桃蚜组织蛋白酶基因 CTSB-16D 和 CTSB-348 的 克隆、表达谱及对不同环境胁迫的响应

孟建玉³, 杨昌利¹, 姜万千1。杨磊2。 张长禹1*

(1. 贵州大学昆虫研究所,贵州省山地农业病虫害重点实验室,贵阳 550025;2. 湖南中烟工业有限 责任公司,长沙 410007;3.贵州省烟草科学研究院,贵阳 550081)

为了探索组织蛋白酶基因 CTSB-16D 和 CTSB-348 在桃蚜 Myzus persicae (Sulzer)响应高低温和 UV-B 胁 摘要 迫中的作用,通过 RT-PCR 技术克隆了桃蚜 CTSB-16D 和 CTSB-348 基因,利用生物信息学方法分析了它们的序 列特征;采用实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR,RT-qPCR)技术检测了 2 个基因在桃蚜不同发育阶段 的相对表达量及经高温、低温和 UV-B 胁迫不同时长的无翅成虫中的相对表达量。克隆获得了桃蚜 CTSB 16D (GenBank 登录号: MZ962352)和 CTSB 348(GenBank 登录号: MZ962353)基因, 序列长度分别为 1 096 bp 和 1 101 bp, 开放阅读框(ORF)分别为1017 bp和1023 bp,分别编码338个和340个氨基酸,蛋白相对分子量为38.14 kD和 37.52 kD,等电点(pI)为 5.46 和 5.99。系统发育分析表明,桃蚜 CTSB-16D 和 CTSB-348 均与豌豆蚜 Acyrthosiphon pisum (XP_003246386.1、NP_001119608.1) CTSB 亲缘关系最近。RT-qPCR 分析表明, CTSB-16D 和 CTSB-348 在桃蚜不同发育阶段均有表达,分别在1龄若虫和无翅成虫中的表达量最高。高、低温和 UV-B 胁迫对 CTSB-16D和CTSB-348基因的表达具有明显的诱导作用,且表达量均随时间的延长呈先上升后下降的趋势;4°C 胁迫下, CTSB-16D和 CTSB-348 表达量均在 90 min 时达到峰值; 36℃ 胁迫下, CTSB-16D和 CTSB-348 表达量均 在 30 min 时达到峰值; UV-B 胁迫下, CTSB-16D 和 CTSB-348 表达量分别在 60 min 和 120 min 时达峰值。桃蚜 CTSB-16D和CTSB-348基因在不同发育阶段差异表达,且响应温度和UV-B的胁迫,推测两个基因参与桃蚜的生 长发育并在桃蚜响应环境胁迫中发挥了重要作用。

桃蚜: 组织蛋白酶; 基因克隆; 表达分析 关键词 文献标识码: A **中图分类号:** S 433 **DOI:** 10. 16688/j. zwbh. 2022811

Cloning and expression profiling of the cathepsin genes CTSB-16D and CTSB-348 and their response to different environmental stresses in Myzus persicae (Hemiptera: Aphididae)

JIANG Wanqian¹, YANG Lei², MENG Jianyu³, YANG Changli¹, ZHANG Changyu¹*

(1. Guizhou Provincial Key Laboratory for Agricultural Pest Management in the Mountainous Region, Institute of Entomology, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. China Tobacco Hunan Industrial Co., Ltd., Changsha 410007, China; 3. Guizhou Research Institute of Tobacco Science, Guiyang 550081, China)

Abstract To explore the role of CTSB-16D and CTSB-348 of Myzus persicae (Sulzer) in response to high and low temperature and UV-B stresses, they were cloned by RT-PCR and their sequence characteristics were analyzed using bioinformatics approaches. The relative expression levels of the two genes in aphids at different developmental stages and in wingless adults exposed to high temperature, low temperature and UV-B stresses for different durations were detected by quantitative real-time PCR (RT-qPCR). The sequences of CTSB-16D and CTSB-348 (GenBank acc. nos. MZ962352 and MZ962353) were 1 096 bp and 1 101 bp in length, with an open reading frame of 1 017 bp and 1 023 bp, encoding 338 and 340 amino acids, respectively. The relative molecular



^{2022 - 12 - 27} 修订日期: 2023-02-11

贵州省教育厅特色领域项目(黔教合 KY[2021]057);贵州省烟草公司贵阳市公司科技项目(2022-07);中国烟草总公司贵州 省公司项目(2021XM09)

weight of the proteins are 38.14 kD and 37.52 kD, with an isoelectric point of 5.46 and 5.99, respectively. Phylogenetic analysis showed that both CTSB-16D and CTSB-348 had the closest relationship with CTSB of Acyrthosiphon pisum (XP_003246386.1, NP_001119608.1). RT-qPCR analysis showed that the two genes were expressed at different developmental stages, with the highest expression levels of CTSB-16D and CTSB-348 in the 1st-instar nymph and wingless adults, respectively. Low and high temperature and UV-B stresses obviously induced the expression of CTSB-16D and CTSB-348 genes, and the expression increasing first and then decreased with increasing exposure time. Under 4°C, the expression levels of CTSB-16D and CTSB-348 reached the peak after 90 min exposure, respectively, but under 36°C, their expression reached the peak after 30 min exposure. Under UV-B stress, the expression levels of CTSB-16D and CTSB-348 peaked after 60 min and 120 min exposure, respectively. The different expressions of CTSB-16D and CTSB-348 at different developmental stages and their different responses to temperature and UV-B stresses suggested that the two genes were involved in the growth and development of *M. persicae* in response to environmental stresses.

Key words Myzus persicae; cathepsin; gene cloning; expression analysis

组织蛋白酶(cathepsin,CTS)是一类存在于溶 酶体中的胞内蛋白酶,以酶原形式在核糖体中合成, 并通过高尔基体糖基化和磷酸化后转运至溶酶体 内^[1-2]。根据活性中心的氨基酸残基可将组织蛋白 酶分为3大类:半胱氨酸蛋白酶(CTSB、CTSF、CT-SH, CTSL, CTSK, CTSO, CTSS, CTST, CTSV, CTSX和CTSW)、天冬氨酸蛋白酶(CTSD和VE)、 丝氨酸蛋白酶(CTSA和CTSG)^[3]。组织蛋白酶作 为一种多功能蛋白酶系,在昆虫的生长发育、细胞凋 亡、免疫和生物及非生物胁迫等过程中发挥作用[4]。 例如饥饿条件下,水稻二化螟 Chilo suppressalis CTSO 和CTSL 基因表达量上调,表明两基因编码 的酶参与了肠道内蛋白质的消化^[5]。家蚕 Bombyx mori CTSL参与应对大肠杆菌、球孢白僵菌和蜡样 芽胞杆菌的应激反应,推测其在昆虫的先天免疫系 统中具有重要作用^[6]。Song 等^[7]发现菜蛾盘绒茧 蜂 Cotesia vestalis 寄生的小菜蛾 Plutella xylostella 体内 CTSB 水平会显著升高, 推测 CTSB 可能参 与免疫响应。

温度作为一种重要的非生物环境胁迫因子,会 对昆虫的生长发育、生物学特性和种群动态造成影 响[8-10]。极端温度(高温和低温)胁迫可能导致昆虫 的发育历期延长、寿命缩短和繁殖力降低[11-13]。为 了减小由环境热或冷胁迫而造成的损伤,昆虫已经 进化出了多种保护策略来增加它们的耐受性,进而 适应多变的环境^[14]。高温诱导家蚕 5 龄幼虫 CTSB 和 CTSD 的 高 表 达,导 致 幼 虫 期 缩 短 提 前 化 蛹^[15-16]。柑橘木虱 Diaphorina citri 成虫在高温 (40℃)胁迫下 CTSB 的表达水平显著上调,表明其 积极参与柑橘木虱对高温胁迫的防御响应[17]。

紫外线 B(UV-B)(280~320 nm)是到达地球的 最强光波,能够被大气中的臭氧层有效吸收,但仍约 有10%穿透臭氧层并到达地球^[18]。研究表明, CTSB在UV诱导下作为一种促凋亡介质,从溶酶 体释放到细胞质基质,从而诱导细胞凋亡^[19]。UV-B辐射可导致昆虫体内活性氧(ROS)的形成和积 累,从而对 DNA、蛋白质、碳水化合物和脂质等造成 破坏,并影响生长发育、生理生化和种群结构^[20-21]。 如 UV-B 辐射可提高白纹伊蚊 Aedes albopictus 和 淡色库蚊Culex pipiens 的代谢率,其存活率显著降 低^[22]。UV辐射诱导家蚕 CTSL 表达水平显著增 加,并使其胚胎细胞程序性死亡,表明CTSL参与了 胚胎细胞的程序性死亡^[23]。然而,目前关于 CTSB 在桃蚜 Myzus persicae (Sulzer)响应 UV 胁迫中的 作用尚未见报道。

桃蚜属半翅目 Hemiptera 蚜科 Aphididae,是烟 区常见的害虫,其危害程度较大,世界各地均有分 布。桃蚜寄主范围广,除为害烟草外,还取食十字花 科、蔷薇科、豆科和茄科等 400 多种植物,是典型的 多食性昆虫^[24]。近年来,随着大气臭氧层被破坏, 导致到达地面的紫外线辐射增强,以及全球气候变 暖等问题,对昆虫的生长发育带来影响。然而, CTSB 在抵御温度和 UV 胁迫中的作用尚不清楚。 本研究通过克隆桃蚜 CTSB-16D 和 CTSB-348 基 因并分析它们的序列特征,采用 RT-qPCR 技术检 测2个基因在不同发育阶段、高低温胁迫以及 UV-B胁迫下的表达情况,探索 CTSB 基因在桃蚜生长 发育过程中的作用,为进一步揭示 CTSB 基因在昆 虫应对环境胁迫中的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试虫源:试验所用桃蚜采集于贵阳市花溪区 (106.68°E,26.43°N)周边烟田,在人工气候箱用烟苗 饲养,每7d更换1次烟苗,保证寄主新鲜,室内温度 为(25±1)℃,光周期L//D=14h//10h(光期6:00-20:00;暗期:20:00-6:00),相对湿度(70±5)%。

试剂和仪器: Eastep Super RNA 提取试剂盒, 上海普洛麦格生物产品有限公司; HiFiScript cD-NA 第一链合成试剂盒,北京康为世纪生物科技有 限公司;SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒,生工生 物工程(上海)股份有限公司;2×Taq PCR StarMix 预混液,北京康润诚业生物科技有限公司;pMD19-T载体、大肠杆菌 Escherichia coli DH5α感受态细 胞、TB Green Premix DimerEraser 荧光试剂盒,宝 生物工程(大连)有限公司;其余试剂均为国产分 析纯。RXZ型智能人工气候箱,宁波江南仪器厂; 58B-01型 UV-B紫外灯(波长 280~320 nm,强度 $300 \,\mu W/cm^2$),南京华强电子有限公司;UV-B紫 外辐照计,北京师范大学光电仪器厂;NanoPhotometer[™]P-Class 超微量紫外分光光度仪,美国赛默飞 世尔科技公司; T100 Thermal Cycler PCR 仪、 CFX96Touch 荧光定量 PCR 仪、Imaging System PowerPac 系列电泳仪,美国 Bio-Rad 公司。HZ-2111K-B摇床,太仓市华利达实验设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 样品采集和胁迫试验

试验设置参照周吕等^[25]和 Yang 等^[26]的研 究,并做了进一步优化。不同发育阶段材料:取桃 蚜1、2 龄若虫 80 头,3、4 龄若虫 60 头,无翅和有 翅成虫各 30 头,3 次生物学重复;4、36℃和 UV-B 胁迫试验材料:取桃蚜 1 日龄无翅成虫在培养箱中 以 4℃和 36℃分别处理 0(CK),30,60,90,120 min 和 150 min;取桃蚜 1 日龄无翅成虫暗适应 2 h 后, 以 UV-B(280~320 nm)紫外灯为光源进行辐射处 理 0(CK),30,60,90,120 min 和 150 min,辐射强度 为 300 μ W/cm²,在 UV-B 辐射期间温湿度和正常饲 养条件相同。每处理 30 头,3 次生物学重复,所有 样品处理后立即装入 1.5 mL EP 管,用液氮速冻后 保存于-80℃冰箱备用。

1.2.2 桃蚜 CTSB-16D 和 CTSB-348 基因 cDNA 序列克隆

使用 Eastep[®] Super Total RNA Extraction Kit 提取桃蚜总 RNA, 使用 NanoPhotometer[™] P-Class 分光光度仪检测其浓度,按照 HiFiScript cDNA 第一链合成试剂盒说明书完成 cDNA 第1链 的合成。通过对已知同源昆虫 CTSB 序列比对,在 保守区各设计1对引物 CTSB-16D-F/CTSB-16D-R 和 CTSB-348-F/CTSB-348-R(表 1), 以合成的 cDNA 第1链为模板扩增桃蚜 CTSB-16D 和 CTSB-348 基因的中间片段。PCR 反应体系(25 μL)为:2× Taq PCR StarMix (Dye) 12.5 µL, cDNA 模板 (200 ng/µL)1.5 µL, 正、反向引物(10 µmol/L)各 1.5 μL, DEPC 水 8 μL。反应条件: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min,35 个循环;72℃ 5 min。用1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,使用 SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒回收目的片段, 连接到 pMD[™]19-T 载体上并转化至感受态细胞 DH5α,于LB培养基 37℃条件下培养 12 h,挑取单 菌落做菌落 PCR 鉴定后进行扩大培养, 菌液送往生 工生物工程(上海)股份有限公司测序。

	Table 1 Information of primers used in this study					
I	引物	引物序列(5'-3')	扩增片段长度/bp	退火温度/℃	引物用途	
	Primer code	Primer sequence	Product size	Annealing temperature	Usage of primer	
	CTSB-16D-F	TACATGCAGCAATAGTGGGT	1 096	55	PCR 扩增 CTSB-16D 和	
	CTSB-16D-R	AACAATTAGTTGGTCACTGGC			CTSB-348 开放阅读框	
	CTSB-348-F	TATTTTAGTCCTCAGTCGCA	1 101	55		
	CTSB-348-R	TGTTTACTCTGAAACGAGTG				
	qCTSB-16D-F	GCTGTCATACATGTGGCTTC	147	55	RT-qPCR 检测目的基因	
	qCTSB-16D-R	CGTCATTAGGACAAGGTGGA				
	qCTSB-348-F	TTTGCCCTCGTGGGCTTATT	73	56		
	qCTSB-348-R	ACAACGGATCCAGATCGACG				
	qActin-F	AGTGCGACGTTGACATCAGA	119	55	RT-qPCR 检测内参基因	
	qActin-R	GCTTGGAGCTAAGGCAGTGA				

表 1 本研究所用引物信息

1.2.3 桃蚜 CTSB-16D 和 CTSB-348 基因的序列 分析

应用在线网站 NCBI(https://blast.ncbi.nlm. nih.gov/Blast.cgi)中的 BLAST 程序对桃蚜 CTSB-16D和CTSB-348进行氨基酸序列分析,利用 ORF Finder(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder)查找其开放阅读框;使用 ExPASy ProtParam Tool(https://web.expasy.org/protparam/)和 Ex-PASyTools中的 NetNGlyc 预测蛋白质的理化性 质;使用 TMHMM Server 2.0(https://services. healthtech.dtu.dk/service.php? TMHMM-2.0)预 测蛋白跨膜结构;应用 SMART(http://smart.embl-heidelberg.de/)进行保守结构域的预测;应用网 站(http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/) 分析磷酸化位点。系统发育树由 MEGA 6.0 软件 以邻接法(neighbor-joining)构建,重复运行 1 000 次,进化树的节点处数值表示置信度。

1.2.4 桃蚜 CTSB-16D 和 CTSB-348 基因的表达 分析

选用 Actin 基因作为内参基因,引物见表 1,桃 蚜各发育阶段和经 4℃、36℃和 UV-B 胁迫的无翅 成虫 RNA 提取和 cDNA 合成同 1.2.2,参照 TB Green Premix DimerEraser 荧光试剂盒说明书进行 RT-qPCR 扩增。20 μ L RT-qPCR 反应体系:cDNA 模板 1 μ L, TB Green Premix DimerEraser 10 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各1 μ L, DEPC 水 7 μ L。 反应条件:95℃ 3 min;95℃ 30 s,退火温度(表 1) 30 s,39 个循环;95℃ 10 s,65℃ 5 s。

1.3 数据分析

采用 2^{-▲Δα} 法^[27] 计算桃蚜 CTSB-16D 和 CTSB-348 基因相对表达量。应用 SPSS 19.0 软件 对数据进行单因素方差分析(Tukey 氏法),采用 Excel 2010 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 桃蚜 CTSB-16D 和 CTSB-348 基因克隆与序列 分析

克隆桃蚜 CTSB 基因并命名为 CTSB 16D(Gen-Bank 登录号:MZ962352)和 CTSB 348(GenBank 登录 号:MZ962353),CTSB 16D 和 CTSB 348 长度分别为 1 096 bp 和 1 101 bp,开放阅读框(ORF)为 1 017 bp 和 1 023 bp,编码 338 和 340 个氨基酸。蛋白相对 分子量为 38.14 kD 和 37.52 kD,等电点(pI)为 5.46 和 5.99。计算得到不稳定性指数(Ⅱ)为 27.31 和 25.79,即蛋白质均稳定,预测亲水性的平 均值(GRAVY)为-0.537 和-0.298,表明蛋白质 均表现亲水性。两个蛋白质分别含有 2 个和 1 个 N-糖基化位点,均无跨膜结构域,SMART 分析发现 分别在 86-334 和 89-338 氨基酸处含有木瓜蛋白 酶家族半胱氨酸蛋白酶 Pept_C1 保守结构域。

2.2 桃蚜 CTSB-16D 和 CTSB-348 系统进化分析

以软体动物长牡蛎 Crassostrea gigas CTSB 为 外群,从NCBI数据库搜索鳞翅目、鞘翅目、双翅目 和半翅目昆虫的 CTSB 氨基酸序列,与推导的桃蚜 CTSB 氨基酸序列采用邻接法构建系统发育树(图 1)。结果表明,昆虫纲鳞翅目、鞘翅目、双翅目和半 翅目昆虫 CTSB 各聚为一个分支,软体动物长牡蛎 聚为另一分支;从目以下的分类阶元来看,桃蚜 CTSB-16D 与豌豆蚜 Acyrthosiphon pisum、豆蚜 Aphis craccivora、玉米蚜 Rhopalosiphum maidis 和棉蚜 Aphis gossypii 聚为一支;桃蚜 CTSB-348 与豌豆蚜、玉米蚜和棉蚜及烟粉虱 Bemisia tabaci 和褐飞虱 Nila parvata lugens 聚为一支,说明同一 分支中的昆虫亲缘关系较近,并且发现桃蚜 CTSB-16D和CTSB-348均与同属的豌豆蚜亲缘关系最近, 与其他目昆虫的同源性较低,分属不同支,表明 CTSB 的聚类结果能较好地反映昆虫种间的亲缘关系。

2.3 桃蚜 CTSB-16D 和 CTSB-348 基因的表达分析

CTSB-16D 和 CTSB-348 在桃蚜整个生长发育 阶段均有表达(P<0.05)(图 2),其中 CTSB-16D 在1龄若虫中表达量最高,在2龄若虫期的表达量 最低;CTSB-348 在无翅成虫期的表达量最高,在2 龄、4龄若虫和有翅成虫中表达量较低。

4℃胁迫下,桃蚜 CTSB-16D 和 CTSB-348 的 表达量均随时间呈先上升后下降的趋势(P < 0.05) (图 3),其中 CTSB-16D 在 60、90 min 和 120 min 时 显著高于对照(0 min),在 90 min 时达到峰值,为对 照的 1.56 倍; CTSB-348 的表达量在 30、90、 120 min 和 150 min 时显著高于对照,在 90 min 达 到峰值,为对照的 3.52 倍。

36℃胁迫下,桃蚜 CTSB-16D 和 CTSB-348 表 达量均随时间延长呈先上升后下降的趋势(P< 0.05)(图 4)。*CTSB*-16D 在 30 min 和 60 min 表达 量显著高于对照,在 30 min 达到峰值,为对照的
1.92 倍。*CTSB*-348 在 30 min 时达到峰值,为对照 的 9.11 倍,此后 CTSB-348 相对表达量开始下降, 至 90、120 min 和 150 min 时稳定表达,且均显著高 于对照水平。



利用 bootstrap 进行1 000次计算以检验进化树分支置信度,分支上数值表示置信度。

Bootstrap was used for 1 000 calculations to test the confidence of the branch of the evolutionary tree. The value on the branch indicates the confidence.

图 1 基于邻接法构建的 CTSB 氨基酸序列系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of CTSB constructed by neighbor-joining method based on amino acid sequences



N1~N4:分别表示1~4龄若虫;WSA:无翅成虫;WDA:有翅成虫。数据为平均值±标准差,柱上不同小写字母表示不同发育阶段间基因的相对表达量存在显著性差异(P<0.05,Tukey)。

N1-N4: 1st-4th instar nymphs; WSA: Wingless adults; WDA: Winged adults. Data are mean \pm SD. Different lowercase letters above bars indicate significant differences in the relative expression level of genes during different developmental stages (P < 0.05, Tukey's test).



Fig. 2 Relative expression levels of CTSB-16D and CTSB-348 at different developmental stages of Myzus persicae



数据为平均值±标准误, 柱上不同小写字母表示不同处理时间下基因的相对表达量存在显著差异 (Tukey, P<0.05)。下同。 Data are mean±SD. Different lowercase letters above the bars indicate significant differences in the relative expression level of genes among different exposure time (P<0.05, Tukey's test). The same applies below.

图 3 4°C 胁迫不同时长下桃蚜 CTSB-16D 和 CTSB-348 的相对表达量



for different durations



图 4 36℃ 胁迫不同时长下桃蚜 CTSB-16D 和 CTSB-348 的相对表达量

Fig. 4 Relative expression levels of CTSB-16D and CTSB-348 in Myzus persicae exposed to high temperature (36°C)

UV-B 胁迫下,桃蚜 CTSB-16D 和 CTSB-348 表达量随时间延长呈先上升后下降的趋势 (P < 0.05)(图 5), CTSB-16D 表达量均显著 高于对照,在 60 min 达到峰值,为对照的 15.16 倍,此后的表达量随时间延长逐渐降低;CTSB-348 相对表达量在 60、90 min 和 120 min 均显 著高于对照,在 120 min 达到峰值,为对照的 4.66 倍。





3 结论与讨论

组织蛋白酶是生物体内溶酶体中重要的水解酶 系,本研究克隆获得了桃蚜 2 个组织蛋白酶基因 *CTSB*-16D和*CTSB*-348,序列长度分别为1096 bp 和1101 bp,ORF为1017 bp和1023 bp,序列分析 表明,2个基因编码的氨基酸分别含有2个和1个 *N*-糖基化位点,无跨膜结构域,均具有组织蛋白酶 保守结构域 Pept_C1^[2]。系统发育分析结果表明, 桃蚜 CTSB 与半翅目蚜科昆虫的 CTSB 聚为一支, 说明它们在进化关系上同源关系更近,这与棉蚜的 研究结果一致^[28]。

组织蛋白酶参与昆虫的细胞凋亡,在其个体发 育和变态反应等生命活动中具有重要作用^[29]。本 研究发现,CTSB-16D和CTSB-348基因在桃蚜不 同发育阶段均有表达,CTSB-16D在1龄若虫中的 表达量最高,之后表现为下降趋势,发育到3龄若虫 时达到第2个峰值。CTSB-348表达量在无翅成虫 期达到峰值。这与扶桑绵粉蚧Phenacoccus solenopsis CTSB基因在不同发育阶段表达模式不 同^[30]。可能CTSB基因在不同发育阶段表达模式不 同^[30]。可能CTSB基因在不同昆虫生长发育过程 中发挥的作用不同,如赤拟谷盗Tribolium castaneum CTSB在高龄幼虫中的表达量最高,柑橘木虱 CTSB在若虫和成虫中高表达^[31-32]。棉铃虫 Helicover pa armigera CTSB活性随着胚胎发育逐渐降 低,在蛹后期表达量升高,推测其参与棉铃虫组织分 化^[33]。这表明组织蛋白酶在不同物种发育阶段的 表达具有不同的规律,CTSB在昆虫发育过程中表 现出阶段特异性^[4]。

昆虫属于变温动物,极端低温或高温都会影响 其生存和生长发育[34-35]。组织蛋白酶作为一种多功 能水解酶系,在昆虫响应温度胁迫过程中发挥重要 作用^[4]。例如柑橘木虱、长角血蜱 Haemaphysalis longicornis 和家蚕在不同温度胁迫后,其体内的组 织蛋白酶表达显著上调,推测组织蛋白酶响应温度 的胁迫[16-17,36]。本研究发现,高低温胁迫下桃蚜 CTSB-16D 和 CTSB-348 基因的表达被显著诱导, 且表达量随时间延长整体呈先上升后下降的变化趋 势,4℃胁迫下,CTSB-16D和CTSB-348表达量均 在 90 min 时达到峰值; 36℃胁迫下, CTSB-16D 和 CTSB-348 表达量均在 30 min 达到峰值。在棉蚜 CTSB 基因响应不同温度胁迫时也得到了类似的结 果[37]。我们推测短时间的极端温度刺激,能有效诱 导桃蚜 2个 CTSB 基因的表达,激发体内的保护机 制,从而提高桃蚜对温度胁迫的耐受力。随着极端 温度胁迫时间的延长,CTSB 基因表达量下降,这可 能与半胱氨酸蛋白酶对昆虫响应极端温度胁迫的保 护作用存在阈值有关,当超过保护阈值后会导致 CTSB 的表达水平下降^[38]。

UV-B是环境中影响生物的重要胁迫因子^[39]。

UV-B辐射会引起昆虫相关基因的差异表达,如氧 自由基(ROS)、热激蛋白 HSP70、细胞色素氧化酶 和蛋白酶基因等,从而响应 UV-B 胁迫^[40-42]。本研 究发现, UV-B 能够诱导 CTSB-16D 和 CTSB-348 的表达,推测 CTSB 参与桃蚜对 UV-B 胁迫的应激 反应。二斑叶螨 Tetranychus urticae 在 UV-B 胁迫 下,体内 CTSB 基因的表达量也显著上调^[43]。本研 究还发现 UV-B 胁迫下, CTSB-16D 和 CTSB-348 相对表达量随时间呈先增高后降低的趋势,分别在 60 min 和 120 min 到达峰值,这可能与短时间的 UV-B 胁迫对桃蚜细胞造成的损伤,能够通过其体 内 CTSB 的上调表达来修复有关;而随着 UV-B 胁 迫时间的延长, CTSB-16D 和 CTSB-348 表达量均 显著下降,可能长时间的 UV-B 胁迫对机体造成的 损伤超出 CTSB 基因的阈值,导致表达量下降,这 与 Yoon 等^[44]的研究结果相符。

综上,本研究克隆了桃蚜 CTSB-16D 和 CTSB-348 基因,发现低温、高温和 UV-B 胁迫会诱导桃蚜 成虫 CTSB 基因的表达,该结果初步阐明了 CTSB 基因在桃蚜响应环境胁迫中具有重要的作用,为进 一步深入研究桃蚜 CTSB 功能及其在响应环境胁迫 中的作用机制等方面奠定了基础。

参考文献

- MORT J S, BUTTLE D J. Cathepsin B [J]. International Journal of Biochemistry and Cell, 1997, 29(5): 715 - 720.
- [2] 潘光照. 家蚕 Cathepsin L 的鉴定及功能初探[D]. 重庆: 西南 大学, 2018.
- [3] SUN Yuxuan, ZHU Baojian, TANG Lin, et al. Cathepsin O is involved in the innate immune response and metamorphosis of Antheraea pernyi [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2017, 150: 6-14.
- [4] SAIKHWESKAR N, SUMMANWAR A, JOSHI R, et al. Cathepsins of lepidopteran insects: aspects and prospects [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2015, 64: 51-59.
- [5] GE Zhaoyu, WAN Pinjun, LI Guoqing, et al. Characterization of cysteine protease-like genes in the striped rice stem borer, *Chilo suppressalis* [J]. Genome, 2014, 57(2): 79-88.
- [6] SUN Yuxuan, CHEN Chen, XU Wenjie, et al. Functions of Bombyx mori cathepsin L-like in innate immune response and anti-microbial autophagy [J/OL]. Developmental and Comparative Immunology, 2021, 116: 103927. DOI: 10.1016/ j. dci. 2020. 103927.
- [7] SONG K H, JUNG M K, EUM J H, et al. Proteomic analysis

of parasitized *Plutella xylostella* larvae plasma [J]. Journal of Insect Physiology, 2008, 54(8): 1271 – 1280.

- [8] PAIM R M M, ARAUJO R N, LEIS M, et al. Functional evaluation of heat shock proteins 70 (HSP70/HSC70) on *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) physiological responses associated with feeding and starvation [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2016, 77: 10-20.
- [9] SARKAR N, BARIK A. Effect of temperature on development and reproduction of *Epilachna dodecastigma* (Wied.) (Coleoptera: Coccinellidae) [J]. Proceedings of the Zoological Society, 2017, 70(2): 150 - 155.
- [10] ABRCA M, SPAHN R. Direct and indirect effects of altered temperature regimes and phenological mismatches on insect populations [J]. Current Opinion in Insect Science, 2021, 47: 67-74.
- [11] RWOMUSHANA I, EKESI S, OGOL C K, et al. Mechanisms contributing to the competitive success of the invasive fruit fly *Bactrocera invadens* over the indigenous mango fruit fly, *Ceratitis cosyra*: the role of temperature and resource preemption [J]. Entomologia Experimentalis et Applicata, 2009, 133(1): 27 37.
- [12] ROSS-GILLESPIE V, PICKER M D, DALLAS F H, et al. The role of temperature in egg development of three aquatic insects Lestagella penicillata (Ephemeroptera), Aphanicercella scutata (Plecoptera), Chimarra ambulans (Trichoptera) from South Africa [J]. Journal of Thermal Biology, 2018, 71: 158 – 170.
- [13] PUMHAN N, TIAN Mi, XU Lili, et al. Effects of heat stress and exposure duration on survival characteristics of different developmental stages of *Propylaea japonica*, a dominant aphidophagous ladybeetle in China [J/OL]. Crop Protection, 2020, 130: 105054. DOI: 10. 1016/j. cropro. 2019. 105054.
- [14] 陈兵,康乐. 昆虫对环境温度胁迫的适应与种群分化[J]. 自 然科学进展, 2005, 15(3): 11-17.
- [15] WU Fengyao, ZOU Fengming, JIA Junqiang, et al. The influence of challenge on cathepsin B and D expression patterns in the silkworm *Bombyx mori* L. [J]. International Journal of Industrial Entomology, 2011, 23(1): 129-135.
- [16] KIM B Y, LEE K S, SOHN M R, et al. Bombyx mori cathepsin D expression is induced by high temperature and H₂O₂ exposure [J]. Journal of Asia-Pacific Entomology, 2011, 14(3): 285 - 288.
- [17] SHU Benshui, WU Yongxian, QU Mengqiu, et al. Comparative transcriptomic analyses revealed genes and pathways responsive to heat stress in *Diaphorina citri* [J/OL]. Gene, 2020, 727: 144246. DOI: 10.1016/j.gene. 2019. 144246.
- [18] RÜNGER T M, KAPPES U P. Mechanisms of mutation formation with long-wave ultraviolet light (UVA) [J]. Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine, 2008, 24(1):

2 - 10.

- [19] BIVIK C A, LARSSON P K, KAGEDAL K M, et al. UVA/ B-induced apoptosis in human melanocytes involves translocation of cathepsins and Bcl-2 family members [J]. Journal of Investigative Dermatology, 2006, 126(5); 1119 – 1127.
- [20] MENG Jianyu, ZHANG Changyu, ZHU Fen, et al. Ultraviolet light-induced oxidative stress: effects on antioxidant response of *Helicoverpa armigera* adults [J]. Journal of Insect Physiology, 2009, 55(6): 588 - 592.
- [21] ALI A, RASHID M A, HUANG Qiuying, et al. Influence of UV-A radiation on oxidative stress and antioxidant enzymes in Mythimna separate (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2017, 24(9): 8392 - 8398.
- [22] VILLENA O C, MOMEN B, SULLIVAN J, et al. Effects of ultraviolet radiation on metabolic rate and fitness of *Aedes albopictus* and *Culex pipiens* mosquitoes [J/OL]. PeerJ, 2018, 6: e6133. DOI: 10.7717/peerj. 6133.
- [23] YANG Huan, ZHANG Renze, ZHANG Yuhao, et al. Cathepsin-L is involved in degradation of fat body and programmed cell death in *Bombyx mori* [J/OL]. Gene, 2020, 760: 144998. DOI: 10.1016/j. gene. 2020. 144998.
- [24] 刘金燕,汤朝起,董勇浩,等.烟蚜对不同寄主植物间的选择 性分析[J].烟草科技,2018,51(7):36-39.
- [25] 周吕, 孟建玉, 杨昌利, 等. 草地贪夜蛾热激蛋白基因 SfHsp90 的克隆及在高低温和 UV-A 胁迫下的表达分析[J]. 昆虫 学报, 2020, 63(5): 533-544.
- [26] YANG Changli, MENG Jianyu, ZHOU Lü, et al. Induced heat shock protein 70 confers biological tolerance in UV-B stress-adapted *Myzus persicae* (Hemiptera) [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 220, 1146-1154.
- [27] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta\Omega}$ methods [J]. Methods, 2001, 25(4); 402-408.
- [28] 刘伟娇,张肖丽,高雪珂,等.5个棉蚜组织蛋白酶 B 基因克 隆及在不同寄主专化型中的表达分析[J].环境昆虫学报, 2022,44(4):946-955.
- [29] 程杏安,叶静敏,蒋旭红,等. 草地贪夜蛾组织蛋白酶 B 的基因克隆、序列分析、三维结构预测及其分子对接模拟[J]. 生物技术通报,2018,34(1):183-194.
- [30] 罗梅,董章勇,宾淑英,等.扶桑绵粉蚧组织蛋白酶B基因的 克隆、原核表达和不同发育阶段表达分析[J]. 昆虫学报, 2012,55(3):276-283.
- [31] 魏璐婷. 赤拟谷盗四个半胱氨酸蛋白酶基因 *TccatB25、Tc-catL11、TccatL13* 和 *TcPigk* 的表达特性与 RNAi 效应分析 [D]. 南京:南京师范大学, 2019.
- [32] FERRARA T F, SCHNEIDER V K, KISHI L T, et al. Char-

acterization of a recombinant cathepsin B-like cysteine peptidase from *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae): a putative target for control of citrus Huanglongbing [J/OL]. PLoS ONE, 2015, 10(12): e0145132. DOI: 10.1371/journal. pone. 0145132.

- [33] 杨晓梅,侯立静,董杜鹃,等.组织蛋白酶 B 在棉铃虫个体发 育过程中的表达及活性研究[J].山东大学学报(理学版), 2005,40(5):124-129.
- [34] BOARDMAN L, SØRENSEN J G, TERBLANCHE J S. Physiological and molecular mechanisms associated with cross tolerance between hypoxia and low temperature in *Thaumatotibia leucotreta* [J]. Journal of Insect Physiology, 2015, 82: 75 - 84.
- [35] MA Chunsen, MA Gang, PINCEBOURDE S. Survive a warming climate: insect responses to extreme high temperatures[J]. Annual Review of Entomology, 2021, 66: 163-184.
- [36] 李孟孟. 温度对长角血蜱胚胎发育过程中卵黄蛋白降解及三 种酶的影响[D]. 石家庄:河北师范大学, 2020.
- [37] 刘金萍. 新疆棉区棉蚜和棉长管蚜对高温胁迫的响应及分子 机制[D]. 北京:中国农业科学院, 2021.
- [38] LU Mingxing, DU Yuzhou, CAO Shuangshuang, et al. Molecular cloning and characterization of the first caspase in the striped stem borer, *Chilo suppressalis* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2013, 14(5): 10229 - 10241.
- [39] BURDICK S C, PRISCHMANN-VOLDSETH D A, HAR-MON J P. Density and distribution of soybean aphid, *Aphis glycines* Matsumura (Hemiptera: Aphididae) in response to UV radiation [J]. Population Ecology, 2015, 57(3): 457 466.
- [40] 刘志伟,柳欣,董尧,等.紫外线、高压静电和大麦黄矮病毒胁
 迫下获草谷网蚜 SOD 基因表达[J].植物保护学报,2023,50
 (1):91-100.
- [41] 赵惠燕,都二霞,郭剑文,等.UV-B辐射胁迫下桃蚜差异基 因表达的分子生态初步研究[J].西北农林科技大学学报(自 然科学版),2010,38(3):132-138.
- [42] WANG Xinru, WANG Chao, WANG Xingwei, et al. The functions of caspase in whitefly *Bemisia tabaci* apoptosis in response to ultraviolet irradiation [J]. Insect Molecular Biology, 2018, 27(6): 739 - 751.
- [43] MURATA Y, OSAKABE M. Developmental phase-specific mortality after ultraviolet-B radiation exposure in the two-spotted spider mite [J]. Environmental Entomology, 2017, 46(6): 1448 - 1455.
- [44] YOON J, BANG S H, PARK J S, et al. Increased *in vitro* lysosomal function in oxidative stress-induced cell lines [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2011, 163 (8): 1002 - 1011.