

意大利蜜蜂转铁蛋白基因 *AmTsf* 在吡虫啉胁迫下的表达分析*

秦启倩, 陈兰春, 王菲, 张毅, 曾慧妮, 王悦弟, 许金山, 李治

(重庆师范大学 生命科学学院 媒介昆虫重庆市高校重点实验室 重庆市动物生物学重点实验室, 重庆 401331)

摘要:【目的】通过生物信息学方法鉴定意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*)转铁蛋白(*AmTsf*),分析该蛋白在该蜂种耐受杀虫剂吡虫啉毒性过程中发挥的作用。【方法】通过多重序列比对分析 *AmTsf* 的氨基酸序列特征和结构域组成;利用在线工具预测该蛋白的结构、细胞定位、互作蛋白网络和生物学功能,构建系统进化树分析该蛋白的系统分类和进化关系;采用实时荧光定量 PCR 结合铁稳态测定分析该蛋白的编码基因 *AmTsf* 在意大利蜜蜂耐受杀虫剂吡虫啉毒性过程中的应答特征和功能。【结果】*AmTsf* 蛋白为疏水性蛋白,由 712 个氨基酸残基组成,相对分子质量为 78.7 kDa, pI 为 6.77,具有信号肽和转铁蛋白家族保守的氨基酸残基,主要定位于细胞核和线粒体。环境剂量的吡虫啉暴露导致供试蜜蜂大量死亡;与对照组相比,吡虫啉暴露 24 h 后导致供试蜜蜂头部、胸部和中肠的 Fe^{2+} 过剩,与铁稳态调节紧密相关的 *AmTsf* 在上述各组织中的表达均有统计学意义上的上调($p < 0.05$)。【结论】*AmTsf* 可能通过调节铁稳态来参与意大利蜜蜂对吡虫啉毒性的耐受。

关键词: 转铁蛋白;生物信息学分析;吡虫啉;意大利蜜蜂

中图分类号: Q966

文献标志码: A

文章编号: 1672-6693(2023)02-0034-09

吡虫啉是一种在全球范围内使用最为广泛的新烟碱类杀虫剂,它以口食、接触等方式被昆虫摄入后作用于乙酰胆碱受体,并破坏神经中枢的信号传导,从而杀灭昆虫^[1]。然而,吡虫啉在杀灭对人类有害昆虫的同时也不可避免地危害非靶标类媒介昆虫,尤其是蜜蜂(Apidae)^[2]。大量研究表明,吡虫啉严重影响蜂王的繁殖、蜜蜂幼虫的生长发育、采集蜂的行为和采集效率^[3-5]。最近有研究表明,杀虫剂吡虫啉会导致意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*)体内出现 Fe^{2+} 过剩,从而触发严重的氧化应激^[6]。铁在细胞呼吸、氧气运输、DNA 生物合成等核心代谢过程中发挥着不可或缺的作用^[7-8],但过量的 Fe^{2+} 会通过 Fenton 反应产生活性氧,导致氧化应激^[9-11]。因此,生物体内的 Fe^{2+} 含量总是受到铁代谢的严格调节而保持动态平衡。

转铁蛋白在铁代谢中负责结合和运输 Fe^{2+} ,在防止铁过载以维持细胞铁稳态过程中发挥着至关重要的作用^[12-14]。研究显示,铁代谢紊乱是生物体无法应对由农药导致的氧化应激的重要原因^[15]。转铁蛋白参与铁代谢、免疫、异种生物耐受性和发育^[16]。然而,人们对转铁蛋白与杀虫剂毒理学和耐药性之间的关系知之甚少。转铁蛋白在吡虫啉导致蜜蜂出现 Fe^{2+} 过剩并触发氧化应激过程中将发挥怎样的作用,至今还鲜有研究涉及。为此,本研究鉴定了意大利蜜蜂转铁蛋白(*AmTsf*)的功能位点、结构基因、系统进化等生物信息学特征,采用实时荧光定量 PCR 并结合铁稳态分析,对编码该蛋白的基因 *AmTsf* 在蜜蜂耐受吡虫啉毒性过程中的应答特征进行了探索,以便为蜜蜂耐受杀虫剂的分子机制研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料及主要试剂

供试意大利蜜蜂由重庆师范大学资源昆虫与病原微生物实验室养殖。选用封盖子覆盖大于 70% 的子脾置于人工气候箱内,饲养温度控制在 27~30 °C,相对湿度控制在 50%~70%,以质量分数为 50% 的蔗糖溶液及花

* 收稿日期:2022-06-27 修回日期:2022-09-28 网络出版时间:2023-04-20T17:10

资助项目:国家自然科学基金面上项目(No. 31101770;No. 31302037);重庆市教育委员会科学技术研究重点项目(No. KJZD-K202100502);重庆市自然科学基金面上项目(No. cstc2021jcyj-msxmX0422);重庆高校创新研究群体项目(No. CXQT21013);重庆市大学生创新创业训练计划项目(国家级)(No. 202110637013)

第一作者简介:秦启倩,女,研究方向为微生物学,E-mail:2228273745@qq.com;通信作者:李治,男,副教授,博士,E-mail:lizhicqu@gmail.com.

网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20230420.1318.010.html

粉浆作为日粮。Trizol、氯仿、异丙醇、DEPC 水、无水乙醇、邻菲罗邻溶液、乙酸-乙酸钠等实验试剂均购于重庆化学试剂有限公司;EvoM-MLV 反转录试剂盒、RroTaqHS 预混型 qPCR 试剂盒等则购于重庆艾科瑞生物公司。

1.2 *AmTsf* 的氨基酸序列特征和系统进化分析

AmTsf (GenBank 登录号:AAQ02340.1)的氨基酸序列下载自 NCBI。使用 NCBI 蛋白保守区预测 *AmTsf* 的保守功能结构域;通过线上程序 ExPASy ProtParam (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>) 预测该蛋白的氨基酸数量、相对分子质量、理论等电点、脂肪组氨基酸指数、总平均亲水指数和不稳定指数;采用在线程序 ExPASy ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>) 分析 *AmTsf* 的亲、疏水性;利用 SignalP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 分析蛋白信号肽;运用 GlycoMine (<https://glycomine.erc.monash.edu/Lab/GlycoMine/>) 预测蛋白的糖基化位点;通过 NetPhos 3.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetPhos-3.1>) 预测蛋白的磷酸化位点;采用 Novopro 在线工具 (<https://www.novopro.cn/tools/secondary-structure-prediction.html>) 预测蛋白的二级结构;通过 SWISS-MODEL Repository (<https://www.expasy.org/resources/swiss-model-repository>) 预测蛋白的三级结构;通过 PSORT (<http://psort1.hgc.jp/form.html>) 预测蛋白的亚细胞定位特征;STRING (<https://www.expasy.org/resources/swiss-model-repository>) 预测蛋白互作网络。此外,在 NCBI 中下载不同物种(表 1)的转铁蛋白氨基酸序列,利用 MUSCLE 软件进行氨基酸序列多重序列比对,分析保守氨基酸区域和位点,比对的结果通过 MEGA 6.06 软件以邻接法构建系统进化树。

表 1 典型物种转铁蛋白的 GenBank 登录号

Tab. 1 GenBank accession number of transferrin from typical species

编号	物种	GenBank 登录号	编号	物种	GenBank 登录号
1	意大利蜜蜂(<i>A. mellifera ligustica</i>)	AAQ02340.1	14	麻雀(<i>Passer montanus</i>)	XP_039552802.1
2	中华蜜蜂(<i>Apis cerana cerana</i>)	XP_016916447.1	15	紫翅椋鸟(<i>Sturnus vulgaris</i>)	XP_014725911.1
3	大蜜蜂(<i>Apis dorsata</i>)	XP_006608191.1	16	大白鼠(<i>Rattus norvegicus</i>)	AAH87021.1
4	珍珠鸟(<i>Taeniopygia guttata</i>)	XP_002192726.4	17	高加索蜂(<i>Apis mellifera caucasica</i>)	KAG6800752.1
5	小鼠(<i>Mus musculus</i>)	EDL21066.1	18	黑大蜜蜂(<i>Apis laboriosa</i>)	XP_043789070.1
6	大猩猩(<i>Gorilla gorilla</i>)	AJA37252.1	19	白蚁(<i>Cryptotermes secundus</i>)	XP_023702706.1
7	奶牛(<i>Bos taurus</i>)	AAA96735.1	20	湿木白蚁(<i>Zootermopsis nevadensis</i>)	XP_021919348.1
8	鲑鱼(<i>Salmo salar</i>)	AAA18838.1	21	中国野桑蚕(<i>Bombyx mandarina</i>)	XP_028030847.1
9	鳊鱼(<i>Miichthys miuiy</i>)	AFC68982.1	22	飞蝗(<i>Locusta migratoria</i>)	BBE27867.1
10	鱈鱼(<i>Monopterus albus</i>)	AHA05992.1	23	沙漠蝗虫(<i>Schistocerca gregaria</i>)	QVD39381.1
11	黑腹果蝇(<i>Drosophila melanogaster</i>)	NP_001285404.1	24	菊黄花粉蝶(<i>Zerene cesonia</i>)	XP_038214229.1
12	拟果蝇(<i>Drosophila simulans</i>)	XP_016039917.1	25	粒肩天牛(<i>Apriona germari</i>)	AAW70172.1
13	家蚕(<i>Bombyx mori</i>)	XP_037875810.1			

1.3 吡虫啉暴露和存活率统计

人工孵化获取新出房的意大利蜜蜂工蜂,实验室饲养 7 d 后用 CO₂ 麻醉,分装到笼子中进行吡虫啉暴露毒性实验。实验设置对照组(CK 组)和吡虫啉处理组(IMI 组),每个组设置 3 个生物学重复,每个重复包括 50 只供试蜜蜂。IMI 组的供试蜜蜂被禁食 3 h 后,用含吡虫啉(质量分数为 377×10⁻⁹,蜂窝环境残留剂量)的蔗糖(质量分数为 50%)溶液进行饲喂,CK 组供试蜜蜂则用含丙酮(体积分数为 0.000 2%)的蔗糖(质量分数为 50%)溶液进行饲喂。每日饲喂充足的上述蔗糖溶液和人工花粉浆饵料,整个实验进行 168 h,每 12 h 移除死亡蜜蜂并统计存活率。在吡虫啉暴露 24 h 后取样,用液氮速冻后将样品保存于-80 °C 条件下,用以测定样品组织中 Fe²⁺ 含量和 *AmTsf* 表达水平。

1.4 Fe²⁺ 含量测定

采用邻菲罗邻比色法分别测定供试意大利蜜蜂头、胸和中肠组织的 Fe²⁺ 含量,具体步骤如下:首先测定供试蜜蜂各组织的质量,然后以 $m_{\text{样品}} : V_{\text{提取液}} = 1 \text{ g} : 10 \text{ mL}$ 的比例加入以质量分数为 0.1% 的邻菲罗邻溶液与乙酸-

乙酸钠缓冲溶液按 1:1 比例配置而成的亚铁检测工作液。然后,以 70 Hz 的匀浆频率研磨 3 min,并在 4 °C、12 000 r·min⁻¹ 条件下离心 20 min,收集上清液,并吸取 200 μL 上清液,测定它在 510 nm 处的 OD 光值。标准曲线的绘制:取 27.8 mg FeSO₄·7H₂O 溶于水中,配制成浓度为 100 mmol·L⁻¹ 的 FeSO₄ 溶液;取适量该溶液,分别稀释为 0.15、0.3、0.6、0.9、1.2 和 1.5 mmol·L⁻¹ 的 FeSO₄ 溶液;取 20 μL 上述各浓度的 FeSO₄ 标准溶液,分别加入 180 μL 亚铁检测工作液,以 Fe²⁺ 浓度为 0 的孔为对照,分别测定 OD 值(λ=510 nm),绘制标准曲线。通过标准曲线求得供试蜜蜂头、胸和中肠组织的 Fe²⁺ 含量(以浓度计,单位:mmol·L⁻¹)

1.5 AmTsf 的实时荧光定量 PCR 分析

供试意大利蜜蜂的头、胸和中肠组织经组织研磨器预冷后匀浆。采用 Trizol 法提取各组组织总 RNA,测定 RNA 浓度后采用质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 质量。同时,测定 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值,分析 RNA 纯度。以总 RNA 为第一模板合成 cDNA 链,再以 cDNA 为模板、以基因 RP49 (引物 RP49-F: 5'-CGTCATATGTTGCCAACTGGT-3',引物 RP49-R: 5'-TTGAGCACGTTCAACAATGG-3') 为内参,对 AmTsf (引物 AmTsf-F: 5'-TCCGACATCGGAAAACCCAG-3',引物 AmTsf-R: 5'-CAGCCCAAGTGCATGGTTTC-3') 进行实时荧光定量 PCR 分析。所配制的 20 μL PCR 反应体系中含有 10 μL 2X SYBR Green Pro Taq HS Premix、0.4 μL 上游引物、0.4 μL 下游引物、1 μL cDNA 模板以及 8.2 μL 无酶水。PCR 反应程序如下:95 °C 下预变性 30 s;95 °C 下变性 5 s、60 °C 下退火/延伸 30 s,一共 40 个循环。数据分析采用 CFX Maestro 软件,通过 2^{-ΔΔC_t} 法计算目的基因的相对表达量。

1.6 数据统计

所有数据均用“平均值±标准误”表示。通过 GraphPad 软件对两组供试意大利蜜蜂的数据进行 t-检验分析,当 p<0.05 时,检验结果具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 AmTsf 的生物信息学特征

2.1.1 AmTsf 的理化性质

AmTsf 的分子式为 C₃₄₆₈H₅₄₇₆N₉₅₈O₁₀₆₃S₃₃, 包含 712 个氨基酸残基,相对分子质量为 78.7 kDa,等电点 pI 为 6.77,带正电荷氨基酸残基(Arg+Lys) 个数为 90,带负电荷的氨基酸残基(Asp+Glu) 个数为 89。AmTsf 的总平均亲水系数为-0.39,脂肪组氨基酸指数为 81.38,因此该蛋白为疏水性蛋白(图 1)。AmTsf 的半衰期为 30 h,不稳定系数为 36.73(<40)。

2.1.2 AmTsf 的多重序列比对

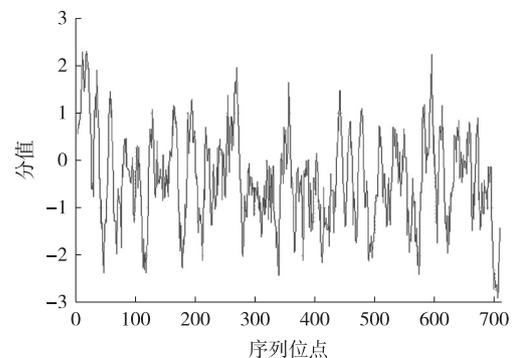
NCBI 功能位点搜索 (conserved domain database) 结合多序列同源性比对结果显示:AmTsf 氨基酸序列相对保守,与昆虫、鱼类、鸟类和哺乳类的转铁蛋白具有共同的结构特征,即 AmTsf 具有转铁蛋白家族高度保守的氨基酸残基(Ala、Cys、Asp、Leu、His、Gly 和 Pro) 以及铁结合活性位点氨基酸残基(Cys⁶²、Cys⁷¹、Asp⁸¹、Cys¹⁴⁷、His¹⁴⁸、Cys²²²、Cys²⁴³、Cys²⁸⁶ 和 Cys³⁰¹) (图 2)。

2.1.3 AmTsf 的功能域特征

AmTsf 有 20 个 N-糖基化位点、20 个 O-糖基化位点和 15 个 C-糖基化位点,此外还有 23 个 Thr 磷酸化位点(表 2,图 3)。PSORT 亚细胞定位分析结果表明 AmTsf 主要定位于细胞核(可能性为 34.8%)和线粒体(可能性为 30.4%),而定位于细胞质的可能性仅为 8.7%。AmTsf 的 N 端具有信号肽,因此它可能属于分泌型蛋白。

2.1.4 AmTsf 的结构预测及互作靶蛋白预测分析

SOPMA 在线二级结构预测分析结果显示:AmTsf 的 α-螺旋占比为 34.83%,β-折叠占比为 6.04%,无规则卷曲占比为 44.24%,C 段延伸占比为 14.89% (图 4)。SWISS-MODEL 综合 Seqidentity 值、GMQE 值、QMEAN 值预测 AmTsf 蛋白质的三级结构主要由 69 个 α-螺旋、27 个 β-折叠和许多无规则卷曲构成(图 5)。



注:高峰值表示疏水区,低峰值表示亲水区。

图 1 AmTsf 的亲/疏水性预测分析结果

Fig. 1 The prediction results of AmTsf in hydrophilic/hydrophobic

(*Bombyx*) 转铁蛋白有着比其他昆虫转铁蛋白更相近的亲缘关系。

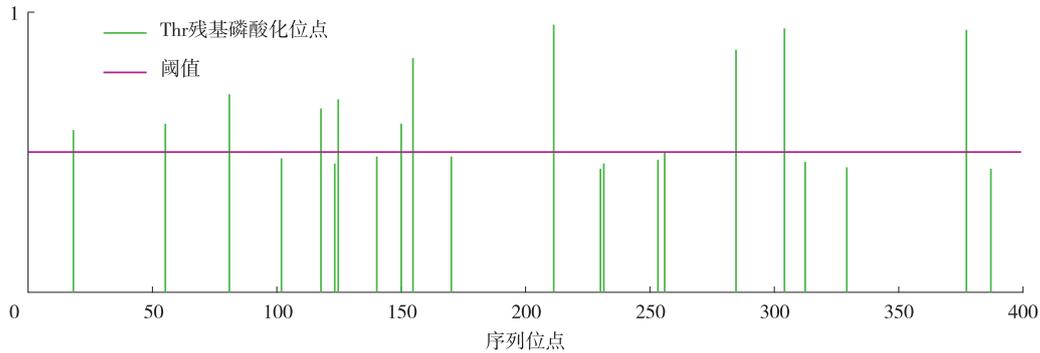


图 3 AmTsf 的磷酸化位点预测分析结果

Fig. 3 Prediction analysis result of phosphorylation site of AmTsf

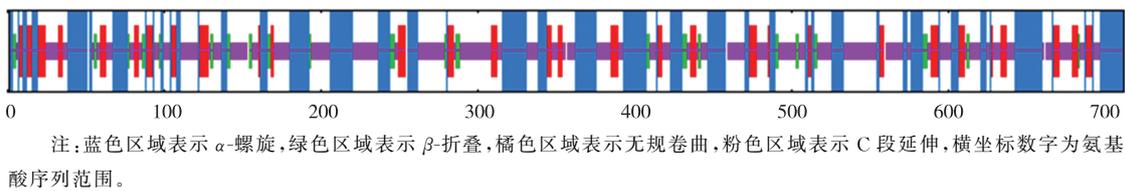


图 4 AmTsf 的二级结构分析

Fig. 4 Secondary structure analysis of AmTsf

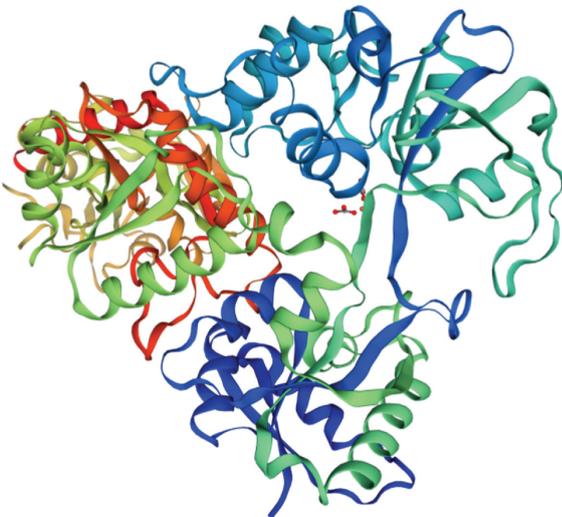
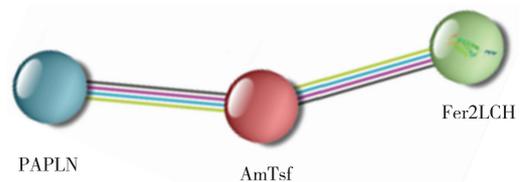


图 5 AmTsf 三级结构预测

Fig. 5 3D structural model prediction of AmTsf



注:图中相互作用蛋白之间不同颜色的线条表示证实该相互作用存在的不同的途径,其中:紫线代表实验已证明的基因,黑线代表共表达的基因,绿线代表相近的基因,黄线代表从文本挖掘证据证明的基因;线的粗细表示相互作用的置信预测度。两种蛋白质之间的线条越丰富表示该预测可靠性越高。

图 6 AmTsf 相互作用靶蛋白的预测

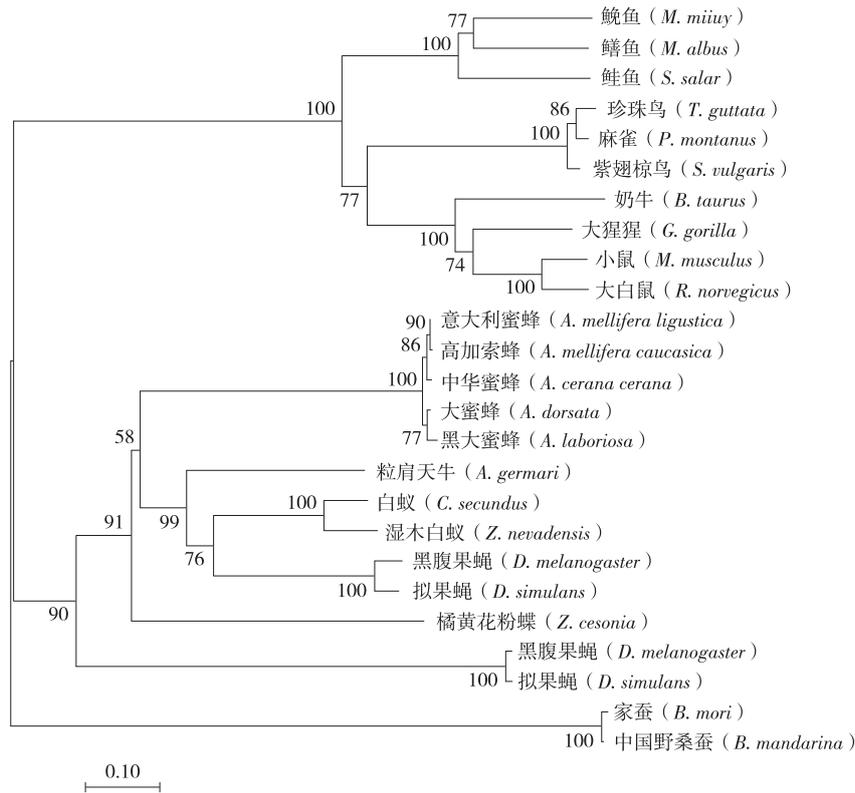
Fig. 6 Prediction of target proteins interacting with AmTsf

2.2 吡虫啉暴露下意大利蜜蜂的存活率

图 8 显示:1) 在整个吡虫啉暴露实验过程中,CK 组供试蜜蜂的存活状况较为稳定,在实验结束(吡虫啉暴露 168 h 后)时的存活率为 92%,为自然响应频率。2) IMI 组在吡虫啉暴露 24 h 后就开始出现大量供试蜜蜂死亡的现象;随着吡虫啉在供试蜜蜂体内的代谢,该组蜜蜂的死亡率逐渐降低且在吡虫啉暴露处理 108 h 后存活率变化基本趋于平缓,蜜蜂个体不再大量死亡。在实验结束时,IMI 组供试蜜蜂存活率仅为 26%。

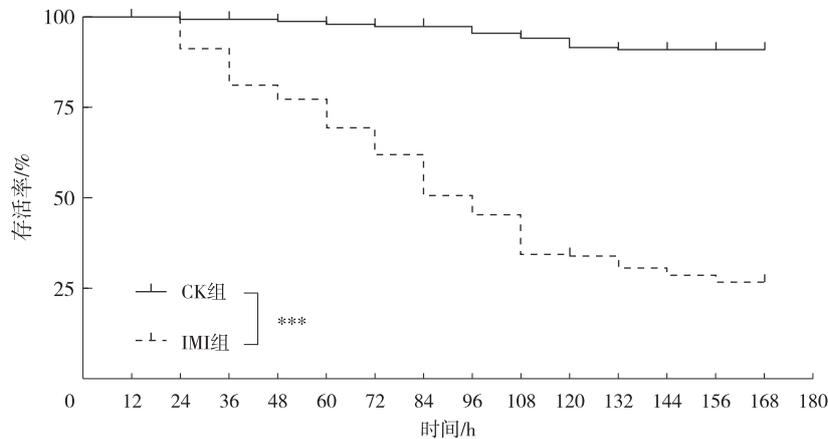
2.3 吡虫啉暴露下意大利蜜蜂不同组织的 Fe^{2+} 含量

吡虫啉暴露实验中供试意大利蜜蜂头、胸和中肠组织的 Fe^{2+} 含量检测结果如图 9 所示。与 CK 组相比,IMI 组的供试蜜蜂头、胸和中肠组织中的 Fe^{2+} 含量在吡虫啉暴露 24 h 后均有明显增加,且组间差异均具有统计学意义($p < 0.05$)。无论是 CK 组还是 IMI 组,供试蜜蜂头部和胸部的 Fe^{2+} 含量均明显比中肠组织的 Fe^{2+} 含量更高,与后者的差异均有统计学意义($p < 0.05$)。



注:各物种转铁蛋白的 GenBank 登录见表 1。

图 7 基于邻接法构建 *AmTsf* 和其他物种转铁蛋白的氨基酸序列的系统进化树
Fig. 7 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of *AmTsf* and transferrins of other species constructed using neighbor-joining method



注:“***”表示两组供试意大利蜜蜂的存活率差异在 $p < 0.001$ 水平上有统计学意义。

图 8 吡虫啉暴露下意大利蜜蜂的存活率
Fig. 8 Survival rate of *A. mellifera ligustica* exposed to imidacloprid

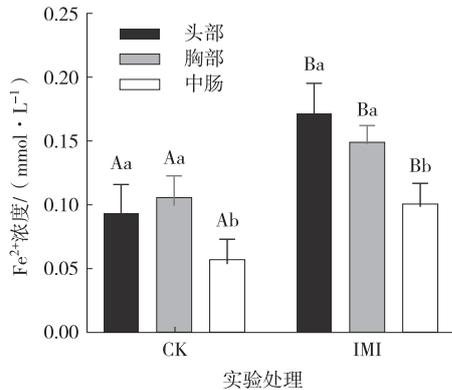
2.4 吡虫啉暴露下 *AmTsf* 在意大利蜜蜂不同组织的表达

实时荧光定量 PCR 结果显示(图 10):与 CK 组相比,IMI 组供试蜜蜂头、胸和中肠组织的 *AmTsf* 的表达在吡虫啉暴露 24 h 后均有明显上调,且组间差异均具有统计学意义($p < 0.05$)。与中肠组织相比,IMI 组供试蜜蜂头部和胸部的 *AmTsf* 的表达上调幅度更大,特别是 IMI 组供试蜜蜂胸部组织 *AmTsf* 的相对表达量与 CK 组相比大约增加了 1 倍。

3 讨论

转铁蛋白家族是一类由保守氨基酸残基和铁结合功能定义的单链糖基化蛋白^[18]。本研究通过多重序列比

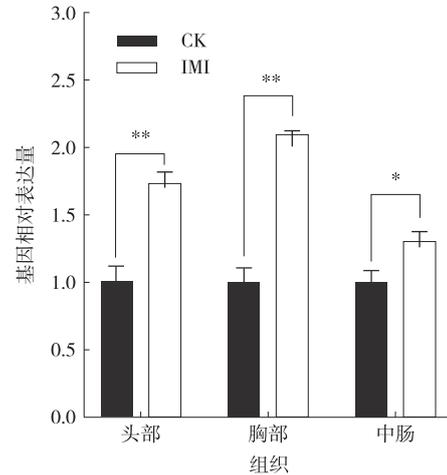
对发现,AmTsf 具有多数物种转铁蛋白的多个保守氨基酸残基,包括 Cys 残基和与铁结合的 Asp、His 残基^[19-21]。在系统进化上,AmTsf 与昆虫的转铁蛋白聚为 1 支,尤其与中华蜜蜂转铁蛋白具有高度的亲缘关系,这表明 AmTsf 属于转铁蛋白家族成员。亚细胞定位预测结果显示 AmTsf 主要在细胞核和线粒体中行使功能,这与其他物种转铁蛋白家族成员的细胞定位特征一致。此外,蛋白互作网络预测结果表明,AmTsf 与铁代谢调控蛋白如铁蛋白 Fer2LCH 有密切的互作关系,推测它们可能共同参与铁稳态的调节过程。总之,AmTsf 具有转铁蛋白家族成员典型的序列和结构特征,可将它归为转铁蛋白家族成员。



注:不同大写字母表示同一组织内 Fe²⁺ 含量的组间差异在 $p < 0.01$ 水平上具有统计学意义,不同小写字母表示同一组内不同组织的 Fe²⁺ 含量差异在 $p < 0.05$ 水平上具有统计学意义。

图 9 吡虫啉暴露对意大利蜜蜂体内 Fe²⁺ 含量的影响

Fig. 9 Effects of imidacloprid exposure on Fe²⁺ content in *A. mellifera ligustica*



注:“*”“**”分别表示数据的组间差异在 $p < 0.05$ 和 $p < 0.01$ 水平上有统计学意义。

图 10 AmTsf 在不同组织中的表达

Fig. 10 Expression of AmTsf in different tissues

作为一种毒性应激因子,吡虫啉会损害蜜蜂的行为能力和营养代谢,严重时 would 触发氧化应激,甚至导致蜜蜂死亡^[22]。He 等人^[6]发现,半致死剂量的吡虫啉暴露会诱导蜜蜂活性氧和 Fe²⁺ 出现过剩情况,从而触发严重的氧化应激并导致蜜蜂死亡。在本研究中,意大利蜜蜂在环境剂量(质量分数为 377×10^{-9})的吡虫啉暴露 24 h 后开始大量死亡,直至吡虫啉暴露 108 h 后供试蜜蜂的存活率变化才开始平缓。在整个吡虫啉暴露实验过程中,与 CK 组相比,IMI 组供试意大利蜜蜂头部、胸部和中肠组织的 Fe²⁺ 含量因吡虫啉暴露而明显增加。该结果与 He 等人^[6]的研究结果一致。这表明即使是环境剂量的吡虫啉也会导致蜜蜂出现铁过载和铁稳态失衡,提示在农业生产中人们应高度重视低剂量吡虫啉对蜜蜂造成的伤害。

转铁蛋白是铁代谢调控中的核心蛋白,通过结合和运输过剩的 Fe²⁺ 来实现对组织铁平衡的调节^[23]。在本研究中,与 CK 组相比,在吡虫啉暴露导致 Fe²⁺ 过剩的 IMI 组供试意大利蜜蜂组织中 AmTsf 的表达也明显上调。这一结果与最近有关昆虫转铁蛋白参与对杀虫剂的耐受性的研究报道一致,例如:在杀虫剂溴氰菊酯暴露下,淡色库蚊(*Culex pipiens pallens*)中转铁蛋白基因上调表达以参与淡色库蚊对菊酯类杀虫剂的抗性^[24-25];植物次生化学物质 2-十三酮处理棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)24 h 后,该物种的转铁蛋白基因的表达明显上调;转铁蛋白基因的 RNA 干扰也明显增加了海灰翅夜蛾(*Spodoptera littoralis*)幼虫对 2-十三酮的敏感性^[26];淡色库蚊的转铁蛋白基因在耐氯氰菊酯菌株中高水平表达,并可能给这些菌株赋予某些杀虫剂抗性^[27-28]。因此,本研究中 AmTsf 在吡虫啉暴露后表达明显上调,这说明该基因积极响应了吡虫啉对蜜蜂的毒性伤害。大量研究已经证实,机体 Fe²⁺ 过剩会通过 Fenton 反应产生过剩的活性氧从而导致氧化应激^[20,29]。在这种胁迫情况下,机会会通过转铁蛋白结合和运走过剩的 Fe²⁺,从而避免因铁过剩导致的氧化应激伤害。因此,本研究中吡虫啉暴露在导致意大利蜜蜂组织 Fe²⁺ 过剩的同时,AmTsf 的表达也同步上升,从而有助于合成更多 AmTsf 来缓解吡虫啉引发的铁过载危害,并增强自身对吡虫啉的抗性。

值得一提的是,本研究发现在吡虫啉暴露下,与头部和中肠相比,AmTsf 在意大利蜜蜂胸部组织的表达水平最高。由于昆虫的胸部富含血淋巴,因此这一结果与近些年来报道的关于转铁蛋白基因在柞蚕(*Antheraea mylitta*)血淋巴中的表达水平比在脂肪体、中肠和丝腺中的表达水平要高得多的现象一致^[22]。其中原因很可能与胁迫条件下铁过载组织中的 Fe²⁺ 会被转铁蛋白结合且经血淋巴运送到脂肪体等机体其他组织并以此降低铁

过载带来的危害有关^[26,30-31]。

综上所述,本研究发​​现吡虫啉暴露导致意大利蜜蜂组织中 Fe^{2+} 过剩,同时诱导 *AmTsf* 表达出现明显上调。*AmTsf* 可能通过结合并运走组织中过剩的铁,潜在地参与意大利蜜蜂对吡虫啉毒性的耐受。尽管如此,*AmTsf* 在意大利蜜蜂抵抗吡虫啉中的具体作用机制如何,仍需通过 RNAi 等处理和​​在蛋白质水平上的研究来获得更确凿的证据。

参考文献:

- [1] DENHOLM I, ROWLAND M W. Tactics for managing pesticide resistance in arthropods: theory and practice[J]. Annual Review of Entomology, 1992, 37: 91-112.
- [2] 龚瑞忠, 陈锐, 陈良燕. 吡虫啉对环境生物的毒性与安全性评价[J]. 农药科学与管理, 1999, 20(3): 12-16.
GONG R Z, CHEN R, CHEN L Y. Toxicity and safety evaluation of imidacloprid on environmental organisms[J]. Pesticide Science and Management, 1999, 20(3): 12-16.
- [3] WU-SMART J, SPIVAK M. Sub-lethal effects of dietary neonicotinoid insecticide exposure on honey bee queen fecundity and colony development[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 32108.
- [4] DECOURTYE A, ARMENGAUD C, RENOUE M, et al. Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.)[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2004, 78(2): 83-92.
- [5] TESOVIK T, ZORC M, RISTANI Ć M, et al. Exposure of honey bee larvae to thiamethoxam and its interaction with *Nosema ceranae* infection in adult honey bees[J]. Environmental Pollution, 2020, 256: 113443.
- [6] HE B, LIU Z H, WANG Y D, et al. Imidacloprid activates ROS and causes mortality in honey bees (*Apis mellifera* L.) by inducing iron overload[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2021, 228: 112709.
- [7] DUNKOV B, GEORGIEVA T. Insect iron binding proteins: insights from the genomes[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2006, 36(4): 300-309.
- [8] MUÑOZ M, VILLAR I, GARCÍA-ERCE J A. An update on iron physiology[J]. World Journal of Gastroenterology, 2009, 15(37): 4617-4626.
- [9] HOWER V, MENDES P, TORTI F M, et al. A general map of iron metabolism and tissue-specific subnetworks[J]. Molecular Biosystems, 2009, 5(5): 422-443.
- [10] KELL D B. Iron behaving badly: inappropriate iron chelation as a major contributor to the aetiology of vascular and other progressive inflammatory and degenerative diseases[J]. BMC Medical Genomics, 2009, 2: 2.
- [11] HALLIWELL B, GUTTERIDGE J M C. Free radicals in biology and medicine[M]. 5th edition. USA: Oxford University Press, 2015.
- [12] LAMBERT L A. Molecular evolution of the transferrin family and associated receptors[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2012, 1820(3): 244-255.
- [13] GRAÇA-SOUZA A V, MAYA-MONTEIRO C, PAIVA-SILVA G O, et al. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2006, 36(4): 322-335.
- [14] ONG S T, HO J Z S, HO B, et al. Iron-withholding strategy in innate immunity[J]. Immunobiology, 2006, 211(4): 295-314.
- [15] COLLIN H, MEISTERTZHEIM A-L, DAVID E, et al. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, Thunberg 1793, to pesticide exposure under experimental conditions[J]. Journal of Experimental Biology, 2010, 213(23): 4010-4017.
- [16] LAMBERT L A, PERRI H, MEEHAN T J. Evolution of duplications in the transferrin family of proteins[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2005, 140(1): 11-25.
- [17] FERREIRA C, BUCCHINI D, MARTIN M-E, et al. Early embryonic lethality of H ferritin gene deletion in mice[J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(5): 3021-3024.
- [18] LAMBERT L A, PERRI H, HALBROOKS P J, et al. Evolution of the transferrin family: conservation of residues associated with iron and anion binding[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2005, 142(2): 129-141.
- [19] TIKLOVÁ K, SENTI K-A, WANG S Q, et al. Epithelial septate junction assembly relies on melanotransferrin iron binding and endocytosis in *Drosophila*[J]. Nature Cell Biology, 2010, 12: 1071-1077.
- [20] GEISER D L, WINZERLING J J. Insect transferrins: multifunctional proteins[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2012, 1820(3): 437-451.
- [21] BALIERA K V B, MAZZO M, BIZZERA P F V, et al. Imidacloprid-induced oxidative stress in honey bees and the antioxidant

- action of caffeine[J]. *Apidologie*, 2018, 49(5): 562-572.
- [22] DUTTA A, DANDAPAT J, MOHANTY N. First report on transferrin in the silkworm, *Antheraea mylitta*, with a putative role in antioxidant defense: insights from proteomic analysis and immunodetection[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2019, 233: 23-34.
- [23] 谭文彬, 王霄, 魏继波, 等. 转铁蛋白基因在三种淡色库蚊体内表达量的比较分析[J]. *中国热带医学*, 2010, 10(9): 1050-1051.
TAN W B, WANG X, WEI J B, et al. Comparison of transferrin gene expression in three species of *Culex pipiens pallens*[J]. *China Tropical Medicine*, 2010, 10(9): 1050-1051.
- [24] 谭文彬, 王霄, 程鹏, 等. 中华按蚊不同株转铁蛋白基因表达水平的比较研究[J]. *济宁医学院学报*, 2013, 36(4): 234-238.
TAN W B, WANG X, CHENG P, et al. Comparative study of transferrin gene expression level from different strains of *Anopheles sinensis*[J]. *Journal of Jining Medical University*, 2013, 36(4): 234-238.
- [25] ZHANG L, SHANG Q, LU Y, et al. A transferrin gene associated with development and 2-tridecanone tolerance in *Helicoverpa armigera*[J]. *Insect Molecular Biology*, 2015, 24(2): 155-166.
- [26] HAMAMA H M, HUSSEIN M, FAHMY A R, et al. A transferrin fragment isolated from the egyptian cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) in response to two commercial bioinsecticides[J]. *Egyptian Journal of Pest Control*, 2016, 26(1): 59-64.
- [27] TAN W B, WANG X, CHENG P, et al. Cloning and overexpression of transferrin gene from cypermethrin-resistant *Culex pipiens pallens*[J]. *Parasitology Research*, 2012, 110: 939-959.
- [28] ZHOU G L, VELASQUEZ L S, GEISER D L, et al. Differential regulation of transferrin 1 and 2 in *Aedes aegypti*[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 39(3): 234-244.
- [29] HARIZANOVA N, GEORGIEVA T, DUNKOV B C, et al. *Aedes aegypti* transferrin, gene structure, expression pattern, and regulation[J]. *Insect Molecular Biology*, 2005, 14(1): 79-88.
- [30] HOU Y, ZOU Y, WANG F, et al. Comparative analysis of proteome maps of silkworm hemolymph during different developmental stages[J]. *Proteome Science*, 2010, 8: 45.
- [31] WU S F, LI J, ZHANG Y, et al. Transferrin family genes in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) in response to three insecticides[J]. *Journal of Economic Entomology*, 2018, 111(1): 375-381.

Animal Sciences

Expression Analysis of Transferrin gene *AmTsf* of *Apis mellifera ligustica* to Imidacloprid Stress

QIN Qiqian, CHEN Lanchun, WANG Fei, ZHANG Yi,
ZENG Huini, WANG Yuedi, XU Jinshan, LI Zhi

(Chongqing Key Laboratory of Vector Insects, Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, College of Life Sciences,
Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: [Purposes] To identify transferrin of *Apis mellifera ligustica* (*AmTsf*) by bioinformatics, and to analyze the role of *AmTsf* in tolerance to toxicity of insecticide imidacloprid. [Methods] The amino acid sequence characteristics and domain composition of *AmTsf* were analyzed by multiple sequences alignment. Online tools predict the structure, cellular localization, interacting protein networks and biological functions of the protein. Phylogenetic tree was constructed to analyze the phyloclassification and evolutionary relationship of the protein. The response characteristics and functions of *AmTsf* to insecticide imidacloprid toxicity in bees were analyzed by real-time quantitative PCR combined with iron homeostasis. [Findings] Bioinformatics analysis predicted that *AmTsf* protein was hydrophobic, consisting of 712 amino acid residues, with a molecular weight of 78.7 kDa and pI of 6.77. A conserved amino acid residue of the signal peptide and transferrin family, primarily located in the nucleus and mitochondria. Experimental analysis found that exposure to environmental concentrations of imidacloprid caused mass bee deaths. Compared with the control group, 24 h exposure to imidacloprid resulted in excess iron ions in the head, thorax and midgut of bees. Importantly, the transferrin encoding gene *AmTsf*, which is closely related to the regulation of iron homeostasis, was synchronously up-regulated in all tissues with the increase of iron ($p < 0.05$). [Conclusions] The results suggest that *AmTsf* may actively respond to imidacloprid toxicity tolerance in honeybees by regulating iron homeostasis.

Keywords: transferrin; bioinformatics analysis; imidacloprid; *Apis mellifera ligustica*