

朱砂叶螨几丁质合成酶基因 1 全长 cDNA 的克隆与表达分析*

辛天蓉** 邹智勇 闵 强 李 雷 吴轩德 王雅瑜 邹志文 夏 斌***

(南昌大学生命科学学院, 南昌 330031)

摘 要 【目的】克隆朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus* 几丁质合成过程中的关键酶几丁质合成酶基因, 并检测该基因在朱砂叶螨生长发育不同阶段的相对表达量。【方法】本研究采用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 以及 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术首次克隆获得朱砂叶螨几丁质合成酶基因 1 的全长 cDNA 序列 (命名为 TcCHS1, GenBank 登录号为 KM242062), 并使用实时荧光定量 PCR 技术首次检测了 TcCHS1 基因在朱砂叶螨生长发育不同阶段的相对表达量。【结果】朱砂叶螨 TcCHS1 基因的 cDNA 全长为 4 881 bp, 包括 198 bp 的 5'非翻译区 (5'-UTR), 4 425 bp 的开放阅读框 (ORF), 258 bp 的 3'非翻译区 (3'-UTR), 开放阅读框编码 1 474 个氨基酸, 预测其蛋白质分子质量约为 168.35 ku, 理论等电点为 6.26。其包含 EDR 和 QRRRW 这 2 个几丁质合成酶基因的标签序列。氨基酸序列同源性分析结果表明: TcCHS1 与其他昆虫该基因编码蛋白的氨基酸序列相似度在 50%左右, 与二斑叶螨 *Tetranychus urticae* 的氨基酸相似度最高 (98%), 与西方盲走螨 *Metaseiulus occidentalis* 的相似度为 55%。分子系统进化的结果也表明 TcCHS1 与其他昆虫的 CHS1 聚在一起, 并且和二斑叶螨具有最近的亲缘关系。荧光定量分析表明 TcCHS1 基因在朱砂叶螨生长发育的不同阶段 (卵、幼螨、第 1 若螨、第 2 若螨、雌成螨和雄成螨) 均有表达, 在卵和雌成螨中的表达量较高, 在第 2 若螨的表达量最低。【结论】TcCHS1 基因可能在朱砂叶螨生长发育过程中具有重要作用。

关键词 朱砂叶螨, 几丁质合成酶, 基因克隆, 表达

Full length cDNA cloning and expression of the chitin synthase gene in *Tetranychus cinnabarinus*

XIN Tian-Rong** ZOU Zhi-Yong MIN Qiang LI Lei WU Xuan-De

WANG Ya-Yu ZOU Zhi-Wen XIA Bin***

(College of Life Science, Nanchang University, Nanchang 330031, China)

Abstract [Objectives] To clone the *Tetranychus cinnabarinus* chitin synthase gene and detect relative levels of the expression of this gene in the different developmental stages of *T. cinnabarinus*. [Methods] The full-length chitin synthase cDNA of *T. cinnabarinus* was first cloned by RT-PCR and RACE-PCR, and the relative expression levels of the TcCHS1 gene were then detected in different developmental stages of *T. cinnabarinus* using quantitative real-time PCR. [Results] TcCHS1 cDNA was 4 881 bp in length, including a 198 bp 5' terminal UTR, 4 425 bp encoding region comprised of 1 474 amino acids and a 258 bp 3' terminal UTR. The theoretical molecular weight of TcCHS1 based on the deduced amino acid sequence was estimated to be 168.35 ku, with an isoelectric point of 6.26. The signature sequences “EDR” and “QRRRW” for chitin synthases were found in TcCHS1. Alignment of the deduced amino acid sequence of TcCHS1 and those of other insects demonstrated that this shared 98% and 55% similarity with *T. urticae* and *Metaseiulus occidentalis*, respectively, and

* 资助项目 Supported projects: 江西省自然科学基金项目 (20132BAB204005); 江西省教育厅科学技术研究项目 (GJJ13097); 国家自然科学基金项目 (NSFC-31160418, 31460553); 大学生创新创业训练计划项目 (20130403025, 20140403023)

**第一作者 First author, E-mail: xintianrong@ncu.edu.cn

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: xiabin9@163.com

收稿日期 Received: 2014-09-19, 接受日期 Accepted: 2015-01-14

approximately 50% similarity with other insects. Phylogenetic tree analysis revealed that the putative CHS amino acid sequence of *T. cinnabarinus* showed high similarity with the CHS1 sequences of other insects, and was most closely related to that of *T. urticae*. Real-time quantitative PCR demonstrated that the TcCHS1 gene was expressed in different development stages, including eggs, larvae, protonymphs, deutonymphs, adult females and adult males. The result suggest that the TcCHS1 mRNA were most highly expressed in eggs and adult females, and least expressed in deutonymphs. [Conclusion] The results indicate that TcCHS1 may play an important role in the growth and development of *T. cinnabarinus*.

Key words *Tetranychus cinnabarinus*, chitin synthase, gene cloning, expression

几丁质合成酶 (Chitin synthase, CHS) 是几丁质生物合成过程中最后一步生化反应过程的关键酶 (Cohen, 2001)。CHS 在很多昆虫的生长发育过程中发挥重要作用。有研究报道通过 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术发现几丁质合成酶 1 基因主要参与中华稻蝗 *Oxya chinensis* 体表和气管几丁质的合成 (余志涛等, 2012)。赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 几丁质合成酶基因 1 能干扰幼虫-幼虫、幼虫-蛹和蛹-成虫的蜕皮; 而几丁质合成酶 2 基因可引起取食量减少, 对昆虫的繁殖和卵的孵化有影响 (Arakane *et al.*, 2005)。也有研究发现沉默飞蝗几丁质合成酶 1 基因会导致飞蝗蜕皮时虫体新旧表皮难以分离, 无法完成蜕皮, 最终死亡 (Zhang *et al.*, 2010)。

CHS 基因的 cDNA 序列首先在酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 和粗糙脉孢菌 *Neurospora crassa* 中克隆得到 (Bulawa *et al.*, 1986; Au-Young *et al.*, 1990; Yarden *et al.*, 1991), 第一个昆虫几丁质合成酶基因的 cDNA 序列是 2000 年从铜绿蝇 *Lucilia coprina* 体内分离出来的 (Tellam *et al.*, 2000)。随后通过 cDNA 文库筛选和 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 等技术陆续克隆出赤拟谷盗 (Arakane *et al.*, 2004)、甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* (L.) (朴冬花等, 2008)、东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* (Zhang *et al.*, 2010)、亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (Qu *et al.*, 2011a, 2011b)、桔全爪螨 *Panonychus citri* (辛天蓉等, 2014) 等的 CHS 序列。

目前有关昆虫 CHS 基因的报道较多, 而蛛形纲中螨类的 CHS 的基因结构以及表达等的报道甚少。朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus* (Biosduval) 是世界性的重要农业害螨, 严重为害

蔬菜、棉花、花卉等经济作物, 目前对朱砂叶螨 CHS 基因的克隆及不同发育阶段的表达尚未见报道。本研究以朱砂叶螨为实验材料, 通过 RT-PCR 和 RACE 技术克隆和测序 TcCHS1 基因全长 cDNA 序列, 并与 GenBank 中已经发表的其他螨类和昆虫 CHS 基因进行了序列同源性比较和系统进化分析, 同时采用实时荧光定量 PCR 技术对 TcCHS1 基因在朱砂叶螨生长发育的不同阶段的表达量进行了分析, 以期对朱砂叶螨 CHS 基因功能的研究奠定基础, 为朱砂叶螨蜕皮及生长发育相关功能和机制的研究提供参考, 也为其他螨类的相关研究提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 供试螨源

朱砂叶螨于 2010 年采自江西省东乡县木薯种植基地, 在实验室用芸豆苗饲养繁殖。饲养条件为温度 (25±1) °C, 相对湿度 70% 左右, 光周期 14L:10D。

1.2 主要试剂和仪器

总 RNA 提取试剂 TRIzol 购自 Invitrogen (USA)。2xTaq PCR Master Mix 以及反转录试剂盒 FastQuant RT Kit (With gNDase) 购自天根生化科技(北京)有限公司。ExTaq DNA 聚合酶、LA Taq、EX Taq、SYBR Premix Ex Taq 等购自大连宝生物工程有限公司。SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 购自 Clontech。DNA 凝胶回收试剂盒购自上海生工生物工程技术服务有限公司。PCR 仪为 S1000TM Thermal Cycle (BIO-RAD), Thermal Cycler ST16R 台式冷冻离心机, 凝胶成像系统为 Alphamager HP (Cell Bioscience), 荧

光定量 PCR 仪为 CFX96TM Real-Time System (BIO-RAD)。

1.3 实验方法

1.3.1 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成 将 3~5 日龄的朱砂叶螨雌成螨挑取到新鲜干净的芸豆叶片上, 让其产卵, 然后把雌成螨挑走, 待卵发育至大约 3 日龄, 用零号毛笔在显微镜下轻轻挑取大约 800 只卵; 让上述一部分卵继续发育并孵化, 挑取 600 只幼螨; 同样方法收集第 1 若螨、第 2 若螨以及 3~5 日龄的雌成螨和雄成螨, 用于总 RNA 的提取。总 RNA 的提取方法按照 Invitrogen 公司的试剂盒操作步骤进行。NanoDrop 2000 超微量分光光度计测定 RNA 浓度及纯度并通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性。然后再根据天根反转录试剂盒 FastQuant RT Kit (With gNDase) 说明书操作, 取 1 μ g 上述不同发育阶段的总 RNA 为反转录模板合成第一链 cDNA, 用于荧光定量 PCR 的模板。朱砂叶螨 TcCHS1 基因全长的克隆采用 3~5 日龄的雌成螨的 cDNA 作为 PCR 的模板; 3' 和 5' 端序列快速扩增的模板采用 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) 反转录合成的 cDNA 第一链。所有的 cDNA 于 -20℃ 冰箱保存备用。

1.3.2 朱砂叶螨 TcCHS1 基因全长 cDNA 的克隆

1.3.2.1 引物设计与合成 根据已经报道的昆虫几丁质合成酶基因的氨基酸保守序列, 用 Primer 5.0 软件设计了 2 对简并引物 (TC-F1, TC-R2, TC-F2, TC-R1; 以及 TC-F3, TC-R4, TC-F4, TC-R3) 分别用于中间片段的巢式 PCR 扩增。由于朱砂叶螨几丁质合成酶基因较大, 根据这两个中间片段的测序结果又设计一对特异引物 (TC-CHS-F1, TC-CHS-R2, TC-CHS-F2, TC-CHS-R1) 来扩增其中间的长片段。根据以上 PCR 产物的测序和拼接的结果, 设计了特异性引物 (TC-3CHS-F1, TC-3CHS-F2; TC-5CHS-R1, TC-5CHS-R2) 分别用于 3'RACE 和 5'RACE 的巢式 PCR 反应。以上所有引物的合成均由生工

生物工程 (上海) 股份有限公司完成。具体引物信息见表 1。

1.3.2.2 PCR 及 RACE 反应 (1) RT-PCR 反应: 25 μ L 反应体系中, 以 3~5 日龄朱砂叶螨雌成螨的 cDNA 为模板。巢式 PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 3 min; 接着 35 个循环, 每个循环包括 94℃ 变性 30 s, 45~50℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1~3 min; 72℃ 总延伸 10 min。(2) RACE 反应: PCR 反应体系: 25 μ L 反应体系中, 分别以 3~5 日龄朱砂叶螨雌成螨的 3' 和 5' cDNA 为模板作巢式 PCR。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 3 min; 接着 35 个循环, 每个循环包括 94℃ 变性 30 s, 50~60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1~3 min; 72℃ 总延伸 10 min。

1.3.2.3 PCR 产物的克隆及测序 上述 PCR 和 RACE 反应的 PCR 产物均经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 割胶回收目的片段并纯化, 将纯化后的产物连接到 pGEM-T Vector (Promega), 并转化到大肠杆菌 DH5 α 中, 转化产物在 37℃ 200 r/min 条件下振荡培养 1 h 后涂布于含有 X-Gal、IPTG 以及氨苄青霉素的 LB 固体培养基上, 置于隔水式恒温培养箱中 37℃ 过夜培养 (12~16 h), 进行蓝白斑筛选。经菌液检测筛选出的阳性克隆送往上海生工进行测序。

1.3.3 序列的拼接及生物信息学分析 利用 DNAMAN 软件进行序列拼接后, 将核苷酸序列翻译成氨基酸序列。将得到的核苷酸序列全长和翻译后的 TcCHS1 氨基酸序列利用 NCBI 网站 (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) 上的 Blast 工具进行数据库核酸序列和氨基酸序列的相似性及同源性查找, 并利用这些序列进行基因同源性的比较。利用 NCBI 中的 ORF Finder 确定其完整编码序列并显示其编码的氨基酸序列。利用蛋白分析专家系统服务器 ExPASy Proteomics Server (<http://ca.expasy.org/>) 所提供的蛋白质在线分析工具, 如 ProtParam (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>) 预测氨基酸序列的分子式、分子量、等电点、稳定性指数等理化性质。利用 SMART 在线程序 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)

表 1 朱砂叶螨几丁质合成酶 TcCHS1 基因克隆中所用到的引物信息
Table 1 Primers of the TcCHS1 in molecular cloning of full-length cDNA

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequences (5'-3')	引物用途 Primer usage
TC-F1	AYTGYTTYTGYYTYATHCCKGG	
TC-R2	TASAKACCCADATYATKCCRTG	
TC-F2	TYTYATHTCANTHGGKTGGTG	中间短片段扩增
TC-R1	CKYTGRATRCARATYTTRCAAGC	Middle fragment
TC-F3	CYATAYGTTTCARTAYGAYCARG	
TC-R4	ARRCARTGRAAYTCTTGYGGAT	
TC-F4	CYTAYACWCAYTGYCCWGARGG	中间短片段扩增
TC-R3	AYTCTTGYGGRTGMARGARTGC	Middle fragment
TC-CHS-F1	TGGGTGGTGGGAAACTACATTG	
TC-CHS-R2	GCTATGAAAAATACGGCAGACGG	中间长片段扩增
TC-CHS-F2	AATCTGCCTTCACTTCTCACA	Middle fragment
TC-CHS-R1	AAGAAAAATGGTTCCTGGTCC	5'末端扩增
TC-5CHS-R1	GAGTATTTGTGAGAAGTGAAGGCAG	5'RACE
TC-5CHS-R2	TCAATGTAGTTTCCCACCACC	
TC-3CHS-F1	CAAATGGCTGAAGATGGTGTTAC	3'末端扩增
TC-3CHS-F2	ATCTGGGTCTTTTGTAGTGGCGG	3'RACE
TC-CHS-F	CCAGTTGGTAGCGGTCTCA	
TC-CHS-R	GCCTCATCGGATCTTGTCGT	荧光定量 PCR
β -actin-F	CAGCCATGTATGTTGCCATC	qRT-PCR
β -actin-R	AAATCACGACCAGCCAAATC	

分析其蛋白结构域。使用 ClustalW1.8 软件, 将朱砂叶螨 TcCHS1 推导的氨基酸序列与 GenBank 数据库中登录的动物的 CHS 进行序列比对, 在 MEGA5.0 软件中采用邻接法 (Neighbor-Joining, NJ 法) 构建系统进化树, 计算方法采用 Bootstrap 法重复计算 1 000 次。

1.3.4 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 的表达分析 根据朱砂叶螨 TcCHS1 基因 cDNA 全长序列设计一对荧光定量的特异引物 TC-CHS-F 和 TC-CHS-R (表 1); 根据朱砂叶螨 β -actin 基因 (登录号: EU159450-1) 的 cDNA 序列设计一对内参引物 β -actin-F 和 β -actin-R (表 1)。实时荧光定量 qRT-PCR 的反应总体积为 20 μ L, 内含

cDNA 模板 2 μ L, 上下游引物各 0.4 μ L (引物浓度为 10 μ mol/L), 荧光染料使用 SYBR Green I。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 然后 36 个循环, 每个循环中 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 57 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 72 $^{\circ}$ C 总延伸 10 min。处理组和对照组均设 3 个生物学重复, 每个样品 3 次技术重复。采用比较 CT 值的相对定量 ($2^{-\Delta\Delta CT}$ 法) 来计算朱砂叶螨 TcCHS1 基因在不同发育阶段 (卵、幼螨、第 1 若螨、第 2 若螨、雌成螨和雄成螨) 的相对表达量; 用 SPSS17.0 统计学软件包进行处理分析, 各处理组间平均值的比较用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 进行检验。 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 朱砂叶螨 TcCHS1 基因 cDNA 序列拼接结果、推导的蛋白序列组成及理化特性预测

本文采用 RT-PCR 方法扩增到朱砂叶螨 TcCHS1 基因中间片段, 通过 RACE PCR 的方法获得其 3' 和 5' 末端序列, 将所有片段用 DNAMAN 软件进行拼接, 获得朱砂叶螨 TcCHS1 基因全长 cDNA 序列全长为 4 881 bp, GenBank 登录号为 KM242062。采用 NCBI 中的 ORF Finder 软件分析表明, 其开放阅读框 (ORF) 为 4 425 bp, 编码 1 474 个氨基酸组成的多肽, 起始密码子 (ATG) 位于 199 bp, 终止密码子 (TAA) 位于 4 623 bp 处, 序列包含 258 bp 的 3' 非翻译区 (3' UTR)。

采用 ProtParam 软件预测朱砂叶螨 TcCHS1 基因编码的蛋白质的基本理化性质, 推导其蛋白质分子式为 $C_{7622}H_{11923}N_{1993}O_{2154}S_{75}$, 分子质量约为 168.35 ku, 理论等电点 pI 为 6.26。负电荷氨基酸残基总数 (Asp+Glu) 为 170, 正电荷氨基酸残基总数 (Arg+Lys) 为 157。半衰期为 30 h, 在酵母和大肠杆菌中体内表达的半衰期分别大于 20 h 和 10 h, 在溶液中的不稳定系数 (Instability index) 为 41.07, 脂肪系数为 99.29, 总平均疏水性 (Grand average of hydropathicity, GRAVY) 为 -0.010。

利用 ExPASy 网站的蛋白质分析软件 TMHMM server v.2.0 预测朱砂叶螨 TcCHS1 基因编码的氨基酸序列共有 17 个跨膜螺旋区 (图 1), 显示 TcCHS1 基因编码的蛋白质是典型的跨膜结构。利用在线软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 预测的糖基化位点为 5 个 (图 1), 分别为 NRTG、NLSD、NLST、NITF 和 NSSG。推测朱砂叶螨 TcCHS1 基因编码的蛋白质存在 3 个结构域: 结构域 A、结构域 B 和结构域 C。结构域 A 在几丁质合成酶的 N 端区, 由 606 个氨基酸组成, 包含 10 个跨膜螺旋。结构域 B 在几丁质合成酶的中心区, 由大约 299 个氨基酸组成, 含有 2 个标签序列 EDR 和 QRRRW。结构域 C (包含 907~1 474 个氨基酸) 位于 C 端。

2.2 同源性比对及系统进化树构建

经在线 BLASTP 软件进行同源性比对, 朱砂叶螨 TcCHS1 基因编码的蛋白质的氨基酸序列与二斑叶螨 *Tetranychus urticae* 的氨基酸序列相似性为 98%, 与西方盲走螨 *Metaseiulus occidentalis* 的相似性为 55%, 与其他昆虫的相似性约为 50% 左右。氨基酸序列比较结果显示, N 端和 C 端的氨基酸差异性比较显著, 结构域 B (即中间的催化结构域) 部分的氨基酸相似性比较高 (图 2)。从 NCBI 中 GenBank 数据库下载其他物种的几丁质合成酶 CHS 的蛋白质序列, 将朱砂叶螨 TcCHS1 基因编码的蛋白序列同其他物种的 CHS 蛋白序列的同源性比对结果见图 2。

将下载的其他动物的 CHS 基因编码的蛋白质的氨基酸序列用 Clustal X1.8 及 MEGA5.0 软件构建 NJ 系统进化树, 分析不同物种间的亲缘关系。从图 3 可以看出, CHS 分为 CHS1 和 CHS2 两支, 朱砂叶螨的 TcCHS1 聚在 CHS1 的大支中, 和 CHS2 不聚在一起; 在 CHS1 的大支中, TcCHS1 与同属于叶螨属的二斑叶螨 TuCHS1 聚在一起, 再与西方盲走螨 MoCHS1 聚成一支, 最后和其他昆虫的 CHS1 聚成一支。分子系统进化关系表明, 朱砂叶螨 TcCHS1 基因编码的蛋白与同属于叶螨属的二斑叶螨 TuCHS1 基因编码的蛋白的亲缘关系最近, 其次是西方盲走螨, 再次是其他昆虫。

2.3 朱砂叶螨生长发育不同阶段 TcCHS1 基因的表达分析

根据 TcCHS1 基因在其生长发育不同阶段的相对表达量作柱形图 (图 4)。图 4 的结果显示, 朱砂叶螨 TcCHS1 基因在朱砂叶螨的生长发育的不同阶段 (卵、幼螨、第 1 若螨、第 2 若螨、雄成螨和雌成螨) 中均有表达, 其表达量由高到低依次为卵、雌成螨、幼螨、雄成螨、第 1 若螨和第 2 若螨。将第 2 若螨的表达量设为 1, 卵和雌成螨的表达量最高, 为第 2 若螨的 1.935 倍; 其次幼螨的表达量为第 2 若螨的 1.929 倍; 在雄成螨和第 1 若螨中的表达量分别为第 2 若螨的 1.863 倍和 1.062 倍。

1 tctttttatctcaacatggctcgtgaaacagttaaaaagtgagatggt
 49 tttgttgaatcgccccaccagtcgacgatgaaacttcaagctccgaatggattgatgtgatactcaaaatatta
 124 aaattatgtgcctatgtgattactttcatagttgttctcgttgttctgtcctatccaaaggattagtcttattt
 199 **ATG**ACCTCAATCATCAAACCAAATCGAACGGGATTAATCATTTGCAGCCATGGAATACCAAGTTTGGATCGAGAT
 1 M T S I I K P **N R T G** L I I C S H G I P S L D R D
 274 AAAAAATATGAAGTAGTGCTTAATTTGTCCGATCCAGAAAGGGTCGCTTGGATCTGGGCTTTAATAGGAGTTCTT
 26 K K Y E V V L **N L S D** P E R V A **W I W A L I G V L**
 349 ATAGTTCAGAGTTAATGACACTTTTTTCGAGCTGCCAGAAATATGTACCTTTAAATCAATTAGAAGACCAAGCAAA
 51 **I V P E L M T L F R A A R I** C T F K S I R R P S K
 424 GCCGTTTTTTCATTAATTTTTATTGTTGAAACATTACATACCATTGGAATTGTAATGCTTGTTCCTGATACTG
 76 A **V F S L I F I V E T L H T I G I V M L V F L I** L
 499 CCATCATTAGATGTTACCAAAGGTGTATTTTAACAAATTGTTTCTGTTTCATTCTCGTTGTTTAAGCTTATTT
 101 P S L D V T K G **V I L T N C F C F I P G C L S L F**
 574 TCTCGTCATTCTGGTGAAGCTGGACGTGGATACAAACTCTACTTGATCTCTTTCCGTTGGAGCTCAACTTCT
 126 **S** R H S G E A G R G Y K T **L L D L L S V G A Q L S**
 649 GGTTTAATACTTTGGTCCGTTGTGAGTCAACAGACAATCCAGTTGCAATTTACATTCTATCGCTTCATTGTTA
 151 **G L I L W S V A** E S T D **N P V A I Y I P I A S L L**
 724 ATTTCAATTGGGTGGTGGGAAACTACATTGATAAGAAATCTCCTTTCCGTGCTATCCAAAGGCTGGCTCAGATC
 176 **I S I G W W E N Y I** D K K S P F R A I Q R L A Q I
 799 AAAGAAGGCCTTCAAAAATCTCGTTATTTTCATCTATATTTTCATTTCAGCATGGAATTTACTCATCTTCATC
 201 K E G L Q K S R Y **F I Y I F I S A W K I I L I F I**
 874 GCAACAATAATTTTACGACTTCTAGTCGATGGATCAGCTTTATATTTATTTCACTCAATTTAAATCTGCCTTCACT
 226 **A T I I L R L** L V D G S A L Y L F T Q F K S A F T
 949 TCTCACAAAATACTCATTATACGCGACCGATCTGATCTTTCTAAATCTCTATCTGATTCAATGTGGCATTGAA
 251 S H K I L I I R D R S D L S K S L S D S N V G I E
 1024 TCTGAATGGCTTGAGATGCCTGCATCAACCTCAGCACCAATCTGGATGCTCATCTTACAAATTAGTGCCTCATGG
 276 S E W L E M P A S T S A **P I W M L I L Q I S A S W**
 1099 TTTTGTATGTTTTTGGTAAATTTGCTTGTAATTTGTATTCAACGTATTTCTTTTGCATCTCCGTTGATTCTC
 301 **F C Y V F G K F A C** K I C I Q R **I S F A S P L I L**
 1174 TCAGTTCCCGTTACTGCCATGACTTTAGCCCAGTTTTGTGTTCTCAATTTTGAAACAGTTGTTCTCTGAATCGT
 326 **S V P V T A M T L A Q F C V** L N F E N S C S L N R
 1249 TTCCTTCTCGTTATCTATTTTGGTCATGTCCAAGTGCAGATACGTTCTTTACAGACGGTGTCTTTTACAATCTA
 351 F L P R Y L F W S C P S A D T F F T D G V F **Y N L**
 1324 CACGAATAATTTGGGTCATCATGTACATCAGTCAATTTTGGATTACTTTCCATATATTCAACCCTAAATGTGAA
 376 **H G I I W V I M Y I S Q F W I T F H I F** N P K C E
 1399 CGTTTGGCGCAACTGAGAACTGTTTGTAAATCCTATGTACTGTGGTTTACTAATTGACGCATCAATGATACTT
 401 R L A T T E K **L F V N P M Y C G L L I D A S M I L**
 1474 AATCGACGACGGGATGATAAAGAAGTAATCAAGGCAGGAGACATTGACAAATCAGTGAGAGATCCTGACAATGTA
 426 N R R R D D K E V I K A G D I D K S V R D P D N V
 1549 CAAGATCCATCTCTACATTATGAAACGATTTTCAGAGCATCCAGATGACAAAAATCAACAGTCCAATCGACAGAT
 451 Q D P S L H Y E T I S E H P D D K K S T V Q S T D
 1624 TTCATAACAAAAATTTGGTTTGTGCTACAATGTGGCATGAAACCTCTGAAGAAATGATCCAAATGTTGAAATCA
 476 F I T K I L V C A T M W H E T S E E M I Q M L K S
 1699 GTTTTGTAGAATGGACTTTGATCAATCAGCTCGTCATAAAGCTCAGAAATATCTTCGAGTTGTTGACCCAGACTAT

501 V F R M D F D Q S A R H K A Q K Y L R V V D P D Y
1774 TATGAATTTGAAGTTCACATTCTTTTGGACGATGCTTTTGAATTGAGCGATGATAATGATGATTATCAAGTGGTA
526 Y E F E V H I L F D D A F E L S D D N D D Y Q V V
1849 AATCGTTTCGTAAACAGTTTATCGAAGTTATTGATACAGCTGCAAGTAACATTCACCAATGTGAAATCAGATTG
551 N R F V K Q F I E V I D T A A S N I H Q C E I R L
1924 AAATCACCAGCAAAATATCCAACCTTACGGTGGTAAATTGGAATACATTTTGCCCGGAGGTAATAAATTGCAT
576 K S P A K Y P T P Y G G K L E Y I L P G G N K L H
1999 GTCCATTTGAAAGATAAAATGAAAATTCGTACAGAAAACGATGGAGTCAAGTAATGTACATGTACTATCTGCTT
601 V H L K D K M K I R H R K R W S Q V M Y M Y Y L L
2074 GGACATCGTTTGATGGAATTACCAATTGATGTTAATCGAAAGGCTACAATGGCTGAGAATACCTATATTTTAACT
626 G H R L M E L P I D V N R K A T M A E N T Y I L T
2149 TTGGATGGAGACATTAATTTCCGTCCTGAAGCAGTGCAACTTCTGTAGATTTAATGAAGAAAAATAAGAATCTT
651 L D G D I N F R P E A V Q L L V D L M K K N K N L
2224 GGAGCTGCCTGTGGACGTATTCATCCAGTTGGTAGCGGTCTCATGGCTTGGTATCAGAAATTTGAATATGCTGTT
676 G A A C G R I H P V G S G L M A W Y Q K F E Y A V
2299 GGTCAATGGCTTCAAAAGGCGACTGAACACATGATTGGATGTGTACTTTGTAGTCCAGGTTGTTCTCACTTTTC
701 G H W L Q K A T E H M I G C V L C S P G C F S L F
2374 CGTGCTAAAGCATTGATGGATGATAATGTCATGAGAAAGTATACGACAAGATCCGACGAGGCCTTACATTATGTA
726 R A K A L M D D N V M R K Y T T R S D E A L H Y V
2449 CAATACGATCAAGGTGAAGATCGATGGCTTTGTACTTCTTTTACAACGAGGTTATCGTGTGAATATTCAGCT
751 Q Y D Q G [REDACTED] W L C T L L L Q R G Y R V E Y S A
2524 GCTGCTGATGCTTATACACATTGCTCAGAAGGTTTTGGTGAATTTTATACTCAACGACGTCGATGGGCTCCATCC
776 A A D A Y T H C S E G F G E F Y T [REDACTED] A P S
2599 ACAATGGCTAATATCTTGATCTTCTTGGTGATTACAAGCGAACTGTGGCAGTAAATGATCACATCTCTTTACTT
801 T M A N I L D L L G D Y K R T V A V N D H I S L L
2674 TATATTGTTTATCAAGGAATGTTGATGGTTGGAACGATTCTTGGACCAGGAACCATTTTCTTATGTTGGTCGGA
826 Y I V Y Q G M L M V G T I L G P G T I F L M L V G
2749 GCTATGGTTGCTGTCTTTTCGTATATCCAATTGGGACTCGTTTCTTTTCAATTTGATACCAATACTCATATTCATC
851 A M V A V F R I S N W D S F L F N L I P I L I F I
2824 GTTATCTGTTTCACATGTAAAAATGATATACAGATTCTGGTTGCACAAATAATGTCCGCTTGTATGCACTACTC
876 V I C F T C K N D I Q I L V A Q I M S A C Y A L L
2899 ATGATGGCTGTCTTTTGTGGTACCGCTATTCAATGGCTGAAGATGGTGTACTTACCCTGCTGCCGTATTTTTTC
901 M M A V F V G T A I Q M A E D G V T S P S A V F F
2974 ATAGCTTTATCTGGGTCTTTTGTAGTGGCGGCATTCTTCATCCACAAGAGTTTCACTGTTTATATCCATGTTTA
926 I A L S G S F V V A A F L H P Q E F H C L Y P C L
3049 CTATATTTCTTTTCGATTCCATGCATGTACCTTCTACTTATGATCTATTCCTGATCAACTGAACGTTGTTACT
951 L Y F L S I P C M Y L L L M I Y S L I N L N V V T
3124 TGGGGAACACGTGAAGTTCAGACTAAAAAGACTAAGGCTGAGTTGGAAGAGGAAAAGAGCTGTTGAAGAAATC
976 W G T R E V Q T K K T K A E L E E E K K A V E E I
3199 AAAAAGGGCAATTTATTGAGTTTCTTGAATCTTAATCCAAACGCTAAAGACGAAGAAGGATCTATTGAATTTAGT
1001 K K G N L L S F L N L N P N A K D E E G S I E F S
3274 CTGGCGAACTGTTTCAGGTGCTCTTTCTGTACATATCCCAAACCAACGACGAAAAGATTCTACTTAAATTT
1026 L A N L F R C S F C T Y P K P N D E K I H L L K I
3349 GAACAACATCTTAGTGAAATGACTGACAACTTGGTGCTCTTGAAAAGTATCTCGACCCACTTGGTGGCCCCAGA

```

1051   E Q H L S E M T D K L G A L E K Y L D P L G G P R
3424   CGTAAAGGATCTTCGATTGGACGTAATGCTAGATTTTCAGATAATTTATCTACTGTAACAGAAAATGAAGAGCAT
1076   R K G S S I G R N A R F S D N L S T V T E N E E H
3499   GAAGACATGGATTCAATTGGCTCAGTATCACAACTGATGATATGTCAATTAAGGATAATGAAGAAGTTGCTCCA
1101   E D M D S I G S V S Q T D D M S I K D N E E V A P
3574   CGATTTGATGGAGATCATCCATACTGGATTGAAGATAAAGATTTGAGAGATGGTGAAATCAAGCAGCTTGCAGAA
1126   R F D G D H P Y W I E D K D L R D G E I K Q L A E
3649   AATGAAATCGCATTTTGAAGGAAGTATTTCCAAATATCTCTATCCAATCGACCAAAATAAAGATCATCAAGCT
1151   N E I A F W K E L I S K Y L Y P I D Q N K D H Q A
3724   CGTGTAGCTGTTGAGTTGAAAGAGCTGCGAAATAGAGTAGTTTTCTCATTTTTTCATGTTAAATGCTCTATTTGTT
1176   R V A V E L K E L R N R V V F S F F M L N A L F V
3799   TTGGTTGTGCTGATACTTCAATTGAATAAGGACATTCTTCATGTAGATTGGCCTTATGGTATTAGAGAAAACATT
1201   L V V L I L Q L N K D I L H V D W P Y G I R E N I
3874   ACATTTATACCAGAACTAATGAAATCCGTATTGAGAAAGAATATCTTGAATGGAACCAATTGGTTGGTCTTT
1226   T F I P E T N E I R I E K E Y L E M E P I G L V F
3949   GTTGCTTTCTTTGGTCTTATTTTGTCTCATCCAAGTATGGTATGCTGTTCCATCGATTGCGAACTTTATCTCAC
1251   V A F F G L I L L I Q L I G M L F H R F G T L S H
4024   ATGTTAGCCTCAGTTAATCTATTCCAAAGTAAACGTGATGACATTCTGGTGAAGATGATCTTAAACGAAATGCT
1276   M L A S V N L F Q S K R D D I S G E D D L K R N A
4099   ATTGATATTGCTCGTCAACTTCAGAAATGAAAGGTTTCAATGATGGTGAAGCTCGGAAGACAATACTTATGGA
1301   I D I A R Q L Q K L K G F N D G E S S E D N T Y G
4174   ATCGCAGCTAGACAGACTATCCAAAAATTAGAGATGCGTGGCAGACAAACAATTAACCGGCACCTTTGGATGTT
1326   I A A R Q T I Q K L E M R G R Q T I K T G T L D V
4249   GCGTTCAGAGAGAAGTTTATGGCGATTTTGAAGCTCAAGAAGAAGGAAGTACAACCTCTGTTCTTGGTGGTAAA
1351   A F R E K F M A I L E A Q E E G T T T P V L G G K
4324   CGAAACAGAGAACTATTAATGCTCTCGTAAGGCGCAGACAAAATATTTTAGGATATGATGATCATGTTGGAATG
1376   R N R E T I N A L V R R R Q N I L G Y D D H V G M
4399   CAGACGCTTGAATAACAATGAGTTTGTTCGTAATCCTGCAAGATCAACACTAGACTCAAAACAAAGACGGCCA
1401   Q T L G I N N E F V R N P A R S T L D S K Q R R P
4474   CCAAATCCTTATGGCACAATGGTATGGTAAATCAAGCTTTTGATGGTTTATCTTCAGACGAAGAATTAGAGACT
1426   P N P Y G T N G M V N Q A F D G L S S D E E L E T
4549   CCCGAAGTAGGCATGTCTACTTACAGGGGAATTAATCGACAAAATTTGAATGGGAAGTCAAGTCAACAATTATTAA
1451   P E V G M S T Y R G I N R Q N L N G N S S Q Q L *
4624   taaattaaatcggttaatttttaacttttccttgaataacattgccatatttatagtcgagagcgtcaacttcttca
4699   aagagacctcgacttttcacctaataaataacgcaacgctttttttatgaacaatacaaattttaactctttatg
4774   taaattttacgttttatgtcaaaattttaacttaacaataaaggtgcttgttatacaagcatatctacttaactgc
4849   ccaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

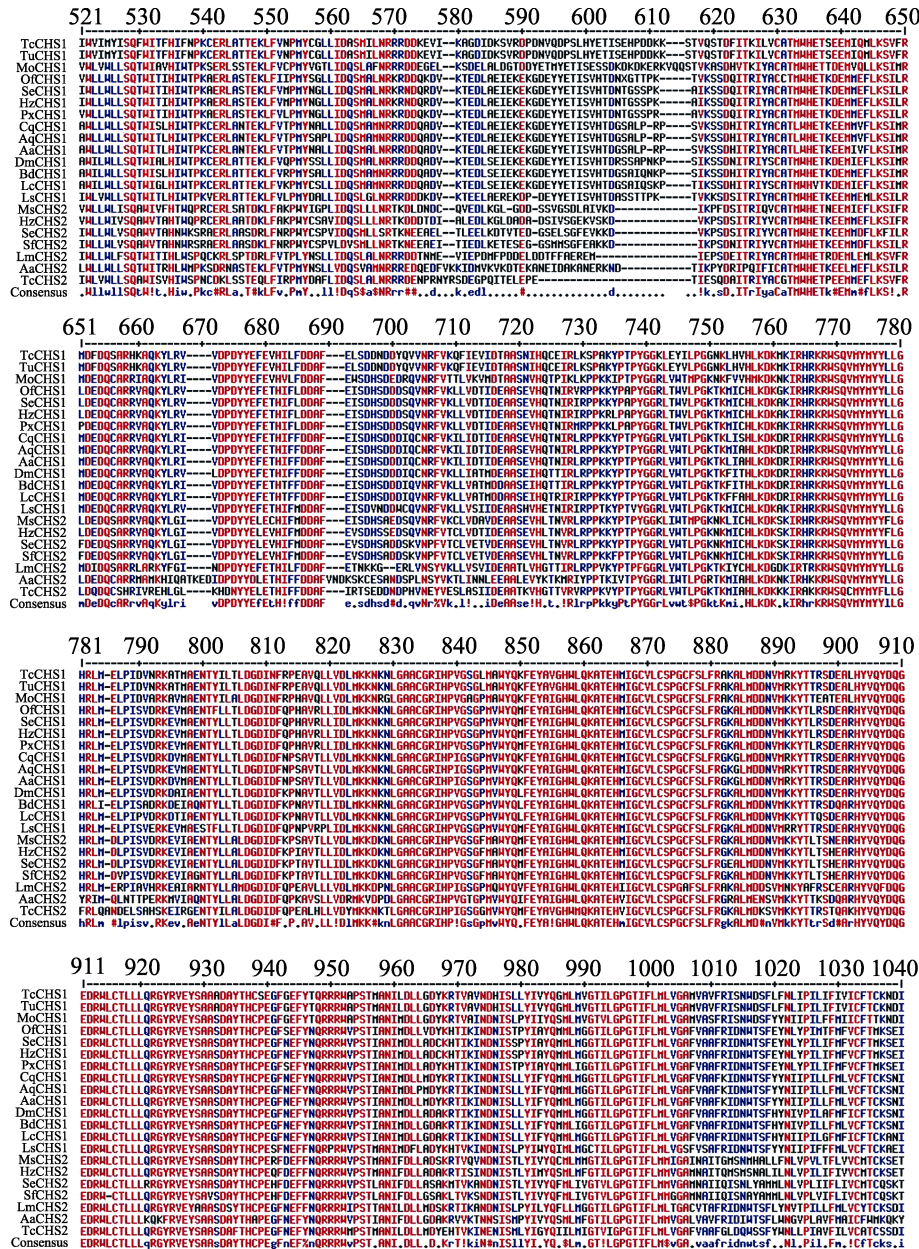
```

图 1 朱砂叶螨几丁质合成酶基因 1 全长 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 1 Chitin synthase 1 cDNA sequence (GenBank accession no. KM242062) and the deduced amino acid sequence from *Tetranychus cinnabarinus*

灰色表示跨膜螺旋区，下划线表示保守的催化结构域，黑色表示几丁质合成酶的标签序列，方框表示糖基化位点，起始密码子为 ATG，*表示终止密码子 TAA。

The putative transmembrane regions are shaded, the amino acid sequence of the putative catalytic domain is underlined, the signature sequences (EDR and QRRRW) are black background, the five potential N-glycosylation sites are in box, the start codon is indicated in bold and the stop codon in bold with an asterisk.

图2 朱砂叶螨 *Tc*CHS1 序列与其他物种 CHS 氨基酸序列的比对Fig. 2 Alignment of amino acid sequences of *Tetranychus cinnabarinus* CHS1 with that of other species

*Tc*CHS1: 朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus* (AC : KM242062) ; *Tu*CHS1: 二斑叶螨 *Tetranychus urticae* (AC : AFG28417.1) ; *Mo*CHS1: 西方盲走螨 *Metaseiulus occidentalis* (AC : XP_003741992.1) ; *Cq*CHS1: 致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* (AC : XP_001866798.1) ; *Lm*CHS2: 东亚飞蝗 *Locusta migratoria* (AC : AFK08615.1) ; *Of*CHS1: 亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (AC : ACF53745.1) ; *Aa*CHS1: 埃及伊蚊 *Aedes aegypti* (AC : XP_001662200.1) ; *Aa*CHS2: 埃及伊蚊 *Aedes aegypti* (AC : AAF34699.2) ; *Ms*CHS2: 烟草天蛾 *Manduca sexta* (AC : AAX20091.1) ; *Ls*CHS1: 灰飞虱 *Laodelphax striatella* (AC : AFC61178.1) ; *Se*CHS1: 甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (AC : AAZ03545.1) ; *Se*CHS2: 甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (AC : ABI96087.1) ; *Hz*CHS1: 谷实夜蛾 *Helicoverpa zea* (AC : ADX66429.1) ; *Hz*CHS2: 谷实夜蛾 *Helicoverpa zea* (AC : ADX66427.1) ; *Aq*CHS1: 四斑按蚊 *Anopheles quadrimaculatus* (AC : ABD74441.1) ; *Px*CHS1: 小菜蛾 *Plutella xylostella* (AC : BAF47974.1) ; *Dm*CHS1: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (AC : NP_730928.2) ; *Bd*CHS1: 桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* (AC : AGB51153.1) ; *Tc*CHS2: 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (AC : NP_001034492.1) ; *Sf*CHS2: 草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* (AC : AAS12599.1) ; *Lc*CHS1: 铜绿蝇 *Lucilia cuprina* (AC : AAG09712.1).

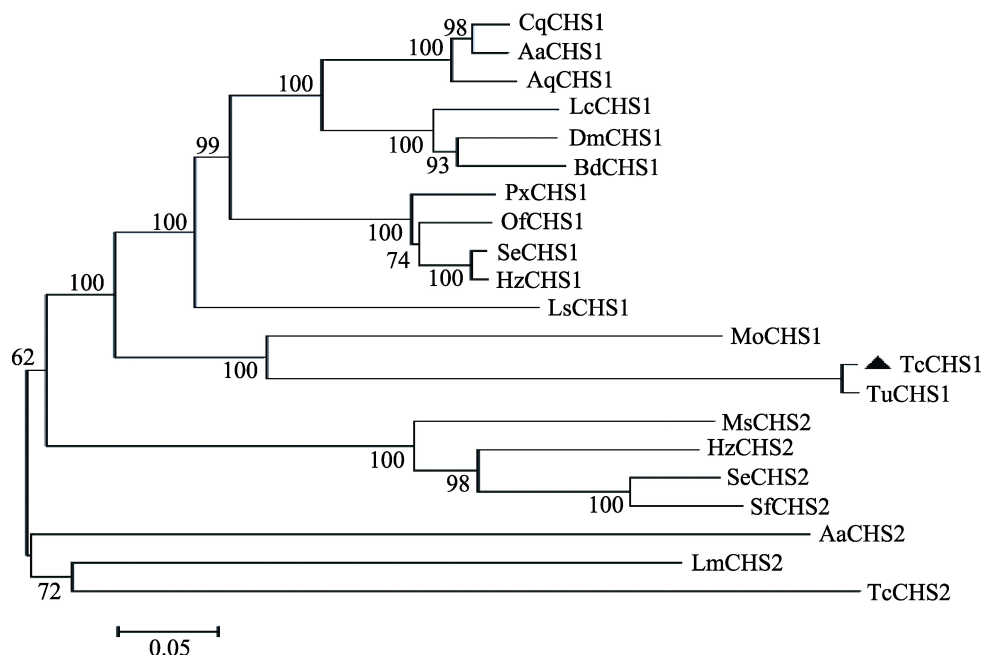


图 3 利用 MEGA5 软件构建的基于 CHS 氨基酸序列的 NJ 系统进化树

Fig. 3 Neighbor-Joining phylogenetic tree based on CHS amino acid sequences using MEGA5

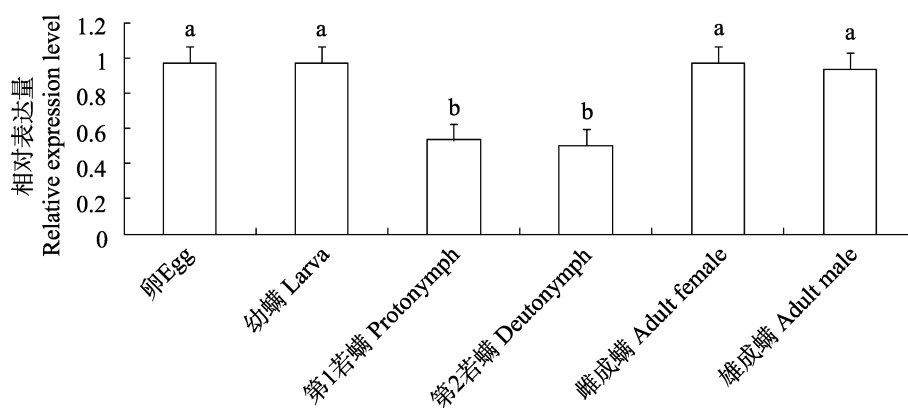


图 4 qRT-PCR 方法检测 TcCHS1 基因在朱砂叶螨生长发育不同阶段的相对表达情况

Fig. 4 Relative expression of TcCHS1 mRNA in different growth and developmental stages of *Tetranychus cinnabarinus* by qRT-PCR

图中数据为平均值±标准误，柱上标有不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Values in the figure are means±SE. Histograms with different letters in the figure are significantly different at $P < 0.05$.

3 讨论

本文从朱砂叶螨中克隆得到 TcCHS1 基因的全长 cDNA 序列，经过序列比对和同源性分析，

显示该基因的开放阅读框 (ORF) 为 4 425 bp，编码 1 个由 1 474 个氨基酸组成的蛋白质。TcCHS1 基因编码的蛋白质的氨基酸序列包含 3 个结构域 A、结构域 B 和结构域 C，其中结构域

B 的序列与其他动物几丁质合成酶基因相同区域的序列具有较高的保守性。序列同源性分析表明, TcCHS1 与同属的二斑叶螨 CHS 序列同源性最高, 与昆虫 CHS 的同源性相对较低 (图 2)。系统进化分析表明, 不同物种间的几丁质合成酶基因的氨基酸序列具有较高的保守性。

利用软件预测朱砂叶螨 TcCHS1 基因编码的蛋白质包含 3 个结构域: 结构域 A、结构域 B 和结构域 C。结构域 A 在几丁质合成酶的 N 端区, 由 10 个跨膜螺旋组成。对于不同的昆虫来说, CHS 含有不同数量的跨膜螺旋, 表现出最低的序列相似性, 这种跨膜螺旋的数目决定了 N 端在膜上的位置, 或者是面向细胞质, 或者是面向细胞外环境 (杨化恩等, 2007)。昆虫中这类跨膜区域的数目 (15~18 个) 比真菌中相应的要多, 比如烟草天蛾几丁质合成酶基因全长包括 1 564 个氨基酸, 预测得到的跨膜螺旋为 16 个 (Zhu *et al.*, 2002), 推测额外的跨膜区段可能参与了几丁质的转运过程 (Tellam *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2002)。结构域 B 在几丁质合成酶的中心区, 由大约 299 个氨基酸组成, 是该蛋白质的催化中心, 而且该结构域氨基酸序列在昆虫和真菌 CHS 各酶中均很保守 (Tellam *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2002), 含有 2 个标签序列 EDR 和 QRRRW (图 1); 此结构域的一些保守氨基酸是酶的催化机制所必须的, 如果被其他的氨基酸取代, 可能会让几丁质合成酶的活力急剧下降。有研究显示酵母几丁质合成酶基因 441 位的天门冬氨酸残基被认为是存在于所有 CHS 中的保守残基, 当它被谷氨酸取代后可引起 CHS 活性的严重丧失 (Nagahashi *et al.*, 1995)。结构域 C (907~1474 个氨基酸) 位于 C 端, 和 N 端类似, 其氨基酸序列差异性比较显著。

几丁质的合成是由多种酶系催化的复杂的生理生化过程, 最后一步反应的关键酶是几丁质合成酶 (Cohen, 2001)。在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* CHS 缺失突变体中发现突变个体

的头部表皮严重畸形 (Ostrowski *et al.*, 2002); 飞蝗 CHS 基因的沉默影响中肠围食膜的完整性, 使其无法消化吸收而死亡 (刘晓健等, 2014), 表明 CHS 对昆虫的生长发育至关重要。本文在已经克隆得到 TcCHS1cDNA 序列的基础上, 进一步对该基因在朱砂叶螨生长发育的不同阶段的表达特性进行研究, 发现其表达贯穿于生命周期各阶段。这和几丁质合成酶基因在云杉卷叶蛾 *Choristoneura fumiferana*、中华稻蝗 *Oxya chinensis*、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 等昆虫中的发育表达模式相似, 研究报道云杉卷叶蛾 CfCHS1 的高表达贯穿于羽化全过程, 包括羽化前、羽化中和羽化后 (Ampasala *et al.*, 2001); CHS1 在中华稻蝗若虫至成虫的生长发育的各个阶段蜕皮后都有表达; 而黑腹果蝇 CHS1 随龄期的增加其表达量也在增加 (Gagou *et al.*, 2002)。分析认为朱砂叶螨生长发育的各个阶段可能需要大量的几丁质合成酶来满足螨体合成几丁质的需求, 表明 TcCHS1 基因的表达与朱砂叶螨体内几丁质的合成密切相关。由此推测 TcCHS1 基因可能与朱砂叶螨的生长发育过程密切相关。因为在朱砂叶螨的生长发育过程中, 通过蜕皮, 周期性的更换表皮, 形成新的螨态, 所以必须以一定的规律不断地合成和降解几丁质, 以确保蜕皮的完成。但是该基因在不同发育阶段的表达量是有差别的, 甜菜夜蛾 CHS1 在各龄期的第一天和最后一天基因表达量较高, 而在龄期的中间, 基因表达量有所降低, 蛹期基因表达量较高 (Chen *et al.*, 2007)。

本研究在成功克隆得到朱砂叶螨 TcCHS1 基因 cDNA 全长的基础上, 对其发育表达模式进行了研究, 这为下一步研究该基因的功能奠定了基础; 由于几丁质是昆虫等节肢动物所特有, 而高等动物不含有几丁质, 所以从理论上讲, 针对几丁质合成代谢来设计杀虫杀螨剂具有较高的安全性, 从生产实践角度上看, 也可能给朱砂叶螨的防治带来新的思路。

参考文献 (References)

- Ampasala DR, Zheng S, Zhang D, Ladd T, Doucet D, Krell PJ, Retnakaran A, Feng Q, 2011. An epidermis-specific chitin synthase cDNA in *Choristoneura fumiferana*: cloning, characterization, developmental and hormonal-regulated expression. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 76(2): 83–96.
- Arakane Y, Hogenkamp DG, Zhu YC, Kramer KJ, Specht CA, Beeman RW, Kanost MR, Muthukrishnan S, 2004. Characterization of two chitin synthase genes of the red flour beetle, *Tribolium castaneum* and alternate exon usage in one of the genes during development. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34(3): 291–304.
- Arakane Y, Muthukrishnan S, Kramer KJ, Specht CA, Tomoyasu Y, Lorenzen MD, Kanost MR, Beeman RW, 2005. The *Tribolium* chitin synthase genes TcCHS1 and TcCHS2 are specialized for synthesis of epidermal cuticle and midgut peritrophic matrix. *Insect Molecular Biology*, 14(5): 453–463.
- Au-Young J, Robbins PW, 1990. Isolation of a chitin synthase gene (CHS1) from *Candida albicans* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 4(2): 197–207.
- Bulawa CE, Slater M, Cabib E, Au-Young J, Sburlati A, Adair WL, Robbins PW, 1986. The *Saccharomyces cerevisiae* structural gene for chitin synthase is not required for chitin synthesis *in vivo*. *Cell*, 46(2): 213–225.
- Chen X, Tian H, Zou L, Tang B, Hu J, Zhang W, 2008. Disruption of *Spodoptera exigua* larval development by silencing chitin synthase gene A with RNA interference. *Bull. Entomol. Res.*, 98(6): 613–619.
- Cohen E, 2001. Chitin synthesis and inhibition, a revisit. *Pest Management Science*, 57(10): 946–950.
- Gagou ME, Kapsetaki M, Turberg A, Kafetzopoulos D, 2002. Stage-specific expression of the chitin synthase DmeChSA and DmeChSB genes during the onset of *Drosophila* metamorphosis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(2): 141–146.
- Liu XJ, Cui M, Li DQ, Zhang HH, Yang ML, Zhang JZ, 2014. Expression, function and regulation of chitin synthase 2 gene in *Locusta migratoria*. *Scientia Agricultura Sinica*, 47(7): 1330–1340. [刘晓健, 崔淼, 李大琪, 张欢欢, 杨美玲, 张建珍, 2014. 飞蝗几丁质合成酶 2 基因的表达特性、功能及调控. 中国农业科学, 47(7): 1330–1340.]
- Nagahashi S, Sudoh M, Ono N, Sawada R, Yamaguchi E, Uchida Y, Mio T, Takagi M, Arisawa M, Yamada-Okabe H, 1995. Characterization of chitin synthase 2 of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(23): 13961–13967.
- Qu M, Liu T, Yang J, Yang Q, 2011a. The gene, expression pattern and subcellular localization of chitin synthase B from the insect *Ostrinia furnacalis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 404(1): 302–307.
- Qu M, Yang Q, 2011b. A novel alternative splicing site of class A chitin synthase from the insect *Ostrinia furnacalis*-gene organization, expression pattern and physiological significance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(12): 923–931.
- Ostrowski S, Dierick HA, Bejsovec A, 2002. Genetic control of cuticle formation during embryonic development of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 161(1): 171–182.
- Piao DH, Fan D, 2008. Cloning and sequence analysis of chitin synthase partial cDNA from *Mamestra brassicae* (L.). *Journal of Northeast Agricultural University*, 39(9): 53–57. [朴冬花, 樊东, 2008. 甘蓝夜蛾几丁质合成酶基因片段的克隆与序列分析. 东北农业大学学报, 39(9): 53–57.]
- Tellam RL, Vuocolo T, Johnson SE, Jaemey J, Pearson RD, 2000. Insect chitin synthase: cDNA sequence, gene organization and expression. *European Journal of Biochemistry*, 267(19): 6025–6042.
- Xin TR, Que SQ, Wu XD, Wang YY, Zou ZW, Xia B, 2014. Full length cDNA cloning and sequence analysis of the chitin synthase gene from *Panonychus citri* (McGregor). *Journal of Nanchang University (Natural Science)*, 38(4): 395–401. [辛天蓉, 阙生全, 吴轩德, 王雅瑜, 邹志文, 夏斌, 2014. 桔全爪螨几丁质合成酶基因克隆与序列. 南昌大学学报 (理科版), 38(4): 395–401.]
- Yang HE, Liu SZ, Li YZ, Du CM, 2007. Chitin synthase from insects and its inhibitor. *Chinese Bulletin of Entomology*, 44(5): 769–773. [杨化恩, 刘守柱, 李友忠, 杜翠敏, 2007. 昆虫几丁质合成酶及其抑制剂. 昆虫知识, 44(5): 769–773.]
- Yarden O, Yanofsky C, 1991. Chitin synthase plays a major role in cell wall biogenesis in *Neurospora crassa*. *Genes & Development*, 5: 2420–2430.
- Yu ZT, Liu XJ, Ma EB, Guo YP, Zhang JZ, 2012. mRNA expression and physiological function of chitin synthase 1 from *Oxya chinensis* (Thunberg). *Scientia Agricultura Sinica*, 45(5):

- 877–884. [余志涛, 刘晓健, 马恩波, 郭亚平, 张建珍, 2012. 中华稻蝗几丁质合成酶 1 基因的 mRNA 表达及功能. 中国农业科学, 45(5): 877–884.]
- Zhang JZ, Liu XJ, Zhang JQ, Li D, Sun Y, Guo Y, Ma E, Zhu KJ, 2010. Silencing of two alternative splicing-derived mRNA variants of chitin synthase 1 gene by RNAi is lethal to the oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(11): 824–833.
- Zhu YC, Specht CA, Dittmer NT, Muthukrishnan S, Kanost MR, Kramwe KJ, 2002. Sequence of a cDNA and expression of the gene encoding a putative epidermal chitin synthase of *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(11): 1497–1506.