环境昆虫学报 2020，42（6）：1352－1360
Journal of Environmental Entomology
http：//hjkcxb. alljournals. net
doi：10. 3969/j. issn. 1674－0858. 2020. 06. 9

舒本水，钟宏新，冯杰，洪一峰，林进添. 草地贪夜蛾半胱氨酸蛋白酶 *Sf-caspase-3* 基因克隆与表达分析［J］. 环境昆虫学报，2020，42（6）：1352－1360.

草地贪夜蛾半胱氨酸蛋白酶 *Sf-caspase-3* 基因克隆与表达分析

舒本水，钟宏新，冯　杰，洪一峰，林进添*
（仲恺农业工程学院，广州市亚热带果树重大疫情控制重点实验室，广州 510225）

摘要：半胱氨酸蛋白酶（caspases）是细胞凋亡过程中重要的酶类，参与调控昆虫变态发育及响应外界压力等多种生理过程。本研究通过转录组数据及逆转录 PCR 鉴定并验证得到草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda Sf-caspase-3* 基因编码区全长。该基因编码区长840 bp，编码 279 个氨基酸，预测蛋白分子量为 31. 43 kDa。氨基酸序列分析表明 Sf-caspase-3 具有保守的 QACRG 五肽序列，且与 Lep-caspase-3 高度保守。进化树分析表明 Sf-caspase-3 与甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* Se-caspase-3 亲缘关系最近。RT-qPCR 检测结果表明 *Sf-caspase-3* 在草地贪夜蛾各个龄期均有表达，其中 3～6 龄幼虫期表达量最高，蛹期和卵期表达量最低。此外 *Sf-caspase-3* 在 6 龄幼虫中肠组织中表达量最高，而在表皮、脂肪体及马氏管中表达量极低。本研究成功构建 Sf-caspase-3 原核表达重组质粒，在 28℃下 0. 4 mmol/L 异丙基硫代半乳糖苷（IPTG）诱导重组菌株 4 h 得到约 50 kDa 大小条带，与预期条带大小相符。蛋白可溶性分析表明 Sf-caspase-3 主要以不可溶的形式存在包涵体中。本研究为草地贪夜蛾 Sf-caspase-3 功能及鳞翅目昆虫细胞凋亡机制研究提供一定的理论依据。

关键词：草地贪夜蛾；*Sf-caspase-3*；克隆；时空表达；原核表达
中图分类号：Q965；S433　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1674－0858（2020）06－1352－9

Cloning and expression analysis of *caspase-3* in *Spodoptera frugiperda*

SHU Ben-Shui，ZHONG Hong-Xin，FENG Jie，HONG Yi-Feng，LIN Jin-Tian*（Guangzhou City Key Laboratory of Subtropical Fruit Tree Pest and Disease Outbreak Control，Zhongkai University of Agriculture and Engineering，Guangzhou 510225，China）

Abstract：Cysteine proteases caspases are important enzymes in the process of apoptosis and participate in various insect physiological processes such as regulating the metamorphosis and responding to external pressure. In this study，the full length of the coding region of *Spodoptera frugiperda Sf-caspase-3* gene was identified and verified by transcriptome data and reverse transcription PCR，respectively. The gene coding region was 840 bp long and encoded 279 amino acids，with a predicted protein molecular weight of 31. 43 kDa. Amino acid sequence analysis showed that Sf-caspase-3 had a conserved QACRG pentapeptide sequence and was highly conserved with Lep-caspase-3. Phylogenetic tree analysis showed that Sf-caspase-3 had the closest relationship with *Spodoptera exigua* Se-caspase-3. RT-qPCR results showed that *Sf-caspase-3* was expressed at every developmental stage of *S. frugiperda*，among which the 3rd～6th instar larval stages owned the highest epression，and pupal and egg stages showed with the lowest expression. For

基金项目：广东省重点领域研发计划项目（2020B020223004）；广东省教育厅创新团队项目（2017KCXTD018）；广州市亚热带果树重大疫情控制重点实验室项目（201805010008）
作者简介：舒本水，男，1991 年生，博士，讲师，主要研究方向为昆虫毒理学，E－mail：shubenshui@126. com
* 通讯作者 Author for correspondence：林进添，博士，教授，主要研究方向为昆虫生理生化，E－mail：linjtian@163. com
收稿日期 Received：2020－06－01；接受日期 Accepted：2020－10－12

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

different tissues of 6th instar larvae, the expression level of *Sf-caspase-3* was the highest in the midgut, but was extremely low in the cuticle, fat body, and malpighian tubules. Besides, Sf-caspase-3 prokaryotic expression recombinant plasmid was successfully constructed. A band of about 50 kDa was identified by SDS-PAGE of the recombinant strain sample which induced by 0.4 mmol/L isopropylthiogalactoside (IPTG) at 28℃ for 4 h. Protein solubility analysis showed that Sf-caspase-3 mainly existed as insoluble form in inclusion bodies. This study provides a theoretical basis for further analysis of Sf-caspase-3 function and the mechanism of lepidopteran insect apoptosis.

Key words: *Spodoptera frugiperda*; *Sf-caspase-3*; spatio-temporal expression; prokaryotic expression

细胞凋亡（apoptosis）是多细胞生物体中受基因调控且自主发生的一种重要生理过程，其通过一系列的生物学反应消除多余、变异或恶化的细胞，参与调控生物体的生长发育、维持机体动态平衡及应对各种外界刺激（Zhang*et al.*，2018；Yuan *et al.*，2020）。天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白酶（caspase）家族是执行细胞凋亡过程的主要酶类，所引发的级联反应是细胞凋亡的中心环节。根据结构域的不同，caspases 被分为具有 caspase 募集结构域（caspase recruitment domains，CARDs）和死亡执行结构域（death effector domains，DEDs）的起始 caspases 和只有短的原结构域的执行 caspases（Wang *et al.*，2018）。迄今为止在线虫、酵母、昆虫乃至哺乳动物中都发现多种不同的 caspases。它们具有高度保守的 QACXG（X 为 R、Q 或 G）五肽序列；以半胱氨酸作为裂解底物的亲和基团催化底物的天冬氨酸羧基端肽键断裂，且对催化底物的天冬氨酸具有特异性（赵瑞杰等，2010）。黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中鉴定的 7 个 caspases，包括起始 caspases Dronc，Dredd 和 Strica 以及执行 caspases Drice，Dcp-1，Decay 和 Damm。一般情况下 caspases 以无活性的酶原形式存在。一旦接收凋亡信号，Apaf-1 同源蛋白 Dark 在 dATP 存在下发生寡聚化形成八聚体凋亡复合体（Apoptosome），Dark 的 CARDs 结构域在凋亡复合体中心形成皇冠状结构募集 Dronc（Yuan *et al.*，2013）。Dronc 形成二聚体后被凋亡复合体激活，活化的 Dronc 催化裂解 Drice，最终导致 caspases 级联反应的放大。活化的 Drice 裂解细胞成分，从而诱导细胞发生凋亡（Kang *et al.*，2017）。

鳞翅目昆虫中 caspases 被划分为 caspase-1，-2，-3，-4，-5 和-6。根据基因结构及与果蝇 caspases 同源性分析，Lep-caspase-1，-2 和-3 被推测为执行 caspases，Lep-caspase-5 和-6 为起始 caspases，而 Lep-caspase-4 的功能未知（Courtiade *et al.*，2011）。目前 *caspase-3* 基因已在斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*、棉铃虫 *Helicoverpa armigera*、甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae*、大蜡螟 *Galleria mellonella*、模毒蛾 *Lymantria monacha* 等多种鳞翅目昆虫被鉴定，同时功能也陆续被揭示。大蜡螟 *Gm-caspase-3* 在不同发育时期均有表达，其中 5 龄幼虫表达量最高。在饥饿状态下大蜡螟中肠细胞发生凋亡并伴随着 *Gm-caspase-3* 的上调表达（Khoa *et al.*，2012）。来源于药西瓜 *Citrullus colocynthis* 的凝集素显著上调石榴螟 *Ectomyelois ceratoniae Ec-caspase-3* 表达量（Ramzi *et al.*，2016）。植物源化合物印楝素上调斜纹夜蛾 *S. litura* 中肠 *Sl-caspase-3* 表达量并诱导斜纹夜蛾中肠细胞发生凋亡，推测 *Sl-caspase-3* 可能参与印楝素诱导的斜纹夜蛾中肠细胞凋亡（Shu *et al.*，2018）。小菜蛾 *Plutella xylostella* 生殖细胞中 *Px-caspase-3* 显著上调表达应对高剂量的^{60}Co-γ 辐照胁迫（Li *et al.*，2019）。

草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda*（Smith）2019 年 1 月入侵我国云南省，是原产于美洲热带和亚热带地区的迁飞性农业重大害虫，目前已扩散至我国大部分地区（王磊等，2019；郭井菲等，2019）。其杂食性、高繁殖能力、强远距离迁飞能力及抗药性等特点对我国乃至全球粮食生产均造成巨大威胁（吴秋琳等，2019）。目前在草地贪夜蛾中已鉴定出 4 种 caspases（Sf-caspase-1，-2，-5 和-6），而 Sf-caspase-3 尚未见报道（Shu *et al.*，2017）。本研究以草地贪夜蛾为研究对象，从转录组数据中分析得到 *Sf-caspase-3* 基因编码区序列。通过 PCR 对 *Sf-caspase-3* 基因编码区进行克隆及测序，证实 *Sf-caspase-3* 基因序列的准确性。采用多种生物信息学软件对 *Sf-caspase-3* 基因进行分析。

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

利用荧光定量 PCR 技术对草地贪夜蛾不同发育时期及 6 龄幼虫不同组织表达量进行分析，推测其在草地贪夜蛾生长发育过程中的功能。同时通过原核表达系统成功对 Sf-caspase-3 进行原核表达。本研究为进一步研究 Sf-caspase-3 功能及鳞翅目昆虫细胞凋亡机制提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

草地贪夜蛾幼虫由本实验室采用人工饲料进行饲喂，成虫采用 10% 蜂蜜水饲养。室内饲养条件为：26 ±1℃，RH 75%，光照周期为 12 L∶12 D。

1.2 草地贪夜蛾 *Sf-caspase-3* 基因克隆及序列分析

1.2.1 草地贪夜蛾 RNA 提取及反转录

收集不同龄期的草地贪夜蛾幼虫进行混合，液氮研磨后采用 RNAiso Plus（TaKaRa）试剂进行草地贪夜蛾总 RNA 提取。总 RNA 采用 1.0% 琼脂糖凝胶检测完整性；微量紫外分光光度计 Nanodrop-100（Thermo Fisher）测定其浓度。根据 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 操作说明，以 1.0 μg 总 RNA 为反转录模板，Oligo dT Primer 为引物进行第一链 cDNA 的合成。合成的 cDNA 用于后续 *Sf-caspase-3* 基因克隆。

1.2.2 引物设计及合成

本研究前期通过 Blast 等技术比对草地贪夜蛾转录组数据鉴定得到 *Sf-caspase-3* 基因编码区全长序列。为确定得到的 *Sf-caspase-3* 基因序列可靠性，本研究根据序列设计编码区特异性引物 *Sf-caspase-3*-CDS-F 和 *Sf-caspase-3*-CDS-R 并由赛默飞世尔科技公司合成。本研究中用到的所有引物序列详见表 1。

表 1 本研究中使用的引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
Sf-caspase-3-CDS-F	5′-ATGGAGAATACAGGGGAAAG-3′
Sf-caspase-3-CDS-R	5′-TCAAAATTTCAGCAGCTTGG-3′
Sf-caspase-3-CDS-F（*BamH* I）	5′-GCGGATCCATGGAGAATACAGGGGAAAG-3′
Sf-caspase-3-CDS-R（*Hind* III）	5′-CGGAAGCTTAAATTTCAGCAGCTTGGTG-3′
Sf-caspase-3-RT-F	5′-GTAATCCCCTGCTGGTCCCT-3′
Sf-caspase-3-RT-R	5′-TCTCGTTGATGGCTGCTTG-3′
Sf-EF2-RT-F	5′-AGCGTGAGAAGAGTGAAAAGGG-3′
Sf-EF2-RT-R	5′-GACCACAAGAGCACCATCAGTTA-3′
Sf-RPL13-RT-F	5′-GCCTTAACCCTGCTTTTGCTAG-3′
Sf-RPL13-RT-R	5′-GCTTCGCCCTTCAATACCTTC-3′
Sf-β-1-TUB-RT-F	5′-TCAGGCGCAAGGCTTTCTT-3′
Sf-β-1-TUB-RT-R	5′-TCGGACACCAGGTCGTTCAT-3′

1.2.3 PCR 扩增、电泳检测及测序

以合成的第一链 cDNA 为模板，*Sf-caspase-3*-CDS-F 和 *Sf-caspase-3*-CDS-R 为引物进行 PCR 扩增。50 μL 反应体系如下：10 × *LA Taq* Buffer II 5.0 μL，dNTP Mixture（2.5 mM each）8.0 μL，cDNA 0.5 μL，上下游引物各 1.0 μL，*LA Taq* 0.5 μL，34.0 μL ddH_2O。PCR 扩增程序如下：95℃预变性 3.0 min，95℃变性 30 s，48℃退火 30 s，72℃延伸 1.0 min，32 个循环，72℃延伸 10 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后采用 Universal DNA 纯化回收试剂盒（天根生化科技（北京）有限公司）回收后与 pMD-19T 载体连接，16℃孵育 2 h 后转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞，氨苄青霉素筛选后挑选单菌落进行扩大培养并进行菌液 PCR，最终选取阳性克隆子进行测序。

1.2.4 生物信息学分析

利用 DNAman6 推导 *Sf-caspase-3* 基因编码蛋白质的氨基酸序列、相对分子量等理化性质。采用在线软件 HMHMM Server v.2.0（http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/）和 SignalP 4.1

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Server（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/）对 Sf-caspase-3 跨膜区域和信号肽进行预测。采用 PTOSITE（http://www.expasy.org/prosite）预测 Sf-caspase-3 的结构特点及关键活性位点。利用 BlastP（http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi）进行氨基酸同源性分析，查找并下载已知的其他物种 Sf-caspase-3 同源序列。利用 DNAman6 对选取的部分鳞翅目昆虫 Sf-caspase-3 氨基酸序列进行多重序列比对，分析鳞翅目昆虫 caspase-3 氨基酸结构的保守区域。采用软件 MEGAX 中 ClustalW 对 caspase-3 氨基酸序列进行比对，利用邻位相连法（Neighbor-joining，参数为：Botstrap 方法，Poisson 模型，1 000 次重复）构建系统发育树。所构建的进化树采用 MEGAX 进行编辑和可视化。采用 SWISS-MODEL 对 Sf-caspase-3 进行 3D 建模。

1.3　*Sf-caspase-3* 基因时空表达分析

1.3.1　样品收集

于草地贪夜蛾不同发育时期挑选一定数量的卵、幼虫、蛹及雌雄成虫置于 1.5 mL 离心管中，液氮速冻后于-80℃冰箱保存。同时选取 6 龄幼虫进行组织解剖，分别收集草地贪夜蛾幼虫的头部、表皮、脂肪体、中肠、马氏管等组织，PBS 缓冲液中洗净后置于 1.5 mL 离心管中，液氮速冻后于-80℃冰箱保存。

1.3.2　RNA 提取、反转录及 RT-qPCR

采用液氮将样品磨碎后加入 RNAiso Plus（TaKaRa）试剂进行草地贪夜蛾不同龄期和组织样品的总 RNA 提取。测定各个样品总 RNA 纯度和浓度后选取等量的总 RNA，采用 FastKing RT Kit（With gDNase）进行反转录。合成的 cDNA 稀释 5 倍后作为模板进行荧光定量 PCR 反应。10 μL 反应体系为：TransStart Tip Green qPCR SuperMix 5.0 μL，基因上下游引物各 0.5 μL，cDNA 1 μL，加 ddH_2O 补足 10 μL，震荡混匀，简短离心后进行 RT-qPCR 反应。反应条件为：95℃ 变性 3 min；95℃ 10 s，60℃ 10 s，72℃ 10 s 循环 45 次；最后熔解曲线步骤为 95℃ 5 s，65℃ 1 min，40℃ 30 s。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对 *Sf-caspase-3* 时空表达情况进行分析，不同实验条件下选用的内参基因不同，其中不同发育阶段以 EF2 和 RPL13 作为内参基因；幼虫不同组织以 RPL13 和 β-I-TUB 为内参基因。实验所需基因引物如表 1 所示。

1.4　Sf-caspase-3 原核表达分析

根据上述已知 *Sf-caspase-3* 编码区序列设计带有酶切位点的编码区引物 *Sf-caspase-3*-CDS-F（*BamH* I）和 *Sf-caspase-3*-CDS-R（*Hind* III）。采用 *LA Taq* 聚合酶进行 *Sf-caspase-3* 基因编码区克隆。pET32a 质粒及纯化回收后的目的片段采用限制性内切酶 *BamH* I 及 *Hind* III（ThermoFisher 公司）双酶切。酶切产物采用 T4 DNA 连接酶（ThermoFisher 公司）于 22℃连接过夜。连接产物转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞，氨苄青霉素筛选后挑选单菌落进行扩大培养并进行菌液 PCR，最终选取阳性克隆子进行测序。将阳性克隆子进行扩大培养，37℃孵育过夜后采用质粒提取试剂盒（天根生化科技（北京）有限公司）进行重组质粒 pET32a-*Sf-caspase-3* 提取。获得的质粒转化至 BL21（DE3）感受态中，氨苄青霉素筛选后挑选单菌落进行扩大培养并进行菌液 PCR，最终选取阳性克隆子用于后续蛋白表达。

阳性克隆子接种于 5 mL LB 液体培养基，37℃ 200 r/min 孵育过夜。将过夜孵育的菌接种于 50 mL LB 液体培养基中继续培养，待菌液 $A_{260} \geqslant 0.6$ 后加入 0.4 mmol/L IPTG 于 28℃下进行蛋白诱导表达。孵育 4 h 后吸取 1 mL 菌液离心，去除上清后加入 100 μL PBS 重悬，然后加入蛋白上样缓冲液，混匀后 100℃孵育 10 min 备用。同时将剩余的菌液离心收集菌体。超声波破碎仪破碎菌体后 4℃ 12 000 rpm 离心 10 min。分别收集上清和沉淀，沉淀用 2 mL PBS 重悬。分别取 200 μL 上清和沉淀并加入蛋白上样缓冲液，混匀后 100℃孵育 10 min。所有的蛋白样品各取 10 μL 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳，考马斯亮蓝 G-250 染色 2 h 后进行脱色液脱色，观察分析蛋白在上清和沉淀中的表达情况。

1.5　数据分析

试验数据以“平均值 ± 标准误（SE）”表示。采用 SPSS 17.0 软件对时空表达试验数据进行单因素方差分析，多重检验法（DMRT 法）进行差异显著性分析（$P < 0.05$）。

2　结果与分析

2.1　*Sf-caspase-3* 基因生物信息学分析

通过 Blast 比对成功鉴定得到 *Sf-caspase-3* 基因序列编码区全长。*Sf-caspase-3* 基因编码区长

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

840 bp，编码 279 个氨基酸，ExPASy 预测 Sf-caspase-3 编码蛋白分子量大小为 31.43 kDa，等电点为 6.50，预测分子式为 $C_{1397}H_{2206}N_{370}O_{425}S_{14}$。HMHMM 分析发现 Sf-caspase-3 无跨膜结构域。SignalP-4.0 Server 分析结果预测该蛋白无信号肽区域，编码的氨基酸为成熟肽。PROSITE 分析表明 Sf-caspase-3 具有典型的执行 caspase 结构特征：短的原结构域，caspase 家族 p20 大亚基（51-174）和 p10 小亚基（187-279）。同时 Sf-caspase-3 蛋白含有半胱氨酸活性位点 KPKLFFVQACRG 和组氨酸活性位点 HSKTSCICITILTHG。

```
          10         20         30         40         50         60
1   ATGGAGAATACAGGGGAAAGTTCCGCTGACATCAAGGGTTTTAATCTAAACCCTTCCAAT
1    M  E  N  T  G  E  S  S  A  D  I  K  G  F  N  L  N  P  S  N

          70         80         90        100        110        120
61  ACCAGTAATCCCCTGCTGGTCCCTGACGAAGCCGGTGTGAAGTTTGATCCAAACGCCTTG
21   T  S  N  P  L  L  V  P  D  E  A  G  V  K  F  D  P  N  A  L

         130        140        150        160        170        180
121 TATTATGATATGAGCGGTGATAAGTACCTCATAATATTGAACCAGAAAACTTTTAAGAAA
41   Y  Y  D  M  S  G  D  K  Y  L  I  I  L  N  Q  K  T  F  K  K

         190        200        210        220        230        240
181 ACTATTTATTTCAGAAACAAGCAGCCATCAACGAGAAATGGTACTGACAATGACGTGAAG
61   T  I  Y  F  R  N  K  Q  P  S  T  R  N  G  T  D  N  D  V  K

         250        260        270        280        290        300
241 AGTTTGAAAGCCATATTCGGGGACCTAGGTTTCCAGGTCACCGTCTATAAAGACCTGGAA
81   S  L  K  A  I  F  G  D  L  G  F  Q  V  T  V  Y  K  D  L  E

         310        320        330        340        350        360
301 TATTCAGACATTATCAAAAATCTAACTGCAATTGCTACCAAAGACCACTCGAAGACCTCA
101  Y  S  D  I  I  K  N  L  T  A  I  A  T  K  D  H  S  K  T  S

         370        380        390        400        410        420
361 TGCATCTGCATCACTATCCTGACTCACGGTGACAAGGGCGGCGAGGTGCACGCAGCAGAC
121  C  I  C  I  T  I  L  T  H  G  D  K  G  G  E  V  H  A  A  D

         430        440        450        460        470        480
421 CGGCCATATTTACTGTCTGATATCATGGCCATTTTCGAGAAACAGCTAACCCTTGTCAAC
141  R  P  Y  L  L  S  D  I  M  A  I  F  E  K  Q  L  T  L  V  N

         490        500        510        520        530        540
481 AAGCCAAAATTGTTCTTTGTACAGGCTTGCAGAGGCGCCAACACGGACGCAGGTAACACC
161  K  P  K  L  F  F  V  Q  A  C  R  G  A  N  T  D  A  G  N  T

         550        560        570        580        590        600
541 ATAGCACTGGACAGCGAGAGCGTGATGACTATACCCACACCTGACTTCCTCGTACTG
181  I  A  L  D  S  E  S  V  M  T  I  P  T  H  A  D  F  L  V  L

         610        620        630        640        650        660
601 TGTTCTACTGTAGAAGATCACCTATCCTACCGCGACATGTACGGTTCTTGGATGATCCAA
201  C  S  T  V  E  D  H  L  S  Y  R  D  M  Y  G  S  W  M  I  Q

         670        680        690        700        710        720
661 GCTCTCTGCCACGTGATCAAGGAACATCATGAGGATCTGGACCTCCTTCACATGGTCACC
221  A  L  C  H  V  I  K  E  H  H  E  D  L  D  L  L  H  M  V  T

         730        740        750        760        770        780
721 CTCACGAACAGGAAGGTGGCTTACGAGAGGACCACCTATACTCCTTCTAATATGGCGCTG
241  L  T  N  R  K  V  A  Y  E  R  T  T  Y  T  P  S  N  M  A  L

         790        800        810        820        830        840
781 AACAATAAAAAACAAATGCCGGAGACAAGATTTACTCTCACCAAGCTGCTGAAATTTGA
261  N  N  K  K  Q  M  P  E  T  R  F  T  L  T  K  L  L  K  F  *
```

图 1 *Sf-caspase-3* 基因编码区序列及其对应的氨基酸序列

Fig. 1 ORF region of *Sf-caspase-3* and the deduced amino acid sequence

注：横杠标注的位置为保守五肽序列 QACRG。Note: The position indicated by the horizontal bar is the conservative pentapeptide sequence QACRG.

2.2 Sf-caspase-3 多重序列比对及进化分析

将 Sf-caspase-3 氨基酸序列在 NCBI 进行 BlastP 比对，发现 Sf-caspase-3 与多种鳞翅目昆虫 Lep-caspase-3 相似性在 48.26% ~91.81% 之间，其中与斜纹夜蛾 Sl-caspase-3 相似性最高。多重序列比对结果显示 Sf-caspase-3 与多数鳞翅目昆虫 caspase-3 序列具有高度的一致性（图 2）。从 NCBI 数据库中选取具有近 20 种昆虫物种的 caspase-3 氨基酸序列，采用 Clustal W 对所有氨基酸进行比对后采用 MEGAX 软件中的 Neighbor-Joining 法（Bootstrap 法以 Poisson 模型重复构建1 000 次）进行 caspase-3 系统发育树构建。结果如图 3 所示，Sf-caspase-3 与甜菜夜蛾及甘蓝夜蛾等夜蛾科昆虫 caspase-3 亲缘关系较近，与传统上的分类基本一致。

2.3 Sf-caspase-3 蛋白二级结构预测及 3D 结构模拟

采用 SWISS-MODEL 进行同源建模，蛋白氨基酸序列同源比对结果显示 Sf-caspase-3 蛋白与人源 caspase-3（Apopain）蛋白（PDB ID: 1qx3.1.A）氨基酸序列相似度高达 34.75%。以人 caspase-3 三级结构为模板进行 Sf-caspase-3 三级结构预测，定性模型的能量分析（Qualitative Model Energy Analysis，QMEAN）为-5.09，序列覆盖率为 85%。Sf-caspase-3 三级结构预测结果表明其主要由 α 螺旋和 β 折叠组成，中间由 β 转角及无规则卷曲进行连接（图 4）。

2.4 *Sf-caspase-3* 基因在不同发育时期及组织中的表达量分析

RT-qPCR 结果表明草地贪夜蛾 *Sf-caspase-3* 基因在不同龄期均有表达。其中高龄幼虫期表达量最高，而在卵期、初孵幼虫期及蛹期表达量较低（图 5-A）。草地贪夜蛾 6 龄幼虫不同组织基因表达量分析结果表明 *Sf-caspase-3* 在中肠表达量最高，其次是头部，而在表皮、脂肪体及马氏管表达量均极低（图 5-B）。

2.5 Sf-caspase-3 在大肠杆菌中诱导表达及可溶性分析

转化重组质粒 pET32a-*Sf-caspase-3* 的大肠杆菌经 IPTG 诱导后进行 SDS-PAGE 电泳检测。结果表明未加入 IPTG 诱导的样品中没有明显的目标蛋白条带出现，而 IPTG 诱导的样品中出现明显蛋白条带，且大小约为 50 kDa，与预测的蛋白大小基本相符（图 6）。上述结果表明 Sf-caspase-3 能够成功在大肠杆菌进行诱导表达。对上清和沉淀的蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳检测，结果表明上清中目标蛋白条带较淡，而在沉淀中出现明显的目标蛋白带。以上结果表明 Sf-caspase-3 在大肠杆菌表达系统中主要以不可溶的包涵体形式存在（图 6）。

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

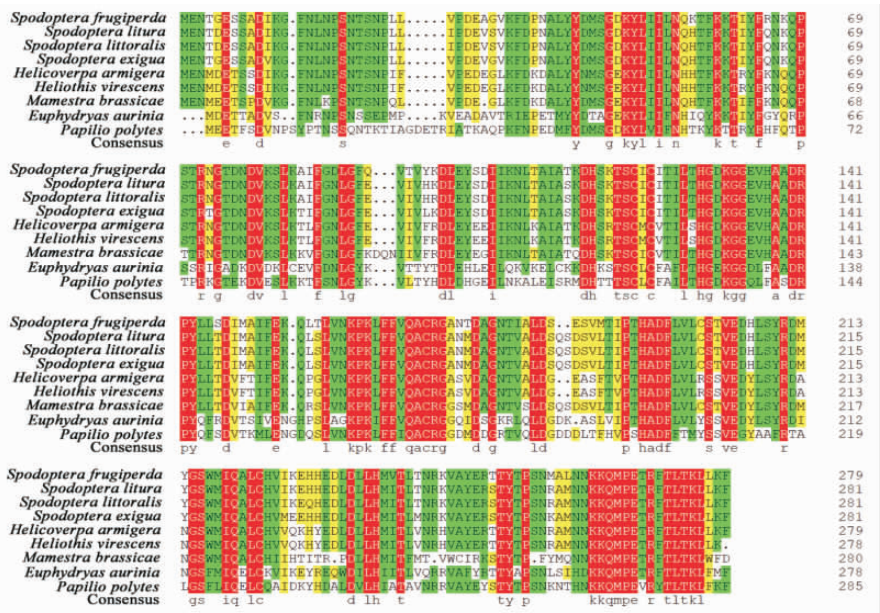


图 2　Sf-caspase-3 与其他鳞翅目昆虫 caspase-3 多重序列比对结果

Fig. 2　A multiple sequence alignment of Sf-caspase-3 together with caspase-3 from other lepidopteran insects

注：红色和绿色部分序列为高度保守区域。用于多重序列比对的其他鳞翅目 caspase-3 GeneBank 登录号如下：Note: The red and green bases in the figure indicate highly conserved regions. GeneBank accession numbers of caspase-3 from different Lepidoptera species were showed as following: 斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*（AFJ04534.1）；海灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis*（AEK20824.1）；甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*（AEK20823.1）；棉铃虫 *Helicoverpa armigera*（AEK20819.1）；烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*（AEK20820.1）；甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae*（AEK20822.1）；金堇蛱蝶 *Euphydryas aurinia*（AEF30499.1）；玉带凤蝶 *Papilio polytes*（XP_013133991.1）。

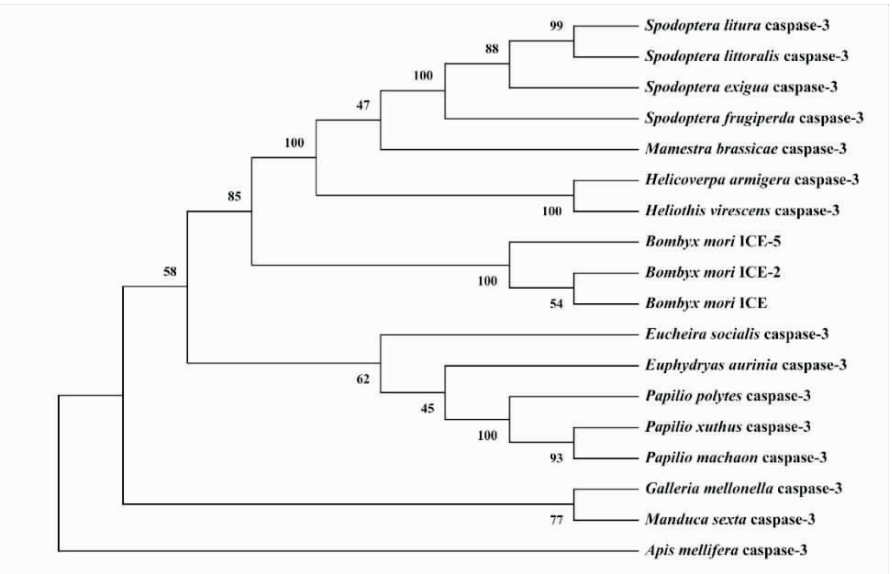


图 3　基于氨基酸序列构建的草地贪夜蛾及其他昆虫 caspase-3 的系统进化树

Fig. 3　Phylogenetic tree based on the amino acid sequences of insect caspase-3

注：用于构建系统进化树的 caspase-3 氨基酸序列包括：Note: The amino acid sequences of Caspase-3 from different insects used for phylogenetic tree construction were listed as following: 斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*（Sl-caspase-3：AFJ04534.1）；海灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis*（Sl-caspase-3：AEK20824.1）；甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*（Se-caspase-3：AEK20823.1）；棉铃虫 *Helicoverpa armigera*（Ha-caspase-3：AEK20819.1）；烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*（Hv-caspase-3：AEK20820.1）；家蚕 *Bombyx mori*（Bm-ICE5：NP_001106741.1；Bm-ICE2：ABC94941.1；Bm-ICE：NP_001037297.1）；甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae*（Mb-caspase-3：AEK20822.1）；粉蝶 *Eucheira socialis*（Es-caspase-3：AEK20817.1）；金堇蛱蝶 *Euphydryas aurinia*（Ea-caspase-3：AEF30499.1）；玉带凤蝶 *Papilio polytes*（Pp-caspase-3：XP_013133991.1）；柑橘凤蝶 *Papilio xuthus*（Px-caspase-3：XP_013181072.1）；金凤蝶 *Papilio machaon*（Pm-caspase-3：XP_014362694.1）；大蜡螟 *Galleria mellonella*（Gm-caspsae-3：AEK20818.1）；烟草天蛾 *Manduca sexta*（Ms-caspase-3：XP_030036027.1）和意大利蜜蜂 and *Apis mellifera*（Am-caspase-3：XP_394855.4）。

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

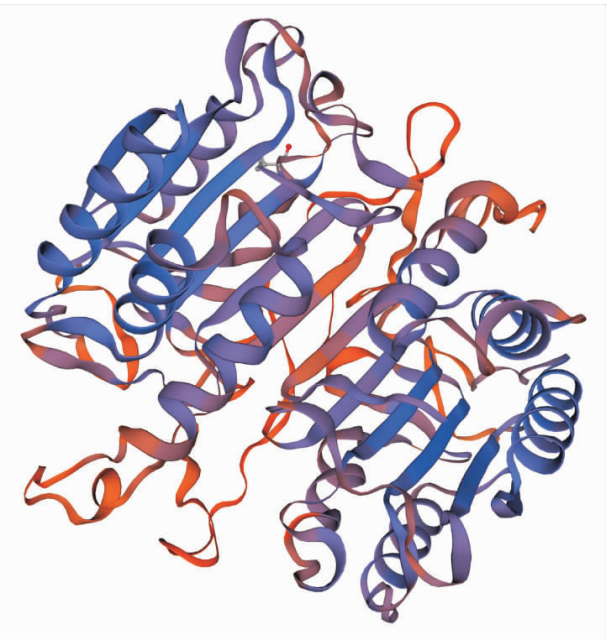


图 4　草地贪夜蛾 Sf-caspase-3 蛋白三级结构预测

Fig. 4　Predicted 3D structure model of *Spodoptera frugiperda* Sf-caspase-3

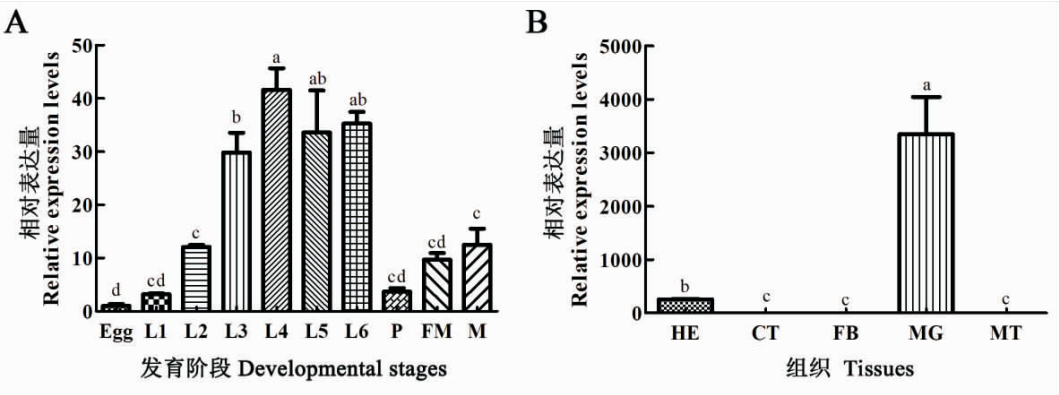


图 5　*Sf-caspase-3* 在草地贪夜蛾不同发育时期及 6 龄幼虫不同组织中 mRNA 水平相对表达量

Fig. 5　Relative expression levels of *Sf-caspase-3* in different developmental stages and different tissues of 6th larvae of *Spodoptera frugiperda*

注：A，*Sf-caspase-3* 在不同发育时期 mRNA 水平相对表达量。Egg，卵；L1，1 龄幼虫；L2，2 龄幼虫；L3，3 龄幼虫；L4，4 龄幼虫；L5，5 龄幼虫；L6，6 龄幼虫；P，蛹；FM，雌成虫；M，雄成虫。B，*Sf-caspase-3* 在 6 龄幼虫不同组织中 mRNA 水平相对表达量。HE，头部；CT，表皮；FB，脂肪体；MG，中肠；MT，马氏管。图中数据为平均值 ± 标准误；3 个生物学重复；柱上标有不同的字母表示差异显著（$P < 0.05$，DMRT 法）。Note: A, Relative expression levels of *Sf-caspase-3* in different developmental stages of *S. frugiperda*. L1, 1st instar larvae; L2, 2nd instar larvae; L3, 3rd instar larvae; L4, 4th instar larvae; L5, 5th instar larvae; L6, 6th instar larvae; P, pupae; FM, female adult; M, male adult. B, mRNA expression levels of *Sf-caspase-3* in different tissues of 6th larvae. HE, head; CT, cuticle; FB, fat body; MG, midgut; MT, malpighian tubules. Data are mean ± SE. Histograms with different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$, Duncan's multiple range test in one way ANOVA).

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

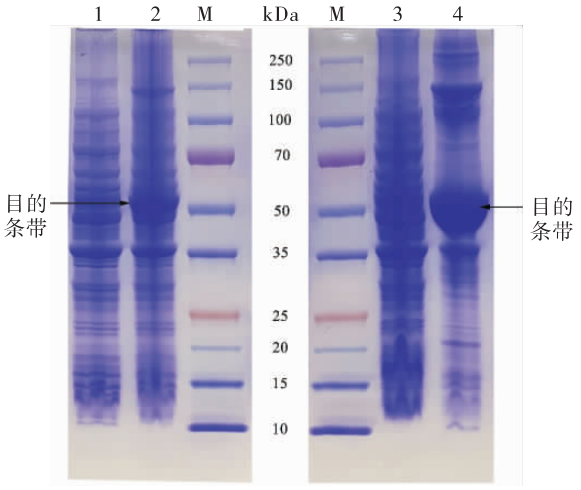


图 6　Sf-caspase-3 在大肠杆菌中诱导表达及可溶性分析

Fig. 6　Expression profiles and soluble analysis of Sf-caspase-3 induced by IPTG in *Escherichia coli*

注：M，蛋白 Marker；泳道 1，未加 IPTG 诱导重组菌株蛋白表达情况；泳道 2，0.4 mmol/L IPTG 诱导 4 h 重组菌株蛋白表达情况；泳道 3，菌体破碎离心后上清蛋白表达情况；泳道 4，菌体破碎离心后沉淀蛋白表达情况。Note: M, Protein Marker; Lane 1, Protein expression profiles of recombinant *E. coli* strain without IPTG induction; Lane 2, Protein expression profiles of recombinant *E. coli* strain induced by 0.4 mmol/L IPTG for 4 h; Lane 3, Protein expression profiles of supernatant solution; Lane 4, Protein expression profiles of bacterial precipitation.

3　结论与讨论

本研究通过转录组数据分析及克隆得到草地贪夜蛾 *Sf-caspase-3* 基因编码区序列；利用生物信息学软件分析 Sf-caspase-3 基本信息；运用荧光定量 PCR 技术对 *Sf-caspase-3* 在草地贪夜蛾不同发育时期及 6 龄幼虫不同组织中转录水平表达量进行分析；构建 Sf-caspase-3 原核表达重组质粒并成功表达 Sf-caspase-3 原核蛋白。本研究为进一步丰富鳞翅目 caspases 基因数据库，深入研究 *Sf-caspase-3* 基因功能及解析鳞翅目昆虫细胞凋亡机制提供一定的理论依据。

细胞凋亡是有机体为维持机体稳态，主动有序地清除不必要细胞的死亡过程。目前在模式生物秀丽小杆线虫 *Caenorhabditis elegans*、黑腹果蝇及哺乳动物中细胞凋亡机制研究比较全面且深入。而鳞翅目昆虫细胞凋亡相关研究相对较少，目前主要集中在两方面：一是研究凋亡刺激后形态学及生理学变化；二是关键凋亡相关基因的功能分析（Shu *et al.*，2019）。Caspases 是执行细胞凋亡过程的主要酶类，所引发的级联反应是细胞凋亡的中心环节。近些年来关于鳞翅目昆虫 caspase 家族基因的研究越来越丰富，目前 Lep-caspase-3 在多种鳞翅目昆虫中均得到鉴定，这对于全面了解 caspases 及解析鳞翅目昆虫细胞凋亡机制具有重要意义（Courtiade *et al.*，2011）。本研究通过转录组数据分析和克隆验证 *Sf-caspase-3* 基因编码区序列。Sf-caspase-3 氨基酸序列分析发现其具有高度保守的五肽序列（QACRG），与 Lep-caspase-3 的五肽序列完全一致。同时 Sf-caspase-3 具有 Lep-caspase-3 的典型蛋白结构：一段短的原结构域，Caspase 家族 p20 亚基和 Caspase 家族 p10 亚基。系统发育树分析结果表明 Sf-caspase-3 与夜蛾科昆虫 caspase-3 亲缘关系最近，进一步证实 caspase-3 进化过程中的保守性。

在鳞翅目昆虫卵-幼虫-蛹-成虫整个发育过程中细胞凋亡扮演着重要的角色，包括参与去除多余细胞及组织降解等（包希艳等，2017；Tettamanti and Casartelli，2019）。本研究通过荧光定量 PCR 技术对不同发育时期 *Sf-caspase-3* 转录水平表达量进行检测。结果表明 *Sf-caspase-3* 在草地贪夜蛾整个发育时期均有表达，其中在 3～6 龄幼虫期表达量最高，在卵及蛹期表达量最低。而鳞翅目昆虫虫态转变时一般凋亡发生比较严重，caspases 表达量较其他时期高。例如二化螟 *Cs-caspase-1* 和家蚕 *BmDronc* 在老熟幼虫和蛹期表达量最高（Lu *et al.*，2013；Zhang *et al.*，2013）。本研究结果与前期研究结果有所差别。导致出现这种结果的原因可能有两个：一是 Sf-caspase-3 在草地贪夜蛾细胞凋亡中的作用并不突出，并不是主要的 caspase 酶类参与细胞凋亡；而 Sf-caspase-1 可能作为主要的执行 caspase 参与变态发育过程中细胞凋亡事件的完成。二是 Sf-caspase-3 可能存在其他非凋亡执行功能参与草地贪夜蛾的生长发育过程，具体的功能有待进一步研究。此外，6 龄幼虫不同组织中 *Sf-caspase-3* 转录水平表达量分析表明其在中肠中表达量最高，而在表皮、脂肪体及马氏管中表达量极低。推测 Sf-caspase-3 在草地贪夜蛾中肠组织特异高表达可能与中肠组织对食物的响应有关，具体的功能有待进一步研究。

此外，本研究构建 Sf-caspase-3 原核表达重组质粒；并于大肠杆菌 BL21（DE3）菌株成功诱导

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表达 Sf-caspase-3 原核蛋白。蛋白可溶性分析发现 Sf-caspase-3 原核蛋白在本研究实验条件下主要以包涵体形成存在。后续进行蛋白诱导表达时需要考虑调整 IPTG 浓度、降低诱导温度及转速等条件增加可溶性蛋白含量，保证蛋白纯化的成功率。

参考文献（References）

Bao X, Chen P, Liu T, *et al.* Advances in apoptosis-related genes in the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2017, 60 (4): 487-498. [包希艳, 陈鹏, 刘太行, 等. 家蚕凋亡相关基因研究进展 [J]. 昆虫学报, 2017, 60 (4): 487－498]

Courtiade J, Pauchet Y, Vogel H, *et al.* A comprehensive characterization of the caspase gene family in insects from the order Lepidoptera [J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 357.

Guo JF, He KL, Wang ZY. Biological characteristics, trend of fall armyworm *Spodoptera frugiperda*, and the strategy for management of the pest [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2019, 56 (3): 361－369. [郭井菲, 何康来, 王振营. 草地贪夜蛾的生物学特性、发展趋势及防控对策 [J]. 应用昆虫学报, 2019, 56 (3): 361－369]

Kang Y, Neuman SD, Bashirullah A. Tango7 regulates cortical activity of caspases during reaper－triggered changes in tissue elasticity [J]. *Nature Communications*, 2017, 8 (1): 603.

Khoa DB, Takeda M. Expression analysis of inhibitor of apoptosis and related caspases in the midgut and silk gland of the greater wax moth, *Galleria mellonella*, during metamorphosis and under starvation [J]. *Gene*, 2012, 510 (2): 133－141.

Li XX, Zhang K, Deng YK, *et al.* Effects of ^{60}Co-γ radiation on testis physiological aspects of *Plutella xylostella* (Linnaeus) [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 169: 937－943.

Lu MX, Du YZ, Cao SS, *et al.* Molecular cloning and characterization of the first caspase in the striped stem borer, *Chilo suppressalis* [J]. *International Journal of Molecular Science*, 2013, 14 (5): 10229－10241.

Ramzi S, Sahragard A, Sendi JJ, *et al.* Effect of *Citrullus colocynthis* L. (Cucurbitaceae) agglutinin on gene expression of caspases in *Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) [J]. *Journal of Entomological and Acarological Research*, 2016, 48: 5699.

Shu B, Zhang J, Cui G, *et al.* Azadirachtin affects the growth of *Spodoptera litura* Fabricius by inducing apoptosis in larval midgut [J]. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 137.

Shu B, Zhang J, Sethuraman V, *et al.* Transcriptome analysis of *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells reveals putative apoptosis-related genes and a preliminary apoptosis mechanism induced by azadirachtin [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7 (1): 13231.

Shu B, Zhang J, Zeng J, Cui G, *et al.* Stability of selected reference genes in Sf9 cells treated with extrinsic apoptotic agents [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9 (1): 14147.

Tettamanti G, Casartelli M. Cell death during complete metamorphosis [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 2019, 374 (1783): 20190065.

Wang L, Chen KW, Zhong GH, *et al.* Progress for occurrence and management and the strategy of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Smith) [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2019, 41 (3): 479－487. [王磊, 陈科伟, 钟国华, 等. 重大入侵害虫草地贪夜蛾发生危害、防控研究进展及防控策略探讨 [J]. 环境昆虫学报, 2019, 41 (3): 479－487]

Wang XR, Wang C, Wang XW, *et al.* The functions of caspase in whitefly *Bemisia tabaci* apoptosis in response to ultraviolet irradiation [J]. *Insect Molecular Biology*, 2018, 27 (6): 739－751.

Wu Q, Jiang Y, Hu G, *et al.* Analysis on spring and summer migration routes of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) from tropical and southern subtropical zones of China [J]. *Plant Protection*, 2019, 45 (3): 1－9. [吴秋琳, 姜玉英, 胡高, 等. 中国热带和南亚热带地区草地贪夜蛾春夏两季迁飞轨迹的分析 [J]. 植物保护, 2019, 45 (3): 1－9]

Yu H, Li ZQ, Ou-Yang YY, *et al.* Identification of four caspase genes from *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) and their regulations toward different apoptotic stimulations [J]. *Insect Science*, 2019, doi: 10.1111/1744－7917.12741.

Yuan S, Akey CW. Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation [J]. *Structure*, 2013, 21 (4): 501－515.

Zhang J, Zhang Z, Shu B, *et al.* Cytotoxic and apoptotic activity of the novel harmine derivative ZC-14 in Sf9 cells [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19 (3): E811.

Zhang JY, Xu W, Pan C, *et al.* Cloning and characterization of the caspase family member BmDronc from *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) embryo cells [J]. *Annals of the Entomological Society of America*, 2013, 106 (2): 265－272.

Zhao RJ, Li YQ, Wang H, *et al.* The relationship of caspase family and apoptosis [J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2010, 46 (17): 73－78. [赵瑞杰, 李引乾, 王会, 等. Caspase 家族与细胞凋亡的关系 [J]. 中国畜牧杂志, 2010, 46 (17): 73－78]

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net