

白背飞虱海藻糖合成酶基因的克隆及序列分析

张道伟¹, 陈 静², 郭玉双³

(1. 遵义师范学院, 贵州 遵义 563002; 2. 遵义医学院, 贵州 遵义 563003; 3. 贵州省烟草科学研究所, 贵州 贵阳 550081)

摘要:为进一步深入研究白背飞虱的迁飞能力与能量代谢,利用同源克隆及 RACE 的方法,从白背飞虱 *Sogatella furcifera* 中克隆获得海藻糖合成酶基因(TPS)的全长 cDNA 序列(Genbank 登录号:JQ013797),该基因全长为 3 278 bp,包含 353 bp 的 3' 非编码区(UTR)和 501 bp 的 5'UTR,开放阅读框(ORF)为 2 424 bp,编码 807 个氨基酸。该基因预测的蛋白分子量为 90.372 kD,等电点为 6.08,有 3 个预测的糖基化位点,无信号肽及跨膜结构。进化分析结果表明:白背飞虱的海藻糖合成酶与其它昆虫的海藻糖合成酶基因的同源性较高,与褐飞虱相比较同源性高达 98%。

关键词:白背飞虱;海藻糖合成酶基因;克隆;序列分析

中图分类号:S435.112.3;Q785

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2012)05-0014-06

海藻糖是一种重要的非还原二糖,其不但可以作为能量物质和结构组分存在,而且在冷冻和干旱等不良环境下,对生物大分子有较好的保护作用,在保护机体免受环境胁迫及细胞能量储存等过程中有着重要作用^[1-2]。海藻糖是由 6-磷酸海藻糖合成酶催化尿苷二磷酸(Uridine Diphosphate,UDP)葡萄糖和 6-磷酸葡萄糖合成 6-磷酸海藻糖(Trehalose-6-phosphate,Tre6P),然后再在 6-磷酸海藻糖磷酸酯酶(Trehalose-6-phosphate phosphatase,TPP)的作用下生成海藻糖的生物学过程。目前,已有多种昆虫的海藻糖合成酶基因被克隆,如埃及伊蚊 *Aedes aegypti* (XP_001657813)、果蝇 *Drosophila melanogaster* (NP_608827)、东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* (ABV44614)、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (XP_975776)、金小蜂 *Nasonia vitripennis* (XP_001603693)、致倦库蚊 *Culex pipiens quinquefasciatus* (XP_001850998)、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (ABM66814)、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (DQ086235)及冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* (XP_317243)等,但是对其功能的研究还相对较少。该研究采用同源序列克隆和 RACE

技术克隆白背飞虱 TPS 基因,旨在明确 TPS 基因的序列特征,为研究其表达与生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 白背飞虱在人工气候箱内用水稻饲养,温度为 27℃、相对湿度(95±5)%、光照 14 h、黑暗 10 h。

1.1.2 主要试剂和仪器 BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit、dNTP、AMV (Reverse Transcriptase XL)、oligo d(T)₁₈、Ribonuclease Inhibitor、DNA Marker DL2000、pMD18-T 载体等购自 Takara 公司;Trans Taq DNA 聚合酶 Hi-Fi、大肠杆菌 (*Escherichia Coli*) DH5α 购自北京全式金生物技术有限公司;提取总 RNA 所用 Trizol 试剂盒购自 Invitrogen 公司;氨苄青霉素、DEPC、CaCl₂ 购自上海生工生物工程有限公司;DNA Gel Extraction kit 购自 Omega 公司,PCR 引物由上海英骏公司合成。PCR 扩增仪、凝胶成像系统为 BioRad 公司生产,DNA 电泳仪采用北京六一仪器厂的 DYY-6C 型电泳仪。

1.1.3 引物设计 将目前已经报道的昆虫中的 TPS 基因进行序列比对,设计简并引物,引物序列见表 1。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取 取已饥饿 24 h 的新鲜白背飞虱 5 龄若虫 5 头置于无 RNase 的研钵中,加入液氮,迅速进行研磨至粉末状;然后用移液器

收稿日期:2012-03-07

第一作者简介:张道伟(1981-),男,河南省内乡县人,博士,讲师,从事昆虫及农业螨类分子生物学研究。E-mail:zhangdw1000@163.com。

通讯作者:陈静(1982-),女,贵州省遵义市人,博士,讲师,从事昆虫功能基因的研究与利用。E-mail:chenjing_1983@126.com。

加入 0.5 mL Trizol 于研钵中,继续进行研磨;待研钵中的固态物融化后,将其用移液器转移至 1.5 mL EP 管中,用力振荡 15 s,室温静置 5 min;加入 0.1 mL 氯仿,混合后静置 5 min,4℃,12 000 g 离心 15 min;小心取上清液移入一个新的 EP 管中,再加入 0.25 mL 异丙醇,室温静置

10 min,然后于 4℃,12 000 g 离心 10 min;倒掉上清液后,加入 0.5 mL 75% 乙醇洗涤沉淀,4℃,7 500 g 离心 5 min,弃掉上清液;将 EP 管倒置在超净工作台 10~15 min,加入 30 μL 经过 DEPC 处理过的去离子水,将所获得的 RNA 用凝胶电泳和分光光度计检测浓度和纯度。

表 1 *SfTPS* 基因的全长 cDNA 扩增策略和引物

Table 1 Amplified strategy and primers for *SfTPS* full-length cDNA

扩增区域 Amplified region	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
中间片段 Middle fragment	TPS-F1	5'-TTCTGGCCWYTRTTCCAYTC-3'
	TPS-F2	5'-TTCTTCYTKCAYATYCCRTTCC-3'
	TPS-R1	5'-GCCATACCYTTWAGRGCC-3'
	TPS-R2	5'-CGGTARTGGAAHGTHAGCA-3'
	TPS 3-1	5'-GTTGGCACTGTTGCTGGACTA-3'
	TPS 3-2	5'-GCTGACCTATGCAGGCAACCATG-3'
3'-RACE	TPS 3-1	5'-GTTGGCACTGTTGCTGGACTA-3'
	TPS 3-2	5'-GCTGACCTATGCAGGCAACCATG-3'
5'-RACE	TPS 5-1	5'-ACTCCTGGTACTCTTTCACGTCG-3'
	TPS 5-2	5'-CAACAGTCCACGAAGTTCAGAC-3'
RACE 接头引物	UPM	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCA GTGGTATCAACGCAGAGT-3'
Linker-adapter		5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
	NUP	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'

1.2.2 RT-PCR 扩增 在总体积为 25 μL 的 EP 管中依次加入 1 μg 白背飞虱总 RNA,5 μL 的 5× AMV buffer,2 μL dNTP(10 mmol·L⁻¹),0.5 μL 的 AMV RTase,补充 DEPC 处理水至 25 μL,在 42℃ 的水浴中保温 1.5 h 后,在 95℃ 放置 10 min 灭活 AMV RNase,即获得一链 cDNA。两对简并引物:TPS-F1 及 TPS-R1,TPS-F2 及 TPS-R2 根据已知的昆虫 *TPS* 基因的保守结构域设计。第一次 PCR 采用 TPS-F1 及 TPS-R1 作为正反向引物,扩增程序:95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 30 s,46℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 2 min,35 个循环,72℃ 延伸 10 min;第二次 PCR 采用巢式 PCR 扩增,用第一次 PCR 的产物稀释 50 倍作为模板,用引物 TPS-F2 及 TPS-R2 扩增,PCR 程序与第一次相同。

1.2.3 胶回收、连接、转化和验证 将 PCR 中的目的条带用琼脂糖凝胶电泳后按 DNA Gel Purification kit 试剂盒说明书回收片段后,连接到 pMD18-T 载体中,然后将其转入 DH5α 感受态细胞中,挑斑验证后送上海英骏公司测序。

1.2.4 cDNA 的末端快速扩增(RACE) 根据序列检测正确的白背飞虱 *TPS* 基因中间片段,

结合 RACE 试剂盒(Clontech BD SMART RACE cDNA Amplification Kit)操作指南构建 5' 和 3'RACE 文库。TPS 3-1,TPS 3-2,TPS 5-1,TPS5-2 四条引物根据获得的中间片段序列来设计,分别用于扩增白背飞虱 *TPS* 基因的 5' 和 3' 端序列。5'RACE 扩增采用试剂盒中的 UPM 引物和 TPS 5-1,二次巢式 PCR 时采用 NUP 和 TPS 5-2;同样,3'RACE 扩增采用试剂盒中的 UPM 引物和 TPS 3-1,二次巢式 PCR 时采用 NUP 和 TPS 3-2。PCR 扩增程序:95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 2 min,35 个循环,72℃ 延伸 10 min;第二次 PCR 采用巢式 PCR 扩增,用第一次 PCR 的产物稀释 50 倍作为模板,PCR 程序与第一次相同。

1.2.5 序列分析及系统学分析 序列分析方法采用 DNASTar 和 Vector 等软件进行,序列比对、氨基酸同源性分析及系统树构建等采用 ClustalW 和 MEGA 4.1 等分析。分子量、等电点、跨膜结构、信号肽和糖基化位点分析采用 http://web.expasy.org/compute_pi/、<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>和 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>等在线分析软件。

2 结果与分析

2.1 白背飞虱海藻糖合成酶基因的克隆及序列分析

白背飞虱的 *TPS* 基因克隆中,首先经过 2 次 PCR,利用 TPS-F2 和 TPS-R2 作为引物,获得了一段约 1 300 bp 的片段(见图 1)。从测序结果分析看出该片段与同为飞虱科的昆虫褐飞虱的

TPS 基因同源性最高,在氨基酸上达到 93% 的相似性,因此初步判定该片段为白背飞虱 *TPS* 基因的部分片段。根据这段 cDNA 序列,分别在 5' 和 3' 端设计了 4 条特异性引物(见表 1)。利用白背飞虱的 5' 和 3' RACE 文库作为模板经过两轮的 PCR 扩增后,在 5' 和 3' 端分别显示出 1 200 bp 左右的条带(见图 1)。

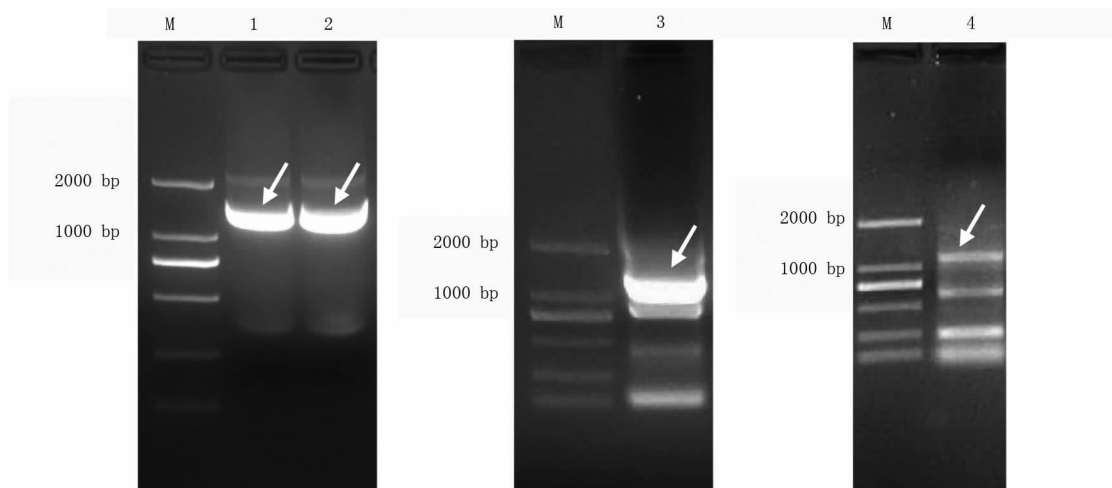


图 1 *TPS* 基因中间片段及 RACE PCR 扩增

Fig. 1 Agrose gel electrophoresis of *S. furcifera* *TPS* gene

M: DL2000 marker; 1 和 2: *TPS* 中间片段扩增; 3: 3' RACE 扩增结果; 4: 5' RACE 扩增结果; 白色箭头代表目标带

M indicates the DNA marker DL2000; lane 1 and 2 are the part fragment of *TPS* gene; lane 3 is the 3' RACE result; lane 4 is the 5' RACE result; the white arrow represents the target band

回收、连接、转化、验证和测序的结果表明为白背飞虱的 *TPS* 基因。将 5' RACE、3' RACE 和中间片段的序列拼接,获得的白背飞虱的 *TPS* 基因的 cDNA 全长为 3 278 bp,包含 353 bp 的 3' 非编码区域(UTR)和 501 bp 的 5' UTR,开放阅读框(ORF)为 2 424 bp,编码 807 个氨基酸(见图 2)。白背飞虱海藻糖合成酶基因预测的蛋白分子量为 90. 372 kD,等电点为 6. 08。采用 TM-HMMServer v. 2. 0 和 SignalP 3. 0 Server 在线分析,没有发现其含有跨膜结构和信号肽。

2.2 昆虫的 *TPS* 基因同源性分析

利用 Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)将预测出的白背飞虱 *TPS* 蛋白序列与其它物种 *TPS* 进行序列比对(GenBank 登录号分别为:褐飞虱 NITPS (ACV20871),红褐斑腿蝗 DpTPS (ACV32626),东亚飞蝗 LmTPS (ABV44614),豌豆蚜 ApTPS (XP_001944221),赤拟谷盗 TcTPS (XP_975776),意大利蜜蜂 NvTPS (XP_001603693),棉铃虫 HaTPS (ACH88521),埃及伊

蚊 AaTPS (XP_001657813),西方蜜蜂 AmTPS (XP_392397),甜菜夜蛾 SeTPS (ABM66814),冈比亚按蚊 AgTPS (XP_317243),致倦库蚊 CqTPS (XP_001850998),黑腹果蝇 DmTPS (NP608827),酿酒酵母 ScTPS (ABU44491),大肠杆菌 EcTPS (NP_416410),拟南芥 AtTPS (AAD30578),银杏 GbTPS (AAX16014),蓖麻 RcTPS (XP_002522255),甘蓝菜 BoTPS (ABD65165)和陆地棉 GhTPS (AAV65495)。用 Mega4. 1 软件对这些物种的 *TPS* 进行进化树分析(见图 3),可看出,这些物种 *TPS* 可分成两大组,昆虫类 *TPS* 及大肠杆菌 *TPS* 与植物类和酿酒酵母分属两个支类。*SfTPS* 位于昆虫组中,并与同翅目昆虫褐飞虱、半翅目昆虫豌豆蚜及直翅目昆虫红褐斑腿蝗、东亚飞蝗的 *TPS* 亲缘关系较近,与双翅目昆虫黑腹果蝇、埃及伊蚊和冈比亚按蚊的 *TPS* 亲缘关系次之,而非昆虫类 *TPS* 的亲缘关系较远,这与用 Clustal W 进行同源分析的结果一致。

1 ACATGGGGAGTGTTCCTGACAGTGGCAGAGAACGGTTGCTTGTAGATAGTTGTGATTATAAATACTATAAAACAGACATGCCGGT
 100 CCATGATTTAACTAGTGTATTATCATATCTCTTTGTCATCGTGTGATTAACAAGCAGTCTGCTCTATGATTGTTAAATTTATTTAATGTGTTCTGT
 199 TTAGTTTGTATTAACTGTTCAACGAAAACATAACCTTCAAACTCGTCAAGATAACATTTTGATAAAAGTTCATTTCGCTTACGTGTTTTTACCCTGTT
 298 ACTTATTGTGTACAAATTTATGAGCTTTAATCTTCTAATATTCATTACAGTTTGGTCTGATGAAGTCGATTATTGTTATGCGGGTACAAATTTTT
 397 AACTCAAGTCTGCATTCAAAAAGTTTGTATCAGTGTATTAACCTGGTAGACTGAAGCTATTTACAAGACATTTGAATGTTCTAAAATTAATCAA
 M I D N P D T D G I A G G K I I V V S N R L P F V L K R D A S
 496 ATCAAAATGATTGATAATCCTGACACTGATGGTATTGCTGGAGGAAAAATCATTGTGGTTCAAAATCGTTGCTTTTGTGTTGAAGAGAGATGCTAGT
 G N L S R H A S A G G L V T A V A P V V V R N K G I W I G W P G I
 595 GGAACCTGTCCAGACATGCAAGTGTGGTGTAGTAACAGCTGATGCCCTGTTGTGGTTAGAAATAAGGGAATATGGATTGGATGGCCAGGGATT
 Q L D N P E E L I P E S D P N D K T P T A G L L S S Q V V A V Q V
 694 CAGTTGGATAATCCTGAAGAATTGATTCCTGAGTCGGATCCAAATGACAAAACACCCACAGCTGGACTCCTTTCTAGTCAGGTGGTTCAGTTAGT
 E P Q V F D S Y Y N G C C N R T F W P L F H S M P D R A V F S A D
 793 GAACCCAGGTATTGACAGCTACTACAATGGATGCTGCAATAGAAGTTTGGCCTCTATTTCACTCAATGCCTGACAGGGCTGTATTTCTGCCGAT
 H W K S Y Q E V N R M F A N H T I Q S L R S L P K T E A N G V A C
 892 CATTGGAAGTCATATCAAGAAGTGAACAGGATGTTGCGAATCATACAATCCAGTCACTGAGATCATTGCCAAAGACTGAGCGGAATGGTGTGCCCTGC
 N T P L I W I H D Y H L M L C A N T V R N V C D E M N L K C K I G
 991 AATACGCCACTCATTGGATTGATGACTATCATTGATGCTGTGCGCAATACAGTCAGAAACGTTTGTGATGAGATGAAGTTGAAGTGAATAATTTGGT
 F F L H I P F P P W D I F R L F P W A D E V L Q G M L G C D M V G
 1090 TTCTTCTGCACATTCATTCCACCTTGGGATATATTAGATTTGCCCTTGGGCTGATGAGGTTCTTCAAGGAATGTTAGGCTGCGACATGGTCGGC
 F H I E D Y C L N F V D C C Q R R L G C R V D R K G L L V E H G G
 1189 TTTCACATAGAAGACTACTGTCTGAAGTTCGTGGACTGTTGCCAGCGGAGACTGGGCTGTGCTGTGGACCGCAAGGGTCTGCTGGTGAACATGGCGGG
 R S V R V R P L P I G I R P D R F V Q L A E S A P A V L A P A P A
 1288 CGATCAGTGGCGCTGCGCCACTGCGGATCGGTATCCCTTCGACCGGTTGCTGCAACTGGCCGAGTCGGCGCTGCGCTTCTACAGAGATGCGTGGC
 Q K V V L G V D R L D Y T K G L V H R L C A F E I L L Q K Y P Q H
 1387 CAGAAGTGGTCTAGGCTGATCGGCTGACTACACCAAGGCGCTTGTGCACCGATTGTGCGCTTGTGATATTGCTGCAGAGTATCCGCAACAC
 L E K V T L L Q I S V P S R T D V K E Y Q E L K E E M D Q L V G R
 1486 CTCGAAAGTGACATTATTGCAAAATTCGGTACCCTCGCGGACCGAGTGAAGGAGTACCAGGAGTTGAAGGAGGAGATGGACCAACTGGTGGGACGT
 I N G R F T T P N W S P I R Y I Y G C V S Q D E L A A F Y R D A S
 1585 ATCAATGGCAGATTACCACTCCCAACTGCGCGATTGCTGATACCTACGGCTGCGTCAGTCAGGATGAGTTGGCGGCTTCTACAGAGATGCGTGGC
 V A L V T P L R D G M N L V A K E F V A C Q I N E P P G V L I V S
 1684 GTTGCTCTCGTCACGCCACTGCGGATGGAATGAATCTTGTGGCGAAAGAAATTTGTGCTGTGATGATGAGGCTCCGGGCTTCTCATCGTGTCC
 P F A G A G E M M H E A L I C N P Y E I N D A A E V I H R A L T M
 1783 CCGTTCGCTGGAGCTGGAGAAATGATGCACGAGGCTTGGATTGCAACCTTATGAGATAAATGACGAGCTGAGGTGATACCGGGGCTGACCATG
 P E D E R T L R M N Y L R R R E K T H S V D Y W M R S F L K A M G
 1882 CCCGAAGATGAGAGAACACTGCGCATGAATATCTGAGAAGACGGGAGAACGACGAGCTGACTACTGGATGCGGAGTTTCTGAAGGCTATGGGC
 T L I S E D G E E V L P T T M Q P V T M D D F D E Y L S Y I G N
 1981 ACCGTGATCTCGGAGGATGGCGAGGAAGTCTCCACCACAATGCAGCGGTTACCATGGATGACTTTGATGAATACCTGTCCAAGTACATTGGGAAC
 T N K L A L L L D Y D G T L A P I A P H P D L A I L P Q E T K H V
 2080 ACGAATAAGTTGGCACTGTTGCTGGACTACGATGGGACTGTGGCTCCGATAGCGCCGATCCCGACCTCGCCATCTGCCGAGGAGACAAAACAGCTG
 L E R L S N M P E V Y I S I I S G R N V H N V K E M V G I D G L T
 2179 CTGGAGCGCTCTCAACATGCCGAGGTCTACATCTCTATCATTTCCGGCCGCAACGTTCAACAGTCAAGGAATGGTTGGGATCGACGGGCTGACC
 Y A G N H G L E I L H P D G S R F M H P M P T E F E D K C S A L L
 2278 TATGCAGGCAACCATGGATTGGAATTTCTACATCCGAGCGAAGTCGATTTCATGATCCGATGCCAATGAGTTCGAGGACAAATCGAGCGCCCTCTTG
 Q A L Q E Q V C K A G A W V E N K G A L L T F H Y R E T P I D V R
 2377 CAAGCGCTACAAGAACAGGTTTGAAGCGGGCGCATGGGTGGAGAACAAGGGCGTGTGCTGACGTTTCACTACCGGAGACGCGCATCGACGTGCGC
 P E M V A Q A R A L I E A H G F R A G E A H C A L E A K P P V Q W
 2476 CCCGAGATGGTGGCGAGGCGGGCGCTGATCGAGGCGCAGCGTTCCGTGCGGGAGAGGCACACTGTGCGCTCGAGGCAAGGCCCGCTGCAGTGG
 N K G R A S I Y I L R T A F G L D C S E R I R I Y I D D V T D
 2575 AACAAAGGCGCGCGTCCATCTACATCTGCGCACGGCTTGGCTCGACTGTAGCGAACGATCCGATCATATACGCGCGGATGACGTACCGGAT
 E D A M E A L K G M A A T F R V A Q S S I V K T S A Q R R L P S T
 2674 GAGGATGCCATGGAGGCTCTGAAAGGAATGCCGCCACTTCCGTGTGGCCAGTCGAGCATTGTGAAGACATCCGCTCAGCGAAGACTGCCAAGCACT
 D S V L T M L K W V E R H F S K R A A S G L A S T Q S A S S S M R
 2773 GACTCTGTGCTGACGATGCTCAAAATGGTTCGAGCGTCACTTCAGCAAGCGAGCCCTCTGCTTGCCTCCACCAATCGGCATCGAGCTCCATGCGC
 Q Q Q A L K I Q M S L P S D T K R *
 2872 CAGCAACAGGCGCTAAAGATCCAATGTCGCTCCCGTCAGATACCAACGATTAATCACTACCTGAGAAGTCGCCAAAGTCGGCCGACGACAAGTCACT
 2971 ATTGCTGTAGTAGTCAAAGTTGGCCGACGACGAAAACACTACCTTAGTAGTAGTCAAAGTTGGCCGACGACAAAACACCCTTAGTAGTAGTCAAAGT
 3070 TGGCCGACAACATTAACACTACTTTAGTAGTCACTGCTGTAGTCTTGTGATGAGCTTAACTTTTACCAATTTGATGAAGTTCAGCTGAGTGGT
 3169 TAGAGCTGGGAATTTGGGAATGAATGAAACACCATAAACATAAATTTGAAGTACTTTCAAGACATATAAATTTGCCTTACAAAAA
 3268 AAAAAAAAAA

图2 SFTPS的核苷酸和氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide and amino acid sequences of SFTPS

下划线为起始密码子和终止密码子;方框为3个预测的N-糖基化位点

The start and stop codons are shaded in Underline; 3 potential N-glycosylation sites are shown by box

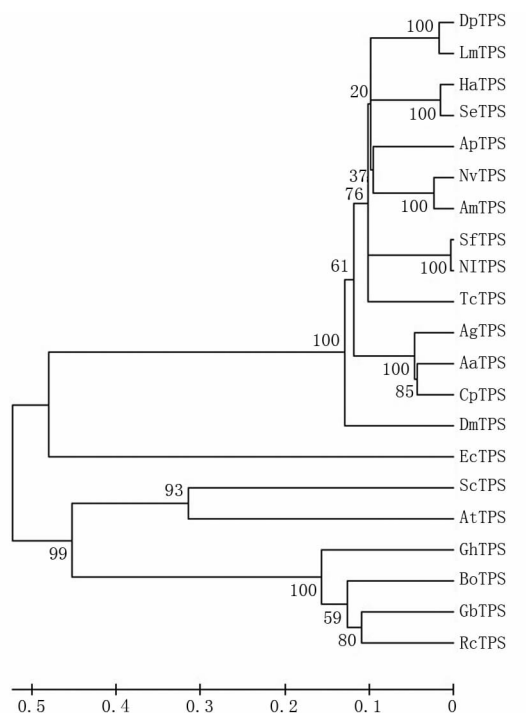


图 3 部分已知物种 TPS 基因的进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic trees for some known TPS genes

3 结论与讨论

海藻糖存在于已知所有种类的昆虫中,是昆虫血淋巴中的主要糖类(大约占 80%~90%)和能量物质^[3]。昆虫摄取食物后血液中葡萄糖的浓度会暂时升高,随即葡萄糖在海藻糖合成酶的作用下合成为海藻糖。昆虫血淋巴中海藻糖的浓度和代谢的变化影响昆虫的众多生理行为,包括昆虫蜕皮过程中几丁质的合成^[4]和耐寒性^[3]等。也有报道,海藻糖浓度的高低影响昆虫的取食行为^[5]。所以,海藻糖在昆虫的能量代谢中扮演着重要角色。最近,很多生物学家致力于开发海藻糖合成酶及海藻糖酶抑制剂的新型农药,试图通过阻断生物体内海藻糖的分解和合成来达到控制害虫和杀菌的目的。另外,海藻糖作为昆虫体内重要的血糖,在昆虫几乎所有的组织中都存在。在需要能量的活动,如飞行过程中,昆虫体内海藻糖的含量会迅速下降,表明海藻糖可以作为能量来源为昆虫的飞行提供能量^[6]。Candy 等也报道,昆虫中的海藻糖在脂肪体中合成后即释放到血淋巴中,而后海藻糖通过血淋巴运输到昆虫的飞行肌细胞,在昆虫飞行中海藻糖被分解为葡萄糖,为昆虫的飞行提供能量^[7]。在伏蝇 *Phormia regina* 的飞翔肌内,海藻糖是开始启动时的能量物质,在飞翔开始时,海藻糖浓度迅速下降,但飞

翔后糖元成为飞翔肌的主要能源^[8]。粘虫蛾在飞翔的开始阶段主要是利用糖类作为飞翔肌的能量物质。飞翔肌储备的糖类是有限的,仅够飞翔启动的需要(约 3 min),以后就必须动员脂肪体和肠道供应能量物质,以海藻糖形式通过血淋巴进入飞翔肌^[9]。除此之外,海藻糖合成酶对昆虫的抗逆有一定的作用,在果蝇中诱导 TPS1 基因表达后其海藻糖含量升高,对缺氧的耐受力增加,并且将 TPS1 基因敲除后会导致果蝇幼虫死亡^[10]。对棉铃虫滞育蛹的抗寒机理的研究发现海藻糖含量在滞育和非滞育棉铃虫蛹个体中有显著差异,海藻糖合成酶酶活的变化趋势和血淋巴海藻糖含量的变化趋势基本一致^[11]。

在该研究中,从白背飞虱中克隆到海藻糖合成酶基因。经在 NCBI 的 Blast 中比对后,发现它与已知的昆虫 TPS 的同源性最高,所以确定它就是白背飞虱的 TPS 基因。昆虫的海藻糖合成酶基因非常保守,含有非常多的保守区域。在植物、细菌和真菌中,通常拥有 2 个海藻糖合成酶基因(TPS 和 TPP),而这些生物中的海藻糖合成也由 TPS 和 TPP 共同完成。通过对白背飞虱和其它昆虫的 TPS 蛋白在 NCBI 的 Blast 中发现,其也包含了 TPS(OtsA)和 TPP(OtsB)两个结构域。并且从进化树上可以发现昆虫类 TPS、大肠杆菌 TPS 与植物类、酿酒酵母的 TPS 分属两个支类。在克隆获得白背飞虱海藻糖合成酶全长 cDNA 的基础上,对其序列进行了特性分析,为进一步研究其生物学功能奠定基础。

参考文献:

- [1] Becker A, Schloer P, Steel J E, et al. The regulation of trehalose metabolism in insects[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 1996, 52: 433-439.
- [2] Thompson S N. Trehalose-the insect 'blood' sugar[J]. Advances in Insect Physiology, 2003, 31: 203-285.
- [3] Wyatt G R. The biochemistry of sugars and polysaccharides in insects [J]. Advances in Insect Physiology, 1967, 4: 287-360.
- [4] Candy D J, Kilby B A. Studies on chitin synthesis in the desert locust[J]. Journal of Experimental Biology, 1962, 39: 129-140.
- [5] Thompson S N, Dahlman D L. Blood sugar formation due to abnormally elevated gluconeogenesis; aberrant regulation in a parasitized insect, *Manduca sexta* Linnaeus[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1999, 1454(2): 133-142.
- [6] Elbein A D, Pan Y T, Pastuszak I, et al. New insights on trehalose: A multifunctional molecule [J]. Glycobiology, 2003, 13: 17R-27R.

- [7] Candy D J, Kilby B A, Biochem J. The biosynthesis of trehalose in the locust fat body[J]. Biochemical Journal, 1961, 78:531-536.
- [8] Sacktor B, Wormser S E. Regulation of metabolism in working muscle in vivo. I. Concentrations of some glycolytic, tri-carboxylic acid cycle, and amino acid intermediates in insect flight muscle during flight[J]. Journal of Biological Chemistry, 1966, 241(3):624-631.
- [9] 王宗舜, 欧阳迎春. 东方粘虫飞行初期糖类的动用和消耗[J]. 昆虫学报, 1995, 38(2):146-152.
- [10] Chen Qiaofang, Ma Enbo, Behar K L, et al. Role of trehalose phosphate synthase in anoxia tolerance and development in *Drosophila melanogaster*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277:3274-3279.
- [11] Xu Jun, Bao Bin, Zhang Zhifang, et al. Identification of a novel gene encoding the trehalose phosphate synthase in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*[J]. Glycobiology 2009, 19(3):250-257.

Cloning and Sequence Analysis of *Trehalose Phosphate Synthase* Gene from *Sogatella furcifera*

ZHANG Dao-wei¹, CHEN Jing², GUO Yu-shuang³

(1. Zunyi Normal College, Zunyi, Guizhou 563002; 2. Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003; 3. Guizhou Tobacco Research Institute, Guiyang, Guizhou 550081)

Abstract: For the purpose of deep studying the migration ability and energy metabolism of *Sogatella furcifera*, the *Trehalose Phosphate Synthase* gene from *Sogatella furcifera* was cloned by homology cloning strategy and technique of Rapid-Amplification of cDNA Ends (RACE). The full-length cDNA of *S. furcifera* TPS (*SfTPS*) was 3 278 bp (Genbank number: JQ 013797) and had an open reading frame (ORF) of 2 424 bp, a 3' UTR (untranslated region) of 353 bp and a 5' UTR of 501 bp. The ORF of *SfTPS* encoded a polypeptide of 807 amino acids with a calculated molecular weight of 90.372 kD, and pI of 6.08. There were three N-glycosylation sites, but no signature peptide and putative transmembrane. A phylogenetic tree results using Blast showed that the amino acid sequence of *SfTPS* had the greatest similarity to other insects. Compared with *Nilaparvata lugens*, they were 98% identified.

Key words: *Sogatella furcifera*; *Trehalose phosphate synthase* gene; clone; sequence analysis

黄金种植——铁皮石斛

2012 年新农村致富好项目, 免费提供种源, 上门指导, 现金收购

铁皮石斛是一种名贵中药材, 被列为“中华九大仙草”之首, 被国际药用植物界称为“药界大熊猫”。它具有抗癌、降血糖和免疫调节等功效, 因此被人工大量采挖, 导致铁皮石斛濒临灭绝, 北京中农环宇生物技术研究所以满足市场需求, 经多年苦心钻研, 突破了铁皮石斛种植难, 生长周期长等技术难关。该所研发的铁皮石斛药用价值高, 适应全国南北方室内外种植, 具有耐旱涝、耐酸碱, 不受季节、环境和土壤限制等特点, 从种到收只需 90 d, 北京中农环宇生物技术研究所以可上门收购。种植 100 m², 可产 13~17 kg 铁皮石斛, 收购价 1 200 元·kg⁻¹, 详情请致电或短信至 13717770566 (注明详细通信地址、姓名及邮编) 免费索取种植指南 (附合同样本) 以便合作。

北京中农环宇生物技术研究所以 全国免费热线: 4000626889

电话: 010-80693999, 80967555 联系人: 王坤 (教授) 13717770566

北京地址: 北京市海淀区中关村南大街 12 号

电话: 027-62324777 联系人: 周老师 13995606466 官方网址: www.hy9588.com

武汉地址: 武汉市东湖新技术开发区光谷生物城区 258 号