研究论文

龟纹瓢虫胰岛素信号通路四个重要基因序列结构与时空表达模式分析*

陈露露[1, 2, 3, 4**] 皇甫宁博[1] 朱香镇[1***] 王 丽[1]
张开心[1, 5] 姬继超[1] 马德英[2, 3***] 崔金杰[1, 5]

（1. 中国农业科学院棉花研究所，棉花生物育种与综合利用全国重点实验室，安阳 455000；
2. 新疆农业大学农学院，棉花教育部工程研究中心，乌鲁木齐 830000；
3. 农林有害生物监测与安全防控重点实验室，乌鲁木齐 830000; 4. 新疆天业（集团）有限公司，石河子 832000；
5. 中国农业科学院西部农业研究中心，昌吉 831100）

摘 要 **【目的】** 明确龟纹瓢虫 *Propylea japonica* 胰岛素信号通路中 4 个关键基因序列结构和时空表达模式。**【方法】** 基于龟纹瓢虫全基因组序列数据，选择 *E(sev)2B*, *TOR*, *PDK1* 和 *PI3K* 4 个基因全长进行结构分析，并通过 qRT-PCR 检测其在龟纹瓢虫雌虫不同发育时期（羽化后第 1、3、5 和 7 天）、不同组织（头、胸、腹和肠）中的表达模式。**【结果】** *E(sev)2B*、*TOR*、*PDK1* 和 *PI3K* 基因表达水平均在成虫羽化后第 7 天显著上调（$P < 0.05$），达到最高水平；*E(sev)2B* 和 *PI3K* 基因在龟纹瓢虫羽化后第 1、3 和 5 天肠中表达水平均显著高于头、胸和腹部（$P < 0.05$）；*TOR* 基因在羽化后第 1 天成虫的胸、腹、肠中表达水平均显著高于头部（$P < 0.05$）；*PDK1* 基因在羽化第 3 天和第 5 天肠中表达水平最高，且显著高于头、胸和腹部（$P < 0.05$）。**【结论】** *E(sev)2B*、*TOR*、*PDK1* 和 *PI3K* 基因在龟纹瓢虫不同发育时期及不同组织中的表达量存在差异，为进一步研究胰岛素信号通路在龟纹瓢虫生殖发育中的作用奠定了基础。

关键词 龟纹瓢虫；胰岛素信号通路；时空表达模式；qRT-PCR

Sequence structure and spatiotemporal expression patterns of four important *Propylea japonica* insulin signaling pathway genes

CHEN Lu-Lu[1, 2, 3, 4**] HUANGFU Ning-Bo[1] ZHU Xiang-Zhen[1***] WANG Li[1]
ZHANG Kai-Xin[1, 5] JI Ji-Chao[1] MA De-Ying[2, 3***] CUI Jin-Jie[1, 5]

(1. State Key Laboratory of Cotton Bio-breeding and Integrated Utilization, Institute of Cotton Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Anyang 455000, China; 2. Cotton Engineering Research Center, Ministry of Education, College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University, Wulumuqi 830000, China; 3. Key Laboratory of Monitoring and Safety Prevention and Control of Agriculture and Forest Pests, Wulumuqi 830000, China; 4. Xinjiang Tianye (Group) Co., Ltd., Shihezi 832000, China; 5. Western Agricultural Research Center, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changji 831100，China)

Abstract **[Aim]** To determine the sequence structure and spatiotemporal expression patterns of four key insulin signaling pathway genes in *Propylea japonica*. **[Methods]** The *E(sev)2B*, *TOR*, *PDK1* and *PI3K* genes were identified in the genome of *P. japonica* and their coded amino sequences and functional domain locations analyzed. Expression profiles of these genes in different developmental stages (1st, 3rd, 5th and 7th day after eclosion) and tissues (head, thorax, abdomen and gut) were investigated using real-time quantitative PCR. **[Results]** Expression levels of all four genes peaked on the 7th day after adult

*资助项目 Supported project：国家重点研发计划“新疆棉花病虫害演替规律与全程绿色防控技术体系集成示范”（2022YFD1400300）
**第一作者 First author，E-mail：cll202110232021@163.com
***共同通讯作者 Co-corresponding authors，E-mail：zhuxiangzhen318@163.com；mdyxnd@163.com
收稿日期 Received：2023-08-25；接受日期 Accepted：2024-04-09

emergence. Expression levels of the *E(sev)2B* and *PI3K* genes were significantly higher in the gut than in the head, thorax and abdomen on the 1st, 3rd and 5th day after emergence ($P < 0.05$). Expression levels of the *TOR* gene in the thorax, abdomen and gut were significantly higher than in the head on the 1st day after emergence ($P < 0.05$). Expression of the *PDK1* gene was highest in the gut on the 3rd and 5th day after emergence, significantly higher than in the head, thorax and abdomen ($P < 0.05$). **[Conclusion]** Expression patterns of the *E(sev)2B*, *TOR*, *PDK1* and *PI3K* genes differed in different developmental stages and tissues of *P. japonica*. This finding lays a foundation for further research on the role of the insulin signaling pathway in the reproductive development of this species.

Key words *Propylea japonica*; insulin signaling pathway; spatiotemporal expression pattern; qRT-PCR;

龟纹瓢虫 *Propylea japonica* 是我国农田生态系统内占据优势地位的捕食性天敌昆虫之一（张世泽等，2014）。规模化饲养龟纹瓢虫极具商业价值，然而，当前面临的一大挑战在于人工饲料饲养环境下的龟纹瓢虫失去了正常的繁殖能力，具体表现为产卵前期显著延长且产卵量大幅减少（张丽莉，2007）。值得注意的是，胰岛素作为生物体内的一种关键调控因子，在生物体的代谢、生长、发育、繁殖乃至衰老过程中均发挥着调控作用，尤为引人注目的是，在不同生物类群中胰岛素信号通路（Insulin signaling pathway，IIS）在卵子发生和卵巢发育阶段的作用极具保守性（Chistiakova，2008；Nässel and Vanden Broeck，2016；Das and Arur，2017），这一发现为探索龟纹瓢虫繁殖难题提供了新的视角。在雌性大草蛉 *Chrysopa pallens* 卵黄发生前对其注射牛胰岛素，可以加速卵巢的成熟，从而提高生殖能力（Zhang，2016）。胰岛素途径还通过控制保幼激素（Juvenile hormone，JH）和蜕皮激素 20-羟基蜕皮酮（20-hydroxyecdysone，20E）的生物合成，进而调节卵黄蛋白的产生和卵子成熟（Smykal and Raikhel，2015）。

IIS 通路主要经过有丝分裂原激活的蛋白激酶（Mitogen activated protein kinase，MAPK）和磷脂酰肌醇 3 激酶（Phosphatidylinositol-3 kinase，PI3K）两条途径。活化的胰岛素受体底物（Insulin receptor substrate，IRS）与生长因子受体结合蛋白（Growth factor receptor-bound protein，GRB）或 PI3K 结合，分别激活 MAPK 和 PI3K 通路。MAPK 途径中，GRB 通过调节上游受体酪氨酸激酶（Receptor tyrosine kinase，RTK）参与各种细胞信号传导，7less 2B 蛋白增强子[Enhancer of sevenless 2B，E(sev)2B]作为 GRB 的同源蛋白（Xia *et al.*，2019），和 GRB 有着同样的功能；另一条途径中，IRS 结合 PI3K 产生高浓度的磷脂酰肌醇三磷酸（Phosphatidylinositol-3,4,5-P3，PIP3），PIP3 活化 3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1（3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1，PDK1）从而激活 RAC 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶（RAC serine/threonine-protein kinase，AKT）并作用于雷帕霉素靶蛋白（Target of rapamycin，TOR），然后将信号传递至下游因子（许抗抗，2014；陈晓昂，2017；夏智勇，2019）（图 1）。IIS 中 GRB 和 PI3K 起着激活两条主要通路的作用，PDK1 作为 PI3K 下游因子，作用不可忽视；而 TOR 途径与 IIS 途径共享许多关键调控因子（Lin and Smagghe，2019）。研究表明，TOR 能够介导营养信号的传递进而激活 JH 的生物合成和卵黄原蛋白的生成（Maestro *et al.*，2009），通过 RNAi 技术干扰白背飞虱 *Sogatella furcifera TOR* 基因的表达，雌虫卵巢发育受到抑制从而无法产卵（邓瑶，2018）。近些年来，胰岛素对秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 和黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 卵巢功能的调节已有大量研究（陈晓昂等，2017；谢鹏飞等，2018），然而胰岛素信号通路基因在龟纹瓢虫生殖发育中的功能还不明确。因此研究胰岛素信号通路相关基因对龟纹瓢虫生长、发育和繁殖的影响极具重要意义。

本研究基于龟纹瓢虫基因组数据，分析了龟纹瓢虫胰岛素信号通路 4 个关键基因 *E(sev)2B*、*TOR*、*PDK1* 和 *PI3K* 的序列结构，以及和其他昆虫间亲缘关系。进一步地，研究了这 4 个基因在龟纹瓢虫雌虫不同发育时期（羽化后第 1、3、5 和 7 天）及不同组织（头、胸、腹和肠）中的相对表达量，为阐明胰岛素信号通路在龟纹瓢虫

生殖发育中的作用奠定了基础。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

在中国农业科学院棉花研究所养虫室连续纯化多代的龟纹瓢虫种群置于纱网笼中进行饲养（30 cm × 30 cm × 30 cm），并将接种了足够多豌豆修尾蚜 *Megoura crassicauda* 的蚕豆苗一并放入纱笼内。饲养过程中，需定期添加豌豆修尾蚜并更换新鲜的蚕豆苗，以确保豌豆修尾蚜种群的稳定，从而保障龟纹瓢虫拥有充足的豌豆修尾蚜作为食物来源。

龟纹瓢虫饲养条件为：光周期 14 L∶10 D，温度（25 ± 1）℃，相对湿度 60%±5%；豌豆修尾蚜饲养条件为：光周期 14 L∶10 D，温度（20 ± 1）℃，相对湿度 60%±5%。

1.2　主要试剂

RNA 提取试剂 TRIzol 购自 Life Technologies 公司；反转录试剂盒 PrimeScript^{TM} RT reagentKit（Perfect Real Time）购自 TaKaRa 公司；实时荧光定量 PCR 试剂盒（TransStart Top Green qPCR SuperMix (+ Dye I）购自北京全式金生物技术有限公司。

1.3　RNA 的提取及 cDNA 合成

分别选取羽化第 1、3、5 和 7 天龟纹瓢虫雌虫虫体以及其头、胸、腹和肠，放置于 1.5 mL 离心管，液氮速冻，- 80 ℃保存。每个时期 5 头试虫，设置 3 个重复。首先，按照 TRIzol 试剂（Life Technologies，美国）说明书进行 RNA 的提取；其次，使用 NanoDrop2000C 及琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 浓度和质量；最后利用反转录试剂盒将不同时期、不同组织龟纹瓢虫的 RNA 样品反转录成 cDNA。

1.4　序列分析

基于本实验室龟纹瓢虫基因组数据（Zhang *et al.*，2020），利用网站（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/）预测基因的开放阅读框（Open reading frame，ORF）。运用 DNAMAN9.01 软件进行序列多重比对。采用在线网站（http://web.expasy.org/protparam/）预测蛋白质理化性质。运用网站 NCBI-Pfam v33.1-18271PSSMs（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi）分析蛋白质的结构域和保守位点，运用 MEGA 7.0 软件通过邻接法（Neighbor-joining method，NJ）构建系统发育树，各分支置信度经由 bootstrap 法均进行 1 000 次的重复检验。

1.5　实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）

运用 Premier 6.0 设计 qRT-PCR 用引物（表 1），选取龟纹瓢虫 *RPS18* 基因作为内参基因（Huangfu *et al.*，2021），引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。qPCR 反应体系为（10 μL）：cDNA 模板 2.0 μL，上、下游引物各 0. 4 μL，2×TransStart Top Green qPCR SuperMix（+ Dye I）5 μL，Nuclease Free Water 2.2 μL。混匀后，进行离心处理，随后将样品放入荧光定量 PCR 仪中扩增。反应步骤为：首先在 94 ℃变性 30 s，然后进行 40 个循环扩增反应，每个循环条件为 94 ℃持续 5 s；55 ℃持续 15 s；72 ℃持续 10 s。每个处理 3 次生物学重复及 3 次技术重复，仪器选用的是 Eppendorf 公司生产的 Mastercycle ep realplex 荧光定量 PCR 仪。反应结束后，根据 Ct 值，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$（Livak and Schmittgen，2001）法进行数据分析。

表 1　qRT-PCR 引物

Table 1　Primers used for qRT-PCR

引物名称 Primer name	上游引物（5′-3′）Forward primer (5′-3′)	下游引物（5′-3′）Reverse primer (5′-3′)
E(sev)2B	CAAGGTACTACGACGCACAAGG	TGGAAACTGAGGATGTACGGTGGTA
MTOR	GCTATGGTAGACGGAATACGCTTGG	CCTTGGAGTGTCGATCCTGGCTAT
PDK1	CCCTCCGTCCAAATCTGAAGTTGAA	CCTCTCCTCAATCTCCTCCTGACTG
PIK3	AGATGCGACCACTTTGGATTGTCTT	CTGTCGGAGATCGTCACCATTCTTG
RPS18	CGCTGGTGATTCCAGATAA	GACGACCTACACCTTTGATG

2 结果与分析

2.1 E(sev)2B、TOR、PDK1 和 PI3K 蛋白的氨基酸序列分析

通过网站分析 *E(sev)2B*、*TOR*、*PDK*1 和 *PI3K* 基因长度（Gene length）、编码的氨基酸数（Number of encoded amino acids）、分子质量（Molecular weight）、等电点（Isoelectric point）、最高的氨基酸种类（Maximum amino acid content）、总负电荷残基（Asp + Glu）、总正电荷残基（Arg + Lys）数、N 端氨基酸（N-terminal amino acids）、蛋白质半衰期（Protein half-life）、不稳定性指数（Instability index）、脂肪族氨基酸指数（Aliphatic index）以及总平均亲水性（Grand average of hydropathicity，GRAVY）（表 2）。

通过氨基酸序列结构域分析发现 E(sev)2B 氨基酸有 SH3_1（第 4-50 个氨基酸）、SH2（第 60-134 个氨基酸）和 SH3_9（第 159-207 个氨基酸）3 个保守结构域；TOR 氨基酸含有 5 个保守结构域，分别是 FAT（第 1452-1764 个氨基酸）结构域、DUF3385（第 802-971 个氨基酸）结构域、FRB（第 1871-1968 个氨基酸）结构域、PI3_PI4_kinase（第 2037-2287 个氨基酸）结构域和末端 FATC（第 2363-2393 氨基酸）结构域；PDK1 氨基酸序列有 PKc_（第 18-286 个氨基酸）和 PH_3（第 382-480 个氨基酸）2 个保守结构域；PI3K 氨基酸有 3 个保守结构域，分别是 PI3K-rbd 结构域（第 5-72 个氨基酸）、PI3Ka 结构域（第 216-356 个氨基酸）和 PI3_PI4 结构域（第 445-650 个氨基酸）（图 1）。

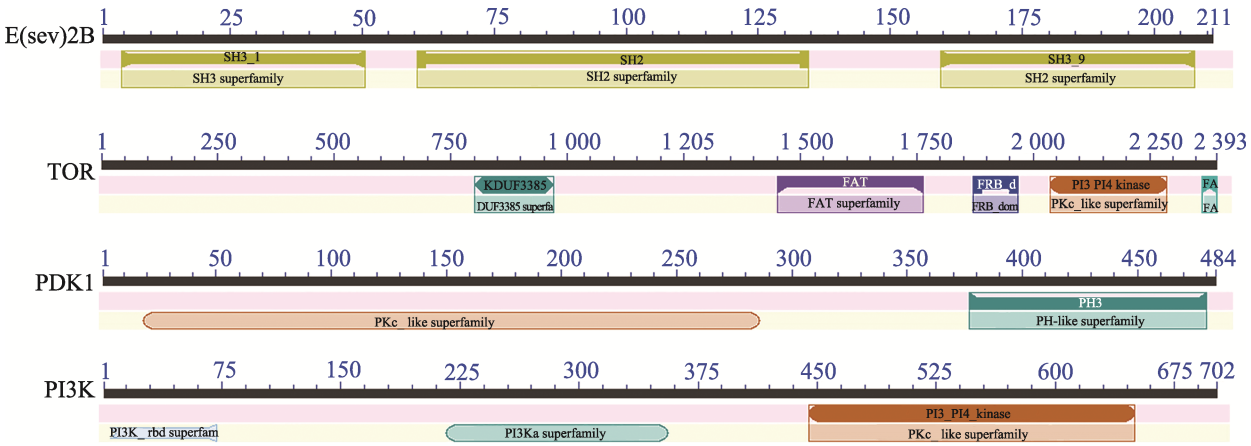

图 1 E(sev)2B、TOR、PDK1 和 PI3K 保守结构域

Fig. 1 Conserved domians of E(sev)2B、TOR、PDK1 and PI3K

表 2 氨基酸序列分析

Table 2 Amino acid sequence analysis

对比参数 Comparison parameter	基因 Gene			
	E(sev)2B	*TOR*	*PDK1*	*PI3K*
基因长度（bp） Gene length (bp)	636	7 182	1 455	2 109
编码氨基酸数目 Number of encoded amino acids	211	2 393	484	702
分子质量（kD） Molecular weight (kD)	24.55	274.1	56.28	80.30
等电点 Isoelectric point	5.72	7.76	6.76	8.59
最高氨基酸含量 Maximum amino acid content	谷氨酸 Glu：9.0%	亮氨酸 Leu：13.0%	亮氨酸 Leu：9.0% 赖氨酸 Lys：9.0%	亮氨酸 Leu：12.4%

续表 2 (Table 2 continued)

对比参数 Comparison parameter	基因 Gene			
	E(sev)2B	*TOR*	*PDK1*	*PI3K*
总负电荷残基 Total negatively charged residues (Asp + Glu)	33	285	69	82
总正电荷残基 Total positive charge residue (Arg + Lys)	26	285	67	91
N端氨基酸 N-terminal amino acids	蛋氨酸 Met	蛋氨酸 Met	蛋氨酸 Met	蛋氨酸 Met
蛋白质半衰期（h） Protein half-life (h)	30	30	30	30
不稳定性指数 Instability index	38.26	44.43	42.15	35.98
脂肪族氨基酸指数 Aliphatic amino acid index	74.83	97.81	84.17	95.67
总平均亲水性 Total average hydrophilicity	- 0.56	- 0.229	- 0.481	- 0.206

2.2　氨基酸序列同源性分析

序列比对结果显示，龟纹瓢虫 *E(sev)2B* 基因编码的氨基酸序列与沙漠暗黑甲 *Asbolus verrucosus* 的一致性最高，达 95.73%，其次与赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 的一致性为 94.79%（图 2）。表明龟纹瓢虫 *E(sev)2B* 基因在昆虫进化过程中有极高保守性。系统进化树聚类表明，龟纹瓢虫 *E(sev)2B* 基因与沙漠暗黑甲 *E(sev)2B* 基因亲缘关系最近，聚为一支。

龟纹瓢虫 PI3_PI4_kinase 保守结构域序列与沙漠暗黑甲一致性最高，为 92.00%，与马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata*、赤拟谷盗和黄粉甲 *Tenebrio molitor* 一致性均为 91.00%（图 3）。龟纹瓢虫 *TOR* 基因与鞘翅目昆虫黄粉甲 *TOR* 基因亲缘关系较近，聚类到同一进化支。

龟纹瓢虫 *PDK1* 基因编码的氨基酸序列与赤拟谷盗一致性最高，为 60.87%，与光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis* 一致性为 60.25%，与蜂巢小甲虫 *Aethina tumida* 一致性为 58.00%，与白蜡窄吉丁 *Agrilus planipennis* 一致性为 57.29%（图 4）。系统进化树聚类表明，龟纹瓢虫 *PDK1* 基因与鞘翅目昆虫玉米根萤叶甲 *Diabrotica virgifera virgifera* 在进化上有同源性，亲缘关系最近，聚类到同一进化支。

龟纹瓢虫 *PI3K* 基因编码的氨基酸序列与白蜡窄吉丁一致性最高，为 61.90%，与 *Cryptotermes secundus* 一致性为 58.95%，与萤火虫 *Photinus pyralis* 一致性为 59.54%，与内华达古白蚁 *Zootermopsis nevadensis* 一致性为 58.39%（图 5）。系统进化

图 2　龟纹瓢虫与其他昆虫 E(sev)2B 的氨基酸序列比对

Fig. 2　Amino acid sequence aligment of E(sev)2B from *Propylea japonica* and other insects

Propylea japonica：龟纹瓢虫，OK482672；*Asbolus verrucosus*：沙漠暗黑甲，RZC37049.1；*Tribolium castaneum*：赤拟谷盗，XP_969998.1；*Abscondita terminalis*：边褐端黑萤，KAF5269566.1；*Agrilus planipennis*：白蜡窄吉丁，XP_018325509.1.

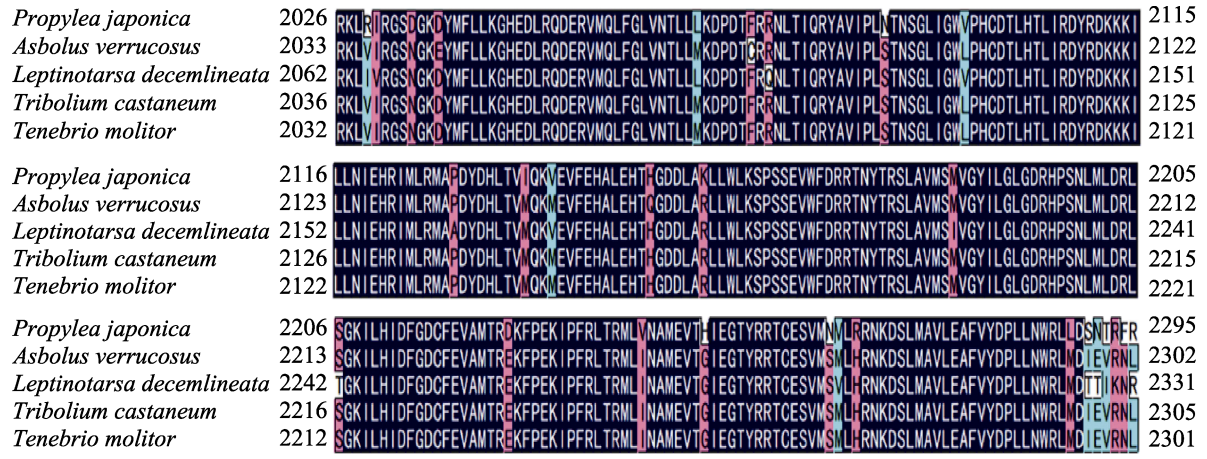

图 3　龟纹瓢虫与其他物种 TOR 的 PI3_PI4 保守结构氨基酸序列比对

Fig. 3　Amino acid sequence aligment of PI3_PI4 of TOR from *Propyle japonica* and other insects

Propylea japonica：龟纹瓢虫，OK482671； *Asbolus verrucosus*：沙漠暗黑甲，RZC37432.1；*Leptinotarsa decemlineata*：马铃薯甲虫，XP 023015005.1；*Tribolium castaneum*：赤拟谷盗，XP 971819.1； *Tenebrio molitor*：黄粉甲，AKB11618.1.

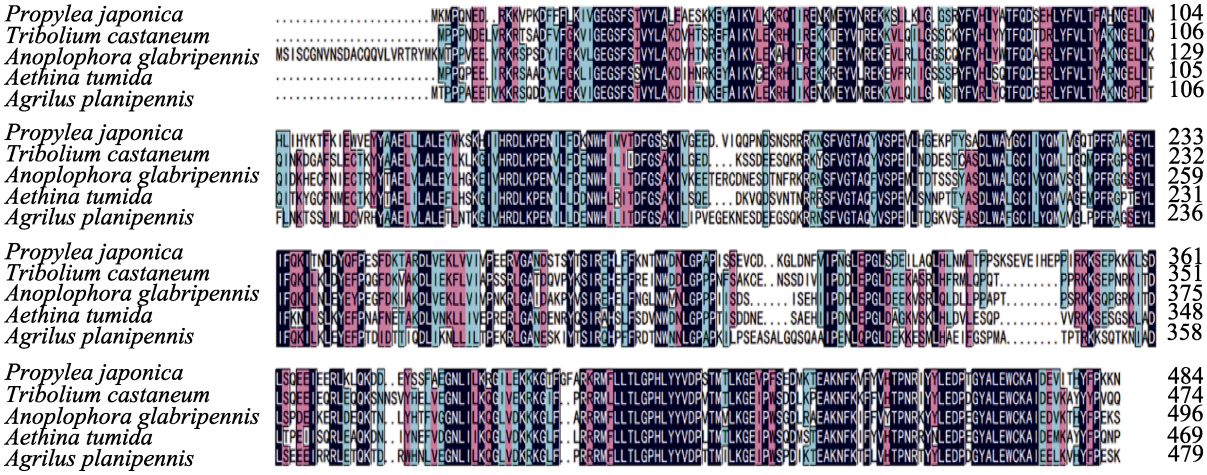

图 4　龟纹瓢虫与其他物种 PDK1 的氨基酸序列比对

Fig. 4　Amino acid sequence aligment of PDK1 from *Propyle japonica* and other insects

Propylea japonica：龟纹瓢虫，OK482674；*Tribolium castaneum*：赤拟谷盗，XP_015833394.1；*Anoplophora glabripennis*：光肩星天牛，XP_018574845.1；*Aethina tumida*：蜂巢小甲虫，XP_019867885.1；*Agrilus planipennis*：白蜡窄吉丁，XP 018333405.1.

树聚类表明（图 6），龟纹瓢虫 *PI3K* 与其他鞘翅目昆虫赤拟谷盗、光肩星天牛、米象 *Sitophilus oryzae* 等 *PI3K* 亲缘关系较近，其中与赤拟谷盗在进化上同源性最高亲缘关系最近，聚类到同一进化支。

2.3　*E(sev)2B*、*TOR*、*PDK1* 和 *PI3K* 基因时空表达分析

E(sev)2B 和 *PI3K* 基因的表达水平在龟纹瓢虫成虫羽化的第 1、3、5 和 7 天整体呈先下降后上升的趋势。*PDK1* 和 *TOR* 基因在成虫羽化第 1 天到第 3 天表达水平逐渐上升，在第 5 天显著下降，两者表达模式基本一致。*E(sev)2B*、*TOR*、*PDK1* 和 *PI3K* 基因均在成虫羽化第 5 天到第 7 天表达水平急剧升高，并达到最高水平（图 7）。

2.4　*E(sev)2B*、*TOR*、*PDK1* 和 *PI3K* 基因组织表达分析

成虫羽化 1 和 3 天后，*E(sev)2B* 基因在头、

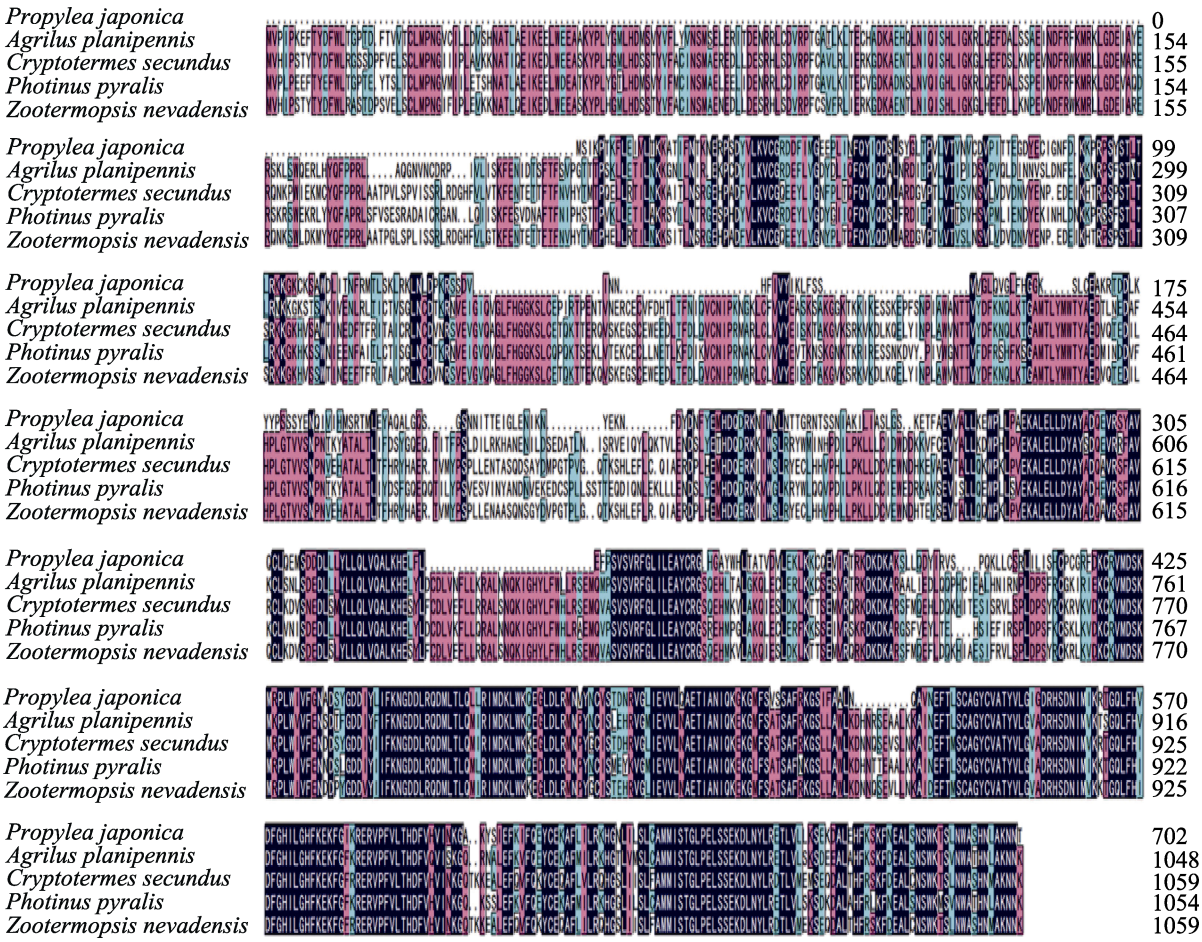

图 5　龟纹瓢虫与其他物种 PI3K 氨基酸序列比对

Fig. 5　Amino acid sequence aligment of PI3K from *Propylea japonica* and other insects

Propylea japonica：龟纹瓢虫，OK482673；*Agrilus planipennis*：白蜡窄吉丁，XP_018318828.1；*Cryptotermes secundus*：堆砂白蚁属，XP_033610950.1；*Photinus pyralis*：萤火虫，XP_031350105.1；*Zootermopsis nevadensis*：内华达古白蚁，XP_021917067.1

胸和腹部中表达基本一致，且在第 1、3 和 5 天在肠中表达水平显著高于头、胸和腹部（$P < 0.05$）。*E(sev)2B* 在成虫羽化的第 7 天，胸部表达量显著高于头、腹和肠中的表达量（$P < 0.05$）（图 8：A）。

成虫羽化第 1 天后，*TOR* 基因在胸部表达水平最高，显著高于头、腹和肠中表达（$P < 0.05$），在头部表达水平最低。在第 3 和 7 天，在头部表达水平最高，显著高于胸、腹部和肠中表达水平（$P < 0.05$）。第 5 天在头部、腹部表达水平最高，显著高于胸和肠中的表达量（$P < 0.05$）（图 8：B）。

成虫羽化第 1 天后，*PDK1* 基因在头部表达水平最高，显著高于胸部和腹部（$P < 0.05$），略高于肠，但未达到显著水平（$P > 0.05$）。在第 3 和 5 天在肠中表达水平最高，显著高于头、胸和腹（$P < 0.05$）。第 7 天在胸部表达水平最高，显著高于头、腹和肠（$P < 0.05$）（图 8：C）。

成虫羽化第 1、3、5 和 7 天后，*PI3K* 基因均在肠中表达量最高，均极显著高于头、胸和腹部（$P < 0.05$）（图 8：D）。

3　讨论

序列分析揭示龟纹瓢虫 E(sev)2B 与人类、泥蚶 *Tegillarca granosa* 和文蛤 *Meretrix meretrix* 的同源蛋白 GRB 结构一致（Cheng *et al.*, 1998；董迎辉等, 2013；高晓艳等, 2015），表明 *E(sev)2B* 基因在进化中比较保守；龟纹瓢

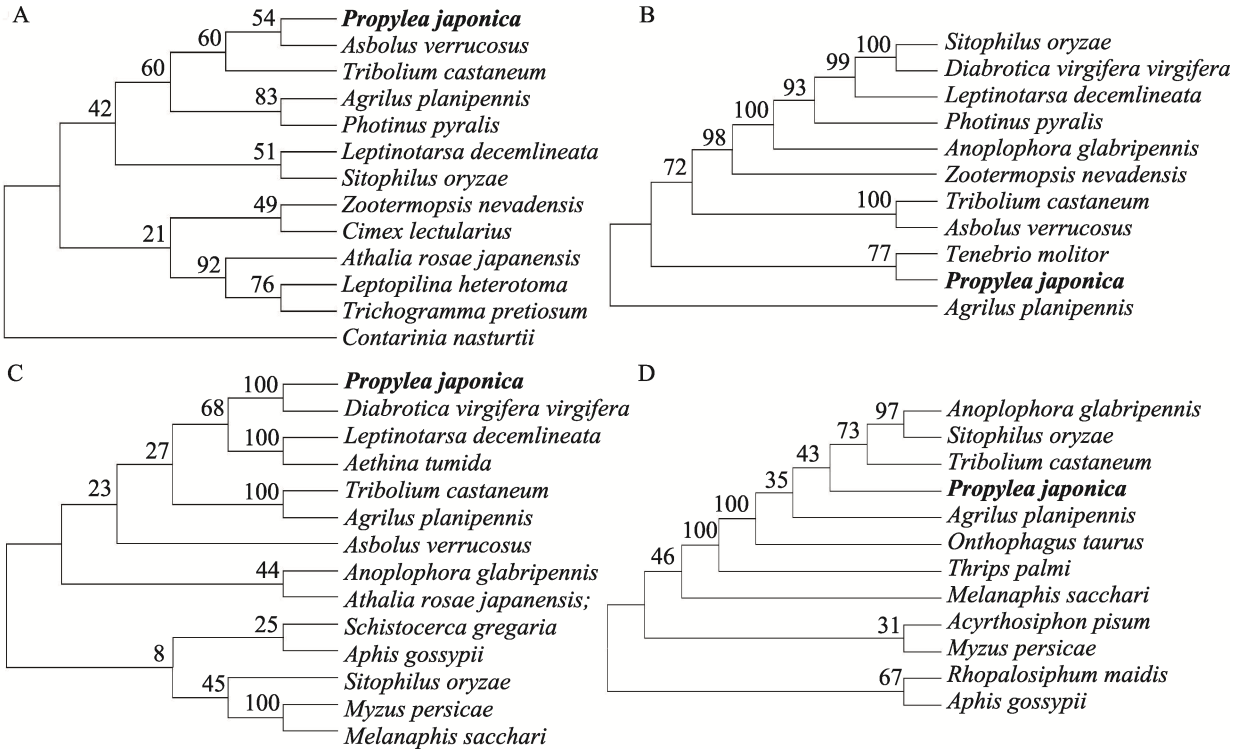

图 6　龟纹瓢虫与其他昆虫 *E(sev)2B* (A)、*TOR* (B)、*PDK1* (C)和 *PI3K* (D)的系统进化分析

Fig. 6　Phylogenetic relationship of *E(sev)2B* (A), *TOR* (B), *PDK1*(C) and *PI3K* (D) from *Propyle japonica* and other insects

E(sev)2B：*Propylea japonica*：龟纹瓢虫，OK482672；*Asbolus verrucosus*：沙漠暗黑甲，RZC37049.1；*Tribolium castaneum*：赤拟谷盗，XP 969998.1；*Agrilus planipennis*：白蜡窄吉丁，XP_018325509.1；*Photinus pyralis*：萤火虫，XP_031355471.1；*Leptinotarsa decemlineata*：马铃薯甲虫，XP 023018933.1；*Sitophilus oryzae*：米象，XP 030760624.1；*Zootermopsis nevadensis*：内华达古白蚁， XP 021934064.1；*Cimex lectularius*：温带臭虫，XP 014243826.1；*Athalia rosae japanensis*：黄翅菜叶蜂，XP 012269666.1；*Leptopilina heterotoma*：异腹小环腹瘿蜂，XP 043471046.1；*Trichogramma pretiosum*：短管赤眼蜂，XP 014235004.1；*Contarinia nasturtii*：甘蓝瘿蚊，XP 031641195.1.*TOR*：*Sitophilus oryzae*：米象，XP 030750054.1；*Diabrotica virgifera virgifera*：玉米根萤叶甲，XP 028145210.1；*Leptinotarsa decemlineata*：马铃薯甲虫，XP 023015005.1；*Photinus pyralis*：萤火虫，XP 031352545.1；*Anoplophora glabripennis*：光肩星天牛，XP 018572076.1；*Zootermopsis nevadensis*：内华达古白蚁，XP 021941476.1；*Tribolium castaneum*：赤拟谷盗，XP 971819.1；*Asbolus verrucosus*：沙漠暗黑甲，RZC37432.1；*Tenebrio molitor*：黄粉甲，AKB11618.1；*Propylea japonica*：龟纹瓢虫，OK482671；*Agrilus planipennis*：白蜡窄吉丁，XP 025831250.1；*PDK1*: *Propylea japonica*：龟纹瓢虫，OK482674；*Diabrotica virgifera virgifera*：玉米根萤叶甲，XP 028128946.1；*Leptinotarsa decemlineata*：马铃薯甲虫，XP 023025583.1；*Aethina tumida*：蜂巢小甲虫，XP 019867885.1；*Tribolium castaneum*：赤拟谷盗，XP 015833394.1；*Agrilus planipennis*：白蜡窄吉丁，XP 018333405.1；*Asbolus verrucosus*：沙漠暗黑甲，RZC33499.1；*Anoplophora glabripennis*：光肩星天牛，XP 018574845.1； *Athalia rosae japanensis*：黄翅菜叶蜂， XP 012267983.1；*Schistocerca gregaria*：沙漠蝗， QVD39211.1 ；*Aphis gossypii*：棉蚜，XP 027845111.1；*Sitophilus oryzae*：米象，XP 030760856.1；*Myzus persicae*：桃蚜，XP 022174736.1；*Melanaphis sacchari*：高粱蚜，XP 025194034.1；*PI3K*：*Anoplophora glabripennis*：光肩星天牛，XP 018567528.1；*Sitophilus oryzae*：米象，XP 030764147.1；*Tribolium castaneum*：赤拟谷盗，EFA09848.2；*Propylea japonica*：龟纹瓢虫，OK482673；*Agrilus planipennis*：白蜡窄吉丁，XP 018318828.1；*Onthophagus taurus*：蜣螂，XP 022907614.1；*Thrips palmi*：棕榈蓟马，XP 018567528.1；M*elanaphis sacchari*：高粱蚜，XP 025192751.1；*Acyrthosiphon pisum*：豌豆蚜，XP 001946655.2；*Myzus persicae*：桃蚜，XP 022177349.1；*Rhopalosiphum maidis*：玉米缢管蚜，XP_026809249.1；*Aphis gossypii*：棉蚜，XP 027850704.1.

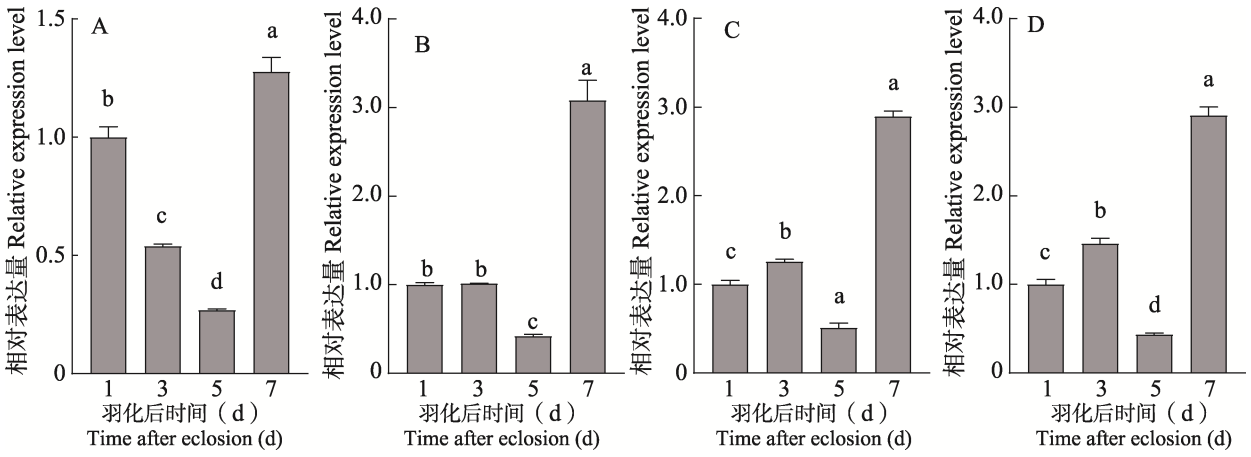

图 7　龟纹瓢虫 *E(sev)2B*（A），*TOR*（B），*PDK1*（C）和 *PI3K*（D）基因在不同发育时期相对表达量

Fig. 7　The relative expression levels of *E(sev)2B* (A), *TOR* (B), *PDK1* (C) and *PI3K* (D) in different developmental stages of *Propylea japonica*

图中数据为平均值±标准误。柱上不同字母表示不同发育阶段间基因表达量差异显著（$P<0.05$，Duncan 氏新复极差法）；*X* 轴中的 1、3、5 和 7 分别表示羽化后第 1、3、5 和 7 天;下图同。

Data in the figure are mean ±SE. Different letters above bars indicate significant difference in the gene expression level between different developmental stages ($P<0.05$, Duncan's new multiple range method). 1, 3, 5 and 7 in the *X*-axis represent the 1st, 3rd, 5th and 7th day after eclosion, respectively. The same below.

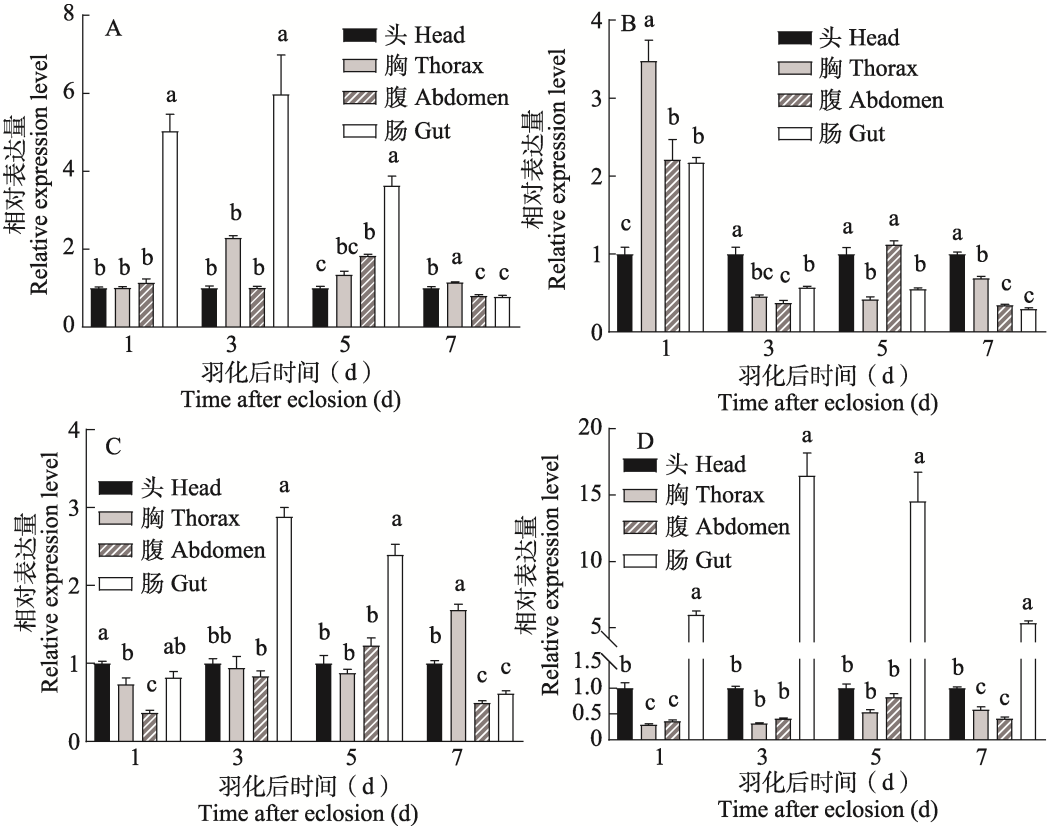

图 8　龟纹瓢虫 *E(sev)2B*（A），*TOR*（B），*PDK1*（C）和 *PIK3*（D）基因在不同组织不同发育时间相对表达量

Fig. 8　The relative expression levels of *E(sev)2B* (A), *TOR* (B), *PDK1* (C) and *PIK3* (D) in different developmental stages and tissues of *Propylea japonica*

虫 TOR 蛋白序列与白背飞虱 *Sogatella furcifera*、马氏珠母贝 *Pinctada martensi* 和中国明对虾 *Fenneropenaeus chinensis* 的 TOR 结构相似（孙姝娟，2010；田群莉等，2014；邓瑶，2018）；PDK1 蛋白序列分析中发现龟纹瓢虫与葱蝇 *Delia antiqua* 和东北林蛙蛋白均有 2 个相同的结构域 PKc_和 PH_3（申力等，2014；巩珊珊等，2017）；PI3K 序列分析发现龟纹瓢虫与家蚕和中国明对虾 PI3K 均有 3 个相同的结构域 PI3K-rbd、PI3Ka 和 PI3Kc（庄俐等，2011；迟艳红，2012）。龟纹瓢虫胰岛素通路基因 *E(sev)2B*、*TOR*、*PDK1* 和 *PIK3* 在不同物种间多重序列比对及系统进化树分析结果都表明了胰岛素信号通路具有较高的保守性。

胰岛素信号通路关键基因 *E(sev)2B*、*TOR*、*PDK1* 和 *PIK3* 基因在龟纹瓢虫雌虫不同发育时期均有表达，且在第 7 天的表达水平显著高于第 1、3 和 5 天，解剖羽化 1-5 d 龟纹瓢虫雌虫发现其卵巢管随着羽化天数增加越来越宽，在第 5 天时卵巢管宽度达到最大值，且开始少量产卵，约在第 10 天达到产卵高峰（皇甫宁博等，2021）。本研究中这 4 个基因均在龟纹瓢虫雌虫羽化第 7 天表达水平上升至最高值，表明在龟纹瓢虫雌虫产卵期表达水平高于其他时期，猜测这 4 个基因均在卵巢发育完全后才开始调控其生殖与产卵。已有研究表明胰岛素介导的信号传导在很大程度上调节卵黄发生和卵母细胞发育，*E(sev)2B*、*TOR*、*PDK1* 和 *PIK3* 作为胰岛素信号通路的关键基因，可调控细胞生长、增殖和分化（刘艳，2008；Belov and Mohammadi，2012；Das and Arur，2017；潘静，2018）。推测这些基因通过调控细胞生长、增殖和分化调节龟纹瓢虫雌虫卵巢发育。

组织表达水平结果显示，*E(sev)2B* 基因在成虫羽化第 1、3 和 5 天、*PI3K* 基因在成虫羽化第 1、3、5 和 7 天以及 *PDK1* 基因在成虫羽化第 3 和 5 天肠道中表达水平均显著高于头、胸和腹部的表达量，而研究表明 *PDK1* 基因是调控昆虫中肠重塑和化蛹的关键因子（Pan *et al.*，2018）。昆虫肠道具有摄取、运送、分泌消化酶、消化食物和吸收营养物质的作用，在成虫羽化后需积累一定的营养物质用来达到性成熟（郭军等，2015；张振宇等，2017）。推测这 3 种基因通过调控肠道吸收积累营养物质间接调控其生殖。

本研究中不同于 *E(sev)2B*、*PI3K* 和 *PDK1* 基因表达情况的是，*TOR* 基因在成虫羽化第 3、5 和 7 天头部有较高表达，这与白背飞虱和家蚕中的研究（Zhou *et al.*，2010；邓瑶，2018）基本一致。昆虫头部是感觉外界和协调活动的主要机构，具有大量的神经分泌系统和控制内分泌以及进食与消化的运动神经元，脑部神经分泌系统在信号传递中也起着重要作用（许抗抗，2014）。推测 TOR 很有可能通过控制龟纹瓢虫从外界获取营养物质以及信息传递调节其生殖。然而，*TOR* 基因在成虫羽化第 1 天在胸、腹和肠中高表达的原因还不太清楚。不少研究表明 TOR 对昆虫生殖力有调节作用，如在褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 和埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 中 TOR 通过介导 *Vg* 的表达来调节繁殖力（Hansen *et al.*，2004；Attardo *et al.*，2005；Zhai *et al.*，2015）。然而从白背飞虱成虫 *TOR* 基因沉默后，成虫羽化第 1、3 和 5 天的卵巢发育被抑制（邓瑶，2018），能够推测 *TOR* 基因在成虫羽化第 1 天在胸、腹和肠中显著的高表达可能和初羽化成虫生殖系统需进一步发育成熟有关。

本研究通过分析胰岛素信号通路中 4 个关键基因的序列结构，以及分析其在龟纹瓢虫发育过程中不同组织的时空表达，为进一步明确胰岛素信号通路在龟纹瓢虫生长发育以及生殖调控的作用奠定了基础。

4 结论

胰岛素信号通路关键基因 *E(sev)2B*、*TOR*、*PDK1* 和 *PI3K* 在龟纹瓢虫雌虫不同发育时期均有表达，且在羽化后第 7 天的表达水平显著高于第 1、3 和 5 天。

E(sev)2B、*TOR*、*PDK1* 和 *PI3K* 在龟纹瓢虫雌虫不同时期不同组织中表达水平存在差异，*PI3K* 基因在 4 个发育时期肠道中表达水平均显著高于头、胸和腹部的表达量。

参考文献 (References)

Attardo GM, Hansen IA, Raikhel AS, 2005. Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: implications for anautogeny. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(7): 661–675.

Belov AA, Mohammadi M, 2012. Grb2, a double-edged sword of receptor tyrosine kinase signaling. *Science Signaling*, 5(249): 49.

Chen XA, Yao HW, Ye GY, 2017. Research advances on insulin-like peptides and their functions in insects. C*hinese Journal of Biological Control*, 33(5): 699–712. [陈晓昂, 姚洪渭, 叶恭银, 2017. 昆虫类胰岛素及其功能研究进展. 中国生物防治学报, 33(5): 699–712.]

Cheng AM, Saxton TM, Sakai R, Kulkarni S, Mbamalu G, Vogel W, Tortorice CG, Cardiff RD, Cross JC, Muller WJ, Pawson T, 1998. Mammalian Grb2 regulates multiple steps in embryonic development and malignant transformation. *Cell*, 95(6): 793–803.

Chistyakova OV, 2008. Signaling pathway of insulin and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) as a potential regulator of lifespan. *Zhurnal Evoliutsionnoi Biokhimii i Fiziologii,* 44(1): 1–11.

Chi YH, 2012. Cloning and preliminary study on the function relationships of genes related to the Rac1/PI3K/Akt pathway in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. Master dissertation. Qindao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences. [迟艳红, 2012. 中国明对虾 Rac1/PI3K/Akt 通路相关基因的克隆和功能关系的初步研究. 硕士学位论文. 青岛: 中国科学院研究生院海洋研究所.]

Das D, Arur S, 2017. Conserved insulin signaling in the regulation of oocyte growth, development, and maturation. *Molecular Reproduction and Development*, 84(6): 444–459.

Deng Y, 2018. Molecular cloning, expression pattern and function analysis of vitellogenin and target of rapamycin gene in *Sogatella furcifera*. Master dissertation. Jingzhou: Yangtze University. [邓瑶, 2018. 白背飞虱卵黄原蛋白和 TOR 基因克隆、表达模式和功能研究. 硕士学位论文. 荆州: 长江大学.]

Dong YH, Xiang X, Yao HH, Bao YB, Sun CS, Lin ZH, 2013. Cloning and expression analysis of *Tegillarca granosa* growth factor receptor-bound protein2 (GRB2) gene. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 44(4): 937–943. [董迎辉, 项翔, 姚韩韩, 包永波, 孙长森, 林志华, 2013. 泥蚶(*Tegillarca granosa*)生长因子受体结合蛋白 2 (GRB2)基因的克隆与表达分析. 海洋与湖沼, 44(4): 937–943.]

Gao XY, Dong YH, Shi SJ, Yao HH, Ruan WB, Zhao JX, Lin ZH, 2015. Cloning, spatiotemporal expression and SNP screening of growth factor receptor-bound protein 2(GRB2) gene in *Meretrix meretrix*. *Journal of Fisheries of China*, 39(9): 1324–1332. [高晓艳, 董迎辉, 施沈佳, 姚韩韩, 阮文斌, 赵家熙, 林志华, 2015. 文蛤生长因子受体结合蛋白 2(GRB2)基因克隆、时空表达及 SNP 位点筛查. 水产学报, 39(9): 1324–1332.]

Gong SS, Shao J, Qu LL, Chai LH, Zhang JY, Xiao XH, 2017. Cloning and bioinformatics analysis of PDK1 gene in *Rana dybowskii*. *Chinese Journal of Wildlife*, 38(4): 641–647. [巩珊珊, 邵婕, 曲俐俐, 柴龙会, 张晶钰, 肖向红, 2017. 东北林蛙 PDK1 基因的克隆及生物信息学分析. 野生动物学报, 38(4): 641–647.]

Guo J, Wu J, Deng XY, Lin LB, Liu S, Li JL, 2015. Advances in research on insect gut microbiota and their functions. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 52(6): 1345–1352. [郭军, 吴杰, 邓先余, 林连兵, 刘珊, 李继莲, 2015. 昆虫肠道菌群的功能研究进展. 应用昆虫学报, 52(6): 1345–1352.]

Hansen IA, Attardo GM, Park JH, Peng Q, Raikhel AS, 2004. Target of rapamycin-mediated amino acid signaling in mosquito anautogeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(29): 10626–10631.

Huangfu NB, Gao XK, Wang L, Zhu XZ, Zhang KX, Li DY, Ji JC, Luo JY, Cui JJ, 2021. Study on the development, oogenesis and follicular epithelial cell of *Propylea japonica*. *Cotton Science*, 33(4): 328–336. [皇甫宁博, 高雪珂, 王丽, 朱香镇, 张开心, 李东阳, 姬继超, 雒珺瑜, 崔金杰, 2021. 龟纹瓢虫生长发育及卵巢与滤泡上皮细胞的研究. 棉花学报, 33(4): 328–336.]

Huangfu NB, Zhu XZ, Chang GF, Wang L, Li DY, Zhang KX, Gao XK, Ji JC, Luo JY, Cui JJ, 2021. Dynamic transcriptome analysis and Methoprene-tolerant gene knockdown reveal that juvenile hormone regulates oogenesis and vitellogenin synthesis in *Propylea japonica*. *Genomics*, 113(4): 2877–2889.

Liu Y, 2008. Cloning and expression pattern of genes upstream of insulin signaling pathway in *Bombyx mori*. Master dissertation. Xi'an: Shaanxi Normal University. [刘艳, 2008. 家蚕胰岛素信号传导途径中上游基因的克隆与表达模式. 硕士学位论文. 西安: 陕西师范大学.]

Lin XY, Smagghe G, 2019. Roles of the insulin signaling pathway in insect development and organ growth. *Peptides*, 122: 169923.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408.

Maestro JL, Cobo J, Bellés X, 2009. Target of rapamycin (TOR) mediates the transduction of nutritional signals into juvenile hormone production. *Journal of Biological Chemistry*, 284(9): 5506–5513.

Nässel DR, Vanden Broeck J, 2016. Insulin/IGF signaling in Drosophila and other insects: factors that regulate production, release and post-release action of the insulin-like peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(2): 271–290.

Pan J, 2018. Insulin and 20-hydroxyecdyone counteractively regulate phosphoinositide-dependent kinase-1 expression for insect pupation. Master dissertation. Jinan: Shandong University. [潘静, 2018. 胰岛素与 20-羟基蜕皮酮拮抗调控 3-磷酸肌醇依赖激酶-1 的表达进而调控昆虫化蛹. 硕士学位论文. 济南: 山东大学.]

Pan J, Di YQ, Li YB, Chen CH, Wang JX, Zhao XF, 2018. Insulin and 20-hydroxyecdysone oppose each other in the regulation of phosphoinositide-dependent kinase-1 expression during insect pupation. *Journal of Biological Chemistry*, 293(48): 18613–18623.

Shen L, Hao YJ, Luo QC, Chen B, 2014. Cloning and bioinformatic analysis of *PDK1* gene from *Delia antiqua*. *Journal of Chongqing Normal University* (*Natural Science*), 31(1): 30–36, 135. [申力, 郝友进, 罗钱春, 陈斌, 2014. 葱蝇 *PDK1* 基因的克隆及生物信息学分析. 重庆师范大学学报(自然科学版), 31(1): 30–36, 135.]

Smykal V, Raikhel AS, 2015. Nutritional control of insect reproduction. *Current Opinion in Insect Science*, 11: 31–38.

Sun SJ, 2010. Molecular cloning of target of rapamycin gene from *Fenneropenaeus chinensis* and fundamental research on TOR signaling pathway. Master dissertation. Qingdao: Chinese Academy of Sciences. [孙姝娟, 2010. 中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) TOR 基因的分子克隆及相关信号通路的初步研究. 硕士学位论文. 青岛: 中国科学院研究生院海洋研究所.]

Tian QL, Deng YW, Du XD, Jiao Y, Huang RL, Wang QH, 2014. Cloning and expression of TOR gene from *Pinctada martensii*. *Genomics and Applied Biology*, 33(6): 1228–1235. [田群莉, 邓岳文, 杜晓东, 焦钰, 黄荣莲, 王庆恒, 2014. 马氏珠母贝 TOR 基因 cDNA 的克隆与组织表达分析. 基因组学与应用生物学, 33(6): 1228–1235.]

Xia Y, He K, Jiao LL, Geng YY, Zhang DC, 2019. Molecular characterization and expression analysis of protein enhancer of sevenless 2B from *Artemia sinica* at early embryonic development and during immune response to bacterial stimulation. *Fish and Shellfish Immunology*, 87: 582–589.

Xia ZY, 2019. Study on the regulation of insulin-like peptide on the trade-offs between and reproduction immunity in the *Locusta migratoria manilensis*. Master dissertation. Hangzhou: Hangzhou Normal University. [夏智勇, 2019. 类胰岛素在东亚飞蝗繁殖与免疫权衡中的调控作用研究. 硕士学位论文. 杭州: 杭州师范大学.]

Xie PF, Li ZH, Huang Q, Wu JC, Liu JL, 2018. Advances in physiological functions of insects insulin, *Journal of Environmental Entomology*, 40(4): 834–839. [谢鹏飞, 李正辉, 黄茜, 吴进才, 刘井兰, 2018. 昆虫胰岛素生理功能的研究进展. 环境昆虫学报, 40(4): 834–839.]

Xu KK, 2014. Studies on the expression and function of six insulin signaling pathway genes from *Bactrocera dorsalis*. Master dissertation. Chongqing: Southwest University. [许抗抗, 2014. 桔小实蝇胰岛素信号通路六个重要基因的表达与功能研究. 硕士学位论文. 重庆: 西南大学.]

Zhai YF, Sun ZX, Zhang JQ, Kang K, Chen J, Zhang WQ, 2015. Activation of the TOR signalling pathway by glutamine regulates insect fecundity. *Scientific Reports*, 5: 10694.

Zhang LJ, Li S, Luo JY, Du P, Wu LK, Li YR, Zhu XZ, Wang L, Zhang S, Cui JJ, 2020. Chromosome‐level genome assembly of the predator *Propylea japonica* to understand its tolerance to insecticides and high temperatures. *Molecular Ecology Resources*, 20 (1): 292–307.

Zhang LL, 2007. Effect of different lipid diets on the growth, reproduction and predation of *Propylea japonica* (Thunberg). Master dissertation. Shanghai: East China Normal University. [张丽莉, 2007. 不同脂肪源饲料对龟纹瓢虫(*Propylaea japonica*) 生长、繁殖和捕食效应的影响. 硕士学位论文. 上海: 华东师范大学.]

Zhang SZ, Wu JX, Zhang Q, Jiang JX, Xu XL, Chen JA, 2004. Research progress on bioecological characteristics and feeding technique of *Propylaea japonica*. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 22(4): 206–210. [张世泽, 仵均祥, 张强, 姜军侠, 许向利, 陈继安, 2004. 龟纹瓢虫生物生态学特性及饲养利用研究进展. 干旱地区农业研究, 22(4): 206–210.]

Zhang TT, Zhang GC, Zeng FF, Liu CY, Mao JJ, 2016. Insulin-like peptides regulate vitellogenesis and oviposition in the green lacewing, *Chrysopa septempunctata*. *Bulletin of Entomological Research*, 107(2): 148–154.

Zhang ZY, Sheng P, Huang SW, Zhao YS, Zhang HY, 2017. Diversity, function and application of insect gut microbiota. *Biotic Resources*, 39(4): 231–239. [张振宇, 圣平, 黄胜威, 赵永顺, 张宏宇, 2017. 昆虫肠道微生物的多样性、功能及应用. 生物资源, 39(4): 231–239.]

Zhou S, Zhou Q, Liu Y, Wang S, Wen D, He Q, Wang W, Bendena WG, Li S, 2010. Two TOR genes in the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Molecular Biology*, 19 (6): 727–35.

Zhuang L, Niu BL, Zhang JJ, Meng ZQ, 2011. Cloning of the phosphoinositide 3-kinase gene from silkworm (*Bombyx mori*). *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 23(4): 685–691. [庄俐, 牛宝龙, 张静静, 孟智启, 2011. 家蚕磷脂酰肌醇 3-激酶(Bmpi3k)基因的克隆及分析. 浙江农业学报, 23(4): 685–691.]