

梨小食心虫几丁质合成酶 2 基因的克隆与表达研究*

杨 静^{1**} 庾 琴^{1**} 高 越¹ 刘中芳¹
史高川² 张鹏九¹ 范仁俊^{1***}

(1. 山西省农业科学院植物保护研究所, 农业有害生物综合治理山西省重点实验室, 太原 030031;

2. 山西省农业科学院棉花研究所, 运城 044000)

摘 要 【目的】研究梨小食心虫 *Grapholitha molesta* (Busck) 几丁质合成酶 2 (*GmCHS2*) 基因序列和表达特性, 为进一步研究其功能及新型杀虫剂的开发提供理论依据。【方法】利用转录组数据和 RACE 技术首次获得 *GmCHS2* 基因 cDNA 序列 (命名为 *GmCHS2*, GenBank 登录号为 KY242360), 利用其他昆虫同源序列构建系统发育树, 利用实时荧光定量 PCR 技术研究 *GmCHS2* 在不同发育阶段和不同组织的表达特性。【结果】*GmCHS2* 基因序列全长 4 991 bp, 开放阅读框为 4 554 bp, 其中 5'端非编码区长 267 bp, 3'端非编码区长 170 bp, 共编码 1 517 个氨基酸, 包含了 14 个跨膜螺旋。系统发育树结果表明该基因属于几丁质合成酶 2 类基因。*GmCHS2* 基因在试虫不同发育阶段都有表达, 预蛹期和成虫期表达量最高; 不同组织中, 前肠和中肠的表达量最高, 其次是后肠, 其余组织表达量很少或不表达。【结论】本文研究了 *GmCHS2* 基因在梨小食心虫不同发育阶段和组织部位的表达特性, 该基因可能在梨小食心虫生长发育过程中具有重要作用。

关键词 梨小食心虫, 几丁质合成酶, 表达谱, 荧光定量 PCR

Molecular cloning, sequence analysis and expression of the chitin synthase 2 gene in the oriental fruit moth *Grapholitha molesta* (Busck)

YANG Jing^{1**} YU Qin^{1**} GAO Yue¹ LIU Zhong-Fang¹
SHI Gao-Chuan² ZHANG Peng-Jiu¹ FAN Ren-Jun^{1***}

(1. Institute of Plant Protection, Shanxi Academy of Agricultural Science, Key Laboratory of Integrated Pest Management in Agriculture (IPMA), Taiyuan 030031, China; 2. Cotton Research Institute, Shanxi Academy of Agricultural Science, Yuncheng 044000, China)

Abstract 【Objectives】To analyze the mRNA expression characteristics of the oriental fruit moth, *Grapholitha molesta* (Busck) chitin synthase 2 gene (*GmCHS2*) and provide a theoretical basis for studying its physiological function and developing new pest control methods. 【Methods】The cDNA of *GmCHS2* (GenBank accession number: KY242360) was obtained based on the transcriptome dataset and rapid amplification cDNA end (RACE) technology. A phylogenetic tree was constructed based on the homologous sequences of other insects. Relative expression levels of the *GmCHS2* gene were detected in different development stages and tissues using real-time quantitative PCR. 【Results】*GmCHS2* cDNA was 4 991bp in length, including a 267 bp 5' terminal UTR and a 170 bp 3' terminal UTR, encodes 1517 amino acids and contains 14 transmembrane helices. A phylogenetic tree indicates that *GmCHS2* belongs to the chitin synthase 2 gene family. Analysis of *GmCHS2* expression in different development stages revealed that the highest expression levels occurred in prepupae and adults. Analysis of the expression of *GmCHS2* in different tissues indicates that it was highly expressed in the foregut and

*资助项目 Supported projects: 山西省农业科学院攻关项目 (YGG1433); 山西省农业科学院博士研究基金 (YBSJJ1513); 山西省农业科技成果转化和推广示范工程 (2015CGZH041); 国家公益性行业专项 (201103024)

**共同第一作者 Co-first authors, E-mail: jingyang830317@126.com, yuqinninetwoone@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: rjfan@163.com

收稿日期 Received: 2016-12-25, 接受日期 Accepted: 2017-05-19

midgut, followed by the hindgut, and only slightly expressed, or not expressed, in other tissues. **[Conclusion]** *GmCHS2* may play an important role in the growth and development of *G. molesta*.

Key words *Grapholitha molesta*, chitin synthase, expression profile, real-time quantitative PCR

几丁质(Chitin)是通过 β -1,4-糖苷键连接而成的多聚物,是自然界含量最丰富的氨基多糖,主要存在于无脊椎动物、藻类、真菌等生物体中(Andersen *et al.*, 1995)。在昆虫中,几丁质是表皮和围食膜的主要结构成分,起着保护、支持和营养的作用(Kramer *et al.*, 1995)。昆虫生长与变态发育过程中,其表皮与围食膜不断地脱落和再生(Merzendorfer and Zimoch, 2004),几丁质也被不断地重复合成和降解。

几丁质在昆虫体内合成是一个高度复杂的过程,其间涉及多种酶的参与,几丁质合成酶(CHS)是几丁质合成途径中的关键酶(Candy and Kilby, 1962)。对多种昆虫几丁质合成酶基因及其编码的蛋白质分析发现,几丁质合成酶基因的开放阅读框长度超过4 500 bp,编码的氨基酸超过1 500个,分子量在160~180 ku之间,是一种大型跨膜蛋白(张文庆等, 2011)。目前已在昆虫中发现的几丁质合成酶可以分为两种,即CHS1和CHS2。CHS1主要在昆虫表皮和气管等外胚层细胞中表达,而CHS2主要在肠壁细胞中表达,其表达产物参与围食膜的形成。无论CHS1还是CHS2,都具有A、B和C 3个共同的结构域。A区域是几丁质合成酶N-末端区域,含有不同数目的跨膜螺旋,物种之间序列相似性最低。B区域是蛋白质的催化中心,该区域高度保守,包括两个非常保守的标签序列EDR和QRRRW。C区域包含几丁质合成酶的C-末端,虽然这个区域的保守性远远低于催化区域,但也有个7个跨膜螺旋作为共同特征(陆建良等, 2008; Qu *et al.*, 2011; 张文庆等, 2011; Liu *et al.*, 2012)。

梨小食心虫 *Grapholitha molesta* (Busck)属鳞翅目Lepidoptera,小卷叶蛾科Olethreutidae。我国除西藏未见报道外,其他各梨、桃产区均有发生,尤以东北、华北和华东地区发生普遍。梨

小食心虫具有分布广、为害重、寄主种类多及寄主转移等特点(范仁俊等, 2013; Yang *et al.*, 2016)。近年来,由于果树种植结构的改变、种植面积的扩大以及化学农药的不合理使用,梨小食心虫对常用化学农药产生了抗药性,造成我国许多地区梨小食心虫的为害逐年加重(郑燕, 2014)。因此,急需研发新型的环境友好型防治梨小食心虫的方法。几丁质合成酶是几丁质代谢的关键酶类,为无脊椎动物体内几丁质代谢所特有的,因此是潜在的环境友好杀虫剂的理想靶标。本文克隆获得梨小食心虫CHS2基因并对其转录表达进行了分析,为进一步研究梨小食心虫几丁质合成酶基因功能奠定基础,也为以几丁质合成酶为靶标的新型杀虫剂的研究开发提供理论依据,为梨小食心虫的防治提供新的思路和方法。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

供试梨小食心虫最初采自山西省太谷县桃园桃梢,随后幼虫在室内人工气候箱用人工饲料饲喂(王艳蓉等, 2011),最佳饲养条件为温度(26 ± 0.5)、RH(70 ± 10)%、15L 9D,成虫饲喂5%蜂蜜水。分别取不同龄期的试虫及预蛹第1天试虫的不同组织,并用液氮迅速冷冻,置于-80℃保藏待用。

1.2 主要试剂和仪器设备

RNAeasy Mini Kits为德国Qiagen公司产品; PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthase、Ex Taq、LA Taq、3'-Full RACE Core Kit和SYBR Premix Ex Taq II (TliRNaseH⁺)为宝生物工程大连有限公司(TAKARA)产品, Gel Extraction和PlasmidMini Kit为Omega公司产品, pEASY-T1 Cloning kit和Trans1-T1 Phage Resistant感受态细胞为北京全式基因产品; PCR引物合成由

上海 Invitrogen 公司合成;普通测序工作由北京美吉生物科技有限公司完成,转录组测序工作由上海派森诺生物科技股份有限公司完成。

凝胶成像系统 AlphaImager HP 由美国 ProteinSimple 公司生产;T100 热循环仪由美国 Bio Rad 公司生产;LineGene 9600 荧光定量 PCR 仪由杭州博日科技有限公司生产。

1.3 梨小食心虫几丁质合成酶 2 基因的克隆

取梨小食心虫 5 龄幼虫和蛹各 1 头,利用 Qiagen 公司的总 RNA 提取试剂 RNAeasy Mini Kits 提取总 RNA,将幼虫和蛹的总 RNA 混合,使用 TAKARA 公司的 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthase 合成 cDNA 第一条链,作为聚合酶链式反应(PCR)的模板。以林晨(2010)的方法,利用简并引物 F2-F 和 F2-R 扩增 *GmCHS2* 基因的中间片段,PCR 反应条件为:94 3 min;94 30 s,温度梯度 45~60 退火 1 min,72 30 s,35 个循环;72 10 min。5'端序列由 *GmCHS2* 基因的中间片段与梨小食心虫转录组数据库比对而获得和 3'端的 RACE 反应按照 3'-Full RACE Core Kit 试剂盒说明书进行。

根据已经获得的 *GmCHS2* 基因片段设计 3'RACE 引物,以试剂盒提供的 3'RACE Outer Primer 和 CHS2 Out Primer 为引物进行第一轮 PCR 反应,反应程序如下:94 3 min;94 30 s,温度梯度 62 退火 30 s,72 2 min,35 个循

环;72 10 min。将 3'RACE 的 PCR 产物取 1 μL 作为模板,以试剂盒提供的 3'RACE Inner Primer 和 CHS2 Inner Primer 为引物进行第 2 轮 PCR 反应,反应程序如下:94 3 min;94 30 s,温度梯度 57 退火 30 s,72 2 min,35 个循环;72 10 min。PCR 反应产物使用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测后,将目的条带按照 Gel Extraction 试剂盒说明书进行纯化回收,回收后的 PCR 产物连接到载体 pEASY-T1 上,转化进入 Trans1-T1 Phage Resistant 感受态细胞中,进行蓝白斑筛选,挑选阳性克隆送到公司进行测序。

通过将已知序列和 3'RACE 获得的序列比对拼接获得 *GmCHS2* 基因 cDNA 序列,在该基因的 5'和 3'非编码区设计引物,进行 PCR 扩增并测序,用于验证拼接的基因序列是否正确。具体引物信息见表 1。

1.4 序列分析和分子进化树分析

利用 NCBI 中的 ORF Finder 确定其完整编码序列并显示其编码的氨基酸序列;利用 NCBI 的 BLASTP 进行蛋白同源性比较分析,利用 ProtPar 软件(<http://web.expasy.org/protparam/>)预测蛋白的理论分子量和等电点等;利用 TMHMM 软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)对蛋白的跨膜区进行分析;利用 NetNGlyc1.0 软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)分析信号肽和糖基化位点;保守结构域也通过 NCBI

表 1 本研究所用的引物
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物用途 Use of primers	引物序列 Primer sequences (5'-3')
F2-F	<i>GmCHS2</i> cDNA 片段	CAARYHACBGSNTTYDITYGT NTGG
F2-R	<i>GmCHS2</i> cDNA fragment	GTCARARAACWNATCATYT
CHS2 Out Primer	3'末端扩增	CGTGTTCTTTGGCTCGGTGAT
CHS2 Inner Primer	3' RACE	AAAAGATTGACGAGGACGGA
CHS2-qPCR-F	<i>GmCHS2</i> 荧光定量 PCR	AGAGACAGTGACGAGGATTC
CHS2-qPCR-R	<i>GmCHS2</i> RT-qPCR	ACGAGGATGTATGCCAGAAC
Actin-F	内参引物	AGAGGGAAATCGTGCGTGA
Actin-R	Internal primers	CATACCCAGGAAGGAAGGCT
CHS2-F	<i>GmCHS2</i> 全长	AAACGGCCCCACAAGCCTCTA
CHS2-R	The full length of <i>GmCHS2</i>	CGTGCCCATTCGGTGTAAGA

BLSAT 查找分析; 利于 Cluster X 将梨小食心虫几丁质合成酶 2 基因推测的氨基酸序列与 GeneBank 数据库中登录的其他昆虫的几丁质合成酶氨基酸序列进行比对; 利用 MEGA5.0 软件构建系统发育树。

1.5 梨小食心虫几丁质合成酶 2 基因时空表达分析

根据王芳等 (2016) 对梨小食心虫龄数和龄期的划分标准, 分别取 2 龄, 3 龄前期、中期和后期, 4 龄前期、中期和后期, 5 龄前期、中期和后期, 预蛹第 1 和第 3 天, 蛹期第 1、3、5 和 7 天以及成虫第 1 和 3 天的试虫组织各 20 mg, 提取总 RNA, 反转录获得 cDNA, 不同龄期的样品均重复 3 次。取预蛹第 1 天试虫的头、表皮、脂肪体、前肠、中肠、后肠、气管和马氏管提取总 RNA, 反转录获得 cDNA, 每个组织重复 3 次。不同龄期的表达量以 2 龄幼虫的表达量作为 1, 不同组织的表达量以表皮的表达量作为 1。以 Actin 为内参基因, 用实时荧光定量 PCR 检测目标基因表达量的变化, 被测目标基因表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算。表达量的差异显著性比较采用 SPSS 软件进行分析。荧光定量 PCR 引物信息见表 1。

2 结果与分析

2.1 梨小食心虫 *GmCHS2* 基因的克隆及蛋白特性分析

利用林晨 (2010) 扩增茶尺蠖几丁质合成酶设计的简并引物扩增获得 *GmCHS2* 基因的片段 1 009 bp。将该序列与梨小食心虫转录组数据比对, 得到了梨小食心虫 5'端序列。进一步进行 3'RACE 获得了梨小食心虫 3'端序列, 将获得的序列与已知序列拼接。通过在 5'和 3'非编码区设计引物扩增获得 *GmCHS2* 的 cDNA 序列, 测序后通过序列对比确认该序列为梨小食心虫 *GmCHS2* 基因 (GenBank 登录号 KY242360, GenBank 将于 2018 年 1 月 1 日之后开始释放该序列)。该序列全长 4 991 bp, 开放阅读框为 4 554 bp, 其中 5'端非编码区长 267 bp, 3'端非编码区长

170 bp, 共编码 1 517 个氨基酸。

通过软件预测分析, *GmCHS2* 基因编码蛋白的分子量为 173.46 ku, 等电点为 5.87; 氨基酸序列不含有信号肽, 有 7 个预测 N-糖基化位点 (图 1 方框); 包含了 14 个跨膜螺旋区 (图 1 灰色背景); 其中 322 个氨基酸是为几丁质合成酶的保守序列 (图 1 下划线), 包含了几丁质合成酶特有的标签序列 EDR 和 QRRRW (图 1 黑色背景)。

2.2 *GmCHS2* 系统进化树的构建

利用 NCBI 的 BLASTP 进行蛋白相似性比较分析发现, *GmCHS2* 基因推导的氨基酸序列与其它物种同源基因编码的 CHS2 蛋白序列相似性很高, 与鳞翅目麦蛾科马铃薯块茎蛾 *Phthorimaea operculella*, 夜蛾科棉铃虫 *Helicoverpa armigera*, 螟蛾科亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis*, 凤蝶科金凤蝶 *Papilio machaon* 和斑蝶科帝王蝶 *Danaus plexippus* 等昆虫的相似性达到 80% 以上, 与这些昆虫的 CHS1 蛋白的相似性也达到 65% 以上。系统进化分析结果表明, *GmCHS2* 与其他昆虫的 CHS2 蛋白聚为一个大支, 而 CHS1 蛋白聚为另一个大支 (图 2), 表明本文获得的梨小食心虫 *GmCHS2* 基因属于昆虫的几丁质合成酶 2 基因家族。

2.3 *GmCHS2* 基因在梨小食心虫不同发育阶段和不同组织的表达特性

利用 RT-PCR 和 qPCR 技术对几丁质合成酶 2 基因在梨小食心虫不同发育阶段的表达进行分析 (图 3)。结果表明, *GmCHS2* 在梨小食心虫幼虫、预蛹、蛹和成虫的不同发育阶段均有表达, 但是表达量存在一定的差异。在幼虫各个阶段 *GmCHS2* 的相对表达量略有变化, 但是没有显著性差异; 在预蛹第 1 天 *GmCHS2* 基因的表达量迅速升高, 预蛹第 3 天达到最高峰, 此时的表达量为 2 龄幼虫的 82 倍; 在蛹期, 该基因的表达量下降到幼虫期的表达水平; 羽化后第 1 天, *GmCHS2* 表达量开始显著上升, 羽化后第 3 天继续上升。*GmCHS2* 基因不同发育阶段的总体表达趋势为预蛹期和成虫期的最高, 其余发育阶段表达量变化不明显。

1
21
41
61
81
101
121
141
161
181
201
221
241
261
281
301
321
341
361
381
401
421
441
461
481
501
521
541
561
581
601
621
641
661
681
701
721
741
761
781
801
821
841
861
881
901
921
941
961
981
1001
1021
1041
1061
1081
1101
1121
1141
1161
1181
1201
1221
1241
1261
1281
1301
1321
1341
1361
1381
1401
1421
1441
1461
1481
1501
1521
1541
1561
1581
1601
1621
1641
1661
1681
1701
1721
1741
1761
1781
1801
1821
1841
1861
1881
1901
1921
1941
1961
1981
2001
2021
2041
2061
2081
2101
2121
2141
2161
2181
2201
2221
2241
2261
2281
2301
2321
2341
2361
2381
2401
2421
2441
2461
2481
2501
2521
2541
2561
2581
2601
2621
2641
2661
2681
2701
2721
2741
2761
2781
2801
2821
2841
2861
2881
2901
2921
2941
2961
2981
3001
3021
3041
3061
3081
3101
3121
3141
3161
3181
3201
3221
3241
3261
3281
3301
3321
3341
3361
3381
3401
3421
3441
3461
3481
3501
3521
3541
3561
3581
3601
3621
3641
3661
3681
3701
3721
3741
3761
3781
3801
3821
3841
3861
3881
3901
3921
3941
3961
3981
4001
4021
4041
4061
4081
4101
4121
4141
4161
4181
4201
4221
4241
4261
4281
4301
4321
4341
4361
4381
4401
4421
4441
4461
4481
4501
4521
4541
4561
4581
4601
4621
4641
4661
4681
4701
4721
4741
4761
4781
4801
4821
4841
4861
4881
4901
4921
4941
4961
4981
5001
5021
5041
5061
5081
5101
5121
5141
5161
5181
5201
5221
5241
5261
5281
5301
5321
5341
5361
5381
5401
5421
5441
5461
5481
5501
5521
5541
5561
5581
5601
5621
5641
5661
5681
5701
5721
5741
5761
5781
5801
5821
5841
5861
5881
5901
5921
5941
5961
5981
6001
6021
6041
6061
6081
6101
6121
6141
6161
6181
6201
6221
6241
6261
6281
6301
6321
6341
6361
6381
6401
6421
6441
6461
6481
6501
6521
6541
6561
6581
6601
6621
6641
6661
6681
6701
6721
6741
6761
6781
6801
6821
6841
6861
6881
6901
6921
6941
6961
6981
7001
7021
7041
7061
7081
7101
7121
7141
7161
7181
7201
7221
7241
7261
7281
7301
7321
7341
7361
7381
7401
7421
7441
7461
7481
7501
7521
7541
7561
7581
7601
7621
7641
7661
7681
7701
7721
7741
7761
7781
7801
7821
7841
7861
7881
7901
7921
7941
7961
7981
8001
8021
8041
8061
8081
8101
8121
8141
8161
8181
8201
8221
8241
8261
8281
8301
8321
8341
8361
8381
8401
8421
8441
8461
8481
8501
8521
8541
8561
8581
8601
8621
8641
8661
8681
8701
8721
8741
8761
8781
8801
8821
8841
8861
8881
8901
8921
8941
8961
8981
9001
9021
9041
9061
9081
9101
9121
9141
9161
9181
9201
9221
9241
9261
9281
9301
9321
9341
9361
9381
9401
9421
9441
9461
9481
9501
9521
9541
9561
9581
9601
9621
9641
9661
9681
9701
9721
9741
9761
9781
9801
9821
9841
9861
9881
9901
9921
9941
9961
9981
10001

2761 TGG CTA TGT ACA CTA CTG TTA CAA CGT GGC TAC CGC GTC GAA TAC TCC GCA GCG TCG GAT GCG TAC ACG CAC TGC CCA GAA GCT TTC GGC GAG TTC TAC AAC CAG CGC CGG CGT TGG GTG
W L C T L L L Q R G Y R V E Y S A A S D A Y T H C P E A F G E F Y N **Q R R R W** V

2881 CCT TCT ACG ATG GCT AAT ATC TTG GAT CTG CTG GGA GAT GCC AAG CAA ACT GTC AAA TCA AAC GAC AAT ATT TCA ACA CTC TAC ATT TGT TAT CAG ATG TTG CTG ATG GTG GGT ACA ATC
P S T M A N I L D L L G D A K Q T V K S N D **N I S** T L Y I C Y Q M L L M V G T I

3001 CTA GGC CGC GGG ACC ATC TTC CTC ATG ATG ATT GGC GCG ATG AAC GCC ATC ACC GGC ATC AGC AAC ATG AAC GCG CTC ATT TTG AAC TTG ATC CCT GTC GTC ATA TTC ATC ACC GTC TGC
L G P G T I F L M M I G A M N A I T G I S N M N A L I L N L I P V V I F I T V C

3121 ATG ACT TGC AAG TCT GAA ACA CAG CTG ATC CTC GCA ACC GCC ATA ACC TGC TTG TAC GCT ATG TTA ATG ATG ATG GTC ATA GTC GGC ATC GCT CTC CAA ATA GTC GAG GAC GGG TGG CTG
M T C K S E T Q L I L A T A I T C L Y A M L M M M V I V G I A L Q I V E D G W L

3241 GCC CCT TCT AGC ATA TTC ACC ATA GTA ACA TTT GGC ATT TTC TTG ATT ACG GCC GCG CTG CAC CCG CAA GAG ATG ATA TGT CTG CTG TAC CTA GTG GTG TAC TAC ATT ACG ATC CCT AGC
A P S S I F T I V T F G I F F I T A A L H P Q E M I C L L Y L V V Y Y I T I P S

3361 ATG TAT ATG TTG CTG ATT ATA TAC TCT TTG TGT AAT TTG AAC AAC GTC TCG TGG GGT ACC CCG GAA GTG GCA CAG AAG AAA ACT TTA AAG GAA ATC GAA CAA GAA AAA AAG GAT GCT GAA
M Y M L L I I Y S L C N L N **N V S** W G T R E V A Q K K T L K E I E Q E K K D A E

3481 GAA GCT CAA AAG ACA ATG GAC ACG CAA ACC GTA AAA AGA ATT TTC GGC AAA TCG GAT GAT GAG AGC GGT TCC ATG GAG ATG AGC GTT GCG GGC TTG TTC AAG TGC ATG TGC TGC ACC AAC
E A Q K T M D T Q T V K R I F G K S D D E S G S M E M S V A G L F K C M C C T N

3601 CCG AAG GAC CAT AAA GAG GAC TTG CAT CTG CTG CAA ATT GCT CAT TCT CTG GAG AAG ATG GAG AAG AGA TTA GAT ACT CTC GGT GCC GTC ACT GAA GCC CCC GAT GTG CCT CGT CCG CGA
P K D H K E D L H L L Q I A H S L E K M E K R L D T L G A V T E A P D V P R R R

3721 TCC ACC CTG CAT CTG CGT GAC ACC CAC ACT CTG TTA GAG GAA TAC GAA GAG CAA AGT GAA TTG TCT GCT GAC ACG CCC AGG GAA GAG AGA GAC GAT TTG ATC AAC CCC TAC TGG GTA GAG
S T L H L R D T H T L L E E Y E E Q S E L S A D T P R E E R D D L I N P Y W V E

3841 GAC CCT GAT GTG AAG AAG GGA GAG GTA GAC TTC TTG AGC ACT GCT GAA AAC CAG TTC TGG AAG GAT CTA ATT GAC ACC TAT TTG AGA CCT ATT GAT GAA AAT AAG GAG GAA CAA GTT CGT
D P D V K K G E V D F L S T A E N Q F W K D L I D T Y L R P I D E N K E E Q V R

3961 ATC GCA AAG GAT TTA AAG GAC CTC CGA GAC AAA ATG GTG TTT GCG TTC GTT ATG TTG AAC GCG TTG TTC GTT TTG GTC ATC TTC TTG CTG CAG CTC AAT CAG GAT CAG CTG CAT TTC CAA
I A K D L K D L R D K M V F A F V M L N A L F V L V I F L L Q L N Q D Q L H F Q

4081 TGG CCT TTC GGG CAA AAA GTG GAC ATT TCA TAT GAC GAT GAA TCC AAT ACA GTA CAA ATC GAA CGA GAG TAT TTG ATG TTG GAG CCC ATC GGC TCG TTG TTC CTC GTG TTC TTC GGC TCG
W P F G Q K V D I S Y D D E S N T V Q I E R E Y L M L E P I G S L F L V F F G S

4201 GTG ATG TTG ATC CAA TTC ACG GCC ATG CTC TTA CAC CGA ATG GGC ACG TTA ACG CAT CTG TTG TCT ACG ACC ACA TTG AAC TGG TAT TGC GCG AAG TCG CCA AAC GAC ACA ACG CAG CAC
V M L I Q F T A M L L H R M G T L T H L L S T T T L N W Y C A K S P **N D T** T Q H

4321 GGC GTG CTG GAA ACC CAA GCA TTC GGC ATC ATC AAA GAC TTG CTC AAT AAC AAA AAG ATT GAC GAG GAG GGA GTA GGC GGC GAC GGT ATA GAC GCG ACT CAT GTG ACA AGA AGA AAG ACT
A V L E T Q A F A I I K D L L N N K K I D E D G V G G D G I D A T H V T R R K T

4441 ATA CAG AAT CTG GAG CGA CCG AAG ACT GTG AAG CCG AAT GAA GTT AAT CTT GAG GCT AAT TTC GAG AAG AGA CTA TCT ACT GTT ATA CAG AAT CCA AAG TCG GAG TAC CTG GCG CCG CTG
I Q N L E R R K T V K P N E V N L E A N F E K R L S T V I Q N P K S E Y L A R L

4561 CCG TCG CTG GGC GGC AGC GAG GCG GCG CCG CTG ACG CTG CCG GCG CTG CAG GCG CCG CCG GAG TCC GTG CTG CAC GAG CCG CCG AAG TCG CAG GCC CAG CTC GGC ACC GCG CCC ATC
P S L G G S E A A R R L T L R A L Q A R R E S V L H E R R K S Q A Q L A T A P I

4681 CCG CTC CCG CAA GAC CTG AGC CCG CCG TCG ACG TCG GGC GCC TAC GTG AAC CCG AGC TAC GAG CCG GCC TTC GAC AGC GAC GAG TCG CCG CCG CTG CCG CCG CCG AGC ACC GTC AGG
P L R Q D L S R P S T S G A Y V **N R S** Y E P A F D S D D E S P R L P R R S T V R

4801 TTC CCG GAC CCT AAT ATA TAA CCT ACT TTT GTA CTT TTA TTA TGA CTG AAT AAC GTA TTT ACA CTA GCA CTA ATT GTT TTT ATT ACC TAT CAT CAT AAA ATC TAA CGT AAC CAG TGT CAG
F R D P N I *

4921 TTC GGT TTT CAA GGA TGT AAC TCG TTG ATA TGA ATT TTC TTG ACT GAC TGT TAA TAT AAA GTA GAC AAC CA

图 1 梨小食心虫几丁质合成酶 2 基因 cDNA 序列和推导的氨基酸序列

Fig. 1 Chitin synthase 2 cDNA sequence and the deduced amino acid sequence from *Grapholitha molesta*

灰色表示跨膜螺旋区, 下划线表示几丁质合成酶保守序列, 黑色表示几丁质合成酶的
2 个标签序列 EDR 和 QRRW, 方框表示预测的 N-糖基化位点。

Gray color indicates trans-membrane helices, the amino acids underlined denotes conserved motif of CHS2, and black color indicates two CHS signature motifs EDR and QRRW, the amino acids in the frames indicate potential N-glycosylation sites.

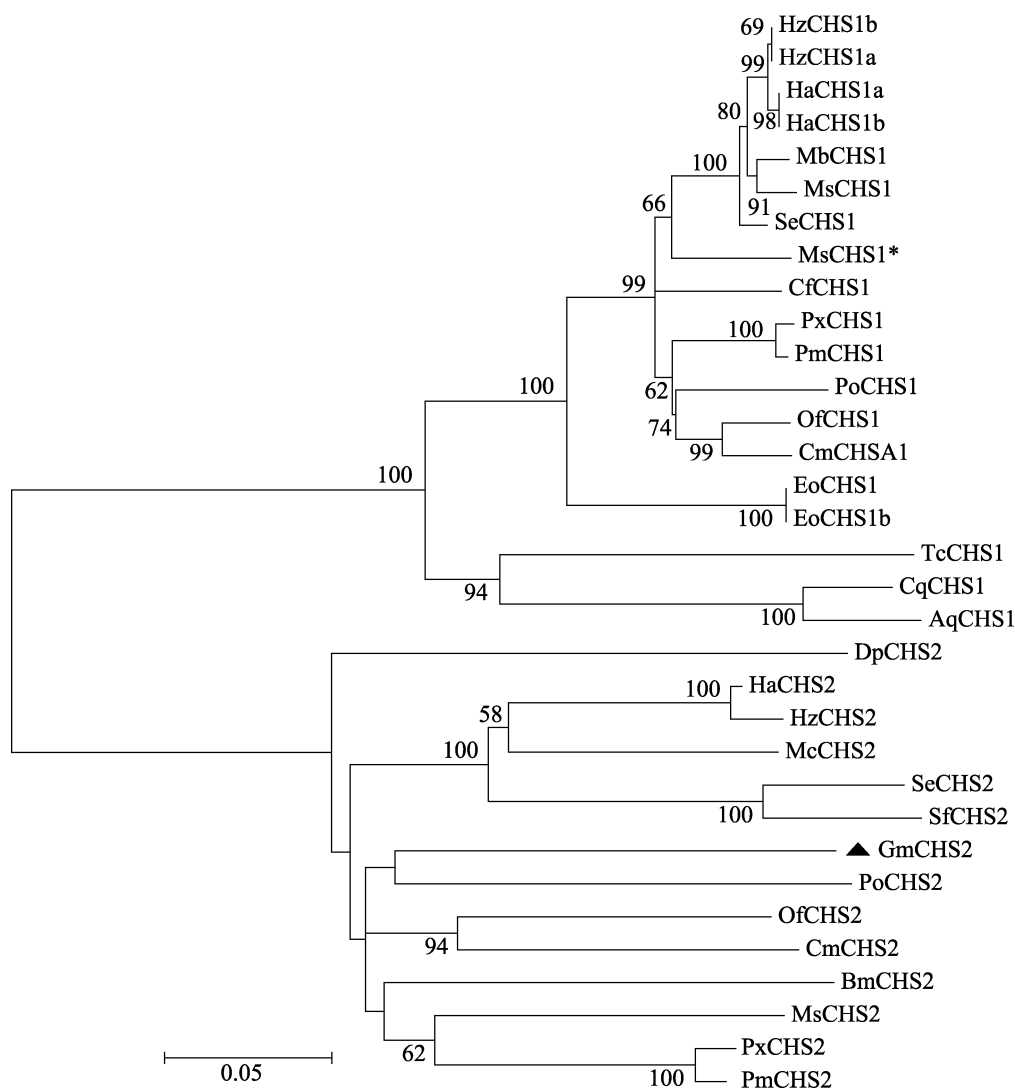


图 2 基于邻接法构建的梨小食心虫 *GmCHS2* 基因与其相关物种的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *GmCHS2* in *Grapholita molesta* and other related insects based on amino acid sequence by using Neighbor-Joining method

节点处的数字为 1 000 次自展后超过 50% 的自展值。

Bootstrap support values (>50) of NJ tree (1 000 replicates) are indicated above the lines.

HzCHS1b (美洲棉铃虫 *Helicoverpa zea* ADX66429), HzCHS1a (美洲棉铃虫 *H. zea* ADX66428), HaCHS1a (棉铃虫 *H. armigera* AKR54210), HaCHS1b (棉铃虫 *H. armigera* AKR54211), MbCHS1 (甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* ABX56676), MsCHS1 (粘虫 *Mythimna separata* AOZ56906), SeCHS1 (甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* AAZ03545), MsCHS1* (烟草天蛾 *Manduca sexta* AAL38051), CfCHS1 (云杉卷叶蛾 *Choristoneura fumiferana* ACD84882), PxCHS1 (柑橘凤蝶 *Papilio xuthus* KPI93758), PmCHS1 (金凤蝶 *P. machaon* KPJ06518), PoCHS1 (马铃薯块茎蛾 *P. operculella* AOE23678), OfCHS1 (亚洲玉米螟 *O. furnacalis* ACF53745), CmCHS1a (稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis* AJG44538), EoCHS1a (茶尺蠖 *Ectropis obliqua* ACA50098), EoCHS1b (茶尺蠖 *E. obliqua* ACD10533), TcCHS1 (赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* NP_001034491), CqCHS1 (致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* XP_001866798), AqCHS1 (四斑按蚊 *Anopheles quadrimaculatus* ABD74441), DpCHS2 (帝王蝶 *D. plexippus* EHJ63544), HaCHS2 (棉铃虫 *H. armigera* AKZ08595), HzCHS2 (美洲棉铃虫 *H. zea* ADX66427), McCHS2 (蓓带夜蛾 *Mamestra configurata* AJF93428), SeCHS2 (甜菜夜蛾 *S. exigua* ABI96087), SfCHS2 (草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* AAS12599), GmCHS2 (*G. molesta* KY242360), PoCHS2 (马铃薯块茎蛾 *P. operculella* AIJ50381), OfCHS2 (亚洲玉米螟 *O. furnacalis* ABB97082), CmCHS2 (稻纵卷叶螟 *C. medinalis* AJG44539), BmCHS2 (家蚕 *Bombyx mori* AFC69002), MsCHS2 (烟草天蛾 *M. sexta* AAX20091), PxCHS2 (柑橘凤蝶 *P. xuthus* KPI93759), PmCHS2 (金凤蝶 *P. machaon* KPJ06520).

同样利用 RT-PCR 和 qPCR 技术对几丁质合成酶 2 基因在梨小食心虫不同组织的表达进行了分析(图 4)。结果显示, *GmCHS2* 在梨小食心虫不同组织的表达量有明显差异。在表皮、头和脂肪体中几乎没有可检测的表达,在气管和马氏管中有少量的表达,在消化道中表达量很高,其中, *GmCHS2* 在前肠表达量最高,其次是中肠,在后肠的表达量是消化道中最低的。

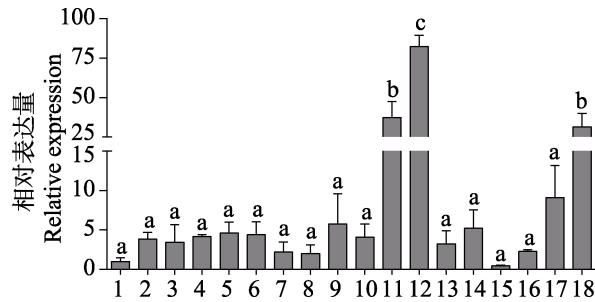


图 3 几丁质合成酶 2 基因 (*GmCHS2*) 在梨小食心虫不同龄期的相对表达量

Fig. 3 Relative expression levels of *GmCHS2* in different developmental stages in the whole body of *Grapholitha molesta*

1: 2 龄幼虫; 2: 3 龄前期幼虫; 3: 3 龄中期幼虫; 4: 3 龄后期幼虫; 5: 4 龄前期幼虫; 6: 4 龄中期幼虫; 7: 4 龄后期幼虫; 8: 5 龄前期幼虫; 9: 5 龄中期幼虫; 10: 5 龄后期幼虫; 11: 预蛹第 1 日龄; 12: 预蛹第 3 日龄; 13: 蛹第 1 日龄; 14: 蛹第 3 日龄; 15: 蛹第 5 日龄; 16: 蛹第 7 日龄; 17: 成虫第 1 日龄; 18: 成虫第 3 日龄。数据均代表 3 次生物学重复的平均值±标准差。柱上标有不同的字母代表基因表达差异显著 ($P < 0.05$, Tukey's B; $n=3$)。下图同。

1: 2nd instar larvae; 2: Anterior stage of 3rd instar larvae; 3: Median stage of 3rd instar larvae; 4: Posterior stage of 3rd instar larvae; 5: Anterior stage of 4th instar larvae; 6: Median stage of 4th instar larvae; 7: Posterior stage of 4th instar larvae; 8: Anterior stage of 5th instar larvae; 9: Median stage of 5th instar larvae; 10: Posterior stage of 5th instar larvae; 11: 1 day prepupae; 12: 3 day prepupae; 13: 1 day pupae; 14: 3 day pupae; 15: 5 day pupae; 16: 7 day pupae; 17: 1 day adults; 18: 3 day adults. The data are mean $\pm$ SD. Histograms with different letters indicate statistically significant difference ($P < 0.05$, Tukey's B; $n=3$). The same below.

3 讨论

本文成功克隆了梨小食心虫 *GmCHS2* 的 cDNA 序列,其中包含 4 554 bp 完整的开放阅读

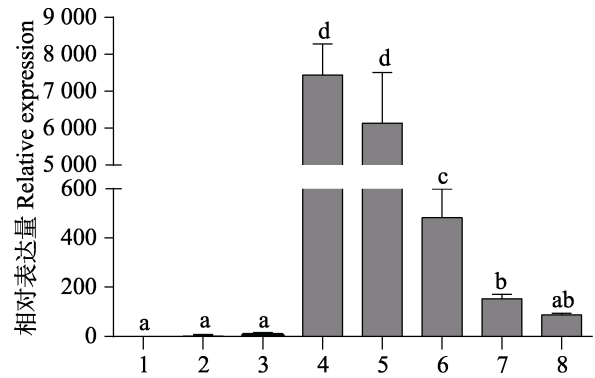


图 4 几丁质合成酶 2 基因 (*GmCHS2*) 在预蛹第 1 天梨小食心虫不同组织部位的相对表达量

Fig. 4 Relative expression levels of *GmCHS2* in tissues from 1-day prepupae of *Grapholitha molesta*

1: 表皮; 2: 头部; 3: 脂肪体; 4: 前肠; 5: 中肠; 6: 后肠; 7: 气管; 8: 马氏管。数据均代表 3 次生物学重复的平均值±标准差。

1: Integument; 2: Head; 3: Fat body; 4: Foregut; 5: Midgut; 6: Hindgut; 7: Trachea; 8: Malpighian tubules.

框 (ORF), 编码 1 517 个氨基酸序列。包含 3 个结构域: 结构域 A、结构域 B 和结构域 C。结构域 A 在几丁质合成酶的 N 端区,由 7 个跨膜螺旋组成。不同昆虫的 CHS 含有不同数量的跨膜螺旋,保守性较低,如稻纵卷叶螟 *C. medinalis* CHS1 和 CHS2 结构域 A 分别包含了 9 和 10 个跨膜螺旋 (余海中等, 2015), 桔全爪螨 *Panonychus citri* CHS2 包含了 8 个跨膜螺旋 (辛天蓉等, 2014)。结构域 B 编码 322 个氨基酸序列,是蛋白质的催化中心,该区域高度保守,包含了几丁质合成酶特有的标签序列 EDR 和 QRRRW。通过比对发现梨小食心虫与亚洲玉米螟 (*O. furnacalis* ABX46067)、棉铃虫 (*H. armigera* AKZ08595)、美洲棉铃虫 (*H. zea* ADX66427)、金凤蝶 (*P. machaon* KPJ06520)、柑橘凤蝶 (*P. xuthus* KPI93759)、烟草天蛾 (*M. sexta* AAX20091) 和稻纵卷叶螟 (*C. medinalis* AJG44539) 等多种鳞翅目昆虫 CHS2 的结构域 B 相似性高达 90% 以上。结构域 C 包含了 7 个跨膜螺旋,与已经报道的稻纵卷叶螟 (*C. medinalis*)、桔全爪螨 (*P. citri*) 等昆虫 CHS2 所包含的跨膜螺旋数量相同 (辛天蓉等, 2014; 余海中等, 2015)。

根据选取的各种昆虫 CHS 氨基酸序列构建的系统进化树可以反映昆虫中该基因的进化关系,系统进化分析显示,这些昆虫的 CHS1 聚为一大支,CHS2 聚为另一大支,这预示着 CHS2 在物种进化过程中非常保守,尤其是其催化结合域。本研究得到的 GmCHS2 分布于 CHS2 区域,因此可以确定 GmCHS2 属于两类几丁质合成酶。

近年来,相关研究表明,在不同昆虫的不同发育阶段,CHS2 基因表达水平表现出一定的差异。但总体来看,该基因在昆虫的蛹期表达水平最低,其次是幼虫期,而成虫期的表达水平最高 (Arakane *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012; 余海中等, 2015)。GmCHS2 在梨小食心虫不同发育阶段的表达模式基本符合这一规律。对基因的时空表达结果细致分析可以看出, GmCHS2 在梨小食心虫发育的各个阶段均有表达,表明 CHS2 对于梨小食心虫各个发育阶段是必需的。但每个发育阶段表达水平有所差异,在幼虫期 GmCHS2 表达量变化的差异不显著,到预蛹期则显著升高。这一结果与之前报道的黑腹果蝇 *Drosophila metamorphosis* DmeCHS2 基因在不同发育阶段的表达水平研究结果一致 (Gagou *et al.*, 2002); 然而,与同为鳞翅目昆虫的亚洲玉米螟 *OfCHS2* 的研究结果存在一定的差异, *OfCHS2* 在预蛹阶段的表达水平与 5 龄最后一天一致,且低于其他阶段 (Qu *et al.*, 2011); 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 的研究表明预蛹期 *TcCHS2* 表达量显著低于成虫期 (Arakane *et al.*, 2008)。以上研究结构表明,不同昆虫 CHS2 基因在预蛹期的表达水平差异明显。我们推测造成这一现象的原因可能是不同昆虫的发育历期不一致;且不同研究中,对昆虫标本的取样间隔时间差异较大,如赤拟谷盗在预蛹期每隔 24 h 取一次昆虫标本 (Arakane *et al.*, 2008),亚洲玉米螟在预蛹期只取了一次 (Qu *et al.*, 2011),而本文中梨小食心虫为每隔 48 h 取一次。因此,获得的研究结果不能完整地显示该基因在不同发育时间的表达量变化。另外,基因的表达水平变化与其功能密切相关,本研究中,梨小食心虫

GmCHS2 在预蛹期如此高水平表达有何特定的功能尚待进一步深入研究。GmCHS2 的表达量在成虫期显著升高,这一结果与 CHS2 基因在冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*、赤拟谷盗及亚洲玉米螟等昆虫的相关研究结果一致 (Arakane *et al.*, 2008; Qu *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012)。在梨小食心虫不同组织中, GmCHS2 主要在消化道中大量表达,气管和马氏管也有少量表达,其他组织表达量极少。已有大量研究表明 CHS2 主要在昆虫肠道表达,参与围食膜的形成 (Bolognesi *et al.*, 2005; Hogenkamp *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2008; Qu *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012)。本研究中 GmCHS2 在前肠和中肠的表达量都较高,且没有显著性差异。这一结果与冈比亚按蚊 *AgCHS2* 及飞蝗 *Locusta migratoria* LmCHS2 在前肠与中肠的表达水平各不相同 (Liu *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012), *AgCHS2* 在冈比亚按蚊前肠的表达水平最高显著高于中肠,而 LmCHS2 在飞蝗的中肠表达水平最高,且显著高于前肠。我们推测出现这一现象很可能是由于这 3 种昆虫分属于不同的目,消化系统的结构存在一定的差异。

本文克隆获得梨小食心虫几丁质合成酶 2 基因 cDNA 序列,并对该序列进行了分析,了解了梨小食心虫几丁质合成酶 2 的结构特征,并对该基因在梨小食心虫的不同发育阶段和不同组织的表达量进行了分析,为进一步采用研究几丁质合成酶基因的功能及其对梨小食心虫生长发育的影响奠定了基础,也为害虫防治提供了新的思路和方法。

参考文献 (References)

- Andersen SO, Højrup P, Roepstorff P, 1995. Insect cuticular proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 25(2): 153–176.
- Arakane Y, Specht CA, Kramer KJ, Muthukrishnan S, Beeman RW, 2008. Chitin synthases are required for survival, fecundity and egg hatch in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(10): 959–962.
- Bolognesi R, Arakane Y, Muthukrishnan S, Kramer KJ, Terra WR, Ferreira C, 2005. Sequences of cDNAs and expression of genes encoding chitin synthase and chitinase in the midgut of *Spodoptera frugiperda*. *Insect Biochemistry and Molecular*

- Biology*, 35(11): 1249–1259.
- Candy DJ, Kilby BA, 1962. Studies on chitin synthesis in the desert locust. *Journal of Experimental Biology*, 39(1): 129.
- Fan RJ, Liu ZF, Lu JJ, Feng YY, Yu Q, Gao Y, Zhang RX, 2013. Progress in the application of IPM to control the oriental fruit moth (*Grapholitha molesta*) in China. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50(6): 1509–1513. [范仁俊, 刘中芳, 陆俊姣, 封云涛, 庾琴, 高越, 张润祥, 2013. 我国梨小食心虫综合防治研究进展. *应用昆虫学报*, 50(6): 1509–1513.]
- Gagou ME, Kapsetaki M, Turberg A, Kafetzopoulos D, 2002. Stage-specific expression of the chitin synthase DmChSA and DmChSB genes during the onset of *Drosophila metamorphosis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(2): 141–146.
- Hogenkamp DG, Arakane Y, Zimoch L, Merzendorfer H, Kramer KJ, Beeman RW, Kanost MR, Specht CA, Muthukrishnan S, 2005. Chitin synthase genes in *Manduca sexta*: characterization of a gut-specific transcript and differential tissue expression of alternately spliced mRNAs during development. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(6): 529–540.
- Kramer KJ, Hopkins TL, Schaefer J, 1995. Applications of solids NMR to the analysis of insect sclerotized structures. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 25(10): 1067–1080.
- Kumar NS, Tang B, Chen X, Tian H, Zhang W, 2008. Molecular cloning, expression pattern and comparative analysis of chitin synthase gene B in *Spodoptera exigua*. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 149(3): 447–453.
- Lin C, 2010. Cloning of chitin synthase(CS) gene from *Ectropis obliqua* and recombination of baculovirus with dsRNAi gene. Doctoral dissertation. Hangzhou: Zhejiang University. [林晨, 2010. 茶尺蠖几丁质合成酶基因克隆及其双链干涉重组病毒毒力研究. 博士学位论文. 杭州: 浙江大学.]
- Liu X, Zhang H, Li S, Zhu KY, Ma E, Zhang J, 2012. Characterization of a midgut-specific chitin synthase gene (LmCHS2) responsible for biosynthesis of chitin of peritrophic matrix in *Locusta migratoria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42(12): 902–910.
- Lu JL, Lin C, Yang XL, Zheng XQ, Liang YR, 2008. Characteristics prediction of insect chitin synthase. *Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.)*, 34(5): 491–501. [陆建良, 林晨, 杨晓丽, 郑新强, 梁月荣, 2008. 昆虫几丁质合成酶特性预测. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 34(5): 491–501.]
- Merzendorfer H, Zimoch L, 2004. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *Journal of Experimental Biology*, 206(Pt24): 4393–4412.
- Qu M, Liu T, Yang J, Yang Q, 2011. The gene, expression pattern and subcellular localization of chitin synthase B from the insect *Ostrinia furnacalis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 404(1): 302–307.
- Wang F, Yu Q, Guo GM, Hao C, Fan RJ, 2016. Determination of larval instar number and duration of the *Grapholitha molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). *Chinese Journal of Applied Entomology*, 53(2): 390–395. [王芳, 庾琴, 郭贵明, 郝赤, 范仁俊, 2016. 梨小食心虫幼虫龄数和龄期的划分. *应用昆虫学报*, 53(2): 390–395.]
- Wang YR, Huang M, Liu XW, Wu JX, Zhao D, 2011. The study on artificial diet of the oriental fruit moth (*Grapholitha molesta*). *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, (5): 161–166. [王艳蓉, 黄敏, 刘喜旺, 仵均祥, 赵栋, 2011. 梨小食心虫人工饲料的研究. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, (5): 161–166.]
- Xin TR, Que SQ, Wu XD, Wang YY, Zou ZW, Xia B, 2014. Full length cDNA cloning and sequence analysis of the chitin synthase gene from *Panonychus citri* (McGregor). *Journal of Nanchang University (Natural Science)*, 38(4): 395–401. [辛天蓉, 阙生全, 吴轩德, 王雅瑜, 邹志文, 夏斌, 2014. 桔全爪螨几丁质合成酶基因克隆与序列. *南昌大学学报(理科版)*, 38(4): 395–401.]
- Yang J, Liu ZF, Fan JQ, Wu YP, Ma RY, Fan RJ, 2016. Genetic variation and population structure of the oriental fruit moth *Grapholitha molesta* in Shanxi, a major pome fruits growing region in North China. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 19(4): 1131–1137.
- Yu HZ, Huang KH, Wang WL, Liu MH, Yang Xin, Zhang Y, Xu JP, 2015. Identification and expression analysis of chitin synthase and related enzymes in the chitin biosynthetic pathway genes of *Cnaphalocrocis medinalis*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 52(5): 1181–1194. [余海中, 黄克慧, 汪婉玲, 刘明辉, 杨鑫, 张彦, 徐家萍, 2015. 稻纵卷叶螟几丁质合成酶及合成通路相关酶基因的鉴定及表达分析. *应用昆虫学报*, 52(5): 1181–1194.]
- Zhang WQ, Chen XF, Tang B, Tian HG, Chen J, Yao Q, 2011. Insect chitin biosynthesis and its regulation. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(3): 475–479. [张文庆, 陈晓菲, 唐斌, 田宏刚, 陈洁, 姚琼, 2011. 昆虫几丁质合成及其调控研究前沿. *应用昆虫学报*, 48(3): 475–479.]
- Zhang X, Zhang J, Park Y, Zhu KY, 2012. Identification and characterization of two chitin synthase genes in African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42(9): 674–682.
- Zheng Y, 2014. The genetic diversity and structured populations of the oriental fruit moth (*Grapholitha molesta*) based on microsatellite loci and mtDNA. Doctoral dissertation. Yanglin: Northwest A&F University. [郑燕, 2014. 基于微卫星和线粒体标记的梨小食心虫种群遗传多样性和遗传结构研究. 博士学位论文. 杨凌: 西北农林科技大学.]