

沙葱萤叶甲热激蛋白基因 *GdHsp10a* 的克隆、分子特征与表达分析

陈 龙¹ 谭 瑶¹ 周晓榕¹ 庞保平^{1*} 单艳敏² 张卓然²

(1. 内蒙古农业大学, 草原昆虫研究中心, 呼和浩特 010019; 2. 内蒙古自治区草原工作站, 呼和浩特 010020)

摘要: 为明确热激蛋白 HSP10 在沙葱萤叶甲 *Galeruca daurica* 生长发育过程中的作用, 采用 RT-PCR 及 RACE 技术克隆沙葱萤叶甲 *Hsp10* 基因 cDNA 的全长序列, 采用生物信息学方法分析其序列特征, 并利用 qPCR 技术对该基因在沙葱萤叶甲不同发育阶段、成虫羽化后不同时期以及不同温度下的表达谱进行分析。结果表明, 克隆获得 1 条新的沙葱萤叶甲 *Hsp10* 基因, 命名为 *GdHsp10a*, GenBank 登录号为 MG460308, cDNA 序列全长为 526 bp, 开放阅读框为 333 bp, 编码蛋白含 110 个氨基酸, 预测分子量为 11.97 kD, 等电点为 9.74; 无信号肽及跨膜结构。同源比对及系统进化分析表明, *GdHSP10a* 与光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis* HSP10 亲缘关系最近, 氨基酸序列一致性为 53.15%。qPCR 结果表明, *GdHsp10a* 在沙葱萤叶甲各发育阶段均有表达, 其中在卵期和成虫期的表达量显著高于幼虫期、预蛹期及蛹期; 成虫羽化后不同时期表达量差异显著, 25 d 时表达量最高, 其次为 100、10 和 7 d 时的表达量; 温度对 *GdHsp10a* 表达量有显著影响, 30℃ 下表达量最高, 35℃ 下表达量次之, 15、20、25 及 40℃ 下表达量最低且无显著差异。表明 *GdHsp10a* 可能在沙葱萤叶甲生长发育及成虫越冬中起着多重作用。

关键词: 沙葱萤叶甲; 热激蛋白 HSP10; 基因克隆; 分子特性; 基因表达; 温度胁迫

Molecular cloning, characterization and expression analysis of the heat shock protein gene *GdHsp10a* in *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae)

Chen Long¹ Tan Yao¹ Zhou Xiaorong¹ Pang Baoping^{1*} Shan Yanmin² Zhang Zhuoran²

(1. Research Center for Grassland Entomology, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010019, Inner Mongolia Autonomous Region, China; 2. Grassland Station of Inner Mongolia, Hohhot 010020, Inner Mongolia Autonomous Region, China)

Abstract: In order to investigate the functions of HSP10 in the development of *Galeruca daurica*, a full-length cDNA encoding HSP10 was cloned from *G. daurica* by RT-PCR and RACE technologies. Bioinformatics programs were applied to analyze its sequence characteristics. qPCR was used to detect its mRNA expression levels at various developmental stages of *G. daurica*, different periods after the adult eclosion, and different temperature stresses. The results showed that the complete cDNA of the gene encoding heat shock protein HSP10 was obtained from *G. daurica*, and named *GdHsp10a* (GenBank accession: MG460308). Its full-length cDNA was 526 bp containing a 333 bp open reading frame that encodes 110 amino acids with the predicted molecular weight of 11.97 kD and pI of 9.74. The deduced protein contained no signal peptide and transmembrane domain. Homology and phylogenetic analyses showed that the amino acid sequence of *GdHSP10a* had the highest similarity (53.15%) with that of Asian long-

基金项目: 国家自然科学基金(31760517)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: pangbp@imau.edu.cn

收稿日期: 2017-12-03

horn beetle *Anoplophora glabripennis* HSP10. *GdHsp10a* was expressed at all developmental stages of *G. daurica*, and the expression levels in eggs and adults were significantly higher than those in the larva, pre-pupa and pupa. The expression levels were significantly different among the different periods after the adult eclosion, and reached the highest on the 25th day. Temperature had a significant effect on the expression of *GdHsp10a*, with the maximum at 30°C, followed by at 35°C, and with the minimum at 15, 20, 25 and 40°C, among which no significant differences existed. The results suggested that *GdHsp10a* might play multiple roles in the development of *G. daurica* and its adult overwintering.

Key words: *Galeruca daurica*; HSP10; gene cloning; molecular characterization; gene expression; temperature stress

热激蛋白(heat shock protein, HSP)是一类受到外界刺激后在体内迅速合成或表达量升高,且保守程度很高的蛋白,是生物体应对极端温度环境的关键因素之一,其在逆境环境下可与解析蛋白结合,进而防止蛋白自发折叠成不溶状态(王海鸿和雷仲仁, 2005)。热激蛋白根据同源性和分子量不同,可划分为HSP100、HSP90、HSP70、HSP60和小分子热激蛋白等家族(Sørensen et al., 2003)。小分子热激蛋白是一个分子伴侣超级家族,分子量大小为14~45 kD,具有保守的 α -晶体结构域,在序列、结构、大小和功能上与其它热激蛋白相比具有更高的多样性(Franck et al., 2004)。小分子热激蛋白通过保护各种参与信号传导、新陈代谢、翻译、转录及其它活动的蛋白质而维持了细胞蛋白组的稳定(Sun & MacRae, 2005)。昆虫小分子热激蛋白除了可以调节热胁迫外,在昆虫变态、发育、滞育和免疫反应中也起着重要作用(Pan et al., 2018)。一个热激蛋白家族成员的功能常随着发育阶段、亚细胞定位及环境条件而变化(King & MacRae, 2015)。虽然目前在双翅目、鳞翅目和膜翅目昆虫中已有多种小分子热激蛋白被鉴定和描述,但在大部分昆虫中只有很少的小分子热激蛋白基因被鉴定(Martin-Folgar et al., 2015),对其生物学功能的了解更少(Bakthisaran et al., 2015)。HSP10是HSP60的协同伴侣, HSP60-HSP10复合体促进多肽的折叠、失活蛋白的再折叠以及错误折叠蛋白的修正(Hayer-Hartl et al., 2016)。然而,目前对昆虫小分子热激蛋白的研究多集中于分子量约为20 kD的HSP20(陆明星等, 2015),对分子量更小的HSP10的研究几乎未见报道。因此,开展对昆虫HSP10的研究有助于更全面地了解昆虫小分子热激蛋白的功能。

沙葱萤叶甲 *Galeruca daurica* (Joannis)是近年来在内蒙古草原暴发成灾的新害虫。自2009年首次暴发以来,发生范围不断扩大,为害程度日趋严重,不仅严重影响草原畜牧业的发展,而且对草原生

态安全构成严重威胁(吴翔等, 2015)。沙葱萤叶甲在内蒙古草原地区1年发生1代,幼虫最早于4月上中旬开始孵化,6月初成虫羽化,取食约1周后开始潜入牛粪、石块及草丛下越冬,整个越冬期间基本不食不动,秋季产卵后,以卵滞育越冬(吴翔等, 2015; Zhou et al., 2016)。本实验室前期根据沙葱萤叶甲转录组数据,已成功克隆了 *Hsp10*、*Hsp60* 和 *Hsp70* 等热激蛋白基因,并对其分子特征以及在不同发育阶段及低温胁迫下的表达谱进行了测定分析(谭瑶等, 2017; Tan et al., 2017a)。为深入了解热激蛋白在沙葱萤叶甲生长发育、应对环境胁迫以及越冬过程中的作用,本研究拟进一步克隆获得新的小分子热激蛋白基因 *Hsp10a* 的cDNA全长序列,分析其序列特征以及在不同发育阶段、成虫不同组织和不同温度下的表达谱,以期揭示热激蛋白在沙葱萤叶甲生长发育及应对温度胁迫中的作用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试昆虫及培养基:于2017年春季将上年秋季从锡林郭勒草原采集的沙葱萤叶甲越冬卵在温度为 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度为 $(70\pm 5)\%$ 、光周期为14 L:10 D的人工气候箱中繁育,幼虫孵化后,以内蒙古自治区野生特有蔬菜种质资源与种质创新重点实验室温室种植的、处于营养生长期的沙葱为食,连续饲养作为供试虫源。LB(luria-bertani, LB)培养基:蛋白胨1 g、酵母粉0.5 g、NaCl 1 g、蒸馏水100 mL。

试剂:RNA提取试剂TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit、反转录PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit、SMARTer RACE 5'/3' Kit、胶回收TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver. 4.0及连接载体pMD19-T Vector Cloning Kit,宝生物工程(大连)有限公司;Taq PCR Master Mix(2 $\times$, Blue Dye),生工生物工程(上海)股份有限公司;GoTaq® qPCR Master Mix(2 $\times$),美国

Promega公司;大肠杆菌 *Escherichia coli* 感受态细胞 DH5 α , 北京天根生化科技有限公司;氨苄西林 (ampicillin, Amp), 北京酷莱博公司。

仪器: PRX-350C 智能型人工气候箱, 宁波海曙塞福实验仪器厂; FTC-3000 实时荧光定量仪, 加拿大 Funglyn Biotech 公司; T1000TM PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司; NanoPhotometerTM P-Class 微量核酸蛋白分析仪, 德国 Implen 公司。

1.2 方法

1.2.1 沙葱萤叶甲 *Hsp10* 基因 cDNA 全长序列的克隆

按照 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 说明书提取沙葱萤叶甲总 RNA, 利用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳和微量核酸蛋白分析仪来检测 RNA 的完整性、质量和浓度。取 1 μ g 总 RNA 用于 cDNA 第一链的合成, 具体操作参照 PrimeScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis Kit 说明书进行。

以本实验室组装的沙葱萤叶甲转录组数据库中基因序列信息为基础, 与 NCBI 中已上传的其它昆虫 *Hsp10* 基因序列的保守区域进行比对, 筛选出沙葱萤叶甲 *Hsp10* 基因。利用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计特异性引物 (表 1), 扩增出中间片段。以 cDNA 第一链为模板进行 RT-PCR 扩增, 采用 25 μ L PCR 反应体系: cDNA 模板 1 μ L、上下游引物 *GdHsp10a*-F/R 各 1 μ L、PCR Master Mix (2 $\times$) 12.5 μ L、超纯水 9.5 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C

变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 进行 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。将目的片段回收后, 利用 pMD-19T 载体连接, 转入大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 中, 吸取连接转化后的感受态细胞 200 μ L, 涂布于含 Amp 的 LB 平板上过夜培养 12~16 h, 而后筛选阳性克隆。在挑取的阳性克隆中加入 10 μ L ddH₂O, 取 2 μ L 作为 cDNA 模板进行菌液 RT-PCR, 反应体系及条件同上。验证所测序列的正确性后, 送北京六合华大基因科技股份有限公司测序。

以测序验证获得的 *Hsp10* 中间片段序列为模板, 根据 SMARTer RACE 5'/3' Kit 使用手册设计 5' 和 3' 基因特异性引物 (gene specific primers, GSP) 及巢氏引物 (nested gene specific primers, NGSP) 分别进行降落 PCR 及巢式 PCR (表 1)。5' RACE 第 1 轮反应程序: 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min, 共 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 70 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min, 共 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 68 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min, 共 25 个循环。将第 1 轮反应产物稀释 20 倍后作为模板, 进行第 2 轮 PCR 反应, 第 2 轮反应程序: 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 68 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min, 共 25 个循环。3' RACE 反应程序与 5' RACE 相同。扩增产物回收纯化经亚克隆后, 送北京六合华大基因科技股份有限公司测序。所得 5' 序列和 3' 序列经验证后, 利用 Vector NTI 11.5 与中间片段进行拼接得到沙葱萤叶甲 *Hsp10a* 基因的 cDNA 全长序列。

表 1 沙葱萤叶甲 *Hsp10* 基因克隆与 qPCR 检测引物信息

Table 1 Primers for cloning and qPCR detection of *GdHsp10a* in *Galeruca daurica*

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	引物用途 Primer usage
GdHsp10a-F	TTCATTCAATCTTTCAGTTTGCTA	RT-PCR
GdHsp10a-R	GTAATGTCTGCTGTGCCGAAATAG	
GdHsp10a 5'-GSP	CGGTTTTATTACCAGGTCTACGCGAG	5' RACE
GdHsp10a 5'-NGSP	CCTACGGCGAGAACTGTGCCTTTTGTGTA	
GdHsp10a 3'-GSP	TACAAAAAGGCACAGTTCTCGCCGTAGG	3' RACE
GdHsp10a 3'-NGSP	CGCCGTAGGACCTGGTAATAAAACCGAT	
GdHsp10a q-F	CTCCGGGGCAAACATTAACC	qPCR
GdHsp10a q-R	CGGAGACTCAAACCAAGGGA	
SDHA-F	GGGAGACCACAATCTCTCTCA	qPCR
SDHA-R	AGCTGGTGCTCCTAAGTCCA	

1.2.2 沙葱萤叶甲 HSP10 的生物信息学分析

利用 NCBI 在线预测网站 ORF Finder (www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html) 预测基因的蛋白编码序列, 应用在线预测网站 SignalIP4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalIP/>) 预测蛋白质信号肽, 利用 DNAMAN 6.0 软件预测蛋白质的分子量和等电点, 采用 TMHMM 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 分析蛋白质跨膜区域, 应用 DNA-

MAN 6.0 软件对沙葱萤叶甲 HSP10 与其它昆虫 HSP10 的氨基酸序列进行比对。使用 MEGA 6.0 软件以邻接法构建系统进化树, 采用模型 p 距离 (p-distance) 分析不同昆虫间 HSP10 的进化关系, 通过 Bootstrap 值检验系统树的置信度, 进行 1 000 次重复运算。

1.2.3 沙葱萤叶甲 *Hsp10* 基因的 qPCR 分析

利用 qPCR 检测 *Hsp10* 基因在沙葱萤叶甲卵、1~3 龄幼虫、预蛹、蛹 (均为蜕皮后 2 d) 和成虫 (羽化

后3 d)不同发育阶段、成虫羽化后不同时期和组织(羽化后3、7、10、15、25、40、60、80、100 d及其相应的头、胸及腹3部分组织)及不同温度下(羽化后3 d的成虫,分别在15、20、25、30、35、40℃下处理1 h)的mRNA表达水平。以特异性引物GdHsp10a q-F/R(表1)进行qPCR扩增,内参基因选用SDHA(Tan et al., 2017b)。每个处理设3个生物学重复,每个生物学重复分别设定为卵30粒、1龄幼虫15头、2龄幼虫7头、3龄幼虫3头、预蛹3头、蛹3头和成虫3头。采用两步法进行qPCR扩增,20 μL反应体系:cDNA 2 μL、上下游引物各0.4 μL、Go Taq® qPCR Master Mix 10 μL、ddH₂O 7.2 μL。反应程序:95℃预变性10 min;95℃变性15 s,60℃退火1 min,40个循环;95℃变性15 s,60℃退火15 s,95℃延伸15 s。

1.3 数据分析

采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对数据进行分析(Livak & Schmittgen, 2001),利用SPSS 20.0软件对数据进行单因素方差分析,应用Duncan氏新复极差法对沙葱萤叶甲不同发育时期、不同组织部位及不同温度条件下Hsp10a的表达量进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 沙葱萤叶甲GdHsp10基因的克隆及序列分析

RT-PCR扩增中间片段大小为340 bp(图1-A),经测序验证,序列信息与沙葱萤叶甲成虫转录组完全一致。经5'RACE和3'RACE扩增反应分别得到

300 bp(图1-B)和320 bp(图1-C)的片段。

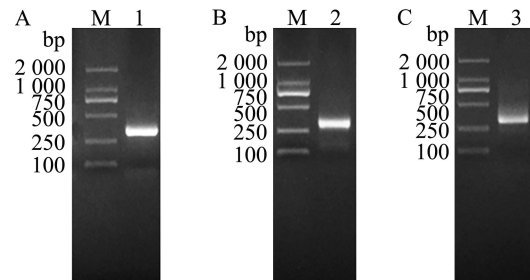


图1 沙葱萤叶甲GdHsp10a的PCR扩增电泳图

Fig. 1 Electrophoretic analysis of PCR products of GdHsp10a from *Galeruca daurica*

M: 蛋白分子量; 1(A): 中间片段; 2(B): 5'RACE片段; 3(C): 3'RACE片段。M: DL2000 marker; 1(A): intermediate segment; 2(B): 5'RACE segment; 3(C): 3'RACE segment.

目的基因及5'序列和3'序列经测序比对验证后表明均为预期目的片段,将3部分进行拼接得到Hsp10基因的cDNA全长序列,命名为GdHsp10a, GenBank登录号为MG460308。该基因cDNA全长为526 bp,开放阅读框长为333 bp,编码110个氨基酸,编码蛋白区左翼5'非编码区长度为98 bp,编码蛋白区右翼3'非编码区长度为95 bp,包含poly(A)尾(图2)。沙葱萤叶甲GdHsp10a编码蛋白的分子量为11.97 kD,理论预测等电点为9.74,无信号肽,不含跨膜结构。

```

1  ATGGGAGTCTAGTCGTAAGTGAAACGTCAAATAAAATCTGTCAATCAATTCTAATATCGAACTTTGTGTTATATAAAGAAAACCCACG
   TTTTAGTAATGTCTGCTGTGCCGAAAATAGCCACGGCTATTAATAAAGAAAATAGTACCGTTGATGAACAGAGTACTGATTAAAAAG
30  M S A V P K I A T A I K I K K I V P L M N R V L I K K
   CCGAAGCGGAGACTCAAACCAAGGGAGGTATAGTATTACCGGATAAAACGAAAGTTAAACTACAAAAGGCACAGTTCTCGCCGTAGGAC
60  A E A E T Q T K G G I V L P D K T K V K L Q K G T V L A V G
   CTGGAATAAAACCGATACCGGACATGATACCGGTTAATGTTTCCCGGAGACGAAGTCATTCTAGCCGATTACGGCGGTACCAGAA
90  P G N K T D T G H V V P V N V C P G D E V I L A D Y G G T R
   TCGAATTAGATAAAGACGAAGTTTATTTCTTTATAGAGAAAACGAAATTCTAGCCAACTGAAAGATTGAATGAATTATTTATCGTA
120 I E L D K D E V Y F L Y R E N E I L A K L K D *
   TTTCACCTGTAATGTTTATTGATAAATAATACATTTTATAGAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图2 沙葱萤叶甲GdHSP10a的核苷酸及推导的编码氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of GdHSP10a in *Galeruca daurica*

: 终止密码子。: Termination codon.

2.2 沙葱萤叶甲GdHSP10同源比对和系统进化分析

利用GdHsp10a编码的氨基酸序列在GenBank中搜索其它昆虫的HSP10序列并进行比对分析。结果表明,GdHSP10a与同属鞘翅目的光肩星天牛Anoplophora glabripennis(XP_018567272.1)及山松大小蠹Dendroctonus ponderosae(XP_019767997.1)的HSP10氨基酸序列一致性最高,分别为53.15%和52.68%,而与膜翅目的佛罗里达弓背蚁Campono-

tus floridanus(XP_011261971.1)的HSP10氨基酸序列一致性则为48.18%(图3)。

在GenBank中搜索部分鞘翅目和其它目昆虫HSP10的氨基酸序列构建系统进化树,发现除赤拟谷盗Tribolium castaneum的TcHSP10外,同一目昆虫的HSP10聚在一起;沙葱萤叶甲GdHSP10首先与同为鞘翅目的光肩星天牛AgHSP10聚为一支,然后与山松大小蠹DpHSP10聚为一大类(图4)。

AgHSP10 ... MASSIPKVTATKVRVFLFNRLIKRDDPATQSKGGI VLPENQKTRVRLGTVVAVGPGQRNDNGQKIPMTVKPGDYVILPDYGGARTEM. GEHYFMHRENDILAKLQE 108
 DpHSP10 MAAQASNLPSAHKIKKLVPFLFNRLIVKRAEPLKESKGGI VLPKAKTAKSLRGTIVVAVGPGTRTEKGVPIPMITIKYGDVIMLPDYGGTRVEMD. EQTYFLFRESEILARYTD 111
 CfHSP10 MAAANAVKRLIPLFDRVLIQRAEAVTKTKGGI VLPKQAQAKVLKGTIVVAVGPGAKNDKGEHVPLSLIKIGDVIPLPEYGGTKVELEDNREYHLFRESDILAKVEV 104
 GdHSP10a ..MSAVPKIATATIKIKIVLIMNRVLIHKAEAEQTQKGGI VLPDKTKVKLKQKTVLAVGPGNKTDITGHVIVVNVCPGDEVILADYGGTRIELDKDEVEFLYRENEILAKLKD 110
 Consensus a k p l r l k g g i v l p g t v a g p g g p g d v l y g g e y r e i l a

图3 沙葱萤叶甲与其它昆虫 HSP10 氨基酸序列比对

Fig. 3 Multiple amino acid sequence alignment of HSP10 from *Galeruca daurica* and other insects

黑色阴影: 一致的氨基酸序列; AgHSP10: 光肩星天牛 HSP10; DpHSP10: 山松大小蠹 HSP10; CfHSP10: 佛罗里达弓背蚁 HSP10; GdHSP10a: 沙葱萤叶甲 HSP10a; Consensus: 共有序列。The common amino acids are indicated in black; AgHSP10: *Anoplophora glabripennis* HSP10; DpHSP10: *Dendroctonus ponderosae* HSP10; CfHSP10: *Camponotus floridanus* HSP10; GdHSP10a: *Galeruca daurica* HSP10a.

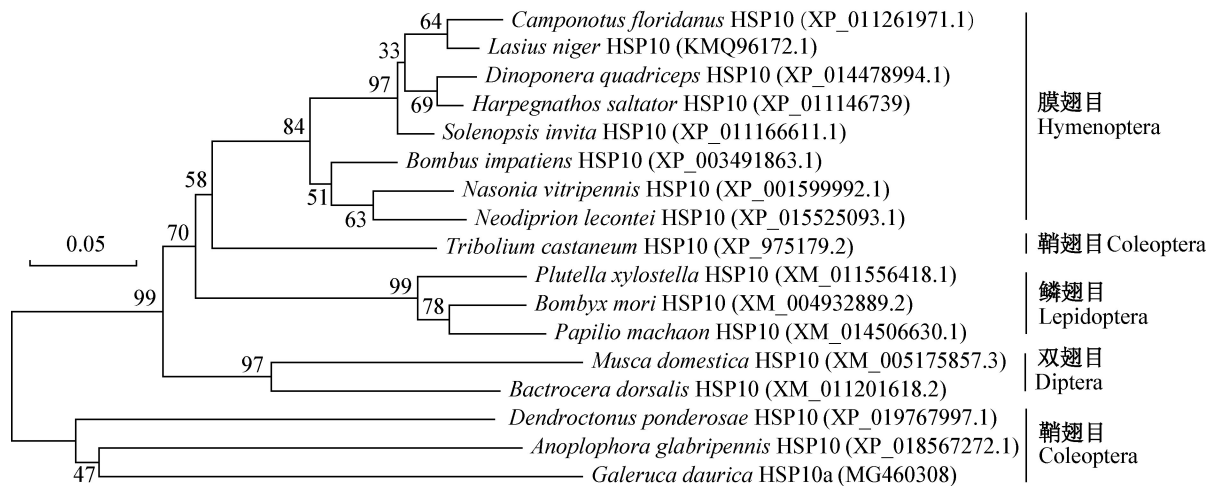


图4 基于 HSP10 氨基酸序列构建沙葱萤叶甲与其它昆虫的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of HSP10 from *Galeruca daurica* and other insects

2.3 沙葱萤叶甲 *Gdhsp10a* 的表达谱分析

2.3.1 在沙葱萤叶甲不同发育阶段的表达谱

在沙葱萤叶甲整个发育阶段 *GdHsp10a* 均有表达,且在卵期和成虫期的表达量显著高于幼虫期、预

蛹期和蛹期 ($P < 0.05$),在幼虫期、预蛹期和蛹期的表达量最低且差异不显著。成虫羽化后 *GdHsp10a* 表达量开始逐渐上升,第15天略有下降,第25天时突然升至最高峰,第40天急剧下降后又逐渐回升(图5)。

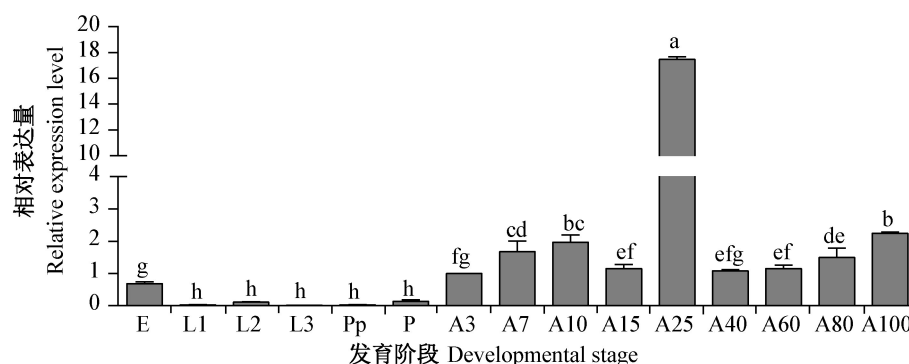


图5 沙葱萤叶甲不同发育阶段 *GdHsp10a* 的表达量

Fig. 5 Expression levels of *GdHsp10a* in different developmental stages of *Galeruca daurica*

E: 卵; L1~L3: 1~3龄幼虫; Pp: 预蛹; P: 蛹; A3~A100: 成虫羽化后天数。图中数据为平均值±标准误。不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著。E: Egg; L1~L3: 1st~3rd instar larva; Pp: pre-pupa; P: pupa; A3~A100: days after adult eclosion. Data are mean±SE. Different letters indicate significant difference at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

2.3.2 在沙葱萤叶甲成虫不同组织部位的表达谱

在沙葱萤叶甲成虫整个发育过程中, *GdHsp10a*

在头、胸和腹部均有表达,但除了羽化后第25天外,不同时期及组织间 *GdHsp10a* 的表达量差异均不显

著;在成虫羽化后第25天,*GdHsp10a*在头、胸和腹中的表达量差异显著($P<0.05$),且在腹部的表达量

最高,在胸部的表达量次之,在头部的表达量最低(图6)。

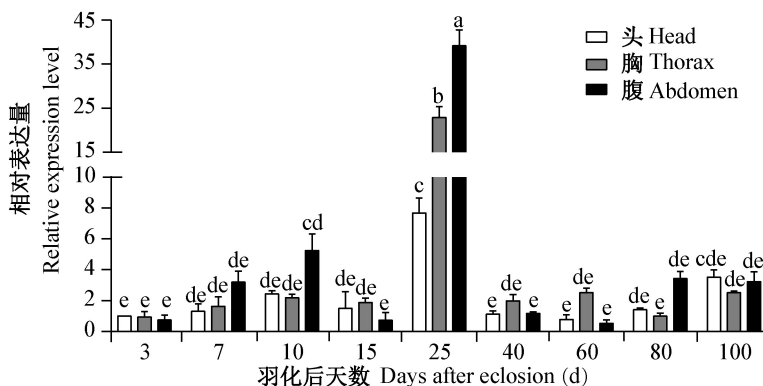


图6 *GdHsp10a*在沙葱萤叶甲成虫不同发育时期的组织表达谱

Fig. 6 Tissue-specific expression profile of *GdHsp10a* in different developmental stages of *Galeruca daurica* adults

图中数据为平均数±标准误。不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SE. Different letters indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

2.3.3 在不同温度下的表达谱

沙葱萤叶甲 *GdHsp10a* 在30℃下的表达量最高($P<0.05$),是15℃下的34.2倍;35℃下次之,为对照的15.1倍;15、20、25及40℃处理间无显著差异(图7)。

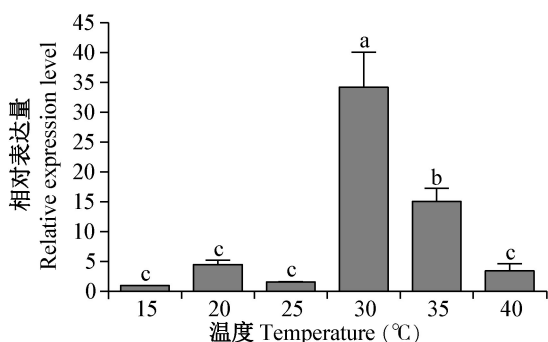


图7 沙葱萤叶甲 *GdHsp10a*在不同温度下的表达量

Fig. 7 Expression levels of *GdHsp10a* in *Galeruca daurica* at different temperatures

图中数据为平均数±标准误。不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SE. Different letters indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

3 讨论

昆虫生长发育过程非常复杂,特别是完全变态的昆虫,一生要经历卵、幼虫、蛹和成虫4个不同的发育阶段,在不同的发育阶段其形态和发育调控机制存在较大差异。在对黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 生长发育机制的研究中发现,小分子热激蛋白起着重要作用(Michaud et al., 2002; Takahashi et al., 2010)。不同种昆虫及不同种类小分子热激蛋

白在不同发育阶段表现出的表达模式不同。水稻二化螟 *Chilo suppressalis* 的小分子热激蛋白基因 *Hsp19.8*、*Hsp21.4*、*Hsp21.5* 和 *Hsp21.7b* 在成虫期的表达量最高,而 *Hsp21.7a* 在1龄幼虫期的表达量最高(Lu et al., 2014);斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 的小分子热激蛋白基因 *Hsp19.7*、*Hsp20* 和 *Hsp20.7* (Shen et al., 2011)、苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* 的 *Hsp19.8* 的表达量也在成虫阶段达到最大(Garczynski et al., 2011)。相反,斜纹夜蛾的 *Hsp20.4* (Shen et al., 2011) 和美洲斑潜蝇 *Liriomyza sativa* 的 *Hsp19.5*、*Hsp20.8* 和 *Hsp21.7* (Huang et al., 2007) 的表达量在成虫期最低。在本研究中,沙葱萤叶甲 *GdHsp10a* 的表达量在不同发育阶段存在显著差异,其中卵期和成虫期的表达量显著高于其它发育阶段的表达量。沙葱萤叶甲越冬卵具有很强的抗寒能力(高靖淳等, 2015), *GdHsp10a* 在卵期的高水平表达可能与之有关。

许多昆虫通过滞育的方式度过不良环境条件,如冬季的严寒(冬滞育)和夏季的炎热(夏滞育),而小分子热激蛋白与滞育密切相关(Rinehart et al., 2007)。粗须麻蝇 *Sarcophaga crassipalpis* 滞育起始阶段体内 *Hsp23* 表达量明显增加,在整个滞育过程中一直维持高水平,滞育终止期下降(Yocum et al., 1998; Hayward et al., 2005);红头丽蝇 *Calliphora vicina* 的 *Hsp23* 和 *Hsp26* 在其滞育幼虫体内上调表达(Fremdt et al., 2014)。本课题组多年室内外的观察结果表明,沙葱萤叶甲成虫羽化后会大量取食,但通常1周以后开始潜入牛粪、石块及草丛下,整个夏季几乎不食不动,秋季以后才恢复活动和取食(吴翔等, 2015)。在本试验中,成虫羽化后7 d, *GdHsp10a* 表

达量开始上升,并且多数时间处于较高水平,这说明沙葱萤叶甲成虫很可能以滞育的形式越冬;但成虫羽化25 d时,虫体未发现异常情况,仍处于不食不动的状态中,*GdHsp10a*的表达量为何突然急剧上升还有待于进一步研究。

小分子热激蛋白不仅在不同发育阶段呈现特异性表达,在不同组织中也呈现特异性表达(Michaud et al., 2002)。水稻二化螟(Lu et al., 2014)和家蚕 *Bombyx mori* (Li et al., 2009)的小分子热激蛋白基因在头部表达量都较高,而中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 的 *Hsp22.6* 却在中肠表达量最高,同时,其它2个小分子热激蛋白基因也表现出组织差异性表达(Zhang et al., 2014)。在本研究中,除羽化后25 d外, *GdHsp10a* 在成虫其它时期的头、胸和腹部表达量均无显著差异。目前对于小分子热激蛋白在不同组织中的作用尚不清楚,可能原因是为了维持正常的组织功能,并在昆虫的不同生物学过程起作用(Gu et al., 2012; Lu et al., 2014)。

热激蛋白是昆虫应对极端温度胁迫而采取的一种重要手段(Hoffmann et al., 2003; Sørensen et al., 2003)。不同种类昆虫的小分子热激蛋白基因对于高温和低温的响应存在着差异。如中华稻蝗 *Oxya chinensis* 小分子热激蛋白基因在不同温度胁迫下,各基因的表达模式存在差异(史学凯等, 2016);而斜纹夜蛾的 *Hsp19.7* 及 *Hsp20.7* (Shen et al., 2011)和摇蚊 *Chironomus riparius* 的 *Hsp27* (Martínez-Paz et al., 2014)的表达水平仅在高温诱导条件下发生变化,而对于低温诱导则无响应。本研究中, *GdHsp10a* 在30℃和35℃下的表达量显著高于15、20、25及40℃下的表达量,超过30℃后,表达水平呈现下降趋势,特别是40℃高温下表达量急剧下降。可能是由于高温对机体造成损伤,使得机体表达 *GdHsp10a* 能力下降。这在研究马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 的 *Ld-HSP60* (魏长平等, 2017)和 *Ld-HSP90* (蒋健等, 2013)以及禾谷缢管蚜 *RpHsp90* (李玉婷等, 2017)时,获得了类似结果。但马铃薯甲虫和禾谷缢管蚜的热激蛋白的耐受温度略高于沙葱萤叶甲,可能是与沙葱萤叶甲发生地夏季最高温度较低、很少超过35℃有关(内部资料),致使其对高温的耐受性低于以上2种昆虫。

本研究成功克隆了沙葱萤叶甲 *GdHsp10a* 基因的全长cDNA,该基因在沙葱萤叶甲各个发育阶段均有表达,其中在成虫期和卵期表达量显著高于其它发育阶段;30~35℃高温胁迫可诱导 *GdHsp10a* 上调表达,表明 *GdHsp10a* 可能在沙葱萤叶甲卵越冬

及成虫越冬中发挥作用,今后还需对热激蛋白在沙葱萤叶甲生长发育及抵抗极端环境条件中的作用机制进行进一步的深入研究。

参 考 文 献 (References)

- Bakthisaran R, Tangirala R, Rao CM. 2015. Small heat shock proteins: role in cellular functions and pathology. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1854(4): 291–319
- Franck E, Madsen O, van Rheede T, Ricard G, Huynen MA, de Jong WW. 2004. Evolutionary diversity of vertebrate small heat shock proteins. *Journal of Molecular Evolution*, 59(6): 792–805
- Fremdt H, Amendt J, Zehner R. 2014. Diapause-specific gene expression in *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae)—a useful diagnostic tool for forensic entomology. *International Journal of Legal Medicine*, 128(6): 1001–1011
- Gao JC, Zhou XR, Pang BP, Bao X, Luo JP, Eerdengqimuge. 2015. Effects of low temperature on the survivorship and development of overwintering eggs of *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Acta Entomologica Sinica*, 52(8): 881–886 (in Chinese) [高靖淳, 周晓榕, 庞保平, 包祥, 罗建平, 额尔登其木格. 2015. 低温对沙葱萤叶甲越冬卵存活和发育的影响. *昆虫学报*, 52(8): 881–886]
- Garczynski SF, Unruh TR, Guedot C, Neven LG. 2011. Characterization of three transcripts encoding small heat shock proteins expressed in the codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Insect Science*, 18(5): 473–483
- Gu J, Huang LX, Shen Y, Huang LH, Feng QL. 2012. Hsp70 and small Hsps are the major heat shock protein members involved in midgut metamorphosis in the common cutworm, *Spodoptera litura*. *Insect Molecular Biology*, 21(5): 535–543
- Hao X, Zhou XR, Pang BP, Zhang ZR, Bao X. 2015. Morphological and biological characteristics of *Galeruca daurica* Joannis. *Acta Agrestia Sinica*, 23(5): 1106–1108 (in Chinese) [昊翔, 周晓榕, 庞保平, 张卓然, 包祥. 2015. 沙葱萤叶甲的形态特征和生物学特性研究. *草地学报*, 23(5): 1106–1108]
- Hayer-Hartl M, Bracher A, Hartl FU. 2016. The GroEL-GroES chaperonin machine: a nano-cage for protein folding. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(1): 62–76
- Hayward SA, Pavlides SC, Tammariello SP, Rinehart JP, Denlinger DL. 2005. Temporal expression patterns of diapause-associated genes in flesh fly pupae from the onset of diapause through post-diapause quiescence. *Journal of Insect Physiology*, 51(6): 631–640
- Hoffmann AA, Sorensen JG, Loeschcke V. 2003. Adaptation of *Drosophila* to temperature extremes: bringing together quantitative and molecular approaches. *Journal of Thermal Biology*, 28(3): 175–216
- Huang LH, Chen B, Kang L. 2007. Impact of mild temperature hardening on thermotolerance, fecundity, and *Hsp* gene expression in *Liriomyza huidobrensis*. *Journal of Insect Physiology*, 53(12): 1199–1205
- Jiang J, Li XR, Zhang YH, Guo WC, Cheng DF, Guo QY. 2013. cDNA cloning of heat shock protein 90 (*Ld-hsp90*) in *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) and its expression un-

- der temperature stress. *Journal of Plant Protection*, 40(5): 399–406 (in Chinese) [蒋健, 李祥瑞, 张云慧, 郭文超, 程登发, 郭青云. 2013. 马铃薯甲虫热激蛋白基因 *Ldhsp90* 的克隆及温度胁迫下的表达. *植物保护学报*, 40(5): 399–406]
- King AM, MacRae TH. 2015. Insect heat shock proteins during stress and diapause. *Annual Review of Entomology*, 60: 59–75
- Li YT, Zhao Q, Fang B, Chen MH. 2017. Molecular cloning and expression analysis of the *Hsp90* gene in the bird cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi*. *Journal of Plant Protection*, 44(1): 16–23 (in Chinese) [李玉婷, 赵奇, 房冰, 陈茂华. 2017. 禾谷缢管蚜热激蛋白 *Hsp90* 基因的克隆和表达分析. *植物保护学报*, 44(1): 16–23]
- Li ZW, Li X, Yu QY, Xiang ZH, Kishino H, Zhang Z. 2009. The small heat shock protein (sHSP) genes in the silkworm, *Bombyx mori*, and comparative analysis with other insect sHSP genes. *BMC Evolutionary Biology*, 9: 215
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408
- Lu MX, Hua J, Cui YD, Du YZ. 2014. Five small heat shock protein genes from *Chilo suppressalis*: characteristics of gene, genomic organization, structural analysis, and transcription profiles. *Cell Stress and Chaperones*, 19(1): 91–104
- Lu MX, Xu J, Du YZ. 2015. Progress in research on insect small heat shock proteins. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 52(6): 1326–1332 (in Chinese) [陆明星, 徐静, 杜予州. 2015. 昆虫小分子量热激蛋白的研究进展. *应用昆虫学报*, 52(6): 1326–1332]
- Martín-Folgar R, de la Fuente M, Morcillo G, Martínez-Guitarte JL. 2015. Characterization of six small HSP genes from *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae): differential expression under conditions of normal growth and heat-induced stress. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 188: 76–86
- Martínez-Paz P, Morales M, Martín R, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G. 2014. Characterization of the small heat shock protein *Hsp27* gene in *Chironomus riparius* (Diptera) and its expression profile in response to temperature changes and xenobiotic exposures. *Cell Stress and Chaperones*, 19(4): 529–540
- Michaud S, Morrow G, Marchand J, Tanguay RM. 2002. *Drosophila* small heat shock proteins: cell and organelle-specific chaperones? *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 28: 79–101
- Pan DD, Lu MX, Li QY, Du YZ. 2018. Characteristics and expression of genes encoding two small heat shock protein genes lacking introns from *Chilo suppressalis*. *Cell Stress and Chaperones*, 23(1): 55–64
- Rinehart JP, Li A, Yocum GD, Robich RM, Hayward SAL, Denlinger DL. 2007. Up-regulation of heat shock proteins is essential for cold survival during insect diapause. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(27): 11130–11137
- Shen Y, Gu J, Huang LH, Zheng SC, Liu L, Xu WH, Feng QL, Kang L. 2011. Cloning and expression analysis of six small heat shock protein genes in the common cutworm, *Spodoptera litura*. *Journal of Insect Physiology*, 57(7): 908–914
- Shi XK, Kou LH, Zhang YP, Ma EB, Zhang JZ, Wu HH. 2016. Effects of temperature on the expression patterns of *OcsHSP* genes in *Oxya chinensis*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 53(6): 1267–1273 (in Chinese) [史学凯, 寇利花, 张育平, 马恩波, 张建珍, 吴海花. 2016. 温度对中华稻蝗小分子热休克蛋白基因表达的影响. *应用昆虫学报*, 53(6): 1267–1273]
- Sørensen JG, Kristensen TN, Loeschcke V. 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters*, 6(11): 1025–1037
- Sun Y, MacRae TH. 2005. Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(21): 2460–2476
- Takahashi KH, Rako L, Takano-Shimizu T, Hoffmann AA, Lee SF. 2010. Effects of small *Hsp* genes on developmental stability and microenvironmental canalization. *BMC Evolutionary Biology*, 10: 284
- Tan Y, Zhang Y, Huo ZJ, Zhou XR, Pang BP. 2017a. Molecular cloning of heat shock protein 10 (*hsp10*) and 60 (*hsp60*) cDNAs from *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae) and their expression analysis. *Bulletin of Entomological Research*, 108(4): 510–512
- Tan Y, Zhang Y, Huo ZJ, Zhou XR, Shan YM, Pang BP. 2017. Molecular cloning and expression profiling of the heat shock protein gene *GdHsp70* in *Galeruca daurica* Joannis (Coleoptera: Chrysomelidae). *Acta Entomologica Sinica*, 60(8): 865–875 (in Chinese) [谭瑶, 张玉, 霍志家, 周晓榕, 单艳敏, 庞保平. 2017. 沙葱茎叶甲热激蛋白基因 *GdHsp70* 的克隆与表达模式分析. *昆虫学报*, 60(8): 865–875]
- Tan Y, Zhou XR, Pang BP. 2017b. Reference gene selection and evaluation for expression analysis using qRT-PCR in *Galeruca daurica* (Joannis). *Bulletin of Entomological Research*, 107(3): 359–368
- Wang HH, Lei ZR. 2005. Current developments of heat shock proteins in insects. *Scientia Agricultura Sinica*, 38(10): 2023–2034 (in Chinese) [王海鸿, 雷仲仁. 2005. 昆虫热休克蛋白的研究进展. *中国农业科学*, 38(10): 2023–2034]
- Wei CP, Jiang J, Li XR, Zhang YH, Zhang FM, Cheng DF, Guo WC, Liu H. 2017. Cloning and sequence analysis of heat shock protein gene *Ld-HSP60* in *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) and its expression under temperature stress. *Acta Entomologica Sinica*, 60(5): 523–532 (in Chinese) [魏长平, 蒋健, 李祥瑞, 张云慧, 张方梅, 程登发, 郭文超, 刘怀. 2017. 马铃薯甲虫热激蛋白基因 *Ld-HSP60* 的克隆序列分析及温度胁迫下的表达. *昆虫学报*, 60(5): 523–532]
- Yocum GD, Joplin KH, Denlinger DL. 1998. Up-regulation of a 23 kDa small heat shock protein transcript during pupal diapause in the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 28(9): 677–682
- Zhang YY, Liu YL, Guo XL, Li YL, Gao HG, Guo XQ, Xu BH. 2014. *sHsp22.6*, an intronless small heat shock protein gene, is involved in stress defense and development in *Apis cerana cerana*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 53: 1–12
- Zhou XR, Gao JC, Pang BP. 2016. Effects of temperature on the termination of egg diapause and post-diapause embryonic development of *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environmental Entomology*, 45(4): 1076–1080

(责任编辑:李美娟)