

中华按蚊血红素过氧化物酶家族基因的全基因组鉴定、特征和进化

尹华春, 张莉娟, 陈斌*

(重庆师范大学昆虫与分子生物学研究所, 媒介昆虫重庆市重点实验室, 重庆 401331)

摘要:【目的】在全基因组上鉴定中华按蚊 *Anopheles sinensis* 血红素过氧化物酶(heme peroxidase, HPX)家族基因,并预测其基本特征,探究双翅目中5种代表性昆虫HPX基因的系统发育关系和进化。【方法】以NCBI数据库中黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 和家蚕 *Bombyx mori* 等昆虫HPX基因编码的氨基酸序列为询问序列,通过本地Blast搜索鉴定中华按蚊基因组上HPX家族基因,并鉴定了冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*、致倦库蚊 *Aedes aegypti* 和埃及伊蚊 *Culex quinquefasciatus* 基因组上的HPX基因;基于冈比亚按蚊HPX基因的命名系统,对中华按蚊HPX基因进行命名;运用生物信息学方法预测了中华按蚊HPX基因的特征,包括基因的结构及在scaffold的定位,氨基酸的替换率和保守结构域,蛋白质3D结构等,通过与冈比亚按蚊共线性分析定位了中华按蚊HPX基因在染色体上的位置;基于HPX核苷酸序列,采用PAUP4.0和MEGA6.0软件利用最大相似法构建了5个双翅目代表性种HPX基因的系统发生树。【结果】中华按蚊基因组共有20个HPX基因,冈比亚按蚊、埃及伊蚊和致倦库蚊基因组分别有18, 14和12个HPX基因。这4种蚊虫的HPX蛋白都被分类进入Peroxinectin, Peroxidasin, DBLPX和DUOX4个亚家族,其氨基酸的分子量介于61.6~186.6 kD之间(除AsHPX8为29.6 kD)。中华按蚊20个HPX基因共具有98个外显子,75个内含子,其外显子与内含子分布模式在基因间差异较大。中华按蚊HPX基因被定位到10个scaffold上,对应到冈比亚按蚊的2R, 3R, 2L, 3L和X染色体。这些中华按蚊HPX基因编码的氨基酸序列(除DUOX)都具有1个血红素结合位点和5个Ca²⁺结合位点,在N端和C端各具有2个半胱氨酸位点并界定了两个二硫键。中华按蚊与冈比亚按蚊同源基因对的 ω 值都小于1,说明HPX基因在进化过程中没有受到明显的环境选择压力。系统发育关系研究表明,5种双翅目昆虫的HPX基因可以分为16个组,其中11个组在进化上呈明显的单系,具有至少83%的bootstrap支持。【结论】本研究提供了中华按蚊的HPX基因的基础信息。不同蚊虫种具有相似分子量的HPX蛋白,这与HPX家族蛋白结构的高度保守性有关。蚊虫的DUOX随着主要功能位点的缺失逐渐失去其功能,这与其特殊环境适应相关。DBLPX亚家族的peroxidase结构域在HPX家族所有亚家族中是最保守的。**关键词:** 中华按蚊; HPX家族; 全基因组鉴定; 特征; 系统发育; 进化

中图分类号: Q969 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2018)01-0036-12

Genome-wide identification, characterization and evolutionary analysis of genes of the heme peroxidase family in *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae)

YIN Hua-Chun, ZHANG Li-Juan, CHEN Bin* (Chongqing Key Laboratory of Vector Insects, Institute of Entomology and Molecular Biology, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

基金项目:“两江学者”计划专项经费;国家自然科学基金项目(31672363, 31372265);国际原子能机构CRP项目(18268);国家科技基础性工作专项重点项目(2015FY210300);广西科技重大专项(桂科AA17129002)

作者简介:尹华春,女,1994年4月生,四川成都人,硕士研究生,研究方向为昆虫分子生物学, E-mail: 492321415@qq.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: bin.chen@cqu.edu.cn

收稿日期 Received: 2017-07-22; 接受日期 Accepted: 2017-10-12

Abstract: 【Aim】 To identify genes of the heme peroxidase (HPX) family of *Anopheles sinensis* at the whole-genome level, to predict the basic features of these HPX members, and to explore the phylogenetics and evolution of the HPX members of five representative dipterans. 【Methods】 The amino acid sequences encoded by HPX genes in *Drosophila melanogaster*, *Bombyx mori* and other insects were downloaded from NCBI databases and used as queries to search for the HPX genes in *An. sinensis* genome using the local Blast program. The HPX genes in *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* on the whole genome were also identified by using the same method. The HPX genes identified in *An. sinensis* were named following the nomenclature system established for *An. gambiae* HPX genes. The characteristics of these HPX genes in *An. sinensis*, including the structure and scaffold location of these genes, the substitution rate and conserved domain of their amino acids, and the 3D structure of their proteins, were predicted using bioinformatics analysis. These *An. sinensis* HPX genes were also located on chromosome through the synteny analysis with *An. gambiae* HPX genes. The phylogenetic relationships of the HPX genes of five representative species of Diptera were constructed based on nucleotide sequences using maximum likelihood method with PAUP 4.0 and MEGA 6.0. 【Results】 The *An. sinensis* genome contains 20 HPX genes, while those of *An. gambiae*, *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* contain 18, 14 and 12 HPX genes, respectively. The HPX proteins of the four mosquito species were all classified into Peroxinectin, Peroxidasin, DBLPX and DUOX subfamilies, with the molecular weights of their amino acids ranging from 61.6 – 186.6 kD, except AsHPX8 (29.6 kD). The 20 HPX genes of *An. sinensis* contain 98 exons and 75 introns, and the distribution patterns of their exons and introns are quite diverse among different genes. These HPX genes of *An. sinensis* are mapped on 10 scaffolds, and syntenied to the chromosomes 2R, 3R, 2L, 3L and X in reference of *An. gambiae* genome. All the amino acid sequences of HPX genes in *An. sinensis* (except DUOX) each has one heme and five Ca^{2+} binding sites, and contains two cysteine sites in each of N-terminus and C-terminus, which define two disulfide bonds. The ω values of *An. sinensis* and *An. gambiae* orthologous gene pairs were all less than 1, suggesting that HPX genes has no obvious environmental selective pressure during their evolution. The HPX genes of the five representative dipteran species were divided into 16 groups on the phylogenetic tree, 11 of which showed to be monophyletic with >83% bootstrap support and homologous genes clustered together. 【Conclusion】 This study provides the basic information frame for the HPX genes of *An. sinensis*. The HPX proteins in different mosquito species have similar molecular weights, and this is associated with a high degree of structure conservation of the HPX family proteins. The DUOX of mosquitoes gradually lost its function with their deletion of the main functional loci, and this is related to its specific environmental adaptation. The peroxidase domain in the DBLPX subfamily is the most conserved in all subfamilies of the HPX family.

Key words: *Anopheles sinensis*; HPX family; genome-wide identification; characteristics; phylogeny; evolution

一些昆虫在进化过程中演化为靠刺吮人或动物的血液为生。这种嗜血昆虫对血液的摄食,导致各种病原体由血液进入昆虫体内的概率大大增加,为了抵抗病原体,这些昆虫的先天免疫系统也随之进化出大量的基因参与到识别和抑制病原体的过程中,其中血红素过氧化物酶(haem peroxidase, HPX)基因在昆虫先天免疫系统中扮演重要角色(Zou *et al.*, 2007)。研究表明,在昆虫多次吸血和产卵过程

中,体内的 HPX 对超量活性氧(reactive oxygen species, ROS) 给其带来的氧化损伤起到调控作用,以此来维护昆虫体内长期的繁殖节律(Kajl *et al.*, 2015),如在冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 体内, H_2O_2 这种 ROS 系统性的增加会导致卵巢和胚胎受到氧化损伤,而 HPX 可以把超量 H_2O_2 作为电子受体催化各种氧化反应,使卵巢和胚胎免受氧化损伤而得到正常发育(DeJong *et al.*, 2007; Shaw *et al.*,

2014)。基于 HPX 对 ROS 的抑制作用,HPX 与超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)等一起构成了生物体内的保护酶系统(enzymes of protective system)(Li *et al.*, 1994),其中 HPX 在昆虫免疫系统的第一道防线中发挥着巨大的作用(Felton and Summers, 1995; Corona and Robinson, 2006)。昆虫体内的 HPX 与脊椎动物体内的髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)对氧化反应的作用类似,但在脊椎动物中只有 5 个类基因与昆虫的 HPX 基因高度相似,并且被证实只与昆虫的 HPXd 基因(peroxidase 亚家族)同源(Lackie and Lackie, 1979)。研究发现 HPX 基因在蚊虫中具有不断扩增的演化趋势(Waterhouse *et al.*, 2007)。蚊虫通过吸血传播病原,研究蚊虫 HPX 基因对于病原传播的机制和控制具有重要意义。

Welinder(1992)首次在植物、真菌、细菌中研究了 HPXs 的进化和结构之间的关系,其后对不同植物、动物、真菌、细菌 HPX 的研究不断涌现(Zámocky, 2004; Huang *et al.*, 2006; McCall *et al.*, 2014),出现了各种命名,如植物过氧化物酶超家族(plant-type peroxidase superfamily)(Zámocky and Obinger, 2010)、非动物过氧化物酶超家族(non-animal heme peroxidase superfamily)(Passardi *et al.*, 2007)等。Nelson 等(1994)等在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中发现了第一个与过氧化物酶结合的氧化蛋白 peroxidase,虽然过氧化物酶在植物、动物和真菌中都具有免疫防御功能,但其属于不同的家族(Joseph *et al.*, 1998; Taurog, 1999)。近年,对昆虫 HPX 家族基因的研究不断出现,已对家蚕 *Bombyx mori* (Shi *et al.*, 2012)、西方蜜蜂 *Apis mellifera* (Korayem *et al.*, 2012)、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (Chen *et al.*, 2016) 等的 HPX 家族基因作了注释、系统发育分析及功能研究,发现 HPXs 基因起源于原核生物。西方蜜蜂(Corona and Robinson, 2006)、黑腹果蝇(Radyuk *et al.*, 2001)、埃及伊蚊 *Aedes aegypti* (Zhao *et al.*, 2001) 和致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* (Reddy *et al.*, 2012) 分别有 10, 10, 14 和 12 个 HPXs 基因,而冈比亚按蚊有 18 个 HPX 基因(Shaw *et al.*, 2014),这反映出不同昆虫的生活习性以及对环境的适应。

中华按蚊 *Anopheles sinensis* 广泛分布于东亚及东南亚,是分布区域的重要传疟媒介,也传播马来丝虫病(Chang *et al.*, 2014)。近年来,重庆师范大学测序并注释了中华按蚊基因组,但尚无 HPX 家族基

因的系统研究。本研究基于重庆师范大学中华按蚊基因组和转录组测序数据(Chen *et al.*, 2014),从 NCBI 下载赤拟谷盗、西方蜜蜂、家蚕和黑腹果蝇等昆虫的 HPX 氨基酸序列作为询问序列,通过生物信息学分析方法,在全基因组水平鉴定了中华按蚊 HPX 家族基因,并对其分类、命名、序列保守性、基因结构、scaffold 分布、系统发育、选择压力等开展了较全面的研究,为进一步开展该家族蛋白的功能研究提供信息基础。

1 材料与方法

1.1 数据来源

本研究使用的中华按蚊基因组数据和转录组数据均来自重庆师范大学昆虫与分子生物学研究所,冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*、埃及伊蚊 *Aedes aegypti*、致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus*、西方蜜蜂 *Apis mellifera*、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*、家蚕 *Bombyx mori* 和黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的基因组数据下载自 NCBI 的 GenBank 数据库、VectorBase 数据库(<https://www.vectorbase.org/>)以及 peroxibase 数据库(Passardi *et al.*, 2007)。

1.2 中华按蚊 HPX 家族基因的全基因组鉴定

为了鉴定中华按蚊 HPX 基因,以冈比亚按蚊、埃及伊蚊、致倦库蚊、西方蜜蜂、赤拟谷盗、家蚕和黑腹果蝇已知 HPX 氨基酸序列作为询问序列,使用 BLASTP 搜索中华按蚊基因组氨基酸数据库,使用 TBLASTN 分别搜索基因组基因 CDs 和核苷酸数据库,阈值都设为 $1e^{-5}$ 。在基因组序列的搜索中,提取 CDs 左右翼侧区至少 1 000 bp 的基因组序列,获得可能的中华按蚊 HPX 基因序列,并使用 FGENESH+ (<http://linux1.softberry.com/>) 预测基因及其结构。为了验证获得的这些序列是否为中华按蚊的 HPX 基因序列,将氨基酸序列或翻译的氨基酸序列在 GenBank 中在线比对,同时,使用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 对这些氨基酸序列作 peroxidase(在 pfam 中注释为 PF03098) 结构域分析,将包含该结构域的基因作为 HPX 基因。

1.3 中华按蚊 HPX 基因的特征及基因组定位分析

将获得的中华按蚊 HPX 基因编码的氨基酸序列,通过 ProtParam 在线软件(<http://www.expasy.org/protparam/>)、TMHMM 在线软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 和 SignalP 在线软件

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), 分别对其分子量、分子式、等电点、信号肽、亲水性系数、不稳定指数、跨膜区特征进行预测。

使用 Clustal W 1.83 软件对中华按蚊 HPX 基因的氨基酸序列进行多重比对, 并将得出的结果导入 GeneDoc 2.7.0 软件预测其保守区域。使用软件 ScanProsite (<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>) 预测 HPX 保守结构域位点, 并在多重比对图中标注出; 使用 Modeller 9.19 对中华按蚊 HPX 家族进行同源建模, 预测 HPX 家族的蛋白质 3D 结构。

基于中华按蚊 HPX 基因序列, 通过 GSDS 在线软件 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 预测中华按蚊 HPX 基因外显子的分布、大小和内含子相位, 并绘制出中华按蚊 HPX 基因结构示意图。基于预测获得的中华按蚊 HPX 基因的编码序列, 统计其在基因组上 scaffold 的位置。同时, 从 VectorBase 数据库下载冈比亚按蚊 HPX 基因在基因组上定位数据, 基于中华按蚊 HPX 基因定位信息与冈比亚按蚊 HPX 基因在染色体上位置做共线性分析, 用 CorelDraw 8.0 绘制中华按蚊 HPX 基因的基因组定位图。

1.4 中华按蚊 HPX 基因的替换率分析

使用 MEGA5.0 软件 (Tamura *et al.*, 2011) 对中华按蚊 HPX 基因的蛋白质编码序列与冈比亚按蚊 HPX 家族直系同源基因的蛋白质编码序列进行多重序列比对, 将比对结果的终止密码子删除后导出为 FASTA 格式, 将该 FASTA 文件在 DAMBE 中转化为 PML 格式后, 通过 PAML (Yang and Nielsen, 2000) 软件计算它们的同义替换率 (K_s)、非同义替换率 (K_a) 以及 K_a/K_s 值, 从而分析中华按蚊 HPX 基因在自然环境下受到的选择压力和选择模式。

1.5 中华按蚊和双翅目代表性种 HPX 基因的系统发育关系

通过 PAUP4.0 和 MEGA6.0 软件, 使用最大似然法 (maximum likelihood), 基于氨基酸序列, 以黑腹果蝇为外群, 推断中华按蚊、冈比亚按蚊、致倦库蚊和埃及伊蚊 HPX 基因的系统发育关系。通过 PAUP4.0 和 Modeltest3.7 (Posada, 2003) 基于赤池信息量准则 (Akaike Information Criterion, AIC) 计算出这些种的 HPX 核苷酸序列的最佳进化模型为 GTR + I + G, 并把该模型用于该系统发育关系推断种。基于 1 000 次的重复, 计算系统发育树上各分支 bootstrap 值, 讨论各分支的统计可信度。

2 结果

2.1 中华按蚊 HPX 家族基因及其理化特性

通过 VectorBase 数据库鉴定, 冈比亚按蚊、埃及伊蚊和致倦库蚊基因组分别有 18, 14 和 12 个 HPX 基因。基于重庆师范大学昆虫与分子生物学研究所测序的中华按蚊全基因组序列, 我们鉴定出 20 个中华按蚊 HPX 基因, 与冈比亚按蚊同源序列一致性达 65% ~ 97% (表 1)。基于中华按蚊与冈比亚按蚊 HPX 基因序列的比对, 结构域和基序分析 (图 1), 及对 HPX 基因系统发生关系的推断, 参考冈比亚按蚊 HPX 家族的命名系统, 我们把中华按蚊 HPX 家族分为 4 个亚家族——Peroxinectin 亚家族、Peroxidasin 亚家族、DUOX 亚家族和 DBLPX 亚家族, 分别有 17, 1, 1 和 1 个成员, 其基因分别命名为 *AsHPX1-17*, *AsHPXd*, *AsDUOX* 和 *AsDBLOX*。其中, *AsHPX16* 和 *AsHPX17* 是不存在于冈比亚按蚊基因组中的 2 个新基因。

这 20 个中华按蚊 HPX 基因的氨基酸序列具有 226 (*AsHPX8*) 到 1 656 个 (*AsHPXd*) 氨基酸, 分子量为 29.6 ~ 184.3 kD, 等电点为 5.25 ~ 9.24, 信号肽长度为 17 ~ 26 个氨基酸。它们的亲水系数在 -0.152 ~ -0.712 之间, 表明 HPX 家族蛋白质均为亲水性蛋白, 这与 HPX 家族蛋白为可溶性蛋白的这一特性相符。

在这 4 个亚家族中, Peroxinectin 亚家族、Peroxidasin 亚家族和 DUOX 亚家族的氨基酸均只具有一个 peroxidase 结构域, 而 DBLPX 亚家族具有两个 peroxidase 结构域, 一个在氨基末端 (DBLPX-N) 与跨膜域 (TM) 相连, 一个在羧基末端 (DBLPX-C) 与 Willebrand Type C (VWC) 蛋白结构相连, 与其他昆虫的 DBLPX 亚家族结构域相同。此外, Peroxidasin 亚家族的 C 端也与结构域 VWC 相连, 该结构域在各种血浆蛋白中均有发现, 符合 HPX 蛋白的特性 (Soudi *et al.*, 2012)。DUOX 亚家族除了 peroxidase 结构域, 还在 C 端连接两个跨膜域 (TM), 3 个 EF-hand 基序 (钙离子结合基序), 一个 Ferric_reduct 结构域, 以及一个 FAD 结构域和一个 NAD 结构域 (Deburme *et al.*, 2010)。

2.2 中华按蚊 HPX 基因的结构

利用 GSDS (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 在线软件分析出中华按蚊 HPX 基因的内含子和外显子的数量、分布与大小, 结果显示中华按蚊的 HPX

表 1 中华按蚊 *HPX* 家族基因及其特征
Table 1 Genes of the *HPX* family in *Anopheles sinensis* and their characteristics

基因 Genes	基因组上定位 Location on scaffold	编码序列 长度 (bp) Length of the coding sequence	氨基酸 大小 (aa) Amino acid size	分子量 (kD) Molecular weight	分子式 Molecular formula	等电点 Isoelectric point (pI)	信号肽 长度 (aa) Signal peptide length	跨膜区 Transmembrane domain	亲水性系数 Hydrophobicity coefficient	不稳定指数 Instability index	与冈比亚按蚊同源基因对比 Comparison with homologous genes of <i>Anopheles gambiae</i>	
											一致性 (%) Identity	基因 ID Gene ID
<i>AsHPX1</i>	scaffold19; 76 247 – 78 629	2 076	691	78.1	C ₃₄₄₆ H ₂₅₉₃ N ₉₈₁ O ₁₀₅₁ S ₂₆	5.92	18	-	-0.522	40.78	95	XP_311448
<i>AsHPX2</i>	scaffold39; 348 831 – 351 001	2 054	684	76.4	C ₃₃₅₇ H ₃₂₂₂ N ₉₆₆ O ₁₀₂₉ S ₂₃	5.86	17	-	-0.284	38.04	73	XP_319784
<i>AsHPX3</i>	scaffold14; 34 368 901 – 34 370 979	3 825	1 274	140.5	C ₆₁₆₁ H ₉₆₅₁ N ₁₈₂₅ O ₁₈₈₂ S ₃₄	9.24	-	-	-0.712	43.46	69	XP_313514
<i>AsHPX4</i>	scaffold16; 8 149 083 – 8 151 051	2 193	730	83.1	C ₃₇₂₉ H ₅₇₄₄ N ₁₀₁₈ O ₁₀₇₁ S ₃₆	6.24	-	✓	-0.282	36.00	98	XP_311106
<i>AsHPX5</i>	scaffold14; 38 676 823 – 38 679 584	2 553	850	93.8	C ₄₁₂₅ H ₄₆₃₁ N ₁₁₈₃ O ₁₂₆₅ S ₃₃	5.69	-	✓	-0.469	37.88	84	XP_309656
<i>AsHPX6</i>	scaffold247; 8 340 – 11 913	2 397	798	89.8	C ₃₉₆₁ H ₆₁₀₇ N ₁₁₆₇ O ₁₁₇₁ S ₃₃	7.07	-	-	-0.545	43.36	68	XP_309590
<i>AsHPX7</i>	scaffold247; 3 194 – 4 688	2 301	766	86.1	C ₃₈₂₇ H ₃₈₈₅ N ₅₆₅ O ₁₁₂₃ S ₃₁	6.28	23	-	-0.362	44.79	72	XP_309592
<i>AsHPX8</i>	scaffold9; 61 607 – 62 614	801	226	29.6	C ₁₃₁₄ H ₂₀₂₄ N ₃₆₄ O ₄₀₀ S ₁₁	7.70	20	-	-0.391	28.00	71	XP_309791
<i>AsHPX9</i>	scaffold54; 25 599 – 27 104	1 761	586	65.9	C ₂₉₀₃ H ₄₅₄₁ N ₈₁₇ O ₈₈₅ S ₂₇	6.56	20	-	-0.365	33.32	68	XP_003436892
<i>AsHPX10</i>	scaffold54; 27 720 – 29 839	1 761	586	66.1	C ₂₉₁₈ H ₄₅₂₂ N ₈₂₀ O ₈₈₂ S ₂₈	6.60	20	-	-0.368	33.44	84	XP_309791
<i>AsHPX11</i>	scaffold9; 71 537 – 73 493	1 770	589	66.4	C ₂₉₁₂ H ₄₅₅₀ N ₈₅₆ O ₈₆₄ S ₃₂	8.46	21	-	-0.353	43.37	80	XP_311449
<i>AsHPX12</i>	scaffold14; 7 255 480 – 7 257 724	1 959	652	73.9	C ₃₂₉₁ H ₅₀₉₆ N ₈₈₈ O ₉₇₇ S ₃₈	6.39	-	-	-0.381	46.13	71	XP_563016
<i>AsHPX13</i>	scaffold110; 6 01 398 – 6 04 538	1 839	612	68.6	C ₃₀₁₃ H ₄₇₀₄ N ₈₆₀ O ₉₀₈ S ₃₅	5.56	-	-	-0.339	44.15	73	XP_554228
<i>AsHPX14</i>	scaffold110; 598 011 – 600 175	1 821	606	68.1	C ₂₉₉₇ H ₄₆₅₅ N ₈₄₉ O ₉₂₃ S ₂₆	5.25	22	-	-0.417	41.12	69	XP_003436891
<i>AsHPX15</i>	scaffold122; 529 275 – 531 336	1 965	654	70.1	C ₃₀₉₀ H ₄₈₂₂ N ₈₅₄ O ₉₆₈ S ₂₃	7.39	-	-	-0.152	43.48	66	XP_309429
<i>AsHPX16</i>	scaffold14; 7 251 873 – 7 253 458	1 896	631	71.4	C ₃₁₇₀ H ₄₉₂₆ N ₈₆₈ O ₉₄₄ S ₃₆	6.65	-	-	-0.404	42.33	65	XP_563016
<i>AsHPX17</i>	scaffold9; 68 340 – 70 303	1 641	546	61.6	C ₂₇₀₈ H ₄₂₂₂ N ₇₈₈ O ₈₀₃ S ₃₄	8.11	20	-	-0.370	41.24	73	XP_311449
<i>AsHPXd</i>	scaffold26; 1 594 101 – 1 625 347	4 971	1 656	184.3	C ₈₀₇₃ H ₁₂₇₆₁ N ₂₃₄₅ O ₂₄₆₂ S ₇₀	6.00	26	✓	-0.414	39.74	81	XP_003435740
<i>AsDUOX</i>	scaffold49; 444 245 – 451 228	4 341	1 446	167.3	C ₇₅₅₆ H ₁₁₆₆₆ N ₂₀₄₂ O ₂₁₁₆ S ₇₄	8.38	-	✓	-0.269	40.69	97	XP_319115
<i>AsDBLOX</i>	scaffold49; 7 560 170 – 7 566 934	4 293	1 430	160.3	C ₇₀₈₈ H ₁₁₀₆₀ N ₂₀₂₀ O ₂₁₀₇ S ₆₄	6.19	-	✓	-0.355	49.13	92	XP_317106

✓: 有 Present; - : 无 Absent.

基因外显子与内含子分布模式差异较大,结构示意图见图2。这些基因共有98个外显子,长度为63~18 833 bp,每个基因具1~12个外显子。其中, *AsDUOX* 和 *AsHPXd* 具有12个外显子, *AsDBLOX* 有8个外显子, *AsHPX3* 有7个外显子,4个基因 (*AsHPX1*, *AsHPX4*, *AsHPX12* 和 *AsHPX16*) 具有5个外显子,7个基因 (*AsHPX5*, *AsHPX6*, *AsHPX9*, *AsHPX10*, *AsHPX11*, *AsHPX14* 和 *AsHPX17*) 具有4

个外显子, *AsHPX8* 和 *AsHPX13* 含3个外显子, *AsHPX7* 和 *AsHPX15* 含2个外显子, *AsHPX2* 仅含1个外显子。

中华按蚊 HPX 基因共有75个内含子,每个基因具有0~11个内含子,长度为45~10 228 bp, *AsHPX3*, *AsHPX9*, *AsHPX13*, *AsHPXd*, *AsDBLOX* 和 *AsDUOX* 具有长的内含子(1 199~10 228 bp),其他基因的内含子长度相当较短(45~598 bp)。这些内

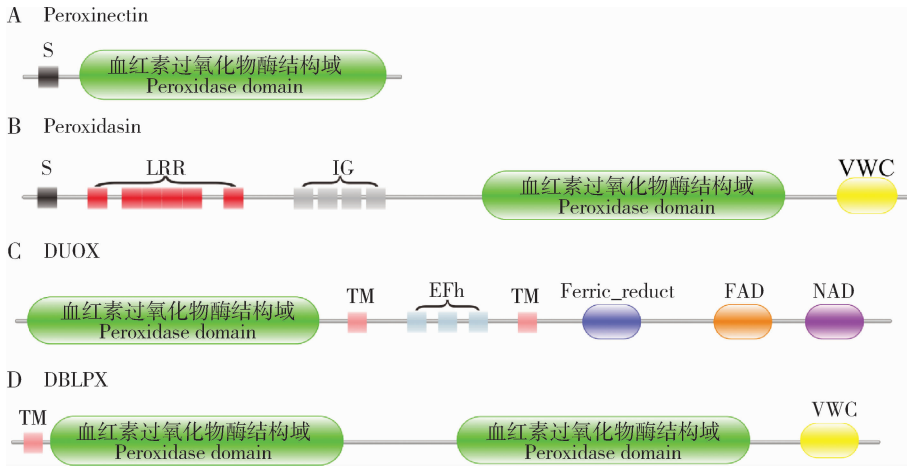


图1 中华按蚊 HPX 家族成员的结构域和基序

Fig. 1 Schematic view of the domains and motifs of the HPX family members in *Anopheles sinensis*

A: Peroxinectin 亚家族 Peroxinectin subfamily; B: Peroxidasin 亚家族 Peroxidasin subfamily; C: DUOX 亚家族 DUOX subfamily; D: DBLPX 亚家族 DBLPX subfamily. S: 信号肽 Signal peptide; LRR: 亮氨酸重复序列 Leucin-rich repeats; IG: 免疫球蛋白结构域 Immunoglobulin domain; VWC: C型血管性血友病因子结构域 Von Willebrand factor type C domain; TM: 跨膜螺旋 Transmembrane helices; EFh: 钙结合基序 EF-hand calcium binding domain; Ferric_reduct: 铁离子还原蛋白结构域 Ferric reductase domain; NAD: 铁还原酶类 NAD 结合结构域 Ferric reductase-like NAD binding domain; FAD: 黄素腺嘌呤二核苷酸结合结构域 Flavin adenine dinucleotide binding domain.

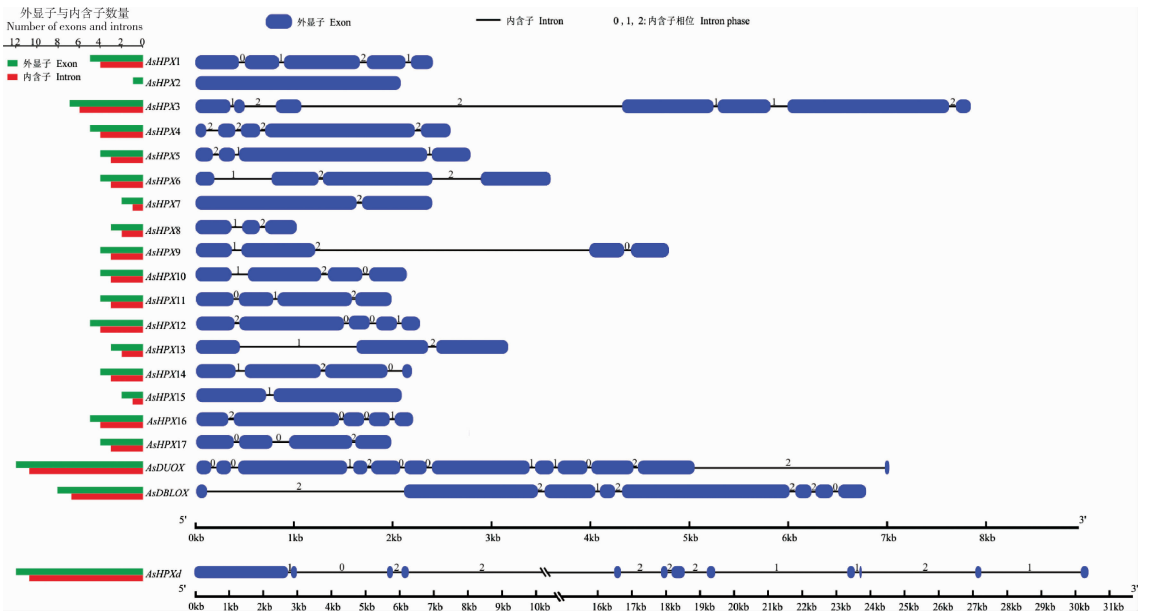


图2 中华按蚊 HPX 基因的结构和内含子相位

Fig. 2 Structure and intron phase of the HPX genes in *Anopheles sinensis*

含子具有 3 种相位 (intron phase): phase 0 型, phase 1 型和 phase 2 型 (图 2)。一个内含子如果位于 2 个完整的密码子之间,则定义为 phase 0 相位内含子;相应地,位于密码子内的第 1 或第 2 个核苷酸之后的内含子,则定义为 phase 1 或 phase 2 内含子。中华按蚊的 HPX 基因中 phase 0 型的内含子有 17 个 (占内含子总数的 22.7%), phase 1 型的有 23 个 (30.7%), phase 2 型的有 35 个 (46.6%)。

2.3 中华按蚊 HPX 基因在基因组上的定位

中华按蚊 HPX 家族基因的基因组定位分析结果表明,20 个 HPX 基因分布在中华按蚊基因组的 10 条 scaffolds 上 (图 3)。基于系统发育关系、序列比对和基因组位置信息分析, *AsHPX16* 和 *AsHPX17* 分别从 *AsHPX12* 和 *AsHPX11* 扩增出的重复基因,中华按蚊的其余 18 个 HPX 基因与冈比亚按蚊 18 个 HPX 基因是一一对应的支系同源基因。

共线性 (synteny) 分析显示,中华按蚊这 10 条 scaffold 中, Scaffold14 和 scaffold247 对应到冈比亚

按蚊 2R 染色体上; scaffold39 和 scaffold49 对应到 3R 染色体上, scaffold9, scaffold110, scaffold54 和 scaffold122 对应到 3L 染色体上;而 scaffold26 和 scaffold16 分别对应到 2L 和 X 染色体上,这些对应信息有助于中华按蚊基因组的细胞和物理图谱构建。

这些定位于不同 scaffold 上的 HPX 基因,大多数成簇聚集 (基因间距小于 20 kb)。在 Scaffold14 上, HPX12 与 HPX16 成簇聚集,间距为 2 kb,它们和 HPX3 的间距为 27.1 Mb, HPX3 和 HPX5 的间距为 4.3 Mb;在 scaffold247 上, *AsHPX6* 和 *AsHPX7* 成簇分布,间距为 3.6 kb;在 scaffold9 上, HPX8, HPX17, HPX11 和 HPX1 的平均间距为 5.7 kb;在 scaffold110 上, HPX14 和 HPX13 的间距为 1.2 kb;在 scaffold54 上, HPX10 和 HPX9 的间距为 10.6 kb。这些成簇聚集的基因在图 6 的系统发育关系中也最近,结构相似,建议起源于一系列的基因重复事件,它们的功能也可能相似。

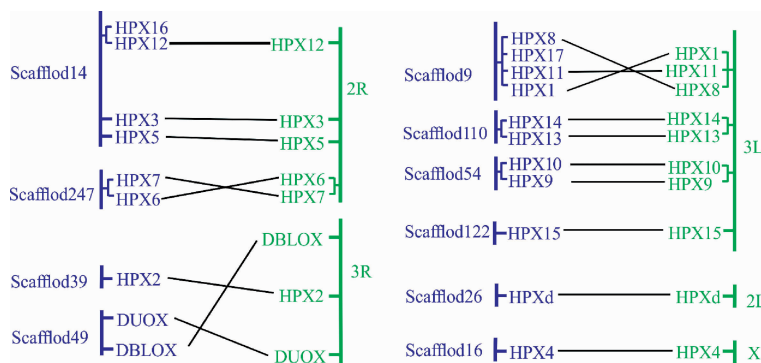


图 3 中华按蚊 HPX 基因的 scaffolds 定位及与冈比亚按蚊 HPX 基因的共线性分析

Fig. 3 The scaffold mapping of the HPX genes in *Anopheles sinensis* and the synteny analysis with the HPX genes in *An. gambiae*. 蓝色部分表示中华按蚊,绿色部分表示冈比亚按蚊。 *An. sinensis* is indicated in blue, and *An. gambiae* in green.

2.4 中华按蚊 HPX 家族的保守结构域和蛋白质结构

对中华按蚊的 HPX 家族的氨基酸进行多重比对分析,及其功能位点标注见图 4 (A)。因为 *AsDUOX* 具有多个结构域且主要的 peroxidase 结构域中多个关键功能位点已经缺失 (Zámocký *et al.*, 2014),所以未被纳入进行多重比对分析。结果显示,中华按蚊 HPX 的氨基酸序列在 N 端和 C 端分别含有 1 个二硫键,由 4 个半胱氨酸位点构成,与冈比亚按蚊 HPX 氨基酸序列特征相似,且 N 端具 5 个钙离子结合位点,1 个过渡态稳定位点, C 端具 1 个血红素结合位点和 1 个铁离子结合位点,这些特征都符合此前对 HPX 基因的研究分析 (Zámocký *et*

al., 2014)。

在 Modeller 9.19 中进行 HPX 家族的同源建模,预测蛋白质的 3D 结构。由于 *AsHPXd* 和 *AsDUOX* 包含多个结构域和主要位点,所以将 *AsHPXd* 和 *AsDUOX* 进行 3D 建模,如图 4 (B) 所示,两者都由多个 α 螺旋和 β 折叠组成,其结构复杂,多个结构域紧密的结合并且共同发挥作用。

2.5 中华按蚊 HPX 基因的替换率和选择压力

dN (Ka 非同义突变)/ dS (Ks 同义突变) 的比率已经被广泛用于检测基因的选择压力,其比率大于 1 时,被认为是正选择,比率小于 1 时为负选择。我们选择冈比亚按蚊与中华按蚊的直系同源基因进行替换率的分析,通过 PAML 软件下的 YN00 程序,计

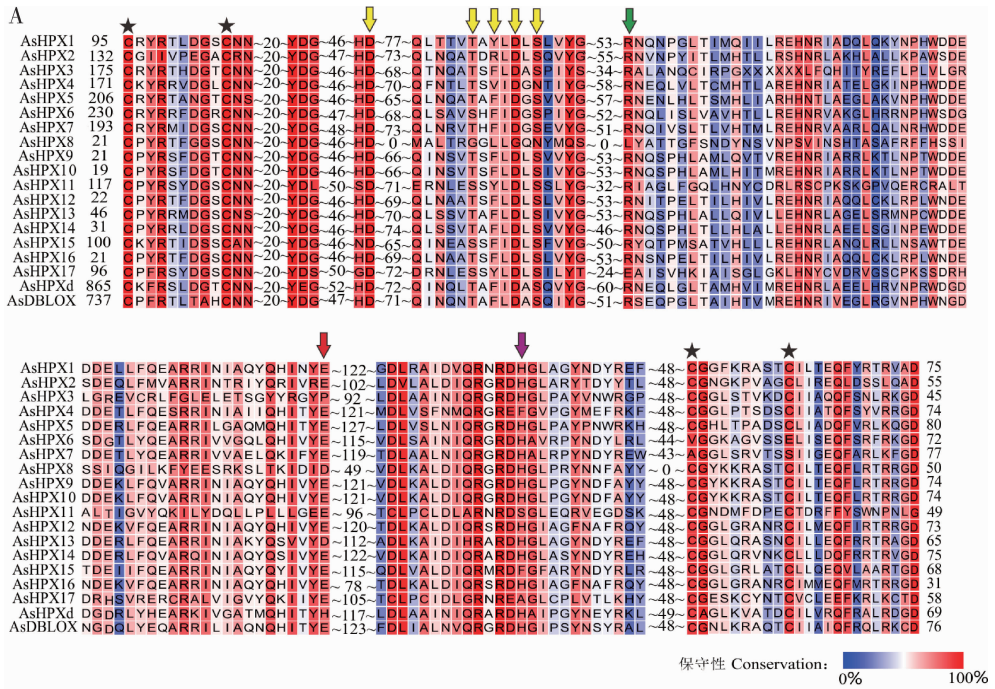


图 4 中华按蚊 HPX 家族成员部分氨基酸序列的多重比对(A)和 AsHPXd 及 AsDUOX 三维结构预测(B)

Fig. 4 Multiple sequence alignment of amino acids of partial HPX family members (A) and the 3D structure prediction of AsHPXd and AsDUOX (B) in *Anopheles sinensis*

星号标注半胱氨酸,5 个黄色箭头标注 Ca^{2+} 结合位点,绿色箭头标注过渡态稳定位点,红色箭头标注血红素结合位点,紫色箭头标注铁离子结合位点。Asterisks indicate cysteine, five yellow arrows indicate Ca^{2+} binding sites, green arrow indicates transition state stabilizer site, red arrow indicates heme binding site, and purple indicates iron ion binding site.

算出 HPXs 基因的 dN, dS 以及 ω (dN/dS) 的值。结果显示,中华按蚊与冈比亚按蚊基因对的 ω 值都小于 1(图 5),说明 HPX 基因在演化的过程中受到的是负选择(纯化选择),其中 DBLOX 基因的 ω 值相对最小,为 0.0504,说明其受到的负选择压相对最大,氨基酸序列也是相对最保守的(Yang and Nielsen, 2000)。与此相对,HPX11 的 ω 值相对最大,为 0.3349,说明其受到的负选择压相对较小。

2.6 中华按蚊及双翅目代表种 HPX 基因的系统发育关系

利用 PAUP4.0 软件,基于核苷酸序列,应用最大似然法构建的中华按蚊、冈比亚按蚊、埃及伊蚊、

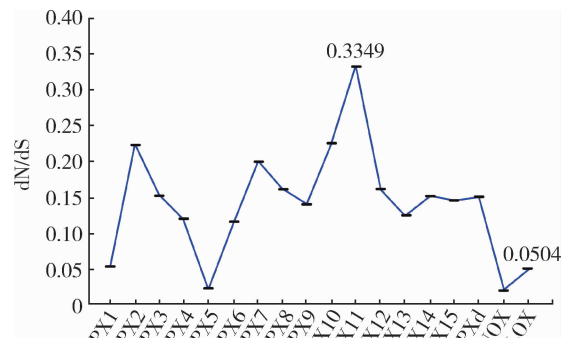


图 5 中华按蚊与冈比亚按蚊 HPX 直系同源基因对的 dN/dS 分析

Fig. 5 dN/dS analysis for the orthologous HPX gene pairs between *Anopheles sinensis* and *An. gambiae*

致倦库蚊和黑腹果蝇 HPX 基因的系统发育树见图 6。结果显示,在这 5 种昆虫中,HPX1-5, HPX7, HPXd, DUOX 和 DBLOX 基因都存在唯一的 1:1:1:1:1 的直系同源基因,并各自形成独立的支系,其 bootstrap 值在 83%~100% 间。在 HPX6 和 HPX11 基因中,4 种蚊虫之间存在 1:1:1:1 的直系同源关系(黑腹果蝇无 HPX6 和 HPX11 基因),具有很好的自展值 100%。仅中华按蚊和冈比亚按蚊具有 HPX8-

10 基因,而且这两个种的 HPX8-10 基因各自成为一个支系,其 bootstrap 自展值为 100%,说明 HPX8-10 基因是按蚊特有基因,而且 HPX8-10 基因在这两个种都从一个基因分化出来。同时,也仅中华按蚊和冈比亚按蚊具有 HPX12, HPX13 和 HPX15 基因,并各自形成独立的支系,其 bootstrap 自展值在 92%~100% 间,说明这些基因也仅为按蚊所特有。

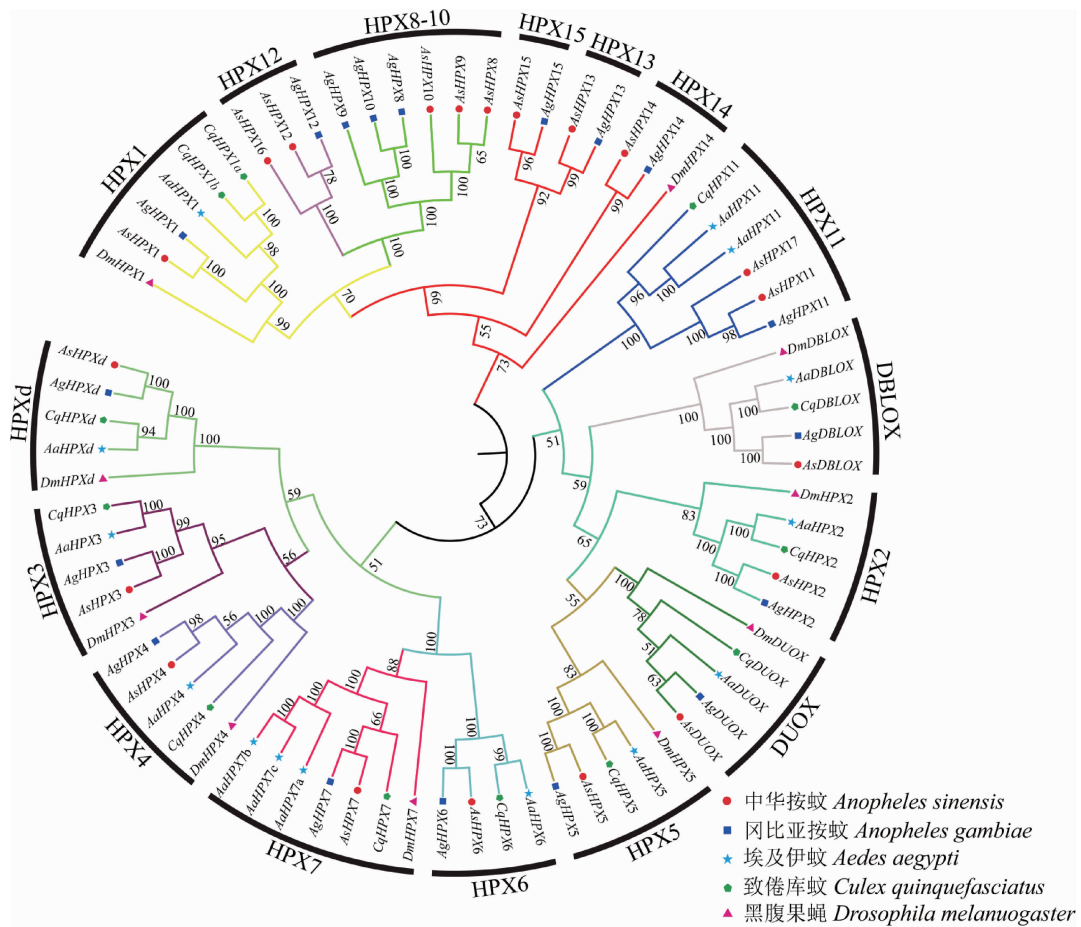


图 6 应用最大似然法基于核苷酸序列的 5 种双翅目昆虫 HPX 基因构建的系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree of HPX genes in five dipteran insect species based on nucleotide sequences using maximum likelihood method

As: 中华按蚊 *Anopheles sinensis*; Ag: 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*; Aa: 埃及伊蚊 *Aedes aegypti*; Cq: 致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus*; Dm: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*.

3 讨论

血红素结合过氧化物酶 HPX 在昆虫的先天免疫系统中扮演着重要的角色,在不同的昆虫中具有明显的种类数量差异。我们的研究发现,中华按蚊中有 20 个 HPX 基因,与黑腹果蝇的 10 个 HPX 基

因,致倦库蚊 12 个 HPX 基因,埃及伊蚊的 14 个 HPX 基因和冈比亚按蚊的 18 个 HPX 基因相比,中华按蚊的 HPX 基因具有扩增现象。不同双翅目物种 HPX 基因数量的差异说明 HPX 在不同昆虫对不同环境的适应的差异以及不同蚊种在吸血和血液中免疫调节因子调控上的差异(Renault *et al.*, 2016)。无脊椎动物没有获得性免疫功能,而以先天性免疫

功能替代,因此在无脊椎动物中,具有对入侵体内异物产生应答反应的细胞黏附蛋白 HPXd 似乎是必不可少的细胞防卫反应(Renault *et al.*, 2016)。

本研究鉴定发现中华按蚊具 20 个 HPX 家族基因,也鉴定了冈比亚按蚊、埃及伊蚊、致倦库蚊基因组上的 HPX 家族基因。中华按蚊 HPX 的分子量大部分在 61.6 ~ 184.3 kD 之间(除 HPX8 为 29.6 kD),其氨基酸序列 N 端和 C 端都具有两个保守的半胱氨酸,各形成一个二硫键。冈比亚按蚊 HPX 的分子量在 66.9 ~ 169.1 kD 间,也在氨基酸序列 N 端和 C 端分别具有一个半胱氨酸形成的二硫键,这与与中华按蚊一致。埃及伊蚊与致倦库蚊的 HPX 分子量分别在 76.1 ~ 186.6 kD 和 67.7 ~ 171.6 kD 间,可以推测不同蚊虫 HPX 分子量相似,这与 HPX 基因结构的保守性有关。

我们研究了中华按蚊、黑腹果蝇、冈比亚按蚊、埃及伊蚊、致倦库蚊 5 个种 HPX 基因的系统发育关系,参考早前的研究,把这些 HPX 基因分为了 16 个组,在这 16 个组中,HPX1-5, HPX7, HPXd, DUOX 和 DBLOX 组都存在唯一的 1:1:1:1:1 的直系同源基因,并各自形成独立的支系,表明这些组的基因起源于蚊虫和果蝇分化之前,没有基因的丢失出现。而 HPX6 和 HPX11 组中缺乏黑腹果蝇 HPX 同源基因,只有 4 种蚊虫之间存在 1:1:1:1 的直系同源关系,说明 HPX6 和 HPX11 组起源于蚊虫和果蝇分化之后。仅中华按蚊和冈比亚按蚊具有 HPX8-10 组,而且这两个种的 HPX8-10 组各自成为一个支系,说明 HPX8-10 组是按蚊特有基因,且 HPX8-10 组在这两个种都从一个基因分化出来。同时,也仅中华按蚊和冈比亚按蚊具有 HPX12, HPX13 和 HPX15 基因,并各自形成独立的支系,说明这些基因也仅为按蚊所特有。鉴于中华按蚊与冈比亚按蚊 HPX 基因数量相似,我们推测是由于中华按蚊与冈比亚按蚊具有很近的亲缘关系,且生活习性以及对环境的适应类似,才会出现相似的 HPX 基因进化。哺乳动物的 DUOX 具有扩增现象(Harper *et al.*, 2005),而昆虫中尚未发现 DUOX 具有扩增,且在这 5 种昆虫中 DUOX 的主要结构域——peroxidase 结构域被预测到缺失了多个关键功能位点,可以推测,在进一步的进化过程中,昆虫的 DUOX 会随着主要功能位点的缺失逐渐失去其功能,这与昆虫的特殊环境适应相关。

在理解基因序列动态的演化时,对非同义和同义替换率的计算是重要的一环,同义突变是没有出

现表型的自然选择,而非同义替换则是受到了强烈的选择压力,因此,非同义和同义替换率的比值是研究分子进化机制的重要内容,比较这两种突变的替换率是了解基因序列进化机制强有力的工具。与冈比亚按蚊直系同源基因比较,中华按蚊 HPX 基因的替换率 ω 值都小于 1,说明 HPX 基因家族在漫长的进化过程中遭受了负选择作用,暗示了 HPX 基因的保守性,其功能在蚊虫中具有很高的重要性。在所分析的 16 个同源基因组中,DBLOX 组的 ω 值相对最小,说明其受到的负选择压力相对最大,氨基酸序列也相对保守,而 DBLOX 组是唯一具有两个 peroxidase 结构域的基因,说明 peroxidase 结构域与 HPX 组的其他结构域相比是最保守的。

HPX 基因在昆虫不同发育时期和不同组织都具有较大量的表达,说明其对昆虫的生长发育、抵抗病原菌侵染以及繁殖都可能发挥着重要作用。有研究表明,HPX 基因在昆虫卵中的表达水平较高,而在幼虫和蛹期的表达保持在较低的水平,在成虫中进一步降低(Garver *et al.*, 2008; Jian, 2016)。而在昆虫不同组织中 HPX 基因表达水平不尽相同,如在家蚕表皮中表达量较高,表皮属于昆虫的重要免疫组织,也可以验证 HPX 基因与昆虫的先天免疫有关(Shi *et al.*, 2012);在褐飞虱 *Nilaparvata lugens*, HPX 在足和翅中具有较高表达,或许可以推测其与肌肉的收缩运动有关(Jian, 2016);在长红锥蝽 *Rhodnius prolixus*, HPX 在卵巢中较高表达,其中 DUOX 作为电子受体在昆虫体内对超量 H_2O_2 进行氧化反应,使卵巢和胚胎免受氧化损伤得到正常发育(Dias *et al.*, 2013)。经过 RNAi 沉默 HPXd 基因后,冈比亚按蚊体内的免疫稳态出现缺陷,成蚊存活率下降,这也表明 HPX 基因在抵抗病原菌侵染中具有重要作用(Garver *et al.*, 2008)。

本研究运用生物信息学方法预测了中华按蚊 HPX 基因及其结构和替换率,分析了 HPX 的保守结构域和 3D 结构,并与冈比亚染色体进行了共线性分析,探究了双翅目中 5 种代表性昆虫 HPX 基因的系统发育关系和进化,丰富了中华按蚊的基因数据,对于进一步研究中华按蚊 HPX 基因及其免疫防御功能具有重要意义。

参考文献 (References)

- Chang XL, Zhong DB, Fang Q, Hartsel J, Zhou GF, Shi LN, Fang FJ, Zhu CL, Yan GY, 2014. Multiple resistances and complex mechanisms of *Anopheles sinensis* mosquito: a major obstacle to

- mosquito-borne diseases control and elimination in China. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 8(5): e2889.
- Chen B, Zhang YJ, He ZB, Li WS, Si FL, Tang Yao, He QY, Qiao L, Yan ZT, Fu WB, 2014. *De novo* transcriptome sequencing and sequence analysis of the malaria vector *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae). *Parasit. Vectors*, 7(1): 314.
- Chen X, Xiong W, Li C, Gao S, Song X, Wu W, Li B, 2016. Comparative RNA-sequencing profiling reveals novel Delta-class glutathione S-transferases relative genes expression patterns in *Tribolium castaneum*. *Gene*, 593(1): 13–20.
- Corona M, Robinson GE, 2006. Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny. *Insect Mol. Biol.*, 15(5): 687–701.
- Debeurme F, Picciocchi A, Dagher MC, Grunwald D, Beaumel S, Fieschi F, Stasia MJ, 2010. Regulation of NADPH oxidase activity in phagocytes: relationship between FAD/NADPH binding and oxidase complex assembly. *J. Biol. Chem.*, 285(43): 33197–33208.
- DeJong RJ, Miller LM, Molina-Cruz A, Gupta L, Kumar S, Barillas-Mury C, 2007. Reactive oxygen species detoxification by catalase is a major determinant of fecundity in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(7): 2121–2126.
- Dias FA, Gandara AC, Queiroz-Barros FG, Oliveira RL, Sorgine MH, Braz GR, Pedro L, 2013. Ovarian dual oxidase (Duox) activity is essential for insect eggshell hardening and waterproofing. *J. Biol. Chem.*, 288(49): 35058–35067.
- Felton GW, Summers CB, 1995. Antioxidant systems in insects. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, 29(2): 187–197.
- Garver LS, Xi Z, Dimopoulos G, 2008. Immunoglobulin superfamily members play an important role in the mosquito immune system. *Dev. Comp. Immunol.*, 32(5): 519–531.
- Harper RW, Xu C, Eiserich JP, Chen Y, Kao CY, Thai P, Setiadia H, Wua R, 2005. Differential regulation of dual NADPH oxidases/peroxidases, DUOX1 and DUOX2, by Th1 and Th2 cytokines in respiratory tract epithelium. *FEBS Lett.*, 579(21): 4911–4917.
- Huang L, Wojciechowski G, Montellano PRO, 2006. Role of heme-protein covalent bonds in mammalian peroxidases. Protection of the heme by a single engineered heme-protein link in horseradish peroxidase. *J. Biol. Chem.*, 281(28): 18983–18988.
- Jian YK, 2016. Function Analysis of a Heme Peroxidase Gene *Nl25323* in *Nilaparvata lugens*. MSc Thesis, Zhejiang University, Hangzhou. [见煜坤, 2016. 褐飞虱亚铁血红素过氧化物酶基因 *Nl25323* 生物学功能解析. 杭州: 浙江大学硕士学位论文]
- Joseph LM, Tan TK, Man WS, 1998. Antifungal effects of hydrogen peroxide and peroxidase on spore germination and mycelial growth of *Pseudocercospora* species. *Can. J. Bot.*, 76(76): 2119–2124.
- Kajla M, Gupta K, Kakani P, Dhawan R, Choudhury TP, Gupta L, Gakhar SK, Kumar S, 2015. Identification of an *Anopheles* lineage-specific unique heme peroxidase HPX15: a plausible candidate for arresting malaria parasite development. *J. Phylogen. Evol. Biol.*, 3(4): 1000160–1000171.
- Korayem AM, Khodairy MM, Abdelaal AAA, Elsonbaty AAM, 2012. The protective strategy of antioxidant enzymes against hydrogen peroxide in honey bee, *Apis mellifera* during two different seasons. *J. Biol. Earth Sci.*, 2(2): B93–B109.
- Lackie AM, Lackie JM, 1979. Evasion of the insect immune response by *Moniliformis dubius* (Acanthocephala): further observations on the origin of the envelope. *Parasitology*, 79(2): 297–301.
- Li ZZ, Shen HJ, Jiang QG, Ji BZ, 1994. A study on the activities of endogenous enzymes of protective system in some insects. *Acta Entomol. Sin.*, 37(4): 399–403.
- Mccall AS, Cummings CF, Bhavé G, Vanacore R, Pagemccaw A, Hudson BG, 2014. Bromine is an essential trace element for assembly of collagen IV scaffolds in tissue development and architecture. *Cell*, 157(6): 1380–1392.
- Nelson RE, Fessler LI, Takagi Y, Blumberg B, Keene DR, Olson PF, Parker CG, Fessler JH, 1994. Peroxidase: a novel enzyme-matrix protein of *Drosophila* development. *EMBO J.*, 13(15): 3438–3447.
- Passardi F, Theilera G, Zámocky M, Cosio C, Rouhierd N, Teixerae F, Margis-Pinheiroe M, Ioannidis V, Penela C, Falquet L, Dunanda C, 2007. PeroxiBase: the peroxidase database. *Phytochemistry*, 68(12): 1605–1611.
- Posada D, 2003. Using MODELTEST and PAUP* to select a model of nucleotide substitution. *Current Protocols in Bioinformatics*, Chapter 6, Unit 6.5.1–6.5.14.
- Radyuk SN, Klichko VI, Spinola B, Sohal RS, Orr WC, 2001. The peroxiredoxin gene family in *Drosophila melanogaster*. *Free Radic Biol. Med.*, 31(9): 1090–1100.
- Reddy BN, Rao BP, Prasad G, Raghavendra K, 2012. Identification and classification of detoxification enzymes from *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Bioinformation*, 8(9): 430–436.
- Renault D, Dorrah MA, Mohamed AA, Abdelfattah EA, Bassal TTM, 2016. Assessment of oxidative stress and activities of antioxidant enzymes depicts the negative systemic effect of iron-containing fertilizers and plant phenolic compounds in the desert locust. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 23: 1–12.
- Shaw WR, Teodori E, Mitchell SN, Baldini F, Gabrieli P, Rogers DW, Catteruccia F, 2014. Mating activates the heme peroxidase HPX15 in the sperm storage organ to ensure fertility in *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111(16): 5854–5859.
- Shi GQ, Yu QY, Zhang Z, 2012. Annotation and evolution of the antioxidant genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 79(2): 87–103.
- Soudi M, Zámocky M, Jakopitsch C, Furtmüller PG, Obinger C, 2012. Molecular evolution, structure, and function of peroxidases. *Chem. Biodivers.*, 9(9): 1776–1793.
- Taurog A, 1999. Molecular evolution of thyroid peroxidase. *Biochimie*, 81(5): 557–562.
- 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.

- Waterhouse RM, Kriventseva EV, Meister S, Xi Z, Alvarez KS, Bartholomay LC, Barillas-Mury C, Bian G, Blandin S, Christensen BM, Dong Y, Jiang H, Kanost MR, Koutsos AC, Levashina EA, Li J, Ligoxygakis P, Maccallum RM, Mayhew GF, Mendes A, Michel K, Osta MA, Paskewitz S, Shin SW, Vlachou D, Wang L, Wei W, Zheng L, Zou Z, Severson DW, Raikhel AS, Kafatos FC, Dimopoulos G, Zdobnov EM, Christophides GK, 2007. Evolutionary dynamics of immune-related genes and pathways in disease-vector mosquitoes. *Science*, 316(5832): 1738 – 1743.
- Welinder KG, 1992. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2(3): 388 – 393.
- Yang Z, Nielsen R, 2000. Estimating synonymous and nonsynonymous substitution rates under realistic evolutionary models. *Mol. Biol. Evol.*, 17(1): 32 – 43.
- Zámocky M, 2004. Phylogenetic relationships in class I of the superfamily of bacterial, fungal, and plant peroxidases. *Eur. J. Biochem.*, 271(16): 3297 – 3309.
- Zámocky M, Obinger C, 2010. Molecular phylogeny of heme peroxidases. In: Torres E, Ayala M eds. *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases*. Springer Berlin, Heidelberg. 7 – 35.
- Zámocky M, Gasselhuber B, Furtmüller PG, Obinger C, 2014. Turning points in the evolution of peroxidase-catalase superfamily: molecular phylogeny of hybrid heme peroxidases. *Cell. Mol. Life Sci.*, 71(23): 4681 – 4696.
- Zhao X, Smartt CT, Li J, Christensen BM, 2001. *Aedes aegypti*, peroxidase gene characterization and developmental expression. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 31(4 – 5): 481 – 490.
- Zou Z, Evans JD, Lu Z, Zhao P, Williams M, Sumathipala N, Hetru C, Hultmark D, Jiang H, 2007. Comparative genomic analysis of the *Tribolium* immune system. *Genome Biol.*, 8(8): R177.

(责任编辑: 马丽萍)