

肚倍蚜 LAC-1 基因 cDNA 的克隆及序列分析

李 芒 雷朝亮

华中农业大学植物科学技术学院/湖北省昆虫资源利用与害虫可持续治理重点实验室, 武汉 430070

摘要 利用反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)和快速扩增 cDNA 末端(RACE)技术扩增得到肚倍蚜体内的 1 型漆酶基因(LAC-1)。基因全长为 2 327 bp 包含 1 773 bp 的完整开放阅读框(ORF), 5' 和 3' 末端非翻译区域(UTR)分别为 449 bp 和 105 bp。根据序列推导出该基因由 591 个氨基酸残基构成, 理论分子质量约为 67 ku, 等电点为 6.31, 该序列具有 4 个氨基酸保守区: HWHGHH、THFWHSH、HPFHLHGH 和 WLFHCHIEFH。系统发育分析表明, 扩增出的基因与其他昆虫 LAC 基因有较高的同源性。

关键词 肚倍蚜; 漆酶; cDNA 克隆; 序列分析

中图分类号 Q 915 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)03-0312-06

漆酶(EC 1. 10. 3. 2 Laccase)是一种多酚氧化酶, 广泛分布于真菌、高等植物、少量细菌和昆虫中^[1-2]。漆酶是一种典型含铜糖蛋白, 其催化氧化机理主要表现在底物自由基的生成和漆酶分子中 4 个铜离子的协同作用^[3]。漆酶作用机理复杂, 可以用于不同类型的底物达 250 种^[4]。研究表明, 漆酶作用方式不仅仅局限于简单的氧化作用, 漆酶在木质素降解、真菌色素合成以及酚类化合物的聚合过程中也发挥着重要作用^[5-7]。

早期研究发现, 漆酶存在于一些昆虫的表皮中^[8-9], 并可能参与昆虫表皮硬化作用。近年来, 随着分子生物学研究的发展, 漆酶基因已在一些昆虫中成功克隆^[10-12]。漆酶基因主要分为 1 型(LAC-1)和 2 型(LAC-2)。2 种漆酶基因在昆虫的不同组织存在着表达差异: 2 型漆酶主要分布于昆虫的表皮组织, Arakane 等^[12]用 RNA 干扰(RNAi)技术证实 2 型 LAC 参与赤拟谷盗的表皮鞣化作用; 而 1 型 LAC 基因多表达于昆虫的中肠、马氏管和脂肪体中, 并与氧化昆虫食物中的毒性物质有关^[11]。

肚倍蚜(*Kaburagia rhusicola* Takagi)是我国的一种重要经济昆虫, 属转主寄生蚜虫, 需在冬寄主薜和夏寄主树上转移寄生才能完成其生活史^[13-14]。肚倍蚜寄生在夏寄主青麸杨(*Rhus potaninii* Maxim)复叶上产生肚倍^[15], 并在肚倍内大量繁殖。肚

倍的成分十分特殊, 其单宁含量为 70% 左右^[16]。一般来说, 单宁对昆虫具有负面作用, 能显著影响昆虫的生长发育和存活率^[17-18]。然而, 肚倍蚜却能在高单宁环境中大量繁殖^[19], 这是一个值得关注的自然现象。为深入了解肚倍蚜适应高单宁环境的机理, 笔者运用 RT-PCR 和 RACE 等方法对肚倍蚜体内的 1 型漆酶基因(LAC-1) cDNA 进行克隆筛选, 获得了肚倍蚜 1 型漆酶基因 cDNA 全长序列, 并对所获得的基因序列与其他昆虫的漆酶基因进行 BLASTP 序列比较和分子进化分析, 旨在确定该基因的类型, 为后续的基因功能研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

供试肚倍蚜(*Kaburagia rhusicola* Takagi)采于湖北省十堰市竹山县文峰乡人工肚倍林。

1.2 主要试剂

总 RNA 提取所用的 TRIzol 购自 Invitrogen 公司; RNA 反转录试剂盒购自 Fermentas 公司; PCR 相关试剂购自 TAKARA 公司; RACE 试剂盒购自 Clontech 公司; DNA 凝胶回收试剂盒购自 Axygen Biosciences 公司; DH5 α 感受态细胞购自北京全式金公司; PCR 引物由武汉伯杰生物技术有限公司合成。

收稿日期: 2011-02-16

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BA06B07)

李 芒, 博士研究生, 研究方向: 昆虫生理学, E-mail: limang@webmail. hzau. edu. cn

通讯作者: 雷朝亮, 教授, 研究方向: 昆虫生理学, E-mail: lioir@mail. hzau. edu. cn

1.3 肚倍蚜总 RNA 提取

剖开肚倍,称取 100 mg 活蚜置于碾钵中,在液氮中碾磨至粉末,加入 1 mL TRIzol 裂解液,抽提步骤按试剂盒说明书进行。RNA 提取后,检测其纯度和完整性,并置于-80 ℃下保存备用。

1.4 LAC-1 基因片段扩增

参照 Liang^[20] 的方法分别设计上游简并引物 LacF1: 5'-GGNACNCAYTTYTGRCAY-3' 和下游简并引物 LacR1: 5'-RTCDATRTGRCARTGNARRAAYCA-3',利用 Fermentas 公司的 RNA 反转录试剂盒进行 cDNA 第一链合成,并以此为模板进行 PCR 扩增,PCR 反应退火温度为 45 ℃,延伸时间为 1.5 min。PCR 反应完成后进行目的条带的回收与检测,将鉴定后的阳性克隆交由华大基因公司进行测序。

1.5 3'-RACE 末端扩增

根据已知 LAC-1 基因片段设计上游引物 LacF2: 5'-TTATTGGTTTTTCCACTGCC-3',利用 Clontech 公司 RACE 试剂盒进行 cDNA 合成,将此 cDNA 为模板,利用试剂盒自带下游引物 NUP 进行 PCR 扩增,反应退火温度为 60 ℃,延伸时间为 1 min,PCR 反应完成后进行目的条带的回收、检测和测序。

1.6 5'-RACE 末端扩增

根据已知的 LAC-1 基因片段设计下游引物 LacR2: 5'-AGCCAGGGGCGTGCGAAACC-3' 和

LacR3: 5'-GATTCGGGTTTGTGTTGTG-3'。利用 Clontech 公司 RACE 试剂盒合成 cDNA,以此为模板,用 LacR2 和试剂盒自带引物 LUMP 进行 PCR 扩增,反应条件参考试剂盒说明。PCR 反应后将反应液稀释 100 倍,以此为模板,用 LacR3 和试剂盒自带引物 SUMP 进行 2 次 PCR,反应退火温度为 55 ℃,延伸时间为 1.5 min。PCR 反应完成后进行目的条带的回收、检测和测序。

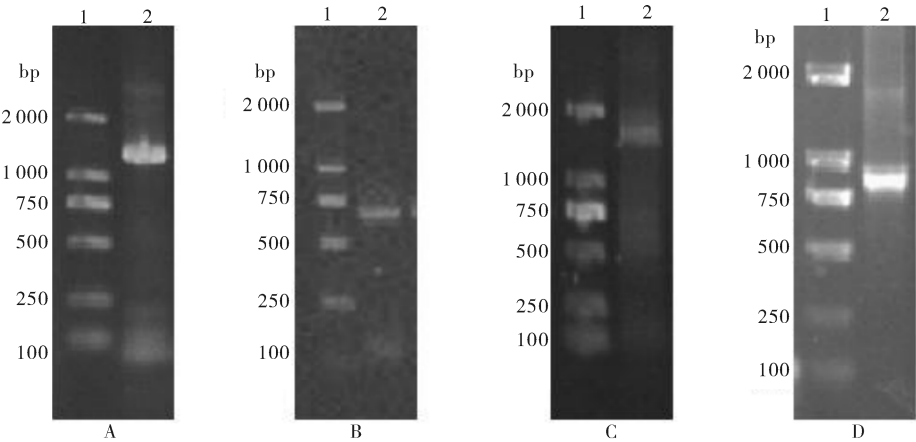
1.7 序列分析及系统进化树构建

对所得的基因片段序列以及 3'-RACE 和 5'-RACE 序列进行分析,利用 DANMAN 软件拼接成完整的 cDNA 序列。根据 NCBI 上的 ORF Finder 软件将测得的 cDNA 片段翻译成氨基酸序列,运用生物软件 DNASTar 进行同源性分析,并预测氨基酸序列的相对分子质量、等电点、疏水性以及二级结构。运用 NCBI BLAST network server 在 GenBank/EMBL 中对黑尾叶蝉、冈比亚按蚊、烟草天蛾、松褐天牛、家蚕、赤拟谷盗、瘤姬蜂和豌豆蚜 8 种昆虫的 16 个不同类型漆酶基因和肚倍蚜所得基因进行同源搜索,利用生物软件 MEGA 4.0 分析其演化关系。

2 结果与分析

2.1 肚倍蚜 LAC-1 基因克隆

以 LacF1 和 LacR1 为引物进行 PCR 扩增电泳(图 1),结果显示在约 1 100 bp 处有明显的条带,与



1. DNA 分子质量标准 DNA marker DL 2 000; 2. PCR 扩增产物 PCR product; A. LacF1 和 LacR1 引物扩增片段 PCR product of LacF1 and LacR1 primers; B. LacF2 和 NUP 引物扩增片段 PCR product of LacF2 and NUP primers; C. LUMP 和 LacR2 引物扩增结果 PCR product of LUMP and LacR2 primers; D. SUMP 和 LacR3 引物扩增结果 PCR product of SUMP and LacR3 primers.

图 1 肚倍蚜 LAC-1 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of LAC-1 gene in *K. rhusicola*

通过氨基酸序列多重对比分析,发现昆虫漆酶在 4 个 Cu-bind 结构域存在高度保守氨基酸序列: HWHGHH、THFWHSH、HPFHLHGH、WLFH-CHIEFH, 这和文献报道的结果一致。

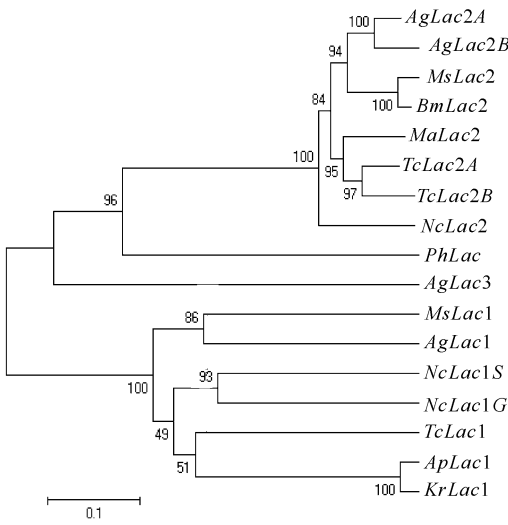
2.3 系统发育树的构建及同源性分析

运用 NCBI BLAST network server 在 Gen-Bank/EMBL 中进行同源搜索,对黑尾叶蝉、冈比亚按蚊、烟草天蛾、松褐天牛、家蚕、赤拟谷盗、瘤姬蜂和豌豆蚜 8 种昆虫的 16 个不同类型漆酶基因和肚倍蚜所得基因,利用生物软件 MEGA4.0 分析相关演化关系,经 NJ 法构建了系统发育树(图 3)。从图 3 可以看出,本研究克隆的肚倍蚜基因所推导的氨基酸序列 KrLac1 同豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum* (*ApLac1* XP_001948070.1)、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (*TcLac1* NP_001034514.1)、黑尾叶蝉 *Nephotettix cincticeps* (*NcLac1S* BAJ06131.1 和 *NcLac1G* BAJ06132.1)、烟草天蛾 *Manduca sexta* (*MsLac1* AAN17506.1) 和冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* (*AgLac1* AAN17505.1) 能按类型聚到一起,并且能与 2 型的漆酶很容易分开。同时,从系统发育树中也可以看到肚倍蚜(*K. rhusicola*)与豌豆蚜(*A. pisum*)的亲缘关系最近,同属于同翅目昆虫,这也证明了试验所得序列与预期一致,克隆的基因序列为 *K. rhusicola* 1 型的漆酶氨基酸序列。

3 讨 论

蚜虫的口器为刺吸式,是一类比较特殊的昆虫。蚜虫通常取食寄主植物的韧皮部,通过吸取植物韧皮部汁液中的养分来满足自身发育需要。在取食过程中,蚜虫对植物的刺探行为会引起取食部位的酚类物质的积累^[21],这种现象通常被视为植物的一种防御反应。由于蚜虫是依靠植物内压被动取食,因此酚类物质不可避免地会进入其体内,这一现象已在蚜虫和另一些同翅目昆虫蜜露或腹管分泌物的研究中得到验证^[22-23]。

虽然酚类物质对蚜虫具有一定毒性^[24],但蚜虫在取食寄主植物时却很少受此防御反应的影响,显然蚜虫通过某种特殊方式适应了食物中的酚类物质的毒性。为此,Miles 等^[25]提出“氧化还原假说”以解释这一现象。该假说认为,刺吸式昆虫唾液中的多酚氧化酶干扰了植物体内正常的氧化还原反应的平衡,同时氧化食物酚类单体形成可以接受的酚



NcLac1S, *NcLac1G*, *NcLac2*: 黑尾叶蝉 *Nephotettix cincticeps*; *AgLac1*, *AgLac2A*, *AgLac3*: 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*; *MsLac1*, *MsLac2*: 烟草天蛾 *Manduca sexta*; *BmLac2*: 家蚕 *Bombyx mori*; *TcLac1*, *TcLac2A*, *TcLac2B*: 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*; *MaLac2*: 松褐天牛 *Monochamus alternatus*; *PhLac*: 瘤姬蜂 *Pimpla hypochondriaca*; *ApLac1*: 豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum*.

图 3 基于漆酶氨基酸序列并利用 NJ 法构建的系统发育树(MEGA 4.0)
Fig.3 The evolutionary history of laccase is inferred using the NJ method and a tree constructed using MEGA software version 4.0 from *K. rhusicola*

低聚体,所以降低了酚类物质对此类昆虫的毒害作用。由于符合 Miles 的氧化还原理论,近年来,关于刺吸式昆虫的漆酶研究也渐渐引发了研究者的兴趣。Liang^[20]研究豌豆蚜时发现 LAC-1 在豌豆蚜的唾液腺和中肠中都有表达,通过唾液腺与底物的显色反应发现,唾液腺中的酚氧化酶对多巴和 ABTS 的底物有明显的氧化作用;Hattori 等^[26]在研究黑尾叶蝉(*Nephotettix cincticeps*)时也发现,黑尾叶蝉的唾液腺和唾液中含有漆酶活性的酚氧化酶;在进一步研究中,Hattori 等^[27]克隆出黑尾叶蝉体内 *NcLac1S*、*NcLac1G* 和 *NcLac2* 3 种漆酶基因,通过定量分析发现,*NcLac1S* 仅大量表达于唾液腺中;*NcLac1G* 在唾液腺、上皮组织、中肠和马氏管多个组织中有所表达;而 *NcLac2* 则主要表达于黑尾叶蝉的上皮组织中。这些结果表明,1 型漆酶对于刺吸式昆虫适应食物中的酚类物质起着重要作用。昆虫对酚类物质的适应机理十分复杂,目前还没有相关文献能较清楚地说明这类适应方式,研究学者大多都是通过相关试验的结果提出种种假设。

由于昆虫的种类众多,各种昆虫因口器和生活环境的不同,取食方式以及取食对象存在很大差异,因此,不同昆虫对酚类物质的适应方式也可能不尽相同。目前,包括肚倍蚜在内的五倍子蚜的相关研究不多。从研究方向看,五倍子蚜的研究主要集中在倍蚜的形态分类、生活史观察以及对五倍子增产作用等方面。关于五倍子蚜生理方面的相关研究报道很少。

笔者利用 PCR 和 RACE 技术首次扩增出肚倍蚜 *LAC-1* 基因序列,得到 2 327 bp 的全长 cDNA 序列,编码区为 1 773 bp,推定的蛋白序列由 591 个氨基酸残基构成。结构的分析结果显示,所得序列含有典型的铜结合蛋白结构。通过相关软件分析发现,肚倍蚜 *LAC-1* 基因与豌豆蚜的 *LAC-1* 亲缘关系最近,氨基酸序列相似性达到 95%。肚倍蚜 *LAC-1* 基因与黑尾叶蝉 *NcLac1G* 和赤拟谷盗 *TcLac1* 基因的相似性也较高。由此可以推导本试验所获得的肚倍蚜的 *LAC-1* 基因编码蛋白是一种作用于多酚底物的氧化酶。

漆酶基因在昆虫的解毒和蜕皮中发挥着重要作用。有关肚倍蚜 *LAC-1* 基因完整 cDNA 序列克隆及推导的蛋白研究结果,将不仅有助于深入了解肚倍蚜多酚氧化酶的分子基础,而且可为其蛋白的功能和差异表达研究提供理论依据。

参 考 文 献

- MESSERSCHMIDT A, HUBER R. The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin modelling and structural relationships [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1990, 187(2): 341-352.
- KUNAMNENI A, BALLESTEROS A, PLOU F J, et al. Fungal laccases-a versatile enzyme for biotechnological applications [C]//MENDEZ-VILAS A. Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology. Badajoz: Formatex Publishing, 2007: 233-244.
- ALCALDE M. Laccases; biological functions, molecular structure and industrial applications [C]//POLAINA J, MACCABE A P. Industrial enzymes. Heidelberg: Springer Netherlands Publishing, 2007: 461-476.
- 梁帅, 周德明, 冯友仁. 白腐真菌漆酶的研究进展及应用前景 [J]. *安徽农业科学*, 2008(4): 1317-1319.
- TEMP U, EGGERT C. Novel interaction between laccase and cellobiose dehydrogenase during pigment synthesis in the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(2): 389-395.
- CLAUS H, FABER G, KÖIG H. Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 59(6): 672-678.
- DESENTIS-MENDOZA R M, HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ H, MORENO A, et al. Enzymatic polymerization of phenolic compounds using laccase and tyrosinase from *Ustilago maydis* [J]. *Biomacromolecules*, 2006, 7(6): 1845-1854.
- YAMAZAKI H I. Cuticular phenoloxidase from the silkworm, *Bombyx mori*: properties, solubilization, and purification [J]. *Insect Biochemistry*, 1972, 2: 431-444.
- THOMAS B R, YONEKURA M, MORGAN T D, et al. A trypsin-solubilized laccase from pharate pupal integument of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* [J]. *Insect Biochemistry*, 1989, 19: 611-622.
- PARKINSON N M, CONYERS C M, KEEN J N, et al. cDNAs encoding large venom proteins from the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca* identified by random sequence analysis [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, 2003, 134(4): 513-520.
- DITTMER N T, SUDERMAN R J, JIANG H B, et al. Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 34(1): 29-41.
- ARAKANE Y, MUTHUKRISHNAN S, BEEMAN R W, et al. Laccase 2 is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, 102(32): 11337-11342.
- 张广学, 乔格侠, 钟铁森. 中国动物志(昆虫纲 14 卷: 同翅目瘿棉蚜科) [M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- 赖永祺, 张燕平, 李正洪, 等. 肚倍蚜生物学研究 I. 生活史 [J]. *林业科学研究*, 1992, 5(2): 394-401.
- 雷朝亮, 邓建华, 薛东, 等. 竹山青麸杨倍子形态及倍蚜的研究 [J]. *华中农业大学学报*, 1996, 15(6): 523-526.
- 李志国, 杨文云, 夏定久. 中国五倍子研究现状 [J]. *林业科学研究*, 2003, 16(6): 760-767.
- BENNETT S E. Tannic acid as a repellent and toxicant to *At-falfa weevil* larvae [J]. *Journal of Economic Entomology*, 1965, 58: 372-373.
- PARK C G, LEE K C, LEE D W, et al. Effects of purified persimmon tannin and tannic acid on survival and reproduction of bean bug, *Riptortus clavatus* [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2004, 30: 2269-2283.
- 赖永祺, 方英, 焦懿, 等. 肚倍蚜生物学研究 II. 生殖 [J]. *林业科学研究*, 1992, 5(6): 554-558.
- LIANG Q. Laccase-1 in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris) [D]. Manhattan: Kansas State University Biochemistry, 2006.
- MILES P W. Aphid saliva [J]. *Biological Reviews*, 1999, 74: 41-85.

[22] DREYER D L,JONES K C,MOLYNEUX R J. Feeding deter-
rency of some pyrrolizidine, indolizidine, and quinolizidine al-
kaloids towards pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) and evi-
dence for phloem transport of indolizidine alkaloid swainsonine
[J]. Journal of Chemical Ecology,1985,11:1045-1051.

[23] MOLYNEUX R J,CAMPBELL B C,DREYER D L. Honey-
dew analysis for detecting phloem transport of plant natural
products[J]. Journal of Chemical Ecology, 1990, 16: 1899-
1909.

[24] JONES K C,KLOCKE J A. Aphid feeding deterrency of ellagi-
tannins, their phenolic hydrolysis products and related phenol-
ic derivatives[J]. Entomologia Experimentalis et Applicata,
1987,44:229-234.

[25] MILES P,OERTLI J. The significance of antioxidants in the a-
phid-plant interaction: the redox hypothesis[J]. Entomologia
Experimentalis et Applicata,1993,67(3):275-283.

[26] HATTORI M,KONISHI H,TAMURA Y,et al. Laccase-type
phenoloxidase in salivary glands and watery saliva of the green
rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps* [J]. Journal of Insect
Physiology,2005,51(12):1359-1365.

[27] HATTORI M,TSUCHIHARA K,NODA H,et al. Molecular
characterization and expression of laccase genes in the salivary
glands of the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps*
(Hemiptera: Cicadellidae)[J]. Insect Biochemistry and Molec-
ular Biology,2010,40(4):331-338.

Molecular cloning and sequence analysis of
LAC-1 in *Kaburagia rhusicola* Takagi

LI Mang LEI Chao-liang

College of Plant Science and Technology ,Huazhong Agricultural University/Key Laboratory of
Insect Resource Utilization and Sustainable Pest Management of Hubei Province ,
Wuhan 430070, China

Abstract In this paper, a full cDNA encoding *LAC-1* from *Kaburagia rhusicola* Takagi was ob-
tained by RT-PCR and RACE techniques. The complete cDNA(2 327 bp)contains a 1 773 bp open read-
ing fram encoding 597 amino acid residues and flanked with a 449 bp 5'UTR and a 105 bp 3' UTR. The
predicted molecular weight of this complete amino acid is about 67 ku with an isoelectric point of 6.31.
Compared with other insect laccase, the cloned gene shares four conserved anino acid sequences motife
HWHGHH, THFWHSH, HPFHLHGH and WLFHCHIEFH. The analysis of phylogenetic relation-
ship showed that the clone gene has high amino acid sequences homology with other insect laccase.

Key words *Kaburagia rhusicola* Takagi; laccase; cDNA cloning; sequence analysis

(责任编辑:陈红叶)