

## 白蜡虫热激蛋白基因在低温胁迫下的表达分析

刘魏魏, 杨璞, 陈晓鸣\*

(中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 国家林业局资源昆虫培育与利用重点实验室, 云南昆明 650224)

**摘要:**白蜡虫对低温的高度耐受性对其生存、繁殖及白蜡生产都至关重要。为探讨低温胁迫对白蜡虫 *hsp* 表达的影响, 采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR), 对白蜡虫二龄雄虫在低温胁迫下 7 个不同的 *hsps* (*hsp21.5*, *hsp21.7*, *hsp40*, *hsp60*, *hsp70*, *hsc70*, *hsp90*) 的基因表达情况进行了检测。结果发现, 除 *hsc70* 外, 其余 *hsps* 均能被低温不同程度地诱导, 其中 *hsp70*、*hsp21.7* 和 *hsp90* 的上调量十分显著。说明多数 *hsps* 都与白蜡虫幼虫应对低温胁迫相关。

**关键词:** *hsp*, 白蜡虫, 低温胁迫, 荧光定量

中图分类号: S899.1

文献标识码: A

## Expression Analysis of Heat Shock Protein Genes in *Ericerus pela* under Cold Stress

LIU Wei-wei, YANG Pu, CHEN Xiao-ming

(Research Institute of Resource Insects, Chinese Academy of Forestry; Key Laboratory of Cultivating and Utilization of Resources Insects of State Forestry Administration, Kunming 650224, Yunnan, China)

**Abstract:** The strong tolerance to low temperatures is critical to the survival, reproduction and wax production of *Ericerus pela*. To investigate the effects of cold stress on heat shock protein (*hsp*) expression in *Ericerus pela*, the transcriptional expression pattern of 7 *hsps* (*hsp21.5*, *hsp21.7*, *hsp40*, *hsp60*, *hsp70*, *hsc70*, and *hsp90*) in second-instar male larvae was examined by quantitative real time PCR (qRT-PCR). The results showed that all the *hsps* were inducible by cold stress except *hsc70*. The expression of *hsp21.7*, *hsp70* and *hsp90* were drastically up-regulated. The results indicated that many *hsps* correlate with cold-stress tolerance in *Ericerus pela*.

**Key words:** *hsp*, *Ericerus pela*, cold stress, real time PCR

热激蛋白(Heat shock protein, Hsp)是一类生物体在受到高温等逆境胁迫后大量表达的蛋白,是机体自我保护的物质基础。Hsp 作为分子伴侣,在促进蛋白质正确折叠/重折叠,防止变性蛋白的聚集,降解错误折叠或凝集的蛋白质,蛋白质的运输和组装中起重要作用<sup>[1]</sup>。多种不同的胁迫,如化学物质,重金属,紫外线,病原物侵入,均可诱导生物体产生 Hsp<sup>[2-5]</sup>。Hsp 普遍存在于原核和真核生物中<sup>[6-8]</sup>,分子量从几千道尔顿到几十万道尔顿不等,进化上

高度保守、分布广泛且呈多家族、多成员的特点,这表明它在细胞功能中的重要性和作用机理的复杂性。对昆虫 Hsp 产生、变化的研究,有助于掌握昆虫的生长发育与各影响因子变化之间的规律。但在 Hsp 与昆虫温度耐受性的研究中,大部分报道集中在 Hsp 与昆虫高温胁迫的关系方面,而对 Hsp 在昆虫应对低温胁迫中的作用研究不多。

白蜡虫 (*Ericerus pela* Chavanness), 属半翅目

收稿日期: 2013-05-05

基金项目: 国家林业公益性行业科研专项(201304808)、国家自然科学基金青年基金(31000983)、云南省应用基础研究基金(2010ZC235)和中国林科院资源昆虫研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(riricaf200904M-3, riricaf2011006M)资助

作者简介: 刘魏魏(1990—), 硕士研究生, 从事资源昆虫分子生物学研究, E-mail: liuwsk@163.com

\* 通讯作者

(Hemiptera) 蚧总科(Coccoidea) 白蜡蚧属(*Ericerus*), 是我国一种具有重要经济价值的资源昆虫。广泛分布于 18°N 到 42°N, 覆盖亚热带, 暖温带, 温带地区。在长春, 最低气温低于 -30℃, 最低月平均气温约 -13℃, 白蜡虫仍可以生存和繁衍后代<sup>[9]</sup>。与大多数昆虫相比, 白蜡虫具有更强的生态适应性和环境可塑性。白蜡虫对极端低温的高度耐受性对其在不同气候带中能否稳定建立和进一步扩大种群, 以及白蜡生产都是非常重要的, 并且还提供了一种研究昆虫对低温胁迫适应性机制的材料<sup>[10-11]</sup>。目前, 对白蜡虫的大部分研究都集中在白蜡生产及相关生态学<sup>[12-13]</sup>, 而其对极端温度适应性的分子机制尚未研究。鉴于 Hsp 在许多昆虫应对不利环境中都起着重要作用, 推测 Hsp 也可能参与白蜡虫的温度适应性。因此, 在本实验室所构建的白蜡虫转录组中 7 个不同的 *hsps* (*hsp21.5*, *hsp21.7*, *hsp40*, *hsp60*, *hsp70*, *hsc70*, *hsp90*) 基因核心序列的基础上, 采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法, 对白蜡虫在低温胁迫下 Hsp 基因表达情况进行了检测。研究结果将有助于了解 Hsp 在白蜡虫对抗逆境胁迫中的作用机制, 进一步从分子水平上理解白蜡虫的适应性和种群多样性, 为研究其它昆虫应对温度胁迫的分子机制提供重要参考。

## 1 实验材料和方法

### 1.1 供试昆虫

因为二龄期为白蜡虫雄虫发育中寿命最长的时期, 因此, 本实验所用白蜡虫为二龄雄虫。采自昆明资源昆虫研究所人工大棚 (102.73°E, 25.04°N) 内女贞树上, 经查阅、参考大量相关文献, 并分析白蜡虫具体的温度耐受性特点后, 将低温处理设置为 5 ~ -20℃, 5℃ 为一个温度梯度。

### 1.2 试虫的低温处理

将女贞树枝条上的二龄雄虫剪下, 装入 10 mL 离心管, 放于冰箱中, 分别进行 5℃、0℃、-5℃、-10℃、-15℃、-20℃ 的低温处理 1 h。以置于 25℃ 的白蜡虫为对照。将每个处理后的白蜡虫从枝条上剥离, 分别装入 1.5 mL 离心管中, 每管虫体 50 ~ 100 mg。用 DEPC 处理水漂洗虫体 3 遍, 吸水纸吸干后加入 1 mL TRIzol 试剂, 将虫体研磨成匀浆后, 用 Parafilm 封口膜封住管口, 振荡混匀, 保存于 -70℃ 超低温冰箱以备提取 RNA。

### 1.3 白蜡虫总 RNA 的提取、定量及 cDNA 的合成

按照 TRIzol (Invitrogen, 美国) 试剂的使用说明

提取白蜡虫二龄雄虫的总 RNA, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 并用 BIONANO 超微量紫外可见分光光度计 (Thermo Scientific, 上海) 测定其浓度和纯度。

将每个温度处理的总 RNA 浓度用 DEPC 水稀释至相同浓度。

将 RNA 浓度定量后, 所有处理均取相同量的总 RNA, 按照 qRT-PCR 的 M-MLV 第一链合成系统试剂盒 (Invitrogen, 美国) 的操作说明, 反转录 cDNA 第一链。

### 1.4 引物的设计与合成

在本实验室构建的白蜡虫转录组 *hsp* 基因核心序列的基础上, 采用 Primer Premier 5 (version 5.00) 软件设计各个 *hsp* 以及内参基因  $\beta$ -actin 的荧光定量引物, 如表 1 所示, 引物的合成委托南京金斯瑞生物技术有限公司。

表 1 荧光定量引物

基因	5'→3'	引物序列
<i>hsp21.5</i>	F	GATAACGAGTTCAGCAGCAT
	R	TGGATACGGTATTTGAGGTG
<i>hsp21.7</i>	F	GCCAAATTCACACGTCGTTAC
	R	CGGAGCAACAATCGATAGGA
<i>hsp40</i>	F	GCCACATTTGCCCAATTCTT
	R	CCACCCAATCCAATATCGTC
<i>hsp60</i>	F	TTGCGAATAACACGAACGAG
	R	TGGATTGGCTCCTTTACTGAT
<i>hsp70</i>	F	CTCGTGGTATCCCTCAAATC
	R	CCTCCTTTGACAGTCTTCCCT
<i>hsc70</i>	F	ACGGTATTTTGAATGTGAGT
	R	TCTTCAACGGTGCTCTTCAT
<i>hsp90</i>	F	CGTGCGTGTATTTCATT
	R	CTTCGTGGATGCCCAACTT
$\beta$ -actin	F	CCACGAGACGACCTACAAT
	R	CGATCCATACGGAGTACT

### 1.5 荧光定量

在 CFX96 实时定量 PCR 仪 (Bio-Rad, 美国) 上进行相对定量。每个样品重复 3 次。反应体系为 20  $\mu$ L: SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad, 美国) 10  $\mu$ L, 正向、反向引物 (20  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 各 1  $\mu$ L, cDNA 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 6  $\mu$ L。反应程序为: 95℃ 3 min; 95℃ 10 s, 55℃ 20 s, 读板记录 C<sub>T</sub> 值, 40 个循环。反应完成后, 系统在 65℃ ~ 95℃, 每次升温 0.5℃, 生成熔解曲线。

### 1.6 数据分析

采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>T</sub></sup> 法<sup>[14]</sup>, 以白蜡虫的  $\beta$ -actin 为内参基因, 计算每个 *hsp* mRNA 相对含量。采用 DPS 数据处理软件, LSD 法 (least significant difference, 最小显

著差法),在  $P < 0.01$  的水平进行差异显著性分析<sup>[15]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 白蜡虫总 RNA 的质量

将提取的白蜡虫总 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳后显示出 18S、28S 两条明亮清晰、无弥散的条带,且点样孔无残留。超微量紫外可见分光光度计检测表明总 RNA 样品的  $A_{260}/A_{280}$  比值在 1.8~2.0 之间。说明提取的白蜡虫总 RNA 完整性好、纯度高,可以用于后续实验。

### 2.2 低温胁迫下白蜡虫二龄雄虫 *hsp*s 基因表达变化

白蜡虫的 *hsp* 和  $\beta$ -actin 荧光定量 PCR 反应的融解曲线均呈单峰,说明产物单一,为特异性扩增。

荧光定量 PCR 结果显示,除 *hsc70* 外,其它 6 个 *hsp*s 在白蜡虫应对低温胁迫时,与对照组(25℃)相比,均有显著差异( $P < 0.01$ )。其中 *hsp70*、*hsp21.7* 和 *hsp90* 的 mRNA 的上调量十分显著,*hsp70*、*hsp21.7* 在 -10℃ 的上调量最大,分别是对照组的 80.70 和 58.05 倍;*hsp90* 在 -15℃ 时增加最多,是对照组的 11.69 倍。*hsp40*、*hsp60* 和 *hsp21.5* mRNA 表达量也有显著增加,其中 *hsp40* 和 *hsp60* 在 -10℃ 时,分别有 4.88 和 2.64 倍的增加量;*hsp21.5* 在 -15℃ 时上调最大,为 1.94 倍。而 *hsc70* 在白蜡虫二龄雄虫的低温胁迫中是下调表达的,不能被低温诱导(图 1)。

## 3 讨论

在白蜡虫二龄雄虫中,除 *hsc70* 外,其它 6 个 *hsp*s 均能被低温不同程度地诱导,其中 *hsp21.7*、*hsp70* 和 *hsp90* 在白蜡虫应对低温胁迫中尤为敏感。在其它的许多昆虫中,也有与此一致的结果。例如,在两种斑潜蝇 *Liriomyza huidobrensis* 和 *Liriomyza sativae* 中,*hsp90*、*hsp70*、*hsp40* 和 *hsp20* 均既能被高温和低温所诱导,其中 *hsp70* 和 *hsp20* 对温度比其它家族更为敏感<sup>[16-17]</sup>。对烟粉虱 *Bemisia tabaci* 的高温耐受性与 *Hsp* 基因的研究发现,*hsp20* 和 *hsp70* 在烟粉虱的高温耐受中起着关键作用<sup>[18]</sup>。*hsp90* 在蒲氏钩蛾 *Thitarodes pui* 的低温胁迫中发挥重要作用<sup>[19]</sup>。

本实验所检测的白蜡虫 *hsp70* 是典型的胞质诱导型 *hsp70*(*hsp70*),大部分 *hsp70* 是没有内含子的,白蜡虫 *hsp21.7* 为物种特异性 *shsp*,物种特异性 *shsp* 大多也无内含子<sup>[20]</sup>。这种无内含子的结构可使白

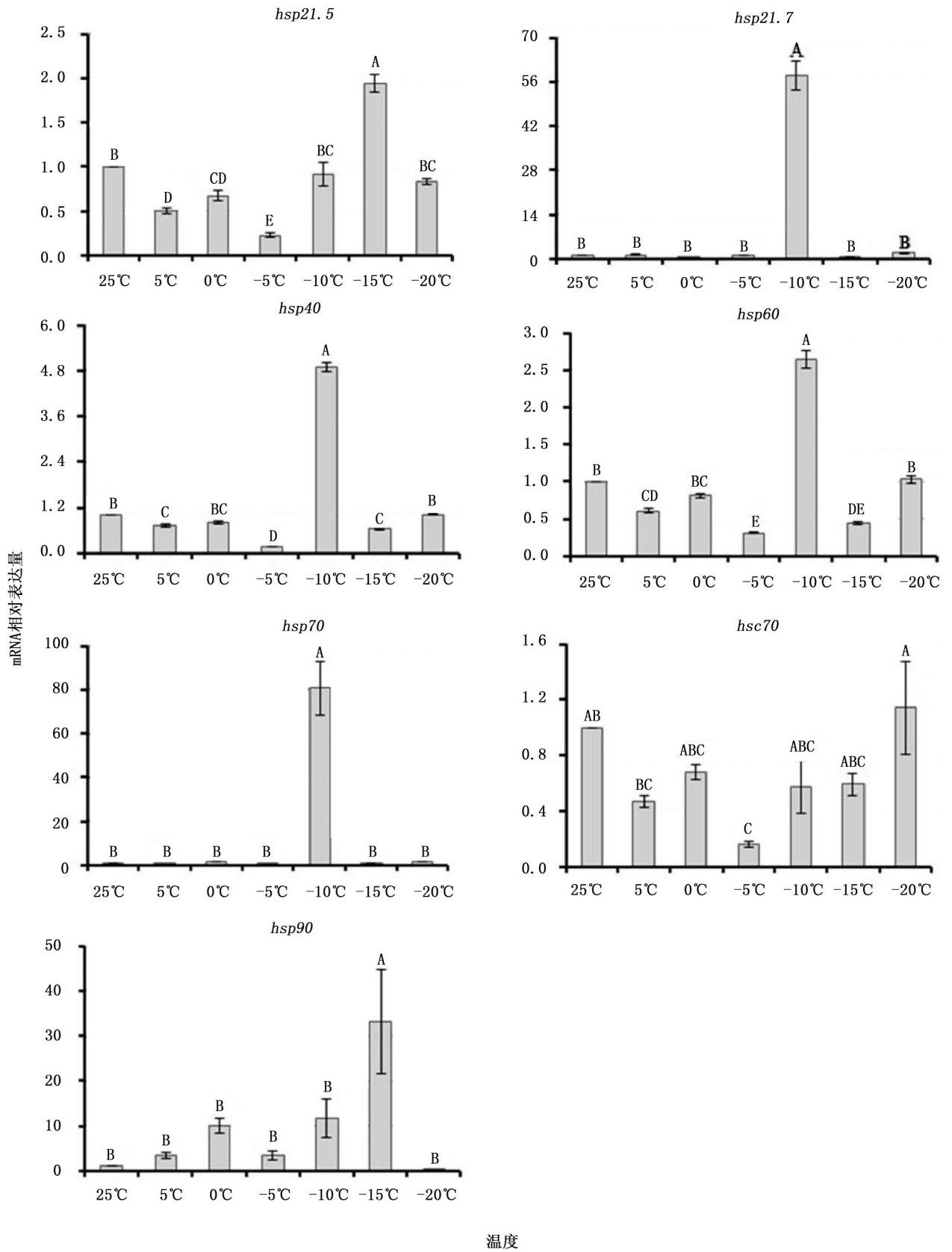
蜡虫 *hsp21.7* 和 *hsp70* 在胁迫应答中无需进行 mRNA 的拼接,转录一旦启动,便能产生成熟的 mRNA,从而能够进行快速转录,优先翻译,防止应激原对其 mRNA 前体的影响,使之能在细胞内快速地选择性积聚,以便在应对各种不利的环境刺激时发挥重要作用。在本研究中,*hsp90* 也能被低温胁迫显著诱导,推测此白蜡虫 *hsp90* 也是诱导型 *hsp*,无内含子,但还需对其做全长克隆等进一步的研究。

本实验所检测的白蜡虫 *hsc70* 为胞质组成型 *hsp70*(*hsc70*)<sup>[20]</sup>,相比 *hsp70*,*hsc70* 基因有内含子,在许多昆虫中是组成型表达的,在受胁迫时没有显著改变<sup>[21]</sup>。如在嗜眠摇蚊 *Polypedilum vanderplanki* 和谷实夜蛾 *Helicoverpa zea* 中,*hsc70* 不能被热激诱导<sup>[22-23]</sup>;在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 和二化螟 *Chilo suppressalis* 中,*hsc70* 不能被低温诱导<sup>[24-25]</sup>,本实验有与此相似的结果。

白蜡虫 *hsp21.5* 为同源性 *shsp*<sup>[20]</sup>,同源性 *shsp* 在序列、基因结构和功能方面都高度保守,且至少有 1 个内含子。它们在生物体中是组成型表达,不被环境胁迫所诱导,但参与机体的基础代谢过程<sup>[26]</sup>。如家蚕 *Bombyx mori* 中的同源性 *shsp* *bm21.4* 在常温下为组成型表达,不能被热激诱导<sup>[27]</sup>。而本实验中,*hsp21.5* 白蜡虫二龄雄虫应对低温胁迫中显著增多,这可能是白蜡虫应对极端温度的一种保护性应答。

白蜡虫 *hsp40* 和 *hsp60* 均能被低温胁迫所诱导。目前有关昆虫 *hsp60* 的研究,以线粒体 *hsp60* 居多<sup>[28,22]</sup>。*hsp60* 在线粒体中比在胞质中的含量丰富,本实验中的 *ep-hsp60* 片段,经过 Blastx 比对,发现也是线粒体 *hsp60*。对昆虫 *hsp40* 家族的报道比其它 *hsp* 家族成员相对较少,因此昆虫的 *hsp40* 有待进一步的研究。

总之,多数昆虫在自然生存条件下都会遭遇低温的胁迫,白蜡虫作为一种重要的经济昆虫,分布广泛,由于引种和人为干扰因素,实验室白蜡虫会出现发育不整齐的现象,实验室培育的白蜡虫一些个体 2 月份进入二龄幼虫,4 月进入成虫期,因此也会面临低温胁迫,作为机体在各种胁迫条件下诱导合成的 *hsp* 是当今生物抗逆生理学研究的一个重要内容。本研究检测了 5 个 *hsp* 家族的 7 个 *hsp* 成员在白蜡虫二龄雄虫低温胁迫中的表达动态,结果将有助于进一步了解白蜡虫幼虫及其它昆虫温度适应的分子机制。



注:字母表示与对照(25°C)相比差异达极显著水平( $P < 0.01$ )。

图1 低温胁迫对白蜡虫二龄雄虫 *hsps* 表达的影响

## 参考文献:

- [1] Gething M J, Sambrook J. Protein folding in the cell [J]. *Nature*, 1992, 355: 33–45
- [2] Planelló R, Herrero O, Martínez-Guitarte J L, *et al.* Comparative effects of butyl benzyl phthalate (BBP) and di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on the aquatic larvae of *Chironomus riparius* based on gene expression assays related to the endocrine system, the stress response and ribosomes [J]. *Aquatic Toxicology*, 2011, 105: 62–70
- [3] Zhang Z, Zhang Q. Molecular cloning, characterization and expression of heat shock protein 70 gene from the oyster *Crassostrea hongkongensis* responding to thermal stress and exposure of  $\text{Cu}^{2+}$  and malachite green [J]. *Gene*, 2012, 497: 172–180
- [4] Sang W, Ma W H, Qiu L, *et al.* The involvement of heat shock protein and cytochrome P450 genes in response to UV-A exposure in the beetle *Tribolium castaneum* [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2012, 58: 830–836
- [5] Burke G R, Moran N A. Responses of the pea aphid transcriptome to infection by facultative symbionts [J]. *Insect Molecular Biology*, 2011, 20: 357–365
- [6] Kanagasabai R, Krishnamurthy K, Druhan L J, *et al.* Forced expression of heat shock protein 27 (Hsp27) reverses P-glycoprotein (ABCBI)-mediated drug efflux and MDR1 gene expression in Adriamycin-resistant human breast cancer cells [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286: 33289–33300
- [7] Baruah K, Norouzzitallab P, Shihao L, *et al.* Feeding truncated heat shock protein 70s protect *Artemia franciscana* against virulent *Vibrio campbellii* challenge [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34 (1): 183–191
- [8] Tamayo D, Muñoz J F, Torres I, *et al.* Involvement of the 90 kDa heat shock protein during adaptation of *Paracoccidioides brasiliensis* to different environmental conditions [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2013, 51: 34–41
- [9] 王志明, 许晓明. 长春市一新外来入侵物种—白蜡虫的生物学特性与种群控制研究 [J]. *吉林农业大学学报*, 2006, 28 (2): 152–154
- [10] Lalouette L, Williams C, Hervant F, *et al.* Metabolic rate and oxidative stress in insects exposed to low temperature thermal fluctuations [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2011, 158: 229–234
- [11] Dunning L T, Dennis A B, Park D C, *et al.* Identification of cold-responsive genes in a New Zealand alpine stick insect using RNA-Seq [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2012, 8: 24–31
- [12] 焦 懿, 赵 萍. 白蜡虫泌蜡期天敌群落的研究 [J]. *生态学报*, 1999, 19 (5): 732–736
- [13] 陈晓鸣, 王自力, 陈 勇, 等. 白蜡虫同地产虫产蜡生产模式构建与分析 [J]. *林业科学*, 2010, 12: 106–113
- [14] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  method [J]. *Methods*, 2001, 25: 402–408
- [15] 唐启义, 冯明光. DPS 数据处理系统—实验设计、统计分析及数据挖掘 [M]. 北京: 科学出版社, 2010: 82–84
- [16] Huang L H, Chen B, Kang L. Impact of mild temperature hardening on thermotolerance, fecundity, and Hsp gene expression in *Liriomyza huidobrensis* [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2007a, 53 (2): 1199–1205
- [17] Huang L H, Kang L. Cloning and interspecific altered expression of heat shock protein genes in two leafminer species in response to thermal stress [J]. *Insect Molecular Biology*, 2007b, 16 (4): 491–500
- [18] 吕志创. 高温热激下雌雄 B 型烟粉虱差异表达基因的筛选和 Hsps 基因功能的鉴定 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2008
- [19] Zou Z W, Sun Z X, Li J F, *et al.* Molecular cloning and characterization of two heat shock proteins in *Thitarodes pui* (Lepidoptera: Hepialidae) [J]. *Cryoletters*, 2011, 32 (3): 225–239
- [20] Liu W W, Yang P, Chen X M, *et al.* Cloning and expression analysis of four heat shock protein genes in the Chinese white wax scale insect, *Ericerus pela* [J]. *Journal of Insect science*, 2013, (待发表)
- [21] Kostal V, Tollarova – Borovanska M. The 70 kDa heat shock protein assists during the repair of chilling injury in the insect, *Pyrrhocoris apterus* [J]. *PLoS ONE*, 2009, 4 (2): e4546
- [22] Gusev O, Cornette R, Kikawada T, *et al.* Expression of heat shock protein-coding genes associated with anhydrobiosis in an African chironomid *Polypedilum vanderplanki* [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2011, 16: 81–90
- [23] Zhang Q R, Denlinger D L. 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]. *Journal of Insect Physiology*, 2010, 56 (2): 138–150
- [24] Colinet H, Lee S F, Hoffmann A. Temporal expression of heat shock genes during cold stress and recovery from chill coma in adult *Drosophila melanogaster* [J]. *FEBS Journal*, 2010, 277: 174–185
- [25] Sonoda S, Fukumoto K, Izumi Y, *et al.* Cloning of heat shock protein genes (*hsp90* and *hsc70*) and their expression during larval diapause and cold tolerance acquisition in the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2006, 63 (1): 36–47
- [26] Li Z W, Li X, Yu Q Y, *et al.* The small heat shock protein (sHSP) genes in the silkworm, *Bombyx mori*, and comparative analysis with other insect sHSP genes [J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2009, 9: 215–224
- [27] Sakano D, Li B, Xia Q, *et al.* Genes encoding small heat shock proteins of the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2006, 70 (10): 2443–2450
- [28] Cui Y D, Du1a Y Z, Lu M X, *et al.* Cloning of the heat shock protein 60 gene from the stem borer, *Chilo suppressalis*, and analysis of expression characteristics under heat stress [J]. *Journal of Insect Science*, 2010, 10: 1–13