



苜蓿夜蛾保幼激素酯酶 cDNA 的克隆、 序列分析及表达研究*

张 欢** 郭博智 樊 东***

(东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030)

摘 要 【目的】 研究苜蓿夜蛾 *Heliothis virescens* 保幼激素酯酶 (Juvenile hormone esterase, JHE) 的功能和作用机理。**【方法】** 本试验提取苜蓿夜蛾的总 RNA, 并利用 RT-PCR 和 RACE 技术, 扩增得到苜蓿夜蛾保幼激素酯酶基因的全长 cDNA 序列, 命名为 *Hvjhe* (GenBank 登录号: JQ901384)。

【结果】 该基因含有 3 106 bp, 包括一个 1 746 bp 的开放阅读框, 编码一个含 581 个氨基酸的多肽, 分子量约为 63.9 ku, 多肽的等电点为 5.11, 且氨基酸序列具含有 5 个保幼激素酯酶特有的氨基酸保守模块。推导的氨基酸序列与烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 和棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 中获得的保幼激素酯酶相似性较高, 分别达到 83%和 82%。荧光定量 PCR 结果表明, 该基因在苜蓿夜蛾不同发育时期和不同组织中都有 mRNA 水平的特异性表达, 且在预蛹期表达量相对较高, 取食期、蛹期期和成虫期表达量相对较低; 在中肠和脂肪体内的表达量相对于其它组织较高。该基因在大肠杆菌 *Escherichia coli* 表达系统中进行了诱导表达, 经 SDS-PAGE 和 Western blot 检测结果表明, 表达出与预测的蛋白分子量相符的融合蛋白。**【结论】** 研究结果表明本试验获得了苜蓿夜蛾中一个新的保幼激素酯酶基因的 cDNA 序列。

关键词 苜蓿夜蛾, 保幼激素酯酶, 克隆, 序列分析, 表达

cDNA cloning, sequence analysis and expression of *JHE* gene in *Heliothis virescens*

ZHANG Huan** GUO Bo-Zhi FAN Dong***

(Agronomy College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract [Objectives] To investigate Juvenile hormone esterase (JHE) cDNA sequence and function in *Heliothis virescens*. **[Methods]** Total RNA was isolated from *H. virescens* and the JHE cDNA sequence was cloned by RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends(RACE). A full-length cDNA sequence encoding JHE was obtained and designated as *Hvjhe* (GenBank accession number: JQ901384). **[Results]** The cDNA sequence, 3 106 base pairs in length, contained an open reading frame of 1 746 base pairs coding for a polypeptide of 581 amino acid residues with a predicted molecular weight of 63.9 ku and pI 5.11. The *Hvjhe* sequence contained five specific conserved motifs identified in JHEs of other insect species. The deduced amino acid sequence of *Hvjhe* shared 83% and 82% identity with homologues in *H. virescens* and *Helicoverpa armigera*, respectively. Transcript analysis on the *Hvjhe* sequence during various developmental stages and in different tissues

* 资助项目 Supported projects: 大豆生物学教育部重点实验室开放基金 (SB11B02)

**第一作者 First author, E-mail: zhanghuan7890@sina.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: dnfd@163.com

收稿日期 Received: 2014-01-22, 接受日期 Accepted: 2014-03-29

was determined by qRT-PCR. The results of qRT-PCR revealed that *Hvjhe* mRNA was expressed at a low level in the feeding, pupal and adult stages, but at a high level in the prepupal stage. The *Hvjhe* transcript was more highly expressed in the fat body and midgut than in other tissues. SDS-PAGE and Western-blot results revealed that *Hvjhe* was expressed in *E. coli*. The molecular weight of expressed protein was consistent with the predicted molecular weight of *Hvjhe*. [Conclusion] The results indicate that a novel juvenile hormone esterase cDNA sequence was successfully obtained.

Key words *Heliothis virescens*, Juvenile hormone esterase, cloning, sequence analysis, expression

保幼激素 (Juvenile hormone, JH) 是最重要的一类昆虫激素, 具有调控昆虫生长、发育、变态和生殖的生理功能 (Riddiford, 1994; Wyatt and Davey, 1996)。昆虫血淋巴中保幼激素的滴度是通过保幼激素的合成 (Li *et al.*, 2002a, 2002b, 2003) 和代谢 (Li *et al.*, 2003) 共同维持和平衡的 (Gilbert *et al.*, 2000; 欧阳迎春和李胜, 2003)。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) 等共同催化完成 (Hammock and Sparks, 1977; Share and Roe, 1988; Maxwell *et al.*, 2002a, 2002b)。JHE 存在于昆虫的血淋巴和一些组织 (如脂肪体和中肠) 的细胞质中, 是降解保幼激素的关键酶之一 (Hammock and Sparks, 1977; Jones *et al.*, 1995)。它能够识别血淋巴中保幼激素-保幼激素结合蛋白 (Juvenile hormone-hemolymph juvenile hormone binding protein, JH-hJHBP) 复合体, 将 JH 从复合体中分离出来溶到血淋巴中, 再由 JHE 清除 JH。促进或抑制 JHE 的活性能打乱昆虫体内的 JH 水平, 影响昆虫蜕皮、化蛹和生殖 (吴孔明, 2010; Abdel-Aal and Hammock, 1985), 使昆虫的发育紊乱, 丧失生活能力或降低生殖力, 从而达到间接杀虫的目的。尽管目前已经对多种昆虫的保幼激素酯酶进行了研究, 但对保幼激素酯酶的作用方式及调控机制还知之不多。利用保幼激素酯酶来打破昆虫体内保幼激素代谢的平衡或利用经突变改造的保幼激素酯酶重组杆状病毒来防治害虫, 具有极大的发展潜力 (Bonning and Hammock, 1996; 章东方, 2002; El-Sayed *et al.*, 2011)。

苜蓿夜蛾 *Heliothis virescens* 属鳞翅目, 夜蛾科。主要危害大豆、向日葵、花生、甜菜等, 特别是对豆科植物如大豆、苜蓿危害较重, 是大豆田中的重要食叶性昆虫。目前主要是通过杀虫剂来防治苜蓿夜蛾。本研究对苜蓿夜蛾 JHE 基因 cDNA 进行了克隆, 获取基因 cDNA 全长序列并对其进行初步研究, 为今后从分子角度利用该基因防治苜蓿夜蛾奠定基础。

1 材料与方法

1.1 昆虫材料、试剂、质粒与菌株

东北农业大学试验田采集的苜蓿夜蛾幼虫, 室内用天然饲料大豆喂养; RNA 提取 TRIzol® Reagent 为 Invitrogen 公司产品、反转录酶 M-MLV Reverse Transcriptase、低熔点琼脂糖购自 Promega 公司; DL2000 DNA Marker、DNA 胶回收试剂盒、5' RACE 试剂盒、Taq DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司; pEasy-T1 克隆载体、彩虹蛋白 Marker 和 Transsata (DE3) 采购于全式金公司, 受体菌 DH5α 实验室保留菌种, 其余试剂为进口或国产分析纯。

1.2 虫体总 RNA 的提取与第一链 cDNA 的合成

苜蓿夜蛾幼虫总 RNA 的提取采用传统 Trizol 萃取法, 选取苜蓿夜蛾 5 龄取食期第 2 天幼虫, 3 头为一个生物学重复, 共设 3 次重复, 每 100 mg 虫体加入 TRIzol® Reagent 1 mL。提取的总 RNA 放入 -80℃ 冰箱中备用。用紫外分光光度计和 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的纯度和完整性。以 dt-Ro-Ri 为 cDNA 合成引物 (表 1), 利用反转录酶 M-MLV Reverse Transcriptase 说明书方法, 合成第一链 cDNA 保存于 -20℃。

表 1 本试验所用引物
Table 1 Primers in the experiment

引物用途 Use of primers	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
合成第一链 cDNA Synthesis of first chain cDNA	dt-Ro-Ri	5'- ATC GAT GGT CGA CGC ATG CG G ATC CAA AGC TTG AAT TCG AGC TC(T) ₁₇ -3'
cDNA 的克隆 Cloning of cDNA	Ro	5'-ATC GAT GGT CGA CGC ATG CGG ATC C-3'
	Ri	5'-GGA TCC AAA GCT TGA ATT CGA GC TCT-3'
	JHE	5'- GCG CCG GTACAAGTACA-3'
	antiJHE	5'-GCG ATTCTGATG AGCGG-3'
	JHE3'Ri	5'- CCC GCAGAG AAA CTC AAC GAC-3'
大肠杆菌原核表达 Expression in <i>Escherich coli</i>	JHE3'Ro	5'- GGC CTG ACA ACC TTC GTC CCT ACTG-3'
	JHE5'Ro	5'-TAC TCA TAG AAG CCG TCC GAA CA-3'
	JHE5'Ri	5'- GAA GGT CTC GCA TTC TGA GCT GGT AAA TCC TAT T -3'
	JHE(BD)F	5'-CCGGAATTCCCTGGCGTGGCCGGGTGCA-3'
	JHE(BD)R	5'-ACGCGTCGACAAGCTGGCTTCTACTGGTCAGGCTGTGC-3'
荧光定量 PCR qRT-PCR	JHE(YG)F	5'-CGGACCCCCGATGAAATACA-3'
	JHE(YG)R	5'-CCACAGTAGGGACGAAGGTT-3'
	β-actionF	5'CCAACGGCATCCACGAGACCA-3'
	β-actionR	5'-TCGGCGATACCAGGGTACAT-3'

1.3 利用 RT-PCR 技术克隆基因 cDNA 序列片段

比较烟芽夜蛾 *H. virescens* (AF037197) 与烟草天蛾 *Manduca sexta* (AF327882) 2 种昆虫 JHE 基因的 cDNA 序列,设计 1 对克隆苜蓿夜蛾 JHE 基因的引物 JHE 和 antiJHE (表 1)。并以合成的 cDNA 为模板扩增苜蓿夜蛾 JHE cDNA 序列的特异片段。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 30 s; 52℃ 30 s; 72℃ 40 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物回收, 与 pEasy-T1 连接, 转化 *Escherich coli* DH5α, 菌落在含有氨苄青霉素的固体平板上进行抗性筛选, 对阳性克隆菌株进行酶切和 PCR 鉴定。连接正确的重组子由博士生物公司进行序列测定。

1.4 克隆基因的 3'cDNA 序列

根据得到的 cDNA 序列设计 2 个克隆基因 3' 端的引物 JHE3'Ro 和 JHE3'Ri, 利用这 2 个引物

与以 dt-R0-Ri 设计的引物 3'-Ro 和 3'-Ri 克隆 JHE 序列的 3'端, cDNA 序列的克隆引物见表 1。首轮 PCR 引物为 JHE3'Ro 和 Ro; 次轮 PCR 引物为 JHE3'Ri 和 Ri。PCR、电泳、回收、测序等反应同上。

1.5 利用 5'RACE 克隆基因的 5'cDNA 序列

利用 TaKaRa 5'-Full RACE Kit, 在已得到的苜蓿夜蛾 JHE cDNA 基因片段中根据试剂盒中的 5'-RACE Outer Primer 和 5'-RACE Inner Primer 分别设计引物 JHE5'Ro 和 JHE5'Ri。以引物 5'-RACE Outer Primer 和 JHE5'Ro 进行第 1 轮 PCR。取首次扩增产物 1 μL, 用 5'-ACE Inner Primer 和 JHE5'Ri 引物进行第 2 次 PCR 扩增, 引物序列见表 1。严格按照试剂盒说明书进行操作, 扩增得到的 PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析、回收、与 pEasy-T₁ 载体连接、转化并测序。根据拼接得到的全长序列, 设计克隆基因 cDNA 全长序列的引物, 一次性克隆全长序列。

1.6 序列分析

用 Clone 软件对获得的 cDNA 序列进行翻译; ExPASy 网站 (<http://ca.expasy.org/tools/>) 的 Compute pI/Mw 蛋白分析软件推导氨基酸序列的分子量和等电点; SignalP 4.1 Server 进行信号肽的预测; clustalx、MEG、Bioxm、boxshade 软件进行同源比较和系统进化分析。*Hvjhe* 特异保守模块分析根据 Ward 等 (1992) 推导获得。

1.7 *Hvjhe* 基因在苜蓿夜蛾不同发育阶段和组织中的特异性表达

1.7.1 不同组织和不同龄期 cDNA 模板的制备
选取苜蓿夜蛾 5 龄幼虫取食期的第 2 天、预蛹期、蛹期的第 2 天和成虫期的第 2 天, 1 头为一个生物学重复, 共设 3 次重复。提取 RNA, DNA 酶处理, 按照试剂盒说明说进行, 反转录成 cDNA, -20 °C 保存备用。

分别解剖苜蓿夜蛾 5 龄第 2 天的 6 个组织, 前肠、中肠、后肠、脂肪体、马氏管、唾腺, 按上述方法制备 cDNA, -20 °C 保存备用。

1.7.2 qPCR 分析 *Hvjhe* 基因 mRNA 水平的表达
qPCR 分析: 采用特异性的引物 JHE (YG) F 和 JHE (YG) R 进行荧光定量反应, 同时用 β -actin 作为内参基因, 引物见表 1。

荧光定量的仪器为 Bio-Rad 公司的 iO5。反应体系 20 μ L 如下: 1 μ L cDNA, 上下游引物各 1 μ L, 10 μ L THUNDERBIRD SYBR[®] qPCR Mix 和 7 μ L dd H₂O。采用 3 步法 PCR 反应程序: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40 个循环。反应在 Bio-Rad 上进行, 每个样品重复 3 次, 反应结束后得到 CT 值, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行数据分析 (Livak and Schmittgen, 2001)。JHE 相对表达量数据用 DPS v6.5 处理分析, 采用 Duncan's 新复极差法 (DMRT) 比较 *Hvjhe* 在不同发育时期和组织的表达差异, 柱形图由 Excel 生成。

1.8 *Hvjhe* 基因的原核表达、纯化及 Western 验证

以含有 *Eco*RI 和 *Sa*II 为酶切位点的引物 JHE (BD) F 和 JHE (BD) R (表 1), 以 cDNA 为

模板进行 PCR 反应, 产物电泳检测纯化后, 与 pEasy-T₁ 连接并转至 DH5 α 感受态细胞中, 通过蓝白斑筛选, 挑取阳性克隆双酶切及测序鉴定。将克隆正确的含有目的片段的重组质粒进行双酶切, 同时对 pET21b 进行双酶切, 所用酶为 *Eco*RI 和 *Sa*II, *T*₄ 连接酶将目的片段与 pET21b 连接, 构建融合表达载体 pET21b-*Hvjhe*, 转至 DH5 α 感受态中, 蓝白斑筛选出阳性克隆, 摇菌、测序、提取质粒, 用 *Eco*RI 和 *Sa*II 双酶切鉴定并测序验证, 鉴定正确的 pET21b-*Hvjhe* 质粒转至 Transetta 菌株。将含融合表达载体的工程菌于摇床上培养, 分光光度计检测 OD₆₀₀ 达到 0.4 ~ 0.6 后, 加 IPTG 至终浓度 0.1 mmol/L, 20 °C 低温诱导 12 h。取 1.5 mL 菌液, 12 000 r/min 离心收集菌体, 加 1 $\times$ SDS 上样缓冲液, 煮沸 8 min, 进行 SDS-PAGE 检测。

取 100 mL 经诱导表达后的菌液离心, 收集菌体经超声破碎后, 收集包涵体, 参照北京全式金公司的 ProteinIso[™] Ni-NTA Resin 蛋白纯化产品说明书进行纯化。

将融合蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜, 用杂交膜清洗液 TBS 洗涤, 以配制好的封闭液孵育。将一抗 (His-tag 抗体)、抗体反应液 HRP (鼠) 及抗体稀释液混合而成的抗体孵育液加至膜上, 于摇床上以适当速度孵育 40 min, 经洗涤后, 加底物 DAB 显色, 拍照。

2 结果与分析

2.1 *Hvjhe* 基因 cDNA 序列的获得

利用 RT-PCR 技术扩增出苜蓿夜蛾 JHE 基因部分 cDNA 序列, 用 Blast 软件搜索, 找到同源性较高的序列均为昆虫 JHEcDNA 序列, 初步断定这段 cDNA 序列属于昆虫 JHE 全长 cDNA 序列的一部分。利用获得的序列设计克隆基因 5' 和 3' 的引物, 克隆得到基因的 5' 和 3' 端序列, 经过序列拼接和全长基因测序得到基因包括完整开放读码框在内的 cDNA 序列。克隆得到的苜蓿夜蛾 JHE cDNA 序列已经登录并获得登录号 JQ901384。该基因的 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列见图 1。

1 GAAAAGTGAGGTGACCGACACCGACCGACGACATGACGACATACGTATTTCGCGCTCGCCTTCTCTGCACGCGTGACAGCGCTGGCGTGG
 91 CCGGGTGCAGCATCGTGCAGCGTGCAGCGCGGACCTGGACTCCGGCACTGTCTGCGGCGTGACAGCGTGGTGGAGGGCTCCAAGTACGCC
 181 AGCTTCCCAGGAGTGCCCTACGCTAAGCAGCCCCCTGGAGACCTAAGATTAAAGGAGCTCGAGCCTCCAGAACATTGGGATGTCCTTCAA
 271 S F P G V P Y A K Q P L G D L R F K E L E P P E H W D V L Q
 GCAACAAATGAAGGACCCATCTGCTTCCAAGCAGAGCTATTATACGGGAGGCTCATGCAGAAGAGCAAGATGAGCGAGGCTTGCATACAC
 361 A T N E G P I C F Q A D V L Y G R L M Q K S K M S E A C I H
 GCCAACATTACGTGCCATGCGCGCCCTCCCCCTGGGAGTACACAGGCCGACGAGCAACTGGAACCTATTTCGGTTCCAGTAATTCGG
 451 A N I H V S R N I I V L G V H R P T R Q L E T I S V P V I P
 GAGGAACACACCACCTGGACTGCCAATCCTGGTGTTCATACATGGTGGAGGATTTCCTTCGGCTCCGGCCACGAGGATTACACGGA
 541 E E L T P P G L P I L V F I H G G G F A F G S G H E D L H G
 CCAGAATATTGGTGCAGCAGGAATATCATCGTATTACGTTTAATTACAGATTGAACGCTCTTCGGTTTCCTGTCCATGAACACGACAAAA
 631 P E Y L V S R N I I V L G V H R P T R Q L E T I S V P V I P
 ATCCCCGGAACGCTGGTCTCCGGGACGAGGTGACCTGTTCGCTGGGTGCAAGAAACGCCAAGAATTTCGGAGGAGACCCCAACGAT
 721 I P G N A G L R D Q V T L L R W V Q R N A K N F G G D P N D
 GTCACCATAGCGGGGACAGCGCGCGGCGAGCTGCCGCGCATCTACTGACTCTGTCTAAAGCTACTGAAGGCTTTTCCAAAGAGCGATT
 811 V T I A H G Q S A G A A A A H L T L S K A T E G Q R A I
 TTGATGAGCGGAACAGGAATAAGCTCTTTCTATAGCAGCTCTCCAGCTTTTCGCGGCTTATATGTGAAACAGTTGCTGCTGTCTGGGC
 901 L M S G T G I S S F Y S S S P A F A A Y M S K Q L L L V L G
 ATCACTGCCACGACCCCGATGAAATACATCAGCAGCTCATCGACCTACCCGACAGAGAACTCAACGACACTAACGCCCTTCTACTCGAA
 991 I T H P D E I T Q Q L I D N F L P A E K L N D I L E
 CAGATTGGCCTGACAACCTTCGTCCCTACTGTGGAATCCCCACTACCTGGAGTCACAACTATTATTGATGATGATCCAGAAAGCTTAATA
 1081 Q I G L T T F V P T V E S P L P G V T T I I D D D P E S L I
 GCCAAGGACGCGGCAAGAATCCACTCTTAATAGGATTACAGCTCAGAAATGCGAGACCTTCCGCAATCGACTAACAACTTTGAC
 A K G R K N I P I I G F T S S E C E T F R N R L T N F D
 1171 CTCGTCAAAAAGATTCAAGACAATCCTACGATCATATAACCGCTAAAGTTTATTATGACACCACAGAGCTGCTGATGGACTTATCA
 L V K K I Q D N P T I I I P P K V L F M T P P E L L M D L S
 1261 AAGACTATCGATAGAAAGTACTACAACGGTACAATAAGTATCGATAAATTTTGAATCATGTTCCGACGGCTTCTATGAGTACCCGTGCA
 K T I D R K Y Y N G T I S I D N F L K S C S D G F Y E Y P A
 1351 TTGAACTAGCACAAAAGCGAGCTGAAACTGGCGGAGCTCCACTGTACTTGTACCGGTTTGGCTACGAGGGTCAGAACAGCGTCATCAAG
 L K L A Q K R A E T G G A P L Y L Y R F A Y E G Q N S V I K
 1441 GCGGTGACGGGGTGAATACGAGGGCGTCCGCCACATTGAGGACCTAACCTACGTGTTTAGGGGCAACTCTGTGGTCGAAGCCCCGGAC
 A V T G L N Y E G V G H I E D L T Y V F R A N S V F E A P D
 1531 GCAGTCGCGCCTTCTGACGATGATGTATGCATGAAGAATCTAATGACGGCATTTCTTCGTCAACTTTATGACATGCAGTAAACCCGATCTGC
 A V A P S D D D V C M K N L M T D F F V N F M T C S K P I C
 1621 GAAGACAATAACTCATTGGAGCTGTGGCGGCGAAGACGGCATGCAATATGAGGACATTGTGTCCCCACCATGGTCAGATCCATGGAG
 E D N N S L E W P A N D G M Q Y E D I V S P T M V R S M E
 1711 TTCTCCTCAGACAACAAGACATTATTGAGTTCTTCGACAGCCTGACAGTAGAAGCCAGCTTTAAATTATAAGACTGAAGTTTGTGCTC
 F S S R Q Q D I I E F F D S L T S R S Q L *
 1801 GATGTAAATATGTGTTAAACTTAAGAGTTATCATAGTGCAGTGTGTTGGACTAAGCCACTAGGTCTTAGACGATCTTAGTTTGAT
 1891 CCTAAGACATGAGAGTGAACAATGTTCTGAGTTAATGTGTGCTGTTGATACTTTAACTTGCAATTAATTTATTTAGATTAAGGTTGATGT
 1981 CACAAGTCTAGTCGGTTACTAAGTAATTCATGTCAACATTGGTCTAATTTAGTTTATAGAGCTTCAAAAAATGTAATTTTCATCATAGT
 2071 AAGTAATAACATAATTAGCAATTGCTACTCTGTATGTGAGGAGACCAATGCTCAGCAATAGGAAAGTACAAAGGCCGATGATGATGAATA
 2161 AGCATTGCAATAGTTACTGTACAACCTTACTACACTCATGACAACTCACTCAAGTGTGGCGATCTTTGTAAAGCCATTTGATTTCTAGAG
 2251 AACAAACGGAACCTTTGCTTTTACGATACGATTAAACATTAGGAACAGCTAGACCTTCTTTAGACCTAGTATTGTTTACGAAGCAATTGT
 2341 AACAAAACCTTTGGGGCCCAACAAGGGTTACTCGTAGATCCAGCATTACGACTAAGCTTTGTTAGAAATGCCCGGATTGATTGATCTCATA
 2431 AAATACTACTAGGCTATAGATAACAATCCGCCCGCAATTTACTTTTAAAGTTAATATAAGTTATTTTGAAGATGATAAGTTTGTACAAATT
 2521 GCTGCAGATCACGAGACAGACACTCAAGTAATTTTCTATTTTCGATTCAATATTTGAAACGGAATCTTACTATTTTGAATTTTCGTGAGTC
 2611 ATGTATGTTATTTTCGCGAATCCATAAATGATTACGCAATTTGTGTAAGTTGGGAATTATGTTCTAATTTAGGCTCGTAAGATGATGATGAT
 2701 GCTACTGTACTAAGATTAGCAGTACAAATGAACCTCGTATTTTAAACCATCAATATCCCTGACTACGAAGGGCAATGTGTAACGTTGCA
 2791 AAAGATGTGACTGTTTAGAATGATTGTCTCGGTGATTCAAGCACTCAAGATGCGTAATGAAGTACTGATGTAACGTATTATAATTTAA
 2881 GTCATTTTACTATTAGTTTTCACGCGCTTGTAAATATTTCACTTTTAAATGTAATTTTAGCATCCCCGACAATGAAGCCAGAGTACAA
 2971 TGATCGGACGCGATCGCGGGCGTTACATTCAATGATTCAATAATAATTGCGACGACGACGAGTGGAAAAA
 3061 AAAAAAAAAAAAAA

图 1 苜蓿夜蛾 *Hvjhe* 基因核苷酸序列及推导的氨基酸序列Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequence of *Heliothis virescens* *Hvjhe* cDNA

起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA 加边框表示, 信号肽用下划线标出, 多聚腺苷酸信号 AATAAA 用双下划线标出, 5 个保幼激素酯酶特有的氨基酸保守模块用黑色阴影表示。

The initial codon ATG and termination codon TAA are boxed, the putative signal peptide of the deduced amino acid sequence is underlined, a putative polyadenylation site(AATAAA)is double-underlined, putative five conserved motifs sites are shaded black.

2.2 *Hvjhe* 基因 cDNA 序列和氨基酸序列分析

苜蓿夜蛾 JHE cDNA 序列 3 106 bp, 含有 70

bp 和 1 287 bp 的 5'和 3'非编码区, 包括一个 1 746 bp 的开放读码框, 编码 581 个氨基酸组成的多

肽, 分子量 63.9 ku, 多肽的等电点为 5.11。ExPASy Proteomics tools SignalP4.1 Server 进行信号肽预测在 17~18 位为信号肽切割位点。本试验克隆的 *Hvjhe* 基因的氨基酸序列与其他昆虫 JHE 的氨基酸序列的同源性进行多重比对, 发现 *Hvjhe* 包含 5 个高度保守的特征性结构域, 包括一个长疏水结合域 GxSxG, 其他 4 个特殊结构功能域 RF、DQ、E 和 GxxHxxD/E。

2.3 昆虫 JHE 氨基酸序列比对及进化树分析

Hvjhe 氨基酸序列与通过 NCBI 的 Blast 软件搜索得到的与其同源性较高的 5 种昆虫进行了相似性比对 (图 2)。结果表明, *Hvjhe* 与棉铃虫 *Helicoverpa armigera* AEB77712 相似性为 82%, 烟芽夜蛾 *H. virescens* AAB88629 相似性为 83%, 家蚕 *Bomby x mori* NP_001037027 相似性为 66%, 烟草天蛾 *M. sexta* AAG42021 相似性为 70%, 云杉卷叶蛾 *Choristoneura fumiferana* AAD3417 相似性为 65%。

对烟芽夜蛾 *H. virescens*、苜蓿夜蛾 *H. virescens*、烟草天蛾 *M. sexta* 等 13 种目前克隆获得的昆虫 JHE 利用邻接法构建了系统进化树 (图 3)。结果表明 *Hvjhe* 氨基酸首先与鳞翅目夜蛾科的烟芽夜蛾 *H. virescens*、棉铃虫 *H. armigera* 和粘虫 *Mythimna separata* 关系密切, 其次再与鳞翅目非夜蛾科的 *Omphisa fuscidentalis*、家蚕 *B. x mori*、烟草天蛾 *M. sexta* 聚类, 然后与膜翅目的意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 和鞘翅目的黄兴天牛 *Psacothoea hilaris*、黄粉虫 *Tenebrio molitor* 和褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 聚类。

2.4 *Hvjhe* 基因 mRNA 在不同发育时期和不同组织的表达分析

Real-time PCR 结果表明, *Hvjhe* 在苜蓿夜蛾的不同发育时期和不同组织均有表达。由图 4(A) 可知, *Hvjhe* 的 mRNA 在预蛹期含量最高, 与取食期、蛹期和成虫期差异显著, 分别是它们的 6.01 倍、6.42 倍和 5.92 倍, 取食期、蛹期和成虫期 mRNA 差异不显著; 由图 4(B) 可知 *Hvjhe* 的 mRNA 在脂肪体内的含量最高, 与前肠、中肠、后肠、唾腺和马氏管差异显著, 分别是它们

的 8.47 倍、2.77 倍、8.66 倍、7.93 和 8.3 倍。中肠与前肠、后肠、马氏管和唾腺差异显著, 分别是它们的 3.05 倍、3.12 倍、2.89 倍和 3.02 倍, 前肠、后肠、马氏管和唾腺间差异不显著。

2.5 *Hvjhe* 的原核表达、纯化与 Western blot 鉴定

异源表达 SDS-PAGE 检测结果显示, 在转化 pET21b-*Hvjhe* 的 Transetta 菌株中有一条约 63.9 ku 的条带产生, 而未插入目的基因的空质粒在相应的位置未出现特异性片段的高效表达, 纯化结果表明, 在相同的位置得到相同的条带。采用 Western blot 方法进行验证表达产物是否为 *Hvjhe* 的融合蛋白, 结果表明融合蛋白与抗体特异性的发生反应, 证明该基因已经在该大肠杆菌表达系统中正确表达 (图 5)。

3 讨论

保幼激素含量可调控昆虫胚胎形成、生长发育、形态变化、繁殖。保幼激素酯酶是降解保幼激素的关键酶之一 (Gilbert *et al.*, 2000)。本研究应用 RT-PCR 和 RACE 技术首次克隆了苜蓿夜蛾保幼激素酯酶基因的全长 cDNA 序列, 该 cDNA 含 3 106 个碱基, 5'和 3'非编码区分别含有 70 个碱基和 1 287 个碱基, 包括一个 1 746 个碱基的开放读码框, 编码 581 个氨基酸组成的多肽, 该序列含有 5 个保幼激素酯酶特有的氨基酸保守模块 (RF、DQ、GQSAG、E 和 GxxHXXD/E) (Ward *et al.*, 1992)。邻接法构建的进化树表明苜蓿夜蛾保幼激素酯酶与同一个属的烟芽夜蛾保幼激素酯酶亲缘关系最近, 其次与棉铃虫和粘虫的保幼激素酯酶亲缘关系较近, 与鳞翅目非夜蛾科的家蚕和烟草天蛾关系较远, 与膜翅目、鞘翅目和半翅目的其他昆虫关系则更远。以上分析表明, 由保幼激素酯酶获得的不同昆虫的进化关系与形态分类上的进化关系相一致。

本试验表明 *Hvjhe* mRNA 在苜蓿夜蛾不同发育阶段和组织中均有特异性表达。不同发育阶段表达研究中 5 龄的第 2 天 *Hvjhe* 的含量低, 其原因可能是昆虫处于取食和生长期, 需要大量的

家蚕 <i>Bombyx mori</i>	NP_001037027	1	MCTFAVLLVYVIVGVRVSSPAASPPSSCNVVAQTESCWVCRTERAEASTLYASFRG
烟草天蛾 <i>Manduca sexta</i>	AAG42021	1	MDARQVCYVYVALLCVSELS---ARIPSEEVVVRTESCWVRGKRAEAGNKSYSASFRG
棉铃虫 <i>Helicoverpa armigera</i>	AEB77712	1	MTSLVLAFLAFLHACTALAWPG-----AASRSVVDAYLDCERVGVGVSARHGFH-FASFLG
苜蓿夜蛾 <i>Heliothis virescens</i>	AGB93712	1	MTSLVLAFLAFLHACTALAWPG-----AASCSVRADLDSCTVCCVCRVSEGSK-YASFFG
烟草夜蛾 <i>Heliothis virescens</i>	AAB88629	1	MTSLVLAFLAFLHACTALAWQE-----TNSRSVVAHLDSCTIRGVFPRSAAGIKH-FASFLG
云杉卷叶蛾 <i>Choristoneura fumiferana</i>	AAD3417	1	MVSSVKSVAVALVAVCGAAS-----ERLRRCARCARRRA-CAARARGGDYASFLA
Consensus		1	*****
家蚕 <i>Bombyx mori</i>	NP_001037027	61	VPIYAKQPVGELRFKELCFEFPWTDYLDATBEGPVCCQTDVLYGRMLHFMHDEACTYANI
烟草天蛾 <i>Manduca sexta</i>	AAG42021	58	VPIYAKQPVGELRFKELCFEFPWQDELDADEGPPCCQTDVLYGRMLHFMHDEACTYANI
棉铃虫 <i>Helicoverpa armigera</i>	AEB77712	55	VPIYAKQPVGDLRFKELCFLEHWDVFNATSEGPICFQTDLYGRIMAFSEMSEACTYANV
苜蓿夜蛾 <i>Heliothis virescens</i>	AGB93712	55	VPIYAKQPVGDLRFKELCFEHWDDVLCATNEGPICFQADVLYGRIMAFSEMSEACTYANI
烟草夜蛾 <i>Heliothis virescens</i>	AAB88629	55	VPIYAKQPVGELRFKELCFLEFPWNTLNATNEGPICFQTDVLYGRIMAFSEMSEACTYANI
云杉卷叶蛾 <i>Choristoneura fumiferana</i>	AAD3417	52	VPIYAKQPVLAALRFKELCFEFPWKGRDATKEGPICFQTDLYGPTMASEMSEACTYANV
Consensus		61	*****
家蚕 <i>Bombyx mori</i>	NP_001037027	121	HVPFLNALLH-----AASETFHKPLPLVFIHGGGFAGSGDADLYGPEY
烟草天蛾 <i>Manduca sexta</i>	AAG42021	118	MVFYVALER-----DAADKNRFAGLEPLVFIHGGGFAGSGDADLYGPEY
棉铃虫 <i>Helicoverpa armigera</i>	AEB77712	115	HVPFLNALLHETDR-----QRDWTFGLPLVFIHGGGFAGSGDADLYGPEY
苜蓿夜蛾 <i>Heliothis virescens</i>	AGB93712	114	HVPFLNALLHGVHRRTRQLETISVVPVPELTFGLPLVFIHGGGFAGSGDADLYGPEY
烟草夜蛾 <i>Heliothis virescens</i>	AAB88629	115	HVPFLNALLH-----VRGTTF-LRPLVFIHGGGFAGSGDADLYGPEY
云杉卷叶蛾 <i>Choristoneura fumiferana</i>	AAD3417	112	YPLCYLEAASEG-----APNRNRTLLPLVFIHGGGFAGSGDADLYGPEY
Consensus		121	*****
家蚕 <i>Bombyx mori</i>	NP_001037027	165	LVTNINVVITFNRYRLNFGFELSITDTPKVPNGNGLRDMVTLLRWVKRNAAFGCDNDVTE
烟草天蛾 <i>Manduca sexta</i>	AAG42021	163	LVSNDVIVITFNRYRLNFGFELSINSTVPGNAGLRDMVTLLRWVQRNAHFGGREDVTE
棉铃虫 <i>Helicoverpa armigera</i>	AEB77712	161	LVSKNIVITFNRYRLNFGFELSMTTKPGNAGLRDMVTLLRWVQRNAHFGGDFNNVTE
苜蓿夜蛾 <i>Heliothis virescens</i>	AGB93712	174	LVSNDVIVITFNRYRLNFGFELSMTTKPGNAGLRDMVTLLRWVQRNAHFGGDFNNVTE
烟草夜蛾 <i>Heliothis virescens</i>	AAB88629	157	LVTNKNIVITFNRYRLNFGFELSMTTKPGNAGLRDMVTLLRWVQRNAHFGGDFNNVTE
云杉卷叶蛾 <i>Choristoneura fumiferana</i>	AAD3417	159	LMGDNVIVITFNRYRLNFGFELSINSSVPGNAGLRDMVTLLRWVKRNAAFGCDNDVTE
Consensus		181	*****
家蚕 <i>Bombyx mori</i>	NP_001037027	225	AGQSAGAAAHLTLTKATEGLVSRAILMSGAGSTFFTSFHSQSINILFSLIGVNS
烟草天蛾 <i>Manduca sexta</i>	AAG42021	223	MGQSAGAAATHLLLSKAAGGLFRAILMSGTSSAFFTINVFACVINKLFTVINGITA
棉铃虫 <i>Helicoverpa armigera</i>	AEB77712	221	AGQSAGAAAHLTLTKAAKGLFKRAILMSGTCHSSFFSSPAPAAHISNOLFLVLGKD
苜蓿夜蛾 <i>Heliothis virescens</i>	AGB93712	234	AGQSAGAAAHLTLTKATEGLFRAILMSGTCHSSFYSSPAPAAHISNOLFLVLGITA
烟草夜蛾 <i>Heliothis virescens</i>	AAB88629	217	AGQSAGASAHLTLTKATEGLFKRAILMSGTCHSYFFTSFPAFYSKOLLQILGINE
云杉卷叶蛾 <i>Choristoneura fumiferana</i>	AAD3417	219	AGQSAGASAHLTLSPARGLFKRAILMSGTSTRFFTSPPAPACVLAQLFLNLGINE
Consensus		241	*****
家蚕 <i>Bombyx mori</i>	NP_001037027	285	TNPEIIEHKLAMVEKLNANRILIDQIGLTTFEPVVEFHFGCTITLIDEDNIMLQOC
烟草天蛾 <i>Manduca sexta</i>	AAG42021	283	TDPEEIHQKLEMPAEKLNANRELLEQFGLTTFEPVVEFHFGCTITLIDEDNIMLQOC
棉铃虫 <i>Helicoverpa armigera</i>	AEB77712	281	TDPEEIHRLKIDLPAAKLSDANALLEQFGLTTFEPVVEFHFGCTITLIDEDNIMLQOC
苜蓿夜蛾 <i>Heliothis virescens</i>	AGB93712	294	TDPEEIHQKIDLPAAKLNTANALLEQIGLTTFEPVVEFHFGCTITLIDEDNIMLQOC
烟草夜蛾 <i>Heliothis virescens</i>	AAB88629	277	TDPEEIHRLKIDLPAAKLBNANAVLEQIGLTTFEPVVEFHFGCTITLIDEDNIMLQOC
云杉卷叶蛾 <i>Choristoneura fumiferana</i>	AAD3417	279	TDPEEIHRLKIDLPAAKLBNANAVLEQIGLTTFEPVVEFHFGCTITLIDEDNIMLQOC
Consensus		301	*****
家蚕 <i>Bombyx mori</i>	NP_001037027	345	RGKDIPLIGFTNSECHMFOHFFQIDIVSKINENPAIVSENLISSTPETALVSNQI
烟草天蛾 <i>Manduca sexta</i>	AAG42021	343	RGKDIPLIGFTDAECIFRQFQIDIVSKIKENPCILVLSVLESSAETITABITKAM
棉铃虫 <i>Helicoverpa armigera</i>	AEB77712	341	RGKNIPLLVGFTSECTFRNRLNFGFVKNIKENPAIIPPPVLTMTPEQLMDLKESI
苜蓿夜蛾 <i>Heliothis virescens</i>	AGB93712	354	RGKNIPLLVGFTSSECTFRNRLNFGFVKKIQDNFTIIPPKVLFMTPEQLMDLKESI
烟草夜蛾 <i>Heliothis virescens</i>	AAB88629	337	RGKNIPLLVGFTSSECTFRNRLNFGFVKKIQDNFTIIPPKVLFMTPEQLMDLKESI
云杉卷叶蛾 <i>Choristoneura fumiferana</i>	AAD3417	339	RGKDIPLLVGFTNACCTFRFPFSIDITLSIACQFVVMPPATVYTPLELPNKIGOI
Consensus		361	*****
家蚕 <i>Bombyx mori</i>	NP_001037027	405	SQRYENGSDLEGFINMCTESYRYPAKMLAEKRSAGDAPVFLYCHSYDGYYSVFRQAF
烟草天蛾 <i>Manduca sexta</i>	AAG42021	403	HEKYKKSVDMEGFIELCTESYRYPAKMLAEKRSAGDAPVFLYCHSYDGYYSVFRQAF
棉铃虫 <i>Helicoverpa armigera</i>	AEB77712	401	BRRYNDSISIDNFKSCSDGEYEPALKLAQKRAETGGAPVLYRFAYEGGNSVHKVM
苜蓿夜蛾 <i>Heliothis virescens</i>	AGB93712	414	BRKYNGHSISIDNFKSCSDGEYEPALKLAQKRAETGGAPVLYRFAYEGGNSVHKVM
烟草夜蛾 <i>Heliothis virescens</i>	AAB88629	397	BRKYNGHSISIDNFKSCSDGEYEPALKLAQKRAETGGAPVLYRFAYEGGNSVHKVM
云杉卷叶蛾 <i>Choristoneura fumiferana</i>	AAD3417	399	VQRYENGSPNINKFIKSCSYRYVYFLKLAEMRAANGGAPVLYRYETADYSVFCGL
Consensus		421	*****
家蚕 <i>Bombyx mori</i>	NP_001037027	464	HLHENGAGHADLTYYLVNVSAG---TSSQKADDEMKYWMTHFTNFMKCSAPMCDT
烟草天蛾 <i>Manduca sexta</i>	AAG42021	463	HLNPEGAGHIEDLTYYVFTNSMIGCHASFFPHKDDHMKYWMTHFTNFMKYSNPETAK
棉铃虫 <i>Helicoverpa armigera</i>	AEB77712	461	ELDYEGAGHIEDLTYYVFTNSVBPAGAPSKDDVMKMLMTSYFVNFMKCSKPCEDN
苜蓿夜蛾 <i>Heliothis virescens</i>	AGB93712	474	GLNYEGVGHIEDLTYYVFRANSVBPDAVAPSDDVCMKMLMTDEYVNFMTCSKPCEDN
烟草夜蛾 <i>Heliothis virescens</i>	AAB88629	457	GLNPEGVGHIEDLTYYVFNVSMBALHAS-PSNDVMKMLMTGELNFKKCSKPCEDN
云杉卷叶蛾 <i>Choristoneura fumiferana</i>	AAD3417	459	ELKYRGCHSIEDLTLLFRANHVIG---ERATSPRCHKMVDAMTYVTNFMHLSNFTKGV
Consensus		481	*****
家蚕 <i>Bombyx mori</i>	NP_001037027	521	TAWPPVTPR-LOQODITENICHQTSLEKELMKNFDFKIH--NGGEBRIK
烟草天蛾 <i>Manduca sexta</i>	AAG42021	523	-LWPEVRADN-IRQODITPDVYQNVKPHSECRMLDFFDSIYNWNGISYCHK
棉铃虫 <i>Helicoverpa armigera</i>	AEB77712	521	NSLEKWPAGDGMQYEDIVSPDMIRSKFSSRQDDIIEFDSIT-----SGEQL
苜蓿夜蛾 <i>Heliothis virescens</i>	AGB93712	534	NSLELWPANBGMQYEDIVSPDMIRSKFSSRQDDIIEFDSIT-----SRGQL
烟草夜蛾 <i>Heliothis virescens</i>	AAB88629	516	NSLEVWPANBGMQYEDIVSPDMIRSKFSSRQDDIIEFDSIT-----SRSPLE
云杉卷叶蛾 <i>Choristoneura fumiferana</i>	AAD3417	515	AGWPAVKREK-LOQONITPELVLT-TVSRDLRLTTFDFDNIT-----SSSS--
Consensus		541	*****

图 2 *Hvjhe* 基因推导的氨基酸序列与其他昆虫 JHE 氨基酸序列的多重比对Fig. 2 Multiple alignment of the deduced amino acid sequence of *Hvjhe* and its homologues from other species

黑色阴影和*表示氨基酸序列 100%一致, 灰色表示 80%一致, 白色和·表示 80%以下一致。

Amino acids with 100% identity are in black box and *, those with 80% in grey box and below 80% in white box. and ·.

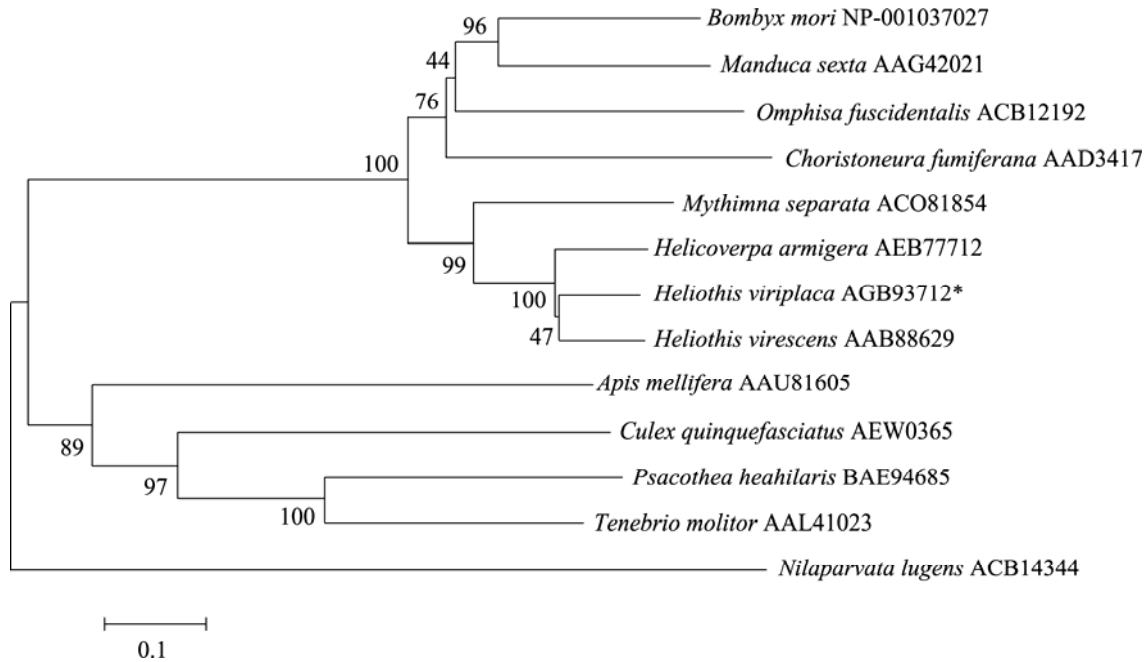


图3 利用邻接法构建的昆虫 JHE 氨基酸序列系统进化树
Fig.3 Neighbor-joining phylogenetic tree of insect JHEs

各 JHE 基因来源及 GenBank 登录号为 The origin of the JHE and their GenBank accession numbers: 意大利蜜蜂 *Apis mellifera* AAU81605 ; 家蚕 *Bombyx mori* NP_001037027 ; 云杉卷叶蛾 *Choristoneura fumiferana* AAD34172 ; 致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* AEW07365 ; 棉铃虫 *Helicoverpa armigera* AEB77712 ; 烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* AAB88629 ; 苜蓿夜蛾 *Heliothis virescens* AGB93712 ; 烟草天蛾 *Manduca sexta* AAG42021 ; 粘虫 *Mythimna separata* ACO81854 ; *Omphisca fuscidentalis* ACB12192 ; 黄兴天牛 *Psacothea hilaris* BAE94685 ; 黄粉虫 *Tenebrio molitor* AAL41023 ; 褐飞虱 *Nilaparvata lugens* ACB14344.

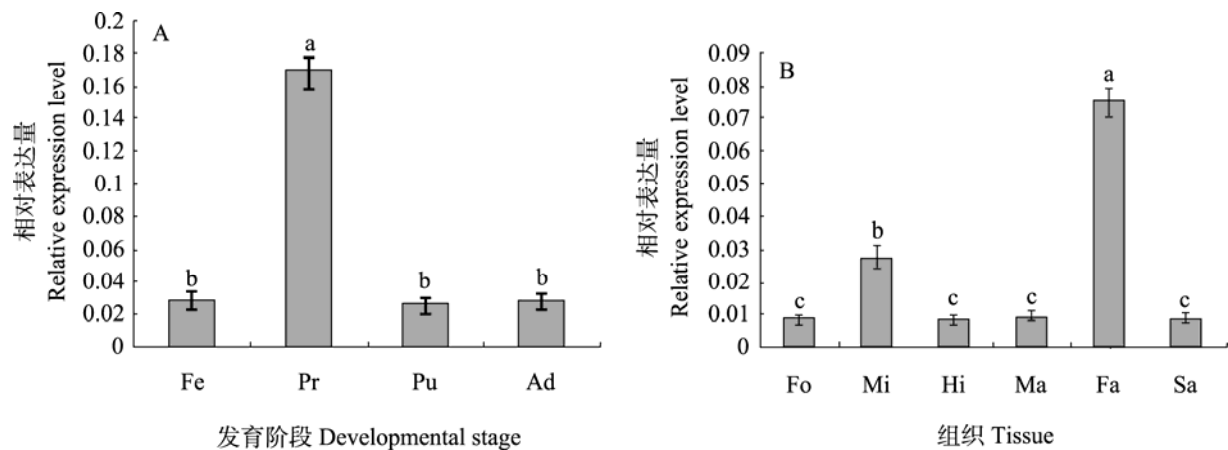


图 4 苜蓿夜蛾不同发育阶段和不同组织 *Hvjhe* 表达量 Real-time PCR 分析

Fig. 4 Relative expression level of the *Hvjhe* mRNA in *Heliothis virescens* at different development stage and tissue

柱上标有不同字母表示基因表达量在 0.05 水平上差异显著 (Duncan's 多重比较法检验)。A: 不同发育阶段; B: 不同组织。
Fe: 取食期; Pr: 预蛹; Pu: 蛹期; Ad: 成虫; Fo: 前肠; Mi: 中肠; Hi: 后肠; Fa: 脂肪体; Sa: 唾液腺; Ma: 马氏管。
Histograms with different letters indicate significant difference in gene expression at the 0.05 level by Duncan's multiple-range test.
A. Different developmental stage; B. Different tissues. Fe: Feeding stage; Pr: Prepupal stage; Pu: Pupal stage; Ad: Adult stage; Fo: Foregut; Mi: Midgut; Hi: Hindgut; Fa: Fat; Sa: Salivary gland; Ma: Malpighian tubule.

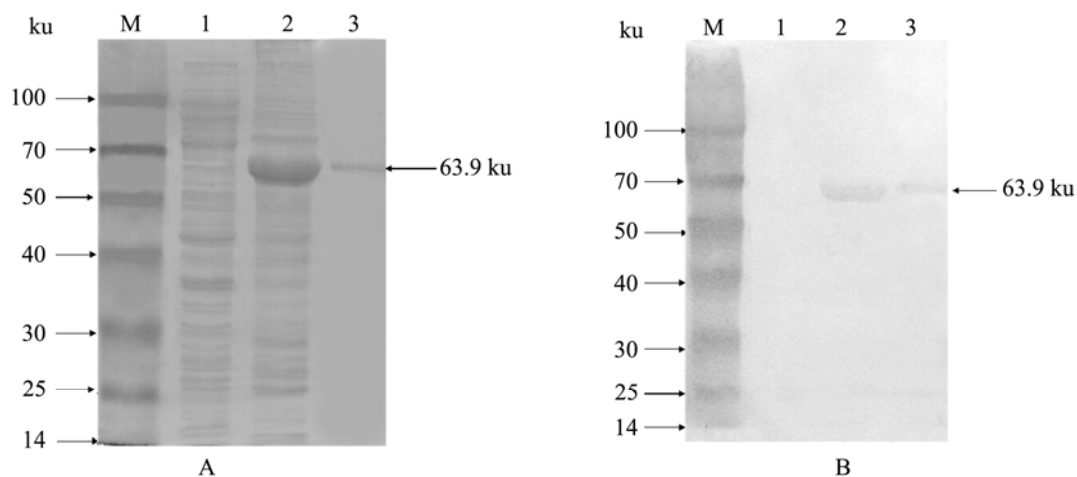


图 5 重组蛋白的 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

Fig. 5 Analysis of recombinant protein by SDS-PAGE and Western blot

A. SDS-PAGE 电泳分析 ;B. Western 印迹鉴定。M : 蛋白分子质量标准 ;1 : pET21b 空载体诱导产物 ;2 : pET21b-HvJHE 的诱导产物 ;3 : 纯化的重组蛋白。

A. SDS-PAGE electrophoresis analysis; B. Western blot analysis. M: Protein molecular weight marker; 1: Expression product of pET21b; 2: Expression product of pET21b-HvJHE; 3: Purified recombinant protein.

保幼激素完成这一时期的生长发育需求,不需要保幼激素酯酶参与这一过程,因此其含量较低;预蛹期马上进入蛹期昆虫需要蜕皮,需要 *Hvjhe* 来降解保幼激素,所以 JHE 含量较高;蛹期进入相对稳定的阶段,JHE 含量会保持较低水平。在昆虫成虫期,保幼激素酯酶可能参与调控昆虫的繁殖和产卵(龙楚云等,2013)。本试验成虫期 *Hvjhe* 也有表达,因此推测 *Hvjhe* 可能与苜蓿夜蛾的繁殖产卵有关联。*Hvjhe* mRNA 组织中特异性表达表明脂肪体和中肠表达量较大,同时在唾腺和马氏管等组织中也有少量表达,这一结果与前人研究有吻合也有不同之处,如褐飞虱 *Nilaparvata lugens* JHE 的 mRNA 在脂肪体、中肠、卵巢中均有表达,脂肪体中表达量最高(Liu *et al.*, 2008)。对家蚕 JHE 蛋白水平组织特异性表达证明,5 龄幼虫 JHE 只在脂肪体中表达,在马氏管、中肠、卵巢等组织中不表达(Hirai *et al.*, 2002)。本研究与其他研究中存在 JHE 在不同组织中表达差异,其原因可能是不同的研究方法(mRNA 水平和蛋白水平)和取样时间差异造成的,本试验后续工作还要对这一问题进一步研究。

原核表达结果表明在 20℃ 的条件下经过 IPTG 诱导可以在大肠杆菌中大量表达外源目的蛋白,纯化及 Western blot 鉴定表明获得的蛋白为目的蛋白。下一步将进行单克隆抗体的制备和活性的检测,为研究利用 JHE 调控昆虫生长发育及防治提供技术基础。

RNAi 技术的发展,有利于昆虫基因功能研究,进一步发展为有效的害虫防治技术。保幼激素酯酶可以用作杀虫剂的靶标,利用 RNAi 方法抑制 *Hvjhe* 的正常表达,打乱蜕皮激素和保幼激素的平衡,进而影响昆虫的正常生长发育,达到控制害虫的目的。利用昆虫取食表达外源基因 dsRNA 的植物来控制害虫已有相关的报道(Baum *et al.*, 2007; Zha *et al.*, 2011),本研究获得的 *Hvjhe* 基因可为以后利用 RNAi 技术防治苜蓿夜蛾奠定基础。

参考文献 (References)

- Abdel-Aal YAI, Hammock BD, 1985. 3-octylthio-1, 1, 1-trifluoro-2-propanone, a high affinity and sloesw binding inhibitor of juvenile hormone esterase from *Trichoplusia ni* (Hübner). *Insect Biochem.*, 15(1): 111-122.
- Baum JA, Bogaert T, Clinton W, 2007. Control of coleopteran insect

- pests through RNA interference. *Nat. Biotechnol.*, 25(11): 1322–1326.
- Bonning BC, Hammock BD, 1996. Development of recombinant baculoviruses for insect control. *Annu. Rev. Entomol.*, 41: 191–210.
- El-Sayed A, El-Sheikh, Shizuo G, Kamita, Kiem Vu, Bruce D, 2011. Improved insecticidal efficacy of a recombinant baculovirus expressing mutated JH esterase from *Manduca sexta*. *Biol. Control.*, 58(3): 354–361.
- Gilbert LI, Granger NA, Roe RM, 2000. The juvenile hormone: historical facts and speculations on future research directions. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30(8): 617–644.
- Hammock BD, Sparks TC, 1977. A rapid assay for insect juvenile hormone esterase activity. *Anal. Biochem.*, 82(2): 573–579.
- Hirai M, Kamimura M, Kikuchia K, Yasukochia Y, Kiuchia M, Shinodab T, Shiotsukia T, 2002. cDNA cloning and characterization of *Bombyx mori* juvenile hormone esterase: an inducible gene by the imidazole insect growth regulator KK-42. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32(6): 627–635.
- Jones G, 1995. Molecular mechanisms of action of juvenile hormone. *Annu. Rev. Entomol.*, 40: 147–169.
- Li S, Falabella P, Kuriachan I, Vinson SB, Borst DW, Malva C, Pennacchio F, 2003. Juvenile hormone synthesis, metabolism, and the resulting haemolymph titer in *Heliothis virescens* larvae parasitized by *Taxoneuron nigricaps*. *J. Insect Physiol.*, 49(11): 1021–1030.
- Li S, Jiang RJ, Cao MX, 2002a. Developmental changes in the ability to synthesize juvenile hormone in vitro by corpora allata from the Eri silkworm, *Samiacynthis ricini*. *Eur. J. Entomol.*, 99(4): 413–419.
- Li S, Jiang RJ, Cao MX, 2002b. Allatotrophic and allatostatic activities in brain extracts of the Eri silkworm, *Samiacynthis ricini*, and the effects of *Manduca sexta* allatotropin and *Manduca sexta* allatostat in on juvenile hormone in vitro. *Physiol. Entomol.*, 27(4): 322–329.
- Liu SH, Yang BJ, Gu JH, 2008. Molecular cloning and characterization of a juvenile hormone esterase gene from brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *J. Insect Physiol.*, 54(12): 1495–1502.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Long CX, Guo JY, Wang FH, 2013. Molecular cloning sequence analysis and developmental expression of cDNA fragment of juvenile hormone esterase from the whitefly *Bemisia tabaci* MED(Hemiptera: Aleyrodidae). *Acta Entomologica Sinica.*, 56(3): 234–242. [龙楚云, 郭建洋, 万方浩, 2013. 烟粉虱 MED 隐种保幼激素酯酶 cDNA 片段克隆、序列分析及在不同发育阶段的表达. 昆虫学报, 56(3): 234–242.]
- Maxwell RA, Weleh WH, Horodyski FM, Schegg KM, Schooley DA, 2002a. Juvenile hormone kinase. Sequencing, cloning, and molecular modeling of juvenile hormone-selective diol kinase from *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.*, 277(24): 21882–21890.
- Maxwell RA, Weleh 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.
- Ouyang YC, Li S, 2003. Modification and application of a high performance liquid chromatography method to separate juvenile hormones and their metabolites. *Acta Entomologica Sinica*, 46(3): 282–287. [欧阳迎春, 李胜, 2003. 保幼激素及其代谢产物的 HPLC 分离方法的改进和应用. 昆虫学报, 46(3): 282–287.]
- Riddiford LM, 1994. Cellular and molecular actions of juvenile hormone I. general considerations and premetamorphic actions. *Adv. Insect Physiol.*, 24: 213–273.
- Share MR, Roe RM, 1988. A partition assay for the simultaneous determination of insect juvenile hormone esterase and epoxide hydrolase activity. *Anal. Biochem.*, 169(1): 81–88.
- Ward, VK, Bonning, BC, Huang, T, 1992. Analysis of the catalytic mechanism of juvenile hormone esterase by site-directed mutagenesis. *Int. J. Biochem.*, 24(12): 1933–1941.
- Wyatt GR, Davey KD, 1996. Cellular and molecular actions of juvenile hormone. Roles of juvenile hormone in adult insects. *Adv. Insect Physiol.*, 26: 1–155.
- Wu KM, 2010. Public Plant Protection and Green Prevention. Beijing: China Agricultural Science and Technology Publishing House Press. 364–369. [吴孔明, 2010. 公共植保与绿色防控. 北京: 中国农业科学技术出版社. 364–369.]
- Zha W, Peng X, Chen R, Du B, Zhu L. 2011. Knockdown of midgut genes by dsRNA-transgenic plant-mediated RNA interference in the Hemipteran insect *Nilaparvata lugens*. *PLoS ONE*, 6(5): e20504.
- Zhang DF, 2002. Purification and biological effects of a recombinant juvenile hormone esterase. *Acta Entomologica Sinica*, 45(6): 743–747. [章东方, 2002. 重组保幼激素酯酶的纯化和生物学效应. 昆虫学报, 45(6): 743–747.]