

烟草甲两个羧酸酯酶基因的克隆及表达模式*

朱晓晔^{1,2}, 丁天波³, 许抗抗¹, 周江², 李灿¹, 杨文佳¹

- (1. 贵阳学院生物与环境工程学院//贵州省山地珍稀动物与经济昆虫重点实验室, 贵州 贵阳 550005;
2. 贵州师范大学生命科学学院, 贵州 贵阳 550001;
3. 青岛农业大学植物医学学院, 山东 青岛 266109)

摘要: 为了深入了解羧酸酯酶(Carboxylesterase, CarE)基因在烟草甲 *Lasioderma serricorne* 生长发育及响应 CO₂ 气调胁迫方面的作用, 在转录组测序基础上, 利用 RT-PCR 技术克隆了烟草甲 2 个 CarE 基因 cDNA 全序列, 对其分子特性和系统发育进行分析, 并利用实时定量 PCR 技术检测其在不同发育阶段及不同 $\varphi(\text{CO}_2)$ 气调胁迫条件下的表达模式。获得了烟草甲 2 个 CarE 基因完整的开放阅读框, 其长度为 1 698 bp 和 1 695 bp, 编码 565 和 564 个氨基酸。氨基酸同源性和系统进化树分析表明, 它们均具有羧酸酯酶典型的保守结构域, 且属于 β 家族, 分别命名为 *LsCarEB1* 和 *LsCarEB2* (GenBank 登录号: MG189601 和 MG189602)。 *LsCarEB1* 和 *LsCarEB2* 在烟草甲的各发育阶段均有所表达, 其中在老龄幼虫期的表达量较高, 显著高于低龄幼虫、蛹和成虫期的表达水平。 LC₁₀、LC₃₀ 和 LC₅₀ 3 种 $\varphi(\text{CO}_2)$ 处理 6 h 后, *LsCarEB1* 和 *LsCarEB2* 的 mRNA 表达量随胁迫 $\varphi(\text{CO}_2)$ 升高而上调且显著高于对照组。推测 *LsCarEB1* 和 *LsCarEB2* 不仅对烟草甲的生长发育具有重要作用, 而且是其响应 CO₂ 气调胁迫的重要机制之一。

关键词: 烟草甲; 羧酸酯酶; 克隆; 表达模式; CO₂ 胁迫

中图分类号: Q78 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579(2018)04-0136-09

Cloning and expression analysis of two carboxylesterase genes in the cigarette beetle, *Lasioderma serricorne* (Coleoptera: Anobiidae)

ZHU Xiaoye^{1,2}, DING Tianbo³, XU Kangkang¹, ZHOU Jiang², LI Can¹, YANG Wenjia¹

- (1. Guizhou Provincial Key Laboratory for Rare Animal and Economic Insects of the Mountainous Region// College of Biology and Environmental Engineering, Guiyang University, Guiyang 550005, China;
2. College of Life Science, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China;
3. College of Plant Health and Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract: In order to better understand the roles of carboxylesterase (CarE) genes in development and response to CO₂ exposure in the cigarette beetle, *Lasioderma serricorne*, we identified and cloned two full-length cDNAs of CarE genes using transcriptome data and RT-PCR technique. We analyzed their molecular characterization and phylogenetic relationship, and detected their expression profiles in different devel-

* 收稿日期: 2017-10-26

基金项目: 国家自然科学基金(31460476); 贵州省科学技术基金联合基金(黔科合 LH 字[2014]7167); 贵州省高层次创新型人才培养(黔科合人才[2016]4020); 贵阳学院高层次人才科研启动费(校人才2014003); 贵州省区域一流学科建设项目(黔教科研发[2017]85号)

作者简介: 朱晓晔(1993年生), 女; 研究方向: 昆虫分子生态学; E-mail: 18886074373@163.com

通信作者: 杨文佳(1986年生), 男; 研究方向: 昆虫分子生态学; E-mail: yangwenjia10@126.com

opmental stages and under different CO₂ stress conditions by using quantitative real-time PCR (qPCR). The open reading frames of two genes were 1 698 bp and 1 695 bp, encoding proteins comprised of 565 and 564 amino acid residues, respectively. The amino acid sequence homology and phylogenetic tree analysis indicated that both of them have typical conserved motifs of CarE protein and belong to β subfamily, and termed as *LsCarEB1* and *LsCarEB2* (GenBank accession no: MG189601 and MG189602), respectively. The qPCR results showed that two genes were both expressed in all tested developmental stages, and the relative mRNA expression levels were significantly higher in lately larvae than those in early larvae, pupae and adults. In *L. serricornis* larvae exposed to CO₂ for 6 h, the mRNA levels of *LsCarEB1* and *LsCarEB2* were significantly increased at different dose treatments compared to that of the control. We speculated that *LsCarEB1* and *LsCarEB2* may be involved in development and play important roles in response to CO₂ stress in *L. serricornis*.

Key words: *Lasioderma serricornis*; carboxylesterase; cloning; expression pattern; CO₂ stress

烟草甲 *Lasioderma serricornis* (Fabricius), 隶属鞘翅目 Coleoptera、窃蠹科 Anobiidae, 是一种世界性的仓储害虫, 在中国大部分地区都有分布。该虫寄主范围广, 对烟叶、粮食、茶叶、中药材等多种储藏物造成危害^[1]。主要以幼虫潜居寄主体内进行蛀食, 排出大量粪便、留下虫尸、产生异味, 严重影响储藏物的产量和品质, 其发生危害具有较强的隐蔽性^[2]。目前烟草甲的防治主要以化学药剂熏蒸为主, 不仅带来食品安全和人类安全隐患, 而且导致其对杀虫剂产生了不同程度的抗药性, 需要探索新的仓储害虫防治策略^[3-4]。气调技术(利用高 φ (CO₂) 和低 φ (O₂) 协同作用) 作为一种新的防治手段, 近年来被广泛应用于仓储害虫的防治^[5], 但目前已在谷象 *Sitophilus granaries*、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*、粉斑螟 *Ephestia cautella*、嗜卷书虱 *Liposcelis bostrychophila* 等发现其对 CO₂ 气调产生了不同程度的抗性^[6-10]。前期研究对昆虫应对 CO₂ 气调胁迫适应性主要集中在生理学和生态学方面, 而分子水平上的机制研究尚未见报道。

羧酸酯酶 (carboxylesterase, CarE) 是一种多功能家族酶, 广泛存在于微生物、植物、昆虫和哺乳动物中。CarE 属于丝氨酸水解酶家族, 具有多种类型, 有广泛的底物专一性和重迭性, 大多数酶的反应机理相同, 因为在其氨基酸序列上存在保守的催化三联体活性中心 (Ser、His、Glu)。在昆虫体内, CarE 的生理功能并不局限在对外源化合物的解毒代谢和对杀虫剂的抗药性形成中的作用^[11-12], 近年来研究发现它在昆虫信息素、激素降解以及调节昆虫行为中起着重要作用。此外, 部分 CarE 与昆虫神经形成和发育调控密切相关。本课题组前期研究发现, 高体积分数 CO₂ 气调胁迫后烟草甲体内 CarE 酶活性显著升高^[17], 推测 CarE

可能在害虫应对 CO₂ 气调胁迫过程中发挥着重要作用。

为了探究 CarE 基因在烟草甲体内的生理功能, 本研究以转录组测序获得的 CarE 序列为基础, 利用 RT-PCR 技术克隆获得烟草甲 2 条 CarE 基因的 cDNA 全长序列, 并对其氨基酸序列、同源性和系统发育进行生物信息学分析, 同时对其在不同发育阶段及 CO₂ 气调胁迫下的表达模式进行分析, 旨在分析 CarE 基因与烟草甲生长发育及与 CO₂ 气调胁迫响应的相关性, 为理解该虫生长发育调控及气调胁迫下的应激机制提供分子基础。

1 材料和方法

1.1 供试昆虫

供试烟草甲于 2010 年采自贵州省贵阳市, 置于温度为 (28 ± 1) °C, 相对湿度为 (75 ± 5) %, 全黑暗的人工气候箱内, 以中药材当归 *Angelica sinensis* 为食料连续饲养繁殖 40 代以上。

1.2 主要试剂

TRIzol 试剂 (TRIzol reagent, Invitrogen 公司); DNA 酶 (RQ1 RNase-Free DNase, Promega 公司); 反转录试剂盒 (PrimeScript[®] RT Reagent Kit, TaKaRa 公司); Taq 酶 (TaKaRa 公司); 胶回收试剂盒 (Gel Extraction Kit, Omega 公司); 载体 (pGEM-T Easy Vector, Promega 公司); 感受态细胞 DH5 α (北京全式金公司); 定量试剂 (GoTaq[®] qPCR Master Mix, Promega 公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 烟草甲 RNA 提取 分别收集烟草甲低龄幼虫、高龄幼虫、蛹和成虫, 每个虫态设置 4 个生物学重复, 每个重复 40 头试虫。按照 TRIzol 试剂说明书提取上述样品总 RNA, 利用 Nanodrop 2000 核

酸浓度测定仪和琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的浓度和完整性。

1.3.2 CO₂ 气调处理 参照笔者实验室已发表的 CO₂ 气调毒理的生物测定数据^[21], 挑取高龄幼虫于 2 个亚致死体积分数 LC₁₀ [$\varphi(\text{CO}_2) = 30\% + \varphi(\text{空气}) = 70\%$] 和 LC₃₀ [$\varphi(\text{CO}_2) = 70\% + \varphi(\text{空气}) = 30\%$], 及致死中体积分数 LC₅₀ [$\varphi(\text{CO}_2) = 90\% + \varphi(\text{空气}) = 10\%$] 的 CO₂ 气调处理 6 h, 挑取存活的试虫备用, 相同条件下空气处理作为对照, 每组处理设置 4 个重复。将处理后的试虫按照 1.3.1 方法分别提取总 RNA。

1.3.3 第一链 cDNA 的合成 利用 DNA 酶处理总 RNA, 去除基因组 DNA 后, 按照 PrimeScript[®] RT Reagent Kit 说明书合成第一链 cDNA, 作为全长验证 PCR 扩增和实时定量 PCR 的模板。

1.3.4 基因克隆 根据笔者实验室测序完成的烟草甲转录组数据中获得的 2 个 CarE 基因片段, BLAST 分析后, 采用 Primer 5.0 软件设计 2 对特异性引物 (表 1) 用于开放阅读框的扩增。PCR 反应体系包含 10 × PCR 缓冲液 2.5 μL, MgCl₂ 2.5 μL, dNTPs 2 μL, 上下游引物各 1 μL, cDNA 模板 2.0 μL, rTaq 酶 0.25 μL, ddH₂O 补足至 25 μL。扩增条件为: 95 °C 预变性 3 min, 然后 95 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 共 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 $w = 1\%$ 琼脂糖凝胶电泳检测后, 按照 Gel Extraction Kit 说明书回收目的条带, 连接至 pGEM-T Easy 上, 再转化至 DH5α 感受态细胞中, 经蓝白斑筛选和 PCR 鉴定, 最终将阳性克隆送往成都擎科梓熙生物技术有限公司进行测序。

表 1 本研究中使用的引物
Table 1 Primers used in this study

引物 primers	基因 Gene	引物序列 Primer sequences (5' - 3')
克隆开放阅读框 Open reading frame cloning	<i>LsCarEB1</i>	F: ATGTCCTTTACTTTCTTTACTGCAC R: TGTATTATTATGATTAGAATAAGAG
	<i>LsCarEB2</i>	F: ATGGCCATGATGATGCCCCCTCCC R: TCACTTTATAGTGTGTACCAAATT
实时定量 PCR Quantitative real-time PCR	<i>LsCarEB1</i>	F: GCGGTTCCGTTGTAGTTGAT R: GCGCATCCGCTTTGTATTAT
	<i>LsCarEB2</i>	F: CCATGGTTTTACCGGTTTTG R: GACCATAAGAGCCGCCATAA
内参基因 Reference gene	<i>LsEF1α</i>	F: GCATCTCCACGGATTTCACT R: AAGGCAAGACGCTTATCGAA

1.3.5 序列分析 利用 DNAMAN 6.03 (Lynnon Biosoft) 软件对测序结果进行编辑和分析, 推导的氨基酸采用 BLAST 工具 (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>) 进行同源性比较分析。利用 ProtParam (<http://web.expasy.org/>)、NetNGlyc 1.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 和 SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 分析编码蛋白的理化性质、N - 糖基化位点和信号肽。利用 Scanprosite (<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>) 分析氨基酸的保守区域。利用 MEGA 7.0 软

件中的邻接法 (Neighbor-joining) 构建系统发育树, 各分支重复检验次数均为 1 000^[18]。

1.3.6 实时定量 PCR 检测 采用实时定量 PCR 方法检测烟草甲 *LsCarEB1* 和 *LsCarEB2* 在不同发育阶段及 CO₂ 气调胁迫后的相对表达量。使用在线软件 Primer 3.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) 设计特异性表达引物, 内参基因采用烟草甲 *LsEF1α* 基因 (GenBank 登录号: KY549658), 引物序列信息如表 1。实时定量 PCR 反应体系如下: GoTaq[®] qPCR Master Mix 10 μL、cDNA 1 μL、上下游引物各 1 μL 以及 Nuclease-free Water 7 μL。扩增条件: 95 °C 预

变性 5 min; 然后 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 共 40 个循环; 最后在 60 ~ 95 °C 进行熔解曲线分析。每个样品重复测定 3 次。利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算不同发育阶段及 CO₂ 气调胁迫后的基因相对表达量^[19], 试验数据采用 SPSS23.0 软件中的单因素方差分析 (ANOVA) 进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 *LsCarEB1* 和 *LsCarEB2* 的克隆及序列分析

利用 RT-PCR 技术扩增出烟草甲 *LsCarEB1* 和 *LsCarEB2* 的 cDNA 全序列, 将其提交到 NCBI 核酸数据库, GenBank 登录号分别为 MG189601 和 MG189602。 *LsCarEB1* 开放阅读框长度为 1 698 bp, 编码 565 个氨基酸 (图 1), 理论相对分子质量和等电点分别为 64 100 和 6.40。 *LsCarEB2* 的开放阅读框为 1 695 bp, 编码 564 个氨基酸 (图 2), 理论相对分子质量和等电点分别为 64 000 和 5.32。经 NetNGlyc 1.0 server 预测, *LsCarEB1* 可能存在 3 个 N-糖基化位点, 分别为 N117、N250 和 N376; *LsCarEB2* 存在 2 个 N-糖基化位点, 分别为 N359 和 N371。经 ScanProsite 分析表明, 2 个推导的蛋白均具有羧酸酯酶典型的两个保守结构域: *LsCarEB1* 蛋白第 199-214 位含羧酸酯酶 B 型丝氨酸活性位点 FGGNPNSVTLTGFSAG, 第 104-110 位含二硫键形成位点 EDCLYLN; *LsCarEB2* 蛋白第 197-212 位含丝氨酸活性位点 FGGNPDSITLTGMSAG, 第 104-110 位含二硫键形成位点 EDCLYVN。 *LsCarEB1* 蛋白催化活性中心是以丝氨酸 (Ser212) 为中心的催化三联体 (Ser212、Glu346 和 His466), *LsCarEB2* 蛋白的催化三联体为 (Ser210、Glu339 和 His461)。 *LsCarEB2* 编码的蛋白 N 末端具有 20 个氨基酸组成的信号肽序列, 推测其可能为分泌蛋白, 而 *LsCarEB1* 无信号肽存在。

将 *LsCarEB1* 和 *LsCarEB2* 编码的氨基酸序列分别进行 BLAST 比对分析, 结果发现, *LsCarEB1* 与同为鞘翅目的赤拟谷盗 *T. castaneum* (GenBank 登录号: CAH64510) 和黄粉虫 *Tenebrio molitor* (AKZ17664) 羧酸酯酶的同源性较高, 分别为 51% 和 44%。 *LsCarEB2* 与赤拟谷盗 *T. castaneum* (KYB968215) 和黄粉虫 *T. molitor* (AKZ17669) 羧酸酯酶的同源性分别为 56% 和 53%。另外, *LsCarEB1* 和 *LsCarEB2* 编码的蛋白质序列相似性为 30.0%。

2.2 *LsCarEB1* 和 *LsCarEB2* 的系统发育分析

将 *LsCarEB1* 和 *LsCarEB2* 推导的氨基酸序列与

GenBank 登录的其它昆虫 CarEs 氨基酸序列进行比对, 利用 MEGA 7.0 软件的邻接法构建进化树。结果表明, 上述昆虫羧酸酯酶可分为 6 个簇 (A、F、G、K、M 和 N), 本文克隆获得的 *LsCarEB1* 和 *LsCarEB2* 基因均属于羧酸酯酶第三功能组 (H-N) 的 M 簇中, 该簇主要为 β 酯酶 (β -esterase) (图 3)。进一步分析发现它们与同为鞘翅目的马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 和赤拟谷盗 *T. castaneum* 的亲缘关系较近, 与传统分类学的分类一致。

2.3 *LsCarEB1* 和 *LsCarEB2* 在不同发育阶段的表达

利用实时定量 PCR 方法检测 *LsCarEB1* 和 *LsCarEB2* 在烟草甲不同发育阶段的表达情况。结果表明, *LsCarEB1* 和 *LsCarEB2* 在烟草甲各发育时期均有表达, 其中 *LsCarEB1* 在高龄幼虫、成虫及低龄幼虫中的相对表达量显著高于蛹期 ($P < 0.05$), 上述时期的 mRNA 表达量分别是蛹期的 14.9、3.58 和 2.50 倍。 *LsCarEB2* 在高龄幼虫、成虫期、低龄幼虫中的表达量分别是蛹期的 6.92、2.76 和 1.21 倍, 且在高龄幼虫期的表达量显著高于其他时期 ($P < 0.05$) (图 4)。

2.4 不同 φ (CO₂) 对 *LsCarEB1* 和 *LsCarEB2* 基因表达的影响

采用 LC₁₀、LC₃₀ 和 LC₅₀ 3 个 φ (CO₂) 处理烟草甲高龄幼虫, 6 h 后发现 *LsCarEB1* 在 LC₁₀ 的相对表达量与对照组相比无明显差异, 而 LC₃₀ 和 LC₅₀ 处理组 mRNA 表达量分别为对照组的 2.7 倍和 4.1 倍, 且显著高于对照组 ($P < 0.05$)。 *LsCarEB2* mRNA 的相对表达量分别为对照的 1.66、1.89 和 2.65 倍, 其表达量随胁迫 CO₂ 的体积分数升高而上调, LC₅₀ 气调胁迫下 mRNA 表达量显著高于对照、LC₁₀ 和 LC₃₀ 处理组 ($P < 0.05$) (图 5)。

3 讨论

羧酸酯酶作为昆虫体内重要的初级代谢酶系, 在杀虫剂及外源物质的代谢、激素降解和神经发育过程中发挥着重要的作用^[11-14]。随着昆虫基因组计划的开展、转录组测序技术不断普及, 目前已有多种昆虫的羧酸酯酶基因被陆续克隆, 如黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*^[22]、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*^[23]、赤拟谷盗 *T. castaneum*^[24]、家蚕 *Bombyx mori*^[25]、意大利蜜蜂 *Apis mellifera*^[26]、豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum*^[27]、温室白粉虱 *Trialeurodes vaporariorum*^[28]、中华稻蝗 *Oxya chinensis*^[29]、橘小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 等^[30]。根据其催化能力、细胞定位和系统进化, 可将昆虫羧酸酯酶分为 14 个

```

1      ATGCCATGATGATGCCCCCTCCCCCTGCTTCCAGTTTCTCGGATGCCTTCTCTCCGTTTTGCTTGTGGGGAAAC
1      M A M M M P P P P V F Q F L G C L L F R F A C W G N

79     GATCATCCCATCGTGGATACACCTTTGGGCCAAATTAGCGGACATTACAGGTCTTCGTACGAGGGAAGGAAATTCTCA
27     D H P I V D T P L G Q I S G H Y R S S Y E G R K F S

157    GCCTTCGAGGGAATCCCTTATGCGAAACCACCTATCGGAGAGCTCAGATTTAAAGAACCACAGCCCACTGAAGCTGG
53     A F E G I P Y A K P P I G E L R F K E P Q P T E A W

235    GAAGGCGTTTTTCAAGCGGATAAATTGCATACATGCATACAATAACAACGGATTAAGATCAAATAACAGGCTCGGAG
79     E G V F Q A D K L H T C I Q Y N G L K D Q I T G S E

313    GATTGTCTCTATTTGAACGTTTACGTGCCAGAAAGCAACCCGTCAGAAGCCGAGAGCCTCGATGTCATCGTCAACATG
105    D C L Y L N V Y V P R S N P S E A E S L D V I V N M

391    CATGCCGGCTGTTACATGGCCGGAAGTGACATCAATACGCTCGACCCACGCATCTCATGGATCGCGACGTTATATTC
131    H A G C Y M A G S G H Q Y A R P T H L M D R D V I F

469    GTCACATTGAACAACAGACTTTCCGCTTTAGGGTCTTATGTCCCGACGATCCAGACTTCTCCTGCAACAACGGCTTG
157    V T L N N R L S A L G F L C P D D P D F S C N N G L

547    AAGGATCAGTCGTTAGCGTTAAATGGGTCCAAGACAACATAAAAAGTTTCGGTGGAAATCCGAACCTCGGTCACCTTA
183    K D Q S L A L K W V Q D N I K S F G G N P N S V T L

625    ACGGGATTTTCGGCCGAGGTTCTAGTGTTTACATTACATTTTCGCTCTTTCGAAAGGGTATTTTCATAGAGGT
209    T G F S A G G S S V H Y H Y I S P L S K G L F H R G

703    TTCTCTACAGTGGCAGGATACTCAATCCGTGGGCTTATCAGGAGAACCAGTGAGAAATTTACACATTGGCTTCT
235    F S Y S G T I L N P W A Y Q E N P S E K F Y T L A S

781    CTGGTCGGTTGCGATGCGAAGAAAGGCAAACACGCTGTAAATACCTCGTGAATGCCTTCGAACTAAAAGCGCTTAT
261    L V G C D A K K G K H A V K Y L V E C L R T K S A Y

859    TCCATAGTAGAAAAATACAACTTTTCGAGGGACTAGTTAACGTATTCCTATAGTGCCTTTCGGACCGCATTCCGAG
287    S I V E K Y K L F E G L V N V F P I V P F G P H S E

937    AAAGGGAAGAAGGGTCCGCCGTCAGATCATCCATATAGAATGCTCGAAGAAGGAAGAATTAACGACGTACCTTGG
313    K G K K G A A V P D H P Y R M L E E G R I N D V P W

1 015  ATTAATTCATAACGTGCGAGGAGTCTTTGTTTTTCACTATCGGGTAAATTCCTTATTTGAAGGTGGTTGACAAACAG
339  I N S I T S E E S L F F T I G L I P Y L K V V D K Q

1 093  TGGAGTCACCTGATGCCGCACATACTGGATTACAATTACACTTTGAGCGAAGAAGAGAAGCCATTAATTGCGAAGAAA
365  W S H L M P H I L D Y N Y T L S E E E K P L I A K K

1 171  ATAAGGGATGTTTATTTGGGAAAAGATAAACTCACACGGGATACGTTCTTAAAGTTTCAGTGAATTTGTTTCAGACAGG
391  I R D V Y L G K D K L T R D T F L K F S E I V S D R

1 249  CTGTTCAACGTGGATTCAATAAAAGCGTCTAAGTTGCAGGCTAAAGTGGCACACTCGCCTGTTTACGACATTTATTTT
417  L F N V D S I K A S K L Q A K V A H S P V Y D I Y F

1 327  AGTTACAAAGGTGAACACAGTGTACCCAAGATCTTTATGACAATTTCAAAGAAATCTTAGGAGTTACTACGGCGAT
443  S Y K G E H S V T Q D L Y D N F K E I L G V T H G D

1 405  GATACCCGTTACGCCTTCGTGGGATTTTACGACCACATCTTGAGCAAATCCGACGTTCAAATGAAGGACCTTTACCTA
469  D T R Y A F V G F Y D H I L S K S D V Q M K D L Y L

1 483  GACCTTTTCTCGTCTTTTACGAAAACGGGAATCCAAAATAGCGGGAGTCCATTGGGAACCCGTTTCTCCGTACGAC
495  D L F S S F T K T G I P K I A G V H W E P V S P Y D

1 561  GAGGATGAATTTAAATATTTACACATTTATTCGCCGAAGAAAATCGTAATGGAGAAGAAGAACGATTTGGTGCCCGAG
521  E D E F K Y L H I Y S P K K I V M E K K N D L V P Q

1 639  AAATTTGGGATTCGTTGCCGTTTAAAGAAAACGAGAATTTGGTACACACTATAAAGTGA
547  K F W D S L P F K E N E N L V H T I K *

```

图 1 烟草甲 *LsCarEB1* 核苷酸序列及推导的氨基酸序列

(起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA 加粗; * 表示终止密码子; 下划虚线为信号肽序列;
下划线为糖基化位点; 催化三联体用阴影表示; 方框为保守氨基酸序列)

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequence of *LsCarEB1* in *Lasioderma sericorne*

(The start codon is indicated with bold and the stop codon is indicated with bold and an asterisk;
N-linked glycosylation is underlined; Putative catalytic triad is shaded; The conserved amino acids are boxed)

```

1      ATGAAATTTTGTATCACAAATTTTATTCTTACTATACTCGAAGACGATCCAGTGAAAACAGAAGACACTTTTCCGTCT
1      M  K  F  L  I  T  I  F  I  L  T  I  L  E  D  D  P  V  K  T  E  D  T  F  P  S
79     GTGGAAACACCTTTAGGAAGAATCGACGGATTTCTCGCAAAAACAAATTACGGAAAAACTTTCCGCCGCTTTCGAAGGA
27     V  E  T  P  L  G  R  I  D  G  F  L  A  K  T  N  Y  G  K  T  F  A  A  F  E  G
157    ATTCCATACGCAGAACCCCAATTGGGCACCTTAAATTTGAATCTCCAAAACCGGTAAAACCATGGTTGGGCGTCTGG
53     I  P  Y  A  E  P  P  I  G  D  L  K  F  E  S  P  K  P  V  K  P  W  L  G  V  W
235    AAAGCAAACACAATGTACAAATGTCTTCAATACAATCATTTACCCGAACCTGGTGATGATTTTCGTAATTTGGAGAAGAA
79     K  A  N  T  M  Y  K  C  L  Q  Y  N  H  F  T  E  P  G  D  D  F  V  I  G  E  E
313    GACTGCTTGTATGTAACATCTACACGCCAGTGAATGCCAATAAGAACTCCAATCTCGATGTAATTATTTTTATTTCAC
105    D  C  L  Y  V  N  I  Y  T  P  V  N  A  N  K  N  S  N  L  D  V  I  I  F  I  H
391    GGAGGAGCTTTTCATGTTCAATATATGGCGGCTTTATGGTCCAAAAATCATAATGGACAGAAATGTCGTATATGTAAT
131    G  G  A  F  M  F  N  Y  G  G  S  Y  G  P  K  I  I  M  D  R  N  V  V  Y  V  N
469    TTCAATTATCGTTTGGGACCTTTAGGTTTTCTGAGTACTGAAGACGAAATGTACCTGGAAATGTTGGACTGAGAGAT
157    F  N  Y  R  L  G  P  L  G  F  L  S  T  E  D  E  I  V  P  G  N  V  G  L  R  D
547    CAAATATTGGCATTGAAATTCATTAAGACAACATAACAATATTTTGGGGGAAATCCCGACTCAATAACGCTTACAGGG
183    Q  I  L  A  L  K  F  I  K  D  N  I  Q  Y  E  G  G  N  P  D  S  I  T  L  T  G
625    ATGTCTGCTGGTGGAGCCAGTGTTCACATACATTATATGTACCCTTTCTAAAGACTGTTTACAGAGGTTTCTCG
209    M  S  A  G  G  A  S  V  H  I  H  Y  M  S  P  L  S  K  G  L  F  N  R  G  F  S
703    CAAAGTGGCTGTGCTCTTAATCCTTGGGTCATTATGAAAAATGGTAGAAAAAGCCTTAAAAATGGCGGATATTTTA
235    Q  S  G  C  A  L  N  P  W  V  I  M  E  N  G  R  E  K  A  L  K  L  A  D  I  L
781    GGTGCCCACAGAAAATACGAAAATGCTGTAGAATGCTGAAAAGCCGCCAGGAAGACAGATTGTTGATTCGTGTG
261    G  C  P  T  E  N  T  K  I  A  V  E  C  L  K  S  R  P  G  R  Q  I  V  D  S  V
859    AAACACTTTTTGCCTTGGCTTTACAATCCGTTTTACCCTTTGGGGTCTGTCGCGATAAAGCATCCAAAAATCCTGTT
287    K  H  F  L  P  W  L  Y  N  P  F  S  P  F  G  V  V  V  D  K  A  S  K  N  P  V
937    CTACCTGAACATCCACTGGATTAATGAAAAACGTAAGTGAAGATCTACCTTATATTTTTTCGCACGTTTTGGAA
313    L  P  E  H  P  L  D  L  M  K  K  R  K  V  Q  D  L  P  Y  I  F  S  H  V  L  E
1 015  GAAGGATTGTATCCAGCTTACGATTTCTGGAACGATAAATATTTATCAGAAATGATGCTAACTGGTCCGAGCTAATC
339  E  G  L  Y  P  A  Y  D  F  W  N  D  K  Y  L  S  E  I  D  A  N  W  S  E  L  I
1 093  CCATTCGTCCTCGATTATAATAACACCAATTTACCAGGGCGAAAAGAGATGAAGTATCGAAAACAATTCGAGAGTTTTAT
365  P  F  V  L  D  Y  N  N  T  I  S  P  G  E  R  D  E  V  S  K  T  I  R  E  F  Y
1 171  TTAAGGACAAATCTGTCAACAAAACACCTTCAAAGATCTCGTGAAGATTGCTCTCGGACAGACTGTTTATATCGGAC
391  L  K  D  K  S  V  N  K  N  T  F  K  D  L  V  K  I  V  S  D  R  L  F  I  S  D
1 249  ATCCAAAAATGTGCTAGAATGCAATCTGCTGCAATGAAATCGCCTGTTTACTATTATCACTTTACGTACAGAGGGAAA
417  I  Q  K  C  A  R  M  Q  S  A  A  M  K  S  P  V  Y  Y  Y  H  F  T  Y  R  G  K
1 327  TTCAGCAAATCTATTGTGAGGATGAAAGAAAACCTTGAAGAATGTTGGGCCATCACATGCGGATGACACAATTTATGTC
443  F  S  K  S  I  V  R  M  K  E  N  L  E  N  V  G  P  S  H  A  D  D  T  I  Y  V
1 405  CTATCATCAACAATAAACACACAAAGCACACCGGAAGATAAAGAAATGTGCAACGAATTTCTTAACATGTGGTTATCC
469  L  S  S  T  I  N  T  Q  S  T  P  E  D  K  E  M  C  N  E  F  L  N  M  W  L  S
1 483  TTTGCTTCGAATAGTCATCCTAAATTACCTGATGATGTTGATTGGCCACAGTCTCAAAGATGTTCAAGATCCATTA
495  F  A  S  N  S  H  P  K  L  P  D  D  V  D  W  P  T  V  S  K  D  V  Q  D  P  L
1 561  ATTTATGCAGAAATAAGATCTCCTGATGATGTGGTCATTTTATCGGATGATAAATTTGGGGAATCATAAATTTGGAGT
521  I  Y  A  E  I  R  S  P  D  D  V  V  I  L  S  D  D  N  L  G  N  H  K  F  W  S
1 639  TCTCTACCAATTAATGAAAACGAGCGAATTTTAAACATTGATTAAGAAGAAGTGTAG
547  S  L  P  I  N  E  N  E  R  I  L  T  L  I  K  E  E  L  *

```

图 2 烟草甲 *LsCarEB2* 核苷酸序列及推导的氨基酸序列
(起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA 加粗；* 表示终止密码子；下划虚线为信号肽序列；
下划线为糖基化位点；催化三联体用阴影表示；方框为保守氨基酸序列)

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequence of *LsCarEB2* in *Lasioderma serricorne*

(The start codon is indicated with bold and the stop codon is indicated with bold and an asterisk; The predicated signal peptide is dotted underlined; N-linked glycosylation is underlined; Putative catalytic triad is shaded; The conserved amino acids are boxed)

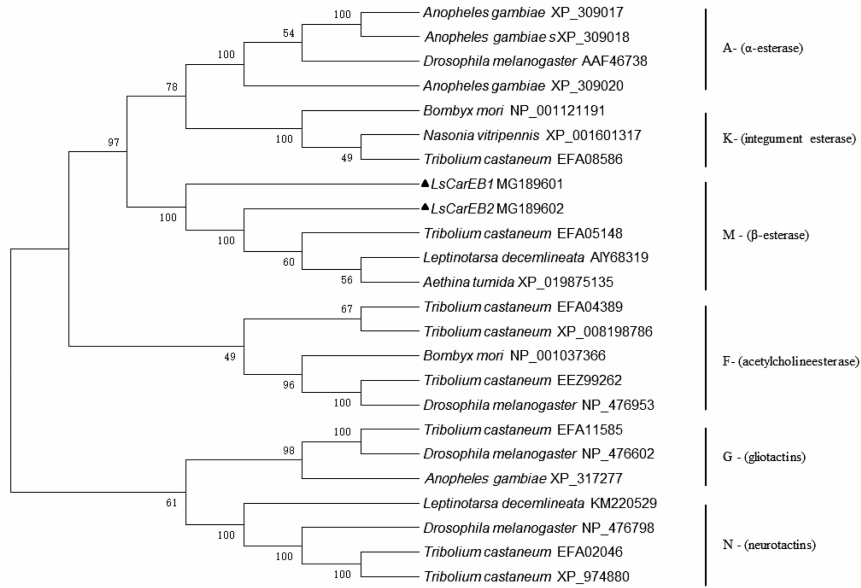


图 3 烟草甲和其他昆虫 CarEs 系统发育关系分析

Fig. 3 Phylogenetic tree of *Lasioderma serricorne* and other insects

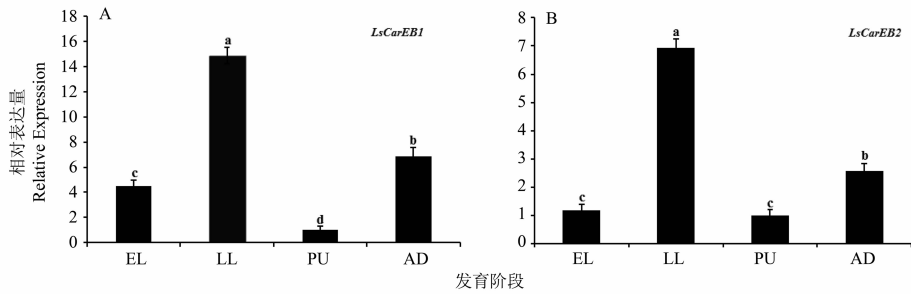


图 4 烟草甲不同发育阶段 *LsCarEBs* 的相对表达量

(柱状图上的不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平差异有统计学意义; EL、LL、PU、AD 分别代表烟草甲的低龄幼虫、高龄幼虫、蛹和成虫 A: *LsCarEB1*; B: *LsCarEB2*)

Fig. 4 Relative expression levels of *LsCarEBs* in different development stages of *L. serricorne*

(Different lowercase letters above bars indicate statistically differences at the 0.05 probability level; EL; early larvae; LL; lately larvae; PU; pupae; AD; adults. A: *LsCarEB1*; B: *LsCarEB2*)

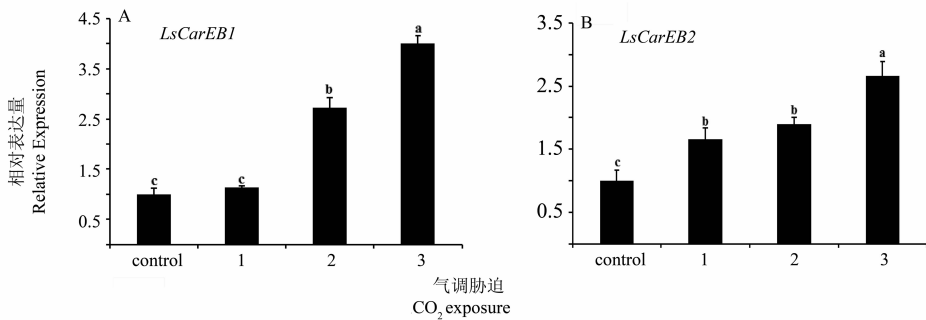


图 5 不同 $\varphi(\text{CO}_2)$ 诱导下烟草甲高龄幼虫体内 *LsCarEBs* 的相对表达量

(柱状图上的不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平差异有统计学意义; Control: 对照; 1: $\text{LC}_{10}(\varphi(\text{CO}_2) = 30\% + \varphi(\text{空气}) = 70\%)$; 2: $\text{LC}_{30}(\varphi(\text{CO}_2) = 70\% + \varphi(\text{空气}) = 30\%)$; 3: $\text{LC}_{50}(\varphi(\text{CO}_2) = 90\% + \varphi(\text{空气}) = 10\%)$; A: *LsCarEB1*; B: *LsCarEB2*)

Fig. 5 Relative expression levels of *LsCarEBs* in lately larvae of *L. serricorne* after exposure to different volume fraction of CO_2

(Different lowercase letters above bars indicate statistically differences at the 0.05 probability level; Control; 1: $\text{LC}_{10}(\varphi(\text{CO}_2) = 30\% + \varphi(\text{air}) = 70\%)$; 2: $\text{LC}_{30}(\varphi(\text{CO}_2) = 70\% + \varphi(\text{air}) = 30\%)$; 3: $\text{LC}_{50}(\varphi(\text{CO}_2) = 90\% + \varphi(\text{air}) = 10\%)$; A: *LsCarEB1*; B: *LsCarEB2*)

簇(命名为A-N簇),进一步可划分为A-C、D-G、H-N 3个功能组^[31]。本研究在烟草甲转录组测序基础上,通过RT-PCR技术克隆获得2条CarE基因cDNA全序列,经与其它昆虫CarE氨基酸进行序列比对和聚类分析,发现*LsCarEB1*和*LsCarEB2*均属于M簇,为 β 酯酶。前期研究发现M簇CarEs基因参与昆虫体内多种生理途径,包括信息素的降解、生殖发育以及对外源物质的解毒代谢等^[28]。

研究发现CarEs基因在昆虫不同发育阶段的表达存在一定的差异。如东亚飞蝗*Locusta migratoria*的*LsCseF1*在卵期和低龄若虫期表达较低,在4龄若虫表达量上调达到峰值,且一直持续到成虫期第5天^[32]。而橘小实蝇*BdCAREB1*主要集中在3龄幼虫期高表达,进一步分析发现,幼虫发育至3龄幼虫进入暴食期,随着食物摄入的外源毒素显著增加,因此*BdCAREB1*的表达量相应升高^[33]。本研究发现烟草甲*LsCarEB1*和*LsCarEB2*在不同发育阶段均有表达,高龄幼虫期的表达量显著高于低龄幼虫、蛹和成虫期,这可能与2个基因在高龄幼虫期发挥重要作用相关,其具体的功能解析还有待于进一步研究。

CO₂气调技术是一种环保安全的新型害虫防治技术,它主要利用高 φ (CO₂)和低 φ (O₂)协同作用来提高对害虫的控制效果^[5]。在同一昆虫中,不同发育阶段对CO₂气调的耐受能力存在显著的差异,如粉螟*C. cautella*各发育时期的试虫经 $\varphi =$

99% CO₂处理后,发现幼虫、蛹和成虫的致死时间分别为99.9、78.1和37.5 h,幼虫对CO₂气调胁迫的耐受性最强;而赤拟谷盗经 $\varphi = 99\%$ CO₂处理后,其幼虫的致死时间明显高于成虫,说明该虫的幼虫阶段具有更强的耐受性^[7]。基于此,选择耐受性相对较差的发育阶段作为控制害虫的关键时期,将为有效地应用CO₂气调防治害虫提供便利。本课题组前期研究发现,烟草甲高龄幼虫对CO₂气调具有较强的耐受能力,进一步分析发现其体内羧酸酯酶的活性显著高于对照^[18],基于羧酸酯酶在外源物质代谢方面的重要作用,推测高龄幼虫期CO₂高耐受性可能与羧酸酯酶的活性升高密切相关。本研究发现,CO₂气调处理烟草甲6 h后,*LsCarEB1*和*LsCarEB2*表达量均显著高于对照组,且mRNA的相对表达量随着胁迫 φ (CO₂)的升高而逐渐上调,我们推测这2个基因可能共同参与了烟草甲对CO₂气调胁迫的应激响应。

本研究成功克隆烟草甲*LsCarEB1*和*LsCarEB2*的全长cDNA,据软件预测这2个基因编码的蛋白质均属于 β 酯酶;*LsCarEB1*和*LsCarEB2*在烟草甲各发育阶段均有表达,且在高龄幼虫期的表达量最高,均能被CO₂气调胁迫诱导表达,说明它们是烟草甲生长发育的重要参与者,并在抵御CO₂气调胁迫过程中起着关键作用。本研究为阐明CarEs基因在昆虫抵抗气调胁迫的分子机制奠定基础,同时为利用CO₂气调防控害虫提供新的思路。

参考文献:

- [1] OMAE Y, FUCHIKAWA T, NAKAYAMA S, et al. Life history and mating behavior of a black-bodied strain of the cigarette beetle *Lasioderma serricorne* (Coleoptera: Anobiidae) [J]. Applied Entomology and Zoology, 2012, 47 (2):157-163.
- [2] IMAI T, MASUDA R. Insecticidal activities of methyl-eugenol and β -asarone, from the herbal medicines Saishin and Sekishōkon, and other alkoxy-propenyl-benzene derivatives against the cigarette beetle *Lasioderma serricorne*, (Coleoptera: Anobiidae) [J]. Applied Entomology and Zoology, 2017, 52(2):183-188.
- [3] PIMENTEL M A G, FARONILR D A, TOTOLA M R, et al. Phosphine resistance, respiration rate and witness consequences in stored-product insects [J]. Pest Management Science, 2007, 63(9):876-881.
- [4] HORI M, KASAIISHI Y. Effects of the conditions of the cigarette beetle, *Lasioderma serricorne* (Fabricius) (Coleoptera: Anobiidae), on the knockdown time by phosphine fumigation [J]. Applied Entomology and Zoology, 2005, 40(4):557-561.
- [5] BELL C H. A review of insect responses to variations encountered in the managed storage environment [J]. Journal of Stored Products Research, 2014, 59:260-274.
- [6] TANAKA F, CHO R, HATA S, et al. Mortality modeling of adult *Tribolium confusum*, (Jacquelin du Val) exposed to different concentrations of carbon dioxide in a mixture with nitrogen [J]. Journal of Stored Products Research, 2016, 69:113-118.
- [7] HUSAIN M, SUKIRNO S, MEHMOOD K, et al. Effectiveness of carbon dioxide against different developmental stages of *Cadra cautella* and *Tribolium castaneum* [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2017, 24 (14):12787-12795.
- [8] NAVARRO S, DIAS R, DONEHAYE E. Induced tolerance of *Sitophilus oryzae* adults to carbon dioxide [J]. Journal of Stored Products Research, 1985, 21(4):207-213.
- [9] MAHBUB H M, AIKINS M J, WES S, et al. Efficacy of controlled atmosphere treatments to manage arthropod pests of dry-cured hams [J]. Insects, 2016, 7(3):44.

- [10] GUNASEKARAM N, RAJENDRAN S. Toxicity of carbon dioxide to drugstore beetle *Stegobium paniceum* and cigarette beetle *Lasioderma serricorne* [J]. Journal of Stored Products Research, 2005, 41(3):283–294.
- [11] MARSHALL S D, PUTTERILL J J, PLUMMERI K M, et al. The carboxylesterase gene family from *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Molecular Evolution, 2003, 57(5):487–500.
- [12] YAN S, CUI F, QIAO C. Structure, function and applications of carboxylesterases from insects for insecticide resistance [J]. Protein and Peptide Letters, 2009, 16(10):1181–1188.
- [13] JEON J H, KIM S J, LEE H S, et al. Novel metagenome-derived carboxylesterase that hydrolyzes β -lactam antibiotics [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(21):7830–7836.
- [14] LI X, SCHULER M A, BERENBAUM M R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics [J]. Annual Review of Entomology, 2007, 52:231–253.
- [15] PAN Y O, GUO H L, GAO X W. Carboxylesterase activity, cDNA sequence, and gene expression in malathion susceptible and resistant strains of the cotton aphid, *Aphis gossypii* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology (Part B), 2009, 152(3):266–270.
- [16] MERLIN C, ROSELL G, CAROTSANS G, et al. Antennal esterase cDNAs from two pest moths, *Spodoptera littoralis*, potentially involved in odourant degradation [J]. Insect Molecular Biology, 2007, 16(1):73–81.
- [17] BISWAS S, REINHARD J, OAKESHOTT J, et al. Sensory regulation of Neuroligins and Neurexin 1 in the honeybee brain [J]. PLoS ONE, 2010, 5(2):e9133.
- [18] LI C, LI Z Z, CAO Y, et al. Partial characterization of stress-induced carboxylesterase from adults of *Stegobium paniceum* and *Lasioderma serricorne* (Coleoptera: Anobiidae) subjected to CO₂-enriched atmosphere [J]. Journal of Pest Science, 2009, 82(1):7–11.
- [19] 李灿, 李子忠. 气调胁迫下 3 种中药材储藏期害虫谷胱甘肽转移酶活性研究 [J]. 植物保护, 2009, 35(2):91–94.
- LI C, LI Z Z. GSTs activity of three pests in stored Chinese medicinal materials [J]. Plant Protection, 2009, 35(2):91–94.
- [20] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10):2731–2739.
- [21] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} method [J]. Methods, 2001, 25(4):402–408.
- [22] ADAMS M D, CELNIKER S E, HOLT R A. The genome sequence of *Drosophila melanogaster* [J]. Science, 2000, 287(5461):2185–2195.
- [23] RANSON H, CLAUDIANOS C, ORTELLI F, et al. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance [J]. Science, 2002, 298(5591):179–181.
- [24] YU Q Y, LU C, LI W L, et al. Annotation and expression of carboxylesterases in the silkworm, *Bombyx mori* [J]. BMC Genomics, 2009, 10(1):553.
- [25] CLAUDIANOS C, RANSON H, JOHNSON R M, et al. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee [J]. Insect Molecular Biology, 2006, 15(5):615–636.
- [26] CRISTOFOLETTI P T, RIBERIO A F, DERAISON C, et al. Midgut adaptation and digestive enzyme distribution in a phloem feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* [J]. Journal of Insect Physiology, 2003, 49(1):11–24.
- [27] KARATOLOS N, PAUCHET Y, WILKINSON P, et al. Pyrosequencing the transcriptome of the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* reveals multiple transcripts encoding insecticide targets and detoxifying enzymes [J]. BMC Genomics, 2011, 12(1):56.
- [28] TSUBOTA T, SHIOTSUKI T. Genomic analysis of carboxyl/cholinesterase genes in the silkworm *Bombyx mori* [J]. BMC Genomics, 2010, 11(1):377.
- [29] 刘娇, 张建珍, 李大琪, 等. 中华稻蝗羧酸酯酶家族基因生物信息学及组织表达特异性分析 [J]. 中国农业科学, 2015, 48(21):4272–4284.
- LIU J, ZHANG J Z, LI D Q, et al. Bioinformatics and tissue-specific expression analysis of carboxylesterase genes from *Oxya chinensis* [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2015, 48(21):4272–4284.
- [30] WANG L L, HUANG Y, LU X P, et al. Overexpression of two α -esterase genes mediates metabolic resistance to malathion in the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) [J]. Insect Molecular Biology, 2015, 24(4):467–479.
- [31] OAKESHOTT J G, CLAUDIANOS C, CAMPBELL P M, et al. Biochemical genetics and genomics of insect esterases [M]//GILBERT L I, IATROU K, GILL S. Comprehensive molecular insect science (Vol. 5). Oxford, UK: Elsevier, 2005:309–381.
- [32] 张建琴, 葛娉婷, 李大琪, 等. 飞蝗羧酸酯酶基因 *LmCesFI* 的时空表达及与杀虫剂耐受性的关系 [J]. 中国农业科学, 2014, 47(8):1522–1530.
- ZHANG J Q, GE P T, LI D Q, et al. Spatio-temporal expression and insecticide tolerance analysis of carboxylesterase gene *LmCesFI* from *Locusta migratoria* [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2014, 47(8):1522–1530.
- [33] 申光茂, 豆威, 王进军. 橘小实蝇羧酸酯酶基因 *Bd-CAREBI* 的克隆及其表达模式解析 [J]. 中国农业科学, 2014, 47(10):1947–1955.
- SHEN G M, DOU W, WANG J J. Cloning and expression analysis of a carboxylesterase gene *BdCAREBI* from *Bactrocera dorsalis* [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2014, 47(10):1947–1955.