

DOI:10.13350/j.cjpb.230412

· 论著 ·

家蝇几丁质酶基因的鉴定与表达分析*

赵文静¹, 焦正龙¹, 苏佩佩¹, 尚小丽², 修江帆¹, 国果^{1,2,3**}

(1. 贵州医科大学基础医学院, 贵州贵阳 550025; 2. 贵州医科大学环境与健康重点实验室; 3. 贵州医科大学转化医学研究中心)

【摘要】 **目的** 从基因家族的角度对家蝇几丁质酶进行鉴定与分析, 初步探讨其潜在的生物学功能。 **方法** 采用生物信息学方法分析家蝇几丁质酶基因的结构、组成及蛋白的理化特性, 并构建分子系统树; 通过 qPCR 检测 8 个基因的时空表达情况和 4 个基因在 3 种浓度的 20E 处理下的表达变化。 **结果** 共鉴定 20 个家蝇几丁质酶基因, N-J 树划分为 8 组; 不同基因的外显子数量及结构域组成存在差异性; 催化结构域具备昆虫几丁质酶高保守序列; 相对分子质量为 $(26.663 \sim 270.602) \times 10^3$, pI 为 5.02~10.28。MdCht2、MdCht5、MdCht7 和 MdCht10 在蛹期显著性高表达; MdCht4、MdCht8、MdCht9 和 MdIDGF7 主要在幼虫期高表达; II 龄幼虫的 8 种几丁质酶基因呈组织特异性表达, 其中在马氏管和肠组织中 MdCht4 显著性高表达。MdCht4、MdCht5、MdCht7 和 MdCht10 对蜕皮激素 20E 的刺激呈正向应答, 注射后 8h 和 12h 时的应激表达量与 20E 的浓度相关。 **结论** 家蝇几丁质酶基因呈组织特异性表达, 部分几丁质酶基因对蜕皮激素 20E 的刺激呈正向应答, 本文为家蝇几丁质酶的功能研究及家蝇的防治提供参考。

【关键词】 几丁质酶; 基因家族; 表达模式; 20-羟基蜕皮激素诱导 (20E); 家蝇

【中图分类号】 R384.2

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)04-0432-07

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Apr;18(4):432-438.]

Identification and expression analysis of chitinase gene in *Musca domestica*

ZHAO Wen-jing¹, JIAO Zheng-long¹, SU Pei-pe¹, SHANG Xiao-li², XIU Jiang-fan¹, GUO Guo^{1,2,3} (1. School of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 2. Key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control; 3. Translational Medicine Research Center of Guizhou Medical University)

【Abstract】 **Objective** This study aimed to investigate the potential biological function of insect chitinase by analyzing the chitinase gene family in *Musca domestica*. **Methods** Bioinformatics methods were used to describe the structures, composition and physicochemical characteristics of housefly chitinases. qPCR was used to detect the expression patterns of eight chitinases. **Results** A total of twenty chitinase genes were identified and divided into eight groups by N-J phylogenetic tree. Each chitinase displayed a distinct schematic diagram of exon and intron organization and domain organization. The catalytic domains of insect chitinase have highly conserved sequences, the molecular weight ranged from $(26.663 \sim 270.602) \times 10^3$, while the pI ranged from 5.02-10.28. During the pupal stage, MdCht2 ($F_{6,12} = 72.86$), MdCht5 ($F_{6,12} = 662.5$), MdCht7 ($F_{6,12} = 72.86$) and MdCht10 ($F_{6,12} = 261.6$) were significantly expressed, while MdCht4 ($F_{6,12} = 114.3$), MdCht8 ($F_{6,12} = 33.73$), MdCht9 ($F_{6,12} = 445.2$) and MdIDGF7 ($F_{6,12} = 71.38$) were significantly expressed mainly in the larval stage ($P < 0.01$). Eight chitinase genes showed tissue-specific expression in the 2nd-instar larvae stage. In Malpighian tube and intestinal tissue, MdCht4 was significantly expressed ($F_{4,8} = 180.6$ and $F_{4,8} = 112.8$, $P < 0.01$). Besides, MdCht4, MdCht5, MdCht7 and MdCht10 responded positively to the stimulation of ecdysone 20E, and their stress expression levels correlated with 20E concentration at 8 h and 12 h after injection. **Conclusion** Our results demonstrate that chitinase genes of *M. domestica* exhibited tissue-specific expression patterns, and some chitinase genes responded positively to the stimulation of ecdysone 20E. This work may provide a reference for the functional study of housefly chitinase and the control of housefly.

【Key words】 chitinase; gene family; expression pattern; 20-hydroxyecdysone induction (20E); *Musca domestica*

**家蝇 (*Musca domestica*) 属于双翅目 Diptera 昆虫, 能够携带大量敏感菌株和耐药菌株, 对公众健康构成威胁^[1]。因此, 研究家蝇的发育过程及生理情况对其防制具有重要的公共卫生意义。

几丁质酶作用于几丁质内部 β -1,4-糖苷键, 参与昆虫的孵化(卵)、蜕皮、羽化、形态发生、围食膜降解和

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目 (No. 81560337, 81760647)。

** **【通讯作者】** 国果, E-mail: guoguo@gmc.edu.cn

【作者简介】 赵文静 (1982-), 女, 硕士, 副教授, 研究方向为昆虫资源与应用。E-mail: zhaowenjing@gmc.edu.cn

先天免疫等一系列重要的生命活动。因此,几丁质酶会在昆虫不同组织及不同生长发育阶段维持一定水平,以保证昆虫的正常生长发育^[2]。在研究几丁质酶与蜕皮的关系时常使用蜕皮激素 20E 诱导昆虫蜕皮,如东亚飞蝗和家蚕^[3-4]。

早期 de la Vega 等^[5]的研究推测昆虫几丁质酶可能涉及多个基因,随后越来越多的昆虫及其众多的几丁质酶被相继报道,这些几丁质酶依据蛋白结构被归为糖苷水解酶 18 家族(glycosyl hydrolases family 18, GH18),包括具有几丁质酶催化活性的蛋白 Chitinase, Cht, 和不具有催化活性的成虫盘生长因子 Imaginal Disc Growth Factor, IDGF^[6]。目前关于昆虫几丁质酶家族基因的研究,通常使用几丁质酶催化结构域的氨基酸序列构建系统发育树,据此进行基因的分组和描述。如 16 条黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 和赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 几丁质酶基因被分为 5 组^[7-8]; 20 条冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 基因分为 8 组^[9]; 12 条家蚕 *Bombyx mori* 基因分为 11 组^[10]; 11 个烟草天蛾 *Manduca sexta* 基因分为 11 组^[11]; 23 条致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* 基因分为 12 组^[12]。然而,迄今关于家蝇几丁质酶的研究停留在以单个基因的鉴定与分析为主^[13-16],尚未从基因家族的角度整体性地对家蝇几丁质酶进行鉴定和描述。

本研究拟从家蝇基因组中鉴定几丁质酶基因,采用生物信息学方法分析基因的序列特征及蛋白的理化特性,并通过构建系统发育树对家蝇几丁质酶进行分组和描述;采用 qPCR 技术检测 8 个基因(*MdCht2*、*MdCht4*、*MdCht5*、*MdCht7*、*MdCht9*、*MdCht10* 和 *MdIDGF7*)在家蝇不同发育阶段的表达情况,最后检测在 II 龄幼虫多种组织的 4 个几丁质酶基因对 3 种浓度的蜕皮激素 20E 的应答情况。初步探讨家蝇几丁质酶基因潜在的生物学特性,为其功能研究和家蝇的防治提供参考。

材料与方 法

1 家蝇来源与饲养

家蝇由贵州医科大学现代病原生物学特色重点实验室(W602)传代繁殖。饲养条件:温度(28±1)°C,相对湿度 50%~60%,光照周期(光照 10 h;黑暗 14 h)。幼虫喂食含量为 33%的麸皮,成蝇喂食奶粉和白糖(1:1)混合物。

2 家蝇几丁质酶家族基因的获取与生物信息学分析

选用黑腹果蝇、冈比亚按蚊和致倦库蚊的几丁质酶基因作为种子序列^[16],使用 BLAST 工具在家蝇基因组^[17]中筛选几丁质酶基因。使用 SMART 工具

(Simple Modular Architecture Research Tool, <http://smart.embl-heidelberg.de>)分析每一个基因的结构域,确认每一条基因归属于 GH18 超家族。使用 GSDS 2.0 (Gene Structure Display Server 2.0, <http://gsds.cbi.pku.edu.cn>)和 Domain Graph, version 1.0 绘制基因结构图和基因结构域图。使用 Clustal X 对几丁质酶催化结构域的氨基酸序列进行多重比对。基于 6 种昆虫几丁质酶催化结构域的氨基酸序列,使用 MEGA X 软件,采用 neighbor-joining (N-J)方法构建系统发育树(bootstrap = 1000),据此进行分组和描述。

3 家蝇各发育阶段和多种组织几丁质酶基因检测

3.1 RNA 提取 分别收集家蝇 6 个发育阶段的样品,包括卵、I 龄幼虫、II 龄幼虫、III 龄幼虫、蛹、成虫(雌和雄)。解剖家蝇 II 龄幼虫,分别收集其中肠、马氏管、气管、表皮和唾液腺的组织样品。使用 SV Total RNA Isolation System Kit (Promega, Madison, WI, USA)提取上述每一样品的总 RNA。使用 Nanodrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)纯化 RNA 产物并进行 1%琼脂糖凝胶检测。使用 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Takara, Otsu, Japan)合成 cDNA 模板的第一链,使用 oligodT 引物作为 cDNA 模板合成中的锚定引物,使用 RT Reagent Kit (Takara, Japan)中的 gDNA Eraser 去除基因组 DNA 污染。所有试验均做 3 次生物学重复。

3.2 几丁质酶基因 qPCR 检测 使用 Quantitative Real-time PCR (qPCR)方法检测 8 个几丁质酶基因 *MdCht2*、*MdCht4*、*MdCht5*、*MdCht7*、*MdCht9*、*MdCht10* 和 *MdIDGF7* 在不同发育阶段的全虫和在 II 龄幼虫多种组织中的表达情况。使用 Primer Premier 5.0 (Premier Biosoft, CA, USA) (表 1)设计基因的特异引物。使用家蝇核糖体蛋白 S18 基因 (*MdRPS18*)作为内参基因。反应程序:95 °C 预变性 30 s;95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 34 s,72 °C 延伸 30 s,共 40 个循环;72 °C 延伸 5 min。所有样品均做 3 次生物学重复。使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法分析结果,组间比较采用双因素方差分析(Two-way ANOVA)。

4 蜕皮激素 20E 刺激试验

将 20-羟基蜕皮激素(20E, Biogas A506554)配制成终浓度为 2.5、5.0、10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的溶液,分别注入不同的 II 龄幼虫体内,每只注射 1 μL 。空白组幼虫注射 10%无水乙醇。分别于注射后 2、4、8、12 和 24 h 收集幼虫,采用 qPCR 法测定几丁质酶基因 *MdCht4*、*MdCht5*、*MdCht7* 和 *MdCht10* 表达情况。试验做 3 次生物学重复。RNA 的提取和表达检测同方法 3。

组间比较采用双因素方差分析(Two-way ANOVA)。

表 1 qPCR 引物
Table 1 Primers for qPCR

基因 Genes	引物 Primers(5'-3')
<i>MdRPS182</i>	F: AAGGGTGTGGGTCGCCGTT R: GCAATGGGTTGGAGATGAT
<i>MdCht2</i>	F: TCCGGTTGGACAACGATGT R: ATTGGCTATGGAACGGGAATT
<i>MdCht4</i>	F: GTGCACCCATTTGAGTTATTCT R: GCATCCTTTAGGGCCATGGT
<i>MdCht5</i>	F: ACGCATCCGAATTTGAAGC R: ACTCACGACGCTGCGAATG
<i>MdCht7</i>	F: FCGTCCCTGTAGGTCCTGACAA R: CCTGTTTCACGTTCCCATTTG
<i>MdCht8</i>	F: ATGCAAAATTCATCAGTTTTTCATCC R: GGATGAAAACGTATGAAATTTGCAT
<i>MdCht9</i>	F: GTTGTGGTGGCTGGAATGAA R: TTGTGCCGATATTCCCAAT
<i>MdCht10</i>	F: TGGTTTCTCGGGTCTCCATT R: TCGGAGCGTATTTCTCTCAACA
<i>MdIDGF7</i>	F: ATGCAAAATTCATCAGTTTTTCATCC R: GGATGAAAACGTATGAAATTTGCAT

注: Forward(F)表示正向引物, Reverse(R)表示反向引物。

结 果

1 家蝇几丁质酶基因序列分析

经 BLAST 比对和 SMART 鉴定, 共在家蝇基因组内鉴定出 20 条几丁质酶及类几丁质酶基因, 包括 9 条 *Cht* 基因和 11 条 *IDGF* 基因, 其外显子和内含子组成如图 1。

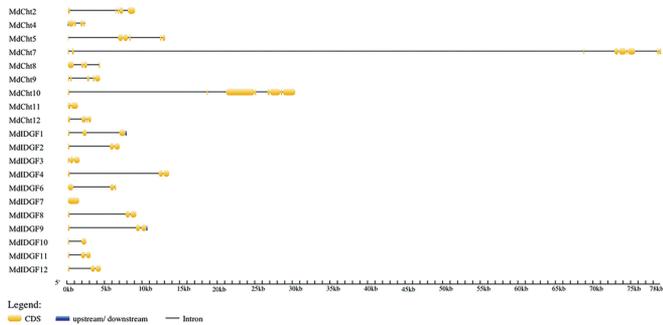


图 1 家蝇几丁质酶基因外显子和内含子组成

Fig. 1 Schematic diagram of the exon and intron organizations of chitinase genes for *M. domestica*

2 家蝇几丁质酶蛋白理化特性

大多数家蝇几丁质酶基因的参考蛋白为 400~500 aa, 但 *MdCht7* 的参考蛋白为 1019 aa, *MdCht10* 的参考蛋白为 2410 aa。Cht (Chitinase) 蛋白相对分子质量为 (45.933~270.602) × 10³, pI 为 5.02~8.89; IDGF 相对分子质量为 (26.663~53.683) × 10³, 除了 3 种 IDGF 的 pI 高于 10, 大多数 IDGF 的 pI 在 7 左右(表 2)。

表 2 家蝇几丁质酶蛋白的理化特性

Table 2 Characteristics of chitinase proteins for *M. domestica*

自定名称 Name	序列号 Accession No.	氨基酸 Amino acid	相对分子质量 Molecular weight (×10 ³)	等电点 pI
MdCht2	XP_005188441.1	509	57.846	6.01
MdCht4	XP_005180251.3	466	50.827	7.35
MdCht5	XP_005178009.1	579	65.609	6.70
MdCht7	XP_011291381.1	1019	114.556	6.15
MdCht8	XP_005180252.1	503	56.902	7.71
MdCht9	NP_001273800.1	464	51.441	5.02
MdCht10	XP_005191759.1	2410	270.602	6.55
MdCht11	XP_011295313.1	481	55.188	7.33
MdCht12	XP_005176318.1	397	45.933	8.89
MdIDGF1	XP_005179407.1	444	50.059	6.99
MdIDGF2	XP_005179408.1	442	49.455	6.63
MdIDGF3	XP_005179411.1	472	53.683	10.14
MdIDGF4	XP_005188679.1	443	48.794	7.83
MdIDGF6	XP_005186299.1	431	48.675	6.95
MdIDGF7	XP_005176156.1	457	51.491	9.28
MdIDGF8	XP_005181905.1	450	50.416	6.54
MdIDGF9	XP_005179409.1	438	49.737	6.91
MdIDGF10	XP_005189066.1	233	26.663	10.28
MdIDGF11	XP_005189067.1	429	47.838	10.05
MdIDGF12	XP_005189317.1	429	47.897	10.15

3 家蝇几丁质酶蛋白的结构域分析

大多数已知昆虫的几丁质酶基因具有 4 种结构域: 信号肽 Signal Peptide(SP)、催化结构域 Catalytic Domain(CD)、几丁质结合结构域 Chitin Binding Domain(CBD)和连接区域 Linker Region。有的蛋白包含所有 4 种结构域, 有的包含部分种类的结构域, 有的出现同种结构域的扩增现象, 家蝇同样如此(图 2)。如 *MdCht7* 包含 1 个 SP、2 个 CD 和 1 个 CBD, *MdCht10* 包含 1 个 SP、4 个 CD 和 4 个 CBD。

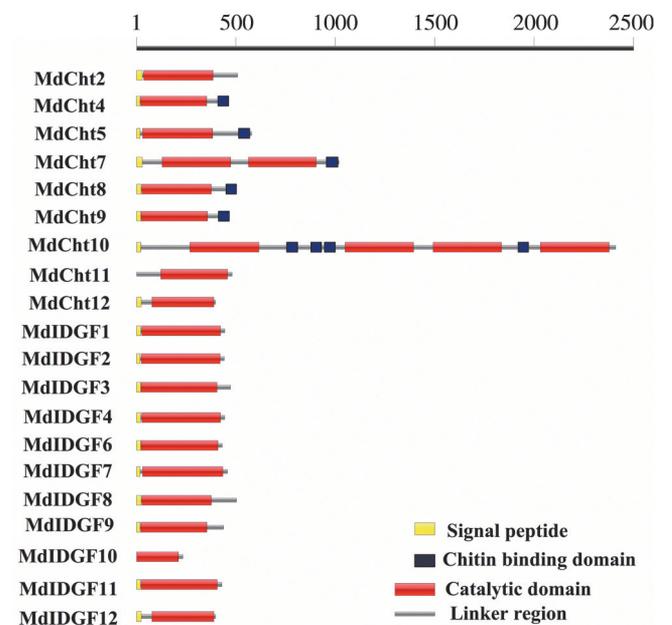


图 2 家蝇几丁质酶蛋白的结构域组成

Fig. 2 The domain organization of the chitinase proteins for *M. domestica*

昆虫几丁质酶的氨基酸序列有一个高度保守片段FDGXDLWEYPC(保守区II),此外还有3个其他特征序列: KXXXXXGGW、MXYDXXG和GXXXWXXDXD^[5,18]。家蝇几丁质酶催化结构域几乎都具备高保守区II,和至少两段其他保守区(图3),但MdIDGF10缺失前两种特征序列。

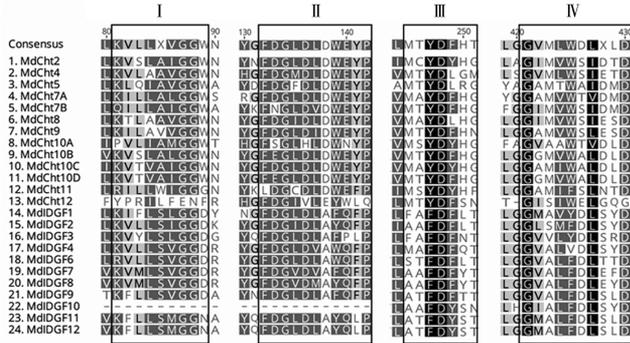


图3 家蝇几丁质酶催化结构域序列的多重比对

Fig. 3 Multiple alignments of the catalytic domains of chitinase for *M. domestica*

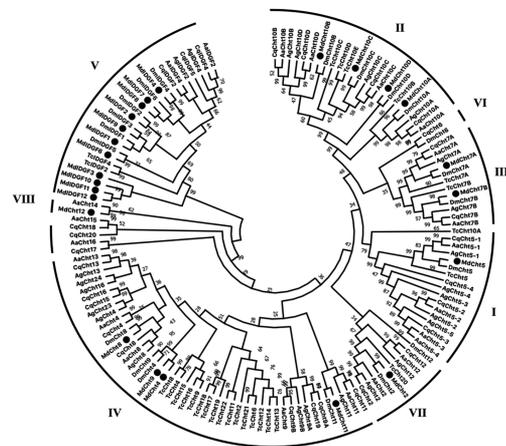
4 家蝇几丁质酶的系统发育分析

基于几丁质酶催化结构域的氨基酸序列构建系统发育树。由于家蝇属于双翅目昆虫,因此选择文献报道的5种双翅目昆虫(黑腹果蝇 *D. melanogaster*,冈比亚按蚊 *A. gambiae*,致倦库蚊 *C. quinquefasciatus*^[12]、埃及伊蚊 *Aedes aegypti*,赤拟谷盗 *T. castaneum*^[9])的几丁质酶序列,共同构建系统发育树,结果家蝇几丁质酶基因被分为8组(图4)。按照家蝇与5种双翅目昆虫的几丁质酶的聚类关系,对家蝇的几丁质酶基因进行命名(表2)。进化树显示, *MdChT5* 属于组I; *MdChT10* 的4个催化结构域 (*MdChT10A*、*MdChT10B*、*MdChT10C* 和 *MdChT10D*) 属于组II; *MdChT7* 的两个催化结构域 (*MdChT7A*、*MdChT7B*) 属于组III; *MdChT4*、*MdChT8*、*MdChT9* 和 *MdChT11* 属于组IV; 所有类几丁质酶基因 *IDGF* 都属于组V; *MdChT2* 属于组VII, *MdChT12* 属于组VIII。

5 家蝇几丁质酶基因的时空表达特性

选择家蝇的7个几丁质酶基因(*ChT*)作为研究对象,使用qPCR检测在家蝇6个不同发育阶段和II龄幼虫多种组织中的表达情况,另外检测一个属于GH18家族但不具有几丁质酶活性的成虫盘生长因子(*IDGF*)基因,用于比较。使用双因素方差分析法(Two-way ANOVA)进行显著性分析,取 $P < 0.0001$ 。展示结果时,一方面以单个几丁质酶基因为单位,展示每个基因在各龄期的表达情况(图5A)。结果显示 *MdChT2* ($F_{6,12} = 72.86$)、*MdChT5* ($F_{6,12} = 662.5$)、*MdChT7* ($F_{6,12} = 62.39$)和 *MdChT10* ($F_{6,12}$

$= 261.6$)在蛹期显著性高表达; *MdChT4* ($F_{6,12} = 114.3$)、*MdChT8* ($F_{6,12} = 33.73$)、*MdChT9* ($F_{6,12} = 445.2$)和 *MdIDGF7* ($F_{6,12} = 71.38$)主要在幼虫期高表达。另一方面以每个发育时期为一组,每组包含8个基因,进行组内比较,展示家蝇在不同发育阶段对这些几丁质酶的需求情况(图5B)。结果显示在整个幼虫期 *MdChT4* 呈显著性高表达(I龄期 $F_{7,14} = 293.3$, II龄期 $F_{7,14} = 213.8$, III龄期 $F_{7,14} = 36.91$);在蛹期 *MdChT5* 和 *MdChT10* 呈显著性高表达($F_{7,14} = 229.0$);在成虫期 *MdChT5* 呈显著性高表达(雌虫 $F_{7,14} = 45.2$,雄虫 $F_{7,14} = 343.8$)。



注:家蝇(Md);黑腹果蝇(Dm);冈比亚按蚊(Ag);埃及伊蚊(Aa);致倦库蚊(Cq);赤拟谷盗(Tc)。

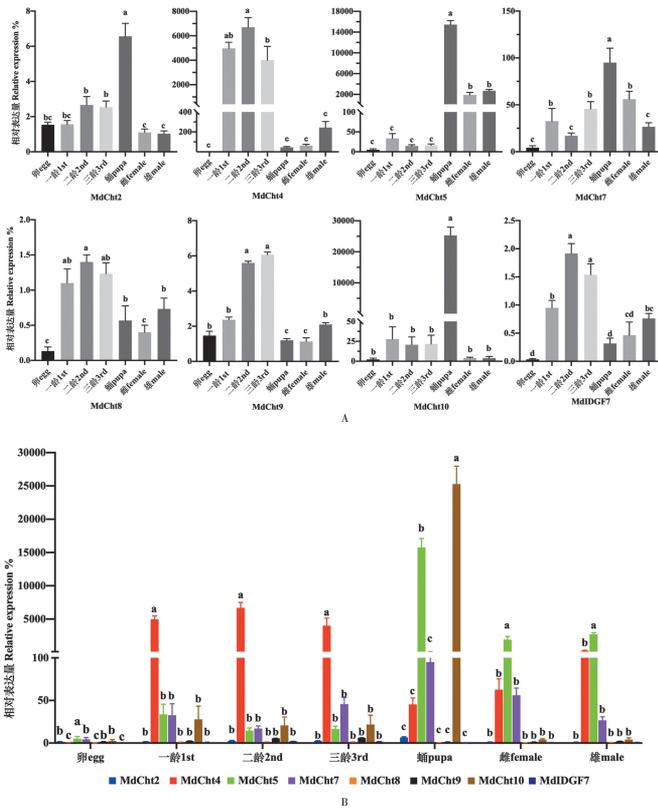
图4 基于6种昆虫几丁质酶的系统发育树

Notes: *M. domestica* (Md); *D. melanogaster* (Dm); *A. gambiae* (Ag); *A. aegypti* (Aa); *C. quinquefasciatus* (Cq); *T. castaneum* (Tc).

Fig. 4 Phylogenetic tree based on the catalytic domains of chitinase for six insects

选择家蝇II龄幼虫的5种组织进行qPCR检测,显著性分析方法同前,取 $P < 0.0001$ 。同样,一方面以单个几丁质酶基因为单位,展示每个基因在各组织中的表达情况(图6A)。结果显示 *MdChT2* 在表皮和气管中高表达($F_{4,8} = 242.3$); *MdChT4* 在马氏小管和肠道中高表达($F_{4,8} = 167.7$); *MdChT5* 在多种组织中均有表达($F_{4,8} = 69.12$),但气管中分布最高; *MdChT7* ($F_{4,8} = 106.8$)和 *MdChT10* ($F_{4,8} = 98.79$)在气管中有显著性高表达; *MdChT8* 在马氏管、肠道和唾液腺呈高表达($F_{4,8} = 76.24$); *MdChT9* ($F_{4,8} = 92.61$)和 *MdIDGF7* ($F_{4,8} = 291.7$)在唾液腺中特异性高表达。另一方面,以每种组织为一组,分析组内8个基因的表达情况,展示II龄期家蝇部分组织中几丁质酶的表达情况(图6B)。其中 *MdChT4* 在马氏管($F_{4,8} = 180.6$)和肠组织($F_{4,8} = 112.8$)中显著性高表达;其他三种组织中各个几丁质酶基因的相对表达量无显著性差异;此外部分基因在某些组织中几乎不表达,如体壁中的

MdCht8, 马氏管中的 *MdCht7*, 肠组织和唾液腺中的 *MdCht2* 和 *MdCht7*。

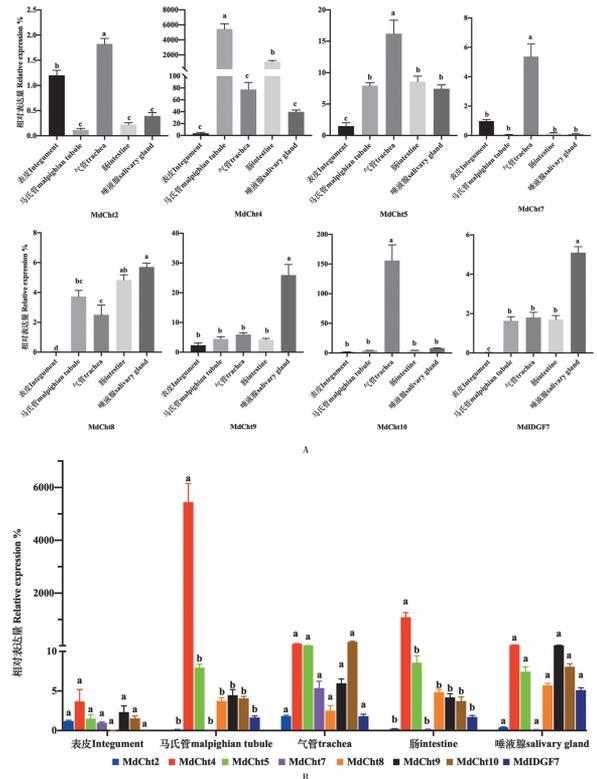


注(Notes): A 组间比较 (Compared with each groups), 以单个基因为对象, 分析每个基因在各龄期的表达情况 B 组内比较 (Compared within each groups), 以每个发育时期为一组, 每组包含 8 个基因, 显示不同发育阶段 8 个基因的相对表达量。柱形上的字母 (a, b, c, d) 相同, 表示组内 (或组间) 没有显著性差异; 反之, 则表示有显著性差异。使用双因素方差分析法 (Two-way ANOVA) 进行显著性分析, $P < 0.0001$ 。下同。

图 5 8 种几丁质酶在家蝇各个生长阶段的表达情况
Fig. 5 Relative expression of eight chitinase genes of *M. domestica* in different developmental stages

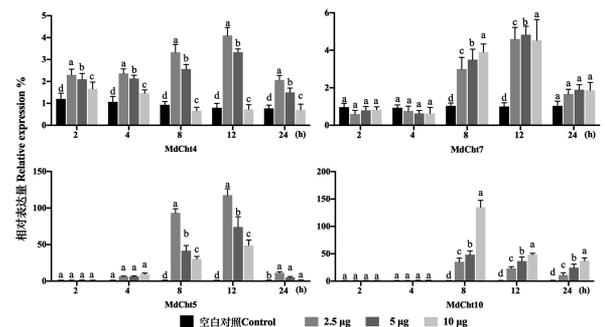
6 蜕皮激素 20E 对几丁质酶基因表达的影响

为了探讨家蝇几丁质酶基因与蜕皮的关系, 从系统树的四个分组中 (组 I、组 II、组 III 和组 IV) 分别选取 1 个基因作为代表, 即 *MdCht5*、*MdCht10*、*MdCht7* 和 *MdCht4*, 然后使用 3 种浓度的 20E 处理家蝇 II 龄幼虫, 并在处理后的 5 个时间点检测上述基因的表达情况 (图 7)。使用双因素方差分析法进行显著性分析, 取 $P < 0.05$ 。结果显示, 4 个基因均对 20E 的刺激呈正向应答, 其中在注射 20E 后的第 8 h 和第 12 h 时, 应激表达量较高。在这两个时间点上, 处理组 *MdCht4* 和 *MdCht5* 的应激表达量随着 20E 浓度的增加而降低, *MdCht7* 和 *MdCht10* 的应激表达量随着 20E 的浓度增加而增高。



注(Notes): A 组间比较, 以单个基因为对象, 分析每个基因在各组织中的表达情况; B 组内比较, 以每种组织为一组, 每组包含 8 个基因, 显示家蝇在五种组织中 8 个基因的表达情况。 $P < 0.0001$ 。

图 6 8 种几丁质酶基于在家蝇不同组织中的表达情况
Fig. 6 Relative expression of eight chitinase genes of *M. domestica* in different tissues



注(Notes): 组内比较 (Compared within each groups), 以单个基因为对象, 以某个时间点为一组, 每组包含该基因对 20E 不同浓度的应激表达量 (含空白对照)。字母 (a, b, c, d) 表示组内比较的结果, 相同则表示基因表达量没有显著性差异; 反之, 则表示具有显著性差异; $P < 0.05$ 。

图 7 4 个家蝇几丁质酶基因对 3 种浓度 20E 的应答情况
Fig. 7 Responses of four chitinase genes of *M. domestica* for 20E in three concentrations

讨论

本研究基于家蝇基因组现有的拼接情况, 检索获得 20 个几丁质酶家族基因成员, 其中几丁质酶基因 (Cht) 9 个, 类几丁质酶基因——成虫盘生长因子 (IDGF) 基因 11 个。我们采用生物信息学方法分析基因的序列特征和其参考蛋白的理化特性, 根据系统

树结构将家蝇几丁质酶基因分为 8 组,并分别命名。系统树的分支结构与选择的物种密切相关,已报道的各种昆虫几丁质酶的分组数量从 5 组到 11 组(组 I 至组 X,和组 h)不等。尽管如此,在现有文献中昆虫几丁质酶的家族基因依然存在一些比较稳定分支,即使选择的昆虫种类、数量和基因不同,依旧能划分出第 I、II、III、IV 和 V 组基因,本研究绘制的家蝇几丁质酶的系统发育树同样如此。这意味着组内基因的催化结构域具有相对独特和保守的序列。鉴于此,本研究结合几丁质酶基因的时空特性,初步探讨 I ~ V 组中家蝇几丁质酶基因潜在的功能。

MdCht5 归为组 I,其参考蛋白具有 1 个信号肽和 1 个催化结构域。一些昆虫位于组 I 的基因可以形成基因簇,例如冈比亚按蚊的 5 个 *Cht5* 在染色体上串联排列,形成一个基因簇^[19]。类似情况还有致倦库蚊的 3 个 *Cht5* 和东亚飞蝗的两个 *Cht5*^[3,12]。但黑腹果蝇和家蝇只有 1 个 *Cht5*,二者与 3 种蚊类的 *Cht5-1* 近缘^[19-20]。Zhang 等^[9]报道冈比亚按蚊的 5 个 *Cht5* 在蛹期成虫期高表达,提示组 I 基因与蚊类的羽化有关^[9]。另外,通过 RNAi 沉默 *Cht5-1* 能够导致东亚飞蝗若虫和小菜蛾成虫异常发育^[3,21],说明 *Cht5* 基因是昆虫发育的关键基因。本研究在家蝇的蛹和成虫阶段检测到 *MdCht5* 高表达,在幼虫多种组织中有较高表达,并能够受 20E 的调节(图 7),提示 *MdCht5* 可能影响家蝇的幼虫生长和羽化。

MgCht10 归为组 II,其参考蛋白包含具有 4 个或 5 个催化结构域的几丁质酶。如黑腹果蝇、冈比亚按蚊、致倦库蚊和本研究中的家蝇,具有 4 个催化结构域^[12,20],赤拟谷盗和家蚕有 5 个^[10,20],褐飞虱有 3 个^[22]。这种基因的扩增现象可能是由于其功能的不可替代性所致。针对蝗虫、小菜蛾、赤拟谷盗 *Cht10* 的干扰试验证明该基因对于昆虫的蜕皮、结蛹和羽化至关重要^[8,21,23]。本实验结果显示,*MdCht10* 在蛹期显著性高表达,在整个幼虫期有较高表达,在 II 龄幼虫的气管中特异性高表达,同时能受 20E 的调节,且应激表达量随 20E 浓度增大而升高(图 7),提示 *MdCht10* 与家蝇的蜕皮和蛹期发育密切相关。

MdCht7A 和 *MdCht7B* 归为组 III,其参考蛋白包含具有两个催化结构域的几丁质酶。组 III 的基因序列较其他组在进化上更为保守,如细菌 (*Pyrococcus kodakaraensis* KOD1)的几丁质酶 *ChiA* 与昆虫 *Cht7* 近缘^[24]。此外,*Cht7* 中的每个催化结构域(*Cht7A* 或 *Cht7B*)能分别表现出相对保守的区域,使其能够在系统树中形成独立的两个分支。针对白背飞虱 *Cht7* 的干扰试验证实其在昆虫蜕皮和翅膀发育中重要作用^[25]。本研究显示,*MdCht7* 几乎参与了所有的发育

阶段,并在蛹期有较高表达。此外,*MdCht7* 在 II 龄幼虫的气管中高表达,能够响应 20E 的刺激,并随 20E 的浓度增加而升高(图 7),这与粘虫 *Mythimna separate* 的研究结果^[26]相似,提示 *MdCht7* 可能与家蝇的蜕皮和羽化密切相关。

MdCht4、*MdCht8* 和 *MdCht9* 归为组 IV,其参考蛋白涵盖了丰富的几丁质酶种类,组内的基因通常被认为具有多种多样的特性和功能。上述三基因中部分存在于肠道,并参与消化含有几丁质的底物,如中肠围食基质或几丁质食物物质^[27]。本实验结果显示,三个基因在表皮表达量极低,但 *MdCht4* 在整个幼虫期显著性高表达(图 5B),在 II 龄幼虫的马氏管和肠组织中高显著性高表达(图 6B)。此外,*MdCht4* 能够较快响应 20E 的刺激(图 7),提示该基因在家蝇的幼虫阶段是一个关键基因。已有研究显示,*MdCht8* 和 *MdCht9* 在幼虫期的唾液腺高表达,但 *MdCht8* 的组织特异性不如 *MdCht9* 明显。此外,*MdCht8* 被证实参与家蝇的先天免疫^[13,15],但更多功能还需进一步探讨。

IDGF 基因归属于组 V,其参考蛋白的催化结构域与 GH18 基因家族参考蛋白相似,但无几丁质酶的酶活性和几丁质结合域。本研究选取该组其中的 1 条基因 *MdIDGF7* 作初步尝试,发现其在幼虫期的唾液腺高表达。筛选到的家蝇 IDGF 基因有 11 个,而家蚕和豌豆蚜虫只有 1 个^[10,28],3 种蚊类和赤拟谷盗有 2 ~ 3 个,果蝇有 6 个^[7,9,12]。显然,家蝇第 V 组的 IDGF 基因在进化中经历了巨大的扩增。通常认为 IDGF 与昆虫的变态发育相关,如番石榴实蝇 *Bactrocera correcta* 的 *IDGF6* 基因与幼虫和成虫翅膀的形成相关^[29]。另一方面,组 V 基因在昆虫的先天免疫中发挥多种作用,如黑腹果蝇的 *IDGF3*^[30]。家蝇组 V 中的众多基因可能会表现出更加多样化的功能。

本研究基于家蝇基因组现有的注释情况,鉴定并描述了 20 个几丁质酶家族基因的序列特征和参考蛋白的理化特性。构建的系统树将家蝇几丁质酶基因分为 8 组,qPCR 检测 8 个基因在家蝇 II 龄幼虫的 5 种组织中存在差异表达,4 个基因对 20E 的刺激呈正向应答。这些结果可以为家蝇几丁质酶的功能研究及家蝇的防治提供参考。

【参考文献】

- [1] Monyama MC, Onyiche ET, Taiwe MO, et al. Bacterial pathogens identified from houseflies in different human and animal settings: A systematic review and meta-analysis [J]. Vet Med Sci, 2022, 8 (2): 827-844.
- [2] Khoushab F, Yamabhai M. Chitin research revisited [J]. Mar Drugs, 2010(8): 1988-2012.

- [3] Li D, Zhang J, Wang Y, et al. Two chitinase 5 genes from *Locusta migratoria*: molecular characteristics and functional differentiation [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2015(58):46-54.
- [4] 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 Mol Biol*, 2017(26):243-253.
- [5] de la Vega H, Specht CA, Liu Y, et al. Chitinases are a multi-gene family in *Aedes*, *Anopheles* and *Drosophila* [J]. *Insect Mol Biol*, 1998(7):233-239.
- [6] Funkhouser JD, Aronson NN. Chitinase family GH18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family [J]. *BMC Evol Biol*, 2007(7):96.
- [7] 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 Biochem Mol Biol*, 2008(38):452-466.
- [8] Zhu Q, Arakane Y, Beeman RW, et al. Characterization of recombinant chitinase-like proteins of *Drosophila melanogaster* and *Tribolium castaneum* [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2008(38):467-477.
- [9] 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):e19899.
- [10] Pan Y, Lv P, Wang Y, et al. In silico identification of novel chitinase-like proteins in the silkworm, *Bombyx mori*, genome [J]. *J Insect Sci*, 2012(12):150.
- [11] Tetreau G, Cao X, Chen YR, et al. Overview of chitin metabolism enzymes in *Manduca sexta*: Identification, domain organization, phylogenetic analysis and gene expression [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2015(62):114-126.
- [12] 赵文静, 张晶, 张春林, 等. 致倦库蚊几丁质酶家族基因的鉴定与分析 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2016, 35(4):797-805.
- [13] 李妍, 马慧玲, 苏佩佩, 等. 家蝇几丁质酶 MDCh9 基因的克隆表达与酶活分析 [J]. *生物技术*, 2018, 28(5):417-424.
- [14] 苏佩佩, 赵欣宇, 李妍, 等. 家蝇几丁质酶 MDCh2 基因的序列分析、克隆与表达模式分析 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2019, 14(6):679-685.
- [15] 吴沁怡, 国果, 赵文静, 等. 家蝇几丁质酶基因 8 (MDCh8) 的 cDNA 克隆及功能初探 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2020, 15(2):168-173.
- [16] 苏佩佩, 赵欣宇, 马慧玲, 等. 家蝇几丁质酶基因 MDCh2 的原核表达及其表达产物的酶学性质分析 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2021, 40(1):72-80.
- [17] Scott JG, Warren WC, Beukeboom LW, et al. Genome of the house fly, *Musca domestica* L., a global vector of diseases with adaptations to a septic environment [J]. *Genome Biol*, 2014(15):466.
- [18] Kramer KJ, Muthukrishnan S. Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 1997(27):887-900.
- [19] Zhang J, Zhang X, Arakane Y, et al. Identification and characterization of a novel chitinase-like gene cluster (AgCh5) possibly derived from tandem duplications in the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae* [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2011(41):521-528.
- [20] 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 Biochem Mol Biol*, 2008(38):452-466.
- [21] Zhu B, Shan J, Li R, et al. Identification and RNAi-based function analysis of chitinase family genes in diamondback moth, *Plutella xylostella* [J]. *Pest Manag Sci*, 2019(75):1951-1961.
- [22] Xi Y, Pan PL, Ye YX, et al. Chitinase-like gene family in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* [J]. *Insect Mol Biol*, 2015(24):29-40.
- [23] Yang M, Wang Y, Jiang F, et al. miR-71 and miR-263 jointly regulate target genes chitin synthase and chitinase to control locust molting [J]. *PLoS Genet*, 2016(12):e1006257.
- [24] Tanaka T, Fujiwara S, Nishikori S, et al. A unique chitinase with dual active sites and triple substrate binding sites from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999(65):5338-5344.
- [25] Chen L, Liu T, Zhou Y, et al. Structural characteristics of an insect group I chitinase, an enzyme indispensable to moulting [J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2014(70):932-942.
- [26] 杨文庆, 樊东. 黏虫几丁质酶 MsCHT7 基因的克隆、表达及蜕皮激素的调控 [J]. *中国生物防治学报*, 2018, 34(3):10.
- [27] Arakane Y, Muthukrishnan S. Insect chitinase and chitinase-like proteins [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2010(67):201-216.
- [28] Nakabachi A, Shigenobu S, Miyagishima S. Chitinase-like proteins encoded in the genome of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* [J]. *Insect Mol Biol*, 2010, 19(Suppl 2):175-185.
- [29] Zhao Y, Li Z, Gu X, et al. Imaginal disc growth factor 6 (Idgf6) is involved in larval and adult wing development in *Bactrocera correcta* (Bezzi) (Diptera: Tephritidae) [J]. *Front Genet*, 2020(11):451.
- [30] Kucerova L, Broz V, Arefin B, et al. The *Drosophila* chitinase-like protein IDGF3 is involved in protection against nematodes and in wound healing [J]. *J Innate Immun*, 2016(8):199-210.

【收稿日期】 2022-11-15 【修回日期】 2023-02-01