

东亚飞蝗 FK506 结合蛋白基因克隆及其免疫功能分析

田野^{1,2} 李贝贝^{1,3} 崔志刚⁴ 农向群^{1,3} 张泽华^{1,3} 王广君^{1,3*} 刘廷辉^{2*}

(1. 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; 2. 河北农业大学植物保护学院, 保定 071001; 3. 国家林业和草原局内蒙古草地有害生物监测防控国家长期科研基地, 内蒙古 锡林浩特 026000; 4. 锡林郭勒盟草原工作站, 内蒙古 锡林浩特 026000)

摘要: 为明确东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* 免疫相关 FK506 结合蛋白 (FK506 binding protein, FKBP) 的功能, 了解 FKBP 对金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 侵染东亚飞蝗的影响, 分离克隆获得 FKBP46 基因及其纯化蛋白, 采用荧光定量 PCR 方法测定 FKBP46 基因在东亚飞蝗成虫不同组织以及不同虫态中肠内的表达量, 通过饵料饲喂方法测定 FKBP46 蛋白对金龟子绿僵菌致病力及对东亚飞蝗体内保护酶超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶 (peroxidase, POD)、酚氧化酶 (phenoloxidase, PO) 和解毒酶乙酰胆碱酯酶 (acetyl cholinesterase, AchE) 活性的影响。结果显示, 东亚飞蝗 FKBP46 基因全长为 1 200 bp, 编码蛋白分子量为 55 kD。FKBP46 基因在成虫不同组织中均有表达, 其中在脂肪体中的相对表达量最高, 为体壁中表达量的 1.77 倍; FKBP46 基因在卵期和成虫期的相对表达量较高, 分别为 1 龄蝗蛹期表达量的 4.88 倍和 6.84 倍。FKBP46 蛋白与金龟子绿僵菌混合饲喂东亚飞蝗, 第 10 天的累计死亡率为 85.56%, 显著高于金龟子绿僵菌单独处理, 而东亚飞蝗体内的保护酶 POD、SOD、PO 和解毒酶 AchE 活性均较金龟子绿僵菌单独处理显著降低。表明 FKBP46 基因能够抑制东亚飞蝗的免疫功能, 降低免疫相关保护酶和解毒酶的活性, 促进金龟子绿僵菌的侵染。

关键词: 东亚飞蝗; FK506 结合蛋白; 保护酶; 金龟子绿僵菌

Cloning and immune functional analysis of FK506 binding protein gene in *Locusta migratoria manilensis*

Tian Ye^{1,2} Li Beibei^{1,3} Cui Zhigang⁴ Nong Xiangqun^{1,3} Zhang Zehua^{1,3} Wang Guangjun^{1,3*} Liu Tinghui^{2*}

(1. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. College of Plant Protection, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, Hebei Province, China; 3. National Long-term Scientific Research Base for Grassland Pests Monitoring and Control in Inner Mongolia, National Forestry and Grassland Administration, Xilinhot 026000, Inner Mongolia Autonomous Region, China; 4. Grassland Workstation of Xilingol League, Xilinhot 026000, Inner Mongolia Autonomous Region, China)

Abstract: In order to clarify the function of FK506 binding protein (FKBP) in *Locusta migratoria manilensis* and illuminate the effect of FKBP in the resistance to *Metarhizium anisopliae* infection, the expression profile of the gene FKBP46 from different tissues of adults and in the midgut of nymphs with different instars was analyzed by using qRT-PCR technique. The FKBP46 gene was cloned, and its expressed protein FKBP46 was purified. The effect of FKBP46 protein on the infection of *M. anisopliae*

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0200402), 中央级科研院所基本科研业务费专项(Y2020XC18, S2020XM17), 河北省现代农业产业技术体系草业创新团队专项(HBCT20181602032018160203)

* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: wangguangjun@caas.cn, liutinghui@126.com

收稿日期: 2020-11-17

and the activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), phenoloxidase (PO) and acetylcholinesterase (AChE) were measured. It was found that the full length of *FKBP46* gene was 1 200 bp, encoding a 55 kD protein. The *FKBP46* gene was expressed in all tissues dynamically, and its relative expression was the highest in the fat body, which was 1.77 times higher than that in integument. The relative expressions of *FKBP46* gene in the egg and adult stages were both higher than that during the first-instar nymphal stage, which were 4.88 times and 6.84 times of the latter, respectively. The results of bioassay showed that, when FKBP46 protein was combined with *M. anisopliae*, the cumulative mortality of *L. migratoria manilensis* increased to 85.56% on the 10th day, which was significantly higher than that with *M. anisopliae* infection alone. Similarly, the activities of POD, SOD, PO and AChE in *L. migratoria manilensis* all decreased significantly. These results indicated that the gene *FKBP46* could promote the infection of *M. anisopliae* by inhibiting the activity of protective enzymes and detoxifying enzymes in *L. migratoria manilensis*.

Key words: *Locusta migratoria manilensis*; FK506 binding protein (FKBP); protective enzyme; *Metarhizium anisopliae*

蝗虫隶属于直翅目蝗亚目,为不完全变态昆虫,广泛分布于温带至热带地区,是世界性的重大经济害虫,几乎所有国家均遭受过蝗灾侵袭。2000年以来,全球气候变化生物效应逐渐显现,加之人类对自然资源的过度开发,蝗灾呈持续偏重发生(于红妍和石旺鹏,2020)。如2020年伊始,沙漠蝗 *Schistocerca gregaria* 灾害席卷了从非洲大陆到阿拉伯半岛、西南亚等20多个国家(赵紫华等,2020)。目前防治蝗虫的方法主要是以有机农药为主的化学防治和以绿僵菌为主的生物防治,化学农药的长期使用带来了生态环境和农产品污染、天敌被大量误杀、蝗虫抗药性增强、人类健康受到严重威胁等诸多负面影响(Lomer et al., 2001)。以绿僵菌为主的生物防治对人畜无害,且无残留、无抗药性等问题,广泛应用于农业生产中的蝗虫防治。

金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 是一类非常重要的昆虫病原真菌,在农林害虫生物防治中应用广泛(Quesada-Moraga et al., 2006),其侵染机制主要是通过分生孢子附着在昆虫体壁后,形成附着胞和穿透钉,在蛋白酶、几丁质酶和脂酶等一系列胞外酶的作用下,穿过体壁进入体腔形成虫菌体,消耗寄主营养,大量繁殖,并分泌多种毒素,最终导致昆虫死亡(Gillespie et al., 2000)。金龟子绿僵菌制剂可以侵染包括东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis*、西藏飞蝗 *Locusta migratoria tibetensis* 和亚洲小车蝗 *Oedaleus decorus asiaticus* 在内的多种蝗虫,能够有效控制田间蝗虫为害(Milner et al., 2003),但与化学防治相比,其存在致死效率低、致死时间长的弊端(Lomer et al., 1997),在一定程度上限制了绿僵菌

的推广应用。

FK506 结合蛋白(FK506 binding protein, FKBP)是一类以胞内蛋白为主的蛋白质超家族,具有肽基-脯氨酰基-顺反异构酶(peptidyl-prolyl-cis-trans-isomerase, PPIase)活性,PPIase能够催化多肽或蛋白质底物中脯氨酸残基N端肽键的构象由顺式转为反式,是蛋白质折叠过程中的一个限速步骤,进而影响底物活性、蛋白质间相互作用和磷酸化状态(Harrar et al., 2001; Galat, 2003; Barik, 2006)。当FK506与FKBP结合后,FK506特有的立体化学结构会抑制FKBP的PPIase活性(Xu et al., 2002; Yu et al., 2012)。FKBP和FK506的二元复合体可抑制钙调磷酸酶的活性,阻止活化T细胞核因子核易位,使免疫细胞产生免疫抑制作用(Geisler & Bailly, 2007)。此外,FKBP参与调控多种细胞过程,包括蛋白质折叠、分子伴侣、受体信号传导、转录和细胞凋亡(Jayaraman et al., 1992; Wang et al., 2007)。东亚飞蝗是世界性的重大经济害虫,在长期进化过程中形成了一套独特的天然免疫系统,使其能够扩大分布、抵御逆境,并抵抗病原微生物的侵染(Wang et al., 2013)。FKBP作为一种免疫调节蛋白,具有调节细胞周期、调节生长发育、调控细胞凋亡以及调节钙离子通道活性等功能(Wang et al., 2005)。推测在绿僵菌侵染过程中,增加FKBP可能会抑制东亚飞蝗免疫反应,缩短绿僵菌侵染周期,提高对蝗虫的致死效率。因此,本研究通过克隆*FKBP46*基因并测定其在东亚飞蝗不同组织和不同虫态中的表达情况,以及FKBP46蛋白对金龟子绿僵菌侵染东亚飞蝗的能力和对东亚飞蝗体内免疫相关酶活性的影响,明

确 *FKBP46* 基因对东亚飞蝗免疫的抑制作用, 以期
为绿僵菌高效生防制剂的研发提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株: 金龟子绿僵菌菌株 IMI330189 为本
实验室长期保藏, 将菌株接种到马铃薯葡萄糖琼脂
酵母 (potato dextrose agar yeast, PDAY) 培养基上,
28℃ 下培养 15 d, 收集分生孢子粉, 密封贮存于 4℃
冰箱, 备用。

供试昆虫及小麦: 东亚飞蝗为本实验室饲养纯
化种群, 在温度 (30±2)℃、相对湿度 (60±5)%、光周
期 14 L: 10 D 的人工气候培养箱中孵化, 将同一时
间孵化、大小一致的蝗蛹转移到长 60 cm×宽 50 cm×
高 70 cm 的养虫笼中, 在光周期 14 L: 10 D、温度 (30±
2)℃、相对湿度 60% 条件下饲养。试验所用小麦品
种为京冬 12, 购自中国农业科学院廊坊科研中试基
地, 在温度 (25±2)℃、相对湿度 (70±5)%、光周期
16 L: 8 D 的人工气候培养箱中培养至 1 叶期供饲。

培养基: PDAY 培养基成分为马铃薯 200 g、蔗
糖 20 g、酵母粉 5 g、琼脂粉 20 g, 蒸馏水定容至 1 L,
121℃ 高压灭菌 15 min; LB (Luria-Bertani) 液体培养
基成分为酵母粉 5 g、胰蛋白胨 10 g、氯化钠 10 g, 蒸
馏水定容至 1 L, 在 121℃ 高温高压下灭菌 15 min (张
彦丰, 2015)。

试剂: LA-*Taq* 酶、PrimeScript™ RT Reagent Kit
with gDNA Eraser、TRIzol、限制性内切酶 *Bam*HI 和
*Hind*III、pMD19-T 载体、SYBR Premix Ex *Taq*™ II
(Tli RNaseH Plus), 日本 TakaRa 公司; 蛋白 Marker、
大肠杆菌 *Escherichia coli* 感受态细胞 BL21 (DE3)
和 Ni-NTA 亲和层析柱, 北京全式金生物有限公司;
质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒, 北京天漠科技开
发有限公司; 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase,
SOD)、过氧化物酶 (peroxidase, POD) 检测试剂盒,
南京建成生物工程研究所; 载体 pET-21b 和大肠杆菌
感受态细胞 DH5α 为本实验室保存; 其余试剂均为
国产分析纯。

仪器: PRX-250B-30 智能人工气候箱, 宁波海
曙赛福实验仪器厂; ETC-811 PCR 仪, 北京东胜创新
生物科技有限公司; Sigma3K15 低温冷冻离心机, 德
国 Sigma 公司; HPX-9052MBE 数显电热培养箱, 上
海博迅实业有限公司医疗设备厂; ABI Fast 7500 荧
光定量 PCR 仪, 美国 Applied Biosystems 公司; Nano-
Photometer NP80 超微量分光光度计, 德国 Implen 公

司; VERSAmax 全波长酶标仪, 美国 Molecular De-
vice 公司; 96 孔酶标板, 北京威莱博生物技术有限
公司; DYY-6C 核酸电泳仪, 北京六一仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 东亚飞蝗 *FKBP46* 基因的克隆

采用 Trizol 法 (Rio et al., 2010) 提取东亚飞蝗成
虫总 RNA 并反转录为 cDNA, 以 cDNA 作为模板、
FKBP46-F/*FKBP46*-R 为引物扩增 *FKBP46* 基因 (表
1), 所有引物均由生工生物工程 (上海) 股份有限公
司合成。25 μL PCR 反应体系: cDNA 模板 1 μL、
dNTP 2 μL、10×PCR Buffer 2.5 μL、*Taq* DNA Poly-
merase 0.5 μL、10 μmol/L 上下游引物各 1 μL、
ddH₂O 17 μL。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 5 min;
94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 90 s, 扩
增 30 个循环; 72℃ 总延伸 10 min; 4℃ 保存。PCR 产
物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 切胶回收纯化, 并连
接到 pMD19-T 载体。采用热激转化法导入大肠杆菌
感受态细胞 DH5α 中; 通过氨苄青霉素进行抗性筛
选, 获得阳性克隆进行菌液 PCR 验证, 并送生工生
物工程 (上海) 股份有限公司测序。采用 DNAMAN
软件进行目的基因核酸序列翻译以及编码蛋白质序
列结构分析预测; 利用 SignalP 在线软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 分析信号肽; 采用
<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam> 在
线工具预测蛋白分子量。运用在线软件 SMART
(<http://smart.emblheidelberg.de/smart/set>) 分析保守
结构域, 利用 NCBI 数据库中 BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行氨基酸序列同源性
分析。

1.2.2 目的蛋白的表达与纯化

取 1.2.1 测序正确的转化子, 参照质粒提取试剂
盒说明书提取质粒, 以该质粒为模板、*FKBP46*-F/
FKBP46-R 为引物扩增 *FKBP46* 基因 (表 1), PCR 反
应体系与程序同 1.2.1。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶
电泳检测、回收, 用 *Bam*HI 和 *Hind*III 进行双酶切。
酶切产物经纯化回收后插入 pET-21b 载体, 通过热
激转化法转入大肠杆菌感受态细胞 BL21 (DE3)。
将筛选获得的阳性克隆在含有终浓度为 50 mg/mL
氨苄青霉素的 LB 液体培养基中于 37℃ 培养至
OD_{600 nm} 为 0.5~0.6 时, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的
异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (isopropyl β-D-1-thio-
galactopyranoside, IPTG), 20℃ 诱导表达 12 h。离
心收集菌体; 300 W 下超声波破碎 5 s, 暂停 5 s, 重
复 99 个循环后, 于 4℃、8 000 r/min 条件下离心 15
min, 取上清

液用亲和层析柱进行蛋白纯化,采用SDS-PAGE电泳检测纯化蛋白,并用pH 8.0的20 mmol/L Tris-HCl缓冲液稀释至终浓度为1 mg/mL,备用。采用相同的处理方法,从含有pET-21b空载体的BL21(DE3)菌株中提取目的蛋白作为阴性对照。

1.2.3 FKBP46基因表达量的测定

采用Trizol法提取东亚飞蝗雌雄成虫不同组织(体壁、后足、血淋巴、脂肪体、中肠、精巢、卵巢)和不同发育阶段(卵块、1龄蝗蛹虫体、2~5龄蝗蛹和成虫中肠)样品的RNA,并用超微量分光光度计测定各样品RNA的浓度和纯度,即 $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 比值在1.9~2.2之间,采用PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒,按照使用说明合成cDNA第1链,−80℃保存备用。

基于NCBI中已经公布的昆虫FKBP基因序列,

结合本实验室前期测得的东亚飞蝗转录组数据,获得FKBP46基因的DNA序列,利用DNAMAN 6.0软件设计荧光定量PCR扩增引物及基因表达所需引物(表1)。以肌动蛋白 β -actin作为内参基因、QF/QR为引物进行qPCR扩增,检测FKBP46基因在东亚飞蝗成虫不同组织、不同发育期中肠内的相对表达量。20 μ L反应体系:cDNA 1 μ L、SYBR Green qPCR Master Mix 10 μ L、10 μ mol/L上下游引物各1 μ L、超纯水7 μ L。反应条件:95℃预变性2 min;95℃变性15 s,60℃退火1 min,扩增40个循环。每个样本设3个生物学重复,采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法(王峰,2018),分别以FKBP46基因在雄成虫体壁和1龄蝗蛹中的表达量为标准参量对目的基因表达量进行分析(袁国瑞等,2016;张晓红等,2019)。

表1 所用引物及其序列
Table 1 Primers and sequences

基因 Gene	引物 Primer	序列(5′-3′) Sequence (5′-3′)	用途 Purpose
β -actin	ActinF	GTTACAAACTGGGACGACAT	内参基因
	ActinR	AGAAAGCACAGCCTGAATAG	qPCR reference gene
FKBP46	QF	ACTTTGAGGCAGGAGACAGG	定量检测
	QR	TCCCACACTCTTCCGCTTT	RT-qPCR
FKBP46	FKBP46-F	CGGGATCCGATGTTTGGGCACTTGTTTGG	基因克隆
	FKBP46-R	CCCAAGCTTGTATTACATTCTTTAGTTCCAC	Cloning of the target gene

下划线分别为BamH I和Hind III酶切位点。BamH I and Hind III restriction enzyme cutting sites are underlined.

1.2.4 FKBP46蛋白对金龟子绿僵菌侵染能力的影响

称取0.5 g金龟子绿僵菌菌株IMI330189孢子粉于0.05%吐温80溶液中振荡混匀,随后用血球计数板计数,加0.05%吐温80溶液稀释至终浓度为 4.15×10^9 个/mL,备用。称取灭菌干麦麸,按质量比5%加入植物油,然后按照质量体积比1:1加入FKBP46蛋白液,即1 g无菌麦麸+1 mL终浓度为1 mg/mL的FKBP46蛋白液,混匀后得到FKBP46蛋白饵剂,采用相同方法,利用1.2.2中阴性蛋白制作对照饵剂,备用。

取同一批次的东亚飞蝗3龄蝗蛹,预先饥饿处理12 h后按照30头/筐放入长30 cm×宽12 cm×高9 cm的无菌生测筐中,用已消毒玻璃板盖好,置于温度30℃、光周期16 L:8 D、相对湿度60%的生测室内,备用。分别设金龟子绿僵菌菌株IMI330189孢子悬浮液和FKBP46蛋白饵剂单独处理以及两者共同处理,其中菌株IMI330189孢子悬浮液采用背板点滴法进行处理,用移液管在每头蝗蛹中胸背板点滴2 μ L,相当于每头蝗虫接种 8.3×10^6 个孢子;FK-

BP46蛋白饵剂直接饲喂,每个重复饲喂饵剂1 g;两者共同处理中,先在每头蝗蛹中胸背板点滴2 μ L金龟子绿僵菌IMI330189孢子悬浮液后,立即饲喂FKBP46蛋白饵剂,每个重复饲喂饵剂1 g。以同时进行0.05%吐温80溶液2 μ L背板点滴和饲喂对照饵剂为对照,方法同上。所有处理和对照均重复5次,每个重复30头蝗蛹。根据试验设计,饲喂24 h后将饵剂取出,以新鲜麦苗饲喂至试验结束,每日记录蝗虫的死亡数与存活数,连续统计10 d。

1.2.5 FKBP46蛋白对东亚飞蝗免疫相关酶活性的影响

将预先饥饿处理12 h的3龄蝗蛹按照15头/筐放入长30 cm×宽12 cm×高9 cm的无菌生测筐中,参照1.2.4方法处理蝗蛹,每个处理重复3次,每个重复15头。处理后第2天从每个处理的3个重复中各取1头蝗蛹,解剖虫体收集中肠组织放入无菌玻璃匀浆器中,加入1 mL预冷的0.7%生理盐水,冰上研磨充分,于4℃、12 000 r/min条件下离心15 min,取上清液作为酶提取液,用于相关酶活性的测定。每个酶提取液总蛋白浓度测定参照Bradford考马斯亮蓝

方法,以牛血清白蛋白为标准蛋白制作标准曲线,用酶标仪在 595 nm 处读取每个样品的 OD 值,计算酶液样品中的蛋白含量,用于酶活性的计算。

POD 和 SOD 的活性测定方法参照试剂盒使用说明进行,每个样品重复 3 次。以在 37℃ 条件下每毫克蛋白每分钟催化 1 μ g 底物的酶量定义为 1 个 POD 活力单位(U/mg),以每毫克蛋白在 1 mL 反应液中抑制率达 50% 时的酶量为 1 个 SOD 活力单位(U/mg)。

酚氧化酶(phenoloxidase, PO)活性测定参照罗万春和薛超彬(2010)方法并加以优化,在 96 孔酶标板中分别加入酶液 20 μ L 和 10 mmol/L 邻苯二酚 180 μ L。迅速置于 37℃ 的酶标仪中,在 420 nm 波长下测定光密度值,间隔 1 min 记录 1 次,共记录 1 h,重复 3 次,数据记录和处理由仪器自带 Softmax Pro 6.1 软件进行,酶活力单位为 OD $\cdot$ min $^{-1}\cdot$ mg $^{-1}$ 。

乙酰胆碱酯酶(acetyl cholinesterase, AchE)活性的测定参照 Han et al.(1998)方法并稍加改动,在 96 孔酶标板加样孔中依次加酶液 50 μ L、0.1 mol/L 的 pH 7.0 磷酸盐缓冲液 50 μ L、45 μ mol/L 二硫代二硝基苯甲酸 100 μ L 和 1.5 mmol/L 碘代乙酰胆碱 100 μ L。迅速置于 37℃ 酶标仪中,在 405 nm 波长下,每隔 25 s 记录 1 次光密度值,共记录 15 min,数据的记录及处理由仪器自带 Softmax Pro 6.1 软件进行,酶活力单位为 OD $\cdot$ min $^{-1}\cdot$ mg $^{-1}$ 。

1.3 数据分析

采用 SPSS 19.0 软件对试验数据进行单因素方差分析,应用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 东亚飞蝗 *FKBP46* 基因克隆结果

通过 PCR 扩增得到 *FKBP* 基因全长序列,长度为 1 200 bp,编码 400 个氨基酸,通过 NCBI 序列比对确定其为东亚飞蝗 *FKBP* 基因,将其命名为 *FKBP46*。利用 SMART 的序列工具分析 *FKBP46* 氨基酸序列,结果显示 *FKBP46* 蛋白在第 306~397 位氨基酸之间存在 *FKBP_C* 超家族保守结构域(图 1),属于 *FKBP_C* 超家族成员之一。

2.2 目的蛋白的表达与纯化

将 *FKBP46* 基因插入表达载体 pET-21b 中获得重组表达载体 pET21b-*FKBP46*,将其导入大肠杆菌 BL21(DE3)后,经 IPTG 诱导表达,获得目的蛋白 *FKBP46*。经过 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测分

析,蛋白分子量大小为 55 kD,与预期大小相符。大量提取蛋白,经镍柱亲和层析纯化,得到 *FKBP46* 纯蛋白(图 2)。

```

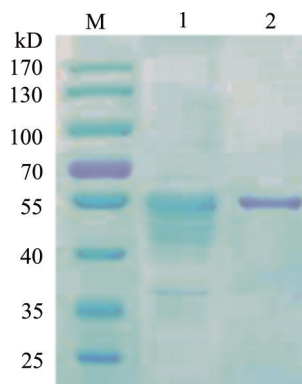
1  MFWALVLEPG KKYAQTIVSKP FHISMASLDV VHSNELVTV
41  NVNFQNAEFI LCNLQKNKIL QTSLLDNFEA GDRIAFYTSG
81  KGRVHLTGYL IDDDVDVDDL DIDAEAESE EDVTPQKNAI
121 KANKQEKRRS VGQTPGKPVV KSKMDSEDE DGDDGDGDFD
161 DDGDSLESL GDSDEEMVEV SEEDDGEDE DSELEETPPQ
201 KHQQGKKKEK QSAKQLQDK QTNPNEMKK KKNKGHDAAT
241 PNTPTVQANG TPETQSGKKK KKGGETPGD KGANTPKPPQ
281 AGSPQTPQKK LLEGGVAVED TVVSGGPVAK PGRFVTVYYT
321 GRLKQNNKKF DETVQGPQFK FRLKGGEVIK GWDIGVTGMK
361 VGGKRKLIIP PHMAYGAKGS PPVIPPNSAL VFEVELKNVN

```

图 1 东亚飞蝗 *FKBP46* 蛋白氨基酸序列及保守结构域所在位置

Fig. 1 Amino acid sequence of *FKBP46* protein of *Locusta migratoria manilensis* and the conserved domains

图中下划线所示为 *FKBP_C* 超家族保守结构域。*FKBP_C* superfamily conserved domains are underlined.



M: 蛋白标准分子量; 1: IPTG 诱导上清液; 2: 纯化 *FKBP46* 蛋白。M: Protein marker; 1: the supernatant after IPTG induction; 2: purified *FKBP46*。

图 2 东亚飞蝗重组蛋白 *FKBP46* 的表达分析及纯化

Fig. 2 Expression analysis and protein purification of *FKBP46* protein in *Locusta migratoria manilensis*

2.3 *FKBP46* 基因的时空表达谱

FKBP46 基因在东亚飞蝗雌雄成虫的足、体壁、中肠、血淋巴、脂肪体、精巢和卵巢中均有表达,其中在雄成虫脂肪体中的表达量最高,是雄成虫体壁中表达量的 1.77 倍;其次为在雌成虫中肠中的相对表达量,是雄成虫体壁中表达量的 1.61 倍;但雌、雄成虫中肠中的相对表达量无显著差异($F=0.56, P>0.05$)。*FKBP46* 基因在雌成虫脂肪体中的相对表达量也较高,为雄成虫体壁中表达量的 1.43 倍,与雄成虫脂肪体中的表达量差异显著($F=137.92, P<0.05$)。*FKBP46* 基因在雌、雄成虫足中的表达量分别为雄成虫

体壁中表达量的86.43%和81.89%,在雌、雄成虫血淋巴中的表达量相对较少(图3-A)。FKBP46基因在雌、雄成虫体壁中的表达量无显著差异。

FKBP46基因在东亚飞蝗卵块、1龄蝗蛹虫体、2~5龄蝗蛹及成虫中肠中都有表达,在成虫中肠中的表达量最高,为1龄蝗蛹中表达量的6.84倍,显著

高于在其他龄期的表达量($F=95.80, P<0.05$)。其次为卵期的表达量,是1龄蝗蛹中表达量的4.88倍;在3龄、2龄、4龄、5龄蝗蛹中肠中的表达量相对稳定,分别约为1龄蝗蛹中表达量的78.33%、74.04%、52.38%和47.25%,表明该基因主要在东亚飞蝗成虫中肠和卵中表达(图3-B)。

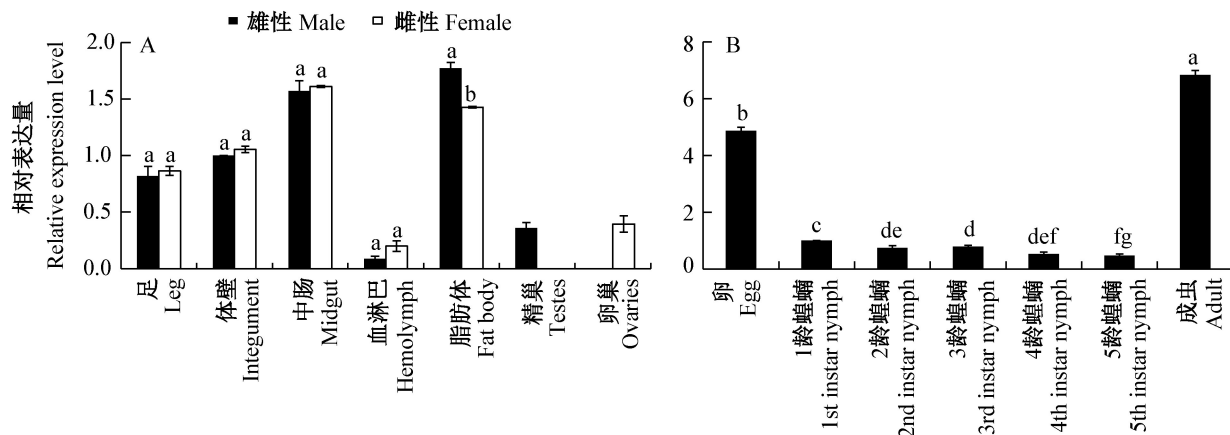


图3 FKBP46基因在东方飞蝗不同组织(A)和不同发育期(B)的表达水平

Fig. 3 Expression analysis of FKBP46 gene in different tissues (A) and developmental stages (B) of *Locusta migratoria manilensis*

图中数据为平均数±标准误。不同小写字母表示经Duncan's新复极差法检验在 $P<0.05$ 差异显著。Data in the figure are mean±SE. Different lowercase letters on the bars indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

2.4 FKBP46蛋白对金龟子绿僵菌感染东亚飞蝗的影响

单独用FKBP46蛋白饵料饲喂东亚飞蝗后,第10天其累计死亡率为1.11%,与对照组(1.11%)无显著差异($F=0, P>0.05$)。单独使用金龟子绿僵菌处理时,东亚飞蝗累计死亡率随处理天数增加而不断上升,第10天达到60.00%,显著高于FKBP46蛋白单独处理组($F=200.54, P<0.05$)和对照组($F=200.54, P<0.05$)。使用金龟子绿僵菌与FKBP46蛋白同时处理东亚飞蝗时,其累计死亡率迅速上升,到第10天达到85.56%,显著高于金龟子绿僵菌单独处理组($F=40.65, P<0.05$;图4)。表明FKBP46蛋白可以显著提升金龟子绿僵菌对东亚飞蝗的致病力,提高杀虫效果。

2.5 FKBP46蛋白对东亚飞蝗相关酶活性的影响

2.5.1 对东亚飞蝗体内POD活性的影响

FKBP46蛋白单独处理东亚飞蝗后,其体内POD活性在第1、3、4、5天与对照之间无显著差异,只在第2天时显著低于对照。金龟子绿僵菌单独处理后,POD活性在第3天和第5天时显著高于对照,尤其是第3天POD活力达到最高,为11.61 U/mg,是同期对照的1.47倍;但在第2天却显著低于对照;其余时间与对照均无显著差异。FKBP46蛋白与金龟子绿僵菌共同处理后,POD活性除在第1天与对照

无显著差异外,在第2~5天均显著低于对照组,且在第3~5天均显著低于金龟子绿僵菌单独处理(图5-A)。

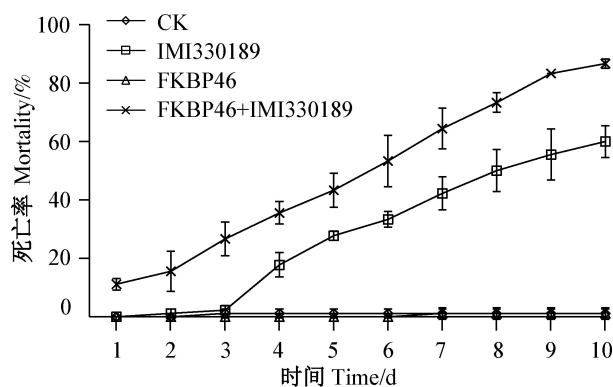


图4 不同处理条件下东亚飞蝗的累计死亡率

Fig. 4 Mortalities of *Locusta migratoria manilensis* in different treatments

图中数据为平均数±标准误。Data are mean±SE.

2.5.2 对东亚飞蝗体内SOD活性的影响

在FKBP46蛋白单独处理东亚飞蝗后,其体内SOD活性在第3天达到最高,为对照的1.29倍,其余时间下与对照之间均无显著差异。金龟子绿僵菌单独处理后,SOD活性在第3天和第5天时显著高于对照,尤其是第3天时达到最高,为10.77 U/mg,是

对照的1.47倍;但在第2天显著低于对照,其余时间下与对照之间无显著差异。FKBP46蛋白与金龟子绿僵菌共同处理后,SOD活性在第1天显著高于对照组,为对照的1.15倍;但在第3~5天显著低于金龟子绿僵菌单独处理,且从第1天开始呈现持续降低的趋势(图5-B)。

2.5.3 对东亚飞蝗体内PO活性的影响

FKBP46蛋白单独处理东亚飞蝗后,其体内PO活性在第1天时显著低于对照,在第2、4、5天与对照之间无显著差异,但在第3天显著高于对照。金龟子绿僵菌单独处理后,PO活性在第2天和第4天显著高于对照,尤其是第4天时PO活性达到最高,为 $14.21 \text{ OD} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$,是对照的2.07倍;但在第3天

和第5天均显著低于对照。FKBP46蛋白与金龟子绿僵菌共同处理后,从第1天到第5天PO活性均显著低于对照与金龟子绿僵菌单独处理(图5-C)。

2.5.4 对东亚飞蝗AchE活性的影响

FKBP46蛋白单独处理东亚飞蝗后,其体内AchE活性除在第1天与对照之间无显著差异外,其余时间下均显著低于对照。金龟子绿僵菌单独处理后,AchE活性除第3天外均显著高于对照;尤其是第2天时AchE活性达到最高,是对照的1.61倍,为 $17.32 \text{ OD} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。FKBP46蛋白与金龟子绿僵菌共同处理后,AchE活性均低于金龟子绿僵菌单独处理,并且在第1、2、4、5天差异显著(图5-D)。

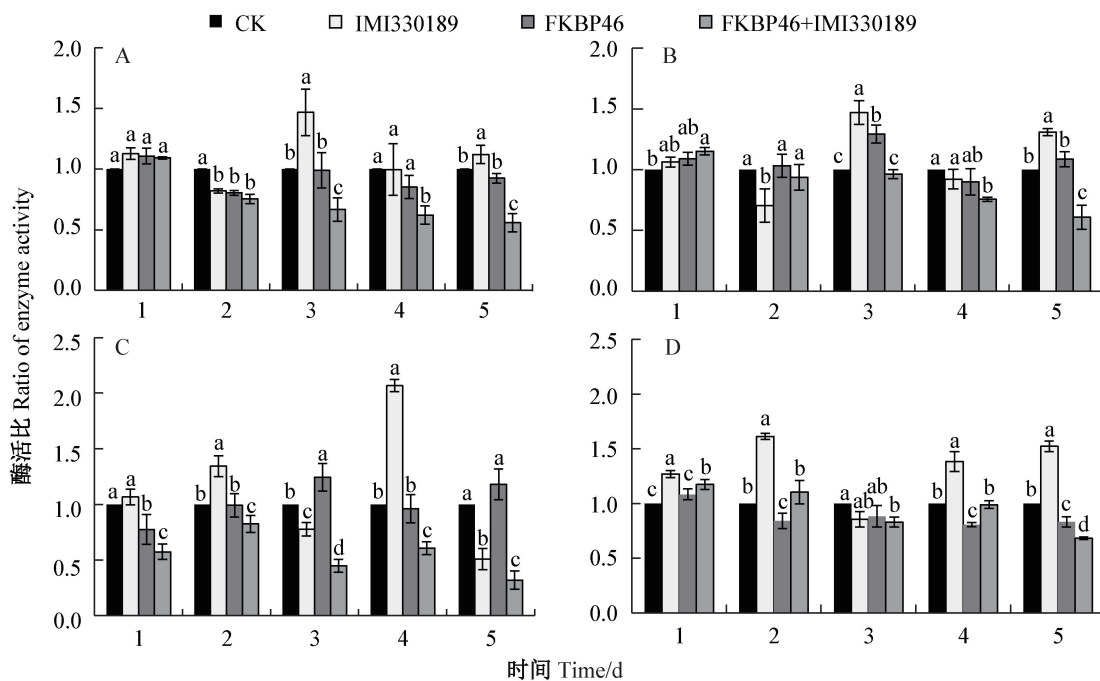


图5 FKBP46蛋白处理后东亚飞蝗POD(A)、SOD(B)、PO(C)和AchE(D)的活性

Fig. 5 The activities of POD (A), SOD (B), PO (C) and AchE (D) after treatment with FKBP46 protein

图中数据为平均数±标准误。相同时间下不同小写字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P < 0.05$ 差异显著。Data in the figure are mean±SE. Different lowercase letters at the same time indicate significant differences at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

3 讨论

本试验克隆得到了1条长度为1 200 bp、具有完整FKBP_C结构域的序列,经过生物信息学分析,确定该基因属于FKBP_C超家族成员;通过原核表达纯化获得FKBP46蛋白,该蛋白分子量为55 kD,与预测的分子量大小一致,为制备特异性抗体和深入研究该蛋白功能提供理论基础。通过对FKBP46基因在东亚飞蝗成虫不同组织和不同发育期的表达量

分析,发现FKBP46基因在脂肪体和中肠中的表达量相对较高。脂肪体作为体液免疫的主要场所,分泌合成许多免疫相关蛋白(Kimbrell, 1991)。因此,推测FKBP46基因对东亚飞蝗免疫反应有着重要作用。FKBP46基因在东亚飞蝗各生长发育阶段均有表达,卵期与成虫期的表达量明显高于幼虫期,在幼虫期的表达量基本相对稳定,这与FKBP基因在家蚕*Bombyx mori*不同发育期的表达趋势相一致(Li et al., 2015),说明该基因在东亚飞蝗生长发育过程

中具有重要作用, 研究结果将为开展昆虫 *FKBP46* 基因功能多样性研究提供基本数据和理论支撑。

昆虫病原真菌的侵染会诱导寄主产生大量的活性氧, 对虫体造成伤害, 引起寄主体内脂质过氧化、能量代谢失衡和DNA突变等。SOD、过氧化氢酶(catalase, CAT)和POD作为昆虫体内氧化自由基的清除系统, 能够协调体内氧自由基处于一种动态平衡状态, 使虫体免受伤害(Medzhitov & Janeway, 1997)。PO作为一种重要的体液免疫因子, 在黑化反应中扮演着重要角色(Roelvink et al., 1995; Duan & Otvos, 2001)。AChE是一种重要的解毒酶, 能将昆虫体内有毒的次生代谢物质转化为无毒性物质(唐振华, 1993), 王龙江等(2010)研究发现, 红火蚁 *Solenopsis invicta* 被球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 侵染后其体内POD和AChE的活性表现出先上升后下降的趋势, SOD和CAT的活性一直高于对照。张彦丰(2015)研究结果表明, 金龟子绿僵菌侵染能使蝗虫体内保护酶SOD、POD和PO活力呈现先升高后降低的趋势, 蝗虫自身免疫能力下降, 最终导致蝗虫死亡。本研究发现FKBP46蛋白与金龟子绿僵菌共同饲喂东亚飞蝗后可以使其死亡率大大提高, 且蝗虫体内的保护酶和解毒酶活性都比金龟子绿僵菌单独处理显著降低, 表明FKBP46蛋白能够有效抑制免疫相关酶的活性, 降低蝗虫免疫能力, 从而促进金龟子绿僵菌的侵入, 提高对蝗虫的致死效果。

Li & Pascale(2015)研究发现, 钙调磷酸酶能够与Toll通路下游Dorsal结合并使其去磷酸化, 使转录因子Dif转移至细胞核, 促进防御素、防卫素、抗菌肽等基因的表达。Jain et al.(1993)研究结果表明, FKBP和FK506的二元复合体可与钙调神经磷酸酶相互作用, 阻止去磷酸化的T细胞转录因子向细胞核内迁移启动转录级联反应, 抑制机体免疫反应。因此, 推测FKBP作为钙调磷酸酶抑制因子会影响飞蝗体液免疫Toll途径级联反应, 抑制飞蝗的免疫反应, 加快金龟子绿僵菌的侵染, 这为绿僵菌制剂的研制和蝗虫防治提供了新思路。

参 考 文 献 (References)

- Barik S. 2006. Immunophilins: for the love of proteins. *Cellular and Molecular Life Science*, 63(24): 2889–2900
- Duan L, Otvos IS. 2001. Influence of larval age and virus concentration on mortality and sublethal effects of a nucleopolyhedrovirus on the western spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). *Environmental Entomology*, 30(1): 136–146
- Galat A. 2003. Peptidylprolyl cis/trans isomerases (immunophilins): biological diversity – targets – functions. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 3(12): 1315–1347
- Geisler M, Bailly A. 2007. Tête-à-tête: the function of FKBP in plant development. *Trends in Plant Science*, 12(10): 465–473
- Gillespie JP, Bailey AM, Cobb B, Vilcinskis A. 2000. Fungi as elicitors of insect immune responses. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 44(2): 49–68
- Han ZJ, Moores GD, Denholm I, Devonshire AL. 1998. Association between biochemical markers and insecticide resistance in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 62(3): 164–171
- Harrar Y, Bellini C, Fauer JD. 2001. FKBP: at the crossroads of folding and transduction. *Trends in Plant Science*, 6(9): 426–431
- Jain J, McCaffrey PG, Miner Z, Kerppola TK, Lambert JN, Verdine GL, Curran T, Rao A. 1993. The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature*, 365(6444): 352–355
- Jayaraman T, Brillantes AM, Timerman AP, Fleischer B S, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Marks AR. 1992. FK506 binding protein associated with the calcium release channel (ryanodine receptor). *Journal of Biological Chemistry*, 267(14): 9474–9477
- Kimbrell DA. 1991. Insect antibacterial proteins: not just for insects and against bacteria. *BioEssays*, 13(12): 657–663
- Li S, Fei JJ, Cheng DD, Jin YF, Zhang WP, Zhang YZ, Lv ZB. 2015. Bioinformatics, tissue distribution, and subcellular localization analyses of FK506 binding protein 12B from silkworms. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 91(2): 109–123
- Li YX, Pascale F. 2015. Specific calcineurin isoforms are involved in *Drosophila* toll immune signaling. *Journal of Immunology*, 194(1): 168–176
- Lomer CJ, Bateman RP, Johnson DL, Langewald J, Thoms M. 2001. Biological control of locusts and grasshoppers. *Annual Review of Entomology*, 46: 667–702
- Lomer CJ, Prior C, Kooyman C. 1997. Development of *Metarhizium* spp. for the control of grasshoppers and locusts. *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, 129(S171): 265–286
- Luo WC, Xue CB. 2010. Insect phenol oxidase and its inhibitor. Beijing: Science Press (in Chinese) [罗万春, 薛超彬. 2010. 昆虫酚氧化酶及其抑制剂. 北京: 科学出版社]
- Medzhitov R, Janeway CA Jr. 1997. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, 91(3): 295–298
- Milner RJ, Lozano LB, Driver F, Hunter D. 2003. A comparative study of two Mexican isolates with an Australian isolate of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*: strain characterisation, temperature profile and virulence for wingless grasshopper, *Phaulacridium vittatum*. *BioControl*, 48(3): 335–348
- Quesada-Moraga E, Carrasco-Díaz JA, Santiago-Álvarez C. 2006. Insecticidal and antifeedant activities of proteins secreted by entomopathogenic fungi against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). *Journal of Applied Entomology*, 130(8): 442–452

- Rio DC, Ares M Jr., Hannon GJ, Nilsen TW. 2010. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). Cold Spring Harbor Protocols, 2010 (6): doi: 10.1101/pdb.prot5439
- Roelvink PW, Corsaro BG, Granados RR. 1995. Characterization of the *Helicoverpa armigera* and *Pseudaletia unipuncta* granulovirus enhancer genes. Journal of General Virology, 76(11): 2693–2705
- Tang ZH. 1993. Insect resistance and its management. Beijing: China Agriculture Press (in Chinese) [唐振华. 1993. 昆虫抗药性及其治理. 北京: 中国农业出版社]
- Wang F. 2018. *Metarhizium anisopliae* induced peanut roots response to establish endosymbiosis. Master thesis. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences (in Chinese) [王峰. 2018. 金龟子绿僵菌诱导花生根建立共生的研究. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院]
- Wang HQ, Nakaya Y, Du ZY, Yamane T, Shirane M, Kudo T, Takeda M, Takebayashi K, Noda Y, Nakayama KI, et al. 2005. Interaction of presenilins with FKBP38 promotes apoptosis by reducing mitochondrial Bcl-2. Human Molecular Genetics, 14(13): 1889–1902
- Wang LJ, Lü LH, Xie MQ, He YR. 2010. Changes of activities of protective enzyme and detoxification enzyme in *Solenopsis invicta* Buren infected by *Beauveria bassiana*. Journal of Huazhong Agricultural University, 29(3): 282–286 (in Chinese) [王龙江, 吕利华, 谢梅琼, 何余容. 2010. 红火蚁感染白僵菌后体内保护酶和酯酶活性的变化. 华中农业大学学报, 29(3): 282–286]
- Wang Y, Han RF, Wu D, Li J, Ma H, Mi HF. 2007. The binding of FKBP23 to BiP modulates BiP's ATPase activity with its PPIase activity. Biochemical & Biophysical Research Communications, 354(1): 315–320
- Wang YD, Yang PC, Cui F, Kang L. 2013. Altered immunity in crowded locust reduced fungal (*Metarhizium anisopliae*) pathogenesis. PLoS Pathogens, 9(1): e1003102
- Xu XH, Su B, Barndt RJ, Chen HY, Xin HB, Yan GF, Chen LY, Cheng DS, Heitman J, Zhuang Y, et al. 2002. FKBP12 is the only FK506 binding protein mediating T-cell inhibition by the immunosuppressant FK506. Transplantation, 73(11): 1835–1848
- Yu YL, Zhang H, Li WC, Mu CH, Zhang FJ, Wang LM, Meng ZD. 2012. Genome-wide analysis and environmental response profiling of the FK506-binding protein gene family in maize (*Zea mays* L.). Gene, 498(2): 212–222
- Yuan GR, Yang WJ, Xu KK, Wang JJ. 2016. Identification and expression profiling of nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 9$ subunit gene in *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). Acta Entomologica Sinica, 59(11): 1189–1198 (in Chinese) [袁国瑞, 杨文佳, 许抗抗, 王进军. 2016. 橘小实蝇 nAChR $\alpha 9$ 亚基基因的鉴定及其时空表达. 昆虫学报, 59(11): 1189–1198]
- Yu HY, Shi WP. 2020. Outbreak, monitoring and control technology of desert locust *Schistocerca gregaria*. Journal of Plant Protection, <https://doi.org/10.13802/j.cnki.zwbhxb.2020.2020801> (in Chinese) [于红妍, 石旺鹏. 2020. 沙漠蝗灾发生、监测及防控技术进展. 植物保护学报, <https://doi.org/10.13802/j.cnki.zwbhxb.2020.2020801>]
- Zhang XH, Feng L, Liu YC, Qiao N, Yin H. 2019. Cloning, prokaryotic expression and spatio-temporal expression profiling of the developmental gene *optomotor-blind* (*omb*) in *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae). Acta Entomologica Sinica, 62(1): 33–40 (in Chinese) [张晓红, 冯莉, 刘亚超, 乔宁, 印红. 2019. 飞蝗发育相关基因 *Omb* 的克隆、原核表达及时空表达分析. 昆虫学报, 62(1): 33–40]
- Zhang YF. 2015. Study of pathogenic mechanism in the midgut of *Locusta migratoria manilensis* infected by *Metarhizium anisopliae*. Master thesis. Urumqi: Xinjiang Agricultural University (in Chinese) [张彦丰. 2015. 绿僵菌对东亚飞蝗中肠致病机理的研究. 硕士学位论文. 乌鲁木齐: 新疆农业大学]
- Zhao ZH, Tu XB, Zhang ZH, Li ZH. 2020. The alert of population expansion of the desert locust *Schistocerca gregaria* and its risk to enter China. Journal of Plant Protection, <https://doi.org/10.13802/j.cnki.zwbhxb.2020.2020802> (in Chinese) [赵紫华, 涂雄兵, 张泽华, 李志红. 2020. 警惕沙漠蝗种群持续增加和入侵我国边境地区的风险. 植物保护学报, <https://doi.org/10.13802/j.cnki.zwbhxb.2020.2020802>]

(责任编辑:李美娟)