

灰飞虱冠蛋白的基因克隆与表达分析

钟嘉怡, 李莉, 王锡锋, 刘文文*

(中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害综合治理全国重点实验室, 北京 100193)

摘要 灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 冠蛋白属于 WD40 重复超家族成员, 主要通过结合肌动蛋白调控细胞骨架的动态聚合与解聚。本研究通过 RT-PCR 克隆并获得了灰飞虱 3 个冠蛋白 coronin 1A, coronin 2B 和 coronin 7 的基因 CDS 区。系统进化树分析显示, 这 3 个冠蛋白分别属于 3 个分支, 且与褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 的 3 个冠蛋白同源性最高, 氨基酸序列相似性分别为 99.2%、88.2% 和 82.5%。荧光定量 PCR 检测结果显示, coronin 1A 在成虫中的转录水平显著高于 2 龄、4 龄若虫, coronin 2B 在雄虫中的转录水平显著高于 2 龄、4 龄若虫和雌虫, coronin 7 在雌虫中的转录水平显著高于 2 龄、4 龄若虫和雄虫。而 3 个冠蛋白基因在唾液腺中的转录水平都显著高于肠道。灰飞虱携带水稻条纹病毒(rice stripe tenuivirus, RSV)后体内 3 个冠蛋白基因的转录水平显著高于对照, 说明冠蛋白可能在灰飞虱传播 RSV 过程中发挥一定作用, 研究结果为深入探究冠蛋白的功能奠定了基础。

关键词 灰飞虱; 水稻条纹病毒; 冠蛋白; 转录水平

中图分类号: S 433.3; S 435.11 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2023077

Gene cloning and expression analysis of coronins in *Laodelphax striatellus*

ZHONG Jiayi, LI Li, WANG Xifeng, LIU Wenwen*

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

Abstract The coronins of *Laodelphax striatellus* are the members of WD40-repeat protein superfamily, which can regulate the dynamic polymerization and depolymerization of actin cytoskeleton. In this study, we cloned the coding sequences of three coronins: coronin 1A, coronin 2B, and coronin 7 of *L. striatellus* by RT-PCR. Phylogenetic analysis showed that these three coronins belonged to separate branches, with the highest homology observed with *Nilaparvata lugens*, showing amino acid sequence similarities of 99.2%, 88.2% and 82.5%, respectively. Analysis of transcription levels of coronin genes showed that transcription level of coronin 1A in adults was significantly higher than that in the 2nd- and 4th-instar nymphs, transcription level of coronin 2B in male adults was significantly higher than in the 2nd- and 4th-instar nymphs and female adults, and transcription level of coronin 7 in female adults was significantly higher than that in the 2nd- and 4th-instar nymphs and male adults. Moreover, the transcription level of the three coronin genes in the salivary glands were significantly higher than those in the gut. In addition, the transcription levels of the three coronin genes in *L. striatellus* carrying rice stripe tenuivirus (RSV) were significantly higher than in non-viruliferous insects, indicating that the three coronins may play a role in transmitting RSV. This study have laid a foundation for further studies on the function of coronins in virus-transmission.

Key words *Laodelphax striatellus*; rice stripe tenuivirus; coronin; transcription level

灰飞虱 *Laodelphax striatellus* (small brown planthopper, SBPH) 属半翅目 Hemiptera 飞虱科 Delphacidae, 其除了直接取食水稻韧皮部汁液对水稻产生危害外, 还能分泌各种化学物质(如多种水解酶)以及间接产生“蜜露”导致水稻长势减弱或死

亡^[1]。此外, 灰飞虱还是多种作物病毒的传播介体, 可传播水稻条纹病毒(rice stripe tenuivirus, RSV)、水稻黑条矮缩病毒(rice black-streaked dwarf virus)、北方禾谷花叶病毒(northern cereal mosaic virus)和大麦黄条点花叶病毒(barley yellow striate

收稿日期: 2023-02-22

修订日期: 2023-03-06

基金项目: 国家自然科学基金(32270173); 国家重点研发计划政府间国际科技创新合作重点专项(2019YFE0108500)

* 通信作者 E-mail: liuwenwen01@caas.cn

mosaic virus)等,导致病毒病害的大面积暴发流行,作物产量严重降低甚至绝收,其造成的病害损失常大于直接取食危害^[2-6]。为了解析灰飞虱的传毒机制,本实验室前期以 RSV 的核衣壳蛋白(nucleocapsid protein, NP)为诱饵筛选了灰飞虱的 cDNA 文库并获得了与 NP 互作的冠蛋白^[7]。

冠蛋白家族(coronin family)是一类进化上保守的肌动蛋白结合蛋白,是由 de Hostos 等于 1991 年首次在盘基网柄菌 *Dictyostelium discoideum* 中鉴定到的,其定位于细胞表面冠状突起,属于 WD40 重复超家族^[8]。在哺乳动物中,冠蛋白家族有 7 个成员,分为 3 大类,其中 coronin 1A, coronin 1B, coronin 1C 和 coronin 6 属于 I 类, coronin 2A 和 coronin 2B 属于 II 类, coronin 7 属于 III 类^[9]。目前包括褐飞虱 *Nilaparvata lugens*、烟粉虱 *Bemisia tabaci* 和棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 在内的多种昆虫的冠蛋白,在 NCBI 数据库中都只检索到了 3 种不同类型,分别属于 I 类、II 类和 III 类。有文献依据的盘状网柄菌中只鉴定到了 coronin 7 (corB)、villindin 和 coronin (corA) 这 3 种冠蛋白;黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 鉴定到 2 种冠蛋白 coronin (coro)和 Pod-1 (coronin 7);而秀丽蝇杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 鉴定到 2 种冠蛋白 Pod-1 (coronin 7)和 coronin (cor-1)^[10]。冠蛋白参与肌动蛋白动力学的调节,细胞骨架动力学是许多生理过程的重要组成部分,如细胞的运动迁移和囊泡的运输等^[11]。细胞运动在包括癌症和自身免疫性疾病等各种疾病的病因学中起着至关重要的作用^[12]。大多数情况下,运动性依赖于肌动蛋白细胞骨架的动态重组,而肌动蛋白微丝的聚合和解聚是一个高度调控的过程,受许多肌动蛋白相关蛋白如冠蛋白、Arp2/3 复合体、ADF 和丝切蛋白(cofilin)等的调节。目前对冠蛋白的研究主要是聚焦在人和哺乳动物中, Ren 等研究发现 coronin 3 促进胃癌转移^[13]; Rastetter 等发现 MAPK12/coronin 2 通路参与调控结肠癌细胞的转移^[14]; Wu 等研究发现 coronin 1C 的表达与肝癌转移成正相关,而与患者预后成负相关, coronin 1C 增强了肝癌细胞的迁移和侵袭活力^[15-16];而乳腺癌、神经胶质母细胞瘤、肾癌等癌症的恶性程度也被证明与冠蛋白家族成员相关^[17-19]。

鉴于冠蛋白家族成员在人类疾病中发挥的重要作用和在真核生物体内的保守性,且其在昆虫中

的功能研究还不清楚,本研究克隆了灰飞虱冠蛋白家族 3 个成员 coronin 1A、coronin 2B 和 coronin 7 的基因,进行了生物信息学相关分析,构建了与其他物种同源基因的进化树,并对这 3 个蛋白在灰飞虱不同发育阶段和不同组织的表达量进行了分析,同时检测了灰飞虱携带 RSV 后冠蛋白的表达差异,研究结果为深入探究冠蛋白在灰飞虱体内的功能及其在传毒过程中发挥的作用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

试验所用灰飞虱包括携带水稻条纹病毒(rice stripe tenuivirus, RSV)的灰飞虱(带毒灰飞虱)和不携带 RSV 的灰飞虱(无毒灰飞虱)种群,为本实验室长期保存种群,分别用‘武育粳 3 号’水稻饲养于恒温光照培养箱中。饲养条件为:光周期为 L//D=16 h//8 h,温度 26~28℃,相对湿度 70%。每 7 d 更换 1 次水稻。每 2 个月利用斑点杂交法对携带 RSV 的灰飞虱(带毒灰飞虱)进行筛选,保证种群带毒率保持在 90%以上。

1.2 主要试剂

All-In-One First-Strand cDNA Synthesis Mix for qPCR (AE341)购自北京全式金公司; Total RNA extraction reagent (R401)和 2×Phanta Max Master Mix (P525)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 1st Strand cDNA Synthesis Kit (11139ES60)和 qPCR SYBR Green Master Mix (11184ES08)购自上海翌圣生物科技股份有限公司; pTOPO-TA/Blunt Simple Cloning Kit (CV2201)和琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒 (DR01)购自北京艾德莱生物科技有限公司; 大肠杆菌 DH5α 菌株 (SAC21)购自北京金沙生物公司; 快速质粒小提试剂盒 (DP105)购自北京生化科技有限公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.3 序列比对及引物设计

在 NCBI 上检索得到褐飞虱冠蛋白家族 3 个成员 (coronin 1A: LOC111059043; coronin 2B: LOC111048487; coronin 7: LOC111045201) 的 CDS 序列。与本地灰飞虱转录组进行 BLAST 比对,拼接后得到灰飞虱 coronin 1A, coronin 2B 和 coronin 7 的部分序列。根据 CDS 区设计 3 对引物克隆 3 个冠蛋白基因,克隆后进行测序分析,再根据测序得到的正确序列设计相应基因的 qPCR 引物(表 1)。

表 1 本试验所用引物信息
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence	退火温度/°C Annealing temperature	引物用途 Purpose
coronin 1A-F	ATGTCATTTTCGAGTTGTTTCG	53	基因克隆
coronin 1A-R	TTAGACCTCGTCTGGTGCAA		
coronin 2B-F	ATGACCAATTCACAGTTGTGG	53	
coronin 2B-R	TTACTGTTTGAGTTTGCGCT		
coronin 7-F	ATGGCCTGGCGTTTAAAGC	54	
coronin 7-R	TCACTCATCCATTCTTCTCA		
Q-actin-F	GCCATCTACGAAGGTTAC		荧光定量 PCR
Q-actin-R	CCATTTCTGTTCGAAGTCCAG		
Q-coronin 1A-F	CAGGGGGTGGTGCTTTCATC		
Q-coronin 1A-R	ACCATGCAATGTCTAGGACGG		
Q-coronin 2B-F	ATGCATCGTGCTCTGACGA		
Q-coronin 2B-R	CACCCTTCGCTTATGACCGT		
Q-coronin 7-F	TCGGGCATCAATCCGAAACA		
Q-coronin 7-R	GACTTGGTTGACAGCGAGGA		
Q-RSV-F	GCCACTCTAGCTGATTGCA		
Q-RSV-R	GTGTCACCACCTTTGTCTCTT		

1.4 灰飞虱样品收集

不同组织样品:取 30 头灰飞虱置于离心管中并插入冰中,为 1 个重复,共 3 个重复。待灰飞虱冻晕后,在体视显微镜(明美光电技术有限公司,型号 MZ101)下解剖唾液腺和肠道,并置于 PBS 溶液中,离心后去掉 PBS 溶液收集唾液腺和肠道组织;解剖完唾液腺和肠道后在剩余组织中加入 3 μL 超纯水,使虫体内血淋巴释放出来,用移液器转移到离心管中。将收集的唾液腺、肠道和血淋巴放入液氮或 -80°C 保存。

不同发育阶段样品:取灰飞虱 2 龄、4 龄若虫,雌、雄成虫各 30 头,每 10 头 1 个重复,共 3 个重复。放入液氮或 -80°C 保存。

带毒灰飞虱与无毒灰飞虱样品:取带毒率 90% 以上的灰飞虱和无毒灰飞虱各 30 头,每 10 头 1 个重复,共 3 个重复。放入液氮或 -80°C 保存。

1.5 总 RNA 提取与 cDNA 合成

采用 TRIzol 试剂分别提取灰飞虱不同组织、不同发育阶段、带毒灰飞虱和无毒灰飞虱的总 RNA。用 NanoDrop 1000 测定总 RNA 浓度,确保总 RNA 的质量良好后,用 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录合成 cDNA 第一链,此 cDNA 用于后续基因克隆的模板,另用 All-In-One First-Strand cDNA Synthesis Mix for qPCR 将 1 μg 总 RNA 反转录成短链 cDNA,用于后续荧光定量 PCR。

1.6 冠蛋白基因的克隆

以 1.5 中合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩

增,反应体系(50 μL):2×Phanta Max Master Mix 25 μL,正、反向引物(10 μmol/L)各 2 μL,模板 cDNA 2 μL,超纯水 19 μL。反应条件为:95°C 预变性 3 min;95°C 变性 15 s,退火 15 s(温度根据引物设定),72°C 延伸(30~60 s/kb),35 个循环;72°C 延伸 5 min。1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物,使用琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒纯化回收目的条带,然后将回收产物连接到 pTOPO 克隆载体上,并转化 DH5α 感受态细胞,涂布于含有氨苄青霉素的 LB 固体培养基上,37°C 过夜培养。挑取单克隆于 600 μL 含有氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37°C,200 r/min 培养 4 h,PCR 验证后,将阳性克隆菌液送至华大基因进行测序,将测序正确的质粒提取 DNA 保存于 -20°C。

1.7 序列拼接及生物信息学分析

利用 SnapGene 软件对测序结果进行拼接及翻译。对氨基酸序列进行跨膜结构(TMhmm Server 2.0, <https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)和信号肽(SignalP 4.1 Server, <https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>)预测;用 ProtParam(<https://web.expasy.org/protparam/>)分析蛋白质分子量和等电点;利用 SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/>)进行蛋白质结构预测;在 NCBI(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)上进行 Blastp 序列比对,检索其他物种的冠蛋白基因序列,利用

EMBOSS Needle (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/) 对序列相似性进行比较,利用 MEGA X 软件构建不同物种冠蛋白基于氨基酸序列的系统进化树。

1.8 实时荧光定量 PCR

以 1.5 中合成的用于 qPCR 的 cDNA 为模板,反应体系 (20 μL) 为: qPCR SYBR Green Master Mix 10 μL , 正、反向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.4 μL , cDNA 2 μL , 超纯水 7.2 μL 。反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环。以 *actin* 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对各个基因的相对表达量进行计算分析。

1.9 数据分析

利用 IBM SPSS Statistics 26 对试验数据进行分析, 3 种冠蛋白基因在不同发育阶段和不同组织之间的差异显著性分析采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 和最小显著性差异法 (least significant difference, LSD), 在无病毒灰飞虱和带病毒灰飞虱之间的差异显著性分析采用 *t* 检验, 显著水平设为 0.05 和 0.01。

2 结果与分析

2.1 冠蛋白基因克隆及生物信息学分析

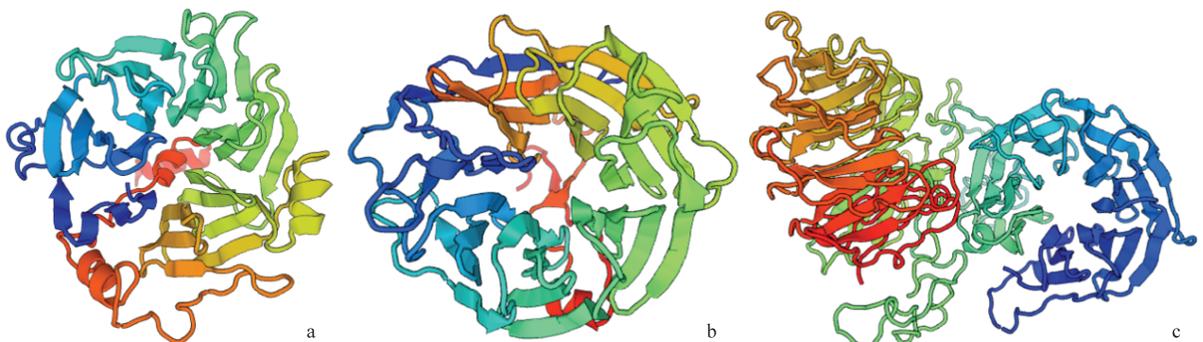
基于灰飞虱转录组数据, 经 PCR 扩增和测序最终得到灰飞虱 coronin 1A、coronin 2B 和 coronin 7 基因的 CDS 区序列, 长度分别为 1 506、1 749 bp 和 3 213 bp, 分别编码 501、582 个和 1 070 个氨基酸。预测的蛋白分子量分别为 55.88、65.67 kD 和 116.81 kD, 等电点分别为 6.00、8.58 和 6.15, 均无跨膜结构, 也无信号肽。利用 EMBOSS Needle 对

氨基酸序列进行相似性比对, 发现灰飞虱 coronin 1A、coronin 2B 和 coronin 7 与褐飞虱 *N. lugens* coronin 1A、coronin 2B 和 coronin 7 的相似性分别为 99.2%、88.2%、82.5%, 与人 *Homo sapiens* 的 coronin 1A、coronin 2B 和 coronin 7 的相似性分别为 68.2%、61.7%、53.7%, 说明 3 个冠蛋白在不同物种间具有高度的保守性。

冠蛋白家族成员具有 WD40 重复结构域 (含有保守的色氨酸-天冬氨酸基序, 长度约为 40 aa), 此结构域包含 5~7 个 WD40 重复序列, 在空间上折叠成一个具有 5~7 个叶片的 β -螺旋桨结构。利用 SWISS-MODEL 对灰飞虱 3 个蛋白的三维结构进行预测, 结果表明, 其中 coronin 1A 和 coronin 2B 含有 N 端由 WD40 重复序列形成的“螺旋桨”结构及 C 端形成的卷曲螺旋结构, 而 coronin 7 是长链蛋白, 空间结构上包含 2 个由 WD40 重复序列形成的“螺旋桨”, 但其缺少 C 端的卷曲螺旋结构域 (图 1)。

2.2 冠蛋白系统进化树分析

从 NCBI 数据库中选取与灰飞虱冠蛋白家族序列同源性较高的 7 种昆虫, 褐飞虱、棉铃虫、烟粉虱、茶翅蛾 *Halymorpha halys*、意大利蜜蜂 *Apis mellifera*、米象 *Sitophilus oryzae*、致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus*, 再加上人和小家鼠 *Mus musculus* 冠蛋白家族的 7 个成员, 利用 MEGA X, 采用邻接法 (neighbour-joining method) 构建冠蛋白基于氨基酸序列在不同物种间的系统进化树。结果显示, 冠蛋白家族 I、II、III 类分别聚成一支, 说明 3 类蛋白在不同物种间保守性强。灰飞虱 coronin 1A、coronin 2B 和 coronin 7 与褐飞虱 coronin 1A、coronin 2B 和 coronin 7 亲缘关系最近 (图 2)。



a: coronin 1A; b: coronin 2B; c: coronin 7.

图 1 灰飞虱 3 个冠蛋白三维结构的预测

Fig. 1 Predicted three-dimensional structures of three coronins in *Laodelphax striatellus*

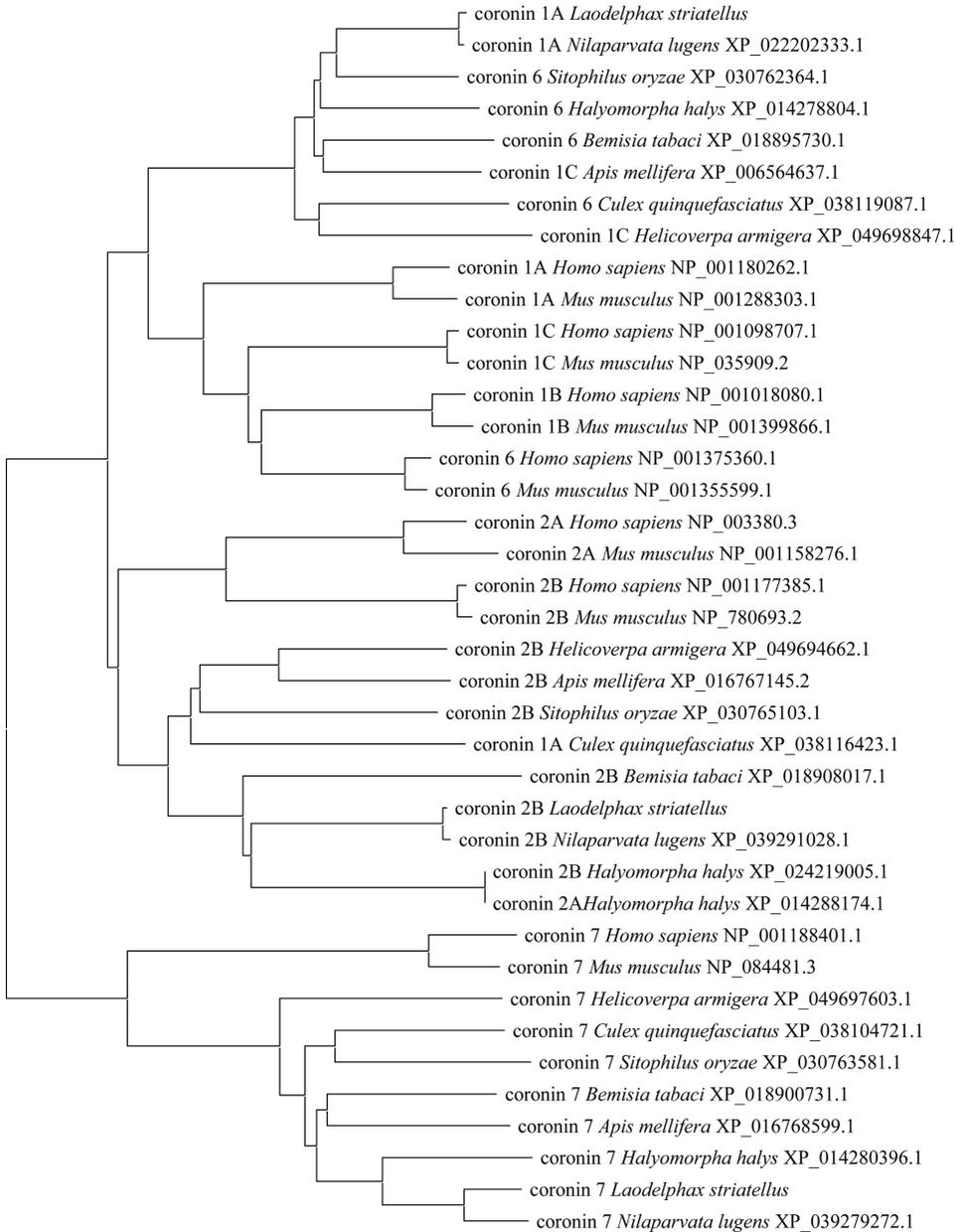


图 2 基于冠蛋白氨基酸序列构建灰飞虱与其他物种的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *Laodelphax striatellus* and other species based on coronin amino acid sequences

2.3 冠蛋白基因的时空表达分析

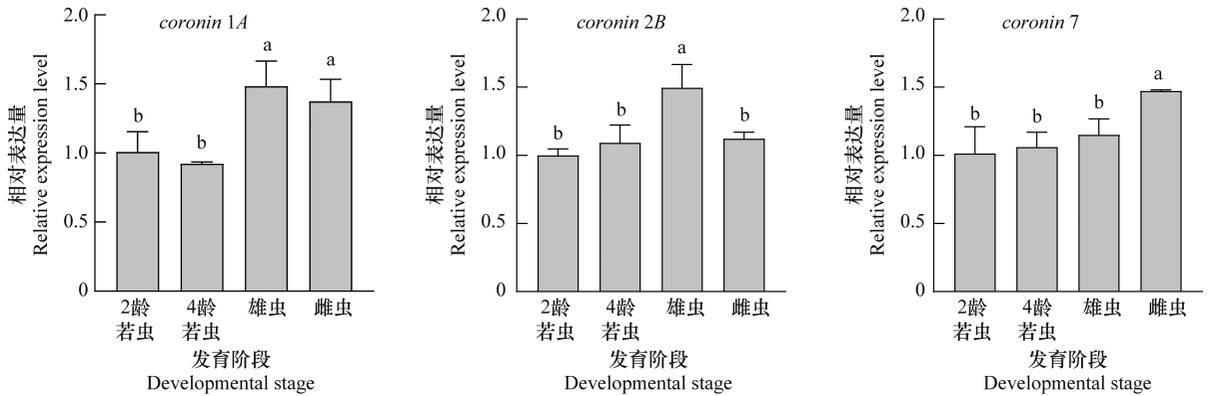
qPCR 检测结果表明, 3 个冠蛋白基因在灰飞虱的各发育阶段和不同组织中都有转录。*coronin 1A* 在成虫(雄虫和雌虫)中的转录水平显著高于 2 龄、4 龄若虫;*coronin 2B* 在雄虫中的转录水平显著高于 2 龄、4 龄若虫和雌虫;而 *coronin 7* 在雌虫中的转录水平显著高于 2 龄、4 龄若虫和雄虫(图 3)。

coronin 1A 在灰飞虱血淋巴中的转录水平最高, 其次是唾液腺, 肠道中最低;*coronin 2B* 在唾液腺中的转录水平最高, 其次是血淋巴和肠道;而 *coronin 7* 在唾液腺和血淋巴中的转录水平显著高于

肠道(图 4)。说明这 3 个冠蛋白基因在灰飞虱体内具有组织特异性, 它们发挥的功能可能也不一样。

2.4 带毒灰飞虱与无毒灰飞虱冠蛋白基因表达差异

为探究冠蛋白家族 3 个蛋白是否在灰飞虱传播水稻条纹病毒(RSV)中发挥一定功能, 我们检测了带毒灰飞虱和无毒灰飞虱体内冠蛋白基因的表达情况, 结果发现带毒灰飞虱体内 3 个冠蛋白基因的转录水平均显著高于无毒灰飞虱(图 5), 这说明病毒侵染灰飞虱后会显著上调冠蛋白基因的表达, 表明它们可能在灰飞虱传播 RSV 时发挥一定作用。



图中数据为平均值±标准误,不同小写字母表示经单因素方差分析(One-way ANOVA)和LSD检验差异显著($P < 0.05$)。下同。
Data are mean±SE. Different lowercase letters indicate significant differences by One-way ANOVA and LSD test ($P < 0.05$). The same applies below.

图 3 冠蛋白基因在灰飞虱不同发育阶段的表达量

Fig. 3 Expression levels of coronin genes at different developmental stages of *Laodelphax striatellus*

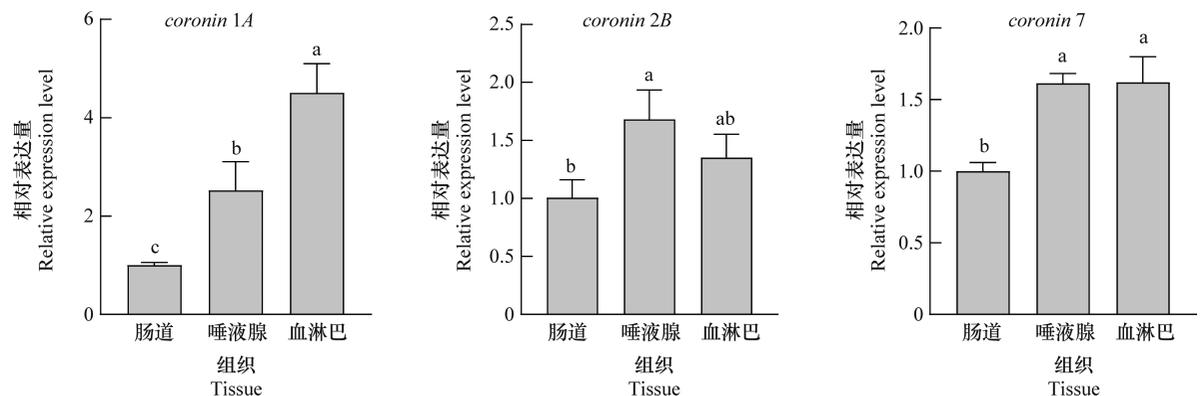
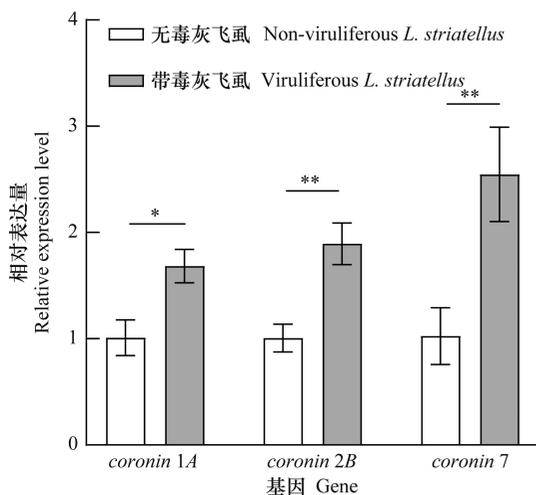


图 4 冠蛋白基因在灰飞虱不同组织的表达量

Fig. 4 Expression levels of coronin genes in different tissues of *Laodelphax striatellus*



图中数据为平均值±标准误。*和**分别表示经 t 检验冠蛋白基因的转录水平在0.05和0.01水平差异显著。

Data are mean±SE. * and ** indicate significant difference in transcription levels of coronin genes at 0.05 and 0.01 levels based on *t*-test.

图 5 带毒灰飞虱与无毒灰飞虱冠蛋白基因的表达量

Fig. 5 Expression level of coronin genes in viruliferous and non-viruliferous *Laodelphax striatellus*

3 结论与讨论

冠蛋白在高等真核生物中具有多种作用,已知它们是肌动蛋白结合蛋白之一,并参与多种重要的细胞功能^[10]。冠蛋白与 F-actin 的相互作用调节 F-actin 的表达和定位^[20-21]。恶性疟原虫 *Plasmodium falciparum* 的冠蛋白在其繁殖后期高表达,促进 F-actin 在质膜上的定位^[22]。因此,冠蛋白通过与蛋白质互作在 F-actin 定位方面具有重要作用。目前已有较多研究发现冠蛋白与人类疾病相关,其可促进肿瘤转移,影响癌症预后等^[23],但其在昆虫上的研究报道较少。NCBI 数据库中灰飞虱冠蛋白均未注释。本研究利用 RT-PCR 技术克隆获得了灰飞虱 coronin 1A、coronin 2B 和 coronin 7 的基因,其中 coronin 1A 与 coronin 2B 和 coronin 7 的氨基酸序列相似性分别为 57.9% 和 23.2%; coronin 2B 与 coronin 7 的相似性只有 22.2%,说明 3 个蛋白之间

的相似性较低,但3个蛋白在空间上都形成一个“螺旋桨”结构,这个结构被认为是冠蛋白与其他蛋白互作的平台^[10]。灰飞虱 *coronin 1A*、*coronin 2B* 和 *coronin 7* 与褐飞虱 *coronin 1A*、*coronin 2B* 和 *coronin 7* 的氨基酸序列相似性分别为 99.2%、88.2%、82.5%,与人 *coronin 1A*、*coronin 2B* 和 *coronin 7* 的相似性分别为 68.2%、61.7%、53.7%,且在对灰飞虱与其他物种的冠蛋白构建进化树时,冠蛋白的 I、II、III 类分别聚成一支,这说明冠蛋白家族成员在不同物种间高度保守。

目前对昆虫中冠蛋白的功能研究较少,但在哺乳动物中冠蛋白的研究已取得了很大进展。有研究发现 *coronin 1A* 参与了吞噬作用,*coronin 1A* 与 NADPH 氧化酶(PHOX)复合体的成分结合,该复合体聚集在吞噬小体表面,产生可以杀死体内病原体的超氧化物^[24]。Humphries 等发现,冠蛋白通过其卷曲螺旋结构域与 Arp2/3 复合体结合,将其招募到肌动蛋白细丝的两侧,促进肌动蛋白细丝成核;而在没有细丝存在的情况下,冠蛋白抑制 Arp2/3 复合体的成核活性^[25]。Cai 等提出 *coronin 1B* 可以通过引导磷酸酶 SSH1L 定位到片状脂膜,去磷酸化激活丝切蛋白(cofilin),从而增强 cofilin 活性来调控肌动蛋白细胞骨架的解聚^[26]。有证据表明,冠蛋白可以区别 F-actin 的核苷酸状态,*coronin 1B* 对 ATP-F-actin 的亲合力远高于对 ADP-F-actin 的亲合力^[27],ATP-F-actin 存在于肌动蛋白细丝聚合的正端,而 ADP-F-actin 存在于解聚末端。冠蛋白是如何调节肌动蛋白细丝动态变化的过程是复杂的,目前的研究也不够完整,但很明显,冠蛋白在肌动蛋白细丝的两端,分别参与了其聚合与解聚。

带毒灰飞虱与无毒灰飞虱相比,*coronin 1A*、*coronin 2B* 和 *coronin 7* 的转录水平均显著上升,而实验室前期利用 RSV 的核衣壳蛋白 NP 为诱饵筛选灰飞虱的 cDNA 文库时,仅筛选到 *coronin 1A* 与 NP 互作^[7]。由于 *coronin 1A* 是保守的肌动蛋白结合蛋白,其对肌动蛋白细胞骨架有着保守的调节作用,推测 *coronin 1A* 可能是通过与 RSV NP 的互作在灰飞虱传播 RSV 中发挥重要作用,且这个过程中可能有肌动蛋白细胞骨架的参与。*coronin 2B* 和 *coronin 7* 在 RSV 侵染后转录水平也显著上升,这

可能是因为 *coronin 2B* 和 *coronin 7* 并不是通过直接与 RSV NP 互作而是通过其他路径发挥功能,后续可以从 *coronin 2B* 和 *coronin 7* 与病毒其他蛋白的互作入手进行研究。

通过本研究,我们克隆了灰飞虱冠蛋白家族 3 个成员 *coronin 1A*、*coronin 2B* 和 *coronin 7*,它们在灰飞虱不同发育阶段的转录水平存在显著差异,且在唾液腺的转录水平显著高于肠道,也明确了灰飞虱携带 RSV 后会引起 3 个冠蛋白基因的转录水平上升,这为下一步探索这 3 个冠蛋白在灰飞虱传播 RSV 中的功能奠定了基础。

参考文献

- [1] 蒯鹏, 娄永根. 稻飞虱生物学、生态学及其防控技术研究进展[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2022, 48(6): 692-700.
- [2] 林奇英, 谢联辉, 谢莉妍, 等. 水稻条纹叶枯病的研究 II. 病害的症状和传播[J]. 福建农学院学报, 1991, 20(1): 24-28.
- [3] 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.
- [4] 周国辉, 张曙光, 邹寿发, 等. 水稻新病害南方水稻黑条矮缩病发生特点及危害趋势分析[J]. 植物保护, 2010, 36(2): 144-146.
- [5] 张爱红, 杨非, 闫冲, 等. 大麦黄条点花叶病毒传播方式和传播特性研究初报[J]. 植物病理学报, 2017, 47(5): 675-680.
- [6] 段西飞, 邸垫平, 余庆波, 等. 小麦矮穗病病原分子生物学鉴定[J]. 植物病理学报, 2010, 40(4): 337-342.
- [7] LIU Wenwen, GRAY S, 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.
- [8] DE HOSTOS E L, BRADTKE B, LOTTSPREICH F, et al. Coronin, an actin binding protein of *Dictyostelium discoideum* localized to cell surface projections, has sequence similarities to G protein beta subunits [J]. The EMBO Journal, 1991, 10(13): 4097-4104.
- [9] UETRECHT A C, BEAR J E. Coronins; the return of the crown [J]. Trends in Cell Biology, 2006, 16(8): 421-426.
- [10] CLEMEN C S, RYBAKIN V, EICHINGER L. The coronin family of proteins [M]. Sub-cellular biochemistry, 2008, 48: 1-137.
- [11] POLLARD T D, BORISY G G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments [J]. Cell, 2003, 112(4): 453-465.
- [12] TUR-GRACIA S, MARTINEZ-QUILES N. Emerging func-

- tions of cytoskeletal proteins in immune diseases [J/OL]. *Journal of Cell Science*, 2021, 134 (3): jcs253534. DOI: 10.1242/jcs.253534.
- [13] REN Gui, TIAN Qifei, AN Yanxin, et al. Coronin 3 promotes gastric cancer metastasis via the up-regulation of MMP-9 and cathepsin K [J/OL]. *Molecular Cancer*, 2012, 11 (1): 67. DOI: 10.1186/1476-4598-11-67.
- [14] RASTETTER R H, BLÖMACHER M, DREBBER U, et al. Coronin 2A (CRN5) expression is associated with colorectal adenoma-adenocarcinoma sequence and oncogenic signalling [J/OL]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 638. DOI: 10.1186/s12885-015-1645-7.
- [15] WU Long, PENG Chunwei, HOU Jinxuan, et al. Coronin-1C is a novel biomarker for hepatocellular carcinoma invasive progression identified by proteomics analysis and clinical validation [J/OL]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2010, 29(1): 17. DOI: 10.1186/1756-9966-29-17.
- [16] WU Lifen, CAI Chunli, WANG Xinghua, et al. MicroRNA-142-3p, a new regulator of RAC1, suppresses the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells [J]. *FEBS Letters*, 2011, 585(9): 1322 - 1330.
- [17] SCHMADEKA R, HARMON B E, SINGH M. Triple-negative breast carcinoma: current and emerging concepts [J]. *American Journal of Clinical Pathology*, 2014, 141 (4): 462 - 477.
- [18] THAL D, XAVIER C P, ROSENTERETER A, et al. Expression of coronin-3 (coronin-1C) in diffuse gliomas is related to malignancy [J]. *The Journal of Pathology*, 2008, 214(4): 415 - 424.
- [19] ATRIH A, MUDALIAR M A, ZAKIKHANI P, et al. Quantitative proteomics in resected renal cancer tissue for biomarker discovery and profiling [J]. *British Journal of Cancer*, 2014, 110(6): 1622 - 1633.
- [20] PATHAK S, GAUBA R, DANTU S C, et al. Coronin: an overview [M]. Switzerland: Springer Nature, 2019.
- [21] APPLETON B A, WU Ping, WIESMANN C. The crystal structure of murine coronin-1: a regulator of actin cytoskeletal dynamics in lymphocytes [J]. *Structure*, 2006, 14(1): 87 - 96.
- [22] OLSHINA M A, ANGRISANO F, MARAPANA D S, et al. *Plasmodium falciparum* coronin organizes arrays of parallel actin filaments potentially guiding directional motility in invasive malaria parasites [J/OL]. *Malaria Journal*, 2015, 14(1): 280. DOI: 10.1186/s12936-015-0801-5.
- [23] 林晨, 马琪, 王萍. 冠蛋白:肿瘤诊断的潜在靶点[J]. *解剖学报*, 2020, 51(3): 461 - 468.
- [24] GROGAN A, REEVES E, KEEP N, et al. Cytosolic phox proteins interact with and regulate the assembly of coronin in neutrophils [J]. *Journal of Cell Science*, 1998, 110(24): 3071 - 3081.
- [25] HUMPHRIES C L, BALCER H I, WINSOR B, et al. Direct regulation of Arp2/3 complex activity and function by the actin binding protein coronin [J]. *Journal of Cell Biology*, 2002, 159 (6): 993 - 1004.
- [26] CAI Liang, MARSHALL T W, UETRECHT A C, et al. Coronin 1B coordinates Arp2/3 complex and cofilin activities at the leading edge [J]. *Cell*, 2007, 128(5): 915 - 929.
- [27] CAI Liang, MAKHOV A M, BEAR J E. F-actin binding is essential for coronin 1B function *in vivo* [J]. *Journal of Cell Science*, 2007, 120(10): 1779 - 1790.
- (责任编辑: 杨明丽)
-
- (上接 177 页)
- [20] 夏亚运, 田苗苗, 李明明, 等. 红颈常室茧蜂雌性生殖系统及卵巢管形态学观察[J]. *中国生物防治学报*, 2019, 35(4): 517 - 526.
- [21] 胡尊睿, 徐志强, 姜晓龙. 管氏肿腿蜂雌性生殖系统解剖结构的研究[J]. *中国森林病虫*, 2013, 32(1): 4 - 7.
- [22] 沈顺章, 牛黎明, 符悦冠, 等. 日本食蚜蚜小蜂的交配行为及雌蜂生殖系统观察[J]. *环境昆虫学报*, 2020, 42(4): 985 - 990.
- [23] 赵灿, 张宝鑫, 李敦松. 两种平腹小蜂的研究进展[J]. *植物保护*, 2022, 48(5): 23 - 29.
- [24] 张彦龙, 唐艳龙, 王小艺, 等. 天牛卵寄生蜂研究进展及应用前景[J]. *林业科学研究*, 2020, 33(4): 169 - 176.
- [25] LABARBERA M. Analyzing body size as a factor in ecology and evolution [J]. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1989, 20: 97 - 117.
- [26] UENO T. Adult size and reproduction in the ectoparasitoid *Agrothereutes lanceolatus* Walker (Hym. Ichneumonidae) [J]. *Journal of Applied Entomology*, 1999, 123 (6): 357 - 361.
- [27] ELIPOPOULOS P A, HARVEY J A, ATHANASSIOU C G, et al. Effect of biotic and abiotic factors on reproductive parameters of the synovigenic endoparasitoid *Venturia canescens* [J]. *Physiological Entomology*, 2003, 28(4): 268 - 275.
- (责任编辑: 杨明丽)