棉铃虫 *HaTO-like* 基因的克隆、序列分析和表达特征*

张松斗[1**] 申忠健[1] 马木提·赛丽蔓[2] 王 旺[1]
刘孝明[1] 李 贞[1] 张青文[1] 刘小侠[1***]
（1.中国农业大学昆虫系，北京 100193；2. 新疆博尔塔拉蒙古自治州农业技术推广中心，博乐 833400）

摘 要 **【目的】** 克隆和分析了棉铃虫 *Helicoverpa armigera HaTO-like* 基因的编码框序列，检测了该基因的时空表达谱以及在棉铃虫感染核型多角体病毒 *HaSNPV* 后的转录变化，为深入研究该基因的功能提供理论依据。**【方法】** 本研究利用 RT-PCR 的方法首次克隆获得 *HaTO-like* 基因的全长 cDNA 序列，通过几种生物信息学软件对该基因的核苷酸序列和氨基酸序列进行了分析，并利用荧光定量 PCR 技术检测了该基因在棉铃虫不同发育阶段、幼虫组织和成虫组织的表达情况，以及 *HaSNPV* 感染对 *HaTO-like* 基因表达的影响。**【结果】** 棉铃虫 *HaTO-like* 基因 cDNA 全长为 994 bp，开放阅读框为 756 bp，编码 251 个氨基酸，其蛋白序列的 N 端含有 23 个氨基酸的信号肽。进一步的序列分析表明棉铃虫 *HaTO-like* 与其他昆虫同源蛋白的氨基酸序列一致性不是太高，大概在 39%~61%之间，其中与家蚕和脐橙螟在系统进化上关系最近。荧光定量 PCR 结果表明该基因在棉铃虫的 5 龄 0 h 和成虫第 1 天的的表达量相对较高，在幼虫的头部和表皮内的表达量较其他幼虫组织较高，在成虫的头部和足的表达量也相对较高。而病毒感染则显著地诱导了该基因在棉铃虫幼虫头部和表皮内的表达。**【讨论】** 本研究克隆了棉铃虫 *HaTO-like* 基因的全长 cDNA 序列，分析了该基因的序列特征和表达谱，为进一步阐释该基因的功能奠定理论基础。

关键词 棉铃虫，*HaTO-like* 基因，分子克隆，时空表达，病毒感染

Cloning, sequence analysis and expression of a takeout-like gene in *Helicoverpa armigera*

ZHANG Song-Dou[1**] SHEN Zhong-Jian[1] MAMUTI·Sailiman[2]
WANG Wang[1] LIU Xiao-Ming[1] LI Zhen[1] ZHANG Qing-Wen[1] LIU Xiao-Xia[1***]
(1. Department of Entomology, China Agricultural University, Beijing 100193, China;
2. Agricultural Technology Promotion Center In Boertala Mongolia Autonomous Prefecture of Xinjiang, 833400, China)

Abstract **[Objectives]** To interpret the function of a *HaTO-like* gene in *Helicoverpa armigera*, we cloned the full-length cDNA of this gene, determined its expression profile in different developmental stages and different tissues, and detected its transcripts in the head and epidermis of larvae after *HaSNPV* infection. **[Methods]** Full-length *HaTO-like* cDNA was amplified by RT-PCR and the nucleotide and amino acid sequences of the gene were further analyzed using bioinformatics software. qRT-PCR was also used to determine the spatio-temporal expression patterns of the gene and its transcript after *HaSNPV* infection. **[Results]** Sequence analysis showed that the full-length cDNA of the *HaTO-like* gene was 994 bp, which includes a 756 bp ORF encoding region comprised of 251 amino acids, and that it shares relative low sequence identity with homologous proteins of other insects. The results of qRT-PCR indicated that the *HaTO-like* gene was more highly expressed in fifth instar larvae at 0 h, and in one day old adults, than in other stages. In larvae, the *HaTO-like* gene was mainly expressed in

*资助项目 Supported projects：国家自然科学基金（31572018）
**第一作者 First author，E-mail：zhangsongdou1128@126.com
***通讯作者 Corresponding author，E-mail：liuxiaoxia611@cau.edu.cn
收稿日期 Received：2016-05-31，接受日期 Accepted：2016-08-15

the head and epidermis whereas in adults it was most highly expressed in the legs. The expression of the *HaTO-like* gene was also induced in head and epidermis of *H. armigera* after HaSNPV infection. **[Conclusion]** This study determined the sequence characteristics of the *HaTO-like* gene, and its expression profiles and establishes a theoretical foundation for further elucidating the functions of the *HaTO-like* gene in *H. armigera*.

Key words *Helicoverpa armigera*, *HaTO-like*, molecular cloning, temporal-spatial expression, virus infection

Takeout（TO）蛋白家族在昆虫中被广泛地研究，包含 250 个氨基酸左右，其 N 末端有 18~23 个氨基酸的保守信号肽序列，属于典型的分泌蛋白（So *et al.*，2000；Benito *et al.*，2010）。TO 蛋白首先在果蝇 *Drosophila melanogaster* 中被鉴定并命名为 *DmTO*，随后在多种昆虫中均发现了这种蛋白，并发现它具有多种重要的功能（Sarov-Blat *et al.*，2000）。TO 基因在昆虫内的表达具有组织特异性，比如，原位杂交结果表明 TO 基因主要在果蝇的前胃和嗉囊中表达（Sarov-Blat *et al.*，2000）；在冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 的触角中检测到 Takeout-like 蛋白（Justice *et al.*，2003）；Fujikawa 等（2006）发现 Takeout-like 蛋白在黑花蝇 *Phormia regina* 的触角和下唇须中高表达；在家蚕 *Bombyx mori* 中，TO 蛋白主要表达于中肠、脂肪体和丝腺中（Saito *et al.*，2006）；而 TO 蛋白在美洲散白蚁 *Reticulitermes flavipes* 的工蚁、兵蚁及若虫的多个组织中也均有表达（Schwinghammer *et al.*，2010）。TO 蛋白表达的组织特异性可能暗示着该基因功能的多样性。其功能主要包括以下几个方面：（1）参与调控昆虫的生物节律；（2）参与昆虫的嗅觉和味觉的感受；（3）调控昆虫的营养平衡和运动；（4）调节昆虫的发育和寿命；（5）参与调节雄性昆虫的求偶行为（Yu *et al.*，2011）。在果蝇中，*DmTO* 编码了一种类似于 JHBP 的 TO 蛋白，它通过提高果蝇饥饿时味觉系统对糖分的敏感性来增加取食量，从而调节果蝇体内的营养平衡（Meunier *et al.*，2007）。烟草天蛾 *Manduca sexta* 的 *TO* 基因家族可以维持表皮细胞中 JH 的含量，同时也受到 JH 和营养状况的调控（Du *et al.*，2003）。Hagai 等（2007）发现意大利蜜蜂 *Apis mellifera* TO 蛋白的表达受到发育相关因子 JH 的调控。因此，我们可以推断昆虫 *TO* 基因在发挥作用的时候受到 JH 的调控，参与 JH 信号传递。序列分析发现 TO 蛋白与保幼激素结合蛋白（Juvenile hormone binding protein，JHBP）的序列同源性比较高，在 N 末端有两个非常保守的半胱氨酸 Cys 残基，可能具有配体结合特性（Fujikawa *et al.*，2006）。

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 属于鳞翅目夜蛾科，是一种世界范围内的杂食性害虫，能够对多种农作物造成巨大的经济损失（Wu *et al.*，2008）。核型多角体病毒（Nuclear polyhedrosis viruses）是一种专性的昆虫病毒，寄主范围较广，主要寄生鳞翅目昆虫，被广泛地应用于农林害虫的防治。NPV 病毒对宿主昆虫有很强的弱化作用，感染病毒的鳞翅目昆虫取食和生长发育均受阻，体内的蜕皮激素水平受到抑制，而 JH 水平升高。许多参与蜕皮激素信号的基因在 NPV 病毒感染后是下调的，比如 Ecdysteroid receptor（ECR）和 Ultraspiracle protein（USP），而 JH 信号相关基因在 NPV 病毒感染后是上调的，比如 Methoprene tolerant（MET）和 JH inducible（JHi）基因（Zhang *et al.*，2015a）。前期未发表的转录组测序结果表明，棉铃虫 *HaTO-like* 基因在 *HaSNPV* 感染后表达量是升高的。因此我们推断棉铃虫 *HaTO-like* 基因可能作为 JH 信号通路中的一个基因参与棉铃虫和 *HaSNPV* 的分子互作。本研究以棉铃虫为实验材料，基于转录组测序拼接结果，利用 RT-PCR 的方法首次克隆获得 *HaTO-like* 基因的全长 cDNA 序列，对该基因的核苷酸序列和氨基酸序列进行了分析，并利用 qRT-PCR 技术检测了该基因的时空表达情况，以及 *HaSNPV* 感染对 *HaTO-like* 表达的影响，希望这些结果能为进一步阐释该基因的分子功能奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

棉铃虫由中国农业大学昆虫实验室用人工饲料饲养，饲养条件为温度（27±1）°C，光周期为 14L∶10D，相对湿度为 75%±5%。幼虫从 3 龄阶段开始单头饲养在指型玻璃管中（5.5 cm 长×2.0 cm 直径）。

棉铃虫核型多角体病毒原粉（5×10^{11} OBs/g）购买于河南济源白云实业有限公司（中国，济源），储存于 4°C 备用。

1.2 主要试剂和仪器

大肠杆菌 DH5α 购自于北京全式金生物技术有限公司（中国，北京）。总 RNA 抽提试剂 TRIzol 购自 Invitrogen（USA）。克隆载体 pDM18-T 试剂盒、PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser 试剂盒、限制性内切酶（*Eco*R I 和 *Hin*d III）、*Taq*DNA 聚合酶、DM2000 Marker、荧光定量试剂盒 SYBR® Premix Ex Taq II （Tli RNaseH Plus）均购自 TaKaRa 公司（Kyoto，Japan）；PCR 产物纯化试剂盒和质粒提取试剂盒购自北京天根生化科技(北京)有限公司（中国，北京）；其他均为国产或进口分析纯试剂。主要的仪器有 T100™ 热循环 PCR 仪（BIO-RAD，USD），Thermal Cycler ST17R 台式冷冻离心机，上海天能凝胶图像处理系统 1600，CFX Connect Real-Time System（BIO-RAD，USD）。

1.3 克隆棉铃虫 *HaTO-like* 基因的样品收集

为了克隆棉铃虫 *HaTO-like* 基因序列，首先收集混合样品用于提取总 RNA，混合样品包括棉铃虫卵、幼虫（1 龄 24 h，3 龄 24 h 和 5 龄 24 h）、蛹第 1 天和第 5 天、成虫第 1 天雌雄虫。储存于 －80°C 备用。

1.4 棉铃虫样品总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

将收集的棉铃虫混合样品放入已高温灭菌处理过的研钵中磨碎，参照 Invitrogen 公司试剂说明书，用 TRIzol Reagent 法提取总 RNA。用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计（Abs260）检测 RNA 样品的纯度和浓度。为了减少误差，每个 RNA 样品均测 3 次求其平均值。根据 TAKARA 公司反转录试剂盒的要求，以提取的总 RNA（1 μg）为模板合成第一链 cDNA 并储存于 －80°C 备用。每个 cDNA 样品均重复 3 次。

1.5 引物设计

根据转录组测序初步得到的棉铃虫 *TO* 基因的序列，利用 NCBI-ORFfinder 软件（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/）找到可能的编码框，再将找到的编码框进行 NCBI-BLAST（https://blast. ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi）比对，确定找到的编码框是 TO-like 家族成员，并命名为 *HaTO-like*。利用 DNAClub 软件根据棉铃虫 *HaTO-like* 基因的序列设计 RT-PCR 的引物以扩增和验证全长序列，正向引物为 TO-F1：5′-ACATGGCGTCTTTACATAC-3，反向引物为 TO-R1：5′-CACAGTGAGCTCATAAATC-3′。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.6 基因全长 cDNA 的克隆和测序验证

本研究根据转录组测序拼接得到的棉铃虫 *HaTO-like* 基因的序列信息，利用设计的特异性引物和棉铃虫的 cDNA 扩增基因全长。扩增条件为：94°C 预变性 5 min；94℃变性 50 s，58°C 退火 50 s，72°C 延伸 1 min，共 40 个循环；最后再 72°C 延伸 10 min。用 1.3%的琼脂糖凝胶电泳检测上述 PCR 反应液，然后将 PCR 产物纯化，再按照载体 PDM 18-T 连接试剂盒说明书，将纯化的目的片段与 PDM 18-T 克隆载体连接，重组质粒转化入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中，涂平板进行蓝白斑筛选。挑取阳性克隆白斑接种于附有 Ampicillin 80 mg/L 的 LB 液体培养基中，37°C 下 180 r/min 过夜培养后提取质粒，通过双酶切验证后将质粒送至上海生工进行测序。

1.7 基因序列特征分析

在 NCBI 上利用 BLAST 检索棉铃虫 *HaTO-like* 基因的同源序列，然后利用 DNAman 软件 6.0.3.48（Lynnon Biosoft, Canada）对不同

物种 takeout 氨基酸序列进行多重联配和一致性分析。选用 MAGE5.10 软件的 Neighbor-joinin 软件构建系统进化树。*HaTO-like* 基因序列的部分理化特征采用在线工具 ProtParam tool（http://web.expasy.org/protparam/）进行分析。利用 SignalP（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/）分析氨基酸序列的信号肽；利用 http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/ 分析这个蛋白是否是跨膜蛋白。

1.8　实时荧光定量 PCR 的检测

棉铃虫不同发育阶段的样品包括卵、幼虫（1 龄 24 h、2 龄 24 h、3 龄 24 h、4 龄 24 h、5 龄 0 h、5 龄 48 h 和 5 龄 96 h）、蛹（第 1、5 和 9 天）和成虫第 1 天。幼虫组织包括头、中肠、表皮、脂肪体、血淋巴和中枢神经系统。成虫组织包括头、胸、腹、足、翅和中肠（Zhang *et al.*，2015b）。在棉铃虫感染 *HaSNPV* 的试验中，按照以前的试验方法，每头 4 龄第 1 天的幼虫接种 10 μL 浓度为 5×10^7 OBs/mL 的 *HaSNPV*（Zhang *et al.*，2015c）。对照组同样状态的棉铃虫接种 10 μL 的灭菌水。分别于 *HaSNPV* 接种 0，24，72，120 h，将染毒棉铃虫先在冰上冷冻麻醉，再利用解剖镊子将棉铃虫的头部和表皮取出来在预冷的 PBS 缓冲液中冲洗 3 次，用干净的卫生纸将组织吸干后放入 TRIzol 中并储存在 –80°C 备用。每个样品至少包括 3 次独立的生物学重复，每次生物学重复包括至少 10 头虫子。总 RNA 提取和 cDNA 合成的实验步骤同 1.4.

在基因表达量的检测过程中，根据 SYBR® Premix Ex Taq II 试剂盒的说明书，在 Bio-Rad CFX Connect™ Real-Time PCR System（Bio-Rad，USA）仪器上进行 qRT-PCR 的扩增。棉铃虫核糖体蛋白 L32（Ribosomal proteins L32，*RPL32*）（JQ744274.1）用作 qRT-PCR 标准化的内参参考基因（Zhang *et al.*，2015c）。正向引物为 RPL32-qF：5′-CATCAATCGGATCGCTATG-3′，反向引物为 RPL32-qR：5′-CCATTGGGTAGCATGTGAC-3′。*HaTO-like* 基因的荧光定量正向引物为 TO-qF：5′-GAGACCACAGATATCGAC-3′，反向引物为 TO-qR：5′-CTGTGGCGCGAAGAGGCGTG-3′。20 μL 荧光定量 PCR 反应体系为：2 × SYBR green supermix 10 μL，正向引物和反向引物均为 1 μL（终浓度为 0.5 μmol/L），cDNA 模板 1 μL (50 ng/μL)，RNase-Free ddH_2O 7 μL。反应条件为：95°C 预变性 3 min，然后 95°C 变性 15 s，60°C 退火和延伸 30 s，共 40 个循环。利用溶解曲线和标准曲线进一步验证引物的特异性和 qRT-PCR 的结果。溶解曲线是在正常的 qRT-PCR 程序结束后添加一个 65~95°C 的反应程序进行构建。标准曲线是以 10 倍浓度稀释的 cDNA 为模板，进行实时荧光定量 PCR 扩增，然后根据 CT 值（Cross threshold）进行计算（Pfaffl *et al.*，2004）。基因的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算（Livak and Schmittgen，2001）。

1.9　统计分析

荧光定量 PCR 的试验均重复 3 次，数值表示平均值±标准差。运用 SPSS 17.0 软件的 Turkey's HSD 多重比较方法对 *HaTO-like* 基因在不同发育阶段和不同组织中的表达差异性进行统计分析（$P<0.05$）。使用 *t*-测验对 *HaTO-like* 基因在染毒棉铃虫的不同组织中的表达差异性进行分析（** 表示 $P<0.01$）。

2　结果与分析

2.1　棉铃虫 *HaTO-like* 基因的克隆和序列分析

利用 NCBI-ORF Finder 和 NCBI-BLAST 软件对 *HaTO-like* 基因的序列进行分析，再结合 RT-PCR 的方法扩增该基因的全长序列，并克隆到 pDM18-T 载体上测序验证，最后将测序正确的序列上传到 GenBank，登录号为 KU981054。序列分析结果表明该基因的 cDNA 全长 994 bp，包含一个 756 bp 的开放阅读框架，编码 251 个氨基酸（图 1）。预测的蛋白分子量为 27.75 ku，等电点为 7.66，前 23 个氨基酸为 N 末端信号肽序列，没有发现跨膜区域。

```
1                                                        GGAGTGAGGTCCGAGA
17   CTTCAGACGCGCTAAATAGAACTTTGTGTTAATAGAATAAATCCTCCTTAGTGAAAC
74   ATGGCGTCTTTACATACATTTTTGACGTCTTCTTTTGTTTTCTTCTGTGTGATCAAT
1    M  A  S  L  H  T  F  L  T  S  S  F  V  F  F  C  V  I  N
132  GGCGGGTTATTTAAAGAAATACCGAGTTACATCCAAGTGTGCAAGCGAGATCCTGCC
20   G  G  L  F  K  E  I  P  S  Y  I  Q  V  C  K  R  D  P  A
188  ACAATCAACGATTGCGTGAAGAAGTCCATCGAAGCCCTGAGACCACAGATATCAACA
39    T  I  N  D  C  V  K  K  S  I  E  A  L  R  P  Q  I  S  T
245  GGCATCCCTGAGCTGGATGTGCCAAGCCTGGATCCCTTCTTTATTCCTGAGATTAAA
58    G  I  P  E  L  D  V  P  S  L  D  P  F  F  I  P  E  I  K
302  GCCCTGACAGCTGACAACACGCCTCTTCGCGCTACAGGCCACAACATCAAGGTCACT
77     A  L  T  A  D  N  T  P  L  R  A  T  G  H  N  I  K  V  T
359  GGTGCCGGCAGCTTCGTCATCAAGAGTTTGACGGTGGACCTTGATACGTTGAAGATC
96    G  A  G  S  F  V  I  K  S  L  T  V  D  L  D  T  L  K  I
416  AAGGCTCGCGTCCGCTTCCCCAAGCTGCACTTCGAAGGCCAGTACAAGCTGGATGGT
115   K  A  R  V  R  F  P  K  L  H  F  E  G  Q  Y  K  L  D  G
473  CAGGTCCTCATCGTGCCCCTGAAGGGAGAAGGAAACCTTAATGCTGATGCTGTGAAA
134   Q  V  L  I  V  P  L  K  G  E  G  N  L  N  A  D  A  V  K
530  TGCGACGCTGAGCTGGTGCTCCACACGCAGATCGTCAACAAGGACGGCGTGGACTAC
153   C  D  A  E  L  V  L  H  T  Q  I  V  N  K  D  G  V  D  Y
587  GTGAAGTTCAAGAAGATTGACACCGACATCAACATCAAGGATTACAGGGTCAAGCTT
172   V  K  F  K  K  I  D  T  D  I  N  I  K  D  Y  R  V  K  L
644  GATGGACTTTTCAACGGAGACAAGAATTTGGGTGAAGCCGCCAACCAAGCGATTAAC
191   D  G  L  F  N  G  D  K  N  L  G  E  A  A  N  Q  A  I  N
701  CAGAACCGTGGCGAAATCCTGAGAGCCACCAAACCTCATTTAGAGAAGACTGTGTCC
210   Q  N  R  G  E  I  L  R  A  T  K  P  H  L  E  K  T  V  S
758  ACGAACCTTCTGGAAGCTGCCAACAACGTGGTCGAAGGTCTGACGTTAGACCAGCTG
229   T  N  L  L  E  A  A  N  N  V  V  E  G  L  T  L  D  Q  L
815  CTGCCCAAACCTTAGAATAGTTCCTAATATACGTCTAACTTAGATTTATGAGCTCAC
248   L  P  K  P  *
872  TGTGATTTTTACTCGTTGATAAAAGTGTTTATATTACTCTTTTTCTACCTTTGTGAC
929  CATGTACTTAAAGTCATACTAAAAAAAAAACTTCTGAAGTCATTTCGCCTATCAATG
986  CGTTTAGCC
```

图 **1** 棉铃虫 ***HaTO-like*** 基因的核苷酸序列和推测的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *HaTO-like* gene from *Helicoverpa armigera*

信号肽序列用实线方框标出，起始密码子为 ATG，*表示终止密码子 TAG。

The sequences of signal peptide are boxed, the start codon is indicated in bold and the stop codon in bold with an asterisk.

2.2 氨基酸序列多重联配和系统进化树分析

氨基酸序列多重联配结果表明棉铃虫 *HaTO-like* 的氨基酸序列和其他 9 种昆虫同源物的序列一致性不是很高，大概在 39%~61%。其中与脐橙螟 *Amyelois transitella* 的一致性为 61%，与家蚕的序列一致性为 60%，与小菜蛾 *Plutella xylostella* 的序列一致性为 57%，而与阿根廷蚂蚁 *Linepithema humile* 的序列一致性最低为 39%（图 2）。序列分析还发现棉铃虫 *HaTO-like* 的氨基酸序列在 N 端位置有 2 个非常保守的 Cys 残基，说明该蛋白可能具有配体结合特性。系统进化树分析也表明，棉铃虫 *HaTO-like* 与脐橙螟、家蚕和阿根廷蚂蚁在进化上亲缘关系最近，这个结果和氨基酸序列多重联配结果保持一致（图 3）。

2.3 *HaTO-like* 基因引物的标准曲线构建和溶解曲线分析

标准曲线结果显示，模板 cDNA 浓度和荧光信号循环数值呈显著的线性关系（图 4：A），*HaTO-like* 基因的相关系数 R^2 为 0.9985，扩增效率为 89.35%。溶解曲线结果表明，*HaTO-like* 基因的溶解温度在 80~85°C 之间，并且是单峰（图 4：B），这说明引物比较特异，反应体系相对稳定，可以进行基因的定量分析。

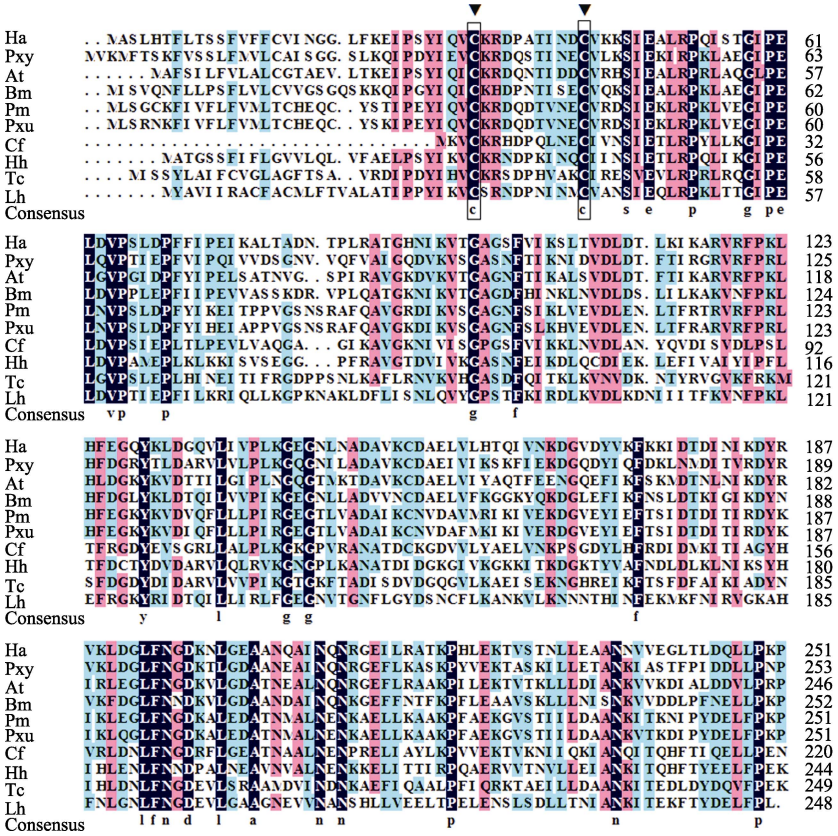

图 2　棉铃虫 ***HaTO-like*** 蛋白和其他昆虫同源物的氨基酸序列多重联配

Fig. 2　Amino acid sequence multiple alignment of *HaTO-like* with other insects homologs

蓝色代表 100%的序列一致性，红色代表 75%的序列一致性，绿色代表小于或等于 50%的序列一致性。有活性的半胱氨酸残基用箭头标记。Ha：棉铃虫 *Helicoverpa armigera*，KU981054；Pxy：小菜蛾 *Plutella xylostella*，XP_011549057.1；AT：脐橙螟 *Amyelois transitella*，XP_013198898.1；BM：家蚕 *Bombyx mori*，XP_004923009.1；PM：金凤蝶 *Papilio machaon*，XP_014354792.1；Pxu：柑橘凤蝶 *Papilio xuthus*，NP_001299082.1；Cf：台湾家白蚁 *Coptotermes formosanus*，AGM32526.1；Hh：茶翅蝽 *Halyomorpha halys*，XP_014289104.1；Tc：赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*，XP_966810.1；Lh：阿根廷蚂蚁 *Linepithema humile*，XP_012219405.1。图 3 同。

Blue represents 100% identity, red represents 75% identity and green represents ≤ 50% identity. The active cysteine residues are marked with arrow. Ha: *Helicoverpa armigera* (KU981054)；Pxy: *Plutella xylostella* (XP_011549057.1); AT: *Amyelois transitella* (XP_013198898.1); BM: *Bombyx mori* (XP_004923009.1); PM: *Papilio machaon* (XP_014354792.1); Pxu: *Papilio xuthus* (NP_001299082.1); Cf: *Coptotermes formosanus* (AGM32526.1); Hh: *Halyomorpha halys* (XP_014289104.1); Tc: *Tribolium castaneum* (XP_966810.1); Lh: *Linepithema humile* (XP_012219405.1). The same as Fig.3.

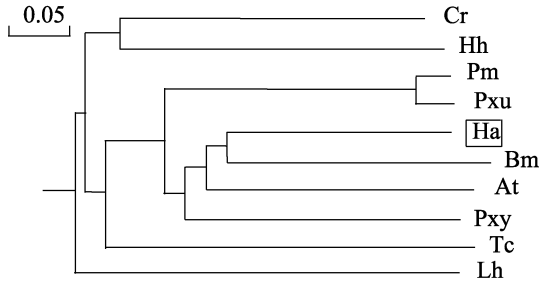

图 3　棉铃虫 ***HaTO-like*** 蛋白和其他昆虫同源物的系统进化树分析

Fig. 3　Phylogenetic tree analysis of *HaTO-like* and its homologs in insects

2.4　*HaTO-like* 基因的时空表达分析

时间表达谱结果表明，*HaTO-like* 基因在棉铃虫所有检测的发育阶段均有所表达，但表达量差异很大，其中在 5 龄 0 h 和成虫第 1 天的表达相对较高，在卵期和 1~4 龄的表达量较低，蛹期的表达量最低（图 5），这也可能暗示着该基因在棉铃虫的不同发育阶段起着不同的作用。空间表达谱结果表明，该基因存在于所有检测的幼虫组织和成虫组织中，并且呈现出组织特异性（图 6：A，

B)。在幼虫的头和表皮中的表达量比中肠、脂肪体、血细胞和中枢神经系统中均高（图 6：A），而在成虫的足和头中的表达量最高，在成虫的胸和翅中的表达量最低（图 6：B)。

2.5 病毒感染对 *HaTO-like* 基因表达的影响

荧光定量 PCR 结果表明，*HaSNPV* 感染 24 h，72 h 和 120 h 后，*HaTO-like* 基因在棉铃虫头部的表达均是升高的（图 7：A)。*HaSNPV* 感染 72 h 和 120 h 后，*HaTO-like* 基因在棉铃虫表皮内的表达也是升高的，但是在 24 h 是没有变化的（图 7：B)。这些结果说明 *HaSNPV* 感染能够诱导棉铃虫 *HaTO-like* 基因的表达。

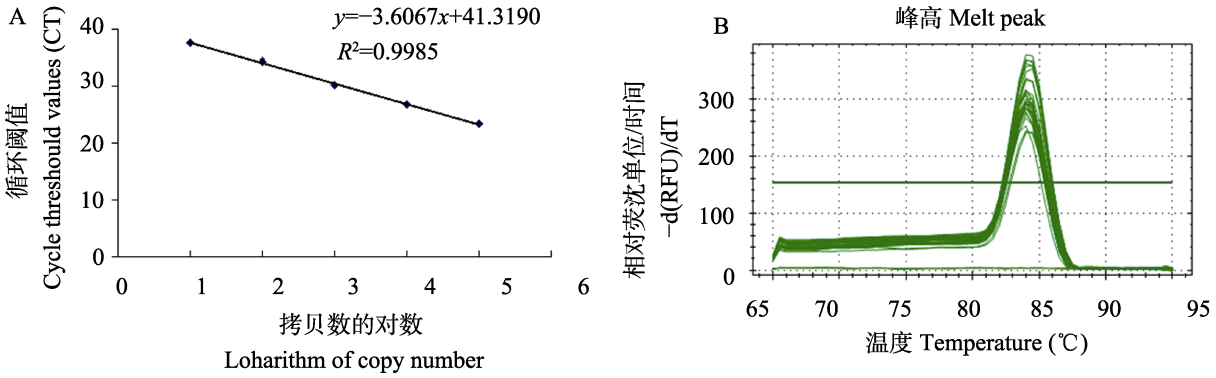

图 4 棉铃虫 ***HaTO-like*** 基因的荧光定量 **PCR** 的标准曲线和溶解曲线

Fig. 4 Standard curve and melting curve of *HaTO-like* gene for quantitative real-time PCR

A. *HaTO-like* 基因的标准曲线；B. *HaTO-like* 基因的溶解曲线。

A. The standard curve of *HaTO-like* gene; B. The melting curve of *HaTO-like* gene.

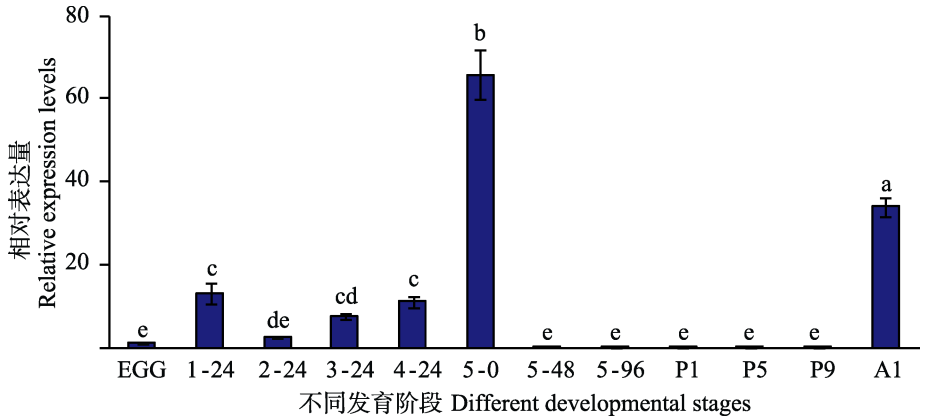

图 5 ***HaTO-like*** 基因在棉铃虫不同发育阶段的表达谱

Fig. 5 Expression level of *HaTO-like* gene in different developmental stages of *Helicoverpa armigera*

EGG：卵（80 粒）；1-24：1 龄 24 h 幼虫（15 头）；2-24：2 龄 24 h 幼虫（15 头）；3-24：3 龄 24 h 幼虫（10 头）；4-24：4 龄 24 h 幼虫（8 头）；5-0：5 龄 0 h 幼虫（8 头）；5-48：5 龄 48 h 幼虫（8 头）；5-96：5 龄 96 h 幼虫（8 头）；P1：蛹期第 1 天（8 头）；P5：蛹期第 5 天（8 头）；P9：蛹期第 9 天（8 头）； A1 成虫第 1 天（6 头雄虫和 6 头雌虫)。数据均代表 3 次生物学重复的平均值±标准差，每次生物学重复包括至少 8 头虫子。柱上标有不同字母表示差异显著（$P < 0.05$，利用 SPSS17.0 软件根据 Turkey 多重比较检验法比较)。图 6 同。

EGG: Egg (80 grain); 1-24: 24 h of 1st instar (15 larvae); 2-24: 24 h of 2nd instar (15 larvae); 3-24: 24 h of 3rd instar (10 larvae); 4-24: 24 h of 4th instar (8 larvae); 5-0 h, 5-48 h, and 5-96 h stand for 5th instar larvae at 0, 48, and 96 h (8 larvae), respectively; P1, P5, and P9 stand for 1, 5, and 9 day pupae (8 pupae), respectively; A1: 1 day adults (6 male and 6 female). The data are mean ± SD. Each biology repeat includes at least 8 larvae, pupae, or adults. Histograms with different letters indicate significant different at 0.05 level by Tukey's multiple-range test in SPSS 17.0 software. The same as Fig. 6.

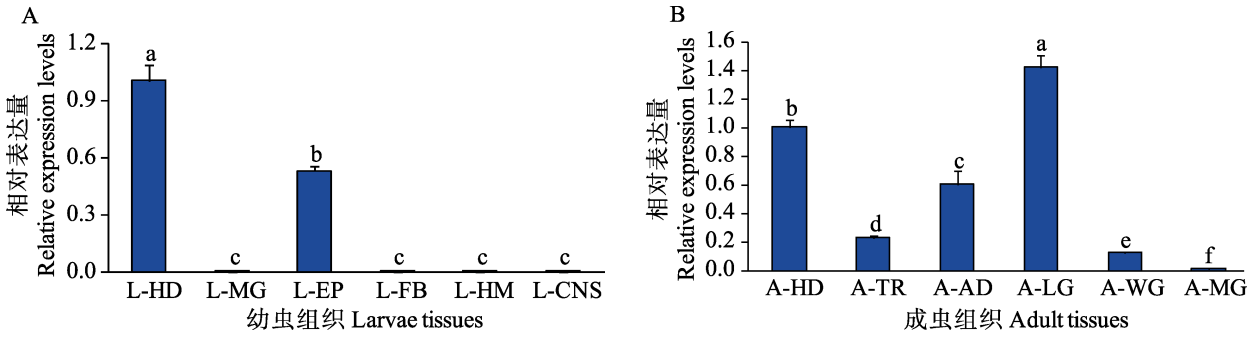

图 6　***HaTO-like*** 基因在棉铃虫幼虫组织（**A**）和成虫组织（**B**）内的表达分析

Fig. 6　Expression analysis of *HaTO-like* in different larvae tissues (A) and adult tissues (B) of *Helicoverpa armigera*

L-HD：幼虫头；L-MG：幼虫中肠；L-EP：幼虫表皮；L-FB：幼虫脂肪体；L-HM：幼虫血淋巴；L-CNS：幼虫中枢神经系统。A-HD：成虫头；A-TR：成虫胸；A-AD：成虫腹；A-LG：成虫足；A-WG：成虫翅；A-MG：成虫中肠。数据均代表 3 次生物学重复的平均值±标准差，每次生物学重复包括 10 头虫子。

L-HD: Heads of larvae; L-MG: Midgut of larvae; L-EP: Epidermis of larvae; L-FB: Fat body of larvae; L-HM: Hemolymph of larvae; L-CNS: Central nervous system of larvae. A-HD: Heads of adult; A-TR: Thorax of larvae; A-AD: Abdomen of larvae; A-LG: Legs of larvae; A-WG: Wings of adult; A-MG: Midgut of adult. The data are mean±SD. Each biology repeat includes at least 10 larvae, pupae, or adults.

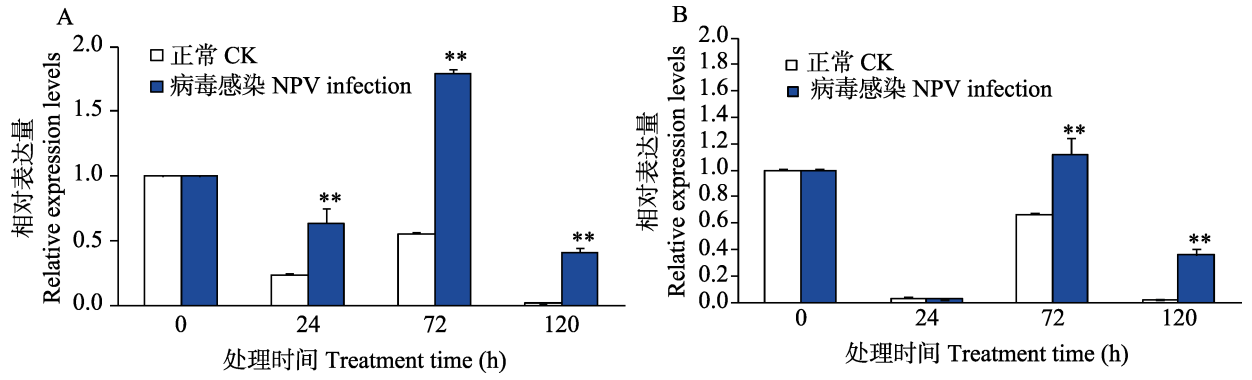

图 7　***HaSNPV*** 感染对 ***HaTO-like*** 基因在棉铃虫的头部（**A**）和表皮（**B**）内表达的影响

Fig. 7　Expression analysis of *HaTO-like* gene in heads (A) and epidermis (B) of *Helicoverpa armigera* after *HaSNPV* infection

A.*HaSNPV* 感染 0，24，72，120 h 后，*HaTO-like* 基因在棉铃虫头部的表达变化；B. *HaSNPV* 感染 0，24，72，120 h 后，*HaTO-like* 基因在棉铃虫表皮内的表达变化。数据均代表 3 次生物学重复的平均值±标准偏差，每次生物学重复包括 8 头虫子。**表示处理和对照之间 *t*-检验差异显著（**：$P < 0.01$）。

A. Transcript levels of *HaTO-like* gene in heads of *H. armigera* after 0, 24, 72, and 120 h of *HaSNPV* infection; B. Expression levels of *HaTO-like* gene in epidermis of *H. armigera* after 0, 24, 72, and 120 h of *HaSNPV* infection. The data are mean±SD. Each biological repeat includes 8 larvae. Significance of pairwise comparisons (treatment vs control) are marked with ** (**: $P < 0.01$) as determined by the Student's *t*-test.

3　讨论

Sarov-Blat 等（2000）通过 cDNA 差减杂交技术首次鉴定得到了 *DmTO* 基因，并证明了该基因是果蝇生物节律和取食/饥饿之间的直接分子联系。TO 蛋白和 JHBP 蛋白具有较高的序列同源性，在蛋白的 N 末端均有 18~23 个氨基酸的信号肽序列和 2 个高度保守的半胱氨酸残基位点，它们共同组成一个超蛋白家族（Fujikawa *et al.*，2006）。目前，关于 *TO* 基因的研究主要集中在几种模式昆虫中，比如果蝇、冈比亚按蚊、家蚕、蜜蜂、白蚁等（Hu *et al.*，2012），而在鳞翅目害虫棉铃虫中还没有相关报道。本研究克隆了 *HaTO-like* 的全长 cDNA 序列，序列分析发现该蛋白的 N 末端具有 23 个氨基酸的信号肽序列，并且在 33 和 43 位存在 2 个 TO/JHBP 蛋

白超家族中高度保守的半胱氨酸位点，符合 TO 蛋白家族的特征，因此将其命名为 *HaTO-like*。进一步的分析结果表明该基因 cDNA 全长 994 bp，包含一个 756 bp 的编码框，编码 251 个氨基酸，预测的蛋白分子量为 27.75 ku，等电点为 7.66，所编码的蛋白为非跨膜蛋白。多重联配和系统进化结果表明棉铃虫 *HaTO-like* 的氨基酸序列在进化中并不是特别保守，和其他 9 种昆虫同源物的序列一致性不是很高，大概在 39%~61%，说明该基因在物种间的变化较大。

基因的表达位置在一定程度上反应了该基因的功能。在家蚕中，TO 基因主要表达于丝腺、脂肪体、触角和中肠中（Saito *et al.*，2006）。而 Du 等（2003）通过原位杂交技术只在烟草天蛾 5 龄第 2 天幼虫的头和表皮中表达，而在其他组织中均没有检测到。本研究中，*HaTO-like* 基因在不同发育阶段的表达属于时间依赖型，可能暗示着该基因在棉铃虫不同发育阶段对外界环境的反应是不一样的。空间表达谱结果表明，*HaTO-like* 基因的表达属于组织依赖型，可能在这些高表达的组织中起着重要的作用。比如，*HaTO-like* 基因在棉铃虫幼虫的头和表皮中的表达量相对较高，推测其可能参与调控营养平衡和生物节律。另外，其在成虫头部的高表达可能暗示着参与调控昆虫的求偶和节律运动，而在足部的高表达还没有在其他昆虫中见过类似的报道，具体的原因还有待进一步进行探索。

以前的研究结果表明，*HaSNPV* 感染能够抑制棉铃虫幼虫的发育，在一定程度上抑制蜕皮激素信号相关基因的表达，促进 JH 信号相关基因的表达（Zhang *et al.*，2015a）。TO 蛋白和 JHBP 蛋白的序列同源性非常高，同时具有配体结合能力，可能携带内源性的具有激素功能的亲脂配体（比如 JH）通过疏水的感受器淋巴液到辅助细胞里。因此，我们进一步分析了 *HaSNPV* 感染对 *HaTO-like* 基因在棉铃虫幼虫头和表皮内表达的影响。荧光定量 PCR 结果表明 *HaSNPV* 感染显著地诱导了 *HaTO-like* 基因在棉铃虫头部和表皮内的表达。这些结果表明 *HaSNPV* 的感染能够诱导棉铃虫 *HaTO-like* 基因的表达。综上所述，本文鉴定了一个典型的棉铃虫 *HaTO-like* 基因，并分析了该基因的序列特征、表达模式及 *HaSNPV* 感染对其表达的影响。这些结果让我们初步地认识了棉铃虫 *HaTO-like* 基因的分子特征，接下来可以从以下两个方面对该基因的功能进行研究：（1）制备 *HaTO-like* 蛋白的抗体，从蛋白水平和细胞水平分析该基因的转录后特征；(2) 通过 RNA 干涉技术研究该基因是否参与棉铃虫抵抗 *HaSNPV* 的侵染。

参考文献 **(References)**

Benito J, Hoxha V, Lama C, Lazareva AA, Ferveur JF, Hardin PE, Dauwalder B, 2010. The circadian output gene *takeout* is regulated by Pdp1ε. *PNAS*, 107(6): 2544–2549.

Du J, Hiruma K, Riddiford LM, 2003. A novel gene in the *takeout* gene family is regulated by hormones and nutrients in *Manduca* larval epidermis. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 33(8): 803–814.

Fujikawa K, Seno K, Ozaki M, 2006. A novel Takeout-like protein expressed in the taste and olfactory organs of the blowfly, *Phormia regina*. *FEBS J*., 273(18): 4311–4321.

Justice RW, Dimitratos S, Walter MF, Woods DF, Biessmann H, 2003. Sexual dimorphic expression of putative antennal carrier protein genes in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol*., 12(6): 581–594.

Hagai T, Cohen M, Bloch G, 2007. Genes encoding putative takeout / juvenile hormone binding proteins in the honeybee (*Apis mellifera*) and modulation by age and juvenile hormone of the takeout-like gene GB19811. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 37(7): 689–701.

Hu LM, Shen JM, Bin SY, Liao HZ, Lin JT, 2012. Cloning, sequence analysis and spatio-temporal expression of *takeout* in *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Journal of Nanjing Agricultural University*, 35(4): 75–80.[胡黎明, 申建梅, 宾淑英, 廖泓之, 林进添, 2012. 桔小实蝇 *takeout* 基因的克隆和序列分析及时空表达. 南京农业大学学报, 35(4): 75–80.]

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 25(4): 402–408.

Meunier N, Belgacem YH, Martin JR, 2007. Regulation of feeding behaviour and locomotor activity by *takeout* in *Drosophila*. *J. Exp. Biol*., 210(Pt 8): 1424–1434.

Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP, 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper- Excel-based tool using

pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.*, 26(6): 509–515.

Saito K, Su ZH, Emi A, Mita K, Takeda M, Fujiwara Y, 2006. Cloning and expression analysis of *takeout* / *JHBP* family genes of silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol*., 15(3): 245–251.

Sarov-Blat L, So WV, Liu L, Rosbash M, 2000. The *Drosophila takeout* gene is a novel molecular link between circadian rhythms and feeding behavior. *Cell*, 101(6): 647–656.

Schwinghammer MA, Zhou X, Kambhampati S, Bennett GW, Scharf ME, 2010. A novel gene from the *takeout* family involved in termite trail-following behavior. *Gene*, 474(1/2): 12–21.

So WV, Sarov-Blat L, Kotarski CK, McDonald MJ, Allada R, Rosbash M, 2000. *Takeout*, a novel *Drosophila* gene under circadian clock transcriptional regulation. *Mol. Cell Biol*., 20(18): 6935–6944.

Wu KM, Lu YH, Feng HQ, Jiang YY, Zhao JZ, 2008. Suppression of cotton bollworm in multiple crops in China in areas with Bt toxin–containing cotton. *Science*, 321(5896): 1676–1678.

Yu Q, An LG, Wang XH, 2011. Recent advances in Takeout protein family of insects. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(2): 404–409. [于芹, 安利国, 王宪辉, 2011. 昆虫 Takeout 蛋白家族的研究进展. 应用昆虫学报, 48(2): 404–409.]

Zhang SD, Wu FM, Li Z, Lu ZQ, Zhang XF, Zhang QW, Liu XX, 2015a. Effects of nucleopolyhedrovirus infection on the development of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and expression of its 20–hydroxyecdysone–and juvenile hormone–related genes. *Florida Entomologist*, 98(2): 681–689.

Zhang SD, Li Z, Nian XG, Wu FM, Shen ZJ, Zhang BY, Zhang QW, Liu XX, 2015b. Sequence analysis, expression profiles and function of thioredoxin 2 and thioredoxin reductase 1 in resistance to nucleopolyhedrovirus in *Helicoverpa armigera*. *Scientific Reports*, DOI: 10.1038/srep15531.

Zhang SD, An SH, Li Z, Wu FM, Yang QP, Liu YC, Cao JJ, Zhang HJ, Zhang QW, Liu XX, 2015c. Identification and validation of reference genes for normalization of gene expression analysis using qRT-PCR in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Gene*, 555(2): 393–402.