

褐飞虱小分子量热激蛋白基因表达特性和功能

潘磊^{1,2,#} 王利华^{2,#} 朱凤³ 韩阳春² 王培² 方继朝^{1,2,4,*}

(¹南京农业大学 植物保护学院, 南京 210095; ²江苏省农业科学院 植物保护研究所, 南京 210014; ³江苏省植物保护植物检疫站, 南京 210036; ⁴江苏省区域现代农业与环境保护协同创新中心, 江苏 淮安 223300; #共同第一作者; *通信联系人, E-mail: fangjc126@126.com)

Expression Profiles and Functions of Small Heat Shock Proteins in *Nilaparvata lugens*

PAN Lei^{1,2,#}, WANG Lihua^{2,#}, ZHU Feng³, HAN Yangchun², WANG Pei², FANG Jichao^{1,2,4,*}

(¹College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; ²Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; ³Jiangsu Plant Protection and Plant Quarantine Station, Nanjing 210036, China; ⁴Jiangsu Collaborative Innovation Center for Regional Modern Agriculture & Environmental Protection, Huaiyin Normal University, Huai'an 223300, China; #These authors contributed equally to this work; *Corresponding author, E-mail: fangjc126@126.com)

Abstract: 【Objective】To explore the adaptation mechanisms of brown planthoppers(BPH) to temperature stress, the expression profiles and functions of small heat shock proteins (sHSPs) in *Nilaparvata lugens* was studied. 【Method】The nucleotide sequence of small heat shock proteins in *N. lugens* was screened from transcriptome database by BLAST; The sequence analysis was carried out by molecular biological software such as Bioedit and Mega; the expression profiles were analyzed by qPCR; and the prokaryotic expression technology was used for functional research. 【Result】Six *sHsps* (*NIHsp20.9*, *NIHsp21.6*, *NIHsp21.9*, *NIHsp22.4*, *NIHsp23.1* and *NIHsp28.7*) with conserved alpha crystal structure were screened. The ORF length of these genes was 561, 531, 570, 570, 588 and 735 bp, and the theoretical isoelectric point was 5.96, 5.77, 6.32, 5.01, 5.74 and 7.74, respectively. The peak expression of *NIHsp28.7* was found in the third larvae and the peak of *NIHsp21.9* and *NIHsp23.1* in females. The expression of these genes decreased in females after exposure to low temperature, while increased after exposure to high temperature except *NIHsp22.4*. To the 3rd instar nymphs, the expression of about half of *sHsps* decreased after low temperature stress and half of *sHsps* increased, while all increased after high temperature stress. Moreover, the survival of transformed BL21 (DE3) was significantly increased after heat treatment. 【Conclusion】The small heat shock protein of *N. lugens* has stage-specific and inducible expression characteristics and show protection against heat stress. It may play an important role in response to high temperature stress, but its role in response to low temperature stress is related to insect developmental stages.

Key words: *Nilaparvata lugens*; small heat shock proteins; temperature; expression

摘要: 【目的】研究褐飞虱小分子量热激蛋白的表达特性和功能,明确其在褐飞虱温度胁迫适应中的作用。【方法】采用 BLAST 从转录组数据库中筛选褐飞虱小分子量热激蛋白基因序列;利用 Bioedit、Mega 等分子生物学软件进行序列分析;利用 qPCR 技术分析目的基因在不同处理下的表达特性;利用原核表达技术研究其功能。【结果】筛选到 6 个含有 α -晶体结构的小分子量热激蛋白基因 *NIHsp20.9*、*NIHsp21.6*、*NIHsp21.9*、*NIHsp22.4*、*NIHsp23.1*、*NIHsp28.7*, 其 ORF 长度依次为 561、531、570、570、588 和 735 bp, 理论等电点为 5.96、5.77、6.32、5.01、5.74 和 7.74。*NIHsp28.7* 在 3 龄若虫中的表达量最高,而 *NIHsp21.9* 和 *NIHsp23.1* 在雌成虫中的表达量最高。雌虫在低温胁迫后所有小分子量热激蛋白基因的表达量均下降,高温胁迫后除 *NIHsp22.4* 外的其他 5 个基因表达量不同程度上调;3 龄若虫在低温胁迫后一半 *sHsps* 表达量下降,另一半上升,高温胁迫后全部上调。转化褐飞虱 *sHsps* 的重组大肠杆菌热激存活率显著上升。【结论】褐飞虱小分子量热激蛋白具有龄期和诱导表达特性及热胁迫保护功能,可能在其高温胁迫应激中具有重要作用,在低温胁迫应激中的作用与虫态有关。

关键词: 褐飞虱; 小分子量热激蛋白; 温度; 表达

中图分类号: Q755; S435.112⁺.3

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2020)01-0037-09

收稿日期: 2019-03-27; 修改稿收到日期: 2019-06-14。

基金项目: 国家重点研发计划资助项目(2016YFD0300706); 国家自然科学基金资助项目(31572004); 江苏省自然科学基金资助项目(BK20170072); 江苏省重点研发计划资助项目(BE2017366)。

褐飞虱(*Nilaparvata lugens*)是我国主要水稻害虫之一,从19世纪开始,在我国频繁暴发,严重危害水稻生产^[1]。褐飞虱种群数量受温度的影响,温度过高或过低均抑制其种群发展^[2]。在高温胁迫下,褐飞虱成虫存活率下降、产卵量显著降低^[3-4];低温胁迫导致褐飞虱若虫发育历期延长,存活率下降,卵孵化率降低甚至不孵化^[5]。此外,温度过高或过低还影响褐飞虱成虫翅的振动频率,削弱雄虫对雌虫翅振动信号的接收,从而影响其种群发展^[6]。

热激蛋白是生物体内广泛存在的蛋白质之一,在原核生物至高等动物中均有发现,其表达和调控是生物应对多种内外环境胁迫的物质基础。根据其分子量大小可分为HSP100、HSP90、HSP70、HSP60和小分子量热激蛋白(sHSPs)。小分子量热激蛋白是分子量在12~43 kD之间的热激蛋白,包含一个约95个保守氨基酸序列的 α -晶体结构,与生物正常生理状态的维持、胁迫应激等有关^[7];其主要功能为维持细胞蛋白稳定,保证膜的完整性和稳定性,保护信使RNA,稳定细胞骨架等^[8-14]。

褐飞虱对热胁迫的适应与热激蛋白有关。Lu等^[15-16]研究发现褐飞虱热激蛋白HSP70和HSP90在其高温胁迫保护中起重要作用,抑制其热激蛋白基因*NIHsc70*和*NIHsp90*的表达使热激后褐飞虱存活率显著降低。Huang等^[17]发现在37℃高温胁迫后褐飞虱热激蛋白上调表达;而5℃低温处理后热激蛋白基因表达量没有显著变化。小分子量热激蛋白作为热激蛋白家族的重要成员,在昆虫抗逆性中起重要作用,如热激显著诱导小菜蛾(*Plutella xylostella*)、中华蜜蜂(*Apis cerana*)小分子量热激蛋白基因的表达^[18-19]。抑制灰飞虱(*Laodelphax striatellus*)小分子量热激蛋白基因的表达导致其对高温的抗逆性下降^[20]。因此,为了明确小分子量热激蛋白在褐飞虱温度胁迫适应中的作用,解析褐飞虱适应温度胁迫的机制,从而为其种群数量预测及生态防控策略的制定提供理论依据,从转录组数据库中筛选出褐飞虱小分子量热激蛋白基因,然后采用qPCR法研究不同龄期褐飞虱*sHsps*表达谱和温度胁迫对雌成虫和3龄若虫*sHsps*表达的影响,利用原核表达技术研究*sHsps*对热胁迫的保护功能。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

褐飞虱种群2006年采自南京,室内采用武运粳7号饲养,饲养条件为温度27℃±1℃,相对湿

度为65%±10%,光周期为光照14 h/黑暗10 h。不同龄期褐飞虱小分子量热激蛋白基因表达差异性检测时,收集同一天的初孵若虫置于30 cm×20 cm×18 cm的塑料筐中饲养,然后选择发育一致的试虫,分别收集1、2、3、4、5龄若虫和雌雄成虫,液氮速冻后贮存于-80℃冰箱,用于总RNA的提取。每个重复1龄若虫取40头,2龄30头,3龄20头,4龄15头,5龄10头,雌成虫6头,雄成虫10头;每处理重复3次。

温度诱导褐飞虱小分子量热激蛋白基因表达特异性分析时,设置的温度处理分别为0℃、6℃、10℃、14℃、18℃、22℃、30℃、33℃、36℃、39℃、42℃、44℃,取羽化1 d的雌成虫和3龄若虫转移至12 cm×2.5 cm的指形管中,除0℃在冰水混合物中孵育外,其余均在台式冷冻恒温振荡器THZ-C-1中孵育1 h,26℃下恢复1 h,收集存活试虫,液氮速冻后贮存于-80℃。3次重复,以不进行温度胁迫的试虫为对照,用于总RNA提取。

1.2 褐飞虱小分子量热激蛋白序列分析

褐飞虱小分子量热激蛋白序列分析采用分子生物学软件Bioedit、Mega等进行。首先根据基因同源性采用离线BLAST从转录组数据库中筛选出小分子量热激蛋白基因,然后利用NCBI ORF Finder在线工具查找这些基因的开放阅读框,再设计引物验证开放阅读框序列。利用ExPASy Translate Tool翻译验证后的序列,Computer pI/Mw Tool计算等电点和理论分子量,Prosite预测小分子量热激蛋白特征区域,Pfam预测小分子量热激蛋白的保守结构域,Bioedit进行序列比对,Mega 7.0.26构建开放阅读框DNA序列系统进化树。

1.3 实时荧光定量PCR(qPCR)

1.3.1 总RNA的提取

总RNA的提取参照Promega公司的总RNA提取试剂盒(SV Total RNA Isolation System)说明书进行。提取的总RNA分别使用1%琼脂糖凝胶电泳检测其完整度,微量分光光度计(Eppendorf BioPhotometer Plus)检测其浓度,-80℃下贮存,用于qPCR模板的合成。

1.3.2 cDNA第1链的合成

cDNA第1链的合成参考TaKaRa的cDNA第一链合成试剂盒[PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time)]说明书进行。以500 ng总RNA为模板,加入2 μL 5×反转录预混缓冲液(PrimeScript RT Master Mix),然后以去RNA酶水补至10 μL,37℃下温育30 min,85℃下10 s灭活

反转录酶后即得到第 1 链 cDNA。

1.3.3 实时荧光定量 PCR

qPCR 参考单丹等^[21]的方法，以 β -actin (EU179846)为内参^[22]，取 1 μ L 稀释 20 倍的 cDNA 为模板，分别加入 10 μ L Taq 酶预混液 (SYBR[®] Premix Ex Taq[™])、0.4 μ L Rox[™]参比染料 (ROX Reference Dye)(50 \times)和 0.4 μ L 10 μ mol/L 上游和下游引物 (引物序列见表 1)，以水补至 20 μ L。先 95 $^{\circ}$ C 下预变性 30 s，然后 95 $^{\circ}$ C 下 5 s，60 $^{\circ}$ C 下 31 s，共 40 个循环，最后进行溶解曲线的扩增。

1.4 小分子量热激蛋白基因原核表达及 BL21(DE3)耐热性测定

根据 Transgen 公司 pEASY-Blunt E1 表达载体设计引物 (引物序列见表 1)，扩增小分子量热激蛋白基因开放阅读框全长，然后将目标序列连接到载体上，转化大肠杆菌 DH5 α ，挑选阳性克隆测序。选择正确表达方向的阳性克隆，扩大培养后提取质粒，转化 BL21 (DE3) 即获得含小分子量热激蛋白的重组细菌。重组细菌耐热性测定参考 Crack 等^[23]的方法。具体步骤为取 50 μ L 菌液加入 5 mL LB 液体培养基中，37 $^{\circ}$ C、250 r/min 下培养至 OD 值约 0.6，然后加入 IPTG 至终浓度 0.1 mmol/L，30 $^{\circ}$ C、200 r/min 下培养过夜，以含空载体的大肠杆菌为对照。取 1 mL 菌液置于 50 $^{\circ}$ C 水浴锅中分别温育 0.5 h 和 1 h，冰浴后稀释 10⁴ 倍，取 100 μ L 热激处理前和处理后样品分别涂板，37 $^{\circ}$ C 培养过夜后记录平板菌落数，每处理 4 个重复。大肠杆菌热激存活率= (热

激处理前菌落数-热激处理后菌落数) \div 热激处理前菌落数 \times 100%。

1.5 数据处理

小分子量热激蛋白基因相对表达量的计算采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT}法^[24]。不同龄期小分子量热激蛋白基因表达差异以 1 龄若虫表达量为参照物计算其他龄期的相对表达量；不同温度胁迫下小分子量热激蛋白基因表达量的计算以不处理试虫为对照。结果均采用 SPSS 19.0, ANOVA 最小显著性差异法在 0.05 水平上进行差异显著性分析。

重组大肠杆菌耐热性实验在相同处理时间水平比较表达小分子量热激蛋白对大肠杆菌耐热性的影响。转化不同小分子量热激蛋白基因后大肠杆菌存活率差异显著性分析采用 SPSS 19.0, ANOVA 最小显著性差异法在 0.05 水平上进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 褐飞虱小分子量热激蛋白基因的序列特征

褐飞虱 6 个小分子量热激蛋白基因开放阅读框碱基序列长 531~735 bp，预测氨基酸序列等电点为 5.01~7.74，理论分子量为 20.9~28.7 kD，均含有 HSP20 保守结构域 PF00011，即约 95 个氨基酸序列的 α -晶体结构 (表 2)。这些基因彼此间氨基酸序列同源性差异较大，同源性最高的是 NIHSP21.9 和 NIHSP23.1，为 68.2%；最低的是 NIHSP20.9 和

表 1 qPCR 和原核表达引物

Table 1. Primer sequences for quantitative real-time PCR and recombinant expression in *E. coli*.

用途 Usage	基因 Gene	上游引物序列 Forward primer (5'-3')	下游引物序列 Reverse primer (5'-3')
实时荧光定量 PCR	NIHsp20.9	AGCACGGCTTCATCTCTC	CCTCTCGCCTTTGGTTTC
qPCR	NIHsp21.6	GTCCTCCAGTATTCGGTTT	TTGTCCTGTTGTTCTTCGT
	NIHsp21.9	TGTTAGCCGCTCCACTCCAAT	CCGTGATTGTCCTTGCGTTCT
	NIHsp22.4	TTTGCGGATTTTCAGCGTTAT	CCACTGCCTCCTACATTCTT
	NIHsp23.1	GTTTACTCGTCGCTACACC	CTCCATCTTCTCCTGCTT
	NIHsp28.7	GAAATACAGATAAGCGGCACC	GAATACCGTCCTTGAAGTTGG
	Ref	TGTCTCTCACACAGTCCCCATCT	GTCAAGTCACGACCAGCCAAG
	NIHsp20.9	ATGTCGCTAGTTCCGCTGCTGT	TTACTGTCCTTCTTTTTCAGCTGGC
原核表达 Procaryotic expression	NIHsp21.6	ATGTCGTTGTTTCCGTAC	TTAGGCCTTTATCTTCTCC
	NIHsp21.9	ATGTCCTGCTACCATACTTTTGTG	TCATGTTTCCATTTTATCCTGG
	NIHsp22.4	ATGGCTGAGAGCGGCGTGAGAC	TTATGTGTGATTGGAATCAGTTTTT
	NIHsp23.1	ATGTCCTGCTACCGATTA	TTAGGTCCTCATCTTCTCC
	NIHsp28.7	ATGAACTCTTGCCGAAAATTG	TCAATTGATAACAATGCGGC

表 2 褐飞虱小分子量热激蛋白序列特征

Table 2. Deduced protein sequences characteristics of *NIHsps* from *N. lugens*.

基因 Gene	开放阅读框 长度 ORF length/bp	预测蛋白质大小 Protein length/aa	功能注释 Annotation	理论等电点 Theoretical isoelectric point	理论分子量 Theoretical molecular weight/kDa	Pfam 编号 Pfam number
<i>NIHsp20.9</i>	561	186	致死蛋白 Protein lethal(2) essential for life	5.96	20.9	PF00011
<i>NIHsp21.6</i>	531	176	α -晶体蛋白 α -crystallin A chain-like	5.77	21.6	PF00011
<i>NIHsp21.9</i>	570	189	α -晶体蛋白 α -crystallin A chain-like	6.32	21.9	PF00011
<i>NIHsp22.4</i>	570	189	α -晶体蛋白 α -crystallin A chain-like	5.01	22.4	PF00011
<i>NIHsp23.1</i>	588	195	小分子热激蛋白 22.0 Small heat shock protein 22.0	5.74	23.1	PF00011
<i>NIHsp28.7</i>	735	244	30 kDa 小分子热激蛋白 30 kDa small heat shock protein	7.74	28.7	PF00011

表 3 褐飞虱小分子量热激蛋白氨基酸序列间的一致性

Table 3. Identities of six *NIHSPs* from *N. lugens*.

蛋白质 Protein	NIHSP20.9	NIHSP21.6	NIHSP21.9	NIHSP22.4	NIHSP23.1	NIHSP28.7
NIHSP20.9	100.0					
NIHSP21.6	33.5	100.0				
NIHSP21.9	42.4	49.4	100.0			
NIHSP22.4	24.1	17.2	19.3	100.0		
NIHSP23.1	39.1	50.0	68.2	20.5	100.0	
NIHSP28.7	6.9	9.8	9.8	8.2	10.6	100.0

NIHSP28.7, 仅有 6.9% (表 3)。利用邻接法构建褐飞虱、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 和人类 (*Homo sapiens*) 小分子量热激蛋白的开放阅读框序列进化树, 发现来自人类的基因聚为一支, 来自褐飞虱和黑腹果蝇的小分子量热激蛋白虽然也表现出同一物种聚为一支的趋势, 但有些基因如褐飞虱 *NIHsp22.4* 与黑腹果蝇 *DmHsp20-like* 同源性更高 (图 1)。

2.2 不同龄期褐飞虱小分子量热激蛋白基因的表达特异性

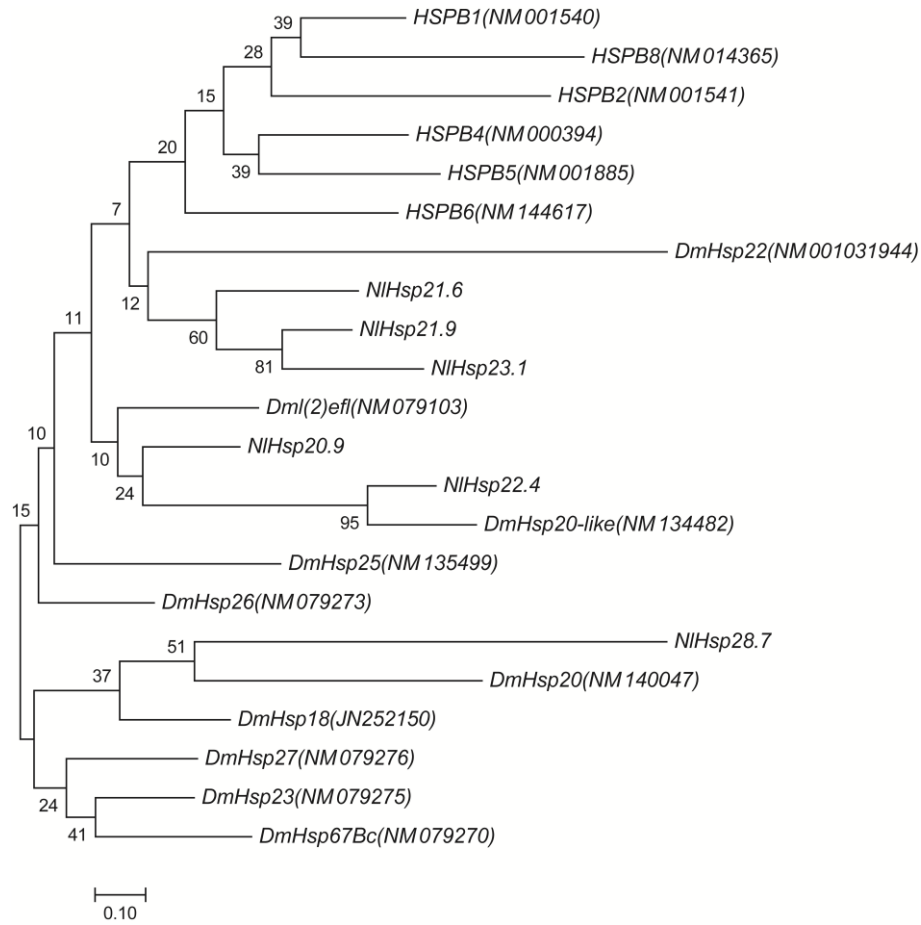
褐飞虱小分子量热激蛋白基因在不同龄期中的转录水平存在显著差异。*NIHsp28.7* 在 3 龄若虫中的表达量最高, *NIHsp20.9* 和 *NIHsp21.6* 在 5 龄若虫中的表达量最高, *NIHsp21.9* 和 *NIHsp23.1* 在雌成虫中的表达量最高, 而 *NIHsp22.4* 在雄成虫中表达量最高。在 1~5 龄若虫中, 除 *NIHsp21.6* 和 *NIHsp28.7* 外, 其余基因的表达量在老龄若虫中略高于或与低龄若虫相当。在雌雄成虫之间, 除 *NIHsp21.9* 和 *NIHsp23.1* 在雌虫中的表达量显著高于雄虫外, 其余无显著差异 (图 2)。

2.3 褐飞虱小分子量热激蛋白基因的诱导表达

褐飞虱小分子量热激蛋白基因在高温和低温胁迫下的表达谱存在显著差异。高温胁迫下, 雌成虫除 *NIHsp22.4* 表达无明显变化外, 其余小分子量

热激蛋白基因表达量均有不同程度的上调(图 3-A); 若虫所有基因表达量均显著上调(图 3-B)。其中 *NIHsp23.1* 和 *NIHsp21.6* 表达量在雌成虫和若虫中变化均非常显著, *NIHsp23.1* 最大诱导倍数在雌成虫和 3 龄若虫中分别为 61.8 和 181.4; *NIHsp21.6* 最大上调倍数分别为 525.5 和 306.0。 *NIHsp20.9*、*NIHsp28.7* 和 *NIHsp21.9* 最大诱导表达倍数若虫大于成虫。最佳诱导温度在不同基因间也存在显著差异。雌成虫 *NIHsp23.1*、*NIHsp21.9*、*NIHsp21.6* 在 42℃ 下处理后表达量最高, 但 *NIHsp20.9* 在 36℃ 热激后表达量最高, 而 *NIHsp28.7* 最高诱导表达量出现在 33℃ 处理后(图 3-A)。3 龄若虫 *NIHsp23.1*、*NIHsp21.9*、*NIHsp21.6* 在 44℃ 下处理后表达量最高, 其余基因在 33℃ 下处理后表达量最高(图 3-B)。

低温处理后, 褐飞虱小分子量热激蛋白基因的表达量在雌成虫中均出现不同程度下降(图 4-A), 在 3 龄若虫中 *NIHsp20.9*、*NIHsp22.4* 和 *NIHsp28.7* 表达量呈下降趋势, 但 *NIHsp21.9*、*NIHsp23.1* 和 *NIHsp21.6* 在 18℃ 和 0℃ 处理后表达量显著增加(图 4-B)。不同基因最佳诱导温度也存在显著差异。如雌成虫 *NIHsp20.9* 在 10℃ 处理后表达量最低, 而 *NIHsp21.6* 在 0℃ 处理后表达量最低(图 4-A); 3 龄若虫 *NIHsp20.9* 在 14℃ 处理后表达量最低, *NIHsp21.9*、*NIHsp23.1*、*NIHsp21.6* 在 0℃ 处理后表

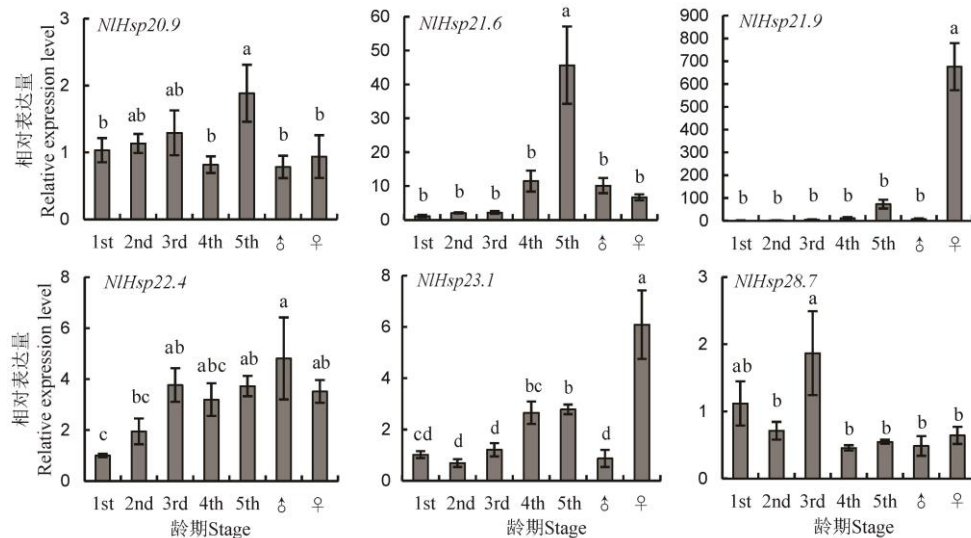


HSPB 开头的基因来自人类，Dm 前缀的基因来自于黑腹果蝇，NI 前缀的基因来自褐飞虱。

The genes with HSPB starts from *Homo sapiens*, the genes prefixed with Dm from *Drosophila melanogaster*, and prefixed with NI from *N. lugens*.

图 1 邻接法构建褐飞虱、黑腹果蝇和人类小分子量热激蛋白开放阅读框 DNA 序列进化树

Fig. 1. Molecular Phylogenetic tree of ORF DNA sequences of *sHsps* from *Nilaparvata lugens*, *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens* by Neighbor-Joining method.

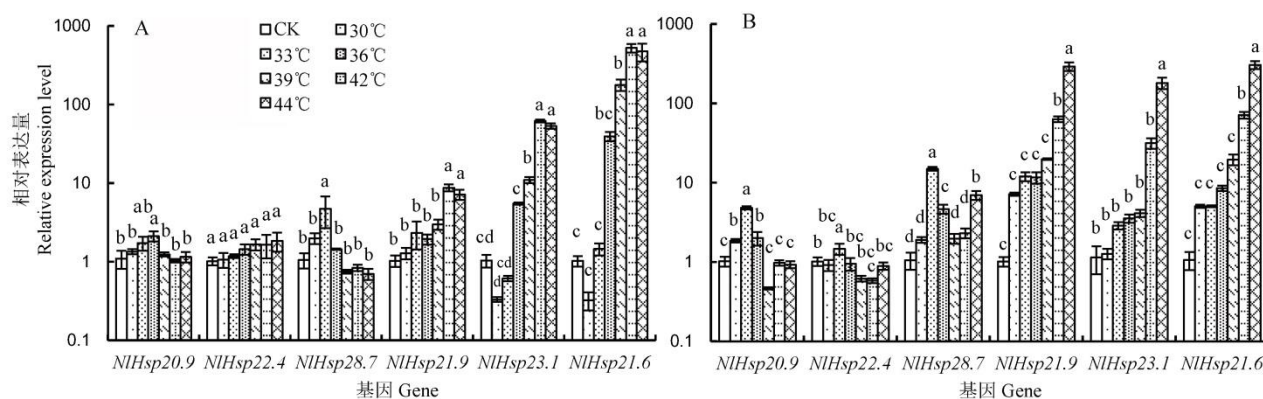


柱上标相同小写字母者表示材料间差异未达 0.05 显著水平。

The same lowercase letters above the bars indicate no significant difference among the materials at the 0.05 level.

图 2 褐飞虱小分子量热激蛋白基因在不同龄期间的相对表达量

Fig. 2. Relative expression level of *NIHsps* in different stage of *N. lugens*.

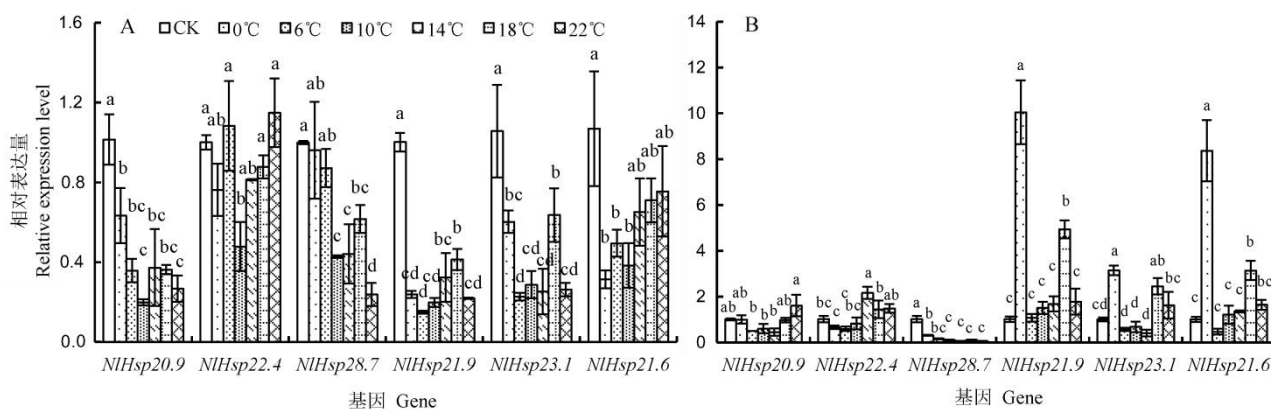


A—雌成虫中的相对表达量; B—3龄若虫中的相对表达量。柱上标相同小写字母者表示处理间差异未达 0.05 显著水平。

A, Relative expression level of *sHsps* of female; B, Relative expression level of *sHsps* of the 3rd larvae. The same lowercase letters above the bars indicate no significant difference among the treatments at the 0.05 level.

图3 高温热激后褐飞虱雌成虫和3龄若虫小分子量热激蛋白基因的相对表达量

Fig. 3. The diagram showed the relative expression level of *sHsps* of *N. lugens* after heat treatment.



A—雌成虫中的相对表达量; B—3龄若虫中的相对表达量。柱上标相同小写字母者表示处理间差异未达 0.05 显著水平。

A, Relative expression level of *sHsps* of female after cold shock; B, Relative expression level of *sHsps* of the 3rd larvae after cold shock. The same lowercase letters above the bars indicate no significant difference among the treatments at the 0.05 level.

图4 低温处理后褐飞虱雌成虫和3龄若虫小分子量热激蛋白基因的相对表达量

Fig. 4. Relative expression levels of *sHsps* of *N. lugens* after cold treatment.

达量最高(图4-B)。

2.4 小分子量热激蛋白重组大肠杆菌的耐热性

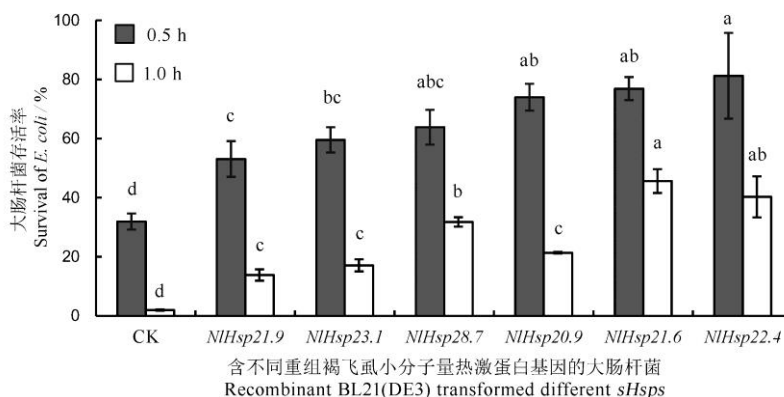
表达褐飞虱小分子量热激蛋白显著提高大肠杆菌的耐热性。含重组褐飞虱小分子量热激蛋白基因的大肠杆菌在高温处理后,其30 min和60 min的存活率均显著增加;但高温热激对大肠杆菌的伤害可能具有累加效应,随着处理时间的延长,大肠杆菌存活率逐渐下降,60 min时其最高存活率仅为30 min的一半左右(图5)。

3 讨论

褐飞虱小分子量热激蛋白基因间序列一致性不高。小分子量热激蛋白与其他热激蛋白家族成员

如HSP70等不同,其 α -晶体结构和N-、C-端经历了不同的进化过程,导致sHSP在 α -晶体结构域部分非常保守,但是在N-、C-端变异较大^[25],使其氨基酸序列间差异也较大。褐飞虱小分子量热激蛋白相互间氨基酸序列一致性最高的仅有68.2%,最低的为6.9%。尽管如此,小分子量热激蛋白在昆虫间的同源性仍然高于昆虫与其他物种,而同一物种间的同源性也常高于不同物种^[20]。褐飞虱与黑腹果蝇小分子量热激蛋白开放阅读框DNA序列间遗传距离小于其与人类相关序列间的遗传距离与此结果一致。

褐飞虱小分子量热激蛋白的基础表达具有明显的发育阶段特异性,如 $NIHsp21.9$ 和 $NIHsp23.1$ 表达峰值出现在雌成虫中, $NIHsp28.7$ 表达峰值出



柱上标相同小写字母者表示材料间差异未达 0.05 显著水平。

The same lowercase letters above the bars indicate no significant difference among the materials at the 0.05 level.

图 5 重组大肠杆菌高温热激存活率

Fig. 5. Survival of recombinant BL21(DE3) transformed sHsps after heat treatment.

现在 3 龄若虫中。这种发育阶段相关的特异性表达可能与小分子量热激蛋白在生物中的广泛功能有关。小分子量热激蛋白参与了昆虫变态、滞育、繁殖等多个生理过程,如桔小实蝇化蛹后小分子量热激蛋白表达量显著上调可能与其变态有关^[26];而云杉卷叶蛾 (*Choristoneura fumiferana*) 滞育前后小分子量热激蛋白的差异表达则可能与滞育状态有关^[27]。褐飞虱小分子量热激蛋白基因在不同龄期的差异表达说明这些基因在褐飞虱的发育中可能具有重要作用。

褐飞虱小分子量热激蛋白基因具有不同的诱导表达特异性。超过半数的基因受高温热激诱导,但仍有部分基因不被诱导或仅被轻微诱导。诱导表达的小分子量热激蛋白在生物热胁迫损伤保护中具有重要作用。小分子量热激蛋白能阻止底物蛋白的聚集或失活,帮助底物蛋白重新折叠。高温热激后褐飞虱小分子量热激蛋白转录水平增加可提高褐飞虱对高温胁迫的适应力,但不同小分子量热激蛋白可能应对不同的高温胁迫。*NIHsp21.9*、*NIHsp23.1*、*NIHsp21.6* 等三个基因的诱导峰值出现在 42℃~44℃,而 *NIHsp28.7* 在 33℃,说明 *NIHsp28.7* 可能应对温和高温胁迫,而其余三个基因应对极端高温胁迫。二化螟也是如此, Lu 等^[28]发现该害虫有两个小分子量热激蛋白基因在 42℃ 热激后表达量最高,而另一个小分子量热激蛋白基因的表达峰值出现在 35℃。

褐飞虱组成型表达的小分子量热激蛋白可能在其基础抗性中起重要作用。与 HSP70 相似,部分小分子量热激蛋白基因的表达几乎不受热激影响。Daugaard 等^[29]认为诱导表达的 HSP70 主要应对胁迫损伤,而组成型热激蛋白 HSC70 在生物组成

型抗性和正常生理活动中起重要作用。Jagla 等^[30]则认为在非应激状态下,小分子量热激蛋白表达的可能原因是保护重要的发育器官免受环境损害。褐飞虱 *NIHsp20.9* 和 *NIHsp22.4* 虽然在热激后表达量变化不显著,但转化这两个基因的大肠杆菌对高温热激的抗逆性显著增加,说明这两个基因在褐飞虱的基础抗性中可能起重要作用。

与高温胁迫不同,褐飞虱小分子量热激蛋白在其低温胁迫适应中的作用与龄期有关。低温处理后,褐飞虱雌成虫小分子量热激蛋白基因转录水平无显著变化或呈现不同程度的下降,这与热激蛋白 HSP70 相似,低温胁迫后褐飞虱 Hsp70s 仅有 1 个基因的表达量略微上调^[17, 21]。与雌成虫不同的是小分子量热激蛋白在褐飞虱若虫的低温抗性中可能具有一定的作用,其 3 龄若虫 *NIHsp21.9* 和 *NIHsp21.6* 在 0℃ 处理后表达量显著上升。但有趣的是褐飞虱 3 龄若虫小分子量热激蛋白在低温胁迫后的上调倍数远低于高温热激,其最大上调倍数在低温胁迫后仅有 10 倍左右,但高温热激后高达 300 倍以上,在雌成虫中更是达到 500 倍以上。这一现象可能与褐飞虱的生物学特性有关。褐飞虱是一种迁飞性害虫,其越冬北界冬季日均最低气温在 15℃ 左右,所以褐飞虱野外生存中一般不会遭遇极端低温,而热激蛋白是一类主要的胁迫应激蛋白,因此褐飞虱在进化上可能较少保留上调热激蛋白应对低温胁迫的反应机制。

综上所述,本研究发现褐飞虱小分子量热激蛋白基因均含有 Hsp20 保守结构域,其开放阅读框 DNA 序列与黑腹果蝇间的同源性高于人类,彼此间氨基酸序列一致性不高。不同龄期褐飞虱小分子量热激蛋白的转录水平存在显著差异;高温诱导后大

多数基因的表达量显著增加,而且表达这些基因的大肠杆菌的耐热性也显著提高。但低温胁迫后 *sHsps* 的转录水平与龄期有关,在雌成虫中表达量不同程度下降,在3龄若虫中,一半 *sHsps* 表达量下降,一半上调。以上结果说明褐飞虱小分子量热激蛋白在其高温抗逆性中可能具有重要作用,但其在低温胁迫应激中的作用受龄期影响。雌成虫对低温胁迫的适应机制以及组成型表达的小分子量热激蛋白在高温胁迫保护之外的功能尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] Kong L H, Cheng J, Escalada M M. Rice Planthoppers[M]. Hangzhou: Zhejiang University Press, 2015: 1-34.
- [2] 石保坤, 胡朝兴, 黄建利, 候茂林. 温度对褐飞虱发育、存活和产卵影响的关系模型[J]. 生态学报, 2014, 34(20): 5868-5874.
Shi B K, Hu C X, Huang J L, Hou M L. The relationship model of temperature on the development, survival and spawning of brown planthopper[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34(20): 5868-5874. (in Chinese with English abstract)
- [3] Jiranan P, Jeremy P, Jeff B. Heat stress impedes development and lowers fecundity of the brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stål)[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(10): e47413.
- [4] 李千金, 徐显浩, 张海亮, 朱敏, 崔旭红. 短时高温暴露对褐飞虱存活和生殖特性的影响[J]. 中国农业科学, 2015, 48(9): 1747-1755.
Li G J, Xu X H, Zhang H L, Zhu M, Cui X H. Effects of short-term high temperature exposure on the survival and reproductive characteristics of brown planthopper[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2015, 48(9): 1747-1755. (in Chinese with English abstract)
- [5] 张焱娇, 杨煌朕, 李保玲. 低温胁迫对褐飞虱种群发生的影响[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(31): 146-148, 153.
Zhang X J, Yang H B, Li B L. Effects of low temperature stress on the population of brown planthopper, *Nilaparvata lugens*[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2018, 46(31): 146-148, 153. (in Chinese with English abstract)
- [6] Long Y, Hu C, Shi B, Yang X, Hou M. Effects of temperature on mate location in the planthopper, *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae) [J]. *Environmental Entomology*, 2012, 41(5): 1231-1238.
- [7] 夏佳音, 张耀洲. 小热休克蛋白的结构和功能[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2013, 23(11): 911-915.
Xia J Y, Zhang Y Z. Structure and function of small heat shock proteins[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 23(11): 911-915. (in Chinese with English abstract)
- [8] Haslbeck M, Braun N, Stromer T, Richter B, Model N, Weinkauff S, Buchner J. *Hsp42* is the general small heat shock protein in the cytosol of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *EMBO Journal*, 2004, 23(3): 638-649.
- [9] Friedrich K L, Giese K C, Buan N R, Vierling E. Interactions between small heat shock protein subunits and substrate in small heat shock protein substrate complexes[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(2): 1080-1089.
- [10] Basha E, Lee G J, Breci L A, Hausrath A C, Buan N, Giese K C, Vierling E. The identity of proteins associated with a small heat shock protein during heat stress in vivo indicates that these chaperones protect a wide range of cellular functions[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(9): 7566-7575.
- [11] Narberhaus F. Alpha-crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2002, 66(1): 64-93.
- [12] Vgh L, Török Z, Balogh G, Glatz A, Piotto S, Horváth I. Membrane regulated stress response: A theoretical and practical approach[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2007, 594: 114-131.
- [13] Kedersha N L, Gupta M, Li W, Miller I, Anderson P. RNA binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules[J]. *Journal of Cell Biology*, 1999, 147(7): 1431-1442.
- [14] Duverger O, Paslaru L, Morange M. HSP25 is involved in two steps of the differentiation of PAM212 keratinocytes[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(11): 10252-10260.
- [15] Lu K, Chen X, Liu W, Zhou Q. Characterization of heat shock cognate protein 70 gene and its differential expression in response to thermal stress between two wing morphs of *Nilaparvata lugens* (Stål)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology: Part A*, 2016, 199: 47-53.
- [16] Lu K, Chen X, Liu W, Zhou Q. Identification of a heat shock protein 90 gene involved in resistance to temperature stress in two wing-morphs of *Nilaparvata lugens* (Stål)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology: Part A*, 2016, 197: 1-8.
- [17] Huang H J, Xue J, Zhuo J C, Cheng R L, Xu H J, Zhang C X. Comparative analysis of the transcriptional responses to low and high temperatures in three rice planthopper species[J]. *Molecular Ecology*, 2017, 26(10): 2726-2737.
- [18] Chen X E, Zhang Y L. Identification of multiple small heat-shock protein genes in *Plutella xylostella* (L.) and

- their expression profiles in response to abiotic stresses[J]. *Cell Stress&Chaperones*, 2015, 20(1): 23-35.
- [19] Zhang Y Y, Liu Y L, Guo X L, Li Y L, Gao H R, Guo X Q, Xu B H. sHsp22.6, an intronless small heat shock protein gene, is involved in stress defense and development in *Apis cerana* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 53: 1-12.
- [20] Wang L H, Zhang Y L, Pan L, Hang Y C, Niu H T, Shan D, Fang J C. Induced expression of small heat shock proteins is associated with thermotolerance in female *Laodelphax striatellus* planthoppers[J]. *Cell Stress&Chaperones*, 2019, 24(1): 115-123.
- [21] 单丹, 王利华, 张月亮, 韩阳春, 牛洪涛, 潘磊, 方继朝. 褐飞虱热激蛋白70在不同温度胁迫下的差异表达特性研究. *中国水稻科学*, 2017, 31(5): 533-541.
Shan D, Wang L H, Zhang Y L, Hang Y C, Niu H T, Pan L, Fang J C. Differential expression characteristics of heat shock protein 70 from brown planthopper, *Nilaparvata lugens* under different temperature stress[J]. *Chinese Journal of Rice Sciences*, 2017, 31(5): 533-541. (in Chinese with English abstract)
- [22] Jiang J J, Huang L F, Chen H S, Yang L. Identification of reference genes and expression analysis of heat shock protein genes in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae), after exposure to heat stress[J]. *Acta Entomology Sinica*, 2015, 58(5): 479-486.
- [23] Crack J A, Mansour M, Sun Y, MacRae T H. Functional analysis of a small heat shock/ α -crystallin protein from *Artemia franciscana*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2002, 269(3): 933-942.
- [24] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta C_T$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [25] Kriehuber T, Rattei T, Weinmaier T, Bepperling A, Haslbeck M, Buchner J. Independent evolution of the core domain and its flanking sequences in small heat shock proteins[J]. *Faseb Journal*, 2010, 24(10): 3633-3642.
- [26] Dou W, Tian Y, Liu H, Shi Y, Smagghe G, Wang J J. Characteristics of six small heat shock protein genes from *Bactrocera dorsalis*: Diverse expression under conditions of thermal stress and normal growth[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology: Part B*, 2017, 11: 8-16.
- [27] Quan G X, Duan J, Fick W, Kyei-Poku G, Candau J N. Expression profiles of 14 small heat shock protein (sHSP) transcripts during larval diapause and under thermal stress in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (L.)[J]. *Cell Stress&Chaper*, 2018, 23(6): 1247-1256.
- [28] Lu M X, Hua J, Cui Y D, Du Y Z. Five small heat shock protein genes from *Chilo suppressalis*: Characteristics of gene, genomic organization, structural analysis, and transcription profiles[J]. *Cell Stress&Chaper*, 2014, 19: 91-104.
- [29] Daugaard M, Rohde M, Jäättelä M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions[J]. *FEBS Letters*, 2007, 581: 3702-3710.
- [30] Jagla T, Dubińska-Magiera M, Poovathumkadavil P, Daczewska M, Jagla K. Developmental expression and functions of the small heat shock proteins in *Drosophila*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19: 3441.