

赤拟谷盗功能基因组学研究进展^{*}

李承军 王艳允 刘 幸 桑 明 李 斌^{**}

(江苏省生物技术与生物多样性重点实验室 南京师范大学生命科学学院 南京 210046)

摘 要 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 是一种重要的模式生物,在遗传、发育、生化与免疫等研究领域均取得了重要的研究进展。同时它也是一种危害极大的鞘翅目类储粮害虫,在世界各地都有分布,每年给储藏物造成了数十亿美元的经济损失。其全基因组测序的完成、遗传操作体系的构建及系统 RNAi 方法的应用都极大地促进了其功能基因组学的研究。本文综述了近年来赤拟谷盗基因组计划及功能基因组学的研究进展,拟为赤拟谷盗的生物学研究和防治奠定基础。

关键词 赤拟谷盗, 功能基因组学, RNA 干扰, 蛋白质组学, 模式生物

Progresses in research on the functional genomics on *Tribolium castaneum*

LI Cheng-Jun WANG Yan-Yun LIU Xing SANG Ming LI Bin^{**}

(Jiangsu Key Laboratory for Biodiversity and Biotechnology, College of Life Science,
Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

Abstract *Tribolium castaneum* is a powerful model organism for research in such fields as insect genetics, biology development, biochemistry and immunity, and rapid and useful progress has been made in these fields in recent years. *T. castaneum* is also an important coleopteran pest of stored agricultural products. This globally distributed pest causes billions of dollars of damage to such stored products each year. Recently, the sequencing of the entire genome of *T. castaneum*, the construction of their genetics operation systems, and the utilization of the systemic RNA interference, have greatly facilitated and accelerated research on their functional genomics and the related fields. In order to facilitate research on both the fundamental biology and control of *T. castaneum*, we here review progresses and achievements in research on *T. castaneum* genome projects and functional genomics over the past few years.

Key words *Tribolium castaneum*, functional genomics, RNA interference, proteomics, model organism

赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 属鞘翅目拟步甲科,拟谷盗属,是危害严重的储粮害虫,在世界范围内广泛分布于热温带地区(Sokoloff, 1972),在我国除西藏之外均有报道。赤拟谷盗食性广,多生活在干燥的环境中,成虫、幼虫均可危害面粉、麸皮、米糠、禾谷类种子等,尤其在面粉厂附近经常大量发生。除直接危害外,其成虫体表的臭腺可分泌含苯醌等致癌物质的臭液,使被害物结块、变色、发臭而不能食用,从而造成严重的经济损失(仵均祥, 2003)。

始于 20 世纪初,果蝇 *Drosophila melanogaster* 成为遗传学研究的模式生物,随着现代遗传学、分子生物学、基因组学及功能基因组学的发展,人们普遍认识到非果蝇模式生物的研究变得越来越重要,而且从基因组学的层面来研究生长与发育、遗传与变异、结构与功能、基因的交流与变迁、物种的进化与适应等问题可以使我们更深入地了解生命的复杂与奥秘。迄今,除 24 种果蝇完成全基因组测序外,另有 6 个目的 29 种昆虫也完成了基因组测序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/>)

^{*} 资助项目:国家自然科学基金(31172146)、江苏高校自然科学研究计划(10KJA180023)、江苏省自然科学基金(BK2011785)及江苏高校优势学科建设工程资助项目。

^{**} 通讯作者, E-mail: libin@njnu.edu.cn

收稿日期:2011-10-28,接受日期 2011-11-08

leuks. cgi)。

赤拟谷盗成为一种重要的模式昆虫,主要得益于美国堪萨斯州立大学的 Susan J. Brown 和 Robin Denell 教授以及美国农业部的 Richard W. Beeman 博士的杰出工作,他们合作得到赤拟谷盗基因组测序的资助,使赤拟谷盗成为最早进行全基因组测序的鞘翅目害虫,并因他们建立的一系列赤拟谷盗突变系、转基因系及赤拟谷盗高效的 RNA interference (RNAi) 机制,从而奠定了赤拟谷盗作为实验模式材料的超级地位 (Schinko *et al.*, 2010; Tomoyasu and Denell, 2004; Richards *et al.*, 2008; Brown *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2008)。作为一种在遗传进化和发育研究方面易于驾驭的模式昆虫,近年来赤拟谷盗在发育、遗传、免疫与生物防治等方面研究均取得了显著进展,本文将对其基因组与功能基因组的相关研究进行简要介绍。

1 赤拟谷盗基因组计划

堪萨斯州立大学科学家完成赤拟谷盗的基因组与 ESTs 测序计划后迅速向全世界发布了原始数据,并接受了全球 60 多个研究小组的合作研究申请,共同对赤拟谷盗基因组进行了高效的注释。结果表明,通过 7.3X 的测序深度,共获得 152 万条序列,最后组装的框架图覆盖度为 160 Mb,其中约 1/3 的部分为重复序列。然而赤拟谷盗全基因组预测为 204 Mb,推测未能测序组装的部分为高度重复的异染色质区域 (Richards *et al.*, 2008)。

为加速基因组注释与功能分析, Park 等 (2008) 利用其所测序的 50 524 条 ESTs 及来自于 NCBI 的 10 704 条 ESTs 组装了 12 269 clusters,并将其中 10 134 clusters 定位到 6 463 个 GLEAN 基因中。约有 1 600 clusters 缺乏对应的 GLEAN 序列,意味着有相当数量的转录序列在基因预测时丢失或被去除,保守估计现在的 ESTs 集合代表着 7 500 多个转录单元。

结合生物信息学分析与 ESTs 证据,预测赤拟谷盗全基因组编码 16 404 个基因,约 47% 的原始基因在昆虫和脊椎动物之间表现出直系同源关系,其中 15% 的基因是普遍存在的单拷贝直系同源基因,此外,约 9% 的基因是昆虫特有的直系同源基因。尽管赤拟谷盗与其它昆虫拥有大致相当的保守基因,然而却拥有更多的非保守基因

(Richards *et al.*, 2008), 赤拟谷盗基因的高度变异性与非保守性也体现在进化与发育相关基因上 (Wheeler *et al.*, 2005)。而且赤拟谷盗比果蝇等昆虫具有更复杂的环境适应性,表现在赤拟谷盗拥有更多的味觉与嗅觉受体基因以及更多的 P450 与其它的脱毒与代谢酶系确保其适应能力 (Richards *et al.*, 2008)。这些新的研究结果也有助于理解其他甲虫种类的生物学机制,使赤拟谷盗也将像果蝇一样,成为甲虫研究的首选模型系统。并且新的测序结果对农业害虫的防治也具有重要意义,有望让科学家找到防御农业害虫的更好方法。

2 赤拟谷盗遗传操作体系的构建

2.1 赤拟谷盗转座子插入突变体系的构建

PiggyBac 转座子与一些形态学标记如眼色基因: *rosy*、*white* 等标记一起使用构建突变品系是一种广泛应用的遗传操作方法 (Rubin and Spradling, 1982; Klemenz *et al.*, 1987), 在没有合适的眼色突变的物种中,则使用增强的绿色荧光蛋白 (EGFP) 替代眼色基因 (Handler and Harrell, 2001)。Berghammer 等 (1999) 使用 *Hermes* 和 *piggyBac* 转座子在赤拟谷盗中虽然可以介导基因的转化,但因荧光蛋白启动子的组织特异性、野生型眼色对微弱荧光蛋白表达的干扰等因素而限制了其应用。因此 Lorenzen 等 (2002) 将赤拟谷盗多聚泛蛋白 (*TcPUB*) 基因的启动子置于其朱红色眼色 (*Tcv*) 基因编码区上游,将其注射进 *Tcv* 缺陷品系的胚胎中, *Tcv* 的瞬时表达可以完全恢复幼虫眼色突变。Siebert 等 (2008) 也将 *TcaTub1* 启动子连接到 *Tcv* 的编码序列,同样可以驱动 *Tcv* 幼虫眼色突变的恢复表达,暗示了赤拟谷盗转座子插入突变体系构建的可能性。

Lorenzen 等 (2003) 进一步在赤拟谷盗中构建、定位了一系列的 *piggyBac* 的插入元件,发现它们可以精确的插入到经典的 TTAA 目标序列,使用 EGFP 报告基因从 45 个转基因品系中发现了 Pig-23、Pig-19 和 Rem-5 3 个增强子诱捕系,这些增强子诱捕系可以活化在基因组中固化的 *helper* 元件并使其携带的转座子在基因组中再迁移,从而使 *piggyBac* 介导的基因组操作有望成为更精细的方法。该小组又在赤拟谷盗中建立了一种高效的 *piggyBac* 插入方法,这种方法使得在鞘翅目昆虫

中实现基因组范围内的饱和插入突变成为了现实的目标(Lorenzen *et al.*, 2007)。

最近 Trauner 等(2009)在赤拟谷盗中实施了大范围的转座子诱变筛选。一共产生了 6 500 多个新的 *piggyBac* 的插入,序列分析表明所有插入位点在基因组中随机分布。其中 421 个插入被证明是胚胎时期隐性致死,75 个是胚胎时期半致死,8 个隐性不育,505 个插入表现为增强子诱捕模式,其中 403 个插入被定位在转录单元内,这些增强子诱捕品系和胚胎致死品系的建立,将极大的促进昆虫生物学、遗传与发育、害虫防治和进化等多种领域的发展。

2.2 赤拟谷盗 GAL4/UAS 二元表达系统的构建

GAL4/UAS 系统是一种高效的二元表达系统,它是基因功能研究的重要工具,广泛应用在果蝇、斑马鱼、非洲爪蟾、拟南芥等模式生物研究中(Brand *et al.*, 1994; Guyer *et al.*, 1998; Scheer and Campos-Ortega, 1999; Hartley *et al.*, 2002)。Schinko 等(2010)将适用于果蝇中的 GAL4/UAS 系统(GAL4 Δ - VP16 和 GAL4 - VP16)直接导入赤拟谷盗中,并让其和携带受 UAST 或 UASp 调控的 lacZ 应答器的赤拟谷盗杂交,热激之后的后代在表型上并没有出现果蝇系统那样明显的差别。于是他们将驱动结构和应答结构中果蝇的核心启动子都替换为赤拟谷盗的核心启动子,发现赤拟谷盗 GAL4 Δ 和 GAL4 - VP16 报告基因的表达可通过内源启动子启动。为了解决 GAL4/UAS 是否具有发育时期或组织特异性问题,他们又对胚胎、幼虫、蛹和成虫进行了热激处理,24 h 后在载有 GAL4 和 UAS 结构的各个发育阶段及不同器官与组织中均有表达,表明 GAL4 Δ 系统可以被广泛的用于赤拟谷盗的转基因体系,这些结果标志赤拟谷盗的 GAL4/UAS 二元表达系统已经建立,并且支持转基因的高表达需要内源性的调控序列的观点。

3 赤拟谷盗 RNAi 机制及应用

RNAi 指靶基因同源的双链 RNA(dsRNA)引起该基因编码的 mRNA 降解,从而特异性抑制该基因的表达, RNAi 具有高效性和高特异性的特点,广泛存在于动、植物等各种生物体内(Fire *et al.*, 1998; Meister and Tuschl, 2004; Mello and

Conte, 2004)。RNAi 技术在赤拟谷盗中应用始于 1999 年,通过直接向胚胎注射 dsRNA 研究基因功能(Brown *et al.*, 1999)。目前在西部玉米根虫、线虫、变形虫、蝉、蚂蚱等多种生物中都进行了 RNAi 的研究(Dong and Friedrich, 2005; Roberts *et al.*, 2007)。迄今研究表明赤拟谷盗是唯一与线虫一样具有高效的系统性 RNAi 机制的昆虫,即把 dsRNA 注射到赤拟谷盗幼虫、蛹、成虫和胚胎的任何时期,可使目的基因的表达受到抑制,而且此抑制效应还可以延续到其下一代,从而使赤拟谷盗成为在发育过程中敲除特定基因活性的最优模式生物(Tomoyasu and Denell, 2004; Tomoyasu *et al.*, 2008; Brown *et al.*, 2009)。

既然赤拟谷盗和线虫都有明显的系统 RNAi 效应,如果系统性 RNAi 的机制在昆虫之间是保守的,那么应该有一些基因在线虫和赤拟谷盗中存在,而在果蝇等其它昆虫中没有。事实表明线虫和赤拟谷盗基因之间保守程度很低,赤拟谷盗缺少一些在线虫中 RNAi 起作用的重要基因。例如, *sid-1* 基因编码的 SID-1 多次跨膜蛋白在线虫中作为摄入 dsRNA 的通道,果蝇没有该基因,表明 *sid-1* 基因是决定机体有无系统 RNAi 的首要条件,而在赤拟谷盗中有 3 个类似于 *sid-1* 的基因,这可能使赤拟谷盗的 RNAi 更灵敏。已知 Ago-2 基因编码的蛋白可提高 RNAi 的效率,果蝇中只有 1 个拷贝,而赤拟谷盗有 2 个,且都参与 RNAi 途径,2 个 Ago-2 可能使得赤拟谷盗的 RNAi 比果蝇更有效率。尽管赤拟谷盗和果蝇都有 2 个 Dicer 酶,在果蝇中只有 Dcr-2 参与 RNAi 途径,而在赤拟谷盗中 Dcr-1 与 Dcr-2 均参与了 RNAi 途径,这可能有助于系统 RNAi 的发生。此外赤拟谷盗比果蝇还多了个 *R2D2-like* 基因,该蛋白可维持 dsRNA 的稳定,从而使赤拟谷盗 RNAi 更加长效。然而 RNA 依赖的 RNA 聚合酶在线虫 RNAi 中起放大作用,在赤拟谷盗中却没有该基因,所以其放大机制仍不清楚。众多关键基因的差异显示赤拟谷盗与线虫的系统 RNAi 的机制并不一样,但是目前还不能判定赤拟谷盗中是否存在 ATP-依赖机制,因此,赤拟谷盗的 RNAi 的分子机制仍需要进一步的研究(Richards *et al.*, 2008; Tomoyasu *et al.*, 2008)。尽管如此, RNAi 的利用已为赤拟谷盗功能基因组学方面的研究奠定了重要的技术基础。目前,利用 RNAi 在赤拟谷盗生长、发育、免

疫及信号传导等研究中已经取得重要进展。

4 赤拟谷盗功能基因组学相关研究

在高通量自动分析与注释的基础上,人们已对各种发育及农业害虫防治与利用中有重要意义的 2 000 多个基因进行了进一步的鉴定与分析,其中包含生长发育调节基因和各种组织器官如眼、腿、翅膀、腹背等发育相关基因,及一系列杀虫剂候选靶标基因:如 24 个 Cys-loop 门控离子通道基因和 134 个细胞色素 P450 基因,或潜在的杀虫剂靶标基因如 24 个 C1 半胱氨酸肽酶基因、72 个 G 蛋白偶联受体(GPCRs)及 41 个神经肽类激素基因等(Richards *et al.*, 2008)。利用这些基因组信息,发展和应用新的实验手段,通过在基因组或系统水平上全面分析基因的功能,使得赤拟谷盗研究从对单一基因或蛋白质的研究转向对多个基因或蛋白质同时进行的系统研究。借助于赤拟谷盗转基因体系、系统 RNAi 方法、基因芯片与表达谱、蛋白质组学以及相应的生物信息学技术平台,在赤拟谷盗生长、发育、免疫等有重要影响的功能基因研究方面已取得了一些重要进展。

4.1 赤拟谷盗生长、发育与激素调节

昆虫的一生从卵到成虫需要经历多次彻底的变化。这些变化是如此明显,又有固定的周期,使昆虫成为探索生命奥秘的理想实验模型。昆虫的发育主要靠神经内分泌系统来调节,神经系统接受环境的刺激,如光照、温度、湿度和食物等,把这些冲动转变成化学信使或激素,目前,关于环境与神经系统之间的相互作用了解不多,而激素对发育的调节已积累了大量的资料,其中研究较多的内分泌激素是保幼激素(JH)和蜕皮激素(Ecd),但是 JH 的受体或信号系统至今还不清楚(Gilbert *et al.*, 2000; Wheeler and Nijhout, 2003; Dubrovsky, 2005)。多种研究表明 Met 蛋白可以在生理浓度下与 JH 结合,所以它可能是一个潜在的 JH 受体(Dubrovsky, 2005; Flatt *et al.*, 2005)。但是 *met* 缺陷对果蝇幼虫到蛹的转变并没有影响(Wilson and Ashok, 1998; Wilson *et al.*, 2006a, 2006b),因此它作为 JH 潜在受体的身份受到了质疑,为解开这个谜团,Konopova 和 Jindra (2007)研究了赤拟谷盗中 *met* 在 JH 缬抗变态作用中的功能。因赤拟谷盗幼虫和早期蛹受 JH 类

似物烯虫酯或天然的 JH-III 诱导导致早期死亡,当抑制 *Tcmet* 表达后,烯虫酯和 JH-III 的这种作用消失,说明 *Tcmet* 在 JH 信号系统中控制着赤拟谷盗进入变态发育的作用。尽管如此,尚无 JH 直接作用于 *Tcmet* 的证据,敲除与 JH 生物合成相关的基因 *JHAMT* 会导致 JH 缺陷(Minakuchi *et al.*, 2008),赤拟谷盗 JH 缺陷会引起交配行为不活跃、精子转移能力弱、雌性个体与 JH 缺陷的雄性交配后卵和后代的产量较低,表明 JH 在调节雄性生殖中也起着重要作用(Parthasarathy *et al.*, 2009),而且 JH 和 20-羟基蜕皮酮(20-hydroxyecdysone, 20E)是卵黄蛋白原(vitellogenin, Vg)基因表达的必须因子(Parthasarathy *et al.*, 2010b)。

20E 是昆虫 Ecd 的主要活性形式,其信号是通过一个异源的二聚体传递,它是由 2 个核内受体 EcR(ecdysone receptor)和 USP(ultraspiracle)组成(Yao *et al.*, 1993)。Ecd 结合 EcR 需要 USP 的搭档才能完成,EcR 和 USP 基因在赤拟谷盗中各有 2 种选择性拼接形式,RNAi 表明 EcR 的选择性拼接而不是 USP 在幼虫-蛹变态时显现了不同的作用(Tan and Palli, 2008)。USP 可能是另一个潜在的 JH 受体(Fang *et al.*, 2005),但 Iwema 研究显示 TcUSP 不管是体内或体外均不能被 RXR 的配体结合,而且因其配体结合位点构象分离,暗示其缺乏与配体的结合能力,并质疑了其作为 JH 受体的可能性(Iwema *et al.*, 2007)。而且 RNAi 沉默 EcR 和 USP 基因后可导致赤拟谷盗滞育,进一步分析表明它还阻断了卵巢生长和初级卵母细胞的成熟(Parthasarathy *et al.*, 2010a)。但 JH 的受体到底是什么迄今还在争议之中。

昆虫体内另一大类激素是成员丰富的神经肽类激素(含部分蛋白质激素和生物胺),它们通过 G 蛋白偶联受体(GPCRs)信号系统来调控参与生物的生长、发育与生殖、取食等行为和其他多种生理过程。目前基于基因组与蛋白质组学方法从赤拟谷盗中共分析发现 41 种神经肽类激素基因,共编码 80 余种成熟的神经肽类激素和 100 余种相关肽类物质,而且这些神经肽激素的相关受体及生物胺受体等也已被鉴定(Hauser *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008),为其功能分析奠定了基础。同时 Arakane 等(2008a)分析了 EH、ETH、CCAP 和 bursicon 等激素及其相关 6 种受体基因,证实这些神经肽信号系统经过复杂的相互作用协同调控昆

虫羽化行为,而 CCAP 和其受体还被报道在调节昆虫心脏的律动方面发挥重要作用 (Li *et al.*, 2011)。

4.2 赤拟谷盗的免疫与防御机制

昆虫在长期的进化过程中,为了有效地保护个体的生存,保证种族的延续,发展出了一套独特的防御与免疫系统,赤拟谷盗和其他昆虫一样用它的表皮和上皮部分保护其身体,导管和食道可作为生理生化的屏障以及通过产生抗菌肽和活性氧/氮 (ROS/RNS) 保持对局部的分子防御 (Zou *et al.*, 2007)。同时这条防御线可以阻止大部分的抗原和其他物质进入血腔,或通过急性反应固定并杀死病原微生物。另外研究发现基质金属蛋白酶 (MMPs) 可以调节赤拟谷盗胚胎时期的气管和原肠的发生以及先天免疫防御反应 (Knorr *et al.*, 2009)。赤拟谷盗体内免疫系统也由细胞免疫 (cellular immunity) 和体液免疫 (humoral immunity) 两部分组成。Arakane 等 (2005) 发现赤拟谷盗 *laccase-2* 基因与表皮的着色与硬化相关,并发现赤拟谷盗的几丁质合成酶 *TcCHS-A* 和 *TcCHS-B* 对于赤拟谷盗的外骨骼表皮和围食膜具有重要的作用 (Arakane *et al.*, 2008b)。进而, Zou 等 (2007) 在赤拟谷盗中分析发现 300 余种基因参与免疫应答,涉及病原体识别,及 Toll、IMD 和 JAK/STAT 3 种主要信号传导途径在细胞内的信号传递及执行。最近研究表明 PLA2 可诱导赤拟谷盗幼虫 Toll 和 IMD 基因的表达,进而产生不同的抗菌肽用于抵抗外源的细菌的侵染 (Shrestha and Kim, 2010)。Altincicek 等 (2008) 发现在 LPS 的刺激下可以诱导 288 个基因表达,其中 75 个是免疫相关基因,并且有 5 个是新鉴定的基因。这些研究表明赤拟谷盗的免疫功能比冈比亚按蚊具有更广泛的防御,这个系统对赤拟谷盗的生存至关重要。

4.3 赤拟谷盗表观遗传学的发展

表观遗传学已经成为一个新的研究热点, miRNA 是表观遗传学研究的一个重要方面。自从在秀丽隐杆线虫中发现了第 1 个 miRNA 以来 (Lee *et al.*, 1993; Wightman *et al.*, 1993), 对于其他生物的 miRNA 的发现、靶标的预测及功能研究也在加紧地进行。随着赤拟谷盗全基因组测序的完成, Luo 等 (2008), Singh 和 Nagaraju (2008) 分

别利用生物学信息方法在赤拟谷盗中预测了 118 个和 45 个 miRNA, 并且也对其潜在的靶标基因进行了预测。进而 Marco 等 (2010) 利用 SOLiD 测序技术在赤拟谷盗中发现了 203 个候选 miRNA, 其中 51 个 miRNA 在 miRBase 中登录过, 33 个 miRNAs 在赤拟谷盗中没有描述但与其它生物的 miRNAs 表现出了很高的同源性, 此外有 119 个新的候选 miRNAs 与已知的 miRNAs 没有明显的同源性。进一步分析发现赤拟谷盗中的 miRNA 的数量至少比模式生物果蝇的 miRNA 总量高出 15%。其中只有 1/3 的 miRNA 基因是保守的, 至少有 18 个 miRNA 在果蝇中缺失但在脊椎动物中是保守的。表明赤拟谷盗较之果蝇具有比较原始的基因特征, 其 miRNA 比果蝇的 miRNA 更具有昆虫祖先的代表性, 也更保守。同样暗示赤拟谷盗研究可能在比较基因组学、进化、发育等研究中扮演更为重要的角色。

4.4 赤拟谷盗蛋白质组学研究

蛋白质组学是阐明生物体各种组织与细胞中全部蛋白质的表达模式及功能的学科。赤拟谷盗的蛋白质组学研究工作也逐渐展开, Li 等 (2008) 从赤拟谷盗头和神经组织中利用蛋白质组学方法鉴定了包括 AKH, CAPA, SIFamide, 胰岛素样激素, 利尿激素与抗利尿激素等 20 个神经肽类基因中的 71 种肽类成分。通过 2D-Gel 结合 MALDI-TOF 的方法, Oppert 等 (2009) 从中肠组织 88 个样品中鉴定了 37 种蛋白, 通过 1D-Gel 结合 ESI-MS/MS 法鉴定出 98 种蛋白, 其中 16 种蛋白在 2 种方法中都被鉴定, 表明不同方法具有不同的蛋白鉴定能力。South 等 (2011) 在对赤拟谷盗精液蛋白的研究中共鉴定 14 种雄性生殖腺的 (SFPs) 蛋白, 其中 13 种有雄性倾向的表达, 为研究 SFPs 在性别决定中的作用打下了基础。赤拟谷盗蛋白质组学的研究还处于起步阶段, 已有的研究大多是进行了蛋白的鉴定, 缺乏对其功能及调控机制的探讨。今后蛋白质组学应将发现具有重要生理调控功能的蛋白, 阐明其作用机制与调控模式等作为主要研究方向。

5 展望

赤拟谷盗作为一种新测序的昆虫, 其功能基因组学研究还处于起步阶段。一方面已经开展的

工作如利用 RNAi 技术研究基因功能的研究只能提供表面上的现象,而揭示深层次的机理或机制才是开展功能基因组研究的根本目的。另外很多生物学领域至今还未有人涉足,或者只进行了一些简单的生物信息学分析,这些基因在赤拟谷盗体内是如何发挥功能的还有待进一步研究。随着新技术的不断引入,功能基因组学的研究目标已经偏向于揭示多种蛋白质协调作用的信号调控机制,对赤拟谷盗而言, RNAi 技术如何与蛋白质组学及高通量测序技术相结合在系统水平上揭示基因功能,以及表观遗传效应如何整合进基因组的遗传机制,这些问题的解决,将为赤拟谷盗生物学研究及其它害虫的防治以及寻找新的杀虫剂靶标提供新的研究方法和思路并奠定重要基础。

参考文献 (References)

- Altincicek B, Knorr E, Vileinskas A, 2008. Beetle immunity: Identification of immune-inducible genes from the model insect *Tribolium castaneum*. *Dev. Comp. Immunol.*, 32(5):585—595.
- Arakane Y, Li B, Muthukrishnan S, Beeman RW, Kramer KJ, Park Y, 2008a. Functional analysis of four neuropeptides, EH, ETH, CCAP and bursicon, and their receptors in adult ecdysis behavior of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Mech. Dev.*, 125 (11/12): 984—995.
- Arakane Y, Muthukrishnan S, Beeman RW, Kanost MR, Kramer KJ, 2005. Laccase 2 is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning. *PNAS*, 102 (32): 11337—11342.
- Arakane Y, Specht CA, Kramer KJ, Muthukrishnan S, Beeman RW, 2008b. Chitin synthases are required for survival, fecundity and egg hatch in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38: 959—962.
- Berghammer AJ, Klingler M, Wimmer EA, 1999. A universal marker for transgenic insects. *Nature*, 402 (6760): 370—371.
- Brand AH, Manoukian AS, Perrimon N, 1994. Ectopic expression in *Drosophila*. *Methods Cell Biol.*, 44: 635—654.
- Brown SJ, Mahaffey JP, Lorenzen MD, Denell RE, Mahaffey JW, 1999. Using RNAi to investigate orthologous homeotic gene function during development of distantly related insects. *Evol. Dev.*, 1(1):11—15.
- Brown SJ, Shippy TD, Miller S, Bolognesi R, Beeman RW, Lorenzen MD, Bucher G, Wimmer EA, Klingler M, 2009. The red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera): a model for studies of development and pest biology. *Cold Spring Harb Protoc.*, doi:10.1101/pdb.em0126
- Dong Y, Friedrich M, 2005. Nymphal RNAi; systemic RNAi mediated gene knockdown in juvenile grasshopper. *Bmc. Biotechnol.*, 5:25.
- Dubrovsky EB, 2005. Hormonal cross talk in insect development. *Trends Endocrinol. Metab.*, 16(1):6—11.
- Fang F, Xu Y, Jones D, Jones G, 2005. Interactions of ultraspiracle with ecdysone receptor in the transduction of ecdysone-and juvenile hormone-signaling. *FEBS J.*, 272 (2):1577—1589.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC, 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669):806—811.
- Flatt T, Tu MP, Tatar M, 2005. Hormonal pleiotropy and the juvenile hormone regulation of *Drosophila* development and life history. *Bioessays*, 27(10):999—1010.
- Gilbert LI, Rybczynski R, Song Q, Mizoguchi A, Morreale R, Smith WA, Matubayashi H, Shionoya M, Nagata S, Kataoka H, 2000. Dynamic regulation of prothoracic gland ecdysteroidogenesis: *Manduca sexta* recombinant prothoracicotropic hormone and brain extracts have identical effects. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30 (11): 1079—1089.
- Guyer D, Tuttle A, Rouse S, Volrath S, Johnson M, Potter S, Gorlach J, Goff S, Crossl L, Ward E, 1998. Activation of latent transgenes in Arabidopsis using a hybrid transcription factor. *Genetics*, 149:633—639.
- Handler AM, Harrell RA, 2001. Transformation of the caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa*, with a piggyBac vector marked with polyubiquitin-regulated GFP. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31(2):199—205.
- Hartley KO, Nutt SL, Amaya E, 2002. Targeted gene expression in transgenic *Xenopus* using the binary Gal4-UAS system. *PNAS*, 99(3):1377—1382.
- Hauser F, Cazzamali G, Williamson M, Park Y, Li B, Tanaka Y, Predel R, Neupert S, Schachtner J, Verleyen P, Grimmeliikhuijzen CJ, 2008. A genome-wide inventory of neurohormone GPCRs in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Front Neuroendocrinol.*, 29(1):142—165.
- Iwema T, Billas IM, Beck Y, Bonneton F, Nierengarten H, Chaumot A, Richards G, Laudet V, Moras D, 2007. Structural and functional characterization of a novel type of

- ligand-independent RXR-USP receptor. *EMBO J.*, 26: 3770—3782.
- Klemenz R, Weber U, Gehring WJ, 1987. The white gene as a marker in a new P-element vector for gene transfer in *Drosophila*. *Nucleic. Acids Res.*, 15(10):3947—3959.
- Knorr E, Schmidthberg H, Vilcinskis A, Altincicek B, 2009. MMPs regulate both development and immunity in the *Tribolium* model insect. *PLoS ONE*, 4(3):e4751.
- Konopova B, Jindra M, 2007. Juvenile hormone resistance gene Methoprene-tolerant controls entry into metamorphosis in the beetle *Tribolium castaneum*. *PNAS*, 104(25): 10488—10493.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V, 1993. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*, 75(5):843—854.
- Li B, Beeman RW, Park Y, 2011. Functions of duplicated genes encoding CCAP receptors in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *J. Insect Physiol.*, 57(9):1190—1197.
- Li B, Predel R, Neupert S, Hauser F, Tanaka Y, Cazzamali G, Williamson M, Arakane Y, Verleyen P, Schoofs L, Schachtner J, Grimmelikhuijzen CJP, Park Y, 2008. Genomics, transcriptomics, and peptidomics of neuropeptides and protein hormones in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Genome Res.*, 18:113—122.
- Lorenzen MD, Berghammer AJ, Brown SJ, Denell RE, Klingler M, Beeman RW, 2003. piggyBac-mediated germline transformation in the beetle *Tribolium castaneum*. *Insect Mol. Biol.*, 12(5):433—440.
- Lorenzen MD, Brown SJ, Denell RE, Beeman RW, 2002. Transgene expression from the *Tribolium castaneum* polyubiquitin promoter. *Insect Mol. Biol.*, 11(5):399—407.
- Lorenzen MD, Kimzey T, Shippy TD, Brown SJ, Denell RE, Beeman RW, 2007. piggyBac-based insertional mutagenesis in *Tribolium castaneum* using donor/helper hybrids. *Insect Mol. Biol.*, 16(3):265—275.
- Luo QB, Zhou Q, Yu XM, Lin HB, Hu SN, Yu J, 2008. Genome-wide mapping of conserved microRNAs and their host transcripts in *Tribolium castaneum*. *J. Genet. Genomics*, 35(6):349—355.
- Marco A, Hui JH, Ronshaugen M, Griffiths-Jones S, 2010. Functional shifts in insect microRNA evolution. *Genome Biol. Evol.*, 2:686—696.
- Meister G, Tuschl T, 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 431(7006):343—349.
- Mello CC, Conte D, 2004. Revealing the world of RNA interference. *Nature*, 431(7006):338—342.
- Minakuchi C, Namiki T, Yoshiyama M, Shinoda T, 2008. RNAi-mediated knockdown of juvenile hormone acid O-methyltransferase gene causes precocious metamorphosis in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *FEBS J.*, 275(11):2919—2931.
- Oppert B, Morris K, Lorenzen MD, Hiromasa Y, Tomich JM, Oppert C, Elpidina, EN, Vinokurov K, Jurat-Fuentes JL, Fabrick J, 2009. *Tribolium castaneum* Larval gut transcriptome and proteome: a resource for the study of the Coleopteran gut. *J. Proteome Res.*, 8(8):3889—3898.
- Park Y, Aikins J, Wang LJ, Beeman RW, Oppert B, Lord JC, Brown SJ, Lorenzen MD, Richards S, Weinstock GM, Gibbs RA, 2008. Analysis of transcriptome data in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38(4):380—386.
- Parthasarathy R, Sheng Z, Sun Z, Palli SR, 2010a. Ecdysteroid regulation of ovarian growth and oocyte maturation in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 40(6):429—439.
- Parthasarathy R, Sun Z, Bai H, Palli SR, 2010b. Juvenile hormone regulation of vitellogenin synthesis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 40(6):405—414.
- Parthasarathy R, Tan A, Sun Z, Chen Z, Rankin M, Palli SR, 2009. Juvenile hormone regulation of male accessory gland activity in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Mech. Dev.*, 126(7):563—579.
- Richards S, Gibbs RA, Weinstock GM, Brown SJ, Denell R, Beeman RW, Gibbs R, Bucher G, Friedrich M, Grimmelikhuijzen CJ, Klingler M, Lorenzen M, Richards S, Roth S, Schröder R, Tautz D, Zdobnov EM, Muzny D, Gibbs RA, Weinstock GM, Attaway T, Bell S, Buhay CJ, Chandrabose MN, Chavez D, Clerk-Blankenburg KP, Cree A, Dao M, Davis C, Chacko J, Dinh H, Dugan-Rocha S, Fowler G, Garner TT, Garnes J, Gnirke A, Hawes A, Hernandez J, Hines S, Holder M, Hume J, Jhangiani SN, Joshi V, Khan ZM, Jackson L, Kovar C, Kowis A, Lee S, Lewis LR, Margolis J, Morgan M, Nazareth LV, Nguyen N, Okwuonu G, Parker D, Richards S, Ruiz SJ, Santibanez J, Savard J, Scherer SE, Schneider B, Sodergren E, Tautz D, Vattahil S, Villasana D, White CS, Wright R, Park Y, Beeman RW, Lord J, Oppert B, Lorenzen M, Brown S, Wang L, Savard J, Tautz D, Richards S, Weinstock G, Gibbs RA, Liu Y, Worley K, Weinstock G, Elsik CG, Reese JT, Elhaik E, Landan G, Graur D, Arensburger P, Atkinson P, Beeman RW,

- Beidler J, Brown SJ, Demuth JP, Drury DW, Du YZ, Fujiwara H, Lorenzen M, Maselli V, Osanai M, Park Y, Robertson HM, Tu Z, Wang JJ, Wang S, Richards S, Song H, Zhang L, Sodergren E, Werner D, Stanke M, Morgenstern B, Solovyev V, Kosarev P, Brown G, Chen HC, Ermolaeva O, Hlavina W, Kapustin Y, Kiryutin B, Kitts P, Maglott D, Pruitt K, Sapojnikov V, Souvorov A, Mackey AJ, Waterhouse RM, Wyder S, Zdobnov EM, Zdobnov EM, Wyder S, Kriventseva EV, Kadowaki T, Bork P, Aranda M, Bao R, Beermann A, Berns N, Bolognesi R, Bonneton F, Bopp D, Brown SJ, Bucher G, Butts T, Chaumot A, Denell RE, Ferrier DE, Friedrich M, Gordon CM, Jindra M, Klingler M, Lan Q, Lattorff HM, Laudet V, von Levetsov C, Liu Z, Lutz R, Lynch JA, da Fonseca RN, Posnien N, Reuter R, Roth S, Savard J, Schinko JB, Schmitt C, Schoppmeier M, Schröder R, Shippy TD, Simonnet F, Marques-Souza H, Tautz D, Tomoyasu Y, Trauner J, Van der Zee M, Vervoort M, Wittkopp N, Wimmer EA, Yang X, Jones AK, Sattelle DB, Ebert PR, Nelson D, Scott JG, Beeman RW, Muthukrishnan S, Kramer KJ, Arakane Y, Beeman RW, Zhu Q, Hogenkamp D, Dixit R, Oppert B, Jiang H, Zou Z, Marshall J, Elpidina E, Vinokurov K, Oppert C, Zou Z, Evans J, Lu Z, Zhao P, Sumathipala N, Altincicek B, Vilcinskis A, Williams M, Hultmark D, Hetru C, Jiang H, Grimmelikhuijzen CJ, Hauser F, Cazzamali G, Williamson M, Park Y, Li B, Tanaka Y, Predel R, Neupert S, Schachtner J, Verleyen P, Raible F, Bork P, Friedrich M, Walden KK, Robertson HM, Angeli S, Forêt S, Bucher G, Schuetz S, Maleszka R, Wimmer EA, Beeman RW, Lorenzen M, Tomoyasu Y, Miller SC, Grossmann D, Bucher G, 2008. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature*, 452(7190): 949—955.
- Roberts J, Baum JA, Bogaert T, Clinton W, Heck GR, Feldmann P, Ilagan O, Johnson S, Plaetinck G, Munyikwa T, Pleau M, Vaughn T, Roberts J, 2007. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat. Biotechnol.*, 25(11):1322—1326.
- Rubin GM, Spradling AC, 1982. Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science*, 218(4570):348—353.
- Scheer N, Campos-Ortega JA, 1999. Use of the Gal4-UAS technique for targeted gene expression in the zebrafish. *Mech. Dev.*, 80(2):153—158.
- Schinko JB, Weber M, Viktorinova I, Kiupakis A, Averof M, Klingler M, Wimmer EA, Bucher G, 2010. Functionality of the GAL4/UAS system in *Tribolium* requires the use of endogenous core promoters. *BMC Dev. Biol.*, 10:53.
- Shrestha S, Kim Y, 2010. Activation of immune-associated phospholipase A2 is functionally linked to Toll/Imd signal pathways in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Dev. Comp. Immunol.*, 34(5):530—537.
- Siebert KS, Lorenzen MD, Brown SJ, Park Y, Beeman RW, 2008. Tubulin superfamily genes in *Tribolium castaneum* and the use of a Tubulin promoter to drive transgene expression. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38(8):749—755.
- Singh J, Nagaraju J, 2008. In silico prediction and characterization of microRNAs from red flour beetle (*Tribolium castaneum*). *Insect Mol. Biol.*, 17(4):427—436.
- Sokoloff A, 1972. The Biology of *Tribolium*: With Special Emphasis on Genetic Aspects Oxford, Clarendon Press. 62—64.
- South A, Sirot LK, Lewis SM, 2011. Identification of predicted seminal fluid proteins in *Tribolium castaneum*. *Insect Mol. Biol.*, 20(4):447—456.
- Tan A, Palli SR, 2008. Ecdysone [corrected] receptor isoforms play distinct roles in controlling molting and metamorphosis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Mol. Cell Endocrinol.*, 291(1/2):42—49.
- Tomoyasu Y, Denell RE, 2004. Larval RNAi in *Tribolium* (Coleoptera) for analyzing adult development. *Dev. Genes Evol.*, 214(11):575—578.
- Tomoyasu Y, Miller SC, Tomita S, Schoppmeier M, Grossmann D, Bucher G, 2008. Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium*. *Genome Biol.*, 9(1):R10.
- Trauner J, Schinko J, Lorenzen MD, Shippy TD, Wimmer EA, Beeman RW, Klingler M, Bucher G, Brown SJ, 2009. Large-scale insertional mutagenesis of a coleopteran stored grain pest, the red flour beetle *Tribolium castaneum*, identifies embryonic lethal mutations and enhancer traps. *BMC Biol.*, 7:73.
- Wheeler DE, Nijhout HF, 2003. A perspective for understanding the modes of juvenile hormone action as a lipid signaling system. *Bioessays*, 25(10):994—1001.
- Wheeler SR, Carrico ML, Wilson BA, Skeath JB, 2005. The *Tribolium columnar* genes reveal conservation and plasticity in neural precursor patterning along the embryonic dorsal-ventral axis. *Dev. Biol.*, 279(2):491—500.
- Wightman B, Ha I, Ruvkun G, 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates

- temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75 (5): 855—862.
- Wilson TG, Ashok M, 1998. Insecticide resistance resulting from an absence of target-site gene product. *PNAS*, 95 (24):14040—14044.
- Wilson TG, Wang S, Beno M, Farkas R, 2006a. Wide mutational spectrum of a gene involved in hormone action and insecticide resistance in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Genet. Genomics*, 276(3):294—303.
- Wilson TG, Yerushalmi Y, Donnell DM, Restifo LL, 2006b. Interaction between hormonal signaling pathways in *Drosophila melanogaster* as revealed by genetic interaction between methoprene-tolerant and broad-complex. *Genetics*, 172(1):253—264.
- 件均祥, 2003. 农业昆虫学. 北京:中国农业出版社. 81.
- Yao TP, Forman BM, Jiang Z, Cherbas L, Chen JD, McKeown M, Cherbas P, Evans RM, 1993. Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. *Nature*, 366(6454):476—479.
- Zou Z, Evans JD, Lu ZQ, Zhao PC, Williams M, Sumathipala N, Hetru C, Hultmark D, Jiang HB, 2007. Comparative genomic analysis of the *Tribolium* immune system. *Genome Biol.*, 8(8):R177.