分类号：Q965；Q966；Q7　　单位代码：10335
密　级：　　学　　号：11116030

Y3029140

浙江大学

博士学位论文

蝶蛹金小蜂毒液蛋白组成及其两个毒液蛋白功能与进化分析

Analysis of venom composition in *Pteromalus pupaurm* and the function and evolution of its two venom proteins

申请人姓名：严智超
指导教师：叶恭银　教授
John H. Werren 教授
专业名称：农业昆虫与害虫防治
研究方向：昆虫生理生化与分子生物学
所在学院：农业与生物技术学院

论文提交日期　二零一六年六月

Y3029140
(博)

分类号：Q965；Q966；Q7　　单位代码：10335

密　级：　　学　　号：11116030

浙江大学

博 士 学 位 论 文

蝶蛹金小蜂毒液蛋白组成及其两个毒液蛋白功能与进化的分析

Analysis of venom composition in *Pteromalus pupaurm* and the function and evolution of its two venom proteins

申请人姓名：严智超

指导教师：叶恭银　教授

John H. Werren 教授

专业名称：农业昆虫与害虫防治

研究方向：昆虫生理生化与分子生物学

所在学院：农业与生物技术学院

论文提交日期　二零一六年六月

Y3029140

蝶蛹金小蜂毒液蛋白组成及其两个毒液蛋白功能与进化的分析

论文作者签名：

指导教师签名：

论文评阅人：双向隐名评阅

答辩委员会主席：万方浩 教授 博导 中国农业科学院

委员：刘树生 教授 博导 浙江大学

冯明光 教授 博导 浙江大学

俞晓平 教授 博导 中国计量大学

张传溪 教授 博导 浙江大学

陈学新 教授 博导 浙江大学

叶恭银 教授 博导 浙江大学

答辩日期：二零一六年六月九日

Analysis of venom composition in *Pteromalus pupaurm* and the function and evolution of its two venom proteins

Author signature: Zhichao Yan

Supervisor signature: Gongyin Ye

Thesis reviewer: Anonymous

Chair: Prof. Fanghao Wan,
Chinese Academy of Agricultural Sciences

Committeeman: Prof. Shusheng Liu, Zhejiang University
Prof. Mingguang Feng, Zhejiang University
Prof. Xiaoping Yu, China Jiliang University
Prof. Chuanxi Zhang, Zhejiang University
Prof. Xuexin Chen, Zhejiang University
Prof. Gongyin Ye, Zhejiang University

Date of Oral Defence: 9 June, 2016

浙江大学研究生学位论文独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得**浙江大学**或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名：　　签字日期：2016 年 6 月 9 日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解**浙江大学**有权保留并向国家有关部门或机构送交本论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权**浙江大学**可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索和传播，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

（保密的学位论文在解密后适用本授权书）

学位论文作者签名：　　导师签名：

签字日期：2016 年 6 月 9 日　　签字日期：2009 年 6 月 9 日

本研究承蒙

国家重点基础研究发展规划（973）项目
（2013CB127600）

国家杰出青年科学基金项目

（31025021）

国家自然科学基金面上项目

（31272098；31472038）

资 助

目 录

致 谢 V

摘 要 VII

ABSTRACT IX

第一章 寄生蜂毒液研究进展 13

1 寄生蜂毒液蛋白组成的研究 13
2 寄生蜂毒液蛋白功能的研究 15
3 寄生蜂毒液蛋白进化的研究 17
3.1 寄生蜂毒液蛋白的进化选择压力 17
3.2 寄生蜂毒液蛋白基因的来源 18
3.4 寄生蜂毒液进化与寄生策略的关系 19
4 寄生蜂毒液蛋白的应用研究进展 19
5 寄生蜂毒液的研究方法进展及前景 20
6 结束语 22

第二章 蝶蛹金小蜂基因组测序及分析 23

1 材料与方法 23
1.1 供试昆虫 23
1.2 DNA 的制备 23
1.3 全基因 shotgun 测序 23
1.4 测序数据过滤 24
1.5 基因组组装拼接 24
1.6 重复序列注释 24
1.7 基因结构预测 25
1.8 基因功能预测 25
1.9 非编码 RNA 注释 26
1.10 基因家族聚类 26
1.11 进化树构建 26
1.12 分化时间估计 26
2 结果与分析 27
2.1 基因组测序及拼接 27
2.5 重复序列识别 28
2.6 基因结构及功能注释 29
2.7 非编码 RNA 注释 30
2.8 进化相关分析 30
3 讨论 33

第三章 蝶蛹金小蜂毒液蛋白组成分析 34

1 材料与方法 34
1.1 供试昆虫 34
1.2 毒腺解剖和 RNA 提取 34
1.3 cDNA 文库构建及测序 35

1.4 转录组数据分析 35
1.5 毒液蛋白相似性比较分析 35
1.6 毒液蛋白的提取 36
1.7 LC-MS/MS 蛋白质谱鉴定 36
1.8 定量 qPCR 37
1.9 Westren blot 37
1.10 数据上传 37
2 结果与分析 39
2.1 蝶蛹金小蜂转录组的拼接及分析 39
2.2 蝶蛹金小蜂毒液蛋白质组鉴定 43
2.3 结合转录组及蛋白质组鉴定蝶蛹金小蜂毒液蛋白 43
2.4 蝶蛹金小蜂毒液蛋白与丽蝇蛹集金小蜂及其他内寄生蜂毒液蛋白的比较分析 44
2.5 蝶蛹金小蜂和丽蝇蛹集金小蜂毒液蛋白的抗体检测 48
3 讨论 48
第四章 蝶蛹金小蜂毒液 SERPIN 剪接体的分析 58
1 材料与方法 58
1.1 供试昆虫 58
1.2 毒液蛋白提取 58
1.3 寄主血淋巴收集 58
1.4 PO 活性检测 59
1.5 毒液蛋白分离 59
1.6 分离蛋白的鉴定 59
1.7 特异性 RT-PCR 60
1.8 序列分析 61
1.9 重组蛋白的表达及纯化 61
1.10 Pull-down 试验 62
1.11 抗体制备 62
1.12 Western Blotting 62
2 结果与分析 62
2.1 蝶蛹金小蜂毒液对寄主黑化反应的影响 62
2.2 毒液 Serpin 可变剪接体的分离及鉴定 65
2.3 序列分析 67
2.4 剪接体特异的 RT-PCR 69
2.5 重组 *Pp*SVI 蛋白对寄主黑化反应的影响 71
2.6 潜在靶标蛋白的鉴定 73
3 讨论 75
第五章 蝶蛹金小蜂犬尿氨酸转氨酶毒液蛋白的分析 77
1 材料与方法 77
1.1 供试昆虫 77
1.2 毒液蛋白提取 77
1.3 毒液蛋白的分离 77
1.4 细胞死亡检测 77
1.5 SDS-PAGE 及蛋白染色 78

1.6 序列分析 78
1.7 昆虫中犬尿氨酸通路相关基因的注释 78
1.8 进化分析 78
2 结果与分析 78
2.1 毒液蛋白分离及鉴定 78
2.2 犬尿氨酸相关通路的注释 81
2.3 犬尿氨酸转氨酶毒液蛋白基因的进化分析 82
3 讨论 84
第六章 总讨论 87
1 蝶蛹金小蜂毒液组分 87
2 蝶蛹金小蜂毒液功能 88
3 蝶蛹金小蜂毒液进化 88
4 本研究创新之处 89
5 研究中存在的问题 89
6 今后的研究方向 90
参考文献 91

致 谢

九年前，怀揣着梦想和对科学的景仰，我来到了浙江大学，这座美丽的学府。然而，光阴似箭，落笔之时，已意味着一段求学生涯的终结。求学路上，几多欢喜，几多忧愁，感谢命运的安排，让我有幸结识了这许多良师益友！

“饮其流时思其源，成吾学时念吾师。”我首先要感谢恩师叶恭银教授,衷心感谢恩师在过去的五年中，在我学习和科研生活中所倾注的大量时间和心血！恩师广博的学识、宽厚的胸怀、严谨的治学精神和一丝不苟的工作作风，令人钦佩，是我一生学习的榜样。恩师不厌其烦地教导我如何治学，如何做人，并毫无保留地与我分享他丰富的生活和科研经验。他也给我提供了很多锻炼自己的机会，在科研事业上对我一如既往地强烈支持，这一切都令我终生难忘。这些不仅成为我美好的回忆，而且将成为我一笔宝贵的人生财富，令我受益终生。

论文的顺利完成，也必须感谢课题组姚洪渭副教授、黄佳副教授和方琦博士在我日常学习、科研、工作及生活中给与的指导、帮助、关心与支持。在此也由衷感谢罗彻斯特大学的 John Werren 教授。John Werren 教授为人亲和，治学严谨，给与了我许多启发性的建议和创新性的思路，为我打开了一个新的学术视野。也感谢美国密苏里-堪萨斯城大学的余小强教授、密苏里-哥伦比亚大学的宋齐生教授，以及美国农部专家 David Stanley 教授在实验中对我实验的大力帮助与支持。另特别感谢叶恭堂在实验材料准备中提供的鼎力支持，使得实验得以顺利进行。

“同窗之情铭记终身，朋友之义永不忘怀。”首先感谢张忠、蔡骏、朱家颖和吴玛莉博士无私的学术交流和资料赠予，为我学业的完成提供了宝贵意见和指引。还要特别感谢昆虫生理生化实验室的各位师兄师姐师弟师妹在实验和生活中给予的帮助，包括已经毕业的王磊、田俊策、陈洋、慎小晶、常雪、卢增斌、吴顺凡、钱岑、朱宇、祖风、王伟、孙方达、郭燕、程璐、姚尧、蒋鹏凌、刘玉娥、韩乃顺、夏仁英、巨青松、刘洋，还有即将一起毕业的徐刚、齐易香、阿力、宁铎、武亚苏、陈利鹏和杜玉萍，祝他们一帆风顺，前程似锦。也十分感谢仍在读的王飞、汪芳、滕子文、肖山、杨蕾、杨磊、王嘉乐、王前进、贾文茜、党聪、王蓓蓓、陈晓昂、李萌琪、顾桂香、常学飞、王龙、李晶晶、熊时姣、毛芬、方绍亮和黄天宇，祝他们顺利完成学业，奔赴美好未来。

此外，我还要感谢父母、家人和女友一直以来的无私支持、默默奉献，与我共同承担

学业上的几许艰辛和人生旅途上的风风雨雨。而我年近而立，却仍未有安身立命之所，心中有愧。你们也是我坚持拼搏，奋勇向前的支撑与动力。

论文完成之际，感慨万千，谨向所有关心、帮助和支持过我的老师、同学和朋友们表示衷心的谢意，感谢生命中有大家的陪伴！

严智超

2016年6月于杭州•浙江大学紫金港

摘 要

寄生蜂是最为丰富多样的昆虫种群之一，同时也是重要的生态调节因子和害虫天敌资源。寄生蜂有两种基本的寄生策略。内寄生蜂将卵产在寄主体内，而外寄生蜂则将卵产在寄主表面。蝶蛹金小蜂 *Pteromalus puparum* 是蛹期内寄生蜂，可寄生包括重要农业害虫菜青虫 *Pieris rapae* 在内的多种蝶类。蝶蛹金小蜂是 Pteromalinae 亚科中一个相对近期从外寄生进化为内寄生的代表种。因而，通过与模式外寄生蜂丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis* 的比较，蝶蛹金小蜂提供了研究内外寄生蜂差异和进化的良好系统。与丽蝇蛹集金小蜂类似，毒液是其寄生过程中主要的寄生因子，可调控寄主的免疫和代谢等系统，进而促进寄生蜂后代的发育。在本论文中，我们解析了蝶蛹金小蜂毒液蛋白的组成，并探索了其中两个毒液蛋白的功能和进化。

1 蝶蛹金小蜂基因组测序与分析

为了更好地获得信息背景用于进一步的毒液研究，我们对蝶蛹金小蜂基因组进行了测序和拼接。拼接所得的蝶蛹金小蜂基因组大小为 338.1 Mb，其中 contig N50 为 38.7 Kb，scaffold N50 为 1.16 Mb。 在该基因组中，204 个 miRNA、140 个 rRNA、52 个 snRNA 和 20 个 snoRNA 得到注释。同时，14946 个蛋白编码基因得到注释，其中 90%的基因拥有至少一个功能注释。进化分析结果显示，蝶蛹金小蜂与丽蝇蛹集金小蜂亲缘关系最近，他们之间的分化时间大约为 30.0719 个百万年。

2 蝶蛹金小蜂毒液蛋白组成分析

为了为寄生蜂后代营造更适宜的生存环境，内外寄生蜂均将毒液注入寄主，并调控寄主的免疫、代谢和发育等。采用转录组和蛋白质组结合的方法，我们在蝶蛹金小蜂毒液中鉴定到 70 个候选毒液蛋白，并对其中 34 个和 8 个毒液蛋白分别采用了实时定量 PCR 和 western blot 进行验证。较之与其他已报道的内寄生蜂毒液蛋白，这些毒液蛋白中的大部分与丽蝇蛹集金小蜂具有更高的序列相似度。另外，13 个蝶蛹金小蜂毒液蛋白只与其他内寄生蜂毒液蛋白有相似性，而不能在丽蝇蛹集金小蜂毒液中被检测到。这些蛋白可能在蝶蛹金小蜂适应内寄生过程中起到一定作用。

3 蝶蛹金小蜂毒液 Serpin 剪接体的分析

为了确保成功寄生，寄生蜂将毒液注入寄主，以抑制黑化反应在内的寄主免疫系统。实验结果表明，蝶蛹金小蜂毒液可在体外抑制寄主血淋巴的黑化，并且该抑制作用具有剂

量效应。采用基于活性追踪的分离纯化方法，我们在蝶蛹金小蜂毒液中鉴定到一个 Serpin 基因的剪接体蛋白，并命名为 *Pp*SVI。该毒液基因至少具有 15 个可变剪接形式。RT-PCR 结果显示，该 *Pp*SVI 毒液剪接体在毒腺中特异性高表达。重组表达的 *Pp*SVI 蛋白也具有抑制寄主 PPO（Prophenoloxidase，酚氧化酶原）通路激活的功能，但不能抑制已经激活的酚氧化酶（Phenoloxidase，PO）的活性。Pull down 实验结果显示，*Pp*SVI 可与寄主的血淋巴蛋白形成 SDS 稳定的复合体。采用 LC-MS/MS 质谱鉴定，菜青虫血淋巴蛋白酶 *Pr*HP8 和 *Pr*PAP1 分别在与复合体中被鉴定到。另，复合体中 *Pr*HP8 和 *Pr*PAP1 的存在进一步被 western blot 所确证。

4 蝶蛹金小蜂毒液犬尿氨酸转氨酶（Kynurenine aminotransferase，KAT）的分析

为了确保成功寄生，寄生蜂毒液还常被用以调控寄主的细胞免疫。前期结果显示，蝶蛹金小蜂毒液可以诱导其寄主血细胞和一些昆虫细胞系的死亡。通过基于活性追踪的分离纯化方法，一个犬尿氨酸转氨酶在其毒液中被鉴定到，可能起到诱导受害细胞死亡的作用。通过对多种昆虫全基因组的注释，发现犬尿氨酸代谢途径中的 Indoleamine indoleamine (IDO) 和 3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase (HAAO) 基因已经在昆虫中丢失，从而丧失了从头合成烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（Nicotinamide adenine dinucleotide，NAD）的能力。因此，该毒液犬尿氨酸转氨酶并不是通过抑制 NAD 合成来诱导细胞死亡，其作用机理有待进一步研究。同时，该犬尿氨酸转氨酶基因家族在蝶蛹金小蜂和丽蝇蛹集金小蜂基因组中曾发生过大量的基因复制。进化树结果暗示，该毒液基因可能源自于非毒液基因的复制事件，其在复制过程中获得了信号肽，并最终被招募为毒液蛋白。

在本论文中，我们测序组装了蝶蛹金小蜂的基因组序列，同时也利用转录组和蛋白质组的方法，解析了蝶蛹金小蜂的毒液蛋白组成。基于活性追踪的分离纯化，我们从中鉴定到一个毒液 Serpin 可变剪接体，可抑制寄主血淋巴的 PPO 激活，还鉴定到一个犬尿氨酸转氨酶可能参与诱导寄主血细胞的死亡。结合基因组序列信息，我们进一步对这两个毒液蛋白的进化来源进行了分析。其中，毒液 Serpin 剪接体可能是通过可变剪接的形式被招募至毒液，而犬尿氨酸转氨酶则可能通过基因复制最终进化成毒液蛋白。这些结果部分揭示了寄生蜂毒液抑制寄主免疫的机理，也为寄生蜂毒液蛋白进化提供了新的见解，同时也为今后更详尽地解析蝶蛹金小蜂毒液蛋白功能和进化提供了坚实的背景信息。

关键词：蝶蛹金小蜂，毒液，内寄生蜂，免疫，进化

Abstract

Parasitoid wasps, being invaluable in classical and augmentative biological control of various insect pests, are among the most abundant and diverse insects on earth. They have two basic lifestyles. Endoparasitoids lay their eggs into internal body of the host, whereas ectoparasiotids lay on the external surface of their hosts. *Pteromalus puparum* is a pupal endoparasitoid wasp that parasitizes a number of butterflies including the agricultural pest small cabbage white butterfly, *Pieris rapae*. *Pteromalus puparum* represents a relatively recent evolution of endoparasitism within the subfamily Pteromalinae, and thus may provide a good model for comparative studies with *Nasonia vitripennis* to better understand the differences and evolutionary relationship between endo- and ectoparasitoids. Similar to *N. vitripennis*, venom from *P. puparum* is considered to be the major maternal factor that alters both the host immunity and physiology to facilitate the development of progenies. In this thesis, we investigated the venom composition of *P. puparum*, also explored the function and evolution of two individual venom proteins.

1 Sequencing and analysis of *P. puparum* genome

To get a better information background for further venom studies, we sequenced and assembled the genome of *P. puparum*. The assembled genome is 338.1 Mb with contig N50 38.7 Kb and scaffold N50 1.16 Mb. Further, 204 miRNA, 140 rRNA, 52 snRNA and 20 snoRNA were annotated. Simultaneously, 14946 genes were also identified. 90% of these 14946 genes showed at least one functional annotation. Phylogenetic showed *P. puparum* is closely related to *N. vitripennis*, their estimated divergent time is around 30 Mya.

2 Analysis of *P. puparum* of venom composition by combination transcriptomic and proteomic approaches

To make a more conducive environment for the wasps' young, both ecto- and endoparasitoids inject venoms into the host to modulate host immunity, metabolism and development. Endoparasitoids have evolved from ectoparasitoids independently in different hymenopteran lineages. *Pteromalus puparum*, a pupal endoparasitoid of various butterflies, represents a relatively recent evolution of endoparasitism within pteromalids. Using a combination of transcriptomic and proteomic approaches, we have identified 70 putative venom proteins in *P. puparum*. Most of them show higher similarity to venom proteins from the related ectoparasitoid *N. vitripennis* than from other more distantly related endoparasitoids. In addition, 13 venom proteins are similar to venoms of distantly related endoparasitoids but have no

detectable venom matches in *Nasonia*. These venom proteins may have a role in adaptation to endoparasitism.

3 Analysis of a Serpin venom splicing isoform from *P. puparum*

To ensure successful parasitism, parasitoid wasps inject venom with their eggs into host to suppress the host immune responses which includes melanization. Venom from *Pteromalus puparum,* a pupal endoparasitoid wasp, inhibited melanization of host hemolymph *in vitro* in a dose-dependent manner. Using assay guided fraction, a serpin splicing isoform with PO inhibitory activity was further separated and identified in *P. puparum* venom, and named as *P. puparum* serpin venom isoform (*Pp*SVI). This serpin gene has at least 15 splicing isoforms that differ only in the C-terminal region which contain the reactive center loop. RT-PCR results showed that the identified serpin isoform in venom was differentially expressed in venom gland. Recombinant *Pp*SVI was demonstrated to suppress host's PPO activation in a dose-dependent manner rather than to inhibit PO activity directly. Pull down assays showed that *Pp*SVI formed SDS-stable complexes with host hemolymph proteins. *Pr*HP8 and *Pr*PAP1 were identified in the complexes by LC-MS/MS. The presence of *Pr*HP8 and *Pr*PAP1 in the complexes was further confirmed by immunoblot.

4 Analysis of a kynurenine aminotransferase (KAT) venom protein from *P. puparum*

To ensure successful parasitism, parasitoid wasps also often inject their venom to modulate the host's hemocytes. *Pteromalus puparum* venom has been shown to induce the mortality of both host hemocytes and other insect cell lines. Using assay guided fraction, a kynurenine aminotransferase was identified in *P. puparum* venom with a potential role in inducing hemocytes' mortality. By genome-wide annotation, we found that indoleamine indoleamine (IDO) and 3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase (HAAO) in kynurenine pathway have been lost in insects, and insects didn't has the ability to *de novo* synthesize NAD. Thus the identified KAT venom protein is not likely to induce cell mortality by inhibiting NAD synthesis. Furthermore, KAT gene have been intensively duplicated in the genome of both P. puprum and *N. vitripennis*. Phylogenetic result indicated that this venom protein might evolved from duplication of a non-venom protein. During gene duplication, this gene got its signal peptide and was finally recruited into venom.

Overall, we sequenced and assembled the genome of *P. puparum*, and revealed its venom composition by combination of both transcriptomic and proteomic approaches. Using assay guided fraction, we identified a serpin venom splicing isoform which inhibited host's PPO activation, and also a kynurenine aminotransferase venom protein which might have a role in inducing mortality of host's hemocytes. Furthermore, using the genomic sequence information,

we inferred the evolutionary sources of these two venom proteins. Serpin venom splicing isoform may be recruited by alternative splicing, and kynurenine aminotransferase venom protein is likely to be recruited by gene duplication. These results lay the groundwork for more detailed studies of venom function and evolution, also partially revealed the mechanism of how parasitoid venom inhibit host's immunity, and made a contribution to gaining insights into parasitoid venom evolution.

Keywords: *Pteromalus puparum*, venom, endoparasitoid, immunity, evolution

此页不缺内容

第一章 寄生蜂毒液研究进展

寄生蜂是膜翅目寄生性昆虫，其种类繁多，已知有10万余种，据估计可达60万余种(Heraty 2009)，其多样性远远超过其他带毒节肢动物，如蜜蜂、蜘蛛、蝎子等。按寄生位置不同，寄生蜂可分为内寄生蜂和外寄生蜂(Asgari & Rivers 2011)。按是否允许寄主继续发育，可分为容性寄生寄生蜂和抑性寄生蜂(Pennacchio & Strand 2006; Whitfield 2003)。按所寄生的寄主发育阶段不同，可分为卵期寄生蜂、幼虫期寄生蜂、蛹期寄生蜂和成虫期寄生蜂，还有跨期寄生蜂(Pennacchio & Strand 2006; Whitfield 2003)。寄生蜂群体具有多种寄生策略，寄主范围广泛，占据了丰富多样的生态位，是不可或缺的生态调节因子。寄生蜂对其自然寄主、甚至非自然寄主的种群调控起到很大作用，对生态稳定和多样性维持发挥有重要影响(Condon *et al.*, 2014)。同时，寄生蜂也是重要的害虫天敌资源，被广泛用于控制各种农业和卫生害虫，在害虫生防领域中起到关键的作用(Asgari & Rivers 2011)。

毒液为寄生蜂所保守共有，是寄生蜂成功寄生的关键因子(Pennacchio & Strand 2006)。寄生蜂毒液注入寄主，可用于协助多分DNA病毒（PDV，polydna virus）或独立调控寄主的行为、免疫、发育和代谢等，最终帮助寄生蜂成功寄生，使其后代顺利发育(Asgari & Rivers 2011)。寄生蜂毒液在与寄主协同进化过程中，也产生了丰富的多样性，其中所含的活性蛋白具有丰富多样的分子结构、靶标和功能。因而，寄生蜂毒液与其他节肢动物如蜜蜂、蜘蛛、蝎子等一样，也是重要的基因资源宝库，在药物开发和杀虫蛋白筛选中将会挥发其潜在作用(Moreau & Guillot 2005)。

本章主要就寄生蜂毒液蛋白组成、功能和进化，对近期研究进行综述，并探讨寄生蜂毒液研究中所采用的方法及应用前景，尝试提出寄生蜂毒液研究中存在的问题及未来可能的发展方向。

1 寄生蜂毒液蛋白组成的研究

随着技术的发展，寄生蜂毒液蛋白组成的研究也在不断进步。Leluk等人（1989）对25种膜翅目毒液进行SDS-PAGE分析比较，发现寄生蜂毒液蛋白组成与其他社会性膜翅目毒液有明显不同(Leluk *et al.*, 1989)。社会性膜翅目如蜜蜂、蚂蚁，以及其他研究较多的带毒节肢动物如蜘蛛、蝎子和蜈蚣等，其毒液主要组成为小肽，而寄生蜂毒液则以大分子蛋白

为主，有些寄生蜂毒液中甚至缺乏20kD以下的蛋白/小肽组分(Leluk *et al.*, 1989)。此后，较早期的寄生蜂毒液组成研究常采蛋白分离鉴定、cDNA文库筛选等方法(Crawford *et al.*, 2008; Parkinson *et al.*, 2002; Parkinson *et al.*, 2004)。Parkinson等人利用毒液蛋白分离后N端测序和毒腺cDNA文库筛选结合的方法，先后在寮黑瘤姬蜂*Pimpla hypochondriaca*中鉴定到19个毒液蛋白(Parkinson *et al.*, 2002; Parkinson *et al.*, 2004)。Crawford等人（2008）等人对*Microctonus hyperodae*采用毒腺cDNA文库测序，并对其中3条毒液蛋白主带进行质谱鉴定，共获得了8条毒液基因的全长(Crawford *et al.*, 2008)。在蝶蛹金小蜂中，朱家颖等人利用cDNA文库筛选，也获得了酸性磷酸酶、碱性磷酸酶等多个毒液蛋白序列(Zhu *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2008)。然而，不论是毒液分离鉴定还是cDNA文库筛选，通量都相对较低，并对一些低丰度的毒液蛋白缺乏鉴定能力。近期，随着高通量测序和蛋白质组技术的进步和普及，越来越多的寄生蜂毒液组成研究采取了蛋白质组结合基因组或转录组的分析策略。de Graaf等人（2010）基于*Nasonia vitripennis*基因组信息，利用蛋白质质谱鉴定到79个毒液蛋白，其中16个毒液蛋白与其他已报道序列均没有相似性(de Graaf *et al.*, 2010)。另，利用转录组和蛋白质组结合的方法，毒液蛋白组成相继在棉大卷蛾甲腹茧蜂*Chelonus inanitus(Vincent et al., 2010)*、波氏匙胸瘿蜂*Leptopilina boulardi(Colinet et al., 2013; Goecks et al., 2013)*、隆脊匙胸瘿蜂*L. heterotoma*、*Hyposoter didymator*、阿尔蚜茧蜂*Aphidius ervi(Colinet et al., 2014; Nguyen et al., 2013)*和蝶蛹金小蜂*P. puparum(Yan et al., 2016)*等中被解析。

总体来说，寄生蜂毒液蛋白组成较之社会性膜翅目昆虫更为丰富。Leluk等人通过SDS-PAGE分析发现，寄生蜂毒液蛋白较之社会性膜翅目毒液具有更多的蛋白条带(Leluk *et al.*, 1989)。de Graaf等人也发现丽蝇蛹集金小蜂*N. vitripennis*毒液蛋白的组成远比意大利蜜蜂*Apis mellifera*的毒液组成要复杂(de Graaf *et al.*, 2010)。这可能是由于寄生蜂毒液与寄主协同进化过程中需要作用于更多寄主靶标。但寄生蜂在不同物种中的毒液数量也存在明显的差异。蝶蛹金小蜂和丽蝇蛹集金小蜂毒液各有70和79个蛋白质/肽(de Graaf *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2016)，波氏匙胸瘿蜂*L. boulardi*和隆脊匙胸瘿蜂*L. heterotoma*各有129和176个(Goecks *et al.*, 2013)，而携带有多分DNA病毒PDV的棉大卷蛾甲腹茧蜂*C. inanitus(Vincent et al., 2010)*、毁侧沟茧蜂*Microplitis demolitor*(Burke & Strand 2014)和阿尔蚜茧蜂*A. ervi(Colinet et al., 2014)*则各有20、30和16个。这些结果提示，携带PDV的寄生蜂毒液可能具有更少的毒液数目和种类。这可能是由于PDV在一定程度上替代了毒液的功能，使毒液所需的种类和数目减少。但鉴于各个寄生蜂间采取的研究方法不尽相同，且样本量太少，

仍不足以得出确切的结论。

另，从毒液蛋白组成来看，寄生蜂毒液呈现了丰富的多样性。远源物种间，各个寄生蜂中均存在一些特异的未知毒液蛋白。寄生蜂近源物种间的毒液也存有较大差异(Colinet *et al.*, 2013; Goecks *et al.*, 2013)。甚至，寄生蜂毒液在种群层面也存在丰富的个体多样性(Colinet *et al.*, 2013)。从毒液蛋白的种类上来看，有些蛋白种类似乎更倾向于被招募致寄生蜂毒液中，类似的现象在蜘蛛、海螺、蛇等毒液研究中也被发现。在寄生蜂中，大多数毒液蛋白为酶类，其次是半胱氨酸富集蛋白/肽如蛋白酶抑制剂、Antigen等(Yan *et al.*, 2016)。其中蛋白类别如丝氨酸蛋白酶、金属蛋白酶、Easterase、Calreticulin、Antigen等为多种寄生蜂毒液所共有。

至今，寄生蜂毒液组成的研究虽然已有一定的发展，但仍存在明显的不足。10万多种已报道的寄生蜂中，仍仅有不到20个物种的毒液组成被解析！另，虽然寄生蜂毒液中以大蛋白为主，但多个研究结果表明寄生蜂毒液中也存在小肽并起到重要的功能(Asgari *et al.*, 2003; Parkinson *et al.*, 2002)。而通常采用的蛋白质组鉴定方法，SDS-PAGE无法有效截留毒液小肽，尤其当缺乏基因组信息时，毒液小肽十分容易被忽略。因而，寄生蜂毒液中的小肽组分更有待进一步分析。

2 寄生蜂毒液蛋白功能的研究

毒液是膜翅目昆虫所保守共有的，但其毒液功能却有较大的差别。社会性膜翅目毒液与其他节肢动物如蜘蛛、蝎子等类似，主要用于取食和防御，其作用靶标主要集中在神经、肌肉、心血管系统等(Schwartz *et al.*, 2012)。而寄生蜂毒液随卵一起注入寄主，为使其后代在寄主体内存活发育，总体来说，除了调控寄主神经系统外，还需抑制寄主免疫，调节寄主发育，改变寄主代谢等等，其功能与作用靶标更为丰富多样(Asgari & Rivers 2011; Zhu *et al.*, 2011)。

寄生蜂毒液的功能还和寄生蜂种类及寄生策略等相关。在不携带PDV的寄生蜂中，毒液起到了调控寄主的主要作用，而在携带PDV的寄生蜂中，毒液往往起到辅助增效作用，在一些姬蜂系统中，毒液甚至未见有明显功能(Doremus *et al.*, 2013)。再如，抑性外寄生蜂毒液常具有神经毒性，可造成寄主发育停止甚至死亡。而容性内寄生蜂毒液则鲜有神经毒性，主要用于调控寄主免疫、发育和代谢等生理过程。

迄今，已有部分寄生蜂毒液蛋白的功能得到了解析。这些研究主要集中于金小蜂亚科

的丽蝇蛹集金小蜂*N. vitripennis*和蝶蛹金小蜂*P. puparum*、果蝇寄生蜂匙胸瘿蜂*Leptopilina*和缨蜂*Ganaspis*，以及菜粉蝶微红绒茧蜂*Cotesia rubecula*、阿尔蚜茧蜂*A. ervi*、寮黑瘤姬蜂*P. hypochondriaca*等几个代表物种。

菜粉蝶微红绒茧蜂*C. rubecula*毒液中的Vn50蛋白，通过与寄主PPO、PAP等互作，可以抑制寄主的PPO激活(Asgari *et al.*, 2003)。波氏匙胸瘿蜂*L. boulardi*毒液中的Serpin(Colinet *et al.*, 2009)也被阐明可以抑制寄主PPO通路的激活，推测其潜在靶标为PPO通路上的某丝氨酸蛋白酶。而波氏匙胸瘿蜂*L. boulardi*中的另一毒液蛋白，超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase，SOD) (Colinet *et al.*, 2011)则可以直接抑制寄主的PO活性，从而协同抑制寄主的黑化反应。蝶蛹金小蜂和丽蝇蛹集金小蜂毒液中的Pacifastin和Kazal型蛋白酶抑制剂，被报道可以抑制寄主的PPO激活。通过RNAi的方法发现，*Nasonia*毒液中的Calreticulin也可能参与抑制了寄主黑化反应(Siebert *et al.*, 2015)。

菜粉蝶微红绒茧蜂*C. rubecula*和蝶蛹金小蜂毒液中的钙网蛋白Calreticulin(Wang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2006)，均可抑制其共同寄主菜青虫血细胞的包囊反应。进一步的研究表明，蝶蛹金小蜂毒液中的Calreticulin可以抑制寄主免疫相关基因的表达。而波氏匙胸瘿蜂*L. boulardi*毒液中的RhoGAP（Ras homologous GTPase Activating Protein）(Colinet *et al.*, 2007; Labrosse *et al.*, 2005)可与寄主的RhoGAP竞争性特异性结合，抑制寄主血细胞的延展。寮黑瘤姬蜂*P. hypochondriaca*毒液中的蛋白组分 VPr1 和VPr3，均可显著削弱寄主血细胞的凝集反应(Dani & Richards 2009; Richards *et al.*, 2011; Richards & Dani 2008)。果蝇寄生蜂*Ganaspis*中的SERCA（Sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase）(Mortimer *et al.*, 2013)可以抑制寄主血细胞的钙流，从而改变其粘附和包囊等行为。

另，阿尔蚜茧蜂*A. ervi*毒液的谷胱甘肽转氨酶（γ-glutamyl transpeptidase，γ-GT）能使寄主蚜虫的卵巢凋亡，起到去势的作用(Falabella *et al.*, 2007)。寮黑瘤姬蜂*P. hypochondriaca*毒液中的Pimplin可造成寄主麻痹(Parkinson *et al.*, 2002)。外寄生蜂*E. pennicornis*毒液中的金属蛋白酶*Ep*MP3可延缓寄主的发育(Price *et al.*, 2009)。菜粉蝶微红绒茧蜂*C. rubecula*毒液中的Vn1.5可以促进PDV基因的表达，对PDV的活性有显著的增效作用。丽蝇蛹集金小蜂毒液中分离纯化出的Defensin型抗菌肽，可起到抑制革兰氏阴性菌的作用(Ye *et al.*, 2010)。通过RNAi干扰*Nasonia*毒液中的Chitinase，结果表明寄主中包括几丁质代谢途径等的9个基因的表达发生了显著变化(Martinson *et al.*, 2015)。

综上可见，寄生蜂毒液蛋白功能的研究仍十分有限，至今仍不到50个寄生蜂单一毒液蛋白功能被解析，而机理研究更是严重缺乏。并且，所研究的功能也主要集中于抑制寄主

免疫（包括体液免疫和细胞免疫），对毒液蛋白调节寄主发育、生殖和神经系统的功能研究均为孤例，对于何种毒液蛋白如何调控寄主营养代谢等尚缺乏研究。

另值得注意的是，从已有的结果来看，在不同的寄生蜂中往往采用不同的蛋白组分，完成趋同的毒液功能。较明显的例子是，不同寄生蜂利用各种毒液蛋白抑制寄主的黑化免疫反应。这表明进化过程中，毒液蛋白可能被独立招募至毒液，并独立进化出功能。另，同源蛋白可能在不同物种毒液中进化出不同的功能。如，Calreticulin在菜粉蝶微红绒茧蜂*C. rubecula*和蝶蛹金小蜂*P. puparum*中报道可以抑制寄主的包囊反应(Wang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2006)。而在*Hyposoter didymator*中，包含Calreticulin的全毒液不存在抑制包囊的功能(Doremus *et al.*, 2013)。丽蝇蛹集金小蜂*N. vitripennis*毒液RNAi实验则表明，Calreticulin在*Nasonia*毒液中可能与黑化相关(Siebert *et al.*, 2015)。

3 寄生蜂毒液蛋白进化的研究

3.1 寄生蜂毒液蛋白的进化选择压力

寄生蜂营拟寄生生活，其后代攫取寄主营养，并最终导致寄主死亡(Pennacchio & Strand 2006)。一般情况下，寄生后的寄生蜂后代和寄主最多只有一者存活下来，或两者同时死亡。根据红桃皇后（Red Queen）假说，寄生蜂与寄主在长期协同进化中存在激烈的“军备竞赛”，只有不断地进化，才能适应生存下来(Pennacchio & Strand 2006)。而寄生蜂毒液与寄主的免疫、神经、发育和代谢等系统直接互作，关系到最终的寄生成功与否，因而寄生蜂毒液在进化中可能受到较大的选择压力。这主要表现为以下两个方面。

一方面，毒液基因的进化速率更快。*Nasonia*的基因组研究结果表明，近源种*N. vitripennis*和*N. giraulti*间，毒液基因较之非毒液基因具有更高的异义替换速率与同义替换速率的比（dN/dS），这表明毒液基因相较于非毒液基因受到更多的选择压力(Werren *et al.*, 2010)。Ellen等人也发现金小蜂总科中的毒液基因GH19（Glycoside hydrolase family 19）几丁质酶在*Nasonia*和*Muscidifurax*分支上呈现了强烈的正选择（dN/dS > 1）(Martinson *et al.*, 2015)。另一方面，毒液基因获得和丢失的速率较快。在检测的15个金小蜂总科物种中，GH19几丁质酶基因只在其中7个物种的毒腺中表达。通过系统发育结果推测，该基因在金小蜂总科中发生了多次毒液基因获得或丢失事件(Colinet *et al.*, 2013; Martinson *et al.*, 2015)。同时，通过对果蝇内寄生蜂*Leptopilina*毒液组分的研究也发现寄生蜂毒液在种间和

种内均存在高度的差异(Colinet *et al.*, 2013)。例如，匙胸瘿蜂*L. boulardi*和*L. heterotoma*之间没有共有的高丰度毒液组分(Colinet *et al.*, 2013)。由此可推测毒液基因的获得和丢失可能存在较高的速率，以适应与寄主激烈的竞争关系。然而，寄生蜂毒液基因获得和丢失的具体速率仍缺乏系统的研究。

3.2 寄生蜂毒液蛋白基因的来源

进化过程中，寄生蜂毒液组分的获得了丰富的多样性，其中毒液新基因的获得起到了重要的作用。然而，寄生蜂毒液基因的来源至今也未有系统的研究。蛇、锥心螺等毒液的研究发现，毒液基因往往由基因复制产生并招募至毒液中，最终特化出特异的毒液功能(Wong & Belov 2012)。寄生蜂可能也通过基因复制产生新的毒液基因。果蝇内寄生蜂波氏匙胸瘿蜂*L. boulardi*毒液中的LbGAP由一个信号肽和一个RhoGAP结构域组成，推测其可能来源于胞内的RhoGAP(Labrosse *et al.*, 2005)。同时，蛋白质组结果也发现该寄生蜂毒液中还存在其他RhoGAP类似的毒液蛋白，但是其关键的互作或酶解位点均已发生了突变(Goecks *et al.*, 2013)。这表明这些毒液蛋白很可能来自于基因复制，并伴随复制事件后的序列分化。阿尔蚜茧蜂*A. ervi*毒液中的γ-glutamyl transpeptidase也发现有类似的基因复制事件(Colinet *et al.*, 2014)。Gaelen & Strand（2014）对毁侧沟茧蜂*M. demolitor*的多种寄生因子进行分析，发现Ci-48a-like和reprolysin-like基因家族发生了大量复制事件，并且部分基因被招募到毒液或畸形细胞中去(Burke & Strand 2014)。另，在毒液基因的招募过程中，尤其基因复制源自非分泌型的非毒液基因，信号肽的获得往往也是必需的。Moreau & Guillot（2005）对多种寄生蜂毒液蛋白的信号肽进行分析，结果表明寄生蜂毒液的信号肽具有经典的信号肽结构，不符合Johes等人（1992）提出的寄生蜂毒液信号肽具有特殊性的假设(Moreau & Guillot 2005)。

寄生蜂在适应不同寄主过程中也可能通过基因水平转移、可变剪接、已有非毒液基因的直接利用和*de novo*生成等方法获得新的毒液基因。基因水平转移在植物寄生线虫中比较常见，而在营自由生活和动物寄生的线虫中较少。植物寄生线虫常通过基因水平转移获得新的唾液基因，这可能与其寄主适应性相关(Haegeman *et al.*, 2011; Mitreva *et al.*, 2009)。在寄生蜂中，Ellen等人（2016）发现糖苷水解酶家族19几丁质酶基因由微孢子虫/兹壶菌水平转移至小蜂总科，并被招募为具有活性的毒液蛋白，调控寄主几丁质代谢相关基因的转录表达(Martinson *et al.*, 2015)。可变剪接也是寄生蜂毒液的可能来源。果蝇寄生蜂*Ganaspis*

sp.1中的sarco/endo-plasmic reticulum calcium ATPase （SERCA）基因有两个可变剪切，一个在非毒腺中表达，另一个则在毒腺中特异表达(Mortimer *et al.*, 2013)。另，寄生蜂毒液蛋白也可来源于已有非毒液基因的直接利用。如，钙网蛋白Calreticulin是高度保守的看家基因，在寄生蜂的各个组织均有表达，但也被招募至毒液中，并在多个寄生蜂毒液中均被检测到(Wang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2006)。此外，各个寄生蜂中还有很多特异性的毒液基因，与所有已知的序列没有同源性。这些毒液基因可能来源于基因的*de novo*生成，但具体的进化来源仍有待于进一步的分析。

3.4 寄生蜂毒液进化与寄生策略的关系

寄生蜂种类丰富多样，占据多种生态位，具有复杂多变的寄生策略(Pennacchio & Strand 2006; Whitfield 1998)。寄生蜂毒液与其寄生策略的关系，由于数据的严重缺乏，几乎仍一无所知。寄生蜂毒液蛋白\肽组分成变化是否与其寄主的转换有关？是否和寄生的寄主时期有关？寄主范围更广的寄生蜂毒液是否具有更多种类的毒液蛋白？在由外寄生向内寄生转化过程中，寄生蜂毒液组成发生了怎样的变化？这些问题仍有待将来进一步研究解答。

在内寄生蜂*Pteromalus puparum*和外寄生蜂*N. vitripennis*毒液的初步比较研究中发现，*P. puparum*的毒液与*N. vitripennis*的毒液，而不是与其他已报道的内寄生蜂毒液，显示了更多的序列相似性(Yan *et al.*, 2016)。这一结果与内寄生蜂有不同独立起源的推测相一致，而*P. puparum*则是在金小蜂亚科中相对近期由外寄生向内寄生转化的物种(Yan *et al.*, 2016)。同时，内寄生蜂*P. puparum*较之外寄生蜂*N. vitripennis*与其他内寄生蜂共有了更多的毒液蛋白种类。这些内寄生蜂所共有的毒液蛋白种类可能与内寄生化相关。

4 寄生蜂毒液蛋白的应用研究进展

寄生蜂物种多样性，远远超过其他带毒节肢动物，且毒液组成丰富，功能与作用靶标多变(Choi *et al.*, 2004)。此外，寄生蜂毒液蛋白在一般情况下不注入特异寄主之外的生物，更不蛰刺人畜。其节肢动物寄主与高等动物存在明显的差异，所以寄生蜂毒液蛋白是更绿色安全的杀虫蛋白候选资源。这些寄生蜂毒液活性蛋白可作为候选的杀虫基因导入昆虫病原物或作物中，以增加昆虫病原物的杀虫效果或使作物获得抗虫性。同时，也不排除部分寄生蜂毒液蛋白可通过保守的生物机制影响到人体反应，从而用于新型药物合成开发的可

能。如，Danneels等发现*Nasonia*毒液可以抑制HEK293细胞的NF- κB通路(Danneels *et al.*, 2014)，Werren等发现*Nasonia*毒液可以调控人肾原代细胞的Sorbitol代谢途径（unpublished）。

然而，相较于寄生蜂毒液蛋白的广阔应用前景，其相关应用研究却十分稀少，至今仅有一些其他寄生蜂寄生因子的应用研究。如，Rodriguez-Andres等将毁侧沟茧蜂*M. demolitor*寄生因子PDV中的Egf1.0蛋白转入塞姆利基森林病毒Semliki Forest virus中，可以显著增强其对埃及伊蚊*Aedes aegypti*的致死效果(Rodriguez-Andres *et al.*, 2012)。Maiti等将红足侧沟茧蜂*Microplitis croceipes*的畸形细胞分泌蛋白TSP14转入烟草，可使烟草获得对烟芽夜蛾*Heliothis virescens*和烟草天蛾*Manduca sexta*的抗性(Maiti *et al.*, 2003)。寄生蜂毒液应用研究稀少，部分也由于寄生蜂毒液组分功能等基础研究的进展缓慢。

5 寄生蜂毒液的研究方法进展及前景

已有的寄生蜂毒液蛋白研究多采用基于活性追踪的分离鉴定或试探性表达验证的策略。对于已知的全毒液功能，基于活性追踪的分离鉴定策略可追踪其功能活性，并进行分离纯化，最终鉴定其中活性组分。该研究策略清晰直接，菜粉蝶微红绒茧蜂*C. rubecula*毒液中的Vn50(Asgari *et al.*, 2003)、波氏匙胸瘿蜂*L. boulardi*毒液中的RhoGAP（Ras homologous GTPase Activating Protein）(Labrosse *et al.*, 2005)、菜粉蝶微红绒茧蜂*C. rubecula*毒液中的Vn1.5(Asgari *et al.*, 2003)、阿尔蚜茧蜂*A. ervi*毒液的γ-glutamyl transpeptidase、寮黑瘤姬蜂*P. hypochondriaca*毒液中的Pimplin(Parkinson *et al.*, 2002)和VPr3(Dani & Richards 2009; Richards & Dani 2008)等等均采用该研究策略。但该策略也有明显的局限性，其主要受限于寄生蜂个体大多较小，且无法像蜜蜂一样用电击法等进行体外取毒，而复杂的毒液组成更加大了分离鉴定的难度(de Graaf *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2008)。

另一个研究策略是试探性表达验证，该策略往往通过序列同源性信息，预测毒液蛋白的功能，再进行表达验证。波氏匙胸瘿蜂*L. boulardi*毒液中的Serpin(Colinet *et al.*, 2009)，菜粉蝶微红绒茧蜂*C. rubecula*和蝶蛹金小蜂毒液中的钙网蛋白Calreticulin(Wang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2006)、寮黑瘤姬蜂*P. hypochondriaca*毒液中的蛋白组分 VPr1(Richards *et al.*, 2011)等，均采用尝试性表达验证。该策略也有其明显的试错性和一定的盲目性。寄生蜂毒液具有丰富的多样性，即使同样寄生果蝇的近缘寄生蜂*L. boulardi*和*L. heterotoma*，其毒液组分和作用机理也存有显著差异(Colinet *et al.*, 2013; Schlenke *et al.*, 2007)。这直接造

成了不同寄生蜂毒液研究之间难以相互借鉴。另，寄生蜂中多各自具有特异性的毒液蛋白，同源序列比对往往无法预测这些毒液蛋白的功能(de Graaf *et al.*, 2010)。

近期，RNA干扰开始应用于寄生蜂毒液基因的研究，并已在*Nasonia*中也取得了一定进展。RNAi实验表明，*Nasonia*毒液中的Calreticulin和Chitinase分别在调控寄主黑化和几丁质代谢中具有潜在功能(Martinson *et al.*, 2015; Siebert *et al.*, 2015)。但由于RNA干扰存在脱靶效应，且毒液蛋白具有冗余性，该技术也存在明显的缺陷和局限性。综上，寄生蜂毒液的研究仍有待引入新的研究方法。

随着生物领域的蓬勃发展，研究技术的不断革新，生命科学研究也将进入一个全新的高速发展阶段。寄生蜂毒液研究的发展也将在以下几个方面得到受益。

1）组学技术的进步和普及。随着转录组、蛋白组的应用和普及，给寄生蜂毒液研究提供了部分之前无法获得的背景信息(dos Santos *et al.*, 2010; Pinto *et al.*, 2012; Yuan *et al.*, 2007)。随着基因组价格的降低和技术的不断进步，尤其是第三代测序技术的应用，将带动寄生蜂基因组测序和重测序的普及，进一步丰富寄生蜂毒液的背景信息(Sanggaard *et al.*, 2014; Werren *et al.*, 2010)。同样，转录组、蛋白质组技术的不断进步，尤其是*de novo*蛋白质谱技术的发展(Seidler *et al.*, 2010)，也将大大加快对寄生蜂毒液蛋白鉴定的步伐，加深人们对寄生蜂毒液的理解。

2）基因工程技术的应用与完善。ZFN（zinc-finger nucleases）、TALEN（transcription activator-like effector nucleases）、CRISPR（clustered regulatory interspaced short palindromic repeat）等基因编辑技术的发展，一方面使毒液基因敲除、敲入、沉默、过表达等成为可能，将大大加快毒液蛋白功能的研究；另一方面，使毒液基因结合转基因技术的应用更为便捷，可转入的选择对象也更为丰富(Gaj *et al.*, 2013)，使寄生蜂毒液的研究和应用更为便捷。尤其是CRISPR技术，具有高效的可操作性和广泛的适应性，已被成功用于哺乳动物、农作物、昆虫、线虫、酵母等多种生物的基因编辑(Pennisi 2013)，并也已在*Nasonia*中获得初步的成功，其在毒液蛋白的研究及应用领域，也将表现出巨大的潜力。

3）高通量筛选等技术的发展和应用。高通量筛选技术的建立，可以从多种候选毒液中快速筛选到含有所需有效组分的毒液，并进一步从该毒液中分离到所需的活性组分(Vetter *et al.*, 2011)。另，毒液蛋白高通量合成和表达技术、高通量结构解析技术等的发展，也将大大加快节肢动物毒液蛋白功能与结构的研究。

4）微流控技术（Microfluidics）能大大减少对样本量的需求，可适用于蛋白合成/表达、酶活分析、细胞分析、微量蛋白质组、单细胞转录组/基因组测序等多个研究领域(Du *et al.*,

2016; Juang & Chang 2016; Reverte *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016)，在生命科学研究中有着广阔的发展前景和巨大的应用潜力，并尤其适用于寄生蜂毒液量少的特性。

6 结束语

寄生蜂种类繁多，毒液蛋白/肽组成丰富，作用靶标多样，且相较于其他节肢动物毒液对脊椎动物更安全无害，是发掘新型杀虫基因的资源宝库。寄生蜂毒液基因有望作为候选的杀虫基因用于抗虫转基因作物的培养和昆虫病原物的改造等，以减少农药的使用。然而，相较于其丰富的多样性和广阔的应用前景，寄生蜂毒液蛋白的研究不论从组成、功能还是进化来看，都十分有限，应用方面的研究则更少。

随着对寄生蜂毒液的关注度不断增加，对其认识的不断加深，研究技术的不断发展，寄生蜂毒液的组分鉴定和功能研究将不断加快，其进化关系也将得更详尽的解析。未来，我们相信越来越多的寄生蜂毒液蛋白将在农业甚至医学领域被开发利用，造福人类。

第二章 蝶蛹金小蜂基因组测序及分析

丽蝇蛹集金小蜂*N. vitripennis*是模式寄生蜂，也是第一个基因组被测序的寄生蜂(Werren *et al.*, 2010)。*Nasonia*基因组的测序开启了寄生蜂研究的后基因组时代。近年来，随着基因组测序价格的不断下降，越来越多物种的基因组得到了测序。蝶蛹金小蜂*Pteromalus puparum*和丽蝇蛹集金小蜂同属Pteromalinae亚科。但与丽蝇蛹集金小蜂*N. vitripennis*（外寄生蜂）明显不同的是，蝶蛹金小蜂为内寄生蜂，并且一个是相对近期从外寄生向内寄生进化的事件(Yan *et al.*, 2016)。为了获得更完善的信息背景，用以深入的毒液功能和进化的研究，我们对蝶蛹金小蜂基因组进行了测序和拼接。同时，该基因组信息也将为研究内外寄生蜂遗传差异提供优秀的比较系统，尤其为研究外寄生向内寄生进化时的毒液改变提供必要的背景信息。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

蝶蛹金小蜂为实验室长期继代饲养，所用寄主为室内饲养的菜粉蝶蛹期(Cai *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005)。饲养条件为25° C，光周期为L：D = 14：10h。当雌蜂羽化后，收集于子弹头玻璃瓶中，取食20%的蜂蜜水以供营养。

1.2 DNA 的制备

DNA制备均采用蝶蛹金小蜂的白蛹期。对于小片段文库的构建，单头蝶蛹金小蜂白蛹解剖去除肠道后，再采用QIAamp DNA Micro Kit试剂盒提取。对于大片段插入文库，来自同一寄主的寄生蜂白蛹经洗涤后，采用QIAGEN Blood & Cell Culture DNA Kit试剂盒提取DNA。

1.3 全基因 shotgun 测序

蝶蛹金小蜂基因组DNA的测序采用了Hiseq和PacBio组合的策略。插入片段长度分别为

500 bp、2 kb、5kb、10kb和15kb的5个测序文库被构建，并采用HiSeq 2000测序平台分别产生83×、38×、33×和32×的数据。同时，利用PacBio P6-C4 chemistry试剂在PacBio RSII测序仪上测序产生5.72 Gb 、约为18×测序深度的PacBio数据。所得PacBio数据的平均读长为2.8 kb。最后，共计测序产生77.23 Gb的数据，241.22×的测序深度。

1.4 测序数据过滤

测序数据是经过了DNA 提取、建库、测序多个步骤之后产生的，为了避免这些步骤中产生的无效数据对后续信息分析带来的影响，采用 FastQC（http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc/）和 NGS QC Toolkit(Patel & Jain 2012)软件对上述无效数据进行过滤，以确保分析的正常进行。过滤标准主要有：1) 过滤掉含有接头序列的 reads；2) 截掉 reads 头部和尾部低质量、不稳定碱基；3) 当单端测序 read 中含有的 N 的含量超过该条 read 长度比例的 10% 时，需要去除此对双末端 reads；4) 由于 PCR 扩增等原因，需过滤重复的 reads；5) 当单端测序 read 中含有的低质量(<=5)碱基数超过该条 read 长度比例 50% 时，需要去除此对双末端 reads；6) 大片段数据首尾 10-20bp 的碱基质量较低， 根据具体情况将头部 20bp 和尾部 30bp 截掉，得到 Clean reads。

1.5 基因组组装拼接

首先利用短片段插入文库的测序数据，采用SOAPdenove软件进行拼接(Luo *et al.*, 2012)。然后，采用SSPACE软件(Boetzer *et al.*, 2011)，利用paired-end信息拼接得到scaffold，并采用GapCloser软件进行局部组装填充未解析的空隙。另外，还利用PacBio的长读长片段，采用PBJelly软件延伸scaffolds的长度(English *et al.*, 2012)。GC分布的计算采用500 bp的窗口和250 bp的步长。短片段插入文库的reads比对回拼接的基因组序列，进而计算全基因组的测序覆盖深度。

1.6 重复序列注释

采用*de novo*预测和同源比对的方法，分别在DNA和蛋白水平，对蝶蛹金小蜂重复序列和转座子Transposable Elements (TEs)序列进行了预测。首先，采用RepeatModeler软件从头

构建了蝶蛹金小蜂重复序列的数据库，并利用该自建的数据库，以及已知的Rebase(Roberts *et al.*, 2015)(http://www.girinst.org/repbase)和Mips-REdat (MIPS Repeat Element Database)数据库，采用RepeatMasker软件对重复序列进行预测(Tempel 2012)。同时，我们采用软件RepeatProteinMask (http://www.repeatmasker.org) 利用WU-BLASTX 比对TE蛋白数据，以鉴定重复序列相关的蛋白。另，也采用了软件TRF (Tandem Repeats Finder)对重复序列进行注释(Benson 1999)。对于SSR序列，我们采用MicroSAtellite (MISA)软件（http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/misa.html）进行鉴定。

1.7 基因结构预测

采用结合*de novo*预测、同源比对和RNA测序信息的方法，我们对蝶蛹金小蜂基因组中的基因结构进行了预测。对于*de novo*预测，屏蔽重复序列后，分别采用了Augustus(Stanke & Waack 2003)、SNAP（http://homepage. mac. com/iankorf）和Geneid(Blanco *et al.*, 2007)进行预测。对于同源比对预测，采用了来自A. mellifera、Anopheles gambiae、Drosophia melanogaster、N. vitripennis和Tribolium castaneum 5个物种的蛋白序列，先通过tblastn（e-value < 1e-5）比对至蝶蛹金小蜂基因组，再采用GeneWise软件(Birney & Durbin 2000)进行更精确的比对预测。基于RNA测序数据的预测，则采用TopHat比对回基因组序列，再利用Cufflinks进行拼装(Ghosh & Chan 2016; Pollier *et al.*, 2013)。最后的基因集合采用EVidenceModeler (EVM)软件产生(Haas *et al.*, 2008)。最后，所有预测的基因比对至TransposonPSI数据库(http://transposonpsi.sourceforge.net/)，以去除含有的转座原件的基因。

1.8 基因功能预测

对于预测的基因，翻译为蛋白序列，采用blastp（E-value ≤ 1e-5）分别比对至SwissProt和TrEMBL数据库(UniProt 2010)。KEGG pathway信息注释采用KAAS(Kanehisa & Goto 2000; Moriya *et al.*, 2007)。结构域注释采用InterProScan (Version 5.2-45.0)(Zdobnov & Apweiler 2001)，分别比对ProDom、PRINTS、Pfam、SMRT、PANTHER和PROSITE等数据库。GO（Gene Ontology）注释则利用InterPro信息进行调取(Hunter *et al.*, 2009)。

1.9 非编码 RNA 注释

rRNA, snRNA和miRNA的注释采用INFERNAL软件比对至Rfam数据库(Release 11.0)(Nawrocki & Eddy 2013)。同时，基于隐马科夫链模型，rRNA的亚基（如5.8S和18S等）也采用RNAmmer软件进行预测(Lagesen *et al.*, 2007)。tRNA采用tRNAscan-SE软件进行预测(Lowe & Eddy 1997)。

1.10 基因家族聚类

所有下载的基因首先通过过滤，去除提前终止或不完整的基因，并去除线粒体基因，最终采用最长的可变剪接体用于后续的分析。序列经过过滤过，采用blastp（e-value < $1e^{-5}$）进行两两比对。最后，基于blastp的结果，采用OrthoMCL进行基因家族聚类(Li *et al.*, 2003)。

1.11 进化树构建

基于OrthoMCL结果，提取所有的单拷贝基因。蛋白序列采用Mafft软件进行比对(Katoh & Standley 2013)，然后利用pal2nal翻译回CDS比对(Suyama *et al.*, 2006)。较差的CDS比对区域采用Gblocks去除(Castresana 2000)。进化树构建采用RaxML（8.0.19）软件(Stamatakis 2006)，所用参数为最大似然法（maximum likelihood）及GTRGAMMA替换模型。

1.12 分化时间估计

基于所有单拷贝基因的四重简并位点，分化时间采用PAML中的MCMCTree软件进行估计，所用的参数为clock = 2，RootAge = <10，model = 7, BDparas = 1 1 0，kappa_gamma = 6 2, alpha_gamma = 1 1(Yang 2007)。其中，用于校准的的化石分化时间证据来自TimeTree database (http://www.timetree.org/)，分别为C. *solmsi marchali*与*T. castaneum*分歧时间为310.7-378 Mya、*A. gambiae*与*P. xylostella*分歧时间为 199-344.7 Mya、*A. mellifera*与 *C. floridanus*分化时间为 138.8-163.5 Mya。

2 结果与分析

2.1 基因组测序及拼接

蝶蛹金小蜂基因组采用全基因组鸟枪法（WGS）策略，首先在 Illumina Hiseq 2000 上对不同片段插入文库进行了双末端（Paired-End）测序，随后我们进行了较为严苛的数据过滤（表2.1）。原始下机数据约 71.51G，过滤后剩余 Clean Data 约 45.71G 数据用于后续分析。另，利用第三代测序技术，进行 PacBio 测序，获得原始测序数据5.72 G (表 2.2)，以用于升级二代测序的组装结果。

采用了二代结合三代的测序拼接策略，最终获得拼接基因组大小 338.1 Mb，Scaffold N50 为 1.16 Mb，Contig N50 为 38.7 Kb，（表2.3）。

表2.1 二代测序数据量统计

Table 2.1 Statistics of Illumina sequence data

Lib	Insert Size (bp)	Raw Data Read Length	Raw Data Reads (M)	Raw Data Bases (G)	Clean Data Read Length	Clean Data Reads (M)	Clean Data Bases (G)	Dup %	Depth X*	Depth X**
	500	100pe	264.05	26.40	95pe	247.60	23.52	2.41	82.52	73.51
Illumina	2K	150pe	80.70	12.11	100pe	58.48	5.85	10.17	37.83	18.27
Hiseq	5K	150pe	71.10	10.67	100pe	56.09	5.61	1.90	33.33	17.53
2000	10K	150pe	69.15	10.37	100pe	52.02	5.20	6.49	32.41	16.26
	15K	150pe	79.71	11.96	100pe	55.33	5.53	2.22	37.37	17.29
Total	-	-	**564.72**	**71.51**	-	**469.51**	**45.71**	-	**223.45**	**142.85**

表2.2 三代测序数据量统计

Table 2.2 Statistics of PacBio sequence data

Lib	Insert size (bp)	Average Read length (bp)	Raw Data (G)	Raw Reads (M)	Depth (X)*	AverageQ
PacBio	20,000	2,762.18	5.72	2.07	17.88	42.20

表2.3 蝶蛹金小蜂基因组组装统计

Table 2.3 Statistics of *P. puparum* genome assembly

Type	Scaffold Length	Scaffold Number	Contig Length	Contig Number
N50	1,160,518	51	38,691	2,110
N60	769,849	87	29,511	3,083

N70	493,271	143	21,862	4,373
N80	304,817	231	15,414	6,162
N90	166,135	378	9,004	8,894
Longest	13,552,012	1	363,734	1
Total	338,104,454	3,446	327,448,593	22,140
Length>100bp	338,104,454	3,446	327,444,487	22,089
Length>2kb	336,554,365	1,533	322,179,264	14,465

2.5 重复序列识别

在基因组中存在着大量的重复序列。其中，简单重复序列(Simple Sequence Repeat，SSR)在 真核生物基因组中广泛存在，一般是以 1-6bp 组成较低程度的重复序列，主要以 2-3 个核苷酸为重复单位如(GA)n、 (AC)n 和(GAA)n 等。MISA[8]软件能识别出序列中的微卫星和复合微卫星及其所在位点。采用该软件分析基因组中 SSR 序列，显示蝶蛹金小蜂基因组中 SSR 序列有 207,930 个。另，对其他的重复序列，同时采用同源对比和 *de novo* 预测的方式对基因组的重复序列进行注释，结果显示蝶蛹金小蜂基因组中含有 41.40 %的重复序列。详细分类统计结果见表2.4-2.7。

表2.4 SSR分布统计

Table 2.4 Statistics of SSR distribution

	Number/Size
Total examined sequences	3,446/ 338,104,454bp
Total identified SSR	207,894
Compound format	35,776
Sequences contain SSR	1,543
Sequences contain SSR(>1)	1,369

表2.5 SSR分类统计

Table 2.5 Statistics of SSR classification

Type	**Unit size(repeat number)**	**Number**
p1	1(>=10)	67,479
p2	2(>=6)	83,139
p3	3(>=5)	19,126
p4	4(>=5)	2,063
p5	5(>=5)	193
p6	6(>=5)	90
p7	7(>=5)	28

表2.6 重复序列的基本统计结果

Table 2.6 Statistics of repeat sequences

Type	Repeat Size(bp)	% of genome
Trf	10,628,803	3.14
RepeatProteinMask	53,405,364	15.80
RepeatMasker(Repbase)	66,751,708	19.74
***De novo*(RepeatModeler)**	112,081,444	33.15
Total	137,826,833	40.76

表2.7 重复序列分类统计

Table 2.7 Statistics of repeat sequence classification

Type	Repbase TEs		TE proteins		RepeatModeler		Combined TEs	
	Length (bp)	% in genome	Length (bp)	% in genome	Length (bp)	% in genome	Length (bp)	% in genome
DNA	18,800,790	5.56	13,563,349	4.01	19,357,085	5.73	31,682,914	9.37
LINE	20,079,614	5.94	19,488,503	5.76	23,560,680	6.97	29,549,823	8.74
LTR	24,224,517	7.16	17,817,908	5.27	27,669,151	8.18	38,674,494	11.44
SINE	90,166	0.03	0	0.00	166,592	0.05	278,486	0.08
Other	5,400,349	1.60	2,697,216	0.80	6,417,342	1.90	19,964,182	5.90
Unknown	771,011	0.23	0	0.00	35,623,672	10.54	22,818,978	6.75
Total	66,751,708	19.74	53,405,364	15.80	112,081,444	33.15	137,826,833	40.76

2.6 基因结构及功能注释

分别采用*de novo* 预测、同源比对和RNA测序结果预测等三种方法，对蝶蛹金小蜂基因组中的基因结构进行预测。最终，在蝶蛹金小蜂基因组中共预测出基因 14,946 个，平均转录本长度为 9332.16 bp，平均 CDS 长度为 1446.29 bp，每个基因中含有 exon 平均个数为 5.98，平均 exon长度为 241.94 bp，平均 intron 长度为 1,584.19 bp（表2.8）。

将预测出的基因分别比对Swissprot、Trembl、KEGG等数据库，得到其功能注释。其中，10038个基因在Swissprot数据库中得到比对注释，13526个基因在Trembl数据库中得到比对注释，5797具有KEGG注释结果，8377个基因具有GO注释结果，10927个基因具有InterProscan的注释结果。总计13571个基因有至少一个功能注释结果，占全部预测基因的90.80%（表2.9）。

表2.8 蝶蛹金小蜂基因组与其它物种基因集比较

Table 2.8 Comparison of annotated gene sets between *P. puparum* and other insects.

Specie	Total number of gene	Average trainscript length(bp)	Average CDS length(bp)	Average exons per gene	Average exon length(bp)	Average intron length(bp)
Pteromalus puparum	14,946	9,332.16	1,446.29	5.98	241.94	1,584.19
Apis mellifera	15,314	7,616.47	1,775.73	5.32	237.82	1,290.27
Anopheles gambiae	12,806	5,481.96	1,606.46	4.05	396.31	1,269.17
Drosophia melanogaster	13,892	5,957.76	2,203.52	3.90	404.77	1,104.90
Nasonia vitripennis	17,083	6,950.65	1,415.72	5.32	266.26	1,282.08
Tribolium castaneum	16,524	5,285.18	1,350.74	4.34	311.14	1,177.53

表2.9 基因功能注释统计

Table 2.9 Statistics of gene functional annotation

Type		Number	Percent(%)
Annotation	**Swissprot**	10,038	67.16
	Trembl	13,526	90.50
	Kegg	5,797	38.79
	GO	8,377	56.05
	InterProscan	10,927	73.11
Total	**Annotated**	13,571	90.80
	Unannotated	1,375	9.20
	Gene	14,946	100.00

2.7 非编码 RNA 注释

通过与已知非编码 RNA比对，在蝶蛹金小蜂基因组共注释得到得到 miRNA 204 个，rRNA 140 个， snRNA 52 个以及 20 个 snoRNA。另，通过tRNAscan-SE预测蝶蛹金小蜂基因组中的tRNA，获得 tRNA共528 个。

2.8 进化相关分析

基因家族是由来自一个祖先基因的一组基因组成。基因家族的鉴定，是进化 分析中很重要的一个方面。通过同源基因的聚类及基因家族的鉴定分析，可以得到单拷贝基因家族和多拷贝基因家族。还可以得到物种特有的基因和家族，它们可能和物种的特异性表型

有关。我们将包括蝶蛹金小蜂在内 13 个物种的基因用来构建基因家族聚类（图2.1）。

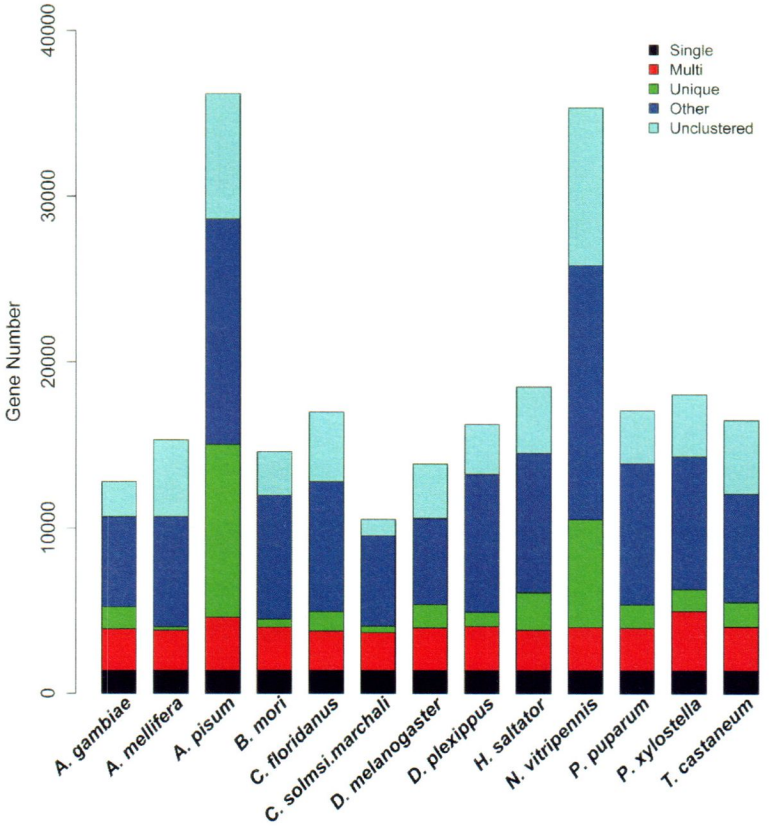


图2.1 蝶蛹金小蜂与其它物种同源基因数目统计

Figure 2.1 Homology gene numbers in *P. pupaum* and other insects.

其中，共鉴定13个物种间保守的单拷贝基因1421个。基于这1421个单拷贝基因，构建物种进化关系。结果表明*P. puparum*与*N. vitripennis*亲缘关系最近，其次为C.solmsi.marchali（图2.2）。进而，基于此进化关系，推测物种间的物种分化时间。*P. puparum*与*N. vitripennis*的分化时间约为30.0719 Mya（16.8-68.8），*P. puparum*与*C. solmsi marchali*的分化时间为137.3169（92-205.9）Mya（图2.3）。

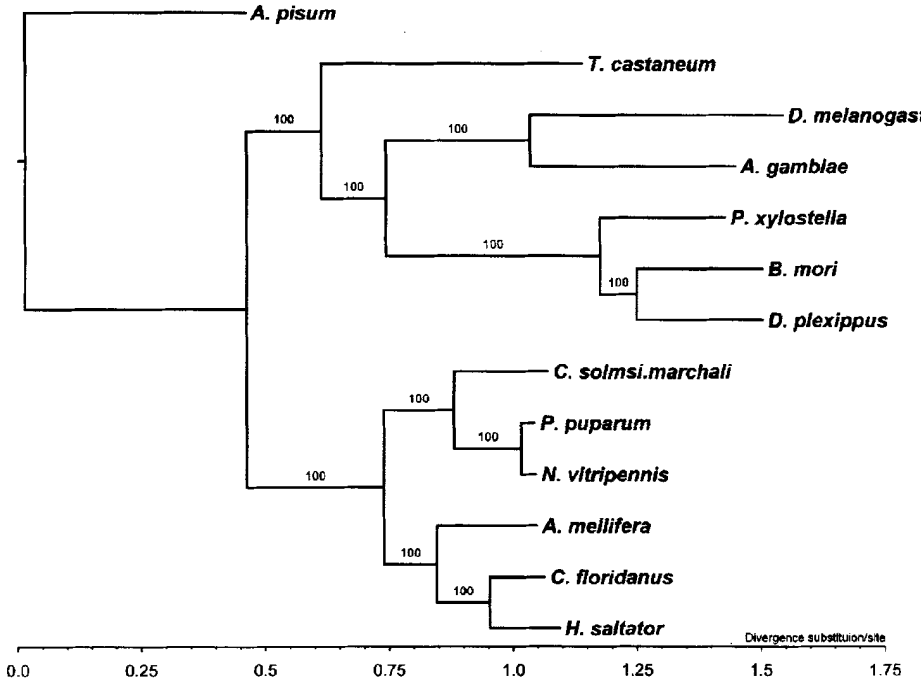


图2.2 蝶蛹金小蜂与其它物种系统发育树

Figure 2.2 Phylogenetic tree of *P. puparum*

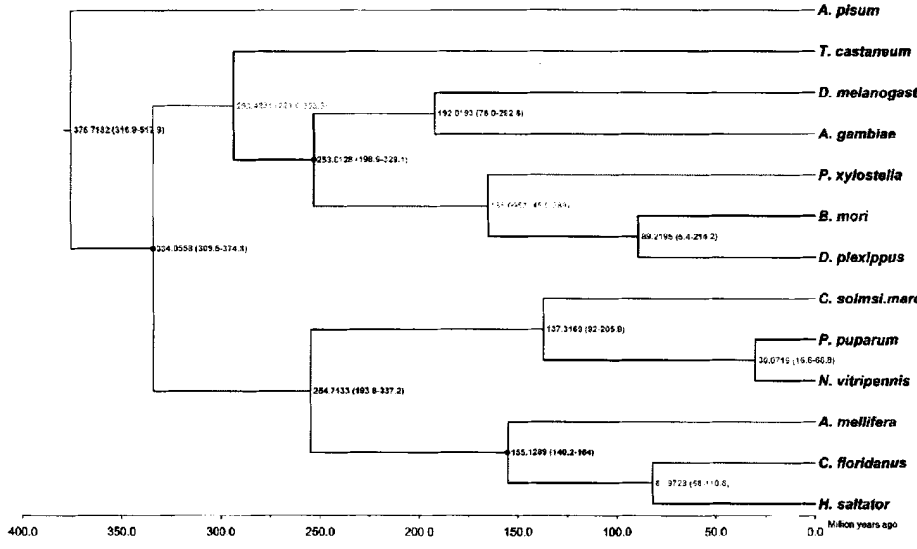


图2.3 分化时间估算图

Figure 2.3 Estimation of divergent time between species

节点上数值代表距今的分化时间(单位为百万年Million years ago, Mya)；标记为红色的节点为已知化石时间：*C. solmsi.marchali*与*T. castaneum*分歧时间为310.7-378 Mya、*A.*

*gambiae*与*P. xylostella*分歧时间为199-344.7 Mya、*A. mellifera*与*C. floridanus*分化时间为138.8-163.5 Mya

3 讨论

蝶蛹金小蜂基因组较小，且雄蜂为单倍体，杂合度低。采用二代结合三代测序的方法，我们最终取得了较理想的拼接结果。基因组信息的获得将有助于今后研究蝶蛹金小蜂免疫、发育、神经、代谢等多个生理过程。在此基础上，可对蝶蛹金小蜂进行改造，使其更好地发挥生防作用。基因组信息也将加速蝶蛹金小蜂中杀虫基因的鉴定，进而服务于杀虫微生物的改造和抗虫作物的培育。

在本论文中，这些信息尤其为进一步分析其毒液蛋白功能及进化提供了坚实的基础。

第三章 蝶蛹金小蜂毒液蛋白组成分析

毒液是重要的基因资源宝库，来自鸡心螺(Lewis et al., 2012)、蛇(Koh et al., 2006)、蝎子(Rodriguez de la Vega et al., 2010)、蜘蛛(King & Hardy 2013; Sanggaard et al., 2014)和蜜蜂(Peiren et al., 2005)等的毒液因而受到了广泛的关注和大量研究。寄生蜂据估计有60万余种，占膜翅目的75%，多样性远胜于以上所有提及的带毒动物(Heraty 2009)。寄生蜂毒液可能是被低估的重要基因资源宝库，相对于寄生蜂丰富的多样性，其毒液组成的研究仍十分匮乏。而蝶蛹金小蜂与模式外寄生蜂丽蝇蛹集金小蜂同属Pteromalinae亚科，是相对近期由外寄生蜂进化而来的内寄生蜂(Yan et al., 2016)。因而，蝶蛹金小蜂和丽蝇蛹集金小蜂是较好比较研究外寄生蜂向内寄生蜂转化时毒液转变的系统。采用转录组和蛋白质组结合的方法，我们对蝶蛹金小蜂的毒液蛋白组成进行了鉴定，为今后蝶蛹金小蜂毒液的功能及进化研究奠定了前期基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

蝶蛹金小蜂饲养同第二章1.1。丽蝇蛹集金小蜂与蝶蛹金小蜂饲养方法类似，不同的是丽蝇蛹集金小蜂采用的寄主为家蝇。

1.2 毒腺解剖和 RNA 提取

取羽化后0-7天且交配后的蝶蛹金小蜂雌蜂，置于−70 °C冰箱5分钟麻痹冻晕，而后在体视镜下解剖。所有溶液为含1 unit/μl RNAase inhibitor (TOYOBO, Osaka, Japan) 的Ringer's saline(KCl 182 mM; NaCl 46 mM; CaCl2 3 mM; Tris-HCl 10 mM)。毒腺和去除毒器官的雌蜂残体分别收集至Trizol试剂（Invitrogen）中。总RNA提取参照Trizol试剂说明书。

1.3 cDNA 文库构建及测序

cDNA文库的构建及测序均委托深圳华大公司完成。提取的RNA采用Sera-mag Magnetic Oligo (dT) beads (Illumina)试剂盒纯化后，用N6引物进行反转录。随后，合成第二条cDNA链、连接接头并PCR扩增后采用QIAquick Gel extraction Kit (Qiagen, Germany)进行纯化。雌蜂全虫的cDNA文库采用Illumina Hiseq 2000进行双端100 bp测序。毒腺和残体的cDNA文则采用1G Illumina Genome Analyzer进行双端75 bp测序。

1.4 转录组数据分析

转录组原始数据过滤后采用Trinity v2013-02-16进行拼接(Grabherr *et al.*, 2011)，并采用blastx（e-value < $1e^{-5}$）比对NCBI nr数据库（2013年3月）对unigene进行注释。表达量则采用软件eXpress v1.3.3进行估计(Roberts & Pachter 2013; Roberts *et al.*, 2011)。毒腺和残体间的差异表达分析利用DEGSeq v1.2.2进行分析(Wang *et al.*, 2010)，其中p值采用Benjamini & Hochberg法进行校正。矫正后的P-value < 0.001，log2(FPKM_VG/FPKM_Carcass) > 1且FPKM_VG (Venom gland) >10用于定义在毒腺中差异表达的unigene。信号肽采用软件SignalP 4.1进行预测(Petersen *et al.*, 2011)。候选的毒液unigene进一步在NCBI上通过blastx手工比对，并根据其比对结果和结构域信息，将其分类为酶、蛋白酶抑制剂、识别结合蛋白、其他和未知蛋白。

1.5 毒液蛋白相似性比较分析

对于相似性分析，蝶蛹金小蜂、丽蝇蛹集金小蜂及其他内寄生蜂毒液采用blastp进行比对。其他内寄生蜂毒液数据库由手工采集生成，数据来源包括*L. boulardi(Goecks et al., 2013)*、*L. heterotoma*、*A. ervi(Colinet et al., 2014)*、*M. demolitor(Burke & Strand 2014)*、*Microctonus* sp.(Crawford *et al.*, 2008)和*C. inanitus(Vincent et al., 2010)*。核苷酸序列采用OrfPredictor (http://proteomics.ysu.edu/tools/OrfPredictor.html)翻译成氨基酸序列。其中，其他内寄生蜂毒液数据库中的序列进一步通过CD-HIT

(http://weizhong-lab.ucsd.edu/cdhit_suite/cgi-bin/index.cgi?cmd=cd-hit)去除冗余序列，序列一致性阈值设为0.5。多序列比对采用MUSCLE v3.8(Edgar 2004)，进化树构建采用MEGA5中的最大似然法(Tamura *et al.*, 2011)。

1.6 毒液蛋白的提取

取羽化后0-7天且交配后的蝶蛹金小蜂和丽蝇蛹集金小蜂雌蜂，置于−70 °C冰箱5分钟麻痹冻晕，而后分别在体视镜下解剖。所有溶液为含Ringer's saline溶液 (KCl 182 mM; NaCl 46 mM; CaCl2 3 mM; Tris-HCl 10 mM, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride)。毒囊清洗数次后转移至eppendorf管，16000 g 4 °C离心1分钟，上清采用0.22 μm Millipore过滤管过滤后，储存于−70 °C备用。毒液蛋白浓度采用Bradford法定量。

1.7 LC-MS/MS 蛋白质谱鉴定

将100 μg 蝶蛹金小蜂毒液蛋白冻干重溶于20 μl重溶溶液中(7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 0.5% Triton X-100, 65 mM DTT, 0.5% Bio-Lyte, and 0.001% bromophenol blue)，随后进行12% SDS-PAGE跑胶并Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad, USA)染色。根据分子量大小，将蛋白胶切割成21条。每一胶条均采用胰酶酶解并进行1DLC-LTQ-Velos (Thermo Finnigan, San Jose, CA)质谱分析。样本先采用Zorbax 300 SB-C18 (Agilent Technologies, Wilmington, DE)柱子进行脱盐，尔后，采用分离柱RP-C18 column (150 μ m i.d., 150 mm length) (Column technology Inc., Fremont, CA)进行分离。溶液A为0.1%甲酸，溶液B为84%乙腈含0.1%甲酸。分离梯度为1h内从4%的溶液B升至50%的溶液B。每次全扫描收集肽或其片段的荷质比20次。质谱数据采用Sequest算法搜索蝶蛹金小蜂转录组数据库(Eng *et al.*, 1994)。参数Carbamidomethyl of cysteine设置为fixed ，oxidation of methionine 设置为variable modifications。Delta CN (≥ 0.1) 和cross-correlation scores (Xcorr, one charge ≥ 1.9, two charges ≥ 2.2, three charges ≥ 3.75)用于过滤肽段鉴定。该部分工作委托由上海中科新生命完成。

1.8 定量 qPCR

cDNA模板采用TransScript one-step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix (TransGen, China)试剂盒进行合成。引物经Primer 3软件设计并在上海生工合成。所有引物序列在表3.1中列出。PCR反应在ABI7500 Real Time PCR system(Applied Biosystems, Foster City, CA)中进行，所用试剂为SsoFast EvaGreen Supermix with Low Rox (Bio-Rad, USA)，程序运行条件如下：95°C激活30秒，95°C复性5秒，60°C 退火34秒，后两个步骤重复40个循环。相对表达量计算采用$2^{-\triangle\triangle CT}$方法(Livak & Schmittgen 2001)，所用内参为18 S rRNA。采用Student检验进行显著性分析，如p-values <0.05且log2(Expression ratio venom gland/carcass) > 1则定义该Unigene在毒腺中差异表达。

1.9 Westren blot

蝶蛹金小蜂毒液蛋白的制备如前所述。重组的毒液蛋白GOBP在pGEX-4T-2中表达，其他均构建至pET-28a载体中表达。β-actin的一抗购自华安。毒液蛋白及残体蛋白在12% SDS-PAGE分离，采用Mini-ProTEAN Tetra system 16 V转膜16h至PVDF（polyvinylidene difluoride）膜。封闭漂洗后，PVDF膜分别与各毒液抗体（根据抗体效价稀释500 至2000倍）和actin抗体（稀释5000倍）孵育1 h。二抗采用羊抗兔IgG-horseradish peroxidase (HRP) conjugate (Sigmae Aldrich, Taufkirchen, Germany; 稀释5000倍)。最后，PVDF膜采用ECL Western Blotting Substrate (Promega)显色，并于Chemi Doc-ItTM 600 Imaging System (UVP)拍照。

1.10 数据上传

所有的转录组原始测序数据已上传至NCBI Sequence Read Archive，编号为SRP055738。转录组拼接结果已上传至GenBank，编号为GECT00000000。

表3.1 验证蝶蛹金小蜂毒液蛋白表达的实时定量PCR引物

Table 3.1. Primers used for Real-time PCR verification of putative venom proteins from *Pteromalus puparum*

	Sequence ID	Forward Primer	Reverse Primer
1	comp45178_c0	GCTGAACTTTTCGAGGATGC	AGCGTCTTGGCCAATTTTT
2	comp39547_c0	CTCACAAGCCGCACATTAGA	TGTGAATCGCAAAGAACGAG
3	comp29468_c0	CGCAGCCTTTCATTTTCAAT	TAGAGGTCCACCCGAATCAC
4	comp39512_c0	CGTCTGGCTAAAGAAAACGG	ATTTTGTCCCACGTCTTTGC
5	comp22199_c0	ATGCTATTCCCACTGCCATC	TGCTGGTCTATTCCCGTTTC
6	comp43143_c1	ATTCTTACGGCTGGTCCCTT	ATCCAAAACCAGCGATTGTC
7	comp36032_c0	GGCATACGCCATTTTTCCTA	TCGTGAAGCTCGACAAACAC
8	comp39522_c0	AAGCCCGATTCAGGTAAC	CCGAGTCCAAAATACACG
9	comp28596_c0	AAGTGATTCTCCGTCACGCT	GGTGTGCCAAGGCTTAATGT
10	comp22365_c0	CCGTTCAATTTGGCTTTAGG	GCAGCTTTCATACCAGCCTC
11	comp36135_c0	TGGAGATTGGGATGGGTTTA	AGTTCATCCTCGAACGCAAT
12	comp44819_c3	AGTGATGACACTCGCACTGG	TATGGCGCACCAGAAGTGTA
13	comp36103_c0	GCTAATCCAAAGCGGAGACA	CACATCAGGTAGTTGCTCGC
14	comp22216_c0	GTCCAGAATGCGAATCTCGT	GTGCATTTTCCGTTGACCTT
15	comp44303_c0	AATGGCGCAGTTCAAATACC	GAGAAATTCATCGGAACGGA
16	comp28217_c0	ATGGCAACCTGTAACGGAAG	TGTGCCGTGATTTTAAGACG
17	comp36121_c0	GGTCGTGATCTCGGAAAAGA	GGACCAGCAGTCACCAGATT
18	comp45164_c0	GAAAAGGTAGCAGCCTGGTG	TGCTGTTTGGCTTTGTATGC
19	comp41377_c0	CGGTAGCTGAATTCCAGGAG	ATCGCAAATTGCCTCGTTAC
20	comp42418_c0	GGTAATTGGGCTCGCATAGA	CCTCTGTTGCTGAGAGGGTC
21	comp45101_c0	TCAAGCACTATTGCAGTGCC	ATGGCAGGCAAATCTGAATC
22	comp44465_c2	AGTCAGCATCCATCTGTCCC	GCGGAAACCTTCTGACACAT
23	comp42555_c0	GCCCTGTTTCTTAAGCGTTG	ATGCATTAATTCCGTTTCCG
24	comp22275_c0	TTGTCAAGATGACTCCACGG	CGAATCCATGCTTCTTCGTT
25	comp29111_c0	GCAAATGACCCAGAAGGAAA	ATGTCTCGTTCGAAGCTCGT
26	comp36458_c0	GCCTCCGTATTTCCATACCA	ATTCTTCGGCTTCACGATGT
27	comp28774_c0	AGTATCGCCGTAAATGGTGC	CCAATCGATTCCTCCACTGT
28	comp28533_c0	ACTTCTACGTCATGGGTGGC	GTCCTTCGTGATCGGAGTGT
29	comp36060_c0	TTTATTGCAGCCAGCATGAG	CTTTTGGAAGCTTCAATGCC
30	comp45096_c0	GGTCACACAGGTGTGCTT	AGTAACCGCCGCTAGATT
31	comp39496_c0	TTAAAGTGTCCGACGAGCA	GAGGGCCTTCGCATAAGTA
32	comp22466_c0	TCCGGATGTGCATAAAATG	TCCTTTTTCGTGGTGTCAA
33	comp22190_c0	CACGGACAGGAACACGTTA	TGGGTCTATTTCAGCACGA
34	comp22195_c0	GGCATTTGGATGTGAAGAAG	TCGGCCTTATAATCTTCAGC
reference	18S rRNA	CGAGCGATGAACCGACAG	CGGGGAGGTAGTGACGAA

2 结果与分析

2.1 蝶蛹金小蜂转录组的拼接及分析

为了获得蝶蛹金小蜂的转录组信息，雌蜂全虫、毒腺、雌蜂残体（去除毒液器官后的雌虫）共三个cDNA文库被构建测序。原始的测序数据进行过滤后，采用Trinity进行*de novo*转录组拼接（图3.1）。统计结果显示，拼接的转录组N50 为2226 bp，N80为825 bp (表3.2)。这里把来自的同一转录位点的冗余转录本中最长的一条定义为unigene。最终，获得了39,738个unigene，共55,958转录本(supplementary Figure S1)。其中，43.73% (17,379) 的unigene在nr数据库通过blastx (e-value < 1e-5)得到了注释。

毒液蛋白由毒腺细胞分泌转运到毒囊中，因而普遍认为其具有信号肽序列。对于转录组中有完整N端（subject start position of the best hit alignment = 1）的unigene，将其翻译成氨基酸序列后采用SignalP进行预测。同时，这些unigene在NCBI nr数据库中的最佳比对序列也被获取用于信号肽预测。结果表明，两种预测信号肽方法的结果一致性为99% (表3.3)。最后，所有的信号肽分析均采用其在nr数据库中的最佳比对序列进行预测。最终，2714个 unigenes被鉴定到含有信号肽序列（图3.2A）。

表3.2 蝶蛹金小蜂转录组拼装结果

Table 3.2. Overview of *Pteromalus puparum* transcriptome

Number of reads from VG	29,540,102
Number of reads from Carcass	28,109,926
Number of reads from FA	27,216,094
Number of assembled transcripts	55958
Transcripts longer than N50	8740
The shortest length	201 bp
The longest length	15705 bp
N50	2226 bp
N80	825 bp
N20	4279 bp

The cDNA library of FA was sequenced on Illumina Hiseq 2000 with paired-end reads of 100 bp. The cDNA libraries of VG and Carcass were sequenced on 1G Illumina Genome Analyzer with paired-end reads of 75 bp.VG: venom gland; Carcass: whole body of female adult without venom apparatus; FA: whole body of female adult

表3.3 两种信号肽预测方法的比较

Table 3.3 Comparison of two methods used for signal peptide analysis

Method 1	Y	N	Y	N	Identity between two methods
Method 2	Y	N	N	Y	
Number of transcripts	1281	10164	79	39	99.00%

Method 1: signal peptide analysis using retrieved reference sequences; Method 2: signal peptide analysis using translated proteins; Y: identified with signal peptides by the methods; N: identified without signal peptides by the methods.

Unigene在毒腺及残体中的表达量则采用eXpress进行估计。为了控制假阳性率，FPKM_VG (Venom gland) >10、log2 (FPKM_VG/FPKM_Carcass) > 1 且corrected P-value < 0.001被用于定义在毒腺中差异表达的基因。采用这一阈值，2355个 unigenes被鉴定为在毒腺中差异性表达 (图3.2A).

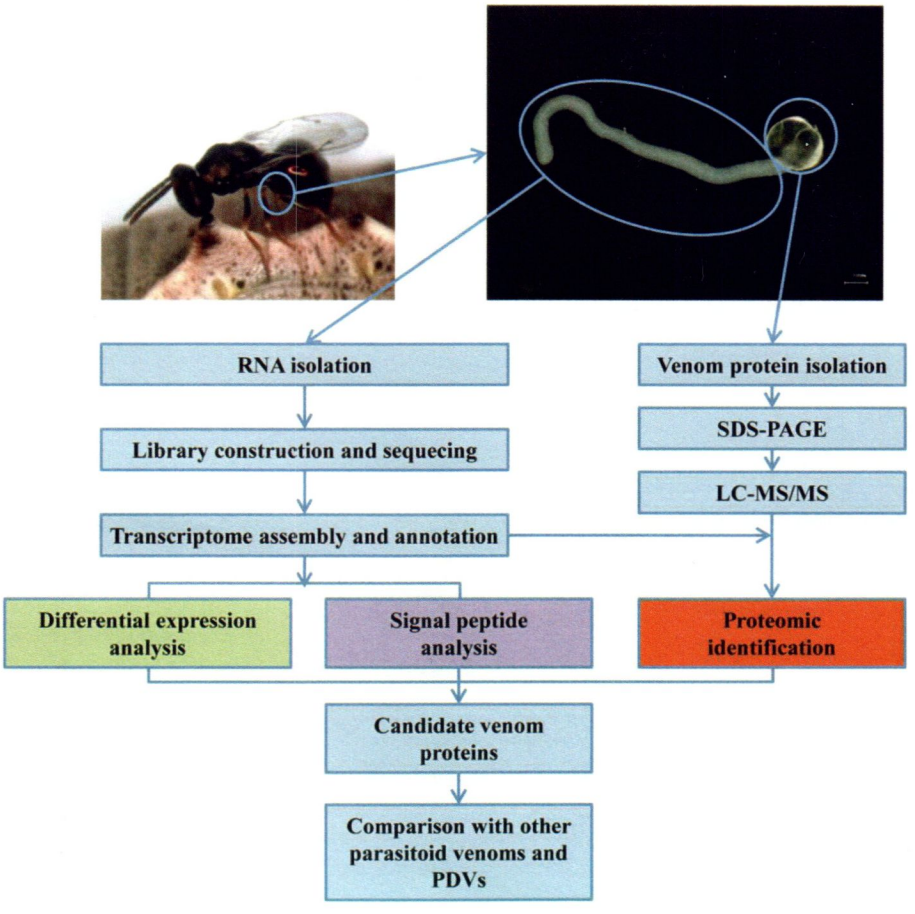


图3.1 结合转录组和蛋白组方法鉴定蝶蛹金小蜂毒液蛋白的路线示意图

Figure 3.1. Schematic representation of combined proteomic and transcriptomic analyses to identify putative venom proteins in *Pteromalus puparum*.

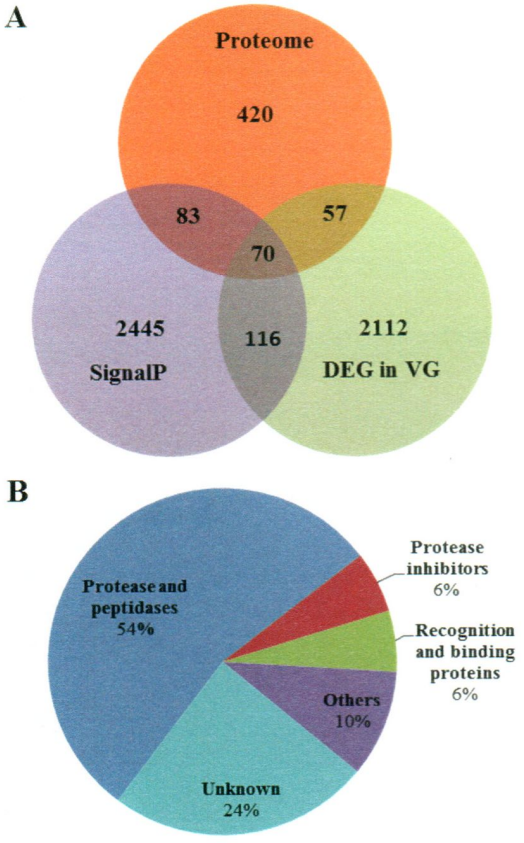


图3.2 蝶蛹金小蜂70个候选毒液蛋白的鉴定

Figure 3.2. Identification of 70 putative venom proteins from *Pteromalus puparum*. (A) Venn diagram of putative venom proteins. The orange circle indicates unigenes which were identified by proteomic approach, the purple circle indicates unigenes with signal peptides, and the light green circle indicates unigenes which are differentially expressed in venom gland. (B) The composition of venom proteins. DEG in VG: differentially expressed unigenes in venom gland; SignalP: signal peptide.

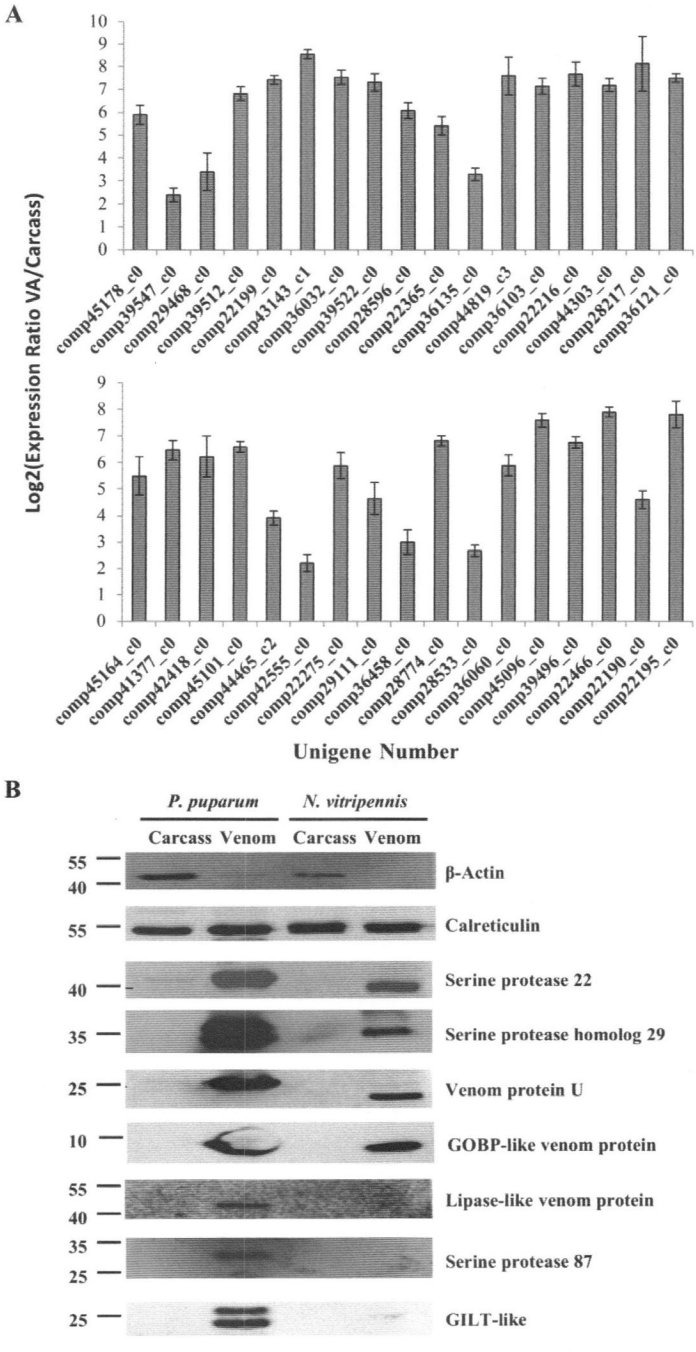


图3.3 实时定量PCR和Western blot验证蝶蛹金小蜂毒液蛋白

Figure 3.3. Verification of putative venom proteins by quantitative real-time PCR (qPCR) and Western blotting. (A) qPCR verification of selected putative venom proteins. The genes and primers used for these proteins are listed in Table S1. (B) Western blotting of venom proteins from *P. puparum* and *N. vitripennis*. β-Actin was used as housekeeping protein. The accession

or unigene numbers of these venom proteins are as follows. calreticulin (GenBank: ACZ68113), serine protease 22 (comp44498_c3), serine protease homolog 29 (comp44055_c7), venom protein U (comp22466_c0); GOBP-like venom protein (comp39522_c0), lipase-like venom protein (comp28596_c0), serine protease 87 (comp43143_c1), GILT-like (comp36384_c0). VA: venom apparatus; Carcass: whole body of female adult without venom apparatus; GILT-like: gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase-like

2.2 蝶蛹金小蜂毒液蛋白质组鉴定

毒液蛋白首先在12% SDS-PAGE胶上进行分离，结果表明蝶蛹金小蜂毒液蛋白的分子大小从小于14 kDa一直到大于97 kDa均有分布。SDS-PAGE被切割成21条胶条，这些胶条胶内酶解后采用LC-MS/MS方法进行蛋白质谱鉴定。蝶蛹金小蜂转录组根据blastx比对结果翻译生成氨基酸数据库，被用于比对蛋白质谱数据。最终，630个 unigenes通过该方法在毒液中被鉴定到(图3.2A)。

2.3 结合转录组及蛋白质组鉴定蝶蛹金小蜂毒液蛋白

为了鉴定可靠的毒液蛋白集合，数据的分析基于以下假设，即毒液蛋白应为在毒腺中差异表达的分泌型蛋白（图3.1）。结合转录组和蛋白质组数据，70个unigene被鉴定为分泌蛋白，且在毒腺中差异表达并被蛋白质组方法所检测到 (图3.2A)。在本研究中，这70个蛋白被定义为候选毒液蛋白用于后续分析。

这70个毒液蛋白根据序列和结构域信息可分类为四类。酶类（38个），蛋白酶抑制剂（4个），识别与结合蛋白（4个），其他（6个）和未知蛋白（17个）（图3.2C）。其中，最丰富的类别为酶类，其中包括酯酶、脂酶、丝氨酸蛋白酶、金属蛋白酶等。第二大类则为未知蛋白。

由于转录组和蛋白质组测序均未有样本重复，所以对其中34个候选毒液基因进一步采用了qPCR验证， 对8个毒液蛋白进行了western blotting验证。所有检测的34个毒液基因均在毒腺中(相对残体)差异性表达（图3.3A），所有8个蛋白也在毒液中被毒液蛋白抗体检测确证（图3.3B）。这些结果表明本研究中所鉴定的毒液蛋白集合是相对可靠的。

2.4 蝶蛹金小蜂毒液蛋白与丽蝇蛹集金小蜂及其他内寄生蜂毒液蛋白的比较分析

蝶泳金小蜂毒液蛋白与其他物种毒液或非毒液蛋白的比较，主要采用三种方法。首先，我们采用blastx比对NCBI nr数据库。排除比对到自身的结果后，绝大部分 (68 of 70)蝶蛹金小蜂毒液蛋白比对到丽蝇蛹集金小蜂的序列(图3.6A，表3.4)。另有两个蝶蛹金小蜂毒液分别比对到寄生蜂*Chelonus inanitus*的一个毒液蛋白和苜蓿切叶蜂*Megachile rotundata*的一个非毒液蛋白。

进而，我们采用blastp将蝶蛹金小蜂毒液蛋白分别与丽蝇蛹集金小蜂和其他内寄生蜂的毒液进行比较（详见材料方法）。70个蝶蛹金小蜂毒液蛋白中，48个 (68.6 %)和46 (65.7%)与丽蝇蛹集金小蜂毒液比对到更高的e-value和bit值 (e-value Wilcoxon matched signs rank (WMSR) test，p=0.009，图3.4，bit score WMSR test，p=0.001，图3.5)。这一结果反映了蝶蛹金小蜂与丽蝇蛹集金小蜂有更近的亲缘关系，而非与其他科或总科中的内寄生蜂亲缘关系较近。这些内寄生蜂为*L. boulardi*、*L. heterotoma*、*A. ervi*、*M. demolitor*、 *Microctonus* sp. 和*C. inanitus*。

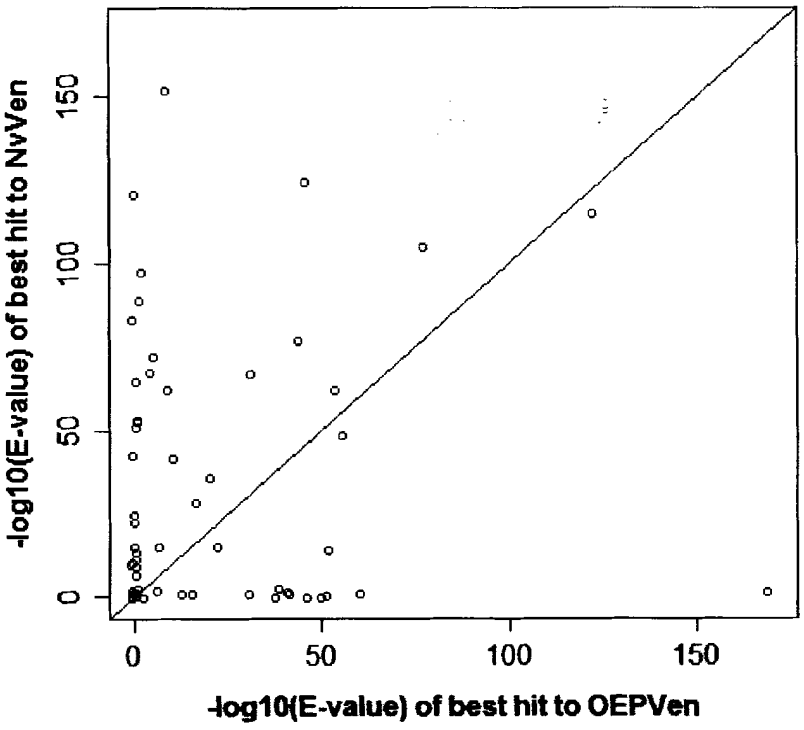


图 3.4 蝶蛹金小蜂比对丽蝇蛹集金小蜂和其他内寄生毒液蛋白的–log10(E-value)分布

Figure 3.4. Distribution of –log10(E-value) of *P. puparum* venom proteins best hit in *N. vitripennis* and other endoparasitoid venoms. Red circles indicate venom proteins of *P. puparum* which hit (e-value ≤ 1e-5 and bit score ≥ 50) both to venom proteins from *N. vitripennis* and other endoparasitoid and show higher similarities to venom proteins other endoparasitoids from than *N. vitripennis*. NvVen: venom proteins from *N. vitripennis*. OEPVen: venom proteins from other endoparasitoid wasps.

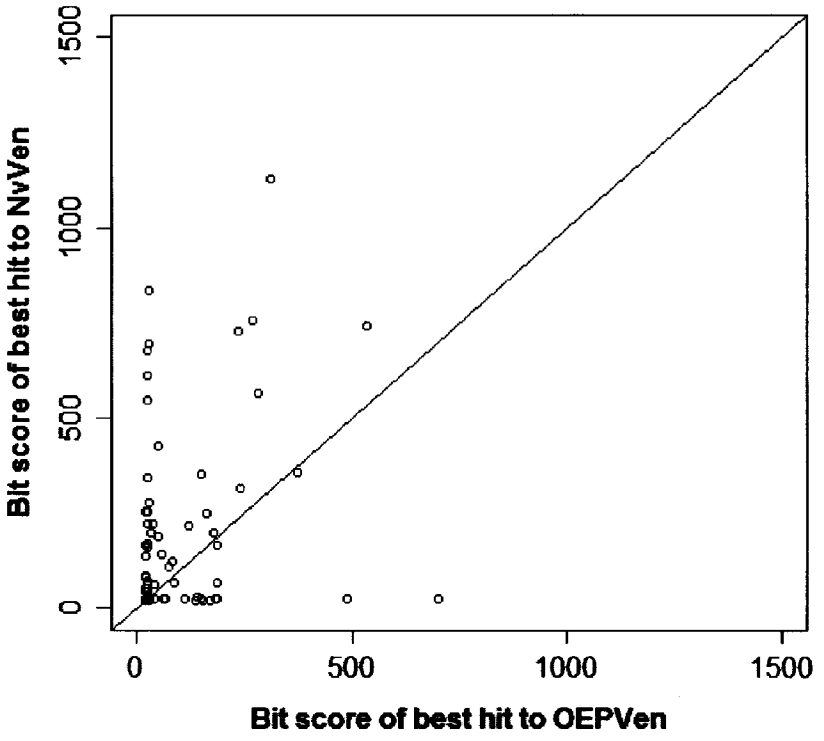


图 3.5 蝶蛹金小蜂比对丽蝇蛹集金小蜂和其他内寄生毒液蛋白的 bit 值分布

Figure S3.5. Distribution of bit score of *P. puparum* venom proteins best hit in *N. vitripennis* and other endoparasitoid venoms. Red circles indicate venom proteins of *P. puparum* which hit (e-value ≤ 1e-5 and bit score ≥ 50) both to venom proteins from *N. vitripennis* and other endoparasitoid and show higher similarities to venom proteins other endoparasitoids from than *N. vitripennis*. NvVen: venom proteins from *N. vitripennis*. OEPVen: venom proteins from other endoparasitoid wasps.

采取阈值e-value ≤ 1e-5且bit score ≥ 50（详见材料与方法），毒液蛋白被分类定义为共有或特有（图3.6B）。基于这一阈值标准，70个蝶蛹金小蜂毒液蛋白中，14个为蝶蛹金小蜂特异，25个仅与丽蝇蛹集金小蜂毒液所共有，13个仅与其他内寄生蜂毒液所有共有，18为3个毒液集合所共有。蝶蛹金小蜂较之丽蝇蛹集金小蜂与其他内寄生蜂共有更多的毒液蛋白（13/70 较之3/79，双尾fisher extract检测，p= 0.006)。这些仅为蝶蛹金小蜂和其他内寄生毒液所共有的蛋白包括adenosine deaminase CECR1-like、protein lethal (2) essential for life-like、disulfide-isomerase A3-like、pancreatic triacylglycerol lipase-like、GILT-like和

protein FAM151A-like等。这些毒液蛋白可能在寄生蜂适应内寄生化中起到一定的作用。

另，25个来自蝶蛹金小蜂的毒液蛋白和22个来自丽蝇蛹集金小蜂的毒液蛋白，仅在被蝶蛹金小蜂和丽蝇蛹集金小蜂毒液中共有。这些毒液蛋白可能为Pteromalinae亚科所特有的毒液蛋白。一些之前仅在丽蝇蛹集金小蜂毒液中报道过的特异蛋白，如毒液蛋白D、G、J、L、O、U和Z等，也在蝶蛹金小蜂毒液中被鉴定到。18个蝶蛹金小蜂毒液蛋白为三个毒液集合所共有，这些蛋白可能是寄生蜂毒液中的一些核心组分。它们包括venom allergen、calreticulin、serine protease、acid phosphatase、glucose dehydrogenase、gamma-glutamyltranspeptidase 等。

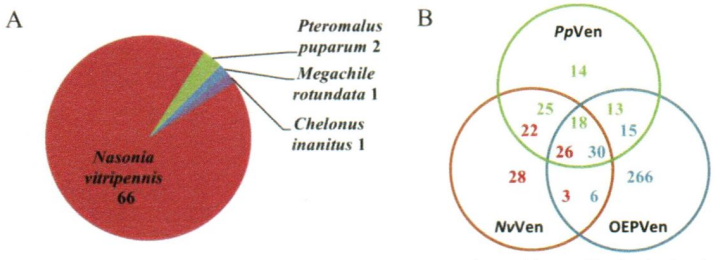


图 3.6 蝶蛹金小蜂毒液蛋白与丽蝇蛹集金小蜂和其他内寄生毒液蛋白的比较

Figure 3.6. Comparison of venom proteins from *Pteromalus puparum* to *Nasonia vitripennis* and other endoparasitoid venoms. (A) Species distribution of the top BLASTX hit in the nr database for putative venom proteins from *P. puparum*. (B) The similarity comparison among *P. puparum*, *N. vitripennis* and other endoparasitoid venoms by BLASTP with a cutoff e-value ≤ 1e-5 and bit score ≥ 50. The green numbers indicate hits from *P. puparum* venom, the red numbers indicate hits from *N. vitripennis*, and the blue numbers indicate hits from other endoparasitoid venoms. As numbers of similar kind of proteins can be different in different venom sets, the hits from different venoms can be different in same category. PpVen: venom proteins from *P. puparum*. NvVen: venom proteins from *N. vitripennis*. OEPVen: venom proteins from other endoparasitoid wasps.

2.5 蝶蛹金小蜂和丽蝇蛹集金小蜂毒液蛋白的抗体检测

结果显示，蝶蛹金小蜂毒液蛋白calreticulin、GOBP-like venom protein、venom protein U、serine protease 22 和serine protease homolog 29的抗体，也可以检测到丽蝇蛹集金小蜂中的毒液蛋白(图4.3B)。这一结果表明，类似的毒液蛋白同时存在于蝶蛹金小蜂和丽蝇蛹集金小蜂毒液中，并具有一定的抗原相似性。同时，部分蝶蛹金小蜂毒液蛋白抗体却并不能检测到丽蝇蛹集金小蜂的毒液蛋白。如GILT-like protein 并未在丽蝇蛹集金小蜂毒液中被鉴定到，因而也未能被蝶蛹金小蜂毒液蛋白GILT-like protein的抗体检测到。 但蝶蛹金小蜂毒液蛋白lipase-like venom protein和serine protease 87 的抗体也不能检测到丽蝇蛹集金小蜂毒液中的蛋白。这可能由于蝶蛹金小蜂和丽蝇蛹集金小蜂毒液蛋白间的抗原特性差异引起的，这些差异可能是序列的分歧或蛋白修饰的差异。

3 讨论

利用高通量RNA测序技术，我们对蝶蛹金小蜂的转录组进行了拼接，并对其进行了差异表达和信号肽的分析。同时，结合shotgun蛋白质组手段，我们最终鉴定了相对可靠的蝶蛹金小蜂毒液蛋白集合。

在本研究中，我们假设蝶蛹金小蜂毒液蛋白是分泌型蛋白，且在毒腺中差异性表达。然而，未在毒腺中差异性表达的基因也不能排除其为毒液基因的可能性，正如热激蛋白、碱性磷酸酶等在寄生蜂毒液中普遍存在，却并不在毒腺差异性表达。在一些极端的例子中，如波氏匙胸瘿蜂*L. boulardi*(Goecks *et al.*, 2013)中几乎所有的毒液蛋白均不在毒腺中差异性表达。在蝶蛹金小蜂中，qPCR结果表明，大部分毒液蛋白似乎是在毒腺中差异表达。另外，很多（116）unigene在毒腺中显著差异性高表达，但是却未被蛋白质组方法所检测到。这些蛋白可能并未分泌至毒囊，仅在毒液器官自身维持中起作用。或者，这些蛋白在蛋白质组检测中被遗落。这种情况在小肽的鉴定中十分常见，因为小肽难以被SDS-PAGE所保留。

尽管采用了比较严苛的过滤标准，蝶蛹金小蜂的毒液组成仍比较复杂。而寄生蜂的毒液也被认为较之社会性膜翅目毒液更为复杂(de Graaf *et al.*, 2010)。 这是因为寄生蜂为了成功寄生，其毒液必需靶向寄主的免疫、发育、代谢甚至神经等多个系统(Asgari & Rivers 2011; de Graaf *et al.*, 2010)。 而社会性膜翅目的毒液则主要用于捕食和防御。

考虑到寄生蜂寄生因子（包括毒液、PDV和其他）的多样性和复杂性，寄生蜂可能是一个被低估的基因资源宝库，可用于药物开发和抗虫基因的筛选(Danneels *et al.*, 2010; Moreau & Guillot 2005)。当然，这必需基于更多寄生蜂毒液的组分、功能及其潜在应用的大量深入研究。而本章中所鉴定的螟蛹金小蜂毒液组分为今后解析其毒液蛋白功能及进化奠定了前期基础。

表 3.4 蝶蛹金小蜂中的候选毒液蛋白列表

Table 3.4. Candidate venom proteins identified in *Pteromalus puparum*.

Genes	VG-FPKM	Carcass-FPKM	log2(VG-FPKM /Carcass-FPKM)	NR ID	NR Description
Proteases and peptidases					
comp40292_c0	64.12	24.91	1.36	XP_001604991.1	PREDICTED: chymotrypsin-1 [*Nasonia vitripennis*]
comp44498_c3	224.81	22.34	3.33	NP_001155043.1	serine protease 22 precursor [*Nasonia vitripennis*]
comp36113_c0	2008.26	2.67	9.56	NP_001155017.1	serine protease 33 precursor [*Nasonia vitripennis*]
comp29468_c0	1131.96	4.01	8.14	NP_001166090.1	serine protease 73 precursor [*Nasonia vitripennis*]
comp43143_c1	12010.35	34.87	8.43	NP_001166092.1	serine protease 87 precursor [*Nasonia vitripennis*]
comp43143_c3	320.51	1.59	7.66	NP_001166092.1	serine protease 87 precursor [*Nasonia vitripennis*]
comp44055_c7	7795.75	14.18	9.10	NP_001155016.1	serine protease homolog 29 precursor [*Nasonia vitripennis*]
comp36103_c0	3127.21	4.39	9.48	NP_001164348.1	serine protease precursor [*Nasonia vitripennis*]
comp40194_c0	353.14	0.62	9.16	XP_001600730.2	PREDICTED: blastula protease 10-like [*Nasonia vitripennis*]
comp29111_c0	373.03	2.54	7.20	XP_001604431.1	PREDICTED: A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 16-like [*Nasonia vitripennis*]
comp41685_c0	496.71	0.43	10.16	XP_001606746.2	PREDICTED: hypothetical protein LOC100123135 [*Nasonia vitripennis*]/region_name="ZnMc"

Genes	VG-FPKM	Carcass-FPKM	log2(VG-FPKM /Carcass-FPKM)	NR ID	NR Description
comp6391_c0	11.58	0.00	∞	XP_001607602.1	PREDICTED: hypothetical protein LOC100123845 [*Nasonia vitripennis*] /region_name="ZnMc"
comp44819_c3	1303.00	1.42	9.84	NP_001154991.1	lipase A-like precursor [*Nasonia vitripennis*]
comp28596_c0	1443.05	2.93	8.95	NP_001155039.1	lipase-like venom protein precursor [*Nasonia vitripennis*]
comp41786_c2	671.63	2.61	8.01	NP_001155039.1	lipase-like venom protein precursor [*Nasonia vitripennis*]
comp42555_c0	259.37	0.58	8.81	XP_003425033.1	PREDICTED: lipase member H-like [*Nasonia vitripennis*]
comp45112_c0	3395.22	6.89	8.94	XP_003425157.1	PREDICTED: pancreatic lipase-related protein 2-like [*Nasonia vitripennis*]
comp28462_c0	1339.53	3.39	8.63	XP_003426830.1	PREDICTED: pancreatic lipase-related protein 2-like [*Nasonia vitripennis*]
comp22275_c0	209.17	0.48	8.78	XP_003425157.1	PREDICTED: pancreatic lipase-related protein 2-like [*Nasonia vitripennis*]
comp36060_c0	1523.36	1.18	10.34	XP_003427888.1	PREDICTED: pancreatic triacylglycerol lipase-like [*Nasonia vitripennis*]
comp22302_c0	2085.48	2.72	9.58	XP_001605737.2	PREDICTED: hypothetical protein LOC100122136 [*Nasonia vitripennis*]/region_name="Abhydro_lipase"

Genes	VG-FPKM	Carcass-FPKM	log2(VG-FPKM /Carcass-FPKM)	NR ID	NR Description
comp44469_c0	87.90	16.55	2.41	XP_001601350.2	PREDICTED: esterase E4 [*Nasonia vitripennis*]
comp43397_c2	588.20	1.07	9.10	XP_003427357.1	PREDICTED: venom acid phosphatase Acph-1-like [*Nasonia vitripennis*]
comp23069_c0	1158.10	6.40	7.50	XP_001605452.1	PREDICTED: venom acid phosphatase Acph-1-like isoform 1 [*Nasonia vitripennis*]
comp36032_c0	7780.99	16.12	8.91	ACA60733.1	venom acid phosphatase [*Pteromalus puparum*]
comp43694_c1	11.98	0.13	6.57	XP_003428033.1	PREDICTED: ribonuclease 1-like [*Nasonia vitripennis*]
comp28533_c0	1882.32	56.40	5.06	NP_001155172.1	inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase-like precursor [*Nasonia vitripennis*]
comp42418_c0	3923.13	7.94	8.95	NP_001155087.1	endonuclease-like venom protein precursor [*Nasonia vitripennis*]
comp45389_c0	210.31	0.40	9.05	XP_003423840.1	PREDICTED: adenosine deaminase CECR1-like [*Nasonia vitripennis*]
comp28685_c0	155.45	25.07	2.63	NP_001153351.1	glucosamine (N-acetyl)-6-sulfatase precursor [*Nasonia vitripennis*]
comp22216_c0	6576.38	5.64	10.19	XP_001602184.1	PREDICTED: alpha-amylase 1-like [*Nasonia vitripennis*]
comp41097_c0	28.35	3.22	3.14	XP_003427944.1	PREDICTED: glucose dehydrogenase [acceptor]-like [*Nasonia vitripennis*]
comp45178_c0	607.76	0.77	9.62	XP_001604839.1	PREDICTED: gamma-glutamyltranspeptidase 1 [*Nasonia vitripennis*]

Genes	VG-FPKM	Carcass-FPKM	log2(VG-FPKM /Carcass-FPKM)	NR ID	NR Description
comp36384_c0	1065.20	92.54	3.52	XP_001606905.1	PREDICTED: gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase-like [*Nasonia vitripennis*]
comp39547_c0	1377.55	6.52	7.72	XP_001607237.1	PREDICTED: kynurenine--oxoglutarate transaminase 1-like [*Nasonia vitripennis*]
comp36135_c0	1720.14	2.56	9.39	XP_003704057.1	PREDICTED: kynurenine--oxoglutarate transaminase 3-like [Megachile rotundata]
comp29610_c1	24.30	0.00	∞	XP_001607234.1	PREDICTED: kynurenine--oxoglutarate transaminase 3-like [*Nasonia vitripennis*]
comp22192_c0	534.83	252.92	1.08	XP_001599732.1	PREDICTED: protein disulfide-isomerase A3-like [*Nasonia vitripennis*]
Protease inhibitors					
comp22195_c0	11118.41	33.42	8.38	XP_003425788.1	PREDICTED: hypothetical protein LOC100677882 [*Nasonia vitripennis*]/region_name="KAZAL_FS"
comp36018_c0	21799.59	571.10	5.25	XP_003424976.1	PREDICTED: hypothetical protein LOC100680056 [*Nasonia vitripennis*]/region_name="KAZAL_FS"

Genes	VG-FPKM	Carcass-FPKM	log2(VG-FPKM /Carcass-FPKM)	NR ID	NR Description
comp44498_c8	449.23	74.76	2.59	XP_001601472.1	PREDICTED: hypothetical protein LOC100117405 [*Nasonia vitripennis*]/region_name="Pacifastin_I"
comp43457_c1	214.00	105.07	1.03	XP_001602351.1	PREDICTED: hypothetical protein LOC100118367 [*Nasonia vitripennis*]/region_name="SERPIN"
Recognition and binding proteins					
comp39522_c0	11298.69	38.03	8.21	NP_001155150.1	GOBP-like venom protein precursor [*Nasonia vitripennis*]
comp36458_c0	222.54	0.19	10.22	XP_003424242.1	PREDICTED: beta-1,3-glucan-binding protein [*Nasonia vitripennis*]
comp44465_c2	177.85	0.17	10.01	NP_001155040.1	low-density lipoprotein receptor-like venom protein precursor [*Nasonia vitripennis*]
comp39967_c0	13.21	3.29	2.00	XP_001604854.1	PREDICTED: low-density lipoprotein receptor-related protein 2-like [*Nasonia vitripennis*]
Others					
comp22191_c0	590.17	217.32	1.44	ACZ68113.1	calreticulin [*Pteromalus puparum*]
comp45101_c0	9683.63	9.36	10.01	XP_003428123.1	PREDICTED: venom allergen 3-like isoform 1 [*Nasonia vitripennis*]
comp40314_c0	22.65	9.07	1.32	NP_001154975.1	major royal jelly protein-like 7 precursor [*Nasonia vitripennis*]
comp41377_c0	4040.63	3.25	10.28	NP_001154978.1	major royal jelly protein-like 9 precursor [*Nasonia vitripennis*]

Genes	VG-FPKM	Carcass-FPKM	log2(VG-FPKM /Carcass-FPKM)	NR ID	NR Description
comp42400_c0	959.54	134.66	2.83	XP_001604366.1	PREDICTED: protein FAM151A-like [*Nasonia vitripennis*]
comp42334_c0	84.05	14.01	2.58	XP_003425370.1	PREDICTED: protein lethal(2)essential for life-like [*Nasonia vitripennis*]
comp43276_c5	596.79	0.70	9.74	CBN72521.1	venom protein A1YI24CM3 [Chelonus inanitus]
Unknown					
comp22190_c0	1507.25	3.23	8.87	NP_001155171.1	venom protein D precursor [*Nasonia vitripennis*]
comp45096_c0	12371.95	110.95	6.80	NP_001164344.1	venom protein G precursor [*Nasonia vitripennis*]
comp36121_c0	1880.93	2.15	9.77	NP_001164347.1	venom protein J precursor [*Nasonia vitripennis*]
comp39496_c0	3197.36	6.01	9.05	NP_001155028.1	venom protein K precursor [*Nasonia vitripennis*]
comp22199_c0	14424.76	30.52	8.88	NP_001155029.1	venom protein L precursor [*Nasonia vitripennis*]
comp39484_c0	951.21	2.35	8.66	NP_001155031.1	venom protein O precursor [*Nasonia vitripennis*]
comp22466_c0	2360.55	4.93	8.90	NP_001155170.1	venom protein U precursor [*Nasonia vitripennis*]
comp45164_c0	4856.06	5.48	9.79	NP_001155169.1	venom protein Z precursor [*Nasonia vitripennis*]
comp28217_c0	3818.61	4.69	9.67	XP_001601835.2	PREDICTED: hypothetical protein LOC100117668 [*Nasonia vitripennis*]

Genes	VG-FPKM	Carcass-FPKM	log2(VG-FPKM /Carcass-FPKM)	NR ID	NR Description
comp39512_c0	4969.28	8.03	9.27	XP_001603579.2	PREDICTED: hypothetical protein LOC100119874 [*Nasonia vitripennis*]
comp22365_c0	1440.42	2.91	8.95	XP_001605945.2	PREDICTED: hypothetical protein LOC100122343 [*Nasonia vitripennis*]
comp44303_c0	5418.77	4.69	10.17	XP_001606517.2	PREDICTED: hypothetical protein LOC100122910 [*Nasonia vitripennis*]
comp22193_c0	1795.35	13.76	7.03	XP_003426294.1	PREDICTED: hypothetical protein LOC100678001 isoform 1 [*Nasonia vitripennis*]
comp37024_c0	3026.09	5.75	9.04	XP_003424286.1	PREDICTED: hypothetical protein LOC100678044 [*Nasonia vitripennis*]
comp22198_c0	2164.89	3.08	9.46	XP_003424263.1	PREDICTED: hypothetical protein LOC100678968 [*Nasonia vitripennis*]
comp28774_c0	1248.40	1.84	9.41	XP_003424971.1	PREDICTED: hypothetical protein LOC100679301 [*Nasonia vitripennis*]
comp41010_c0	103.99	0.86	6.92	XP_003424464.1	PREDICTED: hypothetical protein LOC100679659 isoform 1 [*Nasonia vitripennis*]

∞ indicates the infinite value from division by zero

第四章 蝶蛹金小蜂毒液 Serpin 剪接体的分析

昆虫病原物和寄生物在进化过程已衍化出丰富多样的策略用于逃避寄主的免疫(Celli & Finlay 2002; Dillman *et al.*, 2012; Nielsen-LeRoux *et al.*, 2012)。为确保成功寄生，寄生蜂常向寄主注入寄生因子如PDV或毒液蛋白等，以达到抑制寄主免疫系统的目的。其中以寄生蜂对寄主黑化反应的抑制尤为重要，因为黑化反应是包囊的重要组成部分，能最终导致寄生蜂卵的死亡(Asgari 2006; Poirie *et al.*, 2009; Schmidt *et al.*, 2001)。至今，已有少数寄生蜂寄生因子蛋白被阐明可抑制寄主的黑化反应(Asgari *et al.*, 2003; Asgari *et al.*, 2003; Beck & Strand 2007; Colinet *et al.*, 2011; Colinet *et al.*, 2009)。然而相对于寄生蜂的重要性和多样性，对其寄生因子及其背后的作用机理仍所知甚少。蝶蛹金小蜂可寄生多种蝶类，其中包括重要农业害虫菜青虫Pieris rapae (Cai *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005)。 在蝶蛹金小蜂中，除毒液外未发现有其他寄生因子如PDV、VLP或畸形细胞等(Zhu *et al.*, 2008)。 毒液作为蝶蛹金小蜂中主要的寄生因子，已被证明可调控寄主的发育和代谢(Zhu *et al.*, 2009)，并能抑制寄主的细胞免疫(Cai *et al.*, 2004; Fang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2005)和体液免疫(Fang *et al.*, 2011; Fang *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2015)。本章报道了蝶蛹金小蜂毒液中的一个Serpin可变剪接体，能抑制寄主血淋巴的PPO激活反应，并能和寄主血浆中的蛋白酶形成复合体。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

同第二章1.1。

1.2 毒液蛋白提取

同第三章1.6

1.3 寄主血淋巴收集

寄主血淋巴于冰上收集自未被免疫诱导的菜青虫幼虫或蛹，并稀释四倍至抗凝剂

(4mM sodium chloride, 40 mM potassium chloride, 8 mM EDTA, 9.5 mM citric acid, 27 mM sodium citrate, 5% sucrose, 0.1% polyvinylpyrollidone, and 1.7 mM PIPES, pH 6.8) 中。经3000 g，4 °C离心10 min去除血细胞后，血淋巴保存至−80 °C备用。

1.4 PO 活性检测

15 μl稀释后的菜青虫血淋巴与5μl抑制剂（venom protein or saturated PTU）、5 μl 激活剂（0.1 μl g/μl M. luteus）混合。样品于震荡混匀器25 °C孵育10 min后，添加800 μl底物溶液（20 mM Dopa in PBS, pH=6.5），并取200 μl置于96孔板中检测吸光值A470 20 min（Varioskan Flash multimode reader, Thermo Scientific, USA）。一个PO活性单位被定义为0.001 ΔA470/min。另，为提高PO检测的通量，检测方法进一步被修改至384孔板中。10 μl稀释后的血浆与5 μl蛋白、5 μl激活剂 (0.1 μg/μl M. luteus) 及5 μl底物溶液(50mM L-Dopa in PBS, pH=7.5)混合。混匀后，置于酶标仪Varioskan Flash multimode reader 检测A470，检测频率为每5分钟一次，共检测2小时。统计检验采用Data Processing System (DPS) v 13.5 (Tang & Zhang 2013)。两样本间比较采用Student T检验，多样本间比较采用ANOVA分析后的Tukey多重比较检验。

1.5 毒液蛋白分离

毒液蛋白被稀释至2 ml溶液A (25 mM Tris-HCl, pH=7.5)中，并被上样品至Bio SAX柱(5 μm, 4.6 × 50 mm, Agilent, USA)，利用 Biologic Duo-Flow high performance chromatography system (Bio-rad, Germany)，采用溶液B (25 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH=7.5)进行梯度洗脱。蛋白洗脱速率为0.5 ml/min，并在吸光值280 nm对蛋白进行监测。洗脱组分采用BioLogic BioFrac fraction collector按每管200 μl收集至Eppendorf深孔板中，并用Zeba spin desalting plate (Thermo Scientific, USA)进行脱盐。分离所得组分保存于−80 °C备用。

1.6 分离蛋白的鉴定

为了鉴定毒液中抑制寄主PO活性的组分，200 μl 挑选混合后的组分采用FASP (Filter-aided sample preparation)方法(Wisniewski *et al.*, 2009)进行酶解。尔后，质谱鉴定采用Easy nLC HPLC system (Thermo Scientific, USA) 及Q-Exactive (Thermo Finnigan, USA)。

在本研究中，样本先被上样至Thermo scientific EASY column (5μm, 2cm × 100μm, C18)，然后在另一Thermo scientific EASY column (3 μm, 75 μm × 100 mm, C18) 上进行分离，所用流速为250 nl/min。溶液A为0.1% 甲酸，溶液B为含0.1%甲酸的84%乙腈，洗脱梯度为50 min内从0% 升至50% 溶液B, 然后在4 min 内从50% 升至100%溶液B。每次全扫描收集肽段或其碎片的荷质比10次。MS/MS质谱结果采用Mascot (Perkins *et al.*, 1999)比对翻译后的蝶蛹金小蜂转录组（详见第三章材料方法部分）。Max missed cleavages设为2，Carbamidomethyl of cysteine设为fixed， oxidation of methionine设为variable modifications。Peptide confidence < 0.01 用于过滤肽段的鉴定。该部分工作委托上海中科新生命完成。

1.7 特异性 RT-PCR

雌蜂的解剖和RNA提取及反转录详见第二章材料方法部分。跨越外显子7和外显子8的可变剪接体特异性引物采用软件PerlPrimer V1.1.21(Marshall 2004) 进行设计，并列于Table S1中。可变剪接特异性序列采用TransTaq HiFi DNA Polymerase进行PCR扩增，并切胶回收送至上海博尚测序验证。

表4.1 可变剪接体测序验证所用特异引物的列表

Table 4.1. Primers for confirmation of splicing isoform version and isoform-specific RT-PCR.

Primer	Sequence
Shared forward primer (except isofrom O)	5'-GACTGACATGTTCACCAACTCTG-3'
isoform-A reverse primer	5'-TTAAACAGTTTCCGGATG-3'
isoform-B reverse primer	5'-TTAGCTCCTCGGCTGTACG-3'
isoform-C reverse primer	5'-TTACAAATCTGATACAGTGC-3'
isoform-D reverse primer	5'-TCAATGCTGTACTGGATTATTC-3'
isoform-E reverse primer	5'-TCACAATTTCTCAACAG-3'
isoform-F reverse primer	5'-TTATCCAAAAATCACTG-3'
isoform-G reverse primer	5'-TTACAATTCATTTGAAG-3'
isoform-H reverse primer	5'-TTAAGCTGTAGGGTTAATAATATATC-3'
isoform-I reverse primer	5'-TTACGGTTTAATTACAG-3'
isoform-J reverse primer	5'-TTATGGAGCTAAGACTTG-3'
isoform-K reverse primer	5'-CTATGGGTCAAGCACGAATC-3'
isoform-L reverse primer	5'-TCACAGACTCGGGTCTTG-3'
isoform-M reverse primer	5'-TTAGTTGGTGGGCGATC-3'
isoform-N reverse primer	5'-TTATAGCGTTCTGACCAG-3'
isoform-P reverse primer	5'-TCACAATGTTGGTTCGCCG-3'
isoform-O forward primer	5'-AAGCAAAGTTACGCAGAAGG-3'
isoform-O reverse primer	5'-GTTGTCATCACCGAATCTAATGTC-3'
18S rRNA forward primer	5'- CGAGCGATGAACCGACAG-3'
18S rRNA reverse primer	5'- CGGGGAGGTAGTGACGAA-3'

1.8 序列分析

已报道的转录本和蝶蛹金小蜂转录组中的转录本，Serpin基因的结构采用Splign (Kapustin *et al.*, 2008) 进行预测。多序列比对采用MUSCLE v3.8 (Edgar 2004)。*Pp*SVI的三维结构采用Swiss-model (Arnold *et al.*, 2006; Biasini *et al.*, 2014) 进行建模，所用模板结构为2H4R (PDB ID)，并利用PyMOL v1.7.0.0 (http://pymol.sourceforge.net/)进行作图。信号肽采用SignalP 4.1(Petersen *et al.*, 2011)进行预测。

1.9 重组蛋白的表达及纯化

重组质粒采用ClonExpress One Step Cloning Kit (Vazyme, China)进行构建。其中插入的目的片段和线性化的pFast-Bac-HTB 载体均采用PCR扩增获得，所采用的引物列于表4.2中。线性化的pET-28a载体采用BamHI和 XhoI (TaKaRa, Dalian, China)双酶解获得。对于E. coli中的蛋白表达，重组的pet-28a质粒被转化至BL21 (DE3)感受态，并经过测序验证。在含100 μg/μl 卡那霉素的自动诱导培养基中20 ℃振荡培养48 h后，E. coli 于4 ℃ 10000 g离心10 min收集。对于杆状病毒系统中的蛋白表达，重组的 pFAST-HTB质粒根据说明书用于制备重组杆状病毒。感染杆状病毒后，100 ml Sf9细胞(2 × 106 cells/ml) 于Sf-900 II serum-free medium 28 ℃ 90 rpm振荡孵育72 h。尔后，于4 ℃、1000 g 离心20 min收集细胞。根据说明书步骤，表达自*E. coli* 和Sf9细胞的重组蛋白均采用His-Bind Purification Kit (Novagen) 进行纯化。蛋白浓度采用Bradford法(Bradford 1976)进行测定。

表4.2 重组表达载体构建所用的引物序列

Table 4.2. Primers used for construction of recombinant plasmids.

Insert DNA or linear vector	Forward primer	Reverse primer
pET-28a-PpSVI	5′-AGCAAATGGGTCGCGGATCCGAGGACAAGGCAGTGGAGGC-3′	5′-GTGGTGGTGCTCGAGTTATTCAGCGATCGGATCAG-3′
pFast-Bac-HTB-PpSVI	5′-GATATCCCAACGACCGAGGACAAGGCAGTGGAGGC-3′	5′-ACCGCATGCCTCGAGTTATTCAGCGATCGGATCAG-3′
pET-28a-eGFP	5′-AGCAAATGGGTCGCGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG-3′	5′-GTGGTGGTGCTCGAGTTACTTGTACAGCTCGTCCATG-3′
Linear pFast-Bac-HTB	5′-GGTCGTTGGGATATCGTAATCGTGATG-3′	5′-CTCGAGGCATGCGGTACCAAGCTTG-3′

1.10 Pull-down 试验

1 ml稀释的菜青虫幼虫血淋巴与50 μl 饱和PTU溶液、100 μl M. luteus (1 μg/μl)、5 μl 重组蛋白(2 μg/μl) 于4 °C孵育过夜。12000 g、4 °C离心20 min后，上清与25 μl cOmplete His-tag purification resins (Roche) 于4 °C孵育2 h。含树脂的血淋巴转移至离心柱，多次1000 g离心2 min直至所有样本转移完全。树脂进一步采用300 μl洗涤溶液(1 M NaCl, 120 mM imidazole, 40 mM Tris-HCl, pH 7.9) 洗涤，最终用50 μl洗脱液(1 M imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.9)洗脱。洗脱组分采用SDS-PAGE分析，并进行Lumitein protein gel stain (Biotium, Hayward, CA, USA)染色或抗体免疫检测。

1.11 抗体制备

*Pr*HP8和*Pr*PAP1的抗体采用南京金斯瑞公司的PolyExpress Custom Polyclonal Antibody Production Service。肽段CPTSEELHGNSYEGW和CHSGFSDSDNSRPDD被合成并偶联至keyhole limpet hemocyanin (KLH)分别用于制备*Pr*HP8和*Pr*PAP的抗体。

1.12 Western Blotting

对于*Pr*PAP1和*Pr*HP8的检测详见。对于重组蛋白His tag标签的鉴定，一抗采用THE His Tag鼠抗，二抗为羊抗鼠IgG antibody (H&L) HRP conjugate (GenScript, Nanjin, China)。

2 结果与分析

2.1 蝶蛹金小蜂毒液对寄主黑化反应的影响

为了确保寄生蜂后代的发育，寄生蜂常注射毒液以抑制寄主的免疫，其中就包括寄主的黑化反应。与预期一致，蝶蛹金小蜂毒液也可抑制菜粉蝶蛹和幼虫的血淋巴黑化反应(图4.1A; Student T-test: for hemolymph from pupae, $t = 5.68$, $df = 4$, $p < 0.01$; for hemolymph from larvae, $t = 37.86$, $df = 4$, $p < 0.001$)。虽然菜粉蝶蛹期是蝶蛹金小蜂的自然寄生寄主，但菜粉蝶幼虫更容易用于收集大量清澈的血淋巴。因而，接下来的实验均采用菜粉蝶幼虫的血淋巴进行。

为增加PO活性检测的通量，检测方法进一步进行了修改至384孔板中。底物(L-dopa)、

激活剂(M. luteus) 和抑制剂(PTU、毒液或其他蛋白) 在384孔板中混匀。稀释的血浆样本加入到另一384孔板中，通过离心同时将各个样品混合。尔后，置于酶标仪中检测吸光值470 nm。结果显示，不含抑制剂的样本有5 min左右的滞后阶段，然后吸光值迅速上升并最终达到平台期 (图4.1B)。而含有毒液的样本具有更长的滞后期，1 VRE (venom reservoir equivalent)为20 min 左右，2 VRE 为35 min左右，4 VRE 为40min左右。含有毒液的样本也显示了更平缓的斜率，以及在120min时更低的470 nm吸光值。最终，在120 min的吸光值用于进一步的统计分析 (图4.1C；ANOVO：$df = 6$，$F = 47.245$，$p < 0.001$)。这些结果表明，蝶蛹金小蜂毒液可在体外抑制寄主血淋巴的黑化反应，并呈现剂量效应。

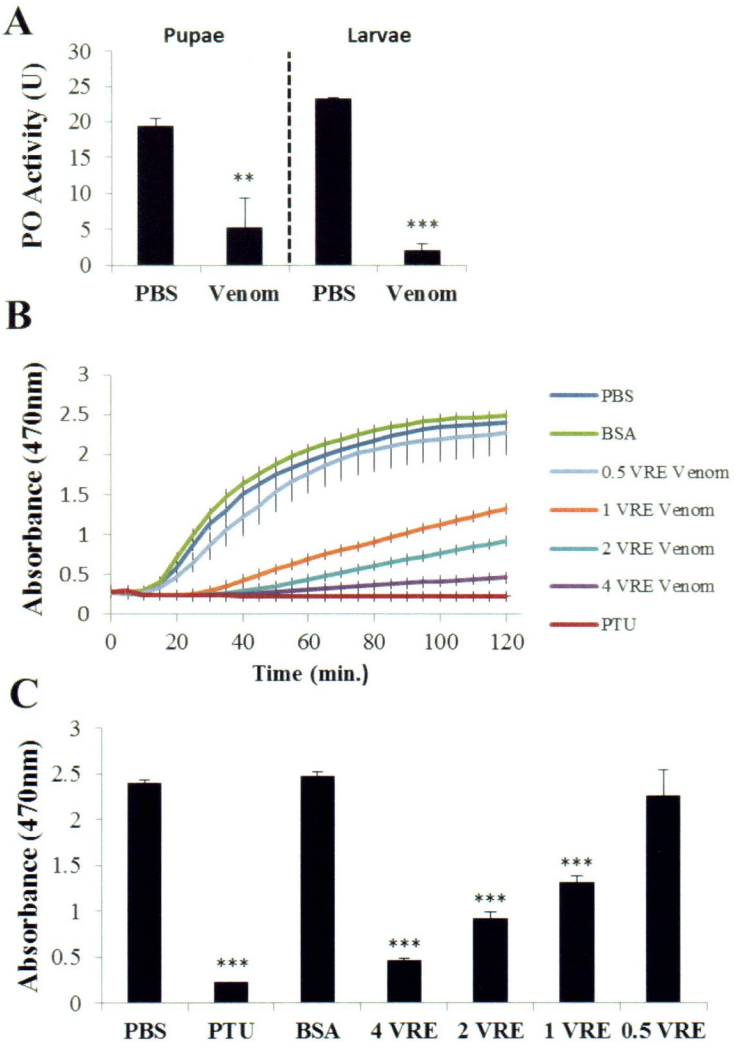


图 4.1 蝶蛹金小蜂毒液抑制菜青虫血淋巴 PO 活性

Figure 4. 1. Venom from Ptreomalus puparum inhibit P. rapea hemolymph PO activity. A, effect of *P. puparum* venom on PO activity of P. rapea hemolymph from larvae and pupae. B, dose-dependent suppression of host hemolymph PO activity by *P. puparum* venom. Dopa chrome or dopamine chrome (melanization intermediates) was monitored at A470 every 5 min for 2 h. C, summary of absorbance A470 at 120 min from (B). All values are present as mean ±

S.E. (n=3). Asterisks indicate significant differences from PBS as the control. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

2.2 毒液 Serpin 可变剪接体的分离及鉴定

在第三章中，70个毒液蛋白被鉴定为候选的蝶蛹金小蜂毒液蛋白(Yan *et al.*, 2016)。蛋白酶抑制剂、丝氨酸蛋白酶、丝氨酸蛋白酶同系物、beta-1,3-glucan-binding蛋白，以及一些功能未知的蛋白在蝶蛹金小蜂毒液中呈现。这些蛋白均有可能在抑制寄主黑化反应中起一定的作用。为了揭示蝶蛹金小蜂毒液中抑制寄主黑化反应的因子，我们对蝶蛹金小蜂毒液进行了基于活性追踪的分离纯化。

采用阴离子交换柱，首先对来自1000个毒囊左右的毒液进行分离，共收集182个组分(图4.2A)。这182个收集组分中，组分76–81可强烈抑制寄主血淋巴的黑化反应。这些组分被混合后进一步采用同一阴离子交换柱进行分离(e.g. 20%-25% buffer B in 40 min, 图4.2B)，共收集95个组分。惊讶的是，抑制黑化的活性峰与A280nm的吸收峰并不重合。这暗示毒液中起抑制黑化反应作用的组分含量较低。

将具有抑制黑化作用的组分36–45 混合后，进行SDS-PAGE跑胶及银染 (图4.2C)。结果显示，分离的混合组分中仍有两条主带（55 kDa和77 kDa）及一些次要条带。同时，组分36–45 混合后酶解并进行LC-MS/MS蛋白质谱鉴定。通过比对蝶蛹金小蜂转录组数据库，一个Serpin的可变剪接（comp44322_c1_seq8）被鉴定到（图4.2D–E），并具有最高的鉴定得分。这一鉴定到的Serpin可变剪接被命名为*P. puparum* serpin venom isoform（*Pp*SVI）。总共有14条来自该可变剪接体的肽段被鉴定，其中3条为该剪接体所特有。通过blastp比对NCBI数据库，*Pp*SVI 匹配至*Nasonia vitripennis* ovalbumin-related protein X isoform X12 (XP_001606111)序列。该序列也是丽蝇蛹集金小蜂LOC100122505基因的一个可变剪接体。其他在混合组分中鉴定到的蛋白还有venom allergen 3-like isoform 1 (comp45101_c0_seq1)、alpha-amylase 1-like (comp22216_c0_seq1)、hypothetical protein LOC100117405 (comp44498_c8_seq1)、endonuclease-like venom protein precursor (comp42418_c0_seq1) 等。另，值得一提的是，该Serpin基因的其他可变剪接体均未在该混合组分中被鉴定到。

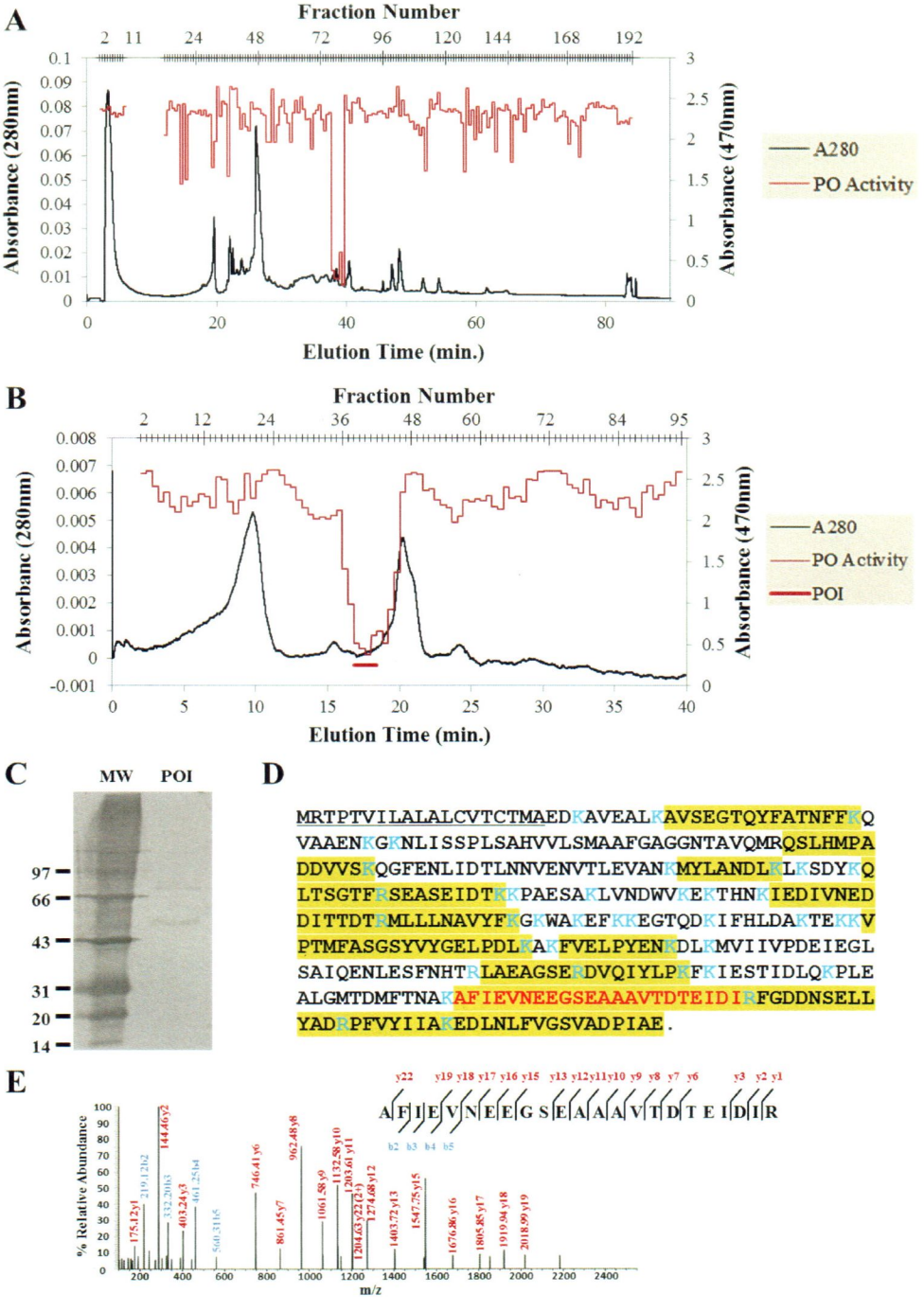


图 4.2 *Pp*SVI 的部分分离和蛋白鉴定

Figure 4.2. Partial separation and identification of *Pp*SVI. A, chromatograph of total *P. puparum* venom by Bio SAX column. Venom protein (~ 1000 RVE) was eluted with a gradient of buffer B from 0% to 100% at flow rate of 0.5 ml/min. B, chromatograph of pooled fractions 76-81 from (A) on the same column with a shallow gradient of buffer B from 20% to 25% in 40 min. Fractions 36–45 was denoted as POI and indicated by red bar. These fractions were pooled together for further SDS-PAGE and LC-MS/MS analysis. C, SDS-PAGE analysis of pooled fraction POI followed by silver staining. D, amino acid sequence of *Pp*SVI with peptides identified by MS (highlighted residues). Trypsin cleavage sites are demarcated in blue. The first isoform-specific tryptic peptide of *Pp*SVI is colored in red. E, MS/MS map marked with b ions (blue) and y ions (red) for the first isoform-specific tryptic peptide of *Pp*SVI.

2.3 序列分析

鉴定到的*Pp*SVI转录本comp44322_c1_seq8共1806 bp长，其中开放阅读框为1197 bp，具有220 bp的 5'非编码区和389 bp的 3'非编码区，其中包括poly-A尾巴(supplemental Fig. S3). 该ORF编码399个氨基酸，其中前19个氨基酸为信号肽。其成熟蛋白的预测分子量为42.1 kDa，预测等电点为4.8。为了确证这个剪接体不是由转录组错误拼接产生，序列采用PCR扩增并测序验证（正向引物：5'-GCGTTAGCGTCTGGAACTCA-3'；反向引物：5'-AAACAGATTGAGTTTGCGGA-3'）。结果表明，该剪接体的转录本缺为真实存在。

为了探明*Pp*SVI的基因结构，采用蝶蛹金小蜂RNA-seq数据及*N. vitripennis* LOC10012250518基因的18个可变剪接，对其基因结构进行预测。结果共16个潜在可变剪接体被预测，并依次命名为可变剪接体A-P，其中可变剪接体O即鉴定到的毒液可变剪接体(Fig. 3A–B)。这16个可变剪接体共享前7个外显子，但外显子8却各不相同。可变的外显子8包含Serpin活性中心，决定了其功能特异性(图4.3A)。虽然这16个可变剪接体在外显子8中均不相同，但比对结果表明，4个氨基酸位点在16个可变剪接体中完全一致，另6个位点为高度保守(图4.3C)。这些保守的位点在Serpin的可变剪接体行使功能时可能起到重要的作用。

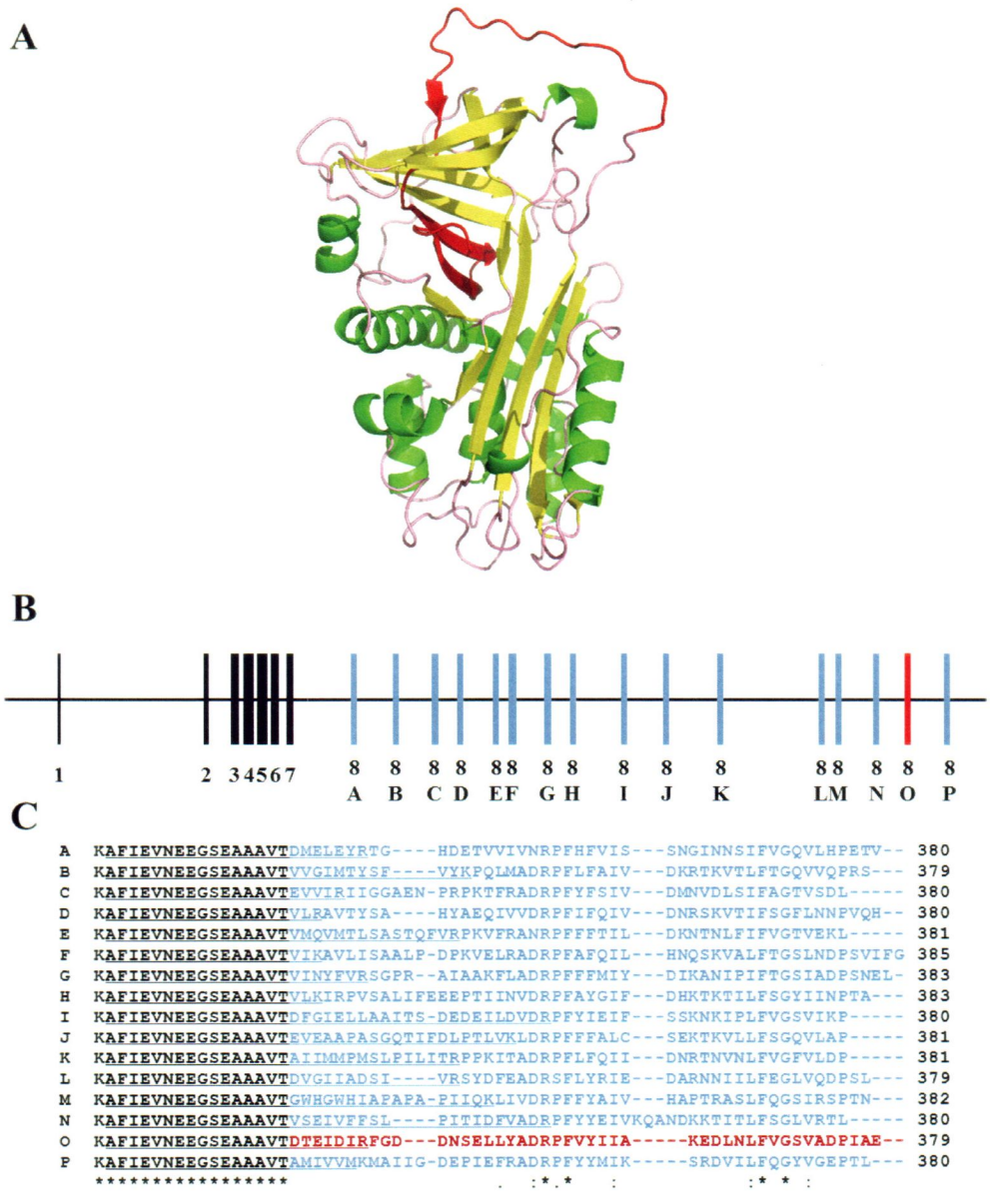


图 4.3 *Pp*SVI 所在 Serpin 基因的不同可变剪接形式

FIGURE 4.3. Alternative splicing of the serpin gene for *Pp*SVI with different versions of exon 8 producing different reactive center loops. A. Predicted tertiary protein structure of *Pp*SVI. The alternative splicing region in the *Pp*SVI is colored in red. Yellow and green indicate α-helices and β-sheets, respectively. B, structure of the serpin gene for *Pp*SVI. The constant coding regions from exon 1 to 7 are colored in black. Coding regions of variable exon 8 are colored in

red for *Pp*SVI and blue for other isoforms. C, amino acid alignment of the carboxyl termini of the 16 predicted isoforms starting with Thr335. The isoform-specific sequences are colored in red for *Pp*SVI and blue for other isoforms. The first isoform-specific tryptic peptides are underlined. An * (asterisk) indicates positions which have a single, fully conserved residue. A : (colon) indicates conservation between groups of strongly similar properties. A . (period) indicates conservation between groups of weakly similar properties.

2.4 剪接体特异的 RT-PCR

为了确定这些可变剪接体是否真实表达，采用跨过外显子7和外显子8的特异引物进行PCR验证。除了可变剪接体L外，其余15个可变剪接体均能在雌蜂cDNA中被PCR扩增并测序确认 (图4.4)。这15个被确认的可变剪接体中，包括之前未被转录组(Yan *et al.*, 2016)成功拼接的可变剪接体A, C, D, F, I, J 和 N。

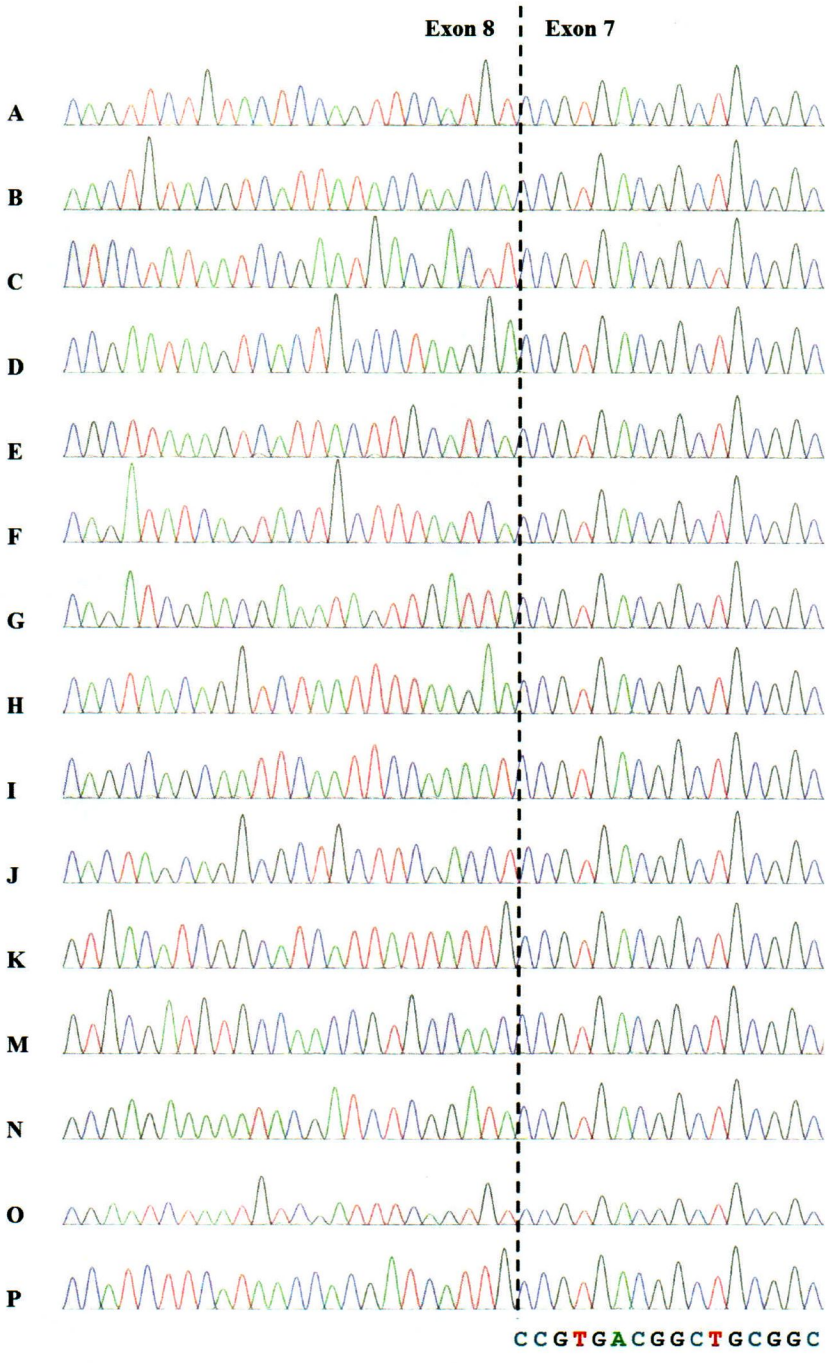


图4.4 15个可变剪接体（除L外）的测序验证结果

Figure 4.4. The sequencing results of 15 splicing isoforms (expect isoform L) spanning from exon 7 to exon 8. The sequences are presented in reverse complementary format. Nucleotide acid A, T, C and G are shown in green, red, blue and black, respectively. The dash line indicates the separation of exon 7 and exon 8.

为进一步探明*Pp*SVI的表达分布，分别对蝶蛹金小蜂头、胸、卵巢、毒腺及残体（去除毒液器官及卵巢的腹部）进行了特异性 RT-PCR检测（图4.5）。结果显示，*Pp*SVI虽然在胸部和卵巢中也有少量表达，但在毒腺中大量差异表达。这一结果表明*Pp*SVI更可能是真实的毒液蛋白，而非由样本处理过程中泄露引起。 但是由于外显子8N 和8O之间的内含子保留事件，无法设计特异引物用于实时定量PCR以检测可变剪接体O（也就是*Pp*SVI)的表达分布（图4.5）。

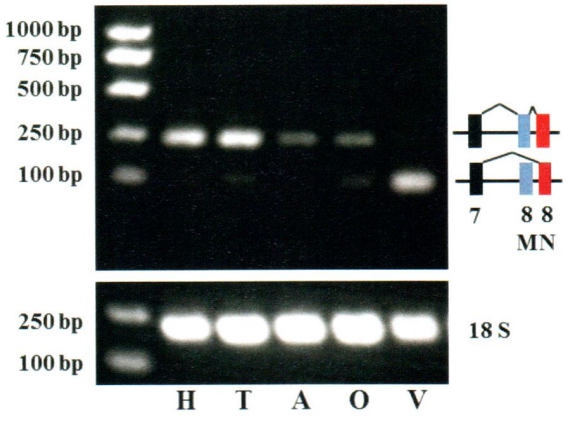


图 4.5 *Pp*SVI 在雌蜂各组织中表达分布

Figure 4.5 Expression pattern of *Pp*SVI in wasp female adult. Isoform-specific PCR was conducted using cDNAs of different tissues dissected from wasp female adults. H: head; T: thorax; A: abdomen without ovary and venom apparatus; O: ovary; V: venom gland.

2.5 重组 *Pp*SVI 蛋白对寄主黑化反应的影响

为了检测*Pp*SVI的功能，重组的*Pp*SVI蛋白被表达并用于检测其对寄主PPO激活的影响。去除作为信号肽的前19个氨基酸后，成熟*Pp*SVI 的编码序列被分别克隆至pFast-HTB和pet-28a载体中。重组蛋白*Pp*SVI在大肠杆菌和杆状病毒系统中均能成功表达(图4.6A)。大肠杆菌中表达的重组*Pp*SVI蛋白具有48 kDa左右的分子量，与预测的45.7 kD的分子量大小接近。杆状病毒中表达的分子量大小为45 kDa，与预测的分子量大小44.3 kDa接近。

当重组蛋白先与寄主血淋巴混合再加入激活剂， 表达自大肠杆菌和杆状病毒的重组蛋白*Pp*SVI (0.5 μg)均能显著抑制寄主的血淋巴黑化反应 (图4.6B; ANOVO: df = 7, F =

125.63, p < 0.001)。其抑制效果同样是剂量依赖的 (图4.6C)。 当重组蛋白与事先激活的血淋巴孵育，仅PTU可以显著抑制血淋巴的PO活性(图4.6D; ANOVA: df = 7, F= 125.63, p < 0.001)。除去PTU后，其他处理间没有显著性差异(图4.6D; ANOVA: df = 6, F = 2.01, p = 0.14, PTU was excluded in this ANOVA analysis)。这些结果表明*Pp*SVI 以及蝶蛹金小蜂毒液可抑制寄主血淋巴的PPO激活途径，但不直接抑制已激活的PO酶。

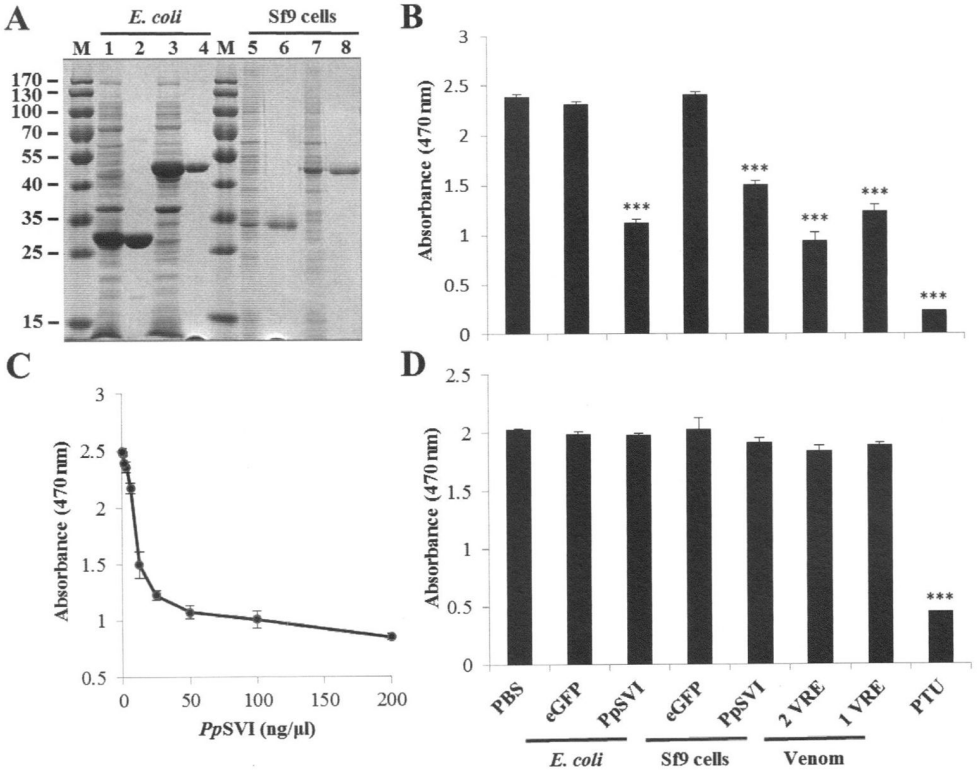


图 4.6 重组 *Pp*SVI 抑制寄主血淋巴的 PPO 激活反应

Figure 4.6 Inhibition of host PPO activation by recombinant *Pp*SVI. A, expression and purification of recombinant *Pp*SVI. M: marker, 1: cell lysate of *E. coli* transformed with pet-28a/eGFP; 2: purified recombinant eGFP from E. coli. 3: cell lysate of *E. coli* transformed with pet-28a/*Pp*SVI, 4: purified recombinant *Pp*SVI from E. coli. 5: cell lysate of Sf9 cells infected by Baculovirus-eGFP. 6: purified recombinant eGFP from Sf9 cells, 7: cell lysate of

Sf9 cells infected by Baculovirus-*Pp*SVI. 6: purified recombinant *Pp*SVI from Sf9 cells. B, effect of recombinant *Pp*SVI on host PO activity. Recombinant proteins (0.5 μg) were incubated with naïve *P. rapea* hemolymph for 5 min before adding *M. luteus*. C, dose-dependent suppression of host PO activity by recombinant *Pp*SVI purified from *E. coli*. D, effect of recombinant *Pp*SVI on PO activity of pre-activated *P. rapea* hemolymph. Hemolymph was activated by incubating with *M. luteus* for 30 min before adding recombinant proteins. All values are present as mean ± S.E. (n=3). Asterisks indicate significant differences from PBS as the control. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

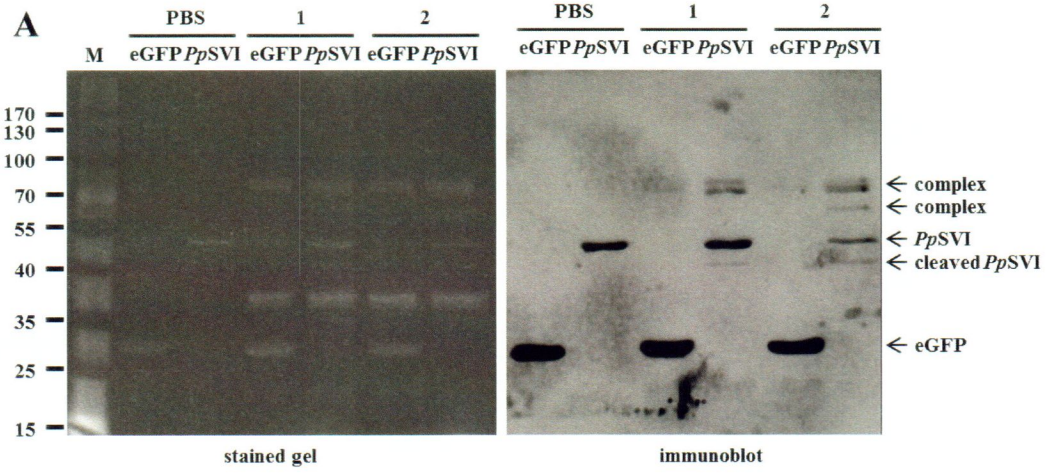
2.6 潜在靶标蛋白的鉴定

Serpin可通过与丝氨酸蛋白酶形成复合体来抑制靶蛋白的活性(Gettins 2002)。为了鉴定*Pp*SVI在寄主血血淋巴中的潜在靶标，采用了pull-down分析，并对其中的特异性条带进行了LC-MS/MS蛋白质谱鉴定。

当*Pp*SVI与事先激活的寄主血淋巴孵育时，蛋白荧光染色结果显示，出现有两条特异性的带，分别位于37 kDa和 78 kDa大小。而His-tag抗体的western结果则显示有3条特异性条带（图4.7A）。这三条特异条带中，两条位置相近，均在78kDa左右，第3条位于完整的*Pp*SVI 下方，具有分子量大小约41 kDa。有趣的是，当*Pp*SVI先与未激活的寄主血淋巴孵育30min后再加入激活剂，出现有另一特异条带，且能被蛋白荧光染色和His-tag抗体同时检测到，具有分子量大小约64 kDa（图4.7A）。

根据LC/MS-MS蛋白质谱鉴定结果，完整*Pp*SVI以下 37 kDa位置的特异性条带主要含有来自*Pp*SVI的肽段，推测其可能为被剪切后的*Pp*SVI。而位于78 kDa附近的两条特异性条，含有来自*Pp*SVI及两个寄主血淋巴蛋白酶的肽段。这两个寄主血淋巴蛋白酶分别为菜青虫转录组中的comp47849_c0 (图4.7B) 和comp44977_c0 (图4.7C)。其中，comp47849_c0 在NCBI数据库中比对至Manduca sexta hemolymph proteinase 8 (HP8, AAV91006.1) ，与其具有59% 的identities和72%的positives，并被命名为*Pr*HP8 (图4.7B). comp44977_c0 则匹配到Danaus plexippus prophenol oxidase activating enzyme precursor (PAP, EHJ64711.1)，与其具有60%的identities和72%的positives，并被命名为*Pr*PAP1 (图4.7C)。同时，来自*Pr*HP8和*Pp*SVI的肽段在64 kDa的特异性条带中被鉴定到。

我们推测位于*Pp*SVI上方的特异性条带为*Pp*SVI分别与寄主血淋巴蛋白酶*Pr*PAP1和*Pr*HP8形成的复合物。这些复合物进一步被*Pr*HP8和*Pr*PAP1的抗体所识别(图4.8)。相反，*Pr*PAP1 和*Pr*HP8均未在增强型绿色荧光蛋白enhanced green florescent protein (eGFP)的pull-down样品中被检测到(图4.8)。



B *Pr*HP8

IYGGDKTDIDEHPWMALLRYDKPKGSHGFYCGGVLISSRYILTAAHCIKGADIPPSWKLSHV
RLGEWNLTSEMDCRSNDCSPPVVDVPVEKLIPHEDYRPRDGNQQNDIALIRLGREVKFNDFV
KPICLPTSEELHGNSYEGWDMEVAGWGKTEHGSTSDVKLKVKLPIVSHQNCMEVYALASRLI
TDKQLCAGGLDGQDSCRGDSGGSLMGQATKKKWFAFGVVSYGPSPCGTPGWPGVYTRVTAFS
DWILTKLEP.

C *Pr*PAP1

IFGGIIADLDEFPWMALLGYRTKNDKVTYQCGGVLFNHRYVLTAAHCVTGQILTVVGKLERVRLGEYDTQTDLDC
LADDCAEPVQEILVQAAYPHSGFSDSDNSRPDDIALVRLTKRARYSDFVSPICLPDYQQPLPPVGDEVLVAGWGK
TLEGKSSPVKVKLSIPMFDKRECVNKYATLKAYLRDKQLCAGGIFAKDSCKGDSGGPLMKRTGDIWTCIGVVSFG
YGCGRDGWPGVYSSVASYMDWIQDKLQSTNV.

图 4.7 *Pp*SVI 所形成符合体中 *Pr*HP8 和 *Pr*PAP1 的蛋白鉴定

Figure 4.7. Identification of *Pr*HP8 and *Pr*PAP1 in the complexes of *Pp*SVI formed with P. rapea proteins. A, SDS-PAGE analysis of *Pp*SVI pull-down samples followed by florescent stain and immunoblot using antibody against His-tag. Treatment 1: hemolymph plus M. luteus and followed by recombinant *Pp*SVI 30 min later; Treatment 2: hemolymph plus recombinant *Pp*SVI and followed by M. luteus 30 min later. B-C, Amino acid sequences of mature *Pr*HP8 (B)

and *Pr*PAP1 (C) with peptides identified by MS (highlighted residues). Trypsin cleavage sites demarcated in blue.

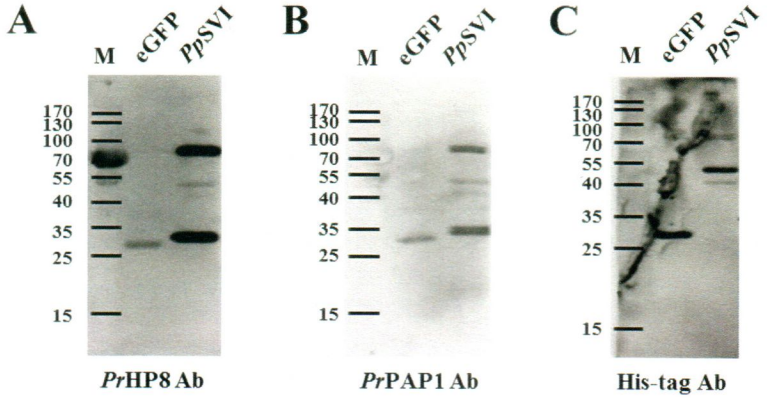


图 4.8 抗体检测 *Pp*SVI 复合体中的 *Pr*HP8 和 *Pr*PAP1

Figure 4.8. Recognition of *Pr*HP8 and *Pr*PAP1 in the complexes of *Pp*SVI by immunoblot. Hemolymph was activated by incubating with M. luteus for 30 min before adding recombinant proteins. Pull-down samples was subjected to SDS-PAGE followed by immunoblot using antibodies against *Pr*HP8 (A), *Pr*PAP1 (B) and His-tag (C), respectively.

3 讨论

抑制寄主黑化反应是寄生蜂中常见的策略。但是在不同的寄生蜂系统中，不同的蛋白被招募来完成这一趋同的功能。已经被报道的可抑制寄主黑化反应的有菜粉蝶微红绒茧蜂 *C. rubecula* 中serine proteinase homolog (SPH) (Asgari *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004) 和小肽 Vn 4.6 (Asgari *et al.*, 2003)、波氏匙胸瘿蜂 *L. boulardi* 毒液中的extracellular superoxide dismutase (SOD) (Colinet *et al.*, 2011) 和 Serpin (Colinet *et al.*, 2009)，以及来自毁侧沟茧蜂 *M. demolitor* PDV 的epidermal growth factor-like (Egf) proteins (Beck & Strand 2007; Lu *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2008)。据估计，寄生蜂多达600,000多种，是极为丰富多样的昆虫种类 (Heraty 2009)。考虑到寄生蜂的多样性，其中抑制黑化寄生因子可能是一个被低估的生物资源宝库，在害虫防治中有着广阔的应用前景。

通过基于活性追踪的分离纯化的方法，一个Serpin的可变剪切体*Pp*SVI在蝶蛹金小蜂毒

液中被鉴定到，并可抑制寄主的黑化反应。这一可变剪接在第三章中的蝶蛹金小蜂毒液蛋白质组鉴定中也被鉴定到(Yan *et al.*, 2016)。但是，之前研究仅采用了基因位点来估计表达量，并未考虑各个可变剪接的表达水平。因此，该*Pp*SVI并未包含于第三章所鉴定到的70个毒液蛋白中。

在昆虫中，Serpin基因进化出可变剪接机制。这些可变剪接体来自同一个基因，但具有不同的反应中心环，以产生多个功能的Serpin。Serpin的可变剪接首次在M. sexta中得到报道，其Serpin-1具有12个可变剪接体(Jiang & Kanost 1997; Jiang *et al.*, 1996)，同样，Serpin的可变剪接也在其他昆虫如Bombyx mori (Zhen *et al.*, 2009), Choristoneura fumiferana (Zheng *et al.*, 2009) and Anopheles gambiae (Suwanchaichinda & Kanost 2009)等中被发现报道。在本研究中，所鉴定的Serpin基因被预测有至少16个可变剪接体 ，其中15个已通过RT-PCR被证明在雌蜂成虫中表达。而未被检测到的可变剪接体L则可能在除雌蜂成虫外的其他发育阶段被表达。除毒液可变剪接体*Pp*SVI外，其他14 个表达的可变剪接体可能起到调控寄生蜂自身的功能，或者也可能被招募至胚胎期或幼虫期用于调控寄主的生理反应。它们的真实功能仍有待进一步验证。

第五章 蝶蛹金小蜂毒液犬尿氨酸转氨酶的分析

寄生蜂中，另一常见的策略为通过寄生因子抑制寄主的细胞免疫(Asgari & Rivers 2011; Er *et al.*, 2011; Schmidt *et al.*, 2001)。前期研究表明，不同寄生蜂可通过各异的毒性蛋白，利用不同作用机制，以达到抑制寄主细胞免疫的目的(Beck & Strand 2005; Colinet *et al.*, 2007; Dani & Richards 2009; Labrosse *et al.*, 2005; Mortimer *et al.*, 2013; Richards & Dani 2008; Zhang *et al.*, 2006)。蝶蛹金小蜂中的前期研究也表明，其毒液可以改变寄主血细胞形态，抑制血细胞包囊反应，同时也可诱导细胞死亡(Cai *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2011)。然而，至于何种毒液蛋白在蝶蛹金小蜂毒液中诱导细胞死亡及其作用机理仍完全未知。而寄生蜂毒液中的致死蛋白可以显著影响寄主的细胞免疫，因而有望作为候选的杀虫基因，用于抗虫转基因作物的培育和杀虫病原物的改造。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

同第二章1.1。

1.2 毒液蛋白提取

同第三章1.6。

1.3 毒液蛋白的分离

同第四章1.5。

1.4 细胞死亡检测

根据说明书步骤，采用CellTox™ Green Cytotoxicity Assay试剂盒对Hi-5细胞死亡进行检测。取50 μl含有CellTox染料的Hi-5细胞（1×10^5 cell/ml）铺板至384孔板中，加入5μl毒

液分离组分25° C孵育。尔后，分别于24h、48h和72h后，采用酶标仪Varioskan Flash multimode reader检测荧光强度。所用激发波长为490nm，发射波长为525nm。

1.5 SDS-PAGE 及蛋白染色

蛋白经12% SDS-PAGE分析后，采用Lumitein Protein Gel Stain进行蛋白染色。

1.6 序列分析

前导肽切割位点的预测采用ProP 1.0 （http://www.cbs.dtu.dk/services/ProP/）。线粒体前导肽预测采用TargetP 1.1（http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/）。其他序列相关分析参见第四章1.8。

1.7 昆虫中犬尿氨酸通路相关基因的注释

利用KEGG(Kanehisa & Goto 2000)中人源的犬尿氨酸通路相关蛋白为种子，对蝶蛹金小蜂及其他昆虫的基因组进行tblastn（e-value < 1e-5）比对。所比对到的基因组序列经提取后，采用FGENESH进行基因结构预测(Solovyev *et al.*, 2006)。最终将所有预测到的基因比对至NCBI和KEGG数据库，并进行手工确认。

1.8 进化分析

同第四章1.11。

2 结果与分析

2.1 毒液蛋白分离及鉴定

采用阴离子交换柱，首先对来自1000个毒囊左右的毒液进行分离（图5.1A）。尔后，将收集的组分与Hi-5细胞系孵育，检测其对Hi-5细胞系的致死作用（图5.1B）。24h后，组分16和17可显著诱导细胞死亡。48h和72h后，组分15-18均可显著诱导细胞死亡（图5.1B）。48h后的细胞照片显示，组分19虽然没有诱导Hi-5细胞的死亡，但其增殖受到了显著的抑

制（图5.2）。通过比较，发现毒液组分的致死活性大致与7.7min的洗脱峰相符合。

同时，对组分10-25进行SDS-PAGE跑胶后染色，结果显示，组分15-19在55kDa左右有一条带，其含量多少大致与活性强弱相符（图5.3）。其中组分17和18中，仅有此一条明显的条带。对该55 kDA附近的条带进行切胶回收，并采用LC-MS/MS进行蛋白质谱鉴定。鉴定到蛋白结果为comp29610_c1_seq1，进而比对回基因组，获得该基因的全长序列。其ORF为1296，共编码431个氨基酸，其中前21个氨基酸为信号肽序列，且氨基酸34和35之间预测具有一个前肽切割位点。在NCBI上blastp比对结果显示，该蛋白匹配至*Nasonia vitripennis* aminotransferase-like venom protein 1 precursor，与其具有85%的identity和93%的positive，并具有一个AAT-like（cd00609，Aspartate aminotransferase family）结构域。进一步序列分析表明，该鉴定到的蛋白为CCBL（cysteine-S-conjugate beta-lyase）型的犬尿氨酸转氨酶。

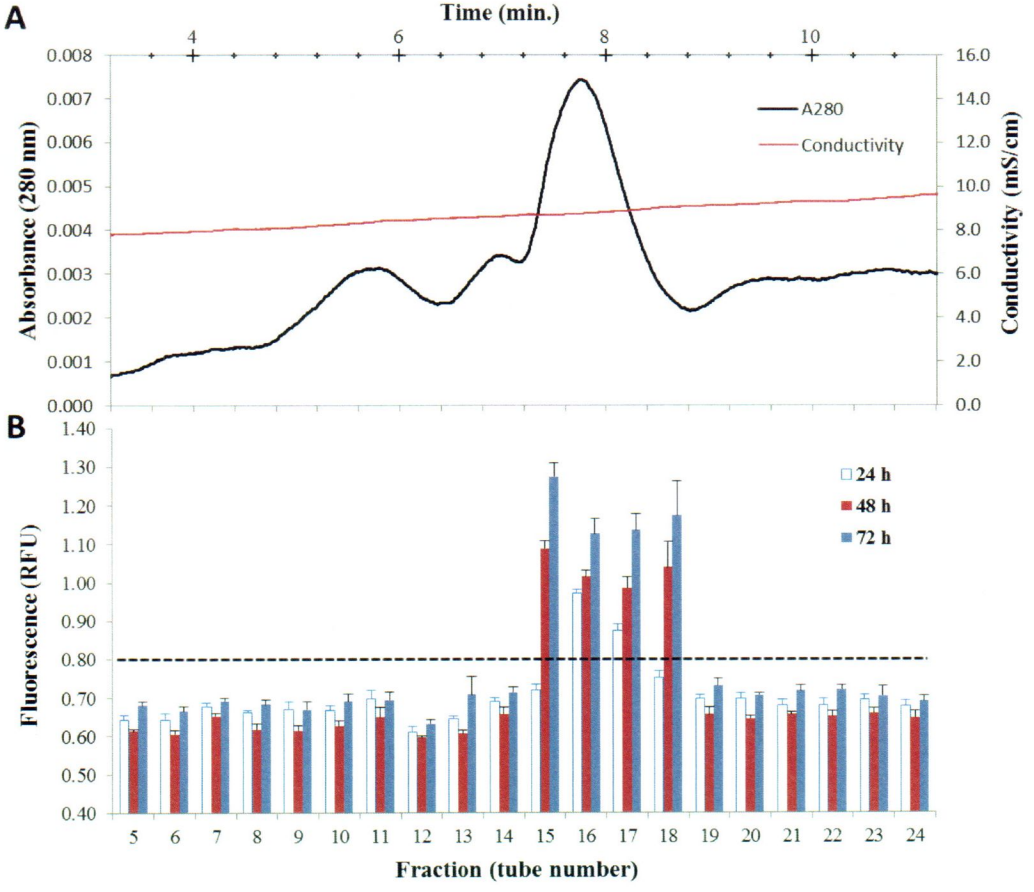


图5.1 毒液蛋白分离纯化及收集组分对Hi-5的致死作用的检测

Figure 5.1 Hi-5 cell death assay guided fraction of *P. puparum* venom

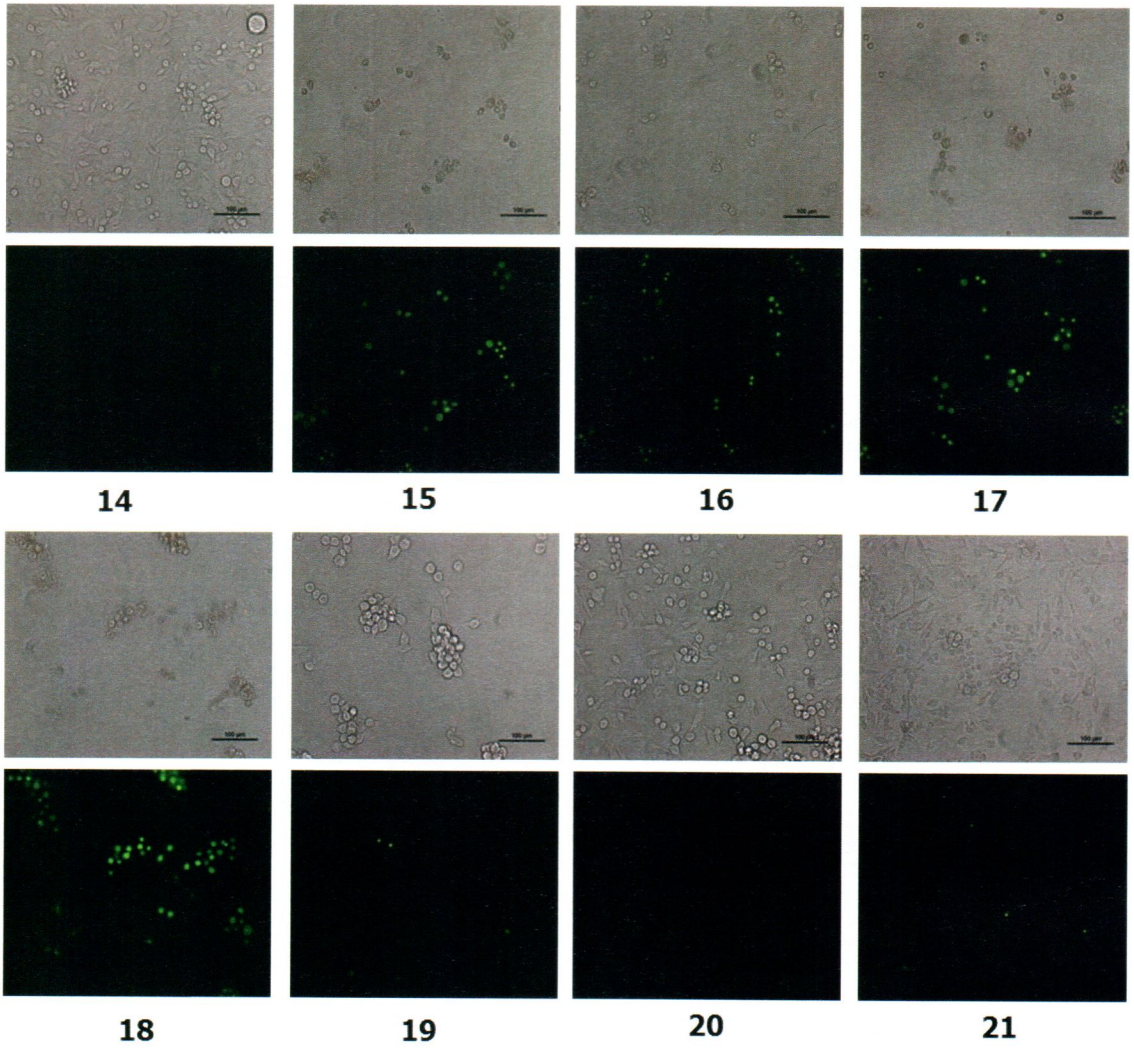


图5.2 毒液各分离组分与Hi-5细胞孵育48 h后细胞形态

Figure 5.2 Effect of venom fractions on Hi-5 cell death after 48h

细胞死亡后，荧光染料穿过细胞膜，进入细胞核染色，发出荧光。

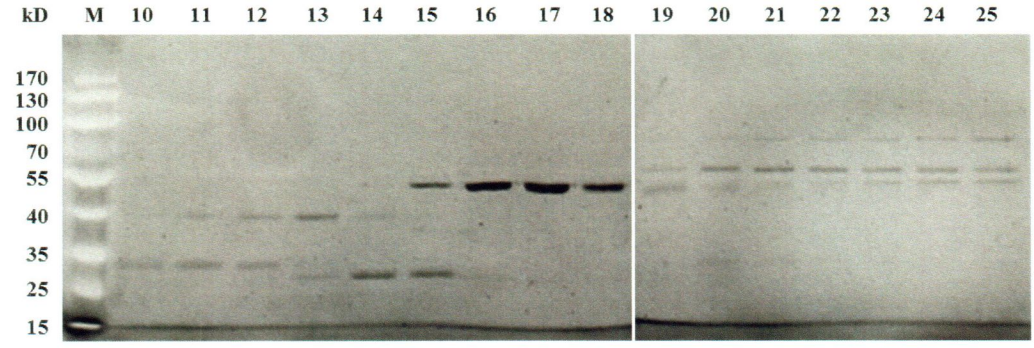


图5.3 毒液分离各组分SDS-PAGE分析及蛋白荧光染色

Figure 5.3 SDS-PAGE and fluorescent stain of venom fractions

2.2 犬尿氨酸相关通路的注释

该鉴定到的转氨酶是犬尿氨酸通路分支上的一个蛋白(Vecsei *et al.*, 2013)。犬尿氨酸通路在哺乳动物的免疫和神经系统中有着重要作用，并且是*de novo*合成Nicotinamide adenine dinucleotide（NAD）的途径(Agudelo *et al.*, ; Mándi & Vécsei 2012; Mezrich *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2010)。NAD是生物所必需的重要辅酶，参与细胞DNA修复、能量合成、细胞代谢等多个生理过程(Rongvaux *et al.*, 2003)。因此，我们推测该毒液转氨酶可能通过抑制受害细胞NAD的合成，最终导致细胞死亡。

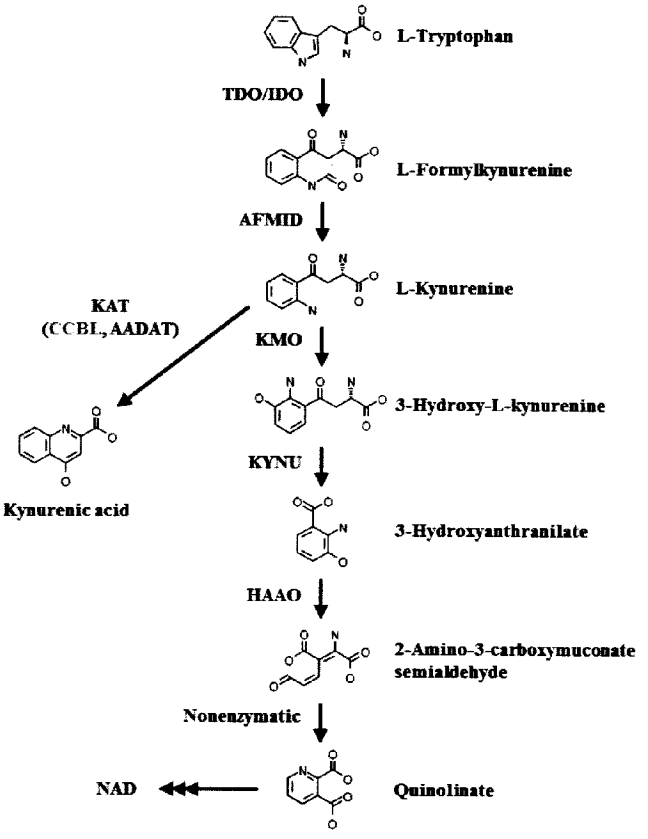


图5.4 犬尿氨酸代谢通路示意图

Figure 5.4 Kynurenie pathway

其中红色标记代表该基因已在所有被检测的昆虫基因组中丢失

为了验证该假设，我们首先对昆虫中犬尿氨酸通路的基因进行注释（图5.4和表5.1）。注释结果发现，IDO（indoleamine 2,3-dioxygenase）、HAAO（3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase）酶普遍已经在所有检查的昆虫基因组中丢失。且*de novo*合成NAD所必需的另一基因KYNU（arylformamidase）也仅存在鳞翅目的Bombyx mori和Danaus plexippus中。这表明*de novo*合成NAD通路中的部分必需基因已在昆虫中丢失，昆虫已丧失从头合成NAD的能力。这也间接说明该鉴定到的毒液转氨酶不可能通过抑制NAD的合成而导致细胞死亡。

2.3 毒液犬尿氨酸转氨酶基因的进化分析

犬尿氨酸转氨酶分为CCBL型（cysteine-S-conjugate beta-lyase）和AADAT型（aminoadipate aminotransferase）。其中，蝶蛹金小蜂毒液中所鉴定到的为CCBL型。有意

思的是，统计发现CCBL型的犬尿氨酸转氨酶在*P. puparum*和*N. vitripennis*中均存在明显的基因扩增现象。该基因家族在*P. puparum*和*N. vitripennis*中均有9个拷贝，依次命名为*Pp*CCBL1至9和*Nv*CCBL1至9，其中*Pp*CCBL9为分离鉴定到的毒液蛋白。

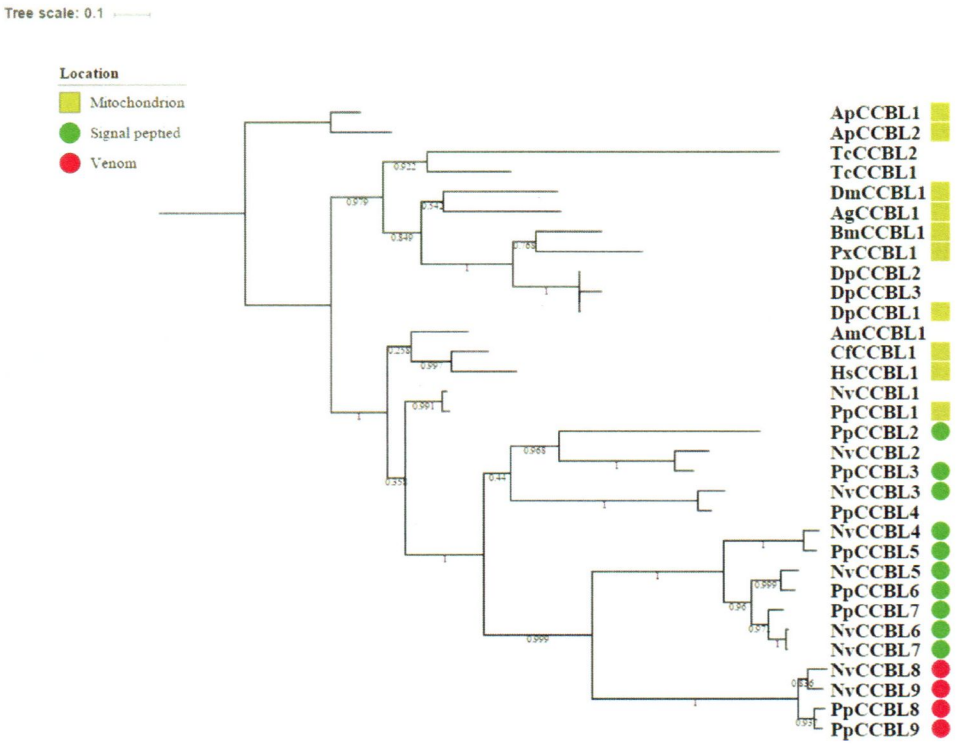


图5.5 CCBL型犬尿氨酸转氨酶基因的进化树分析

Figure 5.5 Phylogenetic tree of CCBL type kynurenine aminotransferase

而在*Danaus plexippus*中有3个拷贝，在*A. mellifera*、*Tribolium castaneum*和*Acyrthosiphon pisum*中有2个拷贝，而在其他6个物种中则仅有一个拷贝（表5.1）。这暗示该基因家族可能在寄生蜂*P. puparum*和*N. vitripennis*中起到重要作用。

通过构建进化树，结果显示，来自蝶蛹金小蜂和丽蝇蛹集金小蜂的CCBL型犬尿氨酸可聚为一支（图5.5.）。其中，推测*Nv*CCBL1和*Pp*CCBL1为线粒体内的胞内看家基因。其他基因从保守的看家基因复制而来，并在复制过程中获得了信号肽。复制分化后，复制出的新基因进化速率明显加快。这部分可能是由于复制后的新基因非看家必需基因，选择压力降低，为放松性选择，也可能是由于其被招募为毒液蛋白，进而与寄主的免疫系统直接互作，受到正选择压力。然而，不论是放松性选择还是正选择，都可导致复制分化后新基因的进化速率加快。另，类似的进化加速现象也在赤拟谷盗*T. castaneum*的基因*Tc*CCBL1中存在，其具体功能有待进一步讨论（图5.5）。

另，根据蛋白质鉴定结果*Nv*CCBL8、9和*Pp*CCBL8、9均为毒液蛋白。在毒液蛋白*Nv*CCBL8、9和*Pp*CCBL8、9中还预测到前导肽的切割位点。在一些抗菌肽中，前导肽在病原物侵入后才被切割去除，释放出抗菌活性。毒液中的前导肽切割位点可能也采用了类似的机制，从而调节毒液蛋白的活性，但该假设仍需要进一步实验证明。

3 讨论

蝶蛹金小蜂的前期研究表明，其毒液同样可作用于Hi-5细胞系，引起细胞死亡(Zhang *et al.*, 2005)。由于Hi-5细胞较之寄主血细胞更容易大量培养获得，故本研究中采用Hi-5细胞系用于筛选毒液中的致死活性组分。

通过基于活性追踪的分离纯化，在蝶蛹金小蜂毒液中鉴定到一个CCBL型的犬尿氨酸转氨酶，可能能引起细胞的死亡。在哺乳动物中，犬尿氨酸转氨酶起到保护神经系统的作用，至今仍未有报道其具有诱导细胞死亡的作用。因而，导致细胞死亡可能是该酶被招募至毒液中特化出的新功能，其功能确证及作用机理仍有待进一步研究。

通过注释昆虫中的犬尿氨酸代谢通路，发现该通路中的几个关键酶已在昆虫中丢失。这些丢失的酶包括IDO和HAAO。其中HAAO酶的丢失，直接导致昆虫无法*de novo*合成NAD。推测昆虫可能通过食物直接获得NAD或其中间产物。因而，毒液中的犬尿氨酸转氨酶也无法通过干扰受害细胞NAD的*de novo*合成，来诱导细胞死亡。

另，CCBL型的犬尿氨酸转移酶在*P. puparum*和*N. vitripennis*基因组中均发生了大量的基因复制现象。该基因的进化反应了一种如何通过基因复制获得新毒液的机制。首先，非分泌型的看家基因发生了复制，并在复制过程中引入了信号肽，并最终被招募至毒液中。新的基因拷贝产生后，其受到到选择压力减小，更容易分化出新的功能。当其被招募至毒液中后，与寄主的协同进化进一步加速了其分化速率。这也表明毒液是研究基因如通过复制特化出新功能的良好研究模型。

表5.1 犬尿氨酸代谢通路中各基因在各昆虫中的数目

Table 5.1 Number of annotated genes of kynurenine pathway in different insects

Protein	EC Number	Number											
		Pp	Nv	Am	Cf	Hs	Dm	Ag	Bm	Dp	Px	Tc	Ap
TDO	1.13.11.11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2
IDO	1.13.11.52	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AFMID	3.5.1.9	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	1
KMO	1.14.13.9	1	1	1	1	2	1	1	1	1	0	1	1
KYNU	3.7.1.3	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0
HAAO	1.13.11.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
KAT													
CCBL	2.6.1.7 4.4.1.13 2.6.1.64	9	9	2	1	1	1	1	1	3	1	2	2
AADAT	2.6.1.7 2.6.1.39	2	2	1	4	2	0	0	1	4	1	1	3

TDO: tryptophan 2,3-dioxygenase; IDO: indoleamine 2,3-dioxygenase; AFMID: arylformamidase; KMO: arylformamidase; KYNU: arylformamidase; HAAO: 3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase; KAT: kynurenine---oxoglutarate transaminase; CCBL: cysteine-S-conjugate beta-lyase; AADAT: aminoadipate aminotransferase; Pp: *Pteromualus puparum*; Nv: *Nasonia vitripennis*; Am: *Apis mellifera*; Cf: *Camponotus floridanus*; Hs: *Harpegnathos saltator*; Dm: *Drosophia melanogaster*; Ag: *Anopheles gambiae*; Bm: *Bombyx mori*; Dp: *Danaus plexippus*; Px: *Plutella xylostella*; Tc: *Tribolium castaneum*; Ap: *Acyrthosiphon pisum*.

此页不缺内容

第六章 总讨论

1 蝶蛹金小蜂毒液组分

Pteromalus puparum 是相对近期从外寄生蜂进化为内寄生蜂的事件。在Pteromalinae亚科中，大部分为外寄生蜂，如*Urolepis rufipes*、*Trichomalopsis sarcophagae*、*Muscidifurax raptor*和*Nasonia* 等。另，在Pteromalus属中也有一些外寄生蜂。例如*P. cerealellae*(Howard & Baker 2003) 和*P. sequester*(Gurreaa *et al.*, 2006) 均为鞘翅目幼虫的外寄生蜂。因此，*P. puparum*和*N. vitripennis*提供了比较研究内外寄生蜂的优良体系，尤其对于研究寄生蜂从外寄生蜂向内寄生蜂进化时的毒液改变。

结合转录组和蛋白质组的方法，我们最终鉴定了70个候选的蝶蛹金小蜂毒液蛋白。通过与丽蝇蛹集金小蜂及其他内寄生蜂毒液蛋白比较，结果显示大部分鉴定到的蝶蛹金小蜂毒液蛋白在NCBI nr数据库中比对到同属于Pteromalinae亚科的丽蝇蛹集金小蜂。另外，大部分蝶蛹金小蜂毒液蛋白与丽蝇蛹集金小蜂毒液蛋白有更高的序列相似性，而不是与其他已报道的内寄生蜂毒液蛋白。这些结果与内寄生蜂有独立不同的起源的推测所一致。

虽然内寄生蜂有不同的独立的进化起源，但也可能存在趋同的毒液招募。显著的是，13个蝶蛹金小蜂毒液蛋白只与已报道的其他内寄生蜂毒液所共有，但是没有在其近源中丽蝇蛹集金小蜂毒液中被鉴定到。这些毒液蛋白可能在适应内寄生化中具有一定的功能。但这也可能是由于各个物种中毒液蛋白的不完全鉴定所导致的结果。进一步的研究仍有待深入展开。

本论文研究揭示了大部分蝶蛹金小蜂毒液蛋白与丽蝇蛹集金小蜂毒液蛋白有更近的亲缘关系，而与其他已报道的内寄生蜂毒液蛋白较远。13个蝶蛹金小蜂毒液蛋白与其他内寄生蜂毒液蛋白有序列相似性，但与近源的丽蝇蛹集金小蜂毒液蛋白不具有相似性。这些蛋白在内寄生化进化中可能起到一定的作用。该研究对理解寄生蜂毒液进化，并为今后深入研究毒液蛋白功能提供了基础信息。

2 蝶蛹金小蜂毒液功能

至今，在蝶蛹金小蜂中并未发现有其他寄生因子如PDV、VLP和畸形细胞等。毒液作为蝶蛹金小蜂中的主要寄生因子，可抑制寄主的细胞免疫、体液免疫，延缓寄主发育、调节其代谢等。而在寄生蜂毒液研究中，目前仍主要集中于对寄主免疫的调控。前期结果表明，不同寄生蜂可采用各异的毒性蛋白，利用不同的作用机制，最终达到抑制寄主细胞免疫和体液免疫。在蝶蛹金小蜂中，其毒液如何调控寄主免疫也已有较多研究基础。蝶蛹金小蜂粗毒液可以显著增加寄主血细胞的数量，抑制寄主血细胞延展，诱导细胞死亡，抑制寄主血淋巴黑化反应和调控寄主免疫相关基因的表达等。

通过基于活性追踪的分离纯化，本论文鉴定出蝶蛹金小蜂毒液中的一个Serpin剪接体能抑制寄主血淋巴的PPO激活反应，但并不能直接抑制PO活性。该Serpin毒液剪接体可与寄主血淋巴蛋白酶形成复合体，其可能通过结合寄主血淋巴蛋白酶*Pr*PAP1和*Pr*HP8，进而抑制寄主的PPO激活反应。另，在蝶蛹金小蜂毒液中还分离鉴定出一个CCBL型的犬尿氨酸转氨酶，其可能引起细胞死亡。进化分析结果表明，该基因在蝶蛹金小蜂和丽蝇蛹集金小蜂基因组中均发生过大量的复制，暗示其在寄生中的重要功能。基于昆虫中犬尿氨酸代谢通路的分析，发现昆虫已丢失*de novo*合成NAD的能力。因而，该毒液犬尿氨酸转氨酶并不能通过抑制NAD的合成来导致细胞死亡。其具体的作用机理仍有待进一步研究。

3 蝶蛹金小蜂毒液进化

进化过程中，寄生蜂毒液组分获得了丰富的多样性，其中毒液新基因的获得起到了重要的作用。然而，寄生蜂毒液基因的来源至今仍未有系统的研究。普遍观点认为毒液基因主要通过复制于非毒液基因，并通过自然选择进化出相应的毒液功能(Wong & Belov 2012)。一些基因复制的例子在寄生蜂毒液中已被报道，如毁侧沟茧蜂*M. demolitor*中的Ci-48a-like proteins和reprolysin-like proteins(Burke & Strand 2014), *Leptopilina*中的含RhoGAP结构域蛋白 (Goecks *et al.*, 2013) 以及阿尔蚜茧蜂*A. ervi*中的γ-glutamyl transpeptidases (Colinet *et al.*, 2014)。在本论文中，我们也发现了一个CCBL型的犬尿氨酸转氨酶基因，其在蝶蛹金小蜂和丽蝇蛹集金小蜂基因组中均发生过广泛的复制事件，并最终被招募至毒液中。进化分析结果显示，该基因复制于非分泌型非毒液基因，并在复制过程中获得信号肽，并最终被招募至毒液中。

但是，基因复制并非毒液多样性的唯一来源。毒液也可起源自*de novo*基因生成，可变剪接(Siigur *et al.*, 2001; Vaiyapuri *et al.*, 2011)、基因水平转移(Martinson *et al.*, 2015)等。本论文也提供了一个毒液通过可变剪接招募的例子。我们推测，Serpin基因的毒液可变剪接体可能源自其非毒液可变剪接体外显子的复制，并最终被招募为毒液蛋白。另一个已知的例子是，寄生蜂*Ganaspis* sp.1中的 sarco/endo-plasmic reticulum calcium ATPase (SERCA)基因。该基因具有两个可变剪接体，一个为毒液可变剪接形式，另一个为非毒液可变剪接形式(Mortimer *et al.*, 2013)。但是，如何通过可变剪接进行毒液招募的潜在机制仍有待进一步阐明。

4 本研究创新之处

1. 采用二代结合三代测序的方法，测序组装了蝶蛹金小蜂的基因组序列。
2. 基于测序的基因组数据，对毒液蛋白进行进化分析，发现一个毒液 Serpin 可变剪接体可能通过可变剪接招募为毒液蛋白，而另一个毒液犬尿氨酸转氨酶则来源自非毒液基因的复制事件。
3. 结合转录组和蛋白质组分析的方法，鉴定出 70 个蝶蛹金小蜂候选毒液蛋白。
4. 通过基于活性追踪的分离纯化的方法，鉴定出抑制寄主黑化和诱导细胞死亡的毒液蛋白各一个。

5 研究中存在的问题

1. 本论文未充分利用已测序的基因组数据，对其进行深入的挖掘。
2. 本论文的功能研究仅局限于蝶蛹金小蜂毒液如何抑制寄主免疫反应，而未涉及其对寄主神经、发育和代谢等的影响。
3. 本论文仅采用基于活性追踪和分离鉴定方法，并未采用 RNAi 等方法对未知功能的毒液蛋白进行探索研究。

6 今后的研究方向

1. 探明 *Pp*SVI 及其潜在靶标 *Pr*HP8 在 Toll 通路调节中的作用。
2. 体外重组表达毒液犬尿氨酸转氨酶，验证其功能活性。
3. 研究蝶蛹金小蜂毒液蛋白对寄主神经、发育和代谢等系统的影响。

参考文献

Agudelo, Leandro Z. *et al.* Skeletal muscle PGC-1α1 modulates kynurenine metabolism and mediates resilience to stress-induced depression. ***Cell*** (159), 33-45.

Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J. & Schwede, T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. ***Bioinformatics*** 2006 (22), 195-201.

Asgari, S. Venom proteins from polydnavirus-producing endoparasitoids: their role in host-parasite interactions. ***Arch Insect Biochem Physiol*** 2006 (61), 146-156.

Asgari, S. & Rivers, D. B. Venom proteins from endoparasitoid wasps and their role in host-parasite interactions. ***Annu Rev Entomol*** 2011 (56), 313-335.

Asgari, S., Zareie, R., Zhang, G. & Schmidt, O. Isolation and characterization of a novel venom protein from an endoparasitoid, *Cotesia rubecula* (Hym: Braconidae). ***Arch Insect Biochem Physiol*** 2003 (53), 92-100.

Asgari, S., Zhang, G., Zareie, R. & Schmidt, O. A serine proteinase homolog venom protein from an endoparasitoid wasp inhibits melanization of the host hemolymph. ***Insect Biochem Mol Biol*** 2003 (33), 1017-1024.

Beck, M. & Strand, M. R. Glc1.8 from *Microplitis demolitor* bracovirus induces a loss of adhesion and phagocytosis in insect High Five and S2 cells. ***J Virol*** 2005 (79), 1861-1870.

Beck, M. H. & Strand, M. R. A novel polydnavirus protein inhibits the insect prophenoloxidase activation pathway. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 2007 (104), 19267-19272.

Benson, G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. ***Nucleic Acids Res*** 1999 (27), 573-580.

Biasini, M. *et al.* SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. ***Nucleic Acids Res*** 2014 (42), W252-W258.

Birney, E. & Durbin, R. Using GeneWise in the Drosophila annotation experiment. ***Genome Res*** 2000 (10), 547-548.

Blanco, E., Parra, G. & Guigo, R. Using geneid to identify genes. ***Current protocols in bioinformatics*** 2007 (Chapter 4), Unit 4.3.

Boetzer, M., Henkel, C. V., Jansen, H. J., Butler, D. & Pirovano, W. Scaffolding pre-assembled contigs using SSPACE. ***Bioinformatics*** 2011 (27), 578-579.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. ***Anal Biochem*** 1976 (72), 248-254.

Burke, G. R. & Strand, M. R. Systematic analysis of a wasp parasitism arsenal. ***Mol Ecol*** 2014 (23), 890-901.

Cai, J., Ye, G. & Hu, C. Parasitism of *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) by a pupal endoparasitoid, *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae): Effects of parasitization and venom on host hemocytes. ***J Insect Physiol*** 2004 (50), 315-322.

Castresana, J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. ***Mol Biol Evol*** 2000 (17), 540-552.

Celli, J. & Finlay, B. B. Bacterial avoidance of phagocytosis. ***Trends Microbiol*** 2002 (10), 232-237.

Choi, S. J. *et al.* Isolation and characterization of Psalmopeotoxin I and II: two novel antimalarial peptides from the venom of the tarantula *Psalmopoeus cambridgei*. ***FEBS Lett*** 2004 (572), 109-117.

Colinet, D. *et al.* Identification of the main venom protein components of *Aphidius ervi*, a parasitoid wasp of the aphid model *Acyrthosiphon pisum*. ***BMC Genomics*** 2014 (15), 342.

Colinet, D., Cazes, D., Belghazi, M., Gatti, J.-L. & Poirie, M. Extracellular superoxide dismutase in insects: characterization, function, and interspecific variation in parasitoid wasp venom. ***J Biol Chem*** 2011 (286), 40110-40121.

Colinet, D. *et al.* Extensive inter- and intraspecific venom variation in closely related parasites targeting the same host: the case of *Leptopilina* parasitoids of *Drosophila*. ***Insect Biochem Mol Biol*** 2013 (43), 601-611.

Colinet, D. *et al.* A serpin from the parasitoid wasp *Leptopilina boulardi* targets the *Drosophila* phenoloxidase cascade. ***Dev Comp Immunol*** 2009 (33), 681-689.

Colinet, D., Mathe-Hubert, H., Allemand, R., Gatti, J. L. & Poirie, M. Variability of venom components in immune suppressive parasitoid wasps: from a phylogenetic to a population approach. ***J Insect Physiol*** 2013 (59), 205-212.

Colinet, D., Schmitz, A., Depoix, D., Crochard, D. & Poirie, M. Convergent use of RhoGAP toxins by eukaryotic parasites and bacterial pathogens. ***PLoS Pathog*** 2007 (3), e203.

Condon, M. A. *et al.* Lethal interactions between parasites and prey increase niche diversity in a tropical community. ***Science*** 2014 (343), 1240-1244.

Crawford, A. M. *et al.* The constituents of *Microctonus sp.* parasitoid venoms. ***Insect Mol Biol*** 2008 (17), 313-324.

Dani, M. P. & Richards, E. H. Cloning and expression of the gene for an insect haemocyte anti-aggregation protein (VPr3), from the venom of the endoparasitic wasp, *Pimpla hypochondriaca*. ***Arch Insect Biochem Physiol*** 2009 (71), 191-204.

Danneels, E. L. *et al.* How the venom from the ectoparasitoid wasp *Nasonia vitripennis* exhibits

anti-inflammatory properties on mammalian cell lines. ***PLoS One*** 2014 (9), e96825.

Danneels, E. L., Rivers, D. B. & de Graaf, D. C. Venom proteins of the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis*: recent discovery of an untapped pharmacopee. ***Toxins*** 2010 (2), 494-516.

de Graaf, D. C. *et al.* Insights into the venom composition of the ectoparasitoid wasp *Nasonia vitripennis* from bioinformatic and proteomic studies. ***Insect Mol Biol*** 2010 (19), 11-26.

Dillman, A. R. *et al.* An entomopathogenic nematode by any other name. ***PLoS Pathog*** 2012 (8)

Doremus, T. *et al.* Venom gland extract is not required for successful parasitism in the polydnavirus-associated endoparasitoid *Hyposoter didymator* (Hym. Ichneumonidae) despite the presence of numerous novel and conserved venom proteins. ***Insect Biochem Mol Biol*** 2013 (43), 292-307.

dos Santos, L. D. *et al.* Profiling the proteome of the venom from the social wasp *Polybia paulista*: A clue to understand the envenoming mechanism. ***J Proteome Res*** 2010 (9), 3867-3877.

Du, G., Fang, Q. & den Toonder, J. M. Microfluidics for cell-based high throughput screening platforms: a review. ***Anal Chim Acta*** 2016 (903), 36-50.

Edgar, R. C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. ***Bmc Bioinformatics*** 2004 (5), 1-19.

Eng, J. K., McCormack, A. L. & Yates, J. R. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. ***J Am Soc Mass Spectrom*** 1994 (5), 976-989.

English, A. C. *et al.* Mind the gap: upgrading genomes with Pacific Biosciences RS long-read sequencing technology. ***PLoS One*** 2012 (7), e47768.

Er, A., Sak, O., Ergin, E., Uçkan, F. & Rivers, D. B. Venom-induced immunosuppression: an overview of hemocyte-mediated responses. ***Psyche*** 2011 (2011)

Falabella, P. *et al.* A γ-glutamyl transpeptidase of *Aphidius ervi* venom induces apoptosis in the ovaries of host aphids. ***Insect Biochem Mol Biol*** 2007 (37), 453-465.

Fang, Q. *et al.* Venom of parasitoid, *Pteromalus puparum*, suppresses host, *Pieris rapae*, immune promotion by decreasing host C-type lectin gene expression. ***PLoS One*** 2011 (6), e26888.

Fang, Q. *et al.* Expression of immune-response genes in Lepidopteran host is suppressed by venom from an endoparasitoid, *Pteromalus puparum*. ***BMC Genomics*** 2010 (11), 484.

Fang, Q. *et al. Pteromalus puparum* venom impairs host cellular immune responses by decreasing expression of its scavenger receptor gene. ***Insect Biochem Mol Biol*** 2011 (41), 852-862.

Gaj, T., Gersbach, C. A. & Barbas, C. F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. ***Trends Biotechnol*** 2013 (31), 397-405.

Gettins, P. G. Serpin structure, mechanism, and function. ***Chem Rev*** 2002 (102), 4751-4804.

Ghosh, S. & Chan, C. K. Analysis of RNA-Seq Data Using TopHat and Cufflinks. ***Methods Mol Biol*** 2016 (1374), 339-361.

Goecks, J. *et al.* Integrative approach reveals composition of endoparasitoid wasp venoms. ***PLoS One*** 2013 (8)

Grabherr, M. G. *et al.* Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. ***Nat Biotechnol*** 2011 (29), 644-652.

Gurreaa, M. P., Canoa, J. M. & Fisher, J. R. The ability of an artificial diet to sustain larvae of *Exapion ulicis* (Coleoptera: Apionidae) and the Occurrence of *Pteromalus sequester* (Hymenoptera: Pteromalidae) from field-collected larvae in Oregon. ***Fla Entomol*** 2006 (89), 405-406.

Haas, B. J. *et al.* Automated eukaryotic gene structure annotation using EVidenceModeler and the program to assemble spliced alignments. ***Genome Biol*** 2008 (9), R7.

Haegeman, A., Jones, J. T. & Danchin, E. G. Horizontal gene transfer in nematodes: a catalyst for plant parasitism? ***Mol Plant Microbe Interact.*** 2011 (24), 879-887.

Heraty, J. in *Insect Biodiversity: Science and Society* (eds Peter H. Adler & Robert G. Foottit) 445–462 (Wiley-Blackwell, 2009).

Howard, R. W. & Baker, J. E. Morphology and chemistry of dufour glands in four ectoparasitoids: *Cephalonomia tarsalis*, *C. waterstoni* (Hymenoptera: Bethylidae), *Anisopteromalus calandrae*, and *Pteromalus cerealellae* (Hymenoptera: Pteromalidae). ***Comp biochem physiol B Biochem Mol Biol*** 2003 (135), 153-167.

Hunter, S. *et al.* InterPro: the integrative protein signature database. ***Nucleic Acids Res*** 2009 (37), D211-215.

Jiang, H. & Kanost, M. R. Characterization and functional analysis of 12 naturally occurring reactive site variants of serpin-1 from *Manduca sexta*. ***J Biol Chem*** 1997 (272), 1082-1087.

Jiang, H. *et al.* Organization of serpin gene-1 from *Manduca sexta* - Evolution of a family of alternate exons encoding the reactive site loop. ***J Biol Chem*** 1996 (271), 28017-28023.

Juang, Y. J. & Chang, J. S. Applications of microfluidics in microalgae biotechnology: A review. ***Biotechnol J.*** 2016 (11), 327-335.

Kanehisa, M. & Goto, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. ***Nucleic Acids Res*** 2000 (28), 27-30.

Kapustin, Y., Souvorov, A., Tatusova, T. & Lipman, D. Splign: algorithms for computing spliced alignments with identification of paralogs. ***Biol Direct*** 2008 (3), 20.

Katoh, K. & Standley, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. ***Mol Biol Evol*** 2013 (30), 772-780.

King, G. F. & Hardy, M. C. Spider-venom peptides: structure, pharmacology, and potential for control of insect pests. ***Annu Rev Entomol*** 2013 (58), 475-496.

Koh, D. C. I., Armugam, A. & Jeyaseelan, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. ***Cell Mol Life Sci*** 2006 (63), 3030-3041.

Labrosse, C. *et al.* A RhoGAP protein as a main immune suppressive factor in the *Leptopilina boulardi* (Hymenoptera, Figitidae)-*Drosophila melanogaster* interaction. ***Insect Biochem Mol Biol*** 2005 (35), 93-103.

Lagesen, K. *et al.* RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. ***Nucleic Acids Res*** 2007 (35), 3100-3108.

Leluk, J., Schmidt, J. & Jones, D. Comparative studies on the protein composition of hymenopteran venom reservoirs. ***Toxicon*** 1989 (27), 105-114.

Lewis, R. J., Dutertre, S., Vetter, I. & Christie, M. J. Conus venom peptide pharmacology. ***Pharmacol Rev*** 2012 (64), 259-298.

Li, L., Stoeckert, C. J., Jr. & Roos, D. S. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. ***Genome Res*** 2003 (13), 2178-2189.

Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. ***Methods*** 2001 (25), 402-408.

Lowe, T. M. & Eddy, S. R. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. ***Nucleic Acids Res*** 1997 (25), 955-964.

Lu, Z., Beck, M. H. & Strand, M. R. Egf1.5 is a second phenoloxidase cascade inhibitor encoded by *Microplitis demolitor* bracovirus. ***Insect Biochem Mol Biol*** 2010 (40), 497-505.

Lu, Z., Beck, M. H., Wang, Y., Jiang, H. & Strand, M. R. The viral protein Egf1.0 is a dual activity inhibitor of prophenoloxidase-activating proteinases 1 and 3 from *Manduca sexta*. ***J Biol Chem*** 2008 (283), 21325-21333.

Luo, R. *et al.* SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read *de novo* assembler. ***GigaScience*** 2012 (1), 18.

Maiti, I. B. *et al.* Antibiosis-type insect resistance in transgenic plants expressing a teratocyte secretory protein (TSP14) gene from a hymenopteran endoparasite (*Microplitis croceipes*). ***Plant Biotechnol J*** 2003 (1), 209-219.

Mándi, Y. & Vécsei, L. The kynurenine system and immunoregulation. ***J Neural Transm*** 2012 (119), 197-209.

Marshall, O. J. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. ***Bioinformatics*** 2004 (20), 2471-2472.

Martinson, E. O., Martinson, V. G., Edwards, R., Mrinalini & Werren, J. H. Laterally transferred

gene recruited as a venom in parasitoid wasps. ***Mol Biol Evol*** 2015 (33), 1042-1052.

Mezrich, J. D. *et al.* An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. ***J Immunol*** 2010 (185), 3190-3198.

Mitreva, M., Smant, G. & Helder, J. Role of horizontal gene transfer in the evolution of plant parasitism among nematodes. ***Methods in mol biol*** 2009 (532), 517-535.

Moreau, S. J. M. & Guillot, S. Advances and prospects on biosynthesis, structures and functions of venom proteins from parasitic wasps. ***Insect Biochem Mol Biol*** 2005 (35), 1209-1223.

Moriya, Y., Itoh, M., Okuda, S., Yoshizawa, A. C. & Kanehisa, M. KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. ***Nucleic Acids Res*** 2007 (35), W182-185.

Mortimer, N. T. *et al.* Parasitoid wasp venom SERCA regulates *Drosophila* calcium levels and inhibits cellular immunity. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 2013 (110), 9427-9432.

Nawrocki, E. P. & Eddy, S. R. Infernal 1.1: 100-fold faster RNA homology searches. ***Bioinformatics*** 2013 (29), 2933-2935.

Nguyen, N. T. *et al.* Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates dendritic cell immunogenicity via a kynurenine-dependent mechanism. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 2010 (107), 19961-19966.

Nguyen, T. T. A. *et al.* Early presence of an enolase in the oviposition injecta of the aphid parasitoid *Aphidius ervi* analyzed with chitosan beads as artificial hosts. ***J Insect Physiol*** 2013 (59), 11-18.

Nielsen-LeRoux, C., Gaudriault, S., Ramarao, N., Lereclus, D. & Givaudan, A. How the insect pathogen bacteria *Bacillus thuringiensis* and *Xenorhabdus/Photorhabdus* occupy their hosts. ***Curr Opin Microbiol*** 2012 (15), 220-231.

Parkinson, N., Richards, E. H., Conyers, C., Smith, I. & Edwards, J. P. Analysis of venom constituents from the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca* and cloning of a cDNA encoding a venom protein. ***Insect Biochem Mol Biol*** 2002 (32), 729-735.

Parkinson, N., Smith, I., Audsley, N. & Edwards, J. P. Purification of pimplin, a paralytic heterodimeric polypeptide from venom of the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca*, and cloning of the cDNA encoding one of the subunits. ***Insect Biochem Mol Biol*** 2002 (32), 1769-1773.

Parkinson, N. M. *et al.* Towards a comprehensive view of the primary structure of venom proteins from the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca*. ***Insect Biochem Mol Biol*** 2004 (34), 565-571.

Patel, R. K. & Jain, M. NGS QC Toolkit: a toolkit for quality control of next generation sequencing data. ***PLoS One*** 2012 (7), e30619.

Peiren, N. *et al.* The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach. ***Biochim. Biophys. Acta.*** 2005 (1752), 1-5.

Pennacchio, F. & Strand, M. R. Evolution of developmental strategies in parasitic hymenoptera. ***Annu Rev Entomol*** 2006 (51), 233-258.

Pennisi, E. The CRISPR craze. ***Science*** 2013 (341), 833-836.

Perkins, D. N., Pappin, D. J. C., Creasy, D. M. & Cottrell, J. S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. ***Electrophoresis*** 1999 (20), 3551-3567.

Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G. & Nielsen, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. ***Nat Methods*** 2011 (8), 785-786.

Pinto, J. *et al.* Proteomic view of the venom from the fire ant *Solenopsis invicta* Buren. ***J Proteome Res*** 2012 (11), 4643-4653.

Poirie, M., Carton, Y. & Dubuffet, A. Virulence strategies in parasitoid Hymenoptera as an example of adaptive diversity. ***C R Biol*** 2009 (332), 311-320.

Pollier, J., Rombauts, S. & Goossens, A. Analysis of RNA-Seq data with TopHat and Cufflinks for genome-wide expression analysis of jasmonate-treated plants and plant cultures. ***Methods Mol. Biol.*** 2013 (1011), 305-315.

Price, D. R. G. *et al.* A venom metalloproteinase from the parasitic wasp *Eulophus pennicornis* is toxic towards its host, tomato moth (*Lacanobia oleracae*). ***Insect Mol Biol*** 2009 (18), 195-202.

Reverte, L., Prieto-Simon, B. & Campas, M. New advances in electrochemical biosensors for the detection of toxins: Nanomaterials, magnetic beads and microfluidics systems: a review. ***Anal Chim Acta*** 2016 (908), 8-21.

Richards, E. H., Bradish, H., Dani, M. P., Pietravalle, S. & Lawson, A. Recombinant immunosuppressive protein from *Pimpla hypochondrica* venom (rvpr1) increases the susceptibility of mamestra brassicae larvae to the fungal biological control agent, *Beauveria bassiana*. ***Arch Insect Biochem Physiol*** 2011 (78), 119-131.

Richards, E. H. & Dani, M. P. Biochemical isolation of an insect haemocyte anti-aggregation protein from the venom of the endoparasitic wasp, *Pimpla hypochondriaca*, and identification of its gene. ***J Insect Physiol*** 2008 (54), 1041-1049.

Roberts, A. & Pachter, L. Streaming fragment assignment for real-time analysis of sequencing experiments. ***Nat Methods*** 2013 (10), 71-U99.

Roberts, A., Trapnell, C., Donaghey, J., Rinn, J. L. & Pachter, L. Improving RNA-Seq expression estimates by correcting for fragment bias. ***Genome Biol*** 2011 (12)

Roberts, R. J., Vincze, T., Posfai, J. & Macelis, D. REBASE--a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. ***Nucleic Acids Res*** 2015 (43), D298-299.

Rodriguez-Andres, J. *et al.* Phenoloxidase activity acts as a mosquito innate immune response

against infection with Semliki Forest Virus. ***PLoS Pathog*** 2012 (8), e1002977.

Rodriguez de la Vega, R. C., Schwartz, E. F. & Possani, L. D. Mining on scorpion venom biodiversity. ***Toxicon*** 2010 (56), 1155-1161.

Rongvaux, A., Andris, F., Van Gool, F. & Leo, O. Reconstructing eukaryotic NAD metabolism. ***Bioessays*** 2003 (25), 683-690.

Sanggaard, K. W. *et al.* Spider genomes provide insight into composition and evolution of venom and silk. ***Nat Commun*** 2014 (5)

Schlenke, T. A., Morales, J., Govind, S. & Clark, A. G. Contrasting infection strategies in generalist and specialist wasp parasitoids of *Drosophila melanogaster*. ***PLoS Pathog*** 2007 (3), 1486-1501.

Schmidt, O., Theopold, U. & Strand, M. Innate immunity and its evasion and suppression by hymenopteran endoparasitoids. ***Bioessays*** 2001 (23), 344-351.

Schwartz, E. F., Mourao, C. B., Moreira, K. G., Camargos, T. S. & Mortari, M. R. Arthropod venoms: a vast arsenal of insecticidal neuropeptides. ***Biopolymers*** 2012 (98), 385-405.

Seidler, J., Zinn, N., Boehm, M. E. & Lehmann, W. D. *De novo* sequencing of peptides by MS/MS. ***Proteomics*** 2010 (10), 634-649.

Siebert, A. L., Wheeler, D. & Werren, J. H. A new approach for investigating venom function applied to venom calreticulin in a parasitoid wasp. ***Toxicon*** 2015 (107), 304-316.

Siigur, E., Aaspõllu, A. & Siigur, J. Sequence diversity of *Vipera lebetina* snake venom gland serine proteinase homologs – result of alternative-splicing or genome alteration. ***Gene*** 2001 (263), 199-203.

Solovyev, V., Kosarev, P., Seledsov, I. & Vorobyev, D. Automatic annotation of eukaryotic genes, pseudogenes and promoters. ***Genome Biol*** 2006 (7 Suppl 1), S10 11-12.

Stamatakis, A. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. ***Bioinformatics*** 2006 (22), 2688-2690.

Stanke, M. & Waack, S. Gene prediction with a hidden Markov model and a new intron submodel. ***Bioinformatics*** 2003 (19 Suppl 2), ii215-225.

Suwanchaichinda, C. & Kanost, M. R. The serpin gene family in *Anopheles gambiae*. ***Gene*** 2009 (442), 47-54.

Suyama, M., Torrents, D. & Bork, P. PAL2NAL: robust conversion of protein sequence alignments into the corresponding codon alignments. ***Nucleic Acids Res*** 2006 (34), W609-612.

Tamura, K. *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. ***Mol Biol Evol*** 2011 (28), 2731-2739.

Tang, Q. & Zhang, C. Data Processing System (DPS) software with experimental design, statistical analysis and data mining developed for use in entomological research. ***Insect Sci*** 2013 (20),

254-260.

Tempel, S. Using and understanding RepeatMasker. ***Methods in mol biol*** 2012 (859), 29-51.

UniProt, C. The Universal Protein Resource (UniProt) in 2010. ***Nucleic Acids Res*** 2010 (38), D142-148.

Vaiyapuri, S., Wagstaff, S. C., Harrison, R. A., Gibbins, J. M. & Hutchinson, E. G. Evolutionary analysis of novel serine proteases in the venom gland transcriptome of *Bitis gabonica rhinoceros*. ***PLoS One*** 2011 (6), e21532.

Vecsei, L., Szalardy, L., Fulop, F. & Toldi, J. Kynurenines in the CNS: recent advances and new questions. ***Nat Rev Drug Discov*** 2013 (12), 64-82.

Vetter, I. *et al.* Venomics: a new paradigm for natural products-based drug discovery. ***Amino Acids*** 2011 (40), 15-28.

Vincent, B. *et al.* The venom composition of the parasitic wasp *Chelonus inanitus* resolved by combined expressed sequence tags analysis and proteomic approach. ***BMC Genomics*** 2010 (11), 693.

Wang, L. *et al.* Inhibition of host cell encapsulation through inhibiting immune gene expression by the parasitic wasp venom calreticulin. ***Insect Biochem Mol Biol*** 2013 (43), 936-946.

Wang, L., Feng, Z., Wang, X., Wang, X. & Zhang, X. DEGseq: an R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data. ***Bioinformatics*** 2010 (26), 136-138.

Werren, J. H. *et al.* Functional and evolutionary insights from the genomes of three parasitoid *Nasonia* species. ***Science*** 2010 (327), 343-348.

Whitfield, J. B. Phylogeny and evolution of host-parasitoid interactions in hymenoptera. ***Annu Rev Entomol*** 1998 (43), 129-151.

Whitfield, J. B. in *Adv Parasit* Vol. Volume 54 69-100 (Academic Press, 2003).

Wisniewski, J. R., Zougman, A., Nagaraj, N. & Mann, M. Universal sample preparation method for proteome analysis. ***Nat Methods*** 2009 (6), 359-362.

Wong, E. S. W. & Belov, K. Venom evolution through gene duplications. ***Gene*** 2012 (496), 1-7.

Wu, M. L., Ye, G. Y., Zhu, J. Y., Chen, X. X. & Hu, C. Isolation and characterization of an immunosuppressive protein from venom of the pupa-specific endoparasitoid *Pteromalus puparum*. ***J Invertebr Pathol*** 2008 (99), 186-191.

Yan, Z. *et al.* Insights into the venom composition and evolution of an endoparasitoid wasp by combining proteomic and transcriptomic analyses. ***Sci Rep*** 2016 (6), 19604.

Yang, Z. PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. ***Mol Biol Evol*** 2007 (24), 1586-1591.

Ye, J. L., Zhao, H. W., Wang, H. J., Bian, J. M. & Zheng, R. Q. A defensin antimicrobial peptide

from the venoms of *Nasonia vitripennis*. ***Toxicon*** 2010 (56), 101-106.

Yuan, C. H. *et al.* Proteomic and peptidomic characterization of the venom from the Chinese bird spider, *Ornithoctonus huwena* Wang. ***J Proteome Res*** 2007 (6), 2792-2801.

Zdobnov, E. M. & Apweiler, R. InterProScan--an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. ***Bioinformatics*** 2001 (17), 847-848.

Zhang, G., Lu, Z., Jiang, H. & Asgari, S. Negative regulation of prophenoloxidase (proPO) activation by a clip-domain serine proteinase homolog (SPH) from endoparasitoid venom. ***Insect Biochem Mol Biol*** 2004 (34), 477-483.

Zhang, G., Schmidt, O. & Asgari, S. A calreticulin-like protein from endoparasitoid venom fluid is involved in host hemocyte inactivation. ***Dev Comp Immunol*** 2006 (30), 756-764.

Zhang, J. *et al.* Fundamentals and applications of inertial microfluidics: a review. ***Lab on a chip*** 2016 (16), 10-34.

Zhang, Z., Ye, G. Y., Cai, J. & Hu, C. Comparative venom toxicity between *Pteromalus puparum* and *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera : Pteromalidae) toward the hemocytes of their natural hosts, non-target insects and cultured insect cells. ***Toxicon*** 2005 (46), 337-349.

Zhen, Z., Zhao, P. C., Hua, W., Mita, K. & Jiang, H. B. A comparative analysis of serpin genes in the silkworm genome. ***Genomics*** 2009 (93), 367-375.

Zheng, Y. P. *et al.* Cloning, expression and characterization of four serpin-1 cDNA variants from the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. ***Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*** 2009 (154), 165-173.

Zhu, J., Ye, G., Dong, S., Fang, Q. & Hu, C. Venom of *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae) induced endocrine changes in the hemolymph of its host, *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae). ***Arch Insect Biochem Physiol*** 2009 (71), 45-53.

Zhu, J., Ye, G. & Hu, C. Morphology and ultrastructure of the venom apparatus in the endoparasitic wasp *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae). ***Micron*** 2008 (39), 926-933.

Zhu, J. Y., Ye, G. Y., Fang, Q. & Hu, C. Alkaline phosphatase from venom of the endoparasitoid wasp, *Pteromalus puparum*. ***J Insect Sci*** 2010 (10)

Zhu, J. Y., Ye, G. Y. & Hu, C. Molecular cloning and characterization of acid phosphatase in venom of the endoparasitoid wasp *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae). ***Toxicon*** 2008 (51), 1391-1399.

Zhu, J. Y., Ye, G. Y. & Hu, C. Venom of the endoparasitoid wasp *Pteromalus puparum*: a overview. ***Psyche*** 2011 (2011), 7.

Zhu, Y. *et al.* The endoparasitoid *Pteromalus puparum* influences host gene expression within first hour of parasitization. ***Arch Insect Biochem Physiol*** 2015 (90), 140-153.

作者简历

教育经历：

2011 年 9 月-2016 年 6 月 浙江大学 攻读博士学位 农业昆虫与害虫防治

2007 年 9 月-2011 年 6 月 浙江大学 攻读学士学位 应用生物科学（植物保护方向）

研究经历：

2015 年 5 月-2015 年 10 月 罗彻斯特大学 John H. Werren 实验室 访问学生

博士期间已发表论文:

1. **Zhichao Yan***, Qi Fang*, Lei Wang, Jinding Liu, Yu Zhu, Fei Wang, Fei Li, John H. Werren, Gongyin Ye (*为共同一作者，下同）. Insights into the venom composition and evolution of an endoparasitoid wasp by combining proteomic and transcriptomic analyses. ***Scientific Reports***, 2016, 6: 19604.
2. **Zhichao Yan**, Qi Fang, Yang Liu, Shan Xiao, Lei Yang, Fei Wang, John H. Werren, Gongyin Ye. A serpin venom splicing isoform from an endoparasitoid wasp, *Pteromalus puparum*, suppresses host prophenoloxidase cascade by forming complexes with host hemolymph proteinases (submitted).
3. Yu Zhu, Xinhai Ye, Yang Liu, **Zhichao Yan**, David W. Stanley, Gongyin Ye, Qi Fang. A venom gland extracellular chitin-binding-like protein from pupal endoparasitoid wasps, *Pteromalus puparum*, selectively binds chitin. ***Toxins***, 2016, 7: 5098-5113.
4. Yu Zhu, Qi Fang, Yang Liu, Lingfeng Gao, **Zhichao Yan**, Gongyin Ye*. The endoparasitoid *Pteromalus puparum* influences host gene expression within first hour of parasitization. ***Archives of Insect Biochemistry and Physiology***, 2015, 90, 140-153.

博士期间参加会议：

Zhichao Yan, Qi Fang, Gongyin Ye, John H. Werren. Insights into the venom composition and evolution of an endoparasitoid wasp by combining proteomic and transcriptomic analyses. Ecological and Evolutionary Genomics Gordon Research Conference, University of New England, Biddeford, ME, July 12-17, 2015 (poster in English)