

研究论文

小地老虎 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶基因 cDNA 序列的克隆及 mRNA 组织特异性表达^{*}

高艳玲^{**} 吴丽梅 郭博智 樊东^{***}

(东北农业大学农学院 哈尔滨 150030)

摘 要 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶是昆虫几丁质代谢中一种关键酶,在昆虫的多种生理活动中发挥重要作用。本文以小地老虎 *Agrotis ipsilon* Hufngel 预蛹期幼虫为材料提取总 RNA,利用 RT-PCR 和 RACE 技术,扩增得到其 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶基因的 cDNA 序列。该序列含有 2 701 个碱基,包括一个 1 788 个碱基的开放阅读框,编码一个含 595 个氨基酸的蛋白,分子量约为 68.3 ku,等电点为 5.48。推导得到的氨基酸序列与其他昆虫,尤其是鳞翅目昆虫的 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶高度同源。基因 cDNA 序列已经登录 GenBank 并获得登录号 GU985280。该基因在小地老虎取食期和预蛹期的马氏管、中肠、脂肪体、体壁和去中肠虫体中均含有 mRNA 水平的表达。

关键词 小地老虎, β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶, 分子克隆, 组织表达

cDNA cloning and mRNA expression of β -N-acetylglucosaminidase in different tissues of *Agrotis ipsilon* Hufngel

GAO Yan-Ling^{**} WU Li-Mei GUO Bo-Zhi FAN Dong^{***}

(Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract β -N-acetylglucosaminidase is an enzyme that can degrade chitin in insects. Total RNA was isolated from the prepupal stage of *Agrotis ipsilon* Hufngel. The cDNA sequence was cloned by RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE). The cDNA, 2 701 base pairs in length, contained an open reading frame of 1 788 base pairs coding for a polypeptide of 595 amino acid residues with a predicted molecular weight of 68.3 ku and pI 5.48. The predicted protein shared extensive similarities with those from other insects, especially Lepidopteran insects. The cDNA sequence has been deposited in GenBank with the accession No. GU985280. RT-PCR results indicate that β -N-acetylglucosaminidase mRNA was expressed in the malpighian tubules, midgut, fat bodies and integument.

Key words *Agrotis ipsilon*, β -N-acetylglucosaminidase, cloning, mRNA expression

在昆虫中, β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶 (β -N-acetylglucosaminidase, NAG, EC 3.2.1.30) 是几丁质降解酶系的组分之一。在烟草天蛾 *Manduca sexta* 蜕皮液中发现由 2 种酶水解几丁质, 几丁质酶和 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶 (Kramer and Koga, 1986)。这 2 种酶在几丁质分解代谢过程中协同作用, 水解速率远高于其中一种酶的单独作用。

催化几丁质的活性强度取决于 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶和几丁质酶的相对比例。几丁质酶不能有效地将几丁质分解成 GlcNAc 单体, β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶则能对几丁质酶切产物几丁质低聚物进一步分解产生 GlcNAc 单体 (Sahai and Manocha, 1993)。

家蚕 *Bombyx mori* 中最早纯化出了 β -N-乙酰

* 资助项目: 哈尔滨市科技创新人才研究专项资金项目 (RC2006QN002027)、黑龙江省教育厅科学技术研究项目 (11521020)。

**E-mail: cd_gaoyanling@126.com

***通讯作者, E-mail: dnfd@163.com

收稿日期: 2011-06-13, 接受日期: 2011-07-31

葡萄糖胺糖苷酶(Yasunori *et al.*, 1995),烟草天蛾 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶也随后被克隆出来(Zen *et al.*, 1996),最近 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶在埃及伊蚊 *Aedes aegypti*、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 以及草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 等昆虫中也被鉴定出来(Boquet *et al.*, 2000; Filhoa *et al.*, 2002)。已发现在不同种类昆虫中鉴定出的一些 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶除了能够分解几丁质还具有其它作用。鳞翅目细胞系 Sf21 中发现一种罕见的与膜结合的 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶,通过超速离心试验证实这种酶具有可溶和与膜结合 2 种存在形式。膜结合形式占总 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶的 2/3,在 N-聚糖蛋白加工中起到重要作用(Altmann *et al.*, 1995)。

小地老虎 *Agrotis ipsilon* Hufngel, 属鳞翅目夜蛾科。全国各地都有分布,食性杂,能为害 36 科 100 多种植物。在农业生产中,危害玉米、棉花、蔬菜等作物幼苗。轻发生时造成缺苗断垄,重发时田块可造成几乎无苗或毁种(孙学俊等,2007)。本研究对小地老虎 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶基因 cDNA 进行了克隆,获取了基因 cDNA 全长序列,并对该基因在虫体不同组织中 mRNA 水平的表达进行了研究,为该基因的进一步研究和应用打下了基础。

1 材料与方法

1.1 昆虫材料、试剂、质粒与菌株

田间利用黑光灯诱集小地老虎成虫,室内产卵并用天然饲料喂养;RNA 提取试剂盒 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;克隆载体 pMD18-T、DNA 胶回收试剂盒、DL2000 DNA Marker、*Taq* plus DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司;受体菌 DH5 α 由作者所在实验室保存,其余试剂为进口或国产分析纯。

1.2 虫体总 RNA 的提取

小地老虎预蛹期幼虫总 RNA 的提取参照 RNA 提取试剂盒说明,每 100 mg 虫体加入 TRIzol® Reagent 1 mL。提取的总 RNA 放入 -80℃ 冰箱中备用。

1.3 利用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆基因 cDNA 序列

1.3.1 利用 RT-PCR 克隆部分 cDNA 序列 根据报道的 2 种昆虫:烟草天蛾 *Manduca sexta* (AY368703)、八字地老虎 *Agrotis c-nigrum* (FJ848784) 的 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶核苷酸序列进行比较分析,设计一对引物 AiNAG 和: 5'-ACT TTC CAT TGG CAC ATC AC-3' 和 Anti-AiNAG: 5'-AGC CTT ATA AGC CCT ATC CT-3'。以 Oligo (dt) 3site adapter primer: 5'-GAC TCG AGT CGA CAT CGA (T)₁₇-3' cDNA 合成引物,合成的 cDNA 片段以 AiNAG 和 Anti-AiNAG 扩增 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶 cDNA 序列的特异片段,PCR 反应条件: 94℃ 预变性 3 min; 94℃, 30 s; 52℃, 1 min; 72℃, 1 min, 30 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 pMD18-T vector 连接,转化 *E. coli* DH5 α ,菌落在含有 X-gal 和 IPTG 的平板上进行蓝白斑筛选,对白斑进行酶切和 PCR 鉴定。连接正确的重组子由上海生工生物工程公司进行序列测定。

1.3.2 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 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶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 NAG outer primer: 5'-CAA ATA GTC GTA CAG CTC CTC CCG GGT CGG GTT C-3' 和 NAG inner primer: 5'-TCG AAT GGG AAG CTC TGG CTG TC-3',以引物 5'-RACE outer primer 和 NAG outer primer 进行第 1 轮 PCR。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃, 30 s; 54℃, 1 min; 72℃, 2 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。取首次扩增产物 1 μ L,用 5'-RACE inner primer、NAG inner primer 引物进行第 2 次 PCR 扩增,扩增条件为: 94℃ 预变性 3 min; 94℃, 30 s; 55℃, 1 min; 72℃, 1 min 30 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析。PCR 产物回收、与 pMD18-T 载体连接、转化并测序。

1.3.3 克隆基因的 3'cDNA 序列 根据得到的 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶 5'序列设计 1 个克隆基因 3'端的上游引物 5'-TGG CAG GAC ACT GAT CTC-3'。利用这个引物与 3 site adapter primer: 5'-GAC TCG AGT CGA CAT CGA-3' PCR 扩增基因的 3'端,PCR 反应条件: 94℃, 30 s; 57℃, 1 min; 72℃, 2 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。扩增完成后

用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。检测结果正确后用凝胶回收试剂盒回收,回收产物与 T-载体连接、转化、筛选、鉴定、序列测定,方法同上。

根据拼接得到的全长序列,设计克隆基因全长序列的引物,一次性克隆全长序列。

1.4 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、等电点; SignalP 3.0 Server 进行信号肽的预测; NCBI 中 conserved domain 软件参照 Zen 等 (1996) 提供的保守区比对结果预测氨基酸序列中的保守区; DNAMAN 软件进行系统进化树分析。

1.5 基因的时空表达研究

利用 RT-PCR 法,对小地老虎取食期、预蛹期不同组织 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶在 RNA 水平的表达进行研究。分别提取 5 龄及预蛹期的唾腺、马氏管、中肠、脂肪体、体壁、去中肠虫体的总 RNA, DNA 酶处理。扩增用的特异性引物为 5'-CCG GAA TTC ATG TGG CTT CAA AA TAT AGT-3' 和 5'-CCC AAG CTT TCG ATA GCA GTT GCC TTC GTT-3'; 以 actin 作为对照,引物为: 5'-AGC AAG AGA GGT ATC CTC AC-3' 和: 5'-ATC TCC TGC TCG AAG TCG AG-3'。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃, 30 s; 52℃, 30 s; 72℃, 2 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min, PCR 产物均经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析。

2 结果与分析

2.1 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶基因 cDNA 序列的获得

利用 RT-PCR 技术扩增出小地老虎 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶基因部分 cDNA 序列,在 GenBank 上用 Blast 软件搜索,找到同源性较高的序列均为昆虫 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶 cDNA 序列,初步断定这段 cDNA 序列属于昆虫 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶全长 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。克隆得到的小地老虎 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶 cDNA 序列已经登录 GenBank 并获得登录号

GU985280。该基因的 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列见图 1。

2.2 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶基因 cDNA 序列和氨基酸序列分析

小地老虎 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶 cDNA 序列 2 701 个碱基, 3' 含有 786 个碱基的非编码区, 5' 端有一个 127 个碱基的非编码区, 包括一个 1 788 个碱基的开放读码框, 编码 595 个氨基酸组成的多肽, 分子量约为 68.3 ku, 多肽的等电点为 5.48。ExPASy Proteomics tools SignalP3.0 Server 进行信号肽预测在 23 ~ 24 位为信号肽切割位点, 3' 端含有一个多聚腺苷酸信号 AATAAA。在推导得到的氨基酸序列的 205 ~ 254 位和 359 ~ 375 含有 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶的 2 个高度保守区。在 50 ~ 53 NESY、337 ~ 340 NPTR 和 376 ~ 379 NSSE 含有 3 个 N-位糖基化位点。

2.3 昆虫 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶氨基酸序列比对

小地老虎 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶氨基酸序列与已经克隆得到的其他鳞翅目 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶序列进行了序列比对。结果表明, 小地老虎 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶与夜蛾科的八字地老虎 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶 (FJ848784) 一致性达到 91.9%, 与夜蛾粉纹夜蛾 AY078172 一致性也达到了 78.6%, 与另外几种鳞翅目昆虫烟草天蛾 (AY368703)、家蚕 (S77548)、野蚕 (AF326597)、玉米螟 (DQ887769) β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶一致性都达到 70% 以上, 但与其他几种鳞翅目昆虫, 包括草地贪夜蛾 (EU334747) 等的一致性不到 40% (表 1)。

从系统进化分析结果 (图 2) 发现, 小地老虎的 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶与同一个属的八字地老虎 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶关系最近, 继而与同一个科的粉纹夜蛾 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶关系较近, 与其他鳞翅目不同科昆虫的 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶关系相对较远。但与其他几种鳞翅目昆虫, 包括夜蛾科的草地贪夜蛾 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶的亲缘关系很远。

2.4 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶基因 mRNA 在不同组织中表达

组织特异性表达结果表明, β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶在小地老虎取食期和预蛹期的马氏管、中

```

1   CGCGGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCGATGGAAAAGACCTTCCAACGTAAGCTACTAGGCCACTCTTTGTCACTGTCCCAGCCATC
91  GCGGACCGGTGGACGTAGTCACTTTATAGATTAAGATGGCTTCAAAAATATAGTTTGTGTGCTGTCTACATAACGCTATTATCA
1   M W L Q K Y S L C A V Y I T L L S
181 GTAATATGCGTAAGTCCGATGATGCATCACCATGGAGGTGGACTTGTGAAGAGAGACG ATGCGTGAAGACCCGGAATCACATCCAGAAT
18  V I C V T A D D A S P W R W T C E E R R C V K T R N H I Q N
271 AAGGACCCAGTCTCAGTTTAGAGGCTGCAAGATGTTCTGTAACGAGTATGGTTTACTATGGCCGAAGCCGACTGGAAGGCAGACTTG
48  K D P V L S L E A C K M F C N E Y G L L W P K P T G K A D L
361 GGCAACTCTTGTCTAAGATCAACATCAACAACATCGAGTTAAGATGGCTAAGAGGGAAGGCCCTCGGGTCTCATGACGATGCTGCA
78  G N F L S K I N I N N I E F K M A Q E G R A S G L M N D A A
451 GACAGGTTCAAGAGATAGTATCTCTGGCGATACCTGAAGGCATTTACCCAAGTCACTGGGAAGACTTTGACTATCTCTGTTAAG
108 D R F K K I V S L A I P E G I S P K S S G K T L T I L L V N
541 GAGTTCCTGATGTTAGAGATTTCTCAATGGCAATGAACGAGAGCTACAGCATCCGCGTGCAGGCGGTCTCGGGAGACAGGATCAGTGCC
138 E F P D V R D F S M A M Y S I R V Q A V S G D R I S A
631 ACCATCGGGAGGCTGTTCTTCTGGAGTGAGGCACGGCTCGAGACTCTCTACAGCTCATCGTGTATGATGACATCCGGAACCATATG
168 T I T G G S F F G V R H G L E T L S Q L I V Y D D I R N H M
721 CTGATTGTGCGAGATGTACCATCACTGACAACCCAGTGTACCCGTACCGTGGCATTCTCTTGACACGTCCGCGCAACTTCTACAGCATC
198 L I V R D V T I T D N P V Y P Y R G I L L D T S R N F Y S I
811 GACTCTATCAAGGCTACCATCGATGCGATGGCGGCTGTTAAGTTGAACACTTTCCATTGGCACATCACTGACAGTCAGAGCTTCCCCTTC
228 D S I K A T I D A M A A V K L N T F H W H I T D S Q S F P F
901 GAAGTTAGCAGGCGACCTCAGTTGTCCAAGATCGGTGCTTACTCTCCGGCTAAGGTGCACACTAGAAAAGCTATTGAAGAGGTGGTGGAA
258 E V S R R P Q L S K I G A Y S P A K V H T R K A I E E V V E
991 TACGGAAGAGTGCAGGCTGTGCGGTTTACCGGAGTTTATGCGCCTGCGCAGCTTGGAGAGGGTTGGCAGGACACTGATCTCACCGTC
288 Y G K V R G V R V L P E F D A P A H V G E G W Q D T D L T V
1081 TGCTTCAAGGCTGAACCATGGTCTCTTACTGCGTGAGGCTCTTGTGGCAACTGAACCCGACCCGGAGGAGCTGTACGACTATTG
318 C F K A E P W S S Y C V E P P C G Q E E L Y D Y L
1171 GAGGACATCTACAGGAAAATCCGATGTGTTCCAACAGACATGTTCCACATGGGCGGTGACGAGGTACGCGAGAGCTGTGGAACCTCT
348 E D I Y R E M S D V F Q P D M F H M G G D E V S E S C S
1261 TCTGAAGAAATCCGAACCTCATGATCCAAAACAGGTGGAACCTGGAGCAGGCCAGCTTTTGAAGACTCTGGAACACTTCCAGATGAAG
378 E I Q N F M I Q N R W N L E Q A S F L K L W N Y F Q M K
1351 GCTCAGGATAGGGCTTATAAGGCTTTCGGAAGAGACTGCCCTGATTCTATGGACCAGCAGCTGACCGACTTACGCACATCGATAAC
408 A Q D R A Y K A F G K R L P L I L W T S T L T D F T H I D N
1441 TTCCTCGACAAAGATGATTATATCATCCAGGTTTGGACGACCGGTTCCAGTCCTCAGGTCACTGGTCTCTAGAGAAGGGTTACCGACTG
438 F L D K D D Y I I Q V W T T G S S P Q V T G L L E K G Y R L
1531 ATCATGTCCAACACGACGCGTTATCTCGACTGCGGTTTCGGGCTTGGGTTGGCGAAGGTAACAATTGGTGTCTCCATACATCGGT
468 I M S N Y D A L Y F D C G F G A W V G E G N N W C S P Y I G
1621 TGGCAGAAAGTGTACGACAATAGCCCCGCAAAAATTGCCAAGAAACATAAACACTTGATTTTGGGAGGTGAAGCAGCTCTTGGTCTGAG
498 W Q K V Y D N S P A K I A K K H K H L I L G G E A A L W S E
1711 CAGTCGGAAGTGTCCACCTGGACAACAGGCTGTGGCCGCGCGCCGCGCTCGCCGAGCGACTGTGGGCCGAGCCGACACCTGG
528 Q S D S S T L D N R L W P R A A A L A E R L W A E P D H T W
1801 CACGAGGACAGACAGGATGCTGCATCAGGGAGCGTTTGGTCCGATGGGTACTAAGCCGACTCTTAGAGCCTGAGTGGTGTCTAC
558 H E A E H R M L H I R E R L V R M G T Q A D S L E P E W C Y
1891 CAGAACGAAGCAACTGCTATCGATGAATTTAGGCAACAGTGTGCCACGTGTCAACACTATCTTGTTCACGTCATAATAAAGCT
588 Q N E G N C Y R *
1981 GGTCTGCTCTATGTTCTATGGGTCATACCGACGTGAACGGTTTTCACCTAAGCGAAACATGAATGTTGGCAACACTTGACCACGTCGTAG
2071 ATAATAAACAATGAAGTGCCAAGTCTTCTGTAGTAAAGTAATATTTTATGGATTATAAATTATAGGTTACAGCTATTGTATCACT
2161 GTTTTCACGGAATATAAATGATGATTTCGGGTTCTCTATTACATACATGCCTAATATCAAGCCATAACAATCAGTAATTTGAACCTATA
2251 GTGTTGTATCTGGATATCCAGTTGACCAATATTTGTATCAGTATGGGACAAACATTGCCGCCATACTTTGATTAGACAGTTAACATTTA
2341 TGACCACATTGCCAAACATGAAATCGTTTGTGAAACGTGGCTTATCTGTCTTAAGACTGACCACATTGCCAAACATGAAATCGTTTT
2431 GTGAAACGTGGCTTATCTGTCTTAAGACAATCACTGTGATCGACTCATATACACGTAGGTTTATATTGTAACACATCTCGTAATGTT
2521 TTGTACGTGGATGTGCTAATTGTAATGTCAATGTATGATTATTAACCTAAGTAAAGTATTATTGTAACCTTACATCTTTTGT AATAA

```

图1 小地老虎 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶基因核苷酸序列及推导的氨基酸序列Fig. 1 cDNA and deduced amino acid sequence of NAG from *Agrotis ipsilon*

注:起始密码子 ATG 和终止密码子 TGA 加边框表示,信号肽用下划线标出,N-位糖基化位点用黑色阴影表示,多聚腺苷酸信号 AATAAA 用双下划线标出,保守区用灰色阴影显示,左侧数字代表核苷酸和氨基酸序列位置,* 表示对应核苷酸序列终止密码子。

The initial codon ATG and termination codon TGA are boxed, the putative signal peptide of the deduced amino acid sequence is underlined, N-glycosylation domain is high lighted in black, singal of polyadenylic acid AATAAA are in double-underlined, conserved cDNA region is high lighted in gray, the numbers on the left are for nucleotide sequence and amino acid sequence,

* indicates that corresponding nucleotide sequence is stop codon.

表 1 不同夜蛾科昆虫 NAG 基本特征及与小地老虎 NAG 序列的一致性 (%)
Table 1 Characteristics and identity of *Agrotis ipsilon* NAG with other insects

昆 虫 Insect	GenBank 登录号 Accession No.	cDNA (bp)	ORF (aa)	M. W (ku)	pI	与小地老虎 NAG 氨基酸序列一致性 Identity of <i>Agrotis ipsilon</i> NAG
小地老虎 <i>Agrotis ipsilon</i> *	GU985280	2 701	1 788	68.3	5.48	—
八字地老虎 <i>Agrotis c-nigrum</i>	FJ848784	2 488	1 782	67.8	5.38	91.9
粉纹夜蛾 <i>Trichoplusia ni</i>	AY078172	2 457	1 785	68.0	5.36	78.6
家蚕 <i>Bombyx mori</i>	S77548	3 296	1 788	68.2	5.17	73.1
烟草天蛾 <i>Manduca sexta</i>	AY368703	3 008	1 788	68.6	5.43	72.6
玉米螟 <i>Ostrinia furnacalis</i>	DQ887769	2 592	1 782	67.9	5.32	71.9
野蚕 <i>Bombyx mandarina</i>	AF326597	3 283	1 791	68.2	5.44	71.4
云杉卷叶蛾 <i>Choristoneura fumiferana</i>	DQ005717	2 311	1 779	67.8	5.22	70.5
家蚕 <i>Bombyx mori</i>	AB286957	2 197	1 833	69.6	5.77	38.4
草地贪夜蛾 <i>Spodoptera frugiperda</i>	EU334747	2 319	1 893	70.0	6.75	37.6
家蚕 <i>Bombyx mori</i>	AY601817	1 648	1 608	61.5	5.25	37.6
家蚕 <i>Bombyx mori</i>	AB286958	2 453	1 608	61.6	5.47	37.1
家蚕 <i>Bombyx mori</i>	AY601818	1 564	1 524	58.3	5.46	36.2

注:带* 号的为本研究克隆得到基因的氨基酸序列。图 2 同。
The insect with * is the target AA sequence. The same for Fig. 2.

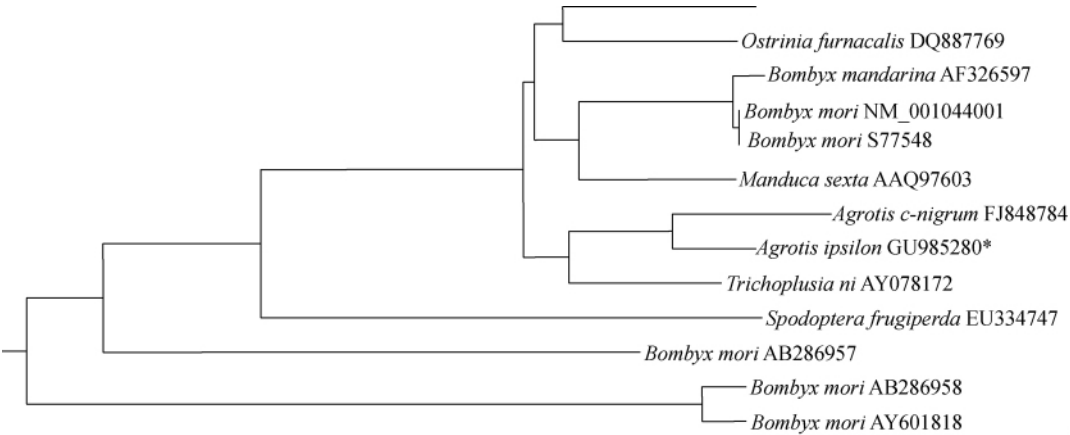


图 2 小地老虎与其他鳞翅目昆虫 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶氨基酸序列系统进化分析
Fig. 2 Phylogenetic tree of insects' NAG which have been deposited in GeneBank

肠、脂肪体、体壁等组织以及去中肠虫体中表达,在唾腺中不表达(图 3);结果表明 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶会在昆虫的多个组织中表达。

3 讨论

β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶广泛存在于动物、植物及微生物中。在甲壳动物与昆虫体内, β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶主要是协助甲壳动物与昆虫

顺利完成生理周期性蜕壳和孵化,同时它作为几丁质级联催化降解途径的关键酶,在自然界的碳循环中也起到了极其重要的作用(Funke and Spindler, 1989; Takahiro *et al.*, 2007)。

本试验克隆得到一条小地老虎 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶 cDNA 序列,通过与其他昆虫 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶基因进行同源性比对和系统进化分析,可以明显看出小地老虎 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷

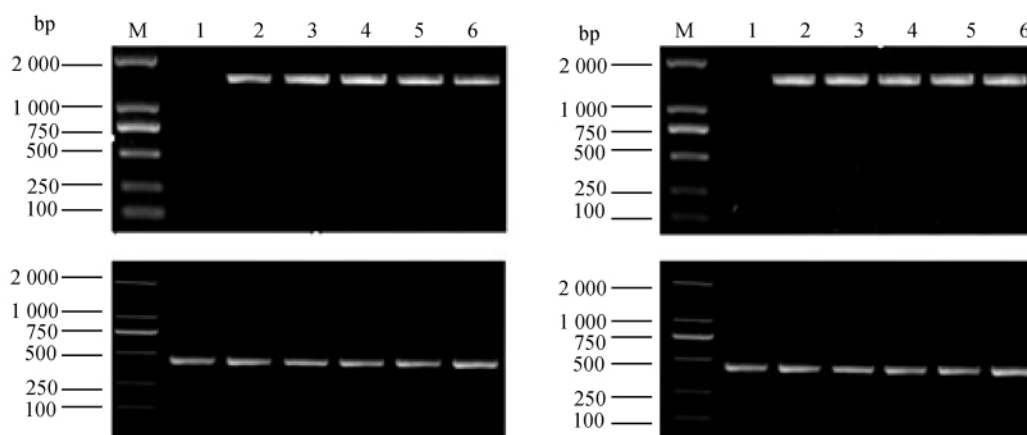


图3 小地老虎 NAG 基因在不同发育阶段各个组织中的表达

Fig.3 mRNA expression at different tissue and developmental stages of NAG from *Agrotis ipsilon*

左侧:取食期 NAG RT-PCR 结果,右侧:预蛹期 NAG RT-PCR 结果。

left:result of NAG RT-PCR at fifth instar larvae;right:result of NAG RT-PCR at prepupal stage.

注:图中 M 均为 DL2000 Marker;1 唾腺 salivary glands;2 马氏管 Malpighian tubules;3 中肠 midgut;4 脂肪体 fat body;5 体壁 integument;6 去中肠虫体 carcass without midgut。图上部条带为 NAG 的 PCR 产物,下部条带为 actin 的 PCR 产物。

upper band: CDA mRNA PCR product;lower band: actin mRNA PCR product.

酶与鳞翅目八字地老虎、粉纹夜蛾、亚洲玉米螟、烟草天蛾等同源性较高,而与同为夜蛾科的草地贪夜蛾同源性较低,推测 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶存在多种不同类型,小地老虎 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶与草地贪夜蛾分属不同类型,可在以后的研究中继续克隆其他类型的小地老虎 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶基因,进一步完善昆虫 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶基因拷贝数研究。

对多种农业害虫和卫生害虫进行有效地控制,杀虫剂的使用是必不可少的。但是害虫对现在使用的商品杀虫剂的抗性都在不断增加。从长远看尚缺乏足够有效的控制害虫的方法。选择 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶破坏几丁质结构或几丁质代谢的平衡破坏昆虫的正常蜕皮过程来防治害虫,具有一定的发展潜力(Joshi *et al.*, 1989; Kramer and Subbaratnam, 1997)。 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶因为能水解几丁质有破坏围食膜的作用,因而被作为防治害虫的潜在的一种手段。可以将此酶导入昆虫的体内来破坏其正常的组织结构,使细菌或病毒更宜侵入虫体,达到抑杀害虫的目的;也可以通过调控此酶的活性来影响昆虫的生长发育,降解几丁质是一种防治昆虫很有前景的策略(欧阳石文等,2001)。

参考文献 (References)

- Altmann F, Schwihla H, Staudacher E, Glössl J, März L, 1995. Insect cells contain an unusual, membrane-bound β -N-acetylglucosaminidase probably involved in the processing of protein N-glycans. *J. Biol. Chem.*, 270 (29): 17344—17349.
- Boquet I, Hitier R, Dumas M, Chaminade M, Pr  at T, 2000. Central brain postembryonic development in *Drosophila*: Implication of genes expressed at the interhemispheric junction. *J. Neurobiol.*, 42 (1): 33—48.
- Filhoa BP, Lemosb FJ, Secundinod NF, P  ascoab V, Pereirac ST, Pimenta PF, 2002. Presence of chitinase and beta-N-acetylglucosaminidase in the *Aedes aegypti*: A chitinolytic system involving peritrophic matrix formation and degradation. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32 (12): 1723—1729.
- Funke B, Spindler KD, 1989. Characterization of chitinase from brine shrimp. *Artemia. Comp. Biochem. Physiol.*, 94 (4): 691—695.
- Joshi S, Kozlowski M, Richens S, Comberbach DM, 1989. Chitinase and chitinase production during fermentation of genetically improved *Serratia liquefaciens*. *Enzyme Microb. Technol.*, 11 (5): 289—296.
- Kramer KJ, Koga D, 1986. Insect chitin: Physical state, synthesis, degradation and metabolic regulation. *Insect Biol.*, 16 (6): 851—877.

- Kramer KJ, Subbaratnam M, 1997. Insect chitinases. molecular biology and potential use as biopesticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27 (11) :887—900.
- Sahai AS, Manocha MS, 1993. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host parasite interaction. *FEMS Microbiol. Rev.*, 11 (4) :317—338.
- Takahiro O, Seiji I, Hideki S, Akihiro U, Toshiki T, Kazuei M, Kazuhito F, Tatsuji S, 2007. Molecular cloning and expression of two novel β -N-Acetylglucosaminidases from silkworm *Bombyx mori* bioscience. *Biotech. Biochem.*, 71 (7) :1626—1635.
- Yasunori N, Isao Y, Masafumi K, Koga D, 1995. Purification of a chitoooligosacch aridolytic β -N-acetylglucosaminidase from *Bombyx mori* larvae during metamorphosis and the nucleotide sequence of its cDNA. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59 (2) :219—225.
- Zen K, Choi HK, Krishnamachary N, Muthukrishnan S, Kramer KJ, 1996. Cloning, expression, and hormonal regulation of an insect beta-N-acetylglucosaminidase gene. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 26 (5) :435—444.
- 欧阳石文, 刘江良, 冯兰香, 赵开军, 2001. 几丁质酶在植物保护中的研究与应用. 山地农业生物学报, 20 (2) : 147—153.
- 孙学俊, 李春宏, 卢刚, 2007. 小地老虎的防治. 湖南林业, 2 :27.