

荒漠甲虫小胸蠶甲低温响应几丁质酶基因 *Mpcht19* 的克隆及表达模式分析

蔡卿龄, 陆雪莹, 马 纪*

(新疆大学生命科学与技术学院, 新疆生物资源基因工程重点实验室, 乌鲁木齐 830046)

摘要:【目的】探索荒漠昆虫小胸蠶甲 *Microdera punctipennis* 低温响应的分子机理并挖掘其耐寒基因。【方法】根据低温转录组数据筛选并克隆小胸蠶甲几丁质酶基因, 并进行生物信息学分析; 通过实时荧光定量 PCR 和免疫组织化学法分析该基因在成虫不同组织中和 4℃ 低温胁迫下的表达模式分析。【结果】从小胸蠶甲成虫克隆获得一个几丁质酶基因 *Mpcht19* (GenBank 登录号: KY126382)。生物信息学分析表明, 该基因编码的蛋白 MpCht19 属于 IV 型昆虫几丁质酶, 理论分子量约为 27.18 kD, 无信号肽, 具亲水性。系统进化分析表明, MpCht19 与赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* IV 型几丁质酶 TcCht19 同源性最高, 氨基酸序列一致性为 34.05%。实时荧光定量 PCR 结果显示, *Mpcht19* 在成虫脂肪体和后肠中高表达, 具有组织特异性; 该基因的表达还受 4℃ 低温诱导。免疫组织化学分析结果显示, 在 4℃ 低温下 MpCht19 蛋白在脂肪体和后肠中表达。【结论】*Mpcht19* 基因的表达具有组织特异性, 并受低温诱导。研究结果有助于深入研究几丁质酶与小胸蠶甲耐寒性的关系。

关键词: 小胸蠶甲; 几丁质酶; 低温胁迫; 基因表达; 免疫组织化学

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2017)03-0286-11

Molecular cloning and expression profiling of a cold stress-related chitinase gene *Mpcht19* in the desert beetle *Microdera punctipennis* (Coleoptera: Tenebrionidae)

CAI Qing-Ling, LU Xue-Ying, MA Ji* (Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

Abstract: 【Aim】 To understand the mechanisms underlying cold tolerance and to discover novel cold-tolerant genes in the desert beetle *Microdera punctipennis*. 【Methods】 The chitinase gene in *M. punctipennis* was cloned by screening cold stress transcriptome data and analyzed by bioinformatics. Its expression profiles in response to low temperature (4℃) stress and in different adult tissues were detected by real-time fluorescence quantitative PCR and immunohistochemistry. 【Results】 A chitinase gene named *Mpcht19* (GenBank accession no.: KY126382) was cloned from *M. punctipennis* adult. Bioinformatics analysis showed that the protein MpCht19 encoded by *Mpcht19* belongs to the type IV insect chitinase family. It is hydrophilic, and the predicted molecular weight is 27.18 kD with no signal peptide. Phylogenetic analysis showed that MpCht19 is similar to TcCht19 of *Tribolium castaneum* with the amino acid sequence identity of 34.05%. The results of real-time fluorescent quantitative PCR showed that the expression of *Mpcht19* was high in the fat body and hindgut with tissue specificity. In addition, its expression was also induced by low temperature of 4℃. Immunohistochemical analysis showed that MpCht19 protein was expressed in the fat body and hindgut at 4℃. 【Conclusion】 The

基金项目: 国家自然科学基金项目(31360527)

作者简介: 蔡卿龄, 女, 1991年7月生, 重庆万州人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫低温分子生物学, E-mail: 526595477@qq.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: majiuci@xju.edu.cn

收稿日期 Received: 2016-11-16; 接受日期 Accepted: 2017-02-08

expression of *Mpcht19* shows the tissue specificity, and is low temperature inducible. The results may help to further investigate the relationship between chitinase function and cold tolerance of *M. punctipennis*.

Key words: *Microdera punctipennis*; chitinase; cold stress; gene expression; immunohistochemistry

温度是影响昆虫生长发育的最主要环境因素, 低温胁迫对昆虫生长发育有重要影响 (Denlinger, 2002)。研究昆虫对低温响应的分子机制发现, 大量基因受到低温诱导后表达量提高 (Clark and Worland, 2008; Clark *et al.*, 2009; Strachan *et al.*, 2011; Davies *et al.*, 2012; Teets and Denlinger, 2014), 这些基因的产物参与可溶性渗透调节剂的生物合成、抗氧化剂的产生及促进膜流动性增加等过程。有些基因参与低温信号转导途径, 对效应分子的转录起调控作用。荒漠拟步甲科昆虫小胸鳖甲 *Microdera punctipennis* 是新疆准噶尔盆地的特有种 (Huang *et al.*, 2005), 能够很好地适应荒漠极端温度和极端干旱环境。我们前期研究发现, 小胸鳖甲的热激蛋白基因 *Mphsp70* 和抗冻蛋白基因 *Mpafp* 的表达都受低温诱导 (Hou *et al.*, 2010; 马文静和马纪, 2012), 这两种基因在小胸鳖甲应对低温胁迫时可能发挥重要作用。为了发掘和分离新的低温响应候选基因, 采用二代测序技术分析 4℃ 低温处理 3 h 的小胸鳖甲成虫转录组数据, 发现大量基因参与昆虫应答低温胁迫。其中, 几丁质酶基因是最为显著的类群 (Lu *et al.*, 2014)。基于氨基酸序列相似性, 几丁质酶分为糖苷水解酶 18 家族和 19 家族。昆虫几丁质酶属于 18 家族几丁质糖苷水解酶, 分为 I ~ VIII 个类型 (Lee *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011), 主要参与昆虫发育阶段的蜕皮、围食膜降解、细胞增殖和机体免疫防御等重要生理代谢活动 (Merzendorfer and Zimoch, 2003; 李瑶和范晓军, 2011; 黄海云等, 2013), 属于氨基糖和核苷糖代谢通路 (ko00520. amino sugar and nucleotide sugar metabolism)。在生长发育的不同阶段, 昆虫几丁质酶具有组织特异性和时空特异性表达 (樊东等, 2005)。

拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 几丁质酶基因的表达与逆境胁迫相关 (Takenaka *et al.*, 2009), 植物几丁质酶基因可以提高植物的耐寒性 (Cabello *et al.*, 2012), 而昆虫几丁质酶的耐寒性功能探究鲜有报道。本研究基于小胸鳖甲低温转录组数据库中的几丁质酶已知序列 786seq1, 克隆获得该基因的蛋白质开放阅读框编码序列 *Mpcht19*。对其进行生物信息

学分析及其在不同组织和低温胁迫下的表达模式研究。

1 材料与方法

1.1 试虫与试剂

1.1.1 试虫: 小胸鳖甲 *M. punctipennis* 成虫采自新疆古尔班通古特沙漠边缘地带 (44°24'N, 87°51'E, 海拔高度: 444 m), 置于 30 ± 0.5℃、相对湿度 30% ± 6%、光周期 16L:8D 条件下的智能光照培养箱中 (GXZ-260B), 饲喂麦麸和新鲜卷心菜。

成虫组织分离: 取出饲养的试虫在室温下解剖, 分离不同组织, 包括前肠、中肠、后肠、脂肪体和体壳 (除去内脏的剩余部分), 立即放入液氮中冷冻以备 RNA 提取; 每个体的组织为一重复, 每个组织均有 3 个以上个体重复。

成虫低温处理: 将 30 头成虫分为 7 组, 每组至少 4 头, 分别放置在 4℃ 低温培养箱处理 0, 1, 3, 5, 7, 9 和 11 h, 取出后迅速置于液氮中冻存以备 RNA 提取; 以 0 h 低温处理 (即未进行低温处理) 为对照; 每只试虫为一个重复, 每个处理至少有 3 个试虫。

1.1.2 试剂: pMD18-T、T4 DNA 连接酶与 *EcoRI* 和 *XhoI* 等限制性内切酶、TaKaRa™ Reverse Transcriptase M-MLV 均为大连 TaKaRa 公司产品; 总 RNA 提取试剂盒 TRIzol® Reagent 和 SYBR Green Supermix Kit 为 Invitrogen 公司产品; DNA 片段回收试剂盒为上海生工生物工程技术服务公司产品; 大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 和 BL21 为北京全式金生物技术有限公司产品。其余化学试剂均为国产分析纯试剂。PCR 所用引物由上海生工生物工程有限公司合成。His-MpCHI786 抗血清由本实验室制备 (陆雪莹等, 2014); DAB 试剂盒为北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司产品。

1.2 几丁质酶基因的克隆与生物信息学分析

根据转录组测序获得的小胸鳖甲几丁质酶 (转录组 ID 号: 786seq1) 序列设计引物, 扩增小胸鳖甲几丁质酶基因开放阅读框 (open reading frame, ORF)。引物设计了 *EcoRI* 和 *XhoI* 酶切位点 (表

1), 以便后续实验。按总 RNA 提取试剂盒的指导, 提取小胸鳖甲成虫总 RNA。使用 TaKaRa™ Reverse Transcriptase M-MLV 对总 RNA 进行反转录合成

cDNA。以 cDNA 为模板进行 RT-PCR 反应, 使用 PCR 产物回收试剂盒回收 PCR 产物, 由上海生工生物工程有限公司测序鉴定。

表 1 基因克隆与荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primers used for gene cloning and real-time quantitative PCR analysis

基因名称 Gene name	基因克隆引物序列(5' - 3') Primer sequence for gene cloning	实时荧光定量 PCR 引物序列(5' - 3') Primer sequence for real-time quantitative PCR
<i>Mpcht19</i>	F: CGGAATTCATGGCTTCGAGTGCCTG R: CCCTCGAGCTACAAGTCTTTTTTA	F: AAGCGGATGGAAGGAGCT R: TGAGCAAGCGCTTTTTTG
<i>Mpβ-actin</i>	- -	F: AAGAACGACAAGGGCAGACTG R: TTAGAAGCACTTCCGGTGGAC

下划线为酶切位点 *EcoRI* 和 *XhoI*。Restriction sites of *EcoRI* and *XhoI* are underlined.

利用 ExPASy 的 ProtParam 在线工具对氨基酸序列进行分析, 预测蛋白质的理化性质、半衰期与稳定性。利用 SignalP4.0 在线预测信号肽, DictyOglyc 1.1 和 NetPhos 3.1 Server 对蛋白质翻译后进行修饰的糖基化位点和磷酸化位点进行在线分析。利用 ExPASy 的 ProtScale 进行在线蛋白质疏水性分析。使用在线软件 SMART 和 UCSC 进行蛋白质结构域预测和分析。利用 ExPASy 中的 TMHMM 在线预测 786seq1 蛋白跨膜螺旋区。使用在线软件 ORF Finder 和 GENSCAN 对开放阅读框进行预测。利用 ClustalW1.81 和 MEGA5 进行多序列比对, 采用邻接法 (neighbor-joining, NJ) 进行系统进化树分析。

1.3 实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR)

将解剖分离的每一个体的不同组织分别提取总 RNA。对低温处理不同时间的整只成虫分别提取总 RNA。按 1.2 节中的方法将总 RNA 分别合成 cDNA。以不同样品的 cDNA 为模板进行 qRT-PCR, 以小胸鳖甲 *Mpβ-actin* 为内参基因 (Hou *et al.*, 2010), 所需引物见表 1。为了评估引物扩增的特异性, 用 ExTaq™ DNA 聚合酶 (TaKaRa) 进行 PCR 扩增检测条带的单一性, 反应程序: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 35 个循环; 72℃ 10 min。目的基因扩增产物回收构建到 pMD™18-T 载体上, 得到标准质粒。测序鉴定正确后, 用紫外分光光度计 (NanoDrop ND-1000) 检测质量并记录原始浓度。将标准质粒稀释为 7 个浓度梯度 (1, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ 和 10⁻⁷ ng/μL) 作为标准曲线扩增的模板, 反应体系为 20 μL: 上下游引物的终浓度各为 0.25 μmol/L, Platinum SYBR Green real-time PCR SuperMix-UDG with ROX 和 1 μL 模板。实时荧光定量 PCR 的特异性引物扩增

100 ~ 150 bp 片段, 扩增效率为 105.13%, 相关指数为 $R^2 = 0.999$ 。使用 Step One Plus™ (96 wells) 荧光定量 PCR 系统 (Applied Biosystems ABI, USA) 进行实时荧光定量 PCR, 反应条件: 95℃ 10 min; 95℃ 15 s, 60℃ 30 s, 72℃ 15 s, 40 个循环。

1.4 免疫组织化学观察

将小胸鳖甲成虫在 4℃ 低温处理 3 h 后, 在冰上解剖虫体得到脂肪体和后肠, 固定、包埋及切片。脱蜡复水, 消除内源性酶及修复抗原。用山羊血清封闭及一抗 His-MpCHI786 抗血清孵育, 滴加二抗反应, 按照浓缩型 DAB 试剂盒的说明方法在显微镜下对切片组织进行 DAB 显色, 脱水、透明, 利用树胶封片后, 将切片放于尼康倒置显微镜 (ECLIPSE Ti, Nikon, Japan) 下观察并拍照。

1.5 数据统计分析

基因的相对表达量采用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta Ct_{treatment} - \Delta Ct_{control})}$ 来计算 (Pfaffl, 2001)。 β -actin 作为内参基因, 在成虫组织中, 基因表达量为与对照 (前肠) 相比的相对表达量。在低温胁迫后, 基因表达量也为与对照 (未进行低温处理的成虫) 相比的相对表达量, 均用倍数表示。采用生物统计学软件 GraphPad Prism 5.0 (La Jolla, CA, USA) 对实验数据进行单因素方差分析, 再采用 Duncan 氏多重比较分析差异显著性, 显著性水平为 0.05。所有测定值均有 3 个以上个体重复。

2 结果

2.1 小胸鳖甲几丁质酶的序列结构及功能域分析

克隆获得小胸鳖甲几丁质酶基因, 命名为 *Mpcht19* (GenBank 登录号: KY126382), 开放阅读框为 744 bp, 编码 247 个氨基酸, 编码蛋白命名为

MpCht19。通过 ExPASy 的 ScanProsite 和 SMART 对 MpCht19 的结构域进行预测(图 1)。结果显示, MpCht19 含有糖苷水解酶 18 家族的保守催化结构域(第 1-229 位氨基酸)。在 N 端的第 14-22 位氨基酸是昆虫几丁质酶的催化活性保守基序 II (FDGXDLWDFP, 其中 X 代表任意氨基酸), 作为几丁质酶水解催化碳水化合物的活性位点(张八生等, 2007)。MpCht19 还包括第 83-89 位和第 210-230 位氨基酸的昆虫几丁质酶的保守基序 III

(MXYDXXG)和基序IV(GXXXWXXDXDD), 均位于催化结构区域, 推测这 2 个序列与保守基序 II 一样可能作为 18 家族糖苷水解酶的特征序列(Hogenkamp, 2006)。在第 21-121 位还有一个胁迫响应 A/B 桶状结构[stress responsive alpha/beta (A/B) barrel domain, Dabb], 提示 MpCht19 可能参与细胞对逆境胁迫的响应。cDNA 序列的 PolyA 加尾信号为 ATAAAG。

```

1   GGCTCTGCCACTTCTCTTCGGTGGCCGCCAGCGCAAGCAAGAGGGCAAAGATGGCTTCG
1                                     M A S
61  AGTGCCCTGCAGTTCTTGAAGAAACACAAGTTCGACGGCATCGACGTCGACTGGGAGTAT
4   S A L Q F L K K H K F D G I D V D W E Y
121 CCCGAAAAGCGAGGCGGCAAATCTTCTGACAAGAAAACTCATCGAAATGCTCAAGGCA
24  P G K R G G K S S D K K N F I E M L K A
181 CTGAAAGGCAAATGAAAAACAACGGTTATTTATTGACTGTGGCTGTGGCTCGTCTCCT
44  L K G K L K N N G Y L L T V A V G S S P
241 GACAGCGGCTCTACGATGTCCCGAAAATTCGAGTTTGGTGGACTACATCAACGTGATG
64  D S G S Y D V P K I S S L V D Y I N V M
301 ACGTACGACTTCCACGGAGCTCCGAGGGCAAAACCGGCCAGAACGCGCCCTTGACGGG
84  T Y D F H G A S E G K T G Q N A P L Y A
361 TCCTCCAAGGACAGCGACTGGGAGAAAGACAACGCCAACTGCGACGCCCGCTCAAAAA
104 S S K D S D W E K D N A N C D A A V K N
421 TGGAAGAGCAAAGGCGCTCCGACGCAAACTGGTCTTGGGACTGGCTTTCTACGGTCAT
124 W K S K G A S A G K L V L G L A F Y G H
481 TCCTACAACTGAAGAACCCCAAGGACAACGGCCTAGGAGCGCCATCAGCGGCGACAAC
144 S Y K L K N P K D N G L G A P I S G D N
541 GGCCAACTCCCCTACAGCGAGATCTGCAAACGAAAAGCGGATGGAAGGAGGTCTGGGAT
164 G Q L P Y S E I C K L K S G W K E V W D
601 TCCGAGCAAAAAGTGCCGTACAAAACAAAAGGCAACAAATGGATAGGCTTCGATAACCCT
184 S E Q K V P Y K H K G N K W I G F D N P
661 ACATCCATCGGTCTGAAAGTGAATACGCCAAGAAGCAAAAAGTAGGCGGCGTGATGATG
204 T S I G L K V K Y A K K Q K L G G V M M
721 TGGGCGTGCATCAAGACGACAAGAACGGTTCTTGCGGAACCAAAAACGCCTTGCTCAAG
224 W A V D Q D D K N G S C G T K N A L L K
781 GAAATAAAAAAGAACTTGTAGTCTTAGCGGAAAAAAAATAAAGTAGCAGAAGATCGG
244 E I K K N L *

```

图 1 小胸鳖甲几丁质酶基因 *Mpcht19* 的 cDNA 序列及预测的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of the chitinase gene *Mpcht19* from *Microdera punctipennis*

灰色部分表示昆虫几丁质酶的保守基序 FDGXDLWDFP, MXYDXXG 和 GXXXWXXDXDD; 双下划线为胁迫响应 A/B 桶状结构域; 粗体下划线为多聚腺苷酸位点; 星号表示终止密码子。The conserved motifs of insect chitinase, FDGXDLWDFP, MXYDXXG and GXXXWXXDXDD, are shown in gray. The potential stress responsive A/B barrel domain (Dabb domain) is marked with double underline. The putative polyadenylation signal sequence (ATAAAG) is in bold type and marked with thin underline. The TGA stop codon is marked with an asterisk.

2.2 MpCht19 的理化性质、信号肽及修饰位点分析

利用 ExPASy 的 ProtParam 工具对 MpCht19 的氨基酸序列进行分析, 结果表明理论分子量为 27.18 kD, 其蛋白分子量较小, 等电点为 9.39, 半衰

期为 30 h, 不稳定系数为 25.17, 化学分子式为 $C_{1216}H_{1903}N_{327}O_{364}S_8$ 。从分析结果判定 MpCht19 是稳定蛋白质。SignalP4.0 预测 MpCht19 无信号肽。

磷酸化和糖基化修饰使多肽成为成熟的蛋白质, 是调节和控制蛋白质活性和功能的最基本的重

要机制(李军等, 2009; 李欣, 2015)。昆虫几丁质酶属于一种糖蛋白, 糖基化和磷酸化调节酶的活性大小, 几丁质酶有很多活性位点, 如糖基化和磷酸化位点。用 DictyOGlyc 进行糖基化位点的在线预测, 结果表明 MpCht19 在第 62 位氨基酸处有 1 个糖基

化位点。几丁质酶用 NetPhos 3.1 Server 进行磷酸化位点在线分析, 结果表明 MpCht19 有 16 个丝氨酸(Ser)磷酸化位点, 4 个酪氨酸(Tyr)磷酸化位点(图 2)。

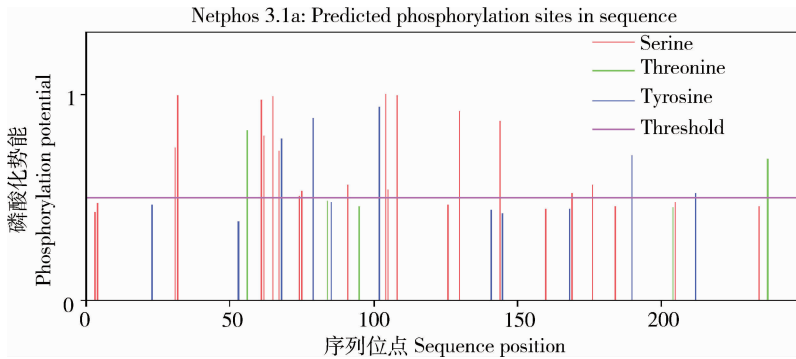


图 2 小胸鳖甲几丁质酶 MpCht19 的磷酸化位点预测

Fig. 2 Prediction of the phosphorylation sites of the chitinase MpCht19 from *Microdera punctipennis*

2.3 MpCht19 跨膜区、疏水性及三级结构模型分析

利用 ExPASy 中 TMHMM 预测显示, MpCht19 无跨膜螺旋区, 利用 ProtScale 软件预测蛋白质疏水性结果显示, MpCht19 的最小值为 -4.50, 最大值为 2.0, 亲水性氨基酸的比例高于疏水性氨基酸, 总平均亲水性为 -0.680, 可以初步判断 MpCht19 具有一定亲水性。

利用 ExPASy 的 3djigsaw 软件基于同源建模的方法, 预测 MpCht19 模拟三维结构为“ α/β ”圆桶形结构(图 3), 中心部分是平行的 β 折叠(黄色箭头)组成内桶, α 螺旋(红色螺旋状)构成外桶与 β 折叠相邻, α 螺旋与 β 折叠间由无规卷曲区域连接, 与预测的编码区第 21-121 位 Dabb 结构域相对应, 靠近 N 端, 催化活性位点保守基序 II 邻近桶状结构的 (β)4 链; 保守基序 III 位于桶状结构内部 (β)6 链, 属于 Dabb 结构域末尾区段; 保守基序 IV 在靠近 C 端的 (β)8 链中, 位于 18 家族糖苷水解酶的末尾区域, 具体功能尚不清楚。对几丁质酶高级结构的认识, 可为对其功能及定向进化研究等提供参考。

2.4 MpCht19 的系统进化分析

选取赤拟谷盗 *T. castaneum*, 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 和黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的 8 种不同类型几丁质酶蛋白, 通过邻接法构建进化树(图 4)。包括 I 型几丁质酶 DmCht5 (NP_650314.1) 和 TcCht5 (NP_001034524.1); II 型几丁质酶 TcCht10 (NP_

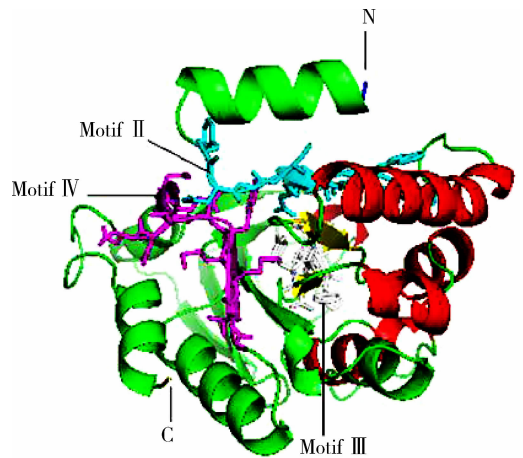


图 3 小胸鳖甲几丁质酶 MpCht19 三级结构预测模型

Fig. 3 Prediction of the tertiary structure of the chitinase MpCht19 from *Microdera punctipennis*

001036067.1), AgCht10 (XP_001238192.2) 和 DmCht10 (EAA46011.1); III 型几丁质酶 TcCht7 (NP_001036035.1), AgCht7 (XP_308858.4) 和 DmCht7 (NP_647768.3); IV 型几丁质酶 TcCht14 (XP_973005.1), TcCht13 (NP_001036034.1), TcCht21 (NP_001034517.1), TcCht12 (XP_972802.2), TcCht19 (XP_973119.2), TcCht18 (XP_973161.2), TcCht17 (XP_972719.1); V 型几丁质酶 TcIDGF2 (NP_001038092.1) 和 TcIDGF4 (NP_001038091.1); VI 型几丁质酶 DmCht6 (NP_572598.3) 和 TcCht6 (XP_967813.1); VII 型几丁质酶 DmCht2 (NP_477298.2), AgCht2 (XP_315650.4);

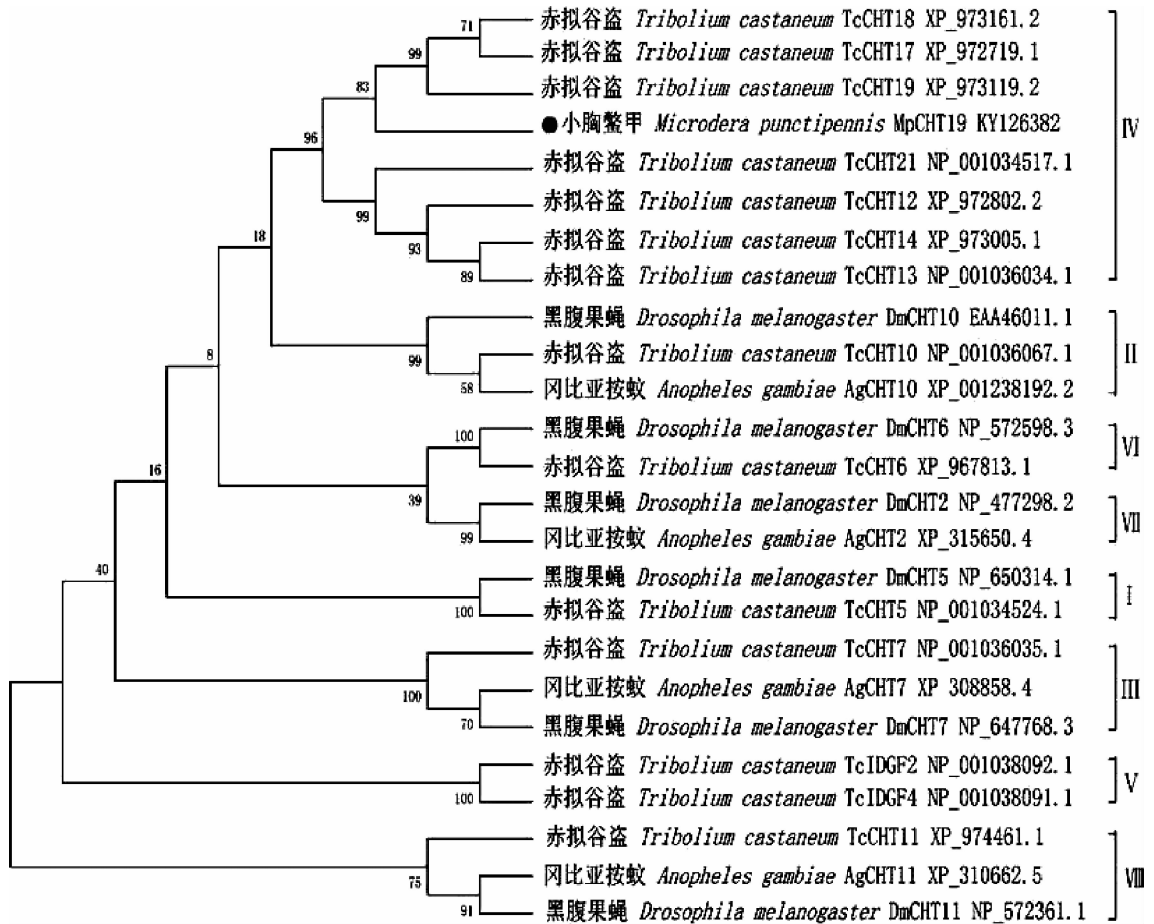


图4 小胸螯甲与不同昆虫几丁质酶的系统进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic tree analysis of chitinases from *Microdera punctipennis* and other insect species

罗马数字为几丁质酶的类型。系统进化树由 MEGA5 软件提供的 NJ 邻接法产生, 抽样测试为 5 000 次重复。The Rome numbers on the right of the graph indicate the types of the chitinase. The phylogenetic tree was generated by using the neighbor-joining method provided by the software MEGA5, and bootstrapping test was performed with 5 000 replicates.

VIII型几丁质酶 TcCht11 (XP_974461.1), AgCht11 (XP_310662.5) 和 DmCht11 (NP_572361.1)。从进化树可以看出, 小胸螯甲几丁质酶 MpCht19 与同为拟步甲科的赤拟谷盗的 IV 型几丁质酶 TcCht19 在进化上最接近, 一致性为 34.05%, 可能在昆虫中执行类似的功能。

2.5 *Mpcht19* 基因的组织表达特异性及在低温胁迫下的表达模式分析

为了研究 *Mpcht19* 是否具有组织表达差异, 以前肠中的表达量作为归一化标准, 计算在不同组织中的相对表达水平 (图 5)。结果显示, *Mpcht19* 基因在脂肪体中的表达量最高, 为对照的 2 倍, 在中肠中的表达量最低, 约为对照的 20%, 极差约为 10 倍, 除体壳外不同组织之间基因的表达量有显著差异 ($F_{4, 25} = 126.4, P < 0.05$)。 *Mpcht19* 在后肠中的相对表达量也很高, 约为前肠和体壳中的 1.5 倍和

2 倍。

为了验证 *Mpcht19* 是否为低温响应基因, 以 25℃ 室温下的小胸螯甲成虫个体的 *Mpcht19* 表达量为对照, 分析 *Mpcht19* 基因在常规驯化 4℃ 低温胁迫不同时间的相对表达量。结果显示, 低温处理 1 h 后 *Mpcht19* 的表达量开始上升, 但未达到显著水平。在 5 h 时表达量急剧下降, 仅为对照组的一半。处理 7 h 时表达量达到最高, 为对照组的 8 倍, 随后又逐渐降低, 至 11 h 时降到最低, 几乎为零 (图 6)。由此可见, 小胸螯甲成虫在 4℃ 处理不同时间 *Mpcht19* 基因的相对表达量发生了显著变化 ($F_{6, 35} = 18.04, P < 0.05$), 说明低温胁迫可诱导 *Mpcht19* 基因的表达。

2.6 *MpCht19* 的组织定位

为了从蛋白质水平上检测几丁质酶 MpCht19 在 4℃ 处理后小胸螯甲成虫后肠和脂肪体中的表

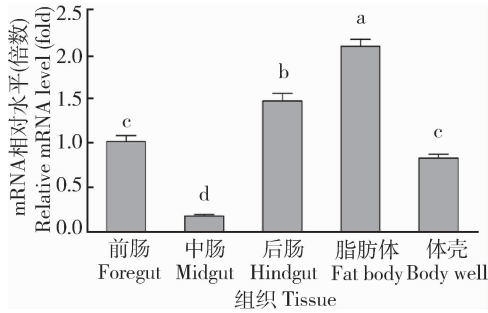


图5 小胸鳖甲成虫不同组织中 *Mpcht19* mRNA 相对表达水平

Fig. 5 Relative expression level of *Mpcht19* mRNA in different tissues of *Microdera punctipennis* adults

相对表达水平是指相对于前肠中表达水平的倍数变化;柱上不同字母表示 Duncan 氏多重比较差异显著 ($P < 0.05$)。The relative expression level is represented as fold change by normalizing the mRNA levels to that in the foregut. Different letters above bars indicate significant difference by Duncan's multiple comparison ($P < 0.05$).

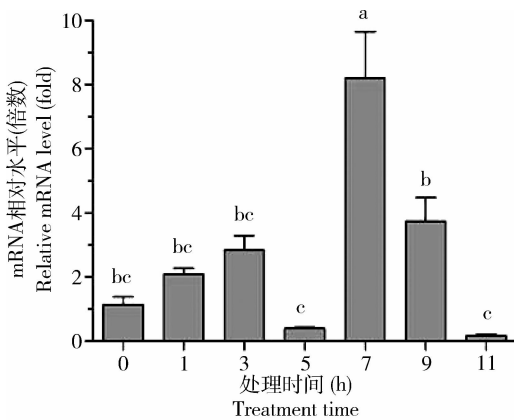


图6 4°C 低温处理不同时间小胸鳖甲成虫 *Mpcht19* mRNA 相对表达水平

Fig. 6 Relative expression level of *Mpcht19* mRNA in adults of *Microdera punctipennis* treated at 4°C for different time relative expression level is represented as fold change by normalizing the mRNA levels to that of the control at 0 h. Different letters above bars indicate that the difference is statistically significant by Duncan's multiple comparison ($P < 0.05$).

达,以 His-MpCht19 抗血清为一抗进行免疫组织化学观察实验。结果表明,与 PBS 代替一抗的阴性对照组(图 7: A, D)相比,实验组(图 7: B, C, E, F)有明显的阳性信号出现。后肠表皮细胞阳性着色较深(图 7: B, C 中箭头所示)。此外,结缔组织也有着色。在脂肪体的间质细胞中有阳性着色,处在分裂期的脂肪细胞核染色质边缘化,形成纺锤状,胞浆

内有阳性着色(图 7: E, F 中箭头所示)。

3 讨论

3.1 MpCht19 的序列特征

昆虫几丁质酶是一种糖蛋白,属于 18 家族几丁质糖苷水解酶(GH18),存在于昆虫生长发育的各个阶段和各个组织中,参与新旧表皮的更替和围食膜的降解(Fukamizo, 2000; Merzendorfer and Zimoch, 2003)。本研究通过低温转录组筛选并克隆获得荒漠拟步甲科昆虫小胸鳖甲的几丁质酶基因 *Mpcht19*,其编码的蛋白 MpCht19 的预测分子量为 27.18 kD。序列分析显示 MpCht19 的氨基酸序列含有昆虫几丁质酶保守的基序,以及更保守的 18 家族糖苷水解酶的催化活性结构域,但无几丁质结合结构域(chitin binding domain, CBD)。这与 IV 型几丁质酶多数缺少 CBD 的特征一致(Lee *et al.*, 2009)。MpCht19 与拟步甲科赤拟谷盗的 TcCht19 几丁质酶序列的相似性最高,氨基酸序列一致性为 34.05%,因此,推测 *Mpcht19* 属于 IV 型几丁质酶基因,其蛋白不具有完整的几丁质酶典型结构,其功能可能与 TcCht19 相似,几丁质酶(EC3.2.1.14)具有专化性裂解几丁质的特性,降解几丁质为低分子量、可溶或不可溶的寡糖,在植物、真菌和细菌中几丁质酶参与细胞壁的重构,在受到生物或非生物胁迫时可以通过将几丁质降解为小分子糖类物质来调节体内渗透平衡(Alcazar-Fuoli *et al.*, 2011),糖类物质也可能可以作为冷冻保护剂保护细胞膜和蛋白质(Neufeld and Leader, 1998; Ramløv, 1999),这对于今后深入研究其功能性质具有很好的指导作用。

虽然,昆虫几丁质酶主要参与昆虫蜕皮、细胞增殖和免疫等生理过程(Kawamura *et al.*, 1999; Shi and Paskewitz, 2004; Zhu *et al.*, 2008; Arakane and Muthukrishnan, 2010),但我们克隆的小胸鳖甲 MpCht19 几丁质酶编码区还包含一个胁迫响应的 Dabb 结构域。该结构域最早在胡杨 *Populus euphratica* 的热休克蛋白 Hsp90 和羟脯氨酸糖蛋白 HRGP 中发现,是与盐胁迫相关的结构域(Gu *et al.*, 2004; Lytle *et al.*, 2004)。在根际细菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus* 的果糖 1,6-二磷酸醛缩酶(检索号 Q9ZA13)的 C 端也发现有此结构(Hayashi *et al.*, 2000)。本研究首次在昆虫几丁质酶中发现含有 Dabb 结构域,但与其同源的 TcCht19 和三维建模模板 acidic mammalian chitinase

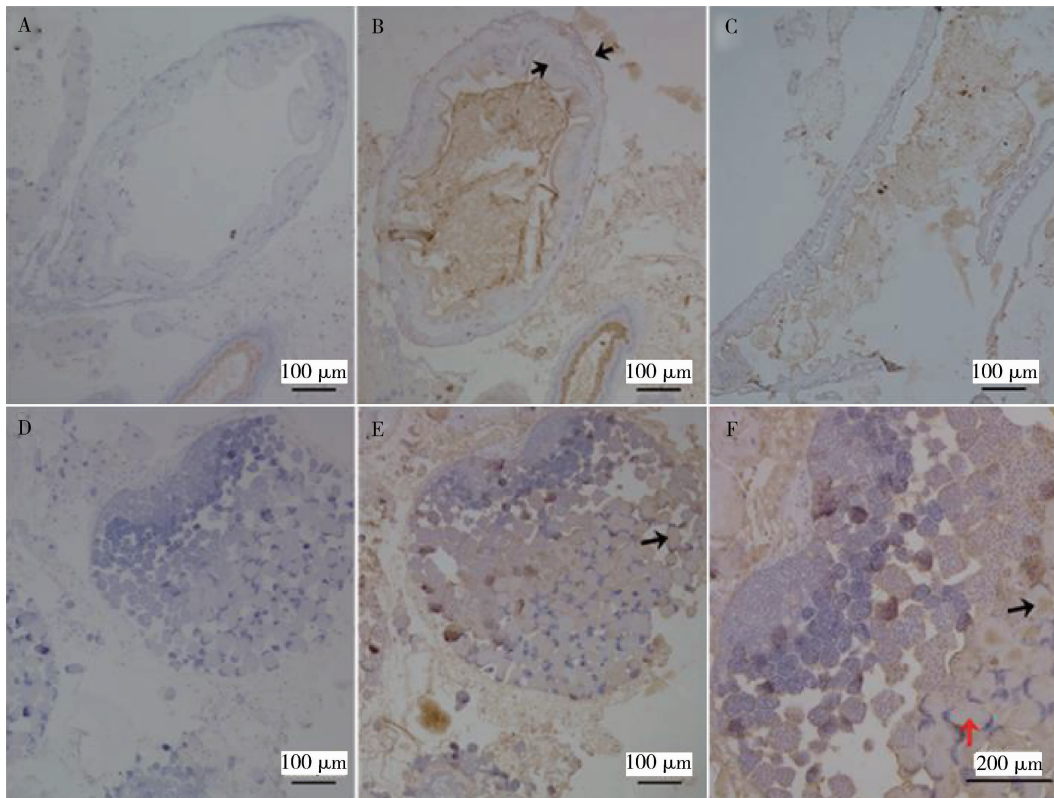


图7 His-MpCht19 抗血清对 4℃ 处理 3 h 小胸鳖甲成虫后肠和脂肪体的免疫组织化学分析

Fig. 7 Immunohistochemical analysis of the hindgut and fat body of the adult

Microdera punctipennis treated by anti-His-MpCht19 antibody at 4℃ for 3 h

A - C: 后肠 Hindgut; D - F: 脂肪体 Fat body. A 和 D 为阴性对照,用 PBS 代替一抗;B, C, E 和 F 由 His-MpCht19 抗血清作为一抗。阳性着色明显的部位用黑箭头示意,分裂期脂肪细胞用红色箭头示意;切片厚度 5 μm。A and D show the negative control with the first antibody replaced by PBS; B, C, E and F show the results tested with the first antibody of His-MpCht19 antiserum. Black arrows indicate the dark positive signals, and the red arrow indicates the fat cells in mitosis. Slice thickness is 5 μm.

(AMCase) 却无此结构,推测 MpCht19 可能参与细胞对逆境胁迫的响应,这与小胸鳖甲在荒漠极端环境的生存适应性可能有关,相关研究有待开展。

信号肽和跨膜螺旋区具有将成熟几丁质酶分泌到胞外的功能,预测结果显示, MpCht19 蛋白不具跨膜区和信号肽,与 IV 型昆虫几丁质酶具有信号肽特征相异,如亲缘关系较近的赤拟谷盗的 TcCht19 的 N 端具有信号肽和催化结构域但也没有跨膜螺旋区,说明 MpCht19 是非分泌型蛋白且可能不是膜相关蛋白,可能在细胞内发挥作用 (Keefe *et al.*, 1990; Thomas *et al.*, 1999)。对昆虫几丁质酶的亚细胞定位研究鲜有报道,植物 I 型和 V 型几丁质酶定位于液泡内,而其他几丁质酶位于胞体外 (赵和, 2004)。此外,预测 MpCht19 具有 1 个糖基化位点和 16 个磷酸化位点,推测与其构象、稳定性以及酶活性有关。几丁质酶存在广泛的修饰作用。木霉的 8 种几丁质酶的成熟蛋白具有催化域、磷酸化

域和糖基化域 (胡仕凤等, 2008)。小胸鳖甲 MpCht19 的化学修饰与其功能活性的关系有待深入研究。

3.2 *Mpcht19* 基因表达对低温胁迫的响应性与组织特异性

Mpcht19 在经过 4℃ 低温诱导 1 h 后表达量就开始上调, 3 h 时达到小高峰, 7 h 后达到高峰, 为室温对照的约 8 倍, 在 5 和 11 h 时, 都降低到很低水平, 形成双峰型的表达模式。 *Mpcht19* 在低温下的这种表达模式表明其表达受低温强烈诱导, 由此推测小胸鳖甲几丁质酶 MpCht19 与其低温适应性有关。生物体在响应逆境胁迫时, 基因或酶类表达模式有多种形式, 由于应对胁迫是以降低正常代谢为代价的, 因此胁迫所刺激的基因表达的改变都是短时间的 (Gao *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2016), 以便细胞不断做出对胁迫刺激的适应性调整。小胸鳖甲的 RAS GTP 酶激活蛋白基因 *MpRASGAP* (阮梦鸽等,

2015)和甘蔗几丁质酶基因(许颖等, 2015)在低温下的表达也具有类似的波动。深入研究可能需要结合信号转导途径进行。

昆虫IV型几丁质酶主要在肠道特异性表达,参与几丁质类物质的降解和吸收(Arakane and Muthukrishnan, 2010),还能抵抗病原菌的入侵,具有免疫功能(Yan *et al.*, 2002)。本研究发现在25℃室温下,*Mpcht19*基因在成虫的后肠和脂肪体中高表达,表明小胸鳖甲几丁质酶MpCHT19在室温下可能具有上述功能。这与冈比亚按蚊的IV型几丁质酶基因在后肠中高表达(Zhang *et al.*, 2011)一致。昆虫脂肪体是糖、脂和蛋白质代谢的中心,*Mpcht19*基因在脂肪体中高表达,与其可能参与氨基糖和核苷糖代谢通路的功能一致。

对4℃处理3 h成虫的脂肪体和后肠的免疫组织化学分析结果显示,*Mpcht19*蛋白在脂肪体、后肠及间质细胞中都有表达,与mRNA水平的研究结果一致。脂肪体内存在大量酶类物质,能够在低温下正常发挥作用,将脂肪体内的存储物质降解为小分子的低温保护物质,维持昆虫血淋巴中蛋白质、脂肪、碳水化合物等物质供给(Hayakawa and Chino, 1983)。蟑螂*Gromphadorhina coquereliana*在受到低温处理后脂肪体发挥重要作用(Chowanski *et al.*, 2015)。水稻螟虫的Saigoku生态型幼虫(Izumi *et al.*, 2007)和壁蜂*Osmia lignaria*(Sgolastra *et al.*, 2011)在越冬滞育过程中会消耗大量脂肪体。糖苷水解酶是昆虫体内正常生理代谢的关键酶系,小胸鳖甲的MpCHT19受低温诱导且在脂肪体内有表达,结合25℃室温下在脂肪体和后肠高表达,推测MpCHT19在低温下能正常发挥作用,通过降解大分子的几丁质为小分子的糖类,为昆虫提供低温保护物质,相关研究有待深入开展。

本研究克隆并分析了小胸鳖甲几丁质酶基因*Mpcht19*的序列并分析了其编码蛋白的结构特点,对*Mpcht19*在不同组织和低温胁迫下的差异表达进行了分析。证明*Mpcht19*在后肠和脂肪体中高表达,为低温响应基因,提示小胸鳖甲几丁质酶的碳水化合物代谢功能可能还有助于在低温下为昆虫提供保护作用,研究结果有助于更为广泛地开展荒漠昆虫小胸鳖甲耐寒的分子机制研究。

参考文献 (References)

- Alcazar-Fuoli L, Clavaud C, Lamarre C, Aimanianda V, Seidl-Seiboth V, Mellado E, 2011. Functional analysis of the fungal/plant class chitinase family in *Aspergillus fumigatus*. *Fung. Genet. Biol.*, 48 (4): 418–429.
- Arakane Y, Muthukrishnan S, 2010. Insect chitinase and chitinase-like proteins. *Cell. Mol. Life Sci.*, 67(2): 201–216.
- Cabello JV, Arce AL, Chan RL, 2012. The homologous HD-Zip I transcription factors HaHB1 and AtHB13 confer cold tolerance via the induction of pathogenesis-related and glucanase proteins. *Plant J.*, 69(1): 141–153.
- Chowanski S, Lubawy J, Spochacz M, Ewelina P, Grzegorz S, Rosinski G, Slocinska M, 2015. Cold induced changes in lipid, protein and carbohydrate levels in the tropical insect *Gromphadorhina coquereliana*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 183C: 57–63.
- Clark MS, Thorne MA, Purać J, Burns G, Hillyard G, Popović ZD, Grubor-Lajsić G, Worland MR, 2009. Surviving the cold: molecular analyses of insect cryoprotective dehydration in the Arctic springtail *Megaphorura arctica* (Tullberg). *BMC Genomics*, 10 (1): 1–11.
- Clark MS, Worland MR, 2008. How insects survive the cold: molecular mechanisms – a review. *J. Comp. Physiol. B*, 178: 917–933.
- Davies SA, Overend G, Sebastian S, Cundall M, Cabrero P, Dow JA, Terhzaz S, 2012. Immune and stress response ‘cross-talk’ in the *Drosophila* Malpighian tubule. *J. Insect Physiol.*, 58(4): 488–497.
- Denlinger DL, 2002. Regulation of diapause. *Annu. Rev. Entomol.*, 47 (1): 93–122.
- Fan D, Zhao KJ, Zhang J, 2005. Molecular characteristics of insect chitinase gene. *Chin. Bull. Entomol.*, 42(4): 364–369. [樊东, 赵奎军, 张杰, 2005. 昆虫几丁质酶基因的分子特性概述. 应用昆虫学报, 42(4): 364–369]
- Fukamizo F, 2000. Chitinolytic enzymes: catalysis, substrate binding, and their application. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 1(1): 105–124.
- Gao W, Long L, Tian XQ, Jin JJ, Liu HL, Zhang H, Xu FC, Song CP, 2016. Genome-wide identification and expression analysis of stress-associated proteins (SAPs) containing A20/AN1 zinc finger in cotton. *Mol. Genet. Genom.*, 291: 2199–2213.
- Gu R, Fonseca S, Puskás LG, László Hackler J, Ágnes Zvara, Dudits D, Pais MS, 2004. Transcript identification and profiling during salt stress and recovery of *Populus euphratica*. *Tree Physiol.*, 24(3): 265–276.
- Hayakawa Y, Chino H, 1983. Insect fat body phosphorylase kinase is Ca²⁺-independent and acts even at 0 degrees C. *Biochim. Biophys. Acta*, 746(1–2): 14–17.
- Hayashi NR, Terazono K, Kodama T, Igarashi Y, 2000. Structure of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase gene cluster from a thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium, *Hydrogenophilus thermoluteolus*, and phylogeny of the fructose 1,6-bisphosphate aldolase encoded by *cbfA* in the cluster. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64(1): 61–71.
- Hou F, Ma J, Liu X, Wang Y, Liu XN, Zhang FC, 2010. Seasonal changes in antifreeze protein gene transcription and water content of beetle *Microdera punctipennis* (Coleoptera: Tenebrionidae) from

- Gurbantonggut Desert in Central Asia. *Cryo Letters*, 31(5): 359 – 370.
- Hu SF, Gao BD, Chen J, 2008. The advances of chitinases and their genes from *Trichoderma* spp. *Chin. J. Biol. Control*, 24(4): 369 – 375. [胡仕凤, 高必达, 陈捷, 2008. 木霉几丁质酶及其基因的研究进展. 中国生物防治学报, 24(4): 369 – 375]
- Huang HY, Zhang Y, Wan ZY, 2013. Evolution and consensus exploration of insects' chitinase by comparative genomics. *J. Hebei Univ. Sci. Technol.*, 34(4): 350 – 354. [黄海云, 张屹, 万张勇, 2013. 昆虫几丁质酶的进化与保守性质的比较基因组学研究. 河北科技大学学报, 34(4): 350 – 354]
- Huang RX, Hu HY, Wu W, Fan ZT, Suo FY, 2005. Formation and evolution of desert insects in Xinjiang and its adjacent regions. *Arid Land Geography*, 28(1): 38 – 44. [黄人鑫, 胡红英, 吴卫, 范兆田, 索菲娅, 2005. 新疆及其毗邻地区荒漠昆虫区系的形成与演变. 干旱区地理, 28(1): 38 – 44]
- Izumi Y, Sonoda S, Tsumuki H, 2007. Effects of diapause and cold-acclimation on the avoidance of freezing injury in fat body tissue of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker. *J. Insect Physiol.*, 53(7): 685 – 690.
- Kawamura K, Shibata T, Saget O, Peel D, Bryant PJ, 1999. A new family of growth factors produced by the fat body and active on *Drosophila* imaginal disc cells. *Development*, 126(2): 211 – 219.
- Keefe D, Hinz U, Meins F, 1990. The effect of ethylene on the cell-type-specific and intracellular localization of β -1,3-glucanase and chitinase in tobacco leaves. *Planta*, 182(1): 43 – 51.
- Lee YG, Chung KC, Wi SG, Lee JC, Bae HJ, 2009. Purification and properties of a chitinase from *Penicillium* sp. LYG 0704. *Protein Expr. Purif.*, 65(2): 244 – 250.
- Li J, Du X, Hosseini Moghaddam SH, Chen YY, 2009. The research progress in protein glycosylation modification. *Bull. Sci. Technol.*, 25(6): 773 – 778. [李军, 杜鑫, Hosseini Moghaddam SH, 陈玉银, 2009. 蛋白质糖基化修饰研究进展. 科技通报, 25(6): 773 – 778]
- Li X, 2015. Advance research on structure and function of p70S6K. *J. Anqing Teach. Coll. (Nat. Sci. Ed.)*, 21(3): 85 – 89. [李欣, 2015. P70s6k 结构与功能研究进展. 安庆师范学院学报(自然科学版), 21(3): 85 – 89]
- Li Y, Fan XJ, 2011. Insect chitinase and its application in insect pest control. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 48(5): 1489 – 1494. [李瑶, 范晓军, 2011. 昆虫几丁质酶及其在害虫防治中的应用. 应用昆虫学报, 48(5): 1489 – 1494]
- Lu X, Li J, Yang J, Liu X, Ma J, 2014. *De novo* transcriptome of the desert beetle *Microdera punctipennis* (Coleoptera: Tenebrionidae) using illumina RNA-seq technology. *Mol. Biol. Rep.*, 41(11): 7293 – 7303.
- Lu XY, Li JQ, Zhuang SZ, Liu XN, Ma J, 2014. Preparation and titer assay of antiserum against chitinase MpCHI786 from the desert insect *Microdera punctipennis*. *Sichuan J. Zool.*, 33(5): 659 – 664. [陆雪莹, 李洁琼, 庄淑珍, 刘小宁, 马纪, 2014. 荒漠昆虫小胸螯甲几丁质酶抗血清的制备及抗体效价检测. 四川动物, 33(5): 659 – 664]
- Lytle BL, Peterson FC, Qiu SH, Luo M, Zhao Q, Markley JL, Volkman BF, 2004. Solution structure of a ubiquitin-like domain from tubulin-binding cofactor. *J. Biol. Chem.*, 279(45): 46787 – 46793.
- Ma WJ, Ma J, 2012. Cloning and sequence analysis of a heat shock protein gene (*Mphsp70*) from *Microdera punctipennis* and its expression in relation to high temperatures. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 49(2): 439 – 447. [马文静, 马纪, 2012. 小胸螯甲热激蛋白基因 (*Mphsp70*) 的克隆、序列分析及温度对其表达的影响. 应用昆虫学报, 49(2): 439 – 447]
- Merzendorf H, Zimoch L, 2003. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J. Exp. Biol.*, 206(24): 4393 – 4412.
- Neufeld DS, Leader JP, 1998. Freezing survival by isolated Malpighian tubules of the New Zealand alpine weta *Hemideina maori*. *J. Exp. Biol.*, 201(Pt 2): 227 – 236.
- Ramløv H, 1999. Microclimate and variations in haemolymph composition in the freezing-tolerant New Zealand alpine weta *Hemideina maori* Hutton (Orthoptera: Stenopelmatidae). *J. Comp. Physiol. B*, 169(3): 224 – 235.
- Ruan MG, Li JQ, Meng SS, Ma J, 2015. Cloning and expression profiling in response to low temperature of Ras GTPase-activating protein gene *MpRasGAP* in the desert beetle *Microdera punctipennis* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Acta Entomol. Sin.*, 58(4): 367 – 374. [阮梦鸽, 李洁琼, 孟闪闪, 马纪, 2015. 荒漠昆虫小胸螯甲 RAS GTP 酶激活蛋白基因 *MpRasGAP* 的克隆及低温表达分析. 昆虫学报, 58(4): 367 – 374]
- Sgolastra F, Kemp WP, Buckner JS, Pitts-Singer TL, Maini S, Bosch J, 2011. The long summer: pre-wintering temperatures affect metabolic expenditure and winter survival in a solitary bee. *J. Insect Physiol.*, 57(12): 1651 – 1659.
- Shi L, Paskewitz SM, 2004. Identification and molecular characterization of two immune-responsive chitinase-like proteins from *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol.*, 13(4): 387 – 398.
- Strachan LA, Tarnowski-Garner HE, Marshall KE, Sinclair BJ, 2011. The evolution of cold tolerance in *Drosophila* larvae. *Physiol. Biochem. Zool.*, 84(1): 43 – 53.
- Su Y, Xu LP, Fu ZW, Yang YT, Guo JL, Wang SS, Que YX, 2014. *Scchi*, encoding an acidic class III chitinase of sugarcane, confers positive responses to biotic and abiotic stresses in sugarcane. *Int. J. Mol. Sci.*, 15(2): 2738 – 2760.
- Takenaka Y, Nakano S, Tamoi M, Sakuda S, Fukamizo T, 2009. Chitinase gene expression in response to environment stresses in *Arabidopsis thaliana*; chitinase inhibitor allosamidin enhances stress tolerance. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73(5): 1066 – 1071.
- Teets NM, Denlinger DL, 2014. Surviving in a frozen desert: environmental stress physiology of terrestrial Antarctic arthropods. *J. Exp. Biol.*, 217(217): 84 – 93.
- Thomas CJ, Brown HL, Hawes CR, Lee BY, Min MK, King LA, 1999. Localization of a baculovirus-induced chitinase in the insect cell endoplasmic reticulum. *J. Virol.*, 72(12): 10207 – 10212.
- Xu RR, Liu CY, Li N, Zhang SZ, 2016. Global identification and

- expression analysis of stress-responsive genes of the Argonaute family in apple. *Mol. Genet. Genomics*, 291(6): 2015–2030.
- Xu Y, Wang ZQ, Wu QB, Chen Y, Yang CC, Feng MX, Su YC, 2015. Cloning, sequencing and expression analysis of chitinase gene *ScChiIV1* from Sugarcane. *Genom. Appl. Biol.*, 34(6): 1258–1266. [许颖, 王竹青, 吴期滨, 陈云, 杨春春, 冯敏谢, 苏亚春, 2015. 甘蔗几丁质酶基因 *ScchiIV1* 的克隆、序列分析及其表达. 基因组学与应用生物学, 34(6): 1258–1266]
- Yan J, Cheng Q, Narashirhan S, Li CB, Aksoy S, 2002. Cloning and functional expression of a fat body-specific chitinase cDNA from the tsetse fly, *Glossina morsitans morsitans*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 32(9): 979–989.
- Zhang BS, Cao YQ, Zhang W, Yin YP, Wang ZK, Peng GX, Xia YX, 2007. Cloning, sequence analysis and tissue expression of chitinase gem from the midgut of *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). *Acta Entomol. Sin.*, 50(6): 555–559. [张八生, 曹月青, 张伟, 殷幼平, 王中康, 彭国雄, 夏玉先, 2007. 东亚飞蝗中肠几丁质酶基因的克隆、序列分析及组织定位. 昆虫学报, 50(6): 555–559]
- Zhang JZ, Zhang X, Arakan Y, Muthukrishnan S, Kramer KJ, Ma E, 2011. Comparative genomic analysis of chitinase and chitinase-like genes in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). *PLoS ONE*, 6(5): e19899.
- Zhao H, 2004. Chitinases and plant protection. *J. Hebei Agric. Sci.*, 8(2): 78–84. [赵和, 2004. 几丁质酶与植物抗病. 河北农业科学, 8(2): 78–84]
- Zhu QS, Arakane Y, Banerjee D, Kramer KJ, Muthukrishnan S, 2008. Domain organization and phylogenetic analysis of the chitinase-like family of proteins in three species of insects. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 38(4): 452–466.

(责任编辑: 马丽萍)