

Q型烟粉虱芳香基硫酸酯酶B基因的克隆及表达分析

宋天雪¹ 田丽霞² 谢文² 崔洪莹³ 向文胜^{1*} 张友军^{2*}

(1. 东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030; 2. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081;
3. 中国农业大学植物保护学院, 北京 100193)

摘要: 为明确烟粉虱 *Bemisia tabaci* 取食感染番茄黄化曲叶病毒 (Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV) 的番茄植株后, 其体内的芳香基硫酸酯酶B基因 (*arylsulfatase B*, *ARSB*) 是否能够做出应答反应, 基于Q型烟粉虱基因组数据克隆得到 *ARSB* 基因 cDNA 全长, 采用生物信息学方法分析其序列特征, 并通过实时荧光定量PCR技术测定 *ARSB* 基因在Q型烟粉虱不同发育阶段、不同组织及携带TYLCV前后的表达量变化情况。结果显示: Q型烟粉虱 *ARSB* 基因的 cDNA 全长为 1 731 bp, 编码 576 个氨基酸, 分子量为 64.89 kD, 具有 *ARSB* 的保守结构域。 *ARSB* 基因在Q型烟粉虱不同发育阶段均有表达, 在卵期表达量最高, 成虫期表达量最低; 该基因在Q型烟粉虱头胸部的表达量显著高于腹部; Q型烟粉虱获取TYLCV 72 h后其体内 *ARSB* 基因表达量显著提高。表明 *ARSB* 基因在Q型烟粉虱不同龄期、不同组织内存在差异表达, 并可能参与Q型烟粉虱对TYLCV的响应和传毒过程。
关键词: Q型烟粉虱; 芳香基硫酸酯酶B; 基因克隆; 表达分析

Molecular cloning and expression analysis of the *arylsulfatase B* gene in *Bemisia tabaci* Q biotype

Song Tianxue¹ Tian Lixia² Xie Wen² Cui Hongying³ Xiang Wensheng^{1*} Zhang Youjun^{2*}

(1. College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang Province, China;
2. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;
3. College of Plant Protection, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: In order to investigate whether the *arylsulfatase B* (*ARSB*) gene of *Bemisia tabaci* Q biotype can respond to *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) on tomatoes, the full-length cDNA of *ARSB* gene was cloned from *B. tabaci* Q biotype based on the genomic data; the sequence characteristics of the gene were analyzed with bioinformatics, and the expression levels of *ARSB* gene in different developmental stages, different tissues and under TYLCV treatment were detected in *B. tabaci* Q biotype by using quantitative real-time PCR. The results showed that the cDNA length of *ARSB* gene was 1 731 bp, encoding 576 amino acids, with a molecular weight of 64.89 kD. It had the conserved domain of *ARSB*. The *ARSB* gene was expressed during different development stages of *B. tabaci* Q biotype. The expression level was the highest in the egg stage and the lowest in the adult stage. The expression level of *ARSB* gene in the head and thorax was significantly higher than that in the abdomen, and the expression level of *ARSB* gene under TYLCV treatment for 72 h was significantly higher than that without TYLCV treatment. This study indicated that the expression level of *ARSB* varied at different developmental stages and in different tissues of *B. tabaci* Q biotype. The *ARSB* gene might play a potential role in the response of *B. tabaci* Q biotype to TYLCV.

Key words: *Bemisia tabaci* Q biotype; arylsulfatase B; gene cloning; expression analysis

基金项目: 国家自然科学基金(31601637, 31572014), 国家重点研发计划(2017YFD0201000)

* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: zhangyoujun@caas.cn, xiangwensheng@neau.edu.cn

收稿日期: 2018-07-09

芳香基硫酸酯酶(arylsulfatase, ARS)是一类蛋白家族,主要负责催化芳香基硫酸酯的脱硫酸基水解反应,生成相应的酚类和硫酸盐(王坤和李立群, 1981),在人体内调节生物分子的硫酸化水平。此过程与细胞的激素调节、细胞各组分的降解、信号通路的调控等有着密切联系(李孟如等, 2014)。在关于人类芳香基硫酸酯酶B(arylsulfatase B, ARSB)的研究中,该酶被定义为溶酶体酶,大量研究表明,在炎症和恶性疾病等生理和病理条件改变的情况下, ARSB活力都有所变化(Dzialiszyński et al., 1967)。 ARSB的先天缺乏或异常减少会使溶酶体功能发生紊乱,导致氨基葡聚糖积累进而引发VI型黏多糖贮积症和异染性脑白质营养不良症(Prabhu et al., 2011)。溶酶体 ARSB被报道后,在肝细胞、肠上皮细胞内也发现非溶酶体 ARSB,该酶的活性与肿瘤的发生有关(Mitsunaga-Nakatsubo et al., 2009; Prabhu et al., 2011)。如恶性乳腺肿瘤细胞与正常乳腺细胞相比, ARSB活性显著下降(Bhattacharyya et al., 2007)。此外,恶性结肠癌组织、前列腺癌组织内 ARSB的活性都显著降低,因此, ARSB活性的降低可以作为癌症患者临床诊断的标记(Prabhu et al., 2011; Feferman et al., 2013)。目前, ARS蛋白家族在其它动物及植物中的功能研究较少,有研究表明南方粘虫 *Prodenia eridania* 的 ARS 和磺基转移酶共同作用参与其蜕皮发育(Yang et al., 1973);在沙漠蝗 *Schistocerca gregaria* 的肠道内容物以及飞蝗 *Locusta migratoria* 的血腔中均检测到 ARS,但其具体的生理功能尚未明确(Robinson et al., 1953; Kikal & Smith, 1959);通过查阅 GenBank 数据可知,在锯齿果蝇 *Drosophila serrata*、豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum*、茶翅蜡 *Halyomorpha halys* 以及赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 等昆虫中也鉴定到 ARSB 基因,但对该基因是否参与到病毒的传播以及其它功能尚未见研究报道。

烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius)属于半翅目粉虱科小粉虱属,是一个复杂的物种复合体。关于烟粉虱的分类,目前主要有2种划分方法,一是根据烟粉虱的地理分布、共生菌组成、寄主范围、传毒能力及杀虫剂抗性等方面的差异分为不同的生物型,目前已报道至少有30多个生物型(Brown & Czosnek, 2002; Dinsdale et al., 2010);二是由 de Barro et al. (2011)近几年提出的将烟粉虱划分为不同的隐种,目前的研究表明,烟粉虱至少已有28个隐种(Dinsdale et al., 2010; Xu et al., 2010; Hu et al., 2011)。本研究并不涉及烟粉虱系统分类的内容,故

本文中依然沿用烟粉虱的生物型概念。在目前已知的生物型中,有2种入侵性和危害性特别强的烟粉虱,即B型和Q型烟粉虱(Brown et al., 1995)。烟粉虱除刺吸植物汁液、分泌蜜露诱发煤污病之外(Byrne & Bellows, 1991),还能够传播上百种植物病毒(任顺祥等, 2011)。如番茄黄化曲叶病毒(*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV)是由烟粉虱以持久循环可持续方式进行传播,给许多地区的番茄生产带来毁灭性病害(Mugiira et al., 2008)。当烟粉虱在感染 TYLCV 的番茄植株上取食时,病毒粒子会随着韧皮部汁液通过口针进入其体内,然后进入消化道,随着血淋巴循环进入唾液腺,在烟粉虱下次取食过程中,病毒粒子会随着唾液腺分泌的唾液侵染到健康植株,导致植物发生病毒病(Czosnek & Ghanim, 2002; Hogenhout & Bos, 2011)。TYLCV 在烟粉虱体内循环并成功传播的过程中,烟粉虱体内的蛋白、病毒蛋白以及寄主植物因子都有参与,如网格蛋白所介导的内吞作用对于 TYLCV 穿越中肠屏障起到协助作用(Pan et al., 2017),亲环蛋白B参与烟粉虱传播 TYLCV (Kanakala & Ghanim, 2016), *knottin1* 基因参与调节烟粉虱对 TYLCV 的摄取及传播(Hariton Shalev et al., 2016)。目前关于这些基因的报道还很少,二者互作关系尚有待于研究。

自噬是真核生物中一种进化上高度保守的用于降解和回收利用细胞内生物大分子和受损细胞器的过程,对于细胞的存活、分化和发育都具有重要作用(Klionsky & Emr, 2000)。自噬通常可以分为宏自噬、微自噬和分子伴侣介导的自噬。宏自噬则是在细胞内形成特殊的自噬泡包裹待降解的蛋白聚集体或受损细胞器,并通过自噬泡与溶酶体的融合将待降解底物运送至溶酶体中降解(Yorimitsu & Klionsky, 2005)。TYLCV 侵染B型烟粉虱的过程中会激发烟粉虱体内溶酶体参与的宏自噬,进而使烟粉虱体内的病毒量和病毒基因的表达下降(Wang et al., 2016)。人体内的 ARSB 对溶酶体的功能具有重要的调节作用,而烟粉虱体内是否存在 ARSB 以及烟粉虱在获取 TYLCV 后其体内 ARSB 的表达量是否会发生变化进而影响溶酶体的功能,参与到烟粉虱对 TYLCV 的响应尚不清楚。本研究根据Q型烟粉虱基因组数据(Xie et al., 2017)设计引物克隆得到 ARSB 基因的 cDNA 全长序列,分析其序列特征以及该基因在烟粉虱不同发育阶段和不同组织中的表达模式,同时对烟粉虱取食携带 TYLCV 的番茄植株后其体内该基因的表达量进行检测,以期深入研究 ARSB 基因在烟粉虱取食 TYLCV 过程中所起的

调控作用奠定基础,为进一步揭示 TYLCV 在烟粉虱体内的传播机制提供新的线索。

1 材料与方法

1.1 材料

供试昆虫:Q型烟粉虱来自中国农业科学院蔬菜花卉研究所长期饲养的种群,寄主植物为棉花,无用药史,温室饲养条件为温度 27±1℃、相对湿度(70±5)%、自然光照。饲养期间为保证Q型烟粉虱种群纯度,每隔2代随机从烟粉虱种群中取30头成虫,采用mtCOI酶切法鉴定烟粉虱种群纯度(Shatters et al., 2009)。

供试培养基和病毒:LB(Luria-Bertani)培养基:胰蛋白胨 10 g、酵母粉 5 g、NaCl 10 g、ddH₂O 1 L。TYLCV 侵染性克隆由浙江大学周雪平教授惠赠,在含 50 μg/mL 利福平和 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 培养基上培养,于 4℃ 保存,每月传代 1 次。

供试番茄及染病番茄植株的获取:番茄品种为中杂九号,市售。取处于 3~4 片真叶期且长势均一的番茄幼苗作为接毒材料,使用一次性无菌注射器将 TYLCV 悬浮液注入番茄叶片内,放入温室内培养 3~4 周后,选取具有明显感染 TYLCV 症状的番茄植株,同时取新叶提取 DNA,使用 TYLCV 外壳蛋白基因的特异性引物进行 PCR,检测是否接毒成功。

试剂及仪器:TRIzol 试剂,美国 Invitrogen 公司;PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)、LA Taq DNA 聚合酶,日本 TaKaRa 公司;DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒,美国 NEB 公司;pEASY-T1 克隆载体、大肠杆菌 *Escherichia coli* Trans T1 感受态细胞,北京全式金生物有限公司;

RealMaster Mix(SYBR Green),北京天根生化生物科技有限公司。S1000™ PCR 扩增仪、琼脂糖凝胶电泳系统、ChemiDoc™ XRS* 紫外凝胶成像系统,美国 Bio-Rad 公司;Centrifuge 5417R 离心机、微量移液器,德国 Eppendorf 公司;Quant Studio3 Applied Biosystems 实时荧光定量 PCR 仪、NanoDrop 2000c 分光光度计,美国 Thermo Fish Scientific 公司。

1.2 方法

1.2.1 ARSB 基因的克隆及测序

用吸虫管吸取 50~100 头 Q 型烟粉虱成虫,使用 TRIzol 法提取其 RNA,使用分光光度计以及 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 样品的浓度及质量,以 1 μg 总 RNA 为模板,参照 TaKaRa 反转录合成试剂盒说明书合成 cDNA。

根据 Q 型烟粉虱基因组数据分析得到 ARSB 基因的开放阅读框(open reading frame, ORF),利用 Primer Premier 5.0 软件设计扩增引物 ARSB-F 和 ARSB-R(表 1),由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。25 μL PCR 反应体系:LA Taq 酶 0.25 μL、LA Taq Buffer 2.5 μL、dNTP 4 μL、ARSB-F 1 μL、ARSB-R 1 μL、cDNA 1 μL、ddH₂O 15.25 μL。PCR 反应程序:95℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 2 min,35 个循环;72℃ 终延伸 10 min。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,在紫外凝胶成像系统下观察拍照,将目的条带切下,使用 DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒进行胶回收,将胶回收产物连接到 pEASY-T1 克隆载体上,连接产物转化到 50 μL 大肠杆菌 Trans T1 感受态细胞内,涂布于 LB 平板上,经蓝白斑筛选,挑取阳性克隆送北京美吉生物医药科技有限公司测序。

表 1 本研究所用引物序列
Table 1 Primers used in this study

基因 Gene	用途 Purpose	引物序列 Primer sequence
ARSB	扩增引物 Amplification primer	ARSB-F: 5'-ATGATAAAATTGAGGGCTTGG-3' ARSB-R: 5'-TTAAAAAAGTTTTCCTCCG-3'
ARSB	定量引物 RT-qPCR primer	qARSB-F: 5'-CAGGCTATGGTGGTTTGCTTA-3' qARSB-R: 5'-TCTTTGGCTACATTGTTGGTCTC-3'
EF-1α	内参引物 Internal reference primer	EF-1α-F: 5'-TAGCCTTGTGCCAATTTCCG-3' EF-1α-R: 5'-CCTTCAGCATTACCGTCC-3'
RPL29	内参引物 Internal reference primer	RPL29-F: 5'-TCGGAAAATTACCGTGAG-3' RPL29-R: 5'-GAACCTGTGATCTACTCCTCTCGTG-3'

1.2.2 ARSB 基因的序列分析

将测序后的结果使用 NCBI BLASTn 进行相似性比较,利用 ExPASy(<http://www.expasy.org>)分子生物学序列分析工具提供的相关软件进行翻译,利用

ExPASy Proteomics Server 提供的在线工具 Prot-param(<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>)对 ARSB 基因编码蛋白质的理化性质进行预测,使用 SignalP 4.1 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/>

SignalP/)进行分泌蛋白的预测。使用在线 HMMTOP 工具 (http://www.enzim.hu/hmmtop/html/adv_submit.html) 进行跨膜区的预测。利用 CELLO.2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) 进行亚细胞定位。利用 NCBI 上的 Conserved Domains 进行保守结构域的预测。从 NCBI 中下载其它昆虫, 包括豌豆蚜、赤拟谷盗、茶翅蜡、锯齿果蝇、温带臭虫 *Cimex lectularius*、埃及伊蚊 *Aedes aegypti*、斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*、内华达古白蚁 *Zootermopsis nevadensis*、光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis* 和丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis* 的 *ARSB* 基因序列, 分析其保守结构域, 利用 MEGA 5.0 软件对烟粉虱 *ARSB* 基因和其它已报道昆虫 *ARSB* 基因的保守结构域通过最大似然法构建系统发育树, 以人类 *Homo sapiens* 的芳香基硫酸酯酶 K 基因 (*arylsulfatase K*, *ARSK*) 作为外群, 用 Bootstrap 进行检验, Bootstrap=1 000, 分析不同昆虫之间的进化关系。

1.2.3 *ARSB* 基因相对表达量的分析

取棉花上的 Q 型烟粉虱成虫, 在显微镜下将头胸、腹部分离存放在 TRIzol 中, 分别提取 RNA, 取 1 μ g 总 RNA 反转录合成 cDNA, 研究 *ARSB* 基因在 Q 型烟粉虱不同组织内的表达情况。根据棉花上烟粉虱饲养种群的发育历期获得不同龄期的试虫, 分别提取卵、1~2 龄、3 龄、4 龄若虫和初羽化成虫 RNA, 分别取 1 μ g 总 RNA 反转录合成 cDNA, 研究 *ARSB* 基因在 Q 型烟粉虱不同发育历期的表达情况。取棉花上初羽化 7 d 内的烟粉虱成虫, 将其转移到感染 TYLCV 的番茄植株上分别让其获毒 24、48 和 72 h 后, 再将其转回棉花植株上饲养 5 d; 同时将棉花上初羽化 7 d 内的 Q 型烟粉虱成虫转移到健康番茄植株上让其取食 24、48 和 72 h 后, 再将其转回棉花植株上饲养 5 d 作为对照组, 每个处理分别收取 30 头 Q 型烟粉虱成虫提取 RNA, 以 1 μ g 总 RNA 为模板反转录合成 cDNA, 研究 *ARSB* 基因在 Q 型烟粉虱成虫取食 TYLCV 不同时间后的表达量。根据克隆得到的 ORF 设计并筛选 RT-qPCR 引物 qARSB-F 和 qARSB-R (表 1), 内参基因为烟粉虱的核糖体蛋白 L29 (ribosomal protein L29, RPL29) 和延伸因子 (elongation factors-1 α , EF-1 α), 二者扩增引物分别为 RPL29-F/RPL29-R 和 EF-1 α -F/EF-1 α -R (表 1) (Li et al., 2013; Su et al., 2013)。通过梯度稀释 2、4、6、8、16、32 倍模板进行 RT-qPCR, 用于绘制 *ARSB*、*RPL29*、*EF-1 α* 的标准曲线和确定引物的扩增效率。所有样品每个处理 3 个生物学重复, 4 个技术重复, 采用 SYBR Green I 染料进行 RT-qPCR, 20 μ L 反应体系: RNase-

Free ddH₂O 7.6 μ L、2 $\times$ SuperReal PreMix Plus 10 μ L、10 μ mol/L 上下游引物各 0.5 μ L、50 $\times$ ROX Reference Dye 0.4 μ L、cDNA 模板 1 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 40 个循环。通过熔解曲线验证 RT-qPCR 反应的特异性, 反应结束后读取 *Ct* 值。根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 *ARSB* 基因在 Q 型烟粉虱的头胸和腹部、不同发育历期以及获取 TYLCV 不同时间后的表达量。

1.3 数据分析

试验数据采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。Q 型烟粉虱不同发育历期、不同组织、取食 TYLCV 不同时间后 *ARSB* 基因的相对表达量均采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 应用 Tukey 法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 Q 型烟粉虱 *ARSB* 基因的克隆及序列分析

以 ARSB-F 和 ARSB-R 为引物、Q 型烟粉虱 cDNA 为模板扩增 *ARSB* 基因, 目的片段经回收、克隆、测序, 得到含有 1 731 bp 核苷酸序列的完整 ORF (图 1)。

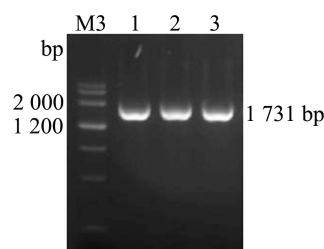


图 1 Q 型烟粉虱 *ARSB* 基因开放型阅读框的克隆

Fig. 1 Cloning of *ARSB* gene open reading frame in *Bemisia tabaci* Q biotype

M3: Marker 3; 1~3: *ARSB* 基因菌液。M3: Marker 3; 1~3: bacteria liquid of *ARSB* gene.

ARSB 基因编码 576 个氨基酸 (图 2), 该基因编码蛋白的分子式为 C₂₉₁₅H₄₄₉₆N₈₀₂O₈₃₈S₂₂, 分子量大小为 64.89 kD, 等电点为 8.55, 带负电残基 (Asp+Glu) 为 59, 带正电残基 (Arg+Lys) 为 64, 不稳定系数为 38.42, 可推测该蛋白为稳定蛋白, 脂肪系数为 80.76, 亲水性系数为 -0.387。该蛋白有 2 个保守结构域, 30~408 个氨基酸为第 1 个保守结构域, 为 N-乙酰半乳糖胺 4-硫酸酯酶 (也称芳香基硫酸酯酶 B) 的结构域, 480~510 个氨基酸为第 2 个结构域, 但目前为止该结构域的功能还未明确。SignalP 4.1 Server 预测该蛋白为分泌蛋白。利用 ProtScale 对 *ARSB* 基因的氨基酸序列/疏水性预测的分析结果表明, 第 12 位的半胱氨酸疏水性最强, 分值为 3.467,

第471位的精氨酸亲水性最强,分值为-2.844,从该蛋白的整个氨基酸序列来看,亲水性氨基酸多于疏水性氨基酸,为亲水性蛋白。ARSB蛋白具有1个跨

膜区,是从第6位氨基酸到第24位氨基酸。ARSB蛋白定位在线粒体和溶酶体内。

```

1  ATGATAAAATTGAGGGCTTGGGTCTTCTGTTTGGCGTGAATGGTTGCGACACAAGTC
1  M I K L R A W V L L F C V L M V A T Q V
61  TTCACCACCGCCACTAAACAGAAGCGACCGCATATTGTCTACATTTTAGCCGACGATCTG
21  F T T A T K Q K R P H I V Y I L A D D L
121 GGTGGAATGATGTAGGATTCCATGGATCCAATGCAATTGACGCGCAATATCGACGCA
41  G W N D V G F H G S N A I Q T P N I D A
181 CTGCGCTATTCTGGTATCATTCTACAAACTTCTACGTGAATCCTCTCTGACGCGCATCC
61  L A Y S G I I L Q N F Y V N P L C T P S
241 CGAGCTGCTCTCATGACCGGAAAATATCCATCCGACAGGTATGCAACACTTCGTCTG
81  R A A L M T G K Y P I R T G M Q H F V L
301 TACGGTGCCGAGCCTCGGGGGTACCACTGAAAGAGAAGCTTCTCCGGAGTACCTAAAA
101 Y G A E P R G L P L K E K L L P E Y L K
361 GAGCTTGGATACACGAACCACATGGTAGGCAAGTGGCATTGGGTCACTACAAGAAGAAG
121 E L G Y T N H M V G K W H L G H Y K K K
421 TATACCTCTCTACAGAGGATTCCACTCTCACCTGGGCTTTTGGACCGCGCGACAAGAC
141 Y T P L Y R G F H S H L G F W T G R Q D
481 TTTTATGATCACACCGCTTGTGAAAATGGCACATGGGGTTAGATATGCGGCGCGGGATG
161 F Y D H T A C E N G T W G L D M R R G M
541 GACGTGGCGTACGACTTGACGCGGAGTACTCGACGAGCTTCTCACTCGCAAGGCCACG
181 D V A Y D L H G E Y S T D V F T R K A T
601 TCGCTTATCCGCGATCACGACCCTCGAAGCCCTCTTCCTGTACATGTCCACGCGGCA
201 S L I R D H D P S K P L F L Y M S H A A
661 ATGCACTCTGGCAACACATACAGCCCTATACCGTCTCAGAGCAGTTGTCCGCCACTATG
221 M H S G N T Y S P I P V S E Q L S A T M
721 TTCGCCACATCCAGGACTACCATCGGAGGAGATACGCTGTTGCACTTTATAAATTGGAC
241 F A H I Q D Y H R R R Y A V A L Y K L D
781 CAGTCTGTAGGTCGCTAGTTGAAGCATTGAGCGAGAAGAAGATGCTAAAGGACACCATC
261 Q S V G S L V E A L S E K K M L K D T I
841 ATCATCTTTACGACGGATAATGGAGGTCCCGCAGCTGGATTCAACATAAACGCAGCGTCA
281 I I F T T D N G G P A A G F N I N A A S
901 AACTGGCCACTCAAAGGAGTCAAAAGTACCCTTTGGGAGGGTGGCGTGAGAGGAGCAGCT
301 N W P L K G V K S T L W E G G V R G A A
961 TTAGTGTGGAGCACAGCATTTAAAAACCCAGGTAGAGTCTCAACTCAATTGATGGACATC
321 L V W S T A F K N P G R V S T Q L M D I
1021 ACATACTGGCTGCCTACCCTTCTATCGGCGGCATCCAATAAAGCATTGATACTAGGAGC
341 T Y W L P T L L S A A S N K S I D T R S
1081 CATAAACTCGATGGACATGATGTCTGGGACTCACTAGTCAGCGATAAGCCGTTGAGCAAC
361 H K L D G H D V W D S L V S D K P F S N
1141 ACAACCATTTGCACAACATTGATCCCATGATGGAATGCAGCTCTTCGTACGCGCAA
381 T T I L H N I D P I D G N A A L R H G K
1201 TGGAATATGTAACGGGCACTGTGTTGAGAGGAATTGGAGATGCCTCATTCGGTCCCTCA
401 W K Y V N G T V F R G I G D A S F G P S
1261 GAAAGGAGTTTCGAGAACGATTATAATGTGAGCTTGGTTCTGGATAGCGTAACAAGCAGG
421 E R S S E N D Y N V S L V L D S V T S R
1321 ATGCTGAAGAACTTAACCTATCTACCTCGCCTGAACAGATCCGGAAGCTGAGGAGACAG
441 M L K K L N L S T S P E Q I R K L R R Q
1381 GCTATGGTGGTTTGTAGACCGGAAGGACCGTAAGTCTGTGACCCGTTTCACGGACCA
461 A M V V C L D R K D R K S C D P F H G P
1441 TGCCTCTCAATATCGAGGATGACCATGCGAGACCAACAATGTAGCCAAAGAGCATCCA
481 C L F N I E D D P C E T N N V A K E H P
1501 GAGGTGTTAAAAGATCTGCAGAACCGTTTGAATGAAATTAGCAAAACGGCTGAGCCTCCC
501 E V L K D L Q N R L N E I S K T A E P P
1561 GGAAATTTACCATTTGACGAGCGTGGGAATCCAGAGCACTGGAGCTATGTTTGGACCAAT
521 G N L P L Y E R G N P E H W S Y V W T N
1621 TTTGGTGACCATCTCAATCTACCCGACGATATCAACCCCGAGGAGAACCGCTCCTCCG
541 F G D H L N L P D D I K P Q G E P L L P
1681 ATCACTGAGGCTGTCTTCGCTGCACGAGAAACGGAGGAAACTTTTAA
561 I T E A V F A C T R N G G K L F *

```

图2 Q型烟粉虱ARSB基因推导的核苷酸序列和氨基酸序列

Fig. 2 The deduced nucleotide and amino acid sequences of ARSB gene from Bemisia tabaci Q biotype

下划线表示 ARSB 的 N-乙酰半乳糖胺 4-硫酸酯酶保守结构域; *代表终止密码子。The conserved domain of N-acetylglucosamine 4- sulphatase of ARSB are underlined; * represents termination codon.

2.2 Q型烟粉虱 $ARSB$ 基因编码蛋白的系统进化分析

系统发育树显示, Q型烟粉虱 $ARSB$ 基因编码的氨基酸序列与锯齿果蝇(GenBank 登录号 XP_020800640.1) $ARSB$ 基因编码的氨基酸序列聚在一支, 再与茶翅蜡(GenBank 登录号 XP_014274958.1)、

豌豆蚜(GenBank 登录号 XP_001950120.1)以及赤拟谷盗(GenBank 登录号 XP_015834556.1)的 $ARSB$ 基因编码的氨基酸序列聚在一起, 与外群人类 $ARSK$ 基因编码的氨基酸序列(GenBank 登录号 AAW66667.1)未聚在一起(图3)。

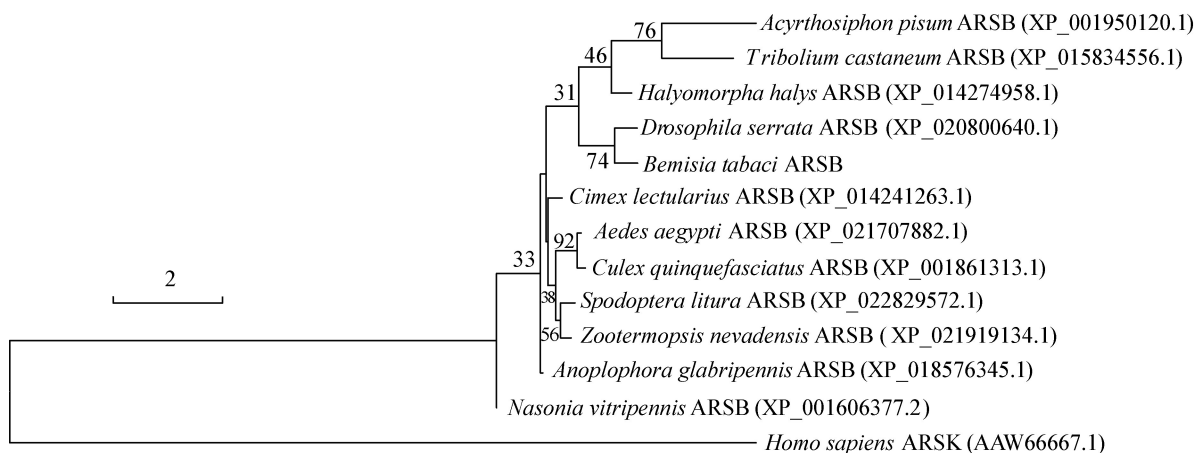


图3 基于 $ARSB$ 氨基酸序列以最大似然法构建Q型烟粉虱与其它昆虫的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of *Bemisia tabaci* Q biotype and other insects by maximum likelihood method based on $ARSB$ amino acid sequences

2.3 Q型烟粉虱 $ARSB$ 基因的表达分析

用特异性引物 q $ARSB$ -F/q $ARSB$ -R、RPL29-F/RPL29-R和EF-1 α -F/EF-1 α -R分别扩增 $ARSB$ 、RPL29和EF-1 α 序列, 获得长度分别为116、144和110 bp的定量片段, 各引物的扩增效率分别为97.6%、94.3%和104.2%, 且相关系数 R^2 均大于0.99。收集荧光信号进行熔解曲线分析, 发现3对引物都只有单一的信号峰, 说明各个引物没有非特异性扩增, 符合荧光定量试验对扩增引物的要求。

以Q型烟粉虱卵为对照, 棉花上Q型烟粉虱体内 $ARSB$ 基因的表达在不同龄期存在差异, $ARSB$ 基因在1~4龄若虫以及成虫期的表达量均低于卵期, 其中在成虫期的表达量最低, 是卵期的1/7, 且这2个龄期的表达量差异显著; 该基因在烟粉虱1~2龄若虫以及3龄若虫中的表达量分别是卵期的1/3和1/4, 且表达量差异显著(图4-A)。以Q型烟粉虱成虫头胸部为对照, $ARSB$ 基因在其腹部的表达量最低, 是头胸部表达量的1/3, 且差异显著(图4-B)。

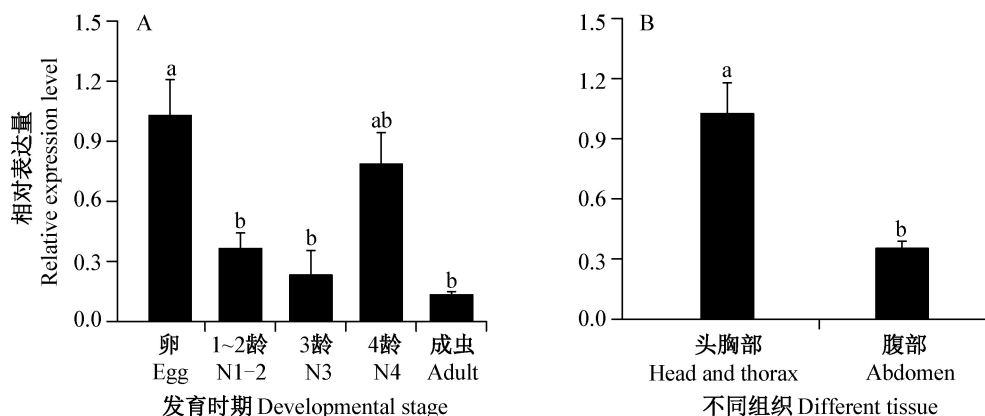


图4 Q型烟粉虱不同发育阶段和不同组织内 $ARSB$ 基因的相对表达水平

Fig. 4 Relative expression levels of $ARSB$ in different developmental stages and different tissues of *Bemisia tabaci* Q biotype

N1~N4: 1~4龄若虫。图中数据为平均数 $\pm$ 标准误。柱上不同字母表示经Turkey法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。N1~N4: 1st~4th instar nymph. Data are mean $\pm$ SE. Different letters on the bars indicate significant difference at $P<0.05$ level by Turkey's test.

与对照组相比,Q型烟粉虱取食感染TYLCV的番茄植株24 h和48 h后,其体内 $ARSB$ 基因的表达量无显著变化,取食72 h后其体内 $ARSB$ 基因的表达量显著升高,为对照组的1.8倍(图5)。

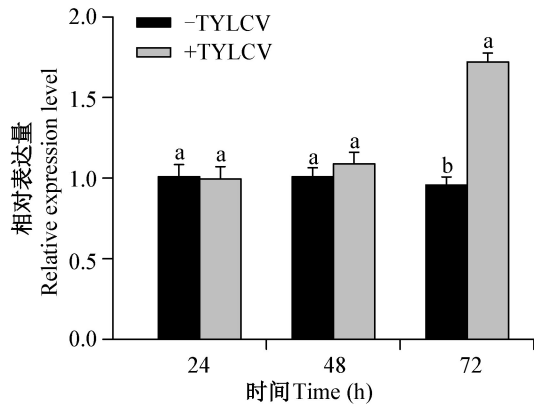


图5 Q型烟粉虱取食感染TYLCV番茄植株不同时间后 $ARSB$ 基因的相对表达水平

Fig. 5 Relative expression levels of $ARSB$ gene in *Bemisia tabaci* Q biotype feeding on the tomato infected with TYLCV
-TYLCV: 对照; +TYLCV: 烟粉虱获取TYLCV。图中数据为平均数±标准误。柱上不同字母表示同一时间点不同处理间经Turkey法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。-TYLCV: Control; +TYLCV: *Bemisia tabaci* acquired TYLCV. Data are mean±SE. Different letters on the bars indicate significant difference between control and treatment at the same time at $P<0.05$ level by Turkey's test.

3 讨论

本研究基于Q型烟粉虱基因组数据分析克隆得到的 $ARSB$ 基因的cDNA全长序列,通过对Q型烟粉虱 $ARSB$ 基因编码蛋白进行保守区域分析,发现该蛋白的第30~408个氨基酸为N-乙酰半乳糖胺4-硫酸酯酶(也称芳香基硫酸酯酶B)的保守结构域,具有芳香基硫酸酯酶的活性位点,该酶主要定位于溶酶体内,可推测其在溶酶体中具有一定的功能。系统进化树分析表明,Q型烟粉虱 $ARSB$ 与锯齿果蝇 $ARSB$ 聚为一支,说明它们在结构上有一定的相似性。可见,本研究克隆到的 $ARSB$ 基因是芳香基硫酸酯酶B基因。

在一些动物的基础研究中,ARS的最适pH较低且主要来源于溶酶体内(Dodgson & Rose, 1970)。昆虫的ARS与磺基转移酶协调作用对昆虫类固醇以及蜕皮激素的合成具有重要的生理意义(Yang & Wilkinson, 1972)。南方粘虫的ARS和磺基转移酶的活性与其发育历期有关,南方粘虫蜕皮过程中

ARS的活性最大,在2次蜕皮发生的间歇时间内该酶的活性最小,因此ARS的活性可以作为南方粘虫蜕皮和羽化的标志(Yang et al., 1973)。本研究结果表明, $ARSB$ 基因在Q型烟粉虱整个发育阶段均有表达,卵期的表达量要显著高于1~4龄若虫期和成虫期,但本试验克隆的 $ARSB$ 基因在Q型烟粉虱蜕皮过程中是否具有一定的作用,还有待进一步研究验证。

TYLCV病毒粒子在烟粉虱体内循环传播的过程中,唾液腺屏障和中肠屏障是阻止病毒传播的2道主要屏障(Hogenhout et al., 2008),烟粉虱的主唾液腺和副唾液腺位于其头部和胸部,中肠位于其腹部。本研究结果显示, $ARSB$ 基因在Q型烟粉虱头胸部的表达量显著高于腹部,可能与该酶在头胸以及腹部所起的作用不同有关。

烟粉虱和双生病毒之间的关系非常复杂(Czosnek & Ghanim, 2012; Gray et al., 2014),与健康烟粉虱相比,感染TYLCV的烟粉虱其寿命和产卵力分别下降27%和36%,在棉花上饲养960 h后,烟粉虱成虫中检测到病毒的比例为50%(Jiu et al., 2006; 2007)。TYLCV侵染会激活烟粉虱体内的免疫反应,导致病毒粒子在烟粉虱体内被降解(Luan et al., 2011)。这些研究结果表明TYLCV侵染烟粉虱会对其机体造成危害进而诱导机体的免疫反应,然而烟粉虱对双生病毒做出免疫应答反应的基本机制尚不明确。本研究中,Q型烟粉虱取食感染TYLCV番茄植株24 h和48 h后 $ARSB$ 基因的表达量与对照组相比无显著差异,可能是由于Q型烟粉虱取食24 h和48 h后体内所积累的病毒量不足以激发其免疫应答反应,未能使该基因显著上调来应对病毒的侵染(Hasegawa et al., 2018)。在Q型烟粉虱取食感染TYLCV番茄植株72 h后体内 $ARSB$ 基因的表达量显著增加,而 $ARSB$ 主要定位于溶酶体内,且Wang et al. (2016)研究结果表明B型烟粉虱溶酶体参与的自噬反应能够抑制TYLCV的传播效率。推测该基因表达量升高很可能促进自噬/溶酶体途径进而使Q型烟粉虱体内病毒粒子降解以达到保护虫体的目的,但 $ARSB$ 基因是如何调节溶酶体功能的具体机制还有待进一步研究。本研究结果可为进一步深入探索 $ARSB$ 基因在烟粉虱传播TYLCV过程中的具体作用提供理论依据。

参考文献 (References)

Bhattacharyya S, Look D, Tobacman JK. 2007. Increased arylsulfatase

- B activity in cystic fibrosis cells following correction of CFTR. *Clinica Chimica Acta*, 380(1/2): 122–127
- Brown JK, Coats SA, Bedford ID, Markham PG, Bird J, Frohlich DR. 1995. Characterization and distribution of esterase electrophores in the whitefly, *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera: Aleyrodidae). *Biochemical Genetics*, 33(7/8): 205–214
- Brown JK, Czosnek H. 2002. Whitefly transmission of plant viruses. *Advances in Botanical Research*, 36: 65–100
- Byrne DN, Bellows TS Jr. 1991. Whitefly biology. *Annual Review of Entomology*, 36(1): 431–457
- Czosnek H, Ghanim M. 2002. The circulative pathway of begomoviruses in the whitefly vector *Bemisia tabaci*: insights from studies with *Tomato yellow leaf curl virus*. *Annals of Applied Biology*, 140(3): 215–231
- Czosnek H, Ghanim M. 2012. Back to basics: are begomoviruses whitefly pathogens? *Journal of Integrative Agriculture*, 11(2): 225–234
- de Barro PJ, Liu SS, Boykin LM, Dinsdale AB. 2011. *Bemisia tabaci*: a statement of species status. *Annual Review of Entomology*, 56: 1–19
- Dinsdale A, Cook L, Riginos C, Buckley YM, de Barro P. 2010. Refined global analysis of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodoidea: Aleyrodidae) mitochondrial cytochrome oxidase 1 to identify species level genetic boundaries. *Annals of the Entomological Society of America*, 103(2): 196–208
- Dodgson KS, Rose FA. 1970. Sulfoconjugation and sulfohydrolysis. *Metabolic Conjugation and Metabolic Hydrolysis*, 1: 239–325
- Dzialiszyński LM, Fröhlich A, Kuczyński J, Pydzik T. 1967. The activity of arylsulfatase in some tumors of the genital organs in women. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 15(1): 97–99
- Feferman L, Bhattacharyya S, Deaton R, Gann P, Guzman G, Kajdacsy-Balla A, Tobacman JK. 2013. Arylsulfatase B (N-acetylgalactosamine-4-sulfatase): potential role as a biomarker in prostate cancer. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 16(3): 277–284
- Gray S, Cilia M, Ghanim M. 2014. Circulative, “nonpropagative” virus transmission: an orchestra of virus-, insect-, and plant-derived instruments. *Advances in Virus Research*, 89: 141–199
- Hariton Shalev A, Sobol I, Ghanim M, Liu SS, Czosnek H. 2016. The whitefly *Bemisia tabaci* *knottin-1* gene is implicated in regulating the quantity of *Tomato yellow leaf curl virus* ingested and transmitted by the insect. *Viruses*, 8(7): e205
- Hasegawa DK, Chen W, Zheng Y, Kaur N, Wintermantel WM, Simmons AM, Fei Z, Ling KS. 2018. Comparative transcriptome analysis reveals networks of genes activated in the whitefly, *Bemisia tabaci* when fed on tomato plants infected with *Tomato yellow leaf curl virus*. *Virology*, 513: 52–64
- Hogenhout SA, Ammar ED, Whitfield AE, Redinbaugh MG. 2008. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 46: 327–359
- Hogenhout SA, Bos JIB. 2011. Effector proteins that modulate plant-insect interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(4): 422–428
- Hu J, de Barro P, Zhao H, Wang J, Nardi F, Liu SS. 2011. An extensive field survey combined with a phylogenetic analysis reveals rapid and widespread invasion of two alien whiteflies in China. *PLoS ONE*, 6(1): e16061
- Jiu M, Zhou XP, Liu SS. 2006. Acquisition and transmission of two begomoviruses by the B and a non-B biotype of *Bemisia tabaci* from Zhejiang, China. *Journal of Phytopathology*, 154(10): 587–591
- Jiu M, Zhou X P, Tong L, Xu J, Yang X, Wan FH, Liu SS. 2007. Vector-virus mutualism accelerates population increase of an invasive whitefly. *PLoS ONE*, 2(1): e182
- Kanakala S, Ghanim M. 2016. Implication of the whitefly *Bemisia tabaci* cyclophilin B protein in the transmission of *Tomato yellow leaf curl virus*. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1702
- Kikal T, Smith JN. 1959. Comparative detoxication 6: the metabolism of 6-amino-4 nitro-o-cresol and 4: 6-dinitro-o-cresol in locusts. *The Biochemical Journal*, 71(1): 48–54
- Klionsky DJ, Emr SD. 2000. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*, 290(5497): 1717–1721
- Li MR, Wang R, Sheng Q. 2014. Advances in research of arylsulfatase in tumor diagnosis and oncology. *Pharmaceutical Biotechnology*, 21(1): 81–85 (in Chinese) [李孟如, 王蓉, 盛清. 2014. 芳香基硫酸酯酶在肿瘤诊断和治疗中的研究进展. *药物生物技术*, 21(1): 81–85]
- Li R, Xie W, Wang S, Wu Q, Yang N, Yang X, Pan H, Zhou X, Bai L, Xu B, et al. 2013. Reference gene selection for qRT-PCR analysis in the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *PLoS ONE*, 8(1): e53006
- Luan JB, Li JM, Varela N, Wang YL, Li FF, Bao YY, Zhang CX, Liu SS, Wang XW. 2011. Global analysis of the transcriptional response of whitefly to *Tomato yellow leaf curl China virus* reveals the relationship of coevolved adaptations. *Journal of Virology*, 85(7): 3330–3340
- Mitsunaga-Nakatsubo K, Kusunoki S, Kawakami H, Akasaka K, Aki-moto Y. 2009. Cell-surface arylsulfatase A and B on sinusoidal endothelial cells, hepatocytes, and Kupffer cells in mammalian livers. *Medical Molecular Morphology*, 42(2): 63–69
- Mugiira RB, Liu SS, Zhou X. 2008. *Tomato yellow leaf curl virus* and *Tomato leaf curl Taiwan virus* invade south-east coast of China. *Journal of Phytopathology*, 156(4): 217–221
- Pan LL, Chen QF, Zhao JJ, Guo T, Wang XW, Hariton-Shalev A, Czosnek H, Liu SS. 2017. Clathrin-mediated endocytosis is involved in *Tomato yellow leaf curl virus* transport across the midgut bar-

- rier of its whitefly vector. *Virology*, 502: 152–159
- Prabhu SV, Bhattacharyya S, Guzman-Hartman G, Macias V, Kajdacsy-Balla A, Tobacman JK. 2011. Extra-lysosomal localization of arylsulfatase B in human colonic epithelium. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 59(3): 328–335
- Ren SX, Qiu BL, Ge F, Zhang YJ, Du YZ, Chen XX, Guo JY, Lin KJ, Peng ZQ, Yao SL, et al. 2011. Research progress of the monitoring, forecast and sustainable management of whitefly pests in China. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(1): 7–15 (in Chinese) [任顺祥, 邱宝利, 戈峰, 张友军, 杜予州, 陈学新, 郭建英, 林克剑, 彭正强, 姚松林, 等. 2011. 粉虱类害虫的监测预警与可持续治理技术透视. *应用昆虫学报*, 48(1): 7–15]
- Robinson D, Smith JN, Williams RT. 1953. Studies in detoxication. XLVI. β -glucuronidase and arylsulphatase in the crop fluid of locusts. *The Biochemical Journal*, 53(1): 125–129
- Shatters RG Jr., Powell CA, Boykin LM, Liansheng H, McKenzie CL. 2009. Improved DNA barcoding method for *Bemisia tabaci* and related Aleyrodidae: development of universal and *Bemisia tabaci* biotype-specific mitochondrial cytochrome c oxidase I polymerase chain reaction primers. *Journal of Economic Entomology*, 102(2): 750–758
- Su YL, He WB, Wang J, Li JM, Liu SS, Wang XW. 2013. Selection of endogenous reference genes for gene expression analysis in the Mediterranean species of the *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) complex. *Journal of Economic Entomology*, 106(3): 1446–1455
- Wang K, Li LK. 1981. Arylsulfatase and its isoenzyme. *Foreign Medical Sciences: Clinical Biochemistry and Laboratory Book*, (4): 1–6 (in Chinese) [王坤, 李立群. 1981. 芳香基硫酸酯酶及其同工酶. *国外医学: 临床生物化学与检验学分册*, (4): 1–6]
- Wang LL, Wang XR, Wei XM, Huang H, Wu JX, Chen XX, Liu SS, Wang XW. 2016. The autophagy pathway participates in resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* infection in whiteflies. *Autophagy*, 12(9): 1560–1574
- Xie W, Chen CH, Yang ZH, Guo LT, Yang X, Wang D, Chen M, Huang JQ, Wen YN, Zeng Y, et al. 2017. Genome sequencing of the sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci* MED/Q. *GigaScience*, 6(5): 1–7
- Xu J, de Barro PJ, Liu SS. 2010. Reproductive incompatibility among genetic groups of *Bemisia tabaci* supports the proposition that the whitefly is a cryptic species complex. *Bulletin of Entomological Research*, 100(3): 359–366
- Yang RSH, Pelliccia JG, Wilkinson CF. 1973. Age-dependent arylsulphatase and sulphotransferase activities in the southern armyworm: a possible insect endocrine regulatory mechanism? *Biochemical Journal*, 136(3): 817–820
- Yang RSH, Wilkinson CF. 1972. Enzymic sulphation of *p*-nitrophenol and steroids by larval gut tissues of the southern armyworm (*Prodenia eridania* Cramer). *The Biochemical Journal*, 130(2): 487–493
- Yorimitsu T, Klionsky DJ. 2005. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death & Differentiation*, 12(S2): 1542–1552

(责任编辑:李美娟)