCTGCGTGAAGGAGATCGGAGTGTATGCAAGGAGCATGTGTGCATCTCTGTTGGGAGCCCGACACCGTCAATGAAGCCAACGGGGGCATCCGCGCCCTCACTTACCAGATG 660
V K A A C K E I G V V C K E H V S H T L W E P D T V I K A N G G I P P L T Y Q M 153
TTTTTCATACAGTGACAATATCGGTGATCCACGCGCGCGGTCCACGATATCGATTAAAGGAGATCAAGTTCGGAAGCCTGCTGAATGCTTCTACAATGAGTTTACGGTCTTCGAT 780
F L H T V T T I G D P P R P V H D I D L R R V K F G S L P E C F Y N E F T V F D 193
AAGGCTCCCAACCGGAGGACTTGGCGGTCTCTGGAACGAGGATATCGCATGATCCGCTGGTGGTGGTGGAGCAGACGCTCAACAAATGAACAACGCGTAGCTGTGGAG 900
K A P K P E D L G V F L E N E D I R M I R W V G G E S T A L K Q M Q Q R L A V E 233
CATGAGACCTTCCTGAGGGTTCGTACTTGGCAACGATGGCAATCCTGACTTGTGGGGCCTCCCATATCGTTGAGTCCAGCGCTGAGATTGGTTGTCTCTCCGTAGGAGCTTCTAC 1020
H E T F L R G S Y L P T H G N P D L L G P P I S L S P A L R F G C L S V R S F Y 273
TGGTCCGTTCAAGATCTTTTCGTAAGATGCATCAGGGTGGTCTTACTACCAATCAGCATCGCATTTTATTAACGGGCGAGTTAATTGGCGTGAATATTCCACACGATGAGCGTGAAC 1140
W S V Q D L F R K V H Q G R L T T Q S A S H F I T G Q L I W R E Y F H T M S V N 313
AACCTAACTACGGCCAGATGTCTGGCAACCTATTTGTTGGATATACCTGGAAGAACCAGGAGATGAGTTGAAGAGATGGGAAGATGGTGGCAGCGGTTTCCCATTCGTGAC 1260
N P N Y G Q M S G N P I C L D I P W K N P E G D E L K R W E D G R T G F P F V D 353
GCAACCATGCGTCAACTGAAGACCGAGGGTGGTGCACACCGCGGCCGCAACACTGTGCGTCTTCTCAGCGTGGGACTCTCTGGCTGTCTGGGAACATGGCTGAACCACTTC 1380
A T M R Q L K T E G W L H H A A R N T V A S F L T R G T L W L S W E H G L N H F 393
CTCAAGTACCTGCTGACGTTGACTGGTCACTGCTGCGCGGCACTGGATGTGGGTGTGCTGCTCAGCGTTCGAGGCTCTCTGGACTCGGGGAGTGTGCTGTCCAGTGGGACTGGGA 1500
L K Y L L D V D W S V C A G N W M W V S S S A F E A L L D S G E C A C P V R L G 433
CAGCGACTGGACCCACGCGGGAGTACGTGGGAGATACGTGCCGAGCTGGCGTGCATGCCGTTGGAGTACATTTATGAACCATGGAAGCTCTATGCATCCAGGGCGTGGCAAC 1620
Q R L D P S G E Y V R R Y V P E L A C M P V E Y I Y E P W K A P I D I Q G R A N 473
TGCATCATAGGCAAGGACTACCTGCTCCCGTAGTGAACCATCTGGTCCGCGCAGAGGAAACAAGAACCACCTGAAGGAACCTCCGCCATATTTTACAAAAAGCTCCCCCATTTGCTGC 1740
C I I G K D Y P A P V V N H L V A A Q R N K N T M K E L R H I L Q K A P P H C C 513
CCCTCTCAGAGAAGAAATCCGGCAATTTATGTGGCTCAACGAGTAAACAATGACGTACGAAAAATCGACACTATTTGTATTGACGTAGAATTTAAAGTTTATGATGGATGCTGTGTTAA 1860
P S S E E E I R Q F M W L N E
TGCTTTCCATTTATGTTAGAATAAGTTGCAAGGTAAGTCTTGATTCTCGGACATCAAACTATTTTATTCAGGAATAAAGTTGATGCTTAAAGTTTGTGGGGGATAAAATATAT 1980
AGGTAACATAAAAAAACTCTGAAATGGGACTGTAATAACCAAGTTGCTCAACTGCTGCTGATATATAAATCAACCTCTAATGGGATTATGGAGATATGCTGCGCGCATGTCAGAC 2100
GAATTGTGGACTAACTAAATCGTACAAAAATGGTCTGATGTGGGAGATGGTAAGACGAACCGGATAAGTTCTGTGAGGAAGAACGCGGGTTTCGAAAAAAAAGAAAAAAA 2260
AAAAAA

```

图2 *Aycry1* 基因的核苷酸和氨基酸序列Fig. 2 Nucleotide sequence and the putative amino acid sequence of the *Aycry1*

“=”代表 poly(A) 加 A 信号序列 (AATAAA)。

“=” stand for the poly(A) signal site.

出现在 ZT7 (开灯时间是 8:00—22:00)。方差分析结果表明,不同时间 *Aycry1* 和 *Aycry2* 的表达量无显著差异 ($cry1: F = 1.09, df = 7, 24, P = 0.3975; cry2: F = 0.07, df = 7, 24, P = 0.6731$) (图 6)。

3 讨论

昆虫生物钟参与调控多种昆虫行为,包括取食、交配、产卵、迁飞等 (Froy *et al.*, 2003; Sauman *et al.*, 2005; Matsumoto *et al.*, 2008; Merlin *et al.*, 2009)。目前对于生物钟分子机制在脉孢菌

Neurospora crassa、果蝇、小鼠等模式生物上已取得重大进展 (Emery *et al.*, 1998, 2000; Stanewsky *et al.*, 1998; Ceriani *et al.*, 1999; Dunlap, 1999; Emery *et al.*, 2000; Krishnan *et al.*, 2001; Stanewsky, 2002; Busza *et al.*, 2004; Sancar, 2004; Rubin *et al.*, 2006)。*cry* 基因是生物钟核心基因之一,本研究克隆获得小地老虎 *cry1* 和 *cry2* 基因的全长序列,扩增的序列在 3'末端出现 poly(A) 加尾信号,将编码蛋白与拟南芥 6-4DNA 光解酶、果蝇 6-4DNA 光解酶以及小鼠 CRY1 和 CRY2 蛋白序列比对,分析显示这 2 个基因均含有完整的

```

ACATGGGGAGTCTAGTTTTGTACGCCACTTTTGTGATTACCTCCTCCCTTATATCAACGTAA 60
TATATTCATAACGTTCTAAAAAGGGTAGAATCCAGTTGCACCTTGTTATTATCTTACTAGTATACTGAAGTAAGGCCATAATGTTTGGATGTGTTTCAGTTGGACTAAATAAGTT 180
TTGTTCTGTGCACAGTGGTATTGAGAAGTTGCATTTTGGAAAAGCTGCTTTGATTACAAAAAGTAATCAACCTGTGTTTGAATTTGAAGAAGTTTGTGTTTGTGTAACAATACTTGTCT 300
GGACTGTGACCTGCAATAAATTTTATGGAAATGATCGGGATATCCAGAGTAACCTTATCCACACAGGGCGCAATGTGTGTAATACATGAAGATGTCAGCTTCTGCCGAGACGTTGCCG 420
M E I D R D I Q S N L F H T R R N V C K Y M K M S A S A E T L P 32
GCTCCGACCGTAGCAGCGGGGGGCTCTCGCTGCTGCGGCGCTCCTCATGCTGCGCTGCGGCTGCTGCGGCTGCGGCGGGAAGCACATCGTGCAGTGGTCCGAAAAGGCTGCGCTC 540
A P T V R P R A P L A A A A A P H A S P A A R R P G G K H I V H W F R K G L R L 72
CATGATAACCCAGCGTTAAAGGATGGCTAGTGAAGCAGCGACGTTTCAGATGTGTTTATATCGATCCTTGGTTCGCCAGCTCTTCTAATGTGGCATCAACAAATGGAGTTTCTG 660
H D N P A L K D G L V D A A T F R C V F I I D P W F A S S S N V G I N K W R F L 112
CTGCAATGTTTGAAGACTTGGATAGCAGTTTGGGAACTTAACTCCGACTGTTCGTGGTGGGAGGCAACCTGCCGATGCATTGCCGAATTTATTCGAGAATGGGGAACCCCG 780
L Q C L E D L D S S L R K L N S R L F V V R G Q P A D A L P K L F R E W G T T A 152
TTGCTCTCGAGGAGGATCCGAGCTTACGGCGCGGTGCGAGAACCAATATTATGTCAAAATGTGCGGAAGTGGCATTACCGTCACATCTCGAGTTTCTCACACATTATACAAATTA 900
L S F E E D P E P Y G R V R D H N I M S K C R E V G I T V T S R V S H T L Y K L 192
GATCAATAATAGAACGAAACGTTGTAAGCGCCACTCAGTACCACAGTTCCAGGCATTGATGCCAGCATGCCTCCACCTCCACGCGAGGCGCGATATACGCAAAACACTG 1020
D Q I I E R N G G K A P L T Y H Q F Q A L I A S M P P P P P A E A P I S A K T L 232
AACGGCGCCACCGCTGTAAACGATGACCATGATGCGTTTGGTGTACCCACCTCGAAGATCTGGATTGCGAGCTGAGGGTTTAAACCTCCCGTTTGGATCGGAGGGGAAAGT 1140
N G A T T P V T D D H D R F G V P T L E E L G F E T E G L K P P V W I 126
GAAGCTTATAGTAGTTAGAAAGACATCTGGAAGAAAGCTTGGGTGCTTCTTTCGGGCGACCGAAATGACACACAGTCACTATTGGCAAGCCAGACAGGCTTATCACCTACTTA 1260
E A L A R L E R H L E R K A W V A S F G R P K M T P Q S L L A S Q T G L S P Y L 312
AGGTTTGGTTGTTTATCAACAGATTATTTTACTACAGTTGACAGAAATGTACAAAGAGTTAAAGCAGTAAGACCCGCTGTCTCTTCATGGGCAAACTACTGTGAGGGAATTTTC 1380
R F G C L S T R L F Y Y Q L T E L Y K R V K R V R P P L S L H G Q I L W R E F P 352
TATTGCGTGCAACGCAATCCTAATTTTACCGTATGGAAGGAAATCCTATATGTGTTCAATACCATGGGAAAGAAATCAAGAAGCATTAGCGAAATGGGCTAGTGGCAATCTGGA 1500
Y C A A T R N P N F D R M E G N P I C V Q I P W E K N Q E A L A K W A S G O S G 392
TTTCTTGGATGCAATAATGATACAATTAAGAGAAGAGCTGGATCCACCACTTAGCCAGGCGATGCGAGTGGCATGCTTCTAACGAGGGGTGACTTGTGGATCTCATGGGAAGAA 1620
N G A T T P V T D D H D R F G V P T L E E L G F E T E G L K P P V W I 432
GGAATGAAGGTGTCGACGAATGCTTCTCGACGCGACTGGTCTGTAATGGGGCATGTGATGTGGCTATCGTGCTCATCATTTTCCAGCAATTTTCCACTGCTATTGCCCGGTC 1740
G M K V F D E L L L D A D W S V N A G M W M W L S C S S F F Q Q F F H C Y C P V 472
CGTTTCGGGCGAAACTGATCCTAATGTTGATTATTAAGGAGATACATTC CATTGAGAATATGCCAGCGATACATCCACGAGCGGTGGGTGCTCCTGAGTCTGTGCGAGAG 1860
R F G R K T D P N G D F I R R Y I P A L K N M P T R Y I H E P W V A P E S V Q Q 512
GCGGCGCGTGATCATCGGTGCGGACTACCCATGCCATGGTGAACATGCGAAAGCTCACAGGTCAACATCGAAGCATCAACAAAGTATACGCGCAGTTAGCGAAATCAACCA 1980
A A R C I I G R D Y P M P M V D H A K A S Q V N I E R I K Q V Y A Q L A K F K P 552
CAAGGTACATTGAATCCCAACGCTGTACAACGACCGAAGCTGATGCAATCATCCCGAGCCCGAATTCAATAATAACGACATCAACAGTCCAACTTCTGTGACGCCAAGCACCTGAT 2100
Q G T L N P N A V Q R P N V M Q S S P S P N S I I T S I N Q S N F L C S Q A P D 592
CAACCGGCGACTACACGACATAATACCTATAAGGATAATGATGTGTTATCCAAAGCCTATGAGCCACCGCTCCATGAAGCCTTCGTTCAAGCAAGTTGTTATCGTACAGAAAAA 2220
Q P A T T P D I I P Y K D N D V V F Q K P M S H R S M K P S F K Q V V I V Q K K 632
CAAGTACCAATGTCATACAAACAGTATGCGAAACAAAGGAGAACTATGTCGTCAATAGACAACATAGATGTCGCTTCAAAATGCCAAGAAATGATCATTACAACGAGCAAAACAA 2340
Q S T N V I Q T V S Q T K E N Y V V N R Q L D V A F K M P R N D H L Q P A K Q E 672
AATTATGATTTTAAAACTTAATTAATAATATGCTCAGGATATGCCAACAGTCCAGAAATCTTTGAGAATGACCAACAACTAAGAGTGAATATTGCTCAGCAGACATTGAAA 2460
N Y D F K N L I I N N Y A Q G Y A N S P E I F E N D Q T T K S E L F A Q Q T L K 712
ATTAACAGTTTAAATATGAAAAACAGAAGTTCTTTTGTCTTCTATCTGATAACGGAGTACGTAAGACGCTGGTCACAAAGAGCGCGCGCTCCTCTTATGCTCCGGCATC 2580
I N S F N Y E K Q K F F L S S Y P D N G V R K A A G H N E A P A P P P Y A S G I 752
GACCAGACCAATATGAGTTTCAATATGAGAACAAATAGAAAAATGTAAGAGTGAAGCAATGACGCGACATGTATACATCAATGTCAATTAACGACGATGGAATATTTCAAC 2700
D H D T N M S F N N E N K T E N V K D E A N D G T C I H P M S I N D D G I I S N 792
GAAACACGAGTAATACTTCTAATGAATGTGACAAATATTGAAAAATGAAATCAGAAGTAATTAATAAATATGATGATGTTTATAATCTATTAAACCATGGCTATATAA 2820
E N Q I N T S N E C D N Y S E N E N Q K
CAACTGAAGTCTCTACTGATTACTATTTCATCTGTCTTATCCAAAAACATTGAGCTGTGTGTACAGAACTTGCCTGACAGTACATTATTGTTATTCTGTAAGAACTACAAGATGAT 2940
ACAGTAGAAGTATTCTGAATCAAGATATGACGCAAGTGTGTTCCGGCACAAAACAGTATCCGCGCGGCGAGATCTCTATAAATAGTTGAATTATAATTTAAGACCAACTTACAAGA 3060
TTGTTAGTAGCTAAATAATGTTTGTATATCGAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 3 *Aycry2* 基因的核苷酸和氨基酸序列Fig. 3 Nucleotide sequence and the putative amino acid sequence of the *Aycry2*

“=”代表 ploy(A) 加 A 信号序列 (AATAAA)。

“=” stand for the poly(A) signal site.

PHR 功能域, 在 PHR 功能域含有 FAD (黄素腺嘌呤二核苷酸) 和 MTHF (甲基四氢叶酸) 结合的全部关键位点, C 端结构域中也包含完整的色氨酸三联体 (Emery *et al.*, 1998; Berndt *et al.*, 2007; Hitomi *et al.*, 2009) 说明我们获得的是全长的基因

序列。

多序列比对结果表明, *AyCRY1* 和 *AyCRY2* 与其它昆虫的 *CRY1* 和 *CRY2* 均表现出较高的一致性, 其中与棉铃虫 *CRY1* 和 *CRY2* 的一致性最高。与前人 (Yuan *et al.*, 2007; 倪慧等, 2011) 的研究结



图 4 AyCRY1 和 AyCRY2 氨基酸序列比对

Fig. 4 Alignment analysis of amino acid sequences of AyCRYs and other CRY family members

保守的功能区域被标注“-”代表 MTHF 结合区,“=”代表 FAD 结合区,“*”代表 FAD 结合位点,三角代表色氨酸三联体。

“-” stand for MTHF binding region “=” stand for FAD binding region “*” stand for FAD binding sites,

solid triangle stands for Trp triad.

At: 拟南芥 *Arabidopsis thaliana*; Dm: 果蝇 *Drosophila melanogaster*;

Ms: 小鼠 *Mus musculus*; PHR: 6,4-DNA 光解酶 6,4-DNA Photolyase.

果类似。聚类分析表明,昆虫的 CRY1 与 CRY2 能很好的聚类到一起 (Yuan *et al.*, 2007), CRY1 能以目为单位进行聚类,说明 CRY1 适合进行目一级分类单元的系统分析; CRY2 与 CRY1 情况类似,但半翅目类群的豌豆蚜和点蜂缘蝽分成两支,这两类物种在分类学上存在争议,国内将蚜虫列入同翅目 (Homoptera), 而将蝽类列入半翅目

(Hemiptera), 国外则将同翅目和半翅目合称半翅目; CRY2 聚类结果表明这两类昆虫在进化上存在较大差异。

在长期进化过程中,经过多次基因的复制和丢失,昆虫形成了 3 类 CRY 基因组合,分别代表 3 种不同的生物钟调控机制 (Yuan *et al.*, 2007; Tomioka and Matsumoto, 2010)。在果蝇中只含有

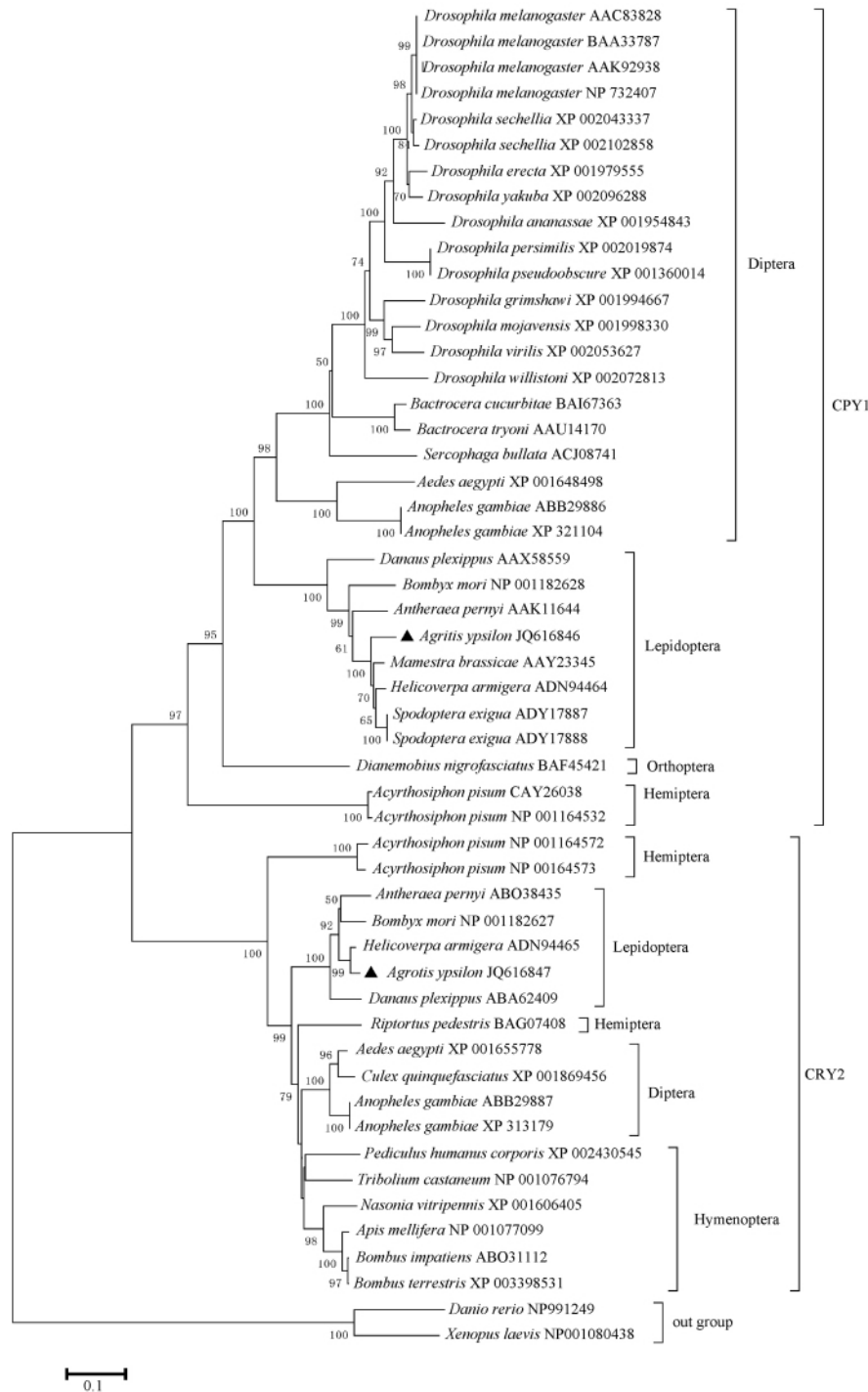


图 5 以斑马鱼和非洲爬蟾的 *cry-DASH* 为外群, 基于 NJ 法的昆虫 CRY 氨基酸聚类分析

Fig. 5 A neighbor-joining tree using Poisson-correction distances was constructed with amino acid sequences from 50 insects using *Danio rerio* and *Xenopus laevis* *cry-DASH* as outgroup

▲代表本研究所获得的小地老虎 CRY。

▲ stand for the sequence cloned in this study.

cry1 (*dcry1*), 蜜蜂和赤拟谷盗中只含有 *cry2*, 大斑蝶 *Danaus plexippus* 中既含有 *cry1* (*Dpcry1*) 又含有

cry2 (*Dpcry2*)。分析其各自 *cry* 的波动规律表明, *dcry1* 在 ZT0-5 进入高峰, 在 ZT17 进入低谷, 昼夜

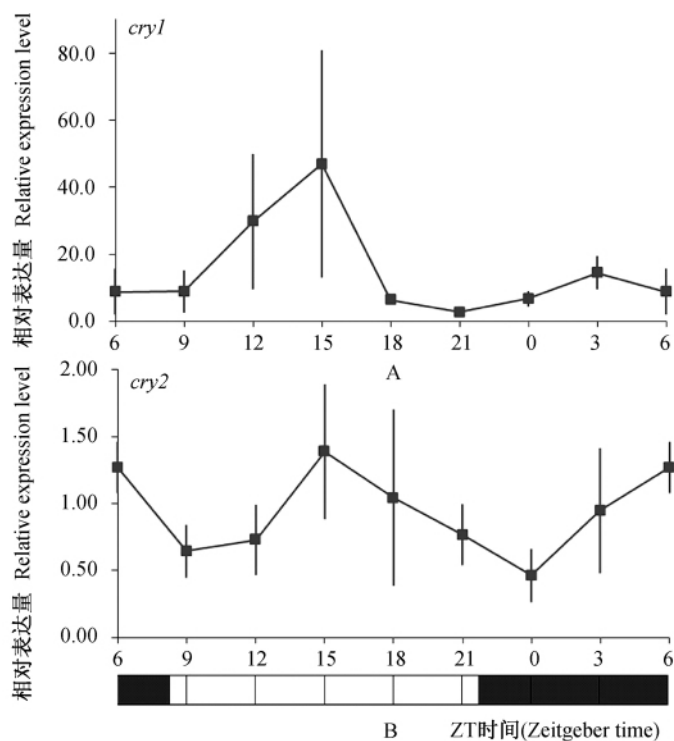


图 6 小地老虎 *cry1* (A) 和 *cry2* (B) 基因的 24 h 昼夜表达节律

Fig. 6 Relative expression level of both *cry1* (A) and *cry2* (B) in different time from *Agrotis ypsilon*

阴影代表黑夜, 无阴影处代表白天 (8:00—22:00)。

Black stand for night, white stands for day (8:00—22:00).

差异极显著 (Emery *et al.*, 1998)。大斑蝶 *cry* 和蜜蜂 *cry* 表现出完全相反的波动相位, *Dpcry1* 和 *Dpcry2* 在 ZT18 达到高峰, ZT0-3 进入低谷, *Amcry2* 在 ZT17 达到高峰, ZT0-5 进入低谷 (Rubin *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2008)。荧光定量结果表明, *Aycry1* 和 *Aycry2* 表现出相同的趋势, 表达峰值出现在 ZT7。且 *Aycry1* 和 *Aycry2* 昼夜波动性未达到极显著水平。这表明, 大斑蝶和蜜蜂等昆虫进化出和果蝇差异极大的生物钟模式, 而小地老虎虽然和大斑蝶同属于鳞翅目昆虫, 但由于二者处于不同生态位, 生物钟模式也表现出差异。

综上所述, 本研究成功获得了小地老虎的两类 *cry* 基因 (*Aycry1* 和 *Aycry2*) 并分析了其昼夜波动规律, 其 mRNA 表达量昼夜变化不同于果蝇和大斑蝶。该结果与小地老虎具有不同的活动节律相一致。值得注意的是, 本研究只统计了小地老虎在长光周期下整头个体的昼夜表达节律, 下一步将研究不同组织及不同光周期下的表达节律, 以期获得小地老虎更为详细的生物钟分子调控机

制。

参考文献 (References)

- Berndt A, Kottke T, Breitkreuz H, Dvorsky R, Hennig S, Alexander M, Wolf E, 2007. A novel photoreaction mechanism for the circadian blue light photoreceptor *Drosophila* cryptochrome. *J. Biol. Chem.*, 282 (17): 13011—13021.
- Busza A, Emery-Le M, Rosbash M, Emery P, 2004. Roles of the two *Drosophila* cryptochrome structural domains in circadian photoreception. *Science*, 304 (5676): 1503—1506.
- Cashmore AR, 2003. Cryptochromes: enabling plants and animals to determine circadian time. *Cell*, 114 (5): 537—543.
- Cashmore AR, Jarillo J, Wu YJ, Liu DM, 1999. Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science*, 284 (5415): 760—764.
- Ceriani MF, Darlington TK, Staknis D, Mas P, Petti AA, Weitz CJ, Kay SA, 1999. Light-dependent sequestration of timeless by cryptochrome. *Science*, 285 (5427): 553—556.

- Dunlap JC, 1999. Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, 96 (2) :271—290.
- Emery P, So WV, Kaneko M, Hall JC, Rosbash M, 1998. CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell*, 95 (5) :669—679.
- Emery P, Stanewsky R, Forster CH, Emery-Le M, Hall JC, Rosbash M, 2000. *Drosophila* CRY is a deep brain circadian photoreceptor. *Neuron*, 26 (2) :493—504.
- Froy O, Gotter AL, Casselman AL, Reppert SM, 2003. Illuminating the circadian clock in monarch butterfly migration. *Science*, 300 (5623) :1303—1305.
- Hitomi K, DiTacchio L, Arvai SA, Yamamoto JP, Kim ST, Todo T, Tainer JA, Iwai S, Panda S, Getzoff ED, 2009. Functional motifs in the (6 - 4) photolyase crystal structure make a comparative framework for DNA repair photolyases and clock cryptochromes. *PNAS*, 106 (17) :6962—6967.
- Kanai S, Kikuno R, Toh H, Ryo H, Todo T, 1997. Molecular evolution of the photolyase-blue-light photoreceptor family. *J. Mol. Evol.*, 45 (5) :535—548.
- Krishnan B, Levine JD, Kathlea M, Lynch S, Dowse HB, Funes P, Hall JC, Hardin PE, Dryer SE, 2001. A new role for cryptochrome in a *Drosophila* circadian oscillator. *Nature*, 411 (6835) :313—317.
- Lin C, Shalitin D, 2003. Cryptochrome structure and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 54 (1) :469—496.
- Lin C, Todo T, 2005. The cryptochromes. *Genome Biol.*, 6 (5) :220.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods*, 25 (4) :402—408.
- Matsumoto A, Ohta Y, Itoh TQ, Sanada-Morimura S, Matsuyama T, Fuchikawa T, Tanimura T, Miyatake T, 2008. Period gene of *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae) among strains with different mating times and sterile insect technique. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 101 (6) :1121—1130.
- Merlin C, Francois MC, Queguiner I, Coisne MM, Joly EJ, 2006. Evidence for a putative antennal clock in *Mamestra brassicae*: molecular cloning and characterization of two clock genes—period and cryptochrome—in antennae. *Insect Mol. Biol.*, 15 (2) :137—145.
- Merlin C, Gegear RJ, Reppert SM, 2009. Antennal circadian clocks coordinate sun compass orientation in migratory monarch butterflies. *Science*, 325 (5948) :1700—1704.
- Rubin EB, Shemesh Y, Cohen M, Elgavish S, Robertson HM, Blosh G, 2006. Molecular and phylogenetic analyses reveal mammalian-like clockwork in the honey bee (*Apis mellifera*) and shed new light on the molecular evolution of the circadian clock. *Genome Res.*, 16 (11) :1352—1365.
- Sancar A, 2003. Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chem. Rev.*, 103 (6) :2203—2237.
- Sancar A, 2004. Regulation of the mammalian circadian clock by cryptochrome. *J. Biol. Chem.*, 279 (33) :34079—34082.
- Sauman I, Briscoe AD, Zhu HS, Shi DD, Froy O, Stalleicken J, Yuan Q, Casselman A, Reppert SM, 2005. Connecting the navigational clock to sun compass input in monarch butterfly brain. *Neuron*, 46 (3) :457—467.
- Stanewsky R, 2002. Clock mechanisms in *Drosophila*. *Cell Tissue Res.*, 309 (1) :11—26.
- Stanewsky R, Kaneko M, Emery P, Beretta B, Smith KA, Kay SA, Rasbash M, Hall JC, 1998. *cryb* mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell*, 95 (5) :681—692.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28 (10) :2731—2739.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic. Acids. Res.*, 22 (22) :4673—4680.
- Todo T, 1999. Functional diversity of the DNA photolyase/blue light receptor family. *Mutat. Res.*, 434 (2) :89—97.
- Tomioka K, Matsumoto A, 2010. A comparative view of insect circadian clock systems. *Cell Mol. Life Sci.*, 67 (9) :1397—1406.
- Young MW, 2000. Circadian rhythms. Marking time for a kingdom. *Science*, 288 (5465) :451—453.
- Yuan Q, Metterville D, Briscoe AD, Reppert SM, 2007. Insect cryptochromes: gene duplication and loss define diverse ways to construct insect circadian clocks. *Mol. Biol. Evol.*, 24 (4) :948—955.
- Zhu HS, Sauman I, Yuan Q, Casselman A, Emery-Le M, Emery P, Reppert SM, 2008. Cryptochromes define a novel circadian clock mechanism in monarch butterflies that may underlie sun compass navigation. *PLoS Biol.*, 6 (1) :e4.
- 陆琼, 张永军, 于洪春, 曹广春, 陆宴辉, 郭予元, 2009. Cry2Ab 杀虫蛋白对小地老虎幼虫致死效果及体内酶活

- 性变化. 植物保护学报, 36(1):16—20.
- 倪慧, 闫硕, 刘小侠, 张青文, 2011. 交配和黑光灯处理对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 生物钟基因 *cryptochrome* mRNA 表达的影响. 安徽农业科学, 39(19):11531—11533.
- 王文栋, 梁辉, 朱晓苏, 陶卉, 徐丽, 司马杨虎, 徐世清, 2011. 家蚕生物钟基因 *Bmcry1* 与 *Bmcry2* 的克隆及生物信息学分析. 昆虫学报, 54(1):9—19.
- 韦芳, 王正荣, 2003. 哺乳动物近日节律相关基因的研究进展. 癌症, 22(4):445—448.
- 向玉勇, 杨茂发, 2008. 小地老虎在我国的发生危害及防治技术研究. 安徽农业科学, 36(33):14636—14639.
- 俞波, 吴涛, 倪银华, 周静露, 诸葛芬, 孙璐, 傅正伟, 2011. 生物钟的转录后与翻译后水平调控进展. 生命科学, 23(5):470—476.