

褐飞虱吞蛋白的基因克隆、多克隆抗体制备及表达定位

俞叶微[#], 许益鹏[#], 赵晨星, 韩善捷, 安鹏, 俞晓平^{*}

(中国计量大学生命科学学院, 浙江省生物计量与检验检疫重点实验室, 杭州 310018)

摘要:【目的】探析吞蛋白(endophilin)在褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 生长繁殖过程中的作用。【方法】克隆褐飞虱吞蛋白基因,并进行生物信息学分析;在大肠杆菌 *Escherichia coli* Rosetta 中诱导表达褐飞虱吞蛋白基因,融合蛋白经 Ni 柱亲和和层析法纯化后,免疫新西兰兔子,获得相应的多克隆抗体;将所得的抗体用于检测褐飞虱卵巢中吞蛋白的表达和定位。【结果】克隆得到褐飞虱两个吞蛋白基因 *endophilin A* (*Endo A*)和 *endophilin B* (*Endo B*),GenBank 登录号分别为 KY126096 和 KY126095,分别编码 387 个和 352 个氨基酸,都含有吞蛋白典型的 BAR 结构域和 SH3 结构域,但它们在结构上存在差异。ELISA 和 Western blot 检测结果表明,制备的兔抗血清效价达 1:1 000 000,并表现出较好特异性。将获得的抗体应用于免疫荧光实验表明,Endo A 和 Endo B 蛋白在褐飞虱卵巢中普遍表达,在卵巢滤泡细胞的细胞间隙、细胞膜、细胞质中广泛分布,而且与脂类物质的分布模式类似,与正在侵入褐飞虱卵巢的类酵母共生菌共定位。【结论】获得了褐飞虱吞蛋白基因 *Endo A* 和 *Endo B* 序列,并明确了其生物信息学特征,成功制备了 Endo A 和 Endo B 多克隆抗体,分析了 Endo A 和 Endo B 在褐飞虱卵巢中的表达情况,认为其可能与褐飞虱卵巢发育和成熟以及类酵母共生菌入侵褐飞虱卵巢有关。这些结果为进一步研究 Endo A 和 Endo B 在褐飞虱中的生物学功能奠定了基础。

关键词: 褐飞虱; 吞蛋白; 基因克隆; 多克隆抗体; 蛋白定位; 卵巢

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2017)03-0274-12

Gene cloning, polyclonal antibody preparation and expression localization of the endophilins from *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae)

YU Ye-Wei[#], XU Yi-Peng[#], ZHAO Chen-Xing, HAN Shan-Jie, AN Peng, YU Xiao-Ping^{*} (Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biometrology and Inspection & Quarantine, College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: 【Aim】 To explore the function of endophilin in the growth and reproduction of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. 【Methods】 The endophilin genes of *N. lugens* were cloned and analyzed by bioinformatics. Then, recombinant prokaryotic expression vectors were constructed and transferred into *Escherichia coli* Rosetta to induce the expression of fusion proteins. After purification by Ni affinity chromatography, the fusion proteins were used to immunize the New Zealand rabbits to obtain polyclonal antibodies against endophilins. The obtained antibodies were used to detect the expression and localization of endophilins in *N. lugens* ovary. 【Results】 Two endophilin genes, *endophilin A* (*Endo A*) and *endophilin B* (*Endo B*), were cloned from *N. lugens*, with the GenBank accession numbers of KY126096 and KY126095, respectively. *Endo A* and *Endo B* encode 387 and 352 amino acids, respectively. Both

基金项目: 国家自然科学基金项目(31501632); 浙江省自然科学基金项目(LQ14C140006); 国家“973”计划项目(2012CB114105); 2016 年度浙江省“育才工程”项目

作者简介: 俞叶微, 女, 1992 年生, 浙江台州人, 硕士研究生, 研究方向为褐飞虱分子生物学, E-mail: 1360093264@qq.com; 许益鹏, 男, 1984 年生, 浙江温州人, 博士, 副教授, 研究方向为褐飞虱及其共生菌的分子生物学, E-mail: xyp@cjlu.edu.cn

[#]共同第一作者 Authors with equal contribution

^{*} 通讯作者 Corresponding author, E-mail: yxp@cjlu.edu.cn

收稿日期 Received: 2016-12-13; 接受日期 Accepted: 2017-02-23

encoded proteins contain the typical BAR domain and SH3 domain, but show different structure. The titer of the obtained antibodies was estimated as high as 1:1 000 000 dilution ratio through ELISA, and the antibodies had good specificity as shown by Western blot. Using immunofluorescence, the antibodies were used to detect the expression of Endo A and Endo B in *N. lugens* ovary. The results indicated that Endo A and Endo B were universally expressed in *N. lugens* ovary. In ovary, Endo A and Endo B were widely distributed in the extracellular space, cytomembrane and cytoplasm of follicle cells of *N. lugens* ovary, and this distribution pattern was similar to that of lipids. Meanwhile, Endo A and Endo B were colocalized with yeast-like symbionts invading into *N. lugens* ovary. 【Conclusion】 The nucleotide sequences and the biological characteristics of *Endo A* and *Endo B* were clarified. With the obtained polyclonal antibodies of Endo A and Endo B, the expression of Endo A and Endo B in *N. lugens* ovary was profiled, and the results suggest that Endo A and Endo B might be associated with the development and maturity of *N. lugens* ovary as well as the invasion of the yeast-like endosymbionts to *N. lugens* ovary. These results lay the foundation for further studies on the biological function of Endo A and Endo B in *N. lugens*.

Key words: *Nilaparvata lugens*; endophilin; gene cloning; polyclonal antibody; protein localization; ovary

褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stål) 属半翅目 (Hemiptera) 飞虱科 (Delphacidae), 单吸食水稻汁液, 对我国水稻生产造成直接危害 (Bottrell and Schoenly, 2012), 也可通过取食行为传播病毒对水稻造成间接危害 (李汝铎, 1996)。褐飞虱对化学农药和抗性水稻有很强的抗性, 这与其较强的繁殖能力密不可分 (吕仲贤等, 1998; 程遐年等, 2003; 陈列忠等, 2006; 荆胜利等, 2013)。我们的前期研究发现, 褐飞虱中存在吞蛋白基因 *endophilin A* 和 *endophilin B*, 并且其在褐飞虱卵巢中大量转录表达, 预示着 *endophilin A* 和 *endophilin B* 可能在褐飞虱卵巢发育和生殖繁殖起着重要作用。

吞蛋白 (endophilin) 参与膜内吞的多个过程 (Gortat *et al.*, 2012; Murdoch *et al.*, 2016), 同时在信号传导 (Dasgupta *et al.*, 2013)、线粒体代谢 (Wang *et al.*, 2016)、疾病的发生 (Cao *et al.*, 2014)、调节凋亡与自噬 (Takahashi *et al.*, 2008) 等方面也发挥着重要作用。吞蛋白家族在结构上具有很高的同源性, 均由 N 端的 BAR (Bin/Amphiphysin/RVS) 结构域、中间的可变区及 C 端的 SH3 (Src Homology 3) 结构域构成 (Kjaerulff *et al.*, 2011)。吞蛋白通过 C 端的 SH3 结构域与多种内吞蛋白如 amphiphysin, synaptojanin 和 dynamin 结合 (Pechstein *et al.*, 2015), 在内吞方面发挥重大作用 (Soda *et al.*, 2012)。而吞蛋白 N 端 BAR 结构域引起吞蛋白二聚化, 与膜结合且改变膜的曲率, 促使囊泡的形成发挥重大作用 (Chen *et al.*, 2009; Gortat *et al.*, 2012)。吞蛋白有两个家族, *endophilin A* 和 *endophilin B*。研究发现, 在哺乳动物中, *endophilin A*

主要特异性地表达于脑组织, 神经突触末梢尤其丰富, 而 *endophilin B* 在各个组织中均有分布。

为研究褐飞虱 *endophilin A* 和 *endophilin B* 的功能, 本研究克隆了这两个基因, 制备了其多克隆抗体, 并通过免疫荧光标记研究了 *endophilin A* 和 *endophilin B* 蛋白在褐飞虱卵巢中的表达和定位情况, 为后续深入研究 *endophilin A* 和 *endophilin B* 在褐飞虱体内的生物学功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 昆虫来源

褐飞虱种群在中国计量大学浙江省生物计量与检验检疫重点实验室恒温室内长期饲养, 用 TN1 水稻饲喂, 环境条件为 $27 \pm 1^\circ\text{C}$, 相对湿度为 $80\% \pm 2\%$, 光照周期为 14L:10D。

1.2 主要试剂和菌株

PCR 试剂盒、限制性内切酶、反转录试剂盒 (PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser)、RNA 提取试剂盒 (TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit)、*Taq* DNA polymerase 和 pMD-18T 购自 TaKaRa 宝生物工程 (大连) 有限公司; Ni-NTA His·Bind Resin 纯化树脂购自上海七海复泰生物科技有限公司; NC 膜购自 PALL 公司; SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、免疫染色试剂 (洗涤液、固定液、封闭液、一抗稀释液、二抗稀释液和抗荧光淬灭封片液) 购自碧云天生物技术公司; 超滤管 Amicon® Pro 购自 Merck Millipore 公司; Western blot 所用的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记二抗和 DAB 显色液等相关

试剂购自 Solarbio 科技有限公司;免疫荧光二抗 (Dylight 488, Goat anti Rabbit IgG) 购自 Abbkine 公司;克隆菌株 JM109、表达菌株 Rosetta、表达载体 pET-28a 由本实验室保藏。

1.3 基因克隆

选取 2~3 头成虫褐飞虱,利用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,根据反转录试剂盒说明反转录获得 cDNA。根据实验室前期获得的褐飞虱转录组中 *endophilin A* (简称 *Endo A*) 和 *endophilin B* (简称 *Endo B*) 相关序列信息,通过 Primer Premier 5.0 软件 (Singh *et al.*, 1998) 设计 *Endo A* 和 *Endo B* 的 PCR 扩增引物。以 cDNA 为模板利用高保真酶进行 PCR,分别扩增 *Endo A* 和 *Endo B*。反应体系共 25 μL : 17 μL ddH₂O, 0.5 μL 高保真酶, 2 μL dNTPs, 10 \times buffer 2.5 μL , 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 上下引物各 1 μL 和 1 μL 模板。扩增条件: 预变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 退火 (*Endo A*: 52 $^{\circ}\text{C}$; *Endo B*: 54 $^{\circ}\text{C}$) 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。*Endo A* 上下游引物分别为 5'-TCAGAAGCTCTCTCACGTCAA-3' 和 5'-AGCGCAAGCGAATAGCTCTA-3'; *Endo B* 上下游引物分别为 5'-TCCATGGGAGTTTC TTGTGA-3' 和 5'-TCTCTAGCAATCTATCACTCCCA-3'。1% 琼脂糖凝胶电泳分离并回收 PCR 产物,连接转化至 pMD-18T 克隆载体。分别挑取 3 个单菌落进行菌液 PCR 鉴定,将目标菌液送至上海瑞迪公司进行测序。

1.4 生物信息学分析

通过 EditSeq 对测序结果的开放阅读框、蛋白编码、蛋白分子量及等电点等分析。通过 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) Blastx 搜索与褐飞虱吞蛋白同源性较高的氨基酸序列,利用 ClustalW 软件进行氨基酸多序列比对 (Larkin *et al.*, 2007) 且通过 MEGA 6.0 软件中的邻接法建立系统进化树图谱 (Tamura *et al.*, 2011)。在 NCBI 的 CDD (Conserved Domain Database) 数据库预测蛋白结构域。由 Phyre² 在线网站预测 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) 蛋白三级结构。

1.5 重组原核表达体系构建

根据已经得到的 *Endo A* 和 *Endo B* 编码区序列,设计含酶切位点引物。*Endo A* 上下游引物分别为 5'-GAATTCATGGCGTTCGCTGGGCTGA-3' (下划线处为 *EcoR* I 位点) 和 5'-AAGCTTTTACGGCAGCGGACGACG-3' (下划线处为 *Hind* III 位点)。*Endo B* 上下游引物分别为 5'-GGATCCATGGATTCAACG

TAAAAAAGTTAA-3' (下划线处为 *Bam*HI 位点) 和 5'-CTCGAGCTCGAGTCAATTTAGAAATTCACAAATACC-3' (下划线处为 *Xho*I 位点)。以 cDNA 为模板进行 PCR 分别扩增 *Endo A* 和 *Endo B*。PCR 体系和条件同 1.3 节,连接转化与鉴定同 1.3 节。得到的重组质粒分别命名为 pMD-*Endo A* 和 pMD-*Endo B*。

重组质粒 pMD-*Endo A* 与 pET-28a 空质粒用 *Eco*RI 和 *Hind*III 进行双酶切;重组质粒 pMD-*Endo B* 与 pET-28a 空质粒用 *Bam*HI 和 *Xho*I 进行双酶切,目的产物进行割胶回收,连接转化。重组质粒分别命名为 pET-28a-*Endo A* 和 pET-28a-*Endo B*,分别转化至大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109 感受态中,筛选单菌落进行菌液 PCR 鉴定、质粒双酶切鉴定和测序分析。将鉴定正确的重组质粒 pET-28a-*Endo A* 和 pET-28a-*Endo B* 及空载体质粒 pET-28a 分别转化大肠杆菌 Rosetta 表达菌株中,用硫酸卡那霉素抗性筛选得到阳性克隆即为诱导表达菌株。

1.6 目的蛋白诱导表达与纯化

将表达菌株的单菌落以 1:100 接种于含有硫酸卡那霉素 (100 $\mu\text{g/mL}$) 的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 震荡培养过夜,再以 1:100 重新接种于 10 mL 新鲜 LB 中,37 $^{\circ}\text{C}$ 震荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.4~0.6 之间,加入不同浓度 IPTG 在不同温度及不同时间下进行诱导表达,筛选出最佳 IPTG 浓度、诱导温度及时间。诱导后,离心收集菌体,1 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 清洗 3 次。加入 2 mL TBST (pH 7.4) 置于冰浴中超声破碎 (70 Hz, 工作 5 s, 间歇 15 s, 共 10 min), 8 000 \times g 离心 20 min, 收集上清及沉淀。通过 SDS-PAGE 对蛋白的表达进行分析。

小规模诱导成功表达后,进行大规模诱导。如上离心收集菌体后,重悬于 pH 7.4 的 TBST 中, -70 $^{\circ}\text{C}$ /37 $^{\circ}\text{C}$ 反复冻融 3 次后,再进行超声破碎,分别收集上清和沉淀。沉淀用 Tris-HCl 洗 3 次,重悬于裂解液 (50 mmol/L Tris-HCl, 5 mol/L NaCl, 8 mol/L 尿素, 20 mmol/L 咪唑, pH 7.4) 中,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存过夜。裂解液 4 $^{\circ}\text{C}$ 8 000 \times g 离心 20 min, 取上清液经 0.45 μm 滤膜过滤后,用 Ni-NTA His \cdot Bind Resin 亲和层析柱纯化蛋白,经过 10~200 mmol/L 等梯度咪唑浓度洗脱,收集各部分洗脱液进行 SDS-PAGE 检测。若上清有较多蛋白,收集后,同样如上进行过柱纯化操作。用 BCA 法对收集纯化的蛋白进行定量分析并用超滤管浓缩,冷冻干燥后于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.7 重组蛋白的多抗血清制备

纯化后的 Endo A 和 Endo B 融合蛋白免疫新西兰大白兔, 制备多克隆抗体。耳缘静脉采血作为阴性血清, 首次免疫时分别取 1 mL 的 1 mg/mL 纯化蛋白与等体积的弗氏完全佐剂混匀, 充分乳化后皮下多点注射, 每头 2 mL。此后每两周加强免疫一次, 佐剂改用弗氏不完全佐剂, 第 4 次免疫后分别收集血清, 保存于 -70°C 。

1.8 抗体效价检测

抗体的效价检测采用 ELISA 法。根据 TMB 底物显色液试剂盒说明书, 在 96 孔酶标板中加入纯化后的 Endo A 或 Endo B 融合蛋白于 4°C 包被过夜, 每孔加入蛋白 50 μg 。用洗涤缓冲液 PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。每孔加 0.1 mL 0.1% BSA 封闭液, 37°C 孵育 1 h 后 PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。每孔分别加入按 1:10 等梯度稀释的 Endo A (或 Endo B) 抗体 4°C 孵化过夜, PBST 洗涤 3 次后, 加入 1:2 000 稀释的羊抗兔 IgG-HRP 室温孵育 1 h, 洗涤后, 加 TMB 底物显色液反应 15 min, 每孔加 50 μL 的 2 mol/L H_2SO_4 终止反应后, 于 450 nm 处测 OD 值。当阳性血清与阴性血清光吸收值 (P/N) ≥ 2.1 时为阳性, 该阳性所在的稀释倍数即为效价。

1.9 Western blot 检测

取 3 头褐飞虱雌成虫, 加入等体积磁珠及 100 μL RIPA 细胞快速裂解液 60 Hz 震荡, 4°C 3 000 r/min 离心 5 min, 循环 3 次, 最后 4°C 10 000 r/min 离心 5 min, 将上清吸入预冷的干净离心管中, 即得褐飞虱总蛋白。分别将褐飞虱总蛋白和重组蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳 (各取 15 μL 蛋白上样), 并通过湿转法 (60 V 转移 2 h) 转印到 NC 膜上。然后将膜放入 5% 脱脂奶粉中, 37°C 封闭 2 h, 用 TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。将 NC 膜放入以 1:500 稀释的吞蛋白重组蛋白兔抗血清溶液中, 4°C 孵育过夜, 用 TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。然后加入 1:1 500 稀释的羊抗兔 IgG-HRP, 室温孵育过夜, 用 TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min; 最后在 NC 膜表面加入辣根过氧化物 DAB 显色液, 37°C 避光 10 min, 终止反应, 并观察膜上的蛋白显色情况。

1.10 免疫荧光标记

取羽化后 3 d 的褐飞虱雌成虫进行解剖, 获取完整卵巢于载剖片上, 用 PBS 清洗 3 次, 每次 10 min。加入适量固定液覆盖卵巢, 4°C 过夜, 洗涤同上。加入适量封闭液, 37°C 封闭 2 h, 用 PBS 清洗 3 次, 每次 10 min。将制备的 Endo A 多抗和 Endo B

多抗分别作为该实验一抗, 以 1:500 稀释后与卵巢共孵育, 放置于湿盒, 4°C 过夜, PBS 清洗 3 次后, 加入 1:1 000 稀释的荧光抗兔二抗, 37°C 避光孵育 2 h。用 PBS 清洗 3 次, 每次 10 min。用 DAPI 染料、DiI 染料分别标记细胞核和脂类物质。加入荧光淬灭抑制剂, 封片。对处理完成的样品在 Leica (SP8) 共聚焦显微镜下观察, 拍照记录。

2 结果

2.1 Endo A 和 Endo B 基因克隆及序列分析

本研究克隆得到褐飞虱两个吞蛋白基因 *Endo A* (GenBank 登录号: KY126096) 和 *Endo B* (GenBank 登录号: KY126095)。经 EditSeq 分析表明, *Endo A* 的 cDNA 序列含有一个完整 1 164 bp 的开放阅读框, 编码 387 个氨基酸, 预测分子量为 43.075 kD, 理论等电点为 5.459; *Endo B* 的 cDNA 序列含有一个完整 1 059 bp 的开放阅读框, 编码 352 个氨基酸, 预测分子量为 39.003 kD, 理论等电点为 6.130 (图 1)。

通过 NCBI Blast X 搜索与褐飞虱吞蛋白同源性较高的氨基酸序列。利用 ClustalW 软件进行氨基酸多序列比对, 使用邻位相连法在 MEGA 6.0 软件中建立系统进化树图谱 (图 2)。结果显示, 褐飞虱 *Endo A* 与麦双尾蚜 *Diuraphis noxia* 的系统发育关系较近, *Endo B* 与柑橘木虱 *Diaphorina citri* 的系统发育关系较近, 说明了 *Endo A* 和 *Endo B* 在昆虫中的保守性。

Endo A 和 *Endo B* 均在 N 端和 C 端分别具有 BAR 结构域和 SH3 结构域。利用 Phyre² 在线网站结构对 *Endo A* 和 *Endo B* 的三级结构进行预测, 结果表明, 在 BAR 结构域, *Endo A* 和 *Endo B* 都有 4 个螺旋结构, 但是 *Endo B* 的第 3 螺旋中间有较明显的中断, 另外 *Endo A* 和 *Endo B* 在螺旋 1 和螺旋 2 之间的连接环的方向也存在区别 (图 3: A, C); 在 SH3 结构域, *Endo A* 和 *Endo B* 都有 5 个折叠, 二者结构相差不明显 (图 3: B, D)。

2.2 Endo A 和 Endo B 基因的原核表达及重组蛋白纯化

电泳和酶切鉴定结果显示, 成功构建了 pET-28a-*Endo A* 和 pET-28a-*Endo B* 原核表达载体 (图 4), 测序结果也验证了原核表达载体的成功构建。

将重组质粒 pET-28a-*Endo A* 和 pET-28a-*Endo B* 转化至 Rosetta 感受态细胞中, 小规模诱导表达后, 进行 SDS-PAGE 分析。结果显示, *Endo A* 蛋白

A 1 TCAGAAGCTCTCTCAGTCAATAGAAGCAGCGCAAGACAATAACATAAAATCAAGATGGCGTTCGCTGGGCTGAAAAACAGATCAACAA
 1 M A F A G L K K Q I N K
 91 ATGCAATCAGTATATGACAGAGAAGATGGGTGGCGCTGAAGGCACCAAACTGGATGTGGATTTCTGTGACATGGAAAGAAAAACAGACGT
 13 C N Q Y M T E K M G G A E G T K L D V D F V D M E R K T D V
 181 CACCTATGAGCTGGTGGATGAATTCAGCTGAAGACAAAAGGAGTTCTCGAGCCGAACCCGACAGCAGCCAAGATGGCCGCGGTGAA
 43 T Y E L V D E L A Q L K T K E F L Q P N P T A R A K M A A V K
 271 GGGCATCTCGAAGCTGAGTGGCCAGGCCAAGGCCCTCCACCTACCCGACGCCGAGGGACTTCTCGGGACTGCCTCTCCATGTACGGCAA
 73 G I S K L S G Q A K A S T Y P Q P E G L L G D C L S M Y G K
 361 GAAGCTCGGAGACGACAGCATGTTCCGGCAAGCAATGCTGGAGTTGGGGAAGGGCTGAAACAGATGGCGGATGCAAGTATGCCTTGGGA
 103 K L G D D S M F G Q A M L E F G E G L K Q M A D V K Y A L D
 451 TGATAGCACGAAACAGAACTTCTCGAGCCTCTGCATCATCTGCAGACCAAGGACCTCAAGAAGTCAATGCATCACCAGAAAGAAATGCA
 133 D S T K Q N F L E P L H H L Q T K D L K E V M H H R K K L Q
 541 GGGACGCTGCTAGATTTTACTGCAAGCGCGGACGCTCAAGCAAAAGGCTCGAACATTGCAGATGATGAGATACGTCAGGCTGAGGAGAA
 163 G R R L D F D C K R R R R Q A K G S N I A D D E I R Q A E E K
 631 ATTTGCAGAATCCCTCCATTTGCTCAGATGGGAATGTTCAATCTACTCGAAAATGACCTTGACAGGATCTCAGCTTGTGACTTTTGC
 193 F A E S L H L A Q M G M F N L L E N D V E Q V S Q L V T F A
 721 TGAAGCGCTTCTGGAATATCACCAGCAGTGCACAGAGATCATGAAAATGTTGGTTGAAAATCTTCAAGAAAAATGCAGCGAAGCAGCCAA
 223 E A L L E Y H Q Q C T E I M K T V V E N L Q E K C S E A A N
 811 CCGGCCAAAAGTTGAATTTGTCCGAAGACGTTGGCAGACCTGCACGTTGGAGGAATTTCCGAGGGCATGAATGGTACGACTGTTTCCA
 253 R P K V E F V P K T L A D L H V E G I S E G M N G T T V F H
 901 CGTCAATCCTCCCTCCGAATCTGACCACCTCCCCCGACCCCTTGGTCAAGGCTCAGCGCTCCCGTTAGAGCTTCTCCATTGCCATCTCC
 283 V N P P S E S D H L P P D P W S R L S A P V R A S P L P S P
 991 AGTAAAAGTTCTCCAGCTAGAATCCGATGAATGCGGGAGGAAAGTCCGCATGTTGCACACCCCTGTACGATTTGCAACCGGAGAAACCC
 313 V K S S P A R T P M N A G T K G S P C C T A L Y D F E P E N P
 1081 TGGAGAATCTGGATTTAAGAAGGTGATACAATCTGTGACTCAGCGCTGCGACGAGAATGTTGGAAGGAGCCCAACGACGCGAC
 343 G E L G F K E G D T I L L T Q A V D E N W F E G S P N G R T
 1171 CGGCTACTTTCCCGTCTCTTATGTCCAGGTCGTCTCCCGTCCCGTGAAGCGGCAACGAATCCCGCAACACATCACGGTAAACAGCAGAA
 373 G Y F P V S Y V Q V V V P L P *
 1261 GTAAGCGCAAGCGAATAGCTCTA

B 1 TCCATGGGAGTTTCTTGTGATCAATAAAGTTTGAAAGGTGATTCTTTTATTATTCAAATATAAAAAATGGATTTCACAGTAAAAAAGTT
 1 M D F N V K K L
 91 AATAAACGATGCAGGAACCGCTCTGAGTAGAGTAGTTCAGCTAACTGAAGAGAACTAGGTACATCTGAGAAGACTGAGTTGGATGCACA
 9 I N D A G T A L S R V V Q L T E E K L G T S E K T E L D A H
 181 TTTGAGAACTGCGCGAAGCATCTGATCAAAACAAATTTGACCGAGAACTATTGAGGAATACTGAGGCTGACTCACTCCAAACCC
 39 F E N L A E R S D Q T K L W T E K L L R N T E A V L T P N P
 271 AGGAAACCGTGGAGGACTATTGTTGAGAGAATAGAAAAGAGAAGCCAAACGTTTGACTAACTGGAGTATTTAGGAAACGATAT
 69 G N R V E D Y L F E K I E K K K P T R L T N L E Y L G N D M
 361 GATAGAAGCCGGTAAACGATTTTGGACCGGGACGCTCTATGGTAGTGCTTTAATAAAGGTGGGCAATGCGAGCAGCGTATAGGAGCAAT
 99 I E A G N D F G P G T S Y G S A L I K V G Q C E Q R I G A I
 451 AGAGAAGGAATTCATAGTCTCCGCAATCACTGCTTCTCTCTCTCTAAGAAAGTTCTCGATGGTGAATGAAGACTATTTCTCAAAGA
 129 E K E F I A S A N H C F L S P L R K F L D G E M K T I L K E
 541 ACGTGGACTATTGGAGAGTAAAGGTTGGATCTAGATCGGTGAAGAGTCCGAGTCCGCAAGCCAGATCAATGCTGGTACGCCACCCAA
 159 R G L L E S K R L D L D A C K S R V R K A R S M L G Q P P N
 631 TGGGAACCGCACCTTCGAGTGGCGCAGTCCGAATACGACCGTCAAGGCTGAGATCACCAAACTGCTGCTGGAGGGTGTGAACAGCTCCCA
 189 A E R D L R V A Q S E Y D R Q A E I T K L L L E G V N S S H
 721 TGCCAGTCACTGCGCAGTCTACAGCAATTCGTGATGCGCAGGTCACTTATTACGAGCGATGTCATCACACCATGCAACAGCTCAAGGC
 219 A S H L R S L H E F V D A Q V T Y Y E R C H H T M Q Q L K A
 811 TGAATGCGAGTTTGTGCGGAGCCCCCGCGCTTCCGCATCATCTGCATCTTCTCGATTCCTCGAATCAGTGGGGTACAGGGGGG
 249 E M Q S L S G A P P A S A S S A S F L H S S N H V G S Q G G
 901 GCAGGGGGCCCCATAACCCCGGGAGCAACGGCATCTCCCTCGGGGGACAGCGTGCACAGGGTGTCTGCGACTATGACGCCAAAGA
 279 G G G P I T P G A T A S P S G G Q R A R V L C D Y D A K D
 991 TCAGTCCAACTCAGTCTTATGACCGATGAGGTGATAACAGTTTTCAAAAATACAGAAAGCAGGACTACCTGATGGGGAAACGGGGCAC
 309 Q S E L S L M T D E V I T V F K I P E S E D Y L M G E R G T
 1081 ACAGCGGGTAAAGTACCAGCGGATTTGTTGAATTTCTAAATGAACAACCCCAAAAAACCCAAAACTGTATTCTCAACCTCTAT
 339 Q R G K V P A V F V E F L N *
 1171 ATTCACTATATCTGTGTACGGATTCTGTATTCTCTAGCAATCTATCACTCCCA

图1 *Endo A* (A) 和 *Endo B* (B) 核酸序列和推导的氨基酸序列Fig. 1 The nucleotide and deduced amino acid sequences of *Endo A* (A) and *Endo B* (B)

下划线表示 BAR 结构域, 波浪线表示 SH3 结构域, 翻译起始密码子加粗表示, 翻译终止密码子斜体表示。The BAR domains (Bin/Amphiphysin/RVS) are underlined. The SH3 domains (Src Homology 3) are underlined with wavy line. The translation initiation codons are in bold. The translation stop codons are in italics.

主要以包涵体形式存在, Endo B 蛋白在上清和沉淀中均有存在(图 5)。考虑到包涵体中非目的蛋白相

对上清中更少, 为利于后期纯化, 在 Endo B 的诱导表达时不考虑上清中的融合蛋白量。

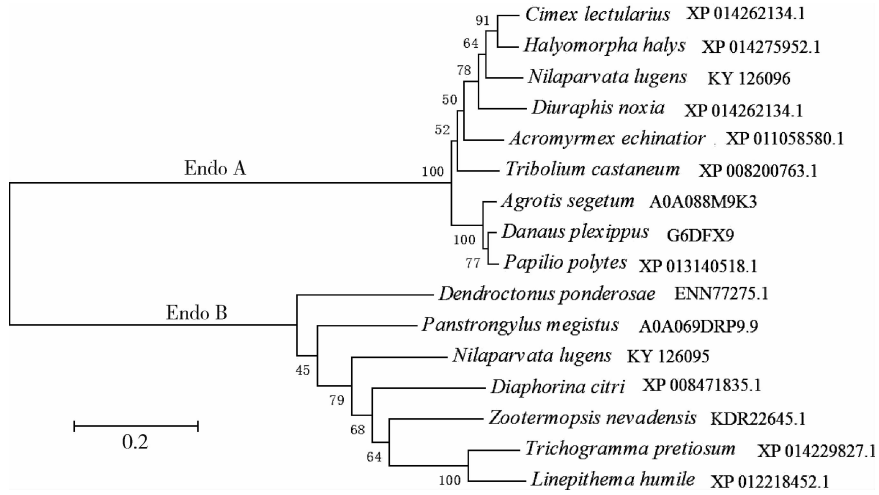


图 2 Endo A 和 Endo B 氨基酸序列的系统进化分析(邻接法)

Fig. 2 Phylogenetic analysis based on amino acid sequences of Endo A and Endo B by neighbor-joining method

标尺示遗传距离。抽样测试为 1 000 次重复。Scale bar indicates the genetic distance. The bootstrapping test was performed with 1 000 replicates.

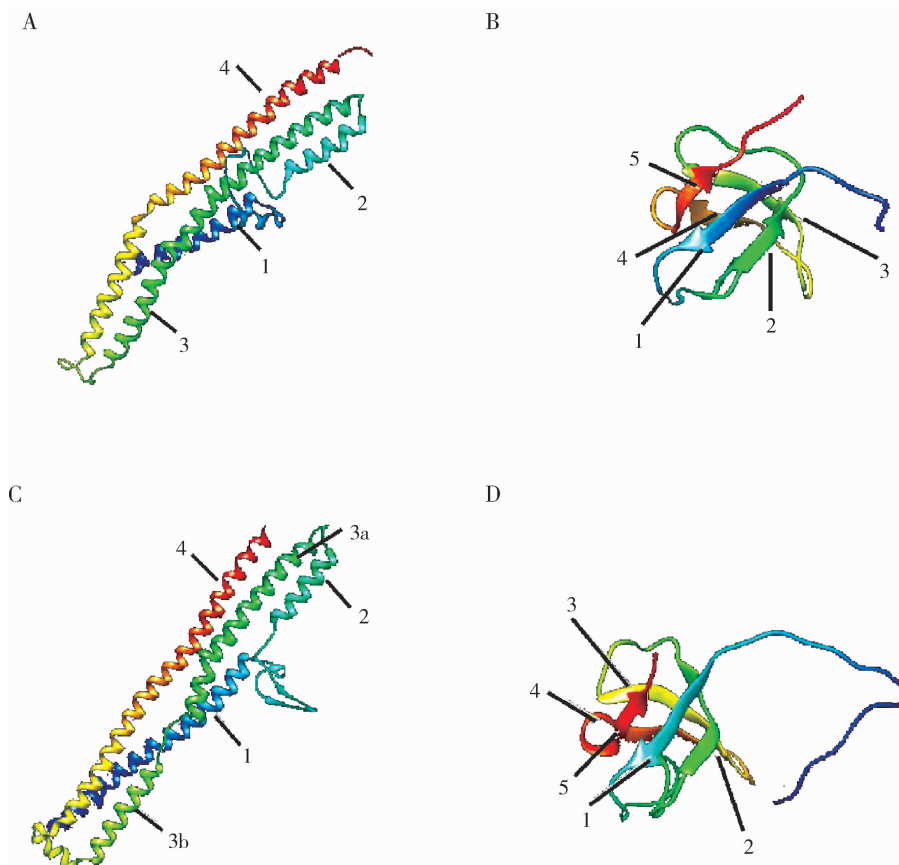


图 3 Endo A 和 Endo B 蛋白三级结构模型

Fig. 3 Tertiary structure model of Endo A and Endo B proteins

A, C: 分别是 Endo A 和 Endo B 的 BAR 结构域 BAR domains of Endo A and Endo B, respectively; 1-4: α 螺旋 Alpha helixes. B, D: 分别是 Endo A 和 Endo B 的 SH3 结构域 SH3 domains of Endo A and Endo B, respectively; 1-5: β 折叠 Beta sheets.

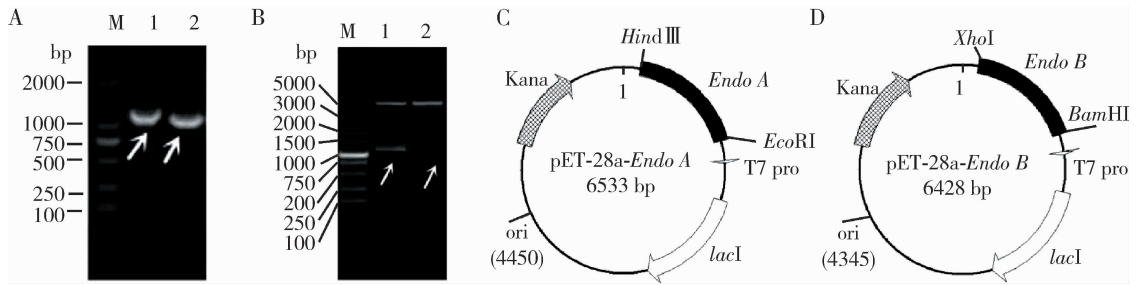


图4 *Endo A* 和 *Endo B* 基因扩增和重组表达载体构建

Fig. 4 PCR amplification and prokaryotic expression vector construction of *Endo A* and *Endo B*

A: *Endo A* 和 *Endo B* PCR 产物 PCR products of *Endo A* and *Endo B*. M: DNA Marker DL2000; 1: *Endo A*; 2: *Endo B*. B: 重组质粒 pET-28a-*Endo A* 和 pET-28a-*Endo B* 双酶切鉴定 Enzyme digestion results of the recombinant plasmids pET-28a-*Endo A* and pET-28a-*Endo B*. M: DNA Marker DL5000; 1: pET-28a-*Endo A* 重组质粒经 *EcoRI* 和 *HindIII* 酶切结果 pET-28a-*Endo A* recombinant plasmid digested by *EcoRI* and *HindIII*; 2: pET-28a-*Endo B* 重组质粒经 *BamHI* 和 *XhoI* 酶切结果 pET-28a-*Endo B* recombinant plasmid digested by *BamHI* and *XhoI*. 箭头指示酶切释放的 *Endo A* 和 *Endo B* 的片段. The arrows indicate the released *Endo A* and *Endo B* digested fragments. C: pET-28a-*Endo A* 质粒图 Map of pET-28a-*Endo A*. D: pET-28a-*Endo B* 质粒图 Map of pET-28a-*Endo B*.

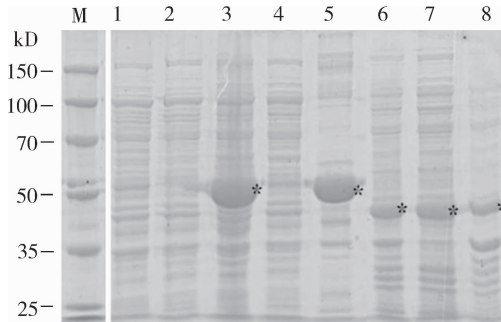


图5 重组蛋白 *Endo A* 和 *Endo B* 的可溶性分析

Fig. 5 Solubility analysis of recombinant proteins *Endo A* and *Endo B*

M: 15 ~ 150 kD 蛋白质分子量标准 15 ~ 150 kD protein marker; 1: Rosetta 菌全菌蛋白 Total protein of Rosetta; 2: pET-28a 空载体转化菌全菌蛋白 Total protein of pET-28a transformant; 3: pET-28a-*Endo A* 重组质粒转化菌全菌蛋白 Total protein of pET-28a-*Endo A* recombinant plasmid transformant; 4: pET-28a-*Endo A* 重组质粒转化菌裂解后上清 Supernatant of lysate from pET-28a-*Endo A* recombinant plasmid transformant; 5: pET-28a-*Endo A* 重组质粒转化菌裂解后沉淀 Precipitates of lysate from pET-28a-*Endo A* recombinant plasmid transformant; 6: pET-28a-*Endo B* 重组质粒转化菌全菌蛋白 Total protein of pET-28a-*Endo B* recombinant plasmid transformant; 7: pET-28a-*Endo B* 重组质粒转化菌裂解后上清 Supernatant of lysate from pET-28a-*Endo B* recombinant plasmid transformant; 8: pET-28a-*Endo B* 重组质粒转化菌裂解后沉淀 Precipitates of lysate from pET-28a-*Endo B* recombinant plasmid transformant. 星号分别指示表达 *Endo A* 和 *Endo B* 重组蛋白. The asterisks respectively indicate recombinant *Endo A* and *Endo B*.

在调整诱导条件时发现, *Endo A* 蛋白在 28℃ 0.4 mmol/L IPTG 诱导 4 h 后, 即可大量表达, 诱导 8 h 和 10 h 时, 表达量有所提升; 当 IPTG 浓度调整为 0.6, 0.8 和 1.0 mmol/L 时对表达量无明显影响 (图 6)。考虑到高浓度 IPTG 会抑制表达菌体的生长, 我们采取 0.4 mmol/L 的 IPTG 左右诱导浓度。为获得最大量的蛋白表达量, 诱导时间确定为 10 h。在不同 IPTG 浓度和诱导时间下, *Endo B* 蛋白的诱导表达量的变化与 *Endo A* 的类似, 最终选择的诱导条件为 28℃ 0.4 mmol/L IPTG 诱导 10 h (图 7)。

利用 Ni-NTA His · Bind Resin 纯化柱亲和层析纯化融合 6 × His 的重组蛋白。含 10, 20, 50, 80,

100, 120, 150 和 200 mmol/L 的咪唑洗脱缓冲液过柱分管收集 *Endo A* 和 *Endo B* 的 6 × His 融合蛋白。结果发现, 在咪唑浓度为 50 ~ 80 mmol/L 时, 洗脱下来的 *Endo A* 融合蛋白较纯 (图 8: A), 而在咪唑浓度为 50 ~ 100 mmol/L 时, 洗脱下来的 *Endo B* 融合蛋白较纯 (图 8: B)。收取在 50 ~ 80 mmol/L 洗脱下的 *Endo A* 融合蛋白液和 50 ~ 100 mmol/L 洗脱下的 *Endo B* 融合蛋白液。将上述洗脱液超滤后, 以每管 1 mg 的融合蛋白量分装, 冷冻干燥后制备蛋白粉保存于 -70℃, 以为制备抗体用。

2.3 *Endo A* 和 *Endo B* 多克隆抗体效价及特异性分析
将 *Endo A* 和 *Endo B* 重组蛋白免疫新西兰兔

后,分别采集第 3 次免疫后一周血清,用 ELISA 法分析抗体效价,结果表明 Endo A 和 Endo B 的多抗效价都可达 1:1 000 000 (表 1)。

采集第 4 次免疫后一周全血血清,用于 Western

blot 分析抗体的特异性。Western blot 结果显示,Endo A 抗体、Endo B 抗体和褐飞虱总蛋白及纯化蛋白均能特异性结合(图 9),表明制备的 Endo A 兔多抗和 Endo B 兔多抗特异性良好。

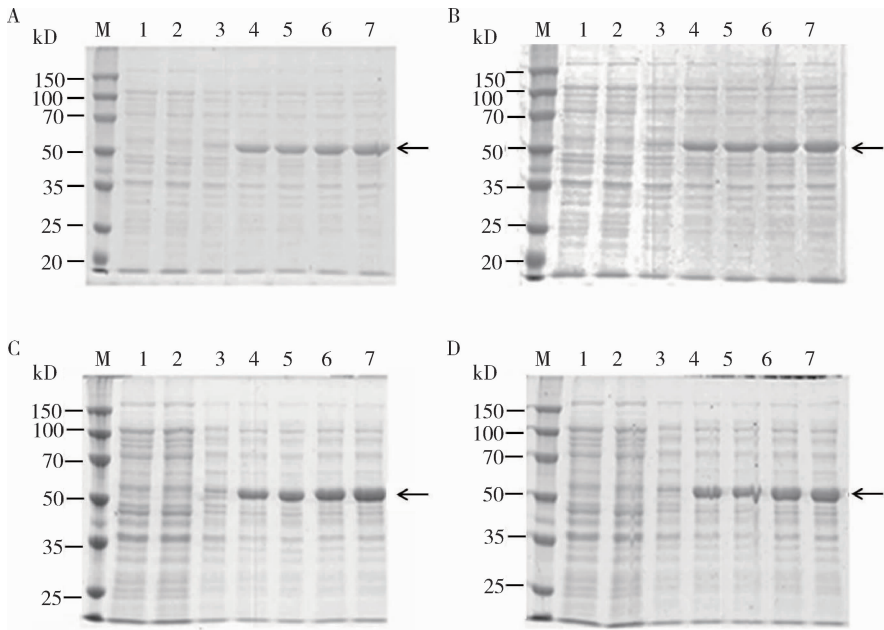


图 6 IPTG 浓度和诱导时间对 Endo A 蛋白表达影响

Fig. 6 Impact of IPTG concentration and induction time on the expression of Endo A protein

A - D: IPTG 诱导时间分别为 4, 6, 8 和 10 h IPTG induction for 4, 6, 8 and 10 h, respectively. M: 15 ~ 150 kD 蛋白质分子量标准 15 - 150 kD protein marker; 1: Rosetta 菌全菌蛋白 Total protein of Rosetta; 2: pET-28a 空载体转化菌全菌蛋白 Total protein of pET-28a empty plasmid transformant; 3: 未诱导 pET-28a-Endo A 重组质粒转化菌全菌蛋白 Total protein of pET-28a-Endo A recombinant plasmid transformant without induction; 4 - 7: 28℃ 时 IPTG 终浓度分别为 0.4, 0.6, 0.8 和 1.0 mmol/L 条件下 pET-28a-Endo A 重组质粒转化菌全菌蛋白 Total protein of pET-28a-Endo A recombinant plasmid transformant by induction at 28℃ with 0.4, 0.6, 0.8 and 1.0 mmol/L IPTG, respectively. 箭头表示诱导的 Endo A 融合蛋白。The arrows indicate the expressed Endo A fusion protein.

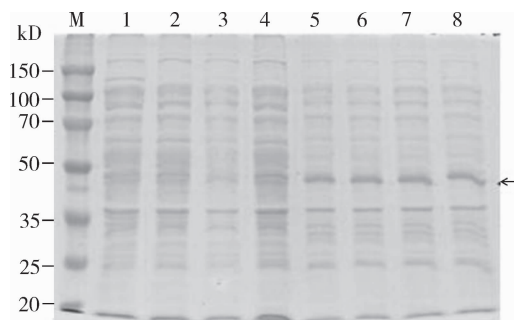


图 7 28℃ 诱导 10 h IPTG 浓度对 Endo B 蛋白表达影响

Fig. 7 Impact of IPTG concentration on the expression of Endo B after IPTG induction for 10 h at 28℃

M: 15 ~ 150 kD 蛋白质分子量标准 15 - 150 kD protein marker; 1: Rosetta 菌全菌蛋白 Total protein of Rosetta; 2: 未诱导 pET-28a 空载体转化菌全菌蛋白 Total protein of pET-28a transformant without induction; 3: 诱导 pET-28a 空载体转化菌全菌蛋白 Total protein of pET-28a transformant by induction; 4: 未诱导 pET-28a-Endo B 重组质粒转化菌全菌蛋白 Total protein of pET-28a-Endo B transformant without induction; 5 - 8: 加入 IPTG 浓度分别为 0.4, 0.6, 0.8 和 1.0 mmol/L 诱导时, pET-28a-Endo B 重组质粒转化菌全菌蛋白 Total protein of pET-28a-Endo B transformant by IPTG induction at the concentration of 0.4, 0.6, 0.8 and 1.0 mmol/L, respectively. 箭头表示诱导的融合蛋白 Endo B。The arrows indicate the expressed Endo B fusion protein.

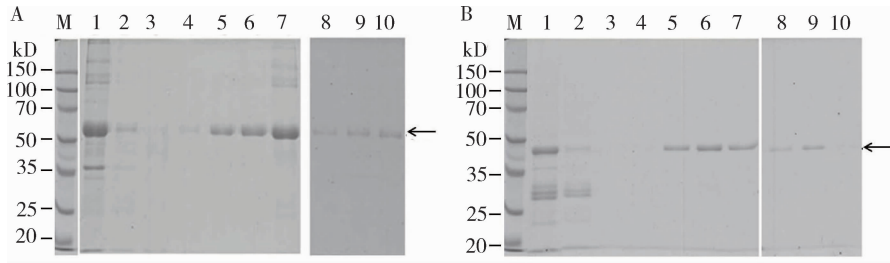


图8 蛋白 Endo A (A)和 Endo B (B)过柱纯化结果分析

Fig. 8 Purification of Endo A (A) and Endo B (B) by affinity column chromatography

A: Endo A; B: Endo B. M: 15 ~ 150 kD 蛋白质分子量标准 15 - 150 kD protein marker; 1: Endo A 和 Endo B 包涵体蛋白液过柱后的收集液 Collected solution of the dissolution of Endo A and Endo B inclusion body through the column; 2: 上样缓冲液洗脱液 Eluted solution of the loading buffer through the column; 3 - 10: 分别含 10, 20, 50, 80, 100, 120, 150 和 200 mmol/L 咪唑洗脱缓冲液过柱收集液 Collected solution of 10, 20, 50, 80, 100, 120, 150 and 200 mmol/L imidazole elution buffer through the column, respectively. 箭头分别指示过柱纯化后 Endo A 和 Endo B 蛋白。The arrows indicate the purified protein Endo A and Endo B, respectively.

表 1 抗体 ELISA 结果分析

Table 1 ELISA results of antibodies

稀释比 Dilution ratio	OD ₄₅₀ 值 OD ₄₅₀ value			
	Endo A 免疫血清 Endo A immune serum	Endo A 免疫前血清 Endo A pre-immune serum	Endo B 免疫血清 Endo B immune serum	Endo B 免疫前血清 Endo B pre-immune serum
1:10 000	1.913 ± 0.091	0.085 ± 0.015	0.791 ± 0.076	0.072 ± 0.011
1:100 000	0.594 ± 0.018	0.086 ± 0.018	0.657 ± 0.147	0.070 ± 0.009
1:1 000 000	0.193 ± 0.010	0.090 ± 0.014	0.189 ± 0.032	0.080 ± 0.013
1:10 000 000	0.120 ± 0.008	0.085 ± 0.009	0.148 ± 0.031	0.075 ± 0.018

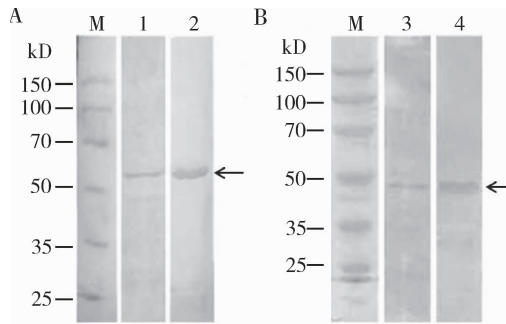


图9 Western blot 检测 Endo A (A)和 Endo B (B)多克隆抗体的免疫特异性

Fig. 9 Detection of the immunological specificity of Endo A (A) and Endo B (B) polyclonal antibodies by Western blot

A: Endo A; B: Endo B. M: Protein Marker; 1: 褐飞虱总蛋白内源性 Endo A 检测 Detection of endogenous Endo A in the total protein of *Nilaparvata lugens*; 2: Endo A 纯化蛋白检测结果 Detection of purified Endo A; 3: 褐飞虱总蛋白内源性 Endo B 检测 Detection of endogenous Endo B in the total protein of *N. lugens*; 4: Endo B 纯化蛋白的检测检测结果 Detection of purified Endo B. 箭头分别指示由 Endo A 和 Endo B 抗体检测到的 Endo A 和 Endo B 蛋白条带。The arrows indicate Endo A and Endo B detected by their polyclonal antibodies, respectively.

2.4 Endo A 和 Endo B 在褐飞虱卵巢中的表达和定位

用免疫荧光技术研究 Endo A 和 Endo B 在褐飞虱卵巢中的表达情况。结果显示,Endo A 和 Endo B 都在褐飞虱卵巢中普遍表达,在卵巢小管的各个部分均有表达(图 10: A - C, G - I),它们在卵巢滤泡

细胞的细胞间隙、细胞膜、细胞质广泛分布,而在滤泡细胞的细胞膜核内则少量分布(图 10: D - F, J - L)。除细胞核外,Endo A 和 Endo B 蛋白与脂类物质(Dil 染色)的分布模式类似,且与正在侵入褐飞虱卵巢的类酵母共生菌(yeast-like symbionts, YLS)共定位(图 10: D - F, J - L)。

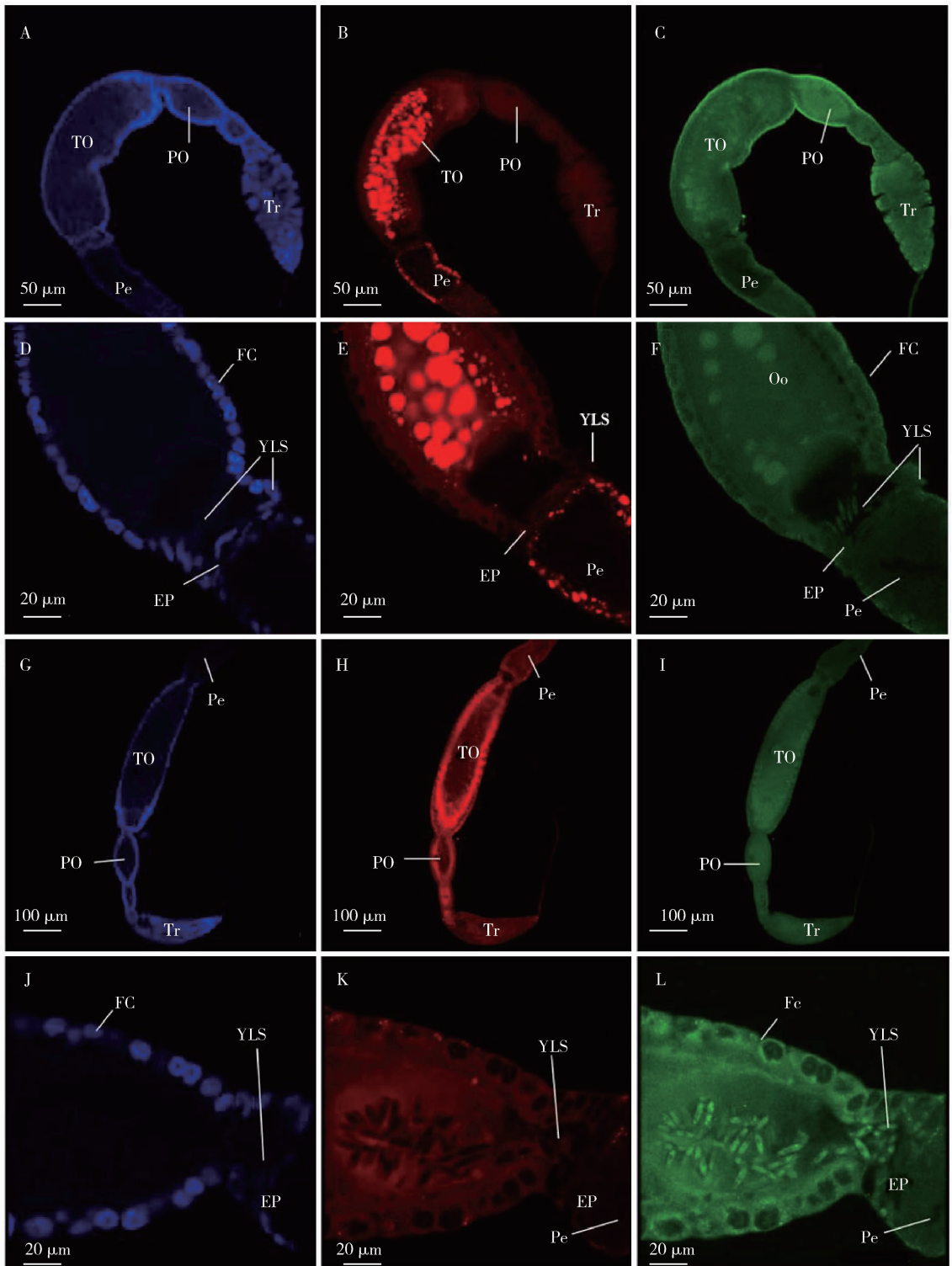


图 10 免疫荧光检测 Endo A 和 Endo B 在褐飞虱卵巢集中的蛋白表达和定位

Fig. 10 Detection of the expression and localization of Endo A and Endo B in *Nilaparvata lugens* ovary by immunofluorescence
 A - F: Endo A; G - L: Endo B. 蓝色、红色、绿色分别指示细胞核、脂类物质和 Endo A (或 Endo B) Blue, red and green signal represent nucleus, lipids and protein Endo A (or protein Endo B), respectively. Oo: 卵母细胞 Oocyte; FC: 液泡细胞 Follicle cell; YLS: 类酵母共生菌 Yeast-like symbiont; EP: 上皮栓 Epithelial plug; Pe: 卵巢柄 Petiole; TO: 倒一卵母细胞 Terminal oocyte; PO: 倒二卵母细胞 Penultimate oocyte; Tr: 滋养区 Tropharium of ovariole.

3 讨论

本研究克隆得到褐飞虱 *Endo A* 和 *Endo B* 两个吞蛋白基因,进化分析表明二者在昆虫中较为保守,说明这两个基因在褐飞虱中可能发挥着较为重要的作用。免疫荧光结果显示,褐飞虱的 *Endo A* 和 *Endo B* 在卵巢中广泛表达,并且二者的定位与脂类物质的分布相似,说明它们在褐飞虱卵巢吸收脂类物质和卵巢成熟有关。Tsai 等(2014)的研究也发现,*Endo B* 在果蝇卵母细胞内吞卵黄的过程中具有重要作用,与本研究的结果一致。免疫荧光结果还显示,*Endo A* 和 *Endo B* 还与入侵褐飞虱卵巢的类酵母共生菌共定位,说明这两个蛋白与 YLS 入侵褐飞虱卵巢有一定的关联。

三级结构预测分析表明,*Endo A* 和 *Endo B* 蛋白在 BAR 结构域上存在较大差异,说明二者在细胞膜变化、囊泡形成等功能上可能存在差别。有研究发现,*Endo A* 与 *Endo B* 存在功能差异,*Endo A* 主要参与突触囊泡内吞的多个环节(Pechstein *et al.*, 2015),包括膜表面受体内吞调节信号转导如表皮生长因子介导的内吞作用(Soubeyran *et al.*, 2003)和 $\beta 1$ -肾上腺素能受体介导的内吞作用(Vinatier *et al.*, 2006),以及与参与神经退行性疾病如阿尔茨海默病(Cao *et al.*, 2014)和亨廷顿病(Zuccato *et al.*, 2010)的蛋白相关;而 *Endo B* 在调节细胞凋亡(Xu *et al.*, 2016)、自噬和抑制肿瘤发生(Takahashi *et al.*, 2007)以及调节线粒体膜动力方面(Wang *et al.*, 2016)发挥重要作用。

在制备多克隆抗体过程中,为后期更容易纯化,我们选择带 $6 \times \text{His}$ 的 pET-28a 作为融合表达载体。通过改变诱导时间和 IPTG 诱导浓度,我们最终选择 *Endo A* 和 *Endo B* 的诱导条件为 0.4 mmol/L IPTG 28°C 诱导 10 h。尽管融合蛋白多存在于包涵体中,但并不影响其免疫原性,且包涵体表达量大,蛋白相对纯度高,利于蛋白纯化(李江峰等, 2016)。在后期纯化时,本研究采取逐步提高咪唑浓度的方式从 Ni 柱进行洗脱目的蛋白,得到了较好的纯化效果,有报道称在咪唑中加入一定量的 DTT,可以提高纯化效果,但高浓度 DTT 也有可能对 Ni 柱造成损伤(孙海霞等, 2014),从本研究来看,并不需要添加 DTT。本研究还发现,利用超滤离心管可以实现对目的蛋白的快速回收,其过程相较于使用半透膜对变性蛋白逐步复性的复杂处理步骤更加方便、高效、

省时。这些结果为最终获得了高效价、特异性强的 *Endo A* 和 *Endo B* 多克隆抗体提供了基础。

综上所述,本研究以褐飞虱吞蛋白为研究对象,克隆 *Endo A* 和 *Endo B* 基因,并对其生物信息学和结构进行了分析。通过制备多克隆抗体,我们研究了 *Endo A* 和 *Endo B* 在褐飞虱卵巢的表达定位,为今后深入研究这两个蛋白在褐飞虱的生物学功能奠定了分子基础。

参考文献 (References)

- Bottrell DG, Schoenly KG, 2012. Resurrecting the ghost of green revolutions past: the brown planthopper as a recurring threat to high-yielding rice production in tropical Asia. *J. Asia-Pac. Entomol.*, 15 (1): 122–140.
- Cao M, Milosevic I, Giovedi S, De CP, 2014. Upregulation of Parkin in endophilin mutant mice. *J. Neurosci.*, 34(49): 16544–16549.
- Chen L, Li H, Zhao R, Zhu J, 2009. Study progress of cell endocytosis. *J. Clin. Oncol.*, 8(6): 360–365.
- Chen LZ, Yu XP, Chen JM, Lv ZX, Zheng XS, Zhang JF, 2006. Advance in research on the application of symbiotes in the management of the brown planthoppers, *Nilaparvata lugens* (Stål). *Agrochemicals*, 45(11): 726–729. [陈列忠, 俞晓平, 陈建明, 吕仲贤, 郑许松, 张珏锋, 2006. 共生菌在褐飞虱防治中的应用. *农药*, 45(11): 726–729]
- Cheng XN, Wu JC, Ma F, 2003. Brown Planthopper: Occurrence and Control. China Agriculture Press, Beijing. [程遐年, 吴进才, 马飞, 2003. 褐飞虱研究与防治. 北京: 中国农业出版社]
- Dasgupta S, Jin SJ, Shao C, Mukhopadhyay ND, Sokhi UK, Das SK, Brait M, Talbot C, Yung RC, Begum S, 2013. SH3GL2 is frequently deleted in non-small cell lung cancer and downregulates tumor growth by modulating EGFR signaling. *J. Mol. Med.*, 91 (3): 381–393.
- Gortat A, Sanroman MJ, Vannier C, Schmidt AA, 2012. Single point mutation in Bin/Amphiphysin/Rvs (BAR) sequence of endophilin impairs dimerization, membrane shaping, and Src homology 3 domain-mediated partnership. *J. Biol. Chem.*, 287(6): 4232–4247.
- Jing SL, He GC, Jiang L, Li G, Liu H, Chen Y, Qin R, 2013. Advancement in studies on the virulent of brown planthopper. *Botanical Research*, (2): 6–12. [荆胜利, 何光存, 江磊, 李刚, 刘虹, 陈雁, 覃瑞, 2013. 褐飞虱致害性研究进展. *植物学研究*, (2): 6–12]
- Kjaerulf O, Brodin L, Jung A, 2011. The structure and function of endophilin proteins. *Cell Biochem. Biophys.*, 60(3): 137–154.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, 2007. ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics*, 23(21): 2947–2958.
- Li JF, Wan HF, Wang JH, Cai L, 2016. Prokaryotic expression and purification of human interleukin-6 and renaturation of inclusion body. *Chin. J. Cell. Mol. Immunol.*, 32(2): 228–231. [李江峰, 万惠芳, 王继华, 才蕾, 2016. 人白介素 6 的原核表达

- 和纯化及包涵体复性. 细胞与分子免疫学杂志, 32(2): 228 - 231]
- Li RD, 1996. Brown Planthopper and Its Population Management. Fudan University Press, Shanghai. [李汝铎, 1996. 褐飞虱及其种群管理. 上海: 复旦大学出版社]
- Lv ZX, Yu XP, Tao LY, Chen JM, Zheng XS, Zhang QH, Huang FK, Tang J, 1998. The virulence characteristics of various populations of brown planthopper. *J. Southwest Agric. Univ.*, 20(5): 446 - 449. [吕仲贤, 俞晓平, 陶林勇, 陈建明, 郑许松, 张启华, 黄凤宽, 唐健, 1998. 褐飞虱虫源的致害特性研究. 西南农业大学学报, 20(5): 446 - 449]
- Murdoch JD, Rostovsky CM, Gowrisankaran S, Arora AS, Soukup SF, Vidal R, Capece V, Freytag S, Fischer A, Verstreken P, Bonn S, Raimundo N, Milosevic I, 2016. Endophilin-A deficiency induces the Foxo3a-Fbxo32 network in the brain and causes dysregulation of autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Cell Rep.*, 17(4): 1071 - 1086.
- Pechstein A, Gerth F, Milosevic I, Jäpel M, Eichhorn-Grünig M, Vorontsova O, Bacetic J, Maritzen T, Shupliakov O, Freund C, 2015. Vesicle uncoating regulated by SH3-SH3 domain-mediated complex formation between endophilin and intersectin at synapses. *EMBO Rep.*, 16(2): 232 - 239.
- Singh VK, Mangalam AK, Dwivedi S, Naik S, 1998. Primer premier; program for design of degenerate primers from a protein sequence. *Biotechniques*, 24(2): 318 - 319.
- Soda K, Balkin DM, Ferguson SM, Paradise S, Milosevic I, Giovedi S, Volpicelli-Daley L, Tian X, Wu Y, Ma H, 2012. Role of dynamin, synaptojanin, and endophilin in podocyte foot processes. *J. Clin. Invest.*, 122(12): 4401 - 4411.
- Soubeyran P, Kowanzet K, Szymkiewicz I, Langdon, Amp WY, Dikic I, 2003. Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors. *Nature*, 416(6877): 183 - 187.
- Sun HX, Chen J, Yang ZF, 2014. Prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of cytochrome P450 gene *CYP4C62* from *Nilaparvata lugens* (Hemiptera; Delphacidae). *Acta Entomol. Sin.*, 57(6): 656 - 662. [孙海霞, 陈俊, 杨之帆, 2014. 褐飞虱细胞色素 P450 基因 *CYP4C62* 的原核表达及多克隆抗体的制备. 昆虫学报, 57(6): 656 - 662]
- Takahashi Y, Coppola D, Matsushita N, Cualing HD, Sun M, Sato Y, Liang C, Jung JU, Cheng JQ, Mul JJ, 2007. Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat. Cell Biol.*, 9(10): 1142 - 1151.
- Takahashi Y, Meyerkord CL, Wang HG, 2008. BAR gaining membranes for autophagosome formation: regulation of autophagy and tumorigenesis by Bif-1/Endophilin B1. *Autophagy*, 4(1): 121 - 124.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28(10): 2731 - 2739.
- Tsai YC, Chiang W, Liou W, Lee WH, Chang YW, Wang PY, Li YC, Tanaka T, Nakamura A, Pai LM, 2014. Endophilin B is required for the *Drosophila* oocyte to endocytose yolk downstream of Oskar. *Development*, 141(3): 563 - 573.
- Vinatier J, Herzog E, Plamont MA, Wojcik SM, Schmidt A, Brose N, Daviet L, El MS, Giros B, 2006. Interaction between the vesicular glutamate transporter type 1 and endophilin A1, a protein essential for endocytosis. *J. Neurochem.*, 97(4): 1111 - 1125.
- Wang YH, Wang JQ, Wang Q, Yun W, Guo C, Quan C, Chai T, Tang TS, 2016. Endophilin B2 promotes inner mitochondrial membrane degradation by forming heterodimers with Endophilin B1 during mitophagy. *Sci. Rep.*, (6): 1 - 13.
- Xu L, Wang Z, He SY, Zhang SF, Luo HJ, Zhou K, Li XF, Qiu SP, Cao KY, 2016. Bax-interacting factor-1 inhibits cell proliferation and promotes apoptosis in prostate cancer cells. *Oncol. Rep.*, 36(6): 3513 - 3521.
- Zuccato C, Valenza M, Cattaneo E, 2010. Molecular mechanisms and potential therapeutical targets in Huntington's disease. *Physiol. Rev.*, 90(3): 905 - 981.

(责任编辑: 马丽萍)