

褐飞虱核糖体小亚基蛋白 S8 基因 *NIRPS8* 的克隆及其表达分析*

朱家骏** 郝培应*** 陆潮峰 冯娅琳 俞晓平***

(中国计量学院生命科学院, 浙江省生物计量及检验检疫技术重点实验室, 杭州 310018)

摘 要 【目的】核糖体蛋白在生物体内具有重要作用, 本研究旨在探明核糖体蛋白 S8 在褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 生长发育过程中的表达规律和功能。【方法】本文根据褐飞虱基因表达谱提供的差异表达基因信息及转录组提供的基因核心序列, 结合褐飞虱基因组比对分析, 对褐飞虱核糖体 S8 基因进行了预测, 并通过 RT-PCR 获得了褐飞虱核糖体小亚基蛋白 S8 的全长 cDNA 序列, 命名为 *NIRPS8* (GenBank 登录号: KU341337)。【结果】*NIRPS8* 基因全长 627 bp, 编码 208 个氨基酸。进化分析表明, 褐飞虱与桑粉介壳虫 *Maconellicoccus hirsutus* 亲缘关系最为接近。应用荧光定量 PCR 分析了基因 *NIRPS8* 的表达规律, 结果表明, *NIRPS8* 基因在褐飞虱怀卵雌虫中表达量最高, 而在雄成虫、初羽化雌成虫与 1~5 龄若虫表达量相对较低; 在褐飞虱体内, *NIRPS8* 基因在卵巢中表达量最高, 中肠次之, 在其他部位表达量较低。在抗性品种 ASD7 和 RHT 上, *NIRPS8* 基因表达量分别为感性品种 TN1 上的 1.99 倍和 2.14 倍。*NIRPS8* 基因在经过饥饿处理 1 d 的褐飞虱组中表达量为正常组的 1.6 倍。【结论】研究结果显示 *NIRPS8* 基因在褐飞虱生长、繁殖中发挥作用, 为进一步研究 *NIRPS8* 基因在褐飞虱生长发育和对抗性品种适应中的功能提供了线索。**关键词** 褐飞虱, *NIRPS8* 基因, RT-qPCR, 致害性变异

Cloning and expression analysis of ribosomal protein S8 gene, *NIRPS8* in the brown planthopper (*Nilaparvata lugens*)

ZHU Jia-Jun** HAO Pei-Ying*** LU Chao-Feng FENG Ya-Lin YU Xiao-Ping***

(Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biometrology and Inspection & Quarantine, College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

Abstract [Objectives] Ribosomal proteins play very important roles in the growth and development of organisms. This study aimed to determine the expression pattern and function of a ribosomal protein S8 gene, *NIRPS8* (GenBank No. KU341337) in the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. [Methods] The full length cDNA of *NIRPS8* was amplified from *N. lugens* by RT-PCR and rapid-amplification of cDNA ends using RNA-seq analysis of transcriptome and gene expression profile information. [Results] The results show that *NIRPS8* has an open reading frame of 627 bp encoding 208 amino acid residues. A phylogenetic tree based on variation in the *NIRPS8* gene shows that *N. lugens* is most closely related to *Maconellicoccus hirsutus*. qRT-PCR analysis revealed that the mRNA level was highest in gravid females but relatively low in adult males, newly eclosed female adults, and nymphs. qRT-PCR analysis of the head, thorax, fat body, ovaries, and mid gut, revealed that *NIRPS8* was most highly expressed in the ovaries. The relative expression levels of *NIRPS8* in the resistant rice varieties ASD7 and RHT were 1.99 and 2.14 times, respectively, that in the susceptible rice variety TN1. The relative expression of *NIRPS8* in a treatment group provided with water only was 1.6 times that of a group fed TN1 rice. [Conclusion] This study provides new clues for further research on the function of *RPS8* in *N. lugens* development and its adaptation to

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金项目 (31171860, 30900944); 国家重点基础研究发展计划 (“973”计划) 项目 (2012CB114100, 2011CB111602); 浙江省公益性技术应用研究计划项目 (2012C22041)

**第一作者 First author, E-mail: 785326209@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: yxp@cjlu.edu.cn; haopeiyy@163.com

收稿日期 Received: 2016-01-11, 接受日期 Accepted: 2016-03-17

resistant rice varieties.

Key words *Nilaparvata lugens*, *NIRPS8* gene, RT-qPCR, virulence variation

褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stål) 是单食性水稻害虫, 主要取食水稻韧皮部汁液, 对水稻的茎部和叶鞘造成创伤; 此外, 褐飞虱还传播水稻草状丛矮病毒和齿叶矮缩病毒等, 诱发水稻的倒伏、减产 (Zhu *et al.*, 2004, 2013; Bao *et al.*, 2009)。褐飞虱生长周期短, 世代繁衍快, 迁徙能力强, 是东南亚地区为害最严重的水稻害虫。1970 年之后, 随着耕作制度的改变和高产水稻品种的推广, 以及化学肥料的过度使用, 褐飞虱从我国水稻生产的次要害虫逐渐发展为现阶段威胁水稻生产的最主要害虫 (程家安等, 2008; Savary *et al.*, 2012)。在防治褐飞虱的综合治理体系中, 抗虫品种的种植被认为是一种经济、高效和环境友好型的控制方式, 被广泛应用生产。然而, 长期种植抗性水稻会导致水稻对褐飞虱的抗性降低, 即抗性品种的应用诱发褐飞虱种群发生致害性变异, 形成能够适应抗性水稻的褐飞虱种群 (Lu *et al.*, 2004; Heong *et al.*, 2009)。因此, 研究褐飞虱致害性变异, 对筛选与发现新的褐飞虱防治靶标具有重要的意义。

核糖体蛋白除了参与核糖体相关的翻译过程, 还参与转录调控、细胞发育和细胞分化等过程 (Ferguson *et al.*, 2015; Orelle *et al.*, 2015; Takada and Kurisakiet *al.*, 2015)。例如, 核糖体蛋白 L5、L11 通过对泛素蛋白连接酶 E3 样蛋白 MDM2 结合, 调节 MDM2 介导的下游转录事件 (Zhou *et al.*, 2015)。有学者在研究小鼠核糖体通路时发现, 在营养缺乏状态下, 生物体会抑制 rRNA 的合成, 造成核糖体胁迫, 核糖体蛋白与核糖体 RNA 之间比例关系失衡, 游离的核糖体蛋白和 MDM2 相互作用, 促进脂肪细胞的脂解作用, 增强线粒体脂肪酸的 β 氧化, 有助于生物体对抗营养缺乏的恶劣环境 (Liu *et al.*, 2014)。在应对核糖体胁迫的过程中, 核糖体通路中大量不同种类的核糖体蛋白如 RPL5、RPL11、RPS3、RPS15 均会对细胞增殖、营养循环产生调节作用 (Lior *et al.*, 2014)。RPS8 为核糖体小亚基蛋白

S8, 是一种 Cyclin-dependent kinase 11(CDK11) p46 相互作用蛋白, CDK11 蛋白家族在生物体内主要是以丝氨酸 Ser/苏氨酸 Thr 蛋白激酶的形式参与细胞周期以及细胞的凋亡的调控 (Hao *et al.*, 2011)。但是, RPS8 在褐飞虱中除了参与核糖体组成外, 是否还具有类似于 RPL5、RPL11、RPS3 等的其他功能目前还不明确。本研究在前期取得的褐飞虱转录组及表达谱数据基础上, 筛选出一段预测为褐飞虱核糖体蛋白 RPS8 (命名为 *NIRPS8*) 的核心序列, 通过克隆 *NIRPS8* 的全长 cDNA, 并采用荧光定量 PCR 技术对 *NIRPS8* 基因在褐飞虱不同发育阶段和不同种群的表达量进行分析, 为进一步探明褐飞虱 *NIRPS8* 基因的功能提供线索, 为筛选新的褐飞虱防治靶标基因提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 供试褐飞虱

水稻培养于人工气候室。实验用褐飞虱 Tn 种群连续饲养在感性水稻品种 TN1 60 代以上, Rh 种群和 As 种群分别饲养在抗性水稻品种 Rathu Heenati (RHT) 和 ASD7 达 40 代以上。褐飞虱饲养条件为温度 (26 ± 2) , 相对湿度为 $80\%\pm 5\%$, 光周期为 16L: 8D。

1.2 供试试剂和仪器

PCR 试剂盒 Taq PCR Master Mix 购于生工生物工程 (上海) 有限公司; RNA 提取试剂盒 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit、凝胶回收试剂盒 DNA Gel Extraction Kit (Axygen)、反转录试剂盒 PrimeScript RT Reagent Kit With gDNA Eraser 和荧光定量 PCR 试剂 SYBR Premix EX Taq 均购自 TaKaRa 公司; 荧光定量 PCR 仪为 ABI step one plus; PCR 仪和核酸电泳仪为 Bio-Rad; 蛋白核酸定量分析仪为 Nanodrop2000 (Thermo)。

1.3 实验方法

1.3.1 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

在 TN1、RHT、ASD7 水稻上,分别吸取 1~2 龄、3~4 龄、5 龄若虫、雄成虫、初羽雌成虫、怀卵雌成虫等用于总 RNA 的提取。总 RNA 的提取方法按照 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 试剂盒操作步骤进行。取得的 RNA 样品浓度和纯度用 Nanodrop2000 蛋白核酸定量分析仪测定,并使用凝胶电泳验证其完整性。根据反转录试剂盒 PrimeScript RT Reagent Kit With gDNA Eraser 说明书,取总量 1 μ g 的总 RNA 模版为反转录模版合成第一链 cDNA,用于荧光定量 PCR 的模版。褐飞虱 *NIRPS8* 的基因全长克隆使用混合龄期的褐飞虱 cDNA 为模版。所有的 cDNA 放置 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.3.2 褐飞虱 *NIRPS8* 基因全长 cDNA 的克隆

根据课题组前期获得的转录组信息提供的 *NIRPS8* 基因核心序列,通过 BLAST 与褐飞虱全基因组 (Xue *et al.*, 2014) 进行比对,筛选出核心序列对应的 scaffold。再通过 Augustus (<http://bioinf.uni-greifswald.de/augustus/submission.php>) 序列预测,选择褐飞虱相近物种豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* 进行同源比对。预测出 cDNA 全长 CDS 区以及 UTR 区,并在两端设计了引物 *NIRPS8*-f1F、*NIRPS8*-f1R 进行全长扩增验证。以上所有引物的合成均由上海桑尼生物科技有限公司合成。使用 50 μ L PCR 体系 pcr master mix 25 μ L, ddH₂O 19 μ L,模版 2 μ L,正反向引物各 2 μ L (10 μ mol/L)。使用梯度 PCR 进行反应,反应程序为 95 $^{\circ}$ C 5 min;95 $^{\circ}$ C 30 s,57~53 $^{\circ}$ C 梯度 30 s,

72 $^{\circ}$ C 2 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min;4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物经过 1%琼脂糖凝胶电泳检测,使用凝胶回收试剂盒 DNA Gel Extraction Kit (Axygen)按照试剂盒说明书进行目的片段的回收。回收产物使用载体 pMD18T(TaKaRa,Japan)进行 16 $^{\circ}$ C 过夜连接。连接产物转化到 100 μ L JM109 感受态中再加入 800 μ L 液体 LB 培养基 37 $^{\circ}$ C 摇床培养 1 h,离心去上清 700 μ L,剩余菌液吹打混匀后涂布在含有 1% Amp 的 LB 固体培养基上,正放 30 min 后倒置培养 9 h 37 $^{\circ}$ C 过夜。挑选 6 个阳性菌落加入配有 1% Amp 的 1 mL LB 液体培养基中,摇床培养 12 h,进行菌落 PCR 验证后,送上海桑尼生物科技有限公司测序。

1.3.3 褐飞虱 *NIRPS8* 序列的拼接及生物信息学分析 利用 DNAMAN 软件对得到的序列进行比对,通过软件把核苷酸序列翻译为氨基酸序列。在 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)使用 Blast 工具对于获得的核酸以及蛋白序列进行同源性比较。使用 NCBI 中的 ORF Finder 工具确定编码的氨基酸序列。使用 MEGA5.0 软件构建进化树。

1.3.4 褐飞虱 *NIRPS8* 表达规律分析 根据克隆的褐飞虱 *NIRPS8* 基因 (KU341337) cDNA 全长序列设计荧光定量 PCR 的特异引物 *QNIRPS8*-F 和 *QNIRPS8*-R(表 1),以 β -actin 基因为内参(表 1),对褐飞虱 1~2 龄若虫、3~4 龄若虫、5 龄若虫、雄成虫、初羽未怀卵雌成虫、怀卵雌成虫的 *NIRPS8* 基因相对表达量进行测定;对褐飞虱不同组织中 *NIRPS8* 基因相对表达量进行测定;对饲养在感性水稻和抗性水稻上的褐飞虱的 *NIRPS8*

表 1 基因克隆和荧光定量 PCR 的引物
Table 1 Primers used in gene cloning and real-time PCR

引物用途 Use of primers	引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence
cDNA 克隆 cDNA cloning	<i>NIRPS8</i> -f1F	GCAATTTGGCTTTAGTTCA
	<i>NIRPS8</i> -f1R	ATCAGTGGCCTACTTTCC
荧光定量 PCR Real-time PCR	<i>QNIRPS8</i> -F	GTACAGGGCACTCAGATTAGACCA
	<i>QNIRPS8</i> -R	TCACAATGGCGTTCTTCACC
	QActin-F	TGCGTGACATCAAGGAGAAGC
	QActin-R	CCATACCCAAGAAGGAAGGCT

基因相对表达量进行测定;对饥饿处理以及阳性对照组的褐飞虱的 *NIRPS8* 基因相对表达量进行测定。荧光定量 PCR 体系为 20 μ L, 反应采用两步法: 95 预变性 30 s, 95 变性 5 s, 60 退火 30 s, 40 个循环。处理组和对照组均设有 3 个生物学重复, 对于褐飞虱 *NIRPS8* 基因的相对表达量采用 CT 的相对定量 ($2^{-\Delta\Delta CT}$) 来计算统计。用 SPSS 22.0 统计学软件包进行 One-way ANOVA 检验, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 褐飞虱 *NIRPS8* 的 cDNA 全长克隆及序列分析

以褐飞虱表达谱核心序列筛选为基础, 对比已经公布的褐飞虱全基因组信息, 筛选到核心序列所在基因组文库的 scaffold, 发现 *NIRPS8* 基因位于 scaffold763_24 (gb|AOSB01108072.1|) 上 (图 1), 通过 Augustus (<http://bioinf.uni-greifswald.de/>) 同源预测 cDNA 全长设计引物, 以褐飞虱 cDNA 为模版, 对 *NIRPS8* 基因进行全长的扩增, 得到与预期长度符合一致的特异性条带, 测序得到一条 725 bp 的片段, 再进行验证对比, 与预期结果一致。

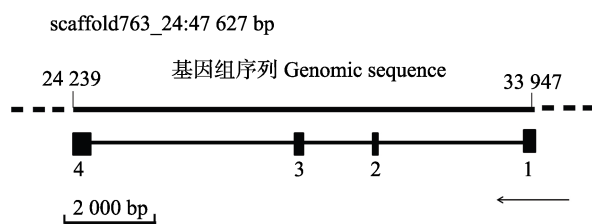


图 1 褐飞虱 *NIRPS8* 基因结构
Fig. 1 Gene structure of *NIRPS8* from *Nilaparvata lugens*

箭头指示基因转录的方向, 数字 1~4 表示外显子。
Arrows indicate the direction of transcription of the gene, number 1 to 4 indicates exons.

经过 Blast X (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) 对比发现克隆得到的基因与其他物种核糖体蛋白 *RPS8* 基因同源性很高。与桑粉介壳虫 *Maconellicoccus hirsutus*、内华达古白蚁 *Zootermopsis nevadensis* 的 *RP S8* 的氨基酸序列相似性均在 85% 以上, 遂

将该基因命名为 *NIRPS8*。经 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>) 分析发现, *NIRPS8* 基因的 OFR 框长度为 627 bp, 编码 208 个氨基酸, 起始密码子 (ATG) 位于克隆得到的 cDNA 序列的 90 bp 处, 终止密码子 (TAG) 位于克隆得到的 cDNA 序列的 716 bp 处 (图 2)。

采用 ProtParam (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/>) 预测褐飞虱 *NIRPS8* 基因编码的蛋白质的基础理化性质, 编码蛋白质的分子式为: $C_{1051}H_{1740}N_{340}O_{290}S_5$, 理论等电点 PI 为 10.75, 分子量为 29.94 ku。半衰期预测: 在哺乳动物网织红细胞内约为 30 h, 在酵母中大于 20 h, 在大肠杆菌中大于 10 h。溶液中的不稳定系数为 44.06, 脂肪系数为 67.6。负电荷氨基酸残基总数为 19, 正电荷氨基酸残基总数为 54。总平均疏水性为 -0.975。

通过蛋白质结构构建网站 (<http://swissmodel.expasy.org/>) 模拟 *NIRPS8* 基因的三维结构, 将原序列与库中已有 5a2q.1 序列经行对比, 序列相似度达到 80.29%, 并对其三维空间结构进行预测分析, *NIRPS8* 基因三维空间结构拥有 6 个 α 螺旋、8 个 β 折叠 (图 3, 图 4)。

在 NCBI 上进行同源性比较, 选出了膜翅目、鳞翅目、等翅目、同翅目的 10 种昆虫的氨基酸序列采用邻接法 (Neighbor joining, NJ) 构建系统进化树 (图 5), 分析得出褐飞虱与桑粉介壳虫 *Maconellicoccus hirsutus* 亲缘关系最近, 与内华达古白蚁 *Zootermopsis nevadensis* 亲缘关系次近, 再次为鳞翅目和膜翅目的其他昆虫。

2.2 褐飞虱不同龄期中 *NIRPS8* 表达量的分析

荧光定量 PCR 对不同龄期褐飞虱的 *NIRPS8* 基因表达量测定结果表明, 基因 *NIRPS8* 在不同若虫期间表达量较稳定, 成虫期有所下降, 但是在怀卵雌成虫中大量表达 (图 6)。将 1~2 龄若虫的相对表达量定为 1, 则 3~4 龄若虫、5 龄若虫、雄成虫、刚羽化的雌性褐飞虱、怀卵褐飞虱的相对表达倍数分别为 0.88 倍、0.88 倍、0.55 倍、0.50 倍、2.19 倍。

```

1      GCAATTTGGCTTTAGTTCACTAGTCTATGAGTTCCTTTACACTG
45     TATTGATATCAATATGGTATTTATATATGCATTTAATTTTAATTC
90     ATGGGTATTTTCACGTGATCACTGGCATAAAAGGCGTGCCACCGGA
      M  G  I  S  R  D  H  W  H  K  R R  A  T  G
135    GGTAAGAGGAAGCCCCCTTCGTAAGAAGAGGAAGTTCGAATTGGGA
      G  K  R  K  P  L  R  K  K  R  K  F  E  L  G
180    CGCCCACCCGCAAACACAAAGCTTGGAGCTCGTCGTATCCACACA
      R  P  P  A  N  T  K  L  G  A  R  R  I  H  T
225    GTCCGTACCCGCGGAGGTAACAAGAGTACAGGGCACTCAGATTA
      V  R  T  R  G  G  N  K  K  Y  R  A  L  R  L
270    GACCAGGGAAATTTCTCATGGGGATCTGAAGGTTGCGCGAGGAAG
      D  Q  G  N  F  S  W  G  S  E  G  C  A  R  K
315    ACGCGTATCATCGACGTGGTGTACAATGCATCCAACAACGAGTTG
      T  R  I  I  D  V  V  Y  N  A  S  N  N  E  L
360    GTGCGAACCAAGACCCTGGTGAAGAACGCCATTGTGACAGTTGAC
      V  R  T  K  T  L  V  K  N  A  I  V  T  V  D
405    GCCACCCCATTCAGGCAATGGTACGAGGCGCACTACGCCCTGCC
      A  T  P  F  R  Q  W  Y  E  A  H  Y  A  L  P
450    GTTGGCCGCAAGAGTGCATCCAAGCTGACTGAAGCCGAGGAAGCG
      V  G  R  K  K  S  S  K  L  T  E  A  E  E  A
495    GTTCTAAACAAGAAGCGATCGAAAAAGGTGGAGAGGAAGTACAAG
      V  L  N  K  K  R  S  K  K  V  E  R  K  Y  K
540    GCGCGTCAACGCACGGCCAAGATTGACCAGGCCCTGGAGGAGCAG
      A  R  Q  R  T  A  K  I  D  Q  A  L  E  E  Q
585    TTCCAGACATCTCGACTGCTGGCCTGCATCGCCAGCCGACCCGGC
      F  Q  T  S  R  L  L  A  C  I  A  S  R  P  G
630    CAGTGTGGTCGCGCCGACGGCTACGTGCTAGAGGGCAAGGAGCTC
      Q  C  G  R  A  D  G  Y  V  L  E  G  K  E  L
      GAGTTCTACATGAGGAAGATCAAGGCCAAGAAGGGAATAGGCC
      E  F  Y  M  R  K  I  K  A  K  K  G  K  *
720    ACTGAT

```

图2 褐飞虱 *NIRPS8* 基因 cDNA 序列及推导的氨基酸序列Fig. 2 cDNA and deduced amino acid sequence of *NIRPS8* gene in *Nilaparvata lugens*

起始密码子和终止密码子用粗体标识。

The star and stop codons are in boldface.

Model_02	MGISRDHWHKRRATGGKRRKPLRKKRKFE	65
5a2q.1.K	MGISRDHWHKRRKTTGGKRRKPYHKKRKVELGRPAANTKLGPRRIHTVVRGGNKKYRALBLDVGNF	65
Model_02	SWGSEGCARKTRIIDVVYNASNNELVTRTKTLVKNAIVTVDATPFRQWYEAHYALPVGRKKSSKLT	130
5a2q.1.K	SWGSEGCARKTRIIDVVYNASNNELVTRTKTLVKNIVLDDSTPYRQWYESHYALPLGRKKGAKLT	130
Model_02	EAEAEAVLNKKRSKKVERKYKARQRTAKIDQALEEQFQTSRLACIASRPGQCGRADGYVLEGGEL	195
5a2q.1.K	PEEEELNKKRSKKIQKKYDERKKNAKISLLEEQFQGGKLLACIASRPGQCGRADGYVLEGGEL	195
Model_02	EFYMRKIKAKK	208
5a2q.1.K	EFYLRKIKAKK	208

图3 褐飞虱 *NIRPS8* 基因氨基酸序列及推导的 α 螺旋和 β 折叠所在三维空间结构的位点Fig. 3 Deduced amino acid sequence of *NIRPS8* gene in *Nilaparvata lugens* and its deduced sites of α -helix and β -sheet in the three-dimensional structure α 螺旋用方框框出, β 折叠用箭头框出。 α -helix is in the square frame, β -sheet is boxed with an arrow.

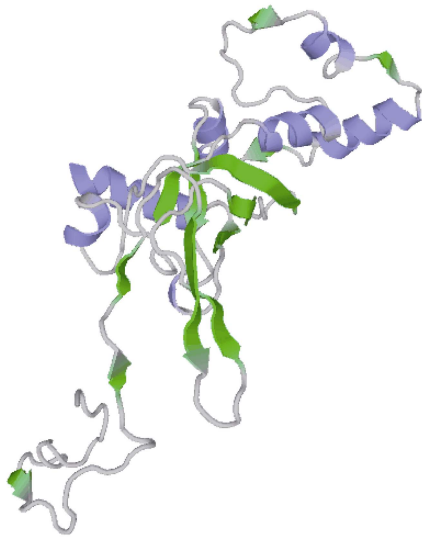


图 4 褐飞虱 *NIRPS8* 基因推导的三维结构空间模型
Fig. 4 Deduced three-dimensional structural model of *NIRPS8* gene in *Nilaparvata lugens*

2.3 褐飞虱不同部位中 *NIRPS8* 表达量的分析

褐飞虱怀卵雌成虫中不同组织部位里的 *NIRPS8* 表达量结果表明, 基因 *NIRPS8* 在头部、胸部和脂肪体中表达量较为相近且处于较低水平。基因 *NIRPS8* 在卵巢中表达量最高, 在中肠中次之(图 7)。将头部中 *NIRPS8* 的相对表达量

定为 1, 则胸部、脂肪体、卵巢、中肠中的相对表达倍数分别为: 0.92 倍、0.81 倍、2.48 倍、1.73 倍。

2.4 不同处理褐飞虱种群中 *NIRPS8* 表达量的分析

2.4.1 褐飞虱感性种群与抗性种群中 *NIRPS8* 表达量的分析 褐飞虱怀卵雌成虫在不同抗性品种上的表达量结果表明, 相较于在感性品种 TN1 上的雌性怀卵褐飞虱, 在抗性品种 RHT 和 ASD7 上褐飞虱的 *NIRPS8* 基因表达量均明显上调(图 8: 左)。以在感性品种 TN 上的怀卵雌虫表达量定为 1, 则在 ASD7 和 RHT 上的怀卵雌虫的 *NIRPS8* 基因表达倍数分别为 1.99 倍和 2.14 倍。

2.4.2 褐飞虱饥饿处理前后 *NIRPS8* 表达量的分析 选取怀卵雌虫作为样本, 对饥饿处理以及阳性对照组的褐飞虱的 *NIRPS8* 基因相对表达量进行测定。相较于正常饲养在水稻上的怀卵雌褐飞虱, 用水饲喂 1 d 后的饥饿处理组的褐飞虱的 *NIRPS8* 基因表达量明显上调(图 8: 右)。以在感性品种 TN 上的怀卵雌虫表达量定为 1, 则在用水饲喂 1 d 后的饥饿处理怀卵雌虫的 *NIRPS8* 基因表达倍数为 1.6 倍。

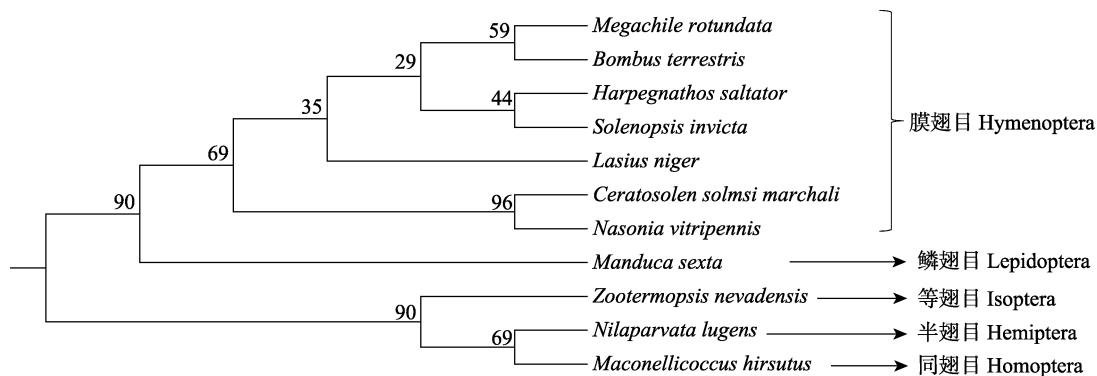
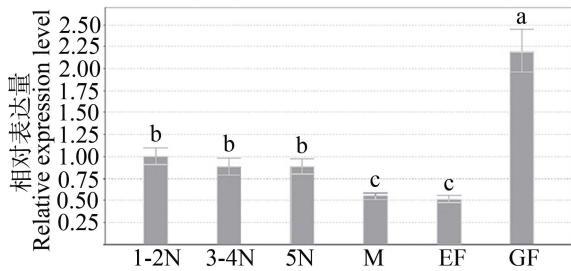


图 5 基于氨基酸序列构建的褐飞虱及其他昆虫 *NIRPS8* 的进化树(邻接法)

Fig. 5 Phylogenetic relationship of *NIRPS8* from *Nilaparvata lugens* and other insects based on amino acid sequence with the neighbor-joining method

NIRPS8 来源以及其 Genbank 登录号 The Genbank accession number of *NIRPS8*: *Megachile rotundata* 苜蓿切叶蜂 (XP_012139009.1), *Bombus terrestris* 欧洲熊蜂(XP_003397407.1), *Harpegnathos saltator* 印度跳蚁(XP_011141954.1), *Solenopsis invicta* 红火蚁(XP_011167792.1), *Lasius niger* 黑蚁(KMQ96299.1), *Ceratosolen solmsi marchali* 榕小蜂(XP_011501111.1), *Nasonia vitripennis* 丽蝇蛹集金小蜂(XP_001604111.1), *Manduca sexta* 烟草天蛾(ACY95327.1), *Zootermopsis nevadensis* 内华达古白蚁(KDR14766.1), *Maconellicoccus hirsutus* 桑粉介壳虫(ABM55665.1), *N. lugens* 褐飞虱(KU341337)。

图 6 *NIRPS8* 基因在褐飞虱不同发育阶段的表达Fig. 6 Expression pattern of *NIRPS8* in different developmental stages of *Nilaparvata lugens*

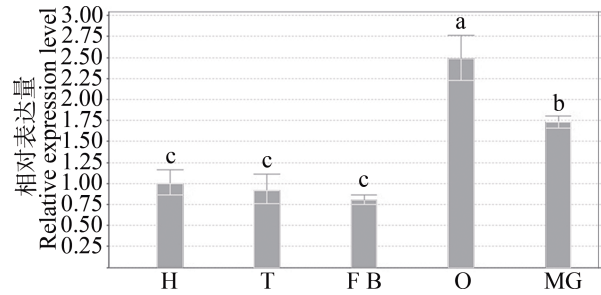
1-2N: 1~2 龄褐飞虱若虫 1st-2nd instar nymph; 3-4N: 3~4 龄褐飞虱若虫 3rd-4th instar nymph; 5N: 5 龄褐飞虱若虫 5th instar nymph; M: 雄成虫 Male adult; EF: 刚羽化的雌性褐飞虱 Newly emerged female adult; GF: 怀卵褐飞虱 Gravid female adult.

图中数据为平均值±标准误, 柱上标有不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。多组间比较采用单因素方差分析和 t -测验。下图同。

Data are mean±SE. Histograms with different letters indicate significantly different at 0.05 level by t -test. The same below.

3 讨论

本研究克隆了褐飞虱核糖体小亚基蛋白 S8 基因, 对其进行了理化性质预测, 并与已知物种的相应基因进行了序列同源性对比, 分析发现不同物种之间的 *RPS8* 基因保守性较高。编码区具有较高的同源性, 说明在生物长期进化演变的过程中, *NIRPS8* 基因起着相同的作用。对于 *NIRPS8*

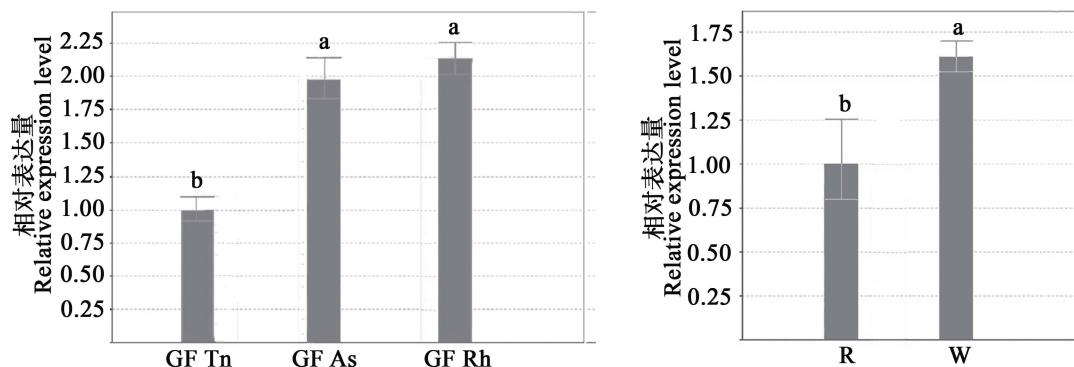
图 7 *NIRPS8* 基因在褐飞虱不同部位的表达Fig. 7 Expression pattern of *NIRPS8* in different parts of *Nilaparvata lugens*

H: 头部 Head; T: 胸部 Thorax; FB: 脂肪体 Fat body;

O: 卵巢 Ovarian; MG: 中肠 Mid gut.

基因编码的蛋白质的基础理化性质、空间结构进行了预测分析, 正电荷氨基酸残基总数为 54, 负电荷氨基酸残基总数为 19, 理论等电点 PI 为 10.75。 *NIRPS8* 正电性的理化性质符合其作为核糖体蛋白易于结合显负电性核糖体 RNA 的预期, 其总平均疏水性为 -0.975, 亲水性的性质也符合核糖体游离分布在细胞质的特点。

核糖体 RNA 和核糖体蛋白组装形成核糖体, 对于维持生物正常的生命活动和调控生物体的生长发育起着重要的作用 (Sébastien and Hurt, 2009)。Jakubowicz 等 (1993) 及 Cytryńska 等 (1995) 研究发现大部分的核糖体蛋白在体内存在着磷酸化修饰, 并且这些修饰大多发挥着调控核糖体蛋白功能的作用。His Pull-down 联合质

图 8 *NIRPS8* 基因在不同种群 (左) 和饥饿处理 (右) 的褐飞虱中的表达Fig. 8 Expression of *NIRPS8* in different population (left) and treatment (right) of *Nilaparvata lugens*

GF Tn: 饲养在 TN1 上的怀卵雌成虫 Gravid female adult feeding on TN1; GF As: 饲养在 ASD7 上的怀卵雌成虫 Gravid female adult feeding on ASD7; GF Rh: 饲养在 RHT 上的怀卵雌成虫 Gravid female adult feeding on RH; R: 饲养在水稻上的褐飞虱 *N. lugens* fed with rice; W: 用水饲喂 1 d 后取样的饥饿组褐飞虱 *N. lugens* fed with water for one day.

谱、GST-pull down、免疫共沉淀等实验证实了 CDK11P46 与 PRS8 蛋白有相互作用, 并且协同控制蛋白质翻译活性 (郝宇晴, 2011)。CDK11 家族即 PITSLRE 磷酸激酶家族在细胞周期中起着重要作用, 参与转录调控和前体 mRNA 的剪切 (Trumbley *et al.*, 2002, 2003; Loyer *et al.*, 2008)。PRS8 作为核糖体 40S 亚基的组成部分, 存在于包含有未翻译的 mRNA 的核糖体蛋白颗粒复合物 (mRNP granule complex) 中, 该复合物作为一种转录后的操纵因子参与内质网监控和之后的分泌途径的调节, 以及参与泛素化等蛋白相关生理代谢 (Joson *et al.*, 2007)。我们对 *NIRPS8* 基因在不同龄期褐飞虱体内表达规律进行分析发现, 该基因在各个龄期以及雌雄褐飞虱体内均有表达, 在 1~5 龄若虫阶段表达量较高, 在未怀卵成虫体内表达量较低, 但在怀卵雌虫体内表达量达到最高。据此认为, 这可能与若虫以及怀卵雌虫在正常生理阶段细胞增殖速度较快, 蛋白质大量合成有关。对于褐飞虱各个组织中 *NIRPS8* 基因的表达量的检测也表明, *NIRPS8* 基因在褐飞虱体内卵巢中表达量最高, 也印证了推测 *NIRPS8* 基因和细胞增殖, 蛋白质合成有关。

根据 Liu 等 (2014) 对小鼠核糖体通路的研究, 在营养缺乏状态下, 生物体会抑制核糖体 RNA 的合成, 造成核糖体蛋白和核糖体 RNA 之间的比例失衡, 形成核糖体胁迫, 游离的核糖体蛋白与 MDM2 相互作用促进脂解, 增强线粒体脂肪酸的 β 氧化, 帮助生物体对抗营养缺乏的环境。此外, 在核糖体应激时, 核糖体蛋白 L5、L11、L23、L37、S3、S15、S20 等会表现出上调趋势 (Lior *et al.*, 2014)。其中, L5-L11-L23 形成的复合物会抑制 MDM2 介导的 p53 泛素化, 从而激活转录因子 p53 (Dai and Lu, 2004)。核糖体蛋白 L37、S20 和 S15 可以通过调节 Mdm2-p53-MdmX 网络对 p53 的活性产生影响 (Daftuar *et al.*, 2013)。核糖体蛋白 S3 与 MDM2 起到相互作用, 调节转录因子 p53 的活性, 同时核糖体蛋白 S3 对维护基因组的完整性也起着重要作用 (Sridevi *et al.*, 2009)。*NIRPS8* 基因在感性品种上的表达量较低, 在抗性品种上的表达量

有明显上调, 我们认为这可能与褐飞虱细胞对抗性水稻胁迫的应激有关。褐飞虱在感性品种上正常生存, *NIRPS8* 基因表达量处于正常水平; 而在抗性品种上, 褐飞虱的食物和营养条件发生变化, 可能受到营养不良或有毒物质的影响, 褐飞虱为了维持自身的生存, 发生核糖体应激, 上调了 *NIRPS8* 等基因的表达。对于褐飞虱各个组织中 *NIRPS8* 基因的表达量的检测也表明, *NIRPS8* 基因在褐飞虱体内中肠中表达量为次高, 仅次于卵巢, 也从侧面说明了 *NIRPS8* 基因与褐飞虱营养表达有关。在对于褐飞虱的饥饿实验中, 经过 1 d 用水饲喂的实验组褐飞虱的 *NIRPS8* 基因表达量为在水稻上正常饲养褐飞虱对照组的 1.6 倍, 也同样支持以上的设想。由此推测, *NIRPS8* 可能参与调控脂肪细胞脂解等代谢过程, 以维持褐飞虱应激状态下的能量和物质需求, 但具体过程有待进一步验证。

本研究初步探究了 *NIRPS8* 基因在褐飞虱的体内的表达规律, 但对于 *NIRPS8* 基因在褐飞虱体内具体的生理作用, 以及上下游通路对于褐飞虱的影响还不明确。在后续研究中, 对于 *NIRPS8* 基因具体的作用机理以及上下游通路的更深层次的研究仍十分必要。

参考文献 (References)

- Bao HB, Liu SH, Gu JH, Wang XZ, Liang XL, Liu ZW, 2009. Sublethal effects of four insecticides on the reproduction and wing formation of brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Pest Management Science*, 65(2): 170-174.
- Cheng JA, Zhu JL, Zhu ZR, Zhang LG, 2008. planthopper outbreak and environment regulation. *Journal of Environmental Entomology*, 30(2): 176-182. [程家安, 朱金良, 祝增荣, 章连观, 2008. 稻田飞虱灾变与环境调控. *环境昆虫学报*, 30(2): 176-182.]
- Cytryńska M, Wojda I, Jakubowicz T, 1995. The acidic ribosomal proteins of different yeast species, phosphorylation by ribosome-associated protein kinases. *J. Basic Microbiol.*, 35(6): 367-373.
- Dai MS, Lu H, 2004. Inhibition of MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation by ribosomal protein L5. *J. Biol. Chem.*, 24(43): 44475-44482.
- Daftuar L, Zhu Y, Jacq X, Prives C, 2013. Ribosomal proteins RPL37, RPS15 and RPS20 regulate the Mdm2-p53-MdmX

- network. *PLoS ONE*, 8(7): e68667.
- Ferguson A, Wang LY, Altman RB, Terry DS, Juette MF, Burnett BJ, Alejo JL, Dass RA, Parks MM, Vincent CT, Blanchard SC, 2015. Functional dynamics within the human ribosome regulate the rate of active protein synthesis. *Molecular Cell*, 60(3): 475–486.
- Hao YQ, 2011. CDK11p46 and RPS8 associate with each other and suppress translation in a synergistic manner. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 407(1): 169–174.
- Hao YQ, 2011. The effect of ribosomal protein s8 in protein translation. [郝雨晴, 2011. 核糖体蛋白 RPS8 对蛋白质翻译的影响极其机制的研究. 硕士学位论文. 上海: 复旦大学.]
- Heong KL, Hardy B, 2009. Planthoppers: new threats to the sustainability of intensive rice production systems in Asia. International Rice Research Institute. Asian Development Bank, Australian Government, Australian Centre for International Agricultural Research. 281–302.
- Jakubowicz T, Cytryńska M, Kowalczyk W, Gasior E, 1993. Phosphorylation of acidic ribosomal proteins by ribosome-associated protein kinases of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Acta Biochim. Pol.*, 40(4): 497–505.
- Joseon L, Vikesaa J, Krogh A, Nielsen LK, Hansen T, Borup R, Johnsen AH, Christiansen J, Nielsen FC, 2007. Molecular composition of IMP1 ribonucleoprotein granules. *Mol. Cell Proteomics*, 6(5): 798–811.
- Lior G, Sinisa V, Moshe O, 2014. p53 and ribosome biogenesis stress: The essentials. *Febs Letters*, 588(16): 2571–2579.
- Liu Y, He YZ, Aiwen J, Andrey PT, Zhou LS, Laura AT, Patrick L, Kim T, Lei O, Rosalind AC, Gug ZN, Yong QC, Jeffrey MM, 2014. Ribosomal protein-Mdm2-p53 pathway coordinates nutrient stress with lipid metabolism by regulating MCD and promoting fatty acid oxidation.. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 111(23): 2414–2422.
- Loyer P, Trmbley JH, Grenet JA, 2008. Characterization of cyclin L1 and L2 interactions with CDK11 and splicing factors: influence of cyclin L isoforms on splice site selection. *J. Biol. Chem.*, 283(12): 7721–7732.
- Lu ZX, Yu XP, Chen JM, Zheng XS, Xu HX, 2004. Dynamics of yeast-like symbiote and its relationship with the virulence of brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål, to resistant rice varieties. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 7(3): 317–323.
- Takada H, Kurisaki A, 2015. Emerging roles of nucleolar and ribosomal proteins in cancer, development, and aging. *Cell Mol. Life Sci.*, 72(21): 4015–4025.
- Orelle C, Carlson ED, Szal T, Florin T, Jewett MC, Mankin AS, 2015. Protein synthesis by ribosomes with tethered subunits. *Nature*, 524(524): 119–124.
- Savary S, Horgan F, Willocquet L, 2012. A review of principles for sustainable pest management in rice. *Crop Protection*, 32 (1358): 54–63.
- Sridevi Y, Lindsey DM, Maureen H, Sonia L, Vijay H, Walter AD, 2015. Ribosomal protein S3: A multi-functional protein that interacts with both p53 and MDM2 through its KH domain. *DNA Repair*, 8(10): 1215–1224.
- Sébastien FC, Hurt ED 2009. Cell biology: Arrest by ribosome. *Nature*, 459(7243): 46–47.
- Trmbley JH, Hu D, Hsl LC, 2002. Pitsre p110 protein kinases associate with transcription complexes and affect their activity. *J. Biol. Chem.*, 277(4): 2589–2596.
- Xue J, Zhou X, Zhang CX, Yu LL., Fan HW, Wang Z, Xu HJ, Xi Y, Zhu ZR, Zhou WW, Pan PL, Li BL, Colbourne JK, Noda H, Suetsugu Y, Kobayashi T, Zheng Y, Liu S, Zhang R, Liu Y, Luo YD, Fang DM, Chen Y, Zhan DL, Lv XD, Cai Y, Wang ZB, Huang HJ, Cheng RL, Zhang XC, Lou YH, Yu B, Zhuo JC, Ye YX, Zhang WQ, Shen ZC, Yang HM, Wang J, Wang J, Bao YY, Cheng JA, 2014. Genomes of the rice pest brown planthopper and its endosymbionts reveal complex complementary contributions for host adaptation. *Genome. Biol.*, 15 (12): 521.
- Trmbley JH, Hu D, Slaughter CA, 2003. Casein kinase 2 interacts With eyelid-dependent kinase 11(CDK11) in vivo and phosphorylates both the RNA polymerase 11 carboxyl-terminal domain and CDK11 in vitro. *J. Biol. Chem.*, 278(4): 2265–2270.
- Zhou X, Hao Q, Zhang Q, Liao JM, Ke JW, Liao P, Cao B, Lu H, 2015. Ribosomal proteins L11 and L5 activate TAp73 by overcoming MDM2 inhibition. *Cell Death and Differentiation*, 22(5): 755–766.
- Zhu YL, Wang J, Xie ZJ, Liu YP, Wang JJ, 2013. Cloning and mRNA expression analysis of the Vacuolar H⁺-ATPase δ subunit gene in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50(3): 666–674. [朱友理, 王剑, 谢志娟, 刘亚萍, 王建军, 2013. 褐飞虱 V-ATPase δ 亚基基因的克隆与 mRNA 表达分析. 应用昆虫学报, 50(3): 666–674.]
- Zhu ZR, Cheng JA, Jiang MX, Zhang XX, 2004. Complex influence of rice variety, fertilization timing and insecticide on population dynamics of *Sogatella furcifera* (Horvath), *Nilaparvata lugens* (Stål) (Homoptera: Delphacidae) and their natural enemies in rice in Hangzhou, China. *Journal of Pest Science*, 77(2): 65–74.