研究论文

大螟热激蛋白 83 基因克隆及序列分析*

孙 猛** 陆明星 汤小天 杜予州***

（扬州大学园艺与植物保护学院，扬州 225009）

摘 要 **【目的】** 近年来，大螟 *Sesamia inferens* (Walker) 对水稻的为害逐渐加重并成为水稻的重要害虫之一。HSP83 家族作为分子伴侣参与生物生长发育并对外界刺激产生响应，对生物功能蛋白质的正确折叠及胁迫信号传递有着重要意义。本研究旨在克隆大螟 HSP90 家族 HSP83 基因的 cDNA 及基因组全长序列，分析其基本特性。**【方法】** 应用 RT-PCR 及 RACE 技术从大螟中克隆 HSP83 基因的 cDNA 序列；获取基因组序列，进行基因组验证，并与 cDNA 序列比较分析其有无内含子；进行系统发育分析。**【结果】** 大螟 HSP83 基因被命名为 *Sihsp83*（GenBank 登录号：KM077137），长度为 2 496 bp，开放阅读框长 2 154 bp，编码 717 个氨基酸，推测分子量为 82.6 ku。该基因编码的氨基酸序列中含有 5 个 HSP90 家族保守序列，在 C-末端存在细胞质定位信号。大螟 HSP83 基因组序列长度为 2 218 bp（GenBank 登录号：KM077138），不含内含子。在系统发育树中，大螟 HSP83 与其他夜蛾科昆虫的 HSP90 家族聚为一支。**【结论】** 获得的大螟 HSP83 基因是 HSP90 基因家族成员；大螟的 HSP83 是细胞质热激蛋白，具有很高的保守性。

关键词 大螟，HSP83，基因克隆，序列分析

Molecular cloning and sequence analysis of the HSP83 gene in *Sesamia inferens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae)

SUN Meng** LU Ming-Xing TANG Xiao-Tian DU Yu-Zhou***

(School of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract **[Objectives]** The pink borer, *Sesamia inferens* (Walker) has in recent years become a major pest of rice crops that is responsible for steadily increasing crop losses. The heat shock protein 90 (HSP90) family is of great significance for the correct folding and transmission of proteins in organisms. HSP90 affects the growth and development of organisms and their responses to external stimuli. Our study's aim was to clone the full length cDNA and genome sequences of the HSP83 gene from *S. inferens*, and analyze its basic characteristics. **[Methods]** RT-PCR and RACE were used to clone the full-length cDNA of HSC70 gene from *S. inferens*. The genomic sequence was determined by genomic validation, introns were analyzed by sequence analysis and a phylogeny constructed. **[Results]** The complete cDNA sequence was obtained and named as *Sihsp83* (GenBank accession no.: KM077137). This was 2 496 bp in length and contained an opening reading frame (ORF) of 2 154 bp encoding 717 amino acid residues with a predicted molecular weight of 82.6 ku. Five conserved sequences of the HSP90 family exist in this amino acid sequence. The cytoplasmic localization signal was present in the C-terminal. Analysis of the genomic DNA sequence (GenBank accession no.: KM077138) demonstrated that the HSP83 gene does not contain introns. **[Conclusion]** Full-length cDNA and genome sequences of the HSP83 gene from *S. inferens* were obtained, and do not contain introns. Sequence analysis confirms that HSP90 is very conservative.

* 资助项目：973 项目（2012CB114100）；国家基金项目（31371937）

**E-mail: sunmeng8888@aliyun.com

***通讯作者，E-mail: yzdu@yzu.edu.cn

收稿日期：2014-07-20，接受日期：2014-08-26

Key words　*Sesamia inferens*, HSP83, gene cloning, sequence analysis

热激蛋白（Heat shock proteins，HSPs）是一类广泛存在于各种生物中可以被多种外界胁迫因子（如高温、低温、干燥、杀虫剂、重金属、饥饿、缺氧等）诱导表达的特殊蛋白质，也被称为应激蛋白（Stress proteins）（Lindquist，1986；Nover and Scharf，1997；Feder and Hofmann，1999；Kregel，2002）。热激蛋白常作为分子伴侣防止蛋白质前体积累，协助蛋白质跨膜运输，维持蛋白质的正常折叠状态，促进错误折叠的蛋白质降解，在蛋白质从头折叠及外界胁迫下稳定多肽链并防止蛋白质失活（Parsell and Lindquist，1993；Hartl and Hayer-Hartl，2002）。按照分子量可以将热激蛋白主要分为 5 大类：HSP110（100~104 ku）、HSP90（82~90 ku）、HSP70（68~75 ku）、HSP60（58~65 ku）和 sHSPs（15~40 ku）（Denlinger *et al.*，2001；Lee *et al.*，2007）。HSP90 家族高度保守，参与调控、维持细胞内多种蛋白的构象和功能，使细胞在外界环境胁迫下正常存活（Picard，2002）。HSP90 广泛介导胁迫信号的传递，参与类固醇激素受体、激酶和转录因子的折叠，并激活底物，起始胁迫信号的传递（Jackson *et al.*，2004；Wegele *et al.*，2004；Zuehlke and Johnson，2010）。HSP90 蛋白质分子由 3 个基本结构域组成：N-端为高度保守的 25 ku 结构域，具有 ATP 结合位点，能催化水解 ATP（Prodromou *et al.*，1997；Sato *et al.*，2003）；C-端为 12 ku 结构域，具有保守的 EEVD 基序（Young *et al.*，1998；Pearl and Prodromou，2006）；中间为 40 ku 结构域，结构不保守，比较多变，与靶标蛋白的结合有关（Sato *et al.*，2000；Fontana *et al.*，2002）。

大螟 *Sesamia inferens*（Walker）又名稻蛀茎夜蛾、紫螟，隶属于鳞翅目（Lepidoptera）、夜蛾科（Noctuidae），蛀茎夜蛾属（*Sesamia*）。大螟广泛分布于东南亚产稻国家（菲律宾、越南、老挝、柬埔寨等）及南太平洋岛屿（巴布亚新几内亚等），在朝鲜、日本、印度等国家也有报道（Mia and Iwahashi，1999）。过去的研究认为，大螟在我国的分布北限大致在 34°N 的陕西周至、河南信阳、安徽合肥和江苏淮阴一线（章士美，1965；顾海南，1985）。近年来，大螟的分布北限也在逐渐向北扩展，已经在分布北限以北的稻区中发现大螟危害（杜予州等，未发表资料）。大螟原为一种水稻上的常发次要害虫，然而在近几十年，江苏等省相继报道大螟种群数量迅速回升，对水稻为害逐渐加重并上升为主要害虫之一（陈复斌和刘福海，2001；李洪山等，2002；徐修龙等，2009；徐丽娜等，2011；吉海龙等，2012；樊道怀等，2014）。为此，我们对大螟 HSP90 基因进行克隆，分析其基因组及蛋白质特征，为深入研究其表达模式，探讨大螟对环境适应的分子机理，提供科学依据。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

供试虫源采自江苏省扬州市郊区稻田（32°39′ N，119°42′ E）。参照韩超等（2012）饲养方法，在实验室条件下（温度（27±1）℃，相对湿度 70%，光周期 16L∶8D）连续饲养大螟达 3 代以上作为供试虫源。

1.2　总 RNA 提取

取实验室饲养 3 代以上的大螟 5 龄幼虫，参照 SV Total RNA 分离纯化试剂盒（Promega）说明书步骤提取大螟总 RNA。使用 1%琼脂糖凝胶电泳（DYY-4C 电泳仪）和微量分光光度计（Eppendorf BioPhotometer plus）检测 RNA 的完整度、纯度与浓度。将合格的总 RNA 样品于 –80℃超低温冰箱（Thermo Fisher）内保存备用。

1.3　HSP83 基因中间片段的克隆

将无核酸酶的离心管置于冰上，依次加入：2 μL 模板 RNA，1 μL 引物 oligo $(dT)_{18}$，加 DEPC 水至 15 μL，然后在上述离心管中依次加入：5 μL M-MLV 5×Buffer，1.25 μL dNTPs Mixture（各 10

mmol/L），1 μL M-MLV Reverse Transcriptase 和 2.75 μL RNase-free ddH_2O。将混合物短暂离心，置于 42℃温育 60 min，然后 70℃下加热 5 min，反应产物立即置于 – 20℃冻存备用。

在灭菌 PCR 管中依次加入：2.5 μL 10×Taq Buffer、2 μL dNTPs、1 μL cDNA 模板、上下游引物各 1 μL（表 1）、0.25 μL *Taq* 酶（TaKaRa）。加 ddH_2O 至 25 μL，在 PCR 仪（S-100，Bio-Rad）上采用降落 PCR 扩增中间片段，程序如下：94℃预变性 5 min；94℃变性 30 s，60℃ 30 s， – 1℃/循环，72℃延伸 1 min 共 9 个循环；然后 94℃变性 30 s，50℃ 30 s，70℃延伸 1 min，共 25 个循环；72℃延伸 10 min；4℃保存。取 5 μL PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测，观察有无目的条带。

检测到目的条带后，将剩余产物全部进行琼脂糖凝胶电泳，参照 Axyprep DNA 凝胶回收试剂盒（Axygen）说明书步骤回收 PCR 产物。将目的片段进行载体连接，方法参照 pGEM-T Easy Vector 试剂盒（Promega）说明书。将连接产物进一步进行 DH5α感受态细胞转化。菌液 PCR 初步验证后，送菌液至上海英骏生物技术有限公司测序，每个测序送 3 个以上克隆。

1.4 HSP83 基因 5′和 3′末端片段克隆

参照 SMARTer^{TM} RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒（Clontech）说明书合成 5′和 3′ cDNA 第一条链，cDNA 产物保存于 – 20℃待用。根据已得到的中间片段序列，分别设计 5′引物和 3′引物（表 1）。5′和 3′片段扩增体系为：0.5 μL TaKaRa La *Taq*（5 U/μL），5 μL 10×La PCR Buffer II（Mg^{2+} free），5 μL $MgCl_2$（25 mmol/L），8 μL dNTP Mixture（各 2.5 mmol/L），2 μL 5′或 3′ cDNA 模板，2 μL 引物 5′或 3′引物（10 mmol/L），5 μL UPM（10×），22.5 μL RNase-free ddH_2O。PCR 程序为：94℃ 5 min；94℃ 30 s，68℃ 30 s，72℃ 2 min，35 个循环；然后 72℃延伸 10 min 后 4℃保存。PCR 产物的检测、回收、连接、转化、测序均与中间片段扩增方法一致。

1.5 HSP83 基因序列拼接与分析

测序结果在 GenBank 中进行 Blast 同源序列检索（http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi）予以确认后用 DNAMAN 拼接得到基因全长，利用 ORF Finder（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html）查找基因完整的开放阅读框（Opening reading frame，ORF）。然后在 ORF 两侧设计引物进行基因全长验证以确认其准确性（表 1）。使用 SWISS 生物信息学研究所 ExPASy 分子生物学序列分析工具包括翻译、评估 pI/MW 和 Blast 分析推导氨基酸序列（Gasteiger *et al.*，2003）。使用 MEGA 6.06 软件采用邻接法、最小进化法、最大似然法和最大简约法构建大螟系统进化树（Tamura *et al.*，2013)。

表 1 研究中使用的引物
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列（5′-3′） Primer sequences	产物长度（bp） Amplicon size	用途 Purpose
hsp83DP-F	ATTGATACCGGTATTGGTAT	383	中间片段扩增 Intermediate fragment amplification
hsp83DP-R	TTGATGGGGTAGCCGATGAA		
hsp83RACE-5′	GTCAGCGACCAGGTAGCAAGAGTAGA	602	5′RACE
hsp83RACE-3′	ACTCAAAGCACAACGACGACGAAC	1 881	3′RACE
hsp83cDNA-F	AAACAGTCAAAATGCCCGAAGA	2 218	cDNA 全长验证 Verification of full-length cDNA
hsp83cDNA-R	TCGCGAGACAATCATAAACACC		

hsp83DNA-F hsp83DNA-R	AAACAGTCAAAATGCCCGAAGA TCGCGAGACAATCATAAACACC	2 218	基因组验证 Verification of genome

1.6　HSP83 蛋白质结构分析

使用 Phyre2（http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html）以与大螟热激蛋白 83 最相似的蛋白质模型为模板，预测大螟热激蛋白 83 结构模型（Kelley and Sternberg，2009）。使用 Chimera 软件调整三维结构和原子排列（Pettersen *et al.*，2004）。

1.7　HSP83 基因组验证

选取大螟 5 龄幼虫，参照 AxyPrep 基因组 DNA 小量试剂盒（Axygen）说明书步骤提取大螟基因组 DNA。基因组 DNA 样品置于 – 20℃冰箱中保存备用。根据已获得的大螟热激蛋白基因全长序列（cDNA），设计 1 对引物，其产物包含整个开放阅读框（表 1）。PCR 产物的检测、回收、连接、转化、测序均与中间片段扩增方法一致。测序结果在 GenBank 中进行 Blast 同源序列检索予以确认后用 DNAMAN 拼接得到基因组序列全长。与 cDNA 序列全长进行比对，分析内含子分布情况。

2　结果与分析

2.1　大螟 HSP83 基因序列分析

以大螟 cDNA 为模板，用中间片段引物进行 PCR 扩增得到 383 bp 的特异性条带，经回收、克隆、测序。将测序结果进行 Blast 比对发现与西非蛀茎夜蛾 *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre)的 HSP83 基因（*hsp83*）序列对应片段相似度达到 97%，表明该片段为大螟 HSP83 基因（*hsp83*）中间片断。进一步使用 RACE 技术扩增得到大螟 *hsp83* 的 5′端序列（602 bp）和 3′端序列（1 881 bp）。利用 DNAMAN 拼接这 3 个片段可得到 2 496 bp 的大螟 *hsp83* 全长，cDNA 序列全长验证表明所获得的 *hsp83* 序列正确可靠，故命名为 *Sihsp83*（GenBank 登录号：KM077137）。同时将大螟 *hsp83* 与西非蛀茎夜蛾的 *hsp83* 比对，发现二者之间相似度高达 97%。

ORF Finder 分析显示，*Sihsp83* 包含 179 bp 的 5′非编码区（5′ untranslated region，5′UTR）、2 154 bp 的 ORF 和 163 bp 的 3′非编码区（3′ untranslated region，3′UTR），3′UTR 末端具有典型的 ploy A 结构，其上游 16 bp 处具有 1 个多聚腺苷酸结构的加尾信号 AATAAA。*Sihsp83* 共编码 717 个氨基酸，蛋白质分子量为 82.6 ku，等电点为 4.99。具有 5 个 HSP90 家族签名序列：YSNKEIFLRELISNSSDALDKIR（33~55 aa）、LGTIAKSGT（102~110 aa）、IGQFGVGFYSCYLVAD（126~141 aa）、IKLYVRRVFI（347~356 aa）和 GVVDSEDLPLNISRE（373~387 aa）。C-末端（714~717 aa）有所有真核细胞 HSP90 的共同特征基序（EEVD），同时也是细胞质定位信号，说明大螟 HSP83 是细胞质热激蛋白家族成员（图 1）。

2.2　大螟 HSP83 结构预测

使用 Phyre2 软件（http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html），以酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* (Hansen) HSP90（PDB ID: c2cg9A）（Ali *et al.*，2006）为模板预测出大螟 HSP83 结构模型。通过序列搜索，可以在预测结构中找到 5 个 HSP90 家族签名序列（图 2）。

2.3　大螟 HSP83 基因组序列分析

通过实验获得 *Sihsp83* 的基因组序列，长度为 2 218 bp（GenBank 登录号：KM077138）。对比 cDNA 序列发现 *Sihsp83* 中无内含子。

2.4　大螟 HSP83 系统发育分析

利用 MEGA 6.06 软件基于邻接法、最小进化法、最大简约法和最大似然法将鳞翅目昆虫 17 种 HSP90 与大螟 HSP83 进行系统进化分析。

发现 4 种建树方法所得结果一致，因此在本文中只显示了邻接法所得结果(图 3)。结果表明，大螟 HSP83 与西非蚌茎夜蛾 HSP83 聚为一支，再与其他夜蛾科昆虫的 HSP90 家族热激蛋白聚为一支。由此可以看出，我们实验获得的大螟 HSP83 基因序列是正确可靠的。

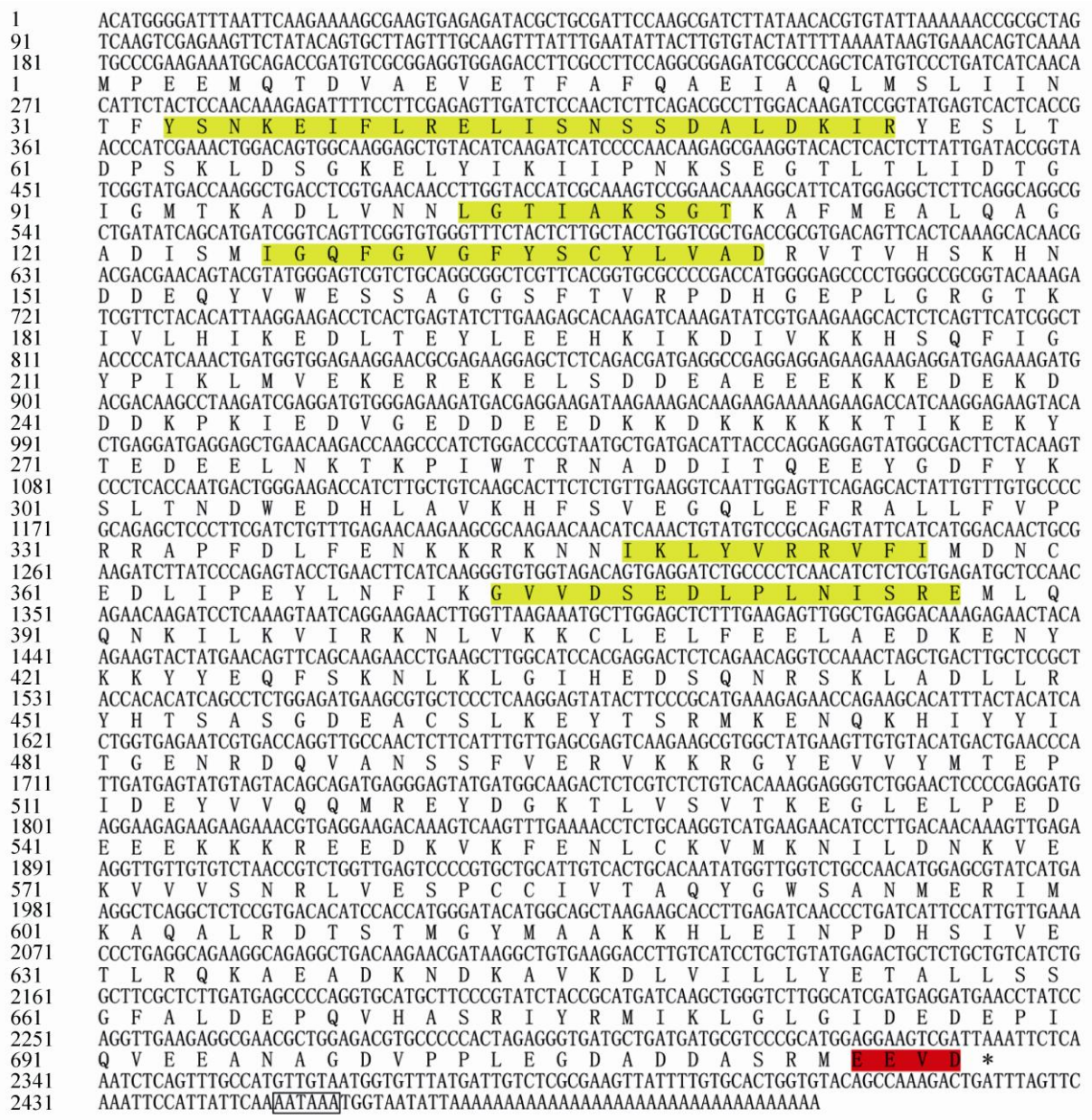

图 1　大螟 HSP83 基因 cDNA 序列及其编码氨基酸序列

Fig. 1　Nucleotide and deduced amino acid sequence of HSP83 of *Sesamia inferens*

黄色表示 5 个 *hsp90* 家族签名序列，红色表示细胞质定位信号，方框表示多聚腺苷酸结构的加尾信号。

Five signature sequences of *hsp90* family are stressed by yellow, the cytoplasmic HSP90 carboxyl terminal region is stressed by red, the putative polyadenylation signal is stressed by boxed.

3 讨论

大螟在早年一直被认为是水稻上的次要害虫，人们也一直不重视它的防治与研究。70 年代后期大螟种群数量开始上升，80 年代到 90 初期大螟种群数量局部地区上升很快，但为害没有像二化螟 *Chilo suppressalis*（Walker）和三化螟 *Tryporyza incertulas*（Walker）那么严重（胡建章，1983）；90 年代中期至今，大螟在我国东部一些稻区的危害已超过二化螟，并由次要害虫上升为主要害虫（吴和生等，1995；陈复斌和刘福海，2001；李洪山等，2002；徐修龙等，2009；徐丽娜等，2011；吉海龙等，2012；樊道怀等，2014）。根据我们的调查研究，大螟的危害区域也有向北延伸的趋势。

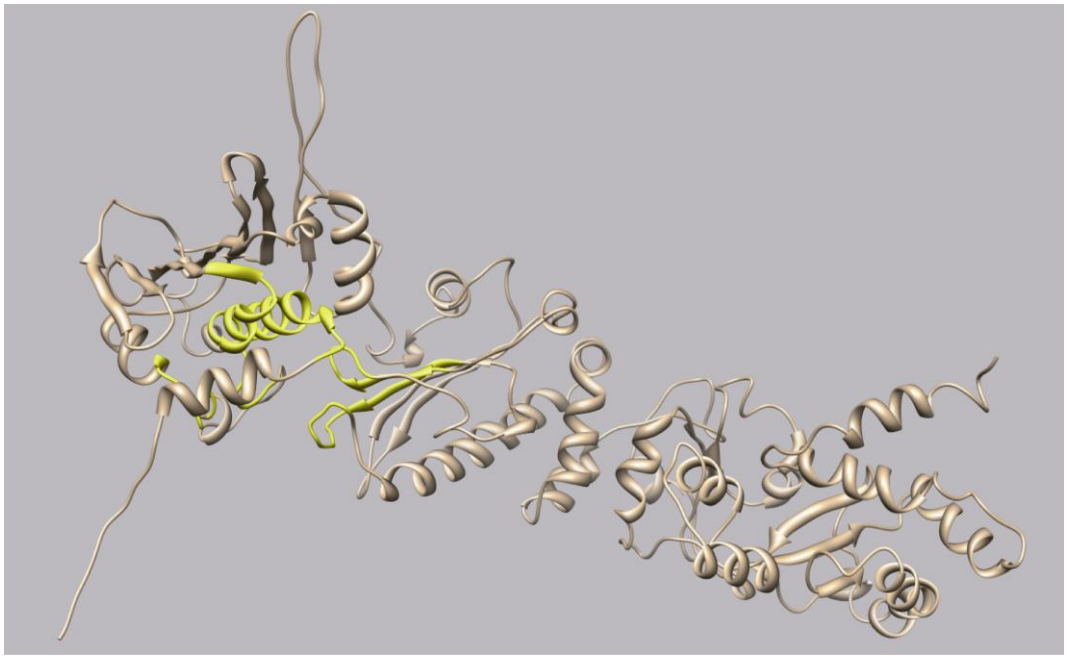

图 2 大螟 HSP83 结构预测图
Fig. 2 The structural prediction of *Sesamia inferens* HSP83
黄色表示 5 个 *hsp90* 家族签名序列。Five signature sequences of *hsp90* family are stressed by yellow.

热激蛋白是一类响应环境胁迫的重要蛋白质，HSP90 家族参与调控、维持细胞内多种蛋白的构象和功能，使细胞在外界环境胁迫下正常存活（Picard，2002）。在很多昆虫种类中，HSP90 得到了大量研究。然而，关于热激蛋白 90 家族基因 cDNA 序列信息在大螟中还未见报道。为此我们应用 RT-PCR 以及 RACE 技术首次克隆得到了大螟 HSP90 家族基因（*Sihsp83*）的 cDNA 序列，并分析其基因组及蛋白质特征。

本研究克隆获得的基因编码 717 个氨基酸，预测蛋白质分子量为 82.6 ku，HSP90 家族的 5 个经典标签序列在大螟 HSP83 氨基酸序列中发现。将预测氨基酸序列进行 Blast 比对发现与西非蚌茎夜蛾 HSP83（Gkouvitsas *et al.*，2009）、粘虫 *Mythimna separate* (Walker) HSP90（Xu

* 资助项目：973 项目（2012CB114100）；国家基金项目（31371937）
**E-mail: sunmeng8888@aliyun.com
***通讯作者，E-mail: yzdu@yzu.edu.cn
收稿日期：2014-07-20，接受日期：2014-08-26

et al.，2011）、甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* (Linnaeus) HSP90（Sonoda *et al.*，2007）、草地夜蛾 *Spodoptera frugiperda* (Smmith) HSP83（Landais *et al.*，2001）、二化螟 HSP90（Sonoda *et al.*，2006）等鳞翅目 HSP90 家族氨基酸序列相似度极高。这表明我们获得的基因属于 HSP90 基因家族。

在大螟 HSP83 氨基酸序列的末端发现了一个高度保守的基序 EEVD，这表明大螟 HSP83 为细胞质热激蛋白家族成员（Gupta，1995）；同时，此基序被认为能与许多具有 TPR 基序（Tetratricopeptide repeat，含有 34 个氨基酸的重复序列）的协同分子伴侣结合，如 Hop/Stil、Hip、Fkbps、PP5、Sgt 和 Cyp40（Pearl and Prodromou，2006；Allan and Ratajczak，2011；Gitau *et al.*，2012）。然而，除果蝇外，HSP90 与含 TPR 基序的蛋白质相互作用在昆虫中还不清楚（Carrigan *et al.*，2005）。

由于 HSP90 高度保守，被广泛用于物种的系统发育分析。本研究也证实了这种保守性，大

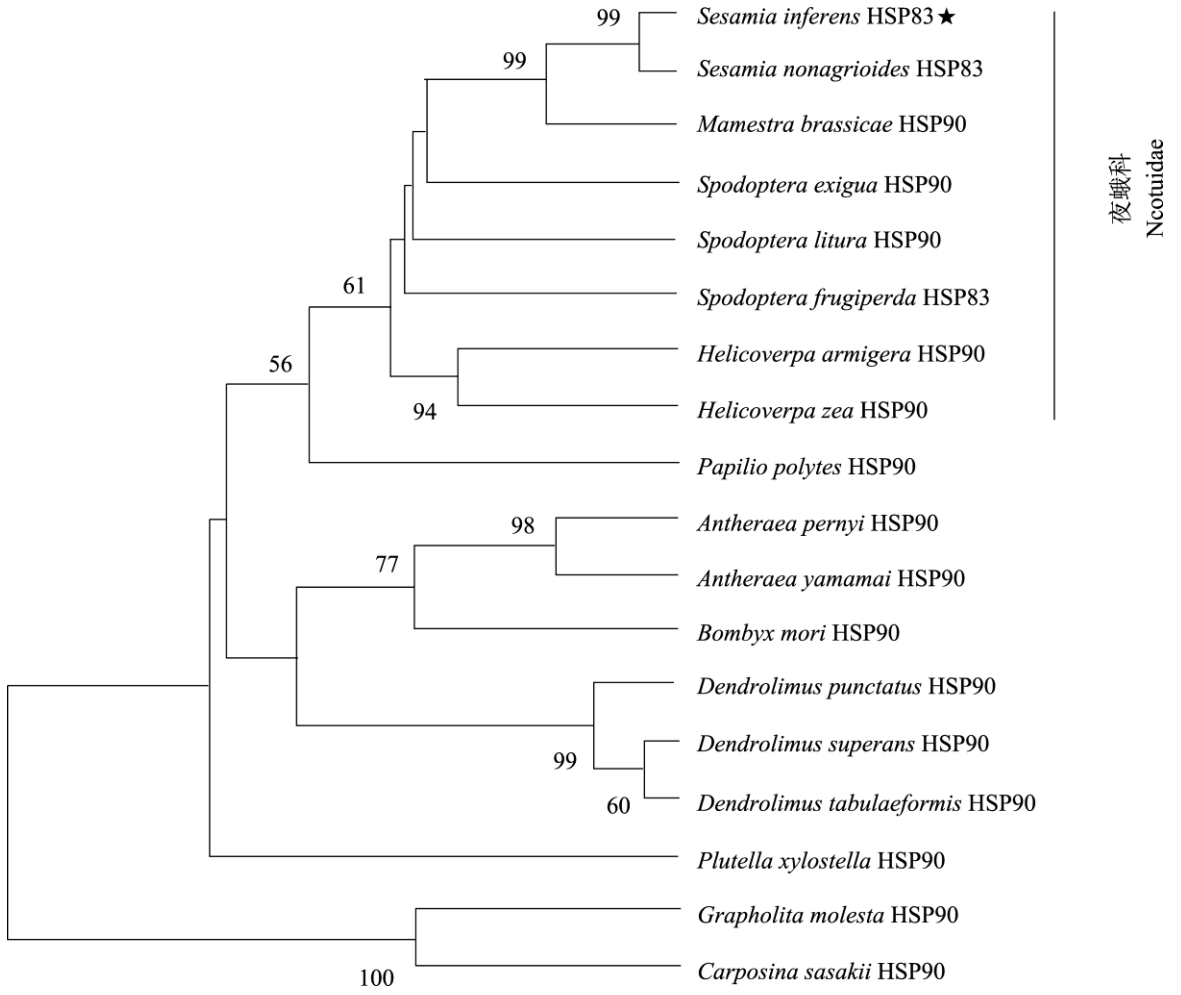

图 3　大螟 HSP83 与其他鳞翅目昆虫 HSP90（或 HSP83）的系统发育树（邻接法）

Fig. 3　Neighbor-Joining phylogenetic tree showing *Sesamia inferens* HSP83 with respect to the other Lepidoptera insect HSP90 (or HSP83)

各分支上的数字为自引导值（1 000 次重复，仅显示>50 的值）；*S. inferens* HSP83（大螟，KM077137）、*S. nonagrioides* HSP83（西非蛀茎夜蛾，DQ198859.2）、*Mamestra brassicae* HSP90（甘蓝夜蛾，AB251894.1）、*Spodoptera exigua* HSP90（甜菜夜蛾，FJ862050.1）、*Spodoptera litura* HSP90（斜纹夜蛾，GU433379.1）、*Spodoptera frugiperda* HSP83（草地

夜蛾，AF254880.1）、*Helicoverpa armigera* HSP90（棉铃虫，FJ986209.1）、*Helicoverpa zea* HSP90（美洲棉铃虫，GQ389710.1）、*Papilio polytes* HSP90（玉带凤蝶，AK402420.1）、*Antheraea pernyi* HPS90（柞蚕，GU235994.1）、*Antheraea yamamai* HSP90（天蚕，AB176669.1）、*Bombyx mori* HSP90（家蚕，AB060275.1）、*Dendrolimus punctatus* HSP90（马尾松毛虫，EF190214.1）、*Dendrolimus superans* HSP90（落叶松毛虫，EF197937.1）、*Dendrolimus tabulaeformis* HSP90（油松毛虫，EF197936.1）、*Plutella xylostella* HSP90（小菜蛾，KF471526.1）、*Grapholita molesta* HSP90（梨小食心虫，JX678980.1）、*Carposina sasakii* HSP90（桃蛀果蛾，HQ392512.1）。

Numbers on the branches are the bootstrap values obtained from 1 000 replicates (only bootstrap values >50 are shown). HSP90 (HSP83) amino acids were from the following species with their accession numbers: *S. inferens* HSP83 (KM077137), *S. nonagrioides* HSP83 (DQ198859.2), *Mamestra brassicae* HSP90 (AB251894.1), *Spodoptera exigua* HSP90 (FJ862050.1), *Spodoptera litura* HSP90 (GU433379.1), *Spodoptera frugiperda* HSP83 (AF254880.1), *Helicoverpa armigera* HSP90 (FJ986209.1), *Helicoverpa zea* HSP90 (GQ389710.1), *Papilio polytes* HSP90 (AK402420.1), *Antheraea pernyi* HPS90 (GU235994.1), *Antheraea yamamai* HSP90 (AB176669.1), *Bombyx mori* HSP90 (AB060275.1), *Dendrolimus punctatus* HSP90 (EF190214.1), *Dendrolimus superans* HSP90 (EF197937.1), *Dendrolimus tabulaeformis* HSP90 (EF197936.1), *Plutella xylostella* HSP90 (KF471526.1), *Grapholita molesta* HSP90 (JX678980.1), and *Carposina sasakii* HSP90 (HQ392512.1).

螟 HSP83 与其他鳞翅目昆虫的 HSP90 相似性均在 90%以上，且能很好地与夜蛾科昆虫的 HSP90 聚在一起。这说明，本研究得到的大螟 HSP83 基因序列是正确的；同时也说明 HSP90 是一个用于系统发育分析的良好分子标记。

有研究表明，与表达丰度低的基因相比，表达丰度高的基因不具有内含子或内含子较少（Castillo-Davis *et al.*, 2002；Wong *et al.*, 2004）。例如，诱导型 HSP70 家族基因（*hsp70*）在胁迫条件下很短的时间内可被诱导表达数十甚至数百倍，常不含有内含子；而组成型 HSP70 家族基因（*hsc70*）在胁迫条件下表达量变化不显著，常含有内含子（Chuang *et al.*, 2007；Wang *et al.*, 2008）。棉铃虫 *Helicoverpa armigera*（Hübner）、粘虫、烟夜蛾 *Helicoverpa assulta*（Guenée）、斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*（Fabricius）等多种鳞翅目昆虫的 HSP90 基因都不含有内含子（Xu *et al.*, 2011）。而本研究克隆得到的 *Sihsp83* 同样不含内含子，我们推测 *Sihsp83* 在胁迫条件下很短的时间内即可被诱导表达，这需要在进一步的研究中进行验证。

本研究只克隆了大螟 HSP83 基因的 cDNA 及基因组序列，有必要从基因水平和蛋白质水平或采用 RNA 干扰技术来研究该基因的表达及功能，特别是研究大螟各种热激蛋白之间以及热激蛋白与其他逆境胁迫相关蛋白质之间的相互关系，这对了解大螟对环境胁迫适应的分子机理具有重要意义。

参考文献 (References)

Ali MMU, Roe SM, Vaughan C, Meyer P, Panaretou B, Piper PW, Prodromou C, Pearl LH, 2006. Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex. *Nature*, 440(7087): 1013–1017.

Allan RK, Ratajczak T, 2011. Versatile TPR domains accommodate different modes of target protein recognition and function. *Cell. Stress. Chaperon*, 16(4): 353–367.

Carrigan PE, Riggs DL, Chinkers M, Smith DF, 2005. Functional comparison of human and *Drosophila* Hop reveals novel role in steroid receptor maturation. *J. Biol. Chem.* 280(10): 8906–8911.

Castillo-Davis CI, Mekhedov SL, Hartl DL, Koonin EV, Kondrashov FA, 2002. Selection for short introns in highly expressed genes. *Nat. Genet.*, 31(4): 415–418.

Chuang KH, Ho SH, Song YL, 2007. Cloning and expression analysis of heat shock cognate 70 gene promoter in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Gene*, 405(1): 10–18.

Denlinger DL, Rinehart JP, Yocum GD, 2001. Stress proteins: a role in insect diapause // Denlinger DL, Giebultowicz JM, Saunders DS (eds.). Insect timing: Circadian rhythmicity to seasonality, Elsevier, Amsterdam. 155–171.

Feder ME, Hofmann GE, 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.*, 61(1): 243–282.

Fontana J, Fulton D, Chen Y, Fairchild TA, McCabe TJ, Fujita N, Tsuruo T, Sessa WC, 2002. Domain mapping studies reveal that the M domain of *hsp90* serves as a molecular scaffold to regulate Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and NO release. *Circ. Res.*, 90(8): 866–873.

Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A,

2003. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.*, 31(13): 3784–3788.

Gitau GW, Mandal P, Blatch GL, Przyborski J, Shonhai A, 2012. Characterisation of the *Plasmodium falciparum* Hsp70-Hsp90 organising protein (PfHop). *Cell. Stress. Chaperon.*, 17(2): 191–202.

Gkouvitsas T, Kontogiannatos D, Kourti A, 2009. Expression of the Hsp83 gene in response to diapause and thermal stress in the moth *Sesamia nonagrioides*. *Insect Mol. Biol.*, 18(6): 759–768.

Gupta RS, 1995. Phylogenetic analysis of the 90 kD heat shock family of protein sequences and an examination of the relationship among animals, plants, and fungi species. *Mol. Biol. Evol.*, 12(6): 1063–1073.

Hartl FU, Hayer-Hartl M, 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, 295(5561): 1852–1858.

Jackson SE, Queitsch C, Toft D, 2004. Hsp 90: from structure to phenotype. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 11(12): 1152–1155.

Kelley LA, Sternberg MJE, 2009. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat. Protoc.*, 4(3): 363–371.

Kregel KC, 2002. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J. Appl. Physiol.*, 92(5): 2177–2186.

Landais I, Pommet J M, Mita K, Nohata J, Gimenez S, Fournier P, Devauchelle G, Duonor-Cerutti M, Ogliastro M, 2001. Characterization of the cDNA encoding the 90 kDa heat-shock protein in the Lepidoptera *Bombyx mori* and *Spodoptera frugiperda*. *Gene*, 271(2): 223–231.

Lee U, Rioflorido I, Hong SW, Larkindale J, Waters ER, Vierling E, 2007. The Arabidopsis ClpB/Hsp100 family of proteins: chaperones for stress and chloroplast development. *Plant J.*, 49(1): 115–127.

Lindquist S, 1986. The heat-shock response. *Annu. Rev. Biochem.*, 55(1): 1151–1191.

Mia AM, Iwahashi O, 1999. Seasonal changes in infestation level of sugarcane by the pink borer, *Sesamia inferens* (Lepidoptera: Noctuidae), in relation to a parasitoid, *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae), on Okinawa Island. *Appl. Entomol. Zool.*, 34(4): 429–434.

Nover L, Scharf KD, 1997. Heat stress proteins and transcription factors. *Cell. Mol. Life. Sci.*, 53(1): 80–103.

Parsell DA, Lindquist S, 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.*, 27(1): 437–496.

Pearl LH, Prodromou C, 2006. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu. Rev. Biochem.*, 75(1): 271–294.

Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin T, 2004. UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.*, 25(13): 1605–1612.

Picard D, 2002. Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cell. Mol. Life Sci.*, 59(10): 1640–1648.

Prodromou C, Roe SM, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH, 1997. Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell*, 90(1): 65–75.

Sato N, Yamamoto T, Sekine Y, Yumioka T, Junicho A, Fuse H, Matsuda T, 2003. Involvement of heat-shock protein 90 in the interleukin-6-mediated signaling pathway through STAT3. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 300(4): 847–852.

Sato S, Fujita N, Tsuruo T, 2000. Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *PNAS*, 97(20): 10832–10837.

Sonoda S, Ashfaq M, Tsumuki H, 2007. A comparison of heat shock protein genes from cultured cells of the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae*, in response to heavy metals. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 65(4): 210–222.

Sonoda S, Fukumoto K, Izumi Y, Yoshida H, Tsumuki H, 2006. Cloning of heat shock protein genes (hsp90 and hsc70) and their expression during larval diapause and cold tolerance acquisition in the rice stem borer, *Chilo suppressalis*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 63(1): 36–27.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S, 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 30(12): 2725–2729.

Wang H, Dong SZ, Li K, Hu C, Ye GY, 2008. A heat shock cognate 70 gene in the endoparasitoid, *Pteromalus puparum*, and its expression in relation to thermal stress. *BMB Rep.*, 41(5): 388–393.

Wegele H, Müller L, Buchner J, 2004. Hsp70 and Hsp90—a relay team for protein folding. *Rev. Physiol. Bioch. P.*, 151(1): 1–44.

Wong CS, Mak CH, Ko RC, 2004. Cloning and characterization of the mitochondrial heat-shock protein 60 gene of *Trichinella spiralis*. *Parasitol. Res.*, 93(6): 461–467.

Xu PJ, Li T, Xiao JH, Murphy RW, Huang DW, 2011. Universal primers for amplifying the complete coding sequence of cytoplasmic heat shock protein 90 (HSP90) in Lepidoptera. *Eur. J. Entomol.*, 108(1): 164–168.

Young JC, Obermann WMJ, Hartl FU, 1998. Specific binding of tetratricopeptide repeat proteins to the C-terminal 12-kDa domain of hsp90. *J. Biol. Chem.*, 273(29): 18007–18010.

Zuehlke A, Johnson JL, 2010. Hsp90 and co-chaperones twist the

functions of diverse client proteins. *Biopolymers*, 93(3): 211–217.

陈复斌, 刘福海, 2001. 水稻大螟为害规律的调查与研究. 植保技术与推广, 21(9): 18–20. [CHEN FB, LIU FH, 2001. Research on the infestation of *Sesamia inferens*. *Plant Protection Technology and Extension*, 21(9): 18–20.]

樊道怀, 王新忠, 朱昌稳, 胡玉龙, 2014. 不同药剂防治水稻大螟效果研究. 现代农业科技, (1): 99. [FAN DH, WANG XZ, ZHU CW, HU YL, 2014. The control efficacy of different insecticides to *Sesamia inferens* on rice. *Modern Agricultural Science and Technology*, (1): 99.]

顾海南, 1985. 大螟越冬特性的初步研究. 生态学报, 5(1): 64–70. [GU HN, 1985. Preliminary study on the characteristics of hibernation of pink rice borer, *Sesamia inferens* Walker. *Acta Ecologica Sinica*, 5(1): 64–70.]

韩超, 彭于发, 侯茂林, 陈法军, 翟保平, 韩兰芝, 2012. 大螟人工饲养技术的初步研究. 应用昆虫学报, 49(1): 281–285. [HAN C, PENG YF, HOU ML, CHEN FJ, ZHAI BP, HAN LZ, 2012. A preliminary study on artificial rearing of the pink stem borer, *Sesamia inferen*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(1): 281–285.]

胡建章, 1983. 杂交水稻大螟的发生特点及种群变动原因初析. 江苏农业科学, (11): 22–24. [HU JZ, 1983. Preliminary analysis of population change characteristics and reason of *Sesamia inferens* on hybrid rice. *Jiangsu Agricultural Sciences*, (11): 22–24.]

吉海龙, 汤留弟, 徐彩萍, 沈晓萍, 吴向阳, 潘林芳, 2012. 昆山地区水稻大螟种群数量动态及综防技术研究. 农业灾害研究, 2(1): 9–11. [JI HL, TANG LD, XU CP, SHEN XP, WU XY, PAN LF, 2012. Study on population dynamic and integrated control techniques of *Sesamia Inferens* in Kunshan. *Journal of Agricultural Catastrophology*, 2(1): 9–11.]

李洪山, 李慈厚, 李红阳, 赵阳, 陈洪新, 2002. 苏北稻区水稻大螟种群消长特点及在寄主间的转换规律. 植保技术与推广, 22(10): 13–16. [LI HS, LI CH, LI HY, ZHAO Y, CHEN HX, 2002. *Sesamia inferen* population fluctuation characteristics and migrated law between hosts in the northern Jiangsu. *Plant Protection Technology and Extension*, 22(10): 13–16.]

吴和生, 姜海洲, 王宏庆, 王权章, 周群喜, 薛根祥, 1995. 东台市水稻大螟迅猛回升. 植保技术与推广, 15(4): 37–38. [WU HS, JIANG HZ, WANG HQ, WANG QZ, ZHOU QX, XUE GX, 1995. *Sesamia inferens* rebound rapidly on Dongtai rice. *Plant Protection Technology and Extension*, 15(4): 37–38.]

徐丽娜, 李昌春, 胡本进, 周子燕, 李晓霞, 2011. 中国大螟研究历史、现状与展望. 中国农学通报, 27(24): 244–248. [XU LN, LI CC, HU BJ, ZHOU ZY, LI XX, 2011. Review of history, present situation and prospect of pink stem borer in China. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 27(24): 244-248.]

徐修龙, 王国田, 王广兰, 葛霞, 2009. 水稻大螟发生情况与防治措施. 现代农业科技, (5): 134–134. [XU XL, WANG GT, WANG GL, GE X, 2009. Investigation and control measures of *Sesamia inferens* on rice. *Modern Agricultural Science and Technology*, (5): 134–134.]

章士美, 1965. 从某些农业昆虫的分布来讨论古北、东洋两地区在我国秦岭以东的分界线问题. 昆虫学报, 14(4): 411–419. [ZHANG SM, 1965. A discussion on the line of demarcation of the Palearctic and Oriental regions east of Chinling based on the knowledge of the distribution of some agricultural insects. *Acta Entomologica Sinica*, 14(4): 411–419.]