

斜纹夜蛾铁硫亚基蛋白的表达及功能鉴定

左洪亮, 陈永, 高璐, 刘海远, 钟国华*

(华南农业大学昆虫毒理研究室, 广州 510642)

摘要: 铁硫亚基蛋白(rieske iron-sulfur protein, RISP) 是线粒体复合物Ⅲ的关键蛋白亚基之一, 在呼吸链电子传递过程中起到重要作用。本研究通过 RT-PCR 克隆得到斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* RISP 基因 *SlitRISP* 的 ORF, 构建了 pET32a-*SlitRISP* 原核表达载体, SDS-PAGE 和 Western blot 检测结果显示, *SlitRISP* 原核表达蛋白以包涵体的形式存在于菌体沉淀中, 且 RISP 抗体可成功用于该蛋白的免疫印迹检测。为了进一步鉴定 *SlitRISP* 在斜纹夜蛾离体细胞系 SL-1 中的功能, 通过向细胞内转染 siRNA, 利用 RNAi 技术沉默 SL-1 中的 *SlitRISP*。qRT-PCR 结果表明, 分别经 50 nmol/L 和 100 nmol/L siRNA 处理 48 h 后, SL-1 中 *SlitRISP* 的表达均几乎完全被抑制; Western blot 结果显示, SL-1 中 *SlitRISP* 含量显著低于 CK。当 SL-1 *SlitRISP* 被成功沉默后, 通过检测 SL-1 线粒体膜电位、细胞 ATP 含量和细胞增殖抑制率鉴定 RISP 在线粒体电子传递过程中的重要作用。流式细胞仪测定结果表明, 经 50 nmol/L 和 100 nmol/L siRNA 处理 24 h 后, SL-1 线粒体膜电位相对于 CK 分别降低 23.52% 和 11.32%, 而处理 48 h 后, SL-1 线粒体膜电位则分别升高 5.58% 和 27.66%; siRNA 处理 24 h 和 48 h 后, SL-1 ATP 含量相对于 CK 分别降低 82.71% 和 84.50%, 最终导致 SL-1 细胞增殖抑制率分别为 53.64% 和 67.94%。这些结果表明 *SlitRISP* 在 SL-1 中参与线粒体膜电位的形成和细胞 ATP 的合成。介于 RISP 在线粒体电子传递链中的重要作用, 其可能成为新型杀虫作用靶标, 这可为研制新型呼吸抑制剂提供参考。

关键词: 斜纹夜蛾; 铁硫亚基蛋白; 原核表达; 蛋白功能; SL-1 细胞

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2012)02-0139-08

Expression and function identification of the Rieske iron-sulfur protein from the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae)

ZUO Hong-Liang, CHEN Yong, GAO Lu, LIU Hai-Yuan, ZHONG Guo-Hua* (Laboratory of Insect Toxicology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The Rieske iron-sulfur protein (RISP) is a key protein subunit of mitochondrial complex III, which plays an important role in the respiratory electron transport chain. The opening reading-frame (ORF) of *SlitRISP* was cloned by RT-PCR from *Spodoptera litura* for the construction of prokaryotic expression vector pET32a-*SlitRISP*. SDS-PAGE and Western blot analysis showed that the prokaryotic protein *SlitRISP* was mainly present as inclusion body in the bacteria precipitate, and the antibody of RISP could be applied to the immunoblot analysis of *SlitRISP* successfully. In order to identify the function of *SlitRISP* in the cultured cell line SL-1 of *S. litura*, RNAi was used to silence *SlitRISP* by transfecting siRNA into SL-1 cells. The qRT-PCR result showed that at 48 h after the SL-1 cells were treated with 50 nmol/L and 100 nmol/L siRNA, respectively, the expression levels of *SlitRISP* mRNA were all inhibited effectively compared with the control. The Western blotting result showed that the content of *SlitRISP* in SL-1 cells was obviously lower than the control. The mitochondrial membrane potential (MMP), ATP content and inhibition rate of cell proliferation were detected based on the obvious silence of *SlitRISP* in SL-1 cells to identify the important roles of RISP in the electron-transport chain of mitochondria. The changes of MMP in SL-1 cells were monitored by flow cytometry (FCM), which decreased by 23.52% and 11.32% at 24 h after the SL-1 cells were treated with 50 nmol/L and 100 nmol/L siRNA, respectively, compared with control. However, at 48 h after the SL-1 cells were treated with 50 nmol/L and 100 nmol/L siRNA, the MMP increased by 5.58% and 27.66%, respectively. The ATP content in SL-1 cells at 48 h after treatment with 50 nmol/L and 100 nmol/L siRNA was decreased by 82.71% and

基金项目: 国家自然科学基金项目(30971944)

作者简介: 左洪亮, 男, 1987年生, 硕士研究生, 研究方向为天然源农药与农药毒理, E-mail: zhuzuo@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: guohuazhong@scau.edu.cn

收稿日期 Received: 2011-11-30; 接受日期 Accepted: 2012-02-05

84.50%, respectively, measured by luminometer. Owing to the suppression of ATP synthesis by siRNA in SL-1 cells, the inhibition rates of cell multiplication reached to 53.64% and 67.94%, respectively, at 48 h after the SL-1 cells were treated with 50 nmol/L and 100 nmol/L siRNA. These results demonstrate that the RISP plays an important role in the MMP formation and ATP synthesis in SL-1 cells. As RISP plays important roles in the electron-transport chain of mitochondria, it could become a new target for pest control, and this may provide reference for developing new respiration inhibitors.

Key words: *Spodoptera litura*; Rieske iron-sulfur protein; prokaryotic expression; protein function; *Spodoptera litura* cultured cell line (SL-1)

线粒体是细胞进行呼吸作用的场所,线粒体呼吸链主要由4个相对分子质量较大的跨膜蛋白复合体(I, II, III和IV)组成(Choksi *et al.*, 2011)。线粒体复合物III又称辅酶Q-细胞色素C还原酶(ubiquinol-cytochrome c reductase),由9~11个亚基组成,其中包括两个细胞色素b(b562和b566)、1个细胞色素C1和1个铁硫蛋白亚基(Rieske iron-sulfur protein, RISP)(Lai *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2011)。在呼吸链的电子传递过程中,RISP负责将一个电子从还原型辅酶Q传递给细胞色素C1,并将一个质子释放到线粒体膜间隙,以此产生膜电位用于ATP的形成(Atteia *et al.*, 2003; Gurung *et al.*, 2005; Korde *et al.*, 2011)。RISP作为呼吸链中的重要电子传递介质,可用作新型化学农药、生物制剂和转基因植物的重要靶标,从基因或蛋白质水平抑制害虫RISP的功能,切断整个呼吸链,抑制害虫ATP合成,进而抑制害虫生长发育甚至致其死亡。

鉴于线粒体复合物III铁硫蛋白亚基RISP在线粒体结构和呼吸链中的重要作用,近年来其在昆虫中的研究也备受关注。Shergill等(1995)运用电子顺磁共振技术,解释了棉贪夜蛾*Spodoptera littoralis*线粒体铁硫蛋白亚基的结构特征,为棉贪夜蛾和其他昆虫呼吸链相关研究提供了参考;Smid等(2006)通过RNAi特异性沉默了布氏锥虫*Trypanosoma brucei*线粒体RISP,抑制了其呼吸作用和能量代谢,进而证明该蛋白在布氏锥虫生命周期里不可替代的作用;Gong等(2011)针对小菜蛾*Plutella xylostella* RISP基因编码区设计特异的siRNAs,利用饲喂的方法将其导入小菜蛾体内后,可以成功抑制其RISP的表达,并导致其体内ATP含量明显降低,证明RISP在其ATP合成中起到重要作用。

作者在先前的研究中,克隆得到斜纹夜蛾*Spodoptera litura* RISP基因*SlitRISP*的cDNA全长,qRT-PCR的结果表明*SlitRISP*在斜纹夜蛾各个发育时期均有表达,其表达量随虫体生长逐渐升高,并

在蛹期降至最低,至成虫羽化后再次达到最大值(陈永等,2011)。本研究在此基础上,克隆得到*SlitRISP*开放阅读框(open reading frame, ORF),构建原核表达载体并诱导表达,运用蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测*SlitRISP*原核表达蛋白;在成功验证RISP抗体能够应用于*SlitRISP*免疫印迹检测的基础上,将特异性作用于*SlitRISP*的siRNA转染至斜纹夜蛾离体培养细胞系SL-1,从细胞水平鉴定*SlitRISP*的功能,旨在为进一步研究昆虫RISP功能和创制作用于呼吸链关键功能蛋白的新型杀虫剂提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫与细胞系

斜纹夜蛾为本实验室人工饲养,饲养条件为 $26 \pm 1^\circ\text{C}$, RH 70%~80%,光周期16L:8D。供试细胞系为斜纹夜蛾离体培养细胞系SL-1,由本实验室按常规方法培养(钟国华等,2008)。

1.2 总RNA提取及cDNA第一链的合成

收集斜纹夜蛾成虫,用足量液氮冷冻研磨后,参照总RNA提取试剂盒说明书(OMEGA, USA),用Trizol法提取总RNA,并溶解于40 μL DEPC处理的超纯水。取2 μL 总RNA,以Oligo(dT)₁₈作为反转引物,在反转录酶PrimerScript Reverse Transcriptase(TaKaRa,大连)的作用下,合成cDNA第一链。

1.3 *SlitRISP* ORF扩增及原核表达载体构建

根据NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)登录的斜纹夜蛾*SlitRISP*序列(HQ599193.1),设计特异性引物*SlitRISPOF*(5'-CCGGAGCTCATGACTTCGGTCACAAGGGCT-3')和*SlitRISPOR*(5'-CGGC TCGAGTTAACCTACGACTAACAGGCT-3'),并添加限制性内切酶位点*Sac* I(GAGCTC)和*Xho* I(CTCGAG)及3个保护碱基。交由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。以合成的斜纹夜蛾成虫

cDNA 第一链为模板, 在引物 *SlitRISPOF* 和 *SlitRISPOR* 作用下进行 *SlitRISP* ORF PCR 扩增。PCR 反应条件为: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 65℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 10 min; 4℃ 保存。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶纯化回收后 -20℃ 保存备用。

参照质粒小提试剂盒(天根生化科技有限公司, 北京)说明书, 从已转化 pET32a 空质粒大肠杆菌 *Escherichia coli* (DH5 α) 的隔夜菌中提取 pET32a 空质粒。将上述 PCR 产物与 pET32a 空质粒分别用限制性内切酶 *Sac* I 和 *Xho* I (NEB 有限公司, 北京) 进行双酶切, 酶切体系为: PCR 产物或 pET32a 空质粒 20 μ L, NEB Buffer 4 5 μ L, *Sac* I 和 *Xho* I 各 2.5 μ L, BSA 1 μ L, 加水补足 50 μ L, 37℃ 酶切 4 h。酶切产物经 1.5% 琼脂糖凝胶纯化回收后, 利用 T4 连接酶(TaKaRa, 大连) 连接 *SlitRISP* ORF 和 pET32a 载体, 构建原核表达载体 pET32a-*SlitRISP*。连接体系为: 载体和 *SlitRISP* ORF 各 4 μ L, T4 连接酶 1 μ L, T4 连接酶缓冲液 1 μ L, 16℃ 连接过夜。连接产物和 pET32a 空质粒分别转化至 *Transtetta* (DE3) (北京全式金生物技术有限公司) 感受态细胞。挑选菌斑摇菌, 经 PCR 鉴定为阳性后送至英潍捷基(上海) 贸易有限公司测序。确定测序结果正确后, 扩大培养含阳性重组质粒的菌液, 提取 pET32a-*SlitRISP* 重组质粒和 pET32a 空质粒用以 PCR 鉴定和双酶切鉴定。

经测序结果确定 pET32a-*SlitRISP* 原核表达载体构建成功后, 将含有 pET32a-*SlitRISP* 和 pET32a 空质粒的大肠杆菌分别接种至 50 mL 液体 LB 培养基(Amp 终浓度 100 μ g/mL), 振荡培养至菌液 OD 值为 0.6 ~ 0.8 时, 加入异丙基-D-硫代吡喃半乳糖苷(β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG) 至终浓度为 1 mmol/L, 28℃ 低温诱导 8 h。收集相同质量诱导菌体, 超声波破碎后, 分离上清和沉淀, 分别加入 0.5 倍体积 4 \times SDS 上样缓冲液, 8 min 沸水热处理后用 SDS-PAGE(浓缩胶 4%, 分离胶 12%) 电泳分离, 经考马斯亮蓝染色并脱色后, 检测原核表达蛋白表达。

1.4 蛋白免疫印迹检测

按上述条件诱导 pET32a-*SlitRISP* 原核表达蛋白, 用 SDS-PAGE(浓缩胶 4%, 分离胶 12%) 电泳分离后, 采用电转法(90 mA, 1.5 h) 将蛋白转移至硝酸纤维素(PVDF) 膜上。转膜后, 经 Western blot 膜封闭液(天根生化科技有限公司, 北京) 室温振

荡封闭过夜后, 分别孵育 RISP 多克隆抗体(抗体稀释倍数: 1:5 000) (Gong *et al.*, 2011), 和 HisyTag 单克隆抗体(Cell Signaling Technology, 美国; 抗体稀释倍数: 1:1 000), 室温振荡孵育 8 h, 孵育二抗(羊抗兔, 南京凯基生物科技发展有限公司, 稀释倍数: 1:15 000), 室温振荡孵育 2 h, 最后用增强型 HRP-DAB 底物显色试剂盒(天根生化科技有限公司, 北京) 显色。

1.5 SL-1 细胞系 siRNA 转染

根据 *SlitRISP* ORF 序列设计一对 siRNA 引物(正向引物: 5'-GGUAAACGACGCUAUUUATT-3', 反向引物: 5'-UAAAUAGCGUCGUUUAACCTT-3') 交由上海吉玛制药技术有限公司合成。取对数生长期 SL-1 细胞接种于 6 孔细胞培养板中, 培养 24 h 后, 吸除培养基, 加入 2 mL 不含血清的培养基, 并添加用以沉默 *SlitRISP* 的 siRNA 至终浓度分别为 50 nmol/L 和 100 nmol/L 进行干扰试验。先将 siRNA 与 4 μ L 转染试剂 Lipo2000 (Invitrogen Life Technologies Corporation, 美国) 分别溶于 500 μ L 无血清培养基中, 静置 5 min 后混匀, 室温孵育 20 min 后加入到 6 孔培养板中。设置转染 ddH₂O 和未转染正常细胞(CK) 两组对照, 每个处理 3 个重复孔, 将细胞置于 27℃ 细胞培养箱中培养, 24 h 和 48 h 后, 对其进行生理生化检测。

1.6 SL-1 细胞 *SlitRISP* 表达量检测

根据 *SlitRISP* 设计一对定量引物: *SlitRISPRTF* (5'-GGGCTGGGCATTTGGCTCCTTAC-3') 和 *SlitRISPRTR* (5'-CAACACCTTCTCTGCTGGCCTGT-3'), 用以荧光定量 PCR 检测 *SlitRISP* 表达量, 以 β -actin (定量 PCR 引物为: *actinRTF*: 5'-CGTCCCCATCTACGAAGGTT-3', *actinRTR*: 5'-AGCGGTGGTGGTGAAGAG-3') 作为内参基因。分别提取转染 siRNA 24 h 和 48 h SL-1 细胞总 RNA 并合成 cDNA, 以此作为模板, 进行 qRT-PCR 检测 SL-1 转染 siRNA 后 *SlitRISP* 表达量变化。qRT-PCR 检测在美国 BIO-RAD CFX96 实时荧光定量 PCR 仪中进行, PCR 反应体系为 25 μ L: 灭菌超纯水 9.5 μ L; SYBR Premix Ex TaqTM 12.5 μ L; 10 μ mol/L 的上、下游引物各 0.5 μ L; cDNA 模板 2 μ L。采用三步法进行 PCR 反应, 反应条件为: 95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 30 s, 72℃ 15 s, 40 个循环; 熔解曲线条件: 检测温度 70 ~ 95℃, 升温速度 0.5℃/次, 恒温时间 5 s/次。采用 Bio-Rad CFX Manager (admin) 进行数据记录分析, 产生熔解曲线, 其中阈值线由

软件自动设定。每个样品设 3 次重复。每对引物设 3 个以无菌超纯水代替 cDNA 模板的空白对照。数据分析采用比较 CT 值的相对定量法 (Livak and Schmittgen, 2001), 分析 *SlitRISP* 在 SL-1 细胞的相对表达量。

参照细胞总蛋白提取试剂盒 (Thermo Fisher Scientific, 欧洲联盟) 说明书提取转染 siRNA 48 h SL-1 细胞总蛋白, 按上述 Western blot 检测方法, 以 β -actin 抗体作为内参抗体 (Cell Signaling Technology, 美国; 抗体稀释倍数: 1:1 000), 用 RISP 多克隆抗体检测 SL-1 细胞 *SlitRISP* 蛋白。

1.7 SL-1 细胞线粒体膜电位测定

参照 Halestrap 等 (2000) 的方法, 按上述转染条件向 SL-1 细胞内转入 siRNA, 继续培养 24 h 和 48 h, 分别收集细胞, 2 000 r/min 离心 2 min, 弃上清, PBS 漂洗 2 次, 加入 10 μ mol/L 罗丹明 123 (rhodamine123), 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min, PBS 漂洗 2 次离心去除上清液, 并以预冷的 PBS 重悬细胞, 立即用流式细胞仪 (FL1 通道) 检测, 每个样品收集 1.5×10^4 个细胞, CellQuest 软件分析结果, 每个处理重复 3 次。通过荧光强度 (mean intensity of fluorescence, MIF) 值反映线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 降低率, 按如下公式计算: MMP 降低率 (%) = (对照组 MIF - 处理组 MIF) / 对照组 MIF \times 100%。

1.8 SL-1 细胞 ATP 含量的检测

按上述转染条件向 SL-1 细胞内转入 siRNA, 继续培养 24 h 和 48 h, 参照 ATP 检测试剂盒 (碧云天生物技术研究所) 说明书检测各处理 ATP 含量, 每处理重复 3 次。测量前, 将 ATP 标准溶液用 ATP 检测裂解液稀释成 0.1, 0.5, 1, 5 和 10 μ mol/L 5 个浓度梯度。在检测孔内加上 10 μ L 待测液, 迅速用移液器混匀, 至少间隔 2 s 后, 立即用 Wallac 1420 多标记测定仪 Luminometer 测定 PLU 值, 得到上述 5 个浓度对应值分别是 44, 239, 483, 2 550 和 4 682, 绘制标准曲线。按照每个样品或标准品 100 μ L ATP 的比例配制 ATP 检测工作液, 取 10 μ L 测定 PLU 值, 并根据标准曲线算出被测样品 ATP 浓度。

1.9 SL-1 细胞增殖的测定

采用 MTT 法检测 siRNA 沉默 *SlitRISP* 后 SL-1 细胞的增殖活性。按上述转染条件向 SL-1 细胞内转入 siRNA, 分别于继续培养 24 h, 48 h 和 72 h 后加入 5 μ g/mL MTT 10 μ L, 继续孵育 4 h 后, 弃除上清液, 每孔加 DMSO 100 μ L, 室温下避光振荡

0.5 h, 以空白孔调零, 在酶标仪上检测 570 nm 处吸光度 (A_{570}) 值, 按如下公式计算: 细胞增殖抑制率 (%) = (1 - 调零后受试组 A_{570} 值 / 调零后对照组 A_{570} 值) \times 100%。每个处理设置 3 个重复。

1.10 数据统计与分析

核苷酸及氨基酸序列分析由 DNASTAR7.1 EditSeq 完成, SL-1 细胞 *SlitRISP* 相对表达量、线粒体膜电位、ATP 含量和细胞增殖抑制率数据用 DPS v6.50 进行处理分析, 采用邓肯氏新复极差检验法 (DMRT 法) 比较各处理结果之间的差异。

2 结果与分析

2.1 *SlitRISP* 原核表达和检测

利用引物 *SlitRISPOF* 和 *SlitRISPOR* 从斜纹夜蛾成虫 cDNA 中扩增到 816 bp 的 *SlitRISP* ORF, 经 *Sac* I 和 *Xho* I 双酶切处理后, 连接至同样经 *Sac* I 和 *Xho* I 双酶切处理的 pET32a 原核表达载体, 构建 *SlitRISP* 原核表达载体 (pET32a-*SlitRISP*)。对 pET32a-*SlitRISP* 进行 PCR 鉴定, 以空 pET32a 质粒作对照, 电泳结果显示, 与空质粒对比, 在位于 750 ~ 1 000 bp 处 (816 bp) 有特异性条带 (图 1: A)。用限制性内切酶 *Sac* I 和 *Xho* I 酶切处理 pET32a-*SlitRISP*, 以空 pET32a 空质粒作对照, 进行双酶切鉴定, 酶切电泳结果显示, 重组质粒被切割成两条带, 一条位于 5 000 bp 以上 (约 5 800 bp), 为 pET32a 经酶切后剩余载体序列, 另一条带位于 750 ~ 1 000 bp 处 (816 bp), 为从重组质粒上切割得到的 *SlitRISP* 序列 (图 1: B)。PCR 鉴定和双酶切鉴定结果显示, pET32a-*SlitRISP* 构建成功。

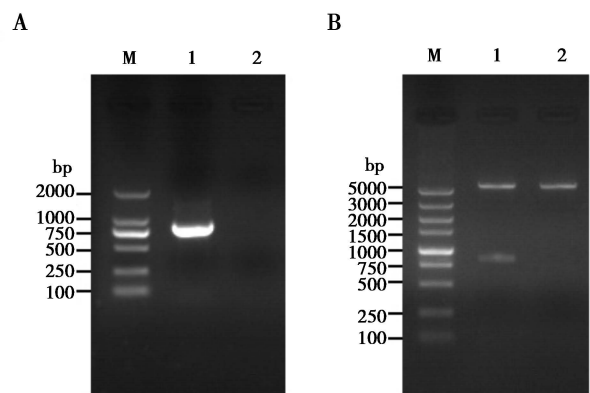


图 1 重组质粒 pET32a-*SlitRISP* PCR (A) 和双酶切鉴定 (B)

Fig. 1 PCR (A) and double-enzyme cleavage (B)

of pET32a-*SlitRISP*

M: DNA 分子量标准 DNA marker; 1: pET32a-*SlitRISP*; 2: pET32a 空质粒 pET32a plasmid.

将重组质粒 pET32a-*SlitRISP* 质粒导入 *Transtetta* (DE3) 菌株, 经 IPTG 诱导后, 收集菌体, 用超声波进行破碎, 分别取上清和沉进行 SDS-PAGE, 以未转质粒的 *Transtetta* (DE3) 菌株作对照, 电泳结果显示, *SlitRISP* 原核表达蛋白(约 29 kD) 与 pET32a 载体上 TrxydTag, SydTag 和 HisydTag(约 18 kD) 共同构成 47 kD 左右的重组蛋白形成包涵体, 存在于经超声波破碎后菌体沉淀中(图 2: A)。将经 SDS-PAGE 分离的 *SlitRISP* 蛋白转移至 PVDF 膜上, 以 HisydTag 抗体作为内参, 用 RISP 多克隆抗体免疫印迹检测 *SlitRISP* 原核表达蛋白, Western blot 结果显示均有单一条带, 且大小相同(图 2: B), 证明 *SlitRISP* 蛋白成功表达, 且带有 HisydTag 标签。

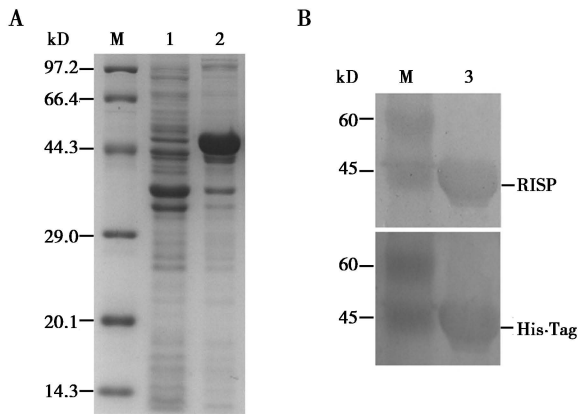


图 2 *SlitRISP* 原核表达蛋白电泳(A) 和 Western blot 检测(B)

Fig. 2 SDS-PAGE (A) and Western blot analysis (B) of prokaryotic expression product of *SlitRISP*

M: 蛋白质分子标准量 Protein molecular weight marker; 1: pET32a 空质粒 pET32a plasmid; 2: pET32a-*SlitRISP* 重组质粒 Recombinant plasmid of pET32a-*SlitRISP*; 3: *SlitRISP* 原核表达蛋白 Prokaryotic expression product of *SlitRISP*.

2.2 SL-1 细胞转染 siRNA 后 *SlitRISP* 表达量检测

用 qRT-PCR 检测 *SlitRISP* 表达量, 结果表明, 化学合成 siRNA 能显著抑制 SL-1 *SlitRISP* 的表达, 干扰处理 24 h 后以 ddH₂O, 50 nmol/L siRNA 和 100 nmol/L siRNA 处理组 *SlitRISP* 相对表达量分别为 CK 组的 1.11, 0.106 和 0.004 倍, 48 h 后相对表达量分别为 CK 组的 1.449, 0.001 和 0.002 倍, 加入 siRNA 的处理组 RISP 表达几乎被完全抑制, 与对照组表达量存在显著差异, 以致无法从图中看出柱状图(图 3)。

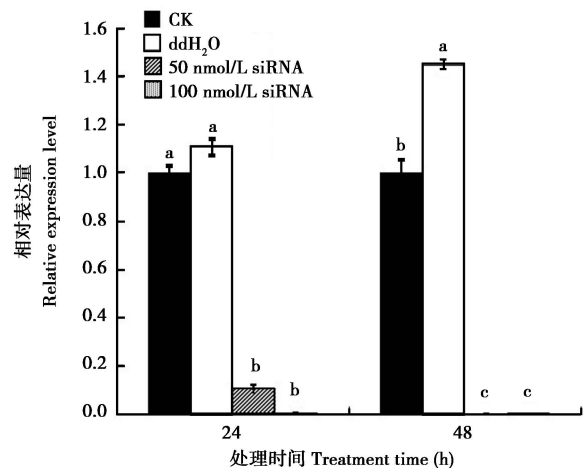


图 3 siRNA 处理对 SL-1 细胞 *SlitRISP* 相对表达量的影响

Fig. 3 Relative expression level of *SlitRISP* in SL-1 cells suppressed by siRNA

CK: 未转染正常细胞 Untransfected cells. 图中数据为平均值 \pm SD, 柱上字母表示不同处理间的差异性显著 ($P < 0.05$); 下图同。Data in the figure are mean \pm SD, different letters above bars indicate significant differences between different treatments ($P < 0.05$). The same for the following figures.

分别提取转染 siRNA 24 h 和 48 h 的 SL-1 细胞总蛋白, 以 β -actin 作为内参, 用 RISP 多克隆抗体免疫印迹检测 SL-1 细胞中 *SlitRISP* 蛋白变化。Western blot 结果显示, 转染 24 h 后, CK 和转染 ddH₂O 处理组可检测出明显的 *SlitRISP* 蛋白单一条带, 以 50 nmol/L 和 100 nmol/L 也可检测出单一条带, 但表达量相对较低(图 4: A); 转染 48 h 后, CK 和转染 ddH₂O 处理组可检测出明显的 *SlitRISP* 蛋白单一条带, 而以 50 nmol/L 和 100 nmol/L siRNA 处理组只能检测出微量 *SlitRISP* 蛋白条带(图 4: B), 说明转染 siRNA 48 h 后, SL-1 细胞内 *SlitRISP* 蛋白含量较少。该结果与转染 48 h 后 *SlitRISP* 的 qRT-PCR 检测结果一致。

2.3 *SlitRISP* 被抑制后对 SL-1 细胞线粒体膜电位的影响

SL-1 细胞转染 siRNA 后, 以流式细胞仪测定细胞线粒体膜电位(MMP), 结果表明, 以 50 nmol/L 和 100 nmol/L siRNA 处理 SL-1 细胞 24 h 后, MMP 比 CK 组分别降低 23.52% 和 11.32%; 但处理 48 h 后 MMP 出现反弹, 其中以 50 nmol/L 处理的 Rhodanmol/Line123 荧光强度值与 CK 组和转染 ddH₂O 组差异不明显, 说明 MMP 恢复至 CK 水平, 但 100 nmol/L 处理 MMP 值较 CK 组升高 27.66%, 显著高于 CK 和转染 ddH₂O 组(图 5)。

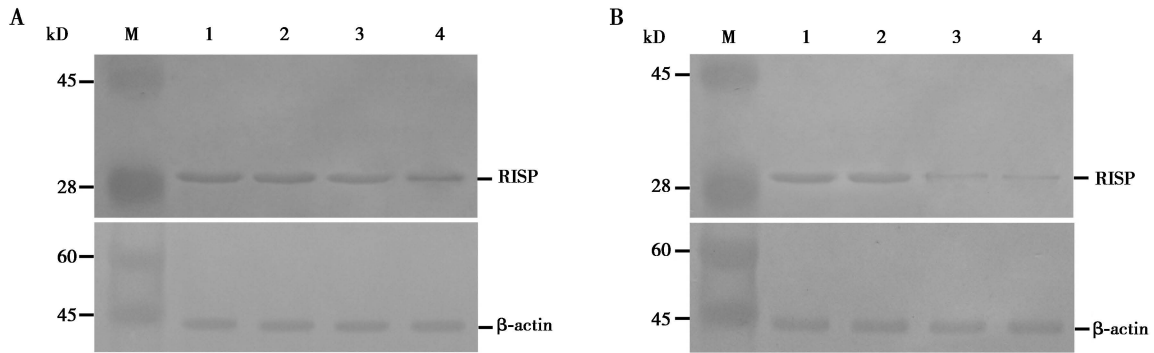


图4 siRNA 处理 24 h (A) 和 48 h (B) SL-1 细胞后的 SlitRISP Western blot 检测

Fig. 4 Western blot analysis of SlitRISP in SL-1 cells at 24 h (A) and 48 h (B) after treatment with siRNA

M: 预染蛋白质分子标准量 Prestained protein molecular weight marker; 1: CK; 2: ddH₂O; 3: 50 nmol/L siRNA; 4: 100 nmol/L siRNA.

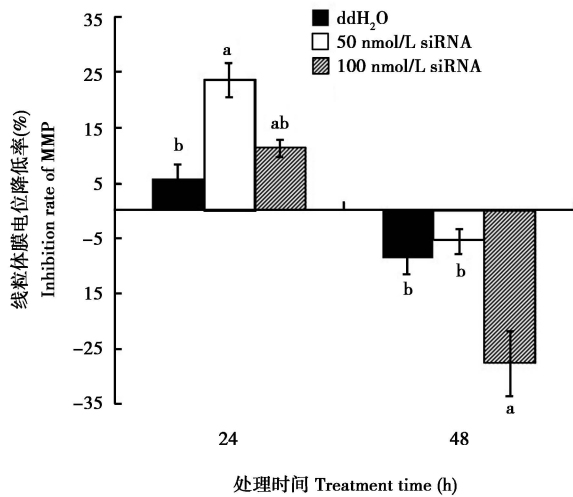


图5 siRNA 处理对 SL-1 细胞线粒体膜电位(MMP)的影响
Fig. 5 Inhibition of mitochondrial membrane potential (MMP) by siRNA in SL-1 cells

2.4 SlitRISP 被抑制后对 SL-1 细胞 ATP 含量的影响

根据方法 1.8 中绘制的标准曲线 $Y = 472.59X + 30.62$, 相关系数 R^2 为 0.998。ATP 的含量测定结果表明, 以 50 nmol/L siRNA 干扰 24 h 后, SL-1 细胞 ATP 含量为 4.55 $\mu\text{mol/L}$, 仅比 CK 降低 7.85%, 但以 100 nmol/L 处理同期 ATP 含量下降至 2.60 $\mu\text{mol/L}$, 明显低于 CK, 比 CK 降低 47.35%; 干扰处理 48 h 后, 以 50 nmol/L 和 100 nmol/L 处理的 ATP 含量分别仅为 0.93 和 0.83 $\mu\text{mol/L}$, 均显著低于 CK, ATP 含量比 CK 分别降低 82.71% 和 84.50% (图 6)。

2.5 SlitRISP 被抑制后对 SL-1 细胞增殖的影响

MTT 法测定结果表明, 以 50 和 100 nmol/L

siRNA 处理 24 h 后, SL-1 细胞增殖抑制率分别为 41.36% 和 45.17%, 处理后 48 h 对细胞增殖抑制率分别为 53.64% 和 67.94%, 同期转染 ddH₂O 处理组的细胞增殖抑制率分别仅为 8.07% 和 11.49%, 抑制不明显(图 7)。

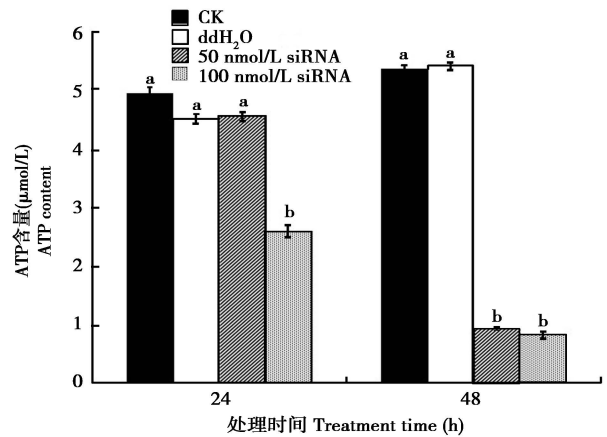


图6 siRNA 处理对 SL-1 细胞 ATP 含量的影响

Fig. 6 ATP content in SL-1 cells suppressed by siRNA

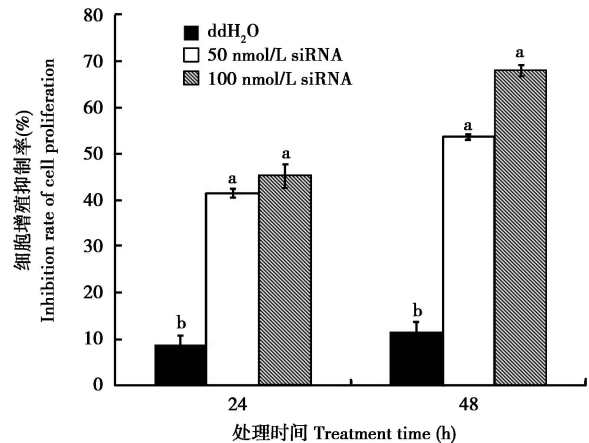


图7 siRNA 处理对 SL-1 细胞的增殖抑制作用

Fig. 7 Inhibition of SL-1 cell proliferation by siRNA

3 结论与讨论

RISP 作为电子传递介质, 在线粒体电子传递链中起着重要作用。深入研究昆虫 RISP 分子结构有助于进一步了解昆虫线粒体电子传递机制, 对研发以昆虫 RISP 作为靶标的新型呼吸链抑制剂有参考价值。本研究克隆得到 *SlitRISP* ORF 后, 成功构建了 pET32a-*SlitRISP* 原核表达载体, 并将该载体导入 Transetta (DE3) 表达菌株, SDS-PAGE 和 Western blot 检测结果表明, *SlitRISP* 原核表达蛋白主要以包涵体形式存在于菌体沉淀中, pET32 原核表达载体的使用, 使 *SlitRISP* 原核表达蛋白连有 Trx·Tag, S·Tag 和 His·Tag 标签, 有利于后期对该原核表达蛋白快速检测与纯化, 为昆虫 RISP 蛋白生物学特性和功能研究提供参考。在 RISP 抗体能成功用于 *SlitRISP* 原核表达蛋白 Western blot 检测的基础上, 通过向斜纹夜蛾离体胞系 SL-1 内转染 siRNA, 特异性沉默 SL-1 细胞 *SlitRISP* 基因, 经 qRT-PCR 和 Western blot 分别从 mRNA 水平和蛋白质水平证实 SL-1 细胞 *SlitRISP* 被沉默后, 再从 SL-1 细胞线粒体膜电位、ATP 含量和细胞增殖能力等角度鉴定 RISP 的功能。虽然 *SlitRISP* 的功能有待深入研究, 特别是在活体水平干扰效果仍需验证, 但这些结果仍然证实了 RISP 在线粒体呼吸链中的重要作用, 展示了 RISP 作为杀虫剂作用靶标的研究潜力, 今后可从诸如 RNAi、转基因植物或工程菌等技术角度, 抑制害虫 RISP 功能, 切断其能量供应, 从而达到控制害虫的目的。

利用离体昆虫细胞鉴定基因功能具有简便、快速、直观的优点, 是一种基因功能研究的重要检测方法。本研究通过向斜纹夜蛾离体胞系 SL-1 转染 siRNA, 特异性沉默 SL-1 细胞 *SlitRISP* 基因, 进而从细胞水平深入研究 *SlitRISP* 功能, 为昆虫基因功能研究提供了一个值得借鉴的模式。RISP 在线粒体电子传递链中, 负责将一个电子从还原型辅酶 Q 传递给细胞色素 C1, 并向线粒体膜间隙释放质子, 使膜电位升高, 用以合成 ATP (Rajagukguk *et al.*, 2007; Kuznetsov *et al.*, 2010)。从荧光定量检测结果可以看出, siRNA 转染至 SL-1 细胞后, 随着 siRNA 处理浓度的升高和处理时间的延长, siRNA 对 *SlitRISP* 表达的抑制效果更加显著; 然而 ddH₂O 处理组 RISP 表达量略高于 CK 组, 这可能由于转染过程中, 为使细胞能够从培养基中摄取 siRNA, 转

染试剂中的活性成份促进细胞生长及代谢, 细胞 ATP 需求及合成量增大, 进而表现为 RISP 表达量略有升高。SL-1 细胞呼吸链被破坏, 阻碍质子进入线粒体膜间隙, 使线粒体膜电位降低, 这与 siRNA 处理 SL-1 细胞 24 h 后线粒体膜电位测定结果相符, 但处理后 48 h 线粒体膜电位出现反弹, 其中以高剂量的 100 nmol/L siRNA 处理组的膜电位提高 27.66%。出现这种现象, 可能是由于转染 48 h 后, SL-1 细胞内 siRNA 逐渐被降解, 其对 *SlitRISP* 沉默作用随之减弱, 细胞线粒体自身的修复机制促使线粒体膜电位迅速回升, 因而出现反弹现象。尽管如此, 由于 RISP 基因表达被抑制, RISP 蛋白合成减少, 直接导致细胞 ATP 合成量显著减少, 而且未能得到及时恢复, 无法满足细胞新陈代谢和细胞分裂的能量需求, 因此, 导致细胞增殖受到明显的抑制, 且抑制率随着 siRNA 处理浓度的提高和时间的延长而增加。这种推理是否合理, 需要今后通过深入研究作用机制和信号转导途径等来验证。

参考文献 (References)

- Atteia A, van Lis R, Wetterskog D, Gutierrez-Cirlos EB, Ongay-Larios L, Franzen LG, Gonzalez-Halphen D, 2003. Structure, organization and expression of the genes encoding mitochondrial cytochrome C₁ and the Rieske iron-sulfur protein in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular Genetics and Genomics*, 268(5): 637–644.
- Chen Y, Gong L, Zuo HL, Zhong GH, 2011. Cloning, sequence analysis and developmental expression profiling of the rieske iron-sulfur protein of mitochondrial complex III from the common cutworm, *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 54(7): 762–768. [陈永, 龚亮, 左洪亮, 钟国华, 2011. 斜纹夜蛾线粒体复合物 III Fe-S 蛋白基因克隆序列分析及在不同发育阶段的表达特征. *昆虫学报*, 54(7): 762–768]
- Choksi KB, Nuss JE, DeFord JH, Papaconstantinou J, 2011. Mitochondrial electron transport chain functions in long-lived Ames dwarf mice. *Aging*, 3(8): 754–367.
- Gong L, Yang XQ, Zhang BL, Zhong GH, Hu MY, 2011. Silencing of Rieske iron-sulfur protein using chemically synthesised siRNA as a potential biopesticide against *Plutella xylostella*. *Pest Management Science*, 67(5): 514–520.
- Gurung B, Yu L, Xia D, Yu CA, 2005. The iron-sulfur cluster of the Rieske iron-sulfur protein functions as a proton-exiting gate in the cytochrome bc₁ complex. *Journal of Biological Chemistry*, 280(26): 24895–24902.
- Halestrap AP, Doran E, Gillespie JP, O'Toole A, 2000. Mitochondria and cell death. *Biochemical Society Transactions*, 28(2): 170–177.
- Korde AS, Yadav VR, Zheng YM, Wang YX, 2011. Primary role of mitochondrial Rieske iron-sulfur protein in hypoxic ROS production

- in pulmonary artery myocytes. *Free Radical Biology & Medicine*, 50(8): 945–952.
- Kuznetsov AM, Zueva EM, Masliy AN, Krishtalik LI, 2010. Redox potential of the Rieske iron-sulfur protein quantum-chemical and electrostatic study. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1797(3): 347–359.
- Lai B, Zhang L, Dong LY, Zhu YH, Sun FY, Zheng P, 2006. Impact of inhibition of Q_o site of mitochondrial complex III with myxothiazol on persistent sodium currents via superoxide and protein kinase C in rat hippocampal CA1 cells. *Neurobiology of Disease*, 21(1): 206–216.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Rajagukguk S, Yang SQ, Yu CA, Yu LD, Durham B, Millett F, 2007. Effect of mutations in the cytochrome b *ef* loop on the electron-transfer reactions of the Rieske iron-sulfur protein in the cytochrome bc_1 complex. *Biochemistry*, 46(7): 1791–1798.
- Shergill JK, Cammack R, Chen JH, Fisher MJ, Madden S, Rees HH, 1995. EPR spectroscopic characterization of the iron-sulfur proteins and cytochrome P-450 in mitochondria from the insect *Spodoptera littoralis* (cotton leafworm). *Biochem. J.*, 307(3): 719–728.
- Smid O, Horakova E, Vilimova V, Hrdy I, Cammack R, Horvath A, Lukes J, Tachezy J, 2006. Knock-downs of iron-sulfur cluster assembly proteins IscS and IscU down-regulate the active mitochondrion of procyclic *Trypanosoma brucei*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(39): 28679–28686.
- Yang M, Ge Y, Wu JY, Xiao JF, Yu J, 2011. Coevolution study of mitochondria respiratory chain proteins: Toward the understanding of protein-protein interaction. *Journal of Genetics and Genomics*, 38(5): 201–207.
- Zhong GH, Shui KJ, Lv CJ, Jia JW, Ren TJ, Hu MY, 2008. Induction of apoptosis by azadirachtin, a botanical insecticidal component, in *Spodoptera litura* cultured cell line SL-1. *Acta Entomologica Sinica*, 51(6): 618–627. [钟国华, 水克娟, 吕朝军, 贾建文, 任太军, 胡美英, 2008. 印楝素对 SL-1 的细胞凋亡诱导作用. 昆虫学报, 51(6): 618–627]

(责任编辑: 赵利辉)