

铁硫簇组装蛋白在意大利蜜蜂耐受吡虫啉毒害中的应答分析^{*}

何彪, 王悦弟, 秦启倩, 陈兰春, 段佳欣, 许金山, 李治

(重庆师范大学 生命科学学院, 重庆 401331)

摘要:【目的】用生物信息学方法鉴定意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*)铁硫簇组装蛋白(AmIscA),分析它在意大利蜜蜂工蜂耐受杀虫剂吡虫啉毒性中的应答特征。【方法】多重序列比对分析 AmIscA 的氨基酸序列特征和结构域组成;在线预测该蛋白的结构以及互作蛋白网络,预测它的生物学功能;构建系统进化树分析该蛋白的分类和进化关系;构建半致死模型,实时荧光定量 PCR 分析 *AmIscA* 基因在工蜂耐受杀虫剂吡虫啉毒性 0~48 h 中的表达特征。【结果】*AmIscA* 基因 cDNA 序列全长 514 bp,编码 130 个氨基酸残基,计算出 AmIscA 的相对分子质量为 14.1 kDa, pI 为 9.06。AmIscA 为疏水性蛋白,具有铁硫簇组装蛋白保守的半胱氨酸和天冬氨酸残基,并且不具备信号肽,定位于线粒体中。经 48 h 的半致死剂量吡虫啉暴露后的工蜂存活率为 45%±5%。*AmIscA* 基因表达受吡虫啉胁迫而上调,且呈先升高后下降趋势。【结论】AmIscA 积极响应吡虫啉导致的毒性胁迫,可能通过抗氧化作用潜在地参与了意大利蜜蜂对吡虫啉毒性的耐受。

关键词:铁硫簇组装蛋白;吡虫啉;半致死;意大利蜜蜂

中图分类号:Q966

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2021)04-0021-09

铁硫簇由无机铁和硫构成,是生物学中最常见的一种氧化还原中心类型^[1]。铁硫簇作为多种蛋白的辅助因子,通过电子传递广泛地参与细胞能量的转移、基因表达调控、铁稳态、氧化应激反应等方面的调节^[2]。铁硫簇的组装合成由氮固定系统、铁硫簇形成系统和硫利用因子系统共同完成^[3]。在铁硫簇形成系统中,L-半胱氨酸首先激活铁硫簇组装蛋白(Iron-sulfur cluster assembly protein, IscA)中的铁中心。然后半胱氨酸脱硫酶(IscS)以 L-半胱氨酸-铁络合物为底物生成 IscS-S-Fe。最终, IscS 中的 S-Fe 经蛋白质相互作用而转移到 IscA 中进行铁硫簇的组装^[4]。其中, IscA 编码铁硫簇支架的一个组成部分,是一种铁结合蛋白,为铁硫簇组装酶(IscU)中瞬时铁硫簇的组装提供铁,负责[2Fe-2S]和[4Fe-4S]团簇的合成和成熟,在铁硫簇的组装中起着至关重要的作用^[5-7]。IscA 广泛地参与了生物体铁稳态的调节^[8-9]、基因表达的调控、线粒体铁硫蛋白成熟过程和线粒体功能稳定性的维持^[10]。不仅如此, IscA 在能量代谢中能够在细胞氧化呼吸链与光合作用中起到电子传递的作用,还能在细菌的营养代谢中为固氮所需的蛋白提供电子传递^[11-15]。

有关 IscA 在昆虫中的研究鲜有报道,仅发现该蛋白作为磁感应原件参与昆虫的生物导航的功能,例如 IscA 的编码基因表达在褐飞虱(*Nilaparvata lugens*)的迁移过程中上调^[16]。蜜蜂是重要的媒介昆虫,对保障农业生产和维持生态系统稳定起着至关重要的作用;蜂产品也具有重要的经济价值^[17-19]。然而,由于杀虫剂的广泛使用,蜜蜂种群数量严重下降。吡虫啉是一种典型的新烟碱类杀虫剂,可通过破坏神经系统信号传导而杀灭害虫^[19],同时也对非靶标昆虫蜜蜂造成严重危害。在吡虫啉暴露下,蜜蜂神经系统信号无法正常传导而麻痹死亡^[20]。然而,蜜蜂作为一种在生态位及经济上都十分重要的资源昆虫,有关它的 IscA 研究资料却十分匮乏。在蜜蜂应对杀虫剂胁迫中, IscA 有何作用罕有报道。本研究对意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*)铁硫簇组装蛋白(AmIscA)的功能位点、结构基团、系统进化等生物信息学特征进行了分析鉴定,并进一步通过构建吡虫啉半致死剂量(LD₅₀)模型,采用实时荧光定量 PCR 分析了 *AmIscA* 基因在意大利蜜蜂工蜂耐受吡虫啉毒性胁迫

^{*} 收稿日期:2021-01-12 修回日期:2021-03-09 网络出版时间:2021-06-30 10:23

资助项目:现代农业产业技术体系建设专项资金(No. CARS-44-KXJ21);国家自然科学基金(No. 31101770; No. 31302037);重庆市教育委员会科学技术研究项目(No. KJ1703051);重庆市前沿与应用基础研究计划项目(No. cstc2014jcyjA80039; No. cstc2015jcyjA80014);重庆师范大学自然科学基金项目(No. 13XLB009)

第一作者简介:何彪,男,研究方向为生物化学与分子生物学, E-mail: 455457471@qq.com; 通信作者:李治,男,副教授,博士, E-mail: lizhicnu@gmail.com

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20210630.0902.010.html>

过程中的应答特征,以便为探明蜜蜂耐受杀虫剂的分子机制提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料及主要试剂

研究用意大利蜜蜂由重庆师范大学生命科学学院媒介昆虫重点实验室养殖。饲养温度为 25~27 ℃,相对湿度为 70%~90%,日粮为质量分数为 50%的蔗糖溶液加花粉。实验用试剂 Trizol、氯仿、异丙醇、DEPC 水、cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒等购于 TaKaRa 公司,EvaGreen 2X qPCR MasterMix 购于 ABM 公司。

1.2 AmIscA 的氨基酸序列特征和系统进化分析

AmIscA 的氨基酸序列(GenBank 登录号:XP_624993.1)下载自 NCBI。使用 NCBI 蛋白保守区数据库预测 AmIscA 的保守功能结构域;通过线上程序 ProtParam(<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>)分析该蛋白的组分和理化性质;使用 Portscales(<http://web.expasy.org/protscale/>)在线分析该蛋白的亲、疏水性质;利用在线程序 TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)预测该蛋白的跨膜结构;通过 PRED-TMBB(<http://biophysics.biol.uoa.gr/PRED-TMBB/input.jsp>)在线预测分析该蛋白跨膜区域所对应的疏水区;使用 SignalP(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)分析该蛋白是否为分泌型蛋白;通过 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)在线预测该蛋白的二级结构;使用 Phyre2(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)在线预测该蛋白的三级结构;运用 PSORT II (<http://psort.hgc.jp/form2.html>)在线预测该蛋白的亚细胞定位特征;利用 STRING(<https://string-db.org/>)在线预测蛋白互作网络。此外,在 NCBI 中下载不同物种(表 1)的 IscA 氨基酸序列与 AmIscA 在 MUSCLE 软件进行氨基酸序列多重比对,分析保守氨基酸序列,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 IscA 的基因库登记号

Tab. 1 GenBank accession numbers of IscA from typical species

编号	物种	Genbank 登录号	编号	物种	Genbank 登录号
1	苹果实蝇(<i>Rhagoletis pomonella</i>)	XP_036338887.1	19	阿德利企鹅(<i>Pygoscelis adeliae</i>)	XP_009326468.1
2	斯蒂芬斯按蚊(<i>Anopheles stephensis</i>)	XP_035906927.1	20	短嘴鸦(<i>Corvus brachyrhynchos</i>)	XP_017595953.1
3	锈腹实蝇(<i>Bactrocera latifrons</i>)	XP_018782789.1	21	安氏蜂鸟(<i>Calypte anna</i>)	XP_030323201.1
4	脐橙螟(<i>Amelois transitella</i>)	XP_013187476.1	22	酿酒酵母(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	NP_010553.3
5	柑橘凤蝶(<i>Papilio xuthus</i>)	XP_013177750.1	23	脑炎原虫(<i>Encephalitozoon cuniculi</i>)	NC_003237.1
6	菜粉蝶(<i>Pieris ropae</i>)	XP_022128099.1	24	恶性疟原虫(<i>Plasmodium falciparum</i>)	XP_001348692.1
7	苜蓿蚜(<i>Aphis craccivora</i>)	KAF0711854.1	25	隐孢子虫(<i>Cryptosporidium parvum</i>)	XP_627477.1
8	豆荚草盲蝽(<i>Lygus hesperus</i>)	JAG37073.1	26	醋杆菌(<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>)	WP_012227375.1
9	麦双尾蚜(<i>Diuraphis noxia</i>)	XP_015376588.1	27	束毛藻属(<i>Trichodesmium erythraeum</i>)	WP_011610323.1
10	白蚁(<i>Cryptotermes secundus</i>)	XP_023721314.1	28	脱硫脱硫弧菌(<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>)	WP_014321038.1
11	德国小蠊(<i>Blattella germanica</i>)	PSN34371.1	29	玉米(<i>Zea mays</i>)	XP_008675464.1
12	湿木白蚁(<i>Zootermopsis nevadensis</i>)	XP_021939398.1	30	拟南芥(<i>Arabidopsis thaliana</i>)	NP_201373.1
13	尼洛虫(<i>Arvicanthus niloticus</i>)	NC_047669.1	31	切叶蜂(<i>Megachile rotundata</i>)	XP_012148627.1
14	非洲象(<i>Loxodonta africana</i>)	NW_003573453.1	32	中华蜜蜂(<i>Apis cerana cerana</i>)	XP_016917087.1
15	人(<i>Homo sapiens</i>)	NC_000009.12	33	光肩星天牛(<i>Anoplophora glabripennis</i>)	XP_018574160.1
16	多氏花鱒鱼(<i>Poecilia formosa</i>)	XP_007557953.1	34	黑腹果蝇(<i>Drosophila melanogaster</i>)	NP_649840.1
17	鳊浪白鱼(<i>Anabarilius grahami</i>)	ROI27803.1	35	意大利蜜蜂(<i>Apis mellifera ligustica</i>)	XP_624993.1
18	克氏棘口线虫(<i>Etheostoma cragini</i>)	XP_034726685.1			

1.3 吡虫啉处理和存活统计

人工孵化获取新出房工蜂,实验室饲养 7 d 后用 CO₂ 麻醉,并分装到 24 孔细胞培养板中进行吡虫啉毒性实

验。设置对照组和吡虫啉 LD₅₀ 处理组,每个组设 3 个生物学重复,1 个重复有 24 只蜜蜂,共计 72 只蜜蜂。吡虫啉 LD₅₀ 处理组的蜜蜂首先禁食饥饿 3 h,然后以每只 2 μL 的剂量人工饲喂 LD₅₀ 吡虫啉溶液;该溶液用质量分数为 50% 的蔗糖溶液配制,吡虫啉设计终质量浓度为 68 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。对照组的蜜蜂饲喂每只 2 μL 的丙酮溶液;该溶液用质量分数为 50% 的蔗糖溶液配制,丙酮的体积分数为 0.136%。将 15 min 内吃完上述溶液的蜜蜂,每只再补足 8 μL 质量分数为 50% 的蔗糖溶液作为日粮。饲喂完成后,48 h 内每过 12 h 统计蜜蜂存活率并取样,在此期间保证蜜蜂饮水和食物充足。两组蜜蜂的生存曲线采用 Graph Pad 软件进行绘制,以 Log-rank (Mantel-Cox) test 进行统计分析,当 $p < 0.05$ 时,两者生存曲线有统计学意义上的差异。

1.4 吡虫啉暴露下 *AmIscA* 基因的荧光定量 PCR 分析

蜜蜂样本经液氮预冷并研磨,采用 Trizol 法提取整只蜜蜂总 RNA,测定 RNA 浓度,并通过质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析和 OD260 与 OD280 比值检测 RNA 纯度。以总 RNA 为模板合成第一链 cDNA。以 cDNA 为模板,RP49 基因(引物 RP49-F:5'-CGTCATATGTTGCCAACTGGT-3',引物 RP49-R:5'-TTGAGC-ACGTTCAACAATGG-3')为内参,对 *AmIscA* 基因(引物 *AmIscA*-F:5'-GCGCTGCGCTTACTTTAACA-3',引物 *AmIscA*-R:5'-ACATCCTCGTTGTTTCACACT-3')进行实时荧光定量 PCR 分析。构建 PCR 反应体系如下:依次加入 10 μL SYBR Premix E $\times$ Taq,1 μL 质量浓度为 100 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的 cDNA、浓度为 0.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的上下游引物各 1 μL ,最后加入 7 μL 双蒸水使反应体系总体积为 20 μL 。PCR 程序分为两步:第 1 步为扩增程序,即 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s,共 40 个循环的 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 5 s、68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s。第 2 步为溶解曲线分析:从 60 $^{\circ}\text{C}$ 至 95 $^{\circ}\text{C}$ 每 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 读数 1 次。整个反应程序在 Bio-Rad CFX96 荧光定量 PCR 仪上进行。*AmIscA* 基因的实时荧光定量 PCR 表达分析中对照组和吡虫啉 LD₅₀ 处理组各设有 3 个生物学重复,每个生物学重复设有 3 个技术重复。通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 *AmIscA* 基因的相对表达量,采用 t -检验分析两组蜜蜂的这一指标的差异,当 $p < 0.05$ 时,检验结果具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 *AmIscA* 的生物信息学特征

2.1.1 *AmIscA* 的理化性质 *AmIscA* 基因共编码 130 个氨基酸残基,由此计算出 *AmIscA* 的相对分子质量为 14.1 kDa, pI 为 9.06,带负电荷氨基酸残基(天冬氨酸+谷氨酸)为 15 个,带正电荷氨基酸残基(精氨酸+赖氨酸)为 20 个。图 1 显示:在 *AmIscA* 的氨基酸序列中第 10,23,29,50 和 83 位氨基酸残基处表现出最强疏水性,总平均亲水系数预测为 -0.061,说明该蛋白总体上表现疏水性,为疏水性蛋白。

2.1.2 *AmIscA* 的多重序列比对分析 NCBI 功能位点搜索 (Conserved domain database) 结合多重序列同源性比对结果(图 2)可知,*AmIscA* 属于真核生物 Fe-S biosyn 家族成员,与哺乳动物、鱼类、鸟类、昆虫、真菌、植物、细菌及原虫的 *IscA* 在氨基酸序列特征上相对保守。*AmIscA* 具有 *IscA* 家族的保守半胱氨酸和天冬氨酸残基,以及典型的 N-糖基化位点与磷酸化位点,但缺乏 2 个关键功能位点“ACGD”。

2.1.3 *AmIscA* 的功能域特征 磷酸化位点及糖基化位点预测 *AmIscA* 有 4 个 N-糖基化位点,位于第 58,113,114 和 116 位氨基酸残基;有 6 个 O-糖基化位点,位于第 3,4,10,

22,27 和 31 位氨基酸残基(图 2)。此外,该蛋白质中的丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸残基磷酸化位点共计 15 个,其中丝氨酸残基磷酸化位点位于第 3,4,31,62 和 72 位;苏氨酸残基磷酸化位点位于第 10,22,27,64,98 和 105 位;酪氨酸残基磷酸化位点位于第 63,67 和 102 位(图 2)。以上预测结果表明,*AmIscA* 具有高酶活性特征,有利于有机体中的酶促反应活动进行,可能在信号传递和能量代谢等生物功能上发挥着较大作用^[18]。此外,在线程序 TMHMM 预测 *AmIscA* 有 5 个跨膜结构域,分别位于氨基酸序列第 22~32 位、第 47~55 位、第 61~67 位、第 83~95 位和第 101~113 位氨基酸残基之间。结合用在线软件 PRED-TMBB 分析发现,上述跨膜区域对应于 *AmIscA* 相应的疏水区(图 3)。PSORT II Prediction 在线进行蛋白的亚细胞定位预测发现,*AmIscA* 为线粒体定位,在线粒体内发挥作用。SignalP 预测 *AmIscA* 的 N 端不具有信号肽,说明它不属于分泌型蛋白。

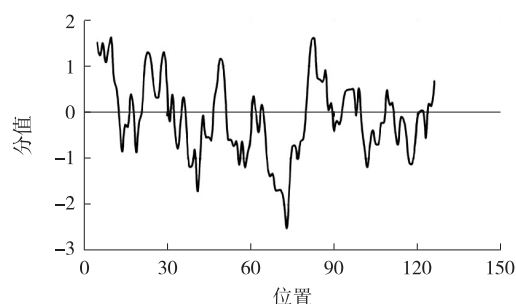
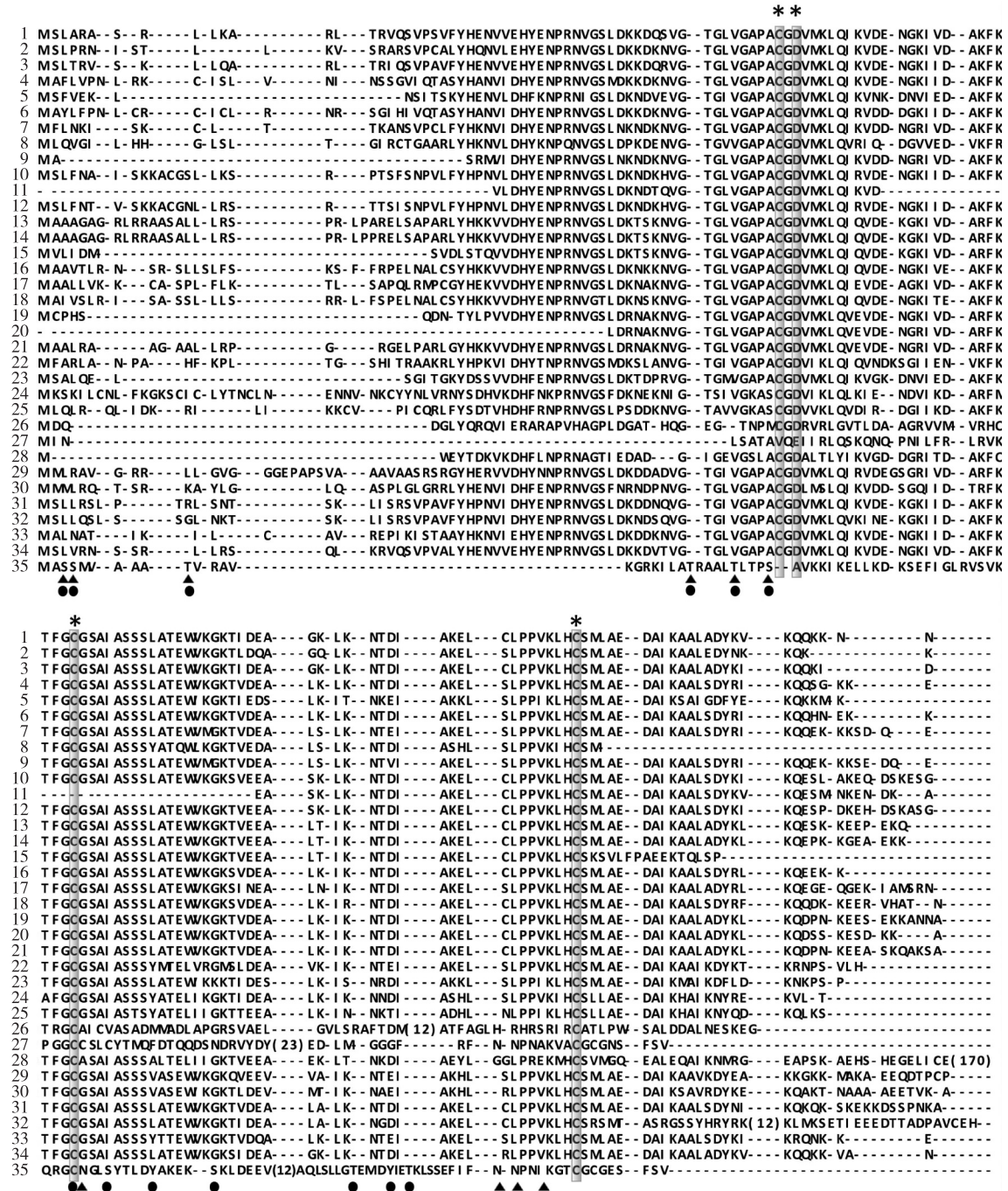


图1 *AmIscA* 的疏水性分析

Fig.1 Hydrophobicity analysis of *AmIscA*



注：“▲”为 N-糖基化位点，“●”为磷酸化位点，“*”为铁硫簇组装蛋白的保守半胱氨酸和天冬氨酸残基。编号 1~35 对应的物种学名及 GenBank 登录号见表 1

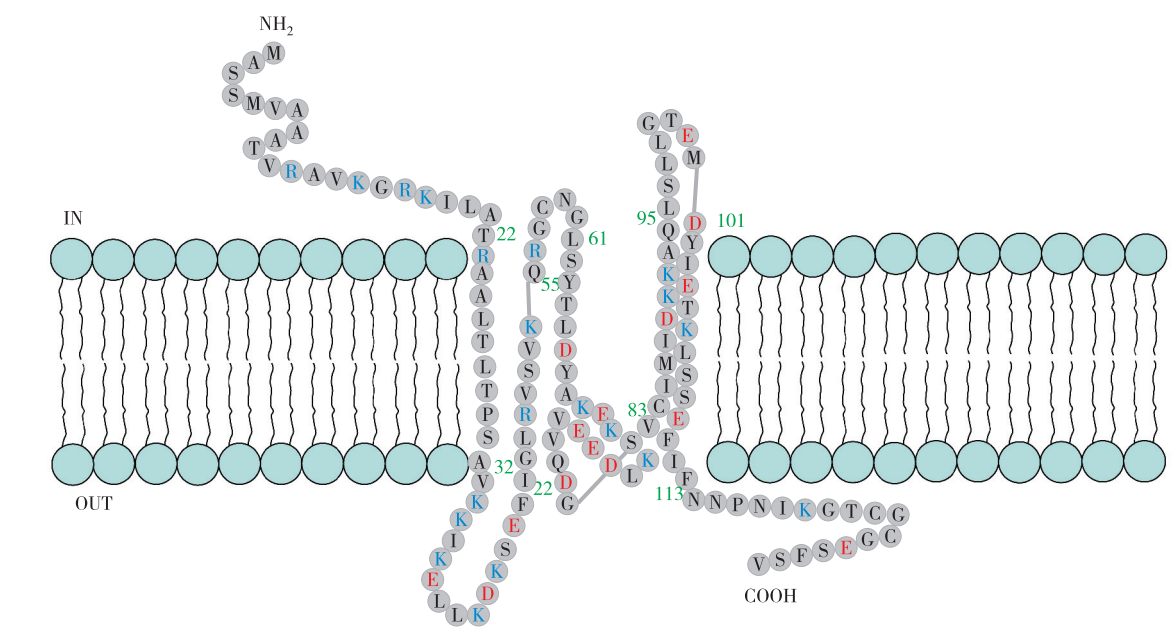
图 2 AmIscA 的氨基酸序列特征和多重序列比对分析

Fig. 2 Amino acid sequence characteristics and multiple alignment of AmIscA

2.1.4 AmIscA 的结构预测 利用 SOPMA 在线进行二级结构预测分析发现:AmIscA 的无规则卷曲占比为 48.46%;7 个 β -折叠的占比为 26.15%;2 个 α -螺旋的占比为 13.08%;C 段延伸链的占比为 12.31%(图 4)。进一步对 AmIscA 的三级结构进行分析可知,该蛋白结构的核心为 α - β - α 三明治结构,双股反平行 β -折叠片段和两股 α -螺旋,该结构与典型的 IscA 家族成员结构模型相似度达 40.57%,且具有相似的[2Fe-2S]晶体结构(图 5)。

2.1.5 AmIscA 的功能预测 采用 NCBI 中数据库进行保守结构域分析发现,AmIscA 具有 IscA 家族典型的铁硫簇结合位点“CGC”(图 2)。进一步通过在线蛋白质互作网络分析(图 6),预测该蛋白与线粒体中的转移酶 CAF17(CNGBdb 编号和 GenBank 登录号分别为 LOC724700 和 XP_006565633.1)、IscS(CNGBdb 编号和 GenBank 登录号分别为 LOC410039 和 XP_393524.3)铁硫簇支架同系物 NFU1(CNGBdb 编号和 GenBank 登

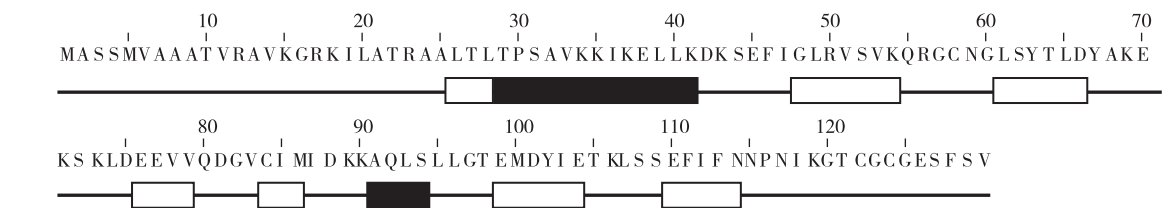
录号分别为 LOC412366 和 XP_395826.2)和 IscU(GenBank 登录号为 XP_392655.2)存在高置信度的相互作用关系,共同完成铁硫蛋白的合成组装。



注:红色字母代表带正电荷的氨基酸;蓝色字母代表带负电荷的氨基酸;黑色字母表示中性氨基酸;IN 表示膜内;OUT 表示膜外;蓝球和双线代表脂质双分子层;绿色数字代表位于细胞膜内部或外部的氨基酸;NH₂ 与 COOH 分别代表氨基末端和羧基末端

图 3 AmIscA 的跨膜结构预测

Fig. 3 Transmembrane structure prediction of AmIscA



注:白色方框表示 α -螺旋,黑色方块表示 β -折叠,黑线表示无规则卷曲和 C 端延伸链

图 4 AmIscA 的二级结构预测

Fig. 4 Secondary structure analysis of AmIscA

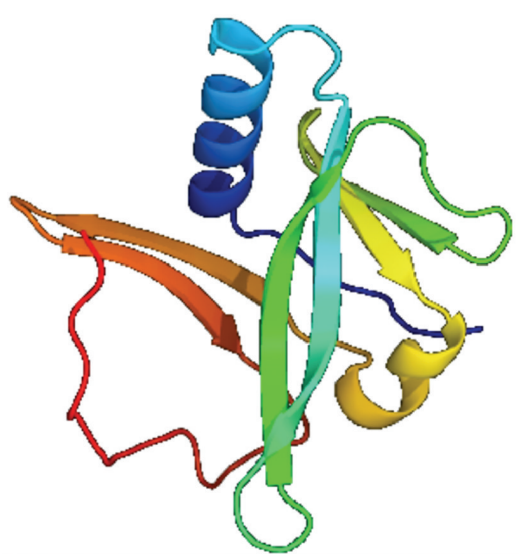
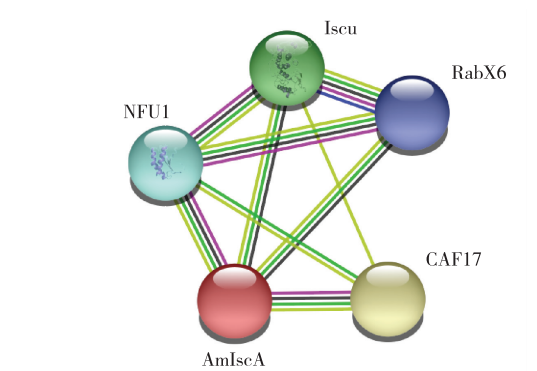


图 5 AmIscA 的 3D 结构模型预测

Fig. 5 3D structural model prediction of AmIscA



注: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。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,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 AmIscA 相互作用靶蛋白的预测

Fig. 6 Prediction of target proteins interacting with AmIscA

2.1.6 AmIscA 的系统进化分析 结合昆虫、哺乳动物、鱼类、鸟类、真菌和植物代表物种的 IscA 的氨基酸序列, 加上 AmIscA 的氨基酸序列进行了聚类分析, 结果如图 7 所示: 不同类别的代表物种的 IscA 各自分别聚为一支, 但昆虫的 IscA 在系统进化上与哺乳动物和鱼类的 IscA 的遗传距离较近。AmIscA 在昆虫大类中与蜜蜂属 (*Apis*) 动物的 IscA 聚为一支, 且与中华蜜蜂亲缘关系最为接近。在昆虫中, 蜜蜂的 IscA 比其他昆虫分化晚, 而意大利蜜蜂的分化最晚, 这表明 AmIscA 在进化上是一种年轻的蛋白质。

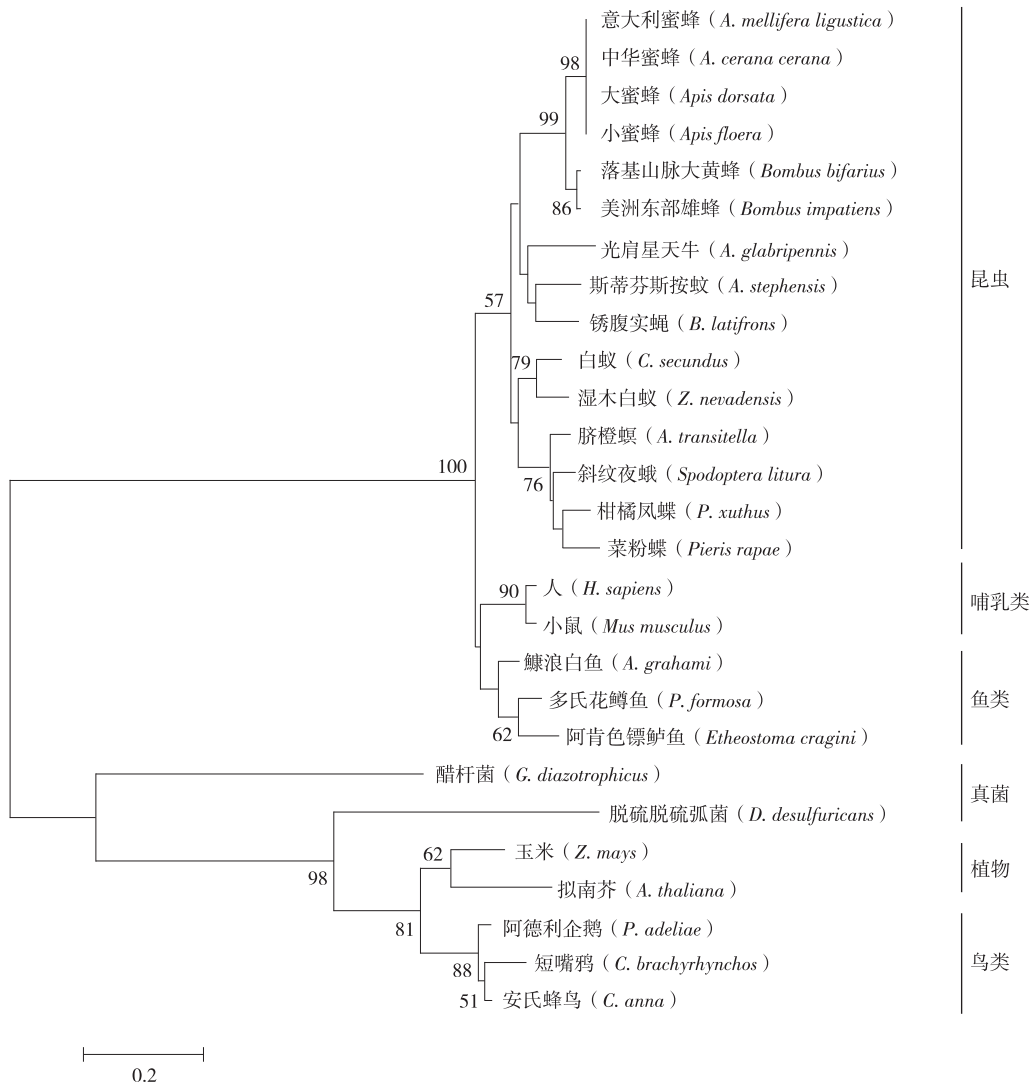


图 7 基于邻接法构建意大利蜜蜂和其他物种 IscA 的氨基酸序列的系统进化树

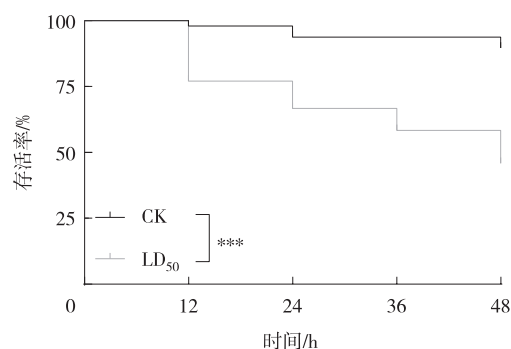
Fig. 7 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of IscA from *A. mellifera ligustica* and other species constructed using neighbor-joining method

2.2 吡虫啉暴露下意大利蜜蜂的存活率

图 8 显示: 在实验室饲养条件下, 对照组意大利蜜蜂的存活状况较为稳定, 直至实验观测结束即 48 h 后存活率为 $90\% \pm 3\%$, 属于自然响应频率。但在整个实验进程中, 吡虫啉 LD_{50} 处理组意大利蜜蜂的存活率在最初的 12 h 内急剧下降, 说明在此期间蜜蜂受到严重的毒性胁迫; 随着吡虫啉暴露进程的继续, 蜜蜂的存活率下降趋势明显减缓, 表明意大利蜜蜂在此期间抵抗和逐步缓解了吡虫啉所带的毒性胁迫。即便如此, 吡虫啉 LD_{50} 处理组意大利蜜蜂仍然保持了较高的死亡率, 直至实验观测结束时的存活率仅为 $45\% \pm 5\%$ 。

2.3 吡虫啉暴露下 AmIscA 基因的表达分析

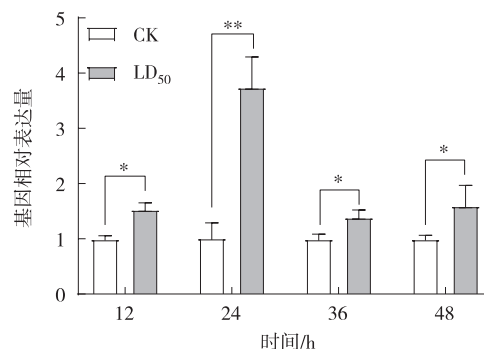
图 9 显示: 较对照组而言, 吡虫啉 LD_{50} 处理组的 AmIscA 基因表达在 12 h 后呈现明显上调, 在 24 h 后此上调幅度达到最大, 在 36 h 后上调幅度减少, 在 48 h 后仍有明显上调; 两组 AmIscA 基因相对表达量始终有统计学意义上的差异 ($p < 0.05$)。



注:CK为对照组,LD₅₀为吡虫啉 LD₅₀处理组,下同;***表示两组间存活率差异在 $p < 0.001$ 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统计

Fig. 8 Survival statistics of *Apis mellifera* under imidacloprid exposure



注:数据以“平均值±标准误”表示;*,**分别表示组间数据差异在 $p < 0.05$ 和 $p < 0.01$ 水平上有统计学意义

图9 *AmIscA* 基因在不同处理下的表达特征

Fig. 9 Expression characteristics of *AmIscA* gene under different treatments

3 讨论

IscA 是一种普遍存在的线粒体内高度保守蛋白,负责铁硫簇组装中间产物的结合,它作为电子传递的蛋白辅助因子参与细胞中许多生理过程^[8]。本研究预测 AmIscA 在线粒体中行使有关功能,这与其他物种 IscA 成员的细胞定位特征一致。此外,在系统进化上 AmIscA 与其他物种包括昆虫、哺乳动物、鱼类、鸟类、真菌和植物的 IscA 具有较高亲缘关系,提示该蛋白具有 IscA 家族成员同样的生物学功能。以前的研究表明,IscA 的半胱氨酸残基涉及到铁的氧化和半胱氨酸的还原^[21],且半胱氨酸残基的氧化为硫化物 $[2Fe-2S]^{2+}$ 的产生提供两个电子^[22],参与铁硫簇中间体的结合,在铁硫簇的组装过程中缺一不可。IscA 的铁硫簇结合位点在绝大部分物种中都保守存在。这一保守的进化结构被认为是共同机制特征的证据。在本研究中,AmIscA 氨基酸序列具有 IscA 家族典型的铁硫簇结合位点半胱氨酸残基。IscA 家族这一典型的功能结构能够将铁和硫有效地转运至 IscU,进而为铁硫簇的组装提供硫^[23]。本研究中的三级结构分析也发现,AmIscA 蛋白结构与典型的 IscA 家族成员结构模型相似度达 40.57%,具有相似的 $[2Fe-2S]$ 晶体结构。不仅如此,蛋白的互作网络分析表明 AmIscA 与铁硫簇组装紧密相关的 IscS, NFU1 和 IscU 存在高置信度的相互作用关系,共同完成对铁硫簇的组装合成。综上所述,AmIscA 具有 IscA 家族成员典型的生物信息学特征,可将它归类为 IscA。

吡虫啉作为新一代神经性杀虫剂,与乙酰胆碱受体竞争性结合,致使蜜蜂产生持续性神经冲动、抽搐、麻痹而最终死亡,该杀虫剂广泛的使用与环境残留使得蜜蜂种群数量急剧下降^[24]。以前的研究表明,吡虫啉导致昆虫机体产生氧化应激和损伤^[25],许多抗氧化物酶如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、过氧化物酶等均大量合成以抵抗吡虫啉的毒性胁迫^[26-27]。铁硫簇作为辅助因子赋予了许多铁硫簇蛋白(含铁硫簇)氧化还原及催化活性。铁硫簇蛋白参与维持线粒体氧化还原稳定,降低活性氧的产生,维持细胞的正常功能^[28]。当生物体受到外界刺激产生氧化应激时,铁硫簇蛋白的大量表达有助于系统对外界胁迫刺激的抵抗。一旦敲除铁硫簇蛋白基因,线粒体活性氧会增加并导致细胞凋亡^[29]。通常而言,IscA 大量合成,意味着有更多的铁硫簇的组装合成,这有助于铁硫簇蛋白对氧化应激的调节^[3]。本研究中,和对照组相比,意大利蜜蜂在吡虫啉暴露处理刚开始的 12 h 内迅速大量死亡,之后死亡速率在 24~48 h 这段时间内明显减缓;而 *AmIscA* 基因表达在吡虫啉暴露处理 12 h 后明显上调,24 h 后上调幅度达到最大,36~48 h 间的上调幅度则又回落到与最初 12 h 的上调幅度接近一致。吡虫啉暴露处理 12~24 h 这段时间内意大利蜜蜂的 *AmIscA* 基因表达出现明显的大幅上调,表明此期间铁硫簇的组装合成旺盛,机体对铁硫簇蛋白的需求较高。基于铁硫簇蛋白的氧化还原和氧化应激的调节功能,以及前人有关吡虫啉暴露会导致蜜蜂产生氧化应激和损伤的报道^[30-31],本研究推测在应对吡虫啉所引起的氧化应激过程中,意大利蜜蜂通过大量合成 AmIscA 来加速铁硫簇的组装和促进相应铁硫簇蛋白的成熟,以抵抗吡虫啉暴露带来的氧化胁迫,稳定线粒体的氧化还原状态。综上所述,本研究结果表明 AmIscA 积极响应吡虫啉导致的毒性胁迫,潜在地参与了意大利蜜蜂对吡虫啉毒害的抵抗。

参考文献:

- [1] HOLM R H, LO W. Structural conversions of synthetic and protein-bound iron-sulfur clusters[J]. Chemical Reviews, 2016, 116 (22): 13685-13713.
- [2] BRAYMER J J, FREIBERT S A, RAKWALSKA-BANGE M, et al. Mechanistic concepts of iron-sulfur protein biogenesis in Biology[J]. Biochimica et Biophysica Acta Molecular Cell Research, 2021, 1868(1): 118863.
- [3] MAIO N, JAIN A, ROUAULT T A. Mammalian iron-sulfur cluster biogenesis; recent insights into the roles of frataxin, acyl carrier protein and ATPase-mediated transfer to recipient proteins[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2020, 55: 34-44.
- [4] YANG J J, BITOUN J P, DING H G. Interplay of IscA and IscU in biogenesis of iron-sulfur clusters[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(38): 27956-27963.
- [5] TONG W H, ROUAULT T. Distinct iron-sulfur cluster assembly complexes exist in the cytosol and mitochondria of human cells[J]. The EMBO Journal, 2000, 19(21): 5692-5700.
- [6] UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021[J]. Nucleic Acids Research, 2020 (D1): D480-D489.
- [7] DING H G, CLARK R J. Characterization of iron binding in IscA, an ancient iron-sulphur cluster assembly protein[J]. The Biochemical Journal, 2004, 379(Pt2): 433-440.
- [8] DING B J, SMITH E S, DING H G. Mobilization of the iron center in IscA for the iron-sulphur cluster assembly in IscU[J]. The Biochem Journal, 2005, 389(Pt3): 797-802.
- [9] QIAN L, ZHENG C L, LIU J S. Characterization of iron-sulfur cluster assembly protein IscA from *Acidithiobacillus ferrooxidans* [J]. Biochemistry (Mosc), 2013, 78(3): 244-251.
- [10] JENSEN L T, CULOTTA V C. Role of *Saccharomyces cerevisiae* ISA1 and ISA2 in iron homeostasis[J]. Molecular and Cellular Biology, 2000, 20(11): 3918-3927.
- [11] LILL R, FREIBERT S A. Mechanisms of mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis[J]. Annual Review of Biochemistry, 2020, 89(1): 6. 1-6. 29
- [12] REES D C, HOWARD J B. The interface between the biological and inorganic worlds: iron-sulfur metalloclusters[J]. Science, 2003, 300(5621): 929-931.
- [13] HINCHLIFFE P, SAZANOV L A. Organization of iron-sulfur clusters in respiratory complex I[J]. Science, 2005, 309(5735): 771-774.
- [14] FRAZZON J, DEAN D R. Formation of iron-sulfur in bacteria: an merging field in bioinorganic chemistry[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2003, 7(2): 166-173.
- [15] JOHNSON D C, DEAN D R, SMITH A D, et al. Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters[J]. Annual Review of Biochemistry, 2005, 74(1): 247-281.
- [16] NOGI T, FATHIR I, MASAYUKI K, et al. Crystal structures of photosynthetic reaction center and high-potential iron-sulfur protein from *Thermochromatium tepidum*: thermostability and electron transfer[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(25): 13561-13566.
- [17] XU J J, ZHANG Y C, WU J Q, et al. Molecular characterization, spatial-temporal expression and magnetic response patterns of iron-sulfur cluster assembly1 (IscA1) in the rice planthopper, *Nilaparvata lugens* [J]. Insect Science, 2019(3): 413-423.
- [18] SÁNCHEZ-BAYO F, WYCKHUYS K A G. Worldwide decline of the entomofauna: a review of its drivers[J]. Biological Conservation, 2019, 232: 8-27.
- [19] REILLY J R, ARTZ D R, BIDDINGER D, et al. Crop production in the USA is frequently limited by a lack of pollinators[J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2020, 287(1931): 20200922.
- [20] 张祖芸, 李震, 曾志将. 吡虫啉对蜜蜂行为与生理影响研究进展[J]. 应用昆虫学报, 2018, 55(05): 769-777.
- ZHANG Z Y, LI Z, ZENG Z J, et al. Effects of imidacloprid on bee behavior and physiology[J]. Chinese Journal of Applied Entomology, 2018, 55(5): 769-777.
- [21] WOLLENBERG M, BERNDT C, BILL E, et al. A dimer of the FeS cluster biosynthesis protein IscA from cyanobacteria binds a [2Fe2S] cluster between two protomers and transfers it to [2Fe2S] and [4Fe4S] apo proteins[J]. European Journal of Biochemistry, 2003, 270(8): 1662-1671.
- [22] KREBS C, AGAR J N, SMITH A D, et al. IscA, an alternate scaffold for Fe-S cluster biosynthesis[J]. Biochemistry, 2001, 40 (46): 14069-14080.
- [23] SHEPARD E M, BOYD E S, BRODERICK J B, et al. Biosynthesis of complex iron-sulfur enzymes[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2011, 15(2): 319-327.

- [24] JESCHKE P, NAUEN R, SCHINDLER M, et al. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 59(7): 2897-2908.
- [25] FELIPE M, ZUO Z Y, WANG J L, et al. Low doses of the neonicotinoid insecticide imidacloprid induce ROS triggering neurological and metabolic impairments in *Drosophila* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(41): 25840-25850.
- [26] KANG Z W, LIU F H, Pang R P, et al. Effect of sublethal doses of imidacloprid on the biological performance of aphid endoparasitoid *Aphidius gifuensis* (Hymenoptera: Aphididae) and influence on its related gene expression[J]. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 01729.
- [27] YUCEL M S, KAYIS T. Imidacloprid induced alterations in oxidative stress, biochemical, genotoxic, and immunotoxic biomarkers in non-mammalian model organism *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) [J]. *Journal of Environmental Science and Health Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 2019, 54(1): 27-34.
- [28] GOMEZ M, PÉREZ-GALLARDO R V, SÁNCHEZ L A, et al. Malfunctioning of the iron-sulfur cluster assembly machinery in *Saccharomyces cerevisiae* produces oxidative stress via an iron-dependent mechanism, causing dysfunction in respiratory complexes[J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(10): e111585.
- [29] PÉREZ-GALLARDO R V, BRIONES L S, et al. Reactive oxygen species production induced by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* increases because of a dysfunctional mitochondrial iron-sulfur cluster assembly system[J]. *FEMS Yeast Research*, 2013, 13: 804-819.
- [30] GREGORC A, ALBURAKI M, RINDERER N, et al. Effects of coumaphos and imidacloprid on honey bee (Hymenoptera: Apidae) lifespan and antioxidant gene regulations in laboratory experiments[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(33): 15003.
- [31] BALIEIRA K V B, MAZZO M, BIZERRA P F V, et al. Imidacloprid-induced oxidative stress in honey bees and the antioxidant action of caffeine[J]. *Apidologie*, 2018, 49: 562-572.

Animal Sciences

Response Analysis of Iron-Sulfur Cluster Assembly Protein in *Apis mellifera ligustica* Tolerance to Imidacloprid Toxicity

HE Biao, WANG Yuedi, QIN Qiqian, CHEN Lanchun, DUAN Jiaxin, XU Jinshan, LI Zhi

(College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: [Purposes] To bioinformatics characterizes the iron-sulfur cluster assembly protein of *Apis mellifera ligustica* (AmIscA) and analyzes its response in worker tolerance imidacloprid toxicity. [Methods] Multiple sequence alignment was used to analyze the sequence characteristics and domain composition of AmIscA. The structure, interaction network and biological function of AmIscA were predicted by using an On-line program. A phylogenetic tree was constructed to analyze the classification and phylogenetic evolutionary of AmIscA. The semi-lethal model was constructed, and the expression characteristics of *AmIscA* gene in worker bees tolerance to imidacloprid toxicity were detected by real-time fluorescence quantitative PCR after 0~48 hours exposure. [Findings] The full-length cDNA sequence of the *AmIscA* gene was 514 bp, which encodes 130 amino acids. This protein AmIscA is predicted to have a molecular weight of 14.1 kDa, a theoretical pI value of 9.06. The hydrophilic-hydrophobic analysis showed that this protein was hydrophobic with cysteine and aspartic acid conserved residues of classify iron-sulfur cluster assembly protein family. The signal peptide and subcellular localization prediction showed that this protein had no signal peptide and was localized in mitochondria. After being exposed to a half-lethal dose of imidacloprid for 48 hours, the bees' survival rate was $45\% \pm 5\%$. Real-time quantitative PCR analysis showed that the expression levels of *AmIscA* gene was up-regulated under imidacloprid stress and presented a tendency of upregulation first, then downregulation compared to the control group. [Conclusions] AmIscA actively responds to the toxic stress caused by imidacloprid and potentially participates in the resistance of bees to imidacloprid toxicity.

Keywords: iron-sulfur cluster assembly protein; imidacloprid; semi-lethal; *Apis mellifera ligustica*

(责任编辑 方 兴)