

星豹蛛NPC2基因家族克隆及表达模式分析



赵萌萌 焦丽亚琳 牛越 王美 张晓晨 李锐*

(山西农业大学植物保护学院, 太谷 030801)

摘要: 为探究气味载体蛋白——尼曼匹克C2型蛋白(Niemann-Pick type C2 protein, NPC2)在星豹蛛 *Pardosa astrigera* 体内的功能, 从星豹蛛体内筛选鉴定出 *PaNPC2-1* 和 *PaNPC2-2* 基因并采用反转录聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)技术进行基因克隆, 利用实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, RT-qPCR)技术对星豹蛛不同组织、不同发育期 *PaNPC2-1* 和 *PaNPC2-2* 基因的表达模式进行分析。结果显示, *PaNPC2-1* 和 *PaNPC2-2* 开放阅读框长度分别为 441 bp 和 492 bp, 编码 146 个和 163 个氨基酸。序列分析显示, 2 个 *PaNPC2* 基因具有 NPC2 基因家族的典型特征, 且具有 6 个保守的半胱氨酸位点。组织表达谱结果显示, *PaNPC2-1* 在雌成蛛触肢以及雄成蛛螯肢中的表达量最高, *PaNPC2-2* 在雌成蛛躯干的表达量显著高于雌成蛛的其他组织; 发育期表达谱结果显示, *PaNPC2-1* 在 6 龄幼蛛期的表达量最高, *PaNPC2-2* 在成蛛期的表达量最高。推测 *PaNPC2-1* 可能参与星豹蛛的化学通信, 而 *PaNPC2-2* 则行使着不同于化学通信的其他功能。

关键词: 星豹蛛; NPC2 蛋白; 基因克隆; 表达分析; 化学通信

Cloning and expression pattern analysis of NPC2 gene family in a wolf spider *Pardosa astrigera* (Araneae: Lycosidae)

Zhao Mengmeng Jiao Liyalin Niu Yue Wang Mei Zhang Xiaochen Li Rui*

(College of Plant Protection, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi Province, China)

Abstract: To investigate the function of the odor-carrier protein Niemann-Pick type C2 protein (NPC2) in wolf spider *Pardosa astrigera*, *PaNPC2-1* and *PaNPC2-2* genes were cloned by using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The expression patterns of *PaNPC2-1* and *PaNPC2-2* genes in different tissues and at different developmental stages of *P. astrigera* were analyzed using quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR). The results showed that the length of open reading frames of *PaNPC2-1* and *PaNPC2-2* were 441 bp and 492 bp, encoding 146 and 163 amino acids, respectively. Sequence analysis showed that the two *PaNPC2* genes had the typical characteristics of NPC2 family genes, with six conserved cysteine residues. Tissue expression profile showed that *PaNPC2-1* expression level was highest in the pedipalps of female adults and the chelicerae of male adults; *PaNPC2-2* expression level in the cephalothorax and abdomen of female adults was significantly higher than that in other tissues of male and female adults. The expression profile at different developmental stages indicated that the expression level of *PaNPC2-1* was the highest in six-instar juvenile spiders and that of *PaNPC2-2* was the highest in adult spiders. By analyzing the spatio-temporal expression profiles, it is speculated that *PaNPC2-1* may be involved in chemical communication in *P. astrigera*, while *PaNPC2-2* not.

基金项目: 农业农村部农产品质量安全监管专项(15197063), 山西省基础研究计划(自由探索类)项目(20210302124160)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: sxaulr@126.com

收稿日期: 2022-08-31

Key words: *Pardosa astrigera*; NPC2 protein; gene cloning; expression analysis; chemical communication

昆虫嗅觉是其捕食和繁殖的基础,环境中的气味分子通过昆虫感受器上的小孔进入感受器中的淋巴液,与气味载体蛋白进行选择结合后,再运输到气味受体上或与气味受体结合,进而进行化学信号的传递(Jiang et al., 2009)。从昆虫的嗅觉机制中可以看出气味载体蛋白在化学信息传导过程中起到了十分重要的作用。目前公认的气味载体蛋白有3类,包括气味结合蛋白(odorant binding protein, OBP),化学感觉蛋白(chemosensory protein, CSP)以及尼曼皮克C2型蛋白(Niemann-Pick type C2 Protein, NPC2)。在节肢动物这个庞大的家族里,有学者提出OBP只局限于昆虫,在甲壳类和其他节肢动物中OBP和CSP数量十分有限。面对复杂的环境,仅仅依靠OBP以及CSP,节肢动物是无法识别所有化合物,因此提出除OBP和CSP外,还应该存在其他的化学载体蛋白(Pelosi et al., 2014)。NPC2最初是在人体的附睾分泌物中被发现,在脊椎动物里承担着运输脂质和胆固醇的功能(Kirchhoff et al., 1996; Klein et al., 2006)。Pelosi et al. (2014)研究发现NPC2与节肢动物中OBP和CSP相似,是一类小分子可溶性蛋白,具有6个保守的半胱氨酸位点并且具有比OBP和CSP更大的疏水结合腔,因此首次提出在节肢动物中NPC2可能承担着化学载体的功能。目前在东方蜜蜂 *Apis cerana* (Liman et al., 2014)、日本弓背蚁 *Camponotus japonicus* (Ishida et al., 2014)、中红侧沟茧蜂 *Microplitis mediator* (郑瑶, 2017)、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Zhu et al., 2018)和中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* (张莉等, 2022)等昆虫纲昆虫体内发现了NPC2家族基因,另外在箠子硬蜱 *Ixodes ricinus* (Iovinella et al., 2016)、美洲钝眼蜱 *Amblyomma americanum* (Renthall et al., 2017)和拟环纹豹蛛 *Pardosa pseudoannulata* (Xiu et al., 2019)等蛛形纲动物体内也发现了NPC2蛋白,这给蛛形纲的化学通信研究提供了新的方向和思路。

蛛形纲的蜘蛛目以及蜱螨目被认为是捕食性天敌的2个重要类群。星豹蛛 *P. astrigera* 属蜘蛛目 Araneae 狼蛛科 Lycosidae, 因其捕食量大, 繁殖力强, 被认为是农田中重要的捕食性天敌(董慈祥等, 1995)。作为捕食性天敌, 其种群数量与田间害虫的发生数量有直接关系(李锐等, 2014)。捕食性天敌会利用视觉、听觉、机械振动以及嗅觉等来感知环境

中的变化并调整行为以求生存(Su et al., 2021)。王洪全(2006)研究发现狼蛛科仅有单眼, 没有复眼, 有听毛但无听器, 作为游猎型的蜘蛛, 不能像结网蜘蛛一样依靠网的震动去捕食猎物以及寻找配偶, 因此嗅觉及化学通信对星豹蛛捕食以及繁殖具有重要作用。在节肢动物中, 对嗅觉的研究主要集中在昆虫纲上, 而对蛛形纲的研究相对较少。在蛛形纲中, 嗅觉的研究主要集中在螨类和蜱类上(Sonenshine, 2006; Renthall et al., 2017)。对于蜘蛛的嗅觉研究多数仅存在行为学测定和化学传感器的观察上(黄婷, 2015), 在分子水平对蜘蛛的嗅觉机制研究甚少。目前在狼蛛科中, 仅在拟环纹豹蛛体内发现 *Ppse-OBP1-2*、*PpseNPC2-1*、*PpseNPC2-2*、*PpseNPC2-5* 和 *PpseNPC2-6* 与嗅觉相关的基因(Cao et al., 2018; Xiu et al., 2019)。

本研究基于本课题组已有的转录组测序数据库(未发表)从星豹蛛体内筛选获得NPC2基因, 采用反转录聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)进行基因克隆, 并且利用实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, RT-qPCR)技术对不同组织和不同发育期的目标基因进行表达模式分析, 以期为进一步探究NPC2蛋白在星豹蛛体内的调控机制提供理论基础, 为蜘蛛化学通信的深入探究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试虫源: 星豹蛛幼蛛采集自山西农业大学太谷校区农作站, 将其带回实验室饲养。星豹蛛单头饲养于玻璃指形管中(内直径1.5 cm、高8 cm), 内置脱脂棉球保湿, 置于光周期16 L: 8 D、温度(29±1)℃的人工气候箱中饲养, 以黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 以及黄粉虫 *Tenebrio molitor* 为主要食物饲养, 待其蜕皮为成蛛, 雌雄成蛛交配, 产卵孵化获得幼蛛, 备用。黑腹果蝇由本课题组在室外以水果诱集获得, 用人工饲料于25 mL的锥形瓶内进行饲养, 黄粉虫由山西农业大学基础部黄粉虫饲养室提供, 并于室内麦麸饲养。

试剂及仪器: RNA提取试剂盒、胶回收试剂盒、克隆试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 反转录试剂盒、荧光定量试剂盒, 南京诺唯赞生物科技

有限公司;高保真酶,北京全式金生物技术股份有限公司;其他试剂均为国产分析纯。MGC-300H人工气候箱,上海一恒科学仪器有限公司;BioDrop μ Lite超微量蛋白核酸分析仪,铭海生物科学仪器(上海)有限公司;T100 Thermal Cycler PCR仪、PowerPac HC164-5052电泳仪,美国Bio-Rad公司;AT126SL凝胶成像仪,美国Alpha Innotech公司;Mx3000P荧光定量PCR仪,美国安捷伦Stratagene公司。

1.2 方法

1.2.1 基因克隆及生物信息学分析

利用Primer Premier 5.0软件设计*PaNPC2-1*和*PaNPC2-2*基因所对应的引物(表1),所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。取2头星豹蛛雌成蛛放于液氮中研磨提取总RNA,对提取的

总RNA进行质量和浓度的检测,当 $1.9 < A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} < 2.1$,浓度在100 mg/ μ L以上时则检测合格,利用反转录试剂盒进行第一链cDNA的合成,以此为模板采用RT-PCR技术扩增基因,50 μ L PCR反应体系:cDNA模板2 μ L、上下游引物各1 μ L、5 $\times$ TransStart[®] Fast-Pfu Buffer 10 μ L、2.5 mmol/L dNTPs 4 μ L、TransStart[®] FastPfu DNA Polymerase 1 μ L、Nuclease-free Water 31 μ L。PCR反应程序:95 $^{\circ}$ C预变性1 min;95 $^{\circ}$ C变性20 s,不同退火温度退火20 s,72 $^{\circ}$ C延伸1 min,40个循环;72 $^{\circ}$ C终延伸5 min。PCR产物用1%的琼脂糖凝胶电泳检测,将目的条带胶回收并进行连接转化,挑选阳性单菌落进行菌液PCR验证,PCR验证体系及程序同上,最后送由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

表1 本研究中的引物信息

Table 1 Primer information in this study

基因 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	退火温度 Annealing temperature/ $^{\circ}$ C	产物长度 Product size/bp	用途 Purpose
<i>PaNPC2-1</i>	F: TCAGCTCTAGAACTGTCTCAA R: TGCTCGACGTATGAAAAATATG	62	528	基因克隆 Gene cloning
<i>PaNPC2-2</i>	F: CATTGAATTGTTGGGACTGAA R: CTTGGATTAATTTGGTATTACGAA	58	548	
<i>PaNPC2-1</i>	F: CGAATCCCTGACTGATAGCGAA R: CAATAGGGCACTCAATATCCTCT	60	125	RT-qPCR
<i>PaNPC2-2</i>	F: CCTTGCAATGCGACAACAGT R: TGCTCGGCACTTCAACACC		154	
β -Actin	F: GCAATCCTTCGTTTGGACTT R: TTCTCTTTCAGCAGTGGTAGTGA		102	

使用NCBI ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)软件进行序列开放阅读框的查找,使用Jalview软件进行多序列比对,利用ExPasy-ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>)进行蛋白质理化性质的预测,利用SignalP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-5.0>)软件进行信号肽预测,使用MEGA 7.0进行聚类分析,通过邻接法构建系统进化树,重复构建1 000次。

1.2.2 星豹蛛*PaNPC2-1*和*PaNPC2-2*组织表达谱分析

取饥饿处理3天的星豹蛛雌雄成蛛各70头,置于液氮速冻后于冰上进行解剖,分别取雌雄成蛛的螯肢、触肢、步足以及躯干(头胸部及腹部)等组织,并提取RNA,反转录为第一链cDNA,以其为模板进行RT-qPCR反应,进行3次生物学重复。内参基因选用星豹蛛 β -Actin(李锐等,2015), β -Actin、*PaN-*

*PC2-1*和*PaNPC2-2*对应引物如表1所示。20 μ L RT-qPCR的反应体系:2 $\times$ chamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μ L、上下游引物各0.4 μ L、cDNA模板2 μ L、ddH₂O 7.2 μ L。反应程序:95 $^{\circ}$ C预变性30 s;95 $^{\circ}$ C变性10 s,60 $^{\circ}$ C退火30 s,40个循环;95 $^{\circ}$ C变性15 s,60 $^{\circ}$ C退火60 s,95 $^{\circ}$ C变性15 s。每个样品3个技术学重复。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对星豹蛛不同组织内*PaNPC2-1*和*PaNPC2-2*的相对表达量进行分析。

1.2.3 星豹蛛*PaNPC2-1*和*PaNPC2-2*发育期表达谱分析

取未交配的雌雄成蛛各1头放入25 mL锥形瓶中,内置湿棉球保湿,使其交配产卵。幼蛛从母蛛背部离去可自由活动视为2龄样品;此后,每蜕1次皮,视为进入下个龄期(燕晶晶等,2022)。取2龄40头、3龄30头、4龄10头、5龄和6龄各5头、雌雄成蛛各2头,分别提取相应发育期蜘蛛的RNA,反转录合成

cDNA, 进行 RT-qPCR 反应, 3 次生物学重复。内参基因, RT-qPCR 的反应体系以及反应程序同 1.2.2。每个样品 3 次重复。

1.3 数据分析

试验数据采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析, 不同组织和不同发育期的基因相对表达量用最小显著差异 (LSD) 法进行差异显著性检验, 雌雄同一组织间利用 *t* 检验法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 *PaNPC2-1* 和 *PaNPC2-2* 基因克隆及序列分析

通过克隆获得星豹蛛的 2 个 NPC2 (*Pardosa as-trigera* NPC2, *PaNPC2*) 基因, 分别命名为 *PaNPC2-1*, *PaNPC2-2*。这 2 个基因序列的完整开放阅读框依次为 441 bp 和 492 bp, 编码 146 个和 163 个氨基酸, 编码的蛋白预测分子量为 36.76 kD 和 41.66 kD, 分子式分别为 $C_{1366}H_{2293}N_{441}O_{577}S_{82}$ 和 $C_{1550}H_{2610}N_{492}O_{657}S_{94}$ 。2 个基因序列在 N 端都有信号肽, 分别由 17 个

和 18 个氨基酸残基组成, 属于小分子分泌蛋白; 通过 TMHMM2.0 网站预测, 发现均不存在跨膜区域。*PaNPC2-1* 编码的蛋白质等电点是 4.35, 不稳定指数是 37.49, 为稳定蛋白质, 其亲水性总平均数为 -0.111, 为亲水性蛋白。*PaNPC2-2* 编码的蛋白质等电点为 4.98, 不稳定指数是 43.34, 为不稳定蛋白, 其亲水性总平均数为 0.312, 为疏水性蛋白。对星豹蛛 *PaNPC2* 基因序列进行分析, 发现其与黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 和拟环纹豹蛛体内的 NPC2 基因具有相似性, 均含有氨基酸保守区域, 具有 6 个保守的半胱氨酸 (图 1)。通过构建系统发育树, 对星豹蛛 NPC2 基因进行聚类分析, 结果显示, *PaNPC2-1* 与拟环纹豹蛛的亲缘关系较近, 其中与拟环纹豹蛛的 *PpseNPC2-2* (GenBank 登录号: MK142308) 氨基酸序列一致性为 96.83%, *PaNPC2-2* 与斑络新妇 *Nephila pilipes*、棒足毛嗜纺蛛 *Trichonephila clavipes* 和棒络新妇 *Trichonephila clavata* 的亲缘关系较近 (图 2)。

► <i>PaNPC2-2</i>	-----MWFVLLILSYSFARHVSSEQVSFIPCGENT-----FSSLYITPCNATTVNUNQ 48
<i>DmNPC2e</i>	-----MLRIVVTLALILAT-----VNATNVQQCKNK-----PFPLDVNIKDC EE-----P-- 40
<i>DmNPC2b</i>	-----MKLSLGLFVIFAALIGF-----TSSTDVSQCPKSKSKALAAAGDVSISNCPK-----S-- 47
<i>DmNPC2a</i>	-----ML-----RYAVIACAALVVF-----AGALEFSDCGSK-----TGKFTRVAIEGCDT-----TKA 44
<i>PpseNPC2-1</i>	-----M-YFVTAVLALLMVAE-----TFAIKYTD CGSK-----KGVVDVLLSGCED-----S-D 43
► <i>PaNPC2-1</i>	-----MYFAAVLTLLFVSE-----ALALKYTD CGSK-----SGRIIDVRLTGCE-----S-D 42
<i>PpseNPC2-2</i>	-----MYFAAVLTLLFVSE-----ALALKYTD CGSK-----SGRIIDVRLTGCE-----S-D 42
<i>PpseNPC2-5</i>	-----MN-QSIL-LLLFGFINI-----CYATRFSD CGSV-----TGKVKFVEVTNCPD-----NQD 44
<i>PpseNPC2-3</i>	MYFRSPFRALLLSNMN-YLVLFALVFSLPVK-----TSSSPYELCESP-----ASDINYLNVTD CDD-----SRE 59
<i>PpseNPC2-4</i>	-----MN-RLFACILLALAAAY-----SLASPYEDCGSD-----SGQVSAVEVSDCAD-----GQD 45
<i>PpseNPC2-6</i>	-----MN-RLFAWILLTTLAAC-----SFASPYEDCGSD-----SGQVTAVEVSGCDD-----GQE 45
C	
► <i>PaNPC2-2</i>	TCVLMHGHNILFQAYFVSP-FNSSSLQVATMITLEGVEVPSINSNG--YDPCF-----GSITPACPVTE 108
<i>DmNPC2e</i>	PCVVYKGTIAVMEVHFLGNNNNIKSITATTTAKVLGMNLPYALPDEVSDVCRN-----LLYGAICPIDK 104
<i>DmNPC2b</i>	KCILKRNTIASIQMKIRPE-RDFQELTSDIIGIILDVLPFPFGYYGT-SACPHIYDEAGEKKVGCPLKA 114
<i>DmNPC2a</i>	ECILKRNTTYSFSDIFALA-EETAVKTVVHGKVLGIEMPFPLANP-DAC-----VDSGLKCPLEK 103
<i>PpseNPC2-1</i>	VC ELKRGETYSYGLTFESL-TDSKSLKAVHVGIGGISMYPYIPNS-NAC-----EGSNEVECPLES 102
► <i>PaNPC2-1</i>	VC ELKRGETYTYGLSFESL-TDSENVKAHVYGI VGGVTPMPYPLPNP-NAC-----ETEDIECP IEN 101
<i>PpseNPC2-2</i>	VC ELKRGETYTYGLSFESL-TDSENVKAHVYGI VGGVTPMPYPLPNP-NAC-----ETEDIECP IEN 101
<i>PpseNPC2-5</i>	ICV LKKGTTVDVKVHFTPN-VRSQSLTALLNAEIMDTVPVPLPLDEP-DAC-----KT-GISCPVKK 102
<i>PpseNPC2-3</i>	VC ILKRGTQVTIQLSFNSQ-KDFKKLRAHVYGI ISGNLFPFSLKES-DAC-----KN-GIPCPFTA 117
<i>PpseNPC2-4</i>	TC TLKKGTTQAQITIKFNSK-TDTKSLKAVHVGIVSGVPIPFPLPNP-DAC-----KA-GVSCPVKS 103
<i>PpseNPC2-6</i>	SC TLKRGTNAQITIKFNSK-TDTKSLTGVVHGLVAGIPVPFPLPNP-NAC-----KA-GVSCPVKS 103
C	
► <i>PaNPC2-2</i>	GKTYFFQKLYNVQSEFP IGLMDLKLVLIDMETKDVAGCGKIKILVAKNPDMYLD-----C 163
<i>DmNPC2e</i>	DEDVTYQNFYVEPSFPEITADVTVTLNDAAQNEP-ITCFVVSCKIRKGATAAQMDGYLLDWTNPL 168
<i>DmNPC2b</i>	GQVYTYKNSFKILPVYPTVSL EIHGWLGDKHG-D-AACFQIPAKIKA-----C 159
<i>DmNPC2a</i>	DESRYRTATLPVLRSYPKVSVLVKWLQDQDGAD-IICVEIPAKIQ-----C 148
<i>PpseNPC2-1</i>	GNTYMYGNEIEIRKSYP SVRADVKWELRDENNEN-VVCVLIPVQIV-----C 147
► <i>PaNPC2-1</i>	GKVYDFENTFDVRTSY PAMRLDVKWLKDDNNEN-IVCGIIPVQIV-----C 146
<i>PpseNPC2-2</i>	GKIYDFENTFDVRQSY PAMRLDVKWLKDDNNEN-IVCGIIPVQIV-----C 146
<i>PpseNPC2-5</i>	GKSYTYQNSLEILDFYPEIELSVKLELKDQHKH-MVCGSIKCKIQSN-----C 149
<i>PpseNPC2-3</i>	GQTGTYINQIDVKIYYPPIPVTVRWELRDENGDD-IVCIDINCEID-----C 162
<i>PpseNPC2-4</i>	GESYTYSDKLDIKTSYPPVSVKVRVELKGENDDD-LVCVEIPQIS-----C 148
<i>PpseNPC2-6</i>	GQSYTYSDKLEIKTIYPPLSLKVRYELRGEKNDD-LVCVEIPCTIA-----C 148
C	

Dm: 黑腹果蝇; *DmNPC2a*, *DmNPC2b* 和 *DmNPC2e* 的 GenBank 登录号分别为 NP_608637.1、NP_650331.1 和 NP_731439.2。*Ppse*: 拟环纹豹蛛; *PpseNPC2-1*, *PpseNPC2-2*, *PpseNPC2-3*, *PpseNPC2-4*, *PpseNPC2-5* 和 *PpseNPC2-6* 的 GenBank 登录号分别为 MK142307、MK142308、MK142309、MK142310、MK142311 和 MK142312。灰色阴影为 6 个保守的半胱氨酸位点, 黑色箭头为星豹蛛 *PaNPC2* 基因。*Dm*: *Drosophila melanogaster*; GenBank accession numbers of *DmNPC2a*, *DmNPC2b* and *DmNPC2e* are NP_608637.1, NP_650333.1 and NP_731439.2, respectively. *Ppse*: *Pardosa pseudoannulata*; GenBank accession numbers of *PpseNPC2-1*, *PpseNPC2-2*, *PpseNPC2-3*, *PpseNPC2-4*, *PpseNPC2-5* and *PpseNPC2-6* are MK142307, MK142308, MK142309, MK142310, MK142311 and MK142312, respectively. The six conserved cysteine sites are shaded in gray, and the *PaNPC2* gene of *P. astrigera* is represented by dark arrow.

图 1 星豹蛛 *PaNPC2* 与部分节肢动物 NPC2 基因序列比对

Fig. 1 Sequence alignment of *PaNPC2* genes of *Pardosa astrigera* and NPC2 genes of some other arthropods

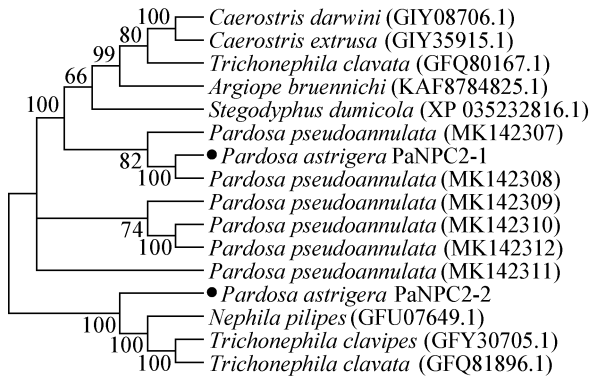
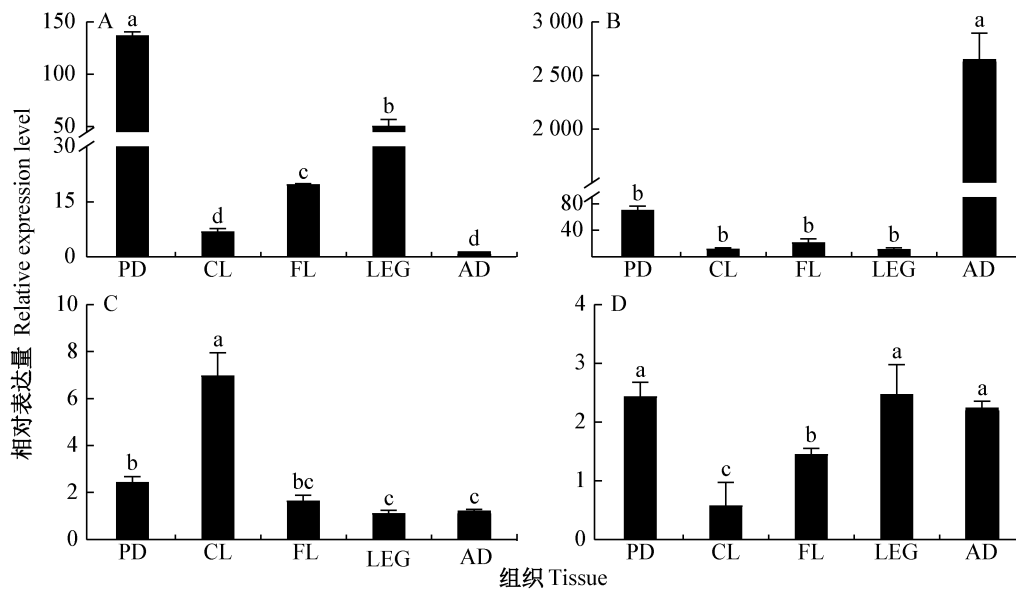


图2 采用邻接法构建星豹蛛 *PaNPC2* 与其他类似蛛形纲动物 NPC2 基因的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *PaNPC2* from *Pardosa astrigera* and NPC2s from other related arachnids using neighbour-joining method



PD: 触肢; CL: 螯肢; FL: 第1对步足; LEG: 其他步足; AD: 躯干(头胸部及腹部)。PD: Pedipalps; CL: chelicerae; FL: first pair of legs; LEG: other legs; AD: cephalothorax and abdomen.

图3 *PaNPC2-1* 和 *PaNPC2-2* 基因在雌成蛛(A、B)和雄成蛛(C、D)不同组织中的表达模式

Fig. 3 Expression patterns of *PaNPC2-1* and *PaNPC2-2* genes in different tissues of female (A, B) and male (C, D)

图中数据为平均数±标准差。柱上不同字母表示不同组织间基因表达量经LSD检验差异显著(P < 0.05)。Data in the figure are mean±SE. Different letters indicate significant difference among different tissues by LSD test (P < 0.05).

同种组织在雌雄个体间的表达模式不同。*PaNPC2-1* 基因在雌成蛛触肢、第1对步足以及其他步足中的表达量均显著高于雄成蛛(P < 0.05)(图4-A), 而 *PaNPC2-2* 在雌成蛛躯干(头胸部及腹部)、触肢以及其他步足中的表达量都显著高于雄成蛛(P < 0.05)(图4-B)。

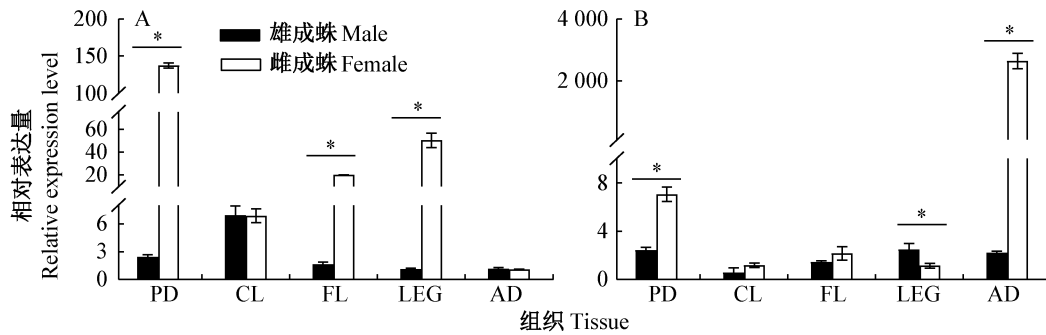
2.3 *PaNPC2-1*、*PaNPC2-2* 不同龄期表达模式分析

PaNPC2-1 和 *PaNPC2-2* 基因在星豹蛛的不同

2.2 *PaNPC2-1*、*PaNPC2-2* 不同组织表达模式分析

星豹蛛 *PaNPC2-1* 和 *PaNPC2-2* 基因在雌雄成蛛的不同组织均有表达。*PaNPC2-1* 在雌成蛛触肢中表达量最高, 其他步足中的表达量次之, 螯肢和躯干(头胸部及腹部)的表达量最低且两者间无显著差异(图3-A)。*PaNPC2-2* 在雌成蛛躯干(头胸部及腹部)中的表达量最高, 在除躯干(头胸部及腹部)之外的其他组织中的表达量均无显著差异(图3-B)。*PaNPC2-1* 在雄成蛛螯肢中的表达量最高, 触肢和第1对步足次之, 而躯干(头胸部及腹部)和其他步足表达量最低且无显著差异(图3-C)。*PaNPC2-2* 在雄成蛛触肢、其他步足以及躯干(头胸部及腹部)中的表达量均无显著差异, 但是显著高于其他组织(P < 0.05), 螯肢中的表达量最低(P < 0.05)(图3-D)。

发育期均有表达, 但两者表达模式不同。*PaNPC2-1* 在星豹蛛不同发育期的表达模式相对来说比较复杂, 在2~6龄幼蛛期的表达量呈现逐步上升趋势, 在6龄幼蛛期表达量最高, 但在成蛛期的表达量却显著下降(P < 0.05)(图5-A)。随着龄期增长, *PaNPC2-2* 在星豹蛛体内的表达量逐步升高, 成蛛中的表达量显著高于各龄期幼蛛(P < 0.05), 在2龄幼蛛中表达量最低(P < 0.05)(图5-B)。



PD: 触肢; CL: 螯肢; FL: 第1对步足; LEG: 其他步足; AD: 躯干(头胸部及腹部)。PD: Pedipalps; CL: chelicerae; FL: first pair of legs; LEG: other legs; AD: cephalothorax and abdomen.

图4 *PaNPC2-1*(A)以及*PaNPC2-2*(B)在星豹蛛雌雄不同个体间同种组织的相对表达量

Fig. 4 Relative expression levels of *PaNPC2-1* (A) and *PaNPC2-2* (B) in the same tissue of male and female *Pardosa astrigera*. 图中数据为平均数±标准差。*表示同一组织雌雄成蛛间基因表达量,经*t*检验法检验差异显著($P<0.05$)。Data in the figure are mean±SE. * indicates significant difference in the expression of male and female adult spiders in the same tissue by *t* test ($P<0.05$).

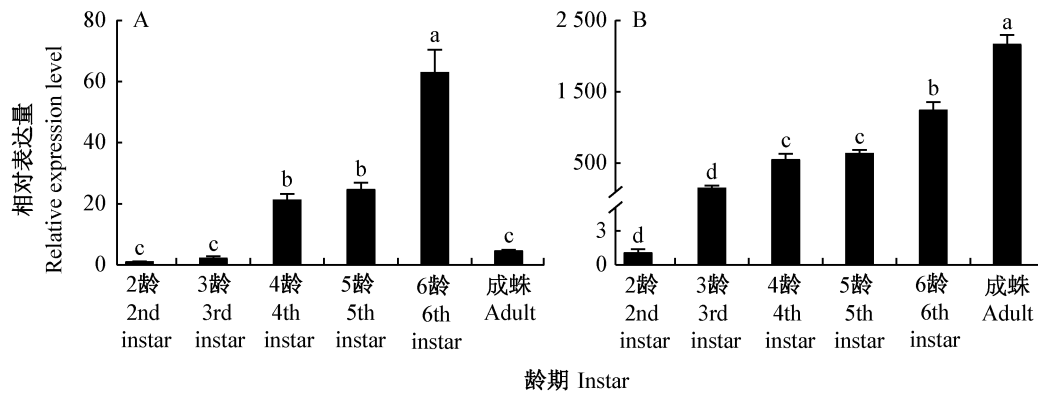


图5 *PaNPC2-1*(A)和*PaNPC2-2*(B)基因在星豹蛛不同发育期的表达模式

Fig. 5 Expression patterns of *PaNPC2-1* (A) and *PaNPC2-2* (B) genes in *Pardosa astrigera* at different developmental stages. 图中数据为平均数±标准差。不同字母表示不同发育期间经LSD法检测差异显著($P<0.05$)。Data in the figure are mean±SE. Different letters indicate significant differences at different developmental stages by LSD test ($P<0.05$).

3 讨论

通过对星豹蛛*PaNPC2*基因的克隆,获得了*PaNPC2-1*和*PaNPC2-2*基因。序列分析结果显示*PaNPC2-1*和*PaNPC2-2*基因完整开放阅读框为441 bp和492 bp,编码的氨基酸长度为146个和163个氨基酸,在N端均有信号肽,属于小分子分泌蛋白。序列对比分析发现*PaNPC2-1*和*PaNPC2-2*基因存在6个保守的半胱氨酸,具有NPC2基因家族的典型特征,说明*PaNPC2*属于NPC2基因家族。

NPC2最早在人体的附睾分泌物中被发现,在脊椎动物中与脂质以及胆固醇的结合运输密切相关且呈现出高度的保守性(Storch & Xu, 2009),其在脊椎动物里比较稳定,具有6个保守的半胱氨酸,排列顺序是26X-C-14X-C-4X-C-45X-C-5X-C-40X-C,还具有一段富含脯氨酸区域PVPFPIP(Vanier & Millat, 2004)。然而,在节肢动物中,NPC2高度分

化,承担更复杂的功能(李晓凤等,2020)。Huang et al.(2007)在果蝇体内共鉴定出8个NPC2蛋白相关基因*DmNPC2a~DmNPC2h*,研究发现*DmNPC2a*和*DmNPC2b*的双突变会导致果蝇死亡,但在后期喂食蜕皮激素相关物质可以改变上述2个NPC2基因突变对果蝇的伤害,因此推测*DmNPC2a*和*DmNPC2b*可能与免疫、胆固醇运输相关。陈剑等(2020)在柑橘大实蝇*Bactrocera minax*体内鉴定出来1个NPC2基因*BminNPC2*,发现其在头部(无触角)和腹部的表达量最高,推测该基因可能不参与柑橘大实蝇的嗅觉通讯,而是具有和*DmNPC2a*相似的功能。继Pelosi et al.(2014)首次提出NPC2在节肢动物中可能承担着化学载体的功能后,越来越多的研究证实NPC2是第3类嗅觉相关蛋白(吴帆等,2021)。宋亚萍等(2022)研究结果显示在长角血蜱*Haemaphysalis longicornis*吸血阶段*HL-NPC2*在脂肪体中的转录水平远高于其他组织,在饱血阶段其在中肠中

的转录水平远高于其他组织,后续的嗅觉性相关试验表明 *HL-NPC2* 可能与长角血蜱嗅觉相关,在气味识别中起着重要作用。目前NPC2在节肢动物中的研究还比较少,但是就当前的研究结果来看,NPC2在节肢动物的嗅觉器官和非嗅觉器官中均有表达,功能也各不相同(吴帆等,2021)。本研究在星豹蛛体内发现了2个 *PaNPC2* 基因,试验结果表明 *PaNPC2-1* 在星豹蛛的主要化学感受器官触肢中高表达,而 *PaNPC2-2* 则在雌蛛的躯干(头胸腹)中高表达,因此、推测2个 *PaNPC2* 基因在星豹蛛体内行使着不同的功能。

触角作为昆虫重要的化学感受器官,是研究昆虫取食、交配和产卵的基础(Huber,2005)。对于蜘蛛而言,普遍认为触肢是其最主要的化学感受器官(Foelix, 1970; Ganske & Uhl, 2018)。Xiu et al. (2019)研究了6个 *PpseNPC2* 在拟环纹豹蛛不同组织中的表达模式,结果表明 *PpseNPC2-1*、*PpseNPC2-2*、*PpseNPC2-5* 和 *PpseNPC2-6* 基因在触肢和螯肢上高表达,暗示其与拟环纹豹蛛的化学通信联系密切。在本研究中,*PaNPC2-1* 在雌成蛛触肢以及雄成蛛螯肢中高表达,与拟环纹豹蛛 *PpseNPC2-1* 表达模式相似(Xiu et al., 2019);聚类分析结果也有显示 *PaNPC2-1* 与拟环纹豹蛛 *PpseNPC2-1*、*PpseNPC2-2* 的序列相似度高;发育期表达谱结果显示, *PaNPC2-1* 在2~6龄幼蛛中表达量依次升高,在成蛛中表达量显著下降,可能是与星豹蛛随着龄期的增长,捕食量增大且星豹蛛在6龄幼蛛的发育历期长有关(燕晶晶等,2022)。*PaNPC2-2* 基因表达量在雌成蛛的躯干(头胸部及腹部)显著高于其他组织,在2龄幼蛛期到成蛛期间的表达量逐步升高,且在成蛛期的表达量显著高于幼蛛期。张莉等(2022)研究表明结果,中华蜜蜂 *AcNPC2a* 基因在新出房蜂的腹部表达量最高,其腹部分布着消化、营养以及生殖器官,表明 *AcNPC2a* 可能参与中华蜜蜂的消化、营养以及卵巢的发育等。*PaNPC2-2* 与 *AcNPC2a* 的表达模式相似,推测 *PaNPC2-2* 基因在星豹蛛体内可能承担着其他的功能,雌性星豹蛛消化和生殖器官均位于头胸和腹部, *PaNPC2-2* 基因在雌成蛛的头胸部和腹部的表达量最高,因此推测其可能参与了星豹蛛的消化及生殖过程。

星豹蛛性情凶猛,专捕活虫,对棉铃虫、绿盲蝽 *Apolygus lucorum* 和东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* 等多种害虫都有较好的捕食效果(仵光俊等,1988;田方文,2001)。由于星豹蛛的捕食特性,使其成为农田生态系统中重要的天敌,其嗅觉即化

学通信在捕食猎物以及寻找配偶中发挥着重要作用(荆奇等,2010)。本研究从星豹蛛体内筛选和鉴定出2个NPC2基因,通过组织和发育期的表达谱分析,推测 *PaNPC2-1* 可能参与星豹蛛的捕食行为中,而 *PaNPC2-2* 可能承担着其他功能,这也进一步说明了NPC2蛋白家族在节肢动物中功能的多样化。为了进一步探究NPC2蛋白家族在星豹蛛体内行使的功能以及星豹蛛的嗅觉机制,今后将利用RNA干扰技术、荧光竞争结合技术等对其功能进一步验证。

参 考 文 献 (References)

- Cao YS, Liu JB, Guo JX, Wu H, Zhang GR. 2018. Identification and analysis of odorant-binding protein genes from the wolf spider *Pardosa pseudoannulata* (Araneae: Lycosidae) based on its transcriptome. *Chemoecology*, 28: 123–130
- Chen J, Wang ZX, Yang L, Ye HX, Mao L, Gui LY, Zhang GH. 2020. Sequence analysis and tissue expression pattern of *Niemann-Pick type C2* gene in *Bactrocera minax*. *Plant Protection*, 46(4): 132–136 (in Chinese) [陈剑, 王兆祥, 杨岭, 叶海霞, 毛丽, 桂连友, 张国辉. 2020. 柑橘大实蝇NPC2基因的序列分析和组织表达模式. *植物保护*, 46(4): 132–136]
- Dong CX, Li GQ, Yang QR, Deng RZ, Zhao PH, Gong FT. 1995. Preliminary study on the biology, ecology and conservation of a wolf spider *Pardosa astrigera*. *Shandong Agricultural Sciences*, 27(2): 29–30 (in Chinese) [董慈祥, 李国泉, 杨青蕊, 邓如志, 赵平厚, 巩凤田. 1995. 星豹蛛生物生态学及保护利用的初步研究. *山东农业科学*, 27(2): 29–30]
- Foelix RF. 1970. Chemosensitive hairs in spiders. *Journal of Morphology*, 132(3): 313–333
- Ganske AS, Uhl G. 2018. The sensory equipment of a spider-A morphological survey of different types of sensillum in both sexes of *Argiope bruennichi* (Araneae, Araneidae). *Arthropod Structure & Development*, 47(2): 144–161
- Huang T. 2015. Research of effect and mechanism of olfaction on prey locating of wolf spider. Master thesis. Changsha: Hunan Normal University (in Chinese) [黄婷. 2015. 狼蛛嗅觉器官在寻觅、定位猎物中的作用及机制研究. 硕士学位论文. 长沙: 湖南师范大学].
- Huang X, Warren JT, Buchanan J, Gilbert LI, Scott MP. 2007. *Drosophila* *Niemann-Pick type C-2* genes control sterol homeostasis and steroid biosynthesis: a model of human neurodegenerative disease. *Development*, 134(20): 3733–3742
- Huber BA. 2005. Sexual selection research on spiders: progress and biases. *Biological Reviews*, 80(3): 363–385
- Iovinella I, Ban LP, Song LM, Pelosi P, Dani FR. 2016. Proteomic analysis of castor bean tick *Ixodes ricinus*: a focus on chemosensory organs. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 78: 58–68
- Ishida Y, Tsuchiya W, Fujii T, Fujimoto Z, Miyazawa M, Ishibashi J, Matsuyama S, Ishikawa Y, Yamazaki T. 2014. *Niemann-Pick type C2* protein mediating chemical communication in the worker ant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(12): 4381–4386

- States of America, 111(10): 3847–3852
- Jiang QY, Wang WX, Zhang ZD, Zhang L. 2009. Binding specificity of locust odorant binding protein and its key binding site for initial recognition of alcohols. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39(7): 440–447
- Jing Q, Zhou Q, You KX, Yan HM. 2010. Studies on spider predation and chemical communication. *Insect studies in central China* (Vol. 6). Changsha: Central South University Press, pp. 281–282 (in Chinese) [荆奇, 周琼, 尤克西, 颜亨梅. 2010. 蜘蛛捕食行为和化学通讯的研究. 华中昆虫研究(第6卷). 长沙: 中南大学出版社, pp. 281–282]
- Kirchhoff C, Osterhoff C, Young L. 1996. Molecular cloning and characterization of HE1, a major secretory protein of the human epididymis. *Biology of Reproduction*, 54(4): 847–856
- Klein A, Amigo L, Retamal MJ, Morales MG, Miquel JF, Rigotti A, Zanlungo S. 2006. NPC2 is expressed in human and murine liver and secreted into bile: potential implications for body cholesterol homeostasis. *Hepatology*, 43(1): 126–133
- Li R, Li SL, Li N, Li SC, Hong JP. 2014. The effects of low doses of insecticides on predation of green peach aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) by a wolf spider *Pardosa astrigera* (Araneae: Lycosidae). *Journal of Plant Protection*, 41(6): 711–716 (in Chinese) [李锐, 李萨丽, 李娜, 李生才, 洪坚平. 2014. 低剂量杀虫剂对星豹蛛捕食桃蚜功能模型的影响. 植物保护学报, 41(6): 711–716]
- Li R, Liu J, Li SL, Li N, Li SC, Hong JP. 2015. Effects of temperature induction on the expression level of *hsp70* and *hsp90* gene in *Pardosa astrigera* L. Koch. *Journal of Plant Protection*, 42(3): 321–326 (in Chinese) [李锐, 刘佳, 李萨丽, 李娜, 李生才, 洪坚平. 2015. 温度诱导对星豹蛛热激蛋白 *hsp70* 和 *hsp90* 基因表达的影响. 植物保护学报, 42(3): 321–326]
- Li XF, Song YH, Xiao Y, Su R, Chen X, Yang WY, Zhong YJ. 2020. Research progress on function of ML protein superfamily in insects. *Acta Sericologica Sinica*, 46(4): 500–508 (in Chinese) [李晓凤, 宋宇航, 肖阳, 苏睿, 陈雪, 杨婉莹, 钟仰进. 2020. ML蛋白超家族在昆虫中的功能研究进展. 蚕业科学, 46(4): 500–508]
- Liman ER, Zhang YV, Montell C. 2014. Peripheral coding of taste. *Neuron*, 81(5): 984–1000
- Pelosi P, Iovinella I, Felicioli A, Dani FR. 2014. Soluble proteins of chemical communication: an overview across arthropods. *Frontiers in Physiology*, 5: 320
- Renthal R, Manghnani L, Bernal S, Qu YY, Griffith WP, Lohmeyer K, Guerrero FD, Borges LMF, Pérez de León A. 2017. The chemosensory appendage proteome of *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) reveals putative odorant-binding and other chemoreception-related proteins. *Insect Science*, 24(5): 730–742
- Sonenshine DE. 2006. Tick pheromones and their use in tick control. *Annual Review of Entomology*, 51: 557–580
- Song YP, Kuang CY, Cao J, Zhou YZ, Zhang HS, Wu JY, Zhou JL. 2022. Cloning and preliminary identification of olfactory-related molecule NPC2 gene of *Haemaphysalis longicornis*. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, DOI: 10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20220424.003 (in Chinese) [宋亚萍, 旷策嫣, 曹杰, 周勇志, 张厚双, 武军元, 周金林. 2022. 长角血蜱嗅觉相关分子 NPC2 基因的克隆与初步鉴定. 中国动物传染病学报, DOI: 10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20220424.003]
- Storch J, Xu Z. 2009. Niemann-Pick C2 (NPC2) and intracellular cholesterol trafficking. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1791(7): 671–678
- Su YZ, Zhang B, Xu XN. 2021. Chemosensory systems in predatory mites: from ecology to genome. *Systematic and Applied Acarology*, 26(5): 852–865
- Tian FW. 2001. Study on biological characteristics and predation function of *Pardosa astrigera*, the predator of locust. *Plant Protection Technology and Extension*, 21(7): 3–4, 6 (in Chinese) [田方文. 2001. 蝗虫天敌星豹蛛生物学特性及捕食功能研究. 植保技术与推广, 21(7): 3–4, 6]
- Vanier MT, Millat G. 2004. Structure and function of the NPC2 protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1685(1/2/3): 14–21
- Wang HQ. 2006. Study on the structure and function of spider community in China rice region. Changsha: Hunan Normal University Press, pp. 43 (in Chinese) [王洪全. 2006. 中国稻田蜘蛛群落结构和功能的研究. 长沙: 湖南师范大学出版社, pp. 43]
- Wu F, Zhang L, Qiu YL, Li HL. 2021. Research progress of olfactory binding proteins in insects. *Acta Entomologica Sinica*, 64(4): 523–535 (in Chinese) [吴帆, 张莉, 邱一蕾, 李红亮. 2021. 昆虫嗅觉结合蛋白研究进展. 昆虫学报, 64(4): 523–535]
- Wu GJ, Zhang SL, Chen ZJ. 1988. Biological characteristics of wolf spider *Pardosa astrigera*. *Shaanxi Journal of Agricultural Sciences*, 34(3): 21–22, 31 (in Chinese) [仵光俊, 张淑, 陈志杰. 1988. 星豹蛛的生物学特性. 陕西农业科学, 34(3): 21–22, 31]
- Xiu CL, Xiao Y, Zhang S, Bao HB, Liu ZW, Zhang YJ. 2019. Niemann-Pick proteins type C2 are identified as olfactory related genes of *Pardosa pseudoannulata* by transcriptome and expression profile analysis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics & Proteomics*, 29: 320–329
- Yan JJ, Wang YL, Zhao R, Tian GQ, Li R. 2021. Analysis of population growth, development and fecundity dynamics of wolf spider *Pardosa astrigera* based on age-stage two-sex life table. *Journal of Plant Protection*, 48(3): 593–601 (in Chinese) [燕晶晶, 王雅丽, 赵瑞, 田国强, 李锐. 2021. 基于年龄-龄期两性生命表的星豹蛛种群生长发育和繁殖动态分析. 植物保护学报, 48(3): 593–601]
- Zhang L, Zhang N, Jiang HQ, Wu F, Li HL. 2022. Molecular cloning and expression pattern analysis of NPC2 gene family of *Apis cerana cerana*. *Scientia Agricultura Sinica*, 55(12): 2461–2471 (in Chinese) [张莉, 张楠, 江虎强, 吴帆, 李红亮. 2022. 中华蜜蜂 NPC2 基因家族克隆及表达模式分析. 中国农业科学, 55(12): 2461–2471]
- Zheng Y. 2017. Functional characterization of Niemann-Pick type C2 proteins in the parasitoid wasp *Microplitis mediator* (Hymenoptera: Braconidae). Master thesis. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences (in Chinese) [郑瑶. 2017. 中红侧沟茧蜂 NPC2 蛋白的功能特性. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院]
- Zhu JA, Guo M, Ban LP, Song LM, Liu Y, Pelosi P, Wang GR. 2018. Niemann-Pick C2 proteins: a new function for an old family. *Frontiers in Physiology*, 9: 52