

沙葱萤叶甲己糖激酶基因的克隆、相对表达量及RNA干扰效应

马红悦 李玲 李艳艳 谭瑶 庞保平*

(内蒙古农业大学草原昆虫研究中心, 呼和浩特 010020)

摘要: 为揭示沙葱萤叶甲 *Galeruca daurica* 己糖激酶基因的功能, 根据本课题组组装的沙葱萤叶甲转录组测序数据, 应用cDNA末端快速扩增技术(rapid amplification of cDNA ends, RACE)克隆获得沙葱萤叶甲己糖激酶基因的cDNA全长序列, 分析其编码蛋白的氨基酸序列与其它昆虫同源蛋白氨基酸序列之间的系统进化关系, 采用实时荧光定量技术(real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR)测定不同发育阶段和不同温度下沙葱萤叶甲己糖激酶基因的相对表达量以及对RNA干扰的响应。结果表明, 沙葱萤叶甲己糖激酶基因的cDNA全长为1 699 bp, 开放阅读框长为1 479 bp, 编码492个氨基酸; 沙葱萤叶甲己糖激酶氨基酸序列与玉米根萤叶甲 *Diabrotica virgifera virgifera* 己糖激酶氨基酸序列一致性最高, 为65.42%。己糖激酶基因在沙葱萤叶甲不同发育阶段均有表达, 成虫滞育期间相对表达量维持在低水平, 而滞育结束后相对表达量急剧上升达最高值。在0~40℃范围内, 随着温度增加, 己糖激酶基因在沙葱萤叶甲成虫体内相对表达量呈先升高后下降的趋势。采用RNA干扰技术沉默沙葱萤叶甲成虫己糖激酶基因2 d后, 与对照相比, 己糖激酶基因相对表达量下调90%以上, 4 d后仍下调40%以上; 该基因干扰后12 d内, 沙葱萤叶甲成虫存活率下降了25%以上。表明己糖激酶基因可能在沙葱萤叶甲生长发育和滞育过程中起着重要作用。

关键词: 沙葱萤叶甲; 己糖激酶; 基因克隆; 表达量; RNA干扰; 滞育

Cloning, relative expression, and RNAi effects of the hexokinase gene in *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae)

MA Hongyue LI Ling LI Yanyan TAN Yao PANG Baoping*

(Research Center for Grassland Entomology, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010020, Inner Mongolia Autonomous Region, China)

Abstract: In order to investigate the functions of the hexokinase gene in leaf beetle *Galeruca daurica* (*GdHK*), the full-length cDNA of *GdHK* gene was cloned by RACE based on the transcriptome data of *G. daurica* assembled in laboratory, and the phylogenetic relationships among its amino acid sequence and those of other insects' homologous proteins were analyzed using the current software. Real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was used to determine the relative expression levels of *GdHK* gene at different developmental stages and in adults under different temperatures, and RNA interference (RNAi) effects. The results showed that the full-length cDNA of the *GdHK* gene was 1 699 bp, which contained a 1 479 bp open reading frame (ORF) encoding 492 amino acids. Homology and phylogenetic analyses showed that the amino acid sequence of *GdHK* had the highest identity (65.42%) with

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: 2019-12-30

that of *Diabrotica virgifera virgifera* HK. The *GdHK* gene was expressed at all developmental stages of *G. daleruca*, and the expression kept at the lowest level during the adult diapause but rose abruptly to the highest level after diapause terminated. The relative expression level of *GdHK* gene began to increase initially, but then decreased with the temperature increasing from 0°C to 40°C. Compared with the control, the relative expression level of *GdHK* gene reduced by over 90% two days after RNAi was performed in the adults and decreased by more than 40% four days after RNAi, and the adult survivorship declined by over 25% in 12 days after RNAi. These results suggested that *GdHK* gene may play an important role in the growth, development and diapause of *G. daleruca*.

Key words: *Galeruca daurica*; hexokinase; gene cloning; expression profiling; RNA interference; diapause

己糖激酶(hexokinase, HK)是糖酵解途径中的限速酶之一,其催化己糖磷酸化生成葡萄糖-6-磷酸,葡萄糖-6-磷酸是糖代谢过程的重要中间产物,生成丙酮酸,进入三羧酸循环,对能量代谢有着重要的调控作用(Wilson, 1997)。滞育是昆虫为了躲避不良环境而暂时停止生长发育的一种现象,是一种延续种群生存的重要生态策略,主要通过改变昆虫体内生理生化代谢以及激素调控来完成滞育过程(Teets & Denlinger, 2014)。最近转录组学和蛋白组学研究表明,大量不同滞育阶段的差异基因显著富集于糖酵解途径中,这意味着糖酵解途径可能在昆虫滞育中起着重要作用(Tu et al., 2015; Kang et al., 2016; Zhang et al., 2018)。目前关于己糖激酶在冬滞育或兼性滞育昆虫中调控滞育的报道较多,如成卫宁等(2009)研究发现麦红吸浆虫 *Sitodiplosis mossellana* 在解除滞育过程中己糖激酶活力开始升高,有利于其体内糖酵解的顺利进行;桃小食心虫 *Carpocapsa sasakii* 在滞育初期己糖激酶活力较低,在滞育后期先迅速升高再迅速下降(张顺益等, 2015);在葱蝇 *Delia antiqua* 夏滞育蛹中2个己糖激酶基因都下调表达,而在冬滞育蛹中2个己糖激酶基因表达模式则正好相反(郭强等, 2015);在棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 滞育蛹中 *Har-HK2* 基因的表达水平低于非滞育蛹,沉默该基因会导致棉铃虫培养细胞存活率下降,棉铃虫蛹期发育延迟,表明己糖激酶在棉铃虫生长发育及滞育调节中起着重要作用(Lin & Xu, 2016);在柞蚕 *Antheraea pernyi* 滞育蛹解除滞育及发育过程中己糖激酶基因上调表达(汝玉涛等, 2017)。而已有研究中关于专性夏滞育昆虫体内己糖激酶的报道较少。沙葱萤叶甲 *Galeruca daurica* 是一种近年来在内蒙古草原上暴发成灾的新害虫,主要为害沙葱、多根葱和野韭等百合科葱属植物。该虫1年发生1代,以卵滞育越冬(Zhou et al.,

2016),夏季成虫羽化后开始大量取食沙葱等寄主植物,7~10 d后取食活动停止,聚集于牛粪、石块或草丛下进入滞育状态,羽化80~90 d后滞育解除,开始进行取食、交尾、产卵等生命活动(昊翔等, 2015; 陈龙等, 2018a)。目前对沙葱萤叶甲成虫夏滞育的机理了解很少。本课题组前期研究了夏滞育不同时期沙葱萤叶甲成虫糖类、蛋白及脂肪含量变化(陈龙等, 2018a)、海藻糖酶基因表达量及酶活性变化(陈龙等, 2018b)和小热激蛋白表达量的变化(陈龙等, 2019),路标等(2017; 2019)克隆了沙葱萤叶甲海藻糖合成酶和海藻糖磷酸酶基因全长序列,并进行了原核表达及对温度胁迫的表达分析。Ma et al. (2019)应用蛋白组学技术分析夏滞育不同阶段沙葱萤叶甲成虫蛋白的变化,发现大量差异蛋白富集于代谢过程、胁迫响应、骨架重构及吞噬体途径中,其中己糖激酶表达量在滞育不同阶段差异极显著。

为揭示沙葱萤叶甲己糖激酶基因的功能,根据本课题组组装的沙葱萤叶甲转录组数据,应用cDNA末端快速扩增技术(rapid amplification of cDNA ends, RACE)克隆沙葱萤叶甲己糖激酶基因的cDNA全长序列,利用软件分析其编码蛋白的氨基酸序列与其它昆虫同源蛋白氨基酸序列之间的系统进化关系,并采用实时荧光定量(real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR)技术分析己糖激酶基因在沙葱萤叶甲不同发育阶段及温度下的表达规律,并利用RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术沉默该基因后,测定其沉默效率及对沙葱萤叶甲成虫存活的影响,以期深入研究沙葱萤叶甲成虫夏滞育过程中糖代谢的调节机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试虫源:于2019年4月自内蒙古锡林郭勒盟

镶黄旗天然草原采集沙葱萤叶甲越冬卵,带回实验室置于温度(25±1)℃、相对湿度(70±5)%、光周期为14 L:10 D的人工气候箱中孵育,幼虫及成虫均以新鲜的沙葱饲养。

试剂及仪器:MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 总 RNA 提取试剂盒、PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒、SMARTer® RACE 5'/3' Kit 试剂盒、MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit 胶回收试剂盒、pMD19-T Vector Cloning Kit 载体克隆试剂盒,宝生物工程(大连)有限公司;pGEM-T Easy 连接载体、2×GoTaq® qPCR Master Mix 荧光定量 PCR 试剂、T7 RiboMAX™ Express RNAi System 试剂盒、T4 DNA 连接酶,美国 Promega 公司;大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 感受态细胞,天根生化科技(北京)有限公司;其它试剂均为国产分析纯。PRX-350C 智能型人工气候箱,宁波海曙赛福实验仪器厂;NanoPhotometer™ P-Class 紫外分光光度计,德国 Implen 公司;FTC-3000 实时荧光定量 PCR 仪,加拿大 Funplyn Biotech 公司;Mycycle Thermal Cycle PCR 仪、PowerPac HC 电泳仪,美国 Bio-Rad 公司;BG-gdsAUTO 凝胶成像分析系统,北京百晶生物技术有限公司;221-34618 型显微注射器,日本 SHIMADZU 公司。

1.2 方法

1.2.1 沙葱萤叶甲己糖激酶基因 cDNA 全长的克隆

总 RNA 提取及 cDNA 合成:按照 MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 总 RNA 提取试剂盒说明书提取沙葱萤叶甲羽化 3 d 成虫的总 RNA,用紫外分光光度计和 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的浓度及质量。根据 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒说明书合成第一链 cDNA,于 -20℃ 保存备用。

中间片段克隆:以羽化 3 d 沙葱萤叶甲成虫 cDNA 为模板,基于本实验室组装的沙葱萤叶甲成虫转录组测序数据(GeneBank 登录号:PRJNA471603),利用 Primer Premier 5.0 软件设计中间片段的特异性引物 GdHK-F (5'-GTAATCCACCACATCTCCGTACTGC-3')/GdHK-R (5'-CACTGCAGCTATTAAAGGCTGCTCCT-3'),扩增候选 *GdHK* 基因的编码序列。所有引物均委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。25 μL 反转录-聚合酶链式扩增反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)体系:100 ng/μL cDNA 模板 1 μL、PCR Master Mix 12.5 μL、0.2 μmol/L 正反向引物各 1 μL、ddH₂O

9.5 μL。RT-PCR 反应条件:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,65℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,35 个循环;72℃ 延伸 10 min。反应完成后使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,将目标 DNA 条带切胶回收纯化,然后连接至 pMD19-T 载体并转化到大肠杆菌感受态细胞 DH5α 中,选择白色单一菌落,加入 10 μL ddH₂O,以 1 μL 菌液为模板进行 PCR 鉴定,PCR 鉴定体系及条件同 RT-PCR,选取阳性克隆菌液送至北京六合华大基因科技有限公司测序验证。

RACE 克隆:根据获得的沙葱萤叶甲己糖激酶基因的中间片段信息,设计 5'/3' 特异性引物 GdHK5'-GSP(ACGTTCTCACCTATTACCCCATCG-CAGT)/GdHK3'-GSP(GAATCTGGTGC GTTTGGT-GATGATGGTG)和 GdHK5'-NGSP(CCTAAGGGA-AGATTATCGTTGCTGACCC)/GdHK3'-NGSP(GC-GTTTGGTGATGATGGTGCTTTGGACT)。按照 SMARTer® RACE 5'/3' Kit 说明书合成 cDNA。以合成的 cDNA 为模板,以试剂盒自带的 UMP 引物和设计的 GSP 特异性引物为引物,根据试剂盒说明书进行降落聚合酶链式扩增反应。PCR 扩增程序:94℃ 变性 30 s,72℃ 延伸 3 min,共循环 5 次;94℃ 变性 30 s,70℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 3 min,共循环 5 次;94℃ 变性 30 s,68℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 3 min,循环 25 次。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后,取 5 μL 反应产物加入到 Tricine-EDTA 中稀释至 20 倍后,进行巢式 PCR 反应。巢式 PCR 反应程序:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,68℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 2 min,共 30 个循环。PCR 扩增产物回收纯化后,连接至 pMD19-T 载体并转化到大肠杆菌感受态细胞 DH5α 中,取 1 μL 菌液为模板进行 PCR 鉴定,反应体系、程序及测序同中间片段克隆。使用 Vector NTI 11.5 软件进行拼接得到沙葱萤叶甲己糖激酶基因的 cDNA 全长序列。

1.2.2 沙葱萤叶甲己糖激酶基因的生物信息学分析

利用 NCBI 在线程序 ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 搜索沙葱萤叶甲己糖激酶基因开放阅读框,利用在线软件 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测基因的信号肽序列,应用 DNAMAN 6.0 软件对沙葱萤叶甲氨基酸序列与其它鞘翅目昆虫己糖激酶的氨基酸序列进行同源性比对,并对分子量和等电点进行预测,应用 TMHMM 2.0 软件分析沙葱萤叶甲己糖激酶基因的蛋白质跨膜结构域 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>),采用邻接法应用 MEGA 6.5 软

件构建系统发育树, 1 000次 bootstrap 检测。

1.2.3 不同发育阶段沙葱萤叶甲己糖激酶基因的表达

为比较不同发育阶段沙葱萤叶甲己糖激酶基因的表达量, 分别收集卵 50 粒、1 龄幼虫 10 头、2 龄幼虫 7 头、3 龄幼虫 5 头、预蛹 4 头、蛹 4 头及羽化 3、7、10、15、25、40、60、80 和 100 d 的雌雄成虫各 2 头, 每个处理设 3 个生物学重复。所取样品用液氮速冻, 于 -80°C 冰箱中保存备用。RNA 提取及 cDNA 合成按照 1.2.1 方法进行。采用 qPCR 技术分析不同发育阶段沙葱萤叶甲己糖激酶基因的表达水平。以沙葱萤叶甲 *SDHA* (GenBank 登录号: KU240575) 为内参基因 (Tan et al., 2017), 引物分别为 *SDHA-F* (5'-GGGAGACCACAATCTCCTCA-3')/*SDHA-R* (5'-AGCTGGTGCTCCTAAGTCCA-3')。利用 Primer 3 Input 在线软件设计己糖激酶基因引物 *qGdHK-F* (5'-TCCGGATTGCAAATAGGCC-3')/*qGdHK-R* (5'-TGCACAAAAGTCCAAAGCA-3')。20 μL qPCR 反应体系: cDNA 模板 2 μL 、上下游引物各 0.4 μL 、Go-Taq[®] qPCR Master Mix 10 μL 、ddH₂O 补齐至 20 μL 。qPCR 反应程序: 95°C 变性 2 min, 95°C 退火 15 s, 60°C 延伸 1 min, 共 40 个循环。溶解曲线: 95°C 变性 15 s, 65°C 退火 15 s, 95°C 延伸 15 s。每个处理 4 次技术重复。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法 (Livak & Schmittgen, 2001) 进行相对表达量分析。

1.2.4 不同温度下沙葱萤叶甲己糖激酶基因的表达

选择羽化 3 d 的沙葱萤叶甲成虫分别在 0、5、10、15、20、25、30、35 和 40°C 温度下处理 1 h, 每个处理雌、雄成虫各 2 头, 每个处理 3 个生物学重复。所取样品用液氮速冻, 于 -80°C 冰箱保存备用。RNA 提取及 cDNA 合成按照 1.2.1 方法进行。引物设计、qPCR 反应体系、程序及相对表达量分析方法同 1.2.3。

1.2.5 沙葱萤叶甲己糖激酶基因的 RNAi 试验

根据 1.2.1 鉴定获得的沙葱萤叶甲己糖激酶基因的 cDNA 全长序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件在 5' 端加 T7 启动子, 设计并合成双链 RNA (double-stranded, dsRNA) 片段的引物 *dsGdHK-F* (5'-TAAT-ACGACTCACTATAGGGGATGCTATAACCGAC-GGGGAGATA-3')/*dsGdHK-R* (5'-TAATACGACTC-ACTATAGGGGGTGGGTCTGACTCTATTTCCGA-AA-3')。按照 T7 RiboMAX[™] Express RNAi System 试剂盒说明书合成 dsRNA 并测定其浓度, 将合成的 dsRNA 用 RNA-free H₂O 稀释至 1 000 ng/ μL 。选取发育条件一致羽化 4 d 的沙葱萤叶甲雌、雄成虫各 80 头, 用显微注射器将沙葱萤叶甲己糖激酶基因

的 dsRNA 分别注射到雌、雄成虫体内, 每头注射体积为 2 μL , 注射位置为沙葱萤叶甲成虫腹部第 2 腹节和第 3 腹节之间的节间膜, 以不注射和注射超纯水为空白对照和阴性对照。分别于注射后第 2 天、第 4 天、第 6 天、第 8 天和第 10 天每个处理收集雌、雄成虫各 4 头, 使用 qPCR 检测 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 效率, qPCR 反应体系及程序同 1.2.4, 每个处理 3 个生物学重复。同时, 观察并记录每个处理其余试虫干扰后 12 d 内的生长发育及存活情况, 以明确己糖激酶基因在沙葱萤叶甲成虫生长发育及存活中的作用。

1.3 数据分析

采用 SPSS 20.0 软件对试验数据进行统计分析, 应用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 沙葱萤叶甲己糖激酶基因的克隆及序列分析

根据组装的沙葱萤叶甲转录组数据获得己糖激酶基因片段, 通过 RACE 技术扩增克隆了沙葱萤叶甲己糖激酶基因的 cDNA 全长序列, GenBank 登录号为 MN638805, 全长为 1 699 bp, 其中 5' 非编码区 (untranslated region, UTR) 长度为 107 bp, 3' UTR 长度为 113 bp (图 1)。开放阅读框长为 1 479 bp, 编码 492 个氨基酸, *GdHK* 编码的蛋白质分子量为 53.24 kD, 等电点为 4.17, 无信号肽和跨膜结构。

2.2 沙葱萤叶甲己糖激酶的序列比对

沙葱萤叶甲己糖激酶的氨基酸序列 (GenBank 登录号为 MN638805) 与玉米根萤叶甲 *Diabrotica virgifera virgifera* 己糖激酶氨基酸序列 (GenBank 登录号为 XP_028135991.1) 的一致性最高, 为 65.42%, 与马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 氨基酸序列 (GenBank 登录号为 XP_023018710.1)、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 氨基酸序列 (GenBank 登录号为 XP_008201716.1)、光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis* 氨基酸序列 (GenBank 登录号为 XP_018569738.1)、山松大小蠹 *Dendroctonus ponderosae* 氨基酸序列 (GenBank 登录号为 XP_019760185.1)、蜂箱奇露尾甲 *Aethina tumida* 氨基酸序列 (GenBank 登录号为 XP_019866322.1)、米象 *Sitophilus oryzae* 氨基酸序列 (GenBank 登录号为 XP_030755563.1) 及蓝舰拟步甲 *Asbolus verrucosus* 氨基酸序列 (GenBank 登录号为 RZC34887.1) 的一致性分别为 58.94%、56.50%、56.19%、53.75%、52.91%、52.88% 和 48.17% (图 2)。

ATGGGGAAGTAGACTAATGTTT
 GACATATGTCAACAATCTGACATCAAAAATTTCCAAATTTTGTGACAAACCAATAAGTTTCAATTC
 1 ATG TCC TTT TGC AAA AGC GAA ACT TGT AAT CCA CCA CAT CTC GGT ACT GGC GAA GAA ATACA GCA AGA
 M S S C K S E T C N P P H L R T A E V I F A R
 70 GAA GAA TTG AAAGAA AAA TGT GGA GAA CTT ATC ATA ACA GAA GAC CAA ATG CAA ACA TAT ATG AAA TCA
 E E L K E K C G E L I I T E D Q M Q T Y M K S
 140 TTT CTA GAAAAT ATT GAA CGA GGA CTG GGA AAA GAT ACT AAC CCG GAT TCA ATT GTT AAA TGT TTC CCA
 F L E N I E R G L G K D T N P D S I V K C F P
 210 ACA TAT GTT CAA AAC TTG CCC GAT GGA ACG GAT TCT GGA AAA TAC CTT GCT TTA GAT CTA GGT GGA AGT
 T Y V Q N L P D G T E S G K Y L A L D L G G S
 280 AAT TTT AGA GTT CTT ATG GTA GAG ATT CCA AAC AAG GGT TAT ACA ATG GAT CAA AAA GTC TCA GAT ATA
 N F R V L M V E I A N K A Y T M D Q K V F S I
 350 TCA GAG GAA AATAGTACA GGA CCC GGT GAA AGT CAT TTT GAT TTC ATA GCT GAA TGT TTA CCA GAT TAT
 S E E I M T G P G E S L F D F I A E C L A D Y
 420 ACT ACA GAG AAG GGT GTC AGC AAC GAT AAT CTT CCC TTA GGC TTC ACA TTT AGT TTT CCA TTA GAA CAA
 T T E K G V S N D N L P L G F T F S F P L E Q
 490 AAA GGT CTT AAG GTA GGG ATC CTC GAA CCG TGG ACC AAA GGA TTC AAC TCC GAT GGG GTA ATA GGT GAG
 K G L K V G I L E R W T K G F N C D G V I G E
 560 AAC GTG GTC CAA CTT TTG GAA GAT GCT ATA ACC AGA CCG GGA GAT ATT CAG ATA AAC GTA GCT GCT GTT
 N V V Q L L E D A I T R R G D I Q I N V A A V
 630 GTT AAC GAC ACC ACT GGT ACT TTA ATG GCA TGC CTT TTA AAA GAT CCG GAT TGC AAA ATA AGC CTC ATA
 V N D T T G T L M A C A F K D P D C K I G L I
 700 GTT GGT ACT GGT ACC AAT GGT TGT TAT GTA GAA AAG GCA GCG AAC GCT GAA CTT TGT GAT GAA CCA GAT
 V G T G T N G C Y V E K Q A N A E L F D E P D
 770 ACA GGT ACT GGT ATT GTT ATC AATAA TTA GAAT CTT GGT CCG TTT GGT GAT GAT GAT GCT TTG GAC TTT
 T G T G I V I I N L E S G A F G D D G A L D F
 840 TGT CCG ACA CAG TAC GAT ATAGAT GTT GAT GAA GCT TCC ATT AAT CCT GGT AGA CAG TTA CCA GAA AAG
 C R T Q Y D I D V D E A S I N P G R Q L H E K
 910 ATG ATATCA GGG ATG TAT ATG GGA GAA CTT GTT AGA TTG GCA CCT GTT AGA TTT ACT AAT GAA GGT ATC
 M I S G M Y M G E L V R L A A V R F T N E G I
 980 ATG TTC GGG GGC ACA CTT TCA GAT GAT TTC AAT ACC CCT CAT ACA TCC GAA ACT AAG TTT GTT TGG GAA
 M F G G T L S D D F N T P H T F E T K F V S E
 1 050 ATAGAG TCA GAC CCA CCA GGC ACT TTC ACT AAA GTT AAA GAA ATG TGT GAT AOC TTA GGA ATG ACA GAT
 I E S D P P G T F T K V K E I C D S L G M T D
 1 120 GCT ACC GAA CAA GAT CAT CTC GAT CTC AAA TAC CTO TGT CAA TGT TTT TGC ACA AGA GCT CCG GTAT TA
 A T E Q D H L D L K Y L C Q C F S T R A A V L
 1 260 ACT CTATAT AAA AAT CCA CCA CAT TTC CAT GAC ATT ATA ATG CCA ACA CTC CCA AAA CTT CTT GAA CCA
 T L Y K N H P H F H D I I M R T L P K L L E P
 1 330 GAT CCC TAC ACA TGT AAA GTA ATG TAT CA GAA GAT GGT AGT GGT ATA GGA CCA CCG TTA ATG CTT GCA
 D P Y T C K V M L S E D G S G I G A A L I A A
 1 400 GTG CCA GCG AAA GGT TCT GAA GGA GGT GCG GAA GAA GAT GGT GAT GAA GAA GGT GAT GAA GAA GGT GAT
 V A A E G S E G G G E E G G E E G G E E G G
 1 470 GAA GGA GGT GGT GAA GGT GAA GGT GAA GGT TAA TGATGATAAATTTTCTATATACCATTTGGGTATATATTTG
 E G G G E G E A E G *
 AATTCAACTGATTTGACATCTCTATAAATATTGTGTAACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

ATG: 起始密码子; *: 终止密码子。ATG: The start codon; *: the termination codon.

图1 沙葱萤叶甲己糖激酶的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of the hexokinase from *Galeruca daurica*

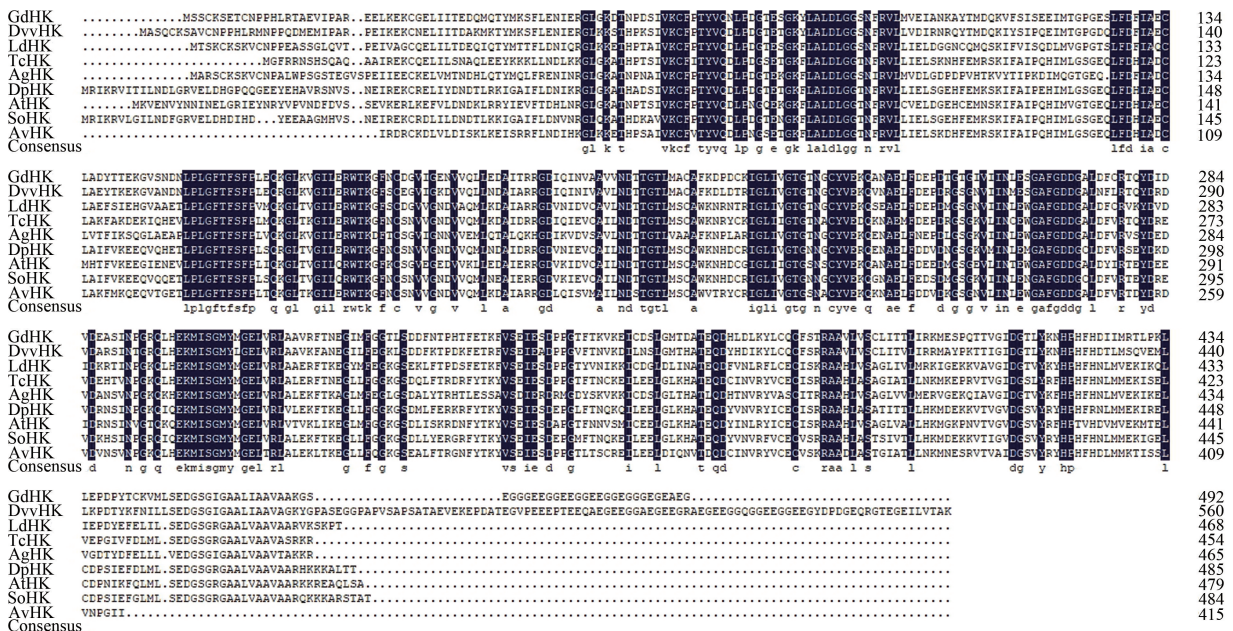


图2 沙葱萤叶甲与其它鞘翅目昆虫己糖激酶氨基酸序列的比对

Fig. 2 Amino acid sequence alignment of hexokinases from *Galeruca daurica* and other Coleopteran species

GdHK, Dvvhk, LdHK, TchK, AgHK, DpHK, AtHK, SoHK 和 AvHK: 沙葱萤叶甲、玉米根萤叶甲、马铃薯甲虫、赤拟谷盗、光肩星天牛、山松大小蠹、蜂箱奇露尾甲、米象和蓝舰拟步甲己糖激酶。Consensus: 共有序列。黑色阴影: 100% 一致性。GdHK, Dvvhk, LdHK, TchK, AgHK, DpHK, AtHK, SoHK, AvHK: Hexokinase from *Galeruca daurica*, *Diabrotica virgifera virgifera*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Tribolium castaneum*, *Anoplophora glabripennis*, *Dendroctonus ponderosae*, *Aethina tumida*, *Sitophilus oryzae*, *Asbolus verrucosus*. Consensus: consensus sequence. Black shadow: 100% identity.

2.3 沙葱萤叶甲己糖激酶的系统进化分析

沙葱萤叶甲己糖激酶首先与玉米根萤叶甲的己

糖激酶聚在一起,置信度为100;然后与光肩星天牛聚为一支;最后与马铃薯甲虫聚为一大分支(图3)。

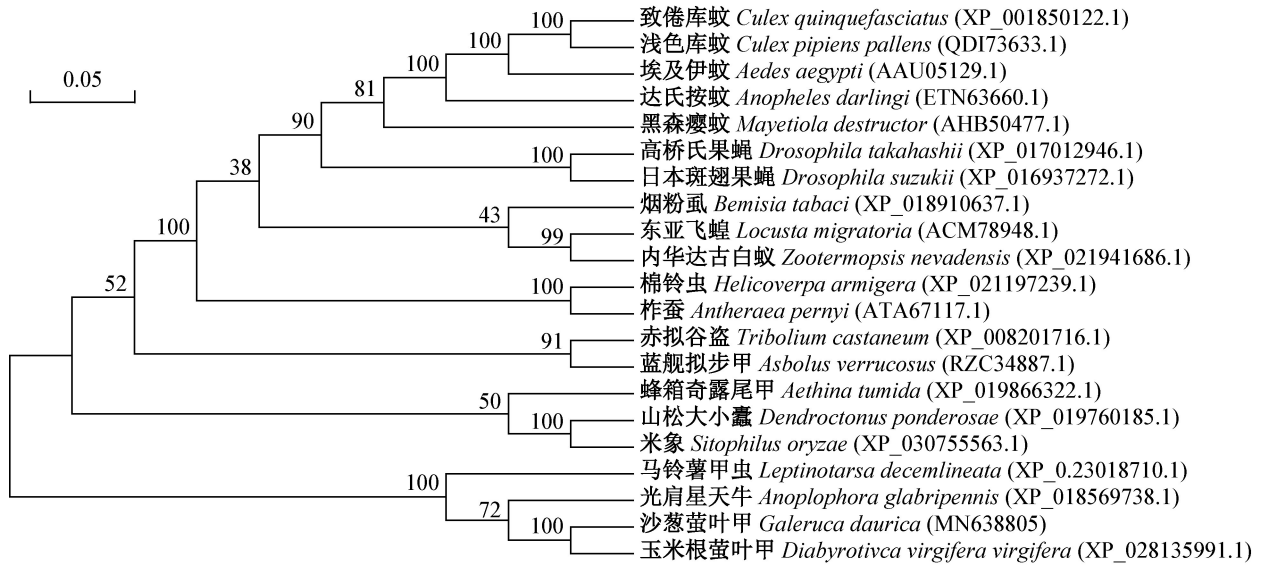


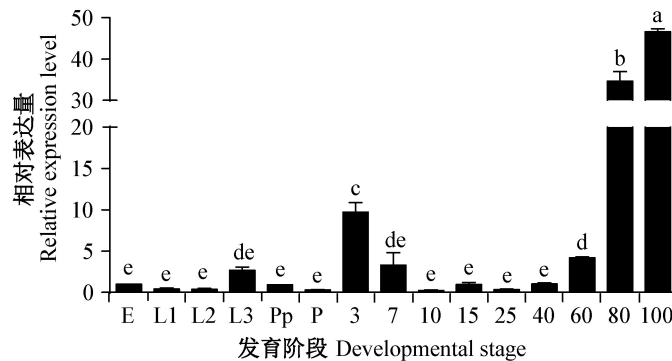
图3 基于己糖激酶氨基酸序列采用邻接法构建的沙葱萤叶甲及其它昆虫的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of hexokinases from *Galeruca daurica* and other insects based on amino acid sequences by neighbor-joining method

2.4 不同发育阶段中己糖激酶基因的表达

不同发育阶段沙葱萤叶甲己糖激酶基因均有表达且差异显著($P<0.05$)。在卵期、幼虫期、预蛹和蛹期相对表达量均较低,但之间差异不显著;成虫羽化后3 d己糖激酶基因相对表达量显著上升($P<0.05$),

约为卵期的10倍;羽化7 d后,成虫进入夏滞育,相对表达量显著下降($P<0.05$),然后在整个滞育期均维持在较低水平;羽化80 d后,滞育解除,相对表达量急剧上升至最高值,约为卵期的40~50倍(图4)。



E: 卵期; L1~L3: 1~3龄幼虫期; Pp: 预蛹期; P: 蛹期; 3~100: 成虫羽化天数。E: Egg stage; L1~L3: 1st-, 2nd-, 3rd-instar larva stage; Pp: pre-pupa stage; P: pupa stage; 3~100: days after adult eclosion.

图4 不同发育阶段沙葱萤叶甲己糖激酶基因的相对表达量

Fig. 4 Relative expression levels of the hexokinase gene of *Galeruca daurica* at different development stages

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 in the figure are mean±SE. Different letters indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

2.5 不同温度下沙葱萤叶甲己糖激酶基因的表达

在0~40℃范围内,随处理温度的升高沙葱萤叶甲成虫己糖激酶基因相对表达量呈先上升后下降的趋势变化,其中10~25℃时己糖激酶基因相对表达

量显著高于其它温度的己糖激酶基因相对表达量($P<0.05$);低于5℃或高于25℃时己糖激酶基因相对表达量显著下降($P<0.05$),但它们之间差异不显著(图5)。

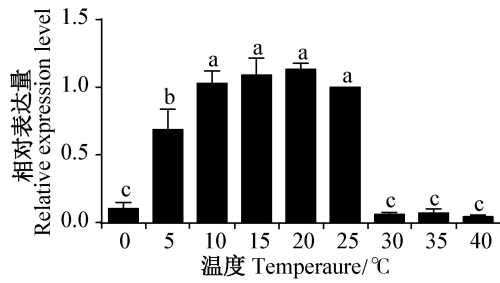


图5 不同温度下沙葱萤叶甲己糖激酶基因的相对表达量
Fig. 5 Relative expression levels of the hexokinase gene of *Galeruca daurica* at different temperatures

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 in the figure are mean±SE. Different letters indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

2.6 RNAi对沙葱萤叶甲己糖激酶基因的影响

己糖激酶基因对沙葱萤叶甲成虫的存活率有显

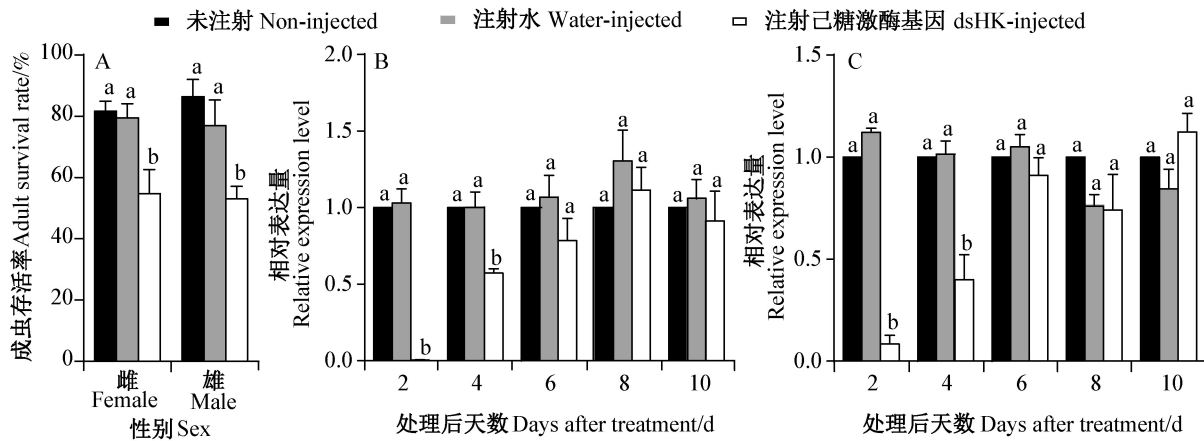


图6 RNA干扰对沙葱萤叶甲成虫存活率(A)及雌成虫(B)和雄成虫(C)中己糖激酶基因相对表达量的影响

Fig. 6 Effects of RNAi on adult survival rate (A) and relative expression levels of the hexokinase gene in the female (B) and male (C) adults of *Galeruca daurica*

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 in the figure are mean±SE. Different letters on the bars indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

3 讨论

根据沙葱萤叶甲转录组数据,本研究应用RACE技术克隆获得了沙葱萤叶甲己糖激酶的cDNA全长序列。氨基酸序列分析显示,沙葱萤叶甲己糖激酶与同属萤叶甲亚科的玉米根萤叶甲己糖激酶同源性最高,氨基酸序列一致性达65.42%,表明该蛋白在进化上比较保守。在其它昆虫中也获得了类似的结果(郭强等,2015;汝玉涛等,2017),这意味着不同昆虫的己糖激酶可能具有相似的功能。昆虫滞育主要特征之一是代谢水平降低,仅能维持滞育期间机体的存活,同时体内储存大量营养物质以供滞育解除后生长发育(Hahn & Denlinger, 2011)。己

糖激酶是葡萄糖代谢及能量产生的重要调节因子。Lin & Xu(2016)研究结果表明,与非滞育蛹相比,棉铃虫滞育蛹中蜕皮激素的水平显著降低,导致与Har-HK2启动子特异结合的转录因子上调表达,最终抑制Har-HK2基因表达并诱导进入滞育。本研究结果表明,己糖激酶基因在沙葱萤叶甲成虫夏滞育期间低水平表达,滞育解除后表达量急剧上升。在其它昆虫滞育研究中也获得了类似的结果,如葱蝇2个己糖激酶基因在夏滞育蛹中的表达水平明显低于非滞育蛹(郭强等,2015);柞蚕蛹解除滞育后,己糖激酶基因的表达水平明显上调,己糖激酶的活性也显著增加(汝玉涛等,2017)。因此,己糖激酶可

显著影响。注射沙葱萤叶甲己糖激酶基因的dsRNA 12 d后,沙葱萤叶甲雌、雄成虫的存活率分别为54.8%和53.0%,比空白对照分别显著降低了25.3%和26.6%($P<0.05$,图6-A)。RNAi能显著降低沙葱萤叶甲雌、雄成虫己糖激酶基因的相对表达量,且干扰效率至少持续4 d。与空白对照和阴性对照相比,RNAi处理2 d后,沙葱萤叶甲雌成虫体内己糖激酶基因相对表达量分别显著下降了96.2%和96.6%($P<0.05$),沙葱萤叶甲雄成虫体内己糖激酶基因分别显著下降了91.6%和92.5%($P<0.05$);RNAi处理4 d后,沙葱萤叶甲雌成虫体内己糖激酶基因相对表达量分别显著下降了42.8%和43.1%($P<0.05$),雄成虫体内己糖激酶基因分别显著下降了59.2%和60.1%($P<0.05$,图6-B~C)。

能在昆虫滞育中起着重要作用。

目前未见有关温度对己糖激酶基因表达影响的报道。本研究表明,温度对沙葱萤叶甲己糖激酶基因的表达有显著影响,温度高于25℃和低于5℃能显著抑制其表达,究其原因可能是高温和低温导致昆虫膜结构受损,己糖激酶基因表达量下调,己糖激酶含量或活性下降,但还需进一步验证。RNAi技术已成为昆虫学领域中基因功能研究的重要手段(Boerjan et al., 2011)。为进一步研究己糖激酶基因在沙葱萤叶甲生长发育及滞育的调控作用,本研究初步对该基因进行RNAi试验,结果表明注射沙葱萤叶甲己糖激酶基因的dsRNA后其靶基因己糖激酶基因表达量显著下调,雌、雄成虫的存活率显著降低。Ge et al.(2019)应用RNAi技术沉默己糖激酶基因在褐飞虱*Nilaparvata lugens*成虫中的表达,导致其成虫蛋白质合成和卵巢发育均受阻,产卵数量减少,可溶性糖含量降低,进一步证实己糖激酶通过调控葡萄糖代谢而参与褐飞虱的生长发育过程。敲低棉铃虫体内己糖激酶基因的表达,能够明显抑制其细胞增殖、代谢水平及蛹的发育,并引起活性氧积累从而导致进入滞育(Lin & Xu, 2016)。Pan et al.(2019)利用RNAi技术敲低了褐飞虱己糖激酶基因,导致海藻糖-6-磷酸合成酶、海藻糖酶、葡萄糖磷酸变位酶等与海藻糖代谢途径相关基因的显著下调,而沙葱萤叶甲夏滞育期间海藻糖酶基因上调表达且酶活性上升(陈龙等, 2018b)。因此,己糖激酶基因可能在沙葱萤叶甲生长发育及滞育过程中起着重要的调控作用。

沙葱萤叶甲成虫夏滞育为专性滞育,成虫羽化7 d左右即进入滞育,3个月左右才解除滞育,给研究工作带来很大困难。下一步将采用RNAi技术降低己糖激酶基因的表达,观察沙葱萤叶甲成虫是否提前进入滞育,或者通过调控以己糖激酶基因为靶基因的微小RNA,从而验证该基因在沙葱萤叶甲成虫夏滞育中的作用。

参 考 文 献 (References)

- BOERJAN B, TOBBACK J, DE LOOF A, SCHOOF L, HUYBRECHTS R. 2011. Fruitless RNAi knockdown in males interferes with copulation success in *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(5): 340–347
- CHEN L, TAN Y, ZHOU XR, PANG BP, SHAN YM, ZHANG ZR. 2019. Molecular cloning, characterization and expression analysis of the heat shock protein gene *GdHsp10a* in *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Plant Protection*, 46(2): 417–424 (in Chinese) [陈龙, 谭瑶, 周晓榕, 庞保平, 单艳敏, 张卓然. 2019. 沙葱萤叶甲热激蛋白基因 *GdHsp10a* 的克隆、分子特征与表达分析. *植物保护学报*, 46(2): 417–424]
- CHEN L, TAN Y, ZHOU XR, PANG BP, GEXIGEDUREN, SUN ZP. 2018b. Molecular cloning, molecular properties and expression analysis of trehalase gene *GdTrel* in *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Acta Entomologica Sinica*, 61(3): 271–281 (in Chinese) [陈龙, 谭瑶, 周晓榕, 庞保平, 格希格都仁, 孙志鹏. 2018b. 沙葱萤叶甲海藻糖酶基因 *GdTrel* 的克隆、分子特性和表达分析. *昆虫学报*, 61(3): 271–281]
- CHEN L, ZHOU XR, GAO LJ, TAN Y, PANG BP. 2018a. Change of carbohydrate, protein and lipid contents in *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae) adults during overwintering. *Acta Entomologica Sinica*, 61(7): 808–814 (in Chinese) [陈龙, 周晓榕, 高利军, 谭瑶, 庞保平. 2018a. 沙葱萤叶甲成虫越冬期间糖类、蛋白及脂肪含量的变化. *昆虫学报*, 61(7): 808–814]
- CHENG WN, LI XL, LI YP, LI JJ, WU JX. 2009. Activities of four sugar metabolic enzymes in *Sitodiplosis mosellana* (Gehin) (Diptera: Cecidomyiidae) larvae at different diapause stages. *Acta Entomologica Sinica*, 52(2): 133–139 (in Chinese) [成卫宁, 李修炼, 李怡萍, 李建军, 仵均祥. 2009. 麦红吸浆虫不同滞育期四种糖代谢酶活力分析. *昆虫学报*, 52(2): 133–139]
- GE LQ, GU HT, LI X, ZHENG S, ZHOU Z, MIAO H, WU JC. 2019. Silencing of triazophos-induced hexokinase-1-like reduces fecundity in *Nilaparvata lugens* (Stål) (Hemiptera: Delphacidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 153: 176–184
- GUO Q, CHEN B, FU DY, REN S, SI FL, HAO YJ. 2015. Identification, characterization of hexokinase genes in *Delia antiqua* and expression analysis during the diapause periods. *Journal of Chongqing Normal University (Natural Science Edition)*, 32(6): 28–34 (in Chinese) [郭强, 陈斌, 付丹影, 任爽, 司凤玲, 郝友进. 2015. 葱蝇己糖激酶基因的鉴定、特征分析及在滞育期的表达分析. *重庆师范大学学报(自然科学版)*, 32(6): 28–34]
- HAHN DA, DENLINGER DL. 2011. Energetics of insect diapause. *Annual Review of Entomology*, 56: 103–121
- HAO X, ZHOU XR, PANG BP, ZHANG ZR, BAO X. 2015. Morphological and biological characteristics of *Galeruca daurica* Joannis (Coleoptera: Chrysomelidae). *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]
- KANG DS, COTTON MA, DENLINGER DL, SIM C. 2016. Comparative transcriptomics reveals key gene expression differences between diapausing and non-diapausing adults of *Culex pipiens*. *PLoS ONE*, 11(4): e0154892
- LIN XW, XU WH. 2016. Hexokinase is a key regulator of energy metabolism and ROS activity in insect lifespan extension. *Aging*, 8(2): 245–258
- LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method. *Methods*, 25(4): 402–408
- LU B, TAN Y, ZHOU XR, XING L, PANG BP. 2017. Molecular cloning

- ing of trehalose-6-phosphate synthase gene *GdTPS* and its response to temperature stress in *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Acta Entomologica Sinica*, 60(12): 1384–1393 (in Chinese) [路标, 谭瑶, 周晓榕, 邢莉, 庞保平. 2017. 沙葱萤叶甲海藻糖合成酶基因 *GdTPS* 的克隆及对温度胁迫的响应. *昆虫学报*, 60(12): 1384–1393]
- LU B, ZHOU XR, PANG BP, DONG RW, NABUQIYA, NAREN-MANDUHU. 2019. Molecular cloning and prokaryotic expression of trehalose-6-phosphate phosphatase gene *GdTPP* in *Galeruca daurica*, and its response to temperature stress. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 56(2): 253–262 (in Chinese) [路标, 周晓榕, 庞保平, 董瑞文, 娜布奇亚, 那仁满都呼. 2019. 沙葱萤叶甲海藻糖磷酸酶基因 *GdTPP* 的克隆、原核表达及对温度胁迫的响应. *应用昆虫学报*, 56(2): 253–262]
- MA HY, ZHOU XR, TAN Y, PANG BP. 2019. Proteomic analysis of adult *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae) at different stages during summer diapause. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part D*, 29: 351–357
- PAN BY, LI GY, WU Y, ZHOU ZS, ZHOU M, LI C. 2019. Glucose utilization in the regulation of chitin synthesis in brown planthopper. *Journal of Insect Science*, 19(5): 3
- RU YT, WANG Y, WANG DY, ZHOU JL, ZENG J, ZHU XW, JANG YR, QIN L. 2017. Tissue-specific expression and enzyme activity variations of *Antheraea pernyi* hexokinase genes during diapause termination and pupa development. *Science of Sericulture*, 43(5): 773–781 (in Chinese) [汝玉涛, 王勇, 王德意, 周敬林, 曾军, 朱绪伟, 姜义仁, 秦利. 2017. 柞蚕己糖激酶基因的组织表达特征及在解除滞育和蛹发育期的表达与酶活性变化. *蚕业科学*, 43(5): 773–781]
- TAN Y, ZHOU XR, PANG BP. 2017. Reference gene selection and evaluation for expression analysis using qRT-PCR in *Galeruca daurica* (Joannis). *Bulletin of Entomological Research*, 107(3): 359–368
- TEETS NM, DENLINGER DL. 2014. Surviving in a frozen desert: environmental stress physiology of terrestrial Antarctic arthropods. *Journal of Experimental Biology*, 217: 84–93
- TU XB, WANG J, HAO K, WHITMAN DW, FAN YL, CAO GC, ZHANG ZH. 2015. Transcriptomic and proteomic analysis of pre-diapause and non-diapause eggs of migratory locust, *Locusta migratoria* L. (Orthoptera: Acridoidea). *Scientific Reports*, 5: 11402
- WILSON JE. 1997. An introduction to the isoenzymes of mammalian hexokinase types I-III. *Biochemical Society Transactions*, 25(1): 103–107
- ZHANG HZ, LI YY, AN T, HUANG FX, WANG MQ, LIU CX, MAO JJ, ZHANG LS. 2018. Comparative transcriptome and iTRAQ proteome analyses reveal the mechanisms of diapause in *Aphis gifuensis* Ashmead (Hymenoptera: Aphididae). *Frontiers in Physiology*, 9: 1697
- ZHANG SY, QIN HW, REN FS, LIU TL, CHEN ZZ, MEN XY, YU Y, XU YY, LI LL. 2015. Activity changes of five metabolic enzymes in *Carposina sasakii* Matsumura during diapause. *Shandong Agricultural Sciences*, 47(6): 97–100 (in Chinese) [张顺益, 秦华伟, 任凤山, 刘廷利, 陈珍珍, 门兴元, 于毅, 许永玉, 李丽莉. 2015. 桃小食心虫滞育过程中5种代谢酶活力变化. *山东农业科学*, 47(6): 97–100]
- 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:张俊芳)