大豆害虫专栏

苜蓿夜蛾葡萄糖氧化酶 cDNA 的克隆、表达及特性研究*

雷 蕾** 赵奎军 高艳玲 李莉莉 樊 东***

（东北农业大学农学院，哈尔滨 150030）

摘 要 **【目的】** 从苜蓿夜蛾 *Heliothis viriplaca* 体内克隆葡萄糖氧化酶（Glucose oxidase, GOX）基因 cDNA 序列，并进行原核表达及活性测定。同时对 GOX 在不同组织的特异表达及对葡萄糖诱导反应的特性进行研究。**【方法】** 以苜蓿夜蛾为材料提取总 RNA，利用 RT-PCR 和 cDNA 末端快速扩增技术，扩增苜蓿夜蛾 GOX 基因全长 cDNA 序列。利用原核表达载体 pET-21b 在大肠杆菌中表达苜蓿夜蛾的 GOX 基因，并用 Ni-NTA 亲和层析柱将带 His-tag 的目的蛋白进行纯化，再利用梯度透析法进行复性，以葡萄糖为底物进行酶的活性测定。同时利用 Real-time PCR 分析 GOX 的组织特异性表达和对葡萄糖的诱导反应。**【结果】** 该 cDNA 序列有 2 154 个碱基，开放阅读框 1 824 个碱基，编码 607 个氨基酸组成的多肽，分子量为 67.04 ku，多肽的等电点为 5.13。该序列命名为 *HvGOX*，在 GenBank 的登录号为 KT907054。序列分析表明，*HvGOX* 的氨基酸序列与其他昆虫的 GOX 氨基酸序列高度同源。该基因在大肠杆菌表达系统中成功地进行了诱导表达，表达出与预测的蛋白分子量相符的融合蛋白。由原核表达载体表达后的蛋白经过变性、纯化和复性后有活性。Real-time PCR 结果表明，该基因在苜蓿夜蛾的不同组织均有 mRNA 水平的特异表达，其中在唾腺中的表达量最高；同时用 0.01%、0.1%、1%和 10%葡萄糖溶液浸泡的大豆叶喂食的幼虫，幼虫体内的 GOX 的表达均被诱导，且在 10%的浓度时诱导表达量最高。**【结论】** 本研究在苜蓿夜蛾体内获得一个新的葡萄糖氧化酶基因，该结果为进一步研究葡萄糖氧化酶在昆虫体内的生物功能奠定基础。

关键词 苜蓿夜蛾，葡萄糖氧化酶，克隆，表达，酶活性

cDNA cloning, expression and characterization of glucose oxidase from *Heliothis viriplaca*

LEI Lei** ZHAO Kui-Jun GAO Yan-Ling LI Li-Li FAN Dong***

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

Abstract **[Objectives]** To obtain the full-length cDNA sequence of glucose oxidase (GOX) from *Heliothis viriplaca*, and determine the GOX activity in the prokaryotic expression system, mRNA expression levels in different tissues and the characterization of glucose induction. **[Methods]** Total RNA was isolated from the larva of *H. viriplaca*. The RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends techniques were used to clone the full-length GOX cDNA sequence. The *E. coli* prokaryotic expression system was used to express the cDNA sequence. The recombinant protein, with a His-tag, was purified by Ni-NAT affinity chromatography. After purification, the recombinant protein was renatured using the gradient dialysis technique. The activity of GOX protein was determined with glucose as the substrate. Real-time PCR was used to analyze mRNA expression levels in different tissues and the reaction of glucose induction. **[Results]** The cDNA sequence of GOX was 2 154 bp, including an open reading frame of 1 824 bp encoding a

*资助项目 Supported projects：植物病虫害生物学国家重点实验室开放基金资助课题（编号：SKLOF201308）；国家现代农业产业技术体系建设专项基金（编号：CARS-04）

**第一作者 First author，E-mail：18946004811@163.com

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

收稿日期 Received：2015-11-16，接受日期 Accepted：2015-12-27

polypeptide of 607 amino acids with an estimated molecular mass of 67.04 ku and an estimated isoelectric point of 5.13. The cDNA sequence has been deposited in GeneBank (accession No. KT907054) and designated as *HvGOX*. SDS-PAGE revealed that *HvGOX* was successfully expressed in *E. coli*. The expressed protein was active after denaturation, purification and renaturation. Sequence analysis indicates that *HvGOX* shares extensive similarities with that of other insects. Real-time PCR results showed that the mRNA transcripts were expressed in different tissues, with the highest expression in the salivary gland. GOX expression in larvae was induced by feeding them soybean leaves soaked in 0.01%, 0.1%, 1% and 10% glucose solution; expression was highest when larvae were fed leaves soaked in 10% glucose solution. **[Conclusion]** A novel GOX cDNA sequence was obtained from *H. viriplaca*. The results provide a foundation for further research on the biological function of GOX in insects.

Key words *Heliothis viriplaca*, glucose oxidase, cloning, expression, enzyme activity

葡萄糖氧化酶（Glucose oxidase，GOX），是氧化还原型酶（EC1.1.3.4），它能够专一地识别β-D-葡萄糖并将其氧化分解成葡萄糖酸内酯和过氧化氢，而葡萄糖酸内酯会进一步转化成葡萄糖酸，过氧化氢则最终会转变成水和氧气（Ramzan and Mehmood，2009）。葡萄糖氧化酶氧化葡萄糖的分解机制存在于绝大部分的生物体内，包括植物、动物和微生物（宁正祥，1998）。葡萄糖氧化酶的研究是从微生物开始的，对于包括昆虫在内的植物与动物体内的葡萄糖氧化酶研究得则较晚（胡永红和王琛柱，2009）。有研究表明，在甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 下唇腺、意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 咽下腺和谷实夜蛾 *Helicoverpa zea* 多个组织中发现GOX的活性（Eichenseer *et al.*，1999；Ohashi *et al.*，1999； Merkx and Bede，2004，2005；Zong *et al.*，2004）。烟碱在烟草的防御系统中起着最重要的作用，而当谷实夜蛾取食烟草时，被取食的部位烟碱的诱导会被抑制（Baldwin，1999），对于抑制烟碱起主要作用的则是美洲棉铃虫唾液中的主要成分葡萄糖氧化酶，它催化反应的产物过氧化氢和葡萄糖酸也有相同的作用（Musser *et al.*，2002），因此昆虫的 GOX 在植物的防御中起到非常重要的作用（Bede *et al.*，2006）。此外 GOX 具有一定的抑菌作用，有研究表明 GOX 能阻止好氧菌生长繁殖，产生过氧化氢起到杀菌作用（刘超等，2010）。利用基因工程技术可以将葡萄糖氧化酶基因克隆到植物体内利用其抑菌作用来抗病（Tang *et al.*，2012）。GOX 还可以作为一种抗菌剂来抑制昆虫病原体对昆虫的侵染从而达到对昆虫免疫的目的（Musser *et al.*，2005）。若利用分子手段将昆虫体内的 GOX 基因进行沉默，则可大大降低昆虫的免疫功能，进而达到防虫、治虫的效果。

苜蓿夜蛾 *Heliothis viriplaca* 属鳞翅目夜蛾科，主要危害棉花、大豆、苜蓿、亚麻等多种农作物，在我国广泛分布，其中大豆、苜蓿受害比较严重，主要以其幼虫蚕食大豆叶片或幼嫩组织，钻入豆荚并蛀食豆荚来危害大豆，造成大豆产量降低，品质变差，是影响我国东北地区大豆生产的重要害虫之一（慕卫等，2002）。由于苜蓿夜蛾具有吐丝和卷叶的特性，在生产上利用化学农药进行防治非常困难，且长时间使用化学药剂易使害虫产生抗药性，并造成环境污染（慕卫等，2004）。因此利用分子手段进行害虫的生物防治可能会成为一条较有效的途径。本研究基于葡萄糖氧化酶的功能和作用，以苜蓿夜蛾为试验材料，对 GOX 基因 cDNA 序列进行克隆，并将该基因在大肠杆菌原核系统进行表达，将表达的蛋白进行酶活测定，并研究该基因在不同组织及不同浓度葡萄糖诱导下的表达情况，研究结果为进一步丰富葡萄糖氧化酶的相关知识和生物学功能同时为日后利用分子手段对苜蓿夜蛾进行防治奠定基础。

1　材料与方法

1.1　昆虫材料

在东北农业大学实验实习基地的大豆田中采集获得苜蓿夜蛾的成虫，室内用 5%的糖水喂养至成虫后，待其产卵，孵育出幼虫，在 26℃，相对湿度为 65%和光周期为 13L∶11D 的饲养箱内用大豆叶饲养到不同龄期备用。

1.2　试剂

Promega 公司的反转录酶 M-MLV Reverse

Transcriptase 和低熔点琼脂糖；Invitrogen 公司的 RNA 提取试剂盒 TRIzol®Reagent；TaKaRa 公司的 DNA 胶回收试剂盒、DNA Marker、质粒提取试剂盒、Taq DNA 聚合酶和限制性内切酶 *Bam*HI、*Xho*I；北京全式金生物公司的 pEasy-T1 载体、蛋白 Marker 和 Ni-NTA 亲和层析柱；本实验室冻存的大肠杆菌 BL21、DH5α 菌株和 pET21b 质粒，其它所用试剂均为国产或进口的分析纯。Ni-NTA 柱所用平衡缓冲液：100 mmol /L NaH_2PO_4、8 mol /L 尿素和 10 mmol/L Tris base，pH 8.0（既是变性缓冲液也是漂洗缓冲液）；洗脱缓冲液分为 5 个梯度分别是含有 40，80，120，160 和 200 mmol/L 咪唑的 pH 为 8.0 平衡缓冲液；复性缓冲液也为 5 个梯度分别是依次含有 0.5，2，4，6，8 mol/L 尿素的 5%蔗糖，100 mmol/L NaH_2PO4，0.4 mol/L 精氨酸，10 mmol/LTris base，1 mmol/L 氧化型谷胱甘肽，5 mmol/L 还原型谷胱甘肽 pH 为 8.0 的混合液；复性缓冲液为 pH 8.0 的 1.5 mmol /L Tris-HCl。

1.3 GOX cDNA 全长序列的克隆

1.3.1 虫体总 RNA 的提取 按照试验要求选取苜蓿夜蛾不同龄期幼虫和提取虫体不同组织，每 100 mg 虫体或组织加入 1 mLTRIzol® Reagent，提取步骤按常规方法进行。提取的总 RNA 放入－80℃冰箱中备用。

1.3.2 第一链 cDNA 的合成 利用 dt-Ro-Ri 为 cDNA 合成引物（表 1），利用 M-MLV Reverse Transcriptase 按照其说明书合成第一条链 cDNA，保存于－20℃冰箱备用。

1.3.3 克隆 cDNA 序列片段 比较棉铃虫 *H. armigera*（ACC94296）、谷实夜蛾 *Helicoverpa zea*（ACJ71598）和甜菜夜蛾 *S. exigua*（ADL38963）3 种昆虫的 GOX 基因的 cDNA 序列，设计一对特异性引物 GOX-S 和 GOX-X（见表 1）克隆苜蓿夜蛾 GOX。PCR 反应条件：94 预变性 5 min；94℃30 s，53℃30 s，72℃30 s，35 个循环；72℃延伸 10 min。用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。将正确的 PCR 产物回收，将回收产物连接于 pEasy-T1 载体上，并且转化到 DH5α 菌株中，用含有氨苄青霉素的固体平板进行菌落抗性筛选，挑选阳性克隆菌株分别进行酶切和 PCR 鉴定。把连接正确的重组子送往博士生物公司进行序列测定。

1.3.4 GOX 基因的 3′cDNA 序列的克隆 根据已经得到的 cDNA 部分序列设计用于克隆基因 3′端的引物 3′-S 和 3′-X，利用这两个引物和引物 3′-Ro 和 3′-Ri 克隆 GOX 序列的 3′端，用于 cDNA 序列克隆的引物见表 1。第 1 轮 PCR 以 3′-Ro 和 3′-S 为引物，第 2 轮以 3′-Ri 和 3′-X 为引物。PCR、电泳、回收、测序等具体反应过程与上一步相同。

1.3.5 GOX 基因的 5′cDNA 序列的克隆 克隆基因的 5′cDNA 序列需利用 TaKaRa 5′-Full RACE Kit。根据试剂盒中的 5′-RACE Outer Primer 和 5′-RACE Inner Primer 分别设计引物 5′-S 和 5′-X。第一轮 PCR 以 5′-RACE Outer Primer 和 5′-X 为引物进行扩增。用第一轮的扩增产物 1 μL 为底物，以 5′-RACE Inner Primer 和 5′-S 为引物进行第 2 次扩增。将扩增所得的 PCR 产物经 0.1%琼脂糖凝胶电泳分析、胶回收、连接、转化和测序。引物见表 1。

1.3.6 GOX cDNA 全长序列的获得 对 1.4.2 及 1.4.4 获得的序列片段拼接得到全长序列，设计克隆基因 cDNA 全长序列的引物 G-S 和 G-X（表 1），克隆全长序列。

1.4 序列分析

利用软件 BioXM 分析已经获得的 cDNA 序列，得到 ORF 和翻译后的氨基酸序列；在 ExPASy 网站（http://ca.expasy.org/tools/）对所得的序列的氨基酸进行分析，分别在 Compute PI/Mw 蛋白分析软件中分析氨基酸序列的等电点和分子量；利用 Signal P4.1Server 预测信号肽；利用 MEGA5.0 和 ClustalX 软件进行同源性比较和系统进化树的构建。

1.5 原核表达及活性测定

1.5.1 表达载体的构建 利用设计所得的表达引物 GB-X 和 GB-S（表 1）进行 PCR 扩增编码区，经 0.1%琼脂糖凝胶电泳检测后的 PCR 产物

进行回收然后与载体 T1 连接，将连接的产物转化到 DH5α 感受态细胞中，挑选阳性克隆的菌落进行摇菌，并用该菌液进行质粒的提取，把所提质粒与原核表达载体 pET21b(+)分别用 *Bam*HI 和 *Xho*I 进行双酶切，将酶切产物纯化后用 T4 连接酶连接构建重组质粒 GOX-pET21b，将重组质粒转化至 BL21 感受态细胞中，再次挑选阳性克隆，摇菌提取质粒进行 *Bam*HI 和 *Xho*I 单酶切、双酶切鉴定分析，鉴定正确的阳性质粒送到博士生物公司测序。

1.5.2　重组蛋白的原核表达　将上述的阳性克隆菌株接种于含有 100 μg/mL amp 的 5 mL LB 液体培养基中，在 37℃ 220 r/min 的摇床中振荡培养 12 h；取 0.5 mL 菌液接种于含有 100 μg/mL 氨苄的 50 mL 的 LB 液体培养基中，同样振荡培养，培养条件为 37℃ 220 r/min 至到 OD600 值为 0.6，然后加入 1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达，加入诱导剂后继续振荡培养 6 h。把诱导后的菌液吸取 2 mL 进行离心，条件为常温 12 000 r/min 和 3 min，将离心产物留沉淀弃上清，再将沉淀中加入 1×蛋白上样 Buffer 150 μL，将混合液沸水浴约 10 min，最后 4℃ 12 000 r/min 离心 3 min，取离心后的上清液 10 μL 进行 SDS-PAGE，检测重组蛋白的表达情况并拍照。

1.5.3　重组蛋白的变性、纯化与复性　取 1.5.2 中诱导表达 6 h 的培养液 50 mL 在 12 000 r/min 4℃ 条件下离心 10 min，随后加入 18 mL pH 为 8.0 的 0.1 mol/L 的 Tris-HCl，并将离心管置于冷冻条件下进行超声破碎：破碎 5 s，间歇 5 s，重复此步骤 10~20 min。将超声破碎的混合液 12 000 r/min

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

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5′-3′)	引物用途 Usage of primer
dt –Ro- Ri	ATCGATGGTCGACGCATGCGGATCCAAAG CTTGAATTCGAGCTC(T) $_{17}$	第一条 cDNA 的合成 Synthesis of the 1st strand cDNA
GOX-S	GGAAAATACCAAGATGATTCTGGCGCA	特异片段克隆 Fragment cloning
GOX-X	GGTCAGTGTGTAGGCGAATCATACAC	
3′-Ro	ATCGATGGTCGACGCATGCGGATCC	5′端和 3′端的扩增 5′end and 3′end amplification
3′-Ri	GGATCCAAAGCTTGAATTCGAGCTCT	
3′-S	CACCACTCGGAAACTGGACGCATGCC	
3′-X	ACCTGACTTTCAAAGATCTG GCGCAA	
5′-Inner	CGCGGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCGATG	
5′-Outer	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA	
5′-S	CCTGAACTCCACAGCATGCAGCGGCACCTA	
5′-X	TACCTCATCGTGGCTCCAAA ACGTT	
G-S	ATACCAAGATGATTCTGGCGCAACAGCA	全长序列克隆 Full-length sequence cloning
G-X	GAAGTGTGCG CCTCTTTCCG CCAC	
GB-S	CGCGGATCCATCTATTGTAGCTGGGAGACTTAGCG	大肠杆菌原核表达 Expression in *E.coli*
GB-X	CCGCTCGAGT TGCCAAGTCT CTTTGATGAA GTGT	
GY-S	CCAGTCTCCTCAACGGTATG	荧光定量 PCR qRT-PCR
GY-X	CAGTTTCCGAGTGGTGCTT	
β-actinS	CCAACGGCATCCACGAGACCA	
β-actinX	TCGGCGATACCAGGGTACAT	

冷冻离心 10 min，收集离心后的上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE，观察目的蛋白是否可溶。在沉淀的包涵体中加入变性缓冲液，依照北京全式金公司 Ni-NTA 亲和层析柱说明书纯化目的蛋白。用梯度洗脱缓冲液洗脱目的蛋白，并 SDS-PAGE 鉴定。将洗脱得到的目的蛋白收集起来，并利用梯度透析法进行重组蛋白的复性过程。依次用梯度复性缓冲液过夜透析复性蛋白。将复性后的重组蛋白进行 SDS-PAGE 来鉴定复性蛋白。

1.5.4 GOX 的活性测定 在葡萄糖氧化酶的作用下，葡萄糖和氧反应生成葡萄糖酸和过氧化氢，过氧化氢和无色的还原型邻联茴香胺在过氧化物酶的作用下，生成水和红色的氧化型邻联茴香胺。具体步骤：分别配置邻联茴香胺甲醇缓冲液、葡萄糖溶液和辣根过氧化物酶液，并将三者混匀，30℃恒温水浴，再向混合液中加入酶样品，（对照组为清水用于调零）再次混匀。将分光光度计在 460 nm 下调零后放入酶样品混合液立刻读数记为 A_0，3 min 后再次读数记为 A_1，$\triangle A=A_1-A_0$ 上述步骤重复 3~4 次。

计算公式为：

X 酶活力（U/mL）$=[\triangle A\div(11.3\times t\times 0.1)]\times n$

t：测定时间（min）；0.1：样品体积（mL）；11.3：消光系数；n：稀释倍数。

1.6 不同组织差异性表达分析

分离苜蓿夜蛾 5 龄第一天幼虫的前肠、中肠、后肠、马氏管、唾腺、脂肪体等组织，对每个组织进行 RNA 提取，提取的 RNA 放于 - 80°C 冰箱保存备用。以荧光定量 PCR 检测不同组织中 GOX 在 RNA 水平的表达。反应体系为 10 μL，分别为 THUNDERBIRD SYBT® qPCR Mix 5 μL、正向引物 1 μL、反向引物 1 μL、DNA 模板 1.5 μL 和 ddH_2O 2.5 μL。PCR 反应采用两步法进行，具体步骤如下：95℃预变性 15 min，95℃变性 10 s，54℃退火 30 s，72℃延伸 20 s，40 个循环，最后以每 1 s 上升 1℃的速度从 54℃上升至 95℃记录溶解曲线。反应结束后确认扩增曲线和融解曲线，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行 PCR 相对定量分析，每个样品设置 3 次重复。数据用 DPS 软件进行统计分析，数值以平均值±标准差（SD）表示，显著性差异分析使用 Duncan's 多重比较法检验（P= 0.05）。柱形图由 Excel 生成。

1.7 不同浓度葡萄糖诱导表达模式分析

选取刚蜕皮的 4 龄苜蓿夜蛾幼虫 25 只，每 5 只一个培养盒，分为 5 组，将每组分别饲喂由 0.01%，0.1%，1%，10%葡萄糖溶液浸泡过的大豆叶以及清水浸泡的大豆叶（对照组），连续饲喂 3 日后提取 RNA。利用荧光定量 PCR 检测 RNA 表达变化。3 次生物学重复，具体的荧光定量 PCR 的方法及过程同 1.6。

2 结果与分析

2.1 cDNA 全长序列的获得及序列分析

利用 RT-PCR 和 RACE 扩增出苜蓿夜蛾 GOX 的部分 cDNA 序列，经拼接得到全长序列，根据拼接结果设计全长引物进行 PCR 扩增，一次性扩增得到全长序列。通过 NCBI Blast 比对分析为 GOX 基因的 cDNA 全长序列。GOX 基因 cDNA 全长序列及推导的氨基酸序列如图 1。

苜蓿夜蛾 GOX 的 cDNA 序列有 2 154 个碱基，开放阅读框含有 1 824 个碱基，5′端有包含 205 个碱基的非编码区，3′端有包含 125 个碱基的非编码区，编码 607 个氨基酸组成的多肽，分子量为 67.04 ku，多肽的等电点为 5.13，N 端有 42 个氨基酸组成的信号肽，在氨基酸位点 143-168 和 321-335 有两个氧化还原酶位点，是 GOX 标签位点。该序列命名为 *HvGOX*，GenBank 登录号为 KT907054（图 1）。

2.2 *HvGOX* 氨基酸序列相似性及系统进化树的分析

将 *HvGOX*（KT907054）翻译得到的氨基酸序列在 NCBI BLAST 上搜索比对，结果表明，*HvGOX* 与棉铃虫 *H. armigera* （ACC94296）和谷实夜蛾 *H. zea*（ACJ71598）相似性为 89%，与甜菜夜蛾 *S. exigua* (ADL38963) 相似性 76%。这 4 种昆虫也是目前夜蛾科昆虫中仅有的克隆出 GOX 基因的昆虫，对这 4 种昆虫的 GOX 的氨基

```
   1 GAAAATTGTAATAATTTTAGTCTTTCAAAGTAGCTTTAGTCTACTAAATCAAAATAAAAACTACACAATTTTCAGCATTAAATCATTTAA
  91 ACATCAGGAACTTAATAAATAAATAGCGAGTCAAAGAAAAATACCATCCAATTATTGTTTTTTTTTGTATAAATATTAGGTATACTGCAG
 181 CGGGTCTAATTAGGAAAATACCAAGATGATTCTGGCGCAACAGCAAGATTGCGGTTGCCCAACCGTAGTAGAAGGGCCGAGTATCCTGAA
                              M  I  L  A  Q  Q  Q  D  C  G  C  P  T  V  V  E  G  P  S  I  L  N
 271 CTCCACAGCATGCAGCGGCACCTATTTATTCATGGTACTCCTACAAGGATACCTCTGGGGACGCTGCGAGATCTCCACGCCTTGCAAGAG
      S  T  A  C  S  G  T  Y  L  F  M  V  L  L  Q  G  Y  L  W  G  R  C  E  I  S  T  P  C  K  R
 361 AATCGAGTCGATAGATGAAACGGAACCAGAATATGACTTCATAGTTGTGGGCGCTGGATCTGCAGGGTCTATTGTAGCTGGGAGACTTAG
      I  E  S  I  D  E  T  E  P  E  Y  D  F  I  V  V  G  A  G  S  A  G  S  I  V  A  G  R  L  S
 451 CGAAAATACTACGTACAATGTCCTTCTATTAGAAGCTGGTGGGCCTGAACCACTGGGTGCCCGCGTCCCATCATTTTACAAAACGTTTTG
      E  N  T  T  Y  N  V  L  L  L  E  A  G  G  P  E  P  L  G  A  R  V  P  S  F  Y  K  T  F  W
 541 GAGCCACGATGAGGTAGACTGGCAAGCGCGAGCGGTACCTGACCCCGGCTTCTGTCTTGATCAAGGAGAACTCGGCTGCCAATGGCCGCT
      S  H  D  E  V  D  W  Q  A  R  A  V  P  D  P  G  F  C  L  D  Q  G  E  L  G  C  Q  W  P  L
 631 AGGAAAAAGCTTAGGAGGAACCAGTCTCCTCAACGGTATGATGTACCACCGAGGCCACGCTGCCGACTTCGACACTTGGGTGGAAGAAGG
      G  K  S  L  G  G  T  S  L  L  N  G  M  M  Y  H  R  G  H  A  A  D  F  D  T  W  V  E  E  G
 721 TGCTGAAGGATGGTCCTGGGACGAGCTCCGACCATTCATGGACATGGCGGAAGGCAACAGACAAGTGGGAAGTCTTGTGGATGGGAAGCA
      A  E  G  W  S  W  D  E  L  R  P  F  M  D  M  A  E  G  N  R  Q  V  G  S  L  V  D  G  K  H
 811 CCACTCGGAAACTGGACGCATGCCAATCCAAACATTTAACTACCAGCCCCAGCAGGTATGGGATTTAATGGGAGCAATAAACCAGACGGG
      H  S  E  T  G  R  M  P  I  Q  T  F  N  Y  Q  P  Q  Q  V  W  D  L  M  G  A  I  N  Q  T  G
 901 ACTGCCGATCATTGCGGACATGAACGACCCGAACACACCCGACGGGTTTGTTGTGGCACAAACCTTTAATGACAATGGCCAGCGTTACAC
      L  P  I  I  A  D  M  N  D  P  N  T  P  D  G  F  V  V  A  Q  T  F  N  D  N  G  Q  R  Y  T
 991 CACAGCCCGTGCATACCTGGTTCCGAAATCCGAGCGACCCAACCTGAGCGTCAAACTCTATGCCCACGTTACTAAGGTCCTCTTCGATGG
      T  A  R  A  Y  L  V  P  K  S  E  R  P  N  L  S  V  K  L  Y  A  H  V  T  K  V  L  F  D  G
1081 GAAGAAAGCGGTGGGAGTGGAATATATTGACGCGAATGGCAATACGAAAACTGTCAAGACTACTAAAGAGGTAATCGTATCAGCAGGAGC
      K  K  A  V  G  V  E  Y  I  D  A  N  G  N  T  K  T  V  K  T  T  K  E  V  I  V  S  A  G  A
1171 GTTAACCAGTCCAAAAATTCTTATGCATTCTGGAGTGGGACCTAAAGAAGTCTTAGAACCATTGGGCATCCCTGTGGTAGCCGACCTGCC
      L  T  S  P  K  I  L  M  H  S  G  V  G  P  K  E  V  L  E  P  L  G  I  P  V  V  A  D  L  P
1261 CGTCGGCAAGGCCCTGAAGAACCATTGCGGAGCCACGCTGAACTTTCTGCTGAAGAACTACAACAATACCCAGGCTCTGAACTGGAATGC
      V  G  K  A  L  K  N  H  C  G  A  T  L  N  F  L  L  K  N  Y  N  N  T  Q  A  L  N  W  N  A
1351 ACTGACTAATTACTTGCTAAAACTGGACGGTCCTATGTCATCTACTGGGCTAACTCAACTCACTGGTCTCCTATACTCAAGCTACGCGGA
      L  T  N  Y  L  L  K  L  D  G  P  M  S  S  T  G  L  T  Q  L  T  G  L  L  Y  S  S  Y  A  D
1441 CAAGAGTCGCAAGCAGCCCGACCTACAGTTCTTCTTCAACGGCCTCTATGCTGACTGCTCCAAGACTGGTGTCATTGGCGAGCCTGCTGA
      K  S  R  K  Q  P  D  L  Q  F  F  F  N  G  L  Y  A  D  C  S  K  T  G  V  I  G  E  P  A  D
1531 CGACTGCAGCGATGGCTACAAAGTTTCAGCGAACGCCGTGGCCCTACTACCACGCAGCGTGGGCTACATGACCATAAACTCGACAGACCC
      D  C  S  D  G  Y  K  V  S  A  N  A  V  A  L  L  P  R  S  V  G  Y  M  T  I  N  S  T  D  P
1621 CATGAGGCCGGCGCAGTACTACCCCAACTTCTTCTCTCACCCCGAAGACATGAACATCGTGATGGAAGGCATTAATTACTTGCGCCAGAT
      M  R  P  A  Q  Y  Y  P  N  F  F  S  H  P  E  D  M  N  I  V  M  E  G  I  N  Y  L  R  Q  I
1711 CTTTGAAAGTCAGGTGCTACAAGAGAAATACAAAGTAGAACTAGACCCGGAGTACACGAAACAGTGTGACAACTTCGAAGCCTGGTCAAG
      F  E  S  Q  V  L  Q  E  K  Y  K  V  E  L  D  P  E  Y  T  K  Q  C  D  N  F  E  A  W  S  R
1801 AGACTGGCAGGAGTGTATGATTCGCCTACACACTGACCCACAGAACCATCAGCTTGCTACCAACGCTATTGGCAAGGTCATCGACCCACA
      D  W  Q  E  C  M  I  R  L  H  T  D  P  Q  N  H  Q  L  A  T  N  A  I  G  K  V  I  D  P  Q
1891 GCTTAGGGTTTACGGCGTCAAAAACTTGCGAGTAATAGACGCGAGTTCCATGCCCTCACAGCCGACTGGCAACCCTCAAGGCACCATCAT
      L  R  V  Y  G  V  K  N  L  R  V  I  D  A  S  S  M  P  S  Q  P  T  G  N  P  Q  G  T  I  M
1981 GGCCGTGGCGGAAAGAGGCGCACACTTCATCAAAGAGACTTGGCAATAAACACAACAATAGATATCCTACGCAATATTATCCTTGTTATT
      A  V  A  E  R  G  A  H  F  I  K  E  T  W  Q  *
2071 ATCAATTACGTACACAAAGTACGAGAATTATGTTCCTCTTATTCAGTGAATAAAATGACGAATATTCAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

图 1　苜蓿夜蛾 GOX 基因核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1　Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Heliothis viriplaca* GOX

起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA 加边框表示，信号肽用单下划线标出，
多聚腺苷酸信号 AATAAA 用双下划线标出，两个氧化还原酶位点用黑色的阴影区表示。
The initial codon ATG and termination codon TAA are boxed, the putative signal peptide sequence is single-underlined, a putative polyadenylation site (AATAAA) is double-underlined, putative two oxidoreductase sites are represented by black shaded area.

酸序列进行同源比对分析，结果见图 2。

因葡萄糖氧化酶和葡萄糖脱氢酶属于同一大家族，本研究把目前 GenBank 登录的棉铃虫 *H. armigera*、苜蓿夜蛾 *H. viriplaca*、谷实夜蛾 *H. zea*、甜菜夜蛾 *S. exigua* 等 11 种葡萄糖氧化酶和葡萄糖脱氢酶（Glucose dehydrogenase，GLD）进行系统进化树的构建，如图 3。结果表明 *HvGOX* 氨基酸与棉铃虫 *H. armigera*，谷实夜蛾 *H. zea*，甜菜夜蛾 *S. exigua* 关系密切，而与其他鳞翅目昆虫柑橘卷夜蛾 *Amyelois transitella*、家蚕 *Bombyx mori*、柑橘凤蝶 *Papilio xuthus*、玉带凤蝶 *Papilio polytes*、小菜蛾 *Plutella xylostella*、黑脉金斑蝶 *Danaus plexippus* 和金凤蝶 *Papilio machaon* 的 GLD 聚类。

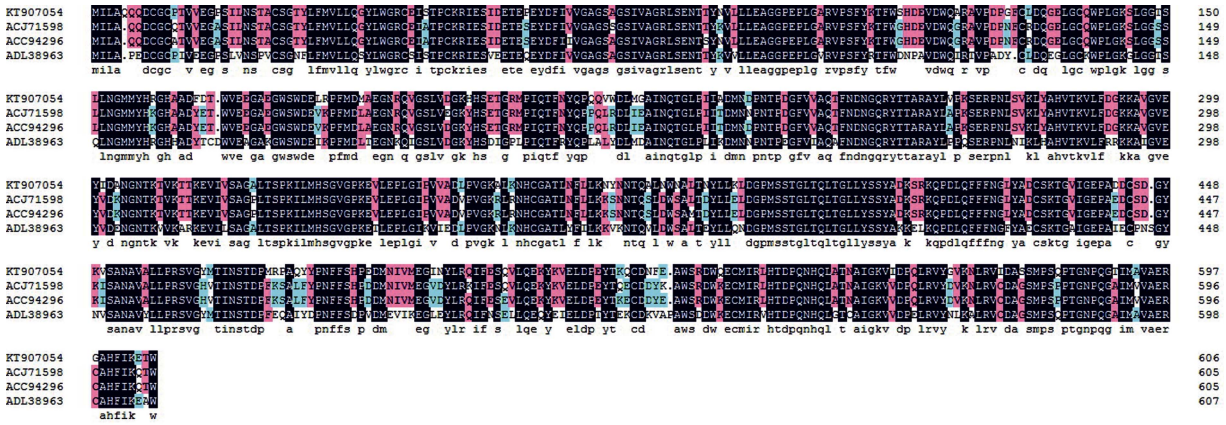

图 2 4 种昆虫 GOX 氨基酸序列的同源比对

Fig. 2 Homology alignment of four insect species GOX

深蓝色背景表示一致性为 100%，粉色背景表示一致性大于等于 75%，浅蓝色背景表示一致性大于等于 50%。4 种昆虫分别为谷实夜蛾 *Helicoverpa zea* (ACJ71598)；棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (ACC94296)；苜蓿夜蛾 *Heliothis viriplaca*（KT907054）；甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (ADL38963)。

The dark blue shade indicates 100% identity, the pink shade indicates ⩾75% identity, while the light blue shade indicates ⩾50% identity. Four insect species are *Helicoverpa zea* (ACJ71598), *Helicoverpa armigera* (ACC94296), *Heliothis viriplaca* (KT907054) and *Spodoptera exigua* (ADL38963).

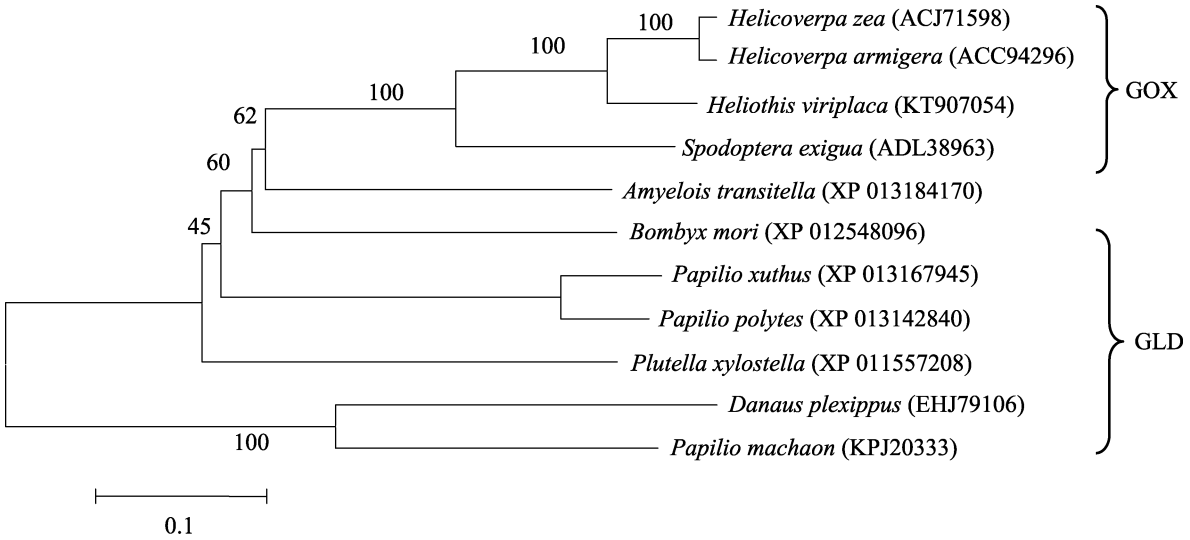

图 3 苜蓿夜蛾 GOX 与其他鳞翅目昆虫 GOX 及 GLD 氨基酸序列的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of GOX and GLD from *Heliothis viriplaca* and other lepidopteran insects

分枝上数字代表自展值；标尺示遗传距离；拉丁文名字后为登录号。构建系统进化树的 11 种鳞翅目昆虫分别为：谷实夜蛾 *Helicoverpa zea* (ACJ71598)；棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (ACC94296)；苜蓿夜蛾 *Heliothis viriplaca*（KT907054）；甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (ADL38963)；柑橘卷夜蛾 *Amyelois transitella* (XP 013184170)；家蚕 *Bombyx mori* (XP 012548096)；柑橘凤蝶 *Papilio xuthus* (XP 013167945)；玉带凤蝶 *Papilio polytes* (XP 013142840)；小菜蛾 *Plutella xylostella* (XP 011557208)；黑脉金斑蝶 *Danaus plexippus* (EHJ79106)；金凤蝶 *Papilio machaon* (KPJ20333)。

Numbers above branches are bootstrap values, the scale bar represents 0.1% nucleotide substitutions per site, and the GenBank accession numbers are behind the Latin names. The species of lepidopteran insects are *Helicoverpa zea* (ACJ71598), *Helicoverpa armigera* (ACC94296), *Heliothis viriplaca* (KT907054), *Spodoptera exigua* (ADL38963), *Amyelois transitella* (XP 013184170), *Bombyx mori* (XP 012548096), *Papilio xuthus* (XP 013167945), *Papilio polytes* (XP 013142840), *Plutella xylostella* (XP 011557208), *Danaus plexippus* (EHJ79106) and *Papilio machaon* (KPJ20333).

2.3　重组蛋白的表达及活性测定结果

将重组的质粒 GOX-pET21b 转入 BL21 菌体内表达后，进行 SDS-PAGE 电泳检测，电泳结果见图 4，诱导表达的分子量约为 67.04 ku，与预期的结果相一致，基本可以确定该诱导的蛋白为苜蓿夜蛾的 GOX 蛋白。

将重组蛋白变性处理后，利用 Ni-NTA 亲和层析柱纯化，获得较高纯度的重组蛋白。如图 4。

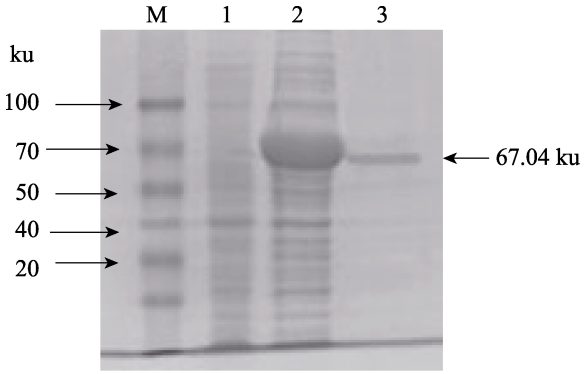

图 4　融合蛋白表达的 GOX SDS-PAGE 结果
Fig. 4　Result of SDS-PAGE of GOX recombinant protein

M：蛋白分子量标准；1：pET21b 空载体诱导产物；2：GOX-pET21b 的诱导产物；3：纯化的重组蛋白。
M: Protein molecular weight marker; 1: Expression product of pET21b; 2: Expression product of GOX-pET21b; 3: Purified GOX recombinant protein.

将变性、纯化又复性的重组蛋白与购买的商品化的葡萄糖氧化酶分别进行活性测定，每组测定重复 3 次。结果如下：重组蛋白酶活力为 0.15 U/mL；商品 GOX 酶活力为 2.36 U/mL。结果表明，在蛋白浓度相同的情况下经原核表达出的葡萄糖氧化酶的活性较商品化的葡萄糖氧化酶的活性低 16 倍。

2.4　*HvGOX* 在虫体不同组织中表达结果

在苜蓿夜蛾的前肠、中肠、后肠、马氏管、唾腺、脂肪体中都有 GOX 基因在转录水平的表达，且在唾腺内的表达量最高，前肠表达量最低，如图 5 所示。由图 5 可知中肠、后肠、马氏管、脂肪体、唾腺中 GOX 的表达量分别是前肠的 1.5 倍，4 倍，8.5 倍，6.1 倍和 59.2 倍。唾腺内 GOX 与前肠、中肠、后肠、马氏管和脂肪体内 GOX 表达差异显著，而前肠、中肠、后肠、马氏管和脂肪体之间 GOX 表达差异不显著。

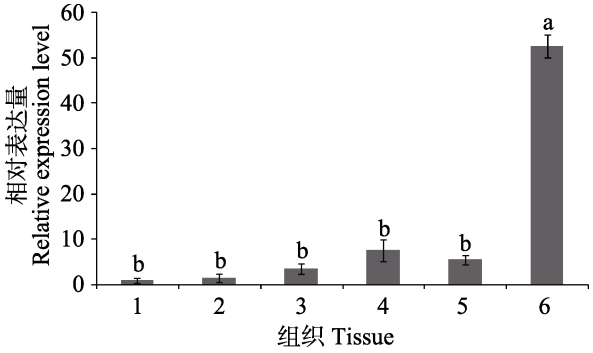

图 5　苜蓿夜蛾不同组织中 GOX 的表达量 Real-time PCR 分析
Fig. 5　Relative expression level of the GOX mRNA in *Heliothis viriplaca* in different tissues

1：前肠；2：中肠；3：后肠；4：马氏管；5：脂肪体；6：唾腺。柱上标有不同字母表示基因表达量 0.05 水平上差异显著（Duncan's 多重比较法检验）。下图同。
1: Foregut; 2: Midgut; 3: Hindgut; 4: Malpighiau tubule; 5: Fat; 6: Salivary gland. Histograms with different letters indicate significant difference in gene expression at the 0.05 level by Duncan's multiple-range test. The same below.

2.5　*HvGOX* 对不同浓度葡萄糖诱导的表达模式分析

用 0.01%、0.1%、1%、10%的葡萄糖溶液饲喂后，均对 GOX 的表达量起到诱导作用，10%浓度时诱导表达量达到最高。10%的葡萄糖溶液诱导的 GOX 的表达量与 0.01%、0.1%、1%差异显著，而 0.01%、0.1%、1% 3 个浓度的葡萄糖溶液诱导 GOX 的表达量差异不显著（图 6）。

3　讨论

葡萄糖氧化酶（GOX）是一种需氧脱氢酶，其全称为 β-D-吡喃葡萄糖需氧脱氢酶，对于 α-D-葡萄糖和 β-D-葡萄糖它能专一性的选择后者（杨振海和蔡辉益，2003）。葡萄糖氧化酶氧化葡萄糖的机制存在于绝大部分的生物体内（宁正祥，1998）。无论是动物、植物还是微生物体内的各个代谢通路中该酶都起到重要的作用。有研究表明，由于葡萄糖氧化酶具有很强的催化氧化-还原反应的作用，可以在一定程度上加速毒性成分的分解，降低动物霉菌毒素中毒反应（肖志明等，

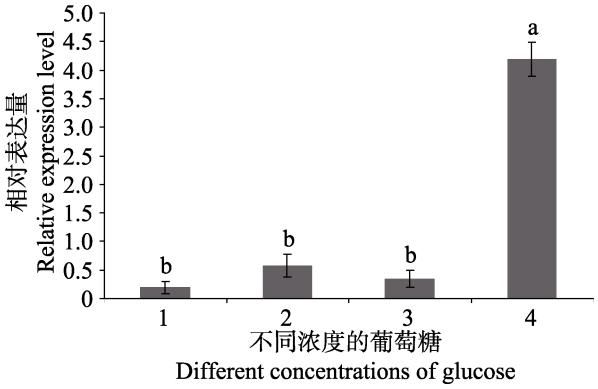

图 6 苜蓿夜蛾 GOX 在不同浓度葡萄糖诱导下的表达量 Real-time PCR 分析

Fig. 6 Relative expression levels of *HvGOX* mRNA at different concentration of glucose induction

1：0.01%浓度的葡萄糖；2：0.1%浓度的葡萄糖溶液；3：L1%浓度的葡萄糖溶液；4：10%浓度的葡萄糖溶液。

1: Glucose concentration of 0.01%; 2: Glucose concentration of 0.1%; 3: Glucose concentration of 1%; 4: Glucose concentration of 10%.

2014）。此外 GOX 具有一定的抑菌作用，能阻止好氧菌生长繁殖，产生过氧化氢起到杀菌作用（刘超等，2010），在植物的直接防御和间接防御中均起着非常重要的作用（Bede *et al.*，2006）。

本研究应用 RT-PCR 和 RACE 技术首次克隆了苜蓿夜蛾葡萄糖氧化酶基因的全长 cDNA 序列。序列比对和功能域分析表明本研究获得的是一个新的葡萄糖氧化酶基因。系统进化树可以看出，苜蓿夜蛾葡萄糖氧化酶与同为鳞翅目的谷实夜蛾和棉铃虫的葡萄糖氧化酶首先聚类，亲缘关系最近，其次与甜菜夜蛾葡萄糖氧化酶聚类，亲缘关系较近，再与其他同为鳞翅目的昆虫的葡萄糖脱氢酶聚类，但亲缘关系相对较远，以上分析表明，本研究的葡萄糖氧化酶与其他昆虫的葡萄糖氧化酶和葡萄糖脱氢酶为同一大家族。

本试验中 GOX 在苜蓿夜蛾不同的组织中均有特异性表达，但在唾腺中的表达量明显高于其他组织。这与从美洲棉铃虫中获得的试验结果相吻合，其下唇腺的 GOX 活性最高（Eichenseer *et al.*，1999）。

本试验中采用不同浓度的葡萄糖溶液喂食苜蓿夜蛾幼虫，均能诱导 GOX 的表达。与 Hu 等（2008）用浸泡 1%蔗糖和 1%葡萄糖的烟草叶片喂食棉铃虫，其下唇腺的 GOX 的活性显著高于正常烟草叶片喂食的试验结果相吻合。

本试验在原核表达系统大肠杆菌表达系统中进行重组蛋白的表达，但经活性测定后发现，重组蛋白的活性较商品化的葡萄糖氧化酶的活性低很多，而有研究表明丝状真菌表达系统在表达真核生物基因有着独特的优点，是因为丝状真菌具有很强的分泌蛋白的能力，可以对表达的真核蛋白进行正确的翻译后加工与修饰，且与高等真核生物相类似（周庆欣，2007）。因此本研究获得的葡萄糖氧化酶在真核系统的表达还有待下一步研究。

本研究从苜蓿夜蛾中克隆获得了一条新的 GOX 基因，其生物学功能和在苜蓿夜蛾防治中具有的潜力有待于进一步研究。

参考文献 (References)

Baldwin IT, 1999. Inducible nicotine production in native *Nicotiana* as an example of adaptive phenotypic plasticity. *J. Chem. Ecol.*, 25(1): 3–30.

Bede JC, Musser RO, Felton GW, Korth KL, 2006. Caterpillar herbivory and salivary enzymes decrease transcript levels of *Medicago truncatula* genes encoding early enzymes in terpenoid biosynthesis. *Plant Mol. Biol.*, 60(4): 519–531.

Eichenseer H, Mathews MC, Bi JL, Murphy JB, Felton GW, 1999. Salivary glucose oxidase: multifunctional roles for *Helicoverpa zea? Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 42(1): 99–109.

Hu YH, Leung DWM, Kang L, Wang CZ, 2008. Diet factors responsible for the change of the glucose oxidase activity in labial salivary glands of *Helicoverpa armigera*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 68(2): 113–121.

Hu YH, Wang SZ, 2009. Insects glucose oxidase and their functions. *Chinese Bulletin of Entomology*, 46(3): 337–343. [胡永红, 王琛柱, 2009. 昆虫葡萄糖氧化酶及其功能. 昆虫知识, 46(3): 337–343.]

Liu C, Yuan JG, Wang YX, Li F, Gao YH, Han X, 2010. Progress glucose oxidase. *Food and Drug*, 12(7): 285–288. [刘超, 袁建国, 王元秀, 李峰, 高艳华, 韩省, 2010. 葡萄糖氧化酶的研究进展. 食品与药物, 12(7): 285–288.]

Merkx JM, Bede JC, 2004. Caterpillar salivary enzymes: “eliciting” a response. *Phytoprotection*, 85(1): 33–37.

Merkx JM, Bede JC, 2005. Influence of diet on the larval beet armyworm, *Spodoptera exigua*, glucose oxidase activity. *J. Insect Sci.*, 5(1): 133–145.

Musser RO, Hum-Musser SM, Eichensser H, Peiffer M, Ervin G, Murphy JB, Felton GW, 2002. Caterpillar saliva beats plant

defences. *Nature*, 416(11): 599–600.

Musser RO, Kwon HS, Williams SA, White CJ, Romano M, Holt SM, 2005. Evidence that caterpillar labial saliva suppresses infectivity of potential bacterial pathogens. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 58(2): 138–144.

Mu W, Wu KM, Liang GM, Zhang WJ, 2002. Study on artificial rearing technigue for *Heliothis virplaca*. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 4(1): 93–96. [慕卫, 吴孔明, 梁革梅, 张文吉, 2002. 苜蓿夜蛾人工饲料技术. 农药学报, 4(1): 93–96]

Mu W, Liu F, Zhao D, Wu KM, 2004. The toxicities of 14 kinds of insecticides to *Heliothis virplaca*. *Acta Phytophylacica Sinica*, 31(3): 333–334. [慕卫, 刘峰, 赵德, 吴孔明, 2004. 14 种杀虫剂对苜蓿夜蛾的毒力比较. 植物保护学报, 31(3): 333–334.]

Ning ZX, 1998. Food Ingredients Analysis Handbook. Beijing: China Light Industry Press. 748–749. [宁正祥, 1998. 食品成分分析手册. 北京: 中国轻工业出版社. 748–749.]

Ohashi K, Natori S, Kubo T, 1999. Expression of amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age dependent role change of the worker honeybee (*Apis mellifera*) . *Eur. J. Biochem.*, 265(1): 127–133.

Ramzan IM, Mehmood T, 2009. Enhanced production of glucose oxidase from UV-mutant of *Aspergillus niger*. *Afr. J. Biotechnol.*, 8(2): 288–290.

Tang QB, Hu YH, Kang L, Chen ZW, 2012. Characterization of glucose-induced glucose oxidase gene and protein expression in *Helicoverpa armigera* larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 79(2): 104–119.

Xiao ZM, Fan X, Ma DX, 2014. Advances in application and testing glucose oxidase method. *Chinese Journal of Animal Science*, 50(18): 76–81. [肖志明, 樊霞, 马东霞, 2014. 葡萄糖氧化酶的应用和检测方法研究进展. 中国畜牧杂志, 50(18): 76–81.]

Yang ZH, Cai HY, 2003. Feed Additive Safety Use. Beijing: China Agriculture Press. 137–138.[杨振海, 蔡辉益, 2003. 饲料添加剂安全使用规范. 北京: 中国农业出版社. 137–138.]

Zhou QX, 2007. Filamentous fungi establish genetic transformation system. Master dissertation. Taian: Shandong Agricultural University. [周庆欣, 2007. 丝状真菌遗传转化体系的建立. 硕士学位论文. 泰安: 山东农业大学.]

Zong N, Wang CZ, 2004. Induction of nicotine in tobacco by herbivory and its relation to glucose oxidase activity in the labial gland of three noctuid caterpillars. *Chin. Sci. Bull.*, 49(15): 1596–1601.

****

封面介绍

枸杞瘿螨 *Aceri macrodonis* Keifer 虫瘿及若螨

枸杞瘿螨隶属于蜱螨目（Acarina）瘿螨科（Eriophyidae），是危害枸杞的重要害虫，主要取食叶片、花蕾等，在叶面形成虫瘿、造成落叶或不能正常开花结果，严重影响树木生长和枸杞产量。枸杞瘿螨在我国宁夏、内蒙古、甘肃、青海、新疆、陕西、山西等地均有分布，以成螨在树皮缝和芽缝内越冬，春季出蛰后钻入叶片内取食、形成虫瘿并在其中产卵；若螨在虫瘿内危害，虫瘿从初期的绿色逐渐变为褐色或黑痣状，影响叶片光合作用。

（张润志　中国科学院动物研究所）