

异色瓢虫过氧化氢酶(Catalase)的 基因克隆及序列分析*

唐 斌^{1,2**} 施佐堃¹ 郭红双¹ 王 甦² 王世贵¹ 张 帆^{2***}

(1. 杭州师范大学生命与环境科学学院, 杭州 310036; 2. 北京市农林科学院植物保护环境保护所, 北京 100097)

摘 要 【目的】克隆异色瓢虫 *Harmonia axyridis* 保护酶系中过氧化氢酶(Catalase , CAT)的全长 cDNA 序列, 并分析该基因的基本特性。【方法】采用同源克隆和锚定 PCR 技术, 从异色瓢虫中克隆到 *HaraxCAT* 基因的 cDNA 全序列 (GenBank 登录号 KC991026), 并采用生物信息学的相关方法进行了分析。【结果】*HaraxCAT* 的 cDNA 序列全长 1 781 bp, 其包含 110 bp 的 3'非编码区域和 45 bp 的 5'非编码区域, 可读框长 1 626 bp, 编码 541 个氨基酸。预测该基因编码蛋白的分子量为 61.55 ku, 理论等电点为 8.33, 包含 3 个糖基化位点, 无信号肽序列和跨膜结构。并且该基因包含了一个长达 18 个氨基酸的潜在的活性位点序列 FDRERIPERVHAKGAGA 和血红素配体信号序列 RIFSYGDTH。同源比对不同昆虫的 CAT 蛋白序列, 发现昆虫 CAT 非常保守, *HaraxCAT* 与其他昆虫的同源性高达 65%及以上, 与赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 同源性最高, 达 75.25%; 系统发育分析表明其与鞘翅目赤拟谷盗和白星金花龟 *Protaetia brevitarsis* 亲缘关系最近。【结论】获得异色瓢虫 *catalase* 基因的 cDNA 全长序列, 证实昆虫 CAT 蛋白非常保守。

关键词 异色瓢虫, 过氧化氢酶, 基因克隆, 序列分析

Cloning and sequence analysis of the *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellinae) catalase gene

TANG Bin^{1,2**} SHI Zuo-Kun¹ GUO Hong-Shuang¹ WANG Su² WANG Shi-Gui¹ ZHANG Fan^{2***}

(1. Hangzhou Key Laboratory of Animal Adaptation and Evolution, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China;

2. Institute of Plant and Environment Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

Abstract 【Objectives】To clone the full length cDNA sequence of the catalase gene from *Harmonia axyridis*, which codes for a kind of important protective insect enzyme, and analyze its basic characteristics. 【Methods】Catalase (CAT) from *Harmonia axyridis* was cloned using homologous cloning and anchored PCR, and the sequence analyzed using bioinformatic methods. 【Results】The full length of the *HaraxCAT* cDNA sequence is 1 781 bp (GenBank accession number KC991026), which contains a 3' untranslated region of 110 bp and a 5' untranslated region of 45 bp. *HaraxCAT* cDNA contains an open reading frame of 1 626 bp, encoding a protein of 541 amino acids residues with a calculated molecular mass of 61.55 ku and pI of 8.33. It has three potential N-glycosylation sites, but no signal peptide, putative cleavage sites or transmembrane domain. *HaraxCAT*, including a proximal active site signature of FDRERIPERVHAKGAGA which encodes about 18 amino acids, also includes a

* 资助项目: 国家“973”计划项目 (2012CB127605); 国家自然科学基金 (31071731); 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (201303024)

**E-mail: tbzm611@163.com

***通讯作者, E-mail: zf6131@263.net

收稿日期: 2013-10-08, 接受日期: 2013-11-16

proximal heme ligand signature of RIFSYGDTH. Blast analysis indicated that insect CAT proteins are very conservative; HaraxCAT has > 65% similarity to that of other insects. HaraxCAT had 75.25% similarity with the corresponding sequence of *Tribolium castaneum*, and phylogenetic analysis shows that it is most closely related to *T. castaneum* and *Protaetia brevitarsis*.

[Conclusion] Sequence analysis of the catalase gene from *H. axyridis* confirms that insect CAT protein are very conservative.

Key words *Harmonia axyridis*, catalase, gene cloning, sequence analysis

过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 与超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) 和过氧化物酶 (Peroxidase, POD) 共同组成昆虫抗氧化酶体系, 清除细胞体内的自由基。正常情况下, 这 3 种酶与超氧自由基处于一种动态平衡, 从而维持昆虫的正常生理活动不受体内的自由基毒害 (冯宏祖等, 2008)。相关研究表明昆虫保护酶系活性与杀虫剂、昆虫病毒、微孢子虫等外界刺激强度、昆虫耐药性和抗逆性等相关 (李周直等, 1994; Janković-Hladni *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2001), 杀虫剂和冷热刺激能够使昆虫体内保护酶系活力发生变化 (冯从经等, 2001; 王楠等, 2008; 朱建兰等, 2008; 陈常理等, 2010)。杀虫剂等处理昆虫后, 昆虫保护酶体系的活性因昆虫种类而异, 一般表现为中毒初期 CAT、SOD 和 POD 的活性上升, 并随着中毒程度的加重而逐渐上升, 接近死亡时又急剧下降 (李周直等, 1994; 吴青君等, 2011)。采用溴氰菊酯处理菜粉蝶 *Pieris rapae*、褐边绿刺蛾 *Parasa consocia* 和褐刺蛾 *Thosea pastornata* 的 CAT 活性先上升最后下降 (李周直等, 1994); 阿维菌素处理朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus* 后, CAT 活性上升 (冯宏祖等, 2008); 小菜蛾 *Plutella xylostella* 抗性种群 CAT 的活性低于敏感种群 (吴青君等, 2011), 表明昆虫酶系统的能量保守性, 即抗性昆虫维持高水平的酶活性是一个大量的耗能过程。

异色瓢虫 *Harmonia axyridis* (Pallas) 属鞘翅

目 Coleoptera 瓢虫亚科 Coccinellinae 瓢虫族 Coccinellini, 对蚜虫、叶螨、介壳虫等重要害虫具有很强的捕食能力, 目前作为一种重要的生物防治天敌, 在我国乃至全世界农林生产中广泛应用 (王小艺和沈佐锐, 2002; 江文娟等, 2007; 王甦等, 2007; 王延鹏等, 2007)。但是由于环境条件对其生存、繁殖等能力影响较大, 农业和林业的应用评价中会出现控害效果不明显或者不稳定的问题。因此, 很有必要开展异色瓢虫抗逆能力及机制方面的研究, 寻找提高和培育其高抗逆能力的途径, 并推广到“绿色食品”的生产中去。本文从异色瓢虫 CAT 基因克隆入手, 并从基因的序列特性方面加以分析, 以期深入研究其抗逆功能奠定基础, 并为异色瓢虫的大规模人工饲养和田间利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 异色瓢虫的饲养与材料收集 异色瓢虫采自浙江杭州下沙 (杭州师范大学下沙校区校园), 在 $(26 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ 、14L:10D 条件下室内连续多代饲养后作为试验材料。大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 菌株由杭州师范大学生命与环境科学学院保存。异色瓢虫材料收集时, 先取冰块放入直径 10 cm 培养皿中, 将异色瓢虫成虫或幼虫置于冰上, 在解剖镜下解剖, 用镊子取出脂肪体并将其置于 EP 管中后, 迅速转移到 -80°C 冰箱保存备用。

1.1.2 主要试剂 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit、AMV RTase 反转录酶、Taq DNA 聚合酶和 pMD18-T 载体均购自宝生物工程 (大连) 公司; DNA 纯化回收试剂盒购自 Omega 公司。PCR 引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.1.3 引物序列 根据已知昆虫 CAT 基因 cDNA 序列的保守结构域, 采用多重序列在线比对软件 (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin>

.html) 设计 3 对简并引物: CAT-DF1 和 CAT-DF2、CAT-DF3 和 CAT-DR1、CAT-DR2 和 CAT-DR3; 待获得正确的 CAT 基因中间片段序列后, 分别设计 3' 和 5' 端特异性引物各 3 对, 分别为: HaraxCAT-5RA、HaraxCAT-5RB、HaraxCAT-5RC、HaraxCAT-3FA、HaraxCAT-3FB 和 HaraxCAT-3FC (表 1)。

表 1 *HaraxCAT* 基因 cDNA 扩增的引物序列
Table 1 Cloning primers for *HaraxCAT* cDNA

扩增区域 PCR fragment	引物名称 Primer name	方向 Direction	类型 Type	核苷酸序列 (5'-3') Nucleotide Sequence (5'-3')
中间片段 Middle fragment	CAT-DF1	F	D	GAA GTN ACB CAY GAY ATC AC
	CAT-DF2	F	D	CAC NGA NGA YGG NAT BTG G
	CAT-DF3	F	D	AGA YGC NRA YAT GTT CTG G
	CAT-DR1	R	D	ATC NGG NGA TGG TTC AAT ACC
	CAT-DR2	R	D	ATG BGG CCA AAC YTT GGT
	CAT-DR3	R	D	GTC ATV ACY TGN ATG TAG
5'末端扩增序列 5'-RACE	HaraxCAT-5RA	R	G	CGG ACA CTT CAT AGC TTG TTC G
	HaraxCAT--5RB	R	G	GTC TCC TCT AGC AAT GGC
	HaraxCAT--5RC	R	G	CAG TTC CCC GGC TCT TTG GA
		F	A	AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT
3'末端扩增序列 3'-RACE	HaraxCAT--3FA	F	G	GGA ACCC TCA AAC CCA TCT G
	HaraxCAT--3FB	F	G	GCT GAT ATG TTC TGG GA
	HaraxCAT--3FC	F	G	AGG CCT GAA AGT ATC CA
		R	O	AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA C(T) ₃₀ VN

注: F: 正向; R: 反向; D: 简并引物; G: 特异性引物; A: 巢式通用引物; O: 3'末端扩增 cDNA 合成引物。

F: Forward; R: Reverse; D: Degenerate primer; G: Specific primer; A: Nested universal primer; O: 3'-RACE CDS primer.

1.2 异色瓢虫脂肪体总 RNA 的抽提

采用异硫氰酸胍法抽提异色瓢虫脂肪体的总 RNA (Tang *et al.*, 2008, 2010)。将 100 mg 脂肪体组织放入小匀浆器中, 加入 500 μ L 变性溶液 D (4 mol 异硫氰酸钠、25 mmol 柠檬酸钠、0.1 mol 巯基乙醇、0.5% 十二烷基肌氨酸钠) 充分匀浆, 匀浆后转移至 DEPC 处理过的 EP 管中, 加入 50 μ L 2 mol/L pH4.0 的乙酸钠溶液、500 μ L pH7.0 的饱和平衡酚和 100 μ L 氯仿/异丙醇(49:1)混合液, 颠倒混匀; 冰上放置 15 min 后, 4 $^{\circ}$ C 10 000 r/min 离心 20 min; 取上层水相至新的 EP 管中, 加入等体积异丙醇混匀, 20 $^{\circ}$ C 放置 1 h 以上, 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 15 min; 沉淀重溶于 100 μ L 变性溶液 D 中, 另加入 10 μ L pH4.0 的乙酸钠溶液和 300 μ L 乙醇混匀, 20 $^{\circ}$ C 放置 1 h 以上; 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 15 min, 将沉淀重溶于 30~50 μ L 的 DEPC 处理水中, -80 $^{\circ}$ C 冰箱长期保存 (唐斌等, 2010)。

1.3 cDNA 合成和 PCR 反应

用紫外分光光度计测定总 RNA 的浓度, 然后在 EP 管中依次加入 1 μ g 总 RNA、5 μ L 5 $\times$ buffer、2 μ L dNTP (10 mmol/ μ L)、1 μ L AMV RTase, DEPC 处理水补至 25 μ L。42 $^{\circ}$ C 水浴保温 1 h 后, 70 $^{\circ}$ C 水浴 10 min 以灭活 AMV RNase, 即获得一链 cDNA (Tang *et al.*, 2010)。第 1 次 PCR 采用 CAT-DF1 和 CAT-DR1 作为正反向引物, 采用以下程序运行: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 45 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 3 个循环; 然后 94 $^{\circ}$ C 30 s, 48 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 30 个循环。第 2 次 PCR 采用巢式 PCR

扩增, 将第 1 次 PCR 产物稀释 50~100 倍作为模板, 进行巢式扩增, 包括不同引物组合: CAT-DF2 和 CAT-DR2; CAT-DF2 和 CAT-DR3; CAT-DF3 和 CAT-DR2, PCR 扩增程序同第 1 次 (Tang *et al.*, 2008, 2010)。

1.4 DNA 纯化、连接、转化和验证

在异色瓢虫的 CAT 基因的克隆中, 利用巢式 PCR 引物 CAT-DF2 和 CAT-DR2 进行 PCR 扩增的产物, 琼脂糖凝胶电泳检测获得了 1 个约 500 bp 的条带, 将目的条带采用琼脂糖凝胶电泳回收后, 连接到 pMD18-T 载体中, 将其转入 DH5 α 细胞, 将验证后正确的转化子送上海英骏生物技术有限公司测序。

1.5 cDNA 的末端快速扩增 (RACE)

采用前期构建的异色瓢虫脂肪体组织的 5' 和 3'-RACE 文库作为模板 cDNA, 5'-RACE 扩增采用试剂盒中的 UPM 通用引物和 HaraxCAT-5RA, 巢式 PCR 时采用 NUP 和 HaraxCAT-5RB; 3'-RACE 扩增采用试剂盒中的 UPM 引物和 HaraxCAT-3FA, 巢式 PCR 时采用 NUP 和 HaraxCAT-3FB。PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 10 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 48 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 30 个循环。HaraxCAT-5RC 和 HaraxCAT-3FC 分别用于 5' 和 3'-RACE 的菌落 PCR 验证。

1.6 序列分析及系统学分析

序列分析和系统分析分别采用 Dnastar、Vector、Compute pI/Mw、ClustalW 和 MEGA5.05, 在线分析的网址为: http://expasy.org/tools/pi_tool。

* 资助项目: 国家“973”计划项目 (2012CB127605); 国家自然科学基金 (31071731); 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (201303024)

**E-mail: tbzm611@163.com

***通讯作者, E-mail: zf6131@263.net

收稿日期: 2013-10-08, 接受日期: 2013-11-16

html , <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> ,
<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/> 和
<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>。

2 结果与分析

2.1 异色瓢虫的 CAT 基因的克隆和序列分析

将测序获得的 500 bp 基因片段翻译成氨基酸序列,并在 NCBI 数据中进行 blast 分析,结果显示该基因为 CAT 家族基因,且与鞘翅目昆虫赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 的同源性最高(75%)。根据该基因序列,分别在 5'和 3'端设计了 3 条特异性引物。以异色瓢虫脂肪体的 5'和 3'-RACE 文库为模板,经两轮 PCR 扩增后,分别得到 750 bp 和 850 bp 左右的条带。将 5'和 3'-RACE 的测序结果和中间片段拼接后,获得了异色瓢虫 CAT 基因的 cDNA 序列,命名为 HaraxCAT。该基因全长为 1 871 bp,其可读框(ORF)长为 1 626 bp,编码 541 个氨基酸,软件分析并预测出该基因编码蛋白的分子量为 61.55 ku,等电点为 8.33。采用 TMHMM Server v. 2.0 和 SignalP 3.0 Server 在线分析,未发现跨膜结构和信号肽序列。采用 NetNGlyc 分析发现 HaraxCAT 蛋白拥有 3 个 N-糖基化位点,分别位于 11aa—13aa、310aa—312aa 和 445aa—447aa(图 1)。并且该基因包含了一个长达 18 个氨基酸的潜在的活性位点序列 FDRERIPERVVHAKGAGA 和血红素配体信号序列 RIFSYGDTH(Nair et al., 2011)。

2.2 昆虫的 CAT 基因同源性和进化分析

从不同目的昆虫挑选具有代表性的物种:埃及伊蚊 *Aedes aegypti* (AedaeCAT, CH478024)、意大利蜜蜂 *Apis mellifera* (ApimeCAT,

NM_001178069)、家蚕 *Bombyx mori* (BommoCAT, NM_001043447)、果蝇 *Drosophila mojavensis* (DromoCAT, XM_002009267)、褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (NilluCAT, HF549036)、异色瓢虫 (HaraxCAT, KC991026) 和赤拟谷盗 (TricaCAT, NM_001160240),用 Multiple 进行比对分析发现,昆虫的 CAT 蛋白高度保守,同源性高达 60%及以上(图 2)。

将异色瓢虫与这些昆虫已知的 CAT 蛋白序列进行比对,结果如下:赤拟谷盗,同源性为 75.25%;黄肢散白蚁 *Reticulitermes flavipes* (JX513905), 71.46%;人体虱 *Pediculus humanus corporis* (XM_002427665), 70.26%;致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* (XM_001848521), 70.0%;白星花金龟 *Protaetia brevitarsis* (EU072050), 69.7%;冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* (DQ980208), 69.05%;家蚕 *Bombyx mori* (NM_001043447), 69.03%;大红斑蝶 *Danaus plexippus* (AGBW01005158), 68.84%;果蝇 *Drosophila mojavensis* (XM_002009267), 68.77%;褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (HF549036), 68.76%;果蝇 *Drosophila pseudoobscura* (XM_001353451), 68.58%;果蝇 *Drosophila yakuba* (XM_002094829), 68.58%;沙漠蝗 *Schistocerca gregaria* (HQ851386), 68.52%;咸水按蚊 *Anopheles aquasalis* (HQ659100), 68.45%;埃及伊蚊 *Aedes aegypti* (CH478024), 68.32%;苜蓿切叶蜂 *Megachile rotundata* (XM_003702658), 68.23%;地中海实蝇 *Ceratitis capitata* (XM_004519049), 68.18%;甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (JN051294), 67.85%;果蝇 *Drosophila willistoni* (XM_002068007), 67.79%;斜纹夜蛾 *Spodoptera*

litura (JQ663444), 67.46% ; 佛罗里达弓背蚊 67.32% ; 玉带凤蝶 *Papilio polytes* (AK402495),
Camponotus floridanus (GL440100), 67.45% ; 山 67.26% ; 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*
 松甲虫 *Dendroctonus ponderosae* (KB740969), (JQ009332), 67.26% ; 印度跳蚁 *Harpegnathos saltator*

```

1  CAACATTGGAAGGTTTCTCTTCAAGTCACTGACAGTGACGGCATATGAGGAGGTTATGTTATCTGTTGTTCAATAATAAACTAGTTTGTGTTAGTCTACGATCAGTTGTTTCATAT
    M R R L C Y L L F N K T S F V L V L R S V C S Y
121 TCTTTGAAACAGGTAGAGGTATTGGAACAGATATCAAAACATGGCTAGCAGGGATCCCGCTTCTGACCAATTAATTCATATAAGGAAAAAGCAAGATGTATTACCACTCACTACT
    S L K Q V E V L E N R Y Q T M A S R D P A S D Q L I Q Y K E K A K N V L P A T T
241 GCACATGGTACCCAATCACAGATAAGGATGCAACTCTCACAGTTGGACGAAGAGGTCCAATCTTTTACACGATGTTCCCTTAATTGAGGAGCTTGCCCATTTCCGACAGAGAAAGAATA
    A H G T P I T D K D A T L T V G R R G P I L L H D V P L I E E L A H F D R E R I
361 CCGGAACGTGTTGCCACGCAAAAGAGCGGAGCATTGGGTATTTGAAGTAACACAGCATCACAAAATACACGAGAGCCAAAGGCTCTTCCCAATCGGGAAGAAAACCTCCAATA
    P E R V V H A K G A G A F G Y F E V T H D I T K Y T R A K V F S Q I G K K T P I
481 GCTGTACGGTCTCGACTGTTGGAGCGAGTCTGGATCCGCGGACACTGTCAGGACCCCTAGAGGTTTCGCTGTTAAATTTTACACAGAAGATGGAATCTGGGACTTGGTAGGAAATAAC
    A V R F S T V G G E S G S A D T V R D P R G F A V K F Y T E D G I W D L V G N N
601 ACACCAATTTCTTTATAAGAGATCCCATACTGTTCCCAAGTTTCATCCATACAAAAGAGGAACCCCTCAAACCATCTGAAAGATGCTGATATGTTCTGGGATTTTCTTACTTTAAGG
    T P I F F I R D P I L F P S F I H T Q K R N P Q T H L K D A D M F W D F L T L R
721 CCTGAAAGATGTCATCAAACTATGTTTTGTTTTCTGACCGTGGTATACCGGATGGTTATAGGCATATGAATGGTTATGGGTCTCATGCTTCAAACTGGTTAATAGTAATGGAGAATAT
    P E S I H Q T M F L F S D R G I P D G Y R H M N G Y G S H A F K L V N S N G E Y
841 TGTTTCTGAAATTCATTACAAAACAGATCAAGGCATAAAAAATTTGAATGTCCAAAGAGCCGGGGAAGTGGCTGTTTACAGCCCTGATTACAGTATAAGGGATTTGTACAATGCCATT
    C F C K F H Y K T D Q G I K N L N V Q R A G E L A G S D P D Y S I R D L Y N A I
961 GCTAGAGGAGATAATCCTTCTCGGACTTCTACATTCAAGTTATGACTAACGAACAAAGCTATGAAGTGTCCGTTCAATCCCTTTGATTAAACAAAGTTTGGTCGCATTCCGAATACCCA
    A R G D P S W T F Y I Q V M T N E Q A M K C P F N P F D L T K V W S H S E Y P
1081 CTTATACCAAGTTGGAATTTGTTTGAACAGAAATCCAGAAAATCTTGTCTGAAGTTGAACAGGTAGCTTTCTCTCCAGACATATGGTACCTGGTATTGAACCCCTCCCAAGATAAA
    L I P V G K L V L N R N P E N Y F A E V E Q V A F S P A H M V P G I E P S P D K
1201 ATGTTATTAGGTAGAATATTCTTATGGTGATACATAGACATCGTCTTGACCCAATTACTTGCAGTTGCCTGTAATTTGCTCTTCCGCACTGCTAATTACATAAGGGATGGCCCA
    M L L G R I F S Y G D T H R H R L G P N Y L Q L P V N C P F R T A N Y I R D G P
1321 TTTGTTATTCAATCAAGGTGCTGCCCTAATCATCAAAACAGTTTCTAGGACCACTAATGATACCGAAAAACAAATCTGCTCTCAGAGTCTATTAGTGGAGATGTCAACGT
    F V I H N Q G A A P N Y H P N S F L G P T D T E N K I L S S E S I S G D V K R
1441 TTTGATACTTGGGACGACGATAATTTTCTCAAGCAAGTATTTTCTATCGCAAAACATTAACAAATGAAGAAAGAGAAAGATTATTGAATAATATTGTTGAAACCTGAAAGATGCGTCA
    F D T W D D D N F S Q A S I F Y R K T L T N E E R E R L L N N I V G N L K D A S
1561 GATTTCATTCACTGAGAGCAGTCAAAATTTTCAGCCAGATTGATGTTTCATTGTTGTAAGAAATCGCTGAAGGCCTAAAATTACAAAGGAAGACCGTAGCAGCTTTGTAACATGTATG
    D F I Q L R A V K N F S Q I D V S F G E K I A E G L K L Q R K T V A A L *
1681 TTAATGTTACTGTTGTGAATAGTAGGTGTTTATTGAAAATGTTTACTGGACTAGGTTCTTAATAATAATGATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
  
```

图 1 异色瓢虫的 *CAT* 基因的核苷酸和氨基酸序列分析

Fig. 1 Nucleotide and amino acid sequences of *CAT* from *Harmonia axyridis*

注: 起始密码子 (ATG) 和终止密码子 (TAG) 采用斜体和加粗标记; 糖基化位点加框表示; 潜在的活性位点序列 FDRERIPERVVHAKGAGA 用加粗和双下划线表示; 血红素配体信号序列 RIFS YGDTH 和终止信号 AATAAA 采用加粗和下划线表示。

Italic and bold nucleotides indicate the start and stop codons, respectively. Potential N-glycosylation site is boxed. The proximal active sites signature is bold and double-lined. The proximal heme ligand signature of RIFS YGDTH and the termination signal of AATAAA are bold and underlined.

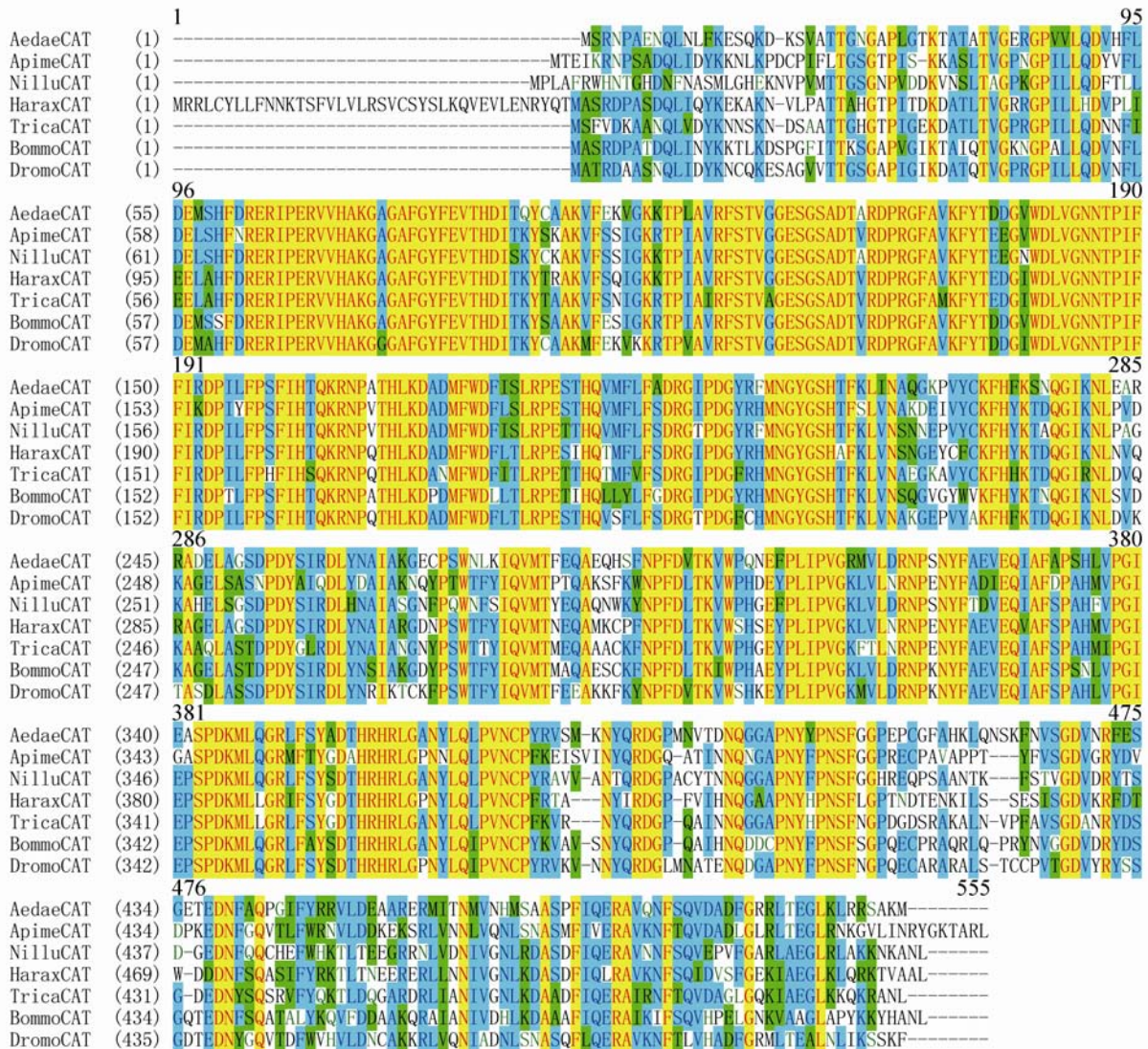


图2 不同目昆虫 CAT 基因编码蛋白序列的比对

Fig. 2 Alignment of the deduced amino acid sequences of CAT gene in insects

注：相关符号分别代表物种名缩写加基因名，如 HaraxCAT 代表异色瓢虫的 CAT 基因；其他分别为 AedaeCAT：埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)；DromoCAT：果蝇(*Drosophila melanogaster*)；NilluCAT：褐飞虱(*Nilaparvata lugens*)；TricaCAT：赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)；ApimeCAT：意大利蜜蜂(*Apis mellifera*)；BommoCAT：家蚕(*Bombyx mori*)。下同。The related letters represent the abbreviations of species name and gene name, such as HaraxCAT represents the CAT gene of *Harmonia axyridis*, and other else, AedaeCAT: *Aedes aegypti*; DromoCAT: *Drosophila melanogaster*; NilluCAT: *Nilaparvata lugens*; TricaCAT: *Tribolium castaneum*; ApimeCAT: *Apis mellifera*; BommoCAT: *Bombyx mori*. The same below.

(GL451712), 67.06% ; 意大利蜜蜂 *Apis mellifera* (NM_001178069), 66.47% ; 豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum*(XM_001943606), 66.07% ; 中国对虾 *Fenneropenaeus chinensis*(EU102287), 65.38% ; 日本沼虾 *Macrobrachium nipponense* (KC485002), 64.99%。图 3 的结果表明，在系

统进化上,CAT 蛋白能很好地区分昆虫的不同分 几个类群相对遗传距离较远。
类阶元,鞘翅目、膜翅目、双翅目、同翅目和鳞
翅目能够很好地区分出来,并且鞘翅目与其他的

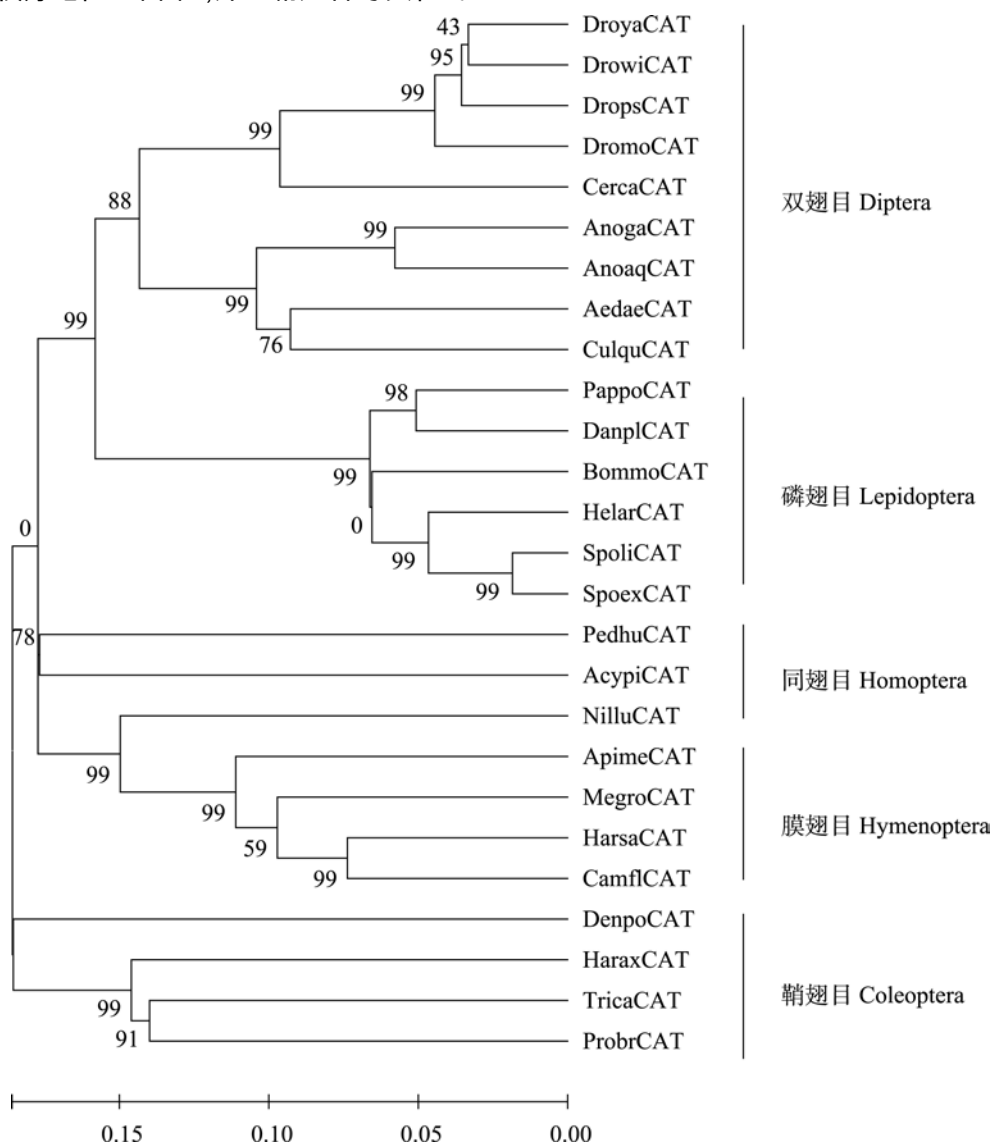


图3 异色瓢虫 CAT 与相关蛋白的系统进化分析
Fig. 3 HaraxCAT and other related CAT proteins

3 讨 论

自 1997 年起,过氧化氢酶就已经从植物、细菌、真菌和动物中发现并被报道 (Klotz *et al.*, 1997)。在昆虫中,许多相关的过氧化氢酶基因

已经被克隆和报道,如黑腹果蝇 (Orr *et al.*, 1990, 1996)、家蚕(Yamamoto *et al.*, 2005)、意大利蜜蜂(Corona and Robinson, 2006)、南极蚊 *Belgica antarctica* (Lopez-Martinez, *et al.*, 2008)、甜菜夜蛾(胡振等, 2011)和摇蚊虫 *Chironomus*

riparius (Nair *et al.*, 2011)。异色瓢虫的蛋白序列与其他昆虫序列非常相似,保守性都高达 65% 及以上,聚类分析结果显示不同目的昆虫能够很好地聚类在一起(图 3),表明相近昆虫之间的保守性更高(胡振等, 2011)。而且,昆虫 CAT 蛋白比对结果显示,异色瓢虫的 CAT 包含了两个标签性序列,分别为一个长达 18 个氨基酸的潜在的活性位点序列“FDRERIPERVVHAKGAGA”和血红素配体信号序列“RIFS YGDTH”,这与先前的报道相似(Nair *et al.*, 2011),不同的地方在于摇蚊虫中的血红素配体信号序列为“RLFS YGDTQ”。

抗氧化酶体系中的谷胱甘肽转移酶(Glutathione S-transferase)、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和过氧化物酶能够保护有机体免受自由基离子所产生的毒害,并帮助维持细胞的形态和正常代谢(Mackay and Bewley, 1989)。过氧化氢酶为一种包含血红素四聚物的酶,且作为关键的抗氧化酶存在于绝大多数生物中,保护细胞免受过氧化氢带来的毒害(Chance *et al.*, 1979; Nair *et al.*, 2011)。当果蝇体内的过氧化酶过量表达时,结果发现能够延长果蝇的寿命周期,并且如果把果蝇体内的 CAT 基因突变掉,会直接导致果蝇的死亡(Griswold *et al.*, 1993)。赵静等(2010)在对异色瓢虫的冷驯化研究过程中发现,在试验条件下 CAT 的活性随冷驯化时间的延长而增加。这表明短时间的低温驯化可以诱导昆虫体内相关保护酶系活性的变化,从而更加有利于适应不利环境,这为深入研究捕食性天敌昆虫的 CAT 在逆境条件下的功能提供了可能。

参考文献 (References)

- Chance B, Sies H, Boveris A, 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.*, 59(3): 527–605.
- Corona M, Robinson GE, 2006. Genes of the antioxidant system of the honeybee: annotation and phylogeny. *Insect Mol. Biol.*, 15(5): 687–701.
- Griswold CM, Matthews AL, Bewley KE, Mahaffey JW, 1993. Molecular characterization and rescue of acatalasemic mutants of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 134(3): 781–788.
- Janković-Hladni M, Ivanović J, Spasić MB, Blagojević D, Perić-Mataruga V, 1997. Effect of the host plant on the antioxidative defence in the midgut of *Lymantria dispar* L. caterpillars of different population origins. *Journal of Insect Physiology*, 43(1): 101–106.
- Klotz MG, Klassen GR, Loewen PC, 1997. Phylogenetic relationships among Prokaryotic and eukaryotic catalases. *Mol. Biol. Evol.*, 14(9): 951–958.
- Lopez-Martinez G, Elnitsky MA, Benoit JB, Lee RE, Denlinger DL, 2008. High resistance to oxidative damage in the Antarctic midge *Belgica Antarctica*, and developmentally linked expression of genes encoding superoxide dismutase, catalase and heat shock protein. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38(8): 796–804.
- Mackay M, Bewley GC, 1989. The genetics of catalase in *Drosophila melanogaster*: isolation and characterization of a catalase mic mutants. *Genetics*, 22(3): 643–652.
- Nair PM, Park SY, Choi J, 2011. Expression of catalase and glutathione S-transferase genes in *Chironomus riparius* on exposure to cadmium and nonylphenol. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 4(4): 399–408.
- Orr EC, Bewley GC, Orr WC, 1990. cDNA and deduced amino acid sequence of *Drosophila catalase*. *Nucleic Acids Research*, 18(12): 3663.
- Orr WC, Orr EC, Legan SK, Sohal RS, 1996. Molecular analysis of the *Drosophila* catalase gene. *Arch. Biochem. Biophys.*, 330(2): 251–258.
- Tang B, Chen J, Yao Q, Pan ZQ, Xu WH, Wang SG, Zhang WQ, 2010. Characterization of a trehalose-6-phosphate synthase gene from *Spodoptera exigua* and its function identification through RNA interference. *Journal of Insect Physiology*, 56(7): 813–821.
- Tang B, Chen XF, Liu Y, Tian HG, Liu J, Hu J, Xu WH, Zhang WQ, 2008. Characterization and expression patterns of a membrane-bound trehalase from *Spodoptera exigua*. *BMC Molecular Biology*, 9: 51.
- Wang Y, Oberley LW, Murhammer DW, 2001. Evidence of oxidative stress following the viral infection of two lepidopteran insect cell lines. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(11): 1311–1318.

- 1448–1455.
- Yamamoto K, Banno Y, Fujii H, Miake F, Kashige N, Aso Y, 2005. Catalase from the silkworm, *Bombyx mori*: gene sequence, distribution, and overexpression. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35(4): 277–283.
- 陈常理, 韦茂兔, 李明江, 沈福泉, 杨重卫, 吕仲贤, 郑许松, 徐红星, 2010. 温度对 B 型烟粉虱存活率和保护酶系的影响. *浙江农业科学*, (4): 853–857. [CHEN CL, WEI MT, LI MJ, SHEN FQ, YANG CW, LV ZX, ZHENG XS, XU HX, 2010. Effect of temperature on survival rate and protective enzymes of *Bemisia tabaci* biotype B in Poinsettia. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, (4): 853–857.]
- 冯从经, 戴华国, 武淑文, 2001. 褐飞虱高温条件下应激反应及体内保护酶系活性的研究. *应用生态学报*, 12(3): 409–413. [FENG CJ, DAI HG, WU SW, 2001. Stress response of *Nilaparvata lugens* at high temperature and activities of its protective enzyme systems. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 12(3): 409–413.]
- 冯宏祖, 刘映红, 何林, 陆蕊娥, 杨大兴, 2008. 阿维菌素和温度胁迫对朱砂叶螨自由基及保护酶活性的影响. *植物保护学报*, 35(6): 530–536. [FENG HZ, LIU YH, HE L, LU RE, YANG DX, 2008. Effects of abamectin and temperature stresses on free radicals and protective enzyme activities in *Tetranychus cinnabarinus*. *Acta Phytophylogica Sinica*, 35(6): 530–536.]
- 胡振, 左洪亮, 李亚楠, 黄劲飞, 胡美英, 2011. 甜菜夜蛾过氧化氢酶 cDNA 序列克隆序列分析和表达特征. *昆虫学报*, 54(11): 1249–1257. [HU Z, ZUO HL, LI YN, HUANG JF, HU MY, 2011. Cloning, sequence analysis and expression profiling of cDNA coding for catalase from the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 54(11): 1249–1257.]
- 江文娟, 李桂亭, 李鹏, 卢申, 2007. 异色瓢虫成虫对桃蚜捕食作用及空间异质性研究. *安徽农业科学*, 35(16): 4750–4751. [JIANG WJ, LI GT, LI P, LU S, 2007. Predation and Spatial Heterogeneity on *Harmonia axyridis* Adult to *Myzus persicae*. *Journal of Anhui*, 35(16): 4750–4751.]
- 李周直, 沈惠娟, 蒋巧根, 嵇保中, 1994. 几种昆虫体内保护酶系统活力的研究. *昆虫学报*, 37(4): 399–403. [LI ZZ, SHEN HJ, JIANG QG, JI BZ, 1994. A study on the activities of endogenous enzymes of protective in some insects. *Acta Entomologica Sinica*, 37(4): 399–403.]
- 唐斌, 王世贵, 王峰巍, 庞虹, 张帆, 2010. 异色瓢虫的 HSP90 基因的克隆与特性分析. *中山大学学报(自然科学版)*, 49(2): 72–78. [TANG B, WANG SG, WANG FW, PANG H, ZHANG F, 2010. Cloning and characterization analysis of heat shock protein 90 Gene from *Harmonia axyridis* (Pallas). *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunatseni*, 49(2): 72–78.]
- 王楠, 张志春, 王满囤, 吴胜兵, 李慧, 张国安, 2008. 腐胺对小菜蛾幼虫生长及保护酶活力的影响. *昆虫知识*, 45(4): 573–576. [WANG N, ZHANG ZC, WANG MK, WU SB, LI H, ZHANG GA, 2008. Effects of putrescine on development and activities of protective enzymes of diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Chinese Bulletin of Entomology*, 5(4): 573–576.]
- 王甦, 张润志, 张帆, 2007. 异色瓢虫生物生态学研究进展. *应用生态学报*, 18(9): 2117–2126. [WANG S, ZHANG RZ, ZHANG F, 2007. Research progress on biology and ecology of *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae). *Chinese Journal of Applied Ecology*, 18(9): 2117–2126.]
- 王小艺, 沈佐锐, 2002. 异色瓢虫的应用研究概况. *昆虫知识*, 39(4): 255–261. [WANG XY, SHEN ZR, 2002. Progress of applied research on multicolored Asian ladybird beetle. *Entomological Knowledge*, 39(4): 255–261.]
- 王延鹏, 吕飞, 王振鹏, 2007. 异色瓢虫开发利用研究进展. *华东昆虫学报*, 16(4): 310–314. [WANG YP, LV F, WANG ZP, 2007. Progress of *Harmonia axyridis* (Pallas) utilization. *Entomological Journal of East China*, 16(4): 310–314.]
- 吴青君, 张友军, 徐宝云, 张文吉, 2011. 保护酶系在小菜蛾对阿维菌素抗性中的作用. *应用昆虫学报*, 48(2): 291–295. [WU QJ, ZHANG YJ, XU BY, ZHANG WJ, 2011. The defending enzymes in abamectin resistant *Plutella xylostella*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(2): 291–295.]
- 赵静, 陈珍珍, 曲建军, 张帆, 印象初, 许永玉, 2010. 异色瓢虫成虫冷驯化反应及体内几种酶活力的相关变化. *昆虫学报*, 53(2): 147–153. [ZHAO J, CHEN ZZ, QU JJ, ZHANG F, YIN XC, XU YY, 2010. Responses of *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) Adults to cold acclimation and the related changes of activities of several enzymes in their bodies. *Acta Entomologica Sinica*, 53(2): 147–153.]
- 朱建兰, 王国利, 刘谨, 张自和, 2008. 四脊裸胞壳 Dh 菌株侵染对钩麦蛾幼虫体内保护酶的影响. *草地学报*, 16(2): 121–125. [ZHU JL, WANG GL, LIU J, ZHANG ZH, 2008. The protective enzyme activities of the larva of *Aproaerema anthylidella* hübner infected by *Emericella quadrilineata* Dh strain. *Acta Agrestia Sinica*, 16(2): 121–125.]