

葱蝇防御素基因的鉴定及针刺对基因表达的影响^{*}

徐燕玲, 付丹影, 司凤玲, 陈 斌, 郝友进

(重庆师范大学 生命科学学院 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】分析葱蝇(*Delia antiqua*)防御素基因家族的序列特征、分子进化和基因表达模式,了解防御素基因在滞育期的免疫应答特征。【方法】利用生物信息学方法,从转录组数据库中搜索防御素基因家族的序列,并进行基因鉴定、系统发育、选择压力及针刺刺激对基因表达的影响分析。【结果】共鉴定出3个防御素前体序列及由此形成的40个氨基酸残基组成的成熟肽 DaDef1, DaDef2 和 DaDef3,理论分子量分别为 4.09, 4.12 4.09 kDa;等电点分别为 8.71, 8.69 和 8.35;它们具有昆虫防御素的典型的保守结构域,有3对分子内二硫键,均为外分泌型、稳定多肽。系统发育分析显示葱蝇防御素成熟肽 Dade1 与新陆原伏蝇(*Protophormia terraenovae*)、丝光绿蝇(*Lucilia sericata*)和家蝇(*Musca domestica*)防御素亲缘关系最近并聚为一枝,再与 Dade2 和 Dade3 聚为一枝。基因表达分析表明针刺能明显影响葱蝇防御素基因的表达。【结论】葱蝇防御素基因家族序列保守性高,具有典型的家族特征;它们的表达模式在冬滞育和非滞育蛹的不同发育时期存在明显差异,说明葱蝇冬滞育蛹和非滞育蛹的免疫应答存在差异。研究结果为进一步研究昆虫防御素类抗菌肽的结构特征、进化以及滞育条件下免疫活动提供理论基础。

关键词:葱蝇;冬滞育;昆虫免疫;防御素;基因表达;系统发育

中图分类号:Q96

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2018)02-0038-07

昆虫受到病原微生物感染或机械损伤后,血淋巴细胞会瞬时分泌抗菌肽及时抵御感染或参与修复损伤^[1];其中昆虫防御素(Insect defensin)是抗菌肽家族中最为普通的一类。到目前为止,已在双翅目(Diptera)、鞘翅目(Coleoptera)、膜翅目(Hymenoptera)、鳞翅目(Lepidoptera)、蜻蜓目(Odonata)等昆虫中共发现超过60种防御素^[2]。研究发现:昆虫防御素成熟肽的分子量较小,一般含有34~43个氨基酸残基;其中富含精氨酸和半胱氨酸残基,带正电荷,含有3~4对分子内二硫键,形成 $Ca\beta\beta$ 型的稳定结构^[3]。也有一些昆虫来源的防御素出现C端或N端延伸,从而引起氨基酸序列长度的增加,例如厩螫蝇(*Stomoxys calcitrans*)的防御素含有N端延伸结构,但它的功能尚不清楚^[4];而熊蜂(*Bombus pascuorum*)和蜜蜂(*Apis mellifera*)的防御素则具有C端延伸并形成酰胺化结构^[5]。昆虫防御素结构稳定且能高效地杀灭革兰氏阳性菌,同时对革兰氏阴性菌、酵母和丝状真菌及某些分支杆菌、螺旋菌、寄生虫等病原微生物都有一定的抑杀作用^[6]。

葱蝇(*Delia antiqua*)作为一种重要的地下害虫,广泛分布于亚洲、欧洲和北美洲,对许多百合科(Liliaceae)类蔬菜造成重大的经济损失^[7]。研究发现葱蝇可通过蛹滞育度过酷暑和严寒。滞育是昆虫在特定发育阶段代谢活动降低、发育停滞的一种生理现象。近些年来,滞育已成为昆虫生态学研究领域的热点之一,但有关滞育期的免疫研究却很少。处于滞育期的黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)体液免疫系统可被革兰氏阴性菌如大肠杆菌(*Escherichia coli*)以及革兰氏阳性细菌如藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)激活^[8];注射凝胶珠可激活滞育期天蚕蛾(*Samia cynthia pryeri*)的细胞免疫反应^[9];在舞毒蛾(*Lymantria dispar*)滞育的起始期和维持期,具有抗微生物感染作用的hemolin基因能明显上调表达^[10]。然而,有关葱蝇滞育期的免疫研究却很少,迄今仅克隆了1个含有clip结构域的胰蛋白酶(DaTrypsin, AY728056)。该蛋白的基因在冬滞育蛹中的表达明显高于夏滞育蛹,据此作者推测可能与滞育期的免疫或发育有关,但它的功能没有进一步报道^[11]。另外,郝友进等人^[12]通过基因数字表达谱分析发现,在自然饲养条件下,免疫基因如防御素基因defensin、麻蝇素基因

* 收稿日期:2017-05-25 修回日期:2017-09-21 网络出版时间:2018-03-23 15:54

资助项目:重庆市自然科学基金(No.cstc2016jcyjA0152);“两江学者”计划专项经费;联合国IAEA项目(No.18268/R0)

第一作者简介:徐燕玲,女,研究方向为生物化学与分子生物学,E-mail:1126087313@qq.com;通信作者:郝友进,教授,E-mail:haoyoujin@hotmail.com

网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20180323.1553.010.html

sarcotoxin、攻击素基因 *attacin* 等在夏滞育蛹中的表达明显高于非滞育蛹,进一步说明葱蝇夏滞育蛹的免疫系统仍处于激活状态。本研究基于转录组数据,进行了葱蝇防御素基因家族成员的鉴定、生物信息学及针刺处理后非滞育和冬滞育蛹中基因的表达模式分析,为进一步明确葱蝇防御素家族基因在滞育期的免疫应答功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫及实验处理

非滞育葱蝇(Non-diapause,ND)饲养在(20±0.5)℃、16 h 光照:8 h 黑暗的光周期和 50%~70%的相对湿度条件下。冬滞育蛹(Winter-diapause,WD)的诱导条件为(15±0.5)℃、12 h 光照:12 h 黑暗的光周期 50%~70%的相对湿度。本研究根据发育形态特征,取同一发育时期的非滞育和冬滞育蛹进行基因的相对表达量分析,刚化蛹时记为第 0 天(D0),具体取样时间点及相应的发育特征见表 1。每个取样点取 4~5 只蛹,用预灭菌的三号昆虫针进行针刺处理以模拟自然条件下的机械损伤,处理后置于原饲养条件下 8 h,液氮中冻存 20 min 后,置于-80℃;对照组除无针刺处理外,其他条件均与针刺处理组相同。本研究设置 3 个生物学重复和 2 个技术重复。

表 1 取样点及蛹的发育特征

Tab. 1 Sampling points and pupae developmental characteristics

ND	WD	发育特征
ND0	WD0(滞育前期)	蛹体表面呈乳白色,蛹壳未分离
ND2	WD3(滞育起始)	头外翻,形成头部形态
ND4	WD20(滞育保持期)	游离脂肪体在眼区中央出现
ND9.5	WD99(滞育解除期)	黄色体在眼部出现并开始移动

1.2 防御素基因序列的搜索与鉴定

从 NCBI 数据库中下载近缘物种黑腹果蝇和家蝇(*Musca domestica*)的已知防御素基因序列作为种子序列,通过本地 BLAST 搜索葱蝇转录组数据库(GAWI01000000)^[13],设定阈值为 $p \leq 1 \times 10^{-10}$,序列一致性大于 50%,同时利用关键词“*Defensin*”进行直接检索。去除重复序列后,利用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)查找候选基因序列的开放阅读框并推测所编码的氨基酸序列。利用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)和 NCBI CDD 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>)分析是否具有典型的昆虫防御素的结构域。

1.3 序列特征分析

使用 Compute pI/Mw(http://web.expasy.org/compute_pi/)在线工具估算蛋白质的理论分子量及等电点;利用 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测分析信号肽;亚细胞定位则通过 WOLFP SORT (http://www.genscript.com/psort/wolf_psort.html) 和 TargetP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)进行分析;利用 ExPaSy 提供的在线 Protparam 软件(<http://web.expasy.org/protparam/>)进行不稳定系数和亲/疏水性分析。氨基酸序列的多重比对则由 BioEdit 中的 Clustal W 程序完成;采用在线软件 DiANNA 1.1 (<http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/>)与 DISULFIND (<http://disulfind.dsi.unifi.it/>)对序列中二硫键的位置进行分析。运用 SOPMA 工具基于 PBILLYON-GERLAND 信息库对防御素成熟肽的二级结构进行预测。三级结构同源建模通过 Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>)进行并用 Swiss-PDBViewer (<http://spdbv.vital-it.ch/disclaim.html#>)进行 3D 结构的可视化处理。

1.4 系统发育及进化分析

为了解昆虫防御素间的亲缘关系,利用 Clustal W 对 10 种昆虫的 12 个防御素成熟肽的氨基酸序列进行多重比对;然后在最佳氨基酸进化模型 WAG+G 的基础上,利 MEGA 6.0^[14]中的最大似然法(ML)构建系统发育树。

1.5 基因选择压力估算

以密码子为单位,利用 MEGA 6.0^[14]对防御素成熟肽的核酸序列进行多重比对;然后用 PAML 软件中的 yn00^[15]程序计算基因序列两两间的非同义替换(Nonsynonymous substitution, K_a)和同义替换(Synonymous substitution, K_s)的比值(K_a/K_s)。

1.6 针刺对葱蝇防御素基因表达的影响

采用 Trizol 法从单个滞育蛹或非滞育蛹中提取总 RNA,利用琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 核酸定量仪检测

RNA 的完整性及浓度。以 3 μg RNA 为模板,按照 HiScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas 公司) 反转录试剂盒的操作说明进行第一链 cDNA 的合成,存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 待用。设计葱蝇防御素基因的特异性引物(表 2)并进行 qPCR 分析。qPCR 总体积为 20 μL ,包括 30 ng cDNA,10 μL SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II,0.8 μL 基因特异性引物(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),用 ddH₂O 补足至 20 μL 。反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s,68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s,共 40 个循环。每个样品均进行 3 次生物学重复和 2 次技术重复。以葱蝇 *Gapdh* 和 α -*Tublin* 作为内参基因对实验结果进行几何平均数处理,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算基因的相对表达量^[16]。

表 2 实时定量 PCR 引物
Tab. 2 Primers used for quantitative real-time PCR

基因	正向引物	反向引物	产物长度/bp
<i>DaDef1</i>	5'-CCACTTGCGACCTCTTGAGT-3'	5'-ACGCCTCTTCCATTGCAGTA-3'	103
<i>DaDef2</i>	5'-CGTACAGGAGTTGTGGGTCC-3'	5'-TACAGCTCAATCGGCAACCG-3'	139
<i>DaDef3</i>	5'-TGGTCGCCATAAAAGAGCC-3'	5'-CCATTGCAATAGCCACCACG-3'	111
<i>GAPDH</i> (内参)	5'-ACGTGGTGCTGCCCCAAAACATCATT-3'	5'-GGCGGACAGTCAAATCAACAAGG-3'	158
α - <i>Tubulin</i> (内参)	5'-TGGCGTGCTGCATGTTGTATCGT-3'	5'-GCCTGGCACAACAGTTGGTGGT-3'	149

1.7 统计分析

本研究中的 qPCR 数据均采用“平均值±标准差”表示,基因表达的差异比较分析由 SPSS 17.0 软件完成。采用单因素方差分析(One-way ANOVA)和 *t*-检验的统计方法对基因的相对表达量差异进行检验,当 $p<0.05$ 时,统计结果具有统计学意义。

2 结果

2.1 葱蝇防御素基因的鉴定

通过 BLASTP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 比对以及 Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) 和 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 的结构域分析,本研究共获得了 3 个防御素同源基因 *DaDef1*,*DaDef2* 和 *DaDef3* 且均含有完整的开放阅读框,它们所编码的防御素前体的氨基酸残基数目分别为 91,94 和 91 个;3 个成熟肽 *DaDef1*,*DaDef2* 和 *DaDef3* 均由 40 个氨基酸残基组成,理论分子量分别为 4.09,4.12 和 4.09 kDa,理论等电点分别为 8.71,8.69 和 8.35(表 3)。通过序列比对发现,葱蝇与其他昆虫防御素的氨基酸序列有很高的一致性,如成熟肽 *Dadef1* 与新陆原伏蝇

表 3 葱蝇防御素基因家族成员基本理化特征
Tab. 3 Basic physicochemical characteristics of members of defensin gene family of *D. antique*

蛋白质 名称	前前体/前体/ 成熟蛋白 氨基酸残 基数目/个		等电点	分子量 /kDa	疏水性 平均值	不稳定 系数
<i>Dadef1</i>	91/68/40		4.09	8.71	0.033	16.61
<i>Dadef2</i>	94/71/40		4.12	8.69	0.015	29.42
<i>Dadef3</i>	91/68/40		4.09	8.35	0.38	33.25

(*Protophormia terraenovae*) 防御素的一致性达 98%。亚细胞定位预测分析显示 3 个防御素成熟肽均为外分泌型。Signal P 分析显示葱蝇防御素前体均含有 23 个氨基酸残基组成的信号肽序列,也说明葱蝇防御素是一种外分泌型抗菌肽,在合成后通过信号肽的引导分泌到细胞外行使功能。多肽的亲/疏水性分析发现 3 个成熟肽均为亲水性多肽,只是亲水系数略有差异,分别为 73.25,73.25 和 83;但均属于稳定多肽。

2.2 防御素的保守结构域分析

蛋白质往往由多个结构域组成,组成这些结构域的氨基酸残基不但能行使特异性功能,同时还可能蕴含着各自的遗传进化信息。分析发现 3 个葱蝇防御素均具有该家族的保守 Knot1 结构域,属于 Defensin-2 超家族;另外,*DaDef1* 和 *DaDef2* 都含有低复杂区域(图 1)。

2.3 跨膜结构域分析

跨膜结构域是膜蛋白和膜脂相结合的主要部位,一般由 20 个左右的疏水性氨基酸残基组成。通过 TMHMM 2.0 预测分析,发现葱蝇及其他昆虫的防御素成熟肽均不含有跨膜螺旋区。

2.4 多重序列比对与二硫键预测

多重序列比对结果显示昆虫防御素成熟肽 C 端的序列相似性较高,变异主要发生在信号肽、前导肽和成熟肽 N 端。

所比对的昆虫防御素成熟肽均有 6 个保守的半胱氨酸残基,且能形成 3 对分子内二硫键,即 C1-C4, C2-C5 和 C3-C6(封三彩图 2)。

2.5 葱蝇防御素成熟肽的三维结构

三维结构模型显示,葱蝇防御素成熟肽具有昆虫防御素的典型 $\alpha\beta$ 结构,即由 1 个 α -螺旋结构域和 2 个反向平行的 β -片层结构域组成,3 对分子内二硫键在两者间起到稳定作用(封三彩图 3)。

2.6 系统进化分析

利用 MEGA 6.0 软件,基于 10 种昆虫 12 个防御素成熟肽的氨基酸序列,以 ML 和 WAG + G 为氨基酸最佳进化模型构建系统发育树(图 4)。结果表明葱蝇防御素成熟肽 Dadef1 与新陆原伏蝇、丝光绿蝇(*Lucilia sericata*)和家蝇防御素亲缘关系最近聚为一枝,再与 Dadef2 和 Dadef3 聚为一枝;果蝇类(*Drosophila*)防御素单独聚为一枝;而沙蝇(*Nyssomyia neivai*)防御素 2 和角蝇(*Haematobia irritans*)防御素 3 则聚为一枝。

2.7 选择压力分析

K_a 和 K_s 是在生物物种进化过程中核苷酸替换的两种形式, K_a/K_s 值的大小能反映出基因进化过程中受到的选择压力大小。研究结果显示,10 种双翅目昆虫中 12 个防御素基因间的 K_a/K_s 值在 0.016~0.694 之间,均明显小于 1(图 5)。其中, K_a/K_s 值最大的为光亮扁角水虻防御素 3 与 DaDef3, K_a/K_s 值最小的为新陆原伏蝇防御素 A 与 DaDef1,表明昆虫防御素基因在进化过程中整体上接受净进化选择。

2.8 针刺对葱蝇防御素基因表达的影响

为比较葱蝇冬滞育和非滞育蛹应答外界机械损伤的免疫反应能力,用针刺模拟机械损伤,利用 qPCR 方法分析了 DaDef1, DaDef2 和 DaDef3 基因经针刺后的表达变化。图 6a-c 显示,在非滞育条件下,与未针刺处理相比,针刺能够诱导 DaDef1 基因相对表达量上调表达 0.22~6.72 倍, DaDef2 基因相对表达量上调表达 0.31~5.31 倍, DaDef3 基因相对表达量上调表达 0.50~11.72 倍;其中针刺对 DaDef3 基因表达的诱导作用最为明显。图 6d-f 显示,在冬滞育条件下,与未针刺处理相比,针刺能诱导 DaDef1 基因相对表达量上调 0.19~4.27 倍, DaDef2 基因相对表达量上调 0.33~6.24 倍, DaDef3 基因相对表达量上调 0.04~11.00 倍;

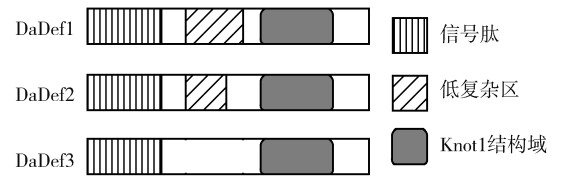
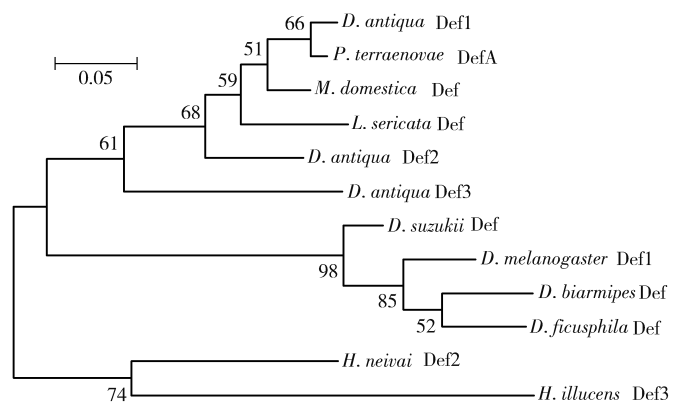


图 1 葱蝇防御素序列的结构域特征

Fig. 1 Domain characteristics of *D. antiqua* defensin sequences



注: *D. antique* Def1, *D. antique* Def2, 和 *D. antique* Def3: 葱蝇防御素 (DaDef1, DaDef2 和 DaDef3); *P. terraenovae* Def A: 新陆原伏蝇防御素 A (Genbank 号: CAA39152); *M. domestica* Def: 家蝇防御素 (Genbank 号: AIL24687); *L. sericata* Def: 丝光绿蝇防御素 (Genbank 号: AD187383); *D. suzukii* Def: 斑翅果蝇防御素 (Genbank 号: XP_016929506); *D. melanogaster* Def: 黑腹果蝇防御素 1 (Genbank 号: AAO72492); *D. biarmipes* Def: 双刺果蝇防御素 (XP_016947240); *D. ficusphila* Def: 嗜榕果蝇防御素 (Genbank 号: XP_017049746); *N. neivai* Def2: 沙蝇防御素 2 (Genbank 号: JAV13021); *H. illucens* Def3: 光亮扁角水虻防御素 3 (Genbank 号: AHH35099)。

图 4 10 种昆虫防御素成熟肽的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of mature defensins of 10 insect species

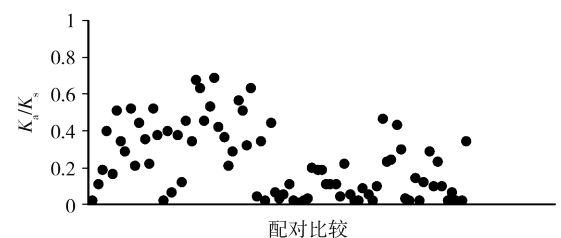
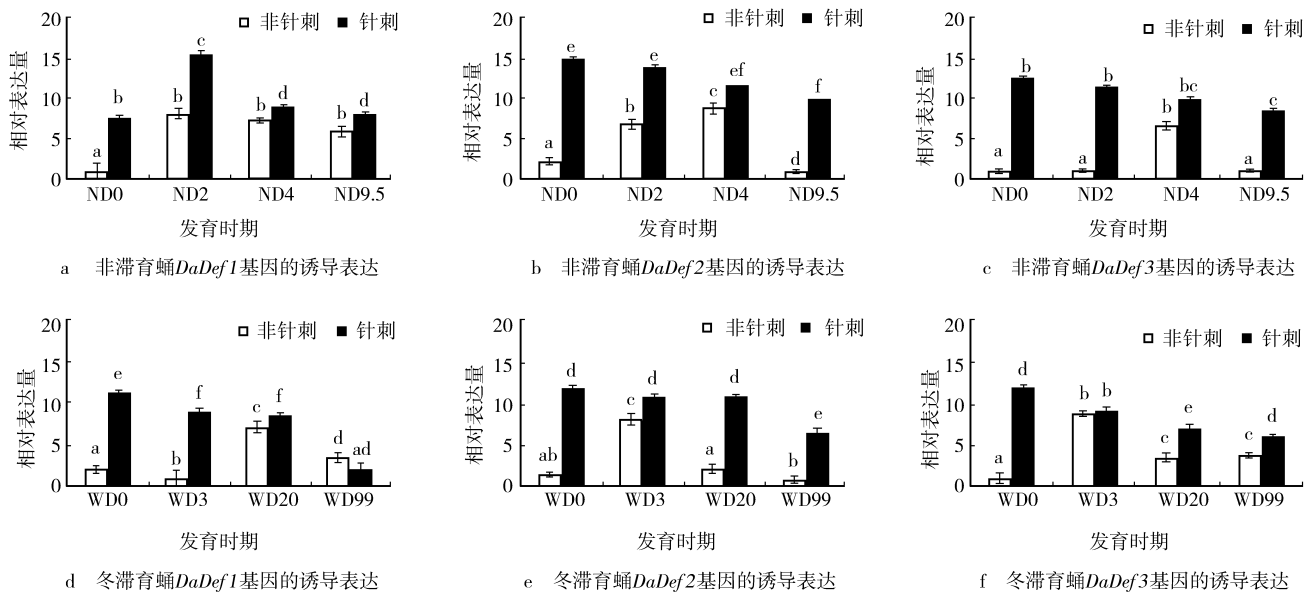


图 5 10 种昆虫防御素成熟肽基因的选择压力分析

Fig. 5 Selective pressure analysis of mature defensin genes of 10 insect species

其中 *DaDef3* 基因表达对针刺的反应更为明显。因此可以推测:葱蝇滞育蛹受到机械损伤后会通过防御素基因表达量的上调来抵御随后而来的病原生物感染,或参与机械损伤修复。



注:不同字母表示不同发育时期各处理组基因相对表达量存在统计学意义上的差异($p < 0.05$)。

图 6 针刺对葱蝇非滞育和冬滞育蛹中 *DaDef1*, *DaDef2* 和 *DaDef3* 基因表达的影响

Fig. 6 Effects of prick on gene expression of *DaDef1*, *DaDef2* and *DaDef3* in non- or winter-diapausing pupae of *D. antiqua*

3 讨论

防御素作为昆虫天然免疫反应中一类常见的抗菌肽,在昆虫受到病原感染时发挥重要的防御作用^[17-18]。目前,已在家蝇、果蝇、家蚕(*Bombyx mori*)、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)、褐尾麻蝇(*Boettcherisca peregrina*)等昆虫中均发现防御素的存在^[19-22],但尚无葱蝇防御素的研究。对大量动物防御素及其基因结构研究发现,防御素首先被翻译成 92~95 个氨基酸残基组成的含有信号肽的前体蛋白,经 N 末端水解后,最后形成有活性的防御素成熟肽。本研究所鉴定的 3 个葱蝇防御素基因分别编码由 91, 94 和 91 个氨基酸残基组成的多肽前体,各含有 1 个由 23 个氨基酸残基组成的信号肽,切除信号肽和前导肽后,变成由 40 个氨基酸残基组成的成熟肽。从氨基酸残基数目看,葱蝇防御素成熟肽符合昆虫防御素的大小范围(昆虫防御素一般由 34~43 氨基酸残基组成)^[23]。

3 个葱蝇防御素成熟肽都含有 6 个保守的半胱氨酸残基,且能形成 3 对分子内二硫键,符合 β -防御素典型的 C1-C4, C2-C5 和 C3-C6 二硫键连接形式。因此,这 3 个葱蝇防御素属于昆虫类 β -防御素。目前,昆虫防御素成熟肽的三级结构已确定,它们的 N 端含有一个 α -螺旋和两个反向平行的 β -折叠,其中 α -螺旋和 β -折叠由 2 个二硫键连接,形成了稳定的 $C\alpha\beta$ 结构^[24]。该结构在昆虫防御素中普遍存在。通过序列比对和二级结构分析,发现葱蝇防御素成熟肽与其他昆虫防御素存在高度的相似性,说明昆虫防御素在结构和功能方面具有一定的相似性。

在分子进化过程中, K_a 和 K_s 作为估算不同进化距离物种间直系同源基因或同一物种内旁系同源基因之间受到自然选择作用的重要参数,对于理解基因在核酸水平上的进化分歧和蛋白质(多肽)的功能多样化具有重要意义。本研究通过配对比较 10 种昆虫 12 个防御素成熟肽,发现在进化过程中葱蝇防御素并没有受到明显的正选择作用,从而证明在昆虫种类多样化过程中,防御素功能具有保守性。

在自然条件下,处于新陈代谢极低的葱蝇滞育蛹仍可能被病原物感染或受到机械损伤。基因表达分析显示针刺在一定程度上能刺激葱蝇冬滞育蛹中防御素基因的上调表达,表达变化规律基本相似;但对 *DaDef3* 基因表达的刺激作用则更为明显。本研究所鉴定的葱蝇防御素对其他革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌的抗(杀)菌谱及作用机制有待进一步研究。滞育期作为发育停滞期,代谢减弱及细胞活动的降低都有可能影响滞育蛹对外界刺激的免疫应答。同时,本研究结果也说明蝇类防御素可能对修复创伤具有重要作用,但作用机理需要进一步研究。本研究为下一步研究葱蝇滞育期的免疫活性特点提供了重要理论基础。

参考文献:

- [1] 苗璐,武慧,王晶,等.昆虫抗菌肽的生物信息学预测及分析[J].广东农业科学,2014,41(8):181-184.
MIAO L, WU H, WANG J, et al. Bioinformatics prediction and analysis of insect antimicrobial peptides[J]. Journal of Guangdong Agricultural Sciences, 2014, 41(8): 181-184
- [2] 王义鹏,赖仞.昆虫抗菌肽结构、性质和基因调控[J].动物学研究,2010,31(1):27-34.
WANG Y P, LAI R. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation[J]. Zoological Research, 2010, 31(1): 27-34.
- [3] BONMATIN J M, BONNAT J L, GALLET X, et al. Two-dimensional ¹H NMR study of recombinant insect defensin A in water: resonance assignments, secondary structure and global folding[J]. Journal of Biomolecular NMR, 1992, 2(3): 235-256.
- [4] LEHANE M J, WU D, LEHANE S M. Midgut-specific immune molecules are produced by the blood-sucking insect *Stomoxys calcitrans*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997, 94(21): 11502-11507.
- [5] FUJIWARA S, IMAI J, FUJIWARA M, et al. A potent antibacterial protein in royal jelly, purification and determination of the primary structure of royalisin[J]. Journal of Biological Chemistry, 1990, 265(19): 11333-11337.
- [6] HANCOCK R E, SCOTT M G. The role of antimicrobial peptides in animal defenses[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, 97(16): 8856-8861.
- [7] 郝友进,胡文霞,陈斌.葱蝇非滞育与夏滞育蛹蛋白的双向凝胶电泳比较分析[J].昆虫学报,2014,57(2):161-167.
HAO Y J, HU W X, CHEN B. Comparative analysis of proteins in non-and summer-diapausing pupae of the onion fly, *Delia antiqua* (Diptera: Anthomyiidae), using two dimensional gel electrophoresis[J]. Acta Entomologica Sinica, 2014, 57(2): 161-167.
- [8] KUBRAK O I, KUČEROV L, THEOPOLD U, et al. The sleeping beauty: how reproductive diapause affects hormone signaling, metabolism, immune response and somatic maintenance in *Drosophila melanogaster*[J]. PLoS One, 2014, 9(11): e113051.
- [9] NAKAMURA A, MIYADO K, TAKEZAWA Y, et al. Innate immune system still works at diapause, a physiological state of dormancy in insects[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011, 410(2): 351-357.
- [10] LEE K Y, HORODYSKI F M, VALAITIS A P, et al. Molecular characterization of the insect immune protein hemolin and its high induction during embryonic diapause in the gypsy moth, *Lymantria dispar*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2002, 32(11): 1457-1467.
- [11] CHEN B, KAYUKAWA T, JIANG H, et al. Da Trypsin, a novel clip-domain serine proteinase gene up-regulated during winter and summer diapauses of the onion maggot, *Delia antiqua*[J]. Gene, 2005, 347(1): 115-123.
- [12] HAO Y J, ZHANG Y J, SI F L, et al. Insight into the possible mechanism of the summer diapause of *Delia antiqua* (Diptera: Anthomyiidae) through digital gene expression analysis[J]. Insect Science, 2016, 23(3): 438-451.
- [13] ZHANG Y J, HAO Y J, SI F L, et al. The de novo transcriptome and its analysis in the worldwide vegetable pest, *Delia antiqua* (Diptera: Anthomyiidae)[J]. G3, 2014, 4(5): 851-859.
- [14] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [15] YANG Z H. PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1586-1591.
- [16] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [17] HOFFMANN J A. Immune responsiveness in vector insects[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997, 94(21): 11152-11153.
- [18] HULTMARK D. Immune reactions in *Drosophila* and other insects: a model for innate immunity[J]. Trends in Genetics, 1993, 9(5): 178-183.
- [19] 王来城,王金星,王来元,等.家蝇防御素基因的 cDNA 克隆及序列分析[J].动物学报,2003,49(3):408-413.
WANG L C, WANG J X, WANG L Y, et al. Cloning and sequence analysis of the full-length cDNA encoding defensin, an antimicrobial peptide from the housefly (*Musca domestica*)[J]. Current Zoology, 2003, 49(3): 408-413.
- [20] 马振刚,贾俊杰,陈全梅,等.家蚕防御素基因的序列特征与表达模式分析及原核表达试验[J].蚕业科学,2012,38(2):249-256.
MA Z G, JIA J J, CHEN Q M, et al. Sequence feature analysis, expression pattern and prokaryotic expression of defensin genes from silkworm (*Bombyx mori*)[J]. Science of Sericulture, 2012, 38(2): 249-256.
- [21] MATSUYAMA K, NATORI S. Purification of three antibacterial proteins from the culture medium of NIH-Sape-4, an embryonic cell line of *Sarcophaga peregrina*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1988, 263(32): 17112-17116.
- [22] 刘先凯,赵彤言,朱礼华,等.白纹伊蚊和埃及伊蚊 *defensinA* 基因克隆及序列分析[J].寄生虫与医学昆虫学报,2002,9(4):216-221.
LIU X K, ZHAO T Y, ZHU L H, et al. Cloning and sequencing of the defensin a gene from *Aedes aegypti* and

- Ae. albopictus* [J]. *Acta Parasitology et Medica Entomologica Sinica*, 2002, 9(4): 216-221.
- [23] 付蓝宝, 于嘉林, 刘伟华. 防御素的生物学特性及其抗病基因工程 [J]. *遗传*, 2011, 33(5): 512-519.
- FU L B, YU J L, LIU W H. Biological characteristics of defensin and its disease-resistance genetic engineering [J]. *Hereditas*, 2011, 33(5): 512-519.
- [24] LAMBERTY M, ZACHARY D, LANOT R, et al. Insect immunity constitutive expression of a cysteine-rich antifungal and a linear antibacterial peptide in a termite insect [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(6): 4085-4092.

Animal Sciences

Identification of the Defensin Genes of *Delia antiqua* and the Effect of Prick on Gene Expression

XU Yanling, FU Danying, SI Fengling, CHEN Bin, HAO Youjin

(Chongqing Key Laboratory of Vector Insects, Institute of Entomology and Molecular Biology, College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: [Purposes] Analyses of sequence characteristics, molecular evolution and gene expression patterns of defensin gene family of *Delia antiqua* were performed for understanding of the immune responses of antibacterial peptide defensin during the diapausing process. [Methods] The sequences of defensin gene family were searched in transcriptome dataset by using bioinformatic approaches. Gene identification, phylogeny, selective pressure analysis and effects of prick on gene expression were also conducted. [Findings] Three defensin genes of onion fly were identified and all mature peptides (designated as DaDef1, DaDef2, and DaDef3) contained 40 amino acid residues with a theoretical molecular weight of 4.09, 4.12, and 4.09 kD, and a pI of 8.71, 8.69, and 8.35. Conserved domain of the typical insect defensins, three pairs of disulfide bonds were found and they were predicted to excreted and stable polypeptides. Phylogenetic analysis showed that mature DaDef1 was phylogenetically close to defensin of *Protophormia terraenovae*, *Lucilia sericata*, and *Musca domestica* and clustered together, then grouped with DaDef2 and DaDef3. Gene expression analysis revealed that prick could significantly the expression of onion fly defensins. [Conclusions] Defensin gene family of *D. antiqua* was highly conserved and characterized by typical family characteristics. Different expression patterns between the developmental stages of winter-diapausing and non-diapusing pupae were observed, suggesting that different immune responses occurred in winter-diapausing and non-diapusing pupae. The results would provide a theoretical basis for further studies of structural features of insect defensins, evolution and immune activities under the diapausing states.

Keywords: *Delia antiqua*; winter-diapause; insect immunity; defensin; gene expression; phylogeny

(责任编辑 方 兴)

(接正文36页)

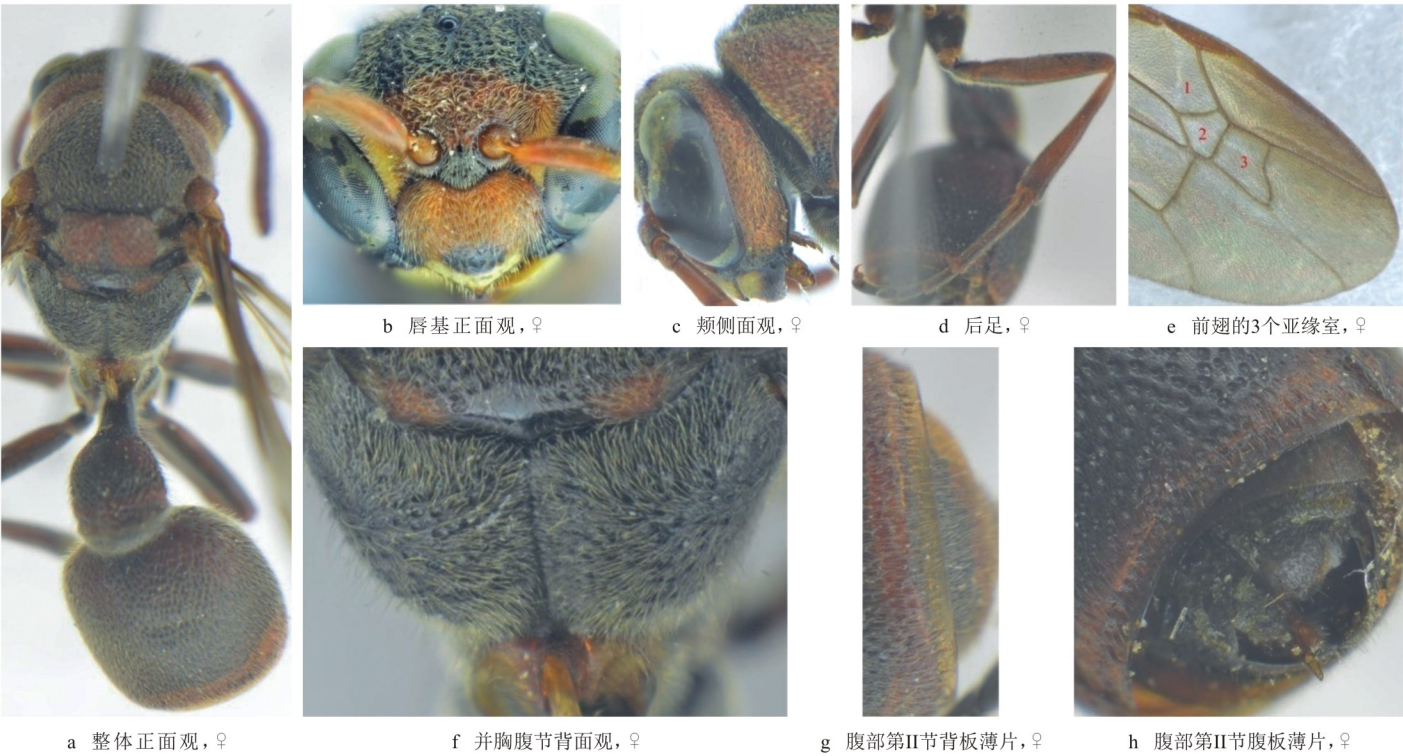
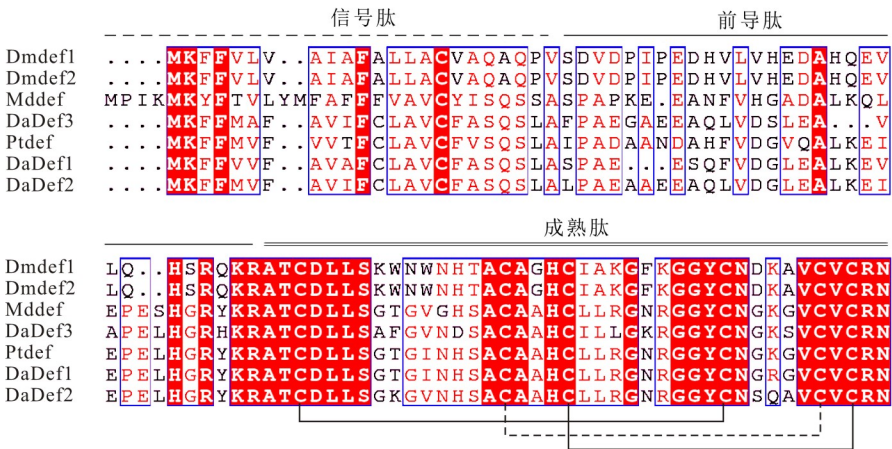


图3 刻点铃腹胡蜂

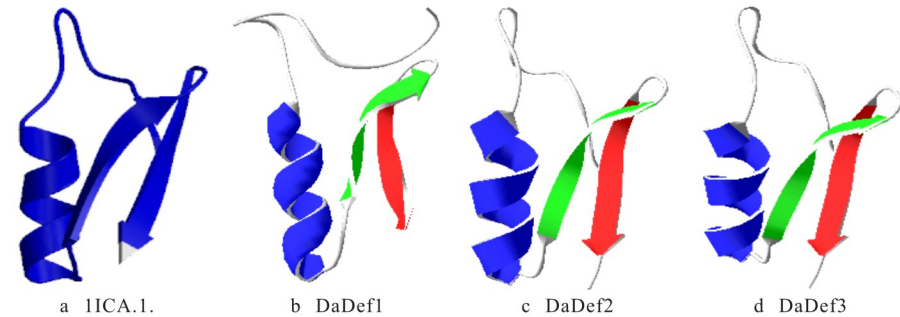
Fig. 3 *Ropalidia sculpturata* Gusenleitner, 2001

(接正文41页)



注: Dmdef1, Dmdef2为黑腹果蝇防御素成熟肽; Mddef为家蝇防御素成熟肽; DaDef1, DaDef2和DaDef3为葱蝇防御素成熟肽; Ptdef为新陆原伏蝇防御素成熟肽。

图2 黑腹果蝇、家蝇、葱蝇和新陆原伏蝇防御素多肽氨基酸序列比对以及二硫键分布
Fig. 2 Multiple amino acid sequences alignment of defensins of *D. melanogaster*, *M. domestica*, *D. antiqua*, and *P. terraenovae* and disulfide bonds distributions



注: IICA. 1.: 新陆原伏蝇防御素A成熟肽; DaDef1, DaDef2和DaDef3: 葱蝇防御素成熟肽。

图3 葱蝇防御素成熟肽的三维结构图模型

Fig. 3 Models of three dimensional structures of mature defensins of *D. antiqua*

(接正文57页)

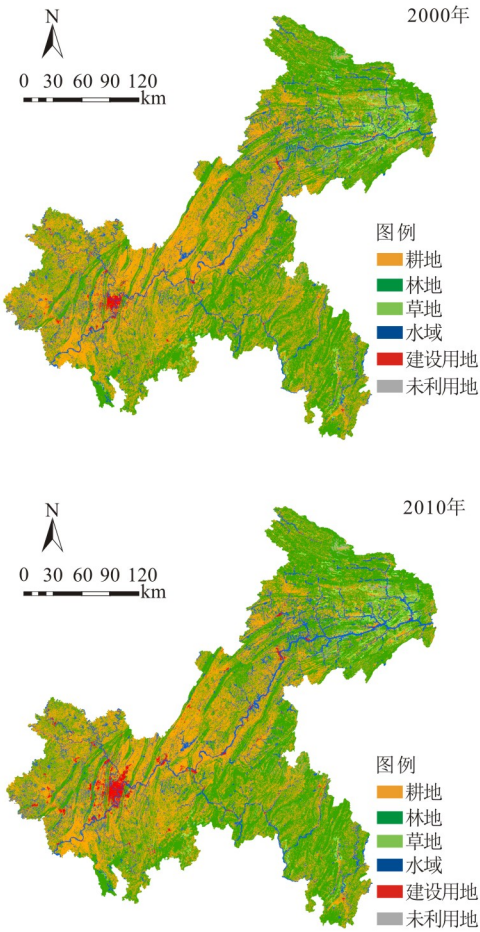


图1 重庆市2000, 2010年土地利用类型图
Fig. 1 The land use map of 2000 and 2010 in Chongqing city