

马秋琴, 王禹生, 梁宽, 等. 草地贪夜蛾自噬相关基因的鉴定 [J]. 华南农业大学学报, 2021, 42(1): 93-100.
MA Qiuqin, WANG Yusheng, LIANG Kuan, et al. Identification of autophagy-related genes in fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*[J]. Journal of South China Agricultural University, 2021, 42(1): 93-100.

草地贪夜蛾自噬相关基因的鉴定

马秋琴, 王禹生, 梁 宽, 韩 勇, 易辉玉, 邓小娟

(华南农业大学 动物科学学院/广东省农业动物功能基因组学与分子育种重点实验室/

广东省蚕桑工程技术研究中心, 广东 广州, 510642)

摘要:【目的】利用草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 基因组序列, 鉴定草地贪夜蛾自噬相关基因 (Autophagy-related gene, *Atg*) 及其对病毒感染的自噬应答, 为研究自噬的分子机制奠定基础。【方法】对人类 *Homo sapiens*、果蝇 *Drosophila melanogaster* 等不同物种来源的自噬相关蛋白 (ATG) 序列进行相似性比对, 搜索草地贪夜蛾自噬相关基因序列, 并通过 NCBI 保守结构域搜索工具预测候选自噬相关蛋白中存在的功能结构域; 并通过 qRT-PCR 检测重组病毒 EGFP-AcMNPV 感染后引起 Sf9 细胞中自噬相关基因的表达。【结果】鉴定获得了草地贪夜蛾参与自噬体形成的核心 *Atg* 基因 10 多个, 包括 *Atg3*、*Atg5*、*Atg6*、*Atg7*、*Atg10*、*Atg12*、*Atg13*、*Atg101* 的全序列以及 *Atg1*、*Atg2*、*Atg4*、*Atg9*、*Atg14*、*Atg16*、*Atg17*、*Atg18* 的部分序列, *Atg2*、*Atg4*、*Atg5*、*Atg6*、*Atg7*、*Atg8*、*Atg12* 等自噬相关基因在重组病毒 EGFP-AcMNPV 感染 Sf9 细胞 6~12 h 后表达量上调。【结论】获得草地贪夜蛾基因组中真核生物保守的自噬相关基因, 暗示草地贪夜蛾的自噬途径在进化中是保守的。AcMNPV 病毒感染 Sf9 细胞可能引发宿主细胞的自噬响应。

关键词: 草地贪夜蛾; 自噬; 自噬相关蛋白; 保守结构域; 自噬途径
中图分类号: Q962 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2021)01-0093-08

Identification of autophagy-related genes in fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*

MA Qiuqin, WANG Yusheng, LIANG Kuan, HAN Yong, YI Huiyu, DENG Xiaojuan
(College of Animal Science, South China Agricultural University/Key Laboratory of Agro-animal Genomics and Molecular Breeding of Guangdong Province/Guangdong Provincial Sericulture and Mulberry Engineering Research Center, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】To identify autophagy-related genes (*Atg*) in fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) genome and their response to viral infection in *S. frugiperda*, and provide a basis for further research on the molecular mechanism of autophagy. 【Method】Autophagy-related protein (ATG) sequences from various species, such as human (*Homo sapiens*) and fruit fly (*Drosophila melanogaster*), were aligned and analyzed for sequence similarity. ATG sequences in *S. frugiperda* genome were searched. Conservative domain (CD) of the candidate ATG were analyzed by NCBI CD search. Furthermore, qRT-PCR was used to detect the expression changes of *Atgs* in Sf9 cells after infection by recombinant EGFP-AcMNPV. 【Result】We identified more than

ten core *Atgs* which were involved in autophagosome formation in *S. frugiperda*, including the complete sequences of *Atg3*, *Atg5*, *Atg6*, *Atg7*, *Atg10*, *Atg12*, *Atg13* and *Atg101*, and the partial sequences of *Atg1*, *Atg2*, *Atg4*, *Atg9*, *Atg14*, *Atg16*, *Atg17* and *Atg18*. The expression levels of *S. frugiperda Atg2*, *Atg4*, *Atg5*, *Atg6*, *Atg7*, *Atg8* and *Atg12* were up-regulated after 6 to 12 hours infection by EGFP-AcMNPV. 【Conclusion】 Eukaryotic conserved *Atgs* exist in the genome of *S. frugiperda*, indicating the autophagy pathway in *S. frugiperda* is evolutionarily conserved. AcMNPV infection might trigger the autophagic response in Sf9 cells.

Key words: *Spodoptera frugiperda*; autophagy; autophagy-related protein; conservative domain; autophagy pathway

细胞自噬 (Autophagy) 是真核生物中普遍存在并高度保守的生理过程。自噬通过形成具有双层膜的自噬体, 将细胞中错误折叠的蛋白质、受损的细胞器运送到溶酶体降解后进行循环利用^[1]。越来越多的研究表明, 自噬是一个正常的细胞所必须的, 是细胞主动的、受调控的生理过程^[2]。自噬相关基因 (Autophagy-related gene, *Atg*) 所编码的蛋白 (ATG) 参与自噬体的形成和选择性自噬的调控^[3]。

自 1997 年第 1 个自噬相关基因 *Atg1* 从酵母中被克隆以来^[4], 酵母中 *Atg5*、*Atg6* 和 *Atg13* 等自噬相关基因相继被克隆^[5], 后来 *Atg* 基因在果蝇 *Drosophila melanogaster*、线虫 *Caenorhabditis elegans*、小鼠 *Mus musculus*、人类 *Homo sapiens* 等物种均被鉴定到。到 2019 年为止, 真核生物中已经发现和鉴定了 42 个 *Atg* 基因^[3], 其中包括 18 个参与自噬体膜形成的核心 *Atg* 基因^[6]。正常条件下, 细胞会发生低水平的自噬, 参与维持细胞内环境的动态平衡; 当受到饥饿、温度变化、低氧等外界环境的刺激, 细胞通过启动一系列的级联反应, 触发自噬相关基因的表达而激活自噬, 从而帮助细胞度过不良环境^[7]。细菌和病毒等病原物的感染也能引发宿主的自噬响应, 研究表明自噬参与病原物的清除^[8-9], 这种清除病原物的自噬作用被称为异体自噬 (Xenophagy)^[7]。

作为一种入侵的鳞翅目害虫, 草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 已经对我国玉米 *Zea mays*、高粱 *Sorghum bicolor*、甘蔗 *Saccharum officinarum* 等农作物的生产造成严重危害。草地贪夜蛾卵巢细胞系 Sf9 是传统上用于杆状病毒表达的细胞系, 同时也是基础研究的常用细胞系。苜蓿丫纹夜蛾核型多角体病毒 (*Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus, AcMNPV) 是杆状病毒的模式种, 与 Sf9 细胞是一对研究病毒与宿主相互作用的模式代表, 但鲜见 AcMNPV 与 Sf9 细胞在自噬应答方面相互作用的研究报道。本研究通过序列相似性和保守结构域分析, 鉴定草地贪夜蛾自噬的相关基因及其对 AcMNPV 感染的自噬应答, 以期研究草地贪夜蛾

的自噬调控机制, 为寻找调控防治草地贪夜蛾的 dsRNA 药物筛选靶点; 另一方面, 研究 AcMNPV 引起 Sf9 细胞的自噬应答及分子机制, 以期为病毒杀虫剂在农业害虫防治上的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

草地贪夜蛾 Sf9 细胞、重组转移载体 pFastBac HTb-EGFP 由华南农业大学动物科学学院昆虫分子生物学与生物技术实验室保存。草地贪夜蛾 Sf9 细胞采用 SFX 昆虫培养基添加 10%(φ) 胎牛血清 (Gibco) 于 28 ℃ 恒温培养箱培养。

PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) 和 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 购自 Takara 公司; Hieff SYBR Green Master Mix 购自上海 Yeasen 公司; Bac-to-Bac 表达系统试剂盒购自 Invitrogen 公司; 转染试剂 FuGENE HD Transfection Reagent 购自 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 草地贪夜蛾 ATG 序列的生物信息学分析 以斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*、人类 *Homo sapiens*、果蝇 *Drosophila melanogaster* 和家蚕 *Bombyx mori* 等物种中已经报道的 ATG 的氨基酸序列为基础, 利用在线 blast 工具 (https://bipaa.genouest.org/sp/spodoptera_frugiperda_pub/blast/) 获得与草地贪夜蛾 ATG 相似性高的序列。通过 NCBI 保守结构域在线工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)^[10] 对草地贪夜蛾候选 ATG 的保守结构域进行预测。

1.2.2 EGFP-AcMNPV 重组病毒的制备 采用 Bac-to-Bac 系统构建带有绿色荧光的 AcMNPV 重组病毒^[11-12]。将重组转移载体 pFastBacHTb-EGFP 转化含 AcMNPV 基因组的 *Escherichia coli* DH10Bac 感受态细胞, 经抗性筛选和 PCR 鉴定获得重组杆粒 Bacmid-EGFP。当 Sf9 细胞培养生长至六孔板的 40%~50% 时 (对数生长期), 将重组杆

粒 Bacmid-EGFP 转染 Sf9 细胞, 转染操作参考 FuGENE HD Transfection Reagent 说明书进行, 转染 72 h 之后收集的上清液即为 P1 病毒。

1.2.3 病毒滴度测定 采用 TCID₅₀ 法^[13] 测定重组病毒 EGFP-AcMNPV 的滴度, 具体操作方法如下: Sf9 细胞在 96 孔板中培养至生长密度为 80%~90% 时, 遗弃培养基, 依次加入经 SFX 10 倍系列稀释 (10⁻¹~10⁻¹⁰) 的重组病毒 EGFP-AcMNPV 稀释液各 100 μL, 每个稀释度设 8 个重复; 感染 72 h 后, 使用倒置荧光显微镜进行观察, 记录各稀释度病毒感染的细胞培养孔中出现和未出现病毒的孔数, 以大约 50% 感染“临界值”的稀释度计算 TCID₅₀。

1.2.4 病毒感染 Sf9 细胞 采用六孔板培养 Sf9 细胞, 当细胞生长密度达到 80%~90% 时, 加入重组病毒 EGFP-AcMNPV, 感染复数 (MOI) 为 8。在感染 6、12、24、36 和 48 h 后, 收集 Sf9 细胞, 并同时取正常培养的 Sf9 细胞作为对照。

1.2.5 qRT-PCR 检测 *Atg* 基因的转录活性 收集

Sf9 细胞, 采用 Trizol 法提取总 RNA, 经 NanoDrop One 微量分光光度计检测, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 为 1.8~2.0 即合格, 取 1μg 总 RNA 用于合成 cDNA。

根据草地贪夜蛾 *Atg* 基因序列, 利用 Premier Primer 5.0 设计荧光实时定量 PCR 引物, 序列见表 1。采用 SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒, 反应体系为 SYBR Green 混合液 (2×) 10 μL, 引物 (10 μmol/L) 各 0.2 μL, cDNA 0.1μL (相当于 10 ng 总 RNA), 加 ddH₂O 至总体积 20 μL。反应程序为: 95 °C 预变性 5 min; (95 °C 10 s, 60 °C 20 s, 72 °C 20 s) 循环 40 次; 溶解曲线在 65~95 °C 每隔 0.5 °C 采集 1 次, 每次采集 5 s, 在 CFX 96 仪器 (Bio-Rad) 上进行反应。以草地贪夜蛾 *Ecdysoless(ECD)* 基因作为内参基因^[14], 采用 2^{-ΔΔct} 法^[15] 计算基因相对表达量, 每个基因设置 3 个重复, 进行 3 次生物学重复。

1.3 数据处理

使用 GraphPad Prism 5.0 软件 *t*-检验方法对数据进行统计分析。

表 1 qRT-PCR 引物序列
Table 1 Primer sequence for qRT-PCR

基因 Gene	正向引物(5'→3') Forward primer	反向引物(5'→3') Reverse primer
<i>Atg2</i>	GATGTTTGCTCATGCCATAGACT	ATGGACCTCAAGTGCGATGC
<i>Atg3</i>	CGCGGAAGTAATGAAGAAAA	CGTACTCGATGGTCGGGATG
<i>Atg4</i>	TGTTGATAGTGCCGCTCAGG	GTTGGGCTTACCACCGATCA
<i>Atg5</i>	AACGACCCTCAACTACCGTG	TGGACATGACTTGGCCTCTG
<i>Atg6</i>	AAGGAGCAAGTTGAGAAAGGT	ATTGAATAGGCATGAGGTGG
<i>Atg7</i>	TTGGAAAGGAGCTGTGGACT	CATACACGGTGGGCTGACTA
<i>Atg8</i>	GAAGGCCAGGCTTGAGACC	GGCTGATGTTGGAGGAATGAC
<i>Atg12</i>	ACAGGAAATGCCCCCATTATGA	GGTCTGGAGATGGAGCAAATG
<i>ECD</i>	CTTCTGACCTGGCTACATTG	ACCTGTTGTTTGTGGCTCTA

2 结果与分析

2.1 草地贪夜蛾自噬相关蛋白的序列分析

根据已经报道的昆虫和哺乳动物等多个物种中的 ATG 序列, 在草地贪夜蛾网站 (https://bipaa.genouest.org/sp/spodoptera_frugiperda_pub/blast/) 进行同源序列的比对分析, 获得了 10 多个核心自噬相关基因, 其中包括已经报道的 *Atg8* (NCBI 登录号 MF069154.1), 和 *Atg3*、*Atg5*、*Atg6*、*Atg7*、*Atg10*、*Atg12*、*Atg13* 和 *Atg101* 基因序列的全长, 以及 *Atg1*、*Atg2*、*Atg4*、*Atg9*、*Atg14*、*Atg16*、*Atg17* 和 *Atg18* 等基因的部分序列 (表 2)。利用 smart blast 在

线比对工具, 比较获得的草地贪夜蛾 ATG 蛋白和黑腹果蝇、人类 ATG 蛋白的氨基酸序列相似性, 显示草地贪夜蛾基因组中存在高度保守的 ATG 序列。从表 2 的比对结果可见, 具有完整序列的 ATG 蛋白中, ATG8 的保守性最高, 草地贪夜蛾 ATG8 与黑腹果蝇 ATG8、人类 GABARAP 的氨基酸序列相似性分别为 93.10% 和 90.52%; ATG3 的保守性也很高, 与黑腹果蝇 ATG8、人类 GABARAP 的氨基酸序列相似性分别为 65.88% 和 64.40%; ATG5、ATG6、ATG12、ATG101 与果蝇序列相似性在 50% 以上, 暗示了草地贪夜蛾自噬相关蛋白具有参与自噬的保守功能。

表 2 草地贪夜蛾自噬相关蛋白的序列与相似性分析

Table 2 Sequence and similarity analysis of *Spodoptera frugiperda* autophagy related proteins

自噬相关蛋白 ¹⁾ Autophagy-related protein	序列编号 Sequence no.	结构域/蛋白家族 ²⁾ Domain/ Protein family	黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>		人类 <i>Homo sapiens</i>	
			名称/NCBI登录号 Name/NCBI accession number	序列相似性/% Sequence similarity	名称/NCBI登录号 Name/NCBI accession number	序列相似性/% Sequence similarity
ATG1*	GSSPFG00023661001.3	PKc_like/ Protein kinases	Autophagy-related 1, isoform A/ NP_648601.1	69.79	Serine/threonine-protein kinase ULK2 / NP_001136082.1	64.10
ATG2*	GSSPFG00005530001.3		Autophagy-related 2, isoform A/ NP_647748.1	30.96	Autophagy-related protein 2 homolog B/ NP_060506.6	32.29
ATG3	GSSPFG00021042001.3	Autophagy_N_C and Autophay_act_C,	Ubiquitin-like-conjugating enzyme ATG3/NP_649059.1	65.88	Ubiquitin-like-conjugating enzyme ATG3 isoform 1/ NP_071933.2	64.40
ATG4a*	GSSPFG00032702001	Peptidase_C54/ Cysteine protease	Autophagy-related 4a, isoform B/ NP_001259852.1	58.12	Cysteine protease ATG4B isoform b/ NP_847896.1	57.83
ATG4b*	GSSPFG00022978001.3	Peptidase_C54/ Cysteine protease	Autophagy-related 4b/ NP_650452.1	46.68	Cysteine protease ATG4D isoform 1 precursor/NP_116274.3	42.92
ATG5	GSSPFG00011494001.3	Autophagy protein Apg5	Autophagy-related 5/ NP_572390.1	58.49	Autophagy protein 5 isoform a/ NP_001273035.1	51.65
ATG6	GSSPFG00029332001.3	Autophagy protein Apg6	Autophagy-related 6/ NP_651209.1	56.53	Beclin-1 isoform a/NP_001300927.1	53.44
ATG7	GSSPFG00017981001.3	E1_like_Apg7	Autophagy-related 7, isoform A/ NP_611350.1	46.86	Ubiquitin-like modifier- activating enzyme ATG7 isoform X7/ XP_011531586.1	43.25
ATG8	GSSPFG00035793001.1	Ubiquitin-like _ATG8_GABARAP	Autophagy-related 8a, isoform A/ NP_727447.1	93.10	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein/ NP_009209.1	90.52
ATG9*	GSSPFG00017231001.3	Autophagy protein Apg9	Autophagy-related 9, isoform A/ NP_611114.1	45.00	Autophagy-related protein 9A/NP_001070666.1	46.88
ATG10	GSSPFG00019539001.3	Autophagy_act_C	Autophagy-related 10, isoform B/ NP_001097215.1	34.76	Ubiquitin-like-conjugating enzyme ATG10 isoform X2/ XP_005248669.1	33.53
ATG12	GSSPFG00008488001.3	Ubiquitin-like_ ATG12	Autophagy-related 12/ NP_648551.3	54.55	Ubiquitin-like protein ATG12 isoform 1/NP_004698.3	69.57
ATG13	GSSPFG00023791001.3	Autophagy-related protein 13	Autophagy-related 13/ NP_649796.1	32.80	Autophagy-related protein 13 isoform g/NP_001333285.1	42.52
ATG14*	GSSPFG00010270001.4	Atg14 super family	Autophagy-related 14/ NP_651669.1	26.45	Beclin 1-associated autophagy- related key regulator/ NP_055739.2	24.12
ATG16*	GSSPFG00003827001.3	Autophagy protein 16 and WD40 super family	Autophagy-related 16, isoform C/ NP_733313.2	36.80	Autophagy-related protein 16-1 isoform 2/ NP_060444.3	31.37
ATG17*	GSSPFG00021933001.4	Ubl_RB1CC1 and ATG11 domain-containing protein	Autophagy-related 17, isoform B/ NP_996156.1	35.33	RB1-inducible coiled-coil protein 1 isoform X11/ XP_011515949.1	30.67
ATG18*	GSSPFG00009401001.3	WD40 super family	Autophagy-related 18a, isoform F/NP_001261566.1	59.61	WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 2 isoform d/ NP_001028691.1	59.31
ATG101	GSSPFG00026235001.3	Autophagy-related protein 101	Autophagy-related 101/ NP_573326.1	56.11	Autophagy-related protein 101/ NP_068753.2	48.87

1) “*” 表示获得该基因的部分序列; 2) 早期在酵母中鉴定的参与自噬的基因被称为 *Apg*, 后来统一使用 *Atg* 来命名

1) “*” means partial sequence of this gene is obtained; 2) The early genes related to autophagy identified in yeast are called *Apg*, which are later uniformly named *Atg*

2.2 草地贪夜蛾 ATG 的结构域及功能分析

利用 NCBI CD(Conserved domain) 在线搜索工具对所获得的候选 ATG 蛋白序列进行保守结构域分析, 表明多数草地贪夜蛾 ATG 蛋白具有该蛋白家族的保守结构域 (图 1), ATG1 具有激酶活性, 是自噬过程中的一个重要蛋白激酶; ATG4 具有肽酶活性, 可以切除 ATG8 的 C 端使甘氨酸 (Gly) 暴露出来; ATG8 和 ATG12 具有类泛素的结构, ATG8 可结合脂分子磷脂酰乙醇胺 (PE), ATG12 可与

ATG5 共价结合; 而 ATG16 和 ATG18 具有 WD40 结构域。根据草地贪夜蛾 ATG 蛋白在序列上与果蝇、人类 ATG 的高度相似性及这些蛋白的功能结构域, 推测这些自噬相关蛋白具有参与自噬体形成及分子机制的调控功能, 草地贪夜蛾中的自噬通路也是真核生物高度保守的 (图 2)。这些 ATG 蛋白通过形成多个不同功能的复合物参与自噬的各个阶段, 包括负责自噬起始的 ATG1/ULK 复合物 (包括 ATG1、ATG17/RBICC1、ATG13 和 ATG101)、主

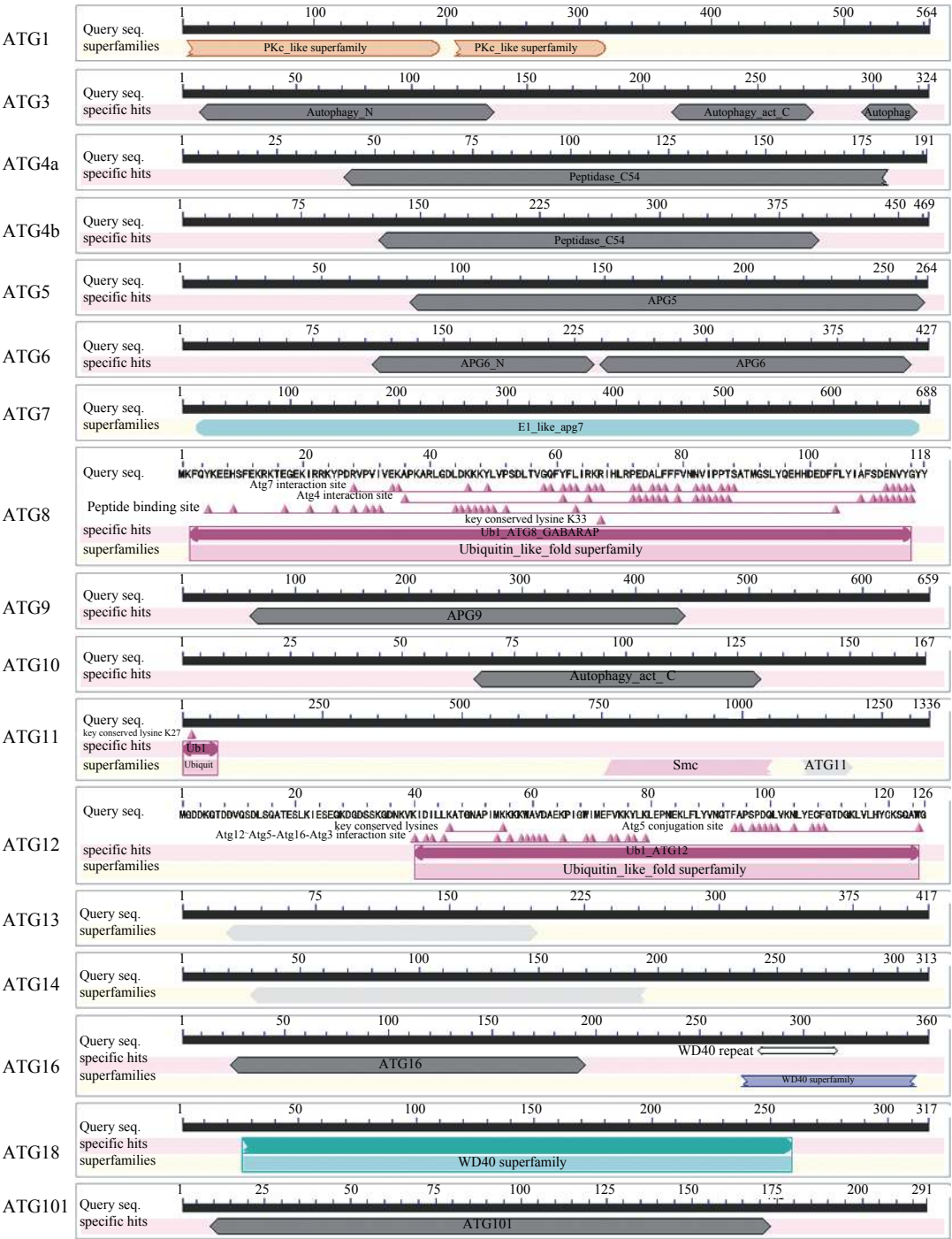


图 1 草地贪夜蛾候选自噬相关蛋白的保守结构域预测

Fig. 1 Prediction of the conserved domains in the candidate autophagy-related proteins of *Spodoptera frugiperda*

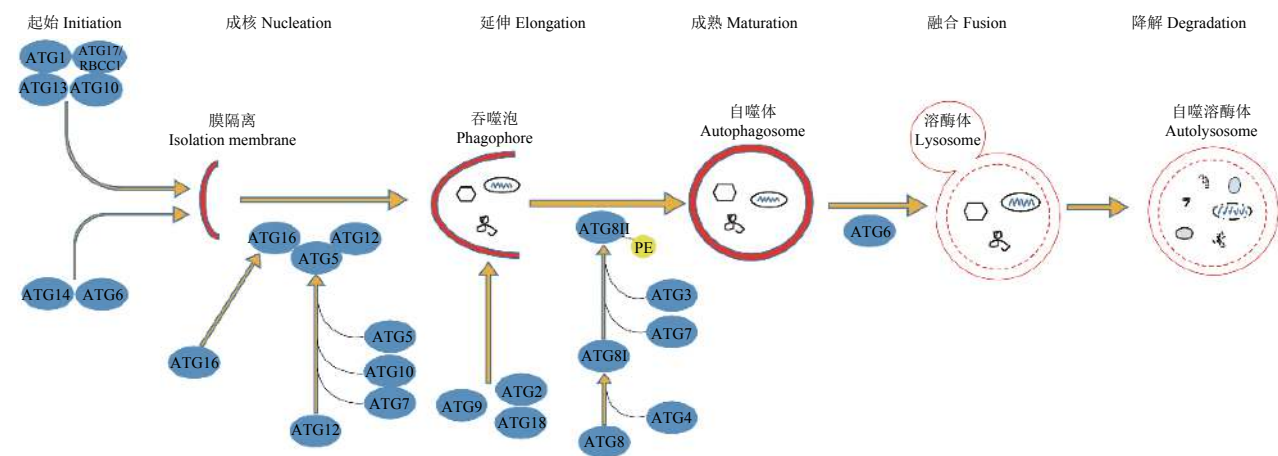


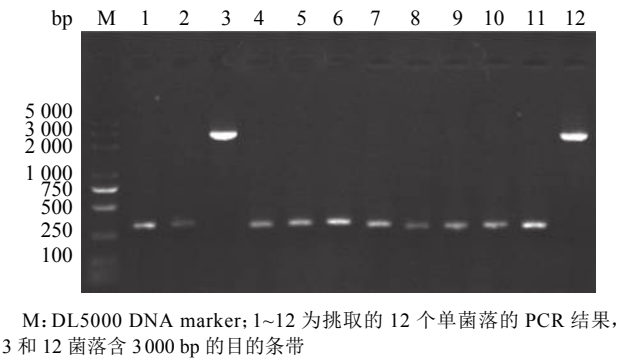
图 2 草地贪夜蛾自噬相关蛋白参与的自噬途径

Fig. 2 The autophagy pathway involving autophagy related proteins in *Spodoptera frugiperda*

要参与成核的Ⅲ型磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3KC3) 复合物 (由 ATG6/Beclin1 和 ATG14 等组成)、参与延伸和成熟的 2 个泛素样蛋白系统: ATG5-ATG12 系统和 ATG8-PE 系统。ATG8 作为类泛素分子, 羧基端被蛋白水解酶 ATG4 切割, 暴露出的甘氨酸在 E1-like 酶 ATG7、E2-like 酶 ATG3 和具有 E3 连接酶活性的 ATG12/ATG5/ATG16 复合物的作用下结合 PE, ATG8-PE 定位于自噬体膜。此外, ATG9、ATG2 和 ATG18 参与了膜延伸的过程。

2.3 重组病毒载体 EGFP-AcMNPV

将 pFast HTb-EGFP 重组载体转化至含 AcMNPV 基因组的大肠埃希菌 *Escherichia coli* 感受态细胞 DH10Bac 中, 经过抗性筛选获得的单菌落, 通过 M13 引物进行 PCR 鉴定, 获得约 3 000 bp 的单一一条带, 表明重组杆粒 Bacmid-HTb-EGFP 已成功构建 (图 3)。经测序验证后将重组杆粒转染 Sf9 细胞, 获得 P1 代重组病毒 EGFP-AcMNPV。以 P3 代重组病毒 EGFP-AcMNPV 感染 Sf9 细胞, 在感染 6、12、24、36 和 48 h 后观察 Sf9 细胞的绿色荧光强弱来判断重组病毒的增殖情况, 结果 (图 4) 表明: 病毒感染 6 和 12 h 后没有观察到绿色荧光; 24 h 后可见少量的绿色荧光, 表明子代病毒已经复



M: DL5000 DNA marker; 1~12 为挑取的 12 个单菌落的 PCR 结果, 3 和 12 菌落含 3 000 bp 的目的条带
M: DL5000 DNA marker; 1-12 were the clones for PCR; the specific bands about 3 000 bp were amplified from clones numbered 3 and 12

图 3 重组杆粒 Bacmid-EGFP 的 PCR 鉴定

Fig. 3 PCR identification of recombinant Bacmid-EGFP

制和繁殖; 在 36 和 48 h 后可见大量的绿色荧光, 表明制备的重组病毒能够有效感染 Sf9 细胞。

2.4 EGFP-AcMNPV 感染 Sf9 细胞引起自噬相关基因的变化

收集 EGFP-AcMNPV 感染不同时间的 Sf9 细胞, 抽提总 RNA, 去除基因组后进行反转录, 通过 qRT-PCR 对自噬相关基因的转录水平进行分析, 定量结果 (图 5) 显示: 多数自噬相关基因的转录水平在病毒感染后表达上调, *Atg2*、*Atg4* 和 *Atg7* 在感染 6 h 后基因表达量显著增加; *Atg5*、*Atg6*、*Atg8* 和

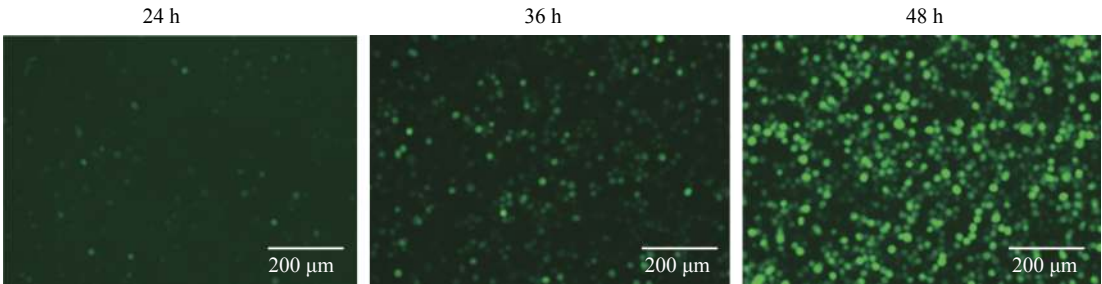
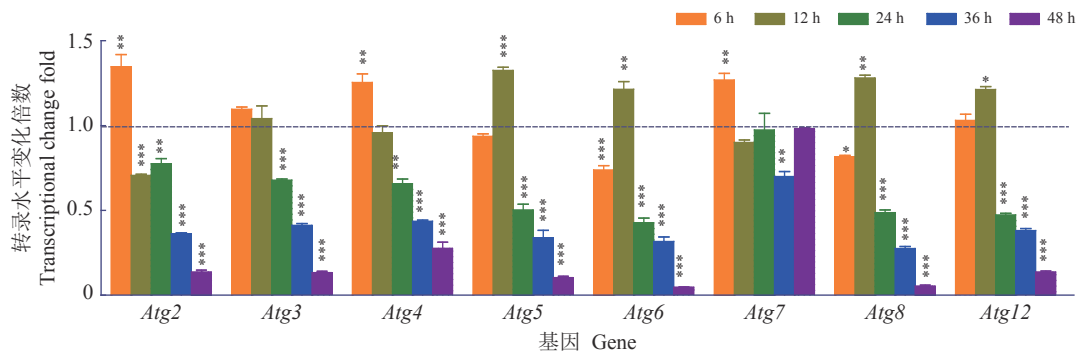


图 4 EGFP-AcMNPV 感染 Sf9 细胞不同时长后的荧光显微镜观察结果

Fig. 4 Fluorescence microscopy of Sf9 cells at different time after infection with EGFP-AcMNPV



图中数据为平均数±标准差, “*”、“**”、“***” 分别表示相同基因在病毒感染后不同时间表达量在 0.05、0.01 和 0.001 水平差异显著 (*t* 检验)
Datum in the figure is mean ± standard deviation; “*”, “**” and “***” indicates significant differences at the levels of 0.05, 0.01 and 0.001 respectively (*t* test)

图 5 AcMNPV 对 Sf9 细胞对自噬相关基因转录水平的影响
Fig. 5 Effects of AcMNPV on transcriptional levels of autophagy-related genes in Sf9 cells

Atg12 在病毒感染 12 h 后表达显著上调;之后随着病毒感染时间的延长,多数自噬相关基因 (除 *Atg7*) 的表达持续下调。可能的原因是子代病毒的大量复制导致宿主细胞自噬相关基因的表达量减少,或是随着感染时间的延长,自噬无法实现细胞“自救”而走向不可逆的死亡。

3 讨论与结论

自噬是真核生物中保守的生理过程,早期认为自噬的主要作用是实现营养物质的循环利用。近年来,随着对自噬研究的不断深入,发现自噬还参与细胞发育和分化、维持内环境的稳定,也与肿瘤形成、神经退行性疾病和免疫疾病有密切关系,自噬已成为国内外研究的热点。通过对酵母、线虫、果蝇、小鼠和人类等多种模式生物的研究,发现尽管有些物种中存在特有的自噬相关基因,但多数自噬基因是高度保守的。通过相似性比对分析,本研究从草地贪夜蛾基因组数据库中获得了自噬相关基因及对应自噬相关蛋白的序列。在参与自噬体膜形成的 18 个核心自噬相关蛋白中,除 ATG29 和 ATG31 外,获得了 ATG1~10、ATG12~14、ATG16~18 共 16 个草地贪夜蛾的 ATG 序列,其中 ATG3、ATG5、ATG6、ATG7、ATG8、ATG10、ATG12 和 ATG13 的序列是完整的。候选自噬相关蛋白保守结构域的分析结果表明,除 ATG2 外,其他自噬相关蛋白中均存在保守的结构域,暗示了在草地贪夜蛾中 ATG 功能的保守性,并且自噬过程也是保守的,猜测同酵母、果蝇和哺乳动物相似,草地贪夜蛾中的自噬也经过了起始、成核、延伸、成熟、融合和降解等基本过程,自噬相关蛋白参与了上述自噬体形成的各个过程和自噬过程中的分子调控。

Sf9 细胞的自噬现象已有报道,饥饿条件和神经毒剂类杀虫剂高效氯氰菊酯都能诱导 Sf9 细胞发

生自噬^[16-17]。最新的研究表明具有杀虫活性的姜黄素、β-咪啉类生物碱是通过阻断信号通路 PI3K/Akt/TOR 诱导 Sf9 细胞发生自噬的^[18-19]。为探讨杆状病毒模式代表 AcMNPV 与宿主 Sf9 细胞在自噬途径中的相互关系,本研究检测了 AcMNPV 病毒感染 Sf9 细胞后中 *Atg* 基因的表达水平,结果显示在感染 6~12 h 后多数 *Atg* 基因的表达上调,暗示了 AcMNPV 的感染激活了 Sf9 细胞中的自噬应答。后续研究进一步通过 Western blot 和免疫荧光显微镜观察等方法验证了自噬的发生 (结果未发表)。在果蝇中的研究结果显示不同的病原菌,如李斯特菌 *Listeria monocytogenes*^[8]、大肠埃希菌^[20]、沃尔巴克氏体 *Wolbachia*^[21] 和水疱性口炎病毒 (Vesicular stomatitis virus, VSV)^[22-23] 的感染都能引发细胞自噬应答,但这些不同的病原菌激活自噬的分子机制不同^[1]。可见,病原菌引发自噬响应的分子机制复杂,AcMNPV 引发 Sf9 细胞自噬响应的分子机制还有待进一步研究。

利用草地贪夜蛾基因组序列,通过相似性比对分析鉴定自噬相关基因及编码的蛋白质序列,结合候选自噬相关蛋白的保守结构域,我们推测了所鉴定的自噬相关蛋白在自噬中的功能。已有研究揭示:利用 RNAi 技术干扰棉铃虫 *Atg6*、*Atg8* 基因的表达引起产卵量和卵的孵化率降低^[24-25];干扰褐飞虱 *Atg1* 的表达,抑制自噬和糖原代谢,降低褐飞虱的生存率^[26]。草地贪夜蛾自噬相关基因与自噬通路的研究可能为未来筛选新型的 dsRNA 药物提供候选靶标。同时,本研究证实了自噬基因在 AcMNPV 感染的 Sf9 细胞中表达上调,暗示了病毒引发 Sf9 细胞的自噬应答,为进一步探究病毒引发草地贪夜蛾自噬响应的分子机制奠定了基础,为探索草地贪夜蛾的生物防治提供了理论依据。

致谢: 衷心感谢中山大学生命科学学院杨凯教授在制备重组病毒 EGFP-AcMNPV 过程中提供的支持与帮助!

参考文献:

[1] KUO C, HANSEN M, TROEMEL E. Autophagy and innate immunity: Insights from invertebrate model organisms[J]. *Autophagy*, 2018, 14(2): 233-242.

[2] YIN Z, PASCUAL C, KLIONSKY D J. Autophagy: Machinery and regulation[J]. *Microbial Cell*, 2016, 3(12): 588-596.

[3] SHENG R, QIN Z H. History and current status of autophagy research[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2019, 1206: 3-37.

[4] MATSUURA A, TSUKADA M, WADA Y, et al. Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Gene*, 1997, 192(2): 245-250.

[5] OHSUMI Y. Protein turnover[J]. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life*, 2006, 58(5/6): 363-369.

[6] SUZUKI H, OSAWA T, FUJIOKA Y, et al. Structural biology of the core autophagy machinery[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2017, 43: 10-17.

[7] PALMISANO N J, MELÉNDEZ A. Autophagy in *C. elegans* development[J]. *Developmental Biology*, 2019, 447(1): 103-125.

[8] YANO T, MITA S, OHMORI H, et al. Autophagic control of listeria through intracellular innate immune recognition in drosophila[J]. *Nature Immunology*, 2008, 9(8): 908-916.

[9] TALLOCY Z, VIRGIN H T, LEVINE B. PKR-dependent autophagic degradation of herpes simplex virus type 1[J]. *Autophagy*, 2006, 2(1): 24-29.

[10] MARCHLER-BAUER A, BO Y, HAN L, et al. CDD/SPARCLE: Functional classification of proteins via subfamily domain architectures[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(D1): D200-D203.

[11] LUCKOW V A, LEE S C, BARRY G F, et al. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Virology*, 1993, 67(8): 4566-4579.

[12] SHANG H, GARRETSON T A, KUMAR C M S, et al. Improved pFastBac™ donor plasmid vectors for higher protein production using the Bac-to-Bac® baculovirus expression vector system[J]. *Journal of Biotechnology*, 2017, 255: 37-46.

[13] 余倩. 斜纹夜蛾核多角体病毒诱导细胞凋亡的研究[D]. 广州: 中山大学, 2008.

[14] SALEM T Z, ALLAM W R, THIEM S M. Verifying the stability of selected genes for normalization in q-PCR experiments of *Spodoptera frugiperda* cells during AcMNPV infection[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e108516.

[15] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.

[16] 谢昆, 王丽仙, 王靖, 等. 草地贪夜蛾 Sf9 细胞对饥饿诱导自噬的响应[J]. *华北农学报*, 2017, 32(3): 91-95.

[17] 杨韵, 卢淼青, 张阳, 等. 高效氯氰菊酯对草地贪夜蛾 Sf9 细胞自噬的诱导作用[J]. *农药学报*, 2017, 19(2): 176-181.

[18] VEERAN S, CUI G, SHU B, et al. Curcumin-induced autophagy and nucleophagy in *Spodoptera frugiperda* Sf9 insect cells occur via PI3K/AKT/TOR pathways[J]. *Journal of Cell Biochemistry*, 2018, 120(2): 2119-2137.

[19] CUI G, SHU B, VEERAN S, et al. Natural beta-carboline alkaloids regulate the PI3K/Akt/mTOR pathway and induce autophagy in insect Sf9 cells[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2019, 154: 67-77.

[20] REN C, FINKEL S E, TOWER J. Conditional inhibition of autophagy genes in adult *Drosophila* impairs immunity without compromising longevity[J]. *Experimental Gerontology*, 2009, 44(3): 228-235.

[21] VORONIN D, COOK D A, STEVEN A, et al. Autophagy regulates *Wolbachia* populations across diverse symbiotic associations[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(25): E1638-E1646.

[22] SHELLY S, LUKINOVA N, BAMBINA S, et al. Autophagy is an essential component of drosophila immunity against vesicular stomatitis virus[J]. *Immunity*, 2009, 30(4): 588-598.

[23] NAKAMOTO M, MOY R H, XU J, et al. Virus recognition by toll-7 activates antiviral autophagy in *Drosophila*[J]. *Immunity*, 2012, 36(4): 658-667.

[24] 张晓娟. 棉铃虫细胞自噬相关基因 Atg8 的分子特征以及对昆虫生长发育的影响[D]. 武汉: 华中师范大学, 2014.

[25] 王霞. Atg6 对棉铃虫繁殖的影响及其在昆虫细胞自噬中的作用[D]. 武汉: 华中师范大学, 2014.

[26] YU F, HAO P, YE C, et al. NIATG1 gene participates in regulating autophagy and fission of mitochondria in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*[J]. *Frontiers in Physiology*, 2020, 10: 1622.

【责任编辑 霍 欢】