

斜纹夜蛾表皮蛋白基因克隆及表达谱分析

赵鹏^{1,2}, 张帅², 赵晨晨^{1,2}, 胡方梅^{1,2}, 崔金杰^{2*}, 李绍勤^{1*}

(1. 华中农业大学植物科学技术学院 / 湖北省昆虫资源利用与害虫可持续治理重点实验室, 武汉 430070;
2. 中国农业科学院棉花研究所 / 棉花生物学国家重点实验室, 河南 安阳 455000)

摘要:【目的】分析斜纹夜蛾不同发育阶段 14 个表皮蛋白 (Cuticular protein, CP) 基因的表达方式, 为深入探究 CP 在斜纹夜蛾生长发育过程中的功能提供参考。【方法】利用聚合酶链反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 扩增斜纹夜蛾表皮蛋白基因 cDNA 序列, 分析其核苷酸序列和相应的氨基酸序列, 并使用 MEGA5.2 软件构建了鳞翅目系统发育树。采用逆转录 PCR (Reverse transcription PCR, RT-PCR) 技术检测分析表皮蛋白基因在 3~6 龄幼虫各组织和 2 日龄成虫生殖器官中的表达。【结果】克隆了 14 个斜纹夜蛾表皮蛋白基因 (Insect cuticular protein gene, ICPG), 序列分析表明斜纹夜蛾表皮蛋白具有 35~36 个氨基酸残基保守基序, 属于几丁质结合蛋白, 它们与棉铃虫的 CP 具有高度的序列同源性。RT-PCR 结果表明, 14 个 ICPG 在 3~6 龄幼虫和 2 日龄成虫中均有表达, 其相对表达量在老龄期幼虫的表皮中较高, 在低龄期幼虫的脂肪体中也较高。此外, 所有 14 个 ICPG 均在睾丸和卵巢中低水平表达。在蛹期, SIICPG-11 和 SIICPG-14 相对表达量最高。【结论】克隆了 14 个斜纹夜蛾 CP 基因的 cDNA。其表达表现出组织和发育阶段特异性, 暗示它们在斜纹夜蛾发育中的功能不同, 为控制斜纹夜蛾靶标位点的选择奠定了基础。

关键词: 斜纹夜蛾; 表皮蛋白; 基因克隆; 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR); 组织表达; 发育阶段

Cloning and Expression Profiling of Cuticular Protein Genes of *Spodoptera litura*

Zhao Peng^{1,2}, Zhang Shuai², Zhao Chenchen^{1,2}, Hu Fangmei^{1,2}, Cui Jinjie^{2*}, Li Shaoqin^{1*}

(1. Hubei Insect Resource Utilization and Sustainable Pest Management Key Laboratory/College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. Institute of Cotton Research of Chinese Academy of Agricultural Sciences/State Key Laboratory of Cotton Biology, Anyang, Henan 455000, China)

Abstract: [Objective] The expression pattern of fourteen cuticular protein (CP) genes (ICPG) in *Spodoptera litura* were analyzed in this study, which provided reference for further study on the function of cuticular proteins in the growth and development of *S. litura*. [Method] Polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify the cDNAs of the genes encoding CPs of *S. litura*. Their nucleotide sequences and corresponding amino acid sequences were analyzed, and lepidopteran phylogenetic tree was constructed using MEGA5.2 software. The expression of CP genes was analyzed in the third to the sixth instar larvae and 2-day-old adult genital organs by the reverse transcription PCR (RT-PCR) technique. [Result] Fourteen cDNAs coding 14 CPs of *S. litura* were obtained. The sequence analysis showed 14 CPs harbor the conserved motif of 35—36 amino acids that is a typical feature of chitin-binding proteins and share high sequence homology with CPs of *Helicoverpa armigera*. RT-PCR results showed that these CP genes were expressed in the third to the sixth instar larvae and 2-day-old adults. In particular, their relative expression levels are higher in the cuticulars of older larvae and lower in the fat bodies of younger larvae. In addition, the relative expression of 14 CP genes was low in testes and ovaries. The highest relative expression of SIICPG-11 and SIICPG-14 in the pupal stage. [Conclusion] In this study, the cDNA of 14 *S. litura* CP genes were cloned. Their expression exhibited tissue and developmental stage specificity indicating their putative roles in *S. litura* development. It lays the foundation for target site selection for the control of *S. litura*.

Keywords: *Spodoptera litura*; cuticular proteins; gene cloning; reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR); tissue expression; developmental stage

收稿日期: 2019-12-25 第一作者简介: 赵鹏 (1994—), 男, 硕士, 365146945@qq.com。* 通信作者: 李绍勤, 女, lishaoqin@163.com; 崔金杰, 男, cuijinjie@126.com

基金项目: 国家现代农业产业技术体系——棉花产业技术体系 (CARS-15-20)

斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 属鳞翅目夜蛾科,是多食性、暴食性害虫,寄主种类广泛,包括蕨类植物、裸子植物、双子叶植物、单子叶植物在内的 109 科,389 种植物^[1],具有世代多、寄主广、抗药性强等特点。近年来斜纹夜蛾暴发面积逐年扩大,发生情况愈加复杂,已成为蔬菜上主要害虫之一,同时严重威胁着棉花、烟草等经济作物的生产^[2]。化学农药的大量频繁使用,使斜纹夜蛾已经对包括有机磷、有机氯、拟除虫菊酯、氨基甲酸酯和苏云金杆菌在内的多种杀虫剂产生了抗性^[3]。因此,研制出新型绿色杀虫剂,制定新的防治策略是斜纹夜蛾防治的当务之急。

昆虫抗药性的产生与昆虫表皮密切相关,昆虫的表皮覆盖着整个身体表面,不仅可防御外来病原物的入侵,还能抵御外界不良环境,在昆虫的生长发育和生理代谢活动中发挥重要作用^[4]。昆虫表皮主要是由几丁质和表皮蛋白(Insect cuticular proteins, ICP)组成^[5],其中编码表皮蛋白的基因被称为表皮蛋白基因(Insect cuticular protein gene, ICPG)。表皮作为昆虫抵御外界不良环境的第一道防线,当昆虫受温度胁迫、渗透胁迫、季节性光周期等环境条件影响时,ICPG 表达调控功能就会做出响应^[5]。昆虫表皮与昆虫抗药性息息相关,尤其以触杀为主的杀虫剂,如拟除虫菊酯类农药等,昆虫对其产生抗性的原因之一就是昆虫表皮对杀虫剂的渗透能力降低^[6]。因此,对昆虫表皮蛋白基因的研究,有助于阐明昆虫部分抗药性的产生机制,并为有效选择杀虫剂靶标提供理论基础。而现阶段表皮蛋白基因的研究主要集中于果蝇科(*Drosophilidae*)^[7]、西方蜜蜂 *Apis mellifera*^[8-10]、家蚕 *Bombyx mori*^[11-13] 和冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*^[14] 等昆虫。目前,有关斜纹夜蛾表皮蛋白基因的研究报道较少。本研究根据斜纹夜蛾转录组测序信息,找到了 14 个预测为编码 CP 的基因,并命名为 *SlICPG* (*Spodoptera litura* insect cuticular protein gene),编号 1~14,应用逆转录聚合酶链反应(Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)技术分析 14 个基因在 3~6 龄幼虫(2 日龄)不同组织和 2 日龄成虫生殖器官中的表达差异,为之后的基因功能验证和发展基于表皮蛋白的害虫防治策略奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

斜纹夜蛾购于河南省科云生物农药有限公司,室内人工饲料饲养 2 代后,选择第 3 代用于试验。饲养温度为 $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$,相对湿度为 $65\% \pm 5\%$,光周期(光暗比)14 h : 10 h。

1.2 主要试剂及仪器

RNA 提取试剂 TRIzol 购自 Life Technologies 公司;反转录试剂盒(PrimeScript™ RT Master Mix)与 rTaq 酶均购自 TaKaRa 公司;实时荧光定量 PCR 试剂(TransStart®Top Green qPCR SuperMix(+Dye I))购自北京全式金生物技术有限公司。梯度 PCR 仪器为 Lab Cycler Gradient;荧光定量 PCR 仪器为 ABI Step One Plus;微量分光光度计为 NANODROP 2000C(美国 Thermo 公司)。

1.3 基因克隆

基于本实验室测得的斜纹夜蛾幼虫转录组(SUB5323417,尚未公布)数据,找到了 14 个表皮蛋白基因。以此为目的基因,利用 Beacon Designer 7 设计特异性引物(表 1)进行克隆。解剖斜纹夜蛾 5 龄幼虫中肠,采取 TRIzol 法提取样品总 RNA,之后使用琼脂糖凝胶电泳和微量分光光度计对 RNA 纯度及完整性进行检测。取 500 ng 的总 RNA 为模板(其余贮存于 -80°C 备用),按照 PrimeScript™ RT Master Mix 反转录试剂盒操作说明,获得 cDNA 第 1 链,并以其为模板,用 rTaq 酶进行 PCR 扩增,扩增体系:10×PCR Buffer 2.5 μL , dNTP Mix 2.0 μL , 上下游引物各 1.0 μL , rTaq 酶 0.125 μL , 模板 1.0 μL , ddH₂O 补齐至 25.0 μL ;扩增条件:94 $^\circ\text{C}$ 预变性 3 min,然后 94 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s,64 $^\circ\text{C}$ 退火 1 min,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 2 min,共 35 个循环。扩增产物用质量分数为 1.2%的琼脂糖凝胶电泳进行检测,之后将 PCR 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.4 进化树构建

利用在线工具 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) GenBank 数据库中检索昆虫表皮蛋白氨基酸序列,利用 MEGA 5.0 软件的邻接法(Neighbor-Joining)构建表皮蛋白系统发育进化树。

1.5 RT-PCR

1.5.1 引物设计与合成。根据克隆得到的斜纹夜蛾相关表皮蛋白基因的核苷酸序列以及利用转录组测序库中已得到注释的序列进行相关基因的引物设计,选取已报道的斜纹夜蛾的 *GAPDH*

和 *RPL10* 基因^[5]作为内参基因,根据实时荧光定量 PCR 的引物设计原则,利用 Beacon Designer 7 设计目标基因的特异性引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表 1。

1.5.2 样品采集。收集斜纹夜蛾 3~6 龄幼虫和 2

表 1 试验中相关引物信息
Table 1 Relevant primer information in the experiment

引物 用途 Primer usage	引物名称 Primer name	上游引物(5'-3') Forward primer	下游引物(5'-3') Reverse primer	扩增片段 长度 Length of amplified segments/bp	扩增效率 Amplifi- cation efficien- cy/%	R ²
基因克隆 Gene cloning	GL-1	CCTATAAATGTTGAGGGAG- GAGTAA	ATTCACAGTAAG- TATATATTGCAAG	3 073		
	GL-2	CCTATAAATGTTGAGGGAG- GAGTAA	GGGAATCGAACCCGCGA- CACGTTGC'	10 618		
	GL-3	TTCTATAATCACAGTTATA- CATCGT	CATATTGCGACTAGAGGTG- GAAAGA	1 680		
	GL-4	AAGTTTT- TACTCCAGCATTAGATTG	AACGTTTTTACATTATT- TATTGCCT	3 457		
	GL-5	GACATTACGTTAGATGCCG- GAGAAA	CATCACAA- CAAATAATATAAAAACG	1 210		
	GL-6	GCTTAAATGACGTTAG- GTTCTGACA	TTCTCATTTTCATTATTA- CATTG	1 015		
	GL-7	TATAAAAGATTATTCCAA- GATCGTC	ATCTTTTATTTACAGGGT- CACTATT	828		
	GL-8	AGCATCAGTCGA- CAACAGTTATCAC	TAGAAAATTATAAAAT- ACGCATCAC	813		
	GL-9	TTCATTTGCTGGCT- TAATCGCGCGG	ACTTGTGACTACTCG- GTTTTTTTA	2 470		
	GL-10	AAAACCAGCGGCGCC- CAATCGAGAG	ATTCACACATCCTCGC- CTCAGTTTA	1 122		
	GL-11	CGAGTATCAGTCAAC- GAGTGGAAT	TTTATTTACAAGGCAGCAC- CACATC	5 559		
	GL-12	CGGACAGTAGAGTGAC- CGTGAATTA	TCTAAATTTAAAAATATC- TAAGCCC	3 282		
	GL-13	CGTTCAACCACAAACAGTC- CCAAGA	TACTAACATAAATTGTT- TATTAACA	773		
	GL-14	TGCATCAGTCGCTC- GATTGCCTTTC	TTATTAA- CAAATTCTTTCAGGATCA	776		

表 1 (续)
Table 1 (Continued)

引物 用途 Primer usage	引物名称 Primer name	上游引物 (5'-3') Forward primer	下游引物 (5'-3') Reverse primer	扩增片段 长度 Length of amplified segments/bp	扩增效率 Amplifi- cation efficien- cy/%	R ²
RT-PCR	SIICPG-1	GCCAAACTGGTGAGTAG- GCTA	CAACCCGGAAATCGAATC	123	97.49	0.998
	SIICPG-2	AACGGAGAAGGTTTGAGCA	AAGATTATTCGGACGCC- ACT	131	101.57	0.998
	SIICPG-3	GTAGTTGCCGCTGATGTCTC	TGCTGGTTTCGTAGGAG- TAGTT	114	92.98	0.999
	SIICPG-4	ACCTTCATCGTTGCCGTCT	CCGTTGTCGGTTTCGTAGA	127	88.96	0.997
	SIICPG-5	TAATGGCATCGTCCGTGA	GCTCTCGTCAGCGAAGT- AAG	150	94.30	0.998
	SIICPG-6	CCGAGAACGGTATCAAACG	TGACCTCAGATTGTCCT- TCAGA	131	86.74	0.999
	SIICPG-7	ATGGTGATTTCAGTTCGG	CGTTTGATACCGTTCTCGG	149	98.99	0.996
	SIICPG-8	CGAAACTGGCAATG- GTATCTC	GCGGTGTAAGTCAGGTG- GAT	134	94.62	0.997
	SIICPG-9	CACCACTTGCGGACTTCTT	GCATTAGATTTCAGCA- CGG	149	100.53	0.997
	SIICPG-10	CACGATGAGAGTTCTG- GTGG	GACACTTCACGCAAGCAC- TAA	107	91.96	0.999
	SIICPG-11	CATCGTGAGGAAACCTGGA	TAAATGCCCACTGCTGAGC	132	98.29	0.998
	SIICPG-12	ACCTTATGTCGGAGAGGCA	CCTTGTAGTTGTGGTTCT- GCTT	133	90.61	0.998
	SIICPG-13	TGTCTACACCGTCACCTA	CATATCACAGATCGCTTGG	150	87.15	0.995
	SIICPG-14	GTCTACACCGTCACCTAC	CATATCACAGATCGCTTGG	101	97.26	0.999
GAPDH RPL10	GAPDH	GGGTATTCTTGACTACAC	CTGGATGTACTTGATGAG	184	109.60	0.996
	RPL10	GACTTGGGTAAGAAGAAG	GATGACATGGAATGGATG	189	109.70	0.998

日龄雌雄成虫(未交配),于超净工作台中解剖幼虫中肠、血淋巴、体壁和脂肪体;解剖雌雄成虫卵巢和精巢,每个样品 6 次重复,每个重复解剖 3 头。RNA 的提取与反转录方法同 1.3,获得的 cDNA 模板贮存于-20℃备用。

1.5.3 引物扩增效率与特异性检验。将斜纹夜蛾 cDNA 按 5 倍梯度稀释成 5 个浓度,并以此为模板制作标准曲线,确定引物扩增效率,根据熔解

曲线分析引物是否形成二聚体或产生非特异性扩增产物。

1.5.4 实时荧光定量 PCR 检测。采用实时荧光定量 PCR 技术检测表皮蛋白基因 *SIICPG* 在斜纹夜蛾 3~6 龄幼虫的中肠、血淋巴、体壁和脂肪体以及羽化 2 d 成虫的卵巢和精巢中的表达变化动态。将 cDNA 进行 20 倍稀释,试验样本和内参分别设 3 个重复,另设无模板的空白对照。实时

荧光定量 PCR 主要根据 TransStart® Top Green qPCR SuperMix (+Dye I) 试剂盒说明书进行, 采用 20.0 μL 体系: 2 \times TransStart® Top Green qPCR SuperMix (+Dye I) 10.0 μL , 上下游引物 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各 0.4 μL , cDNA 模板 1.0 μL , Nuclease-free Water 补齐至 20 μL 。程序采用两步法进行: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 共 40 个循环, 第二步收集荧光。

1.6 数据统计与分析

对实时荧光定量 PCR 结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析, 利用 GraphPad Prism 7 制作图表, 并利用 SPSS 17.0 采用单因素方差分析, Duncan 氏多重比较检验和 t 检验进行差异显著性分析 (0.05 水平)。

2 结果与分析

2.1 斜纹夜蛾表皮蛋白氨基酸同源性比对及进化树构建

克隆得到斜纹夜蛾表皮蛋白基因的核苷酸序列, 利用在线工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 分析找到其编码区 (Coding sequences, CDS)、编码的氨基酸, 利用在线工具 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 对蛋白质保守域进行分析, 结果表明所选目的基因具有 35~36 个氨基酸保守基序, 属于几丁质结合蛋白, 在节肢动物中与几丁质相结合, 并且根据 *SIICPG-10* 和 *SIICPG-11* 的氨基酸序列具有 AAPV/A 保守基序, 可得知二者属于 CPG 家族; 其余表皮蛋白具有 Rebers & Riddiford (R&R) 保守基序, 因此属于 CPR 家族。用 DNAMAN 软件对目的氨基酸序列与其他昆虫 ICPs 的氨基酸序列一致性进行比对, 可知目的基因编码的蛋白质与蛾类昆虫同源性更高, *SIICPG-2* 与脐橙螟 (*Amyelois transitella*) *AtICPG* 氨基酸序列一致性较高, 为 74.63%; *SIICPG-3* 与亚洲玉米螟 (*Ostrinia furnacalis*) *OfICPG* 氨基酸序列一致性为 71.94%; *SIICPG-8* 与棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) *HaICPG* 氨基酸序列一致性为 88.06% (图 1)。利用 MEGA 5.0 软件对包括目的基因编码的蛋白质在内的共 54 条表皮蛋白氨基酸序列进行系统进化树的构建。系统进化树 (图 2) 分析表明,

SIICPG-2 氨基酸序列与 *AtICPG-1* 氨基酸序列聚为一支; *SIICPG-6* 和 *SIICPG-7* 氨基酸序列与家蚕 (*Bombyx mori*) 氨基酸序列聚为一支; *SIICPG-9* 和 *SIICPG-11* 氨基酸序列与柑橘凤蝶 (*Papilio xuthus*) 氨基酸序列聚为一支; *SIICPG-13* 和 *SIICPG-14* 氨基酸序列与粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 氨基酸序列聚为一支; *SIICPG-3*、*SIICPG-4*、*SIICPG-5*、*SIICPG-8* 和 *SIICPG-12* 氨基酸序列与棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) 聚在一起, 表明 14 个斜纹夜蛾 CP 与棉铃虫 CP 亲缘关系较近, 暗示这 14 个 CP 与棉铃虫的 CP 功能相近。

2.2 斜纹夜蛾表皮蛋白基因 *SIICPG* 时空表达差异分析

2.2.1 引物扩增效率与特异性分析。对表 1 中的引物进行实时荧光定量 PCR, 计算得出 14 对引物的扩增效率均在 85%~110% (表 1), 并且产物熔解曲线为单峰, 无杂峰, 表明引物较好, 没有非特异性扩增, 符合后续试验要求。

2.2.2 *SIICPG* 基因龄期和组织表达谱分析。为探究 14 个表皮蛋白基因在不同龄期和组织中的表达差异, 试验选取斜纹夜蛾 4 个龄期, 4 种组织为样品, 以相对应的 cDNA 为模板, 对目的基因表达量进行检测, 结果如图 3 所示。在 3 龄幼虫期, *SIICPG-3*、*SIICPG-5*、*SIICPG-6*、*SIICPG-7*、*SIICPG-9*、*SIICPG-12*、*SIICPG-13* 和 *SIICPG-14* 表达情况较为相似, 均为在体壁组织中相对表达量最高, 而在脂肪体中次之, 在其余组织中的相对表达量较低; 对于基因 *SIICPG-1*、*SIICPG-2*、*SIICPG-8*、*SIICPG-10* 和 *SIICPG-11*, 均高表达于脂肪体组织, 与其余组织相比具有显著差异; 而 *SIICPG-4* 在 3 龄幼虫各组织中相对表达量均较低 (图 3A)。在 4 龄幼虫期, *SIICPG-3*、*SIICPG-5*、*SIICPG-6*、*SIICPG-7*、*SIICPG-9*、*SIICPG-12*、*SIICPG-13* 和 *SIICPG-14* 与 3 龄幼虫期相似, 均在体壁组织中出現高表达, 而基因 *SIICPG-1*、*SIICPG-2*、*SIICPG-4*、*SIICPG-6*、*SIICPG-7*、*SIICPG-9*、*SIICPG-10* 和 *SIICPG-11* 出现在血淋巴组织中相对表达量上升的现象, 并且其中 *SIICPG-10* 和 *SIICPG-11* 在血淋巴组织中相对表达量最高, *SIICPG-8* 在 4 龄幼虫各组织表达量均较低 (图 3B)。在 5 龄幼虫中, 基因 *SIICPG-3*、*SIICPG-4*、*SIICPG-5*、*SIICPG-8*、

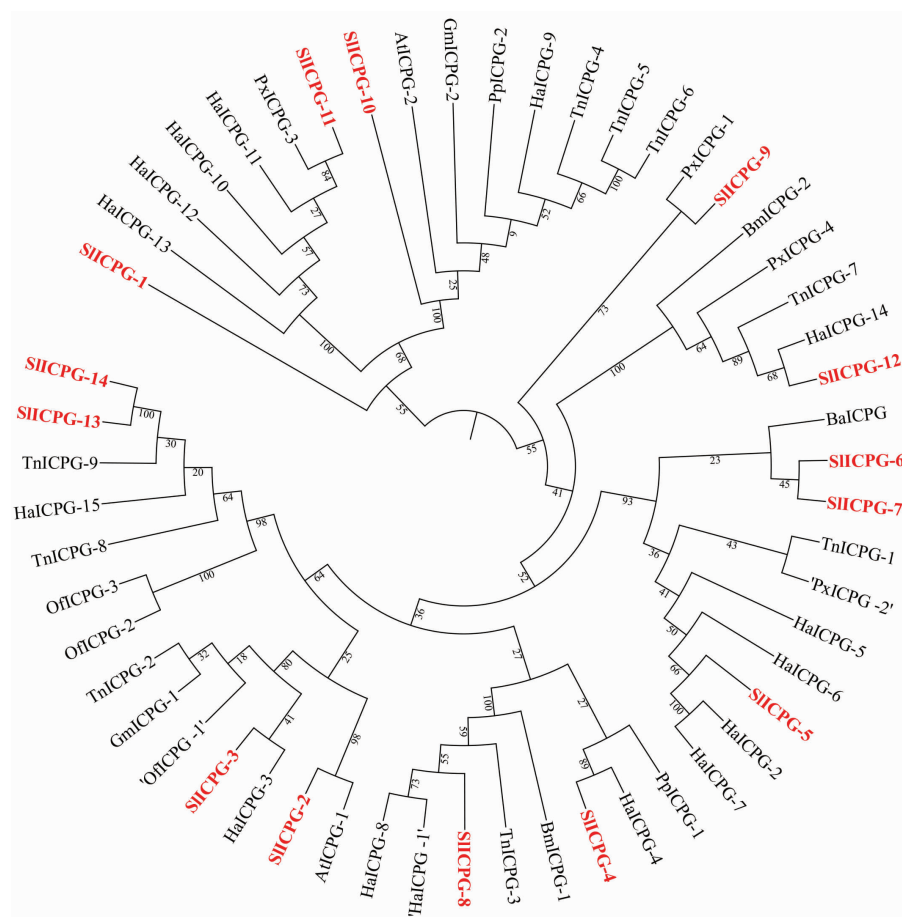
AtICPGMK.FLVLTILFVAYACADVSHLP..QAGGER.....NAQVLRQELDVGVDAVQYAYE..TDNGIKR	56
BmICPGMKSIVLVSMVAVALAAP.....GGPTEP.....IPIVRDDSQINGD.GSYQYAFE.TGNGISA	52
BaICPGMK.VIIVALALVAVAAVAVEY.....EPLKILRSEYDQTPQGGYNFGFE.TENGISR	51
GmICPGMKFFVAILAVVAVVAAADVSHIV..RSP.EA.....DAQVLRQEADVLPD.RYSYSYE.TSNGIAG	55
HaICPGMKSIVLACMLVAVAFAP.Q....GAPAEF.....IPIVKDDSQINGD.GSYQYAFE.TGNGISA	53
OfICPGMKSFVAVLALVAAAADVSHLQ..NP.EA.....GAQIVRQEADVGP.E.SFAYNYE.TSNGIVG	54
PoICPG	GRRLPKSDTYRKPNDNIVDKQIEKSIVNSDTSLIPTATTESSLNTPVKDQGQVKIVK...RKRTRGFVVPVIVTERNFVYAHSGNFHYSFE.GGDGKIV	246
PpICPGMK..SVVLALCAIGCAYGVVPD.....D.....KAAVVRSDYQHNPEGGYQYVYE.TENGISA	50
SLICPG-1MK.FLILSVCAALAAADVSHIL..PKD.EK.....SAQILKQELDVGVGEGYQVWAYE.TENGIAA	31
SLICPG-2MK.FLILSVCAALAAADVSHIL..PKD.EK.....SAQILKQELDVGVGEGYQVWAYE.TENGIAA	55
SLICPG-3MKSFVALLAVVAVVAAADVSHLV..RNP.EA.....DAQILKQVADVLPD.QYNSYSYE.TSNGIAA	55
SLICPG-4MK..TFIVAVCIFACALASEP.....VAQVLRSDYAQSPNGDFQYVYE.TDNGISG	48
SLICPG-5	SVAHQXHTIKLTKMKSIIILVALALVAVAVAGPAAP.....EEVKIVRSEFQQQPEGGYQFGYE.ADNGIVR	80
SLICPG-6MKSMTIIVALALVAVAAIPVD.....EPAKIISANYDSKPDGGYNFNF.TENGIKR	51
SLICPG-7MKSMTIIVALALVAVAAIPVD.....EPIKILRSNFDKDPNGDFQFGFE.TENGIKR	51
SLICPG-8MKSIVLACMLVAVAFAPQ....GAPAEF.....IPIVKDDSQINGD.GSYQYAFE.TGNGISA	54
SLICPG-9	LQQRKRVKNSQLDVFVNETEAEAAKVTITDT...TAKSEEAYKEEQSYATQTEFR...RKGMRAPVVPPIIDSNVYFVSHSGNFHYSYE.GGDGKRA	236
SLICPG-10	LPTISPGDLAGAADAIDAHVEAADHVRAADAAREYHDQASELHG.....QAINAAEDHSWQAVDAVKTAEAQLDGAAG	153
SLICPG-11	YAAGARFIAPSVYAAAVAAAPVYSGAAYYGSPLTYAAYSAPISYCSMSKKRCLQRHRGSAMAARFVVLAALVAMAHCSVVPVARVDADYTSFAYTVAD	300
SLICPG-12	FGPYSHDYEPVGEASVDQYKLIKYPGEDNPFYKDG.YYK.....NNGIKIKQNHNYKEDKYDFDFE.TENKIRA	133
SLICPG-13MKSFIIVLALFVAAVAPASPD.....ADAVVVRYSNIGVDGYNAYE.TSNGIAA	52
SLICPG-14MKSFIIVLALFVAAVAPASPD.....ADAVVVRYSNIGVDGYNAYE.TSNGIAA	52
TnICPG	SATEQ...SNQINMKFIILVALVALVAVASALPVE.....EPEKTVRSNFDVNPDEYNGFGE.TEKGINR	76
Consensus		
AtICPG	EESSTIL...KIDAETAAEV...QQA...SKSPPEETI...QLQVADEN.GYQPCGSHLTFE...PIPEA...ILKALEYIRAHPPPE...SRK..	134
BmICPG	DQKGELN...KVG.DVEALEVQEF..KIPGENQDI...SLTITADEN.GFHPGSHLTFE...PIPEA...IQRALDFAATAFPA..FAAAAAQ.	131
BaICPG	IETGEPEVLDAENKPKQVVAVRGSY..TIDKEENVE...TVNITADEN.GFAEGPSIEKPV.....RR.....	111
GmICPG	QESGQLN...NAGREDEAIEVQSN..QTAPDETPI...QITVANEV.GYQPCGAHLFTTAPQPIPEY...IQRAIAYIAANPPRPE.PVNRRL.	139
HaICPG	DQKGELN...KVG.DVEALEVQEF..SIPGENQTI...HLTITADEN.GFHPGSHLTFE...PVPEA...IQRLAYLATAAP...AAAAAQ.	130
OfICPG	QESGALN...NAGREDEAIEVQSN..KTAPGEVVI...ALTITADEN.GYQPCGAHLFTTAPQPIPEY...IARAIEYIRTHPPAPESPVRFR..	138
PoICPG	FEDGSLN...SIN.DETGEAVSGGF..SKDKLNDI...SLTITADEN.GYRPIGAHLTFE...PIPEE...IARALAYLATRSTP.QPITEPTK	327
PpICPG	HAEGVIR...TLNKDEVSHVQAV..SISPLDQKI...ETTIVADEF.GYKPSGDHLFTTAPVPIPDY...ILRALEWIATHFYKPE...TSKN.	132
SLICPG-1	LAVALAR.PQFYSGYGSYASGYGYY..GYSGYSEYSN...PLSNGSYTYGASPYSGYGY...PIPEA...ILKALEYIRAHPPPE...KN..	88
SLICPG-2	NEAGSLN...QIDAETSACVACQQA...SKSPPEEQI...QFQNVADEN.GYQPCGSHLTFE...PIPEA...ILKALEYIRAHPPPE...KN..	132
SLICPG-3	QESGALN...NAGSDEAIEVQSN..STAPNEERI...AVTIVADEN.GYQPCGAHLFTTAPQPIPEY...IVRALEYIRTHPEKEE.PIRRV..	138
SLICPG-4	QASGAVN...VFGKDEVALEVSSEN..SKSPPEEKVY...SLTITADEN.GYQPCADYLETPEAPVPIPDY...IARAIEWAAAHFYNEK...KA..	128
SLICPG-5	EEVGEVHEALDEENKPKHVVVVRGSY..SIPGEDKPI...SISVFADES.GYHADGESIEKVE.....ARR.....	141
SLICPG-6	VEEGSVHVVDEENKPKHVVVVRGSY..STVNSEQSE...VIDIVADEN.GYRAEGPSVKEVE.....ARR.....	112
SLICPG-7	DEQSKVHEVLDEENKPKHVVVVRGSY..STINADETVE...TIDITADEN.GFQACGSPSIEKNE.....ARR.....	113
SLICPG-8	DQKGELN...KVG.DVEALEVQEF..SIPSENEQPI...HLTITADEN.GYHPAGAHLETFE...PVPEA...IQRALAYLATAAPP..QAAAPAAQ	134
SLICPG-9	YERQQLN...QSN.GGAGSAVEENF..SKDKLNDI...SLQITADEN.GYRPEVGAHLTFE...PIPEE...IKRALEYLATKTTESVEVTERMWT	318
SLICPG-10	AAFVLARQLAGHVAAPALAYGAHGVANGAHGVAYGAAPAVANSPALAAKSTVVSQSLSQSHPAFVVHASFGIAHAAPYGVANAAFVAVAHGLHG	253
SLICPG-11	PNTEDEF...SQVETRUGGNVAGQY..SLDADETKR...TVDITADIVNGENAVVRKDAVVASVVAAPV..VAAFAVAAFAVIAARTVAAFAVVA	387
SLICPG-12	EEKAVLN...NPNITIDEGIASKGFY..EIGPDEFMY...RVDITADEN.GFRPSVKRLETYPYSGKWIYK...VN.....	197
SLICPG-13	QEQGQLN...NAGTENEAEIENQCF..STIGPDEVVY...TVTITANEQ.GFQPCGAHLTFE...PIPEE...IKRALEYLATKTTESVEVTERMWT	106
SLICPG-14	QEQGQLN...NAGTENEAEIENQCF..STIGPDEVVY...TVTITANEQ.GFQPCGAHLTFE...PIPEE...IKRALEYLATKTTESVEVTERMWT	106
TnICPG	QESGQLN...NAGTENEAEIENQCF..STIGPDEVVY...TVTITANEQ.GFQPCGAHLTFE...PIPEE...IKRALEYLATKTTESVEVTERMWT	138
Consensus		

AtICPG: 脐橙螟 *Amyelois transitella*, XP_013194611.1; BmICPG: 家蚕 *Bombyx mori*, NP_001166710.1; BaICPG: 丛林斜眼褐蝶 *Bicyclus anynana*, XP_023954045.1; GmICPG: 大蜡螟 *Galleria mellonella*, XP_026752381.1; HaICPG: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*, XP_021200909.1; OfICPG: 亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis*, XP_028168620.1; PoICPG: 柑橘凤蝶 *Papilio xuthus*, XP_013177811.1; PpICPG: 玉带美凤蝶 *Papilio polytes*, XP_013144018.1; TnICPG: 粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni*, XP_026729269.1。

方框内圈出的为 R&R 保守基序和 AAPV/A 保守基序。The R&R conservative motif and AAPV/A conservative motif are circled in the box.

图 1 斜纹夜蛾及其他昆虫表皮蛋白氨基酸序列比对

Fig. 1 Amino acid alignment of cuticular proteins from *Spodoptera litura* and other insects

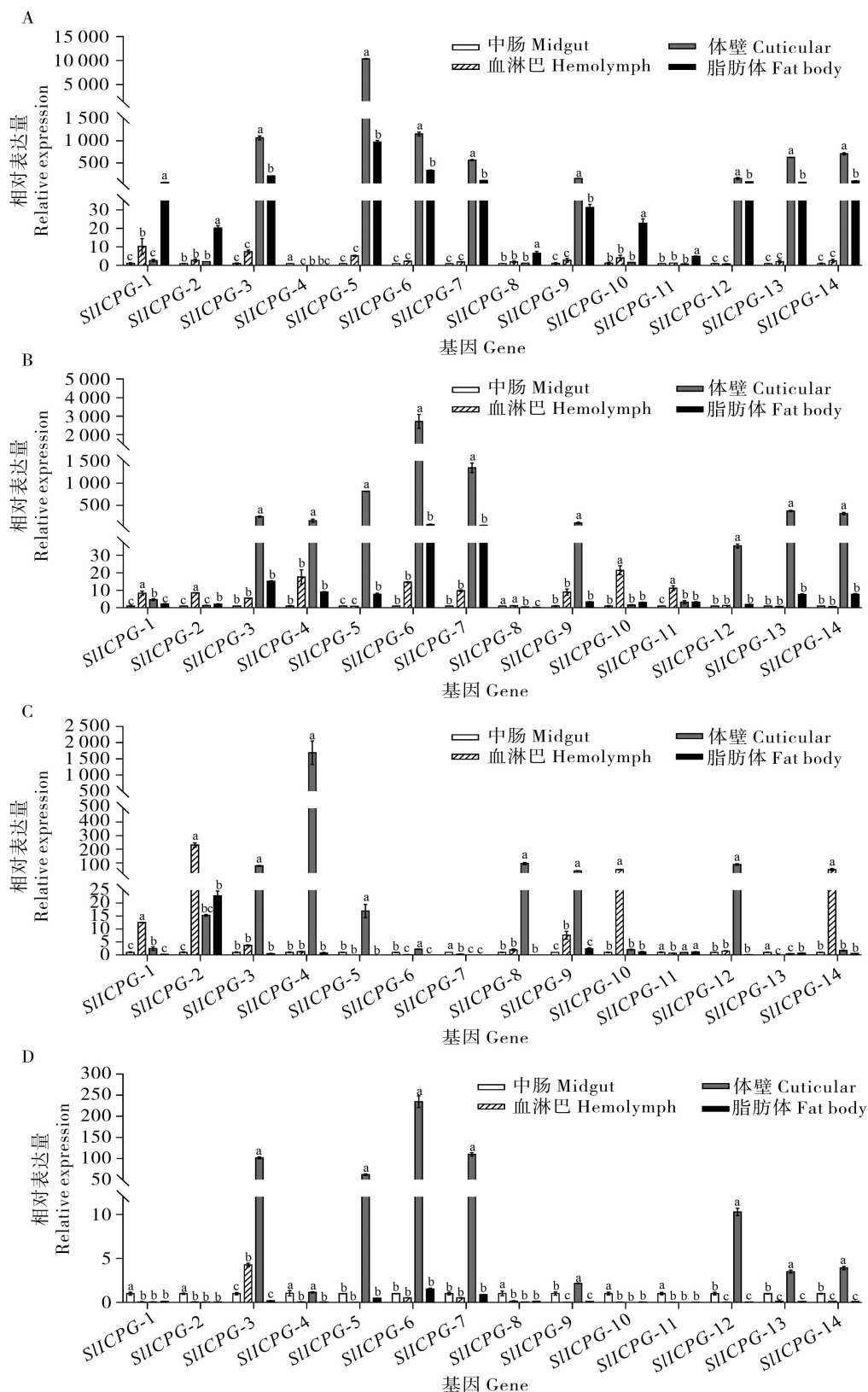


分支节点上的数字表示邻接法(1 000 次重复)得到的 Bootstrap 值;比例尺表示每个位点的碱基替换数。The number on the branch node indicates the Bootstrap value obtained by the neighbor-joining method (1 000 replicates). The bar indicates the estimated number of substitutions per site.

AtICPG-1: 脐橙螟 *Amyelois transitella*, XP_013194611.1; GmICPG-1: 大蜡螟 *Galleria mellonella*, XP_026752381.1; TnICPG-1: 粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni*, XP_026729269.1; HaICPG-1: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*, XP_021200909.1; BmICPG-1: 家蚕 *Bombyx mori*, NP_001166710.1; PxICPG-1: 柑橘凤蝶 *Papilio xuthus*, XP_013177811.1; OfICPG-1: 亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis*, XP_028168620.1; PpICPG-1: 玉带美凤蝶 *Papilio polytes*, XP_013144018.1; HaICPG-2: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*, XP_021201016.1; PxICPG-2: 柑橘凤蝶 *Papilio xuthus*, NP_001298836.1; BaICPG: 丛林斜眼褐蝶 *Bicyclus anynana*, XP_023954045.1; OfICPG-2: 亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis*, XP_028165418.1; OfICPG-3: 亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis*, XP_028165418.1; HaICPG-3: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*, XP_021184511.1; TnICPG-2: 粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni*, XP_026734678.1; HaICPG-4: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*, XP_021184529.1; HaICPG-5: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*, XP_021200853.1; HaICPG-6: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*, XP_021200849.1; HaICPG-7: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*, XP_021201016.1; HaICPG-8: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*, XP_021200909.1; TnICPG-3: 粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni*, XP_026729159.1; TnICPG-4: 粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni*, XP_026742172.1; HaICPG-9: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*, XP_021180816.1; TnICPG-5: 粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni*, XP_026742205.1; TnICPG-6: 粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni*, XP_026742183.1; PpICPG-2: 玉带美凤蝶 *Papilio polytes*, BAM19284.1; GmICPG-2: 大蜡螟 *Galleria mellonella*, XP_026748416.1; AtICPG-2: 脐橙螟 *Amyelois transitella*, XP_013187053.1; HaICPG-10: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*, XP_021197181.1; HaICPG-11: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*, XP_021197173.1; HaICPG-12: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*, XP_021197190.1; HaICPG-13: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*, XP_021197148.1; PxICPG-3: 小菜蛾 *Plutella xylostella*, XP_011567678.1; HaICPG-14: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*, XP_021200394.1; TnICPG-7: 粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni*, XP_026732128.1; BmICPG-2: 家蚕 *Bombyx mori*, FAA00503.1; PxICPG-4: 小菜蛾 *Plutella xylostella*, XP_011551952.1; HaICPG-15: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*, XP_021197296.1; TnICPG-8: 粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni*, XP_026738288.1; TnICPG-9: 粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni*, XP_026738105.1.

图 2 斜纹夜蛾及其他昆虫表皮蛋白进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of insect cuticular proteins of *Spodoptera litura* and other insects



A: 3 龄幼虫; B: 4 龄幼虫; C: 5 龄幼虫; D: 6 龄幼虫。数值为均值±标准差; 柱上不同小写字母表示组间差异显著 (Duncan 氏多重比较检验, $P < 0.05$)。

A: 3rd instar larvae; B: 4th instar larvae; C: 5th instar larvae; D: 6th instar larvae. The values in the figure are means ± standard deviation (SD). Significant differences among groups are indicated by letters above each bar (Duncan's multiple range test, $P < 0.05$).

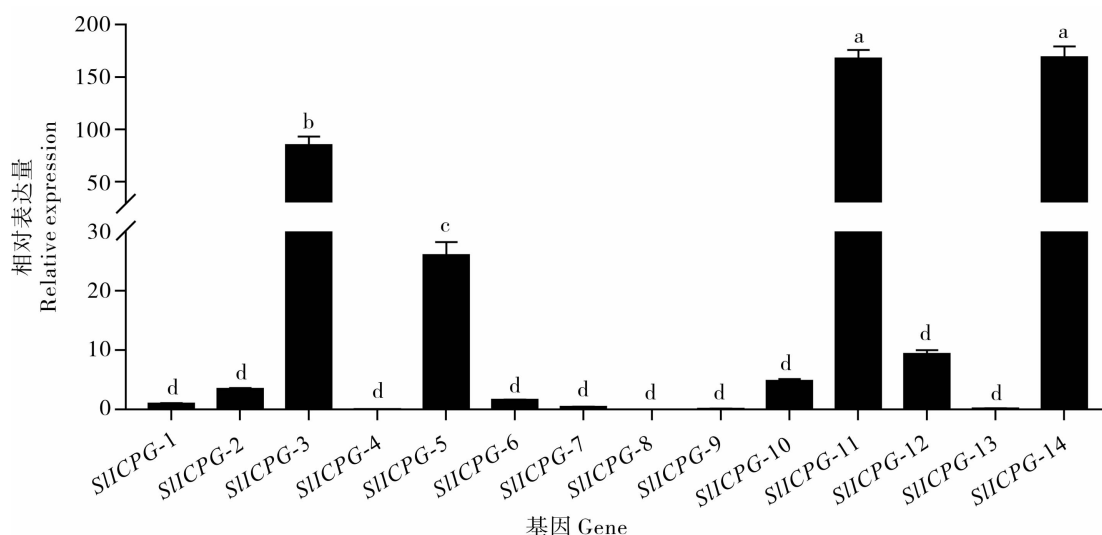
图 3 SIICPG 基因在同龄期斜纹夜蛾不同组织中表达量分析

Fig. 3 Expression of SIICPG genes in different *Spodoptera litura* tissues at the same age

SIICPG-9 和 *SIICPG-12* 在体壁组织中相对表达量最高, 与其余组织相比达到差异显著水平, *SIICPG-1*、*SIICPG-2*、*SIICPG-10* 和 *SIICPG-14* 在血淋巴组织中出现高表达情况, 而剩余组织在 5 龄幼虫中相对表达量较低(图 3C)。在 6 龄幼虫中, 仍是大部分基因在体壁组织中高表达, 如 *SIICPG-3*、*SIICPG-5*、*SIICPG-6*、*SIICPG-7*、*SIICPG-9*、*SIICPG-12*、*SIICPG-13* 和 *SIICPG-14*, 基因 *SIICPG-1*、*SIICPG-2*、*SIICPG-8*、*SIICPG-10* 和 *SIICPG-11* 在中肠组织中的相对表达量与其余组织相比具有显著差异, 但相对表达量较低(图 3D)。综上可知, 14 个目的基因在 4 个龄期、4 个组织中均有表达, 并具有组织特异性。在低龄(3~4 龄)幼虫中, 较多基因在体壁和脂肪体中有较高表达水

平; 在高龄(5~6 龄)幼虫中, 较多基因只在体壁组织中表达水平较高。其中基因 *SIICPG-3*、*SIICPG-5*、*SIICPG-9* 和 *SIICPG-12* 的相对表达量最为稳定, 在各龄期的体壁组织中相对表达量均最高。

2.2.3 *SIICPG* 基因在斜纹夜蛾蛹期表达差异分析。为明确 *SIICPG* 基因在蛹期的表达差异, 以斜纹夜蛾蛹(2 日龄)的 cDNA 为模板, 对 14 个目的基因进行表达量检测, 以 *SIICPG-1* 为对照基因进行差异显著性分析, 结果表明大部分 *SIICPG* 在蛹期相对表达量较低, *SIICPG-3*、*SIICPG-5*、*SIICPG-11* 和 *SIICPG-14* 相对表达量较高, 其中 *SIICPG-11* 和 *SIICPG-14* 相对表达量最高, 与其余基因差异显著(图 4)。



数值为均值±标准差; 柱上不同小写字母表示组间差异显著(Duncan 氏多重比较检验, $P < 0.05$)。

The values in the figure are means ± standard deviation. Significant differences among groups are indicated by letters above each bar (Duncan's multiple range test, $P < 0.05$).

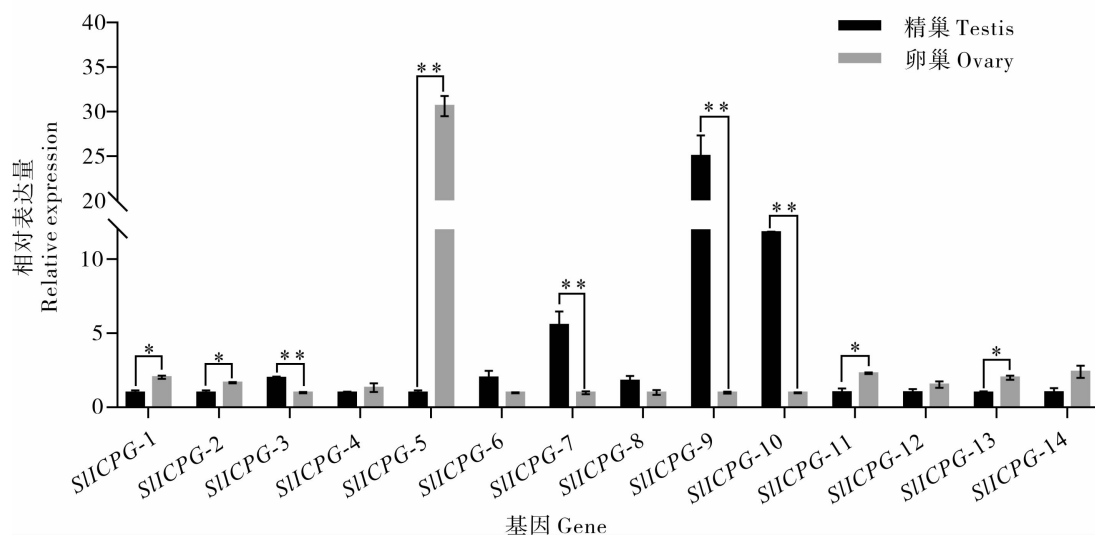
图 4 *SIICPG* 基因在斜纹夜蛾蛹期表达量分析

Fig. 4 Expression of *SIICPG* genes in pupa stage of *Spodoptera litura*

2.2.4 *SIICPG* 基因在斜纹夜蛾成虫生殖器官中表达差异分析。为探究 *SIICPG* 基因在精巢和卵巢中表达的差异, 以 2 日龄成虫精巢和卵巢为样品, 以相对应的 cDNA 为模板进行表达量检测, 结果表明部分基因在精巢和卵巢中的表达出现显著差异, 且相对表达量较低, *SIICPG-3*、*SIICPG-7*、*SIICPG-9* 和 *SIICPG-10* 在精巢中的表达量极显著高于卵巢, *SIICPG-5* 在卵巢中的表达量极显著高于精巢, *SIICPG-1*、*SIICPG-2*、*SIICPG-11*、*SIICPG-13* 在卵巢中的表达量显著高于精巢(图 5)。

3 讨论

表皮作为昆虫抵御外界不良环境的第一道防线, 其在昆虫生长、变态发育、抵御不良环境等方面都起重要作用^[16-17]。表皮由外向内依次为上表皮、外表皮和内表皮, 上表皮主要是由脂肪、蛋白质、多元酚以及蜡质等构成; 而外表皮和内表皮主要由几丁质和蛋白质构成^[16]。其中 CP 是结构蛋白, 起填充表皮间隙和进一步加固表皮的作用^[18]。根据其保守基序的不同, CP 主要可分为



数值为均值±标准差;柱上*和**表示经 t 检验组间差异显著($P<0.05$)、极显著($P<0.01$)。

The values in the figure are means \pm standard deviation (SD). *, ** indicate significance ($P<0.05$), extreme significance ($P<0.01$) among groups by t test, respectively.

图5 SIICPG 基因在斜纹夜蛾成虫生殖器官中表达差异分析

Fig. 5 Differential expression of SIICPG genes in the reproductive organs of adults of *Spodoptera litura*

CPR(含有 R&R 保守基序,可分为 RR-1、RR-2 和 RR-3)、CPF(保守氨基酸基序不超过 44 个)^[19]、TWDL(Tweedle,具有 4 个保守区域)、CPLCP(复杂度低且富含脯氨酸)、CPG(富含甘氨酸并且大多有保守的 AAPA/V 基序)、CPAP1(带有 1 个保守的膜蛋白 A 结构域)、CPAP3(带有 3 个保守的膜蛋白 A 结构域)、CPAPn(无固定数量的膜蛋白 A 结构域)8 个家族^[20-22]。本研究根据保守基序对 14 个 CP 进行家族分类,发现 SIICPG-10 和 SIICPG-11 属于 CPG 家族,其余属于 CPR 家族。CPR 家族分布最为广泛^[21],在直翅目、膜翅目、鞘翅目和双翅目等昆虫中均有发现^[23],R&R 保守基序的 N 端富含亲水性氨基酸,其保守性与 CP 所在角质层类型密切相关,在坚硬角质层中较为保守,而在柔软角质层中相差较大^[5],并且保守基序具有几丁质的结合位点,在结合几丁质方面起重要作用^[24]。有研究进一步表明,其保守基序的分子构象最可能为 β 折叠^[25],而 β 折叠是蛋白质和几丁质相互作用所必需的^[9]。SIICPG-10 和 SIICPG-11 所属的 CPG 家族,主要存在于坚硬的角质层中,与细胞角蛋白、卵壳蛋白等结构蛋白相似,具有保护和支撑的作用^[5,26]。目前,在 7 目 24 种昆虫中已发现了超过 450 种 CP^[27],ICP 的相关研究已逐渐引起了研究者的关注。

昆虫表皮主要含有几丁质-蛋白质复合物,

其组成随部位和物种而异,在不同阶段和不同时期表现出较大的差异^[22],并且有研究表明在所有昆虫物种中都发现了大量的 CP,其数量和特征在不同物种之间也有较大差异^[23,28]。例如中红侧沟茧蜂 *Microplitis mediator* 的 CP 在卵和蛹 2 个阶段出现表达高峰,而这两个时期正是角质层形成和发展的关键时期^[29]。在本研究中,克隆得到斜纹夜蛾 14 个 ICPG,其在幼虫多种组织中均有表达,但在体壁和脂肪体中相对表达量较高,而在生殖器官(精巢、卵巢)中,大部分基因相对表达量较低;这与 ICPG 的组织 and 时期表达特异性^[30]相吻合,并且其表达模式与功能多样性贯穿昆虫整个生命周期^[4]。由于 CP 是幼虫表皮的主要成分之一,其基因表达模式可能直接反映幼虫生长过程中表皮的变化^[31]。有研究表明,桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 的表皮蛋白基因表达谱在向白色蛹转变的过程中发生了显著的变化,表明在蛹形成过程中,表皮蛋白基因可能在分子水平上发生了显著的变化^[31];黄粉虫 *Tenebrio molitor* 在发育的每个阶段都具有独特的表皮蛋白基因表达,并且被证实这是每个发育阶段独特表皮蛋白合成和分泌程序的结果^[32];松墨天牛 *Monochamus alternatus* 表皮蛋白基因在其幼虫中广泛表达,在成虫中表达量最高^[18];家蚕 *Bombyx mori* CPT2 基因在幼虫化蛹时出现表达高峰,在化蛹后,表

达骤然下降,说明其在幼虫化蛹中发挥重要作用^[33];冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* *CPF3*、*CPLCG3* 和 *CPLCG4* 基因在成虫中转录水平较高,并且三者的 mRNA 主要集中于成虫的生殖器和附腺,推测其与成虫生殖系统的发育密切相关^[34-35],正如本试验中 *SIICPG-5*、*SIICPG-9*、*SIICPG-10* 等基因在精巢和卵巢中也出现表达量高的现象,推测其在成虫生殖系统的发育中发挥一定的作用;在半翅目如灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 中,表皮蛋白基因 *CPR1* 在血淋巴中表达,并参与了植物病毒的传递^[36]。这种表达组织的特异性与本研究得出的结论相似。

由于 ICP 与昆虫抗药性密切相关^[33],并且杀虫剂的触杀作用是最主要、最普遍的杀虫方式^[9],因此深入研究 ICPG,可解释部分昆虫抗药性产生的原因。表皮降低杀虫剂穿透性,并能延缓药剂到达靶标部位的时间,随着解毒代谢作用的增强,使昆虫有充分的时间和较快地代谢进入体内的杀虫剂,从而提高对杀虫剂的抗性^[33-34],其中起主要作用的是 ICP。相关研究表明,*CPF3* 家族基因的变化会影响冈比亚按蚊的抗性水平^[34],*CPLCG3* 在抗性冈比亚按蚊和敏感蚊之间有表达差异,并随着蚊龄的增长表达逐渐增强^[37-38]。西非冈比亚按蚊通过过量表达 *CP* 基因(*CPLCG3*、*CPR124*、*CPR127*、*CPR129*)来增厚外表皮、中表皮和内表皮的几丁质层,从而产生对拟除虫菊酯的抗性^[39];另外,已有研究报道杀虫剂谷硫磷能高度诱导马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 的 *ICP* 基因 *LLd-GRP1*、*LLd-GRP2* 和 *LLd-GRP3* 表达,产生抗药性,并且在威斯康辛州中部的吡虫啉抗性群中,*LdCPH1* 的转录水平上升 3.96 倍^[40-41];在淡色库蚊 *Culex pipiens pallens* 中 *ICP* 基因 *Unigene394* 在敏感品系中的表达占 10.78%,而在抗性品系中的表达占 73.95%^[42]。进一步研究发现,*CPLCG5* 通过形成坚硬基质参与拟除虫菊酯抗性形成过程^[43],当敲除淡色库蚊中的 *CPLCG5*,其对溴氰菊酯的敏感性提升^[44]。因此,ICPG 与昆虫抗性的产生具有紧密联系,并可根据相关 ICPG 表达谱,选择适期进行害虫防治。本研究中 14 个基因于高龄幼虫期在体壁中高表达,低龄幼虫期在脂肪体中高表达的试验结果,为后续基因功能研究^[45-46]与害虫防治奠定了基础。

4 结论

本研究中克隆得到斜纹夜蛾 14 个 ICPG,通过序列比对发现所选目的基因编码产物具有 35~36 个氨基酸保守基序,属于几丁质结合蛋白,其中 *SIICPG-1*、*SIICPG-2*、*SIICPG-3*、*SIICPG-4*、*SIICPG-5*、*SIICPG-6*、*SIICPG-7*、*SIICPG-8*、*SIICPG-9*、*SIICPG-12*、*SIICPG-13* 和 *SIICPG-14* 所表达的表皮蛋白属于 CPR 家族,*SIICPG-10* 和 *SIICPG-11* 所表达的表皮蛋白属于 CPG 家族;进化树分析发现,目的基因更多的与棉铃虫表皮蛋白基因同源性较高;对目的基因表达谱进行分析,结果表明所验证基因具有组织龄期表达差异性。在生殖器官(精巢、卵巢)中,大部分基因相对表达量较低,而 *SIICPG-5* 在卵巢中的表达量最高;*SIICPG-3*、*SIICPG-7*、*SIICPG-9* 和 *SIICPG-10* 在精巢中表达量较高;在蛹期,*SIICPG-11* 和 *SIICPG-14* 相对表达量最高。

在幼虫各组织中,多数基因在体壁和脂肪体组织中高表达,并且具有高龄期在体壁组织中高表达,低龄期在脂肪体组织中高表达的现象,推测 14 个表皮蛋白基因更多地参与脂肪体中相关蛋白的合成,协助脂肪体行使其代谢、贮存营养、保护等功能。结合它们各自的 mRNA 表达模式,推断它们可能参与外表皮和内皮层的形成。上述研究结果为单个蛋白精确定位和后续功能研究^[45-46]奠定基础,并且可明确相关表皮蛋白抗性基因低表达时期,从而指导科学施药防治。

参考文献:

- [1] 秦厚国,汪笃栋,丁建,等.斜纹夜蛾寄主植物名录[J].江西农业学报,2006,18(5):51-58. <https://doi.org/10.19386/j.cnki.jxnyxb.2006.05.017>
- [2] Qin Houguo, Wang Dudong, Ding Jian, et al. Host plants of *Spodoptera litura*[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2006, 18(5): 51-58.
- [3] 栾玉柱,顾继伟,李美玲.不同寄主植物对斜纹夜蛾的影响及机制探讨[J].江苏农业科学,2013,41(11):142-144. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1002-1302.2013.11.053>
- [4] Luan Yuzhu, Gu Jiwei, Li Meiling. Effects of different host plants on *Spodoptera litura* and its mechanism[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2013, 41(11): 142-144.
- [5] 周晓梅,黄炳球.斜纹夜蛾抗性及其防治对策的研究进展[J].应用昆虫学报,2002,39(2):98-102. <https://doi.org/10.3969/j.issn.0452-8255.2002.02.004>

- Zhou Xiaomei, Huang Bingqiu. Insecticide resistance of the common cutworm (*Spodoptera litura*) and its control strategies [J]. Chinese Bulletin of Entomology, 2002, 39(2): 98-102.
- [4] 梁欣, 陈斌, 乔梁. 昆虫表皮蛋白基因研究进展[J]. 昆虫学报, 2014, 57(9): 1084-1093.
- Liang Xin, Chen Bin, Qiao Liang. Research progress in insect cuticular protein genes[J]. Acta Entomologica Sinica, 2014, 57(9): 1084-1093.
- [5] 刘清明, 苑园园, 林健荣, 等. 昆虫表皮蛋白及其基因表达调控机理的研究进展[J]. 应用昆虫学报, 2010, 47(2): 247-255.
- Liu Qingming, Yuan Yuanyuan, Lin Jianrong, et al. Advance of researches on insect cuticular proteins and the regulation mechanism of their gene expression[J]. Chinese Bulletin of Entomology, 2010, 47(2): 247-255.
- [6] Mushtaq A, Ian D, Bromilow R H. Delayed cuticular penetration and enhanced metabolism of deltamethrin in pyrethroid-resistant strains of *Helicoverpa armigera* from China and Pakistan[J]. Pest Management Science, 2006, 62(9): 805-810. <https://doi.org/10.1002/ps.1225>
- [7] Snyder M P, Kimbrell D, Hunkapiller M, et al. A transposable element that splits the promoter region inactivates a *Drosophila* cuticle protein gene[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 1982, 79(23): 7430-7434. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.23.7430>
- [8] 孙亮先, 黄周英, 郑华军, 等. 西方蜜蜂表皮蛋白基因 *apd*-like 转录起始位点的定位及 cDNA 序列的分析[J]. 昆虫学报, 2011, 54(2): 224-231.
- Sun Liangxian, Huang Zhouying, Zheng Huajun, et al. TSS identification and cDNA cloning of a cuticular protein gene *apd*-like from the Western honeybee (*Apis mellifera*)[J]. Chinese Bulletin of Entomology, 2011, 54(2): 224-231.
- [9] 孙亮先, 黄周英, 郑华军, 等. 蜜蜂表皮蛋白 *apd* 基因家族 3 个新成员的特性鉴定及昆虫 APD 家族序列特征的分析[J]. 昆虫学报, 2012, 55(1): 12-23. <https://doi.org/CNKI:SUN:KCXB.0.2012-01-002>
- Sun Liangxian, Huang Zhouying, Zheng Huajun, et al. Characterization of three new members of the apidermin (*apd*) gene family from honeybees and sequence analysis of the insect APD family [J]. Chinese Bulletin of Entomology, 2012, 55(1): 12-23.
- [10] Sun L X, Huang Z Y, Zheng H J, et al. Characterization of three new members of the apidermin (*apd*) gene family from honeybees and sequence analysis of the insect APD family[J]. Acta Entomologica Sinica, 2012, 55(1): 12-23.
- [11] Futahashi R, Okamoto S, Kawasaki H, et al. Genome-wide identification of cuticular protein genes in the silkworm, *Bombyx mori*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2008, 38(12): 1138-1146. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2008.05.007>
- [12] 梁九波. 家蚕表皮蛋白基因的表达式分析及表皮蛋白 BmorCPT1 的功能研究[D]. 重庆: 西南大学, 2012.
- Liang Jiubo. Expression profile of cuticular protein genes and function study of cuticular protein BmorCPT1 in silkworm, *Bombyx mori*[D]. Chongqing: Southwest University, 2012.
- [13] Qiao L, Xiong G, Wang R X, et al. Mutation of a cuticular protein, BmorCPR2, alters larval body shape and adaptability in silkworm, *Bombyx mori*[J]. Genetics, 2014, 196(4): 1103-1115. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.158766>
- [14] Togawa T, Dunn W A, Emmons A C, et al. Developmental expression patterns of cuticular protein genes with the R&R consensus from *Anopheles gambiae*[J]. Insect Biochemistry & Molecular Biology, 2008, 38(5): 508-519. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.12.008>
- [15] Lu Y, Yuan M, Gao X, et al. Identification and validation of reference genes for gene expression analysis using quantitative PCR in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae)[J/OL]. PLoS ONE, 2013, 8(7): e68059 (2013-07-09) [2019-12-03]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068059>
- [16] Andersen S O, Hojrup P, Roepstorff P. Insect cuticular proteins [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1995, 25(2): 153-176. [https://doi.org/10.1016/0965-1748\(94\)00052-j](https://doi.org/10.1016/0965-1748(94)00052-j)
- [17] Busse M S, Arnold C P, Par T, et al. A kappaB sequence code for pathway-specific innate immune responses[J]. EMBO Journal, 2014, 26(16): 3826-3835. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601798>
- [18] 许雯. 松墨天牛幼虫表皮蛋白基因的克隆和在头部、体壁中的表达差异分析[D]. 广州: 华南农业大学, 2012.
- Xu Wen. Cloning and expression difference of the ICPG between the head and body wall of *Monochamus alternatus* larvae [D]. Guangzhou: Huanan Agricultural University, 2012.
- [19] Togawa T, Dunn W A, Emmons A C, et al. CPF and CPFL, two related gene families encoding cuticular proteins of *Anopheles gambiae* and other insects[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2007, 37(7): 675-688. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.03.011>
- [20] Liu Q M, Yuan Y Y, Lin J R, et al. Advance of researches on insect cuticular proteins and the regulation mechanism of their gene expression[J]. Chinese Bulletin of Entomology, 2010, 47(2): 247-255. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1238.2010.00550>
- [21] Pan P L, Ye Y X, Lou Y H, et al. A comprehensive omics analysis and functional survey of cuticular proteins in the brown planthopper[J]. PNAS, 2018, 115(20): 5175-5180. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716951115>
- [22] Liu J, Li S, Li W, et al. Genome-wide annotation and comparative analysis of cuticular protein genes in the noctuid pest *Spodoptera litura*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2019, 110: 90-97. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.04.012>
- [23] Willis J H, Papandreou N C, Ionomidou V A, et al. Cuticular proteins[M]// Gilbert L I. Insect molecular biology and biochemistry. San Diego, USA: Academic Press, 2012: 134-166.
- [24] Andersen S O, Hojrup P, Roepstorff P. Insect cuticular proteins [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1995, 25(2): 153-176. [https://doi.org/10.1016/0965-1748\(94\)00052-j](https://doi.org/10.1016/0965-1748(94)00052-j)
- [25] Guan X, Middlebrooks B W, Alexander S, et al. Mutation of

- TweedleD, a member of an unconventional cuticle protein family, alters body shape in *Drosophila*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 2006, 103(45): 16794-16799. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607616103>
- [26] Ionomidou V A, Willis J H, Hamodrakas S J. Is beta-pleated sheet the molecular conformation which dictates formation of helicoidal cuticle?[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1999, 29(3): 285-292. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(99\)00005-3](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(99)00005-3)
- [27] Soares M P, Elias-Neto M, Simões Z L, et al. A cuticle protein gene in the honeybee: expression during development and in relation to the ecdysteroid titer[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2007, 37(12): 1272-1282. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.07.014>
- [28] Locke M. The Wigglesworth lecture: Insects for studying fundamental problems in biology[J]. Journal of Insect Physiology, 2001, 47(4/5): 495-507. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(00\)00123-2](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(00)00123-2)
- [29] Volovych O, Lin Z, Du J, et al. Identification and temporal expression profiles of cuticular proteins in the endoparasitoid wasp, *Microplitis mediator*[J/OL]. Insect Science, 2019 (2019-07-18) [2019-12-03]. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12711>
- [30] Xu W, Luo L L, Hua J, et al. Cloning and expression profiling of a cuticular protein gene in *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae)[J]. Acta Entomologica Sinica, 2014, 57(5): 515-521.
- [31] Chen E H, Hou Q L, Dou W, et al. Genome-wide annotation of cuticular proteins in the oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis*), changes during pupariation and expression analysis of CPAP3 protein genes in response to environmental stresses[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2018, 97: 53-70. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.04.009>
- [32] Roberts P E, Willis J H. The cuticular proteins of *Tenebrio molitor*. II. patterns of synthesis during postembryonic development[J]. Developmental Biology, 1980, 75(1): 70-77. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(80\)90144-X](https://doi.org/10.1016/0012-1606(80)90144-X)
- [33] Ali M S, Swapon A. Regulation of tweedle cuticular protein gene expression at the pre-pupal stage in wing discs of *Bombyx mori*[J]. Munis Entomology and Zoology Journal, 2015, 10(1): 225-233.
- [34] Vannini L, Reed T W, Willis J H. Temporal and spatial expression of cuticular proteins of *Anopheles gambiae* implicated in insecticide resistance or differentiation of M/S incipient species [J]. Parasites and Fibre Toxicology, 2014, 7(1): 24. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-24>
- [35] Liu W, Gray S, Huo Y, et al. Proteomic analysis of interaction between a plant virus and its vector insect reveals new functions of hemipteran cuticular protein[J]. Molecular and Cellular Proteomics, 2015, 14(8): 2229-2242. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.046763>
- [36] 孙雅雯, 郑彬. 昆虫表皮与化学杀虫剂抗性机制关系的研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2014, 10(11): 1055-1056.
- Sun Yawen, Zheng Bin. Advances in the study of the relationship between insect cuticle proteins and insecticide resistance [J]. Journal of Pathogen Biology, 2014, 10(11): 1055-1056.
- [37] Dotson E M, Cornel A J, Willis J H, et al. A family of pupal-specific cuticular protein genes in the mosquito *Anopheles gambiae*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1998, 28(7): 459-472. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(98\)00016-2](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(98)00016-2)
- [38] Cornman R S, Togawa T, Dunn W A, et al. Annotation and analysis of a large cuticular protein family with the R&R consensus in *Anopheles gambiae*[J]. BMC Genomics, 2008, 9(1): 22. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-22>
- [39] Yahouédo G A, Chandre F, Rossignol M, et al. Contributions of cuticle permeability and enzyme detoxification to pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles gambiae*[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 6137. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11357-z>
- [40] Zhang J, Goyer C, Pelletier Y. Environmental stresses induce the expression of putative glycine-rich insect cuticular protein genes in adult *Leptinotarsa decemlineata* (Say)[J]. Insect Molecular Biology, 2008, 17(3): 209-216. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2008.00796.x>
- [41] Clements J, Schoville S, Peterson N, et al. Characterizing molecular mechanisms of imidacloprid resistance in select populations of *Leptinotarsa decemlineata* in the central sands region of wisconsin[J/OL]. PLoS ONE, 2016, 11(1): e0147844 (2016-01-28) [2019-12-03]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147844>
- [42] 方福瑾. 蚊杀虫剂表皮抗性的初步研究[D]. 南京: 南京医科大学, 2014.
- Fang Fujin. Delatamethrin-resistance in *Culex pipiens pallens*: presumptive role for the cuticle protein[D]. Nanjing: Nanjing Medical University, 2014.
- [43] Huang Y, Guo Q, Sun X H, et al. *Culex pipiens pallens* cuticular protein CPLCG5 participates in pyrethroid resistance by forming a rigid matrix[J]. Parasites & Vectors, 2018, 11: 6. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2567-9>
- [44] Fang F, Wang W, Zhang D, et al. The cuticle proteins: A putative role for deltamethrin resistance in *Culex pipiens pallens*[J]. Parasitology Research, 2015, 114(12): 4421-4429. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4683-9>
- [45] Noh M Y, Muthukrishnan S, Kramer K J, et al. *Tribolium castaneum* RR-1 cuticular protein TcCPR4 is required for formation of pore canals in rigid cuticle [J/OL]. PLoS Genetics, 2015, 11(2): e1004963 (2015-02-09) [2019-12-03]. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004963>
- [46] Vannini L, Willis J H. Localization of RR-1 and RR-2 cuticular proteins within the cuticle of *Anopheles gambiae*[J]. Arthropod Structure & Development, 2017, 46(1): 13-29. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2016.10.002> ●