

FK506 结合蛋白 FKBP52 对金龟子绿僵菌 侵染东亚飞蝗的影响

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

(1. 河北农业大学植物保护学院, 保定 071001; 2. 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; 3. 农业农村部锡林郭勒草原有害生物科学观测实验站, 锡林浩特 026000)

摘要 为了明确东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* 免疫相关 FK506 结合蛋白 (FK506 binding protein, FKBP) 的功能, 本研究采用荧光定量 PCR 分析了 *FKBP52* 基因在成虫不同组织以及不同龄期中肠中的表达量; 克隆并表达了 *FKBP52* 基因, 纯化获得目的蛋白; 测定了 FKBP52 蛋白对金龟子绿僵菌 IMI330189 侵染东亚飞蝗及东亚飞蝗体内保护酶活性的影响。研究结果发现 *FKBP52* 基因在成虫不同组织中均有表达, 中肠中相对表达量最高; 在不同龄期的中肠中, 以卵期和成虫期的相对表达量较高。FKBP52 基因全长 1 242 bp, 编码蛋白分子量为 46 kDa。生测及酶活力测定结果表明, 金龟子绿僵菌 IMI330189 与 FKBP52 混合处理时, 东亚飞蝗第 10 天累计死亡率显著提高到 93.33%, 东亚飞蝗体内的保护酶活力均显著降低。上述结果表明, *FKBP52* 基因能够通过抑制东亚飞蝗体内保护酶活性, 促进金龟子绿僵菌 IMI330189 的侵染。

关键词 东亚飞蝗; FK506 结合蛋白; 金龟子绿僵菌; 保护酶

中图分类号: S 476.12 文献标识码: A DOI: 10.16688/j.zwbh.2020019

Effects of FK506-binding protein FKBP52 on *Metarhizium anisopliae* infesting *Locusta migratoria manilensis*

TIAN Ye^{1,2}, LI Beibei^{2,3}, LI Shuang^{2,3}, NONG Xiangqun^{2,3},
ZHANG Zehua^{2,3}, LIU Tinghui^{1*}, WANG Guangjun^{2,3*}

(1. College of Plant Protection, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China; 2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 3. Scientific Observing and Experimental Station of Pests in Xilingol Rangeland, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Xilinhot 026000, China)

Abstract In order to clarify the function of FK506-binding protein (FKBP) of immunity in *Locusta migratoria manilensis*, the expression of *FKBP52* gene in different tissues and midgut of different stages was analyzed by qPCR. The *FKBP52* gene was cloned and expressed, and the target protein was purified. The effect of FKBP52 protein on the protective enzyme activity of *L. migratoria manilensis* infected by *Metarhizium anisopliae* IMI330189 and the mortality were described. The study found that the *FKBP52* gene was expressed in different tissues of adults, and the relative expression was the highest in the midgut. In the midgut of different stages, the relative expression was higher at egg stage and adult stage. The full length of *FKBP52* gene was 1 242 bp, and the molecular weight of the encoded protein was 46 kDa. The results of bioassay and enzyme activity determination showed that, when *M. anisopliae* IMI330189 was mixed with FKBP52, the cumulative mortality of *L. migratoria manilensis* on the 10th day increased significantly to 93.33%, and the activity of protective enzymes decreased significantly. These results showed that *FKBP52* gene could promote the infection of *M. anisopliae* IMI330189 by

收稿日期: 2020-01-08

修订日期: 2020-03-13

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0200402); 国家外专局引智推广项目(GS20190156002); 现代农业产业技术体系(CRAS-34-07); 河北省现代农业产业技术体系草业创新团队专项资金(HBCT20181602032018160203)

* 通信作者 E-mail: 刘廷辉 liutinghui@126.com; 王广君 wangguangjun@caas.cn

inhibiting the activity of protective enzymes in *L. migratoria manilensis*.

Key words *Locusta migratoria manilensis*; FK506 binding protein; *Metarhizium anisopliae*; protective enzyme

FK506 结合蛋白(FK506 binding proteins, FK-BPs)是一类以胞内蛋白为主的蛋白质超家族,因其与 FK506(Prograf, 普乐可复)的相互作用而得名,它具有肽基脯氨酰顺反异构酶(PPIases)活性,可催化多肽或蛋白质底物中的肽-脯氨酸顺反子的转换,从而影响其活性、磷酸化状态、蛋白质间相互作用、亚细胞定位及稳定性^[1-3]。FKBPs 能够结合环孢素 a(CsA)、FK506 或雷帕霉素,发挥免疫抑制效应^[4-5]。在免疫细胞中,FKBPs 和 FK506 的二元复合体共同作用,抑制钙调磷酸酶(CaN)的活性,进一步作用于磷酸化信号途径,使免疫细胞产生免疫抑制作用^[6]。此外,FK506 结合蛋白还有许多其他重要生理功能,如细胞周期调节、钙离子通道活性调节以及发育调节等作用^[7-8]。

金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 作为一类广谱性的昆虫病原真菌,对害虫生物防治具有重要作用。其侵染方式主要有体壁侵入和体内增殖两种^[9]。其中体壁侵染机制是金龟子绿僵菌孢子附着在寄主体表后,形成附着胞和侵染钉,在一系列胞外酶的作用下,穿透体壁进入体腔,形成虫菌体,大量繁殖,消耗寄主营养,并分泌多种毒素,最终造成寄主死亡^[10]。研究发现,采用金龟子绿僵菌制剂可以有效控制蝗虫为害^[11],但与化学农药相比,存在致死效率低、致死时间长的弊端^[12]。其原因一方面是金龟子绿僵菌侵染所需时间较长,另一方面是东亚飞蝗具有较强的免疫防御反应^[13]。因此,我们推测可以通过改变蝗虫体内 FKBPs 的量,抑制东亚飞蝗免疫活性,促进金龟子绿僵菌侵染,达到加速蝗虫死亡的目的。

本试验通过定量 PCR 检测了 *FKBP52* 基因在东亚飞蝗不同组织中的表达情况,克隆了 *FKBP52* 基因,并获得了 FKBP52 蛋白,研究了其对金龟子绿僵菌侵染东亚飞蝗的影响,以及对东亚飞蝗体内免疫相关酶的诱导激活作用,为进一步明确 FKBP 的功能奠定了基础,同时对指导蝗虫防治具有一定的理论意义。

1 材料与方法

1.1 供试菌株、试虫与试剂

供试金龟子绿僵菌菌株 IMI330189 为国外引进

在本实验室长期保藏。培养条件:将菌株接种到 PDAY 培养基(马铃薯 200 g,蔗糖 20 g,酵母粉 5 g,琼脂粉 20 g,补水定容至 1 000 mL,121℃ 高压灭菌 25 min)^[14] 平板上,25℃ 下培养 5 d。收集分生孢子粉,密封贮存于 4℃ 冰箱,备用。

试验所用东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* 为本实验室饲养纯化种群,在人工气候培养箱中于温度(30±2)℃,相对湿度(60±5)%,光周期 L//D=14 h//10 h 条件下孵化后,将同一时间孵化的蝗蛹转移到 60 cm×50 cm×70 cm 规格的养虫笼中饲养,光周期 L//D=14 h//10 h,温度为(30±2)℃。

试剂 TRIzol、PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser、LA-Taq 酶、限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III、SYBR Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)、无 RNase 纯水等均购于 TaKaRa 公司;感受态细胞 BL21 (DE3)、蛋白 Marker 和 Ni-NTA亲和层析柱购自北京全式金生物有限公司;大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 和载体 pET-21b 为本实验室保存;胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自北京天漠科技开发有限公司;超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;引物合成和测序由上海生工生物工程股份有限公司完成。

1.2 东亚飞蝗总 RNA 提取和反转录

用 TRIzol 溶液提取东亚飞蝗成虫后足、体壁、脂肪体和血淋巴等不同组织、卵块、1 龄蝗蛹虫体、2~5 龄蝗蛹及雌雄成虫中肠的 RNA,并用 Nano Photometer 微量紫外分光光度计测定 RNA 浓度和纯度,按照 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser 说明书方法合成 cDNA 第 1 链,直接进行后续试验或者-20℃ 保存备用。

1.3 *FKBP52* 基因在飞蝗成虫不同组织、不同发育阶段中肠中的表达

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东亚飞蝗转录组数据,获得 *FKBP52* 基因的 DNA 序列;利用 DNAMAN 6.0 软件设计荧光定量 PCR 引物及基因克隆所需引物(表 1),由上海生工生物工程股份有限公司合成。

表 1 本试验所用引物及其序列¹⁾
Table 1 Primers and sequences used in this experiment

基因 Gene	引物 Primer	序列(5'-3') Sequence	备注 Note
<i>βactin</i>	ActinF	GTTACAAACTGGGACGACAT	
	ActinR	AGAAAGCACAGCCTGAATAG	
<i>FKBP52</i>	QF	TTGGTGGATGGAACGAAG	定量检测
	QR	TCCGTCGCATTGGTAAAG	
<i>FKBP52</i>	FKBP52-F	<u>CGGAATT</u> TCGTCAACAATGATGAACGAATGC	基因克隆
	FKBP52-R	CCC <u>AAGCTT</u> GCGGAACATCTTCGAGAAG	

1) 下划线分别为 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切位点。
The restriction sites of *EcoR* I and *Hind* III are underlined.

以 *βactin* 基因为内参基因,qPCR 检测飞蝗 *FKBP52* 基因在成虫不同组织、不同发育时期中肠中的相对表达量。反应体系(20 μL):cDNA 1 μL,SYBR Green qPCR Master Mix 10 μL,上下游引物(10 μmol/L)各 1 μL,超纯水 7 μL,混匀,离心,放入荧光定量 PCR 仪中进行扩增。反应条件:95℃ 2 min;95℃ 15 s,60℃ 1 min,40 个循环。每个样本设 3 个生物学重复,采用 2^{-ΔΔC_t}法^[15]进行数据处理。

1.4 东亚飞蝗 *FKBP52* 基因克隆

以 1.2 中合成的成虫时期东亚飞蝗 cDNA 作为模板,FKBP52-F、FKBP52-R 为引物,PCR 扩增 *FKBP52* 基因。反应体系(25 μL):10×PCR Buffer 2.5 μL,dNTPs 2 μL,*Taq* DNA 聚合酶 0.5 μL,上下游引物(10 μmol/L)各 1 μL,cDNA 1 μL,双蒸水 17 μL。反应条件为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 1 min,58℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 90 s,共 30 个循环;72℃ 延伸 10 min;4℃ 保存。PCR 产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测,目的条带切胶回收。将纯化产物连接到 pMD19-T 载体。采用热激转化法,导入感受态细胞 DH5α 中;通过氨苄抗性筛选阳性克隆。将筛选到的阳性克隆进行 PCR 检测,正确的送公司测序。从筛选获得的目标菌株中提取质粒,-20℃ 保存备用。

1.5 生物信息学分析

目的基因核酸序列的翻译以及编码蛋白质序列结构分析预测采用 DNAMAN 软件;蛋白质分子量预测采用 <https://web.expasy.org/cgi-bin/prot-param/protparam> 在线工具;利用 SignalP 在线软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)分析信号肽。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,运用在线软件 SMART (<http://smart.emblheidelberg.de/smart/set>) 分析保守结构域。

1.6 *FKBP52* 蛋白表达与纯化

从测序正确的转化子中提取质粒,以该质粒为模板,用分别带有 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切位点的引物 FKBP52-F/FKBP52-R 进行 PCR,扩增 *FKBP52* 全长基因。PCR 产物经电泳检测无误后,使用琼脂糖凝胶回收试剂盒进行回收,用 *EcoR* I 和 *Hind* III 进行双酶切。将酶切产物回收,与 pET-21b 载体进行连接,构建重组表达载体。采用热激法转化大肠杆菌感受态细胞 BL21,涂板、挑单克隆检测。将阳性克隆在 LB(Amp)液体培养基中 37℃ 培养至 OD₆₀₀ 为 0.5~0.6 时,加入 IPTG,至终浓度为 0.5 mmol/L,16℃ 进行诱导表达 12 h。离心收集菌体,超声波破碎(300 W,超声持续 5 s,暂停 5 s,重复 99 个循环)后,4℃,9 000 r/min 离心 10 min,取上清。用镍柱亲和层析进行蛋白纯化^[15],用 SDS-PAGE 电泳检测所纯化蛋白浓度。

1.7 金龟子绿僵菌与 *FKBP52* 组合对东亚飞蝗生物活性测定

采用金龟子绿僵菌 IMI330189 孢子悬浮液单次背板点滴和 FKBP52 蛋白饲喂 3 龄东亚飞蝗的方法来测定 FKBP52 对金龟子绿僵菌的毒力影响,称取 0.5 g 金龟子绿僵菌孢子粉于 0.05%的吐温 80 溶液中,用涡旋仪使其混合均匀,随后用血球计数板进行计数,配制成终浓度为 4.15×10⁹ 个/mL 的金龟子绿僵菌孢子悬浮液。FKBP52 蛋白测定浓度后,配制成终浓度为 1 mg/mL 的蛋白液。共设 3 个处理 1 个对照。

处理 1:金龟子绿僵菌孢子悬浮液背板点滴,饵料为 1 g 含 5%植物油的无菌麦麸;处理 2:FKBP52

蛋白饲喂, 饵料为 1 g 含 5% 植物油的无菌麦麸 +1 mL 的 FKBP52 蛋白; 处理 3: 同时进行金龟子绿僵菌孢子悬浮液背板点滴和 FKBP52 蛋白饲喂, 饵料为 1 g 含 5% 植物油的无菌麦麸 +1 mL 的 FKBP52 蛋白; 对照: 同时进行 0.05% 的吐温 80 溶液背板点滴和大肠杆菌 BL21(DE3)(含有 pET-21b 空载体)诱导表达的菌体饲喂, 饵料为 1 g 含 5% 植物油的无菌麦麸 +1 mL 终浓度为 1 mg/mL 的空载体诱导表达的蛋白。不同处理中金龟子绿僵菌孢子用量和 FKBP52 蛋白浓度见表 2。对照和所有处理均重复 5 次。

将预先饥饿处理 12 h 的 3 龄东亚飞蝗蝗蛹按照 30 头/筐的标准放入无菌的塑料生测筐中(长×宽×高=30 cm×12 cm×9 cm), 用已消毒的玻璃板盖好。金龟子绿僵菌单独处理和金龟子绿僵菌 + FKBP52 共同处理中的蝗蛹全部以背板点滴的方式接种金龟子绿僵菌 IMI330189 孢子悬浮液(浓度为 4.15×10^9 个/mL), 对照组中的蝗蛹全部以背板点滴的方式接种 0.05% 的吐温 80 溶液, 每头蝗蛹接种量为 2 μ L。对照、FKBP52、绿僵菌单独处理以及金龟子绿僵菌 + FKBP52 共同处理中分别加入相应

的饵料。根据试验设计, 24 h 后将饵料取出, 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。试验于温度 30℃, 相对湿度 60%, 光周期 L//D=16 h//8 h 生测室内进行。

1.8 FKBP52 处理后东亚飞蝗保护酶酶活力测定
按照与 1.7 相同的方法处理蝗蛹, 将 3 龄蝗蛹分装, 每筐 15 头, 每个处理重复 3 次。第 2 天开始, 从每个处理的 3 个重复中各取 1 头蝗虫, 解剖收集中肠, 于液氮中研磨, 加入预冷的 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, 4℃、15 000 r/min 离心 20 min, 取上清作为酶提取液, 以牛血清蛋白 BSA 为标准蛋白, 参照 Bradford 方法^[16]测定每个提取液的蛋白浓度, 然后测定酶液中过氧化物酶(POD)和超氧化物歧化酶(SOD)的活性, 具体测定方法参照试剂盒使用说明书。每个样品重复测定 3 次。

1.9 数据处理与分析
采用 SPSS 19 软件进行单因素方差分析, 并选用多重比较进行显著性差异分析, 其中 $P < 0.05$ 表示样本间存在显著差异, $P < 0.01$ 表示样本间存在极显著差异。

表 2 各处理所用成分、浓度及处理方式
Table 2 The components and their concentrations for each treatments

处理 Treatment	孢子用量/个·mL ⁻¹ ·头 ⁻¹ Content of spores	蛋白浓度/mg·mL ⁻¹ Concentration of protein	处理方式 Treatment
IMI330189	8.3×10^6	0	背板点滴
FKBP52	0	1	饵料饲喂
IMI330189 + FKBP52	8.3×10^6	1	背板点滴 + 饵料饲喂
CK	0	0	背板点滴 + 饵料饲喂

2 结果与分析

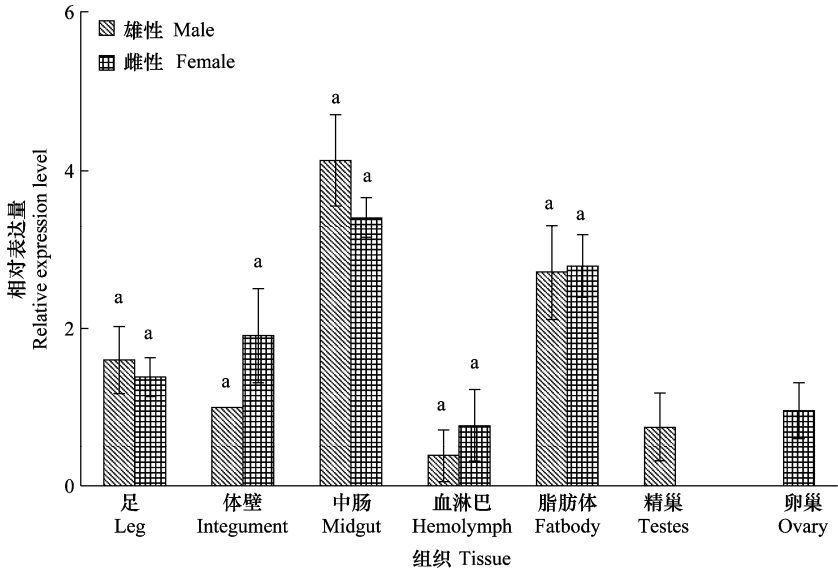
2.1 FKBP52 在飞蝗成虫不同组织中和不同发育时期中肠中的表达分析

研究发现, FKBP52 基因在雌、雄成虫的体壁、血淋巴、脂肪体、足、中肠、精巢和卵巢中都有表达, 其中在雄成虫中肠内的表达量最高。以 FKBP52 基因在雄性成虫体壁中的表达量为标准参量, 雄成虫中肠中 FKBP52 基因的表达量为体壁中表达量的 4.13 倍; 其次为雌成虫中肠, 相对表达量是雄成虫体壁中表达量的 3.41 倍; 但雌、雄成虫中肠的相对表达量无显著性差异($P > 0.05$)。FKBP52 基因在雌、雄成虫脂肪体中的相对表达量也较高, 分别为雄成虫体壁表达量的 2.79 倍和 2.71 倍, 二者之间也无显著性差异($P > 0.05$)。FKBP52 基因在雌、雄成虫

足中的表达量分别为雄成虫体壁表达量的 1.38 倍和 1.60 倍($P > 0.05$)。在雌虫体壁中的表达量与雄虫体壁之间无显著差异。但是在雄性精巢和雌性卵巢中的表达量略低于雄虫体壁。FKBP52 基因在雌、雄成虫血淋巴中的表达量相对较少, 分别为雄成虫体壁表达量的 0.77 倍和 0.38 倍($P > 0.05$)(图 1)。

FKBP52 基因在卵块、1 龄蝗蛹虫体、2~5 龄蝗蛹及雌、雄成虫中肠中都有表达, 其中卵块中表达量最高。以 FKBP52 基因在 1 龄蝗蛹中的表达量为标准参量, 卵块中 FKBP52 基因的表达量为 1 龄蝗蛹表达量的 3.89 倍, 显著高于其他龄期($P < 0.05$)。其次为雌、雄成虫中肠, FKBP52 基因的表达量为 1 龄蝗蛹表达量的 3.09 倍和 2.91 倍, 二者之间无显著性差异($P > 0.05$); 3 龄蝗蛹中肠、2 龄蝗蛹中肠、5 龄蝗蛹中肠、4 龄蝗蛹中肠的表达量依

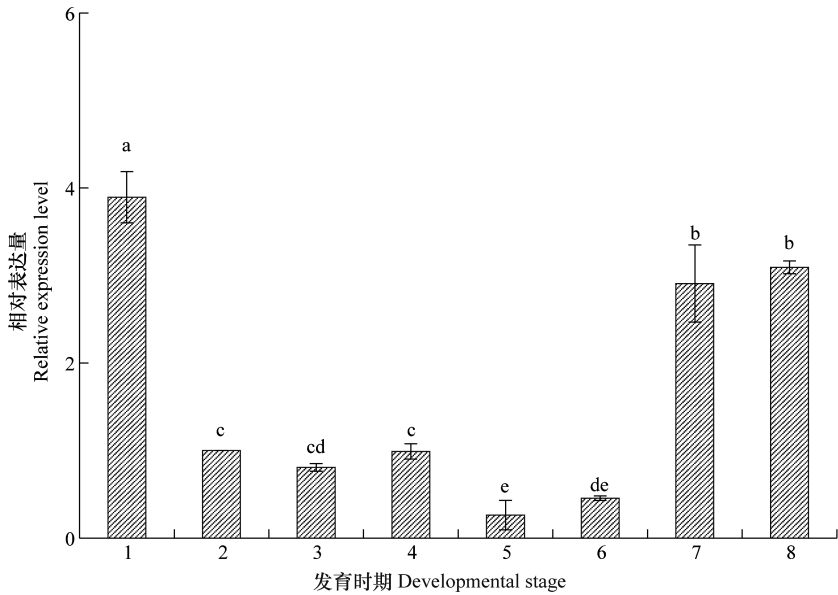
次递减,FKBP52 基因的表达量分别为 1 龄蝗蛹表达量的 0.99,0.81,0.46 和 0.26 倍。可见,不同发育期的转录水平中,该基因主要在东亚飞蝗卵和雌雄成虫中肠中表达(图 2)。



图中数据为3次重复平均值±标准误。相同小写字母表示同一组织不同性别间差异不显著($P>0.05$)
Data in the chart are mean±SE of three replicates. Same lowercase letters above bars indicate no significant difference among different genders in the same tissue ($P>0.05$)

图 1 FKBP52 基因在东亚飞蝗成虫不同组织中的相对表达量

Fig. 1 Relative expression levels of FKBP52 gene in different tissues of *Locusta migratoria manilensis* adults



1: 卵; 2: 1龄蝗蛹; 3: 2龄蝗蛹中肠; 4: 3龄蝗蛹中肠; 5: 4龄蝗蛹中肠; 6: 5龄蝗蛹中肠; 7: 雄成虫中肠; 8: 雌成虫中肠。图中数据为3次重复平均值±标准误。不同小写字母表示不同发育时期差异显著($P<0.05$)
1: Egg; 2: 1st-instar nymph; 3: Midgut of 2nd-instar nymph; 4: Midgut of 3rd-instar nymph; 5: Midgut of 4th-instar nymph; 6: Midgut of 5th-instar nymph; 7: Midgut of male adult; 8: Midgut of female adult. Data in the chart are mean±SE of three replicates. Different lowercase letters above bars indicate significant difference among different developmental stages ($P<0.05$)

图 2 FKBP52 基因在东亚飞蝗不同发育时期的相对表达量

Fig. 2 Relative expression levels of FKBP52 gene in different developmental stages of *Locusta migratoria manilensis*

2.2 东亚飞蝗 FKBP52 基因的克隆

通过 PCR 扩增得到 FKBP 全长基因。将其连接到 pMD19-T 克隆载体中,导入大肠杆菌 DH5α 中,经抗性筛选获得阳性克隆,进行测序。结果表明,该基

因长度为 1 242 bp(图 3),编码 413 个氨基酸,通过 NCBI 序列比对,将其命名为 *FKBP52*。利用 SMART 的序列工具分析 *FKBP52* 氨基酸序列,结果显示 *FKBP52* 蛋白在第 38—130 位氨基酸、158—247 位氨基酸之间存在 2 个 *FKBP_C* 超家族保守结构域,属于 *FKBP_C* 超家族成员之一(图 4 下划线所注)。

2.3 *FKBP52* 蛋白表达与纯化

将 *FKBP52* 基因插入表达载体 pET-21b 中获得重组表达载体 pET21b-*FKBP52*,将其导入大肠杆菌 BL21 后,经 IPTG 诱导表达,获得目的蛋白 *FKBP52*。经过 15% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测分析,蛋白大小为 46 kDa,与预期大小相符。大量提取蛋白,经镍柱亲和层析纯化,得到 *FKBP52* 纯蛋白(图 5)。

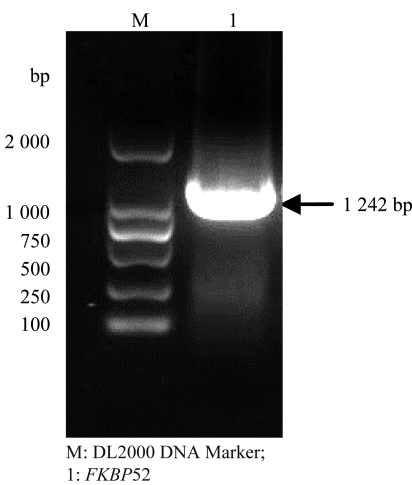
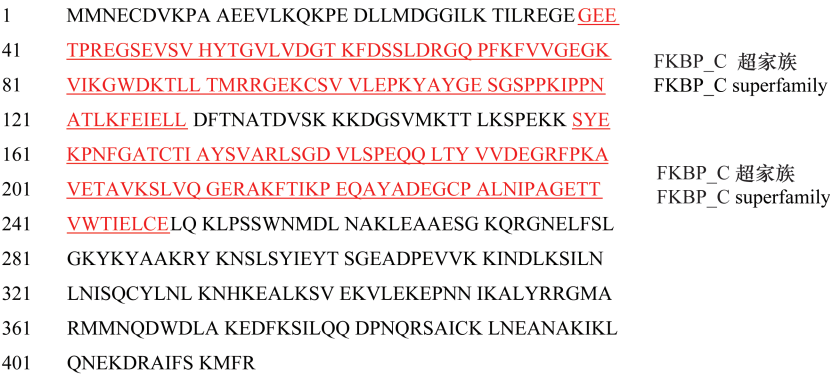


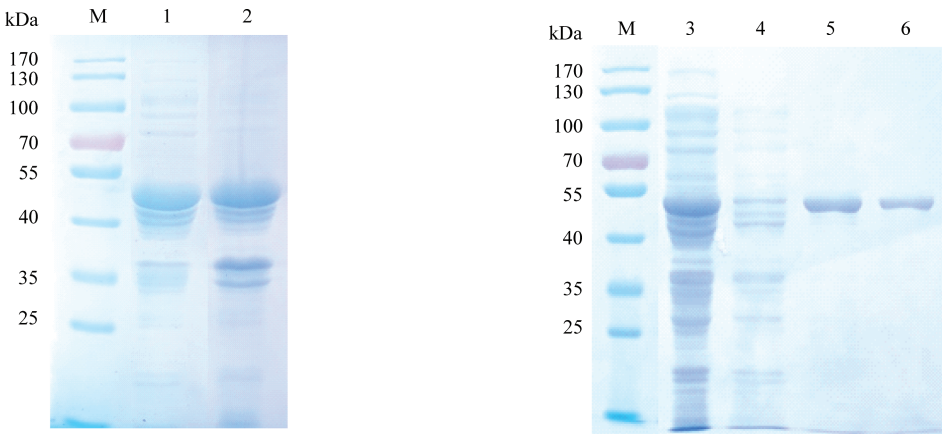
图 3 *FKBP52* 的 PCR 产物电泳分析
Fig. 3 Electrophoresis of the PCR product of *FKBP52* gene



图中下划线为FKBP_C 超家族保守结构域。FKBP_C 超家族: 指具有肽基脯氨酰顺反异构酶活性的蛋白质超家族
The conserved domains of FKBP_C superfamily are underlined. FKBP_C superfamily: FKBP-type peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase

图 4 东亚飞蝗 *FKBP52* 蛋白氨基酸序列及保守结构域所在位置

Fig. 4 Amino acid sequence of *FKBP52* protein and the conserved domain in *Locusta migratoria manilensis*



M: 蛋白标准分子量; 1: IPTG 诱导后上清; 2: IPTG 诱导后沉淀; 3: IPTG 诱导后上清; 4: NI 柱滤出液; 5~6: 纯化的 *FKBP52* 蛋白
M: Protein Marker; 1: The supernatant after IPTG induction; 2: The sediment after IPTG induction; 3: The supernatant after IPTG induction; 4: The filtrate of NI column; 5-6: Purified *FKBP52* protein

图 5 重组蛋白 *FKBP52* 表达分析及其蛋白纯化

Fig. 5 Expression analysis and protein purification of *FKBP52* protein

2.4 FKBP52 蛋白对金龟子绿僵菌感染东亚飞蝗的影响

研究发现,使用只含 FKBP52 蛋白的饵料处理东亚飞蝗,到第 10 天其累计平均死亡率为 2.22%,与对照组(1.11%)无显著差异($P>0.05$)。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不断上升,第 10 天达到 60%,显著高于 FKBP52 蛋白单独处理组和对照组。使用金龟子绿僵菌与 FKBP52 蛋白同时处理东亚飞蝗时,在二者的共同作用下,东亚飞蝗的累计死亡率迅速上升,到第 10 天达到 93.33%,显著高于金龟子绿僵菌单独处理组($P<0.05$)(图 6,表 3)。上述结果表明 FKBP52 蛋白与金龟子绿僵菌共同处理,可以显著提

升对东亚飞蝗的致病力,提高杀虫效果。

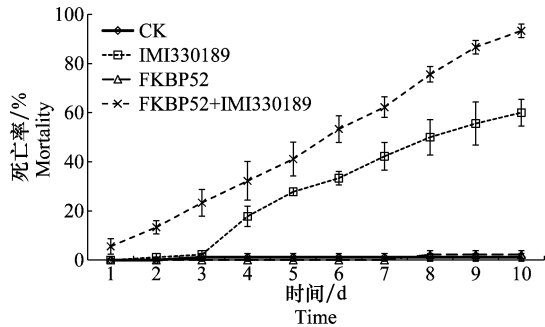


图 6 不同处理条件下东亚飞蝗的累计死亡率
Fig. 6 Cumulative mortalities of *Locusta migratoria manilensis* in different treatments

表 3 不同处理条件下东亚飞蝗死亡率差异性分析¹⁾

Table 3 Mortality analysis of *Locusta migratoria manilensis* in different treatments

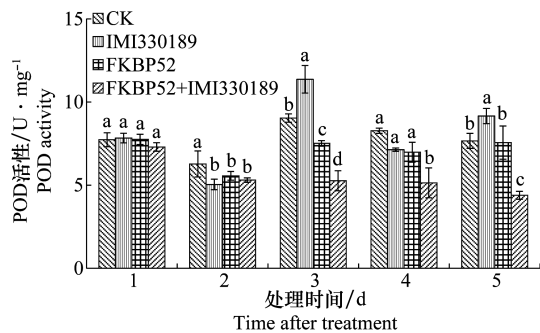
处理时间/d Time after treatment	累计死亡率/% Cumulative mortality			
	IMI330189	FKBP52	FKBP52+IMI330189	CK
1	(0.00±0.00)b	(0.00±0.00)b	(5.55±3.85)a	(0.00±0.00)b
2	(1.11±1.95)b	(0.00±0.00)b	(13.33±3.34)a	(0.00±0.00)b
3	(2.22±1.95)b	(0.00±0.00)b	(23.33±6.67)a	(1.11±1.95)b
4	(17.78±5.09)b	(0.00±0.00)c	(32.22±9.62)a	(1.11±1.95)c
5	(27.78±1.95)b	(0.00±0.00)c	(41.11±8.39)a	(1.11±1.95)c
6	(33.33±3.34)b	(0.00±0.00)c	(53.33±6.67)a	(1.11±1.95)c
7	(42.22±6.94)b	(0.00±0.00)c	(62.22±5.09)a	(1.11±1.95)c
8	(50.00±8.82)b	(2.22±1.95)c	(75.55±3.85)a	(1.11±1.95)c
9	(55.55±10.72)b	(2.22±1.95)c	(86.67±3.34)a	(1.11±1.95)c
10	(60.00±6.67)b	(2.22±1.95)c	(93.33±3.34)a	(1.11±1.95)c

1) 表中列出的数据为平均值±标准误。不同小写字母表示同一时间不同处理间差异显著($P<0.05$)。
Data are presented as mean±SE. Different lowercase letters indicate significant difference among different treatments at the same time ($P<0.05$).

2.5 FKBP52 蛋白对东亚飞蝗过氧化物酶(POD)和超氧化物歧化酶(SOD)酶活力的影响

研究发现,FKBP52 单独处理东亚飞蝗时,第 1、4、5 天 POD 酶活力与对照组之间无显著性差异($P>0.05$),第 2、3 天时 POD 活力显著低于对照组($P<0.05$)。金龟子绿僵菌单独处理时,在第 3 天和第 5 天东亚飞蝗的 POD 酶活力显著高于对照,尤其是第 3 天时,POD 活力达到最高值 11.609 U/mg;但在第 2 天 POD 的酶活力低于对照;在第 1、4 天其酶活力与对照无显著差异。FKBP52 与金龟子绿僵菌共同处理时,除第 1 天外(第 1 天处理组的 POD 酶活力与其他处理无显著差异),第 2、3、4、5 天,处理组的 POD 活性都显著低于对照组($P<0.05$),同时,在第 3—5 天,FKBP52 与金龟子绿僵菌共同处理组 POD 活性显著低于金龟子绿僵菌单独处理组($P<0.05$)(图 7)。

FKBP52 单独处理东亚飞蝗时,第 3、4、5 天,处理



图中数据为 3 次重复平均值±标准误。不同小写字母表示同一时间不同处理间差异显著($P<0.05$)。下同
Data in the chart are mean±SE of three replicates. Different lowercase letters above bars indicate significant difference among different treatments at the same time ($P<0.05$). The same below

图 7 FKBP52 处理后东亚飞蝗的 POD 活力
Fig. 7 Activity of peroxidase in *Locusta migratoria manilensis* after treatment with FKBP52 protein

组的 SOD 酶活力达到 10.502、8.644、9.182 U/mg,显著高于对照组(分别为 8.478、7.729、7.662 U/mg)($P<0.05$),但在第 1、2 天时,与对照组之间都无显

著性差异($P>0.05$)。金龟子绿僵菌单独处理时,在第3天和第5天东亚飞蝗的SOD酶活力显著高于对照,尤其是第3天时,SOD酶活力达到最高值10.769 U/mg;在第1天和第4天,SOD酶活力与对照无显著差异($P>0.05$);但在第2天,处理组的酶活力显著低于对照组($P<0.05$)。FKBP52与金龟子绿僵菌共同处理时,在第1天,处理组SOD酶活力与对照组之间无显著性差异;但第3、4、5天,处理组的SOD活性显著低于对照组和金龟子绿僵菌单独处理组($P<0.05$),且从第1天开始呈现持续降低的趋势(图8)。

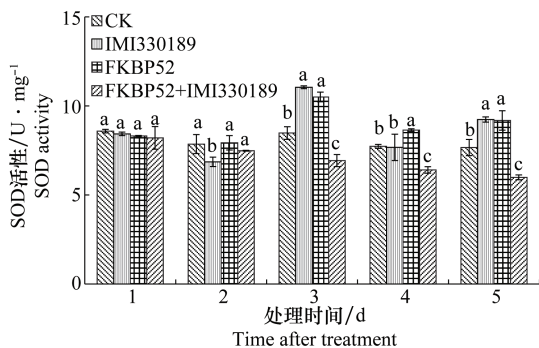


图8 FKBP52处理后东亚飞蝗的SOD活力

Fig. 8 Activity of superoxidase in *Locusta migratoria manilensis* after treatment with FKBP52 protein

3 讨论

昆虫在长期进化中形成了一套独特的免疫系统使其能够抵御逆境,扩大分布,并抵抗病原微生物的侵入。随着分子生物学的发展,关于昆虫免疫的主要过程及分子机理逐渐清晰^[17],昆虫免疫机制的研究成果对于研究飞蝗免疫反应机制具有重要的参考意义^[18-19]。FK506结合蛋白(FKBP)作为一种免疫调节蛋白,还参与了生物体内众多重要生理反应,如细胞周期的调节、钙离子通道活性的调节以及生长发育调节等^[20]。如朱佳证实了FK506结合蛋白与棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 滞育有关^[21]。Li等研究表明FK506结合蛋白在家蚕 *Bombyx mori* 每个发育阶段(卵、幼虫、蛹、成虫)都有表达,具有重要的调节作用^[22]。随着对FK506结合蛋白研究的逐渐深入,其作用机制越来越清楚。刘国通等研究表明,FK506单独并不能发挥免疫抑制作用,它需要先与FKBP12结合才能发挥作用,当FK506与FKBP12结合后,FK506特有的立体化学结构就会抑制FKBP12的肽基脯氨酰顺反异构酶活性,FKBP12在FK506的免疫抑制作用中发挥关键作用^[23]。本

实验室前期验证了FKBP可抑制钙调磷酸酶活性,进一步诱导东亚飞蝗滞育。钙调磷酸酶可以与Toll途径下游Dorsal结合并使其去磷酸化,使转录因子Dif转移至细胞核,调节抗菌肽、防卫素、防御素等基因的表达^[24]。因此,我们推测FKBP作为钙调磷酸酶抑制剂会影响飞蝗体液免疫Toll途径级联反应,促进金龟子绿僵菌的侵染。

本试验克隆得到了长度为1242 bp,含有完整FKBP_C结构域的一段FKBP序列,经过NCBI检索,确定克隆出的蛋白是FKBP_C超家族成员之一,与黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、家蚕中预测的结构相同;通过原核表达获得FKBP52蛋白,SDS-PAGE检测结果表明,该蛋白分子量46 kDa,与推测的分子量大小一致。通过对FKBP52基因在飞蝗不同发育时期和成虫不同组织中的相对表达量分析,发现FKBP52蛋白在中肠和脂肪体中的表达量相对较高。脂肪体是昆虫重要的免疫器官^[25]。因此,我们推测FKBP52蛋白对飞蝗免疫反应有着重要的作用。通过对FKBP52基因在蝗虫不同发育阶段中肠内的表达情况分析,发现其在蝗虫各发育阶段均有表达,但卵期与成虫期表达量明显高于幼虫期,在幼虫阶段的表达量基本相对稳定,这与柞蚕 *Antheraea pernyi* 中FKBP基因在不同发育阶段的表达谱相一致^[26]。

氧化还原反应是昆虫体内重要的化学反应之一,决定着昆虫的衰老与死亡,也会产生对虫体有害的活性氧,包括超氧阴离子、过氧化氢、羟基自由基等^[27]。活性氧的产生会对虫体造成伤害,引起体内脂质过氧化,DNA突变和酶失活等。在长期的发育进化过程中,昆虫形成了一套完整的保护系统,来清除各种活性氧^[28]。过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(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,使机体免受伤害^[29]。王龙江等研究表明,红火蚁 *Solenopsis invicta* 被白僵菌 *Beauveria bassiana* 侵染后体内CAT、SOD酶活力一直高于对照组,POD则表现出先上升后下降的趋势^[30]。张彦丰等研究发现,金龟子绿僵菌侵染能使蝗虫体内保护酶活力发生变化,呈现先升高后降低的趋势,蝗虫免疫降低,最终导致蝗虫死亡^[31]。本试验通过FKBP52与金龟子绿僵菌共同处理东亚飞蝗发现,二者共用可以使蝗虫的死亡率大大提高,且蝗虫体内的POD和SOD酶活力都显著降低,表明

FKBP52 蛋白能够有效抑制蝗虫免疫能力,能够作为正调控因子加强病菌的侵入,增强对寄主的致病力,提高死亡率。本研究为金龟子绿僵菌制剂的研制和蝗虫防治提供了新的思路与借鉴。

参考文献

- [1] AMARAVADHI H, HO S Y. Immunophilins: structures, mechanisms and ligands [J]. *Current Molecular Pharmacology*, 2015, 9(1):37–47.
- [2] BARIK S. Immunophilins: for the love of proteins [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 2007, 63(24): 2889–2900.
- [3] HARRAR Y, BELLINI C, FAURE J D. FKBP: at the crossroads of folding and transduction [J]. *Trends in Plant Science*, 2001, 6(9): 426–431.
- [4] SOLASSOL J, MANGE A, MAUDELONDE T. FKBP family proteins as promising new biomarkers for cancer [J]. *Current Opinion in Pharmacology*, 2011, 11(4): 320–325.
- [5] YU Yanli, ZHANG Hui, LI Wencai, et al. Genome-wide analysis and environmental response profiling of the FK506-binding protein gene family in maize (*Zea mays* L.) [J]. *Gene*, 2012, 498(2): 220–222.
- [6] GEISLER M, BAILLY A. Tête-à-tête: the function of FKBP in plant development [J]. *Trends in Plant Science*, 2007, 12(10): 465–473.
- [7] PINTO D, DUARTE M, SOARES S, et al. Identification of all FK506-binding proteins from *Neurospora crassa* [J]. *Functional Genetics & Biology*, 2008, 45(12): 1600–1607.
- [8] SIGAL N H, DUMONT F J. Cyclosporin A, FK-506, and rapamycin: pharmacologic probes of lymphocyte signal transduction [J]. *Annual Review of Immunology*, 1992, 10(1): 519–560.
- [9] QUESADA-MORAGA E, CARRASCO-DÍAZ J A, SANTIA-GO-ÁLVAREZ C. Insecticidal and antifeedant activities of proteins secreted by entomopathogenic fungi against *Spodoptera littoralis* (Lep. Noctuidae) [J]. *Journal of Applied Entomology*, 2006, 130(8): 442–452.
- [10] CLARKSON J M, CHARNLEY A K. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects [J]. *Trends in Microbiology*, 1996, 4(5): 197–203.
- [11] LOMER C J, BATEMAN R P, JOHNSON D L, et al. Biological control of locusts and grasshoppers [J]. *Annual Review of Entomology*, 2001, 46(1): 667–702.
- [12] LOMER C J, PRIOR C, KOOYMAN C. Development of *Metarhizium* spp. for the control of grasshoppers and locusts [J]. *The Memoirs of the Entomological Society of Canada*, 1997, 129(171): 265–286.
- [13] WANG Yundan, YANG Pengcheng, CUI Feng, et al. Altered immunity in crowded locust reduced fungal (*Metarhizium anisopliae*) pathogenesis [J/OL]. *PLoS Pathogens*, 2013, 9(1): e1003102. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003102.
- [14] 张彦丰. 绿僵菌对东亚飞蝗中肠致病机理的研究[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学, 2015.
- [15] 王峰. 金龟子绿僵菌诱导花生根建立共生的研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2018.
- [16] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1–2):248–254.
- [17] LEMAITRE B, HOFFMANN J. The host defense of *Drosophila melanogaster* [J]. *Annual Review of Immunology*, 2007, 25(1): 697–743.
- [18] NEYEN C, BRETSCHER A J, BINGGELI O, et al. Methods to study *Drosophila* immunity [J]. *Methods*, 2014, 68(1): 116–128.
- [19] JIANG Liang, ZHAO Ping, CHENG Tingcai, et al. A transgenic animal with antiviral properties that might inhibit multiple stages of infection [J]. *Antiviral Research*, 2013, 98(2): 171–173.
- [20] SOMARELLI J A, HERRERA R J. Evolution of the 12 kDa FK506-binding protein gene [J]. *Biology of the Cell*, 2007, 99(6): 311–321.
- [21] 朱佳. 棉铃虫滞育相关基因蜕皮激素调节蛋白和 FK506 结合蛋白的研究[D]. 合肥:中国科学技术大学, 2009.
- [22] LI Si, FEI Jingjing, CHENG Dandan, et al. Bioinformatics, tissue distribution, and subcellular localization analyses of FK506 binding protein 12B from silkworms [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2015, 91(2): 109–123.
- [23] 刘国通, 杨成明. FK506 结合蛋白 12 介导免疫抑制作用机制的研究进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2006, 27(4): 309–311.
- [24] DIJKERS P F, O'FARRELL P H. *Drosophila* calcineurin promotes induction of innate immune responses [J]. *Current Biology*, 2007, 17(23): 2087–2093.
- [25] KIMBRELL D A. Insect antibacterial proteins: not just for insects and against bacteria [J]. *BioEssays*, 1991, 13(12): 657–663.
- [26] 陈默. 柞蚕线粒体控制区的结构特征与 FK506 结合蛋白基因的表达谱分析[D]. 沈阳:沈阳农业大学, 2013.
- [27] 董亮, 何永志, 王远亮, 等. 超氧化物歧化酶(SOD)的应用研究进展[J]. *中国农业科技导报*, 2013(5): 53–58.
- [28] 赵保路. 氧自由基和天然抗氧化剂[M]. 北京:科学出版社, 1999.
- [29] BARBER D J W, THOMAS J K. Reactions of radicals with lecithin bilayers [J]. *Radiation Research*, 1978, 74(1): 51.
- [30] 王龙江, 吕利华, 谢梅琼, 等. 红火蚁感染白僵菌后体内保护酶和酯酶活性的变化[J]. *华中农业大学学报*, 2010, 29(3): 282–286.
- [31] 张彦丰, 王正浩, 农向群, 等. 绿僵菌感染对东亚飞蝗中肠保护酶和解毒酶的影响[J]. *中国生物防治学报*, 2015, 31(6): 876–878.

(责任编辑:田 喆)