

白背飞虱 VAMP7 和 Vt1a 蛋白的原核表达、抗体制备及应用

张潇婉, 张璐, 刘文文, 李莉*, 王锡锋

(中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

摘要 白背飞虱 *Sogatella furcifera* 的囊泡相关膜蛋白 7(VAMP7)和囊泡转运蛋白(Vt1a)隶属于 SNARE(soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor)家族,该家族蛋白主要参与生物体中关键的膜转运过程。前期研究发现这两种蛋白分别与南方水稻黑条矮缩病毒 *Southern rice black-streaked dwarf virus* (SRBSDV)的主要外层衣壳蛋白 P10 存在显著互作,推测可能协助病毒颗粒在介体白背飞虱内的转运和扩散。为了进一步利用血清学技术研究 VAMP7 和 Vt1a 在传毒过程中的功能,本研究克隆了白背飞虱编码这两种蛋白的基因,成功构建了 VAMP7 和 Vt1a 基因的原核表达载体,并将载体分别转入大肠杆菌中进行诱导表达,得到了相应的原核表达蛋白。在蛋白纯化后,将纯化蛋白注射于新西兰大白兔体内进行免疫,分别制备得到 VAMP7 和 Vt1a 的抗体。两种抗体经 Western blot 检测发现,均可分别与白背飞虱体内的 VAMP7 和 Vt1a 特异性结合。利用制备的抗体对白背飞虱的肠道进行免疫标记,激光共聚焦显微镜观察发现所制备抗体能够在白背飞虱中肠上皮细胞的胞质中特异性标记到 VAMP7 和 Vt1a,表明制备的抗体能够成功用于这两种蛋白的体内外检测,为阐明这两种蛋白参与传播 SRBSDV 的机制研究奠定了基础。

关键词 白背飞虱; 囊泡相关膜蛋白 7; 囊泡转运蛋白; 原核表达; Western blot; 免疫荧光标记

中图分类号: S 435.112.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2019622

Preparation and application of the antibodies of *Sogatella furcifera* VAMP7 and Vt1a proteins expressed in *Escherichia coli*

ZHANG Xiaowan, ZHANG Lu, LIU Wenwen, LI Li*, WANG Xifeng

(State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract Vesicle-associated membrane protein 7 (VAMP7) and vesicle transport through interaction with t-SNAREs homolog 1a (Vt1a) of *Sogatella furcifera* belong to the SNARE family, participating in the vesicular transport. In our previous study, they interacted with the P10 of *Southern rice black-streaked dwarf virus* (SRBSDV) respectively, and might facilitate virion transport in insects. In order to use the serological techniques to further validate their functions, the prokaryotic expression vectors of VAMP7 and Vt1a genes were constructed and then transformed into strain BL21 (DE3) of *Escherichia coli* and expressed by IPTG induction. Purified proteins were used to immunize rabbits for preparation of polyclonal antibodies. Western blot showed that the prepared antibodies could specifically bind to the recombinant proteins and VAMP7 and Vt1a in *S. furcifera*, respectively. Immunofluorescent labeling assay revealed that VAMP7 and Vt1a were located in the cytoplasm of the midgut epithelia in *S. furcifera*, which laid the foundation for the functional study of VAMP7 and Vt1a in SRBSDV transmission.

Key words *Sogatella furcifera*; VAMP7; Vt1a; prokaryotic expression; Western blot; immunofluorescence

白背飞虱 *Sogatella furcifera* (Horváth)属半翅目 Hemiptera 飞虱科 Delphacidae, 是重要的迁飞性害

虫。以成虫和若虫群栖稻株基部刺吸汁液,使水稻生长缓慢、分蘖延迟、瘪粒增加,为害严重时,造成稻株枯死,呈“虱烧”状^[1]。除了直接为害外,作为南方水稻黑条矮缩病毒 *Southern rice black-streaked dwarf virus* (SRBSDV) 唯一的传播介体,对于该病毒病害近年在我国的暴发流行发挥了关键作用^[2]。白背飞虱以持久循环增殖方式传播 SRBSDV,病毒进入白背飞虱体内后,会与虫体内多种蛋白发生互作,从而克服相应的传播屏障^[3-4]。本实验室前期以 SRBSDV 的主要外层衣壳蛋白 P10 为诱饵,筛选白背飞虱 cDNA 文库,得到了囊泡相关膜蛋白 7 (vesicle-associated membrane protein 7, VAMP7) 和囊泡转运蛋白 (vesicle transport through interaction with t-SNAREs homolog 1a, Vt1a),进一步利用 pull-down 技术验证这两种蛋白分别与 SRBSDV-P10 存在显著互作,而且在白背飞虱肠道内表达量最高,推测他们在白背飞虱高效传播 SRBSDV 的过程中发挥了重要作用^[5]。

白背飞虱的囊泡相关膜蛋白 7 (VAMP7) 和囊泡转运蛋白 (Vt1a) 均属于 SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) 家族的成员,该家族蛋白在生物体中主要参与和介导膜融合,在细胞内转运和神经递质释放、细胞受精和病毒侵染等过程中发挥作用^[6]。最早在电鳗发电器官的神经末梢中发现 VAMP7,它是一种 V-SNARE 类蛋白,一般定位于囊泡膜上,具有 SNARE 结合活性和囊泡介导的运输功能^[7-8]。Vt1a 属于 SNARE 家族蛋白的 VTI1 类蛋白,其主要定位于高尔基体膜上,参与细胞内蛋白质的转运过程^[9]。相关研究表明,在真核细胞中,VAMP7 和 Vt1a 可以组成一种 SNARE 复合体介导一种向细胞膜表面转运的新型路径^[10]。

以抗体为基础的免疫荧光技术已经广泛应用于介体昆虫传毒相关蛋白的功能研究^[4, 11]。为进一步确定 VAMP7 和 Vt1a 在白背飞虱高效传播 SRBSDV 过程中的功能,急需制备蛋白的特异性抗体。本研究首先利用克隆获得的两种白背飞虱蛋白基因分别构建了原核表达载体,然后将其转化到大肠杆菌体内进行了成功表达。后将纯化蛋白注射于新西兰公兔体内制备获得多克隆抗体,并对抗体进行了纯化和检测,为进一步研究两种蛋白与病毒互作机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 白背飞虱

实验室保存种群,饲养于水稻品种‘黄金晴’幼苗上,置于光照培养箱内(光期 16 h,温度为 28℃;暗期 8 h,温度为 25℃),为保证白背飞虱营养充足,每周更换一次水稻苗。

1.1.2 菌株和载体

大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 购自全式金公司,入门载体 PUC57 和原核表达载体 PET30a 购自 Invitrogen 公司(美国)。

1.1.3 试验试剂

Gateway LR Clonase Enzyme Mix 和 Gateway BP Clonase Enzyme Mix 购自 Invitrogen 公司(美国); Protein A-Sepharose affinity column 购自 Pierce 公司(美国); ExTaq DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司; IPTG、PVDF 膜、不完全佐剂和弗氏完全佐剂购自 Sigma 公司(美国); DNA 回收试剂盒和质粒小提试剂盒购自天根生物有限公司; Ni^{2+} NTA 亲和层析柱购自 General Electric 公司; Goat anti-rabbit IgG-Cy3 购自美国 KPL 公司; 其他所用试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 引物合成

根据本实验室前期获得的 VAMP7 和 Vt1a 蛋白的基因序列分别设计一对含有 *Xba* I 和 *Bam* H I 位点的特异性引物,其中 VAMP7 基因的上游引物为 (*Xba* I VA-F): 5'-TCTACCAATCCAAT-3', 下游引物为 (*Bam* H I VA-R): 5'-ATTGGATTG-GATCGGATCC-3'; Vt1a 基因的上游引物 (*Xba* I Vt-F): 5'-TCTAGATCCAATCCAAT-3', 下游引物 (*Bam* H I Vt-R): 5'-ATTGGATTGGATCGGATCC-3'。用于扩增白背飞虱中的 VAMP7 和 Vt1a 基因。

1.2.2 目的基因的克隆及原核表达载体的构建

取成虫白背飞虱,提取其总 RNA,后反转录成 cDNA,利用 *Xba* I VA-F/ *Bam* H I VA-R 和 *Xba* I Vt-F/ *Bam* H I Vt-R 引物对分别扩增 VAMP7 和 Vt1a 基因。利用 cDNA 为模板,对目的基因进行 PCR 扩增,后经聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,回收纯化目的条带。利用 Gateway BP Clonase Enzyme Mix 试剂盒,将入门克隆载体 PUC57 与回收产物进

行 BP 重组反应,最后得到 PUC57-VAMP7 和 PUC57-Vti1a 的入门载体。对重组载体进行基因测序,测序正确后,选择含有目的基因的中间载体,利用 Gateway LR Clonase Enzyme Mix 试剂盒,将其与原核表达载体 PET30a 进行 LR 重组反应。最终得到含有目的基因的原核表达载体 PET30a-VAMP7 和 PET30a-Vti1a。

1.2.3 原核诱导表达

以空质粒作对照,将构建的原核表达载体 PET30a-VAMP7 和 PET30a-Vti1a 分别转化到大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中,培养后挑取含目的基因重组表达质粒的菌液,接种于含氯霉素和氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,后将其置于 37℃、120 r/min 条件下培养。当菌液 OD₆₀₀ 达 0.6~0.8 时,向其中加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L,在 30℃条件下,继续诱导培养 4 h,后收集 1 mL 菌液离心,弃上清,保留菌体。利用 SDS-PAGE 凝胶电泳和考马斯亮蓝染色检测菌体中目的蛋白的表达情况。当目的蛋白成功表达后,通过 Western blot 方法,利用 6×His 单克隆抗体再次确认目的蛋白表达情况。为获得可溶性蛋白,进一步优化诱导条件,后利用超声波破碎菌体细胞,12 000 r/min 离心 15 min 后收集上清,最后利用 Ni²⁺-NTA 亲和层析柱纯化回收目的蛋白。

1.2.4 抗体制备与检测

利用完全弗氏佐剂乳化回收纯化的可溶性蛋白,后将其注射于新西兰公兔皮下,进行多点免疫。第一次免疫后第 11 天进行第二次免疫,之后每隔 1 周采用肌肉注射的方式进行 1 次免疫加强,注射后每 4 d 取血清,通过间接 ELISA 法,检测效价,在效价达 1:100 000 以上时,分离血清。将分离后的血清通过 ProteinA-Sepharose affinity column 从抗血清中提纯获得 VAMP7 和 Vti1a 抗体,利用 Western blot 技术对两种抗体进行特异性分析。

1.2.5 免疫荧光法检测白背飞虱肠道内的 VAMP7 和 Vti1a 的定位

在解剖镜下剖出白背飞虱的肠道,用 4%的多聚甲醛固定 1 h 后用 0.01 mol/L 磷酸缓冲液(PBS)清洗 3 次,每次 5 min;用 0.2%的 Triton-X-100 渗透 2 h 后,PBS 清洗 3 次,每次 10 min;用 PBS 稀释牛血清白蛋白为 3%的抗体稀释液,然后将其按照 1:100 的比例稀释 VAMP7 和 Vti1a 的一抗,利用稀释

后的一抗孵育 2 h,PBS 洗 3 次,每次 10 min;然后再用稀释后的二抗 anti-rabbit IgG-Cy3 (1:200) 孵育 1.5 h,PBS 洗 3 次;在避光环境中,将清洗后的白背飞虱肠道固定于载玻片上,利用激光共聚焦显微镜 (LSM T-PMT, Germany) 观察 VAMP7 和 Vti1a 的定位情况。

2 结果与分析

2.1 白背飞虱 VAMP7 和 Vti1a 基因的克隆

利用 PCR 获得 VAMP7 和 Vti1a 的目的片段(图 1),其中 VAMP7 基因为 651 bp,Vti1a 基因为 669 bp。PCR 产物切胶回收后与载体 PEASY-T5 进行重组,获得中间载体 PEASY-T5-VAMP7 和 PEASY-T5-Vti1a。转化大肠杆菌,阳性克隆测序后分别通过 BLAST 比对分析,基因同源性均可达 99%以上。

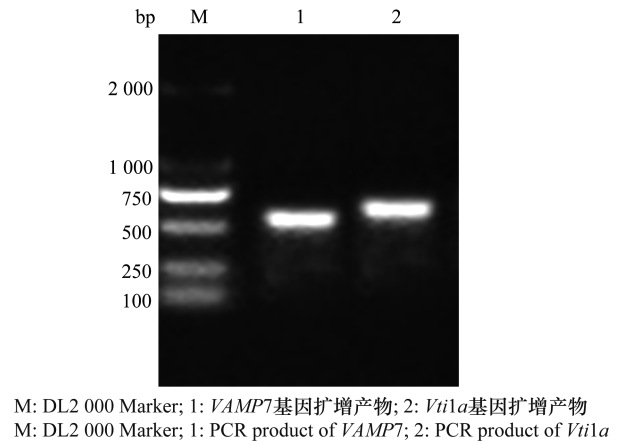
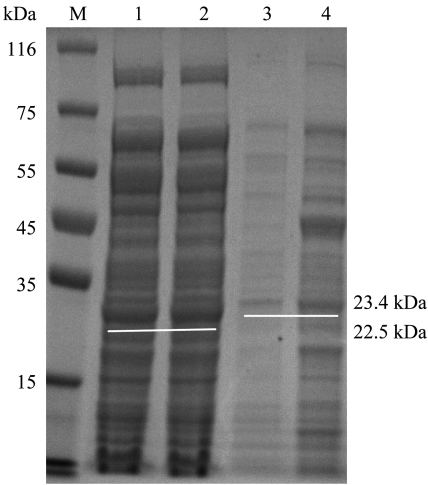


图 1 VAMP7 和 Vti1a 基因的 PCR 扩增结果
Fig. 1 PCR amplification result of VAMP7 and Vti1a

2.2 载体构建与重组蛋白表达

将目的载体 PET30a 与测序正确的中间载体进行 LR 重组,获得重组原核表达载体 PET30a-VAMP7 和 PET30a-Vti1a,然后将这两种原核表达载体分别转入大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中,挑取单菌落于 LB 液体培养基中培养。在 37℃、200 r/min 条件下,IPTG 诱导 4 h 后,利用 SDS-PAGE 凝胶电泳检测蛋白表达情况。结果发现,目的蛋白已特异性表达,VAMP7 和 Vti1a 蛋白大小分别为 22.5 kDa 和 23.4 kDa,与预期的大小一致,而未诱导的菌液样品中未见目的条带(图 2)。因为前期设计的 VAMP7 和 Vti1a 融合蛋白含有 6×His 标签序列,因此在 Western blot 检测中,选用 6×

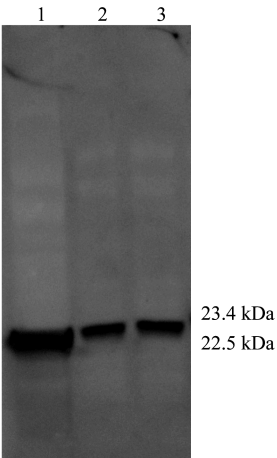
His 单克隆抗体特异性检测目的蛋白的表达情况。结果表明,抗体可分别与 VAMP7 和 Vti1a 的融合蛋白发生特异性反应(图 3)。蛋白纯化中需利用可溶性的蛋白,因为外源基因在大肠杆菌中表达容易产生包涵体蛋白,因此本实验对获得的融合蛋白进行了检测,结果发现,诱导得到的融合蛋白为包涵体蛋白,需要进一步优化诱导条件,以获得可溶性蛋白。



M: 蛋白分子量标准; 1~2: PET30a-VAMP7载体表达产物; 3~4: PET30a-Vti1a载体表达产物
M: Protein molecular weight marker; 1-4: Total proteins of PET30a-VAMP7 (lane 1 and 2) and PET30a-Vti1a (lane 3 and 4) in *E. coli*

图 2 VAMP7 和 Vti1a 基因原核表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of expressed VAMP7 and Vti1a in *Escherichia coli* after induced by IPTG



1: VAMP7基因表达产物; 2~3: Vti1a基因表达产物
1: Purified recombinant VAMP7; 2-3: Purified recombinant Vti1a

图 3 VAMP7 和 Vti1a 重组蛋白的 Western blot 检测
Fig. 3 Western blot analysis of fusion proteins VAMP7 and Vti1a expressed in *Escherichia coli*

2.3 可溶性蛋白的诱导及纯化

为获得可溶性蛋白,本试验进一步优化诱导条件:当菌液 OD₆₀₀ 为 0.1 时,向其中加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L,将其置于 16℃,100 r/min 的条件下诱导过夜。超声波破碎诱导后的菌体,离心得上清和沉淀。利用 SDS-PAGE 电泳分别对收集获得的上清和沉淀进行检测,结果表明,沉淀和上清中均含有目的蛋白。因沉淀中常存在包涵体蛋白,因此本研究选择回收纯化上清中的可溶性蛋白(图 4),用于下一步的抗体制备。

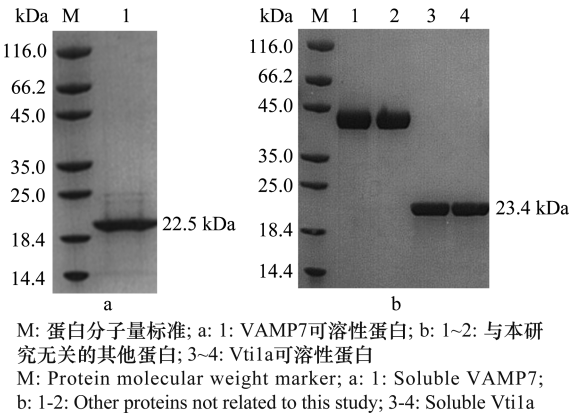


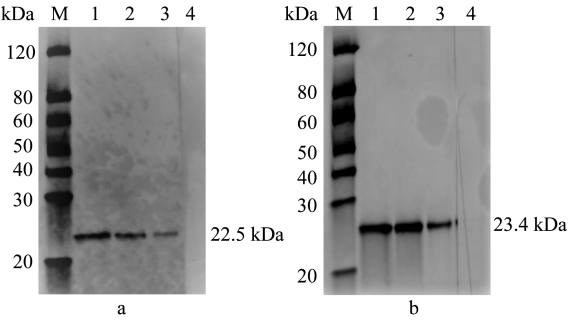
图 4 VAMP7 和 Vti1a 可溶性蛋白的 SDS-PAGE 分析
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of soluble VAMP7 and Vti1a after Ni₂ + NTA affinity chromatography

2.4 抗体的制备及 Western blot 检测

分别将纯化后的 VAMP7 和 Vti1a 多点免疫注射于新西兰公兔皮下,制备相应的抗血清。另外,提取白背飞虱的总蛋白,后将总蛋白通过 SDS-PAGE 凝胶电泳转移至硝酸纤维素膜上,后将其置于含 VAMP7 和 Vti1a 一抗抗体(1:4 000 稀释)的抗体稀释液中孵育,以检测抗体特异性。Western blot 分析结果显示,VAMP7 和 Vti1a 的抗体分别与 VAMP7 和 Vti1a 的重组蛋白、白背飞虱总蛋白有特异性反应,产生 1 条 22.5 kDa 或 23.4 kDa 的条带,而与诱导的空载体未产生任何条带,说明制备的抗体具有特异性(图 5)。

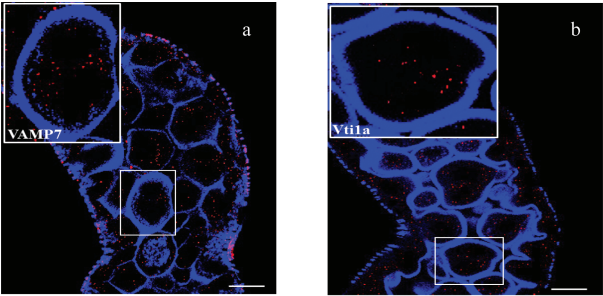
2.5 VAMP7 与 Vti1a 在白背飞虱体内的分布

参照本实验室已有方法进行免疫荧光检测^[12],对白背飞虱成虫肠道进行免疫荧光标记。经激光共聚焦显微镜观察发现,制备的抗体均可特异性地标记 VAMP7(图 6a,红色荧光标记)和 Vti1a 蛋白(图 6b,红色荧光标记),说明制备的 VAMP7 和 Vti1a 抗体能够用于免疫荧光学分析,VAMP7 和 Vti1a 均定位于白背飞虱的肠道上皮细胞内。



a: M: 蛋白分子量标准; 1~2: 白背飞虱总蛋白; 3: 纯化的VAMP7重组蛋白; 4: 阴性对照; b: M: 蛋白分子量标准; 1~2: 白背飞虱总蛋白; 3: 纯化的Vt1la重组蛋白; 4: 阴性对照
a: M: Protein molecular weight marker; 1 and 2: *Sogatella furcifera* total proteins; 3: Purified recombinant VAMP7; 4: PET30a vector transformed BL21 (DE3) as negative control. b: M: Protein molecular weight marker; 1 and 2: *S. furcifera* total proteins; 3: Purified recombinant Vt1la; 4: PET30a vector transformed BL21 (DE3) as negative control

图 5 VAMP7 和 Vt1la 多克隆抗体的 Western blot 分析
Fig. 5 Western blot analysis of VAMP7 and Vt1la polyclonal antibodies



a: VAMP7在白背飞虱中肠的定位; b: Vt1la在白背飞虱中肠的定位; 标尺=20 μm
a: *Sogatella furcifera* midguts are immunolabeled for cell membrane with Alexa Fluor 633 phalloidin (blue) and anti-VAMP7-IgG conjugated with Cy3 (red); b: *S. furcifera* midguts are immunolabeled for cell membrane with Alexa Fluor 633 phalloidin (blue) and anti-Vt1la-IgG conjugated with Cy3 (red). Scale=20 μm

图 6 白背飞虱中肠内 VAMP7 和 Vt1la 蛋白定位分析
Fig. 6 Distribution of VAMP7 and Vt1la in the midgut of *Sogatella furcifera* by immunofluorescence

3 讨论

本研究利用重组技术将白背飞虱编码的 VAMP 7 和 Vt1la 基因重组插入到原核表达载体 PET30a,在大肠杆菌中成功表达了这两种蛋白。可溶性的重组蛋白经 Ni^{2+} -NTA 亲和层析柱纯化后,作为抗原成功制备了具有较高特异性的多克隆抗体,为研究白背飞虱中这两种蛋白的功能奠定了基础。外源基因在大肠杆菌体内表达容易产生包涵体蛋白,这种状态的蛋白质不具有生物学活性且不易纯化回收。有研究表明,胞质内蛋白质生成速率会影响包涵体的形成,新多肽生成越快,浓度则越高,因高浓度的多肽没有充足时

间进行折叠,导致形成了非结晶、无定形的蛋白质聚集集体^[13]。为降低蛋白质的合成速度,获得可溶性蛋白,本研究选择利用低浓度菌体,在低温和低转速条件下诱导。当菌液 OD₆₀₀ 达 0.1 时,加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L,在 16℃、100 r/min 的条件下继续诱导过夜,进而大大增强了大肠杆菌中 VAMP7 和 Vt1la 蛋白的可溶性表达,为最终蛋白质纯化和特异性抗体制备奠定基础。将纯化蛋白免疫于新西兰公兔,制备得到 VAMP7 和 Vt1la 抗体。经检测两种抗体特异性良好、性价比较高,为下一步研究白背飞虱 VAMP7 和 Vt1la 与 SRBSDV 或其他相关病毒的互作机制打下了基础。

白背飞虱是目前已知的唯一一种能够以持久增殖循环的方式传播 SRBSDV 的介体昆虫^[2-3]。在白背飞虱取食过程中,病毒随汁液进入消化道,侵入肠道上皮细胞并在此复制,然后穿透基底膜后扩散入血液淋巴,继而到达唾液腺,再随唾液的分泌完成其传播过程,在整个循环过程中病毒与其昆虫介体内的多种蛋白会形成复杂多样的互作关系^[14]。实验室前期发现白背飞虱的 VAMP7 和 Vt1la 分别可与 SRBSDV 的主要外层衣壳蛋白 P10 发生互作^[5]。在树突结构细胞中,VAMP7 定义了一种新的膜结构,并参与大多数细胞类型常见的运输途径^[7],由此推测 VAMP7 和 Vt1la 可能参与到病毒在介体白背飞虱组织内的移动过程。利用 VAMP7 和 Vt1la 重组蛋白的抗体,我们发现 VAMP7 和 Vt1la 定位在介体白背飞虱肠道上皮细胞的胞质内,这也是 SRBSDV 复制和开始扩散的场所。有研究表明,在人体宫颈癌细胞中 VAMP7 和 Vt1la 蛋白能够组合形成一种 SNARE 复合体^[15],VAMP7、Vt1la、syntaxin 5 蛋白和 rBet1 蛋白共同形成 SNARE 复合体,能够帮助囊泡由内质网向高尔基体转运,在这个过程中 VAMP7 和 Vt1la 蛋白能够自动恢复以备循环使用^[16],我们推测,白背飞虱体内的 VAMP7 和 Vt1la 蛋白可能组成了一种 SNARE 复合体共同完成 SRBSDV 病毒粒体在介体肠道中的转运,而在此过程中 SRBSDV 粒体先与转运囊泡膜上的 VAMP7 结合,通过 VAMP 与靶标膜上的 Vt1la 蛋白特异性识别,将 SRBSDV 病毒粒体运输到特定的囊泡。因此,白背飞虱的这两种蛋白在其高效传播 SRBSDV 的过程中可能发挥重要的作用。

参考文献

[1] 沈君辉,尚金梅,刘光杰. 中国的白背飞虱研究概况[J]. 中国

水稻科学, 2003, 17(增刊): 7-22.

- [2] 周国辉, 温锦君, 蔡德江, 等. 呼肠孤病毒科斐济病毒属一新种: 南方水稻黑条矮缩病毒[J]. 科学通报, 2008, 53(20): 2500-2508.
- [3] PU Lingling, XIE Guohua, JI Chuanyan, et al. Transmission characteristics of *Southern rice black-streaked dwarf virus* by rice planthoppers [J]. Crop Protection, 2012, 41(6): 71-76.
- [4] LIU Wenwen, GRAY S M, HUO Yan, et al. Proteomic analysis of interaction between a plant virus and its vector insect reveals new functions of hemipteran cuticular protein [J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2015, 14(8): 2229-2242.
- [5] THAN W, QIN Faliang, LIU Wenwen, et al. Analysis of *Sogatella furcifera* proteome that interact with P10 protein of Southern rice black-streaked dwarf virus [J/OL]. Scientific Reports, 2016, 6: 32445. DOI: 10.1038/srep32445.
- [6] JAHN R, SCHELLER R H. SNAREs-engines for membrane fusion [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2006, 7(9): 631-643.
- [7] ADVANI R J, YANG Bin, PREKERIS R, et al. VAMP-7 mediates vesicular transport from endosomes to lysosomes [J]. Journal of Cell Biology, 1999, 146(4): 765-775.
- [8] GALLI T, ZAHRAOUI A, VAIDYANATHAN V V, et al. A novel tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein in SNARE complexes of the apical plasma membrane of epithelial cells [J]. Molecular Biology of the Cells, 1998, 9(6): 1437-1448.
- [9] RAMIREZ D M O, KHVOTCHEW M, TRAUTERMAN B, et al. Vt1a identifies a vesicle pool that preferentially recycles

at rest and maintains spontaneous neurotransmission [J]. Neuron, 2012, 73(1): 121-134.

- [10] EMPERADOR-MELERO J, TOONEN R F, VERHAGE M. Vti proteins: beyond endolysosomal trafficking [J]. Neuroscience, 2019, 420: 32-40.
- [11] QIN Faliang, LIU Wenwen, WU Nan, et al. Invasion of midgut epithelial cells by a persistently transmitted virus is mediated by sugar transporter in its insect vector [J/OL]. PLoS Pathogens, 2018, 14(7): e1007201. DOI: 10.1371/journal.ppat.1007201.
- [12] WANG Yajiao, Mao Qianzhao, LIU Wenwen, et al. Localization and distribution of wheat dwarf virus in its vector leafhopper, *Psammotettix alienus* [J]. Phytopathology, 2014, 104(8): 897-904.
- [13] 方敏, 黄华. 包涵体蛋白体外复性的研究进展 [J]. 生物工程学报, 2001, 17(6): 608-612.
- [14] HOGENHOUT S A, AMMAR E D, WHITFIELD A E, et al. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses [J]. Annual Review of Phytopathology, 2008, 46: 327-359.
- [15] FLOWERDEW S E, BURGOYNE R D. A VAMP7/Vt1a SNARE complex distinguishes a non-conventional traffic route to the cell surface used by KChIP1 and Kv4 potassium channels [J]. Biochemical Journal, 2009, 418(3): 529-540.
- [16] SIDDIQI S A, SIDDIQI S, MAHAN J, et al. The identification of a novel ER to Golgi SNARE complex used by the prechylomicron transport vesicle [J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(30): 20974-20982.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 54 页)

- [13] NILIUS B, OWSIANIK G. The transient receptor potential family of ion channels [J]. Genome Biology, 2011, 12(3): 218.
- [14] VRIENS J, NILIUS B, VOETS T. Peripheral thermosensation in mammals [J/OL]. Nature Reviews Neuroscience, 2014, 15(9): 573. DOI: 10.1038/nrn3784.
- [15] CASTILLO K, DIAZ-FRANULIC I, CANAN J, et al. Thermally activated TRP channels: molecular sensors for temperature detection [J/OL]. Physical Biology, 2018, 15(2): 021001. DOI: 10.1088/1478-3975/aa9abf.
- [16] 魏金金, 曹德盼, 杨婷, 等. 豌豆蚜温度受体基因 *Painless* 的克隆及时间和组织表达 [J]. 中国农业科学, 2014, 47(19): 3799-3809.
- [17] TRACEY W D, WILSON R I, LAURENT G, et al. *Painless*, a *Drosophila* gene essential for nociception [J]. Cell, 2003, 113(2): 261-273.
- [18] MATSUURA H, SOKABE T, KOHNO K, et al. Evolutionary conservation and changes in insect TRP channels [J/OL]. BMC Evolutionary Biology, 2009, 9(1): 228. DOI: 10.1186/1471-2148-9-228.
- [19] LIVAK K, SCHMITTGEN T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$

method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

- [20] GIULIETTI A, OVERBERGH L, VALCKX D, et al. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression [J]. Methods, 2002, 25(4): 386-401.
- [21] ALONSO-CARBAJO L, KECSKES M, JACOBS G, et al. Muscling in on TRP channels in vascular smooth muscle cells and cardiomyocytes [J]. Cell Calcium, 2017, 66: 48-61.
- [22] ROSENZWEIG M, KANG K, GARRITY P A. Distinct TRP channels are required for warm and cool avoidance in *Drosophila melanogaster* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008, 105(38): 14668-14673.
- [23] LISHKO P V, PROCKO E, JIN Xiangshu, et al. The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity [J]. Neuron, 2007, 54(6): 905-918.
- [24] CORDERO-MORALES J F, GRACHEVA E O, JULIUS D. Cytoplasmic ankyrin repeats of transient receptor potential A1 (TRPA1) dictate sensitivity to thermal and chemical stimuli [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(46): 18595-18596.

(责任编辑: 田 喆)