

棉蚜 *HSP70* 基因 cDNA 片段的克隆和序列分析

汤兴春,赵惠燕,焦少娟

(西北农林科技大学 植保学院,陕西 杨凌 712100)

[摘要] **【目的】**克隆棉蚜 *HSP70* 基因 cDNA 片段,并分析其基因序列。**【方法】**采集黄色型和绿色型棉蚜,实验室饲养 4~5 代形成单克隆系,温度处理后提取总 RNA 备用。根据已知昆虫 *HSP70* 基因的保守性区域,设计特异性引物,采用 RT-PCR 方法扩增棉蚜 *HSP70* 基因的部分序列,测序后进行核苷酸和推导的氨基酸序列分析。**【结果】**RT-PCR 扩增得到一条长度 783 bp 左右的 *HSP70* 基因 cDNA 片段。测序结果显示,所得 cDNA 片段长度为 783 bp(GenBank 登录号为:EU109426),且黄色型和绿色型棉蚜的核苷酸序列一致,编码 261 个氨基酸残基。由棉蚜该片段推导的氨基酸序列与其他昆虫的同源性较高。**【结论】**获得了棉蚜 *HSP70* 基因 783 bp 的 cDNA 片段,该片段编码 261 个氨基酸残基。

[关键词] 棉蚜;克隆;热休克蛋白 70 基因;同源性

[中图分类号] S435.622⁺.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2008)08-0161-04

Clone and sequence analysis of cDNA fragment of heat shock protein 70 gene in the aphid *Gossypii* Glover

TANG Xing-chun, ZHAO Hui-yan, JIAO Shao-juan

(College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** The study cloned the partial cDNA sequences of *HSP70* genes of *Aphis gossypii* Glover and studied the features of the sequences. **【Method】** Cotton aphids of yellow and green type were collected laboratory and reared for 4~5 generations. After temperature treatment total RNA was extracted to reserve. According to the conserved regions of other known insects, a pair of specific primers were designed and the RT-PCR method was used to amplify the partial sequences of *HSP70* from cotton aphid, then analyzed the nucleotide and deduced amino acid sequence. **【Result】** Sequencing results show that the cDNA fragment was 783 bp in size (GenBank accession No. EU109426). The nucleotide sequence of the yellow type and green type were the same. It encoded 261 amino acid residues. There was high homology of amino acid sequence between the cotton aphid and other insects. **【Conclusion】** Sequencing result show that the cDNA fragment was 783 bp in size, it encoded 261 amino acid residues.

Key words: *Aphis gossypii* Glover; clone; heat shock protein 70 gene; homology

棉蚜 (*Aphis gossypii* Glover) 属同翅目 (*Homoptera*) 蚜科 (*Aphididae*) 蚜属 (*Aphis*), 是世界性的重要农业害虫。棉蚜有黄色型、绿色型和中间型不同体色。汪世泽等^[1]依据棉蚜体色随温度变化提

出了“季节生物型”的概念,指出决定棉蚜体色的主要因素是温度。赵惠燕等^[2]研究发现,不论是自然还是实验种群,群体还是个体,也不论寄主、栽培条件、生育期营养是否相同,棉蚜体色在世代内稳定不

* [收稿日期] 2007-09-11

[基金项目] 国家自然科学基金项目(39970112,30470268);陕西省重点项目(2001SM01)

[作者简介] 汤兴春(1982—),男,安徽巢湖人,在读硕士,主要从事昆虫生态学研究。E-mail: tangxingchun520@yahoo.com.cn

[通讯作者] 赵惠燕(1956—),女,河南西平人,教授,博士生导师,主要从事昆虫生态学研究。E-mail: zhaohy1983@yahoo.com.cn

变;在世代间黄色型、绿色型棉蚜互变的临界温度为 20.65 ℃,温度越高棉蚜体色变黄越快,温度越低变绿越快。程茂高等^[3]、张利军等^[4]根据国内外研究结果提出棉蚜体色变化的基因控制论、寄主专化论和环境因素控制论 3 种学说。

热休克蛋白(Heat shock proteins, HSP)是进化上高度保守、功能上至关重要的一族蛋白,广泛存在于从低等原核生物到高等哺乳动物的整个生物界^[5]。HSP70 是已知热休克蛋白家族中最为保守、研究最为广泛的一种,作为应激保护蛋白,在应激条件下其表达量显著升高^[6],使机体对环境胁迫或伤害的耐受性提高^[7]。

目前,国内外关于蚜虫热休克蛋白的研究很少,Stanley 等^[8]从桃蚜(*Myzus persicae* (Sulzer.)) cDNA 文库中克隆获得 1 条线粒体 HSP60 基因序列,该序列全长 2 348 bp,包含一个 1 722 bp 的开放阅读框架。该开放阅读框架编码 1 个由 574 个氨基酸组成的蛋白质,此蛋白与大肠杆菌中 HSP60 家族成员 GroEL 高度同源(88.7%相似),在蚜虫体内称为 SymL 蛋白。SymL 蛋白在蚜虫传播植物病毒过程中起一定的作用^[9-10],能与马铃薯卷叶病毒(PLRV)和大麦黄矮病毒(BYDV)结合^[11],使其避免酶促降解^[12]。史彩华等^[13]用不同温度对黄色型和绿色型棉蚜进行热胁迫处理,结果发现黄色型和绿色型棉蚜体内总蛋白含量分别在 10 ℃ 30 min 和 30 ℃ 30 min 条件下有最大值,表明棉蚜体色变化与 HSP60 无关。然而关于 HSP70 与棉蚜体色变化的关系,以及 HSP70 在棉蚜抗逆性和遗传分化中的作用还未见研究报道。为此,本研究利用反转录多聚酶链式反应(Reverse transcriptase chain reaction, RT-PCR),对棉蚜 HSP70 基因 cDNA 片段进行了克隆和序列分析,以期对棉蚜生态遗传与进化及棉蚜综合治理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 棉蚜 棉蚜采自陕西省杨凌区花椒树,黄色型和绿色型各一组,分别接于不同的棉株上。黄色型和绿色型棉蚜的饲养温度分别为 22 和 18 ℃,光周期均为 L/D=14 h/10 h,相对湿度均为(60±10)%,在实验室人工气候箱内饲养 4~5 代,形成单克隆系。分别挑选 2 种体色型棉蚜 100 头放入 1.5 mL 离心管中,黄色型和绿色型棉蚜分别进行 10 ℃ 30 min 和 30 ℃ 30 min 水浴处理后,立即放入液氮

中冻死保存。

1.1.2 主要试剂 RNeasy Mini Kit 试剂盒购自 Qiagen 公司;RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒、Taq DNA 聚合酶均购自 Fermentas 公司;凝胶回收试剂盒购自 U-gene 公司;pGEM-T Easy vector 购自 Promeg 公司;质粒小提试剂盒购自天根公司。

1.2 棉蚜总 RNA 的提取

称取 0.500 g 液氮冻存的棉蚜置于 5 mL 的玻璃研磨器内,用试剂盒提取棉蚜总 RNA,具体操作参照 RNeasy Mini Kit 试剂盒提供的标准程序进行。

1.3 棉蚜 HSP70 基因 cDNA 片段的 RT-PCR 扩增

1.3.1 引物设计 根据 GenBank 中的热休克蛋白 70 基因的保守性区域,用 Primer 5.0 软件设计引物:上游引物 5'-GTTCTGCTACTTCAATGATT-3',下游引物 5'-AGCAGTTTCAATACCCAGAG-3'。引物由上海 Invitrogen 公司合成,预期扩增片段长度为 783 bp。

1.3.2 第一链 cDNA 的合成 取 0.1~5 μg 总 RNA,参照 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒提供的标准程序,合成第一链 cDNA。

1.3.3 RT-PCR 反应体系 反应体系 25 μL: Taq DNA 聚合酶缓冲液 2.5 μL, dNTP (2.5 mmol/L) 2.0 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 2.0 μL, 上游引物和下游引物(10 μmol/L) 各 1.0 μL, Taq DNA 聚合酶 0.25 μL, 第一链 cDNA 产物 2.0 μL, ddH₂O 补足 25 μL。反应条件:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 40 s, 57 ℃ 退火 40 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 循环 30 次;72 ℃ 延伸 10 min。

1.4 PCR 产物的回收纯化

取 PCR 产物进行 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳,在紫外灯下切割目标片段,用凝胶回收试剂盒回收纯化扩增产物。

1.5 棉蚜 HSP70 基因 cDNA 片段的克隆和序列分析

参照 pGEM-T Easy vector 试剂盒说明书,将回收 PCR 产物与 pGEM-T Easy vector 连接,4 ℃ 反应过夜。将连接液转化到制备好的 JM 109 感受态细胞中(植保学院植物病毒实验室保存)涂布于 LB 平板(含氨苄青霉素 100 mg/L),蓝白斑筛选后,挑取白色菌落加入 LB 培养液中,37 ℃ 摇床温育过夜。培养好的菌液用质粒小提试剂盒抽提质粒 DNA,进行

PCR 鉴定后送上海生工双向测序。将测序结果用 DNAMAN 和 BLAST 软件进行序列分析。

2 结果与分析

2.1 棉蚜 HSP70 基因 cDNA 片段的 RT-PCR 扩增
采用 RT-PCR 方法,扩增出与预期 783 bp 相符的 cDNA 片段(图 1)。

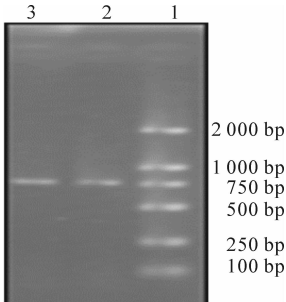


图 1 棉蚜 HSP70 基因 cDNA 片段的 RT-PCR 扩增结果

1. DNA Marker;2. 黄色型棉蚜 PCR 扩增产物;
3. 绿色型棉蚜 PCR 扩增产物

Fig.1 PCR amplification of cDNA fragment of HSP70 gene in cotton aphid

1. DNA Marker;2. Product of PCR amplification(yellow);
3. Product of PCR amplification(green)

2.2 棉蚜 HSP70 基因 cDNA 片段核苷酸序列及推导的氨基酸序列

扩增产物经回收纯化后,连接到 pGEM-T Easy vector 上双向测序,测序结果表明,2 种色型棉蚜的核苷酸序列一致。所得 cDNA 片段(GenBank 登录号为:EU109426)长度为 783 bp(包括引物在内),编码 261 个氨基酸残基(图 2)。

据棉蚜 HSP70 基因 cDNA 片段推导的 HSP70 蛋白氨基酸序列与烟草天蛾(*Manduca sexta*)、蛀茎夜蛾(*Sesamia nonagrioides*)、小菜蛾(*Plutella xylostella*)、油松毛虫(*Dendrolimus tabulaeformis*)、马尾松毛虫(*Dendrolimus punctatus*)、落叶松毛虫(*Dendrolimus superans*)和粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)HSP70 蛋白的同源性均为 96%;与家蚕(*Bombyx mori*)、异色瓢虫(*Harmonia axyridis*)、二化螟(*Chilo suppressalis*)、甘蓝夜蛾(*Mamestra brassicae*)的同源性均为 95%;与飞蝗(*Locusta migratoria*)的同源性为 94%。表明获得的 783 bp 的核苷酸序列编码棉蚜 HSP70 蛋白的部分氨基酸序列。

```
1  GTTCCTGCCTACTTCAATGATTCCCAACGTC AAGCTACCAAAGATTCTGGTACCATTGCT
1  U P A Y F N D S Q R Q A T K D S G T I A
61  GGTTTGAACGTAATGCGTATCATCAATGAACCTACAGCCGCTGCCATTGCATACGGTCTT
21  G L N U M R I I N E P T A A I A Y G L
121 GACAAGAAGACATCTGGAGAACGCAACGTTCTGATCTTCGATTTGGGTGGTGGTACTTTT
41  D K K T S G E R N U L I F D L G G G T F
181 GATGTTTCCATCTTGACCATCGAATATGGAATATTCGAAGTCAAGTCCACTGCTGGAGAC
61  D U S I L T I E D G I F E U K S T A G D
241 ACTCACTTGGGAGGTGAAGATTTTGACAACAGAATGGTCAACCACTTTGTACAAGAGTTC
81  T H L G G E D F D N R M U N H F U Q E F
301 AAACGCAAGTCAAGAAGGACGTGACCACCAACAAAAGAGCCTTGAGACGTTTGAGGACT
101 K R K Y K K D U T T N K R A L R R L R T
361 GCCTGCGAACGTGCAAAGCGTACTCTTTCCTCTTCCACCCAAGGAAGGATTGAAATTGAT
121 A C E R A K R T L S S S T Q A S I E I D
421 TCGTTGTTGAAGGTGTCGACTTCTACACATCCATCACTCGTGCTCGTTTTGAAGAATTG
141 S L F E G U D F Y T S I T R A R F E E L
481 AACGCCGATCTTTCCGTAGTACCATGGAACCCGTAGAAAAATCTCTACGTGACGCTAAG
161 N A D L F R S T M E P U E K S L R D A K
541 ATGGACAAGTCTGCCATCAATGACATTGTATTGGTTGGAAGGTTCAACCCGTATCCCCAAA
181 M D K S A I N D I U L U G G S T R I P K
601 GTACAGAAATTGTTACAAGACTTCTTCAACGGCAAGGAATTGAACAAATCCATCAATCCC
201 U Q K L L Q D F F N G K E L N K S I N P
661 GATGAAGCTGTTGCTATGGTGCCGCGTACAAGCTGCCATCTTGCACGGAGACAAATCT
221 D E A U A Y G A A U Q A A I L H G D K S
721 GAAGAAGTCCAAGACTTGTGTTGCTCGATGTCACTCCTCTGTCTCTGGGTATTGAAACT
241 E E U Q D L L L L D U T P L S L G I E T
781 GCT
261 A
```

图 2 棉蚜 HSP70 基因 cDNA 片段的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig.2 Partial cDNA sequence and deduced amino acid sequence of HSP70 in cotton aphid

3 讨 论

本研究成功克隆获得 783 bp 的棉蚜 HSP70 基因 cDNA 片段,为进一步获得其全长,深入研究

HSP70 的生物抗逆功能,探索 HSP70 作用机理奠定了基础。

棉蚜中有随温度变化体色发生改变的个体,也有体色不发生变化的个体(如木槿、花椒上不变色的

黄蚜),其原因是这 2 种棉蚜的遗传基础不同^[2]。两者在 *HSP70* 基因上是否存在差异,还需进一步深入研究。

环境中的物理、化学、生物因素及其引发的体内生化、生理、病理反应和产生的代谢产物,均可诱导 HSP 的合成增加,从而使细胞或生物免受应激因素的损害。HSP 是家族性蛋白,在昆虫 HSP 家族中除了 HSP70 外,还有 HSP90、HSP60 和小 HSP,其中最重要、表达量最高的是 HSP70,其分布广而且参与许多细胞的正常生理过程。杜桂林等^[14] 研究证实,红色型麦长管蚜种群的 HSP70 表达量显著高于绿色型麦长管蚜种群。棉蚜体内 HSP70 的表达量与其体色之间的关系有待进一步研究。有研究表明,活体蚜虫血液中有 2 种水溶性色素:原蚜色素(Protoaphin)和异蚜色素(Heteroaphin),分别存在于不同的物种中。温度对蚜虫体色的影响,未必就是温度引起了基因的变异,因为任何基因水平的遗传变异,并不一定能在短期内(数代)发生。温度对棉蚜体色影响的机理,可能是温度改变了虫体内相关酶类的活性,使其作用于棉蚜真皮细胞色素粒,从而导致了体色改变。

[参考文献]

[1] 汪世泽,赵惠燕,董应才. 棉蚜体色分化与季节生物型问题[J]. 西北农学院学报,1983,11(2):19-23.
Wang S Z,Zhao H Y,Dong Y C. On the problems of body colour differentiation and seasonal biotypes of cotton aphids (*Aphis gossypii* G.) [J]. Journal of Northwestern College of Agriculture,1983,11(2):19-23. (in Chinese)

[2] 赵惠燕,张改生,汪世泽,等. 棉蚜体色变化的生态遗传学研究[J]. 昆虫学报,1993,36(3):282-289.
Zhao H Y,Zhang G S,Wang S Z,et al. An eco-genetic study of body color in cotton aphids(*Aphis gossypii*) [J]. Acta entomologica sinica,1993,36(3):282-289. (in Chinese)

[3] 程茂高,乔卿梅,原国辉. 昆虫体色分化研究进展 [J]. 昆虫知识,2005,42(2):502-505.
Cheng M G,Qiao Q M,Yuan G H. Progress of the reseach on body color diversity in insects [J]. Chinese Bulletin of Entomology,2005,42(2):502-505. (in Chinese)

[4] 张利军,李友莲,范晓峰. 蚜虫种下体色变化机理研究 [J]. 山西农业科学,2003,31(2):59-63.
Zhang L J,Li Y L,Fan X F. Mechanism of body color transfor-

mation in aphids at the stage of sub-species [J]. Journal of Shanxi Agricultural sciences,2003,31(2):59-63. (in Chinese)

[5] 焦传珍,王在照,李富花,等. 编码中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)一种组成型热休克蛋白 70(HSC70)的 cDNA 克隆、测序及其表达分析 [J]. 科学通报,2004,49(21):2178-2186.
Jiao C Z,Wang Z Z,Li F H,et al. Cloning,sequencing and expression analysis of cDNA encoding a constitutive heat shock protein 70 (HSC70) in *Fenneropenaeus chinensis* [J]. Chinese Science Bulletin,2004,49(21):2178-2186. (in Chinese)

[6] Kiang J G,Tsokos G C. Heat shock protein 70 ku; molecular biology, biochemistry and physiology [J]. Pharmacol Ther, 1998,80:183-201.

[7] 吴任,谢数涛,孙 勇,等. 凡纳滨对虾热休克蛋白 70 的原核高效表达 [J]. 中国水产科学,2006,13(2):305-309.
Wu R,Xie S T,Sun Y,et al. High level prokaryotic expression of heat shock protein 70 in *Litopenaeus vannamei* [J]. Journal of Fishery Sciences of China,2006,13(2):305-309. (in Chinese)

[8] Stanley K, Fenton B. A member of the Hsp60 gene family from the peach potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer.) [J]. Insect Molecular Biology,2000,9(2),211-215.

[9] Ishikawa H. Characterisation of the protein species synthesized in vivo by an aphid endosymbiont [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology,1984,14(4):417-425.

[10] Fukatsu T, Ishikawa H. Synthesis and localization of symbionin, an aphid endosymbiont protein [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology,1992,22(2):167-174.

[11] Filichkin S A,Brumfield S,Filichkin T P,et al. *In vitro* interactions of the aphid endosymbiotic SymL chaperonin with barley yellow dwarf virus [J]. Journal of Virology,1997,71(1):569-577.

[12] Hogenhout S A,Vander W F,Verbeek M,et al. Potato leaf roll virus binds to the equatorial domain of the aphid endosymbiotic *GroEL* homolog [J]. Journal of Virology,1998,72(1):358-365.

[13] 史彩华. 温度胁迫对不同体色棉蚜的影响及体色与 HSPs 的关系 [D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学,2007.
Shi C H. Stressing temperatures lead to the effects on cotton aphids(*Aphis gossypii* *Glover*) in different body color and their relationship between the body color and the HSPs [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2007. (in Chinese)

[14] 杜桂林. 红色麦长管蚜生态学及热激蛋白 70 表达量的研究 [D]. 北京:中国农业科学院,2007.
Du G L. Study on the ecology and the expression of heat shock protein-70(HSP70) in red *Macrosiphum avenae* [D]. Beijing: The Chinese Academy of Agricultural Sciences,2007. (in Chinese)