应用昆虫学报 *Chinese Journal of Applied Entomology* 2016, 53(4): 706–715. DOI: 10.7679/j.issn.2095–1353.2016.088

苜蓿夜蛾丝氨酸蛋白酶基因 cDNA 序列的克隆与原核表达研究*

李莉莉** 周晓群 赵奎军 雷 蕾 樊 东***

（东北农业大学农学院，哈尔滨 150030）

摘 要 **【目的】** 丝氨酸蛋白酶（Serine protease, SP）是以丝氨酸为活性中心的重要的蛋白水解酶。在昆虫中，丝氨酸蛋白酶参与消化、发育、先天免疫反应和组织重建等重要的生理过程。本试验以苜蓿夜蛾 *Heliothis viriplaca* 为材料，克隆其丝氨酸蛋白酶基因的 cDNA 序列，再对该基因进行原核表达并对表达产物进行活性测定研究。**【方法】** 从苜蓿夜蛾中肠中提取总 RNA，通过 RT-PCR 和 RACE 技术，扩增获得丝氨酸蛋白酶基因 cDNA 全长序列，用大肠杆菌 *E. coli* 表达系统进行表达；再对表达的重组蛋白进行变性、纯化与复性，并以 BTEE 为底物进行活性测定。**【结果】** 克隆得到的苜蓿夜蛾中肠丝氨酸蛋白酶基因命名为 *HvSP*，该基因已登录 GenBank，登录号为 KT907053。该基因全长 1 017 bp，开放阅读框为 886 bp，编码 295 个氨基酸，分子量约为 30.8 ku，等电点为 8.27，推导的氨基酸序列与其他昆虫丝氨酸蛋白酶氨基酸序列相似性在 46%～92%之间。在 Tris-HCl 缓冲液中，pH 为 8.5 时，复性的重组蛋白活性最高，为 28.7 U/mL。荧光定量 PCR 结果表明，*HvSP* 基因的 mRNA 在苜蓿夜蛾的多个组织中特异性表达，且在中肠中表达量最高，但在唾腺中未检测到 *HvSP* 的 mRNA 表达。**【结论】** 该研究克隆了一个新的苜蓿夜蛾丝氨酸蛋白酶基因的 cDNA 序列，且原核表达后的重组蛋白经过变性、纯化及复性后具有活性，为进一步探索丝氨酸蛋白酶在昆虫体内的生理生化功能奠定了基础。

关键词 苜蓿夜蛾，丝氨酸蛋白酶，克隆，原核表达，酶活性

cDNA cloning and prokaryotic expression of a serine protease from *Heliothis viriplaca*

LI Li-Li** ZHOU Xiao-Qun ZHAO Kui-Jun LEI Lei FAN Dong***

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

Abstract **[Objectives]** Serine protease (SP) is an important proteolytic enzymes, in which serine is an active center. In insects, serine protease is involved in several important physiological processes, such as digestion, growth, the innate immune response and tissue reconstruction. A full-length cDNA sequence of serine protease was obtained from *Heliothis viriplaca* and its deduced amino acid sequence expressed in an *E. coli* prokaryotic expression system. Enzyme activity was determined after purification and renaturation. **[Methods]** Total midgut RNA was isolated from *H. viriplaca* and one serine protease cDNA sequence was cloned by RT-PCR and RACE to obtain the full-length cDNA sequence. The cDNA sequence was expressed in an *E. coli* expression system and the expressed fusion protein was denatured, purified and renatured. The activity of the recombinant protein was determined with BTEE as the substrate. **[Results]** The serine protease cDNA sequence from *H. viriplaca* was named *HvSP*, which was deposited in GenBank with the accession number KT907053. The sequence length was 1 017 bp which included an open reading frame of 886 bp, encoding 295 amino acids. The molecular weight was about 30.8 ku, and the isoelectric point was 8.27. The similarity of the *HvSP* protein with that of other lepidopteran insects was 46%-92%. The activity of the recombinant protein was 28.7 U/mL at a pH of 8.5 in Tris-HCl buffer solution. The results of quantitative

*资助项目 Supported projects：国家现代农业产业技术体系建设专项基金 CARS-04

**第一作者 First author，E-mail：leelily201@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

PCR showed that *HvSP* was expressed at the mRNA level in multiple tissues, especially in the midgut, but not in the salivary gland. **[Conclusion]** A new *H. viriplaca* serine protease cDNA sequence was obtained. The recombinant protein expressed in *E. coli* was active after denaturation, purification and renaturation. These results establish the basic physiological and biochemical functions of serine protease in *H. viriplaca*.

Key words *Heliothis viriplaca*, serine protease, cloning, prokaryotic expression, enzyme activity

丝氨酸蛋白酶（Serine protease, SP）超家族是一类在 C 端具有特异性保守催化三联体（His、Asp、Ser）结构域的蛋白水解酶，广泛存在于生物有机体中（Ross *et al.*，2003）。该家族成员在食物消化、细胞凋亡与分化、组织重构、受精生殖、胚胎发育、免疫防御等过程中都扮演着很重要的角色（Anisuzzaman *et al.*，2012）。在昆虫中，丝氨酸蛋白酶是大多数昆虫消化系统内重要的消化酶，可以对昆虫取食的食物中的蛋白质类营养物质进行消化降解（Chen *et al.*，2013；Lomate *et al.*，2014），种类主要包括胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶以及弹性蛋白酶等（Colebatch *et al.*，2002）。研究表明，绿盲蝽 *Apolygus lucorum* 的丝氨酸蛋白酶 AlSP3、AlSP4 是重要的消化酶（孙洋等，2012a，2012b），华北大黑鳃金龟 *Holotrichia oblita* 的丝氨酸蛋白酶 HoSP1、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 的丝氨酸蛋白酶 Ha-TLP 及桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 的丝氨酸蛋白酶 BdorSer 在消化系统中均发挥重要作用（Sui *et al.*，2009；胡黎明等，2012；刘海明等，2012）。蜜蜂 *Apis mellifera* 的丝氨酸蛋白酶 Csph41 及黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的丝氨酸蛋白酶则参与了胚胎神经组织的发育过程（Zou *et al.*，2006）。家蚕 *Bombyx mori* 和亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 的丝氨酸蛋白酶 BmHP14、BmHP21 与 SP1、SP13 已被证实是前酚氧化酶原级联反应信号通路及黑化反应中的关键酶（刘碧朗等，2011；李玉欣等，2012；Chu *et al.*，2015），当家蚕受到核型多角体病毒侵染后，蚕体内的丝氨酸蛋白酶表达量明显上调（崔颖俊等，2012），说明丝氨酸蛋白酶在昆虫的免疫防御方面也发挥重要作用。另有研究表明，昆虫卵或蛹壳的黑化、表皮硬化、创伤愈合、侵入病原体的包裹等重要生理过程，也是由丝氨酸蛋白酶的级联反应来完成的（Park *et al.*，2000；杨松和黄复生，2003）。

我国是大豆的重要种植区，大豆的病虫害在很大程度上影响着大豆的产量与品质。在大豆生产过程中，主要害虫有大豆食心虫、苜蓿夜蛾、豆荚螟、大豆根潜蝇、大豆蚜虫等。苜蓿夜蛾是大豆上重要的食叶害虫，有时局部发生严重。

苜蓿夜蛾 *Heliothis viriplaca* 属鳞翅目，夜蛾科害虫，其寄主主要有大豆、苜蓿、亚麻、棉花、花生等多种农作物和牧草。苜蓿夜蛾幼虫取食植物叶片，老熟幼虫还可蛀荚蛀果，造成严重的植株光杆、减产和产品品质下降。近年间歇性爆发成灾，已成为主要的大豆害虫之一。

目前，为预防和控制苜蓿夜蛾主要还是通过化学农药来实现。为寻求一种新的生物防治方法，本研究采用 RT-PCR 和 RACE 技术，克隆获得苜蓿夜蛾丝氨酸蛋白酶基因 cDNA 序列，由于克隆基因表达出所编码的蛋白质可供作结构与功能的研究，在其基础上利用 *E. coli* 表达系统进行原核表达，测定重组蛋白的酶活性，探索和研究基因的功能以及基因表达调控的机理，如酶活性分析、结构分析以及结合研究等，由于体内很难分析单个蛋白质的作用，我们进行表达和纯化是为了在体外进行研究。还通过荧光定量 PCR 技术对其在苜蓿夜蛾不同组织的相对表达量进行分析，为丝氨酸蛋白酶的功能研究和利用分子生物学手段防治该害虫奠定基础，为开拓苜蓿夜蛾的防控新手段提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　供试虫源

东北农业大学香坊试验基地的黑光灯下诱集苜蓿夜蛾成虫，在实验室以 5%蜂蜜水饲养，让

其产卵；幼虫孵化后，移至实验室的培养箱内用新鲜大豆叶饲养至不同龄期备用，培养箱设定的温度为（26±1）℃，相对湿度为 70%，光照周期为 14L∶10D。

1.2 主要试剂

Invitrogen 公司的 TRIzol®Reagent；Promega 公司的反转录酶 M-MLV Reverse Transcriptase、RNA 酶抑制剂、低熔点琼脂糖；TaKaRa 公司的 DL2000 DNA Marker、质粒提取试剂盒、Taq DNA 聚合酶和限制性内切酶 *EcoR*Ⅰ、*Hin*dⅢ；Omega 公司的 DNA 纯化试剂盒；北京全式金生物有限公司的 pEasy-T1 克隆载体、*Trans*1-T1 感受态细胞、蛋白 marker、dNTP 和 Ni-NTA 亲和层析柱；本实验室保存的大肠杆菌菌株 *E. coli* DH5α、BL21 和 pET21b 质粒，其余试剂为进口或国产分析纯。

1.3 丝氨酸蛋白酶基因的克隆

1.3.1 总 RNA 的提取与第一链 cDNA 的合成 苜蓿夜蛾幼虫中肠总 RNA 的提取采用 Trizol 提取法。选取健康的苜蓿夜蛾 5 龄幼虫，在 RNA 保存液中迅速解剖得到中肠组织，每 100 mg 中肠加入 1 mL TRIzol®Reagent 对组织进行裂解，提取过程中的关键是防止 RNase 对 RNA 的降解，因此我们要对提取的中肠总 RNA 纯度和质量进行检测，通常采取的方法是用紫外分光光度计测 OD260/OD280 或用琼脂糖凝胶电泳鉴定，最终得到的总 RNA 放入－80℃冰箱中保存。以 Oligo(dt)3site-Ro-Ri primer：5'-ATG GAT GGT CGA CGC ATG CGG ATC CAA AGC TTG AAT TCG AGC TC(T)$_{17}$-3'（表 1）为引物，反转录酶 M-MLV Reverse Transcriptase 和所提取的总 RNA 为底物合成 cDNA，cDNA 保存于－20℃冰箱备用。

表 1 本实验所用引物序列列表
Table 1 List of the primer sequences in the experiment

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'–3')	引物用途 Use of primers
Oligo(dt)3site-Ro-Ri	ATCGATGGTCGACGCATGCGGATCCAAAGCTTGAATTCGAGCTC(T)$_{17}$	合成第一链 cDNA synthesis of 1st strand cDNA
Ro	ATCGATGGTCGACGCATGCGGATCC	cDNA 的克隆 Cloning of cDNA
Ri	GGATCCAAAGCTTGAATTCGAGCTCT	
HvSP-F	ATGAAGTTCTTGGCTGTGACTCTATTGGCTC	
HvSP-R	AGAGACGTTGGTTGATCCAGCTGATGTAAGA	
HvSP3'Ro	ATCACGAACGCGGTGTGCAGATCT	
HvSP3' Ri	AAGACTCCAACATTTGCACGAGC	
HvSP5'Ro	TTCAGCCTCATGGACACCAATCT	
HvSP5' Ri	TCCCTGTCTGCCTGCTCTTCAGCTA	
HvSP-QF	ATCGATCTAGAAGACATCACCGC	
HvSP-QR	AAGGAAGTGATACCGATCAAGATAGC	
HvSP(BD)-F	CCGGAATTCAAGGAACATCGACCTCGAGGATGTGA	大肠杆菌表达 Expression in *Escherich coli*
HvSP(BD)-R	CCCAAGCTTAAGGCGTTGGTTGATCCAGCTGAT	
HvSP(YG)-F	AACCCGAGCCTTATCCG	荧光定量 PCR qRT-PCR
HvSP(YG)-R	CCGTCAACATTTCCACCAT	
ß-actin-F	CCAACGGCATCCACGAGACCA	
ß-actin-R	TCGGCGATACCAGGGTACAT	

1.3.2　利用 RACE 克隆基因的 3′cDNA 序列和 5′cDNA 序列　比较棉铃虫（Y12280）和烟蚜夜蛾（EF531626）2 种昆虫丝氨酸蛋白酶基因的 cDNA 序列，设计 1 对克隆苜蓿夜蛾丝氨酸蛋白酶基因的引物 HvSP-F 和 HvSP-R（表 1）。并以合成的 cDNA 为模板扩增苜蓿夜蛾丝氨酸蛋白酶 cDNA 序列的特异片段。PCR 反应程序：94℃预变性 5 min；94℃ 30 s，52℃ 30 s，72℃ 30 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，然后对 PCR 产物进行回收，与 pEasy-T1 载体连接，连接产物转化 *E. coli* DH5α，菌落在含有氨苄的抗性 LB 固体平板上进行筛选，对阳性菌株进行酶切，并且通过 PCR 鉴定进一步确认，将最后得到正确的重组质粒交由博士生物公司测序。

根据所获得的基因片段，设计引物 HvSP3′Ro 和 HvSP3′Ri（表 1），用 HvSP3′Ro 与引物 Ro 进行 Outer PCR，电泳检测后再用 HvSP3′Ri 和 Ri 对 Outer PCR 产物进行扩增，然后进行 3′RACE 产物电泳检测、回收、连接、测序，方法与克隆保守区方法一样。

利用 TaKaRa5′-Full RACE Kit 试剂盒中的 5′-RACE Outer Primer 与自己设计的引物 HvSP-5′Ro（表 1）进行第一轮扩增，然后以首轮扩增产物为模板，用 5′-RACE Inner Primer 和 HvSP-5′Ri（表 1）引物进行第二轮扩增，扩增完成后进行电泳检测，检测结果正确后用胶回收试剂盒进行回收，回收产物与 pEasy-T1 载体连接，测序，测序由博士生物完成。

利用已克隆获得的基因片段进行拼接，根据拼接结果设计全长 cDNA 序列的引物 HvSP-QF 和 HvSP-QR（表 1），一次性克隆全长序列。BLAST 比对分析克隆的全长基因序列与已知的丝氨酸蛋白酶基因序列，来确定获得的丝氨酸蛋白酶基因的正确性，并确定 ORF 的存在。

1.4　序列分析

对所得到的 cDNA 序列用 BioXM2.6 软件进行翻译；使用 ExPASy 蛋白网站中（http://www.expasy.org/tools/）的 Compute pI/Mw 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、Prosite 软件进行蛋白质功能位点和结构域的分析；同源性比较采用 NCBI 网站中（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/）的 BLAST 工具；系统进化树的构建使用 ClustalX 和 MEGA4.1 软件，采用邻位相连法（Neighbor-Joining）构建系统进化树。

1.5　丝氨酸蛋白酶基因在苜蓿夜蛾不同组织中的特异性表达

选取健康的苜蓿夜蛾 5 龄幼虫，在 RNA 保存液中将其解剖，取得前肠、中肠、后肠、马氏管、唾腺、脂肪体 6 个不同组织，用 Trizol 提取法提取这 6 个组织的 RNA，3 次生物学重复。得到的 RNA 鉴定其纯度后，立即反转录成 cDNA，－20℃保存备用。

采用特异性引物 HvSP（YG）-F 和 HvSP（YG）-R（表 1）进行荧光定量 PCR，正向引物大小为 17 bp，反向引物大小为 19 bp，扩增片段大小为 179 bp，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。选择 20 μL 反应体系：1 μL cDNA，1 μL HvSP(YG)-F 上游引物，1 μL HvSP(YG)-R 下游引物，10 μL THUNDERBIRD SYBR® qPCR Mix 和 7 μL ddH20。采用 3 步法进行 PCR：94℃预变性 3 min；94℃ 30 s，60℃ 30 s，72℃ 30 s，40 个循环。每个样品重复 3 次，反应结束后得到 CT 值，采用 $2^{-\Delta\Delta T}$ 法进行数据分析（Livak and Schmittgen，2001）。

1.6　丝氨酸蛋白酶基因的原核表达、纯化及活性测定

1.6.1　表达载体 pET21b-*HvSP* 的构建　以获得的苜蓿夜蛾 cDNA 为模板，利用设计的引物 HvSP（BD）-F 和 HvSP（BD）-R（表 1）进行扩增，PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测并回收扩增片段，用 *Hin*dⅢ和 *Eco*RⅠ两种限制性内切酶回收目的片段以及 pET21b 质粒作为载体，16℃连接过夜，构建重组表达载体 pET21b-*HvSP*，转化到大肠杆菌 *E. coli* DH5α 菌株，在 LB 抗性平板（含 100 μg/mL amp）上筛选重组

子，提取质粒 DNA，进行 *Hin*dⅢ/*Eco*RⅠ单酶切、双酶切鉴定分析。

1.6.2 重组蛋白在原核细胞中的表达与纯化 挑选插入正确的重组质粒转入大肠杆菌 BL21 菌株中，然后接种于含有 100 μg/mL amp 的 LB 液体培养基中，37℃ 220 r/min 振荡培养，培养至 A_{600nm} 达到 0.4～0.6 后，加 ITPG 至终浓度为 1 mmol/L，37℃ 220 r/min 诱导培养 6 h，离心收集菌液，进行 SDS-PAGE，检测蛋白的表达。

将重组蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳后转印 PVDF 膜，用 TBS 杂交膜清洗液进行洗涤，洗涤完成后以配制好的封闭液室温下进行孵育，将膜从封闭液中取出，侵入蒸馏水中，在水平摇床上进行漂洗。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，于摇床上以适当转速室温下孵育 40 min 左右，入蒸馏水中漂洗 30 s，再入洗涤液漂洗 3 min，充分洗涤后用 DAB 显色，拍照，留存，鉴定表达产物。

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 Proteinlso™ Ni-NTA Resin 蛋白纯化产品说明书进行纯化。利用梯度透析法对纯化后的蛋白进行复性，对复性后的重组蛋白进行 SDS-PAGE 鉴定。

1.6.3 重组蛋白的活性测定 活性测定参照王琛柱和钦俊德（1996）的方法。酶活性在 pH 7~9 下测定，设 3 次重复。将底物 N-苯甲酰-L-酪氨酸乙酯（BTEE）以 1 mol/L 浓度溶于含 10%（V/V）甲醇的 0.15 mol/L 的 NaCl 溶液中，取该液 0.5 mL 加入含复性蛋白的 0.1 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液中（pH 8.0），对照组中加入 0.5 mL 缓冲液，反应 15 min，然后以对照组调零，256 nm 下测定吸光值。丝氨酸蛋白酶活力单位定义（底物 BTEE）：在本试验条件下，以 BTEE 为底物，每分钟使 ΔA_{256nm} 增加 0.001 所需的酶量定义为 1 个酶活力单位。计算公式为：

$$\text{酶活力单位（U / mL）} = \frac{\Delta A_{256\,nm} / \min}{0.001 \times \text{酶液加入体积（mL）}} \times \text{稀释倍数。}$$

2 结果与分析

2.1 *HvSP* 基因 cDNA 序列和氨基酸序列分析

利用 RT-PCR 和 RACE 技术获得了一个新的苜蓿夜蛾丝氨酸蛋白酶基因的 cDNA 序列，命名为 *HvSP*（GenBank 登录号：KT907053）。该基因长 1 017 bp，开放阅读框为 886 bp，编码 295 个氨基酸，含有 34 bp 和 95 bp 的 5'和 3'非编码区，N 端含有 17 个氨基酸组成的信号肽（图 1）。由 *HvSP* 基因推导的蛋白质分子量为 30.8 ku，等电点为 8.27。通过对结构域的分析，*HvSP* 基因翻译后的氨基酸序列具有明显的丝氨酸蛋白酶的特征，即氨基酸序列中具有保守的活性催化中心，而且含有 3 对半胱氨酸残基，分别位于第 90 与 106 位、219 与 233 位、243 与 273 位，这 6 个保守的半胱氨酸残基组成 3 对二硫键，从而保证蛋白质三级结构的稳定。

2.2 同源性比较和系统进化树分析结果

NCBI Blast 搜索发现 *HvSP* 推导出的氨基酸序列与鳞翅目昆虫丝氨酸蛋白酶的氨基酸序列一致性达到 46%~92%，其中同源性较高的均为胰凝乳蛋白酶，推断本试验获得的丝氨酸蛋白酶为胰凝乳蛋白酶，而与本实验室之前发表的另一条丝氨酸蛋白酶（胰蛋白酶）基因同源性仅为 37%。

对 *HvSP* 氨基酸序列与已经克隆得到的其他鳞翅目昆虫的丝氨酸蛋白酶序列进行系统进化分析，构建系统进化树（图 2）。系统进化分析结果表明，*HvSP* 氨基酸序列首先与鳞翅目夜蛾科铃夜蛾属 *Helicoverpa* 的棉铃虫 *H. armigera* 和实夜蛾属 *Heliothis* 的烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 等聚类，再与甘蓝夜蛾属 *Mamestra* 的蓓带夜蛾 *Mamestra configurata* 聚类，其次与夜蛾属 *Spodoptera* 的斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 和草地夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 聚类，然后与鳞翅目非夜蛾科昆虫欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis*、小菜蛾 *Plutella xylostella* 等昆虫的遗传距离较远。

2.3 *HvSP* 基因 mRNA 在不同组织的表达分析

为了探索 *HvSP* 基因在苜蓿夜蛾不同组织中的表达情况，我们选取了苜蓿夜蛾 5 龄幼虫的前

```
1    GCAGTGCAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACGATTATGAAGTTCTTGGCTGTGACTCTATTGGCTCTGGTGGCGGTTGTTTCCGC
                                        M  K  F  L  A  V  T  L  L  A  L  V  A  V  V  S  A  R  N
91   CATCGACCTCGAGGATGTGATCGACCTCGAAGACATTACTGCCTACGATTATCACACCAAAATTGGTATTCCTCTGGCTGAAAAGATCCG
     I  D  L  E  D  V  I  D  L  E  D  I  T  A  Y  D  Y  H  T  K  I  G  I  P  L  A  E  K  I  R
181  TTTAGCTGAGGAGGAAGCTGAACGCAACCCATCCAGAATTGTTGGTGGTTCTACTTCTAGTCTCGGCGCATTCCCTTACCAGGCTGGACT
     L  A  E  E  E  A  E  R  N  P  S  R  I  V  G  G  S  T  S  S  L  G  A  F  P  Y  Q  A  G  L
271  TCTCGCTCAATTCGCTAGCGGACAGGGTGTCTGCGGTGGTTCTTTGCTTAACCAAAGAAGAGTTCTTACCGCTGCTCACTGCTGGTTTGA
     L  A  Q  F  A  S  G  Q  G  V  C  G  G  S  L  L  N  Q  R  R  V  L  T  A  A  H  C  W  F  D
361  TGGTCGCAACCAGGCCAGGAGTTTCACAGTTGTACTCGGCTCAGTGAACCTGTTCAGCGGTGGAACCAGACTGAATACTGCTAGCGTCGC
     G  R  N  Q  A  R  S  F  T  V  V  L  G  S  V  N  L  F  S  G  G  T  R  L  N  T  A  S  V  A
451  CATGCACGGAAGCTGGAACCCGAGCCTTATCCGTAACGACATCGCCATGATCACCTTGCCTTCCAACGTTGCTTTATCAGGCAACATCGC
     M  H  G  S  W  N  P  S  L  I  R  N  D  I  A  M  I  T  L  P  S  N  V  A  L  S  G  N  I  A
541  AGTTATTGCCCTGCCCTCCGGTAATGAGCTTAATAACAACTTCAACGGTGCCACCGCTACTGCATCTGGATACGGTCTTTCCAGGGATGG
     V  I  A  L  P  S  G  N  E  L  N  N  N  F  N  G  A  T  A  T  A  S  G  Y  G  L  S  R  D  G
631  TGGAAATGTTGACGGCAGTTTGAGACACGTCAACCTACCCGTGATCACGGACGCTGCATGCTCTGTTTCCTTCCCCCTTATCGTTCAGGC
     G  N  V  D  G  S  L  R  H  V  N  L  P  V  I  T  D  A  A  C  S  V  S  F  P  L  I  V  Q  A
721  TTCAAACATTTGCACCAGCGGCGCCAATGGCAGAAGCACTTGCCAGGGTGACTCCGGCGGTCCCCTTGTTGTGAACAGCAACAACAGACG
     S  N  I  C  T  S  G  A  N  G  R  S  T  C  Q  G  D  S  G  G  P  L  V  V  N  S  N  N  R  R
811  CATCTTGATTGGTGTGACCTCCTTCGGATCCGCCCGTGGTTGCCAAGTTGGTTCACCTGCTGCCTTCGCCAGAGTGACTTCTTTCATCAG
     I  L  I  G  V  T  S  F  G  S  A  R  G  C  Q  V  G  S  P  A  A  F  A  R  V  T  S  F  I  S
901  CTGGATCAACCAACGCCTTTAAGATGTAGAAGGAAGACTTCAGTTGTTAATGCATCAGATAAAATATGACTAAACACGCAAAAAAAATAC
     W  I  N  Q  R  L  *
991  AAGAAATACAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

图 1　*HvSP* 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 *HvSP* cDNA

起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA 加方框表示，信号肽用下划线标出，
活性中心用双下划线表示，二硫键用黑色阴影表示。

The initiation codon ATG and termination codon TAA are in box, the signal peptide sequence is underlined, the catalytic active sites are double underline, disulphide bond regions are shaded black.

肠、中肠、后肠、马氏管、唾腺、脂肪体 6 个组织进行荧光定量 PCR 分析（图 3）。结果表明，前肠、中肠、后肠、马氏管、脂肪体都发现了 *HvSP* 基因的 mRNA 表达，但在唾腺中并没有发现。和其他组织相比，*HvSP* 基因在中肠中的表达量最高，并且与其他组织差异显著（$P<0.05$），这表明 *HvSP* 基因主要存在于苜蓿夜蛾的中肠组织中。

2.4　重组蛋白的诱导表达及活性测定结果

目的菌株经 IPTG 诱导后进行 SDS-PAGE，考马斯亮蓝染色结果显示，含目的基因的 *HvSP* 重组质粒在相对分子质量接近 30.8 ku 处，有一条明显的目的条带，与预测的蛋白分子量相近，而未插入目的基因的 pET21b 空载体未检测到目的条带（图 4）。利用 Ni-NTA 亲和层析柱纯化蛋白，用咪唑缓冲液可以把目的蛋白洗脱出来，说明获得较高纯度的重组蛋白。

丝氨酸蛋白酶重组蛋白的活性测定结果如图 5 所示，结果表明在 Tris-HCl（pH 为 8.0）缓冲液中，丝氨酸蛋白酶的最适 pH 为 8.5，在 pH 为 8.5 时，活性达到最高，为 28.7 U/mL（图 5）。

3　讨论

有研究发现鳞翅目昆虫中肠总消化酶活性的 95%是由胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶为主要蛋白消化酶的丝氨酸蛋白酶承担的（Srinivasan *et al*., 2006）。丝氨酸蛋白酶是一大类家族的基因，它包括胰蛋白酶、胰凝乳蛋白醇、弹性蛋白酶和凝血酶等（Chougule *et al*., 2008）。丝氨酸蛋白酶参与了昆虫许多重要的生理生化反应，因此成为害虫治理的最有效的潜在靶标，为开发新的杀虫剂提供了一个方向（Brito *et al*., 2001）。

本试验采用 RACE 末端快速扩增技术成功克隆苜蓿夜蛾丝氨酸蛋白酶 *HvSP* 基因的 cDNA 全长序列，已登录 GenBank，登录号为 KT907053。NCBI Blast 搜索发现 *HvSP* 推导出的氨基酸序列与鳞翅目昆虫丝氨酸蛋白酶的氨基酸序列一致性达到 46%~92%，其中与棉铃虫 *H. armigera*（GenBank 登录号：CAA72966）类胰凝乳蛋白酶的氨基酸序列一致性最高，达 92%，而与之前实验室发表的另一条胰蛋白酶基因相似的仅为 37%（周晓群等，2014），说明 *HvSP* 不是胰蛋白

酶，推断 *HvSP* 是胰凝乳蛋白酶类丝氨酸蛋白酶， 这与进化关系的分析结果也是一致的（图 2）。

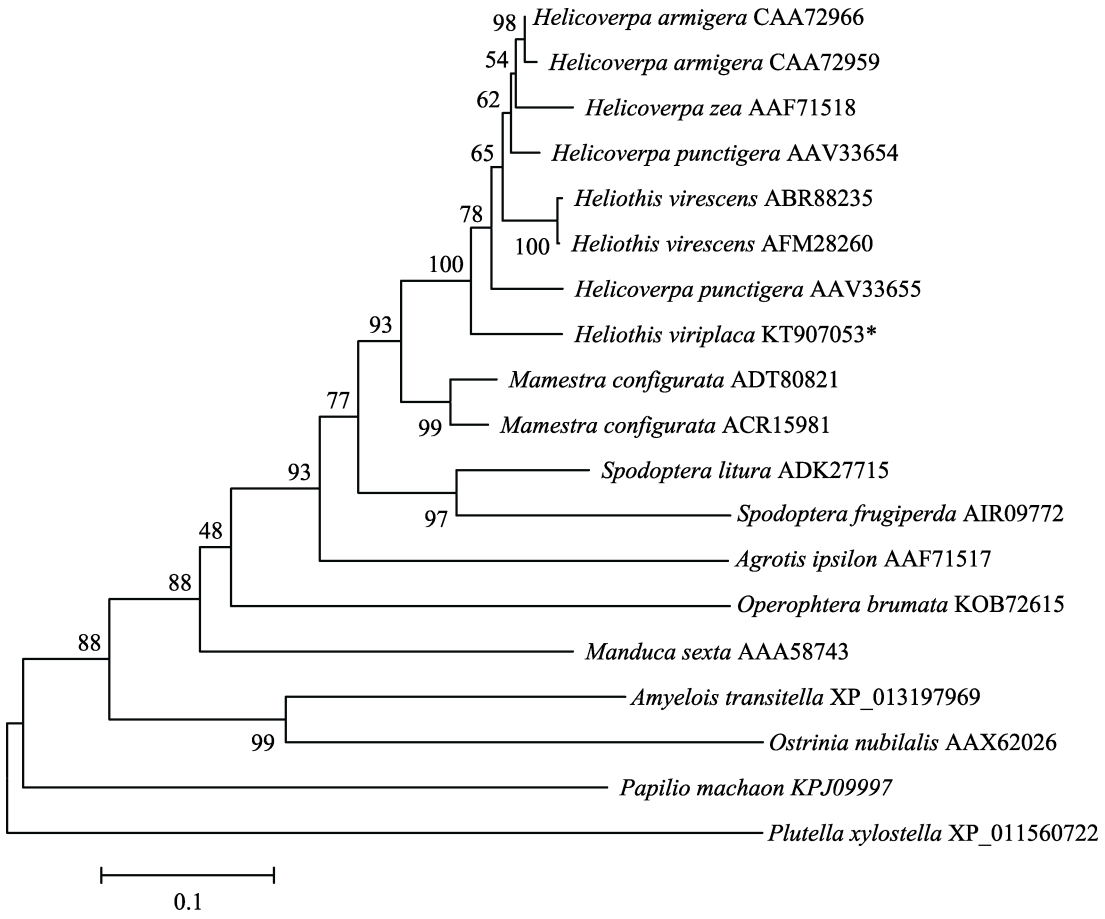

图 2 *HvSP* 与其他昆虫丝氨酸蛋白酶氨基酸序列的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of *HvSP* and other insects′ serine protease

数字代表自展值；标尺表示遗传距离；拉丁名后为 GenBank 登录号；带*的为本研究克隆得到的基因氨基酸序列-*HvSP*。

Numbers represent bootstrap values, the scale represents genetic distance, and the GenBank accession numbers after the Latin names; * indicates the cloned amino acid sequence in this study-*HvSP*.

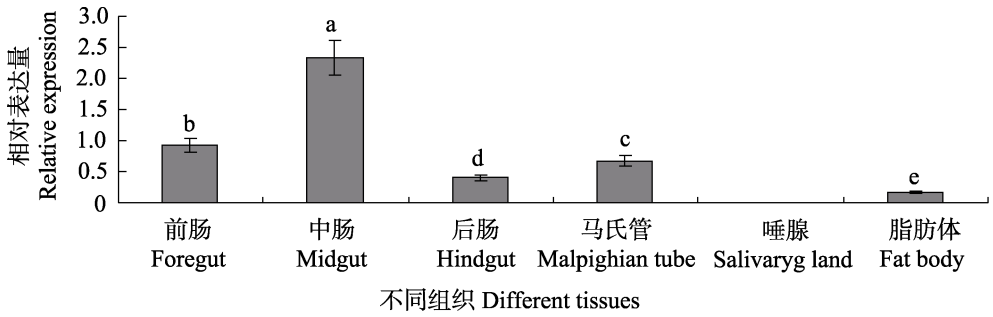

图 3 苜蓿夜蛾不同组织 *HvSP* 表达量分析

Fig. 3 Relative expression level of the *HvSP* mRNA of *Heliothis viriplaca* in different tissues

柱上标有不同小写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）。图 5 同。

Histograms with different lowercase letters indicate significant difference in gene expression at the 0.05 level by Duncan's multiple range test. The same with Fig. 5.

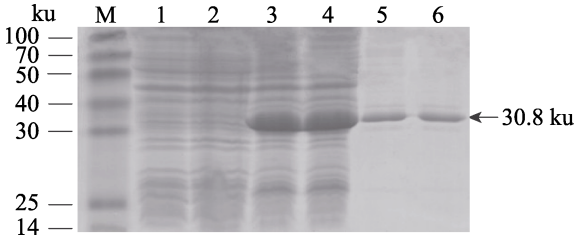

图 4　pET21b-*HvSP* 诱导表达产物的 SDS-PAGE
Fig. 4　SDS-PAGE of expression product of pET21b-*HvSP* by IPTG

M：蛋白质分子量标准；1，2：pET21b 空载体诱导产物；3，4：pET21b-*HvSP* 的诱导产物；5，6：纯化的重组蛋白。
M: Protein molecular weight marker; 1, 2: Expression products of pET21b induced by IPTG; 3, 4: Expression products of pET21b-*HvSP* by IPTG; 5, 6: Purified recombinant protein.

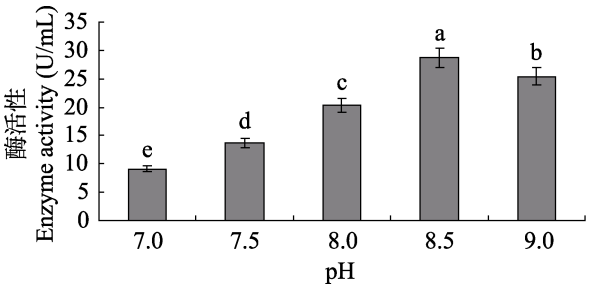

图 5　pH 对丝氨酸蛋白酶活性的影响
Fig. 5　Effect of pH on serine protease activity

目前，丝氨酸蛋白酶基因在昆虫中的异源表达已经成为可能，但绝大多数都是包涵体蛋白，因此研究如何获得有活性的丝氨酸蛋白酶就成了关键。Herrero 等（2005）以甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 为材料克隆一条胰凝乳蛋白酶基因，并在外源表达载体 Sf21 系统中表达，且测得活性结果为对 pH 敏感，在异源表达系统中首次得到了有活性的丝氨酸蛋白酶。刘海明等（2012）从华北大黑鳃金龟 *Holotrichia oblita* 的中肠中成功克隆一条丝氨酸蛋白酶基因，原核表达得到的蛋白证明为包涵体蛋白，通过酶活性测定，没有发现其中具有丝氨酸蛋白酶活性，但是没有深入探索其活性。因此，本试验从苜蓿夜蛾中克隆得到的丝氨酸蛋白酶 *HvSP*，利用所构建的原核表达载体 pET21b-*HvSP* 进行表达，并将表达得到的蛋白进行纯化及复性处理，进而测定其活性。结果表明：本试验所获得的丝氨酸蛋白酶 *HvSP* 经 IPTG 诱导可以在大肠杆菌中表达外源蛋白，纯化鉴定结果也表明所获得的蛋白为目的蛋白，而且蛋白纯化后进行梯度透析复性，以 BTEE 为底物检测出酶活性，为今后经济、有效、大量表达该酶奠定了基础。

基因在组织和发育阶段的特异性表达与该基因在生物内的功能相关。因此，对某一基因在组织水平的表达分布特征的研究，能够为基因的功能分析提供一定的参考线索。目前的研究表明，昆虫丝氨酸蛋白酶的表达主要在昆虫幼虫的中肠。例如，Broehana 等（2008）通过免疫组化的方法研究发现烟草天蛾胰凝乳蛋白酶 MsCTLP 基因主要在进食期的中肠表达，而在饥饿处理和蜕皮期的幼虫中肠检测不到。Coates 等（2008）利用 RT-PCR 方法检测两种胰凝乳蛋白酶基因 OnCl 和 OnC2 均只在中肠中表达。这些结果都说明丝氨酸蛋白酶可能参与到昆虫中肠食物蛋白的消化过程中。本研究通过荧光定量 PCR 对 *HvSP* 基因在苜蓿夜蛾不同组织的相对表达量进行测定，结果发现它们在幼虫取食期的前肠、中肠、后肠、马氏管、脂肪体均有表达，特别是在中肠中表达量最高。因此推断 *HvSP* 基因可能在苜蓿夜蛾幼虫的食物消化方面起到重要作用。

RNAi 是一种高效的特异性强的基因沉默技术，可以抑制特定基因的表达，近年来发展迅速，很快就成为基因功能研究的有力工具，在模式昆虫果蝇 *Drosophila* 以及非模式昆虫中已经成功应用，越来越多的昆虫学者通过将 dsRNA 导入昆虫体内干扰相应基因的表达，来研究基因缺失的拟表型，从而来研究该基因的功能，通过这种方法，越来越多的昆虫基因功能被逐渐确定。并且 RNAi 技术也在害虫防治等领域取得了一些研究成果，Mao 等（2007）对棉铃虫幼虫饲喂表达 P450 基因和谷胱甘肽基因 dsRNA 的棉花，诱导 RNAi 并阻碍了幼虫发育，这一技术为田间害虫控制开辟了新领域。要想进一步更准确的探索 *HvSP* 基因的功能，接下来试验将利用 RNA 干扰技术去研究丝氨酸蛋白酶基因在表达受到抑制

的情况下，苜蓿夜蛾中相应丝氨酸蛋白酶对昆虫消化功能甚至生长发育所产生的影响，探索其基因功能，从而为从分子生物学角度开展该害虫防治奠定基础。

参考文献 (References)

Anisuzzaman, Islam MK, Alim MA, 2012. Longistatin is an unconventional serine protease and induces protective immunity against tick infestation. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 182(1/2): 45–53.

Brito LO, Lopes AR, Parra JR, Terra WR, Silva-Filho MC, 2001. Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to proteinase inhibitors may be mediated by the synthesis of new proteinases. *Comp. Biochem. Phys. B. Biochem. Mol. Biol.*, 128(2): 365–375.

Broehan G, Kemper M, Driemeier D, Vogelpohl I, Merzendorfer H, 2008. Cloning and expression analysis of midgut chymotrypsin-like proteinases in the tobacco hornworm. *J. Insect Physiol.*, 54(8): 1243–1252.

Chen H, Zhu YC, Whitworth RJ, Reese JC, Chen MS, 2013. Serine and cysteine protease-like genes in the genome of a gall midge and their interactions with host plant genotypes. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 43(8): 701–711.

Chougule NP, Doyle E, Fitches E, Gatehouse JA, 2008. Biochemical characterization of midgut digestive proteases from *Mamestra brassicae* (cabbage moth; Lepidoptera: Noctuidae) and effect of soybean Kunitz inhibitor (SKTI) in feeding assays. *J. Insect Phys.*, 54(3): 563–572.

Chu Y, Liu Y, Shen DX, Hong F, Wang GR, An CG, 2015. Serine proteases SP1 and SP13 mediate the melanization response of Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis*, against entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.*, 128(6): 64–72.

Coates BS, Sumerford DV, Hellmich RL, Lewis LC, 2008. Mining an Ostrinia nubilalis midgut expressed sequence tag (EST) library for candidate genes and single nucleotide polymorphism (SNPs). *J. Mol. Biol.*, 17(6): 607–620.

Colebatch G, Cooper P, East P, 2002. cDNA cloning of a salivary chymotrypsin-like protease and the identification of six additional cDNAs encoding putative digestive proteases from the green mirid, *Creontiades dilutes*(Hemiptera:Miridae). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32(9): 1065–1075.

Cui YJ, Guo W, Zhao QL, 2012. Early changes in larval haemolymph protein expression profile of Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus. *Science of Sericulture*, 38(6): 1012–1027. [崔颖俊, 郭伟, 赵巧玲, 2012. 家蚕核型多角体病毒感染早期家蚕幼虫血淋巴蛋白质表达谱的变化. 蚕业科学, 38(6): 1012–1027.]

Herrero S, Combes E, Oers MMV, Vlak JM, Maagd RA, Beekwilder J, 2005. Identification and recombinant expression of a novel chymotrypsin from *Spodoptera exigua*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35(10): 1073–1082.

Hu LM, Zeng L, Shen JM, Bin SY, Liao HZ, Chen GF, Lin JT, 2012. Clong and expression analysis of serine protease gene in *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae). *Journal of Northwest A&F University* (*Nat. Sci. Ed.*), 40(7): 70–76. [胡黎明, 曾玲, 申建梅, 宾淑英, 廖泓之, 陈高峰, 林进添, 2012. 桔小实蝇丝氨酸蛋白酶基因(*BdorSer*)的克隆与表达分析. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 40(7): 70–76.]

Li YX, Qi XW, Hang Q, 2012. Molecular cloning and expression analysis of serine protease gene *BmHP14* in silkworm, *Bombyx mori*. *Science of Sericulture*, 37(3): 419–424. [李玉欣, 亓希武, 韩琦, 2012. 家蚕丝氨酸蛋白酶基因*BmHP14*的克隆及表达分析. 蚕业科学, 38(5): 814–821.]

Liu BL, Li YX, Qi XW, 2011. Molecular cloning and expression analysis of serine protease gene *BmHP21* in silkworm, *Bombyx mori*. *Science of Sericulture*, 37(3): 419–424. [刘碧朗, 李玉欣, 亓希武, 2011. 家蚕丝氨酸蛋白酶基因*BmHP21*的克隆及表达分析. 蚕业科学, 37(3): 419–424.]

Liu HM, Zheng GL, Li CY, Zhou HX, 2012. Molecular cloning, sequence analysis and expression of serine protease cDNAs from the midgut of *Holotrichia oblita* (Coleoptera: Melolonthidae). *Acta Entomologica Sinica*, 55(2): 147–155. [刘海明, 郑桂玲, 李长友, 周洪旭, 2012. 华北大黑鳃金龟中肠丝氨酸蛋白酶cDNA 克隆、序列分析及表达. 昆虫学报, 55(2): 147–155.]

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32(10): 1295–1309.

Lomate PR, Mahajan NS, Kale SM, Gupta VS, Giri AP, 2014. Identification and expression profiling of *Helicoverpa armigera* microRNAs and their possible role in the regulation of digestive protease genes. *Insect Biochem.Mol. Biol.*, 54(11): 129–137.

Mao YB, Cai WJ, Wang JW, Hong GJ, Tao XY, Wang LJ, Huang YP, Chen XY, 2007. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nat. Biotechnil.*, 25(11): 1307–1313.

Park DS, Shin SW, Hong SD, 2000. Immunological detection of serpin in the fall webworm, *Hyphantria cunea* and its inhibitory activity on the prophenoloxidase system. *Mol. Cells*, 10(2) : 186–192.

Ross J, Jiang HB, Kanost MR, 2003. Serine proteases and their homologs in the *Drosophila melanogaster* genome: an initial annlysis of sequence conservation and phylogenetic relationships.

Gene, 304 (1): 117–131.

Srinivasan A, Giri AP, Gupta VS, 2006. Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases. *Cell Mol. Biol. Lett.*, 11(1): 132–154.

Sui YP, Wang JX, Zhao XF, 2009. The impacts of classical insect hormones on the expression of a new digestive trypsin-like protease(TLP) from the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Insect Mol. Biol.*, 18(4): 443–456.

Sun Y, Bai LX, Zhang YJ, Xiao LB, Tan YA, Sheng Y, 2012a. Identification and expression analysis of serine protease AlSP3 gene in *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür). *Jiangsu J. Agr. Sci.*, 28(5): 991–998. [孙洋, 柏立新, 张永军, 肖留斌, 谭永安, 盛洋, 2012. 绿盲蝽丝氨酸蛋白酶基因 AlSP3 的鉴定及表达谱分析. 江苏农业学报, 28(5): 991–998.]

Sun Y, Bai LX, Zhang YJ, Xiao LB, Tan YA, Wu GQ, 2012b. Cloning of serine protease gene AlSP4 and its expression patterns after feeding on different host plants in *Apolygus lucorum* (Hemiptera: Miridae). *Acta Entomologica Sinica*, 55(6): 641–650. [孙洋, 柏立新, 张永军, 肖留斌, 谭永安, 吴国强, 2012. 绿盲蝽丝氨酸蛋白酶基因 AlSP4 的克隆及取食不同寄主植物后的表达谱分析. 昆虫学报, 55(6): 641–650.]

Wang CZ, Qin JD, 1996. Partial characterization of protease activity in the midgut of *Helicoverpa armigera* larvae. *Acta Entomologica Sinica*, 39(1): 7–11. [王琛柱, 钦俊德, 1996. 棉铃虫幼虫中肠主要蛋白酶活性的鉴定. 昆虫学报, 39(1): 7–11.]

Yang S, Huang FS, 2003. Molecular mechanism on the insect melanotic encapsulation response. *Parasitic Diseases Foreign Medical Sciences*, 30(4): 164–168.[杨松, 黄复生. 2003. 昆虫黑化反应的分子机制研究进展. 国外医学: 寄生虫病分册, 30(4): 164–168]

Zhou XQ, Gao YL, Zhao KJ, Fan D, 2014. cDNA cloning , sequence analysis and prokaryotic expression of a serine protease from the midgut of *Heliothis viriplaca* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 57(9): 1008–1017. [周晓群, 高艳玲, 赵奎军, 樊东, 2014. 苜蓿夜蛾中肠丝氨酸蛋白酶 cDNAD 的克隆、序列分析及原核表达. 昆虫学报, 57(9): 1008–1017.]

Zou Z, Lopez DL, Kanost MR, 2006. Comparative analysis of serine protease-related genes the honey bee genome: possible involvement in embryonic development and innate immunity. *Insect Mol. Biol.*, 15(5): 603–614.