

# 西伯利亚蝗抗菌肽基因的克隆及表达特性研究\*

魏笑佳\*\* 叶小芳 孙文青 王佳琳 王振红 哈力亚·革命 季 荣 扈鸿霞\*\*\*

(新疆师范大学生命科学学院, 中亚区域跨境有害生物联合控制国际研究中心,  
新疆特殊环境物种多样性应用与调控实验室, 乌鲁木齐 830054)

**摘 要** 【目的】扩增西伯利亚蝗 *Gomphoceris sibiricus* 抗菌肽 (*attacin*) 基因, 并对其进行生物信息学分析, 同时分析西伯利亚蝗不同组织中抗菌肽基因的差异表达。【方法】基于 RACE 技术从西伯利亚蝗中克隆得到抗菌肽, 利用生物信息学软件对西伯利亚蝗抗菌肽的一级结构、二级结构、三级结构、系统进化和亚细胞定位进行分析。采用实时荧光定量 PCR 技术检测了西伯利亚蝗抗菌肽基因在马氏管、中肠、后肠、脂肪体和唾液腺中的相对表达量。【结果】克隆获得的抗菌肽基因的开放阅读框为 282 bp, 编码 93 个氨基酸, 其编码蛋白预测理论分子量为 9.98 ku, 等电点为 9.26。抗菌肽氨基酸序列中存在信号肽序列。基因定量分析显示, 抗菌肽基因在西伯利亚蝗的中肠中表达量最高。【结论】*attacin* 在西伯利亚蝗成虫不同组织中差异表达, 提示其消化道在防御病原微生物的入侵中起着重要的作用。

**关键词** 西伯利亚蝗; 抗菌肽基因; 生物信息学分析; 表达特征

## Cloning and expression of the attacin gene in *Gomphoceris sibiricus*

WEI Xiao-Jia\*\* YE Xiao-Fang SUN Wen-Qing WANG Jia-Lin  
WANG Zhen-Hong HALIYA · Geming JI Rong HU Hong-Xia\*\*\*

(International Center for the Collaborative Management of Cross-border Pest in Central Asia, Key Laboratory of Special Environment Biodiversity Application and Regulation in Xinjiang, College of Life Sciences, Xinjiang Normal University, Urumqi 830054, China)

**Abstract** 【Objectives】The *attacin* gene of *Gomphoceris sibiricus* was amplified and sequenced and its differential expression in different tissues was quantified. 【Methods】The *attacin* gene was cloned using RACE technology and its primary structure, secondary structure, tertiary structure, phylogeny and subcellular localization, analyzed with bioinformatics software. Real-time quantitative PCR(RT-qPCR) was used to detect the relative expression of the gene in the Malpighian tubules, midgut, hindgut, fat body and salivary glands. 【Results】The cloned *attacin* gene contained an open reading frame of 282 bp and encoded 93 amino acid residues. Its predicted molecular weights is 9.98 ku, and its isoelectric point is 9.26. Sequencing revealed signal peptide sequences. The gene was most highly expressed in the midgut. 【Conclusion】Differences in expression levels of the *attacin* gene in different adult tissues of *G. sibiricus* suggests that the digestive tract plays an important role in preventing the invasion of pathogenic microorganisms.

**Key words** *Gomphoceris sibiricus*; *attacin* gene; bioinformatics analysis; expression pattern

西伯利亚蝗 *Gomphoceris sibiricus* 属直翅目 Orthoptera、槌角蝗科 Gomphoceridae, 大足蝗属, 在国外分布于俄罗斯西伯利亚和蒙古国, 在国内分布于新疆、内蒙古、黑龙江及甘肃等地(李娟

等, 2014; 闫蒙云等, 2018)。新疆草资源丰富, 幅员辽阔, 为不同蝗虫的繁衍创造了优越条件(杨会枫等, 2016), 西伯利亚蝗作为新疆的优势种蝗虫, 对当地的草地及农作物危害极大, 严

\*资助项目 Supported projects: 自治区杰出青年科学基金(2021D01E18); 新疆维吾尔自治区高校科研计划(XJEDU2021I022); 新疆师范大学重点实验室招标课题(XJTSWZ-2021-03); 新疆维吾尔自治区天山英才计划

\*\*第一作者 First author, E-mail: 1356163423@qq.com

\*\*\*通讯作者 Corresponding author, E-mail: huhongxia111@126.com

收稿日期 Received: 2020-10-08; 接受日期 Accepted: 2021-07-12

重影响了新疆畜牧业的发展(赵玲等, 2012)。

抗菌肽是由哺乳动物、植物、昆虫、蛭和微生物产生的具有多种结构特性的生物活性分子, 是原核和真核生物天然免疫防御系统的多功能组成部分(Tonk *et al.*, 2016)。昆虫不断暴露于微生物感染, 并产生了非常多样的抗菌肽, 以应对多重耐药病原体的威胁(Tonk and Vilcinskis, 2017; Hirsch *et al.*, 2020)。昆虫抗菌肽大多数是 20-50 个残基的小肽, 带正电荷, 水溶性好, 热稳定性强, 具有广谱的抗细菌、抗真菌、抗病毒甚至抗寄生虫活性(Yi *et al.*, 2014; Mylonakis *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2018), 对细菌、真菌、病毒、原虫及癌细胞均具有杀伤作用(Jia *et al.*, 2018)。昆虫抗菌肽根据结构和序列分为 4 组, 分别是一种螺旋状的、富含半胱氨酸的、富含脯氨酸的和富含甘氨酸的肽。具有疏水性质的肽的正电荷允许它们与细菌细胞膜强烈结合, 导致其破坏和细胞死亡(Chowdhury *et al.*, 2020)。昆虫抗菌肽因其种类多样和具有较理想的抑菌效果已成为一种很有前途的新药物来源, 在医药、养殖和食品等行业都有广阔的应用前景(孟德梅等, 2019)。目前, 科研人员对昆虫抗菌肽的研究已有较为系统的认知(王龙等, 2017; Hirsch *et al.*, 2020)。

随着分子生物学技术的产生与近年来的迅猛发展, 使得直翅目的分子生物研究快速朝纵深方向发展。本研究以西伯利亚蝗为试验材料, 克隆获得了西伯利亚蝗抗菌肽基因(命名为

*attacin*), 并对其序列和表达特征进行分析, 研究结果为今后揭示西伯利亚蝗抗菌肽的生物学功能提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验昆虫

西伯利亚蝗成虫采自哈密地区巴里坤北山(93°49'E, 43°68'N), 3 头雌虫 3 头雄虫研磨混合后, 提取总 RNA。

### 1.2 基因克隆

利用 RNeasy mini 试剂盒(Qiagen, Germany), 参照试剂盒说明书提取西伯利亚蝗总 RNA。使用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计(ThermoFisher, USA)测定总 RNA 含量和纯度, 后通过 1%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。以提取的 RNA 为模板, 用 SMART<sup>TM</sup>RACE cDNA amplification kit(Clontech)合成 cDNA 第 1 链。

采用 SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA amplification kit(Clontech)试剂盒合成 5'RACE 和 3'RACE cDNA。根据 NCBI 上已公布的东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* 的抗菌肽基因序列, 利用 PrimerSelect 软件(DNASTAR, USA)分别设计 5'RACE 和 3'RACE 特异性引物(GSP)和嵌套基因特异性引物(NGSP)(表 1), 分别进行 5'和 3'RACE 扩增。RACE 扩增反应根据

表 1 RACE PCR 扩增引物  
Table 1 The primer pairs and probe used for RACE PCR

| 基因<br>Gene           | 引物<br>Primer           | 序列 (5'-3')<br>Sequence (5'-3')                             | 末端<br>End |
|----------------------|------------------------|------------------------------------------------------------|-----------|
| <i>attacin</i><br>基因 | 5'-RACE 第一轮            | GSP1-Prolix<br>GATTACGCCAAGCTTCCGGAGTAGTTGGGC-TTGCCGGCTG   | 5'        |
|                      | 5'-RACE 第二轮            | NGSP1- Prolix<br>GATTACGCCAAGCTTCGGTAGACCCTCTGCCAGGATCCGTC | 5'        |
|                      | 3'-RACE 第一轮            | GSP2-Prolix<br>GATTACGCCAAGCTTGTGGTGGGAGTCCAA-GGCCAAGGC    | 3'        |
|                      | 3'-RACE 第二轮            | NGSP2- Prolix<br>GATTACGCCAAGCTTCACAGAGAGAAGGGCGTGGGCACG   | 3'        |
|                      | 上游引物 Upstream primer   | Prolix -full-F<br>GCGCTCAGCTGCGCTTTCCTTC                   | 282 bp    |
|                      | 下游引物 Downstream primer | Prolix -Full-R<br>GAACCAGTATGAAGGCAGCAGTCATCCTCG           |           |

SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA amplification kit (Clontech) 步骤进行, 兼用巢式 PCR 扩增。PCR 反应过程如下; 预变性: 95 °C 5 min; 变性: 95 °C 30 s, 退火: 60 °C 30 s, 延伸: 72 °C 30 s, 循环: 30 次。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 并将纯化后的目的条带送至上海生工生物工程有限公司测序。

### 1.3 序列生物信息学分析

利用 EditSeq 软件 (DNASTAR, USA) 对该基因的 ORF (开放阅读框)、分子量大小以及等电点进行预测, 并利用 ExPASy 网站中的 ProtParam 工具预测该基因氨基酸的理化性质, 利用 ExPASy 网站中的 ProtScale 工具搜索得出氨基酸的亲水性。利用 SignalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行信号肽预测。利用 SOPMA 软件预测二级结构。

采用 Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行序列同源比对搜索, 选取不同目, 且同源性在 40% 以上的相关序列构建系统进化树, 进化树构建用 MEGA7.0, 运用 Neighbor- Joining 方法建立系统进化树, 通过 bootstrap 检验进化树的置信度, 1 000 次重复检验。利用在线分析工具 WOLF PSORT 分析抗菌肽蛋白的亚细胞

定位。

### 1.4 不同组织 *attacin* 基因的表达量分析

**1.4.1 总 RNA 的提取和 cDNA 的制备** 选择西伯利亚蝗成虫, 置于解剖盘上取其马氏管、中肠、后肠、脂肪体和唾液腺 5 种组织, 每组样品收取 3 个生物学重复, 收取的材料放置于研钵中, 研磨后利用 RNeasy mini 试剂盒提取西伯利亚蝗不同组织样品的总 RNA。

用随机引物 oligodT15 和反转录酶 M-MLV (Takara, Japan) 对 1 µg RNA, 进行反转录, 将反转录产物 cDNA 保存在 -20 °C 冰箱储存待用。

**1.4.2 荧光定量 PCR** 根据克隆获得的序列, 利用 PrimerSelect 软件 (DNASTAR, USA) 设计荧光定量引物 (表 2), 以 *β-actin* 作为内参。引物序列由上海生工生物工程有限公司合成。

仪器使用 Roche (瑞士) 公司的 LightCycler96 荧光定量 PCR 仪, 使用采用 SYBR Green I 法进行相对定量, 荧光染料使用 Takara (Japan) 公司的 TB Green Premix Ex Taq II (TliRNase H Plus)。每个处理重复 3 次。PCR 过程如下, 预变性: 95 °C 10 s; 变性: 95 °C 5 s, 退火: 62 °C 30 s, 延伸: 72 °C 15 s, 循环 40 次。定量 PCR 数据采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  方法进行计算。

表 2 荧光定量 PCR 扩增引物

Table 2 The primer pairs and probe used for fluorescence quantitative PCR

| 基因<br>Gene              | 引物<br>Primer           |             | 序列 (5'-3')<br>Sequence (5'-3') | 长度 (bp)<br>Length (bp) |
|-------------------------|------------------------|-------------|--------------------------------|------------------------|
| 抗菌肽基因<br><i>attacin</i> | 上游引物 Upstream primer   | Q-PRO-F1    | GCGGTGCTCCTCGTCGTTCTGA         | 175                    |
|                         | 下游引物 Downstream primer | Q-PRO-R1    | TGGTCCTGCCGTCGTCGCTCTT         |                        |
| <i>β-actin</i>          | 上游引物 Upstream primer   | Q-β-actin-F | CGAAGCACAGTCAAAGAGAGGTA        | 102                    |
|                         | 下游引物 Downstream primer | Q-β-actin-R | GCTTCAGTCAAGAGAACAGGATG        |                        |

## 2 结果与分析

### 2.1 基因克隆及序列分析

**2.1.1 *attacin* 基因的克隆** 克隆获得全长 cDNA 序列, 提交 NCBI 之后, 基因登录号为 GenBank: MF039651.1。

**2.1.2 一级结构分析** 克隆获得的 *attacin* 基因

开放阅读框 (ORF) 的长度为 282 bp, 可编码氨基酸为 93 个。其推导的氨基酸序列预测理论分子量为 9.98 ku, 理论等电点为 9.26, 表明抗菌肽蛋白偏碱性。在 ProtParam 在线预测软件中得出氨基酸组成中缬氨酸 (Val) 含量最高, 占总氨基酸的 14.0%, 甘氨酸 (Gly) 次之, 占 12.9%。此外, 抗菌肽蛋白不稳定指标为 11.10, 归类为稳定的蛋白质。抗菌肽蛋白的脂肪指标为 71.18,

平均亲水性值为 - 0.432。ExPASy 网站中的 ProtScale 工具搜索,选择氨基酸标度默认值设置 Hphob./Kyte& Doolittle, 得出抗菌肽疏水性最强的分值为 3.4, 亲水性最强的分值为 - 3.2。从整个氨基酸序列亲疏水性分布图可以看出, 抗菌肽氨基酸序列中疏水氨基酸区域少于亲水氨基酸区域 (图 1), 因此表明抗菌肽属于亲水性蛋白。

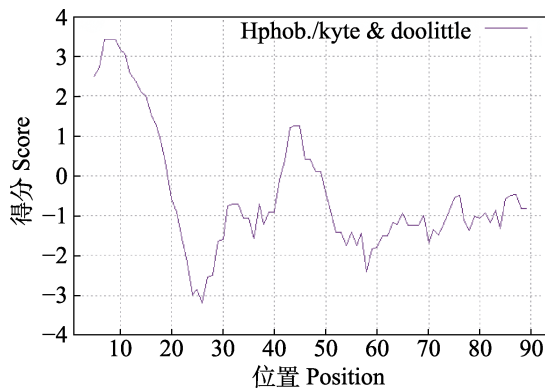


图 1 attacin 蛋白亲水性和疏水性分析  
Fig. 1 Hydrophilic-hydrophobic analysis of attacin protein

横坐标表示每个蛋白质氨基酸残基序号; 纵坐标为氨基酸疏水性标度, 正值表示氨基酸具有疏水性, 负值表示氨基酸具有亲水性。

The abscissa indicates the sequence number of the amino acid residue; the ordinate indicates the amino acid hydrophobic scale, the positive indicates hydrophobic, and the negative indicates hydrophilic.

**2.1.3 信号肽分析** 通过 SignalP 4.0 分析发现, attacin 氨基酸序列中存在信号肽序列, 信号肽的位置是 1-18 位氨基酸 (图 2), 其预测的剪切位点位于 18-19 位氨基酸。

**2.1.4 蛋白二级结构分析** 通过 SOPMA 软件预测表明, 该 attacin 蛋白二级结构的 4 种类型及所占总体百分比分别为  $\alpha$  螺旋占 13.98%,  $\beta$  折叠占 34.41%,  $\beta$  转角占 13.98%, 无规则卷曲占 37.63%。

**2.1.5 系统进化分析** 从 NCBI 数据库下载已经报道的部分物种 attacin 蛋白序列, 同源性分析表明, 与东亚飞蝗抗菌肽 (登录号为: BAM63553.1) 一致性最高, 为 88.17% (表 3)。

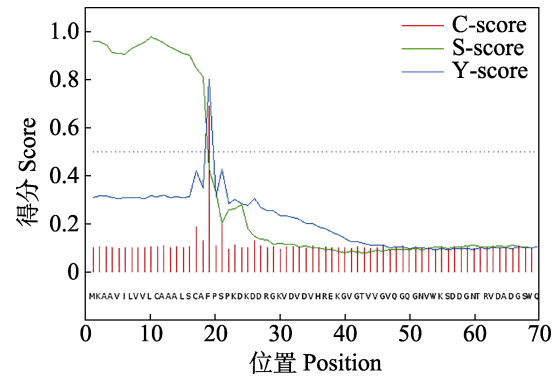


图 2 attacin 蛋白信号肽分析

Fig. 2 Analysis of attacin signal peptides

横坐标表示蛋白质氨基酸残基序号; 纵坐标为得分。

S-score: 每个氨基酸对应 1 个 S 值, 信号肽区域的 S 值较高; C-score: 剪切位点值, 在剪切位点处 C 值是最高的; Y-score: 综合考虑 S 值和

C 值的一个参数。

The abscissa indicates the sequence number of the amino acid residue; the ordinate indicates the amino acid score. S-score: Each amino acid corresponds to 1 S value, the S value of the signal peptide region is higher; the C-score: Splice site value, the highest C value is at the splice site; Y-score: Considers a parameter of S value and C value.

用 Mega 7.0 软件 Test Neighbor Joining Tree 方法进行同源性分析并构建系统进化树, 结果显示, 与直翅目的东亚飞蝗在进化关系上最为接近 (图 3)。

**2.1.6 抗菌肽蛋白亚细胞定位分析** 利用在线分析工具 WOLF PSORT 分析抗菌肽蛋白的亚细胞定位结果显示, attacin 蛋白定位于细胞外。

## 2.2 表达特征

以 10 倍稀释的 cDNA 作为模板, 进行实时荧光定量 PCR 检测, 得到标准曲线的 Ct 值与浓度之间呈现良好的线性关系, 获得的线性方程:  $y = -3.167x + 25.952$ , 相关系数  $R^2 = 1$ , 扩增效率为 107%。

在不同组织中, 抗菌肽基因在中肠中的表达量最高且差异显著 ( $P < 0.05$ ), 后肠和唾液腺中的表达量没有差异排第 2, 马氏管和脂肪体的表达量最低 (图 4), 表明 attacin 基因在西伯利亚蝗体内主要表达器官为中肠。

表 3 与西伯利亚蝗 attacin 比对的其他同源 attacin 蛋白的序列信息  
Table 3 Sequence information of other homologs attacin proteins compared to *Gomphocerus sibiricus* attacin

| 序列号<br>Accession | 种类<br>Description                           | 种<br>Species                                 | 目<br>Order       | 同源性 (%)<br>Percent identity (%) |
|------------------|---------------------------------------------|----------------------------------------------|------------------|---------------------------------|
| BAM63553.1       | 双翅肽 Lm-diptericin                           | 东亚飞蝗<br><i>Locusta migratoria manilensis</i> | 直翅目 Orthoptera   | 88.17                           |
| AFZ78839.1       | 猎蝽素抗菌蛋白<br>Prolixicin antimicrobial protein | 台湾乳白蚁<br><i>Coptotermes formosanus</i>       | 蜚蠊目 Blattodea    | 55.26                           |
| ACB06753.1       | 双翅肽 Diptericin                              | 长红猎蝽 <i>Rhodnius prolixus</i>                | 半翅目 Hemiptera    | 43.75                           |
| ACZ28727.1       | 抗菌肽 Antibacterial peptide                   | 异色瓢虫 <i>Harmonia axyridis</i>                | 鞘翅目 Coleoptera   | 43.75                           |
| ACC68686.1       | 猎蝽素抗菌肽<br>Prolixicin antimicrobial peptide  | 长红猎蝽 <i>Rhodnius prolixus</i>                | 半翅目 Hemiptera    | 43.75                           |
| XP_026275073.1   | 双翅肽 A Diptericin A                          | 西花蓟马<br><i>Frankliniella occidentalis</i>    | 缨翅目 Thysanoptera | 42.42                           |
| XP_021942498.1   | 类 B 攻击素 Attacin-B-like                      | 内华达古白蚁<br><i>Zootermopsis nevadensis</i>     | 蜚蠊目 Blattodea    | 41.67                           |
| AXG21617.1       | 攻击素 2 Attacin 2                             | 黄粉虫 <i>Tenebrio molitor</i>                  | 鞘翅目 Coleoptera   | 40.62                           |

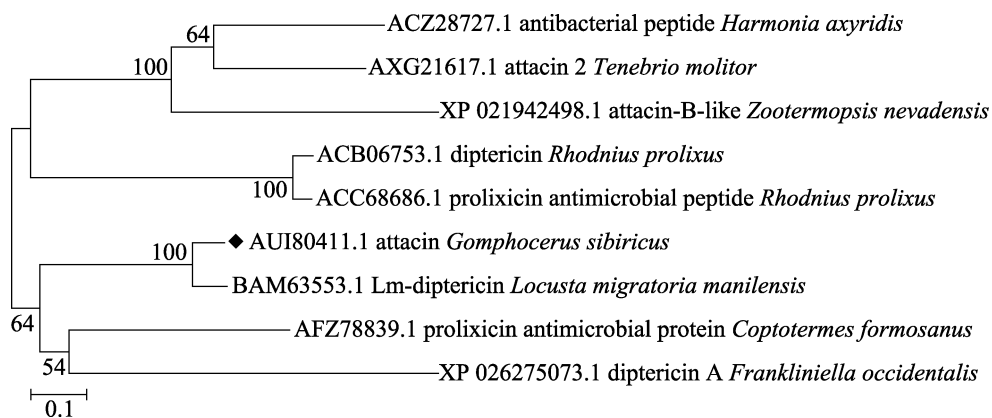


图 3 西伯利亚蝗 attacin 与其他同源 attacin 蛋白的系统发生分析  
Fig. 3 Phylogenetic analysis of *Gomphocerus sibiricus* attacin and other homologous attacins

◆标记的为西伯利亚蝗 attacin。◆labeled *Gomphocerus sibiricus* attacin.  
东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis*; 台湾乳白蚁 *Coptotermes formosanus*; 长红猎蝽 *Rhodnius prolixus*; 异色瓢虫 *Harmonia axyridis*; 西花蓟马 *Frankliniella occidentalis*; 内华达古白蚁 *Zootermopsis nevadensis*; 黄粉虫 *Tenebrio molitor*.

### 3 讨论

本研究利用 RACE 技术,从西伯利亚蝗成虫体内成功克隆到 attacin 基因,并借助相关生物信息学在线软件,预测 attacin 基因编码的蛋白质的结构与功能。对该基因进行同源性分析发现,该基因与东亚飞蝗 Lm-diptericin 相似性最高,达 88%,且与台湾乳白蚁 Coptotermes formosanus、长红猎蝽 Rhodnius prolixus 等的抗

菌肽关系较近,表明该基因是西伯利亚蝗抗菌肽。影响抗菌肽生物学特性的因素有很多,其中肽链长度、氨基酸空间结构及组成、电荷数与分布、疏水性及亲水性特点等是主要的自身决定因素 (Panicker and George, 2013)。抗菌肽通常理化性质稳定,具有较好的耐热性和耐酸碱性 (Tornesello et al., 2020)。通过 ProtParam 对 attacin 进行生物信息学分析,西伯利亚蝗抗菌肽 attacin 也具有上述特性,这也意味着这些特性是

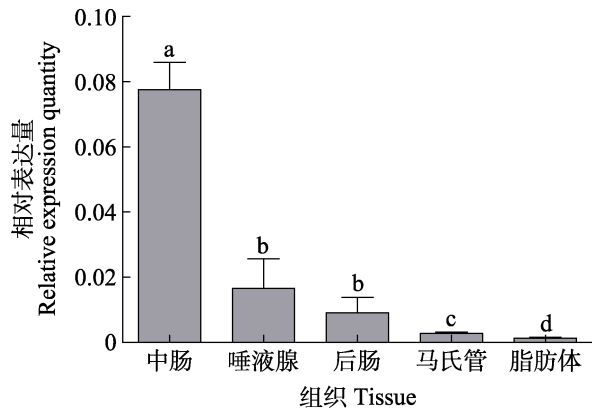


图4 *attacin* 基因在不同组织中的相对表达量

Fig. 4 Relative expression levels of *attacin* gene in different tissues

中肠: Midgut; 唾液腺: Salivary gland; 后肠: Hindgut;  
马氏管: Malpighiantube; 脂肪体: Fat body;  
柱上标有不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Histograms with different lowercase letters indicate significant differences at the 0.05 level.

*attacin* 具有活性的基础。

合成的蛋白质要发挥其生物学功能, 必须进入特定部位才能执行, 有的蛋白质合成后要经过内质网膜进入腔内进行加工, 成为分泌型蛋白 (Kilic *et al.*, 2010)。氨基端具有疏水性肽段是大多数分泌蛋白的特征, 疏水性肽段一般有 15-35 个氨基酸, 其能引导蛋白质的多肽链通过内质网膜, 然后进入腔内 (Zhang and Henzel, 2004)。信号肽分析结果显示, *attacin* 具有信号肽, N 端有一个 18 个氨基酸残基的信号肽, 成熟肽由 75 个氨基酸残基组成, 说明 *attacin* 是分泌蛋白, 新合成的多肽通过信号肽分泌到细胞外发挥生理功能。

蛋白质中的氨基酸有疏水性的和亲水性的, 它能让蛋白质发生折叠, 所以氨基酸的疏水性和亲水性的分布情况, 可以直接反映出该蛋白质如何折叠。在蛋白质折叠的过程中, 该蛋白质能形成亲水的表面以及疏水的内核, 而且高疏水值区域出现在潜在的跨膜区。ExPASy 网站中的 ProtScale 工具预测结果显示, *attacin* 亲水性氨基酸的区域总体多于疏水性氨基酸的区域, 所以表明 *attacin* 是亲水性蛋白, 与 ProtParam 给出的平均亲水性相符合。像大多数抗菌肽一样, 本研究

ProtScale 结果中, 1-19 位氨基酸有一个明显的疏水区, 其有可能为信号肽区域, 这与 SignalP 4.0 分析结果一致 (Vanhoye *et al.*, 2003), 表明其是一种分泌型蛋白。有报道表明, 抗菌肽在插入到细胞膜的过程中, 其疏水特性起了关键的作用, 想要提高抗菌肽的抗菌活性, 可以通过适当的增加其疏水性来完成 (徐欣瑶等, 2019)。尽管 *attacin* 在总体上是亲水性的, 但在其序列中也包含一些疏水性的残基位点, 这也可以提高 *attacin* 的抗菌活性。

蛋白质主要的生化特征及功能, 由蛋白质的空间结构来决定, 蛋白质多肽链进一步螺旋、折叠和卷曲而形成的高级空间结构是决定蛋白质能否执行功能的前提 (Huang *et al.*, 2010)。在 *attacin* 蛋白中占比例较高的是  $\beta$  折叠,  $\beta$  折叠是位于蛋白质内部的, 而且它能够牢固地维持该蛋白的高级结构。存在于蛋白质表面的一般是有利于抗原抗体相互作用的  $\beta$  转角和无规则卷曲 (腾桥等, 2018)。通过 WOLF PSORT 亚细胞定位结果显示, *attacin* 蛋白定位于细胞外, 有文献报道, 膜内区域和跨膜区域一般不会是抗原表位, 有可能作为抗原表位的是膜外区域的氨基酸序列 (腾桥等, 2018)。抗菌肽是一种天然免疫效应分子, 它能够通过各种方式调节机体免疫应答 (Haney *et al.*, 2017), 有研究表明, 抗菌肽的  $\alpha$ -螺旋结构有助于透过和破坏细菌的细胞膜 (Huang *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2020)。本研究中抗菌肽的二级结构中  $\alpha$ -螺旋结构占 13.98%, 有助于其发挥抗菌作用。

本研究采用荧光定量 PCR 方法研究了 *attacin* 在马氏管、中肠、后肠、脂肪体和唾液腺中的表达情况。在正常情况下, *attacin* 在马氏管、中肠、后肠、脂肪体和唾液腺中均有表达, 但在马氏管和脂肪体中的表达水平很低, 中肠的表达水平最高, 其次是唾液腺和后肠 (图 5), 说明 *attacin* 在正常情况下呈低水平的组成型表达, 以维持适当水平的抗性。中肠的表达水平最高, 表明西伯利亚蝗消化道在防御病原微生物的入侵中起着重要的作用 (时红等, 2013)。本研究中 *attacin* 在中肠的表达水平最高, 与东亚飞蝗有差

异,可能是由于不同种在抗菌肽基因的表达调控机制差异造成的。

在昆虫体内,目前有报道的抗菌肽是具有抗菌活性的一大类蛋白质 (Feng *et al.*, 2020)。本研究中,抗菌肽在蝗虫消化组织中肠中的表达量最高,而不是像绿蝇或其它昆虫一样在免疫相关组织脂肪体中表达量最高 (Baumann *et al.*, 2015; Feng *et al.*, 2020)。对于取食量很大的蝗虫来说,消化道结构及功能的完整性是其生存的首要前提,而在细菌感染烟草天蛾中的研究中也发现,细菌及其毒素复合物通过摧毁中肠上皮细胞达到感染宿主的目的 (Silva *et al.*, 2002)。那么,蝗虫在中肠表达大量的抗菌肽来避免病原生物通过破坏中肠细胞达成感染,也是蝗虫进化出的一种积极的生存策略。

本研究对 *attacin* 基因生物信息学分析有助于我们在今后克隆表达及分子免疫方面提供理论参考。根据预测的功能与结构,再结合相关的分子实验验证,以进一步了解 *attacin* 基因结构与功能。对不同组织中 *attacin* 表达特性进行研究,可为其免疫防御机制的研究提供基础数据。

## 参考文献 (References)

- Baumann A, Lehmann R, Beckert A, Vilcinskas A, Franta Z, 2015. Selection and evaluation of tissue specific reference genes in *Lucilia sericata* during an immune challenge. *PLoS ONE*, 10(8): e0135093.
- Chowdhury T, Mandal SM, Kumari R, Ghosh AK, 2020. Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide (QAK) from the hemolymph of *Antheraea mylitta*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 527(2): 411–417.
- Feng M, Fei SG, Xia JM, Labropoulou V, Swevers L, Sun JC, 2020. Antimicrobial peptides as potential antiviral factors in insect antiviral immune response. *Front. Immunol.*, 11: 2030.
- Haney EF, Mansour SC, Hancock RE, 2017. Antimicrobial peptides: An introduction. *Methods Mol. Biol.*, 1548: 3–22.
- Hirsch R, Wiesner J, Bauer A, Marker A, Vogel H, Hammann PE, Vilcinskas A, 2020. Antimicrobial peptides from rat-tailed maggots of the drone fly *Eristalis tenax* show potent activity against multidrug-resistant gram-negative bacteria. *Microorganisms*, 8(5): 626.
- Huang Y, Huang J, Chen Y, 2010. Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: Relationships of structure and function. *Protein Cell*, 1(2): 143–152.
- Jia FJ, Wang JY, Peng JX, Zhao P, Kong ZQ, Wang KR, Yan WJ, Wang R, 2018. The in vitro, in vivo antifungal activity and the action mode of Jelleine-I against *Candida* species. *Amino Acids*, 50(2): 229–239.
- Kilic A, Klose S, Dobberstein B, Knust E, Kapp K, 2010. The *Drosophila* crumbs signal peptide is unusually long and is a substrate for signal peptide peptidase. *Eur. J. Cell Biol.*, 89(6): 449–461.
- Li J, Li S, Wang DM, Ji R, 2014. Changes in the contents of stress resistant substances in *Gomphocerus sibiricus* (Orthoptera: Acrididae) under high temperature stress. *Acta Entomologica Sinica*, 57(10): 1155–1161. [李娟, 李爽, 王冬梅, 季荣, 2014. 高温胁迫下西伯利亚蝗体内抗逆物质含量变化. 昆虫学报, 57(10): 1155–1161.]
- Meng DM, Liu QY, Guo YJ, Fan ZC, Yang R, Sheng JP, 2019. Research progress on molecular structure and functional characteristics of natural antimicrobial peptides. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 19(10): 342–350. [孟德梅, 刘庆艳, 郭雅君, 樊振川, 杨瑞, 生吉萍, 2019. 天然抗菌肽的分子结构与功能特性研究进展. 中国食品学报, 19(10): 342–350.]
- Mylonakis E, Podsiadlowski L, Muhammed M, Vilcinskas A, 2016. Diversity, evolution and medical applications of insect antimicrobial peptides. *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 371(1695): 20150290.
- Panicker VP, George S, 2013. Identification of three novel myeloid cathelicidin cDNAs and their predicted peptides in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Indian J. Biochem. Biophys.*, 50(4): 273–277.
- Silva CP, Waterfield NR, Daborn PJ, Dean P, Chilver T, Au CP, Sharma S, Potter U, Reynolds SE, French-Constant RH, 2002. Bacterial infection of a model insect: *Photographus luminescens* and *Manduca sexta*. *Cell Microbiol.*, 4(6): 329–339.
- Shi H, Chen B, He ZB, 2013. Cloning and expression analysis of the *prolaxin* gene from *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). *Chin. J. Appl. Environ. Biol.*, 19(2): 236–240. [时红, 陈斌, 何正波, 2013. 东亚飞蝗 *prolaxin* 基因的克隆与表达分析. 应用与环境生物学报, 19(2): 236–240.]
- Tornesello AL, Borrelli A, Buonaguro L, Buonaguro FM, Tornesello ML, 2020. Antimicrobial peptides as anticancer agents: Functional properties and biological activities. *Molecules*, 25(12): 2850.
- Tan A, Suzuki R, Yokoyama C, Yano S, Konno H, 2020. Antimicrobial activity and secondary structure of a novel peptide derived from ovalbumin. *J. Pept. Sci.*, 26(10): e3276.

- Tonk M, Vilcinskas A, Rahnamaeian M, 2016. Insect antimicrobial peptides: Potential tools for the prevention of skin cancer. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100(17): 7397–7405.
- Tonk M, Vilcinskas A, 2017. The medical potential of antimicrobial peptides from insects. *Curr. Top. Med. Chem.*, 17(5): 554–575.
- Ten Q, Xia LJ, Zhang FC, 2018. Bioinformatics prediction of GPC3 gene structure and function. *Genomics and Applied Biology*, 37(3): 1131–1136. [腾桥, 夏丽洁, 张富春, 2018. GPC3 基因的结构与功能生物信息学预测. 基因组学与应用生物学, 37(3): 1131–1136.]
- Vanhoye D, Bruston F, Nicolas P, Amiche M, 2003. Antimicrobial peptides from hyloid and ranin frogs originated from a 150-million-year-old ancestral precursor with a conserved signal peptide but a hypermutable antimicrobial domain. *Eur. J. Biochem.*, 270(9): 2068–2081.
- Wang L, Feng Q, Gao JM, Sun LN, Yu YY, Xia Q, 2017. Classification of insect antimicrobial peptides and its applications in medicine. *Journal of Environmental Entomology*, 39(6): 1387–1396. [王龙, 冯群, 高嘉敏, 孙丽娜, 余运运, 夏婧, 2017. 昆虫抗菌肽分类及在医学中应用. 环境昆虫学报, 39(6): 1387–1396.]
- Wu QH, Patočka J, Kuča K, 2018. Insect antimicrobial peptides, a mini review. *Toxins*, 10(11): 461.
- Xu XY, Dong N, Li XR, Yang Y, Wang ZH, Shan AS, 2019. Effect of different hydrophobic amino acids on biological activity of alpha helix antimicrobial peptides. *Aeta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 50(4): 791–801. [徐欣瑶, 董娜, 李欣然, 杨洋, 王志华, 单安山, 2019. 不同疏水性氨基酸对  $\alpha$ -螺旋抗菌肽生物学活性的影响. 畜牧兽医学报, 50(4): 791–801.]
- Yang HF, Zheng JH, Wu XL, Mu C, Lin J, Xu ZL, 2016. Prediction of potential distribution of *Gomphocerus sibiricus* in Xinjiang based on MaxEnt model. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 53(1): 43–50. [杨会枫, 郑江华, 吴秀兰, 穆晨, 林俊, 许仲林, 2016. 基于 MaxEnt 模型的西伯利亚蝗虫在新疆潜在分布预测研究. 新疆农业科学, 53(1): 43–50.]
- Yan MY, He LZ, Wang H, Yu F, He L, Yuan L, Liao CM, Liu YP, Li ZW, Ji R, Ye XF, 2018. Developmental characteristics of overwintering eggs and embryos of *Gomphocerus sibiricus*. *Pratacultural Science*, 35(8): 1985–1993. [闫蒙云, 何立志, 王晗, 于非, 何岚, 袁亮, 廖成敏, 刘余平, 李占武, 季荣, 叶小芳, 2018. 西伯利亚蝗越冬卵的发育特征及胚胎发育规律. 草业科学, 35(8): 1985–1993.]
- Yi HY, Chowdhury M, Huang YD, Yu XQ, 2014. Insect antimicrobial peptides and their applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98(13): 5807–5822.
- Zhao L, Wang DY, Zhao L, Xiao HW, 2012. Research progress of grasshoppers in Xinjiang. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 49(7): 1212–1223. [赵玲, 王登元, 赵莉, 肖宏伟, 2012. 新疆蝗虫的研究进展. 新疆农业科学, 49(7): 1212–1223.]
- Zhang Z, Henzel WJ, 2004. Signal peptide prediction based on analysis of experimentally verified cleavage sites. *Protein Sci.*, 13(10): 2819–2824.