

棉铃虫 V-ATP 酶 G 亚基基因克隆及相对表达量分析

Cloning and relative expression level of vacuolar-type proton ATPase G subunit gene in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera*

王梦珂 赵 特* 周 琳* 杜鹏强 刘向阳 郭线茹

(河南农业大学植物保护学院, 河南省新型农药创制与应用重点实验室, 河南省绿色农药创制工程技术研究中心, 郑州 450002)

WANG Mengke ZHAO Te* ZHOU Lin* DU Pengqiang LIU Xiangyang GUO Xianru

(Henan Research Center of Green Pesticide Engineering and Technology, Henan Key Laboratory of Creation and Application of New Pesticides, College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan Province, China)

液泡型 H⁺-ATP 酶(vacuolar-type proton ATPase), 简称 V-ATP 酶, 通过水解腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)产生能量转运质子, 分为 V₁ 结构域和 V₀ 结构域, 其分别负责 ATP 的水解和质子的转运。V-ATP 酶主要存在于昆虫的马氏管、中肠和唾液腺等器官的上皮细胞质膜上, 对昆虫的生长发育有重要作用(钟丰等, 2016)。G 亚基是 V₁ 结构域的重要组成部分, 与 V-ATP 酶的组装和活性密切相关。本研究拟通过克隆棉铃虫 *Helicoverpa armigera* V-ATP 酶 G 亚基基因来研究该亚基在棉铃虫不同发育阶段和不同组织中的相对表达量, 以期 V-ATP 酶亚基的功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试昆虫: 本实验室于温度 26±1℃、光周期 L 14:D 10、相对湿度 60%~85% 的人工气候箱中用人工饲料饲养的棉铃虫种群, 收集 24 h 内产的棉铃虫卵、发育健康且大小一致的 1~6 龄幼虫、蛹和成虫进行试验。

试剂及仪器: TRIzol 试剂, 美国 Invitrogen 公司; 2×Es Taq Master Mix、大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 感受态细胞, 北京庄盟国际生物基因科技有限公司; 质粒 DNA 提取试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司; DNA 凝胶回收试剂盒、PrimerScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser、TB Green™ Premix Ex Taq II 试剂盒, 日本 TaKaRa 公司; 其它试剂均为国产分析纯。DYY-6C 电泳仪, 北京六一仪器厂; In-GeniusLHR 凝胶成像系统, 美国 Syngene 公司;

QuantStudio 3 Real-Time PCR System, 美国 ABI 公司。

1.2 方法

棉铃虫不同虫态样品的采集: 为比较棉铃虫不同发育阶段 V-ATP 酶 G 亚基的表达量, 分别收集棉铃虫卵、1~6 龄幼虫、蛹和成虫样品, 其中卵 100 粒、1 龄幼虫 30 头、2 龄幼虫 20 头、3 龄幼虫 10 头、4 龄和 5 龄幼虫各 5 头、6 龄幼虫、雌蛹、雄蛹、雌雄成虫各 3 头。为比较棉铃虫不同组织中 V-ATP 酶 G 亚基的相对表达量, 分别收集交配期雌雄成虫的触角、去除触角的头部、去除翅和足的胸部、去除外生殖器的腹节、足、翅、外生殖器组织样品, 其中触角 30 对, 头部 20 个, 胸部 10 个, 腹节 10 个, 前、中和后足各 15 对, 翅 20 对, 雌、雄性外生殖器各 25 个。样品置于液氮迅速冷冻后研磨成粉末状, 每个样品设置 3 个生物学重复。

PCR 扩增、克隆与序列分析: 采用 Trizol 法分别提取各样品总 RNA, 参照 PrimerScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 说明书合成 cDNA。根据 NCBI 提供的棉铃虫 V-ATP 酶 G 亚基基因序列(XM_021332876.1), 利用 Primer Premier 6.0 软件设计特异性引物 HAG-F (5'-ATGGCGAGCCAGACACAGGGA-3') 和 HAG-R (5'-TTAGATAAGGCGGTA GTTGGTGTGC-3')。50 μL PCR 反应体系: 2×Es Taq Master Mix 25 μL、10 μmol/L 上下游引物各 2 μL、cDNA 模板 2 μL、ddH₂O 19 μL。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 15 s, 60℃ 退火 15 s, 72℃ 延伸 30 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 5 min。将 PCR 产物电泳后切胶回收, 回收产物连接到 T 载体后转化到

大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞上, 筛选阳性克隆提取质粒 DNA 测序。引物合成和测序工作委托郑州擎科生物技术有限公司完成。将所得序列在 NCBI 上进行 BLAST 比对分析, 用 DNAMAN 9 软件进行氨基酸序列一致性分析, 基于邻接法采用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树。

棉铃虫 V-ATP 酶 G 亚基基因相对表达量分析: 以 GAPDH 为内参基因分别设计 1 对内参引物 GAPDH-F (5'-GAAGTCAAGTCCGTGGAGATG-3')/GAPDH-R (5'-GACCTGTGCTGTGAAGTCG-3') 和 1 对特异性引物 QG-F (5'-AACAATTGCTGGCAGCTGAA-3')/QG-R (5'-CTTAGCAGCAACACCTTCCC-3')。12 μ L 荧光定量 PCR 反应体系: TB Green™ Premix Ex Taq II 6 μ L、10 μ mol/L 引物各 0.5 μ L、cDNA 模板 1 μ L、OX Reference Dye II 0.24 μ L、ddH₂O 3.76 μ L。荧光定量 PCR 反应条件: 95℃ 预变性 2 min; 95℃ 变性 15 s, 60℃ 退火 30 s, 40 个循环。每个样品 3 个重复, 反应结束后收集 C_t 值, 采用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 法进行相对表达量分析, 以表达量最低的样品为基准进行定量分析。

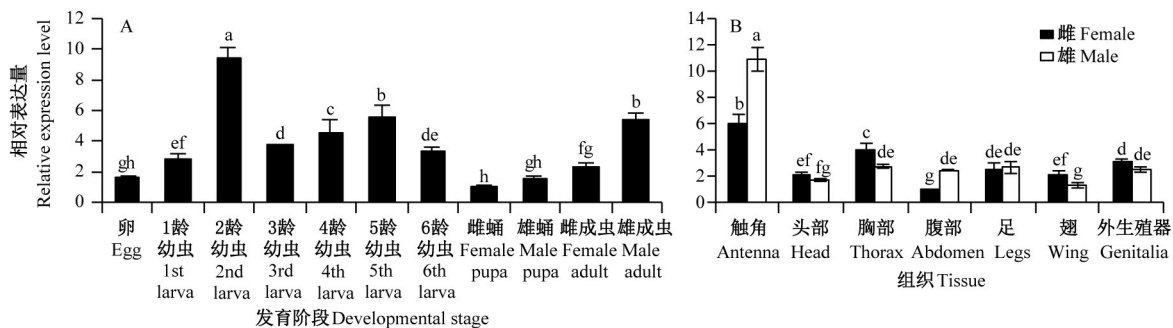


图1 棉铃虫不同发育阶段(A)和不同组织(B)V-ATP酶G亚基基因的相对表达量

Fig. 1 Relative expression of V-ATPase G subunit gene at different developmental stages (A) and tissues (B) of *Helicoverpa armigera*

数据为平均数±标准差。不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters indicate significant difference at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

3 讨论

幼虫期昆虫发育旺盛, 代谢水平高, 需要 V-ATP 酶水解 ATP 来提供能量, 因此幼虫期基因表达量高, 推测 V-ATP 酶 G 亚基基因与昆虫幼虫生长发育有关。在各组织中, 雄成虫触角的相对表达量最高, 而 V-ATP 酶能在激素分泌和神经递质释放过程中发挥功能, 表明 V-ATP 酶与昆虫感觉行为有关。棉铃虫雄成虫腹部 G 亚基基因相对表达量显著高于雌成虫腹部的, 与胡黎明等(2011)关于橘小实蝇 *Bactrocera dorsalis* V-ATP 酶 G 亚基基因在雄性生殖器中的表达量远远高于雌性生殖器的结果一致, 推测 V-ATP 酶 G 亚基基因可能与雄成虫性发育有关。

1.3 数据分析

采用 SPSS 19.0 软件对试验数据进行统计分析, 应用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 棉铃虫 V-ATP 酶 G 亚基基因克隆与序列分析

经测序棉铃虫 V-ATPase 酶 G 亚基开放阅读框长 354 bp, 编码 117 个氨基酸。氨基酸序列比对结果显示, 与斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 和家蚕 *Bombyx mori* 的 V-ATPase 酶 G 亚基氨基酸同源性分别为 96% 和 95%。系统发育树结果显示, 棉铃虫与斜纹夜蛾、粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 亲缘关系最近。

2.2 棉铃虫 V-ATP 酶 G 亚基基因相对表达量

在不同发育阶段, V-ATP 酶 G 亚基基因相对表达量差异显著, 其中雌蛹中表达量最低, 2 龄幼虫的相对表达量最高, 为雌蛹的 9.45 倍, 5 龄幼虫次之, 为雌蛹的 5.62 倍(图 1-A)。在不同组织中, V-ATP 酶 G 亚基基因均有表达, 其中雌成虫腹部的相对表达量最低, 雄成虫触角的相对表达量最高, 为雌成虫腹部的 10.89 倍, 雄成虫腹部的相对表达量是雌成虫腹部的 2.45 倍(图 1-B)。

参考文献 (References)

- HU LM, SHEN JM, BIN SY, LIN JT. 2011. Cloning and tissue-specific expression analysis of V-ATPase G subunit gene in *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae). *Acta Entomologica Sinica*, 54(12): 1452–1458 (in Chinese) [胡黎明, 申建梅, 宾淑英, 林进添. 2011. 桔小实蝇 V-ATPase G 亚基基因的克隆及组织表达特异性分析. *昆虫学报*, 54(12): 1452–1458]
- 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]
- (责任编辑: 张俊芳)