

隐花色素蛋白和铁硫簇蛋白相互作用及其在褐飞虱发育与生殖中的作用*

张英超^{1,2**} 曾路影³ 万贵钧³ 江幸福⁴ 陈法军³ 潘卫东^{1,2***}

(1. 中国科学院电工研究所生物电磁学北京市重点实验室, 北京 100190; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 南京农业大学植物保护学院昆虫系昆虫信息生态研究组, 南京 210095; 4. 中国农业科学院植物保护研究所植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

摘要 【目的】在真核生物中验证隐花色素蛋白(Cryptochrome)/铁硫簇蛋白(Iron-sulfur cluster assembly 1) 的相互作用, 研究 2 种蛋白在褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 发育和生殖过程中的作用, 为二者在磁感受机制中的协同作用及磁场对昆虫生理状态的调控机制提供依据和新的研究方向。【方法】通过酵母双杂交系统对褐飞虱 I 型隐花色素蛋白/II 隐花色素蛋白与铁硫簇蛋白的相互作用进行验证。在褐飞虱 3 龄若虫和羽化第 1 天成虫中建立 I 型隐花色素蛋白和铁硫簇蛋白基因 RNAi (RNA interference) 沉默模型, 并采用 RT-qPCR 检测 2 个基因沉默效率, 统计沉默虫体的若虫历期和产卵量。【结果】褐飞虱 I 型隐花色素蛋白与铁硫簇蛋白存在相互作用, 而 II 隐花色素蛋白与铁硫簇蛋白不存在相互作用。褐飞虱 3 龄若虫和羽化第 1 天成虫中成功建立 I 型隐花色素蛋白和铁硫簇蛋白基因 RNAi 沉默模型, 在注射 dsRNA 后第 2 天、第 4 天和第 6 天时, 2 个基因的沉默效率均能达到 70% 以上。I 型隐花色素蛋白和铁硫簇蛋白基因沉默虫体的若虫历期无明显变化, 但是产卵量受到显著性抑制。【结论】褐飞虱 I 型隐花色素蛋白和铁硫簇蛋白存在相互作用, 二者在褐飞虱生殖过程中发挥重要作用。

关键词 隐花色素蛋白; 铁硫簇蛋白; 生物磁感受; 褐飞虱

Interaction between cryptochrome and iron-sulfur cluster assembly 1 protein and their roles in the development and reproduction of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*

ZHANG Ying-Chao^{1,2**} ZENG Lu-Ying³ WAN Gui-Jun³
JIANG Xing-Fu⁴ CHEN Fa-Jun³ PAN Wei-Dong^{1,2***}

(1. Beijing Key Laboratory of Bioelectromagnetics, Institute of Electrical Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Department of Entomology, College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 4. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract 【Objectives】To verify the interaction between cryptochrome (Cry) and iron-sulfur cluster assembly 1 (IscA1) protein in eukaryotes, and to study the role of these two proteins in the development and reproduction of brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, so as to provide a basis for investigating the synergy between these proteins in magnetoreception and the physiological regulation of the magnetic field in insects. 【Methods】The interaction between *N. lugens* Cry1/Cry 2 and IscA1 was verified using yeast two hybrid technology. The RNAi (RNA interference) silencing model of *Cry1/IscA1* gene was established in 3rd instar nymphs and 1-day-old adults and the silencing efficiency of these two genes detected by RT-qPCR. The duration of the nymph period and the oviposition rate of silenced individuals were measured. 【Results】There is an interaction between Cry1 and IscA1 in *N. lugens* but not between Cry2 and IscA1. The RNAi silencing model of the *Cry1/I*

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金 (31670855, 31870367); 国家自然科学基金青年科学基金 (31701787)

**第一作者 First author, E-mail: zhangyingchao15@mails.ucas.edu.cn

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: panwd@mail.iee.ac.cn

收稿日期 Received: 2020-07-22; 接受日期 Accepted: 2020-09-21

IscA1 gene was successfully established in 3rd instar nymphs and 1-day-old adults; the silencing efficiency of these two genes was > 70% on the 2nd, 4th and 6th day after dsRNA injection. There was no change in the duration of the nymph period after *Cry1/IscA1* gene silencing but oviposition was significantly inhibited. **[Conclusion]** *Cry1* interacts with *IscA1* in *N. lugens* and plays an important role in the reproduction of this species.

Key words cryptochrome; iron-sulfur cluster assembly 1; magnetoreception; *Nilaparvata lugens*

地球本身是一个巨大的磁体,地磁场是其自身产生的磁场。地磁场的磁力线从南半球的磁南极向上离开地球表面,经赤道处平行于地表,至北半球向下进入磁北极,这些磁力线具有水平和垂直分量,可以被当作罗盘来使用。研究表明包括昆虫在内的许多动物都可以利用地磁场定向导航 (Camlitepe and Stradling, 1995; Boles and Lohmann, 2003; Lohmann *et al.*, 2004; Wiltshcko and Wiltshcko, 2005; Dennis *et al.*, 2007; Guerra *et al.*, 2014; Veronika *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2017)。地磁场除了可以被动物利用进行定向导航外,其参数的变化对很多生物的生理生化亦会产生一系列的影响。研究发现磁场会对生物生殖和胚胎发生产生不同程度影响 (Brewer, 1979; Strand *et al.*, 1983); 还会影响有丝分裂过程 (Denegre *et al.*, 1998; Valles, 2002)。在昆虫中的研究发现,其发育和代谢也受到磁场的影响 (Prolić and Nenadovic, 1995; Raus *et al.*, 2009; Wan *et al.*, 2014)。

目前有关生物磁感受的研究,主要提出以下几种机制:基于磁铁矿的磁感受机制、光依赖的自由基对磁感受机制和磁性蛋白生物指南针模型。基于磁铁矿的磁感受机制认为生物体内的单畴磁铁矿晶体调控感官系统从而使生物获得磁感受能力 (Kirschvink *et al.*, 2001)。而光依赖的自由基对磁感受机制则认为磁感受并不需要特定的铁氧化物,也不需要膜表面形成铁氧化物簇,仅需要色素分子吸收光进行电子传递,产生一对临时配对的自由基对,而磁场的变化可以影响自由基对的自旋状态,令生物在第一时间感受到变化的磁场信息 (Ritz *et al.*, 2010; 陈薇等, 2013)。隐花色素 (Cryptochrome, Cry) 作为蓝光受体被证实介导了光依赖的自由基对磁感受 (Gegeer *et al.*, 2008, 2010)。随着研究的

不断深入,2015 年北京大學謝燦團隊在體外研究中发现了一种由隐花色素蛋白 Cry 和铁硫簇蛋白 (Iron-sulfur cluster assembly 1, *IscA1*, 又被称为 Magnetoreceptor protein, *MagR*) 多聚化形成的蛋白复合体,该复合体自带极性,被认为可能是磁感应复合物,从而提出磁性蛋白生物指南针模型 (Qin *et al.*, 2015)。

隐花色素蛋白属于光裂解酶家族,其黄素腺嘌呤二核苷酸 (Flavin adenine dinucleotide, *FAD*) 结构在受到光刺激之后可以产生自由基对 (Ritz *et al.*, 2010)。动物的隐花色素主要分为 2 类:一类对蓝紫光敏感,作为光感受器对昼夜节律起到调节作用,这类隐花色素被称为 I 型隐花色素 (*Cry1*); 另一类对光不敏感,作为生物钟转录因子 *Cycle/Bmal1* 的抑制因子,参与动物体内生物钟负反馈调节,这类隐花色素被称为 II 型隐花色素 (*Cry2*) (Griffin *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2005)。在昆虫磁生物学效应研究中,隐花色素蛋白被发现参与其中,磁场通过调控隐花色素蛋白基因的表达水平进而影响昆虫的发育和生殖 (Wan *et al.*, 2014)。但是,关于隐花色素在昆虫发育和生殖过程中的作用还不清楚。铁硫簇蛋白是一种线粒体蛋白,蛋白活性中心含有 Fe-S 原子,具有极强的电子传递功能 (Meyer, 2008),同时在能量代谢、维持线粒体稳定和基因表达调控方面发挥中重要作用 (Jensen and Culotta, 2000; Kaut *et al.*, 2000)。最新的研究表明铁硫簇蛋白中的电子自旋通过磁偶极-偶极相互作用可以向自由基对引入一个波动的局部磁场,从而实现自由基对单重-三重态的相互转换 (Xiao *et al.*, 2020)。不过目前关于 *Cry/IscA1* 在生物磁感受过程中的协同作用,主要集中在体外的计算模拟阶段,尚缺乏在真核生物中的实验证据。并且隐花色素蛋白在不同物种中的类型有所差

异,哪种类型的隐花色素蛋白与铁硫簇蛋白存在协同作用也需要进一步的明确。此外,铁硫簇蛋白是否在昆虫发育和生殖过程中发挥作用也还没有报道。

本试验以迁飞性昆虫褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 为研究对象,利用酵母双杂交系统在真核细胞中对褐飞虱隐花色素蛋白 Cry1/Cry2 和铁硫簇蛋白 IscA1 的相互作用进行了验证;同时,检测 Cry1/IscA1 沉默后褐飞虱若虫历期和产卵量,以揭示 Cry1/IscA1 在褐飞虱发育和生殖过程中发挥的作用,为后期两蛋白磁感受功能的研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

褐飞虱来自华中农业大学植物科学技术学院华红霞老师实验室。实验室的饲养条件为:相对湿度 80%±5%,温度 (26±1)℃,光周期 L14:D10。供试水稻为易感品种 TN1,选择高度为 10-15 cm 的水稻苗饲喂褐飞虱到试验所需的龄期,期间每 2 d 更换 1 次水稻苗。

1.2 试验仪器和试剂

试验中主要使用的仪器为:智能人工气候培养箱(宁波江南仪器厂)、超净工作台(北京昌平长城空气净化工程有限公司)、-80℃超低温冰箱(日本 Sanyo 公司)、超纯水系统(德国 Milli-Q 公司)、台式冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司)、显微注射仪(美国 WPI 公司)、PCR 仪(美国 ABI 公司)、核酸电泳系统(美国 Bio-Rad 公司)、凝胶成像系统(美国 Proteinsimple 公司)、荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

试验中主要使用的试剂:快速克隆试剂盒(诺唯赞公司)、DNA 胶回收试剂盒(天根生化公司)、Peasy-T3 载体(全式基因)、Y2HGold 感受态细胞(北京华越洋公司)、Trizol(美国 Invitrogen 公司)、反转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司)、Fast SYBR Green Master Mix(美国 Thermo 公司)、pGADT7、pGBKT7 载体(日本 Clontech 公司)。

1.3 酵母双杂交验证蛋白互作

1.3.1 表达载体构建 根据 NCBI 中褐飞虱 Cry1/Cry2 和 IscA1 基因序列,设计带有双酶切位点(Cry1: EcoRI/BamHI, Cry2 和 IscA1: NdeI/EcoRI)的引物(表 1)。从褐飞虱 cDNA 中克隆上述基因的开放阅读框(Open reading frame, ORF)。通过同源同组的方式将 ORF 片段分别连接到线性化的 pGADT7 和 pGBKT7 载体(图 1)上,构建 pGADT7-Cry1(AD-Cry1)、pGADT7-Cry2(AD-Cry2)和 pGBKT7-IscA1(BD-IscA1)表达载体,并送测序。

1.3.2 共转化 将测序正确的质粒共转化进入到 Y2HGold 感受态细胞进行蛋白表达。试验中共转化组分为: pGADT7+pGBKT7(空载); AD-Cry1+pGBKT7、AD-Cry2 pGBKT7、pGADT7+BD-IscA1(毒性和自激活检测); AD-Cry1+BD-IscA1、AD-Cry2+BD-IscA1(试验组)。转化步骤如下:首先将 Y2HGold 感受态细胞从 -80℃超低温冰箱中取出放置于冰上融化,目的质粒置于冰上进行预冷,100℃煮沸 15 min 将 Carrier DNA 煮沸后快速放置于冰上;然后向 50 μL 已融化的感受态细胞中依次加入预冷后的目的质粒 5 μg、Carrier DNA 5 μL 和 PEG/LiAC 250 μL,并吸打 3 次使其充分混匀,42℃温浴 20 min;之后快速离心 10 s 去上清液;最后向沉淀中加 200 μL ddH₂O 重悬浮,并涂于 SD-Leu-Trp 和 SD-Leu-Trp-His 平板,于 29℃培养。

1.4 基于 RNAi 的褐飞虱隐花色素蛋白和铁硫簇蛋白基因沉默模型构建

1.4.1 dsRNA 合成与注射 根据褐飞虱 Cry1 和 IscA1 基因的 cDNA 序列,设计引物(表 1)合成 dsRNA,并通过显微注射的方式对褐飞虱进行基因沉默。显微注射的具体步骤如下:首先根据体表特征筛选出褐飞虱 3 龄若虫和羽化第 1 天的成虫,收集在装有水稻苗的玻璃试管中,并向试管中缓缓通入二氧化碳气体,迷晕褐飞虱;然后将褐飞虱有序排列在琼脂糖凝胶板上;之后采用显微注射仪对褐飞虱胸部第 1 对和第 2 对足中间位置进行注射;最后将注射过的褐飞虱放置于水稻苗上待其复苏。

表 1 试验中所用引物
Table 1 Primers in the experiment

引物名称 Primer names	序列 Sequences (5'-3')	用途 Usage
AD-Cry1-F	GCCATGGAGGCCAGTGAATTCATGTCGGATGAGATGAG	Cry1 基因同源重组引物 Primers of <i>Cry1</i> gene homologous recombination
AD-Cry1-R	CAGCTCGAGCTCGATGGATCCGGTAGGAACGCATACGTGATCA	
AD-Cry2-F	GACGTACCAGATTACGCTCATATGACAGGTGAGGTGGTTCCAT	Cry2 基因同源重组引物 Primers of <i>Cry2</i> gene homologous recombination
AD-Cry2-R	TATCGATGCCACCCGGGTGGAAGTTGTGCATAATGAACCGCTTC	
BD-IscA1-F	CTGATCTCAGAGGAGGACCTGCATATGGCTGGACGAGTTTTCAGCTT	IscA1 基因同源重组引物 Primers of <i>IscA1</i> gene homologous recombination
BD-IscA1-R	CGCTGCAGGTCGACGGATCCCCGGGAAGACTGAAAAGCTTTCGCCGACG	
NI-Cry1-dsRNA-F	TAATACGACTCACTATAGGGGTGGGGTTCCACCGCTAACTTA	Cry1 基因沉默引物 Primers of <i>Cry1</i> gene silencing
NI-Cry1-dsRNA-R	TAATACGACTCACTATAGGGCCTCGTAGGCACGCATATTGAA	
NI-IscA1-dsRNA-F	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGCAGCACTGGTTTTGACAC	IscA1 基因沉默引物 Primers of <i>IscA1</i> gene silencing
NI-IscA1-dsRNA-R	TAATACGACTCACTATAGGGGCTTTTGCATCTATTATGACGC	
GFP-dsRNA-F	TAATACGACTCACTATAGGGACGTAAACGGCCACAAGTTC	对照组引物 Primers of control group
GFP-dsRNA-R	TAATACGACTCACTATAGGGTGTCTGCTGGTAGTGGTCG	
NI-Cry1-qPCR-F	ATGTCCGATGAGATGAGTG	Cry1 基因荧光定量引物 Primers of <i>Cry1</i> gene RT-qPCR
NI-Cry1-qPCR-R	TATGAAGATTGGATAGAAGTTGTG	
NI-IscA1-qPCR-F	AGACTCATATAGACGATGTTAA	IscA1 基因荧光定量引物 Primers of <i>IscA1</i> gene RT-qPCR
NI-IscA1-qPCR-R	CCTCCAATGTCCTCTAAC	
NI-Actin-qPCR-F	CCAACCGTGAGAAGATGACC	内参基因引物 Primers of internal reference gene
NI-Actin-qPCR-R	GATGTCACGCACGATTTCAC	

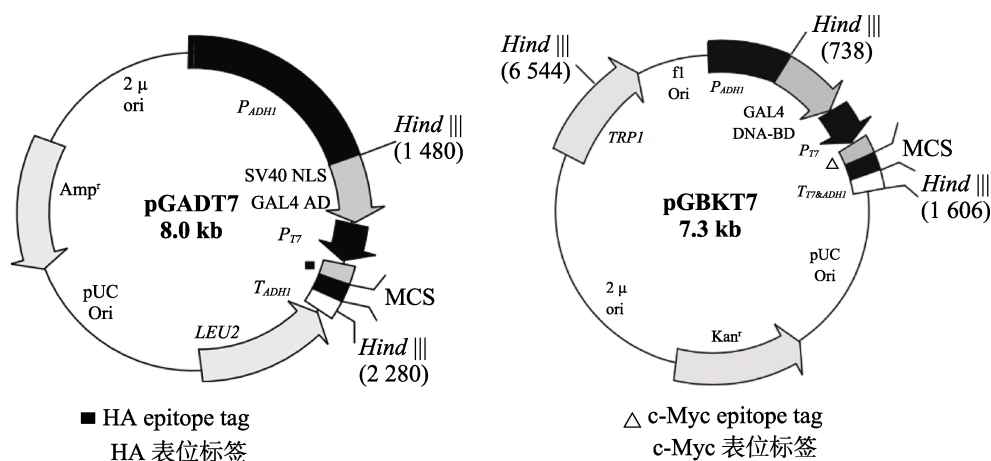


图 1 pGADT7 和 pGBKT7 载体图谱
Fig. 1 Vector map of pGADT7 and pGBKT7

1.4.2 RT-qPCR 沉默效率检测 注射 dsRNA 的褐飞虱, 分别在注射后第 2 天、第 4 天和第 6 天取样检测沉默效率。每个处理随机取样 5 头, 重

复 3 次。对样品进行 RNA 提取, 反转录为 cDNA 后采用 ABI Q6 Real-time PCR system 对基因的表达水平进行检测。内参基因是褐飞虱 *β-Actin*

基因 (GenBank accession no. EU179846)。使用到的引物见表 1。

1.5 基因沉默虫体若虫历期统计

将注射 dsRNA (dsGFP:15 头; ds*Nl-CryI*:17 头; ds*IscA1*:19 头) 后苏醒的 3 龄褐飞虱若虫单独置于直径 4.5 cm、高度 15 cm 的玻璃试管中进行饲养。每根试管中放有 2 棵用海绵包裹的水稻苗供褐飞虱取食, 水稻苗的根部露在海绵外部, 以便吸收营养液, 海绵上部保持干燥, 以避免褐飞虱身体沾水无法正常活动。每根试管均进行编号。每天观察记录褐飞虱和水稻苗的生长情况, 根据水稻苗的情况, 定期统一更换新苗。待若虫羽化成虫后记录日期, 根据日期计算出每头虫子从 3 龄到成虫所经历的若虫期。

1.6 基因沉默虫体产卵量统计

对羽化第 1 天的褐飞虱成虫进行 dsRNA 注射后 (每个基因 20 头雌虫, 40 头雄虫), 按照 1:2 的雌雄比例进行配对, 饲养于与 1.5 中描述相同的玻璃试管中, 每个试管中放置高度为 12 cm 左右的水稻苗供褐飞虱产卵。每天对褐飞虱和水稻苗的情况进行观察, 在第 5 天时, 统一将褐飞虱转移至新的水稻苗上, 转移时保证试管上的编号一一对应。转移完成后将已产卵的水稻苗取出, 在体视镜下通过显微解剖, 统计前 5 d 的产卵量。第 10 天时, 将褐飞虱从产卵苗上取出,

在体视镜下通过显微解剖, 统计 5-10 d 的产卵量。总产卵量是 1-5 d 和 5-10 d 两次产卵量之和。

1.7 数据分析

数据采用 SPSS 20.0 进行统计分析, GraphPad Prism 7.0 进行绘图, 数据以平均数±标准误差表示。基因表达量和若虫历期采用单因素方差分析, 产卵量采用双尾 Student-*t* test 进行分析。P < 0.05 为有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 隐花色素蛋白与铁硫簇蛋白互作

由图 2 的结果可知, 转化了阳性对照的 pGADT7-T+pGBKT7-53 的酵母菌在 SD-Leu-Trp 和 SD-Leu-Trp-His 的平板上均能生长, 表明转化步骤操作正确; 转化了 pGADT7+pGBKT7、AD-Cry1+pGBKT7、AD-Cry2+pGBKT7、pGADT7+BD-IscA1 的酵母菌都能在 SD-Leu-Trp 平板上生长, 且菌落大小一致, 说明上述载体表达的融合蛋白对 Y2HGold 酵母的生长无毒性, 且对酵母的生长未有抑制作用。AD-Cry1+pGBKT7、AD-Cry2+pGBKT7、pGADT7+BD-IscA1 共转化酵母菌在 SD-Leu-Trp-His 平板上不能生长, 表明上述 3 组载体表达的融合蛋白不能自激活 Y2HGold 酵母菌报告基因。共转化了 AD-Cry1+BD-IscA1、AD-Cry2+BD-IscA1 的酵母菌均可以在 SD-Leu-

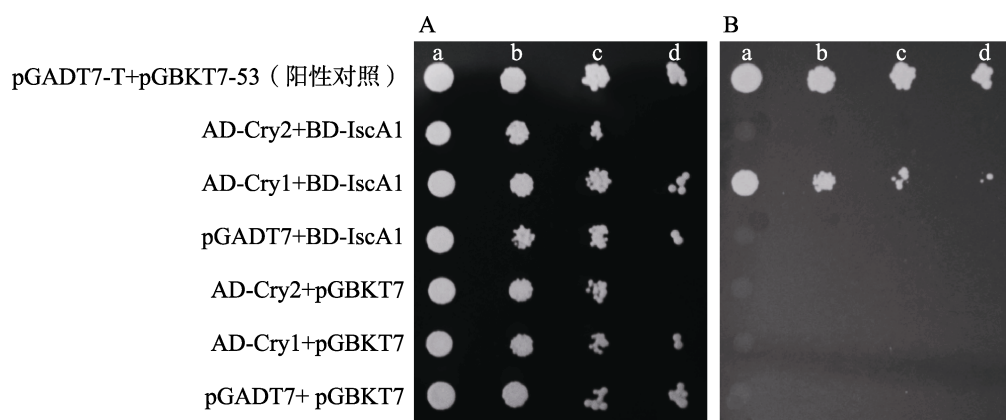


图 2 共转化酵母菌 Y2HGold 在 SD-Leu-Trp 平板 (A) 和 SD-Trp-His 平板 (B) 生长情况
Fig. 2 Growth of co-transformed yeast cells Y2HGold on SD-Leu-Trp (A/C) and SD-Leu-Trp-His (B/D)

a: 原浓度; b: 稀释 10 倍; c: 稀释 100 倍; d: 稀释 1 000 倍。

a: Original concentration; b: Diluted 10 times; c: Diluted 100 times; d: Diluted 1 000 times.

Trp 平板上生长, 但只有共转化了 AD-Cry1+BD-IscA1 的酵母菌能在 SD-Leu-Trp-His 平板上生长, 而 AD-Cry2+BD-IscA1 的酵母菌无法在 SD-Leu-Trp-His 平板上生长, 表明 Cry1 和 IscA1 的融合蛋白激活了 Y2HGold 酵母菌的 His 报告基因, 从而使其能在 SD-Leu-Trp-His 平板上生长; 而 Cry2 和 IscA1 的融合蛋白未能激活 Y2HGold 酵母菌的 His 报告基因, 无法在 SD-Leu-Trp-His 平板上生长。上述结果说明 Cry1 与 IscA1 之间存在相互作用。

2.2 基因沉默效率

Cry1 的沉默效率结果表明, 若虫和成虫注射 dsRNA 后 *Cry1* 基因均能得到有效沉默。若虫注射 ds*Nl-Cry1* 后第 2 天沉默效率为 70%, 第 4 天和第 6 天沉默效率达到 80% (图 3: A); 成虫的沉默效率均达到 80% (图 3: B)。对 *IscA1* 基因的沉默效率检测结果表明, 该基因也能被有效沉默。在若虫和成虫中, *IscA1* 基因的沉默效率均达到 90% (图 3: C, D)。

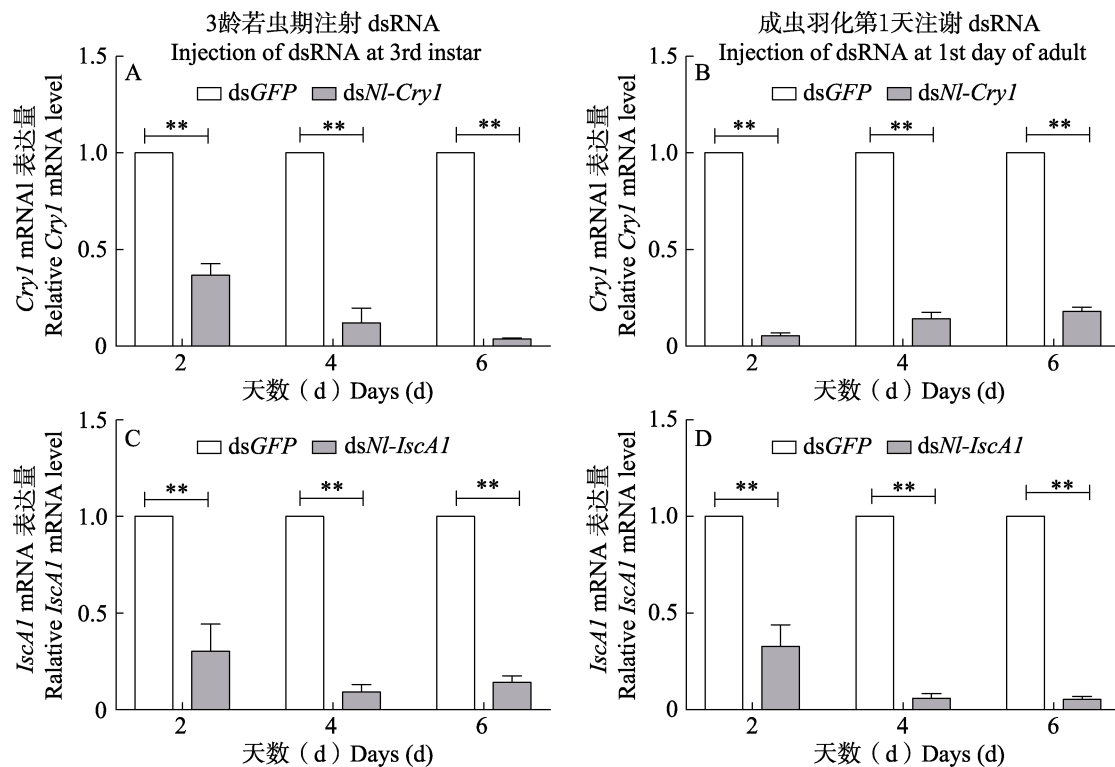


图 3 *Cry1* 基因和 *IscA1* 基因沉默效率

Fig. 3 The RNAi efficiency for *Cry1* and *IscA1*

A. 3 龄若虫期注射 dsRNA 后 *Cry1* mRNA 表达量; B. 成虫羽化第 1 天注射 dsRNA 后 *Cry1* mRNA 表达量; C. 3 龄若虫期注射 dsRNA 后 *IscA1* mRNA 表达量; D. 成虫羽化第 1 天注射 dsRNA 后 *IscA1* mRNA 表达量。

A. The relative *Cry1* mRNA level after injection of dsRNA at 3rd instar; B. The relative *Cry1* mRNA level after injection of dsRNA at 1st day of adult; C. The relative *IscA1* mRNA level after injection of dsRNA at 3rd instar; D. The relative *IscA1* mRNA level after injection of dsRNA at 1st day of adult.

相对表达水平是利用注射 dsGFP 后 *Cry1*/*IscA1* 值计算 ($n=3$)。**表示基因表达量在 $P<0.01$ 水平上差异显著。

The relative expression level was quantified with regard to the *Cry1*/*IscA1* value injected with dsGFP ($n=3$).

** indicates significant difference of gene expression at the 0.01 level.

2.3 基因沉默对褐飞虱若虫期的影响

经单因素方差分析发现, *Cry1* 基因沉默对褐飞虱若虫历期无明显影响; *IscA1* 基因沉默对

褐飞虱若虫历期亦无明显影响 (图 4)。

经双尾 Student's *t*-test 分析发现, *Cry1* 和 *IscA1* 基因的沉默对褐飞虱的产卵量有显著性影

响。与对照组相比,注射 *dsNI-Cry1* 的褐飞虱第 1-5 天、第 6-10 天以及总的产卵量显著性下降;注射 *dsNI-IscA1* 的褐飞虱第 1-5 天的产卵量略有升高,但未有显著性差异,而第 6-10 天以及总的产卵量均明显降低(图 5)。

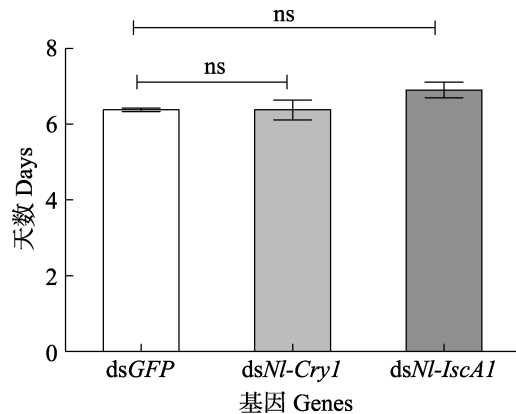


图 4 *Cry1/IscA1* 基因沉默后 3 龄若虫到成虫历期

Fig. 4 Developmental durations of nymph from the third instar to the adult of BPH after *Cry1/IscA1* gene silencing

ns 代表不同组间差异不显著。下图同。

ns indicates no significant difference among the different groups. The same below.

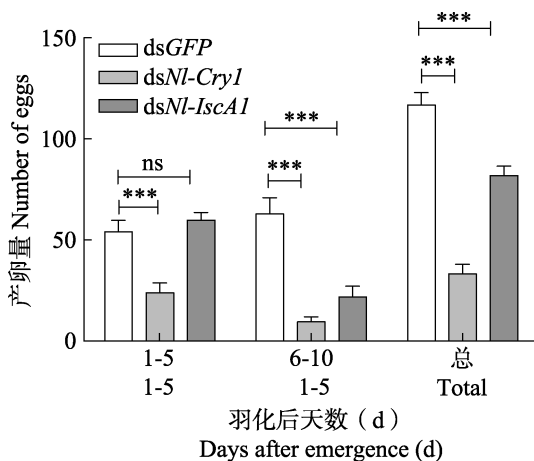


图 5 *Cry1/IscA1* 基因沉默后褐飞虱产卵量

Fig. 5 The number of eggs of BPH after *Cry1/IscA1* silencing

***表示产卵量在 $P < 0.001$ 水平上差异显著。

*** indicates significant difference of number of eggs at the 0.01 level.

3 讨论

磁受体是生物感知地磁场的关键分子,研究

它对于阐明生物磁感受机制具有重要的意义。隐花色素蛋白和铁硫簇蛋白是目前已知的 2 种磁受体蛋白,但是二者之间是否存在相互作用一直缺乏在真核生物中的实验证据。本研究通过酵母双杂交系统,在真核生物体内明确了二者之间互作,同时证实了其在昆虫发育和生殖中的作用。

酵母双杂交系统用于在真核生物中测定蛋白质的结合作用,具有高度敏感性。通过在酵母细胞体内表达蛋白,使得蛋白保持了天然的构象更接近其在生物体内的真实状态;同时,酵母双杂交系统的表达载体使用了强启动子,融合蛋白能够高水平的表达,即使蛋白之间的相互作用不强或者结合比较短暂亦能被检测出(White, 1996; Gietz and Woods, 2002)。在该系统中,只有存在相互作用的蛋白才能激活下游报告基因,从而得以在缺失培养基上生长。本试验中表达 *Cry1+IscA1* 融合蛋白的酵母菌可以在 SD-Leu-Trp-His 培养基上生长,而表达 *Cry2+IscA1* 融合蛋白的酵母菌无法在 SD-Leu-Trp-His 培养基上生长,表明 *Cry1* 与 *IscA1* 存在相互作用,而 *Cry2* 与 *IscA1* 之间无相互作用。试验也对蛋白的自激活进行检测,通过比较转化融合蛋白表达载体 AD-*Cry1*+BD-*IscA1* 和 AD-*Cry2*+BD-*IscA1* 的酵母菌与 pGADT7+pGBKT7、AD-*Cry1*+pGBKT7、AD-*Cry2*+pGBKT7、pGADT7+BD-*IscA1* 的酵母菌在 SD-Leu-Trp-His 平板上的生长情况,发现在 SD-Leu-Trp-His 平板上只有转化了融合蛋白表达载体的菌株可以生长,其余酵母菌均不能生长,排除了蛋白独自表达激活报告基因的情况。已有研究表明 FAD 结构域可能是 *Cry* 与 *IscA1* 蛋白相互作用的一个桥梁(Qin *et al.*, 2015)。不过,前期对于褐飞虱 *Cry1* 和 *Cry2* 的蛋白结构预测显示,在 2 种类型 *Cry* 蛋白中均存在 FAD 结合域(Xu *et al.*, 2015),而本研究发现只有 *Cry1* 与 *IscA1* 之间存在互作,推测 FAD 活性位点在 *Cry2* 中可能存在突变,导致其与 *IscA1* 无法发生相互作用,除此之外也不排除 *Cry1* 与 *IscA1* 之间可能存在其它的作用位点,今后可以在此方面开展相关研究。

生物钟基因对哺乳动物的生殖过程发挥着不可或缺的作用(李瑞文等, 2013)。在哺乳动

物子宫、胎盘和胎膜中都能检测到 *Bmal1/Clock/Per1/Per2/Cry1* 和 *Cry2* 基因 (Ratajczak *et al.*, 2010), 并且 *Per1/Per2* 和 *Bmal1* 基因在输卵管中呈节律性的表达 (Kennaway *et al.*, 2003); 同时 *Clock* 与卵泡的发育相关 (Shimizu *et al.*, 2012), 预示生物钟基因与生殖分娩过程密切相关。本试验中沉默 *Cry1* 基因的褐飞虱产卵量显著性下降, 首次证实了 *Cry1* 基因在昆虫生殖中发挥的作用, 同时也为隐花色素蛋白参与磁场对昆虫生殖调控提供了依据。不过本研究也发现, *Cry1* 基因沉默后褐飞虱的若虫历期并没有发生改变, 因此我们推测磁场对昆虫历期的影响有可能是通过除 *Cry1* 外的其它基因实现的 (Wan *et al.*, 2014)。本试验还发现 *IscA1* 基因沉默后褐飞虱的产卵量也发生显著性的变化, 与对照组相比, 沉默虫体的产卵量显著性下降, 表明 *IscA1* 与褐飞虱的生殖也密切相关。铁硫簇蛋白作为线粒体蛋白, 参与了细胞内的能量代谢, 其缺失可导致酵母菌的呼吸代谢过程受损及菌体生长的延迟 (Kaut *et al.*, 2000)。此外, 生物的生理节律循环需要依靠机体的关键代谢途径和节律机制的相互协调 (Wijnen and Young, 2006)。研究表明铁硫簇蛋白可以通过调节生物体内的铁代谢平衡, 影响生物钟蛋白对神经的调节, 进而影响机体的生物节律。Kosmidis 等 (2011) 在果蝇神经胶质细胞中过表达铁蛋白亚基, 使结合铁的铁蛋白积累, 导致果蝇昼夜节律活动丧失。Mandilaras 和 Missirlis (2012) 将铁硫簇蛋白干扰后发现, 果蝇的昼夜节律发生混乱。本试验中铁硫簇蛋白的沉默可能也引起了褐飞虱节律的改变, 从而影响褐飞虱生殖。该基因是否参与到了磁场对褐飞虱生殖的调控可以在接下来的工作中进一步探究。

此外, 通过酵母双杂交已经证实 *Cry1* 和 *IscA1* 蛋白之间存在相互作用, 表明二者在褐飞虱中存在于同一信号通路中; 而基因沉默的结果显示, 两基因的沉默均可引起褐飞虱产卵量下降, 但 *IscA1* 基因的影响滞后, 在 6-10 d 时才出现, 推测在信号通路中 *IscA1* 基因可能位于通路上游, 借助于通路下游的 *Cry1* 基因介导了褐飞虱的生殖调控。此通路是否涉及其它基因的参与

还需要进一步的研究。

综上所述, 本研究证实了褐飞虱隐花色素蛋白 *Cry1* 与铁硫簇蛋白 *IscA1* 之间存在相互作用, 表明昆虫体内存在的两类隐花色素功能有所不同; 同时, 亦为生物体内 *Cry* 蛋白/*IscA1* 蛋白形成磁感受复合体发挥协同作用提供了在真核生物中的实验证据。同时研究还发现, *Cry1* 在褐飞虱的生殖过程中发挥重要作用, 为 *Cry1* 介导的磁场对褐飞虱生殖调控提供了依据。*IscA1* 蛋白在褐飞虱生殖中的功能的发现也为磁场对褐飞虱生殖调控机制提供了新的方向。

参考文献 (References)

- Boles LC, Lohmann KJ, 2003. True navigation and magnetic maps in spiny lobsters. *Nature*, 421(6918): 60–63.
- Brewer HB, 1979. Some preliminary studies on the effects of a static magnetic field on the life cycle of *Lebistes reticulatus* (guppy). *Biophysical Journal*, 28(2): 305–314.
- Camlitepe Y, Stradling DJ, 1995. Wood ants orient to magnetic fields. *Proceedings Biological Sciences*, 261(1306): 37–41.
- Chen W, Wang XM, Sun HB, 2014. Cryptochrome: A light-dependent magnetoreceptor. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 30(10): 973–978. [陈薇, 王晓明, 孙红宾, 2014. 隐花色素——生物磁感应蛋白. 中国生物化学与分子生物学报, 30(10): 973–978.]
- Dennis TE, Rayner MJ, Walker MM, 2007. Evidence that pigeons orient to geomagnetic intensity during homing. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*, 274(1614): 1153–1158.
- Denegre JM, Jr VJ, Lin K, Jordan WB, Mowry KL, 1998. Cleavage planes in frog eggs are altered by strong magnetic fields. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(25): 14729–14732.
- Gegear RJ, Casselman A, Waddell S, Reppert SM, 2008. Cryptochrome mediates light-dependent magnetosensitivity in *Drosophila*. *Nature*, 454(7207): 1014–1018.
- Gegear RJ, Foley LE, Casselman A, 2010. Animal cryptochromes mediate magnetoreception by an unconventional photochemical mechanism. *Nature*, 463(7282): 804–807.
- Gietz RD, Woods RA, 2002. Screening for protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *Methods in Molecular Biology*, 185(6): 471–486.
- Griffin EA, Staknis D, Weitz CJ, 1999. Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock. *Science*, 286(5440): 768–771.

- Guerra PA, Gegear RJ, Peppert SM, 2014. A magnetic compass aids monarch butterfly migration. *Nature Communications*, 5(1): 4164.
- Jensen LT, Culotta VC, 2000. Role of *saccharomyces cerevisiae* ISCA1 and ISCA2 in iron homeostasis. *Molecular and Cellular Biology*, 20(11): 3918–3927.
- Kaut A, Lange H, Diekert K, Kispal G, Lill R, 2000. Isa1p is a component of the mitochondrial machinery for maturation of cellular iron-sulfur proteins and requires conserved cysteine residues for function. *Journal of Biological Chemistry*, 275(21): 15955–15961.
- Kennaway DJ, Varcoe TJ, Mau VJ, 2003. Rhythmic expression of clock and clock-controlled genes in the rat oviduct. *Molecular Human Reproduction*, 9(9): 503–507.
- Kirschvink JL, Walker MM, Diebel CE, 2001. Magnetite-based magnetoreception. *Current Opinion in Neurobiology*, 11(4): 462–467.
- Kosmidis S, Botella JA, Mandilaras K, Schneuwly S, Skoulakis EM, Rouault TA, Missirlis F, 2011. Ferritin overexpression in *drosophila* glia leads to iron deposition in the optic lobes and late-onset behavioral defects. *Neurobiology of Disease*, 43(1): 213–219.
- Li RW, Cheng ST, Wang ZR, 2013. Clock gene and mammal reproduction. *Journal of Biology*, 30(4): 67–70. [李瑞文, 成姝婷, 王正荣, 2013. 生物钟基因与哺乳动物生殖. 生物学杂志, 30(4): 67–70.]
- Lohmann KJ, Lohmann CM, Ehrhart LM, Bagley DA, Swing T, 2004. Animal behaviour: Geomagnetic map used in sea-turtle navigation. *Nature*, 428(6986): 909–910.
- Mandilaras K, Missirlis F, 2012. Genes for iron metabolism influence circadian rhythms in *drosophila melanogaster*. *Metallomics*, 4(9): 928–936.
- Meyer J, 2008. Iron-sulfur protein folds, iron-sulfur chemistry, and evolution. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 13(2): 157–170.
- Prolić ZM, Nenadovic V, 1995. The Influence of a permanent magnetic-field on the process of adult emergence in *Tenebrio molitor*. *Journal of Insect Physiology*, 41(12): 1113–1118.
- Qin SY, Yin H, Yang CL, Dou YF, Liu ZM, Zhang P, Yu H, Huang YL, Feng J, Hao JF, Hao J, Deng LZ, Yan XY, Dong XL, Zhao ZX, Jiang TJ, Wang HW, Luo SJ, Xie C, 2015. A magnetic protein biocompass. *Nature Materials*, 15(2): 217–226.
- Ratajczak CK, Herzog ED, Muglia LJ, 2010. Clock gene expression in gravid uterus and extra-embryonic tissues during late gestation in the mouse. *Reproduction Fertility & Development*, 22(5): 743–750.
- Raus S, Todorovic D, Prolic Z, 2009. Viability of old house borer (*Hylotrupes bajulus*) larvae exposed to a constant magnetic field of 98 mT under laboratory conditions. *Archives of Biological Sciences*, 61(1): 129–134.
- Ritz T, Yoshii T, Helfrich-Foerster C, Ahmad M, 2010. Cryptochrome: A photoreceptor with the properties of a magnetoreceptor? *Communicative & Integrative Biology*, 3(1): 24–27.
- Shimizu T, Hirai Y, Murayama C, Miyamoto A, 2012. Expressions of the circadian genes *Per2*, *Bmal1*, *Clock* and *Cry1* during the different stages of follicular development and their regulation by FSH in bovine granulosa cells from small follicles. *Livestock Science*, 145(1/3): 292–297.
- Strand JA, Abernethy CS, Skalski JR, Genoway RG, 1983. Effects of magnetic field exposure on fertilization success in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Bioelectromagnetics*, 4(4): 295–301.
- Valles JM, 2002. Model of magnetic field-induced mitotic apparatus reorientation in frog eggs. *Biophysical Journal*, 82(3): 1260–1265.
- Veronika L, Hayden ME, Marco B, Gerhard G, 2014. Does the earth's magnetic field serve as a reference for alignment of the honeybee waggle dance? *PLoS ONE*, 9(12): e115665.
- Wan GJ, Jiang SL, Zhao ZC, Zhao ZC, Xu JJ, Tao XR, Sword GA, Gao YB, Pan WD, Chen FJ, 2014. Bio-effects of near-zero magnetic fields on the growth, development and fecundity of small brown planthopper, *Laodelphax striatellus* and brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Journal of Insect Physiology*, 68(3): 7–15.
- White MA, 1996. The yeast two-hybrid system: Forward and reverse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of American*, 93(19): 10001–10003.
- Wijnen H, Young MW, 2006. Interplay of circadian clocks and metabolic rhythms. *Annual Review of Genetics*, 40(1): 409–448.
- Wiltshko W, Wiltshko R, 2005. Magnetic orientation and magnetoreception in birds and other animals. *Journal of Comparative Physiology*, 191(8): 675–693.
- Xiao DW, Hu WH, Cai YF, Zhao N, 2020. Magnetic noise enabled biocompass. *Physical Review Letters*, doi: 124. 10.1103/PhysRevLett.124.128101.
- Xu JJ, Pan W, Zhang YC, Li Y, Wan GJ, Chen FJ, Sword GA, Pan WD, 2017. Behavioral evidence for a magnetic sense in the oriental armyworm, *Mythimna separata*. *Biology Open*, 6(3): 340–347.
- Xu JJ, Wan GJ, Hu DB, He J, Chen FJ, Wang XH, Hua HX, Pan WD, 2015. Molecular characterization, tissue and developmental expression profiles of cryptochrome genes in wing dimorphic brown planthoppers, *Nilaparvata lugens*. *Insect Science*, 23(6): 805–818.
- Zhu H, Yuan Q, Briscoe AD, Froy O, Casselman A, Reppert S M, 2005. The two CRYs of the butterfly. *Current Biology*, 15(23): 953–954.