



汪斌伟, 樊晓红, 吴朝妍, 朱家颖. 管氏肿腿蜂毒液过敏原 3 基因的克隆及表达分析 [J]. 环境昆虫学报, 2023, 45 (4): 1009–1015.

管氏肿腿蜂毒液过敏原 3 基因的克隆及表达分析

汪斌伟, 樊晓红, 吴朝妍, 朱家颖*

(西南林业大学生物多样性保护学院, 云南省森林火灾预警与重点实验室, 昆明 650224)

摘要: 为研究管氏肿腿蜂 *Scleroderma guani* 毒液过敏原 3 基因 *SgA3* 的功能, 通过 RT-PCR 克隆 *SgA3* 基因, 采用荧光定量 PCR 分析其在不同发育阶段和组织中的表达特征, 并利用载体 pSUMO-Mut 对其进行原核表达。克隆获得 *SgA3* 基因开放阅读框长 699 bp, 编码 233 个氨基酸, 其中信号肽位于 N 端第 1~23 位氨基酸。多序列比对分析发现, *SgA3* 与丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis*、粉蝶盘绒茧蜂 *Cotesia glomerata*、红火蚁 *Solenopsis invicta* 和常见黄胡蜂 *Vespa vulgaris* 过敏原 3 的氨基酸序列一致性分别为 50.44%、50%、48.89% 和 47.83%。荧光定量 PCR 结果表明, *SgA3* 基因在雌成虫中高表达, 且在毒液器官中的表达量显著高于雌成虫其他组织和雄成虫中的表达量。利用 pSUMO-Mut 表达载体, 成功表达并纯化得到高纯度的 *SgA3* 重组蛋白。该研究结果为进一步研究 *SgA3* 基因的功能奠定了基础。

关键词: 毒液; 过敏原 3; 基因克隆; 表达特征; 原核表达

中图分类号: Q968.1; S433

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2023) 04-1009-07

Cloning and expression analysis of venom allergen 3 gene of *Scleroderma guani*

WANG Bin-Wei, FAN Xiao-Hong, WU Chao-Yan, ZHU Jia-Ying* (Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control of Yunnan Province, College of Biodiversity and Conservation, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

Abstract: In order to investigate the physiological function of venom allergen 3 gene of *Scleroderma guani* (*SgA3*), this gene was cloned by RT-PCR. Its expression pattern at different developmental stages and in various tissues was analyzed by real time fluorescence quantitative PCR (qPCR). This gene was expressed by using prokaryotic vector pSUMO-Mut. The cloned ORF of *SgA3* gene is 699 bp in length, encoding 233 amino acids. The amino acid positions 1~23 at the N-terminus of deduced amino acid of *SgA3* gene was signal peptide sequence. Multiple sequence alignment analysis indicated that between *SgA3* shared the amino acid sequence identity of 50.44%, 50%, 48.89% and 47.83% with allergen 3 of *Nasonia vitripennis*, *Cotesia glomerata*, *Solenopsis invicta* and *Nasonia vitripennis*, respectively. qPCR results showed that *SgA3* gene was highly expressed at female adult stage and had higher expression in venom apparatus than in other female tissues and male adults. This venom gene was successfully expressed using vector pSUMO-Mut and high-purity *SgA3* recombinant protein was obtained. The findings lay a foundation for further characterizing the physiological function of this venom gene.

Key words: Venom; allergen 3; gene cloning; expression pattern; prokaryotic expression

基金项目: 国家自然科学基金 (32060126); 国家林草科技创新计划青年拔尖人才项目 (2019132615); 中国科学院“西部之光”人才培养计划“西部青年学者”项目; 云南省高层次人才培养项目 (YNWR-QNBJ-2018-393)

作者简介: 汪斌伟, 男, 1997 年生, 云南保山人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫生理生化与分子生物学, E-mail: wang_binwei@126.com

* 通讯作者 Author for correspondence: 朱家颖, 男, 博士, 教授, 研究方向为昆虫生理生化与分子生物学, E-mail: jy Zhu@swfu.edu.cn

收稿日期 Received: 2022-03-18; 接受日期 Accepted: 2022-05-06

膜翅目昆虫作为种类繁多的有毒动物类群之一,其毒液含有丰富多样的蛋白和多肽 (Beckage and Gelman, 2004; Danneelset al., 2010; Dias et al., 2014)。其中,大多数社会性膜翅目昆虫的毒液能引起过敏反应,特别是对于敏感人群 (Bilò, 2011; Worm et al., 2014)。现有研究表明,社会性膜翅目昆虫毒液内含的磷脂酶 A (Phospholipase A)、透明质酸酶 (Hyaluronidase)、酸性磷酸酶 (Acid Phosphatase)、抗原 5 (Antigen 5) 等是导致人类过敏的致敏成分 (Müller, 2002; Spillner et al., 2014)。例如,胡蜂 *Polybia paulista* 毒液磷脂酶 A1 能水解 sn-1 位的 1,2-二酰基-3-甘油磷脂的酯键,将这些底物转化为相应的溶质化合物并释放脂肪酸 (Santos et al., 2007); 黑腹虎头蜂 *Vespa basalis* 磷脂酶 A1 能够破坏生物膜的磷脂结构,引发严重的溶血,并导致动物的心功能障碍和死亡 (Hou et al., 2016)。

寄生蜂是一类膜翅目中的重要天敌昆虫,毒液作为该类群的关键寄生因子之一,具有调控寄主生长发育、抑制寄主免疫反应、影响寄主营养代谢等生理功能,在寄主体内发挥重要作用 (Beckage and Gelman, 2004; Kim-Joet al., 2019; Yang et al., 2021; 李丽芳等, 2021)。目前,通过对隶属 茧蜂科 Braconidae、姬蜂科 Ichneumonidae、金小蜂科 Pteromalidae 等近 10 个科的 20 多种寄生蜂毒液组分进行鉴定 (李丽芳等, 2021), 获得了上百种毒液蛋白,但是仅探明了丝氨酸蛋白酶同源物、钙网蛋白、RhoGAP 等少数毒液蛋白的功能 (Poirié et al., 2014; Moreau and Asgari, 2015; Wu et al., 2020; Huang et al., 2021; Quicke and Butcher, 2021; 李丽芳等, 2021)。通过比较寄生蜂与社会性膜翅目蜂类之间的毒液组分发现,它们存在较大差异 (Poirié et al., 2014; Dashevsky and Rodriguez, 2021)。如,寄生蜂毒液不像社会性膜翅目蜂类毒液一样富含致敏蛋白成分,仅酸性磷酸酶、过敏原 3 (Allergen 3) 等个别致敏蛋白在寄生蜂毒液中被鉴定到,且除酸性磷酸酶普遍存在寄生蜂毒液中外,其他种类的致敏蛋白仅在少数寄生蜂 (如,菜蛾盘绒茧蜂 *Cotesia plutellae*、丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis* 和谷象金小蜂 *Anisopteromalus calandrae*) 中被鉴定到 (许俊峰和韩召军, 2008; Dorémus et al., 2013; Perkin et al., 2015)。但是,目前尚不清楚这些寄生蜂毒液致敏蛋白的生理功能。

本文以天牛、小蠹虫等重要蛀干害虫的外寄生蜂—管氏肿腿蜂 *Scleroderma guani* 为研究对象,在前期研究发现过敏原 3 (SgA3) 为该蜂主要毒液组分之一的基础上 (Zhu, 2016), 通过 RT-PCR 扩增 SgA3 基因的开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 序列,分析其时空表达特征,原核表达并纯化 SgA3 重组蛋白,以期为进一步探究该毒液蛋白的生理功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

管氏肿腿蜂的饲养参照 Zhu et al. (2013) 的方法,利用刚化蛹的黄粉虫 *Tenebrio molitor* 作为寄主在室内进行继代饲养,利用蘸有 20% 蜂蜜水的脱脂棉球饲养成蜂。

1.2 SgA3 基因克隆及序列分析

取羽化 1~5 d 的管氏肿腿蜂雌蜂,采用 Trizol 法提取其总 RNA。利用分光光度计和 1% 琼脂凝胶电泳检测总 RNA 的浓度、质量和完整性,利用逆转录试剂盒 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific),参照试剂盒说明书合成 cDNA 模板,产物置于 -20℃ 保存备用。基于前期实验室从管氏肿腿蜂毒液器官转录组数据中获得的 SgA3 基因序列 (Zhu et al., 2016), 利用 Primer Premier 5 软件 (Premier Biosoft International) 设计 PCR 引物 (正向引物 5'-ATGATAAGATACGCGACATACGGT-3' 和反向引物 5'-TTATTTTACGTGATAGATTGGTTCGCCGATCC-3') 扩增 SgA3 基因的 ORF 序列。扩增 PCR 体系 (25 μL): cDNA 模板 2 μL, 正反向引物各 1 μL, 12.5 μL dNTP, 8.5 μL ddH₂O。PCR 扩增条件为: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 30 s, 65℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 设置循环 35 次; 72℃ 终延伸 10 min。利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物后,测序由铂尚生物技术 (上海) 有限公司完成。

使用 DNASTAR 7.1 (Burland, 2000) 对测序得到的 SgA3 基因序列进行拼接和翻译,分析基因编码蛋白的预测分子量和等电点。采用 BlastP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>) 对序列进行同源比对搜索,结构域使用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 进行预测,信号肽利用 SignalP 5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>) 预测,

采用 ClustalX 1.83 进行多序列比对分析 (Chenna *et al.*, 2003)。

1.3 *SgA3* 基因的表达特征分析

分别收集不同发育阶段 (卵、早期幼虫、晚期幼虫、老熟幼虫、白茧蛹、黄茧蛹、黑茧蛹、羽化 1~25 d 雌蜂) 的管氏肿腿蜂以及羽化 1~5 d 的管氏肿腿蜂雄成虫、雌成虫不同组织 (毒液器官、卵巢、残体) 于 1.5 mL 离心管中, 液氮冷冻处理并充分研磨后加入 Trizol (Invitrogen) 试剂, -80°C 保存备用。每个样品设置 3 个生物学重复。参照 1.2 的方法, 提取每个样品的总 RNA, 采用逆转录试剂盒并以总 RNA 为模板合成相应的 cDNA。依据 1.2 中获得的 *SgA3* 基因 ORF 序列, 设计基因特异性引物 (正向引物 5'-CCATCTTCAAGTCCAAGTTC-3' 和反向引物 3'-CAACGGTAGCCAATTCATC-5')。以 18S *rRNA* 基因作为内参 (正向引物 5'-TGGGCCGCTACGTTTACTTT-3' 和反向引物 5'-CACCTCTAACGTCGCAATAC-3'), 采用 qPCR (Real time fluorescence quantitative PCR, qPCR) 技术, 分析在不同发育阶段、雄蜂以及雌蜂不同组织中 *SgA3* 基因的表达特征。qPCR 反应体系 (20 μL) 为: Bestar[®] qPCR mastermix (DBIR Bioscience) 10 μL , 正反向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μL , cDNA 1 μL , ddH₂O 8 μL 。qPCR 反应程序为: 95°C 预变性 30 s; 95°C 变性 5 s, 60°C 退火 40 s, 循环 45 次。

1.4 *SgA3* 基因的原核表达

参照韩开健等 (2021) 的方法, 运用 PAS (PCR-based Accurate Synthesis) 方法合成含有 *Stu* I 和 *Hind* III 酶切位点的 *SgA3* 基因 (韩开健等, 2021), 利用限制性内切酶双酶切后依靠同源碱基互补配对, 链接到表达载体 pSUMO-Mut (南京钟鼎生物技术有限公司)。表达载体经菌落 PCR 及测序验证构建成功后, 构建重组表达质粒, 转入大肠杆菌 *Escherichia coli* 表达菌株 BL21 (DE3) 感受态细胞中进行原核表达。表达菌株经测序验证正确后置于 LB (Lysogeny broth) 培养液, 37°C 220 rpm 振荡培养至菌体 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8, 加入终浓度为 0.5 mM 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG) 再次诱导培养。取 1 mL 培养物离心弃上清, 用 100 μL PBS (Phosphate-buffered saline) 缓冲液重悬菌液后离心弃上清, 菌体沉淀经 PBS 再次重悬,

对重悬液进行超声波破碎后, 离心取上清液与沉淀。利用 Ni-IDA-Sepharose CL-6B 亲和层析柱纯化重组表达蛋白, 将其收集后在 PBS (pH7.4) 中透析过夜后, 加入 PBS 重悬。利用 12% SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) 检测获得的菌液上清、沉淀中以及纯化后的蛋白, 考马斯亮蓝 R-250 进行染色, 过夜保存后利用脱色液脱色处理, 对凝胶进行拍照观察并分析目标蛋白表达情况。

1.5 数据统计与分析

所获得的数据利用 Excel 进行整理。依照 Q-GENE 法计算基因的相对表达量 (Muller *et al.*, 2002; Simon, 2003)。采用 SPSS 软件进行 LSD 多重比较分析基因相对表达量的差异显著性 ($P < 0.05$), 并使用 Graphpad prism 8 软件进行制图。

2 结果与分析

2.1 *SgA3* 基因的克隆及序列分析

克隆得到长为 699 bp 的 *SgA3* 基因 ORF 序列, 编码 233 个氨基酸, 预测相对分子量为 26.18 kDa, 等电点 8.42。信号肽预测结果显示, *SgA3* 氨基酸序列 N 端 1~23 位氨基酸为信号肽序列。结构域分析发现, *SgA3* 氨基酸序列中具有 1 个 CAP (Cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 protein) 结构域, 属于半胱氨酸分泌蛋白。多序列比对分析发现, *SgA3* 与丽蝇蛹集金小蜂、粉蝶盘绒茧蜂、红火蚁和常见黄胡蜂过敏原 3 的氨基酸序列一致性分别为 50.44%、50%、48.89% 和 47.83% (图 1)。

2.2 *SgA3* 基因的表达特征分析

在不同发育阶段, *SgA3* 基因的表达量有所不同 (图 2)。从黑茧蛹期开始, *SgA3* 基因呈现高表达, 其表达量显著高于卵期和幼虫期。*SgA3* 基因在黑茧蛹期到 5 日龄成虫之间的表达量逐渐升高, 在 5 日龄成虫中达到最高, 在其后的成虫阶段表达量逐渐降低。

在雌成虫不同组织中, *SgA3* 基因在毒液器官中高表达, 在卵巢中基本不表达, 毒液器官中的表达量显著高于残体和卵巢中的表达量 (图 3)。尽管 *SgA3* 在雄成虫中有一定的表达量, 但其表达量显著低于雌成虫毒液器官中的表达量。

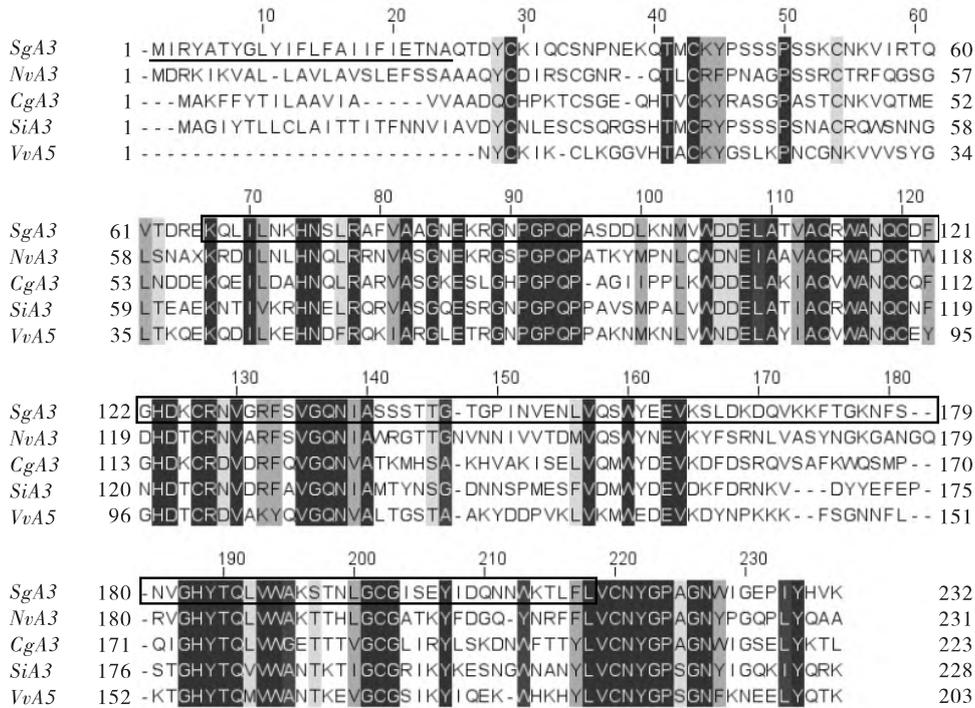


图 1 *SgA3* 与其他昆虫过敏原 3 的多序列比对

Fig. 1 Multiple alignment of *SgA3* and allergen 3 of other insects

注: 下划线区域为信号肽, 方框为 CAP 结构域, 深色阴影标记的是保守位点。Sg, 管氏肿腿蜂; Nv, 丽蝇蛹集金小蜂 (XP_031786258); Cg, 粉蝶盘绒茧蜂 (XP_044593958); Si, 红火蚁 (XP_011165202); Vv, 常见黄胡蜂 (CAB42887)。Note: Signal peptide was underlined. CAP domain was indicated in box. Dark shading indicated conserved sites. Sg, *Scleroderma guani*; Nv, *Nasonia vitripenni* (XP_031786258); Cg, *Cotesia glomerata* (XP_044593958); Si, *Solenopsis invicta* (XP_011165202); Vv, *Vespa vulgaris* (CAB42887)。

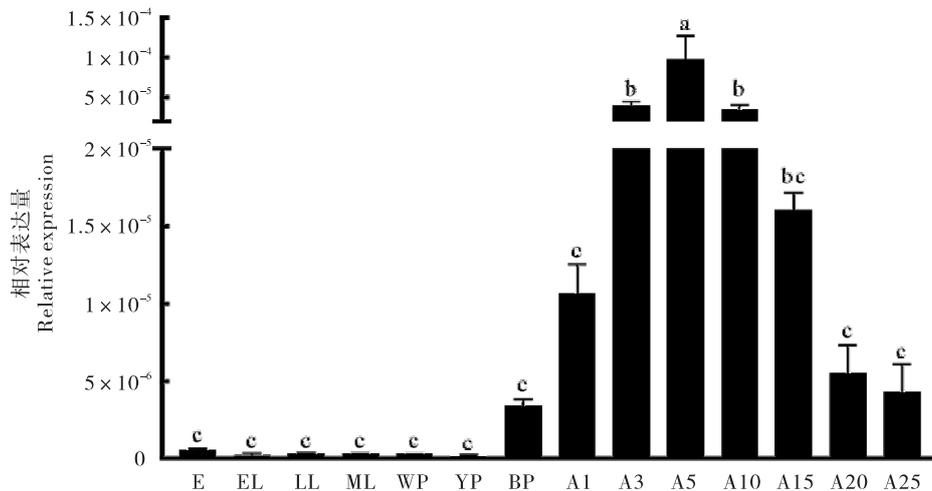


图 2 *SgA3* 基因在不同发育阶段的相对表达量

Fig. 2 Relative expression profiles of *SgA3* gene at different developmental stages

注: E, 卵; EL, 早期幼虫; LL, 晚期幼虫; ML, 老熟幼虫; WP, 白茧蛹; YP, 黄茧蛹; BP, 黑茧蛹; A1 ~ 25, 羽化 1 ~ 25 d 的雌成虫。数据为平均值 ± 标准差。柱上不同字母表示不同发育阶段基因相对表达量存在显著差异。

Note: E, egg; EL, early larva; LL, late larva; ML, mature larva; WP, pupa in white cocoon; YP, pupa in yellow cocoon; BP, pupa in black cocoon; A1 ~ 25, female adult after emergence 1 ~ 25 days. Data in the figure were mean ± SD. Different letters above the bars indicated significant difference gene expression levels among different developmental stages.

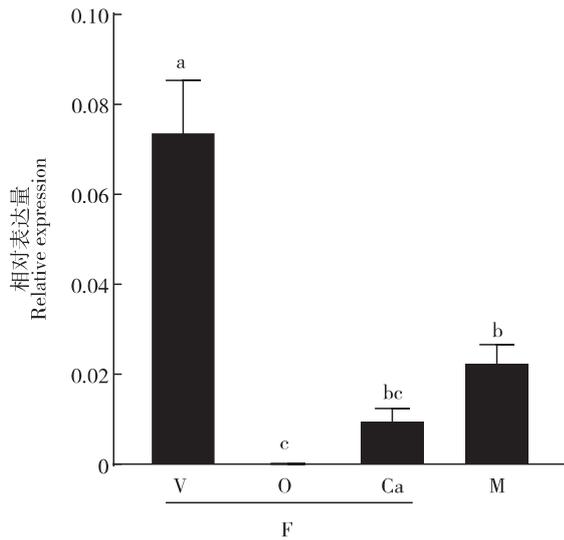


图3 *SgA3* 基因在不同组织中的相对表达量

Fig. 3 Relative expression levels of *SgA3* gene in different tissues

注: F, 雌成虫; M, 雄成虫; V, 毒液器官; O, 卵巢; Ca, 残体 (除去毒液器官和卵巢)。数据为平均值 ± 标准差。柱上不同字母表示不同组织中的基因相对表达量存在显著差异。Note: F, Female adult; M, Male adult; V, Venom apparatus; O, Ovary; Ca, Carcass (without venom apparatus and ovary). Data in the figure were mean ± SD. Different letters above the bars indicated significant difference gene expression levels among different tissues.

2.3 *SgA3* 基因的原核表达

将去除信号肽的 *SgA3* 基因 ORF 序列插入到 pSUMO-Mut 原核载体中, 转化大肠杆菌后, 利用 IPTG 进行诱导表达并纯化 (图 4)。SDS-PAGE 电泳结果显示, 利用大肠杆菌表达得到重组 *SgA3* 融合蛋白, 并且存在于沉淀中, 约 36 kDa。将表达标签切除后, 得到分子量与理论分子量相符的 *SgA3* 重组蛋白, 约 26 kDa。电泳检测结果显示, 纯化得到的为切除表达标签后的高纯度 *SgA3* 重组蛋白。

3 结论与讨论

氨基酸序列分析发现, 克隆得到 *SgA3* 基因氨基酸序列中具有保守的 CAP 蛋白结构域, 所以 *SgA3* 为该家族成员 (Perkin *et al.*, 2015; Laurino *et al.*, 2016)。而且, 信号肽分析结果显示, *SgA3* 氨基酸序列中存在信号肽, 表明其为分泌蛋白。多序列比对分析发现, *SgA3* 与丽蝇蛹集金小蜂、

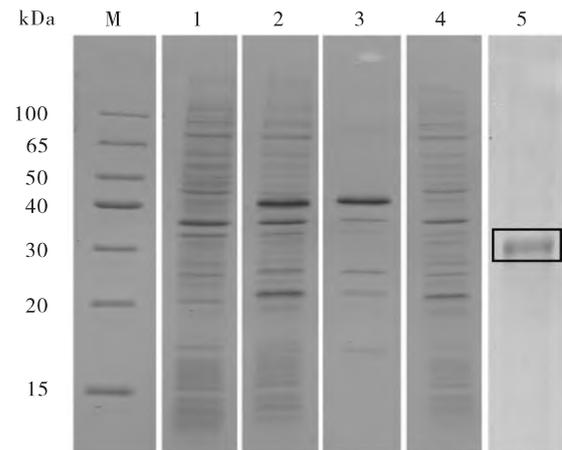


图4 *SgA3* 基因原核表达 SDS-PAGE 及 Western blot 检测

Fig. 4 SDS-PAGE and western blot analysis of prokaryotic expression of *SgA3* gene

注: M, 标准蛋白; 1, 未诱导的表达产物; 2, 诱导后的表达产物; 3, 诱导表达的沉淀; 4, 诱导表达的上清; 5, 表达标签切除后纯化的蛋白 (方框内)。

Note: M, Protein marker; 1, Total protein of un-induced *Escherichia coli*; 2, Total protein of induced *E. coli*; 3, Precipitate of total protein after induction; 4, Supernatant of total protein after induction; 5, Purified protein after SUMO tag been excised (in the box).

粉蝶盘绒茧蜂、红火蚁和常见黄胡蜂过敏原 3 的氨基酸之间具有较高的一致性, 且均属于 CAP 家族蛋白, 该家族成员通常具有细胞外内分泌或旁分泌功能 (King *et al.*, 1987; Hoffman, 2006)。有研究证实, 过敏原 3 为红火蚁和常见胡蜂 *V. vulgaris* 毒液中的高丰度蛋白, 能使人类会引起严重的过敏反应 (Hoffman *et al.*, 1988; Blank *et al.*, 2010; Potiwat and Sitcharungsi, 2015)。由于 *SgA3* 以及红火蚁和常见黄胡蜂毒液过敏原 3 的氨基酸序列之间高度保守, 推测 *SgA3* 也能引起人类的过敏反应, 但需要进一步证实。

基因表达特征结果表明, *SgA3* 基因从成熟黑色茧中的蛹期开始逐渐呈现高表达, 于成虫 5 日龄时表达量最高, 随后表达量逐渐降低。该表达特征与管氏肿腿蜂抗凝血酶 III、丝氨酸蛋白酶同源物等相似, 表明 *SgA3* 基因的表达与毒液器官的发育密切相关 (Wu *et al.*, 2020; 韩开健等, 2021; 李丽芳等, 2021)。在不同组织中, *SgA3* 基因在毒液器官中高度表达, 再次证实前期蛋白质谱分析发现的 *SgA3* 是管氏肿腿蜂毒液中的高丰度蛋白组分 (Zhu, 2016)。此外, *SgA3* 基因在雄成

虫中的表达量显著低于毒液器官中的表达量，这是由于 *SgA3* 基因为毒液蛋白编码基因且雄性无毒液器官所致。

本研究成功利用 pSUMO-Mut 载体对 *SgA3* 基因进行了原核表达，得到重组蛋白。产物经 SDS-PAGE 电泳结果显示，重组表达蛋白主要存在于沉淀中。这是由于大肠杆菌表达系统不能完成 *SgA3* 重组蛋白的翻译后修饰所致，后期需要进一步采用合适的溶液来对重组蛋白进行复性，或者采用酵母、昆虫细胞等表达系统来进行表达，获得可溶性的重组表达蛋白，进而开展其生理功能研究 (Seismann *et al.*, 2010; Borodina *et al.*, 2011)。但是，将表达标签切除后，可以纯化获得高纯度的 *SgA3* 重组蛋白，其可以用于制备抗体来进一步研究 *SgA3* 基因的表达特征，并为该毒液蛋白后续生理功能探究奠定基础。

参考文献 (References)

- Beckage NE, Gelman DB. Wasp parasitoid disruption of host development: Implications for new biologically based strategies for insect control [J]. *Annual Review of Entomology*, 2004, 49: 299–330.
- Bilò MB. Anaphylaxis caused by Hymenoptera stings: From epidemiology to treatment [J]. *Allergy*, 2011, 66 (95): 35–37.
- Blank S, Seismann H, Bockisch B, *et al.* Identification, recombinant expression, and characterization of the 100 kDa high molecular weight Hymenoptera venom allergens Api m 5 and Ves v 3 [J]. *The Journal of Immunology*, 2010, 184 (9): 5403–5413.
- Borodina I, Jensen BM, Wagner T, *et al.* Expression of enzymatically inactive wasp venom phospholipase A1 in *Pichia pastoris* [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6 (6): e21267.
- Burland TG. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2000, 132: 71–91.
- Chenna R, Sugawara H, Koike T, *et al.* Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs [J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31 (13): 3497–3500.
- Danneels EL, Rivers DB, de Graaf DC. Venom proteins of the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis*: Recent discovery of an untapped pharmacopee [J]. *Toxins*, 2010, 2 (4): 494–516.
- Dashevsky D, Rodriguez J. A short review of the venoms and toxins of spider wasps (Hymenoptera: Pompilidae) [J]. *Toxins*, 2021, 13 (11): 744.
- Dias NB, de Souza BM, Gomes PC, *et al.* Peptide diversity in the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera): A comparison of the intra- and inter-colony compositions [J]. *Peptides*, 2014, 51: 122–130.
- Dorémus T, Urbach S, Jouan V, *et al.* Venom gland extract is not required for successful parasitism in the polydnavirus-associated endoparasitoid *Hyposoter didymator* (Hym. Ichneumonidae) despite the presence of numerous novel and conserved venom proteins [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 43 (3): 292–307.
- Han KJ, Fan XH, Wu CY, *et al.* Cloning and expression of the venom antithrombin III gene in *Scleroderma guani* (Hymenoptera: Bethyridae) [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2021, 58 (5): 1065–1072. [韩开健, 樊晓红, 吴朝妍, 等. 管氏肿腿蜂毒液抗凝血酶 III 基因的克隆与表达分析 [J]. *应用昆虫学报*, 2021, 58 (5): 1065–1072]
- Hoffman DR, Dove DE, Moffitt JE, *et al.* Allergens in Hymenoptera venom. XXI. Cross-reactivity and multiple reactivity between fire ant venom and bee and wasp venoms [J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1988, 82 (5): 828–834.
- Hoffman DR. Hymenoptera venom allergens [J]. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 2006, 30 (2): 109–128.
- Hou MH, Chuang CY, Ko TP, *et al.* Crystal structure of vespid phospholipase A 1 reveals insights into the mechanism for cause of membrane dysfunction [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2016, 68: 79–88.
- Huang J, Chen J, Fang G, *et al.* Two novel venom proteins underlie divergent parasitic strategies between a generalist and a specialist parasite [J]. *Nature Communication*, 2021, 12 (1): 234.
- Kim Jo C, Gatti JL, Poirié M. Drosophila cellular immunity against parasitoid wasps: A complex and time-dependent process [J]. *Frontiers in Physiology*, 2019, 10: 603.
- King TP, Kochoumian L, Lam T. Immunochemical observations of antigen 5, a major venom allergen of hornets, yellowjackets and wasps [J]. *Molecular Immunology*, 1987, 24 (8): 857–864.
- Laurino S, Grossi G, Pucci P, *et al.* Identification of major *Toxoneuron nigriceps* venom proteins using an integrated transcriptomic/proteomic approach [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2016, 76: 49–61.
- Li LF, Wu CY, Han KJ, *et al.* Effects of the serine protease homologue SgSPH from the venom of *Scleroderma guani* (Hymenoptera: Bethyridae) on the phenoloxidase activity in the host hemolymph [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2021, 64 (2): 170–177. [李丽芳, 吴朝妍, 韩开健, 等. 管氏肿腿蜂毒液丝氨酸蛋白酶同源物 SgSPH 对寄主血淋巴酚氧化酶活性的影响 [J]. *昆虫学报*, 2021, 64 (2): 170–177]
- Moreau SJ, Asgari S. Venom proteins from parasitoid wasps and their biological functions [J]. *Toxins*, 2015, 7 (7): 2385–2412.
- Muller PY, Janovjak H, Miserez AR, *et al.* Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR [J]. *Biotechniques*, 2002, 32 (6): 1372–1379.
- Müller UR. Recombinant Hymenoptera venom allergens [J]. *Allergy*, 2002, 57 (7): 570–576.
- Perkin LC, Friesen KS, Flinn PW, *et al.* Venom gland components of the ectoparasitoid wasp, *Anisopteromalus calandrae* [J]. *Journal of Venom Research*, 2015, 6: 19–37.
- Poirié M, Colinet D, Gatti JL. Insights into function and evolution of parasitoid wasp venoms [J]. *Current Opinion in Insect Science*, 2014, 6: 52–60.

- Potiwat R , Sitcharungsi R. Ant allergens and hypersensitivity reactions in response to ant stings [J]. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunol* , 2015 , 33 (4) : 267 - 275.
- Quicke DLJ , Butcher BA. Review of venoms of non-polydnavirus carrying ichneumonoid wasps [J]. *Biology* , 2021 , 10 (1) : 50.
- Santos LD , Santos KS , de Souza BM , et al. Purification , sequencing and structural characterization of the phospholipase A1 from the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera , Vespidae) [J]. *Toxicon* , 2007 , 50 : 923 - 937.
- Seismann H , Blank S , Cifuentes L , et al. Recombinant phospholipase A1 (Ves v 1) from yellow jacket venom for improved diagnosis of Hymenoptera venom hypersensitivity [J]. *Clinical and Molecular Allergy* , 2010 , 8 : 1 - 8.
- Simon P. Q-Gene: Processing quantitative real-time RT-PCR data [J]. *Bioinformatics* , 2003 , 19 (11) : 1439 - 1440.
- Spillner E , Blank S , Jakob T. Hymenoptera allergens: From venom to “venome” [J]. *Frontiers in Immunology* , 2014 , 5 : 77.
- Worm M , Eckermann O , Dölle S , et al. Triggers and treatment of anaphylaxis: An analysis of 4000 cases from Germany , Austria and Switzerland [J]. *Deutsches Arzteblatt International* , 2014 , 111 (21) : 367 - 375.
- Wu CY , Huang JM , Zhao YJ , et al. Venom serine proteinase homolog of the ectoparasitoid *Scleroderma guani* impairs host phenoloxidase cascade [J]. *Toxicon* , 2020 , 183 : 29 - 35.
- Xu JF , Han ZJ. Cloning , sequence analysis and expression of two genes of venom allergens in *Rhynchium brunneum* (Fabricius) (Hymenoptera : Eumenidae) [J]. *Acta Entomologica Sinica* , 2008 , 51 (11) : 1129 - 1137. [许俊峰 , 韩召军. 黄唇蜾蠃蜂毒中两个过敏原全长基因的克隆、序列分析和表达 [J]. 昆虫学报, 2008 , 51 (11) : 1129 - 1137]
- Yang L , Qiu LM , Fang Q , Stanley DW , et al. Cellular and humoral immune interactions between *Drosophila* and its parasitoids [J]. *Insect Science* , 2021 , 28 (5) : 1208 - 1227.
- Zhu JY , Yang P , Zhang Z , et al. Transcriptomic immune response of *Tenebrio molitor* pupae to parasitization by *Scleroderma guani* [J]. *PLoS ONE* , 2013 , 8 (1) : e54411.
- Zhu JY. Deciphering the main venom components of the ectoparasitic ant-like bethylid wasp , *Scleroderma guani* [J]. *Toxicon* , 2016 , 113 : 32 - 40.