

大螟水通道蛋白 *SiAQP* 基因的克隆与表达分析*

肖天晶** 汤小天 陆明星 马德英^{1***} 杜予州^{2***}

(1. 新疆农业大学农学院&农林有害生物监测与安全防护重点实验室, 乌鲁木齐 830001;

2. 扬州大学园艺与植物保护学院&扬州大学应用昆虫研究所, 扬州 225009)

摘要 【目的】水通道蛋白(AQP)是一种重要的膜结合蛋白,它可以在植物、细菌和动物的细胞膜上形成通道以促进水分和甘油等小分子的运输。本文研究了大螟水通道蛋白基因(*SiAQP*)的序列特征以及该基因的表达模式和功能。【方法】运用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆获取大螟水通道蛋白基因(*SiAQP*);运用生物信息学软件分析该基因特征;用实时荧光定量 PCR 技术(qRT-PCR)分析该基因在大螟的不同器官组织、不同发育阶段以及在不同温度和湿度条件下的表达模式。【结果】*SiAQP* 的开放阅读框(ORF)为 831 bp,编码 276 个氨基酸,分子量为 29.27 ku,等电点 8.16。保守结构域分析发现其含有两个高度保守的水通道蛋白特征序列 NPA(Asn-Pro-Ala)基序和 6 个跨膜结构域。qPCR 结果显示,不同器官组织中,后肠的 *SiAQP* 表达量显著高于其它组织;不同发育阶段中成虫期的 *SiAQP* 表达量最高,卵和蛹期表达量相对较低;不同温度处理下 *SiAQP* 的表达量相对稳定,与 27℃ 对比高温与低温处理都没有显著变化;随着湿度的上升大螟幼虫和雌雄蛹的 *SiAQP* 表达量都呈现出显著的先上升后下降趋势,表明高湿度和低湿度环境都会抑制 *SiAQP* 的表达。【结论】*SiAQP* 在大螟不同的器官组织表达具有明显的差异,温度对 *SiAQP* 的表达影响较小,而湿度的影响较大,成虫能较好的适应不同湿度环境。

关键词 大螟;组织;发育阶段;温度;湿度

Molecular cloning and expression analysis of the *Sesamia inferens* aquaporin (*SiAQP*) gene

XIAO Tian-Jing^{1,2**} TANG Xiao-Tian² LU Ming-Xing² MA De-Ying^{1***} DU Yu-Zhou^{2***}

(1. College of Agronomy & Key Laboratory of the Pest Monitoring and Safety Control of Crops and Forests,

Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830001, China; 2. College of Horticulture and Plant

Protection & Institute of Applied Entomology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract [Objectives] To determine the sequence characteristics, expression patterns, and function, of the pink borer, *Sesamia inferens* (Walker) aquaporin gene (*SiAQP*), a membrane-bound protein gene that facilitates the movement of water, glycerol and other substances across cell membranes in plants, bacteria and animals via channels. [Methods] The aquaporin gene *SiAQP* was cloned from *S. inferens* by RT-PCR and RACE technology. The expression patterns of *SiAQP* in different tissues, developmental stages, temperatures and relative humidity was analyzed with Real time quantitative PCR. [Results] *SiAQP* contains a 831 bp open reading frame (ORF) and encodes 276 amino acids. It has a theoretical molecular weight of 29.27 ku and an isoelectric point of 8.16. *SiAQP* has six transmembrane domains and two highly conserved asparagine-proline-alanine motifs (NPA motifs). Real time quantitative PCR showed that expression in the hindgut was significantly higher than in other tissues. The expression of *SiAQP* was highest in adults and relatively low in eggs and pupae. The

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金项目(31371937); 国家重点研发计划(2017YFD0200400)

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

***共同通讯作者 Co-corresponding authors, E-mail: yzdu@yzu.edu.cn; mdyxnd@163.com

收稿日期 Received: 2019-03-15; 接受日期 Accepted: 2019-07-05

expression of *SiAQP* was relatively stable in different temperature treatments, and there was no significant difference between high and low temperature treatments relative to the 27 °C control. Expression in larvae and pupae first decreased, then increased, with increasing humidity, indicating that both high and low humidity can inhibit the expression of *SiAQP*. [Conclusion] The expression of *SiAQP* was significantly different in different tissues. Although the expression of *SiAQP* was not greatly affected by temperature, it was significantly affected by humidity. Adult *S. inferens* may be more tolerant to low or high humidity than larvae and pupae.

Key words AQP; *Sesamia inferens*; tissues; development; temperature; humidity

水通道蛋白 (Aquaporins, AQP) 是一种重要的膜内嵌蛋白 (Major intrinsic protein, MIP), 能够促进细胞间水和尿素、甘油等小分子的运输, 维持生物体内不同液体环境的稳定状态 (Hara-Chikuma and Verkman, 2006; Ishibashi and Kondo, 2009; Mukhopadhyay *et al.*, 2014)。除此之外, 一些 AQP 还可以运输营养物质、代谢前体、废物、毒素和气体等物质 (Junpei *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2009; Bienert *et al.*, 2013)。研究发现, 除了部分原核生物, AQP 广泛存在于包括病毒在内的几乎所有生物中 (Ishibashi *et al.*, 2017), 其中哺乳动物已发现 13 种不同类型的 AQP (AQP0-AQP12) (陆明星等, 2017)。目前, 针对不同研究对象的 AQP 具有不同的分类标准和方法, 由于昆虫水通道蛋白研究相对较少, 具体的分类仍有争议, 如 Campbell 等 (2008) 将昆虫水通道蛋白分为 DRIP、BIB 和 PRIP 三大类, 而 Kambara 等 (2009) 则通过对比 17 个物种的 71 种昆虫 MIP 序列将其分为了四大类。尽管如此, 典型的昆虫水通道蛋白都拥有 6 个疏水性横跨膜区域, 其中大部分昆虫水通道蛋白都包含两个 NPA (Asn-Pro-Ala) 结构单元。当然, 相对于数量庞大、种类繁多的昆虫而言, 目前有关昆虫水通道蛋白的相关研究远远不够。

大螟 *Sesamia inferens* (Walker), 属于鳞翅目 (Lepidoptera) 夜蛾科 (Noctuidae) 蛀茎夜蛾属 (*Sesamia*), 主要为害水稻、玉米、茭白、小麦、甘蔗等作物, 是典型的广食性昆虫。近些年随着全球气候变暖和耕作制度的变化, 国内大螟分布逐渐突破传统的北纬 34°分界线, 比如在河北馆陶 (北纬 36°27'-36°47') 已有大螟为害玉

米的报道 (陈立涛等, 2018)。由于越冬能力是制约大螟分布的主要因素之一, 长江流域冬季低温高湿度与北方冬季低温低湿度的气候差异对大螟越冬的影响颇具研究价值, 因此对低温环境中越冬大螟幼虫水分调节能力的研究就显得尤为重要。为了解 AQP 在大螟生长、发育、越冬等过程中发挥的重要作用, 我们克隆了大螟的 AQP 基因 (*SiAQP*) 并对其结构和功能进行了分析, 同时研究了 *SiAQP* 在大螟不同组织、不同发育阶段、不同温湿度条件下的表达, 初步分析 *SiAQP* 在大螟生长发育中的功能和在温湿度耐受性中的作用, 为大螟的种群变动机制研究提供一定的分子基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

大螟种群采自扬州地区水稻田, 在实验室用茭白稳定饲养 3 代以上。

试验室饲养条件: 温度 (26 ± 1) °C, 湿度 $65\% \pm 5\%$, 光周期 L:D=16:8。

1.2 实验样品的准备和处理

1.2.1 大螟幼虫不同组织样品的处理 随机选取 10 头体重相似的 5 龄大螟幼虫, 在显微镜下解剖分离并收集大螟幼虫的头部 (HE)、表皮 (EP)、脂肪体 (FB)、前肠 (FG)、中肠 (MG)、后肠 (HG)、马氏管 (MT) 和血淋巴 (HC)。将分离后的组织用液氮速冻, 于 -80 °C 冰箱保存。每个组织样品设置 4 个重复。

1.2.2 大螟不同发育阶段样品的处理 从室内饲养的第 4 代大螟种群中随机选择试验样品, 其中大螟卵 (Egg) 60 粒、1 龄幼虫 50 头、2 龄幼

虫 30 头、3 龄幼虫 10 头、4-6 龄幼虫各 1 头、雌蛹 (fp) 1 头、雄蛹 (mp) 1 头、雌蛾 (fa) 1 头、雄蛾 (ma) 1 头。将样品液氮速冻,于 -80 冰箱保存。每个样品处理设置 4 个重复。

1.2.3 大螟不同温度样品的处理 取大小、体重相似的 5 龄大螟幼虫,分别置于恒温水浴槽中(购自博日科技有限公司)进行温度梯度(-8、-6、-4、-2、0、27、35、37、41、43 和 45)处理 2 h。处理后将样品置于 27 人工气候培养箱恢复 2 h。所有样品液氮速冻,于 -80 冰箱保存。每个温度处理设置 4 个重复。

1.2.4 大螟不同湿度样品的处理 取大小、体重相似的 5 龄大螟幼虫、雌蛹、雄蛹、雌蛾和雄蛾各 5 头,分别置于自动培养箱中,设置温度条件 27 ,光周期 L:D=16:8,湿度条件分别为 25%、50%、75%和 95%。湿度处理 24 h 后,所有样品液氮速冻,于 -80 冰箱保存。

1.3 RNA 的提取以及第一链 cDNA 的合成

使用 SV Total RNA 分离纯化试剂盒(购自美国 Promega 公司)提取大螟 5 龄幼虫的总 RNA。利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的提取是否成功,若 RNA 提取成功则用 Eppendorf BioPhotometer plus 蛋白核酸分析仪(购自德国 Eppendorf 公司)检测总 RNA 的浓度。以获取的大螟总 RNA 为底物,以 Oligo (dT)₁₈(购自伯乐生命医学产品(上海)有限公司)为引物催化合成 cDNA 第一链。

1.4 大螟 AQP 基因中间片段的克隆

根据昆虫水通道蛋白的特征序列设计一对兼并引物(表 1),以所得的 cDNA 第一链为模板对中间片段进行扩增。扩增体系为:2×Taq Master Mix (Dye Plus) 12.5 μL(购自南京诺唯赞公司) cDNA 1 μL、上下游引物各 1 μL、ddH₂O 9.5 μL,共 25 μL。PCR 程序为:94 预变性 3 min,94 变性 30 s,65 退火 30 s,72 延伸 30 s,退火温度降 1 循环,19 个循环,然后 94 变性 30 s,45 退火 30 s,72 延伸 1 min,

最后 72 延伸 10 min。反应结束后用 1%琼脂糖凝胶进行电泳,使用 Axyprep DNA 凝胶回收试剂盒(购自美国 AxyGen 生物技术有限公司)分离纯化 PCR 产物。胶回收产物与 pGEM-T Easy Vector 载体(购自美国 Promega 公司)进行连接,然后将连接产物转化入 DH5α 感受态细胞中。挑取白色单菌落进行 PCR 鉴定,将阳性菌液送往上海生工生物工程公司测序。

1.5 大螟 AQP 基因 5'和 3'末端片段的克隆

利用已获得的大螟 AQP 基因片段,根据 RACE 引物设计的规则,使用 Primer 5 设计 5'和 3'末端特异性引物(表 1)进行大螟 AQP 基因 5'和 3'末端序列的扩增。使用 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒(购自日本 TaKaRa 公司)合成 RACE cDNA 第一链。以合成的 RACE cDNA 为模板对 5'和 3'末端进行扩增。扩增体系为:2×Taq Master Mix (Dye Plus) 12.5 μL(购自南京诺唯赞公司) cDNA 1 μL、5'或 3'引物 1 μL、UPM3 μL、ddH₂O 7.5 μL,共 25 μL。反应程序为:94 预变性 5 min、94 变性 30 s、68 退火 30 s、72 延伸 2 min,35 个循环,最后 72 延伸 10 min。对 PCR 产物进行回收纯化、克隆和测序。

1.6 大螟 AQP 基因序列的拼接和分析

使用 ContigExpress 软件将中间片段和 5'、3'末端序列进行拼接,得到大螟 AQP 基因的全长序列。使用在线工具 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>)分析大螟 AQP 基因的开放阅读框(ORF),并以此为基础设计跨开放阅读框的特异性引物,进行全长验证。使用 Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行同源性搜索。使用 MEGA X,采用邻接法构建大螟 AQP 与其它昆虫 AQP 的系统进化树。利用 ORF Finder 翻译得到的氨基酸序列通过 InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>)对大螟 AQP 氨基酸序列进行蛋白家族预测分析,通过 ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>)

表 1 试验中所用的引物
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequences (5' → 3')	引物用途 Usage of primers
AQPDP-F	ACAAGCTGATCTGGAGGCA	中间片段扩增
AQPDP-R	TGGCAGGCGGTGATGCTGAG	Intermediate fragment amplification
AQPRACE-5'	GCTACATCGTCGTCCAAACACTCG	5'RACE
AQPRACE-3'	GCAGCAACACCAATGGAAGTTAGCACGA	3'RACE
SiAQPDNA-F	TGTATGTAGCCACAACGAAAGG	基因组验证
SiAQPDNA-R	CGTCGAGCATATTGACAGACTA	Verification of genome
SiAQPqPCR-F	GCACGCCTTACAAAACACA	实时定量
SiAQPqPCR-R	CTGAGAGACCGATGATAGAGGA	Real-time quantitative PCR
18SrRNA-F	CAACACGGGAAATCTCACCA	实时定量内参基因 Reference gene in qPCR
18SrRNA-R	GACAAATCGCTCCACCAACTAA	
RPS13-F	TGGTAAGGGTATCTCCCAATCA	
RPS13-R	TCGTCAGCAGTCAGTTTCAGC	

分析其分子量、等电点等信息,通过 ExPASy 的 ProtScale 程序 (<https://web.expasy.org/protscale/>) 分析蛋白疏水性,通过 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 分析大螟 AQP 的跨膜结构。

1.7 大螟 AQP 基因组验证

使用 AxyPrep 基因组 DNA 小量试剂盒 (购自美国 AxyGen 生物技术有限公司) 提取大螟 5 龄幼虫的基因组 DNA。根据已获得的大螟 AQP 基因全长 cDNA 序列,在 ORF 两端设计一对引物 (表 1),按照中间片段的方法扩增大螟 AQP 的基因组序列,回收纯化、克隆和测序。在 GenBank 中对测序结果进行 Blast 同源序列检索。使用大螟 AQP 基因组序列和 cDNA 全长序列进行比较,分析是否存在内含子。

1.8 大螟 AQP 基因的表达分析和数据分析

使用 SV Total RNA 分离纯化试剂盒 (购自美国 Promega 公司) 提取不同处理大螟样品的 RNA。使用 PrimeScript RT reagent Kit Perfect Real Time 试剂盒 (购自美国 Bio-Rad 公司) 合成 cDNA 第一链。使用 RPS13 作为大螟不同组织处理的内参基因,使用 18SrRNA 作为大螟不同发育阶段、

不同温度处理和不同湿度处理的内参基因 (Sun *et al.*, 2015)。使用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 qPCR 扩增反应。反应体系为: STBR®Premix Ex Taq™ (2×) (购自美国 Bio-Rad 公司) 10 μL, 上、下游引物各 1 μL, cDNA 2 μL, ddH₂O 6 μL。反应程序为 95℃ 预变性 3 min, 95℃ 变性 15 s, 58.9℃ 退火 30 s, 40 个循环。反应结束后读取 Ct 值,每个发育阶段和组织进行 4 个反应,每个反应 3 次重复。

所得数据由 SPSS 软件分析处理。显著性差异使用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 选用 Tukey 进行多重比较。表达水平使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行相对定量分析。

2 结果与分析

2.1 大螟 AQP 基因的序列特征分析

以大螟 cDNA 模板,通过扩增、纯化、克隆、测序,得到大螟 AQP 基因 (SiAQP) 的 cDNA 全长序列。对 SiAQP 进行序列分析发现无内含子,中间开放阅读框 (ORF) 长度为 831 bp,起始密码子 ATG,终止密码子 TAA,编码 276 个氨基酸,分子量为 29.27 ku,等电点 8.16,不稳定系数 28.08 (<40 为稳定序列),脂肪系数 120.47,

总平均亲水性 0.693, 具有强疏水性 (图 2), 符合水通道蛋白的一般疏水特性。保守结构域和跨膜结构预测分析发现 SiAQP 含有两个高度保守的水通道蛋白特征序列 NPA (Asn-Pro-Ala) 基

序, 6 个跨膜结构域 (TM1-TM6) (图 1, 图 3)。蛋白家族预测分析结果表明 SiAQP 氨基酸序列属于膜内嵌蛋白家族 (MIP, IPR000425) 中的水通道蛋白家族 (AQP, IPR 034294)。

```

1      ACATGGGACTCAAGTGATGTAGCCACAACGAAAGGTAGTCTCATACGCACGCCTTACAAAACACAACAGTTCT
76     CTGCGAGCGTCTTCGGAATTTTCAATTACAATCAAATTACACTTTCACGGTGTATTTATTTAATTCATATTTCA
151    AAACAGTGCGGTGCGGTGACGTTATAACAGCGGGACAGAACTCGAAAGTGCTTATTTCAAGAAAAGTTATTTTA
226    GACGACAAAATGAAACGGATTACGCTATGGATGAGATGCAGAAGAGAACCTCTCTATCATCGGTCTCTCAGAC
1      M K T D Y A M D E M Q K R T S S I I G L S D
301    GTGACCGACTACAAGCTGATCTGGAGGCAGCTTATCGCCGAGCTGCTGGGAACCTTCGTGCTAACTCCATTGGT
23     V T D Y K L I W R Q L I A E L L G T F V L T S I G
                                     TM1(32~54aa)
376    GTTGCTGCATGCATCAGCATCAAGGAAGCAACGCTCCTGAGGTACACGATCGCGCTATGCTTTGGTCTACTC
48     V A A C I S I K E A N A P E V T S I A L C F G L L
451    GTCGGTCTATTGTGACGGCTATTGGACATGTGTGCGGCGGTATATCAACCCCGGTGACAAATGGGGCTGCTC
73     V G S I V Q A I G H V S G G H I N P A V T M G L L
                                     TM2(64~86aa)
526    GCCGCTGGTGACATCAAAATCCTGAAGGCTTCTGTACATCGTCGTCAAACACTCGGCCATTGCTGGAGCT
98     A A G D I K I L K A F C Y I V V Q T L G A I A G A
                                     TM3(107~129aa)
601    GCCTTCATCAGGTTGGCGTCCAGAGAACCAAGTGGGCGGCTCGGAATGACGCTGCCCGGGCAGACGTTACT
123    A F I R L A V P E N Q V G G F G M T L P G A D V T
676    GATGCTCAGGCTGTGCTGATCGAGGCTCTTATCAGTTCGTATTGGTTATGGTGGTGACGGCGTGTTGACGGG
148    D A Q A V L I E A L I T F V L V M V V H G V C D G
                                     TM4(149~168aa)
751    CGCCGCAACGACCTCAAGGATCCGCGCCCTCGCCATCGGCCTCAGCATACCGCCTGCCAAGCTGCTTGCAAT
173    R R N D L K G S A P L A I G L S I T A C Q A A C I
                                     TM5(180~202aa)
826    CCCTTCACCGGCTCAAGCATGAACCCCGCCGTTCCATCGGACCGCTCTTGTTATGGGCATCTGGAACCTCACAT
198    P F T G S S M N P A R S I G P A L V M G I W T S H
901    TGGGTTTACTGGGTGGGCCCATCGTCGGCGGTGTGGTTGCTGGGCTCGTGTACCAGTTTCATCTTCGCATCGGC
223    W V Y W V G P I V G G V V A G L V Y Q F I F R I G
                                     TM6(222~244aa)
976    AAGACTGGGCGAGAGTGGCTCCTACGACTTCTAGACAACGCGTGACGATAATCGAACGCGGCCGACGCTACACC
248    K T G R E W L L R L L D N C V T I I E R G R R Y T
1051   GTGCCATTCTATAACCCCGCTCGCACATGCACTACTCAGTCTTTTGAAATATTGCCAATATGGGTTCAAAATT
273    V P I L *
1126   ACCGTGATATTTTATGCACCCATTTATTTGTAATACGCAAAATCAACATAGTTAACGAACTCTCATGAGAACT
1201   TTCTACTGTTCTTGAGTTTCTATTATTAACCAAGTATTAGCATATGCGAGGCGATAGTATTAGCTTATTGAT
1267   ATAACCAAGTTATATGTTGACTAAATGAAATAGGACATTGTCAATGAGCTTATCTTCTATATTTTATGCTCT
1351   GTCAATATGCTCGACGAAATCCAAAGGTTTACTACAGACATATTGTTATTGTTCTTCAAAATATATGAAAAA
1426   TACCGATTGGAACCGTTTGTGCGAGTAAGATATTTAATATAAGTTATAGTTAATATAAATAAGATATTAAGT
1501   TTATTTATATTTATGGAATAAAGTATGTTAAAGGTGGATTGATATTATAACACGTCATAGCTCGAGTGCCTAG
1576   TGCTAGTTATGTGATTAATTTAATACATGTGAGAAGAACTTTAGTGGGTATTCACCTTCGAAATTTAGCTCACAC
1651   AAAATGAAATTTATGAAAAAATATCATTATTGATCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 大螟 SiAQP 的 cDNA 序列及编码的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of SiAQP from *Sesamia inferens*

方框标记为 AQP 基序; 下划线标记为跨膜结构域。

NPA motif is boxed; Underscores indicate the transmembrane alpha helices domains.

2.2 大螟 AQP 的系统发育分析

利用大螟 AQP (SiAQP) 的氨基酸序列, 结合前人研究结果, 从 DRIP、PRIP 和 BIB 3 个昆

虫水通道蛋白亚家族中挑选了 27 种不同昆虫的水通道蛋白, 根据它们的 GenBank 登记号下载其氨基酸序列 (其中 mRNA 序列通过 ORF finder 翻译成蛋白氨基酸序列), 利用 MEGA X 软件,

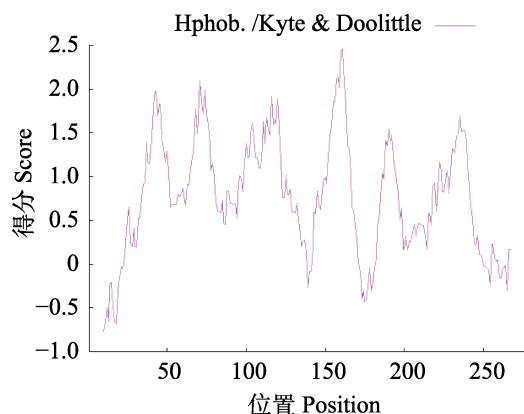


图2 大螟 SiAQP 的疏/亲水性预测
Fig. 2 the amino acid scale of SiAQP from *Sesamia inferens*

得分在“0”以上为疏水，得分在“0”以下为亲水。
Scores above “0” are hydrophobic, scores below “0” are hydrophilic.

采用邻近法重复 1 000 次构建这些昆虫水通道蛋白的系统进化发育树(图 4)。如图 4 所示, SiAQP 属于昆虫水通道蛋白的 DRIP 亚族, 该亚族属于水渗透型 AQP, 因此推测 SiAQP 在大螟体内主要功能为水分渗透调节。

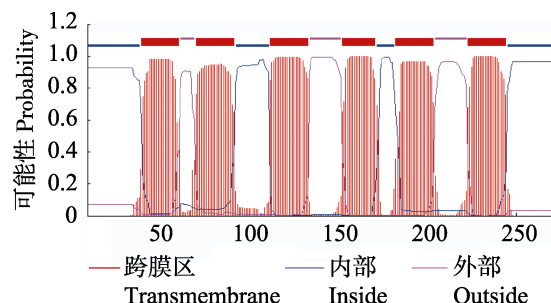


图3 大螟 SiAQP 的跨膜结构
Fig. 3 Prediction of transmembrane helices in proteins of SiAQP from *Sesamia inferens*

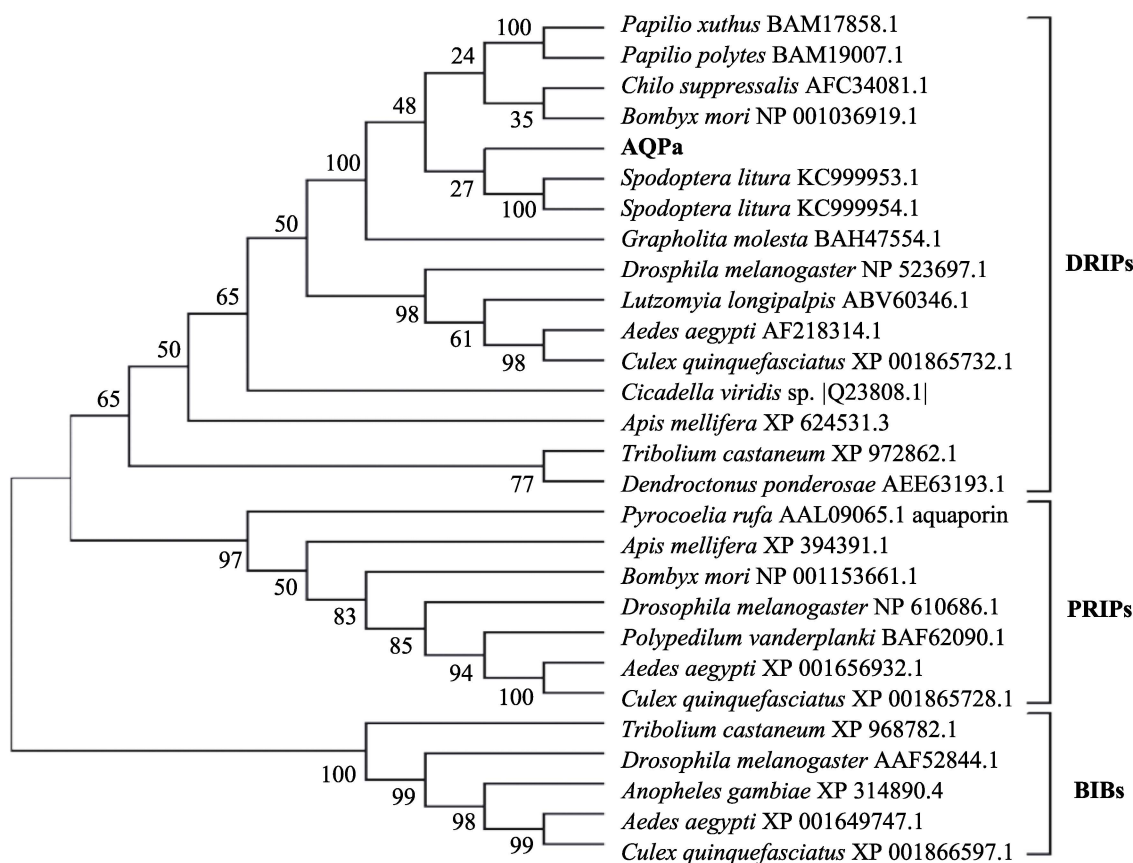


图4 昆虫不同 AQP 的系统进化树
Fig. 4 Phylogenetic tree of AQP in insects

大号加粗标记“ AQPα”为本研究中的 SiAQP, 分支上的数字代表 1 000 个抽样重复的 bootstrap 验证中可信度的百分比, 右侧标出的是水通道蛋白的类型: DRIP、PRIP 和 BIB。

SiAQP in the study is marked with a large size as “AQPα” and bold. The numbers on the branches represent confidential percentage of the bootstrap in 1 000 sampling replicates. The types of aquaporins are shown on the right of the figure: DRIPs, PRIPs and BIBs.

2.3 大螟 *AQP* 基因的表达

2.3.1 *SiAQP* 在大螟幼虫不同器官组织内的表达 根据大螟幼虫不同组织中 *SiAQP* 的 qPCR 分析结果 ($F = 8.583$, $P < 0.05$) (图 5) 可以发现, 在大螟幼虫的不同器官组织中, 后肠的 *SiAQP* 表达量最高, 与其它组织内的 *SiAQP* 表达量存在显著差异 ($P < 0.05$), 可以达到头部组织的 11 倍。同时, 虽然马氏管、前肠和中肠等消化吸收器官的 *SiAQP* 表达量高于表皮、脂肪体和血淋巴等组织, 但是它们之间的 *SiAQP* 表达量并没有显著差异 ($P > 0.05$)。

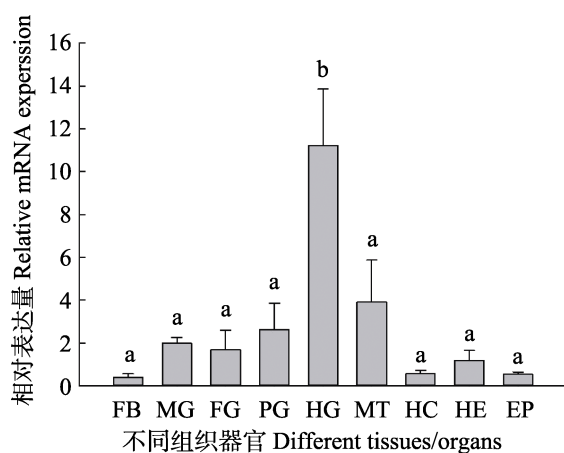


图 5 *SiAQP* 在不同组织内的相对表达量

Fig. 5 Relative expression of *SiAQP* in different tissues of *Sesamia inferens*

FB: 脂肪体; MG: 中肠; FG: 前肠; PG: 唾液腺; HG: 后肠; MT: 马氏管; HC: 血淋巴; HE: 头部; EP: 表皮; 柱上标有不同字母代表了各处理间的差异显著 ($P \leq 0.05$)。下图同。

FB: Fat body; MG: Midgut; FG: Foregut; PG: Salivary gland; HG: Hindgut; MT: Markovian canal; HC: Hemolymph; HE: Head; EP: Epidermis; The different letters marked in the figure represent the significance of the differences between the treatments. The same below.

2.3.2 *SiAQP* 在大螟不同生长发育阶段的表达

在卵、1 龄幼虫、2 龄幼虫、3 龄幼虫、4 龄幼虫、5 龄幼虫、6 龄幼虫、雌/雄蛹和雌/雄成虫等整个大螟发育历程中, *SiAQP* 表达量在雄性成虫体内达到最高, 显著高于其它虫态 ($F = 9.350$, $P < 0.05$) (图 6)。虽然卵期、幼虫和蛹期之间 *SiAQP* 表达量没有显著差异 ($P > 0.05$), 但是从整个发育过程中我们仍可以看到从卵期孵化为

低龄幼虫时 *SiAQP* 表达量相对上升, 随着低龄幼虫逐渐发育为高龄幼虫之后其表达量又逐渐下降, 从高龄幼虫 (5 龄、6 龄) 到化蛹, 其整体 *SiAQP* 表达量相对稳定, 并在羽化之后表达量再度上升。

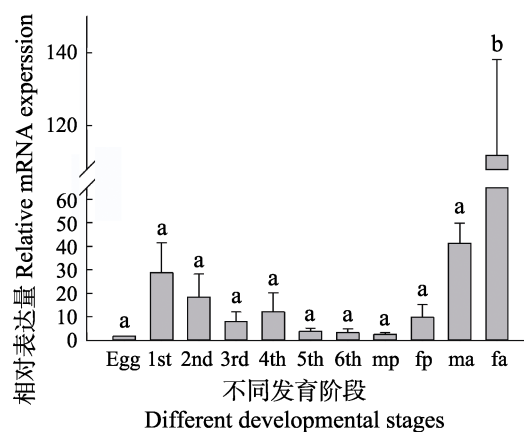


图 6 *SiAQP* 在大螟不同发育阶段的相对表达量

Fig. 6 Relative mRNA expression of *SiAQP* in developmental stages of *Sesamia inferens*

卵: Egg; 1 龄幼虫: 1st instar larva; 2 龄幼虫: 2nd instar larva; 3 龄幼虫: 3rd instar larva; 4 龄幼虫: 4th instar larva; 5 龄幼虫: 5th instar larva; 6 龄幼虫: 6th instar larva; 雄蛹: Male pupa; 雌蛹: Female pupa; 雄成虫: Male adult; 雌成虫: Female adult.

2.3.3 大螟幼虫在不同温度处理下 *SiAQP* 的表达 以 27 为参照对大螟 5 龄幼虫进行高、低温处理, 根据 qPCR 分析结果可以发现 (图 7), 虽然 -4 和 0 处理的幼虫其 *SiAQP* 的表达

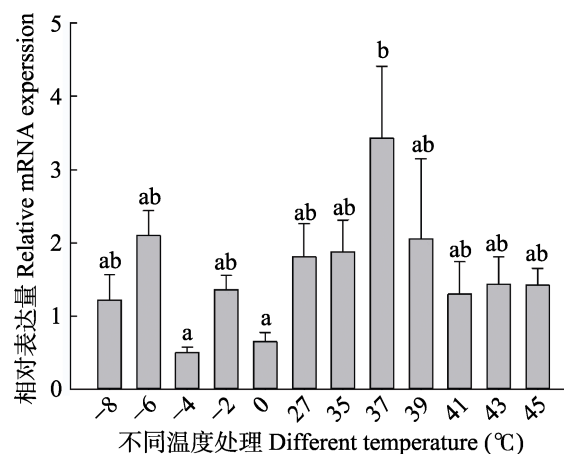


图 7 不同温度下 *SiAQP* 的相对表达量

Fig. 7 Relative mRNA expression of *SiAQP* at different temperature

量相对较低,但整个低温处理(−8–0 ℃)之间并无显著差异($P>0.05$);同样,在高温处理(35–45 ℃)中的 *SiAQP* 的表达量也相对稳定,各温度处理之间没有显著差异($P>0.05$);与对照组相比,低温处理和高温处理中 *SiAQP* 的表达都没有显著差异($P>0.05$),仅在 37 ℃ 高温处理与 −4 ℃ 和 0 ℃ 的低温处理间的表达量出现显著差异($F=2.153$, $P<0.05$)。这表明 *SiAQP* 的表达受温度影响较小。

2.3.4 不同发育阶段大螟在不同湿度条件下的 *SiAQP* 表达 将 5 龄大螟幼虫置于不同的相对湿度(RH)条件下处理发现,随着湿度的上升(25%–75% RH), *SiAQP* 的表达量也逐渐上升,并在 75% RH 时达到最高,但湿度过高(95% RH)时 *SiAQP* 的表达量反而显著下降($F=5.648$, $P<0.05$) (图 8)。这表明对大螟幼虫而言,75% RH 是适宜的湿度环境,过低或者过高的湿度都会抑制 *SiAQP* 的表达。

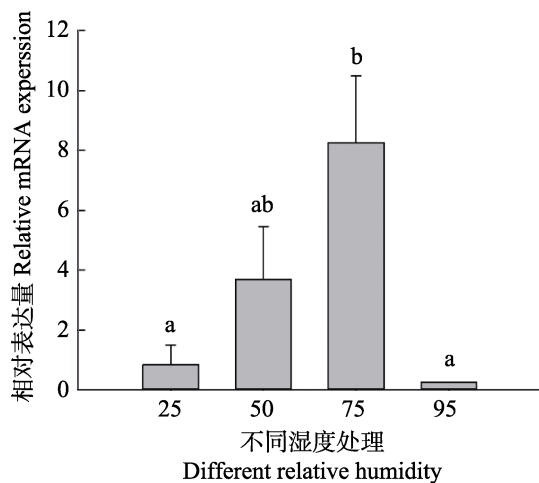


图 8 不同湿度下 5 龄幼虫的 *SiAQP* 相对表达量
Fig. 8 Relative mRNA expression of *SiAQP* at different relative humidity for 5th instar larva

用不同的相对湿度处理大螟雌($F=8.334$, $P<0.05$)、雄蛹($F=4.222$, $P<0.05$)发现,随着湿度上升大螟蛹的 *SiAQP* 的表达量也出现了先上升后下降的趋势,并在 50% RH 时达到最高(图 9:A, 图 9:B)。这表明对大螟蛹而言,50% RH 是相对适宜的湿度环境,过低或者过高的湿度环境都会抑制大螟蛹的 *SiAQP* 表达。

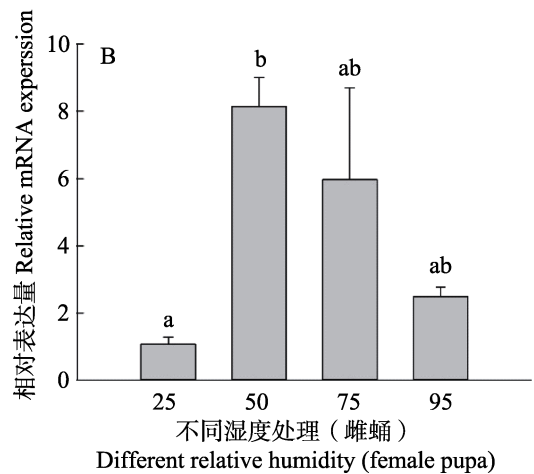
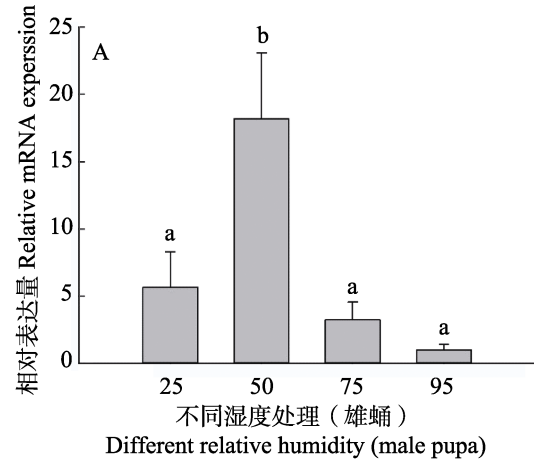


图 9 不同湿度下蛹的 *SiAQP* 相对表达量
Fig. 9 Relative mRNA expression of *SiAQP* at different relative humidity for pupa

- A. 柱上标有不同字母代表了各处理间的差异显著性;
B. 柱上标有不同字母代表了各处理。下同。
A. The different letters marked in the figure represent the significance of the differences between the treatments;
B. The different letters marked in the figure represent the sign. The same below.

用不同的相对湿度处理大螟雌($F=2.448$, $P>0.05$)、雄成虫($F=1.734$, $P>0.05$)时发现,随着湿度上升,大螟成虫的 *SiAQP* 的表达量也出现先上升后下降的趋势,并在 50% RH 时达到最高,但各处理间并无显著差异(图 10:A, B)。这可能是由于大螟成虫具有更高的湿度适应能力。

3 讨论

本研究通过基因克隆技术首次获得了大螟的一条水通道蛋白基因并命名为 *SiAQP*。基于氨基酸序列分析和预测结果表明,大螟水通道蛋白

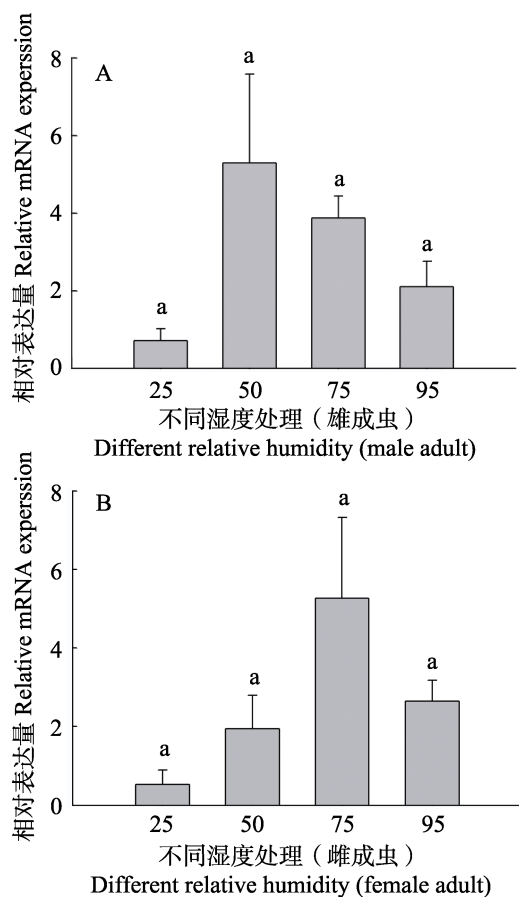


图 10 不同湿度下成虫的 SiAQP 相对表达量
Fig. 10 Relative mRNA expression of SiAQP at different relative humidity for adult

(SiAQP) 属于膜内嵌蛋白家族 (MIP) 中的水通道蛋白家族 (AQP)。通过 Blast 比对发现 SiAQP 的氨基酸序列与棉铃虫、斜纹夜蛾、家蚕、赤眼蜂等昆虫的水通道蛋白的氨基酸序列相似度都在 90% 以上, 保守域也存在水通道蛋白的特征序列 NPA 基序和 6 个跨膜结构域, 亲疏水性预测结果为强疏水性, 这些都符合水通道蛋白的结构和功能特征 (陆明星等, 2017), 因此确定此序列为大螟的水通道蛋白序列。自 1996 年第一条昆虫水通道蛋白基因被发现以来 (Caherec *et al.*, 1996), 截至 2017 年已有 40 多条不同昆虫、不同类型的水通道蛋白基因被记录 (陆明星等, 2017), 近两年也有越来越多的昆虫水通道蛋白基因被发现和研究 (李耀华等, 2017; Tsujimoto *et al.*, 2017), 本研究首次获得大螟水通道蛋白基因, 为进一步开展昆虫水通道蛋白的研究提供基础材料。

水通道蛋白是一种跨膜蛋白, 可以在细胞膜内外形成通道, 除了水分运输功能外, 人们还陆续发现部分水通道蛋白可以运输尿素、甘油等小分子以及营养物质、代谢前体、废物、毒素和气体等物质 (Junpei *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2009; Bienert *et al.*, 2013)。根据蛋白间结构和功能的差异, 人们对已确定的昆虫水通道蛋白进行了分类, 其中 Campbell (2008) 将昆虫水通道蛋白主要分为 DRIP、BIB 和 PRIP 三大类, 而有的学者则将其分为了 DRIP、BIB、PRIP 和 PPIP 四大类 (Kambara *et al.*, 2009; Xia *et al.*, 2017)。本研究结合前人研究结果, 从 DRIP、PRIP 和 BIB 3 个昆虫水通道蛋白亚族中选取了 27 种不同昆虫的水通道蛋白质序列 (刘海远等, 2013; 李耀华等, 2017), 结合我们自己克隆得到的 SiAQP 的氨基酸序列构建系统进化发育树, 结果表明 SiAQP 属于 DRIP 亚族。而该亚族属于水渗透型 AQP, 因此推测 SiAQP 在大螟体内主要功能为水分渗透调节。

生物有机体不同组织的功能分工差异通常是由蛋白质基因表达的蛋白种类不同所致。我们对大螟不同组织的 SiAQP 表达量差异分析结果表明, SiAQP 在后肠中的表达量最高, 这与后肠的水分吸收功能相一致, 也与埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 水通道蛋白的表达研究结果类似 (Marusalin *et al.*, 2012)。此外, 本研究中马氏管、前肠和中肠等消化吸收器官的 SiAQP 表达量都相对高于表皮、脂肪体和血淋巴等组织, 而二化螟 *Chilo suppressalis* 和烟粉虱 *Bemisia tabaci* 的水通道蛋白基因在成虫和若虫肠道中的表达量也高于其它组织器官 (Ekert *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2018), 这进一步印证了消化吸收器官需要更多的 AQP 表达来保证其水分回收的功能。

昆虫不同的生长发育阶段对外界环境的需求和适应能力存在差异。我们对大螟卵期、1 龄、2 龄、3 龄、4 龄、5 龄、6 龄、雌/雄蛹和雌/雄成虫等不同生长发育阶段的 SiAQP 表达水平差异进行了研究, 结果发现从卵孵化为低龄幼虫时 SiAQP 表达量相对上升, 而随着低龄幼虫逐渐发

育为高龄幼虫之后其表达量又逐渐下降,从高龄幼虫(5龄、6龄)到化蛹其 SiAQP 表达量相对稳定,并在羽化之后表达量再度上升。此外,雄性成虫的 SiAQP 表达量显著高于其它发育阶段,在豆荚草盲蝽 *Lygus hesperus* 的水通道蛋白基因表达研究中也发现雄虫的 AQP 基因表达量最高 (Fabrick *et al.*, 2014), 这可能是因为成虫仅靠取食花粉存活,进水量较低,必须通过较高的 AQP 基因表达来保证高效率的吸收利用水分。也与豆荚草盲蝽水通道蛋白的研究结果一样 (Fabrick *et al.*, 2014), 本研究中卵期的 SiAQP 表达量也最低,可能正是由于卵期 AQP 表达量较低,保水能力比较差,进而导致大螟卵块孵化时对环境湿度要求较高的现象。当然,不同昆虫间的这种表达差异并非完全一致,如斜纹夜蛾水通道蛋白 SIAQP1 的最高表达量就发生在预蛹和蛹期 (刘海远等, 2013)。

昆虫的生长发育、繁殖和分布都会受到温度的影响 (Bale *et al.* 2002)。在温度对大螟水通道蛋白表达影响的研究中,大螟的 SiAQP 表现出了有限的差异性,仅仅在低温处理的 -4 和 0 处理与高温处理中 37 处理间存在显著差异,其它低温处理 (-8、-6、-4、-2、0) 间与高温处理 (35、37、39、41、43、45) 间并无显著差异,这表明温度对大螟的 SiAQP 表达影响不大。但是,长时间的 -4 低温处理小胸鳖甲会促进其体内水通道蛋白基因 (*MpAQP1*) 的表达 (李耀华等, 2017), 这表明温度对昆虫体内水通道蛋白表达的影响在不同昆虫间存在差异。

在本研究中我们发现,随着湿度的上升,大螟幼虫和雌、雄蛹体内的 SiAQP 表达量都出现了先上升后下降的趋势,其中大螟幼虫、雌、雄蛹的 SiAQP 最高表达水平分别出现在 75% RH、50% RH、50% RH,雌、雄成虫在不同湿度环境下 SiAQP 的表达没有显著差异,而二化螟雄性成虫的水通道蛋白基因 *CsDrip1* 在 75% 湿度条件下表达受到明显的抑制 (Lu *et al.*, 2018)。此外,我们的研究表明,低湿度和高湿度环境都会抑制

大螟体内 SiAQP 的表达,而大螟成虫对不同湿度环境的适应能力则相对较强。

昆虫 AQPs 的功能和种类比较复杂,此前对 AQPs 的研究主要聚集在哺乳动物和人类领域,而作为生命之源的水与昆虫的生长和繁殖息息相关,因此近些年人们对昆虫 AQPs 的研究也越来越多。对昆虫 AQPs 的研究可以帮助我们更好地了解昆虫在生长发育、繁殖和分布等领域的分子机理,对我们深入研究昆虫的生理和行为变化以及相关害虫防治具有重要意义。

参考文献 (References)

- Bale JS, Masters GJ, Hodkinson ID, 2002. Herbivory in global climate change research: direct effects of rising temperature on insect herbivores. *Global Change Biology*, 8(1): 1–16.
- Bienert GP, Desguin B, Chaumont F, Hols P, 2013. Channel-mediated lactic acid transport: a novel function for aquaglyceroporins in bacteria. *Biochemical Journal*, 454(3): 559–570.
- Le Caherec F, Deschamps S, Delamarche C, Pellerin I, Bonnet G, Guillam MT, 1996. Molecular cloning and characterization of an insect aquaporin: functional comparison with aquaporin 1. *Acm/IEEE International Conference on Automated Software Engineering*, Blackwell Science Ltd.
- Campbell EM, Ball AS, Bowman AS, 2008. Invertebrate aquaporins: a review. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic and Environmental Physiology*, 178(8): 935–955.
- Chen LT, Wang YF, Liu L, He YT, Ma JF, Dong ZP, 2018. First report of *Sesamia inferens* on summer maize in Guantao County of Hebei Province. *Journal of Hebei Agricultural Sciences*, 21(6): 53–55. [陈立涛, 王永芳, 刘莉, 郝延堂, 马继芳, 董志平, 2018. 河北馆陶首次发现大螟为害夏玉米. 河北农业科学, 21(6): 53–55.]
- Fabrick JA, Pei J, Hull JJ, Yool AJ, 2014. Molecular and functional characterization of multiple aquaporin water channel proteins from the western tarnished plant bug, *Lygus hesperus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 45: 125–140.
- Gomes D, Agasse A, Thiébaud P, Delrot S, Gerós H, Chaumont F, 2009. Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788 (6): 1213–1228.
- Hara-Chikuma M, Verkman AS, 2006. Physiological roles of glycerol-transporting aquaporins: the aquaglyceroporins. *Cellular & Molecular Life Science Cmls*, 63(12): 1386–1392.

- Ishibashi K, Hara S, Kondo HS, 2009. Aquaporin water channels in mammals. *Clinical & Experimental Nephrology*, 13(2): 107.
- Ishibashi K, Morishita Y, Tanaka Y, 2017. The evolutionary aspects of aquaporin family. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 969: 35–50.
- Takano J, 2006. The Arabidopsis major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *The Plant Cell Online*, 18(6): 1498–1509.
- Kambara K, Takematsu Y, Azuma M, Kobayashi J, 2009. cDNA cloning of aquaporin gene expressed in the digestive tract of the Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki (Isoptera: Rhinotermitidae). *Applied Entomology & Zoology*, 44(2): 315–321.
- Liu HY, Shu BS, Jiang CL, Liangde L, Zhong GH, 2013. Molecular cloning, characterization and expression analysis of aquaporin 1 (AQP1) gene in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 56(4): 339–349. [刘海远, 舒本水, 姜春来, 李良德, 钟国华, 2013. 斜纹夜蛾水通道蛋白 1(AQP1)基因的克隆、分子特性和表达分析. 昆虫学报, 56(4): 339–349.]
- Liu Y, Promeneur D, Rojek A, Kumar N, Frokiaer J, Nielsen S, 2007. Aquaporin 9 is the major pathway for glycerol uptake by mouse erythrocytes, with implications for malarial virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 104(30): 12560–12564.
- Li YH, Liu XN, Ma J, 2017. Cloning of an aquaporin gene (MpAQP1) from the desert beetle *Microdera punctipennis* and influence of low temperature on its expression. *Journal of Environmental Entomology*, 39(6): 1326–1333. [李耀华, 刘小宁, 马纪, 2017. 荒漠昆虫小胸蠃甲水通道蛋白基因 MpAQP1 克隆及低温对其表达的影响. 环境昆虫学报, 39(6): 1326–1333.]
- Lu MX, Pan DD, Xu J, Liu Y, Wang GR, Du YZ, 2017. Research progress in insect aquaporins. *Journal of Environmental Entomology*, 39(5): 983–991. [陆明星, 潘丹丹, 徐静, 刘杨, 王桂荣, 杜予州, 2017. 昆虫水通道蛋白的研究进展. 环境昆虫学报, 39(5): 983–991.]
- Lu MX, Pan DD, Xu J, Liu Y, Wang GR, Du YZ, 2018. Identification and functional analysis of the first aquaporin from striped stem borer, *Chilo suppressalis*. *Frontiers in Physiology*, 9: 1–13.
- Marusalin J, Matier BJ, Rheault MR, Donini A, 2012. Aquaporin homologs and water transport in the anal papillae of the larval mosquito, *Aedes aegypti*. *Journal of Comparative Physiology B*, 182(8): 1047–1056.
- Mukhopadhyay R, Bhattacharjee H, Rosen BP, 2014. Aquaglyceroporins: generalized metalloid channels. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840(5): 1583–1591.
- Sun M, Lu MX, Tang XT, Du YZ, 2015. Exploring valid reference genes for quantitative real-time PCR analysis in *Sesamia inferens* (Lepidoptera: Noctuidae). *PLoS ONE*, 10(1): e0115979.
- Tsujimoto H, Sakamoto JM, Rasgon JL, 2017. Functional characterization of aquaporin-like genes in the human bed bug *Cimex lectularius*. *Scientific Reports*, 7(1): 3214.
- Van Ekert E, Chauvigné F, Finn RN, Mathew LG, Hull JJ, Cerdà J, 2016. Molecular and functional characterization of *Bemisia tabaci* aquaporins reveals the water channel diversity of hemipteran insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 77: 39–51.
- Xia W, Zhao PW, Yi ZQ, Cui YB, 2017. Phylogenetic and specific sequence analysis of four paralogs in insect aquaporins. *Molecular Medicine Reports*, 16(4): 4903–4908.