隐花色素蛋白和铁硫簇蛋白相互作用及其 在褐飞虱发育与生殖中的作用^{*}

张英超^{1,2**} 曾路影³ 万贵钧³ 江幸福⁴ 陈法军³ 潘卫东^{1,2***}

(1. 中国科学院电工研究所生物电磁学北京市重点实验室,北京 100190;2. 中国科学院大学,北京 100049;3. 南京农业大学植物保护 学院昆虫系昆虫信息生态研究组,南京 210095;4. 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【目的】在真核生物中验证隐花色素蛋白(Cryptochrome)/铁硫簇蛋白(Iron-sulfur cluster assembly 1)的相互作用,研究 2 种蛋白在褐飞虱 Nilaparvata lugens 发育和生殖过程中的作用,为二者在磁感受机制中的协同作用及磁场对昆虫生理状态的调控机制提供依据和新的研究方向。【方法】通过酵母双杂交系统对褐飞虱 I 型隐花色素蛋白/II 隐花色素蛋白与铁硫簇蛋白的相互作用进行验证。在褐飞虱 3 龄若虫和羽化第 1 天成虫中建立 I 型隐花色素蛋白和铁硫簇蛋白基因 RNAi(RNA interference)沉默模型,并采用 RT-qPCR 检测 2 个基因沉默效率,统计沉默虫体的若虫历期和产卵量。【结果】 褐飞虱 I 型隐花色素蛋白与铁硫簇蛋白存在相互作用,而 II 隐花色素蛋白与铁硫簇蛋白不存在相互作用。褐飞虱 3 龄若虫和羽化第 1 天成虫中成功建立 I 型隐花色素蛋白和铁硫簇蛋白基因 RNAi 沉默模型,在注射 dsRNA 后第 2 天、第 4 天和第 6 天时,2 个基因的沉默效率均能达到 70%以上。I 型隐花色素蛋白和铁硫簇蛋白基因沉默虫体的若虫历期无明显变化,但是产卵量受到显著性抑制。【结论】 褐飞虱 I 型隐花色素蛋白和铁硫簇蛋白存在相互作用,二者在褐飞虱生殖过程中发挥重要作用。

关键词 隐花色素蛋白;铁硫簇蛋白;生物磁感受;褐飞虱

Interaction between cryptochrome and iron-sulfur cluster assembly 1 protein and their roles in the development and reproduction of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*

ZHANG Ying-Chao^{1, 2**} ZENG Lu-Ying³ WAN Gui-Jun³ JIANG Xing-Fu⁴ CHEN Fa-Jun³ PAN Wei-Dong^{1, 2***}

(1. Beijing Key Laboratory of Bioelectromagnetics, Institute of Electrical Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Department of Entomology, College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 4. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract [**Objectives**] To verify the interaction between cryptochrome (Cry) and iron-sulfur cluster assembly 1 (IscA1) protein in eukaryotes, and to study the role of these two proteins in the development and reproduction of brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, so as to provide a basis for investigating the synergy between these proteins in magnetoreception and the physiological regulation of the magnetic field in insects. [**Methods**] The interaction between *N. lugens* Cry1/Cry 2 and IscA1 was verified using yeast, two hybrid technology. The RNAi (RNA interference) silencing model of *Cry1/IscA1* gene was established in 3rd instar nymphs and 1-day-old adults and the silencing efficiency of these two genes detected by RT-qPCR. The duration of the nymph period and the oviposition rate of silenced individuals were measured. [**Results**] There is an interaction between Cry1 and IscA1 in *N. lugens* but not between Cry2 and IscA1. The RNAi silencing model of the *Cry1/*

**第一作者 First author, E-mail: zhangyingchao15@mails.ucas.edu.cn

^{*}资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金 (31670855, 31870367); 国家自然科学基金青年科学基金 (31701787)

^{***}通讯作者 Corresponding author, E-mail: panwd@mail.iee.ac.cn

收稿日期 Received: 2020-07-22; 接受日期 Accepted: 2020-09-21

IscA1 gene was successfully established in 3^{rd} instar nymphs and 1-day-old adults; the silencing efficiency of these two genes was > 70% on the 2nd, 4th and 6th day after dsRNA injection. There was no change in the duration of the nymph period after *Cry1/IscA1* gene silencing but oviposition was significantly inhibited. **[Conclusion]** Cry1 interacts with IscA1 in *N. lugens* and plays an important role in the reproduction of this species.

Key words cryptochrome; iron-sulfur cluster assembly 1; magnetoreception; Nilaparvata lugens

地球本身是一个巨大的磁体, 地磁场是其自 身产生的磁场。地磁场的磁力线从南半球的磁南 极向上离开地球表面,经赤道处平行于地表,至 北半球向下进入磁北极,这些磁力线具有水平和 垂直分量,可以被当作罗盘来使用。研究表明包 括昆虫在内的许多动物都可以利用地磁场定向 导航(Camlitepe and Stradling, 1995; Boles and Lohmann, 2003; Lohmann et al., 2004; Wiltschko and Wiltschko, 2005; Dennis et al., 2007; Guerra et al., 2014; Veronika et al., 2014; Xu et al., 2017)。地磁场除了可以被动物利用进行定向导 航外,其参数的变化对很多生物的生理生化亦会 产生一系列的影响。研究发现磁场会对生物生殖 和胚胎发生产生不同程度影响(Brewer, 1979; Strand et al., 1983); 还会影响有丝分裂过程 (Denegre et al., 1998; Valles, 2002)。在昆虫 中的研究发现,其发育和代谢也受到磁场的影响 (Prolić and Nenadovic, 1995; Raus et al., 2009; Wan et al., 2014)_o

目前有关生物磁感受的研究,主要提出以下 几种机制:基于磁铁矿的磁感受机制、光依赖的 自由基对磁感受机制和磁性蛋白生物指南针模 型。基于磁铁矿的磁感受机制认为生物体内的单 磁畴磁铁矿晶体调控感官系统从而使生物获得 磁感受能力(Kirschvink *et al.*, 2001)。而光依 赖的自由基对磁感受机制则认为磁感受并不需 要特定的铁氧化物,也不需要在膜表面形成铁氧 化物簇,仅需要色素分子吸收光进行电子传递, 产生一对临时配对的自由基对,而磁场的变化可 以影响自由基对的自旋状态,令生物在第一时间 感受到变化的磁场信息(Ritz *et al.*, 2010;陈薇 等, 2013)。隐花色素(Cryptochrome, Cry)作 为蓝光受体被证实介导了光依赖的自由基对磁 感受(Gegear *et al.*, 2008, 2010)。随着研究的 不断深入,2015 年北京大学谢灿团队在体外研 究中发现了一种由隐花色素蛋白 Cry 和铁硫簇 蛋白(Iron-sulfur cluster assembly 1, IscA1,又 被称为 Magnetoreceptor protein, MagR)多聚化 形成的蛋白复合体,该复合体自带极性,被认为 可能是磁感应复合物,从而提出磁性蛋白生物指 南针模型(Qin *et al.*, 2015)。

隐花色素蛋白属于光裂解酶家族,其黄素腺 嘌呤二核苷酸(Flavin adenine dinucleotide, FAD) 结构在受到光刺激之后可以产生自由基对(Ritz et al., 2010)。动物的隐花色素主要分为2类: 一类对蓝紫光敏感,作为光感受器对昼夜节律起 到调节作用,这类隐花色素被称为 I 型隐花色素 (Cry1); 另一类对光不敏感, 作为生物钟转录 因子 Cycle/Bmall 的抑制因子,参与动物体内生 物钟负反馈调节,这类隐花色素被称为Ⅱ型隐花 色素 (Cry2) (Griffin et al., 1999; Zhu et al., 2005)。在昆虫磁生物学效应研究中,隐花色素 蛋白被发现参与其中,磁场通过调控隐花色素蛋 白基因的表达水平进而影响昆虫的发育和生殖 (Wan et al., 2014)。但是,关于隐花色素在昆 虫发育和生殖过程中的作用还不清楚。铁硫簇蛋 白是一种线粒体蛋白,蛋白活性中心含有 Fe-S 原子,具有极强的电子传递功能(Meyer, 2008), 同时在能量代谢、维持线粒体稳定和基因表达调 控方面发挥中重要作用(Jensen and Culotta, 2000; Kaut et al., 2000)。最新的研究表明铁硫 簇蛋白中的电子自旋通过磁偶极-偶极相互作用 可以向自由基对引入一个波动的局部磁场,从 而实现自由基对单重-三重态的相互转换(Xiao et al., 2020)。不过目前关于 Cry/IscA1 在生物 磁感受过程中的协同作用,主要集中在体外的计 算模拟阶段,尚缺乏在真核生物中的实验证据。 并且隐花色素蛋白在不同物种中的类型有所差

异,哪种类型的隐花色素蛋白与铁硫簇蛋白存在 协同作用也需要进一步的明确。此外,铁硫簇蛋 白是否在昆虫发育和生殖过程中发挥作用也还 尚未有报道。

本试验以迁飞性昆虫褐飞虱 Nilaparvata lugens 为研究对象,利用酵母双杂交系统在真核 细胞中对褐飞虱隐花色素蛋白 Cry1/Cry2 和铁硫 簇蛋白 IscA1 的相互作用进行了验证;同时,检 测 Cry1/IscA1 沉默后褐飞虱若虫历期和产卵量, 以揭示 Cry1/IscA1 在褐飞虱发育和生殖过程中 发挥的作用,为后期两蛋白磁感受功能的研究提 供基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

褐飞虱来自华中农业大学植物科学技术学 院华红霞老师实验室。实验室的饲养条件为:相 对湿度 80%±5%,温度(26±1)℃,光周期 L14: D10。供试水稻为易感品种 TN1,选择高度为 10-15 cm 的水稻苗饲喂褐飞虱到试验所需的龄 期,期间每 2 d 更换 1 次水稻苗。

1.2 试验仪器和试剂

试验中主要使用的仪器为:智能人工气候培养箱(宁波江南仪器厂)、超净工作台(北京昌平长城空气净化工程有限公司)、-80 ℃超低温冰箱(日本 Sanyo 公司)、超纯水系统(德国Milli-Q公司)、台式冷冻离心机(德国 Eppendorf公司)、显微注射仪(美国 WPI 公司)、PCR 仪(美国 ABI 公司)、核酸电泳系统(美国 Bio-Rad公司)、凝胶成像系统(美国 Proteinsimple 公司)、荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

试验中主要使用的试剂:快速克隆试剂盒 (诺唯赞公司)、DNA 胶回收试剂盒(天根生化 公司)、Peasy-T3 载体(全式基因)、Y2HGold 感受态细胞(北京华越洋公司)、Trizol(美国 Invitrogen 公司)、反转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司)、Fast SYBR Green Master Mix(美国 Thermo 公司)、pGADT7、pGBKT7 载体(日本 Clontech 公司)。

1.3 酵母双杂交验证蛋白互作

1.3.1 表达载体构建 根据 NCBI 中褐飞虱 *Cry1/Cry2*和 *IscA1* 基因序列,设计带有双酶切 位点(*Cry1: EcoRI/BamHI*, *Cry2*和 *IscA1: NdeI/ EcoRI*)的引物(表1)。从褐飞虱 cDNA 中克隆 上述基因的开放阅读框(Open reading frame, ORF)。通过同源同组的方式将 ORF 片段分别连 接到线性化的 pGADT7 和 pGBKT7 载体(图1) 上,构建 pGADT7-Cry1(AD-Cry1)、pGADT7-Cry2(AD-Cry2)和 pGBKT7-IscA1(BD-IscA1) 表达载体,并送测序。

1.3.2 共转化 将测序正确的质粒共转化进入 到 Y2HGold 感受态细胞进行蛋白表达。试验中 共转化组分为: pGADT7+pGBKT7(空载); AD-Cry1+pGBKT7、AD-Cry2 pGBKT7、pGADT7+ BD-IscA1 (毒性和自激活检测); AD-Cry1+BD-IscA1、AD-Cry2+BD-IscA1(试验组)。转化步 骤如下:首先将 Y2HGold 感受态细胞从 - 80 ℃ 超低温冰箱中取出放置于冰上融化,目的质粒置 于冰上进行预冷, 100 ℃煮沸 15 min 将 Carrier DNA 煮沸后快速放置于冰上; 然后向 50 µL 已 融化的感受态细胞中依次加入预冷后的目的质 粒 5 µg、Carrier DNA 5 µL 和 PEG/LiAC 250 µL, 并吸打 3 次使其充分混匀, 42 ℃温浴 20 min; 之后快速离心 10 s 去上清液;最后向沉淀中加 200 µL ddH2O 重悬浮,并涂于 SD-Leu-Trp 和 SD-Leu-Trp-His 平板,于 29 ℃培养。

1.4 基于 RNAi 的褐飞虱隐花色素蛋白和铁硫 簇蛋白基因沉默模型构建

1.4.1 dsRNA 合成与注射 根据褐飞虱 Cryl 和 IscAl 基因的 cDNA 序列,设计引物(表1)合成 dsRNA,并通过显微注射的方式对褐飞虱进 行基因沉默。显微注射的具体步骤如下:首先根 据体表特征筛选出褐飞虱3龄若虫和羽化第1天 的成虫,收集在装有水稻苗的玻璃试管中,并向 试管中缓缓通入二氧化碳气体,迷晕褐飞虱;然 后将褐飞虱有序排列在琼脂糖凝胶板上;之后采 用显微注射仪对褐飞虱胸部第1对和第2对足中 间位置进行注射;最后将注射过的褐飞虱放置于 水稻苗上待其复苏。

	Tuble 1 Trimers in the experiment	
引物名称	序列	用途
Primer names	Sequences (5'-3')	Usage
AD-Cry1-F	GCCATGGAGGCCAGTGAATTCATGTCGGATGAGATGAG	Cryl 基因同源重组引物
AD-Cry1-R	CAGCTCGAGCTCGATGGATCCGGTAGGAACGCATACGTGATCA	Primers of <i>Cry1</i> gene homologous recombination
AD-Cry2-F	GACGTACCAGATTACGCTCATATGACAGGTGAGGTGGTTCCAT	Cry2 基因同源重组引物
AD-Cry2-R	TATCGATGCCCACCCGGGTGGAACTTGTGCATAATGAACCGCTT C	Primers of <i>Cry2</i> gene homologous recombination
BD-IscA1-F	CTGATCTCAGAGGAGGACCTGCATATGGCTGGACGAGTTTTAG CTT	IscAl 基因同源重组引物
BD-IscA1-R	CGCTGCAGGTCGACGGATCCCCGGGAAGACTGAAAAGCTTTC GCCGCAG	homologous recombination
Nl-Cry1-dsRNA-F	TAATACGACTCACTATAGGGGTGGGGTTCCACCGCTAACTTA	Cryl 基因沉默引物
Nl-Cry1-dsRNA-R	TAATACGACTCACTATAGGGCCTCGTAGGCACGCATATTGAA	Primers of <i>Cry1</i> gene silencing
Nl-IscA1-dsRNA-F	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGCAGCACTGGTTTTGACAC	IscA1 基因沉默引物
Nl-IscA1-dsRNA-R	TAATACGACTCACTATAGGGGGCTTTTGCATCTATTATGACGC	Primers of <i>IscA1</i> gene silencing
GFP-dsRNA-F	TAATACGACTCACTATAGGGACGTAAACGGCCACAAGTTC	对照组引物
GFP-dsRNA-R	TAATACGACTCACTATAGGGTGTTCTGCTGGTAGTGGTCG	Primers of control group
Nl-Cry1-qPCR-F	ATGTCCGATGAGATGAGTG	Cry1 基因荧光定量引物
Nl-Cry1-qPCR-R	TATGAAGATTGGATAGAAGTTGTG	Primers of Cry1 gene RT-qPCR
Nl-IscA1-qPCR-F	AGACTCATATAGACGATGTTAA	IscAl 基因荧光定量引物
Nl-IscA1-qPCR-R	CCTCCAATGTCCTCTAAC	Primers of <i>IscA1</i> gene RT-qPCR
Nl-Actin-qPCR-F	CCAACCGTGAGAAGATGACC	内参基因引物
Nl-Actin-qPCR-R	GATGTCACGCACGATTTCAC	Primers of internal reference gene

表 1 试验中所用引物 Table 1 Primers in the experiment



Fig. 1 Vector map of pGADT7 and pGBKT7

1.4.2 RT-qPCR 沉默效率检测 注射 dsRNA 的 褐飞虱,分别在注射后第 2 天、第 4 天和第 6 天 取样检测沉默效率。每个处理随机取样 5 头,重

复 3 次。对样品进行 RNA 提取,反转为 cDNA 后采用 ABI Q6 Real-time PCR system 对基因的 表达水平进行检测。内参基因是褐飞虱 β -Actin

基因(GenBank accession no. EU179846)。使用 到的引物见表 1。

1.5 基因沉默虫体若虫历期统计

将注射 dsRNA (dsGFP:15 头; dsNl-Cryl:17 头; dsIscA1:19 头)后苏醒的 3 龄褐飞虱若虫单 独置于直径 4.5 cm、高度 15 cm 的玻璃试管中进 行饲养。每根试管中放有 2 棵用海绵包裹的水稻 苗供褐飞虱取食,水稻苗的根部露在海绵外部, 以便吸收营养液,海绵上部保持干燥,以避免褐 飞虱身体沾水无法正常活动。每根试管均进行编 号。每天观察记录褐飞虱和水稻苗的生长情况, 根据水稻苗的情况,定期统一更换新苗。待若虫 羽化成虫后记录日期,根据日期计算出每头虫子 从 3 龄到成虫所经历的若虫期。

1.6 基因沉默虫体产卵量统计

对羽化第1天的褐飞虱成虫进行 dsRNA 注 射后(每个基因 20 头雌虫,40 头雄虫),按照 1:2 的雌雄比例进行配对,饲养于与1.5 中描述 相同的玻璃试管中,每个试管中放置高度为12 cm 左右的水稻苗供褐飞虱产卵。每天对褐飞虱和水 稻苗的情况进行观察,在第5天时,统一将褐飞 虱转移至新的水稻苗上,转移时保证试管上的编 号——对应。转移完成后将已产卵的水稻苗取 出,在体视镜下通过显微解剖,统计前5d的产 卵量。第10天时,将褐飞虱从产卵苗上取出, 在体视镜下通过显微解剖,统计 5-10 d 的产卵量。总产卵量是 1-5 d 和 5-10 d 两次产卵量之和。

1.7 数据分析

数据采用 SPSS 20.0 进行统计分析, GraphPad Prism 7.0 进行绘图,数据以平均数±标准误差表示。基因表达量和若虫历期采用单因素方差分析,产卵量采用双尾 Student-*t* test 进行分析。*P* < 0.05 为有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 隐花色素蛋白与铁硫簇蛋白互作

由图 2 的结果可知,转化了阳性对照的 pGADT7-T+pGBKT7-53 的酵母菌在 SD-Leu-Trp 和 SD-Leu-Trp-His 的平板上均能生长,表明转化 步骤操作正确;转化了 pGADT7+pGBKT7、AD-Cry1+pGBKT7、AD-Cry2+pGBKT7、pGADT7+ BD-IscA1 的酵母菌都能在 SD-Leu-Trp 平板上生 长,且菌落大小一致,说明上述载体表达的融合 蛋白对 Y2HGold 酵母的生长无毒性,且对酵母 的生长未有抑制作用。AD-Cry1+pGBKT7、AD-Cry2+pGBKT7、pGADT7+BD-IscA1 共转化酵母 菌在 SD-Leu-Trp-His 平板上不能生长,表明上述 3 组载体表达的融合蛋白不能自激活 Y2HGold 酵母菌报告基因。共转化了 AD-Cry1+BD-IscA1、 AD-Cry2+BD-IscA1 的酵母菌均可以在 SD-Leu-





a: 原浓度; b: 稀释 10 倍; c: 稀释 100 倍; d: 稀释 1 000 倍。 a: Original concentration; b: Diluted 10 times; c: Diluted 100 times; d: Diluted 1 000 times. Trp 平板上生长,但只有共转化了 AD-Cry1+BD-IscA1 的酵母菌能在 SD-Leu-Trp-His 平板上生 长,而 AD-Cry2+BD-IscA1 的酵母菌无法在 SD-Leu-Trp-His 平板上生长,表明 Cry1 和 IscA1 的 融合蛋白激活了 Y2HGold 酵母菌的 His 报告基 因,从而使其能在 SD-Leu-Trp-His 平板上生长; 而 Cry2 和 IscA1 的融合蛋白未能激活 Y2HGold 酵母菌的 His 报告基因,无法在 SD-Leu-Trp-His 平板上生长。上述结果说明 Cry1 与 IscA1 之间

2.2 基因沉默效率

*Cry1*的沉默效率结果表明,若虫和成虫注射 dsRNA 后 *Cry1* 基因均能得到有效沉默。若虫注射 ds*NI-Cry1* 后第 2 天沉默效率为 70%,第 4 天和第 6 天沉默效率达到 80%(图 3: A);成虫的沉默效率均达到 80%(图 3: B)。对 *IscA1* 基因的沉默效率检测结果表明,该基因也能被有效沉默。在若虫和成虫中,*IscA1* 基因的沉默效率均达到 90%(图 3: C, D)。



Fig. 3 The RNAi efficiency for Cry1 and IscA1

A. 3 龄若虫期注射 dsRNA 后 *Cry1* mRNA 表达量; B. 成虫羽化第 1 天注射 dsRNA 后 *Cry1* mRNA 表达量; C. 3 龄若虫期注射 dsRNA 后 *IscA1* mRNA 表达量; D. 成虫羽化第 1 天注射 dsRNA 后 *IscA1* mRNA 表达量。 A. The relative *Cry1* mRNA level after injection of dsRNA at 3rd instar; B. The relative *Cry1* mRNA level after injection of dsRNA at 1st day of adult; C. The relative *IscA1* mRNA level after injection of dsRNA at 1st day of adult; C. The relative *IscA1* mRNA level after injection of dsRNA at 1st day of adult; C. The relative *IscA1* mRNA level after injection of dsRNA at 1st day of adult.

相对表达水平是利用注射 ds*GFP* 后 *Cry1/IscA1* 值计算 (*n*=3)。**表示基因表达量在 *P*<0.01 水平上差异显著。 The relative expression level was quantified with regard to the *Cry1/IscA1* value injected with ds*GFP* (*n*=3). ** indicates significant difference of gene expression at the 0.01 level.

2.3 基因沉默对褐飞虱若虫期的影响

经单因素方差分析发现, Cryl 基因沉默对 褐飞虱若虫历期无明显影响; IscAl 基因沉默对 褐飞虱若虫历期亦无明显影响(图4)。

经双尾 Student's *t*-test 分析发现, *Cry1* 和 *IscA1* 基因的沉默对褐飞虱的产卵量有显著性影

存在相互作用。

响。与对照组相比,注射 dsNl-Cryl 的褐飞虱第 1-5 天、第 6-10 天以及总的产卵量显著性下降; 注射 dsNl-IscAl 的褐飞虱第 1-5 天的产卵量略有 升高,但未有显著性差异,而第 6-10 天以及总 的产卵量均明显降低(图 5)。



图 4 Cry1/IscA1 基因沉默后 3 龄若虫到成虫历期 Fig. 4 Developmental durations of nymphy from the third instar to the adult of BPH after Cry1/IscA1 gene silencing ns 代表不同组间差异不显著。下图同。 ns indicates no significant difference among the different groups. The same below.





***表示产卵量在 P < 0.001 水平上差异显著。 *** indicates significant difference of number of eggs at the 0.01 level.

3 讨论

磁受体是生物感知地磁场的关键分子,研究

它对于阐明生物磁感受机制具有重要的意义。隐 花色素蛋白和铁硫簇蛋白是目前已知的 2 种磁 受体蛋白,但是二者之间是否存在相互作用一直 缺乏在真核生物中的实验证据。本研究通过酵母 双杂交系统,在真核生物体内明确了二者之间互 作,同时证实了其在昆虫发育和生殖中的作用。

酵母双杂交系统用于在真核生物中测定蛋 白质的结合作用,具有高度敏感性。通过在酵母 细胞体内表达蛋白,使得蛋白保持了天然的构象 更接近其在生物体内的真实状态;同时,酵母双 杂交系统的表达载体使用了强启动子,融合蛋白 能够高水平的表达,即使蛋白之间的相互作用不 强或者结合比较短暂亦能被检测出(White, 1996; Gietz and Woods, 2002)。在该系统中, 只有存在相互作用的蛋白才能激活下游报告基 因,从而得以在缺失培养基上生长。本试验中表 达 Cry1+IscA1 融合蛋白的酵母菌可以在 SD-Leu-Trp-His 培养基上生长, 而表达 Cry2+IscA1 融合蛋白的酵母菌无法在 SD-Leu-Trp-His 培养 基上生长,表明 Cry1 与 IscA1 存在相互作用, 而 Cry2 与 IscA1 之间无相互作用。试验也对蛋 白的自激活进行检测,通过比较转化融合蛋白表 达载体 AD-Cry1+BD-IscA1 和 AD-Cry2+BD-IscA1 的酵母菌与 pGADT7+pGBKT7、AD-Cry1+pGBKT7、AD-Cry2+pGBKT7、pGADT7+ BD-IscA1 的酵母菌在 SD-Leu-Trp-His 平板上的 生长情况,发现在 SD-Leu-Trp-His 平板上只有转 化了融合蛋白表达载体的菌株可以生长,其余 酵母菌均不能生长,排除了蛋白独自表达激活报 告基因的情况。已有研究表明 FAD 结构域可能 是 Cry 与 IscA1 蛋白相互作用的一个桥梁 (Qin et al., 2015)。不过, 前期对于褐飞虱 Cry1 和 Cry2 的蛋白结构预测显示, 在 2 种类型 Cry 蛋 自中均存在 FAD 结合域 (Xu et al., 2015), 而 本研究发现只有 Cry1 与 IscA1 之间存在互作, 推测 FAD 活性位点在 Cry2 中可能存在突变,导 致其与 IscA1 无法发生相互作用,除此之外也不 排除 Cry1 与 IscA1 之间可能存在其它的作用位 点,今后可以在此方面开展相关研究。

生物钟基因对哺乳动物的生殖过程发挥着 不可或缺的作用(李瑞文等, 2013)。在哺乳动

物子宫、胎盘和胎膜中都能检测到 Bmall/Clock/ Per1/Per2/Cry1 和 Cry2 基因(Ratajczak et al., 2010), 并且 Perl/Per2 和 Bmall 基因在输卵管 中呈节律性的表达 (Kennaway et al., 2003); 同 时 Clock 与卵泡的发育相关 (Shimizu et al., 2012), 预示生物钟基因与生殖分娩过程密切相 关。本试验中沉默 Crvl 基因的褐飞虱产卵量显 著性下降,首次证实了 Cryl 基因在昆虫生殖中 发挥的作用,同时也为隐花色素蛋白参与磁场对 昆虫生殖调控提供了依据。不过本研究也发现, Cryl 基因沉默后褐飞虱的若虫历期并没有发生 改变,因此我们推测磁场对昆虫历期的影响有 可能是通过除 Cryl 外的其它基因实现的(Wan et al., 2014)。本试验还发现 IscAl 基因沉默后 褐飞虱的产卵量也发生显著性的变化,与对照组 相比,沉默虫体的产卵量显著性下降,表明 IscA1 与褐飞虱的生殖也密切相关。铁硫簇蛋白作为线 粒体蛋白,参与了细胞内的能量代谢,其缺失可 导致酵母菌的呼吸代谢过程受损及菌体生长的 延迟(Kaut et al., 2000)。此外, 生物的生理节 律循环需要依靠机体的关键代谢途径和节律机 制的相互协调 (Wijnen and Young, 2006)。研究 表明铁硫簇蛋白可以通过调节生物体内的铁代 谢平衡,影响生物钟蛋白对神经的调节,进而影 响机体的生物节律。Kosmidis 等(2011)在果蝇 神经胶质细胞中过表达铁蛋白亚基,使结合铁的 铁蛋白积累,导致果蝇昼夜节律活动丧失。 Mandilaras 和 Missirlis (2012)将铁硫簇蛋白干 扰后发现,果蝇的昼夜节律发生混乱。本试验中 铁硫簇蛋白的沉默可能也引起了褐飞虱节律的 改变,从而影响褐飞虱生殖。该基因是否参与到 了磁场对褐飞虱生殖的调控可以在接下来的工 作中进一步探究。

此外,通过酵母双杂交已经证实 Cry1 和 IscA1 蛋白之间存在相互作用,表明二者在褐飞 虱中存在于同一信号通路中;而基因沉默的结果 显示,两基因的沉默均可引起褐飞虱产卵量下 降,但 IscA1 基因的影响滞后,在 6-10 d 时才出 现,推测在信号通路中 IscA1 基因可能位于通路 上游,借助于通路下游的 Cry1 基因介导了褐飞 虱的生殖调控。此通路是否涉及其它基因的参与 还需要进一步的研究。

综上所述,本研究证实了褐飞虱隐花色素蛋白 Cry1 与铁硫簇蛋白 IcsA1 之间存在相互作用, 表明昆虫体内存在的两类隐花色素功能有所不同;同时,亦为生物体内 Cry 蛋白/IscA1 蛋白形成磁感受复合体发挥协同作用提供了在真核生物中的实验证据。同时研究还发现, Cry1 在褐飞虱的生殖过程中发挥重要作用,为 Cry1 介导的磁场对褐飞虱生殖调控提供了依据。IscA1 蛋白在褐飞虱生殖可的功能的发现也为磁场对褐 飞虱生殖调控机制提供了新的方向。

参考文献 (References)

- Boles LC, Lohmann KJ, 2003. True navigation and magnetic maps in spiny lobsters. *Nature*, 421(6918): 60–63.
- Brewer HB, 1979. Some preliminary studies on the effects of a static magnetic field on the life cycle of *Lebistes reticulates* (guppy). *Biophysical Journal*, 28(2): 305–314.
- Camlitepe Y, Stradling DJ, 1995. Wood ants orient to magnetic fields. *Proceedings Biological Sciences*, 261(1306): 37–41.
- Chen W, Wang XM, Sun HB, 2014. Cryptochrome: A light-dependent magnetoreceptor. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 30(10): 973–978. [陈薇, 王晓明, 孙红宾, 2014. 隐花 色素——生物磁感应蛋白. 中国生物化学与分子生物学报, 30(10): 973–978.]
- Dennis TE, Rayner MJ, Walker MM, 2007. Evidence that pigeons orient to geomagnetic intensity during homing. *Proceedings of* the Royal Society B Biological Sciences, 274(1614): 1153–1158.
- Denegre JM, Jr VJ, Lin K, Jordan WB, Mowry KL, 1998. Cleavage planes in frog eggs are altered by strong magnetic fields. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(25): 14729–14732.
- Gegear RJ, Casselman A, Waddell S, Reppert SM, 2008. Cryptochrome mediates light-dependent magnetosensitivity in Drosophila. *Nature*, 454(7207): 1014–1018.
- Gegear RJ, Foley LE, Casselman A, 2010. Animal cryptochromes mediate magnetoreception by an unconventional photochemical mechanism. *Nature*, 463(7282): 804–807.
- Gietz RD, Woods RA, 2002. Screening for protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *Methods in Molecular Biology*, 185(6): 471–486.
- Griffin EA, Staknis D, Weitz CJ, 1999. Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock. *Science*, 286(5440): 768–771.

58 卷

- Guerra PA, Gegear RJ, Peppert SM, 2014. A magnetic compass aids monarch butterfly migration. *Nature Communications*, 5(1): 4164.
- Jensen LT, Culotta VC, 2000. Role of saccharomyces cerevisiae ISCA1 and ISCA2 in iron homeostasis. *Molecular and Cellular Biology*, 20(11): 3918–3927.
- Kaut A, Lange H, Diekert K, Kispal G, Lill R, 2000. Isa1p is a component of the mitochondrial machinery for maturation of cellular iron-sulfur proteins and requires conserved cysteine residues for function. *Journal of Biological Chemistry*, 275(21): 15955–15961.
- Kennaway DJ, Varcoe TJ, Mau VJ, 2003. Rhythmic expression of clock and clock-controlled genes in the rat oviduct. *Molecular Human Reproduction*, 9(9): 503–507.
- Kirschvink JL, Walker MM, Diebel CE, 2001. Magnetite-based magnetoreception. *Current Opinion in Neurobiology*, 11(4): 462–467.
- Kosmidis S, Botella JA, Mandilaras K, Schneuwly S, Skoulakis EM, Rouault TA, Missirlis F, 2011. Ferritin overexpression in drosophila glia leads to iron deposition in the optic lobes and late-onset behavioral defects. *Neurobiology of Disease*, 43(1): 213–219.
- Li RW, Cheng ST, Wang ZR, 2013. Clock gene and mammal reproduction. *Journal of Biology*, 30(4): 67–70. [李瑞文, 成姝 婷, 王正荣, 2013. 生物钟基因与哺乳动物生殖. 生物学杂志, 30(4): 67–70.]
- Lohmann KJ, Lohmann CM, Ehrhart LM, Bagley DA, Swing T, 2004. Animal behaviour: Geomagnetic map used in sea-turtle navigation. *Nature*, 428(6986): 909–910.
- Mandilaras K, Missirlis F, 2012. Genes for iron metabolism influence circadian rhythms in drosophila melanogaster. *Metallomics*, 4(9): 928–936.
- Meyer J, 2008. Iron-sulfur protein folds, iron-sulfur chemistry, and evolution. *Journal of Biolpgical Inorganic Chemistry*, 13(2): 157–170.
- Prolić ZM, Nenadovic V, 1995. The Influence of a permanent magnetic-field on the process of adult emergence in *Tenebrio molitor*. *Journal of Insect Physiology*, 41(12): 1113–1118.
- Qin SY, Yin H, Yang CL, Dou YF, Liu ZM, Zhang P, Yu H, Huang YL, Feng J, Hao JF, Hao J, Deng LZ, Yan XY, Dong XL, Zhao ZX, Jiang TJ, Wang HW, Luo SJ, Xie C, 2015. A magnetic protein biocompass. *Nature Materials*, 15(2): 217–226.
- Ratajczak CK, Herzog ED, Muglia LJ, 2010. Clock gene expression in gravid uterus and extra-embryonic tissues during late gestation in the mouse. *Reproduction Fertility & Development*, 22(5): 743–750.
- Raus S, Todorovic D, Prolic Z, 2009. Viability of old house borer (*Hylotrupes bajulus*) larvae exposed to a constant magnetic field of 98 mT under laboratory conditions. *Archives of Biological*

Sciences, 61(1): 129-134.

- Ritz T, Yoshii T, Helfrich-Foerster C, Ahmad M, 2010. Cryptochrome: A photoreceptor with the properties of a magnetoreceptor? *Communicative & Integrative Biology*, 3(1): 24–27.
- Shimizu T, Hirai Y, Murayama C, Miyamoto A, 2012. Expressions of the circadian genes Per2, Bmal1, Clock and Cry1 during the different stages of follicular development and their regulation by FSH in bovine granulosa cells from small follicles. *Livestock Science*, 145(1/3): 292–297.
- Strand JA, Abernethy CS, Skalski JR, Genoway RG, 1983. Effects of magnetic field exposure on fertilization success in rainbow trout, *Salmo gairdneri. Bioelectromagnetics*, 4(4): 295–301.
- Valles JM, 2002. Model of magnetic field-induced mitotic apparatus reorientation in frog eggs. *Biophysical Journal*, 82(3): 1260– 1265.
- Veronika L, Hayden ME, Marco B, Gerhard G, 2014. Does the earth's magnetic field serve as a reference for alignment of the honeybee waggle dance? *PLoS ONE*, 9(12): e115665.
- Wan GJ, Jiang SL, Zhao ZC, Zhao ZC, Xu JJ, Tao XR, Sword GA, Gao YB, Pan WD, Chen FJ, 2014. Bio-effects of near-zero magnetic fields on the growth, development and fecundity of small brown planthopper, *Laodelphax striatellus* and brown planthopper, *Nilaparvata lugens. Journal of Insect Physiology*, 68(3): 7–15.
- White MA, 1996. The yeast two-hybrid system: Forward and reverse. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of American, 93(19): 10001–10003.
- Wijnen H, Young MW, 2006. Interplay of circadian clocks and metabolic rhythms. *Annual Review of Genetics*, 40(1): 409–448.
- Wiltschko W, Wiltschko R, 2005. Magnetic orientation and magnetoreception in brids and other animals. *Journal of Comparative Physiology*, 191(8): 675–693.
- Xiao DW, Hu WH, Cai YF, Zhao N, 2020. Magnetic noise enabled biocompass. *Physical Review Letters*, doi: 124. 10.1103/PhysRev Lett.124.128101.
- Xu JJ, Pan W, Zhang YC, Li Y, Wan GJ, Chen FJ, Sword GA, Pan WD, 2017. Behavioral evidence for a magnetic sense in the oriental armyworm, *Mythimna separata*. *Biology Open*, 6(3): 340–347.
- Xu JJ, Wan GJ, Hu DB, He J, Chen FJ, Wang XH, Hua HX, Pan WD, 2015. Molecular characterization, tissue and developmental expression profiles of cryptochrome genes in wing dimorphic brown planthoppers, *Nilaparvata lugens. Insect Science*, 23(6): 805–818.
- Zhu H, Yuan Q, Briscoe AD, Froy O, Casselman A, Reppert S M, 2005. The two CRYs of the butterfly. *Current Biology*, 15(23): 953–954.