

沙葱萤叶甲海藻糖磷酸酶基因 *GdTPP* 的克隆、原核表达及对温度胁迫的响应*

路 标^{1**} 周晓榕¹ 庞保平^{1***} 董瑞文² 娜布其亚² 那仁满都呼²

(1. 内蒙古农业大学草原昆虫研究中心, 呼和浩特 010020; 2. 四子王旗草原工作站, 四子王旗 011800)

摘 要 【目的】海藻糖磷酸酶 (Trehalose-6-phosphate phosphatase, TPP) 是参与昆虫海藻糖合成的关键酶之一。本研究旨在克隆和表达沙葱萤叶甲 *Galeruca daurica* 海藻糖磷酸酶基因, 分析其对不同温度胁迫的响应, 以期为进一步揭示其在沙葱萤叶甲生长发育及抗寒、耐热中的作用奠定基础。【方法】根据沙葱萤叶甲转录组数据, 通过 cDNA 末端快速扩增 (Rapid-amplification of cDNA ends, RACE) 技术克隆沙葱萤叶甲 TPP 的全长 cDNA 序列, 并对该基因进行生物信息学分析; 将该基因与 pET28a 载体链接构建表达载体, 导入大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3) 使其表达; 利用实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测 TPP 基因在沙葱萤叶甲 2 龄幼虫不同温度下的表达格局。【结果】克隆获得 1 条沙葱萤叶甲 TPP 基因 cDNA 全长序列 (*GdTPP*, GenBank 登录号: MG431210), 该基因全长 1 372 bp, 开放阅读框 (ORF) 864 bp, 编码 287 个氨基酸; 蛋白预测分子量为 32.32 ku, 等电点 (pI) 为 6.19; 无信号肽和跨膜结构; 包含 2 个 N-糖基化位点; 蛋白质亚细胞定位预测该蛋白位于细胞质中。同源性分析表明, *GdTPP* 与马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* TPP 亲缘关系最近。成功构建原核表达载体 pET28a-*GdTPP* 经 IPTG 诱导, *GdTPP* 在大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3) 中高效表达。qPCR 结果表明, 低于 25 ℃ 对照时, *GdTPP* 表达量随着温度下降而上升, -10 ℃ 时达到最高值, 为对照的 1.82 倍; 高于 25 ℃ 对照时, *GdTPP* 表达量随着温度上升而上升, 40 ℃ 时达到最高值, 为对照的 1.68 倍。【结论】沙葱萤叶甲幼虫通过上调 *GdTPP* 的表达来应对高温和低温胁迫, 该结果为进一步揭示 TPP 在昆虫应对温度胁迫过程中的作用奠定了基础。

关键词 沙葱萤叶甲; 海藻糖磷酸酶; 基因克隆; 温度胁迫; 原核表达; 表达分析

Molecular cloning and prokaryotic expression of the trehalose-6-phosphate phosphatase gene *GdTPP* in *Galeruca daurica* during temperature stress

LU Biao^{1**} ZHOU Xiao-Rong¹ PANG Bao-Ping^{1***} DONG Rui-Wen²
NABUQIYA² NARENMANDUHU²

(1. Research Center for Grassland Entomology, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010020, China;

2. Siziwangqi Grassland Station, Siziwangqi 011800, China)

Abstract [Objectives] To clone the Trehalose-6-phosphate phosphatase (TPP), a key enzyme in the trehalose synthesis pathway, in *Galeruca daurica*, quantify its expression during temperature stress, and lay a foundation for further investigation on the role of this gene in the growth and development of *G. daurica*. [Methods] Based on transcriptomic data, the full-length cDNA sequence of the *G. daurica* TPP gene was cloned using the RACE method, and analyzed with bioinformatic software. The gene was then inserted into the prokaryotic expression vector pET-28a (+) to create a recombinant plasmid pET-GdTPP, which was then transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) to express TPP. qPCR was performed to profile

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金项目 (31360441)

**第一作者 First author, E-mail: 406745067@qq.com

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

收稿日期 Received: 2018-06-13; 接受日期 Accepted: 2018-12-05

the expression of the gene in 2nd-instar larvae under different temperatures. **[Results]** The full-length cDNA sequence of the *G. daurica* TPP gene (*GdTPP*, GenBanka accession No: MG431210) was obtained from *G. daurica* larvae. *GdTPP* is 1 372 bp in length with an open reading frame (ORF) of 864 bp, encoding 287 amino acids and has a predicted molecular weight of 32.32 ku and pI of 6.19. The encoded protein contains two potential N-glycosylation sites. Subcellular localization prediction indicates that the encoded protein is located in the cytoplasm and lacks signal peptide and transmembrane domains. *GdTPP* has one conserved domain, and is most similar to *Leptinotarsa decemlineata* TPP in amino acid sequence identity (68%). A recombinant plasmid, pET-*GdTPP*, was successfully constructed, and *GdTPP* was efficiently expressed in *E. coli*. The qPCR results show that, at temperatures lower than 25 °C (control), the expression level of *GdTPP* increases with decreasing temperature to a maximum of 1.86 times that of the control at -10 °C. However, at temperatures higher than 25 °C, the expression increased with temperature to a maximum of 1.68 times that of the control at 40 °C. **[Conclusion]** The expression of *GdTPP* in *G. daurica* larvae was up-regulated in response to cold- and heat-stress. These results provide a basis for further investigation on the role of TPP in temperature stress in insects.

Key words *Galeruca daurica*; trealose-6-phosphate phosphatase; gene cloning; temperature stress; prokaryotic expression; expression profiling

海藻糖是一种非还原性糖,对多种生物活性物质具有非特异性保护作用,是天然双糖最稳定的糖类。作为一种非还原性双糖,海藻糖能以高浓度存在于昆虫体内,并影响着昆虫碳水化合物的摄取及其体内营养物质的动态平衡(Thompson, 2003)。海藻糖具有生物抗逆性,其含量在胁迫环境下被大量积累(张建波等, 2015),能够在高温、高寒、干燥失水等恶劣条件下在细胞表面形成特殊的保护膜,有效地保护生物分子结构不被破坏(于彩虹等, 2008)。昆虫在长期的自然驯化过程中,通过提高海藻糖的含量来抵御逆境(Bale, 2002)。海藻糖对于维持昆虫的生命活动及对逆境胁迫的适应性有重要作用。

海藻糖磷酸酶(Trealose-6-phosphate phosphatase, TPP)和海藻糖磷酸合成酶(Trealose-6-phosphate synthase, TPS)是海藻糖合成过程中的两个关键酶,广泛存在于低等的动植物、微生物等生物体内。在绝大多数的真核和原核生物中,研究比较深入的海藻糖合成途径是 TPS-TPP 途径,是目前已知的昆虫体内海藻糖合成最主要的途径。在催化海藻糖合成的过程中,TPS 首先催化尿苷二磷酸葡萄糖转移葡萄糖基给 6-磷酸葡萄糖生成 6-磷酸海藻糖,然后 TPP 水解 6-磷酸海藻糖生成海藻糖(Becker *et al.*, 1996)。在真菌中,TPP 与 TPS 作为一个复合体来调控海藻糖的合成,TPP 对海藻糖的合成、代谢及真菌

对温度的敏感性有着重要的作用(Leyman *et al.*, 2001; Eastmond and Graham, 2003)。在植物中,提高 TPP 基因的表达可以提高植物对非生物逆境胁迫的抗性,如在拟南芥中超表达 *AtTPPD* 基因后,转基因植株抗盐能力增强(Krasensky *et al.*, 2014)。嗜眠摇蚊 *Polypedium vanderplanki* 能够在干燥胁迫条件下通过提高海藻糖磷酸合成酶和海藻糖磷酸酶的活性,并同时降低海藻糖酶的活性,以大量积累海藻糖来保护昆虫免受干燥条件的损害(Mitsumasu *et al.*, 2010)。昆虫体内海藻糖含量的升高或降低是通过调控 TPS 与 TPP 基因的表达而发生的,这可能表明 TPP 基因在昆虫长期的自然驯化过程中起着重要作用。在葱蝇 *Delia antiqua* 中,TPP 和 TPS 基因在夏滞育和冬滞育初期表达量最高,随后逐渐下降,非滞育时期表达量较低(Guo *et al.*, 2015)。目前已有从近 40 种昆虫中克隆出 TPS 基因(唐斌等, 2014; 路标等, 2017),然而只在葱蝇中克隆出 TPP 基因(Guo *et al.*, 2015)。因此,开展昆虫 TPP 基因的研究对揭示昆虫海藻糖合成的分子机制具有重要的意义。

沙葱萤叶甲 *Galeruca daurica* (Joannis) 是一种近年来在内蒙古草原猖獗发生的新害虫,其食性窄,主要以幼虫为害沙葱 *Allium mongolium* Regel、多根葱 *Allium polyrhizum* Turcz. ex Regel 及野韭 *Allium ramosum* L. 等百合科葱属植物的

叶部, 严重时会啃食茎部, 将植物地上部分啃食一光(吴翔等, 2014)。该虫越冬卵和幼虫抗寒能力强(李浩等, 2014; 高靖淳等, 2015), 但对其抗寒机理却很少了解。本实验室前期成功地克隆了沙葱萤叶甲海藻糖磷酸合成酶和海藻糖酶基因, 并进行了表达谱分析(路标等, 2017; 陈龙等, 2018)。本研究利用 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术成功克隆了沙葱萤叶甲 TPP 基因 cDNA 全长序列, 对该基因的序列特征进行生物信息学分析, 并在原核表达系统中成功表达; 应用实时荧光定量 PCR(qPCR)技术对短时低温和高温胁迫下的 TPP 基因表达谱进行了分析, 为进一步揭示沙葱萤叶甲抗寒性的分子机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

2017 年春季将越冬卵置于温度(25 ± 0.5)、相对湿度 $70\% \pm 5\%$ 、光周期 14L:10D 的 PRX-350C 智能型人工气候箱(宁波海曙塞福实验仪器厂)进行孵育, 整个饲养过程均以野韭为食。选取 2 龄(4 日龄)幼虫作为供试虫源, 每 8-9 头一组。不同温度处理: 分别在 -14、-10、-5、0、5、10、15、20、25、30、35、40 处理 1 h, 每组 3 个重复, 以液氮速冻后置于 -80 冰箱储存备用。

1.2 主要试剂和仪器

RNA 提取试剂盒 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit、Premix TaqTM (TaKaRa TaqTM Version 2.0 plus dye)、PrmerScriptTM 1 st Strand cDNA Synthesis Kit、pMD19-T Vectors Cloning Kit、DL1000 DNA Maker、DL5000 DNA Maker、SMARTer[®] RACE 5'-3' Kit、感受态细胞 DH5 α 均购自大连宝生物工程有限公司; Go Taq[®] qPCR Master Mix 为 Promega 公司; PageRulerTM Prestained Protein Ladder 购自 Thermo 公司; T4 DNA Ligase、限制性内切酶 *Bam*HI、*Xho*I 购自 NEW ENGLAND BioLabs 公司; 感受态细胞

BL21(DE3)购自天根生化科技(北京)有限公司; 原核表达载体 pET-28a(+)为本实验室保存; 引物合成及序列测定由北京六合华大基因科技股份有限公司完成。其他试剂为国产分析纯试剂。T100 Thermal Cycler 购自美国 Bio-Rad 公司; 荧光定量 PCR 仪 FTC-3000P 购自加拿大 Funglyn Biotech 公司。

1.3 RNA 的提取及 cDNA 的合成

用 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 提取不同温度处理下的沙葱萤叶甲 2 龄幼虫(约 60 mg)总 RNA, -80 保存。分别取 1 μ g 总 RNA 用 PrmerScriptTM 1 st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录合成 cDNA, -20 保存, 用于后续的定量表达分析。另取 -10 处理的 2 龄幼虫总 RNA 按照 SMARTer[®] RACE 5'-3' Kit User Manual 方法合成第一链 cDNA, cDNA 用于沙葱萤叶甲 TPP 克隆。

1.4 沙葱萤叶甲 TPP 基因片段的扩增

依据本实验室测得的沙葱萤叶甲幼虫转录组数据, 筛选注释为沙葱萤叶甲海藻糖磷酸酶的 unigene 序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物(表 1)。25 μ L PCR 反应体系: cDNA 模板 1 μ L, 上、下游引物各 1 μ L, Premix TaqTM 12.5 μ L, Rnase Free ddH₂O 9.5 μ L。反应条件: 94 预变性 3 min; 94 变性 30 s, 55 退火 30 s, 72 延伸 1 min, 共进行 30 个循环; 72 延伸 10 min。PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 扩增产物用 DNA 凝胶回收试剂盒回收纯化后连接至 pMD19-T 质粒载体, 之后转化大肠杆菌 DH5 α 后涂布含 Amp 的 LB 平板。菌落 PCR 鉴定正确后, 用质粒提取试剂盒提取菌液的质粒, 送至北京六合华大基因科技股份有限公司进行测序。将测序结果与转录组数据库中鉴定出的 TPP 基因片段序列通过 DNAMAN 软件进行比对。

1.5 TPP 基因 5'cDNA 末端快速扩增(Rapid amplification of cDNA ends, RACE)

因沙葱萤叶甲 TPP 基因的中间片段序列包含 3'末端, 我们只设计 5'特异性引物: TPP-5-F1,

TPP-5-F2 (表 1)。利用这些引物进行 TPP 基因的 5'-RACE 扩增, 以获得 TPP 基因的全长。采用 SMART RACE 说明书上的 Touchdown PCR 和 Nest PCR 方法进行 5'-RACE。首先利用通用引物 UPM 和特异性引物 TPP-5-F1 所配成的 50 μ L PCR 反应体系进行 Touchdown PCR, 扩增条件为: 94 30 s, 72 2 min, 5 个循环; 94 30 s, 70 30 s, 72 2 min, 5 个循环; 94

30 s, 68 30 s, 72 2 min, 25 个循环。电泳检测后, 取 5 μ L PCR 产物加入到 Tricine-EDTA Buffer 中配成模板, 使用通用引物 NUP 和特异性引物 TPP-5-F2 进行 Nest PCR, 其扩增条件为: 94 预变性 3 min; 94 30 s, 68 30 s, 72 2 min, 25 个循环; 72 延伸 7 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测、回收、连接、转化、测序, 方法与 1.3 中间片段克隆方法一样。

表 1 TPP 引物名称及序列
Table 1 The primers of TPP used in the study

引物用途 Use of primers	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequences
TPP 基因片段扩增 Amplification of TPP gene fragment	TPP-F1	GGATTTTATAATAGAACAGAATTCG
	TPP-R1	ATGCAGACTTAATTACTTAGTGAAA
	TPP-F2	AACTTGAATTTTGAGATGATTTAAA
	TPP-R2	AAAGTGTTAATACTAAAAATTCGA
TPP 基因 RACE 扩增 Amplification of cDNA ends	TPP-5-F1	CCTTAGTTTCGGGTGGGATCGTCGC
	TPP-5-F2	GGATCGTCGCCAAGTCTGGATGTGC
	UMP	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
	NUP	CTAATACGACTCACTATAGGGC
实时荧光定量 PCR Real-time quantitative of cDNA	Q-TPP-F	TAAAGAGCATGGTTGGCGTG
	Q-TPP-R	TTTCTATCCAGGCGCCATCT
重组表达 Recombinant expression	pET-TPP-F	GGATCCATCGTTCAAATATGGT(BamH I)
	pET-TPP-R	CTCGAGCACAAAAATTTGCCTAA (Xho I)
内参基因 qPCR qPCR of reference gene	Q-SDHA-F	GGGAGACCACAATCTCCTCA
	Q-SDHA-R	AGCTGGTGCTCCTAAGTCCA

1.6 沙葱蚱叶甲 TPP 序列分析及系统发育树的构建

应用在线预测网站 ORF Finder (www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html) 对 TPP 基因的开放阅读编码框 (ORF) 进行预测; 应用在线预测网站 SignalIP4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行信号肽预测; 使用 DNAMAN V6.0 (Lynnon Biosoft, 加拿大) 软件进行分子质量 (Molecular weight, MW) 以及等电点 (Isoelectric point, pI) 预测; 跨膜区的预测使用 TMHMM Server V.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>); 利用蛋白质亚细胞定位软件 WoLF PSORT ([\[wolfsort.org/\]\(http://wolfsort.org/\)\) 对蛋白质进行定位预测; 糖基化位点预测采用 NetOGlyc 4.0 Server \(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>\) 和 NetNGlyc 1.0 Server \(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>\) 在线软件进行分析; 使用 KinasePhos \(<http://kinasephos.mbc.nctu.edu.tw/>\) 在线软件预测磷酸化位点; 运用 ExPASy Proteomics Tools \(\[https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html\]\(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html\)\) 预测 GdTPP 二级结构; 以 GdTPP 序列作为询问序列, 利用 NCBI 软件在 GenBank 中搜寻其他昆虫 TPP 的同源性序列, 并运用 DNAMAN 软件进行比对分析; 用 MEGA6.0 软](http://</p>
</div>
<div data-bbox=)

件中的邻接法 (Neighbor-joining, NJ) 构建系统发育树, 重复运行 1 000 次, 在进化树的节点处显示自举检验值, 判断序列是否属于直系同源序列。

1.7 沙葱萤叶甲 *TPP* 基因的原核表达

1.7.1 *TPP* 基因的 PCR 扩增 根据沙葱萤叶甲 *TPP* 的 ORF 序列设计 1 对特异性引物 *pET-TPP-F* 和 *pET-TPP-R* (表 1), 上游引物中有 *Bam*H I 酶切位点, 下游引物中有 *Xho* I 酶切位点, 并利用该引物进行 PCR 扩增。扩增产物进行凝胶电泳检测、回收纯化, 与 pMT-19T 载体链接, 转入大肠杆菌 DH5 α , 蓝白斑筛选, 菌落 PCR 鉴定正确后, 送至北京六合华大基因科技股份有限公司进行测序。

1.7.2 *TPP* 基因原核表达载体的构建 取测序成功的 pMT-19-GdTPP 菌液, 加卡那霉素 (Kan⁺50 μ g/mL) 抗性过夜培养, 提取质粒。根据设计的相应酶切位点对 T 载体质粒进行双酶切, 胶回收纯化后, 与经同样酶切的表达质粒载体 pET-28a(+)用 T4 连接酶 16 过夜连接, 构建表达质粒 pET-GdTPP 转化大肠杆菌克隆菌株 DH5 α 。菌落 PCR 鉴定正确后, 用质粒提取试剂盒提取菌液的质粒, 并转入表达菌株 BL21(DE3) 大肠杆菌感受态细胞中, 用于原核表达。

1.7.3 *TPP* 基因的原核表达 将上述中培养的 BL21(DE3)菌株进行菌落 PCR 鉴定正确后, 用质粒提取试剂盒提取菌液的质粒, 挑取酶切正确的单克隆于 10 mL LB 培养基中(含 Kan⁺50 μ g/mL) 37 过夜培养。吸取以上菌液按 1:100 稀释后继续震荡培养, 当 A₆₀₀ 达到 0.4 后, 取 2 mL 菌液, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导目的蛋白的表达, 37 震荡培养 4-5 h。12 000 r/min 离心 2 min 收集菌体, 弃上清。加入 1 $\times$ DTT 10 μ L, 2 $\times$ SDS 40 μ L, ddH₂O 50 μ L, 吹打混匀, 100 煮沸 10 min, 4 放置 5 min。12 000 r/min 离心 1 min, 取 20 μ L 上清进行 SDS-PAGE 电泳检测。

1.8 沙葱萤叶甲 *TPP* 基因的表达分析

采用实时荧光定量 PCR (Real-time quantitative

PCR, qPCR) 方法测定沙葱萤叶甲不同温度胁迫下 *TPP* 基因的表达水平。以从沙葱萤叶甲筛选出的内参基因 *SDHA* (GenBank 登录号: KU240575) 为内参基因 (Tan *et al.*, 2017) (表 1) 以 25 处理的沙葱萤叶甲 2 龄幼虫为对照, 1.3 中反转录合成的 cDNA 为模板, 并进行稀释。20 μ L 的反应体系: 模板 2 μ L, 上/下游引物各 0.4 μ L, Go Taq[®] qPCR Master Mix 10 μ L, Nuclease-Free Water 7.2 μ L。反应条件采用两步法 PCR 程序进行反应: 95 预变性 10 min; 95 变性 15 s, 60 退火 1 min, 共 40 个循环; 95 15 s, 60 15 s, 95 15 s。每个处理重复 3 次, 每个重复含 8-9 头试虫。

1.9 数据统计与分析

采用 2^{-CT} 法分析沙葱萤叶甲 *TPP* 基因的相对表达量 (Livak and Schmittgen, 2001), 不同温度处理间相对表达量差异显著性分析采用单因素分析 (One-way ANOVA, Duncan 氏新复极差法)。利用 SPSS20.0 统计分析软件对数据进行统计分析, 数据以平均数 $\pm$ 标准误表示。

2 结果与分析

2.1 沙葱萤叶甲 *TPP* 基因的克隆及序列分析

根据前期沙葱萤叶甲幼虫转录组获得的 *TPP* 基因核苷酸序列信息, 通过 PCR 扩增, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析, 得到该基因的片段 (图 1: A), 进行胶回收测序后, 其大小为 1 077 bp。5'-RACE 巢式 PCR 扩增最终产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行分析, 出现一条与预计相近的特异性条带, 测序后得到一条 295 bp (图 1: B)。测序比对表明该片段属于海藻糖磷酸酶的一部分, 将这 2 个片段序列用 DNAMAN 软件拼接起来得到该基因的全长 cDNA 1 372 bp 序列, 以 *TPP-F2* 和 *TPP-R2* 引物扩增得到包含 ORF 在内的片段 1 321 bp (图 1: C)。推断该基因 cDNA 全长为 1 372 bp, 并将其命名为 *GdTPP* (GenBank 登录号: MG431210), ORF 全长 864 bp, 编码 287 个氨基酸 (图 2)。

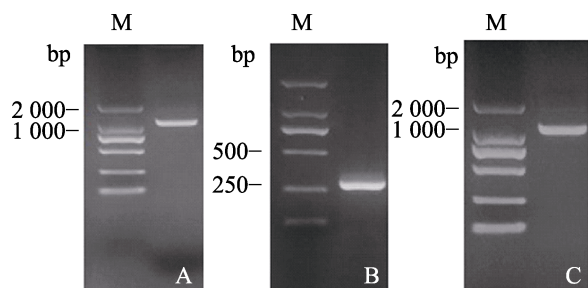


图 1 沙葱萤叶甲 *GdTPP* 全长 cDNA 的 PCR 扩增电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram for PCR amplification products of *GdTPP* from *Galeruca daurica*

M: DL2000 Marker; A. *GdTPP* 的中间片段; B. *GdTPP* 的 5'-RACE 扩增产物; C. 包含 ORF 的 *GdTPP* 扩增。

M: DL2000 Marker; A. Intermediate fragment of *GdTPP*; B. 5'-RACE-PCR product of *GdTPP*; C. Amplification of *GdTPP* including ORF.

生物信息学分析结果表明, *GdTPP* 编码的蛋白预测分子量为 32.32 ku, 等电点 (pI) 6.19; 无信号肽, 无跨膜区; 蛋白质亚细胞定位预测该蛋白位于细胞质中; NetOGlyc 分析发现, *GdTPP* 具有 1 个 O-糖基化位点; NetNGlyc 预测显示, *GdTPP* 包含 2N-糖基化位点, 分别位于第 11、43 位氨基酸 (图 2); KinasePhos 在线软件分析表明, *GdTPP* 具有 5 个磷酸位点, 其中丝氨酸 (S) 磷酸位点有 1 个 (S78), 酪氨酸 (Y) 磷酸位点 1 个 (Y33) 苏氨酸 (T) 磷酸位点 3 个 (T55, T167, T237); 运用 ExPASy Proteomics Tools 中的 GOR4 预测 *GdTPP* 二级结构 结果表明 *GdTPP* 有 111 个 α -螺旋 (Alpha helix), 54 个 (Extended strand) β -折叠和 122 个无规则卷曲 (Random

```

CTTGAATTTTGAGATGATTTAAATAGTATTTGCAAAGATTAGATAACCTTGTGTGACACCG
CGAGTGTATTTATAACGAATTTATTATCAAATACTATTTTATTTTATGCATATCCTTAAA
1      M H I L K
CTATTGGATTTTATAATAGAACAGAATTCGCATTGCATTTATCTACAGATATGTGTCT
6      L F G F Y [N] R T E F A L H L S T D M C S
ACAACTGGCGAATTTGGAAGAATATGTAACGAAATATTTAGAAGGATCTTCAAATTTTCT
26     T T G D L E E Y V T K Y L E G S S [N] L S
CTTTTATTAGATTATGATGGTACTCTAACGCCTATTGTAGCACATCCAGACTTGGCGACG
46     L L L D Y D G T L T P I V A H P D L A T
ATCCACCCGAAACTAAGGATGTTTGAAGAAATATCTCAAATTCCTGAAATATTTGTG
66     I P P E T K D V L E R L S Q I P E I F V
GCAATTATATCTGGTAGAGCTGTGGATAATGTAAGAGCATGGTTGGCGTGGATACTATT
86     A I I S G R A V D N V K S M V G V D T I
ACATATGCTGGAAATCATGGACTGGAGGTATTATATCCAGATGGTTCTAGATATAATCAC
106    T Y A G N H G L E V L Y P D G S R Y N H
CAGTTACCATCCAACCTTTGATGATCACTAAAGAACTAATTGCCAATTAGAAAAAAA
126    Q L P S N F D D Q L K E L I A K L E K F
GTAGTCAGAGATGGCGCTGGATAGAAAATAAGGGGTCCACCCTAATTTTCATTATAGA
146    V V R D G A W I E N K G S T L T F H Y R
GCTACTCCAGAACCTTTAAAAGAACTATAAGACAGGAGGCTGAGAAAATCATACAAGAA
166    A T P E P L K E T I R Q E A E K I I Q E
GCCAATTTTAAATTTGGAAGACACACATGGCAATAGAAGTAAGACCTAAAGTGGAGTGG
186    A N F K I G K A H M A I E V R P K V E W
AATAAAGGCAGCATTCCTACTACTTTTAGAGAAGAAATATGGAATAATTGGAACAAG
206    N K G S I A L L L L E K K Y G N N W N K
GAAACAAAAGTTATTTATAGGAGATGATACGACTGACGAAGATGCAATGAAGGCATTG
226    E T K V I F I G D D T T D E D A M K A L
AAAGGAAATGCAGCTACTTTTCAAGATTGCTAAATGTGACGCTATGAAAATAATGCAGAA
246    K G N A A T F R I A K C D A M K T N A E
AAAATAATATCCTCACTGATAATGTTATAGAGATACTGAAATAGTGGACAAATATTTT
266    K I I S S T D N V I E I L K L V D K Y F
AAAAATGAATTATATAGTCTGGATGTCATAATATTTTAAATATTAGTTGTGTTA
286    K K *
CATAAGAATATATATTTTGTCCACAACCACTTAATAATAAATCAATATTTTACTTCCTA
ACTAAAAGTATATGGTACCATATATCACTAGAGTGAATTATGATAAGTCACGTTTGCAT
TTAAATAGCATATGTTGCTATGACATCACAACATTCACGACATCCCGATAGGTGACTAG
AGATGGGGGATTCGATATGATATTTTCACTAAGTAATTAAGTCTGCATATTTTGTGTTAGG
AAATTTGTGCTGGAATATATTGTATCGACAAAATATCGAAATTTTGTAGTATTAACACTT
TTCATATCGATATTTCTAATATTGATATTTTAAATAATATATTATATA

```

图 2 沙葱萤叶甲 *GdTPP* 的核苷酸序列和推导的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *GdTPP* in *Galeruca daurica*

图中起始密码子、终止密码子用 “—” 下划线标出, 经典 poly(A) 加尾信号用 “=” 标出, 糖基化位点加框标出。

The initiator and terminator are underlined of “—”, the poly(A) plus tail signal are underlined of “=”, and the potential N-glycosylation sites are boxed.

coil), 各占 38.68%、18.82%和 42.51%。

2.2 沙葱萤叶甲 *GdTPP* 同源比对及系统进化分析

利用 *GdTPP* 推测所得氨基酸序列在 GenBank 数据库中搜索昆虫 TPP 序列并比对分析。结果表明, 沙葱萤叶甲 *GdTPP* 与马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* TPP (Genbank 登录号: ARI45063.1) 氨基酸序列一致性最高, 为 68%; 其次是光肩星

天牛 *Anoplophora glabripennis* TPP (Genbank 登录号: XP_018577974.1)、山松大小蠹 *Dendroctonus ponderosae* TPP (Genbank 登录号: XP_019761750.1) 和赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* TPP (Genbank 登录号: XP_015834855.1), 其氨基酸一致性分别为 66%、66%和 53% (图 3)。

采用从 NCBI 数据库中搜索到已知的 TPP 氨基酸序列, 选择 13 种代表性昆虫的 TPP 构建系统进化树。结果表明, 13 种昆虫中同一目昆虫

GdTPP	MHILKLFGFYNRTFALHSLTDMCSTTGDLEEVYTKYLEGSSNLSLLLDY	50
LdTPP	MLKGFDDYEEYLTLEYLNNSSKIALLLDY	28
AgTPP	MCDNYEEYLTYYIEDSSKLAALLDY	25
DpTPP	MESCGNRRSFDDFEDHLTQYKDAKQIALLLDY	33
TcTPP	MGSLITQEDHDDIGTTSMPAVTLDDFDEYLAKYIGNTHKLAALLDY	46
Consensus	y lllldy	
GdTPP	DGTLTPIVAHPDLATIPPTKDVLERLSQIPEIFVAIISGRAVDNVKSMV	100
LdTPP	DGTLTPIVAHPDLAKIPSTKTLHSLSRPEVFVAIISGRSVSNVRNMV	78
AgTPP	DGTLTPIVAHPDLATIPPTKSVLHSLSLMSGIFVAIISGRNVNNVEMV	75
DpTPP	DGTLTPIVAHPDLATIPPLTKALIEDLSAVENIFIAIISGRNTDINVQCMV	83
TcTPP	DGTLTPIVAHPDLATIPPTKTNVLRSLNISDVYIAIISGRDNNVQCMV	96
Consensus	pi hpdla ip tk l ls aaisgr nvk mv	
GdTPP	GVDTITTYAGNHGIEVLYPDGSRYNHQLFSNFDQIKELIAKLEKVVVRDG	150
LdTPP	GLNSTTYAGNHGIEVLYPDGSTYREKLEFENFEDQVNLIAKLEKVVVRDG	128
AgTPP	GIDNTTYAGNHGIEVLYPDGTRYVHQLPTEFNQVNELIQKLENSVVRDG	125
DpTPP	GIDNTTYAGNHGIEVLYPDGTYVHQLPTEFSNQVKQLIANLEQSVVRDG	133
TcTPP	GIDGITYAGNHGIEILHPNTKFEVPMETEFDRKVGELLRQLQERVVRDG	146
Consensus	i yagnhg e p h p f l l v rdg	
GdTPP	AWIENKGSILTFHYRATPEPLKETIRQEAETIIEANFKTKAHMAIEVR	200
LdTPP	AWIENKGSILTFHYRATPEENLRGEIEQTAQRNIEANFKVGAHCAIEAR	178
AgTPP	AWIENKGSILTFHYRATPEENLRNEIEKTAQKRIEDANFKVGAHCAIEAR	175
DpTPP	AWIENKGSILTFHYRATPEEKRTIEENTARQIEKAGFKVGNAMIEAR	183
TcTPP	AWIENKGSILTFHYRATPEESHIRPQIAEEAKRIIEEAGFKVGAHCAIEAK	196
Consensus	enkg ltfh r tp a i a fk g ah a e	
GdTPP	PEVDWNGKSVALLILEKKYGNN.WNKETKVIFIGDDTTDEDAMKALKGNA	249
LdTPP	PEVDWNGKSVALLILEKKYGNN.WKNDVKVVFAGDDTTDEDAMRELKGAA	227
AgTPP	PEVDWNGKSVALLILENNYGEN.WSKNVKVVFAGDDTTDEDAMRELKGNA	224
DpTPP	PEVDWNGKSVALLILDRHFGANKWKGNVKVIFAGDDTTDEDAMRELKGNA	233
TcTPP	PEVDWNGKSVALLILRTAFQVD.WSERIRIIFAGDDTTDEDAMRELKGMA	245
Consensus	v wnkg l g w gddttededam lkg a	
GdTPP	ATFRIAKCDAMKINAETISSTDNVIEILKLVDKYFKK.....	287
LdTPP	ATFRIAFAVNINTEADKLLSSTGEVVKILKLVERIVKK.....	265
AgTPP	ATFRISSSLNVETCAEKLSSSTEAVRQMLIYIEKIMLKNNINLS	267
DpTPP	ATFRIAFTVDVKTAEKLLSSTQAVTVLKLVKKLAKK.....	271
TcTPP	ATFRVSSSIVKTSAEERLESTDSVLTMLKQVVERHLSRRK...	285
Consensus	t a st v l	

图 3 沙葱萤叶甲与其他昆虫同源 TPP 氨基酸序列比对

Fig. 3 Multiple alignment of amino acid sequences of TPPs from *Galeruca daurica*

TPP 序列来源及 GenBank 登录号 Origin of TPPs and their GenBank accession numbers. GdTPP: 沙葱萤叶甲 *Galeruca daurica*, MG431210; LdTPP: 马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata*, ARI45063.1; AgTPP: 光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis*, XP_018577974.1; DpTPP: 山松大小蠹 *Dendroctonus ponderosae*, XP_019761750.1; TcTPP: 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*, XP_015834855.1.

的 TPP 首先聚为一支。沙葱萤叶甲 TPP 与其他鞘翅目昆虫的 TPP 位于同一分支, 其中, 沙葱萤叶甲 TPP 与同为鞘翅目的马铃薯甲虫 *L. decemlineata* (Genbank 登录号: ARI45063.1)

TPP 的亲缘关系最近, 与其他鞘翅目昆虫 TPP 的关系较近, 而非鞘翅目昆虫 TPP 的关系较远(图 4)。分子进化分析表明, 沙葱萤叶甲 GdTPP 在鞘翅目昆虫中具有相对保守的进化特性。

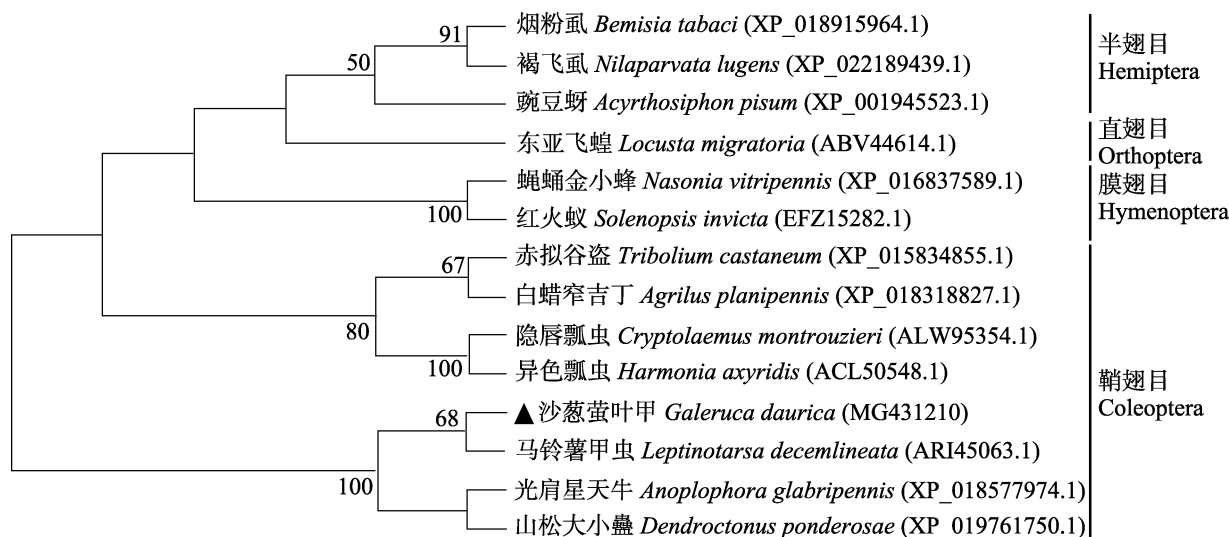


图 4 沙葱萤叶甲和其他物种 TPP 氨基酸序列构建的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of trehalose-6-phosphate phosphatase (TPP) from *Galeruca daurica* and other insect species

采用 MEGA6.0 软件的邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建昆虫海藻糖磷酸酶发育树, 括号内为基因 GenBank 登录号; 重复运行 1 000 次, 分支上的数字表示置信度; 沙葱萤叶甲海藻糖磷酸酶用三角形标记。

The tree is constructed using MEGA 6.0 based on amino acid sequences of insect trehalose-6-phosphate phosphatase with Neighbor-Joining method (NJ). GenBank accession number of gene is in brackets. One thousand replications are performed, and numbers at nodes are bootstrap *P*-values. The trehalose-6-phosphate phosphatase of *G. daurica* is marked with filled triangle.

2.3 沙葱萤叶甲 GdTPP 基因的原核表达

将 *GdTPP* 基因经酶切、连接形成重组质粒 pET-GdTPP, 并转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 筛选阳性克隆, 提取质粒并进行双酶切验证, 将鉴定正确的表达质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 经浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导 4-5 h。SDS-PAGE 电泳分析表明 (图 5), 含有 *GdTPP* 的细菌在 IPTG 诱导下表达了一条大约 32.3 ku 的特异蛋白条带, 与推测的大小一致, 而未诱导的重组表达载体及对照组的空载体未产生该特异条带。结果表明, *GdTPP* 蛋白在大肠杆菌内成功表达。

2.4 沙葱萤叶甲 GdTPP 在不同温度胁迫下的表达量分析

采用实时荧光定量 PCR 技术检测不同温度

胁迫后沙葱萤叶甲 2 龄幼虫 *GdTPP* mRNA 的相对表达量变化。结果表明: 当温度低于 25 对照时, 随着温度的下降, *GdTPP* 的表达量逐渐上升, 在 -10 时达到最高值, 为对照的 1.86 倍 ($P < 0.05$), 然后下降; 当温度高于 25 对照时, *GdTPP* 的表达量随着温度的升高而上升, 在 40 时的表达量为对照组的 1.68 倍 ($P < 0.05$) (图 6)。

3 讨论

昆虫海藻糖磷酸酶参与海藻糖的生物合成, 将海藻糖-6-磷酸去磷酸化生成海藻糖。本研究从沙葱萤叶甲的幼虫转录组数据库中鉴定其中一个转录本, 它编码的蛋白质与昆虫的海藻糖磷酸酶具有较高的相似性, 推测它是沙葱萤叶甲的海藻糖磷酸酶基因。通过 RACE 方法成功克隆获

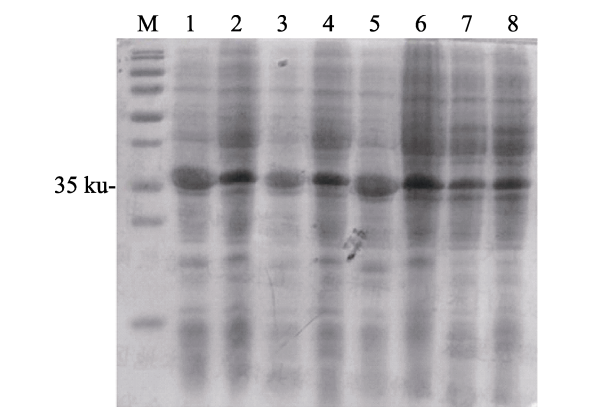


图 5 *GdTPP* 在大肠杆菌 DE3 中表达蛋白的 SDS-PAGE 检测

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of *GdTPP* expressed in *E. coli* DE3

M: 蛋白分子量标准; 1, 3, 5: IPTG 诱导的 pET-*GdTPP* 菌体蛋白; 2, 4, 6: pET-*GdTPP* 未诱导的菌体蛋白; 7: IPTG 诱导的 pET-28a(+)-菌体蛋白; 8: pET-28a(+)未诱导的菌体蛋白。

M: Protein molecular weight; 1, 3, 5: pET-*GdTPP* fusionprotein induced by IPTG; 2, 4, 6: pET-*GdTPP* fusion protein without induction; 7: pET-28a(+)- fusion protein induced by IPTG; 8: pET-28a(+)- fusion protein without induction.

得了沙葱萤叶甲海藻糖磷酸酶基因 (*GdTPP*) 全长 cDNA。经过生物信息学、蛋白同源性分析及进化树的构建,进一步确认了该基因就是海藻糖磷酸酶基因,属于昆虫 TPP 家族。同源性比较和系统进化分析表明,*GdTPP* 与马铃薯甲虫 *L. decemlineata* 的 TPP 亲缘关系最近,氨基酸序列

一致性最高,为 68%,意味着两者具有相似的功能。

本研究成功构建了原核表达载体 pET-*GdTPP*,并转到感受态细胞 BL21 (DE3) 表达菌株,对表达产物的 SDS-PAGE 电泳结果显示的条带和预测的蛋白分子量大小一致,大约为 32.3 ku,表明 pET-*GdTPP* 可以在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中稳定表达,这为后期 *GdTPP* 特异性抗体的制备以及其功能研究奠定了基础。

在本研究中,沙葱萤叶甲幼虫经过短时低温和高温胁迫后,*GdTPP* 的表达量随着低温诱导温度的降低和高温诱导温度的上升而显著升高,胁迫强度越大,*GdTPP* 表达量上升幅度越大,而且低温胁迫对 *GdTPP* 的诱导能力略高于高温胁迫。低温和高温胁迫对沙葱萤叶甲 *GdTPS* 的诱导规律与 *GdTPP* 相同(路标等,2017)。但在 -14℃ 时 *GdTPP* 和 *GdTPS* 表达量反而显著低于 -10℃ 的表达量,这很可能是因为沙葱萤叶甲 2 龄幼虫的过冷却点为 -13.3℃ (李浩等,2014),-14℃ 的低温使部分昆虫个体死亡,使其失去生理活性,从而导致其表达量低于 -10℃;或者昆虫的海藻糖合成存在新的合成途径。另外,*GdTPP* 和 *GdTPS* 两个基因的上调表达是否会导致海藻糖磷酸酶和海藻糖合成酶含量的增加及酶活性的提高,从而导致海藻糖的进一步合成,还有待于进一步深入研究。

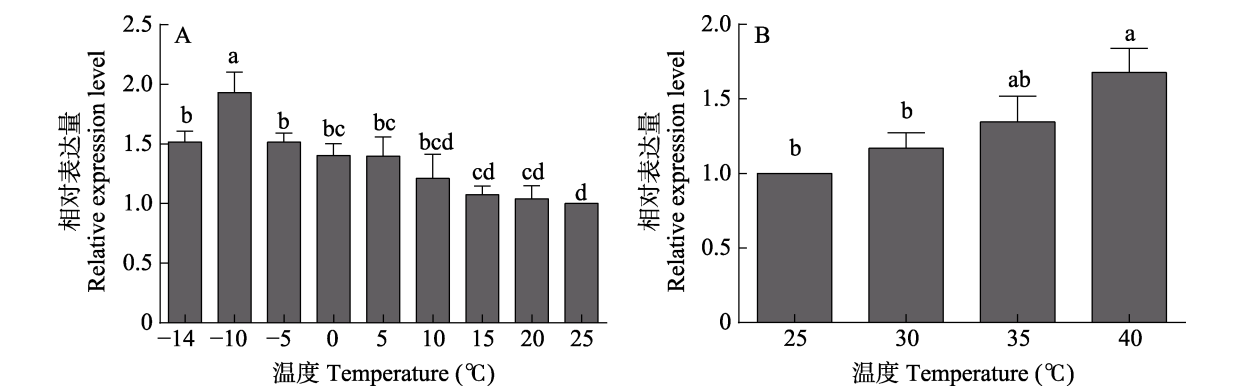


图 6 *GdTPP* 在沙葱萤叶甲 2 龄幼虫不同温度胁迫下的相对表达量

Fig. 6 Relative expression level of *GdTPP* in the 2nd instar larvae of *Galeruca daurica* under different temperature treatments

A. 低温胁迫; B. 高温胁迫。柱上标有不同小写英文字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

A. Cold stress; B. Hot stress. Histograms with different letters indicate significantly different at 0.05 level.

参考文献 (References)

- Becker A, Schloder P, Steele JE, Wegener G, 1996. The regulation of trehalose metabolism in insects. *Experientia*, 52(5): 433–439.
- Bale JS, 2002. Insects and low temperatures: from molecular biology to distributions and abundance. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 357(1423): 849–862.
- Chen L, Tan Y, Zhou XR, Gexigeduren, Sun ZP, 2018. Molecular cloning, characterization and expression analysis of trehalase gene *GdTrel* in *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Acta Entomologica Sinica*, 61(3): 271–281. [陈龙, 谭瑶, 周晓榕, 庞保平, 格希格都仁, 孙志鹏, 2018. 沙葱萤叶甲海藻糖酶基因 *GdTrel* 的克隆、分子特性和表达分析. 昆虫学报, 61(3): 271–281.]
- Eastmond PJ, Graham IA, 2003. Trehalose metabolism: a regulatory role for trehalose-6-phosphate. *Current Opinion of Plant Biology*, 6(3): 231–235.
- Gao JC, Zhou XR, Pang BP, Bao X, Luo JP, Erdengqimuge, 2015. Effects of low temperature on the survivorship and development of overwintering eggs of *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Acta Entomologica Sinica*, 52(8): 881–886. [高靖淳, 周晓榕, 庞保平, 包祥, 罗建平, 额尔登其木格, 2015. 低温对沙葱萤叶甲越冬卵存活和发育的影响. 昆虫学报, 52(8): 881–886.]
- Guo Q, Hao YJ, Li Y, Zhang YJ, Ren S, Si FL, Chen B, 2015. Gene cloning, characterization and expression and enzymatic activities related to trehalose metabolism during diapause of the onion maggot *Delia antiqua* (Diptera: Anthomyiidae). *Gene*, 565(1): 106–115.
- Hao X, Zhou XR, Pang BP, Zhang ZR, Ma CY, 2014. Effects of host plants on feeding amount, growth and development of *Galeruca daurica* Joannis larvae (Coleoptera: Chrysomelidae). *Acta Agrestia Sinica*, 22(4): 854–858. [昊翔, 周晓榕, 庞保平, 张卓然, 马崇勇, 2014. 寄主植物对沙葱萤叶甲幼虫生长发育及取食的影响. 草地学报, 22(4): 854–858.]
- Krasensky J, Broyart C, Rabanal FA, 2014. The redox-sensitive chloroplast trehalose-6-phosphate phosphatase *AtTPPD* regulates salt stress tolerance. *Antioxid Redox Signal*, 21(9): 1289–1304.
- Leyman B, Van Dijck P, Thevelein JM, 2001. An unexpected plethora of trehalose biosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana*. *Trends on Plant Science*, 11(6): 510–513.
- Li H, Zhou XR, Pang BP, Chang J, 2014. Supercooling capacity and cold hardiness of *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Acta Entomologica Sinica*, 57(2): 212–217. [李浩, 周晓榕, 庞保平, 常静, 2014. 沙葱萤叶甲的过冷却能力与抗寒性. 昆虫学报, 57(2): 212–217.]
- 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: 402–408.
- Lu B, Tan Y, Zhou XR, Xing L, Pang BP, 2017. Molecular cloning of trehalose-6-phosphate synthase gene *GdTPS* and its response to temperature stress in *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Acta Entomologica Sinica*, 60(12): 1384–1393. [路标, 谭瑶, 周晓榕, 邢莉, 庞保平, 2017. 沙葱萤叶甲海藻糖合成酶基因 *GdTPS* 的克隆及对温度胁迫的响应. 昆虫学报, 60(12): 1384–1393.]
- Mitsumasa K, Kanamori Y, Fujita M, Iwata K, Tanaka D, Kikuta S, Watanabe M, Cornette R, Okuda T, Kikawada T, 2010. Enzymatic control of anhydrobiosis-related accumulation of trehalose in the sleeping chironomid, *Polypedium vanderplanki*. *FEBS Journal*, 277(20): 4215–4228.
- 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.
- Tang B, Xu QY, Zhao LN, Wang SG, Zhang F, 2014. Progress in research on the characteristics and functions of trehalose and the *TPS* gene in insects. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 51(6): 1397–1405. [唐斌, 徐青叶, 赵丽娜, 王世贵, 张帆, 2014. 昆虫海藻糖及其合成酶基因的特性与功能研究进展. 应用昆虫学报, 51(6): 1397–1405.]
- Thompson SN, 2003. Trehalose-the insect 'blood' sugar. *Advances on Insect Physiology*, 31(3): 205–285.
- Yu CH, Lu D, Lin RH, Wang XJ, Jiang H, Zhao F, 2008. Trehalose-the blood sugar in insects. *Chinese Bulletin of Entomology*, 45(5): 832–837. [于彩虹, 卢丹, 林荣华, 王晓军, 姜辉, 赵飞, 2008. 海藻糖-昆虫的血糖. 昆虫知识, 45(5): 832–837.]
- Zhang JB, Wang SS, Hao DH, 2015. Comparison of metabolic differences of trehalose in *Nicotiana tabacum* seedlings under drought and chilling stress. *Biotechnology Bulletin*, 39(4): 111–118. [张建波, 王莎莎, 郝大海, 2015. 干旱和低温胁迫影响烟草幼苗海藻糖代谢的差异比较. 生物技术通报, 39(4): 111–118.]