

# 棉铃虫幼虫唾液腺 cDNA 文库的构建及 EST 分析

张 帅, 崔金杰\*, 王春义, 雒珺瑜, 吕丽敏  
(中国农业科学院棉花研究所, 棉花生物学国家重点实验室, 河南安阳 455000)

**摘要:** 棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 幼虫唾液中的各种酶类及各种生化组分在棉铃虫与植物相互作用及协同进化中起到重要作用; 唾液腺是棉铃虫唾液成分的合成器官。本研究通过构建棉铃虫幼虫唾液腺全长 cDNA 文库, 测序得到 1 502 条 EST 序列, 聚类分析后获得 821 个 unigenes, 为筛选棉铃虫与寄主互作信号因子提供基因信息资源。使用 Blast2 GO 软件对 821 个 unigenes 进行了比对和功能注释, 初步获得棉铃虫幼虫唾液腺中 mRNA 的构成特征。结果显示, 在棉铃虫唾液腺 ESTs 文库中, 鉴定得到脂类相关消化酶基因 17 个, 糖类相关消化酶基因 5 个, 半胱氨酸蛋白酶基因 1 个, 丝氨酸蛋白酶基因 20 个(其中 16 个为新发现), 提示唾液腺的主要功能是分泌消化酶进行预消化; 还发现在棉铃虫幼虫唾液腺中存在表皮蛋白、气味结合蛋白和化学感受蛋白基因。结果为研究棉铃虫预消化系统打下基础。

**关键词:** 棉铃虫; 唾液腺; cDNA 文库; 消化酶; 表达谱; EST 分析

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2012)06-0625-09

## cDNA library construction and EST analysis of larval salivary glands of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)

ZHANG Shuai, CUI Jin-Jie\*, WANG Chun-Yi, LUO Jun-Yu, LÜ Li-Min (State Key Laboratory of Cotton Biology, Cotton Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Anyang, Henan 455000, China)

**Abstract:** *Helicoverpa armigera* (Hübner) saliva play important roles in insect-host plant interactions. In this study we constructed a cDNA library of salivary glands of *H. armigera* larvae where saliva is secreted. We randomly sequenced 1 501 expressed sequence tags (ESTs), and clustering resulted in a total of 821 unigenes. Blast2 GO program was used to do BLASTx, functional annotation and metabolism analysis. Finally, we classified mRNAs in salivary glands of *H. armigera* larvae. By annotation of these ESTs, genes encoding 17 enzymes for digestion of fat, 5 enzymes for digestion of carbohydrates, and 20 serine proteases (of which 16 are newly reported) were identified, suggesting that the function of salivary glands is secreting saliva for predigestion. The cuticle protein, odorant-binding protein and chemosensory protein genes were identified in salivary glands of *H. armigera* larvae for the first time. The results will lay a foundation for studying predigestion system in *H. armigera*.

**Key words:** *Helicoverpa armigera*; salivary glands; cDNA library; digestive enzymes; expression profile; EST analysis

在昆虫与植物长期的协同进化过程中, 它们之间的信息交流途径也随之发展。在昆虫取食寄主植物时常常会口器中充满或分泌唾液, 各种昆虫唾液成分由于进化而千差万别, 而这种差异也正是植物识别昆虫的有效途径。一方面植食性昆虫为了有效获得营养、对付食物中的有毒成分、以及开拓新的食物资源等, 唾液成分进行相应的调整, 唾液成分必然在各个类群之间各不相同, 甚至同种的不同种

群间也有一定差异(殷海娣等, 2006); 另一方面植物根据昆虫的唾液成分判断昆虫种类、龄期、取食方式进行不同的抗性反应(严盈等, 2008)。

对于昆虫唾液成分和功能的研究很早就吸血昆虫中进行深入开展 (Valenzuela *et al.*, 2002; Alves-Silva *et al.*, 2010; Assumpcao *et al.*, 2011), 对植食性昆虫唾液成分的研究相对滞后。对于其主要功能的昆虫唾液腺成分在重要的农业害虫中得到研

基金项目: 农业部公益性行业科研专项(201103012); 转基因生物新品种培育重大专项(2011ZX080012-004)

作者简介: 张帅, 男, 1981 年生, 副研究员, 研究方向为昆虫生理生化与分子生物学, E-mail: zhscrl@163.com

\* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: cuijj@cricaas.com.cn

收稿日期 Received: 2012-03-21; 接受日期 Accepted: 2012-05-23

究,鳞翅目幼虫口腔分泌物(或反吐液)中含有的 $\beta$ -葡糖苷酶、葡萄糖氧化酶等酶类和挥发物诱导素等有机成分,已经证明可以诱导植物的反应,美洲棉铃虫 *Helicoverpa zea* 唾液中葡萄糖氧化酶可以控制烟草中的尼古丁表达(Musser *et al.*, 2002);刺吸式昆虫唾液中多聚半乳糖醛酸酶、碱性磷酸酯酶、蔗糖酶、多酚氧化酶等成分可能是某些植物特定病理反应的激发子(严盈等, 2008)。最近对麦双尾蚜 *Diuraphis noxia*、豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* 和桃蚜 *Myzus persicae* 唾液的蛋白质组学分析发现,它们唾液中的差异蛋白组分多于相同的蛋白组分,这可能是由于它们各自与寄主的作用方式各不相同(Harmel *et al.*, 2008; Carolan *et al.*, 2009; Cooper *et al.*, 2010)。

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 是一种世界性分布的重要的农业害虫(郭予元, 1998)。虽然近些年由于转 Bt 基因棉的种植,有效地控制了棉铃虫的发生,但棉铃虫对 Bt 蛋白的抗性也日益突出,有必要寻找新的棉铃虫治理策略。对棉铃虫消化系统的研究有助于开发新的防治技术,棉铃虫中肠的蛋白组学和 ESTs 表达谱的研究已有报道(Pauchet *et al.*, 2008; 邹朗云等, 2011),唾液腺的研究最近也有报道,Celorio-Mancera 等(2011)构建了采自于德国的棉铃虫幼虫唾液腺的均一化 cDNA 文库并对唾液腺进行蛋白质组学分析,共获得 8 289 个 ESTs 序列。本研究中,我们构建了采自于河南安阳的棉铃虫幼虫唾液腺 cDNA 文库,共获得 821 个 unigenes,不仅利于研究棉铃虫与寄主作用信号因子,也可以为研究棉铃虫消化系统打下基础,同时也可以与已有的 ESTs 文库进行对比,研究不同种群棉铃虫唾液组分的差异。

## 1 材料与方法

### 1.1 昆虫材料

棉铃虫 *H. armigera* 于 2000 年采自中国农业科学院棉花研究所东试验农场棉田,一直室内人工饲料饲养(饲养环境温度控制在  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ ,相对湿度控制在 60%~85%,光周期 14L:10D)。于 2010 年选取 4 龄幼虫 200 头,于冰上解剖提取唾液腺,迅速将提取到的唾液腺置于液氮中。提取完成后,紧接着进行总 RNA 提取。

### 1.2 RNA 提取

棉铃虫总 RNA 的提取使用 Invitrogen 公司

Trizol 试剂,提取步骤按说明书进行。提取的 RNA 使用分光光度计和琼脂糖凝胶电泳进行检测。

### 1.3 cDNA 文库的构建

文库构建使用 In-Fusion<sup>®</sup> SMARTer<sup>™</sup> cDNA Library Construction Kit 试剂盒,文库构建流程如下:取 2  $\mu\text{L}$  棉铃虫唾液腺总 RNA,依次加入 1  $\mu\text{L}$  3' SMART CDS Primer II A, 1.5  $\mu\text{L}$  无 RNase 去离子水。轻轻混匀后离心,72 $^\circ\text{C}$  孵育 3 min, 42 $^\circ\text{C}$  孵育 2 min 后离心,每管中加入 2.0  $\mu\text{L}$  5  $\times$  First-Strand Buffer, 0.25  $\mu\text{L}$  DTT (100 mmol/L), 1.0  $\mu\text{L}$  dNTP Mix (10 mmol/L), 1.0  $\mu\text{L}$  SMARTer II A Oligonucleotide (12  $\mu\text{mol/L}$ , 0.25  $\mu\text{L}$  RNase Inhibitor, 1.0  $\mu\text{L}$  SMARTScribe<sup>™</sup> Reverse Transcriptase, 至总体积为 10  $\mu\text{L}$ 。轻轻混匀离心后在 PCR 仪中 42 $^\circ\text{C}$  孵育 90 min,在冰上终止第一链的合成,至此第一链合成完成。在合成第二链的反应中选用 LD-PCR 法。合成的 dscDNA 使用 CHROMA SPIN<sup>™</sup> DEPC-1000 色谱柱和乙醇沉淀法进行纯化筛选。

纯化的 dscDNA 使用 In-Fusion 技术与 pSMART2IF 载体进行连接。连接产物通过电击转化仪导入到感受态细胞 DH5 $\alpha$  中。然后通过菌落计数和菌落 PCR 鉴定文库滴度和插入效率及插入片段大小。

### 1.4 EST 序列测定与分析

随即选取阳性克隆送上海生工生物工程有限公司进行序列测定,测定的原始序列使用进行去除载体序列与拼接。然后进行聚类分析。聚类得到的 unigenes 使用 Blast2GO 工具进行注释分析(Conesa *et al.*, 2005)。

## 2 结果与分析

### 2.1 棉铃虫唾液腺总 RNA 的提取

棉铃虫唾液腺总 RNA 电泳图中典型 28S 和 18S 条带清晰(图 1: A),  $A_{260}/A_{280}$  在 1.87~2.10,说明总 RNA 质量能够满足后续试验要求。

### 2.2 棉铃虫唾液腺 cDNA 双链的合成

以总 RNA 反转录得到 dscDNA,电泳条带弥散均匀(图 1: B),有明显的主带,具有很高的丰度。

### 2.3 棉铃虫唾液腺 cDNA 文库质量分析

根据试剂盒说明书提供的滴度测定方法,计算出构建的文库滴度为  $4.9 \times 10^6$  pfu/mL,随即挑选 50 个阳性克隆,检测到的重组率为 100%,插入片段在 0.4~2.0 kb 之间。

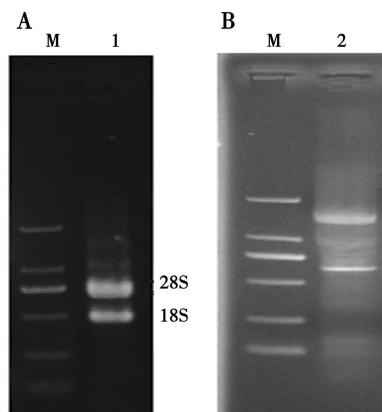


图1 棉铃虫唾液腺总 RNA(A)和双链 cDNA(B)的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total RNA (A) and dscDNA (B) from salivary glands of *Helicoverpa armigera* larvae. M: DL2000 Plus Marker; 1: 总 RNA Total RNA; 2: 双链 cDNA Double stranded cDNA.

## 2.4 EST 序列处理与分析

本试验共得到 1 502 个 EST 序列, 经过去载体聚类分析后得到 821 个 unigenes。总的来说, 有 56.1% 的 unigenes 长度处于 901 ~ 1 200 bp 区段,

而在这之中 1 001 ~ 1 100 bp 的最多, 占 25.0%。其他长度区段的 unigenes 基本上都在 50 个左右(图 2: A)。通过用 Blast X 分析, 从 GenBank 非冗余数据库中搜索来注释这些 unigenes。在 821 个 unigenes 中, 有 213 个 unigenes (25.9%) 没有找到与它们相似性的序列; 608 个(74.1%) unigenes 能找到与它们相似性高的序列, 其中 495 个(60.3%) 是具有已知功能的基因, 剩余为未知功能基因(图 2: B)。

## 2.5 棉铃虫唾液腺 ESTs 的丰富度

棉铃虫唾液腺 ESTs 文库中某种基因的丰富度可以体现出该基因在唾液腺内的丰富度。在整个 ESTs 文库中, 有 245 个 unigenes 具有 2 个以上 ESTs, 576 个 unigenes 是由一个 EST 组成。在棉铃虫唾液腺 ESTs 文库中, 占最大丰度的为一类表皮蛋白, 有 78 个 ESTs 编码这种表皮蛋白。另外, 还有 Contig\12 和 Contig\16 两类表皮蛋白在唾液腺 ESTs 文库中具有较高的丰度, ESTs 个数分别为 58 个和 20 个。一种胰脂肪酶类似蛋白基因也具有较高的丰富度, 有 57 个 ESTs 编码这种蛋白(表 1)。

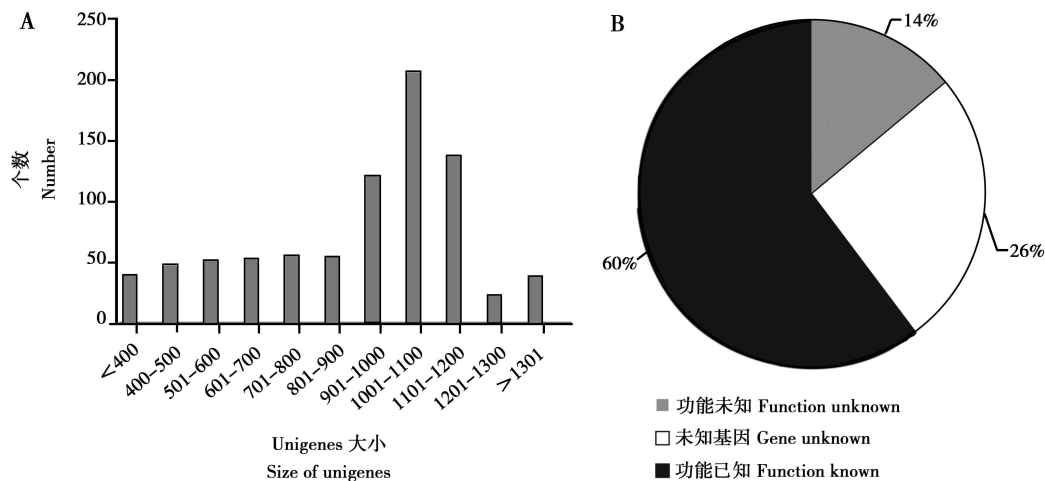


图2 棉铃虫幼虫唾液腺 EST 序列长度分布(A)和功能注释(B)

Fig. 2 Distribution of ESTs in each contig in cDNA library of salivary glands of *Helicoverpa armigera* larvae (A) and contigs and singletons with or without match in NCBI database using BLASTx (B)

## 2.6 棉铃虫唾液腺 ESTs 的功能注释

通过 Blast X 分析, 与棉铃虫唾液腺 unigenes 相匹配的昆虫物种几乎全部为进行全基因组测序的昆虫或其近源种, 排在前 5 种昆虫种类为赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*, 黑腹果蝇 *Drosophila*

*melanogaster*, 家蚕 *Bombyx mori*, 埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 和冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*。另外, 有 132 个 unigenes 与棉铃虫相匹配, 排在第 29 位(图 3)。

表 1 棉铃虫幼虫唾液腺 ESTs 文库中表达丰度最高的 11 个基因簇

Table 1 List of 11 largest contigs assembled from 1 502 ESTs from the salivary glands of *Helicoverpa armigera* larvae

基因簇名称 Sequence name	基因簇类别 Sequence description	长度 (bp) Sequence length	ESTs 数 Number of ESTs	E-value	平均一致性 (%) Mean identity
Contig\26	表皮蛋白 Cuticle protein	1 232	78	2. 22E -55	65. 90
Contig\12	表皮蛋白 Cuticle protein	1 254	58	2. 77E -46	80. 50
Contig\20	胰脂肪酶类似蛋白 Pancreatic lipase-like protein	1 258	57	0	62. 05
Contig\74	肌动蛋白 Actin	1 734	37	0	99. 40
Contig\17	细胞色素 b Cytochrome b	1 217	34	1. 55E -148	91. 60
Contig\23	肌肉 LIM 蛋白 Muscle lim protein isoform 1	757	21	1. 18E -36	94. 40
Contig\16	表皮蛋白 Cuticle protein	1 553	20	1. 38E -51	66. 10
Contig\9	ATP 合酶 ATP synthase f0 subunit 6	1 189	19	1. 70E -93	88. 75
Contig\80	无 None	1 500	19	-	-
Contig\79	sjchgc09076 蛋白 sjchgc09076 protein	1 001	18	5. 32E -46	67. 00
Contig\116	化学感受蛋白 Chemosensory protein	1 139	16	1. 12E -48	93. 40

- : 无数值 None.

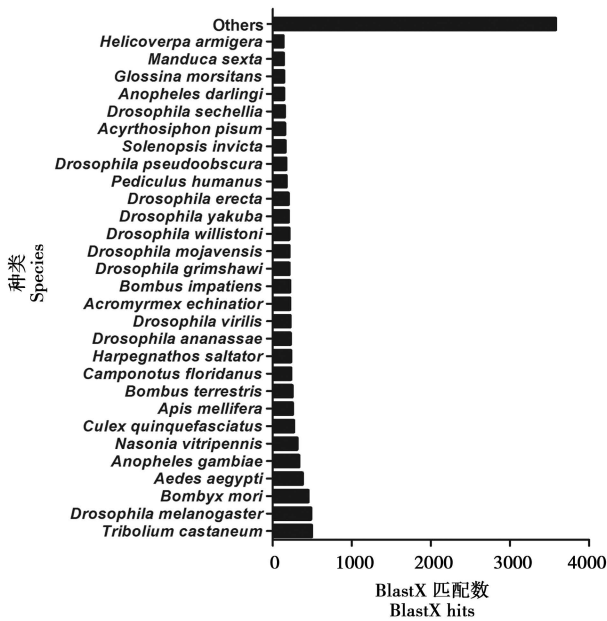


图 3 棉铃虫幼虫唾液腺 ESTs 与其他昆虫的相似性

Fig. 3 Similarity of salivary gland ESTs of *Helicoverpa armigera* larvae with those of other insects

2.7 棉铃虫唾液腺 ESTs 的 GO 分析注释

分别从细胞组分、分子功能以及生物过程方面对棉铃虫唾液腺已知功能 unigenes 进行了分类。其中在构成细胞组分中包含 6 类，数量较多的有 3 类，数量最多的为细胞，有 262 个 unigenes，占参与细胞组成 unigenes 总数的 42. 60%；其次为细胞器，有 179 个，占参与细胞组成 unigenes 总数的 29. 11%；最后是大分子化合物，有 133 个，占参与细胞组成 unigenes 总数的 21. 63% (表 2)。

在参与的分子功能分类中，参与结合活性的 unigenes 数量最多，有 213 个，占参与生物过程 unigenes 总数的 38. 45%；其次为参与催化活性的 unigenes，有 185 个，占参与生物过程 unigenes 总数的 33. 45%；结构分子活性有 68 个，占参与生物过程 unigenes 总数的 12. 27%；转运活性的有 39 个，占参与生物过程 unigenes 总数的 7. 04%；具有其他活性的 unigenes 数量占参与生物过程 unigenes 总数的 2. 0% 以下 (表 2)。

棉铃虫唾液腺 unigenes 参与的生物过程种类较多, 有 22 种之多。其中所占比例在 20% 以上的为参与细胞过程和新陈代谢过程的 unigenes, 分别有

251 个和 240 个。所占比例在 5% 以上有 5 类, 分别是多细胞器官过程、定位过程、生物调控过程、发育过程和细胞组分调节过程(表 2)。

表 2 棉铃虫幼虫唾液腺 ESTs 的 GO 注释分布

Table 2 Distribution of salivary gland ESTs of *Helicoverpa armigera* larvae annotated at GO level 2

	注释分类 Classification of annotated genes	unigenes 数目(个) Number of unigenes	unigenes 百分比 Percentage of unigenes	unigenes 总数(个) Total number of unigenes
细胞成分 Cell component	细胞 Cell	262	42.60	615
	突触 Synapse	1	0.16	
	有膜内腔 Membrane-enclosed lumen	23	3.74	
	胞外区 Extracellular region	17	2.76	
	大分子复合物 Macromolecular complex	133	21.63	
	器官 Organelle	179	29.11	
	分子功能 Molecular function	分子信号转导活性 Molecular transducer activity	10	
转录调控因子活性 Transcription regulator activity		8	1.44	
结构分子活性 Structural molecule activity		68	12.27	
蛋白酶体调控因子活性 Proteasome regulator activity		1	0.18	
电子载体活性 Electron carrier activity		11	1.99	
抗氧化活性 Antioxidant activity		7	1.26	
酶调控因子活性 Enzyme regulator activity		11	1.99	
结合 Binding		213	38.45	
翻译调控因子活性 Translation regulator activity		1	0.18	
催化活性 Catalytic activity		185	33.39	
转运载体活性 Transporter activity		39	7.04	

续表 2 Table 2 continued

	注释分类 Classification of annotated genes	unigenes 数目(个) Number of unigenes	unigenes 百分比 Percentage of unigenes	unigenes 总数(个) Total number of unigenes
生物过程	多细胞组织进程	55	5.60	982
Biological process	Multicellular organismal process			
	细胞组分发生	30	3.05	
	Cellular component biogenesis			
	节律过程	2	0.20	
	Rhythmic process			
	生物学粘连	7	0.71	
	Biological adhesion			
	多器官进程	7	0.71	
	Multi-organism process			
	定位	73	7.43	
	Localization			
	代谢过程	240	24.44	
	Metabolic process			
	信号	21	2.14	
	Signaling			
	细胞进程	251	25.56	
	Cellular process			
	刺激反应	42	4.28	
	Response to stimulus			
	生殖	17	1.73	
	Reproduction			
	生物调节	82	8.35	
	Biological regulation			
	免疫系统进程	9	0.92	
	Immune system process			
	生长	11	1.12	
	Growth			
	死亡	6	0.61	
	Death			
	发育进程	53	5.40	
	Developmental process			
	色素沉着	1	0.10	
	Pigmentation			
	细胞组分形成	56	5.70	
	Cellular component organization			
	细胞壁组成和发生	2	0.20	
	Cell wall organization or biogenesis			
	细胞增殖	8	0.81	
	Cell proliferation			
	运动	9	0.92	
	Locomotion			

## 2.8 棉铃虫唾液中的酶类

在棉铃虫唾液腺 ESTs 文库中, 获得脂类相关消化酶基因 17 个, 编码包括酯酶、脂肪酶、脂肪水解酶、羧酸酯酶、羧酸胆碱酯酶和磷酸甘油变位酶等多种类型酶类。还获得糖类相关消化酶基因 5 个, 主要编码水解酶类。在获得的蛋白酶基因中, 有编码半胱氨酸蛋白酶的基因 1 个, 编码丝氨酸蛋白酶类的基因有 20 个, 其中 16 个为新基因。对获得的 20 个编码丝氨酸蛋白酶的基因进行聚类分析发现, 20 个丝氨酸蛋白酶基因大致可以分为 5 类, 其中有两类聚在一起的丝氨酸蛋白酶基因个数最多, 都有 7 个(图 4)。

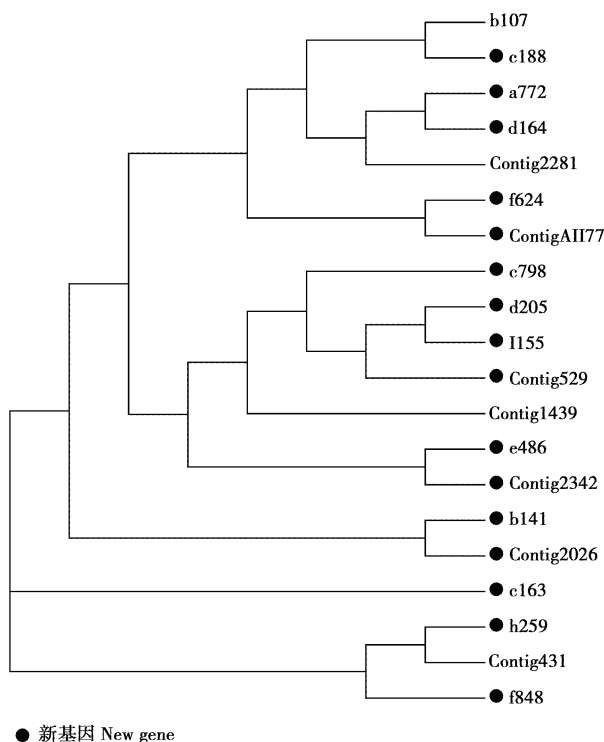


图 4 棉铃虫唾液腺中丝氨酸蛋白酶基因聚类分析

Fig. 4 Neighbor-joining tree of serine protease genes from salivary glands of *Helicoverpa armigera* larvae

## 2.9 与已有棉铃虫唾液腺文库的比较

Celorio-Mancera 等(2011)构建了德国的棉铃虫唾液腺的均一化 cDNA 文库(以下称 Celorio-Mancera 文库), 共获得 8 289 个 EST 序列, 在 NCBI 的注册号为 JK126269 ~ JK145657。使用生物信息技术, 笔者对两个文库中的几类基因进行了对比。

Celorio-Mancera 等(2011)共获得 3 个气味结合蛋白基因和 5 个化学感受蛋白基因。而本研究建立的文库中共获得 5 个气味结合蛋白基因和 2 个化学

感受蛋白基因, 其中编码气味结合蛋白的基因种类与 Celorio-Mancera 等(2011)报道的同类基因都不相同, 编码化学感受蛋白的基因有一个相同, 并且其中 3 个气味结合蛋白基因为新基因(GenBank 登录号: JQ753074 ~ JQ753076), 而化学感受蛋白基因均为新基因。Celorio-Mancera 文库有未知基因 2 470 个, 占 29.8%, 本研究构建的文库有未知基因 213 个, 占 25.9%。Celorio-Mancera 文库有各种酶类基因 1 600 个, 占 19.3%, 本研究构建文库有各种酶类基因 202 个, 占 24.6%。Celorio-Mancera 文库中有编码各类核糖体蛋白基因 257 个, 占 3.1%, 本研究构建文库中有编码各类核糖体蛋白基因 54 个, 占 6.6%。Celorio-Mancera 文库有热激蛋白基因 26 个, 占 0.3%, 本研究构建文库中有 7 个, 占 0.8%。

## 3 讨论

昆虫唾液腺是开口于口腔中的多细胞腺体, 按其在昆虫体内开口的位置, 分为上颚腺、下颚腺或下唇腺(雷朝亮和荣秀兰, 2003)。棉铃虫是杂食性昆虫, 主要取食植物组织, 但也能取食某些昆虫。由于棉铃虫的杂食性特点, 使其要面对多种有害的植物次生代谢物, 这需要其具有特殊的解毒途径。在棉铃虫取食植物组织时, 首先进行咀嚼, 在咀嚼过程中分泌大量的唾液对植物组织进行预处理, 然后一起吞进消化道。在这个过程中, 不但完成对植物组织的预消化, 也对植物组织中的有毒物质进行初步处理。

棉铃虫的唾液中含有大量预消化酶类, 在昆虫取食时对食物进行预消化。预消化酶类包括蛋白酶、淀粉酶、酯酶。对棉铃虫唾液中的消化酶类最早是使用生化手段进行研究, 因为相同种类的消化酶可能具有多种基因类型, 而且各类型之间生化性质相近, 所以很难进行准确的分类纯化, 只能对某一大类酶的功能进行研究, 而不能对特定种类的消化酶性质进行研究。近些年, 陆续从棉铃虫唾液腺中克隆得到一些消化酶基因, 从本研究结果可以看出棉铃虫唾液腺中消化酶基因种类巨大, 而且分化情况复杂, 少量的消化酶基因不能很好地研究棉铃虫唾液中预消化酶情况。

通过构建某一昆虫的组织器官 cDNA 文库, 进行大规模 ESTs 测序已被证明是一种研究基因表达和寻找新基因的非常有效方法。本研究选取棉铃虫

4 龄幼虫作为试验材料, 主要因为 1~3 龄幼虫个体较小, 唾液腺提取困难, 而 5 龄幼虫在正常条件下将进入蛹期, 唾液成分可能会发生变化, 不能很好地反映棉铃虫幼虫正常取食过程中的唾液构成。在研究构建的棉铃虫唾液腺 ESTs 文库中, 获得编码脂类相关消化酶的基因 17 个, 编码糖类相关消化酶的基因 5 个, 编码半胱氨酸蛋白酶的基因 1 个, 编码丝氨酸蛋白酶的基因 20 个, 其中 16 个为新基因。这为下一步研究棉铃虫唾液中消化酶的作用打下基础。

在棉铃虫唾液腺文库中, 克隆得到大量的昆虫表皮合成相关蛋白, 通过明确这些昆虫表皮合成相关蛋白在棉铃虫唾液腺发育中的作用, 可以开发干扰棉铃虫唾液腺发育的技术, 开辟控制棉铃虫的新手段。我们还在棉铃虫唾液腺 ESTs 文库中获得 5 个气味结合蛋白基因和 2 个化学感受蛋白基因, 其中 3 个气味结合蛋白基因是新基因, 化学感受蛋白基因全部为新基因。气味结合蛋白和化学感受蛋白是昆虫感知气味化学信号的重要蛋白, 主要存在于昆虫的感觉器官, 不过这类蛋白同时存在于非感觉器官。在棉铃虫的雄性性腺中存在一种气味结合蛋白, 通过交配传递到雌虫体内, 进而附着在棉铃虫卵上 (Sun *et al.*, 2012)。埃及伊蚊 *A. aegypti* 中也有一种气味结合蛋白存在于其雄虫触角和性腺中, 通过交配传递到雌虫体内 (Sirot *et al.*, 2008)。在甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* 中有一种化学感受蛋白存在于信息素腺体中 (Jacquin-Joly *et al.*, 2001), 在家蚕中也有多种化学感受蛋白存在于信息素腺体中 (Dani *et al.*, 2011)。西方蜜蜂 *Apis mellifera* 的上颚腺合成和分泌多种信息素, 其中也存在着大量的气味结合蛋白 (Iovinella *et al.*, 2011)。气味结合蛋白还具有生理调节功能, 在红火蚁 *Solenopsis invicta* 中, 敲除一个在胸部表达的 OBP 基因后, 产生多蚁后现象 (Krieger and Ross, 2002)。另外, OBPs 还有保护嗅觉器官免受自由基等有害物质损害的作用 (Grolli *et al.*, 2006)。棉铃虫唾液腺还没有报道能合成信息素, 在棉铃虫唾液腺中存在气味结合蛋白和化学感受蛋白基因也是首次发现, 有必要对棉铃虫的唾液腺中存在的这些气味结合蛋白和化学感受蛋白基因的作用进行研究。

通过本研究, 我们对棉铃虫唾液腺中基因表达情况有了初步的了解, 也克隆得到大量棉铃虫唾液中消化相关酶类基因。以上研究为对棉铃虫唾液腺的生理生化功能研究打下基础, 另外也可以发掘唾

液腺中棉铃虫与寄主互作的蛋白基因, 进而研究棉铃虫与棉花之间的互作关系, 为开辟棉铃虫治理新技术打下基础。

## 参考文献 (References)

- Alves-Silva J, Ribeiro JM, Van Den Abbeele J, Attardo G, Hao Z, Haines LR, Soares MB, Berriman M, Aksoy S, Lehane MJ, 2010. An insight into the sialome of *Glossina morsitans morsitans*. *BMC Genomics*, 11: 213.
- Assumpcao TC, Charneau S, Santiago PB, Francischetti IM, Meng Z, Araujo CN, Pham VM, Queiroz RM, de Castro CN, Ricart CA, Santana JM, Ribeiro JM, 2011. Insight into the salivary transcriptome and proteome of *Dipetalogaster maxima*. *Journal of Proteome Research*, 10: 669–679.
- Carolan JC, Fitzroy CIJ, Ashton PD, Douglas AE, Wilkinson TL, 2009. The secreted salivary proteome of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* characterized by mass spectrometry. *Proteomics*, 9: 2457–2467.
- Celorio-Mancera Mde L, Courtiade J, Muck A, Heckel DG, Musser RO, Vogel H, 2011. Sialome of a generalist lepidopteran herbivore: identification of transcripts and proteins from *Helicoverpa armigera* labial salivary glands. *PLoS ONE*, 6: e26676.
- Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M, 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21: 3674–3676.
- Cooper WR, Dillwith JW, Puterka CJ, 2010. Salivary proteins of Russian wheat aphid (Hemiptera: Aphididae). *Environmental Entomology*, 39: 223–231.
- Dani FR, Michelucci E, Francese S, Mastrobuoni G, Cappellozza S, La Marca G, Niccolini A, Felicioli A, Moneti G, Pelosi P, 2011. Odorant-binding proteins and chemosensory proteins in pheromone detection and release in the silkworm *Bombyx mori*. *Chemical Senses*, 36: 335–344.
- Grolli S, Merli E, Conti V, Scaltriti E, Ramoni R, 2006. Odorant binding protein has the biochemical properties of a scavenger for 4-hydroxy-2-nonenal in mammalian nasal mucosa. *FEBS Journal*, 273: 5131–5142.
- Guo YY, 1998. Research on Cotton Bollworm. China Agriculture Press, Beijing. [郭予元, 1998. 棉铃虫的研究. 北京: 中国农业出版社]
- Harmel N, Létocart E, Cherqui A, Giordanengo P, Mazzucchelli G, Guillonneau F, De Pauw E, Haubruge E, Francis F, 2008. Identification of aphid salivary proteins: a proteomic investigation of *Myzus persicae*. *Insect Molecular Biology*, 17: 165–174.
- Iovinella I, Dani FR, Niccolini A, Sagona S, Michelucci E, Gazzano A, Turillazzi S, Felicioli A, Pelosi P, 2011. Differential expression of odorant-binding proteins in the mandibular glands of the honey bee according to caste and age. *Journal of Proteome Research*, 10: 3439–3449.
- Jacquin-Joly E, Vogt RG, François MC, Nagnan-Le Meillour P, 2001. Functional and expression pattern analysis of chemosensory proteins



- expressed in antennae and pheromonal gland of *Mamestra brassicae*. *Chemical Senses*, 26: 833 – 844.
- Krieger MJB, Ross KG, 2002. Identification of a major gene regulating complex social behavior. *Science*, 295: 328 – 332.
- Lei CL, Rong XL, 2003. General Entomology. China Agriculture Press, Beijing. [雷朝亮, 荣秀兰, 2003. 普通昆虫学. 北京: 中国农业出版社]
- Musser RO, Hum-Musser SM, Eichenseer H, Peiffer M, Gary E, Murphy JB, Felton GW, 2002. Herbivory: caterpillar saliva beats plant defences. *Nature*, 416: 599 – 600.
- Pauchet Y, Muck A, Svatos A, Heckel DG, Preiss S, 2008. Mapping the larval midgut lumen proteome of *Helicoverpa armigera*, a generalist herbivorous insect. *Journal of Proteome Research*, 7: 1629 – 1639.
- Sirof LK, Poulson RL, McKenna MC, Gimary H, Wolfner MF, Harrington LC, 2008. Identity and transfer of male reproductive gland proteins of the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*: potential tools for control of female feeding and reproduction. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38: 176 – 189.
- Sun YL, Huang LQ, Pelosi P, Wang CZ, 2012. Expression in antennae and reproductive organs suggests a dual role of an odorant-binding protein in two sibling *Helicoverpa* species. *PLoS ONE*, 7: e30040.
- Valenzuela JG, 2002. High-throughput approaches to study salivary proteins and genes from vectors of disease. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 1199 – 1209.
- Yan Y, Liu WX, Wan FH, 2008. Roles of salivary components in piercing-sucking insect-plant interactions. *Acta Entomologica Sinica*, 51(5): 537 – 544. [严盈, 刘万学, 万方浩, 2008. 唾液成分在刺吸式昆虫与植物关系中的作用. 昆虫学报, 51(5): 537 – 544]
- Yin HD, Huang CH, Xue K, Wang RJ, Yan FM, 2006. Roles of insect salivary components in insect-plant interactions. *Acta Entomologica Sinica*, 49(5): 843 – 849. [殷海娣, 黄翠虹, 薛莹, 王戎疆, 闫凤鸣, 2006. 昆虫唾液成分在昆虫与植物关系中的作用. 昆虫学报, 49(5): 843 – 849]
- Zou LY, Cao GC, Zhang Q, Zhang Y, Liang GM, Wu KM, Guo YY, 2011. cDNA library construction and EST analysis of the larval midgut of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 54(7): 739 – 745. [邹朗云, 曹广春, 张谦, 张彦, 梁革梅, 吴孔明, 郭予元, 2011. 棉铃虫中肠 cDNA 文库的构建及 EST 分析. 昆虫学报, 54(7): 739 – 745]

(责任编辑: 赵利辉)