

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2018.03.005

橘小实蝇神经肽 sulfakinin 的分子生物学特性及其表达模式

栗洪飞, 郑莉莎, 石 岩, 王进军, 蒋红波*
西南大学植物保护学院, 西南大学农业科学研究院, 重庆 400716

摘要:【目的】分析橘小实蝇 sulfakinin 的时空表达模式及其对饥饿的响应,初步明确 sulfakinin 在调节橘小实蝇行为和生理方面的功能。【方法】利用 RT-PCR 技术克隆橘小实蝇神经肽 sulfakinin 的 cDNA 序列,采用实时定量 PCR 技术分析该基因在橘小实蝇不同发育阶段、成虫不同组织、幼虫不同组织及其在饥饿胁迫下的表达模式,并运用半定量 RT-PCR 技术进一步验证。【结果】实时定量 PCR 分析结果表明,sulfakinin 在橘小实蝇的幼虫期和成虫期显著性高表达,卵期和蛹期几乎不表达。其中早期成虫表达量最高,约为晚期成虫的 2 倍,幼虫期表达量位于两者之间。在橘小实蝇幼虫、成虫不同组织中,sulfakinin 在中枢神经系统的表达量显著高于其他组织,在触角的表达量仅次于中枢神经系统。此外,橘小实蝇在经饥饿处理 24 h 的过程中,sulfakinin 的表达量均出现下调,其中从饥饿处理结果可知在 6 h 下降幅度最大,12 h 和 24 h 表达量下降幅度减少。半定量 RT-PCR 技术进一步检测结果与实时定量 PCR 技术检测结果一致。【结论】sulfakinin 在橘小实蝇中枢神经系统可能调节橘小实蝇成虫对饥饿胁迫的响应。其在触角中的高表达可能与橘小实蝇嗅觉的敏感性相关。本研究为进一步研究橘小实蝇 sulfakinin 的生理功能、评估其药靶潜力奠定了理论基础。

关键词: 橘小实蝇; 神经肽; sulfakinin; 表达模式; 分子克隆

Molecular characterization and expression profiling of sulfakinin in *Bactrocera dorsalis*

LI Hongfei, ZHENG Lisha, SHI Yan, WANG Jinjun, JIANG Hongbo*
College of Plant Protection, Academy of Agricultural Science, Southwest University, Chongqing 400716, China

Abstract: 【Aim】 We investigated the temporal and spatial expression profiles of sulfakinin in *Bactrocera dorsalis*, as well as its response to starvation stress, to elucidate its vital functions in this fly's physiology and behavior. 【Method】 The cDNA of the *B. dorsalis* sulfakinin (Bacsulfakinin) was cloned by RT-PCR. QRT-PCR (real-time quantitative PCR) was employed to determine its expression patterns in different developmental stages, different tissues as well as the corresponding expression profiles under the stress of starvation. All the QRT-PCR results were further confirmed by semi-quantitative RT-PCR. 【Result】 QRT-PCR results indicated that sulfakinin was highly expressed in larvae, early adults and late-adults, while has little expression in the eggs and pupae. The expression of sulfakinin was highest in early adults, which was about twice as in late adults, and the expression level of sulfakinin in larvae was between the early adults and late-adults. The expression of sulfakinin was remarkably higher in the CNS (Central Nervous System) than in other tissues in both larvae and adults. Interestingly, the expression of sulfakinin was expressed the highest in the antennae. In addition, in the process of starvation for 24 h, the expression of sulfakinin decreased at all three time points tested which induced the fruit fly without food and water for 6, 12 and 24 hours. The expression level of sulfakinin decreased the most by 6 h from the starvation stress results. 【Conclusion】 Sulfakinin is possibly modulating the response of the oriental fruit fly upon starvation. The high expression level of sulfakinin in antenna may be related to olfactory sensitivity of the oriental fruit fly. This study laid a solid foundation for future studies of the physiological functions and assessment of target potential for sulfakinin.

Key words: *Bactrocera dorsalis*; neuropeptide; sulfakinin; expression profiles; molecular cloning

橘小实蝇 *Bactrocera dorsalis* (Hendel), 又名东方果实蝇, 属双翅目 Diptera 实蝇科 Tetrphitedae 果实蝇属 *Bactrocera*, 是一种重大农业入侵害虫(陈韶萍等, 2014)。橘小实蝇寄主范围广, 可危害柑橘、番石榴、杨桃、芒果、香蕉、茄子、辣椒、瓜类等 46 科 250 多种水果和蔬菜(汪恩国等, 2013; 袁国瑞等, 2016)。由于其极强的环境适应和入侵扩散能力, 已被多个国家列为检疫对象, 并且在热带和亚热带成为最具毁灭性的害虫之一(Clarke *et al.*, 2005)。尽管可以使用寄生蜂等对橘小实蝇进行生物防治, 但目前最有效的控制方法仍是化学防治(Lin *et al.*, 2012)。近年来, 橘小实蝇抗药性愈演愈烈, 如何有效控制其危害, 是目前全世界果蔬产业面临的一个严峻问题。

昆虫的神经肽是一类由昆虫神经系统分泌的微量高效能小分子蛋白质(多肽), 是多细胞生物体内的重要信使(魏兆军和赵远, 2005)。到目前为止, 就多细胞生物体而言, 昆虫神经肽是最大、种类最多的信号分子(Schoofs *et al.*, 2017), 调控着昆虫的许多重要生理过程, 如生长、发育(Gui *et al.*, 2017)、取食(Hong *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013)、记忆(Cervantes-Sandoval & Davis, 2012)、生殖(Nilay *et al.*, 2008)、代谢、遗传(Altstein & Nässel, 2010)等。因此, 神经肽信号调节系统被认为是理想的防治昆虫的杀虫靶标, 如 tachykinin(Nachman *et al.*, 2010)、滞育激素(diapause hormone)(Zhang *et al.*, 2011)、sulfakinin(Yu *et al.*, 2013b)等。研究表明, sulfakinin 与昆虫的取食有极密切的关系, 调控多种昆虫的取食行为(Schoofs *et al.*, 2017)。sulfakinins 定位于交感神经系统和中枢神经系统, 类似于哺乳类动物胃分泌素(Anders *et al.*, 2000; Duve *et al.*, 1994; Nichols & Lim, 1995)。昆虫 sulfakinins 首次于马德拉蜚蠊 *Leucophaea maderae* Browse 头部的提取物中分离得到(Nachman *et al.*, 1986)。随后, 又在果蝇(Nichols *et al.*, 1988)、沙漠蝗 *Schistocerca gregaria* Forsk(Wei *et al.*, 2000)、德国小蠊 *Blattella germanica* (L.)(Jose *et al.*, 2001)等多种昆虫中发现。研究显示, 注射 sulfakinin 后的亚洲飞蝗 *Locusta migratoria* L. 减少了食物的摄取(Altstein & Nässel, 2010), 且与 sulfakinin 的注射量呈正相关(Zels *et al.*, 2015); 德国小蠊在注射 sulfakinin 肽段后, 减少了 84% 的食物摄取 Jose *et al.*,

2001)。与之相反, 利用 RNAi 抑制双斑蟋 *Gryllus bimaculatus* (De Geer)、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* Herbst 的 sulfakinin, 其食物摄取量显著增加(Meyering-Vos & Müller, 2007; Yu *et al.*, 2013a); RNAi 后果蝇出现摄食增加且取食行为异常的现象(Söderberg *et al.*, 2012); nonsulfated sulfakinin (SK) 参与调节大麦虫 *Zophobas atratus* Fab 的幼虫和蛹期的糖类和类脂化合物代谢作用, 影响其幼虫脂肪体和线粒体相关能量代谢活动(Slocinska *et al.*, 2016)。目前, sulfakinin 被定位于许多昆虫的中枢神经系统, 且又与昆虫的取食有密切关系, 意味着其具有重要的生理功能以及良好的药靶潜力。

sulfakinin 表达模式分析可为深入研究橘小实蝇 sulfakinin 的生理功能、药靶潜力提供基础数据, 为靶向橘小实蝇重要神经肽信号传递系统、开发高度特异的控制剂奠定基础。橘小实蝇 sulfakinin 具有何种生理功能仍不得而知, 是否具有药靶潜力亟需深入研究。本文以橘小实蝇为对象, 克隆获得了神经肽 sulfakinin 的 cDNA 全长, 并利用实时荧光定量 PCR 解析了其时空表达模式分析, 为进一步研究橘小实蝇 sulfakinin 基因功能奠定基础, 同时为以昆虫神经肽为靶标的新型杀虫剂的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

橘小实蝇于 2007 年采自云南省(云南品系), 带回实验室后饲养于西南大学昆虫学及害虫控制工程重点实验室人工气候室内。饲养温度(27 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 饲养相对湿度(70 ± 5)%, 光周期 14L: 10D。所有试虫均为人工饲料饲养。

1.2 主要试剂

高保真 DNA 聚合酶 PrimerSTARTTM Max Premix 及 PCR 相关试剂、半定量 PCR 所用 Taq 酶及相关试剂均购自 TakaRa 公司, Trizol 试剂购自 Life Technologies 公司, 反转录试剂盒购自 Promega 公司, iQTM SYBR[®] Green Supermix 购自 Bio-rad 公司。

1.3 样品的制备

加入 Trizol 试剂充分研磨, 参照 Trizol 试剂说明书提取样品的总 RNA, 琼脂糖电泳检测总 RNA 的完整性, Nanodrop 2000 核酸浓度测定仪检测其浓度和纯度, 使用 RQ1 Rnase-Free Dnase 去除基因组 DNA, 按照反转录试剂盒说明书进行反转录合成

第一链 cDNA,在-20 ℃ 冰箱中保存备用。

1.4 序列比对分析

在 GenBank(XM_011207950) 查询获得橘小实蝇 sulfakinin 序列;利用在线程序 SignalP 4.1(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 预测信号肽(signal peptide);根据在线程序 Neuro Pred(<http://neuroproteomics.scs.uiuc.edu/neuropred.htm>) 预测成熟肽切割位点(dibasic cleavage sites);氨基酸序列比对分析通过 DNAMAN、WebLogo 等软件完成。通过 MEGA5 软件中的邻接法构建系统发育树,用在线工具 WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) 作图;利用 Primer premier 5.0 软件设计橘小实蝇 sulfakinin 的特异性 qPCR 引物(表 1),并用 DNAMAN 6.0 对所设计的引物进行评价。

表 1 研究所用引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

引物类型 Primer type	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')
qPCR 引物	dl-sulfakinin-F1	TGGTGGCCTTAACGTTGACT
Primers for qPCR	dl-sulfakinin-R1	CCAGAGGCATACCACCAGAT
	α-Tubulin-qF	CGCATTCATGGTTGATAACG
	α-Tubulin-qR	GGGCACCAAGTTAGTCTGGA
	半定量 PCR 引物	dl-sulfakinin-F
Primers for semi-qPCR	dl-sulfakinin-R	CCAGAGGCATACCACCAGAT
	全长验证 Full-length confirmation	orf-sulfakininF1
	orf-sulfakininR1	GCAACTGTAATGGCTCAAGT
		CTGTCTAAGTACTTCTCCCA

1.5 sulfakinin 表达模式分析

橘小实蝇不同发育阶段和不同组织表达模式的样品收集参照桂顺华(2017)方法:不同发育阶段选取卵(1 d)、幼虫(4 d)、蛹(4 d)、早期成虫(5 d)、晚期成虫(10 d);选取孵化后 4 日龄幼虫解剖不同组织,包括中枢神经系统、脂肪体、中肠、马氏管、气管和表皮;选取羽化后 5 日龄未交配的成虫解剖不同组织,包括中枢神经系统、脂肪体、中肠、马氏管、触角、精巢和卵巢。每个样品 4 个生物重复,总 RNA 提取和 cDNA 合成参照 1.3。

根据 GenBank 查询获得的序列设计橘小实蝇 sulfakinin 特异性 qPCR 引物,同时采用橘小实蝇 α-Tubulin 作为内参基因(Shen *et al.*, 2010)(GenBank 登录号: GU269902)。qPCR 反应体系如下: cDNA 0.5 μL、GoTaq® qPCR Master Mix 5 μL、ddH₂O 3.5

μL、上下游引物各 0.5 μL。反应条件为 95 ℃ 预变性 2 min,95 ℃ 变性 15 s,60 ℃ 退火 30 s,60 ℃ 延伸 30 s,进行 40 个循环,最后 95 ℃ 后延伸 30 s。每次实验技术重复 2 个,生物重复 4 次。

利用 2^{-ΔΔC_t} 法(Livak & Schmittgen, 2001) 对数据进行分析。其中,不同发育阶段表达模式研究中,晚期成虫相对表达量设置为校准值;成虫不同组织表达模式研究中,成虫触角组织的相对表达量设置为校准值;幼虫不同组织表达模式研究中,幼虫中肠组织的相对表达量设置为校准值。

1.6 半定量检测 sulfakinin 相对表达量

以反转录合成的第一链 cDNA 为模板,采用巢式 PCR 扩增,体系为 25 μL: cDNA 1 μL、ddH₂O 17.375 μL、buffer (Mg⁺) 2.5 μL、dNTP 2 μL、rTaq 0.125 μL、上下游引物各 1 μL。反应条件为 98 ℃ 预变性 3 min,98 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 90 s,sulfakinin 扩增进行 35 个循环,内参 α-Tubulin 扩增进行 30 个循环,最后 72 ℃ 后延伸 10 min。用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.7 饥饿胁迫

分别挑取 4 头经饥饿处理 6、12、24 h 的橘小实蝇羽化后 5 日龄的成虫,加入 Trizol 充分研磨,总 RNA 提取和 cDNA 合成参照 1.2,每个处理 4 个生物重复,每个生物重复雌雄各 2 头且只取头部。

2 结果与分析

2.1 sulfakinin 的序列分析

利用 RT-PCR 技术,克隆获得了橘小实蝇 sulfakinin 的 cDNA 全长序列(GenBank 登录号: XM_011207950)。cDNA 全长 417 bp,编码 138 个氨基酸。5' 端前 30 个氨基酸残基为信号肽序列;前体包含 2 个成熟肽(图 1)。其成熟肽 C 端具有典型的 sulfakinin 基序 GHMRFamide(图 2)。

将 sulfakinin 编码的氨基酸序列与 GenBank 登录的其他昆虫的 sulfakinin 氨基酸序列进行比对(表 2),并通过 MEGA 5 软件中的邻接法构建系统发育树,各分支重复检验次数均为 1000。结果表明,橘小实蝇与黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的 sulfakinin 亲缘关系最近,且聚为一支(图 1A)。各目的昆虫均单独成一支,与传统的分类关系一致,说明昆虫 sulfakinin 在进化上具有较好的保守性。

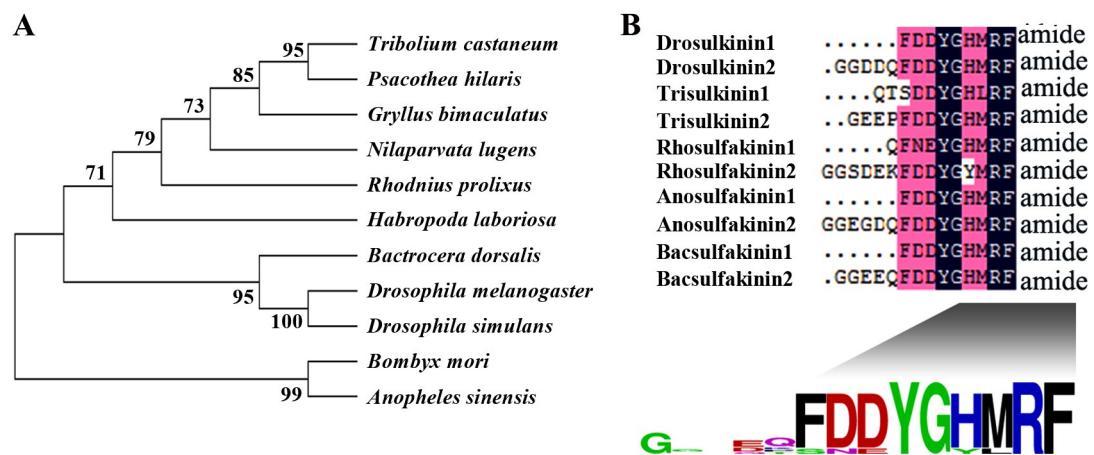


图 1 Sulfakinin 的序列分析

Fig.1 Sequence analysis of sulfakinin

A;Sulfakinin 系统发育分析;B;5 种不同昆虫 sulfakinin 成熟肽序列比对分析。

A: Phylogenetic relationships analysis of sulfakinin; B: The alignment of five kinds of insect mature peptides.

1	ATGGCTCAAGTTCTAAAGAAATCCAGTACGGCAGCCGGAATGGTGGCCTTAACGTTGACT
1	M A Q V L K K S S T A A G M V A L T L T
61	TTTGTATCGTCATAAAATCAGCAGTAGGCAGTAACCTGGATGGAATGCAATCAGAATCA
21	F C I V I N S A V G S N L D G M Q S E S
121	CATGATATTAATTCTAATGGTAATGAAGCATCTGGTGGTATGCTCTGGAATCGCTCATC
41	H D I N S N G N E A S G G M P L E S L I
181	GACGGCCGAGGATATTTACAAACCATCGCTATTTGCGATCAATATACGGCTACGGCCCCG
61	D G R R I F T N H R Y L R S I Y G Y G P
241	AAAATGTTTCAAATATCCCGTTCTAAGATCCCAATAGAACTCGATTGTAGTAGAAAAT
81	K M F Q I S R S K I P I E L D L L V E N
301	GAGAGCGGAGATCGATCAAAGCGTTTTGACGATTATGGACACATGCGCTTTGGAAAAAGA
101	E D G D R S K R F D D Y G H M R F F G K R
361	GGGGGCGAGGAACAGTTTGATGACTATGGCCATATGCGATTGGGAGAAGTACTTAG
121	G G E E Q F D D Y G H M R F F G R S T *

图 2 Sulfakinin 基因全长序列及其编码的氨基酸序列

Fig.2 The nucleic acid sequence of sulfakinin and the deduced amino acid (AA) sequence

* ;终止子,成熟肽用下划线代表。

* : Terminator, the underline represents the mature peptide.

表 2 不同昆虫 sulfakinin 的 GenBank 登录信息

Table 2 The GenBank ID of sulfakinin of some insects

种名 Species	缩写 Abbreviation	GenBank 登录号 GenBank ID
<i>Drosophila melanogaster</i>	Drosulkinin	NM_080106.3
<i>Tribolium castaneum</i>	Trisulkinin	KC161574.1
<i>Rhodnius prolixus</i>	Rhosulfakinin	ACS45388.1
<i>Anopheles gambiae</i>	Anosulfakinin	AAR03495.1
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Bacsulfakinin	XM_011207950
<i>Bombyx mori</i>	Bomsulfakinin	AB362223.1
<i>Habropoda laboriosa</i>	Habsulfakinin	(KOC62825.1)
<i>Nilaparvata lugens</i>	Nilsulfakinin	(AFW19802.1)
<i>Psacotheta hilaris</i>	Psasulfakinin	(BAH11170.1)
<i>Gryllus bimaculatus</i>	Grysulfakinin	(CAL48349.1)
<i>Anopheles sinensis</i>	Anosulfakinin	(KFB42310.1)

通过与果蝇、赤拟谷盗、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* Say、长红猎蝽 *Rhodnius prolixus* Stal 五者之

间 sulfakinin 成熟肽序列的比对,发现橘小实蝇与黑腹果蝇,长红猎蝽等的 sulfakinin 都具有较高的保守性(图 1B)。橘小实蝇和果蝇的 sulfakinin1 序列完全一致,sulfakinin2 序列有 2 个异常的氨基酸残基,橘小实蝇 N 端第三、第四位置是 2 个谷氨酸(E),而果蝇在对应位置是 2 个谷氨酰胺(Q)。此外,橘小实蝇、黑腹果蝇与冈比亚按蚊三者的 sulfakinin 成熟肽都具有完全一致的序列 FDDYGHMR-Famide。长红猎蝽 sulfakinin1 与赤拟谷盗 sulfakinin2 分别具有一个差异的氨基酸残基。赤拟谷盗的 sulfakinin1 N 端第三个位置的苯丙氨酸(F)残基替换成丝氨酸(S)残基,长红猎蝽的 sulfakinin2 C 端第三个位置的组氨酸(H)残基被替换为酪氨酸(Y)残基。

2.2 橘小实蝇 *sulfakinin* 的时空表达模式

2.2.1 橘小实蝇不同组织的表达特性 橘小实蝇成虫的不同组织中,*sulfakinin* 在中枢神经系统的表达量显著高于其他组织 ($P<0.05$), 约为触角的 2 倍, 在触角的相对表达量仅次于中枢神经系统, 且显著高于其他组织 ($P<0.05$)。 *sulfakinin* 在脂肪体、中肠、马氏管、卵巢和精巢中表达量很低或几乎不表达 (图 3)。半定量 PCR 结果与之对应。

在橘小实蝇幼虫的不同组织中,*sulfakinin* 在中枢神经系统中显著高表达 ($P<0.05$), 在脂肪体、中肠及马氏管中均有一定程度的表达, 在表皮和气管中表达量极低或几乎不表达 (图 4)。其中,*sulfakinin* 在中肠的表达量约等于马氏管, 约为中枢神经系统表达量的 1/3; 脂肪体中的相对表达量低于中肠和马氏管, 高于表皮; 在气管中的相对表达量最低, 几乎不表达。半定量 PCR 结果与之对应。

2.2.2 橘小实蝇不同发育阶段的表达特性 在橘小实蝇的不同发育阶段,*sulfakinin* 在卵期几乎不表达, 在蛹期有一定量的表达, 在幼虫、早期成虫、晚期成虫显著高表达 ($P<0.05$) (图 5)。其中,*sulfakinin* 在早期成虫中的相对表达量约为晚期成虫的 2 倍, 幼虫时期的相对表达量居于早期成虫与晚期成虫之间, 晚期成虫的相对表达量在这 3 个时期最低。半定量 PCR 结果与之对应。

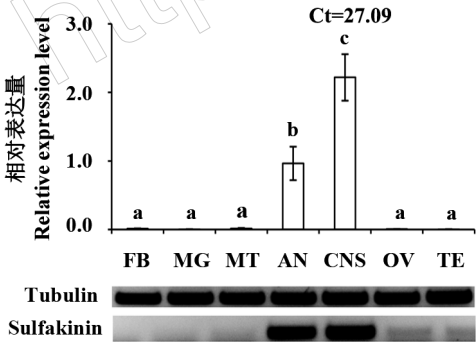


图 3 *Sulfakinin* 在橘小实蝇成虫不同组织的表达模式

Fig.3 The expression profiles of *sulfakinin* in different adult tissues of *B. dorsalis*

柱上不同字母表示经 LSD 多重比较后差异显著。半定量检测 *sulfakinin* 在橘小实蝇成虫不同组织的相对表达量。

FB: 脂肪体; MG: 中肠; MT: 马氏管; AN: 触角; CNS: 中枢神经系统; OV: 卵巢; TE: 精巢。

Different letters above the column indicate significant difference at $P<0.05$. Semi-quantitative RT-PCR detection of *sulfakinin* levels in different adult tissues of *B. dorsalis*. FB: Fat body; MG: Midgut; MT: Malpighian tube; AN: Antennae; CNS: Central nervous system; OV: Ovary; TE: Testis.

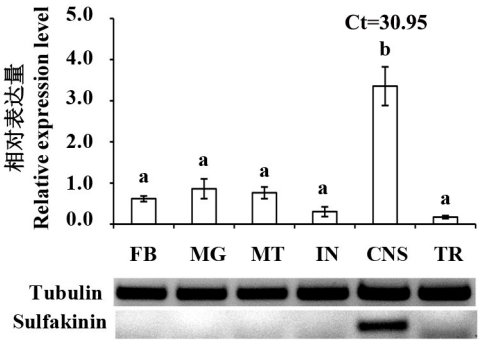


图 4 *sulfakinin* 在橘小实蝇幼虫不同组织的表达模式

Fig.4 The expression profiles of *sulfakinin* in different larval tissues of *B. dorsalis*

柱上不同字母表示经 LSD 多重比较后差异显著。半定量检测 *sulfakinin* 在橘小实蝇幼虫不同组织的相对表达量。

FB: 脂肪体; MG: 中肠; MT: 马氏管; IN: 表皮; CNS: 中枢神经系统; TR: 气管。

Different letters above the column indicate significant difference at $P<0.05$. Semi-quantitative RT-PCR detection of *sulfakinin* levels in different larval tissues of *B. dorsalis*. FB: Fat body; MG: Midgut; MT: Malpighian tube; IN: Skin; CNS: Central nervous system; TR: Tracheal.

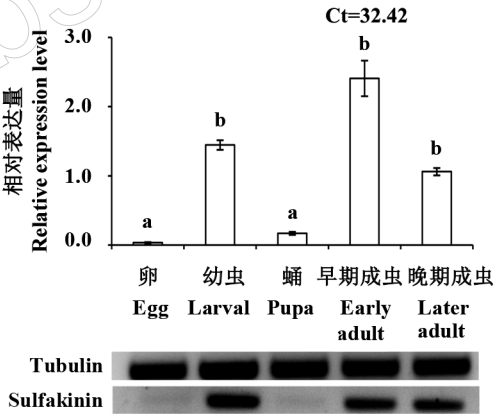


图 5 *Sulfakinin* 在橘小实蝇不同发育阶段的表达模式

Fig.5 The expression profiles of *sulfakinin* in different developmental stages of *B. dorsalis*

柱上不同字母表示经 LSD 多重比较后差异显著。半定量检测 *sulfakinin* 在橘小实蝇成虫不同组织的相对表达量。

Different letters above the column indicate significant difference at $P<0.05$. Semi-quantitative RT-PCR detection of *sulfakinin* levels in different developmental stages of *B. dorsalis*.

2.3 *sulfakinin* 在饥饿胁迫下的表达模式

橘小实蝇成虫在饥饿胁迫下, *sulfakinin* 表达量随时间发生变化。结果显示, 橘小实蝇成虫饥饿 6 h 后, *sulfakinin* 的相对表达量为 0.31, 低于对照的 0.58; 随着饥饿时间不断延长, *sulfakinin* 的表达量呈下降趋势; 饥饿 12 h 后, *sulfakinin* 的表达量达 0.18, 低于对照的 0.26; 24 h 后, *sulfakinin* 表达量为 0.20, 低于对照的 0.27; 总体来看, 饥饿处理后成虫 *sulfakinin* 相对表达量均低于对照组, 其中, 饥饿 6 h

处,sulfakinin 的表达量下降幅度最大。

3 讨论

本研究通过与其他昆虫 sulfakinin 编码氨基酸序列比较发现,黑腹果蝇、拟果蝇、赤拟谷盗等昆虫的 sulfakinin 单独聚为一簇;通过与其他昆虫的 sulfakinin 成熟肽序列的比对发现,橘小实蝇与黑腹果蝇、赤拟谷盗、冈比亚按蚊、长红猎蝽等的 sulfakinin1 和 sulfakinin2 均相似度很高,这表明物种之间的 sulfakinin 均有很好的保守性。

大量研究证实,sulfakinin 调控昆虫对食物的摄取,这与本研究中 sulfakinin 在橘小实蝇不同发育时期表达模式结果一致,sulfakinin 在幼虫、成虫期等取食高峰期抑制试虫过量取食而高表达,而在卵期和蛹期无取食行为时期则几乎不表达。

本研究发现,sulfakinin 在橘小实蝇成虫和幼虫气管中高表达,而在幼虫和成虫的其他组织表达量很低或几乎不表达,这与在反吐丽蝇 *Calliphora vomitoria* L.(Duve *et al.*,1994)、美洲大蠊 *Periplaneta americana* (L.)(East *et al.*,1997)及黑腹果蝇(Nichols & Lim,1995)中的研究结果相似。研究还发现,sulfakinin 在橘小实蝇成虫的触角中也显著性高表达。由于触角是昆虫感觉系统的重要组成部分,行使嗅觉,感受气流、CO₂、湿度和温度等功能,左右其选择食物、取食、躲避危险等一系列行为。这暗示橘小实蝇 sulfakinin 在外周神经系统也扮演着重要角色,极有可能与嗅觉相关。

Sulfakinin 在橘小实蝇早期成虫中的表达量约为晚期成虫的2倍。羽化不久的早期成虫需要补充营养以达到性成熟,尤其在鳞翅目和双翅目昆虫的生殖活动起重要作用。因此,早期成虫比晚期成虫的 sulfakinin 表达量的差异极大可能与此有关。

Sulfakinin 在橘小实蝇幼虫脂肪体有一定程度的表达,其是否承担脂肪体和线粒体的相关能量代谢还有待进一步研究。另有研究表明,双斑蟋肠道有 sulfakinin 基因的表达(Meyering-Vos & Müller,2007),然而,sulfakinin 在橘小实蝇中肠没有显著性表达,这暗示 sulfakinin 在橘小实蝇与双斑蟋之间可能承担着截然不同的生理功能。

研究表明,sulfakinin 是类似于哺乳类动物胃分泌素或肠促胰酶肽,有减少食物消耗的作用(Jose *et al.*,2001; Nachman *et al.*,1986)。本研究结果显示,橘小实蝇成虫在饥饿过程中,sulfakinin 表达量

起初下降幅度最大,随时间推移,下降幅度减小,但仍低于对照组,暗示 sulfakinin 参与了饥饿调节过程。究竟其如何调节橘小实蝇对饥饿的响应过程仍需进一步研究。

参考文献

- 陈韶萍,黄振,郭琼霞,刘长明,2014. 实蝇类害虫分子鉴定研究进展. 生物安全学报,23(3): 151-155.
- 桂顺华,2017. 橘小实蝇 Tachykinin 和 Natalisin 信号系统的生理功能及其药靶潜力评估. 博士学位论文. 重庆: 西南大学.
- 汪恩国,王永才,余山红,王会福,2013. 临海柑橘园橘小实蝇种群数量消长规律. 生物安全学报,22(2): 91-96.
- 魏兆军,赵远,2005. 珍贵绢丝昆虫天蚕 FXPRLamide 家族神经肽的免疫组织化学鉴定. 中国农业科学,38(12): 2542-2548.
- 袁国瑞,杨文佳,许抗抗,王进军,2016. 橘小实蝇 *nAChR* $\alpha 9$ 亚基基因的鉴定及其时空表达. 昆虫学报,59(11): 1189-1198.
- ALTSTEIN M, NÄSSEL D R, 2010. *Neuropeptide signaling in insects, in neuropeptide systems as targets for parasite and pest control*. Boston MA: Springer.
- ANDERS H, JOHNSEN, HANNE D, MARLENE D, MIKE H, ALAN T, 2000. Sulfakinin neuropeptides in a crustacean. Isolation, identification and tissue localization in the tiger prawn *Penaeus monodon*. *European Journal of Biochemistry*, 267: 1153-1160.
- CERVANTES-SANDOVAL I, DAVIS R L, 2012. Distinct traces for appetitive versus aversive olfactory memories in DPM neurons of *Drosophila*. *Current Biology*, 22: 1247-1252.
- CLARKE A R, ARMSTRONG K F, CARMICHAEL A E, MILNE J R, RAGHU S, RODERICK G K, YEATES D K, 2005. Invasive phytophagous pests arising through a recent evolutionary radiation: the *Bactrocera dorsalis* complex of fruit flies. *Annual Review of Entomology*, 50: 293-319.
- DUVE H, REHFELD J F, EAST P, THORPE A, 1994. Localisation of sulfakinin neuronal pathways in the blowfly *Calliphora vomitoria*. *Cell and Tissue Research*, 275: 177-186.
- EAST P D, HALES D F, COOPER P D, 1997. Distribution of sulfakinin-like peptides in the central and sympathetic nervous system of the American cockroach, *Periplaneta americana* (L.) and the field cricket, *Teleogryllus commodus* (Walker). *Tissue and Cell*, 29: 347-354.
- GUI S H, JIANG H B, SMAGGHE G, WANG J J, 2017. The neuropeptides and protein hormones of the agricultural pest fruit fly *Bactrocera dorsalis*: what do we learn from the genome sequencing

- and tissue-specific transcriptomes? *Peptides*, 98: 29–34.
- HONG S H, LEE K S, KWAK S J, KIM A K, BAI H, JUNG M S, KWON O Y, SONG W J, TATAR M, YU K, 2012. Minibrain/Dyrk1a regulates food intake through the Sir2-FOXO-sNPF/NPY pathway in *Drosophila* and mammals. *PLoS Genetics*, 8: e1002857.
- JOSE L M, RUTH A, NURIA P, MARI-LUZ V, MARIA-DOLORS P, DAVID A, ISABEL N, XAVIER B, 2001. Screening of antifeedant activity in brain extracts led to the identification of sulfakinin as a satiety promoter in the German cockroach. Are arthropod sulfakinins homologous to vertebrate gastrins-cholecystokinins? *European Journal of Biochemistry*, 268: 5824–5830.
- LIN Y, JIN T, ZENG L, LU Y, 2012. Cuticular penetration of β -cypermethrin in insecticide-susceptible and resistant strains of *Bactrocera dorsalis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 103: 189–193.
- LIVAK K J, SCHMITTGEN T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 25: 402–408.
- MEYERING-VOS M, MÜLLER A, 2007. RNA interference suggests sulfakinins as satiety effectors in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Journal of Insect Physiology*, 53: 840–848.
- NACHMAN R J, HOLMAN G M, COOK B J, HADDON W F, LING N, 1986. Leucosulfakinin-II, a blocked sulfated insect neuropeptide with homology to cholecystokinin and gastrin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 140: 357–364.
- NACHMAN R J, MAHDIAN K, NASSEL D R, ISAAC R E, PRYOR N, SMAGGHE G, 2010. Biostable multi-Aib analogs of tachykinin-related peptides demonstrate potent oral aphicidal activity in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphidae). *Peptides*, 32: 587–594.
- NICHOLS R, LIM I A, 1995. Spatial and temporal immunocytochemical analysis of drosulfakinin (Dsk) gene products in the *Drosophila melanogaster* central nervous system. *Cell and Tissue Research*, 283: 107–116.
- NICHOLS R, SCHNEUWLY S A, DIXON J E, 1988. Identification and characterization of a *Drosophila* homologue to the vertebrate neuropeptide cholecystokinin. *Journal of Biological Chemistry*, 263: 12167–12170.
- NILAY Y, YOUNG-JOON K, CARLOS R, DICKSON B J, 2008. A receptor that mediates the post-mating switch in *Drosophila* reproductive behaviour. *Nature*, 451: 33–37.
- ZHANG Q, NACHMAN R J, KACZMAREK K, ZABROCKI J, DENLINGER D L, 2011. Disruption of insect diapause using agonists and an antagonist of diapause hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108: 16922–16926.
- SCHOOFS L, DE L A, VAN H M B, 2017. Neuropeptides as rRegulators of behavior in insects. *Annual Review of Entomology*, 62: 35–52.
- SHEN G M, JIANG H B, WANG X N, WANG J J, 2010. Evaluation of endogenous references for gene expression profiling in different tissues of the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *BMC Molecular Biology*, 11: 76.
- SLOCINSKA M, ANTOS-KRZEMINSKA N, ROSINSKI G, JARMUSZKIEWICZ W, 2016. Nonsulfated sulfakinin changes metabolic parameters of insect fat body mitochondria. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 934: 177–189.
- SÖDERBERG J, CARLSSON M, NASSEL D, 2012. Insulin-producing cells in the *Drosophila* brain also express satiety-inducing cholecystokinin-like peptide, drosulfakinin. *Frontiers in Endocrinology*, 3: 1–13.
- WANG Y, PU Y, SHEN P, 2013. Neuropeptide-gated perception of appetitive olfactory inputs in *Drosophila* larvae. *Cell Reports*, 3: 820–830.
- WEI Z, BAGGERMAN G, NACHMAN R J, GOLDSWORTHY G, VERHAERT P, LOOF A D, SCHOOFS L, 2000. Sulfakinins reduce food intake in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Journal of Insect Physiology*, 46: 1259–1265.
- YU N, BENZI V, ZOTTI M J, STALJANSSENS D, KACZMAREK K, ZABROCKI J, NACHMAN R J, SMAGGHE G, 2013a. Analogs of sulfakinin-related peptides demonstrate reduction in food intake in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, while putative antagonists increase consumption. *Peptides*, 41: 107–112.
- YU N, NACHMAN R J, SMAGGHE G, 2013b. Characterization of sulfakinin and sulfakinin receptor and their roles in food intake in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Gen Comp Endocrinol*, 188: 196–203.
- ZELS S, DILLEN S, CRABBE K, SPIT J, NACHMAN R J, BROECK J V, 2015. Sulfakinin is an important regulator of digestive processes in the migratory locust, *Locusta migratoria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 61: 8–16.

(责任编辑:郭莹)