

· 论 著 ·

滞育及冷暴露对白纹伊蚊卵 *Hsp70* 基因表达的影响

李玉伟, 鲁亮, 刘起勇

中国疾病预防控制中心传染病预防控制所媒介生物控制室, 世界卫生组织媒介生物监测与管理合作中心, 传染病预防控制国家重点实验室, 北京 102206

摘要: **目的** 研究白纹伊蚊卵在滞育以及冷暴露条件下, 热休克蛋白 70 基因(*Hsp70*)的表达情况, 探究 *Hsp70* 在增强白纹伊蚊卵耐寒性方面的作用。 **方法** 以无冷暴露的非滞育卵作为对照组, 采用 RT-qPCR 方法检测白纹伊蚊滞育卵和非滞育卵 *Hsp70* mRNA 的表达情况。 **结果** 室温 25 °C 条件下, 滞育卵与非滞育卵表达的 *Hsp70* 差异无统计学意义 ($P=0.392$)。与对照组相比, 冷暴露后蚊卵 *Hsp70* 表达量均增加, 且滞育卵 *Hsp70* 的表达量明显高于非滞育卵的表达量, 分别是其对照组的 16.44 和 5.22 倍。 **结论** *Hsp70* 并不是白纹伊蚊滞育期间的重要组成部分, 但是在冷暴露的恢复期表达量上调。

关键词: 白纹伊蚊; 卵; 冷暴露; 滞育; 热休克蛋白 70 基因

中图分类号: R384.1 文献标志码: A 文章编号: 1003-4692(2014)03-0211-04

DOI: 10.11853/j.issn.1003.4692.2014.03.004

Effects of diapause and cold exposure on expression of *Hsp70* in *Aedes albopictus* eggs

LI Yu-wei, LU Liang, LIU Qi-yong

WHO Collaborating Centre for Vector Surveillance and Management, State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Corresponding author: LU Liang, Email: luliang@icdc.cn

Supported by the National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2012CB955501)

Abstract: Objective To investigate the expression of *Hsp70* in *Aedes albopictus* diapausing and nondiapausing eggs after cold exposure and to determine the role of *Hsp70* in enhancing cold tolerance of *Ae. albopictus* eggs. **Methods** *Hsp70* mRNA expression in *Ae. albopictus* diapausing and nondiapausing eggs after cold exposure was determined by real-time quantitative PCR, using non-cold-exposed nondiapausing eggs as a control. **Results** No significant difference in *Hsp70* mRNA expression was observed between diapausing and nondiapausing eggs at room temperature (25 °C) ($P=0.392$). *Hsp70* mRNA expression increased in both diapausing and nondiapausing eggs after cold exposure, as compared with that of the control. Furthermore, the diapausing eggs had a higher amount of *Hsp70* mRNA than the nondiapausing eggs; the expression levels in diapausing and nondiapausing eggs were 16.44 and 5.22 times, respectively, that of the control. **Conclusion** The expression of *Hsp70* is usually not up-regulated during diapausing process, but it is up-regulated during recovery from cold exposure.

Key words: *Aedes albopictus*; Egg; Cold exposure; Diapause; *Hsp70*

白纹伊蚊(*Aedes albopictus*)是一种重要的医学媒介昆虫,在我国分布范围很广,是传播登革热和登革出血热的重要媒介^[1]。作为一种变温动物,温度变化是造成白纹伊蚊种群季节消长的基本原因之一,耐受低温能力的高低是其种群存在与发展的重要前提,决定

着它们的生殖、扩散、分布以及下一季节的发生动态^[2]。在种群向高纬度扩散的例子中,最冷月份或季度的最低温度和平均温度往往被认为是白纹伊蚊分布的生态学限制因素^[3]。在这种情况下,滞育卵的产生能提高其在温带地区冬季的存活率,有助于白纹伊蚊种群的向北扩散^[4],是白纹伊蚊越冬的重要策略。实验室及野外实验均证实滞育能增强白纹伊蚊对低温的耐受能力^[5]。

热休克蛋白(heat shock protein, HSPs)是细胞或生

基金项目:国家重大科学研究计划(973项目)(2012CB955501)

作者简介:李玉伟,男,在读硕士,主要从事媒介生物病原生物学及相关公共卫生研究。Email: liyuwei137@gmail.com

通讯作者:鲁亮, Email: luliang@icdc.cn

物体受到热胁迫后,体内新合成或含量增加的一类遗传上高度保守的蛋白质,在原核生物和真核生物中普遍存在^[6]。低温暴露导致热休克蛋白 70 基因(*Hsp70*) mRNA 表达的上调在果蝇(*Drosophila melanogaster*)^[7-8]及其他昆虫中已有报道^[9-10],越来越多的研究发现昆虫在滞育期间,*Hsp70* mRNA 表达量增加^[11-13]。对于冬季滞育的昆虫,*Hsp70* 的上调表达对于越冬个体的存活十分重要,是提高昆虫越冬抗寒性的重要因子^[14-15]。

本研究通过模拟白纹伊蚊越冬状态的卵,研究 *Hsp70* 的表达情况,以便分析白纹伊蚊越冬卵的抗低温能力及 *Hsp70* 在其中发挥的作用。

1 材料与方 法

1.1 实验种群及饲养方法

1.1.1 种群来源 白纹伊蚊实验种群,2012 年采自北京市昌平区,经多代饲养繁殖,已达到正常群体的自然繁殖水平。

1.1.2 饲养条件 温度(27±1)℃,相对湿度(80±5)%,光照周期(L:D)=16 h:8 h。使用脱氯自来水,幼虫饲料用羊肝粉和馒头粉按 1:1 混合而成;成蚊饲养用 10% 的蔗糖溶液及饲喂小白鼠血。

1.1.3 非滞育卵的获得 将蛹转移到温度(21±1)℃,相对湿度(80±5)%,光照周期(L:D)=16 h:8 h 的气

候模拟室,成蚊羽化 7~10 d 后进食血餐,3~4 d 后搜集产下的非滞育卵,保存在相同条件下 6 d 后完成胚胎发育。

1.1.4 滞育卵的获得 将蛹转移到温度(21±1)℃,相对湿度(80±5)%,光照周期(L:D)=8 h:16 h 的气候模拟室,成蚊羽化 7~12 d 后进食血餐,3~4 d 后搜集产下的滞育卵,保存在相同条件下 6 d 后完成胚胎发育。

1.2 实验方法

1.2.1 冷暴露处理 将滞育卵在-7℃处理 2 h 后,室温 25℃分别恢复 1、2、3、5、7、9 h 后,冻存于-80℃备用,每个处理重复 3 次,以不接受低温处理的卵为对照。非滞育卵的处理方法与滞育卵相同。

1.2.2 总 RNA 的提取与第一链 cDNA 的合成 取白纹伊蚊卵,采用 RNAeasy Mini Kits(购自 Qiagen 公司)试剂盒提取总 RNA。利用紫外分光光度计 NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer(NanoDrop Technologies, USA)检测其纯度及浓度,并经琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性。取 1 μg 总 RNA 为模板,应用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒(购自 TaKaRa 公司),合成第一链 cDNA。

1.2.3 引物、探针的设计 根据 GenBank 数据库中公开发表的基因序列,设计 *Hsp70* 和内参基因 β -actin 的引物和探针(由北京天一辉远公司合成),见表 1。

表 1 *Hsp70*、 β -actin 的引物和探针
Table 1 Primers and probes for *Hsp70* and β -actin

基因	基因编号	引物序列(5'~3')	产物大小(bp)
<i>Hsp70</i>	JN132154.1	Forward: GAACGTTCTGCTGTTTCGATTTG	96
		Reverse: TGTCGCCGTTGTTAGCAA	
		Probe: FAM-TACCTTCGATGTGTCCCTTTTGACCATTGA-BHQ	
β -actin	DQ657949.1	Forward: CGGAAGAGCACCCAGTTCTC	70
		Reverse: TGTGTCATCTTCTCGCGGTTAG	
		Probe: FAM-ACAGAGGCCCCCTGAACCCAAAG-BHQ	

1.2.4 扩增效率一致性检测 将合成的 cDNA 以 3 倍倍比稀释 5 个浓度梯度,各取 1 μl 进行实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)反应,检测目的基因和内参基因的扩增效率是否一致。

1.2.5 实时定量 PCR 检测 采用 RT-qPCR 结合比较 Ct 值法对白纹伊蚊卵 *Hsp70* 表达进行相对定量分析;采用 β -actin 作为内参基因,分析 *Hsp70* 表达的相对变化。RT-qPCR 反应根据荧光定量试剂盒 GoTaq® Probe qPCR Master Mix(购自 Promega 公司)的说明,采用 20 μl 的反应体系:GoTaq® Probe qPCR Master Mix(2×)10 μl,上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μl,探针(10 μmol/L)0.5 μl,1 μl 稀释 10 倍的 cDNA 作为模板,加超纯水至总体积 20 μl。在 CFX 96 实时定量 PCR 仪

(Bio-Rad 公司)上进行 RT-qPCR 检测,主要反应条件:95℃预变性 2 min;95℃变性 3 s,60℃退火/延伸 30 s,40 个循环。每个循环在 60℃时检测荧光强度。

1.3 数据分析 数据采用 SPSS 11.0 软件进行 t 检验及单因素方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 RNA 质量控制 经过分光光度计检测,提取的总 RNA A260/A280 均在 1.8~2.0 之间。使用 1% 琼脂糖凝胶进行 RNA 电泳,28S、18S、5S 条带清晰,提取的 RNA 符合实验要求,可用于下一步 cDNA 的合成。

2.2 扩增效率一致性 白纹伊蚊卵 cDNA 以 3 倍倍比稀释 5 个浓度梯度,假定最初模板浓度为 243,则其他

梯度稀释的样品浓度可依次认定为:81、27、9和3。以初始浓度的对数值作为横坐标, Ct 值作为纵坐标建立 RT-qPCR 的标准曲线(图1)。Hsp70 和 β-actin 标准曲线的相关系数 R² 分别为 0.9985 和 0.9962, 说明线性关系良好。两标准曲线斜率分别为 -3.3235 和 -3.2163, 扩增效率分别为 99.93% 和 104.61%, 符合 95% < E < 105% 的范围, 说明 Hsp70 和 β-actin 的扩增效率基本一致, 可以利用 2^{-ΔΔCt} 公式进行实验结果分析。

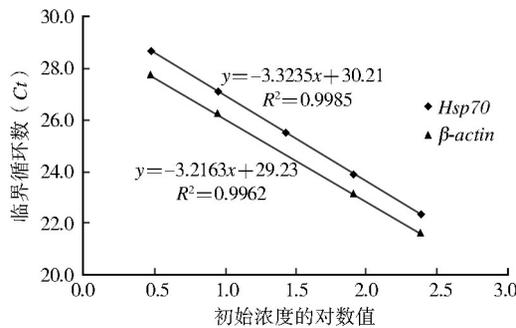


图1 Hsp70 和 β-actin 的标准曲线

Figure 1 The standard curve of Hsp70 and β-actin expression

2.3 Hsp70 的表达

2.3.1 滞育卵 Hsp70 的表达 未经其他处理的滞育卵与非滞育卵 Hsp70 的表达, 差异无统计学意义 (P = 0.392) (表 2), 表明在滞育期间, 白纹伊蚊卵 Hsp70 表达未发生明显变化。

表 2 Hsp70 在白纹伊蚊滞育卵与非滞育卵中的表达

Table 2 The expression of Hsp70 in *Ae. albopictus* diapausing and nondiapausing eggs

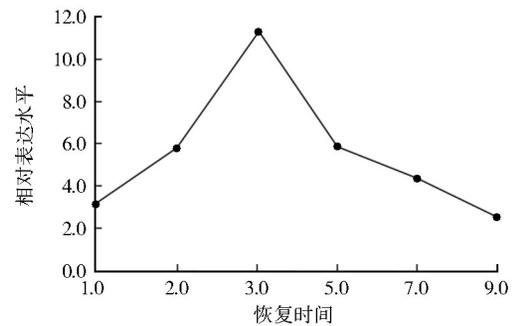
对象	Ct 值		ΔCt	-ΔΔCt	2 ^{-ΔΔCt}
	Hsp70	β-actin			
非滞育卵	27.99 ± 0.14	23.42 ± 0.17	4.57 ± 0.08	0.00 ± 0.08	1.01 ± 0.05
滞育卵	27.35 ± 0.57	22.96 ± 0.37	4.39 ± 0.20	0.18 ± 0.20	1.18 ± 0.17

注: Ct 值为临界循环次数。

2.3.2 冷暴露处理后 Hsp70 的表达 滞育卵暴露在 -7 °C 2 h 后, 在 25 °C 室温下, 随着恢复时间的增加, Hsp70 的 mRNA 表达量明显上调, 在 3 h 时达到最高水平, 随后逐渐下降(图 2)。将恢复 3 h 时白纹伊蚊滞育卵与非滞育卵 Hsp70 mRNA 的表达量进行比较(图 3), 滞育卵与非滞育卵 Hsp70 mRNA 的表达量分别是对照组的 16.44 和 5.22 倍, 滞育卵在经过同样的低温处理和恢复过程后, Hsp70 mRNA 的表达量显著高于非滞育卵的表达量, 且差异有统计学意义 (P < 0.05)。

3 讨论

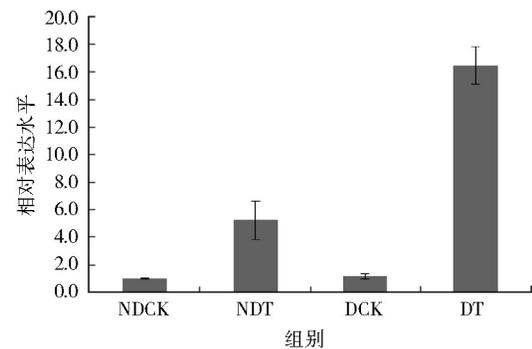
尽管热休克蛋白是在高温胁迫研究中发现的, 但是在低温、氨基酸类似物、低氧、高盐、重金属离子、营



注: 以无冷暴露的滞育卵作为对照组。

图 2 白纹伊蚊滞育卵经过低温处理后 Hsp70 mRNA 在不同恢复时间的相对表达量

Figure 2 Relative expression levels of Hsp70 mRNA in diapausing eggs of *Ae. albopictus* at different times after cold exposure



注: NDCK. 非滞育卵无冷暴露组; NDT. 非滞育卵冷暴露组; DCK. 滞育卵无冷暴露组; DT. 滞育卵冷暴露组; 以 NDCK 作为对照组, 求得其他各组相对于对照组的相对表达量; 图中柱高数据为平均数 ± 标准误 ($\bar{x} \pm s_x$)。

图 3 白纹伊蚊滞育卵与非滞育卵冷暴露后 Hsp70 mRNA 的相对表达量

Figure 3 Relative expression levels of Hsp70 mRNA in diapausing and nondiapausing eggs of *Ae. albopictus* after cold exposure

养饥饿、紫外线、胞外 pH 值变化等胁迫环境下, 同样会有热休克蛋白的生成^[16], 最大限度地降低胁迫对机体细胞的损伤。此外研究还发现, 一些昆虫在滞育期间 Hsp70 表达上调。胚胎滞育的舞毒蛾 (*Lymantria dispar*)^[15] 和家蚕 (*Bombyx mori*)^[17] 的 Hsp70 表达量显著高于它们的非滞育虫期。麻蝇 (*Sarcophaga crassipalpis*)、苜蓿切叶蜂 (*Megachile rotundata*)、美国核桃实蝇 (*Rhagoletis suavis*) 和烟草天蛾 (*Manduca sexta*) 滞育蛹中 Hsp70 表达量均明显高于非滞育蛹^[12, 15, 18]。此外在欧洲玉米螟 (*Ostrinia nubilalis*) 滞育幼虫^[15] 和科罗拉多马铃薯甲虫 (*Leptinotarsa decemlineata*) 滞育成虫中^[19] 也发现有类似 Hsp70 表达上调的现象。

然而不是所有的昆虫在滞育期均上调表达 Hsp70。在丝光绿蝇 (*Lucilia sericata*) 的滞育幼虫中, Hsp70 表达量在滞育期间无变化^[20]。以成虫滞育越冬的叔白颜果蝇 (*Drosophila triauraria*)^[21-22] 和淡色库蚊 (*Culex pipiens*)^[23], 滞育期间 Hsp70 表达量在滞育成虫

与非滞育成虫之间差异无统计学意义。本研究同样发现白纹伊蚊的滞育卵与非滞育卵相比 *Hsp70* 的表达差异无统计学意义。

虽然 *Hsp70* 在白纹伊蚊滞育期并没有上调表达,但是在滞育期间受冷刺激(-7 °C, 2 h)后能迅速增加表达,说明冷暴露诱导的 *Hsp70* 表达并不受滞育状态的影响。这种情况在淡色库蚊滞育成虫^[24]、棉铃虫(*Helicoverpa zea*)的滞育蛹^[25]中也存在。在同样的冷暴露条件下,白纹伊蚊滞育卵 *Hsp70* 表达量比非滞育卵的高,而且白纹伊蚊是以滞育卵越冬的,所以我们推测在滞育期间低温诱导表达的 *Hsp70* 有助于增强白纹伊蚊卵的耐寒性。

参考文献

- [1] 吴家红,程金芝,陈璐,等.白纹伊蚊 β -actin基因实时荧光定量RT-PCR方法的建立[J].四川动物,2010,29(5):593-595.
- [2] McDonald JR, Head J, Bale JS, et al. Cold tolerance, overwintering and establishment potential of *Thrips palmi* [J]. *Physiol Entomol*, 2000,25(2):159-166.
- [3] Hanson SM, Cralg GB Jr. *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) eggs: field survivorship during northern Indiana winters [J]. *J Med Entomol*, 1995,32(5):599-604.
- [4] Reynolds JA, Poelchau MF, Rahman Z, et al. Transcript profiling reveals mechanisms for lipid conservation during diapause in the mosquito, *Aedes albopictus* [J]. *J Insect Physiol*, 2012, 58 (7) : 966-973.
- [5] Hanson SM, Cralg GB Jr. Cold acclimation, diapause, and geographic origin affect cold hardiness in eggs of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) [J]. *J Med Entomol*, 1994,31(2):192-201.
- [6] 王海鸿,雷仲仁.昆虫热休克蛋白的研究进展[J].中国农业科学,2005,38(10):2023-2034.
- [7] Goto SG, Kimura MT. Heat- and cold-shock responses and temperature adaptations in subtropical and temperate species of *Drosophila* [J]. *J Insect Physiol*, 1998,44(12):1233-1239.
- [8] Sinclair BJ, Gibbs AG, Roberts SP. Gene transcription during exposure to, and recovery from, cold and desiccation stress in *Drosophila melanogaster* [J]. *Insect Mol Biol*, 2007, 16 (4) : 435-443.
- [9] Jiang X, Zhai H, Wang L, et al. Cloning of the heat shock protein 90 and 70 genes from the beet armyworm, *Spodoptera exigua*, and expression characteristics in relation to thermal stress and development [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2012,17(1):67-80.
- [10] Kostal V, Tollarova-borovanska M. The 70 kDa heat shock protein assists during the repair of chilling injury in the insect, *Pyrhhorocis apterus* [J]. *PLoS One*, 2009,4(2):e4546.
- [11] Denlinger DL, Rinehart JP, Yocum GD. Stress proteins: A role in insect diapause? [M]// Denlinger DL, Giebultowicz JM, Saunders DS. *Insect Timing: Circadian Rhythmicity to Seasonality*. Amsterdam: Elsevier Science B.V, 2001: 155-171.
- [12] Rinehart JP, Yocum GD, Denlinger DL. Developmental upregulation of inducible *Hsp70* transcripts, but not the cognate form, during pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis* [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2000,30(6):515-521.
- [13] Hayward SA, Pavlides A SC, Tammariello SP, et al. Temporal expression patterns of diapause-associated genes in flesh fly pupae from the onset of diapause through post-diapause quiescence [J]. *J Insect Physiol*, 2005,51(6):631-640.
- [14] 肖海军,魏兆军,薛芳森.昆虫滞育关联热休克蛋白的研究进展 [J]. *昆虫学报*, 2011, 54(9):1068-1075.
- [15] Rinehart JP, Li A, Yocum GD, et al. Up-regulation of heat shock proteins is essential for cold survival during insect diapause [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2007, 104(27):11130-11137.
- [16] 张永强,王进军,丁伟,等.昆虫热休克蛋白的研究概况 [J]. *昆虫知识*, 2004,41(1):16-19.
- [17] Moribe Y, Oka K, Niimi T, et al. Expression of heat shock protein 70a mRNA in *Bombyx mori* diapause eggs [J]. *J Insect Physiol*, 2010,56(9):1246-1252.
- [18] Yocum GD, Kemp WP, Bosch J, et al. Temporal variation in overwintering gene expression and respiration in the solitary bee *Megachile rotundata* [J]. *J Insect Physiol*, 2005,51(6):621-629.
- [19] Yocum GD. Differential expression of two *Hsp70* transcripts in response to cold shock, thermoperiod, and adult diapause in the *Colorado potato beetle* [J]. *J Insect Physiol*, 2001, 47 (10) : 1139-1145.
- [20] Tachibanas I, Numata H, Goto SG. Gene expression of heat-shock proteins (*Hsp23*, *Hsp70* and *Hsp90*) during and after larval diapause in the blow fly *Lucilia sericata* [J]. *J Insect Physiol*, 2005, 51(6):641-647.
- [21] Goto SG, Yoshida KM, Kimura MT. Accumulation of *Hsp70* mRNA under environmental stresses in diapausing and nondiapausing adults of *Drosophila triauraria* [J]. *J Insect Physiol*, 1998,44(10):1009-1015.
- [22] Goto SG, Kimura MT. Heat-shock-responsive genes are not involved in the adult diapause of *Drosophila triauraria* [J]. *Gene*, 2004,326:117-122.
- [23] Robich RM, Rinehart JP, Kitchen J, et al. Diapause-specific gene expression in the northern house mosquito, *Culex pipiens* L., identified by suppressive subtractive hybridization [J]. *J Insect Physiol*, 2007,53(3):235-245.
- [24] Rinehart JP, Robich RM, Denlinger DL. Enhanced cold and desiccation tolerance in diapausing adults of *Culex pipiens*, and a role for *Hsp70* in response to cold shock but not as a component of the diapause program [J]. *J Med Entomol*, 2006,43(4):713-722.
- [25] Zhang Q, Denlinger DL. Molecular characterization of heat shock protein 90, 70 and 70 cognate cDNAs and their expression patterns during thermal stress and pupal diapause in the corn earworm [J]. *J Insect Physiol*, 2010,56(2):138-150.

收稿日期:2014-03-07