第 31 卷 第 4 期　　华 中 农 业 大 学 学 报　　Vol. 31　No. 4
2012 年　8 月　　Journal of Huazhong Agricultural University　　Aug. 2012,457～462

# 桔小实蝇二硫键异构酶基因的克隆及其发育表达

胡黎明[1]　申建梅[1]　胡美英[2]　宾淑英[1]　黄华枝[3]　廖泓之[1]　林进添[1]

1. 仲恺农业工程学院植物保护系/外来有害生物预警与控制研究所,广州 510225;
2. 华南农业大学资源环境学院/天然农药与化学生物学教育部重点实验室,广州 510642;
3. 广东省广州市园林科学研究所,广州 510405

**摘要**　利用 RT-PCR 和 RACE 方法克隆获得桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* (Hendel) 二硫键异构酶(protein disulfide isomerase,PDI)基因的 cDNA 序列,命名为 *BdorPDI*。测序结果表明,*BdorPDI* 开放阅读框全长 1 497 bp,编码 498 个氨基酸。氨基酸序列结构分析表明,该序列有 PDI 蛋白家族的典型特征:N 端含有信号肽序列;在序列的 N 端及 C 端具有二硫键/巯基氧化还原位点 CGHC;在 C 末端含有内质网滞留信号肽 KDEL。进化树分析表明:桔小实蝇的 PDI 蛋白序列与脊椎动物安乐蜥(*Anolis carolinensis*)的序列(XP_003217370)一致性最低,为 49.3%;与双翅目昆虫刺舌蝇(*Glossina morsitans*)的序列(ADD20271)一致性最高,为 76.3%。荧光定量 PCR 分析表明:*BdorPDI* mRNA 在桔小实蝇 1～3 龄幼虫中的表达量相对较低,且呈逐渐增长的趋势;在 1 d 蛹中的 *BdorPDI* mRNA 表达量达到最高峰,其表达量是基准含量的 536.50 倍,且随着蛹的发育,*BdorPDI* mRNA 表达量呈逐渐降低的趋势。由此可见,桔小实蝇二硫键异构酶在化蛹过程中发挥了重要的生理功能。

**关键词**　桔小实蝇;二硫键异构酶;基因克隆;实时定量 PCR

**中图分类号**　Q 966;Q 969.512.4　　**文献标识码**　A　　**文章编号**　1000-2421(2012)04-0457-06

蛋白二硫键异构酶(protein disulfide isomerase,PDI)是存在于真核生物内质网膜上的一种对肽链中或肽链间的巯基(-SH)氧化形成二硫键或对错误配对的二硫键进行异构化的一种功能酶,属于蛋白二硫键/巯基氧化还原蛋白超家族[1]。研究结果表明,二硫键异构酶在蛋白的折叠、组装和翻译后修饰等过程中都有重要的生理作用,它不仅参与蛋白的折叠、组装及翻译后修饰等过程,而且涉及到肌动蛋白丝组装、基因表达、胞间交流以及受体功能的调节等过程[2-5]。在常用的昆虫杆状病毒表达载体中引入二硫键异构酶作为分子伴侣与目标蛋白共表达可以提高一种抗菌蛋白(nuecin)的可溶性及抗菌活性[6]。在受到弧菌或白斑综合症病毒感染时,中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)的 2 种二硫键异构酶(FcPDI1, FcPDI2)表达量明显升高,推测其有可能参与到个体免疫机制中[7]。

在对桔小实蝇 PDI mRNA 的组织分布特征研究中,Hu 等[8]的研究发现 PDI 与昆虫 CSP 具有一定的亲和性,且在昆虫触角中有较高的表达量,推测其有可能参与化学感受蛋白中二硫键的形成。家蚕体内的二硫键异构酶(bPDI)表达量受到保幼激素的调节,同时对微生物的侵染具有明显的应答效应[9]。由此可见,蛋白二硫键异构酶在昆虫的生命活动过程中发挥着重要作用。对昆虫 PDI 蛋白分子特征的深入研究,有望为害虫防治提供新的药物作用靶标。

桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis*(Hendel)寄主范围广,可为害 250 多种植物,包括多种水果和蔬菜,是一种重要的检疫性害虫[10-12]。目前,桔小实蝇的防治以化学农药为主,但由于化学农药的不当使用,近年来某些地区桔小实蝇野外种群已对多种类型的农药产生了严重的抗药性[13-14]。因此,寻找功能蛋白作为新的药物作用靶标,将成为害虫综合治理和解决桔小实蝇抗药性的一条新途径。有关桔小实蝇二硫键异构酶在昆虫各组织中的表达情况,笔者已经进行了相关报道[8]。

为进一步研究二硫键异构酶在昆虫发育过程中的功能,笔者以桔小实蝇为供试昆虫,采用 RT-PCR

收稿日期:2012-02-12
基金项目:国家自然科学基金项目(31171852)、广东省大学生创新实验项目(1134711022)和仲恺农业工程学院科研基金项目(G3100003)
胡黎明,博士,讲师. 研究方向:昆虫分子生物学. E-mail:hlm66@eyou.com
通讯作者:林进添,博士,教授. 研究方向:农业害虫综合防治. E-mail:linjtian@163.com

和RACE技术克隆获得桔小实蝇二硫键异构酶基因(命名为 *BdorPDI*),利用实时荧光定量PCR技术明确了该基因在昆虫发育过程中表达量的变化情况,旨在为深入研究桔小实蝇二硫键异构酶的功能和害虫防治提供科学依据。

# 1 材料与方法

## 1.1 供试昆虫和主要试剂

供试桔小实蝇由笔者所在实验室提供,用人工饲料饲养,待桔小实蝇发育到性成熟时期,分别收集卵、1～3龄幼虫和1、4、7、10 d的蛹以及羽化5 min内的雌雄成虫,将样品迅速放入液氮冷冻后保存于－70 ℃冰箱备用。

RNA提取试剂盒购于Omega公司,3′-RACE和5′-RACE试剂盒购于Invitrogen公司,pMD20-T克隆载体、反转录系统、Ex*Taq*DNA聚合酶及SYBR Premix Ex*Taq*荧光试剂均购于TaKaRa公司,核酸琼脂糖凝胶回收试剂盒购于TIANGEN公司。

## 1.2 桔小实蝇RNA的提取和反转录

按照RNA抽提试剂盒(Omega公司)使用说明提取桔小实蝇不同发育时期的总RNA。经琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测后,按照反转录系统说明书以Oligo-dT为引物进行反转录获得cDNA,以此作为PCR和荧光定量PCR模板。

## 1.3 引物设计与合成

根据桔小实蝇二硫键异构酶EST序列(GT091162),设计2条基因特异引物(PDI-51和PDI-52)分别与5′-RACE试剂盒提供的GeneRacer 5′Primer及GeneRacer 5′Nested Primer进行槽式PCR扩增,获得 *BdorPDI* cDNA的5′端序列。进一步根据得到的5′端序列信息设计2条3′-RACE(PDI-31、PDI-32)反应引物进行3′端序列扩增。将3′端扩增后的测序结果与已登录的EST序列进行一致性核实。所有引物在广州英骏生物技术有限公司合成,引物序列见表1。

## 1.4 PCR扩增与RACE反应

以合成的cDNA为模板,加入10×Ex*Taq*DNA聚合酶反应缓冲液5 μL(含 $Mg^{2+}$),正向和反向引物各1 μL(10 mol/L),2.5 mmol/L dNTP 4 μL,Ex*Taq*DNA聚合酶0.25 μL(5 U/μL),加水至50 μL,混匀离心后放入PCR仪扩增。

表1 试验中所用的引物

Table 1 Primers used in this experiment

| 引物 Primer | 引物序列 Primer sequence(5′-3′) |
|---|---|
| Oligo-dT | GGCCGGCCTTTTTTTTTTTT |
| PDI-51 | GGAATGAAGATATTTTTGTGTGTTCC |
| PDI-52 | AATTGTTTGCAATGACCACACCATGG |
| PDI-31 | GGTCGCAAGCAACTTCGATGATG |
| PDI-32 | GGATAAGAGCAAAGATGTGCTTG |
| GeneRacer 5′Primer | CGACTGGAGCACGAGGACACTGA |
| GeneRacer 5′Nested Primer | GGACACTGACATGGACTGAAGGAGA |
| PDI QF | CTTCATTCCCCACCATCAAACTG |
| PDI QR | TTTCTCCTCCACCTCTTCTTCTGA |
| Bact F | CGTTTCCGTTGCCCAGAATTCC |
| Bact R | TCAGCAATACCTGGGTACATG |

PCR反应程序:94 ℃变性3 min;接着进行35个循环,循环条件为94 ℃ 30 s,64 ℃ 45 s,72 ℃1 min;循环完毕后,72 ℃保温10 min。

RACE反应参照试剂盒说明书。扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。

## 1.5 PCR和RACE产物克隆及序列测定

PCR及RACE产物经回收纯化后连接到pMD-20载体,进一步转化到感受态大肠杆菌DH5α中,经蓝白斑和氨苄筛选,重组质粒经扩大培养,提取质粒DNA用于检测。测序工作由广州英骏生物技术有限公司完成。

## 1.6 序列分析与分子进化树构建

利用Blast在NCBI网站进行序列相似性比对分析,采用Megalign程序中的Clustal W方法进行序列进化关系分析。

## 1.7 荧光定量PCR

采用5′Primer引物设计软件在桔小实蝇PDI编码区设计荧光定量反应引物,进一步通过电泳的方法进行筛选,获得符合要求的特异性引物PDIQF、PDIQR,以 *actin* 基因作为内参基因(引物为BactF、BactR)。荧光定量所用引物序列见表1。荧光定量PCR采用25 μL体系,各反应成分的含量为12.5 μL SYBR预混液,10 μmol/L的上、下游引物各0.5 μL,cDNA模板1 μL,灭菌超纯水10.5 μL,混匀,离心后进行PCR仪扩增。PCR反应条件为94 ℃ 预变性30 s,接着进行40个循环,每个循环采用两步法:95 ℃ 5 s,63 ℃ 30 s。反应中设置以水为阴性对照,每个样本取样3次作为重复。使用仪器为Bio-Rad公司的iQ5。反应结束后收集Ct值,参照Livak等[15]的方法采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行数据分析与处理。

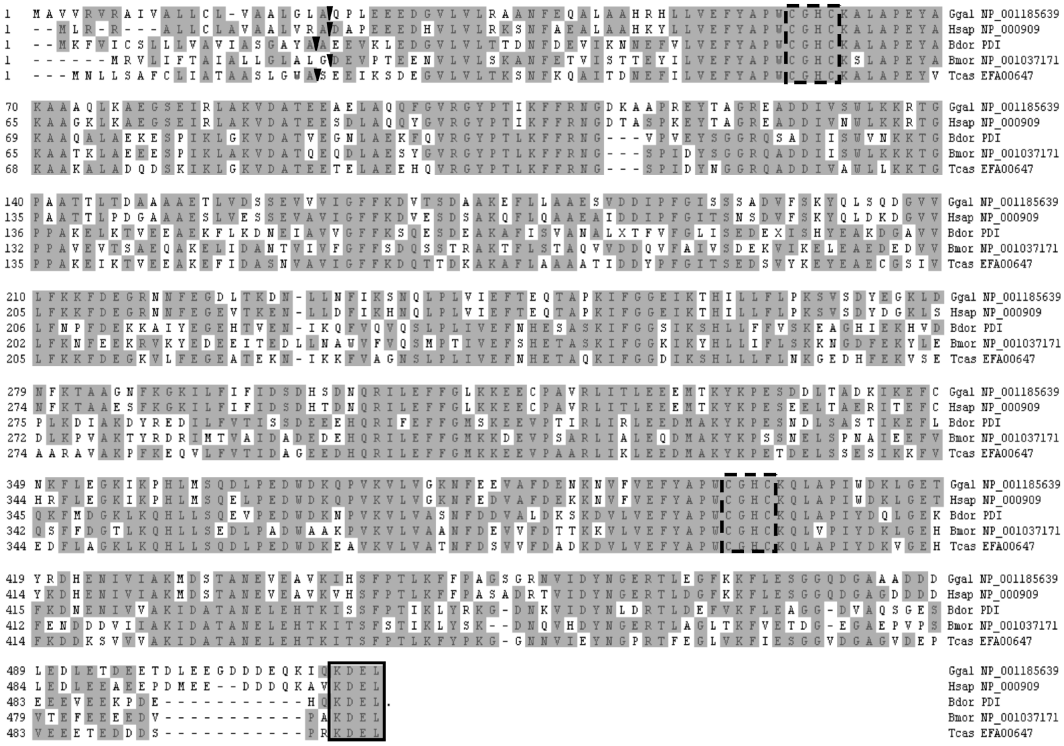
## 2　结果与分析

### 2.1　基因克隆与序列分析

以桔小实蝇触角 cDNA 为模板，以基因特异引物（PDI-51、PDI -52）与试剂盒中引物搭配扩增获得 1 200 bp 左右的特异条带。测序后进一步的 Blast 分析表明，该序列与其他昆虫的 PDI 基因序列一致性最高，推测所获得的片段是桔小实蝇 PDI cDNA 片段的一部分。

根据所得的 cDNA 片段设计 2 条特异引物（PDI-31、PDI-32）进行基因 3′端序列的扩增。测序后一致性分析表明，得到的序列与已经登录的 EST 序列基本一致。将两端序列拼接后可得到 PDI 的 cDNA全长序列。该基因编码区大小为 1 497 bp，编码 498 个氨基酸，命名为 *BdorPDI*，预测其蛋白分子质量约 56.17 ku，等电点为 4.75。将来自哺乳动物人、卵生动物原鸡及昆虫纲鳞翅目、鞘翅目昆虫的 PDI 蛋白与桔小实蝇 PDI 蛋白序列进行一致性比较分析，结果见图 1。

由图 1 可知，5 条来源于进化关系较远物种的二硫键异构酶具有较高的序列一致性。在序列的 N 端都有分泌性信号肽，而在蛋白 C 端具有内质网滞留信号肽（ER retention signal）-KDEL-。另外，在序列中还包含 2 个大多数 PDI 蛋白序列中存在的二硫键/巯基氧化还原活性位点-Cys-X-Y-Cys-（CGHC）[16-17]。



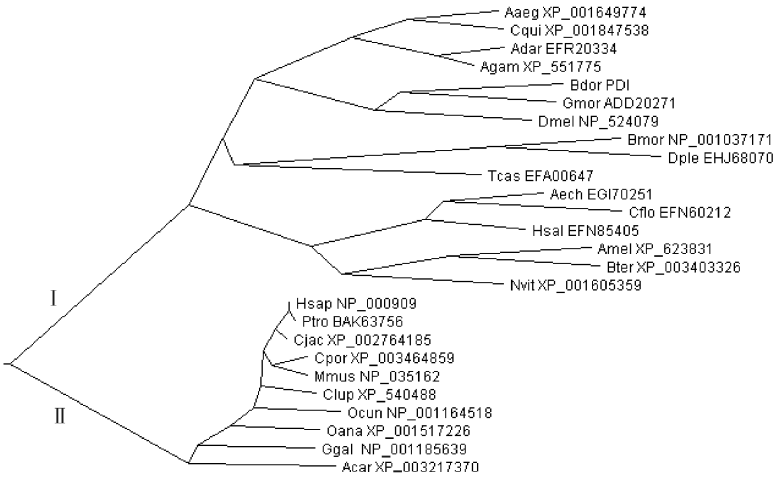

Bmor：家蚕 *Bombyx mori*；Bdor：桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis*；Hsap：人 *Homo sapiens*；Ggal：原鸡 *Gallus gallus*；Tcas：赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*；图中倒三角号表示各蛋白信号肽位置，虚线框表示硫巯基氧化活性位点，2 条横线表示保守的硫巯基氧化活性区域。Inverted triangles reveal the cleave sites of signal peptide in every amino sequence，thioredoxin active sites were highlighted with doted boxes，two thioredoxin active site domains was indicated with line 1 and line 2.

**图 1　桔小实蝇 PDI 蛋白与其他 PDI 蛋白的氨基酸序列比对**

Fig. 1　Amino acid sequence alignment of *Bactrocera dorsalis* PDI with the known PDI proteins

### 2.2　PDI 蛋白的系统发育分析

为研究 PDI 蛋白在不同物种之间的进化关系，本研究从 GenBank 中选取脊椎动物门、节肢动物门的部分二硫键异构酶蛋白序列，采用 Megalin 软件中的 Clustal W 方法构建系统进化树，结果见图 2。由图 2 可知，26 条 PDI 蛋白序列聚为Ⅰ和Ⅱ 2 个大类，分别对应节肢动物门和脊椎动物门的序列。第Ⅰ类的 PDI 蛋白聚为 3 个亚类分别对应昆虫的双翅目、鳞翅目和鞘翅目及膜翅目。双翅目中桔小实蝇（*Bactroceradorsalis*）与同属蝇科的刺舌




Aaeg:埃及伊蚊 *Aedes aegypti*；Cqui:库蚊 *Culex quinquefasciatus*；Adar:达氏蚊 *Anopheles darlingi*；Agam:冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*；Bdor:桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis*；Gmor:刺舌蝇 *Glossina morsitans*；Dmel:拟暗果蝇 *Drosophila melanogaster*；Bmor:家蚕 *Bombyx mori*；Dple:君主斑蝶 *Danaus plexippus*；Tcas:赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*；Aech:切叶蚁 *Acromyrmex echinatior*；Cflo:佛罗里达弓背蚁 *Camponotus floridanus*；Hsal:印度跳蚁 *Harpegnathos saltator*；Amel:意大利蜜蜂 *Apis mellifera*；Bter:熊蜂王 Bombus terrestris；Nvit:丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis*；Hsap:人 *Homo sapiens*；Ptor:黑猩猩 *Pan troglodytes*；Cjac:贼猴 *Callithrix jacchus*；Cpor:豚鼠 *Cavia porcellus*；Mmus:家鼠 *Mus musculus*；Clup:家犬 *Canis lupus familiaris*；Ocun:兔 *Oryctolagus cuniculus*；Oana:鸭嘴兽 *Ornithorhynchus anatinus*；Ggal:原鸡 *Gallus gallus*；Acar:安乐蜥 *Anolis carolinensis*.

**图2 PDI蛋白的系统进化树**

Fig. 2 Phylogenetic tree relationships of PDI protein families

蝇(*Glossina morsitans*)、黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)聚到一簇中,与同属双翅目的埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)、库蚊(*Culex quinquefasciatus*)等蚊科昆虫的序列表现出相对较远的遗传距离。

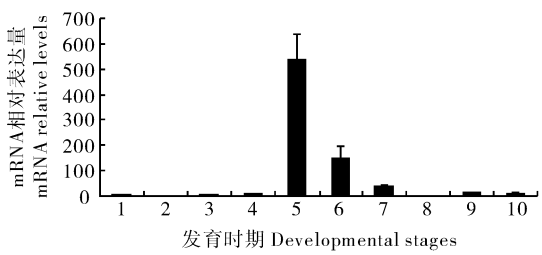
进一步的序列分析结果表明,桔小实蝇的PDI蛋白序列与安乐蜥(*Anolis carolinensis*)的序列一致性最低,为49.3%。在昆虫纲中 *BdorPDI* 与刺舌蝇(*Glossina morsitans*)的序列一致性最高,为76.3%。

## 2.3 基因表达量分析

以桔小实蝇10 d蛹中 *BdorPDI* mRNA含量为基准含量,对其在不同发育时期的变化情况进行分析,结果见图3。

由图3可知,*BdorPDI* mRNA几乎在桔小实蝇发育的各个时期都有表达,但以10 d蛹期的表达量最低,在卵和1～3龄幼虫中的表达量也相对较低,分别为基准含量的2.44倍、1.52倍、3.21倍和6.25倍。在桔小实蝇幼虫期 *BdorPDI* mRNA的表达量呈逐渐增长的趋势,而且在桔小实蝇从3龄幼虫到1 d蛹的发育过程中,*BdorPDI* mRNA表达量出现突增的趋势。桔小实蝇1 d蛹中 *BdorPDI* mRNA表达量是基准含量的536.50倍,为桔小实蝇发育各阶段表达的最高峰。

另外,随着桔小实蝇蛹的发育,*BdorPDI* mRNA的表达量逐渐降低,4 d蛹和7 d蛹中的表达量分别是基准含量的146.30倍和37.28倍。桔小实蝇10 d蛹的 *BdorPDI* mRNA表达量有升高的趋势,新羽化雌雄成虫中 *BdorPDI* mRNA的表达量分别是基准含量的11.28倍和8.30倍。




1:卵 Eggs；2:1龄幼虫 1-instar larva；3:2龄幼虫 2-instar larva；4:3龄幼虫 3-instar larva；5:1 d的蛹 1 d-old pupa；6:4 d的蛹 4 d-old pupa；7:7 d的蛹 7 d-old pupa；8:10 d的蛹 10 d-old pupa；9:新羽化雌虫 Newly-emerged female；10:新羽化雄虫 Newly-emerged male.

**图3 不同发育时期 *BdorPDI* mRNA的相对表达量**

Fig. 3 Development profile of *BdorPDI* mRNA relative levels

## 3 讨　论

已有的研究结果表明，蛋白二硫键异构酶(PDI)是首个被发现的具有催化多肽链折叠功能的酶分子[18]，其主要功能是催化多肽链中或之间共价二硫键的正确键合而使蛋白形成合理的折叠构象[19]，在真核生物内质网蛋白分子合成和修饰运转中均能发挥重要功能。本研究采用 RT-PCR 方法和 RACE 技术克隆了桔小实蝇二硫键异构酶基因(*BdorPDI*)，该基因编码区大小为1 497 bp，编码 498 个氨基酸。

前人对来自昆虫、哺乳动物、植物、线虫和真菌中 8 条 PDI 蛋白序列的家族一级结构进行了分析，发现该蛋白家族在 N 末端和 C 末端 2 个区域都具有保守的二硫键/巯基氧化还原区域，同时存在 2 个保守的氧化还原位点-CGHC-[7,20-21]。本研究对来自家蚕(*Bombyx mori*)、桔小实蝇(*Bactrocera dorsalis*)、人(*Homo sapiens*)、原鸡(*Gallus gallus*)和赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)分类地位较远物种的 PDI 蛋白进行多重比对，结果发现这个区域保守性高于其他区域，这与前人的研究结果一致。推测该蛋白在生命的早期活动中就发挥了重要作用，其进化分离甚至早于动物、植物和微生物之间的进化分离。本研究进一步对来自 26 个物种的 PDI 蛋白进行聚类分析，结果表明各序列间具有高度的保守性。另外，各氨基酸序列的聚类关系较好地反映了各物种的分类地位，说明该蛋白在具有高度保守的同时也表现出一定的进化性。

到目前为止，对于 PDI 蛋白在昆虫的发育过程中表达变化的研究还未见详细报道。笔者对桔小实蝇的 9 个发育时期进行取样，较系统地研究了桔小实蝇 PDI 蛋白在昆虫发育过程中的变化情况，结果表明在 1 d 蛹中的 *BdorPDI* mRNA 表达量达到最高峰，且从 3 龄幼虫到蛹的过程中其表达量激增，可见桔小实蝇二硫键异构酶在化蛹过程中发挥了重要的生理功能。

本研究克隆获得 *BdorPDI* 基因，分析了该基因的氨基酸序列特征，并利用荧光定量 PCR 技术对其在不同发育时期的差异表达进行了分析，表明桔小实蝇二硫键异构酶在化蛹过程中有一定的作用。在后续的研究中可构建该基因蛋白的三维结构进行药物设计以调控昆虫的生长发育，为害虫的综合防治提供理论依据。

## 参　考　文　献


[1] NOIVA R. Enzymatic catalysis of disulfide formation [J]. Protein Expression and Purification, 1994, 5(1): 1-13.

[2] TABB J S, MOLYNEAUX B J, COHEN D L, et al. Langford GM. transport of ER vesicles on actin filaments in neurons by myosin V [J]. Journal of Cell Science, 1998, 111: 3221-3234.

[3] FRAND A R, CUOZZO J W, KAISER C A. Pathways for protein disulphide bond formation [J]. Trends in Cell Biology, 2000, 10(5): 203-210.

[4] MARCUS N, SHAFFER D, FARRAR P, et al. Tissue distribution of three members of the murine protein disulfide isomerase (PDI) family [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1996, 1309(3): 253-260.

[5] YOSHIKAWA S, KAMADA M, MAEGAWA M, et al. Hormonal control of mRNA expression of immunoglobulin binding factor in uterine cervix [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000, 279(3): 898-903.

[6] GOO T W, YUN E Y, KIM S W. Bombyx mori protein disulfide isomerase enhances the production of nuecin, an antibacterial protein [J]. BMB Report, 2008, 41(5): 400-403.

[7] REN Q, ZHOU J, SUN S S, et al. Molecular cloning and expression pattern analysis of two novel disulfide isomerases in shrimp [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 2011, 153: 301-309.

[8] HU L M, SHEN J M, HU M Y, et al. Screening of T7 phage displayed *Bactrocera dorsalis* (Hendel) antenna cDNA library against chemosensory protein [J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2010, 75(3): 174-186.

[9] GOO T W, YUN E Y, HWANG J S, et al. Molecular characterization of a *Bombyx mori* protein disulfide isomerase (bPDI) [J]. Cell Stress Chaperones, 2002, 7(1): 118-125.

[10] NAKAHARA S, KOBASHIGAWA Y, MURAJI M. Genetic variations among and within populations of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae), detected by PCR-RFLP of the mitochondrial control region [J]. Journal of Applied Entomology and Zoology, 2008, 43(3): 457-465.

[11] ALYOKHIN A V, MILLE C, MESSING R H, et al. Selection of pupation habitats by oriental fruit fly larvae in the laboratory [J]. Journal of Insect Behavior, 2001, 14(1): 57-68.

[12] 刘芹，牛长缨，王旭. 橘小实蝇不同地区种群成虫耐饥渴能力的比较[J]. 华中农业大学学报，2010，29(4)：436-439.

[13] HSU J C, FENG H T. Insecticide susceptibility of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) in Taiwan [J]. Chinese Journal of Entomology, 2000, 20: 109-118.

[14] 章玉苹，曾玲，陆永跃，等. 华南地区桔小实蝇抗药性动态监测[J]. 华南农业大学学报，2007，28(3)：20-23.

[15] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$

method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

[16] KANAI S, TOH H, HAYANO T, et al. Molecular evolution of the domain structures of protein disulfide isomerases [J]. Journal of Molecular Evolution, 1998, 47(2): 200-210.

[17] MCARTHRR A D, KNODLER L A, SILBERMAN J D, et al. The evolutionary origins of eukaryotic protein disulfide isomerase domains: new evidence from the amitochondriate protist *Giardia lablia* [J]. Molecular Biology and Evolution, 2001, 18(8): 1455-1463.

[18] GOLDBERGER R F, EPSTEIN C J, ANFINSEN C B. Acceleration of reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by a microsomal system from rat liver [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1963, 238(2): 628-635.

[19] NOIVA R, LENNARA W J. A multifunctional protein resident in the lumen of the endoplasmic reticulum [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1992, 267: 3553-3556.

[20] TACHIKAWA H, TAKEUCHI Y, FUNAHASHI W, et al. Isolation and characterization of a yeast gene, MPD1, the over expression of which suppresses in viability caused by protein disulfide isomerase depletion [J]. FEBS Letters, 1995, 369: 212-216.

[21] BENHAM A M, CABIBBO A, FASSIO A, et al. The CXX-CXXC motif determines the folding, structure and stability of human Ero1-Lalpha [J]. EMBO Journal, 2000, 19: 4493-4502.

# Cloning and developmental expression pattern analysis of PDI in *Bactrocera dorsalis* (Hendel)

HU Li-ming[1] SHEN Jian-mei[1] HU Mei-ying[2] BIN Shu-ying[1]
HUANG Hua-zhi[3] LIAO Hong-zhi[1] LIN Jin-tian[1]

1. *Department of Plant Protection, Zhongkai University of Agriculture and Engineering / Institute for Management of Invasive Alien Species, Guangzhou* 510225, *China*;
2. *College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University / Key Laboratory of Nature Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Guangzhou* 510642, *China*;
3. *Guangzhou Institute of Garden Science, Guangdong Province, Guangzhou* 510405, *China*

**Abstract** Protein disulfide isomerases (PDI) play in the protein folding, assembly, and posttranslational modification. In present study, a protein disulfide isomerase (PDI) cDNA sequence from *Bactrocera dorsalis* (*BdorPDI*) was cloned using the reverse transcription PCR (RT-PCR) compound with rapid amplification cDNA ends (RACE) method. The open reading frame (ORF) of *BdorPDI* is 1 497 bp in length and the deduced peptide contains 498 amino acids residues. Primary structure of the sequence reveals the typical characteristics of PDI family: signal peptide in the N-terminal, two CGHC active-site sequence motif in the N- and C- terminal, and retention signal KEDL at its C-end. Phylogenetic analysis show that *Bactrocera dorsalis* PDI shared the lowest sequence identity (49.3%) with PDI(XP_003217370) from *Anolis carolinensis*, and the highest sequence identity (76.3%) with PDI (ADD20271) from *Glossina morsitans*. Real-time PCR results indicated that *BdorPDI* expressed during whole developmental stages. The relative expression level in larvae was lower but gradually increased during the developing from 1-instar larva to 3-instar larva. The expression level in 1 d- old pupa reach a peak and the amount is about 536.50 folds of that in the baseline. The amount of the *BdorPDI* mRNA gradually decreases during the pupa development. The results implied that *Bactrocera dorsalis* PDI play an important physiological role in the pupation procession.

**Key words** *Bactrocera dorsalis* (Hendel); protein disulfide isomerases (PDI); gene clone; real-time PCR

(责任编辑:陈红叶)