小地老虎谷胱甘肽-*S*-转移酶 AiGSTs1 的分子特性及其对杀虫剂胁迫的响应*

李茂业[1**] 黄 岩[1] 蒋秀云[1] 何佶弦[2***] 刘 苏[1***]

（1. 作物有害生物综合治理安徽省重点实验室，植物病虫害生物学与绿色防控安徽普通高校重点实验室，安徽农业大学植物保护学院，合肥 230036；2. 四川省烟草公司广元市公司，广元 628017）

摘 要 **【目的】** 鉴定小地老虎 *Agrotis ipsilon* sigma 家族谷胱甘肽-*S*-转移酶（*GST*）基因，明确其编码蛋白质的催化活性，阐明该基因在小地老虎不同发育期、不同组织及在毒死蜱和高效氯氟氰菊酯胁迫下的表达模式，为深入探究小地老虎 *GST* 在杀虫剂解毒代谢中的功能提供理论基础。**【方法】** 利用同源检索方法从小地老虎转录组中鉴定 *GST* 基因，利用原核表达系统表达重组蛋白并使用试剂盒检测其活性，使用实时荧光定量 PCR 技术分析基因的表达模式。**【结果】** 从小地老虎转录组中鉴定了一个编码 sigma 家族 GST 的 cDNA 序列，命名为 *AiGSTs1*。其编码的 AiGSTs1 蛋白含有谷胱甘肽结合位点和底物结合位点，具有 GSTs 的典型特征。在大肠杆菌中成功表达了重组 AiGSTs1 蛋白，测得此蛋白不仅具有谷胱甘肽转移酶活性，还具有过氧化物酶活性。毒死蜱和高效氯氟氰菊酯均可抑制重组 AiGSTs1 蛋白的活性。*AiGSTs1* 在供试的小地老虎不同发育期和组织中均有表达，但在蛹期和幼虫脂肪体中表达量最高。使用 LD_{50} 剂量毒死蜱和高效氯氟氰菊酯处理小地老虎幼虫后，*AiGSTs1* 的表达水平显著上升。**【结论】** 本研究明确了小地老虎 *AiGSTs1* 的序列、所编码蛋白的活性和表达模式。毒死蜱和高效氯氟氰菊酯能够诱导 *AiGSTs1* 表达水平上调，表明该基因可能在这 2 种杀虫剂的解毒代谢中起重要作用。

关键词 小地老虎；谷胱甘肽-*S*-转移酶；原核表达；毒死蜱；高效氯氟氰菊酯；解毒代谢

Molecular characterization of glutathione-*S*-transferase (AiGSTs1) in *Agrotis ipsilon* subject to insecticide stress

LI Mao-Ye[1**] HUANG Yan[1] JIANG Xiu-Yun[1] HE Ji-Xian[2***] LIU Su[1***]

(1. Anhui Province Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops, Key Laboratory of Biology and Sustainable Management of Plant Diseases and Pests of Anhui Higher Education Institutes, School of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2. Sichuan Guangyuan Tobacco Company, Guangyuan 628017, China)

Abstract **[Objectives]** To provide a theoretical basis for exploring the role of GSTs in insecticide detoxification in *Agrotis ipsilon* by identifying the sigma class glutathione-*S*-transferase (*GST*) gene in *A. ipsilon*, determining the catalytic activity of the protein encoded by this gene, and elucidating its expression patterns in different developmental stages, tissues, and in response to the stress induced by chlorpyrifos and lambda-cyhalothrin. **[Methods]** The *A. ipsilon GST* gene was identified from transcriptome data using a homological search method. Recombinant protein was expressed in a prokaryotic expression system and its activity detected with commercial kits. The expression pattern of the gene was analyzed using reverse transcription quantitative PCR. **[Results]** A cDNA (designated *AiGSTs1*) sequence encoding a putative sigma class GST was identified in the *A. ipsilon* transcriptome. Protein encoded by *AiGSTs1* contain glutathione-binding and substrate-binding sites, which are typical characteristics of GSTs. Recombinant AiGSTs1 protein was expressed in *Escherichia coli*, and this protein

*资助项目 Supported projects：安徽省自然科学基金面上项目（1908085MC70）；中国烟草总公司四川省公司科技项目（SCYC202112）

**第一作者 First author，E-mail：limaoye81@ahau.edu.cn

***共同通讯作者 Co-corresponding authors，E-mail：181060703@qq.com；suliu@ahau.edu.cn

收稿日期 Received：2020-11-30；接受日期 Accepted：2021-04-19

displayed not only GST activity but also peroxidase activity. In addition, the activity of AiGSTs1 was significantly inhibited by chlorpyrifos and lambda-cyhalothrin. *AiGSTs1* mRNA was detectable in different developmental stages and tissues. Highest expression was in the pupal stage and the larval fat body. Furthermore, *AiGSTs1* transcription levels were significantly upregulated in larvae exposed to LD_{50} doses of chlorpyrifos and lambda-cyhalothrin. **[Conclusion]** Transcription of *AiGSTs1* can be induced by chlorpyrifos and lambda-cyhalothrin, which suggests that the *AiGSTs1* gene may play essential roles in the metabolic detoxification of these insecticides.

Key words *Agrotis ipsilon*; GST; expression; chlorpyrifos; lambda-cyhalothrin; metabolic detoxification

谷胱甘肽-*S*-转移酶（Glutathione-*S*-transferases，GSTs）是一类多功能代谢酶，在生物体中广泛存在（陈澄宇等，2015）。GSTs 的主要功能是催化还原型谷胱甘肽与有害化合物的偶联，增强这些化合物的水溶性，使它们能够被快速排出细胞（徐莉等，2020）。在昆虫中，GSTs 具有多种重要的生理功能，例如代谢外源有毒物质（植物次生化合物和化学杀虫剂等）、保护细胞免受氧化损伤、代谢内源激素以及降解触角感器中的气味分子等（Li *et al.*，2007，2018；Enya *et al.*，2015；李帅等，2018）。因此 GSTs 对于昆虫的生命活动至关重要。

昆虫的 GSTs 包括胞质型和微粒体型两大类，其中绝大多数为胞质型 GSTs（尤燕春等，2013）。根据其氨基酸序列一致性、蛋白结构与生化特性，可将昆虫胞质型 GSTs 划分为 delta、epsilon、omega、sigma、theta 和 zeta 6 个家族，不能被划分至这 6 个家族的 GST 均被归为“未分类（Unclassified）”组（金燕璐等，2018）。目前，针对昆虫 GSTs 的鉴定与功能已有较多探索，有研究发现 delta 和 epsilon 家族的一些 GSTs 具有代谢植物次生物质和杀虫剂的活性，而 sigma 家族的一些 GSTs 具有解毒代谢、保护细胞及维持机体稳态的功能（Li *et al.*，2007）。前人（Yamamoto *et al.*，2006；Li *et al.*，2020）研究表明，家蚕 *Bombyx mori* 和小菜蛾 *Plutella xylostella* 的 sigma 家族 GSTs 涉及苄氯菊酯、溴氰菊酯和唑虫酰胺的解毒代谢；沉默东亚飞蝗 *Locusta migratoria* 的 sigma 家族 *GST* 基因之后，试虫对甲萘威敏感性显著上升（Qin *et al.*，2012）。此外，黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的 sigma 家族 GST 能够代谢脂质过氧化物从而保护细胞（Singh *et al.*，2001）；中华蜜蜂 *Apis cerana* 和熊峰 *Bombus ignitus* 的 sigma 家族 GST 能够保护 DNA 免受氧化损伤（Kim *et al.*，2011；Yan *et al.*，2013）；棉蚜 *Aphis gossypii*、二化螟 *Chilo suppressalis*、美国白蛾 *Hyphantria cunea* 和杨小舟蛾 *Micromelalopha troglodyta* 的 sigma 家族 GSTs 对杀虫剂、病原微生物和植物次生代谢物的胁迫有应激响应（Huang *et al.*，2011；金燕璐等，2018；Sun *et al.*，2020；王传鹏等，2020）。可见 sigma 家族 GSTs 在保护昆虫抵御外界胁迫中有重要作用。

小地老虎 *Agrotis ipsilon* 属鳞翅目 Lepidoptera 夜蛾科 Noctuidae，是在我国广泛分布的重要农业害虫。此虫寄主广泛，其幼虫能取食玉米、小麦、棉花、烟草、蔬菜等多种作物（张林林等，2013）。小地老虎幼虫白天隐藏于表土层中，夜间将幼苗咬断拖入土中，导致缺苗断垄；成虫具长距离迁飞能力，每年给农作物生产造成严重的经济损失（周燕等，2020）。当前对小地老虎的防治以喷施化学杀虫剂为主，毒死蜱和高效氯氟氰菊酯是 2 种常用的防治药剂。但在一些地区，小地老虎对这 2 种药剂的敏感性逐渐下降（于伟丽等，2012；何发林等，2018），这可能与 GSTs 有关。在前人（Liu *et al.*，2017a）的研究中发现一个 delta 家族 GST 可能参与小地老虎对这 2 种化学药剂的解毒。但小地老虎 sigma 家族 GST 是否参与杀虫剂的解毒过程，目前尚不清楚。本文从小地老虎中克隆一条 sigma 家族 *GST* 基因的 cDNA 序列（命名为 *AiGSTs1*），原核表达 AiGSTs1 重组蛋白并研究其催化活性，分析 *AiGSTs1* 基因在毒死蜱和高效氯氟氰菊酯胁迫下的表达模式。这将为深入探索 *AiGSTs1* 在杀虫剂

解毒中的生理功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

本研究所用小地老虎为实验室饲养种群。幼虫使用人工饲料饲养，成虫饲喂 10%的蜂蜜水。饲养过程中，选取 1、3、5 龄幼虫、蛹和雌雄成虫，其中 1 龄幼虫 50 头，其余龄期幼虫、蛹和成虫均为 15 头。另取 3 龄幼虫 30 头，在冰上解剖获取中肠、脂肪体、马氏管和表皮。不同龄期试虫取样与组织解剖均设置 3 次生物学重复。所有样品均用液氮速冻，置于 - 80 ℃超低温冰箱保存备用。

1.2 杀虫剂处理

毒死蜱和高效氯氟氰菊酯原药购自德国 Dr. Ehrenstorfer 公司，纯度均≥95%。将 2 种杀虫剂溶于丙酮，并梯度稀释至工作浓度（毒死蜱：1.8 ng·μL^{-1}；高效氯氟氰菊酯：0.6 ng·μL^{-1}）。采用点滴法，将 2 种药剂分别点滴至小地老虎 3 龄幼虫腹部背板上，每头幼虫点滴 1 μL。所用剂量均为这 2 种杀虫剂的 LD_{50} 剂量（Liu *et al.*，2017a）。对照组试虫点滴等量的丙酮。分别于处理后 6、12、18 和 24 h 收集存活的试虫，液氮速冻后置于 - 80 ℃超低温冰箱保存备用。实验设置 3 次生物学重复，每个生物学重复包含 20 头试虫。

1.3 RNA 提取和第 1 链 cDNA 合成

使用 RNAiso Plus 试剂（宝生物，大连）提取试虫和组织样本的总 RNA。使用琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 2000 超微量分光光度计（Thermo Scientific，美国）检测 RNA 的完整性和浓度。利用 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒（宝生物，大连）合成第 1 链 cDNA。

1.4 *AiGSTs1* 克隆与序列分析

Gu 等（2013）此前已报道了小地老虎转录组数据。本实验以斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* SlGSTs1（GenBank 登录号：AUN86411）氨基酸序列为模板，使用 BLAST 软件的 TBLASTN 算法进行同源检索（Altschul *et al.*，1997），获得 *AiGSTs1* 的 cDNA 序列。据此设计基因特异性引物（表 1），使用 KOD FX DNA 聚合酶，以小地老虎第 1 链 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增产物经凝胶电泳分离、切胶纯化等步骤后，连入 pEASY Blunt E2 表达载体（全式金，北京），送生物公司测序。*AiGSTs1* 所编码蛋白质的分子量和等电点使用 ExPASy 在线工具计算（http://web.expasy.org/compute_pi/），保守结构域和活性位点使用 CD-search 程序预测（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/cdd/cdd.shtml），多序列连配使用 Clustal Omega 程序进行（http://www.ebi.ac.uk/tools/msa/clustalo/），连配结果导入 MEGA7.0 软件，使用最大似然法（Maximum likelihood）构建系统进化树（Kumar *et al.*，2016）。各分支置信度经 Bootstrap 法循环检验 1 000 次。

1.5 重组蛋白表达与活性测定

将 1.4 中构建的 pEASY Blunt E2-AiGSTs1

表 1 本实验所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列（5′-3′） Primer sequence	扩增效率（%） Amplification efficiency	用途 Purpose
AiGSTs1-F	ATGCCGAAAAAACTTCAAT	未计算 Uncalculated	ORF 克隆、载体构建 ORF cloning; Vector construction
AiGSTs1-R	TTTCTTATCATCAAACTTGG		
AiGSTs1-qF	GTCTTCCATACGGCCAGTTC	91%	实时荧光定量 PCR Quantitative PCR
AiGSTs1-qR	ACGGTGTAGACCGCAGACTC		
β-actin-qF	GATGTTGACATTCGTAAG	95%	
β-actin-qR	ATCTTGATCTTCATTGTG		

表达载体(表达的重组蛋白的羧基端带有组氨酸标签)转入大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞，挑取阳性克隆接种含 50 mg·L^{-1}氨苄青霉素的 LB 培养液，在 37 ℃、220 r/min 摇床上震荡培养，直至 OD_{600} 吸光值达到 0.6。然后加入终浓度为 0.5 mmol·L^{-1} 的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷（IPTG），继续震荡培养 3 h。在离心力 1 000×g、4 ℃条件下离心 10 min 收集菌体沉淀，弃去培养液，加入缓冲液（成分为 20 mmol·L^{-1} Tris·HCl，pH 7.4；500 mmol·L^{-1} NaCl）重悬菌体，反复冻融（ - 20 ℃冷冻，再置于室温融化）3 次，使细胞裂解。因 AiGSTs1 重组蛋白多为可溶状态，故使用 HisTrap 亲和纯化柱（GE Healthcare，瑞典）进行纯化，以 200 mmol·L^{-1} 咪唑洗脱。使用密理博公司 Centricon YM-10 型超滤管对蛋白进行脱盐和缓冲液置换。最终获得的纯化蛋白经由聚丙烯酰氨凝胶电泳（SDS-PAGE）分析，并使用 BCA 蛋白质定量试剂盒(南京建成生物工程研究所)测定蛋白浓度。使用 GST 活性测定试剂盒（南京建成生物工程研究所）检测 AiGSTs1 重组蛋白的谷胱甘肽转移酶活性，该试剂盒所用试剂为 1-氯-2,4-二硝基苯（CDNB）和还原型谷胱甘肽（GSH），所测得的蛋白活性表示为每毫克蛋白每分钟所消耗 CDNB 的物质的量。使用总谷胱甘肽过氧化物酶检测试剂盒(碧云天生物技术公司)检测 AiGSTs1 重组蛋白的过氧化物酶活性，该试剂盒所用试剂为过氧化氢异丙苯（Cumene hydroperoxide）、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（NADPH）和 GSH，所测得的蛋白活性表示为每毫克蛋白每分钟所消耗 NADPH 的物质的量。实验设置 3 次生物学重复，以不含重组 AiGSTs1 蛋白的反应液为对照。

1.6　杀虫剂对重组蛋白活性抑制实验

毒死蜱和高效氯氟氰菊酯溶于丙酮，浓度均稀释为 1 mg·L^{-1}。取 2 μL 杀虫剂溶液与 198 μL 重组蛋白溶液（含 1 μg 重组 AiGSTs1 蛋白、100 mmol·L^{-1} PBS）混合，置于室温下放置 30 min 后，使用 GST 活性测定试剂盒（南京建成生物工程研究所）检测 AiGSTs1 的残余活性。实验设置 3 次生物学重复，以仅加入 2 μL 丙酮的反应液为对照。

1.7　实时荧光定量 PCR

使用实时荧光定量 PCR（RT-qPCR）技术检测 *AiGSTs1* 的表达模式。所用引物列于表 1，使用小地老虎肌动蛋白 *β-actin* 基因作为内参（Gu *et al*.，2013）。RT-qPCR 所用试剂为宝生物（大连）公司 SYBR Premix ExTaq II（Tli RNaseH Plus），反应总体积为 20 μL，包含 10 μL SYBR Premix ExTaq II、1 μL（10 ng）第 1 链 cDNA 模板、0.4 μL 上游引物、0.4 μL 下游引物和 8.2 μL 无核酸酶的水。RT-qPCR 仪器为 Bio-Rad 公司 CFX96 型实时荧光定量 PCR 仪，热循环参数为：95 ℃ 30 s，1 个循环；95 ℃ 5 s、60 ℃ 25 s，40 个循环。热循环步骤结束后，温度从 60 ℃逐步上升至 95 ℃，记录熔解曲线，以排除引物二聚体和非特异性扩增。同时在每一轮反应中均包含无核酸酶的对照和无 cDNA 模板的对照，以检测潜在的污染。RT-qPCR 设置 3 次独立的生物学重复，基因的相对表达量使用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算（Livak and Schmittgen，2001）。

1.8　数据统计

使用 DPS 数据处理系统 v9.5 版进行数据统计（Tang and Zhang，2013），采用 Student's *t*-检验比较两组样本之间的差异显著性，使用单因素方差分析（One-way ANOVA）和 Tukey 氏多重比较法分析多个样本之间的差异显著性。显著性水平设为 $P<0.05$。

2　结果与分析

2.1　*AiGSTs1* 序列分析

通过检索小地老虎转录组，并经过 PCR 扩增和基因测序，获得了 1 条编码 GST 的 cDNA 序列。基于不同昆虫的 GSTs 构建了系统进化树，结果显示该小地老虎 GST 被聚在 sigma 分支（图 1）。因此，将其命名为 *AiGSTs1*（GenBank 登录号：MW014342）。*AiGSTs1* 序列中包含 636 bp 的开放阅读框，编码一个由 211 个氨基酸

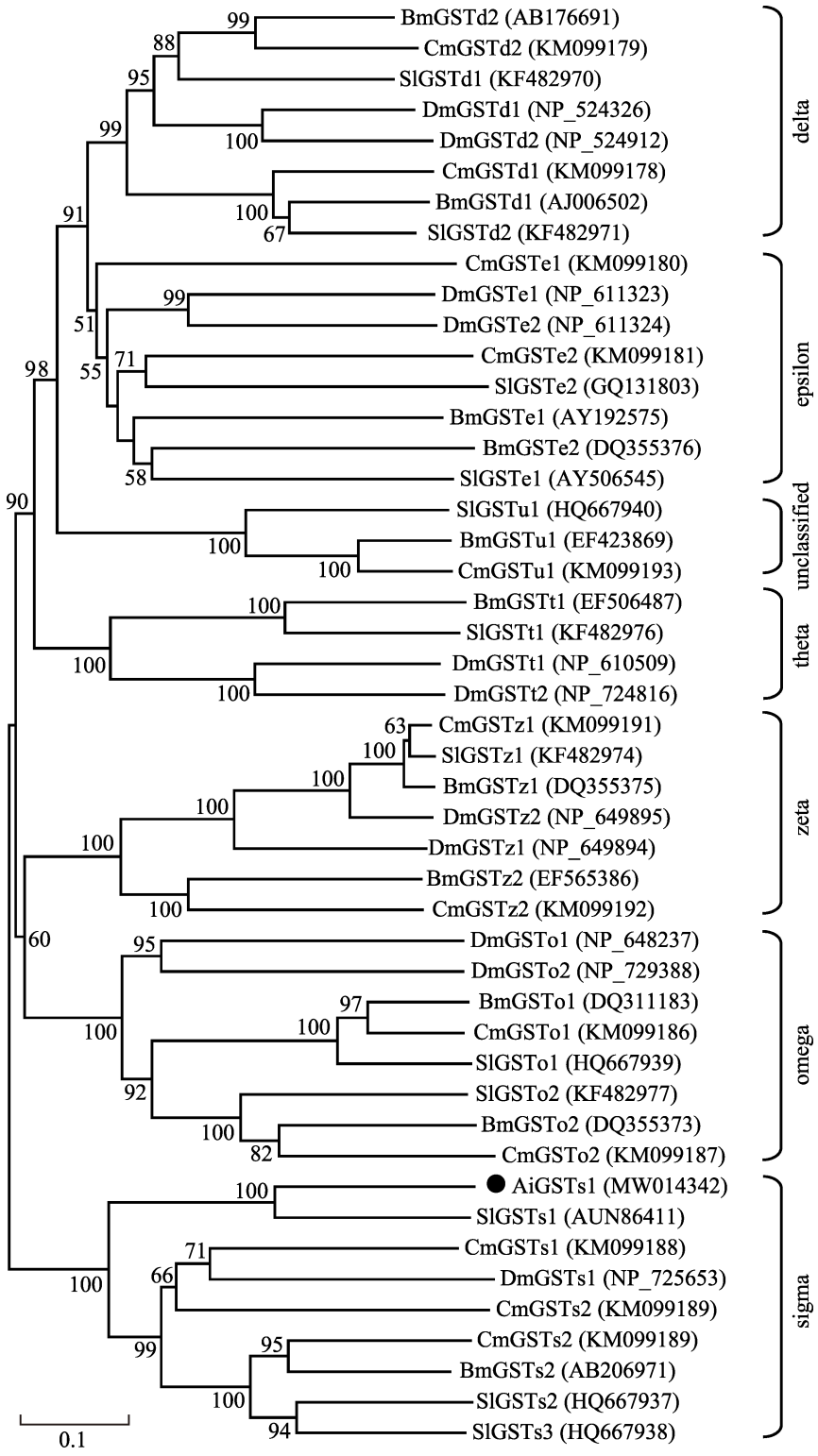

图 1　昆虫 GSTs 进化树

Fig. 1　Phylogenetic tree of insect GSTs

AiGSTs1 以实心圆形标注，低于 50 的自举值未显示。Dm：黑腹果蝇；Bm：家蚕；Sl：斜纹夜蛾；Cm：稻纵卷叶螟。括号中为 GenBank 登录号。

AiGSTs1 is indicated with a solid circle, bootstrap values lower than 50 are not shown. Dm: *Drosophila melanogaster*; Bm: *Bombyx mori*; Sl: *Spodoptera litura*; Cm: *Cnaphalocrocis medinalis*. GenBank accession numbers are shown in parentheses.

残基组成的蛋白质（图 2）。该蛋白质理论分子量为 24.6 ku，等电点为 7.4。多序列连配与 CD-search 程序预测结果表明，AiGSTs1 蛋白的谷胱甘肽结合位点包括 Tyr_7、Leu_{13}、Trp_{38}、Gln_{51}、Phe_{52}、Pro_{53}、Gln_{64} 和 Thr_{65} 等氨基酸残基，底物结合位点包括 Phe_{97}、Trp_{100}、Lys_{101}、Thr_{104}、Pro_{105}、Val_{159} 和 Ala_{162} 等氨基酸残基（图 2）。其中谷胱甘肽结合位点在不同昆虫 sigma 家族 GST 蛋白中的保守性较高，而底物结合位点的保守性相对较低（图 2）。

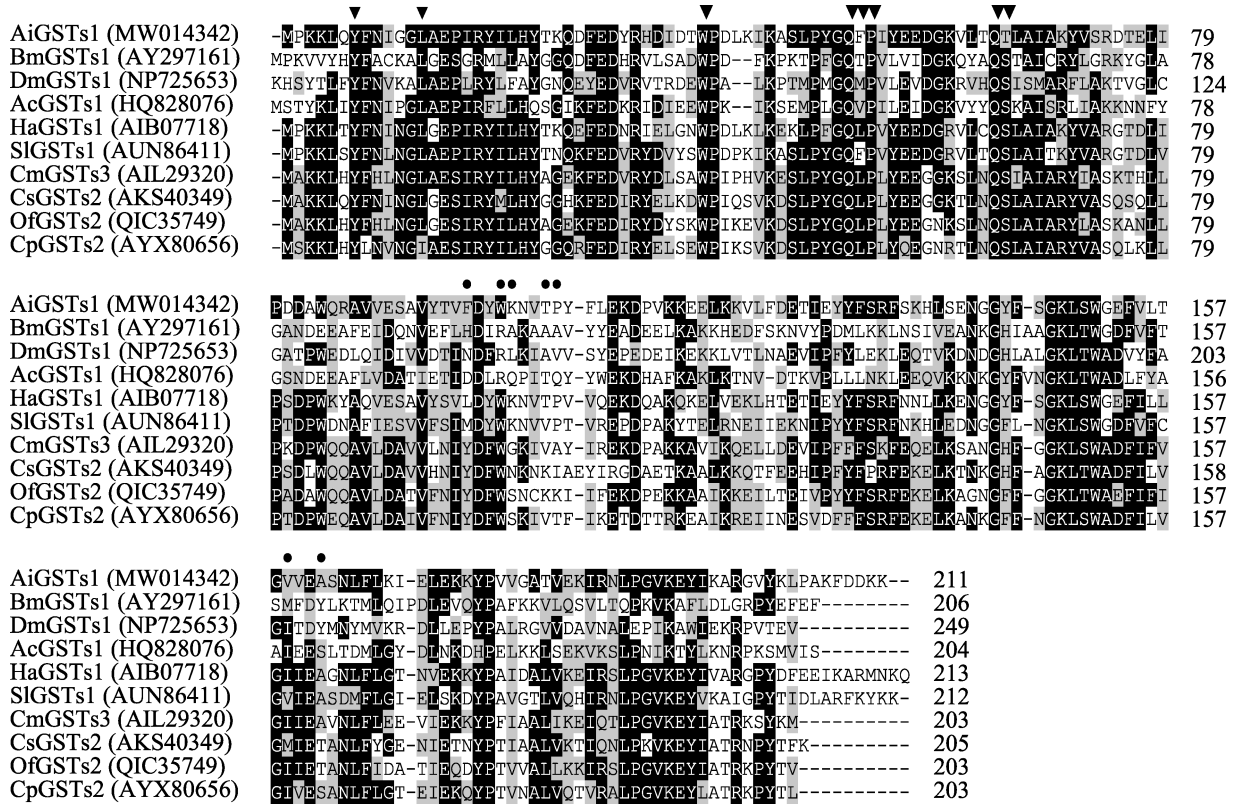

图 2　AiGSTs1 与其它昆虫 GSTs 蛋白序列连配

Fig. 2　Alignment of the protein sequence of AiGSTs1 and GSTs from other insect species

谷胱甘肽结合位点和底物结合位点分别以实心倒三角形和实心圆形标注。黑色背景表示一致的氨基酸残基，灰色背景表示相似的氨基酸残基。Ai：小地老虎；Bm：家蚕；Dm：黑腹果蝇；Ac：中华蜜蜂；Ha：棉铃虫；Sp：斜纹夜蛾；Cm：稻纵卷叶螟；Cs：二化螟；Of：亚洲玉米螟；Cp：苹果蠹蛾。括号中为 GenBank 登录号。

Glutathione-binding sites and substrate-binding sites are indicated with inverted filled triangles and circles, respectively. Identical amino acid residues are shaded black and similar amino acid residues are shaded grey. Bm: *Bombyx mori*; Dm: *Drosophila melanogaster*; Ac: *Apis cerana*; Ha: *Helicoverpa armigera*; Sl: *Spodoptera litura*; Cm: *Cnaphalocrocis medinalis*; Cs: *Chilo suppressalis*; Of: *Ostrinia furnacalis*; Cp: *Cydia pomonella*. GenBank accession numbers are shown in parentheses.

2.2　AiGSTs1 原核表达、活性与杀虫剂抑制效应

将构建的 pEASY Blunt E2-AiGSTs1 表达载体转化大肠杆菌 BL21(DE3)菌株，进行原核表达。经 SDS-PAGE 检测，发现若未经 IPTG 诱导，大肠杆菌表达产物在 25 ku 附近的蛋白条带不明显（图 3：A，泳道 2）；当体系中加入 IPTG 诱导后，大肠杆菌表达产物在 25 ku 附近有一条非常明显的蛋白条带（图 3：A，泳道 3），分子量大小与预期一致，表明 AiGSTs1 重组蛋白在大肠杆菌中成功表达。使用亲和层析柱获得了纯化的 AiGSTs1 重组蛋白（图 3：A，泳道 4），测得其谷胱甘肽转移酶活性为（13.2±1.8）μmol·min^{-1}·mg^{-1}（图 3：B），过氧化物酶活性为（0.5±0.1）μmol·min^{-1}·mg^{-1}（图 3：C）。杀虫剂对酶活性抑制实验结果表明，毒死蜱和高效氯氟氰菊酯均可显著抑制 AiGSTs1 重组蛋白的催化活性（图 4）。

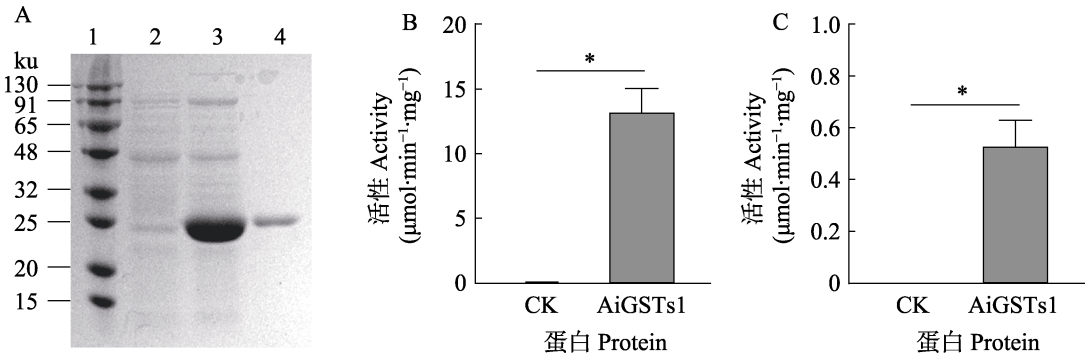

图 3　AiGSTs1 原核表达及活性测定

Fig. 3　Analysis of prokaryotic expression products of AiGSTs1 using SDS-PAGE

A. 聚丙烯酰氨凝胶电泳分析 AiGSTs1 原核表达产物，1：蛋白分子量标准；2：未经 IPTG 诱导的表达产物；3：使用 IPTG 诱导后的表达产物；4：纯化的 AiGSTs1 重组蛋白；B. AiGSTs1 的谷胱甘肽转移酶活性测定，以不含 AiGSTs1 重组蛋白的反应液为对照，星号表示经 Student's *t*-检验差异显著（$P < 0.05$）；C. AiGSTs1 的过氧化物酶活性测定，以不含 AiGSTs1 重组蛋白的反应液为对照，星号表示经 Student's *t*-检验差异显著（$P < 0.05$）。

A. Analysis of prokaryotic expression products of AiGSTs1 using SDS-PAGE, 1: Protein ladder; 2: Expression products from *E. coli* not induced by IPTG; 3: Expression products from *E. coli* induced by IPTG; 4: Purified recombinant AiGSTs1 protein; B. Glutathione transferase activity of recombinant AiGSTs1 protein, the activity in the reaction mixture in the absence of AiGSTs1 is used as a control, asterisk represents significant difference ($P < 0.05$, Student's *t*-test). C. Peroxidase activity of AiGSTs1, the activity in the reaction mixture in the absence of AiGSTs1 is set as a control, asterisk represents significant difference ($P < 0.05$, Student's *t*-test).

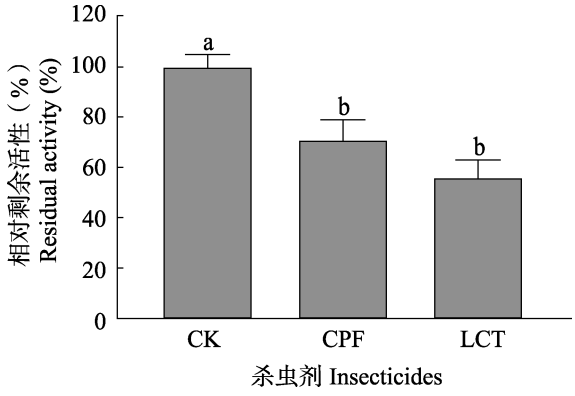

图 4　2 种杀虫剂对 AiGSTs1 重组蛋白活性的抑制效应

Fig. 4　Inhibition effect of two insecticides on the acticity of AiGSTs1

CPF：毒死蜱；LCT：高效氯氟氰菊酯。

CPF：Chlorpyrifos; LCT: Lambda-cyhalothrin.

柱上标有不同小写字母表示经单因素方差分析检验差异显著（$P < 0.05$，Tukey 氏多重比较法）。下图同。

Histograms with different lowercase letters indicate significant difference in One-way ANOVA ($P < 0.05$, Tukey's multiple comparison). The same below.

2.3　*AiGSTs1* 在不同发育期和不同组织中的表达模式

实时荧光定量 PCR 结果表明，小地老虎 1、3、5 龄幼虫、蛹和雌雄成虫中均检测到 *AiGSTs1* 的表达，但相对表达水平不同。*AiGSTs1* 在 1 龄幼虫期表达量最低，随着龄期增长其表达量逐渐升高，在蛹期的表达量达到最高，且 *AiGSTs1* 在蛹期的表达水平显著高于其它发育期（$P<0.05$）（图 5：A）。在成虫期，*AiGSTs1* 表达水平显著下降（图 5：A）。同时在小地老虎幼虫中肠、脂肪体、马氏管和表皮中检测到 *AiGSTs1* 的表达，结果显示该基因在脂肪体中的表达水平最高，且显著高于其它组织（$P<0.05$）。*AiGSTs1* 在中肠中的表达量也较高，在马氏管中表达量较低，在表皮中的表达水平最低（图 5：B）。

2.4　*AiGSTs1* 在杀虫剂胁迫下的表达模式

毒死蜱和高效氯氟氰菊酯处理均使 *AiGSTs1* 基因表达水平显著上调（$P<0.05$）。使用毒死蜱处理 6 h 后，*AiGSTs1* 表达量显著升高至对照组的 2.27 倍，处理后 12 h 该基因表达量上升至最大值（为对照组 4.96 倍）（图 6：A）。虽然毒死蜱处理 24 h 后 *AiGSTs1* 基因的表达量有所下降，但其表达水平仍显著高于对照组（$P<0.05$）（图 6：A）。高效氯氟氰菊酯处理 6、12 和 24 h 后，

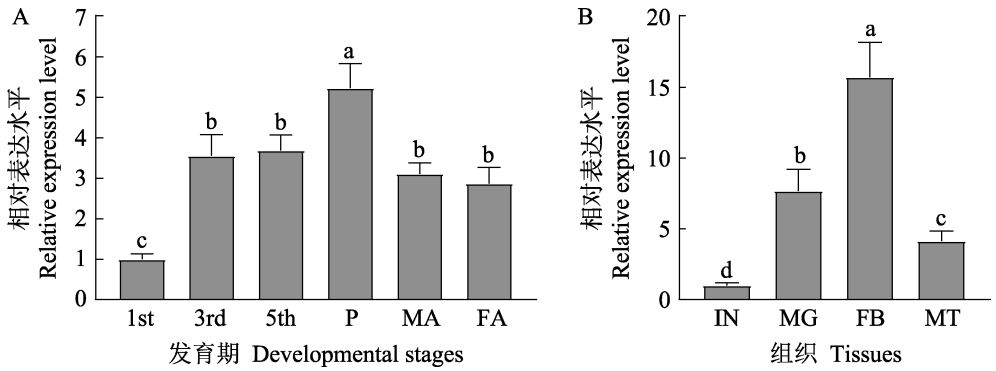

图 5　*AiGSTs1* 在不同发育期（A）和不同组织（B）中的表达模式

Fig. 5　Expression pattern of *AiGSTs1* in different developmental stages (A) and tissues (B)

1st：1 龄幼虫；3rd：3 龄幼虫；5th：5 龄幼虫；P：蛹；MA：雄成虫；FA：雌成虫；IN：体壁；MG：中肠；FB：脂肪体；MT：马氏管。

1st: First-instar larva; 3rd: Third-instar larva; 5th: Fifth-instar larva; P: Pupa; MA: Male adults; FA: Female adults; IN: Integument; MG: Midgut; FB: Fat body; MT: Malpighian tubules.

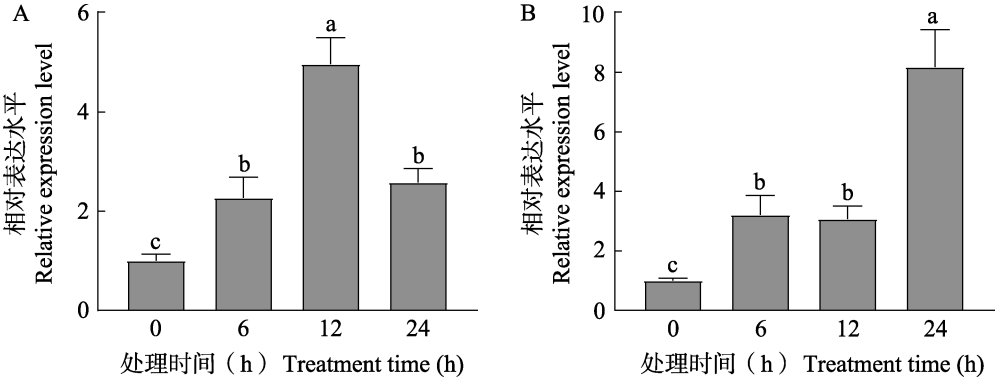

图 6　*AiGSTs1* 应对毒死蜱（A）和高效氯氟氰菊酯（B）的表达模式

Fig. 6　Expression pattern of *AiGSTs1* in response to chlorpyrifos (A) and lambda-cyhalothrin (B)

AiGSTs1 表达水平均显著上调（$P<0.05$），其中以处理 24 h 后 *AiGSTs1* 的表达水平为最高（图 6：B）。处理 6、12 和 24 h 后 *AiGSTs1* 表达水平分别为对照组的 3.21 倍、3.07 倍和 8.17 倍（图 6：B）。

3　结论与讨论

本研究首次鉴定并克隆了 1 条小地老虎 sigma 家族 *GST* 基因的 cDNA 序列（*AiGSTs1*）。*AiGSTs1* 编码的蛋白中含有谷胱甘肽结合位点和底物结合位点，符合 GSTs 的典型特征。针对黑腹果蝇和家蚕 sigma 家族 GSTs 蛋白晶体结构的研究表明，谷胱甘肽结合位点和底物结合位点中的一些氨基酸残基（如黑腹果蝇 DmGSTs1 的 Trp_{85}、Gln_{96}、Gln_{109} 和家蚕 BmGSTs1 的 Tyr_8、Leu_{14}、Trp_{39} 等）对于 GSTs 的催化功能具有重要作用（Agianian *et al.*，2003；Yamamoto *et al.*，2013）。这些氨基酸残基在小地老虎 AiGSTs1 蛋白序列中也较为保守，暗示这些残基可能具有保守的功能。此外，原核表达的 AiGSTs1 蛋白具有谷胱甘肽转移酶活性和过氧化物酶活性，表明 *AiGSTs1* 编码的是有功能的蛋白。*AiGSTs1* 序列的获得和重组蛋白的成功表达为深入研究该基因的生理功能奠定了基础。

大多数昆虫 *GST*s 基因的表达水平在不同发育阶段和不同组织中均不相同，例如美国白蛾 *GSTs1* 在卵和低龄幼虫期的表达量较高，而在蛹期和成虫期的表达量较低（Sun *et al.*，2020）。菜粉蝶 *Pieris rapae* 的 *GSTs1* 在幼虫脂肪体中的表达水平显著高于中肠和马氏管（Liu *et al.*，

2017b）。这些研究结果表明 *GST*s 在昆虫不同发育阶段和不同组织中可能发挥着不同的作用。本研究发现，在小地老虎不同的发育阶段均能检测到 *AiGSTs1* 基因的表达，但该基因在蛹期的表达量显著高于幼虫期和成虫期。蛹期是昆虫重要的变态期，在此期间进行着幼虫组织的分解和成虫组织的形成（刘素宁等，2019），*AiGSTs1* 在蛹期高表达表明该基因可能在蛹期特有的生理过程中行使功能。此外，由于幼虫期和成虫期小地老虎的生存条件和食物均存在差异，这些因素是否会对 *AiGSTs1* 的表达造成影响，也需要进一步探讨。本研究发现 *AiGSTs1* 在幼虫脂肪体中的表达水平显著高于其它组织。脂肪体是昆虫重要的贮能和代谢器官，与昆虫的生长、发育、变态和生殖等有密切联系（Arrese and Soulages，2010）。推测 *AiGSTs1* 在脂肪体中高表达可能与外源和内源物质的代谢有关。

毒死蜱和高效氯氟氰菊酯是当前化学防治小地老虎的常用药剂（于伟丽等，2012；何发林等，2018）。这 2 种药剂虽然作用机制不同，但在本实验中均能显著抑制 AiGSTs1 重组蛋白的活性，表明 AiGSTs1 与这 2 种杀虫剂存在结合效应，可能对这 2 种药剂具有代谢作用。本研究同时发现毒死蜱和高效氯氟氰菊酯胁迫能够诱导 *AiGSTs1* 表达水平显著上调，表明 *AiGSTs1* 基因的过量表达可能是小地老虎应对杀虫剂胁迫的一种生理响应机制。在其它昆虫中也发现一些 sigma 家族 *GST*s 基因受到杀虫剂胁迫后表达量会显著上升（Balakrishnan *et al*. 2018；Li *et al*.，2020），还发现一些 sigma 家族 GSTs 涉及杀虫剂的解毒（Yamamoto *et al*.，2006；Qin *et al*.，2012；马雯等，2019）。因此推测 *AiGSTs1* 可能参与毒死蜱和高效氯氟氰菊酯的解毒代谢。另一方面，很多昆虫的 sigma 家族 GSTs 具有过氧化物酶活性，能够保护机体免受氧化损伤（Kim *et al*.，2011；Yan *et al*.，2013）。在前人（Liu *et al*.，2017a）的研究中，发现使用毒死蜱和高效氯氟氰菊酯处理小地老虎幼虫后，试虫体内丙二醛含量显著上升。丙二醛是脂质过氧化的产物之一，其含量高低反映了细胞的氧化受损程度（刘小飞等，2018），因此丙二醛含量上升表明毒死蜱和高效氯氟氰菊酯使小地老虎产生了氧化损伤。考虑到 AiGSTs1 蛋白具有过氧化物酶活性，因而推测 *AiGSTs1* 表达水平的上调可能会帮助小地老虎应对毒死蜱和高效氯氟氰菊酯产生的氧化胁迫。

本研究基于小地老虎转录组数据，成功鉴定并克隆了 *AiGSTs1* 基因的完整 cDNA 序列。通过分析其序列特征、系统进化关系和所编码蛋白的性质，明确了 *AiGSTs1* 属于 sigma 家族，并且其所编码的蛋白具有谷胱甘肽转移酶和过氧化物酶活性。*AiGSTs1* 在小地老虎不同发育期和组织中均能检测到表达，但在蛹期和幼虫脂肪体中表达量最高。毒死蜱和高效氯氟氰菊酯处理均能诱导 *AiGSTs1* 的表达水平显著上调，表明该基因在应对毒死蜱和高效氯氟氰菊酯的胁迫中起重要作用。后续研究将利用 RNA 干扰等技术深入探索该基因在杀虫剂胁迫应答中的生理功能，为系统阐明小地老虎 GSTs 在杀虫剂敏感性下降和抗性形成中的作用机制奠定基础。

参考文献 (References)

Agianian B, Tucker PA, Schouten A, Leonard K, Bullard B, Gros P, 2003. Structure of a *Drosophila* sigma class glutathione *S*-transferase reveals a novel active site topography suited for lipid peroxidation products. *Journal of Molecular Biology*, 326(1): 151–165.

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ, 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17): 3389–3402.

Arrese EL, Soulages JL, 2010. Insect fat body: Energy, metabolism, and regulation. *Annual Review of Entomology*, 55: 207–225.

Balakrishnan B, Su S, Zhang C, Chen M, 2018. Identification and functional characterization of two sigma glutathione *S*-transferase genes from bird cherry-oat aphid (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology*, 112(1): 416–424.

Chen CY, Kang ZJ, Shi XY, Gao XW, 2015. Metabolic adaptation mechanisms of insects to plant secondary metabolites and their implications for insecticide resistance of insects. *Acta Entomologica Sinica*, 58(10): 1126–1139. [陈澄宇, 康志娇, 史雪岩, 高希武, 2015. 昆虫对植物次生物质的代谢适应机制及其对昆虫抗药性的意义. 昆虫学报, 58(10): 1126–1139.]

Enya S, Daimon T, Igarashi F, Kataoka H, Uchibori M, Sezutsu H,

Shinoda T, Niwa R, 2015. The silkworm glutathione *S*-transferase gene noppera-bo is required for ecdysteroid biosynthesis and larval development. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 61(1): 1–7.

Gu SH, Wu KM, Guo YY, Pickett J, Field L, Zhou JJ, Zhang YJ, 2013. Identification of genes expressed in the sex pheromone gland of the black cutworm *Agrotis ipsilon* with putative roles in sex pheromone biosynthesis and transport. *BMC Genomics*, 14(1): 636.

He FL, Jiang XY, Yao CT, Shang DL, Li XD, 2018. Co-toxicity of chlorantraniliprole with six insecticides against *Agrotis ipsilon*. *Plant Protection*, 44(6): 236–241. [何发林, 姜兴印, 姚晨涛, 尚佃龙, 李向东, 2018. 氯虫苯甲酰胺与 6 种药剂复配对小地老虎的联合毒力. 植物保护, 44(6): 236–241.]

Huang J, Wu S, Ye G, 2011. Molecular characterization of the sigma class glutathione *S*-transferase from *Chilo suppressalis* and expression analysis upon bacterial and insecticidal challenge. *Journal of Economic Entomology*, 104(6): 2046–2053.

Jin YL, Zhang BX, Lin HF, 2018. Identifying, and measuring the expression profiles, of *Chilo suppressalis* glutathione-*S*-transferase genes. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 55(3): 349–359. [金燕璐, 张邦贤, 林华峰, 2018. 二化螟谷胱甘肽-*S*-转移酶基因的鉴定与表达模式分析. 应用昆虫学报, 55(3): 349–359.]

Kim BY, Hui WL, Lee KS, Wan H, Yoon HJ, Gui ZZ, Chen S, Jin BR, 2011. Molecular cloning and oxidative stress response of a sigma-class glutathione *S*-transferase of the bumblebee *Bombus ignitus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 158(1): 83–89.

Kumar S, Stecher G, Tamura K, 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7): 1870–1874.

Li GW, Chen XL, Xu XL, Wu JX, 2018. Degradation of sex pheromone and plant volatile components by an antennal glutathione *S*-transferase in the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* Busck (Lepidoptera: Tortricidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 99(4): e21512.

Li S, Su L, Li BL, Li YP, Li GW, Wu JX, 2018. cDNA cloning, prokaryotic expression and enzymatic characteristics of the glutathione *S*-transferase GmolGST6 in *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). *Acta Entomologica Sinica*, 61(4): 398–409. [李帅, 苏丽, 李伯辽, 李怡萍, 李广伟, 仵均祥, 2018. 梨小食心虫谷胱甘肽 S-转移酶 GmolGST6 的基因克隆、原核表达和酶学特征. 昆虫学报, 61(4): 398–409.]

Li X, Schuler MA, Berenbaum MR, 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annual Review of Entomology*, 52: 231–253.

Li Y, Sun H, Tian Z, Su X, Li Y, Ye X, Zhou Y, Zheng S, Liu J, Zhang Y, 2020. The determination of *Plutella xylostella* (L.) GSTs (PxGSTs) involved in the detoxification metabolism of Tolfenpyrad. *Pest Management Science*, 76(12): 4036–4045.

Liu S, Cao Y, Zhang YX, Pan YM, Li SG, 2017a. Molecular characterization of a delta class glutathione *S*-transferase gene from the black cutworm *Agrotis ipsilon*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 20(4): 1175–1182.

Liu S, Zhang YX, Wang WL, Zhang BX, Li SG, 2017b. Identification and characterisation of seventeen glutathione *S*-transferase genes from the cabbage white butterfly *Pieris rapae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 143(1): 102–110.

Liu SN, Ren CH, Li S, 2019. Progress in research on hormonal and nutritional regulation in insect metamorphosis. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 56(4): 639–651. [刘素宁, 任充华, 李胜, 2019. 昆虫变态发育的激素和营养调控研究进展与展望. 应用昆虫学报, 56(4): 639–651.]

Liu XF, Meng JY, Zhang Y, Zhang CY, 2018. Effects of UV-Bradiation on the antioxidant system of *Myzus persicae*. *Journal of Environmental Entomology*, 40(6):1422–1428. [刘小飞, 孟建玉, 张滢, 张长禹, 2018. UV-B 照射对烟蚜抗氧化系统的影响. 环境昆虫学报, 40(6): 1422–1428.]

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408.

Ma W, Liu J, Zhnag XY, Shen GH, Qin XM, Zhang JQ, 2019. Enzymatic characteristics and metabolic analysis to malathion and p,p'-DDT of LmGSTS2 from *Locusta migratoria*. *Scientia Agricultura Sinica*, 52(8): 1389–1399. [马雯, 刘娇, 张学尧, 申国华, 秦雪梅, 张建琴, 2019. 飞蝗 LmGSTS2 的酶学特性及其对马拉硫磷、p,p'-DDT 的代谢分析. 中国农业科学, 52(8): 1389–1399.]

Qin G, Jia M, Liu T, Zhang X, Guo Y, Zhu KY, Ma E, Zhang J, 2012. Heterologous expression and characterization of a sigma glutathione *S*-transferase involved in carbaryl detoxification from oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). *Journal of Insect Physiology*, 58(2): 220–227.

Singh SP, Coronella JA, Beneš H, Cochrane BJ, Zimniak P, 2001. Catalytic function of *Drosophila melanogaster* glutathione *S*-transferase DmGSTS1-1 (GST-2) in conjugation of lipid peroxidation end products. *European Journal of Biochemistry*, 268(10): 2912–2923.

Sun L, Yin J, Du H, Liu P, Cao C, 2020. Characterisation of GST genes from the *Hyphantria cunea* and their response to the oxidative stress caused by the infection of *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus (HcNPV). *Pesticide Biochemistry and*

Physiology, 163(1): 254–262.

Tang QY, Zhang CX, 2013. Data processing system (DPS) software with experimental design, statistical analysis and data mining developed for use in entomological research. *Insect Science*, 20(2): 254–260.

Wang CP, Zhang S, Gao XK, Luo JY, Zhu XZ, Wang L, Zhang KX, Yang YH, Cui JJ, 2020. Clone and expression analysis of three glutathione-S-transferase genes in different host-specific types of *Aphis gossypii* Glover. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 57(4): 823–832. [王传鹏, 张帅, 高雪珂, 雒珺瑜, 朱香镇, 王丽, 张开心, 杨亦桦, 崔金杰, 2020. 三个棉蚜谷胱甘肽-S-转移酶（GST）基因克隆及在不同寄主专化型中的表达分析. 应用昆虫学报, 57(4): 823–832.]

Xu L, Wang JH, Mei L, Li D, 2020. Research progress on the molecular mechanisms of insecticides resistance mediated by detoxification enzymes and transporters. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 22(1): 1–10. [徐莉, 王建华, 梅宇, 李冬, 2020. 解毒酶和转运蛋白介导的害虫抗药性分子机制研究进展. 农药学学报, 22(1): 1–10.]

Yamamoto K, Higashiura A, Suzuki M, Aritake K, Urade Y, Uodome N, Nakagawa A, 2013. Crystal structure of a *Bombyx mori* sigma-class glutathione transferase exhibiting prostaglandin E synthase activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830(6): 3711–3718.

Yamamoto K, Zhang PB, Banno Y, Fujii H, 2006. Identification of a sigma-class glutathione-*S*-transferase from the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Applied Entomology*, 130(9): 515–522.

Yan H, Jia H, Gao H, Guo X, Xu B, 2013. Identification, genomic organization, and oxidative stress response of a sigma class glutathione *S*-transferase gene (AccGSTS1) in the honey bee, *Apis cerana cerana*. *Cell Stress and Chaperones*, 18(4): 415–426.

You YC, Xie M, You MS, 2013. The diversity and role of glutathione *S*-transferase in insecticide resistance in insects. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50(3): 831–840. [尤燕春, 谢苗, 尤民生, 2013. 昆虫谷胱甘肽 *S*-转移酶的多样性及其介导的抗药性. 应用昆虫学报, 50(3): 831–840.]

Yu WL, Du JH, Hu YP, Shen RP, Mu W, 2012. Toxicity of six insecticides to black cutworm *Agrotis ypsilon* (Rottemberg) and safety evaluation to oil organisms. *Acta Phytophylacica Sinica*, 39(3): 277–282. [于伟丽, 杜军辉, 胡延萍, 申瑞平, 慕卫, 2012. 六种杀虫剂对小地老虎的毒力及对土壤生物安全性评价. 植物保护学报, 39(3): 277–282.]

Zhang LL, Li YH, Wu JX, 2013. Effects of various host plants on the development and protective enzyme activity of the black cutworm, *Agrotis ypsilon*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50(4):1049–1054. [张林林, 李艳红, 仵均祥, 2013. 不同寄主植物对小地老虎生长发育和保护酶活性的影响. 应用昆虫学报, 50(4):1049–1054.]

Zhou Y, Zhnag HW, Wu KM, 2020. Frequency of migration of agricultural pests across the Bohai Sea in northern China and a control strategy for these species. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 57(2): 233–243. [周燕, 张浩文, 吴孔明, 2020. 农业害虫跨越渤海的迁飞规律与控制策略. 应用昆虫学报, 57(2): 233–243.]