

# 葱蝇己糖激酶基因的鉴定、特征分析及在滞育期的表达分析\*

郭强, 陈斌, 付丹影, 任爽, 司风玲, 郝友进

(重庆师范大学 生命科学学院 昆虫与分子生物学研究所, 重庆 401331)

**摘要:** 基于转录组数据,首次鉴定了葱蝇(*Delia antiqua*) 2条己糖激酶(Hexokinase, HXK)基因分别命名为 *DaHXK-1* 和 *DaHXK-2*。*DaHXK-1* 基因含有 1 544 bp 的开放阅读框,编码 513 个氨基酸,相对分子量和理论等电点分别为 58.3 kD 和 5.97;*DaHXK-2* 基因的开放阅读框为 2 512 bp,编码 819 个氨基酸,相对分子量和理论等电点分别为 91.1 kD 和 9.19,二者编码的蛋白同为胞质型蛋白,具有该酶蛋白质典型的保守结构域,且与家蝇(*Musca domestica*) MdhXK-1 和 MdhXK-2 蛋白的同源性分别为 74% 和 78%;系统发育分析显示它们与其他双翅目(Diptera)昆虫的己糖激酶的进化关系最近,表明己糖激酶在进化过程中比较保守。基因表达分析显示 *DaHXK-1* 和 *DaHXK-2* 基因在夏滞育蛹中都下调表达;*DaHXK-1* 基因在冬滞育蛹中的表达呈先上升后下降趋势,*DaHXK-2* 基因的表达模式则相反。研究认为 *DaHXK-1* 和 *DaHXK-2* 基因的不同表达模式可能与组织特异性有关。

**关键词:** 葱蝇;滞育;己糖激酶;生物信息学分析

**中图分类号:** Q966

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1672-6693(2015)06-0028-07

葱蝇(*Delia antiqua*) 是世界性地下害虫,广泛分布于北半球温带地区,对百合类蔬菜造成严重的危害<sup>[1]</sup>。葱蝇蛹通过夏滞育(Summer-diapause, SD)度过高温和酷暑;通过冬滞育(Winter-diapause, WD)抵抗低温和严寒。葱蝇是少数具有这两种滞育类型且出现在同一发育时期(头外翻时期)的昆虫之一<sup>[2]</sup>。因此,葱蝇是比较分析昆虫夏滞育和冬滞育分子机制差异的理想物种之一。

滞育是昆虫度过不良环境、维持个体生存、延续种群的重要生态策略。滞育特征表现为发育停滞、抗逆性增强、代谢活动极低。滞育作为一种代谢活动非常不一致的发育阶段,有些代谢途径被终止或抑制,另一些维持昆虫生存所必须的代谢活动则得到保持或增强<sup>[3]</sup>。目前,关于滞育昆虫的生态机制和滞育期生理生化已有较多的研究报道<sup>[4]</sup>,但对葱蝇滞育期的生理机制尤其是对能量储藏物质合成的中间代谢途径有关基因的研究甚少。

己糖激酶(Hexokinase, HXK, 编号 EC 2.7.1.1) 是许多糖代谢途径中的关键酶,广泛存在于细菌、酵母、植物、昆虫和脊椎动物中。研究表明黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*) 具有 3 个 HXK 同工酶<sup>[5]</sup>,而家蚕(*Bombyx mori*) 有 4 个 HXK 同工酶<sup>[6]</sup>。作为糖代谢的重要限速酶之一, HXK 参与了糖酵解、糖异生、磷酸戊糖代谢、糖醛酸代谢、海藻糖代谢及糖原合成等过程,直接影响昆虫体内的生理变化,从而影响昆虫生理活动。本研究基于葱蝇转录组数据,鉴定了 2 条 HXK 基因;通过数字基因表达谱比较了葱蝇夏滞育和冬滞育蛹中 HXK 基因的表达特点。较为全面地分析了 2 个 HXK 的蛋白特征并探究了它们基因的表达模式,为进一步研究葱蝇滞育蛹的糖代谢机制提供理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试昆虫

葱蝇为本实验室长期饲养的实验种群<sup>[7]</sup>。成虫饲养温度为(23±0.5)℃,相对湿度 50%~70%,光周期为

\* 收稿日期:2014-12-20 修回日期:2015-03-05 网络出版时间:2015-9-28 12:19

资助项目:重庆市“两江学者”计划专项经费;国家自然科学基金(No. 31372265);重庆师范大学重点项目(No. 12XL205);重庆师范大学博士启动基金(No. 11XLB005)

作者简介:郭强,男,研究方向为生化与分子生物学, E-mail: Guopengfei6883302@126.com;通信作者:郝友进,教授, E-mail: haoyoujin@hotmail.com

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.n.20150928.1219.046.html>

16 h 光照 : 8 h 黑暗;非滞育幼虫及蛹饲养条件为(20±0.5) °C,光周期为 16 h 光照 : 8 h 黑暗;夏滞育的诱导温度为(25±0.5) °C,光周期为 16 h 光照 : 8 h 黑暗;冬滞育的诱导温度为(18±0.5) °C,光周期为 12 h 光照 : 12 h 黑暗。

## 1.2 基因序列检索

以“Hexokinase”作为关键词,在葱蝇转录组(SRR access number:916227)<sup>[8]</sup>中进行搜索,然后对检索序列进行 BlastP 分析。

## 1.3 生物信息学分析

利用 ORF Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)查找序列的开放阅读框、推测编码氨基酸序列;分别利用 Compute pI/Mw ([http://www.expasy.org/compute\\_pi/](http://www.expasy.org/compute_pi/))和 ProtScale (<http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>)进行蛋白质的理论分子量、等电点及亲、疏水性分析;蛋白的跨膜区及信号肽预测由 TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)和 SignalP4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)完成;利用 WoLF PSORT(<http://wolfpsort.org/>)进行蛋白的亚细胞定位预测;通过 SMART 软件(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)进行蛋白质的功能结构域分析;蛋白质的二级结构分析由 SNP (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>)完成。用 OrthoMCL (<http://www.orthomcl.org/orthomcl/>)在线软件进行了蛋白质同源性分析。蛋白质的三维结构由 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>)构建后,用 PDBview 程序显示分析和编辑,并用 Compute Electrostatic Potential 对蛋白表面的电荷分布进行预测分析。

## 1.4 系统发育关系分析

分别以 HXK-1 和 HXK-2 作为询问序列,在 GenBank 中对昆虫 HXK 进行同源性搜索。利用 MEGA 5.1 软件预测蛋白质最佳进化模型。采用贝叶斯(Bayesian V 3.01)方法构建系统进化树,运行 4 个马尔科夫链,3 条热链和 1 条冷链,以随机树为起始树,运行 10 万代,每 100 代取 1 棵树,舍去老化的前 250 棵树后,根据剩余样本构建一致树并计算相关参数。以家鼠(*Mus musculus*)同源 HXK 序列(登录号:AAB57759)作为外群。

## 1.5 RNA 的提取及基因表达谱测序

用 TRIZOL 法提取非滞育(ND)、滞育起始期(SI,WI)、滞育维持期(SM,WI)和滞育静止期(SQ,WQ)蛹的总 RNA 并用 Agilent 2100 检测 RNA 的完整性。mRNA 经 Oligo(dT)磁珠富集后,随机打断成约 200 nt 的片段,以片段化的 mRNA 为模板,用六碱基随机引物合成 cDNA 第一链后,加入 dNTPs、缓冲液、DNA 聚合酶 I 和 Rnase H 进行 cDNA 第二链的合成;纯化后进行末端修复、加 ploy(A)和测序接头,再经琼脂糖凝胶电泳回收目的片段,最后进行 PCR 扩增并构建测序文库。采用 Hiseq 2000 进行测序,测序工作由深圳华大基因研究院完成。测序所得的原始数据经去接头、去低质量序列后进行拼接。参考本实验室前期获得的转录组数据。基因表达量的计算使用 RPKM 法(Reads per kb million reads)<sup>[9]</sup>。样本间的差异表达基因的筛选标准为假阳性率(False discovery rate,FDR)不高于 0.001,且以 2 为底相对表达量比率值对数(log<sub>2</sub>-ratio)的绝对值不低于 1(差异倍数不低于 2 倍)。将差异基因映射到 KEGG 数据库中的代谢通路中。从中找出糖代谢相关基因,并比较分析它们在不同时期的表达情况。

# 2 结果与分析

## 2.1 HXK 基因鉴定

经数据库检索找到 2 条编码 HXK 的基因序列(Unigene2150 和 Unigene2949)。BlastP 分析显示它们分别与家蝇(*Musca domestica*)HXK-1 和 HXK-2 的氨基酸序列相似率最高,分别为 74%和 78%。结构域分析显示它们都含有两个高度保守的 HXK 结构域(HXK1 和 HXK2),表明葱蝇的 2 个基因为 HXK 家族成员;因此将它们命名为 *DaHXK-1*(Unigene2150,GenBank 登录号:AHN49716)和 *DaHXK-2*(Unigene2949,GenBank 登录号:AHN49715)。

## 2.2 蛋白序列分析

氨基酸序列分析显示 *DaHXK-1* 基因编码的蛋白质含有 513 个氨基酸,相对分子量为 58.3 kD,理论等电点

为 5.97, 无信号肽, 不存在跨膜螺旋区, 为细胞质型蛋白。DaHXK-1 蛋白具有 HXK 家族保守的功能结构域 HXK1(氨基酸序列位置: 48~248,  $E=1.5e-58$ ) 和 HXK2(氨基酸序列位置: 250~493,  $E=5.6e-60$ ) (图 1)。*DaHXK-2* 基因编码的蛋白质含有 819 个氨基酸, 相对分子量为 91.1 kD, 理论等电点为 9.19, 无信号肽, 同样为细胞质型蛋白; DaHXK-2 蛋白也具有两个保守的功能结构域: HXK1(氨基酸序列位置: 264~468,  $E=2.5e-75$ ) 和 HXK2(氨基酸序列位置: 470~709,  $E=9.8e-78$ ) (图 1)。蛋白质翻译后修饰分析发现 DaHXK-1 和 DaHXK-2 蛋白都有 N-糖基化位点、蛋白激酶 C 磷酸化位点、N-肉豆蔻酰化位点及酪蛋白激酶 II 磷酸化位点(表 1)。同时, 它们含有保守序列 DLGGTNXR、DTTG、VLGT, 葡萄糖结合序列 GFTFSFP 和 NDTTG, 葡萄糖-6-磷酸结合序列 DGSVY, 以及 ATP 结合区 DLGGTNF/LR(图 1)。

DaHXK-1	MKS-----MYETEKQSDPVRNGKVEDTVKRLAFTDAIVERTKQVFISFMELATNME---PSSIQMEN	93
MdHXK-1	-----MYQIEQLQCDPEKQQRVEALLNGLQITDDALERTGQVFRENDLAKMK---PSSIQMEN	58
DaHXK-2	DDISTLLSHKTTN---TPSTTAPYASASVAEKRRKMVHELCCQLLITDEQINELNYRILHEIKKCLAKDTHQKANRKFV	314
MdHXK-2	GEG--ITGHKTTNPPPPRPTTAPFANASVAEKRRKMVHELCCQLLITDEQINELTYRILHEIKKGLAKDTHAKANRKFV	192
DaHXK-1	TYVEFLDPGTEGCTFLAMDLCCTNLRVLMMTMKRGEVSNIEIVQHFYFDEEERLGGCDKLFDFHAKCTDDBAKKQKQKDDC	173
MdHXK-1	TYVEFLDPGTEGCTFLAMDLCCTNLRVLMMTLEQGQILLEIVQYFPLPPEHRLAGDGDALFYLAKCVDEBARNQELDEDL	138
DaHXK-2	TYVCDLPNGNFRGKFTALDTGGTNERVLIHLKEDHDFQMESRIYALPHLMGSGIQTFPHAECCANRNMNEHDVYKF	393
MdHXK-2	TYVCDLPNGNFRGKFTALDLGGTNERVLIHLKEDHDFQMESRIYALPHLMGSGTOLFPHIAECSINRNMVEHNTKSE	271
DaHXK-1	KYSIGTFESEFPMRSELDSEGLVVTWTKSEFNCPSVVGSDAVLLLRKSLAKYKRNLELVVALINDPTGTLMHGALLDANERI	253
MdHXK-1	IYSMGFTFSEFPMRQSATDSGVVTVWTKSEFNCPSVVGSDAVLLLRKFTKRYKRNLELVVALINDPTGTLMHGAIMDANERI	218
DaHXK-2	RLPFGTFESEFPLTQLCLTKCILVTVWTKSEFNCAGVVDVQVLLLEDAIARRGDVQIDVCAILNDTTGTILMSCAWKNINCKI	473
MdHXK-2	RLPFGTFESEFPLTQLCLTKCILVTVWTKSEFNCAGVVDVQVLLLEDAIARRGDVQIDVCAILNDTTGTILMSCAWKNINCKI	351
DaHXK-1	GIVLIGTGSNCTYMERANRKYKHWEKQRHGEKEVVDVVEWGAFGDNCVLDLDMSTEEFDRIVDEGSLKNSFTFERYIGCKYLG	333
MdHXK-1	GIVLIGTGSNCTYMERSSKYLHWQERHGERLDVVDVVEWCAFGDNCVLDLDFIKTDYDQVDEGSLKNSFTFERYISCKYLG	298
DaHXK-2	GLLVIGTGSNCTYMERVEEEMFLAGANGRPHVLLINTEWGAFGDNCVLDLDFVDEVDVDSHINPGKQVFEKMSIMYME	563
MdHXK-2	GLLVIGTGSNCTYMERVEEEMFLGASNGRPFVLLINTEWGAFGDNCVLDLDFVDEVDVDRHSINPGKQVFEKMSIMYME	431
DaHXK-1	ELCRCLLAKLHTEKIFLPQVAEEDLPQPTWEGSDNVSTLEHDTLRNGWENVENLRKKFNALQIEADLLQILRYVAGLIS	413
MdHXK-1	ELCRCLLAKLHTEKIFLPQVAEEDLPQPTWEGSDNVSTLEHDTLRNGWENVENLRKKFNALQIEADLLQILRYVAGLIS	378
DaHXK-2	ETVRLDITVRMYKAGVLFKGVDSIVLMTRGQFFIKYVSEIFADEP--GVFTNCRVWLEELGLNNAATDFPCANVRYTCECVS	631
MdHXK-2	ETVRLDITVRMYKAGVLFKGVDSIVLMTRGQFFIKYVSEIFADEP--GVFTNCRVWLEELGLTEATDDEPCANVRYTCECVS	509
DaHXK-1	KRAAQTVAINTSVLNRMGEEEGDNTIVATVGSVYRHEHRLRKKWITVYALWVND-KKCKRMTREDFGSGRGAATVAEAD	492
MdHXK-1	KRAAQTVAINTSVLNRMGMSPEEGDDITVATVGSVYRHEHRLRQWITVYALWTKD-KTKKYLADDFGSGRGAATVAEAE	457
DaHXK-2	KRAAHLVSSGIATLNRKMNPEQ---VTVGVGDSVYRHEHRLRQWITVYALWTKD-KTKKYLADDFGSGRGAALVAAC	707
MdHXK-2	KRAAHLVSSGIATLNRKMNPEH---VTVGVGDSVYRHEHRLRQWITVYALWTKD-KTKKYLADDFGSGRGAALVAAC	586
DaHXK-1	KLR-LRECSNIYFHTITNNT-----	512
MdHXK-1	KLR-RQNL-----	464
DaHXK-2	RED-VPKKKKIITSINIKTNYNTRYDNKKKVKKIALTFNARMCRRESSGGTERKITLYYRAYIFIKNKHGLLVNLLWRLLS	786
MdHXK-2	REDNLPKKKKE-----	597

注: 倒三角形代表保守位点, 星号表示葡萄糖结合位点, 实心圆点表示葡萄糖-6-磷酸结合位点, 空心圆圈表示 ATP 结合位点。

图 1 葱蝇 DaHXK-1、DaHXK-2 与家蝇 MdHXK-1、MdHXK-2 的氨基酸序列比对

Fig. 1 Multiple alignment of the deduced amino acid sequence of *D. antiqua* DaHXK-1 and DaHXK-2, and *M. domestica* MdHXK-1 and MdHXK-2

## 2.3 二级结构分析

利用 USD 方法, 对 DaHXK-1 和 DaHXK-2 蛋白的二级结构进行预测。结果表明, DaHXK-1 蛋白由 34.18% 的  $\alpha$ -螺旋、16.21% 的  $\beta$ -折叠和 49.61% 的无规则卷曲组成; 而 DaHXK-2 蛋白则由 26.68% 的  $\alpha$ -螺旋、22.03% 的  $\beta$ -折叠和 51.26% 的无规则卷曲组成(图 2)。该分析表明无规则卷曲是 DaHXK-1 和 DaHXK-2 蛋白二级结构中的最大结构元件,  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠则分散于整个蛋白质中。

## 2.4 三级结构分析

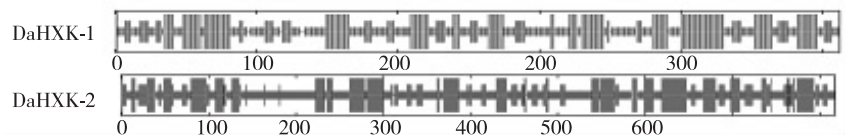
利用 SWISS-MODEL 进行同源建模, 结果显示 DaHXK-1 蛋白的空间结构有 14 条  $\alpha$ -螺旋和 10 股反向平行的  $\beta$ -折叠组成(封二彩图 3a); DaHXK-2 则有 22 条  $\alpha$ -螺旋和 14 股反向平行的  $\beta$ -折叠组成(封二彩图 3b)。它们分别与人的 HXK I(PDB: 1qha. A) 和 HXK II(PDB: 2nzt. A) 相似率最高, 分别为 47.85% 和 38.04%。拉试图统计比较显示 DaHXK-1 和 DaHXK-2 模型有很好的立体化学结构, 表明 HXK 家族成员有较高的空间结构保守

性。如封二彩图 3c 和 3d 所示, DaH XK-1 和 DaH XK-2 表面以负电荷为主,而在活性位点区域正电荷聚集,这种电荷分布模式更有利于 HXK 的催化反应。

表 1 DaH XK-1 和 DaH XK-2 的功能位点比较  
Tab. 1 Comparison of functional sites of DaH XK-1 and DaH XK-2

位点名称	模式类型	氨基酸序列		随机概率
		HXK-1	HXK-2	
N-糖基化位点	N(P)[ST]-{P}[12]	105~108; NGTF; 235~238; NDTT; 368~371; NVSV; 378~381; NDSW; 423~425; NTSV; 438~441; NITV; 509~512; NNTE	188~191; NGTL; 197~200; NCTK; 205~208; NGCC; 455~458; NDTT; 614~617; NATD; 810~813; NCTK	5.1e-03
蛋白激酶 C 磷酸化位点	[ST]-x-[RK]	124~125; TMK; 394~396; TAR; 413~415; SKR; 480~482; SGK;	13~15; SIR; 48~50; SGR; 69~71; TKR; 76~78; SGK; 222~224; TDK; 246~248; SHK; 631~633; SKR; 696~698; SGR; 756 ~758; TER	1.4e-02
N-肉豆蔻 酰化位点	G{EDRKHPFYW}- x(2)-[STAGCN]	102~107; GTENGT; 106~111; GTFLAM; 189~194; GLDSGV; 193~198; GVLVTW; 254~259; GIVLGT; 258~263; GTGSNG; 260~265; GSNGCY; 479~484; GSGKGA	409~414; GLTKGL; 413~418; GLLVTW; 459~464; GTLMSC; 474~479; GLIVGT; 478~483; GTGSNA; 480~485; GSNACY; 549~554; GMYMGE; 582~587; GQFFTK; 598~603; GVFTNC; 611~616; GLNNAT; 657~662; GVDGSV; 695~700; GSGRGA; 775~780; GLLVNL	1.4e-02
酪蛋白激酶 II 磷酸化位点	[ST]-x(2)-[DE]	35~38; SMYE; 76~79; SEME; 188~ 191; SGLD; 226~229; TNIE; 305~308; TEFD; 310~313; TVDE; 370~373; SVIE; 376~379; TLND; 383~386; SLEE; 398~401; SNDD	8~11; TTSE; 217~220; SSTD 218~ 221; STDE; 263~266; SVAE 525~528; TEFD; 590~593; SEIE 616~619; TD- ED; 728~731; TRYD 787~790; TIVE	1.5e-02
HXK 标签	[LIVM]-G-F-[TN]- F-S-W-T-K-x-[LF]	117~202; LGFTFSFPMRQSGLDSGV- LVTWTKSF	397~422; LGFTFSFPLTLGLT-KGL- LVTWTKGF	5.1e-17
酪氨酸激酶 磷酸化位点	[RK]-x(2,3)-[DE]- x(2,3)-Y	167~175; KQLKDDCKY	—	4.1e-04
cAMP 和 cGMP 依赖性蛋白激 酶磷酸化位点	[RK](2)-x-[ST]	—	17~20; KKKT; 715~718; KKIT; 749~ 752; RRES; 758~761; RKIT	1.6e-03
细胞附着序列	R-G-D	—	443~445; RGD	2.0e-04
酰胺化位点	x-G-[RK]-[RK]	—	76~79; SGKK	8.6e-04

根据氨基酸序列同源性分析结果, 选取了 17 种昆虫的 20 条 HXK 蛋白质序列(表 2), 并以 WAG+G 为最佳进化模型进行系统发育树的构建。结果显示 DaH XK-1 和 DaH XK-2 蛋白分别与家蝇的 HXK-1 和 HXK-2 蛋白聚为一支, 表明它们是直系同源蛋白(图 4)。



注: 图中线条由高到低依次表示  $\alpha$ 螺旋、 $\beta$ 折叠、无规则卷曲。

图 2 DaH XK-1 和 DaH XK-2 的二级结构

Fig. 2 The secondary structure of DaH XK-1 and DaH XK-2

这与 OrthoMCL 的分析结果相一致,同属于 OG5-126743 同源系列。另外,葱蝇 *DaH XK-2* 蛋白与其他双翅目(Diptera)昆虫的 HXK 蛋白形成姊妹系。*DaH XK-1* 蛋白则与其他膜翅目(Hymenoptera)昆虫的 HXK 蛋白形成姊妹分支。

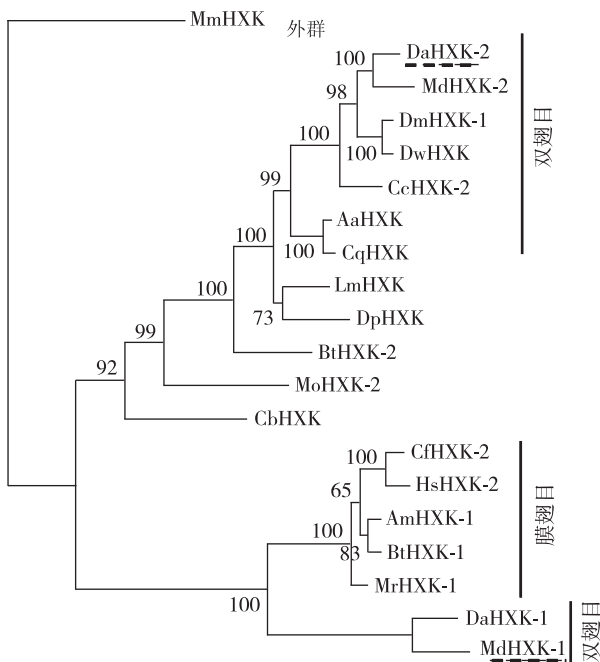
表 2 17 种昆虫的 20 条 HXK 蛋白质序列

Tab. 2 20 HXK protein sequences in 17 insect species

蛋白名称	物种	登录号	蛋白名称	物种	登录号
DaHXK-1	葱蝇( <i>D. antiqua</i> )	AHN49716	DmHXK-1	黑腹果蝇( <i>Drosophila melanogaster</i> )	NP_727350
DaHXK-2	葱蝇( <i>D. antiqua</i> )	AHN49715	MoHXK-2	西花蓟马( <i>Metaseiulus occidentalis</i> )	XP_003747899
MdHXK-1	家蝇( <i>M. domestica</i> )	XP_005179307	MrHXK-1	苜蓿切叶蜂( <i>Megachile rotundata</i> )	XP_003708388
MdHXK-2	家蝇( <i>M. domestica</i> )	XP_005182332	HsHXK-2	印度跳蚁( <i>Harpegnathos saltator</i> )	EFN77452
BtHXK-1	熊蜂( <i>Bombus terrestris</i> )	XP_003394957	CfHXK-2	弓背蚁( <i>Camponotus floridanus</i> )	EFN64975
BtHXK-2	熊蜂( <i>Bombus terrestris</i> )	XP_003401409	LmHXK	飞蝗( <i>Locusta migratoria</i> )	ACM78948
AmHXK-1	意大利蜜蜂( <i>Apis mellifera</i> )	XP_006560610	CqHXK	致倦库蚊( <i>Culex quinquefasciatus</i> )	XP_00185012
DpHXK	大红斑蝶( <i>Danaus plexippus</i> )	EHJ75730	DwHXK	果蝇( <i>Drosophila willistoni</i> )	XP_002067500
AaHXK	埃及伊蚊( <i>Aedes aegypti</i> )	XP_001660030	CbHXK	军蚁( <i>Cera pachys biroi</i> )	EZA53295
CcHXK-2	地中海实蝇( <i>Ceratitis capitata</i> )	XP_004521010	MmHXK-1	家鼠( <i>M. musculus</i> )	AAB57759

2.5 HXK 基因的表达谱分析

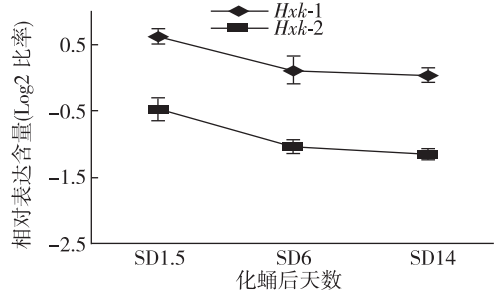
为进一步了解非滞育和滞育蛹中糖代谢的变化规律,本研究对 *DaH XK-1* 和 *DaH XK-2* 基因进行了鉴定和数字表达谱分析。结果显示 *DaH XK-1* 和 *DaH XK-2* 基因在夏滞育葱蝇蛹中呈现一直下调的表达趋势,而在冬滞育蛹中二者却呈相反的表达趋势,*DaH XK-1* 基因先上升后下降,而 *DaH XK-2* 基因先下降后上升(图 5)。



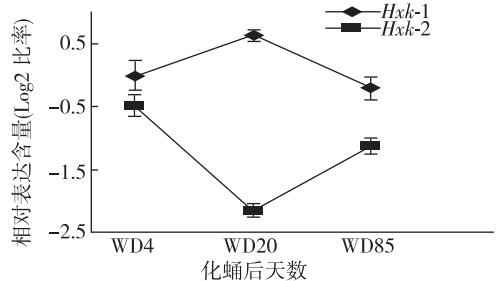
注:分支上的数字为贝叶斯验后概率;分支长度表示每个氨基酸的替代率。各 HXK 的来源和登录号见表 2。

图 4 *DaH XK-1* 和 *DaH XK-2* 与其他昆虫 HXK 的系统树

Fig. 4 Phylogenetic tree of *DaH XK-1*, *DaH XK-2*, and other insect hexokinases



a 夏滞育



b 冬滞育

注:同一发育时期的蛹作为实验材料(刚化蛹时为 D0);SD1.5 = WD4(滞育起始期);SD6 = WD20(滞育维持期);SD14 = WD85(滞育静止期)。

图 5 *DaH XK-1* 和 *DaH XK-2* 基因在夏滞育和冬滞育中的表达模式

Fig. 5 The expression analysis of *DaH XK-1* and *DaH XK-2* in summer-and winter-diapause

### 3 讨论

本研究通过葱蝇转录数据分析,得到2个 *HXK* 基因。氨基酸序列分析显示 DaHXK-1 和 DaHXK-2 蛋白与其他双翅目昆虫的 *HXK* 蛋白同源性高,表明该蛋白在进化上比较保守;推测与之在双翅目昆虫中执行相似功能有关。葱蝇 *HXK* 具有高度保守的葡萄糖、ATP 和 G-6-P 结合位点,有相同的 N-糖基化位点、蛋白激酶 C 磷酸化位点、酪蛋白激酶 II 磷酸化位点和 *HXK* 标签。蛋白质的磷酸化和去磷酸化过程在细胞的信号转导中起重要作用,它是生物体中普遍存在的一种调节机制,几乎涉及所有的生理和病理过程,如糖代谢、细胞的生长发育、基因表达等<sup>[10]</sup>,这为 *HXK* 在葱蝇滞育糖代谢中的功能提供了理论依据。但 DaHXK-1 蛋白有1个特殊的酪氨酸激酶磷酸化位点, DaHXK-2 蛋白有3个特有的蛋白修饰位点: cAMP 和 cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点、N-肉豆蔻酰化位点、酰胺化位点和细胞附着序列。这些特有位点可能影响两个基因的不同功能。研究发现家蚕有4种 *HXK* 同工酶,它们在发育过程中有明显的时空表达模式<sup>[6]</sup>。研究表明果蝇 *HXK-A* 虽然在不同组织中都有表达,但在飞行肌中表达量最高<sup>[11-12]</sup>。还发现 *HXK* 在线粒体和细胞质中的活性也存在差异<sup>[13]</sup>。对黑腹果蝇幼虫、成虫及不同组织的研究显示 *HXK-1*, *HXK-2* 和 *HXK-3* 蛋白具有不同的酶活性变化趋势<sup>[14]</sup>。因此,推测本研究中 DaHXK-1 和 DaHXK-2 蛋白的不同表达模式可能与组织特异性有关。

*HXK* 表达受激素的调控,从而影响葡萄糖含量的变化,而糖含量的变化与葱蝇滞育的发生、维持和终止有密切的关系。代谢过程中积累的葡萄糖等中间代谢产物可以通过血淋巴进入大脑,影响神经肽 *PTTH* 的合成,进而对昆虫滞育和其他变态发育过程起到调节作用<sup>[10]</sup>;同时糖含量的变化有可能反过来影响昆虫的滞育进程。

本研究报道的2个葱蝇 *HXK* 基因及其序列特征进一步丰富了昆虫 *HXK* 酶系基因数据。系统发育分析显示 DaHXK-1 和 DaHXK-2 蛋白分别与双翅目昆虫的 *HXK* 蛋白聚为一支,表明该酶在进化中比较保守。通过表达谱数据探究了2个 *HXK* 基因在夏滞育和冬滞育的表达模式,发现2个基因在夏滞育中有相同的表达模式,而在冬滞育中表达模式却相反。研究推测不同表达模式可能与组织特异性有关,且对进一步揭示冬、夏滞育糖代谢特点奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] 宋增明,薛明,王洪涛. 六种昆虫生长调节剂对葱蝇生长发育和繁殖力的影响[J]. 昆虫学报, 2007, 50(8): 775-781.  
Song Z M, Xue M, Wang H T. Effects of six insect growth, development and reproduction of *Delia antiqua* (Meigen) (Diptera: Anthomyiidae) [J]. Acta Entomologica Sinica, 2007, 50(8): 775-781.
- [2] Chen B, Kayukawa T, Jiang H, et al. DaTrypsin, a novel clip-domain serine proteinase gene up-regulated during winter and summer diapauses of the onion maggot, *Delia antiqua* [J]. Gene, 2005, 347(1): 115-123.
- [3] 孙德旭, 陆明贤. 菜粉蝶滞育期的糖类代谢[J]. 沈阳农业大学学报, 1989, 20(12): 330-336.  
Sun D X, Lu M X. Carbohydrate metabolism of the cabbage white butterfly (*Pieris rapae* L.) during diapause [J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 1989, 20(12): 330-336.
- [4] Ding L, Li Y, Goto M. Physiological and biochemical changes in summer and winter diapause and non-diapause pupae of the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae* L. during long-term cold acclimation [J]. J Insect Physiol, 2003, 49(12): 1153-1159.
- [5] Jayakumar P C, Shouche Y S, Patole M S. Functional analysis of *Drosophila melanogaster* hexokinase Hex-A locus: multiple initiator-like elements enhance DPE containing promoter activity [J]. Insect Mol Bio, 2007, 16(1): 3-13.
- [6] Yanagawa H A. Tissue distribution, purifications, and properties of multiple forms of hexokinase in the silkworm, *Bombyx mori* [J]. Insect Biochem, 1977, 8(1): 293-305.
- [7] 陈斌, 黎万顺, 冯国忠, 等. 葱蝇的实验室饲养、生物学特性及滞育诱导 [J]. 重庆师范大学学报: 自然科学版, 2010, 7(2): 9-13.  
Chen B, Li W S, Feng G Z, et al. Laboratory rearing, biological characteristics and diapause induction of the onion maggot, *Delia antiqua* [J]. Journal of Chongqing Normal University: Natural Science, 2010, 27(2): 9-13.
- [8] Zhang Y J, Hao Y J, Si F L et al. The *de novo* transcriptome and its analysis in the worldwide vegetable pest, *Delia antiqua* (Diptera: Anthomyiidae) [J]. G3 (Bethesda), 2014, 4(5): 851-859.
- [9] Mortazavi A, Williams B A, McCue K, et al. Mapping and

quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq [J]. Nat Methods, 2008, 5(7): 621-628.

- [10] Xu W H, Lu Y X, Denlinger D L. Cross-talk between the fat body and brain regulates insect developmental arrest [J]. PNAS, 2012, 109(36): 14687-14692.
- [11] Kenneth B S. Regulatory properties of hexokinase from flight muscle of *Schistocerca americana gregaria*. role of the enzyme in control of glycolysis during the rest- to - flight [J]. Insect Biochem, 1980, 10(6): 637-645.
- [12] Jayakumar P C, Shouche Y S, Patole M S. Cloning of two hexokinase isoenzyme sequences from *Drosophila mela-*

*nogaster* [J]. Insect Biochem Mol Biol, 2001, 31(12): 1165-1171.

- [13] Crabtree B, Newsholme E A. The activities of phosphorylase, hexokinase, phosphofructokinase, lactate dehydrogenase and the glycerol 3-phosphate dehydrogenases in muscles from vertebrates and invertebrates [J]. Biochem J, 1972, 126(1): 49-58.
- [14] Madhavan K, Fox D J, Ursprung H. Developmental genetics of hexokinase isozymes in *Drosophila melanogaster* [J]. J Insect Physiol, 1972, 18(8): 1523-1530.

## Animal Sciences

### Identification, Characterization of Hexokinase Genes in *Delia antiqua* and Expression Analysis during the Diapause Periods

GUO Qiang, CHEN Bin, FU Danying, REN Shuang, SI Fengling, HAO Youjin

(Institute of Entomology and Molecular Biology, College of Life Sciences,  
Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

**Abstract:** In this study, two hexokinase genes were firstly identified based on transcriptome data, and designated as *DaH XK-1* and *DaH XK-2*. *DaH XK-1* contains an opening reading frame of 1 544 bp, encodes a 513-aa protein with a theoretical molecular weight of 58.3 kD and pI of 5.97. *DaH XK-2* contains an opening reading frame of 2 512 bp, encodes an 819-aa protein with a theoretical molecular weight of 91.1 kD and pI of 9.19. Both encoded proteins are cytoplasmic protein. Homology analysis showed that they have two conserved functional domains and other functional sites. They share 74%, 78% identity to MdH XK-1 and MdH XK-2 of *Musca domestica*, respectively. Phylogenetic analysis showed that they were clustered with H X Ks of other Diptera insects, suggesting that hexokinase was more conservative during insect's evolution. Gene expression analysis revealed that *DaH XK-1* and *DaH XK-2* were down-regulated in summer diapause. *DaH XK-1* showed a up-down expression pattern in winter diapause. However, *DaH XK-2* had a contrary expression pattern. The research showed that the different expression of *DaH XK-1* and *DaH XK-2* may be tissue-specific expression.

**Key words:** *Delia antiqua*; diapause; hexokinase; bioinformatic analysis

(责任编辑 方 兴)