

# 烟粉虱 MED 隐种铁蛋白基因克隆、不同发育阶段和吡虫啉胁迫下的表达及原核表达

白润娥<sup>1</sup>, 王雄雅<sup>1</sup>, 李静静<sup>1</sup>, 刘晓华<sup>2</sup>, 熊大斌<sup>3</sup>, 李冬兵<sup>3</sup>,  
曹玲珑<sup>3</sup>, 闫凤鸣<sup>1,\*</sup>

(1. 河南农业大学植物保护学院, 郑州 450002; 2. 河南农业大学园艺学院, 郑州 450002; 3. 国家小麦工程技术研究中心, 郑州 450002)

**摘要:** 昆虫铁蛋白在铁转运和贮藏、抗氧化胁迫及病菌侵染等诱导的免疫反应等过程中发挥重要作用。为探索烟粉虱 *Bemisia tabaci* 铁蛋白功能, 本研究以烟粉虱 MED 隐种 *Bemisia tabaci* MED 为研究对象, 采用反转录 PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR) 克隆铁蛋白基因, 采用荧光定量 PCR 检测了该基因在烟粉虱不同发育时期及在吡虫啉胁迫条件下成虫体内 mRNA 的表达量, 并利用原核表达载体 pMAL-*BtFer1* 对该蛋白进行体外表达和纯化。克隆获得烟粉虱铁蛋白基因的 cDNA 序列, 并命名为 *BtFer1* (GenBank 登录号: JX865415)。该基因 cDNA 长度为 1 043 bp, 编码 224 个氨基酸残基, 序列中含有铁蛋白典型的铁结合功能域, 以及由 19 个氨基酸残基构成的信号肽。荧光定量分析显示, *BtFer1* 在不同发育时期均有表达, 以成虫和 3 龄若虫期的表达量较高, 并且该基因的表达受吡虫啉胁迫处理的强烈诱导。体外表达、纯化和电泳检测显示, 在 0.3 mmol/L 浓度 IPTG 诱导下融合蛋白在上清和沉淀中均能表达, 电泳检测到一条约 68 kD 的外源蛋白, 与预测融合蛋白分子量大小相符。本研究明确了该铁蛋白基因在烟粉虱 MED 隐种不同发育阶段及在低浓度吡虫啉胁迫下成虫体内的表达水平, 为深入研究其功能提供理论依据。

**关键词:** 烟粉虱 MED 隐种; 铁蛋白; 基因克隆; 表达分析; 原核表达; 吡虫啉

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2013)07-0738-09

## Cloning, expression profiles in different developmental stages and under imidacloprid stress and prokaryotic expression of a ferritin gene in *Bemisia tabaci* MED (Hemiptera: Aleyrodidae)

BAI Run-E<sup>1</sup>, WANG Xiong-Ya<sup>1</sup>, LI Jing-Jing<sup>1</sup>, LIU Xiao-Hua<sup>2</sup>, XIONG Da-Bin<sup>3</sup>, LI Dong-Bing<sup>3</sup>, CAO Ling-Long<sup>3</sup>, YAN Feng-Ming<sup>1,\*</sup> (1. College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. College of Horticulture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 3. National Engineering Research Center for Wheat, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** Insect ferritins play key roles in iron transport, response to oxidative stress and the immune response to pathogen infection and others. In this study, cDNA identification and expression of recombinant ferritin from *Bemisia tabaci* MED were done in order to elucidate the function of ferritin in this insect. The cDNA was amplified by RT-PCR and named *BtFer1* (GenBank accession number: JX865415). The partial sequence of *BtFer1* is 1 043 bp in length, encoding 224 amino acids. Sequence analysis indicated that the protein has the characteristic features of typical ferritin iron-binding region signature and a 19-residue signal peptide. q-PCR assay displayed that *BtFer1* was expressed in various developmental stages of *B. tabaci* and the expression levels in *B. tabaci* at the adult and 3rd instar nymphal stages were much higher than those at other stages. The expression profiling also showed that *BtFer1* was up-regulated in adults treated with 1 mg/L imidacloprid. Furthermore, the *BtFer1* gene was constructed into the expression vector pMAL-c2x for protein expression in prokaryotic cells and purified by amylose affinity. The results showed that the fused MBP-*BtFer1* proteins could be effectively induced with 0.3 mmol/L IPTG, and the fusion protein was about 68 kDa, which was consistent with the

基金项目: 国家自然科学基金项目(30571219); 国家转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08012-007B)

作者简介: 白润娥, 女, 1968 年 11 月生, 山西平遥人, 讲师, 研究方向为粉虱分类及分子生物学, E-mail: yxbre@163.com

\* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: fmyan@henau.edu.cn

收稿日期 Received: 2013-03-01; 接受日期 Accepted: 2013-06-13

predicted result. This study makes clear the expression levels of *BtFer1* in various developmental stages and in adults of *B. tabaci* MED treated with lower concentration of imidacloprid, and provides a basis for further functional study of this gene.

**Key words:** *Bemisia tabaci* MED; ferritin; gene cloning; expression profiling; prokaryotic expression; imidacloprid

铁作为辅酶广泛参与细胞内多种生理生化过程, 例如核酸合成、氧代谢、三羧酸循环、类固醇和氨基酸合成 (Andrews, 2008)。在生物体内, 铁元素主要以  $\text{Fe}^{3+}$  和  $\text{Fe}^{2+}$  两种离子形式存在, 其中  $\text{Fe}^{2+}$  毒性巨大, 能够导致机体内生物大分子的氧化损伤和炎症产生, 因此生物体通过表达特定蛋白以结合、运输和封存该类铁离子, 铁蛋白就是其中最重要的产物 (Arosio *et al.*, 2009)。在哺乳动物体内, 胞外铁元素的运转由转铁蛋白负责, 胞内铁元素的贮存由铁蛋白执行 (Andrews, 2008)。根据存在部位的差异, 铁蛋白可分为细胞质、血清和线粒体铁蛋白 3 种类型 (Arosio *et al.*, 2009)。细胞质铁蛋白发挥储存和调节铁含量的功能, 血清铁蛋白作为分泌型蛋白主要参与铁转移和铁供体激活功能 (Fisher *et al.*, 2007; Leimberg *et al.*, 2008), 线粒体铁蛋白发挥抗氧化剂和对抗铁离子对细胞产生毒性的保护剂功能 (Cazzola *et al.*, 2003; Levi and Arosio, 2004)。与哺乳动物不同, 昆虫体内铁转运蛋白和铁蛋白都具有铁转运活性 (Strickler-Dinglasan *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009), 多数铁蛋白属于分泌型蛋白, 存在于内质网和淋巴的铁蛋白需要经过糖基化修饰以及在信号肽序列引导下才能进入分泌途径 (Kim *et al.*, 2004; Qiu *et al.*, 2005)。除参与铁代谢之外, 蛋白质组学研究显示铁蛋白的表达受多种病原物诱导, 表明昆虫铁蛋白在免疫应答反应中扮演重要角色 (Paskewitz and Shi, 2005; Altincicek *et al.*, 2008)。

有关昆虫铁蛋白的研究始于 20 世纪 60 年代, 迄今已分离和鉴定了多种昆虫的铁蛋白及其编码基因 (Dunkov *et al.*, 1995; Pham *et al.*, 1996; Charlesworth *et al.*, 1997; Nichol and Locke, 1999), 对铁蛋白的结构和功能、分泌途径和表达调控进行了系统研究, 获得了系列突破性进展 (Andrews, 2008; Arosio *et al.*, 2009)。然而, 有关烟粉虱铁蛋白功能的研究还未见报道。烟粉虱 *Bemisia tabaci* 属于典型的入侵物种, 寄主植物多达 700 种以上 (Greathead, 1986), 是最重要的农业害虫之一。最新研究表明, 烟粉虱为复合种, 至少有 24 个隐种

(de Barro *et al.*, 2011)。传统上我国入侵烟粉虱以 MEAM1 隐种 (以往称“B 型烟粉虱”) 为主, 近年来 MED 隐种 (以往称“Q 型烟粉虱”) 逐渐演变为优势种群 (Luo *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010), 主要原因就在于 MED 隐种对包括吡虫啉在内的多种杀虫剂均能迅速产生抗药性 (Cahill *et al.*, 1996; Ahmad *et al.*, 2002)。烟粉虱抗药性机理研究表明, 细胞色素 P450 基因 *CYP6CM1* 与该昆虫对吡虫啉的抗性密切相关 (Karunker *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2011), 但其抗药性是否还涉及其他基因还不清楚。本研究借助生物信息学技术和 RT-PCR 方法从烟粉虱 MED 隐种中克隆获得一个铁蛋白基因 cDNA 序列, 并对该基因编码蛋白的结构特点, 以及在不同发育时期和吡虫啉胁迫条件下成虫体内 mRNA 的表达水平进行检测; 在此基础上, 构建了麦芽糖结合蛋白 (MBP) 融合表达载体, 利用宿主菌表达融合型烟粉虱铁蛋白, 以及利用麦芽糖吸附纯化蛋白, 为深入研究烟粉虱铁蛋白的功能提供有益探索, 并期望为阐明烟粉虱 MED 隐种的成灾机理和发展新的烟粉虱控制措施提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 供试烟粉虱:** 烟粉虱 MED 隐种为河南农业大学植物保护学院化学生态学实验室饲养 (温度为 28℃, 湿度为 70%~90%, 光照 16L:8D), 寄主植物为烟草 *Nicotiana tabacum*。

**1.1.2 主要试剂及仪器:** DH5 $\alpha$  和 BL21 等菌种为本实验室保存; pMAL-c2x 和 pGM-T 载体由 TIANGENE (北京) 公司提供; 总 RNA 提取试剂盒 Trizol、胶回收试剂盒、RNA 酶抑制剂、M-MLV、pfu-Taq 酶和 LA-Taq DNA 酶, 以及各种限制性内切酶、SYBR Green II 荧光定量试剂盒购自 TaKaRa (大连) 公司; 所用引物自行设计, 并由 Invitrogen (北京) 公司合成。Real-Time System 购自 Bio-Rad 公司。

### 1.2 烟粉虱 MED 隐种铁蛋白基因的 cDNA 克隆

**1.2.1 总 RNA 提取和 cDNA 第一链合成:** 随机取

龄期一致的健康烟粉虱成虫,液氮速冻后采用 Trizol 试剂盒提取总 RNA,经琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测后,取 2  $\mu\text{g}$  总 RNA 采用 M-MLV 反转录酶合成 cDNA 第一链, RNase 消化 cDNA 产物,具体操作参照反转录试剂盒。

**1.2.2 烟粉虱 *Fer1* 基因引物设计和 PCR 扩增:** 根据大蜡螟 *Galleria mellonella* 铁蛋白 (GenBank 登录号: AF329683) 的氨基酸序列,搜索 GenBank 的 EST 数据库,拼接获得一个包含完整开放读码框 (ORF) 的烟粉虱铁蛋白基因 cDNA 序列,利用 Primer 5.0 设计 PCR 扩增引物 BtPfl/BtPr1 (表 1)。

**1.2.3 PCR 扩增反应体系及程序:** 以 cDNA 第一链为模板,每个反应体系 20  $\mu\text{L}$ , 包含 2  $\mu\text{L}$  模版、2  $\mu\text{L}$  Buffer, 2  $\mu\text{L}$  dNTPs, 上下游引物各 1  $\mu\text{L}$ , 0.2  $\mu\text{L}$  pfu-Taq 酶; 扩增程序为 94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  2.0 min, 32 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。

**1.2.4 PCR 产物回收、克隆和测序:** PCR 扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶检测后,采用胶回收试剂盒回收目的条带并连接到 pGM-T 载体,连接产物转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 在 X-gal/IPTG 琼脂糖平板上挑选阳性白色克隆,由大连 TaKaRa 公司完成序列测定。

**1.2.5 序列分析:** 利用 DNASTAR 进行序列组装、读码框分析,利用 Clustal  $\times$  1.83 和 Boxshade 软件包对包括烟粉虱 *Fer1* 在内的铁蛋白氨基酸进行序列联配和聚类分析。

### 1.3 烟粉虱铁蛋白基因的 mRNA 表达谱分析

**1.3.1 样品处理及取样:** 显微镜检处于卵, 1, 2, 3 和 4 龄 (伪蛹) 若虫和成虫等不同发育期的烟粉虱,各虫期每样品取 100 个 (头), 3 次重复,立即

液氮速冻,用于 RNA 提取。

**1.3.2 吡虫啉药物处理及取样:** 选取发育一致的健康烟粉虱成虫,接种于温室内养虫笼 (170 cm  $\times$  170 cm  $\times$  90 cm), 每笼放置 1 株 4~5 叶期的烟草幼苗,待适应生长 1 d 后,喷施浓度为 1 mg/L 的吡虫啉,并于喷施 0, 10, 30, 60, 120, 240 和 480 min 后取样,各处理每样品取样 50 头, 3 次重复,立即液氮速冻,用于 RNA 提取。

**1.3.3 定量引物设计:** 根据烟粉虱 *Fer1* 的 cDNA 序列,采用 Primer 5.0 设计引物 BtPf2/BtPr2, 以 *actin* 作为内部参照 (BtAfl/BtAr1), 引物序列见表 1。

**1.3.4 荧光定量 PCR 反应:** 反应体系为 20  $\mu\text{L}$ , 包含 2  $\mu\text{L}$  模版、上下游引物各 2  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$  SYBR Green II; PCR 扩增程序: 95 $^{\circ}\text{C}$  预变性 15 min; 94 $^{\circ}\text{C}$  10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$  31 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 35 个循环。3 次重复。采用  $2^{-\Delta\Delta\text{C}_T}$  方法分析目标基因的相对表达量及其标准差 (Livak and Schmittgen, 2001)。

### 1.4 烟粉虱铁蛋白基因的原核表达

**1.4.1 原核表达载体构建:** 根据烟粉虱 *Fer1* 基因 cDNA 序列设计分别含有 *EcoR* 酶和 *Sal* I 酶切位点的上下游引物 BtPf3/BtPr3 (表 1), 以测序证实含有烟粉虱 *Fer1* 的阳性质粒为模版, 扩增目的片段, 除退火温度设定为 55 $^{\circ}\text{C}$  外, PCR 扩增体系及扩增程序与上述克隆程序相同。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳、回收后装入 pGEM-T 载体, 获得重组载体 pGEM-*BtFer1*, 重组载体经测序验证其正确性。用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切载体 pGEM-*BtFer1*, 回收目的片段, 插入经相同双酶切获得的线性化 pMAL-c2x 载体, 转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 重组质粒经酶切鉴定和测序证实, 将重组表达载体 pMALc2x-*BtFer1* 转化至表达菌株 BL21。

表 1 本实验所用引物

Table 1 Primers for the experiment

引物用途 Use of primers	引物名称 Primer name	引物序列 (5' - 3') Primer sequence
cDNA 克隆 cDNA cloning	BtPfl	GGCGAAACGAGCAAATACATG
	BtPr1	ACGGAAAAATGTTCAACTTTATTACAAAG
实时荧光定量 PCR	BtPf2	AATACATCGGCAAACGTGGAG
	BtPr2	CAACCTCTGGCTCGTGAAG
qRT-PCR	BtAfl	GGGTCTAATGGTCCGCTATGGCTC
	BtAr1	GGCTTCGGTCAGGAGGATGG
原核表达载体构建 Prokaryotic expression vector construction	BtPr3	GAATTCCGATGCAAAATTGAGCCTTCT
	BtPf3	GTCGACACCAAGTGACTTCTGAAGATGC

**1.4.2 MBP 融合铁蛋白的表达和 PAGE 分析:** 将阳性重组克隆分别置于 5 mL 含 100 mg/L 氨苄青霉素的液体 LB 培养基中, 37°C 培养过夜, 取 50  $\mu$ L 菌液接种于 50 mL 含 100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基, 培养条件为 37°C, 250 r/min, 待菌液 OD<sub>600</sub> 值达到 0.5 时添加 IPTG 至终浓度为 0.3 mmol/L 诱导, 分别于诱导 0, 0.5, 1 和 3 h 时取样。提取诱导菌体总蛋白, 15% SDS-PAGE 蛋白质电泳检测表达效果之后, 利用 Amylose 亲和柱纯化融合蛋白, 具体程序参见试剂盒操作程序。

### 1.5 数据统计与分析

将荧光定量 PCR 测出的烟粉虱 *Fer1* 基因相对表达量数据进行方差分析与多重比较分析, 分析烟粉虱 *Fer1* 基因在不同发育时期相对表达量差异以及在不同吡虫啉处理时间段相对表达量差异。采用统计软件 SPSS 19.0 进行以上统计分析, 其中多重比较分析时选用 Duncan 氏新复极差检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 烟粉虱 MED 隐种烟粉虱 *Fer1* 基因 cDNA 克隆及序列分析

根据大蜡螟铁蛋白的氨基酸序列, 借助生物信息学和 GenBank 数据库, 采用软件对高度同源的烟粉虱 EST 序列进行拼接, 获得 1 个含有完整编码框的烟粉虱铁蛋白基因的 cDNA 序列。根据拼接序列设计引物, 其中正向引物产生于序列 EE603117, 反向引物产生于序列 EE601026, 采用 RT-PCR 扩增获得一个与预期片段大小相符的条带(图 1), 克隆、测序证实所得序列为目的基因, 命名为 *BtFer1*。序列分析显示 *BtFer1* 全长 1 043 bp, 5'非翻译区 117 bp, 3'非翻译区 251 bp, 包含 1 个典型的加尾信号 AATAAA(图 2), 开放阅读框编码 224 个氨基酸, 分子量约为 25.26 kD。此序列已提交到 GenBank, 登录号 JX865415。利用生物信息学软件 (<http://www.expasy.org/cgi-bin/prosite/>) 对推导的氨基酸序列分析结果显示, *BtFer1* 含有铁蛋白家族的保守功能域(Y<sup>44</sup> ~ M<sup>202</sup>), 表明该蛋白属于铁蛋白家族。信号肽预测(Signal P4.0)显示, *BtFer1* 含有一个由 19 个氨基酸残基构成的信号肽(M<sup>1</sup> ~ A<sup>19</sup>)。此外, 该蛋白还存在 1 个蛋白激酶 C 磷酸化位点(第 123 ~ 125 位), 1 个酰胺化位点(第 107 ~ 110 位), 1 个 cAMP 和 cGMP 依赖的蛋白激酶磷酸化位点(第 90 ~ 93 位), 2 个 N-豆蔻酰化位点(第 12 ~ 17 和 34 ~

39 位), 以及 4 个酪蛋白激酶磷酸化位点(第 33 ~ 36, 95 ~ 98, 148 ~ 151 和 174 ~ 177 位), 表明在 *BtFer1* 的生物合成过程中需要多种翻译后加工修饰作用才能成为具有天然功能的成熟肽。

多序列比对分析显示(图 3), *BtFer1* 与其他已知昆虫铁蛋白相似性较低, 氨基酸序列一致性介于 25.8%~48.7% 之间, 并与烟草天蛾铁蛋白序列一致性最高(48.7%), 与埃及伊蚊铁蛋白序列一致性最低(25.8%), 表明 *BtFer1* 基因在物种间的差异较大。

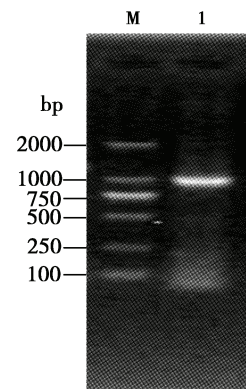


图 1 烟粉虱 MED 隐种 *BtFer1* 基因 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of *BtFer1* from *Bemisia tabaci* MED. M: DNA 分子量标准物 DNA marker; 1: cDNA 扩增片段 cDNA fragment amplified.

### 2.2 烟粉虱 MED 隐种 *BtFer1* 基因表达的发育特性

*BtFer1* 基因的转录表达与发育阶段密切相关。荧光定量 PCR 分析显示(图 4), 在烟粉虱各发育阶段该基因均能表达, 但是表达量存在差异。例如, 在 1, 2 和 3 龄若虫, 伪蛹和成虫期体内的相对表达量分别为卵期的 87.24%, 31.91%, 172.70%, 41.39% 和 626.39%, 表明 *BtFer1* 的转录表达与发育时期密切相关。

### 2.3 烟粉虱 MED 隐种 *BtFer1* 的表达受吡虫啉胁迫诱导

铁蛋白的重要功能之一是螯合生物体在氧化胁迫条件下产生的 Fe<sup>2+</sup>, 以降低/缓解其危害。从图 5 可知, 在喷施 1 mg/L 吡虫啉胁迫下烟粉虱成虫体内 *BtFer1* 的表达量在经过短暂降低后迅速上升, 例如, 胁迫 30 min 时 *BtFer1* 的表达量已达到对照的 1.47 倍, 胁迫 60, 120 和 240 min 时的表达量分别为对照的 1.46, 2.22 和 3.17 倍, 并达到峰值。此后, 该基因的表达量虽略有下降, 但依然维持在较高水平, 表明在吡虫啉胁迫下烟粉虱需要大量表达 *BtFer1*, 缓解该胁迫对虫体的伤害。

```

1      GGCAGAAACGAGCAAATACATGATTTCTGTTCCGTTTCACACTGAATTGATAAGCTGAATTTCCCTCCGAGGCGAGACTACAGTCTT
91     CAGGATTTTCATCTCATTTCGTCCAATCATGGATGCAAAATGAGCCTTCTTCTCTGCTGGGTGCTGCTGCGGCTACGCGTGAATTT
1      M D A K L S L L L L L L G A V A A A S A E F
181    TGCTACAGCGATGTCGTCGGAGCTTGACGTCACAGGCTCAGAATTGGCCAAGTGAATGCCAAGTACGGAGCTGCCACGAAGTAATG
22     C Y S D V V G A C S P T G S E L A N C N A K Y G A A H E V M
271    AAAGATTTACAGAGCTATGTCAATACACACATAACCCGGAACGGAATATCTTTGATGTCACACTTCAACAACACGGAAGAAAC
52     K D L Q S Y V N T H I T R N W Q Y L L M S T Y F N N Y E K N
361    CGTGCCTGGTTCTCCAACTTACAAGAACTGTCGACACCCGATGGGAGGACCCATTGACCTCATCAATACATCGCAACACGTTGGA
82     R A G F S K L Y K K L S D T A W E D A I D L I K Y I G K R G
451    GGTAAGATGGACTTCGGTTTCAGGAAGGAAGACACTTACCGGCTAATGTTGATACTTATGAAATGCATGAAGTGGGAAGTCTGCAAAG
112    G K M D F G F R K E D T Y R A N V D T Y E M H E L G S L A K
541    GCTTTGGACATCCAAAAGTCTAGCTGAAGAATCACACCACTTACCGGAGAAGCCATGCGCAGGAAGCAAGACTTCCACGACCCAGAG
142    A L D I Q K S L A E E S H H I H G E A M R R K Q D F H D P E
631    GTTGGTTCTTTCATTGAGAACAATTCGTTCCACACATGCTGATGCCGACGTAATGGCCGGACACTCAACGACTTGAGGAAATTTG
172    V G S F I E N K F V H Q H A D A V R E L A G H S N D L R K L
721    ATGAGCAACACAGCCGATCAGAGCCTTGCCCTTACATCTTGGACAGCATCTTCAGAAGTCACTTGGTTAATTCGCTACTCACTCTCTC
202    M S N T A D Q S L A L Y I F D Q H L Q K S L G *
811    TCCTCGTAAAAATAAAATCATCACTGTTAATGACTCCTCAATATAAAGAAAAAATCAAACATGATCAAACTAAAAGGAGGGCATT
901    CCTAAGACTTTACCTTAATCGTTTATATTTTGTAAAGATAGTTTTAGTGCACTTTTTTAAATACCGTCAATAATATTAGTAATAT
991    TAAGTTTCAGTATTTTAAATGCTTGAATAAAGTTGAACATTTTTTCCTG

```

图2 烟粉虱 MED 隐种铁蛋白 *BtFer1* cDNA 序列推导的氨基酸序列

Fig. 2 The nucleotide and putative amino acid sequences of *BtFer1* from *Bemisia tabaci* MED

单下划线示信号肽序列; 双下划线示铁蛋白家族的保守功能域; 阴影显示多聚(A)尾。Single underlined amino acid sequences show the putative signal sequence. Double underlined amino acid sequences show the putative ferritin-like diiron domain. A putative poly (A+) signal is highlighted in shade.

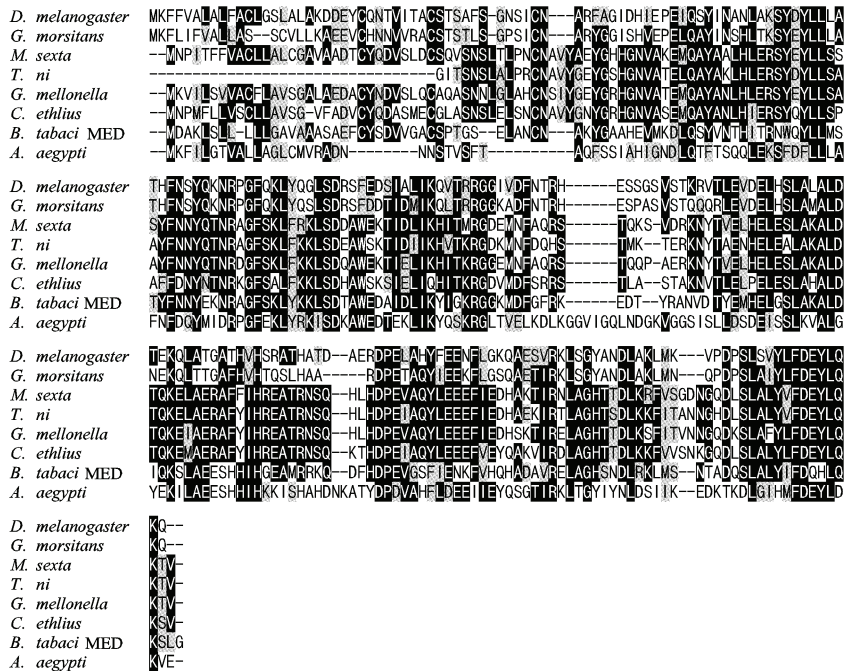


图3 烟粉虱 MED 隐种 *BtFer1* 及其同源基因推导的氨基酸序列的多序列比对结果

Fig. 3 Multiple alignment of the deduced amino acid sequences of *BtFer1* from *Bemisia tabaci* MED and its homologues from other insects

铁蛋白基因序列来源及 GenBank 登录号 The origin of ferritin genes and their GenBank accession numbers; *D. melanogaster*: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*, AAF07879; *G. morsitans*: 刺舌蝇 *Glossina morsitans*, AF368916; *M. sexta*: 烟草天蛾 *Manduca sexta*, AAF44717; *T. ni*: 粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni*, AAX94729; *G. mellonella*: 大蜡螟 *Galleria mellonella*, AF329683; *C. ethlius*: 巴西白斑弄蝶 *Calpodis ethlius*, AAD50240; *B. tabaci* MED: 烟粉虱 MED 隐种 *Bemisia tabaci*, JX865415; *A. aegypti*: 埃及伊蚊 *Aedes aegypti*, AA041698. 以 Clustal X 进行多序列比对, Boxshade 标注; 黑影表示相同氨基酸, 灰色阴影表示相似氨基酸. Alignments and shading were done with Clustal X and Boxshade. The identical and similar residues were shaded in black and gray, respectively.

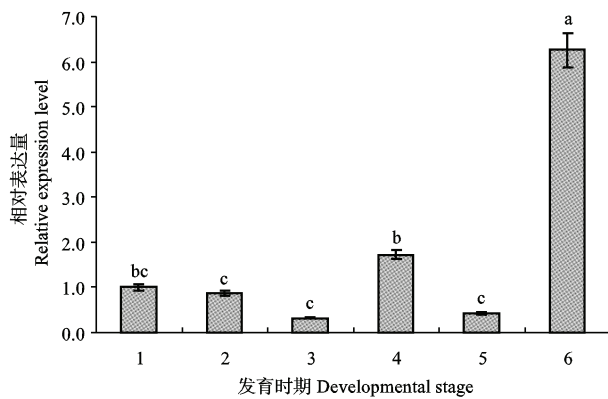


图4 烟粉虱 MED 隐种 *BtFer1* 不同发育时期相对表达量

Fig. 4 Relative expression level of *BtFer1* in different developmental stages of *Bemisia tabaci* MED

图中数据为平均值  $\pm$  标准误; 柱上不同小写字母表示不同发育阶段间比较差异显著 ( $P < 0.01$ )。Data in the figure are mean  $\pm$  SE. The different lowercase letters above bars represent significant difference among different developmental stages of *B. tabaci* MED ( $P < 0.01$ ). 以卵中表达量作为1, 选取 *actin* 作为标准化内参, 用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法计算相对表达量。The relative expression level of *BtFer1* in different developmental stages of *B. tabaci* MED is determined by  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method compared with that in the eggs, and *actin* is selected as the housekeeping gene. 1: 卵 Egg; 2: 1 龄若虫 1st instar nymph; 3: 2 龄若虫 2nd instar nymph; 4: 3 龄若虫 3rd instar nymph; 5: 伪蛹 Pseudopupa; 6: 成虫 Adult.

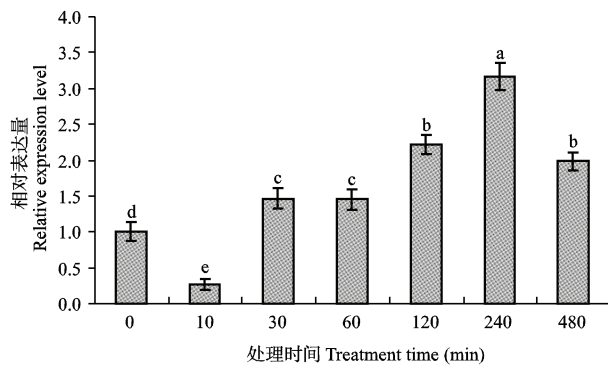


图5 吡虫啉 (1 mg/L) 处理条件下烟粉虱成虫体内 *BtFer1* 的相对表达量

Fig. 5 Relative expression level of *BtFer1* in *Bemisia tabaci* adults under imidacloprid (1 mg/L) stress

图中数据为平均值  $\pm$  标准误; 柱上不同小写字母表示不同处理时间之间比较差异显著 ( $P < 0.01$ )。Data in the figure are mean  $\pm$  SE. The different lowercase letters above bars represent significant difference among different time after treatment ( $P < 0.01$ ).

#### 2.4 MBP 融合 *BtFer1* 表达载体构建和鉴定

利用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切 pMAL-c2x 空载体和 pGEM-*BtFer1* 载体, 分别获得含有相同酶切位点的线性化 pMAL-c2x 空载体和目的基因片段, 经 T4

连接酶连接环化、转化进入大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 以及对阳性菌落培养、质粒提取获得重组表达载体 pMAL-*BtFer1*。重组表达载体 pMAL-*BtFer1* 经 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切后, 在 700 bp 以下检测到特异条带, 与预期目的片段 (680 bp) 相符 (图 6), 测序结果同样证实所获得的重组载体正确。

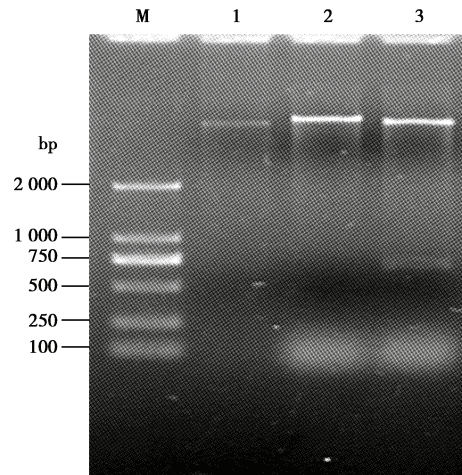


图6 重组质粒 pMALc2-*BtFer1* 的酶切鉴定

Fig. 6 Restriction enzyme digestion analysis of recombinant plasmid pMALc2-*BtFer1*

M: DNA 分子量标准物 DNA marker; 1: *EcoR* I 单酶切 pMAL-c2x 载体 pMAL-c2x vector digested with *EcoR* I; 2: *EcoR* I 单酶切 pMALc2-*BtFer1* 重组载体 pMALc2-*BtFer1* digested with *EcoR* I; 3: *EcoR* I/*Sal* I 双酶切 pMALc2-*BtFer1* 重组载体 pMALc2-*BtFer1* digested with *EcoR* I/*Sal* I.

#### 2.5 MBP 融合蛋白表达与纯化

SDS-PAGE 蛋白质电泳检测显示 (图 7): 在 0.3 mmol/L 浓度 IPTG 诱导下, 重组载体 pMAL-*BtFer1* 菌体总蛋白样品中可检测到特异性蛋白条带, 分子量约为 68 kD, 与预期 MBP-*BtFer1* 融合蛋白分子量大小相符 (MBP 标签蛋白与铁蛋白的分子量分别为 40 kD 和 25.3 kD), 表明融合铁蛋白能够有效表达; IPTG 诱导可增加融合蛋白的表达量, 并以诱导 1 h 时表达量最高, 长时间 (3 h) 诱导反而降低表达量; 融合蛋白 MBP-*BtFer1* 同时存在于上清液和沉淀中, 上清中的含量略高于沉淀; (4) 采用 Amylose 亲和柱对上清中融合蛋白进行纯化, 经 SDS-PAGE 检测显示融合蛋白主带明显, 纯化效率高。

### 3 结论与讨论

脊椎动物胞质铁蛋白由 24 个亚基构成的分子量约为 440 kD 的异源多聚体 (Arosio *et al.*, 2009),

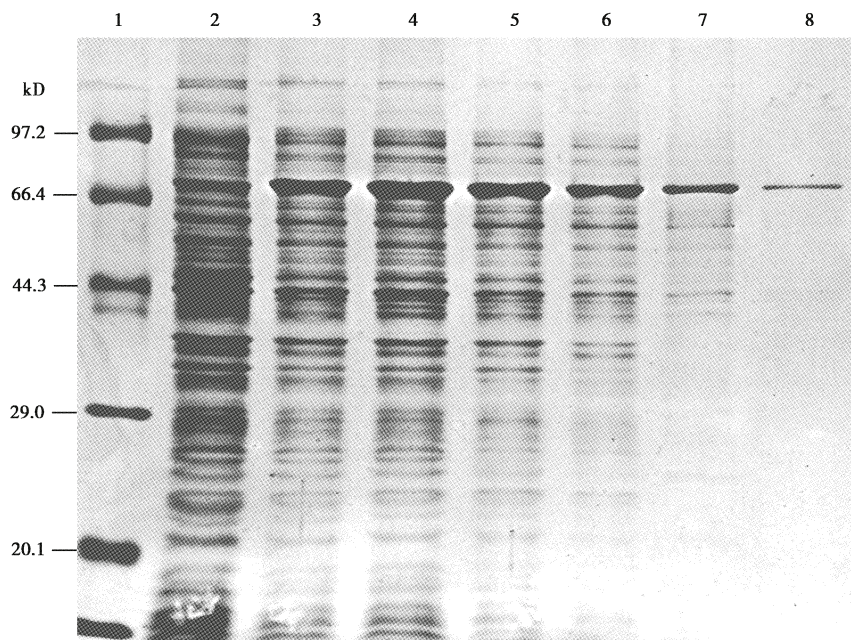


图7 烟粉虱铁蛋白体外表达 SDS-PAGE 电泳检测

Fig. 7 Expression of ferritin of *Bemisia tabaci* *in vitro* detected by SDS-PAGE

1: 蛋白质分子量标准物 Protein molecular weight marker; 2-5: 分别为 IPTG 诱导 0, 0.5, 1 和 3 h 样品总蛋白 Total protein from cells induced by IPTG for 0, 0.5, 1 and 3 h, respectively; 6: 超声波破碎后上清液总蛋白 Total protein from the supernatant; 7: 超声波破碎后沉淀总蛋白 Total protein from the pellet; 8: 麦芽糖吸附纯化后融合蛋白 Purified protein eluted from amylose column with maltose.

亚基组成包括重链和轻链两类, 分别由不同基因编码。哺乳动物分泌型铁蛋白虽然仅占总铁蛋白的一小部分, 但是该类蛋白发挥的作用非常重要, 其含量水平是监测机体内铁元素平衡的重要指标, 如缺铁还是过量 (Zimmermann, 2008), 相比之下, 血清铁蛋白浓度变化与机体内炎症、感染、肝功能、肿瘤和氧化胁迫程度密切相关。与哺乳动物不同, 昆虫体内的转铁蛋白和铁蛋白均具有铁运输功能 (Strickler-Dinglasan *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009), 并以分泌型蛋白为主 (Wang *et al.*, 2009)。昆虫铁蛋白也是由两种类型亚基构成, 但是多聚体的分子量普遍比哺乳动物大, 一般在 400 ~ 600 kD 之间, 主要由于亚基的分子量比哺乳动物铁蛋白的要大 (21 ~ 36 kD), 本文报道的烟粉虱铁蛋白 BtFer1 理论分子量为 25.26 kD。在铁蛋白亚基合成过程中, 一般需要经过糖基化修饰, 然而 BtFer1 并无糖基化修饰位点, 但是存在多种类型的磷酸化修饰位点, 以及多个酰胺化和 N-豆蔻酰化位点, 可能由于烟粉虱物种特性决定的, 具体情况还需实验证据核实。在昆虫体内, 铁蛋白亚基多含有信号肽, 用于引导新生肽链进入分泌通道形成成熟亚基, BtFer1 同样含有信号肽 (M<sup>1</sup> ~ A<sup>19</sup>) 序列, 表明该蛋白属于分泌型铁蛋白。

现有研究表明, 铁蛋白基因在昆虫的各种组织中均能表达, 但是表达水平存在差异, 并与发育程度密切相关 (Daphne *et al.*, 2010), 本文研究结果同样证实 BtFer1 在烟粉虱各发育阶段均能表达, 尤其在成虫和 3 龄若虫期表达量较高, 显著高于卵、1 龄若虫、伪蛹和 2 龄若虫期 (图 4)。昆虫铁蛋白的功能主要包括铁运输 (Kidane *et al.*, 2006; Arosio *et al.*, 2009), 抗氧化胁迫和炎症 (Arosio *et al.*, 2009), 参与免疫 (Paskewitz and Shi, 2005), 及可能行使转铁蛋白的功能 (Kim *et al.*, 2009)。吡虫啉属于内吸性杀虫剂, 该类杀虫剂通过竞争性结合烟酸乙酰胆碱酯酶受体, 有效干扰烟粉虱运动神经系统的化学信号传递, 在此过程中将伴随着一系列的氧化胁迫产生 (He *et al.*, 2011), 为此昆虫体内将大量合成铁蛋白以缓解上述胁迫 (Arosio *et al.*, 2009)。本文研究结果显示在喷施低浓度吡虫啉条件下, 成虫内体 BtFer1 基因在经过短暂调整后表达量迅速上升 (图 5), 受吡虫啉胁迫强烈诱导, 表明该类蛋白可能直接或者间接地参与烟粉虱的抗药性, 具体结论有待进一步证实。本文构建的原核表达载体 pMAL-BtFer1, 其融合蛋白 MBP-BtFer1 在宿主菌 BL21 (DE3) 能够稳定高效表达, 表达产物以可溶性蛋白形式存在于上清液中 (图 5), 这为后续

融合蛋白的纯化和分离带来便利。由于构建的表达载体含有编码麦芽糖结合蛋白的标签序列, 为利用商业化抗 MBP 抗体检测融合蛋白研究 BtFer1 与其他蛋白互作, 以及利用凝血酶类蛋白酶酶切纯化产物获得成熟铁蛋白并研究钙蛋白的结构和功能奠定了基础。

### 参考文献 (References)

- Ahmad M, Arif MI, Ahmad Z, Denholm I, 2002. Cotton whitefly (*Bemisia tabaci*) resistance to organophosphate and pyrethroid insecticides in Pakistan. *Pest Manag. Sci.*, 58(2): 203–208.
- Altincicek B, Knorr E, Vilcinskas A, 2008. Beetle immunity: identification of immune-inducible genes from the model insect *Tribolium castaneum*. *Dev. Comp. Immunol.*, 32(5): 585–595.
- Andrews NC, 2008. Forging a field; the golden age of iron biology. *Blood*, 112(2): 219–230.
- Arosio P, Ingrassia R, Cavadini P, 2009. Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochim. Biophys. Acta*, 1790(7): 589–599.
- Cahill M, Denholm I, Gorman K, Day S, Elbert A, Nauen R, 1996. Baseline determination and detection of imidacloprid resistance in *Bemisia tabaci*. *Bull. Entomol. Res.*, 86(4): 343–349.
- Cazzola M, Invernizzi R, Bergamaschi G, Levi S, Corsi B, Travaglino E, Rolandi V, Biasiotto G, Drysdale J, Arosio P, 2003. Mitochondrial ferritin expression in erythroid cells from patients with sideroblastic anemia. *Blood*, 101(5): 1996–2000.
- Charlesworth A, Georgieva T, Gospodov I, Law JH, Dunkov BC, Ralcheva N, Barillas-Mury C, Ralchev K, Kafatos FC, 1997. Isolation and properties of *Drosophila melanogaster* ferritin – molecular cloning of a cDNA that encodes one subunit, and localization of the gene on the third chromosome. *Eur. J. Biochem.*, 247(2): 470–475.
- Daphne QD, Pham, Joy J, Winzerling, 2010. Insect ferritins: typical or atypical? *Biochim. Biophys. Acta*, 1800(8): 824–833.
- De Barro PJ, Liu SS, Boykin LM, Dinsdale AB, 2011. *Bemisia tabaci*: a statement of species status. *Annual Review of Entomology*, 56: 1–19.
- Dunkov BC, Zhang D, Choumarov K, Winzerling JJ, Law JH, 1995. Isolation and characterization of mosquito ferritin and cloning of a cDNA that encodes one subunit. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 29(3): 293–307.
- Fisher J, Devraj K, Ingram J, Slagle-Webb B, Madhankumar AB, Liu X, Klinger M, Simpson IA, Connor JR, 2007. Ferritin: a novel mechanism for delivery of iron to the brain and other organs. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 293(2): C641–C649.
- Greathead AH, 1986. Host plants. In: Cock MJW ed. *Bemisia tabaci* – A Literature Survey on the Cotton Whitefly with an Annotated Bibliography. CAB International Institute of Biological Control, Ascot, UK. 17–26.
- He Y, Zhao J, Wu D, Wyckhuys KA, Wu K, 2011. Sublethal effects of imidacloprid on *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) under laboratory conditions. *J. Econ. Entomol.*, 104(3): 833–838.
- Jones CM, Daniels M, Andrews M, Slater R, Lind RJ, Gorman K, Williamson MS, Denholm I, 2011. Age-specific expression of a P450 monooxygenase (CYP6CM1) correlates with neonicotinoid resistance in *Bemisia tabaci*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 101(1): 53–58.
- Karunker I, Benting J, Lueke B, Ponge T, Nauen R, Roditakis E, Vontas J, Gorman K, Denholm I, Morin S, 2008. Over-expression of cytochrome P450 CYP6CM1 is associated with high resistance to imidacloprid in the B and Q biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38(6): 634–644.
- Kidane TZ, Sauble E, Linder MC, 2006. Release of iron from ferritin requires lysosomal activity. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 291(3): C445–C455.
- Kim BY, Lee KS, Yoon HJ, Kim I, Li J, Sohn HD, Jin BR, 2009. Expression profile of the iron-binding proteins transferrin and ferritin heavy chain subunit in the bumblebee *Bombus ignitus*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 153(2): 165–170.
- Kim SR, Lee KS, Yoon HJ, Park NS, Lee SM, Kim I, Seo SJ, Sohn HD, Jin BR, 2004. Molecular cloning, expression and characterization of cDNAs encoding the ferritin subunits from the beetle, *Apriona germari*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 138(4): 423–433.
- Leimberg JM, Prus E, Lin KG, Fibach E, Konijn AM, 2008. Iron-chelator complexes as iron sources for early developing human erythroid precursors. *Transl. Res.*, 151(2): 88–96.
- Levi S, Arosio P, 2004. Mitochondrial ferritin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 36(10): 1887–1889.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Luo C, Jones CM, Devine G, Zhang F, Denholm I, Gorman K, 2010. Insecticide resistance in *Bemisia tabaci* biotype Q (Hemiptera: Aleyrodidae) from China. *Crop Protection*, 29(5): 429–434.
- Nichol H, Locke M, 1999. Secreted ferritin subunits are of two kinds in insects: molecular cloning of cDNAs encoding two major subunits of secreted ferritin from *Calpodes ethlius*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29(11): 999–1013.
- Paskewitz SM, Shi L, 2005. The hemolymph proteome of *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35(8): 815–824.
- Pham DQ-D, Zhang D, Hufnagel DH, Winzerling J, 1996. *Manduca sexta* hemolymph ferritin: cDNA sequence and mRNA expression. *Gene*, 172(2): 255–259.
- Qiu L, Gao JR, Clark M, 2005. Sequencing and characterization of a cDNA encoding a ferritin subunit of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 60(3): 140–150.
- Strickler-Dinglasan PM, Guz N, Attardo G, ksoy S, 2006. Molecular characterization of iron binding proteins from *Glossina morsitans morsitans* (Diptera: Glossinidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 36(12): 921–933.
- Wang D, Kim BY, Lee KS, Yoon HJ, Cui Z, Lu W, Jia JM, Kim DH,



- Sohn HD, Jin BR, 2009. Molecular characterization of iron binding proteins, transferrin and ferritin heavy chain subunit, from the bumblebee *Bombus ignitus*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 152(1): 20–27.
- Wang ZY, Yan HF, Yang YH, Wu YD, 2010. Biotype and insecticide resistance status of the whitefly *Bemisia tabaci* from China. *Pest Manag. Sci.*, 66(11): 1360–1366.
- Zimmermann MB, 2008. Methods to assess iron and iodine status. *Br. J. Nutr.*, 99(Suppl. 3): S2–S9.

(责任编辑: 赵利辉)