



马红悦, 李玲, 乌亚汗, 田羽, 李艳艳, 庞保平. 沙葱萤叶甲核糖体蛋白基因 *GdRpS3a* 的克隆、分子特性及表达分析 [J]. 环境昆虫学报, 2021, 43 (5): 1220–1228.

沙葱萤叶甲核糖体蛋白基因 *GdRpS3a* 的克隆、分子特性及表达分析

马红悦¹, 李玲¹, 乌亚汗², 田羽², 李艳艳¹, 庞保平^{1*}

(1. 内蒙古农业大学草原昆虫研究中心, 呼和浩特 010020; 2. 内蒙古镶黄旗草原工作站, 内蒙古镶黄旗 013250)

摘要: 核糖体蛋白 (ribosomal protein, Rp) 是一类参与蛋白质合成、细胞代谢、机体免疫及信号传导等重要功能的蛋白质。本研究旨在克隆沙葱萤叶甲 *Galeruca daurica* 核糖体蛋白 S3a 基因 cDNA 全长序列, 分析其分子特性和表达模式, 以期为进一步研究其在沙葱萤叶甲生长发育及滞育中的作用提供必要的基础。根据现有的沙葱萤叶甲转录组测序数据, 应用 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术克隆获得了沙葱萤叶甲 *RpS3a* 基因的全长 cDNA 序列, 命名为 *GdRpS3a* (GenBank 登录号: MN660144)。该基因全长为 800 bp, 开放阅读框全长为 687 bp, 编码 228 个氨基酸, 具有核糖体蛋白 S3a 家族的保守功能域; 预测分子量为 25.63 kDa, 等电点 pI 为 10.53, 无信号肽和跨膜结构。同源序列比对和系统发育分析表明, *GdRpS3a* 与玉米根萤叶甲 *Diabrotica virgifera virgifera* *RpS3a* 的亲缘关系最近, 其氨基酸序列一致性最高为 54.10%。采用 qPCR 技术检测该基因在沙葱萤叶甲不同发育阶段 (卵、1~3 龄幼虫、预蛹、蛹及成虫羽化 3、7、10、15、25、40、60、80 和 100 d) 和 3 日龄成虫在不同温度 (0、5、10、15、20、25、30、35 和 40℃) 处理 1 h 后的表达谱。结果表明: *GdRpS3a* 在不同发育阶段的沙葱萤叶甲体内均有表达, 在成虫滞育结束后表达量最高, 在卵期和成虫滞育期间低表达。温度对 *GdRpS3a* 的表达有显著的影响, 30℃ 下最高, 0℃ 下最低。*GdRpS3a* 的表达与沙葱萤叶甲生长发育阶段及环境温度有关, 可能在沙葱萤叶甲成虫夏滞育中起着重要作用。

关键词: 沙葱萤叶甲; 核糖体蛋白; 基因克隆; 表达分析; 夏滞育

中图分类号: Q965; S433

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2021) 05-1220-09

Molecular cloning, characterization and expression analysis of ribosomal protein S3a gene *GdRpS3a* in *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae)

MA Hong-Yue¹, LI Ling¹, WUYAHAN², TIAN Yu², LI Yan-Yan¹, PANG Bao-Ping^{1*} (1. Research Center for Grassland Entomology, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010020, China; 2. Grassland Station of Xianghuang Banner, Xianghuang Banner 013250, Inner Mongolia, China)

Abstract: Ribosomal proteins are a kind of important proteins which are involved in the functions of protein synthesis, cellular metabolism, organism immunity, signal transduction and etc. This study aims to clone a ribosomal protein S3a (RpS3a) gene from *Galeruca daurica*, and to analyze its molecular characteristics and expression patterns so as to build a foundation for investigation on its functions in the development and diapause of *G. daurica*. The full-length cDNA of *RpS3a* was successfully cloned from *G.*

基金项目: 国家自然科学基金 (31760517)

作者简介: 马红悦, 女, 博士研究生, 研究方向为昆虫生态与分子生物学, E-mail: plmmhy1111@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence: 庞保平, 男, 博士, 教授, 主要研究方向为昆虫生态与分子生物学, E-mail: pangbp@imau.edu.cn

收稿日期 Received: 2020-07-03; 接受日期 Accepted: 2020-08-12

daurica by RACE according to the sequence information available in the transcriptome data, and named *GdRpS3a* (GenBank accession number: MN660114), whose length was 800 bp with an open reading frame (ORF) of 687 bp, encoding a protein of 228 amino acids with the predicted molecular weight of 25.63 kDa and pI of 10.53. The encoded protein contains a conserved domain of RpS3a family without signal peptide and transmembrane domain. Homologous sequence alignment and phylogenetic analysis showed that *GdRpS3a* has the closest affinity with *Diabrotica virgifera virgifera* RpS3a with the highest amino acid sequence identity (54.10%). Its expression profiling at different development stages (egg, 1 ~ 3 instar larva, prepupa, pupa, and adult of 3, 7, 10, 15, 25, 40, 60, 80, and 100 days after eclosion) and in the three-day old adults exposed to different temperatures (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, and 40℃) for 1 h was performed by qPCR. The results showed that *GdRpS3a* was expressed at different development stages with the highest expression levels after termination of adult diapause and the lowest during the egg stage and adult diapause. Temperature had significant effects on the expression levels of *GdRpS3a* with the highest level at 30℃ and the lowest at 0℃. In conclusion, the expression of *GdRpS3a* was related to the developmental stages of *G. daurica* and environmental temperature, and may played an important role in summer diapause of *G. daurica* adults.

Key words: *Galeruca daurica*; ribosomal protein; gene cloning; expression analysis; summer diapause

核糖体蛋白 S3a (RpS3a) 是一种核糖体小亚基蛋白, 除参与蛋白质合成外, 还有许多生理功能, 如细胞凋亡 (Naora *et al.*, 1998)、细胞转化 (Lecomte *et al.*, 1997)、卵子形成 (Reynaud *et al.*, 1997; Zurita *et al.*, 1997)、信号传导 (Norihisa *et al.*, 2002) 及免疫功能 (Hu *et al.*, 2000) 等。目前, 从高等的哺乳动物到低等的细菌, 已有许多物种的 S3a 基因被成功解析, 并且 S3a 蛋白的一些核糖体外的功能也得到了证实 (朱保健等, 2010)。然而, 目前昆虫核糖体蛋白的研究较少, 且主要集中于模式昆虫 - 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (Schmidt *et al.*, 1996; Reynaud *et al.*, 1997; van Beest *et al.*, 1998; 李艳红, 2014)、经济昆虫 - 家蚕 *Bombyx mori* (Yang and Sehna, 1998)、柞蚕 *Antheraea pernyi* (朱保健等, 2010) 和卫生害虫 - 尖音库蚊 *Culex pipiens* (Robich *et al.*, 2007; He *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010; Kim and Denlinger, 2010)、埃及伊蚊 *Aedes aegypti* (Mazzacano and Fallon, 1996; Niu and Fallon, 2000)、家蝇 *Musca domestica* (胡亚等, 2016) 及麻蝇 *Sarcophaga crassipalpis* (Craiq and Denlinger, 2000) 等, 对农业害虫核糖体蛋白的研究仅限于对几种主要害虫核糖体蛋白基因的克隆及表达谱分析, 如烟草天蛾 *Manduca sexta* (Song and Gilbert, 1997)、地中海实蝇 *Ceratitis capitata* (Gagou *et al.*, 2000; Verras *et al.*, 2004)、菜蛾 (Wang *et al.*, 2005)、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*

(潘湛清等, 2008)、粘虫 *Mythimna separata* (李柯等, 2010; 李柯, 2012)、褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (朱家俊等, 2016; Zhu *et al.*, 2017) 及松墨天牛 *Monochamus alternatus* (罗淋淋等, 2016) 等。

滞育是昆虫为躲避不利的环境条件而暂时停止发育的季节性适应策略, 在昆虫生命活动中起着重要作用。然而, 核糖体蛋白在昆虫滞育中的作用却很少了解。Robich 等 (2007) 首次发现 RpS3a 在尖音库蚊滞育初期显著下调。Kim 等 (2010) 进一步证实, RpS3a 在非滞育雌成虫中持续表达, 而在滞育初期 (成虫羽化后 7 ~ 10 d) 急剧下调, 应用 RNAi 沉默 RpS3a 可使非滞育雌虫卵泡停止发育, 但沉默效应只有 10 d, RNAi 短暂的 RpS3a 抑制不能持续地阻止卵巢发育, 并且外用保幼激素可抵消 RpS3a 的干扰效应。卵巢发育停止是成虫滞育的主要特征 (Kim *et al.*, 2010), 上述研究表明核糖体蛋白可能在昆虫成虫滞育中起着重要作用。

沙葱萤叶甲 *Galeruca daurica* (Joannis) 属鞘翅目 Coleoptera 叶甲科 Chrysomelidae 萤叶甲亚科 Galerucinae, 是近年来在内蒙古草原上猖獗成灾的新害虫, 主要啃食沙葱 *Allium mongolium*、多根葱 *A. polyrhizum*、野韭 *A. ramosum* 等百合科葱属牧草 (吴翔等, 2015)。沙葱萤叶甲一年发生一代, 以卵滞育越冬 (高靖淳等, 2015; Zhou *et al.*, 2016), 幼虫最早于 4 月上中旬开始出现, 夏季成虫羽化取食约 7 ~ 10 d 后停止取食活动, 聚集于草

丛、牛粪及石块下滞育越冬,为专性滞育;成虫羽化约 80~90 d 后滞育解除,开始取食、交配及产卵(陈龙等,2018a; Ma *et al.*, 2019)。目前对沙葱萤叶甲成虫夏滞育及其机理的了解还很少,主要集中在不同滞育阶段体内糖类、蛋白、脂肪含量(陈龙等,2018a)及海藻糖酶(陈龙等,2018b)和热激蛋白(陈龙等,2019)基因表达量的变化。本研究前期应用蛋白组学技术分析了沙葱萤叶甲成虫夏滞育不同阶段蛋白组成的变化,结果发现多个核糖体蛋白差异表达(Ma *et al.*, 2019)。因此,本试验拟克隆沙葱萤叶甲 *RpS3a* 基因,分析其在沙葱萤叶甲不同发育阶段及不同温度胁迫下的表达特性,以期为进一步揭示 *RpS3a* 在沙葱萤叶甲生长发育及其夏滞育中的调控作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

本试验所用的供试沙葱萤叶甲越冬卵于 2019 年 4 月采自内蒙古锡林郭勒盟镶黄旗草原。将越冬卵置于温度 $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 $70\% \pm 5\%$ 、光周期为 14 L:10 D 的 PRX-350C 智能型人工气候箱(宁波海曙赛福实验仪器厂)中孵育,幼虫孵化后以沙葱饲养。期间收集:(1)发育阶段:卵、幼虫 1~3 龄、预蛹、蛹、成虫羽化 3、7、10、15、25、40、60、80 和 100 d。每组 3 个生物学重复,每个生物学重复:卵 50 粒,1~3 龄幼虫各 5~10 头,预蛹和蛹各 5 头,成虫 4 头(♀:♂=2:2)。(2)温度处理:选择羽化 3 d 的成虫,分别在 0、5、10、15、20、25、30、35 及 40°C 处理 1 h,每组 3 个重复,每个重复雌雄各 2 头。用液氮迅速冷冻后置于 -80°C 冰箱保存备用。

1.2 主要试剂

TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit, PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time), SMARTer[®] RACE 5'/3' Kit User Manual, TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit, pMD19-T Vector Cloning Kit, DNA 2000 Marker 等均购自大连 TaKaRa 有限公司; PGEM-T Easy 载体, T7 RiboMAXTM Express RNAi System 试剂盒, GoTaq[®] qPCR Master Mix (2×), T4 DNA 连接酶等均购自美国 Promega 公司; Taq

PCR Master Mix (2×, blue dye) 购自上海生工有限公司;感受态细胞 DH5 α 购自 Tiangen 生化科技有限公司。

1.3 总 RNA 提取和反转录

将 1.1 节中超低温冻存的样品分别用液氮研磨,采用 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 试剂盒提取总 RNA,使用分光光度计(NanoPhotometerTM P-Class)和 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的浓度及完整性。按照 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 说明书操作,反转录获得 cDNA 第 1 链,并置于 -20°C 保存备用。

1.4 沙葱萤叶甲 *RpS3a* 中间片段的克隆

根据本实验室建立的沙葱萤叶甲转录组数据,筛选注释为沙葱萤叶甲 *RpS3a* 的基因序列,并通过 NCBI 网站序列进行比对鉴定。利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物 *RpS3a*-F 和 *RpS3a*-R (表 1),引物由上海生工生物有限公司合成。反应体系 (25 μL): PCR Master Mix 12.5 μL , 上/下游引物 (0.2 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL , cDNA 模板 1 μL (100 ng/ μL) 和 RNase-free Water 9.5 μL 。PCR 反应程序: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 65°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min, 4°C 保存。PCR 反应结束后,将产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,将目的 DNA 片段纯化、回收后连接 pMD[®]19-T 载体并且转化至感受态细胞 DH5 α ,吸取 200 μL 菌液涂平板,在 37°C 下倒置过夜培养 12~16 h,待菌落长出后,进行蓝白斑筛选,挑取阳性克隆菌落并 PCR 验证后,送至北京六合华大基因有限公司测序。

1.5 沙葱萤叶甲 *RpS3a* 的 3'端序列和 5'端序列克隆

以沙葱萤叶甲成虫羽化 3 d 的 RNA 为模板,利用 SMARTer[®] RACE 5'/3' Kit User Manual 试剂盒合成 5'-RACE-Ready cDNA 和 3'-RACE-Ready cDNA。根据测序验证后的中间片段,分别设计 5'/3'特异性引物 (gene-specific primer, GSP) 和嵌套基因特异性引物 (nested gene-specific primer, NGSP) (表 1)。分别用试剂盒中自带的 10× Universal Primer A Mix (UPM) 引物和特异性引物 GSP 配对进行 Touchdown PCR。反应体系共 50 μL : 5'-or 3'-RACE-Ready cDNA 2.5 μL , 10× UPM 5 μL , 5' or 3' GSP (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , Master Mix 41.5 μL 。反应程序: 94°C 30 s 变性, 70°C

3 min 延伸, 5 个循环; 94℃ 30 s 变性, 70℃ 30 s 退火, 72℃ 3 min 延伸, 5 个循环; 94℃ 30 s 变性, 68℃ 30 s 退火, 72℃ 3 min 延伸, 25 个循环。用 Tricine-EDTA 稀释 Touchdown PCR 反应产物 15 倍为模板, 以试剂盒自带 short 引物和 NGSP 为

配对进行巢式 PCR 反应, 反应体系同 1.4 节, 反应程序: 90℃ 5 min 预变性, 90℃ 30 s 变性, 68℃ 30 s 退火, 72℃ 3 min 延伸, 30 个循环。用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物后, 纯化回收目的片段、连接载体、转化、测序等同 1.4。

表 1 引物信息
Table 1 Primer information

引物 Primers	引物序列 (5'-3') Primer sequences	引物用途 Use of primers
RpS3a-F	TTCACACGAAAAGACTGGTACGACG	RpS3a 片段克隆 cDNA cloning of RpS3a fragment
RpS3a-R	AACGGGTGGCTCTAACCTATCCACT	
RpS3a-5'-GSP	CTTAGCAACTGAACCATCCACTTGTGAGA	
RpS3a-5'-NGSP	GCAACTGAACCATCCACTTGTGAGATGA	
RpS3a-3'-GSP	TGTCATCTCACAAGTGGATGGTTCAGTTG	5'/3' RACE
RpS3a-3'-NGSP	TCACAAGTGGATGGTTCAGTTGCTAAGAC	
short	CTAATACGACTCACTATAGGGC	
qRpS3a-F	CCAATTTCCACGGTATGGAC	
qRpS3a-R	TGACCTGGGTATGTTGAGCA	qPCR
SDHA-F	GGGAGACCACAATCTCCTCA	
SDHA-R	AGCTGCTGCTCCTAAGTCCA	

1.6 生物信息学分析

利用 NCBI ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 预测沙葱萤叶甲 *RpS3a* 的开放阅读框, 采用 NCBI 中的 BlastP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 和 DNAMAN 6.0 (Lynnon Biosoft, 加拿大) 进行同源性分析及序列比对, 使用在线软件 SignalIP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测沙葱萤叶甲 *RpS3a* 的信号肽序列, 运用 DNAMAN 6.0 软件 (Lynnon Biosoft, 加拿大) 进行分子量和等电点的预测, 蛋白跨膜区分析采用 TMHMM 在线软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), 用 Phylosuite 软件构建系统发育树 (贝叶斯法 MrBayes), 1 000 次抽样分析 (Zhang *et al.*, 2020)。

1.7 沙葱萤叶甲 *RpS3a* 的表达谱分析

利用荧光定量技术 (qPCR) 检测 *RpS3a* 在沙葱萤叶甲不同发育时期以及不同温度下的相对表达量。定量实验在 FTC-3000 实时荧光定量 PCR 仪 (Funglyn Biotech, 加拿大) 上进行。qPCR 特异性

引物为 qRpS3a-F/qPRS3a-R, 内参为 *SDHA* (Tan *et al.*, 2017), 反应体系 (20 μL): cDNA 模板 2 μL, qRpS3a-F 和 qRpS3a-R 引物 (10 μmol/L) 各 0.4 μL, GoTaq[®] qPCR Master Mix 10 μL, ddH₂O 7.2 μL。反应程序: 95℃ 预变性 3 min, 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 40 个循环; 95℃ 15 s, 65℃ 15 s, 95℃ 15 s。每个处理 3 个生物学重复, 进行 4 次技术重复, 采用 2^{-ΔΔCt} 方法进行定量分析 (Livak and Schmittgen, 2001)。

1.8 数据分析

利用 SPSS 20.0 进行单因素方差分析, Duncan 法进行多重比较, 数据结果用平均值 ± 标准误 (SE) 表示, 显著水平 *P* < 0.05。

2 结果与分析

2.1 沙葱萤叶甲 *RpS3a* 的 cDNA 全长克隆及序列分析

根据沙葱萤叶甲转录组数据, 筛选注释为沙葱萤叶甲 *RpS3a* 的基因序列, 设计引物进行中间

片段的 PCR 扩增, 获得目的片段的大小为 690 bp, 所得测序结果与转录组数据库中的序列信息完全一致。在 3' 和 5' RACE 中分别获得 350 bp 和 170 bp 两个片段, 通过序列拼接及测序验证得到 *RpS3a* 的 cDNA 全长序列, 命名为 *GdRpS3a* (GenBank 登录号为: MN660144)。*GdRpS3a* 的全长为 800 bp, 开放阅读框 (open-reading frame, ORF) 为 687 bp, 共编码 228 个氨基酸, 5' 非编码区 (untranslated region, UTR) 长度为 58 bp, 3' UTR 长度为 55 bp; 具有核糖体蛋白 S3a 家族的保守功能域。推测的编码蛋白分子量为 25.63 kDa, 预测等电点 (pI) 为 10.53。SignalP 4.1 Server 预测结果显示该蛋白无信号肽。TMHMM 在线软件分析蛋白质跨膜区域结果表明, *GdRpS3a* 不含跨膜结构。

2.2 *GdRpS3a* 的同源序列对比及系统进化分析

利用 NCBI Blast 同源性搜索, 得到其它 8 个同

为鞘翅目物种的 *RpS3a* 序列, 利用 DNAMAN 软件进行氨基酸序列比对。结果显示, 沙葱萤叶甲 *RpS3a* 的氨基酸序列与同一亚科的玉米根萤叶甲 *Diabrotica virgifera virgifera* *RpS3a* 的一致性最高, 为 54.10%; 其次是马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 和光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis*, 同为 52.99%。此外, 白杨叶甲 *Chrysomela tremula*、小蜂窝甲虫 *Aethina tumida*、米象 *Sitophilus oryzae*、山松大小蠹 *Dendroctonus ponderosae*、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 的氨基酸一致性分别为 49.44%、49.25%、43.98%、42.32% 和 41.20% (图 1)。

所建立的系统发育树表明 (图 2): 沙葱萤叶甲 *RpS3a* 与玉米根萤叶甲的 *RpS3a* 亲缘关系最近, 首先聚为一分支, 置信度为 83%; 然后与同为叶甲科的马铃薯甲虫聚在一起, 再与白杨叶甲聚为一大分支, 在一定程度上反应其亲缘关系。

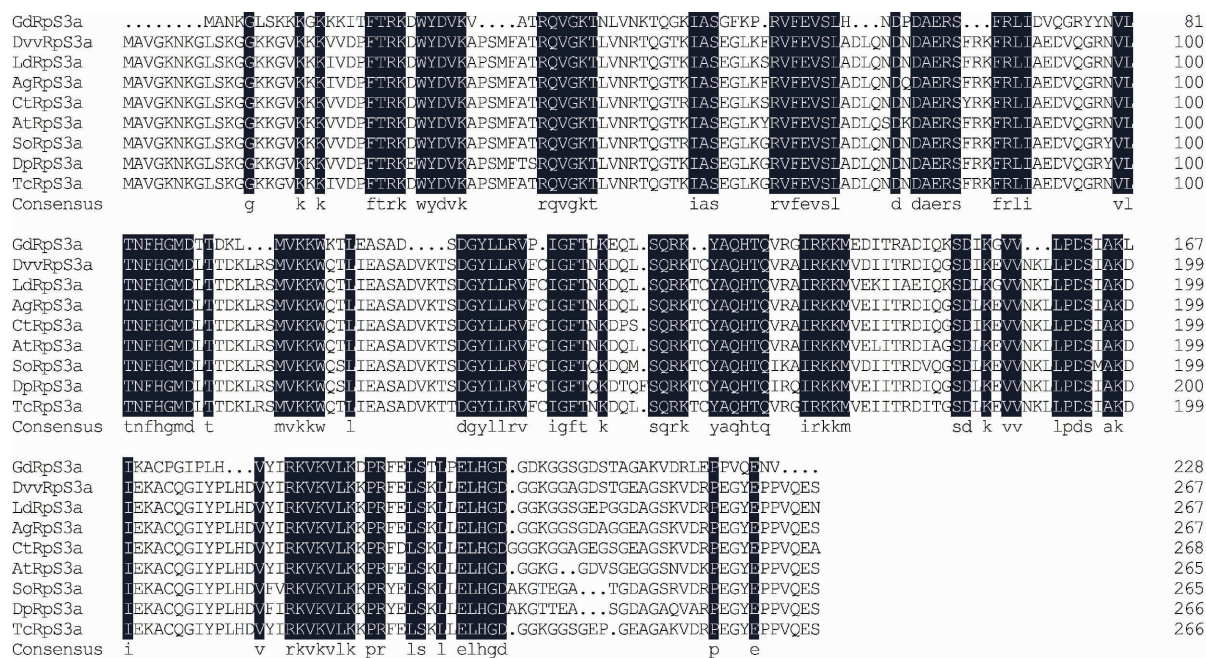


图 1 沙葱萤叶甲与其它昆虫 *RpS3a* 的氨基酸序列对比

Fig. 1 Multiple amino acid sequence alignment of *RpS3a* from *Galeruca daurica* and other insects

注: *RpS3a* 基因来源种及 GenBank 登录号 Origin species of serine proteases and their GenBank accession number: DvRpS3a, 玉米根萤叶甲 *Diabrotica virgifera virgifera* (XP_028147150.1); LdRpS3a, 马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* (XP_023012581.1); AgRpS3a, 光肩星天牛 *Anoplophora glabripenni* (XP_018574215.1); CtRpS3a, 白杨叶甲 *Chrysomela tremula* (ACY71306.1); AtRpS3a, 小蜂窝甲虫 *Aethina tumida* (XP_019874748.1); SoRpS3a, 米象 *Sitophilus oryzae* (XP_030752980.1); DpRpS3a, 山松大小蠹 *Dendroctonus ponderosae* (XP_019769603.1); TcRpS3a, 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (XP_968064.1); Consensus, 共有序列 Consensus sequence. 黑色阴影表示 100% 一致性 Black shadow indicated 100% of identity.

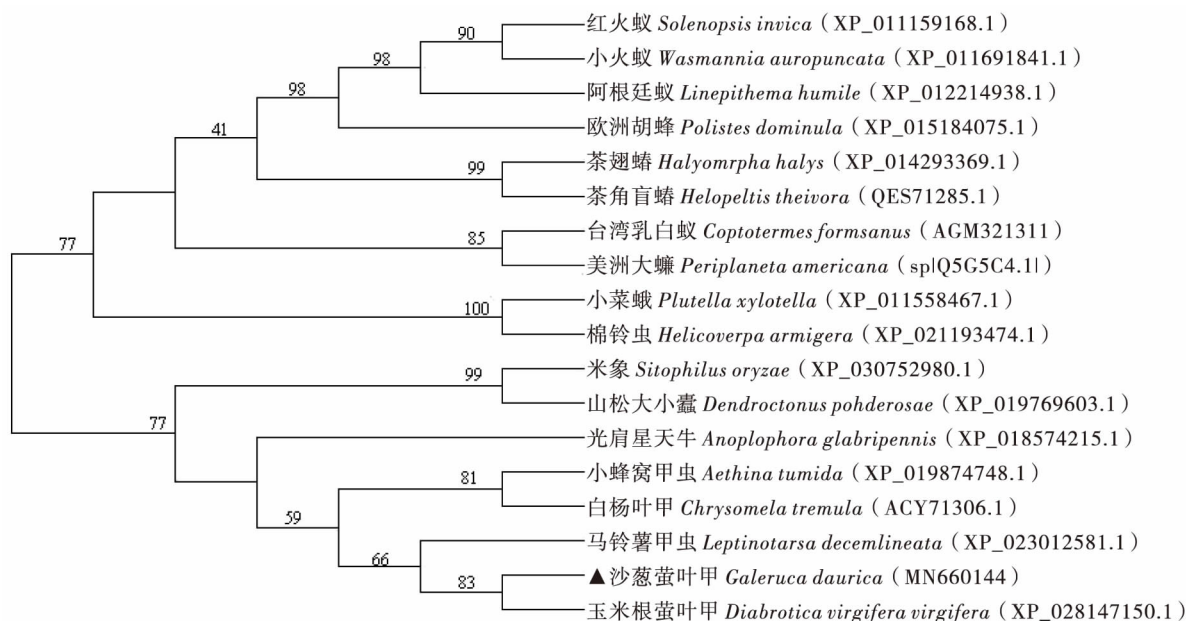


图2 基于氨基酸序列构建沙葱萤叶甲与其它昆虫 RpS3a 的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of RpS3a from *Galeruca daurica* and other insect species

注: 分支节点上的 bootstrap 数值表示 1 000 次重复计算的百分比值。Note: Numbers on the branches indicated the bootstrap values based on 1 000 replicates.

2.3 沙葱萤叶甲 *RpS3a* 在不同发育阶段的表达模式

RpS3a 在沙葱萤叶甲的不同发育阶段均有表达, 且存在显著差异 ($P < 0.05$)。成虫滞育结束后 (80 d 和 100 d) 表达量最高, 其次 60 日龄成虫、幼虫、预蛹和蛹, 最低为卵和 3 ~ 40 日龄成虫 (图 3)。

2.4 不同温度下沙葱萤叶甲 *RpS3a* 的表达模式

沙葱萤叶甲成虫经不同温度处理 1 h 后, *GdRpS3a* 的相对表达量存在显著差异 ($P < 0.05$), 其中 30℃ 下表达量最高, 约为常温对照 25℃ 的 10 倍; 其次为 15℃, 约为对照的 6 倍; 最低为 0℃ 和 25℃; 其它温度处理间表达量差异不显著 ($P > 0.05$) (图 4)。

3 结论与讨论

核糖体蛋白在生物体内普遍存在且种类繁多, 参与一系列的生命过程, 包括细胞凋亡、调控转录、恶性转化及免疫应答等细胞功能 (Warner and McIntosh, 2009)。核糖体蛋白 S3a 存在于 40S 的核糖体亚基上, 在蛋白质翻译过程中起着重要作用, 是生命体中蛋白质合成和细胞代谢的重要调控因子 (Shemer *et al.*, 2000)。本研究通过 RACE 技术, 首次从沙葱萤叶甲中成功克隆了 *RpS3a* 的

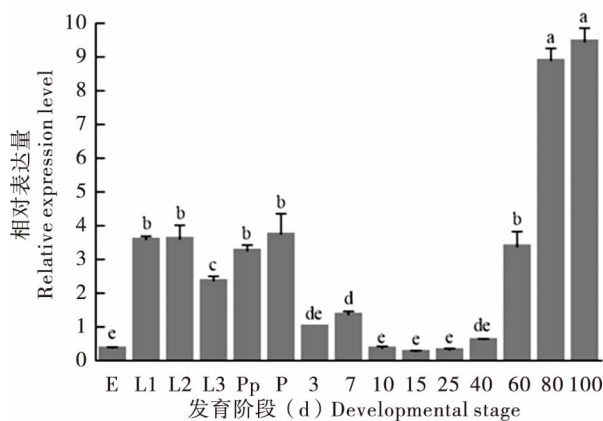


图3 *GdRpS3a* 在沙葱萤叶甲不同发育阶段的表达水平

Fig. 3 Transcript levels of *GdRpS3a* in different developmental stages of *Galeruca daurica*

注: E, 卵; L1 ~ L3, 1 ~ 3 龄幼虫; Pp, 预蛹; P, 蛹; 3 ~ 100, 成虫羽化天数。图中数值为平均值 ± 标准误; 柱上不同小写字母表示差异显著 (Duncan 氏多重检验, $P < 0.05$)。Note: E, Egg; L1 ~ L3, 1st ~ 3rd instar larva; Pp, Pre-pupa; P, Pupa; 3 ~ 100, Day after adult eclosion. Data in the figure were mean ± SE, and different letters above bars indicated significant difference by Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

cDNA 全长序列。系统发育分析表明, 沙葱萤叶甲 *RpS3a* 与玉米根萤叶甲 *RpS3a* 的亲缘关系上最近, 二者同属于鞘翅目叶甲科萤叶甲亚科。该基因编

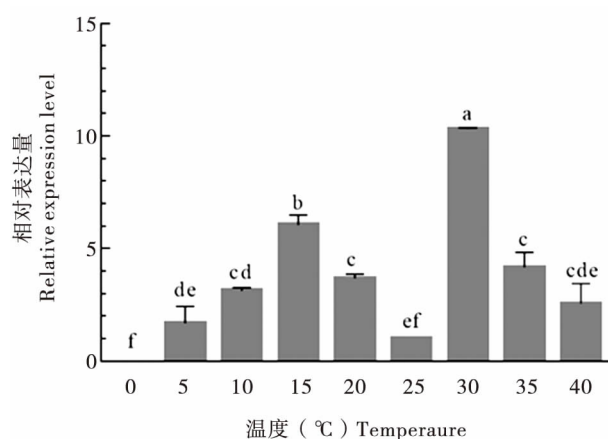


图4 沙葱萤叶甲 *GdRpS3a* 在不同温度下的表达水平

Fig. 4 Transcript levels of *GdRpS3a* in *Galeruca daurica* at different temperatures

注: 图中数值为平均值 $\pm$ 标准误; 柱上不同小写字母表示差异显著 (Duncan 氏多重检验, $P < 0.05$)。Note: Data in the figure were mean $\pm$ SE, and different letters above bars indicated significant difference by Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

码的氨基酸序列与玉米根萤叶甲、马铃薯甲虫等物种的 RpS3a 序列进行比对, 存在一个 RpS3a 蛋白家族的保守功能域。因此, 本研究所克隆的基因属于核糖体蛋白 S3a 家族中的一员。

核糖体蛋白主要作用是参与蛋白质的合成, 但许多核糖体蛋白还具有次要功能 (Wool, 1996)。RpS3a 在果蝇 *Drosophilidae* 的整个发育过程中均有表达 (van Beest *et al.*, 1998), 特别是在胚胎发育过程和卵巢发育的雌成虫中高表达, 是卵子形成必需的 (Reynaud *et al.*, 1997)。随后在其他昆虫中的研究中也获得了类似的结果, 如: 地中海实蝇 *CcRpS21* 在胚胎和幼虫中的表达量高于蛹和成虫, 且雌成虫高于雄成虫 (Verras *et al.*, 2004); 一种摇蚊 *Chironomus riparius* 的 *RpL11*、*RpL13*、*RpS3* 和 *RpS6* 在胚胎形成过程中的表达量显著高于幼虫、蛹和成虫 (Martínez-Guitarte *et al.*, 2007; Park and Kwak, 2012); 尖音库蚊 *RpS4* 在卵中高表达而在幼虫中低表达 (Hu *et al.*, 2007); 褐飞虱 *NIRPL5* 在抱卵的雌成虫中最高, 其次为若虫, 雄成虫和刚羽化的雌成虫最低; RNAi 沉默该基因导致卵巢发育迟缓、产卵量下降 (Zhu *et al.*, 2017)。上述研究表明, 核糖体蛋白与昆虫生长发育, 特别是与胚胎发育有关。通过对沙葱萤叶甲 *GdRpS3a* 在整个生命周期中的表达

检测发现, 几乎在整个昆虫的发育阶段都有表达。本研究中, *GdRpS3a* 在沙葱萤叶甲不同发育阶段差异表达, 卵及羽化 40 d 内成虫中的表达量显著低于幼虫、预蛹、蛹及羽化 60 d 后成虫中的表达量。前期研究表明, 沙葱萤叶甲成虫秋季产卵后即以卵滞育越冬, 越冬卵必须经过秋冬季的低温才能解除滞育 (Zhou *et al.*, 2016)。夏季成虫羽化后大量取食, 约羽化 7 ~ 10 d 后停止取食或少量取食, 活动停止, 进入专性滞育状态。羽化约 80 ~ 90 d 后结束滞育, 开始逐渐取食、交尾产卵等 (陈龙等, 2018a)。核糖体蛋白在细胞分化活跃的组织中高表达 (Jain *et al.*, 2004; Martínez-Guitarte *et al.*, 2007)。因此, *GdRpS3a* 在细胞分化基本停滞的滞育卵和滞育前 (3 d 和 7 d) 及滞育前、中期 (10、15、25 和 40 d) 的成虫中表达量低而在生长发育较快的幼虫期、预蛹期、蛹期以及滞育后期 (60 d) 和解除后的成虫期 (80 d 和 100 d) 高表达是合理的。Reynaud 等 (1997) 也发现 *RpS3a* 在未滞育的雌蚊中高表达, 而在滞育的雌蚊中低表达。蛋白组学研究表明, 包括 RpS3a 在内的多种核糖体蛋白在滞育解除后上调表达 (Ma *et al.*, 2019)。因此, 可认为 RpS3a 上调表达可能促进了沙葱萤叶甲成虫卵巢的发育, 随着卵巢的发育, 成虫夏滞育逐渐解除。但该推论还需通过对卵巢的解剖观察及其它实验进一步验证。

温度是影响昆虫生长发育及繁殖的重要因素之一。然而, 目前温度对核糖体蛋白表达影响的研究却很少。本研究中, 温度对沙葱萤叶甲 *GdRpS3a* 的表达有显著影响, 但没有一定的规律性, 表达量不随温度的上升而升高或下降。*GdRpS3a* 在 30°C 下表达量最高, 而超过 30°C (35°C 和 40°C) 表达量下降, 这可能是因为高温不利于昆虫的生长发育。而 Martínez-Guitarte 等 (2007) 的研究却表明 35°C 高温对摇蚊 *RpL11* 和 *RpL13* 的表达无显著影响。造成差异的原因可能与核糖体蛋白或昆虫种类不同有关。

参考文献 (References)

- Chen W, Jiang GF, Dong SY, *et al.* cDNA cloning, characterization and expression analysis of ribosomal protein S23 gene of *Periplaneta americana* (Blattodea: Blattellidae) [J]. *Florida Entomologist*, 2014, 97 (4): 1774 - 1782.
- Chen L, Zhou XR, Gao LJ, *et al.* Changes of sugar, protein and fat content in *Galeruca daurica* adults during summer [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2018a, 61 (7): 808 - 814. [陈龙, 周晓

- 榕, 高利军, 等. 沙葱萤叶甲成虫越冬期间糖类、蛋白及脂肪含量的变化 [J]. 昆虫学报, 2018a, 61 (7): 808–814]
- Chen L, Tan Y, Zhou XR, *et al.* Molecular cloning, molecular properties and expression analysis of trehalase (GdTrel) in *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2018b, 61 (3): 271–281. [陈龙, 谭瑶, 周晓榕, 等. 沙葱萤叶甲海藻糖酶基因 GdTrel 的克隆、分子特性和表达分析 [J]. 昆虫学报, 2018b, 61 (3): 271–281]
- Chen L, Tan Y, Zhou X, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression analysis of the heat shock protein gene *GdHsp10a* in *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae) [J]. *Journal of Plant Protection*, 2019, 46 (2): 417–424. [陈龙, 谭瑶, 周晓榕, 等. 沙葱萤叶甲热激蛋白基因 *GdHsp10a* 的克隆、分子特征与表达分析 [J]. 植物保护学报, 2019, 46 (2): 417–424]
- Craiq TL, Denlinger DL. Sequence and transcription patterns of 60S ribosomal protein P0, a diapause-regulated AP endonuclease in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis* [J]. *Gene*, 2000, 255 (2): 381–388.
- Gagou ME, Ballesta JPG, Kouyanou S. Cloning and characterization of the ribosomal protein CcP0 of the medfly *Ceratitis capitata* [J]. *Insect Molecular Biology*, 2000, 9 (1): 47–55.
- Gao JC, Zhou XR, Pang BP, *et al.* Effects of low temperature on the survivorship and development of overwintering eggs of *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2015, 52 (8): 881–886. [高靖淳, 周晓榕, 庞保平, 等. 低温对沙葱萤叶甲越冬卵存活和发育的影响 [J]. 昆虫学报, 2015, 52 (8): 881–886]
- Hamauchi N, Ohdaira T, Shinohara A, *et al.* Identification of ribosomal protein S3a as a candidate for a novel PI 3-kinase target in the nucleus [J]. *Cytotechnology*, 2002, 40 (1–3): 85–92.
- Hao X, Zhou XR, Pang BP, *et al.* Morphological and biological characteristics of *Galeruca daurica* Joannis (Coleoptera: Chrysomelidae) [J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2015, 23 (5): 1106–1108. [吴翔, 周晓榕, 庞保平, 等. 沙葱萤叶甲的形态特征和生物学特性研究 [J]. 草地学报, 2015, 23 (5): 1106–1108.]
- He J, Sun H, Zhang D, *et al.* Cloning and characterization of 60S ribosomal protein L22 (*RPL22*) from *Culex pipiens pallens* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, B*, 2009, 153 (2): 216–222.
- Hu X, Wang W, Zhang D, *et al.* Cloning and characterization of 40S ribosomal protein S4 from *Culex pipiens pallens* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, B*, 2007, 146 (2): 265–270.
- Hu Y, Lu C, Wei CC, *et al.* Cloning and expression pattern of ribosomal protein S18 gene in *Musca domestica* [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32 (6): 135–142. [胡亚, 卢诚, 魏川川, 等. 家蝇核糖体蛋白 S18 基因的克隆及表达模式研究 [J]. 生物技术通报, 2016, 32 (6): 135–142]
- Hu ZB, Minden MD, McCulloch EA, *et al.* Regulation of drug sensitivity by ribosomal protein S3a [J]. *Blood*, 2000, 95 (3): 1047–1055.
- Jain M, Tyagi SB, Thakur JK, *et al.* Molecular characterization of a light-responsive gene, breast basic conserved protein 1 (*OsiBBC1*), encoding nuclear-localized protein homologous to ribosomal protein L13 from *Oryza sativa indica* [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, 1676 (2): 182–192.
- Kim M, Denlinger DL. A potential role for ribosomal protein S2 in the gene network regulating reproductive diapause in the mosquito *Culex pipiens* [J]. *Journal of Comparative Physiology*, 2010, 180 (2): 171–178.
- Kim M, Sim C, Denlinger DL. RNA interference directed against ribosomal protein S3a suggests a link between this gene and arrested ovarian development during adult diapause in *Culex pipiens* [J]. *Insect Molecular Biology*, 2010, 19 (1): 27–33.
- Lecomte F, Szpirer J, Szpirer C. The S3a ribosomal protein gene is identical to the *Fte-1* (*v-fos* transformation effector) gene and the TNF- α -induced *TU-11* gene, and its transcript is altered in transformed and tumor cells [J]. *Gene*, 1997, 186 (2): 271–277.
- Li HY. Effect of reduced expression of ribosomal protein S3 on *Drosophila* development [J]. *Journal of Chongqing Normal University (Natural Science Edition)*, 2014, 31 (3): 22–25. [李红艳. 核糖体蛋白 S3 表达减少对果蝇发育的影响 [J]. 重庆师范大学学报 (自然科学版), 2014, 31 (3): 22–25]
- Li K. Cloning and expression of a cDNA encoding ribosomal protein S7 in *Mythimna separata* [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2012, 49 (3): 673–680. [李柯. 粘虫核糖体蛋白 S7 cDNA 的克隆和表达分析 [J]. 应用昆虫学报, 2012, 49 (3): 673–680]
- Li K, Yin H, Lian ZM, *et al.* Cloning and sequence analysis of a ribosomal protein S11 gene in the oriental armyworm, *Mythimna separata* (Walker) [J]. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 2010, 38 (4): 171–175, 182. [李柯, 阴环, 廉振民, 等. 粘虫核糖体蛋白 S11 基因 cDNA 的克隆和序列分析 [J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2010, 38 (4): 171–175, 182]
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25 (4): 402–408.
- Luo LL, Cai ZL, Ling T. Cloning cDNA of ribosomal protein (RPS15A) from *Monochamus alternatus* and effects of insecticides on its expression [J]. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 2016, 44 (2): 165–171. [罗淋淋, 蔡紫玲, 林同. 松墨天牛核糖体蛋白 (RPS15A) cDNA 的克隆及农药胁迫对其表达的影响 [J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2016, 44 (2): 165–171]
- Ma HY, Zhou XR, Tan Y, *et al.* Proteomic analysis of adult *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae) at different stages during summer diapause [J]. *Comparative Biochemistry Physiology, D*, 2019, 29: 351–357.
- Martínez-Guitarte JL, Planelló R, Morcillo G. Characterization and expression during development and under environmental stress of the genes encoding ribosomal proteins L11 and L13 in *Chironomus riparius* [J]. *Comparative Biochemistry Physiology, B*, 2007, 147 (4): 590–596.

- Mazzacano CA, Fallon AM. Changes in ribosomal protein rpL8 mRNA during the reproductive cycle of the mosquito, *Aedes aegypti* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1996, 26 (6): 563 – 570.
- Naora H, Takai I, Adachi M, *et al.* Altered cellular responses by varying expression of a ribosomal protein gene: Sequential coordination of enhancement and suppression of ribosomal protein S3a gene expression induces apoptosis [J]. *Journal of Cellular Biology*, 1998, 141 (3): 741 – 753.
- Niu L L, Fallon AM. Differential regulation of ribosomal protein gene expression in *Aedes aegypti* mosquitoes before and after the blood meal [J]. *Insect Molecular Biology*, 2000, 9 (6): 613 – 623.
- Pan ZQ, Yao Q, Tang B, *et al.* Cloning and sequence analysis of three 60S ribosomal protein genes from *Spodoptera exigua* [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2008, 30 (4): 310 – 317. [潘湛清, 姚琼, 唐斌, 等. 甜菜夜蛾三个 60S 核糖体蛋白基因的获得与序列分析 [J]. 环境昆虫学报, 2008, 30 (4): 310 – 317]
- Park K, Kwak IS. Gene expression of ribosomal protein mRNA in *Chironomus riparius*: Effects of endocrine disruptor chemicals and antibiotics [J]. *Comparative Biochemistry Physiology, C*, 2012, 156 (2): 113 – 120.
- Reynaud E, Bolshakov VN, Barajas V, *et al.* Antisense suppression of the putative ribosomal protein S3A gene disrupts ovarian development in *Drosophila melanogaster* [J]. *Molecular Genomics and Genetics*, 1997, 256 (4): 462 – 467.
- Robich RM, Rinehart JP, Kitchen LJ, *et al.* Diapause – specific gene expression in the northern house mosquito, *Culex pipiens* L., identified by suppressive subtractive hybridization [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2007, 53 (3): 235 – 245.
- Schmidt A, Hollmann M, Schäfer U. A newly identified Minute locus, M (2) 32D, encodes the ribosomal protein L9 in *Drosophila melanogaster* [J]. *Molecular Genomics and Genetics*, 1996, 251 (3): 381.
- Shemer R, Eibschitz I, Cavari B. Isolation and characterization of medaka ribosomal protein S3a (fet – 1) cDNA and gene [J]. *Gene*, 2000, 250 (1 – 2): 209 – 217.
- Song Q, Gilbert LL. Molecular cloning, developmental expression, and phosphorylation of ribosomal protein S6 in the endocrine gland responsible for insect molting [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272 (7): 4429 – 4435.
- Tan Y, Zhou XR, Pang BP. Reference gene selection and evaluation for expression analysis using qRT – PCR in *Galeruca daurica* (Joannis) [J]. *Bulletin of Entomological Research*, 2017, 107 (3): 359 – 368.
- van Beest M, Mortin M, Clevers H. *Drosophila RpS3a*, a novel Minute gene situated between the segment polarity genes *cubitus interruptus* and *dTCF* [J]. *Nucleic Acids Research*, 1998, 26 (19): 4471 – 4475.
- Verras M, Theodoraki M, Mintzas AC. Cloning, characterization, and developmental expression of the ribosomal protein S21 gene of the mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2004, 56: 133 – 142.
- Wang SL, Sheng CF, Qiao CL, *et al.* cDNA sequence analysis of ribosomal protein S13 gene in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) [J]. *Insect Science*, 2005, 12 (3): 225 – 229.
- Warner JR, McIntosh KB. How common are extraribosomal functions of ribosomal proteins? [J]. *Molecular Cell*, 2009, 34 (1): 3 – 11.
- Wool IG. Extraribosomal functions of ribosomal proteins [J]. *Trends in Biochemistry Science*, 1996, 21 (5): 164 – 165.
- Yang Y, Sehna F. Ribosomal protein L5 of *Bombyx mori*: cDNA sequence and tissue differences in the L5 mRNA content [J]. *Insect Molecular Biology*, 1998, 7 (4): 301 – 306.
- Zhang D, Gao FL, Jakovlić I, *et al.* PhyloSuite: An integrated and scalable desktop platform for streamlined molecular sequence data management and evolutionary phylogenetics studies [J]. *Molecular Ecology Resource*, 2020, 20 (1): 348 – 355.
- Zhou XR, Gao JC, Pang BP. Effects of temperature on the termination of egg diapause and post-diapause embryonic development of *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae) [J]. *Environmental Entomology*, 2016, 45 (4): 1076 – 1080.
- Zhu BJ, Liu CL, Liu QN. Cloning and expression analysis of ribosomal protein S3a gene from *Antheraea pernyi* [J]. *Scientia Sericulture*, 2010, 36 (3): 507 – 512. [朱保建, 刘朝良, 刘秋宁. 柞蚕核糖体蛋白基因 S3a 的克隆及表达分析 [J]. 蚕业科学, 2010, 36 (3): 507 – 512]
- Zhu J, Hao P, Lu C, *et al.* Expression and RNA interference of ribosomal protein L5 gene in *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) [J]. *Journal of Insect Science*, 2017, 17 (3): 1 – 8.
- Zhu JJ, Hao PY, Lu CF, *et al.* Cloning and expression analysis of ribosomal protein S8 gene, *NIRPS8* in the brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2016, 53 (5): 1036 – 1044. [朱家骏, 郝培应, 陆潮峰, 等. 褐飞虱核糖体小亚基蛋白 S8 基因 *NIRPS8* 的克隆及其表达分析 [J]. 应用昆虫学报, 2016, 53 (5): 1036 – 1044]
- Zurita M, Reynaud E, Kafatos FC. Cloning and characterization of cDNAs preferentially expressed in the ovary of the mosquito, *Anopheles gambiae* [J]. *Insect Molecular Biology*, 1997, 6 (1): 55 – 62.