

黄粉虫不同抗冻蛋白基因家族成员的低温应激表达^{*}

冯云甲^{1,2} 徐洪富² 王宪辉^{1**}

(1. 中国科学院动物研究所农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室 北京 100101;

2. 山东农业大学植物保护学院 泰安 271000)

摘要 黄粉虫 *Tenebrio molitor* L. 抗冻蛋白基因家族有多个成员,其氨基酸数量和蛋白结构存在差异。尽管有报道发现冷驯化后这些抗冻蛋白的表达量会升高,但不同家族成员是否存在功能分化尚不清楚。本研究中,检测了冷驯化对低温死亡率的效应和对不同类型的抗冻蛋白家族成员基因表达量的影响。结果表明,冷驯化可以显著降低黄粉虫幼虫的低温死亡率和提高不同类型抗冻蛋白基因的表达量。其中,长的抗冻蛋白和低温死亡率的相关关系最为明显。说明不同的抗冻蛋白家族成员的功能有明显的分化,为进一步理解抗冻蛋白的活性和利用抗冻蛋白提供了新的认识。

关键词 系统树,驯化,基因表达,死亡率,实时荧光定量

Gene expression of different antifreeze proteins of *Tenebrio molitor* in response to cold acclimation

FENG Yun-Jia^{1,2} XU Hong-Fu² WANG Xian-Hui^{1**}

(1. State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology,

Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

2. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271000, China)

Abstract The *Tenebrio molitor* L. antifreeze protein gene family has multiple members which differ in the number of amino acids and protein structure. The mRNA level of antifreeze proteins is enhanced by cold conditions but functional differentiation of different members of this family is not clear. In this study, we examined the effects of mortality from cold exposure on the gene expression of different types of antifreeze protein members in the family. The results show that cold acclimation can significantly reduce larval mortality and improve expression of the antifreeze protein gene. The longest antifreeze protein is most important to low-temperature-related mortality. This result indicates that the function of different antifreeze protein family members differs and provides new insights for the use of antifreeze proteins and antifreeze protein activity.

Key words phylogenetic tree, acclimation, gene expression, mortality rate, RT-PCR

抗冻蛋白(antifreeze proteins, AFP)是一类具有热滞活性的蛋白,属于一个大的基因家族。目前,已从多种节肢动物中分离到抗冻蛋白,例如蜘蛛(Husby and Zachariassen, 1980)、鳞类(Block and Duman, 1989)、蜈蚣(Tursman and Duman, 1995)、蛾类(Tyshenko *et al.*, 1997)以及甲虫(Graham *et al.*, 1997)等。昆虫中的抗冻蛋白与其它生物相比,活性是最高的(Jia and Davies,

2002)。Graham等(1997)从黄粉甲幼虫中分离的抗冻蛋白在1 mg/L的浓度下可以达到5.5℃的热滞活性。抗冻蛋白家族成员的活性往往与它们的保守片段长度是成正相关的(Leinala *et al.*, 2002)。但是,抗冻蛋白不同家族成员的功能是否有分化,目前尚不清楚。

黄粉虫 *Tenebrio molitor* L. 抗冻蛋白基因家族拥有大量的成员。以往的研究发现黄粉虫抗冻蛋

* 资助项目:农业部转基因专项(2009ZX08009-099B)。

**通讯作者, E-mail: wangxh@ioz.ac.cn

收稿日期:2011-04-15,接受日期:2011-11-24

白的表达量受到诸多因素的影响,例如温度、虫龄、光周期、湿度、饥饿(Graham *et al.*, 2000)。在本研究中,作者选定3个不同长度的抗冻蛋白基因 AF160494、AF160496 及 AF160497 (Liou *et al.*, 1999) 经冷驯化后进行表达量的测定,来探讨抗冻蛋白家族中不同成员基因表达量与耐寒性之间的关系。

1 材料与方法

1.1 试验昆虫

黄粉虫(购自山东)饲喂在温度(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 相对湿度 $60\% \pm 5\%$,完全黑暗的条件下,采用麦麸进行饲养,每周喂养1次胡萝卜补充水分。

1.2 主要试剂

DNA 胶回收试剂盒为百泰克(Bioteke)生物公司产品,Taq 酶、dNTP、M-MLV 反转录酶、DNA marker 及 pMD18-T 载体购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa),引物合成和 DNA 测序由华大基因公司完成,感受态细胞菌种 DH5 来自上海生工公司,智能人工气候箱(宁波海曙赛福实验仪器厂),低温处理用的是 programmable temperature controller (PolyScience),RNA 提取用的是 QIAGEN 公司的 RNeasy Mini Kit。

1.3 实验方法

1.3.1 冷驯化处理 取样时间为喂食胡萝卜后 3 d,选取虫体重量在(190 ± 10) mg 的个体。在 4°C 黑暗的环境下,驯养 4、8、16、24 d,然后在 -11°C 条件下处理 24 h,关闭机器 12 h 后取出试虫,计算虫体死亡率。每个处理 5 个平行组,每组 50 头幼虫。取部分经过 4°C 驯化的试虫每组取 5 头放入液氮中供 RNA 提取,其余的在 -11°C 低温处理器处理 24 h 后计算其死亡率。

1.3.2 黄粉虫 RNA 提取 分别取 CK 和 4、8、16 d 试虫提取总 RNA,将试虫置于研钵中并加入液氮,待研钵中液氮不再剧烈沸腾时进行研磨,研磨过程要迅速。使用 RNeasy Mini Kit (QIAGEN),按照说明书操作进行提取。提取完成后,测量记录 RNA 的提取浓度。使用 M-MLV 反转录系统 (Promega) 将 $2 \mu\text{g}$ 的 RNA 反转录为 cDNA,可用于普通 PCR 或定量 PCR (qPCR)。

1.3.3 选取的序列、引物设计及定量程序 选取 AF160497、AF160496、AF160494,分别设计定量引

物: F1 TTACTGCTACAACATGTACTAACTCA, R1 GTTTTAGCTTAGATAAGAACAGTTTTGT; F2 GAAACTGTAATACAGCCATGACGTG, R2 TT-TAGCTTAGACTATCCCTCCGTG; F3 AGACTGTTTT-GAAGCCAACACATG, R3 AGATCGGATACAATA-CAGAGTTTTAACT; 黄粉虫 18s 定量引物上游引物: TCAGATACCGCCCTAGTTCTAACC,下游引物: CGTCAATTTCCTTTAAGTTTCAGCT。在黄粉虫 cDNA 中进行扩增,使用 PAGE 胶进行检测。胶回收后进行连接转化,选取 4 个摇菌,送华大基因测序验证。定量仪器为 MX3000 (美国 Stratagene 生产),定量程序为 95°C 3 min; 解链 95°C 30 s,退火 58°C 30 s,延伸 68°C 30 s,40 个循环。

1.4 数据处理与分析

Clustal W2. 0. 12 软件用来序列的比对。利用 MEGA5 软件,用邻近法 (the neighbour-joining method) 构建抗冻蛋白的进化树。死亡率和基因相对表达量的显著性分析利用 Spass 软件中 tukey 多重比较方法进行。

2 结果与分析

图 1 是对应基因氨基酸的序列比较,可以清楚地看到保守序列典型的由 12 个氨基酸(灰色标记) TCTXSXXCXXAX (X 代表任意氨基酸) 组成的连续重复片段,这是拟步甲科昆虫抗冻蛋白所特有的结构基序。除了缺失序列,整个比较的氨基酸都表现出高度的近似性,将这些氨基酸序列按连续重复片段的多少分为 3 类,最长的是 AF160497,中等的为 AF160496、AF159118、DQ229124,其余的则较短。从图 2 中可以看出,基因 AF160497 (148 aa)、AF160496 (124 aa)、AF160494 (112 aa),位于进化树不同分枝,从进化角度上来讲,具有一定的代表性。这些蛋白的基本功能都是相似的,氨基酸序列的缺失及进化树中处于不同分枝,说明它们在蛋白的活性上存在差异,或者在相应基因表达量上应该存在着差异。

在不同的冷驯化时间下,低温处理后的黄粉虫的死亡率呈逐渐下降趋势,其中除了处理 16 和 24 d 的幼虫死亡率没有明显差异外其他处理均存在显著性差异 ($P < 0.05$)。处理 16 d 后死亡率降至 17%,大约为对照的 0.25 倍。而 24 d 的低温驯化处理使死亡率降至 13%,但与 16 d 的死亡率无

	5	15	25	35	45	55
AF160495	MAFKTCGFSK	KWLVIIVVM	CLCTECYCHC	TGGADTSCT	DACTGCGNCP	NAHTCTDSK-
AF160494	MAFKTCGFSK	KWLVIIVVM	CLCTECYCQC	TGGADTSCT	GACTGCGNCP	NAVTCNSQ-
AF159117	MAFKTCGFSK	KWLVIIVVM	CLCTECYCRC	TGGADTSCT	QACTSCRNCP	NAKTCTNSQ-
AF159116	MAFKACGFSK	KWLVIIVVM	CLCTECYCHC	TGGADTSCT	DACTGCGNCP	NAHTCTDSK-
AF159115	MAFLTCGFSK	KWLVIIVVM	CLCTECYCQC	TGGADTSCT	AACTGCGNCP	NAHTCTDSQ-
AF159114	MGFKTCGFSK	KWLVTAVVM	CLCTECYCQC	TGGADTSCT	AACTGCGNCP	NAVTCNSQ-
DQ229123	MAFKTCAFTK	NWLIIVVM	CLCTEYNCQC	SMSAN-----	-SCTNCENCP	NAVTCNSK-
DQ229124	MAFKTCCFTK	NWLVIVVM	CLCTEYCYQC	TGGADTSCT	AACTGCGNCP	NAVTCDSH-
AF160496	MAFKTCGFSK	KWLIIVVM	CLCTECYCQC	TGGADTSCT	AACTGCGSCP	NAHTCTDSKN
AF159118	MAFKTCGFSK	KWLIIVVM	CLCTECYCQC	TGGADTSCT	AACTGCGSCP	NAHTCTDSKN
AF160497	MSFKISTFTK	IWLIIVVM	CLCNEYNCQC	TGAADTSCT	AACTGCGNCP	NAITCTGSK-
	65	75	85	95	105	115
AF160495	-----	NCVKAATCT	GSTKCN	-----	-----	TARTCTNSKD
AF160494	-----	HCVKANTCT	GSTDCN	-----	-----	TAQTCTNSKD
AF159117	-----	HCVRARTCT	GSTDCN	-----	-----	RAMTCTNSKD
AF159116	-----	NCVKAATCT	GSTKCN	-----	-----	TARTCTNSKD
AF159115	-----	HCVKAATCT	GSTDCN	-----	-----	TARTCTNSKD
AF159114	-----	HCVKATCT	GSTDCN	-----	-----	TAVTCTNSKD
DQ229123	-----	NCINAVTCS	GSTNCN	-----	-----	RATTCSNSKD
DQ229124	-----	NCVKAVTCT	GSTNCN	-----	-----	TATTCTNSKD
AF160496	CVRAETCTDS	ENCVKAHTCT	GSRNCN	-----	-----	TAMTCTNSKD
AF159118	CVRAETCTDS	ENCVKAHTCT	GSRNCN	-----	-----	TAMTCTNSKD
AF160497	-----	NCVRATTCT	GSTNCNRATT	CTNSKGCLEA	TTCTGSTHCH	RATTCTNSKD
	125	135	145	155	165	
AF160495	CFEAKTCT	-----	DSTNCYKATA	CTNSTGCPGH	-----	
AF160494	CFEANTCT	-----	DSTNCYKATA	CTNSSGCPGH	-----	
AF159117	CFEAKTCT	-----	DSTNCYKATT	CTNSTGCPGH	-----	
AF159116	CFEAKTCT	-----	DSTNCYKATA	CTNSTGCPGH	-----	
AF159115	CFEAATCT	-----	DSTNCYKATA	CTHSTGCPGH	-----	
AF159114	CFEAQTCT	-----	DSTNCYKATA	CTNSTGCPGH	-----	
DQ229123	CFVATTCS	-----	GSTNCYKALT	CVNSTGCPGH	-----	
DQ229124	CFEAATCTGS	SNCYTAATCT	DSTNCYKATT	CTNSTGCPGQ	LVFLLIHK	
AF160496	CFEAKTCT	-----	DSTNCYKATA	CTNSTGCPGH	-----	
AF159118	CFEAKTCT	-----	DSTNCYKATA	CTNSTGCPGH	-----	
AF160497	CFEATTCTGS	SNCYTATTCT	DSTNCYKATA	CTNSTGCPGH	-----	

图 1 目前在 NCBI 数据库中获得黄粉虫全长抗冻蛋白 mRNA 碱基序列对应氨基酸序列的 Clustal W 分析

Fig. 1 Comparison of the current amino acid sequence of *Tenebrio molitor* antifreeze protein obtained full mRNA length in the NCBI by Clustal W

灰色标记区域是所列抗冻蛋白氨基酸保守区存在缺失的区域。

Gray marked area is the missing conserved amino acid region of antifreeze proteins listed in the existence.

显著性差异 (图 3)。

黄粉虫体内 3 个基因的基因相对表达量在 4℃ 驯化后, 基因表达量都明显高于对照的基因表达量。AF160494 基因在低温驯化后, 所有的时间点都高于对照处理 2 倍。AF160496 基因在 4 d 取样点的表达量可以达到对照处理的 4 倍。而 AF160497 则一直表现出高于对照 10 倍。

在处理的过程中各个基因的表达量变化趋势不同(图 4)。例如 AF160496 呈现先上升后下降趋势, AF160497, AF160494 整体呈现上升趋势, 说明当驯化时间延长时, 基因 AF160497, AF160494 升为主导基因。另外, 3 个基因在相同时间取样点, 基因 AF160494 在黄粉虫体内的表达量在每一

个处理取样点都是最高的。在趋势上, 最短的和最长的基因都表现出增长的趋势。然而, 中等长度的基因 AF160496 在短暂上升后, 表现出下降的趋势。

作者分析了低温处理后的死亡率与抗冻蛋白基因表达量的关系。基因 AF160496 的表达量和死亡率呈现出显著负相关关系 ($P < 0.05$)。而与基因 AF160497 及 AF160494 表达量表现出不显著的负趋势 ($P > 0.05$)。

3 讨论

不同抗冻蛋白家族成员的功能并不相同。在对照条件下, 大龄幼虫基因 AF160494 的表达量就

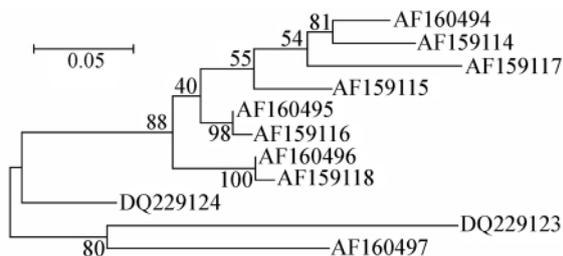


图 2 基于最大似然法建立的目前在 NCBI 数据库中获得的黄粉虫全长抗冻蛋白 mRNA 碱基序列对应氨基酸序列的无根系统树

Fig. 2 Maximum likelihood method tree of the current amino acid sequence of *Tenebrio molitor* antifreeze protein obtained full mRNA length in the NCBI

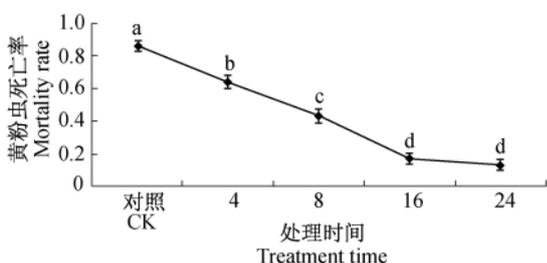


图 3 黄粉虫 4°C 驯化 4、8、16 和 24 d 及对照, -11°C 处理 24 h 的死亡率

Fig. 3 Mortality of *Tenebrio molitor* after 4, 8, 16, 24 d and CK of acclimation(4°C), 24 h of acclimation(-11°C)

注: 数据后标有不同小写字母

代表差异显著 ($P < 0.05$)。下图同。

Data with different small letters within a column are significantly different at 0.05 level. The same below.

有一个比较高的初始含量。而龄期较小的黄粉虫幼虫体内基因 AF160494 表达量较低, 经过驯化后才能达到未经处理的末龄期幼虫体内基因 AF160494 的表达量 (Graham *et al.*, 2000)。因此, 作者推断基因 AF160494 是一种在黄粉虫大龄幼虫体内稳定表达的基因, 是大龄幼虫积极应对自然环境的进化。基因 AF160497 的表达量, 经过低温驯化, 有了急剧增长, 表明其有较强的低温诱导效应。以往文献中报道, 基因 AF160497 对应蛋白是黄粉虫体内抗冻蛋白中活性最高的 (Graham *et al.*, 1997), 这就说明低温环境下, 黄粉虫会表达合成最具活性的抗冻蛋白, 这是与长期进化形成的适应机制相符合的。基因 AF160496 保守区

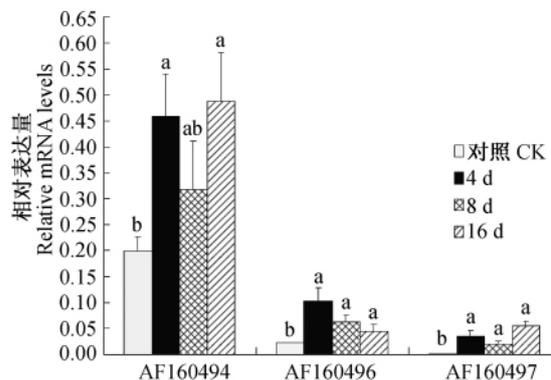


图 4 黄粉虫 4°C 驯化 4、8、16 d 及对照条件下, 不同基因的 mRNA 相对表达水平

Fig. 4 The relative mRNA levels of different genes, *Tenebrio molitor* acclimated 4°C at 4, 8, 16 d and the control condition

域长度处于前两者之间, 基因表达量的变化 4 d 最高随后逐步降低, 表现出一种虫体一定时期对寒冷应对的应急补充作用, 是对低温应急的积极进化 (Graether and Sykes, 2004)。通过在同一外界刺激下, 对 3 个基因的检测结果比较, 对相似功能基因家族成员在虫体不同时期中存在的意义有了一个新的认识。

不同的抗冻蛋白家族成员间表达模式表现出差异。从对照到 4 d 取样点 3 个基因表达量都有所提升, 作者推测是低温驯化初期抗冻蛋白在虫体内含量较低, 虫体需要一个高的基因表达量来迅速提升体内抗冻蛋白浓度提高耐寒能力。而低温驯化 8 d 后 3 个基因表现出降低现象。以前的报道发现抗冻蛋白的积累对细胞有一定的毒害作用 (Kawahara *et al.*, 2009), 这可能是细胞为了避免其毒性而暂时调低其基因表达量的原因。在 16 d 的低温驯化后, 基因 AF160497 及 AF160494 表达量继续增加。说明这 2 个基因对于黄粉虫的抗冻能力来说, 是非常重要的。

在整个抗冻蛋白基因家族中, 保守区域存在差异的几个基因在低温的诱导下表现出不同的趋势, 但是黄粉虫的耐寒性却是持续增强的, 作者认为这是体内整个家族共同作用的结果, 是一个复杂调控的过程, 是昆虫自身对寒冷长期适应进化的结果。通过不同家族成员基因表达的分析, 作者对各个基因的存在意义及趋势分化上有了新的认识, 可以通过模拟各个蛋白间的仿生配比来提

高抗冻效果, 同样作者的研究也对基因家族的成员之间功能的研究有一定的指导意义。

参考文献(References)

- Block W , Duman JG , 1989. Presence of thermal hysteresis producing antifreeze proteins in the antarctic mite , *Alaskozetes antarcticus*. *J. Exp. Zool.* ,250 (2) : 229—231.
- Graether SP , Sykes BD , 2004. Cold survival in freeze-intolerant insects—the structure and function of β - helical antifreeze proteins. *Eur. J. Biochem.* , 271 (16) : 3285—3296.
- Graham LA , Liou YC , Walker VK , Davies PL , 1997. Hyperactive antifreeze protein from beetles. *Nature* , 388 (6644) : 727—728.
- Graham LA , Walker KV , Davies PL , 2000. Developmental and environmental regulation of antifreeze proteins in the meal worm beetle *Tenebrio molitor*. *Eur. J. Biochem.* , 267 (21) : 6452—6458.
- Husby JA , Zachariassen KE , 1980. Antifreeze agents in the body fluid of winter active insects and spiders. *Cell. Mol. Life Sci.* , 36 (8) : 963—964.
- Jia Z , Davies PL , 2002. Antifreeze proteins: an unusual receptor-ligand interaction. *Trends Biochem. Sci.* , 27 (2) : 101—106.
- Kawahara H , Higa S , Tatsukawa H , Obata H , 2009. Cryoprotection and cryosterilization effects of type I antifreeze protein on *E. coli* cells. *Biocontrol Sci.* , 14 (2) : 49—54.
- Leinala EK , Davies PL , Doucet D , Tyshenko MG , Walker VK , Jia ZC , 2002. A β -helical antifreeze protein isoform with increased activity. *J. Biol. Chem.* , 277 (36) : 33349—33352.
- Liou YC , Thibault P , Walker VK , Davies PL , Graham LA , 1999. A complex family of highly heterogeneous and internally repetitive hyperactive antifreeze proteins from the beetle *Tenebrio molitor*. *Biochemistry* , 38 (35) : 11415—11424.
- Tursman D , Duman JG , 1995. Cryoprotective effects of thermal hysteresis protein on survivorship of frozen gut cells from the freeze-tolerant centipede *Lithobius forficatus*. *J. Exp. Zool.* , 272 (4) : 249—257.
- Tyshenko MG , Doucet D , Davies PL , Walker VK , 1997. The antifreeze potential of the spruce budworm thermal hysteresis protein. *Nat. Biotechnol.* , 15 (9) : 887—890.