

栗灰螟几丁质保守结构域内含蛋白1基因的克隆及表达分析

Cloning and expression analysis of *Chitinase domain containing 1* from yellow top borer *Chilo infuscatellus*

江凌霄 王伟重 郭燕芳 高三基 王锦达*

(福建农林大学国家甘蔗工程技术中心, 福州 350000)

JIANG Lingxiao WANG Weizhong GUO Yanfang GAO Sanji WANG Jinda*

(National Sugarcane Engineering Research Center of Sugarcane, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350000, Fujian Province, China)

栗灰螟 *Chilo infuscatellus* 属鳞翅目螟蛾科, 也称二点螟, 主要为害我国南方的甘蔗以及北方的谷子等作物。几丁质是昆虫外表皮、围食膜等组织的重要组成部分, 几丁质及对应的几丁质酶通过准确调控旧表皮蜕去、新表皮合成维持着昆虫各发育阶段的代谢平衡(Zhang et al., 2016)。通过干扰、破坏几丁质酶的合成从而影响昆虫的几丁质代谢是现代化学农药靶标的研究热点。根据 Wang et al. (2019) 的转录组测序结果发现栗灰螟体内含有一类新型几丁质酶——几丁质保守结构域内含蛋白1(chitinase domain containing 1, *Chid1*) 基因。本研究通过PCR技术扩增栗灰螟 *Chid1* 基因(*CiChid1*) 的全长序列, 并对该基因进行生物信息学分析和表达模式检测, 以期揭示 *Chid1* 的功能并未利用几丁质酶基因作为害虫防治的新型靶标提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试昆虫: 栗灰螟幼虫采自广西壮族自治区龙州县甘蔗地, 带回室内以实验室内种植的玉米(郑单985, 市售)为饲料于温度(26±1)℃、相对湿度70%、光周期L 16 h:D 8 h条件下饲养。

试剂及仪器: RNA提取试剂盒, 德国Qiagen公司; Eraser PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit、PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)、TaKaRa Ex Taq®、TB Green™ Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus)、PMD-19T载体, 宝生物工程(大连)有限公司; Gel Extraction Kit D2500, 美国Omega公司; 大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α感受态细胞, 北京全式金生物技术

有限公司。MGC-1000HP-2L人工气候箱, 上海一恒科学仪器有限公司; T500 PCR仪, 美国Bio-Rad公司; ABI-Q3定量PCR仪, 美国ABI有限公司。

1.2 方法

PCR扩增、克隆与序列分析: 使用RNA提取试剂盒提取栗灰螟3龄幼虫总RNA, 参照Eraser PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit说明书合成第一链cDNA。根据 *CiChid1* 基因序列(Wang et al., 2019), 利用Primer Premier 5.0软件设计特异性引物 *CiChid1*-F (5'-GCTGCGTCCTAAAGTAT-3') 和 *CiChid1*-R (5'-AGTT-CTCACATACCATCAC-3') 扩增目的序列全长, 本研究所有引物均由福州博尚生物技术有限公司合成。25 μL PCR反应体系: cDNA模板1 μL、10 μmol/L上下游引物各1 μL、DNA聚合酶反应缓冲液2.5 μL、dNTP 2 μL、Ex Taq DNA聚合酶0.25 μL、ddH₂O 17.25 μL。反应程序: 94℃预变性3 min; 94℃变性30 s, 58℃退火30 s, 72℃延伸1 min, 35个循环; 72℃延伸7 min。将PCR产物电泳后切胶回收, 回收产物连接到PMD-19T载体后转化到大肠杆菌DH5α感受态细胞上, 筛选阳性克隆送中国铂尚生物技术(上海)有限公司测序。从NCBI网站选取29种不同昆虫的相关基因序列, 与本研究克隆的 *CiChid1* 蛋白序列用Clustal W软件进行多重序列比对, 再使用MEGA 6.0软件采用邻接法构建系统进化树, Bootstrap为1 000。

CiChid1 基因的表达量分析: 为比较栗灰螟各虫态 *CiChid1* 基因的表达量, 收集室内饲养的1~6龄幼虫、蛹、雌雄成虫各3只混合。解剖5龄幼虫的头部、表皮和肠道, 比较栗灰螟不同组织中 *CiChid1* 基因

的表达量。每个样品设3个生物学重复。上述样品收集时迅速置于液氮中,于-80℃保存备用。提取后的RNA使用PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)合成第一链cDNA,备用。特异性引物 qCiChid1-F (5'-TTGTTATATGATAGAGCCTGATT-3') 和 qCiChid1-R (5'-AATTCATACACTGCTAATGGT-3')用于*CiChid1*基因表达量检测,以 β -actin为内参基因设计内参引物 q β -actin-F (5'-ACCAACTGGGACGATATGGAGAA-3') 和 q β -actin-R (5'-CCTCAGTCAAGAGGACTGGGTGC-3')。20 μ L PCR反应体系:2 $\times$ TB Green™ Premix Ex Taq™ 10 μ L、ROX Reference Dye II 0.4 μ L、上下游引物各0.4 μ L、cDNA模板1 μ L、ddH₂O 7.8 μ L。反应程序:95℃预变性30 s;95℃变性5 s,60℃退火34 s,40个循环;95℃变性15 s,60℃退火1 min,95℃变性15 s,60℃退火15 s。采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法分析试验结果。

1.3 数据分析

试验数据采用SPSS 18.0软件进行统计分析,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 *CiChid1* 基因的克隆及氨基酸序列分析

经克隆测序获得栗灰螟*CiChid1*基因的cDNA序列全长1345 bp,编码394个氨基酸,预测的蛋白

质分子量为45.5 kD,等电点为9.07。系统发育进化树显示,来自同一目的昆虫聚在一起,其中栗灰螟*CiChid1*蛋白与其它鳞翅目昆虫聚在一支,且与同为螟蛾科的二化螟最为接近。

2.2 *CiChid1* 基因的时空表达分析

*CiChid1*基因在栗灰螟不同虫态均有一定表达,在5龄幼虫中的表达量最高,其次为成虫,分别为1龄幼虫的76.2倍和42.7倍,而*CiChid1*基因在1龄和3龄幼虫中的表达量最低(图1-A)。*CiChid1*基因在栗灰螟5龄幼虫肠道组织中的表达量相对较高,为头部的18.4倍,在表皮中的表达量为头部中表达量的5.1倍(图1-B)。

3 讨论

几丁质酶除了水解几丁质,还参与昆虫的食物消化和围食膜降解等生理过程。本研究首次从昆虫体内克隆并验证了*Chid1*基因。在检测*CiChid1*的表达模式后发现,该基因在栗灰螟的5龄幼虫期及成虫期表达量较高,在其肠道组织中表达量亦相对较高,推测该基因在栗灰螟的暴食期参与了围食膜再生、食物消化等生命活动。该基因编码的蛋白能参与巨噬细胞的内吞、外排作用;且奚骏等(2013)构建的*Chid1*基因剔除小鼠发育正常,未出现胚胎致死、交配繁殖能力下降的异常现象,因此还需通过原核表达,同时结合Western bolt等技术研究*Chid1*蛋白的理化性质。

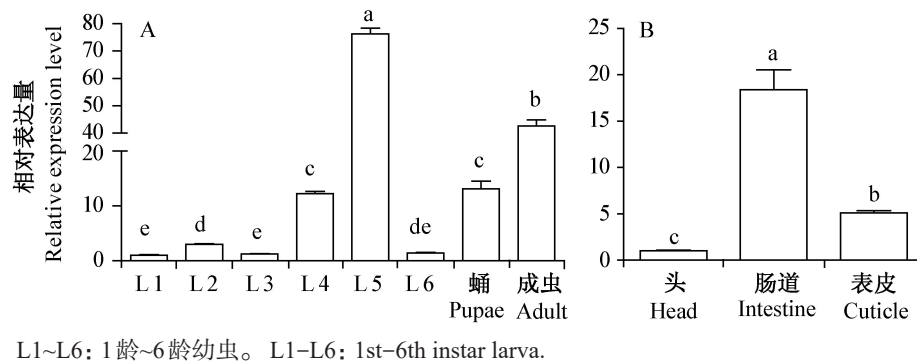


图1 栗灰螟*CiChid1*基因在不同龄期(A)和不同组织中(B)的表达情况

Fig. 1 Relative expression level of *CiChid1* from different developmental stages (A) and tissues (B) of *Chilo infuscatellus*. 图中数据为平均数 $\pm$ 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 $\pm$ SD. Different letters indicate significant difference at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

参考文献 (References)

- WANG JD, ZHANG JS, GUO YF, CHEN LF, WANG FL, HUANG MT, GAO SJ, WANG R. 2019. Molecular cloning, characterization, and expression profiling analysis of Cry toxin receptor genes from sugarcane shoot borer *Chilo infuscatellus* (Snellen). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 157: 186–195
- XI J, WU YB, SUN X, REN JK. 2013. Generation of chitinase domain containing 1 (*Chid1*) knockout mice. *Chinese Journal of Cell Bi-*

ology, 35(3): 316–321 (in Chinese) [奚骏, 吴友兵, 孙霞, 任建科. 2013. 几丁质酶结构域内含蛋白1(*Chid1*)基因剔除小鼠的建立. 中国细胞生物学学报, 35(3): 316–321]

- ZHANG DW, QIAN ZM, ZHANG ZL, LUO Y. 2016. The new research progress in function of insect chitinase gene family. *Journal of Environmental Entomology*, 38(1): 193–199 (in Chinese) [张道伟, 钱正敏, 张正玲, 骆颖. 2016. 昆虫几丁质酶基因家族功能研究进展. 环境昆虫学报, 38(1): 193–199]

(责任编辑:王璇)