

分类号: S435

单位代码: 10335

密 级: 无

学 号: 21416103



Y3449193

浙江大学

硕士学位论文



黑尾叶蝉类胰岛素及其受体基因克隆与表达分析

Gene cloning and expression analysis of insulin-like peptides  
and their receptors in the green rice leafhopper, *Nephotettix*  
*cincticeps* (Uhler)(Hemiptera: Cicadellidae)

申请人姓名: 陈晓昂

指导教师: 姚洪渭 副教授

叶恭银 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: 二〇一七年六月

分类号: S435

单位代码: 10335

密 级: 无

学 号: 21416103

浙江大学



硕士学位论文



黑尾叶蝉类胰岛素及其受体基因克隆与表达分析

Gene cloning and expression analysis of insulin-like peptides  
and their receptors in the green rice leafhopper, *Nephotettix*  
*cincticeps* (Uhler)(Hemiptera: Cicadellidae)

申请人姓名: 陈晓昂

指导教师: 姚洪渭 副教授

叶恭银 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: 二〇一七年六月

黑尾叶蝉类胰岛素及其受体基因克隆与表达分析



论文作者签名: 陈晓宇  
指导教师签名: 陈斌

论文评阅人: 双向隐名评阅

|          |     |    |        |
|----------|-----|----|--------|
| 答辩委员会主席: | 夏庆友 | 教授 | 西南大学   |
| 委员:      | 周树堂 | 教授 | 河南大学   |
|          | 陈斌  | 教授 | 重庆师范大学 |

答辩日期: 二〇一七年六月六日

# Gene cloning and expression analysis of insulin-like peptides and their receptors in the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps* (Uhler)(Hemiptera: Cicadellidae)



**Author signature:** Xiao-Ang Chen *Xiao-Ang Chen*

**Supervisor signature:** Hong-Wei Yao

---

Gong-Yin Ye

**Thesis Reviewers:** Anonymous

## Defence committee

**Chairman:** Prof. Qing-You Xia, Xi'an University

**Members:** Prof. Shu-Tang Zhou, Henan University

---

Prof. Bin Chen, Chongqing Normal University

**Date of Defence:** 6 June, 2017

## 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：陈晓彤 签字日期：2017年 06月 06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：陈晓彤

导师签名：杨晓明

签字日期：2017年 06月 06日

签字日期：2017年 06月 06日

# **本研究承蒙**

**国家 973 项目**

**农作物重要病毒病昆虫传播与致害的生物学基础**

**(编号 2014CB138404)**

**资助**

## 致谢

岁月如梭，白驹过隙，三年行来，感悟良多。念及离别，辗转反侧，子时提笔，心有所思，忆似水年华，感时光不复。

本实验研究及学位论文的撰写是在导师叶恭银教授和姚洪渭副教授的亲切关怀与悉心指导下完成的。叶恭银教授知识渊博、治学严谨，思想修养高尚，工作雷厉风行、精益求精，他诲人不倦的敬业精神以及宽容的待人风范深深地激励着我。姚洪渭老师在学业上给了我精心的指导，使我有进一步学习的机会；在生活上给了我无微不至的关怀，在我最迷茫的时候，给我指明了方向。恩师言传身教，恩情似海。在此，我要向恩师致以崇高的敬意！

此外，在论文的完成和学习生活的过程中，得到了黄佳老师、方琦老师等对我的指导和帮助和支持鼓励，在此致以最诚挚的谢意！

在此，特别感谢我的师兄师姐王飞、严智超、徐刚、腾子文、汪芳、齐易香、王前进、杜玉萍、陈利鹏、宁铎、武亚苏、杨蕾、贾文西、师弟王龙、常学飞、杨磊等，感谢你们在我迷茫困惑时给我的鼓励和帮助，让我坚定了继续前行的勇气和信念。

感谢和我一同做实验，一起探讨问题的党聪、王蓓蓓、肖山等同学，他们与我共同经历了科研中的艰辛。感谢他们给予的无私帮助，同时也营造了互帮互助的学习环境。

感谢我的师妹李晶晶，在我实验和学习过程中给予的无私帮助！朝夕相处的同窗之谊，我会永远珍惜。

感谢我的师兄王飞，在毕业过程中给予我的无限帮助！

借此机会，向我的家人表示最深情的谢意，焉得谖草，言树之背，养育之恩。你们永远健康快乐是我最大的心愿！

在论文即将完成之际，我的内心难以平静。闻道有先后，术业有专攻，三年所学唯悟“研究”之真味。学问如浩瀚宇宙，今有寸得，期间收获了许多可敬的师长、同学、朋友给予的无言帮助，在此请接受我诚挚的谢意！

衷心感谢评阅论文以及参加答辩工作的各位专家和教授！最后，感谢我生活学习了三年的母校—浙江大学。求是创新的精神将伴随我以后的人生道路，激励我不断前行。

## 前言

黑尾叶蝉 (*Nephotettix cincticeps*) 属半翅目 (Hemiptera) 叶蝉科 (Cicadellidae), 是重要的水稻害虫。黑尾叶蝉在水稻整个生长期以若虫和成虫吸汁直接造成受害, 其中秧苗期为害可致使稻叶变黄枯死, 分蘖期为害可致使稻株矮小, 穗期为害可致使空壳率增加。此外, 黑尾叶蝉作为媒介昆虫还能传播多种水稻病毒病如普通矮缩病毒 (Rice dwarf virus, RDV)、黄矮病 (Rice yellow stunt virus, RYSV) 和黄萎病 (Rice yellow dwarf virus, RYDV) 等, 给水稻生产带来严重威胁。

当前, 有关植物-病毒-媒介昆虫三者关系是植物学、病毒学、昆虫学和生态学等相关领域的研究热点 (史晓斌等, 2012; Stout 等, 2006), 其中水稻-RDV-黑尾叶蝉的三者互作亦颇受关注 (梁莉, 2010)。黑尾叶蝉作为媒介昆虫, 在 RDV 传播过程中发挥着重要作用, 其第二代经卵的传毒率高达 60-85% (Fukusni, 1940)。然而, 研究发现被 RDV 感染的黑尾叶蝉存在雌成虫寿命缩短、产卵量下降、以及子代存活率降低等生物学指标变化 (Nakasuji 和 Kiritani, 1970)。这表明 RDV 对其传播媒介——黑尾叶蝉的生存与繁殖存在明显的不利影响。此外, 梁莉 (2010) 还发现带毒黑尾叶蝉的若虫发育历期亦显著减短, 但不带毒的黑尾叶蝉在取食感染 RDV 稻株后却出现若虫发育历期显著延长和雌成虫产卵量明显增加等现象。因此, 推测 RDV 可能直接通过干扰叶蝉体内生理平衡或者间接通过改变水稻内环境生理条件来共同影响黑尾叶蝉的生长与繁殖, 促进叶蝉对健康稻株的传毒, 进而加剧 RDV 病害的发生与流行。

在当前已知的众多昆虫生理调控因子中, 类胰岛素 (Insulin-like peptides, ILPs) 作为一类重要的肽激素对于维持昆虫正常的生长、发育、寿命和生殖等多种生物学性状均极为关键 (Wu 和 Brown, 2006; Antonova 等, 2012; Kannan 和 Fridell, 2013)。此外, 类胰岛素还是调节昆虫生殖与免疫之间生理平衡的重要开关之一 (Schwenke 等, 2016)。较高的

类胰岛素信号传导 (insulin/insulin-like growth factor-like signaling, IIS) 活性可促进昆虫产卵等生殖行为; 较低类胰岛素信号传导活性可增强昆虫对病原微生物的免疫水平。十二斑蜻蜓 *Libellula pulchella* 因 *Hoplorhynchus* 属肠道寄生虫感染而导致的代谢紊乱等病理学变化可通过阻断类胰岛素信号传导而得以恢复正常 (Schilder 和 Marden, 2006)。昆虫免疫相关的 Toll 通路和 c-Jun 氨基末端蛋白激酶 (c-Jun N-terminal protein kinases, JNK) 通路等均可抑制类胰岛素的信号传导 (Wang 等, 2005; Dionne 等, 2006)。受营养响应 (nutrient-responsive) 的胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinases, ERK) 通路被认为是果蝇与蚊虫体内抗病毒感染的中肠屏障, 并能被脊椎动物的胰岛素激活 (Xu 等, 2013)。鉴于黑尾叶蝉在感染 RDV 过程中以及携带 RDV 之后, 其生长、发育、寿命和生殖等生物学性状均有不同程度变化, 因此推测类胰岛素可能在其中亦起着重要的调控作用。然而, 有关黑尾叶蝉类胰岛素基因及其功能等方面至今尚乏深入研究。

为此, 本论文在黑尾叶蝉转录组数据库中筛选获得 10 条类胰岛素和 2 条胰岛素受体 (Insulin receptors, InRs) 基因的全长 DNA 序列信息基础上, 采用定量 PCR 技术探明了这些基因在转录水平的时空分布, 并在明确带毒黑尾叶蝉中 *NcILP4* 基因高水平表达基础上, 采用 RNAi 技术初步研究了该基因的功能。论文结果旨在为深入理解昆虫类胰岛素基因及其生物学功能、以及用于害虫防治新技术研发提供基础。

## 中文摘要

黑尾叶蝉 *Nephotettix cincticeps* (Uhler) 是水稻矮缩病毒 (Rice Dwarf Virus, RDV) 的重要传播媒介。在长期进化过程中, 水稻、RDV 和黑尾叶蝉之间形成了复杂的互作关系。前期研究表明, 黑尾叶蝉携带 RDV 后出现若虫发育历期延长、雌成虫寿命缩短、产卵量下降以及子代存活率降低等生物学变化。为探讨其内在机制, 本论文以黑尾叶蝉类胰岛素及其受体为研究对象, 就相关基因及其在 RDV 与黑尾叶蝉互作中的功能作用开展了初步研究, 获得主要结果如下:

### 1. 黑尾叶蝉类胰岛素及其受体基因克隆与序列分析

在黑尾叶蝉转录组数据库中筛选获得 10 条类胰岛素基因 (NcILP1-10) 和 2 条胰岛素受体基因 (NcInR1-2)。这些基因均包含 18~26 个氨基酸残基的信号肽序列, 都属分泌蛋白。采用 RT-PCR 技术克隆获得这些基因的全长 cDNA 序列。黑尾叶蝉类胰岛素及其受体蛋白在进化上存在多样性特征。

### 2. 黑尾叶蝉类胰岛素及其受体基因表达分析

采用实时荧光定量 PCR 对黑尾叶蝉类胰岛素及其受体基因的时空转录特征作了分析。除 NcILP5 在卵、若虫和成虫的表达量均相对较高外, 其他类胰岛素及其受体主要在若虫期和成虫期表达。从组织分布来看, NcILP1 和 NcILP3 主要在中肠表达, NcILP2 和 NcILP5 在卵巢表达, NcILP4、NcILP6 和 NcILP8 在脑表达, NcILP9 在脑和中肠表达, NcILP10 在脑、中肠和卵巢均有表达。NcInR1 主要在脑和卵巢表达, 而 NcInR2 则主要在脑、中肠和卵巢表达, 且以卵巢表达量显著较高。携带 RDV 可显著抑制黑尾叶蝉 NcILP4 基因表达。黑尾叶蝉不同类胰岛素基因表达的时空分布多样性, 揭示了这些类胰岛素在功能上可能存在的异同。

### 3. 黑尾叶蝉类胰岛素 NcILP4 功能初探

黑尾叶蝉类胰岛素 NcILP4 基因经 RNAi 沉默后,其转录水平显著下调,且体内的海藻糖含量略有升高,而糖原和甘油三酯含量则均显著降低。这表明 NcILP4 可能参与海藻糖代谢、糖元和脂肪合成等营养代谢过程。

综合本论文结果,推测 RDV 可能通过 NcILP4 介导对黑尾叶蝉生物学的作用影响。论文结果不仅为促进对水稻-RDV-黑尾叶蝉三者互作机制的深入研究提供了基础,而且还为深入理解昆虫类胰岛素基因及其生物学功能、以及用于害虫防治新技术研发提供了基础。

**关键词:** 黑尾叶蝉; 类胰岛素; 胰岛素受体; 水稻矮缩病毒; 基因克隆;  
实时荧光定量 PCR; 表达分析; 时空分布; RNA 干扰; 海藻糖; 糖原; 甘油三酯

## Abstract

The green leafhoppers, *Nephotettix cincticeps* (Uhler) (Homoptera: Cicadellidae), is one of the important insect vectors to spread rice dwarf virus (RDV). The complex interaction relationship among rice, RDV and *N. cincticeps* is formed in long-term evolution. The previous studies showed biological changes like the extension of nymph development, the shortening of female adult longevity, and the decreases of fecundity and offspring survival rate in *N. cincticeps* infected with RDV. In order to explore the underlying mechanisms, we primarily studied the genes and their functions of insulin-like peptides and their receptors in the interaction. The main results are shown as follows:

### **1. Gene cloning and sequence analysis of insulin-like peptides and their receptors in *N. cincticeps***

The genes of 10 insulin-like peptides (NcILP1-10) and 2 insulin receptor (NcInR1-2) were obtained via screening from the transcriptome database of *N. cincticeps* in the laboratory. These genes contain a signal peptide fragment with 18~26 amino acid residues, which means they are all secretory proteins. The full-length cDNA sequences of these genes were cloned by RT-PCR. There is an evolutionary diversity in the sequences of insulin-like peptides and their receptors.

### **2. Expression analysis of insulin-like peptides and their receptors in *N. cincticeps***

The temporal and spatial transcription of insulin-like peptides and their receptors in *N. cincticeps* were characterized by real-time quantitative PCR. Except for NcILP5 with high expression levels in eggs, nymphs and adults, the other insulin-like peptides and their receptors are mainly expressed in nymph and adult stages. As for the tissue distribution of gene

expression, NcILP1 and NcILP3 are found mainly in the midgut; NcILP2 and NcILP5 in the ovary; NcILP4, NcILP6 and NcILP8 in the brain; NcILP9 in brain and midgut; and NcILP10 in brain, ovary and midgut. NcInR1 is expressed mainly in the brain and ovary. NcInR2 is expressed in the brain, midgut and ovary, in which the expression is significantly higher in the ovary. RDV can significantly inhibit the gene expression of NcILP4 in *N. cincticeps*. The diversity of temporal and spatial expression distributions of insulin-like peptides may reveal the similarity and difference in the function of these genes.

### 3. Preliminary exploration of NcILP4 function in *N. cincticeps*

The transcription level of NcILP4 gene decreased significantly in *N. cincticeps* after RNAi. The content of trehalose increased slightly with NcILP4 gene silence, while the contents of glycogen and triglyceride decreased significantly. It indicates that NcILP4 may be involved in trehalose metabolism, and glycogen and fat synthesis process.

Based on these results, it suggests that RDV may impact the biology of *N. cincticeps* through interaction with NcILP4. The results not only provide a basis for further research on the interaction mechanism among rice, RDV, and *N. cincticeps*, but also for further understanding of insect insulin genes and their biological function, as well as for development of new pest control technology.

**Key Words:** *Nephotettix cincticeps* (Uhler), Insulin-like peptide, Insulin receptor, Rice dwarf virus, Gene cloning, Real-time quantitative PCR, Expression analysis, Temporal and spatial distributions, RNA interference, Trehalose, Glycogen, Triglyceride

目录

|                                       |      |
|---------------------------------------|------|
| 致谢 .....                              | I    |
| 前言 .....                              | II   |
| 中文摘要 .....                            | IV   |
| Abstract .....                        | VI   |
| 目录 .....                              | VIII |
| 第一章 文献综述 .....                        | 1    |
| 1.1 昆虫类胰岛素 .....                      | 1    |
| 1.2 昆虫类胰岛素受体 .....                    | 6    |
| 1.3 昆虫类胰岛素表达与释放 .....                 | 7    |
| 1.4 昆虫类胰岛素信号通路 .....                  | 10   |
| 1.5 昆虫类胰岛素功能 .....                    | 12   |
| 1.5.1 生殖调控 .....                      | 12   |
| 1.5.2 寿命调控 .....                      | 13   |
| 1.5.3 代谢调控 .....                      | 14   |
| 1.5.4 生长和发育调控 .....                   | 15   |
| 1.5.5 翅型调控 .....                      | 16   |
| 1.5.6 其他功能 .....                      | 16   |
| 1.6 结语 .....                          | 17   |
| 第二章 黑尾叶蝉类胰岛素及其受体基因克隆与序列分析 .....       | 18   |
| 2.1 材料与方法 .....                       | 18   |
| 2.1.1 试验材料 .....                      | 18   |
| 2.1.1.1 供试昆虫 .....                    | 18   |
| 2.1.1.2 主要试剂 .....                    | 19   |
| 2.1.2 试验方法 .....                      | 19   |
| 2.1.2.1 黑尾叶蝉类胰岛素及其受体基因的筛选 .....       | 19   |
| 2.1.2.2 黑尾叶蝉总 RNA 提取 .....            | 19   |
| 2.1.2.3 黑尾叶蝉 cDNA 合成 .....            | 20   |
| 2.1.2.4 黑尾叶蝉类胰岛素及其受体基因克隆 .....        | 20   |
| 2.1.2.5 黑尾叶蝉类胰岛素及其受体基因序列分析 .....      | 23   |
| 2.2 结果与分析 .....                       | 23   |
| 2.2.1 黑尾叶蝉类胰岛素及受体基因的筛选与克隆 .....       | 23   |
| 2.2.2 黑尾叶蝉类胰岛素及其受体基因的序列分析 .....       | 24   |
| 2.3 讨论 .....                          | 28   |
| 第三章 黑尾叶蝉类胰岛素及其受体基因表达分析 .....          | 31   |
| 3.1 材料与方法 .....                       | 31   |
| 3.1.1 试验材料 .....                      | 31   |
| 3.1.2 黑尾叶蝉类胰岛素及其受体基因表达的时间动态分析 .....   | 32   |
| 3.1.3 黑尾叶蝉类胰岛素及其受体基因表达的组织分布分析 .....   | 32   |
| 3.1.4 RDV 影响黑尾叶蝉类胰岛素及其受体基因表达的分析 ..... | 34   |
| 3.1.5 数据分析 .....                      | 34   |

3.2 结果与分析 .....34

    3.2.1 黑尾叶蝉类胰岛素及其受体基因表达的时间动态 .....34

    3.2.2 黑尾叶蝉类胰岛素及其受体基因表达的组织分布 .....36

    3.2.3 黑尾叶蝉类胰岛素及其受体基因表达的 RDV 影响 .....37

3.3 讨论 .....38

**第四章 黑尾叶蝉类胰岛素 NcILP4 功能初探 .....39**

    4.1 材料与方法 .....39

        4.1.1 试验材料 .....39

        4.1.2 RNAi .....40

        4.1.3 生化检测 .....40

            4.1.3.1 海藻糖含量测定 .....40

            4.1.3.2 糖元含量测定 .....40

            4.1.3.3 甘油三酯含量测定 .....41

        4.1.4 数据分析 .....41

    4.2 结果与分析 .....41

        4.2.1 黑尾叶蝉 NcILP4 的 RNAi 分析 .....41

        4.2.2 黑尾叶蝉 NcILP4 基因沉默的生理学效应 .....42

    4.3 讨论 .....42

**总结 .....45**

    研究结果 .....45

    创新之处 .....45

    不足之处及今后研究方向 .....46

**参考文献 .....47**

**附录 .....56**

## 第一章 文献综述

胰岛素（Insulin）是一类在生物体内具有调控代谢、生长、发育、生殖和寿命等多种功能的肽类激素，其结构与功能以及相关的胰岛素信号途径（Insulin/IGF signaling pathway, IIS）在不同生物类群中极具保守性（Nässel 和 Broeck, 2016）。胰岛素自 1921 年被发现以来（Banting 和 Best, 1922），因其在调控血糖代谢及其相关的糖尿病和肥胖等人类疾病中的重要作用而颇受重视，并得到广泛而深入研究（Cohen, 2006; Hall, 2017）。相对于脊椎动物体内存在的胰岛素、类胰岛素生长因子（Insulin-like growth factors, IGFs）、松弛肽（Relaxin）和类胰岛素（Insulin-like peptides, ILPs）等不同类型，无脊椎动物中则以类胰岛素为主。上世纪九十年代，在秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 和黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中发现因胰岛素信号传导缺陷而导致寿命延长的现象（Kenyon 等, 1993; Clancy 等, 2001; Tatar 等, 2001; Fontana 等, 2010），由此有关无脊椎动物类胰岛素及其信号通路就一直倍受关注，其中以昆虫类胰岛素相关的研究尤为全面而深入。至今，在昆虫类胰岛素及其信号通路以及功能机制等方面研究已有较多积累（顾世红等, 2009; 张龙辉和王国栋, 2014; Garofalo, 2002; Goberdhan 和 Wilson C, 2003; Wu 和 Brown, 2006; Teleman, 2010; Partridge 等, 2011; Antonova 等, 2012; Erion 和 Sehgal, 2013; Green 和 Extavour, 2014; Nässel 等, 2015; Altintas 等, 2016; Nässel 和 Broeck, 2016），其中特别是对黑腹果蝇的相关研究为深入理解人类疾病的发生及其治疗策略与药物开发提供了较好的试验模型。

### 1.1 昆虫类胰岛素

家蚕素（Bombyxin）是第一个从昆虫体内分离获得的家蚕 *Bombyx mori* 类胰岛素蛋白（Nagasawa 等, 1986）。当时因其对眉纹天蚕蛾 *Samia*

*cynthia* 前胸腺具有刺激产生蜕皮激素 (Ecdysone) 的活性而被误认为是一种促前胸腺激素 (Prothoracicotropic hormone) (Nagasawa 等, 1984)。此后, 编码家蚕素蛋白的基因被陆续鉴定并克隆 (Adachi 等, 1989; Kawakami 等, 1989; Aslam 等, 2011)。近年来, 随着基因组测序与生物信息学等技术发展, 越来越多的不同昆虫体内的类胰岛素蛋白及其基因得以被发现与鉴定。据不完全统计, 至今在 GenBank 数据库中登录有类胰岛素等相关蛋白或基因的昆虫种类已多达 108 种, 分别属于双翅目、鳞翅目、膜翅目、鞘翅目、半翅目、虱目、蜚蠊目、直翅目和弹尾目等 9 个目。昆虫体内类胰岛素编码基因的数目因种类而异 (表 1.1)。在家蚕基因组中已发现 38 个家蚕素基因, 根据其编码氨基酸序列相似性可被分为 12 个家族: BbxA~G 和 BbxV~Z; 其中, BbxA、B、C 和 V 家族分别由 10、12、6 和 2 个基因组成, 其余家族则均仅有单个基因 (Iwami 等, 1996; Aslam 等, 2011)。在双翅目黑腹果蝇中, 先后发现有 8 条类胰岛素基因 (DILP1~8), 分别在不同的组织器官和发育时期特异性表达 (Grönke 等, 2010; Garelli 等, 2012); 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 和埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 体内亦分别含有 8 条和 7 条类胰岛素基因 (Krieger 等, 2004; Riehle 等, 2006)。在直翅目东亚飞蝗 *Locusta migratoria* 和沙漠飞蝗 *Schistocerca gregaria* 中, 则均仅发现 1 条类胰岛素基因 (Lagueux 等, 1990; Badisco 等, 2008)。

昆虫类胰岛素的结构与脊椎动物的相似, 其前体由 B-C-A 三条肽链和信号肽组成, 其中 C 链可被水解酶切除, A 链和 B 链由一个链内和两个链间的二硫键连接, 形成异二聚体成熟肽。A 链和 B 链中形成二硫键的半胱氨酸位点高度保守, 分别构成类胰岛素的特征结构域 (图 1.1)。不同昆虫类胰岛素的合成部位多不相同, 且受发育虫态的影响。研究表明, 昆虫的脑、脂肪体、卵巢、唾液腺和中肠等组织和器官均能表达产生类胰岛素, 其中脑部的中央神经分泌细胞 (Medial neurosecretory cells, MNCs) 是主要的合成场所 (Nässel 和 Broeck, 2016)。由脑部神经分泌细胞合成的类胰岛素经位于心侧体 (Corpora cardiaca) 和咽侧体 (Corpora

allata) 神经血液区 (Neurohemal area)、以及主动脉和肠等前端的轴突末端释放到循环系统中, 或与胰岛素受体 (Insulin receptor, InR) 结合, 或在血淋巴中被降解 (Antonova 等, 2012)。此外, 在家蚕和果蝇的类胰岛素家族中还发现有 C 链未被切除的类胰岛素生长因子类似蛋白 (IGFs-like peptides), 其在家蚕中主要由脂肪体合成, 可能促进成虫特异性器官的生长和发育 (Brogiolo 等, 2001; Okamoto 等, 2009)。

表 1.1 已报道昆虫类胰岛素及其受体的基因  
Table 1.1 The reported genes of insect insulin-like peptides and insulin-like receptors

| 目 Order        | 种 Species                              | 类胰岛素基因       |                                                                                                                             | 类胰岛素受体基因     |                                       | 参考文献                                                                   |
|----------------|----------------------------------------|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|---------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
|                |                                        | ILP gene     |                                                                                                                             | InR gene     |                                       | References                                                             |
|                |                                        | 数目<br>Number | 编号<br>Accession no.                                                                                                         | 数目<br>Number | 编号<br>Accession no.                   |                                                                        |
| 双翅目<br>Diptera | 黑腹果蝇<br><i>Drosophila melanogaster</i> | 8            | NM079288;<br>NM130644;<br>NM130714;<br>NM140102;<br>NM140103;<br>NM140104;<br>NM140692;<br>NM206315                         | 3            | NM079712;<br>NM170236;<br>NM001103496 | Fernandezalmonacid 等，1987；Grönke 等，2010；Garelli 等，2012；Van Hiel 等，2014 |
|                | 桔小实蝇<br><i>Bactrocera dorsalis</i>     | 6            | XM011212549;<br>XM011212550;<br>XM011212551;<br>XM011214937;<br>XM011215586;<br>XM019991240                                 | 1            | XM011199133                           | Xu 等，2015                                                              |
|                | 埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>              | 8            | XM001649340;<br>XM001657435;<br>XM001657436;<br>XM001657437;<br>XM001657438;<br>XM001657571;<br>XM001657572;<br>XM001662872 | 1            | XM001661210                           | Graf 等，1997；Riehle 等，2006                                              |
|                | 冈比亚按蚊<br><i>Anopheles gambiae</i>      | 7            | XM314564;<br>XM314565;<br>XM314567;                                                                                         | 1            | XM320130                              | Krieger 等，2004                                                         |

| 目 Order            | 种 Species                          | 类胰岛素基因       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 类胰岛素受体基因     |                     | 参考文献<br>References                                        |
|--------------------|------------------------------------|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|---------------------|-----------------------------------------------------------|
|                    |                                    | ILP gene     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | InR gene     |                     |                                                           |
|                    |                                    | 数目<br>Number | 编号<br>Accession no.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 数目<br>Number | 编号<br>Accession no. |                                                           |
|                    |                                    |              | XM558134;<br>XM558137;<br>XM001231147;<br>XM001237578                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |              |                     |                                                           |
|                    | 淡色库蚊 <i>Culex quinquefasciatus</i> | 5            | XM001843186;<br>XM001845003;<br>XM001868222;<br>XM001868224;<br>XM001868225                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 1            | XM001847386         | Sim 和 Denlinger, 2008; 2009                               |
| 鳞翅目<br>Lepidoptera | 家蚕 <i>Bombyx mori</i>              | 38           | D00340;<br>D00771;<br>D00776;<br>D00789;<br>NM001110301;<br>NM001126261;<br>NM001126262;<br>NM001126263;<br>NM001126264;<br>NM001128134;<br>NM001128135;<br>NM001128136;<br>NM001128157;<br>NM001128158;<br>NM001128162;<br>NM001128163;<br>NM001128315;<br>NM001128316;<br>NM001128317;<br>NM001128318;<br>NM001128319;<br>NM001128320;<br>NM001128321;<br>NM001128322;<br>NM001128323;<br>NM001145324;<br>NM001173419;<br>NM001173420;<br>NM001246356; | 1            | NM001043546         | Nagasawa 等, 1986;<br>Iwami 等, 1996;<br>Fullbright 等, 1997 |

| 目 Order            | 种 Species                                 | 类胰岛素基因       |                                                                                                                               | 类胰岛素受体基因     |                             | 参考文献<br>References                                |
|--------------------|-------------------------------------------|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|-----------------------------|---------------------------------------------------|
|                    |                                           | ILP gene     |                                                                                                                               | InR gene     |                             |                                                   |
|                    |                                           | 数目<br>Number | 编号<br>Accession no.                                                                                                           | 数目<br>Number | 编号<br>Accession no.         |                                                   |
|                    |                                           |              | XM004934049;<br>XM012688591;<br>XM012693434;<br>XM012697100;<br>AB360450;<br>AB360451;<br>AB360452;<br>AB360453;<br>AB360454; |              |                             |                                                   |
|                    | 眉纹天蚕蛾<br><i>Samia cynthia ricini</i>      | 6            | #                                                                                                                             | /            |                             | Kimura-Kawakami 等, 1992                           |
|                    | 甘薯天蛾 <i>Agrius convolvuli</i>             | 2            | #                                                                                                                             | /            |                             | Iwami 等, 1996                                     |
|                    | 海灰翅夜蛾<br><i>Spodoptera littoralis</i>     | 2            | HQ451072;<br>HQ451073                                                                                                         | 1            | HQ433354                    | Van de Velde 等                                    |
|                    | 烟草天蛾<br><i>Manduca sexta</i>              | 1            | DQ080209                                                                                                                      | 1            | FJ169464                    | Koyama 等, 2008                                    |
| 膜翅目<br>Hymenoptera | 红火蚁<br><i>Solenopsis invicta</i>          | /            |                                                                                                                               | 2            | NM001304592;<br>NM001304600 | Lu 和 Pietrantonio, 2011                           |
|                    | 意大利蜜蜂 <i>Apis mellifera</i>               | 2            | GU785068;<br>NM001177903                                                                                                      | 2            | NM001246667;<br>XM394771    | Wheeler 等, 2006;<br>de Azevedo 和 Hartfelder, 2008 |
| 鞘翅目<br>Coleoptera  | 赤拟谷盗<br><i>Tribolium castaneum</i>        | 4            | EFA02796;<br>EEZ99258;<br>EFA02918;<br>KYB29166                                                                               | 2            | XM015979252;<br>XM015979414 | Li 等, 2008; Sang 等, 2016                          |
|                    | 粪金龟<br><i>Onthophagus nigriventris</i>    | /            |                                                                                                                               | 1            | JN711464                    | Lavine 等, 2013                                    |
|                    | 马铃薯甲虫<br><i>Leptinotarsa decemlineata</i> | 5            | AKQ48973;<br>AKQ48974;<br>AKQ48975;<br>AKQ48976;<br>AKQ48977                                                                  | 1            | AKQ48960                    | Fu 等, 2016                                        |
| 半翅目                | 褐飞虱                                       | 4            | KF974340;                                                                                                                     | 2            | KF974333;                   | Xu 等, 2015                                        |

| 目 Order    | 种 Species                           | 类胰岛素基因       |                                    | 类胰岛素受体基因     |                             | 参考文献                                |
|------------|-------------------------------------|--------------|------------------------------------|--------------|-----------------------------|-------------------------------------|
|            |                                     | ILP gene     |                                    | InR gene     |                             |                                     |
|            |                                     | 数目<br>Number | 编号<br>Accession no.                | 数目<br>Number | 编号<br>Accession no.         |                                     |
| Hemiptera  | <i>Nilaparvata lugens</i>           |              | KF974341;<br>KF974342;<br>AB817263 |              | KF974334                    |                                     |
|            | 豌豆长管蚜<br><i>Acyrtosiphon pisum</i>  | 10           | #                                  | 2            | XM008184754;<br>XM008187695 | Huybrechts 等 ,<br>2010; Guo 等, 2016 |
|            | 褐色橘蚜<br><i>Toxoptera citricidus</i> | /            |                                    | 2            | KX507134;<br>KX507135       | Ding 等, 2017                        |
|            | 长红猎蝽<br><i>Rhodnius prolixus</i>    | 3            | KT896507;<br>GU230850;<br>KX185519 | /            |                             | Defferrari 等, 2016                  |
|            | 德国小蠊<br><i>Blattella germanica</i>  | 1            | HG972850                           | 1            | HG518668                    | Abrisqueta 等, 2014                  |
| Blattaria  |                                     |              |                                    |              |                             |                                     |
| 直翅目        | 东亚飞蝗                                | 1            | CAA82852                           | /            |                             | Lagueux 等, 1990                     |
| Orthoptera | <i>Locusta migratoria</i>           |              |                                    |              |                             |                                     |
|            | 沙漠蝗<br><i>Schistocerca gregaria</i> | 1            | AM889089                           | /            |                             | Badisco 等, 2008                     |

注：“/”示尚未见有报道；“#”示文献中直接提供序列。

Note: The slash means there has been no report yet; the pound means gene sequences are provided directly in the reference.

1.2 昆虫类胰岛素受体

在哺乳动物中，存在多种不同类型的胰岛素受体，如能与胰岛素和类胰岛素生长因子等结合的受体酪氨酸激酶（Receptor tyrosine kinase, RTK）、以及能与松弛肽和类胰岛素等结合的 G 蛋白偶联受体（G-protein coupled receptors, GPCRs）（Ward 和 Lawrence, 2011）。在昆虫、线虫和软体动物中，较长时间以来都只发现存在 RTK 受体类型（Antonova 等, 2012; Nässel 等, 2015）；而且不同昆虫种类中还存在单基因和双

基因 (InR1 和 InR2) 的区分 (表 1.1)。如双翅目黑腹果蝇 (Ruan 等, 1995)、桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* (Xu 等, 2015) 和埃及伊蚊 *Aedes aegypti* (Graf 等, 1997)、鳞翅目家蚕 (Fullbright 等, 1997)、蜚蠊目德国小蠊 *Blattella germanica* (Abrisqueta 等, 2014) 和鞘翅目粪金龟 *Onthophagus nigriventris* (Lavine 等, 2013) 等仅发现单个 RTK 型胰岛素受体基因; 而具有多型现象的膜翅目意大利蜜蜂 *Aphis mellifera* (de Azevedo 和 Hartfelder, 2008) 和红火蚁 *Solenopsis invicta* (Lu 和 Pietrantonio, 2011)、半翅目褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Xu 等, 2015)、豌豆长管蚜 *Acyrtosiphon pisum* (Guo 等, 2016) 和褐色橘蚜 *Toxoptera citricida* (Ding 等, 2017)、以及不具多型现象的鞘翅目赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (Sang 等, 2016) 等均存在两个 RTK 型胰岛素受体基因。其中, 褐飞虱的两个胰岛素受体基因可通过调控 FOXO 活性而分别控制其翅型发生: InR1 通过激活 PI3K/Akt (Phosphatidylinositol-3-kinase / Protein kinase B) 信号级联诱导产生长翅型, 该通路如被抑制则诱导产生短翅型; InR2 与 InR1 正相反, 作为负调控因子抑制该通路后则可诱导产生短翅型 (Xu 等, 2015)。2015 年, 在黑腹果蝇中首次克隆获得两个含有类松弛肽受体的富含亮氨酸重复序列的 G 蛋白偶联受体 C 型 (Relaxin receptor-like leucine-rich repeats containing GPCRs type C) 胰岛素受体 dLGR3 和 dLGR4 (Van Hiel 等, 2014), 其中, dLGR3 的配体是类松弛肽 DILP8 (Colombani 等, 2015)。

### 1.3 昆虫类胰岛素表达与释放

昆虫类胰岛素的表达因发育时期、细胞类型及组织器官不同而异 (Nässel 等, 2015; Nässel 和 Broeck, 2016)。以黑腹果蝇类胰岛素蛋白 (DILP1~8) 为例, DILP1 在幼虫、蛹和成虫的脑神经分泌细胞中均有表达; DILP2~5 可由胚胎的中胚层 (Mesoderm) 和中肠细胞产生, 其中 DILP2、3 和 5 在幼虫和成虫脑神经分泌细胞、DILP3 在成虫中肠肌肉细胞、DILP4 在幼虫中肠前端、以及 DILP5 在成虫卵巢和马氏管中亦

有表达；DILP6 主要在幼虫和成虫的脂肪体细胞中表达；DILP7 主要由胚胎中肠细胞以及位于幼虫和成虫腹神经节中的神经元细胞产生；DILP8 则主要在幼虫成虫盘（Imaginal discs）和成虫卵巢中表达。昆虫脑神经分泌细胞中，葡萄糖可诱导、激发类胰岛素的分泌与释放：葡萄糖在转运蛋白（Glucose transporter, GLUT1）介导下进入糖代谢途径，由此线粒体产生的 ATP 抑制膜上 ATP 敏感性钾离子通道（ATP-sensitive potassium channels,  $K_{ATP}$ ），并引起细胞膜去极化，进而激活电压敏感性钙离子通道（Voltage-sensitive calcium channels），导致类胰岛素以类似于神经递质（Neurotransmitter）的释放方式而分泌至胞外。其中，神经递质、神经肽和肽激素等可通过作用神经分泌细胞而影响类胰岛素的表达、释放以及信号转导过程。已报道的这些调控因子按其作用效果可分为促进调控、抑制调控和多重调控等（Nässel 和 Broeck, 2016）。如在果蝇成虫中，受碳水化合物或脂肪水平升高而诱导脂肪体表达的细胞因子肽 Uparired 2（Upd2）即属促进因子，其通过作用于细胞因子受体 Domeless（Dome）而激活 GABA 能神经元细胞（GABAergic neurons）中的 JAK/STAT 信号通路，阻止 GABA 释放以免除细胞膜的超极化（Hyperpolarization），进而促进类胰岛素的分泌（Rajan 和 Perrimon, 2012）。其他的促进因子有脂联素（Adiponectin）（Kwak 等, 2013）、短神经肽 F（Short neuropeptide F）和 Corazonin（Kapan 等, 2012）、以及抑咽侧体素 A（Allatostatin A）（Hentze 等, 2015）等，其受体表达量降低均可导致类胰岛素多肽及其信号通路下调。抑制因子如多肽 Limostatin 表达量降低则能促进类胰岛素多肽及其信号通路上调（Alfa 等, 2015）；而 5-羟色胺（5-Hydroxytryptamine）和章鱼胺（Octopamine）等受体基因下调亦能促进类胰岛素多肽表达与释放（Luo 等, 2012; 2014）。此外，果蝇神经肽如速激肽（Tachykinin）对类胰岛素多肽的表达调控受后者种类及饥饿状态等影响，其受体基因下调可导致已喂食果蝇 DILP2 和 DILP3 的表达量增高，而导致未喂食果蝇 DILP2 和 DILP3 分别同时上调和下调（Siviter 等, 2000）。

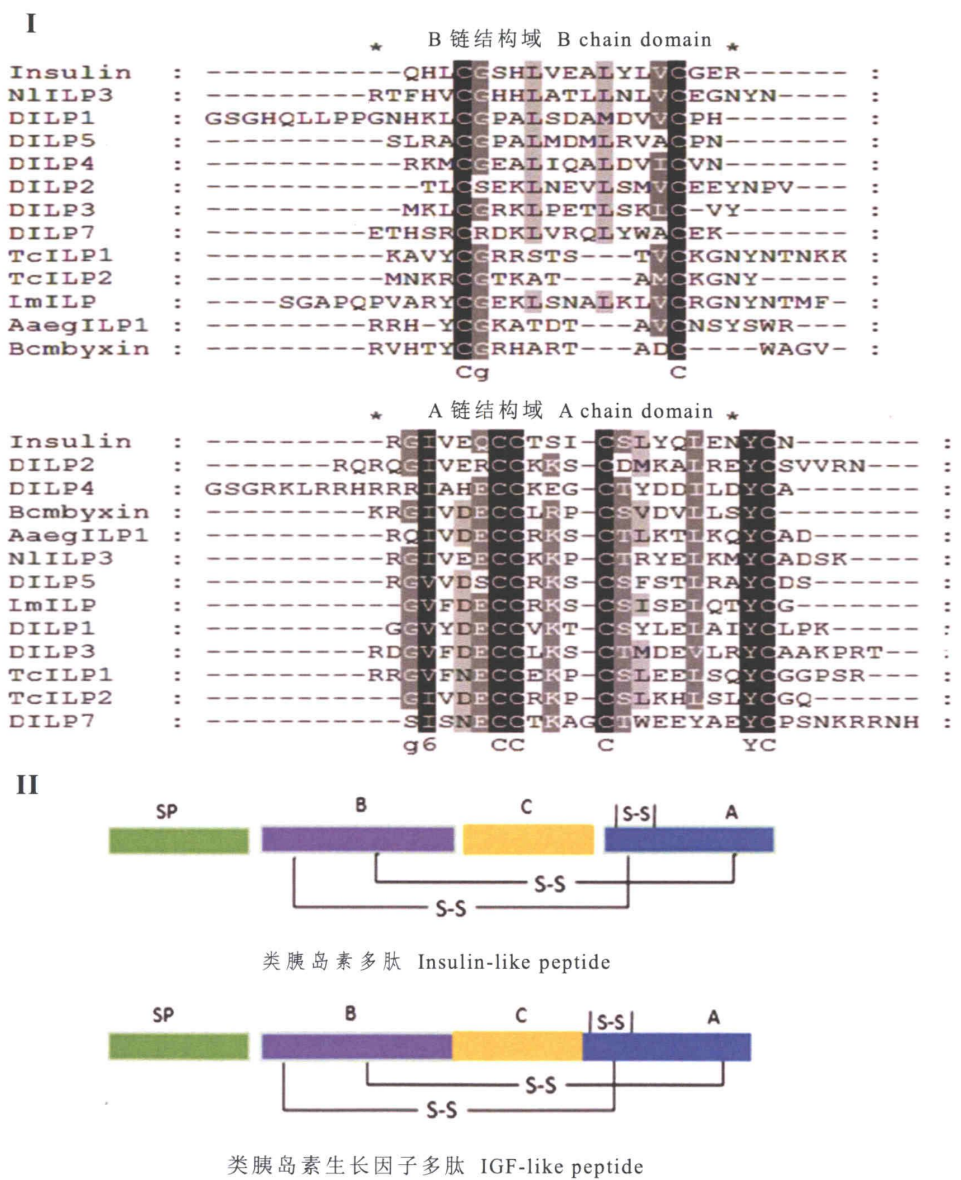


图 1.1 人胰岛素和六种昆虫胰岛素氨基酸多重序列的比对（I）及类胰岛素氨基酸序列模体（II）

Fig. 1.1 Amino acid sequences of some insulin superfamily members (I) and the putative insulin structural motifs (II)

注：DILP1-7 为果蝇类胰岛素基因；AaegILP1-8 为埃及伊蚊类胰岛素基因；TcILP1-4 为赤拟谷盗类胰岛素基因；NIILP1-4 为褐飞虱类胰岛素基因；LmILP 为飞蝗类胰岛素基因。

Note: DILP1-7, Insulin-like peptides of *Drosophila melanogaster*; AaegILP1-8, Insulin-like peptides of *Aedes aegypti*; TcILP1-4, Insulin-like peptides of *Tribolium castaneum*; NIILP1-4, Insulin-like peptides of *Nilaparvata lugens*; LmILP, Insulin-like peptide of *Locusta migratoria*.

## 1.4 昆虫类胰岛素信号通路

类胰岛素与其跨膜受体结合后，激活下游信号通路，进而调控昆虫生长、发育、代谢、生殖和免疫等生命活动（Wu 和 Brown, 2006）。目前，有关昆虫类胰岛素信号通路在黑腹果蝇中已有较多的研究积累，主要涉及果蝇 RTK 受体传导的信号通路（图 1.2）（Garofalo, 2002; Goberdhan 和 Wilson, 2003; Wu 和 Brown, 2006; Teleman, 2010; Antonova 等, 2012; Nässel 等, 2015）。

在果蝇中，与人胰岛素信号通路基因同源的类胰岛素、类胰岛素生长因子（DIR）、胰岛素受体底物（IRS/chico）、PI3K、磷酸肌醇依赖的蛋白激酶（Phosphoinositide-dependent protein kinase, PDK）、AKT/PKB 和 FOXO 等基因已相继被发现，表明其信号通路和哺乳动物类似（Böhni 等, 1999; Verdu 等, 1999; Weinkove 等, 1999; Jünger 等, 2003）。类胰岛素受体在与类胰岛素结合后即发生  $\beta$  亚基自磷酸化，激活的 RTK 将 IRS 的酪氨酸残基磷酸化，进而与生长因子受体结合蛋白 2（GRB2）或 PI3K 上特异的 SH<sub>2</sub>（SRC-homology）结构域结合，分别激活两条不同的信号通路：（1）激活的 GRB2 和鸟苷释放蛋白（Son of sevenless, SOS）结合形成 IRS/GRB2/SOS 复合物，随后通过丝裂原活化蛋白激酶（Mitogen-activated protein kinase, MAPK）信号级联反应激活 MEK/ERK（Mitogen-activated ERK-activating kinase / Extracellular signal regulated kinase）信号通路，主要调控细胞增殖、分化和发育等（Blenis, 1993; Shaul 和 Seger, 2007; Chakraborty 等, 2013）；（2）磷酸化的 IRS 和 PI3K 亚基 p85（85kDa）结合，激活 PI3K 亚基 p110（110 kDa），进而促进磷脂酰肌醇二磷酸（Phosphatidylinositol-4,5-P<sub>2</sub>, PIP<sub>2</sub>）转变为磷脂酰肌醇三磷酸（Phosphatidylinositol-3,4,5-P<sub>3</sub>, PIP<sub>3</sub>），高浓度 PIP<sub>3</sub> 随后依次活化 PDK、激活 AKT/PKB、抑制 TSC1-2（Tuberous sclerosis 1-2）和激活 TOR（Target of rapamycin），TOR 或与 S6K 结合而促进蛋白翻译过程，

或使磷酸化起始因子 4EBP (Karyotic initiation factor 4E-binding protein) 磷酸化失活而调控蛋白质合成 (Gingras 等, 2001), 而 AKT/PKB 还可以磷酸化 FOXO 丝氨酸/苏氨酸残基, 降低胞质 FOXO 浓度以防止阻断细胞生长, 并下调与细胞增殖、凋亡和代谢等相关基因转录 (Burgering 等, 2002)。第二条信号通路称为 PI3K 途径, 这两条途径相互独立, 但在一定条件下也能相互激活 (Cantley, 2002)。

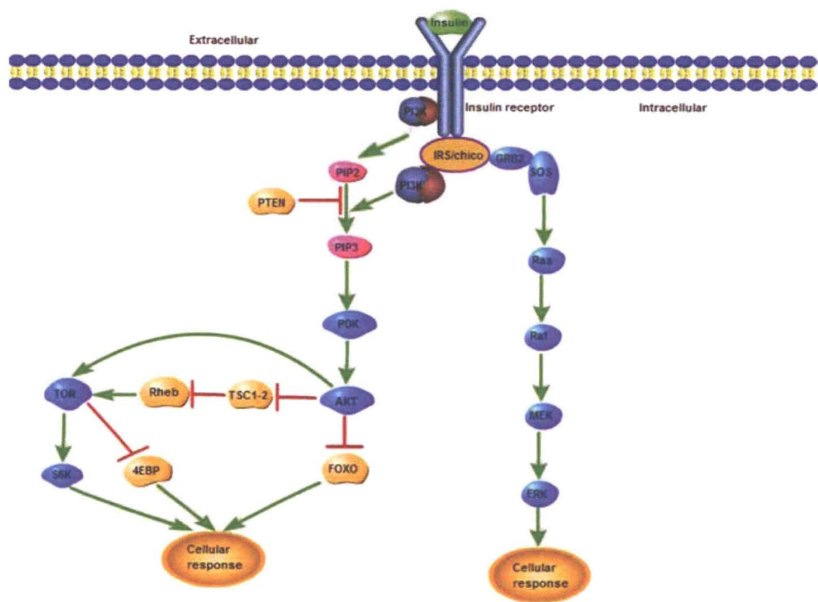


图1.2 胰岛素信号通路示意简图[修改自Das和Dobens (2015) ]

Fig. 1.2 The insulin signaling pathways [Revised from Das & Dobens (2015)]

注：IRS为胰岛素受体底物蛋白；PIP2为磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸；PIP3为磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸；PDK为磷酸肌醇依赖性蛋白激酶；AKT为蛋白激酶B；FOXO为叉头转录因子；TSC1-2为结节硬化症基因复合物；Rheb为小G蛋白；TOR为雷帕霉素靶蛋白；S6K为核糖体S6K蛋白激酶；GRB2为生长因子受体结合蛋白2；SOS为鸟苷释放蛋白；PTEN为人第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因；MEK为丝裂原活化的ERK激活激酶；ERK为胞外信号调节激酶。

Note: IRS, Insulin receptor substrate; PIP2, Phosphatidylinositol-4,5-P2; PIP3, Phosphatidylinositol-3,4,5-P3; PDK, Phosphoinositide-dependent protein kinase; AKT, Protein kinase B; FOXO, Fork head transcription factor; TSC1-2, Tuberous sclerosis 1-2; Rheb, Ras homolog enriched in brain; TOR, Target of Rapamycin; S6K, Ribosomal protein S6 kinase; GRB2, Growth factor receptor-bound protein 2; SOS, Son of Sevenless; PTEN, Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten; MEK, mitogen-activated ERK-activating kinase; ERK, Extracellular signal regulated kinase..

## 1.5 昆虫类胰岛素功能

与哺乳类相似，昆虫类胰岛素及其信号通路极具保守性，并对昆虫整个生命周期中的各种生命活动都起着关键的调控作用，具体主要表现在生殖、寿命、代谢、生长与发育以及多型分化等方面（Wu和Brown，2006；Antonova等，2012；Kannan和Fridell，2013）。

### 1.5.1 生殖调控

类胰岛素及其通路是昆虫除蜕皮激素和保幼激素（Juvenile hormone, JH）以外重要的生殖调控因子，其不仅能直接调控昆虫生殖活动，还能与蜕皮激素和JH互作起着协同调控作用。黑腹果蝇在去除能分泌DILPs的中央神经细胞后，繁殖能力显著下降（Ikeya等，2002；Broughton等，2005）。果蝇Chico突变体不育，而将处于卵黄发生前期的野生型果蝇卵巢移植到突变体中，可诱导其卵黄发生；与此相反，将Chico突变体卵巢移植到野生型体内则不能产生卵黄蛋白，而且野生型和Chico突变型体内JH和血淋巴20-羟基蜕皮酮（20-HE）的水平均基本一致（Richard等，2005）。赤拟谷盗类胰岛素通路中的FOXO能与Vg基因启动子的FHRE2位点特异性结合而调控Vg蛋白表达（Sheng等，2011）。这表明昆虫类胰岛素及其通路可不依赖JH和20-HE而直接调控生殖。

类胰岛素与蜕皮激素和JH互作对昆虫生殖的调控，主要体现在卵黄蛋白合成和卵子成熟等过程。埃及伊蚊经牛胰岛素处理后可促进其卵巢蜕皮激素的合成，并在 $1.7\mu\text{M}$ ~ $85\mu\text{M}$ 范围内存在明显剂量效应，而酪氨酸激酶（tyrosine kinase, TK）和PI3K等抑制剂处理则可阻断蜕皮激素合成（Riehle和Brown，1999）。埃及伊蚊ILP3可促进其卵巢产生蜕皮激素和卵母细胞吸收卵黄蛋白（Brown等，2008）。果蝇INR突变体卵巢在前期即停止发育，而经JH类似物—甲氧普林（Methoprene）处理则可恢复卵黄发生（Tatar等，2001）。在赤拟谷盗中，JH酸甲基转移酶（JH Acid

Methyl Transferase, JHAMT) 基因或MET (methoprene-tolerant) 基因 RNAi后可降低脂肪体和脑中ILP2和ILP3转录水平,而再经JHIII处理则可恢复因JHAMT基因RNAi而降低的ILP2和ILP3转录水平(Sheng等, 2011)。赤拟谷盗经牛胰岛素注射或对FOXO进行RNAi后,其Vg转录和翻译水平均显著增高(Sheng等, 2011);而对INR和Chico进行RNAi后,赤拟谷盗Vg转录水平则显著降低,且雌成虫不能产卵(Parthasarathy和Palli, 2011)。马铃薯甲虫*Leptinotarsa decemlineata*类胰岛素基因RNAi后,其蜕皮激素和保幼激素合成均受到抑制(Fu等, 2016)。此外,大草蛉*Chrysopa septempunctata*经注射牛胰岛素后,其卵巢发育、Vg合成及繁殖能力均有显著提高(Zhang等, 2017)。

### 1.5.2 寿命调控

在秀丽隐杆线虫和黑腹果蝇中发现的因类胰岛素信号传导缺陷而导致寿命延长现象(Kenyon等, 1993; Clancy等, 2001; Tatar等, 2001; Fontana等, 2010),引发了对无脊椎动物类胰岛素多肽及其通路研究的关注(Nässel和Broeck, 2016)。昆虫类胰岛素及其通路对寿命的调控与线虫相似,抑制FOXO负调控因子如DILPs(Grönke等, 2010; Parthasarathy和Palli, 2011)、InR(Tatar等, 2001)、IRS/Chico(Clancy等, 2001; Tu等, 2002)和14-3-3ε(Nielsen等, 2008)等以及过表达IIS拮抗因子如PTEN或FOXO等(Hwangbo等, 2004; Giannakou等, 2004; Wessells等, 2004; Demontis和Perrimon, 2010)均能显著延长果蝇寿命或减缓心脏衰老(Altintas等, 2016)。

研究表明,胰岛素及其通路对生物的寿命调控是高度保守的,主要涉及滞育和抗逆性等调控过程。在黑腹果蝇中,通过去除能表达产生DILP2、DILP3和DILP5的神经分泌细胞、采用Chico突变体和过表达Imp-L2(Imaginal Morphogenesis Protein-Late 2)以抑制血淋巴中DILP2和DILP5水平等均可增强果蝇卵滞育(Schiesari等, 2016)。果蝇DIR突变体雌成虫寿命延长85%,其体内JH含量显著降低,且卵巢蜕皮激素合

成亦受到抑制；用JH类似物处理可诱导DIR突变体的卵黄发生，同时寿命恢复正常（Tatar等，2001）。与此类似，大斑蝶*Danaus plexippus*迁徙种群JH水平显著降低，而其寿命则由夏季种群的几周延长到数月；用JH处理大斑蝶迁徙种群可使其寿命恢复正常，而切除夏季种群咽侧体可使其寿命延长一倍（Herman和Tatar，2001）。对大菜粉蝶*Pieris brassicae*蛹注射具有完整结构的牛胰岛素可打破其滞育并合成蜕皮激素（Arpagaus，1987）。这表明JH和蜕皮激素参与了昆虫类胰岛素及其通路对寿命的调控作用（Riehle和Brown，1999；Tatar等，2003）。此外，去除能合成DILPs的中央神经细胞后，导致果蝇寿命延长、抗氧化应激和抗饥饿能力增强（Broughton等，2005）；Chico突变体果蝇的寿命显著延长，且抗逆性增加（Clancy等，2001），而诱导PTEN、FOXO或4E-BP过表达均可显著延长果蝇寿命，并增强其抗逆性（Giannakou等，2004；Wessell等，2004）。

### 1.5.3 代谢调控

在哺乳动物中，胰岛素主要通过促进细胞吸收葡萄糖并将其转化为糖原，抑制糖异生作用，促进蛋白质和脂肪酸的合成反应，抑制其分解反应调节碳水化合物代谢。昆虫体内糖类的主要成分为海藻糖。向颈部结扎的家蚕幼虫注射家蚕素II可降低海藻糖浓度和提高海藻糖酶活性，并且还可以降低脂肪体中糖原含量和提高糖原磷酸化酶活性（Satake等，1997）。家蚕素对家蚕成虫的血淋巴海藻糖和脂肪体糖原含量并无明显影响（Satake等，1999）。因此，家蚕幼虫ILPs的主要功能可能是促进糖代谢。在果蝇中，去除合成DILPs的中央神经细胞可导致其血淋巴葡萄糖和海藻糖含量升高，并表现出糖尿病症状，而过表达DILP2则可使葡萄糖和海藻糖水趋于归正常（Rulifson等，2002；Broughton等，2005；Grönke等，2010）。在果蝇胚胎Kc细胞中，胰岛素不能促进葡萄糖吸收，但能降低糖原合成，并通过磷酸戊糖途径促进葡萄糖氧化和乳酸合成（Ceddia等，2003）。豌豆长管蚜经类胰岛素Apirp5基因沉默后，其体内可溶性碳

水化合物和糖原含量显著升高(Guo等, 2016)。类似地, 长红锥蝽 *Rhodnius prolixus* 在IGF基因沉默后, 其血淋巴中碳水化合物和脂肪含量显著升高(Defferrari等, 2016)。越冬滞育的淡色库蚊 *Culex pipiens* 雌成虫的FOXO基因RNAi后, 其体内脂肪含量降低(Sim和Denlinger, 2009)。

#### 1.5.4 生长和发育调控

昆虫的生长发育受到内部基因和外部环境的共同调控, 其中营养物质是生长调控的重要因素之一。类胰岛素及其通路可根据外部环境变化来调节昆虫体内的物质与能量代谢, 其对昆虫生长发育的影响具有多样性, 表现在能直接自主调控细胞生长与增殖、组织与器官发育、虫体大小和体重等各方面。果蝇类胰岛素通路相关基因如InR、Chico、PI3K和AKT等被RNAi后, 其体型、体重、翅面积、细胞体积和数量均显著降低(Böhni等, 1999; Verdu等, 1999; Weinkove等, 1999; Brogiolo等, 2001); 反之, 过表达DILPs则可显著增加各组织的细胞体积和数量, 进而促使虫体增大(Böhni等, 1999; Brogiolo等, 2001; Garofalo, 2002)。通过去除能合成类胰岛素的神经分泌细胞, 可导致果蝇发育延迟和生长缓慢(Rulifson等, 2002)。此外, 类胰岛素及其通路还参与昆虫胚胎的生长与发育, 敲除类胰岛素及其受体基因会导致胚胎早期致死和幼虫发育滞后等现象(Chen等, 1996; Wang等, 2013; Guo等, 2016)。

果蝇细胞生长受到PI3K信号通路和能量物质代谢途径的共同调控(Scanga等, 2000; Tatar等, 2001)。抑制PI3K活性可抑制蝇蛆细胞生长, 并出现类似于饥饿诱导表型; 而体外诱导DIR或者PI3K过表达可使细胞自主避免使用其生长和DNA复制所必需的能量物质。在果蝇幼虫脂肪体和表皮等组织中, PI3K表达水平受其能量水平影响: 摄入能量物质后, IR和PI3K被激活, 进而促进合成代谢、细胞生长和增殖; 能量物质不足时可导致DIR/PI3K活性降低, 由合成代谢转换为分解代谢, 进而细胞生长和增殖停滞。研究表明, 果蝇TOR信号通路也能参与细胞生长调控, 干扰TSC1/2表达甚至能恢复因类胰岛素通路上游基因缺失而导致的

表型变化 (Oldham等, 2000; Potter等, 2001)。其中, 核糖体蛋白激酶 S6K是PI3K通路和TOR通路共有的下游因子, S6K功能缺失的果蝇亦可因细胞体积减小而导致体型变小, 因此推测S6K作为共有的效应分子将生长因子调控的PI3K通路和营养调控的TOR通路联系起来而共同调控细胞生长 (Garofalo, 2002)。与类胰岛素通路下游FOXO的仅改变细胞数量而不影响细胞大小的作用方式 (Puig等, 2003) 不同, S6K只能改变细胞大小, 而对细胞数量并无影响 (Montagne等, 1999)。

### 1.5.5 翅型调控

昆虫类胰岛素及其通路参与翅型分化的调控。褐飞虱体内的两个胰岛素受体NlInR1和NlInR2可通过FOXO活性共同调控制长短翅型的发育 (Xu等, 2015)。NlInR1激活Akt, 使FOXO转录因子磷酸化后失去转录因子活性, 导致产生长翅型个体; NlInR2作为通路负调控因子, 其表达可阻断类胰岛素信号通路, FOXO未能被磷酸化而具有转录因子活性, 进而产生短翅型个体。与此类似, 在褐色橘蚜中采用RNAi分别沉默胰岛素受体 AcInR1、AcInR2以及 AcInR1和AcInR2, 其若虫分别表现为翅正常发育、翅畸形发育和未发育等表型 (Ding等, 2017)。

### 1.5.6 其他功能

昆虫类胰岛素及其通路还调控昆虫的取食和交配等行为。敲除赤拟谷盗的胰岛素受体 INR 基因后, 其食物摄入明显减少, 并导致体重减轻 (Lin 等, 2016)。去除类胰岛素分泌神经细胞的未交配果蝇, 其性接受能力显著强于野生型果蝇 (Fu 等, 2016)。此外, 在社会型昆虫的等级分化中, 类胰岛素及其通路亦起着重要的调控作用。不同营养条件可诱导意大利蜜蜂蜂王和工蜂的等级分化, 涉及类胰岛素通路和 TOR 信号通路 (Patel 等, 2007; Wolschin 等, 2011)。这两条通路的基因表达在蜂王和工蜂之间存在显著差异 (Wheeler 等, 2014), 其中类胰岛素 AmILP1 和 AmILP2 基因分别在蜂王和工蜂中特异性高水平表达, 对

AmILP1 基因沉默可导致 JH 滴度降低，而对 AmILP2 基因沉默则导致卵巢缩小（Wang 等，2013；Wheeler 等，2006）。由此，类胰岛素信号通路和 TOR 信号通路是通过影响 JH 来共同调控蜂王和工蜂的分化（Mutti 等，2011）。

## 1.6 结语

在无脊椎动物中，多种 ILPs 与其相应的唯一受体结合，启动一系列的信号级联反应形成类胰岛素信号通路，以调控其生长、发育、代谢、繁殖和寿命等生命活动。此外，在褐飞虱和蜜蜂等昆虫中还发现存在 2 种类胰岛素受体，对翅型分化与等级形成亦具有重要调控作用。以昆虫为研究对象的类胰岛素及其通路研究不仅有助于深入理解生物体内高度保守的胰岛素信号通路及其功能，可为人类相关疾病的诊断与治疗提供模型，同时也可害虫防治提供新的思路。类胰岛素信号通路中的相关基因均能参与昆虫各项生理活动的调控，因此都可作为候选杀虫基因而用于害虫防治，以减少化学农药使用。这可以说是发掘新型杀虫基因的资源宝库。随着对昆虫类胰岛素及其信号通路功能认识的不断加深，研究技术的不断发展，胰岛素信号通路相关基因在今后的害虫控制及天敌等益虫保护利用上有望得到更为广泛的应用。

## 第二章 黑尾叶蝉类胰岛素及其受体基因克隆与序列分析

黑尾叶蝉是 RDV 的重要传播媒介 (Fukusni, 1940)。研究表明, 不带毒的黑尾叶蝉在取食感染 RDV 稻株后出现若虫发育历期显著延长和雌成虫产卵量明显增加等现象 (梁莉, 2010); 而感染携带 RDV 的黑尾叶蝉却表现为若虫发育历期和雌成虫寿命等明显缩短、产卵量下降、以及子代存活率降低等生物学指标变化 (Nakasuji 和 Kiritani, 1970; 梁莉, 2010)。显然, RDV 可能直接通过干扰叶蝉体内生理平衡或者间接通过改变水稻内环境生理条件来共同影响黑尾叶蝉的生长与繁殖, 促进叶蝉对健康稻株的传毒, 进而加剧 RDV 病害的发生与流行。鉴于类胰岛素是维持昆虫正常生长、发育、寿命、生殖和免疫等多种生物学性状的重要调控因子, 推测其可能在 RDV-水稻-叶蝉三者关系中亦起着关键的调控作用。

为此, 本章在转录组数据库中筛选、克隆黑尾叶蝉类胰岛素及其受体基因序列, 为探明类胰岛素在 RDV-水稻-叶蝉三者关系中作用机制提供基础。

### 2.1 材料与方法

#### 2.1.1 试验材料

##### 2.1.1.1 供试昆虫

黑尾叶蝉采集于浙江杭州的浙大紫金港校区试验农场。该地区一直未见有水稻感染 RDV 的发病情况。田间采得的黑尾叶蝉在室内以温度  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度  $70\pm 5\%$ 、光强度 12000-14000 Lux 和光周期为 14h:10h (光照:黑暗) 的条件下, 用籼稻品种台中在来 1 号 (Taichung Native 1, TN1) 连续培养 3 代以上, 供试验用。

### 2.1.1.2 主要试剂

用于基因克隆的相关试剂,如 T4 DNA 连接酶、cDNA 合成试剂盒、DNA Marker、大肠杆菌感受态细胞等购于北京全式金生物有限公司; Trizol 试剂盒购于美国 Invitrogen 公司; 限制性内切酶、普通 PCR 试剂盒和 SYBR 定量 PCR 试剂盒等购于大连宝生物工程公司等。其他如质粒抽提试剂盒和凝胶回收试剂盒等购于上海生工有限公司。

### 2.1.2 试验方法

#### 2.1.2.1 黑尾叶蝉类胰岛素及其受体基因的筛选

根据已报道的黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、家蚕 *Bombyx mori*、埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 和褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 等昆虫的类胰岛素及其受体基因序列,在本实验室构建的黑尾叶蝉转录组数据库(由全虫及脑、卵巢、脂肪体和唾液腺等不同组织的转录组数据组成)中进行本地 BLAST 比对,筛选出黑尾叶蝉的类胰岛素及其受体的基因。根据筛选获得的类胰岛素及其受体基因序列分别设计合成特异性引物(表 2.1),从黑尾叶蝉体内扩增、克隆获得全长 cDNA 序列。

#### 2.1.2.2 黑尾叶蝉总 RNA 提取

- (1) 取不同龄期的健康黑尾叶蝉若虫和成虫置于无 RNase 的研磨管中,加入 500  $\mu$ L Trizol 试剂,打碎研磨后于室温静置 5 min;
- (2) 向管中加入 100  $\mu$ L 氯仿,剧烈震荡 15 s,室温静置 2 min, 4  $^{\circ}$ C 12,000 g 离心 15 min;
- (3) 取上清于新的无 RNase 离心管中,加入 100  $\mu$ L 氯仿, 4  $^{\circ}$ C 12,000 g 离心 15 min;
- (4) 取上清,加入 250  $\mu$ L 异丙醇,轻微震荡后置于冰上静置 10 min, 4  $^{\circ}$ C 12,000 g 离心 10 min;

- (5) 弃上清，加入无RNase的75 %乙醇，4 ℃ 7,500 g离心5 min;
- (6) 弃上清，加入20 μL DEPC水溶解，取1 μL用NanoDrop 2000（美国Thermo公司）测量RNA浓度和纯度，并置于-80 ℃冰箱保存。

2.1.2.3 黑尾叶蝉 cDNA 合成

以黑尾叶蝉总RNA为模板，采用北京全式金公司cDNA合成试剂盒（EasyScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix）。

- (1) 按照下列体系分别向无RNase离心管中依次加入

|                              |               |
|------------------------------|---------------|
| Total RNA                    | 1.0 μg        |
| Random primer                | 1.0 μl        |
| Oligo(dT) primer             | 0.5 μl        |
| TransScript RT/RI Enzyme Mix | 0.5 μl        |
| 2× TS reaction Mix           | 10.0 μl       |
| <u>gDNA Remover</u>          | <u>1.0 μl</u> |
| Rnase-free Water             | 补足至 20.0 μl   |

轻轻混匀后甩至管底。

- (2) 在 PCR 仪上依次执行 25 ℃ 10 min、42 ℃ 2 h、85 ℃ 5 min 程序，
- 将获得 cDNA 置于-20 ℃冰箱保存。

2.1.2.4 黑尾叶蝉类胰岛素及其受体基因克隆

- (1) 根据本章 2.1.2.1 筛选共获得 10 条黑尾叶蝉类胰岛素基因和 2 条胰
- 胰岛素受体基因，采用软件 Primer Premier 5.0 分别设计特异性引物
- （表 2.1），由生工生物工程（上海）股份有限公司合成，用于类
- 胰岛素及其受体基因的 PCR 克隆。

表 2.1 黑尾叶蝉类胰岛素及其受体基因克隆的引物序列  
Table 2.1 Cloning primers of insulin-like and insulin receptor genes of  
*Nephotettix cincticeps*

| 引物 Primers | 序列 Sequences                          |
|------------|---------------------------------------|
| NcILP1-F   | 5'-CTT ACA AAC ACG CCC GCT AC-3'      |
| NcILP1-R   | 5'-TGA GTT CAC GGT GGA ATG TT-3'      |
| NcILP2-F   | 5'-GAG GTG TAA CAT TGG AGG TGT C-3'   |
| NcILP2-R   | 5'-CGG CAC AAT TTA TTT CTT CGT GT-3'  |
| NcILP3-F   | 5'-AGT CAC AAA CAC CCA CAA GA-3'      |
| NcILP3-R   | 5'-TGA GAC CAC TAC AGA TCAG CC-3'     |
| NcILP4-F   | 5'-TGC GCC AGA GAC TTA GAA GA-3'      |
| NcILP4-R   | 5'-TTA CTG AGT GTT CTT GGC GAA-3'     |
| NcILP5-F   | 5'-TGC AGA TCA TGA AGA ACA CAT TGT-3' |
| NcILP5-R   | 5'-TCT GGC GCT TCA ATC AAA CC-3'      |
| NcILP6-F   | 5'-AAG AAC TCA GGC GAA ACC-3'         |
| NcILP6-R   | 5'-AGA ACA GTG AGG GCA GGT-3'         |
| NcILP7-F   | 5'-CAC AGG CAC TCA CAA CAG-3'         |
| NcILP7-R   | 5'-GAA ATC GTG GCA ACA TAA-3'         |
| NcILP8-F   | 5'-GCA AGG ACT GAC CGA CAC-3'         |
| NcILP8-R   | 5'-CGT AAA GTG GGT GAA ACA TC-3'      |
| NcILP9-F   | 5'-GGT AGG TTG CCA TTT CAG-3'         |
| NcILP9-R   | 5'-AAG TAG CCT TGC CGA TTC-3'         |
| NcILP10-F  | 5'-CTT CCT TCC TCA CCG AGT CA-3'      |
| NcILP10-R  | 5'-GCA GGG ATA TCA CTT TCG GC-3'      |
| NcIR1-F    | 5'-ATG AAT GTT CTG GGT GGA-3'         |
| NcIR1-R    | 5'-GTC AAG GCA AGT GTA GCA-3'         |
| NcIR2-F    | 5'-TTG TCG TCC AGT CCC AGA-3'         |
| NcIR2-R    | 5'-GGA GGT GTC CCA TTG TCA-3'         |

(2) PCR反应如下：

|                                              |            |
|----------------------------------------------|------------|
| TaKaga LA Taq (5 U/I. t1)                    | 0.5 μL     |
| 10× LA PCR Buffer 11 (Mg <sup>2+</sup> Plus) | 5.0 μL     |
| dNTP Mix                                     | 5.0 μL     |
| 模板DNA                                        | 2.0 μL     |
| 引物F                                          | 1.0 μL     |
| 引物R                                          | 1.0 μL     |
| ddH <sub>2</sub> O                           | 补足至50.0 μL |

反应程序为：94 ℃ 3 min，1个循环；94 ℃ 30 s，55 ℃ 1 minn，72 ℃ 1 min，35个循环；72℃ 10 min。

(3) 对 PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳。

(4) 采用凝胶回收试剂盒（Axygen Gel Extraction Kit）对 PCR 产物进行切胶回收。

(5) 将回收的PCR产物与载体连接，反应体系如下：

|                          |            |
|--------------------------|------------|
| 2× Rapid Ligation Buffer | 5.0 μl     |
| pGEM-T Easy Vector       | 1.0 μl     |
| 切胶回收产物                   | 1.0 μl     |
| T4 DNA Ligase            | 1.0 μl     |
| ddH <sub>2</sub> O       | 补足至50.0 μl |

混匀后甩至管底，4 ℃反应过夜。

(6) 转化：将连接好的目的产物加入 50 μl Trans-T1 感受态细胞（北京全式金）中，轻轻混匀，冰上孵育 30 min。42 ℃热激 45 s，立即置于冰上 2 min。加入 500 μl 无抗 LB 培养基，轻轻混匀，37 ℃ 200 rpm 培养 1h。将培养液涂布于含有 IPTG 和 X-gal 的 LB 固体培养基上，37 ℃培养箱培养 12 h。

(7)质粒抽提与测序：挑选白色单菌落于 1 ml Amp 液体 LB 培养基中，37 ℃ 200 rpm 培养 3 h，送至上海铂尚公司进行测序。

### 2.1.2.5 黑尾叶蝉类胰岛素及其受体基因序列分析

- (1) 利用 ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 确定开放阅读框;
- (2) 使用 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽;
- (3) 通过 NCBI 上 conserved domains 查找保守序列(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)
- (4) 在 GenBank 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中搜索获得不同昆虫的类胰岛素及其受体基因序列;
- (5) 采用 ClustalX 2.0 软件对多序列进行对比分析;
- (6) 采用 MEGA 6.05 软件以邻接法 (Neighbor-Joining method) 构建进化树, 相似距离采用 JTT 矩阵法 (JTT matrix-based method) 估算。同源序列进化分析中, 对比对质量较差的区域通过 Gblocks Server ([http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks\\_server.html](http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks_server.html)) 进行删除。

## 2.2 结果与分析

### 2.2.1 黑尾叶蝉类胰岛素及受体基因的筛选与克隆

以 GenBank 数据库中已有的昆虫类胰岛素及其受体基因序列为检索项, 采用 BLAST 程序在本实验室的黑尾叶蝉转录组数据库筛选获得 10 条类胰岛素基因 (NcILP1-10) 和 2 条胰岛素受体基因 (NcInR1-2)。分别设计相应的特异性引物, 以黑尾叶蝉 cDNA 为模板进行 RT-PCR 扩增, 扩增产物经 TA 克隆测序, 获得黑尾叶蝉类胰岛素及其受体基因的 cDNA 序列。

克隆获得的黑尾叶蝉类胰岛素及其受体的编码基因全长 cDNA 及其推导的氨基酸序列见附录一 (I-XII)。

2.2.2 黑尾叶蝉类胰岛素及其受体基因的序列分析

在克隆的10条黑尾叶蝉类胰岛素中，以NcILP4和NcILP10分别为最短和最长，其分子量分别为8.43Kd和252Kd（表2.2）。黑尾叶蝉胰岛素受体NcInR1和NcInR2蛋白全长分别包含1,316和1,290个氨基酸。运用SignalP4.1进行信号肽分析，发现10个黑尾叶蝉类胰岛素和2个受体蛋白均包含18~26个氨基酸残基的信号肽序列，表明都属于分泌蛋白。

表 2.2 黑尾叶蝉类胰岛素及其受体基因的生物学信息  
Table 2.2 The bioinformation of cloned insulin-like and insulin receptor genes of *Nephotettix cincticeps*

| 基因<br>Genes | 开放阅读框<br>ORF（bp） | 编码氨基酸数/分子量<br>AA numbers/MW（Kd） | 信号肽氨基酸数<br>AA numbers of signal<br>peptides |
|-------------|------------------|---------------------------------|---------------------------------------------|
| NcILP1      | 345              | 115 / 12.99                     | 22                                          |
| NcILP2      | 278              | 91 / 9.99                       | 18                                          |
| NcILP3      | 339              | 112 / 12.79                     | 19                                          |
| NcILP4      | 231              | 76 / 8.43                       | 25                                          |
| NcILP5      | 288              | 95 / 10.67                      | 26                                          |
| NcILP6      | 381              | 126 / 14.55                     | 18                                          |
| NcILP7      | 396              | 131 / 15.26                     | 21                                          |
| NcILP8      | 363              | 120 / 13.51                     | 21                                          |
| NcILP9      | 387              | 128 / 14.09                     | 21                                          |
| NcILP10     | 759              | 252 / 28.29                     | 19                                          |
| NcInR1      | 3951             | 1316 / 150.77                   | 26                                          |
| NcInR2      | 3873             | 1290 / 146.63                   | 20                                          |

将黑尾叶蝉类胰岛素氨基酸序列和家蚕素以及人胰岛素的氨基酸序列进行多重序列比对，发现黑尾叶蝉类胰岛素B链具有典型的C-X(11)-C结构域，即两个保守的半胱氨酸之间包含11个氨基酸，A链具有典型的

CC-X(3)-C-X(8)-C结构域 (图2.1)。

根据B链结构域序列将黑尾叶蝉10条类胰岛素分成3组：(1) NcILP7，与果蝇DILP4归在一支，同类群还包括DILP3-4、DILP7和家蚕素等；(2) NcILP2-3、NcILP6和NcILP8，与冈比亚按蚊AgILP3和火红蚁SiILP2归为一支；(3) NcILP1、NcILP4-5和NcILP9-10，与果蝇DILP1-2、DILP5-6以及褐飞虱NIILP4聚类在一起（图2.2）。这表明黑尾叶蝉类胰岛素蛋白的进化存在多样性。

黑尾叶蝉胰岛素受体蛋白 NcInR1 和 NcInR2 的结构域分布较为相似, 从 N 端均依次排列有: 1 个 Furin-like 结构域 (Furin-like cysteine rich region) 位于 2 个 Recep-L 结构域之间、2 个 FN3 结构域 (Fibronectin type 3 domain) 和 1 个 PTKc InsR-like 结构域 (Catalytic domain of Insulin Receptor-like Protein Tyrosine Kinases) (图 2.3)。这与褐飞虱 NcInR2 的结构域组成与排列一致。褐飞虱 NcInR1 在相同区域则具有 3 个 FN3 结构域, 而果蝇则仅有 1 个 FN3 结构域。

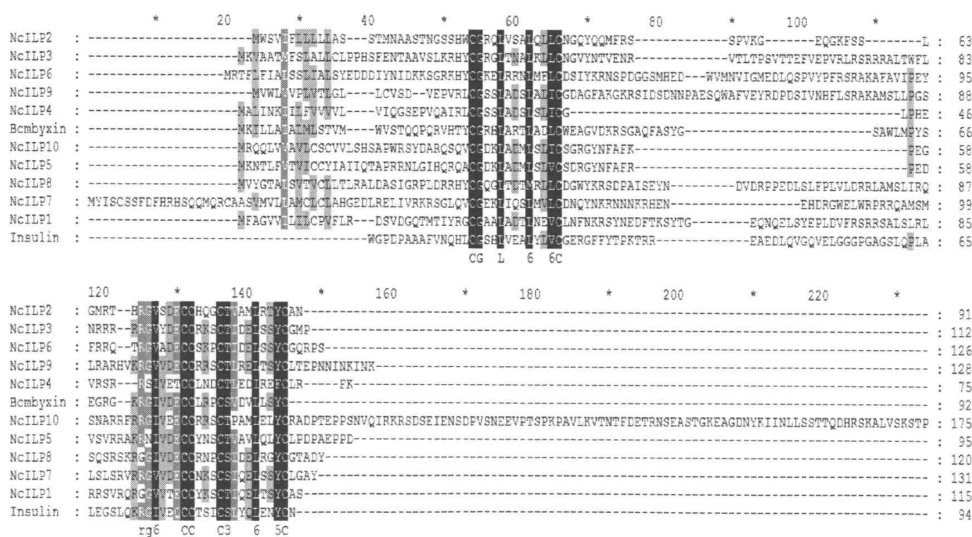


图2.1 黑尾叶蝉类胰岛素、家蚕素和人胰岛素的氨基酸序列比对分析

**Fig. 2.1 Alignment of amino acid sequences of NcILPI-10, Bombyxin and Human insulin**

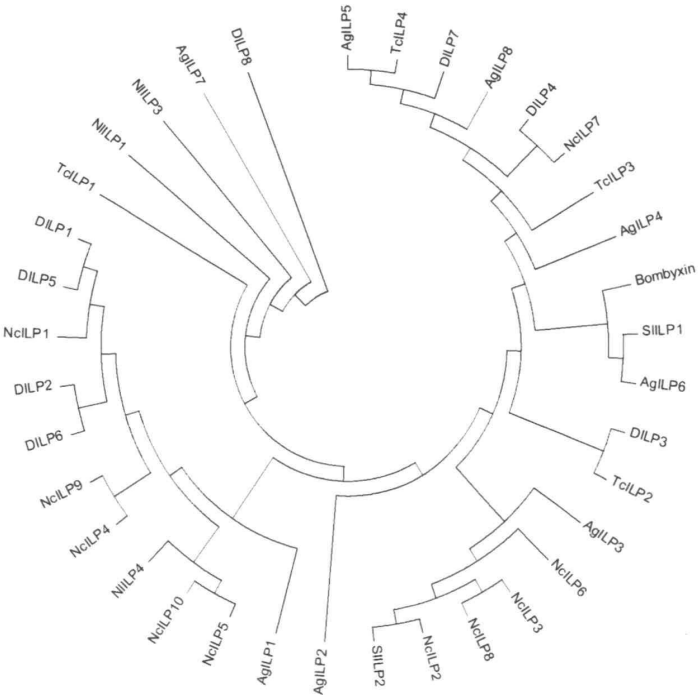


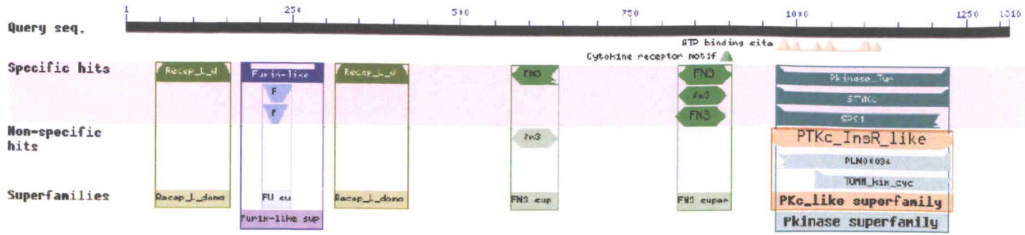
图2.2 基于类胰岛素B链保守结构域序列的进化分析

Fig. 2.2 Phylogeny of conserved sequence of B chain domain in insulin-like peptides

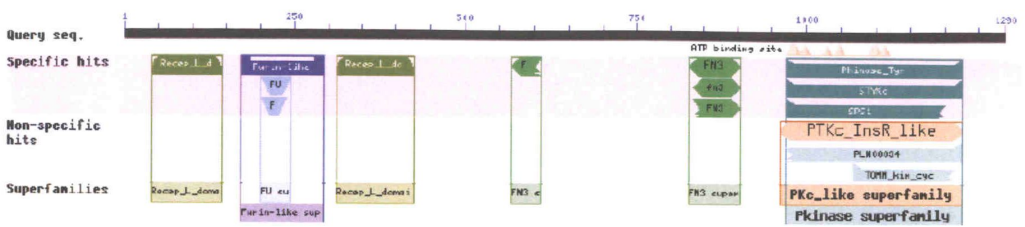
注：Ag 示冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*；Bombyxin 属家蚕 *Bombyx mori*；Dm 示黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*；Nc 示黑尾叶蝉 *Nephotettix cincticeps*；Nl 示褐飞虱 *Nilaparvata lugens*；Si 示红火蚁 *Solenopsis invicta*；Tc 示赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*。

根据保守的结构域序列对不同昆虫的胰岛素受体蛋白进行进化关系分析，其中包括单基因受体的昆虫如果蝇、家蚕、蚊类和马铃薯甲虫等、以及双基因受体的如褐飞虱、豌豆长管蚜、褐色橘蚜、意大利蜜蜂和红火蚁等。结果发现，黑尾叶蝉NcInR2与单基因受体、以及双基因受体中的1条归在一起，而NcInR1则与双基因受体的另1条归在一起（图2.4）。这表明NcInR1所在的分支可能在进化过程中发生了丢失。在进化关系，黑尾叶蝉胰岛素受体与半翅目蚜虫和膜翅目昆虫的较为相近，而与同为半翅目的褐飞虱则相对较远些。

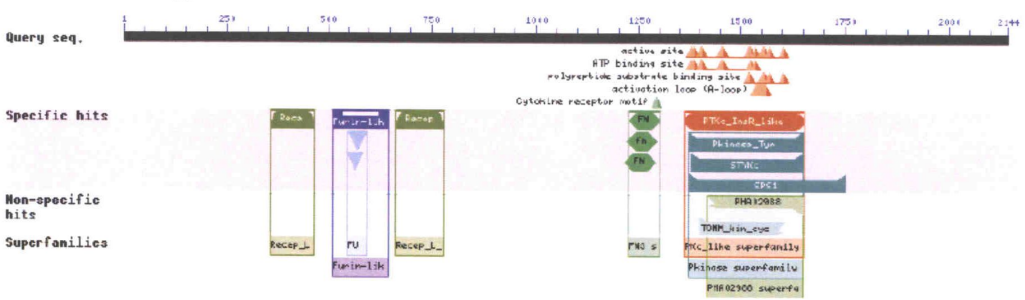
I. NcInR1



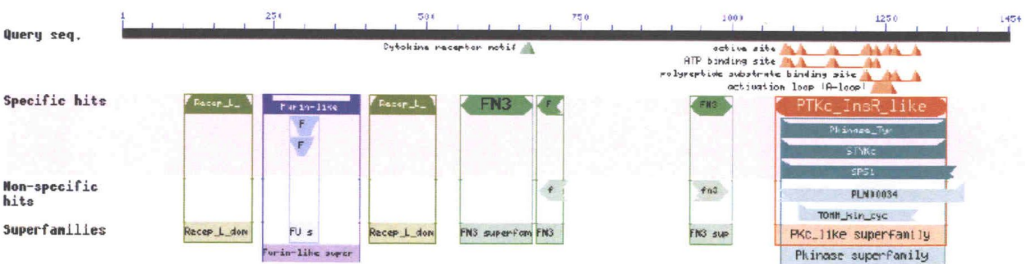
II. NcInR2



III. DInR (NP\_524436)



IV. NlInR1 (AIY24638)



V. NlInR2 (AIY24639)

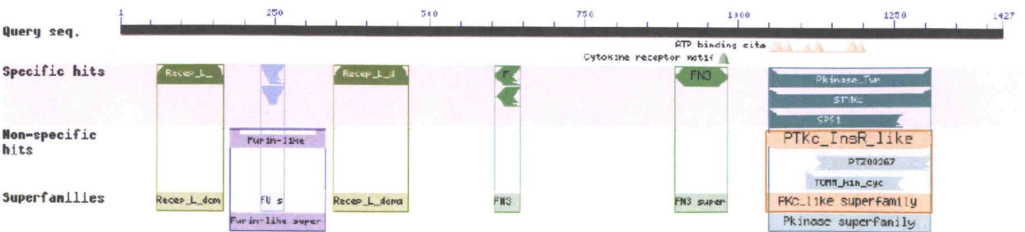


图2.3 黑尾叶蝉胰岛素受体蛋白的保守结构域分布

Fig. 2.3 Distribution of conserved domains in insulin receptors of *Nephrotettix cincticeps*

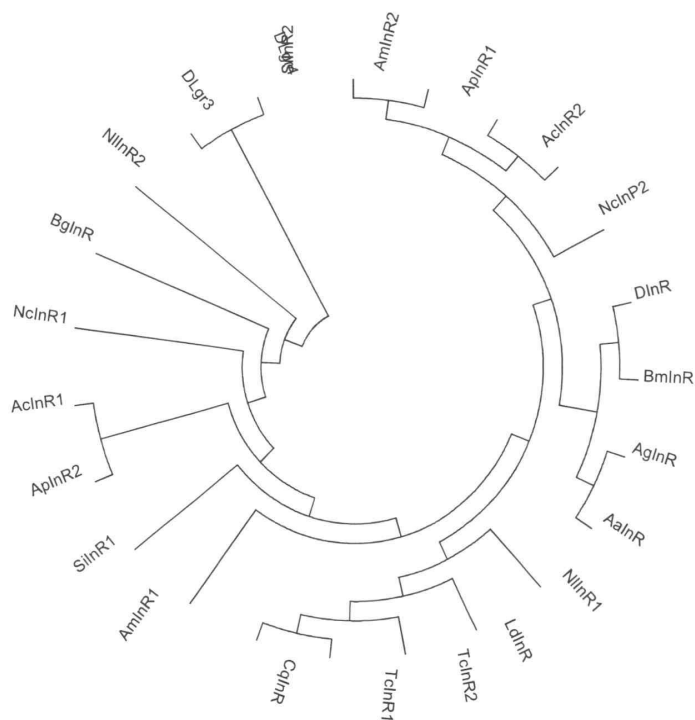


图2.4 基于胰岛素受体保守结构域序列的进化分析

Fig. 2.4 Phylogeny of conserved domains of insulin receptors

注：Aa 示埃及伊蚊 *Aedes aegypti*；Ac 示褐色橘蚜 *Toxoptera citricidus*；Ag 示冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*；Am 示意大利蜜蜂 *Apis mellifera*；Ap 示豌豆长管蚜 *Acyrtosiphon pisum*；Bg 示德国小蠊 *Blattella germannica*；Bm 示家蚕 *Bombyx mori*；Cq 示淡色库蚊 *Culex quinquefasciatus*；Dm 示黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*；Ld 示马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata*；Nl 示褐飞虱 *Nilaparvata lugens*；Si 示红火蚁 *Solenopsis invicta*；Tc 示赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*。

2.3 讨论

无脊椎动物的类胰岛素蛋白是脊椎动物胰岛素的同源基因，和胰岛素、胰岛素样生长因子、松弛素等共同构成胰岛素超基因家族。无脊椎动物体内存在一条或多条类胰岛素，其结构和哺乳动物胰岛素高度保守。自从 Nagasawa 等（1986）发现第一条昆虫类胰岛素——家蚕素以来，在家蚕中共发现 38 条类胰岛素基因，分属 12 个家族（Iwami 等，1996；

Aslam 等, 2011)。已报道的鳞翅目昆虫体内类胰岛素基因的数目变化较大, 如烟草天蛾仅有 1 条类胰岛素基因 (Koyama 等, 2008)。在蜚蠊目德国小蠊 (Abrisqueta 等, 2014) 和直翅目蝗虫 (Lagueux 等, 1990; Badisco 等, 2008) 中也仅发现 1 条类胰岛素基因。双翅目昆虫的类胰岛素基因数量则相对较为稳定, 通常由多条类胰岛素基因组成, 如黑腹果蝇 (Fernandezalmonacid 等, 1987; Ruan 等, 1995; Ikeya 等, 2001; Garelli 等, 2012; VanHiel 等, 2014) 和埃及伊蚊 (Riehle 等, 2006) 各有 8 条, 冈比亚按蚊 7 条 (Krieger 等, 2004)、桔小实蝇 6 条 (Rihle 等, 2014; Xu 等, 2016) 和淡色库蚊 5 条 (Sim 等, 2008) 等 (表 1.1)。已报道的半翅目昆虫类胰岛素的基因数量从长红猎蝽的 3 条 (Defferrari 等, 2016) 到豌豆长管蚜的 10 条 (Huybrechts 等, 2010; Guo 等, 2016) 之间, 其中褐飞虱体内已发现有 4 条类胰岛素基因 (Xu 等, 2015)。就同属于半翅目的黑尾叶蝉而言, 本文从其转录组数据库中检索到 10 条类胰岛素 NcILP1~10 序列, 其 ORF 长度从 231bp 到 758bp 不等, 不仅均包含信号肽序列, 而且具有典型的 B 链 C-X(11)-C 和 A 链 CC-X(3)-C-X(8)-C 等结构域。根据保守的 B 链结构域序列, 可将 10 条黑尾叶蝉类胰岛素分成 3 类, 并与不同昆虫类胰岛素存在不同的亲源关系。因此, 推测黑尾叶蝉的类胰岛素不仅在功能上而且在进化上都存在多样性。

胰岛素受体是胰岛素信号传导途径中的关键组成部分, 其作为起始位点而存在于多数细胞表面, 为跨膜蛋白。哺乳动物的胰岛素受体有多种类型, 如以胰岛素和 IGFs 为配体的 RTK 受体和以松弛肽为配体的 GPCR 受体等 (Ward 和 Lawrence, 2011)。其结构均为  $\alpha_2\beta_2$  四聚体,  $\alpha$  亚基位于膜外, 含有胰岛素结合位点,  $\beta$  亚基为跨膜蛋白, 两者通过二硫键连接形成二聚体, 并和另一个  $\alpha$ 、 $\beta$  亚基结合形成成熟的  $\alpha_2\beta_2$  四聚体。 $\beta$  亚基膜内部分含有酪氨酸激酶结构域。在昆虫中, 主要存在 RTK 受体类型 (Antonova 等, 2012; Nässel 等, 2015), 并且不同昆虫种类中还存在单基因和双基因 (InR1 和 InR2) 的区分。至今已报道单 RTK 型胰

胰岛素受体基因存在于双翅目黑腹果蝇（Ruan 等，1995）、桔小实蝇（Xu 等，2015）和埃及伊蚊（Graf 等，1997）、鳞翅目家蚕（Fullbright 等，1997）、蜚蠊目德国小蠊（Abrisqueta 等，2014）和鞘翅目粪金龟（Lavine 等，2013）等体内；而双 RTK 型胰岛素受体基因则存在于膜翅目意大利蜜蜂（de Azevedo 和 Hartfelder，2008）和红火蚁（Lu 和 Pietrantonio，2011）、半翅目褐飞虱（Xu 等，2015）、豌豆长管蚜（Guo 等，2016）和褐色橘蚜（Ding 等，2017）、以及鞘翅目赤拟谷盗（Sang 等，2016）中。此外，在黑腹果蝇中还发现存在 2 个含有类松弛肽受体的富含亮氨酸重复序列的 GPCR 受体 C 型胰岛素受体 dLGR3 和 dLGR4（Van Hiel 等，2014），其中，dLGR3 的配体是类松弛肽 DILP8（Colombani 等，2015）。本文在黑尾叶蝉体内克隆获得 2 条 RTK 型胰岛素受体基因，均具有典型的胰岛素受体结构域分布。研究表明，褐飞虱 2 条类胰岛素受体通过相互作用来共同调节翅型发育（Xu 等，2015）。因此，推测黑尾叶蝉 2 条类胰岛素受体可能亦通过相互作用来共同调控各种生理学活动。进化关系分析结果表明，胰岛素受体可能从双基因型向单基因型的演变。

黑尾叶蝉类胰岛素及其受体基因的克隆获得，不仅为今后的功能研究奠定的物质基础，而且还进一步揭示了昆虫类胰岛素信号传导途径在昆虫进化过程中的重要性。

### 第三章 黑尾叶蝉类胰岛素及其受体基因表达分析

在哺乳动物中,胰岛素主要功能是降低血糖浓度,增强糖原合成。由于胰岛素参与生物体内的营养与能量代谢,因此必然会对细胞生长、发育、寿命、生殖和免疫等生命活动产生影响(顾世红与陈建国,2009)。与高等动物胰岛素基因主要在胰腺细胞中表达不同,昆虫体内的类胰岛素基因数目较多,且不同基因的表达水平因发育时间和组织器官而异(Nässel 等, 2015; Nässel 和 Broeck, 2016)。以黑腹果蝇的 8 条类胰岛素基因为例,DILP1 主要在幼虫、蛹和成虫的脑神经分泌细胞中表达;DILP2~5 主要由胚胎的中胚层(Mesoderm)和中肠细胞产生,其中 DILP2、3 和 5 在幼虫和成虫脑神经分泌细胞、DILP3 在成虫中肠肌肉细胞、DILP4 在幼虫中肠前端、以及 DILP5 在成虫卵巢和马氏管中亦有表达;DILP6 主要在幼虫和成虫的脂肪体细胞中表达;DILP7 主要由胚胎中肠细胞以及位于幼虫和成虫腹神经节中的神经元细胞产生;DILP8 则主要在幼虫成虫盘(Imaginal discs)和成虫卵巢中表达。昆虫体内不同类胰岛素基因的时空表达模式多不相同,表明这些基因的功能差异,而且存在各自的时效性。

在黑尾叶蝉中,现已从转录组数据库中筛选获得了 10 条类胰岛素基因和 2 条胰岛素受体基因(详见第二章)。为探明黑尾叶蝉不同类胰岛素及其受体基因的功能与作用,本章采用实时荧光定量 PCR 对这些基因的时空表达分布作了初步分析。

## 3.1 材料与方法

### 3.1.1 试验材料

供试的健康不带毒黑尾叶蝉与主要试剂同第二章 2.1.1。其中,感染 RDV 的黑尾叶蝉为传毒筛选后在携带 RDV 水稻植株上连续饲养的室内种群。供试带毒黑尾叶蝉的个体均经过以 RDV 特异性引物(RDVS8-F:

5'-ATA GCT GGC GTT ACG GCT AC-3'和 RDVS8-R: 5'-AAA CCG TCC ACC TGA CTA CG-3') 的 PCR 检测鉴定。

3.1.2 黑尾叶蝉类胰岛素及其受体基因表达的时间动态分析

分别取黑尾叶蝉卵、1-5 龄若虫和不同日龄的雌成虫，采用 Trizol 法提取总 RNA（见第二章 2.1.2.2），并以此为模板逆转录合成第一链 cDNA（见第二章 2.1.2.3）。根据克隆、测序获得的黑尾叶蝉类胰岛素及其受体基因序列，经 Primer3web（4.0 版本，<http://primer3.ut.ee/>）设计、由生工生物工程（上海）股份有限公司合成用于实时荧光定量 PCR 检测的特异性引物（表 3.1）。利用 CFX96 Real-time PCR 检测系统（美国 Bio-RAD 公司），以 cDNA 的 3 倍稀释液为模板，对黑尾叶蝉不同类胰岛素及其受体基因的转录水平进行定量检测，以 28S 为内参基因。

qPCR 反应采用 SYBR® Premix ExTaq™ perfect RealTime 试剂盒（中国大连宝生），反应体系如下：

|                       |             |
|-----------------------|-------------|
| SYBR Premix EX Taq II | 12.5 μL     |
| Former Primer         | 1.0 μL      |
| Reveser Primer        | 1.0 μL      |
| cDNA                  | 2.0 μL      |
| ddH <sub>2</sub> O    | 补足至 25.0 μL |

反应程序为：95 ℃ 30 s，1 个循环；95 ℃ 5 s，60 ℃ 30 s，40 个循环；溶解曲线（95 ℃ 10 s；65 ℃ 5 s；95 ℃ 50 s）。反应完成后，通过（ $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ）方法，将得到的  $C_T$  值转换成各个样品中基因的相对表达量（Livak 等，2001）。

3.1.3 黑尾叶蝉类胰岛素及其受体基因表达的组织分布分析

取黑尾叶蝉雌成虫，在冰上解剖分别获得脑、唾液腺、中肠、卵巢和脂肪体等组织。随后的总 RNA 提取、cDNA 逆转录与定量 PCR 检测以及表达量分析同本章 3.1.2。

表 3.1 黑尾叶蝉类胰岛素及其受体基因定量 PCR 检测的引物序列

Table 3.1 qRT-PCR primers of insulin-like and insulin receptor genes of *Nephotettix cincticeps*

| 引物 Primers | 序列 Sequences                     |
|------------|----------------------------------|
| qNcILP1-F  | 5'-GCC CTG TAT TCC TAC GCG AT-3' |
| qNcILP1-R  | 5'-CTC CTG GTT CTG CTC TCC TG-3' |
| qNcILP2-F  | 5'-CTG GTA TCC GCC CTA CAA CT-3' |
| qNcILP2-R  | 5'-TGC ACA GTA TGT CCG TAG CA-3' |
| qNcILP3-F  | 5'-GCC ACT ATG TTT TCC CTG GC-3' |
| qNcILP3-R  | 5'-ATT CGT CAG TCC CCT TCC AC-3' |
| qNcILP4-F  | 5'-CTT TTC GTC GTG GTT GTG CT-3' |
| qNcILP4-R  | 5'-TGT CTT CCA GTG TGC AGT CA-3' |
| qNcILP5-F  | 5'-GCC TTT AGA CCA GAG GAC GT-3' |
| qNcILP5-R  | 5'-CCG GCA GAC AGT ACA GCT-3'    |
| qNcILP6-F  | 5'-CAA GCG AAA CTC CCC TGA TG-3' |
| qNcILP6-R  | 5'-AGA ACA GTG AGG GCA GGT-3'    |
| qNcILP7-F  | 5'-CAC AGG CAC TCA CAA CAG-3'    |
| qNcILP7-R  | 5'-GAA ATC GTG GCA ACA TAA-3'    |
| qNcILP8-F  | 5'-GCA AGG ACT GAC CGA CAC-3'    |
| qNcILP8-R  | 5'-CGT AAA GTG GGT GAA ACA TC-3' |
| qNcILP9-F  | 5'-GGT AGG TTG CCA TTT CAG-3'    |
| qNcILP9-R  | 5'-AAG TAG CCT TGC CGA TTC-3'    |
| qNcILP10-F | 5'-CTT CCT TCC TCA CCG AGT CA-3' |
| qNcILP10-R | 5'-GCA GGG ATA TCA CTT TCG GC-3' |
| qNcInR1-F  | 5'-CGA GTT GTC ATG GAG GCC TA-3' |
| qNcInR1-R  | 5'-GCA ACG TTC CAC ACA CTC AT-3' |
| qNcInR2-F  | 5'-GTT CCA GGA CTT TGC CCT TG-3' |
| qNcInR2-R  | 5'-CCT GGT GAT GTT CTC CCA CT-3' |
| qNc28S-F   | 5'-TCA GCG ATG TCA GTT TGA GG-3' |
| qNc28S-R   | 5'-CCT CCT CTC GCA ATG AGA AC-3' |

### 3.1.4 RDV 影响黑尾叶蝉类胰岛素及其受体基因表达的分析

分别取不带毒与带毒黑尾叶蝉 4 龄若虫，提取总 RNA、逆转录合成 cDNA、定量 PCR 检测以及表达量分析等同本章 3.1.2。

### 3.1.5 数据分析

采用 DPS 14.50 软件（唐启义和冯明光，2007）对数据作统计分析，平均数的方差分析采用 Tukey 法进行显著性检验，两两比较采用  $t$  测验。

## 3.2 结果与分析

### 3.2.1 黑尾叶蝉类胰岛素及其受体基因表达的时间动态

黑尾叶蝉不同时期类胰岛素及其受体基因的转录水平见图 3.1。

根据基因转录水平的高低，10 条黑尾叶蝉类胰岛素基因大致可分成 3 类：（1）转录水平相对较低的，如 NcILP3、NcILP6 和 NcILP10 等；（2）水平相对较高的，如 NcILP7-9 等；（3）水平特别高的，如 NcILP1-2 和 NcILP4-5 等。根据不同时期的转录水平高低，又可分成 3 类：（1）5 龄若虫和成虫期的转录水平较高，如 NcILP1-2、NcILP4-5 和 NcILP7-8 等，其中 NcILP5 的卵期的转录水平亦相对较高；（2）若虫期和成虫期的转录水平均呈单峰变化，如 NcILP6；（3）若虫期和成虫期的转录水平相当，如 NcILP9-10 等。

就 2 条胰岛素受体而言，以 NcInR1 基因的转录水平相对较低，且主要在 5 龄若虫和成虫期表达。NcInR2 在卵期的表达量极低，而在若虫期与成虫期的表达量相对较高，其中尤以成虫期第 8-12d 的转录水平显著为高（ $p < 0.05$ ）。

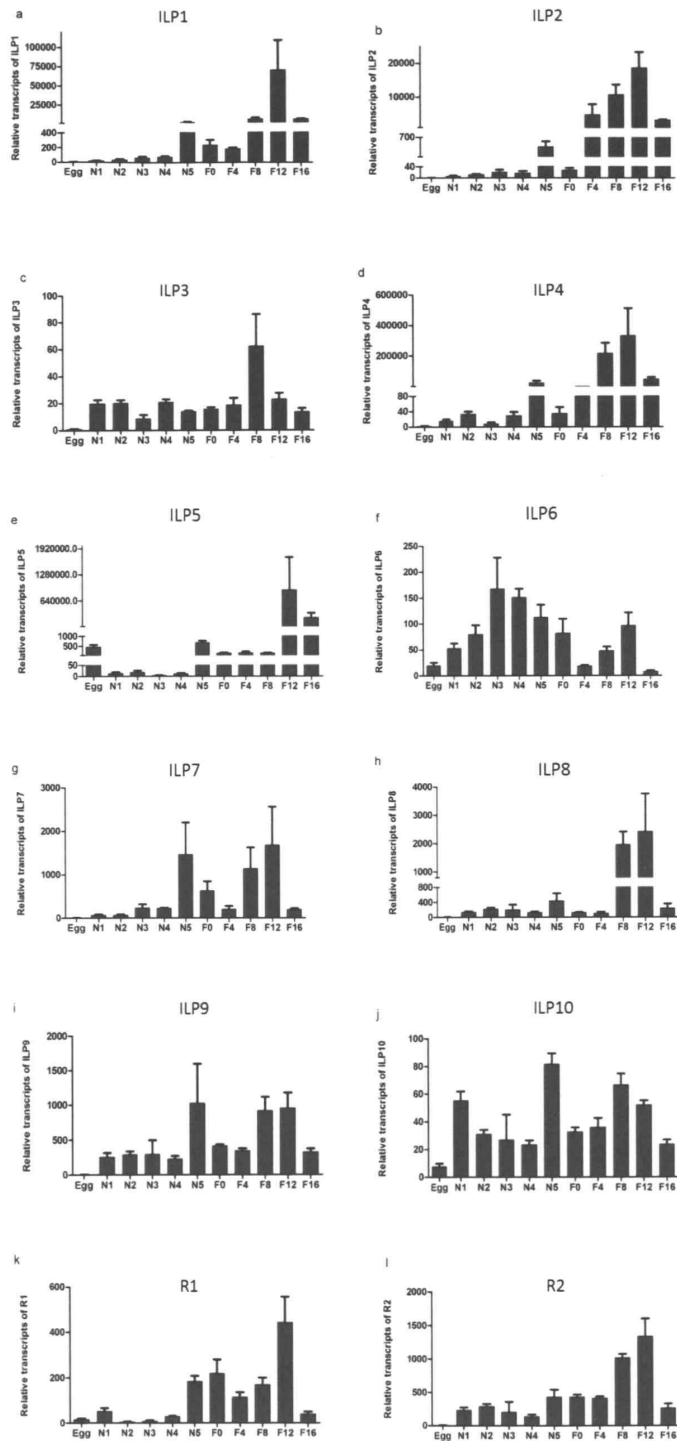


图3.1 黑尾叶蝉不同时期类胰岛素及其受体基因的转录水平

Fig. 3.1 qPCR analysis of mRNA levels of insulin-like peptides and its receptors in *Nephotettix cincticeps* at different stages

3.2.2 黑尾叶蝉类胰岛素及其受体基因表达的组织分布

黑尾叶蝉不同组织或器官中类胰岛素及其受体基因的转录水平见图 3.2。

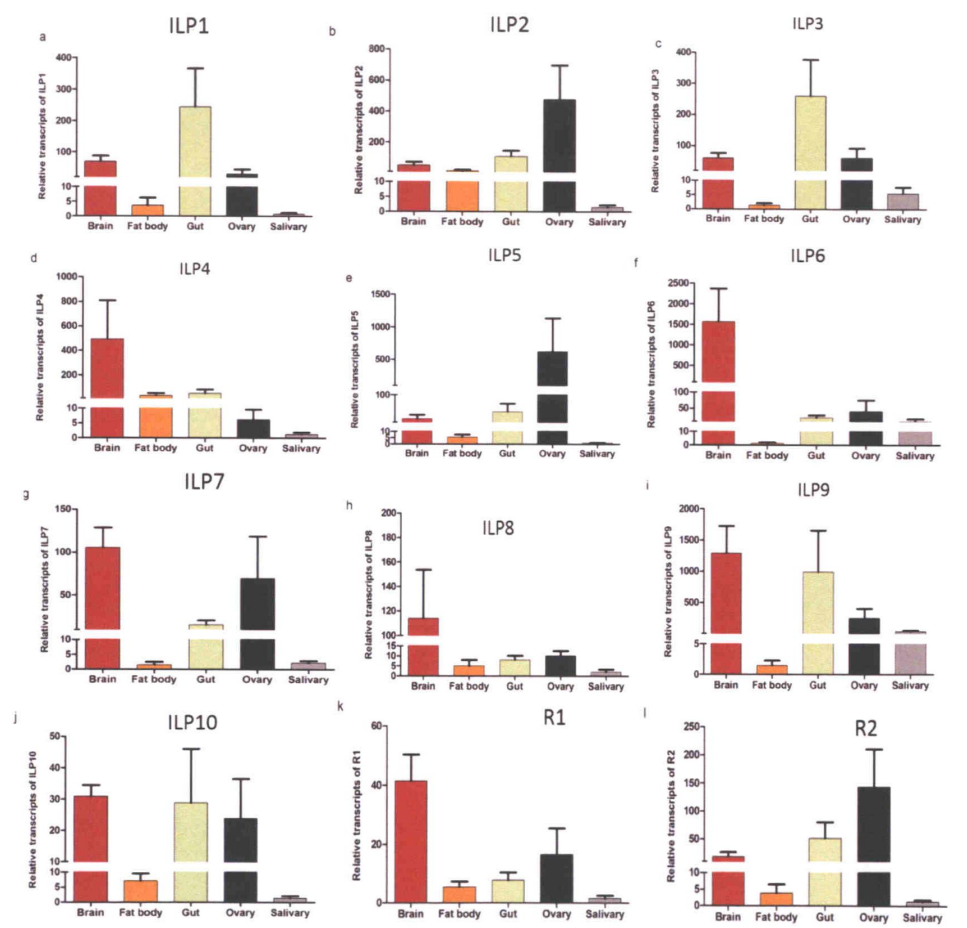


图3.2 黑尾叶蝉不同组织类胰岛素及其受体基因的表达水平

Fig. 3.2 qPCR analysis of mRNA levels of insulin-like peptides and its receptors in different tissues of *Nephotettix cincticeps*

在脑中表达的类胰岛素有 NcILP4、NcILP6 和 NcILP8-10 等，其中以 NcILP4、NcILP6 和 NcILP9 的表达水平较高，NcILP8 次之，NcILP10 较低；此外 NcILP9 在中肠、NcILP10 在中肠和卵巢中的表达量亦均较

高。在中肠中表达的类胰岛素有 NcILP1、NcILP3 和 NcILP10 等，其中 NcILP1 和 NcILP3 的表达水平相似，均显著高于 NcILP10 ( $p<0.05$ )。在卵巢中表达的类胰岛素有 NcILP2 和 NcILP5，其中 NcILP5 的表达水平显著高于 NcILP2 ( $p<0.05$ )。

黑尾叶蝉胰岛素受体的基因表达水平以 NcInR2 显著较高( $p<0.05$ )。NcInR1 主要在脑和卵巢中表达，而 NcInR2 则主要在脑、中肠和卵巢中表达，且以卵巢的表达量显著较高 ( $p<0.05$ )。

3.2.3 黑尾叶蝉类胰岛素及其受体基因表达的 RDV 影响

分别对不带毒和带毒的黑尾叶尾 4 龄若虫进行不同类胰岛素及其受体基因的转录水平检测，发现带毒叶蝉体内 NcILP4 和 NcILP5 的转录水平明显低于不带毒的，其中 NcILP4 表达水平的差异在 10 倍左右，达显著水平 ( $p<0.05$ )。其余类胰岛素以及受体的基因表达水平以带毒叶蝉为高，或两者差异并不明显 ( $p>0.05$ )，其中 NcILP3 和 NcILP9 以带毒的显著为高 ( $p<0.05$ )。这表明 NcILP4 可能在 RDV 对黑尾叶蝉生物学影响中起着重要作用。

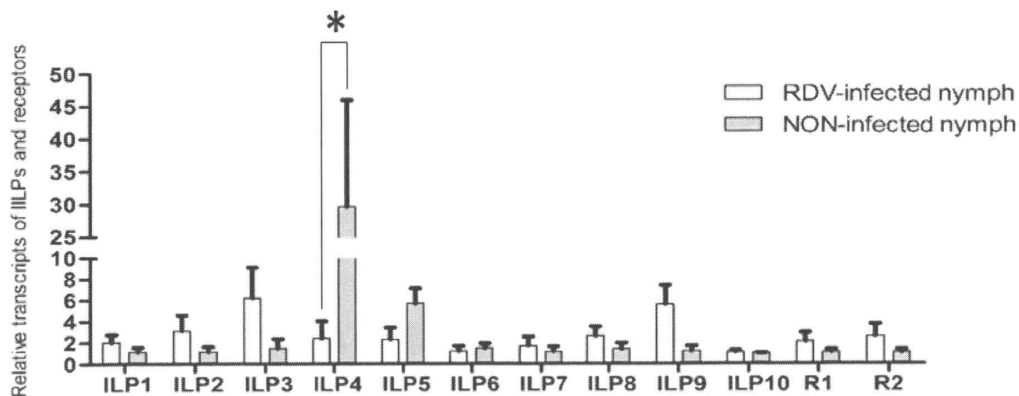


图3.3 RDV对黑尾叶蝉类胰岛素及其受体基因表达水平的影响  
Fig. 3.3 Effect of RDV infection on mRNA levels of insulin-like peptides and its receptors in *Nephotettix cincticeps*

### 3.3 讨论

昆虫类胰岛素蛋白结构保守，其加工修饰、分泌、所参与的信号通路等与脊椎动物比较相似。其中，类胰岛素的基因表达因发育时期、细胞类型及组织器官不同而异(Nässel 等, 2015; Nässel 和 Broeck, 2016)。在黑尾叶蝉中，除 NcILP5 在卵、若虫和成虫中表达量均相对较高外，其他类胰岛素及其受体则主要在若虫期和成虫期表达。从组织分布来看，NcILP1 和 NcILP3 主要在中肠表达，NcILP2 和 NcILP5 在卵巢表达，NcILP4、NcILP6 和 NcILP8 主要在脑表达，NcILP9 在脑和中肠中表达，NcILP10 在脑、中肠和卵巢中均有表达。NcInR1 主要在脑和卵巢中表达，而 NcInR2 则主要在脑、中肠和卵巢中表达，且以卵巢的表达量显著较高。与黑腹果蝇的类胰岛素相似，黑尾叶蝉不同类胰岛素基因表达的时空分布异同，揭示了这些类胰岛素在功能上可能存在的异同。

在昆虫脑神经分泌细胞中，葡萄糖可诱导、激发类胰岛素的分泌与释放，而神经递质、神经肽和肽激素等可通过作用神经分泌细胞而影响类胰岛素的表达、释放以及信号转导过程。至今已报道多种调控因子，按作用效果有（1）促进调控的，如 Upd2 (Rajan 和 Perrimon, 2012)、脂联素 (Kwak 等, 2013)、短神经肽 F 和 Corazonin (Kapan 等, 2012)、以及抑咽侧体素 A (Hentze 等, 2015) 等；（2）抑制调控的，如 Limostatin (Alfa 等, 2015)、5-羟色胺和章鱼胺 (Luo 等, 2012; 2014) 等；（3）多重调控的，如速激肽 (Siviter 等, 2000) 等。在黑尾叶蝉中，携带 RDV 可显著抑制 NcILP4 的基因表达，而 NcILP4 主要在脑高水平表达。因此，RDV 对黑尾叶蝉生物学的影响可能与对 NcILP4 的抑制调控有关，但其中的内在机制尚有待深入研究。

## 第四章 黑尾叶蝉类胰岛素 NcILP4 功能初探

在哺乳动物中，胰岛素主要通过调控血糖浓度来参与营养和能量代谢过程。类似的，昆虫类胰岛素也能促进葡萄糖吸收和糖元合成，并从糖元代谢向脂肪和蛋白质等代谢转化（Wen 等，2010）。不同生物体内胰岛素结构与功能以及其信号通路的调控机制等都非常保守。对果蝇的研究结果表明，类胰岛素可通过激活胰岛素通路和 TOR 通路等来调控生长、发育、新陈代谢、繁殖及免疫等生命过程。由于黑尾叶蝉感染 RDV 后，其若虫发育历期、雌成虫寿命和产卵量等生物学指标均发生显著性变化（Nakasuji 和 Kiritani, 1970; 梁莉, 2010），因此推测 RDV 对黑尾叶蝉的这种影响可能与叶蝉的类胰岛素信号通路有关。

为此，本文在克隆黑尾叶蝉类胰岛素及其受体基因基础上，采用实时定量 PCR 技术分析比较了感染 RDV 对这些基因在转录水平上的影响。结果发现，黑尾叶蝉若虫感染 RDV 后，NcILP4 的基因转录水平显著提高（第三章）。为了明确 NcILP4 在 RDV 影响黑尾叶蝉生物学指标中的作用，本章采用 RNAi 技术下调 NcILP4 表达水平，进而比较分析了糖类如海藻糖和糖原、以及脂类如甘油三酯等含量变化。

### 4.1 材料与方法

#### 4.1.1 试验材料

供试的健康不带毒黑尾叶蝉与主要试剂同第二章 2.1.1。其中，感染 RDV 的黑尾叶蝉为传毒筛选后在携带 RDV 水稻植株上连续饲养的室内种群（第三章 3.1.1）。

用于 RNAi 的 siRNAs 由广州锐博生物公司合成。用于检测海藻糖、糖原和甘油三酯等的试剂盒购于苏州科铭生物技术有限公司。

### 4.1.2 RNAi

制备 1% 的含有凹槽的琼脂糖板。取健康不带毒黑尾叶蝉 2 龄初若虫，于冰上麻醉后置于琼脂糖平板凹槽处，胸腹连接处的节间膜作为注射位点。用拉针仪将毛细管拉成合适的长度，并调节尖端处的粗细，将 siRNA 置于毛细管中。每头若虫注射 18.3nl NcILP4 siRNA (2.0 pmol)。将注射后的黑尾叶蝉接入放有新鲜水稻的养虫罐中，并移入人工培养箱中，饲养条件同第二章 2.1.1.1。24 h 后取活虫用于检测分析。

RNAi 效果采用定量 PCR 检测。PCR 体系与程序同第三章 3.1.2。

### 4.1.3 生化检测

分别采用试剂盒检测黑尾叶蝉 NcILP4 经 RNAi 24h 后的海藻糖、糖原和甘油三酯等含量变化。具体操作参照试剂盒说明进行，每项检测至少重复 6 次。

#### 4.1.3.1 海藻糖含量测定

称取 0.031 g 组织样品于 1 mL 提取液中，冰上匀浆后室温静置 45 min，期间振荡 3-5 次。室温 8,000× g 离心 10 min，取上清。取 0.06 mL 上清液和 0.24 mL 工作液混匀后，95 °C 水浴 10 min。冷却至室温后用酶标仪在 620 nm 波长测定吸光值 A。海藻糖含量的计算公式为：

$$\text{海藻糖含量(mg/g)} = [V1 \times (A - 0.0729) / 4.4488] / (W \times V1 / V2)$$

其中，V1 为加入反应体系中的样本体积；V2 为样品提取液的总体积 1 mL。

#### 4.1.3.2 糖元含量测定

样品制备与检测过程同 4.1.3.1。糖元含量的计算公式为：

$$\text{糖原(mg/g)} = 1.11 \times (C_{\text{标准}} \times V1) \times (A3 - A1) / (A2 - A1) / (W \times V1 / V2)$$

其中, V1 为加入反应体系中的样本体积; V2 为样品提取液的总体积 1 mL; C 标准为标准管浓度 0.1 mg/mL; A1、A2 和 A3 分别为空白管、标准管和测定管的吸光值。

#### 4.1.3.3 甘油三酯含量测定

称取 0.031 g 组织样品于 0.75 mL 提取液中, 匀浆后 95 °C 水浴 10 min, 期间充分振荡。待组织样品全部溶解后, 冷却并用超纯水定容至 5 mL。室温 8,000× g 离心 10 min, 取上清。取 0.01 mL 上清液依次和 125 μL 试剂一、25 μL 试剂二混匀后, 剧烈震荡 15 min, 静置。待分层后取上层液 15 μL 于新离心管中, 依次加入 50 μL 试剂三和 15 μL 试剂四, 充分混匀后 65 °C 水浴 3 min。再依次加入试剂五和试剂六各 50 μL。充分混匀, 65 °C 水浴 3 min 后, 用酶标仪在 420 nm 波长测定吸光值 A。甘油三酯含量的计算公式为:

$$\text{甘油三酯含量(mg/g)} = C \text{ 标准} \times (A3 - A1) / (A2 - A1) / W$$

其中, C 标准为标准管浓度 0.1 mg/mL; A1、A2 和 A3 分别为空白管、标准管和测定管的吸光值。

#### 4.1.4 数据分析

采用 DPS 14.50 软件(唐启义和冯明光, 2007)对数据作统计分析, 平均数的方差分析采用 Tukey 法进行显著性检验, 两两比较采用 *t* 测验。

## 4.2 结果与分析

### 4.2.1 黑尾叶蝉 NcILP4 的 RNAi 分析

黑尾叶蝉类胰岛素 NcILP4 基因经 RNAi 后, 其转录水平显著下调( $p < 0.05$ ), 约为对照的 1/10 (图 4.1)。这表明采用特异性 SiRNA 片段注射能有效降低叶蝉若虫体内 NcILP4 的转录。NcILP4 的 RNAi 体系构建成功为今后叶蝉类胰岛素的功能研究提供了基础。

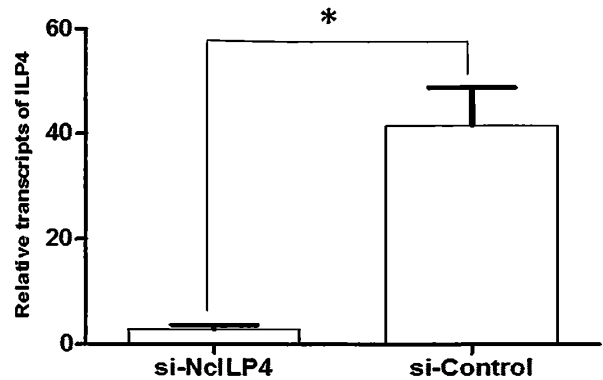


图4.1 黑尾叶蝉NcILP4经RNAi后的表达水平

Fig. 3.2 qPCR analysis of NcILP4 mRNA level in *Nephotettix cincticeps* after RNAi

4.2.2 黑尾叶蝉 NcILP4 基因沉默的生理学效应

黑尾叶蝉类胰岛素 NcILP4 基因经 RNAi 后,其体内海藻糖含量略有升高,但差异未达显著 ( $p>0.05$ );糖原和甘油三脂含量则均显著降低 ( $p<0.05$ )。这表明 NcILP4 参与海藻糖代谢、糖元合成与脂类合成等营养代谢过程。

4.3 讨论

胰岛素具有保守的结构和功能,且其信号通路的调控机制在不同生物中较为相似。在哺乳动物中,高浓度血糖(葡萄糖)能诱导胰腺分泌胰岛素以促进细胞吸收葡萄糖,并在肝脏中转化为糖原和脂肪进而储存;反之低浓度血糖会抑制糖原和脂肪合成,其中脂肪可被分解为脂肪酸和转化为葡萄糖 (Van Heemst, 2010)。

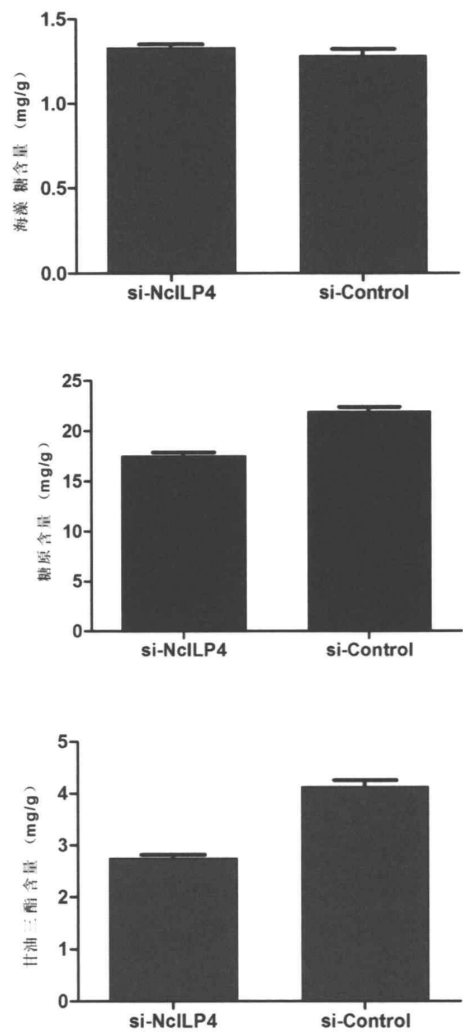


图4.2 黑尾叶蝉经RNAi后海藻糖、糖原和甘油三酯的含量

Fig.4.2 The contents of trehalose, glycogen and triglycer in *Nephrotettix cincticeps* after RNAi

在昆虫中，海藻糖是血淋巴中最主要的糖类物质，糖原和甘油三酯分别是糖类和脂肪的主要储存形式。通过注射昆虫类胰岛素（家蚕素），家蚕幼虫血淋巴和脂肪体中的海藻糖浓度均有降低，同时发现脂肪体海藻糖酶和糖原磷酸化酶的活性均大幅上升，表明海藻糖和糖原降解成葡萄糖而收被吸收，即家蚕素是通过促进糖代谢来降低血淋巴糖浓度

(Satake 等, 1997)。类似的, 类胰岛素并不能增加果蝇 Kc 细胞的葡萄糖的吸收和脂肪及糖原的合成, 而可通过磷酸戊糖途径等增强葡萄糖氧化和乳酸产生来降低血淋巴糖浓度 (Ceddia 等, 2003)。摘除果蝇合成 DILPs 的中央神经细胞可导致其血淋巴葡萄糖和海藻糖含量升高, 并表现出糖尿病症状, 而过表达 DILP2 则可使葡萄糖和海藻糖水平趋于正常 (Rulifson 等, 2002; Broughton 等, 2005; Grönke 等, 2010)。对摘除脑部的伊蚊注射类胰岛素 ILP3 后, 表现出海藻糖转运水平降低, 糖原和脂肪含量增加等 (Brown, 2008)。将豌豆长管蚜和长红锥蝽的 IGF 基因分别沉默后, 血淋巴中的碳水化合物和脂肪含量均显著升高 (Defferrari 等, 2016; Guo 等, 2016)。

本章采用 RNAi 对黑尾叶蝉进行 NcILP4 基因沉默, 可显著降低 NcILP4 表达量, 并且其体内的海藻糖浓度略有升高, 而糖原与甘油三酯等含量则显著降低。这与前人结果相似, 表明 NcILP4 具有调控黑尾叶蝉生理代谢的功能。

越来越多的研究表明, 类胰岛素缺失及其信号传导缺陷可导致昆虫寿命延长和繁殖能力降低 (Wu 和 Brown, 2006; Antonova 等, 2012; Kannan 和 Fridell, 2013; Nässel 和 Broeck, 2016), 而携带 RDV 的黑尾叶蝉可表现出若虫发育历期延长、雌成虫寿命缩短和产卵量下降等 (Nakasuji 和 Kiritani, 1970; 梁莉, 2010), 可能与 RDV 干扰黑尾叶蝉体内类胰岛素及其信号传导有关。本文研究结果表明, 携带 RDV 黑尾叶蝉的 NcILP4 表达量显著降低 (第三章结果), 因此推测 NcILP4 可能参与由 RDV 引起的黑尾叶蝉生物学变化。

由于黑尾叶蝉 RNAi 后存活数量以及时间等限制, 本文未对 NcILP4 基因沉默的黑尾叶蝉开展生物学以及传毒能力等研究。有关黑尾叶蝉 NcILP4 的生物学功能、调控机制以及在 RDV 传播中的作用机理尚待今后进一步研究。

## 总结

### 研究结果

黑尾叶蝉取食获得 RDV 后，出现若虫发育历期延长、雌成虫寿命缩短、产卵量下降以及子代存活率降低等生物学变化。为探讨其内在机制，本文在黑尾叶蝉转录组数据中检索获得类胰岛素及其受体相关基因序列的基础上，克隆获得了 10 条类胰岛素（NcILP1-10）和 2 条胰岛素受体（NcInR1-2）全长基因，同时分析了这些基因的时空表达分布特征以及黑尾叶蝉携带 RDV 后的基因表达水平差异变化，进而筛选出 NcILP4 可能参与 RDV 对黑尾叶蝉生物学的作用影响，最后采用 RNAi 技术初步研究了该基因的生理学功能。

本文获得的主要结果有：（1）从黑尾叶蝉转录组数据中筛选得到了 10 条类胰岛素和 2 条胰岛素受体的基因序列，并采用 RT-PCR 克隆得到了这些基因的全长 cDNA 序列；（2）采用定量 PCR 技术，明确了上述黑尾叶蝉类胰岛素及其受体基因在不同发育时期和不同组织中的表达分布情况；（3）筛选出在携带 RDV 和不带毒黑尾叶蝉体内差异表达的类胰岛素 NcILP4；（4）采用 RNAi 技术将 NcILP4 基因沉默后，黑尾叶蝉体内糖原和甘油三酯含量显著降低。

综合本论文研究结果，推测 RDV 可能通过 NcILP4 介导对黑尾叶蝉生物学的作用影响。

### 创新之处

（1）有关植物-病毒-媒介昆虫三者互作的研究主要集中传毒（识别）、增殖和植物抗病毒等方面，有关病毒对媒介昆虫生物学、生理学影响以及互作机制等方面至今少有研究。本研究在已有报道携带 RDV 可导致黑尾叶蝉若虫发育历期延长、雌成虫寿命缩短、产卵量下降以及子代存活率降低等生物学影响的基础上，率先以类胰岛素及其受体为切入点，

开展 RDV 对黑尾叶蝉类胰岛素及其信号通路的影响研究。初步明确了 RDV 抑制 NcILP4 基因转录可能是导致黑尾叶蝉生物学与生理学变化的影响机制之一。这在国内外尚属首次。

(2) 明确了黑尾叶蝉类胰岛素及其受体基因的序列特征、表达模式以及系统进化关系等。同时, 成功构建了黑尾叶蝉 RNAi 体系, 实现了对类胰岛素 NcILP4 的基因沉默。

(3) 本论文结果不仅为促进对水稻-RDV-黑尾叶蝉三者互作机制的深入研究提供了基础, 而且还为深入理解昆虫类胰岛素基因及其生物学功能、以及用于害虫防治新技术研发提供了基础。

## 不足之处及今后研究方向

(1) 未能获得黑尾叶蝉 NcILP4 的抗体, 以从蛋白水平上研究黑尾叶蝉 NcILP4 的产生、分泌和表达调控机制等。

(2) 本文虽然成功构建了 RNAi 体系, 并实现 NcILP4 的基因沉默, 但未能对 NcILP4 基因沉默的黑尾叶蝉开展生物学以及传毒能力等研究。有关黑尾叶蝉 NcILP4 的生物学和生理学功能尚待进一步研究。

(3) 本文虽然明确了 RDV 对黑尾叶蝉 NcILP4 基因转录的影响, 但未能深入探讨 RDV 对 NcILP4 基因表达的抑制调控机理。今后可继续开展 NcILP4 与 RDV 互作机制的研究。

(4) 有关黑尾叶蝉 NcILP4 和其他类胰岛素基因之间的互作关系仍有待进一步探索。

## 参考文献

- [1] 顾世红, 陈建国. 胰岛素信号转导、昆虫发育与老化[J]. 昆虫知识, 2009, 46(4): 501-508
- [2] 梁莉. 水稻、黑尾叶蝉与水稻矮缩病毒三者间关系的初步研究[M]. 浙江大学硕士学位论文, 2010
- [3] 史晓斌, 谢文, 张友军. 植物病毒病媒介昆虫的传毒特性和机制研究进展[J]. 昆虫学报, 2012, 55(7): 841-848
- [4] 张龙辉, 王国栋. 无脊椎动物胰岛素样蛋白 (Insulin-like/related peptides) 研究进展——以昆虫为例[J]. 生物技术通报, 2014, (10): 33-42
- [5] Abrisqueta M, Sören-Castillo S, Maestro JL. Insulin receptor-mediated nutritional signalling regulates juvenile hormone biosynthesis and vitellogenin production in the German cockroach[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2014, 49(6): 14-23
- [6] Adachi T, Takiya S, Suzuki Y, *et al.* cDNA structure and expression of bombyxin, an insulin-like brain secretory peptide of the silkworm *Bombyx mori*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1989, 264(13): 7681-7685
- [7] Alfa RW, Park S, Skelly KR, *et al.* Suppression of insulin production and secretion by a dectetin hormone[J]. Cell Metabolism, 2015, 21(2): 323-333
- [8] Altintas O, Park S, Lee SJ. The role of insulin/IGF-1 signaling in the longevity of model invertebrates, *C. elegans* and *D. melanogaster*[J]. BMB Reports, 2016, 49(2): 81-92
- [9] Antonova Y, Arik AJ, Moore W, *et al.* Insulin-like peptides: Structure, signaling and function[M]//Gilbert L I, ed. Insect Endocrinology. London, UK: Elsevier Academic Press, 2012, 63-92
- [10] Arpagaus M. Vertebrate insulin induces diapause termination in *Pieris brassicae* pupae[J]. Development Genes and Evolution, 1987, 196(8): 527-530
- [11] Aslam AF, Kiya T, Mita K, *et al.* Identification of novel bombyxin genes from the genome of the silkworm *Bombyx mori* and analysis of their expression[J]. Zoological Science, 2011, 28(8): 609-616
- [12] Badisco L, Claeys I, Van Hiel M, *et al.* Purification and characterization of an insulin-related peptide in the desert locust, *Schistocerca gregaria*: immunolocalization, cDNA cloning, transcript profiling and interaction with neuroparsin[J]. Journal of Molecular Endocrinology, 2008, 40(3): 137-150
- [13] Banting FG, Best CH. The internal secretion of the pancreas[J]. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 1922, 7(5): 251-266
- [14] Blenis J. Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own RSK[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1993, 90(13): 5889-5892
- [15] Böhni R, Riesgo-Escovar J, Oldham S, *et al.* Autonomous control of cell and organ size by CHICO, a *Drosophila* homolog of vertebrate IRS1-4[J]. Cell, 1999, 97(7): 865-875

- [16] Brogiolo W, Stocker H, Ikeya T, *et al.* An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control[J]. *Current Biology*, 2001, 11(4): 213-221
- [17] Broughton SJ, Piper MD, Ikeya T, *et al.* Longer lifespan, altered metabolism, and stress resistance in *Drosophila* from ablation of cells making insulin-like ligands[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(8): 3105-3110
- [18] Brown MR, Clark KD, Gulia M, *et al.* An insulin-like peptide regulates egg maturation and metabolism in the mosquito *Aedes aegypti*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(15): 5716-5721
- [19] Burgering BM, Kops GJ. Cell cycle and death control: long live Forkheads[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2002, 27(7): 352-360
- [20] Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway[J]. *Science*, 2002, 296(5573): 1655-1657
- [21] Ceddia RB, Bikopoulos GJ, Hilliker AJ, *et al.* Insulin stimulates glucose metabolism via the pentose phosphate pathway in *Drosophila* Kc cells[J]. *Febs Letters*, 2003, 555(2): 307-310
- [22] Chakraborty C, Doss CG, Bandyopadhyay S, *et al.* Mapping the structural topology of IRS family cascades through computational biology[J]. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2013, 67(3): 1319-1331
- [23] Chen C, Jack J, Garofalo RS. The *Drosophila* insulin receptor is required for normal growth[J]. *Endocrinology*, 1996, 137(3): 846-856
- [24] Clancy DJ, Gems D, Harshman LG, *et al.* Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein[J]. *Science*, 2001, 292(5514): 104-106
- [25] Cohen P. The twentieth century struggle to decipher insulin signaling[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2006, 7(11): 867-873
- [26] Colombani J, Andersen DS, Boulan L, *et al.* *Drosophila* Lgr3 couples organ growth with maturation and ensures developmental stability[J]. *Current Biology*, 2015, 25(20): 2723-2729
- [27] Das R, Dobens LL. Conservation of gene and tissue networks regulating insulin signalling in flies and vertebrates[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2015, 43(5): 1057-1062
- [28] de Azevedo SV, Hartfelder K. The insulin signaling pathway in honey bee (*Apis mellifera*) caste development - differential expression of insulin-like peptides and insulin receptors in queen and worker larvae[J]. *Journal of Insect Physiology*, 2008, 54(6): 1064-1071
- [29] Defferrari MS, Orchard I, Lange AB. Identification of the first insulin-like peptide in the disease vector *Rhodnius prolixus*: Involvement in metabolic homeostasis of lipids and carbohydrates[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2016, 70: 148-159

- [30] Demontis F, Perrimon N. FOXO/4E-BP signaling in *Drosophila* muscles regulates organism-wide proteostasis during aging[J]. *Cell*, 2010, 143(5): 813-825
- [31] Ding BY, Shang F, Zhang Q, *et al.* Silencing of two insulin receptor genes disrupts nymph-adult transition of alate brown citrus aphid[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(2): 357
- [32] Dionne MS, Pham LN, Shirasu-Hiza M, *et al.* Akt and FOXO dysregulation contribute to infection-induced wasting in *Drosophila*[J]. *Current Biology*, 2006, 16: 1977-1985
- [33] Erion R, Sehgal A. Regulation of insect behavior via the insulin-signaling pathway[J]. *Frontiers in Physiology*, 2013, 4: 353
- [34] Fernandezalmonacid R, Rosen OM. Structure and ligand specificity of the *Drosophila melanogaster* insulin receptor[J]. *Molecular and cellular biology*, 1987, 7(8): 2718-2727
- [35] Fontana L, Partridge L, Longo VD. Extending healthy life span—from yeast to humans[J]. *Science*, 2010, 328(5976): 321-326
- [36] Fu KY, Zhu TT, Guo WC, *et al.* Knockdown of a putative insulin-like peptide gene *LdILP2* in *Leptinotarsa decemlineata* by RNA interference impairs pupation and adult emergence[J]. *Gene*, 2016, 581(2): 170-177
- [37] Fukusni T. Further studies on the dwarf disease of rice plant[J]. *Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido Imperial University*, 1940, 45: 83-154
- [38] Fullbright G, Lacy ER, Büllesbach EE. The prothoracicotropic hormone Bombyxin has specific receptors on insect ovarian cells[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1997, 245(3): 774-780
- [39] Garelli A, Gontijo AM, Miguela V, *et al.* Imaginal discs secrete insulin-like peptide 8 to mediate plasticity of growth and maturation.[J]. *Science*, 2012, 336(6081): 579-582
- [40] Garofalo RS. Genetic analysis of insulin signaling in *Drosophila*[J]. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2002, 13(4): 156-162
- [41] Giannakou ME, Goss M, Junger MA, *et al.* Long-lived *Drosophila* with overexpressed dFOXO in adult fat body[J]. *Science*, 2004, 305(5682): 361
- [42] Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR[J]. *Genes and Development*, 2001, 15(7): 807-826
- [43] Goberdhan DC, Wilson C. The functions of insulin signaling: size isn't everything, even in *Drosophila*[J]. *Differentiation*, 2003, 71(7): 375-397
- [44] Graf R, Neuenschwander S, Brown MR, *et al.* Insulin-mediated secretion of ecdysteroids from mosquito ovaries and molecular cloning of the insulin receptor homologue from ovaries of bloodfed *Aedes aegypti*[J]. *Insect Molecular Biology*, 1997, 6(2): 151-163
- [45] Green DA 2nd, Extavour CG. Insulin signalling underlies both plasticity and divergence of a reproductive trait in *Drosophila*[J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2014, 281(1779): 20132673

- [46] Grönke S, Clarke DF, Broughton S, *et al.* Molecular evolution and functional characterization of *Drosophila* insulin-like peptides[J]. Plos Genetics, 2010, 6(2): e1000857
- [47] Guo SS, Zhang M, Liu TX. Insulin-related peptide 5 is involved in regulating embryo development and biochemical composition in pea aphid with wing polyphenism[J]. Frontiers in Physiology, 2016, 7: 31
- [48] Hall KD. A review of the carbohydrate-insulin model of obesity[J]. European Journal of Clinical Nutrition, 2017, 71(3): 323-326
- [49] Hentze JL, Carlsson MA, Kondo S, *et al.* The neuropeptide allatostatin A regulates metabolism and feeding decisions in *Drosophila*[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 11680
- [50] Herman WS, Tatar M. Juvenile hormone regulation of longevity in the migratory monarch butterfly[J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2001, 268 (1485): 2509-2514
- [51] Huybrechts J, Bonhomme J, Minoli S, *et al.* Neuropeptide and neurohormone precursors in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*[J]. Insect Molecular Biology, 2010, 19(S2): 87-95
- [52] Hwangbo DS, Gershman B, Tu MP, *et al.* *Drosophila* dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body[J]. Nature, 2004, 429(6991): 562-566
- [53] Ikeya T, Galic M, Belawat P, *et al.* Nutrient-dependent expression of insulin-like peptides from neuroendocrine cells in the CNS contributes to growth regulation in *Drosophila*[J]. Current Biology, 2002, 12(15): 1293-1300
- [54] Iwami M, Furuya I, Kataoka H. Bombyxin-related peptides: cDNA structure and expression in the brain of the hornworm *Agrius convolvuli*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1996, 26(1): 25-32
- [55] Iwami M, Tanaka A, Hano N, *et al.* Bombyxin gene expression in tissues other than brain detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and *in situ* hybridization. Experientia, 1996, 52(9): 882-887
- [56] Jünger MA, Rintelen F, Stocker H, *et al.* The *Drosophila* forkhead transcription factor FOXO mediates the reduction in cell number associated with reduced insulin signaling[J]. Journal of Biology, 2003, 2(3): 20
- [57] Kannan K, Fridell YW. Functional implications of *Drosophila* insulin-like peptides in metabolism, aging, and dietary restriction[J]. Frontiers in Physiology, 2013, 4(4): 288
- [58] Kapan N, Lushchak OV, Luo J, *et al.* Identified peptidergic neurons in the *Drosophila* brain regulate insulinproducing cells, stress responses and metabolism by coexpressed short neuropeptide F and corazonin[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2012, 69(23): 4051-4066
- [59] Kawakami A, Iwami M, Nagasawa H, *et al.* Structure and organization of four clustered genes that encode bombyxin, an insulin-related brain secretory peptide of the silkworm *Bombyx mori*[J]. Proceedings of the National Academy

- of Sciences of the United States of America, 1989, 86(18): 6843-6847
- [60] Kenyon C, Chang J, Gensch E, *et al.* A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type[J]. Nature, 1993, 366(6454): 461-464
- [61] Kimura-Kawakami M, Iwami M, Kawakami A, *et al.* Structure and expression of bombyxin-related peptide genes of the moth *Samia cynthia ricini*[J]. General and Comparative Endocrinology, 1992, 86(2): 257-268
- [62] Koyama T, Syropyatova MO, Riddiford LM. Insulin/IGF signaling regulates the change in commitment in imaginal discs and primordia by overriding the effect of juvenile hormone[J]. Developmental biology, 2008, 324(2): 258-265
- [63] Krieger MJ, Jahan N, Riehle MA, *et al.* Molecular characterization of insulin-like peptide genes and their expression in the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*[J]. Insect Molecular Biology, 2004, 13(3): 305-315
- [64] Kwak SJ, Hong SH, Bajracharya R, *et al.* *Drosophila* adiponectin receptor in insulin producing cells regulates glucose and lipid metabolism by controlling insulin secretion[J]. PLoS ONE, 2013, 8(7): e68641
- [65] Lagueux M, Lwoff L, Meister M, *et al.* cDNAs from neurosecretory cells of brains of *Locusta migratoria* (Insecta, Orthoptera) encoding a novel member of the superfamily of insulins[J]. European Journal of Biochemistry, 1990, 187(1): 249-254
- [66] Lavine LC, Hahn LL, Warren IA, *et al.* Cloning and characterization of an mRNA encoding an insulin receptor from the horned scarab beetle *Onthophagus nigriventris* (Coleoptera: Scarabaeidae)[J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2013, 82(1): 43-57
- [67] Li B, Predel R, Neupert S, *et al.* Genomics, transcriptomics, and peptidomics of neuropeptides and protein hormones in the red flour beetle *Tribolium castaneum*[J]. Genome Research, 2008, 18(1): 113-122
- [68] Lin X, Yu N, Smagghe G. Insulin receptor regulates food intake through sulfakinin signaling in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*[J]. Peptides, 2016, 80: 89-95
- [69] Lu HL, Pietrantonio PV. Insect insulin receptors: insights from sequence and caste expression analyses of two cloned hymenopteran insulin receptor cDNAs from the fire ant[J]. Insect Molecular Biology, 2011, 20(5): 637-649
- [70] Luo J, Becnel J, Nichols CD, *et al.* Insulin-producing cells in the brain of adult *Drosophila* are regulated by the serotonin 5-HT(1A) receptor[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2012, 69(3): 471-484
- [71] Luo J, Lushchak OV, Goergen P, *et al.* *Drosophila* insulin-producing cells are differentially modulated by serotonin and octopamine receptors and affect social behavior[J]. PLoS ONE, 2014, 9(6): e99732
- [72] Montagne J, Stewart MJ, Stocker H, *et al.* *Drosophila* S6 kinase: a regulator of cell size[J]. Science, 1999, 285(5436): 2126-2129
- [73] Mutti NS, Dolezal AG, Wolschin F, *et al.* IRS and TOR nutrient-signaling pathways act via juvenile hormone to influence honey bee caste fate[J]. Journal

- of Experimental Biology, 2011, 214(Pt 23): 3977-3984
- [74] Nagasawa H, Kataoka H, Hori Y, *et al.* Isolation and some characterization of the prothoracicotropic hormone from *Bombyx mori*[J]. General and Comparative Endocrinology, 1984, 53(1): 143-152
- [75] Nagasawa H, Kataoka H, Isogai A, *et al.* Amino acid sequence of a prothoracicotropic hormone of the silkworm *Bombyx mori*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986, 83(16): 5840-5843
- [76] Nakasuji F, Kiritani K. III-effects of rice dwarf virus upon its vector, *Nephotettix cincticeps* Uhler (Hemiptera: Deltocephalidae), and its significance for changes in relative abundance of infected individuals among vector populations[J]. Applied Entomology and Zoology, 1970, 5(1): 1-12
- [77] Nässel DR, Broeck JV. Insulin/IGF signaling in *Drosophila* and other insects: factors that regulate production, release and post-release action of the insulinlike peptides[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2016, 73(2): 271-290
- [78] Nässel DR, Liu Y, Luo J. Insulin/IGF signaling and its regulation in *Drosophila*[J]. General and Comparative Endocrinology, 2015, 221: 255-266
- [79] Nielsen MD, Luo X, Biteau B, *et al.* 14-3-3 $\epsilon$  antagonizes FoxO to control growth, apoptosis and longevity in *Drosophila*[J]. Aging Cell, 2008, 7(5): 688-699
- [80] Okamoto N, Yamanaka N, Satake H, *et al.* An ecdysteroid-inducible insulin-like growth factor-like peptide regulates adult development of the silkworm *Bombyx mori*[J]. The FEBS journal, 2009, 276(5): 1221-1232
- [81] Oldham S, Montagne J, Radimerski T, *et al.* Genetic and biochemical characterization of dTOR, the *Drosophila* homolog of the target of rapamycin[J]. Genes and Development, 2000, 14(21): 2689-2694
- [82] Parthasarathy R, Palli SR. Molecular analysis of nutritional and hormonal regulation of female reproduction in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2011, 41(5): 294-305
- [83] Partridge L, Alic N, Bjedov I, *et al.* Ageing in *Drosophila*: the role of the insulin/Igf and TOR signalling network[J]. Experimental Gerontology, 2011, 46(5): 376-381
- [84] Patel A, Fondrk MK, Kaftanoglu O, *et al.* The making of a queen: TOR pathway is a key player in diphenic caste development[J]. PLoS One, 2007, 2(6): e509
- [85] Potter CJ, Huang H, Xu T. *Drosophila* Tsc1 functions with Tsc2 to antagonize insulin signaling in regulating cell growth, cell proliferation, and organ size[J]. Cell, 2001, 105(3): 357-368
- [86] Puig O, Marr MT, Ruhf ML, *et al.* Control of cell number by *Drosophila* FOXO: downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway[J]. Genes and Development, 2003, 17(16): 2006-2020

- [87] Rajan A, Perrimon N. *Drosophila* cytokine unpaired 2 regulates physiological homeostasis by remotely controlling insulin secretion[J]. *Cell*, 2012, 151(1): 123-137
- [88] Richard DS, Rybczynski R, Wilson TG, *et al.* Insulin signaling is necessary for vitellogenesis in *Drosophila melanogaster* independent of the roles of juvenile hormone and ecdysteroids: female sterility of the *chico*<sup>1</sup> insulin signaling mutation is autonomous to the ovary[J]. *Journal of Insect Physiology*, 2005, 51(4): 455-464
- [89] Riehle MA, Brown MR. Insulin stimulates ecdysteroid production through a conserved signaling cascade in the mosquito *Aedes aegypti*[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1999, 29(10): 855-860
- [90] Riehle MA, Fan Y, Cao C, *et al.* Molecular characterization of insulin-like peptides in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*: expression, cellular localization, and phylogeny[J]. *Peptides*, 2006, 27(11): 2547-2560
- [91] Ruan Y, Chen C, Cao Y, *et al.* The *Drosophila* insulin receptor contains a novel carboxyl-terminal extension likely to play an important role in signal transduction[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(9): 4236-4243
- [92] Rulifson E J, Kim SK, Nusse R. Ablation of insulin-producing neurons in flies: growth and diabetic phenotypes[J]. *Science*, 2002, 296(5570): 1118-1120
- [93] Sang M, Li C, Wu W, *et al.* Identification and evolution of two insulin receptor genes involved in *Tribolium castaneum* development and reproduction[J]. *Gene*, 2016, 585(2): 196-204
- [94] Satake S, Masumura M, Ishizaki H, *et al.* Bombyxin, an insulin-related peptide of insects, reduces the major storage carbohydrates in the silkworm *Bombyx mori*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B Biochemistry and Molecular Biology*, 1997, 118(2): 349-357.
- [95] Satake S, Nagata K, Kataoka H, *et al.* Bombyxin secretion in the adult silkworm *Bombyx mori*: sex-specificity and its correlation with metabolism[J]. *Journal of Insect Physiology*, 1999, 45(10): 939-945
- [96] Scanga SE, Ruel L, Binari RC, *et al.* The conserved PI3'K/PTEN/Akt signaling pathway regulates both cell size and survival in *Drosophila*[J]. *Oncogene*, 2000, 19(35): 3971-3977
- [97] Schiesari L, Andreatta G, Kyriacou CP, *et al.* The Insulin-like proteins dILPs-2/5 determine diapause inducibility in *Drosophila*[J]. *PLoS One*, 2016, 11(9): e0163680
- [98] Schilder RJ, Marden JH. Metabolic syndrome and obesity in an insect[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103: 18805-18809
- [99] Schwenke RA, Lazzaro BP, Wolfner MF. Reproduction-immunity trade-offs in insects[J]. *Annual Review Entomology*, 2016, 61: 239-256
- [100] Shaul YD, Seger R. The MEK/ERK cascade: From signaling specificity to diverse functions[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2007, 1773(8): 155-164

- 1213-1226
- [101] Sheng Z, Xu J, Bai H, *et al.* Juvenile hormone regulates vitellogenin gene expression through insulin-like peptide signaling pathway in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(49): 41924-41936
- [102] Sim C, Denlinger DL. A shut-down in expression of an insulin-like peptide, ILP-1, halts ovarian maturation during the overwintering diapause of the mosquito *Culex pipiens*[J]. Insect Molecular Biology, 2009, 18(3): 325-332
- [103] Sim C, Denlinger DL. Insulin signaling and FOXO regulate the overwintering diapause of the mosquito *Culex pipiens*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(105): 6777-6781
- [104] Siviter RJ, Coast GM, Winther AM, *et al.* Expression and functional characterization of a *Drosophila* neuropeptide precursor with homology to mammalian preprotachykinin A[J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(30): 23273-23280
- [105] Stout MJ, Thaler JS, Thomma BPHJ. Plant-mediated interactions between pathogenic microorganisms and herbivorous arthropods[J]. Annual Review of Entomology, 2006, 51: 663-689
- [106] Tatar M, Bartke A, Antebi A. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals[J]. Science, 2003, 299(5611): 1346-1351
- [107] Tatar M, Kopelman A, Epstein D, *et al.* A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function[J]. Science, 2001, 292(5514): 107-110
- [108] Teleman AA. Molecular mechanisms of metabolic regulation by insulin in *Drosophila*[J]. Biochemical Journal, 2010, 425(1): 13-26
- [109] Tu MP, Epstein D, Tatar M. The demography of slow aging in male and female *Drosophila* mutant for the insulin-receptor substrate homologue *chico*[J]. Aging Cell, 2002, 1(1): 75-80
- [110] Van de Velde S, Badisco L, Claeys I, *et al.* Insulin-like peptides in *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera): Detection, localization and identification[J]. General and Comparative Endocrinology, 2007, 153(1-3): 72-79
- [111] Van Heemst D. Insulin, IGF-1 and longevity. Aging and Disease[J], 2010, 1: 147-157
- [112] Van Hiel MB, Vandersmissen HP, Proost P, *et al.* Cloning, constitutive activity and expression profiling of two receptors related to relaxin receptors in *Drosophila melanogaster*[J]. Peptides, 2014, 68: 83
- [113] Verdu J, Buratovich MA, Wilder EL, *et al.* Cell-autonomous regulation of cell and organ growth in *Drosophila* by Akt/PKB[J]. Nature Cell Biology, 1999, 1(8): 500-506

- [114] Wang MC, Bohmann D, Jasper H. JNK extends life span and limits growth by antagonizing cellular and organism-wide responses to insulin signaling[J]. *Cell*, 2005, 121: 115-125
- [115] Wang Y, Azevedo SV, Hartfelder K, *et al.* Insulin-like peptides (AmILP1 and AmILP2) differentially affect female caste development in the honey bee (*Apis mellifera* L.)[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2013, 216(23): 4347-4357
- [116] Ward CW, Lawrence MC. Landmarks in insulin research[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2011, 2(2): 76
- [117] Weinkove D, Neufeld TP, Twardzik T, *et al.* Regulation of imaginal disc cell size, cell number and organ size by *Drosophila* class I(A) phosphoinositide 3-kinase and its adaptor[J]. *Current Biology*, 1999, 9(18): 1019-1029
- [118] Wessells RJ, Fitzgerald E, Cypser JR, *et al.* Insulin regulation of heart function in aging fruit flies[J]. *Nature Genetics*, 2004, 36(36): 1275-1281
- [119] Wheeler DE, Buck N, Evans JD. Expression of insulin pathway genes during the period of caste determination in the honey bee, *Apis mellifera*[J]. *Insect Molecular Biology*, 2006, 15(5): 597-602
- [120] Wheeler DE, Buck NA, Evans JD. Expression of insulin/insulin-like signalling and TOR pathway genes in honey bee caste determination[J]. *Insect Molecular Biology*, 2014, 23(1): 113-121
- [121] Wolschin F, Mutti NS, Amdam GV. Insulin receptor substrate influences female caste development in honeybees[J]. *Biology Letters*, 2011, 7(1): 112-115
- [122] Wu Q, Brown MR. Signaling and function of insulin-like peptides in insects[J]. *Annual Review of Entomology*, 2006, 51: 1-24
- [123] Xu HJ, Xue J, Lu B, *et al.* Two insulin receptors determine alternative wing morphs in planthoppers[J]. *Nature*, 2015, 519(7544): 464-467
- [124] Xu J, Hopkins K, Sabin L, *et al.* ERK signaling couples nutrient status to antiviral defense in the insect gut[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(37): 15025-15030
- [125] Xu KK, Yang WJ, Tian Y, *et al.* Insulin signaling pathway in the oriental fruit fly: The role of insulin receptor substrate in ovarian development[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2015, 216: 125-133
- [126] Zhang TT, Zhang GC, Zeng FF, *et al.* Insulin-like peptides regulate vitellogenesis and oviposition in the green lacewing, *Chrysopa septempunctata*[J]. *Bulletin of Entomological Research*, 2017, 107(2): 148-154

附录

10 20 30 40 50 60 70 80 90  
ATGTTTGCTGGAGCTGGTGATCTACTTATCTTATGCCCTGTATTCTACGCGATTCTGTAGATGGACAAACGATGACAACTCTATCGGGGGTGT  
M F R G V V I L I L C P V E L R D S V D G Q T M T I Y R G C  
  
100 110 120 130 140 150 160 170 180  
GGAGCTGCCCTAGCTGACACGCTCARTGAGGTCTGCCCTAAACTTTARTANGCGCTCATACARTGAAGACTTCACAAAATCCTATACAGGA  
G A R L A D T L N E V C L N F N K R S Y N E D F T K S Y T G  
  
190 200 210 220 230 240 250 260 270  
GAGCAGAACCCAGCTTGTCTTATGAGCCTCTAGACCTATTCCGTAGTCGCAGATCGGCCCTTGTACCTTAGGTTACCTAGACTCAGTTCCG  
E Q N Q E L S Y E P L D V F R S R R S R L S L R L R R S V R  
  
280 290 300 310 320 330 340 350  
CRACGAGGAGGCGTTGTCACAGARTGTTGCTACAAATCTTGCAACATACAGAGCTARCTTCATCTGTGCACTCT  
Q R G G V V T E C C Y K S C T I Q E L T S Y C A S

I. NcILP1 编码基因全长 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列

10 20 30 40 50 60 70 80 90  
ATCTGGTCTGTGATATTCTTATTGCTGCTACTTGCAGCTCTACGATGATGCTGCATCACCACCGGATCTAGTCATCTGTTGGACGA  
M W S V I E L L L L L A S S T M N A A S T N G S S H W C G R  
  
100 110 120 130 140 150 160 170 180  
CAGCTGGTATCCGCCCTACAACTGCTCTGCARTGGTCARTACCGCAATGTTACGGGCTTCTCCTGTGAAGGTTGACAAAGGCAATTC  
Q L V S A L Q L L C N G Q Y Q Q M F R S S P V K G E Q G K F  
  
190 200 210 220 230 240 250 260 270  
AGCAGCCTTGGARTGAGGACTCATCGCGTGTGAGTGACGARTGCTGTCATCAGGATGCACTGTTGCGATGCTACGGACATCTGTGCA  
S S L G M R T H R G V S D E C C H Q G C T V A M L R T Y C A  
  
280  
ARC  
N

II. NcILP2 编码基因全长 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列

10 20 30 40 50 60 70 80 90  
ATGARGCTTGCAGCCACTATCTTTTCCTCGCTTGTCTATGCTCTCCTCCCACTCGTTTGAAACACAGCTCAGTCTCGTTGAGAGCA  
M K V A A T M F S L A L L C L P P H S F E N T A A V S L K R  
  
100 110 120 130 140 150 160 170 180  
CACTACTGTGGAGGGGACTGACGARTGCTCTGAGCTGCTGTGCARTGGGGTTTACAAACCCGTTGAGARTAGAGTGACTCTGACACCA  
H Y C G R G L T N A R L K L L C N G V Y N T V E N R V T L T P  
  
190 200 210 220 230 240 250 260 270  
TCAGTTACAAACAGAGTTTGTGGAACCTGTANGGCTGAGAAGTCCTCGTCGGGCTCTTACTTGGTTCTTGARACGGCGAAGACGTCGTGGG  
S V T T E E V E P V R L R S R R R A L T W F L N R R R R G  
  
280 290 300 310 320 330 340  
GTCTATGATGATGCTGCCGCAAGAGCTGCACARTAGATGAACCTCTATCCTACTGTGGGATGCCA  
V Y D E C C R K S C T I D E L S S Y C G M P

III. NcILP3 编码基因全长 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列

10 20 30 40 50 60 70 80 90  
ATGGCTCTCATCAATTAATTTATCTTTTCGTCGTGGTTGTGCTGGTGATACAGGCTCTGAGCCGGTCCAGCAATTCGCTTTATGCGGC  
M A L I N K I I L E V V V V L V I Q G S E P V Q A I R L C G  
100 110 120 130 140 150 160 170 180  
TCGAGTCTAGCGGACTCTCTTAGTCTAATATGCGCTCTCCGACGAGGTTCCGTAGTCCGACGCTCAATTCGTGGAACATGCTGCGCTCAAT  
S S L A D S L S L I C G L P H E V R S R R S I V E T C C L N  
190 200 210 220 230  
GACTGCACACTGGAGACATTTAGGGARTTTTGCCTTCGTTTTAAA  
D C T L E D I R E E C L R F K

IV. NcILP4 编码基因全长 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列

10 20 30 40 50 60 70 80 90  
ATGAAGAACACATTTGTTTGTAACTGTCTCTGCTCTATATAGCCATCATCCAGACGGCCCCGAGGCGAATCTTGCCRTACACCAGAGA  
M K N T L F V T V I C C Y I A I I Q T A P R R N L G I H Q R  
100 110 120 130 140 150 160 170 180  
CAGGCTTGTGGCGAACACTCGCTGACATGCTGTCACTGGTGTGCTCAGATAGGGCTACAACTTTGCCTTTACACCAGGACGCTGAGT  
Q A C G D K L A D M L S L V C S D R G Y N F A E R P E D V S  
190 200 210 220 230 240 250 260 270  
GTTCCGGCGAGCGCAACCTAGTGGACGAGTGTCTACACACGTTGCACCGTCGCTGTGTTCAGCTGTACTGTCTGCCGAGCCCC  
V R R A K R N I V D E C C Y N S C T V A V L Q L Y C L P D P  
280 290  
GCTGAGCCTTCGGAC  
A E P P D

V. NcILP5 编码基因全长 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列

10 20 30 40 50 60 70 80 90  
ATGAGAACCTTTTGTTCATTGCACTTTCTCTTTTANTCGCCCTCTCTTATGAGACGATGACATTTACAACTTTGACAAAGAAAGTGGA  
M R T F L F I A L S S L I A L S Y E D D D I Y N I D K K S G  
100 110 120 130 140 150 160 170 180  
CGGAACATTTATGTGGCAAGAACTCAGGCGAATCCTTATGTTTCTCTGTGACAGCTCTACAAAGCAAACTCCCTGATGGTGGTTCC  
R K H Y C G K E L R R N L M F L C D S I Y K R N S P D G G S  
190 200 210 220 230 240 250 260 270  
ATGCAATGAGGACTGGGTGATGAACGTCATCGGATGGAGATCTGCAAGCCCTCTATACCCGTTCCGCTCCAGGCCAAGGCTTTGCC  
M H E D W V M N V I G M E D L Q S P V Y P F E R S R A K A F A  
280 290 300 310 320 330 340 350 360  
GTGATCCCAGATATTTCCGGAGCCAAACACGAGGGGTTGCAGACGAGTGTGCTCCAAAGCCCTGCACATCGATGAGCTCTCCAGCTAT  
V I P E Y F R R Q T R G V A D E C C S K P C T I D E L S S Y  
370 380  
TGTTGGCAACGACCATCA  
C G Q R P S

VI. NcILP6 编码基因全长 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90
ATGTACATTTTCATGTTCCGTCTTTTGACTTTTACAGGCACTCACACAGATGCCAGCGCTGTCAGCGCTCGGTGATGCTGCTGCGCGATG
M Y I S C S S F D F H R H S Q Q M Q R C A A S V M V L L A M

100     110     120     130     140     150     160     170     180
TGCTGTGTTTGGCCACGGAGAGGACCTTCAGGCACTTCATCGTCAGGAGCGCTCGGGCCTTCACGTGTGCGGCGAARAGTTGATCCAG
C L C L A H G E D L R E L I V R K R S G L Q V C G E K L I Q

190     200     210     220     230     240     250     260     270
TCCCTARTGGTTCTTTGTGACACCCAGTACACCAARAGGAACAATAATAGCGCCRTGAAACCGAACACGACAGAGTTGGGAGCTTTGG
S L M V L C D N Q Y N K R N N N K R H E N E H D R G W E L W

280     290     300     310     320     330     340     350     360
CGACCAACGGAGACAGCCATGTCCATGTGTCTTATCAGCTGTGAGGCGCGCGCTTGTAGACGARTCTTGCACACAGTCATGCAGTATC
R P R R Q A M S M L S L S R V R R G V V D E C C N K S C S I

370     380     390     400
CAGCACTAGCTCATACTGTCTGGGGCTTAT
Q E L S S Y C L G A Y

```

## VII. NcILP7 编码基因全长 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90
ATGGTATACGGGACGGCGTTGTGCGGTGACCGTGTGTCTTCTGACTCTTAGAGCACTGGACGCCAGCTTCGGACGTCCTCTCGACCGCCGC
M V Y G T A L S V T V C L L T L R A L D A S I G R P L D R R

100     110     120     130     140     150     160     170     180
CACTACTGCGGGCAAGGACTGACCGACACCTGCGTCTCCCTTTGTGACGGCTGCTACACACGCTCCGACCCGCCATCTCAGAGTATAT
H Y C G Q G L T D T M R L L C D G W Y K R S D P R I S E Y N

190     200     210     220     230     240     250     260     270
GACGTTGACCGCGCCCTGAGGACCTGAGCCTTTTCCCCCTGGTGCTGGACCGCTCGCCTAGCCTAGACCTGATCCGCCAGTCCGAGTCC
D V D R P P E D L S L E P L V L D R R L A M S L I R Q S Q S

280     290     300     310     320     330     340     350     360
CGCAGCAACCGTGGAGGCACTCGTGACGACTGCTGTCCACACCCCTTGCTCCATCGATGAGCTGCGAGGTTACTCCGGACACGCCGACTAC
R S K R G G I V D E C C R N P C S I D E L R G Y C G T A D Y

```

## VIII. NcILP8 编码基因全长 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90
ATGGTGTGGCTGGTGGTTCCTTGGTCACCCCTGGGGTTGCTATGTGTCTCAGACGTCGAACTGTTAGGCTATGTGGAAGTAGCCTTGCC
M V W L V V P L V T L G L L C V S D V E P V R L C G S S L A

100     110     120     130     140     150     160     170     180
GATTCACTCGCTCTGATCTGCGGGACGCGAGATTGCAAGGCAACGTTCCATTGATTACAGACACACCCCTCGACAGTCCCACTGG
D S L A L I C G D A G F A K G K R S I D S D N N P R E S Q W

190     200     210     220     230     240     250     260     270
GCATTTGTAGACTACAGAGTCTCTGACTCARTTGTGANTCACTTTCTGAGCCGAGCAAAAGCCATGAGTCTTCTCCAGGATCGCTAAGA
A F V E Y R D P D S I V N H F L S R A K A M S L L P G S L R

280     290     300     310     320     330     340     350     360
GCAGACACGTCAAAGACGCTGTAGTTGACGAGTGCTGCCGACATCTTGCACCTTAGAGAACTCACTTCGTACTGCTTACACAGACCA
A R H V K R G V V D E C C R R S C T L R E L T S Y C L T E P

370     380     390
AACACATCAATAAATTATATA
N N I N K I N K

```

## IX. NcILP9 编码基因全长 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
ATGAGACAAACAGCTGGTGGTAGCCGTTCTCTAGCTGTGTAGTTCTATCACACTCTGCTCCTTGGCGAGATTACGACGCGCGCCAGAGT
M R Q Q L V V A V L C S C V V L S H S A P W R S Y D A R Q S

      100     110     120     130     140     150     160     170     180
CAGTTTGTGGCGACAGTTGGCCGATATGCTCCCTCATTTGCTCTGCTCGGTACAGCTTTGCTTCAACCCGGAGCGAGCAGT
Q V C G D K L A D M L S L I C S G R G Y N F A F K P E G S N

      190     200     210     220     230     240     250     260     270
GCAGAGGATTCGGCGGTGGGATAGTCGAGAGCTGTTGTCGGCGAGCTTGATCCCGGCAGTGTGCGACTATATCTGCCGCGTGCACCA
A R R R F R R G I V E E C C R R S C T P R M L E L Y C R A D P

      280     290     300     310     320     330     340     350     360
ACCGAACCCCTTCCACGTCACAAATCAGGAGCGAGGTGACAGTGAARTTGAGARTTCTGATCCGCTGTCAACCGAGAGGCTACCGACT
T E P P S N V Q I R K R S D S E I E N S D P V S N E E V P T

      370     380     390     400     410     420     430     440     450
TCCCAACAGCCTGCAGTATTAAAGTGACGAATCTTTGATGAAACAGAAACAGCGAGCCTCCACAGGGAGGAGCGGGAGATAAC
S P K P A V L K V T N T E D E T R N S E A S T G K E A G D N

      460     470     480     490     500     510     520     530     540
TATAAATTTATCAATTTGTTGAGTTCAACACCGCAGGATCACAGTCGAGGCTTTGCTGAGCAGTCCACACCGAACGATACCACAG
Y K I I N L L S S T T Q D H R S K A L V S K S T P N D T T E

      550     560     570     580     590     600     610     620     630
GAGAGGGTCTTAGCCACAGCGTCTTGAGACATCACACCCACCCATCATGCCCCGAGGAGTCAACAGTCCGGAAACATCAACCAAG
E E G L S H N V L R H M N H H H A R R K S H V R K T S T K

      640     650     660     670     680     690     700     710     720
GCGAAARAGACAGAGCCTTCTCGAGGGAAATACGAGGACGTTTGAGTAGGACCGGTGAGGCCTTACTTCGACGGCCGGCCATACGCC
A K K D K K L L E G N T R T F E I G T V K P Y F A G R P Y A

      730     740     750     760
TCATATAGAGGCAGCTACATCCACACCTCTCTGTCTG
S Y R G S Y I H T S L S

```

### X. NcILP10 编码基因全长 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列

60

1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980  
AACATGAATTCAAAGTATGAAATTGCTAGGGTCACAAAAACAGAACTGTTTGTGTATGAAAGAAATGTTAGAATCCCCAAAACATGGA  
N M N S K Y E I A R V T K N R T V C C M K E M L E S P K H G

1990 2000 2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070  
TATGAAAACTGTGCTCCAAATATACATTAACATGATTCTCTCTGGTGTCTATGGACTTAGAACTTGAACCTGGACTCTCTTGTGAATCTCATTTTC  
Y E K L C S N I H Y N M I P S G A M D L E P G L S C E S H F

2080 2090 2100 2110 2120 2130 2140 2150 2160  
AATAGCTATATTGCAAAATTTTAAAGCTTAATGAGGATTTCACACACAAAGGAGGTGAGTAACTCAATATCCTCAAACTCAGGGAGGTA  
N S Y I Q N F K L N E D F N N K G G V S K S I S S K L R E V

2170 2180 2190 2200 2210 2220 2230 2240 2250  
TCTGAAATTTTATATCATACGATAGATTGAACACAAACAAATGAAGGATCAGAAATTAGCTAAAGATGAGAAGCTCATTAATAGAGTGAT  
S E I L Y H N D R L N T N N E G S E L A K D E N V I N R V Y

2260 2270 2280 2290 2300 2310 2320 2330 2340  
TTACAGCTGATTGCGAAAAATTTTACAATAAAAGGTGTTAGGCACCTTCATGATTATATTGTCACAAATGAGGCTTGCCGAGAGGAC  
L P A D S K N F T I K G V R H F H D Y I V T I E A C R E G D

2350 2360 2370 2380 2390 2400 2410 2420 2430  
ACACTTTCAGACAGCATGTATGACACACACAGATGTAGTAAACGAGATATAATCGTTGTTGGAAGCTCAGCCGACAAAAACGACAGATAC  
T L S D S M Y D T T R C S K R D I I V V R T Q P D K N A D T

2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500 2510 2520  
ATATCTAATGCCATTGACTATGAAGTAAATAAACCAACACTCTATGTTACTTGGAAAGCCACCATCAGAACCAAAAGGAATGTTGTTGCT  
I S N A I D Y E V I N Q T L Y V T W K P P S E P N G M V V A

2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600 2610  
TACGAGTTTGAATACAGGGAAAAAGATGTTTACAATTCAAAATCTGTTATATATTGTATATCATACAAAGAAATTTGAAGTTAATGAGCAC  
Y E L E Y R E K D V T N S K S V I Y C I S Y K E F E V N E H

2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690 2700  
AGCTACTGGATTATAGGCTCTCTCACCAGGAAGTATGAATTCAGAGTACGAACATATATCTCTTCAGGAAAAGGTCCATTTGCCGATATT  
S Y W I I G L S P G K Y E F R V R T I S L A G K G P F A V F

2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790  
AGAAGCTTTTATATCATCAAAACCATTCAAAATTCCTGACTATACCTTTAGTTTGTAGTTCTGATTATCTTTTACTGATGTGCACAGTTAT  
R S F I I I K P F K I P D Y T L V L V L I I F L L I V T V I

2800 2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880  
TTAACTTATGCACTGAAGTTCCTTAAGAATAAAAAACCTAATTTGGAGGATATACTTTATAGCTACAGTGAATCCCAATATTTCATGTATT  
L T Y A L K F L K N K K P N L E D I L I A T V N P Q Y S C I

2890 2900 2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970  
TTGGACCACTGGGAAGTGTCAAAAGAGGATGTTATTTTGTAGGGAATTCGGATCTGGAACCTTTTGGAAAGGTGTATGAAGGCATTTTA  
L D Q W E V S K E D V I F V R E I G S G T F G K V Y E G I L

2980 2990 3000 3010 3020 3030 3040 3050 3060  
CAGCCAAATAAATGAAGCTTGGCAGTGAATAAAGCTGTCAATGAACACACATTTGCATATGATAAAAGGATTTTCTTAAGAGCTTCATAA  
Q P N N K P C A V K T V N E N T F A Y D K K V F L N E A S I

3070 3080 3090 3100 3110 3120 3130 3140 3150  
ATGAAATCAGTTTTCGGGCACATATCATAGTCCAGCTTCAGGTGTAGTCTCACAAGAGAAACACCACTTGTATCATGGAACCTAATG  
M K S V S G T Y H I V Q L L G V V S Q E K P P L V I M E L N

3160 3170 3180 3190 3200 3210 3220 3230 3240  
GACGGTGGGATTACGATCATTTTCTAATATCATCCAGAGGGTCTAATTTCCCTGATGAAATAGTTAAATTCAAAATGGCTGCCAGATT  
D G G D L R S F L I S S R G S N F P D E I V K F K M A A Q I

3250 3260 3270 3280 3290 3300 3310 3320 3330  
GCAGATGGAATGTGTTTTCATGGAAGCAAAAAATTTGTACATCGGGATTAGCTGCTAGGAACCTGCTAGTAAAGTTTCAGATGAC  
A D G M C F M E A K K F V H R D L A A R N C L V S K V S D D

3340 3350 3360 3370 3380 3390 3400 3410 3420  
CAATTCGTAGTCAAGATTGGGGATTTTGGAAATGACTCGAGATATATATGAAGCTGATTATTACCGTAAAGGCGATAGGGACTCTTACCC  
Q I V V K I G D F G M T R D I Y E T D Y Y R K G D K G L L P

3430 3440 3450 3460 3470 3480 3490 3500 3510  
ATTAGATGGATGGCGCCAGAAAGTCTCAAGGATGTTTGTTCACAACTTATTGAGACATATGGAGCTACGGCTCGTCTTGTGGGAGATC  
I R W M A P E S L K D G L F T S Y S D I W S Y G V V L W E I

3520 3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590 3600  
ACTACTTTAGGTGAACCAACCTATCAGGGATCGAGTATGAGACTGTACTGAAGGAGGTGATGAAAGGCAGGTTGAGGTTGCAAAATFCCC  
T T L G E Q P Y Q S S N E T V L K E V M K G R L R L Q I P

3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670 3680 3690  
TCTGACTGCTCTCTCTCTTGAAGACCATCATGGAGCATGCTGGAGAAGTACACCTCTGAAAGAGTCAAGTTTCTATGAAGCTGTGAGC  
S D C S P P L R T I M E A C W R T R P P E R V S F M K A V S

3700 3710 3720 3730 3740 3750 3760 3770 3780  
ACCTTTGAAGTGTGTTTGTGATCAAGATTCAGAAAGTTTCATATATCACAGCGAAGAGCTATAATTTAAGGAAGGCTCTTTCAGAC  
T F E C F V D Q E F K K V S Y Y H S E E A I N L R K A L S D

379038003810382038303840385038603870

TACATGGAARTGTGGTCCGTTGAAGATCCGTTACTTCAAGAGGAAATCTACTCATGATAAATGGTGAATTAATGATGGACATATCAAGG

Y M E M W S V E D P L L Q E E N L L M I N G E L M M D I S R

38803890390039103920393039403950

CTATTTCAAAAGCCAAATCATAGGTTTTC AATAAAAATGAATCCATCAAGAAAATCCTGACTCCTCTGAAGAGGTT

L F Q K P N H R F S I K M N S I Q E N P D S S E E V

XI. NcInR1 编码基因全长 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列

10 20 30 40 50 60 70 80 90  
ATGGTCGACCTCTCGCTTACTCTGCTGATCCCTCGCGATCGTACCCCTTGGCGGGCGCATCTCGCGGAACATCAGCGTCAGGAAC  
M V D P L A L L C L I L A I V P P L A G R I C G N I S V R N

100 110 120 130 140 150 160 170 180  
GAGGTC AAGGAGTTGGAGAGCTTACGGAACCTGCACTGTGTGTCGAAGGAACGTAAGTATGATAGAGAACCAAGTATCGGGTGG  
E V K E L E S L R N C T V V E G N V L I V L I E N Q S I G W

190 200 210 220 230 240 250 260 270  
AAGGACTTGGAACTGATAGCTTCCCTGAGCTGAGGGAAGTGAAGTATTTGATGTTCTACCGGGTCCGAGGGCTGCTAAGTTTGGGC  
K D L E P Y S F P E L R E V T E Y L M F Y R V R G L L S L G

280 290 300 310 320 330 340 350 360  
AAACTGTTCCCAACCTGGAGAGATAGGGGGCTCTGACCTGTTCAGGACTTTGCCCTTGTGTTTATGAGATGTACAGTCTGCAGGAG  
K L F P N L E K I G G S D L F Q D F A L V V Y E M Y S L Q E

370 380 390 400 410 420 430 440 450  
ATCGGCTTATCCAGCTCCGGAGATCAGGAGAGCTCCGTCATGATCAATAGAACCCGAATCTATGTTTCGGGAACACGGTAAAGTGG  
I G L S S L R E I T R G S V M I N K N P N L C F G N T V K W

460 470 480 490 500 510 520 530 540  
GAGAACATCACCAGTGGAAATGCTTTCATGAAGAACCTGAGCTACGTCACGAGAGCCAGATGGACTGTCCTAGCTGCCCGAGCACTGC  
E N I T R W N A F M K N V S Y V T Q S Q M D C P S C P E H C

550 560 570 580 590 600 610 620 630  
CCTCAAGGAGCTGTTGGAACTCCACTCAGTGTCAAGTTCAGAGGAGTGTCCCATTTGTCATCTCTGTGTGTGGGGGCTGCTCCAAC  
P Q G A C W N S T Q C Q F Q T E V S H C H P L C V G G C S N

640 650 660 670 680 690 700 710 720  
CCGGGTCTGAACACTGTGTACTCTGTAAAGTTTCTACGACCCAGAGGCAATGTGTGATCGCTGTGCTCCCAACACATATAAATAC  
P G P E H C Y S C K G F Y D P R G Q C V I A C P P N T Y K Y

730 740 750 760 770 780 790 800 810  
CGGAACCGGCGTGTGTACCGCTGAGCAGTGTCTCGAGTTGTCTGCTCCGGGCGTGGCAAAGTTGTCCACAGGACAGTGCACGGAT  
R N R R C V T R E Q C L E L S V S G R G K V V H Q D Q C Q D

820 830 840 850 860 870 880 890 900  
AGCTGTCCCTCGGGGCTCAGCCGACTACGCGGGGCGAGTGCCTGCCCTGCGAGGGTCTGTGCTCCGAAGGTGTGCGCCGCGCAAGAA  
S C P S G L Q P D Y A A G E C R P C E G R C P K V C A G E E

910 920 930 940 950 960 970 980 990  
ATATCCAGCACTGGCGAGGCTCAGAAATTTAGGGGATGCACCATTCATTGACGGTTCTCTGCGAGATTGTTATAAAGGCGGAGACATCCGAC  
I S S T G E A Q K F R G C T I I D G S L Q I V I K A E T S D

1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080  
GCCGTTCACAGCATCTCGAGGAGAGCTCGGATCTATAGAACAGATCAAGGGTCACTGCGAGTTGCGCGCTCATCTCAAGGACTC  
A V H S I L E E S L G S I E Q I K G H L Q V A R S S L T D L

1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170  
AACTTCTTAAATAATCTACGGTATATACGGCAGCAAAAACCCCAAGGTCGCAAGCAGGATAGTGGCGTCACTCATATACAGCAAC  
N F L K N L T V I H G S K N P K V A S T I V R S L I I H D N

1180 1190 1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260  
GAAAACCTGCAAGACCTCTGGGACTGGACACAAAGAGAACTTTACTGTAGTTCAAGGCAAGTCTACTTTTCATTACATCCGAAACTT  
E N L Q D L W D W T T K R N F T V V Q G K V Y F H Y N P K L

1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350  
TGCTTACAGCTATTACAGCTTTACTGGACAAATCGGGTACACAAAGTGTACAGTACTTCCGAGTTGGGGAGAGAAATCCACAGCTGAT  
C L H R I Y T L L D K I G Y N K S V S S S E L G K E S N G D

1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440  
CAGTTCCTGCAACCGCCGACGAGATAAGCATTCGCGTCTCTGGACGTGACGGTAGACAGTATCAAAATAGCGGTTCCTCATTTGAACGGC  
Q F P C N A D E I S I A V L D V T V D S I K I R V P I M K G

1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520 1530  
ACGGATATATTGCGGTCTGCGCTACTACACGAGATCCGACGCAACATCACAGGTTTCGACGAGCTGGACCAATGCTCCGACTAC  
T D I L R S V A Y Y T R D P H G N I T R F D D L D Q C S D Y

1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610 1620  
GGGTGGCGCTCAGTGGACATGCACTGTGTGACAAGACTGGGTTTCGAAGGAAGCATGATCGAGCTGGAGCCCTACACCATCTACGCGTTC  
G W R S V D M Q L V D K T G F E G S M I E L E P Y T I Y A F

1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700 1710  
TACGTGATGACGTACACGATGTATAGTGTGGGAGCTCGCAGCAGAAATAGGCACGAGAGGACGTTGCCGGGCAACCCACGGAGATCACG  
Y V M T Y T M Y S V G A R S R I R H E R T L P G T P T E I T

1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800  
GACCTGAGAACCTTCTGACACCAAGCTGACAGATCGAGTACGTTGGCAACCTCCCGTCAAGTCAATGGCAGACTGCAGGAGTACGTC  
D L R T F V S T S S Q I E L R W Q P P R Q L N G R L Q E Y V

1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890  
GTCTCGTGGTCCGAGCTGGAGGAAGATAGAGCTTTCATCGACCAACGAACTACTGTGAGTTCTGTGTTAGCGGAACTAAGCCGTAC  
V S W S E L E E D R A F I D Q R N Y C E V P V L A E T K P Y

1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980  
AAGTCAAGGCACACGATCCAAAAACCGCAGAAATAAGAGTTGCTGTACTAATCCGCAAGAAATCTGTACCGAAAGACGATTGATGATATA  
K S R H T I Q K P Q N K S C C T N P Q E I L L P K D D F D I

1990 2000 2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070  
TTATGCAATAAATCTTGAATAATCACCTTATGGGTTCTTAGATAAAAACAAATACATATCTTGTAAATCTTTTTTCATTCTTATATTCAC  
L C N N F E N S P Y G F L D K T K Y I S C K S F F I S Y I H

2080 2090 2100 2110 2120 2130 2140 2150 2160  
AAGAGTCCCTTTGACTCCGACTCTGTATTACTAAAGAAACACCGAGTGGTTTACAAAACCGCACATGATGAACATTTTACTAGTAAAG  
K S P F F D S S T L I T K E T P V V Y K T A H D E H F T S K K

2170 2180 2190 2200 2210 2220 2230 2240 2250  
TTAGTTCGAATAAATGTTTCAACATTACAAATCAAAATTTCTGACATTAACAAAAGATTCCGCTGTAAAATATGAAAATAGTCA  
L G R N K N V S T L Q N Q I S D I K Q K D S A V K Y E N K S

2260 2270 2280 2290 2300 2310 2320 2330 2340  
TTGCTTCCGTCAAAAGTGTATTATAATACGAAAGTAGTTTTTAAAGGACTAAAACACTATCAAAAGTATGTTATAGTGTAAAGGCGGTGT  
L L P S K S V I N T K V V L K G L K H Y Q K Y V I S V K A C

2350 2360 2370 2380 2390 2400 2410 2420 2430  
CGGCGCCTCACGAAATCAAGACAGATTCCACAAATCACAAATTAATAGATGTAGTCAATCCGAAATATCAACAGCTCAACCCAAAGGA  
R E P H E N E T D F H K S Q N N R C S Q S E I I T A Q T K G

2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500 2510 2520  
ATCCAGAGTTAGATGCAATCTCTAAAATAAAGTGTATGTGAGAAACGATGACGAAAGAAATCAACAGAAATCAAGTGGGATGTACCT  
I Q E L D A I P K N K V Y V R N D D E K N A T E I S W D V P

2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600 2610  
TTAAACCTTAATGGAATATAGTGGCATTTGAATAGAAATATCGAAGTAAGGATATAGAAAATTCRAACCCCATGAAGACTGTTTATCG  
L N P N G Y I V A F E I E Y R S K D I E N S N P M K D C L S

2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690 2700  
TACAGACAGTTTCGAGAAAACACAAATAAACACGTAATACACTCACTCTCCCGGGAAGATACGAGTTTAAAGTTCGAGCCATATCGTTA  
Y R Q F E K F N N K H V I H S L S P G R Y E F K V R A I S L

2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790  
CACGCAAGGAGCCACCGCGTGGCATATTACACCTTCAATATAATAAGAAATAGCTATTAACCTGTATAGTATATTGGCTTTGGTAGCA  
H G K G P T A L A Y Y N L Q Y N K N S Y N L I V I L A L V A

2800 2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880  
GTTATGGTGGTTGCTTGTGTCATATTGAAAGTGTGCCCCAAGAACGGTGTAGTGGTTTGGACATAATCCCACTACCACTACGCCCGA  
V M V V A L V I L K V S P K N G V V V L D I N P N Y H Y A R

2890 2900 2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970  
GATGAGTATGAGATTGACAGAGACGATTTGAATGGTGGACGAGCTGGGAACCGGACGCTTCGGGAAGGTGTACAGAGGTGCAATGAAG  
D E Y E I D R D D V E L V D E L G T G S F G K V Y R G R M K

2980 2990 3000 3010 3020 3030 3040 3050 3060  
TCGACGAACCTGCACTGCGCGATCAAGACGCTCAGCGAAGACGCCACTAGGATCAATGTCAACGAGTTTCTGACAGAAAGCCACTGTCTATG  
S T N L H C A I K T L S E D A T R I N V N E F L T E A T V M

3070 3080 3090 3100 3110 3120 3130 3140 3150  
AAGTCCATGACGAAAGCCGACTCTCTGTGGGAATATACGGAGTAGTGTGCGCAAGGGAAGCCACCGTGTGCTCATGGACTCATGGAT  
K S M T K A Y F L V E I Y G V V S Q G K P P L V L M E L M D

3160 3170 3180 3190 3200 3210 3220 3230 3240  
AACGAGATTTCGCAACTTATCTAAGGGAAACGAGGGAACAAATCCCGTGACGACGCAATGATGATCAAAATGGCTTTGGAGATCGCC  
N G D L R T Y L R E T R E T N P V T N A M M I K M A L E I A

3250 3260 3270 3280 3290 3300 3310 3320 3330  
GATGGGATGGCGTACATGGAGGCGCACAGTTCTGTGCACAGGACCTGGCGGCACGGAACCTGTCTGGTGACCGGTGACCTTACAGTTAAA  
D G M A Y M E A H K F V H R D L A A R N C L V S G D L T V K

3340 3350 3360 3370 3380 3390 3400 3410 3420  
GTGGGAGACTTCGGGATGTCCAGGGACGTGTACGAGACGGAGTACTACAGGAAGGGAACGCGGGGTTCCTCCCATCCGGTGGATGGCA  
V G D F G M S R D V Y E T E Y Y R K R N A G F L P I R W M A

3430 3440 3450 3460 3470 3480 3490 3500 3510  
CCAGAAAGCCTCAAGGACGGGGACTTCACCACTGCTCGGACGTGTGGAGCTACGCGGTGGTGTGTGGGAGATCGTGACCTCGCGGAG  
P E S L K D G D F T S R S D V W S Y G V V L W E I V T L A E

3520 3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590 3600  
CAGCGGTACCGAGGTTACAGCAACGACGAGTCTATGACGCGGTCATCGCGGAGTCCGGTGGTGAATACCGGAGACCGCCCTCCCGG  
Q P Y Q G Y S N D Q V M H A V I A G S R L V I P E T A P S P

3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670 3680 3690  
TTGGCGAAACTCATGTCCACCTGCTGGAGAACCAAGCCGTCCTGGAGGTGGACCTTCATGAGCATCGTGCAGTCCCTGAACTACTACCCAC  
L A K L M S T C W R T K P S W R W T F M S I V D S L N Y Y H

3700 3710 3720 3730 3740 3750 3760 3770 3780  
GACGACGAGTTCCGGAGGGTTGCGTACTACACAGTGTGGAGGCGGTGGCCACGAGACGGGCCAGTGGGAGTACGTGGACATGAAGCCG  
D D E F R R V A Y Y H S V E A V A T R R A T W E Y V D M K P

379038003810382038303840385038603870

CAGGTCAGCGCTCCGCCCTCCTACAGGCTCACGCCCTGTCGACGAGGAGTCGACAAACAAGACTGGGTAGTTCTGGCATGTCCTTTAGATTTT

Q V S A P P S Y R L T P V D E E S T N K T G S S G M S L D F

XII. NcInR2 编码基因全长 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列