大豆食心虫储存蛋白 *hexamerin* 基因的克隆与表达分析*

臧振原** 贾宝辉 李涵哲 李 娜 孟凡立 李文滨***

（东北农业大学农学院 大豆生物学教育部重点实验室 哈尔滨 150030）

摘 要 **【目的】** 储存蛋白是昆虫发育、变态和生殖过程中氨基酸的主要来源， Hexamerin 是储存蛋白家族重要成员，在昆虫的生长发育中起着重要作用。为了研究 *hexamerin* 基因（*SpbHex*）在大豆食心虫 *Leguminivora glycinivorella* Matsumurav 生长发育过程中的作用，对大豆食心虫 *SpbHex* 基因进行克隆与表达分析。**【方法】** 利用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆 *SpbHex* 的 cDNA 全长序列，并通过 qPCR 研究其在不同发育阶段和幼虫不同组织的表达情况。**【结果】** *SpbHex* 基因 cDNA 序列全长 2 161 bp，其中开放阅读框 2 112 bp，编码 703 个氨基酸。蛋白预测分子量 84.15 ku。*hexamerin* 基因在大豆食心虫不同发育阶段和不同组织中均有表达。在不同生长发育阶段中 4 龄幼虫的表达量较高，1 龄和成虫的表达量较低；在不同组织中脂肪体的表达量较高，表皮中的表达量最低。**【结论】** 本研究克隆了大豆食心虫储存蛋白 *hexamerin* 基因，并对其在大豆食心虫中表达模式进行分析，为进一步明确 *hexamerin* 基因在大豆食心虫生长发育中的作用奠定基础。

关键词 大豆食心虫，*hexamerin* 基因，基因克隆，表达分析

Molecular cloning and expression analysis of the *SpbHex* (*hexamerin* gene) in soybean pod borer (*Leguminivora glycinivorella* Matsumurav)

ZANG Zhen-Yuan** JIA Bao-Hui LI Han-Zhe LI Na MENG Fan-Li LI Wen-Bin***

(Key Laboratory of Soybean Biology, Ministry of Education, School of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract **[Objectives]** In insects, Storage Superfamily Proteins (SSPs) accumulate apparently to serve as sources of amino acids during metamorphosis, reproduction and development. Hexamerins are important SSPs. In order to study the function of the *hexamerin* gene in the development of soybean pod borer, the gene was cloned and its expression analyzed. **[Methods]** The full length of the cDNA sequence of the soybean pod borer *hexamerin* gene (*SpbHex*) was amplified using the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE). The expression of *SpbHex* in all developmental stages and tissues was analyzed using Realtime quantitative PCR. **[Results]** A soybean pod borer gene encoding *hexamerin* (*SpbHex*) was cloned. The full length of *SpbHex* was 2 161 bp with an open reading frame (OFR) of 2 112 bp. The ORF of *SpbHex* encodes a protein of 703 amino acids with a predicted molecular mass of approximately 84.15 ku. RT-PCR analyses indicates that *SpbHex* was expressed in all development stages, with the highest expression in fourth instar

* 资助项目：国家自然科学青年基金（31201229）；中国博士后科学基金（2012M510914）；黑龙江省博士后基金（LBH-Z11223）；黑龙江省普通高等学校青年学术骨干支持计划项目（1253G008）；黑龙江省教育厅科技项目（10531012）；东北农业大学博士启动基金（2012RCB07）

**E-mail: zhenyuanzang1989@163.com

***通讯作者，E-mail: wenbinli@yahoo.com

收稿日期：2013-11-26，接受日期：2014-01-05

larvae and the lowest in first instar larvae and adults. Meanwhile, RT-PCR analyses indicates high quantities of *SpbHex* transcript in the fat body and low amounts in the cuticle. **[Conclusions]** The *hexamerin* gene of the soybean pod borer was cloned and its transcription profiles determined in all developmental stages and tissues. The present findings lays the foundation for further study of the function of *SpbHex* in the development of the soybean pod borer.

Key words soybean pod borer, *hexamerin* gene, gene clone, expression analysis

大豆食心虫 *Leguminivora glycinivorella* Matsumurav 属于昆虫纲鳞翅目（Lepidoptera）小卷蛾科（Olethreutidae），俗称大豆蛀荚虫、小红虫、大豆害虫，在东北大豆产区发生比较严重（刘洋等，2005），每年 7 月末 8 月初大豆食心虫的成虫将卵产于豆荚表面，初孵幼虫仅在豆荚表面爬行 8 h 左右寻找到合适的位点，然后幼虫钻入豆荚内食豆粒，9 月中旬老熟幼虫钻出豆荚，在土内筑茧越冬，翌年 7 月末 8 月初化蛹羽化成成虫。幼虫钻蛀豆荚，将豆粒咬成沟道或残破状，严重影响大豆产量和品质，由于大豆食心虫在豆荚表面停留时间比较短，所以很难用化学杀虫剂进行防治，因此需要寻找一种新的防治方法。大豆食心虫是一种典型的滞育昆虫，滞育期长达 10 个月之久，因此在该虫滞育期间储存蛋白可能是维持其生命的关键基因，到目前为止，对大豆食心虫储存蛋白基因的相关研究还未见报道。

全变态昆虫幼虫在变态发育开始之前，其血淋巴和脂肪体等组织中有一类特殊蛋白家族大量表达，这类蛋白被称为储存蛋白（Storage protein，SP）（冯从经等，2010）。大豆食心虫的储存蛋白 Hexamerin 通常在幼虫脂肪体内合成，然后分泌到血淋巴中，化蛹前在血淋巴中积累或再次被蛹脂肪体吸收并形成蛋白颗粒（Kanost *et al.*，990）。当昆虫进行变态发育、繁殖和产卵等活动时，体内需要大量氨基酸，这时储存在脂肪体中的储存蛋白 Hexamerin 就会迅速分解以补充氨基酸（Wheelerhr and Martínez，1995；Zhu *et al.*，2002）。因此，储存蛋白在昆虫氨基酸的供给与代谢需求之间提供了一个重要的缓冲环节（马彩霞，2002；Hahn *et al.*，2008；Hathaway *et al.*，2009）。另外，某些储存蛋白还可以作为载体，结合和转运昆虫蜕皮甾醇（Ecdysteroid）及保幼激素（Juvenile hormone，JH）（Tawfik *et al.*，2006）。富含甲硫氨酸的储存蛋白还在成虫期卵黄蛋白合成和卵形成中起关键作用（Ashfaq *et al.*，2007），在蜜蜂中这类储存蛋白又被称为卵黄原蛋白，与蜜蜂的生殖发育以及寿命长短有重要的相关性（李继莲等，2009）。Tang 等（2010）利用 RNA 干扰技术沉默了在甜菜夜蛾 *Laphygma exigua* 中的储存蛋白，导致幼虫的死亡率达到 70%~80%，明显高于对照组。上述研究成果均表明储存蛋白是变态发育昆虫的重要基因，研究储存蛋白的表达调控，有助于阐明其在昆虫繁殖、生长和发育中的功能。

因此，本文根据 GenBank 上已经发表的昆虫储存蛋白 Hexamerin 蛋白质序列，利用其蛋白的保守区域，克隆大豆食心虫 *hexamerin*（*SpbHex*）基因的全长序列，利用荧光定量 PCR 对大豆食心虫不同生育时期和幼虫中不同组织的 *SpbHex* 基因的表达量进行分析，为进一步利用 RNA 干扰技术防治大豆食心虫奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

大豆食心虫为 2011 年采自东北农业大学香坊农场实验基地，从大豆田间出现大豆食心虫成虫开始，收集成虫、1 龄、2 龄、3 龄和 4 龄幼虫，将收集的虫样分别放入无 RNase 的 EP 管中，立即放入液氮中冷冻，然后存于－80℃低温冰箱，每个处理重复 3 次。选取 4 龄幼虫剖取神经节、表皮、中肠和脂肪体组织后，分别放入无 RNase 的 EP 管中，立即放入－80℃低温冰箱中保存。

1.2 主要试剂

总 RNA 提取试剂盒购自康为世纪生物科

技有限公司，反转录 Quantscript RT Kit 和 SuperReal PreMix （SYBR Green）购自天根生物科技有限公司，OMEGA 小剂量胶回收试剂盒购自 Omega 公司，*ExTaq* DNA 聚合酶、*LATaq* DNA 聚合酶、dNTP、DNA Marker、3' RACE Kit 购自 TaKaRa 公司，5'RACE Kit 购自 Clontech 公司，引物合成及测序均由上海生工生物工程公司完成。

1.3 总 RNA 提取及 cDNA 合成

取 20 头大豆食心虫幼虫置于研磨器中，加 RNA 提取液 1 mL，研磨后按试剂盒说明书提取总 RNA，经电泳检测后根据反转录试剂盒说明书进行反转录反应获得第一链 cDNA。

1.4 大豆食心虫 *hexamerin* 基因全长 cDNA 序列的克隆

根据 GenBank 上已经发表鳞翅目昆虫的棉铃虫（*Helicoverpa armigera*，登录号 JN315688.1）、柑橘凤蝶（*Papilio xuthus*，登录号 AK401096.1）、家蚕（*Bombyx mori*，登录号 JQ043182.1）、小菜蛾（*Plutella xylostella*，登录号 AB253735.1）、大蜡螟（*Galleria mellonella*，登录号 M73793.1）的 *hexamerin* 序列的保守区域设计简并引物（hexF1 与 hexR1），用 Touchdown-PCR 扩增大豆食心虫 *hexamerin* 基因的特异片段。Touchdown-PCR 程序设计如下 95℃预变性 5 min; 然后 95℃变性 30 s，62~57℃退火 30 s，每循环降低 0.5℃，72℃延伸 30 s，共 10 个循环，然后按 95℃变性 30 s，55℃退火 30 s，72℃延伸 30 s，进行 25 次循环，最后 72℃延伸 7 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后，切下扩增目的条带，利用 OMEGA 胶回收试剂盒回收纯化，然后克隆于 pGEM-T Easy 载体，培养后送样测序（上海生工生物工程公司）。

引物具体如下：hexF1：CGAACCGGTCCGTGGYAYGAYCAYA；

hexR1：GCATTACCCTAACATCGTCGATNGCDATRTC。

根据测序获得的大豆食心虫 *hexamerin* 基因特异序列，设计了 hex5out 和 hex5in 基因特异性引物结合 5' RACE Kit 中的 5'Outer 与 5'Inner 引物用于 5' RACE 反应，设计了 hexF3out 与 hexF3in 引物结合 3'RACE Kit 中的 3'Outer 与 3'Inner 引物用于 3'RACE 反应。按照试剂盒说明书进行大豆食心虫 *hexamerin* 基因的 3'和 5'末端序列扩增，然后将 RACE PCR 产物进行切胶回收纯化，克隆于 pGEM-T Easy 载体，培养后送样测序。将 3'RACE、5' RACE 获得的序列和 *hexamerin* 基因特异序列进行拼接，得到大豆食心虫 *hexamerin* 基因的全长 cDNA 序列，根据拼接结果设计特异性引物（hexfF 和 hexfR）扩增大豆食心虫 *hexamerin* 基因 cDNA 的全长序列，进行序列验证。

引物具体如下：hexF3out: ATTTGGAACCAGGATGAAATGCATGATTTG；

hexF3in：ATACGTCCAAGGTGTGCTAGTCGTGATGCTG；

hex5out：TCTGGGGCTGGTAGAAGAACCTCTCGGA；

hex5in：GAAGGGCTTGTGGTTGAGACGGGGCTGA；

hexfF：AAGATGAAGACTGTCCTGAT；

hexfR：GAAGGGCTTGTGGTTGAGACGGGGCTGA。

1.5 序列分析

利用 NCBI 的 Blast 软件进行序列相似性比较；利用 NCBI 的 ORF finder 进行 ORF 和蛋白质序列预测；用 DNAMAN6.0 进行蛋白质分子量和等电点的预测；用 MEGA5.0 软件中的 Neighbor-joining 法进行系统进化树分析。

1.6 大豆食心虫 *hexamerin* 基因表达分析

1.6.1 不同龄期 *hexamerin* 基因表达量的检测

利用 RNA 提取试剂盒提取大豆食心虫成虫、1 龄、2 龄、3 龄和 4 龄幼虫 5 个时期的总 RNA，反转录为 cDNA 作为荧光定量 PCR 检测的模

板。以大豆食心虫 *actin* 基因作为内参基因，用定量引物（qhexF，qhexR，qActin-F，qActin-R）进行 PCR 扩增，qPCR 程序设计如下 95℃预变性 15 min，95℃变性 10 s，60℃退火 20 s，72℃延伸 20 s，40 个循环，最后以每 1 s 上升 1℃的速度从 60℃上升至 95℃记录溶解曲线，每个虫期设 3 个生物学重复，每个生物重复包含 3 头虫子，每个样品设 3 个技术重复。反应结束后收集循环数阈值（Cycle threshold，Ct 值），采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法进行数据分析，根据 Klein（2002）的研究，荧光定量 PCR 的扩增效率应在 90%~110%之间，选取 *actin* 基因和 *hexamerin* 基因扩增效率均>95% 的数据进行分析。

引物如下：qhexF：GGTCCCAAATACGACAGCAATG；

qhexR：AACAGGGCGAAGTCAGTAGAGT；

qActin-F：GGCGACATAGCACAGCTTCT；

qActin-R：ATCCTCCGTCTGGACCTTGGC。

1.6.2 幼虫不同组织 *hexamerin* 基因表达量的检测 选取大豆食心虫 4 龄幼虫进行解剖，剖取神经节、表皮、中肠和脂肪体组织后迅速置于液氮中，提取总 RNA 后进行荧光定量 PCR（方法同 1.6.1）。

2 结果与分析

2.1 大豆食心虫 *hexamerin* 基因全长 cDNA 的克隆与分析

以大豆食心虫 cDNA 第一条链为模板，根据鳞翅目昆虫 Hexamerin 蛋白序列的保守区域设计的简并引物进行 PCR 扩增，得到 527 bp 的大豆食心虫 *hexamerin* 基因特异片段。通过 3'和 5' RACE 分别得到 841 bp 和 1 861 bp 末端序列，经拼接后获得 2 161 bp 的大豆食心虫 *hexamerin* 基因全长 cDNA 序列。根据拼接序列结果设计特异性引物扩增大豆食心虫的 *hexamerin* 基因全长 cDNA 序列，PCR 扩增获得 2 000 bp 左右的特异性目条带（图 1），测序结果与原序列拼接结果完全一致。

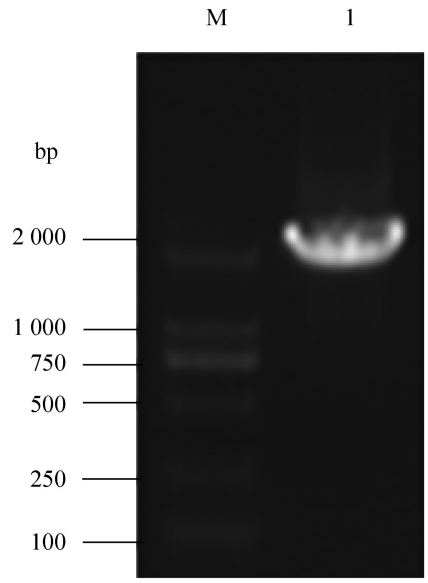

图 1 大豆食心虫 *hexamerin* 基因的 PCR 扩增
Fig. 1 PCR amplification of a *hexamerin* gene from soybean pod borer

M: DNA 分子标准物（DL2000）；1: PCR 扩增产物。
M: Molecular weight (DL2000); 1: Amplification product of *hexamerin* gene.

大豆食心虫 *hexamerin* 基因命名为 *SpbHex*，GenBank 登录号为 KF687948。*SpbHex* 基因全长 2 161 bp，其中开放阅读框 2 112 bp， 编码 703 个氨基酸的蛋白（图 2），预测分子量 84.15 ku，理论等电点 5.63。

利用 NCBI 的 Blast 软件对 *SpbHex* 序列进行相似性分析，发现其与其他鳞翅目昆虫 *hexamerin* 基因具有很高的同源性，其中与棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 的同源性最高达到 90%以上，与菜粉蝶 *Pieris rapae*、大蜡螟 *Galleria mellonella*、柑橘凤蝶 *Papilio xuthus*、家蚕 *Bombyx mori* 的 *hexamerin* 基因序列同源性也达到 80%以上。

采用 MEGA5.0 软件利用相邻连接法 NJ（Neighbor-joining method）构建系统进化树，结果表明，*SpbHex* 基因和鳞翅目棉铃虫

Helicoverpa armiger 的亲缘关系较近，分布在同

```
1    atgaagactgtcctgatcctagctgctgtcgtggccctcgcggtcgcgggtactgttccgcacaaacatgaggtggggctgaagtctgtt
1     M  K  T  V  L  I  L  A  A  V  V  A  L  A  V  A  G  T  V  P  H  K  H  E  V  G  L  K  S  V
91   gatgctcattacattgagcatcaaactaaagtcatcgaccttctcgagagcatcggacagtacagaaaggacgccgattggttcaagctt
31    D  A  H  Y  I  E  H  Q  T  K  V  I  D  L  L  E  S  I  G  Q  Y  R  K  D  A  D  W  F  K  L
181  ggctacgaatacgatgtcgaggctaacattgacaactacaccaacaagaaggccgtcgaggagttcctcgtgtactacaagagcggtttc
61    G  Y  E  Y  D  V  E  A  N  I  D  N  Y  T  N  K  K  A  V  E  E  F  L  V  Y  Y  K  S  G  F
271  atgcccaagtacaagactttctccgtcttctacgatgaaatgagggaggaggccatcgctctcttcaagctcttctactacgctaaggac
91    M  P  K  Y  K  T  F  S  V  F  Y  D  E  M  R  E  E  A  I  A  L  F  K  L  F  Y  Y  A  K  D
361  ttcgagaccttctacaagaccgccgccttcgcccgcgtgcactgcaacgatggccagttcctctacgcctactacatcgccatctaccaa
121   F  E  T  F  Y  K  T  A  A  F  A  R  V  H  C  N  D  G  Q  F  L  Y  A  Y  Y  I  A  I  Y  Q
451  cgccctgacacccagaccctcgtgctccccgctccgtacgagatgttccctcagtacttcgtcaacaccaagactttcctgaaggcatac
151   R  P  D  T  Q  T  L  V  L  P  A  P  Y  E  M  F  P  Q  Y  F  V  N  T  K  T  F  L  K  A  Y
541  cgcactaagatgcagcacggcgacttcgaccccgcctatgtcgccacccacggcatctaccacgagaacggcaaatacgtcttctactcc
181   R  T  K  M  Q  H  G  D  F  D  P  A  Y  V  A  T  H  G  I  Y  H  E  N  G  K  Y  V  F  Y  S
631  aactacaccagcccctggttgaccggcagcgttgaggacaagctttcctacttcaccgaggacattggcatgaactcctactactactac
211   N  Y  T  S  P  W  L  T  G  S  V  E  D  K  L  S  Y  F  T  E  D  I  G  M  N  S  Y  Y  Y  Y
691  ttccagatcctctacccttctggtggaaagagaacagcatccctcacttcgacgagatgcgtggagactacttctacttcttctaccaa
241   F  Q  I  L  Y  P  F  W  W  K  E  N  S  I  P  H  F  D  E  M  R  G  D  Y  F  Y  F  F  Y  Q
811  cagcttattgctcagtactacctgaaccgtctcagcaacggacttggagagatccctgaattctcgtggtacaagcccatcgagaccggt
271   Q  L  I  A  Q  Y  Y  L  N  R  L  S  N  G  L  G  E  I  P  E  F  S  W  Y  K  P  I  E  T  G
901  tactactgccagctgtccacttactatcccttcttctcgagaaacgaatactaccacatcaacaaggttgaaaacgaccagtacattcag
301   Y  Y  C  Q  L  S  T  Y  Y  P  F  F  S  R  N  E  Y  Y  H  I  N  K  V  E  N  D  Q  Y  I  Q
991  taccttagcaactacgagcagtctttcctgtactacttggagcaaggccacttcaaggcttacaaccaagagattgacctgcgcaactcc
331   Y  L  S  N  Y  E  Q  S  F  L  Y  Y  L  E  Q  G  H  F  K  A  Y  N  Q  E  I  D  L  R  N  S
1081 aaggccatcgacttcgtctccaaatactggttcaccaccgtcgacttgtacgaaaagatgcccaagaactacgaacgtttctacgaagtt
361   K  A  I  D  F  V  S  K  Y  W  F  T  T  V  D  L  Y  E  K  M  P  K  N  Y  E  R  F  Y  E  V
1171 atcggtcttcacctcctctctgccactcctgagcccactgacaaatacaccatcttccccagcgctctggagctgcaccagacctctctg
391   I  G  L  H  L  L  S  A  T  P  E  P  T  D  K  Y  T  I  F  P  S  A  L  E  L  H  Q  T  S  L
1261 cgcgaccccatgttctaccagttctacgctcgcatcctgaactacttcctccaatggaaagagtacctcgaaccctacagctacagccat
421   R  D  P  M  F  Y  Q  F  Y  A  R  I  L  N  Y  F  L  Q  W  K  E  Y  L  E  P  Y  S  Y  S  H
1351 ctccacttcgagggtgtcaagatcaacgacgtcaaggttgacaagctggtcactttcttcgagccctacgactttgacatcaccaacgac
451   L  H  F  E  G  V  K  I  N  D  V  K  V  D  K  L  V  T  F  F  E  P  Y  D  F  D  I  T  N  D
1441 ctcttccacagtgttgaggagttcaagagtaacgaccccaacatctacgctgtccgtcagccccgtctcaaccacaagcccttcaccgtc
481   L  F  H  S  V  E  E  F  K  S  N  D  P  N  I  Y  A  V  R  Q  P  R  L  N  H  K  P  F  T  V
1531 accgtcgatgtcaagtctgacgtcgctaccgacgccgtgttcaagatcttcctgggtcccaaatacgacagcaatggctatcctcttaac
511   T  V  D  V  K  S  D  V  A  T  D  A  V  F  K  I  F  L  G  P  K  Y  D  S  N  G  Y  P  L  N
1621 attgaagacaactggatgaacttcgtcgagcttgactggttcgtacacaagcttaccgttggacagaacaagatcgaccgtcactctact
541   I  E  D  N  W  M  N  F  V  E  L  D  W  F  V  H  K  L  T  V  G  Q  N  K  I  D  R  H  S  T
1711 gacttcgccctgttcaaggaagactccgtgtctgttatggacctcttgaaatacttcaaacaaggaaaggtccctgttgatatgtccgag
571   D  F  A  L  F  K  E  D  S  V  S  V  M  D  L  L  K  Y  F  K  Q  G  K  V  P  V  D  M  S  E
1801 aggttcttctaccagccccagagaatgatgctgcctaagggtaccaagggtggcttccccttccagctgtacgtcgtcgtctacccccac
601   R  F  F  Y  Q  P  Q  R  M  M  L  P  K  G  T  K  G  G  F  P  F  Q  L  Y  V  V  V  Y  P  H
1891 actcctctgcctcagggttgggaactgttgaaggcttacttccccgacatgaagcccatgtcctacccccttcgaccgccccgtgtacgag
631   T  P  L  P  Q  G  W  E  L  L  K  A  Y  F  P  D  M  K  P  M  S  Y  P  F  D  R  P  V  Y  E
1981 acctacttcaagcagcccaacatctaccacgaggatgtgttcatctaccacgagggcgagctgaccgccaactttacaacgtgcaggag
661   T  Y  F  K  Q  P  N  I  Y  H  E  D  V  F  I  Y  H  E  G  E  L  T  A  N  F  Y  N  V  Q  E
2071 tactaccccaactacaagaaccaggttcccaagcattaa
691   Y  Y  P  N  Y  K  N  Q  V  P  K  H  *
```

图 2　*SpbHex* 核苷酸序列及预测的氨基酸序列
Fig. 2　Nucleotide and deduced amino acid sequences of *SpbHex*

一分支，与鞘翅目的黄粉虫 *Tenebrio molitor* 亲缘关系较远，处于不同分支（图 3）。采用 MEGA5.0 软件利用 ME 和 MP 法构建的系统进化树，其中 ME 构建的系统进化树与相邻连接法 NJ 完全一致，MP 构建的系统进化树除部分置信度存在差异，其他也完全一致。

2.2　*SpbHex* 基因的表达模式分析

为了确定 *SpbHex* 基因在大豆食心虫不同发育时期和不同组织的表达情况，利用荧光定量 PCR 对 *SpbHex* mRNA 表达情况进行检测，结果

表明，*SpbHex* 在成虫和幼虫各个发育阶段均有　　表达（图 4），其中 4 龄幼虫成虫期（N4）的表

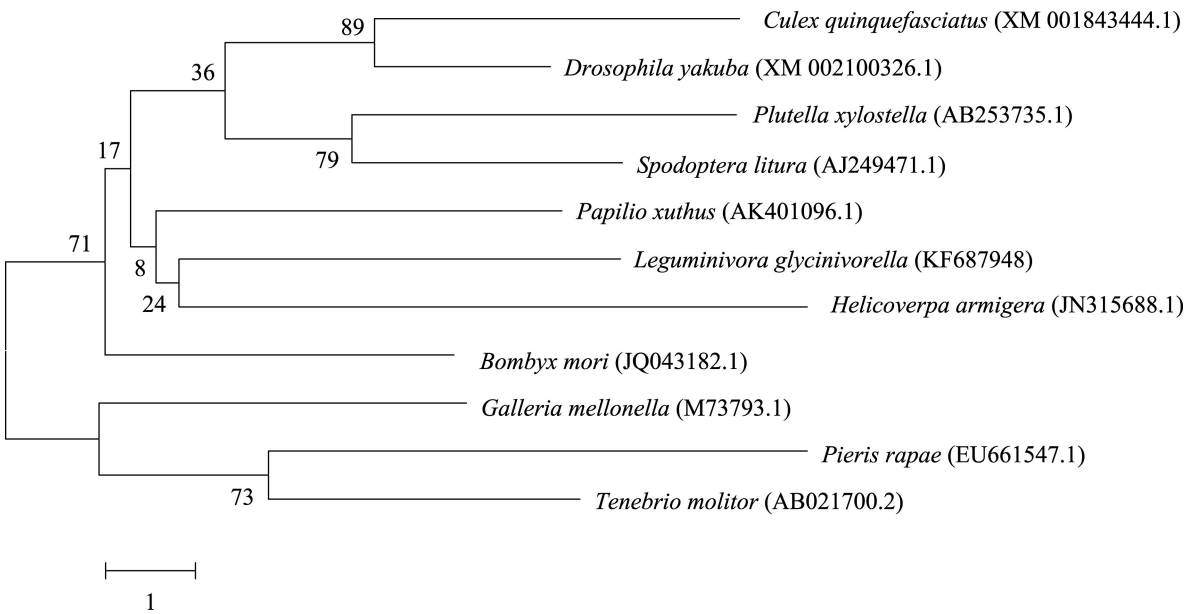

图 3　*SpbHex* 与其他昆虫 *hexamerin* 的系统进化树

Fig. 3　Phylogenic tree based on amino acid sequences of *SpbHex* and *hexamerin* from other insects

枝上显示 bootstrap 1 000 个循环的置信度。The numbers represent the percentage of 1 000 bootstrap replications.

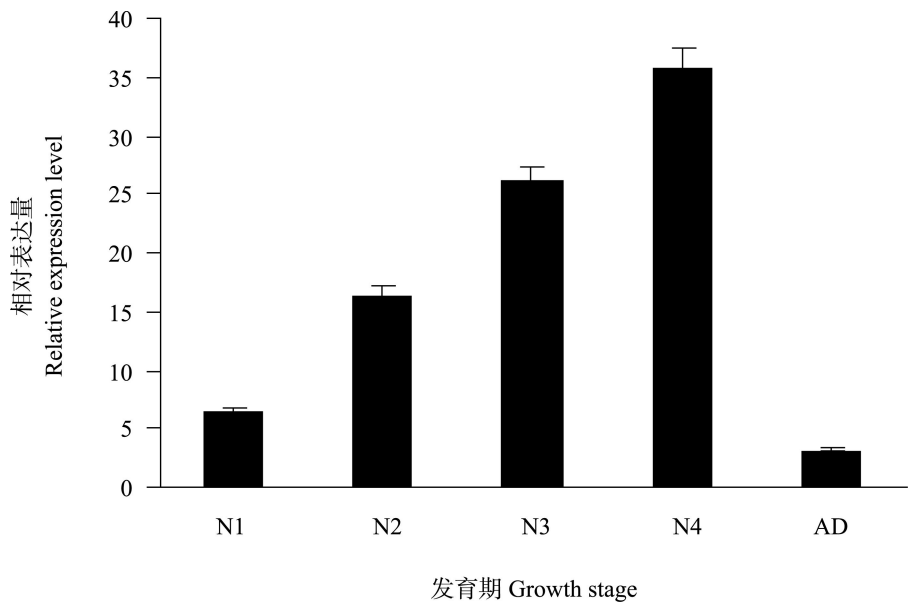

图 4　*SpbHex* 在大豆食心虫不同发育阶段的表达量

Fig. 4　Transcript level of *SpbHex* in different development stage(standard deviation)

N1：1 龄幼虫；N2：2 龄幼虫；N3：3 龄幼虫；N4：4 龄幼虫；AD：成虫。

First (N1), second (N2), third (N3), forth (N4) instar larvae and adults (AD) of soybean pod borer..
图中数据为平均值±SD。下图同。Data in the figure are mean±SD, the same below.

达量最高，2 龄幼虫（N2）和 3 龄幼虫（N3）的表达量较高，1 龄幼虫 （N1）和成虫（AD）表达量较低。

SpbHex 基因在大豆食心虫的神经节、表皮、中肠和脂肪体 4 个组织中均有表达，其中脂肪体（FT）的相对表达量最高，神经节（SY）的表达量较高，表皮（CU）和中肠（MD）相对表达量较低（图 5）。

3　讨论

Hexamerin 基因编码的储存蛋白通常被分为 3 类: 第一类是芳香储存蛋白，该类蛋白富含芳香基团，其芳香族氨基酸酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸的总含量超过 15% ;第二类是富含甲硫氨酸的储存蛋白，其甲硫氨酸含量通常为 4% ~11%，并且芳香族氨基酸含量为 9% ~13%（Telfer and Kunkel，1991）；第三类是适量甲硫氨酸储存蛋白，这类储存蛋白的芳香族氨基酸含量在富含甲硫氨酸储存蛋白的区间范围内，但其甲硫氨酸含量却较低（4%~5.5%）（Spyliotopoulos *et al.*，2007 ）。对克隆的储存蛋白 *SpbHex* 的基因氨基酸组成成分进行分析，该蛋白中甲硫氨酸含量为 2.3%，芳香族氨基酸含量为 20.5%（苯丙氨酸 8.2%、酪氨酸 10.9%、色氨酸 1.4%），表明本研究克隆的 *SpbHex* 基因编码的蛋白质是芳香储存蛋白。

储存蛋白是一类仅存在幼虫血淋巴，主要或唯一由幼虫脂肪体（相当于哺乳动物的肝脏）合成，然后释放到血淋巴，经过一段时间的积累在末龄浓度达到高峰（Godlewski *et al.*，2003; Chandrasekar *et al.*，2008），因蛹期脂肪体被选择性地重吸收而成高密度蛋白结晶颗粒使浓度下降，储存的蛋白颗粒是成虫发育的重要营养物质（Hagner-Holler *et al.*，2007）。本研究结果也表明大豆食心虫的储存蛋白 *SpbHex* 基因在大豆食心虫老熟 4 龄幼虫的表达最高，而且在 4 龄幼虫中的脂肪体表达最高，与 Zhu 等（2002）的研究结果相一致，进一步表明本研究克隆的 *SpbHex* 基因是编码大豆食心虫储存蛋白。

在昆虫发育过程中，昆虫幼虫体内储存蛋白含量的变化及基因表达也受到蜕皮甾醇和保幼激素等激素的调控（Moreira *et al.*，2004；Spyliotopoulos *et al.*，2007）。因此，在昆虫生长发育和变态发育期间，储存蛋白可以作为研究

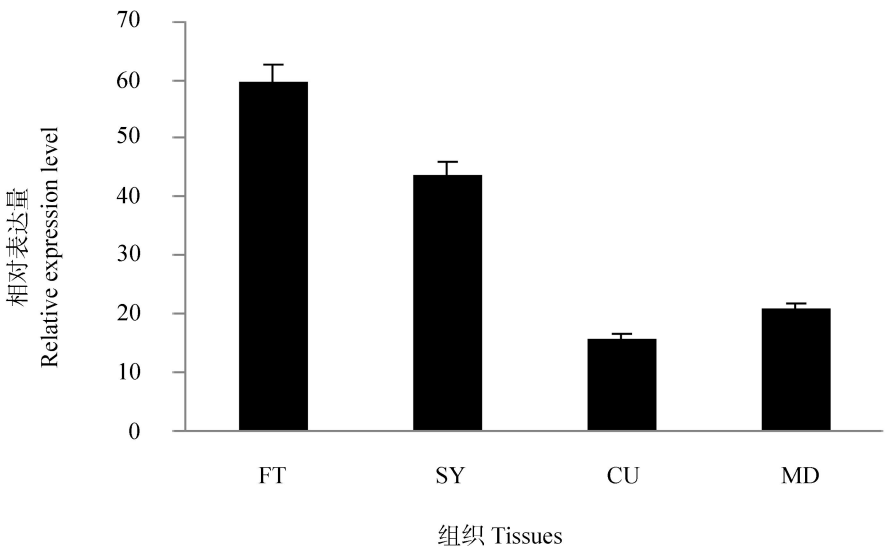

图 5　*SpbHex* 在大豆食心虫不同组织的表达量

Fig. 5 Transcript level of *SpbHex* in different tissues of soybean pod borer(standard deviation)

FT：脂肪体；SY：神经节；CU：表皮；MD：中肠。

FT: Fat body; SY: Synganglion; CU: Cuticle; SA: Salivary; MD: Midgut.

体内蛋白质合成、代谢以及蛋白质功能、基因调控和资源物质分配的一个很好的模式分子。目前，有关大豆食心虫储存蛋白基因序列的获得与功能尚未见研究报道。本研究以大豆食心虫幼虫为试验材料，利用 RT-PCR 方法克隆了储存蛋白的 cDNA 全长序列，并通过实时荧光定量 PCR 分析大豆食心虫幼虫体内储存蛋白基因在 mRNA 水平上的动态变化规律，以阐明储存蛋白基因表达调控的分子机制，为进一步明确 *SpbHex* 基因在大豆食心虫生长发育中的作用奠定基础。

参考文献 (References)

Ashfaq M, Sonoda S, Tsumuki H， 2007. Expression of two methionine-rich storage protein genes of *Plutellaxy lostella* (L.) inresponse to development juvenile hormone analog and pyrethroid. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 148(1): 84–92.

Chandrasekar R, Jae SS, Krishnan M, 2008. Expression and localization of storage protein 1 (SP1) in differentiated fat body tissues of red hairy caterpillar, *Amsacta albistriga* Walker. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 69(2): 70–84.

Godlewski J, Kłudkiewicz B, Grzelak K, Beresewicz M, Cymborowski B, 2003. Hormonal regulation of the expression of two storage proteins in the larval fat body of the greater wax moth (*Galleria mellonella*). *J. Insect Physiol.*, 49(6): 551–559.

Hahn DA, James LN, Milne KR, Hatle JD, 2008. Life-history plasticity after attaining a dietary threshold for reproduction is associated with protein storage in flesh flies. *Functional Ecology*, 22(6): 1081–1090.

Hathaway M, Hatle J, Li S, Ding X, Barry T, Hong F, Wood H, Borst D. 2009. Characterization of hexamerin proteins and their mRNA s in the adult lubber grasshopper: the effects of nutrition and juvenile hormone on their levels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 154(3): 323–332.

Hagner-Holler S, Pick C, Girgenrath S, Marden JH, Burmester T, 2007. Diversity of stonefly hexamerins and implication for the evolution of insect storage proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37(10): 1064–1074.

Kanost MR, Kawooya JK, Ryan RD, Van Heusden MC, Ziegler R, 1990. Insect hemolymph proteins. *Adv. Insect Physiol.*, 57(22): 299–366.

Klein D， 2002. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol. Med*., 8(6): 257–260.

Moreira CK, Capurro ML, Walter M, Biessmann H, James AA, deBianchi AG, Marinotti O 2004. Prmiary characterization and basal promoter activity of two hexamerin genes of *Musca domestica*. *Journal of Insect Physiology*, 4(2): 1–10.

Spyliotopoulos A, Gkouvitsas T, Fantinou A, Kourti A. 2007. Expression of a cDNA encoding a member of the hexamerin storage proteins from themoth *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera) during diapause. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 148(1): 44–54.

Tawfik AI, Kellner R, Hoffmann KH, Lorenz MW, 2006. Purification, characterization and titre of the haemolymph juvenile hormone binding proteins from *Schistocerca gregaria* and *Gryllus bimaculatus*. *Journa l of Insect Physiology*, 52(3): 255–268.

Tang B, Wang SG, Zhang F, 2010. Two storage hexamerins from the beet armyworm *Spodoptera exigua*: cloning, characterization and the effect of gene silencing on survival. *BMC Molecular Biology,* 31(11): 65–77.

Telfer WH, Kunkel JG, 1991. The function and evolution of insect storage hexamers. *Annual Review of Entomology*, 36: 205–228.

Wheelerhr DE, Martínez T, 1995. Storage proteins in *ants* (Hymenoptera: Formicidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, 112(1): 15–19.

Zhu YC, Muthukrishnan S, Kramer KJ, 2002. cDNA sequences and mRNA levels of two hexamerin storage proteins PinSP1 and PinSP2 from the Indianmeal moth, *Plodia interpunctella*. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 32(12): 525–536.

冯从经, 桑守亮, 翟会峰, 2010. 亚洲玉米螟幼虫体内储存蛋白 cDNAcDNA 片段克隆与序列分析. 植物保护学报, 37(5): 391 – 397. Feng CJ, Sang SL, Zhai HF,2010. Cloning and sequence analysis of cDNA fragment of storage protein from the larvae of Asian corn borer, ostrinia furnacalis (Guenée) (Lepidoptera: Crambidae). *Acta Phytophylacica Sinica*, 37(5): 391-397.]

刘洋, 王继安, 赵奎军, 2005. 大豆抗食心虫性遗传研究. 东北农业大学学报, 36(2): 138–141. [Liu Y, Wang JA, Zhao KJ, 2005. Study on the inheritance law of soybean resistance to pod borer. *Journal of Northeast Agricultural University*, 36(2): 138-141.]

李继莲, 吴杰, 彩万志, 赵章武, 2009. 蜜蜂卵黄原蛋白的作用. 昆虫知识, 46(5): 802-807. [Li JL, Wu J, Cai WZ, Zhao ZW, 2009. The functions of vitellogenin in the honeybee. *Chinese Bulletin of Entomology*, 46(5): 802-807.]

马彩霞, 刘惠霞, 沙忠利, 李怡萍, 2002. 昆虫体内储存蛋白的研究进展. 昆虫知识, 39(6): 416−420. [Ma CX, Liu HX, Sha ZL, Li YP, 2002. Progress in research on insect storage proteins. *Chinese Bulletin of Entomology*, 39(6): 416-420.]