

袁 远,高 熹,喜 超,等. 椰子织蛾 CSP 基因的克隆与序列分析[J]. 江苏农业科学,2019,47(3):43–46.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2019.03.010

椰子织蛾 CSP 基因的克隆与序列分析

袁 远¹,高 熹¹,喜 超²,杨志新³,雷腾云⁴,张连根⁵,朱家位⁶

(1. 云南农业大学植物保护学院,云南昆明 650201; 2. 云南高原特色产业研究院,云南昆明 650201;

3. 云南农业大学学生处,云南昆明 650201; 4. 云南农业大学招生就业处,云南昆明 650201;

5. 云南农业大学农学与生物技术学院,云南昆明 650201; 6. 云南农业大学财务处,云南昆明 650201)

摘要:利用 rapid – amplification of cDNA ends (RACE) 技术,克隆获得了 1 条椰子织蛾 (*Opisina aremosella*) 的全长化感蛋白基因序列。该基因全长为 561 bp,开放阅读框全长为 393 bp,3' 和 5' 端非编码序列分别为 48、120 bp,编码 130 个氨基酸,所编码蛋白质的理论分子量为 14.8 ku,等电点为 5.85。同源性比对分析发现,椰子织蛾化感蛋白基因氨基酸序列有 4 个保守半胱氨酸位点且与其他昆虫化感蛋白基因在氨基酸的水平上相似性不高。除与棉红铃虫 (*Pectinophora gossypiella*) 相似度达 71% 外,与其他昆虫相比,均低于 10%。SignalP 预测显示,椰子织蛾化感蛋白基因所编码的前 20 个氨基酸为信号肽序列 (MAMKYLVIVLSCVLAAIVAG)。系统进化树分析结果表明,椰子织蛾化感蛋白与稻纵卷叶螟 (*Cnaphalocrocis medinalis*)、亚洲玉米螟 (*Ostrinia furnacalis*) 和家蚕 (*Bombyx mori*) 化感蛋白 1、2、3、4 聚为同一族,与家蚕化感蛋白 1、2、3、4 的进化程度最近。这为深入研究昆虫化学感受蛋白、揭开昆虫与环境化学信息联系的规律奠定理论基础。

关键词:椰子织蛾;化感蛋白;基因克隆;序列分析;系统进化树

中图分类号:S433.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002–1302(2019)03–0043–03

高度发达的化学感受系统对昆虫与环境中的化学信息联系具有重要作用。昆虫在长期进化过程中,发展演变出复杂的化学信息感受机制。例如,在觅食、寻偶、产卵等行为中,通过敏锐的嗅觉、味觉、触觉等功能,感受各种环境化学因子的刺激,从而进行精巧的化学通信,以适应环境选择,保持种群繁衍^[1]。昆虫发达的化学感受系统功能的发挥是基于昆虫各种感器淋巴液中分布着大量的化学感受蛋白 (chemosensory proteins,简称 CSPs) 和气味结合蛋白 (odorant – binding proteins,简称 OBPs)。环境中的气味分子与各种嗅觉相关蛋白结合后,被运送至嗅觉神经末梢,从而引发以嗅觉功能为主的各种化学感受反应^[2–3]。自 1994 年 McKenna 等首次在黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 触角中发现 2 种与传统的气味结合蛋白无论在结构还是在功能上都有明显差别的蛋白后,研究者们随后相继又在多个目的昆虫如双翅目、直翅目、半翅目、膜翅目、鳞翅目、鞘翅目、脉翅目等中鉴定了大量编码 CSP 的基因^[4–6]。由于此类蛋白主要存在于昆虫各种化学感受器,与感受环境化学刺激有关,所以又称之为昆虫化学感受蛋白 (chemosensory protein,简称 CSP)。CSP 种类具有多样性,表达部位也不仅仅局限于感受器官,昆虫 CSP 在身体各

部分的表达分布具有全面性,种类具有多样性,种间种内分布具有普遍性,而且在雌雄虫中均有表达,这些特点易于适应接受复杂的环境化学刺激信息,承担复杂的化学感受功能^[7]。CSP 在昆虫行为中扮演着重要角色,故对其进行深入研究,这不仅能阐明昆虫化学感受蛋白的作用机制,更有助于深入解析昆虫与环境信息交流本质,为进一步开拓害虫防治和益虫利用新途径提供了重要基础。

目前,有关昆虫化学感受蛋白的研究主要集中于一些较常见的农业害虫,如烟粉虱、棉花粉蚧、西花蓟马等。对于椰子织蛾化感蛋白基因的研究相对来说就很少了,但其危害性却不容忽视。2013 年 8 月,我国首次在海南省万宁市兴隆镇华侨农场的椰林中发现椰子织蛾 (*Opisina aremosella* Walker),风险分析表明,该虫在我国属于高度危险性有害生物,风险值 (*R* 值) 达 2.20^[8]。鉴于椰子织蛾危害的严重性,于 2014 年被国家林业局列为林业危险性有害生物^[9]。目前,国内对椰子织蛾的基因研究较少,仅有关于形态特征、生物生态学及生物防治方面的介绍性报道^[10–11]。因此,本研究对椰子织蛾的化感蛋白进行克隆和序列分析,旨在探索椰子织蛾感知外界环境化学信号的作用机制,为今后对该虫防治提供新思路和新途径、研究昆虫与环境之间信息联系的本质规律奠定分子基础。

1 材料与方法

1.1 试虫

椰子织蛾于 2016 年采自海南椰子树,于云南农业大学实验室以香蕉叶片为寄主培养,待羽化至成虫收集作为试验材料。

1.2 总 RNA 的抽提

总 RNA 的抽提采用 TRIZOL 试剂盒 (Invitrogen) 提取。

收稿日期:2018–07–03

基金项目:国家现代农业产业技术体系建设项目 (编号:SARS–11–YNZQC); 云南省现代农业产业技术体系建设项目 (编号:2017KJTX0011); 云南省重点研发计划 (编号:2017ZF004)。

作者简介:袁 远 (1982–),男,云南昆明人,硕士,助理研究员,主要从事植物保护研究。E-mail:yuan940@qq.com。

通信作者:朱家位,硕士,高级会计师,主要从事财务管理和科研管理工作,E-mail:zhjw7@163.com;张连根,硕士,讲师,主要从事农业气象研究,E-mail:842304905@qq.com。

1.3 RACE

以新鲜抽提的椰子织蛾总 RNA 为材料,利用 Clontech 公司的 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit,合成 3' 和 5' RACE cDNA 模板,以合成的 cDNA 为模板,参照 RACE 试剂盒说明书克隆该基因的 5' 端和 3' 端序列。PCR 采用 Advantage 2 PCR kit(Clontech)。PCR 反应条件为:94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 30 s,60 ℃ 退火 50 s,72 ℃ 延伸 2.5 min,循环 40 次;72 ℃ 延伸 10 min。1% 琼脂糖检测 PCR 扩增结果,对目的条带进行切胶回收后并纯化。用 TA 克隆法连接 pGEM® - T - easy 载体 (Promega),转化宿主菌为 DH5α。在 X - Gal 和 IPTG 的存在下,经蓝白斑筛选,挑阳性克隆于金思特科技(南京)有限公司测序。

1.4 序列分析

核苷酸序列的翻译和氨基酸序列的比对分析分别使用 GENETYX - MIN 5.1 和 ClustalX 1.83 软件^[12],蛋白信号肽的预测使用 SignalP 在线分析工具^[13],结构域预测采用 M

Motifscan^[14],分子系统树的构建采用 MEGA 4.0 进行^[15]。

2 结果与分析

2.1 cDNA 克隆及序列分析

将 3' 和 5' RACE 扩增所得目的基因片段进行拼接,共得椰子织蛾化感蛋白基因的全长序列为 561 bp,开放阅读框全长为 393 bp,命名为 *OarCSP* (图 1)。3' 和 5' 端非编码序列分别为 48、120 bp,该基因编码 130 个氨基酸,预测分子量和等电点分别为 14.80 ku 和 5.85。SignalP 预测显示,该蛋白的前 20 个氨基酸为信号肽序列(MAMKYLVLSCLVLAIAIVAG)。结构分析表明,*OarCSP* 氨基酸序列中潜在 1 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点(TGCE⁷²⁻⁷⁵)、2 个 N - 豆蔻酰化位点(GQKYTD²⁰⁻²⁵和 GCEKCT⁷³⁻⁷⁸)、2 个蛋白质激酶 C 磷酸化位点(TDK²⁴⁻²⁶和 TPR¹²¹⁻¹²³)和 1 个酪氨酸激酶磷酸化位点(TGK¹¹⁰⁻¹¹²)。

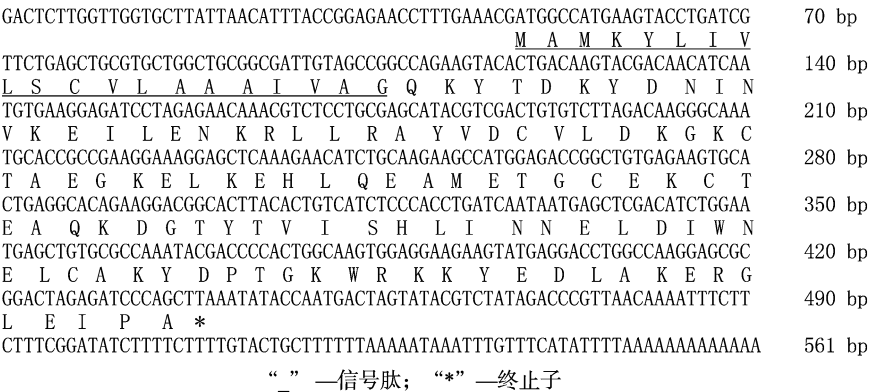
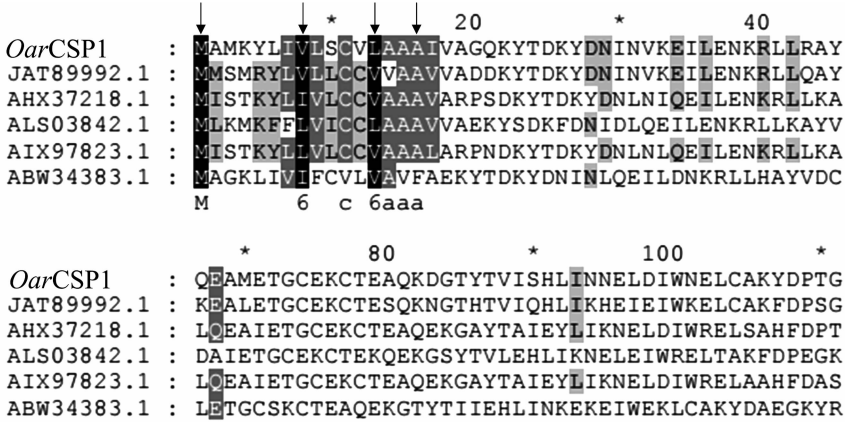


图1 *OarCSP* 基因的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

2.2 同源性比较和进化分析

应用 ClustalX 对 *OarCSP* 与其他昆虫化感蛋白的氨基酸进行序列比对。由图 2 可知,*OarCSP* 氨基酸序列具有 4 个保守半胱氨酸位点,与鳞翅目其他昆虫相似性不高,其中与棉红铃虫 (*Pectinophora gossypiella*)、桃蛀螟 (*Conogethes punctiferalis*)、茶尺蠖 (*Ectropis obliqua*)、稻纵卷叶螟 (*Cnaphalocrocis medinalis*) 和菜粉蝶 (*Pieris rapae*) 的相似性分

别为 71%、5%、9%、6%、8%。应用 MEGA 4.0 邻接法 (neighbor - joining, 简称 NJ) 对 *OarCSP* 与鳞翅目其他昆虫 CSP 氨基酸序列进行分子进化分析,构建 NJ 进化树 (图 3)。结果显示,鳞翅目夜蛾科、蚕蛾科、螟蛾科的化感蛋白聚为 2 个族,*OarCSP* 与化感蛋白 *OfurCSP*、*CmedCSP1*、*BmorCSP1*、*BmorCSP2*、*BmorCSP3*、*BmorCSP4* 同源性高,聚为一族。



相同和相似的氨基酸分别用黑色和灰色标出,箭头表示 4 个保守的半胱氨酸位点。化学感受蛋白的来源及 GenBank 登录号分别为棉红铃虫(JAT89992.1)、桃蛀螟(AHX37218.1)、茶尺蠖(ALS03842.1)、稻纵卷叶螟(AIX97823.1)、菜粉蝶(ABW34383.1)

图2 *OarCSP* 与其他昆虫化感蛋白的氨基酸序列比对

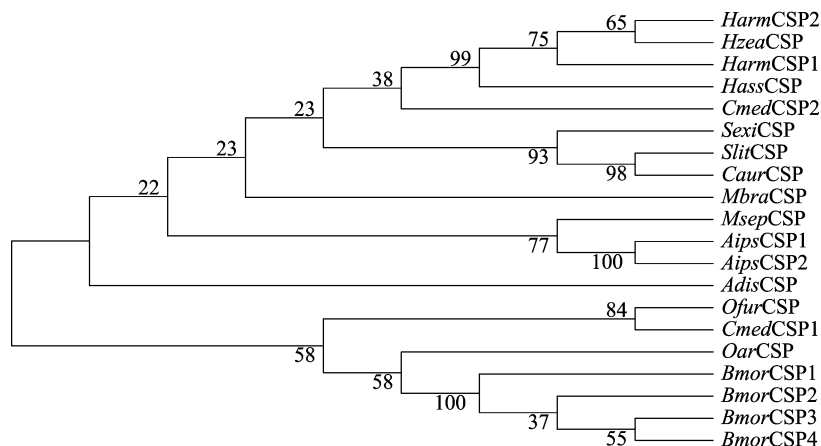


图3 *OarCSP* 与鳞翅目其他昆虫化感蛋白的系统进化分析

该分析所用 20 个鳞翅目昆虫化感蛋白的 GenBank 登录号如下: *HassCSP* [烟青虫 (*Helicoverpa assulta*)], ABB91378.1; *OfurCSP* [亚洲玉米螟 (*O. furnacalis*)], BAV56805.1; *CmedCSP1* [稻纵卷叶螟 (*Cnaphalocrocis medinalis*)], AIX97823.1; *CmedCSP2*, ALT31606.1; *MbraCSP* [甘蓝夜蛾 (*Mamestra brassicae*)], AAF71289.1; *MsepCSP* [黏虫 (*Mythimna separata*)], JAV45867.1; *AipsCSP1* [小地老虎 (*Agrotis ipsilon*)], AGR39577.1; *AipsCSP2*, AAP57460.1; *AdisCSP* (*Athetis dissimilis*), ALJ93810.1; *SexiCSP* [甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*)], AKT26484.1; *HarmCSP1* [棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*)], AAK53762.1; *HarmCSP2*, AFR92097.1; *CaurCSP* [台湾稻螟 (*Chilo auricilius*)], AIU68827.1; *HzeaCSP* [美洲棉铃虫 (*Helicoverpa zea*)], AAN63675.1; *BmorCSP1* [家蚕 (*Bombyx mori*)], NP_001037052.1; *BmorCSP2*, AAV34688.1; *BmorCSP3*, AFF18000.1; *BmorCSP4*, AFD97753.1; *SliiCSP* [斜纹夜蛾 (*Spodoptera litura*)], ALJ30219.1。

3 结论与讨论

在研究昆虫对环境化学因子刺激感受机制的过程中,起初的研究重点是对气味的感受机制,昆虫化学感受蛋白的研究源于对昆虫气味结合蛋白的研究。然而,人们发现昆虫对环境化学因子刺激的许多行为反应并不能用气味结合蛋白和气味感受机理来解释,直到 20 世纪 90 年代 CSP 的发现,才为昆虫对环境化学因子刺激感受机理开辟了新的途径。本研究利用 RACE 技术,从椰子织蛾中克隆获得 1 个 CSP 基因,根据其 cDNA 序列推导的氨基酸序列表明, *OarCSP* 具有昆虫化感蛋白的典型特征:相对分子量小,为 14.80 ku, N-端存在 20 个氨基酸左右的信号肽,具有 4 个保守的半胱氨酸位点和典型的化感蛋白结构域,这体现了不同昆虫化感蛋白在进化过程中的保守性。通常,每一种昆虫中都存在多个化感蛋白基因,特别是近年来随着基因组学的迅猛发展,许多化感蛋白已迅速地昆虫基因组中被发掘,如从黑腹果蝇、冈比亚按蚊 (*Anopheles gambiae*)、意大利蜜蜂和家蚕的基因组中分别获得 4、8、6、22 个化感蛋白基因,且有假基因的存在。同时还发现, CSP 编码基因数目在各昆虫物种中都少于化学感受受体 (OR 或 GR) 和 OBP 编码基因数,还有很多化感蛋白没有被

发现^[16],据此可知,更多的椰子织蛾化感蛋白基因有待克隆获得。多序列同源性分析表明, *OarCSP* 与同目的昆虫相似性均较低,这主要是因为迄今化感蛋白仅在家蚕、小地老虎、棉铃虫、烟青虫等少数鳞翅目昆虫中报道,尤其是在织蛾科鲜有报道的缘故。此外,这体现了不同昆虫物种在生物演变过程中化感蛋白的进化现象,也反映了不同昆虫之间化感行为的多样性,这可能是不同昆虫在适应不同环境中接受复杂化学信息刺激的进化结果。经分子进化分析发现, *OarCSP* 与化感蛋白 *OfurCSP*、*CmedCSP1*、*BmorCSP1*、*BmorCSP2*、*BmorCSP3*、*BmorCSP4* 聚为同一族,表明它们应为同一家族,尤其是 *OarCSP* 与家蚕化感蛋白 *BmorCSP1*、2、3 和 4 的进化程度最近,它们之间的组织表达分布、生理功能等应相似。

昆虫与环境之间的化学通信对于昆虫生存和繁殖至关重要,昆虫 CSP 遍布几乎所有感受器,起到感受、溶解、运输、传导环境化学刺激因子的作用^[17]。其对昆虫感知外界化学环境的变化具有关键作用。通过研究 CSP 开发害虫产卵忌避剂等“昆虫行为防治剂”,以及益虫利用新技术等一直是国内外研究的热点和目标。通过掌握昆虫对环境化学刺激的分子感受机制,阐明昆虫行为反应的本质,有利于提高益虫利用和害虫治理效率。但要明确昆虫化学感受蛋白的化学信息转换、信号传导过程,还要对昆虫化感蛋白进行深入研究,才能为防治害虫和利用益虫提供新思路和新途径。本研究克隆获得椰子织蛾气感蛋白 *OarCSP* 的基因全长序列,为深入研究昆虫化学感受蛋白,揭开昆虫与环境化学信息联系的规律奠定理论基础。

参考文献:

- [1] Pilpel Y, Lancet D. Olfaction: good reception in fruitfly antennae [J]. Nature, 1999, 398 (6725): 285, 287.
- [2] 吴帆, 张晓曼, 赵磊, 等. Q 型烟粉虱化学感受蛋白 CSP1 与植物挥发物的结合特征 [J]. 中国农业科学, 2015, 48 (10): 1955 - 1961.
- [3] Pelosi P, Zhou J J, Ban L P, et al. Soluble proteins in insect chemical communication [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2006, 63 (14): 1658 - 1676.
- [4] 王思豹, 张帅, 雒珺瑜, 等. 大草蛉化学感受蛋白基因 *CpalCSP3* 组织表达谱及气味结合特性分析 [J]. 棉花学报, 2015, 27 (3): 260 - 267.

白羽,丁海麦,石松利. 濒危植物蒙古扁桃 SRAP 反应体系优化[J]. 江苏农业科学,2019,47(3):46-48.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.03.011

濒危植物蒙古扁桃 SRAP 反应体系优化

白羽¹,丁海麦²,石松利¹

(1. 包头医学院药学院,内蒙古包头 014000; 2. 包头医学院基础医学与法医学院,内蒙古包头 014000)

摘要:为利用 SRAP 技术研究蒙古扁桃资源遗传多样性评价和种质资源鉴定,利用正交试验法 $L_{16}(4^5)$ 正交设计,对影响蒙古扁桃 SRAP-PCR 反应体系的 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度、*Taq* DNA 聚合酶量、引物浓度 4 个因素以及模板 DNA 浓度进行筛选。优化的蒙古扁桃 SRAP-PCR 最佳反应体系为 Mg^{2+} 浓度为 2.5 mmol/L, dNTPs 浓度为 0.25 mmol/L, 模板 DNA 浓度为 100 ng, *Taq* 酶浓度为 2.00 U, 引物浓度 1.0 μ mol/L, 2.5 μ L 10 \times PCR buffer, 总体积为 25 μ L。筛选结果表明,对蒙古扁桃 SRAP-PCR 扩增结果影响最大的是 *Taq* 聚合酶浓度,最小的是 dNTPs 浓度。运用该体系对 144 个随机 SRAP 引物组合进行筛选,筛选出 12 个条带清晰、多态性高的引物组合,为蒙古扁桃种质资源的研究奠定了基础。

关键词:蒙古扁桃;分子标记;SRAP;正交试验;反应体系;优化

中图分类号: S567.1⁺90.24 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)03-0046-03

蒙古扁桃是蔷薇科李属的多年生木本植物^[1],是传统的中药材,种仁可入药,主治干咳、阴虚便秘等病症。蒙古扁桃为亚洲中部戈壁地区特有的旱生种类,分布于我国的戈壁荒漠草原区^[2],是国家三级保护植物^[3]。近年来蒙古扁桃的研究主要体现在生理^[4-5]、药理性^[6-7]、组织培养^[8-10]、有效成分鉴定分离^[11-13]等方面,但对于蒙古扁桃资源的遗传多样性

研究和种质资源鉴定仍不多。

相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism,简称 SRAP)是一种以 PCR 标记技术为基础的分子标记技术,该技术重复性高、简便、快速,以广泛应用于药用植物的种质资源鉴定、遗传多样性研究、指纹图谱和亲缘关系等方面的研究。本研究利用正交试验设计对蒙古扁桃 SRAP-PCR 反应体系进行了优化,分析 SRAP-PCR 反应体系中各因素的相互影响^[14],得到最佳优化的组合,并对 144 对引物进行了 SRAP-PCR 分子标记,筛选一些多态性高的引物组合,为进一步研究蒙古扁桃种质资源和遗传多样性打下基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 材料 所选材料为蒙古扁桃的种仁,采集于阿拉善诺

收稿日期:2017-10-16

基金项目:国家自然科学基金(编号:81102760);内蒙古自然科学基金(编号:2015MS0808)。

作者简介:白羽(1991—),男,内蒙古兴安盟人,硕士研究生,主要从事中蒙药遗传多样性研究。Tel:(0472)7167855;E-mail:18247269257@163.com。

通信作者:石松利,教授,硕士生导师,主要从事中蒙药化学与分子生物学研究。Tel:(0472)7167855;E-mail:shisongli122@126.com。

[5] Natori S, Kubo T, Nomura A, et al. Purification and localization of p10, a novel protein that increases in nymphal regenerating legs of *Periplaneta americana* (American cockroach). [J]. International Journal of Developmental Biology, 1992, 36(3):391-8.

[6] Kitabayashi A N, Arai T, Kubo T, et al. Molecular cloning of cDNA for p10, a novel protein that increases in the regenerating legs of *Periplaneta americana* (American cockroach) [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1998, 28(10):785-790.

[7] 柳晓磊, 翁群芳, 胡美英, 等. 昆虫化学感受蛋白基因的进化分析[J]. 华中农业大学学报, 2011, 2(2):177-181.

[8] 阎伟, 吕宝乾, 李洪, 等. 椰子织蛾传入中国及其海南省的风险性分析[J]. 生物安全学报, 2013, 22(3):163-168.

[9] 李洪, 刘丽, 阎伟. 新入侵害虫椰子织蛾的发生及防治[J]. 中国森林病虫, 2015, 4(4):10-13.

[10] 陆永跃, 王敏. 椰子织蛾的形态特征识别[J]. 环境昆虫学报, 2013, 35(6):838-842.

[11] 刘向蕊, 吕宝乾, 金启安, 等. 5 种杀虫剂对入侵害虫椰子织蛾的室内毒力测定[J]. 生物安全学报, 2014, 23(1):13-17.

[12] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24):4876-4882.

[13] Dyrlov B J, Nielsen H, von Heijne G, et al. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0 [J]. Journal of Molecular Biology, 2004, 340(4):783-795.

[14] Hulo N, Bairoch A, Bulliard V, et al. The 20 years of PROSITE [J]. Nucleic Acids Research, 2008, 36:D245.

[15] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8):1596-1599.

[16] Vieira F G, Rozas J. Comparative genomics of the odorant-binding and chemosensory protein gene families across the arthropoda: origin and evolutionary history of the chemosensory system [J]. Genome Biology and Evolution, 2011, 3:476-490.

[17] 刘金香, 钟国华, 谢建军, 等. 昆虫化学感受蛋白研究进展[J]. 昆虫学报, 2005, 48(3):418-426.