

吕子豪,王春燕,林 同. 黄野螟中性肽链内切酶基因表达的时空动态[J].江苏农业学报,2019,35(3):573-580.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2019.03.010

黄野螟中性肽链内切酶基因表达的时空动态

吕子豪, 王春燕, 林 同

(华南农业大学林学与风景园林学院,广东 广州 510642)

摘要: 从黄野螟(*Heortia vitessoides* Moore)转录组文库中成功筛选到具有完整 ORF 框的黄野螟中性肽链内切酶基因(*NEP*)序列,命名为 *HvNEP*(登录号:MH298329)。该序列 ORF 框长2 310 bp,共编码 769 个氨基酸。同源比对分析结果表明,*HvNEP* 蛋白氨基酸序列与棉铃虫(*Helicoverpa armigera* Hubner)*NEP* 蛋白氨基酸序列的同源性最高,达 79%。RT-qPCR 结果显示,*HvNEP* 在黄野螟成虫中表达量最高,为卵(对照)的 113.77 倍。*HvNEP* 在黄野螟不同组织间存在表达差异,幼虫阶段在头部表达量最高,为体壁(对照)的 5.28 倍。成虫阶段,*HvNEP* 在翅中表达量最高,为腹(对照)的 11.06 倍,在足中最低(0.11 倍)。分析黄野螟 *NEP* 时空表达动态发现,*HvNEP* 可能与昆虫行为的调控及神经系统的完善有关。在 60 ng/ μ l 和 120 ng/ μ l 的 20-羟基蜕皮激素(20E)胁迫下,*HvNEP* 表达量均高于对照,表明 *HvNEP* 作为蜕皮激素的次级应答基因,其表达受 20-羟基蜕皮激素调节。

关键词: 黄野螟;中性肽链内切酶;蜕皮激素

中图分类号: S435.79

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2019)03-0573-08

Temporal and spatial dynamics expression of neprilysin gene in *Heortia vitessoides*

LYU Zi-hao, WANG Chun-yan, LIN Tong

(College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The full-length cDNA sequence of *H. vitessoides* neprilysin gene(*NEP*) was screened from the transcriptome library, and named *HvNEP*(GenBank: MH298329). The sequence open reading frame(ORF) was 2 310 bp in length and encoded 769 amino acids. Homology alignment analysis results showed that the amino acid sequence of *HvNEP* protein had the highest homology with that of the *Helicoverpa armigera* Hubner *NEP* protein (79%). According to the results of RT-qPCR analysis, the expression of *HvNEP* in adult was highest, which was 113.77 times of that in eggs(control). The expression of *HvNEP* was different among different tissues of *H. vitessoides*. The highest expression in the larvae was 5.28 times of that in the body wall(control). In the adult stage, the expression of *HvNEP*

was the highest in the wings (11.06 times of that in the abdomen) and the lowest in the feet (0.11 times of that in the abdomen). Temporal and spatial dynamics expression of *HvNEP* indicated that it might be involved in the regulation of insect behavior and the improvement of nervous system. Under the stress of 60 ng/ μ l and 120

收稿日期:2018-07-27

基金项目:国家自然科学基金项目(31470653);广东省自然科学基金项目(2015A030313416)

作者简介:吕子豪(1993-),男,广东惠州人,硕士研究生,研究方向为昆虫分子生物学。(E-mail)1375886@qq.com

通讯作者:林 同,(E-mail)lintong@scau.edu.cn

ng/ μ l 20-hydroxyecdysone (20E), the expression of *HvNEP* was higher than that of the control, indicating that *HvNEP*, as a secondary response gene of ecdysing hormone, was regulated by 20E.

Key words: *Heortia vitessoides*; neprilysin; ecdysing hormone

黄野螟 (*Heortia vitessoides*) 属鳞翅目 (Lepidoptera) 草螟科 (Crambidae) 齿螟亚科 (Odontiinae), 是植物土沉香 (*Aquilaria sinensis*) 的重要食叶害虫^[1-2]。该虫在中国南部分布广泛, 主要活动范围在广东省、广西省、海南省、云南省、福建省以及中国台湾和香港等地^[1]。其幼虫生长发育迅速, 在爆发时期, 虫口密度大, 食量大, 短时间内便可吃光被害树叶, 严重影响土沉香的产量和结香质量^[3]。近年来, 随着广东和海南等地大规模种植土沉香, 黄野螟虫害问题愈发严重。

蛋白酶在多种生理系统中起着关键作用, 其中 M13 家族的中性肽链内切酶 (*NEP*) 参与神经肽和肽激素的加工, 主要由膜结合锌蛋白酶组成^[4]。*NEP* 属于 M13 锌金属蛋白酶家族, 是一种 II 型整合细胞膜糖蛋白^[5], 存在于多种细胞膜上。1974 年, Ma 等首次在兔肾小管的刷状缘发现 *NEP*^[6]。2001 年, Zhao 等在一种无脊椎动物家蚕 (*Bombyx mori*) 中克隆出中性肽链内切酶 24.11-like 基因, 并将其命名为 *bmNEP-I*^[7]。随后 Butler 研究发现, *NEP* 在果蝇胸侧板、背侧和腹侧铰链中均有表达^[8]。*NEP* 与昆虫头部和足部的再生有关^[9]。

M13 金属蛋白酶参与调控哺乳动物的疾病, 例如阿尔茨海默病^[10-11]、炎症^[12]、癌症^[13]等, 亦会影响生殖健康与繁殖^[4, 14-15]。然而, 关于它们在昆虫中的生理作用研究较少。仅有的研究表明, *NEP* 作为 20-羟基蜕皮激素 (20-hydroxyecdysone, 20E) 次级应答基因, 可能参与昆虫变态发育^[9]和翅原基的形成^[7, 16]。研究 *NEP* 不仅对明确昆虫神经系统发育具有重要意义, 而且对经济昆虫的利用、农林害虫的控制和昆虫生长调节剂与生物害虫农药的开发具有重要指导价值。因此, 本研究从黄野螟转录组文库中筛选 *NEP* 基因, 并对其生物信息学及时空表达分析, 旨在为黄野螟 *NEP* 基因及其编码的蛋白质研究提供分子生物学信息。

1 材料与方法

1.1 试验材料

黄野螟幼虫采自广州天鹿湖森林公园, 1~5 龄幼虫在培养箱中用土沉香叶片饲养, 老熟幼虫移至铺有沙土的塑料养虫盒中, 待其化蛹羽化。饲养温度为 26 °C, 相对湿度为 70%~75%, 光照周期为光/暗=14 h/10 h。

总 RNA 提取试剂盒 (E.Z.N.A.™ Total RNA Kit II), 购自 OMEGA 公司; 反转录试剂盒 (PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser) 及实时荧光定量试剂盒 (TB Green premix Ex Taq™), 均购自 TaKaRa 公司。20E 试剂购自上海源叶生物科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 样品处理 选取 40 头健康的 4 龄幼虫, 经无菌水清洗后, 在腊盘上解剖, 获得幼虫的头、体壁、脂肪体、中肠、马氏管等样品, 立即置于无菌去酶的 EP 管中, 经液氮速冻后, 存放在 -80 °C 冰箱中备用。选取 30 头健康的 1 日龄成虫在腊盘上解剖, 获取成虫的触角、足、头、胸、腹、翅等组织样品, 立即置于无菌去酶的冻存管中, 经液氮速冻后, 存放于 -80 °C 冰箱中备用。用二甲基亚砜 (DMSO) 将 20-羟基蜕皮激素 (20E) 稀释至 10 mg/ml, 存放于 -20 °C 冰箱备用。用 1×PBS 将 20E 稀释至 60 ng/ μ l 和 120 ng/ μ l 2 个质量浓度, 并分别从虫体腹部侧面注射。注射前用 75% 酒精擦拭虫体, 每头注射 1 μ l, 对照注射等量稀释的 DMSO。

1.2.2 总 RNA 提取及 cDNA 合成 按照 E.Z.N.A. A™ Total RNA Kit II 提取试剂盒说明书提取各样品总 RNA。检测合格后, 置于 -80 °C 冰箱中保存备用。按照 PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser 反转录试剂盒说明书进行第一链 cDNA 合成, 合成后稀释 20 倍, 作为实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 反应的模板, 置于 -20 °C 冰箱中保存备用。

1.2.3 引物设计及基因的表达 以 4 龄幼虫 cDNA 为模版, 通过普通 PCR 扩增目的基因及内参基因片

段。琼脂糖凝胶电泳检测结果显示,条带大小符合预期且无杂带,并测序确认。RT-qPCR 的熔解曲线只有 1 个信号峰,说明引物特异性高,结果可靠。用实时荧光定量 PCR 反应(RT-qPCR)检测基因的表达量,所用引物为:5'-GCTGATGGAGTCCGTGCTGAAC-3' 和 5'-CGAGTAGAAGGCGTTGACGATGG-3',内参基因为 β -actin,阴性对照为无菌超纯水。反应体系为: cDNA 模板 20.0 μ l, TB Green Premix *Ex Taq* 10.0 μ l, 上游引物 0.4 μ l, 下游引物 0.4 μ l, ddH₂O 7.2 μ l。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 解链 10 s, 60 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 共进行 40 个循环。每个样品设置 3 个重复。反应结束后,使用 LightCycler480 荧光定量 PCR 仪自带的分析软件,选择相对定量分析模式并导出原始数据,使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量法计算 *NEP* 的相对表达量, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 即为目的基因的相对表达倍数。采用 SPSS 18.0 软件进行单因素方差分析与邓肯氏多重比较分析,采用 GraphPad Prism 5 绘图。

1.2.4 生物信息学分析 在 NCBI 网站(<http://blast.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行基因序列同源比对,用 ProtParam 软件分析理化性质,用 Signal P 4.1(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>)进行信号肽预测,用 NetNGlyc 软件分析 *N*-糖基化修饰(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos3.1/>)预测磷酸化修饰位点,用 TMpred 软件(<https://embnet.vital-it.ch/cgi-bin/>)进行跨膜区分析,用 PSORT 软件(<https://psort.hgc.jp/cgi-bin/runpsort.pl>)进行亚细胞定位,用 NPS 在线工具(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_gor4.pl)预测蛋白质二级结构,用 SWISS-MODEL 在线工具(<https://www.swissmodel.expasy.org/interactive/yrSsgx/models/>)进行蛋白质高级结构建模,用 ClustalX 软件和 MEGA5.0 软件构建系统发育进化树(NJ 法)。

2 结果与分析

2.1 黄野螟中性肽链内切酶基因序列及其编码的蛋白质结构

从黄野螟 cDNA 文库中筛选出具有完整 ORF 框的中性肽链内切酶基因,将其命名为 *HvNEP* (登录号:MH298329),序列包含 2 310 bp 长的 ORF 框,编码 769 个氨基酸(图 1)。使用 ProtParam 软件分

析 *HvNEP* 的理化性质,结果显示该蛋白质的分子量为 86 909.14,等电点为 6.76,脂肪系数为 80.59,不稳定指数为 38.49。总平均疏水性计算结果为 -0.335,推测其为亲水性蛋白质。NetPhos3.1 软件分析结果显示 *HvNEP* 含有 9 个酪氨酸磷酸化位点,23 个苏氨酸磷酸化位点和 42 个丝氨酸磷酸化位点(得分>0.5)。NetNGlyc 软件分析结果显示 *HvNEP* 有 6 个糖基化位点。SignalP 在线工具预测结果显示,*HvNEP* 无信号肽,推测其为非分泌蛋白质。非分泌蛋白质不存在 *N*-糖基化位点,所以我们推测 6 个预测的糖基化位点只是潜在的位点。TMPred 软件分析结果表明,*HvNEP* 为跨膜蛋白质,具有 7 个跨膜结构域,其中得分大于 2 000 的 2 个重要跨膜区域中,一个是从内向外的,位于 37 至 56 位氨基酸,另一个从外向内的重要跨膜区域位于 32 至 56 位氨基酸。亚细胞定位预测结果显示,*HvNEP* 位于内质网的可能性最大(为 30.4%),其次是位于线粒体的可能性(有 26.1%的可能性),位于高尔基体和细胞质的可能性则较低(均为 17.4%),位于细胞核的可能性最低(4.3%)。

使用 Sopma 软件进行蛋白质二级结构预测,结果显示构成 *HvNEP* 蛋白的主要元件为 α 螺旋和无规则卷曲,分别占 50.20% 和 37.71%。此外,延伸链和 β 转角,则各占 8.58% 与 3.51%。使用 SWISS-MODEL 软件进行蛋白质三级结构建模,结果显示 *HvNEP* 基因编码的蛋白质主要由 α 螺旋与无规则卷曲组成(图 2),预测结果与 Sopma 软件预测的一致。Conserved Domains 软件分析结果显示,*HvNEP* 属于锌谷氨酸蛋白超基因家族中的 M13 家族,包含锌结合基序 HEITH 和 2 个重要催化基序 VNAFY 和 GENIAD^[17](图 1)。

2.2 *HvNEP* 序列的同源性比对及系统发育树分析

通过 Blast 与 MEGA5.0 软件进行同源性比对,结果显示 *HvNEP* 序列与棉铃虫 *NEP* 的同源性最高(79%),与烟粉虱(*Bemisia Tabaci*)的同源性最低(67%)(图 3)。为研究 *HvNEP* 与其他物种昆虫间的亲缘关系,基于其与鳞翅目、膜翅目、鞘翅目、半翅目等 4 个目中 10 种昆虫的 *NEP* 蛋白氨基酸序列,采用 NJ 法构建系统发育树。结果表明,黄野螟与烟粉虱同源性最低,与棉铃虫处于同一分支(图 4)。

ATGAGTGGGGACGACAGATATATTCTACACGTAACATGAGAAATATGCGAAGCCGTCATGCTGGGCACAGCGGTCGGGCTA	1
M S G D A E Y I S T R N M R N N A K P S C W A Q R S R L	
GAGAAAAGGCTGACCGTGGCGCAGCGCTACCGGTGTGCTGGCTGTGCGCTTCTGCGCCGATTCATCGCCACGCTGCTAATG	85
E K R L T L A A A V T G V L A V A F C A A F I A T L L M	
CGGACCACCTCGGACTTCAGCAACATGCCTCAGACTAGTGAATTGAGACTTTCCTCACCCATGCCGCTCGAGTCATCGCAAG	169
R T T S D F S N M P Q T S E L R L S S P M P L A V I A K	
GAAGGAAACAGCATTGTAGTTCCCGGATGTATACACTGCTCAAACTGCTCAGAACATGGACGACAAAGTGGATCCT	253
E G N S I C S S P G C I H T A S K L L T N M D D K V D P	
TGCGAGCTTCTGACTTTGCTGCGGGTCTTCGTCAAGAACCCGCTTCGGAGCAGACAAGACCTTGTCAACACCTTT	337
C D D F V D F A C G S F V K N T R I P D D K T S V N T F	
TCCATCATCAGGATGAGCTCCAGGGACAAATCCGAGCACTTCTGTATGAACCTACTGCGCTAACGAGCCTAGGCCCTTCGTC	421
S I I T D E L Q G Q I R A L L D E P T A P N E P R P F V	
TTGGTAAGACCTTGTACCAAGCTGCATGAATAGGACTGTATCGAGGTCGTGGAGTGAACCTCTACTAGACATGCTGAAG	505
L A K T L Y Q A C M N R T V I E G R G V K P L L D M L K	
CGTCTGGGCGGTGGCCGGTCTGGATGGGACTCCTGGAACGATCGCGCTTCTCCTGGGAACAATCCGTCTACAAGTTACAG	589
R L G G W P V L D G D S W N D R A F S W E Q S V Y K F R	
AAAGCGGCTACTCGGTAGATTACTTCCTGGACTTCTCCATCAGTGTGACGCTCAAGAACTCCACAAAGCGAATCATTGATCTG	673
K A G Y S V D Y F L D F S I S V D V K N S T K R I I D L	
GACCAAGCTCTCTGGGTCTGAGTCGCGAGTATCTGAACCGAGGGTTAGCGACAAACTCGTGACGCGCTACTACGAGTACATG	757
D Q A S L G L S R E Y L N R G F S D K L V Q A Y Y E Y M	
GTGACATCGCGCCCTGCTGGGGCGGACAAGGAACGAGCAAGAAGAACTCAAAGAGTCTTGACCTTTGAGATGAAGCTC	841
V D I A A L L G A D K E R A K K E L K E S L T F E M K L	
GCTAACATTTCTGGCTGGAGAAACGTGGAACGCTACTAGTCTCTACAATCCTATGACCATCGCTCAACTGCAGCAGAAG	925
A N I S L P L E K R R N A T S L Y N P M T I A Q L Q K	
TTCCCAAGCATTCCTGGTGGAGTACATCAACAACTGCTCGCGCCGATCTAAGTGTGGTCTTGACGAGGTCACCATCGTC	1 009
F P S I P W L E V I N K L L A P H L S V G L D E V T I V	
AGCGTGCCCAATACATATCCGATCTTGAGGTCTTCTGCGCGAGAGCCTGCCGCTGTGAAGCCAACTACGTAATGTGGCGG	1 093
S V P K V I S D L E V L L A E T P A R V Q A N Y V M W R	
GTTGCTGGCGCTCTGTGCTTACCTAACCGAGGAACGCTGCGAGACAGCTGGCCTACGTCACCGCTCTATCCGGCAAGACA	1 177
V A G A S V S Y L T E E L R R R Q L A V V T A L S G K T	
GAGCGGAGAGCCGTGGAAGGAGTGCAGGATACACGAGCGTCAGTATGTGATTGCGGTGGGCGCACTTACATAAGAAAA	1 261
E R E S R W K E C A D T S V S M S I A V G A L Y I R K	
TACTTTAATGAGAACTCTAAAGCTAACGCGTTGGAATGGTCAACGACATCAAGCAGCAATCCGCAAGACGCTAAACGAAGTG	1 345
Y F N E N L V D W W Q E E T K Q Q F R K T L N E V	
GACTGGATGACGAGAGAACTCGGAGGCGCGCTGGAGAAAGCGACGCAATGGCTCCACATCGCTATCCAGCGAAATG	1 429
D W M D E R T R Q A A L E K A D A M A S H I A Y P S E M	
CTCGATAACGAAAACTGACAGATTCTACCAAGGCTGGAGATGTCTTCGGACAAGCTGATGGAGTCCGTGCTGAACCTGACT	1 513
L D N E K L T D F Y Q G L E M S S D K L M E S V L N L T	
CTGTTCCGTACTGAGTACCTGTTGGCAAACTCCGTGAGCCCGTCAACAAAGACCGACTGGGTTTCCCATGGAGCTCCAGCCATC	1 597
L F G T E Y L F G K L R E P V N K T D W V S H G R P A I	
GTCAACGCCTTCTACTCGTCTATTGAAAACAGCATCCAATCCCGACCGGTATTCTGCAAGGAGCGTTTTCTCTGCTATGCGG	1 681
{V N A F Y} S S I E N S I Q F P A G I L Q G A F F S A M R	
CCAGCTACATGAACACGCGCCATCGGATTGGAACAGAAATTACCCACGCGTTGATGATCAGGGTCGTCATTT	1 765
P A V M N Y G A I G F V I G {H E I T H} G F D D Q G R Q F	
GACAAGAACGGCAATCTGTTGACTGGTGGCAAGAGGAGCAAGCAAAAGTACCTGGAGAAAGCCAAATGCATTATTGACCAG	1 849
D K N G N L V D W W Q E E T K Q K V L E K A K C I I D Q	
TACTCAAACTACACAGTCAAGGAAGTCGGATTGAAGTTGAACGCGTCAATACTCAAGGAGAGAACATTGCTGACAACTGGAGGC	1 933
V S N Y T V K E V G L K L N G V N T Q {G E N I A D} N G G	
ATCAAGAGGCTTACTATGCGTACCAGGCTTGGAGCAGCGACACGCGAGGAAACCCGCTTGCAGGACTAGAGAAATACACA	2 017
I K E A Y V A Y Q A W T Q R H G E E T R L P G L E K Y T	
CCGAAACAGCTGTTCTGGCTGAGCGCGGCAACACATGTTGCGCGGTGTACCGCAACGAGCCATCAAACGCGCATCAGACC	2 101
P K Q L T F W L S A A N T W C A V Y R N E A I K L R I T T	
GGCTTCCACGCGCGGCGCTTCCGAGTGGTGGGCCCATGTCCAACATGGAAGAGTTCGCTCCGACTCCAGTGCCCTCTC	2 185
G F H A P G R F R V V G P M S N M E E F A S D F Q C P L	
GGCTCTCAATGAACCGAGCAAGAAGTCAAAAGTTGGTAG	2 269
G S P M N P S K K C K V W *	

磷酸化位点分别以圆形(Ser)、方形(Thr)、倒三角形(Tyr)标注,锌结合基序 HEITH、催化基序 VNAFY 和 GENIAD 以大括号标注,跨膜结构域(得分>2 000)以加粗下划线标注,低密度复杂区以阴影标注,起始密码子和终止密码子 TAG 分别以细横线与星号标注。

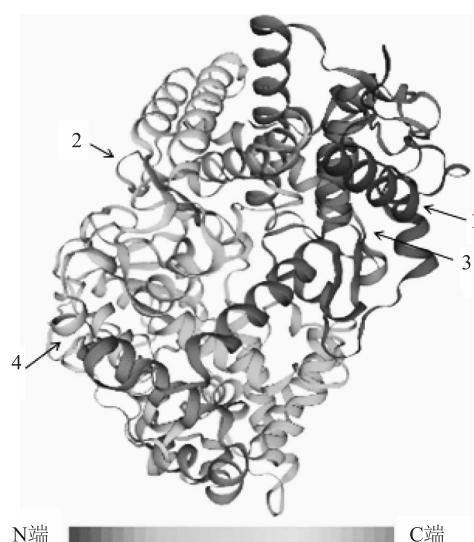
图 1 黄野螟 *NEP* 基因核苷酸序列及其编码的氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *NEP* gene from *Heortia vitessoides*

2.3 *HvNEP* 基因在黄野螟不同虫态和不同组织中的表达

由图 5 可知,*HvNEP* 在黄野螟各虫态中均有表达,且各虫态间差异显著。在成虫中表达量达到峰

值,为卵的 113.77 倍;在 3 龄和 4 龄幼虫时表达量最低,仅为卵的 1.31 倍和 0.60 倍。由图 6 可知,*HvNEP* 在黄野螟幼虫各组织中均有表达,在体壁中表达量最低。在头部表达量最高,为体壁的 5.28



1、2、3、4 分别表示 α 螺旋、 β 转角、延伸链和无规则卷曲。

图 2 HvNEP 蛋白三维结构

Fig.2 Three-dimensional structure of HvNEP protein

倍;其次是马氏管中,表达量为体壁的 2.89 倍。成虫时,*HvNEP* 在翅中表达量最高,为腹的 11.06 倍,其次是触角与头,表达量分别为腹的 3.75 倍与 2.08 倍(图 7)。为研究蜕皮激素对 *HvNEP* 表达量的影响,以等量稀释的 DMSO 为对照,探讨不同时间不同 20E 质量浓度梯度下 *HvNEP* 的表达量差异(图 8)。在 20E 注射质量浓度为 60 ng/ μ l 时,*HvNEP* 的表达量随时间增加而升高,但在 24 h 时黄野螟 *HvNEP* 基因的表达变化不明显,在 48 h 和 72 h 时 *HvNEP* 基因的表达量显著提高;在注射质量浓度为 120 ng/ μ l 时,*HvNEP* 的表达量随时间的增加先升高后降低,在 48 h 时表达量达到峰值,为对照的 74.03 倍。说明 *HvNEP* 基因的表达水平受蜕皮激素调控,且在注射质量浓度为 120 ng/ μ l 后 48 h,蜕皮激素对其表达量的影响最显著。

3 讨论

Neprilysin (M13) 家族蛋白高度保守部分为 HEITH 锌结合基序和 2 个重要的催化基序 VNAFY 和 GENIAD^[17]。VNAFY 基序存在于各种昆虫的 M13 肽酶中,影响底物对 P1 和 P1' 位置间肽键的取向^[18-19],其结构的变化可能会对酶性质产生连锁效应^[17]。GENIAD 已被证明是影响内肽酶活性的关键。此基序若发生显著变异,很可能导致酶活性丧失^[20]。

在昆虫生长过程中,*NEP* 基因参与昆虫的变

态^[9]。RT-qPCR 结果表明, *HvNEP* 在黄野螟各发育阶段均有表达,在 1 龄和 2 龄幼虫期表达量较高,分别为卵的 6.44 倍和 5.97 倍。有研究结果表明,过表达 *Neprilysin2* 基因会导致果蝇表现出新的行为表型(异常攀爬行为),说明果蝇运动的改变可能是神经肽信号遭到干扰所致^[21]。同属中性肽链内切酶 (M13) 家族的 *HvNEP* 可能也与神经肽信号有关,并在黄野螟 1 龄和 2 龄幼虫期发挥重要作用。*HvNEP* 在成虫期的表达量极为突出,为卵的 113.77 倍。我们推测,黄野螟羽化后存活时间较短,因此其成虫神经系统需要迅速发育,神经肽和肽激素的合成变得旺盛,为生殖行为做好准备,与之相关的 *HvNEP* 基因在此阶段应有极高的表达量。

大多无脊椎动物存在类 *NEP* 活性物质^[22]。RT-qPCR 结果表明, *HvNEP* 基因在黄野螟幼虫各组织中均有表达,在头部的表达量最高,为体壁的 5.28 倍。脑是昆虫的神经中枢,调控昆虫行为和生理活动^[23]。推测 *HvNEP* 参与调控黄野螟幼虫脑神经发育与神经肽酶水平^[24-25]。昆虫马氏管不仅有助于昆虫排泄代谢废物和调节水盐平衡^[26],还具有免疫调控功能^[27],神经肽在昆虫免疫过程中起一定作用^[28]。本研究结果显示 *HvNEP* 在马氏管中表达量较高,推测其与马氏管行使免疫功能有关。

分析成虫组织荧光定量结果发现, *HvNEP* 在成虫触角和头均有较高表达,分别为腹的 3.75 和 2.08 倍。蛾类昆虫嗅觉中枢发达,触角内含丰富的神经纤维球^[29], *HvNEP* 可能参与成虫嗅觉神经系统的完善。*HvNEP* 在成虫翅中表达量最高,为腹的 11.06 倍。有研究结果表明,在蜕皮激素诱导下,翅原基中会形成类 *NEP* 活性物质^[16]。翅是昆虫的飞行器官,而神经肽信号系统调控昆虫的行为^[28], *NEP* 参与神经肽的加工^[4],推测 *HvNEP* 在翅中的高表达与昆虫行为有密切关系。

蜕皮激素在动植物体中普遍存在,能够诱导昆虫组织细胞程序化死亡^[30], 20E 是其在昆虫体内的活性形式。当昆虫体内保幼激素滴度较高时, 20E 引起昆虫脱皮,当保幼激素滴度较低时, 20E 诱导昆虫进入下一龄期或发生变态^[31]。本研究对黄野螟进行了外源 20E 胁迫,在注射 20E 后 24 h,黄野螟 *HvNEP* 的表达水平上升,且注射质量浓度越高影响越明显。当注射质量浓度为 60 ng/ μ l 时, *HvNEP* 的表达量随时间增加而上升;当注射质量浓度为 120

H.viteßsoides	MSCEAEYI STR. NMRNNAKPSVACRSRLKRLTAAAVTCVLAFAVCAFI ATLLMR. TTSDFS. NMPCTSELRLSSPMP. ... LAVI AKEG. ... NSI ESSPCCI	96
H.armigera	MSCEACVI STNYDMRNKVPFVGCRTKLEKRI LAACVTVLAI AFLAVAVTIVVR. SSTDI S. CI PCTSELRSSSV. ... PAVI VKGCPSTVELNSPCCI	100
M.sexta	MSCEAEYI ATNVMRSNVPFVGCRTKLEKRI LAACVATALAI AFLAVI VSLMR. SATDI S. EMPCTSELRLSSPMP. ... PTVI SKCG. NNVELSSPCCI	99
P.rapae	MSACEYI STSYNMRNNTKASFVFCRTIRKRLALACVVAVLAVAFFAFLATI MRR. PSTDVN. CVPCTSELRISFTFP. ... PAVI AKNE. ... FPKVKIDACI	98
P.dominula	PTWKRRSTLERCTVI AVSGVLLCI ALAVALGVLAANTATSCSSNDC. LPSTAEALCVI KC. TTI NRCSTEKNCI VSPCCV	82
B.terrestris	PTWKRRSTLERCTVI AVSGVLLCI ALAVALGVLAANTATSCSSNDC. VNSFCLPSTADALNGYCNKGVHVI DKSCCEFEVYTKFCI	92
T.castaneum	PTWKRRSTNERCTI LLLTAI STLI CI SLVVALVTVLN. RNC. EARTTFSAEALHSAN. PAVNAFTEE. ... AKTQLTPCCI	77
D.ponderosae	PTWKRRSTNERCTI LLLTAI STLI CI SLVVALVTVLN. RSTL. VTNPTAFALGCC. ... TVVI NAPDAKCECKMOLTPCCI	80
P.barbatus	PTWKRRSTLERCTVI AVSGVLLCVALAVLGI LAAN. TTGN TSNMVTI VNAEMLPSTAEALSCSCVP. VNTI PKETKCN. I LTPCCV	91
B.tabaci	PTWKRRSTLERCTVI AVSGVLLCVALAVLGI LAAN. TTGN TSNMVTI VNAEMLPSTAEALSCSCVP. VNTI PKETKCN. I LTPCCV	96
A.glabripennis	SEHSSSCSRNPTWKRRSTLERCTVI AVSGVLLCVALAVLGI LAAN. TTGN TSNMVTI VNAEMLPSTAEALSCSCVP. VNTI PKETKCN. I LTPCCV	76
H.viteßsoides	HTASKLITNMDKVDPCDEFYFAAGSFLVKNRIPDERKTSVNTESI TIFLCCQI RALLLEPTAPNEPRPFI AKTLYOACNRTVI ECGVKPLILMLKRI CGWVPLGCSW	209
H.armigera	HTASKLITNMDKVDPCDEFYFAAGSFLVKNRIPDERKTSVNTESI TIFLCCQI RALLLEPTAPNEPRPFI AKTLYOACNRTVI ECGVKPLILMLKRI CGWVPLGCSW	213
M.sexta	HTASKLITNMDKVDPCDEFYFAAGSFLVKNRIPDERKTSVNTESI TIFLCCQI RALLLEPTAPNEPRPFI AKTLYOACNRTVI ECGVKPLILMLKRI CGWVPLGCSW	212
P.rapae	HTASKLITNMDKVDPCDEFYFAAGSFLVKNRIPDERKTSVNTESI TIFLCCQI RALLLEPTAPNEPRPFI AKTLYOACNRTVI ECGVKPLILMLKRI CGWVPLGCSW	211
P.dominula	HTASKLITNMDKVDPCDEFYFAAGSFLVKNRIPDERKTSVNTESI TIFLCCQI RALLLEPTAPNEPRPFI AKTLYOACNRTVI ECGVKPLILMLKRI CGWVPLGCSW	195
B.terrestris	HTASKLITNMDKVDPCDEFYFAAGSFLVKNRIPDERKTSVNTESI TIFLCCQI RALLLEPTAPNEPRPFI AKTLYOACNRTVI ECGVKPLILMLKRI CGWVPLGCSW	205
T.castaneum	HTASKLITNMDKVDPCDEFYFAAGSFLVKNRIPDERKTSVNTESI TIFLCCQI RALLLEPTAPNEPRPFI AKTLYOACNRTVI ECGVKPLILMLKRI CGWVPLGCSW	190
D.ponderosae	HTASKLITNMDKVDPCDEFYFAAGSFLVKNRIPDERKTSVNTESI TIFLCCQI RALLLEPTAPNEPRPFI AKTLYOACNRTVI ECGVKPLILMLKRI CGWVPLGCSW	193
P.barbatus	HTASKLITNMDKVDPCDEFYFAAGSFLVKNRIPDERKTSVNTESI TIFLCCQI RALLLEPTAPNEPRPFI AKTLYOACNRTVI ECGVKPLILMLKRI CGWVPLGCSW	204
B.tabaci	HTASKLITNMDKVDPCDEFYFAAGSFLVKNRIPDERKTSVNTESI TIFLCCQI RALLLEPTAPNEPRPFI AKTLYOACNRTVI ECGVKPLILMLKRI CGWVPLGCSW	209
A.glabripennis	HTASKLITNMDKVDPCDEFYFAAGSFLVKNRIPDERKTSVNTESI TIFLCCQI RALLLEPTAPNEPRPFI AKTLYOACNRTVI ECGVKPLILMLKRI CGWVPLGCSW	189
H.viteßsoides	NDRAPSTVECSVYKFRKACYSVDYELFESI SVDVKNSTKRI TILDOASLCL SREVLNRCESDKI VAYYAYVVDI AALLGADKERAKKELKESLTFEVLKLANI SLPLNEBRNAT	322
H.armigera	NDRAPSTVECSVYKFRKACYSVDYELFESI SVDVKNSTKRI TILDOASLCL SREVLNRCESDKI VAYYAYVVDI AALLGADKERAKKELKESLTFEVLKLANI SLPLNEBRNAT	326
M.sexta	NDRAPSTVECSVYKFRKACYSVDYELFESI SVDVKNSTKRI TILDOASLCL SREVLNRCESDKI VAYYAYVVDI AALLGADKERAKKELKESLTFEVLKLANI SLPLNEBRNAT	325
P.rapae	NDRAPSTVECSVYKFRKACYSVDYELFESI SVDVKNSTKRI TILDOASLCL SREVLNRCESDKI VAYYAYVVDI AALLGADKERAKKELKESLTFEVLKLANI SLPLNEBRNAT	324
P.dominula	NDRAPSTVECSVYKFRKACYSVDYELFESI SVDVKNSTKRI TILDOASLCL SREVLNRCESDKI VAYYAYVVDI AALLGADKERAKKELKESLTFEVLKLANI SLPLNEBRNAT	308
B.terrestris	NDRAPSTVECSVYKFRKACYSVDYELFESI SVDVKNSTKRI TILDOASLCL SREVLNRCESDKI VAYYAYVVDI AALLGADKERAKKELKESLTFEVLKLANI SLPLNEBRNAT	318
T.castaneum	NDRAPSTVECSVYKFRKACYSVDYELFESI SVDVKNSTKRI TILDOASLCL SREVLNRCESDKI VAYYAYVVDI AALLGADKERAKKELKESLTFEVLKLANI SLPLNEBRNAT	303
D.ponderosae	NDRAPSTVECSVYKFRKACYSVDYELFESI SVDVKNSTKRI TILDOASLCL SREVLNRCESDKI VAYYAYVVDI AALLGADKERAKKELKESLTFEVLKLANI SLPLNEBRNAT	306
P.barbatus	NDRAPSTVECSVYKFRKACYSVDYELFESI SVDVKNSTKRI TILDOASLCL SREVLNRCESDKI VAYYAYVVDI AALLGADKERAKKELKESLTFEVLKLANI SLPLNEBRNAT	317
B.tabaci	NDRAPSTVECSVYKFRKACYSVDYELFESI SVDVKNSTKRI TILDOASLCL SREVLNRCESDKI VAYYAYVVDI AALLGADKERAKKELKESLTFEVLKLANI SLPLNEBRNAT	322
A.glabripennis	NDRAPSTVECSVYKFRKACYSVDYELFESI SVDVKNSTKRI TILDOASLCL SREVLNRCESDKI VAYYAYVVDI AALLGADKERAKKELKESLTFEVLKLANI SLPLNEBRNAT	302
H.viteßsoides	SLYNPMIT AELCKEFPK PWLEY NRI LAPHVSLTEVTI VNSPKYI SLEVLLEAFTPAFCANYAVWRVACASVSYLTFEELRRCLAVTALSCKTERE SRWKEGATTTSV	435
H.armigera	SLYNPMIT AELCKEFPK PWLEY NRI LAPHVSLTEVTI VNSPKYI SLEVLLEAFTPAFCANYAVWRVACASVSYLTFEELRRCLAVTALSCKTERE SRWKEGATTTSV	439
M.sexta	SLYNPMIT AELCKEFPK PWLEY NRI LAPHVSLTEVTI VNSPKYI SLEVLLEAFTPAFCANYAVWRVACASVSYLTFEELRRCLAVTALSCKTERE SRWKEGATTTSV	438
P.rapae	SLYNPMIT AELCKEFPK PWLEY NRI LAPHVSLTEVTI VNSPKYI SLEVLLEAFTPAFCANYAVWRVACASVSYLTFEELRRCLAVTALSCKTERE SRWKEGATTTSV	437
P.dominula	SLYNPMIT AELCKEFPK PWLEY NRI LAPHVSLTEVTI VNSPKYI SLEVLLEAFTPAFCANYAVWRVACASVSYLTFEELRRCLAVTALSCKTERE SRWKEGATTTSV	421
B.terrestris	SLYNPMIT AELCKEFPK PWLEY NRI LAPHVSLTEVTI VNSPKYI SLEVLLEAFTPAFCANYAVWRVACASVSYLTFEELRRCLAVTALSCKTERE SRWKEGATTTSV	431
T.castaneum	SLYNPMIT AELCKEFPK PWLEY NRI LAPHVSLTEVTI VNSPKYI SLEVLLEAFTPAFCANYAVWRVACASVSYLTFEELRRCLAVTALSCKTERE SRWKEGATTTSV	416
D.ponderosae	SLYNPMIT AELCKEFPK PWLEY NRI LAPHVSLTEVTI VNSPKYI SLEVLLEAFTPAFCANYAVWRVACASVSYLTFEELRRCLAVTALSCKTERE SRWKEGATTTSV	419
P.barbatus	SLYNPMIT AELCKEFPK PWLEY NRI LAPHVSLTEVTI VNSPKYI SLEVLLEAFTPAFCANYAVWRVACASVSYLTFEELRRCLAVTALSCKTERE SRWKEGATTTSV	430
B.tabaci	SLYNPMIT AELCKEFPK PWLEY NRI LAPHVSLTEVTI VNSPKYI SLEVLLEAFTPAFCANYAVWRVACASVSYLTFEELRRCLAVTALSCKTERE SRWKEGATTTSV	435
A.glabripennis	SLYNPMIT AELCKEFPK PWLEY NRI LAPHVSLTEVTI VNSPKYI SLEVLLEAFTPAFCANYAVWRVACASVSYLTFEELRRCLAVTALSCKTERE SRWKEGATTTSV	415
H.viteßsoides	SNISI AVGALYI RYKFNENSKANALEVNDI ROCFRKTL NEVVDWDETRCAAEKADAMASHI AYPSEMLNENKIDTFYCCLENSSEKLMESVNLTL FCTEYLFGLKREPVN	548
H.armigera	SNISI AVGALYI RYKFNENSKANALEVNDI ROCFRKTL NEVVDWDETRCAAEKADAMASHI AYPSEMLNENKIDTFYCCLENSSEKLMESVNLTL FCTEYLFGLKREPVN	552
M.sexta	SNISI AVGALYI RYKFNENSKANALEVNDI ROCFRKTL NEVVDWDETRCAAEKADAMASHI AYPSEMLNENKIDTFYCCLENSSEKLMESVNLTL FCTEYLFGLKREPVN	551
P.rapae	SNISI AVGALYI RYKFNENSKANALEVNDI ROCFRKTL NEVVDWDETRCAAEKADAMASHI AYPSEMLNENKIDTFYCCLENSSEKLMESVNLTL FCTEYLFGLKREPVN	550
P.dominula	SNISI AVGALYI RYKFNENSKANALEVNDI ROCFRKTL NEVVDWDETRCAAEKADAMASHI AYPSEMLNENKIDTFYCCLENSSEKLMESVNLTL FCTEYLFGLKREPVN	534
B.terrestris	SNISI AVGALYI RYKFNENSKANALEVNDI ROCFRKTL NEVVDWDETRCAAEKADAMASHI AYPSEMLNENKIDTFYCCLENSSEKLMESVNLTL FCTEYLFGLKREPVN	544
T.castaneum	SNISI AVGALYI RYKFNENSKANALEVNDI ROCFRKTL NEVVDWDETRCAAEKADAMASHI AYPSEMLNENKIDTFYCCLENSSEKLMESVNLTL FCTEYLFGLKREPVN	529
D.ponderosae	SNISI AVGALYI RYKFNENSKANALEVNDI ROCFRKTL NEVVDWDETRCAAEKADAMASHI AYPSEMLNENKIDTFYCCLENSSEKLMESVNLTL FCTEYLFGLKREPVN	532
P.barbatus	SNISI AVGALYI RYKFNENSKANALEVNDI ROCFRKTL NEVVDWDETRCAAEKADAMASHI AYPSEMLNENKIDTFYCCLENSSEKLMESVNLTL FCTEYLFGLKREPVN	543
B.tabaci	SNISI AVGALYI RYKFNENSKANALEVNDI ROCFRKTL NEVVDWDETRCAAEKADAMASHI AYPSEMLNENKIDTFYCCLENSSEKLMESVNLTL FCTEYLFGLKREPVN	548
A.glabripennis	SNISI AVGALYI RYKFNENSKANALEVNDI ROCFRKTL NEVVDWDETRCAAEKADAMASHI AYPSEMLNENKIDTFYCCLENSSEKLMESVNLTL FCTEYLFGLKREPVN	528
H.viteßsoides	KTEVVS HCRPAI VNAFYSSI ENSI CFPACI LCCAFESAKRRANVYAGI GFVI GHEI THGFEDDQCRFDKNGVWVWCEETKCKYLEKACI I TOYNSYTVKEVCLKNGN	661
H.armigera	KTEVVS HCRPAI VNAFYSSI ENSI CFPACI LCCAFESAKRRANVYAGI GFVI GHEI THGFEDDQCRFDKNGVWVWCEETKCKYLEKACI I TOYNSYTVKEVCLKNGN	665
M.sexta	KTEVVS HCRPAI VNAFYSSI ENSI CFPACI LCCAFESAKRRANVYAGI GFVI GHEI THGFEDDQCRFDKNGVWVWCEETKCKYLEKACI I TOYNSYTVKEVCLKNGN	664
P.rapae	KTEVVS HCRPAI VNAFYSSI ENSI CFPACI LCCAFESAKRRANVYAGI GFVI GHEI THGFEDDQCRFDKNGVWVWCEETKCKYLEKACI I TOYNSYTVKEVCLKNGN	663
P.dominula	KTEVVS HCRPAI VNAFYSSI ENSI CFPACI LCCAFESAKRRANVYAGI GFVI GHEI THGFEDDQCRFDKNGVWVWCEETKCKYLEKACI I TOYNSYTVKEVCLKNGN	647
B.terrestris	KTEVVS HCRPAI VNAFYSSI ENSI CFPACI LCCAFESAKRRANVYAGI GFVI GHEI THGFEDDQCRFDKNGVWVWCEETKCKYLEKACI I TOYNSYTVKEVCLKNGN	657
T.castaneum	KTEVVS HCRPAI VNAFYSSI ENSI CFPACI LCCAFESAKRRANVYAGI GFVI GHEI THGFEDDQCRFDKNGVWVWCEETKCKYLEKACI I TOYNSYTVKEVCLKNGN	642
D.ponderosae	KTEVVS HCRPAI VNAFYSSI ENSI CFPACI LCCAFESAKRRANVYAGI GFVI GHEI THGFEDDQCRFDKNGVWVWCEETKCKYLEKACI I TOYNSYTVKEVCLKNGN	645
P.barbatus	KTEVVS HCRPAI VNAFYSSI ENSI CFPACI LCCAFESAKRRANVYAGI GFVI GHEI THGFEDDQCRFDKNGVWVWCEETKCKYLEKACI I TOYNSYTVKEVCLKNGN	656
B.tabaci	KTEVVS HCRPAI VNAFYSSI ENSI CFPACI LCCAFESAKRRANVYAGI GFVI GHEI THGFEDDQCRFDKNGVWVWCEETKCKYLEKACI I TOYNSYTVKEVCLKNGN	661
A.glabripennis	KTEVVS HCRPAI VNAFYSSI ENSI CFPACI LCCAFESAKRRANVYAGI GFVI GHEI THGFEDDQCRFDKNGVWVWCEETKCKYLEKACI I TOYNSYTVKEVCLKNGN	641
H.viteßsoides	TOCFNI AENDGCKEAYAYCAVTHRHCEBARI PCLFKYIPKCLFV SAANTWAVYRNEAI KIRI TTGFAPCFRFRVCPNSNHEFFASTFPCPCSPNPNKCKRV	768
H.armigera	TOCFNI AENDGCKEAYAYCAVTHRHCEBARI PCLFKYIPKCLFV SAANTWAVYRNEAI KIRI TTGFAPCFRFRVCPNSNHEFFASTFPCPCSPNPNKCKRV	772
M.sexta	TOCFNI AENDGCKEAYAYCAVTHRHCEBARI PCLFKYIPKCLFV SAANTWAVYRNEAI KIRI TTGFAPCFRFRVCPNSNHEFFASTFPCPCSPNPNKCKRV	771
P.rapae	TOCFNI AENDGCKEAYAYCAVTHRHCEBARI PCLFKYIPKCLFV SAANTWAVYRNEAI KIRI TTGFAPCFRFRVCPNSNHEFFASTFPCPCSPNPNKCKRV	770
P.dominula	TOCFNI AENDGCKEAYAYCAVTHRHCEBARI PCLFKYIPKCLFV SAANTWAVYRNEAI KIRI TTGFAPCFRFRVCPNSNHEFFASTFPCPCSPNPNKCKRV	753
B.terrestris	TOCFNI AENDGCKEAYAYCAVTHRHCEBARI PCLFKYIPKCLFV SAANTWAVYRNEAI KIRI TTGFAPCFRFRVCPNSNHEFFASTFPCPCSPNPNKCKRV	763
T.castaneum	TOCFNI AENDGCKEAYAYCAVTHRHCEBARI PCLFKYIPKCLFV SAANTWAVYRNEAI KIRI TTGFAPCFRFRVCPNSNHEFFASTFPCPCSPNPNKCKRV	748
D.ponderosae	TOCFNI AENDGCKEAYAYCAVTHRHCEBARI PCLFKYIPKCLFV SAANTWAVYRNEAI KIRI TTGFAPCFRFRVCPNSNHEFFASTFPCPCSPNPNKCKRV	751
P.barbatus	TOCFNI AENDGCKEAYAYCAVTHRHCEBARI PCLFKYIPKCLFV SAANTWAVYRNEAI KIRI TTGFAPCFRFRVCPNSNHEFFASTFPCPCSPNPNKCKRV	762
B.tabaci	TOCFNI AENDGCKEAYAYCAVTHRHCEBARI PCLFKYIPKCLFV SAANTWAVYRNEAI KIRI TTGFAPCFRFRVCPNSNHEFFASTFPCPCSPNPNKCKRV	768
A.glabripennis	TOCFNI AENDGCKEAYAYCAVTHRHCEBARI PCLFKYIPKCLFV SAANTWAVYRNEAI KIRI TTGFAPCFRFRVCPNSNHEFFASTFPCPCSPNPNKCKRV	747

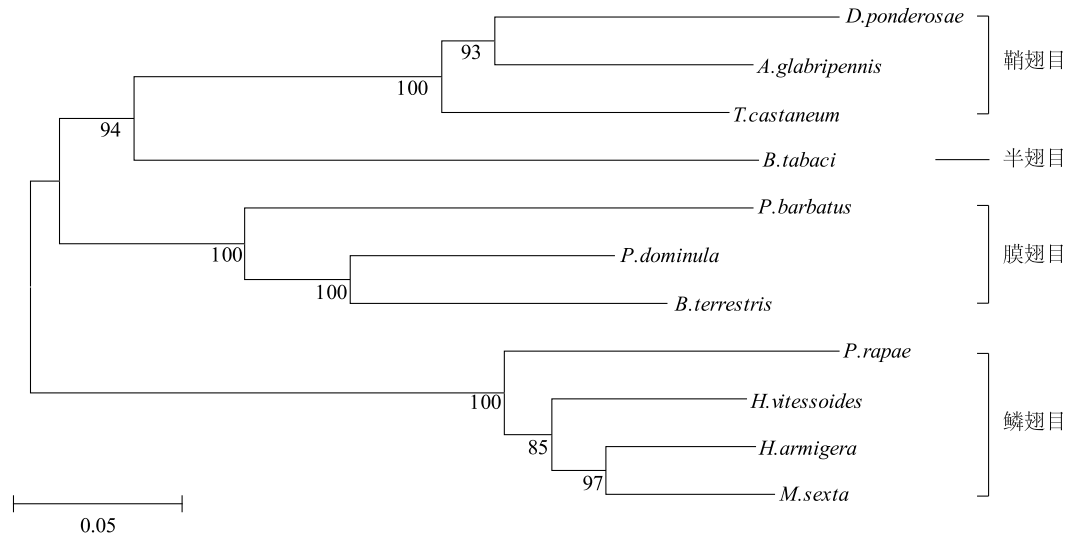
图 3 11 种昆虫 NEP 序列同源性比对结果

Fig.3 Homology analysis based on NEP from 11 species of insect

ng/ μ l 时, *HvNEP* 的表达量随时间增加先上升后降低。此结果说明, *HvNEP* 作为蜕皮激素的次级应答基因, 其表达受 20E 调节。另外, 注射不同质量浓度的蜕皮激素对 *HvNEP* 基因表达量的影响不同, 在

注射后 72 h, 120 ng/ μ l 的外源 20E 对 *HvNEP* 表达的诱导效果不如 60 ng/ μ l, 推测较高质量浓度的 20E 胁迫会激发虫体内的负反馈调节机制。

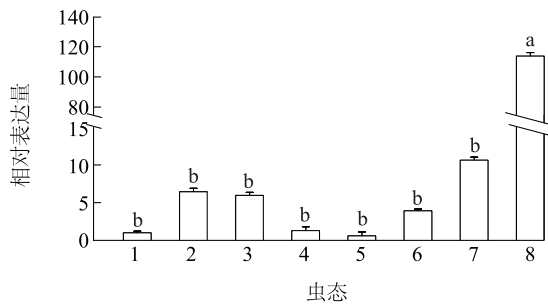
本研究结果为探究昆虫中性肽链内切酶基因提



D. ponderosae: 中欧山松大小蠹 (XP_019757686.1); *A. glabripennis*: 光肩星天牛 (XP_018565533.1); *T. castaneum*: 赤拟谷盗 (KYB27446.1); *B. tabaci*: 烟粉虱 (XP_018915734.1); *P. barbatus*: 红收获蚁 (XP_011640343); *P. dominula*: 造纸胡蜂 (XP_015173766.1); *B. terrestris*: 熊蜂 (XP_012170213.1); *P. rapae*: 菜青虫 (XP_022118584.1); *H. vitessoides*: 黄野螟; *H. armigera*: 棉铃虫 (XP_021187553.1); *M. sexta*: 烟草天蛾 (AAO21504.1)。

图4 基于 NEP 蛋白氨基酸序列构建的系统发育树 (NJ 法)

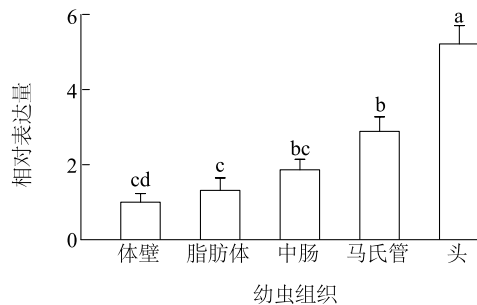
Fig.4 Phylogenetic relationships based on amino acid sequence of NEP protein from 11 species of insect



1: 卵 (对照); 2: 1 龄幼虫; 3: 2 龄幼虫; 4: 3 龄幼虫; 5: 4 龄幼虫; 6: 5 龄幼虫; 7: 蛹; 8: 成虫。柱上不同字母代表差异显著 ($P < 0.05$)。

图5 *HvNEP* 基因在黄野螟各虫态中的表达

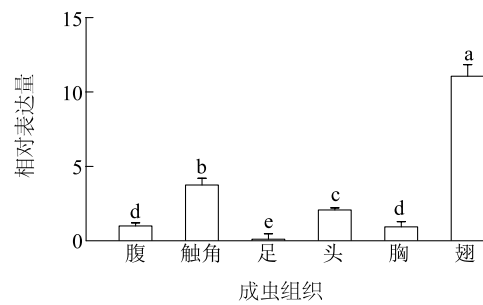
Fig.5 The expression level of *HvNEP* in different stages of *H. vitessoides*



柱上不同字母代表差异显著 ($P < 0.05$)。

图6 *HvNEP* 基因在黄野螟幼虫中的表达

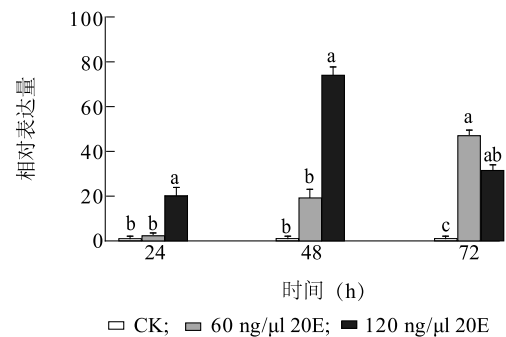
Fig.6 The expression level of *HvNEP* in the larvae of *H. vitessoides*



柱上不同字母代表差异显著 ($P < 0.05$)。

图7 *HvNEP* 基因在黄野螟成虫中的表达

Fig.7 The expression level of *HvNEP* in the adults of *H. vitessoides*



柱上不同字母代表差异显著 ($P < 0.05$)。

图8 不同时间不同质量浓度 20E 对 *HvNEP* 基因表达的影响

Fig.8 Expression profile of *HvNEP* at different time after 20E treatment of different concentration

供了分子依据。*NEP* 是昆虫生长发育中不可或缺的一员,具有成为害虫控制剂靶标的潜力。后期我们将基于本研究成果,运用基因编辑和 RNA 干扰技术,更深入地研究 *HvNEP* 的功能。

参考文献:

- [1] 茅裕婷,张 蒙,靳秀芳,等. 土沉香对黄野螟的抗性研究[J]. 华南农业大学学报,2017, 38(6): 89-96.
- [2] 田耀华,原慧芳,倪书邦,等. 沉香属植物研究进展[J]. 热带亚热带植物学报,2009, 17(1): 98-104.
- [3] 乔海莉,陆鹏飞,陈 君,等. 黄野螟生物学特性及发生规律研究[J]. 应用昆虫学报,2013, 50(5): 1244-1252.
- [4] SITNIK J L, FRANCIS C, HENS K, et al. Neprilysins: an evolutionarily conserved family of metalloproteases that play important roles in reproduction in *Drosophila*[J]. *Genetics*, 2014, 196(3): 781-797.
- [5] HONG Y, JTURNER A. Old enzyme with new interest: Review of newly understood NEP functions and its potential regulators[J]. *Chinese Journal of Biochemistry & Molecular Biology*, 2007, 23(2): 85-92.
- [6] MA K, AJ K. The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border[J]. *Biochemical Journal*, 1974, 137(3): 477-488.
- [7] ZHAO X, MITA K, SHIMADA T, et al. Isolation and expression of an ecdysteroid-inducible neutral endopeptidase 24.11-like gene in wing discs of *Bombyx mori*[J]. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 2001, 31(12): 1213-1219.
- [8] BUTLER M J. Discovery of genes with highly restricted expression patterns in the *Drosophila* wing disc using DNA oligonucleotide microarrays[J]. *Development*, 2003, 130(4): 659-670.
- [9] WILSON C L, SHIRRAS A D, ISAAC R E. Extracellular peptidases of imaginal discs of *Drosophila melanogaster*[J]. *Peptides*, 2002, 23(11): 2007-2014.
- [10] MULDER S D, VEERHUIS R, BLANKENSTEIN M A, et al. The effect of amyloid associated proteins on the expression of genes involved in amyloid- β clearance by adult human astrocytes[J]. *Experimental Neurology*, 2012, 233(1): 373-379.
- [11] KLEIN C, PATTEMENSAH C, TALEB O, et al. The neuroprotector kynurenic acid increases neuronal cell survival through neprilysin induction[J]. *Neuropharmacology*, 2013, 70(1): 254-260.
- [12] WONG S S, SUN N N, FASTJE C D, et al. Role of neprilysin in airway inflammation induced by diesel exhaust emissions[J]. *Research Report*, 2011, 120(159): 3-40.
- [13] SMOLLIH M, GÖTTE M, YIP G W, et al. On the role of endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1) and neprilysin in human breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2007, 106(3): 361-369.
- [14] SEGURA J, RUILOPE L M. Dual-acting angiotensin receptor-neprilysin inhibition[J]. *Current Hypertension Reports*, 2011, 13(1): 74-78.
- [15] WICK M J, BUESING E J, WEHLING C A, et al. Decreased neprilysin and pulmonary vascular remodeling in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine*, 2011, 183(3): 330-340.
- [16] BARRETT A J, RAWLINGS N D, WOESSNER J F. Handbook of proteolytic enzymes[M]. London: Elsevier Academic Press, 2004: 419-436.
- [17] BLAND N D, PINNEY J W, THOMAS J E, et al. Bioinformatic analysis of the neprilysin (M13) family of peptidases reveals complex evolutionary and functional relationships[J]. *Bmc Evolutionary Biology*, 2008, 8(1): 1-10.
- [18] OEFNER C, D ARCY A, HENNIG M, et al. Structure of human neutral endopeptidase (neprilysin) complexed with phosphoramidon 1[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2000, 296(2): 341.
- [19] LAURENT V, SALZET M. Metabolism of angiotensins by head membranes of the leech *Theromyzon tessulatum*[J]. *Febs Letters*, 1996, 384(2): 123-127.
- [20] KENNY A J, BOUSTEAD C M. Cell-surface peptidases in health and disease[M]. Oxfordshire: BIOS Scientific Publishers Ltd, 1997: 59-78.
- [21] BLAND N D, ROBINSON P, THOMAS J E, et al. Locomotor and geotactic behavior of *Drosophila melanogaster* over-expressing neprilysin 2[J]. *Peptides*, 2009, 30(3): 571-574.
- [22] KASHI Y. Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution[J]. *Trends in Genetics* Tig, 2006, 22(5): 253-259.
- [23] CHAPMAN R F. The insects: structure and function[M]. New York: American Elsevier Publishing Co, 1969: 1317.
- [24] CARPENTIER M, GUILLEMETTE C, BAILEY J L, et al. Reduced fertility in male mice deficient in the zinc metallopeptidase NLI[J]. *Molecular & Cellular Biology*, 2004, 24(10): 4428.
- [25] ISAAC R E. Neuropeptide-degrading endopeptidase activity of locust (*Schistocerca gregaria*) synaptic membranes[J]. *Biochemical Journal*, 1988, 255(3): 843-847.
- [26] DOW J A T. Insights into the *Malpighian tubule* from functional genomics[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2009, 212(3): 435-445.
- [27] 赵新慧. 家蚕马氏管响应 BmNPV 感染相关 miRNA 的初步研究[D]. 镇江:江苏科技大学,2013.
- [28] 桂顺华. 桔小实蝇 Tachykinin 和 Natalisin 信号系统的生理功能及其药靶潜力评估[D]. 重庆:西南大学,2017.
- [29] ZHAO X C, CHEN Q Y, GUO P, et al. Glomerular identification in the antennal lobe of the male moth *Helicoverpa armigera*[J]. *Journal of Comparative Neurology*, 2016, 524(15): 2993-3013.
- [30] 姚大彬. 外源 20-羟基蜕皮激素对洋虫的影响及其 *EcR* 和 *HR3* 基因的表达分析[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2013.
- [31] RIDDIFFORD L M, HIRUMA K, ZHOU X, et al. Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster*[J]. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 2003, 33(12): 1327-1338.

(责任编辑:张震林)