基于 RNAi 沉默与转录组分析的埃及伊蚊 *AaTryp1* 基因功能解析*

段顶峰[1, 2**] 龚 雪[1, 2] 邬溢杨[1, 2] 余忠浩[1, 2]
周艳娇[1, 2] 聂 萌[1, 2] 廖承红[1, 2***]

（1. 海南大学生命健康学院病媒生物学实验室，海南省全健康重点实验室，海南省协同创新中心，海口 570228；
2. 海南大学国际全健康研究院，海口 570228）

摘 要 **【目的】** 明确埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 胰蛋白酶 1 基因（*AaTryp1*）的组织及发育阶段表达特征，通过 RNA 干扰（RNA interference，RNAi）结合转录组测序（RNA-seq）技术解析该基因沉默后的分子响应及潜在生物学功能，为深入阐明其在蚊虫生理调控中的作用机制提供理论依据。**【方法】** 采用 RT-qPCR 技术检测 *AaTryp1* 在埃及伊蚊不同组织、发育阶段的表达差异；通过体外合成靶向 *AaTryp1* 的 dsRNA 并导入雌蚊体内，结合 RNA-seq 技术系统分析基因沉默后的转录组变化，对筛选获得的差异表达基因（Differentially expressed genes，DEGs）进行 GO（Gene Ontology）功能富集及 KEGG（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes）通路分析，并对干扰后 DEGs 进行定量验证。**【结果】** *AaTryp1* 在埃及伊蚊雌蚊中呈现特异性高表达，其中唾液腺、腿部及中肠组织的表达量显著（$P < 0.05$）高于其他组织，且吸血前后表达水平存在显著差异；RNAi 处理后，*AaTryp1* 被有效敲低，转录组分析共筛选出 110 个 DEGs。GO 富集分析显示，这些 DEGs 主要富集于代谢过程、细胞过程等生物学过程，以及催化活性、结合活性等分子功能类别；KEGG 通路分析表明，DEGs 显著富集于肾素-血管紧张素系统、神经活性配体-受体相互作用、脂肪酸生物合成等非经典消化与免疫相关通路。RT-qPCR 验证结果与 RNA-seq 表达趋势一致，证实测序数据可靠。**【结论】** *AaTryp1* 在埃及伊蚊雌蚊中具有组织特异性和吸血响应性表达特征，其功能不仅可能涉及经典的消化代谢过程，还可能参与体液稳态调节、神经信号传导及脂质代谢等多个关键生理过程。本研究为后续深入解析该基因的调控机制及蚊虫防控靶标的开发提供了重要基础。

关键词 *AaTryp1*；RNA 干扰；转录组；差异表达基因

Functional analysis of the *Aedes aegypti AaTryp1* gene based on RNAi and transcriptomics

DUAN Ding-Feng[1, 2**] GONG Xue[1, 2] WU Yi-Yang[1, 2] YU Zhong-Hao[1, 2]
ZHOU Yan-Jiao[1, 2] NIE Meng[1, 2] LIAO Cheng-Hong[1, 2***]

(1. Hainan Provincial Collaborative Innovation Center, Hainan Provincial Key Laboratory of One Health, Laboratory of Medical Entomology, School of Life and Health Sciences, Hainan University, Haikou 570228, China;
2. International One Health Research Institute, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract **[Aim]** To characterize differences in the expression patterns of the trypsin 1 gene of *Aedes aegypti* (*AaTryp1*) in different tissues and developmental stages, and to investigate the molecular response and potential biological functions of this gene by combining RNA interference (RNAi) with transcriptome sequencing (RNA-seq), thereby providing a theoretical basis

*资助项目 Supported projects：国家自然科学基金项目（32560130；31960703；U22A20363）；海南省重点研发项目（No.ZDYF2023XDNY061）

**第一作者 First author，E-mail：3030192854@qq.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：liaochh@hainanu.edu.cn

收稿日期 Received：2026-05-08；接受日期 Accepted：2026-06-28

for elucidating its physiological role in mosquitoes. **[Methods]** RT-qPCR was used to determine the differences in the expression of *AaTryp1* in different tissues and developmental stages. Double-stranded RNA targeting *AaTryp1* was synthesized *in vitro* and introduced into female mosquitoes. RNA-seq was then performed to systematically analyze transcriptomic changes following gene silencing. The identified differentially expressed genes (DEGs) were subjected to Gene Ontology (GO) enrichment and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analyses, and selected DEGs were further validated using quantitative real-time PCR. **[Results]** *AaTryp1* showed tissue-specific expression in female *A. aegypti*, with significantly higher expression in the salivary glands, legs and midgut, than in other tissues. Its expression differed significantly before and after a blood meal. RNAi treatment effectively knocked down *AaTryp1*. Transcriptome analysis identified 110 DEGs. GO enrichment analysis showed that these DEGs were mainly associated with metabolic and cellular processes, as well as molecular functions including catalytic activity and binding. KEGG pathway analysis revealed significant enrichment in several non-classical digestion-and immunity-related pathways, including the renin-angiotensin system, neuroactive ligand-receptor interaction and fatty acid biosynthesis. RT-qPCR validation was consistent with the RNA-seq results, confirming the reliability of the sequencing data. **[Conclusion]** *AaTryp1* exhibits tissue-specific, blood-meal related, expression in female *A. aegypti*. Its function may not be limited to classical digestive metabolism, but may also be involved in hemolymph homeostasis, neural signaling and lipid metabolism. This study provides an important foundation for further elucidation of the regulatory mechanism of *AaTryp1*, and for the development of novel mosquito control targets.

Key words *AaTryp1*; RNAi; transcriptome; differentially expressed genes

埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 是登革热、寨卡病毒及黄热病等多种重要虫媒传染病的主要传播媒介（Burt *et al*., 2017; Sun *et al*., 2020; Rodrigues *et al*., 2021），其广泛的地理分布及较强的环境适应能力对全球公共卫生安全构成了严重威胁（Zhang *et al*., 2025）。尽管近年来围绕埃及伊蚊的生物学特性开展了大量研究，但其体内蛋白质功能的系统性解析仍相对不足，尤其是部分具有潜在重要生理作用的蛋白，其具体功能尚未得到深入阐明（Martins *et al*., 2021）。胰蛋白酶（Trypsin）作为丝氨酸蛋白酶家族的重要成员，在昆虫体内广泛存在，是维持其生长发育和繁殖所必需的一类功能蛋白。目前，关于胰蛋白酶不同亚型的研究多集中于模式昆虫或农业害虫，其功能主要聚焦于消化代谢及免疫防御等方面（Borges-Veloso *et al*., 2015; Awais *et al*., 2024; Zheng *et al*., 2024）。然而，随着研究的不断深入，部分研究表明胰蛋白酶家族成员可能还参与其他复杂的生理调控过程。例如，已有研究发现，*Trypsin-1* 在小菜蛾 *Plutella xylostella* 中作为雄性生殖相关的关键基因发挥重要作用（Peng *et al*., 2025），提示该类蛋白可能具有不同于传统认知的生物学功能。尽管如此，关于 *Trypsin-1* 在埃及伊蚊中的功能研究尚未见系统性报道，其在蚊虫生理过程中的具体作用及分子机制仍有待进一步探索。

RNA 干扰（RNA interference，RNAi）作为一种重要的基因沉默技术，已被广泛应用于昆虫学研究领域，如在中华拟同形溞 *Daphnia sinensis* 中 RNAi 表明 *Dsussp* 和 *Dsmapk* 基因在中华拟同形溞的生殖发育中起重要作用（赵雅洁等, 2024）以及通过 RNAi 降低 *MDCht9* 基因 mRNA 表达后发现该基因在家蝇幼虫中参与时期生长发育、蛋白质的消化与吸收、雄虫性成熟、物质代谢等功能，为害虫防治提供了新的潜在分子靶标（李妍等, 2021）。该技术通过设计特异性双链 RNA（Double-stranded RNA，dsRNA），并采用注射或饲喂等方式导入昆虫体内，在转录后水平介导同源 mRNA 的特异性降解，从而有效抑制目标基因的表达（Chen *et al*., 2019; Lu *et al*., 2023）。相较于传统的基因敲除或突变技术，RNAi 具有操作简便、实验周期短、特异性强及适用范围广等优点。基于上述优势，RNAi 技术已成为当前解析昆虫基因功能及生命活动调控机制的重要研究手段，并在功能基因筛选与分子机制研究中发挥着关键作用（苏佩佩等, 2021; 张司雯等,

2021）。

近年来，RNA 测序（RNA-seq）技术的快速发展为基因功能研究提供了强有力的技术手段。作为一种基于高通量测序平台的转录组分析方法，RNA-seq 具有高灵敏度、高分辨率和无背景噪音等显著优势，能够在全基因组水平上对基因表达进行定量分析。与传统方法相比，RNA-seq 不仅可以检测已知基因的表达变化，还能够发现新转录本、可变剪接事件及低丰度基因，从而全面揭示生物体在不同发育阶段或处理条件下的转录调控网络。目前，该技术已广泛应用于动植物发育（Lin *et al.*, 2023; 赵雅洁等, 2024）、生殖（郭海山等, 2026）、免疫（张文君等, 2026）及病原互作（罗锐丰等, 2026）等领域，为功能基因筛选及分子机制解析提供了重要依据。

本研究以埃及伊蚊为研究对象，首先对 *AaTryp1* 基因在其体内的表达特性进行分析。在此基础上，结合其表达特征，选取雌性成蚊作为研究材料，采用 RNA 干扰技术对 *AaTryp1* 基因进行敲低处理，并结合 RNA 测序（RNA-Seq）技术对干扰后雌蚊的转录组变化进行系统分析，筛选差异表达基因并开展功能富集分析，旨在从转录水平解析 *AaTryp1* 的潜在生物学功能及其参与的调控通路，以期为后续深入研究其作用机制提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　实验昆虫

实验所用埃及伊蚊（*Rockefeller* 株）由海南大学生命健康学院病媒生物实验室提供。幼虫饲育于塑料实验盆（32.5 cm×24.5 cm×10.0 cm）中，投放适量碎鼠粮作为饵料。为保持水体溶氧量及水质清洁，每日更换饲养用水。幼虫置于恒温培养箱（BIC-400，上海博迅医疗生物仪器股份有限公司）内，环境参数设定为温度（28±1）℃，相对湿度 75%±5%。成蚊羽化后收集于标准蚊笼（22.5 cm×22.5 cm×22.5 cm），维持环境为（27±1）℃、相对湿度 80%、光周期 12L：12D，并持续供给 8%蔗糖溶液以维持其正常生理代谢（陈静等, 2018）。

1.2　RNA 提取

按龄期收集埃及伊蚊蚊卵、幼虫（L1-L4 4 个阶段）、蛹（白蛹和黑蛹 2 个阶段）和 2-3 d 的成虫（雌蚊和雄蚊），其中蚊卵采集 100 只，幼虫每个阶段各 30 只，蛹期两个阶段各 5 只，成蚊阶段雌蚊和雄蚊各 3 只，保存在 Trizol 试剂中。此外，解剖雌性成虫，分别收集头、唾液腺、胸部、中肠、腹部和腿保存于 Trizol 试剂中，每个样本均由 20 只独立雌性成虫组成。使用 Trizol 试剂制造商说明书（Life technologies）分离提取总 RNA。以上所有样品均设置至少 3 个生物重复。

1.3　*AaTryp1*-dsRNA 合成与注射

为获得本研究所需的双链 RNA（dsRNA），采用体外转录方法合成靶向干扰片段。根据埃及伊蚊 *Trypsin-1* 基因序列（基因 ID：5572507）设计特异性引物。以来自于细菌并在埃及伊蚊体内不存在的 β-葡萄糖醛酸苷酶基因（*GUS*，基因 ID：946149）作为阴性对照组（Dedow *et al*., 2022），根据基因序列设计其特异性引物（表 1）。首先提取埃及伊蚊成蚊总 RNA，并以其为模板进行 PCR 扩增，以获得 dsRNA 两条互补链的 DNA 模板。随后利用南京诺唯赞生物科技股份有限公司提供的 T7 RNAi Transcription Kit（BOX 1），按照说明书进行体外转录反应，合成未纯化的 ds*AaTryp1*。所得转录产物经乙酸钠溶液（pH 5.6）和异丙醇沉淀纯化，离心后收集沉淀，获得纯化的 ds*AaTryp1*，用于后续 RNA 干扰实验。收集羽化后 2-3 d 的雌性埃及伊蚊成蚊，为减少个体间生理差异并便于操作，实验前对蚊虫进行 12 h 断食处理。随后将雌蚊置于 - 20 ℃条件下冷冻麻醉 3 min，使其暂时失去活动能力。利用显微注射仪将纯化后的 ds*AaTryp1* 和 ds*GUS* 注射至雌蚊胸腔内（Chen *et al*., 2025）。注射完成后，每组各取 6 只用于干扰效率检测，采用实时荧光定量 PCR（qPCR）检测目标基因表达水平，以评估 RNA 干扰效率。所有样品均设置至少 3 个生物重复。

表 1 dsRNA 模板扩增引物
Table 1 dsRNA template amplification primers

基因 Gene	引物 Primer	引物序列（5′-3′） Primer sequence (5′-3′)
AaTryp1	*AaTryp1*-F	GCCATCGGTGCTACCTCTTT
	AaTryp1-R	TGGCAGCTCAATCAACCGTA
AaTryp1T7	*AaTryp1T7*-F	ggatcctaatacgactcactatagggGCCATCGGTGCTACCTCTTT
	AaTryp1T7-R	ggatcctaatacgactcactatagggTGGCAGCTCAATCAACCGTA
GUS	*GUS*-F	ATGAACATGGCATCGTGGT
	GUS-R	GGCACAGCACATCAAAGAGA
GUST7	*GUST7*-F	ggatcctaatacgactcactatagggATGAACATGGCATCGTGGT
	GUST7-R	ggatcctaatacgactcactatagggGGCACAGCACATCAAAGAGA

1.4 样品采集与测序

RNA-Seq 测序由上海美吉生物医药科技有限公司完成。按照测序平台要求收集样品，将注射不同处理 dsRNA 的雌性埃及伊蚊成蚊设置为 3 个实验组，分别为 DEPC 水注射组（DEPC 组）、ds*GUS* 注射组（ds*GUS* 组）以及 ds*AaTryp1* 注射组（ds*AaTryp1* 组）。每个处理组设置 3 个生物学重复，每个重复收集 1 管样品，每管样品质量约为 100 mg。所收集样品立即保存并用于后续 RNA 提取及转录组测序分析。

1.5 RT-qPCR 验证

取干扰处理后 12 h 并经断食处理的雌性埃及伊蚊成蚊，分别设为空白对照组（DEPC 组）、阴性对照组（ds*GUS* 组）及实验组（ds*AaTryp1* 组），提取各组总 RNA 用于后续分析（Chen *et al*., 2019）。根据转录组测序结果，筛选显著差异表达基因，从中选取上调和下调基因共 10 个，设计特异性 qPCR 引物进行验证（表 2）。采用 SPARKscript Ⅱ RT Plus kit（With gDNA Eraser）进行反转录反应，反应体系为 20 μL，

表 2 RT-qPCR 模板扩增引物
Table 2 Primers used for RT-qPCR amplification

基因 ID Gene ID	正向引物序列（5′-3′） Forward primer sequence (5′-3′)	反向引物序列（5′-3′） Reverse primer sequence (5′-3′)
LOC5567968	AGTGAGAGAATCGTTGGCGG	TCGGCAGGCTTTTTATCCCA
LOC5578869	TGTAGGCACGGTAGAACTGC	TAGATCGGTCCAGAGGCCAT
LOC5577569	GGAGGAAACGTAGCGGACAA	CTGACCACTCCCACCTGAAC
LOC5571062	TACCACGAACAGAGCCCTCA	ACCTTACTGCAAACAGGGCA
LOC110679877	GTCAGTCACCCAAAAACGCA	CGTTTATTTCCAGCCCGTGG
LOC110680334	TGGCGTAATCGACTTGTACGG	TGGCCGTGCTCGGTAACTTC
LOC5575698	TTTAGTGACGAGCGCCGATT	AACTGCAACTGGGAACCGTA
LOC5573303	GCTCTGCTCCGTAATCTGGA	CACTGTTGCCTTCCTTGCAG
LOC5574052	TGCAGAGTCCCATACCGTTG	CCACCAGGAAACTCAAAGCG
LOC5571256	CCGTAATGACCAGAAGGCGT	CCGATGATTGGACTCGCTGA
LOC110680939（*RPS-17*）	TCCGTGGTATCTCCATCAAGCT	CACTTCCGGCACGTAGTTGTC
LOC5572507（*AaTryp1*）	CCCTGATATGCCGAACGTGT	GACCCCAAGAGACGATTCCT

以去除基因组 DNA 污染并合成 cDNA 模板。实时荧光定量 PCR 采用 2×SYBR Green qPCR Mix（With ROX）配置，总反应体系为 10 μL。每个处理组设置 3 个生物学重复，所有样品均进行技术重复检测。以埃及伊蚊 40S 核糖体蛋白 S17 基因作为内参基因（*RPS-17*）（Weldon *et al*., 2018）。qPCR 扩增结束后，利用 LC96 软件对扩增曲线及溶解曲线进行人工校验，确保扩增特异性及数据准确性，相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行计算分析（Chen *et al*., 2023）。数据处理及图表绘制采用 GraphPad Prism 10.1.2 软件完成。

1.6　数据分析

所有实验数据均以平均值±标准误（Mean±SE）表示。统计分析采用 GraphPad Prism 10.1.2 软件进行处理。不同处理组之间的差异采用单因素方差分析（One-way ANOVA）进行比较。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义，以 $P < 0.01$ 表示差异极显著。转录组测序数据的差异表达分析采用 DESeq2 软件进行筛选，以|$\log_2$fold change (FC)|≥1 且 FDR < 0.05 作为差异表达基因筛选标准。差异表达基因的功能注释与富集分析分别通过 Gene Ontology（GO）和 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes（KEGG）数据库进行。

2　结果与分析

2.1　*AaTryp1* 表达特性

本研究通过定量实时荧光 PCR（RT-qPCR）检测其在多个发育阶段（卵、1-4 龄幼虫、早期蛹（白蛹）、晚期蛹（黑蛹）、雄蚊、未吸血雌蚊、吸血后 72 h 雌蚊）以及成蚊主要组织（中肠、唾液腺、头部、胸部、腿、表皮）中的转录水平。结果显示，*AaTryp1* 在整个发育过程中呈显著动态变化（图 1：A，B），该基因在晚期蛹（黑蛹）和成年未吸血雌蚊中显著（$P < 0.05$）高表达，尤其是在吸血后 6 h 的雌蚊中达到峰值。其在黑蛹中高表达，而在后面的雌蚊中特异表达和吸血后短时间的表达迅速攀升，提示其表达受血液摄食强烈诱导。在组织特异性方面，*AaTryp1* 在成年雌蚊各组织中呈现高度区域化分布（图 1：C）。其在腿部、唾液腺和中肠中有显著性高于其它部位的表达，这表明 *AaTryp1* 可能在埃及伊蚊中发挥着多方面的功能。

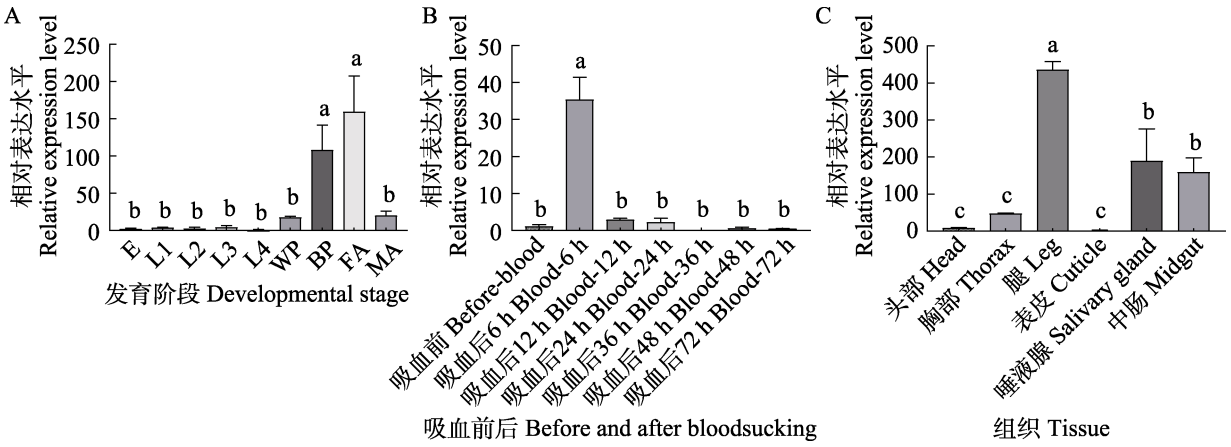


图 1　*AaTryp1* 在埃及伊蚊中不同发育时期（A）、血餐前后（B）和不同组织（C）中的转录丰度

Fig. 1　Transcription abundance of *AaTryp1* at different developmental stages (A), before and after blood feeding (B), and in different tissues (C) *in Aedes aegypti*

E：蚊卵；L1-L4：幼虫 1-4 龄；WP：白蛹；BP：黑蛹；FA：雌蚊；MA：雄蚊。数据为平均值±标准误（$n = 3$），柱上标有不同的小写字母表示差异显著（$P < 0.05$，单因素方差分析）。

E: Eggs; L1-L4: 1st- to 4th-instar larvae; WP: White pupa stage; BP: Black pupa stage; FA: Female adults; MA: Male adults. Data in the figure are mean±SE ($n = 3$). Different lowercase letters above bars indicate significant difference ($P < 0.05$, one-way ANOVA).

2.2 RNAi 干扰效率验证

采用体外转录方法合成靶向 *AaTryp1* 基因的双链 RNA(ds*AaTryp1*)以及作为阴性对照的 *GUS* 基因的双链 RNA（ds*GUS*）。经 1%琼脂糖凝胶电泳检测（图 2：A）可见，在第一泳道和第二泳道都在 400-500 bp 处出现清晰且特异性条带，表明 ds*AaTryp1* 和 ds*GUS* 成功合成，且产物完整性良好，可用于后续 RNA 干扰实验。将注射处理后的雌性埃及伊蚊成蚊分为 3 组：空白对照组（DEPC 组）、阴性对照组（ds*GUS* 组）和实验组（ds*AaTryp1* 组）。采用实时荧光定量 PCR（RT-qPCR）对各组中 *AaTryp1* 基因的表达水平进行检测（图 2：B）。结果显示，与对照组相比，ds*AaTryp1* 组中目标基因表达量显著下调，干扰效率约为 80%（$P < 0.05$），表明 RNA 干扰效果显著。以上结果表明能够满足后续实验分析的要求。

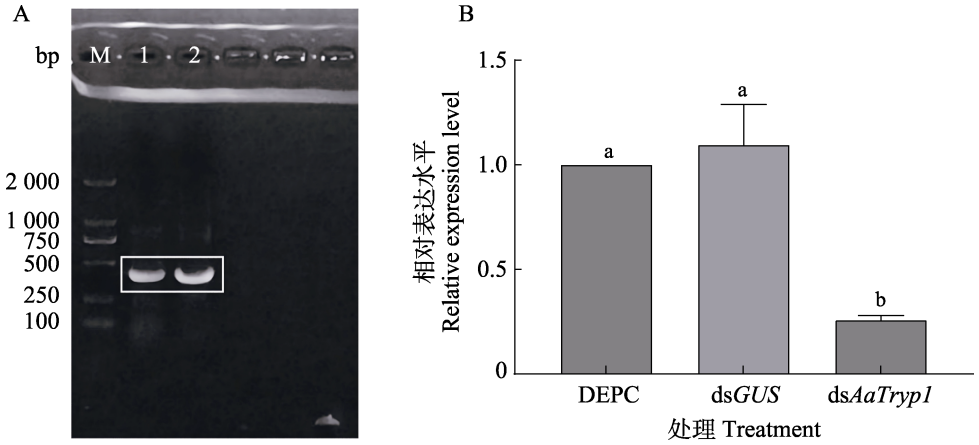


图 2 dsRNA 的制作及注射干扰埃及伊蚊 *AaTryp1* mRNA 的表达

Fig. 2 Preparation of dsRNA and RNAi-mediated silencing of *AaTryp1* mRNA expression in *Aedes aegypti*

A. 纯化的 ds*GUS* 和 ds*AaTryp1* 凝胶电泳结果图；B. 注射 DEPC、ds*GUS* 和 ds*AaTryp1* 后 12 h，埃及伊蚊 *AaTryp1* 的相对表达水平。M：分子量标准参照物；1：ds*GUS*；2：ds*AaTryp1*。以 DEPC 组为空白对照组和 ds*GUS* 组为阴性对照组，ds*AaTryp1* 组为实验组。数据为平均值±标准误（$n = 3$），柱上标有不同的小写字母表示差异显著（$P < 0.05$，单因素方差分析）。

A. Agarose gel electrophoresis analysis of purified ds*GUS* and ds*AaTryp1*; B. Relative expression levels of *AaTryp1* in *A. aegypti* at 12 h after injection with DEPC, ds*GUS*, or ds*AaTryp1*. M: Molecular weight marker; 1: ds*GUS*; 2: ds*AaTryp1*. The DEPC-treated group is used as the blank control, the ds*GUS*-treated group is used as the negative control, and the ds*AaTryp1*-treated group is used as the experimental group. Data in the figure are mean±SE ($n = 3$). Different lowercase letters above bars indicate significant difference ($P < 0.05$, one-way ANOVA).

2.3 转录组测序数据评估

为系统分析 *AaTryp1* 基因沉默后雌性埃及伊蚊的转录组变化，对 DEPC 组、ds*GUS* 组及 ds*AaTryp1* 组样品进行 RNA-Seq 测序。经原始数据质控处理后，获得高质量 Clean reads 用于后续分析。结果显示，各样品测序数据质量良好，Q30 比例均高于 90%，GC 含量分布正常，未见明显偏倚，表明测序数据具有较高的准确性和可靠性。并且通过相关性分析可以看出各处理组生物学重复之间相关性较高，重复性良好，数据稳定性较强。综上所述，本研究获得的转录组测序数据质量可靠，可用于后续差异表达基因筛选及功能富集分析（表 3）。

表 3　测序数据统计

Table 3　Sequencing data statistics

样本 Sample	有效读段数 Clean reads	错误率（%） Error rate (%)	Q30 (%)	GC 含量（%） GC content(%)
DEPC_1	43 965 682	0.011 9	96.02	49.38
DEPC_2	39 409 710	0.011 8	96.07	50.21
DEPC_3	40 263 808	0.011 8	96.16	50.11
dsRNA_GUS_1	40468 742	0.01 19	96.03	49.49
dsRNA_GUS_2	40 816 792	0.011 8	96.08	49.67
dsRNA_GUS_3	41 132 510	0.011 8	96.21	48.93
dsRNA_Try1_1	41 673 768	0.011 8	96.11	49.04
dsRNA_Try1_2	45 736 218	0.011 7	96.41	49.56
dsRNA_Try1_3	41 014 642	0.011 8	96.15	48.61

2.4　差异表达基因（DEGs）整体分析

为系统评估 *AaTryp1* 基因沉默对雌性埃及伊蚊转录水平的影响，基于 RNA-Seq 测序数据对各处理组进行差异表达分析。以 DEPC 组为空白对照组和 ds*GUS* 组为阴性对照组，ds*AaTryp1* 组为实验组，采用差异表达分析方法对基因表达水平进行比较筛选。火山图结果显示，与空白对照组相比，干扰 *AaTryp1* 基因后蚊虫体内有 47 个基因显示出上调，63 个基因下调（图 3：A）。与阴性对照组相比，有 29 个基因显示上调，103 个基因下调（图 3：B）。

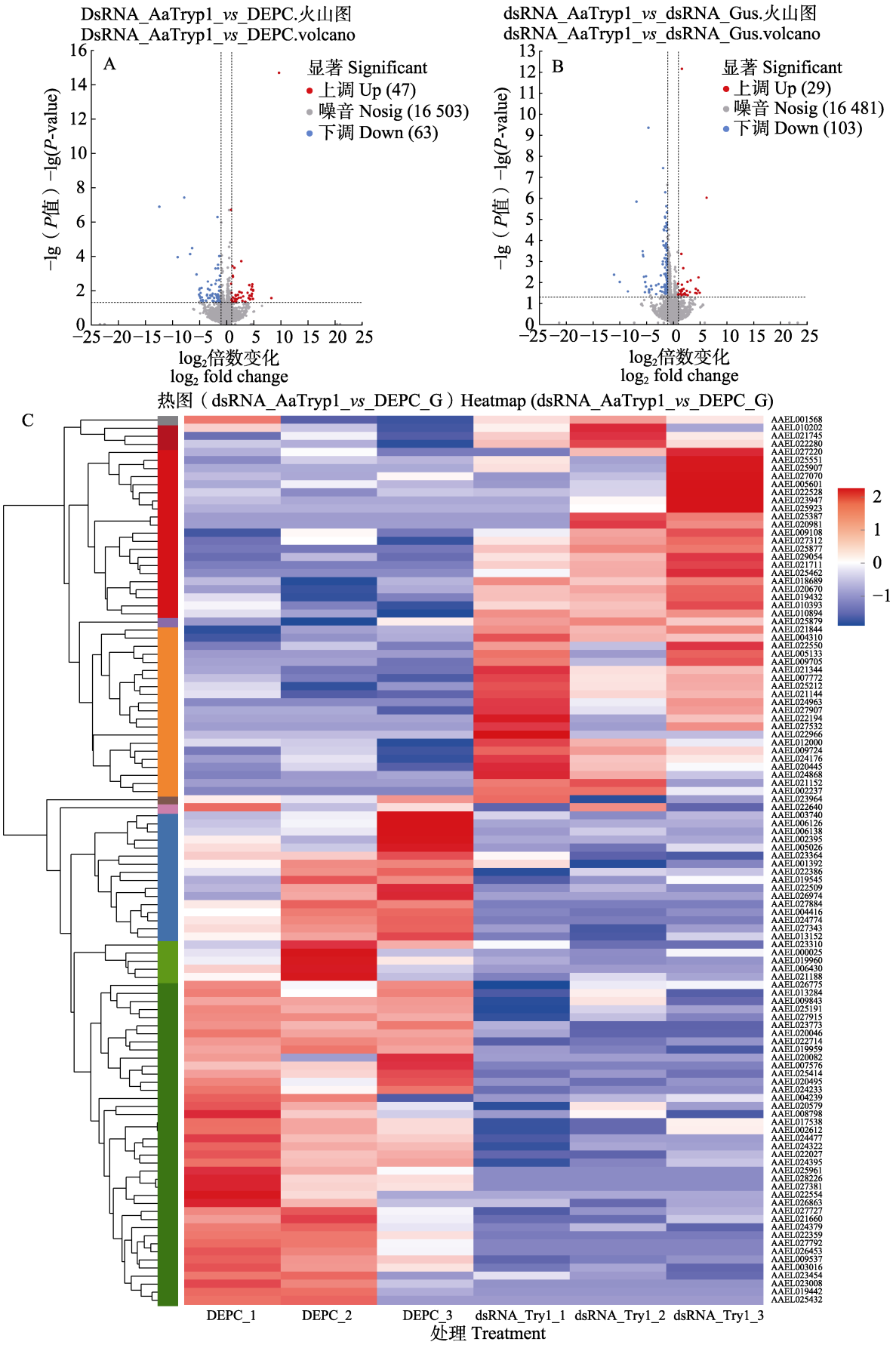
火山图显示显著差异基因分布清晰，上调与下调基因分布对称，提示数据具有良好的统计学可靠性；进一步对两组的层次聚类分析结果表明（图 3：C，D），不同处理组之间基因表达模式存在明显差异，而组内生物学重复聚类良好，说明实验重复性较高。

2.5　GO 功能注释分析和 KEGG 信号通路富集分析

为进一步解析差异表达基因的潜在生物学功能，对实验组和空白对照组筛选获得的差异表达基因进行 GO 功能注释分析及 KEGG 代谢通路富集分析。结果显示，差异基因在生物过程（Biological process）、分子功能（Molecular function）和细胞组分（Cellular component）三大类中均有显著富集。差异表达基因中参与生物学过程的基因有 59 个，主要集中在代谢过程和细胞过程；参与细胞组分的基因有 52 个，集中在细胞分解实体上；在分子功能上，有 91 个差异基因表现出催化和结合活性（图 4：A）。进一步对差异表达基因进行 KEGG 通路富集分析发现，在筛选获得的 110 个差异基因中，除传统富集于免疫反应及消化吸收相关通路外，还显著富集于肾素-血管紧张素系统（Renin-angiotensin system）、神经活性配体-受体相互作用（Neuroactive ligand-receptor interaction）以及脂肪酸生物合成（Fatty acid biosynthesis）等通路（图 4：B）。上述通路分别涉及血液调控、信号转导及物质代谢等多种重要生理过程，提示 *AaTryp1* 基因沉默可能在埃及伊蚊体内引发多层次的生物学响应，不仅影响其基础代谢活动，还可能参与调控与血液处理及信息传递相关的生理功能。

2.6　核心差异基因的表达验证

为验证 RNA-Seq 测序结果的可靠性，从 ds*AaTryp1* 组与 DEPC 组筛选获得的差异表达基因中，选取表达显著上调和显著下调的基因各 5 个进行实时荧光定量 PCR（RT-qPCR）验证。以埃及伊蚊为研究对象，对上述候选基因的表达水平进行检测与分析。结果显示，所选 10 个差异基因的表达趋势与 RNA-Seq 分析结果一致，其中下调基因在 ds*AaTryp1* 组中呈显著下调表达（图 5：A-E），而上调基因则表现为显著上升


DsRNA_AaTryp1_vs_DEPC.火山图
DsRNA_AaTryp1_vs_DEPC.volcano
A
显著 Significant
上调 Up (47)
噪音 Nosig (16 503)
下调 Down (63)
−lg（P值）−lg(P-value)
log2倍数变化
log2 fold change
dsRNA_AaTryp1_vs_dsRNA_Gus.火山图
dsRNA_AaTryp1_vs_dsRNA_Gus.volcano
B
显著 Significant
上调 Up (29)
噪音 Nosig (16 481)
下调 Down (103)
热图（dsRNA_AaTryp1_vs_DEPC_G）Heatmap (dsRNA_AaTryp1_vs_DEPC_G)
C
DEPC_1
DEPC_2
DEPC_3
dsRNA_Try1_1
dsRNA_Try1_2
dsRNA_Try1_3
处理 Treatment

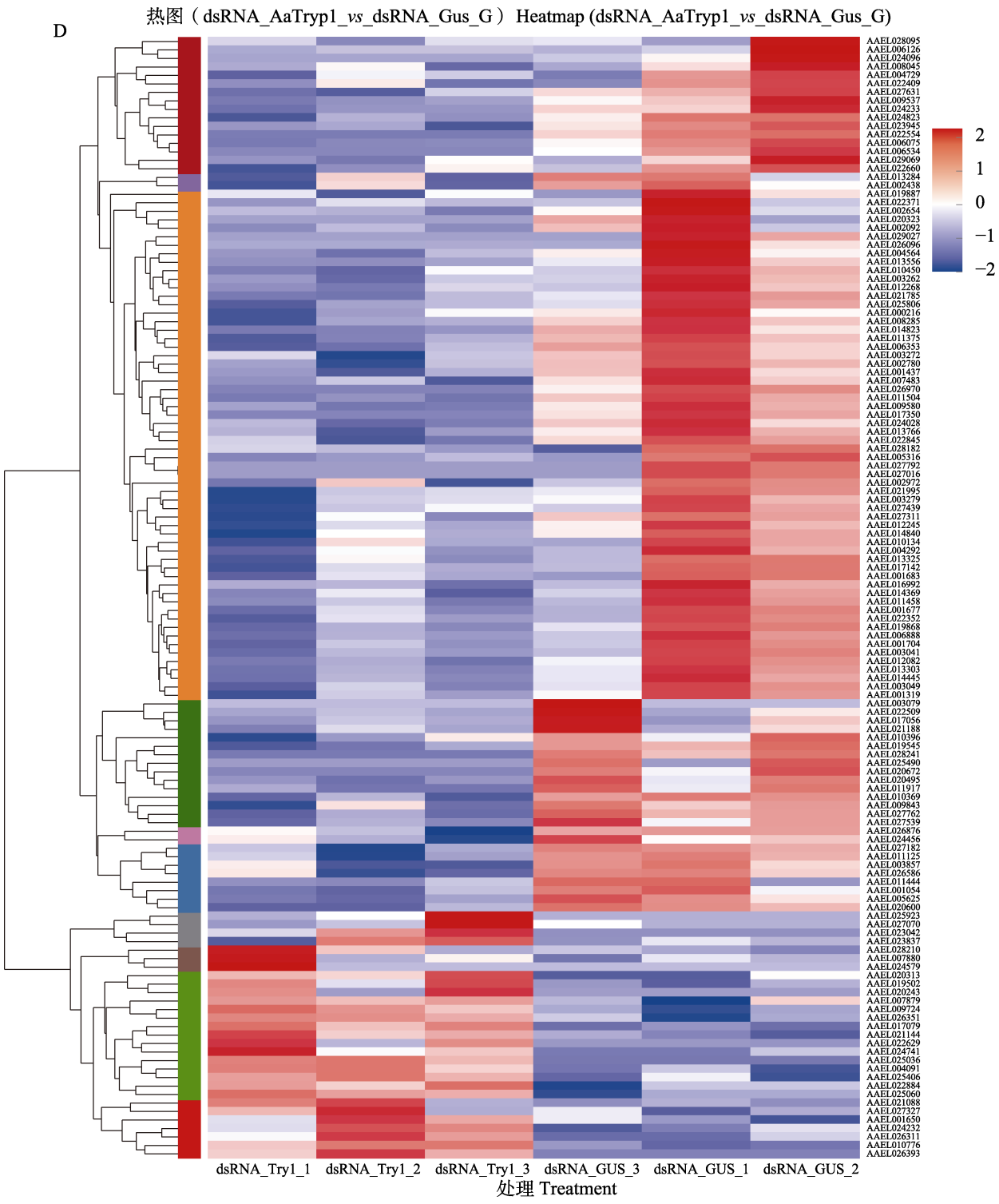


图 3　埃及伊蚊样品间差异表达基因火山图及聚类图

Fig. 3　Volcano plots and clustering analysis of differentially expressed genes (DEGs) among *Aedes aegypti* samples

A. *AaTryp1* 干扰组与 DEPC 组差异表达基因火山图；B. *AaTryp1* 干扰组与 ds*GUS* 组差异表达基因火山图；C. *AaTryp1* 干扰组与 DEPC 组差异表达基因聚类图；D. *AaTryp1* 干扰组与 ds*GUS* 组差异表达基因聚类图。

A. Volcano plot of DEGs between the *AaTryp1*-silenced group and the DEPC control group; B. Volcano plot of DEGs between the *AaTryp1*-silenced group and the ds*GUS* control group; C. Heatmap clustering of DEGs between the *AaTryp1*-silenced group and the DEPC control group; D. Heatmap clustering of DEGs between the *AaTryp1*-silenced group and the ds*GUS* control group.

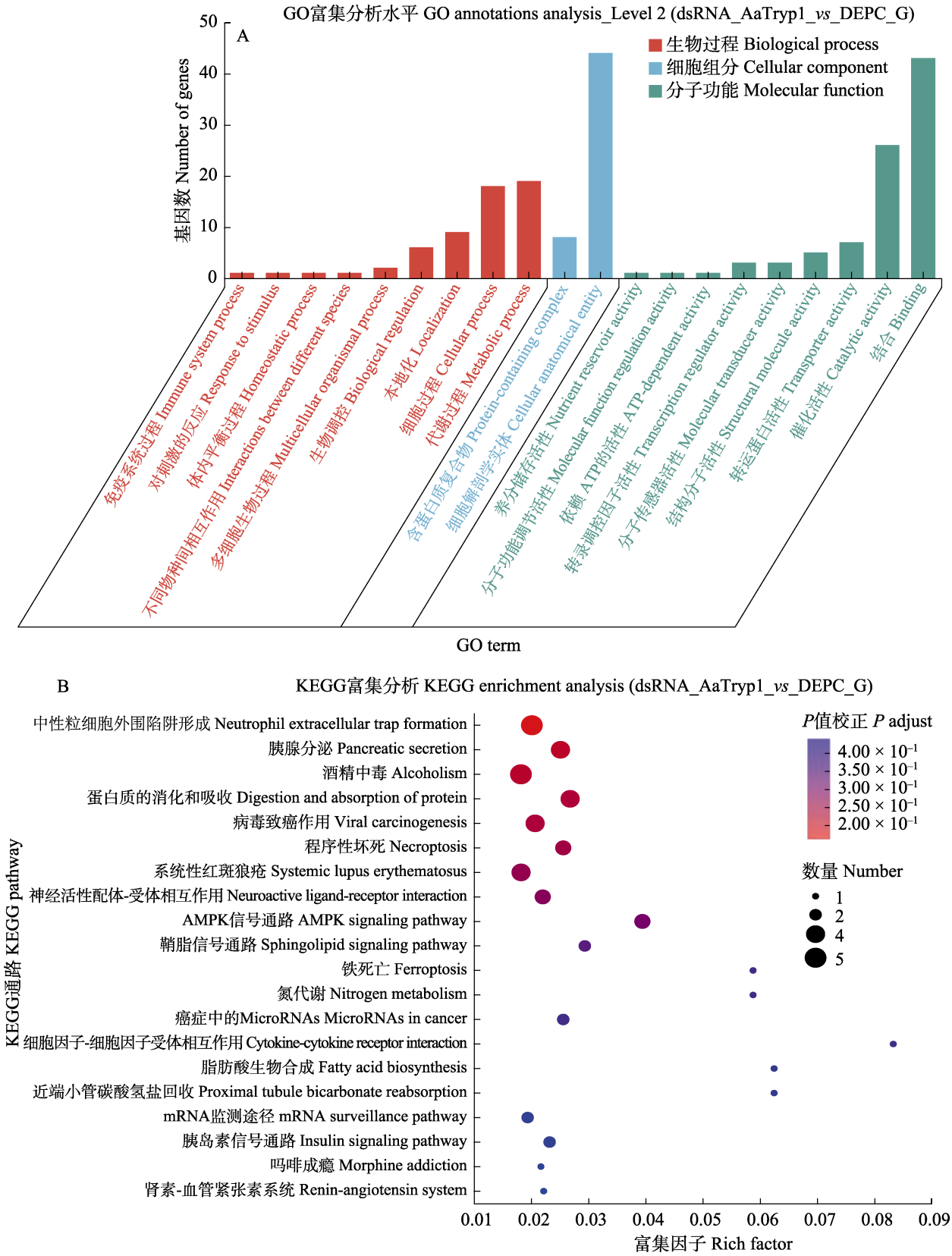


图 4　*AaTryp1* 干扰组与 DEPC 组样本间差异基因 GO term 分类统计（A）及差异基因 KEGG 富集分析（B）

Fig. 4　Gene ontology classification (A) and KEGG pathway enrichment analysis (B) of differentially expressed genes between the *AaTryp1*-silenced group and the DEPC control group

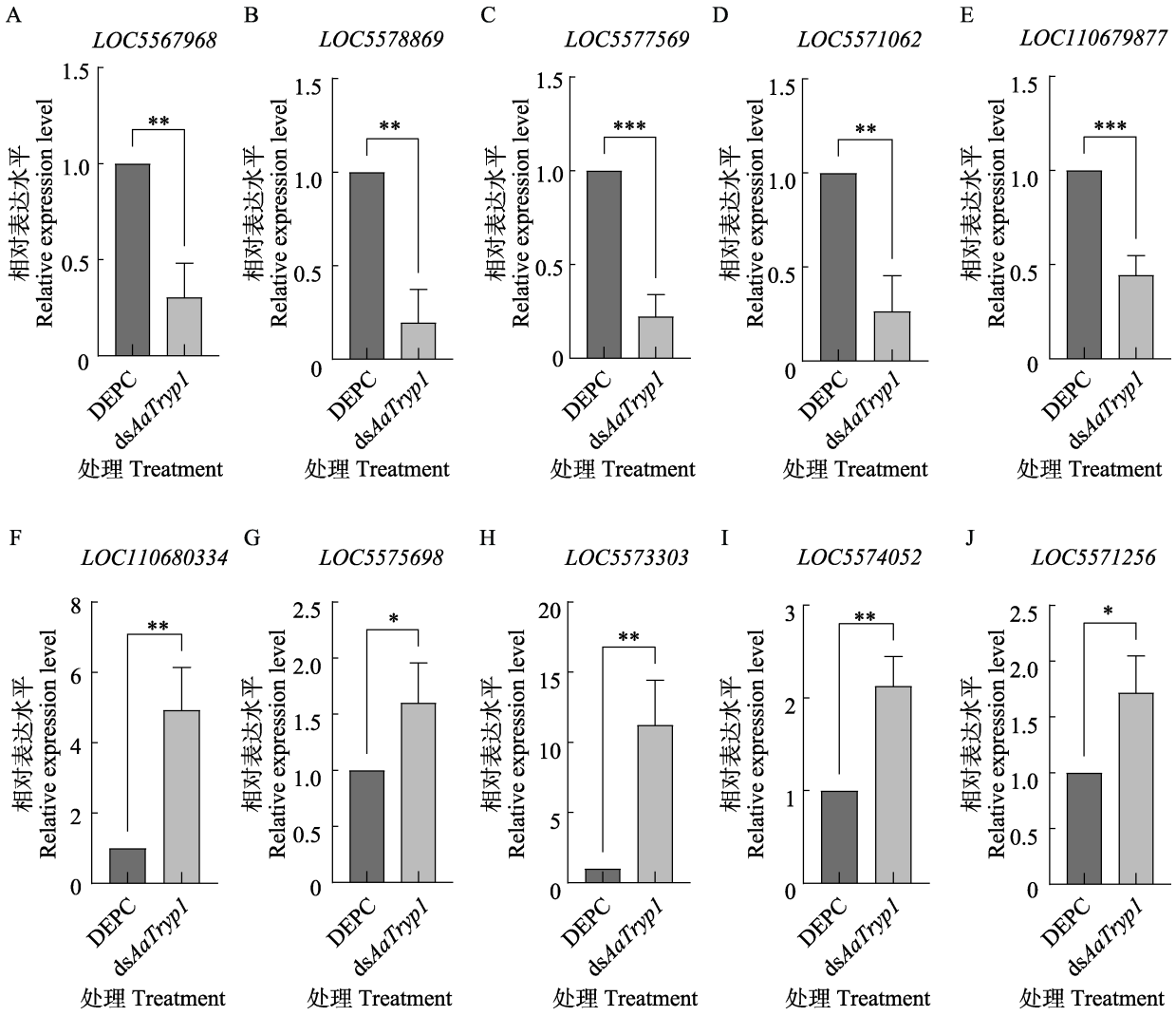


图 5　*AaTryp1* 干扰组与 DEPC 组样本间差异表达基因的 RT-qPCR 验证

Fig. 5　RT-qPCR validation of differentially expressed genes (DEGs) between the *AaTryp1*-silenced group and the DEPC control group

A-E. *AaTryp1* 干扰组与 DEPC 组中显著下调基因验证；F-J. *AaTryp1* 干扰组与 DEPC 组中显著上调基因验证。数据为平均值±标准误（$n = 3$），星号表示经 Student 氏 t 检验两组间差异显著（* $P < 0.05$，** $P < 0.01$，*** $P < 0.001$）。

A-E. Validation of significantly downregulated genes in the *AaTryp1*-silenced group compared with the DEPC control group; F-J. Validation of significantly upregulated genes in the *AaTryp1*-silenced group compared with the DEPC control group. Data in the figure are mean±SE ($n = 3$). Asterisks indicate statistically significant difference between the two groups as determined by Student's t-test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

（图 5：F-J）（$P < 0.05$）。上述结果表明，本研究获得的转录组测序数据具有较高的可靠性。

3　讨论

胰蛋白酶是丝氨酸蛋白酶家族的重要成员，长期以来主要被认为参与昆虫肠道蛋白质降解和营养吸收，但随着功能基因组学研究的深入，越来越多证据表明，胰蛋白酶家族成员的功能并不局限于消化代谢，还可能参与生殖发育、免疫调控及信号转导等多种生理过程。本研究首先对 *AaTryp1* 基因在其体内的表达特性进行分析。在此基础上，结合其表达特征，选取雌性成蚊作为研究材料，采用 RNAi 结合 RNA-Seq 策略，从整体转录响应角度分析了该基因沉默后的变化特征。结果显示，*AaTryp1* 被有效敲低后可引起蚊体内广泛的转录重塑，提示该基因可能在维持

吸血后机体多层次生理稳态中发挥重要作用。RNAi 结果表明，ds*AaTryp1* 注射后 *AaTryp1* mRNA 表达水平显著下降，干扰效率约为 80%，说明所设计 dsRNA 具有较好的特异性和沉默效果，也表明 RNAi 技术可在埃及伊蚊中较为稳定地用于功能基因分析；同时，转录组数据质量控制结果良好，样本间重复性较高，且核心差异基因的 RT-qPCR 验证结果与 RNA-Seq 趋势一致，进一步证实了测序分析结果的可靠性。

GO 富集结果显示，差异表达基因主要集中于代谢过程、细胞过程以及催化活性和结合活性等条目，提示 *AaTryp1* 沉默后首先影响的是机体基础代谢相关网络。值得注意的是，KEGG 富集结果显示，差异表达基因除富集于传统的消化吸收和免疫相关通路外，还显著涉及肾素-血管紧张素系统、神经活性配体-受体相互作用及脂肪酸生物合成等通路，提示 *AaTryp1* 的功能可能超出传统消化酶范畴，参与更广泛的生理调控网络。具体而言，肾素-血管紧张素系统相关通路的富集提示 *AaTryp1* 可能与吸血后体液稳态调节及血液处理过程有关；对于吸血昆虫而言，吸血后需要快速完成血液成分重排和多余水分排出，以维持渗透压平衡和代谢稳定（Sajadi *et al*., 2025），因此与血液处理相关的分子网络尤为重要，*AaTryp1* 沉默后该类通路发生变化，提示其可能间接参与吸血后血液状态调控、离子平衡或相关活性肽前体加工过程，但这一推测仍需后续结合生理指标和功能实验进一步验证。神经活性配体-受体相互作用通路的富集则表明，*AaTryp1* 可能影响神经肽或其他信号分子的成熟与转导；昆虫的取食、交配、产卵及飞行等行为均受神经内分泌系统精细调节（Helfrich-Förster, 2024; Ombuya *et al*., 2025; Konopińska *et al*., 2026），而多种神经肽需要经过蛋白酶加工后才具有生物活性（Hook *et al*., 2018），因此 *AaTryp1* 可能通过影响某些神经活性分子的加工过程，进而参与行为调控或生理节律维持。脂肪酸生物合成通路的显著富集说明 *AaTryp1* 沉默后可能影响脂质代谢与能量重塑，脂肪酸不仅是重要的能量储备物质，也是细胞膜合成和生殖发育所必需的代谢底物（O'Donoghue *et al*., 2025），对于吸血后快速进行卵巢发育的雌蚊而言，脂质代谢稳态至关重要，*AaTryp1* 表达下降后脂肪酸合成相关基因发生改变，提示该基因可能与能量分配、营养转化以及后续生殖准备过程存在关联。

综上，*AaTryp1* 在埃及伊蚊雌蚊中特异性表达，且在雌蚊吸血后 6 h 有显著表达的现象，值得注意的是，*AaTryp1* 不局限于中肠中表达，还在腿部和唾液腺这些与血液吸食和行为感官的部位高表达，由此选取成熟后雌蚊进行 *AaTryp1* 干扰沉默后所引发的转录变化也不局限于消化相关基因，而是涉及代谢、信号传导和能量利用等多个层面，提示其可能在埃及伊蚊体内发挥较为广泛的生理调控作用，尤其可能与吸血后血液处理、体液稳态维持及相关生理适应过程密切相关。本研究从转录组层面初步揭示了 *AaTryp1* 沉默后埃及伊蚊体内的系统性响应，说明该基因可能是连接消化代谢、血液处理和信号调控的重要节点之一，研究结果不仅丰富了昆虫胰蛋白酶家族的功能认识，也为蚊媒昆虫关键功能基因筛选及潜在干预靶标开发提供了参考。但需要指出的是，本研究主要基于转录水平变化进行分析，尚不能直接证明 *AaTryp1* 与上述通路之间存在因果关系。此外，差异表达基因在蛋白水平及表型层面的变化尚未得到验证，因此其具体生理功能及调控机制仍需进一步研究。未来可结合蛋白组学分析、关键分子互作验证以及相关生理表型测定，对 *AaTryp1* 在血液处理、体液稳态及行为调控中的具体作用进行深入解析，从而增强结论的因果性与生物学解释力度。

参考文献 (References)

Awais MM, Fei SG, Xia JM, Feng M, Sun JC, 2024. Insights into midgut cell types and their crucial role in antiviral immunity in the lepidopteran model *Bombyx mori*. *Frontiers in Immunology*, 15: 1349428.

Borges-Veloso A, Saboia-Vahia L, Dias-Lopes G, Domont GB, Britto C, Cuervo P, Jesus JBD, 2015. In-depth characterization of trypsin-like serine peptidases in the midgut of the sugar fed *Culex quinquefasciatus*. *Parasites & Vectors*, 8(1): 373.

Burt FJ, Chen WQ, Miner JJ, Lenschow DJ, Merits A, Schnettler E,

Kohl A, Rudd PA, Taylor A, Herrero LJ, Zaid A, Ng LFP, Mahalingam S, 2017. Chikungunya virus: An update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(4): e107–e117.

Chen J, Lu HR, Zhang L, Liao CH, Han Q, 2019. RNA interference-mediated knockdown of 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde synthase affects larval development and adult survival in the mosquito *Aedes aegypti*. *Parasites & Vectors*, 12(1): 311.

Chen J, Vavricka CJ, Wei SS, Nakazawa Y, Matsumoto Y, Chen HQ, Tang Y, Liang J, Chen JK, Huang YN, Noguchi K, Hasunuma T, Guan H, Li JY, Liao CH, Han Q, 2025. 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde synthase evolved an ordered structure to deliver oxygen to pyridoxal 5'-phosphate for cuticle assembly in the mosquito *Aedes aegypti*. *Nature Communications*, 16(1): 4486.

Chen J, Zhang L, Lu HR, Cong JH, Shang ZA, Liao CH, Han Q, 2018. Sequence characterization and expression analysis of cuticular gene AaCPR100A in *Aedes aegypti*. *Acta Parasitologica et Medica Entomologica Sinica*, 25(1): 18–22. [陈静, 张磊, 卢浩然, 从军灏, 商子昂, 廖承红, 韩谦, 2018. 埃及伊蚊表皮结构基因 AaCPR100A 序列特征和表达特性分析. 寄生虫与医学昆虫学报, 25(1): 18–22.]

Chen ZW, Halford NG, Liu CH, 2023. Real-time quantitative PCR: Primer design, reference gene selection, calculations and statistics. *Metabolites*, 13(7): 806.

Dedow LK, Oren E, Braybrook SA, 2022. Fake news blues: A GUS staining protocol to reduce false-negative data. *Plant Direct*, 6(2): e367.

Guo HS, Liu SX, Liu PQ, Jin WW, Li Z, Li WT, Kang XT, Sun GR, 2026. Effects of induced moulting on reproductive function and hypothalamic transcriptome changes in aging cocks. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 57(6): 3273–3287. [郭海山, 刘双星, 刘平泉, 金炜炜, 李烛南, 李文婷, 康相涛, 孙桂荣, 2026. 诱导换羽对老龄种公鸡生殖功能及下丘脑转录组变化的影响. 畜牧兽医学报, 57(6): 3273–3287.]

Helfrich-Förster C, 2024. Neuropeptidergic regulation of insect diapause by the circadian clock. *Current Opinion in Insect Science*, 63: 101198.

Hook V, Lietz CB, Podvin S, Cajka T, Fiehn O, 2018. Diversity of neuropeptide cell-cell signaling molecules generated by proteolytic processing revealed by neuropeptidomics mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 29(5): 807–816.

Konopińska N, Walkowiak-Nowicka K, Nowicki G, Keshavarz M, Chowański S, Rolff J, Urbański A, 2026. Tachykinin-related peptide signalling is important for the immune response of the mealworm beetle *Tenebrio molitor* L. *Frontiers in Immunology*, 17: 1725225.

Li Y, Guo G, Su PP, Zhao XY, Yang LB, Zhao WJ, Xiu JF, 2021. Transcriptome analysis of *Musca domestica* larvae with RNA interference of MDCht9 gene. *Genomics and Applied Biology*, 40(2): 569–577. [李妍, 国果, 苏佩佩, 赵欣宇, 杨隆兵, 赵文静, 修江帆, 2021. RNA 干扰 MDCht9 基因的家蝇幼虫的转录组分析. 基因组学与应用生物学, 40(2): 569–577.]

Lin ZN, Huang YQ, Liu SH, Huang QW, Zhang BL, Wang TP, Zhang ZD, Zhu XW, Liao CH, Han Q, 2023. Gene coexpression network during ontogeny in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *BMC Genomics*, 24(1): 301.

Lu YZ, Deng XY, Zhu QJ, Wu DH, Zhong JL, Wen L, Yu XQ, 2023. dsRNA delivery, targeting and application in pest control. *Agronomy*, 13(3): 714.

Luo RF, Lin B, Lu Y, Li Z, Shang ML, Lu YF, Xu WD, Zhang QH, 2026. Transcriptomic analysis of *Arthrinium arundinis* infecting moso bamboo and identification of key pathogenic genes. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 39(5): 1093–1101. [罗锐丰, 林斌, 卢颖, 李哲, 尚梦兰, 鲁泳锋, 许旺栋, 张清华, 2026. 芦竹节菱孢侵染毛竹的转录组分析及致病关键基因鉴定. 西南农业学报, 39(5): 1093–1101.]

Martins M, Ramos LFC, Murillo JR, Torres A, De Carvalho SS, Domont GB, Oliveira DMPD, Mesquita RD, Nogueira FCS, Maciel-de-Freitas R, Junqueira M, 2021. Comprehensive quantitative proteome analysis of *Aedes aegypti* identifies proteins and pathways involved in *Wolbachia pipientis* and zika virus interference phenomenon. *Frontiers in Physiology*, 12: 642237.

O'Donoghue AJ, Liu CX, Simington CJ, Montermoso S, Moreno-Galvez E, Serafim MSM, Burata OE, Lucero RM, Nguyen JT, Fong D, Tran K, Millan N, Gallimore JM, Parungao K, Fong J, Suzuki BM, Jiang ZZ, Isoe J, Rascón AA, 2025. Comprehensive proteolytic profiling of *Aedes aegypti* mosquito midgut extracts: Unraveling the blood meal protein digestion system. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 19(2): e0012555.

Ombuya A, Guo JY, Liu WX, 2025. Insect mating behaviors: A review of the regulatory role of neuropeptides. *Insects*, 16(5): 506.

Peng L, Zheng JH, Liu LL, Huang MQ, Cao MH, Cui JD, Vasseur L, You MS, Zou MM, 2025. Identification of seminal fluid proteins and reproductive function of trypsin-1 in male *Plutella xylostella*.

International Journal of Biological Macromolecules, 306: 141450.

Rodrigues NB, Godoy RSM, Orfano AS, Chaves BA, Campolina TB, Costa BDA, Félix LDS, Silva BM, Norris DE, Pimenta PFP, Secundino NFC, 2021. Brazilian *Aedes aegypti* as a competent vector for multiple complex arboviral coinfections. *The Journal of Infectious Diseases*, 224(1): 101–108.

Sajadi F, Scipio CD, Snan L, Paluzzi JP, 2025. Dynamics of release and activity of select neuropeptides post-bloodmeal in the female mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Experimental Biology*, 228(21): jeb250150.

Su PP, Guo G, Zhao XY, Yang LB, Zhu LJ, Tian ZQ, Zhu GM, Shang XL, 2021. Transcriptome analysis of *Musca domestica* larvae with RNAi of chitinase 2 gene. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 27(1): 177–184. [苏佩佩, 国果, 赵欣宇, 杨隆兵, 朱丽娟, 田竺青, 朱贵明, 尚小丽, 2021. 基于 RNA 干扰的家蝇几丁质酶 2 的幼虫转录组测序. 应用与环境生物学报, 27(1): 177–184.]

Sun P, Nie KX, Zhu YB, Liu Y, Wu P, Liu ZW, Du SY, Fan HH, Chen CH, Zhang RL, Wang PH, Cheng G, 2020. A mosquito salivary protein promotes flavivirus transmission by activation of autophagy. *Nature Communications*, 11(1): 260.

Weldon CW, Nyamukondiwa C, Karsten M, Chown SL, Terblanche JS, 2018. Geographic variation and plasticity in climate stress resistance among southern African populations of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Scientific Reports*, 8(1): 9849.

Zhang SW, Deng X, Wang L, Luo HT, Wang YQ, Wang Y, Li QZ, Wang HY, 2021. Identification and analysis of RNA interference-related enzyme gene families in *Setaria italica*. *Pratacultural Science*, 38(7): 1380–1392. [张司雯, 邓欣, 王龙, 罗皓天, 王禹茜, 王月, 李清竹, 王红艳, 2021. 谷子 RNA 干扰相关酶类基因家族的鉴定与分析. 草业科学, 38(7): 1380–1392.]

Zhang WJ, Zen WF, Duan WY, Cui GC, Niu L, Pan L, Sun SH, Liu P, 2026. Transcriptomic analysis of resistance mechanisms in peach *Prunus persica* in response to powdery mildew infection. *Journal of Fruit Science*, 43(6): 1407–1416. [张文君, 曾文芳, 段文宜, 崔国朝, 牛良, 潘磊, 孙世航, 刘普, 2026. 基于转录组学分析桃响应白粉病菌侵染的分子模式. 果树学报, 43(6): 1407–1416.]

Zhang XY, Mei HY, Nie PX, Hu XK, Feng JM, 2025. Future climate predicts range shifts and increased global habitat suitability for 29 *Aedes* mosquito species. *Insects*, 16(5): 476.

Zhao YJ, Li GQ, Wang YP, Jin QD, Deng DG, 2024. Screening of two genes related to the reproduction of *Daphnia similis* and their RNA interference study. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 48(1): 176–184. [赵雅洁, 李国庆, 王业平, 金齐德, 邓道贵, 2024. 两个与中华拟同形溞生殖相关基因的筛选及其 RNA 干扰研究. 水生生物学报, 48(1): 176–184.]

Zheng X, Wu FT, Zhao L, Zhou H, Zhou ZJ, Jia ZH, Shi F, 2024. Exploration of protease resources in the gut of omnivorous *Gryllotalpa orientalis* (Orthoptera: Gryllotalpidae). *Biology*, 13(9): 650.