



Characteristics and Gene Expression of Fat Body in Adult Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis* 【Research report】

東方果實蠅成蟲脂肪體之特性及基因表現【研究報告】

Yu-Han Zuo, Kuang-Hui Lu, and Mei-Er Chen*
左雨涵、路光暉、陳美娥*

*通訊作者E-mail: meirchen@dragon.nchu.edu.tw

Received: 2013/05/31 Accepted: 2013/06/20 Available online: 2013/06/01

Abstract

Insect fat body is responsible for storing nutrients, providing energy and metabolizing materials. Dissection and histological observation revealed that there were two forms of fat body in the adult abdomen of *Bactrocera dorsalis* (Hendel), i.e., white nodule-like "larval fat body" and thin sheet-like "adult fat body". The amount of larval fat body was decreasing while adult fat body was increasing with adult growth. The degradation rate of larval fat body was decreased when the flies were reared under starvation. There was still larval fat body in the flies for starving 12 days. Using cDNA subtraction, stage specific-expressed genes from the abdominal fat body of 0-day-old and 9-day-old adults were screened. The subtracted results showed that arylphorin receptor (ArR) gene expressed most abundantly in the 0-day-old adult fat body, and up to 15.0%; yet yolk protein gene 1 (yp1) was the major gene expressed in 9-day-old adult fat body, and up to 34.8%. Reverse transcription PCR analysis demonstrated that ArR expressed greatly in larval fat body; in contrast, yp1 did not express in larval fat body, but specifically expressed in adult fat body of females. The transcriptional expression of ArR was decreasing, but yp1 was increasing with normal adult growth. In adult fat body, ArR and yp1 expressed less in starved females than that of normal females. These results suggested that the function of larval fat body is for energy storage and that of adult fat body is to synthesize proteins for adult physiology, for example, ovary development.

摘要

脂肪體於昆蟲體內負責儲存營養、提供能量及代謝物質。解剖與組織切片結果顯示，東方果實蠅 (*Bactrocera dorsalis* (Hendel)) 成蟲腹部具有兩種形式之脂肪體：一為白色顆粒球狀的幼蟲形式脂肪體，另一為扁平片狀的成蟲形式脂肪體。隨著成蟲的成長，幼蟲形式脂肪體所佔比例逐漸遞減，至第12日齡完全消失；而成蟲形式脂肪體則逐日增加。飢餓狀況下之東方果實蠅成蟲，體內幼蟲形式脂肪體消退的速率減緩，至第12日齡仍存於體內。利用cDNA篩減法篩選第0日齡及第9日齡成蟲腹部脂肪體各自專一表現之基因，其結果顯示第0日齡成蟲腹部脂肪體表現之基因中，以芳基蛋白受器 (arylphorin receptor) 基因所佔比例最高，達15.0%；而第9日齡者，則以卵黃蛋白基因1 (yolk protein gene 1) 最多，所佔比率高達34.8%。以RT-PCR分析，進一步證明芳基蛋白受器基因大量表現於幼蟲形式脂肪體；相對地，卵黃蛋白基因1於幼蟲形式脂肪體不表現，僅表現於雌成蟲的成蟲形式脂肪體。正常飼育下，隨著東方果實蠅成蟲成長，芳基蛋白受器基因表現量逐漸降低，而卵黃蛋白基因1表現量則顯著增加。飢餓狀況下，則芳基蛋白受器基因及卵黃蛋白基因1於成蟲脂肪體的表現量皆較正常飼育者少。上述結果推論，幼蟲形式脂肪體具有儲存能量之功能，而成蟲形式脂肪體則合成成蟲生理如卵巢發育所需之蛋白。

Key words: larval fat body, adult fat body, cDNA subtraction, arylphorin receptor gene, yolk protein gene 1

關鍵詞: 幼蟲形式脂肪體、成蟲形式脂肪體、cDNA篩減法、芳基蛋白受器基因、卵黃蛋白基因1。

Full Text: [PDF \(7.66 MB\)](#)

下載其它卷期全文 Browse all articles in archive: <http://entsocjournal.yabee.com.tw>

東方果實蠅成蟲脂肪體之特性及基因表現

左雨涵、路光暉、陳美娥*

國立中興大學昆蟲學系 402 台中市南區國光路 250 號

摘 要

脂肪體於昆蟲體內負責儲存營養、提供能量及代謝物質。解剖與組織切片結果顯示，東方果實蠅 (*Bactrocera dorsalis* (Hendel)) 成蟲腹部具有兩種形式之脂肪體：一為白色顆粒球狀的幼蟲形式脂肪體，另一為扁平片狀的成蟲形式脂肪體。隨著成蟲的成長，幼蟲形式脂肪體所佔比例逐漸遞減，至第 12 日齡完全消失；而成蟲形式脂肪體則逐日增加。飢餓狀況下之東方果實蠅成蟲，體內幼蟲形式脂肪體消退的速率減緩，至第 12 日齡仍存於體內。利用 cDNA 篩減法篩選第 0 日齡及第 9 日齡成蟲腹部脂肪體各自專一表現之基因，其結果顯示第 0 日齡成蟲腹部脂肪體表現之基因中，以芳基蛋白受器 (arylphorin receptor) 基因所佔比例最高，達 15.0%；而第 9 日齡者，則以卵黃蛋白基因 1 (yolk protein gene 1) 最多，所佔比率高達 34.8%。以 RT-PCR 分析，進一步證明芳基蛋白受器基因大量表現於幼蟲形式脂肪體；相對地，卵黃蛋白基因 1 於幼蟲形式脂肪體不表現，僅表現於雌成蟲的成蟲形式脂肪體。正常飼育下，隨著東方果實蠅成蟲成長，芳基蛋白受器基因表現量逐漸降低，而卵黃蛋白基因 1 表現量則顯著增加。飢餓狀況下，則芳基蛋白受器基因及卵黃蛋白基因 1 於成蟲脂肪體的表現量皆較正常飼育者少。上述結果推論，幼蟲形式脂肪體具有儲存能量之功能，而成蟲形式脂肪體則合成成蟲生理如卵巢發育所需之蛋白。

關鍵詞：幼蟲形式脂肪體、成蟲形式脂肪體、cDNA 篩減法、芳基蛋白受器基因、卵黃蛋白基因 1。

前 言

脂肪體 (fat body) 為昆蟲體內重要代

謝、合成及儲存之組織，可進行脂質 (Arrese *et al.*, 2001)、碳水化合物 (Keeley, 1985)、胺基酸及氮的代謝 (Kishimoto *et al.*, 1999;

*論文聯繫人
Corresponding email: meirchen@dragon.nchu.edu.tw

Shinbo *et al.*, 1997) 與蛋白質合成 (Kanost *et al.*, 1990)。於昆蟲發育及生殖時期，脂肪體可提供能量並合成昆蟲生理所需之蛋白。

脂肪體在昆蟲體內具有不同的功能。玉米穗蟲 (*Helicoverpa zea*) 的末齡幼蟲末期，體內脂肪體呈藍色及白色，藍色脂肪體分布於內臟四周，稱之為圍臟脂肪體 (perivisceral fat body)，用於儲存蛋白；而白色脂肪體則分布於體壁四周，稱為周邊脂肪體 (peripheral fat body)，用於蛋白質之合成 (Hauerland *et al.*, 1990; Hauerland and Shirk, 1995)。黃果蠅 (*Drosophila melanogaster*) 及肉蠅 (*Sarcophaga peregrina*) 幼蟲時期的脂肪體依位置區分為前端及後端 (anterior and posterior) 脂肪體 (Dean *et al.*, 1985)；後端脂肪體所產生的蛋白儲存顆粒較前端脂肪體多，因此推斷後端脂肪體主要功能為儲存蛋白 (Dean *et al.*, 1985; Butterworth and Rasch, 1986)。

隨著發育期的變化，脂肪體的功能亦會隨之改變。於幼蟲取食時期，食物中的碳水化合物多以肝醣 (glycogen) 形式儲存於脂肪體，一但無法進食，如蛹期或食物不足，便開始消耗儲存的能量。末齡幼蟲的初期，脂肪體合成儲存蛋白，如雙翅目的 hexamerin 及玉米穗蟲的極高密度脂蛋白 (very high density lipoprotein, VHDL)，並分泌至血淋巴 (Wyatt and Pan, 1978; Tahara *et al.*, 1982)；到了末期，脂肪細胞 (adipocyte) 上的儲存蛋白受器 (storage protein receptor) 可將儲存蛋白由血淋巴攝入細胞儲存 (Tojo *et al.*, 1978; Ueno *et al.*, 1983)。相較於幼蟲脂肪體的主要功能以儲存蛋白為主，成蟲時期的脂肪體組織則轉而以合成及分泌生殖與飛行所需之蛋白為主；此時脂肪體細胞會出現豐富的顆粒性內質網 (rough endoplasmic reticulum) 與高

基氏體 (Golgi complex)，合成、修飾與運送成蟲生理所需之蛋白 (Dean *et al.*, 1985)。

過去文獻大多著重於末齡幼蟲脂肪體分布及功能之探究，本研究則著重於探究東方果實蠅 (*Bactrocera dorsalis* (Hendel)) 成蟲腹部脂肪體之形式與功能之轉變，並藉由 cDNA 篩減法 (cDNA subtraction) 篩選出於成蟲體內之幼蟲或成蟲形式脂肪體大量表現之基因，藉以推測不同類型脂肪體於東方果實蠅成蟲之生理功能，以及更進一步探討於飢餓時，不同形式脂肪體分布及其基因表現之影響。

材料與方法

一、試驗昆蟲之飼育

東方果實蠅飼育於光暗週期比為 12 : 12 小時之 28°C 恆溫空間，幼蟲以酵母粉 140 g、糖 240 g、麥皮 480 g、苯甲酸鈉 5 g、鹽酸 20 mL 及水 1,800 mL 之混合物飼養；成蟲飼育於 30 × 30 × 30 立方公分之紗網箱並提供充足水分及飼料 (糖 : 酵母粉 : 蛋白胍為 3 : 1 : 1) (Chiu, 1978)。

飢餓處理之樣本，亦以上述條件飼育，但成蟲階段自羽化後僅提供水分及糖 (即不提供蛋白質)。

二、冷凍切片

冷凍切片機 (Leica CM1850 ; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) 預冷至 -20°C 備用。預先將一層冷凍包埋劑 (Shandon Cryomatrix™ ; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) 塗佈於樣品台上，放入冷凍切片機內預冷，包埋劑由透明變為白色。分別取東方果實蠅第 0 (羽化後 24 小時內)，3 (羽化後 72~96 小時)，6 (羽化後 144~168 小時)，9 (羽化後 216~240 小時) 及

12 日齡 (羽化後 288~312 小時) 成蟲之腹部，將之置於鋪有包埋劑的樣品台上，再以包埋劑完全覆蓋，於 -20°C 靜置 30 分鐘以上，使其完全硬化，即可進行切片，切片厚度為 $8\ \mu\text{m}$ 。切下之樣本，以載玻片黏附收集。切片過程均於 -20°C 下進行。

切片樣本以染劑伊紅 (eosin) 於室溫染色 30 秒，細胞質會被伊紅染紅，再以磷酸緩衝液浸泡退染 10 分鐘，重複 2 次；用蓋玻片覆蓋，以紙巾吸除多餘的磷酸緩衝液，利用顯微鏡觀察並記錄之。

三、脂肪體樣本收集

於室溫下，分別解剖第 0 日齡與第 9 日齡之東方果實蠅成蟲雌蟲與雄蟲各 30 隻，取其腹部脂肪體，浸泡於 TRI reagent[®] (Applied Biosystems, Co., Foster city, CA, USA) 並稍加研磨，使 TRI reagent 進入破碎的細胞，防止 RNA 被分解，以液態氮急速冷凍後，置於 -70°C 冷凍保存。

四、cDNA 篩減法及基因定序、序列分析

利用 PCR-Select[™] cDNA Subtraction Kit (Clontech Laboratories Inc., Mountain View, CA, USA) 並依其說明書分別建構第 0 日齡及第 9 日齡成蟲腹部脂肪體之減差基因庫 (subtracted cDNA library)。簡言之，第 0 日齡減差基因庫之建立係以第 0 日齡成蟲腹部脂肪體 cDNA 為 tester，第 9 日齡成蟲腹部脂肪體 cDNA 為 driver。首先，將 tester 分為兩組，於一組 cDNA 5' 端加上 adaptor 1，另一組則加上 adaptor 2。接著，進一步將此兩組 tester 分別與大量 driver 進行第一次雜合，此時 tester 與 driver 共同表現的 cDNA 便可彼此進行雜合。因 driver cDNA 量遠多於 tester，故 tester 中與 driver 相同的 cDNA

多數會與 driver 的 cDNA 雜合，而 tester 中特異表現的基因則仍可與其互補股雜合。最後，將兩組 testers 彼此進行第二次雜合，再以 adaptor 1 及 adaptor 2 上的專一性引子進行 PCR 增幅。以此 PCR 產物轉染細菌後所建立的菌落群，即視為第 0 日齡成蟲腹部脂肪體之減差基因庫。反之，以第 9 日齡成蟲腹部脂肪體 cDNA 為 tester，以大量第 0 日齡成蟲腹部脂肪體 cDNA 為 driver，經相同方法所建構之基因庫即視為第 9 日齡成蟲腹部脂肪體之減差基因庫。

自上述兩個減差基因庫各自挑選並確認含插入基因之白色菌落，交付源資國際生物科技公司定序 (台北，台灣)。該公司以 BigDye[®] 系統 (Applied Biosystems) 進行定序反應，並以 ABI 3730 DNA sequencer (Applied Biosystems) 偵測定序結果。

五、芳基蛋白受器及卵黃蛋白基因 1 之表現測定

將所收集的脂肪體樣本，製備總量 RNA。取 $5\ \mu\text{g}$ 總量 RNA 利用 SuperScript[®] III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) 合成 cDNA。利用專一性引子 (序列如表一) 進行聚合酶連鎖反應增幅 cDNA 中的特定片段。於已滅菌的 $0.2\ \text{mL}$ 微量離心管中，分別加入無菌水 $18.8\ \mu\text{L}$ 、10 倍 PCR buffer $2.5\ \mu\text{L}$ 、dNTP (10 mM) $0.5\ \mu\text{L}$ 、專一性引子 F ($10\ \mu\text{M}$) $1\ \mu\text{L}$ 、專一性引子 R ($10\ \mu\text{M}$) $1\ \mu\text{L}$ 、rTaq (Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan) $0.2\ \mu\text{L}$ 及 $1\ \mu\text{L}$ cDNA。將此混合液置迴溫反應器中進行 PCR，反應條件設定如下：第一階段： 94°C 5 分鐘；第二階段： 94°C 30 秒、 62°C 15 秒及 72°C 30 秒為一週期，反應 25 週期；第三階段： 72°C 2 分鐘；第四階段： 4°C 24 小時。以 DNA 膠體電泳偵測放大片段。

表一 RT-PCR 使用引子之序列

Table 1. The sequences of primers used in RT-PCR

Primer name	Primer sequence
yolk protein 1 sense (F)	5'- AACCTGTGGATTGGTTATCGGCCTCT -3'
yolk protein 1 antisense (R)	5'- GGACGACTGTGGCAAACCAGTAATGA -3'
arylphorin receptor sense (F)	5'- TTCAAAGTGTGAGAGTTATCAAAGTG -3'
arylphorin receptor antisense (R)	5'- AATCGGGTGTACTCGCCAG -3'
β -actin sense (F)	5'- CCACCAGACATGACAATGTTGGCA -3'
β -actin antisense (R)	5'- AAGCCAATCGTGAGAAGATGACCC -3'

結 果

一、東方果實蠅成蟲腹部脂肪體之形態與切片觀察

東方果實蠅成蟲腹部具有兩種不同形式之脂肪體，分別為白色顆粒球狀與扁平片狀且密布氣管與微氣管（圖一）。對照東方果實蠅幼蟲體內脂肪體形態皆為球狀的脂肪體，推測片狀的脂肪體於東方果實蠅成蟲才逐漸增生。因此，本文將成蟲體內球狀的脂肪體稱為幼蟲形式脂肪體，而片狀的脂肪體稱為成蟲形式脂肪體。

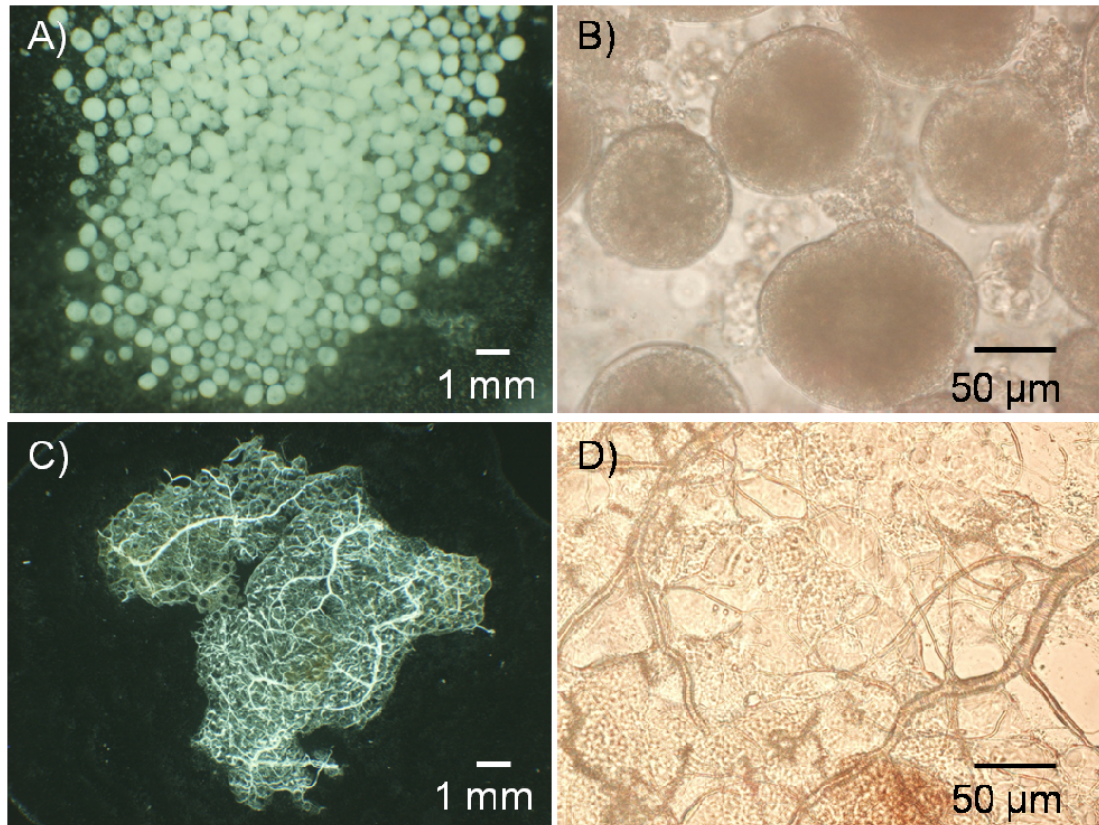
除了蟲體解剖發現東方果實蠅成蟲腹部具有兩種形式迥異的脂肪體，並以冷凍切片觀察兩形式脂肪體於成蟲之分布。正常飼育下，初羽化（第 0 日齡）之東方果實蠅雌（圖二 A）蟲之腹部切片結果顯示，幾乎皆為幼蟲形式脂肪體。第 3 日齡之雌蟲腹部切片顯示，靠近體壁處多為成蟲形式脂肪體分布，而遠離體壁，靠近體內其他組織器官的脂肪體則為幼蟲形式脂肪體（圖二 B）。除了以分布位置來區分幼蟲或成蟲形式脂肪體，亦可依照伊紅染色後的結果來判定，幼蟲形式的脂肪體以伊紅染色，會呈現較深的紅色，此現象是因為幼蟲形式脂肪體的蛋白質含量較高所導致。第 6 日齡雌蟲腹部的脂肪體形式以成蟲形式脂肪體占大部分，而幼蟲形式脂肪體僅占少部分（圖二 C）；

第 9 日齡時，幼蟲形式脂肪體於成蟲腹部脂肪體所佔之比例更少，相對的，成蟲形式脂肪體所佔比例持續增加（圖二 D）；第 12 日齡雌蟲腹部切片顯示，脂肪體形式幾乎皆為成蟲形式脂肪體（圖二 E）。此兩種形式之脂肪體於雄蟲之消長情形與雌蟲相同（結果未示出）。

飢餓處理的東方果實蠅腹部脂肪體總量較正常飼育的少，且脂肪體組織亦較為鬆散（圖三）。第 3 日齡雌蟲腹部脂肪體的形式如圖所示（圖三 A），幾乎皆為幼蟲形式脂肪體；第 6 日齡腹部切片結果顯示，成蟲形式脂肪體已增生，但仍有許多幼蟲形式脂肪體散佈於腹部（圖三 B）；第 9 日齡切片之結果，仍然留有幼蟲形式脂肪體於腹部（圖三 C）；直至第 12 日齡雌蟲腹部依舊殘存幼蟲形式脂肪體（圖三 D）。相較於正常飼育的第 9 日齡雌蟲腹部，幼蟲形式脂肪體已消失殆盡，脂肪體形式幾乎皆為成蟲形式脂肪體；飢餓處理組則至第 12 日齡，幼蟲形式脂肪體依舊零星散佈於成蟲腹部。飢餓處理之雄蟲腹部脂肪體轉變情形與雌蟲相同（結果未示出）。

二、cDNA 篩減法之結果

自第 0 日齡及第 9 日齡成蟲腹部脂肪體之減差基因庫中，任選菌株，分析其序列所得結果如表二及三。在定序的 200 個菌株中，第 0 日齡成蟲腹部脂肪體芳基蛋白受器



圖一 東方果實蠅成蟲腹部脂肪體之組織形態。A 及 B 圖為幼蟲形式脂肪體，於第 1 日齡雌成蟲腹部內取出，外觀形態為白色顆粒球狀。C 及 D 圖為成蟲形式脂肪體，於第 6 日齡雌成蟲腹部內取出，外觀形態為白色（某些部分為棕色）之扁平片狀，密布氣管與微氣管。

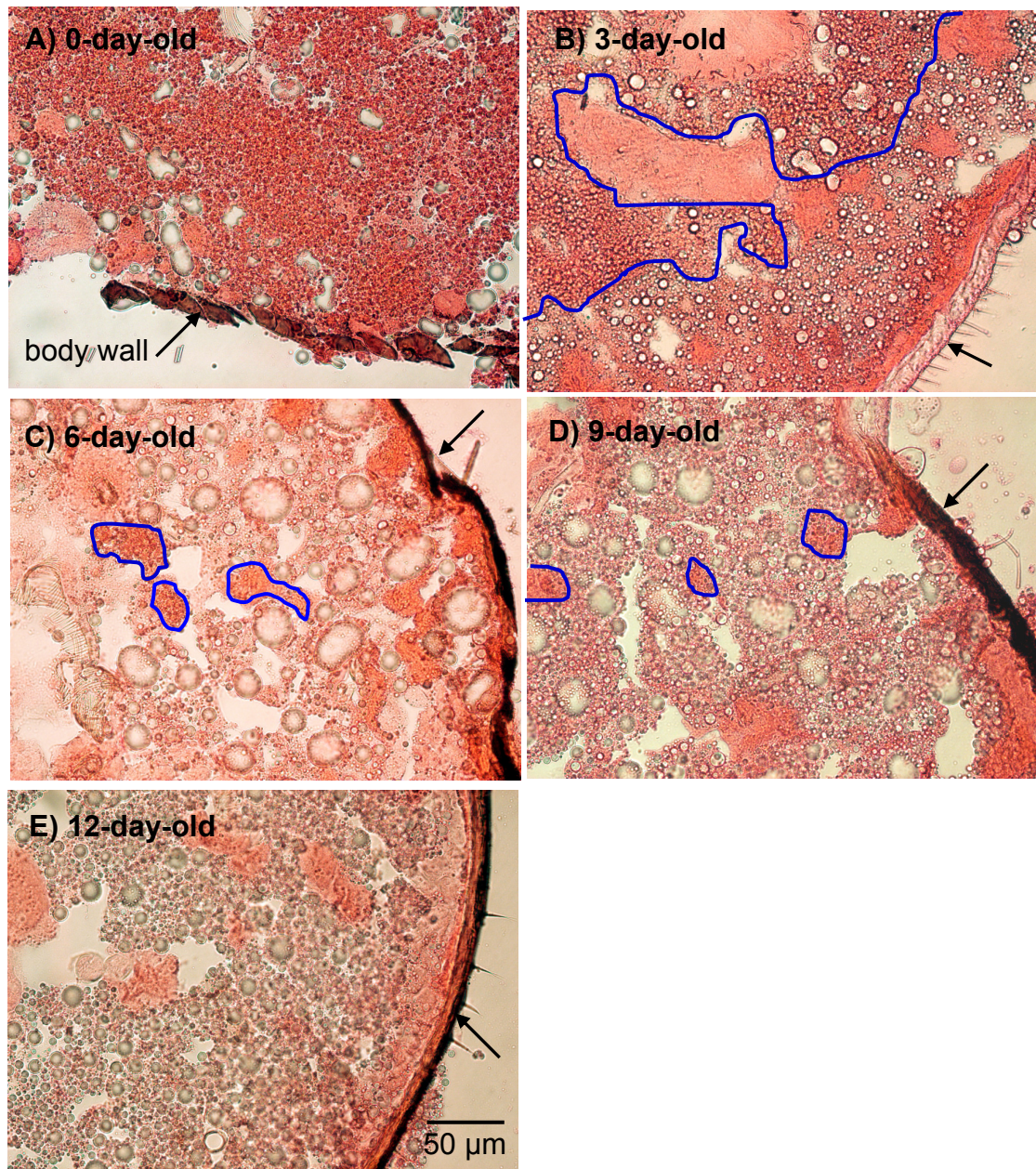
Fig. 1. Morphology of abdominal fat body of *Bactrocera dorsalis* adults. A and B: the larval fat body dissected from 1-day-old adult females. They were white nodule-like. C and D: the adult fat body dissected from 6-day-old adult females. They were white (mingled with brown) thin sheet-like and connected with numerous tracheae and tracheoles.

(arylphorin receptor) 佔 15%；儲存蛋白佔 5.5%；酵素類為 11.0%；表皮蛋白佔 4.5%；核糖體蛋白佔 3.5%；其他種類基因佔 19.5%；未知基因則佔 41.0% (表二)。芳基蛋白受器為一種儲存蛋白受器，加上儲存蛋白其所佔比例高達 20.5%，故由此推測幼蟲形式脂肪體的主要功能為儲存蛋白。第 9 日齡成蟲腹部脂肪體則以卵黃蛋白基因 1 (yolk protein gene 1) 的表現量最多，在定序的 46 個菌株中佔 34.8% (表三)，推測合成雌蟲卵巢發育所需之蛋白為

成蟲形式脂肪體主要功能之一。

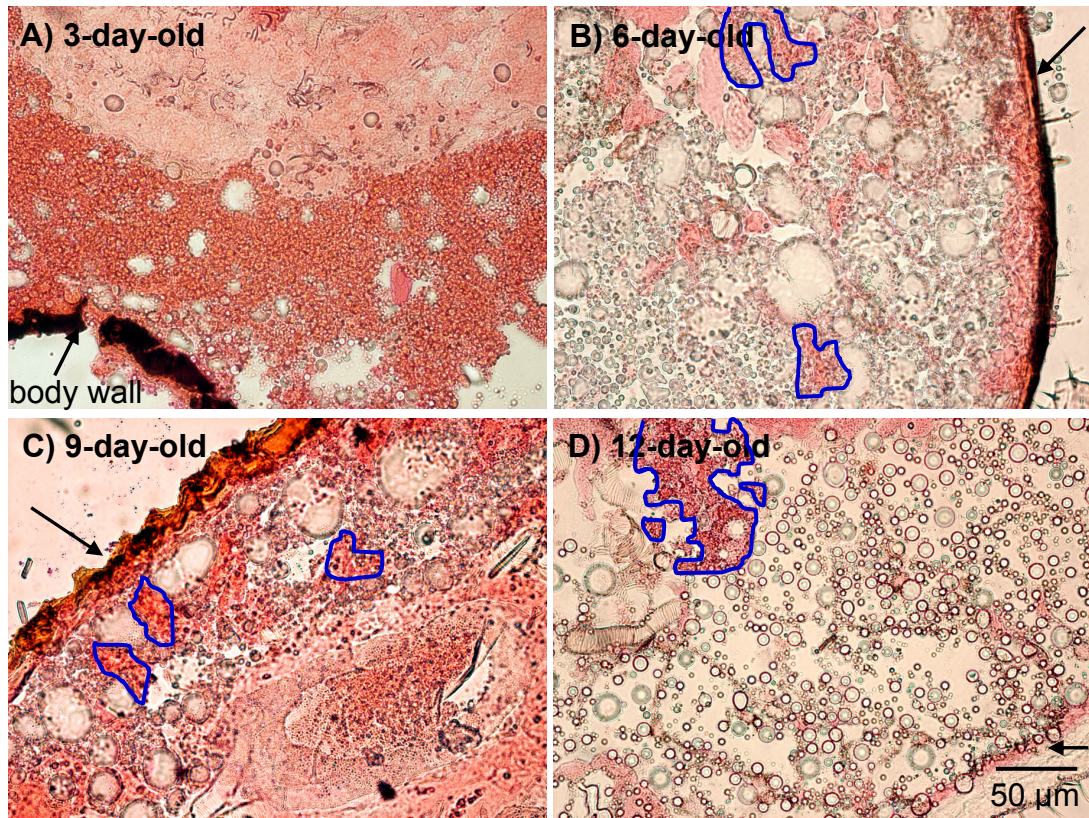
三、芳基蛋白受器及卵黃蛋白基因 1 於不同形式脂肪體之表現及飢餓對其之調節

RT-PCR 分析結果顯示，芳基蛋白受器基因大量表現於幼蟲形式脂肪體，於成蟲形式脂肪體並不表現；相對地，卵黃蛋白基因 1 於幼蟲形式脂肪體不表現，只表現於第 9 日齡雌成蟲的成蟲形式脂肪體 (圖四)；而做為內部對照組 (internal control) 的東方果實蠅肌動蛋



圖二 東方果實蠅雌成蟲腹部冷凍切片結果：箭頭所指為體壁，幼蟲脂肪體以藍色線條框出。A) 第 0 日齡成蟲體內皆為幼蟲脂肪體；B) 第 3 日齡成蟲，圖中遠離體壁部分為幼蟲脂肪體；C) 第 6 日齡成蟲；D) 第 9 日齡成蟲；E) 第 12 日齡成蟲體內皆為成蟲脂肪體。

Fig. 2. The frozen section of abdomen from females of *Bactrocera dorsalis*. Arrows pointed out body wall, and the larval fat body was circled by blue lines in B, C, and D. A) 0-day-old females, all larval fat body. B) 3-day-old females, the larval fat body was away from the body wall. C) 6-day-old adult females. D) 9-day-old adult females. E) 12-day-old adult females, all adult fat body.



圖三 飢餓處理的東方果實蠅雌成蟲腹部組織切片圖：箭頭所指為體壁，幼蟲脂肪體以藍色線條框出。A) 第 3 日齡成蟲體內皆為幼蟲脂肪體；B) 第 6 日齡成蟲；C) 第 9 日齡成蟲；D) 第 12 日齡成蟲。

Fig. 3. Abdominal sections of starved females of *Bactrocera dorsalis*. Arrows pointed out body wall, and the larval fat body was circled by blue lines in B, C, and D. A) 3-day-old females, all larval fat body. B) 6-day-old females. C) 9-day-old females. D) 12-day-old females.

白於兩種形式脂肪體皆有表現。

正常飼育的東方果實蠅雌成蟲，腹部芳基蛋白受器基因於第 0 及 3 日齡有較高的表現量，然隨著雌成蟲日齡增加，表現量隨之減少（圖五 A1）；而卵黃蛋白基因 1 於第 3、6、9 及 12 日齡有較高的表現量，其表現量隨著雌成蟲生長而增加（圖五 B1）。

以 RT-PCR 分析，東方果實蠅芳基蛋白受器基因表現於飢餓處理後的第 0 及 3 天，隨著雌成蟲日齡增加，表現量快速減少，甚至不表現（圖五 A2）；而卵黃蛋白基因 1 於飢餓處理

後的第 3、6、9 及 12 天仍有表現，但表現量較正常飼育雌蟲少（圖五 B2）。上述結果顯示，飢餓處理東方果實蠅雌成蟲，會減少芳基蛋白受器基因及卵黃白基因 1 之表現量。

討 論

一、東方果實蠅成蟲腹部幼蟲與成蟲形式脂肪體之形態、消長與功能

東方果實蠅成蟲腹部具有兩種不同形式之脂肪體，分別為幼蟲形式脂肪體與成蟲形式

表二 東方果實蠅第 0 日齡成蟲腹部脂肪體 cDNA library 之基因表現產物

Table 2. List of fat body cDNA of day-0 adult *Bactrocera dorsalis* abdomens showing similarity with NCBI database

Category	Accession no.	Size (bp)	Homology	E value	Number (percentage %)
Arylphorin receptor	JZ476873	497	Arylphorin receptor	2e-07	30 (15.0)
Storage protein	JZ476874	412	Larval serum protein 1 β subunit	4e-05	11 (5.5)
Enzyme	JZ476875	1077	Fatty acyl-CoA desaturase	3e-56	1 (0.5)
	JZ476876	789	Glycogen synthase	6e-155	2 (1)
	JZ476877	338	Cullin	1e-46	1 (0.5)
	JZ476878	366	Malate dehydrogenase 2	6e-16	1 (0.5)
	JZ476879	339	Disulfide isomerase	3e-66	1 (0.5)
	JZ476880	511	Deoxyribonuclease I	3e-15	2 (1)
	JZ476882	642	Dihydropteridine reductase isoform A	6e-115	3 (1.5)
	JZ476883	462	Phosphoglucomutase	2e-73	1 (0.5)
	JZ476884	477	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	2e-106	1 (0.5)
	JZ476885	353	Diacylglycerol o-acyltransferase	1e-51	1 (0.5)
	JZ476886	392	Pyruvate dehydrogenase	6e-82	1 (0.5)
	JZ476887	663	Phosphoenolpyruvate carboxykinase, isoform A	7e-75	1 (0.5)
	JZ476888	557	Closely related to alcohol dehydrogenase	1e-54	1 (0.5)
	JZ476889	417	Serine protease	6e-55	1 (0.5)
	JZ476890	376	Triacylglycerol lipase, pancreatic	8e-13	1 (0.5)
	JZ476891	526	Mariner transposase	8e-16	1 (0.5)
	JZ476892	500	Lipase 3 precursor	9e-113	1 (0.5)
	JZ476906	1076	Cytochrome P450 307a1	1e-106	1 (0.5)
Cuticular protein	JZ476894	322	Cuticular protein 100A	3e-27	3 (1.5)
	JZ476895	442	Cuticle protein	5e-05	5 (2.5)
	JZ476900	617	Cuticular protein 92F	2e-10	1 (0.5)
Ribosomal protein	JZ476896	464	Ribosomal protein L3, isoform A	1e-78	2 (1.0)
	JZ476897	458	Ribosomal protein L18, isoform A	4e-84	2 (1.0)
	JZ476898	306	Ribosomal protein S17	5e-35	1 (0.5)
	JZ476899	285	L23A ribosomal protein natural variant	1e-20	1 (0.5)
	JZ476902	791	Ribosomal protein S15	1e-73	1 (0.5)
Others	JZ476903	779	Alpha-tocopherol transfer protein	1e-76	1 (0.5)
	JZ476904	765	Solute carrier family 41	2e-73	2 (1.0)
	JZ476905	995	Eukaryotic-initiation-factor-4G, isoform B	5e-68	3 (1.5)
	JZ476907	485	Odorant-binding protein 83g	1e-34	1 (0.5)
	JZ476908	1110	Helmsman	3e-58	3 (1.5)
	JZ476909	530	Intronic protein 259	2e-83	1 (0.5)
	JZ476910	741	DNAJ chaperone	3e-39	1 (0.5)
	JZ476911	574	Actin-5	5e-41	1 (0.5)

表二 (續)

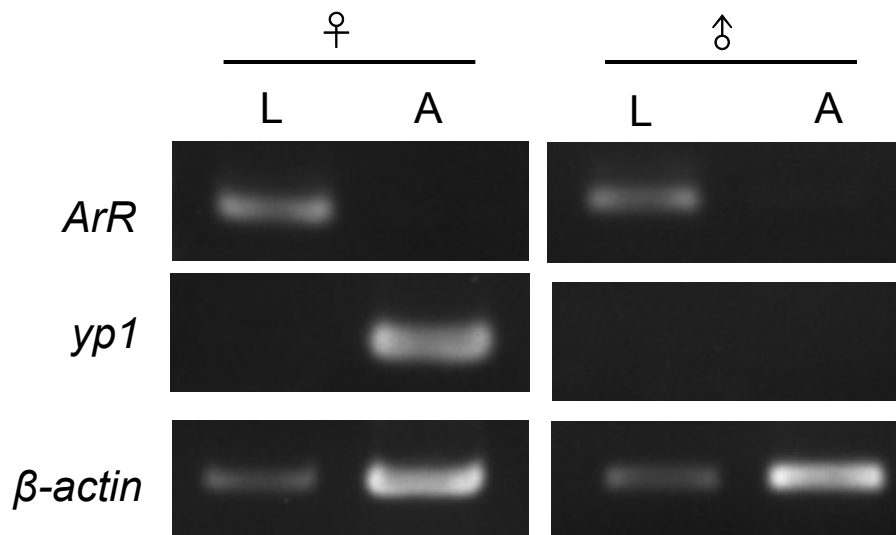
Table 2. (continued)

Category	Accession no.	Size (bp)	Homology	E value	Number (percentage %)
	JZ476912	729	T-complex protein 1, alpha subunit	4e-166	1 (0.5)
	JZ476913	472	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma	1e-51	1 (0.5)
	JZ476914	744	Tetratricopeptide repeat protein 2, isoform B	7e-68	1 (0.5)
	JZ476915	320	Putative salivary secreted protein	2e-07	1 (0.5)
	JZ476916	666	Ced-6 isoform D	6e-24	1 (0.5)
	JZ476917	310	Replication protein A 70	1e-45	2 (1.0)
	JZ476918	796	Discs lost protein	8e-96	1 (0.5)
	JZ476919	508	Thiolester containing protein II, isoform C	2e-29	1 (0.5)
	JZ476920	670	Hemomucin	3e-125	1 (0.5)
	JZ476922	1048	Adiponectin receptor protein 2	6e-111	1 (0.5)
	JZ476923	390	Cortactin	3e-30	1 (0.5)
	JZ476924	653	Relish	5e-08	1 (0.5)
	JZ476925	250	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	1e-28	1 (0.5)
	JZ476926	268	Ken	4e-04	1 (0.5)
	JZ476927	439	Troponin C type IIIa	4e-27	1 (0.5)
	JZ476928	296	Attacin C	1e-21	1 (0.5)
	JZ476929	414	CRAL/TRIO domain-containing protein	2e-27	1 (0.5)
	JZ476881	477	Fat body protein 1	2e-34	8 (4.0)
Unknown					82 (41.0)

表三 東方果實蠅第9日齡成蟲腹部脂肪體 cDNA library 之基因表現產物

Table 3. List of fat body cDNA of day-9 adult *Bactrocera dorsalis* abdomens showing similarity with NCBI database

Category	Accession no.	Size (bp)	Homology	E value	Number (percentage %)
Yolk protein					16 (34.8)
	JZ476930	404	Yolk protein 1	8e-88	15 (32.6)
	JZ476931	507	Vitellogenin 2	4e-77	1 (2.2)
Enzyme					6 (13.2)
	JZ476932	468	Phosphoglycolate phosphatase-like	7e-51	1 (2.2)
	JZ476933	510	Serine 3-dehydrogenase	2e-43	1 (2.2)
	JZ476934	658	Acetyl-CoA synthetase	2e-124	1 (2.2)
	JZ476935	711	S-adenosylmethionine synthetase	7e-39	1 (2.2)
	JZ476936	706	Fatty acid synthase	4e-48	2 (4.4)
Others					9 (19.6)
	JZ476937	655	Ribosomal protein L10Ab, isoform A	3e-125	1 (2.2)
	JZ476938	728	Retinoid- and fatty acid-binding glycoprotein	1e-47	1 (2.2)
	JZ476939	222	Odorant-binding protein	0.014	7 (15.2)
Unknown					15 (32.4)



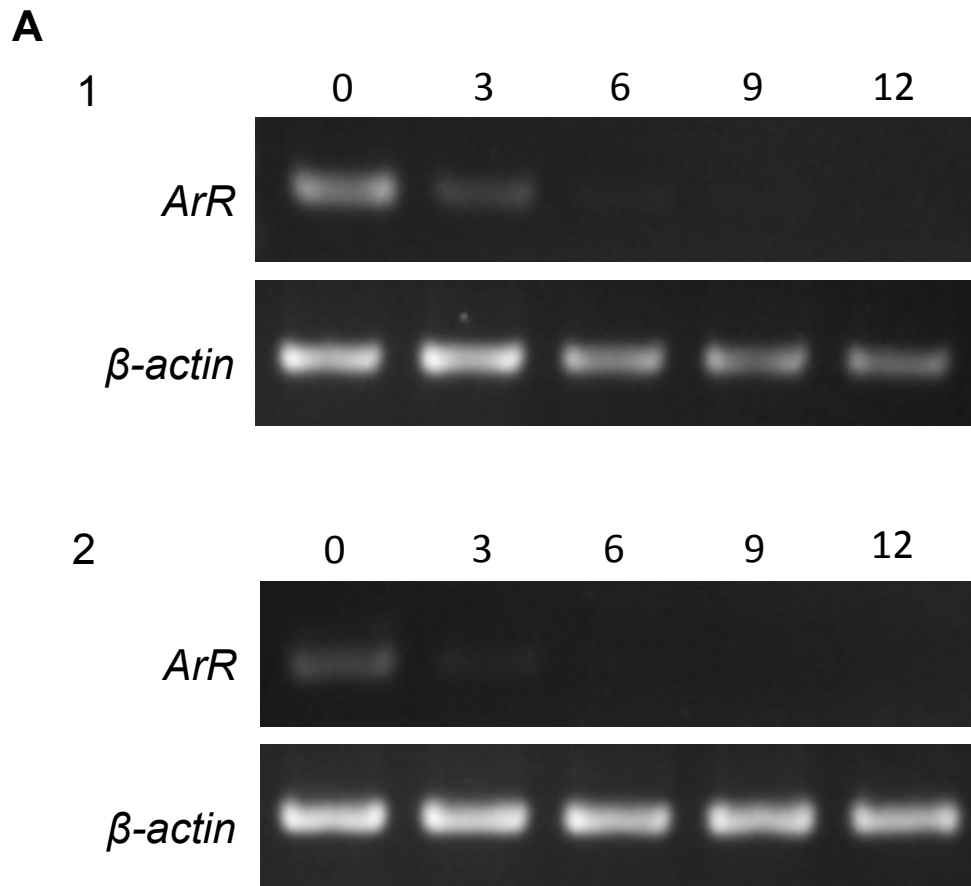
圖四 芳基蛋白受器基因 (*ArR*) 與卵黃蛋白基因 1 (*yp1*) 於東方果實蠅脂肪體之表現。分別從第零日齡成蟲腹部取出幼蟲形式脂肪體 (L) 及第九日齡成蟲腹部取出成蟲形式脂肪體 (A)，以 RT-PCR 分析顯示芳基蛋白受器基因表現於幼蟲形式脂肪體，而卵黃蛋白基因 1 表現於第九日齡雌成蟲的成蟲形式脂肪體。內部對照組為肌動蛋白基因 (*β-actin*)。

Fig. 4. Gene expression of *arylphorin receptor (ArR)* and *yolk protein gene 1 (yp1)* in *Bactrocera dorsalis* fat body. Larval fat body (L) and adult fat body (A) were obtained from 0-day-old and 9-day-old adult abdomen, respectively. By RT-PCT, *ArR* was expressed in L, and *yp1* was expressed in A of female. *β-actin* was used as the internal control.

脂肪體。幼蟲形式脂肪體分布位置較靠近腹部其他組織且主要功能為儲存蛋白，此與玉米穗蟲圍臟脂肪體相似 (Hauerland *et al.*, 1990; Hauerland and Shirk, 1995)。而成蟲形式脂肪體，分布位置較靠近體壁，則與玉米穗蟲周邊脂肪體相仿 (Hauerland *et al.*, 1990; Hauerland and Shirk, 1995)。

冷凍切片結果顯示，正常飼育的第 9 日齡成蟲腹部，幼蟲形式脂肪體已消失殆盡，脂肪體形式幾乎皆為成蟲形式脂肪體。肉蠅幼蟲的前端脂肪體於化蛹後 24 小時會開始分解，而後端脂肪體於化蛹後 44 小時亦開始分解，且前端脂肪體分解速率較快，而後端脂肪體則可存留至羽化後成蟲之前幾日齡。由於兩端脂肪體分解速率不同，因此作者推測幼蟲時期的前

端及後端脂肪體之功能不甚相同 (Nakajima and Natori, 2000)。黃果蠅幼蟲時期的脂肪體細胞於蟲體化蛹後，細胞數目便逐漸減少 (Butterworth *et al.*, 1988)，直到羽化後 9 小時，幼蟲時期脂肪體的數目僅剩原來的 50%；而羽化後 24 小時，脂肪體已減少 70%；直至羽化後 48 小時，幼蟲時期的脂肪體才會於成蟲體內完全消失 (Aguila *et al.*, 2007)。相較於肉蠅及黃果蠅幼蟲時期脂肪體完全消失的時間，東方果實蠅的幼蟲時期脂肪體於成蟲體內的消失則較緩慢，但皆顯示了幼蟲時期的脂肪體細胞可存留至成蟲時期，推測幼蟲時期的脂肪體細胞於成蟲可能具有特定功能 (Hauerland and Shirk, 1995)。例如於蟲體無法取食或缺乏食物來源時，便可消耗幼蟲時

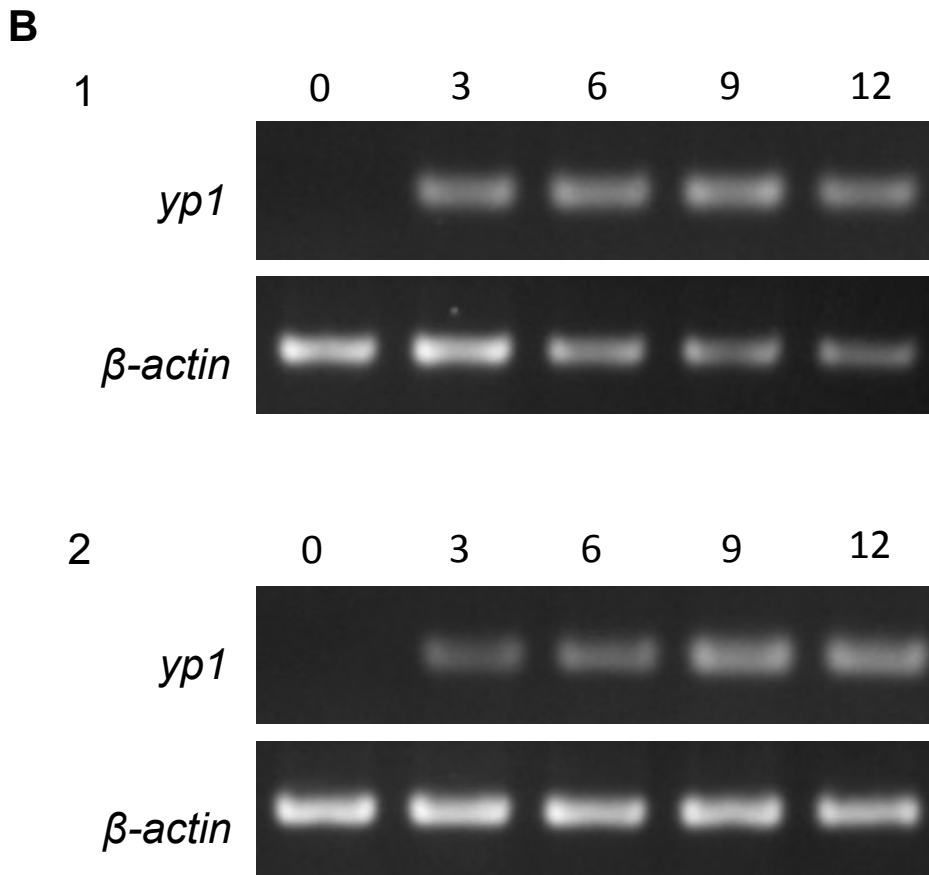


圖五 飢餓對芳基蛋白受器基因 (*ArR*) 與卵黃蛋白基因 1 (*yp1*) 於東方果實蠅雌成蟲腹部表現之影響。A：芳基蛋白受器基因表現情形；B：卵黃蛋白基因 1 表現情形。Panel 1：正常飼育處理；Panel 2：以飢餓處理雌成蟲後第 0、3、6、9 及 12 天取樣，並以 RT-PCR 檢測基因表現。相較於正常飼育的雌成蟲，於飢餓處理的狀況下，兩基因的表現量皆較少。內部對照組為肌動蛋白 (β -actin)。

Fig. 5. Effect of starvation on gene expression of *arylphorin receptor (ArR)* and *yolk protein gene 1 (yp1)* in the abdomen of *Bactrocera dorsalis* females. A: Transcriptional expression of *ArR*; B: Transcription expression of *yp1*. Panel 1: Fed control; Panel 2: Starving treatment. The transcriptional expression levels of both genes were measured using RT-PCR at 0-, 3-, 6-, 9- and 12-day, respectively, after starving treatments. When compared with fed females, the expression levels of both genes were lower under starving treatment. β -actin gene was used as the internal control.

期儲存於脂肪體中的營養，作為能量來源 (Aguila *et al.*, 2007)。飢餓處理之東方果實蠅至第 12 日齡，幼蟲形式脂肪體依舊零星散佈於成蟲腹部。成蟲形式脂肪體形成較慢，且幼蟲形式脂肪體分解亦較慢。可能是因為幼蟲形

式脂肪體因胺基酸缺乏的狀況，需要保留蛋白質做為能量供給或其他生理上的需求，因此幼蟲形式脂肪體不會如同於正常飼育般快速地被分解。胺基酸的缺乏亦使成蟲形式脂肪體的細胞無法正常增長，且成蟲形式脂肪體的主要



圖五 (續)。
Fig. 5. (continued)

功能為合成成蟲生理所需之蛋白，由於飢餓處理的食物不含蛋白質，成蟲形式脂肪體缺乏胺基酸來源，無法順利合成蛋白。

東方果實蠅第0日齡成蟲腹部脂肪體以幼蟲形式脂肪體為主，cDNA 篩減法所得結果顯示，以儲存蛋白類的基因及其受器（如芳基蛋白受器基因）所佔的比例總和較高，總計20.5%。且以伊紅染色時，幼蟲形式脂肪體呈深紅色，亦說明幼蟲形式脂肪體細胞含有較多蛋白 (Haunerland *et al.*, 1990)，推測幼蟲形式脂肪體的主要功能為儲存蛋白質。玉米穗蟲

(Wang and Haunerland, 1993)、外米綴蛾 (Arif *et al.*, 2003)、家蠶 (Cheng *et al.*, 2006)、藍麗蠅 (Burmester and Scheller, 1995a, b)、黃果蠅 (Burmester *et al.*, 1999) 及肉蠅 (Chung *et al.*, 1995) 等幼蟲時期脂肪體會表現高量的能量儲存蛋白類群基因，顯示上述昆蟲之幼蟲時期脂肪體功能與東方果實蠅成蟲體內幼蟲形式脂肪體相同皆以儲存能量為主。

第9日齡成蟲腹部脂肪體則以卵黃蛋白基因1的表現量最多，佔34.8%，推測成蟲形式

脂肪體的主要功能之一為合成卵巢發育所需之蛋白。東方果實蠅成蟲體內的兩種形式脂肪體具有不同功能：初羽化時，幼蟲形式脂肪體以儲存能量為主，隨著東方果實蠅生長並準備生殖時，成蟲形式脂肪體功用為合成成蟲生理所需之蛋白質。

二、芳基蛋白受器及卵黃蛋白基因 1 與脂肪體消長之關係

芳基蛋白受器基因之表現與幼蟲形式脂肪體，皆隨著雌成蟲的日齡增加而減少；相反地，卵黃蛋白基因 1 之表現與成蟲形式脂肪體，皆隨著雌成蟲的發育而增加。上述結果顯示芳基蛋白受器基因及卵黃蛋白基因 1 之表現與幼蟲及成蟲形式脂肪體的消長情形，其結果是相符的。

飢餓狀態下的東方果實蠅雌成蟲，芳基蛋白受器基因的表現量快速減少。冷凍切片的結果顯示，飢餓處理後，幼蟲形式脂肪體可存留至第 12 日齡，但芳基蛋白受器基因的表現卻無法持續至第 12 日齡，表現量反而快速的減少。卵黃蛋白基因 1 於蟲體於飢餓處理的情況，表現量亦較少。推測東方果實蠅處於飢餓狀態，缺乏胺基酸來源，因此無法合成芳基蛋白受器基因及卵黃蛋白基因 1，且由於缺乏能量，細胞內轉錄及轉譯之效能皆會降低 (Marr II *et al.*, 2007)。

本試驗結果推測幼蟲形式脂肪體具有儲存能量之功能，而成蟲形式脂肪體則以合成生殖所需蛋白為主；然而，幼蟲形式脂肪體完全崩解後，東方果實蠅成蟲時期的脂肪體是否依舊有儲存能量之功能？亦即是否由成蟲形式脂肪體執行此功能？脂肪體所表現的芳基蛋白受器可攝入芳基蛋白，作為變態時期的能量來源，若芳基蛋白受器不表現或過量表現，對東方果實蠅有何生理的影響？皆為未來可探

究之相關議題。

引用文獻

- Aguila JR, Suszko J, Gibbs AG, Hoshizaki DK.** 2007. The role of larval fat body in adult *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol* 210: 956-963.
- Arif A, Scheller K, Dutta-Gupta A.** 2003. Tyrosine kinase mediated phosphorylation of the hexamerin receptor in the rice moth *Corcyra cephalonica* by ecdysteroids. *Insect Biochem Mol Biol* 33: 921-928.
- Arrese EL, Canavoso LE, Jouni ZE, Pennington JE, Tsuchida K, Wells MA.** 2001. Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions. *Insect Biochem Mol Biol* 31: 7-17.
- Burmester T, Scheller K.** 1995a. Ecdysterone-mediated uptake of arylphorin by larval fat bodies of *Calliphora vicina*: involvement and developmental regulation of arylphorin binding proteins. *Insect Biochem Mol Biol* 25: 799-806.
- Burmester T, Scheller K.** 1995b. Complete cDNA-sequence of the receptor responsible for arylphorin uptake by the larval fat body of the blowfly, *Calliphora vicina*. *Insect Biochem Mol Biol* 25: 981-989.
- Burmester T, Antoniewski C, Lepesant JA.** 1999. Ecdysone-regulation of synthesis and processing of Fat Body Protein 1, the larval serum protein receptor of *Drosophila melanogaster*.

- Eur J Biochem 262: 49-55.
- Butterworth FM, Rasch EM.** 1986. Adipose tissue of *Drosophila melanogaster*. VII. Distribution of nuclear DNA amount along the anterior-posterior axis in the larval fat body. J Exp Zool 239: 77-85.
- Butterworth FM, Emerson L, Rasch EM.** 1988. Maturation and degeneration of the fat body in the *Drosophila* larva and pupa as revealed by morphometric analysis. Tiss Cell 20: 255-268.
- Cheng DJ, Xia QY, Zhao P, Wang ZL, Xu HF, Li GR, Lu C, Xiang ZH.** 2006. EST-based profiling and comparison of gene expression in the silkworm fat body during metamorphosis. Arch Insect Biochem Physiol 61: 10-23.
- Chiu HT.** 1978. Studies on the improvement of mass rearing for oriental fruit flies. Plant Prot Bull 20: 87-92. (in Chinese)
- Chung SO, Kubo T, Natori S.** 1995. Molecular cloning and sequencing of arylphorin-binding protein in protein granules of *Sarcophaga* fat body. J Biol Chem 270: 4624-4631.
- Dean RL, Locke M, Collins JV.** 1985. Structure of the fat body. pp 155-210. In: Kerkut GA, Gilbert LI (eds). Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. vol. 3. Pergamon Press, Oxford.
- Hauerland NH, Shirk PD.** 1995. Regional and functional differentiation in the insect fat body. Annu Rev Entomol 40: 121-145.
- Hauerland NH, Nair KK, Bowers WS.** 1990. Fat body heterogeneity during development of *Heliothis zea*. Insect Biochem 20: 829-837.
- Kanost MR, Kawooya JK, Law JH, Ryan RO, Van Heusden MC, Ziegler R.** 1990. Insect haemolymph proteins. Adv Insect Physiol 22: 299-396.
- Keeley LL.** 1985. Physiology and Biochemistry of the Fat Body. pp. 211-248. In: Kerkut GA, Gilbert LI (eds). Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. vol. 3. Pergamon, Oxford.
- Kishimoto A, Nakato H, Izumi S, Tomino S.** 1999. Biosynthesis of major plasma proteins in the primary culture of fat body cells from the silkworm, *Bombyx mori*. Cell Tiss Res 297: 329-335.
- Marr II MT, D'Alessio JA, Puig O, Tjian R.** 2007. IRES-mediated functional coupling of transcription and translation amplifies insulin receptor feedback. Genes Dev 21: 175-183.
- Nakajima Y, Natori S.** 2000. Identification and characterization of an anterior fat body protein in an insect. J Biochem 127: 901-908.
- Shinbo H, Konno K, Hirayama C.** 1997. The pathway of ammonia assimilation in the silkworm, *Bombyx mori*. J Insect Physiol 43: 959-964.
- Tahara T, Maeda Y, Kuroiwa A, Ueno K, Obinata M, Natori S.** 1982. Identification of storage-protein messenger RNA of the fleshfly

- Sarcophaga peregrina*. Biochem J 203: 571-575.
- Tojo S, Betechaku T, Ziccardi V, Wyatt GR.** 1978. Fat body protein granules and storage proteins in the silkworm, *Hyalophora cecropia*. J Cell Biol 78: 823-838.
- Ueno K, Ohsaea F, Natori S.** 1983. Identification and activation of storage protein receptor of *Sarcophaga peregrina* fat body by 20-hydroxyecdysone. J Biol Chem 258: 12210-12214.
- Wang ZX, Haunerland NH.** 1993. Storage protein uptake in *Helicoverpa zea*-Purification of the very high-density lipoprotein receptor from perivisceral fat body. J Biol Chem 268: 16673-16678.
- Wyatt GR, Pan ML.** 1978. Insect plasma proteins. Annu Rev Biochem 47: 779-817.

收件日期：2013年5月31日

接受日期：2013年6月20日

Characteristics and Gene Expression of Fat Body in Adult Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis*

Yu-Han Zuo, Kuang-Hui Lu, and Mei-Er Chen*

Department of Entomology, National Chung Hsing University, 250 Kuo-Kuang Rd., Taichung 40227, Taiwan

ABSTRACT

Insect fat body is responsible for storing nutrients, providing energy and metabolizing materials. Dissection and histological observation revealed that there were two forms of fat body in the adult abdomen of *Bactrocera dorsalis* (Hendel), *i.e.*, white nodule-like “larval fat body” and thin sheet-like “adult fat body”. The amount of larval fat body was decreasing while adult fat body was increasing with adult growth. The degradation rate of larval fat body was decreased when the flies were reared under starvation. There was still larval fat body in the flies for starving 12 days. Using cDNA subtraction, stage specific-expressed genes from the abdominal fat body of 0-day-old and 9-day-old adults were screened. The subtracted results showed that arylphorin receptor (*ArR*) gene expressed most abundantly in the 0-day-old adult fat body, and up to 15.0%; yet yolk protein gene 1 (*yp1*) was the major gene expressed in 9-day-old adult fat body, and up to 34.8%. Reverse transcription PCR analysis demonstrated that *ArR* expressed greatly in larval fat body; in contrast, *yp1* did not express in larval fat body, but specifically expressed in adult fat body of females. The transcriptional expression of *ArR* was decreasing, but *yp1* was increasing with normal adult growth. In adult fat body, *ArR* and *yp1* expressed less in starved females than that of normal females. These results suggested that the function of larval fat body is for energy storage and that of adult fat body is to synthesize proteins for adult physiology, for example, ovary development.

Key words: larval fat body, adult fat body, cDNA subtraction, arylphorin receptor gene, yolk protein gene 1