应用昆虫学报 *Chinese Journal of Applied Entomology* 2014, 51(3): 689–701. DOI: 10.7679/j.issn.2095–1353.2014.083

研究论文

稻纵卷叶螟氨肽酶 N 基因的克隆及时空表达分析*

杜立啸[1] 周艳聪[1,2] 王兴云[1] 韩兰芝[1**] 侯茂林[1] 彭于发[1]

（1. 中国农业科学院植物保护研究所，植物病虫害生物学国家重点实验室，北京 100193；2. 山西农业大学农学院，太谷 030801）

摘 要 【目的】 昆虫中肠氨肽酶 N（Aminopeptidase N，APN）是 Bt 杀虫蛋白的重要受体之一，与 Bt 蛋白的杀虫机制及昆虫对 Bt 蛋白的抗性密切相关。为阐明稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis*（Guenée）*APN* 基因的功能及明确 Bt 蛋白对稻纵卷叶螟的毒力机制，本研究系统开展了稻纵卷叶螟中肠 APN 基因的克隆及时空表达分析。**【方法】** 通过简并引物 PCR 结合 RACE 技术克隆并获得 4 条稻纵卷叶螟 APN 基因的 cDNA 序列全长，采用实时定量 PCR 技术研究了 *APN* 基因在稻纵卷叶螟不同虫态及幼虫不同组织中的时空表达情况。**【结果】** 经 NCBI 同源比对分析，认为这 4 个基因分属于 *APN* 基因家族的不同类别，分别将其命名为 *CmAPN1*（GenBank 登录号：HQ853294）、*CmAPN2*（GenBank 登录号：HQ853295）、*CmAPN3*（GenBank 登录号：KJ143755）、*CmAPN4*（GenBank 登录号：HQ853296）。序列分析表明，*CmAPN1-4* cDNA 序列全长分别为：3 698、3 478、3 150 和 3 149 bp，开放阅读框分别为：3 045、2 877、3 045 和 2 862 bp，分别编码 965、958、1 014 和 952 个氨基酸。其推导的氨基酸序列具有鳞翅目昆虫氨肽酶 N 的典型结构特征，即含有糖基化位点、N-末端信号肽序列、谷氨酸锌化氨肽酶保守结构 GAMEN、锌结合位点 $HEX_2HX_{18}E$、C-末端糖基磷脂酰肌醇（GPI）锚信号肽。实时定量研究表明，*CmAPNs* 在幼虫中的表达量显著高于卵、蛹和成虫；在幼虫中，*CmAPN1* 的表达水平明显低于 *CmAPN2-4*，且其在不同龄期中的表达差异显著；*CmAPN2-4* 的表达量随幼虫龄期的增加而增加；*CmAPNs* 在幼虫肠道组织中的表达量显著高于其它组织器官，且 *CmAPN1* 和 *CmAPN2* 分别在中肠和后肠中呈现高水平表达，*CmAPN3* 在前、中肠内均高水平表达；但 *CmAPN4* 在各个组织器官中的表达均保持较低水平。**【结论】** *CmAPNs* 基因在稻纵卷叶螟的不同虫态和不同组织中呈现了差异显著的时空表达，采用 RNA 干扰方法进行 *CmAPNs* 基因功能研究时，要选择适宜的虫态和虫龄进行干扰。

关键词 稻纵卷叶螟，Bt 受体蛋白，氨肽酶 N，基因克隆，时空表达

Cloning and spatio-temporal expression of aminopeptidase N encoding genes in *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Pyralidae)

DU Li-Xiao[1] ZHOU Yan-Cong[1,2] WANG Xing-Yun[1] HAN Lan-Zhi[1**]
HOU Mao-Lin[1] Peng Yu-Fa[1]

(1. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, State Key Laboratory of Plant Disease and Insect Pests, Beijing 100193, China; 2. Agronomy College, Shangxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract [Objectives] Aminopeptidase N (APN) is an important receptor of *Bacillus thuringiensis* (Bt) in the midgut of insects that is associated with Bt toxicity and the resistance mechanisms of insect to Bt protein. Cloning and spatio-temporal expression of aminopeptidase N encoding genes in *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) (Lepidoptera: Pyralidae) were

* 资助项目：转基因生物新品种培育科技重大专项（2014ZX08011-001 和 2014ZX08012-004）

**通讯作者，E-mail: lzhan@ippcaas.cn

收稿日期：2014-02-13，接受日期：2014-03-29

conducted to reveal the function of *CsAPNs* and the molecular resistance mechanism of *C. medinalis* to Bt protein. **[Methods]** The full-length cDNA sequence encoding APN was cloned by degenerative primer PCR and RACE techniques. The relative expression levels of *APN* genes in different developmental stages and various larval tissues of *C. medinalis* were determined by Quantitative Real-time PCR method. **[Results]** Comparison of sequence identity in NCBI revealed four *APN* genes belonging to different classes of the APN family were named *CmAPN1* (GenBank Accession No. HQ853294), *CmAPN2* (GenBank Accession No. HQ853295), *CmAPN3* (GenBank Accession No. KJ143755) and *CmAPN4* (GenBank Accession No. HQ853296), respectively. The full-length sequences encoding *CmAPN1-4* were 3 698, 3 478, 3 150 and 3 149 bp, respectively. The open reading frames were 3 045, 2 877, 3 045 and 2 862 bp, which encoded proteins of 965, 958, 1 014 and 952 amino acid residues, respectively. Putative protein sequences included potential glycosylation sites and a zinc metal binding site motif of $HEX_2HX_{18}E$, which is typical of the active sites of the zinc-dependent metalloproteases, and a highly conserved GAMEN motif, which was to form part of the active site. Each sequences had a cleavable N-terminal signal peptide and glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor signal peptide, which is also typical characters of lepidopteran APN proteins. Expression levels of *CmAPNs* in larval stages were significantly higher than these in eggs, pupae or adults. During the larval stage, the expression level of *CmAPN1* was significantly lower than that of *CmAPN2-4*, though it differed significantly among different larval developmental stages. Transcription levels of *CmAPN2-4* increased with larval instars. *CmAPNs* presented significantly different expression levels in different larval tissues, with higher expression in the gut and abdomen and lower expression in the head, thorax, fat body, and entire body minus gut tissues. *CmAPN1* and *CmAPN2* showed higher expression in the midgut and hindgut, respectively. Similarly, *CmAPN3* exhibited significantly high transcription levels in both the foregut and midgut. However, significantly lower expression levels of *CmAPN4* were detected among different tissues compared to those of *CmAPN1-3*. **[Conclusion]** *CmAPNs* have significantly differently spatio-temporal expression patterns in different developmental stages and tissues of *C. medinalis*. Therefore, to determine the function of *CmAPNs* it is very important to choose the appropriate instar for RNA interference.

Key words *Cnaphalocrocis medinalis*, Bt receptor protein, aminopeptidase N, gene cloning, spatio-temporal expression

稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis*（Guenée）是水稻上的一种重要害虫，广泛分布在亚洲的主要水稻产区（张孝羲等，1980，1981；陈永年，1985）。自 20 世纪 90 年代以来，该虫在我国多次暴发成灾，给我国的水稻生产造成严重危害（翟保平和程家安，2006）。目前，稻纵卷叶螟的防治主要依赖化学农药，然而大量、长期使用杀虫剂不但增加了生产成本，而且造成环境污染。Bt 水稻的成功研制为稻纵卷叶螟的防治提供了新策略，但害虫对 Bt 作物的抗性风险成为制约其可持续应用的关键因素(Gould，1998)。因此，明确害虫对 Bt 作物的抗性演化机制，制定适宜的抗性治理策略已成为 Bt 水稻推广应用的当务之急。

前期研究表明，Bt 杀虫蛋白与受体结合能力的改变是昆虫 Bt 抗性产生的主要原因 (Ferré and Van Rie, 2002)。昆虫中肠的刷状缘膜囊泡（Brush border membrane vesicles，BBMV）上存在多种 Bt 受体，其中氨肽酶-N（Aminopeptidase N，APN）是最重要的受体蛋白之一（Pigott and Ellar，2007）。它广泛存在于动植物体内，是一类锌依赖的水解蛋白酶，在鳞翅目昆虫中肠的 BBMV 上分布最为丰富，约占中肠蛋白总量的 55%（Pigott and Ellar，2007）。自烟草天蛾 *Manduca sexta* 的 APN 首次被分离并鉴定为 Bt 毒素受体以来，目前已有棉铃虫 *Helicoverpa armigera*、玉米螟 *Ostrinia nubilalis*、小菜蛾 *Plutella xylostella*、舞毒蛾 *Lymantria dispar*、烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 等 10 余种昆虫的 90 多个 APN 基因被相继克隆并在 GenBank 上登录（马文静等，2011）。进一步通过标记、结合、免疫组化、RNA 干涉等方法对 Bt 蛋白与 APN 的结合能力及 APN 基因的功能进行了大量研究，发现 APN 基因的下调表达（Rajagopal *et al.*，2002；Herrero *et al.*，2005；Sivakumar *et al.*，2007；Yang *et al.*, 2010；Tiewsiri and Wang，2011）、基因突变（Zhu *et al.*，2000）或缺失（Zhang *et al.*，2009）都可引起害虫对 Bt 蛋白产生抗性。

稻纵卷叶螟在 Bt 水稻上的种群动态（李冬虎等，2004；刘雨芳等，2005；Han *et al.*，2007；崔旭红和张国安，2008）、对 Bt 杀虫蛋白的敏感基线及潜在的抗性风险（Han *et al.*，2008）已有报道，但其对 Bt 杀虫蛋白抗性产生的分子机制研究还未见报道，而有效的抗性治理策略是建立在对害虫抗性分子机制明确的基础之上（Ferré and Van Rie，2002）。基于此，本研究系统开展了稻纵卷叶螟 *APN* 基因的克隆、序列分析及该基因的时空表达谱，以期为稻纵卷叶螟 *APN* 基因的功能分析及对 Bt 杀虫蛋白抗性产生的分子机制研究奠定基础。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

稻纵卷叶螟成虫采自江苏省农业科学院实验基地（江苏，南京）的水稻田内，将成虫带回养虫室内饲养，雌、雄配对置于放有分蘖期水稻苗的交配笼中交配并产卵，期间饲喂 10%的蜂蜜水以便为成虫提供营养，每隔 1~2 d 更换一次新的水稻苗，将产有卵粒的水稻苗取出后，放在养虫室内用新鲜的桶栽水稻饲养至供试虫龄。饲养的环境条件为：温度（27±1）℃，相对湿度为 85%±10%，光周期 14L∶10D。

1.2　主要试剂

总 RNA 提取试剂 Trizol、ColdScript cDNA、GeneRacer™ Kit 均购自 Invitrogen 公司。FastQuan RT Kit（with gDNase）、SuperReal PreMix Plus（SYBR Green）、Ampicillin（100 mg/ml）、IPTG（50 mg/mL）、X-gal（20 mg/mL）和 Top10 感受态细胞购自天根生化科技（北京）有限公司。rTaq、Ex Taq、*LA* Taq DNA 聚合酶、dNTPs 和 10×PCR buffer（含 $MgCl_2$）缓冲液均购自 TaKaRa 公司；DNA Marker 购自 GenStar 公司；DNA Gel Extraction Kit 购自 Axygen 公司；pGEM-T Easy Vector System I 购自 Promega 公司。引物合成（PAGE 纯度）由上海生物工程技术服务有限公司完成。常用化学试剂均为市售分析纯。

1.3　稻纵卷叶螟 *APNs* 基因全长 cDNA 克隆

1.3.1　总 RNA 提取和第一链 cDNA 的合成　取单头稻纵卷叶螟 4 龄幼虫中肠放入无 RNase 的匀浆器中，采用 Trizol 法提取总 RNA，获得的 RNA 沉淀用 35 μL DEPC 水溶解，测定其 OD_{260}/OD_{280} 值和浓度，并进行 1%琼脂糖凝胶电泳。取总 RNA 为模板，以随机引物为反转录引物，在反转录酶的作用下催化第一链 cDNA 的合成。

1.3.2　*APNs* 基因片段的克隆　根据 GenBank 中登陆的其他鳞翅目近缘种的 APN 氨基酸序列，采用 Primer 5.0 软件根据保守区域结合密码子偏好性设计了一对简并引物（表 1），以第一链 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，扩增完毕后，用 1%琼脂糖凝胶电泳检测并回收 PCR 产物。利用 Axygen 琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒回收 PCR 产物，经胶回收后克隆于 pGEM-T Easy 载体上，转化 Top10 感受态细胞，挑取单菌落放大培养，进行菌落 PCR 鉴定，再对阳性克隆进行测序。

RACE 扩增：根据简并引物 PCR 扩增产物测序结果，设计了 3′RACE 引物和 5′RACE 引物，用于 RACE-PCR 反应，分别获得稻纵卷叶螟 APNs 基因的 3′末端和 5′末端 cDNA 序列。3′RACE 和 5′RACE 反应按照 Invitrogen 说明书进行。反应参数为：94℃预变性 5 min；80℃ 1 min，加 *LA* Taq 酶 0.5 μL；94℃ 1 min，72℃ 1 min，72℃ 4 min 30 s，5 个循环；94℃ 1 min，70℃ 1 min，72℃ 4 min 30 s，5 个循环；94℃ 1 min，65℃ 1 min，72℃ 4 min 30 s，25 个循环；72℃ 10 min；4℃保存。并以此 PCR 产物为模板，按上述步骤，进行半巢式 PCR 扩增。用 1%琼脂糖凝胶电泳进行检测，分离并纯化 PCR 产物，连接转化后，经菌液 PCR 鉴定，对阳性克隆进行测序。

全长序列验证：根据简并引物 PCR 及 RACE-PCR 扩增结果，将得到的 *APNs* 核苷酸片段用 DNAMAN 软件进行连接。采用 Primer 5.0 设计全长引物用于 PCR 扩增、测序，对 *APNs* 的 cDNA 全长序列进行验证。

1.4 序列分析

所得序列在 NCBI 上进行同源性比较分析（http://www.ncbi.nlm.gov/blast/）。利用 DNAMAN 和 DNASIS 软件找出开放阅读框并将核苷酸序列推导出氨基酸序列；利用 DNAMAN 软件分析基因的保守区域；利用 ExPASy-Compute pI/Mw tool（http://web.expasy.org/compute_pi/）分析氨基酸序列的分子量和等电点；利用 SignalP 4.1 Server（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/）和 Big-PI Predictor（http://mendel.imp.ac.at/gpi/gpi_server.html）分别分析氨基酸序列的 N-末端和 C-末端的信号肽序列；利用 ExPASy NetNGlyc 1.0 Server 分析氨基酸序列的 N-糖基化位点(http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/)；利用 ExPASy NetOGlyc 4.0 Server 分析氨基酸序列的 O-糖基化位点（http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/）；利用 TMHMM Server v.2.0（http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/）分析氨基酸序列的跨膜结构；在 PROSITE 数据库中进行保守区同源分析（http://www.expasy.ch/prosite/）。

1.5 实时定量 PCR 法检测稻纵卷叶螟 *APNs* 基因的表达谱

1.5.1 定量模板的制备 将卵、1~5 龄幼虫、蛹及成虫置于匀浆器中，加入 Trizol 研磨匀浆，分别提取稻纵卷叶螟不同虫态的总 RNA，NanoDrop 2000 检测其纯度并定量，以定量后的总 RNA 为模板，去除基因组 DNA 并进行反转录（反转录试剂盒 FastQuan RT Kit（with gDNase)），获得 cDNA 第一链，作为 *APNs* 基因不同虫态表达谱分析的反应模板。所有不同虫态处理的稻纵卷叶螟样品重量均保持一致，每一处理 3 次重复。

取稻纵卷叶螟 4 龄幼虫的头、胸、腹、前肠、中肠、后肠、脂肪体和去肠道后的整个虫体组织，按上述步骤，分别提取总 RNA，并进行 cDNA 第一链的合成，用于不同组织表达谱分析的反应模板，所有处理样品的重量均保持一致，每一处理 3 次重复。

1.5.2 引物设计与特异性验证 以稻纵卷叶螟的*β-actin* 和 *Elongation Factor*（*EF*）基因作为内参基因，根据获得的 *APNs* 的 cDNA 全长、*β-actin* 及 *EF* 基因片段利用 Primer 5.0 设计引物（表 1），引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。

为了验证引物的特异性，将反转录得到的稻纵卷叶螟 *APNs* 基因的 cDNA 浓度分别以 10 倍系列稀释成 10^0、10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}、10^{-5}、10^{-6}、10^{-7} 的浓度梯度，以这 8 个不同浓度的 cDNA 为模板，分别进行荧光定量 PCR。每个样品 4 次重复，同时设置 4 个空白对照。反应结束后，收集 Ct 值，并计算出各基因的扩增曲线及扩增效率。同时进行琼脂糖凝胶电泳，检测条带的单一性，测序并确定该条带是否为预期的目的条带。

1.5.3 *APNs* 基因的表达谱检测 用于实时定量 PCR 扩增检测的起始模板为上述已合成好的不同虫态、不同组织 cDNA 倍比稀释的溶液。反应体系为 20 μL，包括：2×PuperReal PreMix Plus 10 μL、正反向引物（10 μmol/L）各 0.6 μL、cDNA 模板 1 μL、50×ROX Reference Dye Ⅱ 0.4 μL、RNase-free ddH_2O 7.4 μL。反应程序为：95℃，预变性 15 min，1 个循环；95℃ 10 s，60℃ 20 s，72℃ 30 s，40 个循环。空白对照模板为水，所有样品均重复 4 次，反应均在 ABI Prism7500 Fast Detection System（Applied Biosytems）实时定量 PCR 仪上完成。

1.6 数据处理与分析

以 *APNs* 基因在卵和头部中的表达量为标准参量，利用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 相对定量法计算 *APNs* 在稻纵卷叶螟不同虫态和不同组织中的表达量差异（Livak and Schmittgen, 2001），表达量的差异显著性比较采用 SPSS 软件（SPSS v17.0）进行分析。

2 结果与分析

2.1 稻纵卷叶螟 *APNs* 基因全长 cDNA 的克隆

利用简并引物 PCR 扩增 *APNs* 基因的目的片段，测序结果通过 NCBI-BLAST 比对分析，

表 1　本研究中所用引物
Table 1　Oligonucleotides primers designed in this study

引物名称 Primer name	基因 Gene	引物序列（5' → 3'）Primer sequences	用途 Purpose of use
APN_F		CCNTGYTAYGAYGARCC	简并引物 Degenerate primer for cDNA
APN_R		TCRTTNACNATYTGNGC	
APN1_RACE3'	*APN1*	CTTGGACTGACCAACCAGGACATC	5'RACE 和 3'RACE 5' and 3' RACE PCR amplifications
APN1_RACEN3		CGCAAATCCGTAGTGATGAATGG	
APN1_RACE5'		TCAGACGAGTCCGTGAGCAAGATAGA	
APN1_RACEN5		CTGCTTGGAGTAACCGTTGGTATGGA	
APN2_RACE3	*APN2*	ACCCTGATTGGGAGAATCTGACACC	
APN2_RACEN3'		CAAGAGTAACCACGCAGCCATTCA	
APN2_RACE5'		CTGGTGGAGGCAGAGGAGTCGG	
APN2_RACEN5'		GGCTGTGATGTAGTTCCCGAACCATT	
APN3_RACE3'	*APN3*	TTACCCCGATAATGCCTAC	
APN3_RACEN3'		TGGATAGTTCCCGTCACGTTTGC	
APN3_RACE5'		TGTTGAAACGACGCTGATA	
APN3_RACEN5'		GCGTGCTCCCTTCCGACGACT	
APN4_RACE3'	*APN4*	GACATGGCTACTGGACAAATCACCC	
APN4_RACEN3'		ACCTACGAAACAGCAACACGAGAACC	
APN4_RACE5'		CGAGGGGTTGTTAGCGACAGAGGT	
APN4_RACEN5'		GCAAAGGACTCGTTGAGCCAAAGGTTAC	
APN1_ENDF	*APN1*	TAGGGAAAAGTTGCCTAGAGTC	全长序列扩增 End to end PCR amplifications
APN1_ENDR		CCACAACAGTTATGTTGCTCAG	
APN2_ENDF	*APN2*	ACAGCACAATGTCCTTCCTAA	
APN2_ENDR		CCTTGATTGGAAACCTTATTAC	
APN3_ENDF	*APN3*	TTAGAAGGTCGCCGTCGTGAT	
APN3_ENDR		GGACTGACAAGAAGGCCGTGT	
APN4_ENDF	*APN4*	CTAGTCGGTAGTGCGTGGTCG	
APN4_ENDR		TACCGAGATCCGATTCGCTTTT	
SYAPN1-F	*APN1*	TTGTGGTGGTGGGGAGACG	实时定量 PCR Quantitative Real-time PCR
SYAPN1-R		TGAAGAAAGGATAGAAGGTGGAGC	
SYAPN2-F	*APN2*	CATTACTGTCAATAGACCAGCCAA	
SYAPN2-R		CACCTTCTTCGTAAAGGAGACG	
SYAPN3-F	*APN3*	CGCCAGCGACCCTGACTTTA	
SYAPN3-R		GGTCCTTTCAATGCCTTAG	
SYAPN4-F	*APN4*	GCTCAACGAGTCCTTTGCCAG	
SYAPN4-R		CAAGGTTGTAGGCGTTTTCTCTC	
SYactin-F1	*β-actin*	GTATGGAATCTTGCGGTATC	
SYactin-R1		ATCTTGATCTTGATGGTGGA	
SYEF-F	*Elongation factor*	CAAGGAGGGTAAGGCTGAGG	
SYEF-R		GTTCCGATACCACCGATTTT	

表明目的片段与相应的 *APN* 基因序列具有较高的同源性，进一步通过 RACE-PCR 获得 3′端和 5′端序列，最后通过 DNAMAN 软件将各片段序列进行拼接，获得全长序列。针对全长序列，利用 Primer 5 设计特异性引物进行 PCR 扩增，分别得到了长度为 3 698、3 478、3 150 和 3 149 bp 的 4 段序列（图 1）。

将获得的 4 个 *APN* 基因的氨基酸序列在 NCBI 上进行同源性序列比对，BLAST 结果表明，序列 1 与二化螟 *Chilo suppressalis CsAPN1*（GenBank 登录号：AFU51580）、亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis OfAPN1*（登录号：ABV01346）、舞毒蛾 *LdAPN1*（登录号：AAD31183）和烟草天蛾 *MsAPN1*（登录号：AAM13691）的相似性分别达到了 62%、65%、63%和 61%；序列 2 与家蚕 *Bombyx mori BmAPN2*（登录号：AFK85018）、棉铃虫 *HaAPN2*（登录号：AAP37951）和小菜蛾 *PxAPN2*（登录号：AAS75551）的相似性分别达到了 65%、64%和 59%；序列 3 与欧洲玉米螟 *OnAPN3*（登录号：ACT35083）、家蚕 *BmAPN3*（登录号：NP_001104835）、二化螟 *CsAPN3*（登录号：AEB96253）和甘蔗螟 *Diatraea saccharalis DsAPN3*（登录号：ADL38970）的相似性分别达到了 62%、62%、58%和 58%；序列 4 与亚洲玉米螟 *OfAPN4*（登录号：ACB87202）、欧洲玉米螟 *OnAPN4*（登录号：ACV74256）、二化螟 *CsAPN4*（登录号：ADZ57273）和棉铃虫 *HaAPN4*（登录号：AAP37950）的相似性分别达到了 73%、72%、69%和 63%。因此，分别将其命名为 *CmAPN1*、*CmAPN2*、*CmAPN3* 和 *CmAPN4*。并将得到的 4 条氨基酸序列与已在 GenBank 中登录的其它鳞翅目昆虫 *APN* 基因的氨基酸序列进行系统发育分析，如图 2 所示。

2.2 序列分析

克隆得到的稻纵卷叶螟 *CmAPN1*、*CmAPN2*、*CmAPN3* 和 *CmAPN4* 的 cDNA 全长分别为 3 698、3 478、3 150 和 3 149 bp，分别编码 965、958、1 014 和 952 个氨基酸；预测蛋白质的分子量分别为：110.198、108.889、115.385 和 108.37 ku，等电点分别为：4.97、5.09、4.88 和 5.33。

利用 Signal IP 程序对氨基酸序列分析表明，稻纵卷叶螟 CmAPN1 的氨基酸序列中含有 5 个 O-糖基化位点，1 个 N-糖基化位点，1 个 GPI-锚定位点，前 18 个氨基酸为 N-末端的信号肽序列，C-末端具有 19 个氨基酸的糖基磷脂酰肌醇（GPI）锚信号肽（图 3）；CmAPN2 的氨基酸序列含有 3 个 O-糖基化位点，4 个 N-糖基化位点，2 个 GPI-锚定位点，前 19 个氨基酸为 N-末端的

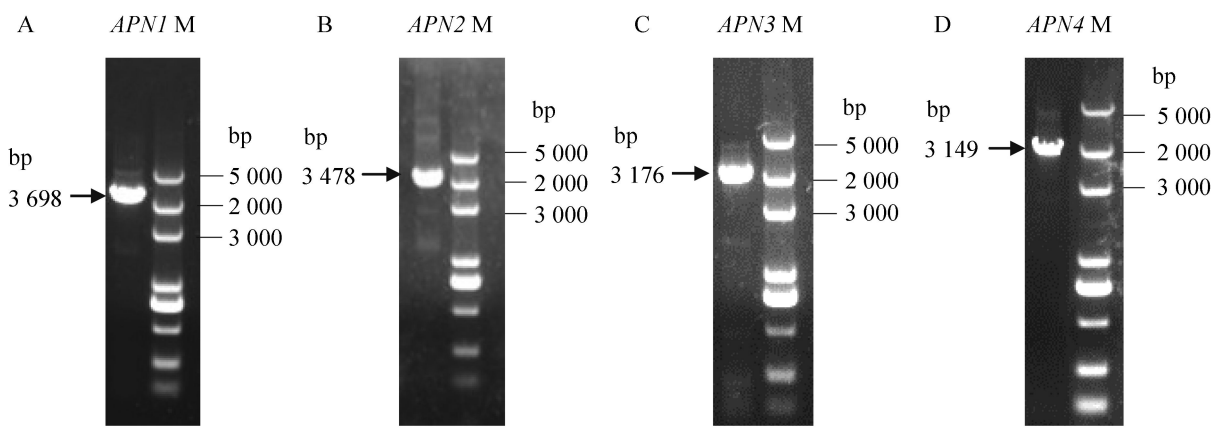

图 1 稻纵卷叶螟 *APNs* 基因的 PCR 扩增产物鉴定

Fig. 1 Identification of PCR amplification products of *Cnaphalocrocis medinalis APNs* gene

A: *APN1*; B: *APN2*; C: *APN3*; D: *APN4* ; M: DNA 分子量标准 DNA marker.

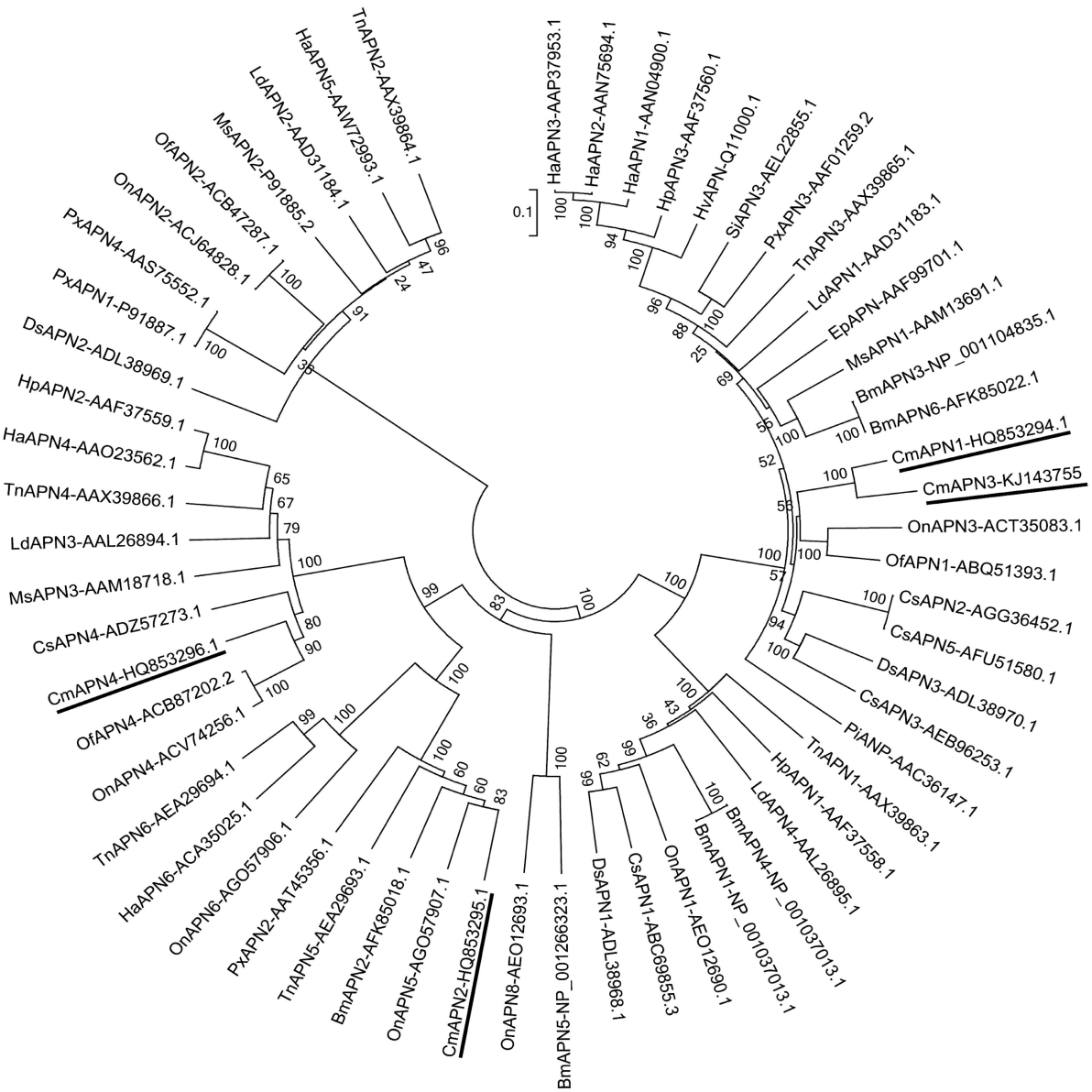

图 2　稻纵卷叶螟与其它鳞翅目昆虫 APN 氨基酸序列的系统发育树分析

Fig. 2　Phylogenetic tree of amino acid sequences of APN in *Cnaphalocrocis medinalis* and other lepidopteran insects

Bm：家蚕 *Bombyx mori*；Cm：稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis*；Cs：二化螟 *Chilo suppressalis*；Ds：甘蔗螟 *Diatraea saccharalis*；Ep：苹果褐卷蛾 *Epipjyas postvittana*；Ha：棉铃虫 *Helicoverpa armigera*；Hp：澳洲棉铃虫 *Helicoverpa punctigera*；Hv：烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*；Ld：舞毒蛾 *Lymantria dispar*；Ms：烟草天蛾 *Manduca sexta*；Of：亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis*；On：欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis*；Pi：度谷螟 *Plodia interpunctella*；Px：小菜蛾 *Plutella xylostella*；Se：甜菜夜蛾 *Spodopter exigua*；Si：大螟 *Sesamia inferens*；Tn：粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni*.

信号肽序列，C-末端具有 20 个氨基酸的糖基磷脂酰肌醇（GPI）锚信号肽（图 3）；CmAPN3 的氨基酸序列含有 12 个 O-糖基化位点，3 个 N-糖基化位点，1 个 GPI-锚定位点，前 18 个氨基酸为 N-末端的信号肽序列，C-末端具有 19 个氨基酸的糖基磷脂酰肌醇（GPI）锚信号肽（图 3）；CmAPN4 的氨基酸序列不含 O-糖基化位点，但有 6 个 N-糖基化位点，2 个 GPI-锚定位点，前

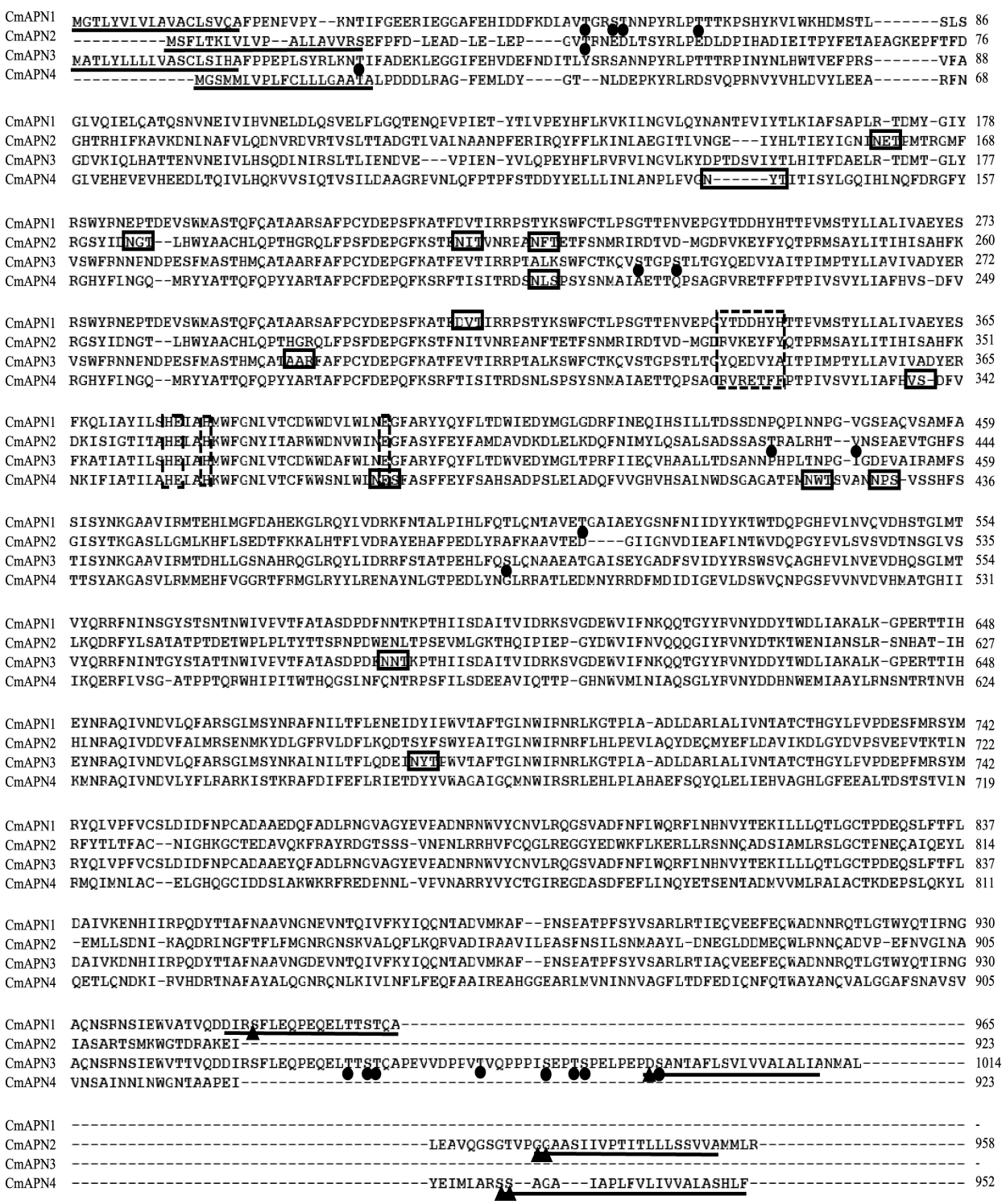

图 3 推导出的稻纵卷叶螟 **CmAPNs** 氨基酸序列

Fig. 3 Deduced amino acid sequences of CmAPNs

潜在的 N-糖基化位点用实线方框标出；O-糖基化位点用实心圆在下方标出；N-端信号肽和 C-端 GPI 添加信号肽序列均用下划线标出；保守结构 GAMEN 和锌结合位点 $HEX_2H_{18}E$ 用虚方框标出；GPI 锚定位点用黑色实心三角在下方标出。

Protential N-linked glycosylation sites are boxed. O-linked glycosylation sites are indicated by black dots. Signal peptides at the N-terminal and C-terminal are underlined. The consensus GAMEN motifs and the zine-blinding motif $HEX_2H_{18}E$ are framed by dotted line. The GPI anchor points are marked by black solid triangle.

19 个氨基酸为 N-末端的信号肽序列，C-末端具有 22 个氨基酸的糖基磷脂酰肌醇（GPI）锚信号肽（图 3）。利用 TMHMM Server 程序对氨基酸序列进行跨膜区预测发现，CmAPN1 和 CmAPN3 不含跨膜结构，而 CmAPN2 和 CmAPN4 为跨膜蛋白，其中 CmAPN2 氨基酸序列第 1-930 个氨基酸序列为膜外区域，第 931-953 个氨基酸序列为跨膜区域，第 954-958 个氨基酸序列为膜内区域；CmAPN4 的氨基酸序列第 1-925 个氨基酸序列为膜外区域，第 926-948 个氨基酸序列为跨膜区域，第 949-952 个氨基酸序列为膜内区域（图 3）。在 PROSITE 数据库中进行保守区同源搜索发现，4 个氨基酸序列中均存在 2 个保守基元，即锌结合位点 $HEX_2HX_{18}E$ 和谷氨酸锌化氨肽酶的保守结构 GAMEN（图 3），这些均为鳞翅目昆虫 APN 的典型结构特征。

2.3　引物特异性验证

以稀释成不同浓度梯度的 cDNA 为模板，进行实时荧光定量 PCR，结果显示浓度每降低 10 倍，C_T 值就会相应增加 3~4 个循环。模板浓度与可检测到的荧光信号循环数呈显著的线性关系（图 4），*β-actin*、*EF*、*APN1*、*APN2*、*APN3* 和 *APN4* 的相关系数 *R* 分别为 0.9992、0.9996、0.9997、0.9996、0.9997 和 0.9984，扩增效率分别为 105%、102%、103%、105%、104%、104%。

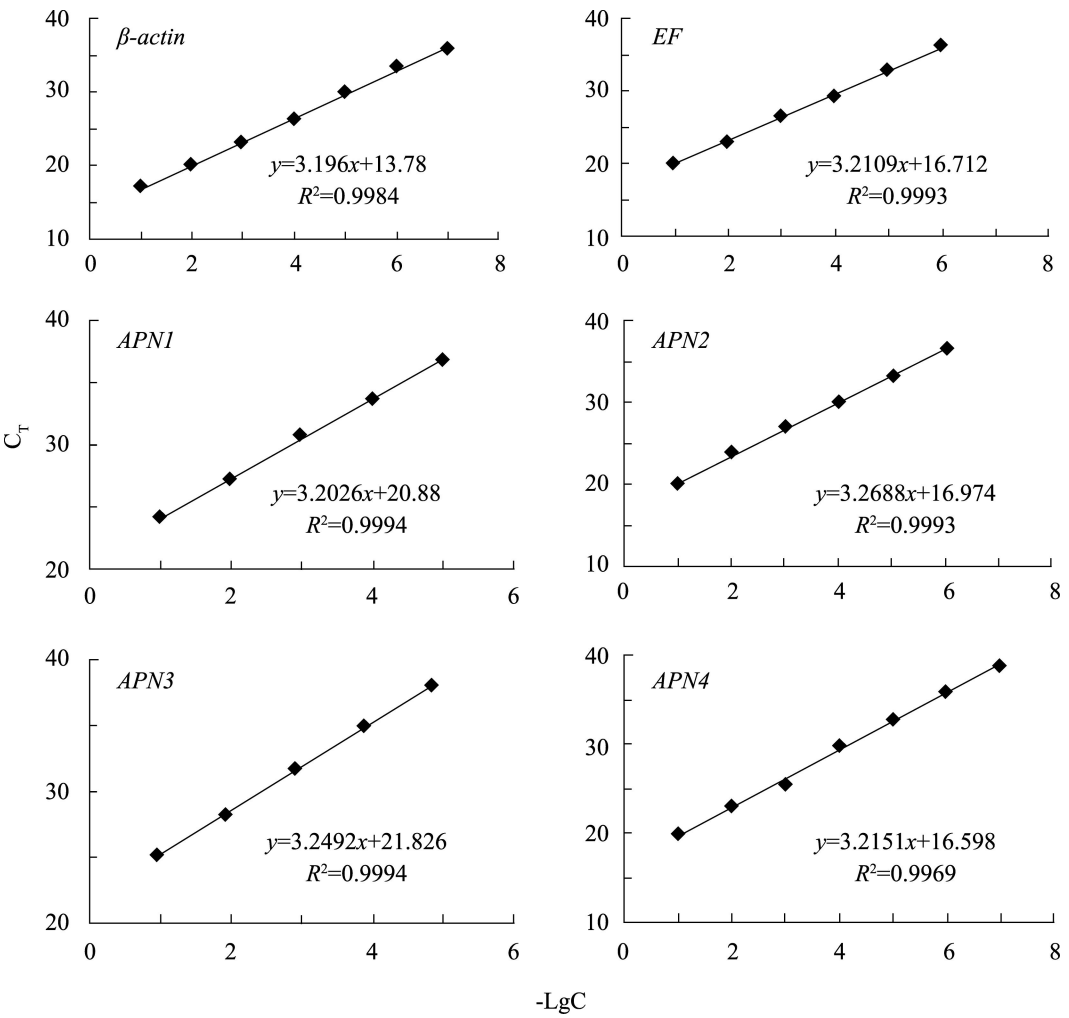

图 4　*CmAPNs*、*β-actin* 和 *EF* 基因的实时定量 PCR 标准曲线

Fig. 4　Standard curve of *CmAPNs*, *β-actin* and *EF* genes for quantitative real-time PCR

溶解曲线分析，2 个内参基因和 4 个目的基因的扩增片段溶解温度均在 85~90℃，且都为单峰；定量 PCR 后，将目的基因与内参基因的定量 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳，可看到目的片段大小与预期结果相一致（图 5），测序结果显示为对应基因的部分片段，据此认为引物特异性较高，反应体系稳定，可以进行基因的定量分析。

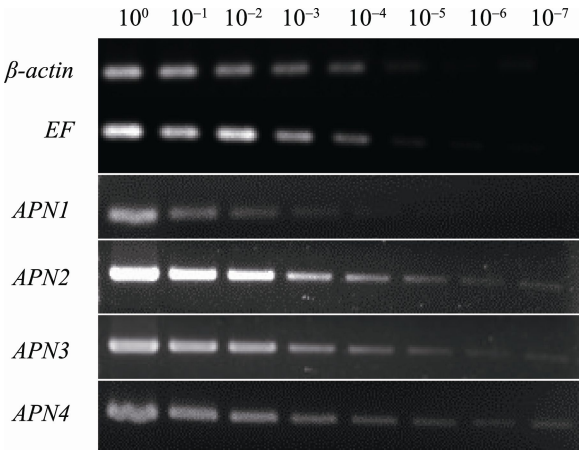

图 5 *CmAPNs* 基因的实时定量 PCR 扩增
Fig. 5 Quantitative real-time PCR analysis of *CmAPNs*

2.4 *CmAPNs* 基因在稻纵卷叶螟不同虫态及幼虫不同组织中的时空表达分析

2.4.1 *CmAPNs* 基因在稻纵卷叶螟不同虫态中的表达谱 *CmAPN1-4* 在幼虫不同龄期中的表达量显著高于卵、蛹和成虫（$P<0.05$），卵、蛹和成虫 3 虫态的表达量最低，但三者之间没有显著差异（$P>0.05$）(图 6：A)。与 *CmAPN1* 和 *CmAPN2* 相比，*CmAPN3* 和 *CmAPN4* 在幼虫不同龄期中的表达量较高，且差异较大，1 龄幼虫表达量最低，随龄期的增加，表达量显著升高，5 龄时两基因的表达量达到最高。*CmAPN1* 在幼虫各龄期中的表达量较稳定，不同龄期之间的表达量差异不明显；与 *CmAPN1* 相比，幼虫生长后期（4~5 龄）*CmAPN2* 的表达量显著升高，到 5 龄时达到最高，但仍显著低于 *CmAPN3* 和 *CmAPN4* 的表达水平（$P<0.05$）(图 6：A)。

2.4.2 *CmAPNs* 基因在稻纵卷叶螟 4 龄幼虫不同组织中的表达谱 *CmAPNs* 在幼虫肠道组织中的表达量显著高于去肠道后的虫体组织、头、胸和脂肪体等组织器官的表达量（$P<0.05$）；对 *CmAPN1* 来说，其在中肠中的表达量显著高于其它组织器官（$P<0.05$）；*CmAPN2* 在后肠中的表达量最高（$P<0.05$）；但 *CmAPN3* 在前肠和中肠中的表达量均显著高于其它组织（$P<0.05$）；*CmAPN4* 在不同组织中的表达量明显低于 *CmAPN1-3*，且非常稳定，相比较而言，其在腹部中的表达量显著高于其它组织器官(图 6：B)。

4 讨论

本研究通过 PCR 结合 RACE 技术扩增共得到 4 条稻纵卷叶螟 *APN* 基因的 cDNA 全长序列，经序列分析发现这 4 条序列均具有鳞翅目昆虫氨肽酶 N 典型的结构特征，即 N-末端信号肽、谷氨酸锌化氨肽酶保守结构 GAMEN、锌结合位点 $HEX_2HX_{18}E$ 及 C-末端糖基磷脂酰肌醇（GPI）锚信号肽。经同源比对分析后，分别将其命名为 *CmAPN1*、*CmAPN2*、*CmAPN3* 和 *CmAPN4*。进一步的实时定量研究表明，*CmAPNs* 在幼虫中的表达量显著高于其它虫态，且 *CmAPN2*、*CmAPN3* 和 *CmAPN4* 的表达随幼虫龄期的增加而升高，但 *CmAPN1* 在不同虫态中的表达量均保持较低水平；*CmAPNs* 在肠道和腹部中的表达量均显著高于其它组织。APN 是昆虫体内一种重要的消化食物的蛋白酶，它的主要功能是在消化中切除多肽的末端中性氨基酸残基（Wang *et al.*，2005）。在稻纵卷叶螟的各个虫态中，幼虫期是取食量最大的时期，且 1 龄幼虫取食量最小，随龄期增加，取食量逐渐增大，而 *CmAPNs* 的时空表达与幼虫的取食量呈现一定的正相关。消化食物的肠道组织（中、后肠）主要位于昆虫的腹部，所以腹部和肠道组织中的 APN 表达量显著高于其它组织。可见，*CmAPNs* 的这种表达模式与昆虫的取食和消化习性是相适应的。

此外，本研究还发现 4 个 *APN* 基因在稻纵卷叶螟不同虫态和不同组织中的表达量呈显著差异，表现出明显的时空表达特性，这种现象在其它昆虫也有大量报道。Wang 等（2005）运用

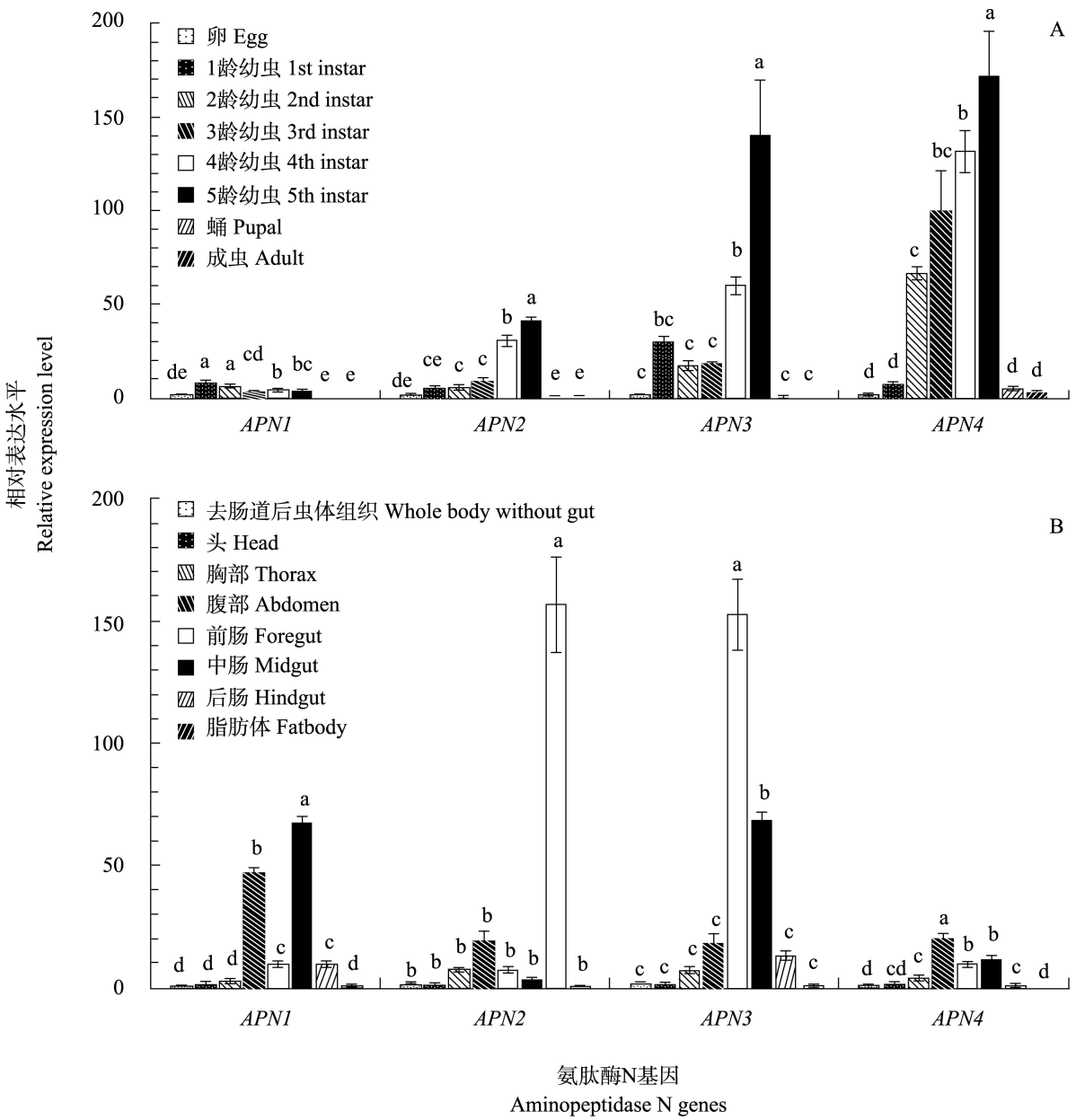

图 6　*CmAPNs* 基因在稻纵卷叶螟不同虫态（A）和 4 龄幼虫不同组织中（B）的表达

Fig. 6　Expression profiles of *CmAPNs* in different developmental stages (A) and different tissues (B) in the 4th instar larvae of *Cnaphalocrocis medinalis*

图中数据为：平均数±标准误，柱上不同字母表示同一基因不同处理间差异显著(P<0.05) (Duncan 氏新复极差法)。不同虫态各处理的样本数分别为：卵：50 粒；1 龄幼虫：20 头；2 龄幼虫：10 头；3 龄幼虫：5 头；4 龄幼虫：3 头；5 龄幼虫：3 头；蛹：3 头；成虫：3 只；4 龄幼虫不同组织各处理的样本数分别为：去肠道后虫体组织：10 头；头：50 头；胸：20 头；腹：5 头；前肠：50 头；中肠：50 头；后肠：50 头；脂肪体：50 头。每个处理的重复数均为 3 次。

Data in the figure are represented as mean±SE. Histograms with different letters indicate significant difference among different treatments in the same aminopeptidase gene (P<0.05) (Duncan's multiple range test). Number of each treatment in different developmental stage and different tissues in the 4th instar larvae is listed as the following. Eggs: 50; 1st instar larvae: 20; 2nd instar larvae: 10; 3rd instar larvae: 5; 4th instar larvae: 3; 5th instar larvae: 3; Pupae: 3; Adult: 3; Whole body without gut: 10; Head: 50; Thorax: 20; Abdomen: 5; Foregut: 50; Midgut: 50; Hindgut: 50; Fatbody: 50. Three times were replicated in each treatment.

RT-PCR 技术发现，*TnAPN1-4* 在粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 中肠组织中的表达量显著高于其它组织。王猛等（2013）对家蚕 *Bombyx mori* 5 龄幼虫 *BmAPNs* 基因在中肠组织中的表达水平研究发现，5 个 *BmAPNs* 基因的表达量在同一品系或不同品系间均呈显著差异，且 *BmAPN1* 和 *BmAPN3* 的表达量均显著低于 *BmAPN2*、*BmAPN4* 和 *BmAPN5*。Angelucci 等（2008）对棉铃虫中肠组织中的 7 个 *HaAPNs* 基因的表达量研究发现，*HaAPN3*、*HaAPN4*、*HaAPN5* 基因的表达量基本相同，而 *HaAPN1* 的表达量只有它们的一半，*HaAPN2* 却不足它们的 1/1000。而且昆虫肠道组织并不是 *APN* 基因高表达的唯一组织器官，欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis* 马氏管中 *OnAPN8* 基因的表达量与中肠组织中的表达量没有显著差异（Crava *et al*.，2010）。这进一步说明了，*APN* 基因在同一种昆虫的不同组织器官、虫态或不同种昆虫间同一组织器官或龄期的表达量均不相同。

昆虫对 Bt 杀虫蛋白抗性的产生与中肠受体基因的表达量密切相关。在已证实中肠 APN 为 Bt 蛋白受体的鳞翅目昆虫中，通过 RNA 干扰技术，明确了该基因的下调表达与昆虫对 Bt 蛋白的敏感性下降或抗性密切相关。Rajagopal 等（2002）研究发现，斜纹夜蛾 *Spodoptera litura SlAPN4* 基因被干扰后其幼虫对 Cry1Ca 的敏感性下降。类似的研究也表明，*APN* 基因的下调表达与棉铃虫对 Cry1Ac 和甘蔗螟 *Diatraea saccharalis* 对 Cry1Ab 抗性增强密切相关（Sivakumar *et al*.，2007；Yang *et al*.，2010）。Tiewsiri 和 Wang （2011）采用蛋白质组学、质谱、结合和体外表达等方法明确了粉纹夜蛾中肠 *TnAPN1* 的下调表达与 Cry1Ac 抗性相关。本研究通过 PCR 结合 RACE 技术获得了 4 条稻纵卷叶螟 *CmAPN* 基因的 cDNA 序列，并从 mRNA 水平检测了 *CmAPNs* 基因在稻纵卷叶螟不同虫态和不同组织中的表达，但 *CmAPNs* 基因的功能研究还尚未涉及。因此，本文的下一步研究计划是采用 RNAi 技术，阐明 *CmAPNs* 基因的功能，明确 *CmAPNs* 与稻纵卷叶螟对 Bt 蛋白敏感性之间的关系。基于本研究中 *CmAPNs* 在稻纵卷叶螟不同虫态和组织中的时空表达谱，为易于获得干扰表型，建议下一步研究最好优先选择在幼虫肠道组织中表达水平较高的 *CmAPN3* 进行干扰。鉴于 *CmAPN3* 基因的表达量随虫龄的增加而升高，建议选择龄期相对较大的幼虫进行干扰，但由于幼虫龄期过大，用 Bt 杀虫蛋白生物测定的方法难以鉴定生物表型。因此，认为选择 3 或 4 龄幼虫采用体外注射的方法进行干扰较合适，进而通过生物测定鉴定干扰表型，阐明 *CmAPNs* 基因的功能，为昆虫对 Bt 蛋白抗性的分子机制和 APN 受体基因功能验证提供理论依据。

参考文献 (References)

Angelucci C, Barrett-Wilt GA, Hunt D, Akhurst RJ, East PD, Gordon KH, Campbell PM, 2008. Diversity of aminopeptidases, derived from four lepidopteran gene duplications, and polycalins expressed in the midgut of *Helicoverpa armigera*: identification of proteins binding the δ-endotoxin, Cry1Ac of *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 38(7): 685–696.

Crava CM, Bel Y, Lee SF, Manachini B, Heckel DG, Escriche B, 2010. Study of the aminopeptidase N gene family in the lepidopterans *Ostrinia nubilalis* (Hübner) and *Bombyx mori* (L.): sequences, mapping and expression. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 40(7): 506–515.

Ferré J, Van Rie J, 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol*., 47(1): 501–533.

Gould F, 1998. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. *Annu. Rev. Entomol.* , 43: 701–726.

Han LZ, Liu PL, Hou ML, Peng YF, 2008. Baseline susceptibility of *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Pyralidae) to *Bacillus thuringiensis* toxins in China. *J. Econ. Entomol*., 101(5): 1691–1696.

Han LZ, Wu KM, Peng YF, Wang F, Guo YY, 2007. Efficacy of transgenic rice expressing Cry1Ac and CpTI against the rice leaffolder, *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée). *J. Invertebr. Pathol*., 96(1): 71–79.

Herrero S, Gechev T, Bakker P, Moar W, Maagd R, 2005. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks

expression of one of four aminopeptidase N genes. *BMC Genomics*, 6(1): 96-105.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitateive PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25: 402–408.

Pigott CR, Ellar DJ, 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Micro. Mol. Biol. Rev.*, 71(2): 255–281.

Rajagopal R, Sivakumar S, Neema A, Pawan M, Raj KB, 2002. Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *J. Biol. Chem.*, 277(49): 46849–46851.

Sivakumar S, Rajagopal R, Venkatesh GR, 2007. Knockdown of aminopeptidase-N from *Helicoverpa armigera* larvae and in transfected *Sf21* cells by RNA interference reveals its functional interaction with *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein Cry1Ac. *J. Biol. Chem.*, 282(10): 7312–7319.

Tiewsiri K, Wang P, 2011. Differential alteration of two aminopeptidases N associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in cabbage looper. *PNAS*, 108(34): 14037–14042.

Wang P, Zhang X, Zhang J, 2005. Molecular characterization of four midgut aminopeptidase N isozymes from the cabbage looper *Trichoplusia ni*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35(6): 611–620.

Yang YL, Zhu YC, Ottea J, Husseneder C, Leonard BR, Abel C, Huang F, 2010. Molecular characterization and RNA interference of three midgut aminopeptidase N isozymes from *Bacillus thuringiensis*-susceptible and -resistant strains of sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 40: 592–603.

Zhang SP, Cheng HM, Gao YL, Wang GR, Liang GM, Wu KM, 2009. Mutation of an aminopeptidase N gene is associated with *Helicoverpa armigera* resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39(7): 421–429.

Zhu YC, Kramer KJ, Oppert B, Dowdy AK, 2000. cDNAs of aminopeptidase-like protein genes from *Plodia interpunctella* strains with different susceptibilities to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30(3): 215–224.

陈永年, 1985. 国外稻纵卷叶螟研究概述. 昆虫知识, 6: 287–289. [CHEN YN, 1985. Research summary of *Cnaphalocrocis medinalis* in foreign countries. *Chinese Bulletin of Entomology*, 6: 287-289.]

崔旭红, 张国安, 2008. 转 Bt 基因水稻对水稻螟虫和稻纵卷叶螟的抗性. 中国农学通报, 24(1): 355–358. [CUI XH, ZHANG GA, 2008. Resistance of transgenic *Bt* rice against *Chilo suppressalis*, *Scirpophaga incertulas* and *Cnaphalocrocis medinalis*. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 24(1): 355-358.]

李冬虎, 傅强, 王锋, 姚青, 赖凤香, 吴进才, 张志涛, 2004. 转 *sck/cry1Ac* 双基因抗虫水稻对二化螟和稻纵卷叶螟的抗虫效果. 中国水稻科学, 18(1): 43–47. [LI DH, FU Q, WANG F, YAO Q, LAI FX, WU JC, ZHANG ZT, 2004. Resistance of transgenic rice containing both *sck* and *cry1Ac* genes against *Chilo suppressalis* and *Cnaphalocrocis medinalis*. *Chinese Journal of Rice Science*, 18(1): 43-47.]

刘雨芳, 王锋, 尤民生, 汪琼, 胡斯琴, 刘文海, 赵士熙, 2005. 转基因水稻及其杂交后代对稻纵卷叶螟的田间抗性检测. 中国农业科学, 38(4): 725–729. [LIU YF, WANG F, YOU MS, WANG Q, HU XQ, LIU WH, ZHAO SX, 2005. Resistance of *cry1Ac + SCK* transgenic rice and its filial generation to the rice leaf roller *Cnaphalocrocis medinalis*. *Scientia Agricultura Sinica*, 38(4): 725-729.]

马文静, 韩兰芝, 尹新明, 曹广春, 苏丽娟, 2011. 鳞翅目昆虫氨肽酶 N 与 Bt 毒素的结合及其与 Bt 抗性的关系. 环境昆虫学报, 33 (3): 378–387. [MA WJ, HAN LZ, YIN XM, CAO GC, SU LJ, 2011. Binding of Bt Cry toxins to lepidopteran midgut aminopeptidase N and the relationship between their interactions with Bt resistance. *Journal of Environmental Entomology*, 33(3): 378-387.]

王猛, 程晨, 郝碧芳, 徐安英, 沈兴家, 黄金山, 2013. 家蚕氨肽酶 N 家族基因在 5 龄幼虫中肠组织的表达分析. 蚕业科学, 39(4): 689–694. [WANG M, CHENG C, HAO BF, XU AY, SHEN XJ, HUANG JS, 2013. Expression analysis of aminopeptidase N family genes in midgut tissue of the fifth instar *Bombyx mori* larvae. *Science of Sericulture*, 39(4): 689-694.]

翟保平, 程家安, 2006. 2006 年水稻两迁害虫研讨会纪要. 昆虫知识, 43(4): 585–588. [ZHAI BP, CHENG JA, 2006. Conference minutes of two rice migrant pests in 2006. *Chinese Bulletin of Entomology*, 43(4): 585-588.]

张孝羲, 耿济国, 周威君, 1981. 我国稻纵卷叶螟迁飞规律的研究. 南京农学院学报, 3(3): 43–54. [ZHANG XX, GENG JG, ZHOU WJ, 1981. Researches on migrant rule of *Cnaphalocrocis medinalis* in China. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 3(3): 43-54.]

张孝羲, 陆自强, 耿济国, 李国柱, 陈学礼, 吴学文, 1980. 稻纵卷叶螟迁飞途径的研究. 昆虫学报, 23(2): 130–139. [ZHANG

XX, LU ZQ, GENG JG, LI GZ, CHEN XL, WU XW, 1980. Researches on migrant route of *Cnaphalocrocis medinalis* in China. *Acta Entomologica Sinica*, 23(2):130-139.]