环境昆虫学报 2020，42（6）：1424－1431
Journal of Environmental Entomology
http：//hjkcxb. alljournals. net
doi：10. 3969/j. issn. 1674－0858. 2020. 06. 17

罗生慧，随慧，包静，麦麦提艾力·阿卜杜纳斯尔，白雪莹，吕国会，刘小宁．棉铃虫Ⅰ型和Ⅶ型几丁质酶基因表达规律的比较分析［J］．环境昆虫学报，2020，42（6）：1424－1431.

棉铃虫Ⅰ型和Ⅶ型几丁质酶基因表达规律的比较分析

罗生慧，随　慧*，包　静，麦麦提艾力·阿卜杜纳斯尔，
白雪莹，吕国会，刘小宁**
（新疆大学生命科学与技术学院，新疆生物资源基因工程重点实验室，乌鲁木齐 830046）

摘要：几丁质酶（chitinase，CHT）在昆虫生长发育过程中主要有降解围食膜、外骨骼、角质层以及肠道内层的几丁质成分，从而参与昆虫的蜕皮和细胞增殖的功能。在本研究中，分析比较了棉铃虫Ⅰ型和Ⅶ型几丁质酶HaCHTⅠ、HaCHTⅦ的结构域及其时空表达特性，对进一步功能研究提供重要的素材。首先利用生物信息学在线工具SMART对本课题组前期所获得的几丁质酶基因 *HaCHT I*、*HaCHT VII* 的结构域进行分析；之后采用qRT-PCR方法研究棉铃虫6龄幼虫不同组织和幼虫不同龄期蜕皮前后的中肠中 *HaCHT I*、*HaCHT VII* 的时空表达特性。结果表明：对几丁质酶HaCHTⅠ、HaCHTⅦ结构域进行分析，发现HaCHTⅠ和HaCHTⅦ均具有信号肽序列、催化区域、连接区域，且HaCHTⅠ有一个几丁质结合结构域，而HaCHTⅦ则无；棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 几丁质酶基因 *HaCHT I* 和 *HaCHT VII* 在6龄幼虫不同组织部位的均有表达，其中 *HaCHT I* 在各个部位的表达量没有显著的差异，而 *HaCHT VII* 在头壳和体壁中表达显著高于其它组织；几丁质酶基因 *HaCHT I*、*HaCHT VII* 在棉铃虫幼虫蜕皮前后中肠的表达量变化较大，其中 *HaCHT I* 在3龄、4龄、5龄、6龄末期及蛹期时的表达量呈递减的趋势，在4龄、5龄、6龄初期时表达量则是先减后增的趋势，而 *HaCHT VII* 在3龄、4龄、5龄、6龄末期及蛹期时的表达量呈递增的趋势，恰与同一时期 *HaCHT I* 的表达量相反，在4龄、5龄、6龄初期时 *HaCHT VII* 的表达量呈递减的趋势。棉铃虫HaCHTⅠ和HaCHTⅦ的结构域和时空表达都存在差异，据此可推测这些差异可能对其功能具有一定的影响。研究结果为深入研究几丁质酶基因 *HaCHT I* 和 *HaCHT VII* 的功能奠定了基础。

关键词：棉铃虫；Ⅰ型几丁质酶；Ⅶ型几丁质酶；比较分析
中图分类号：Q968.1；S433　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1674－0858（2020）06－1424－08

Comparative analysis of expression regularity of chitinase genes *HaCHT I* and *HaCHT VII* in *Helicoverpa armigera*

LUO Sheng-Hui，SUI Hui*，BAO Jing，Maimaitiaili Abudunasier，BAI Xue-Ying，LV Guo-Hui，LIU Xiao-Ning**（Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering，College of Life Science and Technology University，Urumqi 830046，China）

Abstract：Chitinase（CHT）mainly degrades chitin in peritrophic membrane，exoskeleton，cuticle，inner intestinal layer and participates in insect molting and cell proliferation during insect growth and development. In this study，we analyzed and compared the structural domains and spatiotemporal expression characteristics of two types of chitinases of *H. armigera HaCHT I* and *HaCHT VII*，providing important materials for further study of their functions. First，both domains and spatio-temporal expression

基金项目：国家自然基金（31972279）；新疆大学大学生实训项目（201810755013）；新疆维吾尔自治区2017年天山雪松计（2017xs20）
作者简介：罗生慧，女，在读硕士研究生，研究方向为生物化学与分子生物学，E－mail：995222708@qq.com
* 共同第一作者：随慧，女，本科生，E－mail：1461480580@qq.com
** 通讯作者 Author for correspondence：刘小宁，女，博士，教授，主要研究方向为农业昆虫与害虫防治，E－mail：liuxn0103@sina.com
收稿日期 Received：2019－11－25；接受日期 Accepted：2020－04－14

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

of chitinase *HaCHT I* and *HaCHT VII* were analyzed by SMART, an online tool of bioinformatics, and qRT-PCR. The results showed that both HaCHTⅠ and HaCHTⅦ had signal peptide sequence, catalytic domain (CAD) and linker region, and HaCHTⅠ had a chitin-binding domain (CBD), but HaCHTⅦ had no CBD. The results of qRT-PCR showed that the two chitinase genes were expressed in different tissues of the 6th instar larvae of *H. armigera*. The expression of *HaCHT I* in different tissues was no significantly difference, but the expression of *HaCHT VII* in the head capsule and integument was significantly higher than that in other tissue. The expression of chitinase genes *HaCHT I* and *HaCHT VII* in the midgut of *H. armigera* larvae before and after molting are varied greatly. The expression of *HaCHT I* decreased gradually at the end of 3rd, 4th, 5th, 6th instar larvae and pupal stage, and decreased firstly and then increased at the early stage of 4th, 5th and 6th instar larvae. On the contrary, the expression of *HaCHT VII* increased gradually at the end of 3rd, 4th, 5th, 6th instar larvae and pupal stage, and decreased gradually at the early stage of 4th, 5th and 6th instar larvae. Both domains and spatio-temporal expression characteristics between *HaCHT I* and *HaCHT VII* from *H. armigera* have obvious differences, which indicated that might affect the function of HaCHTⅠ and HaCHTⅦ. The results will lay a foundation for the further study of *HaCHT I* and *HaCHT VII* function.

Key word: *Helicoverpa armigera*; HaCHTⅠ; HaCHTⅦ; comparative analysis

棉铃虫是主要的农业害虫之一，是棉花蕾铃期的主要害虫，对其它农作物也具有巨大的危害性。因其具有广泛寄主范围以及转移危害的习性，对农业经济造成巨大的损失。化学杀虫剂因为使用方便、作用快速而被作为主要控制害虫的方法，但长期使用化学药物导致抗药性增加（Aktar *et al.*，2009）。因此，需要寻找一种环境友好型的害虫防治方法。研究发现，几丁质是构成昆虫角质层、表皮、肠道及围食膜的主要成分，而高等动植物体内不存在几丁质，因此，可以通过几丁质降解酶来破坏棉铃虫中几丁质的代谢平衡，从而可以达到绿色防治棉铃虫的目的。

几丁质（Chitin）是昆虫外骨骼角质层、围食膜、头壳、体壁等部位的主要成分，用以保护昆虫并维持昆虫的体型，还可以限制昆虫的生长。几丁质是在昆虫内表皮和外表皮或在新分泌的、非硬化的前表皮中发现的，且在昆虫的整个生命过程中几丁质的降解与合成是一直存在的（Lehane，1997；张严峻等，2000；相静波，2004；张八生，2007；Hegedus *et al.*，2009）。在昆虫的整个生命周期中，昆虫必须降解旧的角质层同时合成新角质（Hata *et al.*，1996；Merzendorfer and Zimoch，2003；Muthukrishnan *et al.*，2012），即蜕皮现象（Nijhout *et al.*，1981）。而昆虫的蜕皮过程是由几丁质酶（chitinase）和β-N-乙酰葡糖胺糖苷酶（β-N-acetyglucosaminidase）协同完成的（Fukamizo *et al.*，1985）。

几丁质酶（chitinase，CHT）是昆虫生长发育的各个阶段起着至关重要的作用，在蜕皮、围食膜的降解以及消化等重要生理过程（Shi *et al.*，2004；Zhu *et al.*，2008；Arakane *et al.*，2010；Jasrapuria *et al.*，2010；Qu *et al.*，2014）均与几丁质酶息息相关。几丁质酶是一类具生物催化活性的水解酶，能特异性水解成形的几丁质。随着生物技术及生物信息学的不断发展，通过对昆虫几丁质酶及其类似蛋白的催化域进行系统发育分析，可将昆虫几丁质酶划分为十个（Ⅰ-Ⅹ）类型（group）（Arakane *et al.*，2003；Zhang *et al.*，2011；夏梦，2015；Liu *et al.*，2018），每个类型几丁质酶在昆虫发育过程中执行不同的生理功能，其中II型几丁质酶包括4～5个催化域和4～7个CBD区主要与蜕皮发育相关（李大琪等，2011）；III型几丁质酶包含2个催化域和一个CBD区，在N端含有一个跨膜结构域，属于膜结合蛋白，参与昆虫蛹化后腹部的收缩和翅的伸展（范晓军等，2013）；IV型几丁质酶主要由一个信号肽和一个催化域组成，大部分缺失CBD区，参与围食膜的降解与更新，抵抗含有几丁质的有害病原菌，对昆虫起免疫保护作用（Khajuria *et al.*，2010）；V型几丁质酶包含一个信号肽和一个催化域，但缺乏CBD区，可作为生长因子，来增强细胞的增值能力（Zhu *et al.*，2008）；VI型几丁质酶分子量较大，在C端有一个较长的富含Ser/Thr的高度糖基化无规则卷曲，可用来保护相似结构的几丁质酶

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

不被降解（Yasuyuki and Subbaratnam，2010）。本文主要对Ⅰ型几丁质酶和Ⅶ型几丁质酶的结构和不同时空表达规律进行了研究。Ⅰ型几丁质酶（通常CHT5属于Ⅰ型几丁质酶）主要参与昆虫蜕皮过程中旧表皮的消化，目前已经在鳞翅目、双翅目、鞘翅目、半翅目和直翅目昆虫中进行研究。Ⅰ型几丁质酶基因在昆虫表皮中的表达量最大（仙笑笑等，2012），该类酶的结构域含有N-末端信号肽、催化域（catalic domain，CAD）、连接区（linker）以及C-末端的几丁质结合结构域（chitinase binding domain，CBD）（张常，2014），CBD会增强酶对几丁质的亲和能力（夏梦，2015）。研究发现，当Ⅰ型几丁质酶被RNAi沉默时，会导致蜕皮失败，甚至使昆虫死亡，这表明Ⅰ型几丁质酶在蜕皮过程中参与新旧角质层的更新（Noh *et al.*，2018）。对于昆虫赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 而言，Ⅰ型几丁质酶不正常的表达将导致其不能成功的从幼虫变为蛹，表明Ⅰ型几丁质酶对外骨骼或围食膜几丁质的降解有重要作用（Zhang *et al.*，2012；张常，2014；Noh *et al.*，2018）。Ⅶ型几丁质酶包含一个信号肽和单一的CAD，没有CBD，该类几丁质酶的功能尚不明确，有待进一步研究（Liu *et al.*，2018）。

昆虫几丁质酶作为分解昆虫体壁、中肠、围食膜等组织中几丁质的重要水解酶，在昆虫的消化、变态等生理活动中发挥着至关重要的作用，几丁质酶的过量或缺失都可影响到昆虫的正常发育。在本课题组前期的研究中发现HaCHT Ⅰ可以降解胶体几丁质，而HaCHT Ⅶ对胶体几丁质则没有降解活性，但其可将寡聚糖降解成单糖，本研究以此为基础对棉铃虫Ⅰ型和Ⅶ型几丁质酶的结构域及其基因表达规律进行了比较分析。为其功能的进一步探究奠定基础，也为棉铃虫生物防治提供有利信息。

1 材料与方法

1.1 材料实验昆虫

棉铃虫是由新疆生物资源基因工程重点实验室饲养，饲养条件：温度26 ± 2℃，RH65% ± 5%，光周期16 h∶8 h。

1.2 实验材料与试剂

RNA提取试剂盒（Trans Zol Up Plus RNA Kit）购于北京全式金公司；Real master mix SYBR green PCR试剂盒购买于invitrogen公司；Taq DNA聚合酶购自大连TaKaRa公司；其余化学试剂均为国产分析纯试剂；引物合成及测序均由上海生工完成。

1.3 结构域分析

通过利用在线工具SMART（http://smart.embl-heidelberg.de/）预测对本课题组前期克隆获得的棉铃虫的Ⅰ型和Ⅶ型几丁质酶HaCHTⅠ、HaCHTⅦ的蛋白结构域，并标注信号肽、催化结构域、几丁质酶保守区以及几丁质结合结构域。

1.4 棉铃虫总RNA的提取及cDNA第一链的合成

为研究 *HaCHT Ⅰ* 和 *HaCHT Ⅶ* 在棉铃虫生长发育过程的蜕皮阶段的表达规律，本研究收集了棉铃虫不同发育阶段蜕皮前后的中肠组织，同时收集了棉铃虫6龄幼虫的头壳、前肠、中肠、后肠、脂肪体、体壁，收集的所有组织均在－80℃冰箱保存备用。按照制造商的说明提取总RNA，将1 μg的总RNA合成为cDNA：首先，将Oligo d(T)$_{18}$引物加入到总RNA中，并在70℃下温育10 min，后在冰上快速冷却5 min。然后加入MLV逆转录酶，在42℃孵育1 h，72℃孵育15 min。最后将反转录cDNA产物在冰上冷却并储存在－80℃以进行qRT-PCR。

1.5 棉铃虫 *HaCHT Ⅰ* 和 *HaCHT Ⅶ* 在不同发育阶段蜕皮前后和不同组织中的表达量

根据引物设计原则，运用DNAMAN 6.0软件和primer 5.0软件设计了引物，*HaCHT Ⅰ*（GenBank accession number：AAQ91786.1）的正向引物：5′-ATGA GAGTGATACTAGCGACGTTGGC-3′；反向引物：5′-CTAAGGCGTCCTGTTCATGAGC CGG-3′。*HaCHT Ⅶ*（GenBank accession number：XP_021180780.1）正向引物：5′-ATGAAAGTTTTA AGTTTATTCTTTGTT-3′；反向引物：5′-CTACAA ATTCAACACAAAAGCTACAGAC-3′。

qRT-PCR反应体系：10 μL 2 × SYBR Green PCR Master Mix；1 μL ROX荧光染料；0.02 μL Yellow；上下游引物各0.5 μL（1 mmol/L）；1 μL cDNA；ddH_2O补充至20 μL。qRT-PCR循环参数包括95℃ 10 min，40个循环，每个循环包括95℃ 20 s，59℃ 30 s和72℃ 45 s，然后95℃ 15 s和60℃ 1 min。在每次qRT-PCR结束时，产生融解曲线以检测引物二聚体的形成。通过使用 *tubulin* 基因作为内参进行qRT-PCR的相对表达分析。qRT-PCR分析使用3个生物重复和2技术重复。根据

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

$2^{-\triangle\triangle Ct}$进行计算表达量。数据用 SPSS（IBM SPSS Statistic 19）软件进行统计学分析，不同组织表达量进行单因素方差分析，蜕皮前后的表达量进行成组数据的 T－检验。

2　结果与分析

2.1　HaCHT Ⅰ和 HaCHTⅦ结构域的比较

本研究通过利用在线工具 SMART（http://smart.embl-heidelberg.de/）预测 HaCHT Ⅰ和 HaCHT Ⅶ的信号肽序列、催化区域、连接区域和几丁质结合结构域（图 1）。分析表明，HaCHT Ⅰ包括 4 个区域：N-末端信号肽、一个催化域、连接区以及 C-末端几丁质结合结构域，而 HaCHTⅦ仅含有一个 N-末端信号肽、一个催化域和一个连接区。

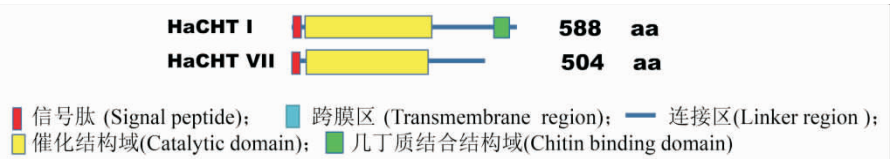

图 1　HaCHT Ⅰ和 HaCHTⅦ结构域的比较

Fig. 1　Domain comparison between HaCHT Ⅰ and HaCHTⅦ

2.2　*HaCHT I* 和 *HaCHT VII* 在棉铃虫不同组织的表达分析

运用 qRT-PCR 检测 *HaCHT I* 在棉铃虫不同组织的表达量，如图 2-A 结果显示 *HaCHTI* 在棉铃虫的所有组织部位均有表达，但在统计学上没有显著差异（$P>0.05$）。图 2-B 结果显示的是 *HaCHT VII* 在棉铃虫不同组织的表达量，*HaCHT VII* 在棉铃虫所有组织部位也均有表达，其中在头壳和体壁中的表达量显著高于前肠、中肠、后肠和脂肪体（$P<0.05$）；脂肪体中表达量显著高于前肠、中肠、后肠（$P<0.05$）；前肠、中肠、后肠中没有显著性差异（$P>0.05$）。

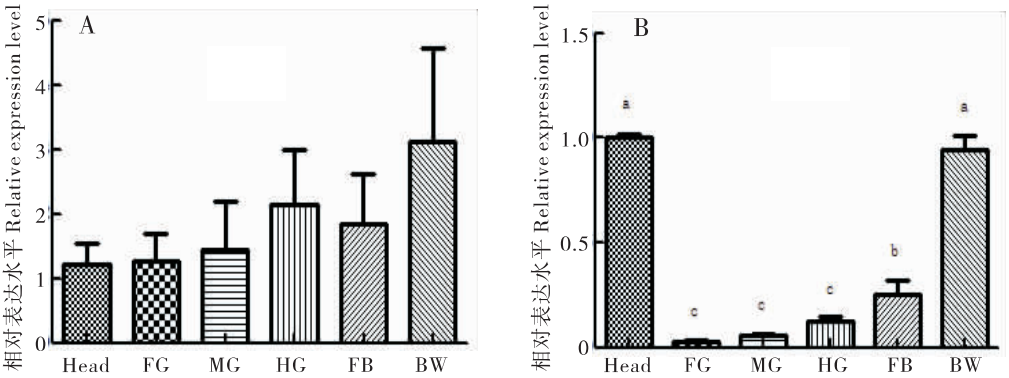

图 2　*HaCHT I* 和 *HaCHT VII* 在棉铃虫不同组织的表达量

Fig. 2　Relative expression level of *HaCHT I* and *HaCHT VII* in different tissue of *Helicoverpa armigera*

注：Head，头壳；FG，前肠；MG，中肠；HG，后肠；FB，脂肪体；BW，体壁。A，*HaCHTI* 在不同组织中的表达量；B，*HaCHT VII* 在不同组织中的表达量，qRT-PCR 进行 3 个生物学重复，2 个技术重复，数据使用单因素方差分析。

Note: Head; FG, Foregut; MG, Midgut; HG, Hindgut; FB, Fat Bady; BW, Bady Wall. A, Expression amount of *HaCHT I* in different tissue; B, Expression amount of *HaCHT VII* in different tissue. Three biological replications and two technical replications were performed by qRT-PCR, and the data were analyzed by one-way ANOVA.

2.3　*HaCHT I* 和 *HaCHT VII*在棉铃虫幼虫蜕皮前后中肠中的表达分析

运用 qRT-PCR 检测 *HaCHT I* 和 *HaCHT VII* 基因在棉铃虫幼虫不同组织的表达量，结果表明 *HaCHT I* 和 *HaCHT VII* 基因在棉铃虫幼虫 3 龄末至预蛹阶段在中肠中均有表达。3 龄末期 *HaCHT I* 表达量显著高于 4 龄末期（$P<0.05$），4 龄末期 *HaCHT I* 表达量显著高于 5 龄、6 龄末期及蛹期

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

($P<0.05$)，5 龄、6 龄末期及蛹期没有显著性差异（$P>0.05$），总体分析 *HaCHT I* 在 3 龄、4 龄、5 龄、6 龄末期及蛹期时的表达量呈递减的趋势（图 3-A）；4 龄、6 龄初期 *HaCHT I* 基因的表达量均显著高于 5 龄初期（$P<0.05$），总体分析 *HaCHT I* 基因的表达量在 4 龄、5 龄、6 龄初期时呈先减后增的趋势（图 3-B）。而同一时期 *HaCHT VII* 和 *HaCHT I* 基因的表达量几乎成相反关系。在 3 龄、4 龄末期时 *HaCHT*Ⅶ的表达量没有显著性差异，但均显著低于 5 龄末期（$P<0.05$），5 龄末期 *HaCHT VII* 表达量又显著低于 6 龄末期与蛹期（$P<0.05$），6 龄末期与蛹期没有显著性差异，总体分析 *HaCHT VII* 在 3 龄、4 龄、5 龄、6 龄末期及蛹期时的表达量呈递增的趋势（图 3-C）。4 龄、5 龄初期 *HaCHT VII* 的表达量无显著差异（$P>0.05$），但显著高于 6 龄初期（$P<0.05$），总体分析 *HaCHT VII* 的表达量呈递减的趋势，与 *HaCHT I* 在不同龄期的初期表达量模式不同（图 3-D）。

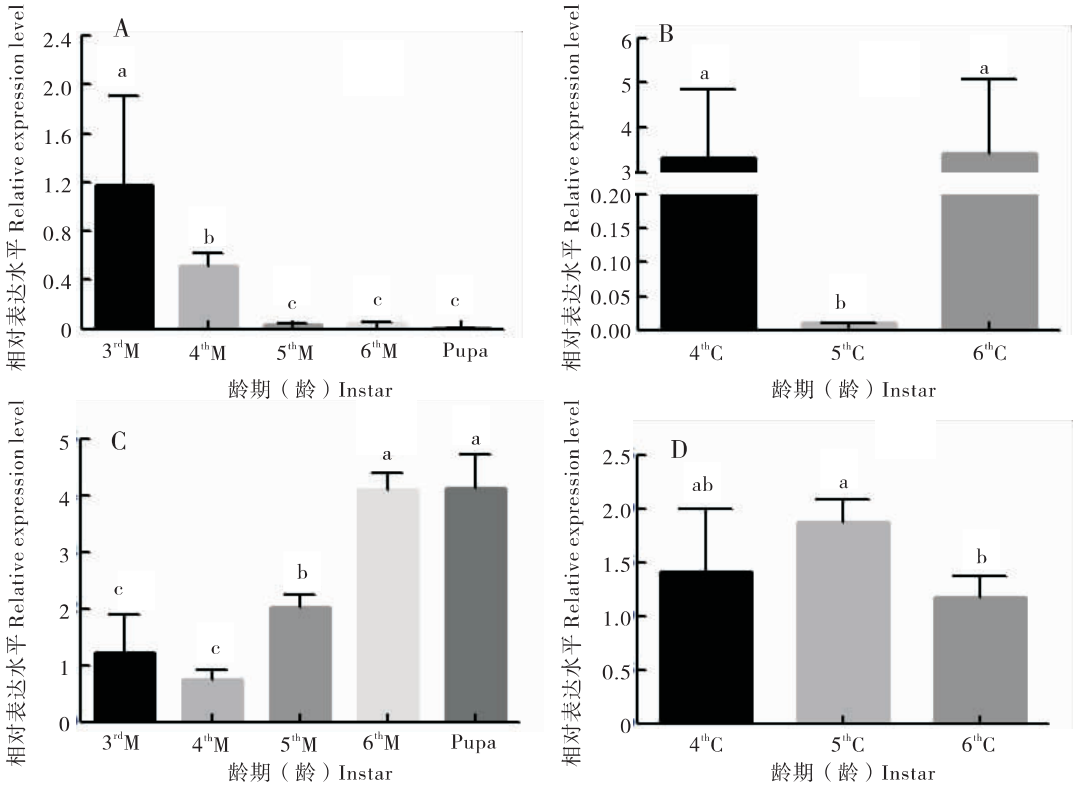

图 3 *HaCHT I* 和 *HaCHT VII* 在棉铃虫幼虫发育阶段的表达量

Fig. 3 Expression of *HaCHT I* and *HaCHT VII* in the developmental stage of *Helicoverpa armigera* larvae

注：3^{rd}M，3 龄末期；4^{th}M，4 龄末期；5^{th}M，5 龄末期；6^{th}M，6 龄末期；Pupa，蛹期；4^{th}C，4 龄初期；5^{th}C，5 龄初期；6^{th}C，6 龄初期。A，*HaCHT I* 在幼虫 3 龄、4 龄、5 龄、6 龄末期以及蛹期的表达量；B，*HaCHT I* 在幼虫 4 龄、5 龄、6 龄初期表达量；C，*HaCHT VII* 在幼虫 3 龄、4 龄、5 龄、6 龄末期以及蛹期的表达量；D，*HaCHT VII* 在幼虫 4 龄、5 龄、6 龄初期的表达量。qRT－PCR 进行 3 个生物学重复，2 个技术重复，数据使用单因素方差分析。

Note: 3^{rd}M, 3 inster telephase; 4^{th}M, 4 inster telephase; 5^{th}M, 5 inster telephase; 6^{th}M, 6 inster telephase; Pupa, Pupa stage; 3^{rd}C, 3 inster initial; 4^{th}C, 4 inster initial; 5^{th}C, 5 inster initial; 6^{th}C, 6 inster initial. A, Expression amount of *HaCHT I* at the end of the 3rd, 4th, 5th and 6th instar and the pupal stage of *H. armigera*; B, Expression amount of *HaCHT I* at the beginning of the 4th, 5th and 6th instar of *H. armigera*; C, Expression amount of *HaCHT VII* at the end of the 3rd, 4th, 5th and 6th instar and the pupal stage of *H. armigera*; D, Expression amount of *HaCHT VII* at the beginning of the 4th, 5th and 6th instar of *H. armigera*. Three biological replications and two technical replications were performed by qRT－PCR, and the data were analyzed by one－way ANOVA.

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

3　结论与讨论

在昆虫的生长发育过程中，由几丁质组成的外骨骼及中肠的围食膜限制了体内器官的生长，因此，昆虫在生长发育过程中会出现蜕皮现象（Riddiford *et al.*，2016）。在昆虫蜕皮过程中，几丁质酶负责消化围食膜和外骨骼中的几丁质。昆虫几丁质酶是数量庞大且结构多样化的酶家族（Merzendorfer and Zimoch，2003）。近年来，由于其在几丁质代谢中的重要生化功能而倍受关注。几丁质酶是一种内切酶，可降解几丁质为几丁寡糖。随着生物信息学的不断发展，通过对昆虫几丁质酶及其类似蛋白的催化域进行系统发育分析，可将昆虫几丁质酶至少划分为 10 种类型（Arakane *et al.*，2003；Zhang *et al.*，2011；夏梦，2015；Liu *et al.*，2018），每种类型具有各自的结构，其中有些几丁质酶具有一个共同的结构域，即几丁质结合结构域（CBD 区）。CBD 是昆虫几丁质酶的一个重要结构，具有 6 个保守的半胱氨酸，可能形成了 3 个二硫键（Sinu *et al.*，2010）。其中 CBD 结构域可增强几丁质酶与不溶性底物之间的亲和性，所以含有 CBD 结构域的几丁质酶可能对降解多聚几丁质比降解几丁寡糖更加有效（Yasuyuki *et al.*，2003）。

本研究对棉铃虫几丁质酶 HaCHTⅠ和 HaCHTⅦ以及前期所获得的 HaCHTⅣ的结构域进行比较，发现 HaCHTⅠ和 HaCHTⅣ在结构上都具有 CBD 区，而 HaCHTⅦ则没有 CBD 区。本课题组前期对 HaCHTⅠ和 HaCHTⅣ的底物探索发现，两者均具有降解胶体几丁质的作用（古新蓉等，2019；麦麦提艾力等，2019）。在几丁质酶降解几丁质的过程中，几丁质酶的 CBD 就会锚定胶体几丁质，增加对底物的亲和能力（Zhu *et al.*，2008）。当几丁质酶没有 CBD 结构域时，也可降解几丁质，但是其活性很低（Genta *et al.*，2009）。赤拟谷盗体内，异常表达的Ⅰ型几丁质酶则会导致昆虫无法顺利的从幼虫蜕变为蛹，说明Ⅰ型几丁质酶在参与角质层几丁质降解或围食膜的更换中起重要作用。大多数Ⅳ型几丁质酶在中肠或脂肪体中表达，还有少数Ⅳ型几丁质酶具有特异的表达时期（Zhu *et al.*，2008），Ⅳ型几丁质酶的结构域组成以及表达方式的特殊，说明其对昆虫具有十分重要的生理功能。有相关研究报道，当沉默欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis* 体内的Ⅳ型几丁质酶（OnCHT）时，其中肠围食膜的孔径变小而且对食物的消化速率有明显的下降，最终会影响昆虫的生长发育，甚至会抑制昆虫的生长（Khajuria *et al.*，2010）。本文推测 HaCHTⅠ和 HaCHTⅣ可能对围食膜均有影响，这可能与它们有相同的 CBD 有关。HaCHTⅦ对胶体几丁质就没有几丁质降解活性，却能将壳二糖降解成单糖（麦麦提艾力等，2019），分析可能与其没有 CBD 有关，这就为 HaCHTⅦ在棉铃虫体内起到将寡聚糖降解为单糖（N-乙酰基葡糖糖）提供了有力的证据，并为新几丁质的合成提供起始底物，参与昆虫的生长发育过程。为此本研究采用 qRT-PCR 方法对棉铃虫几丁质酶基因 *HaCHT I* 在棉铃虫不同组织及幼虫中的时空表达特性进行分析，发现 *HaCHT I* 在棉铃虫的各个组织中均高表达，在整个发育过程中均有一个基础水平的表达，表明 HaCHTⅠ在棉铃虫的生长发育阶段的蜕皮过程中起着至关重要的作用，在蜕皮前后的表达量变化很大，尤其是 4 龄和 6 龄蜕皮后的表达量很高，有可能此期发挥着更重的作用。据相关报道显示赤拟谷盗的Ⅰ型几丁质酶基因 *TcCHT5* 在幼虫－成虫蜕皮过程中高表达（Zhu *et al.*，2008），但桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 中Ⅰ型几丁质酶基因 *BdCHT5* 在幼虫－蛹和蛹－成虫阶段均有高表达，推测 BdCHT5 在幼虫－蛹和蛹－成虫变态过程中调控几丁质的降解（Liu *et al.*，2018）；家蚕 *Bombyx mori* 的Ⅰ型几丁质酶 *BmCHT5* 在 3 龄幼虫蜕皮前开始高表达，并且在蜕皮过程以及蜕皮后也高表达，蜕皮 12 h 后开始消失（Kim *et al.*，1998），后期研究发现，*BmCHT5* 在 5 龄幼虫蜕皮前后以及化蛹期间表达较高，推测 *BmCHT5* 主要在该阶段参与昆虫的蜕皮（Zhang *et al.*，2016）；美国白蛾 *Hyphantria cunea* 的Ⅰ型几丁质酶基因 *HcCHT5* 在 4 龄幼虫蜕皮前（60 h）开始高表达，并在蜕皮过程以及蜕皮后也高表达，蜕皮12 h 后开始降低（Kim *et al.*，1998）。棉铃虫、赤拟谷盗、家蚕、美国白蛾均是全变态昆虫，综合分析可以得出，*HaCHT I* 可能在棉铃虫蜕皮过程中发挥着降解表皮几丁质成分的作用，以满足棉铃虫幼虫的不断生长发育，这与前期对Ⅰ型几丁质酶功能的研究与报道是一致的，对棉铃虫几丁质酶基因 *HaCHT VII* 在棉铃虫不同组织及幼虫中的时空表达特性进行分析，*HaCHT VII* 在头壳和体壁中表达显著高于其他组织，蜕皮前后表达量的

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

变化较大，尤其是 6 龄末期和预蛹期的表达量相对很高，且本研究在饲养棉铃虫的过程中发现，由 6 龄末期到预蛹的过程中棉铃虫的表皮和头壳的变化较大，因此推测从幼虫到预蛹阶段 HaCHTⅦ可能对头壳和体壁的变化发挥重要作用。

本研究通过对棉铃虫Ⅰ型和Ⅶ型几丁质酶 HaCHTⅠ、HaCHTⅦ的结构域进行比较分析后，发现两者具有相似的结构域，唯一不同点在于Ⅰ型比Ⅶ型多了一个 CBD。两种几丁质酶基因的时空表达也存在明显的差异，其中 *HaCHT I* 在 4 龄初期和 6 龄末期的表达量显著高于其他龄期，在各个组织中均有表达且没有显著性差异，因此推测 *HaCHT I* 参与其角质层几丁质降解的更换过程，从而促进旧表皮的降解及新表皮的生长，以满足棉铃虫发育和变态需求；*HaCHT VII* 在 6 末及预蛹时高表达，在头壳和体壁中高表达，说明 *HaCHT VII* 可能对棉铃虫外骨骼系统中几丁质的形成具有重要作用。

在本研究中对几丁质酶基因 *HaCHT I* 和 *HaCHT VII* 只进行了初步的比较分析，结合本课题组前期对这些酶底物研究的结果，发现 HaCHTⅠ可以降解胶体几丁质，而 HaCHTⅦ对降解胶体几丁质没有降解活性，但其可将寡聚糖降解成单糖，可能为新的几丁质的合成提供起始底物，推测这可能与其没有结构域 CBD 有关。若对 HaCHTⅠ和 HaCHTⅦ进行 RNA 干扰、抑制、突变等手段破坏酶活性，检测其对围食膜的形态结构、昆虫的生长发育过程的影响，最终探明两种几丁质酶的功能差异，为其进一步的开发利用奠定基础。

参考文献（References）

Aktar W, Sengupta D, Chowdhury A. Impact of pesticides use in agriculture: Their benefits and hazards [J]. *Interdiscip Toxicol.*, 2009, 2 (1): 1 – 12.

Arakane Y, Muthukrishnan S. Insect chitinase and chitinase – like proteins [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2010, 67 (2): 20 – 216.

Arakane Y, Zhu Q, Matsumiya M, *et al.* Properties of catalytic, linker and chitin – binding domains of insect chitinase [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 33 (6): 631.

Abudunasier M, Li MG, Bao J, *et al.* Phylogenetic classification of chitinases in cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*), expression and analysis of enzymetic characterization on group VII chitinase [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2019, 27 (3): 119 – 127. [麦麦提艾力·阿卜杜纳斯尔, 李梦鸽, 包静, 等. 棉铃虫几丁质酶的系统分类及Ⅶ型几丁质酶表达与酶学性质分析 [J]. 农业生物技术学报, 2019, 27 (3): 119 – 127]

Abudunasier M, Ma J, Liu N, *et al.* Gene cloning, characterization and expression profile of a group IV chitinase from *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Journal of Entomology*, 2019, 62 (2): 32 – 42. [麦麦提艾力·阿卜杜纳斯尔, 马纪, 刘宁, 等. 棉铃虫Ⅳ型几丁质酶的基因克隆、酶学性质及表达谱 [J]. 昆虫学报, 2019, 62 (2): 32 – 42]

Fan XJ, Song ZF, Xian XX, *et al.* Bioinformatics analysis of the chitinase gene from *Lithocolletis striata* [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2013, 32 (1): 91 – 96. [范晓军, 宋志芳, 仙笑笑, 等. 金纹细蛾几丁质酶基因生物信息学分析 [J]. 基因组学与应用生学, 2013, 32 (1): 91 – 96]

Fukamizo T, Kramer KJ. Mechanism of chitin hydrolysis by the binary chitinase system in insect moulting fluid [J]. *Insect Biochemistry*, 1985, 15 (2): 141 – 145.

Genta FA, Blanes L, Cristofoletti PT, *et al.* Purification, characterization and molecular cloning of the major chitinase from *Tenebrio molitor* larval midgut [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 39 (12): 861 – 874.

Gu XR, Abudunasier M, Li MG, *et al.* Expression of group I chitinase from *Helicoverpa armigera* [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2019, 41 (5): 1076 – 1082. [古新蓉, 麦麦提艾力·阿卜杜纳斯尔, 李梦鸽, 等. 棉铃虫Ⅰ型几丁质酶的表达 [J]. 环境昆虫学报, 2019, 41 (5): 1076 – 1082.]

Hegedus D, Erlandson M, Gillott C, *et al.* New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function [J]. *Annual Review of Entomology*, 2009, 54 (54): 285 – 302.

Jasrapuria S, Arakane Y, Osman G, *et al.* Genes encoding proteins with peritrophin A-type chitin-binding domains in *Tribolium castaneum* are grouped into three distinct families based on phylogeny, expression and function [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 40 (3): 0 – 227.

Khajuria C, Buschman LL, Chen MS, *et al.* A gut – specific chitinase gene essential for regulation of chitin content of peritrophic matrix and growth of *Ostrinia nubilalis* larvae [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 40 (8): 621 – 629.

Kim MG, Shin SW, Bae KS, *et al.* Molecular cloning of chitinase cDNAs from the silkworm, *Bombyx mori* and the fall webworm, *Hyphantria cunea* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1998, 28 (3): 163.

Lehane MJ. Peritrophic matrix structure and function [J]. *Annual Review of Entomology*, 1997, 42 (42): 525 – 550.

Liu SH, Li HF, Yang Y, *et al.* Genome – wide identification of chitinase and chitin deacetylase gene families in the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D Genomics and Proteomics*, 2018, 27.

Li DQ, Du JZ, Zhang JQ, *et al.* Expression and function of *Locusta migratoria manilensis* chitinase family genes [J]. *Agricultural Science in China*, 2011, 44 (3): 485 – 492. [李大琪, 杜建中, 张建琴, 等. 东亚飞蝗几丁质酶家族基因的表达特性与功能研究 [J]. 中国农业科学, 2011, 44 (3): 485 – 492]

Merzendorfer H, Zimoch L. Chitin metabolism in insects: Structure,

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

function and regulation of chitin synthases and chitinases [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2003, 206 (24): 4393 – 4412.

Muthukrishnan S, Merzendorfer H, Arakane Y, *et al.* 7-Chitin metabolism in insects [J]. *Insect Molecular Biology and Biochemistry*, 2003, 4: 193 – 235.

Nijhout HF. Physiological control of molting in insects [J]. *American Zoologist*, 1981, 21 (3): 631 – 640.

Ohno T, Armand S, Hata T, *et al.* A modular family 19 chitinase found in the prokaryotic organism streptomyces griseus HUT 6037 [J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178 (17): 5065.

Qu M, Ma L, Chen P, *et al.* Proteomic analysis of insect molting fluid with a focus on enzymes involved in chitin degradation [J]. *Journal of Proteome Research*, 2014, 13 (6): 2931 – 2940.

Riddiford LM, Yang M, Wang Y, *et al.* MiR-71 and miR-263 jointly regulate target genes chitin synthase and chitinase to control locust molting [J]. *PLoS Genetics*, 2016, 12 (8): e1006257.

Shi L, Paskewitz SM. Identification and molecular characterization of two immune-responsive chitinase-like proteins from *Anopheles gambiae* [J]. *Insect Molecular Biology*, 2004, 13 (4): 387 – 398.

Sinu J, Yasuyuki A, Gamal O, *et al.* Genes encoding proteins with peritrophin A-type chitin-binding domains in *Tribolium castaneum* are grouped into three distinct families based on phylogeny, expression and function [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 40 (3): 214 – 227.

Xia M. Molecular Cloning, Biochemical Characterization and Inhibitor Discovery of Group IV Chitinase from the Insect *Ostrinia furnacalis* [D]. Dalian: University of Technology Master Thesis, 2015. [夏梦，亚洲玉米螟Ⅳ家族几丁质酶的克隆表达、性质表征及抑制剂研究 [D]. 大连：大连理工大学硕士论文，2015]

Xian XX, Fan XJ, Song ZF, *et al.* Application of bioinformatics in the study of insect chitinase [J]. *Biological Technology*, 2012, 22 (5): 89 – 93. [仙笑笑，范晓军，宋志芳，等. 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]

Xiang JB. Studies on the Structure and Composition of Insect Peritrophic Membranes and their Relationship with the Selective Toxicity of Celangulin V [D]. Xianyang: Northwest A & F University Master Thesis, 2004. [相静波，昆虫围食膜结构、组分及与苦皮藤素Ⅴ选择毒性关系的研究 [D]. 咸阳：西北农林科技大学硕士论文，2004]

Yasuyuki A, Qingsong Z, Masahiro M, *et al.* Properties of catalytic, linker and chitin-binding domains of insect chitinase [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 33 (6): 631 – 648.

Yasuyuki A and Subbaratnam M. Insect chitinase and chitinase-like proteins [J]. *Cellular & Molecular Life Sciences*, 2010, 67 (2): 201 – 216.

Young NM, Subbaratnam M, Kramer KJ, *et al.* A chitinase with two catalytic domains is required for organization of the cuticular extracellular matrix of a beetle [J]. *PLoS Genetics*, 2018, 14 (3): e1007307.

Zhang J, Zhang X, Arakane Y, *et al.* Comparative genomic analysis of chitinase and chitinase – like genes in the African malaria mosquito, (*Anopheles gambiae*) [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6.

Zhang X, Zheng S. 20-hydroxyecdysone enhances the expression of the chitinase 5 *via* Broad-Complex Zinc-Finger 4 during metamorphosis in silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Insect Molecular Biology*, 2016, 26 (2).

Zhang D, Chen J, Yao Q, *et al.* Functional analysis of two chitinase genes during the pupation and eclosion stages of the beet armyworm *spodoptera exigua* by RNA interference [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2012, 79 (4 – 5): 220 – 234.

Zhu Q, Arakane Y, Banerjee D, *et al.* Domain organization and phylogenetic analysis of the chitinase-like family of proteins in three species of insects [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2008a, 38 (4): 452 – 466.

Zhu Q, Arakane Y, Beeman RW, Kramer KJ, *et al.* Characterization of recombinant chitinase-like proteins of *Drosophila melanogaster* and *Tribolium castaneum* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2008b, 38 (4): 467 – 477.

Zhu Q, Arakane Y, Beeman RW, *et al.* Functional specialization among insect chitinase family genes revealed by RNA interference [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008c, 105 (18): 6650 – 6655.

Zhang BS, Cao YQ, Zhang W, *et al.* Cloning, sequence analysis and histological localization of the midgut chitinase gene of *Locusta migratoria manilensis* [J]. *Journal of Entomology*, 2007, 50 (6): 555 – 559. [张八生，曹月青，张伟，等. 东亚飞蝗中肠几丁质酶基因的克隆、序列分析及组织定位 [J]. 昆虫学报，2007，50 (6)：555 – 559]

Zhang C. Study on the Function of Chitinases I and II in the Development of *Lymantria dispar* [D]. Taiyuan: University of Technology Master Thesis, 2014. [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：太原理工大学硕士论文，2014]

ZhangYJ, Tan J, Lin YQ. Effects of low temperature and chitinase treatment on peritrophic membrane of *Helicoverpa armigera* [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2000, 16 (4): 152 – 155. [张严峻，谭军，林玉清. 低温和几丁质酶处理对棉铃虫围食膜的影响 [J]. 中国生物防治学报，2000，16 (4)：152 – 155]

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