沙葱萤叶甲保幼激素结合蛋白基因 *GdJHBP* 的克隆及表达分析*

陈 龙[1**] 周晓榕[1] 谭 瑶[1] 庞保平[1***] 新巴音[2]

（1. 内蒙古农业大学草原昆虫研究中心，呼和浩特 010020；2. 锡林浩特市草原工作站，锡林浩特 026000）

摘 要 **【目的】** 克隆沙葱萤叶甲 *Galeruca daurica* 保幼激素结合蛋白基因（Juvenile hormone binding protein，JHBP）cDNA 全长序列，分析其分子特征和表达特性，为进一步明确其在沙葱萤叶甲生长发育及滞育中的作用奠定基础。**【方法】** 基于本实验室组装的沙葱萤叶甲转录组数据库，采用 RACE 技术，克隆沙葱萤叶甲 *GdJHBP* 基因 cDNA 全长序列；运用 ORF Finder、SignaIP、DNAMAN 和 TMHMM 等软件分析其分子特征；利用 MEGA6.0 软件中的邻接法（Neighbor-joining，NJ）构建系统发育树；应用荧光实时定量 PCR（RT-qPCR）技术分析 *GdJHBP* 在沙葱萤叶甲不同发育时期、成虫不同组织及高温胁迫下的表达模式。**【结果】** 克隆获得了沙葱萤叶甲保幼激素结合蛋白基因 *GdJHBP* cDNA 全长序列（GenBank 登录号：MG460309），cDNA 全长为 826 bp，开放阅读框（ORF）为 714 bp，编码 237 个氨基酸；蛋白质预测分子量为 26.58 ku，等电点为 4.37；包含 1 条信号肽，无跨膜区，且在第 27-189 位氨基酸之间存在一个保幼激素结合蛋白家族 JHBP 保守结构域。序列比对分析表明，不同昆虫 JHBP 间氨基酸序列一致性较低，沙葱萤叶甲 GdJHBP 与棕榈象 *Rhynchophorus ferrugineus* RfJHBP 和马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* JHBP 3p2 的氨基酸序列一致性最高也仅为 30%。系统发育分析表明，GdJHBP 与棕榈象血淋巴 JHBP 亲缘关系最近。RT-qPCR 结果显示，*GdJHBP* 在沙葱萤叶甲不同发育阶段均有表达，在幼虫期表达量最高，在卵和蛹期微量表达；在成虫滞育期间低表达，在滞育前与滞育结束后则有较高表达；在成虫发育过程中，头部的表达量显著低于腹部和胸部；高温（30-40 ℃）可诱导 *GdJHBP* 上调表达，在 35 ℃时表达量达到最高值。**【结论】** 沙葱萤叶甲 GdJHBP 属于血淋巴 JHBP，在沙葱萤叶甲生长发育和成虫夏滞育中可能发挥着重要作用。

关键词 沙葱萤叶甲；保幼激素结合蛋白；分子克隆；表达谱；夏滞育；高温

Cloning and expression profiling of the *Galeruca daurica* juvenile hormone binding protein gene, *GdJHBP*

CHEN Long[1**] ZHOU Xiao-Rong[1] TAN Yao[1] PANG Bao-Ping[1***] XINBAYIN[2]

(1. Research Center for Grassland Entomology, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010020, China;
2. Grassland Station of Xilinhaote, Xilinhaote 026000, China)

Abstract **[Objectives]** To clone the full cDNA sequence of the *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomellidae) juvenile hormone binding protein gene, analyze its molecular characteristics and expression profiles, and provide information that will help further clarify its function in the development and summer diapause of *G. daurica*. **[Methods]** Based on the transcriptome database of *G. daurica*, RACE technology was used to clone the full cDNA sequence of *GdJHBP*, the molecular characteristics of which were analyzed by software, including ORF Finder, SignaIP, DNAMAN and TMHMM. A neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree was constructed using MEGA 6.0 software. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to assay the expression profiles of *GdJHBP* in different developmental stages and adult tissues, and under high temperature.

*资助项目 Supported projects：国家自然科学基金（31760517）

**第一作者 First author，E-mail：15774711140@163.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：pangbp@imau.edu.cn

收稿日期 Received：2019-03-13；接受日期 Accepted：2019-06-28

[Results] The full cDNA sequence of *GdJHBP* (GenBank accession No.: MG460309) obtained from *G. daurica* was 826 bp in length with an open reading frame (ORF) 714 bp long, and encodes 237 amino acids with a predicted molecular weight of 26.58 ku and an isoelectric point of 4.37. The encoding protein is a single peptide without transmembrane structure, and contains a conserved JHBP family domain between 27 and 189 residues. Sequence alignment indicates a low amino acid sequence identity between the JHBPs of different insects; the highest identity, with *Rhynchophorus ferrugineus* RfJHBP and *Leptinotarsa decemlineata* LdJHBP 3p2, was only 30%. Phylogenetic analysis indicates that GdJHBP is most closely related to a hemolymph JHBP from *R. ferrugineus*. RT-qPCR indicates that *GdJHBP* was expressed in various developmental stages of *G. daurica* with the highest expression in larvae and the lowest in eggs and pupae. Expression of *GdJHBP* was relatively low during the summer diapause of *G. daurica* adults and was higher both before, and after, diapause. *GdJHBP* was more highly expressed in the thorax and abdomen than in the head during adult development. High temperatures (30 to 40 ℃) induced *GdJHBP* to be up-regulated with peak expression at 35 ℃. **[Conclusion]** GdJHBP belongs to the hemolymph JHBP family and may play an important role in the development and summer diapause of *G. daurica*.

Key words *Galeruca daurica*; juvenile hormone binding protein; molecular cloning; expression profiling; summer diapause; high temperature

保幼激素（Juvenile hormone，JH）是由昆虫咽侧体（Corpora allata，CA）合成分泌的一类重要的昆虫激素，其借助于血淋巴中的保幼激素结合蛋白（Juvenile hormone binding protein，JHBP）在昆虫体内发挥独特的生物学作用（Jindra *et al.*，2013）。根据 JHBP 在昆虫体内的分布，可将其分为血淋巴保幼激素、细胞质保幼激素和细胞核保幼激素 3 类。JHBP 通过在血淋巴中与保幼激素结合或释放，使保幼激素维持在一个适宜的滴度，以达到保护胚胎的作用（Orth *et al.*，1999，2003）。细胞质 JHBP 和细胞核 JHBP 被认为是保幼激素的受体（Shemshedini *et al.*，1990；Konopova and Jindra，2007）。昆虫滞育按照昆虫的不同发育时期，可将滞育分为胚胎滞育（卵滞育）、幼虫滞育、蛹滞育和成虫滞育 4 类。在多种昆虫的滞育研究中，JH 被认为是一种重要激素，在成虫滞育调控中发挥作用（Jindra *et al.*，2013）。JH 对昆虫滞育的调控作用已在多种昆虫中利用摘除或灼烧咽侧体等手段被证实，如摘除马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 未滞育个体的 CA，其就会出现停止进食和钻入土壤等一些类似滞育的行为（de Kort，1990）。昆虫生殖滞育可被 JH 终止，在黑足黑守瓜 *Aulacophora nigripennis*（Watanabe and Tanaka，2000）和稻黑蝽象 *Scotinophara lurida*（Cho *et al.*，2007）的研究中已被证实。作为 JH 的载体或受体，JHBP 对 JH 功能的发挥具有重要的作用。JHBP 最早在果蝇 *Drosophila melanogaster* 中发现（Chang *et al.*，1980），目前关于昆虫 JHBP 的研究主要集中于鳞翅目昆虫（Hidayat and Goodman，1994；Ritdachyeng *et al.*，2012；何石宝等，2018），而关于鞘翅目昆虫 JHBP 的相关研究未见报道。

沙葱萤叶甲 *Galeruca daurica*（Joannis）是近些年严重危害内蒙古草原的一种新害虫，其 1 年发生 1 代，以成虫滞育越夏，以卵滞育越冬（吴翔等，2015；Zhou *et al.*，2016）。其成虫羽化取食约 1 周后即进入滞育状态，为专性夏滞育，整个夏季很少取食和活动（Ma *et al.*，2019）。滞育作为多数昆虫的一种季节性适应性机制，期间生长发育和繁殖等均处于停滞状态，以此来躲避不利的外界环境。然而，目前对昆虫滞育的研究多集中于兼性滞育昆虫，而对于专性夏滞育的机理很少了解。因此，对沙葱萤叶甲成虫夏滞育机理开展研究，不仅有助于揭示其发生规律和成灾机制，而且有助于更全面地揭示昆虫滞育的机理。本实验室前期转录组学和蛋白组学研究表明，JHBP 在沙葱萤叶甲成虫夏滞育不同阶段差异表达（Ma *et al.*，2019）。因此，推测 JH 及其 JHBP 在沙葱萤叶甲成虫夏滞育调控中起重要作用。本研究克隆沙葱萤叶甲 JHBP 基因，明确其基因的序列特征以及在沙葱萤叶甲不同发育时期、成虫不同组织部位及高温胁迫下的表达特性，旨在为进一步研究该基因在沙葱萤叶甲生长

发育以及在夏滞育中对成虫的调控作用奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　供试昆虫　将沙葱萤叶甲的越冬卵置于 PRX-350C 智能型人工气候箱（宁波海曙塞福实验仪器厂）中孵化，培养条件为温度（25±1）℃、RH 为 70%±5%、光周期为 14L∶10D，孵化的幼虫以沙葱连续饲养。

（1）选取卵、幼虫（1-3 龄）、预蛹、蛹（均为蜕皮后 2 d）及成虫期的样品，液氮速冻后于－80 ℃保存，用于不同发育时期的表达检测。

（2）选取羽化后 3、7、10、15、25、40、60、80 和 100 d 的成虫，并取下头部、胸部和腹部，将其用液氮速冻后置于－80 ℃的冰箱中保存，用于不同发育阶段成虫及组织的表达检测。

（3）选取羽化后 3 d 的成虫，在不同温度条件（25、30、35 和 40 ℃）下处理 1 h，以 25 ℃为对照，速冻于液氮后储存备用，用于不同温度胁迫的表达检测。

上述每个样品处理均收集 3 个生物学重复，每个生物学重复包括卵 30（粒）、1 龄幼虫（15 头）、2 龄幼虫（7 头），3 龄幼虫、预蛹、蛹和成虫（均为 3 头）。

1.1.2　主要试剂　TaKaRa RNA 提取试剂盒、cDNA 合成试剂盒、5′-3′ RACE 试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、pMD19-T 载体及 Taq 酶等均购自大连 TaKaRa 公司；感受态细胞 DH5α 购自天根（Tiangen）公司；SYBR Green qPCR Master Mix 购自 Promega 公司。

1.2　RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

选取各供试样品 40-100 mg，置于高温灭菌后的研磨中用液氮研磨，详细的提取步骤依照 TaKaRa RNA 提取试剂盒说明书执行。采用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳和 Nano Photometer™P-Class 超微量分光光度计分别检测 RNA 质量和浓度。参照 TaKaRa cDNA 合成试剂盒说明书合成 cDNA 第一链。

1.3　沙葱萤叶甲 *GdJHBP* 基因序列的筛选及验证

根据本实验室已获取得沙葱萤叶甲成虫转录组数据，根据功能注释信息筛选出 *GdJHBP* 基因序列，利用 Primer Premier 5.0 软件设计 *GdJHBP* 扩增引物（表 1）。本实验采用的 PCR 体系：总体积 25 μL，其中 DNA 模板 1 μL（100 ng/μL），F/R 引物各 1 μL（0.2 μmol·L^{-1}），PCR Master Mix 12.5 μL，RNase-free Water 9.5 μL。PCR 扩增条件：预变性 94 ℃ 5 min；94 ℃ 30 s，56 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min 循环 30 次；72 ℃延伸 10 min，4 ℃条件下保存。PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后，利用 TaKaRa DNA 胶回收试剂盒回收，经琼脂糖凝胶电泳检测合格后与 pMD19-T 载体连接，而后在感受态细胞 DH5α 中进行转化。将已连接转化后的感受态细胞吸取 200 μL 涂布于含 X-gal、氨苄和 IPTG 的 LB 固体培养基中过夜（连续培养 12-16 h），而后进行蓝白斑筛选，挑取白色单一菌落 10 个，分别加入 10 μL ddH_2O，各选取 1 μL 为模板进行菌液 PCR，扩增体系和条件同上述 RT-PCR。以菌液 PCR 扩增条带是否单一，大小与预期是否相同为检测合格标准。选取检测合格的 3 个菌液样品剩余的 9 μL 含菌 ddH_2O 加入 1.5 mL LB 液体培养基（含 1.5 μL Amp）中培养 12-16 h 后送北京六合华大公司测序。

1.4　*GdJHBP* 基因 cDNA 5′和 3′ RACE 扩增及全长基因序列的获取

以测序验证获得的 *GdJHBP* 中间片段序列为模板，根据 TaKaRa 5′-3′ RACE 试剂盒说明书分别设计 5′ GSP 引物进行降落 PCR 和 3′ NGSP 引物进行巢式 PCR（表 1）。5′RACE 第一轮反应条件：变性（94 ℃ 30 s），延伸（72 ℃ 3 min），循环 5 次；变性（94 ℃ 30 s），退火（70 ℃ 30 s），延伸（72 ℃ 3 min）循环 5 次；变性（94 ℃ 30 s），退火（68 ℃ 30 s），延伸（72 ℃ 3 min）循环 25 次；以稀释 20 倍的第一轮反应产物为模板，进行二次 PCR，反应条件：变性（94 ℃ 30 s），退火（68 ℃ 30 s），延伸（72 ℃ 3 min）循环 25 次。3′RACE 与上述条件相同。扩增后的 PCR 产物经回收及亚克隆后，送北京六合华大测

表 1 沙葱萤叶甲 *GdJHBP* 的克隆与 RT-qPCR 检测引物信息
Table 1 Primers for cloning and RT-qPCR detection of *GdJHBP* in *Galeruca daurica*

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	引物用途 Primer usage
GdJHBP-F	5′-AAGCTAAAACACAATAATGTTCTTG-3′	中间片段克隆 Intermediate segment clone
GdJHBP-R	5′-TTAAATTAATATCTTCCTGTTAACTCAT-3′	
GdJHBP 5′-GSP	5′-ACGAAGAGCCGCATCCTTATCAGTTCCT-3′	RACE 克隆 RACE clone
GdJHBP 5′-NGSP	5′-GAGCCGCATCCTTATCAGTTCCTCTAGC-3′	
GdJHBP 3′-GSP	5′-CCACAGAAGGTTTTGGACTTTTCGGAGG-3′	
GdJHBP 3′-NGSP	5′-GGACTTTTCGGAGGTGGAATTCAAGCTC-3′	
GdJHBP q-F	5′-GGAAACATTGGCATTGCAGC-3′	RT-qPCR
GdJHBP q-R	5′-CTCGTTGAAAGTGGCGTCAA-3′	
SDHA-F	5′-GGGAGACCACAATCTCCTCA-3′	
SDHA-R	5′-AGCTGGTGCTCCTAAGTCCA-3′	

序。验证所得 5′和 3′序列信息后，利用 Vector NTI 11.5 将中间片段、5′和 3′拼接获得 *GdJHBP* 基因完整的 cDNA 序列。

1.5 沙葱萤叶甲 GdJHBP 的生物信息学分析

将 *GdJHBP* 基因 cDNA 序列置于 NCBI ORF finder（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/）中搜索具体蛋白编码区域位置。蛋白质等电点、分子量与信号肽选用 DNAMAN V6.0 软件和 SignalIP5.0（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/）预测。蛋白跨膜情况利用在线预测软件 TMHMM（http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/）预测。用 MEGA6.0 软件中的邻接法构建系统发育树。

1.6 沙葱萤叶甲 *GdJHBP* 的表达谱分析

应用荧光实时定量 PCR（qPCR）技术分析沙葱萤叶甲不同发育时期、成虫不同组织部位及高温胁迫下的 *GdJHBP* 基因的表达量，选用 *SDHA* 作为内参基因（Tan *et al.*，2017）。qPCR 反应体系及反应条件的设置参照 SYBR Green qPCR Master Mix 使用说明书。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析 mRNA 的相对表达量（Livak and Schmittgen，2001）。

1.7 数据统计与分析

数据利用 SPSS 20.0 软件，采用单因素（ANOVA）中的 Duncan 氏法对沙葱萤叶甲不同发育时期、成虫不同组织部位及高温胁迫下 *GdJHBP* 的表达情况进行统计分析。结果以平均值±标准误表示，显著水平设定 $P<0.05$。

2 结果与分析

2.1 *GdJHBP* 的克隆及生物信息学分析

以根据转录组数据中的 *GdJHBP* 基因序列为模板，设计扩增中间片段的引物，电泳结果显示，扩增出目的片段大小为 755 bp（图 1：A），测序核苷酸序列与转录组中该基因序列相符。

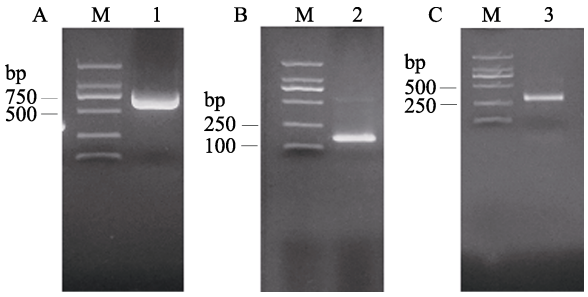


图 1 沙葱萤叶甲 *GdJHBP* 中间片段（A）、5′ RACE 目的片段（B）和 3′RACE 目的片段（C）PCR 扩增电泳图
Fig. 1 Electrophoretogram for PCR amplification products of the intermediate segment (A), 5′ RACE (B) and 3′ RACE (C) target fragments of *GdJHBP* from *Galeruca daurica*

M：DL2000 marker；1：*GdJHBP* 中间片段；2：5′RACE 片段；3：3′RACE 片段。
M： L2000 marker; 1: Intermediate segment of *GdJHBP*; 2: 5′ RACE segment; 3: 3′RACE segment.

经 5′ RACE PCR 反应获得 139 bp 的目的片段（图 1：B）。经 3′ RACE PCR 反应获得 281 bp 的目的片段（图 1：C）。测序的基因序列经比对后表明，扩增所得片段为所需目的片段，经片段拼接后得到 *GdJHBP* 基因的完整 cDNA 序列。

沙葱萤叶甲 *GdJHBP* 基因的 cDNA 全长为 826 bp（GenBank 登录号：MG460309），其中 ORF 长 714 bp，编码 237 个氨基酸，5′UTR 为 41 bp，3′UTR 为 71 bp（图 2：A）。

GdJHBP 的预测蛋白分子量为 26.58 ku，等电点为 4.37。蛋白质保守结构域预测结果表明：GdJHBP 拥有 JHBP 超基因家族的保守功能结构域（图 2：B）；GdJHBP 的 N 端有一条 18 个氨基酸残基（MFLFKVFTILSLALLARG）的信号肽且不含跨膜结构。

2.2　GdJHBP 的同源性比对及系统发育关系分析

从 NCBI 中搜索其它昆虫的血淋巴 JHBP、细胞质 JHBP 和细胞核 JHBP 的氨基酸序列与 *GdJHBP* 比对分析。序列比对结果显示，不同昆虫 JHBP 间的氨基酸序列一致性均较低，沙葱萤叶甲 GdJHBP 氨基酸序列与马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* JHBP 3p2 和棕榈象 *Rhynchophorus ferrugineus* JHBP 氨基酸序列一致性最高也仅为 30%，其次为马铃薯甲虫 JHBP 5p2 和马铃薯甲虫 JHBP 5p1，氨基酸序列一致性分别为 29%和 28%。

通过 NCBI 搜索其它已知的昆虫保幼激素结合蛋白的氨基酸序列，结合沙葱萤叶甲 GdJHBP 序列信息构建系统进化树。发育树结果表明细胞质、血淋巴和细胞核来源的 JHBP 分别聚为一支（图 3）。GdJHBP 与棕榈象 *Rhynchophorus ferrugineus* 血淋巴 hJHBP 聚在一起，然后与马铃薯甲虫 3 条未知类型的 JHBP 序列聚在一支，说明沙葱萤叶甲 GdJHBP 和棕榈象血淋巴 hJHBP 的亲缘关系比马铃薯甲虫 3 条未知类型的 JHBP 更近。

2.3　*GdJHBP* 发育阶段和组织特异性表达

RT-qPCR 分析表明，*GdJHBP* 在沙葱萤叶甲不同发育阶段均有表达，且存在显著差异（$P<0.05$）（图 4）。其中，在 1 龄和 2 龄幼虫中表达量最高，其次为 3 龄幼虫，在卵和蛹中的表达量最低；在成虫期，*GdJHBP* 表达量在滞育前（羽化 3 d）较高，进入滞育（羽化 7 d）以后，表达量显著下降并维持在较低的水平，羽化 40 d 以后随着成虫发育，表达量又逐渐升高，滞育解除（羽化后 100 d）后，表达量显著上升，但远低于幼虫期的表达量。*GdJHBP* 在沙葱萤叶甲成虫头、胸和腹部均有表达，但在胸和腹部的表达量远高于头部（图 5）。

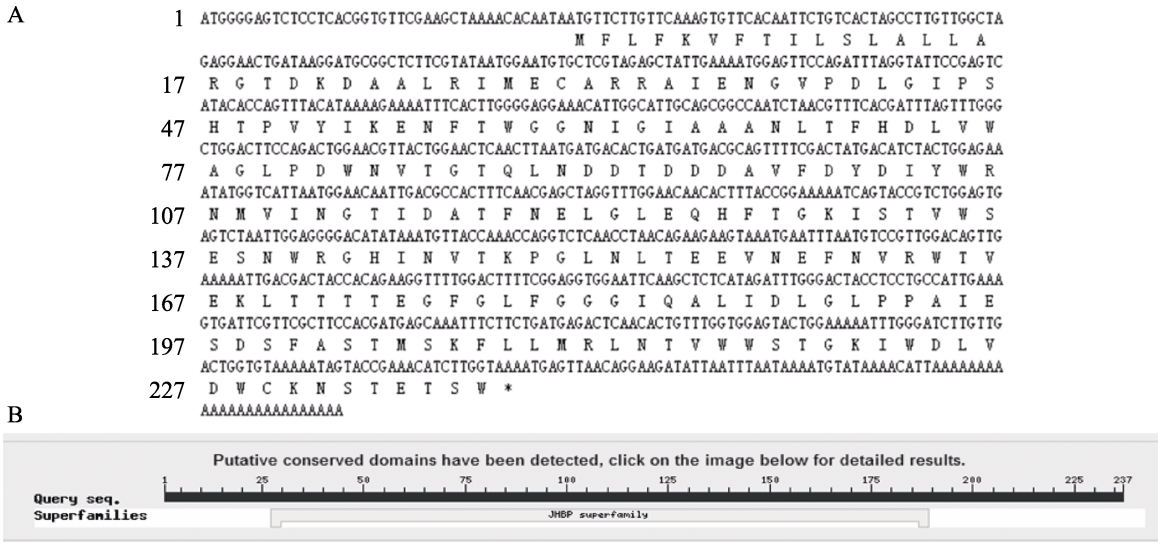


图 2　沙葱萤叶甲 *GdJHBP* 基因的核苷酸及推导的编码氨基酸序列（A）及序列包含的保守功能域（B）

Fig. 2　Nucleotide and encoded deduced amino acid sequence (A) and the conserved domains (B) of *GdJHBP* in *Galeruca daurica*

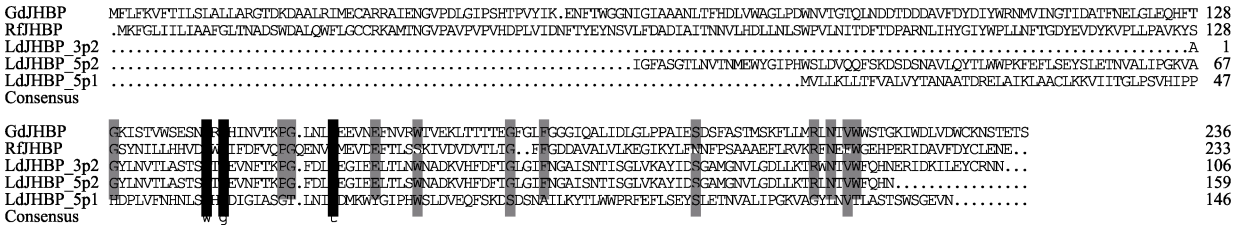


图 3 沙葱萤叶甲 GdJHBP 与其它昆虫 JHBP 基因的氨基酸序列比对

Fig. 3 Multiple amino acid sequence alignment of JHBP from *Galeruca daurica* and other insects

黑色阴影：100%氨基酸序列一致性 Black shadow indicates 100% identity in amino acid sequence；灰色阴影：75%氨基酸序列一致性 Grey shadow shows 75% identity in amino acid sequence; GdJHBP：沙葱萤叶甲 *Galeruca daurica* JHBP（MG460309）；RfJHBP：棕榈象 *Rhynchophorus ferrugineus* JHBP（AMK48565）；LdJHBP_3p2：马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* JHBP 3p2（AEX93418）；LdJHBP_5p2：马铃薯甲虫 *L. decemlineata* JHBP 5p2（AEX93420）；LdJHBP_5p1：马铃薯甲虫 *L. decemlineata* JHBP 5p1（AEX93419）.

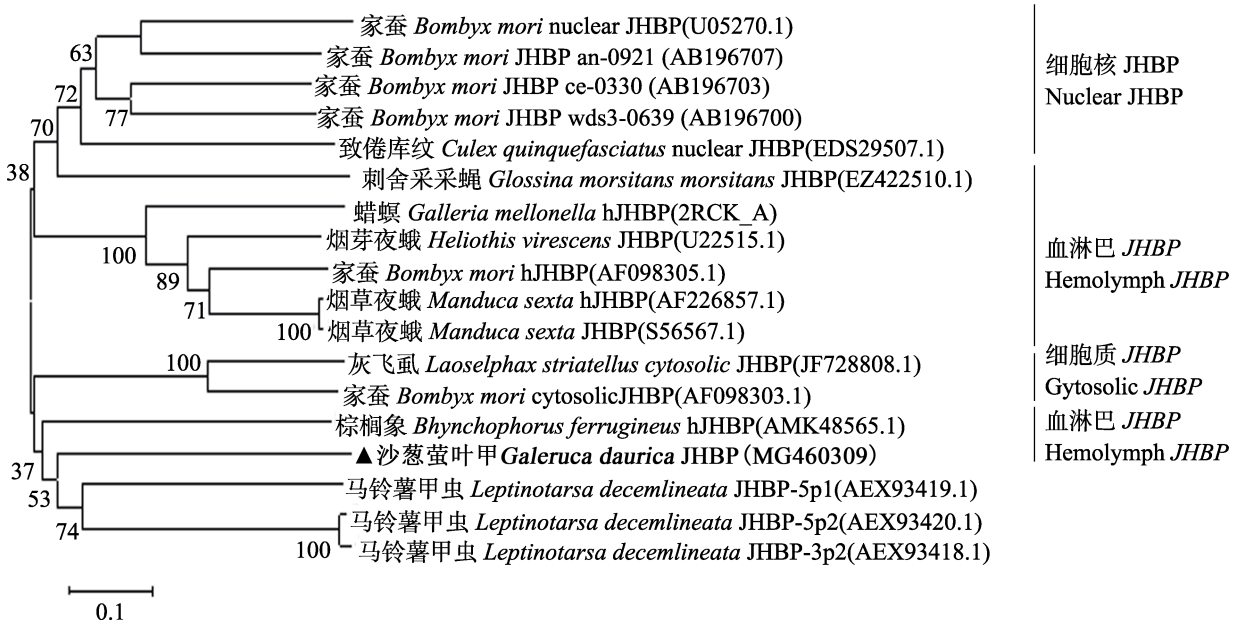


图 4 沙葱萤叶甲与其它昆虫保幼激素结合蛋白氨基酸序列构建的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on amino acid sequence of JHBPs from *Galeruca daurica* and other insects

使用 MEGA6 软件中的 Neighbor-Joining（NJ）法构建系统进化树，采用 P 距离（P-distance），重复运算 1 000 次。沙葱萤叶甲保幼激素结合蛋白基因用三角标记。

The tree was constructed by MEGA 6.0 using the Neighbor-joining (NJ) method, using P-distance, and one thousand replications were performed. The juvenile hormone binding protein of *Galeruca daurica* was marked with filled triangle.

2.4 高温对 *GdJHBP* 表达的影响

沙葱萤叶甲成虫在高温胁迫下处理 1 h 后，*GdJHBP* 表达量显著上升（P<0.05），且随温度升高而呈现上升的趋势，35 ℃时达到最高值，而后略有下降且差异显著（P<0.05）（图 6）。

3 讨论

JHBP 在 JH 运输和功能发挥中起着重要作用（Jindra *et al.*，2013）。在本研究中，根据本实验室组装的沙葱萤叶甲成虫转录组数据，结合 RACE 技术成功克隆得到沙葱萤叶甲 JHBP 基因的全长 cDNA 序列。序列比对和系统进化分析表明，沙葱萤叶甲 JHBP 与棕榈象血淋巴 JHBP 亲缘关系最近。因此，推测本次克隆获得的沙葱萤叶甲 JHBP 属于血淋巴 JHBP。氨基酸序列比对分析表明，不同昆虫 JHBP 间氨基酸序列一致性较低，沙葱萤叶甲 JHBP 与棕榈象和马铃薯甲虫

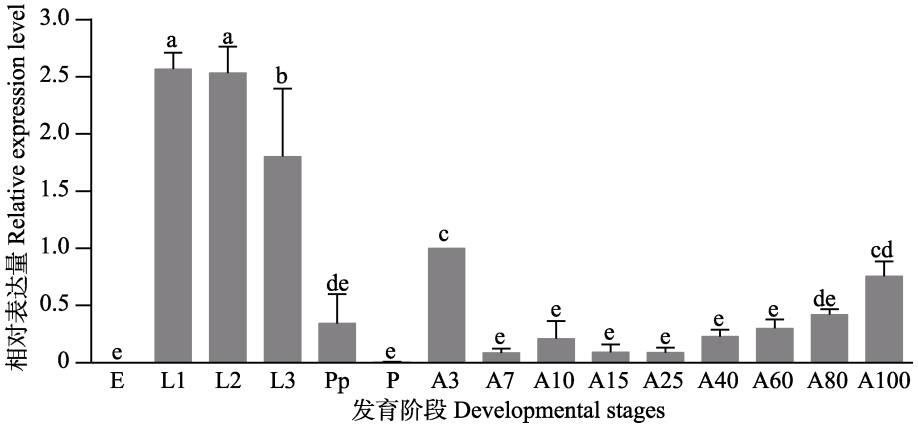


图 5　*GdJHBP* 在沙葱萤叶甲不同发育阶段的表达量

Fig. 5　Expressions levels of *GdJHBP* at different developmental stages of *Galeruca daurica*

E：卵；L1-L3：1-3 龄幼虫；Pp：预蛹；P：蛹；A3-A100：成虫羽化后第 3、7、10、15、25、40、60、80 和 100 天。图中数值为平均值±标准误，柱上标有不同的字母表示经 Duncan's 多重比较后差异显著（P<0.05）。下图同。

E: Egg; L1-L3: 1st-3th instar larva; Pp: Pre-pupa; P: Pupa; A3-A100: 3, 7, 10, 15, 25, 40, 60, 80, and 100 days after adult eclosion. Data represent the mean±SE. Histograms with different letters indicate significant difference by Duncan's multiple range test (P<0.05). The same below.

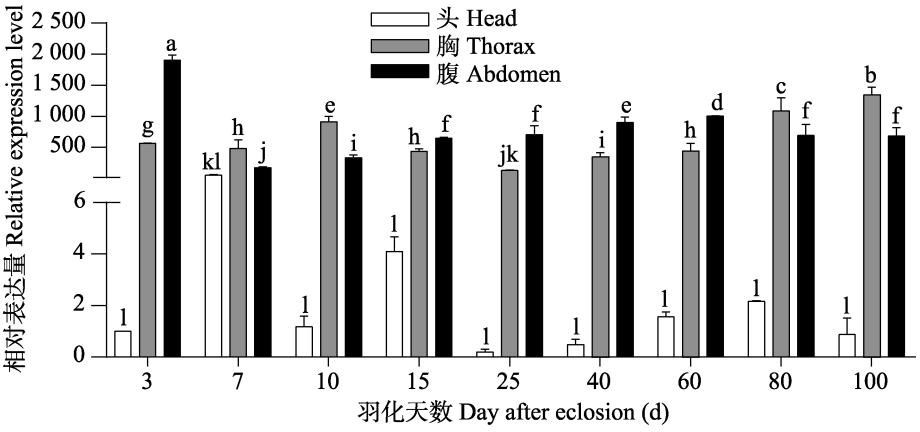


图 6　*GdJHBP* 在沙葱萤叶甲成虫不同组织中的表达量

Fig. 6　Expression levels of *GdJHBP* in different tissues of *Galeruca daurica*

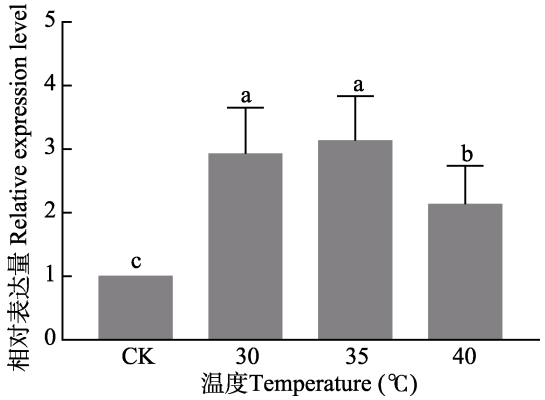


图 7　*JHBP* 在不同温度下的表达量

Fig.7　Expression levels of *GdJHBP* at different temperatures

JHBP 一致性最高也只有 30%。其他研究者也获得了类似的结果，这说明昆虫种间 JHBP 分化较大（Ritdachyeng *et al.*，2012；何石宝等，2017）。

JH 在昆虫滞育调控中发挥着重要作用（Jindra *et al.*，2013），而 JHBP 在昆虫体内运输 JH 并防止保幼激素酯酶降解 JH（Orth *et al.*，2003）。*JHBP* 表达量的变化与 JH 滴度的变化相一致（Ritdachyeng *et al.*，2012）。本研究表明，*GdJHBP* 在沙葱萤叶甲末龄幼虫（3 龄幼虫和前蛹）中的表达量显著低于 1 龄和 2 龄幼虫中的表达量。在其它种类昆虫的研究中也获得了类似的结果，如 *JHBP* 在灰飞虱 *Laodelphax*

striatellus 5 龄若虫（末龄）中的表达量显著低于 4 龄若虫（贺秀婷等，2012）。其原因是由于 JH 滴度在末龄幼虫（若虫）阶段显著降低或缺失，致使完全变态昆虫步入蛹期，不完全变态昆虫则羽化为成虫（Dubrovsky，2005；Bernardo and Dubrovsky，2012；Belles and Santos，2014）。同时，*GdJHBP* 在蛹期的表达量显著低于幼虫期。在其它昆虫中也获得了相同的结果，如竹虫 *Omphisa fuscidentalis*（Ritdachyeng *et al.*，2012）和家蚕 *Bombyx mori*（何石宝等，2018）。*GdJHBP* 在卵中仅微量表达，其原因可能是卵的个体较小，对保幼激素的需求较少，相应的 *JHBP* 表达量低（Li *et al.*，2015）。

目前认为保幼激素的缺乏是导致昆虫生殖滞育的主要原因（Denlinger，2003）。在短日照条件下，羽化后的马铃薯甲虫体内 JH 滴度呈现“U”型，即先下降，进入滞育期则维持在较低水平，而后随着滞育强度逐步减弱，JH 含量则呈现上升趋势，在滞育解除后快速上升（de Kort，1990）。马铃薯甲虫与沙葱萤叶甲为同属同科昆虫，对滞育的调控机理可能具有一定的相似性。本研究中，沙葱萤叶甲成虫 *GdJHBP* 的较高表达量出现在滞育前（羽化后 3 d），当进入滞育后表达量下降并维持在一个低水平，到滞育后期表达量逐渐上升，滞育结束后（羽化后 100 d）恢复到滞育前的水平。因此，保幼激素缺乏可能也是引起沙葱萤叶甲成虫生殖滞育的主要原因，保幼激素含量上升，滞育才得以解除。但沙葱萤叶甲 JH 滴度变化是否与 *GdJHBP* 表达变化相一致，还有待于进一步研究。

不同昆虫 *JHBP* 的表达部位不尽相同。沙葱萤叶甲 *GdJHBP* 在沙葱萤叶甲成虫的胸部和腹部高度表达，在头部低表达。家蚕 *Bmtol* 基因主要在家蚕 *B. mori* 5 龄幼虫的头部、表皮和精巢中表达量较高，而在脂肪体、中肠、丝腺、马氏管、血淋巴及卵巢等其他组织中表达量较低或无表达（何石宝等，2017）。但 Saito 等（2006）研究表明，*JHBP* 主要在家蚕 4 龄幼虫的脂肪体中表达，在中肠、丝腺和精巢中也有少量表达。在意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 中，只在头部和腹部检测到了 *JHBP* 的表达，在其它部位却没有发现（Hagai *et al.*，2007）。柞蚕 *Antheraea pernyi* 的细胞质 *cJHBP* 在马氏管中高表达，在血淋巴、脂肪体、丝腺、表皮、精巢、卵巢、脑和肌肉中也有不同程度的表达（Li *et al.*，2015）。竹虫 *O. fuscidentalis* 的 *OfJHBP* 在 5 龄幼虫脂肪体中高度表达，而在脑、前胸腺、表皮、肠道和丝腺中低表达（Ritdachyeng *et al.*，2012）。造成差异的原因很可能与昆虫种类、发育阶段及生理状态有关，也可能与 JHBP 的类型有关。

高温能诱导 *JHBP* 上调表达（Li *et al.*，2015）。本研究中，与 25 ℃对照相比，30-40 ℃高温处理 1 h 均可诱导 *GdJHBP* 上调表达，但在 40 ℃条件下的表达量显著低于 30 ℃和 35 ℃。可能是异常高温降低了昆虫咽侧体的活性，使体内 JH 滴度下降（Rohrkasten and Ferenz，1986），*JHBP* 表达量也相应下降。

本研究成功克隆了沙葱萤叶甲保幼激素结合蛋白基因 *GdJHBP*，与棕榈象血淋巴 JHBP 亲缘关系最近。*GdJHBP* 在沙葱萤叶甲不同发育阶段均有表达，其中幼虫期表达量最高，卵和蛹期微量表达；在成虫滞育期间低水平表达，且主要在胸部和腹部表达；高温可使其表达量上调。保幼激素缺乏可能是导致沙葱萤叶甲成虫夏滞育的主要原因之一。

参考文献 (References)

Belles X, Santos CG, 2014. The MEKRE93 (Methoprene tolerant-Kruppel homolog 1-E93) pathway in the regulation of insect metamorphosis, and the homology of the pupal stage. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 52(1): 60–68.

Bernardo TJ, Dubrovsky EB, 2012. Molecular mechanisms of transcription activation by juvenile hormone: A critical role for bHLH-PAS and nuclear receptor proteins. *Insects*, 3(1): 324–338.

Chang ES, Coudron TA, Bruce MJ, Sage BA, O'conner JD, Law JH, 1980. Juvenile hormone-binding protein from the cytosol of *Drosophila* Kc cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(8): 4657–4661.

Cho JR, Lee M, Min HS, Boo KS, 2007. Effect of the juvenile hormone analog, fenoxycarb on termination of reproductive diapause in *Scotinophara lurida* (Burmeister) (Heteroptera: Pentatomidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 10(2): 145–150.

de Kort CAD, 1990. Thirty-five years of diapause research with the Colorado potato beetle. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 56(1): 1–13.

Denlinger DL, 2003. Regulation of diapause. *Annual Review of Entomology*, 47: 93–122.

Dubrovsky EB, 2005. Hormonal cross talk in insect development. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 16(1): 6–11.

Hagai T, Cohen M, Bloch G, 2007. Genes encoding putative takeout /juvenile hormone binding proteins in the honeybee (*Apis mellifera*) and modulation by age and juvenile hormone of the takeout-like gene GB19811. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(7): 689–701.

Hao X, Zhou XR, Pang BP, Zhang ZR, Bao X, 2015. Morphological and biological characteristics of *Galeruca daurica* Joannis (Coleoptera: Chrysomelidae). *Acta Agrestia Sinica*, 23(5): 1106–1108. [昊翔, 周晓榕, 庞保平, 张卓然, 包祥, 2015. 沙葱萤叶甲的形态特征和生物学特性研究. 草地学报, 23(5): 1106–1108.]

He SB, Yang CF, Shang S, Wang LY, Tang WC, Zhu Y, 2017. Cloning and expression analysis of juvenile hormone binding protein gene *Bmtol* in silkworm, *Bombyx mori*. *China Biotechnology*, 37(10): 16–25. [何石宝, 杨成飞, 尚杉, 王凌燕, 唐文超, 朱勇, 2017. 家蚕保幼激素结合蛋白 *Bmtol* 基因的克隆及表达分析. 中国生物工程杂志, 37(10): 16–25.]

He SB, Yin YR, Zheng X, Guo DD, Xin J, Zhu Y, 2018. Expression and characterization of juvenile hormone binding protein *Bmtol* gene in silkworm, *Bombyx mori*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 34(1): 78–89. [何石宝, 殷娅茹, 郑茜, 郭东东, 辛佳, 朱勇, 2018. 家蚕保幼激素结合蛋白 *Bmtol* 基因的克隆及功能分析. 生物工程学报, 34(1): 78–89.]

He XT, Zhang YN, Li F, Li GQ, Dong SL, 2012. Cloning, temporal expression of a juvenile hormone binding protein gene in *Laodelphax striatellus* (Fallen). *Journal of Nanjing Agricultural University*, 35(2): 59–64. [贺秀婷, 张亚楠, 李飞, 李国清, 董双林, 2012. 灰飞虱保幼激素结合蛋白基因的克隆及表达动态. 南京农业大学学报, 35(2): 59–64.]

Hidayat P, Goodman WG, 1994. Juvenile-hormone and hemolymph juvenile-hormone binding-protein titers and their interaction in the hemolymph of 4th stadium *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 24(7): 709–715.

Jindra M, Palli SR, Riddiford LM, 2013. The juvenile hormone signaling pathway in insect development. *Annual Review of Entomology*, 58: 181–204.

Konopova B, Jindra M, 2007. Juvenile hormone resistance gene Methoprene-tolerant controls entry into metamorphosis in the beetle *Tribolium castaneum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(25): 10488–10493.

Li Y, Peng MH, Chen MM, Li YP, Zhang QR, Jiang XF, Liu YQ, 2015. Characterization of insect cytosolic juvenile hormone binding protein gene: Highly homology with vertebrate glyoxalase domain containing protein 4. *Biochemical Systematics and Ecology*, 58: 227–234.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. *Methods*, 25(4): 402–408.

Ma HY, Zhou XR, Tan Y, Pang BP, 2019. Proteomic analysis of adult *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae) at different stages during summer diapause. *Comparative Biochemistry and Physiology-D*, 29: 351–357.

Orth AP, Lan Q, Goodman WG, 1999. Ligand regulation of juvenile hormone binding protein mRNA in mutant *Manduca sexta*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 149(1/2): 61–69.

Orth AP, Tauchman SJ, Doll SC, 2003. Embryonic expression of juvenile hormone binding protein and its relationship to the toxic effects of juvenile hormone in *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(12): 1275–1284.

Ritdachyeng E, Manaboon M, Tobe SS, Singtripop T, 2012. Molecular characterization and gene expression of juvenile hormone binding protein in the bamboo borer, *Omphisa fuscidentalis*. *Journal of Insect Physiology*, 58(11): 1493–1501.

Rohrkasten A, Ferenz HJ, 1986. Properties of the vitellogenin receptor of isolated locust oocyte membranes. *International Journal of Invertebrate Reproduction*, 10(2): 133–142.

Saito K, Su ZH, Emi A, Mita K, Takeda M, Fujiwara Y, 2016. Cloning and expression analysis of takeout/JHBP family genes of silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Molecular Biology*, 15(3): 245–251.

Shemshedini L, Lanous M, Wilson TG, 1990. Evidence for a juvenile hormone binding protein receptor involved in protein synthesis in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(4):1913–1918.

Tan Y, Zhou XR, Pang BP, 2017. Reference gene selection and evaluation for expression analysis using qRT-PCR in *Galeruca daurica* (Joannis). *Bulletin of Entomological Research*, 107(3): 359–368.

Watanabe M, Tanaka K, 2000. Hormonal control of diapause and overwintering traits in a leaf beetle, *Aulacophora nigripennis*. *Physiological Entomology*, 25(4): 337–345.

Zhou XR, Gao JC, Pang BP, 2016. Effects of temperature on the termination of egg diapause and post-diapause embryonic development of *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environmental Entomology*, 45(4): 1076–1080.