

DOI: 10. 11686/cyxb2024147

<http://cyxb.magtech.com.cn>

马瑞, 吴宜亭, 李岩, 等. 豌豆蚜组织蛋白酶K基因(*ApCtsk1*)的鉴定及功能研究. 草业学报, 2025, 34(2): 174—183.

MA Rui, WU Yi-ting, LI Yan, *et al.* Identification and functional analysis of *ApCtsk1* encoding cathepsin K in *Acyrtosiphon pisum*. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(2): 174—183.

豌豆蚜组织蛋白酶K基因(*ApCtsk1*)的鉴定及功能研究

马瑞, 吴宜亭, 李岩, 于展姿, 刘磊, 王森山*

(甘肃农业大学植物保护学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要:为探究豌豆蚜 *ApCtsk1* 基因的生理功能, 评估其作为豌豆蚜防治靶标的潜力, 从而为防控策略的制定提供理论依据。本研究以豌豆蚜为对象, 利用 NCBI、ExPASy Proteomics Server、MEGA 11 等在线网站和软件分析 *ApCtsk1* 的氨基酸序列特征并构建系统发育树; 采用 RT-qPCR 技术解析其在不同发育阶段、不同组织的表达模式; 通过 RNAi 研究 *ApCtsk1* 在豌豆蚜个体发育和繁殖中的生物学功能。结果表明: 豌豆蚜 *ApCtsk1* 与半翅目蚜科昆虫的半胱氨酸蛋白酶聚为一支, 其在 4 龄若蚜期显著高表达, 并在成虫腹部、卵巢、表皮表达量较高。RNAi 干扰 3 龄若蚜的 *ApCtsk1* 后, 与对照组相比, 豌豆蚜死亡率升高至 22.22%, 体长体宽分别减小 12.56%、13.22%, 体色异常, 行动缓慢。此外, 经 *dsApCtsk1* 处理的蚜虫出现蜕皮失败的致死现象, 且干扰后豌豆蚜繁殖力也受到影响, 表现为产蚜时间的推迟和一段时间产蚜量的降低。由此可见, *ApCtsk1* 在豌豆蚜个体发育、存活和繁殖过程中具有重要的作用。

关键词: 豌豆蚜; 组织蛋白酶K; 繁殖; RNAi

Identification and functional analysis of *ApCtsk1* encoding cathepsin K in *Acyrtosiphon pisum*

MA Rui, WU Yi-ting, LI Yan, YU Zhan-zi, LIU Lei, WANG Sen-shan*

College of Plant Protection, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

Abstract: The aim of this research was to explore the function of *ApCtsk1* in pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) and evaluate its potential as a target for the prevention and control of this pest. The amino acid sequence characteristics of the putative *ApCtsk1* protein were analyzed using tools at various websites (NCBI, ExPASy Proteomics Server) and a phylogenetic tree was constructed using MEGA 11. The transcript levels of its encoding gene were determined in aphids at different stages of development and in different tissues by RT-qPCR analysis. The biological function of *ApCtsk1* in the development and reproduction of *A. pisum* was investigated using an RNA interference gene knock-down strategy. In the phylogenetic analysis, *ApCtsk1* was clustered with cysteine proteases from other members of the Aphididae in the Hemiptera. High transcript levels of *ApCtsk1* were detected in fourth instar nymphs, and in the abdomen, ovary, and cuticle of adult aphids. Compared with *A. pisum* in the control group, those in the *ApCtsk1*-knockdown group showed an increased mortality rate (22.22% higher), decreased body length and body width (decreased by 12.56% and 13.22%, respectively), abnormal body color, and slower movement. In addition, the

收稿日期: 2024-04-29; 改回日期: 2024-06-17

基金项目: 甘肃省种业攻关计划项目 (GYGG-2024-7), 甘肃省自然科学基金项目 (20JR5RA028), 甘肃省高等学校创新基金项目 (2022A-060) 和甘肃农业大学公招博士科研启动项目 (GAN-KYQD-2019-28) 资助。

作者简介: 马瑞 (1999—), 女, 山东邹城人, 在读硕士。E-mail: marui19990103@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: wangsenshan@gau.edu.cn

aphids with knocked-down *ApCtsk1* showed the lethal phenomenon of molting failure, which affected their fecundity. These changes resulted in delayed reproduction and decreased reproduction over time. Our findings show that *ApCtsk1* plays an important role in the development, survival, and reproduction of *A. pisum*.

Key words: *Acyrtosiphon pisum*; cathepsin K; fecundity; RNAi

组织蛋白酶(cathepsin)是一类存在于弱酸环境(如溶酶体)中的胞内蛋白酶,因此广泛分布于细菌、病毒、植物、昆虫、哺乳动物等生物体中^[1]。它的一个重要功能是参与溶酶体中蛋白质的水解,从而参与有机体的各种生理活动^[2-3]。按照组织蛋白酶水解活性的分类标准,多数组织蛋白酶属于半胱氨酸蛋白酶,包括 cathepsin B、C、F、H、K、L、O、S、V、X 和 W,它们的共同特点是都具有一个半胱氨酸残基活性位点;少数组织蛋白酶为天冬氨酸蛋白酶(cathepsin D、E)和丝氨酸蛋白酶(cathepsin A、G)^[4-6]。值得注意的是,研究最多的组织蛋白酶是半胱氨酸蛋白酶,尤其是在哺乳动物中。半胱氨酸蛋白酶在细胞内发挥着极为重要的作用,也是在生命周期所有阶段表达的必需酶^[7]。这种蛋白水解酶的活性中心由半胱氨酸、组氨酸和天冬酰胺残基组成,具有独特的闭环形状,在生物进化过程中表现出极大的保守性。在研究昆虫的半胱氨酸蛋白酶时,主要关注的是昆虫卵发育阶段以及蜕皮、化蛹和羽化等其他发育阶段的组织重建和破坏^[8-9]。目前关于半胱氨酸蛋白酶的研究主要集中在组织蛋白酶 B 和 L^[10],而组织蛋白酶 K 在昆虫中的研究鲜有报道。

组织蛋白酶 K(cathepsin K)具有木瓜蛋白酶家族的典型结构,是木瓜蛋白酶家族重要的半胱氨酸蛋白酶,以酶原形式在核糖体中合成,通过高尔基体糖基化和磷酸化后转运至溶酶体内,进行一系列反应,形成成熟的组织蛋白酶 K,进而发挥相对应的生物学功能^[11]。组织蛋白酶 K 与组织蛋白酶 B、L 具有高度同源性,在酸性环境中具有很强的胶原酶活性,具有降解胶原的能力^[12],也是目前已知的体内蛋白水解作用最强的弹性蛋白酶。在医学方面有研究显示,CTSK 基因会在破骨细胞的边缘褶皱处特异性表达,其主要作用底物是构成骨基质 90% 以上的 I 型胶原。此外,它具有很强的胶原溶解作用,还能够降解骨基质中的 II 型胶原、骨桥接素以及骨连接素等蛋白。因此,CTSK 是破骨细胞中溶骨活性最强的关键酶^[13]。CTSK 基因的突变或缺失可能导致患者发生致密性骨质不全症、骨质疏松症和骨脆性骨折等疾病^[14],同时与骨关节炎、风湿性关节炎以及其他关节炎症也密切相关^[15]。除了骨组织外,在机体的不同细胞中均有表达,这决定着其参与机体多种生物功能。

豌豆蚜(*Acyrtosiphon pisum*)属半翅目(Hemiptera)蚜科(Aphididae),危害包括蚕豆(*Vicia faba*)、白羽扇豆(*Lupinus albus*)、紫花苜蓿(*Medicago sativa*)、扁豆(*Lens culinaris*)、鹰嘴豆(*Cicer arietinum*)和山豆(*Lathyrus sativus*)等在内的多种豆科植物^[16-18],是全球范围内重要的农业害虫。由于其寄主范围广,生命周期复杂,对不同环境条件具有适应性和灵活性^[19],使得对这种害虫的防治变得困难。豌豆蚜可直接从叶片、茎和荚果中吸取汁液来损害作物,也可以作为媒介间接传播超过 30 种植物病毒,包括黄瓜(*Cucumis sativus*)花叶病毒、甜菜(*Beta vulgaris*)黄化病毒、豌豆(*Pisum sativum*)花叶病毒和菜豆(*Phaseolus vulgaris*)卷叶病毒^[20-21]。豌豆蚜主要取食幼苗的茎、顶端嫩枝和叶柄,随着植株成熟,也会危害花和荚果,造成叶片卷曲、枯萎、营养不良等。此外,豌豆蚜在取食的同时通过刺吸式口器刺破细胞并注入对植物有毒性的唾液,导致植物受损严重^[22]。不仅如此,豌豆蚜分泌的蜜露会诱发霉菌的产生,从而影响寄主植物的光合作用^[23]。据报道,豌豆蚜的为害曾使得印度豌豆产量损失高达 35.7%^[24]。因此,豌豆蚜的防治对农业生产至关重要。为了减轻豌豆蚜对作物的危害,保障农业生产的稳定和可持续发展,研究人员需要开发有效的防治措施,例如采用生物治理、化学防治和培育抗性品种等方法。

众多研究已经证实,组织蛋白酶在昆虫的消化过程^[25]、生长发育^[26]、组织分化^[27]以及变态过程^[28]中扮演着关键角色,因此它们被认为是控制害虫的潜在靶标。在蚜虫中的半胱氨酸蛋白酶,如组织蛋白酶 L 和组织蛋白酶 B,在肠道中的表达量较高^[29-32],这表明它们可能在植物韧皮部蛋白质的降解和吸收过程中发挥作用。在人工饲料中添加特定的组织蛋白酶 L dsRNA 来饲喂豌豆蚜,可以实现对该基因在肠道中的特异性沉默,从而验证了 RNAi 技术在昆虫基因调控中的有效性^[33]。此外,RNAi 介导的组织蛋白酶 B 基因沉默,可以通过寄主植物特异性的方式抑制桃蚜的生长^[34]。本研究从豌豆蚜基因组中筛选出一个组织蛋白酶 K 基因(*ApCtsk1*),分析 *ApCtsk1* 的氨基酸序列结构域特征并构建系统发育树;其次,解析 *ApCtsk1* 在不同组织和发育阶段的表达模式;最后,基于

RNAi技术,利用膜取食系统将dsRNA递送至豌豆蚜体内,研究*ApCtsk1*在豌豆蚜个体发育和繁殖中的生物学功能。研究结果为RNA干扰技术筛选防治害虫新的靶标基因提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

本研究中的参试豌豆蚜由甘肃农业大学植物保护学院害虫综合防治实验室提供;挑取单头豌豆蚜置于蚕豆幼苗上饲养并建立种群,豌豆蚜与蚕豆植株置于人工气候箱[温度:(20±1)℃,相对湿度:70%±5%,光周期:16 h光照/8 h黑暗]饲养。

1.2 研究方法

1.2.1 组织蛋白酶K基因的鉴定与分析 从豌豆蚜基因组中筛选出组织蛋白酶K(*ApCtsk1*)基因,NCBI下载*ApCtsk1*基因的碱基序列和氨基酸序列(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。利用ExPASy Proteomics Server(<https://web.expasy.org/protparam/>)计算*ApCtsk1*基因的多个物理和化学参数(氨基酸数量、分子量及理论等电点);应用在线网站SOPMA(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa%20sopma.html)对蛋白质的二级结构进行预测;在NCBI中使用Domain & Structures的CDD工具(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>)预测蛋白质的保守结构域;通过SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/expasy.org>)的同源建模法^[35]对组织蛋白酶B蛋白三维结构进行预测;从NCBI数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)下载麦无网长管蚜(*Metopolophium dirhodum*)、马铃薯长管蚜(*Macrosiphum euphorbiae*)、桃蚜(*Myzus persicae*)等11种昆虫的组织蛋白酶基因的蛋白序列,利用MEGA 11软件中的邻接法^[36]构建系统进化树,各分支的置信度经bootstrap法^[36]进行1000次循环检验。

1.2.2 豌豆蚜不同组织、不同龄期*ApCtsk1*基因的表达模式分析 试验于2022年7月—2023年3月在甘肃农业大学植物保护学院的害虫综合防治实验室进行。

不同发育阶段的样品收集:分别收集在蚕豆叶片上饲养的不同龄期(1~4龄,成虫)的豌豆蚜各20、15、10、5头。样品经液氮冷冻后置于-80℃冰箱供试,每组处理设置4次重复。

不同组织的样品收集:将豌豆蚜饲养至成虫后,置于冰上解剖。分别收集50头豌豆蚜的头、胸、腹、中肠、卵巢、表皮组织,经液氮冷冻后保存至-80℃冰箱供试。每组处理设置4次重复。

利用Trizol试剂法^[37]提取豌豆蚜不同龄期、不同组织的RNA。使用NanoPhotometer NP80 Touch(IMPLEN GMBH,德国)对RNA的完整性、纯度和浓度进行了评估。采用TaKaRa反转录试剂盒(PrimeScript™ RT reagent kit with gDNA Eraser)去除gDNA并合成cDNA第一条链。

以上述合成的cDNA为模板,根据豌豆蚜*ApCtsk1*(登录号:NM_001135939.1)的CDS序列,利用Primer Premier 3(<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>)设计RT-qPCR引物(表1)。豌豆蚜的*EF1α*(GenBank登录号:AY219737.1)和*RPL7*(GenBank登录号:NM_001135898.1)为内参基因。

使用NovoStart® SYBR qPCR SuperMix Plus试剂盒(Novoprotein,中国)进行RT-qPCR检测。PCR反应体系(10 μL):2×NovoStart® SYBR qPCR SuperMix Plus 5.0 μL,正反向引物(10 μmol·L⁻¹)各0.5 μL,cDNA 0.5 μL,RNase-Free water 3.3 μL。PCR反应条件:95℃ 2 min,95℃ 15 s,60℃ 30 s,40个循环。溶解曲线温度为65~95℃。每个处理进行4次生物学重复,采用相对定量2^{-ΔΔCt}法^[38]计算目标基因的相对表达量。

表1 豌豆蚜*ApCtsk1*基因qPCR的引物序列

Table 1 Primer sequence of qPCR for *ApCtsk1* gene of *A. pisum*

基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	产物大小 Product size (bp)	扩增效率 Amplification efficiency (%)
<i>EF1α</i>	CTGTGCTTATTGTCGCTGCT TCGCTGTATGGTGGTTCAGT	157	108.25
<i>RPL7</i>	TTGAAGAGCGTAAGGGAAGCTG TATTGGTGATTGGAATGCGTTG	76	97.89
<i>ApCtsk1</i>	ACTGGTACCATCGAAGGAGC GCCATGCTTCTCAATCCAAGA	153	101.71

1.2.3 豌豆蚜 *ApCtsk1* 的 RNAi 以 cDNA 为模板,基于豌豆蚜 *ApCtsk1* 的序列,利用在线工具 Primer Premier 3([http://bioinfo. ut. ee/primer3/](http://bioinfo.ut.ee/primer3/))设计合成 dsRNA 的引物(表 2),通过 PCR 扩增目的干扰片段,利用天根 DP219-02 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒对所得 PCR 产物回收,并连接转化,验证菌液 PCR,验证无误后利用天根公司质粒抽提试剂盒回收质粒,以获得的高浓度 DNA 为模板,利用 Transcript Aid T7 High Yield Transcription Kit 试剂盒进行 dsRNA 合成,将所得的 dsRNA 置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

表 2 dsRNA 引物

Table 2 dsRNA primers

基因 Gene	引物方向 Primer direction (5'-3')	核苷酸序列 Nucleotide sequence (5'-3')	产物长度 Product size (bp)
<i>dsGFP</i>	上游 Forward	TAATACGACTCACTATAGGGCAGTTCTTGTTGAATTAGATG	436
	下游 Reverse	TAATACGACTCACTATAGGGTTTGGTTTGTCTCCCATGATG	
<i>dsApCtsk1</i>	上游 Forward	TAATACGACTCACTATAGGGTGAATCTTTCCTGGACCTGG	541
	下游 Reverse	TAATACGACTCACTATAGGGATTGCCAAAACCCCAACTGC	

采用双层泊拉膜固定蔗糖溶液(20%~35%)+dsRNA($500\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)的方法递送。膜取食系统所需要的实验材料均提前在紫外灯(HCB-900V,中国)下灭菌处理,制作过程在超净工作台中进行。首先将饥饿处理 12 h 的 3 龄豌豆蚜若虫转移至一端由 Parafilm 膜封口的短玻管(直径:2.5 cm,高度:3 cm)中,另一端封口后取 100 μL 饲料点在一端的 Parafilm 膜中央,另取一层 Parafilm 膜固定,使人工饲料均匀平铺在两膜之间(24 h 后更换饲料)。倒置 30 s,待蚜虫固定取食后正置在短玻管架上,盖上黄纸片,置于培养箱中培养。以 *dsGFP* 为对照,共设 2 组处理,每组处理进行 4 次生物学重复,每次重复 30 头蚜虫。

在干扰过程中,每 12 h 统计豌豆蚜的死亡数量。待蚜虫取食 dsRNA 48 h 后,分别收集每组处理中每次重复的 10 头若蚜作为样本,经液氮冷冻后保存至 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱供试。提取样本总 RNA,RT-qPCR 检测靶标基因的表达量,并计算沉默效率,公式为:沉默效率(%)=(1-*dsApCtsk1* 处理的 *ApCtsk1* 相对表达量) $\times 100$,基因的沉默效率与基因的相对表达量直接相关。当基因的沉默效率高时,意味着目标基因的表达量被显著抑制,因此其相对表达量会降低。反之,当基因的沉默效率低时,目标基因的表达量抑制不明显,其相对表达量则相对较高。为观察取食 dsRNA 对蚜虫生长表型的影响,随机挑选每组处理中每次重复的不同样本置于体视显微镜(SZX2-ILLTQ,中国)下观察拍照记录表型,并测量体长体宽等参数指标。经 dsRNA 处理后的若蚜置于培养皿中单头饲养,同样设 2 组处理,每组处理重复 8 次。每隔 12 h 观察一次,连续观察 7 d,记录成蚜平均产蚜数。

1.3 数据分析

使用 Microsoft Excel 2019、SPSS 23.0 软件进行数据整理和统计分析,显著性检验采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行多重比较,以 $P<0.05$ 作为差异显著性标准;使用 Origin 2018 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 豌豆蚜 *ApCtsk1* 基因的鉴定及生物信息学分析

基于豌豆蚜的基因组数据库,本研究筛选出豌豆蚜组织蛋白酶 K 基因 *ApCtsk1*(登录号:NM_001135939.1),利用 ExPASy Proteomics Server 分析发现 *ApCtsk1* 编码的氨基酸长度为 558 aa,蛋白质分子量为 63.5 kDa,理论等电点为 5.51,属于酸性蛋白质。随后,对 *ApCtsk1* 编码的蛋白二级结构预测发现其主要由 α 螺旋、 β 折叠、无规则卷曲以及延伸链组成。其中无规则卷曲在二级结构中含量占比最高, β 折叠在二级结构中的含量占比最低(图 1a)。利用 SWISS-MODEL 在线网站对组织蛋白酶 B 蛋白的三级结构进行预测发现,*ApCtsk1* 编码的氨基酸与模型数据库中高粱蚜 *cfaD_1* 编码的序列同源性为 91.04%(图 1b)。采用 SMART 软件对豌豆蚜 *ApCtsk1* 蛋白结构域进行分析,结果如图所示(图 1c),其蛋白结构不具有跨膜结构域,但含有木瓜蛋白酶家族半胱氨酸蛋白酶

Pept_C1保守结构域(339~557 aa),这表明筛选得到的目的蛋白序列为豌豆蚜半胱氨酸蛋白酶序列,有着较高的保守性。值得注意的是,*ApCtsk1*还具有一个组织蛋白酶前体抑制结构域 I29(252~309 aa),此结构域位于一些 C1 肽酶的 N-末端,如 Cathepsin L,起着前体肽的作用。系统进化树分析发现,麦无网长管蚜消化型半胱氨酸蛋白酶 3-like、马铃薯长管蚜未命名蛋白产物和豌豆蚜组织蛋白酶 K 聚为一个分支,说明豌豆蚜 *ApCtsk1* 与同属的麦无网长管蚜和马铃薯长管蚜亲缘关系较近(图 2)。

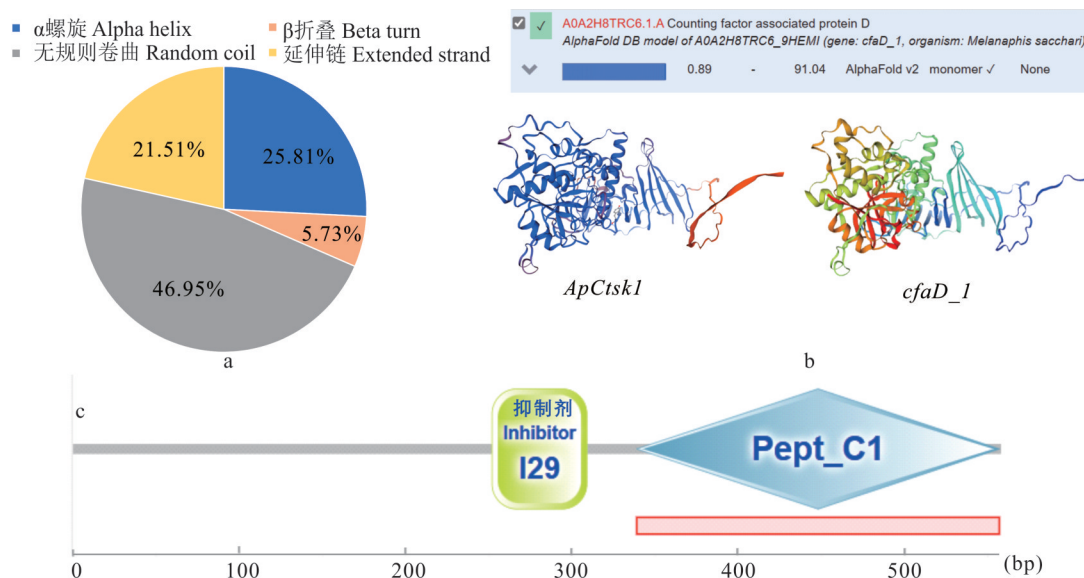


图 1 豌豆蚜 *ApCtsk1* 蛋白的二级结构、三级结构、结构域预测

Fig. 1 Prediction of secondary structure, tertiary structure and domain of *ApCtsk1* protein in *A. pisum*

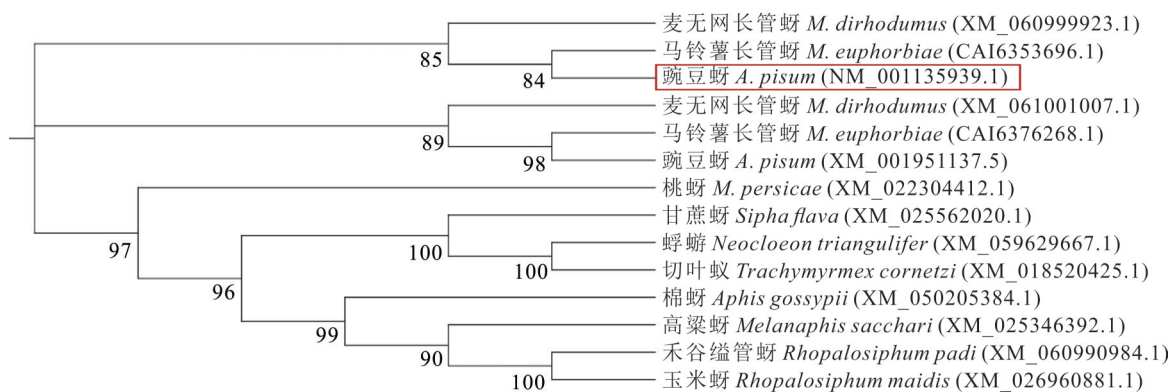


图 2 豌豆蚜组织蛋白酶 K 的系统发育分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of cathepsin K protein in *A. pisum*

2.2 豌豆蚜 *ApCtsk1* 基因的时空表达分析

豌豆蚜 *ApCtsk1* 基因在不同发育阶段的表达模式如图 3A 所示,其在各个发育时期均检测到表达量,且在 4 龄若蚜期显著高表达;豌豆蚜 *ApCtsk1* 基因在不同组织中的表达模式如图 3B 所示,其不同组织中均检测到表达量,值得注意的是其在腹部、卵巢、表皮显著高表达($P < 0.05$)。

2.3 豌豆蚜 *ApCtsk1* 基因的功能验证

对豌豆蚜 3 龄若蚜 *ApCtsk1* 基因进行干扰。结果如图 4A 所示,在干扰 48 h 后, *ApCtsk1* 的表达量与 *dsGFP* 对照组相比显著降低。沉默效率达 82.5%, $(1 - 0.175) \times 100\% = 82.5\%$, 0.175 即图 4A RNAi 后 *ApCtsk1* 的相对表达量。结果证明对此基因的干扰可以有效地抑制其在豌豆蚜体内的表达。

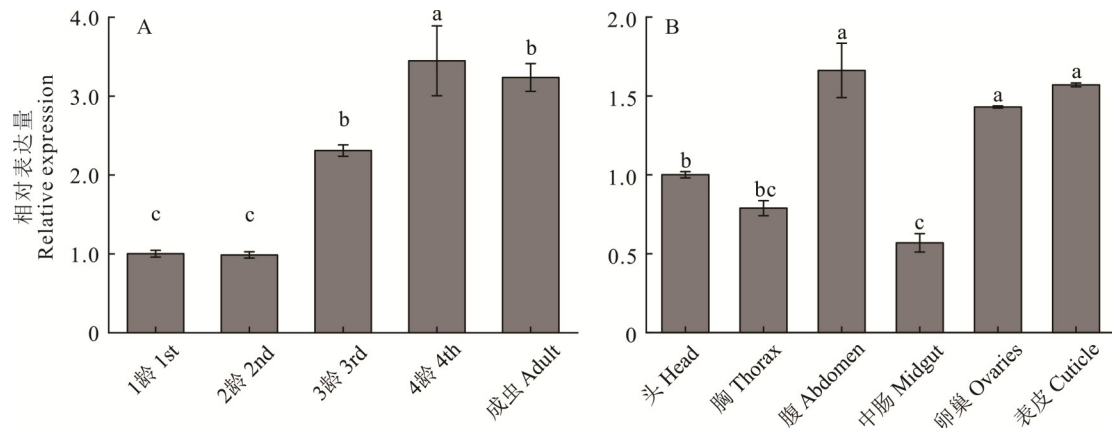


图 3 豌豆蚜不同发育阶段、不同组织的 *ApCtsk1* 表达量

Fig. 3 The expression of *ApCtsk1* in different developmental stages and different tissues of *A. pisum*

A: *ApCtsk1* 在豌豆蚜不同龄期的表达量; B: *ApCtsk1* 在豌豆蚜成蚜不同组织的表达量; 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。A: The expression level of *ApCtsk1* in different instars of *A. pisum*; B: The expression level of *ApCtsk1* in different tissues of adult *A. pisum*; Different letters indicate significant differences at the 0.05 level.

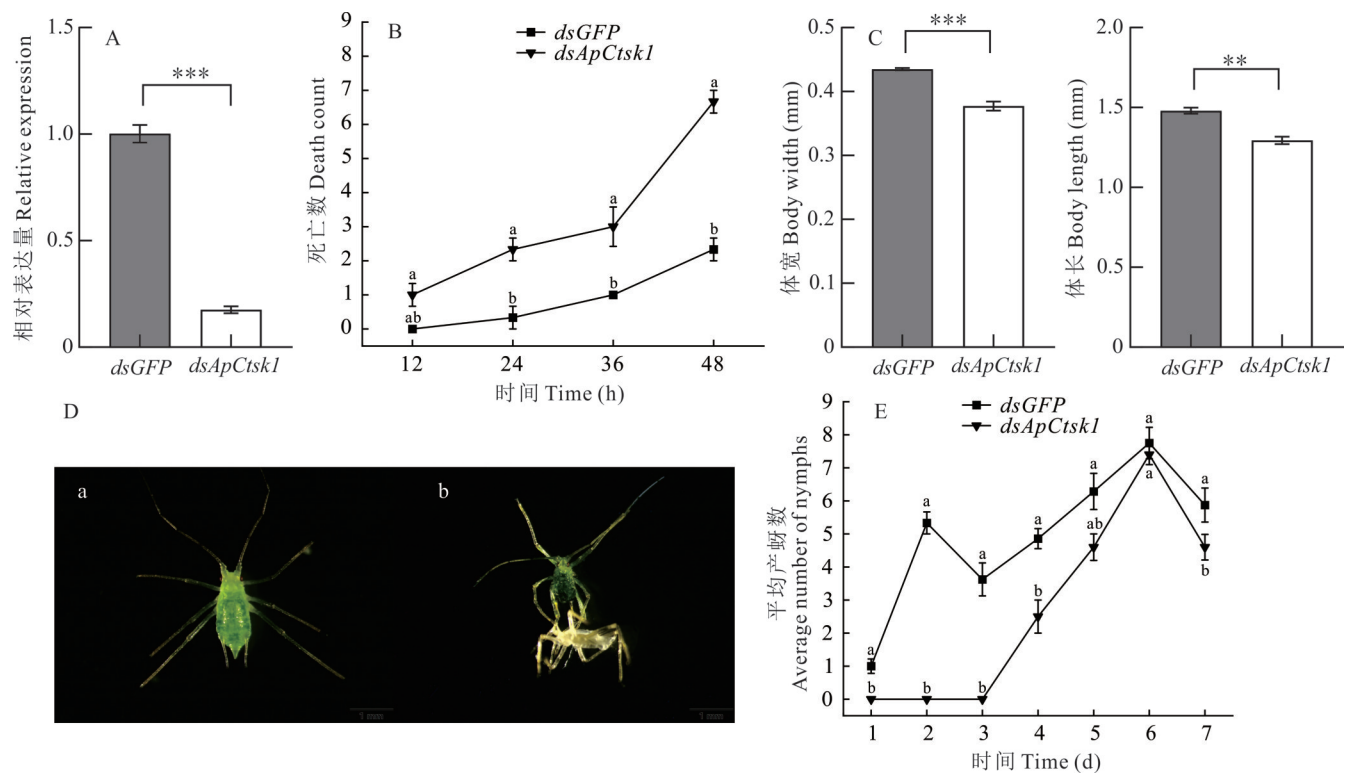


图 4 RNAi *ApCtsk1* 处理后对豌豆蚜的影响

Fig. 4 The effect of RNAi *ApCtsk1* on *A. pisum*

A: 豌豆蚜 *ApCtsk1* 的沉默效率; B: RNAi *ApCtsk1* 对豌豆蚜死亡数的影响; C: RNAi *ApCtsk1* 对豌豆蚜体长、体宽的影响; D: RNAi *ApCtsk1* 处理后豌豆蚜出现的致死表型, a 经 *dsGFP* 处理, b 经 *dsApCtsk1* 处理; E: RNAi *ApCtsk1* 对豌豆蚜单日平均产蚜力的影响。相对表达量和体长体宽采用独立样本 *T* 检验进行差异显著性分析, * 表示显著差异 ($P < 0.05$), ** 表示极显著差异 ($P < 0.01$), *** 表示极其显著差异 ($P < 0.001$)。死亡数和平均产蚜数采用单因素方差分析, 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。A: The silencing efficiency of *ApCtsk1*; B: The effect of RNAi *ApCtsk1* on the death count of *A. pisum*; C: The effect of RNAi *ApCtsk1* on the body length and body width of *A. pisum*; D: The lethal phenotype of *A. pisum* after RNAi *ApCtsk1*, a, treated with *dsGFP*, b, treated with *dsApCtsk1*; E: Effects of RNAi *ApCtsk1* on the average daily fecundity of *A. pisum*. The relative expression and body length and body width were analyzed by independent sample *T*-test, * represents significant difference ($P < 0.05$), ** represents extremely significant difference ($P < 0.01$), *** represents extremely significant difference ($P < 0.001$). The number of deaths and the average number of aphids were analyzed by one-way analysis of variance, and different letters indicated significant differences ($P < 0.05$).

如图4B所示,与对照组相比,*dsApCtsk1*处理过的豌豆蚜累计死亡数逐渐升高且最终显著高于对照组。经*dsApCtsk1*处理的3龄若蚜在各时间点的死亡率分别是3.33%(12 h)、7.78%(24 h)、10.00%(36 h)、22.22%(48 h)。这些结果表明,注射*dsApCtsk1*的豌豆蚜若虫体内基因的表达被抑制,并且导致死亡率显著增加。

如图4C所示,3龄若蚜经过*dsApCtsk1*处理48 h后的体长、体宽均显著小于*dsGFP*对照组。具体来说,经过*dsGFP*处理的豌豆蚜体长平均值为 (1.479 ± 0.038) mm,与之相比,经*dsApCtsk1*处理的豌豆蚜体长缩短12.56%;而经过*dsGFP*处理的豌豆蚜体宽平均值为 (0.435 ± 0.004) mm,对应的体宽缩短13.22%。这些结果表明,*dsApCtsk1*处理对豌豆蚜的形态大小产生了显著的抑制效果。

如图4D所示,干扰3龄若蚜*ApCtsk1*基因24 h时均未观察到蜕皮异常现象。*dsRNA*处理48 h后,蚜虫出现体型变小、体色异常、行动迟缓的共同现象,这与对照组明显不同。干扰后,对照组*dsGFP*处理的豌豆蚜能顺利地蜕去躯干表皮,头、胸及腹部均可蜕皮而出,且体色正常,腹部圆润饱满。然而,*dsApCtsk1*处理的蚜虫从后足表现出蜕皮困难,旧表皮缠绕在后足上,使其行走不便,最终导致死亡。

豌豆蚜取食了*dsApCtsk1*后,将其转移至蚕豆叶片单头饲养,每天统计产蚜数。统计发现,经处理的豌豆蚜繁殖力受到一定的影响,它们的产蚜时间延迟,产蚜量减少(图4E)。从开始产蚜起,在1~7 d之间,对照组和处理组的雌蚜单日平均产蚜数大致呈先上升后下降的趋势。在1~4 d之间,*dsGFP*组成蚜的单日平均产蚜量显著高于*dsApCtsk1*组的成蚜,而在5~7 d期间,*dsApCtsk1*处理的豌豆蚜产蚜量有所回升与对照组趋于一致。结果表明,*dsApCtsk1*影响了豌豆蚜的繁殖过程。

3 讨论

作为世界范围内重要的农业害虫,豌豆蚜对农作物的质量和产量构成了严重威胁,因此开发新的策略防治豌豆蚜以减少杀虫剂的使用将是未来农业发展的重要选择之一。研究表明,组织蛋白酶在昆虫的生长发育、消化生长和繁殖等生命过程中发挥着不可或缺的作用^[30,39-42]。本研究以豌豆蚜为对象,探究*ApCtsk1*在豌豆蚜体内的功能,系统发育树分析发现,豌豆蚜*ApCtsk1*与半翅目蚜科昆虫的半胱氨酸蛋白酶聚为一支,说明它们在进化关系上同源关系更近。作为蚜虫体内一类重要的水解酶,研究该基因的功能,既可以了解其在豌豆蚜体内的功能,又可以为RNA干扰技术筛选防治害虫新的靶标基因提供理论依据。本研究对*ApCtsk1*在豌豆蚜不同龄期的转录水平分析发现,其表达大致为先上升后下降的趋势。棉蚜组织蛋白酶基因*AgCb-2*、*AgCb-4*在不同发育阶段的表达量也呈现先升高再下降的趋势^[43]。研究发现,组织蛋白酶K在赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)的肠道中并不表达,而在胚胎中高表达^[44]。柞蚕(*Antheraea pernyi*)蛹期的卵巢中组织蛋白酶B的活性在卵巢整个发育过程中呈递增趋势,在化蛹第10天达到峰值,并在卵中也检测到组织蛋白酶B的存在,推测组织蛋白酶B可能在柞蚕卵巢发育过程中起到分解卵黄蛋白的作用^[45]。而本研究*ApCtsk1*在豌豆蚜腹部、卵巢、表皮的显著高表达,暗示其极有可能参与豌豆蚜的个体发育和繁殖过程。通过对经*dsApCtsk1*处理3龄若蚜的表达水平进行定量检测发现,若蚜体内*ApCtsk1*的表达水平受到明显抑制,表明RNA干扰技术对昆虫靶标基因的特异性干扰效果明显。*dsApCtsk1*处理后,豌豆蚜的累计死亡率逐渐升高并最终显著高于对照组。在甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)的研究中,5龄幼虫经*dsRNA-SeCath-D*处理后化蛹出现异常且死亡率达25%^[46]。刘金萍^[47]在对棉蚜的*ApCathB01*基因干扰后发现,蚜虫在29℃条件下的存活率显著下降。*dsApCtsk1*处理后,豌豆蚜的体长和体宽明显受到抑制,不仅如此,豌豆蚜还出现了蜕皮异常和致死现象。在对赤拟谷盗的*TccatL13*进行干扰后也发现成熟的子一代幼虫表现出体长和体宽急剧下降的表型,随后将产卵量统计试验与后代生长发育数据相结合发现*TccatL13*可促进肠道食物营养的水解从而影响幼虫的生长发育^[48]。Rauf等^[49]通过植物介导的RNA干扰沉默*MpCath-L*基因时,桃蚜成虫的死亡率显著上升到80%。与此同时,其繁殖力也出现了明显的下降,若虫发育出现延迟。经*dsApCtsk1*处理后的豌豆蚜繁殖能力也受到一定影响,表现为产蚜时间推迟和一段时间内产蚜量的减少。组织蛋白酶影响着生物体的潜在繁殖力,这些酶在卵巢中的激活过程看起来非常复杂,它们会受到包括性激素在内的多种不同因素的调节,但任何组织蛋白酶活性水平的改变都可能导致对生殖的不利^[50]。综上所述,豌豆蚜*ApCtsk1*基因在其发育、存活与繁殖过程中发挥重要的作用。

4 结论

本研究筛选得到豌豆蚜组织蛋白酶K基因(*ApCtsk1*),并对其进行生物信息学分析。同时解析了*ApCtsk1*在豌豆蚜不同发育阶段以及不同组织的特异性表达,功能验证揭示了*ApCtsk1*在豌豆蚜个体发育、存活和繁殖过程中存在重要的作用。研究结果为深入理解昆虫组织蛋白酶K基因功能、聚焦害虫防控靶标研发提供了重要参考和理论基础。

参考文献 References:

- [1] Mort J S, Buttle D J. Cathepsin B. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 1997, 29(5): 715—720.
- [2] Barros N M T, Puzer L, Tersariol I L, *et al.* Plasma prekallikrein/kallikrein processing by lysosomal cysteine proteases. Biological Chemistry, 2004, 385(11): 1087—1091.
- [3] Lang T, Willinger U, Holzer G, *et al.* Soluble cathepsin-L: A marker of bone resorption and bone density. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 2004, 144(3): 163—166.
- [4] Lu S Y, Ren H L, Liu Z S, *et al.* The progress of study on the cathepsin B. Journal of Hebei Normal University (Natural Science Edition), 2004, 28(3): 306—309.
卢士英,任洪林,柳增善,等. 组织蛋白酶B研究进展. 河北师范大学学报(自然科学版), 2004, 28(3): 306—309.
- [5] Chen L, Zhang M, Sun L, *et al.* Identification and expressional analysis of two cathepsins from half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). Fish & Shellfish Immunology, 2011, 31(6): 1270—1277.
- [6] Pan G Z. Identification and functional analysis of *Cathepsin L* in silkworm (*Bombyx mori*). Chongqing: Southwest University, 2018.
潘光照. 家蚕 *Cathepsin L* 的鉴定及功能初探. 重庆: 西南大学, 2018.
- [7] Dalton J P, Neill S O, Stack C, *et al.* Fasciola hepatica cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. International Journal for Parasitology, 2003, 33(11): 1173—1181.
- [8] Liu J, Shi G P, Zhang W Q, *et al.* Cathepsin L function in insect moulting: molecular cloning and functional analysis in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. Insect Molecular Biology, 2006, 15(6): 823—834.
- [9] Wang L F, Chai L Q, He H J, *et al.* A cathepsin L-like proteinase is involved in moulting and metamorphosis in *Helicoverpa armigera*. Insect Molecular Biology, 2010, 19(1): 99—111.
- [10] Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, *et al.* Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Proteins and Proteomics, 2012, 1824(1): 68—88.
- [11] Patil A D, Freyer A J, Carte B, *et al.* Haploscleridamine, a novel tryptamine-derived alkaloid from a sponge of the order Haplosclerida: an inhibitor of cathepsin K. Journal of Natural Products, 2002, 65(4): 628—629.
- [12] Lecaille F, Kaleta J, Brömme D, *et al.* Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. Chemical Reviews, 2002, 102(12): 4459—4488.
- [13] He W T, Liu K, Sun J X, *et al.* Research advance of cathepsin K and the treatment of osteoporosis. Chinese Journal of Osteoporosis, 2008, 14(9): 670—673.
何伟涛,刘康,孙金谔,等. 组织蛋白酶K与骨质疏松症治疗的研究进展. 中国骨质疏松杂志, 2008, 14(9): 670—673.
- [14] Costa A G, Cusano N E, Silva B C, *et al.* Cathepsin K: its skeletal actions and role as a therapeutic target in osteoporosis. Nature Reviews Rheumatology, 2011, 7(8): 447—456.
- [15] Novinec M, Lenarčič B. Cathepsin K: a unique collagenolytic cysteine peptidase. Biological Chemistry, 2013, 394(9): 1163—1179.
- [16] Tesfaye A, Wale M, Azerefege F, *et al.* *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Homoptera: Aphididae) feeding preference and performance on cool-season food legumes in northwestern Ethiopia. International Journal of Pest Management, 2013, 59(4): 319—328.
- [17] Soleimani S, Madadi H. Seasonal dynamics of: the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris), its natural enemies the seven spotted lady beetle *Coccinella septempunctata* Linnaeus and variegated lady beetle *Hippodamia variegata* Goeze, and their parasitoid *Dinocampus coccinellae* (Schränk). Journal of Plant Protection Research, 2015, 55(4): 421—428.
- [18] Aznar Fernández T, Cimmino A, Masi M, *et al.* Antifeedant activity of long-chain alcohols, and fungal and plant metabolites against pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) as potential biocontrol strategy. Natural Product Research, 2018, 33(17): 2471—2479.

- [19] Srinivasan D G, Abdelhady A, Stern D L, *et al.* Gene expression analysis of parthenogenetic embryonic development of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, suggests that aphid parthenogenesis evolved from meiotic oogenesis. *PLoS One*, 2014, 9(12): e115099.
- [20] Paudel S, Bechinski E J, Stokes B S, *et al.* Deriving economic models for pea aphid (Hemiptera: Aphididae) as a direct-pest and a virus-vector on commercial lentils. *Journal of Economic Entomology*, 2018, 111(5): 2225–2232.
- [21] Rashed A, Feng X, Sean M, *et al.* Vector-borne viruses of pulse crops, with a particular emphasis on north American cropping system. *Annals of the Entomological Society of America*, 2018, 111(4): 205–227.
- [22] Wang D, Deng J, Pei Y F, *et al.* Identification and virulence characterization of entomopathogenic fungus *Lecanicillium attenuatum* against the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae). *Applied Entomology and Zoology*, 2017, 52(3): 511–518.
- [23] Lu W N, Kuo M H. Life table and heat tolerance of *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae) in subtropical Taiwan. *Entomological Science*, 2008, 11(3): 273–279.
- [24] Bhatnagar A. Efficacy and economics of some insecticides and a neem formulation on incidence of pea aphid (*Acyrtosiphum pisum*) on pea, *Pisum sativum*. *Annals of Plant Protection Sciences*, 1996, 4(2): 131–133.
- [25] Saikhedkar N, Summanwar A, Joshi R, *et al.* Cathepsins of Lepidopteran insects: Aspects and prospects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2015, 64(2015): 51–59.
- [26] Cheng X A, Lin X W, Jiang X H, *et al.* cDNA cloning, prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of cathepsin L in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 2018, 61(4): 410–422.
程杏安, 林贤伟, 蒋旭红, 等. 草地贪夜蛾组织蛋白酶L的基因克隆、原核表达及多克隆抗体制备. *昆虫学报*, 2018, 61(4): 410–422.
- [27] Yang K M, Bae E, Ahn S G, *et al.* Co-chaperone BAG₂ determines the pro-oncogenic role of cathepsin B in triple-negative breast cancer cells. *Cell Reports*, 2017, 21(10): 2952–2964.
- [28] Pym A, Singh K S, Nordgren Å, *et al.* Host plant adaptation in the polyphagous whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*, is associated with transcriptional plasticity and altered sensitivity to insecticides. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 996.
- [29] Pyati P, Bandani A R, Fitches E, *et al.* Protein digestion in cereal aphids (*Sitobion avenae*) as a target for plant defence by endogenous proteinase inhibitors. *Journal of Insect Physiology*, 2011, 57(7): 881–891.
- [30] Cristofolletti P T, Ribeiro A F, Deraison C, *et al.* Midgut adaptation and digestive enzyme distribution in a phloem feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of Insect Physiology*, 2003, 49(1): 11–24.
- [31] Ramsey J S, Wilson A C C, de Vos M, *et al.* Genomic resources for *Myzus persicae*: EST sequencing, SNP identification, and microarray design. *BMC Genomics*, 2007, 8(1): 423–450.
- [32] Deraison C, Darboux I, Duportets L, *et al.* Cloning and characterization of a gut-specific cathepsin L from the aphid *Aphis gossypii*. *Insect Molecular Biology*, 2004, 13(2): 165–177.
- [33] Sapountzis P, Duport G, Balmand S, *et al.* New insight into the RNA interference response against cathepsin-L gene in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*: Molting or gut phenotypes specifically induced by injection or feeding treatments. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 51(2014): 20–32.
- [34] Mathers T C, Chen Y, Kaithakottil G, *et al.* Rapid transcriptional plasticity of duplicated gene clusters enables a clonally reproducing aphid to colonise diverse plant species. *Genome Biology*, 2017, 18(1): 27–47.
- [35] Waterhouse A, Bertoni M. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(W1): W296–W303.
- [36] Nikmanesh A, Esmailzadeh A. Comparison of genetic diversity and phylogenetic structure of *BRCA1* gene of some domestic and wild sheep breeds in different countries. *Animal Biotechnology*, 2023, 34(9): 4746–4759.
- [37] Rio D C, Ares M. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010, 2010(6): 5439–5442.
- [38] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [39] Liu J. Physiology function analysis of lysosomal cysteine proteases. Hefei: University of Science and Technology of China, 2006.
刘健. 溶酶体半胱氨酸蛋白酶生理功能的研究. 合肥: 中国科学技术大学, 2006.
- [40] Cai X Y, Yu J, Yu H Y, *et al.* Core promoter regulates the expression of cathepsin B gene in the fat body of *Bombyx mori*.

- Gene, 2014, 542(2): 232–239.
- [41] Guo S Y, Wu W M, Li S Y, *et al.* 20-hydroxyecdysone-upregulated proteases involved in *Bombyx* larval fat body destruction. *Insect Molecular Biology*, 2018, 27(6): 724–738.
- [42] Liao J Y. The mechanism of cathepsin affects the transmission of tomato chlorosis virus by Q *Bemisia tabaci*. Changsha: Hunan University, 2020.
廖锦钰. 组织蛋白酶影响Q烟粉虱传播番茄褪绿病毒的机制. 长沙: 湖南大学, 2020.
- [43] Liu W J, Zhang X L, Gao X K, *et al.* Clone and expression analysis of five cathepsin B genes in different host-specific types of *Aphis gossypii* Glover. *Journal of Environmental Entomology*, 2022, 44(4): 946–955.
刘伟娇, 张肖丽, 高雪珂, 等. 5个棉蚜组织蛋白酶B基因克隆及在不同寄主专化型中的表达分析. *环境昆虫学报*, 2022, 44(4): 946–955.
- [44] Martynov A G, Elpidina E N, Perkin L, *et al.* Functional analysis of C1 family cysteine peptidases in the larval gut of *Tenebrio molitor* and *Tribolium castaneum*. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 75.
- [45] Zhao X, Wang J, Yagi N, *et al.* Occurrence of a cathepsin B-like acid cysteine proteinase in the eggs of silkworm moth, *Antheraea pernyi*. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry and Molecular Biology*, 1996, 113(1): 95–103.
- [46] Kang T, Jin R, Zhang Y, *et al.* Functional characterization of the aspartic proteinase cathepsin D in the beet armyworm (*Spodoptera exigua*). *Gene*, 2017, 617: 1–7.
- [47] Liu J P. The response of *Aphis gossypii* and *Acyrtosiphon gossypii* from Xinjiang cotton-growing region to heat stress and its molecular mechanism. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2021.
刘金萍. 新疆棉区棉蚜和棉长管蚜对高温胁迫的响应及分子机制. 北京: 中国农业科学院, 2021.
- [48] Wei L T. Expression characteristics and RNAi effect analysis of four cysteine protease genes *TccatB25*, *TccatL11*, *TccatL13* and *TcPigk* in *Tribolium castaneum*. Nanjing: Nanjing Normal University, 2019.
魏璐婷. 赤拟谷盗四个半胱氨酸蛋白酶基因 *TccatB25*、*TccatL11*、*TccatL13* 和 *TcPigk* 的表达特性与RNAi效应分析. 南京: 南京师范大学, 2019.
- [49] Rauf I, Asif M, Amin I, *et al.* Silencing cathepsin L expression reduces *Myzus persicae* protein content and the nutritional value as prey for *Coccinella septempunctata*. *Insect Molecular Biology*, 2019, 28(6): 785–797.
- [50] Carnevali O, Cionna C, Tosti L, *et al.* Role of cathepsins in ovarian follicle growth and maturation. *General and Comparative Endocrinology*, 2006, 146(3): 195–203.