

意大利蜜蜂 *AmCht11* 基因的克隆鉴定和发育时期表达分析^{*}

王 李, 王林玲, 马荣琴, 衡 惠, 李 治
(重庆师范大学 生命科学学院, 重庆 401331)

摘要:【目的】克隆鉴定和定量 PCR 分析不同发育时期意大利蜜蜂(*Apis mellifera*)几丁质酶 *AmCht11* 基因。【方法】克隆测序鉴定 *AmCht11* 基因序列,通过多重序列比对分析该基因编码的氨基酸序列特征和结构域组成;在线预测 *AmCht11* 蛋白的二级结构、三级结构以及相互作用靶蛋白,构建系统进化树分析该蛋白在几丁质酶家族中的分类和进化关系;实时定量 PCR 分析 *AmCht11* 基因的组织表达特征。【结果】*AmCht11* 基因 cDNA 序列全长 1 404 bp,编码 468 个氨基酸;预测 *AmCht11* 蛋白质相对分子质量为 53.5 kDa,等电点为 7.21。多重序列比对和系统进化分析表明,*AmCht11* 蛋白为几丁质酶 GH18 家族 Group-VIII 亚家族成员,该蛋白的氨基酸序列 N-端含有跨膜域,具典型的几丁质酶催化结构域,无结合结构域,也不具信号肽。进一步实时定量 PCR 分析表明,*AmCht11* 基因表达量在意大利蜜蜂幼虫发育第 2 至第 5 日龄无明显波动,至幼虫后期第 6 日龄表达量明显上调。【结论】推测 *AmCht11* 基因与意大利蜜蜂幼虫发育后期的蜕皮有关。

关键词:几丁质酶;GH18 家族;克隆;表达谱;意大利蜜蜂

中图分类号:Q966

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2018)03-0045-07

几丁质(Chitin)是由 N-乙酰氨基葡萄糖胺以 β -1-4-糖苷键链接而成的线性多聚糖^[1],在自然界中仅次于纤维素成为第二大可再生自然资源^[2]。几丁质是昆虫外骨骼和围食膜的重要成分^[3],它的合成与降解在幼虫蜕皮发育、成虫外骨骼维持与更新等生理过程中发挥着重要的作用^[4-6]。几丁质酶是降解几丁质的关键酶之一,根据结构域及功能特征可将几丁质酶分为糖基水解酶 18 家族(GH18)和 19 家族(GH19)^[7-8]。昆虫几丁质酶属于 GH18 家族的内切酶,成员主要存在于体壁、中肠、脂肪体等组织,能将几丁质水解成低分子量的 N-乙酰-D-氨基葡萄糖或寡聚物,参与着昆虫的蜕皮、围食膜的降解、防御体表和肠道病原的入侵等重要生命活动^[1]。

最早被成功克隆鉴定的昆虫几丁质酶基因来自于烟草天蛾(*Manduca sexta*)^[9],随后不少典型的几丁质酶基因陆续在致倦库蚊(*Culex quinquefasciatus*)^[10]、家蚕(*Bombyx mori*)^[11]、斜纹夜蛾(*Prodenia litura*)^[12]等昆虫中被广泛鉴定和分析,但有关意大利蜜蜂(*Apis mellifera*)几丁质酶基因的研究资料非常少。意大利蜜蜂简称意蜂,属膜翅目(Hymenoptera)、蜜蜂总科(Apoidea)、蜜蜂科(Apidae)、蜜蜂属(*Apis*)^[13],是一种典型的社会性、资源型昆虫,因该物种在授粉和提供蜂产品方面给自然界和农牧业生产领域带来巨大的生态和经济价值,故而受到国内外学者的广泛关注^[14-18]。对意蜂几丁质酶基因进行鉴定和分析,将有助于了解几丁质酶在蜜蜂蜕皮和免疫防御中的功能。

本研究对意大利蜜蜂几丁质酶 *AmCht11* 基因进行克隆鉴定,通过生物信息学方法预测该基因编码的氨基酸序列和 3D 结构特征,分析 *AmCht11* 蛋白在几丁质酶家族成员中的分类和系统进化关系。同时,还采用实时荧光定量 PCR 方法,分析该基因在蜜蜂幼虫发育进程中的表达特征,以便为深入探讨几丁质酶在意大利蜜蜂发育过程中的作用提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料及主要试剂

供试意蜂由重庆师范大学病原微生物与资源昆虫实验室饲养。RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、TaqDNA

^{*} 收稿日期:2017-11-14 修回日期:2018-04-21 网络出版时间:2018-05-22 10:02

资助项目:现代农业产业技术体系建设专项资金(No. CARS-44-KXJ21);国家高技术研究发展计划“863”项目(No. 2013AA102507);重庆师范大学博士科研启动基金(No. 13XLB009);重庆市教育委员会科学技术研究项目(No. KJ1703051);重庆市自然科学基金(No. 31302037);重庆市前沿与应用基础研究计划项目(No. cstc2014jcyjA80039;No. cstc2015jcyjA80014)

第一作者简介:王李,女,研究方向为微生物学,E-mail:2515325667@qq.com;通信作者:李治,男,副教授,博士,E-mail:lizhicqu@gmail.com

网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20180522.1001.034.html

聚合酶、限制性内切酶等试剂购自 TaKaRa 公司,胶回收试剂盒、PCR 试剂盒、连接酶、抗生素等试剂均购自上海生工生物有限公司。

1.2 *AmCht11* 基因的序列特征和系统进化分析

在 BeeBase(http://hymenopteragenome.org/beebase/?q=consortium_datasets)中下载意蜂几丁质酶基因序列,利用 NCBI 蛋白保守区数据库(Conserved domain database,CDD)预测 *AmCht11* 基因编码的 AmCht11 蛋白的保守区域,在 ProtParam (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>)在线分析它的组分和理化性质,通过 Prot Scale(<http://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl?1>)在线分析它的疏水性;采用 TMHMM v. 2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)在线预测 AmCht11 蛋白质跨膜结构域,在 SMART 中在线分析它的功能结构域,利用 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl)在线分析它的二级结构,在 SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/>)在线同源建模该蛋白的三级结构,采用 STRING(<https://string-db.org/cgi/network.pl?taskId=1ZN1mZPdZVwg>)在线预测与 AmCht11 蛋白相互作用的蛋白,在 ClustalOmega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolresult.ebi?jobId=clustalo-I20170905-092604-0132-64212098-pg>)在线进行多重序列对比找出该蛋白保守的氨基酸序列。在 NCBI 中下载冈比亚按蚊(*Anopheles gambiae*)、家蚕、黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)以及赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)的不同类型的 GH18 家族几丁质酶的相关资料,结合 AmCht11 蛋白在 MUSCLE 软件进行氨基酸序列多重对比分析,对比的结果在 MEGA 6.06 采用 NJ 法构建系统进化树。

1.3 *AmCht11* 基因的克隆

取意蜂提取总 RNA,去除 DNA,反转录获得 cDNA。RNA 的提取、DNA 的去除以及反转录操作参照试剂说明书进行。根据 *AmCht11* 基因序列(BeeBase 登陆号为 GB47539)以及原核表达载体 pET30a,用 Premier5 设计包含酶切位点的特异引物 PCR-AmCht11F(序列为:5'-GCGCGGATCCATGGTTAAGCAAATTCCTGT-3',下划线处为 BamHI 酶切位点)和 PCR-AmCht11R(序列为:5'-GCGCGTCGACATTTTCTTGATACCTGAGGA-3',下划线处为 Sal I 酶切位点)。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应程序:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 40 s,63 °C 退火 40 s,72 °C 延伸 1 min,共 40 个循环。PCR 产物通过胶回收并双酶切后连接到 pET30a 载体,转化到大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)DH5 α 感受态细胞,挑选阳性菌株测序。

1.4 *AmCht11* 基因在意蜂幼虫发育时期的实时荧光定量 PCR 分析

取第 2 到第 6 日龄的意蜂幼虫经液氮充分研磨,用 Trizol 试剂溶解后提取 RNA,通过 DNase I 酶去除 DNA,经反转录合成第 1 链 cDNA。采用 primer 5.0 设计 qPCR-*AmCht11* 荧光定量 PCR 特异性引物即 qPCR-*AmCht11*F(序列为:5'-TATCAGTTCGCCACAGCATTTTC-3')和 qPCR-*AmCht11*R(序列为:5'-TCCCA-GAGCGTGTTTCAGGTC-3')。以意蜂 *Actin* 基因为内参,引物序列参照文献[19],即 *Actin*F(序列为:5'-TGC-CAACACTGTCCTTTCTG-3')和 *Actin*R(序列为:5'-AGAATTGACCCACCAATCCA-3')。PCR 程序分为两步,第一步为扩增程序:95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 15 s,60 °C 退火 30 s,68 °C 延伸 30 s,共 40 个循环。第二步为溶解曲线分析:95 °C 变性 15 s,60 °C 退火 30 s,68 °C 延伸 30 s,共 20 min。荧光定量 PCR 在 ABI stepone-plus 荧光定量 PCR 仪上进行,采用 SYBR Premix Ex Taq YM(Tli RNaseH Plus),ROX plus 试剂盒(TaKaRa 公司),按照说明书进行操作,反应体系为 20 μ L。以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各发育时期 *AmCht11* 基因的相对表达水平。

1.5 数据统计分析

所有定量分析均设置 3 个生物学重复,每个生物学重复设置 3 个技术重复。用 SPSS 12.0 软件进行实验数据的统计学分析,使用单因素方差分析(One-way ANOVA)研究 *AmCht11* 基因在幼虫发育时期的表达特征, $p < 0.05$ 表示统计结果具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 *AmCht11* 基因的克隆

以意蜂 cDNA 为模板 PCR 扩增 *AmCht11* 基因,经质量分数为 1%的琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图 1 所示:PCR 检测到单一条带,DNA 片段全长 1 400 bp,测序结果显示该条带与 BeeBase 蜜蜂基因组数据库 *AmCht11* 基因序列一致。

2.2 AmCht11 蛋白的生物信息学特征

2.2.1 理化性质 *AmCht11* 基因编码的蛋白质含 468 个氨基酸残基,预测相对分子质量约为 53.5 kDa,等电点为 7.21。总带负电荷的氨基酸(Asp+Glu)个数为 46,总带正电荷的氨基酸(Arg+Lys)个数为 46。体外环境半衰期为 30 h,不稳定指数为 42.7 大于 40,属于不稳定蛋白。蛋白疏水性分析结果表明:AmCht11 蛋白第 31 和 32 位氨基酸残基分值最高为 3.311,疏水性最强;第 88 位氨基酸残基分值最低为 -3.067,亲水性最强。最终预测该蛋白为亲水性蛋白。

2.2.2 多重序列比对分析 将 AmCht11 蛋白与代表性昆虫 GH18 家族几丁质酶的氨基酸序列进行多重序列对比,结果如图 2 所示:AmCht11 蛋白的催化区含有几丁质酶的 4 个典型催化功能基序,分别为“RxxxxxGG”“FDGxLDLWEFP”“MxYDxxF”和“GAMxLxxNx D”,与已报道的保守基序“KxxxxxGG”“FDGx-LDLWEYP”“MxYDxxG”和“GAMxWxxDxD”仅存在个别氨基酸位点上的差异^[20]。这表明 AmCht11 蛋白与已报道的 GH18 家族 Group-VIII 型几丁质酶的序列特征相似,含有 GH18 家族所特有的 4 个催化结构基序。

序列长度/bp Marker *AmCht11*

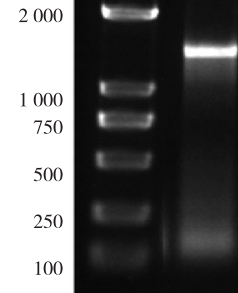


图 1 意蜂 *AmCht11* 基因 PCR 分析

Fig.1 PCR analysis of the *AmCht11* gene in honeybees *A. mellifera*

Am-XP_006572082.1	IYKEVIGLKKFQPELRVMISVGGSGNE-LHLGFSEMVKNHANRKRFIKSVLNVTRTFGFDGLDLDEWEP	AWLGADERE-K-IRFIQLLEELRKEFYRAKET	
Tc-NP_001034524.1	GFRNFTNLKKTTHPKVQLQVAVGGNAE-GGSKYSAMVAEKSRDAFIRSVISFMNQYEF	FDGFDLDEWEP	GAADRGGFSFDKDKFFYFVGLERRAFDKEGKN
Tc-NP_001036067.1	FYEKVTAYKSKG--IKVLVAIGGNDGAGDKYSRLVNNPSARRRFIAHVVDFIETNNF	FDGLDLDEWEP	PKCWQVDCNKG-ASDKSAFAADFVKELHEAFKP
Tc-NP_001036035.1	MYDRVVALREKNPDKILLAIAGGNAF-GSTPFKELTNSVFRMNQFVYDAIDFLREFQ	FNGLDVEWEP	PR--GADDR---AAYVNLKELRVAFEGEAKT
Ag-XP_315650.4	GYEKLTMRAAHPHILKVLAIAGGNE-GSEKYSNLAANPERRQAFVKNALDFVKQYGF	FDGLDLDEWEP	TQRRG-KPADRENFVALVRELSQLFRKHN--
Ag-XP_001687765.2	GFAKFTGLKTYNKNILKTLAIAGGNE-GSSRFSPVLVADAERNNQFVKNTIKFLRQNH	FDGLDLDEWEP	AFRDGSKPKDRENYAQLVQELREEFERESSK
Dm-NP_611542.2	NIKSFNALKLNPNVILKTLVAVGGNAE-GSKRFSVLVARDPSKREKFVDDVVRFLQRHGF	FDGLDLDEWEP	GQRHSLDNEDRSNYITFLKELKEGLEPFG--
Am-XP_006572082.1	-----LILSVAAVAPQAIVDQSYVMTEMAKYIDFVNLMSYDYHFFVWYYPITGLNAPLFSRAAESGY	-----LSTLNVNFSVHYWLSKGMPEKLIIGIPT	
Tc-NP_001034524.1	-----WEITMAVPIAKFRLQEGYHVPELCELLDAIHVMSYDLRG	-----NWAGFADSHSPLYKRPHDQWY	-----EKLNVNDGLQLWVDYGCSPKKLIVGIPF
Tc-NP_001036067.1	KG---WLLSAAVSPSRVVDAGYDVPTLSKYLDWIAVMCYDYHG	---QWDKITGHVAPMYAHFEDA	-----DATFNTFTIHYWIEKGADRRLKVMGMFM
Tc-NP_001036035.1	SGQPRLLLTAAVPASFEAIAAGYDVPEISKYLDFINVMTYDFHG	---QWERTVGHNSPLFPLESATSY	-----QKKLTVDFSAREWVKQAPKEKLMIGMPT
Ag-XP_315650.4	-----LLTSAFGAGKDTIDSAYDVKALSKYLDFLHMCYDYKG	---SWDGRIGPNAPLTS	-----RDFLNVEYSIEHLELGLAPASKLVGLLGF
Ag-XP_001687765.2	TGRPRLLLTMAVPAGIEYVEKGYDVPKLNKYLDWFMNLSYDYHS	---AYEPAVNHHSPFSLEEASEYN	---FDSELNIDYSVKFYLKAGADREKLVIGIPT
Dm-NP_611542.2	-----FILSAAVGSQAQFSAEISYDIPAMVPYLDLINMAYDLHG	---PWDQVVGINAPLYAAEKDASDSSGRQQQLNVDAVKYWLKAGAPAEKLIILGVFP	
Am-XP_006572082.1	YGHTYRLDNSLNHGLLAPAN---GFGKLG---NMGFVSYPYTVCEFLRNG-AESVFEEF	---SKV-PYAYKD---KEWISYDDITSIIYKAEWIRANNFG	
Tc-NP_001034524.1	YGRFTFLSNSNTNYPNGTYINKEAGGSPGYPTNATGFLAYYEICEPIILNKDGSWTKKWD	---EHGKVPYAYKG---NQWVGYESVQIKMDWIKSKGYG	
Tc-NP_001036067.1	YQGSFSLADNNQNGLNAAATY---GGGEAGEETTRAGFLAYYEICTNVIKKGWVVRDRR	---GRIGPYAYLR---DQWVSFDDIGMIRHKSEFIKAMGLG	
Tc-NP_001036035.1	YGRSFELVNKTQFDIGAPAS---GGTTPGKYTAEAGFMSFYEICDFLHEDNTTLVWDNE	---QQV-PFAYRG---NQWVGFDDESLTKMAWLKEEGFG	
Ag-XP_315650.4	YGRFTFVSPMAKAR-LGDTSD---KVGFGAPSTKRENGFMCYNEVCEELKRNPDWTLWDAAASEMVAIKSNGTASQVVYDSTRSIANKVRFAVRQKLA	---	---
Ag-XP_001687765.2	YGRSYTLNPNPATDIGAPAD---GPGEQDATTREKGYLAYYEICSSLKD-SNDWTVVQPNPKAMGFPAYKG	---NQWVGVDDEAIAARRKAKYVAENGLG	---
Dm-NP_611542.2	YGRSFTLATAEGNQFQAPHI---GKGIAGNSYREPGVLGYNELCEMME	---REEWTQKWEATQQV-PYAYRQ---RQWVGYESDPRSLAKAQYVMDNHLG	---
Am-XP_006572082.1	GAMILSLNVDVWNNTCKFNESFPLTRTIMKILRYQEN	-----	-----
Tc-NP_001034524.1	GAMITWAIMDDDFHGLCGPK-NPLINILYANMNSYS	-----	-----VPEPTISTTPR
Tc-NP_001036067.1	GGMIWALDLDFFKNLCGCEEYPLRTINRVLRGYAKPDPKCI	-----	-----LGRDNKTKPK
Tc-NP_001036035.1	GIMIWSVDMDDFRGSCGSGKYPLINAMRQELEGYKVKL	-----	-----EYDGPY
Ag-XP_315650.4	GLMVWSVDTDDFNGLCAPEADTYKDFGGAGLTI?P	-----	-----PVSGKYPL
Ag-XP_001687765.2	GIMFWSIDNDDFRGTCGKPYPIIEAAKEALLASTEVGINDVASSGRPRKPSRSRSPGSATRNRVNTDNNNEIKASEKTSQGRKVARFVRVTTTSTTT	-----	-----
Dm-NP_611542.2	GIMIWSLESDDFRGTCGQOPYPLLHEINRVLFEG	-----	-----NTPSGLIT

注:方框部分为 4 个保守的催化结构域;Dm-黑腹果蝇,Am-意蜂,Tc-赤拟谷盗,Ag-冈比亚按蚊。

图 2 AmCht11 蛋白的氨基酸序列特征和多序列对比分析

Fig.2 Amino acid sequence characteristics and multiple alignment of AmCht11 protein

2.2.3 功能结构域特征 蛋白质结构预测分析发现,AmCht11 蛋白的一级结构水平上仅含有 1 个糖苷键水解酶催化区即氨基酸序列中的第 108~441 位,不具有典型几丁质酶的 N-端信号肽和 C-端结合区,属于昆虫几丁质酶 GH18 家族中 Group-VIII 成员。该蛋白 N 端没有预测到信号肽,但在前端有 1 个跨膜结构域即氨基酸序列中的第 27~49 位(封二彩图 3)。在蛋白质二级结构水平上(封二彩图 4),AmCht11 蛋白包含 α -螺旋、 β -折叠、延伸链和无规卷曲。其中: α -螺旋比例最高,占整个氨基酸序列的 41.03%;无规卷曲占整个氨基酸序列的 27.99%;

延伸链占整个氨基酸序列的 19.23%; β -折叠比例最少,占整个氨基酸序列的 11.75%。在蛋白质三级结构水平上(封二彩图 5),AmCht11 蛋白的 3D 结构模型与典型几丁质酶结构模型的相似性达 37.25%。AmCht11 的催化结构区含有 16 个 α -螺旋和 15 个 β -折叠。第 223 位的 Glu 残基被认为是几丁质酶工作机制中的质子供体,在催化结构域“FDGxD²¹⁹LD²²¹WEFP”(数字表示氨基酸序列中的位数)中的 Asp 残基被预测为主要的催化活性残基^[21]。

2.2.4 相互作用靶蛋白的预测 使用 STRING 数据库通过生物信息学的方法构建蛋白之间的相互作用关系网络,在 STRING^[22] 中预测可能与 AmCht11 蛋白相互作用的靶蛋白,结果如封二彩图 6 所示。预测发现 AmCht11 蛋白可能与 5 个蛋白存在相互作用关系,它们包括 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶、 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶、正乙酰基-D-葡萄糖胺类激酶、 β -氨基己糖苷酶以及 1 个 GH18 家族几丁质酶。

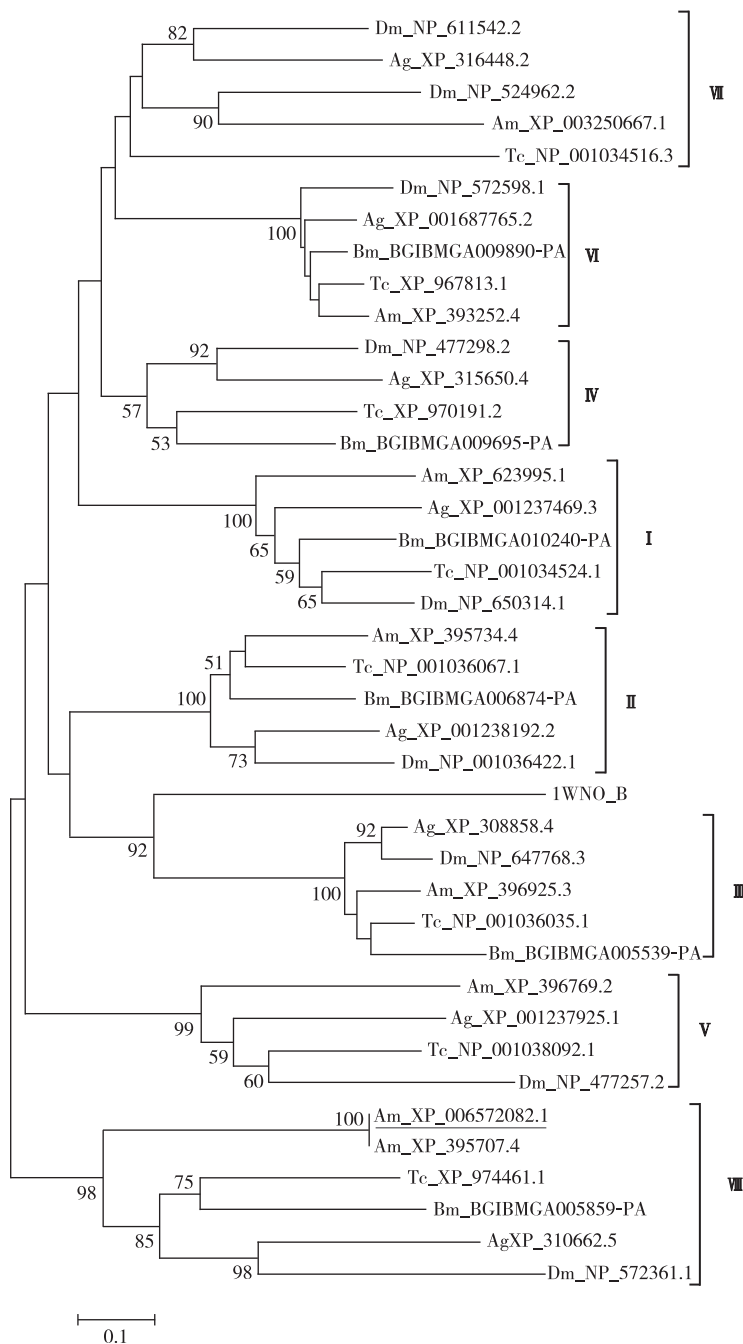
2.2.5 系统进化分析 昆虫 GH18 家族几丁质酶通常由信号肽、催化结构域、连接区和结合区构成,根据结构相似性被分为 8 个 Group 子家族。基于代表物种昆虫几丁质酶序列,对 AmCht11 蛋白进行了系统发生分析,结果如图 7 所示。AmCht11 蛋白明显的与已报道的昆虫几丁质酶 GH18 家族的 Group-VIII 型单独聚为一枝,表明该蛋白为 Group-VIII 成员几丁质酶。

2.3 *AmCht11* 基因在幼虫发育进程中的表达特征

结果显示,*AmCht11* 基因在蜜蜂幼虫第 2 到第 6 日龄都有表达,幼虫发育前期转录水平变化不大,只是到后期第 6 日龄时,*AmCht11* 基因的相对表达量与前 5 个日龄相比有统计学意义上的升高($p < 0.05$)(图 8)。

3 讨论

几丁质酶是一类水解蛋白酶家族,能将几丁质水解成低分子量的 N-乙酰-D-氨基葡萄糖或寡聚物。大量研究结果表明,典型的几丁质酶结构通常由“N-端信号肽—催化结构域—连接区—C-端几丁质结合域”构成^[23]。由于物种进化的差异,昆虫 GH18 家族几丁质酶在上述结构域的组成和数量上存在一定的差异,进一步被划分成 I 到 VIII 共 8 个 Group。其中:Group-I 和 Group-VII 具有 1 个信号肽、1 个催化域和 1 个结合域;Group-II 由 1 个信号肽、4~5 个催化域和 4~5 个结合域构成;Group-III 缺乏信号肽;Group-IV 和 Group-V 无结合域;Group-VI 插入了其他功能结构域;Group-VIII 不含结合域且 N-端信号肽区被跨膜区取代^[23]。本研究中,意蜂 AmCht11 蛋白的 N-端有 1 个跨膜域,但不含信号肽,也



注:下划线部分为 AmCht11 蛋白;Am-意蜂,Ag-冈比亚按蚊,Bm-家蚕,Dm-黑腹果蝇,Tc-赤拟谷盗。I 到 VIII 分别为 GH18 家族中的 8 个 Group 子家族编号。

图 7 意蜂和其他 4 种昆虫 GH18 家族几丁质酶的进化树

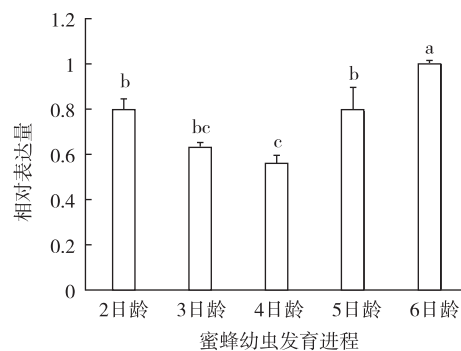
Fig. 7 Phylogenetic tree of GH18 family chitinase from *A. mellifera* and 4 other insect species

不具有结合域,该结构组成与 GH18 家族的 Group-Ⅷ型成员特征一致。除了结构域组成外,催化结构域中氨基酸基团的高度保守性也是几丁质酶的重要特征之一。几丁质酶的催化结构域主要包括“KxxxxxGGW”“FDGxLDLWE-YP”“MxYDxxG”和“GxxxWxxDxDD”共 4 个关键的保守氨基酸基序^[23]。本研究中,氨基酸多重序列比对结果表明,笔者克隆鉴定的意蜂蛋白 *AmCht11* 蛋白与代表性昆虫几丁质酶的催化结构域具有高度的氨基酸序列相似性,催化结构域仅在“RxxxxxGG”“FDGxLDLWEFP”“MxYGxxF”和“GAMxLxxNxD”共 4 个别位点上存在细微差异。进一步系统进化分析发现, *AmCht11* 蛋白与代表性昆虫的 Group-Ⅷ成员单独聚为一枝。综上结果,由于 *AmCht11* 几丁质酶特有的催化活性基序高度保守,加之它的功能结构域组成与 Group-Ⅷ成员一致,且系统进化上聚类为 Group-Ⅷ家族,因此意蜂蛋白 *AmCht11* 可被鉴定为几丁质酶 GH18 家族 Group-Ⅷ成员。

降解几丁质是几丁质酶最重要的功能,不同亚家族几丁质酶在昆虫的生命活动中往往参与了不同的生理过程。有研究表明,赤拟谷盗的 Group-I 亚家族成员 *TcCht5* 蛋白在幼虫、蛹、成虫等阶段均有表达,但非幼虫→幼虫、幼虫→蛹发育过程中蜕皮所必需,而真正参与蜕皮的是 Group-II 亚家族成员 *TcCht10* 蛋白^[24]。在黑腹果蝇的研究中发现,几丁质酶 *DmCht2* 在表皮的形成中起着重要的作用,几丁质酶 *DmIDGF6* 在表皮的维护中起作用。另外,赤拟谷盗几丁质酶 Group-III 成员并未参与到赤拟谷盗的蜕皮,而是在化蛹时腹部收缩和翼/鞘翅伸展中发挥着重要的作用^[24]。此外还有研究发现, *TcCht11* 蛋白有催化结构域, N-端由跨膜域代替信号肽,该蛋白在各个发育时期均有表达,研究者推测它主要作用于中肠围食膜的几丁质^[23]。值得注意的是, Group-Ⅷ成员几丁质酶 N-端信号肽通常被跨膜域所替换,虽具有保守的催化结构域,但缺乏结合区,为几丁质酶 GH18 家族中结构最为简单的蛋白水解酶。截至目前,昆虫 Group-Ⅷ成员的功能尚不清楚。本研究中,意蜂几丁质酶 *AmCht11* 蛋白为 Group-Ⅷ成员,它的 N-端信号肽被跨膜区取代,缺乏结合域。实时荧光定量 PCR 分析发现,该基因在蜜蜂幼虫发育第 2 到第 5 日龄的蜕皮生长中表达相对稳定,而在进入幼虫后期(第 6 日龄)有明显的上调表达,推测 *AmCht11* 蛋白可能在幼虫→蛹的发育进程发挥作用。此外,笔者还通过 STRING 数据库构建蛋白质与蛋白质的互作网络关系的方法^[25-26],预测到可能与 *AmCht11* 蛋白相互作用的蛋白 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶。 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶是昆虫几丁质代谢中的关键酶,在昆虫的多种生理活动中发挥着重要作用^[27]。考虑到 *AmCht11* 蛋白为 Group-Ⅷ型几丁质酶,功能结构域不完整,缺乏结合区,因此可以推测 *AmCht11* 蛋白可能需要与其他蛋白的相互作用来共同作用于蜜蜂的生长发育。

参考文献:

- [1] 席羽. 褐飞虱几丁质降解酶系基因家族分析[D]. 杭州:浙江大学,2014.
YU X. Analyses of chitinolytic enzyme gene families in *Nilaparvata lugens* [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2014.
- [2] 贺玉年. 三种鳞翅目昆虫几丁质降解酶基因的克隆及分子特性研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2009.
HE Y N. Molecular cloning and characterization of chitin degrading enzymes from three Lepidopteran insects [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2009.
- [3] 张建珍. 昆虫几丁质代谢与植物保护[J]. 中国农业科学, 2014, 47(7): 1301-1302.
- [4] ZHANG J Z. Insect chitin metabolism and plant protection [J]. Chinese Journal of Agricultural Sciences, 2014, 47(7): 1301-1302.
- [4] 张文庆, 陈晓菲, 唐斌, 等. 昆虫几丁质合成及其调控研究前沿[J]. 应用昆虫学报, 2011, 48(3): 475-479.
ZHANG W Q, CHEN XF, TANG B, et al. Insect chitin biosynthesis and its regulation [J]. Journal of Applied Insectology, 2011, 48(3): 475-479.
- [5] 张道伟, 钱正敏, 张正玲, 等. 昆虫几丁质酶基因家族功能研究进展[J]. 环境昆虫学报, 2016, 38(1): 193-199.
ZHANG D W, QIAN Z M, ZHANG Z L, et al. The new research progress in function of insect chitinase gene family



注:不同小写字母表示数据差异具有统计学意义 ($p < 0.05$)。

图8 实时定量 PCR 分析意蜂 *AmCht11* 基因在幼虫发育进程中的表达特征

Fig. 8 Real time quantitative PCR analysis of the expression patterns of *AmCht11* gene in the developmental of the *A. mellifera* larvae

- [J]. Journal of Environmental Insects, 2016, 38(1): 193-199.
- [6] 吴青悦. 亚洲玉米螟几丁质水解酶的克隆表达与生化性质表征[D]. 大连: 大连理工大学, 2012.
- wu q y. recombinant expression and biochemical characterization of chitinolytic enzymes from the insect *Ostrinia furnacalis* [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2012.
- [7] 王靖. 亚洲玉米螟Ⅲ家族几丁质酶的克隆表达与生化性质表征[D]. 辽宁: 大连理工大学, 2016.
- WANG J. Molecular cloning and biochemical characterization of group Ⅲ chitinase from the insect *Ostrinia furnacalis* [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2016.
- [8] 仙笑笑, 范晓军, 赵秋勇. 生物信息学在昆虫几丁质酶研究中的应用[J]. 生物技术, 2012, 22(5): 89-93.
- XIAN X X, FAN X J, ZHAO Q Y. Application of bioinformatics in the study of insect chitinase[J]. Biotechnology, 2012, 22(5): 89-93.
- [9] KRAMER K J, CORPUZ L, CHOI H K, et al. Sequence of a cDNA and expression of the gene encoding epidermal and gut chitinases of *Manduca sexta* [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1993, 23(6): 691-701.
- [10] 赵文静, 张晶, 张春林, 等. 致倦库蚊几丁质酶家族基因的鉴定与分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(4): 797-805.
- ZHAO W J, ZHANG J, ZHANG C L, et al. Identification and analysis of chitinase family genes in *Culex quinquefasciatus* [J]. Genomics and Applied Biology, 2016, 35(4): 797-805.
- [11] 赵祥杰, 李琳, 杨荣玲, 等. 家蚕蛹糖水解酶 18 家族几丁质酶的抗原表位预测与结构分析[J]. 现代食品科技, 2016(11): 85-90.
- ZHAO X J, LI L, YANG R L, et al. Antigenic epitope prediction and structural analysis of glycoside hydrolase family 18 chitinase allergen from domestic silkworm (*Bombyx mori*) pupa[J]. Modern Food Science and Technology, 2016(11): 85-90.
- [12] 张晓娟, 丁洋, 陈亚青, 等. 斜纹夜蛾几丁质酶家族基因鉴定与时空表达分析[J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 2015, 47(3): 100-106.
- ZHANG X J, DING Y, CHEN Y Q, et al. Identification and expression analysis of chitinases in common cutworm, *Spodoptera litura* [J]. Journal of South China Normal University (Natural Science Edition), 2015, 47(3): 100-106.
- [13] 袁安, 郭亚惠, 黄晓, 等. 发育温度对蜜蜂归巢能力及记忆相关基因表达的影响[J]. 应用昆虫学报, 2016, 53(6): 1261-1266.
- YUAN A, GUO Y H, HUANG X, et al. Effect of brood developmental temperature on the homing capability and memory related gene expression of worker bees *Apis mellifera* [J]. Journal of Applied Insectology, 2016, 53(6): 1261-1266.
- [14] 郭新军. 秦岭地区蜜蜂科昆虫生物地理学研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2005.
- GUO X J. Biogeography of Apidae in Qinling mountain [D]. Xi'an: Shaanxi Normal University, 2005.
- [15] 舒联莹. 有关蜜蜂授粉的论文摘要[J]. 中国养蜂, 1957(6): 1-3.
- SHU L Y. A summary of the polls on bees [J]. Chinese-Beekeepers, 1957(6): 1-3.
- [16] 罗术东, 王彪, 褚忠桥, 等. 不同蜂为设施辣椒授粉的授粉效果比较[J]. 环境昆虫学报, 2015, 37(2): 381-386.
- LUO S D, WANG B, ZHU Z Q, et al. Comparison of the pollination effects for pepper between different bees in greenhouse [J]. Journal of Environmental Insects, 2015, 37(2): 381-386.
- [17] 郑军, 易继平, 李双华, 等. 秭归县柑桔蜜蜂授粉与绿色防控技术集成效益分析[J]. 湖北植保, 2016(6): 27-29.
- ZHENG J, YI J P, LI S H, et al. Analysis on the benefit of pollination and green control technology of citrus bee in Zigui county [J]. Hubei Plant Protection, 2016(6): 27-29.
- [18] 王少珩, 伍伟斌. 几种蜂产品的游离氨基酸测定及营养价值分析[J]. 氨基酸杂志, 1989(3): 40-41.
- WANG S H, WU W B. Determination of free amino acids and nutritional value of several bee products [J]. Journal of Amino Acids, 1989(3): 40-41.
- [19] 刘芳, 宗超, 余林生, 等. 意大利蜜蜂哺育蜂与采集蜂行为转变相关基因的表达差异研究[J]. 应用昆虫学报, 2015, 52(2): 300-307.
- LIU F, ZONG C, YU L S, et al. Analysis on differentially expressed genes associated with the behavioral transition in *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica* between nurses and foragers [J]. Journal of Applied Insectology, 2015, 52(2): 300-307.
- [20] PAN Y, LÜ P, WANG Y, et al. In silico identification of novel chitinase-like proteins in the silkworm, *Bombyx mori*, genome [J]. Journal of Insect Science, 2012, 12(150): 1-14.
- [21] SIRIMONTREE P, SUGINTA W, SRITHO N, et al. Mutation strategies for obtaining chitooligosaccharides with longer chains by transglycosylation reaction of family GH18 chitinase [J]. Bioscience Biotechnology & Biochemistry, 2014, 78(12): 2014-2021.
- [22] 郑建伟, 利小平, 董俊英, 等. 构建以 RACK1 为核心口腔鳞状细胞癌差异基因间相互作用的关系网路[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(18): 2911-2916.
- ZHENG J W, LI X P, DONG J Y, et al. Constructing an interaction network of differential genes of oral squamous

- cell carcinoma with RACK1 as a core [J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2015, 19(18): 2911-2916.
- [23] Arakane Y, Muthukrishnan S. Insect chitinase and chitinase-like proteins[J]. Cellular & Molecular Life Sciences, 2010, 67(2): 201-216.
- [24] Pesch YY, Riedel D, Patil K R, et al. Chitinases and imaginal disc growth factors organize the extracellular matrix formation at barrier tissues in insects[J]. Sci Rep, 2016, 6: 18340.
- [25] 任慧, 张常, 范晓军. 昆虫几丁质酶的分类、功能分析、重组表达及酶学性质的研究进展[J]. 农业生物技术学报, 2014, 22(4): 502-507.
- REN H, ZHANG C, FAN X J. Research progress of classification, functional analysis, recombinant expression and enzymology properties on insect chitinase[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2014, 22(4): 502-507.
- [26] 张常. I型和II型几丁质酶在舞毒蛾发育过程中的功能研究[D]. 太原: 太原理工大学, 2014.
- ZHANG C. Functional study on group i and group ii chitinases during development of *Lymantria dispar* [D]. Taiyuan: Taiyuan University of Technology, 2014.
- [27] 李大琪. 飞蝗几丁质酶家族基因功能及 RNAi 介导的害虫防治应用研究[D]. 太原: 山西大学, 2016.
- LI D Q. Function of *Locusta migratoria* chitinase family genes and potential application in RNAi-mediated pest control[D]. Taiyuan: Shanxi University, 2016.

Animal Sciences

Cloning, Identification, and Expression Analysis of *AmCht11* Gene in Developing *Apis mellifera*

WANG Li, WANG Linling, MA Rongqin, HENG Hui, LI Zhi

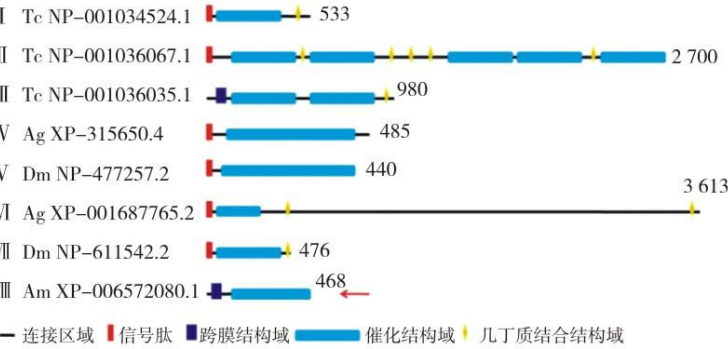
(College of Life Science, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: [Purposes] To clone, identify, and qPCR analysis of chitinase gene *AmCht11* in honeybees *Apis mellifera*. [Methods] Cloning, sequencing, and identification of the *AmCht11* gene sequence. Multiple alignment analysis of the *AmCht11* amino acid sequence features and domain composition. Prediction online and analysis of the *AmCht11* secondary structure, 3D structure model, and the interaction target protein. Construct phylogenetic tree to analyze the classification and evolution relationship of *AmCht11* in chitinase family. Real-time quantitative PCR analysis of *AmCht11* gene expression pattern in different tissues of *A. mellifera*. [Findings] The full length of *AmCht11* cDNA sequence was 1 404 bp, and encodes 468 amino acids residues. *AmCht11* has a calculated molecular mass of 53.5 kDa and a theoretical pI of 7.21. Multiple sequence alignment and phylogenetic analysis showed that *AmCht11* can be classified into the Group-VIII of the GH18 family of glycoside hydrolase. *AmCht11* has the typical Glyco_18 catalytic domain but without the N-terminal signal peptide and the chitin binding domains as in most chitinase family members. Further real-time quantitative PCR analysis showed that the expression level of *AmCht11* gene did not significantly change from the 2nd to 5th day old, but up-regulated start at the 6th day old of larval development. [Conclusions] *AmCht11* may have an important role in the molt of *A. mellifera* at the end of larval stage.

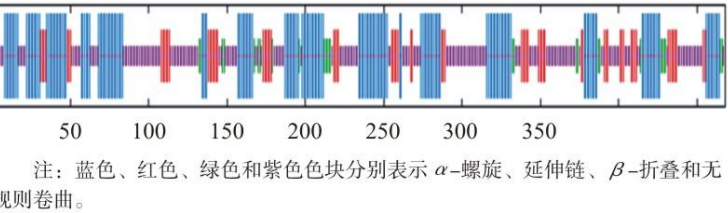
Keywords: chitinase; GH18 family; cloning; expression profile; *Apis mellifera*

(责任编辑 方 兴)

(接正文47~48页)



注：Am-意大利蜜蜂，Ag-冈比亚按蚊，Dm-黑腹果蝇，Tc-赤拟谷盗。
图3 昆虫几丁质酶GH18家族结构域示意图
Fig. 3 Schematic diagram of domain architecture of GH18 family chitinase



注：蓝色、红色、绿色和紫色色块分别表示α-螺旋、延伸链、β-折叠和无规则卷曲。
图4 意大利蜜蜂AmCht11蛋白二级结构预测
Fig. 4 Secondary structure analysis of AmCht11 protein of *A. mellifera*

(接正文48页)

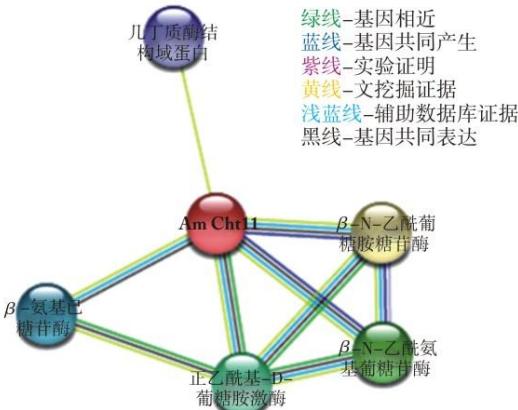


图6 与意蜂AmCht11蛋白相互作用靶蛋白的预测
Fig. 6 Prediction of the proteins interact with AmCht11 protein from *A. mellifera*

(接正文76页)

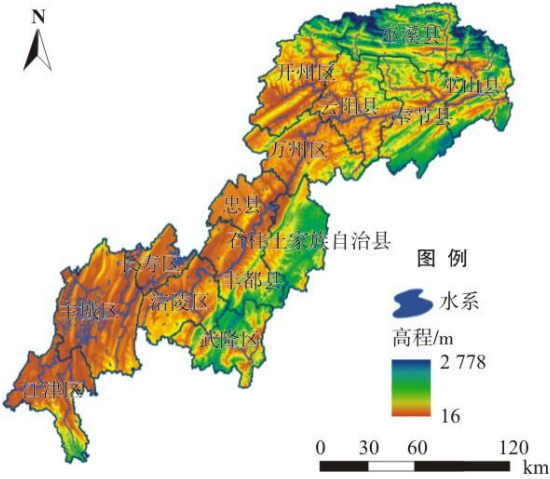
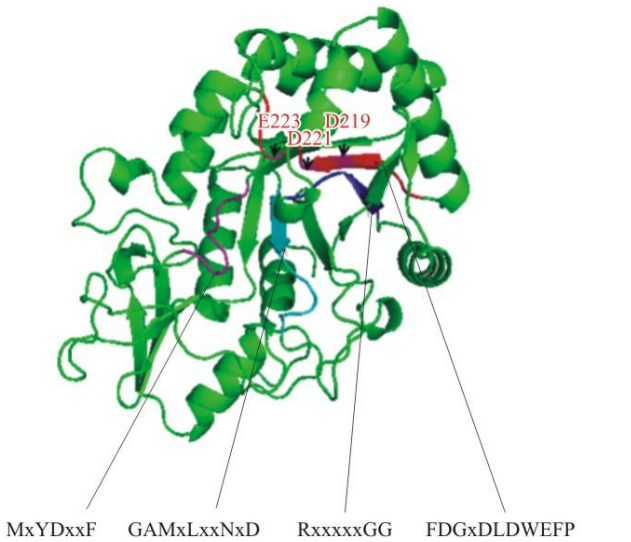
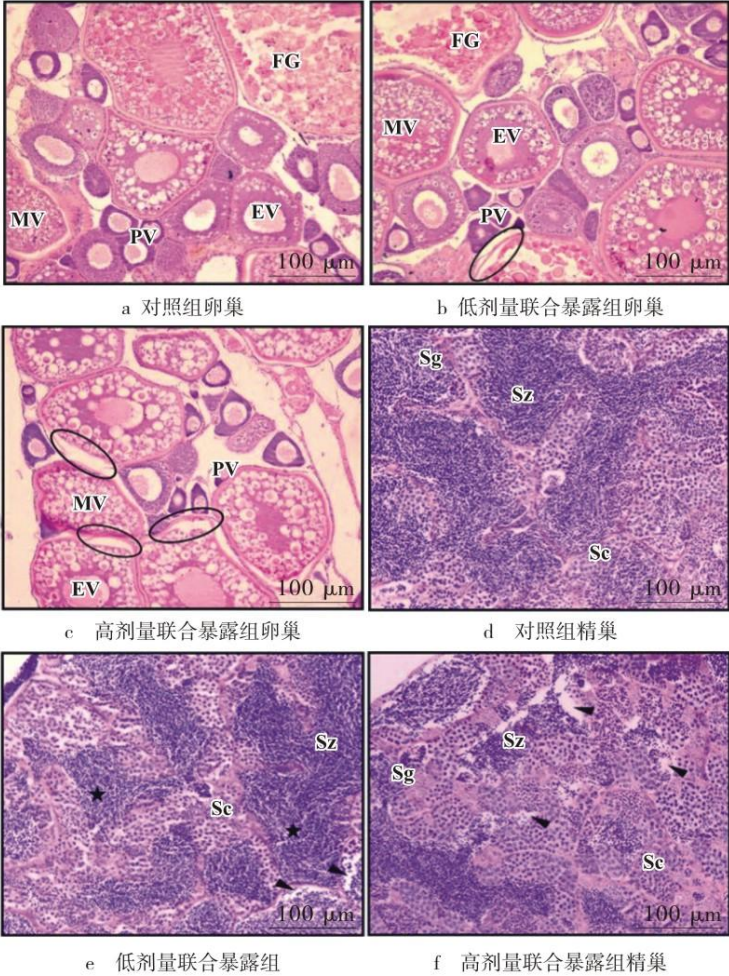


图1 研究区位置及高程
Fig. 1 Location and the DEM of the study area



注：D219和D221分别表示第219，221位天冬氨酸；E223表示第223位谷氨酸。MxYDxxF, GAMxLxxNxN, RxxxxxGG和FDGxLDLWEFP为GH18家族保守氨基酸基序。
图5 意蜂AmCht11蛋白的3D结构模型预测
Fig. 5 Predicted 3D structural model of AmCht11 protein from *A. mellifera*

(接正文60页)



注：EV-卵黄发生早期；MV-卵黄发生中期；FG-成熟卵母细胞；PV-卵黄生成前期；Sg-精原细胞；Sc-精母细胞；Sz-精子；椭圆-卵母细胞膜与滤泡细胞层分离；五角星-精子紊乱；黑色三角-空腔。
图2 汞镉联合暴露对成年斑马鱼卵巢和精巢组织学的影响
Fig. 2 Effects of combined exposure to Hg and Cd on histology of the ovary and testis in adult zebrafish