

异色瓢虫的 *HSP90* 基因的克隆与特性分析*

唐 斌^{1,2}, 王世贵¹, 王峰巍^{2,3}, 庞 虹³, 张 帆²

(1. 杭州师范大学杭州市动物适应与进化重点实验室, 浙江 杭州 310036;

2. 北京市农林科学院植保环保所, 北京 100089;

3. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 采用同源克隆和锚定 PCR 技术, 从异色瓢虫 *Harmonia axyridis* (Pallas) 中克隆到热休克蛋白 *HSP90* 基因的 cDNA 全序列 (Genbank number: FJ501962)。cDNA 全长 2 480 bp, 包含 3'非编码区域 (UTR) 为 200 bp 和 5'UTR 为 126 bp, 开放阅读框 (ORF) 长 2 154 bp, 编码 717 个氨基酸。预测的相对分子质量为 82 230, 理论等电点为 4.96, 无糖基化位点、跨膜结构和信号肽。在 N 端具有 *HSP90* 基因保守的 ATPase 结构, 含有 *HSP90* 家族的 C 末端的保守序列 EEVD。与赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 相比较, 同源性高达 90%, 系统发育分析也表明两者的亲缘关系最近。*HaaHSP90* 基因的克隆和比较分析为进一步深入研究异色瓢虫的抗逆机理及其进化具有重要意义。

关键词: 异色瓢虫; *HSP90*; 克隆; 特性分析; 序列分析

中图分类号: Q78 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579 (2010) 02-0072-07

Cloning and Characterization Analysis of Heat Shock Protein 90 Gene from *Harmonia axyridis* (Pallas)

TANG Bin^{1,2}, WANG Shigui¹, WANG Fengwei^{2,3}, PANG Hong³, ZHANG Fan²

(1. Hangzhou Key Laboratory of Animal and Evolution, Hangzhou Normal University,
Hangzhou 310036, China;

2. Institute of Plant and Environment Protection, Beijing Academy of Agriculture
and Forestry Sciences, Beijing 100089, China;

3. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China

Abstract: The heat shock protein 90 (*HSP90*) gene from *Harmonia axyridis* (Pallas) was cloned using techniques of homological cloning and anchored PCR. The full length of cDNA sequence is 2 480 bp (Genbank number: FJ501962), containing a 3'UTR (untranslated region) of 200 bp, a 5'UTR of 126 bp, and an ORF of 2 154 bp which encodes a polypeptide of 717 amino acids with an estimated molecular weight of 82 230 and pI of 4.96. There are no glycosylation sites, putative transmembrane domain and signature peptide. It contains ATPase conservative domain of (*HSP90*) in N-site and EEVD signature sequence on C-site. Compared with *Tribolium castaneum*, they are 90% identities and Phylogenetic analysis shows that these two species are most closely related. Cloning and comparison analysis of *HSP90* genes from *Harmonia axyridis* (Pallas) could be useful in the studies of anti-stress mechanism, tolerance improvement breeding and evolution for these animals.

Key words: *Harmonia axyridis*; *HSP90*; cloning; characterization analysis; sequence analysis

* 收稿日期: 2009-02-28

基金项目: 国家“973”计划资助项目 (2009CB119200); 国家科技部支撑计划资助项目 (2008BADA5B02); 杭州师范大学高层次人才引进启动基金资助项目 (YS05203105)

作者简介: 唐斌 (1980年生), 男, 博士; 通讯作者: 庞虹, 张帆; E-mail: Lsshpan@mail.sysu.edu.cn

热休克蛋白 (Heat shock protein, HSP), 又称热应激蛋白 (heat stress protein, HSP) 和应激蛋白 (stress protein, SP)。它是机体在应激情况下细胞内迅速合成的一组蛋白质, Ritassa^[1] 在 1962 年首次从果蝇中发现。到了 1974 年, Tissieres^[2] 发现热休克反应中可以转录合成一组特殊蛋白, 而且伴随着这类蛋白的合成, 细胞的其他蛋白合成却受到抑制。而且昆虫体内热激蛋白的表达量越高, 其耐热性就越强^[3-4]。除了高热之外, 多种应激原如重金属、饥饿、缺氧、缺血等都可以诱导 HSP 的表达。

异色瓢虫 *Harmonia axyridis* (Pallas) 属鞘翅目 Coleoptera, 瓢甲科 Coccinellidae, 是多种农林作物害虫的重要捕食性天敌, 在生物防治中具有良好的应用前景^[5]。国外主要分布于俄罗斯、蒙古、朝鲜、日本等地, 我国各地均有分布。异色瓢虫可取食各类蚜虫和松干蚧、粉蚧、绵蚧、木虱、螨类、某些鳞翅目和鞘翅目昆虫的卵、低龄幼虫和蛹等^[6]。我国是农业大国, 且富有异色瓢虫资源, 因此在异色瓢虫的开发利用方面具有明显的优势和较大的空间^[7]。目前国内外对瓢虫耐热性的研究不多, 且研究主要是集中一些著名的模式生物或世

界范围发生的害虫进行, 对天敌尤其是瓢虫的耐热性研究甚少, 其热耐热性发生机理的研究更是缺乏。

1 材料与方法

1.1 试验材料与仪器

1.1.1 异色瓢虫的饲养与材料收集 异色瓢虫由北京农林科学院生物防治中心实验室在 $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$, 14L: 10D (L: Light; D: Dark) 条件下饲养。大肠杆菌 DH5 α 菌株由杭州师范大学生命与环境科学学院昆虫生理生化与分子生物学实验室保存。异色瓢虫整个腹部的解剖在冰上进行, 并快速放置到冰浴的 EP 管中, -80°C 保存备用。

1.1.2 主要试剂及仪器 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech), TaqDNA 聚合酶和 pMD18-T 载体购自大连宝生物公司, DNA Gel Purification kit 购自 Omega 公司, PCR 引物由上海英骏公司合成。PCR 扩增仪为 Eppendorf 公司的 Mastercycler personal, DNA 电泳仪采用北京市六一仪器厂的 DYY-6C 型电泳仪。

1.1.3 引物序列及作用 引物序列及作用见表 1。

表 1 *HaHSP90* 基因的 cDNA 扩增的策略和引物

Table 1 Cloning strategy and primers for *HaHSP90* cDNA

扩增区域	引物名称	方向 ¹⁾	类型 ²⁾	核苷酸序列 (5'-3')
PCR 片段	HSP90-DF1	F	D	ACC GGY ATY CGN ATG AC
	HSP90-DF2	F	D	TGG GAR GAY CAY YTK GC
	HSP90-DR1	R	D	CCA TRT ADC CCA TNG TGG A
	HSP90-DR2	R	D	TCC ATR TTD GCV GWC CA
5'-RACE	HaHSP90-5RA	R	G	CAG GTA TGA GTT CTT CGC AGT TG
	HaHSP90-5RB	R	G	CTG CGG ACA TAC AGT TTA ATG
	HaHSP90-5RC	R	G	CGA ATG GTA CTC TAC GAG GAA C
		F	A	AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT
3'-RACE	HaHSP90-3FA	F	G	GGA AGG TTT GGA ACT GCC TGA
	HaHSP90-3FB	F	G	GAA GAA GCG TGA GGA AGA CA
	HaHSP90-3FC	F	G	TGA AGG TCT CTG CAA AGT GA
		R	O	AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA C (T) ₃₀ VN

1) F: 正向 (Forward); R: 反向 (Reverse);

2) D: 简并引物; G: 特异性引物; A: Nested Universal Primer; O: 3'-RACE CDS Primer

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 的抽提、cDNA 合成和 PCR 反应

采用异硫氰酸胍法方法抽提异色瓢虫整个腹部部分的总 RNA^[8]。将 100 mg 的脂肪体组织放入小匀浆

器中, 加入 500 μL SolutionD 充分匀浆。匀浆完成后转移到 DEPC 处理过的 EP 管中, 然后加入 50 μL 2 mol/L 的乙酸钠溶液 (pH4.0), 500 μL 的饱和平衡酚 (pH7.0), 100 μL 的氯仿/异丙醇

(49:1), 颠倒混匀。再放置冰上 15 min 后, 4 ℃ 10 000 r/min 离心 20 min。取上层水相到新的 EP 管中, 加入等体积异丙醇混匀, -20 ℃ 放置 1 h 以上, 4 ℃ 12 000 r/min 离心 15 min。沉淀重溶于 100 μL Solution D 中, 另外加入 10 μL 的乙酸钠溶液 (pH4.0) 和 300 μL 乙醇混匀, -20 ℃ 放置 1 h 以上。最后是 4 ℃ 12 000 r/min 离心 15 min, 将沉淀重溶于 30 ~ 50 μL 的 DEPC 处理水中, -80 ℃ 长期保存。Solution D (4 mol/L 异硫氰酸钠, 25 mmol/L 柠檬酸钠, 0.1 mol/L 巯基乙醇, $w = 0.5\%$ 十二烷基肌氨酸钠)。

先采用紫外分光光度计测定总 RNA 的浓度, 再在总体积为 25 μL 的 EP 管中依次加入 1 μg 总 RNA, 5 μL 的 5 × buf, 2 μL 的 dNTP (10 mmol/L), 1 μL 的 AMV RTase, 补充 DEPC 处理水到 25 μL, 在 42 ℃ 的水浴中保温 1 h 后, 再放入 70 ℃ 的水浴 10 min 灭活 AMV RNase, 即获得一链 cDNA^[9]。两对简并引物: HSP90-DF1, HSP90-DF2, HSP90-DR1 和 HSP90-DR2 根据已知的昆虫 HSP90 基因的保守结构域设计。第 1 次 PCR 采用 HSP90-DF1 和 HSP90-DR1 作为正反向引物, 在以下的程序下运行: 先是 3 个循环的 94 ℃ 30 s, 45 ℃ 30 s 和 72 ℃ 80 s; 然后是 30 个循环的 94 ℃ 30 s, 48 ℃ 30 s 和 72 ℃ 80 s。第 2 次 PCR 采用巢式 PCR 扩增, 用第 1 次 PCR 的产物稀释 100 倍作为模板, HSP90-DF2 和 HSP90-DR2 来扩增, PCR 程序跟一次一样。

1.2.2 胶回收、连接、转化和验证 将 PCR 中的目的条带采用琼脂糖凝胶电泳回收后, 连接到 TAKARA 的 pMD18-T 载体中, 然后将其转入 DH5α 细胞中, 挑斑验证后送往上海英骏公司测序。

1.2.3 cDNA 的末端快速扩增 (RACE) 根据 Clontech 的 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 分别构建异色瓢虫的 5' 和 3' RACE 文库。HaHSP90-5RA, HaHSP90-5RB, HaHSP90-5RC, HaHSP90-3FA, HaHSP90-3FB 和 HaHSP90-3FC 三对引物根据获的中间片段序列来设计, 分别用于扩增异色瓢虫 HSP90 基因的 5' 和 3' 端序列。5' RACE 扩增采用试剂盒中的 UPM 引物和 HaHSP90-5RA, 二次巢式 PCR 时采用 NUP 和 HaHSP90-5RB。同样 3' RACE 扩增采用试剂盒中的 UPM 引物和 HaHSP90-3FA, 二次巢式 PCR 时采用 NUP 和 HaHSP90-3FB。

采用一样的 PCR 程序: 94 ℃ 10 min 后, 30 个循环的 94 ℃ 30 s, 48 ℃ 30 s 和 72 ℃ 120 s。HaHSP90-5RC 和 HaHSP90-3FC 分别用于验证 5' 和 3' RACE 的菌落 PCR。

1.2.4 序列分析及系统学分析 序列分析方法采用 Dnastar、Dnaman、Vector 等软件进行, 序列比对、氨基酸同源性分析及系统树构建等采用 Blast, ClustalW 和 MEGA3.1 等分析。基因的特性采用 Compute pI/Mw tool: http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html, TMHMM Server v. 2.0: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/> SignalP 3.0 Server: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> 和 Multiple sequence alignment by Florence Corpet: <http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html> 等在线分析软件。

2 结果与分析

2.1 异色瓢虫的 HSP90 基因的克隆和序列分析

异色瓢虫的 HSP90 基因的克隆中, 首先经过两次 PCR, 利用 HSP90-DF2 和 HSP90-DR2 作为引物, 获得了一段约 900 bp 左右的片段。测序结果显示为 HSP90 基因, 且与鞘翅目昆虫赤拟谷盗的同源性最高, 在氨基酸上达到 93% 的相似性。根据这段序列, 分别在 5' 和 3' 端设计了 3 条特异性引物, 具体见图 1。利用异色瓢虫的 5' 和 3' RACE 文库作为模板经过两轮的 PCR 扩增后, 分别显示出 1 200 bp 和 500 bp 左右的条带。回收、连接、转化、验证和测序的结果表明为所需要的 HSP90 基因序列。

拼接 5' 和 3' RACE 的序列和中间片段, 获得的异色瓢虫的 HSP90 基因的 cDNA 全长为 2 480 bp, 编码 717 个氨基酸。并预测出的相对分子质量为 82 230, 等电点为 4.96。在 N 端具有 HSP90 基因保守的 ATPase 结构, 具体见图 2。采用 TMHMM Server v. 2.0 和 SignalP 3.0 Server 在线分析, 没有发现其含有跨膜结构和信号肽。但是, 其 C 端为保守的 EEVD 结构, 这与已知的所有昆虫 HSP90 基因结构一致^[10]。并且终止密码子的后面和 polyA 的前面发现了 AATAAA 结构, 表明获得的为完整的 cDNA 序列。通过与所有昆虫中克隆和基因组测序推测的 HSP90 基因比对结果也证明了这点。

HaHSP90	MDPE--VQN-GEVETFAFQAEIAQMSLTINTFYSNKEIFLRELISNSDALKIRYQSLETFACLESKRELYTRITPNKNDGLTITDGTGIMTKADLVNGLTIAKSG	
TcHSP90	MDPE--NQK-GVETFAFQAEIAQMSLTINTFYSNKEIFLRELISNSDALKIRYQSLETFACLESKRELYTRITPNKNDGLTITDGTGIMTKADLVNGLTIAKSG	
BmHSP90	MDPEMTQ-GEVETFAFQAEIAQMSLTINTFYSNKEIFLRELISNSDALKIRYQSLETFACLESKRELYTRITPNKNDGLTITDGTGIMTKADLVNGLTIAKSG	
AmHSP90	STEMETKA-EDVETFAFQAEIAQMSLTINTFYSNKEIFLRELISNSDALKIRYQSLETFACLESKRELYTRITPNKNDGLTITDGTGIMTKADLVNGLTIAKSG	
DmHSP90	MP-EAETFAFQAEIAQMSLTINTFYSNKEIFLRELISNSDALKIRYQSLETFACLESKRELYTRITPNKNDGLTITDGTGIMTKADLVNGLTIAKSG	
ApHSP90	MDPEMTQ-GEVETFAFQAEIAQMSLTINTFYSNKEIFLRELISNSDALKIRYQSLETFACLESKRELYTRITPNKNDGLTITDGTGIMTKADLVNGLTIAKSG	
LmHSP90	MDQA--AEVETFAFQAEIAQMSLTINTFYSNKEIFLRELISNSDALKIRYQSLETFACLESKRELYTRITPNKNDGLTITDGTGIMTKADLVNGLTIAKSG	
BtHSP90	MDPEVNM-EQAEIETFAFQAEIAQMSLTINTFYSNKEIFLRELISNSDALKIRYQSLETFACLESKRELYTRITPNKNDGLTITDGTGIMTKADLVNGLTIAKSG	
HaHSP90	TKAFMEALQAGADISMLGQGVGFYSAYLVADKVTYVSKNDDEQYVSSAGGSFTVIRIDPEPLGRGKTVLHKEQAARLEERKIKETVKKHSQIYGPITKLVER	
TcHSP90	TKAFMEALQAGADISMLGQGVGFYSAYLVADKVTYVSKNDDEQYVSSAGGSFTVIRIDPEPLGRGKTVLHKEQAARLEERKIKETVKKHSQIYGPITKLVER	
BmHSP90	TKAFMEALQAGADISMLGQGVGFYSAYLVADKVTYVSKNDDEQYVSSAGGSFTVIRIDPEPLGRGKTVLHKEQAARLEERKIKETVKKHSQIYGPITKLVER	
AmHSP90	TKAFMEALQAGADISMLGQGVGFYSAYLVADKVTYVSKNDDEQYVSSAGGSFTVIRIDPEPLGRGKTVLHKEQAARLEERKIKETVKKHSQIYGPITKLVER	
DmHSP90	TKAFMEALQAGADISMLGQGVGFYSAYLVADKVTYVSKNDDEQYVSSAGGSFTVIRIDPEPLGRGKTVLHKEQAARLEERKIKETVKKHSQIYGPITKLVER	
ApHSP90	TKAFMEALQAGADISMLGQGVGFYSAYLVADKVTYVSKNDDEQYVSSAGGSFTVIRIDPEPLGRGKTVLHKEQAARLEERKIKETVKKHSQIYGPITKLVER	
LmHSP90	TKAFMEALQAGADISMLGQGVGFYSAYLVADKVTYVSKNDDEQYVSSAGGSFTVIRIDPEPLGRGKTVLHKEQAARLEERKIKETVKKHSQIYGPITKLVER	
BtHSP90	TKAFMEALQAGADISMLGQGVGFYSAYLVADKVTYVSKNDDEQYVSSAGGSFTVIRIDPEPLGRGKTVLHKEQAARLEERKIKETVKKHSQIYGPITKLVER	
HaHSP90	ERKELSDDEAEERKDE-EEATE-ESDK-PKIEDVGEDEDEL---KEKRRKKKTIKEKYTEDEELNKTPIWTRADDISQEEYGEFYKSLNDWEDHLAVKHSEVEGG	
TcHSP90	ERKELSDDEAEERKDE-EEATE-ESDK-PKIEDVGEDEDEL---TKKEDKKKKTIKEKYTEDEELNKTPIWTRADDISQEEYGEFYKSLNDWEDHLAVKHSEVEGG	
BmHSP90	ERKELSDDEAEERKDE-EEATE-ESDK-PKIEDVGEDEDEL---KKDTRKKKKTIKEKYTEDEELNKTPIWTRADDISQEEYGEFYKSLNDWEDHLAVKHSEVEGG	
AmHSP90	ERKELSDDEAEERKDE-EEATE-ESDK-PKIEDVGEDEDEL---EEGKRRKKKTIKEKYTEDEELNKTPIWTRADDISQEEYGEFYKSLNDWEDHLAVKHSEVEGG	
DmHSP90	ERKELSDDEAEERKDE-EEATE-ESDK-PKIEDVGEDEDEL---KKDTRKKKKTIKEKYTEDEELNKTPIWTRADDISQEEYGEFYKSLNDWEDHLAVKHSEVEGG	
ApHSP90	ERKELSDDEAEERKDE-EEATE-ESDK-PKIEDVGEDEDEL---KKDTRKKKKTIKEKYTEDEELNKTPIWTRADDISQEEYGEFYKSLNDWEDHLAVKHSEVEGG	
LmHSP90	ERKELSDDEAEERKDE-EEATE-ESDK-PKIEDVGEDEDEL---SGDKKKKKTIKEKYTEDEELNKTPIWTRADDISQEEYGEFYKSLNDWEDHLAVKHSEVEGG	
BtHSP90	ERKELSDDEAEERKDE-EEATE-ESDK-PKIEDVGEDEDEL---EGEKRRKKKTIKEKYTEDEELNKTPIWTRADDISQEEYGEFYKSLNDWEDHLAVKHSEVEGG	
HaHSP90	LEFRALLLEPRAPDFLEFNKRRKNKILYVRRVFMDCBDELPYLNFRIGWVDSDELPLNISREMLQNNKILKVRKNLYKKCLELFEELADEENFKKYEQSSKN	
TcHSP90	LEFRALLLEPRAPDFLEFNKRRKNKILYVRRVFMDCBDELPYLNFRIGWVDSDELPLNISREMLQNNKILKVRKNLYKKCLELFEELADEENFKKYEQSSKN	
BmHSP90	LEFRALLLEPRAPDFLEFNKRRKNKILYVRRVFMDCBDELPYLNFRIGWVDSDELPLNISREMLQNNKILKVRKNLYKKCLELFEELADEENFKKYEQSSKN	
AmHSP90	LEFRALLLEPRAPDFLEFNKRRKNKILYVRRVFMDCBDELPYLNFRIGWVDSDELPLNISREMLQNNKILKVRKNLYKKCLELFEELADEENFKKYEQSSKN	
DmHSP90	LEFRALLLEPRAPDFLEFNKRRKNKILYVRRVFMDCBDELPYLNFRIGWVDSDELPLNISREMLQNNKILKVRKNLYKKCLELFEELADEENFKKYEQSSKN	
ApHSP90	LEFRALLLEPRAPDFLEFNKRRKNKILYVRRVFMDCBDELPYLNFRIGWVDSDELPLNISREMLQNNKILKVRKNLYKKCLELFEELADEENFKKYEQSSKN	
LmHSP90	LEFRALLLEPRAPDFLEFNKRRKNKILYVRRVFMDCBDELPYLNFRIGWVDSDELPLNISREMLQNNKILKVRKNLYKKCLELFEELADEENFKKYEQSSKN	
BtHSP90	LEFRALLLEPRAPDFLEFNKRRKNKILYVRRVFMDCBDELPYLNFRIGWVDSDELPLNISREMLQNNKILKVRKNLYKKCLELFEELADEENFKKYEQSSKN	
HaHSP90	IKLGTHDSNRKSLAEFLRVHTSASGDAESLKDQVYSRMANQKSLYYLTGESKEQVANSFVERVKKRGFEVYVATPEIDBYVQMKQKEYDGRKLVSVTKRGLPEL	
TcHSP90	IKLGTHDSNRKSLAEFLRVHTSASGDAESLKDQVYSRMANQKSLYYLTGESKEQVANSFVERVKKRGFEVYVATPEIDBYVQMKQKEYDGRKLVSVTKRGLPEL	
BmHSP90	IKLGTHDSNRKSLAEFLRVHTSASGDAESLKDQVYSRMANQKSLYYLTGESKEQVANSFVERVKKRGFEVYVATPEIDBYVQMKQKEYDGRKLVSVTKRGLPEL	
AmHSP90	IKLGTHDSNRKSLAEFLRVHTSASGDAESLKDQVYSRMANQKSLYYLTGESKEQVANSFVERVKKRGFEVYVATPEIDBYVQMKQKEYDGRKLVSVTKRGLPEL	
DmHSP90	IKLGTHDSNRKSLAEFLRVHTSASGDAESLKDQVYSRMANQKSLYYLTGESKEQVANSFVERVKKRGFEVYVATPEIDBYVQMKQKEYDGRKLVSVTKRGLPEL	
ApHSP90	IKLGTHDSNRKSLAEFLRVHTSASGDAESLKDQVYSRMANQKSLYYLTGESKEQVANSFVERVKKRGFEVYVATPEIDBYVQMKQKEYDGRKLVSVTKRGLPEL	
LmHSP90	IKLGTHDSNRKSLAEFLRVHTSASGDAESLKDQVYSRMANQKSLYYLTGESKEQVANSFVERVKKRGFEVYVATPEIDBYVQMKQKEYDGRKLVSVTKRGLPEL	
BtHSP90	IKLGTHDSNRKSLAEFLRVHTSASGDAESLKDQVYSRMANQKSLYYLTGESKEQVANSFVERVKKRGFEVYVATPEIDBYVQMKQKEYDGRKLVSVTKRGLPEL	
HaHSP90	DEBKRRREDKAKFELCKVARDLIDNKVEKVVSNRLVSPCCIVTSQYGTANMERIMKAQALRDTSTMGVMAAKKHLEINPDHVEFLRQKAEADKDAKAVOLVI	
TcHSP90	DEBKRRREDKAKFELCKVARDLIDNKVEKVVSNRLVSPCCIVTSQYGTANMERIMKAQALRDTSTMGVMAAKKHLEINPDHVEFLRQKAEADKDAKAVOLVI	
BmHSP90	DEBKRRREDKAKFELCKVARDLIDNKVEKVVSNRLVSPCCIVTSQYGTANMERIMKAQALRDTSTMGVMAAKKHLEINPDHVEFLRQKAEADKDAKAVOLVI	
AmHSP90	DEBKRRREDKAKFELCKVARDLIDNKVEKVVSNRLVSPCCIVTSQYGTANMERIMKAQALRDTSTMGVMAAKKHLEINPDHVEFLRQKAEADKDAKAVOLVI	
DmHSP90	DEBKRRREDKAKFELCKVARDLIDNKVEKVVSNRLVSPCCIVTSQYGTANMERIMKAQALRDTSTMGVMAAKKHLEINPDHVEFLRQKAEADKDAKAVOLVI	
ApHSP90	DEBKRRREDKAKFELCKVARDLIDNKVEKVVSNRLVSPCCIVTSQYGTANMERIMKAQALRDTSTMGVMAAKKHLEINPDHVEFLRQKAEADKDAKAVOLVI	
LmHSP90	DEBKRRREDKAKFELCKVARDLIDNKVEKVVSNRLVSPCCIVTSQYGTANMERIMKAQALRDTSTMGVMAAKKHLEINPDHVEFLRQKAEADKDAKAVOLVI	
BtHSP90	DEBKRRREDKAKFELCKVARDLIDNKVEKVVSNRLVSPCCIVTSQYGTANMERIMKAQALRDTSTMGVMAAKKHLEINPDHVEFLRQKAEADKDAKAVOLVI	
HaHSP90	ILFETALLSSGFTLDEPQVHARIRYRIKILGLGIDPEESWVPEPST-EAP-AEAAGTSEDAASRMEEVD	Identity
TcHSP90	ILFETALLSSGFTLDEPQVHARIRYRIKILGLGIDPEESWVPEPST-EAP-AEAAGTSEDAASRMEEVD	90
BmHSP90	ILFETALLSSGFTLDEPQVHARIRYRIKILGLGIDPEESWVPEPST-EAP-AEAAGTSEDAASRMEEVD	84
AmHSP90	ILFETALLSSGFTLDEPQVHARIRYRIKILGLGIDPEESWVPEPST-EAP-AEAAGTSEDAASRMEEVD	84
DmHSP90	ILFETALLSSGFTLDEPQVHARIRYRIKILGLGIDPEESWVPEPST-EAP-AEAAGTSEDAASRMEEVD	87
ApHSP90	ILFETALLSSGFTLDEPQVHARIRYRIKILGLGIDPEESWVPEPST-EAP-AEAAGTSEDAASRMEEVD	81
LmHSP90	ILFETALLSSGFTLDEPQVHARIRYRIKILGLGIDPEESWVPEPST-EAP-AEAAGTSEDAASRMEEVD	85
BtHSP90	ILFETALLSSGFTLDEPQVHARIRYRIKILGLGIDPEESWVPEPST-EAP-AEAAGTSEDAASRMEEVD	84

图 3 不同目中的昆虫 HSP90 基因蛋白序列比对结果与分析

Fig. 3 Alignment of the deduced amino acid sequences of HSP90 gene in insects

084221); *Chilo suppressalis* (AB206477); *Delia antitica* (AJ890081); *Dendrolimus punctatus* (EF213549); *Dendrolimus superans* (EF197937); *Dendrolimus tabulaeformis* (EF213551); *Drosophila ananassae* (XM_001956781); *Drosophila buzzatii* (EF035454); *Drosophila erecta* (XM_001971675); *Drosophila grimshawi* (XM_001983964); *Drosophila melanogaster* (NM_079175); *Drosophila mojavensis* (XM_002008142); *Drosophila pseudoobscura* (XM_001353435); *Drosophila sechellia* (XM_002035123); *Drosophila virilis* (XM_002046942); *Drosophila wilsoni* (XM_002062289); *Drosophila yakuba* (XM_002093481); *Liriomyza huidobrensis* (AY851367); *Liriomyza sativae* (AY851368); *Locusta migratoria* (AY445913); *Loxostege sticticalis* (EU233821); *Lucilia cuprina* (EF584332); *Macrocentrus cingulum*

(EU570065); *Mamestra brassicae* (AB251894); *Microplitis mediator* (EU137872); *Nasonia vitripennis* (XM_001605141); *Omphisa fuscidentalis* (EF523380); *Plutella xylostella* (AB214972); *Sesamia nonagrioides* (DQ198859); *Spodoptera frugiperda* (AF254880); *Trialeurodes vaporariorum* (EU934245) 和 *T. castaneum* (NM_001100597)。图 4 的结果表明: 在系统进化进化上, 鞘翅目与同翅目和直翅目的最近, 其次为半翅目、膜翅目和鳞翅目, 同双翅目等相隔较远。

3 讨论

HSP90 家族的第一个成员是在果蝇中发现的, 其相对分子质量为 83 000, 所以又称为 Hsp83 家族。HSP90 的分子特征是 25 000 的 N 一端具有一个靶蛋白的结合部位 P 和一个 ATP 功能域^[11-13],

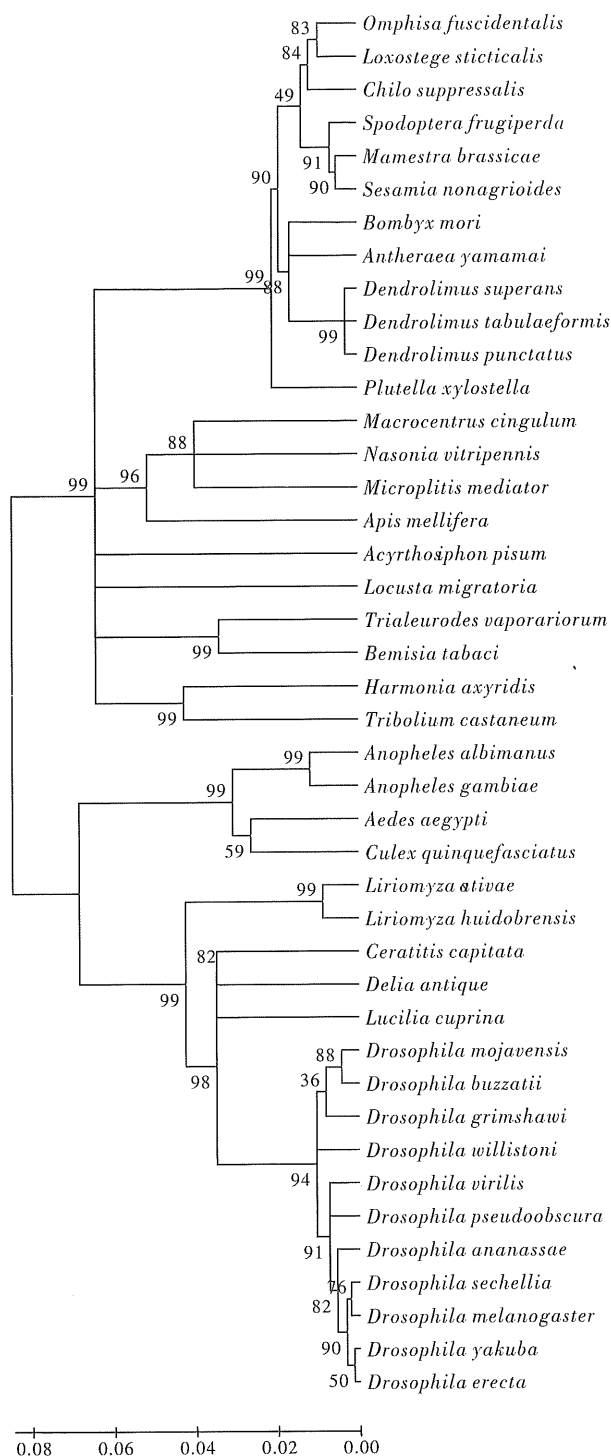


图4 异色瓢虫的HSP90与相关蛋白的聚合进化分析

Fig. 4 Phylogenetic analysis of HaHSP90 and other related proteins

C-端最末端4个氨基酸是EEVD域,是所有真核细胞HSP90的共同特性^[10]。通常HSP90蛋白在C-末端区域发生二聚化,以二聚体形式存在。HSP90在正常或胁迫条件下的各种类型细胞胞质中都有存在,作为陪伴蛋白与变性蛋白结合,维持它们的折叠状态^[14]。HSP90更重要的作用是与蛋白

激酶和类固醇激素受体等信号传导蛋白相互作用并形成复合体^[15],使其具有生物活性。即使是在无胁迫的条件下,HSP90也是真核生物必不可少的^[16]。

自Ritossa在果蝇中发现热休克蛋白以来,其研究已经有了较大的进展。目前在昆虫中已开展过热休克蛋白研究的类群主要涉及双翅目、鳞翅目、直翅目、蜚蠊目、膜翅目、同翅目和鞘翅目等^[17-23]。昆虫在遭受到热激或其他诱导时产生热休克蛋白,而正常的蛋白质合成受到抑制。由于昆虫热休克蛋白参与耐热反应过程,研究昆虫HSPs和耐热性的关系,有利于了解昆虫的生长发育对温度依赖的规律。除温度外的其他许多因子,如病原体侵入、胞外pH值变化、紫外线照射、某些重金属离子的破坏、高盐浓度、氨基酸类似物、缺氧、水分胁迫、钙离子载体、营养饥饿等均能引起昆虫的热休克反应。因此,研究昆虫热休克蛋白的产生、变化可以了解昆虫的生长发育随各影响因子变化的规律,尤其对于天敌昆虫的抗热机制的研究,有利于天敌的释放和评价对害虫的控制潜能。

参考文献:

- [1] RITASSA F M. Experimental activation of specific puff loci in polytene chromosomes of *Drosophila* [J]. *Experimental Cell Research*, 1964, 35: 601-607.
- [2] TISSERES A, MITCHELL A K. Some new proteins induced by temperature shock in *Drosophila* [J]. *J Mol Biol*, 1974, 84: 389-398.
- [3] LE B E, VALENTI P, LUCCHETTA P, et al. Effects of mild heat shocks at young age on aging and longevity in *Drosophila melanogaster* [J]. *Biogerontology*, 2001, 2: 155-164.
- [4] MURPHY C T, MCCARROLL S A, BARMANN C I, et al. Genes that act downstream of DAF216 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 2003, 424: 277-283.
- [5] 江文娟, 李桂亭, 李鹏, 等. 异色瓢虫成虫对桃蚜捕食作用及空间异质性研究 [J]. *安徽农业科学*, 2007, 35 (16): 4750-4751.
- [6] 王小艺, 沈佐锐. 异色瓢虫的应用研究概况 [J]. *昆虫知识*, 2002, 39 (4): 255-261.
- [7] 王延鹏, 吕飞, 王振鹏. 异色瓢虫开发利用研究进展 [J]. *华东昆虫学报*, 2007, 16 (4): 310-314.
- [8] CHOMCZYNSKI P, SACCHI N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. *Anal Biochem*, 1987, 162: 156-159.

- [9] TANG B, CHEN X F, LIU Y, et al. Characterization and expression patterns of a membrane-bound trehalase from *Spodoptera exigua* [J]. BMC Molecular Biology, 2008, 9: 51.
- [10] PETER C, TAMAS S, CSABA S. The 90-kDa molecular chaperone family: Structure, function and clinical applications. A comprehensive review [J]. Pharmacology Therapeutics, 1998, 79 (2): 129 - 168.
- [11] PRODROMOU C, ROE S M, O'BRIEN R, et al. Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone [J]. Cell, 1997(a), 90(1): 65 - 75.
- [12] PRODROMOU C, ROE S M, PIPER P W, et al. A molecular clamp in the crystal structure of the N-terminal domain of the yeast Hsp90 chaperone [J]. Nature Structural Biology, 1997(b), 4 (6): 477 - 482.
- [13] STEBBINS C E, RUSSO A A, SCHNEIDER C, et al. Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: Targeting of a protein chaperone by an antitumor agent [J]. Cell, 1997, 89 (2): 239 - 250.
- [14] YONEHARA M, MINAMI Y, KAWATA Y, et al. Heat-induced chaperone activity of HSP90 [J]. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271 (5): 2641 - 2645.
- [15] RUTHERFORD S L, ZUKER C S. Protein folding and the regulation of signaling pathways [J]. Cell, 1994, 79 (7): 1129 - 1132.
- [16] BORKOVICH K A, FARRELLY F W, FINKELSTEIN D B, et al. hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures [J]. Molecular and Cellular Biology, 1989, 9 (9): 3919 - 3930.
- [17] RITOSSA F M. A new puffing pattern induced by heat-shock and DNP in *Drosophila* [J]. Experientia, 1962, 18: 571 - 573.
- [18] DEAN R L, ATKINSON B G. The acquisition of thermotolerance in larvae of *Calpodethius* (Lepidoptera) and the *in vitro* synthesis of heat-shock protein [J]. Can J Biochem Cell Biol, 1982, 61: 472 - 479.
- [19] BALDAIA L, MAISONHAUTE C, PORCHERON P, et al. Effect of heat shock on protein synthesis in *Locustami gratoria* epidermis [J]. Arch Insect Biochem Physiol, 1987, 4: 225 - 231.
- [20] WHYARD S, WYATT G R, WALKER V K. The heat shock response in *Locustami gratoria* [J]. J Comp Physiol, 1986, 156: 813 - 817.
- [21] RUDER G K, OVSENEK N, HEIKKILA J J, et al. Examination of heat shock gene expression in nerve cord isolated from heat-stressed American cockroach, *Periplaneta Americana*, Biochem [J]. Cell Biol, 1989, 67: 168 - 178.
- [22] 王荫长. 昆虫生物化学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [23] 李斌, 夏庆友, 孙卫忠, 等. 昆虫 HSP 基因的系统研究 [J]. 蚕业科学, 2003, 29 (4): 340 - 343.