

陈晓, 吴焱锐, 李会琴, 等. 叉角厉蝽丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 *EfSPI8*、*EfSPI31* 的克隆与表达分析[J]. 江苏农业学报, 2026, 42(7): 1349-1359.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2026.07.006

叉角厉蝽丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 *EfSPI8*、*EfSPI31* 的克隆与表达分析

陈晓¹, 吴焱锐¹, 李会琴¹, 杨昌和¹, 陈岗², 马云昆³, 吴国星¹, 高熹¹

(1. 云南农业大学植物保护学院, 云南 昆明 650201; 2. 云南省烟草公司楚雄州公司, 云南 楚雄 675000; 3. 安宁市种植业服务中心, 云南 昆明 650303)

摘要: 丝氨酸蛋白酶抑制剂(SPI)参与昆虫凝血、免疫黑化及生长发育等关键生理过程的调控, 在昆虫免疫及宿主-病原体互作中发挥重要作用。本研究旨在克隆叉角厉蝽毒液丝氨酸蛋白酶抑制剂编码基因 *EfSPI8* 和 *EfSPI31*, 并分析其编码蛋白质的特性及表达模式。通过 PCR 成功克隆获得 *EfSPI8*、*EfSPI31* 的开放阅读框(ORF)序列, 长度分别为1 083 bp、2 793 bp, 分别编码 361 个、931 个氨基酸。生物信息学分析结果表明, *EfSPI8*、*EfSPI31* 蛋白的理论相对分子量分别为41 100、104 800, 两者 N 端分别含有长度为 30 aa、26 aa 的信号肽序列, 均属于分泌蛋白; *EfSPI8* 具有典型的丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族(Serpin)结构域及反应中心环(RCL), 属于 Serpin 超家族; *EfSPI31* 含有 3 对二硫键以稳定蛋白质结构, 属于 Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制剂家族。序列比对结果显示, *EfSPI8* 与茶翅蝽(*Halyomorpha halys*) Serpin 的同源性为 39.27%; *EfSPI31* 与稻绿蝽(*Nezara viridula*) Kazal 的同源性达 88.28%。实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)结果显示, *EfSPI8* 基因在叉角厉蝽 5 龄若虫、雄成虫、唾液腺主腺前叶及精巢中高表达, 推测其可能参与捕食相关免疫抑制及生殖调控; *EfSPI31* 基因在 4~5 龄叉角厉蝽若虫、精巢和脂肪体中高表达, 推测其可能与免疫、代谢储备和生殖系统发育相关。研究结果为阐明 2 种蛋白酶抑制剂在捕食性天敌昆虫中的多功能作用提供了分子基础。

关键词: 叉角厉蝽; 唾液腺; 丝氨酸蛋白酶抑制剂; 基因克隆; 表达模式

中图分类号: S476.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2026)07-1349-11

Cloning and expression analysis of serine protease inhibitor genes *EfSPI8* and *EfSPI31* in *Eocanthecona furcellata*

CHEN Xiao¹, WU Yankun¹, LI Huiqin¹, YANG Changhe¹, CHEN Gang², MA Yunkun³, WU Guoxing¹, GAO Xi¹

(1. College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. Chuxiong Prefecture Company, Yunnan Tobacco Company, Chuxiong 675000, China; 3. Anning Planting Industry Service Center, Kunming 650303, China)

收稿日期: 2025-11-25

基金项目: 云南省农业基础研究联合专项(202301BD070001-137); 云南省中青年学术和技术带头人后备人才项目(202205AC160077); 云南省烟草公司科技计划项目(2023530000241012)

作者简介: 陈晓(2001-), 女, 云南芒市人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫分子生物学与生物防治。(E-mail) 15108646682@163.com

通讯作者: 高熹, (E-mail) chonchon@163.com

Abstract: Serine protease inhibitors (SPIs) are involved in regulating key physiological processes in insects, such as coagulation, immune melanization, and growth and development, playing an important role in insect immunity and host-pathogen interactions. This study aimed to clone the venom serine protease inhibitor genes *EfSPI8* and *EfSPI31* from the predatory stink bug *Eocanthecona furcellata* and analyze the characteristics and ex-

pression patterns of their encoded proteins. The open reading frame (ORF) sequences of *EjSPI8* and *EjSPI31* were successfully cloned by PCR, with lengths of 1 083 bp and 2 793 bp, encoding 361 and 931 amino acids, respectively. Bioinformatic analysis revealed that the theoretical relative molecular masses of EfSPI8 and EfSPI31 were 41 100 and 104 800, respectively. Both proteins contained signal peptide sequences at their N-termini, with lengths of 30 and 26 amino acids, indicating that they were secretory proteins. EfSPI8 possessed a typical serine protease inhibitor superfamily (Serpín) domain and a reactive center loop (RCL), belonging to the Serpín superfamily. EfSPI31 contained three pairs of disulfide bonds that stabilized its protein structure, and belonged to the Kazal-type serine protease inhibitor family. Sequence alignment revealed that EfSPI8 shared 39.27% amino acid sequence identity with a Serpín from *Halyomorpha halys*, while EfSPI31 showed 88.28% identity with a Kazal-type protein from *Nezara viridula*. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) results showed that *EjSPI8* was highly expressed in fifth-instar nymphs, male adults, the anterior lobe of the main salivary gland, and testes, suggesting its potential involvement in prey-related immune suppression and reproductive regulation. *EjSPI31* was highly expressed in fourth- to fifth-instar nymphs, testes, and fat body, indicating possible roles in immunity, metabolic reserve, and reproductive system development. These findings provide a molecular basis for understanding the multifunctional roles of these two protease inhibitors in predatory natural enemy insects.

Key words: *Eocanthecona furcellata*; salivary gland; serine protease inhibitor; gene cloning; expression pattern

丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族(Serpín)是一类结构保守、功能多样的蛋白酶抑制剂超家族(Protease inhibitor superfamily),在维持生物体内稳态方面起着关键作用^[1]。多数 Serpín 作为丝氨酸蛋白酶的不可逆抑制剂,通过精确调控丝氨酸蛋白酶级联反应,广泛参与包括血液凝固、纤维蛋白溶解、免疫黑化及组织重建等众多生理过程。在昆虫中,Serpín 被视为免疫自发性调节与病原生物对宿主免疫调控的核心组分^[2]。当外源物侵入时,昆虫通过多种识别受体激活复杂的免疫信号通路,引发细胞与体液免疫应答^[3-4]。在此过程中,Serpín 通过负向调控关键丝氨酸蛋白酶,防止免疫反应的过度激活。例如,黄粉甲(*Tenebrio molitor*)中的丝氨酸蛋白酶抑制剂 SPN48 能调节 Spätzle 蛋白酶及其上游蛋白酶活性,参与 Toll 通路免疫信号的精确调控^[5]。此外,节肢动物中的一条重要免疫通路——酚氧化酶原激活系统,同样受到 Serpín 的严密调控。该系统通过丝氨酸蛋白酶级联反应,激活血淋巴中的酚氧化酶原,进而促进黑色素合成,以定位并标记受病原体或寄生虫入侵的组织损伤区域^[6]。例如,通过对烟草天蛾(*Manduca sexta*)的研究证实,*sepin-1J* 可以通过抑制酚氧化酶原激活蛋白酶,从而阻断黑化免疫反应^[7]。

捕食性蝽作为一类重要的有毒昆虫,其唾液腺分泌的毒液能够快速麻痹并裂解猎物组织,这类毒液成分复杂,通常由富含二硫键的多肽、生物活性磷脂、小分子化合物(如 *N,N*-二甲基苯胺、1,2,5-三噻吩烷等)及磷脂酶 A 等多种活性物质构成^[8-9]。目

前,对多种捕食性蝽的毒液成分进行分析发现,丝氨酸蛋白酶抑制剂普遍存在于其毒液中,提示丝氨酸蛋白酶抑制剂(SPI)可能是捕食性蝽毒液的关键功能组分之一,但是其具体生理功能仍有待深入解析^[10-13]。叉角厉蝽(*Eocanthecona furcellata*)是一种半翅目益蝽亚科的刺吸式捕食性天敌昆虫,该物种具有捕食范围广、捕食能力强、繁殖力高、环境适应性强等优势,对多种鳞翅目害虫展现出显著的生物防治潜力^[14-15]。基于前期的唾液腺转录组数据分析结果,叉角厉蝽 *EjSPI8*、*EjSPI31* 基因在唾液腺中的相对表达量较高,提示其可能作为毒液组分参与捕食生理过程。基于此,本研究通过克隆叉角厉蝽 *EjSPI8* 与 *EjSPI31* 基因的完整开放阅读框,用实时荧光定量 PCR 技术系统分析其不同发育阶段及不同组织中的表达特征,以期深入探究二者在捕食相关毒液功能中的作用机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试昆虫 叉角厉蝽采集于云南省玉溪市元江县,在人工气候条件[温度(27±1)℃,湿度60%~80%,光/暗周期14 h/10 h]下以黄粉虫蛹为饲料进行多代饲养,建立稳定的试验种群。

1.1.2 主要试剂 BGMG Fast RNAex Kit 通用型试剂盒,购自重庆葆光生物技术有限公司;PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser、TB Green® Premix Ex Taq™ II(Tli RnaseH Plus)、*Escherichia coli* DH5α 及

pMD™19-T 载体试剂盒,购自宝日医生物技术(北京)有限公司;PCR 扩增、胶回收及筛选所需异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷(X-Gal)、氨苄青霉素(Amp)等,购自北京擎科生物科技有限公司。

1.1.3 主要仪器 主要试验仪器包括:立体显微镜(型号:Olympus Stemi 2000-C),PCR 仪(型号:Biometra TAdvanced 96G),实时荧光定量 PCR 系统(型号:Eco48),凝胶成像系统(型号:GenoSens 1880),电泳仪(型号:DYY-8C),人工气候箱(型号:RXZ-300C),高速冷冻离心机(型号:HC-3018R),高压灭菌锅(型号:XFH-50MA)。

1.2 叉角厉蝽唾液腺总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

参照张曼等^[16]的方法剖取叉角厉蝽的唾液腺,参照 BGMG Fast RNAex Kit 说明书提取总 RNA,经 OD_{260}/OD_{280} 值(1.8~2.0)、琼脂糖凝胶电泳及基因组 DNA 污染检测验证质量后,用于后续试验。用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 合成 cDNA。将 cDNA 产物于-20℃冻存,用于后续试验。

1.3 *EfSPI8*、*EfSPI31* 基因的克隆与测序

基于前期获得的叉角厉蝽唾液腺 *EfSPI8*、*EfSPI31* 基因完整开放阅读框(ORF)序列^[17]。借助 Primer 5.0 和美国国家生物技术信息中心(NCBI)的 Primer-BLAST 设计引物(表 1),具体参照张曼等^[16]的方法并加以改进。以唾液腺 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 总反应体系为 25 μ L,其中包含 22 μ L 金牌 Mix(Green)、各 1 μ L 上游引物和下游引物(10 μ mol/L)、1 μ L cDNA 模板。PCR 扩增程序如下:98℃预变性 2 min;98℃变性 10 s,58℃退火 10 s,72℃延伸 10 s,共 40 个循环;72℃延伸 5 min,4℃保温。扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后,用胶回收试剂盒纯化目的片段,将纯化产物连接至 pMD19-T 载体上,通过热击转化至 DH5 α 感受态细胞。将转化菌涂布于含 IPTG、X-Gal 和 Amp 的 LB 平板上,于 37℃培养 12~16 h 后进行蓝白斑的筛选。挑取 20 个白斑菌落,经菌液 PCR 验证后进行测序分析。

1.4 *EfSPI8*、*EfSPI31* 基因生物信息学特征分析

测序结果用 DNASTAR SeqMan 拼接;用 BiOXM 验证序列的准确性;用 ESPript 3.0 进行多序列比对;用 SignalP 5.0 预测信号肽;用 ExPASy ProtParam 计算相对分子量、等电点及亲疏水性;用 NCBI CDD

识别结构域与功能位点;用 Cell-PLoc 2.0 预测亚细胞的定位;用 DeepTMHMM 分析跨膜结构;用 MEGA 11.0 的邻接法构建系统发育树,并通过自举法(Bootstrap)1 000 次重复检验评估节点的置信度。

1.5 *EfSPI8*、*EfSPI31* 基因时空表达特征分析

参照张曼等^[18]的方法,收集叉角厉蝽各发育阶段的样本(卵 50 粒;1~4 龄若虫唾液腺各 40 个;5 龄若虫及雌成虫、雄成虫唾液腺各 20 个)。分别收集 3 日龄雌成虫、雄成虫共 10 头,解剖获取以下组织:唾液腺主腺前叶、唾液腺主腺后叶、唾液腺副腺、脂肪体、卵巢、精巢、肠道,以及去除唾液腺、脂肪体和生殖器官后的残体,设 3 次生物学重复。样本用 TRIzol 保存后,参照方法 1.2 提取总 RNA 并合成 cDNA,用 TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RnaseH Plus)试剂盒进行 qPCR,以核糖体蛋白 *EfR-PL9* 为内参基因^[19],引物序列见表 1。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对表达量。

表 1 本研究所用引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

引物名称	引物序列	引物用途
<i>EfSPI8</i> -F	5'-AGGAATAACGACCGATGAACCG-3'	基因克隆
<i>EfSPI8</i> -R	5'-CACCATTACGCAAGCAGTAGCC-3'	
<i>EfSPI31</i> -F	5'-GAAGCGGAGGAAGAATACA-3'	
<i>EfSPI31</i> -R	5'-ACCACGACATACGACCTGA-3'	
RT- <i>EfSPI8</i> -F	5'-GGGTGCCGACTTCTCAGGAAT-3'	实时荧光定量 PCR
RT- <i>EfSPI8</i> -R	5'-GCCGCTTCAGTCCTTCTTCA-3'	
RT- <i>EfSPI31</i> -F	5'-TGGGCTGCGATGCGCTTGTCT-3'	
RT- <i>EfSPI31</i> -R	5'-GTGTGCTCTGCGTCTTGCTCAG-3'	
RT- <i>EfRPL9</i> -F	5'-TTCAACCGCAGCAAGTTCT-3'	
RT- <i>EfRPL9</i> -R	5'-GACGTTACGGCATTGGCAT-3'	

1.6 数据分析

用 Excel 2019 进行数据整理;用 DPS 软件进行单因素方差分析,比较不同处理间的表达差异,并通过 Duncan's 新复极差法进行多重比较;用 Graph-Pad Prism 9.5 完成图表的绘制。

2 结果与分析

2.1 *EfSPI8*、*EfSPI31* 基因的克隆与序列分析

从叉角厉蝽唾液腺中克隆获得丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 *EfSPI8*、*EfSPI31* 的开放阅读框,相应的编码

区长度分别为1 083 bp、2 793 bp,分别编码 361 个、931 个氨基酸。理化性质预测结果表明,EfSPI8、EfSPI31 均为亲水性蛋白质。EfSPI8、EfSPI31 基因编码蛋白质的 N 端分别有 30 个、26 个氨基酸残基的信号肽序列,预测二者均为分泌蛋白,它们在叉角厉蟀捕食过程中可能会随着唾液腺毒液一同注入猎物体内。

2.2 EfSPI8、EfSPI31 蛋白的理化性质分析

EfSPI8 蛋白的相对分子量为41 100,理论等电点(pI)为 5.33,不稳定指数为 33.25,表明其结构较为稳定。氨基酸组成分析结果显示,EfSPI8 含有 50

个带负电荷氨基酸残基[天冬氨酸/谷氨酸(Asp/Glu)]和 43 个带正电荷氨基酸残基[精氨酸/赖氨酸(Arg/Lys)],其脂肪族指数为 95.10%,总平均疏水性指数为-0.125,整体表现为弱亲水性特征。EfSPI31 蛋白的相对分子量为 104 800,等电点为 6.35,不稳定指数为 56.66;在氨基酸组成方面,该蛋白质含有 104 个负电荷氨基酸残基(Asp/Glu)和 93 个正电荷氨基酸残基(Arg/Lys);该蛋白质的脂肪族指数为 75.18%,总平均疏水性指数为-0.278,表明该蛋白质整体呈亲水性(表 2)。

表 2 叉角厉蟀唾液蛋白 EfSPI8、EfSPI31 的序列特征

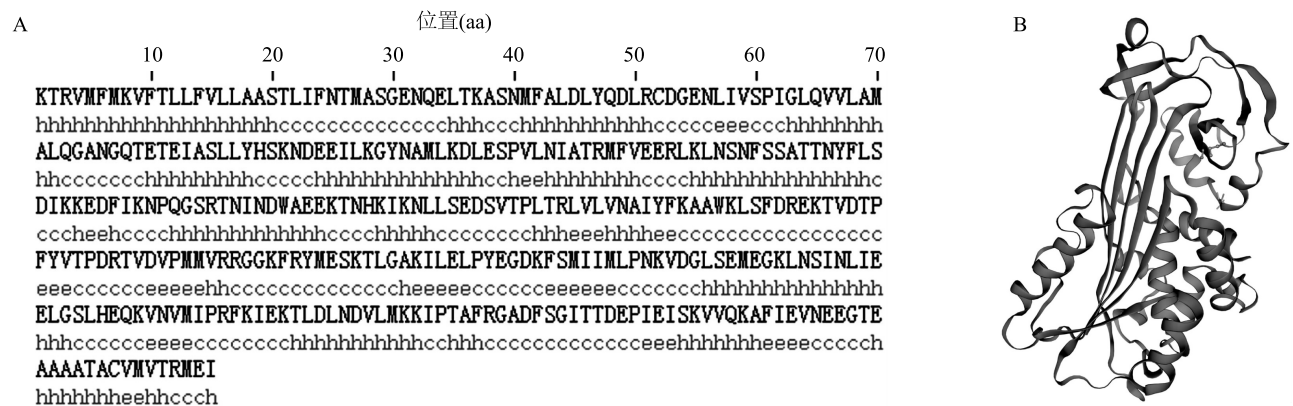
Table 2 Sequence characteristics of the salivary proteins EfSPI8 and EfSPI31 in *Eocanthecona furcellata*

蛋白质	相对分子量	等电点 (pI)	不稳定指数	平均疏水性 指数	跨膜结构域 数量(个)	亚细胞定位	脂肪族指数 (%)
EfSPI8	41 100	5.33	33.25	-0.125	1	胞外	95.10
EfSPI31	104 800	6.35	56.66	-0.278	0	胞外	75.18

2.3 EfSPI8、EfSPI31 蛋白的二级结构、三级结构预测

基于二级结构预测结果分析得出,叉角厉蟀的 EfSPI8 蛋白构象主要由 α -螺旋(占比 46.85%)、无

规则卷曲(占比 41.10%)和延伸链(占比 12.05%)组成(图 1A)。EfSPI8 蛋白的三级结构模拟结果显示,该蛋白质以 α -螺旋为空间构象的主要结构元件(图 1B)。



h: α -螺旋; c: 无规则卷曲; e: 延伸链; K: 赖氨酸; T: 苏氨酸; R: 精氨酸; V: 缬氨酸; M: 甲硫氨酸; F: 苯丙氨酸; W: 色氨酸; L: 亮氨酸; A: 丙氨酸; S: 丝氨酸; G: 甘氨酸; E: 谷氨酸; N: 天冬酰胺; Q: 谷氨酰胺; Y: 酪氨酸; D: 天冬氨酸; C: 半胱氨酸; H: 组氨酸; I: 异亮氨酸; P: 脯氨酸。

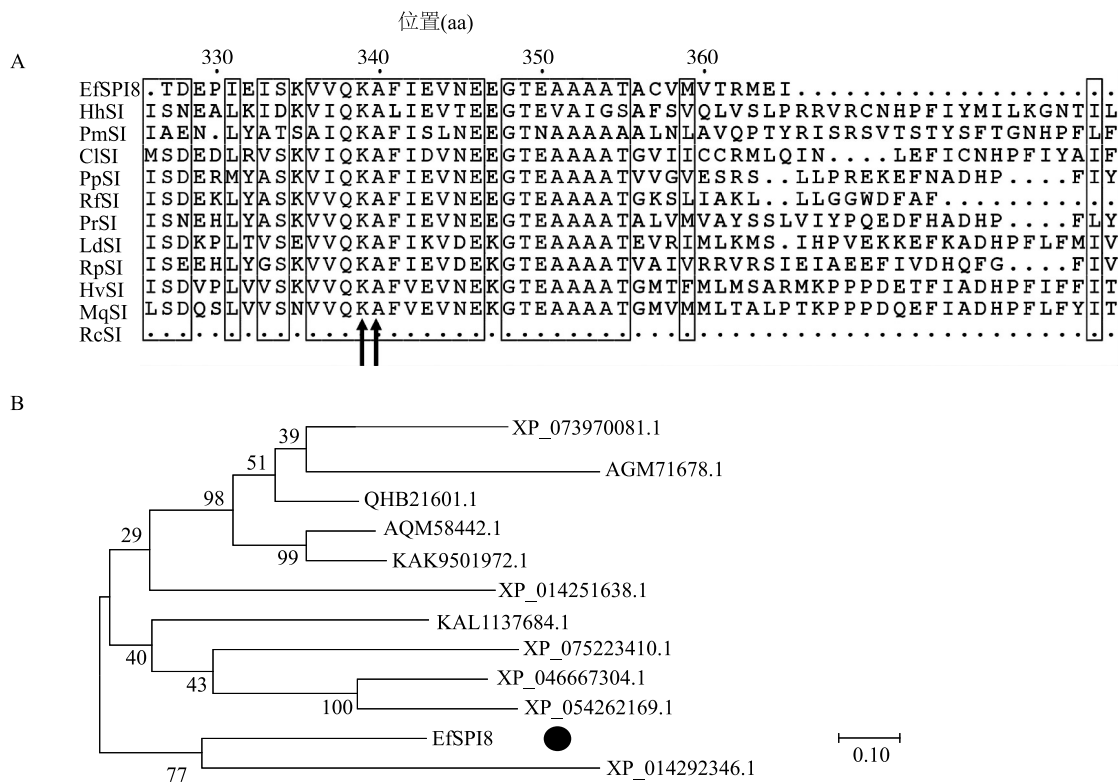
图 1 EfSPI8 蛋白的二级结构(A)和三级结构(B)预测结果

Fig.1 Predicted secondary (A) and tertiary (B) structures of EfSPI8 protein

根据叉角厉蟀 EfSPI31 蛋白的二级结构预测分析结果(图 2A),其构象成分包括 α -螺旋(占比 21.15%)、无规则卷曲(占比 72.26%)及延伸链(占比 6.59%)。叉角厉蟀 EfSPI31 蛋白的三级结构模拟结果(图 2B)进一步表明,该蛋白质在空间上呈现出以无规则卷曲为主导的结构特征。

2.4 EfSPI8、EfSPI31 的系统进化树分析

结构域分析结果显示,EfSPI8 的氨基酸序列包含 1 个完整的 Serpin 结构域及其反应中心环(RCL),符合丝氨酸蛋白酶抑制剂 Serpin 家族的典型特征。对于典型的 Serpin 而言,其 RCL 通常位于蛋白质序列 C 末端之前约 30~40 个氨基酸的区域。



E: 谷氨酸; F: 苯丙氨酸; S: 丝氨酸; P: 脯氨酸; I: 异亮氨酸; T: 苏氨酸; D: 天冬氨酸; K: 赖氨酸; V: 缬氨酸; Q: 谷氨酰胺; A: 丙氨酸; G: 甘氨酸; C: 半胱氨酸; M: 甲硫氨酸; R: 精氨酸; H: 组氨酸; N: 天冬酰胺; L: 亮氨酸; Y: 酪氨酸; W: 色氨酸。EfSPI8 对应物种为叉角厉蝽 (*Eocanthecona furcellata*); HhSI 对应物种为茶翅蝽 (*Halyomorpha halys*), 登录号: XP_014292346.1; PmSI 对应物种为大锥蝽 (*Panstrongylus megistus*), 登录号: AGM71678.1; ClSI 对应物种为温带臭虫 (*Cimex lectularius*), 登录号: XP_014251638.1; PpSI 对应物种为食蜂猎蝽 (*Pristhesancus plagipennis*), 登录号: AQM58442.1; RfSI 对应物种为红彩瑞猎蝽 (*Rhynocoris fuscipes*), 登录号: KAK9501972.1; PrSI 对应物种为红斑猎蝽 (*Pristhesancus rhadamanthus*), 登录号: QHB21601.1; LdSI 对应物种为斑衣蜡蝉 (*Lycorma delicatula*), 登录号: XP_075223410.1; RpSI 对应物种为长红锥蝽 (*Rhodnius prolixus*), 登录号: XP_073970081.1; HvSI 对应物种为褐翅透尖叶蝉 (*Homalodisca vitripennis*), 登录号: XP_046667304.1; MqSI 对应物种为紫苑叶蝉 (*Macrosteles quadrilineatus*), 登录号: XP_054262169.1; RcSI 对应物种为中华螳螂蝽 (*Ranatra chinensis*), 登录号: KAL1137684.1。黑色圆圈标注的为目标蛋白质, 左侧箭头表示 P1 位点, 右侧箭头表示 P1' 位点。

图 3 叉角厉蝽 EfSPI8 的多序列比对结果 (A) 与系统发育树 (B)

Fig.3 Multiple sequence alignment (A) and phylogenetic tree analysis (B) of *Eocanthecona furcellata* EfSPI8

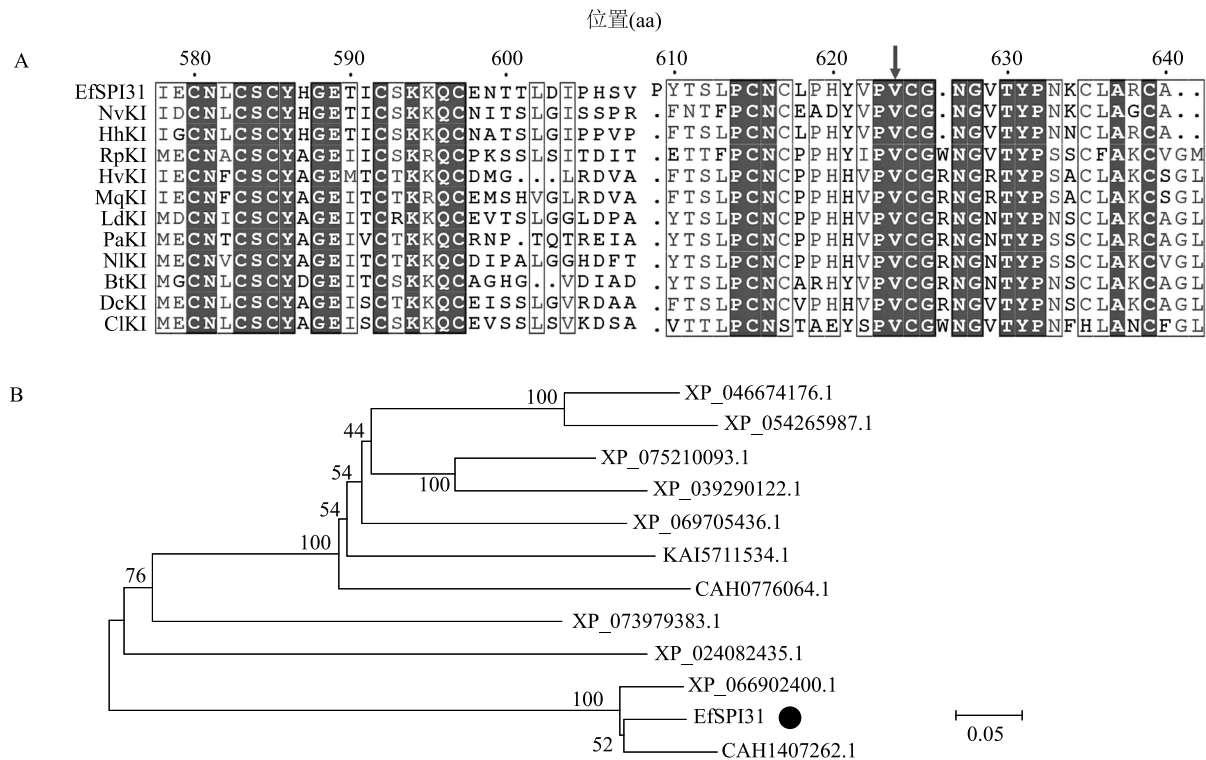
在相对较高水平。

由图 5B 可以看出, 叉角厉蝽成虫组织中的 *EfSPI8* 表现出高度的组织表达特异性。在唾液腺主腺前叶和精巢中, *EfSPI8* 的相对表达水平较高。相比之下, 在唾液腺主腺后叶、卵巢和肠道等组织中, *EfSPI8* 的相对表达量较低。

由图 6 可以看出, *EfSPI31* 在叉角厉蝽 4~5 龄若虫中的相对表达量显著高于其他发育阶段 ($P < 0.05$), 在卵期几乎不表达。RT-qPCR 分析结果显示, *EfSPI31* 在叉角厉蝽不同发育阶段和不同组织中的相对表达量存在显著差异。其中, 精巢、脂肪体中的相对表达量显著高于其他组织 ($P < 0.05$)。此

外还可以看出, *EfSPI31* 具有明显的发育阶段特异性、组织特异性, 提示该基因在叉角厉蝽的生长发育及生理功能中发挥重要作用。

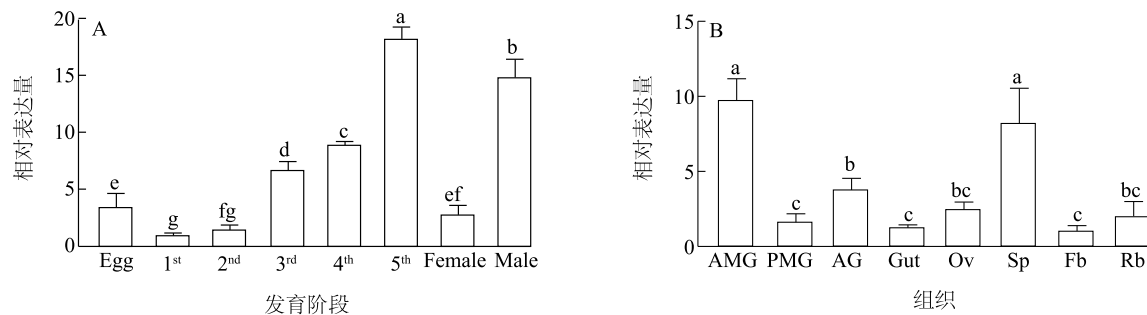
如图 6A 所示, *EfSPI31* 的相对表达量在叉角厉蝽整个发育阶段呈现动态变化, 其相对表达量的高峰出现在 4~5 龄若虫期。在卵期及低龄若虫期 (1~2 龄), *EfSPI31* 的相对表达量较低; 从 3 龄若虫期开始, 其相对表达量显著上升, 并在 5 龄若虫期达到峰值 ($P < 0.05$); 进入成虫期后, *EfSPI31* 的相对表达水平相较于 5 龄若虫有明显回落, 但仍维持在较高水平。对成虫组织中 *EfSPI31* 相对表达量的分析发现, *EfSPI31* 表现出组织表达特异性 (图 6B)。



I: 异亮氨酸; E: 谷氨酸; C: 半胱氨酸; N: 天冬酰胺; L: 亮氨酸; S: 丝氨酸; Y: 酪氨酸; H: 组氨酸; G: 甘氨酸; T: 苏氨酸; K: 赖氨酸; Q: 谷氨酰胺; R: 精氨酸; P: 脯氨酸; V: 缬氨酸; A: 丙氨酸; D: 天冬氨酸; F: 苯丙氨酸; W: 色氨酸; M: 甲硫氨酸。EfSPI31 对应物种为叉角厉蝽 (*Eocanthecona furcellata*); NvKI 对应物种为稻绿蝽 (*Nezara viridula*), 登录号: CAH1407262.1; HhKI 对应物种为茶翅蝽 (*Halyomorpha halys*), 登录号: XP_066902400.1; RpKI 对应物种为长红锥蝽 (*Rhodnius prolixus*), 登录号: XP_073979383.1; HvKI 对应物种为褐透翅尖叶蝉 (*Homalodisca vitripennis*), 登录号: XP_046674176.1; MqKI 对应物种为紫菀叶蝉 (*Macrostelus quadrilineatus*), 登录号: XP_054265987.1; LdKI 对应物种为斑衣蜡蝉 (*Lycorma delicatula*), 登录号: XP_075210093.1; PaKI 对应物种为美洲大蠊 (*Periplaneta americana*), 登录号: XP_069705436.1; NIKI 对应物种为褐飞虱 (*Nilaparvata lugens*), 登录号: XP_039290122.1; BtKI 对应物种为烟粉虱 (*Bemisia tabaci*), 登录号: CAH0776064.1; DeKI 对应物种为柑橘木虱 (*Diaphorina citri*), 登录号: KAI5711534.1; CIKI 对应物种为温带臭虫 (*Cimex lectularius*), 登录号: XP_024082435.1。黑色圆圈标注为目标蛋白质, 灰色箭头表示 P1 位点。

图 4 叉角厉蝽 EfSPI31 的多序列比对结果 (A) 与系统发育树 (B)

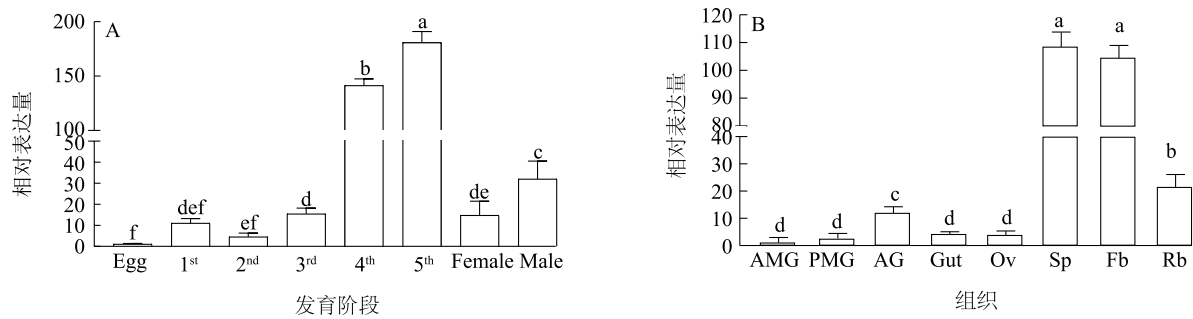
Fig.4 Multiple sequence alignment (A) and phylogenetic tree analysis (B) of *Eocanthecona furcellata* EfSPI31



Egg: 卵; 1st: 1 龄若虫; 2nd: 2 龄若虫; 3rd: 3 龄若虫; 4th: 4 龄若虫; 5th: 5 龄若虫; Female: 雌成虫; Male: 雄成虫; AMG: 唾液腺主腺前叶; PMG: 唾液腺主腺后叶; AG: 唾液腺副腺; Gut: 肠道; Ov: 卵巢; Sp: 精巢; Fb: 脂肪体; Rb: 去除毒液器官、肠道、生殖器官和脂肪体后的残体。数据为平均值±标准差, 不同字母表示组间存在显著差异 ($P < 0.05$)。

图 5 *EfSPI8* 基因在叉角厉蝽不同发育阶段 (A) 和组织 (B) 中的表达水平

Fig.5 *EfSPI8* expression profiles across developmental stages (A) and tissues (B) in *Eocanthecona furcellata*



Egg: 卵; 1st: 1 龄若虫; 2nd: 2 龄若虫; 3rd: 3 龄若虫; 4th: 4 龄若虫; 5th: 5 龄若虫; Female: 雌成虫; Male: 雄成虫; AMG: 唾液腺主腺前叶; PMG: 唾液腺主腺后叶; AG: 唾液腺副腺; Gut: 肠道; Ov: 卵巢; Sp: 精巢; Fb: 脂肪体; Rb: 去除毒液器官、肠道、生殖器官和脂肪体后的残体。数据为平均值±标准差, 不同字母表示组间存在显著差异 ($P < 0.05$)。

图 6 *EfSPI31* 基因在叉角厉蝽不同发育阶段 (A) 和组织 (B) 中的表达水平

Fig.6 *EfSPI31* expression profiles across developmental stages (A) and tissues (B) in *Eocanthecona furcellata*

3 讨论与结论

本研究基于叉角厉蝽唾液腺转录组数据^[17], 成功克隆获得了丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 *EfSPI8* 的完整开放阅读框序列。结构域预测结果显示, *EfSPI8* 氨基酸序列含有 Serpin 保守结构域, 属于 Serpin 家族成员。尽管昆虫 *Serpin* 基因普遍存在可变剪切现象^[20], 但是本研究通过对选取的 12 个半翅目昆虫 *Serpin* 蛋白序列的比对, 未发现 *EfSPI8* 存在可变剪切形式。Serpin 蛋白的关键结构特征是其 C 端反应中心环 (RCL), 其中 P1 位的氨基酸残基决定了其对靶蛋白酶的特异性识别能力^[2], *EfSPI8* 的 P1 位为赖氨酸 (K), 可被胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶特异性识别、剪切。具有类似 P1 位点的 Serpin 已被报道参与调控昆虫免疫反应, 包括酚氧化酶原 (PPO) 的激活及抗菌肽合成等过程^[21-22]。例如, 在家蚕中, *BmSerpin-15* 的相对表达在受到白僵菌、藤黄微球菌感染后上调, 负向调控 PPO 激活途径及抗菌肽的诱导表达^[23]; 而 *BmSerpin-5* 则通过抑制 PPO 的蛋白水解得到激活, 阻断黑化反应, 并负调控抗菌肽的表达, 其机制可能涉及对血淋巴中 *BmHP6* 或 *BmSP21* 活性的直接抑制^[24]。关于 *EfSPI8* 是否具备类似免疫调控的功能, 尚需进一步试验验证。

典型的 Kazal 结构域在空间上由 2 个 α -螺旋、3 个反向平行的 β -折叠构成一个刚性框架, 决定其底物特异性的关键 P1 残基则位于一段灵活的无规则卷曲区域^[25-26]。已有研究证实, P1 位点 (通常位于第 2 个保守半胱氨酸后的第 2 个氨基酸) 的组成与

抑制靶标之间存在明确的对应关系: 精氨酸 (R) 或赖氨酸 (K) 通常抑制胰蛋白酶; 苯丙氨酸 (F)、酪氨酸 (Y) 等疏水残基倾向于抑制胰凝乳蛋白酶; 丙氨酸 (A)、缬氨酸 (V) 或甘氨酸 (G) 通常对弹性蛋白酶的抑制能力较强^[27-29]。本研究从叉角厉蝽中鉴定到一个含有完整 Kazal 结构域的丝氨酸蛋白酶抑制剂 *EfSPI31*, 该蛋白质具备典型的 6 个保守半胱氨酸残基, 可形成 3 对二硫键以稳定其空间结构。尤为关键的是, 序列分析结果显示, 该蛋白质的 P1 位点为缬氨酸 (V), 据此推测 *EfSPI31* 可能是一种弹性蛋白酶特异性抑制剂。这一推测与已知的 Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制剂 (KSPI) 在昆虫中的多种生理功能高度契合。Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制剂是一类含有特征性 Kazal 结构域的蛋白质家族, 大量研究发现, KSPI 是昆虫免疫防御的核心组分^[30]。例如, 丽蝇蛹集金小蜂 (*Nasonia vitripennis*) 的 *NvKSPI-1*、*NvKSPI-2* 能够抑制宿主血淋巴中酚氧化酶原的激活^[31]; 埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*)、长红锥蝽 (*Rhodnius prolixus*) 等吸血昆虫则利用 KSPI 作为抗凝血剂, 有效中和胰蛋白酶、凝血酶等多种蛋白酶活性^[32-33]。值得注意的是, 具有弹性蛋白酶抑制活性的 KSPI 的功能并不仅限于免疫。在沙漠蝗虫 (*Schistocerca gregaria*) 中, 源自卵巢腺的 KSPI (Greglin) 通过可逆地抑制弹性蛋白酶、胰凝乳蛋白酶, 保护卵黄前体免于水解, 从而调控卵黄发生与卵母细胞成熟^[34]。类似的, 罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 的 Kazal 型抑制剂 MrPink 通过靶向胰凝乳蛋白酶, 参与调控精子的明胶溶解活性, 影响雄性

生殖过程^[35]。结合同类 KSPI 的已知功能,我们推测 *EjSPI31* 在叉角厉蝽中既可能参与免疫应答,调控如黑化反应等生理过程,又可能在生殖发育过程中扮演特定角色,类似 Greglin、MrPink 的功能模式^[36]。当然,*EjSPI31* 是否有这些功能后续仍需通过重组蛋白质表达、酶活性抑制试验及体内基因功能验证来最终确认。

表达谱分析结果显示,*EjSPI8*、*EjSPI31* 均呈现明显的发育阶段特异性,二者均在 5 龄若虫期的相对表达量最高,暗示这 2 个丝氨酸蛋白酶抑制剂基因均与叉角厉蝽若虫阶段旺盛的捕食行为、剧烈的发育转变密切相关。叉角厉蝽 1 龄若虫取食植物汁液,自 2 龄起逐渐转为捕食型,且随龄期的增长,其捕食能力不断增强^[37-38]。5 龄若虫期作为羽化前的关键发育阶段,需要储备充足物质与能量以完成形态重塑,此时高表达的 Serpin 可能通过调控蛋白酶水解活性,保护机体组织免受过度降解,进而保障变态发育的顺利进行^[39]。此外,高水平毒液相关蛋白质的表达也有助于提升若虫的捕食效率与防御能力^[40]。

在组织表达模式上,2 个基因呈现明显分化,表明其功能可能出现了分工。其中,*EjSPI8* 在毒腺系统中具有区域特异性表达模式,在唾液腺主腺前叶、主腺后叶和副腺中的相对表达水平存在差异。前期研究指出,捕食性蝽类不同毒腺部位分泌的毒液在生理功能上可能有明确分工,如白斑猎蝽(*Platyeris biguttatus*)主腺前叶分泌的毒液主要用于麻痹猎物,主腺后叶分泌的毒液则表现出杀虫活性,而副腺分泌的毒液并不直接参与捕食过程^[41]。由黄带犀猎蝽主腺后叶分泌的毒液能够有效消化猎物组织,由副腺分泌的毒液表现出较高的杀虫活性,由主腺后叶分泌的毒液对酚氧化酶有较好的抑制能力^[13]。因此推测,*EjSPI8* 作为毒液组分,可能在捕食、毒液功能分化中发挥重要作用。此外,*EjSPI8* 在精巢中也表现为高表达,暗示其可能参与生殖过程。已有研究发现,Serpin 家族成员参与生殖与胚胎发育调控,例如果蝇(*Drosophila melanogaster*) *Spn27A* 通过抑制 Easter 蛋白酶参与 Toll 信号通路,调控胚胎背腹轴的形成,其缺失会导致胚胎腹侧化^[42]; *Spn76A* 作为昆虫精液中首个被鉴定的蛋白质,在昆虫交配后被转移至雌虫体内并迅速降解,可能参与受精后的生理调控^[43-44]。这些发现为深入解析 *EjSPI8* 在

叉角厉蝽生殖发育中的潜在功能提供了线索。

与 *EjSPI8* 不同,*EjSPI31* 并未表现出明显的毒腺特异性,主要在精巢、脂肪体中高表达,提示其功能更偏向于免疫与生殖调控。*EjSPI31* 在精巢中的高表达,提示其参与雄性生殖过程,这一发现与多种昆虫中的研究结果一致。例如,在黑腹果蝇中,*Spn28F*、*Spn38F*、*Spn53F*、*Spn75F* 和 *Spn77Bc* 都在其雄性附腺中特异性表达,并在交配后转移至雌虫体内,被认为可能参与调控精子活力以及雌虫受精后的生理响应^[45-47]。类似地,在冈比亚按蚊(*Anopheles gambiae*)、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)与白纹伊蚊(*Aedes albopictus*)中,丝氨酸蛋白酶抑制剂(SPI)已被鉴定为精液的关键组分,并在雄性生殖系统中高表达^[48-50]。上述研究结果表明,SPI 在雄性昆虫生殖中可能具有保守功能。同时,脂肪体是昆虫合成免疫效应分子的核心器官,而 SPI 作为先天免疫的关键调节因子,可以通过直接抑制病原体蛋白酶或精细调控内源性丝氨酸蛋白酶级联反应(如黑化反应与抗菌肽合成通路),从而介导免疫防御^[51-52]。月形天蚕蛾(*Actias selene*) Kazal 型 SPI(AsKSPI)在脂肪体中特异性表达,并可通过抑制酚氧化酶原(PPO)的激活来负向调控黑化反应,从而调节宿主的先天免疫^[53]。据此推测,*EjSPI31* 在叉角厉蝽中可能参与雄性生殖过程的调控,也可能通过抑制黑化反应或抗菌肽通路,在系统性免疫防御中发挥作用。但是这些功能的确立,有赖于后续通过 RNA 干扰、重组蛋白功能分析等试验进行深入验证。

参考文献:

- [1] Silverman G A, Bird P I, Carrell R W, et al. The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins [J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276 (36): 33293-33296.
- [2] Irving J A, Pike R N, Lesk A M, et al. Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function [J]. Genome Research, 2000, 10 (12): 1845-1864.
- [3] Lu Y Z, Su F H, Li Q L, et al. Pattern recognition receptors in *Drosophila* immune responses [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2020, 102: 103468.
- [4] Hillyer J F. Insect immunology and hematopoiesis [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2016, 58: 102-118.
- [5] Park S H, Jiang R, Piao S F, et al. Structural and functional characterization of a highly specific serpin in the insect innate im-

- munity[J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(2): 1567-1575.
- [6] Amparyup P, Charoensapsri W, Tassanakajon A. Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 34(4): 990-1001.
- [7] Jiang H B, Wang Y, Yu X Q, et al. Prophenoloxidase-activating proteinase-3 (PAP-3) from *Manduca sexta* hemolymph: a clip-domain serine proteinase regulated by serpin-1J and serine proteinase homologs[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2003, 33(10): 1049-1060.
- [8] Walker A A, Robinson S D, Undheim E A B, et al. Missiles of mass disruption: composition and glandular origin of venom used as a projectile defensive weapon by the assassin bug *Platymeris rhadamanthus*[J]. Toxins, 2019, 11(11): 673.
- [9] Schwartz E F, Mourão C B F, Moreira K G, et al. Arthropod venoms: a vast arsenal of insecticidal neuropeptides[J]. Peptide Science, 2012, 98(4): 385-405.
- [10] Walker A A, Hernández-Vargas M J, Corzo G, et al. Giant fish-killing water bug reveals ancient and dynamic venom evolution in Heteroptera[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2018, 75(17): 3215-3229.
- [11] Walker A A, Mayhew M L, Jin J Y, et al. The assassin bug *Pristhesancus plagipennis* produces two distinct venoms in separate gland lumens[J]. Nature Communications, 2018, 9: 755.
- [12] Fischer M L, Wielsch N, Heckel D G, et al. Context-dependent venom deployment and protein composition in two assassin bugs[J]. Ecology and Evolution, 2020, 10(18): 9932-9947.
- [13] Wu C Y, Li L, Wang Y Q, et al. Morphological, functional, compositional and transcriptional constraints shape the distinct venom profiles of the assassin bug *Sycanus croceovittatus*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 250: 126162.
- [14] 陈雪梅, 谷星慧, 洗继东, 等. 叉角厉蝽对烟草上斜纹夜蛾搜索效率影响因子的研究[J]. 环境昆虫学报, 2021, 43(1): 224-232.
- [15] Vanitha K, Raviprasad T N, Shwetha V. Life cycle of *Eocanthecona furcellata* Wolff (Hemiptera: Pentatomidae) a predatory bug in cashew plantations, upon rearing on wax moth larvae[J]. Journal of Entomology and Zoology Studies, 2018, 6(2): 3007-3010.
- [16] 张曼, 高平, 陈晓, 等. 叉角厉蝽丝氨酸蛋白酶及抑制剂基因的克隆与表达分析[J]. 环境昆虫学报, 2024, 46(3): 659-669.
- [17] 高平, 廖贤斌, 李丽芳, 等. 叉角厉蝽唾液腺转录组及差异分析[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2021, 36(1): 29-38.
- [18] 张曼, 刘炳顺, 陈晓, 等. 叉角厉蝽毒液丝氨酸蛋白酶基因 *E/SP2* 克隆、表达及捕食功能分析[J]. 南方农业学报, 2024, 55(2): 489-498.
- [19] 张曼. 叉角厉蝽丝氨酸蛋白酶 *E/SP1* 与 *E/SP2* 及抑制剂 *E/SP120* 基因功能研究[D]. 昆明: 云南农业大学, 2024.
- [20] Yan Z C, Fang Q, Liu Y, et al. A venom serpin splicing isoform of the endoparasitoid wasp *Pteromalus puparum* suppresses host prophenoloxidase cascade by forming complexes with host hemolymph proteinases[J]. Journal of Biological Chemistry, 2017, 292(3): 1038-1051.
- [21] 赵爱平. 梨小食心虫幼虫中肠胰蛋白酶活性、表达量及与生长发育的关系研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- [22] 朱艳娟, 殷焱芳, 王震, 等. 饲养温度对蠋蛾胰蛋白酶活性的影响及消化器官形态初步观察[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(3): 767-773.
- [23] 刘栋然. 家蚕 *Bmserpin-15* 的功能初探与分析[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2015.
- [24] Liu D R, Wang L, Yang L, et al. Serpin-15 from *Bombyx mori* inhibits prophenoloxidase activation and expression of antimicrobial peptides[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2015, 51(1): 22-28.
- [25] Stubbs M T, Morenweiser R, Stürzebecher J, et al. The three-dimensional structure of recombinant leech-derived tryptase inhibitor in complex with trypsin[J]. Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(32): 19931-19937.
- [26] 安玲娜. Kazal 型蛋白酶抑制剂 *BmSPI65* 参与家蚕细胞免疫的功能研究[D]. 重庆: 西南大学, 2020.
- [27] Zhao P, Dong Z M, Duan J, et al. Genome-wide identification and immune response analysis of serine protease inhibitor genes in the silkworm, *Bombyx mori*[J]. PLoS One, 2012, 7(2): e31168.
- [28] Gulley M M, Zhang X, Michel K. The roles of serpins in mosquito immunology and physiology[J]. Journal of Insect Physiology, 2013, 59(2): 138-147.
- [29] 梁文凯, 刘莎, 王玉琴, 等. 蠋蛾丝氨酸蛋白酶抑制剂基因鉴定及其表达特征分析[J]. 环境昆虫学报, 2024, 46(3): 641-649.
- [30] Rimphanitchayakit V, Tassanakajon A. Structure and function of invertebrate Kazal-type serine proteinase inhibitors[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2010, 34(4): 377-386.
- [31] Qian C, Fang Q, Wang L, et al. Molecular cloning and functional studies of two kazal-type serine protease inhibitors specifically expressed by *Nasonia vitripennis* venom apparatus[J]. Toxins, 2015, 7(8): 2888-2905.
- [32] Watanabe R M O, Soares T S, Morais-Zani K, et al. A novel trypsin Kazal-type inhibitor from *Aedes aegypti* with thrombin coagulant inhibitory activity[J]. Biochimie, 2010, 92(8): 933-939.
- [33] Shakeel M, Xu X X, De Mandal S, et al. Role of serine protease inhibitors in insect-host-pathogen interactions[J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2019, 102(3): e21556.
- [34] Guo W, Wu Z X, Yang L B, et al. Juvenile hormone-dependent Kazal-type serine protease inhibitor Greglin safeguards insect vitellogenesis and egg production[J]. The FASEB Journal, 2019, 33(1): 917-927.
- [35] Li Y, Qian Y Q, Ma W M, et al. Inhibition mechanism and the effects of structure on activity of male reproduction-related peptidase inhibitor kazal-type (MRPINK) of *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Marine Biotechnology, 2009, 11(2): 252-259.

- [36] Kong X W, Guo X R, Lin J, et al. Transcriptomic analysis of the gonads of *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae) following infection with *Paranosema locustae* [J]. Bulletin of Entomological Research, 2024, 114(6): 763-775.
- [37] 姚明勇, 王 岚, 周 吕, 等. 性比对叉角厉蝽成虫寿命和繁殖力的影响[J]. 山地农业生物学报, 2019, 38(3): 78-81.
- [38] 张 曼, 高 平, 赵 航, 等. 捕食性天敌叉角厉蝽生长发育、繁殖及各虫态形态特征观察[J]. 南方农业学报, 2022, 53(4): 1078-1087.
- [39] Yang W, Huang M D, Jiang L. Advancements in serine protease inhibitors: from mechanistic insights to clinical applications [J]. Catalysts, 2024, 14(11): 787.
- [40] Wen J, Chen K W, Fu L, et al. Exposure of *Eocanthecona furcellata* (Hemiptera: Pentatomidae) nymphs and adults to high temperatures induces an aestivo-hibernal egg diapause: a strategy for surviving hot summers [J]. Applied Entomology and Zoology, 2017, 52(3): 457-467.
- [41] Gao F D, Tian L, Li X Y, et al. Proteotranscriptomic analysis and toxicity assay suggest the functional distinction between venom gland chambers in twin-spotted assassin bug, *Platymeris biguttatus* [J]. Biology, 2022, 11(3): 464.
- [42] Nappi A J, Frey F, Carton Y. *Drosophila* serpin 27A is a likely target for immune suppression of the blood cell-mediated melanotic encapsulation response [J]. Journal of Insect Physiology, 2005, 51(2): 197-205.
- [43] Meekins D A, Kanost M R, Michel K. Serpins in arthropod biology [J]. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2017, 62: 105-119.
- [44] 陈 俊. 丝氨酸蛋白酶抑制剂 LmSPN2 调控蝗卵滞育研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2021.
- [45] LaFlamme B A, Ram K R, Wolfner M F. The *Drosophila melanogaster* seminal fluid protease "seminase" regulates proteolytic and post-mating reproductive processes [J]. PLoS Genetics, 2012, 8(1): e1002435.
- [46] Garrett M, Fullaondo A, Troxler L, et al. Identification and analysis of serpin-family genes by homology and synteny across the 12 sequenced Drosophilid genomes [J]. BMC Genomics, 2009, 10(1): 489.
- [47] Mueller J L, Ripoll D R, Aquadro C F, et al. Comparative structural modeling and inference of conserved protein classes in *Drosophila* seminal fluid [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(37): 13542-13547.
- [48] Dottorini T, Nicolaides L, Ranson H, et al. A genome-wide analysis in *Anopheles gambiae* mosquitoes reveals 46 male accessory gland genes, possible modulators of female behavior [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(41): 16215-16220.
- [49] Sirot L K, Poulson R L, McKenna M C, et al. Identity and transfer of male reproductive gland proteins of the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*: potential tools for control of female feeding and reproduction [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2008, 38(2): 176-189.
- [50] Boes K E, Ribeiro J M C, Wong A, et al. Identification and characterization of seminal fluid proteins in the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus* [J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2014, 8(6): e2946.
- [51] Yang F, Wang Y, Sumathipala N, et al. *Manduca sexta* serpin-12 controls the prophenoloxidase activation system in larval hemolymph [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2018, 99: 27-36.
- [52] Dudzic J P, Hanson M A, Iatsenko I, et al. More than black or white: melanization and toll share regulatory serine proteases in *Drosophila* [J]. Cell Reports, 2019, 27(4): 1050-1061.
- [53] Wang N, Xie F J, Liu Y, et al. A Kazal-type serine protease inhibitor mediates innate immunity in wild silkworm *Actias selene* Hübner [J]. Journal of Biosciences, 2022, 47(2): 34.

(责任编辑: 徐 艳)