

橘小实蝇半胱氨酸蛋白酶基因 克隆及表达模式*

杨文佳^{1,2}, 许抗抗^{1,2}, 王进军², 李灿¹

1. 贵阳学院生物与环境工程学院//有害生物控制与资源利用
贵州省高校特色重点实验室, 贵州 贵阳 550005;
2. 西南大学植物保护学院//昆虫学及害虫控制工程
重庆市市级重点实验室, 重庆 400716)

摘要: 为了深入了解半胱氨酸蛋白酶基因的作用和寻求害虫防治新的分子靶标, 利用 RT-PCR 和 RACE 技术, 从橘小实蝇 *Bactrocera dorsalis* (Hendel) 体内克隆获得半胱氨酸蛋白酶基因 *Bdcyp* 的 cDNA 全长序列 (GenBank 登录号: KU904503), 采用生物信息学软件分析了 *Bdcyp* 编码蛋白的特性, 利用实时定量 PCR 技术检测其在不同发育阶段和不同组织的表达量。橘小实蝇 *Bdcyp* 的 cDNA 全长为 1 955 bp, 开放阅读框为 1 653 bp, 编码 551 个氨基酸, 预测蛋白质相对分子质量和等电点分别为 62 900 和 6.11。*Bdcyp* 具有半胱氨酸蛋白酶的典型特征, 即信号肽、3 个催化活性区域 (Cys-His-Asn) 以及 2 个保守的 ERFNIN 和 GNFD 特征基序。系统发育分析表明 *Bdcyp* 编码的蛋白质与橄榄实蝇半胱氨酸蛋白酶亲缘关系最近。*Bdcyp* 在三龄幼虫、蛹和成虫期均有表达, 其在蛹中期的表达量最高; 表达部位主要在幼虫脂肪体, 其次为气管和表皮, 而在中肠的表达量最低。这些结果为进一步研究 *Bdcyp* 基因功能提供了依据。

关键词: 橘小实蝇; 半胱氨酸蛋白酶; 克隆; 序列分析; 表达模式

中图分类号: Q78 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2017) 01-0131-07

Molecular cloning and expression profiling of a cysteine proteinase gene in the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Hendel)

YANG Wenjia^{1,2}, XU Kangkang^{1,2}, WANG Jinjun², LI Can¹

1. Key & Special Laboratory of Guizhou High College for Pest Control and Resource Utilization //
College of Biology and Engineering of Environment, Guiyang University, Guiyang 550005, China;
2. Key Laboratory of Entomology and Pest Control Engineering //
College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: In order to better understand the roles of cysteine proteinase gene and develop a novel molecular target for insect pest control, we obtained the full-length cDNA sequence of *Bdcyp* (GenBank accession no. KU904503) from the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hende) by using RT-PCR and RACE methods. The deduced amino acid sequence analysis of *Bdcyp* was performed by using bioinformatics methods. The expression patterns of *Bdcyp* in different stages and tissues were investigated using

* 收稿日期: 2016-04-22

基金项目: 贵州省特色重点学科基金 (ZDXK [2015] 11); 贵阳学院高层次人才科研启动费 (校人才 2014003); 中央高校基本科研业务费专项资金 (XDJK2013A017); 贵州省高层次创新型人才培养 (黔科合人才 [2016] 4020)

作者简介: 杨文佳 (1986 年生), 男; 研究方向: 昆虫分子生态学; E-mail: yangwenjia10@126.com

通信作者: 李灿 (1979 年生), 男; 研究方向: 昆虫生态与害虫综合治理; E-mail: lican790108@163.com

quantitative real-time PCR (qPCR). The *Bdcyp* was 1 955 bp in length, containing an open reading frame of 1 653 bp which encodes 551 amino acid residues with a predicted molecular weight of 62 900 and isoelectric point of 6.11. *Bdcyp* had typical features of cysteine proteinase, including signal peptide, three catalytic active regions (Cys-His-Asn), and two conserved motifs (ERFNIN and GNFD). Phylogenetic analysis showed that *Bdcyp* has the closest genetic relationship with the cysteine proteinase of *B. oleae*. *Bdcyp* was constitutively expressed in the tested stages, including third-instar larvae, pupae and adults. The highest expression level was observed at the middle of pupal stage. Tissue-specific expression showed that the highest expression was in the fat body, followed by trachea and integument, and the expression in midgut was the lowest. The results provide the basis for further studying the function of *Bdcyp*.

Key words: *Bactrocera dorsalis*; cysteine proteinase; cloning; sequence analysis; expression pattern

半胱氨酸蛋白酶 (cysteine proteinase, cyp) 广泛存在于微生物、植物和动物等生物体内, 它主要在细胞内和外蛋白降解中发挥着关键的作用^[1-2]。半胱氨酸蛋白酶分为 3 个结构家族: 木瓜蛋白酶、ICE/CED3 型蛋白酶类和天冬酰胺特异性内肽酶家族, 其中木瓜蛋白酶家族是最大的一个家族^[1]。溶酶体半胱氨酸蛋白酶 (Cathepsin, Cat) 是木瓜蛋白酶家族的重要部分, 目前已在人类和哺乳动物中发现 11 种。根据其分子特征和底物特异性, 可分为 Cat B、C、F、H、K、L、O、S、V、W 和 X 型。Cat 具有多种多样的生物学功能, 它不仅参与体内蛋白质的水解, 还可以参与骨质吸收、抗原呈递、组织再生、肿瘤入侵和转移以及细胞凋亡等生理活动^[3-5]。

迄今为止, 在昆虫中发现 B、L、D、O 和 T 等多种类型的半胱氨酸蛋白酶, 其中常见的为 Cat B、L 和 D 型。在昆虫体内, 半胱氨酸蛋白酶的生理功能并不局限在溶酶体内蛋白质的降解^[6-8], 近年来研究发现它还参与了昆虫的个体发育过程, 可以调节卵母细胞发生和早期胚胎发育^[9-10], 并在昆虫变态过程中组织的解体和重建起着重要作用^[11-12]。此外, 部分蛋白酶与昆虫的长期记忆和种群防御等紧密相关^[13-14]。

橘小实蝇 *Bactrocera dorsalis* (Hendel), 隶属双翅目 Diptera, 实蝇科 Tetrphitedae, 由于极强的环境适应能力和入侵扩散能力, 严重危害多种重要的水果和蔬菜, 已成为重要的世界性农业害虫^[15-16]。由于人们长期、大量使用化学农药防治橘小实蝇, 不可避免地导致其对杀虫剂产生了不同程度的抗性, 防治难度不断增加^[17-18]。因此, 探索新的靶标、开发新型控制剂是发展橘小实蝇防治策略的当务之急。以往研究表明半胱氨酸蛋白酶在昆虫生长发育过程中起着重要作用, 并考虑作为害虫防治的靶蛋白^[6, 19]。因此, 本研究在转录组测序的基础

上, 利用 RACE 技术首次从橘小实蝇体内克隆获得 *Bdcyp* 的全长基因, 并对其进行生物信息学分析, 同时研究了其在不同发育阶段和不同组织的时空表达特性, 为进一步揭示该基因的生理功能提供基础数据, 也为其作为害虫防治的潜在靶标基因奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫与样品收集

橘小实蝇于 2007 年采自福建省福州市, 利用人工饲料在人工气候箱内连续饲养多代并建立种群。饲养条件为温度 (27 ± 1) °C、相对湿度 (70 ± 5)%、光周期 14 L: 10D。分别收集不同日龄的橘小实蝇三龄幼虫、蛹和新羽化成虫; 选取发育整齐的三龄第 4 天的幼虫, 通过解剖获得表皮、气管、中肠、脂肪体和马氏管 5 个组织。将所有样品经液氮速冻后于 -80 °C 冰箱内保存备用, 每组样品设置 3 个生物学重复。

1.2 主要试剂

TRIzol 购自 Invitrogen 公司; DNase、rTaq 酶和 PrimeScript® RT Reagent Kit 购自 TaKaRa 公司; SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 购自 Clontech 公司; Gel Extraction Kit 购自 Omega 公司; 感受态细胞 DH5α 购自北京全式金公司; pGEM-T Easy 载体和 GoTaq® qPCR Master Mix 购自 Promega 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 总 RNA 的提取与第一链 cDNA 的合成 按照 TRIzol 试剂说明书分别提取橘小实蝇不同发育阶段和不同组织的总 RNA, 利用琼脂糖电泳检测总 RNA 的完整性, 通过 Nanodrop 2000 核酸浓度测定仪检测其浓度和纯度, 并利用 DNase 去除基因组 DNA。取新羽化成虫的 RNA 为模板, 分别按照 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 和 Prime-

Script® RT Reagent Kit 说明书合成第一链 cDNA, 用于 RACE 扩增和全长验证 PCR 模板制备。所有样品按照 PrimeScript® RT Reagent Kit 说明书合成第一链 cDNA, 用于实时定量 PCR 模板制备。

1.3.2 引物设计与合成 根据笔者之前测序完成的橘小实蝇脂肪体转录组数据库^[20], 筛选半胱氨酸蛋白酶基因片段, 采用 Primer Premier 5.0 软件设计相关引物 (表 1) 用于 *Bdcyp* 基因的 RACE 和开放阅读框扩增, 引物合成由上海生工生物工程股份有限公司完成。

表 1 本研究中涉及的引物信息

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5' - 3') Primer sequences	用途 Usage
3'GSP1	TCATTTCAAAGCCAAACACGG	3' - RACE
3'GSP2	TTGCGGCTCGTGCTGCTCCT	
<i>Bdcyp</i> -F	GACCGGTTTCGTTTACAAGC	开放阅读
<i>Bdcyp</i> -R	CATAGGTATGTAAATAAATCG	框扩增
q- <i>Bdcyp</i> -F	AATGGTACCGCTGAAAATCG	定量
q- <i>Bdcyp</i> -R	TGTAACCGCGCATCTCATAA	分析
q- α - <i>Tubulin</i> -F	CGCATTTCATGTTGATAACG	内参
q- α - <i>Tubulin</i> -R	GGGCACCAAGTTAGTCTGGA	基因

1.3.3 基因克隆 以 1.3.1 合成的 cDNA 为模板, 利用相应的特异性引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系, 包含 2.5 μ L 10 \times PCR 缓冲液, 2.5 μ L MgCl₂ (25 μ mol/L), 2 μ L dNTPs (10 nmol/L), 正/反向引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, 2.0 μ L cDNA 模板, 0.25 μ L rTaq 酶, ddH₂O 补足至 25 μ L, 混匀, 离心, 放入 PCR 仪扩增。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 然后 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 ~ 65 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 ~ 2 min, 34 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 $w = 1.5\%$ 琼脂糖凝胶电泳鉴定后, 将目的条带切胶回收, 按照 Gel Extraction Mini Kit 说明书操作, 然后将回收产物连接至 pGEM-T Easy 载体, 转化到感受态大肠杆菌中, 经蓝白筛选和 PCR 鉴定, 将阳性克隆送往北京六合华大基因公司进行测序。

1.3.4 序列分析 利用 DNAMAN v6.0 (Lynnon Biosoft) 软件完成测序结果的编辑和分析, 推导的氨基酸采用 NCBI 站点的 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>) 程序进行同源性比较分析。利用 ProtParam (<http://web.expasy.org/>)、SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 和 NetNGlyc 1.0 server ([\[www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/\]\(http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/\)\) 分析编码蛋白的理化性质、信号肽和 N - 糖基化位点。利用 Scanprosite \(<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>\) 分析保守区域。利用 MEGA5.04 软件中的邻接法 \(Neighbor-joining\) 构建系统发育树^{\[21\]}, 各分支重复检验次数均为 1 000。](http://</p>
</div>
<div data-bbox=)

1.3.5 *Bdcyp* 表达模式分析 采用实时定量 PCR 技术检测橘小实蝇 *Bdcyp* 基因在不同发育阶段和不同组织的相对表达量。使用在线软件 Primer 3.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) 设计定量 PCR 引物, 内参基因采用橘小实蝇 α -*Tubulin* (GenBank 登录号: GU269902)^[22], 引物序列信息如表 1。定量 PCR 反应体系如下: 10 μ L GoTaq® qPCR Master Mix、1 μ L cDNA、7 μ L ddH₂O 和正/反向引物各 1 μ L。扩增反应在 CFX96™ Real-Time System 实时定量 PCR 仪 (Bio-Rad) 中进行, 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火并延伸 30 s, 共 40 个循环; 接着 60 ~ 95 $^{\circ}$ C 的熔解曲线。每个样品重复测定 3 次。利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算目的基因的相对表达量^[23], 试验数据采用 SPSS17.0 软件的单因素方差分析法 (ANOVA) 进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 橘小实蝇 *Bdcyp* 基因 cDNA 的序列分析

采用 RT-PCR 结合 RACE 技术, 克隆获得橘小实蝇半胱氨酸蛋白酶基因, 命名为 *Bdcyp* (GenBank 登录号: KU904503), 其 cDNA 序列全长 1 955 bp, 包含 5' 端非编码区 142 bp 和 3' 端非编码区 160 bp, 开放阅读框为 1 653 bp, 编码 551 个氨基酸残基, 预测相对分子质量为 62 900, 理论等电点 pI 值为 6.11。*Bdcyp* 编码的蛋白 N 末端具有 20 个氨基酸组成的信号肽序列, 推测其可能为分泌型蛋白。根据 NetNGlyc 1.0 server 分析结果, *Bdcyp* 可能存在 3 个 N - 糖基化位点, 分别 N102, N435 和 N447。*Bdcyp* 具有昆虫半胱氨酸蛋白酶基因家族特有的保守结构域: 催化三联体 (Cys³⁵⁶、His⁴⁹⁹、Asn⁵¹⁹)、ERFNN 基序、GNFD 基序以及结构花样 G³⁹⁶C³⁹⁷D³⁹⁸G³⁹⁹G⁴⁰⁰簇 (图 1)。

将 *Bdcyp* 编码的氨基酸序列进行 BLAST 分析, 结果表明, *Bdcyp* 与同为双翅目的橄榄实蝇 *Bactrocera oleae* (GenBank 登录号: XP_014098451) 半胱氨酸蛋白酶的同源性最高, 为 96%; 与地中海实蝇 *Ceratitis capitata* (XP_004522056)、铜绿蝇 *Lucilia cuprina* (KNC23990) 以及埃及伊蚊 *Aedes aegypti*

(ABE72972) 的相似性分别为 92%、87% 和 67%，进一步表明克隆得到的是橘小实蝇半胱氨酸蛋白酶基因。

2.2 Bdcyp 的系统发育分析

将 *Bdcyp* 编码的氨基酸序列与 GenBank 登录的其他昆虫的半胱氨酸蛋白酶氨基酸序列进行比对，

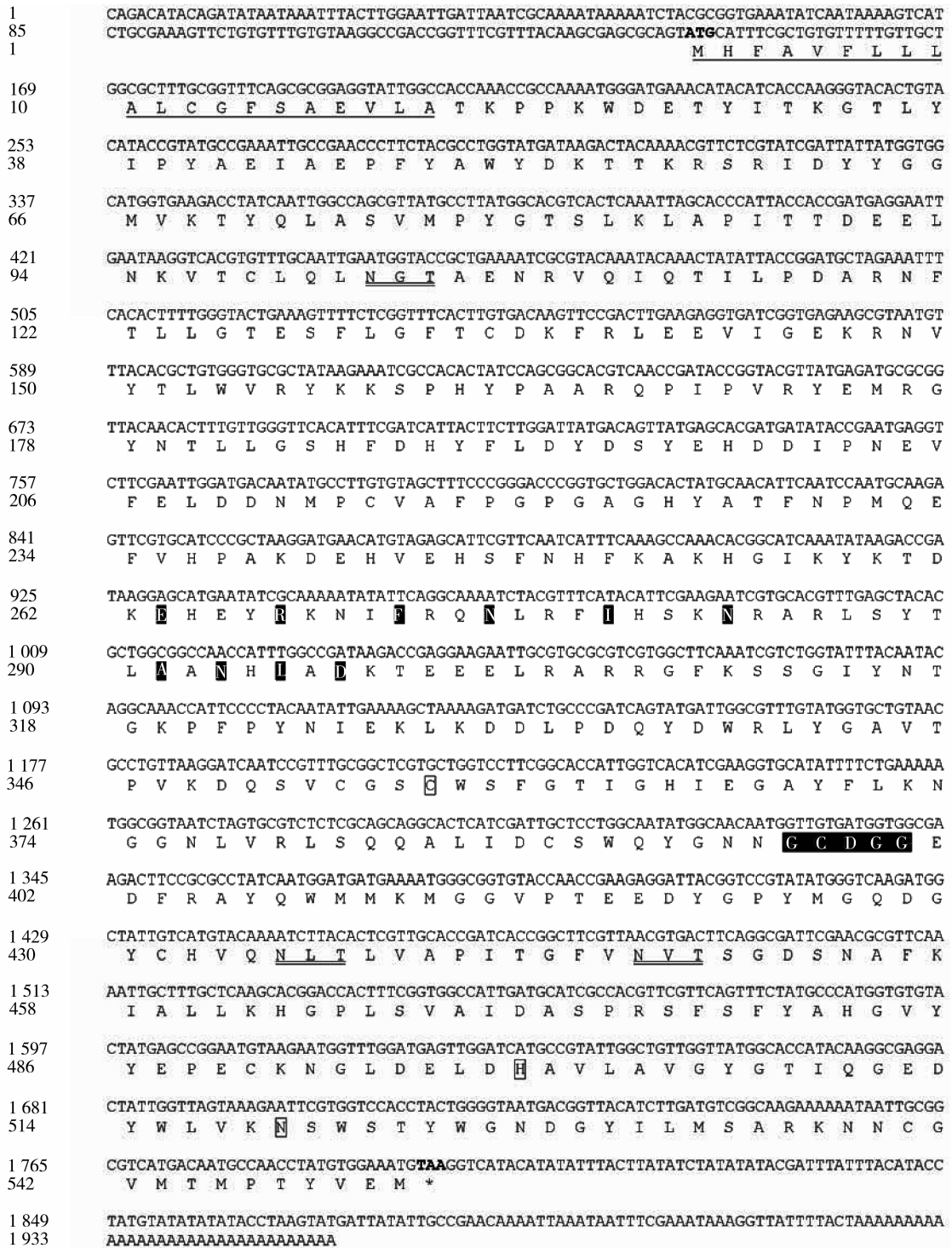


图 1 橘小实蝇 *Bdcyp* 基因的 cDNA 序列及推导的氨基酸序列
起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA 加粗；* 表示终止密码子；下划线为信号肽序列；双下划线为糖基化位点；催化三联体用方框表示；黑色底纹的为保守结构域 (ERFNIN、GNFD 和 GCDGG)

Fig. 1 The cDNA and deduced amino acid sequence of *Bdcyp* in *Bactrocera dorsalis*

The start codon is indicated with bold and the stop codon is indicated with bold and an asterisk. The predicated signal peptide is underlined. N-linked glycosylation is double underlined. Putative catalytic triad is boxed. Three conserved motifs of ERFNIN, GNFD and GCDGG are in white with blackground

并通过 MEGA5.04 软件中的邻接法构建系统发育树。结果表明，橘小实蝇 *Bdcyp* 与橄榄实蝇 *B. oleae* 半胱氨酸蛋白酶的亲缘关系最近，且聚为一支（图 2）。各目的昆虫均单独成一支，与传统上的分类关系一致，说明昆虫半胱氨酸蛋白酶在进化上具有较好的保守性。

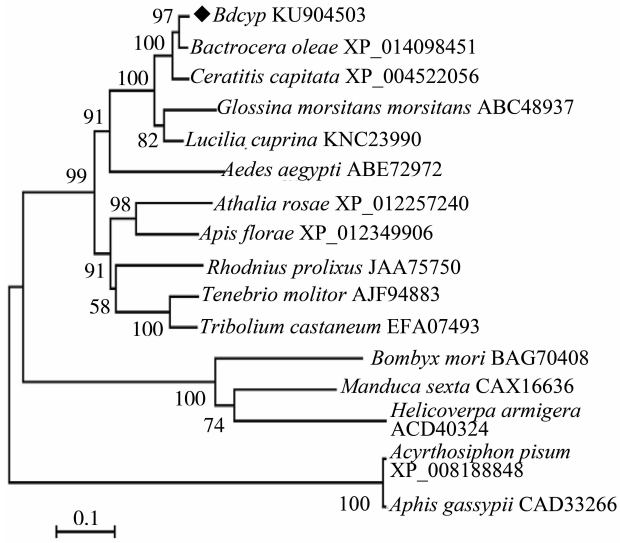


图 2 橘小实蝇 *Bdcyp* 系统发育分析

Fig. 2 Phylogenetic relationships analysis of *Bdcyp* of *B. dorsalis*

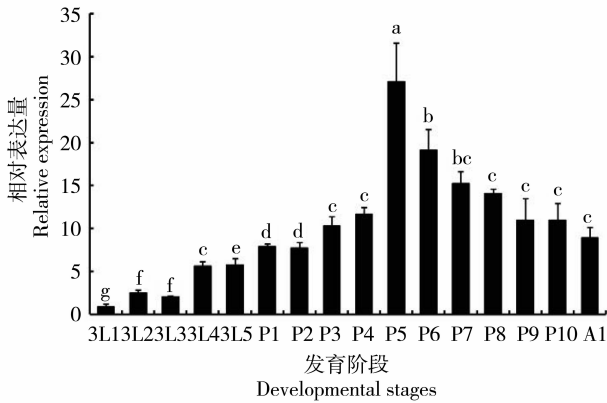


图 3 橘小实蝇 *Bdcyp* 在不同发育阶段的相对表达量

通过实时定量 PCR 检测三龄幼虫、蛹和成虫的 16 个不同时间点的表达量；3L1：三龄第 1 天幼虫；P1：第 1 天蛹；A1：第 1 天成虫；柱上不同字母代表显著性差异（单因素方差， $P < 0.05$ ）

Fig. 3 Relative expression level of *Bdcyp* in different developmental stages of *B. dorsalis*

Expression levels at 16 different time points in third-instar larvae, pupae and adults were detected by qPCR. Different letters above bars indicate significant difference at the 0.05 level (one-way ANOVA)

2.3 *Bdcyp* 在橘小实蝇不同发育阶段的表达模式

采用实时定量 PCR 方法检测 *Bdcyp* 在橘小实蝇不同发育阶段的表达情况。结果显示，*Bdcyp* 在橘小实蝇三龄幼虫、蛹期和成虫期均有表达（图 3）。从三龄幼虫到成虫的发育过程中，*Bdcyp* 的表达量呈现先升高后降低的趋势，蛹期第 5 天 *Bdcyp* 基因 mRNA 表达量显著高于其他时期（ $P < 0.05$ ），说明 *Bdcyp* 可能主要在这一时期发挥作用。

2.4 *Bdcyp* 在橘小实蝇不同组织间的表达模式

采用实时定量 PCR 方法检测 *Bdcyp* 在橘小实蝇三龄第 4 天幼虫 5 个不同组织的表达情况。结果显示，*Bdcyp* 在脂肪体的表达量显著高于其他 4 个组织（ $P < 0.05$ ），在表皮和气管中表达次之，而在马氏管和中肠的表达量较低（图 4）。

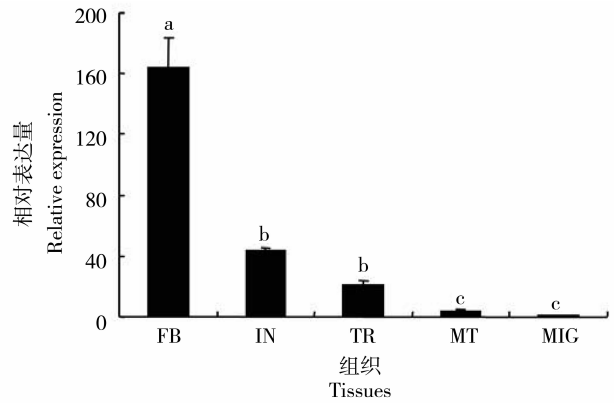


图 4 橘小实蝇 *Bdcyp* 在不同组织间的相对表达量

通过实时定量 PCR 检测脂肪体、表皮、气管、马氏管和中肠的表达量；柱上不同字母代表显著性差异（单因素方差， $P < 0.05$ ）

Fig. 4 Relative expression level of *Bdcyp* in different tissues of *B. dorsalis*

Expression levels in fat body (FB), integument (IN), Trachea (TR), Malpighian tubules (MT), and midgut (MG) were detected by qPCR. Different letters above bars indicate significant difference at the 0.05 level (one-way ANOVA)

3 讨论

半胱氨酸蛋白酶参与昆虫体内的食物消化^[6-8]、变态发育^[9-12]、种群防御^[13-14]等生理过程，在昆虫生命活动中发挥着重要作用。干扰半胱氨酸蛋白酶的生理功能，将会对目标害虫的活动和发育造成直接影响，导致其生理机能受到严重阻碍而死亡。因此，深入研究昆虫半胱氨酸蛋白酶将为开发新型杀虫剂提供潜在靶标。近年来昆虫半胱氨酸

酸蛋白酶的分子研究受到关注, 包括埃及伊蚊 *A. aegypti*^[24]、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*^[25]、刺舌蝇 *Glossina morsitans morsitans*^[26]、棉铃虫 *Helicoverpa armigera*^[19]、黄粉虫 *Tenebrio molitor*^[27]、麦杆蝇 *Delia coarctata*^[28] 等多种昆虫的半胱氨酸蛋白酶基因的结构和功能得到了鉴定。本研究以重要的农业害虫橘小实蝇为研究对象, 采用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆获得 *Bdcyp* 基因的 cDNA 全长。同源性比对分析结果表明, *Bdcyp* 编码的氨基酸序列与其他已知昆虫的半胱氨酸蛋白酶具有较高的一致性, 均在 60% 以上。*Bdcyp* 具有半胱氨酸蛋白酶的典型特征, 包括信号肽、催化三联体以及两个保守的 ERFNIN 和 GNFD 特征基序, 说明不同昆虫的半胱氨酸蛋白酶结构高度保守。

在昆虫中, 半胱氨酸蛋白酶在不同发育阶段的表达量存在很大的差异, 说明其在生长发育过程中发挥着不同的作用。棉铃虫 *Har-CL* 在幼虫 5~6 龄蜕皮前表达量显著升高, 而后快速下降, 然后在化蛹前再次升高, 说明 *Har-CL* 在幼虫发育期间被严格调控^[19]。甘蓝地种蝇 *Delia radicum DrCP1* 在整个发育时期均有表达, 包括卵、幼虫、蛹和成虫, 但在幼虫-蛹转化期的表达量明显升高, 说明该基因可能与幼虫变态化蛹有关^[19]。另外, 半胱氨酸蛋白酶在昆虫胚胎时期、生殖过程中发挥着重要作用^[7,30]。本研究发现, *Bdcyp* 在橘小实蝇不同发育阶段均有表达, 主要集中在蛹期高表达, 而在其他时期的表达量较低。基于半胱氨酸蛋白酶在变态发育方面的重要作用, 推测 *Bdcyp* 在蛹中期的高表达与这一时期的主要生命活动密切相关。我们对橘小实蝇不同日龄的蛹进行解剖观察, 发现化蛹后 1~2 d 其体内组织出现溶离、解体的现象; 化蛹后第 5 天成虫形态初现, 随后虫体上的覆盖物消失并羽化为成虫, 而这一时期 *Bdcyp* 的表达量有明显的提升, 因此推测 *Bdcyp* 在蛹期的组织重建和羽化过程中起着重要作用。

生物体内基因的表达规律与其所具有的功能有着密切的联系, 研究发现昆虫半胱氨酸蛋白酶基因的表达具有组织特异性。已有多数研究表明, 消化器官如肠道是半胱氨酸蛋白酶基因表达的主要场所, 包括黑腹果蝇 *D. melanogaster*^[25]、刺舌蝇 *G. morsitans morsitans*^[26]、豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum*^[8], 它们是重要的消化蛋白酶。Matsumoto 等^[7]发现玉米象鼻虫 *Sitophilus zeamais* 半胱氨酸蛋白酶基因在生殖器官, 如卵母细胞和滋养层中有较高的表达, 推测其可能在胚胎发育过程中起着重要

作用。通过免疫组化技术对半胱氨酸蛋白酶在家蚕 *Bombyx mori* 卵中的分布进行了定位分析, 发现其与卵黄蛋白的降解相关^[31]。此外, 目前还发现的半胱氨酸蛋白酶的合成部位还有昆虫的脂肪体以及血淋巴中的血细胞^[24,32]。本研究发现 *Bdcyp* 在橘小实蝇的幼虫脂肪体中表达量最高, 而脂肪体在双翅目蜕皮变态过程中发生解离, 推测 *Bdcyp* 可能参与幼虫组织的解离等。本研究仅从 mRNA 水平上检测了半胱氨酸蛋白酶基因在橘小实蝇体内的表达情况, 尚未涉及蛋白水平的表达及功能鉴定。根据本研究获得的 *Bdcyp* 全长基因结构及在不同发育时期和不同组织的表达量情况, 推测该基因在组织重建和蜕皮变态中发挥着重要作用, 下一步将研究该基因在橘小实蝇变态发育过程中的作用, 为基于 *Bdcyp* 的分子靶标的研发提供理论参考。

参考文献:

- [1] BERTI P J, STORER A C. Alignment/Phylogeny of the papain superfamily of cysteine proteases [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1995, 246(2): 273-283.
- [2] CHAPMAN H A, RIESE R J, SHI G P. Emerging roles for cysteine proteases in human biology [J]. *Annual Review of Physiology*, 1997, 59(1): 63-88.
- [3] ISAHARA K, OHSAWA Y, KANAMORI S. Regulation of a novel pathway for cell death by lysosomal aspartic and cysteine proteinases [J]. *Neuroscience*, 1999, 91(1): 233-349.
- [4] CHERNAYA V I. Early postnatal development-related dynamics of the activity of cathepsin L in rat brain structures [J]. *Neurophysiology*, 2001, 33(1): 15-18.
- [5] BARROS N M, PUZER L, TERSARIOL I L, et al. Plasma prekallikrein/kallikrein processing by lysosomal cysteine proteases [J]. *Biological Chemistry*, 2004, 385(11): 1087-1091.
- [6] BOLTER C, JONGSMA M A. The adaptation of insects to plant protease inhibitors [J]. *Journal of Insect Physiology*, 1997, 43(10): 885-895.
- [7] MATSUMOTO I, EMORI Y, ABE K, et al. Characterization of a gene family encoding cysteine proteinases of *Sitophilus zeamais* (maize weevil), and analysis of the protein distribution in various tissues including alimentary tract and germ cells [J]. *Journal of Biochemistry*, 1997, 121(3): 464-476.
- [8] CRISTOFOLETTI P T, RIBERIO A F, DERAISON C, et al. Midgut adaption and digestive enzyme distribution in a phloem feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2003, 49(1): 11-24.
- [9] UCHIDA K, OHMORI D, UENO T, et al. Preoviposition activation of cathepsin-like proteinase in degenerating ovarian follicles of the mosquito *Culex pipiens pallens* [J]. *Developmental Biology*, 2001, 237(1): 68-78.

- [10] ZHAO X F, AN X M, WANG J X, et al. Expression of the *Helicoverpa* cathepsin B-like proteinase during embryonic development [J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2005, 58(1): 39–46.
- [11] SHIBA H, UCHIDA K, KOBAYASHI H, et al. Involvement of cathepsin B and L-like proteinases in silk gland histolysis during metamorphosis of *Bombyx mori* [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2001, 390(1): 28–34.
- [12] RABOSI A, STOKA V, PUIZDAR V, et al. Novel aspartyl proteinase associated to fat body histolysis during *Ceratitis capitata* early metamorphosis [J]. Archives of insect Biochemistry and Physiology, 2004, 57(2): 51–67.
- [13] COMAS D, PETIT F, PREAT T. *Drosophila* long-term memory formation involves regulation of cathepsin activity [J]. Nature, 2004, 430(6998): 460–463.
- [14] KUTSUKAKE M, SHIBAO H, NIKOH N, et al. Venomous protease of aphid soldier for colony defense [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(31): 11338–11343.
- [15] CLARKE A R, ARMSTRONG K F, CARMICHAEL A E, et al. Invasive phytophagous pests arising through a recent tropical evolutionary radiation; the *Bactrocera dorsalis* complex of fruit flies [J]. Annual Review of Entomology, 2005, 50(1): 293–319.
- [16] 李伟丰, 杨朗, 唐侃, 等. 中国桔小实蝇种群的微卫星多态性分析 [J]. 昆虫学报, 2007, 50(12): 1255–1262.
- LI W F, YANG L, TANG K, et al. Microsatellite polymorphism of *Bactrocera dorsalis* (Hendel) populations in China [J]. Acta Entomologica Sinica, 2007, 50(12): 1255–1262.
- [17] JIN T, ZENG L, LIU Y Y, et al. Insecticide resistance of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae), in mainland China [J]. Pest Management Science, 2011, 67(3): 370–376.
- [18] WANG L L, HUANG Y, LU X P, et al. Overexpression of two α -esterase genes mediates metabolic resistance to malathion in the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) [J]. Insect Molecular Biology, 2015, 24(4): 467–479.
- [19] LIU J, SHI G P, ZHANG W Q, et al. Cathepsin L function in insect molting: molecular cloning and functional analysis in the cotton boll worm, *Helicoverpa armigera* [J]. Insect Molecular Biology, 2006, 15(6): 823–834.
- [20] YANG W J, YUAN G R, CONG L, et al. *De novo* cloning and annotation of genes associated with immunity, detoxification and energy metabolism from the fat body of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* [J]. PLoS ONE, 2014, 6: e94470.
- [21] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731–2739.
- [22] SHEN G M, JIANG H B, WANG X N, et al. Evaluation of endogenous references for gene expression profiling in different tissues of the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Dipter: Tephritidae) [J]. BMC Molecular Biology, 2010, 11(214): 1982–1995.
- [23] LIVALL K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402–408.
- [24] CHO W L, TSAO S M, HAYS A R, et al. Mosquito cathepsin B-like protease involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor [J]. Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(19): 13311–13321.
- [25] MATSUMOTO M, WATANABE H, ABE K, et al. A putative digestive cysteine proteinase from *Drosophila melanogaster* is predominantly expressed in the embryonic and larval midgut [J]. European Journal of Biochemistry, 1995, 227(1/2): 582–587.
- [26] YAN J, CHENG Q, LI C B, et al. Molecular characterization of three gut genes from *Glossina morsitans morsitans*: cathepsin B, zinc-metalloprotease and zinc-carboxypeptidase [J]. Insect Molecular Biology, 2002, 11(1): 57–65.
- [27] BETON D, GUZZO C R, RIBEIRO A F, et al. The 3D structure and function of digestive cathepsin L-like proteinases of *Tenebrio molitor* larval midgut [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2012, 42(9): 655–664.
- [28] PYATI P S, BELL H A, FITCHES E, et al. Cathepsin L-like cysteine proteinase (*DcCathL*) from *Delia coarctata* (wheat bulb fly): basis of insecticidal activity [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2009, 39(8): 535–546.
- [29] HEGEDUS D, O'GRADY M, CHAMANKHAH M, et al. Changes in cysteine protease activity and localization during midgut metamorphosis in the crucifer root maggot (*Delia radicum*) [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2002, 32(11): 1585–1596.
- [30] YAMAMOTO Y, TAKAHASHI S Y. Cysteine proteinase from *Bombyx* eggs: role in programmed degradation of yolk proteins during embryogenesis [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 1993, 106(1): 35–45.
- [31] YAMAMOTO Y, TAKIMOTO K, IZUMI S, et al. Molecular cloning and sequencing of cDNA that encodes cysteine proteinase in the egg of the silk worm, *Bombyx mori* [J]. Journal of Biochemistry, 1994, 116(6): 1330–1335.
- [32] KURATA S, SAITO H, NATORI S. Purification of a 29-kDa hemocyte proteinase of *Sarcophaga peregrina* [J]. European Journal of Biochemistry, 1992, 204(2): 911–914.