

褐飞虱蜕皮激素合成相关 Halloween 基因的克隆及功能分析

李凯龙^{1,2,*}, 傅强¹, 王渭霞¹, 赖凤香¹, 万品俊¹

(1. 中国水稻研究所水稻生物学国家重点实验室, 杭州 3100062;

2. 湖南省粮油产品质量监测中心, 长沙 410201)

摘要:【目的】蜕皮激素(ecdysone)是调控昆虫生长发育和繁殖的重要激素,其合成主要由5个称为 Halloween 基因编码的细胞色素 P450 (spook/CYP307A1, Phantom/CYP306A1, disembodied/CYP302A1, shadow/CYP315A1 和 shade/CYP314A1)参与。褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 系东南亚和东亚地区危害最为严重的水稻害虫之一,以蜕皮激素调控基因为靶标,应用 RNAi 技术防控褐飞虱正逐步成为研究热点。本研究旨在揭示褐飞虱体内 Halloween 基因的功能,为褐飞虱的防控和新农药的开发提供理论依据。【方法】本研究基于褐飞虱基因组和转录组数据,利用 RT-PCR 技术克隆了参与蜕皮激素合成的5个 Halloween 基因;利用生物信息学软件预测分析其编码蛋白的结构特性;利用 MEGA5.0 邻接法构建系统进化树;利用实时荧光定量 PCR 技术研究其时空表达特征;利用注射法 RNAi 技术分析 *Cyp314a1* 基因表达下调对褐飞虱生长发育和繁殖的影响。【结果】克隆获得褐飞虱的5个 Halloween 基因,即 *NIcyp307a1* (GenBank 登录号: KM217014.1), *NIcyp306a1* (GenBank 登录号: KM217013.1), *NIcyp302a1* (GenBank 登录号: KM216995.1), *NIcyp315a1* (GenBank 登录号: KM216998.1) 和 *NIcyp314a1* (GenBank 登录号: KU928172)。进化分析表明,这5个基因分属于 CYP2 和线粒体两大类群,并与各自的同源基因聚类在一起,说明 Halloween 基因和蜕皮激素合成途径在昆虫进化过程中十分保守。*NIcyp314a1* 具有5个 P450 的保守结构域和两个跨膜结构域,是典型的线粒体酶。qRT-PCR 检测结果显示,5个 Halloween 基因的表达量在整个褐飞虱5龄若虫期内呈现波动状,且均在5龄若虫蜕皮后的24 h 和 60 h 出现表达量峰值。*NIcyp314a1* 在褐飞虱发育各个龄期均表达,且在成虫中表达量最高;*NIcyp314a1* 在胸部表达量较头部和腹部高,其在脂肪体中的表达量最高,其次是在足、表皮、翅芽中,中肠中表达量最低。利用注射法 RNAi 对 *NIcyp314a1* 基因进行沉默后,*NIcyp314a1* 的表达量在注射后第4天较对照极显著降低 84.6% ($P < 0.01$),同时蜕皮激素通路下游的响应关键基因 *NIFTZ-F1* 的表达量较对照极显著降低 64.1% ($P < 0.01$)。表型观察发现,*NIcyp314a1* 表达量的下调导致了褐飞虱蜕皮困难,出现畸形虫体,第7天死亡率大于 95%,且 *NIcyp314a1* 表达量的下调导致了褐飞虱卵巢发育畸形。【结论】褐飞虱蜕皮激素合成相关的 Halloween 基因在进化上非常保守,Halloween 基因功能的研究揭示了褐飞虱体内 Halloween 基因对于褐飞虱蜕皮和繁殖的重要性。其表达水平的降低导致了褐飞虱生长发育和繁殖受阻,提示褐飞虱 Halloween 基因可用于褐飞虱蜕皮和繁殖进程的调控,同样也为 Halloween 基因在褐飞虱防治方面的潜在应用提供了依据。

关键词: 褐飞虱; 蜕皮激素; Halloween 基因; 基因表达; 蜕皮; 繁殖

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2017)10-1129-12

基金项目: 浙江省自然科学基金(Y15C140023); 现代农业产业技术体系建设专项基金资助项目(CARS-01-18)

作者简介: 李凯龙,男,1988年3月生,湖南洪江人,助理研究员,研究方向为昆虫生理及分子生物学, E-mail: lannuolkl@foxmail.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: lannuolkl@foxmail.com

收稿日期 Received: 2017-07-08; 接受日期 Accepted: 2017-08-29

Molecular cloning and functional characterization of Halloween genes involved in ecdysteroid biosynthesis in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae)

LI Kai-Long^{1,2,*}, FU Qiang¹, WANG Wei-Xia¹, LAI Feng-Xiang¹, WAN Pin-Jun¹ (1. State Key Laboratory of Rice Biology, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China; 2. Hunan Provincial Center for Monitoring of Grain Oil Products Quality, Changsha 410201, China)

Abstract: 【Aim】 As one of the most important insects endohormones, ecdysone plays an important role in regulating the development and reproduction of insects. Five Halloween genes are involved in ecdysteroid biosynthesis and encode cytochrome P450 enzymes spook/CYP307A1, Phantom/CYP306A1, disembodied/CYP302A1, shadow/CYP315A1 and shade/CYP314A1, respectively. The brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, is one of the most destructive pests of rice throughout Southeastern and Eastern Asia. For *N. lugens*, ecdysteroid regulated genes of RNAi technology management has gradually become a research hotspot. The objective of this study is to investigate the function of Halloween genes in *N. lugens* so as to provide the theoretical basis for the management of *N. lugens* and development of new pesticides. 【Methods】 Based on the genome and transcriptome database of *N. lugens*, five ecdysteroidogenesis-related Halloween genes in *N. lugens* were cloned using RT-PCR, and the deduced protein structure was predicted using different bioinformatics software, and the phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method of MEGA 5.0. The expression profiles of these genes in different tissues of nymph and at different developmental stages of *N. lugens* were detected by quantitative real-time PCR. RNAi experiment was carried out to examine the effects of knockdown of Halloween genes on the development and reproduction of *N. lugens*. 【Results】 Five Halloween genes involved in ecdysteroidogenesis, *i. e.*, *NlCyp307a1*, *NlCyp306a1*, *NlCyp302a1*, *NlCyp315a1*, and *NlCyp314a1*, were cloned and identified in *N. lugens*. Phylogenetic analysis revealed that the five Halloween genes belong to two superfamilies 2-Clan and Mito-Clan, respectively, and clustered with their homologous genes in other insects, suggesting that Halloween genes and edysteroidogenesis pathways are very highly conserved during insect evolution. *NlCYP314A1* contains five conserved P450s motifs and two transmembrane domains, being a typical mitochondria cytochrome P450s. The results of qRT-PCR showed that five Halloween genes had higher mRNA abundance at 24 h and 60 h after molting in the 5th instar nymph stage. *NlCyp314a1* was continually expressed during the whole developmental stage, and showed the highest expression level in adults. Among the examined tissues, thorax had the higher transcription level of *NlCyp314a1* than head and abdomen, and fat body had the highest transcription level of *NlCyp314a1*, followed by leg, integument, wing bud, and midgut. Four days after injection of *dsNlCyp314a1*, the expression levels of *NlCyp314a1* and *NlFTZ-F1* in the treated individuals were extremely significantly decreased by 84.6% and 64.1%, respectively, compared with the control. *NlCyp314a1* knockdown resulted in nymphs failed to molt on time, exhibited apparent phenotypic defects, and >95% mortality of the nymphs at day 7 after injection. *NlCyp314a1* knockdown also resulted in the developmental abnormality of adult ovary. 【Conclusion】 Halloween genes of *N. lugens* involving in ecdysteroidogenesis are evolutionarily conserved. Silencing of selected Halloween gene expression causes phenotypic defects in molting and reproduction. These results suggest that Halloween genes encode functional proteins that are involved in molting and reproduction of *N. lugens*. Halloween genes might be used in altering genetically the progress of molting and reproduction of *N. lugens*. This study provides a theoretical basis for potential application of Halloween genes in the management of *N. lugens*.

Key words: *Nilaparvata lugens*; ecdysone; Halloween gene; gene expression; molting; reproduction

蜕皮激素 (ecdysone) 是一种类固醇物质, 昆虫不能自身从头合成, 只能利用从食物中获取的植物甾醇或动物胆固醇来合成 (Sakurai and Gilbert, 1990)。蜕皮激素的合成一直是昆虫蜕皮激素研究中的热点, 研究发现参与蜕皮激素合成途径的基因主要为编码前胸腺特异性 P450 羟化酶的 Halloween 家族基因, 其基因功能的缺失可导致蜕皮激素滴度的下降, 从而引起昆虫发育受阻、蜕皮畸形或生殖受影响。因此, 开展 Halloween 家族基因在褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 生长发育和繁殖中的研究, 将有助于明确昆虫激素调控机制, 为水稻主要害虫褐飞虱的控制和新农药的开发提供理论依据。

Halloween 家族基因包括 *spook* (*spo*, *Cyp307a1*), *Phantom* (*Phm*, *Cyp306a1*), *disembodied* (*Dib*, *Cyp302a1*), *shadow* (*Sad*, *Cyp315a1*) 和 *shade* (*Shd*, *Cyp314a1*) (Kappler *et al.*, 1986, 1988; Grieneisen *et al.*, 1993; Gilbert, 2004)。其中 CYP307A1, CYP302A1, CYP306A1 和 CYP315A1 参与的催化反应在前胸腺细胞中完成并合成 20E 的前体——无活性的蜕皮酮 (E) (Chavez *et al.*, 2000; Warren *et al.*, 2002, 2004; Niwa *et al.*, 2004), 合成的蜕皮酮释放到血淋巴后, 在周缘组织中由 CYP314A1 催化为具有活性的 20-羟基蜕皮酮 (20E), 这也是最重要的一步催化反应 (Petryk *et al.*, 2003; Rewitz *et al.*, 2006a)。关于这些基因的研究主要集中在鳞翅目和双翅目中, 在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中 *DmPhm*, *DmDib*, *DmSad* 和 *DmShd* 的表达产物 (蜕皮甾醇 25-羟化酶、蜕皮甾醇 22-羟化酶、2-羟化酶和蜕皮激素 20-羟化酶)、代谢底物 (2,22,25-三脱氧蜕皮酮、2,22-二脱氧蜕皮酮、2-二脱氧蜕皮酮和蜕皮酮) 和代谢产物 (2,22-二脱氧蜕皮酮、2-二脱氧蜕皮酮、蜕皮酮和 2-羟基蜕皮酮) 均已被证实, 原位杂交结果显示 *DmPhm*, *DmDib* 和 *DmSad* 在环腺中的前胸腺细胞中表达, 而 *DmShd* 在周缘组织如表皮、中肠、马氏管和脂肪体等中表达, 这些基因的突变体会导致胚胎后期低蜕皮激素滴度, 突变体表型相似, 都表现出胚胎表皮沉积受阻, 胚胎后期的形态建成如头部内卷、背部闭合和肠道发育等出现严重缺陷 (Chavez *et al.*, 2000; Warren *et al.*, 2002, 2004; Petryk *et al.*, 2003; Niwa *et al.*, 2004)。另有研究表明, 雌蚊虫卵巢的发育也与蜕皮激素的合成有关 (Sieglaff *et al.*, 2005), 而雄蚊虫是在附腺中合成蜕皮激素而不是精巢, 附腺中产生的蜕皮激素通过交配而转移雌蚊虫从而有利于雌蚊虫卵巢的发育

(Pondeville *et al.*, 2008)。黑腹果蝇和烟草天蛾 *Manduca sexta* 体内 Halloween 基因在前一次蜕皮后和下一次蜕皮前有表达高峰 (Rewitz *et al.*, 2006b; Warren *et al.*, 2006)。这些证据都表明 Halloween 家族基因对昆虫的蜕皮及繁殖具有重要作用。

由于褐飞虱中细胞色素 P450 基因的研究主要集中在其与抗药性之间的关系, P450 基因参与蜕皮激素合成的研究尚未见报道, 其研究对揭示褐飞虱体内细胞色素 P450 基因的功能多样性具有重要意义。本研究以褐飞虱为研究对象, 通过同源性和进化分析检索并鉴定可能参与褐飞虱蜕皮激素合成的 P450 基因, 在此基础上研究其时空表达谱, 并进一步分析 Halloween 家族基因表达水平下调对褐飞虱生长发育和繁殖的影响。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫和水稻

褐飞虱 *N. lugens*, 虫源采自浙江省杭州市富阳区中国水稻所基地稻田, 在室内室温条件下饲养于感虫水稻 *Oryza sativa* 品种 Taichung Native 1 (TN1) 上 2 代以上, 取适龄若虫或成虫供试。饲养条件: 温度 $27 \pm 1^\circ\text{C}$, 相对湿度 $80\% \pm 10\%$, 光周期 14L:10D。

感虫水稻品种 TN1, 分批播种育秧后种植于无虫网室内的水泥池中, 正常肥水管理。实验开始前 7 d 取 50 ~ 60 d 秧龄的稻苗, 移栽于小泥盆 (直径 8 cm, 高 7 cm), 待稻苗存活后, 每盆保留 3 个壮蘖用以饲养试虫。

1.2 褐飞虱样品准备

采用单头试管饲养法收集褐飞虱 5 龄若虫不同发育时间试虫样品: 每天 24 h 持续观察蜕皮情况, 将刚蜕皮至 5 龄的新鲜若虫接入新的试管中饲养用于取样, 每隔 12 h 为一个节点取样, 分别命名为 N5-0h, N5-12h, N5-24h, N5-36h, N5-48h, N5-60h, N5-72h 和 N5-84h 样品。同时收集正常饲养条件下的褐飞虱 1 - 5 龄若虫 (每个龄期不同天数若虫混合为一个龄期的样品) 及初羽化雌雄成虫 (1 日龄) 10 ~ 50 头。另外, 选取 200 头 5 龄若虫并在解剖镜下分离头部、胸部、腹部、表皮、翅芽、脂肪体、中肠和足置于 1.5 mL Eppendorf 管。以上每处理设置 3 个生物学重复。所有样品用液氮速冻后置于 -80°C 冰箱保存备用。

1.3 总 RNA 的提取和 cDNA 第 1 链合成

褐飞虱总 RNA 的提取采用 Qiagen 公司生产的总 RNA 提取试剂盒 (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA), 提取方法参照试剂盒说明书。利用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳和分光光度计 (Nano-Drop 1000 spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) 检测所提取 RNA 的完整性和浓度, 用于 cDNA 第 1 链的合成。

cDNA 第 1 链的合成采用 Toyobo 公司的反转录试剂盒 (ReverTra Ace qPCR RT Kit, Toyobo Co. LTD, Osaka, Japan), 操作参照试剂盒说明书, RNA 模板量为 1 μg , 以 OligdT 和随机引物为合成引物, 合成 cDNA 第 1 链。

1.4 基因检索、克隆与序列分析

分别根据黑腹果蝇 *D. melanogaster*, 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 和豌豆蚜 *Acyrtosiphum pisum*

Halloween 基因的蛋白序列检索褐飞虱的基因组和转录组, 得到褐飞虱候选 Halloween 基因 (表 1)。利用 Primer Premier 5.0 设计引物 (表 2) 对其进行 RT-PCR 克隆。以褐飞虱各龄期混合 cDNA 模板进行 PCR 扩增, 反应体系: 10 \times ExTaq Buffer 2.5 μL , dNTPs (2.5 mmol/L) 2.0 μL , 正反向引物 (10 mmol/L) 各 1.0 μL , ExTaq 酶 0.125 μL , cDNA 模板 1.0 μL , 双蒸水 17.375 μL 。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 38 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 切胶回收后连于 TOPO2.1 载体 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 上, 转化至 DH5 α 感受态细胞 (Novagen, Darmstadt, Germany) 中, 随机挑选 10 个单克隆送于上海英骏生物技术有限公司进行双端测序。

表 1 基于褐飞虱基因组的 Halloween 基因信息

Table 1 Halloween genes information in *Nilaparvata lugens* genome-wide

基因 Genes	GenBank 登录号 GenBank accession number	基因座 Locus	起始位置(bp) Start	终止位置(bp) End
<i>NICyp302a1</i>	NLU023987.1	scaffold63	376 433	388 490
<i>NICyp306a1</i>	NLU028606.1	scaffold953	252 989	259 596
<i>NICyp307a1</i>	NLU008821.1	scaffold1880	98 321	124 866
<i>NICyp315a1</i>	NLU009808.1	scaffold203	630 868	639 831
<i>NICyp314a1</i>	NLU012361.1	scaffold249	673 355	677 541

测序结果和序列组装通过 DNASTAR Lasergene 软件包 (<http://www.dnastar.com/>) 完成。利用 NCBI 网上 ORF 查找工具 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 查找基因开放阅读框、利用网上 ExPASy 翻译软件进行翻译预测氨基酸序列 (<http://web.expasy.org/translate/>)、利用 NCBI 在线软件 CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>) 和 EMBL 在线软件 SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1) 对氨基酸序列保守结构域进行预测、利用 TMHMM server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 对跨膜结构进行预测、利用 ProtParam (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam>) 对氨基酸序列进行理化特性分析, 所得氨基酸序列通过 NCBI 网上 BLAST 程序 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 与 GenBank 中的 nr 库进行同源性搜索并用 ClustalX2 (Larkin *et al.*, 2007) 与其他昆虫同源序列进行多序列比对, 采用邻接法

(Neighbor-Joining method) 在 MEGA5.0 软件中 (Tamura *et al.*, 2011) 完成系统发育树的构建, 各分支重复检验次数均为 1000 次。

1.5 *NICyp314a1* 基因的 RNAi 实验

NICyp314a1 是蜕皮激素合成最后一步相关酶的编码基因。采用 Ambion 试剂盒 (MEGAscript T7 High Yield Transcription Kit, Austin, USA) 进行双链 RNA (double stranded RNA, dsRNA) dsRNA 的体外转录合成。根据试剂盒操作说明合成目标基因 (*NICyp314a1*) 和用作对照的绿色荧光蛋白基因 (*GFP*) 的 dsRNA 序列, 相关引物序列见表 2。在分光光度计下测量 dsRNA 的浓度, 根据浓度加入不同体积的无 RNAase 水, 调节 dsRNA 浓度约为 4.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

选取褐飞虱 3 龄 1 日龄若虫和 5 龄 3 日龄若虫, 通过显微注射仪将 *NICyp314a1*-dsRNA 或 *GFP*-dsRNA 注射至试虫体内 (注射量: 25 nL dsRNA/每头 (3 龄若虫) 和 100 nL dsRNA/每头 (5 龄若虫))

(Xue *et al.*, 2015))。注射 1 d 后, 移除死亡的褐飞虱, 随后逐日观察试虫的存活数、若虫发育情况及表型(5 龄注射试虫在成虫第 4 天进行解剖并观察卵巢发育情况), 并在在基恩士公司的超景深三维显微系统 VHX-6000 下拍摄表型图片。每处理设置 5

个重复, 每重复 25 头褐飞虱, 于注射后第 4 天随机取 3 个重复, 每个重复取 5 ~ 10 头用于提取总 RNA 并反转录成 cDNA, 方法见 1.3 节, 用于进行定量 PCR(方法同 1.4 节)验证和分析。相关引物序列见表 2。

表 2 本研究所用引物
Table 2 Primers used in this study

引物 Primers	正向引物 (5' - 3') Forward sequences	反向引物 (5' - 3') Reverse sequences	扩增长度 (bp) Amplicon size	引物用途 Purpose
NIcyp302a1	GCTGGCCTGTTCAAAAATCGT	TTAGATTCCAGGCCACACTG	2 087	
NIcyp306a1	ATCCTGCGATGGAGAGTCTCT	CTCACACTCACAAAACAATTTCTCA	1 454	
NIcyp307a1	CTATCGCAGTATCAACCGC	TGTAGCAACGTGTGGAACGA	1 333	基因克隆 Gene cloning
NIcyp315a1	ACCGATGAACCACCTTCTCC	CCATTCCGTAGGGCGTAGAG	1 168	
NIcyp314a1	CAGTTCAGGGAGCGTCTGTC	ACTGGTCCCAATGTCTGTTGG	1 892	
dsNIcyp314a1	T7-TGTTTTTCGTCGGCCACATTC	T7-CACGTTTCGCCTTGTTCGTT	460	双链 RNA 合成 dsRNA
qNIRPS11	CCGATCGTGTGGCGTTGAAGGG	ATGGCCGACATTCTTCCAGGTCC	159	
qNIRPS15	TAAAAATGGCAGACGAAGAGCCCAA	TTCCACGGTTGAAACGTCTGCG	150	
qNIcyp302a1	GTCGTCGCTCATGCTTATGT	GTCAGTGTCTTCAGCCTCA	147	
qNIcyp306a1	CTGATCAAGCAGGCTTFCAA	CATCTTGGACCTCAGAGCA	110	定量 PCR qRT-PCR
qNIcyp307a1	GCAATAATTCCTTGCCTA	AAGCACTCTGCCTCCTCATT	142	
qNIcyp315a1	CGGAATGGGATTGAGAAGTT	CGCAGGTTGATACAAGATGG	104	
qNIcyp314a1	TTGTTGCTCAGCCATCTTTC	TGCTGGGAATGTCGTATTGT	102	
qNIFTZ-F1	ACCCTGAAGTGAGAGGGTTG	TGTGGATTTAGGCATCACT	150	

1.6 实时定量 PCR

qRT-PCR 分析采用 Toyobo 公司生产的 SYBR Green Mix 试剂盒, 参考操作说明, 反应体系共 20.0 μL : 6.4 μL ddH₂O, 10 μL 酶预混液, 上下游引物 (10.0 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.8 μL , 不同组织、龄期和不同 dsRNA 处理试虫模板 2.0 μL 。反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火及延伸 35 s, 45 个循环。基因的相对表达量计算采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法 (Livak and Schmittgen, 2001; Vandesompele *et al.*, 2002), 内参基因选用 *NIRPS11* 和 *NIRPS15* (Yuan *et al.*, 2014)。相关引物序列见表 2。

1.7 数据分析

数据分析采用 DPS 数据处理系统 (Tang and Zhang, 2013), 其中两个处理采用 *t* 检验进行比较, 两个以上处理采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 或双因素方差分析 (Two-way ANOVA), 并采用 Duncan 氏新复极差法进行多重比较; 百分数用反正弦平方根转换。文中所用数据均为平均值 \pm 标准误 (*SE*)。

2 结果

2.1 褐飞虱蜕皮激素合成途径 Halloween 基因 cDNA 序列克隆与系统发育分析

基于褐飞虱基因组和转录组数据, 检索并克隆获得 5 个褐飞虱 Halloween 基因: *NIcyp307a1* (GenBank 登录号: KM217014.1), *NIcyp306a1* (GenBank 登录号: KM217013.1), *NIcyp302a1* (GenBank 登录号: KM216995.1), *NIcyp315a1* (GenBank 登录号: KM216998.1) 和 *NIcyp314a1* (GenBank 登录号: KU928172), ORF 长度分别为 1 935, 1 500, 1 692, 1 443 和 1 629 bp, 推导得到的氨基酸序列长度分别为 644, 499, 563, 480 和 542 aa, 氨基酸序列与同为飞虱科的灰飞虱 *Laodelphax striatella* 或白背飞虱 *Sogatella furcifera* 同源基因编码的氨基酸序列一致性分别达 87%, 87%, 84%, 87% 和 95%。此外, 基于氨基酸序列的系统进化树表明, 褐飞虱 5 个 Halloween 基因编码的氨基酸序列

与其他昆虫中相应的同源序列聚在一起,其中 *NCyp307a1* 和 *NCyp306a1* 属于细胞色素 P450 (CYPs) 家族的 CYP2 类群, *NCyp302a1*,

NCyp315a1 和 *NCyp314a1* 属于细胞色素 P450 (CYPs) 家族的线粒体类群(图 1)。

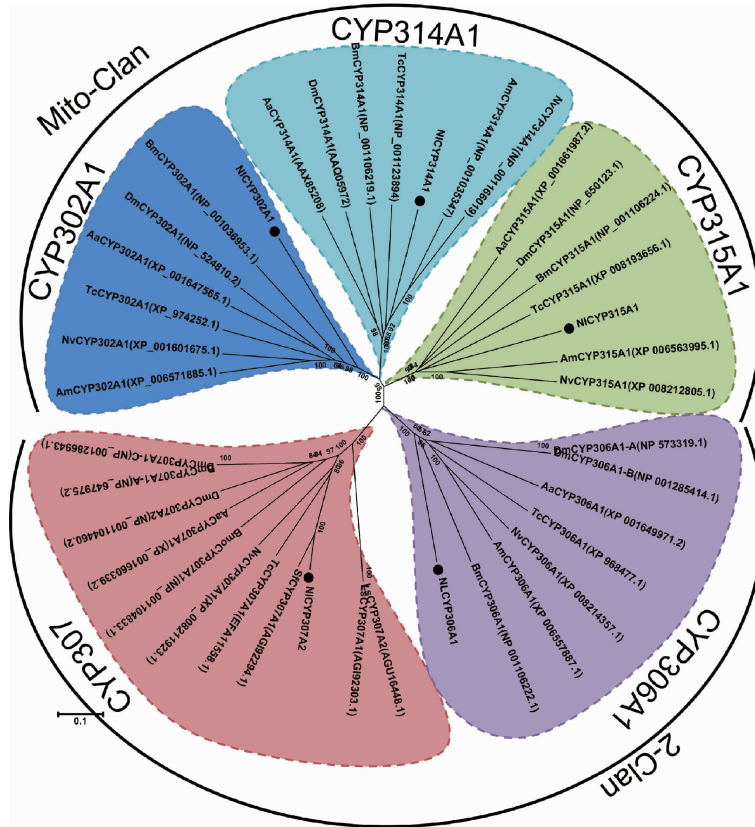


图 1 基于氨基酸序列构建的昆虫 Halloween 蛋白系统进化树(邻接法)

Fig. 1 Phylogenetic tree of Halloween genes from insects reconstructed with the neighbor-joining method based on the amino acid sequence

依据来自黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (Dm)、西方蜜蜂 *Apis mellifera* (Am)、金小蜂 *Nasonia vitripennis* (Nv)、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (Tc)、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* (Aa)、家蚕 *Bombyx mori* (Bm)、白背飞虱 *Sogatella furcifera* (Sf)、灰飞虱 *Laodelphax striatella* (Ls) 和褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Nl) 的 Halloween 蛋白的氨基酸序列,利用 CLUSTX 和 MEGA 软件构建昆虫 Halloween 基因的系统进化树,其中 2-Clan 和 Mito-Clan 分别表示 P450 的 CYP2 和线粒体类群。图中蛋白名称的前两个字母表示其所属物种名称的简写,括号里的代号为该蛋白的 GenBank 登录号。进化树节点数字代表自展 1 000 次重复检验百分比,且图中只显示大于 50% 的自展检验百分比。The phylogenetic tree was generated by CLUSTX and MEGA based on the Halloween amino acid sequences from *Drosophila melanogaster* (Dm), *Apis mellifera* (Am), *Nasonia vitripennis* (Nv), *Tribolium castaneum* (Tc), *Anopheles gambiae* (Aa), *Bombyx mori* (Bm), *Sogatella furcifera* (Sf), *Laodelphax striatella* (Ls) and *Nilaparvata lugens* (Nl). The 2-Clan and Mito-Clan represent the CYP2 and mitochondrial P450 clans, respectively. The first two letters of the protein name indicate the origin species abbreviation, and the code in the brackets represents the GenBank accession number. The test of phylogeny was carried out using a bootstrap analysis of 1 000 replications, and bootstrap values >50% are shown on each node of the tree.

20 羟基蜕皮酮是引起蜕皮的作用物,其合成是由 CYP314A1 催化蜕皮酮完成,CYP314A1 催化反应也是合成蜕皮激素的最后一步(Petryk *et al.*, 2003; Rewitz *et al.*, 2006c)。*NCyp314a1* 分子特征分析表明,其编码蛋白 NICYP314A1 由 542 个氨基酸残基组成,分子式为 $C_{2878}H_{4437}N_{745}O_{782}S_{25}$,理论分子量和等电点分别为 62.18 kD 和 7.92;半衰期约 30 h,不稳定参数为 51.09,属于不稳定蛋白。跨膜结构域预测结果表明,该蛋白存在两个跨膜区域,分别位于 21-43 和 345-367 位氨基酸之间(图 2)。

此外,NICYP314A1 具有 5 个 P450 的保守结构域 WxxxR (Helix-C), GxE/DTT/S (Helix-I), ExxR (Helix-K), PxxFxPE/DRF (PERF motif) 和 PFxxGxRxCxG/A (heme-binding domain),其中 'x' 代表任意氨基酸,其结构域也说明 NICYP314A1 是典型的线粒体酶。同时 NICYP314A1 与黑腹果蝇 *D. melanogaster*、埃及伊蚊 *Aedes aegypti*, 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*, 西方蜜蜂 *Apis mellifera*, 蝇蛹金小蜂 *Nasonia vitripennis*, 佛罗里达弓背蚁 *Camponotus floridanus*, 家蚕 *Bombyx mori*, 棉铃虫

Helicoverpa armigera, 甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae*, 白背飞虱 *Sogatella furcifera*, 灰飞虱 *Laodelphax striatella*, 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 和马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 的 CYP314A1 蛋白序列在 P450 的保守结构域具有高度一致性(图 3)。进

化分析发现,其与同为飞虱科的白背飞虱和灰飞虱的 CYP314A1 蛋白序列聚在一起(图 4)。这些结果表明本研究克隆得到的序列确为褐飞虱 *NiCyp314a1* 基因片段。

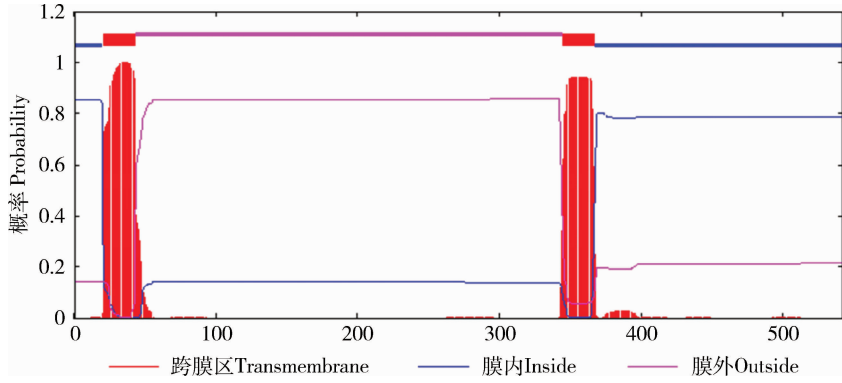


图 2 褐飞虱 NICYP314A1 蛋白跨膜结构域

Fig. 2 The analysis of position of possible transmembrane helices of NICYP314A1 in *Nilaparvata lugens*

Mitochondrial targeting sequence

NiCYP314A1:	-----MVNSSNMLTDSNHWIEASDILFSLAIFSWGCIYMAALVVFVFLVWMLP-----PSWKKRKFPTVYIEEK-----PGLDIPGVVAPLGGTWTWYVSVR-----DMDKRVHDPKQVQ	108
SCYP314A1:	-----TQVWGRARALRHIVQGTQVWVINGDMLTQWVWIEASDILFSLAIFSWGCIYMAALVVFVFLVWMLP-----PSWKKRKFPTVYIEEK-----PGLDIPGVVAPLGGTWTWYVSVR-----DMDKRVHDPKQVQ	128
LcCYP314A1:	-----MGSQCTLTVFAAKEHRHVD-KQCSMNSSNMLTDSNHWIEASDILFSLAIFSWGCIYMAALVVFVFLVWMLP-----PSWKKRKFPTVYIEEK-----PGLDIPGVVAPLGGTWTWYVSVR-----DMDKRVHDPKQVQ	133
AaCYP314A1:	-----MLLSANSFVIAAVLITLITVFLVSHRA-----WFWTATSHSASAEAG-----KFKVAKVPGFSPHPIGTRWVYVSCIGYRINKKHDAKQVQ	89
NvCYP314A1:	-----MIRASVSSAAMPHSSIHMDKTYVSSCNMLLVWVVEVLATAGAMQLSNVCS-----WLNKKSPKSDTADSGVGLPKKSNVQVPGVSPHPIGTRWVYVSCIGYRINKKHDAKQVQ	124
CiCYP314A1:	-----MLLSGNWFTIARAALITLITVFLVSHRA-----WFWTATSHSASAEAG-----KFKVAKVPGFSPHPIGTRWVYVSCIGYRINKKHDAKQVQ	92
DmCYP314A1:	-----MSVILALALVLYCYCALHRHKLADIY-----EPLIKRNTLED-----FVHAEILQEPAPKFR-----RRCVLDVPGSKRPHVGGVYVLLVFRFRAKCKLIEVADLNQ	99
AcCYP314A1:	-----MSVILVLFVYTFMFLYFNPKFKLVESSPFLHLLQDAGDAGSGGLQAATACNAGQTSFVSPAPAPPENDVAPPVPRV-----FVGRHRLPGLGTRWVYVSCIGYRINKKHDAKQVQ	106
TeCYP314A1:	-----MFEKFGSLEWVFLITVFLVSHRA-----WFWTATSHSASAEAG-----KFKVAKVPGFSPHPIGTRWVYVSCIGYRINKKHDAKQVQ	79
LdCYP314A1:	-----MNYIIMDFEILQSLSNVYVYVFLVFLVSHRA-----WFWTATSHSASAEAG-----KFKVAKVPGFSPHPIGTRWVYVSCIGYRINKKHDAKQVQ	88
MbCYP314A1:	-----MSLGAELFHSYVESVFG-----TPPEVVDVSWVPTLILAVLLV-----VAATAAARADGKQ-----STRPQGLVAPLGGTWTWYVSVR-----DMDKRVHDPKQVQ	93
HaCYP314A1:	-----MSLGLVLFHSYVESVFG-----TPPEVVDVSWVPTLILAVLLV-----VAATAAARADGKQ-----ATRPGVGLVAPLGGTWTWYVSVR-----DMDKRVHDPKQVQ	93

Helix C

NiCYP314A1:	YGVVQKDALNWFVNDISREHLDIVLRKSNLPRRFLVYAHKATFRDRYDGLVNVQGHVNDIKLKLPEVQVQKTEBNVHDDPDRHPSASADATTQVREDFCVLSESSGILLGRMGLTERCS-NQVARNLADLVQH	267
SCYP314A1:	YGVVQKDALNWFVNDISREHLDIVLRKSNLPRRFLVYAHKATFRDRYDGLVNVQGHVNDIKLKLPEVQVQKTEBNVHDDPDRHPSASADATTQVREDFCVLSESSGILLGRMGLTERCS-NQVARNLADLVQH	287
LcCYP314A1:	YGVVQKDALNWFVNDISREHLDIVLRKSNLPRRFLVYAHKATFRDRYDGLVNVQGHVNDIKLKLPEVQVQKTEBNVHDDPDRHPSASADATTQVREDFCVLSESSGILLGRMGLTERCS-NQVARNLADLVQH	292
AaCYP314A1:	YGVVQKDALNWFVNDISREHLDIVLRKSNLPRRFLVYAHKATFRDRYDGLVNVQGHVNDIKLKLPEVQVQKTEBNVHDDPDRHPSASADATTQVREDFCVLSESSGILLGRMGLTERCS-NQVARNLADLVQH	246
NvCYP314A1:	YGVVQKDALNWFVNDISREHLDIVLRKSNLPRRFLVYAHKATFRDRYDGLVNVQGHVNDIKLKLPEVQVQKTEBNVHDDPDRHPSASADATTQVREDFCVLSESSGILLGRMGLTERCS-NQVARNLADLVQH	281
CiCYP314A1:	YGVVQKDALNWFVNDISREHLDIVLRKSNLPRRFLVYAHKATFRDRYDGLVNVQGHVNDIKLKLPEVQVQKTEBNVHDDPDRHPSASADATTQVREDFCVLSESSGILLGRMGLTERCS-NQVARNLADLVQH	249
DmCYP314A1:	YGVVQKDALNWFVNDISREHLDIVLRKSNLPRRFLVYAHKATFRDRYDGLVNVQGHVNDIKLKLPEVQVQKTEBNVHDDPDRHPSASADATTQVREDFCVLSESSGILLGRMGLTERCS-NQVARNLADLVQH	259
AcCYP314A1:	YGVVQKDALNWFVNDISREHLDIVLRKSNLPRRFLVYAHKATFRDRYDGLVNVQGHVNDIKLKLPEVQVQKTEBNVHDDPDRHPSASADATTQVREDFCVLSESSGILLGRMGLTERCS-NQVARNLADLVQH	263
AgCYP314A1:	YGVVQKDALNWFVNDISREHLDIVLRKSNLPRRFLVYAHKATFRDRYDGLVNVQGHVNDIKLKLPEVQVQKTEBNVHDDPDRHPSASADATTQVREDFCVLSESSGILLGRMGLTERCS-NQVARNLADLVQH	280
TcCYP314A1:	YGVVQKDALNWFVNDISREHLDIVLRKSNLPRRFLVYAHKATFRDRYDGLVNVQGHVNDIKLKLPEVQVQKTEBNVHDDPDRHPSASADATTQVREDFCVLSESSGILLGRMGLTERCS-NQVARNLADLVQH	237
LdCYP314A1:	YGVVQKDALNWFVNDISREHLDIVLRKSNLPRRFLVYAHKATFRDRYDGLVNVQGHVNDIKLKLPEVQVQKTEBNVHDDPDRHPSASADATTQVREDFCVLSESSGILLGRMGLTERCS-NQVARNLADLVQH	245
MbCYP314A1:	YGVVQKDALNWFVNDISREHLDIVLRKSNLPRRFLVYAHKATFRDRYDGLVNVQGHVNDIKLKLPEVQVQKTEBNVHDDPDRHPSASADATTQVREDFCVLSESSGILLGRMGLTERCS-NQVARNLADLVQH	250
HaCYP314A1:	YGVVQKDALNWFVNDISREHLDIVLRKSNLPRRFLVYAHKATFRDRYDGLVNVQGHVNDIKLKLPEVQVQKTEBNVHDDPDRHPSASADATTQVREDFCVLSESSGILLGRMGLTERCS-NQVARNLADLVQH	250

Helix I

Helix K

NiCYP314A1:	ICASRDIFYGKHNKVFDAVYVLLIQSDVLDVWGLVDTALISEEDCKVPE-----QSVESLHPGFLDGRRRALALIDVJAGDNTGNTLFFVYIANKKRAHNVDELMVSPGTVLANTRIPVPAHVFAPRIPFPACIARI	422
SCYP314A1:	ICASRDIFYGKHNKVFDAVYVLLIQSDVLDVWGLVDTALISEEDCKVPE-----QSVESLHPGFLDGRRRALALIDVJAGDNTGNTLFFVYIANKKRAHNVDELMVSPGTVLANTRIPVPAHVFAPRIPFPACIARI	442
LcCYP314A1:	ICASRDIFYGKHNKVFDAVYVLLIQSDVLDVWGLVDTALISEEDCKVPE-----QSVESLHPGFLDGRRRALALIDVJAGDNTGNTLFFVYIANKKRAHNVDELMVSPGTVLANTRIPVPAHVFAPRIPFPACIARI	427
AaCYP314A1:	ICASRDIFYGKHNKVFDAVYVLLIQSDVLDVWGLVDTALISEEDCKVPE-----QSVESLHPGFLDGRRRALALIDVJAGDNTGNTLFFVYIANKKRAHNVDELMVSPGTVLANTRIPVPAHVFAPRIPFPACIARI	445
NvCYP314A1:	ICASRDIFYGKHNKVFDAVYVLLIQSDVLDVWGLVDTALISEEDCKVPE-----QSVESLHPGFLDGRRRALALIDVJAGDNTGNTLFFVYIANKKRAHNVDELMVSPGTVLANTRIPVPAHVFAPRIPFPACIARI	427
CiCYP314A1:	ICASRDIFYGKHNKVFDAVYVLLIQSDVLDVWGLVDTALISEEDCKVPE-----QSVESLHPGFLDGRRRALALIDVJAGDNTGNTLFFVYIANKKRAHNVDELMVSPGTVLANTRIPVPAHVFAPRIPFPACIARI	404
DmCYP314A1:	ICASRDIFYGKHNKVFDAVYVLLIQSDVLDVWGLVDTALISEEDCKVPE-----QSVESLHPGFLDGRRRALALIDVJAGDNTGNTLFFVYIANKKRAHNVDELMVSPGTVLANTRIPVPAHVFAPRIPFPACIARI	417
AcCYP314A1:	ICASRDIFYGKHNKVFDAVYVLLIQSDVLDVWGLVDTALISEEDCKVPE-----QSVESLHPGFLDGRRRALALIDVJAGDNTGNTLFFVYIANKKRAHNVDELMVSPGTVLANTRIPVPAHVFAPRIPFPACIARI	413
AgCYP314A1:	ICASRDIFYGKHNKVFDAVYVLLIQSDVLDVWGLVDTALISEEDCKVPE-----QSVESLHPGFLDGRRRALALIDVJAGDNTGNTLFFVYIANKKRAHNVDELMVSPGTVLANTRIPVPAHVFAPRIPFPACIARI	428
TcCYP314A1:	ICASRDIFYGKHNKVFDAVYVLLIQSDVLDVWGLVDTALISEEDCKVPE-----QSVESLHPGFLDGRRRALALIDVJAGDNTGNTLFFVYIANKKRAHNVDELMVSPGTVLANTRIPVPAHVFAPRIPFPACIARI	362
LdCYP314A1:	ICASRDIFYGKHNKVFDAVYVLLIQSDVLDVWGLVDTALISEEDCKVPE-----QSVESLHPGFLDGRRRALALIDVJAGDNTGNTLFFVYIANKKRAHNVDELMVSPGTVLANTRIPVPAHVFAPRIPFPACIARI	376
MbCYP314A1:	ICASRDIFYGKHNKVFDAVYVLLIQSDVLDVWGLVDTALISEEDCKVPE-----QSVESLHPGFLDGRRRALALIDVJAGDNTGNTLFFVYIANKKRAHNVDELMVSPGTVLANTRIPVPAHVFAPRIPFPACIARI	401
HaCYP314A1:	ICASRDIFYGKHNKVFDAVYVLLIQSDVLDVWGLVDTALISEEDCKVPE-----QSVESLHPGFLDGRRRALALIDVJAGDNTGNTLFFVYIANKKRAHNVDELMVSPGTVLANTRIPVPAHVFAPRIPFPACIARI	401

PERF motif

Haem binding domain

NiCYP314A1:	EDVDKQGDHQDQENVWVCHWAGQENQNSRNFPERVIMENNELKSP-----PFAFVGRMVEAKRHFLEQVILAKIQENEDVEGS-----GLYFETFLHAKGKFKIFERQNT-----	542
SCYP314A1:	EDVDKQGDHQDQENVWVCHWAGQENQNSRNFPERVIMENNELKSP-----PFAFVGRMVEAKRHFLEQVILAKIQENEDVEGS-----GLYFETFLHAKGKFKIFERQNT-----	562
LcCYP314A1:	EDVDKQGDHQDQENVWVCHWAGQENQNSRNFPERVIMENNELKSP-----PFAFVGRMVEAKRHFLEQVILAKIQENEDVEGS-----GLYFETFLHAKGKFKIFERQNT-----	566
AaCYP314A1:	EDVDKQGDHQDQENVWVCHWAGQENQNSRNFPERVIMENNELKSP-----PFAFVGRMVEAKRHFLEQVILAKIQENEDVEGS-----GLYFETFLHAKGKFKIFERQNT-----	517
NvCYP314A1:	EDVDKQGDHQDQENVWVCHWAGQENQNSRNFPERVIMENNELKSP-----PFAFVGRMVEAKRHFLEQVILAKIQENEDVEGS-----GLYFETFLHAKGKFKIFERQNT-----	542
CiCYP314A1:	EDVDKQGDHQDQENVWVCHWAGQENQNSRNFPERVIMENNELKSP-----PFAFVGRMVEAKRHFLEQVILAKIQENEDVEGS-----GLYFETFLHAKGKFKIFERQNT-----	526
DmCYP314A1:	EDVDKQGDHQDQENVWVCHWAGQENQNSRNFPERVIMENNELKSP-----PFAFVGRMVEAKRHFLEQVILAKIQENEDVEGS-----GLYFETFLHAKGKFKIFERQNT-----	540
AcCYP314A1:	EDVDKQGDHQDQENVWVCHWAGQENQNSRNFPERVIMENNELKSP-----PFAFVGRMVEAKRHFLEQVILAKIQENEDVEGS-----GLYFETFLHAKGKFKIFERQNT-----	538
AgCYP314A1:	EDVDKQGDHQDQENVWVCHWAGQENQNSRNFPERVIMENNELKSP-----PFAFVGRMVEAKRHFLEQVILAKIQENEDVEGS-----GLYFETFLHAKGKFKIFERQNT-----	558
TcCYP314A1:	EDVDKQGDHQDQENVWVCHWAGQENQNSRNFPERVIMENNELKSP-----PFAFVGRMVEAKRHFLEQVILAKIQENEDVEGS-----GLYFETFLHAKGKFKIFERQNT-----	488
LdCYP314A1:	EDVDKQGDHQDQENVWVCHWAGQENQNSRNFPERVIMENNELKSP-----PFAFVGRMVEAKRHFLEQVILAKIQENEDVEGS-----GLYFETFLHAKGKFKIFERQNT-----	508
MbCYP314A1:	EDVDKQGDHQDQENVWVCHWAGQENQNSRNFPERVIMENNELKSP-----PFAFVGRMVEAKRHFLEQVILAKIQENEDVEGS-----GLYFETFLHAKGKFKIFERQNT-----	516
HaCYP314A1:	EDVDKQGDHQDQENVWVCHWAGQENQNSRNFPERVIMENNELKSP-----PFAFVGRMVEAKRHFLEQVILAKIQENEDVEGS-----GLYFETFLHAKGKFKIFERQNT-----	516

图 3 褐飞虱 NICYP314A1 及其他昆虫同源序列的多序列比对

Fig. 3 The multiple alignment of NiCYP314A1 in *Nilaparvata lugens* and homologs from other insects

蛋白来源物种及 GenBank 登录号 Origin species of proteins and their GenBank accession numbers: DmCYP314A1: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*, AAQ05972.1; AaCYP314A1: 埃及伊蚊 *Aedes aegypti*, AAX85208.1; AgCYP314A1: 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*, ABU42525.1; AmCYP314A1: 西方蜜蜂 *Apis mellifera*, NP_001035347.1; NvCYP314A: 金小蜂 *Nasonia vitripennis*, NP_001166019.1; CiCYP314A1: 佛罗伦达弓背蚊 *Camponotus floridanus*, EFN69019.1; MbCYP314A1: 家蚕 *Bombyx mori*, NP_001106219.1; HaCYP314A1: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*, ALJ84054.1; MbCYP314A1: 甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae*, BAN66315.2; SiCYP314A1: 白背飞虱 *Sogatella furcifera*, AGU16445.1; LcCYP314A1: 灰飞虱 *Laodelphax striatella*, AGU16450.1; TeCYP314A1: 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*, NP_001123894.1; LdCYP314A1: 马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata*, AGT57843.1。图 4 同 The same for Fig. 4。黑色实线表示 P450 蛋白保守结构域。The conserved motifs of CYP314A1s are marked by black solid lines.

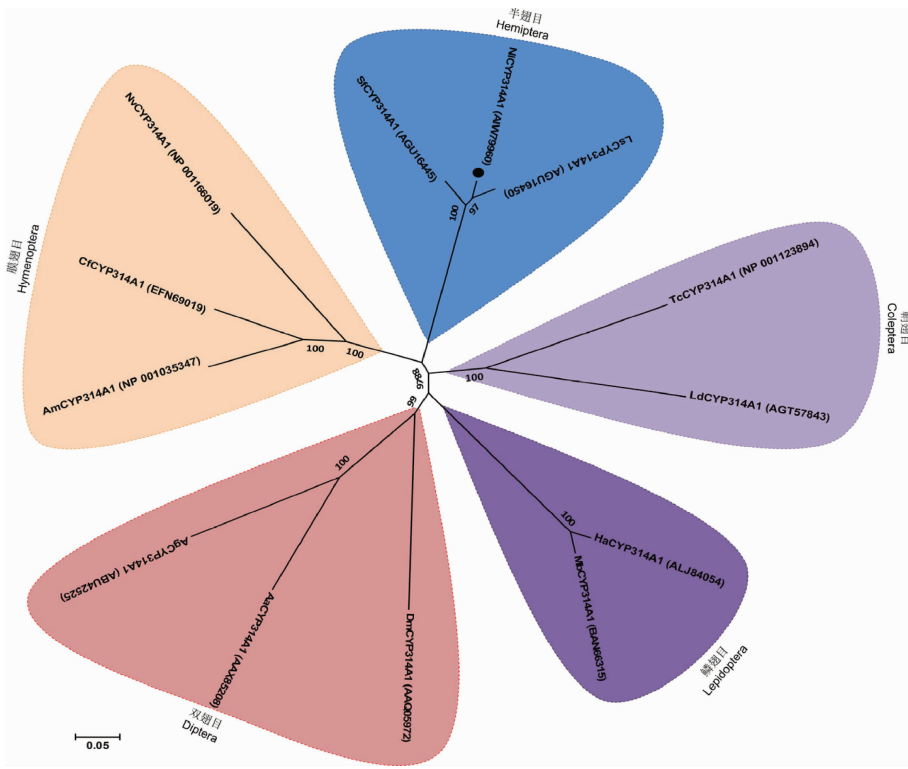


图4 褐飞虱 *NICYP314A1* 及其他昆虫同源序列的系统进化树(邻接法)

Fig. 4 Phylogenetic tree of *NICYP314A1* in *Nilaparvata lugens* and homologs from other insects

进化树节点数字代表自展检验百分比值,且图中只显示大于50%的自展1 000次重复检验百分比。The test of phylogeny was carried out using a bootstrap analysis of 1 000 replications, and bootstrap values >50% are shown on each node of the tree.

2.2 褐飞虱蜕皮激素合成相关基因的时空表达模式

对 Halloween 基因在褐飞虱 5 龄若虫不同发育时间的表达模式进行检测,结果表明,编码蜕皮激素合成相关基因 *NCyp307a1*, *NCyp306a1*, *NCyp302a1*, *NCyp315a1* 和 *NCyp314a1* 的表达量在整个 5 龄若虫期内呈现波动状,且均在 5 龄蜕皮后的第 24 h 和 60 h 出现表达量峰值(图 5)。不同龄期表达动态结果显示,*NCyp314a1* 在褐飞虱各个龄期均有表达,且在成虫中的表达量最高(图 6: A);组织表达模式检测结果表明,*NCyp314a1* 基因在 5 龄若虫胸中表达量较头和腹中高,在脂肪体中的表达量最高,其次是足、表皮、翅芽,中肠中表达量最低(图 6: B)。

2.3 褐飞虱蜕皮激素合成途径最后一步基因 *NCyp314a1* 的功能分析

对注射 dsRNA 4 d 后的试虫 *NCyp314a1* 基因表达量的变化进行检测,结果表明,*NCyp314a1* 在 *NCyp314a1*-RNAi 试虫中的表达量较 *GFP* 对照试虫中的表达量显著下降了 84.6% ($P < 0.01$)。检测蜕皮激素信号通路下游响应基因 *NFTZ-F1* 的表达量,发现其在 *NCyp314a1*-RNAi 试虫中的表达量较 *GFP* 对照试虫中的表达量也显著下降了 64.1%

($P < 0.01$); 而蜕皮激素合成途径上游基因 *NCyp302a1* 在 *NCyp314a1*-RNAi 试虫与对照 *GFP* 试虫中表达量没有显著差异(图 7: A)。

连续观察注射 dsRNA 后试虫的存活情况,发现从注射后第 3 天开始,注射 *NCyp314a1*-dsRNA 试虫的存活率显著低于注射 *GFP*-dsRNA 试虫的存活率 ($P < 0.01$),且注射 *NCyp314a1*-dsRNA 试虫的存活率随着注射时间的延长持续下降,至注射后第 7 天仅为 5.0%,而注射 *GFP*-dsRNA 试虫在注射后第 7 天的存活率为 93.3%,继续观察发现,至注射后第 9 天注射 *NCyp314a1*-dsRNA 的试虫全部死亡(图 7: B)。

通过观察注射 dsRNA 后试虫的蜕皮和卵巢发育情况发现,3 龄注射 *GFP*-dsRNA 后的试虫能正常蜕皮至下一龄期(图 8: A),而注射 *NCyp314a1*-dsRNA 后的试虫不能正常蜕皮至 4 龄若虫而死亡,死亡虫体出现背板表皮裂开、旧表皮组织出现拖尾、未蜕皮若虫出现蜂腰等表型(图 8: B)。另 5 龄若虫注射 *GFP*-dsRNA 后在其羽化后 4 d 的卵巢内有正常香蕉状卵形成(图 8: C),而注射 *NCyp314a1*-dsRNA 试虫卵巢发育畸形,初级卵母细胞中只有椭圆干瘪的卵(图 8: D),经产卵量调查未发现若有虫孵出,且未在水稻苗上发现卵块。

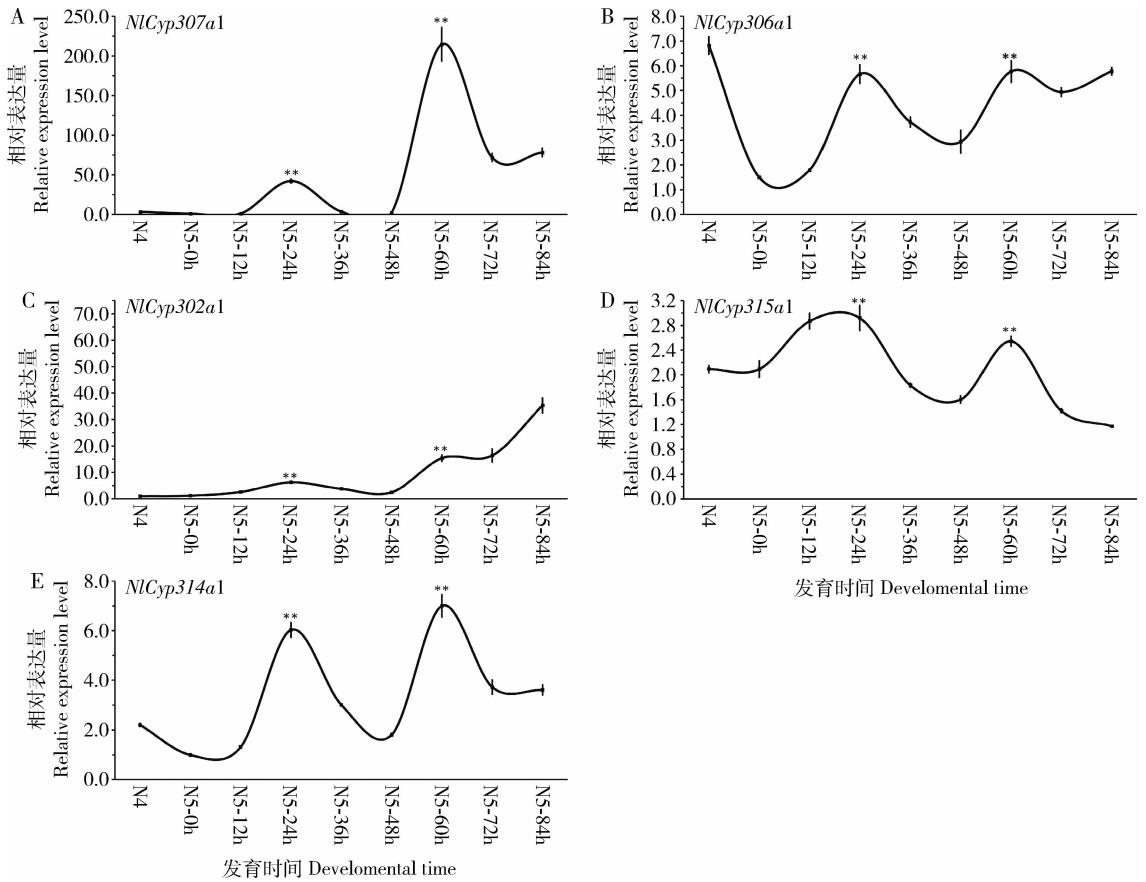
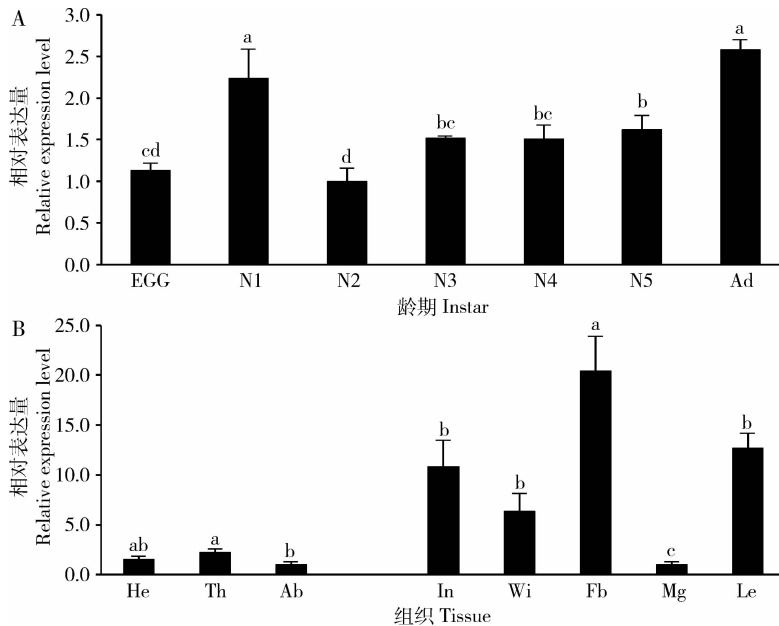


图5 Halloween 基因在褐飞虱 5 龄若虫不同发育时间的表达模式

Fig. 5 Relative expression patterns of Halloween genes during the different developmental time of 5th nymphal instar in *Nilaparvata lugens*

N4: 4 龄若虫 4th instar nymph. N5-0h - N5-84h 代表 5 龄若虫蜕皮后 0 - 84 h 每隔 12 h 取 5 龄若虫不同发育时间试样样品。双星号表示表达峰与波谷具有极显著性差异 ($P < 0.01$, 方差分析中的 Duncan 氏新复极差法检验)。N5 - 0 h (0 h of 5th instar) to N5 - 84 h (84 h of 5th instar) refers to 0 - 84 h after ecdysis of 5th instar nymph. Double asterisk indicates extremely significant difference ($P < 0.01$, Duncan's in ANOVA) between expression peaks and valleys.

图6 *NilCyp314a1* 基因在褐飞虱不同龄期 (A) 和不同组织 (B) 中的表达谱Fig. 6 Temporal (A) and tissue specific (B) expression patterns of *NilCyp314a1* in *Nilaparvata lugens*

A. EGG: 卵 Egg; N1 - N5: 1 - 5 龄若虫 1st - 5th instar nymph, respectively; Ad: 成虫 Adult. B. He: 头 Head; Th: 胸 Thorax; Ab: 腹 Abdomen; In: 表皮 Integument; Mg: 中肠 Midgut; Wi: 翅芽 Wing bud; Le: 足 Leg; Fb: 脂肪体 Fat body. 柱上不同字母表示显著性差异 ($P < 0.05$, 方差分析中的 Duncan 氏新复极差法检验)。Values marked by different letters are significantly different at the 5% level by Duncan's test in ANOVA.

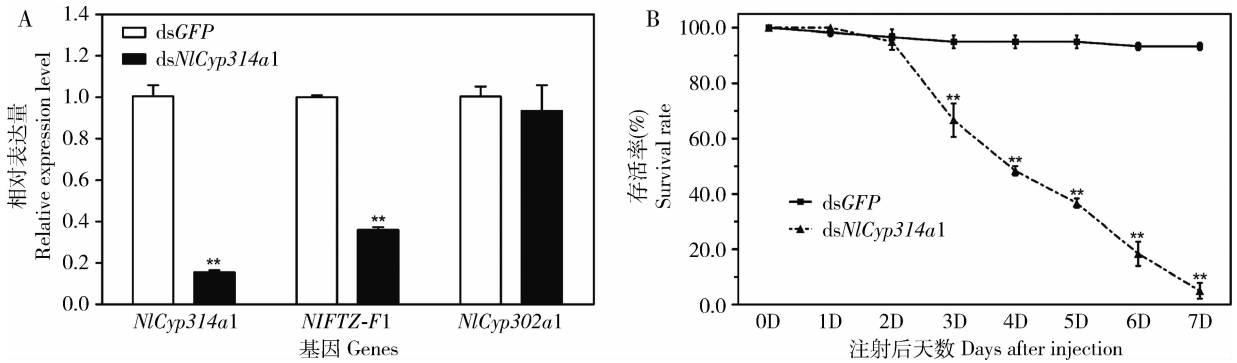


图7 注射 *NICyp314a1*-dsRNA 对褐飞虱体内 *NICyp314a1*, *NIFTZ-F1* 和 *NICyp302a1* 基因表达水平(A) 及褐飞虱若虫存活率(B)的影响

Fig. 7 Effect of ds*NICyp314a1* on the expression levels of *NICyp314a1*, *NIFTZ-F1*, *NICyp302a1* genes (A) and the survival rate of *Nilaparvata lugens* nymphs (B) after injection of *NICyp314a1*-dsRNA

A: 注射 *NICyp314a1*-dsRNA 和 *GFP*-dsRNA 4 d 后褐飞虱 3 龄若虫体内 *NICyp314a1*, *NIFTZ-F1* 和 *NICyp302a1* 基因的表达水平 Effect of ds*NICyp314a1* on the expression levels of *NICyp314a1*, *NIFTZ-F1* and *NICyp302a1* in injected 3rd-instar (N3) at four days after injection. B: 注射 *NICyp314a1*-dsRNA 和 *GFP*-dsRNA 后褐飞虱存活率结果 The survival rate performance of *N. lugens* nymphs subjected to ds*NICyp314a1* injection. 双星号表示 ds*NICyp314a1* 和 ds*GFP* 经 *t* 测验具有极显著性差异 ($P < 0.01$)。Double asterisk indicates extremely significant difference ($P < 0.01$) between ds*NICyp314a1* and ds*GFP* by Student's *t*-test.

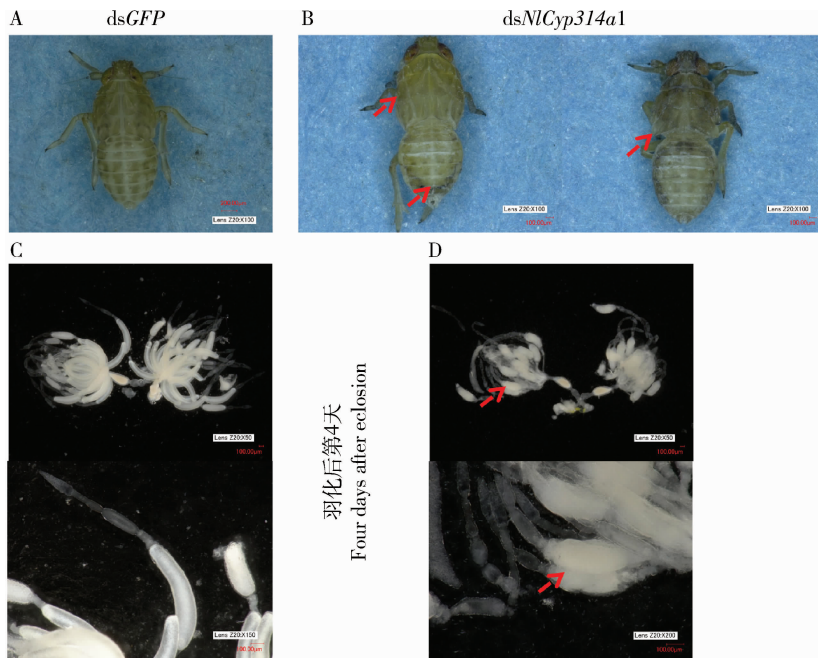


图8 干扰 *NICyp314a1* 基因导致的褐飞虱蜕皮缺陷(A和B)和卵巢畸形表型(C和D)

Fig. 8 Phenotypic defects of ecdysis (A and B) and ovary (C and D) caused by *NICyp314a1*-RNAi in *Nilaparvata lugens*

3 讨论与结论

本研究利用 RT-PCR 技术克隆获得褐飞虱蜕皮激素合成途径 Halloween 基因 *NICyp302a1*, *NICyp306a1*, *NICyp307a1*, *NICyp315a1* 和 *NICyp314a1* 的含 ORF 区的 cDNA 序列, 进化分析发现褐飞虱体内 5 个 Halloween 基因分别属于细胞色素 P450 (CYPs) 家族的 CYP2 类群(*NICyp307a1* 和 *NICyp306a1*)

和细胞色素 P450 (CYPs) 家族的线粒体类群 (*NICyp302a1*, *NICyp315a1* 和 *NICyp314a1*), 且每个基因编码的氨基酸序列都与其在其他昆虫中的同源蛋白序列聚在一起, 这与黑腹果蝇 (Rewitz *et al.*, 2007)、豌豆蚜 (Christiaens *et al.*, 2010)、灰翅夜蛾 *Spodoptera mauritia* (Iga and Smagghe, 2010) 中的研究结果一致, 说明 Halloween 基因和蜕皮激素合成途径在昆虫进化过程中十分保守。NICYP314A1 氨基酸序列中的线粒体特征结构域说明其是典型的线

粒体酶;通过跨膜结构域预测,发现 *NiCYP314A1* 氨基酸序列具有两个跨膜结构域,这一结构有利于 E20MO 运输至昆虫的血淋巴和各个组织中完成蜕皮激素合成的最后一步反应,即可将无活性的蜕皮酮催化成具有活性的 20-羟基蜕皮酮。

褐飞虱体内 Halloween 基因在 5 龄若虫不同发育时间的表达模式显示,这 5 个基因在 5 龄若虫蜕皮后出现两个表达峰值,这与褐飞虱蜕皮激素滴度在蜕皮后出现两个峰值的结果一致 (Kobayashi *et al.*, 1989),与灰飞虱体内 *Lsshade* 基因的表达模式也相似 (Jia *et al.*, 2013)。其他昆虫中的研究也表明,蜕皮激素合成相关基因在某一龄期内的表达量会出现两个峰值,且主峰前面的小峰对于起始蜕皮激素的合成具有重要作用 (Rewitz *et al.*, 2006a, 2006b, 2006c; Iga and Smagghe, 2010; Wan *et al.*, 2014)。*NiCyp314a1* 在褐飞虱若虫组织中的表达模式显示,其在脂肪体中的表达量最高,这与黑腹果蝇幼虫中的原位杂交结果显示 *Cyp314a1* 在黑腹果蝇幼虫脂肪体组织中的表达量高的结果一致 (Petryk *et al.*, 2003),说明在昆虫脂肪体中也可能通过产生蜕皮激素参与到昆虫的生长发育和繁殖过程。

昆虫蜕皮过程受蜕皮激素和保幼激素共同调控,而蜕皮激素级联反应又是蜕皮激素的响应途径,直接调控蜕皮相关基因的表达。在黑腹果蝇、德国小蠊 *Blattella germanica* 和马铃薯甲虫中的研究表明,*FTZ-F1* 作为蜕皮激素级联反应中的关键响应基因,在昆虫的蜕皮和变态过程中具有重要作用,对 *FTZ-F1* 基因进行沉默后,会出现昆虫蜕皮和化蛹困难并导致死亡 (Broadus *et al.*, 1999; Fortier *et al.*, 2003; Cruz *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2014)。通过注射 dsRNA 后的定量检测结果表明,*NiCyp314a1* 基因的沉默对蜕皮激素合成途径上游基因 *NiCyp302a1* 的表达无显著影响,推测在褐飞虱体内 *NiCyp314a1* 基因可能也是褐飞虱蜕皮激素合成途径中的最后一步基因;*NiCyp314a1* 基因表达水平的降低会导致蜕皮激素级联反应响应基因 *NiFTZ-F1* 表达量的下降,说明干扰 *NiCyp314a1* 基因后试虫出现蜕皮困难而出现畸形虫体并有强烈致死作用,这可能是由于 *NiCyp314a1* 基因编码的蛋白通过控制褐飞虱体内蜕皮激素滴度来调控 *NiFTZ-F1* 等蜕皮激素级联反应响应基因的表达,从而影响褐飞虱的蜕皮过程。实验结果还表明,*NiCyp314a1* 可能通过控制蜕皮激素的合成参与到褐飞虱卵母细胞的发育、卵黄原蛋白的产生或填充过程中,这与家蚕中发现

BmCyp314a1 基因被沉默后会引发家蚕化蛹及卵巢发育异常的结果一致,但其中的作用机理有待进一步研究。上述结果均表明,*NiCyp314a1* 参与了褐飞虱蜕皮变态和繁殖进程的调控,为进一步利用 *NiCyp314a1* 防治褐飞虱方面提供了有力的依据。

综上所述,本研究基于同源序列比对、褐飞虱基因组和转录组数据,鉴定获得了 5 个褐飞虱参与蜕皮激素合成的 Halloween 基因,即 *NiCyp307a1*, *NiCyp306a1*, *NiCyp302a1*, *NiCyp315a1* 和 *NiCyp314a1*。这 5 个 Halloween 基因在进化上非常保守,分属于细胞色素 P450 (CYPs) 家族的 CYP2 和线粒体两大类群。5 个 Halloween 基因均在褐飞虱蜕皮后 24 h 和 60 h 时出现表达高峰,这一表达规律对于褐飞虱蜕皮过程的完成起到重要作用。Halloween 基因表达水平的降低会导致褐飞虱生长发育和繁殖受阻,提示褐飞虱 Halloween 基因参与了褐飞虱蜕皮变态和繁殖进程的调控,同样也为 Halloween 基因在褐飞虱防治方面的潜在应用提供了理论依据。

参考文献 (References)

- Broadus J, McCabe JR, Endrizzi B, Thummel CS, Woodard CT, 1999. The *Drosophila* β FTZ-F1 orphan nuclear receptor provides competence for stage-specific responses to the steroid hormone ecdysone. *Mol. Cell*, 3(2): 143–149.
- Chavez VM, Marques G, Delbecq JP, Kobayashi K, Hollingsworth M, Burr J, Natzle JE, O'Connor MB, 2000. The *Drosophila* *disembodied* gene controls late embryonic morphogenesis and codes for a cytochrome P450 enzyme that regulates embryonic ecdysone levels. *Development*, 127(19): 4115–4126.
- Christiaens O, Iga M, Velarde R, Rougé P, Smagghe G, 2010. Halloween genes and nuclear receptors in ecdysteroid biosynthesis and signalling in the pea aphid. *Insect Mol. Biol.*, 19(Suppl. 2): 187–200.
- Cruz J, Nieva C, Mané-Padrós D, Martín D, Bellés X, 2008. Nuclear receptor *BgFTZ-F1* regulates molting and the timing of ecdysteroid production during nymphal development in the hemimetabolous insect *Blattella germanica*. *Dev. Dynam.*, 237(11): 3179–3191.
- Fortier TM, Vasa PP, Woodard CT, 2003. Orphan nuclear receptor β FTZ-F1 is required for muscle-driven morphogenetic events at the prepupal-pupal transition in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.*, 257(1): 153–165.
- Grieneisen M, Warren J, Gilbert LI, 1993. Early steps in ecdysteroid biosynthesis: evidence for the involvement of cytochrome P-450 enzymes. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 23(1): 13–23.
- Gilbert LI, 2004. Halloween genes encode P450 enzymes that mediate steroid hormone biosynthesis in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 215(1–2): 1–10.
- Iga M, Smagghe G, 2010. Identification and expression profile of

- Halloween genes involved in ecdysteroid biosynthesis in *Spodoptera littoralis*. *Peptides*, 31(3): 456–467.
- Jia S, Wan PJ, Zhou LT, Mu LL, Li GQ, 2013. Molecular cloning and RNA interference-mediated functional characterization of a Halloween gene spook in the white-backed planthopper *Sogatella furcifera*. *BMC Mol. Biol.*, 14(1): 1–10.
- Kappler C, Kabbouh M, Durst F, Hoffmann JA, 1986. Studies on the C-2 hydroxylation of 2-deoxyecdysone in *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.*, 16(1): 25–32.
- Kappler C, Kabbouh M, Hetru C, Durst F, Hoffmann JA, 1988. Characterization of three hydroxylases involved in the final steps of biosynthesis of the steroid hormone ecdysone in *Locusta migratoria* (Insecta, Orthoptera). *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 31(6): 891–898.
- Kobayashi M, Uchida M, Kuriyama K, 1989. Elevation of 20-hydroxyecdysone level by buprofezin in *Nilaparvata lugens* (Stål) nymphs. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 34(1): 9–16.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace I M, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG, 2007. ClustalW and ClustalX version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21): 2947–2948.
- Liu XP, Fu KY, Lü FG, Meng QW, Guo WC, Li GQ, 2014. Involvement of FTZ-F1 in the regulation of pupation in *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 55: 51–60.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Niwa R, Matsuda T, Yoshiyama T, Namiki T, Mita K, Fujimoto Y, Kataoka H, 2004. CYP306A1, a cytochrome P450 enzyme, is essential for ecdysteroid biosynthesis in the prothoracic glands of *Bombyx* and *Drosophila*. *J. Biol. Chem.*, 279(34): 35942–35949.
- Petryk A, Warren JT, Marques G, Jarcho MP, Gilbert LI, Kahler J, Parvy JP, Li Y, Dauphin-Villemant C, O'Connor MB, 2003. Shade is the *Drosophila* P450 enzyme that mediates the hydroxylation of ecdysone to the steroid insect molting hormone 20-hydroxyecdysone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(24): 13773–13778.
- Pondeville E, Maria A, Jacques JC, Bourguoin C, Dauphin-Villemant C, 2008. *Anopheles gambiae* males produce and transfer the vitellogenic steroid hormone 20-hydroxyecdysone to females during mating. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105(50): 19631–19636.
- Rewitz KF, Rybczynski R, Warren JT, Gilbert LI, 2006a. The Halloween genes code for cytochrome P450 enzymes mediating synthesis of the insect moulting hormone. *Biochem. Soc. Trans.*, 34(6): 1256–1260.
- Rewitz KF, Rybczynski R, Warren JT, Gilbert LI, 2006b. Identification, characterization and developmental expression of Halloween genes encoding P450 enzymes mediating ecdysone biosynthesis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 36(3): 188–199.
- Rewitz KF, Rybczynski R, Warren JT, Gilbert LI, 2006c. Developmental expression of *Manduca* shade, the P450 mediating the final step in molting hormone synthesis. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 247: 166–174.
- Rewitz KF, O'Connor MB, Gilbert LI, 2007. Molecular evolution of the insect Halloween family of cytochrome P450s: phylogeny, gene organization and functional conservation. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 37(8): 741–753.
- Sakurai S, Gilbert LI, 1990. Biosynthesis and Secretion of Ecdysteroids by the Prothoracic Glands. Springer, Berlin. 83–106.
- Sieglauff DH, Duncan KA, Brown MR, 2005. Expression of genes encoding proteins involved in ecdysteroidogenesis in the female mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 35(5): 471–490.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28(10): 2731–2739.
- Tang QY, Zhang CX, 2013. Data Processing System (DPS) software with experimental design, statistical analysis and data mining developed for use in entomological research. *Insect Sci.*, 20(2): 254–260.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van RN, De Paepe A, Speleman F, 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.*, 3(7): 1–12.
- Wan PJ, Jia S, Li N, Fan JM, Li GQ, 2014. A Halloween gene shadow is a potential target for RNA interference-based pest management in the small brown planthopper *Laodelphax striatellus*. *Pest Manag. Sci.*, 71(2): 199–206.
- Warren JT, Petryk A, Marques G, Jarcho M, Parvy JP, Dauphin-Villemant C, O'Connor MB, Gilbert LI, 2002. Molecular and biochemical characterization of two P450 enzymes in the ecdysteroidogenic pathway of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(17): 11043–11048.
- Warren JT, Petryk A, Marqués G, Parvy JP, Shinoda T, Itoyama K, Kobayashi J, Jarcho M, Li Y, O'Connor MB, Dauphin-Villemant C, Gilbert LI, 2004. Phantom encodes the 25-hydroxylase of *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*: a P450 enzyme critical in ecdysone biosynthesis. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 34(9): 991–1010.
- Warren JT, Yerushalmi Y, Shimell MJ, O'Connor MB, Restifo LL, Gilbert LI, 2006. Discrete pulses of molting hormone, 20-hydroxyecdysone, during late larval development of *Drosophila melanogaster*: correlations with changes in gene activity. *Dev. Dynam.*, 235(2): 315–326.
- Xue J, Ye YX, Jiang YQ, Zhuo JC, Huang HJ, Cheng RL, Xu HJ, Zhang CX, 2015. Efficient RNAi of rice planthoppers using microinjection. *J. Anim. Feed Sci.*, 12(4): 739–747.
- Yuan M, Lu Y, Zhu X, Wan H, Shakeel M, Zhan S, Jin BR, Li J, 2014. Selection and evaluation of potential reference genes for gene expression analysis in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) using reverse-transcription quantitative PCR. *PLoS ONE*, 9(1): e86503.