

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2017.06.029

药材甲热激蛋白基因 *SpHsp60* 的克隆 及温度胁迫下的表达

朱晓晔^{1,2}, 丁天波³, 许抗抗², 严毅², 李灿², 杨文佳²

(1. 贵州师范大学生命科学学院, 贵阳 550001; 2. 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, 贵阳 550005; 3. 青岛农业大学植物医学学院, 青岛 266109)

摘要: 本研究采用 RT-PCR 技术克隆了药材甲热激蛋白 60 (Heat shock protein 60, Hsp60) 基因的 cDNA 全长序列, 命名为 *SpHsp60* (GenBank 登录号: KX778623)。氨基酸序列分析表明 *SpHsp60* 具有 Hsp60 基因家族高度保守的基序, 实时定量 PCR 技术检测了不同温度胁迫后该基因的表达量, 结果表明: -5°C 和 0°C 低温处理 2 h, 药材甲成虫体内的 *SpHsp60* 的表达量均显著高于对照组, 且 42°C 高温处理 2 h 后的表达量也显著高于对照组, 说明 *SpHSP60* 与药材甲应对极端温度胁迫相关。

关键词: 药材甲; 热激蛋白 60; 基因克隆; 温度胁迫; 表达模式

中图分类号: Q965 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2017)06-1311-06

cDNA cloning of heat shock protein 60 (*SpHsp60*) and its expression under temperature stress in *Stegobium paniceum*

ZHU Xiao-Ye^{1,2}, DING Tian-Bo³, XU Kang-Kang², YAN Yi², LI Can², YANG Wen-Jia²

(1. College of Life Science, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China;

2. 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;

3. College of Plant Health and Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract: The full-length cDNA sequence of a heat shock protein 60 (Hsp60) gene from *Stegobium paniceum* was cloned by using RT-PCR technique, and termed as *SpHsp60* (GenBank accession no. KX778623). Amino acid sequence analysis shows that *SpHsp60* had the highly conserved functional motifs of the Hsp60 gene family, The quantitative real-time PCR results indicated that the expression of *SpHsp60* was significantly increased 2 hours after exposed to -5°C and 0°C , compared to the control, and this gene was also induced after exposed to 42°C . The results suggest that the *SpHsp60* gene may correlate with extreme temperature-stress tolerance in *S. paniceum*.

Keywords: *Stegobium paniceum*; Heat shock protein 60; Gene cloning; Temperature stress; Expression pattern

收稿日期: 2016-12-01

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(31501649); 贵州省高层次创新型人才培养(黔科合人才[2016]4020); 贵州省科学技术
联合基金项目(黔科合 LH 字[2014]7167); 贵阳学院高层次人才科研启动费(校人才 2014003)

作者简介: 朱晓晔(1993-), 女, 山东济南人, 硕士研究生, E-mail: 18886074373@163.com

通讯作者: 杨文佳. E-mail: yangwenjia10@126.com

1 引言

药材甲 *Stegobium paniceum* (Linnaeus), 隶属鞘翅目(Coleoptera), 窃蠹科(Anobiidae), 是一种重要的储藏物害虫, 在中国大部分地区都有分布, 对多种储藏物特别是中药材造成严重的危害^[1,2]. 该虫食性复杂, 寄主范围广, 主要以幼虫潜居寄主组织内取食, 其发生危害具有较强的隐蔽性^[3,4]. 药材甲具有极强的温度适应能力, 其中低龄幼虫耐热性最强, 42℃高温处理 7 h 后试虫的死亡率仅为 16%; 而成虫抵御低温能力较强, -10℃下试虫的存活时间长达 8 h^[5]. 目前对药材甲应对极端温度适应性的研究, 主要集中在生态学和生理学等方面, 而在分子水平上对其温度胁迫适应机制的研究尚未有报道.

温度是决定物种数量和分布的重要因素之一, 不同物种的耐受性温度不尽相同^[6]. 当生物体遭受过高或过低温度胁迫时, 热激蛋白(Heat shock protein, Hsp)基因被激活并率先表达, 作为分子伴侣, 它可以与变性蛋白质结合, 修复折叠错误的蛋白质, 并重新激活某些酶, 从而维持生物体的正常生理代谢活动^[7-9]. Hsp 广泛存在于原核和真核生物中, 根据蛋白质分子量和序列相似性, 可将其分为 Hsp100、Hsp90、Hsp70、Hsp60、Hsp40 以及小分子 Hsp 六大类^[10].

Hsp60 是热激蛋白家族的重要成员, 在正常情况下, Hsp60 稳定存在于细胞质和线粒体基质中, 在受到外源刺激后, 将迅速从细胞质中转移到线粒体基质中发挥作用^[11]. 在真菌、线粒体和叶绿体中, Hsp60 可以协同 Hsp10 参与蛋白的折叠和运输. 另外, Hsp60 在多种病原入侵过程中充当抗原激活免疫系统, 在保护免疫应答特异性靶标上起着关键作用^[12-13]. 目前, 已有多种昆虫的 *Hsp60* 基因被克隆, 如马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata*^[14]、白蜡虫 *Ericerus pela*^[15]、二化螟 *Chilo suppressalis*^[16]、铜绿蝇 *Lucilia caprina*^[17]、稻水象甲 *Lissorhoptrus oryzophilus*^[18]、南美斑潜蝇 *Liriomyza huidobrensis* 和美洲斑潜蝇 *L. sativae*^[19], 并对其在转录水平的表达与极端温度的胁迫进行了研究. 为明确药材甲对极端温度的应激响应机制, 本研究根据已有的药材甲转录组数据库, 筛选出 *Hsp60* 基因的 EST 序列, 通过 RT-PCR 技术克隆获得药材甲 *SpHsp60* 基因的 cDNA 全长, 并对其进行生物信息学分析; 利用实时定量 PCR

技术对其在不同温度胁迫下的表达变化进行分析, 以为研究 *Hsp60* 在药材甲应对极端温度胁迫中的作用奠定基础, 也为药材甲的有效防治提供科学依据.

2 材料与方法

2.1 材料

供试虫源: 药材甲于 2010 年采自贵州省贵阳市, 培养于人工气候箱内, 温度为 $28 \pm 1^\circ\text{C}$, 相对湿度为 $75 \pm 5\%$, 光周期为 14 L: 10D, 以中药材甘遂 *Euphorbia kansui* 为食料连续饲养多代并建立种群.

2.2 方法

2.2.1 药材甲总 RNA 提取及第一链 cDNA 合成

根据 TRIzol 试剂说明书提取药材甲成虫总 RNA, 利用 1% 琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop 2000 核酸浓度测定仪检测总 RNA 的质量和浓度. 取 1 μg 总 RNA, 利用 DNA 酶去除基因组 DNA, 随后使用 PrimeScript[®] RT Reagent Kit 合成第一链 cDNA, 稀释 3 倍于 -20℃ 冰箱保存备用.

2.2.2 *SpHsp60* 全长 cDNA 的克隆

根据药材甲转录组数据库中 *Hsp60* 基因的序列信息, 采用 Primer 5.0 软件设计特异性引物(表 1)用于药材甲 *SpHsp60* 基因的开放阅读框扩增. PCR 反应体系为 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μL , MgCl_2 2.5 μL , dNTPs 2 μL , 上下游引物各 1 μL , cDNA 模板 2.0 μL , Taq 酶 0.25 μL 以及 ddH₂O 14 μL . 扩增条件为: 95℃ 预变性 3 min, 95℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 2 min, 共 34 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min. PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测并回收目的条带, 连接至 pGEM-T Easy 载体并转化到感受态细胞中, 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 本研究中涉及的引物信息

Tab. 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence	引物类型 Primer type
<i>SpHsp60</i> -F	ACGATTTTCGCAGCTGCAATAATG	<i>SpHsp60</i>
<i>SpHsp60</i> -R	TCACACTGGGTAGCCTTGTAAC	ORF 验证引物
<i>q-SpHsp60</i> -F	AAAACCGGTGACAACCTCCAG	<i>SpHsp60</i> 定量
<i>q-SpHsp60</i> -R	CGCATCCTGATATTCGACCT	PCR 引物
<i>q-EF1α</i> -F	AAAGTGAAAGCGAGCAGAGC	定量 PCR
<i>q-EF1α</i> -R	TGGACACAGGGATTTTCATCA	内参引物

2.2.3 序列分析 利用 DNAMAN v6.0(Lynnon Biosoft)软件对测序结果的编辑和分析,推导的氨基酸采用 BLAST 软件(<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 Prosite(<http://prosite.expasy.org/>)分析保守区域.利用 MEGA6 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 1000^[20].

2.2.4 *SpHsp60* 在温度胁迫下的相对表达量 采用实时定量 PCR 技术检测不同温度胁迫后药材甲 *SpHsp60* 基因的相对表达量.将羽化后 1d 的药材甲成虫分别置于低温 -5°C 、 0°C 及高温 36°C 和 42°C 处理 2 h 后取出,在 28°C 下恢复 2 h,收集存活试虫用于总 RNA 的提取.以 28°C 恒温饲养的药材甲为对照,每个温度处理 40 头成虫,重复 4 次.根据 1.2.1 方法提取不同温度处理后成虫的总 RNA 并反转录成 cDNA 后进行实时定量 PCR(以 *EF1- α* 基因为内参基因,GenBank 登录号:KR080493).本研究总实时定量多用引物序列如表 1. PCR 反应体系为 $20\ \mu\text{L}$:GoTaq[®] qPCR Master Mix $10\ \mu\text{L}$ 、cDNA 模板 $1\ \mu\text{L}$ 、Nuclease-free Water $7\ \mu\text{L}$ 和上下游引物各 $1\ \mu\text{L}$.反应在 CFX96[™] Real-Time System 实时定量 PCR 仪(Bio-Rad)中进行,反应条件为: 95°C 预变性 10 min; 95°C 变性 30 s, 60°C 退火 30s, 72°C 延伸 30 s,共 40 个循环;最后在 $60\sim 95^{\circ}\text{C}$ 进行熔解曲线分析.利用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法计算 *SpHsp60* 基因的相对表达量^[21],试验数据采用 SPSS17.0 软件的单因素方差分析法(ANOVA)进行差异显著性分析.

3 结果与分析

3.1 药材甲 *SpHsp60* 基因的 cDNA 克隆及序列分析

本研究采用 RT-PCR 技术,从药材甲体内克隆获得热激蛋白 60 基因,命名为 *SpHsp60*(GenBank 登录号:KX778623).*SpHsp60* 的开放阅读框长度为 1719 bp,编码 572 个氨基酸,理论分子量和等电点分别为 60.9 kD 和 5.32.根据 NetNGlyc 1.0 server 分析结果,*SpHsp60* 可能存在 3 个 N-糖基化位点,分别为 N103, N230 和 N426. *SpH-*

sp60 推导的氨基酸序列为 Hsp60 家族序列,第 215-EGMKFDRGYISPY-227 位氨基酸为底物结合位点;第 109-AGDGT TTTATVL-119 位氨基酸为 Mg^{2+} 结合区段;第 54-TMGPKG-59 位氨基酸、第 76-DGVTVAK-82 位氨基酸和第 427-AT-RAAVEEGIVPGGG-441 位氨基酸为 3 个 ATP/ADP 结合位点;第 560-GGMGGMGGMGGM-571 位氨基酸为一个高度保守的 C-末端 GGM 重复序列(图 1).将 *SpHsp60* 编码的氨基酸序列通过 BLAST 比对分析,结果发现,药材甲 *SpHsp60* 氨基酸序列和与赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (GenBank 登录号:NP_001300806)和马铃薯甲虫 *L. decemlineata* (AHB18586)的 Hsp60 氨基酸序列一致性分别为 90%和 88%.

3.2 *SpHsp60* 的系统发育分析

将 *SpHsp60* 编码的氨基酸序列与 GenBank 登录的其它昆虫的 Hsp60 氨基酸序列进行比对,并利用 MEGA6 软件的邻接法构建系统发育树.结果显示,各个目的昆虫 Hsp60 分别各自聚类在一起,这与传统分类一致,说明昆虫 Hsp60 保守性很强.在鞘翅目昆虫中,药材甲 *SpHsp60* 与赤拟谷盗 *T. castaneum*、稻水象甲 *L. oryzophilus* 和马铃薯甲虫 *L. decemlineata* 的 Hsp60 的亲缘关系最近,并聚为一类(图 2).

3.3 *SpHsp60* 对不同温度胁迫下的应激表达模式

采用实时定量 PCR 技术检测了不同温度胁迫后 *SpHsp60* 的表达量.结果表明,低温胁迫对 *SpHsp60* 的表达具有明显的诱导作用, -5°C 和 0°C 低温处理 2 h 后,药材甲成虫体内 *SpHsp60* 的表达量显著高于对照组;而 36°C 高温处理 2 h 后,*SpHsp60* 的表达量与对照组无显著性差异,但 42°C 处理后药材甲 *SpHsp60* 的表达量最高,并显著高于其它处理组(图 3).

4 讨论

本研究在药材甲转录组测序的基础上,利用生物信息学手段结合 RT-PCR 技术成功克隆获得一个药材甲 *Hsp60* 基因 cDNA 全长序列,并命名为 *SpHsp60*.对其氨基酸序列分析表明,*SpHsp60* 具有 Hsp60 家族的典型特征,其 N 端含有高度保守的 ATP 结合位点,具有类似 ATPase 活性,ATP/ADP 结合部位承担着构象转换区的功能^[22];C 端具有保守的 GGM 重复序列,相似的重复序列在多种真核生物的 Hsp70 中也存在,由于细胞中大量

```

1  ATGTATAGAATTCCAGCGAGCATGCGAAGCGTGGCCCTCCGCCAGGCCAATCAGATGGCGAGCTCCAGCGCTGGTACGCCAAGGACGTC
1  M Y R I P A S M R S V A L R Q A N Q M A Q L Q R W Y A K D V
91  AGGTTTGGCCCCAAGTCCGAGCCCTCATGCTTCAAGGCGTCGACGTGCTCGCCGATGCCGTCGCCGTCACCATTGGGCCCAAAGGCCGT
31  R F G P E V R A L M L Q G V D V L A D A V A V T M G P K G R
181 AACGTCATCATCGAGCAGTCATGGGGCTACCCGAAGATCACCAAGGACGGCGTGACCGTCGCCAAAGTGTGCGAGTTGAAGGATAAGTTTC
61  N V I I E Q S W G S P K I T K D G V T V A K G V E L K D K F
271 CAGAAATATTGGTGGCGAGCTGGTGCAGGATGTCGGAACAATACGAACAGGAAGCTGGGGACTGGGACCTACCGCAACCGTGTCTCGCT
91  L N I Q I E R K L V Q D V A N N T N E E A G D G T T S A N G D K A
361 AGGTCGATCGCCAAGGAGGGTTTCGAGAAGCTGGGCAAGGGTCTAATCCTGTGCGAGATCCGTAAGGAATAATGATGGCCGTTGAGAAA
121 R S I A K E G F E N L G K G A N P V E I R K G I M M A V E K
451 ATCAGCGAGACTTTGAAAACCCCTCTAAAACCGGTGACAACTCCAGAGGAGGTTGCCAGGTAGTACCATTCTCTGCGAACGGAGACAAG
151 I T Q T L R L V Q S K P V T T P E E V A Q V A T T S A N G D K
541 TCTGTCGGAGATTTGATCTCCGATGCCATGAAGAGAGTGGTAAAGACGGAGTCATCACCGTGAAGGACGGGAAAAACCTGAGCGATGAG
181 S V G D L I S D A M K R V G K D G V I T V K D G K T L S D E
631 CTGGAAGTTATCGAGGAATGAAATTTGACAGAGGATATATTTCCACCGTATTTTCGTCACACGCTCAAAGTGCAGGATGCAAAAGGTCGAATATCAG
211 L E N I E G M K F D R G Y I S P Y F V N T T K G A K V E Y Q
721 GATCGCCTTCTGCTGTGTGAGCGAGAAGAAGATTTCTTCAGTGCAGTCTATCGTTCCGGCTTTAGAGATGGCAAATTCGACAGAGAAAACCC
241 D A L L L L S E K K I S S V Q S I V P A L E M A N S Q R K P
811 CTGATTAATCATCGCGAAGATGGGATGGAGAGGCTTTGACCACTTAGTTGTTAATAGACTGCGCATTTGGACTTCAAGTTGCGGAGTT
271 L I I I A E D V D G E A L T T L V V N R L R I G L Q V A A V
901 AAAGTCAGGATTTGGTGACAATCCGGCAGCTACTTTGACAGGACATGGCTATTGCGACAGCGGAATCGTATTGGAGACGAATCGAAT
301 K A P G F G D N R R A T L Q D M A I A T G G I V F G D E S N
991 GTAGTTAAGCTGGAGGATGTTACGCCCTCAGGATTTGGGGCAGGTTGGCGAAATAATGATCAAAAAGACGACAGTGTGATCTTGAAGGGA
331 V V K L E D V T P Q D L G Q V G E I M I T K D D T L I L K G
1081 AAGGTTAAAAGAAAGACATCGACAAGCGCCGAGGAAATTCGCGACAGATCGAGAACAACCGAGTCCGAGTACGAGAAGGAGAGCTC
361 K G K K E D I D K R A E E I R D Q I E N T K S E Y E K E K L
1171 CAGGAACGTCTGGCGGTCTGCGAGCGCGTCCCGTCTCAAAGTGGCGGCAGCAGTAGGTTGGAGTGAACGAGAAGAAGGACCGG
391 Q E R L A R L A S G V A V L K V G G S S E V E V N E K K D R
1261 GTCACGACGCGTGAACGCGACAGGGCCGCGTTCGAGGAGGGAATAGTCCCGGAGGCGGCACCGCTCTGCTGAGATGCGCCAGTAGT
421 V N D A L N A T R A A V E E G I V P G G G T A L R L C A S S
1351 CTGGACGACTGAAGCGGTCAATAACGCATCAGGCCATCGGGATCGAGATCGTAAGGAGGGCGCTAGAGTGCCTGCATGACGATTGCG
451 L D G L K A V N N D Q A I G I E I V R R A L R V P C M T I A
1441 AAGAACGCGGTGTGACGGAGCCGTTGTCTGGCTAAAGTGGAGGCGCAACAGGGCGATTACGGATACGACGCTTTGAACAATGAATAT
481 K N A G V D G A V V V A K V E A Q Q G D Y G Y D A L N N E Y
1531 GTCAAATTTGTACGAAAAGGGGATAATTGACCAACAAGGTTGTGCGTACCAGTACCGGATTCAGGATGCCTCTGGATAGCATCCCTGCTGACA
511 V N L Y E K G I I D P T K V V R T A I T D A S T G V A S L L T
1621 ACAGCCGAGGCTGTTATTACGGAGATTCGAAAAGAGGAGGCGCCGATTCGTCAGGTGGTGAATGGGCGAATGGGAGGCATGGGAGGG
541 T A E A V I T E I P K E E A P I P S G G G M G G M G G M G G
1711 ATGATGTAG
571 M M *

```

图 1 药材甲 *SpHsp60* 基因的 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

起始密码子 ATG 加粗; * 代表终止密码子; 双下划线为 C-端高度保守的 GGM 重复序列; 阴影部分表示的是 ATP 结合位点; Mg^{2+} 结合区段用方框标示; 下划线为底物结合位点

Fig. 1 The cDNA and deduced amino acid sequence of *SpHsp60* in *Stegobium paniceum*

The initial codon ATG is in bold and the termination codon TAG is indicated with asterisk. The substrate-binding sites are underlined with a dotted line. The Mg^{2+} binding segments are boxed. The ATP/ADP binding segments are shaded. The conserved GGM repeats at the C-terminal are double underlined

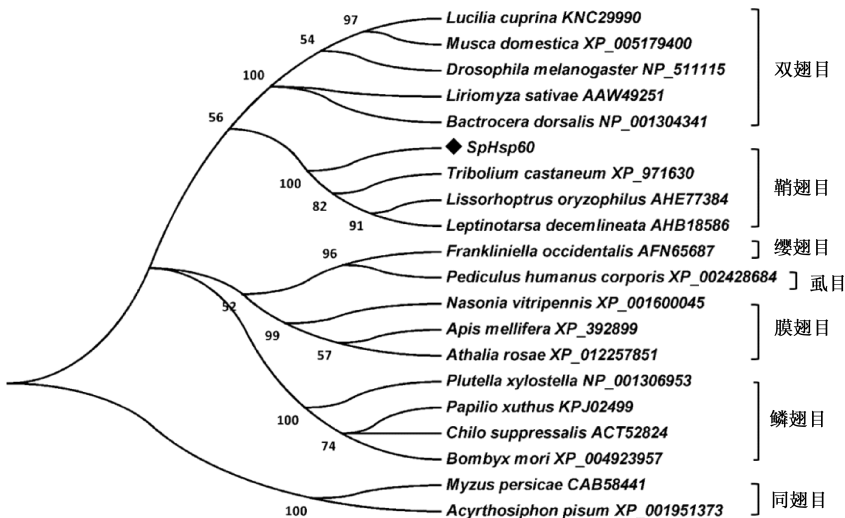


图 2 药材甲 *SpHsp60* 系统发育分析

Fig. 2 Phylogenetic relationships analysis of *SpHsp60* in *Stegobium paniceum*

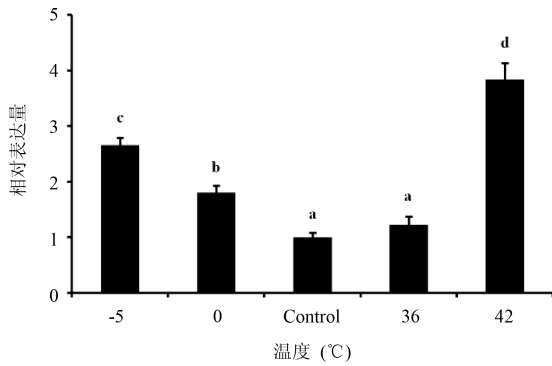


图3 不同温度处理后药材甲成虫 *SpHsp60* 的相对表达量

图中数据为平均数 ± 标准误. 柱上不同字母代表显著性差异(单因素方差, $P < 0.05$)

Fig. 3 The relative expression levels of *SpHsp60* in *Stegobium paniceum* adults after exposure to different temperature stress

Data are mean ± SE. Different letters above bars indicate significant difference at the 0.05 level (one-way ANOVA).

新合成的蛋白质的折叠均依赖于 Hsps, 推测该重复序列在 Hsp60 蛋白的折叠中起着重要的作用^[23]. 同源性分析结果表明, 药材甲和其它多种昆虫的 Hsp60 蛋白具有较高的氨基酸相似性. 本研究系统进化分析发现, 昆虫 HSP60 在进化上具有高度的保守性, 并与传统分类高度一致, 说明 *Hsp60* 可以作为研究物种间进化关系的候选基因.

热激蛋白是昆虫抵御温度胁迫的关键因子, 在极端温度适应过程中起着重要作用. 近年来研究表明, 昆虫体内不同家族 *Hsp* 基因均与温度胁迫应激性密切相关. 陈芳等发现高温可以同时诱导棉花粉蚧体内 3 个热激蛋白基因 *Pshsp70*、*Pshsp70-4* 和 *Pshsp90* 的表达, 且这些基因的相对表达量随着温度的升高呈增加趋势^[24]; 李锐等研究的星豹蛛 *Pardosa astrigera* 在 38°C 时 *hsp70* 和 *hsp90* 表达量分别为对照组的 716.46 和 10.44 倍, 在 -1°C 时其表达量分别为对照组的 334.53 和 9.38 倍^[25]; Liu 等发现极端温度胁迫均能显著诱导白蜡虫成虫体内 *hsp21.5*、*hsp21.7*、*hsp70* 和 *hsc70* 基因的表达^[15]; Yuan 等发现高温胁迫可以诱导稻水象甲体内 8 个热激蛋白基因, 如 *Hsp70*、*Hsp90* 和小分子 *Hsps* 等基因的上调表达, 而低温仅能诱导 1 个 *Hsp70* 和 1 个 *Hsp90* 基因的表达^[18]. 以上研究表明, 多种 *Hsp* 基因的协同上调表达在昆虫抵御极端温度胁迫中发挥着重要作用.

不同昆虫 *Hsp60* 基因在极端温度胁迫的适应中存在明显的差异, 如高温、低温胁迫均不能诱导

马铃薯甲虫体内 *Hsp60* 基因的表达^[14], 类似的结果也出现在潜叶蝇和稻水象甲中^[18,19]. 本研究结果表明, 药材甲在 -5°C 和 0°C 低温作用下, 经 2 h 诱导后, *SpHsp60* 表达量显著高于对照, 且 42°C 高温诱导下 *SpHsp60* 表达量最高, 显著高于其他处理组. 这与其它昆虫的研究结果相似, 如低温胁迫可以诱导白蜡虫和温室白粉虱体内 *Hsp60* 基因的表达^[15,26]; 高温处理铜绿蝇成虫后, 其体内不同组织如马氏管、脂肪体 *Hsp60* 基因的表达量显著上升^[17]. 此外, 目前还发现 Hsp60 在某些特定细胞中发挥作用, 与昆虫的生殖细胞分化、繁殖和发育等紧密相关^[27], 其功能多样性有待进一步研究. 本研究瞄准生物抵御温度胁迫关键因子热激蛋白, 成功克隆药材甲 *SpHsp60* 基因, 并对其应对高温、低温胁迫表达性进行了初步的分析. 下一步将利用 RNA 干扰技术验证其在药材甲应对温度胁迫中的生理功能, 为深入研究药材甲抗逆境的分子机制奠定基础.

参考文献:

- [1] Ignatowicz S, Janczukowicz K, Olejarski P. Integrated pest management (IPM) of the drug store beetle, *Stegobium paniceum* (L.), a serious pest of old books [J]. J Entomol Acarol Res, 2012, 43: 177.
- [2] 曹宇, 李灿. 重要储藏害虫药材甲的生物防治研究进展[J]. 江苏农业科学, 2014, 42: 9.
- [3] 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]. J Pest Sci, 2009, 82: 7.
- [4] 李灿, 李子忠, 杨友联. 贵阳中药材储藏期昆虫群落结构分析[J]. 山地农业生物学报, 2004, 23: 41.
- [5] Abdelghany A Y, Awadalla S S, Abdel-Baky N F, et al. Effects of high and low temperatures on the drugstore beetle (Coleoptera: Anobiidae) [J]. J Econ Entomol, 2010, 103: 1909.
- [6] Gibbs A G, Perkins M C, Markow T A. No place to hide, microclimates of Sonoran Desert *Drosophila* [J]. J Therm Biol, 2003, 28: 353.
- [7] Bukau B, Horwich A L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines [J]. Cell, 1998, 92: 351.
- [8] Voellmy R, Boellmann F. Chaperone regulation of the heat shock protein response [J]. Adv Exp Med Biol, 2007, 23: 89.

- [9] Colinet H, Lee S F, Hoffmann A. Temporal expression of heat shock genes during cold stress and recovery from chill coma in adult *Drosophila melanogaster*[J]. FEBS J, 2010, 277: 174.
- [10] 王秋香,李宗芸,谢艳,等. 果蝇热激蛋白的研究进展[J]. 昆虫知识,2008,45: 698.
- [11] Itoh H, Komatsuda A, Ohtani H, et al. Mammalian HSP60 is quickly sorted into the mitochondria under conditions of dehydration [J]. Eur J Biochem, 2002, 269: 5931.
- [12] Huang W J, Leu J H, Tsau M T, et al. Differential expression of *LvHSP60* in shrimp in response to environmental stress [J]. Fish Shellfish Immun, 2011, 30: 576.
- [13] Xu X Y, Shen Y B, Fu J J, et al. Molecular cloning, characterization and expression patterns of HSP60 in the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. Fish Shellfish Immun, 2011, 31: 864.
- [14] 蒋健. 马铃薯甲虫热激蛋白基因 *hsp60*、*hsp70* 和 *hsp90* 的克隆及温度胁迫下的表达 [D]. 青海大学, 2013.
- [15] 刘魏魏,杨璞,陈晓鸣. 白蜡虫热激蛋白基因在低温胁迫下的表达分析 [J]. 林业科学研究, 2013, 26: 681.
- [16] Cui Y D, Dula Y Z, Lu M X, et al. Cloning of the heat shock protein 60 gene from the stem borer, *Chilo suppressalis*, and analysis of expression characteristics under heat stress [J]. J Insect Sci, 2010, 10: 1.
- [17] Sharma S, Reddy P V J, Rohilla M S, et al. Expression of HSP60 homologue in sheep blowfly *Lucilia cuprina*, during development and heat stress [J]. J Therm Biol, 2006, 31: 546.
- [18] Yuan X, Zhou W W, Zhou Y, et al. Composition and expression of heat shock proteins in an invasive pest, the rice water weevil (Coleoptera: Curculionidae) [J]. Fla Entomol, 2014, 97: 611.
- [19] Huang L H, Kang L. Cloning and inter specific altered expression of heat shock protein genes in two leafminer species in response to thermal stress [J]. Insect Mol Biol, 2007, 16: 491.
- [20] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Mol Biol Evol, 2011, 28: 2731.
- [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: 402.
- [22] Siligardi G, Panaretou B, Meyer P, et al. Regulation of Hsp90 ATPase activity by the co-chaperone Cdc37p/p50cdc37 [J]. J Biol Chem, 2002, 277: 20151.
- [23] Brocchieri L, Karlin S. Conversation among HSP60 sequences in relation to structure, function, and evolution [J]. Protein Sci, 2000, 9: 476.
- [24] 陈芳,陆永跃. 温度胁迫下棉花粉蚜热激蛋白基因的表达分析 [J]. 昆虫学报, 2014, 57: 1253.
- [25] 李锐,李佳,李萨丽,等. 温度诱导对星豹蛛热激蛋白 *hsp70* 和 *hsp90* 基因表达的影响 [J]. 植物保护学报, 2015, 42: 321.
- [26] 郭莉莉,肖林云,余昊,等. 两种粉虱 *Hsp60* 基因的克隆与表达 [J]. 湖北农业科学, 2013, 52: 5390.
- [27] Kozlova T, Perezgasga L, Reynaud E, et al. The *Drosophila melanogaster* homologue of the *hsp60* gene is encoded by the essential locus *l(1)10Ac*, and is differentially expressed during fly development [J]. Dev Genes Evol, 1997, 207: 253.