

大草蛉雄虫卵黄原蛋白基因的鉴定和表达特征

冯彦姣¹, 刘小平¹, 张婷婷^{1,2}, 陈红印¹, 王孟卿¹, 刘晨曦¹, 李玉艳¹, 张礼生¹, 毛建军^{1*}

(1. 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100193; 2. 东北农业大学, 哈尔滨 150040)

摘要: 为探索卵黄原蛋白基因对大草蛉雄虫生殖生理等活动的调节作用, 利用 PCR 技术克隆了大草蛉卵黄原蛋白基因部分 cDNA 序列, 采用生物信息学方法分析其序列特征, 通过实时荧光定量 PCR 技术检测了该基因在不同发育阶段和不同组织的表达特征。结果表明, 克隆到的卵黄原蛋白基因的 cDNA 长度为 1501 bp, 编码 501 个氨基酸, 其预测的蛋白质分子量为 206 kD, 等电点 8.11, 具有 vitellogenin 保守的半胱氨酸残基、GL/ICG、RXXR 等结构域。序列分析表明大草蛉 vitellogenin 与其他昆虫同源蛋白的氨基酸序列一致性不太高, 在 29.46%~36.43%, 与骚扰锥蝽在系统进化上关系最近。荧光定量 PCR 结果显示 vitellogenin 在不同日龄的成虫中表达量没有显著差异; 在雄虫的腹部表达量较高, 均高于头部和胸部, 且头部和胸部的表达量之间没有显著差异, 表达量均较低。结果表明 vitellogenin 基因在大草蛉中的表达具有组织的特异性, 推测其可能参与大草蛉雄虫生殖调控。

关键词: 大草蛉; 卵黄原蛋白基因; 克隆; 表达

中图分类号: S476.2 文献标识码: A 文章编号: 1005-9261(2021)01-0077-09

Identification and Expression Characteristics of Vitellogenin Gene in *Chrysopa pallens* Males

FENG Yanjiao¹, LIU Xiaoping¹, ZHANG Tingting^{1,2}, CHEN Hongyin¹, WANG Mengqing¹, LIU Chenxi¹,
LI Yuyan¹, ZHANG Lisheng¹, MAO Jianjun^{1*}

(1. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. Northeast Forestry University, Haerbin 150040, China)

Abstract: In order to explore the regulatory effect of vitellogenin gene on the reproductive physiology and other activities of male *Chrysopa pallens*, the partial sequence of vitellogenin gene was cloned by PCR, the sequence characteristics were analyzed by bioinformatics, and the expression characteristics of vitellogenin gene in different developmental stages and different tissues were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. The results showed that the cDNA length of the cloned vitellogenin gene was 1501 bp, encoding 501 amino acids, the predicted molecular weight of the protein was 206 kD, the isoelectric point was 8.11, and it had vitellogenin conserved cysteine residues, GL/ICG, RXXR and other domains. Sequence analysis showed that the amino acid sequence of *C. pallens* vitellogenin was not very consistent with that of other insect homologous proteins, which was about 29.46% and 36.43%, which was closely related to the phylogeny of *Triatoma infestans*. The results of fluorescence quantitative PCR showed that there was no significant difference in the expression of vitellogenin in different ages of adults, but the expression in the abdomen of males was higher than that in the head and chest, and there was no significant difference between the head and chest, but the expression was low. The results showed that the expression of vitellogenin gene in *C. pallens* was tissue-specific, and it was speculated that it might be involved in the reproductive regulation of male of *C. pallens*.

Key words: *Chrysopa pallens*; vitellogenin gene; cloning; expression

收稿日期: 2020-01-14

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0201202); 中国农业科学院基本科研业务费重大项目(Y2019YJ06)

作者简介: 冯彦姣, 硕士研究生, E-mail: 18404969254@163.com; *通信作者, 博士, 副研究员, E-mail: maojianjun0615@126.com。

DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2020.04.001

大草蛉 *Chrysopa pallens* 属脉翅目 Neuroptera 草蛉科 Chrysopidae, 成虫、幼虫均可取食农、林、果、蔬上的蚜虫、叶螨、其他昆虫卵及低龄幼虫等多种农林害虫^[1], 是粮食作物、果蔬等经济作物害虫的重要捕食性天敌昆虫^[2,3]。由于具有分布广、食量大、食性广的特征, 在害虫的天敌防治中具有非常广阔的应用前景。

卵黄原蛋白 (Vitellogenin, Vg) 是卵生动物卵黄蛋白的前体物质^[4], 在大部分昆虫中, 由性成熟雌虫的脂肪体合成并分泌到血淋巴, 运输到卵巢后被发育中的卵母细胞选择性地摄取, 在卵子内沉积形成卵黄蛋白, 为胚胎发育提供氨基酸、脂肪、碳水化合物、磷和硫等营养和功能性物质^[5]。随着研究的深入, 在少部分昆虫雄性中也发现有 Vg 的表达。比如在社会性昆虫意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 的表达模式中发现, Vg 基因不仅在蜂王的脂肪体中转录表达, 在雄蜂和工蜂的脂肪体和蜂王的卵巢中也能检测到该基因^[6,7]; 在交配过的米蛾雄性成虫中检测到 vitellogenin mRNA^[8]。此外, 在大草蛉的雄虫中也检测到了 Vg 的存在^[9]。昆虫卵黄蛋白的研究是近年来昆虫生理学和生化学比较活跃的领域之一^[10], 但是对大草蛉雄虫的卵黄原蛋白的表达规律及功能研究还很少有文献报道。

本研究基于大草蛉转录组数据库设计引物, 克隆获得 1 个大草蛉 Vg 蛋白基因的全长序列, 并采用生物信息学方法对其序列进行分析; 通过荧光定量 PCR 方法检测大草蛉 vitellogenin 基因在不同发育阶段、不同组织的表达特征, 以期为深入研究 vitellogenin 功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试昆虫: 本试验中使用的大草蛉为中国农业科学院植物保护研究所天敌昆虫组室内连续多代饲养, 饲养条件为温度 (25±1) °C, 光周期 16L:8D, 相对湿度为 75%±10%。

试剂: TransScript® One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix, Trans2K DNA Marker, 6×DNA Loading Buffer, 北京全式金生物技术有限公司; 感受态细胞 Trans 5α Chemically Competent Cell, 克隆载体 pEASY-T1, 2x High-Fidelity Master Mix, 北京擎科新业生物技术有限公司; Go Taq® qPCR Master Mix, promega 公司; 琼脂糖, 江晨生物公司; 质粒小提试剂盒, 北京天根生化科技有限公司; 所有引物合成和 DNA 测序, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

仪器: 基因扩增仪 ETC811, 东胜公司; 7500 Real-Time PCR System 荧光定量 PCR 仪, 美国 Applied Biosystems 公司; 台式离心机 (sigma1-14); 水平电泳仪, 北京六一生物有限公司; 凝胶成像分析仪 WD-9413B, 北京六一仪器厂; NanoDrop 2000 超微量分光光度计, 美国 Emplen 公司; 旋涡震荡仪 QL-901, 海林市其林贝尔仪器制造有限公司; 微型离心机 Mini-4K, 珠海黑马医学仪器有限公司; 电子天平, 北京赛多利斯仪器系统有限公司; 超净实验工作台 HD-1360, 哈东联公司; 立式压力蒸汽灭菌锅 LS-B50L-I, 江阴滨江医疗设备有限公司; 微波炉 GalanzP7021TP-6。

培养基: LB (Luria-Bertani, LB) 液体培养基: 胰蛋白胨 10 g、酵母提取物 5 g、氯化钠 10 g、蒸馏水 1000 mL; LB 固体培养基: 在 LB 液体培养基中加入琼脂 15 g。

1.2 大草蛉雄虫总 RNA 提取和 cDNA 第一链合成

将单头大草蛉雌虫在液氮中研磨成粉末状, 并迅速加入 TENS 缓冲液, 1 头大草蛉约加缓冲液 1800 μL (分装到离心管中, 300 μL/管), 37 °C 下保育 3~18 h。每管加入 85 μL 5 mol/L 的 NaCl, 旋涡混匀 15 s, 1400 r/min 离心 5 min, 用 70%乙醇洗一次。室温下干燥沉淀 (置于通风橱中, 5 min), 加入 30~40 μL 无菌水溶解。采用紫外微量分光光度计确定 RNA 浓度和质量, 采用凝胶电泳检测总 RNA 的完整性, 采用 PrimeScript RT Reagent Kit 进行反转录, 所得 cDNA 于 -20 °C 冰箱中保存, 备用。

1.3 大草蛉 vitellogenin 基因克隆

根据已知的大草蛉雌虫卵黄原蛋白基因序列 (MH400048) 的信息, 分别设计 1 对简并引物 A1: 5'-TCTTCATTACAGCACTTGGC-3'; B1: 5'-ATTCTCGGCTGTATCCTTCA-3'。利用 ORF finder 软件对其进行分析, 其具有完整开放阅读框 (open reading frame, ORF)。为验证序列的准确性, 用于 PCR 扩增, 引物均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。20 μL 扩增反应体系: 2×PrimeSTAR Max Premix 10 μL、

ddH₂O 7 μL、上下游引物各 1 μL、cDNA 1 μL。PCR 扩增反应条件: 98 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 5 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环。对 PCR 产物进行凝胶电泳检测并分离回收, 将回收产物连接到 pEASY-T1 载体, 然后转化到大肠杆菌 Trans 5α 感受态细胞中。选取已鉴定为阳性克隆的菌液, 委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.4 大草蛉卵黄原蛋白基因 vitellogenin 理化性质及结构域预测

使用 ExPASy-ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam>) 软件分析 vitellogenin 基因编码蛋白的等电点及分子量。使用 TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 在线软件对 vitellogenin 氨基酸序列的跨膜结构域进行预测。使用 SingalP 3.0 软件进行 vitellogenin 蛋白信号肽的预测。利用 DNAMAN 软件进行氨基酸序列的多重比对和亲/疏水性分析。

1.5 大草蛉卵黄原蛋白的同源比对及进化树分析

从 NCBI 数据库中获得多个物种的 vitellogenin 基因, 使用 ClustalW 将大草蛉与获得的物种 vitellogenin 序列进行同源比对后, 使用软件 Mega 6 以邻接法 (neigh-bor-joining, NJ) 经 1000 次抽样分析将部分昆虫 vitellogenin 基因构建系统进化树。

1.6 大草蛉卵黄原蛋白基因的表达分析

测定大草蛉成虫羽化不同时间 vitellogenin 基因相对表达量: 分别取羽化后第 6、12、18、24、30 d 的雄成虫, 每个样品取样为雄成虫 1 头。

测定大草蛉成虫不同组织 vitellogenin 基因相对表达量: 分别取羽化后第 15 d 的大草蛉的雌、雄成虫以及雄成虫的头、胸、腹部位。每个样品取样为雌、雄虫各 1 头, 头 3 个, 胸 3 个, 腹 2 个。所有样品均设置 3 次以上重复, 于液氮中速冻并保存于 -80 °C 备用。根据测序结果设计定量引物: Q-AF: 5'-AAGGAGC CGTATATGATGTTGC-3'; Q-AR: 5'-TTTCAGCGGGACTTGTGG-3', 在生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 并通过普通 PCR 优化反应条件体系。选 *Actin* 作为内参基因, 引物为: AcF: 5'-AACTTCCCGAC GGTCAAGTCAT-3'; AcR: 5'-TGTTGGCGTACAAGTCCTTACG-3'。采用以 SYBR Green 为染料的荧光标记法进行定量检测。20 μL qPCR 体系: 2×Fast Start Es-sential DNA Green Master 10 μL、引物各 1 μL、模板 cDNA 1 μL、ddH₂O 7 μL。反应条件: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 10 s, 72 °C 延伸 10 s, 共 40 个循环; 95 °C 恒温 10 s, 65 °C 恒温 60 s, 97 °C 持续 1 s 制备熔解曲线, 37 °C 冷却 30 s。并使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[11] 计算 vitellogenin 基因的相对表达量。

1.7 大草蛉卵黄原蛋白的表达分析

通过 SDS-PAGE 检测。测定大草蛉雄成虫不同组织卵黄原蛋白的相对表达量: 分别取羽化后第 15 d 的雄成虫及头、胸、腹部位。每个样品取整虫 1 头, 头 3 个, 胸 3 个, 腹 2 个。所有样品均设置 3 次以上重复, 于液氮中速冻并保存于 -80 °C 备用。

1.8 数据统计与分析

使用 GraphPad Prism 6.0 软件对结果进行统计分析, 大草蛉卵黄原蛋白基因 mRNA 定量测定数据采用 ANOVA 单因素方差分析, 采用 Tukey's HSD 法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 大草蛉卵黄原蛋白基因的克隆与进化分析

以大草蛉 cDNA 为模板进行 vitellogenin 基因的扩增, 经测序拼接得到产物的大小为 5561 bp, 其中包含完整开放阅读框 (ORF) 1501 bp, 编码 501 个氨基酸残基。vitellogenin 编码蛋白含有 GLVG 基序、半胱氨酸残基、DGXR 基序、DXXR 基序等 (图 1), 说明产物为大草蛉卵黄原蛋白基因。通过软件分析可得, 其成熟肽的预测相对分子量为 206 kD, 理论等电点为 8.11, 其中包含酸性氨基酸残基 (Asp+Glu) 189 个, 碱性氨基酸残基 (Arg+Lys) 194 个。其分子式为 C₁₆₉₇₅H₂₈₅₁₉N₅₄₃₃O₆₉₇₉S₁₀₆₀, 蛋白的不稳定系数为 44.00, 推测其为不稳定蛋白, 且属于分泌性蛋白。跨膜结构域预测结果显示: Vg 不存在跨膜螺旋区, 其蛋白亲水性总平均值 0.874, 脂肪指数为 36.06。利用 DNAMAN 将其与雌虫的 Vg1 基因序列比较发现两者的相似度高达 99.8%, 如图 2。

1	TCTTCATTACAGCACTTGGCCATATACTTCAAACATGGCTCTTACATCTTTATCCGATTT
1	L H Y S T W P Y T S N M A L T S L S D L
61	AACTAAACAGCAAAGACAACATATTCATATCAGAGAACATCAAGAATCAGAACATACTTA
21	T K Q Q R Q H I H I R E H Q E S E H T Y
121	TGGACAAGAAAACGGAATTGCATATCGCATGAAAGTGCAATCTGAACAATCACCAGCTGA
41	G Q E N G I A Y R M K V Q S E Q S P A E
181	ATGGCGCAATCTTAACAATATGGCTGAAAAATACAATGTTTTAGCTCCAGTAATATTCGT
61	W R N L N N M A E K Y N V L A P V I F V
241	TTGGA AAAATGGCTCGGCAATTCTCTTCATGCCAGTAGTTTGAATTTAGAATATGTTCC
81	W K N W L G N S L H A S S L N L E Y V P
301	TGAATTATCCACTTCTCGTTATGTATCCATAGATATGGGTCATCGTCATGCATATCAATT
101	E L S T S R Y V S I D M G H R H A Y Q F
361	TGAACAAGTATCTCAACATGCACCCATGGATATGACCCGCTTTTTACGGATGAAGCTGA
121	E Q V S Q H A P M D M T R L F T D E A E
421	AGAAAATGATAATTGAGAAAATCATTATCAGAAAACCGCCAAATTGTAGCTTTGAATGT
141	E N D N S E K S L S Q N R Q I V A L N V
481	CGTCAGATTTGGAATCAACCAAGCTGAAGGAGCCGTATATGATGTTGCTCTTAAATCTC
161	V R F G I N Q A E G A V Y D V A L K F S
541	AGGTGAAAATCGCCAAAGATACGTTGCTACATTTGCATACGCCACAAGTCCCCTGAAAA
181	G E N R Q R Y V A T F A Y A T S P A E N
601	TCATTTCCGTC AATTATTGCTTATGTCTAAATATGGTAAAAATCCATACTTAATTTGGGC
201	H F R Q L L L M S K Y G K N P Y L I W A
661	TACAGCTAATACAAACGCTACACAATCACCAGCATTAACCTTTGTGCAAGCTCTTCAAAG
221	T A N T N A T Q S P A L N F V E A L Q S
721	TGATTCTCATGTTAACTACTGAAATCACAGCAAGATTCGGAGGAAGTTTACCAGATCTTGC
241	D S H V N T E I T A R F G G S L P D L A
781	AGAAATCAACGTAAACGCACGATGGGAAAAGAGTCAAGAAAGACGCCAAGCTCTCCAAAG
261	E I N V N A R W E K S Q E R R Q A L Q S
841	TTCCACAATGGCTCAATTACATGCTCGTCAAAATGGAAAATAATATGTATCAAACCTCAAT
281	S T M A Q L H A R Q M E N N M Y Q T P I
901	TGGTGCTAATTTAACTGTTCAAGCAACTATGATGGATAGACTTAACATTCAAGCTGAATT
301	G A N L T V Q A T M M D R L N I Q A E F
961	CGACCAAGTTGATGATATTACCAAAAATATGACACAAAAAATTTGGTCTGCTATTAGCA
321	D Q V D D I T K N M T Q K I W S A I Q H
1021	TTATGGATACCAATATATTGAAAGAAATCCAATTAATGGCATAGGAAGTGGAACTCTAA
341	Y G Y Q Y I E R N P I N G I G S G N S K
1081	GCAAATAAACATTCGTGTTGAATTCGAGCCAGAAAACCTTGAATCTGCAAACATTACTGT
361	Q I N I R V E F E P E N F E S A N I T V
1141	TCAAACACCTAAATCTGATGTTGATTTCAGAAATGTACTTATTA AAAACAAAGCAGTACG
381	Q T P K S D V V F R N V L I K N K A V R
1201	TTCTTTAGTTGCAGTTCGACCTGAATCCAATCCAATAAGTAATTATTACGCTATGCTTTA
401	S L V A V R P E S N P I S N Y Y A M L Y
1261	TCAACGAGTTGAATCTAAAAATGCTGCCGTTTGGGAAGGTACATCCGTTACAACATTCAA
421	Q R V E S K N A A V L E G T S V T T F N
1321	TAATAGAACTTACCAAGTTTCTTTAGGTTACTGCTATCACGTATTCTTACAAACTGTAAA
441	N R T Y Q V S L G Y C Y H V F L Q T V K
1381	ACATCTTCAACGTGAAATTCAGGCAGCGACAATTACATTACTCAATTTTAGTTCTGTGA
461	H L Q R E I Q G S D N L H Y S I L V R E
1441	GGCTAAAAAGAAAAC TACAACGACGTTAAAACTTATTCCGATATGAAGGATACAGCCG
481	A K K E N Y N D V K I L F G Y E G Y S R
1501	AGAAT
501	

图 1 大草蛉部分 vitellogenin 序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 1 Partial vitellogenin gene sequence and its derived amino acid sequence

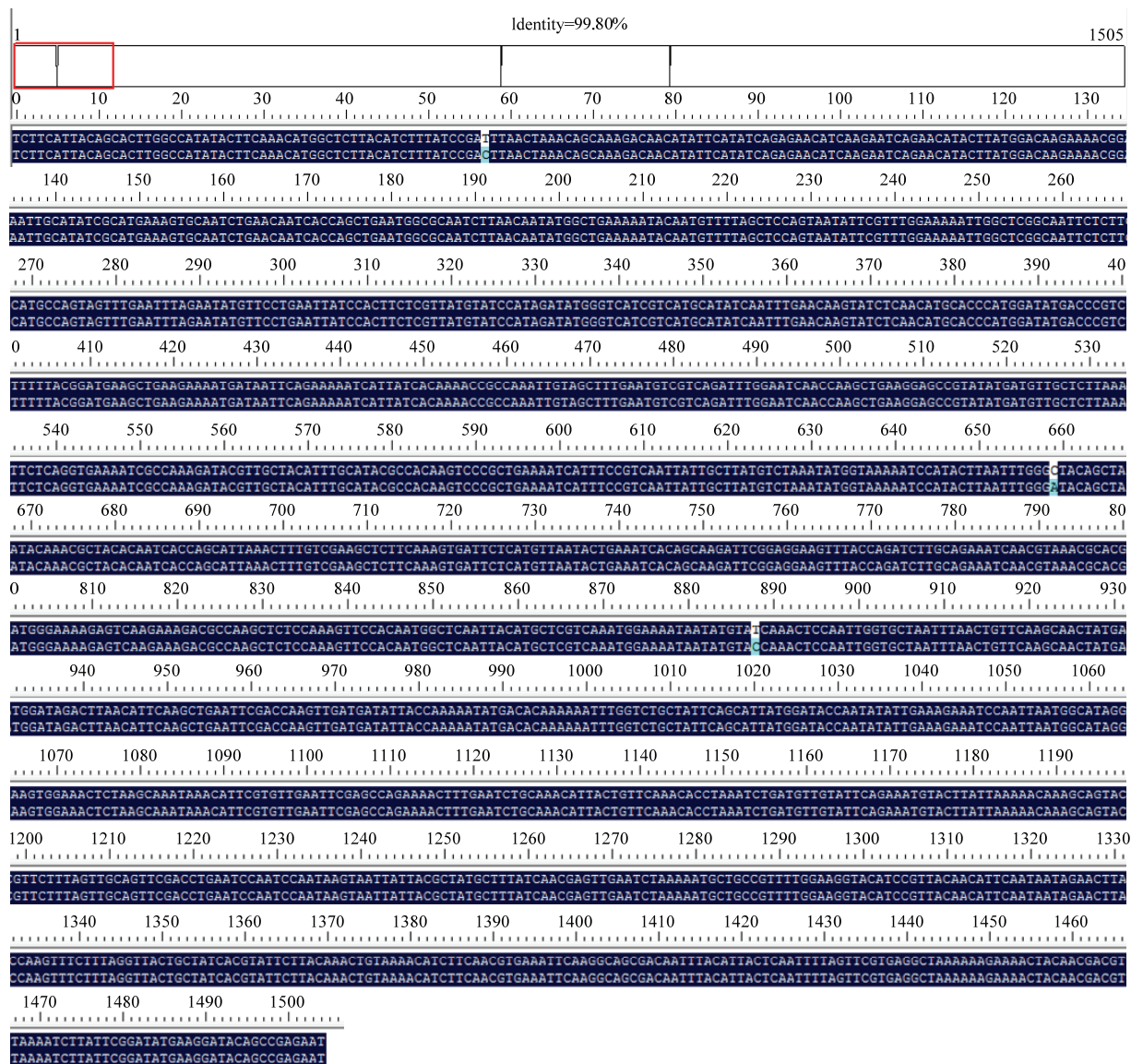


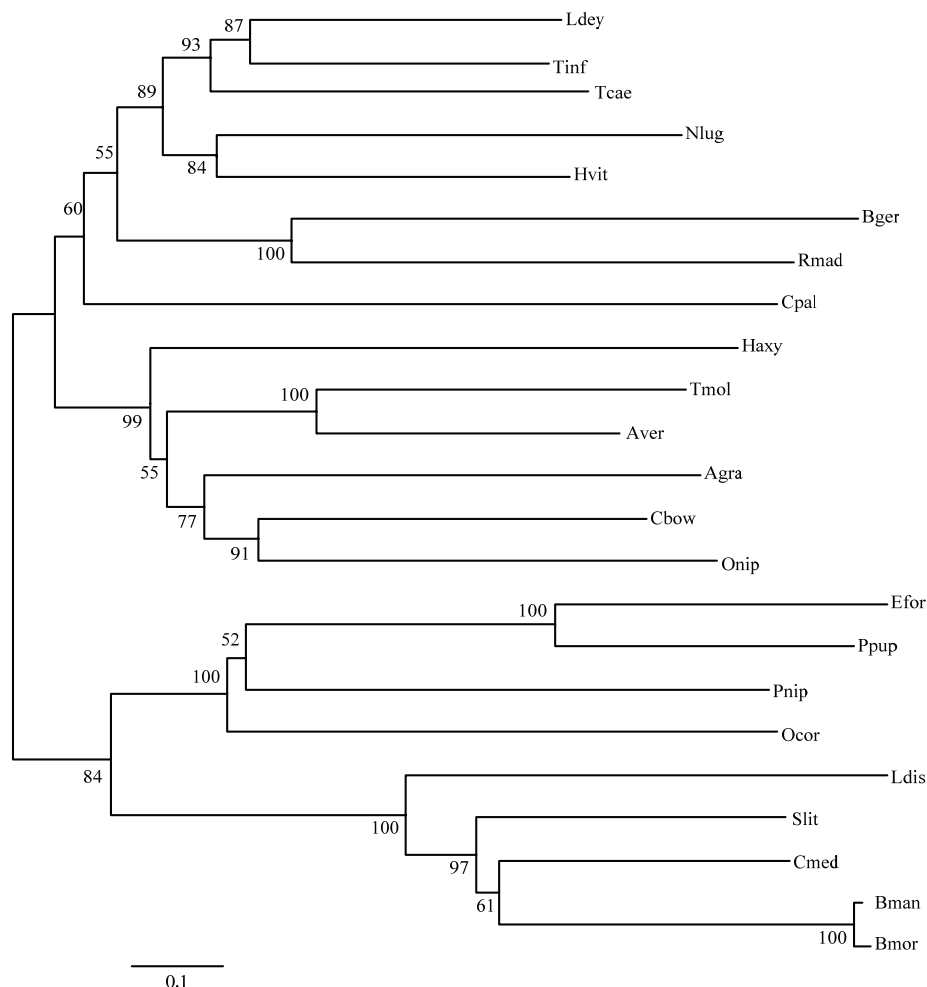
图 2 大草蛉雄虫部分 vitellogenin 序列与雌虫 Vg1 的比对

Fig. 2 Comparison of partial vitellogenin sequence between *Chrysopa pallens* males and females Vg1 gene

利用 NCBI 对大草蛉雄虫 Vg 基因序列进行同源检索, 并选取了半翅目、网翅目、鞘翅目、膜翅目、鳞翅目的 23 个代表性昆虫的基因序列。BLAST 比对结果表明, 雄虫卵黄原蛋白基因序列与骚扰锥蝽 *Triatoma infestans* (GenBank 登录号: AIA09041) 的相似性最高, 为 32.75%, 与其他昆虫 vitellogenin 基因一致性不太高。基于膜翅目、鞘翅目的 23 种 vitellogenin 氨基酸序列, 以邻接法构建的进化树结果显示, vitellogenin 分别聚为 4 支, 大草蛉 vitellogenin 与网翅目的德国小蠊、马德拉蜚蠊先聚合, 其次与半翅目的大田鳖、骚扰锥蝽、赤须盲蝽、褐飞虱、琉璃叶蝉聚为一支; 而鞘翅目的异色瓢虫、大猿叶甲、黄粉虫、疣状天牛、棉铃象甲以及水椰八角铁甲聚为一支; 膜翅目的丽蚜小蜂、蝶蛹金小蜂、日本瘤姬蜂、角额壁蜂聚为一支, 鳞翅目的舞毒蛾、斜纹夜蛾、稻纵卷叶螟、野桑蚕及家蚕则聚为一支。vitellogenin 聚类结果能较好地反映昆虫间的亲缘关系。

2.2 vitellogenin 基因表达分析

2.2.1 大草蛉雄虫不同发育阶段 vitellogenin 基因的表达分析 大草蛉 vitellogenin 基因表达不具有明显的发育阶段特异性, 在羽化后第 6 d 表达量最低, 但是之后的表达水平基本呈现稳定趋势, 差异不大, 这一结果与前面研究人员的结果是相吻合的^[13]。



Ldey: 大田螯 *Lethocerus deyrollei* Vg 基因 (GenBank 登录号: AB425334); Tinf: 骚扰锥蝽 *Triatoma infestans* Vg 基因 (GenBank 登录号: KF915267); Tcae: 赤须盲蝽 *Trigonotylus caelestialium* Vg 基因 (GenBank 登录号: AB600673); Nlug: 褐飞虱 *Nilaparvata lugens* Vg 基因 (GenBank 登录号: AB353856); Hvit: 琉璃叶蝉 *Homalodisca vitripennis* Vg 基因 (GenBank 登录号: DQ118408); Bger: 德国小蠊 *Blattella germanica* Vg 基因 (GenBank 登录号: AJ005115); Rmad: 马德拉蜚蠊 *Rhyarobia maderae* Vg 基因 (GenBank 登录号: AB194976); Haxy: 异色瓢虫 *Harmonia axyridis* Vg 基因 (GenBank 登录号: KY032002); Tmol: 黄粉虫 *Tenebrio molitor* Vg 基因 (GenBank 登录号: AY714212); Aver: 疣状天牛 *Asbolus verrucosus* Vg 基因 (GenBank 登录号: QDEB01004340); Agra: 棉铃象甲 *Anthonomus grandis* Vg 基因 (GenBank 登录号: M72980); Cbow: 大猿叶甲 *Colaphellus bowringi* Vg 基因 (GenBank 登录号: KU516007); Onip: 水椰八角铁甲 *Octodonta nipae* Vg 基因 (GenBank 登录号: KR736347); Efor: 丽蚜小蜂 *Encarsia formosa* Vg 基因 (GenBank 登录号: AY553878); Ppup: 蝶蛹金小蜂 *Pteromalus puparum* Vg 基因 (GenBank 登录号: EF468683); Pnip: 日本瘤姬蜂 *Pimpla nipponica* Vg 基因 (GenBank 登录号: AF026789); Ocor: 角额壁蜂 *Osmia cornifrons* Vg 基因 (GenBank 登录号: KM262552); Ldis: 舞毒蛾 *Lymantria dispar* Vg 基因 (GenBank 登录号: U90756); Slit: 斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* Vg 基因 (GenBank 登录号: EU095334); Cmed: 稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis* Vg 基因 (GenBank 登录号: JN408698); Bman: 野桑蚕 *Bombyx mandarina* Vg 基因 (GenBank 登录号: AB239763); Bmor: 家蚕 *Bombyx mori* Vg 基因 (GenBank 登录号: D13160)

图 3 基于 vitellogenin 氨基酸序列以邻接法构建大草蛉和其相近昆虫的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of vitellogenin from *Chrysopa pallens* and related different insect species by using neighbor-joining method.

2.2.2 大草蛉雄虫不同组织 vitellogenin 基因的表达分析 大草蛉雄虫 vitellogenin 基因的表达具有组织特异性。vitellogenin 基因的表达量在雄虫的腹部最高, 其表达量分别为头部表达量的 3.51 倍 ($F_{1,4}=99438$, $P<0.01$), 为胸部表达量的 2.64 倍 ($F_{1,4}=949.778$, $P<0.01$) (图 4)。雄虫头部和胸部的 vitellogenin 表达量没有显著差异, 表达丰度基本相当。但是雌成虫中的表达量均显著高于雄虫及各组织部位的表达量。

2.2.3 不同组织 vitellogenin 的表达分析 对大草蛉雄成虫各组织部位的卵黄蛋白进行提纯与 SDS-PAGE 电泳分析后发现, 其整虫和腹部的卵黄蛋白分别由约 165 和 46 kD 左右的大小亚基组成, 但是雄虫的头部和胸部的卵黄原蛋白只有小亚基的部分, 没有检测到大亚基。

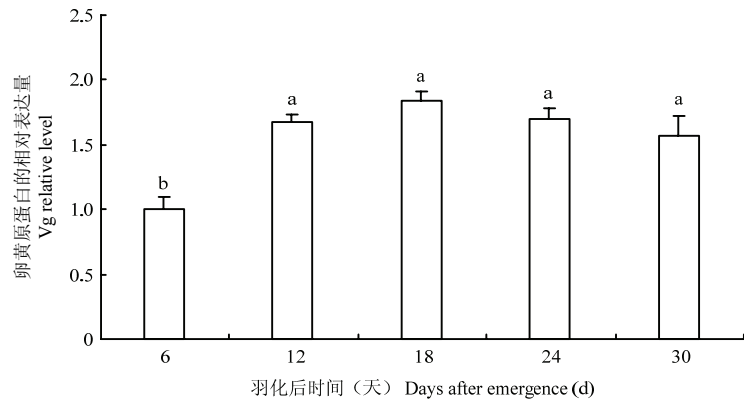


图 4 vitellogenin 基因在大草蛉雄虫羽化后不同天数的相对表达量

Fig. 4 Relative expression of vitellogenin mRNA in male in different days after emergence

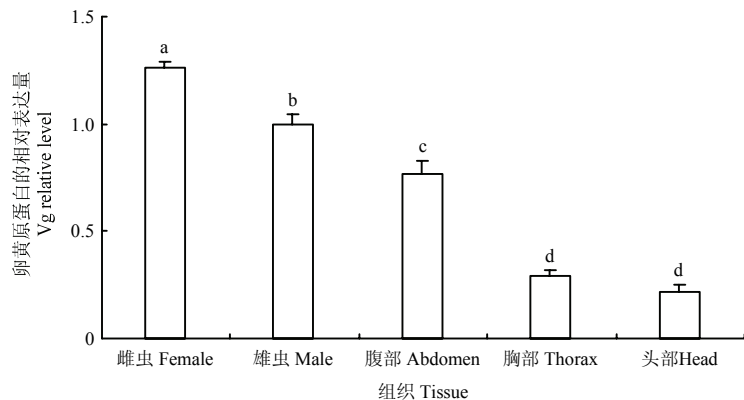


图 5 大草蛉 vitellogenin 基因在雌雄成虫及不同组织中的相对表达量

Fig. 5 Relative expression of vitellogenin mRNA in female and male adults and different tissues

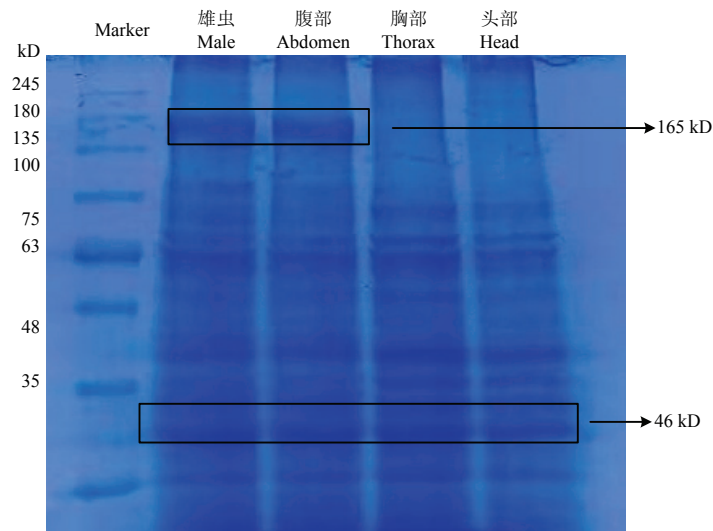


图 6 大草蛉 vitellogenin 蛋白在雌成虫及不同组织中的表达

Fig. 6 Expression of vitellogenin protein in female adult and different tissues

3 讨论

本研究根据大草蛉雌虫的卵黄原蛋白序列信息数据设计了雄虫 Vg 的基因引物，成功克隆了雄虫 Vg 基因的部分 cDNA 序列。经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检验了其表达，大草蛉雄虫卵黄原蛋白由约 165 kD

和 44 kD 大小的两个亚基组成,与陶淑霞等^[13]的研究结果一致。根据蛋白氨基酸序列特征分析,Vg 具有卵黄原蛋白的典型保守特征,包含 GL/ICG 基序、DGXR 基序、半胱氨酸残基等结构域,研究表明 GL/ICG 基序和半胱氨酸残基在昆虫胚胎形成过程中发挥功能性作用^[17,18]。D、E、P、Y 等氨基酸残基在 C-末端高度保守。此外,GL/ICG 基序是鉴定卵黄原蛋白基因的依据^[19]。这与天蚕、中华蜜蜂、小菜蛾、椭圆食粉螨等昆虫 Vg 的研究结果一致^[12-16],且本研究的系统进化分析结果显示,亲缘关系较近的昆虫 Vg 发育树的位置也较近,与传统形态学分类的结果是一致的。

RT-qPCR 结果表明,雄成虫 Vg 在不同发育阶段的表达不具有显著性差异,表达初期 Vg 表达量最少,之后的表达趋势趋于稳定,这种趋势和已报道的大草蛉雌虫中先增加后逐步下降的趋势完全不同^[10]。羽化初期 Vg 基因的表达量较低可能由于该时期各神经、生殖等系统尚未发育完全,因此其功能也不能完全发挥。大草蛉雄虫 Vg 基因在头、胸和腹部的转录表达结果显示,Vg 基因均可以在大草蛉雄虫的头、胸和腹部表达,其中头部表达丰度最低,其次是胸部,而腹部的表达量最高,极显著高于头部和胸部。这一结果与中华蜜蜂工蜂中的 Vg 基因表达结果是一致的^[20]。但是,大草蛉雌虫 Vg 基因的 mRNA 表达丰度是显著高于雄虫及其各组织的。SDS-PAGE 结果显示,大草蛉雄成虫整虫和腹部的卵黄蛋白均由 165 和 46 kD 的大小亚基组成,与大草蛉卵和雌虫 Vg 蛋白一样,属于第 1 类型表达模式,而头部和胸部的 Vg 蛋白只含有小亚基,与果蝇、家蝇等高等双翅目昆虫的 Vg 蛋白一样,属于第 3 类型表达模式^[11]。Vg 是一种雌性蛋白,由雌性脂肪体合成。为揭示雄虫 Vg 蛋白的合成部位,后续还需要分别从雄虫的脂肪体、睾丸、血淋巴等器官或组织提取蛋白以进行鉴定。

在大部分昆虫中 Vg 是在昆虫的脂肪体中合成的,在对社会性昆虫意大利蜜蜂的表达模式研究中也发现,Vg 不仅在蜂王的脂肪体中转录表达,在雄蜂和工蜂的脂肪体和蜂王的卵巢中也均能检测到^[21]。卵黄原蛋白是合成卵黄蛋白的前体物质,与卵黄的生成密切相关,在生殖调控中有着非常重要的作用。Moriyama 等^[22]发现在臭虫中 Vg 基因被干扰后,它体内相关营养物质在从脂肪体到卵母细胞的转运过程中受阻,从而抑制了产卵;在棉铃象甲中,Vg 的表达被沉默后,虽然不影响象甲的产卵量,但会显著降低有效卵的产生^[23]。这些结果均说明,Vg 基因无论是直接影响产卵还是间接影响孵化,都在昆虫繁殖中起到不可忽视的作用。有报道称,在社会性昆虫蜜蜂中,Vg 不仅与生殖行为相关,还有一些特殊的功能,比如还可以帮助蜜蜂适应气候、延长寿命和转化食物,通过清除自由基,减少氧化应激,从而延长工蜂和蜂王的寿命。此外,卵黄原蛋白还与蜜蜂的气候适应、生殖竞争等相关^[24-27]。还有报道发现,蜜蜂卵黄原蛋白的合成受到保幼激素和蜕皮激素等的严格调控^[28]。卵黄原蛋白基因是编码卵黄原蛋白的结构基因,是大草蛉最重要的功能基因之一^[29]。截止目前,对于大草蛉雄虫卵黄原蛋白基因表达调控的研究未见报道。其功能以及基因表达调控机制是怎么样的呢?这些课题都亟待深入研究。尤其是在天敌昆虫应用越来越广泛的今天,卵黄原蛋白基因的研究对大草蛉的扩繁提供基础,为开发实际应用大草蛉这一资源昆虫提供支持。

本研究对大草蛉雄虫的卵黄原蛋白 Vg 基因进行了克隆,分析了该序列与其他昆虫卵黄原蛋白之间的进化关系,并完成了在不同发育阶段、不同组织的表达规律的测定,确定了 Vg 的基本性质,对比其他昆虫卵黄原蛋白基因的研究,推测 Vg 基因对生殖活动和行为的调节起重要作用。这些结果丰富了对雄虫卵黄原蛋白基因的认知,并为进一步探索雄虫卵黄原蛋白基因对其生殖等行为的调控机制提供了理论基础。

参 考 文 献

- [1] 赵敬钊. 对我国棉田草蛉发生规律的初步分析[J]. 武汉师范学院学报(自然科学版), 1981, 34(2): 27-35.
- [2] 胡坚. 大草蛉生活史及其在烟田的消长规律[J]. 烟草科技, 2012(2): 80-82.
- [3] 张帆, 王素琴, 罗晨, 等. 几种人工饲料及繁殖技术对大草蛉生长发育的影响[J]. 植物保护, 2004, 30(5): 36-40.
- [4] Slessor K N, Winston M, Conte L Y. Pheromone communication in the honeybee (*Apis mellifera*)[J]. Journal of Chemical Ecology, 2005, 31(11): 2731-2745.
- [5] 任炳忠, 赵卓. 松嫩平原蝗虫群落动态变化初步研究[J]. 吉林农业大学学报, 2000, 22(4): 123-128.
- [6] Guidugli K R, Piulachs M D, Bellés X, et al. Vitellogenin expression in queen ovaries and in larvae of both sexes of *Apis mellifera*[J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2005, 59(4): 211-218.

- [7] Piulachs M D, Guidugli K R, Barchuk A R, *et al.* The vitellogenin of the honey bee, *Apis mellifera*: structural analysis of the cDNA and expression studies[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 33(4): 459-465.
- [8] Tufail Muhammad, Takeda Makio. Vitellogenin of the cockroach, *Leucophaea maderae*: nucleotide sequence, structure and analysis of processing in the fat body and oocytes[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 32(11): 1469-1476.
- [9] 刘昌燕. 大草蛉卵黄原蛋白基因功能研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.
- [10] 吴亚, 金翠霞. 草甸昆虫群落及其空间与时间结构[J]. *昆虫学报*, 1980, 23(2): 156-165.
- [11] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [12] Liu C, Mao J, Zeng F. *Chrysopa septempunctata* (Neuroptera: Chrysopidae) Vitellogenin functions through effects on egg production and hatching[J]. *Journal of Economic Entomology*, 2015, 108(6): 2779-2788.
- [13] 陶淑霞, 张帆, 李成德. 大草蛉卵黄发生的动态分析[J]. *吉林农业大学学报*, 2004, 26(3): 260-262.
- [14] 奚剑飞. 椭圆食粉蛾卵黄原蛋白基因对重金属铅胁迫的响应机制[D]. 南昌: 南昌大学, 2019.
- [15] 李志勇. 东方蜜蜂卵黄原蛋白基因转录模式[C]//中国农科院蜜蜂研究所. 国家蜂产业技术体系蜜蜂育种与授粉功能研究室学术研讨会暨中国养蜂学会蜜蜂育种专业委员会第四届第一次会议暨中国养蜂学会蜜源与蜜蜂授粉专业委员会第五届第一次会议论文汇编. 中国农科院蜜蜂研究所: 中国养蜂学会, 2012, 4-17.
- [16] 刘朝良, 王磊, 梶浦善太, 等. 天蚕卵黄原蛋白 cDNA 的克隆及序列分析[J]. *激光生物学报*, 2006, 15(1): 39-45.
- [17] 王加伟, 彭露, 邹明民, 等. 昆虫卵黄原蛋白受体(VgRs)及其主要功能综述[J]. *环境昆虫学报*, 2016, 38(4): 831-842.
- [18] Tufail M, Lee J M, Hatakeyama M, *et al.* Cloning of vitellogenin cDNA of the American cockroach, *Periplaneta americana* (Dictyoptera), and its structural and expression analyses[J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2000, 45(1): 37-46.
- [19] Tufail M, Hatakeyama M, Takeda M. Molecular evidence for two vitellogenin genes and processing of vitellogenins in the American cockroach, *Periplaneta Americana*[J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2001, 48(2): 72-80.
- [20] Lee J M, Nishimori Y, Hatakeyama M, *et al.* Vitellogenin of the cicada *Graptopsaltria nigrofusca* (Homoptera): analysis of its primary structure[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2000, 30(1): 1-7.
- [21] 刘丽平. 烟盲蝽卵黄原蛋白基因表达的营养调控[C]//中国植物保护学会. 中国植物保护学会成立 50 周年庆祝大会暨 2012 年学术年会论文集. 中国植物保护学会: 中国植物保护学会, 2012: 574.
- [22] Guidugli K R, Piulachs M D, Bellés X, *et al.* Vitellogenin expression in queen ovaries and in larvae of both sexes of *Apis mellifera*[J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2005, 59(4): 211-218.
- [23] Moriyama M, Hosokawa T, Tanahashi M, *et al.* Suppression of bedbug's reproduction by RNA interference of vitellogenin[J]. *PLoS ONE*, 2016, 11(4): e0153984.
- [24] Coelho R R, Firmino A A P, Macedo L L P D, *et al.* Vitellogenin knockdown strongly affects cotton boll weevil egg viability but not the number of eggs laid by females[J]. *Meta Gene*, 2016, 9(C): 173-180.
- [25] 严盈, 彭露, 万方浩. 昆虫卵黄原蛋白功能多效性: 以蜜蜂为例[J]. *昆虫学报*, 2010, 53(3): 335-348.
- [26] Engels W. Occurrence and significance of vitellogenins in female castes of social Hymenoptera[J]. *American Zoologist*, 1974, 14(4): 1229-1237.
- [27] Fluri P, Wille H, Gerig L, *et al.* Juvenile hormone, vitellogenin and hemocyte composition in winter worker honeybees (*Apis mellifera*)[J]. *Experientia*, 1977, 33(9): 1240-1241.
- [28] Amdam G V, Aase A L, Seehuus S C, *et al.* Social reversal of immunosenescence in honey bee workers[J]. *Experimental Gerontology*, 2005, 40(12): 939-47.
- [29] Seehuus S C, Norberg K, Gimsa U, *et al.* Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(4): 962-967.

(责任编辑: 张莹)