植物保护学报 Journal of Plant Protection，2018，45(3)：568-575 DOI：10.13802/j.cnki.zwbhxb.2018.2016202

# 棉铃虫类肌钙蛋白基因的克隆、原核表达纯化及其时空表达谱分析

艾新宇 赵 洁 王亚美 魏原杰 刘小宁*

（新疆大学生命科学与技术学院，新疆生物资源基因工程重点实验室，乌鲁木齐 830046）

**摘要：**为探索棉铃虫 *Helicoverpa armigera*（Hübner）类肌钙蛋白基因 *HaCal* 的生理功能及其所编码蛋白的生物特性，采用PCR方法克隆了 *HaCal* 的开放阅读框（open reading frame，ORF）序列，借助在线软件对其进行生物信息学分析，通过原核表达技术诱导表达和纯化其编码的蛋白，并通过实时荧光定量PCR技术分析其在棉铃虫不同发育龄期和组织中的表达量。结果显示，*HaCal* 的ORF序列长度为564 bp，编码187个氨基酸，理论分子量为20.52 kD，理论等电点为7.64。其保守结构域与Calponin家族一致，但不含跨膜区和信号肽，系亲水性蛋白。原核表达结果显示，融合蛋白大小与理论值一致，纯化获得了纯度较高的目的蛋白。*HaCal* 在棉铃虫幼虫不同发育阶段和不同组织中均有表达，在6龄幼虫体内表达量最高，是1龄幼虫的2.34倍；在5龄幼虫中肠中表达量最高，是头部的257.14倍。表明棉铃虫类肌钙蛋白基因 *HaCal* 可能与棉铃虫的生长发育过程密切相关。

**关键词：**类肌钙蛋白基因；克隆与表达；生物信息学分析；时空表达；棉铃虫

# Cloning, prokaryotic expression, purification and temporal-spatial expression analysis of the *HaCal* gene from cotton bollworm *Helicoverpa armigera*

Ai Xinyu Zhao Jie Wang Yamei Wei Yuanjie Liu Xiaoning*

（Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China）

**Abstract:** In order to explore the physiological function of *HaCal* (*calponin*) and the biological characteristics of its protein, *HaCal* open reading frame (ORF) sequences were cloned by PCR. Bioinformatics analysis of *HaCal* ORF sequence was carried out by means of on-line software. The expression of *HaCal* gene was induced by prokaryotic expression technology. The expressed protein was purified, and quantified by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction in different developmental stages and tissues of cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Hübner). The results showed that the sequence length of *HaCal* ORF was 564 bp, encoding 187 amino acids, and its theoretical molecular weight was 20.52 kD with a theoretical isoelectric point of 7.64. The conserved domains were consistent with that of the Calponin family, but contained no transmembrane domain and signal peptide, indicating that it was a hydrophilic protein. The results of prokaryotic expression showed that the size of the fusion protein was consistent with the theoretical value, and the target protein with high purity was obtained. *HaCal* was expressed during different developmental stages and in different tissues of *H. armigera* larvae, and the expression of *HaCal* in the 6th-instar larvae was 2.34 times higher than that of the 1st-instar larvae. In different tissues of the larvae, the expression of *HaCal* was the highest in the mid-

基金项目：国家自然科学基金（31471781），新疆自治区青年科技创新人才培养工程（qn2015yx001）

* 通信作者（Author for correspondence），E-mail：liuxn0103@sina.com

收稿日期：2016-11-14

gut, which was 257.14 times of that in the head in the 5st-instar larvae. The *HaCal* gene of *H. armigera* might be closely related to the growth and development of *H. armigera.*

**Key words:** *calponin*; cloning and expression; bioinformatic analysis; spatio-temporal expression; *Helicoverpa armigera*

棉铃虫*Helicoverpa armigera*（Hübner）属鳞翅目夜蛾科，是一种世界性的重要经济害虫。棉铃虫食性杂，寄主植物范围广泛，达30多科200余种，对农作物棉花*Gossypium*、鹰嘴豆*Cicer arietinum*、玉米*Zea mays*、高粱*Sorghum bicolor*、豌豆*Pisum sativum*、番茄*Lycopersicon esculentum*及辣椒*Capsicum annuum*等危害极大。幼虫主要蛀食花、蕾、铃，也取食嫩叶，是棉花蕾铃期的重要钻蛀性害虫（刘小宁等，2014；Zhang et al.，2015；Yogindran & Rajam，2016）。随着时间的延续，传统的化学农药防治和新兴的Bt转基因作物种植都会迫使害虫对其逐渐产生抗性，因此寻找新的替代防控措施就显得尤为重要。植物介导的昆虫解毒酶相关基因、生长发育相关基因的RNAi沉默，由于其特异性相对较强、对环境相对友好等优点受到越来越多的关注（Aravinet al.，2001；Wesley et al.，2001；Mao et al.，2007）。细胞色素P450酶系是生物体中一类重要的代谢酶系，与棉铃虫抗性的产生密切相关。CYP6B6是细胞色素P450酶系家族成员，在植物次生物质的诱导下能调节其表达（刘小宁等，2014）。因此，研究棉铃虫CYP6B6在植物次生物质2-十三烷酮诱导下的调控机制对于摸索棉铃虫抗性的产生机制尤为重要。

本课题组在研究棉铃虫CYP6B6 2-十三烷酮响应转录因子的筛选过程中，通过酵母单杂交技术筛选得到了棉铃虫类肌钙蛋白（calponin）家族基因。而类肌钙蛋白在鸡胗平滑肌中首次被鉴定，具有横纹肌肌钙蛋白T类蛋白的功能，结合肌动蛋白细丝调节平滑肌收缩（North et al.，1994；Rozenblum & Gimona，2008；Marcelo et al.，2016）。随着研究的深入，发现钙调节蛋白是一种与肌动蛋白丝相关的调节蛋白，在平滑肌和许多非肌肉类型细胞中表达，并可作为肌动蛋白激活的肌球蛋白ATP酶的抑制剂发挥功能（Wu & Jin，2008）。类肌钙蛋白还可与许多其它细胞骨架和相关蛋白结合或相互作用，包括原肌球蛋白（Childs et al.，1992）、肌球蛋白（Szymanski & Tao，1997）、微管蛋白（Fujii et al.，1997）、结蛋白（Mabuchi et al.，1997）、凝溶胶蛋白（Ferjani et al.，2006）、$Ca^{2+}$-钙调蛋白（Takahashi et al.，1986）、$Ca^{2+}$-S100（Fujii et al.，1997）和磷脂；也与钙调蛋白结合蛋白和α-辅肌动蛋白相互作用，或与钙调蛋白结合蛋白结合后与磷脂相互作用参与细胞骨架的形成（Gusev，2001）。除了调节平滑肌肌丝的功能和收缩性，类肌钙蛋白也调节非肌肉细胞肌动蛋白细胞骨架进而影响多种细胞活性，例如增殖、粘附、迁移、分化、吞噬和融合等（Liu & Jin，2016）。

然而在昆虫中类肌钙蛋白的相关研究报道非常有限。有文献报道棉铃虫类肌钙蛋白基因*HaCal*参与了20-羟基蜕皮激素（20-hydroxyecdysone，20E）信号通路和保幼激素（juvenile hormone，JH）信号通路，调节相关基因的表达从而影响棉铃虫的生长发育（Liu et al.，2011）。昆虫的生长发育受到20E和JH的调节（Zhou & Riddiford，2002；Riddiford et al.，2003）。在幼虫阶段，20E和JH参与的信号通路相互作用进而影响昆虫发育，但是人们对这种相互作用的机制了解很少。棉铃虫类肌钙蛋白的同源结构域（calponin homology domain，Chd）通过改变其磷酸化在20E和JH信号传导及其交叉联系中发挥关键作用（Zhao et al.，2004）。Chd是许多肌动蛋白的结合结构域，包括一些信号传导蛋白。棉铃虫类肌钙蛋白（HaCal）可以通过20E或JH信号指引快速进入细胞核，但仅在保幼激素类似物的调解下与泛素特异性蛋白酶1相互作用（Liu et al.，2011）。棉铃虫*HaCal*基因被沉默，幼虫发育被阻止，并且泛素特异性蛋白酶1、蛋白激酶C、蜕皮调节转录因子和JH诱导基因的表达被阻断（Liu et al.，2011）。这些研究结果表明，HaCal在激素信号传导中发挥着重要作用，在20E途径中通过以磷酸化形式快速转移至细胞核中发挥作用，在JH途径中以非磷酸化形式与泛素特异性蛋白酶1相互作用以促进20E或JH信号级联，即通过切换其磷酸化状态来调节昆虫发育。

本试验基于酵母单杂交获得的棉铃虫类肌钙蛋白基因的部分序列，克隆棉铃虫类肌钙蛋白基因*HaCal*的开放阅读框（open reading frame，ORF）序列，进行蛋白质结构预测、异源融合表达及纯化；并对棉铃虫幼虫不同发育龄期、蛹期以及幼虫不同组织内*HaCal*的表达量进行分析，以期为研究*HaCal*在棉铃虫生长发育过程中的作用机制及其在棉铃虫防治研究中靶基因的选择提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试昆虫：棉铃虫源自中国农业大学昆虫毒理室，采用人工饲料饲喂，在本实验室饲养20多代。饲养条件为温度25℃、相对湿度75%、光周期L∶D=16 h∶8 h。

试剂：总RNA提取试剂Trizol、带有ROX的Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG试剂盒，美国英杰生命技术有限公司；pMD19-T（simple）、pET28a、T4 DNA连接酶、限制性内切酶、*Taq* DNA聚合酶、dNTP、Oligod（T）18 Primers、Reverse Transcriptase M-MLV（RNase $H^-$）、Recombinant Ribonuclease Inhibitor和dNTP，宝生物工程（大连）有限公司；DNA胶回收试剂盒、质粒DNA小量提取试剂盒、鼠抗His-Tag单克隆抗体、辣根过氧化酶标记的羊抗鼠IgG抗体，天根生化科技（北京）有限公司；DAB底物显色试剂盒，北京全式金生物技术有限公司；BCA蛋白定量试剂盒，Thermo Fisher公司；醋酸纤维素膜，德国Merck Millipore公司；其余所用化学试剂均为国产分析纯。

仪器：DYY-6C琼脂糖水平电泳仪，北京六一仪器厂；Eagle Eye System凝胶成像系统，美国伯乐公司；DYCZ-24ND转膜仪、Ni-NTA纯化柱，伯乐生命医学产品（上海）有限公司；ND-1000紫外/可见分光光度计，香港基因有限公司；7500 FAST实时荧光定量PCR仪，美国ABI公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 棉铃虫类肌钙蛋白基因*HaCal*的克隆

参照总RNA提取试剂盒说明书，选取棉铃虫6龄幼虫采用液氮冷冻研磨提取总RNA。提取的总RNA经1%琼脂糖凝胶电泳以检测RNA的完整性，应用紫外/可见分光光度计检测总RNA的浓度和纯度（$OD_{260}/OD_{280}$）。参照总RNA反转试剂盒说明书，以提取的总RNA为模板，取1 μg混于20 μL体系中以Oligod(T)18为下游引物逆反转录合成cDNA第一链。

根据本课题组通过酵母单杂交得到的*HaCal*基因序列，参考GenBank中棉铃虫*Cal* ORF序列（GenBank登录号HM490090.1），设计合成*HaCal* PCR扩增所需的2个引物，上游引物：5′-CGGGATCCATGGGCGACTAT-3′，下游引物：5′-TTGCGGCCGCTTACATCTGT-3′，下划线为引入的酶切位点*Bam*H I和*Not* I序列。以棉铃虫cDNA为模板扩增*HaCal*基因序列。扩增反应条件：94℃变性5 min；94℃变性30 s，49℃退火45 s，72℃延伸1 min，35个循环；最后72℃延伸10 min。1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。PCR产物经PCR回收试剂盒回收后与pMD19-T（simple）载体16℃过夜连接并转化入DH5α感受态细胞，筛选阳性重组子，正确的重组质粒命名为pMD19-T-HaCal，由生工生物工程（上海）股份有限公司进行测序。

#### 1.2.2 *HaCal*基因的生物信息学分析

对获得的棉铃虫*HaCal*基因进行生物信息学分析，使用DNAMAN 6将ORF翻译成氨基酸序列，进行理论蛋白分子量、等电点的预测；ProParam预测所编码蛋白的理化特性，利用TMHMM Server 2.0在线工具预测蛋白质的跨膜区，ExPASy（ProtScale）进行蛋白的亲水性和疏水性分析；利用PredictProtein和SWISS-MODEL在线工具预测蛋白二级结构；SignalP 4.1 Server工具预测蛋白质的信号肽；Kinase Phos在线预测磷酸化位点；利用NCBI网站数据库对蛋白序列的保守结构域进行预测。

#### 1.2.3 *HaCal*基因的原核表达与Western-blot鉴定

利用限制性内切酶*Bam*H I和*Not* I酶切pMD 19-T-HaCal和含His-Tag的pET28a空载体，*HaCal*片段与pET28a经回收试剂盒回收后，16℃过夜连接，连接产物转化入DH5α感受态细胞，挑取单一菌落进行菌液PCR鉴定，正确后提取重组质粒进行双酶切鉴定，正确的重组质粒命名为pET28a-HaCal，送生工生物工程（上海）股份有限公司测序。将测序结果正确的阳性克隆提取质粒后转化到BL21感受态细胞，将菌液PCR鉴定正确的阳性克隆活菌活化到对数期$OD_{600}$=0.6以上后，加入终浓度为0.5 mmol/L的诱导剂IPTG，37℃振荡培养4 h后超声破碎至相对透亮，并将上清液和沉淀分开处理，同时以转化BL21的空载体pET28a及未诱导的菌液作对照，用15%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate -polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE）检测重组蛋白的表达。

利用Western-blot检验目的蛋白在BL21菌株中的正确表达。将未经IPTG诱导的菌液、空载体pET28a和诱导的融合蛋白经15% SDS-PAGE分离后，使用Mini-PROTEAN 3 Trans-Blot系统将融合蛋白转移至醋酸纤维素膜上。用5%脱脂奶粉37℃封闭2 h；磷酸盐吐温缓冲液冲洗3次，加入1∶2 000稀释的鼠抗His-Tag单克隆抗体（一抗），室温孵育2 h；磷酸盐吐温缓冲液冲洗3次后加入1∶3 000稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG抗体（二抗），室温孵育1 h；磷酸盐吐温缓冲液冲洗3次后采用DAB底物显

色试剂盒显色后观察。

**1.2.4**　重组融合蛋白His-Calponin的纯化

使用Ni-NTA纯化柱纯化His融合蛋白，参照操作说明书采用咪唑浓度梯度洗脱的方法对目的蛋白进行亲和层析纯化。用5倍体积的蒸馏水冲洗层析柱以去除其中的乙醇，大于5倍体积的结合缓冲液平衡柱子1 h，打开底部的盖子，使结合缓冲液流出；将超声离心后的上清液加入柱子中，轻轻吹吸使Ni珠与上清充分混合，4℃层析柜摇晃1 h；打开Ni柱底部的盖子，使液体自然流出；用4倍体积的漂洗缓冲液冲洗柱床，收集流出的液体进行SDS-PAGE分析；用1 mL的洗脱缓冲液洗脱目的蛋白，每次加入洗脱缓冲液后冰浴15 min，重复5次，分别收集流出的液体进行SDS-PAGE检测。使用BCA试剂盒进行蛋白浓度定量。

**1.2.5**　*HaCal*基因时空表达谱的分析

提取棉铃虫不同发育阶段的幼虫、蛹以及5龄幼虫组织（中肠、脂肪体、表皮、头）的总RNA，反转录合成cDNA第一链，方法同1.2.1，用以分析*HaCal*基因在不同虫态和不同组织中的表达规律。所有的样品组织重量均保持一致，每个时期1个生物学重复所用的棉铃虫头数分别为：1龄30头、2龄20头、3龄10头、4~6龄及蛹均为5头。每种组织的1个生物学重复各解剖30头。

以棉铃虫*β-actin*基因作为内参基因，根据获得的*HaCal*的cDNA序列、*β-actin*基因片段利用Primer Premier 5.0设计引物，*β-actin*-F：5′-ATCATCGACGCTCCCGGACA-3′，*β-actin*-R：5′-TAGCTGCTTGACTCCGAGGGTG-3′；*HaCal*-F：5′-AGCCTGCTAACACTGACGGA-3′，*HaCal*-R：5′-CTCCCACAAATCAATAGTCTGG-3′，引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。用于qPCR扩增检测mRNA水平的起始模板为上述合成好的不同虫态、不同组织的cDNA溶液。20 μL反应体系：2×SYBR 10 μL、正反引物各0.5 μL、cDNA模板1 μL、QN ROX Dye 2 μL、Yellow TDB 0.2 μL、$ddH_2O$ 5.8 μL。反应程序为：95℃预变性15 min，1个循环；95℃ 10s，60℃ 20 s，72℃ 30 s，共40个循环。阴性对照不加模板，所有样品重复3次，反应在实时荧光定量PCR仪上完成。反应结束后，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$相对定量法（Wang et al.，2016）计算*HaCal*在棉铃虫不同虫态以及不同组织中的相对表达量。

### 1.3　数据分析

使用SPSS 19.0软件对所得试验数据进行统计分析，不同处理间的比较采用单因素方差分析，用Turkey法进行差异显著性检验。

## 2　结果与分析

### 2.1　棉铃虫*HaCal*基因的克隆

根据设计的引物扩增棉铃虫*Cal*的ORF后，通过1%琼脂糖凝胶电泳进行检测，获得一条大小约560 bp的特异性条带（图1-A）。PCR扩增产物回收后连接转化到pMD19T-Simple载体，得到*HaCal*重组质粒（图1-B），经菌液PCR筛选阳性重组子并测序，结果表明克隆得到的核酸序列大小与预期序列一致（图2）。

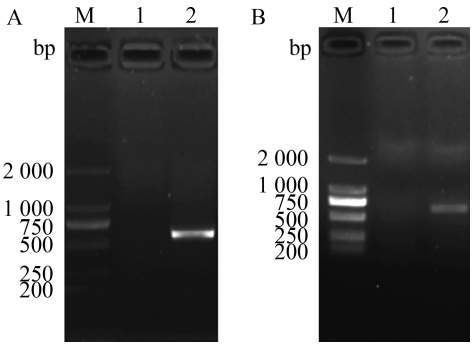


**图1　棉铃虫*HaCal*基因及重组质粒的PCR鉴定**

Fig. 1　PCR amplification of *Helicoverpa armigera HaCal* gene and identification of the recombinant plasmid

A图中：M：标准分子量；1：阴性对照；2：PCR扩增产物。B图中：M：DL2000；1：重组质粒；2：阴性对照。In fig. A：M：DL2000；1：negative control；2：PCR amplification. In fig. B：M：DL2000；1：PCR identification of recombinant plasmid；2：negative control.

### 2.2　棉隆虫*HaCal*基因的生物信息学分析

**2.2.1**　*HaCal*基因cDNA序列分析

对*HaCal*序列进行BLAST比对，显示所得序列为类肌钙蛋白基因家族。利用DNAMAN 6分析*HaCal*的cDNA序列，结果表明棉铃虫*HaCal*基因有完整的ORF，全长564 bp（图2）。从起始密码子ATG至终止密码子TAA，共编码187个氨基酸，理论分子量20.52 kD，理论等电点7.64。

**2.2.2**　*HaCal*基因编码蛋白的结构预测

ProParam预测理化特性显示，带负电荷的氨基酸残基总数（Asp+Glu）为22个，带正电荷的氨基酸残基总数（Arg+Lys）为23个，不稳定系数为33.84，为稳定蛋白；脂肪系数为79.30；总平均亲水系数为−0.499，ProtScale预测亲疏水性显示为亲水性蛋白质。KinasePhos预测结果显示该蛋白序列含有2个

丝氨酸磷酸化位点(图2),TMHMM Server 2.0预测该蛋白质没有跨膜区;SignalP 4.1 Server预测结果显示没有信号肽,表明该蛋白不是分泌型蛋白。蛋白保守结构域预测结果显示,该蛋白只含有1个Calponin homology (CH) domain(interval:33~133),属CH超家族。蛋白质二级结构分析结果表明,所编码蛋白质有$\alpha$-螺旋、环和线性结构3种类型,分别占43.32%、53.48%和3.21%。

```
  1 ATGGGCGACTATCGTGCGGGCAAGGCTGGCATCAACGCCGAGGCGCAGGCCAGGATCAAC
  1  M  G  D  Y  R  A  G  K  A  G  I  N  A  E  A  Q  A  R  I  N
 61 AGCAAGTACAACGATGACATCGCCCACGAGACCCTCGAGTGGATCAAACTGCTTACCGGC
 21  S  K  Y  N  D  D  I  A  H  E  T  L  E  W  I  K  L  L  T  G
121 GAGCCTGCTAACACTGACGGAAGTGCCGAAAATCTGTACGCGGTCTTGAAAGATGGAACT
 41  E  P  A  N  T  D  G  S  A  E  N  L  Y  A  V  L  K  D  G  T
181 CTCCTTTGTAAACTCGTCAATTCTCTCGAGGAAGGATCAGTGAAGAAGGTTAACCAGTCC
 61  L  L  C  K  L  V  N  S  L  E  E  G  S  V  K  K  V  N  Q  S
241 ACCATGGCTTTCAAGTGTATGGAGAACATCAATGCTTTCCTGGAAGCCGTGAAGAAGCTC
 81  T  M  A  F  K  C  M  E  N  I  N  A  F  L  E  A  V  K  K  L
301 GGCGTGCCACCTCAGGAGACTTTCCAGACTATTGATTTGTGGGAGAAGCAGAATCTTTAC
101  G  V  P  P  Q  E  T  F  Q  T  I  D  L  W  E  K  Q  N  L  Y
361 TCCGTCGTCGTGTGCTTGCAATCCTTGGGCCGTAAAGCCGGTAACTTCGGTAAGCCGTCC
121  S  V  V  V  C  L  Q  S  L  G  R  K  A  G  N  F  G  K  P  S
421 ATTGGGCCCAAAGAGGCTGACAAGAACGTGCGTGAGTTCAGTGAAGAGCAGTTGAAGGCT
141  I  G  P  K  E  A  D  K  N  V  R  E  F  S  E  E  Q  L  K  A
481 GGACAGAACGTCATCTCTCTGCAATACGGCACGAACAAGGGCCAGCAGTCCGGTATCTCG
161  G  Q  N  V  I  S  L  Q  Y  G  T  N  K  G  Q  Q  S  G  I  S
541 TTCGGCACCAGGCGACAGATGTAA
181  F  G  T  R  R  Q  M  *
```

**图2 棉铃虫*HaCal*基因的cDNA核苷酸序列及其推导的氨基酸序列**

Fig. 2 The cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *HaCal* gene from *Helicoverpa armigera*

ATG和TAA分别表示起始密码子和终止密码子,虚线框表示磷酸化位点,实线框表示$\alpha$-螺旋结构。ATG and TAA indicate the initiation codon and termination codon, respectively; the dotted-line box indicates the phosphorylation site, and the solid-line frame indicates $\alpha$-helical structure.

### 2.3 棉铃虫*HaCal*原核表达、纯化、Western-blot鉴定

重组质粒pET28a-HaCal经双酶切后经1%琼脂糖凝胶电泳验证,结果显示目的条带大小与预期一致,表明原核表达重组质粒构建成功(图3-A);原核诱导表达后经SDS-PAGE分析,目的条带大小与预测值一致(图3-B)。在诱导条件相同时进行大量诱导,超声处理后分离上清液后进行纯化,纯化样品进行SDS-PAGE分析,第5次洗脱后的蛋白纯度较高,大小正确(图4-A)。Western-blot验证结果显示,条带大小正确且单一,说明成功获得目的蛋白(图4-B)。

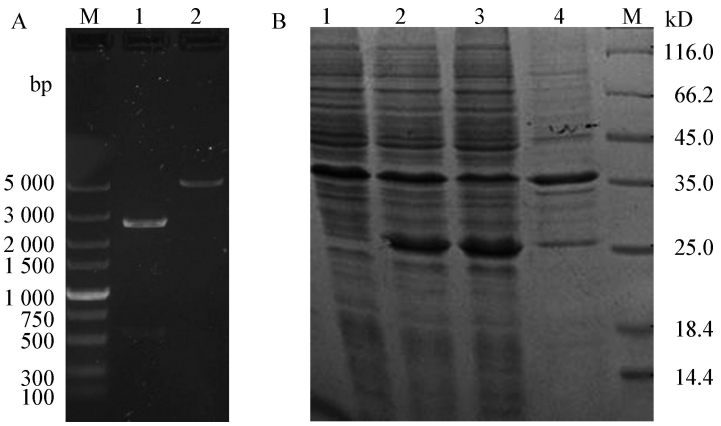


**图3 重组质粒pET28a-HaCal阳性克隆的双酶切鉴定及其原核表达产物的SDS-PAGE分析**

Fig. 3 Identification of the recombinant plasmid pET28a-HaCal positive clone and SDS-PAGE analysis of prokaryotic expression products

A图中:M:标准分子量;1:重组质粒pET28a-HaCal的双酶切;2:重组质粒pET28a-HaCal。B图中:M:标准分子量;1:诱导前;2:诱导后;3:经超声波处理过的上清液;4:经超声波处理过的包涵体。In fig. A: M: molecular weight marker; 1: digested products of pET28a-HaCal by *Bam*H I and *Not* I; 2: pET28a-HaCal. In fig. B: M: molecular weight marker; 1: BL21-His-HaCal without IPTG; 2: BL21-His-HaCal with IPTG; 3: soluble protein of His-HaCal treated with ultrasound; 4: insoluble protein of His-HaCal treated with ultrasound.

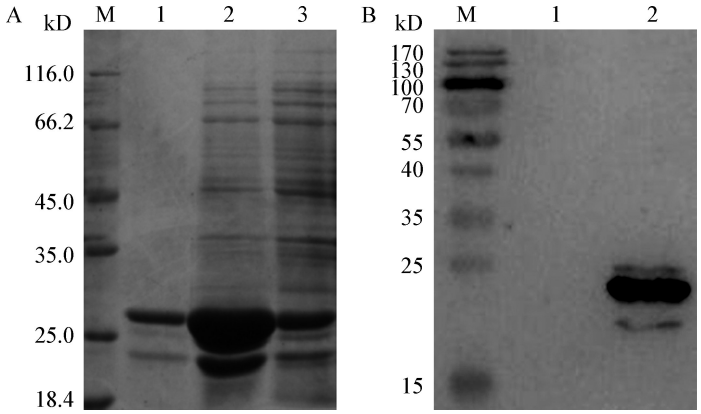


**图4 融合蛋白His-Calponin纯化后SDS-PAGE验证及Western-blot鉴定**

Fig. 4 Verification of the fusion protein His-Calponin purified by SDS-PAGE and its identification by Western-blot

M：标准分子量。A图中：1：洗脱第5次；2：流穿；3：洗涤。B图中：1：诱导前；2：纯化蛋白。M：Molecular weight marker. In fig. A：1：the fifth sample eluted with 500 mmol/L imidazole；2：flow-through；3：the sample washed with 20 mmol/L imidazole. In fig. B：1：BL21-His-HaCal without IPTG；2：purified protein.

### 2.4 棉铃虫*HaCal*基因时空表达谱的分析

*HaCal*基因在棉铃虫各发育阶段均有表达，其中以6龄期最高，以4龄期最低；1龄至3龄期的相对表达量呈平稳趋势，到4龄阶段相对表达量显著降低，约为1龄期的1/3，5龄时显著升高，但较1~3龄期无显著差异，到6龄后又显著上升并达到最高水平，为1龄的2.34倍，之后显著下降。*HaCal*基因在5龄幼虫的脂肪体、中肠、表皮和头中均有表达，在中肠和脂肪体中的表达量分别是头部表达量的257.14倍和53.10倍，三者之间差异显著（图5）。

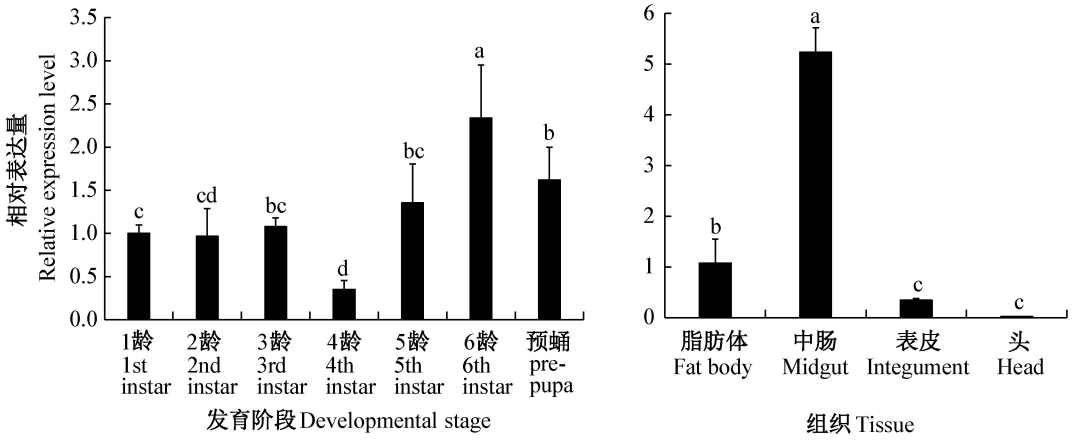


**图5 棉铃虫*HaCal*在不同发育历期及5龄不同组织中的表达量分析**

Fig. 5 The expression levels of *HaCal* gene in different developmental stages and tissues of *Helicoverpa armigera*

图中数据为平均数±标准差。不同字母表示经Turkey法检验在$P<0.05$水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters indicate significant difference at $P<0.05$ level by Turkey test.

## 3 讨论

类肌钙蛋白是与生物许多生理过程相关的一个蛋白质家族，具有相似的结构，含有单个CH结构域和几个Calponin结构域（Bañuelos et al.，1998）。CH结构域是在许多物种中发现的蛋白质模块。它由多个不变核心残基定义，可用于指示进化保守。果蝇信号转导蛋白（DroVav）是一种含有CH域的蛋白质，在果蝇发育中作为一个信号转导器发挥关键作用（Dekel et al.，2000）。Guan et al.（2016）在秀丽隐杆线虫*Caenorhabditis elegans*中发现蛋白质CHDP-1与哺乳动物中的类肌钙蛋白具有同源性，其含有单一的III型CH结构域，与秀丽隐杆线虫突起的形成密切相关。本研究通过对棉铃虫类肌钙蛋白的保守结构域分析得出其含有CH结构域，说明该蛋白属于类肌钙蛋白家族，但是跨膜区预测和信号肽预测都显示为无，说明该蛋白属于核内蛋白。磷酸化位

点预测结果显示其含有2个丝氨酸磷酸化位点，说明其很可能参与激素代谢的信号通路。HaCal在20E和JH信号传导中都是通路的关键节点，并且HaCal受20E和JH类似物烯虫酯的调节，二者都造成其上调并迁移至细胞核发挥作用（Liu et al.，2011）。

Kozłowska et al.（2014）将黑腹果蝇*Drosophila melanogaster*和赤拟谷盗*Tribolium castaneum*的类肌钙蛋白家族基因*Chd64*克隆到经过修饰的表达载体pQE80L上进行表达后，所有表达重组蛋白才能以可溶性形式存在。而本研究中原核表达纯化结果表明，重组融合蛋白不但得到大量诱导表达，而且以可溶性形式存在。纯化之后得到了纯度相对比较高的目的蛋白，分析原因可能是由于本试验采用表达载体pET28a（+），该载体限制了细胞内的细胞空间，增加了蛋白溶解性（Salimi & Babashamsi，2016）。同时His标签有助于利用Ni-NTA亲和层析法纯化融合蛋白。

棉铃虫类肌钙蛋白在调节昆虫生长发育的20E和JH信号通路中具有重要作用，并可介导这2种通路的交叉对话，通过改变磷酸化状态参与激素调节信号通路。在20E信号通路中，类肌钙蛋白以磷酸化形式存在，而在JH途径中以非磷酸化形式存在。本研究对*HaCal*基因进行棉铃虫体内时空表达分析，结果显示该基因在幼虫各龄期均有表达，以6龄期最高。棉铃虫与烟草天蛾*Manduca sexta*具有相似的发育模式（Wang et al.，2007），在摄食时期，JH滴度相对较高，在蜕皮阶段和变态阶段呈下降趋势；而20E呈相反的情况，即在蜕皮阶段和变态阶段以高滴度状态存在。从不同发育阶段来看，1~3龄幼虫中*HaCal*表达量恒定，而在4龄幼虫中显著下降。3~4龄幼虫开始大量取食食物提供生长发育所需营养物质（钟丰等，2016），因此推测该时期JH滴度下降从而控制幼虫蜕皮进入下一龄期的时间，而*HaCal*的表达量受JH调控，因此其表达量在该龄期显著下降。从5龄开始至6龄*HaCal*表达量显著升高，并在6龄达到最大，可能该阶段是变态发育的关键时期，为幼虫化蛹做好准备，因此20E滴度升高引起*HaCal*的表达量升高。从不同组织的表达情况看，中肠组织中*HaCal*表达量最高。中肠作为昆虫消化食物、吸收养分的主要器官，也是激素发挥调控作用的部位，因此推测*HaCal*表达量最高是受JH和20E两种信号通路的影响。RT-qPCR在准确度和灵敏度方面均优于半定量PCR方法，通过该方法得出的*HaCal*表达规律有助于进一步研究其在昆虫体内的调控网络，为研究新型的生物防治途径提供新思路。

本研究成功克隆了棉铃虫类肌钙蛋白基因*HaCal* cDNA序列，序列分析表明*HaCal*具有CH超家族典型结构域，通过原核表达系统诱导纯化了目的蛋白，为深入研究其生理功能提供了优质材料。时空表达结果显示，*HaCal*在棉铃虫不同发育历期和不同组织部位均有表达，暗示该蛋白在昆虫的生长发育过程中参与多种生理机制，但是具体的生理功能还需进一步研究。

## 参 考 文 献（References）


Aravin AA, Naumova NM, Tulin AV, Vagin VV, Rozovsky YM, Gvozdev VA. 2001. Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the Drosophila *melanogaster* germline. Current Biology, 11(13): 1017–1027

Bañuelos S, Saraste M, Djinović Carugo K. 1998. Structural comparisons of calponin homology domains: implications for actin binding. Structure, 6(11): 1419–1431

Childs TJ, Watson MH, Novy RE, Lin JJC, Mak AS. 1992. Calponin and tropomyosin interactions. Biochimica et Biophysica Acta, 1121(1/2): 41–46

Dekel I, Russek N, Jones T, Mortin MA, Katzav S. 2000. Identification of the Drosophila melanogaster homologue of the mammalian signal transducer protein, Vav. FEBS Letters, 472(1): 99–104

Guan LY, Ma XH, Zhang JY, Liu JJ, Wang YC, Ding M. 2016. The calponin family member CHDP-1 interacts with Rac/CED-10 to promote cell protrusions. PLoS Genetics, 12(7): e1006163

Gusev NB. 2001. Some properties of caldesmon and calponin and the participation of these proteins in regulation of smooth muscle contraction and cytoskeleton formation. Biochemistry, 66(10): 1112–1121

Ferjani I, Fattoum A, Maciver SK, Bénistant C, Chahinian A, Manai M, Benyamin Y, Roustan C. 2006. A direct interaction with calponin inhibits the actin-nucleating activity of gelsolin. Biochemical Journal, 396(3): 461–468

Fujii T, Hiromori T, Hamamoto M, Suzuki T. 1997. Interaction of chicken gizzard smooth muscle calponin with brain microtubules. Journal of Biochemistry, 122(2): 344–351

Kozłowska M, Tarczewska A, Jakób M, Szpotkowski K, Wojtas M, Rymarczyk G, Ozyhar A. 2014. Calponin-like Chd64 is partly disordered. PLoS ONE, 9(5): 1–14

Liu PC, Wang JX, Song QS, Zhao XF. 2011. The participation of calponin in the cross talk between 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone signaling pathways by phosphorylation variation. PLoS ONE, 6(6): e19776

Liu R, Jin JP. 2016. Calponin isoforms CNN1, CNN2 and CNN3: regulators for actin cytoskeleton functions in smooth muscle and non-muscle cells. Gene, 585(1): 143–153

Liu XN, Li F, Zhang XT, Zhu Y. 2014. Spatiotemporal expression profile of the cytochrome P450 CYP6B6 from *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) treated with 2-tridecanone. Arid Zone Research, 31(5): 978−983 (in Chinese) [刘小宁, 李芬, 张学涛, 朱燕. 2014. 2-十三烷酮诱导棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)细胞色素P450 CYP6B6时空表达规律的研究. 干旱区研究, 31(5): 978−983]

Mabuchi K, Li B, Ip W, Tao T. 1997. Association of calponin with desmin intermediate filaments. Journal of Biological Chemistry, 272 (36): 22662−22671

Mao YB, Cai WJ, Wang JW, Hong GJ, Tao XY, Wang LJ, Huang YP, Chen XY. 2007. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. Nature Biotechnology, 25(11): 1307−1313

Marcelo KL, Means AR, York B. 2016. The $Ca^{2+}$/calmodulin/CaMKK2 axis: nature's metabolic CaMshaft. Trends in Endocrinology & Metabolism, 27(10): 706−718

North AJ, Gimona M, Cross R A, Small JV. 1994. Calponin is localised in both the contractile apparatus and the cytoskeleton of smooth muscle cells. Journal of Cell Science, 107(3): 437−444

Riddiford LM, Hiruma K, Zhou X, Nelson CA. 2003. Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster.* Insect Biochemistry & Molecular Biology, 33(12): 1327−1338

Rozenblum GT, Gimona M. 2008. Calponins: adaptable modular regulators of the actin cytoskeleton. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 40(10): 1990−1995

Salimi A, Babashamsi M. 2016. Cloning and optimization of soluble vascular endothelial growth factor$_{165}$ expression in *Escherichia coli*. Avicenna Journal of Medical Biotechnology, 8(1): 23−28

Szymanski PT, Tao T. 1997. Localization of protein regions involved in the interaction between calponin and myosin. Journal of Biological Chemistry, 272(17): 11142−11146

Takahashi K, Hiwada K, Kokubu T. 1986. Isolation and characterization of a 34,000-dalton calmodulin- and F-actin-binding protein from chicken gizzard smooth muscle. Biochemical & Biophysical Research Communications, 141(1): 20−26

Wang J, Gao J, Xie J, Zheng XN, Yan Y, Li SG, Xie LP, Zhang RQ. 2016. Cloning and mineralization-related functions of the calponin gene in *Chlamys farreri*. Comparative Biochemistry & Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology, 201: 53−58

Wang JL, Jiang XJ, Wang Q, Hou LJ, Xu DW, Wang JX, Zhao XF. 2007. Identification and expression profile of a putative basement membrane protein gene in the midgut of *Helicoverpa armigera*. BMC Developmental Biology, 7: 76

Wesley SV, Helliwell CA, Smith NA, Wang MB, Rouse DT, Liu Q, Gooding PS, Singh SP, Abbott D, Stoutjesdijk PA, et al. 2001. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. The Plant Journal, 27(6): 581−590

Wu KC, Jin JP. 2008. Calponin in non-muscle cells. Cell Biochemistry & Biophysics, 52: 139

Yogindran S, Rajam MV. 2016. Artificial miRNA-mediated silencing of ecdysone receptor (*EcR*) affects larval development and oogenesis in *Helicoverpa armigera*. Insect Biochemistry & Molecular Biology, 77: 21−30

Zhang SD, Shen ZJ, Li Z, Wu FM, Zhang BY, Liu YJ, Zhang QW, Liu XX. 2015. Identification of a thioredoxin peroxidase gene involved in resistance to nucleopolyhedrovirus infection in Helicoverpa armigera with RNA interference. Journal of Insect Physiology, 82: 17−27

Zhao XF, Wang JX, Xu XL, Li ZM, Kang CJ. 2004. Molecular cloning and expression patterns of the molt-regulating transcription factor HHR3 from *Helicoverpa armigera*. Insect Molecular Biology, 13 (4): 407−412

Zhong F, Wang YN, Xie BT, Zhang WN, Liang GM, Guo YY. 2016. Cloning and expression analysis of V-ATPase subunit A gene in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Hübner). Journal of Plant Protection, 43(5): 705−712 (in Chinese) [钟丰, 王亚楠, 谢丙堂, 张万娜, 梁革梅, 郭予元. 2016. 棉铃虫V-ATP酶亚基A基因克隆及表达谱分析. 植物保护学报, 43(5): 705−712]

Zhou X, Riddiford LM. 2002. Broad specifies pupal development and mediates the 'status quo' action of juvenile hormone on the pupal-adult transformation in *Drosophila* and *Manduca*. Development, 129(9): 2259−2269

（责任编辑：李美娟）