

异色瓢虫海藻糖合成酶基因的克隆及低温诱导表达分析

秦 资^{1,2}, 王 甦², 魏 苹¹, 徐彩娣¹, 唐 斌^{1,2,*}, 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研究所, 北京 100097)

摘要: 海藻糖是昆虫的血糖, 在昆虫体内主要通过海藻糖合成酶 (trehalose-6-phosphate synthase, TPS) 催化合成。本研究通过同源克隆和 cDNA 末端快速扩增 (rapid-amplification of cDNA ends, RACE) 技术, 从异色瓢虫 *Harmonia axyridis* 中克隆得到了 TPS 基因的 cDNA 全长序列, 命名为 *HaTPS* (GenBank 登录号: FJ501960), 全长 2 949 bp, 包含 3' 非翻译区为 505 bp, 5' 非翻译区为 26 bp, 开放阅读框长 2 418 bp, 共编码 805 个氨基酸。软件分析显示该基因编码蛋白的分子量为 90.58 kD, 等电点为 7.01, 包含两个糖基化位点, 无信号肽和跨膜结构。同源比对分析发现, 昆虫中 TPS 基因高度保守, 包含两个保守的结构域。同时, 采用实时荧光定量 PCR 技术对异色瓢虫 *HaTPS* 在不同发育阶段、低温诱导条件下的表达量进行了研究。结果表明: *HaTPS* 在预蛹期的表达量最高; 在短时低温诱导条件下, *HaTPS* 的表达量随着温度的降低而显著升高, 在降温 and 升温处理条件下, *HaTPS* 的表达量呈现先升高后下降的表达趋势。结果表明, TPS 基因在昆虫抗逆中起到了重要的调节作用。昆虫经过低温诱导, 其 TPS 基因的调控能力得到提升。

关键词: 异色瓢虫; 海藻糖合成酶; 海藻糖; 低温诱导; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2012)06-0651-08

Molecular cloning and cold-induced expression of trehalose-6-phosphate synthase gene in *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae)

QIN Zi^{1,2}, WANG Su², WEI Ping¹, XU Cai-Di¹, TANG Bin^{1,2,*}, ZHANG Fan^{2,*} (1. College of Life and Environmental Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China; 2. Institute of Plant and Environment Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

Abstract: Trehalose, which is the blood sugar in insects, is synthesized mainly by trehalose-6-phosphate synthase (TPS) in insects. By homologous cloning and rapid-amplification of cDNA ends (RACE), the full cDNA of the TPS gene in *Harmonia axyridis* was cloned and named *HaTPS* (GenBank accession number: FJ501960). This gene with 5' and 3' non-coding region of 26 bp and 505 bp, respectively, contains an open reading frame of 2 418 nucleotides encoding a protein of 805 amino acids with the predicted molecular weight of 90.58 kDa and pI of 7.01. The encoded protein contains two potential N-glycosylation sites, without signal peptide and transmembrane domain. The homology comparison showed that insect TPS was highly conserved with two conserved domains. Real-time fluorescent quantitative PCR was conducted at different developmental stages under the cold induction to detect the expression of *HaTPS*. The results showed the expression level of *HaTPS* was the highest in the pre-pupal stage. Under the condition of short-term cold induction, the *HaTPS* expression was dramatically increased with temperature decreasing; and under the condition of warming and cooling, its expression level increased first, and then declined. The results suggest that TPS plays an important role in the regulation of insect resilience and its regulatory capacity is increased significantly under cold-induction.

Key words: *Harmonia axyridis*; trehalose-6-phosphate synthase (TPS); trehalose; cold induction; real-time fluorescent quantitative PCR

基金项目: 国家“973”计划项目 (2009CB119206); 国家自然科学基金项目 (31071731, 31000880); 浙江省重点科技创新团队项目 (2010R50039); 杭州市科技局计划项目 (20091133B08); 杭州师范大学优秀中青年骨干教师支持计划 (JTAS2011-01-031); 浙江省大学生科技创新活动计划 (2010R421004); 杭州师范大学科技创新与文化创意基金项目 (2009XJ007); 杭州师范大学研究生创新基金资助项目 (Y20100170)

作者简介: 秦资, 男, 1987 年生, 山东临沂人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫分子生物学, E-mail: qinzi110@163.com

* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: tbzm611@163.com; zfb6131@263.net

收稿日期 Received: 2012-03-14; 接受日期 Accepted: 2012-05-25

海藻糖是由两个葡萄糖分子经半缩醛羟基结合而成的非还原性双糖,海藻糖首先在昆虫体内发现(Crowe *et al.*, 1984)。海藻糖是昆虫血淋巴中最主要的糖类,不仅为其生长发育提供所需的能量,而且能在逆境等条件下大量合成,从而提高昆虫的生命力和活动能力(Thompson, 2003)。早期研究认为海藻糖的合成发生在肌肉和血淋巴中,但新的研究结果表明海藻糖主要在脂肪体中合成(Evans and Dethier, 1957; Thompson, 2003)。海藻糖的生物合成途径在不同生物中并不完全相同,其中研究最多的海藻糖合成途径是由海藻糖合成酶(trehalose-6-phosphate synthase, TPS)催化葡萄糖从UDP-葡萄糖转移给6-磷酸葡萄糖生成6-磷酸海藻糖和UDP,然后6-磷酸海藻糖磷酸化酶(trehalose-6-phosphate phosphatase, TPP)水解6-磷酸海藻糖生成海藻糖,TPS在昆虫体内的海藻糖合成过程中发挥关键作用(Murphy and Wyatt, 1965; Becker *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2002)。

昆虫在长时间的自然驯化后,会通过调节体内物质抵御寒冷,如蝗虫卵及瓢虫随季节变化调整其过冷却点(景小红和康乐, 2003; 赵静等, 2008)。海藻糖在一些耐寒昆虫体内发挥了重要的保护作用,越冬期的昆虫体内的海藻糖含量显著高于非越冬期(Wyatt, 1967),这说明了昆虫在长期的耐寒性自然驯化中,通过调节其体内的海藻糖含量来抵御寒冷,但是关于海藻糖酶在低温诱导下的作用研究则较少。昆虫在通过短时低温诱导后,会显著地提高其存活率,这可能是与昆虫体内酶系变化有关(赵静等, 2010),而海藻糖可以在逆境条件下被激发大量合成,可能在低温诱导时起到重要的作用。

异色瓢虫 *Harmonia axyridis* 是重要的天敌资源,起源于亚洲,之后在美国成功定殖,被引入欧洲后也迅速地建立种群,其对不同地区的环境条件有着极强的适应能力(Koch, 2003; Berkvens *et al.*, 2009),是一种理想的实验材料。本实验以异色瓢虫为对象,利用同源克隆和RACE技术克隆得到了TPS基因完整的cDNA序列,在此基础上利用实时荧光定量PCR技术对不同龄期及短时低温条件下的TPS基因表达进行了研究,探究了昆虫短时低温条件下的TPS的表达模式及作用,为以后利用天敌资源提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

异色瓢虫采自北京市昌平区流村镇王家园苹果

园,在温度为 $25 \pm 1^\circ\text{C}$,相对湿度为 $70\% \pm 5\%$,光周期为16L:8D的条件下建立实验种群。具体饲养方法为:将异色瓢虫成虫放入方形塑料养虫盒(15 cm × 12 cm × 7 cm)中,每盒20~30头,每天饲喂一次豌豆修尾蚜 *Aphis medicaginis*,以纱布封盖。在养虫盒中放入有褶皱的纸条,作为瓢虫的产卵基质。待雌虫产卵后,将卵移至养虫笼(铝合金+60目纱网制,45 cm × 30 cm × 30 cm)中继续饲养,每日提供足量蚜虫作为食物。异色瓢虫室内繁殖3代后,取其成虫或幼虫进行实验。

1.2 主要试剂

RNA提取试剂盒、AMV反转录试剂盒、T载体均为大连宝生物工程有限公司产品;琼脂糖胶回收试剂盒、PCR试剂均为天根生化科技有限公司产品;3'和5'RACE试剂盒为Clontech(大连宝生物工程有限公司)产品;Real Master Mix(Probe)为TIANGEN公司产品;其他试剂如无水乙醇、氯仿、异丙醇(分析纯)等均为Sigma公司产品。

1.3 RNA抽提及第一链cDNA合成

采用Trizol法抽提3头异色瓢虫腹部的总RNA后,用琼脂糖凝胶电泳测定RNA的纯度并利用紫外分光光度计测定RNA的浓度。取1 μg总RNA作为模板,利用AMV反转录试剂盒合成第一链cDNA。

1.4 异色瓢虫TPS基因cDNA中间片段的克隆

根据已知昆虫的TPS基因序列比对结果,从保守区域设计了2对简并引物(表1),以第一链cDNA为模板进行巢式PCR扩增。PCR反应体系为25 μL,其中含模板cDNA 1 μL,10 × Taq Buffer 2.5 μL, dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 2 μL,上下游引物各1 μL, Taq (2.5 U/μL) 0.25 μL,去离子水补至25 μL。具体PCR条件为:94℃预变性5 min,94℃变性30 s,48℃退火30 s,72℃延伸1.5 min,共30个循环,72℃充分延伸5 min。反应结束后,取5 μL PCR产物在1.2%琼脂糖凝胶上电泳。当检测到目的条带后,进行胶回收纯化,然后连接到T载体中,之后进行转化,挑取阳性菌落进行验证,并将含有目的片段的菌液摇菌过夜,最后将菌液送上海英骏公司北京测序部测序。得到测序结果,将序列翻译成蛋白序列,在NCBI库中进行比对,确定该序列是否为异色瓢虫TPS基因的中间片段。

1.5 3'与5'cDNA末端快速扩增(rapid amplification of cDNA ends, RACE)

采用SMART RACE cDNA Amplification Kit 建

表 1 实验中所用的引物
Table 1 Primers used in the experiments

引物名称 Primer name	核苷酸序列(5'-3') Nucleotide sequences	引物用途 Primer use
TPS-DF1	GCTGYAACGVNACBTTYTG	简并引物
TPS-DF2	CTTCYTDCAYATHCCNFTCC	Degenerate primers
TPS-DR1	ATCYTRATNCKTTCRCTCC	
TPS-DR2	TCCARHCCRTGRITDCCA	
TPS-3FA	GGATCTATCATGATGCCTGCTG	RACE
TPS-3FB	GAGATCCTCATAAGCTCGCGCT	
TPS-5RA	CAGTTCACGAACCTCTCGAAGG	
TPS-5RB	GTCGCACCCTTACGGATCTTCC	
NUP	AAGCAGTGGTAACAACGCAGACT	
TPS-QF	CATACTATAATGGTGCCTGTAATG	实时荧光定量
TPS-QR	ATTTAAGGGCTTTGATGTGTC	PCR QRT-PCR
TPS-QProbe	ACTCCACTCAATGCCAGACAGAGC	
18S rRNA-F	ACGGACTTCGGTAGGACG	内参基因
18SrRNA-R	CGCAGACAATCCCGAAA	Reference gene
18SrRNA Probe	ACGTTCTGCCACGCCCTTA	

立异色瓢虫脂肪体组织的 3'与 5'RACE 文库。根据已获得的中间序列,分别设计两对特异性引物(表 1),并进行 PCR。具体 PCR 条件为:94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,共 30 个循环,72℃ 充分延伸 5 min。将目标片断进行回收。PCR 产物电泳分析、回收纯化和序列测定方法同 1.4。

1.6 不同龄期异色瓢虫 TPS 基因的表达

采用实时荧光定量 PCR (real-time fluorescent quantitative PCR, QRT-PCR)法测定,取异色瓢虫不同龄期幼虫及成虫(蜕皮或羽化 2 h 后)为实验对象,并以羽化 3 d 的异色瓢虫为对照组,采用相对 QRT-PCR 法测定 TPS 基因相对表达量。根据异色瓢虫 TPS 基因保守区域设计引物探针,并根据异色瓢虫 18S 基因设计内参引物与探针(表 1)。提取异色瓢虫不同龄期虫体总 RNA(方法同上),用凝胶电泳和紫外分光光度计测定 RNA 纯度和浓度,取 1 μg 总 RNA 量为进行一链 cDNA 反转录。取反转录产物 1 μL 用于 PCR 的模板。相对 QRT-PCR 按照 Real-Max (probe) 试剂盒体系在 ABI7500 (ABI, 美国)上进行荧光定量 PCR,具体 PCR 程序为 94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 15 s,60℃ 退火 30 s,68℃ 延伸 30 s,40 个循环,在 68℃ 收集荧光信号。每个处理组做 3 次重复,每个重复含 3 头试虫。

1.7 不同短时低温条件下异色瓢虫 TPS 基因的表达

取室温饲养条件下羽化 3 d 的异色瓢虫成虫:

(1)不同温度处理分别为:在人工智能培养箱 (Sanyo, MLR-361H, 日本)中,分别于 -5℃,0℃,5℃,10℃ 和 15℃ 下处理 1 h;

(2)降温处理:设定好 -5℃,0℃,5℃,10℃ 和 15℃,将异色瓢虫置于 15℃ 保持 1 h 后,转入 10℃ 保持 1 h,温度依次递减;

(3)升温处理:设定好 -5℃,0℃,5℃,10℃ 和 15℃,将异色瓢虫置于 -5℃ 保持 1 h 后,转入 0℃,保持 1 h,温度依次上升。

上述实验每个处理组重复 3 次,每个重复含 3 头试虫。分别将上述各处理的 3 头异色瓢虫在液氮中研磨,抽提 RNA,并参照 1.6 的方法进行相对 QRT-PCR,以室温下饲养的羽化 3 d 的异色瓢虫为对照组,测定异色瓢虫 TPS 基因的相对表达量。

1.8 序列分析

序列分析和系统分析分别采用 Dnastar、Vector、Compute pL/Mw 和 ClustalW 等,在线分析的网址为: <http://expasy.org/tools/translate>, NetNGlyc 1.0 Server: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>; TMHMM Server v. 2.0: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>; ClustalW: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html> 和 SignalP 3.0 Server: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>。

1.9 数据统计与分析

采用 ABI7500 自带的程序采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法进行 TPS 基因的相对表达量测定，采用 Statistica 6.0 中的 Basic Statistic 进行平均值及标准误分析，采用 One way ANOVA 进行不同处理间的方差分析，设定 $P \leq 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 异色瓢虫 TPS 基因 cDNA 全长的克隆及分析

通过中间片段的扩增得到约 1 200 bp 的条带，经过连接转化及测序，将得到的序列翻译成蛋白序列后，经过 NCBI 的 Blast 比对发现其为 TPS 基因。之后的 3' 与 5' RACE 分别得到了 600 bp 和 500 bp 的序列，经过比对拼接后得到了异色瓢虫 TPS 基因 cDNA 全长序列，命名为 *HaTPS* (GenBank 登录号:

FJ501960)，并从 *TPS* 的两端设计引物，能够直接扩增出全长片段，测序后发现跟拼接序列一致。*HaTPS* 全长 2 949 bp，其中开放阅读框长为 2 418 bp，翻译氨基酸数 805 个，3' 非翻译区为 505 bp，5' 非翻译区为 26 bp，等电点为 7.01，预测蛋白分子量为 90.58 kD (图 1)。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 *HaTPS* 存在两个 N-糖基化位点，分别位于第 99 和 132 位氨基酸。通过和其他昆虫 TPS 基因在 NCBI 的 Blast 中发现，其包括了 *TPS* (*OtsA*) 和 *TPP* (*OtsB*) 两个重要的结构域。

2.2 异色瓢虫 *HaTPS* 同源性和进化分析

将克隆得到的 *HaTPS* 与已经报道的昆虫 TPS 基因的氨基酸比对，进行同源性分析，发现异色瓢虫 TPS 家族具有很高的保守性，拥有很多的非常保

```

1  GATGTCATCACTTCCCTCCGGGATGATGATAGTGGTGGCCAAACCGCTTACCCTTTGTTTTGAAGAGGCTGGAAAATGGCAGACTATCGAGGCATGCAAGTGCCTGGAGGTTTGGTAAACGGT
121  GTAGCTCTGTGATTTAATAACGGAAATGGGTTGTGGGTAGGTTGGCCAGGTATTACCTGGAGGCCATGACGAAAGCCATACCAGAATCTGAGCCTGGAGATATAACACCTACTGCTGGA
   V A P V V I N G N G L W V G W P G I H L E D P D E A I P E S E P G D I T P T A G
241  CTAATAACAGATAAGCCGGTAGCAGTACGTGTTGACCCTAAGATGTTGACTCATACTATAATGTTGCTGTAATGGAACCTTCTGGCCTTACTCCACTCAATGCCAGACAGACTACC
   L K S D K A V A V R V D P K M F D L A G Y Y R D A F V G L V T P L R H S M P D R A T
361  TTCAAGCTGGAAGAATGGAGGATCTACTAGCAGTCAACAACTGTCCGCAACTGCACAATCAAGGCCCTTAAATCTTTGAAGAGGAAAGAATACTCTGATCATGAAGTCAACCCCTC
   F K L E E W R D Y V A V N K L F A C T I K A L K S L K R G K T P D H E V P L
481  ATCTGGGTTATGACTACCAGTTGATGGTGGCAGCTAAATGGATAAGCAGGCTGCCAAGCAGGAGAGATCCCATGCAAACTGGATTCTCTACACAAACCCCTCCC GCCATGGGAC
   I W V H D Y Q L M V A A N W I R Q A A E Q E E I P C K L G F F L H N P F P P W D
601  ATCTTTCGACTTCCCTTGGGAGACGAAATCCTACAGGGGATGCTCAACTGCGCATGTGGCTCCAGATCACTGACTTATGGCTGAATTCGTGGACTGCTGTCAGAGATACCTA
   I F R L L P W G D E I L Q G M L N C D M V G F H I T D Y C L N F V D C C Q R Y L
721  GGTGTCGTCGACCGTAAAGACCTGCTGGTTGAACAGGAGGAAAGATCCGTAAAGGTGCGACCTCTCCGATCGGGATGCCTTCCGAGAGTCCGTGGAACTGGCGGAGAGGCCGCC
   G C R V D R K N L L V E Q R G R S V R V R P L P I G M P F E R F V E L A E K A P
841  AAGGTGTTCTCGGGGAGCAGAAGATCATACTGGGGTGGCAGACTCGACTACACCAAAGGTTGGTTCACAGGCTGCTGCTCTCGATGCTGCTGGAGAAGCATCCGGAGCACAGA
   K V F S G E Q K I I L G V D R L D Y T K G L V H R L L S F E M L L E K H P E H R
961  GGTCAAGTCTCGATGCTCCAGGTCGCGCTTCTAGGACGGACGTGAAGGATGACCAAGAGCTGAAGGAGAACCTGGAACAGCTGATGGTAGGATCAACGGAAGTTCCACCAGCGCG
   G Q V S M L Q V A V P S R T D V K E Y Q E L K E N L E Q L I G R I N G K F T T P
1081  AATTGGTCCGCCATCAGATACATTTATGGTCAGTCAGTCAGGACGACTTGGCCGGTTATTACAGGGATGCTTTTGTGGCCTGGTACCCGTTGAGGGATGGAATGAACCTGGTCCGCC
   N W S P I R Y I Y G Q V S Q D D L A G Y Y R D A F V G L V T P L R D G M N L V A
1201  AAAGAATTGTGGCTTCCAGATCAACTCCTCCAGGTTGCTCATAAGTTCCCGGTTTGGCGAGCTGGAGAACCGTGCAGAGGCTCTCGCTGCAACCCGTACGAGATCGCCGGC
   K E F V A C Q I N S P P G V L I V S P F A G A G E T V H E A L V C N P Y E I A G
1321  GCAGCCGAGGTGTTACACAGGCTCTGACCATGCCCCGAAGCAGGAGGATVCTTCGCATGAACCTGAGGAGGAGAGAGAAAGTTACGATGTGAACCTTCCGACGAAATCTTTCTTA
   A A E V L H R A L T M P E D E R I L R M N Y L R R R E K V N D V N F W T K S F L
1441  TCCGCAATGGGTTCTTGTTCACCCCTGAGACCGGAGATGATGTTGGATCATATGATGCTGCTGTTACTTTGGACGACTTCGATGAATATCTTTGCAATACATTTGGAGATCCTCAT
   S A M G S L F T P E D R D D V G S I M M P A V T L D D F D E Y I G D P H
1561  AAGCTCCGCTTCTACTAGATTATGATGTTACTTTCACCAATCGCACTCTCCGAGTCTCCGAGTCAAGGATGCAACTGAACTAAAACATTCTTCCAGGATGTCCGATATCCCGGAT
   K L A L L L D Y D G T L A P I A P H P D L A V M P T E T K N I L Q R L S N I P D
1681  GTCTACATAGTATCTGATCAGGACGAAATGTGAACAACGTGAAAGAAATGGTGGTATTGAAAGGCATAACATACGCGGTAAACCGGACTAGAGATCTCCACTCAGACGGCACCAA
   V Y I A I V S G R N V N N V K E M V G I E G I T Y A G N H G L E I L H S D G T K
1801  TTCGTGCATCCGATGCTCCAGGAGTGCACGAAAAGTGGCTTCCCTCCTGGCAAGCTGCAGGAGCAGGTTTGCAGGACGGCGCTGGGTTGAGAACAAAGCGCTCTACTGACATTC
   F V H P M P P E C H E K V A S L L A K L Q E Q V C R D G A W V E N K G A L L T F
1921  CACTTCAGGAAATCCCTGCTCCTCAGGAGCGCACTTGAGAAAAGCGCGGTAAGCTGGTGAAGAAAGCTGGCTTCAAGGTTGGGAAATGCCACTGTGCCATTGAGCGGAAGCCACCA
   H F R E V P V H L R D A L E K Q A R K L V E E A G F K V G N A H C A I E A K P P
2041  GTAGAGTGAATAAAGGTAGAGCTCCATCTATCTTGCGAACCGCTTTTGGAGTTGATGGAGTGAGCGTATCAGGATCATTTATGTTGTTGACGATGTCAGCGATGAGGATGCTATG
   V E W N K G R A S I Y I L R T A F G V D W S E R I R I I Y V G D D V T D E D A M
2161  ATGGCTCTCAAGGAATGGTGAACATTCAGAGTAAACATTCAAATATCATTAACGTCAGCAGAACGTCGGTTGCCATCAACAGATTCAGTTCACCATGTTGAAATGGATAGAA
   M A L K G M A A T F R V T T S N I I K T S A E E R R L P S T D S V L T M L K W I E
2281  CGTCACTTTTCAAGAGAAATGCCAACATAATCGATGCAACAACTACAGAAGAGGATGCTTAGCCAAAGCAATGACCAAAAACGTACACATGGAATGTGAGATCTCCGCACTTGCTCAE
   R H F S K R M P N I I D A T T Y R R G S L L A K A M T K N V H M E C E I S A L A Q
2401  GCTCTATCTACCAAAAACGAAAACAATCATAACGAGGACTGAAAATGAATCGTGCAAAATGGATGCATCATTTTTAAAAAGTGTAGCAGTACGAACCAAGATAAGGATCGAATGG
   A L S T K N E N N H T E D *
2521  AAATCACTGAAGCTTTAGGGTTAAATAAGAAATAGAGCACTTCCGATTAGTGATTTTGGATGACTCACCTTGGGTAATCTTGTATCTGTTACTTTGTAATCACTTTGCTGTCGTCG
2641  AGCATATCGTTACAGATTCAAATTTTCTGCTTAAGCGTTTGAAGAAATACCCGACTGATTCTCTAGACTGATAACTTGTAAGATGATTTATCTTTCGGAAACACTAG
2761  ATTTAATAGATATTTCAATGACTATTTATTTTAAATAGATGTCTTCACTCGAACATGAAATCATATCATAGTGGATATATTCATGATAGAAATCTTATAGCCATCTTCTAAG
2881  AATCTTGTGTTGGTGAATGTGAAATAAATAATATGGAACCCAAAATAAAATAAAAAATAAAA

```

图 1 异色瓢虫 TPS 基因 *HaTPS* 的 cDNA 序列

Fig. 1 The cDNA sequence of TPS gene *HaTPS* from *Harmonia axyridis*

图中起始密码子、终止密码子用加粗并用下划线标出，糖基化位点加框标出。The initiator and terminator are in bold and underlined, and the potential N-glycosylation sites are boxed.

守的结构域(图2)。根据在 GenBank 上已登录的 TPS 基因序列, 将其氨基酸序列进行 Multiple 比对, 发现异色瓢虫 HaTPS 与其他昆虫的 TPS 具有很高的序列同源性, 其中, 异色瓢虫 HaTPS 与同为鞘翅目的赤拟谷盗 TcTPS 的同源性最高, 氨基酸序列同源性达到了 89%, 与冈比亚按蚊 AgTPS 同源性最低, 氨基酸序列同源性为 61%。

2.4 不同龄期异色瓢虫 HaTPS 相对表达量测定

异色瓢虫不同龄期 HaTPS 表达量存在差异(图3), 在不同龄期异色瓢虫 HaTPS 表达量普遍低于对照组, 仅在 2 龄第 1 天, 3 龄第 1 天, 预蛹期和成虫第 2 天高于对照组, 其中在预蛹期 HaTPS 的表达量最高, 达到了对照组的 2.26 倍。

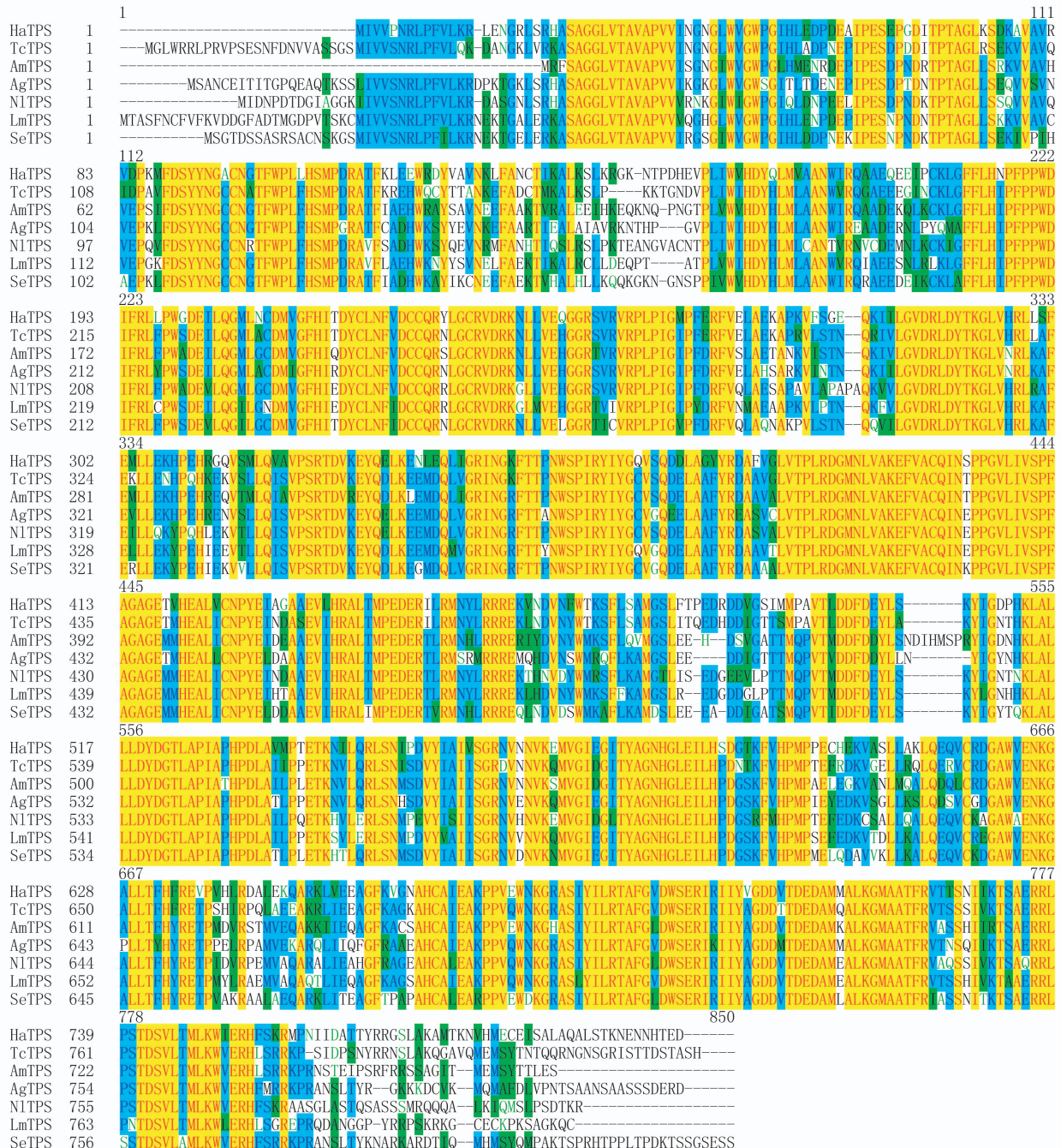


图 2 不同昆虫 TPS 基因编码蛋白氨基酸序列的比对

Fig. 2 Alignment of TPS amino acid sequences of different insects

HaTPS: 异色瓢虫 *Harmonia axyridis*; TcTPS: 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*; AmTPS: 意大利蜜蜂 *Apis mellifera*; AgTPS: 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*; NITPS: 褐飞虱 *Nilaparvata lugens*; LmTPS: 东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis*; SeTPS: 甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*.

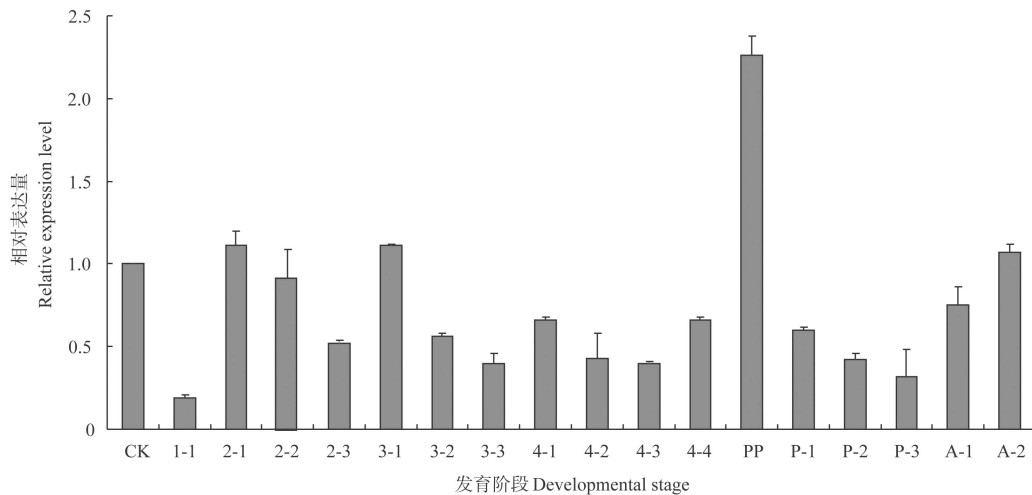


图3 不同龄期异色瓢虫 *HaTPS* 相对表达量

Fig. 3 The relative expression level of *HaTPS* at different developmental stages of *Harmonia axyridis*

CK: 25℃下羽化第3天的成虫 Adult at 3 d after emergence at 25℃; 1-1: 1龄第1天幼虫 The first day of the 1st instar larva; 2-1 - 2-3: 2龄第1天至第3天幼虫 Day 1 to day 3 2th instar larvae; 3-1 - 3-3: 3龄第1天至第3天幼虫 Day 1 to day 3 3th instar larva; 4-1 - 4-4: 4龄第1天至第4天幼虫 Day 1 to day 4 4th instar larva; PP: 预蛹期 Prepupa; P-1 - P-3: 1-3日龄蛹 Day 1 to day 3 Pupa; A-1 - A-2: 羽化第1-2天成虫 Day 1 to day 2 after eclosion. 图柱表示平均值 ± 标准误, 每组处理重复3次, 每个重复含3头试虫。Each bar represents the mean ± SE of three independent experiments with three individuals in each replicate.

2.5 短时低温处理下异色瓢虫 *HaTPS* 表达

取羽化3 d后, 未交配的异色瓢虫成虫, 分别置于-5℃, 0℃, 5℃, 10℃和15℃处理1 h后, 测定其 *HaTPS* 的表达量。结果如图4所示, 低温处理下异色瓢虫 *HaTPS* 的表达均显著高于其在25℃时的正常表达水平, 其中在-5℃时表达量最高为对照组的4.85倍, 且与其他温度相比差异显著, 并且温度越低其表达量升高越显著。

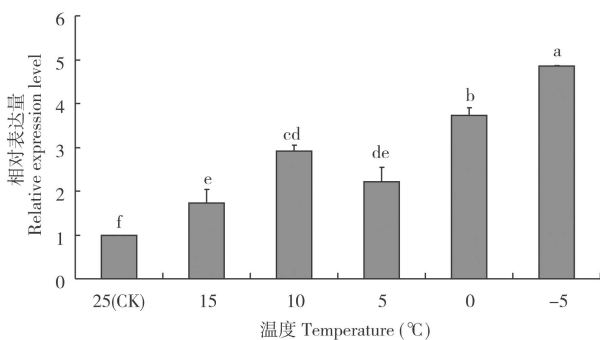


图4 不同温度下异色瓢虫成虫 *HaTPS* 的表达水平

Fig. 4 The expression level of *HaTPS* in *Harmonia axyridis* adults under different temperature conditions

图柱表示平均值 ± 标准误, 每组处理重复3次, 每个重复含3头试虫; 柱上不同字母表示不同处理组间差异显著 (One way ANOVA, $P \leq 0.05$); 下同。Each bar represents the mean ± SE of three independent experiments with three individuals in each replicate. Different letters above bars indicate significant differences between different treatment groups (One way ANOVA, $P \leq 0.05$). The same for the following figures.

在降温处理时, *HaTPS* 的表达出现了先上升后下降的趋势。在经历过前期的诱导之后, *HaTPS* 显著升高, 在5℃时其表达量达到了最高, 为对照组的2.24倍, 而在5℃后的 *HaTPS* 的表达量出现了下降; 在-5℃时 *HaTPS* 的表达量已经低于对照组水平, 仅为其的0.71倍(图5)。

在升温处理时情况则完全不同, 在经历瞬时低温处理后, -5℃时, *HaTPS* 的表达量显著升高, 之后 *HaTPS* 的表达量显著下降, 甚至低于正常水平, 在0℃时其表达量仅为对照组的0.19倍, 随着温度的上升, 其表达量逐渐上升, 当温度升至25℃时, 其表达量基本恢复正常, 达到正常表达水平的1.16倍(图6)。

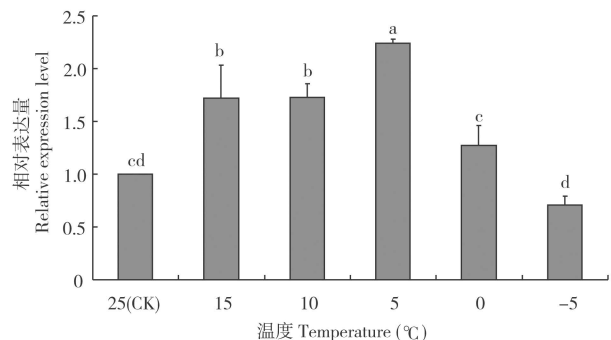


图5 降温处理下异色瓢虫成虫 *HaTPS* 的表达水平

Fig. 5 The expression level of *HaTPS* in *Harmonia axyridis* adults under decreasing temperature conditions

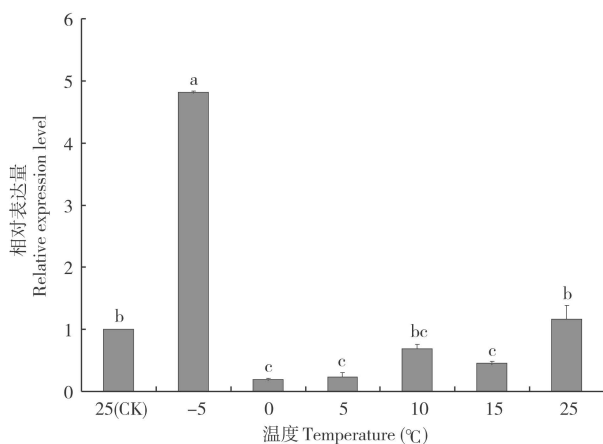


图 6 升温处理下异色瓢虫成虫 *HaTPS* 的表达水平

Fig. 6 The expression level of *HaTPS* in *Harmonia axyridis* adults under increasing temperature conditions

3 讨论

Tsusaki 等(1997)利用放射性探针筛选基因组 DNA 文库的方法,最先克隆得到了海藻糖合酶的基因。目前,TPS 基因已经在多种昆虫被克隆出来 (Chen *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2010, 2011), 并发现昆虫的海藻糖合成酶基因的编码产物最长达 850 个氨基酸,包括了两个非常保守的结构域,而这两个结构域正是酵母中的 TPS (OtsA)和 TPP(OtsB) (Cui and Xia, 2009)。本实验通过同源克隆和 RACE 技术从异色瓢虫中克隆得到了一个 TPS 基因的全长 cDNA 序列,通过与之前已知的 TPS 比对,证明了其属于昆虫 TPS 家族。

TPS 基因调控着昆虫体内海藻糖的合成,昆虫会通过升高或降低其表达量调节昆虫体内海藻糖含量,以适应其生长发育 (Tang *et al.*, 2010)。在蛹期及昆虫的静止期,昆虫的海藻糖含量均高于正常水平 (Wyatt, 1967; Lee, 1991),甚至达到了干重的 15% ~ 20% (Hottinger *et al.*, 1987)。本实验中异色瓢虫不同龄期 TPS 基因 *HaTPS* 表达量的变化与之前研究类似,在预蛹期 *HaTPS* 的表达量最高 (图 3),这可能是由于昆虫在蛹期高含量的海藻糖可以保护昆虫免受外界的干扰,并作为蛋白稳定剂,使昆虫顺利地完形态转换 (Wyatt and Kalf, 1957) 及度过不良环境;同时发现在幼虫各个龄期 *HaTPS* 的表达量各不相同,可能与昆虫的发育状况相关 (Xu *et al.*, 2009)。

昆虫在长期的自然驯化中,会通过海藻糖含量的升高来抵御寒冷 (Salt, 1961; Bale, 1996, 2002),

研究发现昆虫的抗冻蛋白基因也会出现高水平的表达 (Duman *et al.*, 2004), 在长时间的自然驯化过程中,昆虫体内海藻糖含量的升高可能是由 TPS 基因的表达量升高而发生的 (Clark *et al.*, 2009), 暗示着 TPS 基因在昆虫长期的自然驯化过程中起重要作用。而海藻糖可以在逆境条件下被激发大量合成,以保护昆虫膜结构的流动性及蛋白的稳定,本研究结果显示,在经过短时低温诱导后, *HaTPS* 的表达量随着温度的降低显著的升高,在 -5°C 时,其表达量最高,是正常水平的 4.85 倍,这可能是昆虫经过短时低温诱导后, *HaTPS* 的调控能力得到了显著的提升。

HaTPS 在降温处理后,在起始阶段其表达量显著升高,温度为 5°C 时的表达量达到最高,随着温度逐渐下降,其表达量却显著下降,而当温度达 0°C 时, *HaTPS* 表达量恢复到正常水平,暗示着 *HaTPS* 的调控对昆虫在低温诱导后的恢复中起到了重要作用 (图 6)。并且在逐步的低温诱导后, -5°C 时其表达量低于对照组,原因是前期积累的海藻糖已经满足其需要,不需要浪费资源再合成,同时可能是低温诱导加强了 *HaTPS* 的调控能力,相同的 TPS 可以合成更多的海藻糖。另一方面,在异色瓢虫经过逐渐升温处理条件下, *HaTPS* 在经过 25°C 到 -5°C 的短时刺激后显著升高,然后随着温度的升高,其表达量逐渐降低,并在温度恢复到正常温度时, *HaTPS* 的表达量恢复到正常水平,此现象说明前期的诱导下显著地提高了 *HaTPS* 的表达,合成较多的海藻糖以抵抗不利环境,而且可以满足其在一定时间内的生理需要 (Sinclair *et al.*, 2007), 并且短时低温诱导积累的海藻糖有可能引起昆虫的生理生态活动下降 (Kelty and Lee, 2001; Child, 2007; Arrese and Soulages, 2010), 所以随着温度的逐渐升高, *HaTPS* 的表达量反而有所降低,并且 $0 \sim 15^{\circ}\text{C}$ 的表达量基本一致,无明显差异,同时温度的升高有利异色瓢虫的生存,机体自然不需要合成过多的海藻糖,当温度到达 25°C , 其表达水平和正常表达水平一致。

以上的实验结果证实 TPS 基因在昆虫的生长发育及抗逆性等方面具有重要的调节作用,可以针对某个特殊阶段或者特殊组织对异色瓢虫中的海藻糖合成酶的活性进行研究及海藻糖含量测定来证实及确定 TPS 基因的作用,而且该基因还有成为抗逆靶标的潜力,通过诱导 TPS 基因的表达可以使昆虫快速的抵御不良环境,通过深入的研究,可以为以

后的天敌的保存和利用提供理论依据和基础。

参考文献 (References)

- Arrese EL, Soulages JL, 2010. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annu. Rev. Entomol.*, 55: 207–225.
- Bale JS, 1996. Insect cold hardiness: a matter of life and death. *Eur. J. Entomol.*, 93: 369–382.
- Bale JS, 2002. Insects and low temperatures: from molecular biology to distributions and abundance. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 357: 849–862.
- Becker A, Schlöder P, Steele JE, Wegener G, 1996. The regulation of trehalose metabolism in insects. *Experientia*, 52: 433–439.
- Berkvens N, Bale JS, Berkvens D, Tirry L, Clercq PD, 2009. Cold tolerance of the harlequin ladybird *Harmonia axyridis* in Europe. *J. Insect Physiol.*, 56: 138–144.
- Chen Q, Ma E, Behar KL, Xu T, Haddad GG, 2002. Role of trehalose phosphate synthase in anoxia tolerance and development in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.*, 277: 3274–3279.
- Child RE, 2007. Insect damage as a function of climate. In: Padfield T, Borchersen K eds. Museum Microclimates. National Museum of Denmark Copenhagen. 57–60.
- Clark MS, Thorne MAS, Purać J, Burns G, Hillyard G, Popović DŽ, Grubor-Lajšić G, Worland MR, 2009. Surviving the cold: molecular analyses of insect cryoprotective dehydration in the Arctic springtail *Megaphorura arctica* (Tullberg). *BMC Genomics*, 10:1–19.
- Crowe J, Crowe L, Chapman D, 1984. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science*, 223: 701–703.
- Cui SY, Xia YX, 2009. Isolation and characterization of the trehalose-6-phosphate synthase gene from *Locusta migratoria manilensis*. *Insect Science*, 16(4): 287–295.
- Duman JG, Bennett V, Sformo T, Hochstrasser R, Barnes BM, 2004. Antifreeze proteins in Alaskan insects and spiders. *J. Insect Physiol.*, 50(4): 259–266.
- Evans DR, Dethier VG, 1957. The regulation of taste thresholds for sugars in the blowfly. *J. Insect Physiol.*, 1(1): 3–17.
- Hottinger T, Boller T, Wiemken A, 1987. Rapid changes of heat and desiccation tolerance correlated with changes of trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae* cells subjected to temperature shifts. *FEBS Letters*, 220(1): 113–115.
- Jing XH, Kang L, 2003. Seasonal change in the supercooling point of overwintering eggs of *Locusta migratoria*. *Entomological Knowledge*, 40(4): 326–328. [景晓红, 康乐, 2003. 飞蝗越冬卵过冷却点的季节性变化及生态学意义. 昆虫知识, 40(4): 326–328]
- Kelty JD, Lee JR RE, 2001. Rapid cold-hardening of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) during ecologically based thermoperiodic cycles. *J. Exp. Biol.*, 204: 1659–1666.
- Koch RL, 2003. The multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis*; a review of its biology, uses in biological control, and non-target impacts. *J. Insect Sci.*, 3: 32.
- Lee RE, Denlinger DLL, 1991. *Insects at Low Temperature*. Chapman and Hall, New York.
- Murphy TA, Wyatt GR, 1965. The enzymes of glycogen and trehalose and synthesis in silk moth fat body. *J. Biol. Chem.*, 240: 1500–1508.
- Salt RW, 1961. Principles of insect cold-hardiness. *Annu. Rev. Entomol.*, 6: 55–74.
- Sinclair BJ, Gibbs AG, Roberts SP, 2007. Gene transcription during exposure to, and recovery from, cold and desiccation stress in *Drosophila melanogaster*. *Insect Mol. Biol.*, 16(4): 435–443.
- 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. *J. Insect Physiol.*, 56: 813–821.
- Tang B, Zheng HZ, Xu Q, Zou Q, Wang SG, Zhang F, Wang SG, Zhang ZH, 2011. Cloning and pattern of expression of trehalose-6-phosphate synthase cDNA from *Catantops pinguis* (Orthoptera: Catantopidae). *Eur. J. Entomol.*, 108: 355–363.
- Thompson SN, 2003. Trehalose: the insect blood “sugar”. *Adv. Insect Physiol.*, 3: 205–285.
- Tsuzaki K, Nishimoto T, Nakada T, Kubota M, Chaen H, Fukuda S, Sugimoto T, Kurimoto M, 1997. Cloning and sequencing of trehalose synthase gene from *Thermus aquaticus* ATCC339231. *Biochem. Biophys. Acta*, 1334(1): 28–32.
- Wyatt GR, 1967. The biochemistry of sugars and polysaccharides in insects. *Adv. Insect Physiol.*, 4: 287–360.
- Wyatt GR, Kalf GF, 1957. The chemistry of insect hemolymph II. Trehalose and other carbohydrates. *J. Gen. Physiol.*, 40(6): 833–847.
- Xu J, Bao B, Zhang ZF, Yi YZ, Xu WH, 2009. Identification of a novel gene encoding the trehalose phosphate synthase in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Glycobiology*, 19: 250–257.
- 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. [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, Yu LY, Li M, Zheng FQ, Zhang F, Xu YY, 2008. Seasonal variation in cold tolerance of the multicolored ladybeetle, *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) adults. *Acta Entomologica Sinica*, 51(12): 1271–1278. [赵静, 于令媛, 李敏, 郑方强, 张帆, 许永玉, 2008. 异色瓢虫成虫耐寒能力的季节性变化. 昆虫学报, 51(12): 1271–1278]

(责任编辑: 赵利辉)