

doi: 10.3969/j.issn.1674-0858.2009.02.003

异色瓢虫热休克蛋白 70 基因的克隆与分析

杨城欢^{1,2}, 庞虹^{1*}, 张帆^{2*}

(1. 中山大学生命科学学院, 广州 510275; 2. 北京市农林科学院植保环保研究所, 北京 100089)

摘要: 本研究通过 RT-PCR 和 RACE 方法, 首次克隆了异色瓢虫 *Hamonia axyridis* (Pallas) 热休克蛋白 70 (HSP70) cDNA 全序列 (GenBank 登录号: EF668009)。获得的 cDNA 全长 2200 bp, 其中开放阅读框 1956 bp, 编码一个 651 氨基酸的蛋白, 计算分子量为 70 kDa, 等电点 (pI) 为 5.32。同源序列比对结果表明, 异色瓢虫 HSP70 与其它真核生物的 HSP/HSC70 有着较高的序列同源性 (85% ~ 93%)。其中与赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 热休克蛋白 70 (HSP70) 同源性最高, 达到 93%。与其它真核生物 HSP70 一样, 该序列包含真核生物 HSP70 高度保守的全部三个家族标签以及 ATP/GTP 结合位点、一个 Bipartite nuclear localization signal 和细胞核定位信号。

关键词: 异色瓢虫; 热休克蛋白 70; RACE

中图分类号: Q963

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858(2009)02-0124-08

Cloning and sequence analysis of heat shock protein 70 gene in *Hamonia axyridis* (Pallas)

YANG Cheng-Huan^{1,2}, PANG Hong^{1*}, ZHANG Fan^{2*} (1. School of Life Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China; 2. Institute of Plant and Environment Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100089, China)

Abstract: In this paper, a full-length cDNA of HSP70 gene of *Hamonia axyridis* (Pallas) was firstly cloned by the techniques of RT-PCR and rapid amplified of cDNA end (RACE). The HSP70 cDNA (2200 bp) contained a 1956 bp open reading frame (ORF) (Genebank accession number: EF668009) encoding a polypeptide of 651 amino acids with a calculated molecular mass of 70 kDa and an isoelectric point (pI) of 5.32. Blast analysis revealed that the HSP70 shared high identity (85% - 92%) with HSP70s/HSC70s of insects, especially with HSP70 from *Tribolium castaneum* (93%). Three highly conserved HSP70 family signatures were found in the HSP70 gene. Moreover, a putative ATP/GTP binding site, a putative bipartite nuclear location signal and a cytosolic location signal were detected.

Key words: *Hamonia axyridis* (Pallas); heat shock protein 70; RACE

热休克蛋白 (heat shock proteins, HSPs) 是生物体 (或离体培养细胞) 在受到不良环境因素胁迫时迅速产生的一组具有高度保守性的应激蛋白, 因最初是在受热激的果蝇唾液腺染色体中发现的, 因此称为热休克蛋白。

大量研究表明, 除了热胁迫外, 许多有毒物刺激、化学胁迫以及多种病理改变都能够诱导热休克

蛋白表达。例如高温、缺氧、缺乏 ATP、自由基损害、低温、干燥、病毒入侵和重金属等等 (Jenkins *et al*, 1999; Gophna & Ron, 2003; Tammarieb *et al*, 1999; Deitch *et al*, 1995; Tedengren *et al*, 1999)。因此, HSPs 也称为胁迫蛋白 (stress proteins)。

热休克蛋白在增加细胞生存能力和维持细胞正常稳定的多种复杂的防御机制中扮演重要的角

基金项目: 国家科技部支撑计划项目 (2008BADA5B02); 国家科技基础条件平台建设项目 (2005DKA21105); 国家“973”计划项目 (2009CB119200)

作者简介: 杨城欢, 男, 1983年生, 硕士, 研究方向为动物学, E-mail: isomer@tom.com

*通讯作者 Author for correspondence, 庞虹; E-mail: Lsshpan@mail.sysu.edu.cn; 张帆; E-mail: zff6131@263.net

收稿日期 Received: 2009-02-17; 接受日期 Accepted: 2009-05-07

色。目前研究表明,分子伴侣是热休克蛋白绝大部分所具有的功能,它在蛋白质的动态平衡中起着关键的作用。热休克蛋白能帮助细胞内新生肽链正确折叠装配,抑制非正常蛋白的聚集,降解或修复受损和变性蛋白 (Morimoto, 1998; Nollen and Morimoto, 2002)。

热休克蛋白 70是到目前为止被研究得最多的热休克蛋白。研究表明,HSP70基因家族是最保守的基因家族之一 (Boorstein *et al*, 1994)。

虽然 HSP70基因家族成员都是核基因,却存在两种不同的表达类型 (Boorstein *et al*, 1994; Karlin and Brocchieri, 1998)。一种是热休克蛋白 70 (HSP70)基因,它平时表达水平很低,但在受到外界胁迫时能快速表达。而另一种则是热休克同源蛋白 70 (HSC70)基因,与 HSP70基因相反,它在平时表达活跃 (组成性表达),组成型热休克蛋白 70约占一个健康生命体蛋白总量的 5% ~ 10% (Pockley, 2003),但它却不能对外界胁迫做出反应 (Kiang and Tsokos, 1998)。

虽然两种类型的 HSP70在表达上存在不同之处,但它们的蛋白在结构上却具有共同特征,即均含有两个主要的结构域,分子量为 44 kDa的 N-端高度保守的 ATPase功能域 (ATP-binding domain) 和一个分子量约 30 kDa的 C-端多肽结合区域组成 (Kiang and Tsokos, 1998)。C-端最末端含有用于细胞定位的基序 (motif),定位于细胞质的基序序列为 EEVD (Hightower *et al*, 1994)。

热休克蛋白的细胞保护作用使得 HSPs的产生与生物抗胁迫能力有关。目前已经被研究过的生物体都可以观察到,HSPs表达增加后,生物体的耐热性也随之增加 (Lindquist, 1986)。

异色瓢虫 *Hamonia axyridis* (Pallas) 是一种重要的天敌昆虫,因其显著的生物防治作用,长期以来在世界许多国家和地区被人们广泛使用。其强大的温度适应能力表明,在它体内拥有一套强有力的抵抗外界不利条件的抗逆机制,这为研究生物体抗逆机制提供极佳的生物素材。

目前国内外对瓢虫耐热性的研究不多。国外昆虫耐热性的研究主要是针对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。

近年国内异色瓢虫的研究主要集中于对异色瓢虫捕食功能 (葛有茂等, 2006; 林克剑等, 2006; 邓建华, 2002)、人工饲养和人工饲料 (滕树兵和徐志

强, 2005; 郭建英和万方浩, 2001)、抗药性 (王小艺等, 2003; 马艳等, 2001)以及生理生化 (张永军等, 2005)的研究。其热耐热性发生机理的研究缺乏。

本研究根据多种昆虫 HSP70基因 cDNA保守序列设计引物,并运用 cDNA末端快速扩增 (RACE)方法成功获得异色瓢虫 HSP70基因 cDNA全长序列,为下一步深入研究异色瓢虫 HSP70与其胁迫耐受性之间的关系奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验虫源和试验种群的饲养

异色瓢虫北京种群采自北京市昌平区苹果园,在 25 ± 1 下饲养;湿度为 $80 \pm 5\%$,放在 $15 \text{ cm} \times 12 \text{ cm} \times 7 \text{ cm}$ 方形塑料养虫盒中,塑料盒以纱布封盖,每盒放置成虫 20 ~ 30头。以蚕豆蚜 *Aphis medicagoe* 饲养,每天饲喂 1次。在养虫盒放入有褶皱的纸条,瓢虫在纸上产卵。

将取出的异色瓢虫卵置于养虫笼中,笼内放有接过蚜虫的蚕豆苗,异色瓢虫卵在笼内孵化,幼虫取食笼内的蚜虫,以完成幼虫阶段的发育。

野外采集的异色瓢虫在实验室中饲繁 3代后供试验使用。

1.1.2 主要试验试剂及试验耗材

总 RNA 提取试剂盒、cDNA 第一链合成试剂盒、PCR 试剂均为 TANGEN 公司产品;

3 和 5 RACE 试剂盒为 Cbnetech 公司 SMART-TRACE cDNA amplification kit;

胶回收试剂盒是 OMEGA 公司的 Gel Extraction Kit (200);

其它试剂均为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 引物的设计

本实验所用到的引物序列详见表 1。

F1 和 R1 为根据已知昆虫 (赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*、马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata*、美洲斑潜蝇 *Liriomyza sativae*、烟草天蛾 *Manduca sexta* 等 9种) HSP70蛋白的 cDNA 保守序列设计的一对简并引物,预期 cDNA 扩增产物长度为 900 bp 左右。

RT-F2 和 RT-R2 为根据获得的 HSP70 基因 cDNA 片段设计的特异性引物,用于 RACE。

表 1 本研究中所用到的引物
Table 1 Primers used in the study

引物名称 Primer name	引物碱基序列 Primer base
F1	5 - GGCA (A/G) GC (C/T/A) AC (G/A/C) AA (G/A) GATGC - 3
R1	5 - GTTGTC (T/C) TT (C/T/G) GTCAT (G/A/C) GCTC - 3
RT - F2	5 - CAA CTG CTG GTG ACA CCC ATT TGG - 3
RT - R2	5 - CTT CTT CAG ACT TAT CAC CGT GC - 3

1.2.2 异色瓢虫总 RNA 的提取以及 cDNA 第一链的合成

收集单头异色瓢虫成虫 (采集温度: 26 °C), 42 °C 温浴 30 min, 立即投入液氮中, 于液氮中充分研磨瓢虫, 总 RNA 提取按 TANGEN 公司的 RNAprep Tissue/Bacteria Kit 提供的方法进行。用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计定量总 RNA 的纯度和浓度。取 1 ng 总 RNA 作为模板, 进行 cDNA 第一链合成, 具体方法参照 TANGEN 公司 RNAprep Tissue/Bacteria Kit 提供的说明书。

1.2.3 PCR 的扩增、纯化及鉴定

PCR 反应体系为 50 μL, 其中含模板 cDNA 1 μL, 10 × Taq Buffer 10 μL, dNTP Mixture (2.5 mM) 2 μL, 上下游引物各 1 μL, Taq (2.5 U/μL) 1 μL, 去离子水 37 μL。具体 PCR 条件为: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环。反应结束, 取 5 μL PCR 产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳。选择大小与所设计片段相符合的单一 DNA 条带回收。纯化并测序鉴定。使用 BLAST 搜索引擎查询 GenBank/EMBL 数据库对测序结果进行同源性比对, 证实所得到的片段确实为 HSP70 片段。

1.2.4 3' 与 5' cDNA 末端快速扩增 (Rapid Amplified of cDNA End, RACE)

用 SMARTACE cDNA amplification kit (Clontech 公司产品) 进行 3' 与 5' RACE, 详细方法见该公司的产品说明书。将 3' 与 5' RACE 的 PCR 产物进行琼脂糖电泳验证。使用 OMEGA 公司的 Gel

Extraction Kit (200) 对目标片段进行回收。将纯化的 PCR 产物与 pMD 18-T 载体连接, 重组子转化大肠杆菌; 挑取单个白色菌落用质粒提取试剂盒提取, PCR 鉴定后, 挑选阳性克隆送上海英骏生物技术有限公司测序。

1.2.5 序列分析

用 DNA Star 5.0 进行序列拼接、开放阅读框寻找和氨基酸翻译。用 NCBI 网站上的 Blast 比对工具进行序列的比较分析, 利用 CLUSTALX 1.81 和 MEGA 3.0 软件构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 异色瓢虫热休克蛋白 70 cDNA 序列的克隆

根据已知昆虫 (赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*、马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata*、美洲斑潜蝇 *Liriomyza sativae*、烟草天蛾 *Manduca sexta* 等 9 种) HSP70 蛋白的核苷酸序列设计异色瓢虫 HSP70 简并引物 F1 和 R1, PCR 扩增出 1 条约 825 bp 的条带 (图 1 - A), 符合预期估计。回收克隆后测序, 获得 825 bp 的序列, 经 NCBI 数据库 Blast 检索, 与赤拟谷盗、烟草天蛾、粉纹夜蛾以及家蚕等昆虫热休克蛋白 70 cDNA 的同源性非常高, 推测是异色瓢虫热休克蛋白 70 序列。根据中间片段的序列, 设计特异性引物 RT - F2 和 RT - R2, 按 RACE 试剂盒上说明进行 5' 和 3' - RACE, 结果显示 5' 和 3' - RACE 均在 1 kb ~ 1.5 kb 间有 1 条特异性亮带, 回收克隆后进行序列测定。

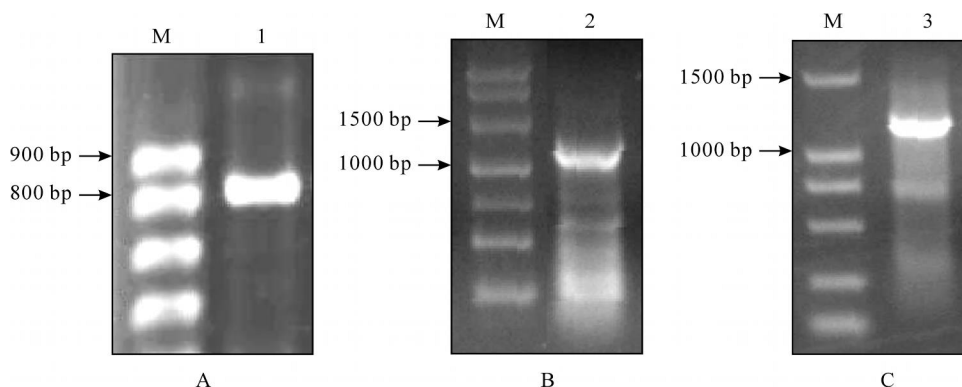


图 1 PCR 产物的电泳检测

Fig 1 PCR amplification of heat shock protein 70 gene in *Hamonia axyridis*

A, 兼并引物扩增结果; B, 5 RACE 结果; C, 3 RACE 结果; M, 标准分子量; 1, PCR 产物 Molecular weight marker, 2, 5 RACE PCR 产物 The result of 5 RACE; 3, 3 RACE PCR 产物 The result of 3 RACE

测序结果表明: 3 RACE 得到长度为 1350 bp 的片段, 5 RACE 得到长度为 1338 bp 的片段。2 个片段经过序列拼接, 最终得到包含完整开放读码框的 2200 bp 的序列 (GenBank 登录号: EF668009)。

```

1      GGATTCATGTTGAGCAACTCAACTATACACTAGGTTTAATTTAAGTATTTATTGAAGTATTGTCTGCAACTTAAGTTTAAAAATAAAAAG
91     ATGGCAAAAAGCACCCGAGTTGGTATTGATTGGGAACCACCTACTCTTGTGTCGGTGTTCCAACATGGAAAAGTTGAAATTATTGCC
1      M A K A P A V G I D L G T T Y S C V G V F Q H G K V E I I A
181    AACGATCAAGGAAACAGGACAACACCGTCCTATGTCGCTTTTACCGACACTGAGCGTCTCATTGGAGATGCTGCCAAAAACCAGGTGGCG
31     N D Q G N R T T P S Y V A F T D T E R L I G D A A K N Q V A
271    ATGAACCCCAATAACACAATATTTGATGCGAAACGCTTATTGGGCGTCGTTTTGATGACACCACTGTCCAAGCTGATATGAAGCACTGG
61     M N P N N T I F D A K R L I G R R F D D T T V Q A D M K H W
361    CCTTTGAAGTCATTAATGATGGAAGCAACCAAAAATCAAGGTAGATTACAAAGGAGAAGCAAAAACATTCTACCCTGAAGAAGTAAGC
91     P F E V I N D G S K P K I K V D Y K G E A K T F Y P E E V S
451    TCTATGGTTCTCACAAAGATGAAGGAACTGCTGAAGCTTATTGGGAAAACTGTCACCAATGTGTATACCCGTACCTGCCTACTTT
121    S M V L T K M K E T A E A Y L G K T V T N A V I T V P A Y F
541    AACGATTCCAAAGACAGGCTACCAAAGATGCTGGTACCATCGCTGGTCTCCAAGTTCTACGTATCATCAATGAACCTACCGCAGCTGCT
151    N D S Q R Q A T K D A G T I A G L Q V L R I I N E P T A A A
631    ATTGCCTACGTTTGGACAAGAAAGCCACTGGTGAAGAAATGTACTCATCTTCGATTGGGAGGTGGTACCTTTGATGTCCTCATCTTA
181    I A Y G L D K K A T G E R N V L I F D L G G G T F D V S I L
721    ACTATTGAAGATGGTATCTTTGAAGTAAAGTCAACTGCTGGTGACACCCATTTGGGAGGAGAAGATTTGACAACAGGATGGTCAATCAC
211    T I E D G I F E V K S T A G D T H L G G E D F D N R M V N H
811    TTTGTACAAGAGTTCAAGCGTAAATACAAAAAGATTTGACCACCAACAAACGTGCTCTTCGTCGTCTCCGTACATCATGTGAAAGGGCT
241    F V Q E F K R K Y K K D L T T N K R A L R R L R T S C E R A
901    AAGCGTACTCTATCATCCTCCACTCAAGCCAGTATTGAAATCGACTCACTCTTTGAGGGTATTGATTTCTACACATCCATCACTCGTGCT
271    K R T L S S S T Q A S I E I D S L F E G I D F Y T S I T R A
991    AGATTTGAAGAATTGAACGCCGATTTGTTCAAGTCAACCATGGAACCTGTTGAGAAGTCCATCCGTGATGCCAAAATGGACAAGACCCAA
301    R F E E L N A D L F R S T M E P V E K S I R D A K M D K T Q
1081   ATCCATGACATCGTTTTGGTAGTGGTCCACACGTATCCCTAAAGTACAGAAGCTTCTCCAAGACTTCTCAATGAAAGGAACTCAAC
331    I H D I V L V G G S T R I P K V Q K L L Q D F F N G K E L N
1171   AAATCCATCAACCTGATGAAGCTGTAGCCTATGGTGTGCTGTACAAGCTGCCATTTTGACCGTGATAAGTCTGAAGAAGTACAAGT
361    K S I N P D E A V A Y G A A V Q A A I L H G D K S E E V Q D

```

121 S M V L T K M K E T A E A Y L G K T V T N A V I T V P A Y F
 541 AACGATTCCCAAAGACAGGCTACCAAAGATGCTGGTACCATCGCTGGTCTCCAAGTCTACGTATCATCAATGAACCTACCGCAGCTGCT
 151 N D S Q R Q A T K D A G T I A G L Q V L R I I N E P T A A A
 631 ATTGCCTACGGTTTGGACAAGAAAGCCACTGGTAAAAGAAATGTACTCATCTTCGATTTGGGAGGTGGTACCTTTGATGTCTCCATCTTA
 181 I A Y G L D K K A T G E R N V L I F D L G G G T F D V S I L
 721 ACTATTGAAGATGGTATCTTTGAAGTAAAGTCAACTGCTGGTGACCCATTGGGGAGGAGAAGATTCGACAACAGGATGGTCAATCAC
 211 T I E D G I F E V K S T A G D T H L G G E D F D N R M V N H
 811 TTTGTACAAGAGTTCAAGCGTAAATACAAAAAGATTGACCACCAACAAACGTGCTCTTCGTCTCCGTACATCATGTGAAAGGGCT
 241 F V Q E F K R K Y K K D L T T N K R A L R R L R T S C E R A
 901 AAGCGTACTCTATCATCTCCACTCAAGCCAGTATTGAAATCGACTCACTCTTTGAGGGTATTGATTTCTACACATCCATCACTCGTGCT
 271 K R T L S S S T Q A S I E I D S L F E G I D F Y T S I T R A
 991 AGATTTGAAGAATTGAACGCCGATTGTTTCAGGTCAACCATGGAACCTGTTGAGAAGTCCATCCGTGATGCCAAAATGGACAAGACCCAA
 301 R F E E L N A D L F R S T M E P V E K S I R D A K M D K T Q
 1081 ATCCATGACATCGTTTTGGTAGGTGGTCCACACGTATCCCTAAAGTACAGAAGCTTCTCCAAGACTTCTCAATGGAAAGGAACTCAAC
 331 I H D I V L V G G S T R I P K V Q K L L Q D F F N G K E L N
 1171 AAATCCATCAACCCTGATGAAGCTGTAGCCTATGGTCTGCTGTACAAGCTGCCATTTTGACCGGTGATAAGTCTGAAGAAGTACAAGAT
 361 K S I N P D E A V A Y G A A V Q A A I L H G D K S E E V Q D
 1261 TTGCTTCTTGTGATGTACACCATGTGCACTTGGTATTGAGACTGCTGGAGGAGTTATGACTGCTTTATTAAGAGGAATACTACCATT
 391 L L L L D V T P L S L G I E T A G G V M T A L I K R N T T I
 1351 CCAACTAAGCAAACCTCAGACCTTACCCTTACTCTGACAAATCAACCTGGAGTACTTATCCAGGTTTATGAAGGAGAACGTGCCATGACA
 421 P T K Q T Q T F T T Y S D N Q P G V L I Q V Y E G E R A M T
 1441 AAGGATAACAATCTTTGGGTAAATTCGAGCTGACCGGTATCCACCTGCACCACGTGGTGTCCACAAAATCGAAGTAACATTCGATATT
 451 K D N N L L G K F E L T G I P P A P R G V P Q I E V T F D I
 1531 GATGCTAATGGTATCTTGAATGTAACAGCCATTGAAAAACCACCAACAAAGAAAACAAAATACCATCACCAACGACAAAGGTCGTCTT
 481 D A N G I L N V T A I E K T T N K E N K I T I T N D K G R L
 1621 AGTAAAGAGGACATTGAACGTATGGTTAACGATGCTGAAAAATACCGTAGTGAAGATGAGAAGCAAAGAGCACCATTGCTGCCAAGAAC
 511 S K E D I E R M V N D A E K Y R S E D E K Q K S T I A A K N
 1711 GGTGGGAATCTTACTGCTTCCAAGTCAAGAGCAGGATTGAGGATGAAAATCTCAAGAGCAAATCAGCGAAACTGATAAGACAACCATC
 541 G L E S Y C F Q V K S T I E D E N L K S K I S E T D K T T I
 1801 ATGGAAAAATGTAACGAAGTTATTGCTTGGTTAGATGCCAATCAATTGGCAGAAAAAGAAGATATGAGCACAAGCATAAGGAATGGAA
 571 M E K C N E V I A W L D A N Q L A E K E E Y E H K H K E L E
 1891 AATATTGTAAAGCAATCATCACTGCCTTGTATCAAGGTGCTGGTGGAGTCCCGGTGGCATGCCAGGTGGTATGCCAGGTGGCTTCCCA
 601 N I C K P I I T A L Y Q G A G G V P G G M P G G M P G G F P
 1981 GGACCTGGAGGTGCCGACCTGGCGGAACCGGTGGTCTGGACCAACTATCGAAGAAGTTGATTAATTAATCACTTGTTCATTCCAAT
 631 G P G G A A P G G T G G A G P T I E E V D *
 2071 TTTGCAGTATTATGCAGACAACGCTTTATTCATACTTAGTGTGTGTTTATTGAAATCCAATTACCATCAGCTGTTTTATCTTCA
 2161 ATAAAATGATACTGAATCAAAAAAAAAAAAAA

图 2 异色瓢虫 HSP70 cDNA 序列全长

Fig 2 Full-length of *Hamonia axyridis* HSP70 cDNA

起始密码子 (ATG) 和多聚腺苷酸信号序列 (AATAAA, 位于 3 非翻译区) 用下划线标出

2.2 异色瓢虫热休克蛋白 70 cDNA 全长序列分析

异色瓢虫 HSP70 cDNA 全长 2200 bp, 包含 1 个

长为 1956 bp 的开放读码框 (open reading frame, ORF)、1 个长为 97 bp 的 3 非转录区和 1 个长为

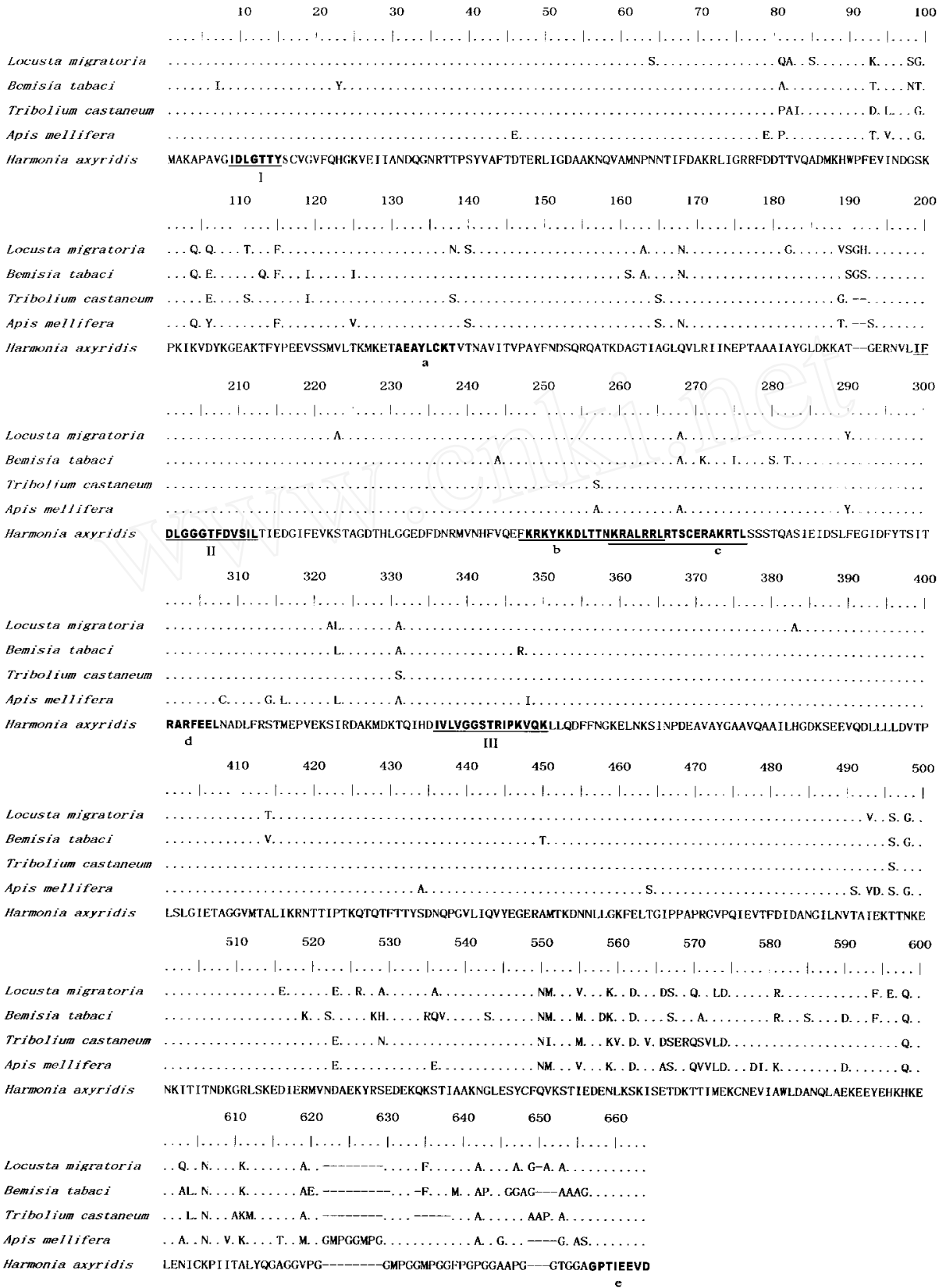


图 3 HSP70蛋白氨基酸序列的序列比较

Fig 3 A lignment of the amino acid sequence of heat shock protein 70

序列功能位点已经加粗表示,具体功能位点如下:“ , , ”为真核生物 HSP70高度保守的 3个家族标签;“a”为 ATP/GTP结合位点;“b”和“c”Bipartite nuclear localization signals;“d”Non - organellar consensus motif;“e”细胞质定位信号

147 bp 的 5 非转录区。开放读码框前的序列为 AAAA TAAA A GATG 与已证实的果蝇的转录起始序列 ANN (C/A) A (A/C) (A/C) GATG 基本一致。多聚化信号 AATAAA 位于 poly(A) 上游 13 bp 处。

从异色瓢虫 HSP70 cDNA 序列推测,异色瓢虫的 HSP70 是一个由 651 个氨基酸组成的蛋白质,分子量为 71,322 Da,等电点 (Isoelectric point, PI) 为 5.32。序列分析发现,异色瓢虫 HSP70 包含真核生物 HSP70 高度保守的 3 个家族标签: DLGTTY (第 9~16 号氨基酸)、IFDLGGGTFDVSL (第 197~210 号氨基酸)、MLVGGSTRIPKVQK (第 334~348 号氨基酸)。

此外还存在以下几个功能位点: 1) ATP/GTP

结合位点: AEA YLGKT (第 131~138 号氨基酸); 2) Non-organelle consensus motif: RARFEEL (第 299~305 号氨基酸); 3) Bipartite nuclear localization signals: KRKYKKDLTINKRALRRL (第 246~263 号氨基酸) 和 KRALRRLRTSCERAKRTL (第 257~274 号氨基酸); 4) 细胞质定位信号: GP-TIEVD (第 648~651 号氨基酸, C 末端) (Bootsstein *et al*, 1994)。

2.3 异色瓢虫 HSP70 氨基酸序列同源性分析

用 MEGA3.0 软件构建 13 种昆虫 HSP70 氨基酸序列进化树 (图 4)。构树方法为 N-J 法, Bootstrap values 已经显示在枝节上。

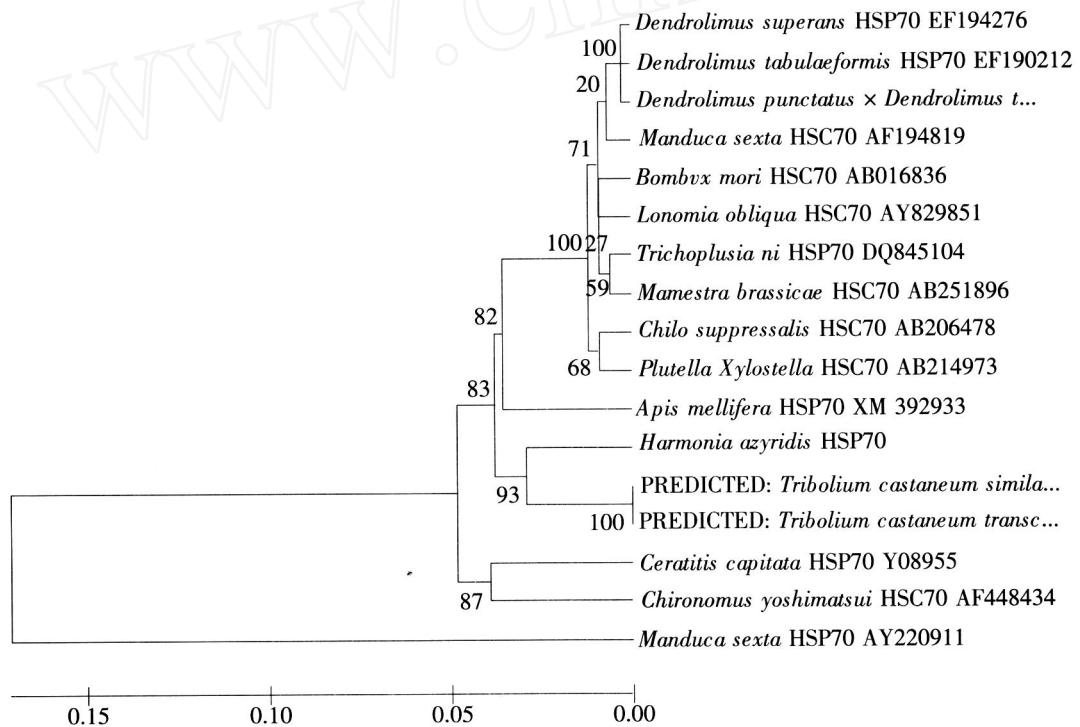


图 4 13 种昆虫 HSP70 蛋白序列的序列同源性分析

Fig 4 Phylogenetic analysis of 13 species insects HSP70 sequences

3 结论与讨论

本研究根据已知昆虫 HSP70 蛋白的核苷酸序列使用 3 和 5 RACE 技术克隆首次得到异色瓢虫特异 cDNA 全长序列。

异色瓢虫 HSP70 cDNA 全长 2200 bp, 包含 1 个长为 1956 bp 的开放读码框 (open reading frame,

ORF)、1 个长为 97 bp 的 3 非转录区和 1 个长为 147 bp 的 5 非转录区。

核酸同源序列比对可知,异色瓢虫 HSP70 与其它真核生物的 HSP/HSC70 有着极高的序列同源性 (85%~93%)。其中与鞘翅目赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 的热休克蛋白 70 同源性最高,达到 93%。

根据 ORF 核酸序列对异色瓢虫 HSP70 性质结构和性质进行推测。异色瓢虫 HSP70 包含 651 个

氨基酸, 推测分子量为 71, 322 Da, 等电点 (Isoelectric point, PI) 为 5.32。序列包含真核生物 HSP70 高度保守的全部三个家族标签以及 ATP/GTP 结合位点、一个核定位信号和细胞核定位信号。推测异色瓢虫的 HSP70 应该定位在细胞质, 并能与 ATP 或 GTP 结合发挥功能。

热休克蛋白 (Heat Shock Proteins, HSPs) 是生物体 (或离体培养细胞) 在受到不良环境因素胁迫时迅速产生的一组具有高度保守性的应激蛋白, 其在增加细胞生存能力和维持细胞正常稳定的多种复杂的防御机制中扮演重要的角色。热休克蛋白能帮助细胞内新生肽链正确折叠装配, 抑制非正常蛋白的聚集, 降解或修复受损和变性蛋白 (Nollen and Morimoto, 2002)。

异色瓢虫起源于亚洲, 在欧洲兴盛繁衍, 同时还在美国成功定殖。它们对不同地区的气候有着极强的适应能力。物种在跨气候带的扩散和定殖过程中, 必然会经历由不适应到适应这一转变过程。在此过程中, 为适应环境胁迫, 特别是热胁迫 (thermal stress), 物种必定发展了对外界胁迫的胁迫耐受能力 (stress tolerance)。在生物体耐受性产生的机制之中, 研究得最多的是热休克蛋白 70 的与生物体胁迫耐受性产生的关系, 因此, 本研究克隆了异色瓢虫热休克蛋白 70 基因的全长序列, 为今后进一步研究异色瓢虫 HSP70 与其热胁迫耐受性之间的关系打下了基础。

参考文献 (References)

- Deng JH, Tan ZX, Shan QL, Wu XF, Liu J, 2002. Functional responses and density interference effect in *Hamonia axyridis* (PALLAS) a predator to *Myzus nicotianae* (Blackman). *Journal of Southwest Agricultural University*, 24 (5): 433 - 435. [邓建华, 谭仲夏, 单琼丽, 吴兴富, 刘江, 2002. 异色瓢虫对烟蚜的捕食功能反应及密度干扰效应. 西南农业大学学报, 24 (5): 433 - 435]
- Wang XY, Shen ZR, Xu WB, Lu J, 2003. Sublethal effects of insecticides on fecundity of multicolored Asian ladybird *Hamonia axyridis*. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 14 (8): 1354 - 1358. [王小艺, 沈佐锐, 徐文兵, 卢健, 2003. 亚致死剂量杀虫剂对异色瓢虫繁殖力的影响. 应用生态学报, 14 (8): 1354 - 1358]
- Deitch EA, Beck SC, Cruz NC, Demaio A, 1995. Induction of heat shock gene expression in colonic epithelial cells after incubation with *Escherichia coli* or endotoxin. *Crit Care Med*, 23: 1371 - 1376.
- Ge YM, Wan L, Zhao SX, 2006. Predation of *Hamonia axyridis* Pallas on *Rhopalosiphum nymphaeae* Linne (Homoptera: Aphididae). *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 28 (2): 208 - 212. [葛有茂, 万玲, 赵士熙, 2006. 异色瓢虫对莲缢管蚜的捕食作用研究. 江西农业大学学报, 28 (2): 208 - 212]
- Gophna U, Ron EZ, 2003. Virulence and the heat shock response. *Int J Med Microbiol*, 292: 453 - 461.
- Guo JY, Wan FH, 2001. Effect of three diets on development and fecundity of the ladybeetles *Hamonia axyridis* and *Propylaea japonica*. *Chinese Journal of Biological Control*, 17 (3): 116 - 120. [郭建英, 万方浩, 2001. 三种饲料对异色瓢虫和龟纹瓢虫的饲喂效果. 中国生物防治, 17 (3): 116 - 120]
- Hightower LE, Sadis SE, Takenaka M, 1994. Interactions of vertebrate HSC70 and HSP70 with unfolded proteins and peptides. *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Jenkins NL, Hoffmann AA, 1999. Limits to the southern border of *Drosophila serrata*: cold resistance, heritable variation, and trade-off. *Evolution*, 53: 1823 - 1834.
- Lin KJ, Wu KM, Liu SB, Zhang YJ, Guo YY, 2006. Functional responses of *Chrysopa sinica*, *Propylaea japonica* and *Leis axyridis* to *Bemisia tabaci*. *Chinese Bulletin of Entomology*, 43 (3): 339 - 343. [林克剑, 吴孔明, 刘山蓓, 张永军, 郭予元, 2006. 中华草蛉, 龟纹瓢虫和异色瓢虫对 B 型烟粉虱的捕食功能反应. 昆虫知识, 43 (3): 339 - 343]
- Lindquist S, 1986. The heat shock response. *Annual Review of Biochemistry*, 55: 1151 - 1191.
- Nollen EA, Morimoto RI, 2002. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. *Journal of Cell Science*, 115: 2808 - 2816.
- Tammariello SP, Rinehart JP, Denlinger DL, 1999. Desiccation elicits heat shock protein transcription in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*, but does not enhance tolerance to high or low temperatures. *J. Insect Physiol*, 45: 933 - 938.
- Tedengren M, Olsson B, Bradley B, Zhou LZ, 1999. Heavy metal uptake, physiological response and survival of the blue mussel (*Mytilus edulis*) from marine and brackish waters in relation to the induction of heat shock protein 70. *Hydrobiologia*, 393
- Teng SB, Xu ZQ, 2005. The cold storage conditions of *Hamonia axyridis* eggs and adults in mass-rearing. *Chinese Bulletin of Entomology*, 42 (2): 180 - 183. [滕树兵, 徐志强, 2005. 人工扩繁代异色瓢虫卵和成虫最适冷藏条件的探讨. 昆虫知识, 42 (2): 180 - 183.]
- Zhang YJ, Sun Y, Yuan HB, Wu KM, Peng YF, Guo YY, 2005. Effects of transgenic Bt-cry1Ab corn pollen on the growth and development and the activity of three metabolic enzymes in *Hamonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae). *Acta Entomologica Sinica*, 48 (6): 898 - 902. [张永军, 孙毅, 袁海滨, 吴孔明, 彭于发, 郭予元, 2005. 转 Bt-cry1Ab 玉米花粉对异色瓢虫生长发育及体内三种代谢酶活性的影响. 昆虫学报, 48 (6): 898 - 902]