中华蜜蜂表皮蛋白 AcFCP12 的克隆表达及其 RNAi 研究*

郭 悦[1**] 李 颜[1] 王程程[1] 张 洁[1] 张飞扬[1] 党晓群[1***] 周泽扬[1,2]

（1. 农业农村部长江上游传粉昆虫资源保护与利用重点实验室，重庆市媒介生物控制和利用重庆市重点实验室，重庆师范大学，重庆 401331；2. 微孢子虫感染与防控重庆市重点实验室，重庆 400715）

摘 要 【目的】 昆虫的表皮是维持昆虫形态、抵御病原以及外界环境变化的主要保护屏障。本研究旨在通过 RNA 干扰（RNA interference，RNAi）检测中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 柔软表皮蛋白 flexible cuticle protein 12 (FCP12)对 CSBV 病毒感染的影响。**【方法】** 采用生物信息学分析鉴定 *AcFCP12* 序列特征，通过 qRT-PCR 检测 CSBV 感染前后中蜂 *AcFCP12* 的转录水平；通过原核表达系统对中华蜜蜂 *AcFCP12* 进行表达、纯化及其抗体制备；利用 L4440 载体表达双链 ds*AcFCP12*，采用 RNAi 干扰技术下调中蜂幼虫 *AcFCP12* 的表达，再对其进行 CSBV 病毒感染实验，通过 qRT-PCR 检测 *AcFCP12* 和 CSBV 衣壳蛋白基因 *VP1* 的表达量，分析 CSBV 病毒感染与中蜂表皮蛋白 AcFCP12 的相关性。**【结果】** 生物信息分析表明，中蜂 *AcFCP12* 包含一个几丁质结合域，具有 RR1 基序，表明该基因编码柔软表皮蛋白。qRT-PCR 结果显示，*AcFCP12* 在 CSBV 病毒感染 24 h 和 48 h 分别下调了 86%和 40%。通过原核克隆表达成功获得约 12 kD 的 AcFCP12 重组蛋白并制备了特异性较好的鼠多克隆抗体。利用 L4440 载体系统成功获得 *AcFCP12* 的双链 RNA，RNAi 实验表明，*AcFCP12* 基因表达下调了 65%。通过下调 *AcFCP12* 表达后再进行 CSBV 病毒感染，qRT-PCR 结果显示 CSBV 的 *VP1* 基因表达量显著增加了 33%。**【结论】** CSBV 病毒感染中蜂引起 *AcFCP12* 表达量降低，下调 *AcFCP12* 表达后导致 CSBV 病毒增殖加剧，表明中华蜜蜂 AcFCP12 在抵御 CSBV 感染时发挥重要作用，研究结果为阐明 CSBV 病毒对中蜂的感染机制奠定基础。

关键词 柔软表皮蛋白；中华蜜蜂；中蜂囊状幼虫病毒；原核表达；RNA 干扰

Cloning and RNAi study of *Apis cerana cerana* cuticular protein AcFCP12

GUO Yue[1**] LI Yan[1] WANG Cheng-Cheng[1] ZHANG Jie[1] ZHANG Fei-Yang[1] DANG Xiao-Qun[1***] ZHOU Ze-Yang[1,2]

(1. Key Laboratory of Conservation and Utilization of Pollinator Insect of the Upper Reaches of the Yangtze River Chongqing Key Laboratory of Vector Control and Utilization, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China; 2.Chongqing Key Laboratory of Microsporidia Infection and Control, Chongqing 400715, China)

Abstract [Objectives] The insect cuticle is the main protective barrier to maintain the morphology of insects and resist pathogens and changes in the external environment. The purpose of this study was to detect the effect of flexible cuticle protein 12 (FCP12) on CSBV virus infection by RNA interference (RNAi). **[Methods]** Using bioinformatics analysis to identify the sequence characteristics of AcFCP12, and using qRT-PCR to detect the transcription level of *AcFCP12* in *Apis cerana cerana* before and after CSBV infection. Expression, purification, and antibody preparation of AcFCP12 using a prokaryotic expression system. The expression of double-stranded ds*AcFCP12* was expressed in L4440 vector, and the

*资助项目 Supported projects：重庆市自然科学基金面上项目（cstc2019jcyj-msxmX0564）；重庆市教委科学技术研究项目（KJQN202000521）；重庆师范大学大学生创新创业训练计划项目（S202210637015）

**第一作者 First author，E-mail：2354366303@qq.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：xqdang@cqnu.edu.cn

收稿日期 Received：2023-07-27；接受日期 Accepted：2023-09-29

expression of *AcFCP12* in *Apis cerana cerana* larvae was down-regulated by RNAi interference technology. Then CSBV infection experiment was carried out, and the expression of *AcFCP12* and CSBV gene *VP1* was detected by qRT-PCR, and the correlation between CSBV infection and *Apis cerana cerana* cuticle protein AcFCP12 was analyzed. **[Results]** Bioinformatic analysis showed that AcFCP12 contained a chitin binding domain with RR1 motif, indicating that the gene encodes flexible cuticle protein. The qRT-PCR results showed that *AcFCP12* was down-regulated by 86% and 40% at 24 and 48 hours of CSBV infection, respectively. The recombinant protein AcFCP12 of about 12 kD was successfully obtained by prokaryotic expression system. The specific mouse polyclonal antibodies against the recombinant protein AcFCP12 was prepared. Double-stranded RNA of *AcFCP12* was successfully obtained using the L4440 vector system. RNAi experiments showed that *AcFCP12* gene transcription was down-regulated by 65% at 24 h of interference when 2 μg of ds*AcFCP12* was added. By down-regulating the transcription of *AcFCP12*,the larvae was infected by CSBV. qRT-PCR results showed that the expression of VP1 increased significantly by 33%. **[Conclusion]** CSBV infection of *A. cerana cerana* caused a decrease in *AcFCP12* expression, and down-regulation of *AcFCP12* transcription led to increased the proliferation of CSBV, suggesting that AcFCP12 plays an important role in defense against CSBV infection. These results lay a foundation for further study of the mechanism underlying the infection of *A. cerana cerana* with CSBV.

Key words flexible cuticle protein; *Apis cerana cerana*; Chinese sacbrood virus; prokaryotic expression; RNA interference

蜜蜂是重要的经济昆虫，在传花授粉和维持生态环境方面发挥着重要作用。中华蜜蜂 *Apis cerana cerana*（以下简称中蜂），是我国特有的蜜蜂种质资源，较西方蜜蜂 *Apis mellifera* 有更强的抗螨、抗病和耐寒等特性。然而，近年来蜜蜂的种群竞争、病毒病、细菌病等（何旭和刘新宇，2011；于慧敏，2021）导致中华蜜蜂的种群数量大幅减少。由意大利蜜蜂携带的囊状幼虫病毒（Sacbrood virus, SBV）感染中蜂给中华蜜蜂的生产造成了巨大的损失（余欣悦等，2023），严重影响了我国养蜂业的进步和发展（Liu *et al.*，2017）。

昆虫表皮是昆虫躯体最外层的组织，主要由几丁质和表皮蛋白（Cuticular proteins, CP）构成，能够维持昆虫形态，作为昆虫免疫的第一道防线，能抵御真菌、细菌、天敌以及外界环境变化。由于各种表皮蛋白和几丁质的结合方式不同，结合后所表现的生物学功能也存在差异，因此，昆虫表皮蛋白的多样性决定了昆虫表皮的多样性。迄今为止，已报道的表皮蛋白家族主要包括 CPR 家族（Rebers and Riddiford，1988）、CPF/CPFL 家族（Togawa *et al.*，2007）等 12 个家族（Liu *et al.*，2019）。西方蜜蜂 *Apis mellifera* 有 48 条 CPR 表皮蛋白（孙亮先等，2012），中华蜜蜂有 40 条表皮蛋白。孙汝江（2014）克隆出 2 个中华蜜蜂表皮蛋白基因 *AccCPR1* 和 *AccCPR2*，二者均属于 CPR 家族 RR-2 亚族，通过免疫组化定位表明 *AccCPR1* 在中肠和表皮中表达，主要对角质层的发育及分化过程有重要作用，而 *AccCPR2* 参与抗逆性应激反应。

昆虫表皮作为昆虫抵御病原体的第一道物理屏障，在病原感染过程中发挥着至关重要的作用。在中蜂囊状幼虫病毒 CSBV 感染机制的研究进程中，Han 等（2013）采用双向电泳结合质谱的方法发现，幼虫表皮蛋白 larval cuticle protein LCP-17-like、flexible cuticle protein 12 等 6 个蛋白在感染 CSBV 后呈现下调表达。Deng 等（2020）采用 RNAseq 技术发现 CSBV 感染后表皮蛋白 larval cuticle protein A1A、larval cuticle protein A2B、flexible cuticle protein 12-like 和 larval cuticle protein A3A 轻微上调。本研究对感染 CSBV 病毒的中蜂幼虫转录组分析，发现 12 kD 柔软表皮蛋白（flexible cuticle protein 12，FCP12）呈现下调。考虑到不同研究团队均发现 12 kD 柔软表皮蛋白在 CSBV 感染中的变化，推测 AcFCP12 在 CSBV 感染中可能具有重要作用，因此，本研究拟以 *AcFCP12* 为研究对象，采用荧光定量 PCR 检测 CSBV 感染幼虫后不同时间段 *AcFCP12* 的转录情况，通过表达 AcFCP12 的重组蛋白制备其多克隆抗体，并构建 *AcFCP12* 的双链 dsRNA 表达载体，借助 RNAi 技术探究中华蜜蜂 *AcFCP12* 下调后对幼虫发育及 CSBV 感染中的作用。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫及病毒

健康中华蜜蜂幼虫购于重庆市璧山区个体户蜂农养殖场；CSBV 病毒粒子由重庆师范大学资源昆虫及其病原微生物学实验室提供；昆明雌性小鼠购于重庆腾鑫生物技术有限公司。

1.2 主要试剂及仪器

实验所用的 Trizol、Primescript RT reagent kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒、Premix Taq™（Ex Taq™ Version 2.0）、pMD19-T vector、Solution I 连接酶购于 TaKaRa 公司；FastStart Essential DNA Green Master 荧光定量 PCR 试剂盒购于 Roche 公司；扩增目的基因引物、大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 感受态细胞、表达菌株 Rosetta （DE3）感受态细胞、D-果糖、D-葡萄糖和酵母提取物（Yeast extract）、琼脂粉（Agar）、氯化钠（NaCl）、Kana 抗生素（Kana）、十二烷基磺酸钠（SDS）等购于生工生物工程股份有限公司；氯仿、异丙醇、甲醇和无水乙醇等购于重庆化学试剂有限公司。

荧光定量 PCR 仪（美国 Bio-Rad 公司）、智能人工气候箱（上海谷宁仪器有限公司）、高速冷冻离心机（Eppendorf）、体式解剖显微镜（莱卡显微系统（上海）有限公司）等。

1.3 *AcFCP12* 基因在 CSBV 感染后的转录分析

取健康 2 日龄中华蜜蜂幼虫分为 2 组，一组为添加正常食物的对照组，另一组为添加 CSBV 病毒的实验组，病毒的添加量为 1×10^7 copies/只，实验组后续添加正常食物；在培养 24 和 48 h 时分别取正常组和感染组各 6 只幼虫，经 75%乙醇和 DEPC 水处理后，冻存与 - 80 ℃备用。后续荧光定量 PCR 参照 1.7。

1.4 中华蜜蜂表皮蛋白 AcFCP12 的原核表达载体构建

根据 GenBank 中登录的 *AcFCP12* 基因序列，通过 Primer 软件设计特异性引物（表 1）。以 4 日龄中蜂幼虫为材料，Trizol 法提取幼虫 RNA，使用反转录试剂盒反转录成 cDNA，以上述 cDNA 为模板进行 *AcFCP12* 基因的体外扩增。PCR 反应体系（50 μL）：cDNA 2 μL，正反向引物（10 mmol/L）各 1 μL，Premix Taq DNA 聚合酶 24 μL，ddH_2O 22 μL。扩增程序：95 ℃预变性 5 min；95 ℃变性 40 s，55 ℃退火 40 s，72 ℃延伸 1 min，循环 35 次；72 ℃终延伸 10 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测分离并胶回收目的片段，连接 pMD19-T 载体并转化至大肠杆菌感受态细胞 DH5α，挑选菌株经菌液 PCR、质粒 PCR 及双酶切三重验证，成功筛选到阳性菌株后，送至生工生物工程（上海）股份

表 1 引物信息

Table 1 Primers information

引物名称 Primers	引物序列（5′-3′） Primer sequence (5′-3′)	用途 Purpose
AcFCP12-F	CCCAAGCTTATGAAGCTGTTCATTGCTTT	PCR
AcFCP12-R	CCGCTCGAGTCAAGCAGGGAGATGTTCAC	
ds*AcFCP12*-F	CCCAAGCTTTGTTCATTGCTTTCGCTCT	RNAi
ds*AcFCP12*-R	CCGCTCGAGGGAAACCATTCTCATCGGCTA	
ds*EGFP*-F	GCTCTAGATTCCATGGCCAACACTTGTC	
ds*EGFP*-R	CCCAAGCTTTCAAGAAGGACCATGTGGTC	
q*AcFCP12*-F	TTTCCAATGGTCAGTCTCATCA	qRT-PCR
q*AcFCP12*-R	GATGGAAACCATTCTCATCGGC	
q*AcActin*-F	TGCCAACACTGTCCTTTCTG	
q*AcActin*-R	AGAATTGACCCACCAATCCA	

下划线代表酶切位点。The underline represents the restriction site.

有限公司进行测序。将测序完成的重组质粒 pMD19- T-*AcFCP12* 亚克隆至 pET28a 表达载体，经过 PCR 和双酶切三重验证确定重组表达载体 pET28a-*AcFCP12* 构建成功。

1.5　AcFCP12 重组蛋白的表达与纯化及多克隆抗体制备

将构建成功的重组质粒转化入大肠杆菌 Rosetta（DE3）感受态细胞中，进行 IPTG 诱导表达。利用亲和层析柱纯化重组蛋白，操作步骤参照 Ni-NAT Superflow Cartridge 蛋白纯化柱的说明书进行。以纯化好的原核表达蛋白作为抗原，采用皮下注射的方式，对云南昆明雌性小鼠进行 4 次免疫后对小鼠进行眼球采血，吸取血清。利用重组蛋白进行免疫印迹检测所制备抗体的特异性。

1.6　AcFCP12 的 RNAi

提取pMD19-T-*EGFP*质粒和pMD19-T-*AcFCP12*质粒以及 L4440 空载质粒，使用限制性核酸内切酶 *Hind* III 和 *Xho* I 获取目的片段，与 L4440 载体连接，获得 L4440-*EGFP* 和 L4440-*AcFCP12* 重组质粒，将质粒转化进大肠杆菌感受态细胞 HT115 菌株，37 ℃过夜培养后获得阳性菌株，随后 Trizol 法提取 dsRNA（史红霞等，2019），经 DNase 和 RNaseA 消化后，测量其浓度，保存于 - 80 ℃备用。

将确定正常存活状态的中蜂幼虫分为 2 组，第 1 组为添加 ds*EGFP* 的对照组，第 2 组为添加 ds*AcFCP12* 的实验组，以最佳干涉浓度 2.0 μg 通过饲喂法对正常幼虫进行干涉实验，并在最佳干涉 24 h 时进行取材，经 75%的乙醇和 DEPC 水处理后，冻存于 - 80 ℃备用，用于检测干涉效率。对上述 2 个干涉组干涉处理后添加 CSBV 病毒（1×10^7 copies/只），后续仍添加正常食物，分别在添加 CSBV 病毒后的 24 和 48 h 各取 6 只幼虫，经 75%乙醇和 DEPC 水处理后，冻存与 - 80 ℃备用。

1.7　荧光定量 PCR

提取上述对照组和实验组幼虫的 RNA，反转录为 cDNA，稀释到 100 ng/μL 左右，以 *AcActin* 为内参基因，以上述稀释的 cDNA 为模板进行 qRT-PCR。参照 FastStart Essential DNA Green Master 说明书配置 20 μL 反应体系：Green Master 2×conc 10 μL，正反向引物（10 μmol/L）各 1 μL，上述 cDNA 模板 1 μL，ddH_2O 7 μL。每个样品重复 3 次并进行 3 次生物学重复。反应程序：预变性 95 ℃，10 min；变性 95 ℃，10 s，退火温度 55 ℃，10 s，延伸 72 ℃，20 s，循环 39 次；熔解曲线 65 ℃ to 95 ℃，增幅 0.5 ℃，5 s。

1.8　数据统计分析

Excel2019 处理 qRT-PCR 获得的 Ct 值，以 *AcActin* 为内参基因，根据 ΔΔCt 法计算出各基因相对表达量，即目的基因的相对表达量=$2^{-\Delta\Delta Ct}$，ΔΔCt=（Ct 目的基因 − Ct 内参基因）实验组 −（Ct 目的基因 − Ct 内参基因）对照组。将数据导入 GraphPad Prism 8.3.0 软件进行作图，并对各基因表达情况进行差异性检测。

2　结果与分析

2.1　*AcFCP12* 基因的序列特征分析

利用在线软件对 *AcFCP12* 序列的基本特征分析，结果发现 *AcFCP12* 基因编码 95 个氨基酸，分子量为 11.67 kD，等电点（pI）为 4.2，经 Expasy（http://www.expasy.ch/prosite）预测 AcFCP12 包含信号肽和一个几丁质结合-4 (chitin-bind-4) 结构域。利用表皮蛋白基因数据库（http://bioinformatics2.biol.uoa.gr/cuticleDB/hmmfind_form.jsp）进行 RR1 和 RR2 亚家族预测，结果显示 *AcFCP12* 与 RR1 基序的比对 E 值为 4×10^{-30}，与 RR2 基序的比对 E 值为 0.000 26，表明 *AcFCP12* 基因属于 CPR 家族的 RR1 亚家族（图 1），为柔软表皮蛋白（Iconomidou *et al.*, 2005）。通过 NCBI 检索并下载 AcFCP12 蛋白与膜翅目其他物种的同源蛋白序列。利用 Clustalx 对上述序列进行多重序列比对分析，如图 2 所示，FCP12 蛋白在蜜蜂科中具有保守的序列 YNYGYELSNGQ+QESAELV+GTENEALAVR+GSYSWV+YTVNYVADEN+GFHPQGEHLP。“+”表示有多个氨基

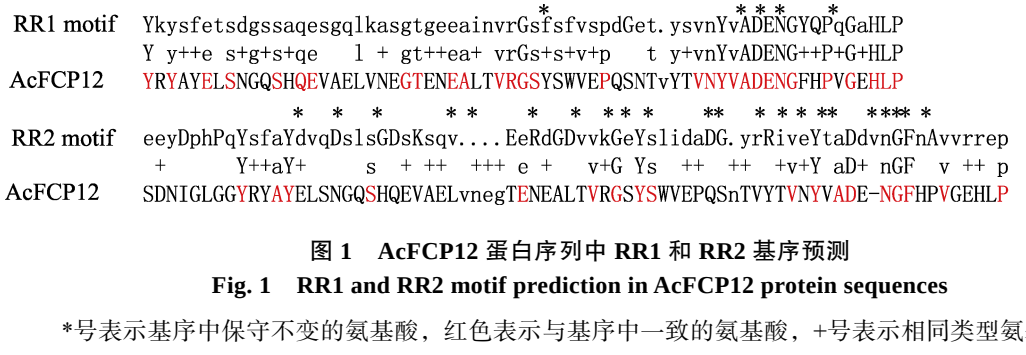

图 1　AcFCP12 蛋白序列中 RR1 和 RR2 基序预测

Fig. 1　RR1 and RR2 motif prediction in AcFCP12 protein sequences

*号表示基序中保守不变的氨基酸，红色表示与基序中一致的氨基酸，+号表示相同类型氨基酸。

* indicate conserved amino acids in the motif, red indicates amino acids consistent with the motif, + indicates the same type of amino acid.

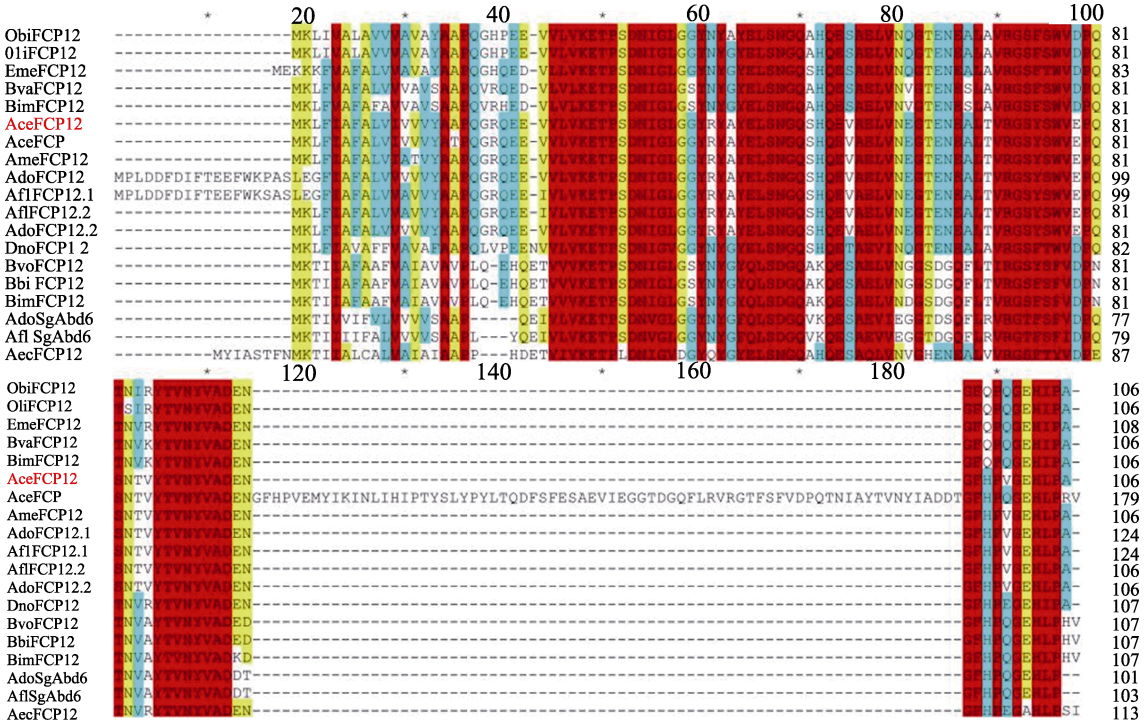

图 2　中华蜜蜂 *AcFCP12* 多重序列比对

Fig. 2　Comparison of multiple sequences of *AcFCP12* in the *Apis cerana cerana*

相同的氨基酸序列用红色表示，黄色和蓝色显示较为保守的氨基酸。

The same amino acid sites is indicated by the red. The yellow and blue sections show more conserved amino acids.

Obi: 红梅森蜂 *Osmia bicornis bicornis*; Oli: 蓝色果园壁蜂 *Osmia lignaria*; Eme: 墨西哥兰花蜂 *Eufriesea mexicana*; Bva: 大黄蜂 *Bombus vancouverensis nearcticus*; Bim: 美洲东部熊蜂 *Bombus impatiens*; Ace: 中华蜜蜂 *Apis cerana*; Ame: 西方蜜蜂 *Apis mellifera*; Ado: 大蜜蜂 *Apis dorsata*; Afl: 小蜜蜂 *Apis florea*; Dno: 杜隧蜂属 *Dufourea novaeangliae*; Bvo: 黄脸熊蜂 *Bombus vosnesenskii*; Bbi: 熊蜂 *Bombus bifarius*; Aec: 切叶蚁 *Acromyrmex echinatior*.

酸可能占据这个位置，下划线表示在所比对物种中一致的氨基酸。其中 YNY 基序在中华蜜蜂、西方蜜蜂、大蜜蜂和小蜜蜂中为 YRY，LAVR 和 PQGEH 也存在多态性，多数蜜蜂为 LTVR 和 PVGEH。这些变化暗示蜜蜂 FCP12 虽然较为保守，但在功能上尤其是结合几丁质方面存在差异。

2.2　*AcFCP12* 基因在 CSBV 感染前后的转录特征

利用实时荧光定量 PCR 检测 *AcFCP12* 在感染 CSBV 病毒后中蜂幼虫体内的转录情况，并通过检测中蜂幼虫体内 CSBV 病毒的结构蛋白基因 *VP1* 的相对表达量，反映 CSBV 病毒的增殖

水平。结果显示，*VP1* 在感染 CSBV 的幼虫中表达量显著增加（图 3：A），说明 CSBV 病毒已成功感染中蜂幼虫，并在体内迅速增殖。同时，*AcFCP12* 的转录水平在 CSBV 感染 24 h 时下调了 86%，在 CSBV 感染 48 h 时下调了 40%（图 3：B），表明 *AcFCP12* 基因在感染 CSBV 病毒的幼虫中呈现持续下调，推测 CSBV 病毒的感染可能诱导 *AcFCP12* 基因的下调表达。

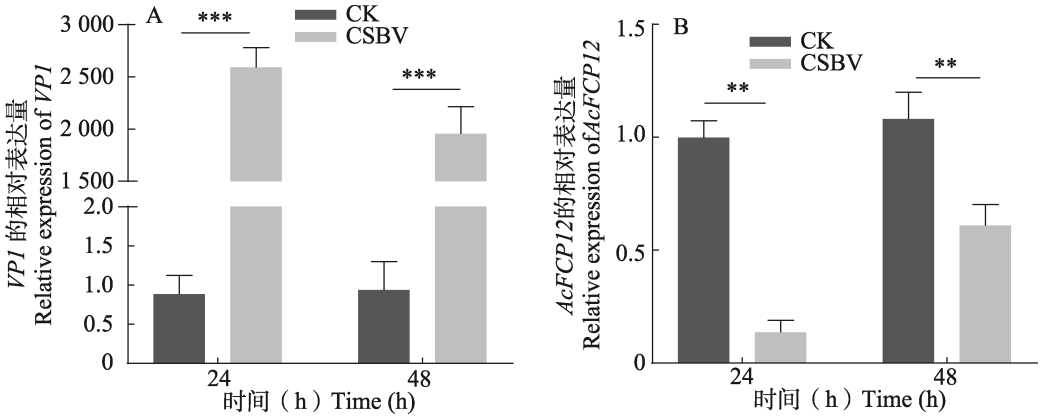

图 3　qRT-PCR 检测 CSBV 对中华蜜蜂幼虫的感染情况（A）和 CSBV 感染前后 *AcFCP12* 在中蜂幼虫体内的转录情况（B）

Fig. 3　Detection of CSBV infection by qRT-PCR on *Apis cerana cerana* larvae (A) and transcription of *AcFCP12* in *Apis cerana cerana* larvae before and after CSBV infection (B)

图中数据为平均值±标准误；柱上标有星号表示经 *t* 检验两组间差异显著（*P<0.05; ** P<0.01; ***P<0.001）。图 7 同。
The data in the figure are mean±SE. The asterisk above the bar indicates significant differences between the two groups by *t*-test (*P<0.05; ** P<0.01; ***P<0.001). The same for Fig.7.

2.3　*AcFCP12* 基因扩增及原核表达载体的构建

以中蜂幼虫 cDNA 为模板扩增 *AcFCP12* 基因，获得 281 bp 左右的核酸片段，并切胶回收目的片段。进行 pMD19-T 克隆载体连接并转化，成功构建 pMD19-T-*AcFCP12*（图 4：A，B）。将重组质粒及 pET28a 质粒进行双酶切后回收目的片段，并进行连接、转化，成功构建 pET28a-*AcFCP12*（图 4：C，D）。最后，将其转入大肠杆菌表达菌株 Rosetta（DE3），进行后续重组蛋白诱导表达实验。

2.4　重组蛋白 AcFCP12 的表达及多克隆抗体的制备

SDS-PAGE 结果显示，诱导表达出约 12 kD 的重组蛋白。对重组蛋白 AcFCP12 进行大量诱导，利用亲和层析柱得到纯化的重组蛋白（图 5：A）。将纯化后的重组蛋白作为抗原免疫昆明雌性小鼠以制备相应的多克隆抗体，以 AcFCP12 纯化的蛋白为底物蛋白，利用 Western blotting 对制备的多克隆抗体特异性进行验证，多克隆抗体能够在重组蛋白中杂交到单一且明显的条带（图 5：B），表明该多克隆抗体制备成功且对抗原的识别特异性较好。

2.5　RNA 干扰中华蜜蜂 *AcFCP12* 对 CSBV 感染的影响

为进一步研究 *AcFCP12* 基因在 CSBV 病毒感染时的作用，将 *AcFCP12* 基因与 L4440 质粒构建双链表达载体（图 6：C），并导入到大肠杆菌 HT115 感受态细胞中，用 IPTG 进行诱导表达。如图 6（D）所示，ds*AcFCP12* 诱导表达成功。通过测定双链 RNA 浓度，按照 1.0、1.5 和 2.0 μg 喂食中蜂 2 日龄幼虫。通过 qRT-RCR 对幼虫体内 RNA 干扰后 *AcFCP12* 的转录水平进行检测，结果显示，对幼虫添食 dsRNA 浓度为 2.0 μg，处理时间为 24 h 时，实验组 ds*AcFCP12* 组幼虫体内 *AcFCP12* 基因的表达量与对照组 ds*EGFP* 组相比显著下调（图 7：A），表明 ds*AcFCP12* 成功干扰幼虫体内 *AcFCP12* 基因的表达。

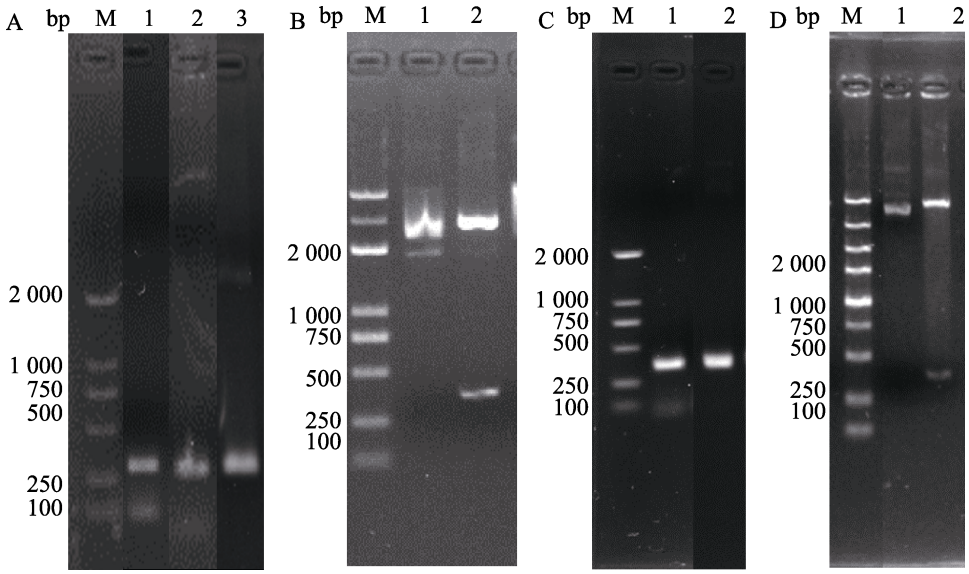

图 4 *AcFCP12* 原核表达载体的构建及验证

Fig. 4 Construction and verification of *AcFCP12* prokaryotic expression vector

A. pMD19-T-*AcFCP12* 载体的构建，M：2000 DNA marker；1：目的基因扩增；2：pMD19-T-*AcFCP12* 菌液 PCR；3：pMD19-T-*AcFCP12* 质粒 PCR；B. pMD19-T- *AcFCP12* 双酶切检测，M：L-DS^{TM}5000 marker；1：pMD19-T- *AcFCP12* 质粒；2：pMD19-T- *AcFCP12* 质粒双酶切；C. pET28a-*AcFCP12* 载体的构建， M：2000 DNA marker；1：pET28a-*AcFCP12*-TOP10 菌液 PCR；2：pET28a-*AcFCP12* 质粒 PCR；D. pET28a-*AcFCP12* 双酶切检测，M：L-DS^{TM}5000 marker；1：pET28a-*AcFCP12* 质粒；2：pET28a-*AcFCP12* 质粒双酶切。

A. Construction of pMD19-T-*AcFCP12* vector, M: 2000 DNA marker; 1: Target gene amplification; 2: pMD19-T-*AcFCP12* bacterial PCR; 3: pMD19-T-*AcFCP12* plasmid PCR; B. Detection of pMD19-T- *AcFCP12* by double enzyme digestion, M: L-DS^{TM}5000 marker; 1: pMD19-T- *AcFCP12* plasmid; 2: pMD19-T-*AcFCP12* double enzyme digestion; C. Construction of pET28a-*AcFCP12* vector, M: 2000 DNA marker; 1: pET28a-*AcFCP12*-TOP10 bacterial PCR; 2: pET28a-*AcFCP12* plasmid PCR; D. Detection of pET28a-*AcFCP12* by double enzyme digestion, M: L-DS^{TM}5000 marker; 1: pET28a-*AcFCP12* plasmid; 2: pET28a-*AcFCP12* double enzyme digestion.

按照此干涉条件，探究 RNAi 处理后 CSBV 病毒的增殖情况。qRT-PCR 结果表明，ds*AcFCP12* 饲喂幼虫 24 h 后，*AcFCP12* 确实出现了下调表达，下调了 65%（$P<0.01$）（图 7：A），然后进行 CSBV 病毒的感染，与未加 ds*AcFCP12* 的幼虫相比，CSBV 病毒感染 24 h 时的 *VP1* 基因表达量增加了 33%（$P<0.05$），CSBV 病毒感染 48 h 时的 *VP1* 基因表达量增加了 70%（$P<0.001$）（图 7：B）。而中蜂体内 *AcFCP12* 基因的表达量与对照组相比 24 h 下调了 48%（$P<0.01$），48 h 下调了 53%（$P<0.001$）（图 7：C），暗示中蜂 *AcFCP12* 基因的下调促进了 CSBV 病毒的增殖。

3 结论与讨论

对感染 CSBV 病毒的中蜂幼虫转录组学进行研究分析，筛选到中华蜜蜂表皮蛋白 *AcFCP12* 基因。对该基因的生物信息学分析发现，*AcFCP12* 基因属于 CPR 家族的 RR1 亚家族，具有一个几丁质结合_4 结构域，说明 *AcFCP12* 为具有结合几丁质功能的柔软表皮蛋白。对感染 CSBV 病毒前后中蜂幼虫转录水平分析发现，感染 CSBV 后 *AcFCP12* 呈现下调趋势，推测该基因可能参与了 CSBV 病毒增殖。

本研究通过设计合成 *AcFCP12* 的扩增引物，以中蜂幼虫 cDNA 为模板进行扩增，获得目的基因片段，构建原核表达载体，诱导表达出 12 kD 左右的重组蛋白，通过 Western blotting 验证 AcFCP12 诱导表达成功。以纯化的重组蛋白作为抗原免疫小鼠，成功制备鼠多克隆抗体 anti-AcFCP12。

在对比正常中蜂幼虫的情况下，发现感染

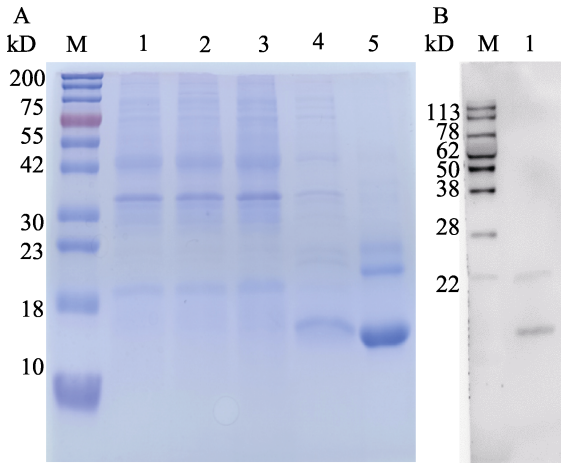

图 5　AcFCP12 重组蛋白的表达及多克隆抗体的检测

Fig. 5　Expression of recombinant protein AcFCP12 and detection of polyclonal antibody

A. AcFCP12 重组蛋白的表达和纯化的 SDS-PAGE, M：双色预染蛋白 marker；1：pET28a-Rosetta 空载未经 IPTG 诱导；2：pET28a-Rosetta 空载经 IPTG 诱导；3：pET28a-*AcFCP12*-Rosetta 未经 IPTG 诱导；4：pET28a-*AcFCP12*-Rosetta 经 IPTG 诱导；5：AcFCP12 重组蛋白纯化；B. 多克隆抗体的 Western blot 鉴定，M：Western protein marker；1：Anti-AcFCP12-M 与 AcFCP12 重组蛋白杂交。

A. Expression and purification of the recombinant AcFCP12 detected by SDS-PAGE, M: Pretained protein marker; 1: pET28a-Rosetta uninduced by IPTG; 2：pET28a-Rosetta induced by IPTG; 3：PET28a-*AcFCP12*-Rosetta uninduced by IPTG; 4：pET28a-*AcFCP12*-Rosetta induced by IPTG; 5：Purification of recombinant protein AcFCP12; B. Western blotting of polyclonal autibody, M：Western protein marker；1：Anti- AcFCP12-M serum immuno hybrided with the recombinant AcFCP12.

CSBV 的幼虫随着病毒的持续增殖，*AcFCP12* 基因呈现持续下调的现象，表明幼虫表皮蛋白基因 *AcFCP12* 随着病毒感染程度的加深表达量持续下调。这与 Han 等（2013）研究结果一致。据此，推测下调 *AcFCP12* 基因的表达，能够导致 CSBV 病毒更好地入侵宿主并能够大量增殖。因此，本研究利用双链 RNA 表达载体 L4440 成功获得了 *AcFCP12* 的 dsRNA，采用 RNA 干扰实验探索将 *AcFCP12* 基因干涉之后，CSBV 病毒对于中蜂幼虫的感染情况以及体内增殖情况。本研究参考史红霞等（2019）的双链 RNA 干扰实验条件优化方法，确定了 ds*AcFCP12* 在幼虫组织的干涉条件，在 dsRNA 浓度为 2.0 μg，干涉时间为 24 h 时能最大程度降低 *AcFCP12* 基因。随后对这些幼虫添加 CSBV 病毒，通过 qRT-PCR 检测病毒的增殖情况以及 *AcFCP12* 的表达，结果表明，与对照组相比，感染 CSBV 病毒 24 h 后，实验组的 *VP1* 基因相对表达量显著增加，而 *AcFCP12* 基因表达量显著下调，说明干涉了 *AcFCP12* 基因的表达后添加 CSBV 病毒，能更好地促进病毒对蜜蜂幼虫的感染。然而，到目前为止，对柔软表皮蛋白的功能仍知之甚少。张倩（2020）对对虾抗弧菌家系和敏感家系的比较转录组分析发现 12 个柔软表皮蛋白基因 FCP12 like 表达量显著高于敏感家系。Sun 等（2020）研究斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* Fabricius 幼虫早期喂食虫害诱导的植物挥发物，发现 9 个编码表皮蛋白基因被诱导上调，其中 *FCP* 上调 1.5 倍。Zhao 等（2020）基于广泛靶向代谢组和转录组技术对草甘膦胁迫下的中华蜜蜂和西方蜜蜂的分子反应机制进行了探讨，发现表皮蛋白在中蜂中的转录水平显著高于西蜂。表皮蛋白（CP）在昆虫维持形态和抵御外界刺激中具有重要作用（赵鹏等，2020；王洋等，2021），表皮蛋白基因的缺失会导致昆虫形态和对外界刺激的敏感性发生变化，通过 RNAi 干扰中华蜜蜂表皮蛋白 CPR 家族 *AccCPR2* 基因的表达降低了抗氧化酶的活性，引起机体的氧化损伤。此外，敲低 *AccCPR2* 也降低了中华蜜蜂的抗药性（Tan *et al.*，2022）。

表皮蛋白的 RR1 家族主要参与柔和型角质层的构建（Karouzouet *et al.*，2007）。马月月等（2018）对柞蚕 *Antheraea pernyi* RR1 亚族表皮蛋白基因 *ApCP12* 与 *ApCP23* 的研究结果显示，*ApCP12* 和 *ApCP23* 在幼虫期柔软型表皮中的表达呈现出升高趋势，而在化蛹后期硬化的阶段表达量下降。中蜂囊状幼虫病毒 CSBV 感染后期可观察到幼虫表皮开始增厚，当幼虫进入封盖期时，其蜕皮过程受阻无法正常化蛹，含有大量病毒颗粒的蜕皮液积累在陈旧表皮内，新表皮还未形成，表皮变硬成囊袋状结构（于慧敏，2021）。

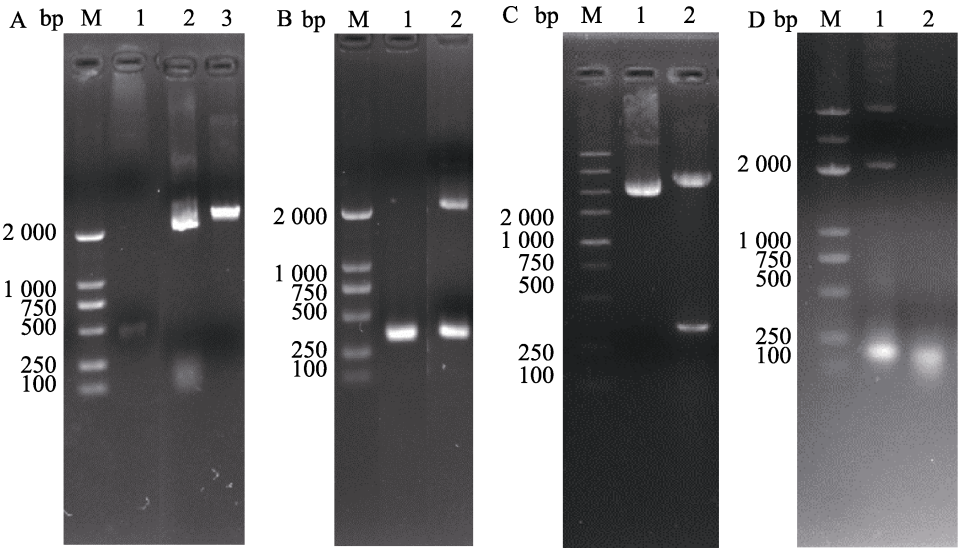

图 6　构建 L4440- *AcFCP12* 重组载体

Fig. 6　Construction of L4440- *AcFCP12* recombinant vector

A.质粒双酶切，　M：2000 DNA marker；1：pMD19-T-*AcFCP12* 质粒双酶切；2：L4440 质粒；3：L4440 质粒双酶切; B. L4440-*AcFCP12* 载体的构建, M：2000 DNA marker；1：L4440-*AcFCP12* 菌液 PCR；2：L4440-*AcFCP12* 质粒 PCR; C. L4440-*AcFCP12* 载体的双酶切检测, M：L-DS^{TM}5000 marker；1：L4440-*AcFCP12* 质粒；2：L4440-*AcFCP12* 质粒双酶切; D. ds*AcFCP12* 的提取, 1：提取的未使用 DNase 和 RNaseA 消化 RNA；2：使用 DNase1 和 RNaseA 消化后的 RNA。

A. Plasmid double digestion, M: 2000 DNA marker; 1: pMD19-T-*AcFCP12* double enzyme digestion; 2: L4440 plasmid; 3: L4440 double enzyme digestion; B. Construction of L4440-*AcFCP12* vector, M: 2000 DNA marker; 1: L4440-*AcFCP12* bacterial PCR; 2: L4440-*AcFCP12* plasmid PCR; C. Detection of L4440-*AcFCP12* by double enzyme digestion, M: L-DS^{TM}5000 marker; 1: L4440-*AcFCP12* plasmid; 2: L4440-*AcFCP12* double enzyme digestion; D. Extraction of ds*AcFCP12*, 1: RNA without digestion by DNase or RNase A; 2: RNA digestion by DNase and RNase A.

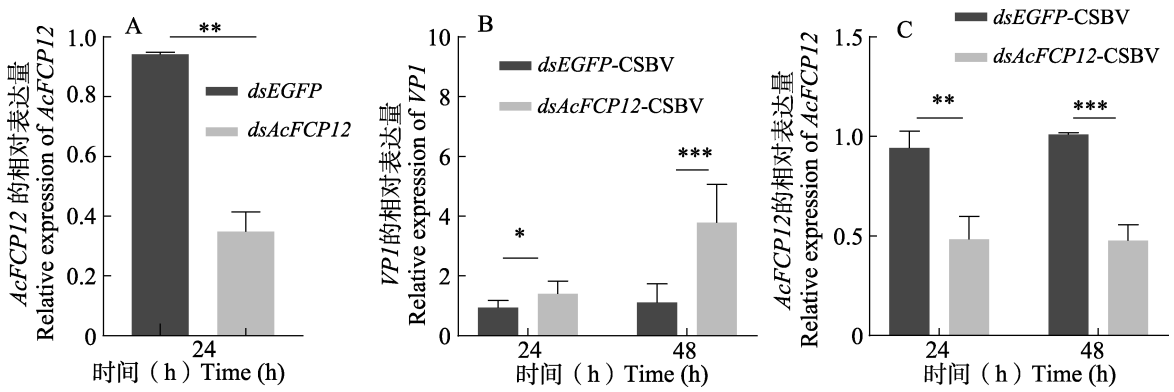

图 7　*AcFCP12* 基因干涉后 *AcFCP12* 的转录水平及添食 CSBV 病毒中蜂幼虫体内 *VP1* 和 *AcFCP12* 的转录水平变化情况

Fig. 7　Transcription levels of *AcFCP12* and changes of transcription levels of *VP1* and *AcFCP12* in larvae fed with CSBV after *ACFCP12* gene intervention

A.　AcFCP12 基因干涉后 AcFCP12 的转录水平；B. *AcFCP12* 基因干涉后添食 CSBV 病毒中蜂幼虫体内 *VP1* 转录水平变化情况；C. *AcFCP12* 基因干涉后添食 CSBV 病毒中蜂幼虫体内 *AcFCP12* 转录水平变化情况。

A. Transcription levels of *AcFCP12* after *ACFCP12* gene intervention;
B. Changes of *VP1* transcription level in larvae fed with CSBV virus after *AcFCP12* gene intervention; C. Changes of *AcFCP12* transcription level in larvae fed with CSBV virus after *AcFCP12* gene intervention.

中蜂感染 CSBV 病毒后 *AcFCP12* 的下调可能与幼虫新表皮合成受阻有关。在后续研究中会深入分析 *FCP12* 在中华蜜蜂和西方蜜蜂幼虫不同发育阶段的表达水平及组织的空间分布及与 CSBV 病毒的相互作用关系，进一步探究 AcFCP12 在 CSBV 侵染时囊袋结构形成过程中的作用。

参考文献 (References)

Deng YC, Zhao HX, Shen S, Yang S, Yang DH, Deng S, Hou CS, 2020. Identification of immune response to sacbrood virus infection in *Apis cerana* under natural condition. *Frontiers in Genetics*, 11(0): 587509.

Han B, Zhang L, Feng M, Fang Y, Li JK, 2013. An integrated proteomics reveals pathological mechanism of honeybee (*Apis cerana*) sacbrood disease. *Journal of Proteome Research*, 12(4): 1881–1897.

He X, Liu XY, 2011. Analysis of the causes of the decline in the population of *Apis cerana cerana*. *Apiculture of China*, 62(5): 21–23. [何旭, 刘新宇, 2011. 中华蜜蜂种群数量下降的成因分析. 中国蜂业, 62(5): 21–23.]

Iconomidou VA, Willis JH, Hamodrakas SJ, 2005. Unique features of the structural model of 'hard' cuticle proteins: implications for chitin-protein interactions and cross-linking in cuticle. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(6): 553–560.

Karouzou MV, Spyropoulos Y, Iconomidou VA, Cornman RS, Hamodrakas S, Willis JH, 2007. *Drosophila* cuticular proteins with the R&R Consensus: Annotation and classification with a new tool for discriminating RR-1 and RR-2 sequences. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(8): 754–760.

Liu JQ, Li SL, Li WS, Peng L, Chen ZW, Xiao YD, Guo HZ, Zhang JW, Cheng TC, Goldsmith MR, Arunkumar KP, Xia QY, Mita K, 2019. Genome-wide annotation and comparative analysis of cuticular protein genes in the noctuid pest *Spodoptera litura*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 110: 90–97.

Liu S, Wang LH, Guo J, Tang YJ, Chen YP, Wu J, Li JL, 2017. Chinese Sacbrood virus infection in Asian honey bees (*Apis cerana cerana*) and host immune responses to the virus infection. *Journal of Invertebrate Pathology*, 150(0): 63–69.

Ma YY, Liu W, Wang Y, Wang DY, Lei P, Ru YT, Jiang YR, Yang RS, Qin L, 2018. Expression profiling and functional analysis of RR-1 cuticular protein genes *ApCP12* and *ApCP23* in *Antheraea pernyi* (Lepidoptera: Saturniidae). *Acta Entomologica Sinica*, 61(2): 188–199. [马月月, 刘微, 王勇, 王德意, 雷飘, 汝玉涛, 姜义仁, 杨瑞生, 秦利, 2018. 柞蚕 RR-1 亚族表皮蛋白基因 *ApCP12* 与 *ApCP23* 的表达特征与功能分析. 昆虫学报, 61(2): 188–199.]

Rebers JE, Riddiford LM, 1988. Structure and expression of a *Manduca sexta* larval cuticle gene homologous to *Drosophila* cuticle genes. *Journal of Molecular Biology*, 203(2): 411–423.

Shi HX, Dang XQ, Zhu XL, Ma ZG, Liu YM, Huang YB, Zhou ZY, Xu JS, 2019. RNA interference against infection by the Chinese sacbrood virus. *Chinese Journal of Virology*, 35(1): 103–111. [史红霞, 党晓群, 朱祥龙, 马振刚, 刘永梅, 黄钰彬, 周泽扬, 许金山, 2019. 中蜂囊状幼虫病毒 *RdRp* 基因 dsRNA 干扰的研究. 病毒学报, 35(1): 103–111.]

Sun LX, Huang ZY, Zheng HJ, Ge QX, Gong LP, Chen HY, 2012. Characterization of three new members of the *apidermin (apd)* gene family from honeybees and sequence analysis of the insect APD family. *Acta Entomologica Sinica*, 55(1): 12–23. [孙亮先, 黄周英, 郑华军, 葛清秀, 龚丽萍, 陈怀宇, 2012. 蜜蜂表皮蛋白 *apidermin(apd)*基因家族 3 个新成员的特性鉴定及昆虫 APD 家族序列特征的分析. 昆虫学报, 55(1): 12–23.]

Sun RJ, 2014. Cloning and functional analysis of cuticular protein genes from *Apis cerana cerana*. Doctoral dissertation. Taian: Shandong Agricultural University . [孙汝江, 2014. 中华蜜蜂表皮蛋白基因的克隆与功能分析. 博士学位论文. 泰安: 山东农业大学.]

Sun ZX, Lin YB, Wang RM, Li QL, Shi Q, Baerson SR, Chen L, Zeng RS, Song YY, 2020. Olfactory perception of herbivore-induced plant volatiles elicits counter-defences in larvae of the tobacco cutworm. *Functional Ecology*, 35(2): 384–397.

Tan S, Li GL, Guo HJ, Li H, Tian M, Liu QX, Wang Y, Xu BH, Guo XQ, 2022. Identification of the cuticle protein *AccCPR2* gene in *Apis cerana cerana* and its response to environmental stress. *Insect Molecular Biology*, 31(5): 634–646.

Togawa T, Augustine Dunn W, Emmons AC, Willis JH, 2007. CPF and CPFL, two related gene families encoding cuticular proteins of *Anopheles gambiae* and other insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(7): 675–688.

Wang Y, Liu HM, Guo XX, Song X, Wang HY, Cheng P, Wang HF, Wang HW, Gong MQ, 2021. Molecular cloning and expression analysis of cuticular protein gene *CpCPR117* in *Culex pipiens pallens*. *Chinese Journal of Vector Biology and Control*, 32(4):

436–440. [王洋, 刘宏美, 郭秀霞, 宋晓, 王海洋, 程鹏, 王海防, 王怀位, 公茂庆, 2021. 淡色库蚊表皮蛋白 *CpCPR117* 基因克隆及表达分析. 中国媒介生物学及控制杂志, 32(4): 436–440.]

Yu HM, 2021. Infection characteristics, tissue localization of Chinese sacbrood virus involved in *Apis cerana cerana* and larval immune response. Master dissertation. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. [于慧敏, 2021. 中华蜜蜂囊状幼虫病毒侵染特性、组织定位及幼虫免疫应答. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院.]

Yu XY, Meng YP, Wang SC, Pan DF, Pei YL, Feng LH, Zhang LZ, Yan WY, 2023. Comparison of expression of the genes associated with immunity and development between *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica* infected with sacbrood virus. *Acta Microbiologica Sinica*, 63(4): 1587–1602. [余欣悦, 孟雅苹, 王守程, 潘东福, 裴娅琳, 冯丽华, 张丽珍, 颜伟玉, 2023. 中华蜜蜂和意大利蜜蜂感染囊状幼虫病毒后免疫及发育相关基因表达比较. 微生物学报, 63(4): 1587–1602.]

Zhang Q, 2020. Development of molecular breeding technology for disease resistance against *Vibro* and the exploration on disease resistance mechanism in shrimp. Doctoral dissertation, Beijing: Chinese Academy of Sciences. [张倩, 2020. 对虾抗弧菌性状分子育种技术研发和抗性机制探究. 博士学位论文. 北京: 中国科学院大学.]

Zhao H, Li GH, Guo DZ, Wang Y, Liu QX, Gao Z, Wang HF, Liu ZG, Guo XQ, Xu BH, 2020. Transcriptomic and metabolomic landscape of the molecular effects of glyphosate commercial formulation on *Apis mellifera ligustica* and *Apis cerana cerana*. *The Science of the Total Environment*, 744: 140819.

Zhao P, Zhang S, Zhao CC, Hu FM, Cui JJ, Li SQ, 2020. Cloning and expression profiling of cuticular protein genes of *Spodoptera litura*. *Cotton Science*, 32(4): 292–304. [赵鹏, 张帅, 赵晨晨, 胡方梅, 崔金杰, 李绍勤, 2020. 斜纹夜蛾表皮蛋白基因克隆及表达谱分析. 棉花学报, 32(4): 292–304.]

****

封面介绍

羽芒宽盾蚜蝇 *Phytomia zonata* (Fabricius)

羽芒宽盾蚜蝇在国内广泛分布，是双翅目（Diptera）食蚜蝇科（Syrphidae）昆虫。体粗壮，体长 12-15 mm；头部和胸部黑色，腹部第 1 背板黑色，第 2、3、4 背板黄棕色。本期封面照片于 2013 年 10 月 3 日拍摄于河北省乐亭县，物种学名由中国农业大学杨定教授和王亮博士鉴定。

（张润志，中国科学院动物研究所）