

甜菜夜蛾围食膜的蛋白质组鉴定*

梁振普** 李鹏娟 王 亮 王朝兴 张小霞***

(河南农业大学生命科学学院, 郑州 450002)

摘 要 【目的】甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 是农业的重要害虫, 为害我国蔬菜等农作物的生长。围食膜 (Peritrophic membrane, PM) 是昆虫体内的第一道屏障, 有助于昆虫食物消化过程和保护昆虫避免细菌或病毒的侵染。本研究选取甜菜夜蛾为实验对象, 通过鉴定围食膜的总蛋白成分, 为探讨围食膜与病原菌相互作用的生理机制奠定基础。【方法】选用人工饲料饲养的甜菜夜蛾 5 龄幼虫, 剥离幼虫围食膜, 利用强变性剂三氟甲磺酸 (Trifluoromethane-sulfonic acid, TFMS) 处理, 并对围食膜蛋白进行质谱鉴定和生物信息学分析, 使用 BLAST 鉴定蛋白的同源性, 探究基因水平转移现象。【结果】本研究共鉴定出 199 个围食膜蛋白。这些鉴定的蛋白可富集于 84 条 GO term ($P < 0.05$); 此外, 所鉴定的蛋白可被注释到 KEGG 的 73 条代谢通路中, 并能形成多个蛋白互作网络, 分别参与能量代谢、蛋白水解、过氧化氢代谢、免疫等多种过程。同时, 鉴定出与抗逆性相关蛋白, 具有解毒代谢等功能, 提高昆虫对农药和恶劣环境的抗性。【结论】本研究对鉴定出的 199 个围食膜蛋白进行分析, 初步揭示围食膜潜在的生物学功能, 并提出一些害虫控制思路, 为新型杀虫剂的研发提供了理论基础。

关键词 甜菜夜蛾; 围食膜; 液质联用技术; 蛋白质组; 生物信息学

Identification of the peritrophic membrane proteome of *Spodoptera exigua*

LIANG Zhen-Pu** LI Peng-Juan WANG Liang WANG Zhao-Xing ZHANG Xiao-Xia***

(College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract 【Objectives】*Spodoptera exigua* is a major agricultural insect pest that damages the growth of many vegetable crops. The peritrophic membrane (PM) is a semipermeable membrane secreted by insect midgut cells that plays an important role in digestion and protects insects from microbes and parasites. The aim of this study was to identify the protein constituents of the *S. exigua* peritrophic membrane, in order to increase understanding of the molecular interaction between the PM and pathogenic microorganisms. 【Methods】The PM of 5th instar *S. exigua* larvae were removed and treated with trifluoromethane-sulfonic acid (TFMS). The peritrophic membrane proteome of larvae was identified by liquid chromatography and mass spectrometry (LC-MS/MS), and the results subjected to bioinformatics analysis. BLAST software was used to compare protein homology online and to explore horizontal gene transfer. 【Results】A total of 199 peritrophic membrane proteins from *Spodoptera exigua* larvae were identified. These proteins could be enriched in 84 GO terms ($P < 0.05$). KEGG enrichment results categorized the identified proteins into 73 metabolic pathways. The results of protein-protein interaction (PPI) analysis indicate that the identified proteins form multiple interaction networks and participate in various processes, such as energy metabolism, protein hydrolysis, hydrogen peroxide metabolism and immunity. The identified proteins included stress-related proteins which are involved in detoxification and metabolism. Such proteins can improve the resistance of insects to pesticides and harsh environmental conditions. 【Conclusion】A total of 199 peritrophic membrane proteins of *S. exigua* larvae were identified and analyzed. The results provide useful information on the potential biological

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金 (31570151, 31490601); 河南省高校科技创新人才项目 (17HASTIT039); 河南省高校重点科研项目 (19A210004); 河南省科技攻关项目 (102102110151, 202102110222)

**第一作者 First author, E-mail: lzpbio@126.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: lzpzxx@126.com

收稿日期 Received: 2019-08-17; 接受日期 Accepted: 2020-12-29

function of the PM and facilitate the development of novel, effective, biological pesticides.

Key words *Spodoptera exigua*; peritrophic membrane; liquid chromatography and mass spectrometry; proteome; bioinformatics

围食膜 (Peritrophic membrane, PM) 是由昆虫中肠细胞分泌的半透性薄膜, 主要成分为粘多糖、几丁质和蛋白质 (刘海明等, 2012)。其中蛋白质含量最高, 约占 22%-55%, 几丁质约占 PM 的 3.7%-13%, 二者的紧密结合维持着 PM 的稳定性。PM 的功能类似于脊椎动物的消化道黏液层, 可以使中肠上皮细胞免受未消化食物残渣造成的损伤, 而且能阻止经口摄取的病原体入侵 (Lehane, 1997; Terra, 2001)。作为昆虫体内的第一道屏障, PM 不仅能够保护昆虫避免细菌或病毒的侵染, 而且能够有效过滤细菌毒素 (Lehane, 1997)。研究表明, PM 产量的改变会影响化学杀虫剂的杀虫效果 (Abedi and Brown, 1961)。PM 中任何能被破坏的位点均可能成为靶标位点 (张霞, 2008; 胡小龙, 2013), 例如粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 肠粘蛋白被增效蛋白作用后, PM 结构被破坏, 导致其渗透性改变 (Wang and Granados, 1997; Peng et al., 1999)。所以, 将 PM 作为靶标, 破坏 PM 的正常生理功能, 即可抑制昆虫的种群数量, 实现害虫防治的目的。因此, 对昆虫 PM 化学组成结构和生物学功能的深入研究, 有助于新型生物杀虫剂的研发。

近年来, 对 PM 的研究逐渐深入。目前越来越多的昆虫 PM 蛋白质组已被鉴定出来, 包括家蝇 *Musca domestica* (Wang et al., 2016)、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* (Dinglasan et al., 2009)、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Campbell et al., 2008)、刺舌蝇 *Glossina morsitans* (Rose et al., 2014)、家蚕 *Bombyx mori* (Hu et al., 2012; Zhong et al., 2012) 和蓓带夜蛾 *Mamestra configurata* (Toprak et al., 2016)。

甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 属鳞翅目、夜蛾科, 该虫分布领域广, 严重为害蔬菜等农作物的生长 (王俊平, 2009)。目前, 对甜菜夜蛾的防治依然是化学方法为主, 但长时间使用农药, 使

甜菜夜蛾体内的抗性逐渐增强, 导致杀虫效果降低。因此, 研究甜菜夜蛾的围食膜结构以及蛋白质种类可为害虫防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验昆虫

甜菜夜蛾幼虫由中国科学院武汉病毒研究所惠赠。幼虫置于 28 °C 恒温培养箱中饲养, 相对湿度为 70%-80%, 光照周期为 14L: 10D。饲喂甜菜夜蛾幼虫的人工饲料配方参考张彬等 (2006)。

1.2 围食膜的处理和蛋白质的制备

围食膜处理方法参照 Edge (2003)。待幼虫饲养至 5 龄, 取出幼虫放置冰上麻醉。去掉头部, 然后将肠道拉出放入提前冰浴的 0.75% 生理盐水中, 使用解剖针在肠道上拉开一个小口, 随后借助肠腔内外部的压力差顺势取出围食膜。剥离围食膜后, 用去离子水反复清洗, 再使用三氟甲磺酸处理, 煮沸 10 min, 使 PM 上的蛋白质全部释放。

1.3 围食膜总蛋白的鉴定

质谱鉴定前, 首先用 SDS-PAGE 电泳技术检测蛋白样品, 电泳前先将样品沸水浴 10 min, 离心后取上清进行 SDS-PAGE 分离, 浓缩胶和分离胶浓度分别为 5% 和 12%。鉴定时采用液质联用技术, 参考王宇 (2016) 的鉴定方法。本实验为了能检测到极少量的蛋白质, 使用胰蛋白酶酶解蛋白溶液, 然后进行冻干处理。使用 2% 乙腈和 0.1% 甲酸的水溶液重悬样品后使用液相色谱 (Liquid chromatograph, LC) 技术进行分离。液相色谱使用 Eksigent NanoLC-Ultra™ 2D 系统 (AB SCIEX), 溶解的样品保持 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流动速度上样至 C18 预柱上 (规格为 100 $\mu\text{m} \times 3 \text{ cm}$,

C18, 3 μm , 150 $\text{\AA}$), 继续保持流速进行冲洗脱盐 10 min。实验所用的分析柱为 C18 反相色谱柱 (规格为 75 μm ×15 cm, C18, 3 μm , 120 $\text{\AA}$)。本研究所用梯度为 70 min 之内流动相 B 由 5% 升高为 35%。质谱实验使用 TripleTOF 5600 系统 (AB SCIEX), 所用喷雾电压、气帘气压及雾化气压分别为 2.5 kV、30 PSI、5 PSI。所用质谱的扫描方式为基于信息依赖的采集模式 (Information Dependent Analysis, IDA), TOF-MS 单张图谱扫描时间设置为 250 ms。

1.4 数据处理与分析

数据分析使用 Mascot 2.3 软件 (Matrix Science), 使鳞翅目夜蛾科 (Noctuidae) 昆虫和鳞翅目菜蛾科昆虫小菜蛾 *Plutella xylostella* 作数据库。Protein score C.I.% 在 95% 以上即为鉴定成功。

1.5 生物信息学分析

对鉴定蛋白做 Gene ontology (简称 GO) 功能分析、Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) Pathway 分析和蛋白互作 (Protein-to-protein interaction, PPI) 分析。GO 体系分为细胞组成 (Cellular component)、分子功能 (Molecular function) 和生物过程 (Biological process) 三部分。本研究中 GO 分析所使用的是 Quick GO 数据库。PPI 分析采用 String 数据库。运用 P 值分析法进行显著性分析, P 值小于 0.05 为结果显著。鉴定蛋白的同源性使用 BLAST 软件。

2 结果与分析

2.1 围食膜蛋白的鉴定和功能分析

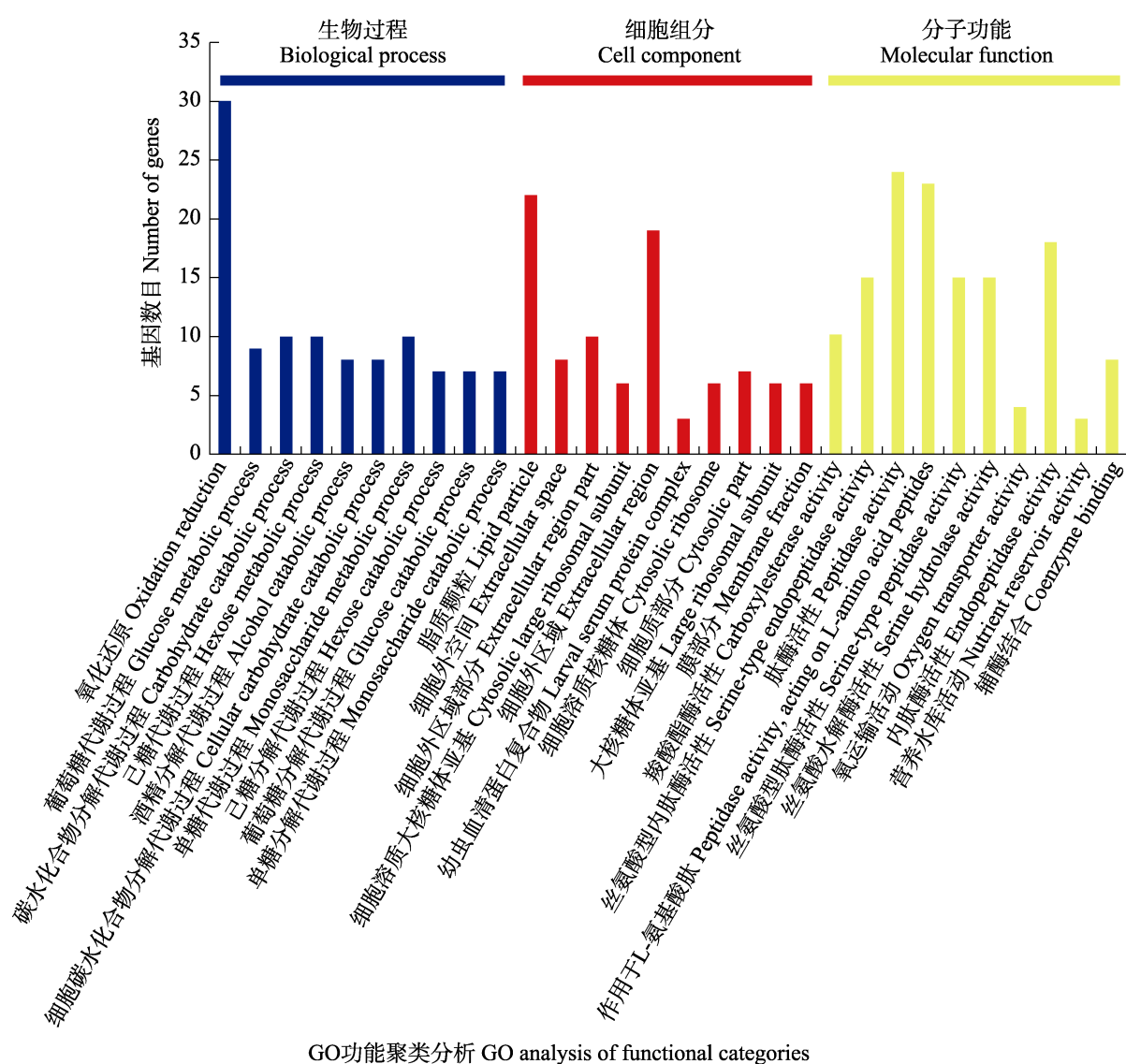
本研究共鉴定出甜菜夜蛾幼虫 PM 蛋白 199 个。所用的匹配数据库为鳞翅目夜蛾科 Noctuidae 昆虫和鳞翅目菜蛾科小菜蛾 *Plutella xylostella*。通过对鉴定出的围食膜蛋白进行 GO 分析, 结果表明它们主要分为三大类: 生物过程 (Biological process, BP)、细胞组分 (Cellular

component, CC) 和分子功能 (Molecular function, MF)。所鉴定的蛋白富集于 84 条 GO term ($P < 0.05$), 显著富集到 BP term 的前 10 条分别为氧化还原 (Oxidation reduction) ($P = 2.98 \times 10^{-9}$)、葡萄糖代谢过程 (Glucose metabolic process) ($P = 1.69 \times 10^{-6}$)、碳水化合物分解代谢过程 (Carbohydrate catabolic process) ($P = 1.90 \times 10^{-6}$)、己糖代谢过程 (Hexose metabolic process) ($P = 2.32 \times 10^{-6}$)、酒精分解代谢过程 (Alcohol catabolic process) ($P = 5.68 \times 10^{-6}$)、细胞碳水化合物分解代谢过程 (Cellular carbohydrate catabolic process) ($P = 5.68 \times 10^{-6}$)、单糖代谢过程 (Monosaccharide metabolic process) ($P = 7.02 \times 10^{-6}$)、己糖分解代谢过程 (Hexose catabolic process) ($P = 2.48 \times 10^{-5}$)、葡萄糖分解代谢过程 (Glucose catabolic process) ($P = 2.48 \times 10^{-5}$)、单糖分解代谢过程 (Monosaccharide catabolic process) ($P = 2.84 \times 10^{-5}$)。显著富集到 CC term 的前 10 条分别为脂质颗粒 (Lipid particle) ($P = 8.22 \times 10^{-10}$)、细胞外空间 (Extracellular space) ($P = 5.24 \times 10^{-4}$)、细胞外区域部分 (Extracellular region part) ($P = 1.19 \times 10^{-3}$)、细胞溶质大核糖体亚基 (Cytosolic large ribosomal subunit) ($P = 2.58 \times 10^{-3}$)、细胞外区域 (Extracellular region) ($P = 2.79 \times 10^{-3}$)、幼虫血清蛋白复合物 (Larval serum protein complex) ($P = 4.36 \times 10^{-3}$)、细胞溶质核糖体 (Cytosolic ribosome) ($P = 2.21 \times 10^{-2}$)、细胞质部分 (Cytosolic part) ($P = 2.33 \times 10^{-2}$)、大核糖体亚基 (Large ribosomal subunit) ($P = 3.26 \times 10^{-2}$)、膜部分 (Membrane fraction) ($P = 3.76 \times 10^{-2}$)。显著富集到 MF term 的前 10 条分别为羧酸酯酶活性 (Carboxylesterase activity) ($P = 9.12 \times 10^{-5}$)、丝氨酸型内肽酶活性 (Serine-type endopeptidase activity) ($P = 3.29 \times 10^{-4}$)、肽酶活性 (Peptidase activity) ($P = 6.79 \times 10^{-4}$)、肽酶活性, 作用于 L-氨基酸肽 (Peptidase activity, acting on L-amino acid peptides) ($P = 7.60 \times 10^{-4}$)、丝氨酸型肽酶活性 (Serine-type peptidase activity) ($P = 8.52 \times 10^{-4}$)、丝氨酸水解酶活性 (Serine hydrolase

activity) ($P=9.08 \times 10^{-4}$)、氧运输活动 (Oxygen transporter activity) ($P=1.28 \times 10^{-3}$)、内肽酶活性 (Endopeptidase activity) ($P=2.21 \times 10^{-3}$)、营养水库活动 (Nutrient reservoir activity) ($P=4.26 \times 10^{-3}$)、辅酶结合 (Coenzyme binding) ($P=1.02 \times 10^{-2}$) (图 1)。

对以上鉴定的蛋白进行 KEGG 分析, 结果显示所鉴定蛋白富集于 73 条代谢途径中, 其中 P 值小于 0.05 的有 51 条, 共有 76 个蛋白。其中富集程度前 10 位的分别是: 代谢通路 (Metabolic pathways) ($P=2.17 \times 10^{-28}$)、碳代谢 (Carbon metabolism) ($P=6.33 \times 10^{-12}$)、淀粉和蔗糖代

谢 (Starch and sucrose metabolism) ($P=4.69 \times 10^{-9}$)、谷胱甘肽代谢 (Glutathione metabolism) ($P=5.40 \times 10^{-9}$)、过氧化物酶体 (Peroxisome) ($P=1.86 \times 10^{-7}$)、糖酵解/糖异生 (Glycolysis/Gluconeogenesis) ($P=3.01 \times 10^{-7}$)、脂肪酸代谢 (Fatty acid metabolism) ($P=9.34 \times 10^{-7}$)、组氨酸代谢 (Histidine metabolism) ($P=6.24 \times 10^{-6}$)、磷酸戊糖途径 (Pentose phosphate pathway) ($P=9.55 \times 10^{-6}$)、TCA 循环 (TCA cycle) ($P=1.44 \times 10^{-5}$) (表 1)。共有 38% (76/199) 的鉴定蛋白被富集到了已知的代谢途径 ($P<0.05$), 其余围食膜蛋白还有待进一步了解。



GO功能聚类分析 GO analysis of functional categories

图 1 鉴定出的围食膜蛋白 GO 分析中最明显的前 10 条

Fig. 1 The most obvious top 10 of the GO enrichment analysis of the identified peritrophic membrane proteins

表 1 鉴定出的围食膜蛋白的 KEGG 富集分析结果

Table 1 KEGG enrichment analysis results of identified peritrophic membrane proteins

KEGG 通路 KEGG pathway	通路 ID Pathway ID	P 值 P-value	Q 值 Q-value	蛋白数 Number of proteins
代谢途径 Metabolic pathways	dme01100	2.17×10^{-28}	1.97×10^{-26}	59
碳代谢 Carbon metabolism	dme01200	6.33×10^{-12}	2.88×10^{-10}	15
淀粉和蔗糖代谢 Starch and sucrose metabolism	dme00500	4.69×10^{-9}	1.23×10^{-7}	10
谷胱甘肽代谢 Glutathione metabolism	dme00480	5.40×10^{-9}	1.23×10^{-7}	10
过氧化物酶体 Peroxisome	dme04146	1.86×10^{-7}	2.83×10^{-6}	9
糖酵解/糖异生 Glycolysis/Gluconeogenesis	dme00010	3.01×10^{-7}	3.92×10^{-6}	8
脂肪酸代谢 Fatty acid metabolism	dme01212	9.34×10^{-7}	1.06×10^{-5}	7
组氨酸代谢 Histidine metabolism	dme00340	6.24×10^{-6}	6.31×10^{-5}	4
磷酸戊糖途径 Pentose phosphate pathway	dme00030	9.55×10^{-6}	8.69×10^{-5}	5
柠檬酸循环 (TCA 循环) Citrate cycle (TCA cycle)	dme00020	1.44×10^{-5}	1.19×10^{-4}	6

鉴定蛋白的蛋白互作分析显示,以 alphasTry、CG10472、Jon65Aiv 等为核心可形成参与蛋白质水解代谢的互作网络, PGRP-LB、GNBP1、Rel、Toll-7 可形成参与机体免疫过程的互作网络。Awd、F1、F2、Rpl15、Rpl13A、Rpl23、Rpl7、Rpl7A 可形成参与机体转录和蛋白合成的互作

网络。以 Mdh1、Eno、Pgi 等为核心可形成参与糖代谢过程的互作网络。以 Aldh-III 和 ScpX 等为核心可形成参与脂肪酸代谢的互作网络。以 Jafrac1、GstD1、Cat、Sod、CG10672 等蛋白可形成参与过氧化氢代谢的互作网络,将过氧化氢降解为无毒物质,使昆虫免受侵害(图 2)。

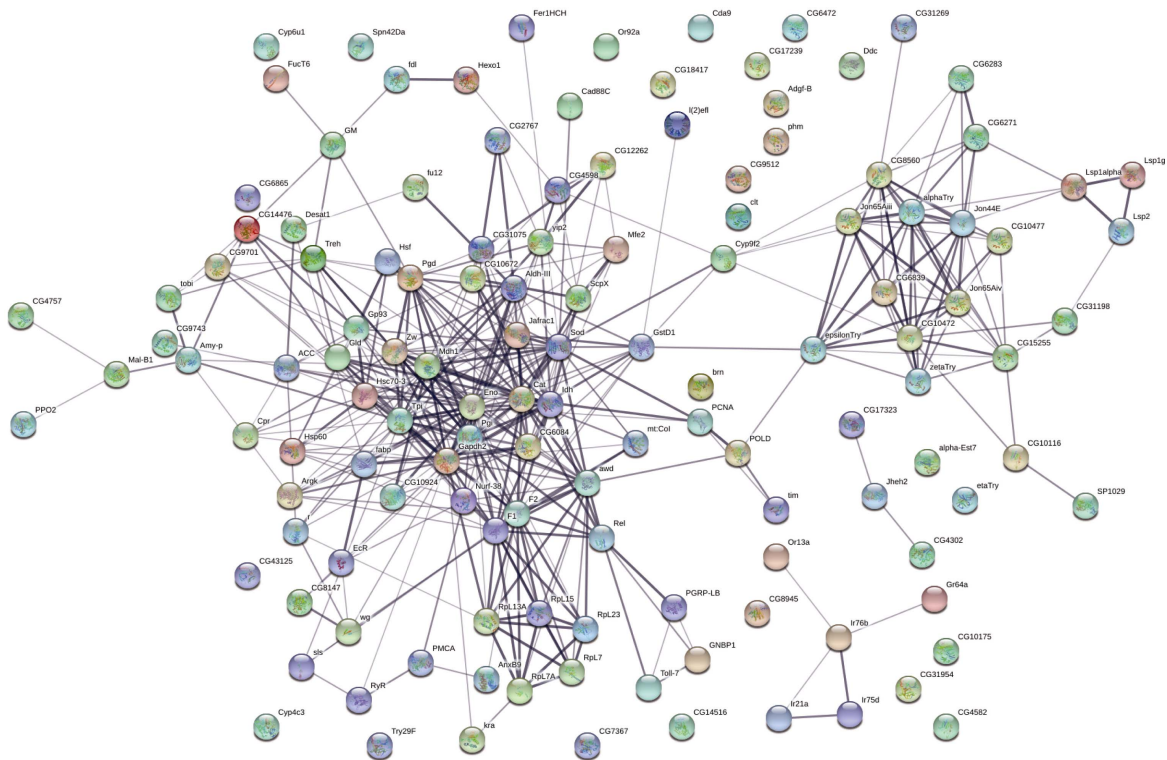


图 2 鉴定出的围食膜蛋白间的互作图

Fig. 2 Protein-protein interaction networks of identified peritrophic membrane proteins

2.2 抗逆性相关蛋白的鉴定

通过质谱鉴定,从甜菜夜蛾围食膜蛋白样品中鉴定出一些与解毒代谢相关的蛋白,包括:羧酸酯酶(CarEs)(CG10116, CG6271, CG10175, CG4757)、细胞色素 P450(Cyp6u1、Cyp12a4、Cyp4c3、Cyp6a13、Cyp9f2)、谷胱甘肽-S-转移酶(GSTs)(GstD1、GstS1)。此外,质谱结果鉴定出 3 个热激蛋白,包括 Hsp60、Hsp70 及其同源蛋白 Hsc70。

2.3 基因水平转移现象的鉴定

基因水平转移(Horizontal gene transfer, HGT)是具有差异的两种生物体间遗传性物质的传播。为探究甜菜夜蛾与杆状病毒之间是否存在 HGT 现象,本实验鉴定出的 199 个蛋白以甜菜夜蛾核型多角体病毒(*Spodoptera exigua multicausid nucleopolyhedrovirus*, SeMNPV)(NC-002169)基因组为数据库,进行同源性分析比对,发现其中有 8 个蛋白与杆状病毒的蛋白具有较高的同源性,它们的 GenBank 登录号分别是:6960582(泛素, V-ubiquitin), 6960547(凋亡抑制蛋白, Inhibitor of apoptosis-2), 6960526(晚期表达因子, Late expression factor-5), 571272046(桥粒斑蛋白, Desmoplakin), 571271479(环指蛋白, RING-finger cg30), 6960538(未知蛋白), 6960552(DNA 聚合酶, DNA polymerase), 6960504(未知蛋白)。鉴定结果再次证实了杆状病毒和宿主昆虫之间存在 HGT 现象,为物种进化提供了一定的事实依据。

3 结论与讨论

围食膜由几丁质微纤丝构成,它们十字交叉形成网状结构,一些蛋白通过几丁质结合域(CBD)与几丁质纤维结合,但也存在一些非结合型蛋白,本身不具有 CBD(Hegedus *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2010)。本研究鉴定出的 199 种蛋白中只有一部分具有 CBD,一些非结合型蛋白(如各种水解酶类)并不结合在几丁质上,推测 PM 可能为这些蛋白提供了特定的结合位

点,使其可以直接和围食膜发生相互作用。另外,这些非结合型蛋白也可能与具有 CBD 的蛋白相互作用,然后成为围食膜的一部分(梁振普等, 2019)。由此可见,采取干预围食膜几丁质形成及其与蛋白质的结合等方法,可有效控制害虫。

本研究利用 TMFS 使围食膜蛋白全部释放出来,证明甜菜夜蛾 PM 蛋白结合十分牢固,是可溶于强变性剂的一类蛋白。近年来,利用质谱法进行 PM 蛋白的鉴定和功能分析逐渐成为热点,但是鉴定结果差异很大。Zhong 等(2012)对家蚕的 PM 蛋白进行鉴定,共获得 305 种蛋白,但 Hu 等(2012)对家蚕 PM 蛋白的鉴定结果仅有 47 种。Toprak 等(2016)对蓀带夜蛾 *Mamestra configurata* PM 进行蛋白组学分析,结果显示存在 82 种蛋白。Dinglasan 等(2009)从冈比亚按蚊 PM 中鉴定出 209 种蛋白。对于鳞翅目昆虫来说,即使同一物种,PM 蛋白的鉴定结果也会有所差别(Hu *et al.*, 2012; Zhong *et al.*, 2012; 李怡萍等, 2013)。推测造成此种差异的原因有很多,包括检索数据库和 PM 蛋白制备方法的差异以及仪器的精确程度等(李怡萍等, 2013; 梁振普等, 2019)。除质谱方法外,鉴定 PM 蛋白还可以利用构建中肠 cDNA 表达文库的方法,然后以核酸和抗体作为探针来筛选目的基因以及新的蛋白基因(Wang and Granados, 1997; Shi *et al.*, 2004; Zhang, 2008)。目前多种昆虫中肠 cDNA 文库已被成功构建,比如小菜蛾、粉纹夜蛾、棉铃虫、蓀带夜蛾等,但是此方法也存在一定的缺陷,涉及到 PCR 扩增,极易改变表达文库中的代表性,影响难扩增基因的克隆;另外实验操作繁琐、耗时长,还需要进一步进行技术改善。

基因水平转移(Horizontal gene transfer, HGT)是具有差异的两种生物体间遗传性物质的传播(段海蓉等, 2011)。Katsuma 等(2008)对家蚕和 BmNPV 的基因组进行了类比分析,研究得出 BmNPV 中有 15 个蛋白与家蚕具有很高的同源性,其有可能是鳞翅目昆虫与杆状病毒间的 HGT 现象。本研究鉴定出的 8 个蛋白与杆状病毒蛋白相似性较高,再次证实病毒和宿主间的

HGT 现象。8 个蛋白中与 Katsuma 等 (2008) 鉴定得到的 15 个蛋白共有 4 个相同, 分别为 V-Ubiquitin、Inhibitor of apoptosis-2、Desmoplakin 和 DNA polymerase。这 8 个蛋白的功能大部分已明确。研究表明, 泛素 Ubiquitin 主要参与蛋白的降解过程 (Varshavsky, 2017)。在 AcMNPV 中, Ubiquitin 与 BV 有关, Ubiquitin 的缺失并不影响病毒增殖, 但会使 BV 产量减少 80%-90% (Reilly and Guarino, 1996; Wang *et al.*, 2010)。*Inhibitor of apoptosis-2* (IAP-2) 是一种细胞凋亡抑制因子, 将 AcMNPV 缺失 IAP-2 后, 病毒增殖不受影响, 这可能是因为另外一种细胞凋亡抑制因子 p35 的存在 (Griffiths *et al.*, 1999)。相反, 将 BmNPV 的 IAP-2 敲除后则会影响病毒增殖 (Katsuma *et al.*, 2008)。研究表明将 AcMNPV 的 IAP-2 转染至粉纹夜蛾细胞后, 可以抑制 HearNPV 感染引起的细胞凋亡, 但 BV 产量会下降 (Zeng *et al.*, 2009)。*DNA polymerase* 是一种重要基因, 在 AcMNPV 和 BmNPV 中敲除 *DNA polymerase* 后, 2 种病毒的复制增殖均受到严重影响 (Gomi *et al.*, 1997; Vanarsdall *et al.*, 2005; Ono *et al.*, 2012)。RING-finger cg30 与 AcMNPV 的 ODV 相关, 从 BmNPV 中敲除该基因会使病毒滴度下降约 90%-99%, 并且致死时间延长 (Zhang *et al.*, 2012)。对杆状病毒的 *Late expression factor-5* (LEF-5) 进行缺失处理, 晚期基因的转录会出现异常; 当在 Sf9 细胞中转染时, 病毒无法产生 (Su *et al.*, 2011)。*Desmoplakin* 是病毒粒子出芽必需的, 同时该基因还参与多角体在核内的聚集过程 (Ke *et al.*, 2008)。

杀虫剂和环境的变化都会对昆虫造成胁迫危害, 而昆虫在进化过程中抗逆性逐渐增强 (Chen *et al.*, 2014)。本研究鉴定结果显示, 甜菜夜蛾的围食膜蛋白中存在抗逆、抗病相关的蛋白, 如解毒代谢酶、热激蛋白。鉴定到的解毒代谢酶包括羧酸酯酶 (CarEs)、细胞色素 P450、谷胱甘肽-S-转移酶 (GSTs), 它们对昆虫分解农药等有毒物质具有重要作用, 能够增强昆虫对农药的降解效果, 使机体免受农药毒害。热激蛋白

(如 Hsp60、Hsc70-3), 可以提高昆虫对不良环境 (高温、干旱、辐射) 的耐受性, 可使昆虫的抗逆性增强, 从而免受外界胁迫的危害。因此, 深入了解昆虫抗逆机制, 破坏抗逆性相关基因, 可以大大降低昆虫对农药和不良环境的耐受性, 实现害虫防治的目的。

参考文献 (References)

- Abedi ZH, Brown AWA, 1961. Peritrophic membrane as vehicle for DDT and DDE excretion in *Aedes aegypti* larvae. *Annals of the Entomological Society of America*, 54(4): 539–542.
- Campbell PM, Cao AT, Hines ER, East PD, Gordon KHJ, 2008. Proteomic analysis of the peritrophic matrix from the gut of the caterpillar, *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(10): 950–958.
- Chen EH, Wei DD, Shen GM, Yuan GR, Bai PP, Wang JJ, 2014. De novo characterization of the *Dialeurodes citri* transcriptome: Mining genes involved in stress resistance and simple sequence repeats (SSRs) discovery. *Insect Molecular Biology*, 23(1): 52–66.
- Dinglasan RR, Devenport M, Florens L, Johnson JR, Mchugh CA, Donnelly-Doman M, Carucci DJ, Yates JR, Jacobs-Lorena M, 2009. The *Anopheles gambiae* adult midgut peritrophic matrix proteome. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39(2): 125–134.
- Duan HR, Qiu DB, Gong CL, Huang ML, 2011. Analysis of horizontal transfer gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *Hereditas*, 33(6): 636–647. [段海蓉, 丘德彬, 贡成良, 黄茉莉, 2011. 家蚕核型多角体病毒水平转移基因分析. *遗传*, 33(6): 636–647.]
- Edge AS, 2003. Deglycosylation of glycoproteins with trifluoromethanesulphonic acid: Elucidation of molecular structure and function. *Biochemical Journal*, 376(2): 339–350.
- Gomi S, Zhou CL, Yih W, Majima K, Maeda S, 1997. Deletion analysis of four of eighteen aate gene expression factor gene homologues of the baculovirus, BmNPV. *Virology*, 230(1): 35–47.
- Griffiths CM, Barnett AL, Ayres MD, Windass J, King LA, Possee RD, 1999. In vitro host range of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus recombinants lacking functional p35, iap1 or iap2. *The Journal of General Virology*, 80(4): 1055–1066.
- Hegedus D, Erlandson M, Gillott C, Toprak U, 2009. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function.

- Annual Review of Entomology*, 54: 285–302.
- Hu XL, 2013. Analysis of *BmDuoX* gene and identification of midgut peritrophic membrane proteins in silkworm. Doctoral dissertation. Zhejiang: Zhejiang University. [胡小龙, 2013. 家蚕 *BmDuoX* 基因分析及中肠围食膜蛋白鉴定. 博士学位论文. 浙江: 浙江大学.]
- Hu XL, Chen L, Xiang XW, Yang R, Yu SF, Wu XF, 2012. Proteomic analysis of peritrophic membrane (PM) from the midgut of fifth-instar larvae, *Bombyx mori*. *Molecular Biology Reports*, 39(4): 3427–3434.
- Katsuma S, Kawaoka S, Mita K, Shimada T, 2008. Genome-wide survey for baculoviral host homologs using the *Bombyx* genome sequence. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(12): 1080–1086.
- Ke JH, Wang JW, Deng RQ, Wang XZ, 2008. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ac66 is required for the efficient egress of nucleocapsids from the nucleus, general synthesis of preoccluded virions and occlusion body formation. *Virology*, 374(2): 421–431.
- Lehane MJ, 1997. Peritrophic matrix structure and function. *Annual Review of Entomology*, 42: 525–550.
- Li YP, Wu JX, Liang GM, Guo YY, Yuan XQ, 2013. Electrophoretic techniques for the separation of peritrophic membrane proteins from *Helicoverpa armigera*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50(6): 1753–1759. [李怡萍, 仵均祥, 梁革梅, 郭予元, 袁向群, 2013. 棉铃虫围食膜蛋白的电泳分离技术. 应用昆虫学报, 50(6): 1753–1759.]
- Liang ZP, Wang L, Li PJ, Wang ZX, Xiao YB, Zhang XX, 2019. Proteomic identification of the peritrophic membrane of *Helicoverpa armigera*. *Acta Entomologica Sinica*, 62(2): 181–192. [梁振普, 王亮, 李鹏娟, 王朝兴, 肖宇博, 张小霞, 2019. 棉铃虫围食膜的蛋白质组鉴定. 昆虫学报, 62(2): 181–192.]
- Liu HM, Li CY, Zhou HX, 2012. Preliminary study on the structure of the peritrophic membrane of *Hyphantria cunea*. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 40(1): 101–103. [刘海明, 李长友, 周洪旭, 2012. 美国白蛾围食膜结构的初步研究. 江苏农业科学, 40(1): 101–103.]
- Ono C, Kamagata T, Taka H, Sahara K, Asano S, Bando H, 2012. Phenotypic grouping of 141 BmNPVs lacking viral gene sequences. *Virus Research*, 165(2): 197–206.
- Reilly LM, Guarino LA, 1996. The viral ubiquitin gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus is not essential for viral replication. *Virology*, 218(1): 243–247.
- Peng JX, Zhong J, Robert R, 1999. A baculovirus enhancer alters the permeability of a mucosal midgut peritrophic matrix from lepidopteran larvae. *Journal of Insect Physiology*, 45(2): 159–166.
- Rose C, Belmonte R, Armstrong SD, Molyneux G, Haines LR, Lehane MJ, Wastling J, Acosta-Serrano A, 2014. An investigation into the protein composition of the *Teneral Glossina morsitans morsitans* peritrophic matrix. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(4): 2691–2691.
- Shi XZ, Chamankhah M, Visal-Shah S, Hemmingsen SM, Erlandson M, Braun L, Altingmees M, Khachatourians GG, Ogrady M, Hegedus DD, 2004. Modeling the structure of the type I peritrophic matrix: Characterization of a *Mamestra configurata* intestinal mucin and a novel peritrophin containing 19 chitin binding domains. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34(10): 1101–1115.
- Su J, Lung O, Blissard GW, 2011. The *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus *lef-5* gene is required for productive infection. *Virology*, 416(1): 54–64.
- Terra WR, 2001. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 47(2): 47–61.
- Toprak U, Erlandson M, Baldwin D, Karcz S, Wan L, Coutu C, Gillott C, Hegedus DD, 2016. Identification of the *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae) peritrophic matrix proteins and enzymes involved in peritrophic matrix chitin metabolism. *Insect Science*, 23(5): 656–674.
- Vanarsdall AL, Okano K, Rohrmann GF, 2005. Characterization of the replication of a baculovirus mutant lacking the DNA polymerase gene. *Virology*, 331(1): 175–180.
- Varshavsky, 2017. The Ubiquitin system, autophagy, and regulated protein degradation. *Annual Review of Biochemistry*, 86: 123–128.
- Wang JP, 2009. Effect of fluorescent brightener FB28 on peritrophic membrane morphology of *Spodoptera exigua*. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 37(12): 5561–5562, 5616. [王俊平, 2009. 荧光增白剂 FB28 对甜菜夜蛾围食膜形态的影响. 安徽农业科学, 37(12): 5561–5562, 5616.]
- Wang P, Granados RR, 1997. Molecular cloning and sequencing of a novel invertebrate intestinal mucin cDNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(26): 16663–16669.
- Wang RR, Deng F, Hou DH, Zhao Y, Guo L, Wang HL, Hu ZH, 2010. Proteomics of the *Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus budded virions. *Journal of Virology*,

- 84(14): 7233–7242.
- Wang Y, 2016. Studies on the midgut transcriptome and peritrophic matrix proteome of the *housefly* larvae with the challenge by *Candida albicans*. Doctoral dissertation. Guizhou: Guizhou Medcial University. [王宇, 2016. 白假丝酵母菌侵染家蝇幼虫中肠转录组及围食膜蛋白质组学研究. 博士学位论文. 贵州: 贵州医科大学.]
- Wang Y, Xiu JF, Cheng JZ, Luo M, Zhao P, Shang XL, Wang T, Wu JW, 2016. Proteomic analysis of the peritrophic matrix from the midgut of third instar larvae, *Musca domestica*. *Biomedical and Environmental Sciences*, 29(1): 56–65.
- Yin J, Wei ZJ, Li KB, Cao YZ, Guo W, 2010. Identification and molecular characterization of a new member of the peritrophic membrane proteins from the meadow moth, *Loxostege sticticalis*. *International Journal of Biological Sciences*, 6(5): 491–498.
- Zeng XD, Nan F, Liang CY, Song JH, Wang Q, Vlak JM, Chen XW, 2009. Functional analysis of the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus IAP1 and IAP2. *Science China-life Sciences*, 52(8): 761–770.
- Zhang B, Liu H, Xiao W, 2006. Influence of artificial diets with different protein levels on larval development and adult fecundity of the beet armyworm *Spodoptera exigua*. *Journal of Southwest Agricultural University (Natural Science)*, 28(1): 81–83, 86. [张彬, 刘怀, 肖伟, 2006. 不同蛋白质饲料对甜菜夜蛾发育和繁殖的影响. 西南农业大学学报(自然科学版), 28(1): 81–83, 86.]
- Zhang MJ, Cheng RL, Lou YH, Ye WL, Zhang T, Fan XY, Fan HW, Zhang CX, 2012. Disruption of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus ORF71 (*Bm71*) results in inefficient budded virus production and decreased virulence in host larvae. *Virus Genes*, 45(1): 161–168.
- Zhang X, 2008. Study on the isolation and identification of insect peritrophic membrane target proteins. Doctoral dissertation. Hebei: Hebei Agricultural Univertisy. [张霞, 2008. 昆虫中肠围食膜靶标蛋白分离鉴定的研究. 博士学位论文. 河北: 河北农业大学.]
- Zhong XW, Zhang LP, Zou Y, Yi QY, Zhao P, Xia QY, Xiang ZH, 2012. Shotgun analysis on the peritrophic membrane of the silkworm *Bombyx mori*. *BMB Reports*, 45(11): 665–670.