环境昆虫学报 *Journal of Environmental Entomology*，March 2016，38（2）：271－279 ISSN 1674-0858

doi：10.3969/j.issn.1674－0858.2016.02.6

异色瓢虫多巴脱羧酶基因序列及低温诱导表达分析

汪慧娟，施佐堃，徐风娇，沈祺达，徐燕霞，王世贵，唐 斌*

（杭州师范大学，动物适应与进化杭州市重点实验室，杭州 310036）

摘要： 多巴脱羧酶（dopa decarboxylase，DDC）是把多巴降解成多巴胺的重要酶类，在昆虫行为和发育中具有重要作用。本研究在转录组获得异色瓢虫 *Harmonia axyridis DDC* 基因序列的基础上，从 ORF 两端设计特异性引物进行扩增并测序验证，获得了 *DDC* 基因的 cDNA 的 ORF 全长序列，其包含 1431 bp，编码 476 个氨基酸，软件分析预测显示该基因编码蛋白的分子量为 53.88 kDa，理论等电点为 5.80。本实验分为升温、降温、低温储存以及不同发育阶段（包括预蛹，1－3 d 蛹，1－3 d 4 龄幼虫以及羽化 1－3 d 成虫）4 个处理组，采用荧光定量 PCR 技术研究异色瓢虫不同处理组 *DDC* 基因的表达水平。结果表明：*DDC* 基因在蛹期第 1 天的表达量最高，在升温诱导条件下表达无差异，降温诱导下表达量上升；黄色雌成虫低温储存条件下基因表达量先显著上升后显著下降，黑色雌成虫表达量无差异，表明 *DDC* 基因可以在低温胁迫下高表达促使异色瓢虫适应环境变化。

关键词： 多巴脱羧酶；异色瓢虫；实时荧光定量 PCR；低温诱导；表达分析

中图分类号： Q963；S476 **文献标志码：** A **文章编号：** 1674－0858（2016）02－0271－09

Gene sequence and expression analysis of Dopa decarboxylase in *Harmonia axyridis* under low temperature induction

WANG Hui-Juan，SHI Zuo-Kun，XU Feng-Jiao，Shen Qi-Da，XU Yan-Xia，WAGN Shi-Gui，TANG Bin*

（Hangzhou Key Laboratory of Animal Adaptation and Evolution，Hangzhou Normal University，Hangzhou 310036，China）

Abstract: Dopa decarboxylase（DDC）is an important enzyme，which can degrade levodopa into dopamine and play key role in the insect behavior and develpoment. Based on *Harmonia axyridis* transcriptome，the full cDNA of *DDC* in *H. axyridis* have been found and its accuracy identified by PCR amplification and sequenced. The whole *DDC* gene consists of 1431 bp open reading frame（OFR）encoding 476 amino acids by PCR and the specific primers from ORF at both ends of the design. Software analysis predicts *DDC* has a molecular mass of 53.88 kDa and isoelectric point of 5.80. Meantime real-time PCR was adopted to analyze the expression of *H. axyridis DDC* at four treatment groups，which including different developmental stages from 4th instar larva to adults，under warming and cooling treatments，and in the low temperature storage treatment. The results show that the expression level of *DDC* is highest in the first day of pupal period，and the expression level of *DDC* gene is indifference under warming process but up-regulation under cooling process. *DDC* gene expression of yellow female individuals is significantly up-regulated then down-regulated but the expression of black female individuals is indifference under the treatment of low temperature storage. The results imply that *DDC* gene can help *H. axyridis* adapt to environment changes by precisely the

基金项目： 国家自然科学基金（31371996）；杭州市科技局计划项目（20140432B01）；杭州师范大学优秀中青年教师支持计划（JTAS2011－01－031）

作者简介： 汪慧娟，女，1992 年生，安徽合肥人，硕士研究生，研究方向为昆虫分子生物学，E－mail：whjj_ 701@163.com

* **通讯作者** Author for correspondence，E－mail：tbzm611@163.com

收稿日期 Received：2016－02－26；**接受日期** Accepted：2016－03－18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

regulation of the dopa decarboxylase synthesis.

Key words: Dopa decarboxylase; *Harmonia axyridis*; Real-time fluorescent quantitative PCR; cold induction; expressional analysis

异色瓢虫 *Harmonia axyridis*，属鞘翅目 Coleoptera 瓢虫科 Coccinellidae（姜文虎，2007），在俄罗斯阿尔泰山脉以东的广大地区及萨哈林岛、库页岛、中国、蒙古、朝鲜、日本等地均有分布，故又称为亚洲瓢虫（杜波，2007；邬梦静等，2014）。异色瓢虫作为重要的生物防治天敌种类，已广泛运用于农林业生产实践中（王小艺和沈佐锐，2002；王甦等，2007；唐斌等，2014），对蚜虫、叶螨及介壳虫等具有很强的捕食能力（Koch，2003；申智慧，2011），同时对木虱、某些鳞翅目以及鞘翅目昆虫的卵和低龄幼虫也具有一定控制作用。我国是农业大国，异色瓢虫资源丰富，在其开发利用方面具有明显的优势和较大的空间。但是瓢虫的自残损耗（王小艺和沈佐锐，2002）、人工大规模饲养技术（郭建英和万方浩，2001；杨洪等，2003）及低温储藏技术（杨俊成和沈佐锐，2000；王小艺和沈佐锐，2002；滕树兵和徐志强，2005；孙锐和王洪平，2008）不成熟等原因限制了其规模化生产。

自然条件下，生物在逐渐降温的过程中受到低温胁迫或冷驯化，能够提高自身抵抗低温的能力以度过寒冷且漫长的冬季。异色瓢虫等天敌昆虫对低温的适应具有多样性，短时低温胁迫或冷驯化能够提高天敌昆虫的抗寒能力，甚至可以提高低温储存的时间和存活率。本实验室前期采用转录组结合数字表达谱等高通量测序技术，筛选出了低温胁迫后异色瓢虫热激蛋白（Heat Shock Protein，HSP）、海藻糖酶（Trehalase，Treh）、转酮醇酶（transketolase）、红细胞结合蛋白（erythrocyte binding protein）和多巴脱羧酶（dopa decarboxylase，DDC）等抗寒基因（邬梦静等，2016）。昆虫体内热激蛋白的表达量越高，其耐热性就越强（Le *et al.*，2001；Murphy *et al.*，2003；唐斌等，2014），海藻糖酶能够通过积累海藻糖的含量来提高昆虫的抗寒能力（唐斌等，2012）。多巴脱羧酶广泛存在于哺乳动物、昆虫及植物中（Bertoldi，2014），是将多巴转化成多巴胺的关键酶，其前体“多巴”（3，4-dihydroxyphenylalanine，DOPA）和产物“多巴胺”（dopamine）在昆虫行为和发育中具有重要功能（Hodgettsand O’Keefe，2006），且多巴脱羧酶在昆虫新表皮形成过程中，作为前体物质参与表皮骨化过程（韩宇等，2010；Vavricka *et al.*，2011），同时参与昆虫表皮物质黑色素的合成（Nagy and Hiripi，2002），并受昆虫蜕皮激素调节（Wang *et al.*，2013）。此外，多巴脱羧酶与昆虫伤口愈合、寄生防御、色素沉淀和表皮硬化等过程密切相关（Hodgettsand O’Keefe，2006）。目前国内外对多巴脱羧酶的研究多集中于农药的控制靶标（王涛等，2012；张文慧等，2014），很少有对高低温胁迫下的研究报道（邬梦静等，2016）。因此，本文研究了异色瓢虫低温胁迫和低温储存条件下多巴脱羧酶基因的表达等，以期为异色瓢虫的抗寒机制及其低温冷藏提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验昆虫

在 25℃ ± 1℃、湿度为 70% ± 5% 和光周期 16L∶8D 条件下建立异色瓢虫试验种群。具体饲养方法为：将异色瓢虫成虫放入养虫笼（铝合金 + 60 目纱网，50.0 cm × 50.0 cm × 50.0 cm）中集中饲养，每个养虫笼放入 30 对以上成虫，笼内放置带有足量豆蚜 *Aphis curviness* Koch 的蚕豆苗，待瓢虫取食到一定程度后，再放入另外一盘含足量蚜虫的蚕豆苗。在养虫笼中可放入有褶皱的纸条，作为瓢虫的产卵基质。待雌虫产卵后，将含有新鲜卵块的叶片或者纸条转移到干净的塑料培养皿中，直至卵孵化后转移至另养虫笼（60 目纱网，50.0 cm × 50.0 cm × 50.0 cm）中继续饲养，繁殖 3 代后，用于试验。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 主要仪器与设备

试验中主要用到的具体仪器和设备包括，常规冰箱（海尔 BCD-290W）、-80℃ 冰箱（艾本德 U410-86）、恒温水浴锅（上海精宏 DK-8D）、高压蒸汽灭菌锅（SANYO MLS-3750）、台式高速离心机（Sigma 1-14）、台式低温离心机（艾本德）、实时荧光定量 PCR 仪（BioRAD CFX96）、无菌超净工作台（ESCO）、电子分析天平（梅特勒-托利多

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

AL204）、移液器（艾本德）和微量测定分光光度计（NanoDrop™ 2000）。

1.2.2　主要试剂与药品

DNA Marker DL2000、6 × Loading buffer、cDNA 一链反转录试剂盒、T 载体等购自大连 Takara 公司；提取总 RNA 用 Trizol 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司；PCR 引物合成和测序由上海英潍捷基公司完成；胶回收试剂盒购自 Omega Bio-tek 公司；实时荧光定量 PCR 试剂盒和八连管等均购自美国 Bio-RAD 公司；氯仿、异丙醇、无水乙醇、EDTA 等常规试剂均购自杭州米克化工有限公司。

1.3　试验方法

1.3.1　RNA 抽提及一链 cDNA 合成

采用 Trizol 法抽提异色瓢虫整体的总 RNA 后，先用琼脂糖凝胶电泳测定 RNA 的纯度及降解情况，后利用微量核酸测定仪测定 RNA 的浓度。一链 cDNA 合成中，取 1 μg 总 RNA 作为模板，采用 AMV 反转录试剂盒根据说明书来合成。

1.3.2　多巴脱羧酶全长序列验证

前期异色瓢虫在华大基因进行转录组测序中，筛选出一个多巴脱羧酶基因序列，将该序列翻译成蛋白序列并在 NCBI 库中进行比对，发现该序列包含了完整的 cDNA 开放阅读框序列（Open Reading Frame，ORF）。根据获得的序列，分别从两端设计特异性引物（见表 1），进行 PCR 扩增。具体 PCR 条件为：94℃ 预变性 5 min，94℃ 变性 30 s，59℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 90 s，共 30 个循环，72℃ 充分延伸 5 min。反应结束，取 5 μL PCR 产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳。当检测到目的条带后，进行回收纯化，进行 T 克隆并连接到 T 载体中，菌落或者酶切进行验证后，送上海英潍捷基公司测序部测序。

1.3.3　异色瓢虫不同发育阶段多巴脱羧酶（*DDC*）基因的表达

采用荧光定量 PCR（Real-time fluorescent quantitative PCR，qRT-PCR）法测定，选取 4 龄幼虫、预蛹、蛹及羽化后 1 – 3 d 成虫（蜕皮或羽化 2 h 后）为研究材料。采用相对 qRT-PCR 法测定 *DDC* 基因相对表达量。根据异色瓢虫 *DDC* 基因保守区域设计实时荧光定量 PCR 检测引物（见表 1），并根据异色瓢虫 *Harp*49 基因设计内参引物（见表 1）。每个发育阶段随机取样 3 头并且重复 3 次，用凝胶电泳和微量测定分光度计测定 RNA 纯度和浓度，取 1 μg 总 RNA 量为进行一链 cDNA 反转录。取反转录产物 1 μL 用于荧光定量 PCR，每个处理重复 3 次。qRT-PCR 按照 Real-Max（probe）试剂盒体系进行荧光定量 PCR，具体 PCR 程序为 94℃ 预变性 5 min，94℃ 变性 15 s，59℃ 退火 30 s，68℃ 延伸 30 s，40 个循环，在 68℃ 收集荧光信号，采用 $2^{-\Delta\Delta T}$ 法进行数据分析。

1.3.4　不同温度条件下异色瓢虫 *DDC* 基因的表达

不同温度分别采用升温和降温处理，降温处理：在人工智能培养箱（Sanyo，MLR-361H，日本）中，设定人工智能培养箱温度为 25℃、15℃、10℃、5℃、05℃ 和 – 5℃ 梯度，首先将异色瓢虫置于 15℃ 保持 2 h，之后转入 10℃ 保持 2 h，依次将异色瓢虫转移至 5℃、0℃ 和 – 5℃，每个温度梯度各保持 2 h。升温处理：设定人工智能培养箱温度为 – 5℃、0℃、5℃、10℃、15℃、25℃ 梯度，首先将异色瓢虫置于 – 5℃ 保持 2 h，之后转入 0℃ 保持 2 h，依次将异色瓢虫转移至 5℃、10℃、15℃、25℃，每个温度梯度各保持 2 h。上述实验进行三次重复，每个处理重复 3 头。分别将上述各处理的异色瓢虫进行液氮研磨，抽提 RNA，并参照 1.3.3 的方法进行 qRT-PCR，测定异色瓢虫 *DDC* 基因的相对表达量。

1.3.5　不同低温储存时间下异色瓢虫 *DDC* 基因的表达

在低温冰箱中，选取异色瓢虫的黑底色斑雌性（黑雌）和黄底色斑雌性（黄雌）成虫，进行低温储存处理，分别在 0 d，5 d，10 d，15 d 和 20 d 取出异色瓢虫，每个时间点每重复选取处理后瓢虫 5 – 10 头，实验重复 3 次，抽提 RNA，并参照 1.3.3 的方法进行 qRT-PCR，测定 *DDC* 基因的相对表达量，定量结果用 $2^{-\Delta\Delta T}$ 法进行数据分析。

1.4　序列分析及数据统计分析

序列分析和系统分析分别采用 Dnastar、Vector、Compute pI/Mw 和 Clustal Omega 等，在线分析网址：http://expasy.org/tools/#translate，NetNGlyc 1.0 Server：http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/；TMHMM Server v. 2.0：http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM – 2.0/ 和 Clustal Omega：http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/，用于在线分析昆虫 *DDC* 基因同源性。

采用 SPSS statistics 20 对所得数据进行均质性分析后不同处理间的差异进行单因素方差分析（One-way ANOVA）和多重比较采用 Tukey-Kramer

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

HSD 分析。图中不同小写字母表示经 One-way ANOVA，Tukey-Kramer HSD 检验后在 0.05 水平上存在显著性差异（$P<0.05$）。

2 结果与分析

2.1 异色瓢虫多巴脱羧酶基因 cDNA 序列分析

转录组获得异色瓢虫 *DDC* 基因 cDNA 全长（序列登录号：KU820948），并进行 PCR 扩增验证后的序列，测序后发现跟转录组序列一致。异色瓢虫 *DDC* 基因全长 1431 bp，其中翻译氨基酸数 476 个，等电点为 5.80，预测蛋白分子量为 53.88 kDa，无信号肽、跨膜结构和潜在糖基化位点（图 1）。

2.2 昆虫的 *DDC* 基因同源性和进化分析

NCBI 上已经有多条关于昆虫的 *DDC* 基因序列被登录，从中挑选了部分有代表性的物种：黄粉虫 *Tenebrio molitor*（TmoDDC – AB028848）、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*（TcaDDC – NM_001102586）、东方粘虫 *Mythimna separata*（MseDDC – AB072300）、家蚕 *Bombyx mori*（BmoDDC – XM_012694440）、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*（SexDDC – JF795469）、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*（DmeDDC – AY197758）、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*（AgaDDC – AF063021）和拟黑多刺蚁 *Polyrhachis vicina*（PviDDC – JN979785），与异色瓢虫采用 Multiple 和 Clustal 2.1 进行比对分析结果发现，不同昆虫的 *DDC* 基因序列高度保守，含有多个保守的结构域，昆虫间的同源相似性高达 71% 及以上。具体相似性结果为，拟黑多刺蚁（71.52%）、黑腹果蝇（73.15%）、冈比亚按蚊（75.32%）、家蚕（75.11%）、东方粘虫（74.89%）、甜菜夜蛾（74.26%）、黄粉虫（81.43%）和赤拟谷盗（79.96%）。

```
1     ATGGAGGCTAATCAGTTTAGGGACTTCGGAAAGGCGATGATAGACTACGTCGCCAATTATCTGGAGAATATAAGGGAGAGGCGGGTTTTG
       M  E  A  N  Q  F  R  D  F  G  K  A  M  I  D  Y  V  A  N  Y  L  E  N  I  R  E  R  R  V  L
91    CCTACTGTAGAACCAGGGTATTTACGTCCTCTACTTCCCAGTGAGGCACCACAAAAACCTGACACATGGCAAGAAGTTATGGCTGACATT
       P  T  V  E  P  G  Y  L  R  P  L  L  P  S  E  A  P  Q  K  P  D  T  W  Q  E  V  M  A  D  I
181   GAAAAAGTCATTATGCCTGGAGTTACACACTGGCATTCACCAAAGTTTCATGCATATTTTCCTACTGCCAACTCCTATCCTGCTATTGTA
       E  K  V  I  M  P  G  V  T  H  W  H  S  P  K  F  H  A  Y  F  P  T  A  N  S  Y  P  A  I  V
271   GCAGATATTCTCAGTGATGGTATTGCTTGCATCGGTTTTTCATGGATCGCAAGTCCCGCTTGCACCGAACTCGAAGTCGTGATGATGGAC
       A  D  I  L  S  D  G  I  A  C  I  G  F  S  W  I  A  S  P  A  C  T  E  L  E  V  V  M  M  D
361   TGGTTGGGAAAAATGATAGGTCTCCCAGAGGAATTCCTCGCTTGTTCAGGGGGTAAGGGGGGCGGCGTAATCCAGGGGACTGCGAGTGAA
       W  L  G  K  M  I  G  L  P  E  E  F  L  A  C  S  G  G  K  G  G  G  V  I  Q  G  T  A  S  E
451   GCTACGCTAGTTGCCTTGCTTGGAGCCAAAGCACGTGCCATTCATCATGTGAAAAAAGAACACCCAGATTGGAAAGATGCCGATATAGCC
       A  T  L  V  A  L  L  G  A  K  A  R  A  I  H  H  V  K  K  E  H  P  D  W  K  D  A  D  I  A
541   GAGAAATTGGTGGGATACACTTCTAGTCAAAGTCATTCTTCGGTTGAACGAGCTGGTCTTCTTGGTGGTGTTAAGTTAAGAGGTCTACCC
       E  K  L  V  G  Y  T  S  S  Q  S  H  S  S  V  E  R  A  G  L  L  G  G  V  K  L  R  G  L  P
631   ACAGACGAATCAAACCGACTACGAGGGGACACTTTAGAAAGGGCAATCAAGGAGGATAGAGAAGCTGGCCTTATTCCATTTTACGTTGTC
       T  D  E  S  N  R  L  R  G  D  T  L  E  R  A  I  K  E  D  R  E  A  G  L  I  P  F  Y  V  V
721   GCCACCCTGGGAACAACCTCATCCTGCACCTTTGACAACCTTGAAGAGATCGGTCCCGTGTGTAATGTTAACAAGGTGTGGCTCCACATC
       A  T  L  G  T  T  S  S  C  T  F  D  N  L  E  E  I  G  P  V  C  N  V  N  K  V  W  L  H  I
811   GACGCCGCTTACGCAGGCGCAGCCTTCACTTGTCCCGAGTACAGGTATCTGATGAAGGGCGTAGAGATGGCCGATTCCTTTGACTTCAAC
       D  A  A  Y  A  G  A  A  F  T  C  P  E  Y  R  Y  L  M  K  G  V  E  M  A  D  S  F  D  F  N
901   CCGCACAAATGGATGTTGGTCACATTTGACTGTTCTGCAATGTGGCTCAAAGACCCCAACTGGCTCGTGGATGCCTTCAATGTTGACCCC
       P  H  K  W  M  L  V  T  F  D  C  S  A  M  W  L  K  D  P  N  W  L  V  D  A  F  N  V  D  P
991   CTCTACTTGAAACACGACCAACAAGGCTCAGCACCGGATTACAGACACTGGCAGATTCAGCTCGGCCGTAGGTTCAGAGCTCTCAAGATT
       L  Y  L  K  H  D  Q  Q  G  S  A  P  D  Y  R  H  W  Q  I  Q  L  G  R  R  F  R  A  L  K  I
1081  TGGTTTGTCTTGAGATTGTACGGAGTCGAGAACATCCAGAAGCATATACGGAAGCAGATTGGGCTTGCACACCATTTCGAAGATTTGGTC
       W  F  V  L  R  L  Y  G  V  E  N  I  Q  K  H  I  R  K  Q  I  G  L  A  H  H  F  E  D  L  V
1171  AAGTCGGACGATAGGTTCGAGGTAACTGAGGAGGTGCTTATGGGTTTGGTGTGCTTCAGGCTAAAGGGCCAGTCGAACGAAGTCAACGAA
       K  S  D  D  R  F  E  V  T  E  E  V  L  M  G  L  V  C  F  R  L  K  G  Q  S  N  E  V  N  E
1261  CGACTTCTGAAGAGGATCAACGCAAGGGGTACCATACATTTGGTTCCTTCTAAGATAAGAGAAATGTACTTTTTGAGAATGGCTGTATGC
       R  L  L  K  R  I  N  A  R  G  T  I  H  L  V  P  S  K  I  R  E  M  Y  F  L  R  M  A  V  C
1351  TCTAGGTTAACTGAGAAGGAAGACATGGATTTATCATGGAAAGAAGTACGGGAATCTGCTGATGATATTTTGGGAGAGTAG
       S  R  L  T  E  K  E  D  M  D  L  S  W  K  E  V  R  E  S  A  D  D  I  L  G  E  *
```

图 1 异色瓢虫 *DDC* 基因 cDNA 序列

Fig. 1 The cDNA sequence of *Harmonia axyridis DDC*

注：图中起始密码子、终止密码子用加粗并用下划线标出。Note: The initiator and terminator were indicated by bold and underlined.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

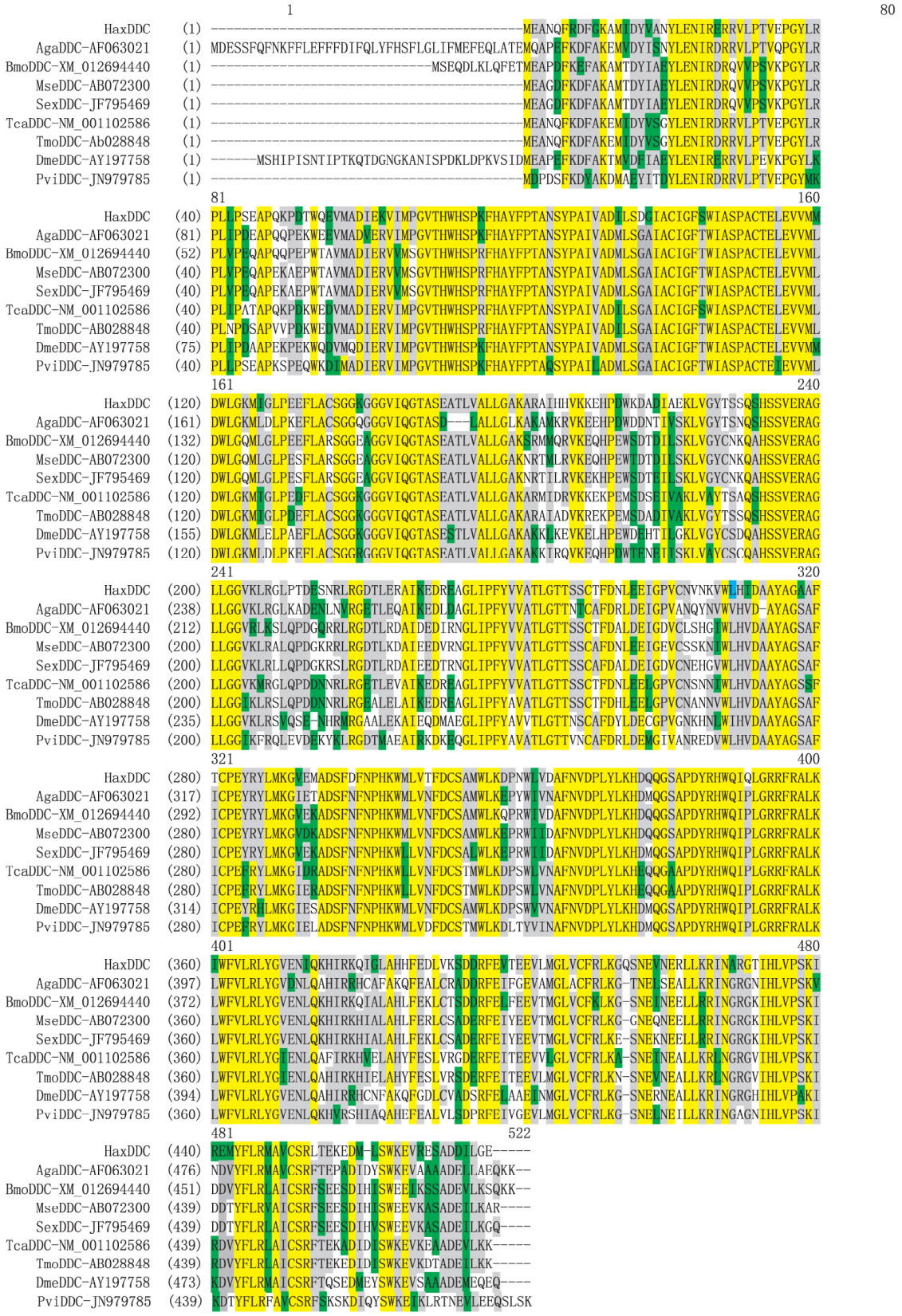

图 2　不同昆虫 *DDC* 基因蛋白序列比对结果与分析

Fig. 2　Alignment of the deduced amino acid sequences of *DDC* gene in insects

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 1 试验中所用的引物

Table 1 Primers used in the experiments

引物片段 PCR fragment	引物名称 Primer name	核苷酸序列 Nucleotide sequences (5' -3')
ORF	HaDDCORF - F	ATGGAGGCTAATCAGTTTAGG
	HaDDCORF - R	CTACTCTCCCAAAATATCATCAG
荧光定量 PCR (qRT - PCR)	HaDDC - qF	TAGTTGCCTTGCTTGGAG
	HaDDC - qR	TTTGATTCGTCTGTGGGTA
内参基因 Reference gene	Harp49 - F	ACGGACTTCGGTAGGACG
	Harp49 - R	CGCAGACAATCCCGAAA

2.3 异色瓢虫不同发育阶段 *DDC* 基因相对表达量

异色瓢虫不同发育阶段 *DDC* 基因表达量差异显著。以羽化后第 3 天的成虫 (A3) 为对照，第 1 天和第 4 天的 4 龄幼虫 *DDC* 基因的表达量显著低于对照组，蛹期第 1 天 (P1) *DDC* 表达量最高且 PP 和 P1 显著性高于对照，蛹期第 2 天和第3 天显著低于 A3，羽化后前 3 d *DDC* 表达量之间差异不显著 (图 3)。

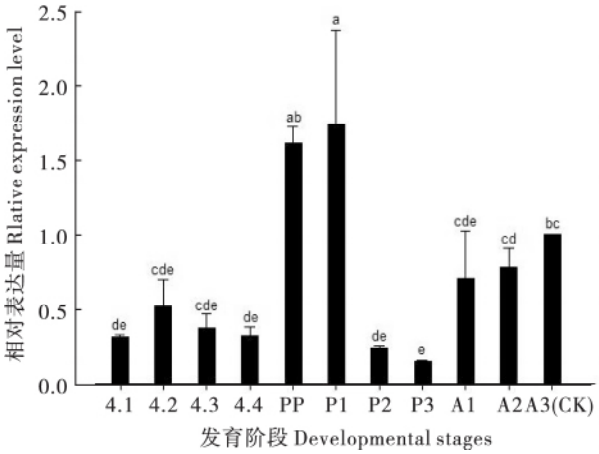

图 3 异色瓢虫不同发育阶段 *DDC* 相对表达量

Fig. 3 The relative expression level of *Harmonia axyridis DDC* in different instars

注：4.1 至 4.4 为 1 - 4 d 4 龄幼虫；PP 为预蛹；P1 - P3 为 1 - 3 d 蛹；A1 - A3 为羽化 1 - 3 d 成虫。Note: 4.1 - 4.4 are day 1 to day 4 4th instar larva; PP is prepupa; P1 - P3 is day 1 to day 3 pupa; A1 - A3 is day 1 to day 3 after eclosion.

2.4 短时降温和升温处理对异色瓢虫 *DDC* 基因相对表达量的影响

降温处理下异色瓢虫 *DDC* 基因的表达量均高于 25℃ 时的水平，-5℃ 时表达量最高，5℃ 和 -5℃ 时与 25℃ 存在显著性高表达，且 10℃ 到 0℃ 之间 *DDC* 的表达无显著性差异 (图 4)。

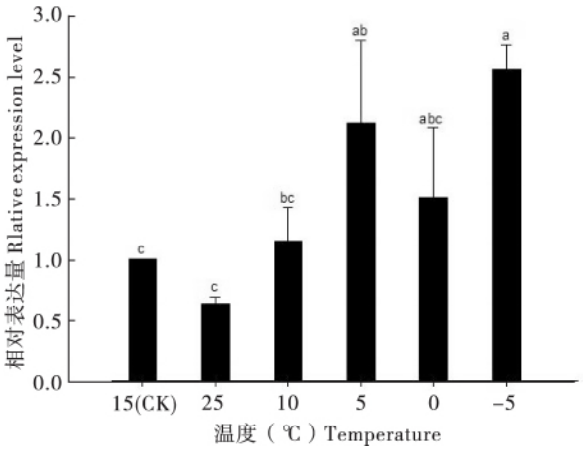

图 4 降温条件下异色瓢虫 *DDC* 基因的表达水平

Fig. 4 The expression level of *Harmonia axyridis DDC* gene under the the treatment of cooling process

升温处理异色瓢虫，以 15℃ 为对照，实验结果显示从 -5℃ 升高到 0℃ 时，*DDC* 表达显著下降，而后表达上升，5℃ 到 25℃ 之间 *DDC* 的表达无显著性差异 (图 5)。

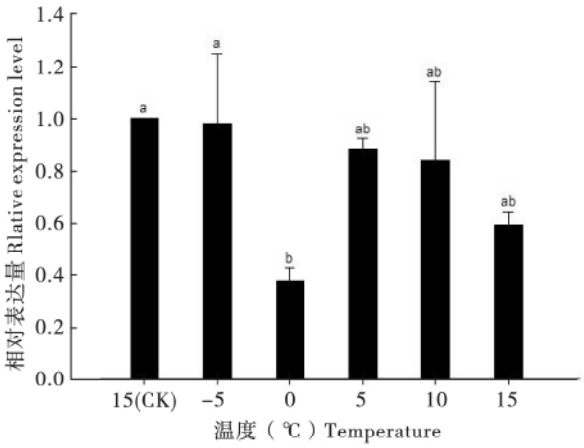

图 5 升温处理下异色瓢虫 *DDC* 基因的表达水平

Fig. 5 The expression level of *Harmonia axyridis DDC* gene under the treatment of increasing temperature

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.5　低温储存条件下异色瓢虫 *DDC* 基因相对表达量

以 0 d 为对照，黑底色斑型雌性瓢虫 *DDC* 的表达量随着储存时间的增加而上升，除了在第 5 天时显著上升，其后的 10 d、15 d 和 20 d 与对照组差异不显著（图 6）。黄底色斑型雌性瓢虫 *DDC* 的表达量在储存 5 d 时达到最高，显著性高于对照及其他储存时间；10 d 和 15 d 开始下降，与对照（0 d）间无显著性差异；当储存到 20 d 时，*DDC* 的表达下降到对照组的 0.2 倍左右，其对照组和其他储存时间均存在显著性差异（图 7）。

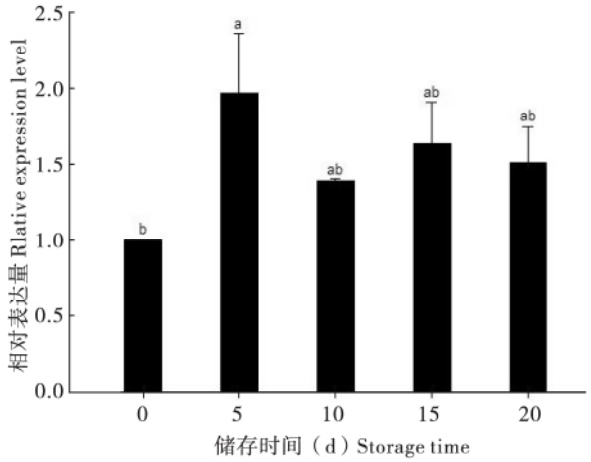

图 6　低温储存下黑底色斑雌性异色瓢虫 *DDC* 基因的表达水平

Fig. 6　The expression level of black female *Harmonia axyridis* *DDC* gene under the treatment of low temperature storage

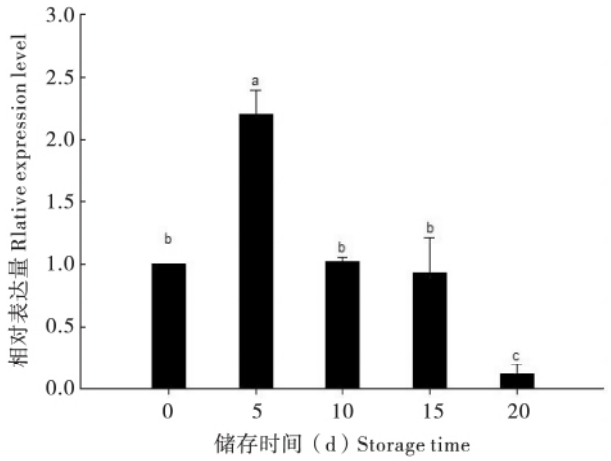

图 7　低温储存黄底色斑雌性异色瓢虫 *DDC* 基因的表达水平

Fig. 7　The expression level of yellow female *Harmonia axyridis* *DDC* gene under the treatment of low temperature storage

3　结论与讨论

昆虫中的 *DDC* 基因最先从黑腹果蝇中克隆出（Tatarenkov and Ayala，2007），其功能主要表现在表皮形成与成熟及神经系统的调节上（Hodgetts and O' Keefe，2006）。目前，甜菜夜蛾（Liu *et al.*，2015）、斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*（张文慧等，2014）、冈比亚按蚊（Paskewitz and Andreev，2008）和家蚕（Wang *et al.*，2013）等昆虫的 *DDC* 基因序列也已有克隆与报道，研究结果显示该基因具有高度保守性（Hodgetts and O' Keefe，2006）。本研究克隆了异色瓢虫多巴脱羧酶基因的 cDNA 全长，通过序列分析可知该基因编码 476 个氨基酸的蛋白（图 1）。由异色瓢虫 *DDC* 基因核苷酸序列推导出的氨基酸序列与鞘翅目昆虫黄粉虫和赤拟谷盗的同源性最高，分别为 81% 和 80%，与双翅目、鳞翅目和膜翅目等 9 种昆虫的同源性也高达 71% 以上（图 2），而鳞翅目昆虫之间的相似性高达 91% 以上（张文慧等，2014）。

DDC 基因在昆虫蜕皮过程中起重要作用，研究表明虫酰肼处理甜菜夜蛾 5 龄幼虫后，4 h 至 72 h DDC 酶活显著低于对照组（王涛等，2012）；而采用 4 个亚致死剂量的虫酰肼溶液浸泡的饲料饲喂斜纹夜蛾 5 龄幼虫 12 h、24 h、36 h、48 h 和 60 h，结果显示 *DDC* 的表达在 12 h 至 48 h 显著高于对照组，而在 60 h 时显著低于对照组，结果说明虫酰肼进入虫体后先启动基因表达，而后抑制表达，影响昆虫正常蜕皮（张文慧等，2014）。在先前的研究报道中 *DDC* 的主要功能是参与昆虫蜕皮的黑化过程以及免疫防御过程等（Hodgetts and O' Keefe，2006），当采用 RNAi 沉默家蚕老熟幼虫的 *DDC* 基因，24 h 后 *DDC* 的表达下降，部分家蚕蛹不能形成且保持在幼虫状态（Wang *et al.*，2013）；同样，冈比亚按蚊的 *DDC* 表达被抑制后其黑色素形成能力降低（Paskewitz and Andreev，2008）。

目前大多有关 *DDC* 的功能研究多集中在昆虫的蜕皮过程，而最近通过转录组技术结合数字表达谱发现 *DDC* 在抗寒过程中具有重要的调控作用，其能够在低温刺激和胁迫条件下高表达，以此调节异色瓢虫的低温胁迫压力（邬梦静等，2016）。本次研究采用升温、降温胁迫进一步研究 *DDC* 对温度变化的反应，结果显示在 5℃ 以后的升温过程

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

DDC 的表达无显著性差异（图 4），而在降温处理中其表达上升，与 25℃ 时相比较，5℃ 和 －5℃ 时 *DDC* 的显著高表达（图 5）该结果表明低温胁迫能够诱导 *DDC* 的高表达，与前期研究结果较一致。同时，为了研究 *DDC* 是否在长期低温胁迫下的表达情况，分别以异色瓢虫实验种群中的黑底色斑和黄底色斑雌性个体进行较长时间的低温处理，研究结果显示黑雌成虫在低温胁迫下表达水平上调，处理 5 d 到 20 d 表达差异不明显（图 6）；而黄雌成虫在低温胁迫 5 d 时显著高表达，其后在 10 d 和 15 d 时表达下降与对照无显著差异，而在 20 d 时显著低于对照组的表达（图 7）。本研究中异色瓢虫黄雌成虫 *DDC* 的表达与邬梦静等（2016）研究结果一致。其研究发现夏天野外异色瓢虫种群在低温冷驯化时 *DDC* 高表达，而经过冷驯化后的低温长期储存时却一直低于对照组的表达（邬梦静等，2016）。众所周知，异色瓢虫的鞘翅具有多种色斑，主要包括黄底型和黑底型两种常见的类型（唐斌等，2012），黄底型和黑底型异色瓢虫 *DDC* 表达的不同，可能是不同色斑型的异色瓢虫在抗寒能力等方面存在差异，其具体差异还有待进一步研究。

自然界的异色瓢虫在越冬前经过自然的低温胁迫过程，使其具有很强的抗寒能力，推测在该过程中包括 *DDC* 在内的众多基因都同时起作用。本研究不但克隆获得了异色瓢虫的 *DDC* 基因序列，还发现其预蛹期、蛹期第 1 天表达量较高（图 3），且通过低温胁迫发现该基因高表达，表明 *DDC* 可能具有应对低温胁迫的功能。

参考文献（References）

Bertoldi M. Mammalian dopa decarboxylase: Structure, catalytic activity and inhibition [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2014, 546: 1－7.

Du B. The Application of PCR－SSCP in the Research of Entomology [D]. Heilongjiang: Northeast Forestryb University, 2007. [杜波. 帽儿山地区异色瓢虫种群的单链构象多态性（SSCP）分析 [D]. 黑龙江: 东北林业大学, 2007]

Guo JY, Wan FH. A study on feeding effects of 3 feeds for *Harminia axyridis* and *Propylaea japonica* [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2001, 17 (3): 116－120. [郭建英, 万方浩. 3 种饲料对异色瓢虫和龟纹瓢虫的饲喂效果 [J]. 中国生物防治, 2001, 17 (3): 116－120]

Han Y, Liu C, Wei LW, *et al*. Expression profile and function of tyrosine hydroxylase gene BmTh in the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2010, 53 (9): 949－956. [韩宇, 刘春, 魏丽婉, 等, 家蚕酪氨酸羟化酶基因 BmTh 的表达及功能 [J]. 昆虫学报, 2010, 53 (9): 949－956]

Hodgetts RB, O' Keefe SL. Dopa decarboxylase: A model gene-enzyme system for studying development, behavior, and systematic [J]. *Annu. Rev. Entomol.*, 2006, 51: 259－84.

Jiang WH, Pan XH, Liu JX, *et al*. Studies on the type of spot in the wings of *Harmonia axyridi* (Pallas) in Baoding [J]. *Hebei Jouranl of Forestry and Orchard Research*, 2007, 22 (2): 198－202. [姜文虎, 潘秀华, 刘军侠, 等. 保定市异色瓢虫色斑类型调查研究 [J]. 河北林果研究, 2007, 22 (2): 198－202]

Koch RL. The multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis*: A review of its Biology, Uses in Biologica Control, and Non－target Impacts [J]. *Insect Science*, 2003, 3: 1－16.

Le BE, Valenti P, Lucchetta P, *et al*. Effects ofmild heat shocks at young age on aging and longevity in *Drosophila melanogaster* [J]. *Biogerontology*, 2001, 2: 155－164.

Liu SS, Wang M, Li XC. Overexpression of *Tyrosine hydroxylase* and Dopa decarboxylase associated with pupal melanization in *Spodoptera exigua* [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 11273.

Murphy CT, Mccarroll SA, Barmann CI, *et al*. Genes that act downstreasm of DAF216 to influence the lifespan of *Caenorhabiditis elegans* [J]. *Nature*, 2003, 424: 277－283.

Nagy L, Hiripi L. Role of tyrosine, DOPA and decarboxylase enzymes in the synthesis of monoamines in the brain of the locust [J]. *Neurochemistry International*, 2002, 41: 9－16.

Noguchi H, Tsuzuki S, Tanaka K *et al*. Isolation and characterization of a dopa decarboxylase cDNA and the induction of its expression by an insect cytokine, growth-blocking peptide in *Pseudaletia separate* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 33: 209－217.

Paskewitz SM, Andreev O. Silencing the genes for dopa decarboxylase or dopachrome conversion enzyme reduces melanization of foreign targets in *Anopheles gambiae* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 2008, 150: 403－408.

Shen ZH, Yang H, Yuan R, *et al*. Investigation in mating behavior and post－copulatory guarding behavior of *Harmonia axyridis* Pallas [J]. *Journal of Mountain Agriculture and Biology*, 2011, 30 (1): 27－31. [申智慧, 杨洪, 袁瑞, 等. 异色瓢虫的交配及配后的保护行为研究 [J]. 山地农业生物学报, 2011, 30 (1): 27－31]

Sui R, Wang HP. Overwintering capability of *Leis axyridis* adults [J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2008, 2: 73－74. [孙锐, 王洪平. 异色瓢虫成虫越冬能力的研究 [J]. 山东农业科学, 2008, 2: 73－74]

Tang B, Shi ZK, Guo HS. Cloning and sequence analysis of the *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellinae) catalase gene [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2014, 51 (1): 26－34. [唐斌, 施佐堃, 郭红双. 异色瓢虫过氧化氢酶（Catalase）的基因克隆及序列分析 [J]. 应用生态学报, 2014, 51 (1): 26－34]

Tang B, Wei P, Chen J, *et al*. Progress in gene features and functions of trehalase [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2012, 55 (11):

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1315 – 1321. [唐斌，魏苹，陈洁，等. 昆虫海藻糖酶基因特性及功能研究进展 [J]. 昆虫学报，2012，55 (11)：1315 – 1321]

Tang B，Zhu J，Guo HS，*et al*. Studies of the diversity of multiple elytral color morphs of *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae) [J]. *Journal of Hangzhou Nornal University* (Natural Science Edition)，2012，11 (2)：21 – 25. [唐斌，诸佶，郭红双，等. 异色瓢虫鞘翅色斑变异多样性研究进展 [J]. 杭州师范大学学报 (自然科学版)，2012，11 (2)：1315 – 1321]

Tatarenkov A，Ayala FJ. Nucleotide variation at the dopa decarboxylase (*Ddc*) gene in natural populations of *Drosophila melanogaster* [J]. *J. Genet.*，2007，86 (2)：125 – 37.

Teng SB，Xu ZQ. The cold storage conditions of *Harmonia axyridis* eggs and adults in mass – rearing [J]. *Chinese Bulletin of Entomology*，2005，42 (2)：180 – 182. [滕树兵，徐志强. 人工扩繁代异色瓢虫卵和成虫最适冷藏条件的探讨 [J]. 昆虫知识，2005，42 (2)：180 – 182]

Vavricka C，Han Q，Huang Y，*et al*. From L-dopa to dihydroxyphenylacetaldehyde: A toxic biochemical pathway plays a vital physiological function ininsects [J]. *PLoS ONE*，2011，16124.

Wang MX，Cai ZZ，Lu Y，*et al*. Expression and functions of dopa decarboxylase in the silkworm，*Bombyx mori* was regulated by molting hormone [J]. *Molecular Biology Reports*，2013，40 (6)：4115 – 4122.

Wang S，Zhang RZ，Zhang F. Research progress on biology and ecology of *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae) [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*，2007，9: 2117 – 2126. [王甦，张润志，张帆. 异色瓢虫生物生态学研究进展 [J]. 应用生态学报，2007，9: 2117 – 2126]

Wang T，Qiu XC，Jiao YY，*et al*. Inhibitory effects of tebufenozide on dopa decarboxylase and tyrosine hydroxylase in 5th instar larvae of *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*，2012，55 (1)：29 – 35. [王涛，邱秀翠，焦艳艳，等. 虫酰肼对甜菜夜蛾多巴脱羧酶和酪氨酸羟化酶的抑制作用 [J]. 昆虫学报，2012，55 (1)：29 – 35]

Wang XY，Shen ZR. Progress of applied research on multicolored Asian ladybird beetle [J]. *Entomological Knowledge*，2002，39 (4)：255 – 261. [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]

Wu MJ，Shen QD，Shi ZK，*et al*. Molecular cloning and expression in different induction of Heat Shock Protein 67B2 gene in *Harmonia axyridis* (Pallas) [J]. *Journal of Environmental Entomology*，2014，36 (6)：919 – 927. [邬梦静，沈祺达，施佐堃，等. 异色瓢虫 HSP67B2 基因的克隆及诱导表达分析 [J]. 环境昆虫学报，2014，36 (6)：919 – 927]

Wu MJ，Xu QY，Liu Y，*et al*. The super cooling point change of *Harmonia axyridis* under low temperature stress and its cold – resistance genes' expression analysis [J]. *Scientia Agricultura Sinica*，2016，49 (4)：677 – 685. [邬梦静，徐青叶，刘雅，等. 异色瓢虫低温胁迫下过冷却点变化及抗寒基因表达分析 [J]. 中国农业科学，2016，49 (4)：677 – 685]

Yang H，Xiong JW，Zhang F. Advances of artificial diet for *Harminia axyridis* [J]. *Journal of Mountain Agriculture and Biology*，2003，22 (2)：169 – 172. [杨洪，熊继文，张帆. 异色瓢虫人工饲料研究进展 [J]. 山地农业生物学报，2003，22 (2)：169 – 172]

Yang JC，Shen ZR. Effect of refrigerated condition on the survival of ladybirds [J]. *Acta Entomologica Sinica*，2000，43: 211 – 214. [杨俊成，沈佐锐. 冷藏条件对瓢虫存活的影响 [J]. 昆虫学报，2000，43: 211 – 214]

Zhang WH，Hou HX，Yang Q，*et al*. Effects of tebufenozide on mRNA expression of dopa decarboxylase gene in larvae of *Spodoptera litura* Fabricius [J]. *Scientia Agricultura Sinica*，2014，47 (8)：1512 – 1521. [张文慧，侯海霞，杨琼，等. 虫酰肼对斜纹夜蛾幼虫多巴脱羧酶基因表达的影响 [J]. 中国农业科学，2014，47 (8)：1512 – 1521]

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net