

小地老虎硫氧还蛋白过氧化物酶 AiTPX1 的分子特征及其对杀虫剂胁迫的响应*

杨浩岚^{1**} 赵 乐^{1**} 曹 付¹ 江连强^{2***}
刘 苏¹ 李茂业¹ 李世广^{1***}

(1. 安徽农业大学植物保护学院, 作物有害生物综合治理安徽省重点实验室, 合肥 230036;

2. 四川省烟草公司凉山州公司, 西昌 615000)

摘 要 【目的】硫氧还蛋白过氧化物酶 (TPX) 在昆虫抵御氧化胁迫中具有重要作用。本研究旨在鉴定小地老虎 *Agrotis ipsilon* TPX 基因, 明确其编码蛋白质的抗氧化能力, 阐明 TPX 基因在小地老虎不同发育期、不同组织以及在 3 种杀虫剂 (高效氯氟氰菊酯、辛硫磷和氯虫苯甲酰胺) 胁迫下的表达模式, 为深入了解小地老虎 TPX 基因的生理功能奠定基础。【方法】利用同源检索技术从小地老虎转录组中鉴定 TPX 基因, 利用大肠杆菌表达重组蛋白并分析其抗氧化能力, 使用实时荧光定量 PCR 技术分析 TPX 基因的表达模式, 使用试剂盒检测幼虫体内 H₂O₂ 的含量变化。【结果】从小地老虎转录组中鉴定了 1 个 TPX 基因的 cDNA 序列, 命名为 *AiTPX1*。根据其编码蛋白质的结构特征, 结合系统进化分析结果, 确定 *AiTPX1* 属于 2-Cys 家族。在大肠杆菌中成功表达了 *AiTPX1* 重组蛋白, 该蛋白能够显著提高大肠杆菌在氧化胁迫下的存活率 ($P<0.05$)。 *AiTPX1* 基因在小地老虎不同发育期和不同组织中均有表达, 但在蛹期和幼虫中肠中表达量最高。使用 LC₅₀ 剂量的高效氯氟氰菊酯、辛硫磷和氯虫苯甲酰胺处理小地老虎幼虫后, 幼虫体内 H₂O₂ 含量显著升高, *AiTPX1* 表达水平也显著上升。高效氯氟氰菊酯处理后 24 h, *AiTPX1* 表达水平为对照组的 8.1 倍 ($P<0.05$), 辛硫磷和氯虫苯甲酰胺处理后 6 h, *AiTPX1* 转录水平分别为对照组的 6.5 倍和 6.0 倍 ($P<0.05$)。【结论】 *AiTPX1* 可能具有缓解高效氯氟氰菊酯、辛硫磷和氯虫苯甲酰胺引起的氧化胁迫的功能, 从而增强小地老虎幼虫对 3 种杀虫剂的耐受性。

关键词 小地老虎; 硫氧还蛋白过氧化物酶; 原核表达; 杀虫剂; 氧化胁迫; 表达模式

Molecular characterization of Thioredoxin peroxidase (AiTPX1) from *Agrotis ipsilon* and its response to insecticide stress

YANG Hao-Lan^{1**} ZHAO Le^{1**} CAO Fu¹ JIANG Lian-Qiang^{2***}
LIU Su¹ LI Mao-Ye¹ LI Shi-Guang^{1***}

(1. Anhui Provincial Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops, School of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2. Liangshan Branch of Sichuan Provincial Tobacco Corporation, Xichang 615000, China)

Abstract 【Aim】Thioredoxin peroxidases (TPX) plays an important role in protecting insects against oxidative stress. This study aims to provide a foundation for exploring the physiological function of the TPX gene in *A. ipsilon* by identifying the TPX sequence in *A. ipsilon* and determining the antioxidative ability of the protein encoded by the gene. The study will also investigate the expression profile of the TPX gene during different developmental stages, in various tissues, and in response to stress induced by three insecticides (lambda-cyhalothrin, phoxim, and chlorantraniliprole). 【Methods】The TPX gene was identified within the *A. ipsilon* transcriptome using a homology search-based method. The recombinant protein was expressed

*资助项目 Supported projects: 安徽省自然科学基金 (2108085MC102); 安徽省高校优秀青年人才支持计划 (gxyq2021167); 中国烟草总公司四川省公司科技项目 (SCYC202112)

**共同第一作者 Co-first authors, E-mail: 949900286@qq.com; 2393344978@qq.com

***共同通讯作者 Co-corresponding authors, E-mail: 76478889@qq.com; lsg920@ahau.edu.cn

收稿日期 Received: 2023-03-01; 接受日期 Accepted: 2023-08-23

in *Escherichia coli* and its antioxidative ability was analyzed. The expression profile of the TPX gene was determined using reverse transcription quantitative PCR. A commercial kit was used to test the H_2O_2 content of larvae. **[Results]** A cDNA sequence (designated AiTPX1) encoding putative TPX was identified from the *A. ipsilon* transcriptome. AiTPX1 encoded a protein belonging to the 2-Cys family based on its structural features and the results of the phylogenetic analysis. The recombinant AiTPX1 protein was successfully expressed in *E. coli*, significantly improving the tolerance of *E. coli* cells to oxidative stress. The mRNA of AiTPX1 was detected in all *A. ipsilon* developmental stages and tissues tested in this study, with the highest levels found in the pupal stage and larval midgut. After treatment with LC_{50} concentrations of lambda-cyhalothrin, phoxim, and chlorantraniliprole, the H_2O_2 content of larvae was significantly increased and there was notable upregulation of AiTPX1 at the transcriptional level. **[Conclusion]** AiTPX1 may enhance the tolerance of *A. ipsilon* larvae to lambda-cyhalothrin, phoxim, and chlorantraniliprole by alleviating oxidative stress induced by exposure to the three insecticides.

Key words *Agrotis ipsilon*; thioredoxin peroxidase; prokaryotic expression; pesticides; oxidative stress; expression profile

杀虫剂是影响昆虫个体生存和种群延续的重要环境胁迫因子之一(伍一军, 2020)。致死剂量的杀虫剂直接威胁昆虫的生存, 亚致死剂量的杀虫剂也会对昆虫的生理产生一系列负面影响, 特别是导致昆虫细胞内产生大量活性氧(Reactive oxygen species, ROS)(张伟等, 2022)。活性氧主要包括过氧化氢(H_2O_2)、超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)和羟基自由基($\cdot OH$)等(刘井兰等, 2006), 虽然正常浓度的活性氧在细胞信号途径中具有重要功能, 但细胞内积累过多的活性氧会引起脂质过氧化, 损伤细胞质膜和核酸等生物大分子, 破坏细胞稳态, 进而损伤组织和器官(Zorov *et al.*, 2014)。为了清除多余的活性氧, 维持机体活性氧平衡, 昆虫进化出了一套高效的防御系统, 这一系统包括多种抗氧化酶, 如超氧化物歧化酶(Superoxide dismutases, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)和硫氧还蛋白过氧化物酶(Thioredoxin peroxidase, TPX)等(Corona and Robinson, 2006)。

TPX 又称为过氧化物还原酶(Peroxiredoxin), 是一类普遍存在于原核和真核生物中的抗氧化酶, 其主要功能是通过硫氧还蛋白系统清除细胞内过量的 H_2O_2 , 保护机体免受氧化损伤(Perkins *et al.*, 2015)。根据保守半胱氨酸残基(Cys)的数量、位置以及蛋白结构特征, TPX 被分为 1-Cys、典型的 2-Cys 和非典型的 2-Cys 3 个家族(Lu and Holmgren, 2014)。在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、家蚕 *Bombyx mori*、棉铃虫

Helicoverpa armigera 和豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* 等昆虫中, TPX 的抗氧化功能已被研究, 其在昆虫响应杀虫剂胁迫中的功能也得到阐释(Radyuk *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2015; 张永栋等, 2017; 田志强等, 2021)。例如, 熏蒸剂二氧化氯处理会引起赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 和印度谷螟 *Plodia interpunctella* 活性氧含量升高以及 TPX 基因表达上调, 当通过 RNA 干扰(RNAi)沉默 TPX 基因后, 2 种昆虫对二氧化氯的耐受性均显著降低(Kim *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2015); 梨小食心虫 *Grapholita molesta* 也有相似的现象, 当沉默其 TPX 基因后, 幼虫对甲氨基阿维菌素苯甲酸盐的敏感性显著上升(Liu *et al.*, 2021)。

小地老虎 *Agrotis ipsilon* 属鳞翅目 Lepidoptera 夜蛾科 Noctuidae, 是一种世界性分布的迁飞性农业害虫。此虫寄主广泛, 其幼虫能够为害多种农林作物, 常造成缺苗断垄, 为害严重时甚至毁种重播(陈建明等, 2004)。长期以来, 对小地老虎的防治主要以喷施化学杀虫剂(如高效氯氟氰菊酯、辛硫磷和氯虫苯甲酰胺等)为主要手段(于伟丽等, 2012; 何发林等, 2018)。但目前仍不清楚化学药剂处理是否会引起小地老虎体内活性氧水平发生变化, 小地老虎 TPX 的分子特征及其对杀虫剂胁迫的响应也有待揭示。因此, 本研究从小地老虎中克隆了 1 条编码 TPX 的 cDNA 序列(命名为 AiTPX1), 分析了其编码蛋白的分子特征, 进一步研究了杀虫剂胁迫下

AiTPX1 基因的表达模式, 以期为深入探索 *AiTPX1* 的生理功能提供前期基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

小地老虎为本实验室饲养种群(李茂业等, 2021), 1 龄和 2 龄幼虫饲喂未喷施过农药的大白菜, 3 龄之后饲喂人工饲料(Zhou *et al.*, 2021)。幼虫化蛹后, 将蛹单头置于玻璃指形管中, 羽化的成虫饲喂 10% (v/v) 蜂蜜水。饲养条件为温度 (26 ± 2) °C, 相对湿度 65%±5%, 光周期为 16L:8D。收集 1-6 龄幼虫、蛹和雌雄成虫(均为孵化、蜕皮或羽化后 1 d 内且体型大小一致), 其中 1 龄幼虫 40 头, 其余龄期均为 10 头。另取蜕皮后 1 d 内且体型大小一致的 3 龄幼虫 30 头, 在冰上解剖分离为表皮, 中肠, 马氏管和脂肪体等不同组织。样本收集和组织解剖均设置 3 次生物学重复, 样品均用液氮速冻后保存于 -80 °C 冰箱。

1.2 杀虫剂处理

高效氯氟氰菊酯和氯虫苯甲酰胺均购自上海阿拉丁公司, 辛硫磷购自北京百灵威公司, 药剂纯度均≥97%。先将 3 种杀虫剂分别溶于丙酮(分析纯, 纯度≥99.5%, 西陇化工股份有限公司)配制为 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的母液, 再用蒸馏水将母液梯度稀释为 5 个不同浓度的工作液(高效氯氟氰菊酯工作液浓度为 0.31、0.63、1.25、2.5 和 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 辛硫磷和氯虫苯甲酰胺工作液浓度为 0.63、1.25、2.5、5 和 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。利用浸虫法, 将小地老虎 3 龄幼虫分别浸入上述工作液中 10 s 后取出, 用滤纸吸去体表多余药液。以 0.1% (v/v) 丙酮水溶液处理的幼虫为对照。随后将幼虫移至 24 孔板内(每孔 1 头), 放入 0.4 g 人工饲料并每日更换, 48 h 后检查死亡数。实验独立重复 3 次, 每个浓度处理包含 30 头幼虫。使用 DPS 数据处理系统 v19.05 版软件的机率值分析法(Tang and Zhang, 2013), 得到高效氯氟氰菊酯、辛硫磷和氯虫苯甲酰胺的致死中浓度(LC_{50})分别为 0.82、2.72 和 $1.67\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。使用 LC_{50} 浓度的 3 种药液处理小地老虎 3 龄幼虫(步骤同上), 以

0.1% (v/v) 丙酮水溶液处理为对照, 处理后 3、6、12、24 和 48 h 收集存活的幼虫, 液氮速冻后保存于 -80 °C 冰箱待用。实验设置 3 次生物学重复, 每重复包含 30 头幼虫。

1.3 *AiTPX1* 鉴定与序列分析

利用 BioEdit 软件中的 BLAST 程序, 以家蚕 BmTPX1 蛋白序列(GenBank 登录号: NP_001037083)为模板, 检索小地老虎转录组(Gu *et al.*, 2013), 得到 1 条编码小地老虎 TPX 的 cDNA 序列, 命名为 *AiTPX1*。使用 ORFfinder (www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/) 预测 *AiTPX1* 的开放阅读框; 使用 ExPASy (web.expasy.org/compute_pi/) 计算理论分子量和等电点; 分别使用 SignalP 5.0 (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) 和 TMHMM 2.0 (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/) 预测分泌信号肽和跨膜区; 多序列连配使用 Clustal Omega 程序进行 (www.ebi.ac.uk/tools/msa/clustalo/); 连配结果导入 MEGA11 软件, 使用最大似然法(Maximum likelihood)构建系统进化树, 各进化分支的置信度采用 Bootstrap 法重复抽样 1 000 次进行检验(Tamura *et al.*, 2021)。

1.4 总 RNA 提取及第 1 链 cDNA 合成

使用 RNAiso Plus 试剂(宝生物, 大连)提取总 RNA, 使用 1.0% (w/v) 琼脂糖(Biowest, 西班牙)凝胶电泳检测 RNA 样品的完整性, 利用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计(Thermo Scientific, 美国)分析 RNA 的浓度。第 1 链 cDNA 的合成使用 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover(东洋纺, 日本)反转录试剂完成。

1.5 蛋白表达和免疫印迹分析

使用 Primer Premier 5.0 软件设计基因特异性引物, 并在上下游引物的 5'端添加与载体重叠的 15 bp 序列以及 *Bam*H I 或 *Hind* III 限制性酶切位点(表 1)。使用此对引物, 利用 KOD Plus 高保真 DNA 聚合酶(东洋纺, 日本)扩增 *AiTPX1* 的完整开放阅读框。PCR 反应产物经过 1.0%

表 1 载体构建及荧光定量 PCR 试验所用引物
Table 1 Primers used in vector construction and real-time quantitative PCR experiment

基因 Gene	引物 Primer	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	扩增效率 (%) Amplification efficiency (%)	目的 Purpose
<i>AiTPX1</i>	F:	CTCGGTACCCTCGAGGGATCCATGCCTCTCCAGCTGACTAA	/	载体构建 Vector construction
	R:	AGACTGCAGGTCGACA <u>AGCTTT</u> TAGTAAGTAGGGTCAAGTTTGAGC		
<i>RpS3</i>	F:	AAGTCCATGAAGTTCGTA	92	定量 PCR RT-qPCR
	R:	GTACTCCTTGTCTTAGCA		
<i>β-actin</i>	F:	GATGTTGACATTCGTAAG	96	定量 PCR RT-qPCR
	R:	ATCTTGATCTTCATTGTG		
<i>AiTPX1</i>	F:	ATCAACACGCCACGCAAAC	93	定量 PCR RT-qPCR
	R:	TCCACCGACCGTCCAACA		

粗体字为与线性化 pCold II 载体两端重叠的 15 bp 序列, 下划线为 *Bam*H I 和 *Hind* III 位点。
The sequence (15 bp) overlapping with each end of the linearized pCold II vector is in bold font; *Bam*H I and *Hind* III sites underlined.

(w/v) 琼脂糖凝胶电泳分析后, 切下目的条带, 使用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒 (康宁生命科学有限公司, 吴江) 回收。将回收产物与预先经过 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后的 pCold II 线性化载体 (宝生物, 大连) 混合, 利用 ClonExpress II 一步法克隆试剂盒 (诺唯赞, 南京) 将 *AiTPX1* 的完整开放阅读框以“同源重组”的方式连接至 pCold II 载体的 *Bam*H I 和 *Hind* III 位点之间。将 pCold II-*AiTPX1* 重组质粒转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 涂布在含有氨苄青霉素 (浓度: 100 mg·L⁻¹) 的 LB 平板上, 倒置于 37 °C 培养箱中过夜培养。次日挑菌斑提取重组质粒, 送通用生物 (安徽) 股份有限公司测序。将测序结果正确的 pCold II-*AiTPX1* 质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞, 涂布于含有氨苄青霉素 (浓度: 100 mg·L⁻¹) 的 LB 平板上, 倒置于 37 °C 培养箱中过夜培养。次日挑取 1 个阳性单克隆接种于 5 mL LB 培养液 (含 100 mg·L⁻¹ 氨苄青霉素), 置于 37 °C、200 r/min 摇床上振荡培养, 每 30 min 用分光光度计测量 1 次, 待其 OD₆₀₀ 达到 0.6 后, 将这 5 mL 菌液全部加入到 1 L LB 培养液 (含 100 mg·L⁻¹ 氨苄青霉素) 中, 在 37 °C、200 r/min 摇床上振荡培养, 当 OD₆₀₀ 达到 0.4 时, 加入终浓度为 1 mmol·L⁻¹ 的异丙基 β-D-1-硫代半乳糖苷 (IPTG), 在 15 °C、180 r/min

摇床上继续培养 12 h。菌液经 3 000×g 离心 10 min, 弃去上清, 加入 100 mL 裂解缓冲液 (20 mmol·L⁻¹ Tris·HCl, pH 7.4; 500 mmol·L⁻¹ NaCl) 将菌体充分悬浮, 冰浴超声裂解。裂解产物经 15 000 ×g、4 °C 离心 15 min 后, 收集上清液进行 12% (w/v) SDS-PAGE 蛋白电泳分析。蛋白质样品经过电泳分离后, 半干转印到聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜上, 先与鼠抗 His-tag 单克隆抗体 (全式金, 北京; 5 000 倍稀释于含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液) 共同孵育 1 h, 随后用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液洗涤 5 次, 每次 5 min; 再与辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG (全式金, 北京; 5 000 倍稀释于含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液) 孵育 2 h, 最后用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液洗涤 5 次, 每次 5 min。免疫印迹信号使用 EasySee Western Blot 试剂盒 (全式金, 北京) 进行显色, 检测仪器为 Bio-Rad 公司 GelDoc XR 型成像系统。

1.6 抗氧化能力检测

挑取 1 个转化了 pCold II-*AiTPX1* 质粒的大肠杆菌 BL21(DE3) 阳性单克隆, 接种 25 mL LB 培养液 (含 100 mg·L⁻¹ 氨苄青霉素), 在 37 °C、200 r/min 摇床上振荡培养。以转化 pCold II 空载体的大肠杆菌 BL21(DE3) 作为对照组。当菌液

OD₆₀₀ 达到 0.3 时, 加入终浓度为 1 mmol·L⁻¹ 的 IPTG, 同时加入终浓度为 0.25 mmol·L⁻¹ 的 H₂O₂ 或 0.25 mmol·L⁻¹ 的过氧化氢异丙苯 (Cumene hydroperoxide, CHP), 在 15 °C、180 r/min 条件下继续培养。每隔 1 h 检测一次菌液 OD₆₀₀ 值, 据此判断细菌生长情况。检测 8 h 后, 将菌液稀释 1 000 倍, 吸取 200 μL 涂在含有氨苄青霉素的 LB 培养平板上, 在 37 °C 培养箱倒置培养 12 h, 统计菌落数量。实验设置 5 次生物学重复。

1.7 H₂O₂ 含量测定

将杀虫剂处理后的小地老虎 3 龄幼虫 (见 1.2 节) 在冰上预冷的 10 mmol·L⁻¹ PBS 缓冲液中充分匀浆, 匀浆液经过 15 000 ×g、4 °C 离心 10 min 后, 将上清液移至一个新的离心管中, 根据说明书使用过氧化氢含量检测试剂盒 (生工生物, 上海) 分析样品中的 H₂O₂ 含量。该试剂盒通过 H₂O₂ 与硫酸钛生成复合物, 通过测定产物在 415 nm 的吸光度, 即可实现对 H₂O₂ 浓度的测定。实验设置 3 次生物学重复。

1.8 实时荧光定量 PCR

使用实时荧光定量 PCR 分析 *AiTPX1* 的表达模式。所用引物见表 1, 以核糖体蛋白 (*RpS3*, GenBank 登录号: JQ822246) 和肌动蛋白 (*β-actin*, GenBank 登录号: JQ822245) 基因作为内参。为验证各对引物的特异性, 使用琼脂糖凝胶电泳分析各对引物的扩增产物, 并将产物测序, 确定扩增产物为靶基因。同时, 将第 1 链 cDNA 梯度稀释, 以之为模板进行扩增, 以 Ct 值和模板浓度对数值分别为纵、横坐标拟合直线, 根据直线的斜率计算引物扩增效率 (表 1)。荧光定量 PCR 反应体系 20 μL, 包括 10 μL SYBR Green Realtime PCR Master Mix (东洋纺, 日本)、0.5 μL 上游引物、0.5 μL 下游引物、1 μL (10 ng) 第 1 链 cDNA 和 8 μL 超纯水。所用仪器为 CFX96 型定量 PCR 仪 (Bio-Rad, 美国), 反应程序为 95 °C 2 min, 1 个循环; 95 °C 10 s, 60 °C 25 s, 40 个循环。反应完成后, 通过熔解曲线程序检测扩增过程是否产生引物二聚体。实验设 3 次生物学重复, 相对表达量使用 Pfaffl 方法计算

(Pfaffl, 2001)。

1.9 数据统计

使用 DPS 数据处理系统 v19.05 版软件 (Tang and Zhang, 2013) 对数据进行统计分析, 两组样本之间的差异显著性采用 Student's *t* 检验进行分析, 三组及以上样本之间的差异显著性通过单因素方差分析 (ANOVA) 和 Tukey's HSD 法进行比较。显著性水平设为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 *AiTPX1* 序列分析

从小地老虎转录组中鉴定了 1 条 *AiTPX1* 序列 (GenBank 登录号: MZ648005), 其包含 634 bp 的开放阅读框, 编码的蛋白质由 195 个氨基酸残基组成 (图 1)。该蛋白质理论分子量为 22.0 kD, 等电点为 6.4。*AiTPX1* 蛋白质序列中没有预测到分泌信号肽和跨膜区, 表明该蛋白位于细胞内。BLASTX 最佳匹配结果显示, *AiTPX1* 与亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* TPX1 的氨基酸一致性最高, 为 97.44%; 与其他代表性鳞翅目昆虫 TPX 的氨基酸一致性介于 91.79%-97.44% 之间 (表 2)。多序列连配结果显示 (图 1), *AiTPX1* 蛋白质序列中具有 2 个位置保守的半胱氨酸残基 (Cys₄₈ 和 Cys₁₆₉) 和 4 个活性位点残基 (Pro₄₁、Thr₄₅、Cys₄₈ 和 Arg₁₂₄)。此外, 在蛋白的羧基端还有 1 个 Tyr - Phe (YF) 基序 (图 1)。系统进化分析结果表明, *AiTPX1* 位于 2-Cys 进化分支中, 且与斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* TPX1 亲缘关系最近 (图 2)。

2.2 *AiTPX1* 重组蛋白的抗氧化性质分析

为了研究 *AiTPX1* 编码蛋白的抗氧化性质, 在大肠杆菌中表达了 *AiTPX1* 重组蛋白。经 IPTG 诱导后, 在转化 pCold II-*AiTPX1* 载体的大肠杆菌中产生了分子量约为 25 kD 的条带, 而转化 pCold II 空载体的大肠杆菌中则无此条带 (图 3: A)。进一步通过蛋白免疫印迹证明该条带为 *AiTPX1* 重组蛋白 (图 3: B)。

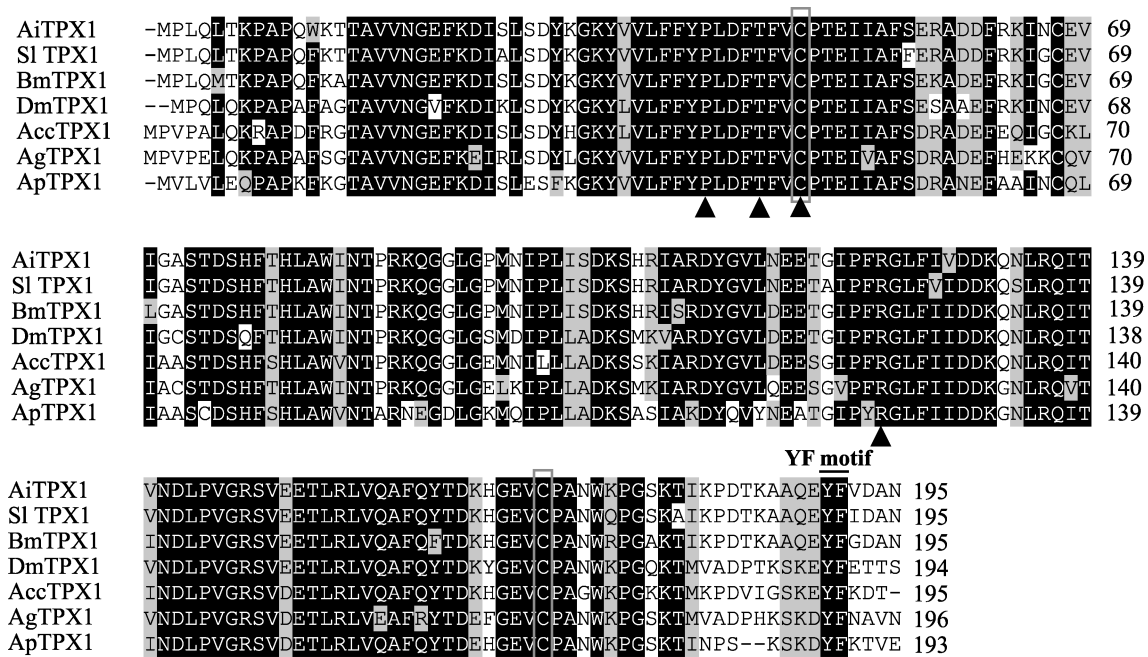


图 1 不同昆虫 TPX 蛋白质序列比对

Fig. 1 Alignment of the TPX protein sequences from different insect species

黑色和灰色背景分别表示一致的和相似的氨基酸残基。灰色方框所示为 2 个位置保守的半胱氨酸残基（Cys₄₈ 和 Cys₁₆₉），实心三角形表示保守的 4 个活性中心残基（Pro₄₁、Thr₄₅、Cys₄₈ 和 Arg₁₂₄）。“YF motif”表示位于蛋白质羧基端的 Tyr-Phe（YF）基序。斜纹夜蛾（Sl, KC685523），家蚕（Bm, NP_001037083），黑腹果蝇（Dm, CG1633），中华蜜蜂（Acc, HM641254），冈比亚按蚊（Ag, XP_308081），豌豆蚜（Ap, XM_001946102）。

Identical and similar amino acid residues are shaded black and grey, respectively. Two positionally conserved cysteines (Cys₄₈ and Cys₁₆₉) are in grey box. Four active - site residues (Pro₄₁, Thr₄₅, Cys₄₈, and Arg₁₂₄) conserved in all TPXs are marked with solid triangles. “YF motif” indicates the Tyr - Phe (YF) motif located at the C - terminus of the TPX proteins. Sl: *Spodoptera litura* (KC685523); Bm: *Bombyx mori* (NP_001037083); Dm: *Drosophila melanogaster* (CG1633); Acc: *Apis cerana cerana* (HM641254); Ag: *Anopheles gambiae* (XP_308081); Ap: *Acyrtosiphon pisum* (XM_001946102).

表 2 小地老虎与其他昆虫 TPX 氨基酸序列的一致性百分数

Table 2 Percent identities of amino acid sequences of TPXs between *Agrotis ipsilon* and other insect species

目 Order	物种名 Species name	GenBank 登录号 GenBank accession no.	一致性 (%) Identity (%)
鳞翅目 Lepidoptera	斜纹夜蛾 <i>Spodoptera litura</i>	XP_022829707	96.4
	棉铃虫 <i>Helicoverpa armigera</i>	XP_021192290	94.9
	梨小食心虫 <i>Grapholita molesta</i>	UAJ49551	94.4
	家蚕 <i>Bombyx mori</i>	XP_037871531	92.3
	小菜蛾 <i>Plutella xylostella</i>	XP_037964284	91.8
双翅目 Diptera	黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	NP_001285202	82.7
	桔小实蝇 <i>Bactrocera dorsalis</i>	XP_011201883	74.9
	埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>	XP_001648452	74.5
	致倦库蚊 <i>Culex quinquefasciatus</i>	XP_001844844	72.5
半翅目 Hemiptera	烟粉虱 <i>Bemisia tabaci</i>	XP_018914184	79.1
	玉米蚜 <i>Rhopalosiphum maidis</i>	XP_026821813	75.4
	褐飞虱 <i>Nilaparvata lugens</i>	XP_022192340	72.9

续表 2 (Table 2 continued)

目 Order	物种名 Species name	GenBank 登录号 GenBank accession no.	一致性 (%) Identity (%)
膜翅目 Hymenoptera	意大利蜜蜂 <i>Apis mellifera</i>	XP_003249289	79.8
	中华蜜蜂 <i>Apis cerana</i>	XP_016904161	79.4
	丽蝇蛹集金小蜂 <i>Nasonia vitripennis</i>	XP_001601016	75.4
鞘翅目 Coleoptera	白蜡窄吉丁 <i>Agrilus planipennis</i>	XP_018325578	74.9
	蜂巢小甲虫 <i>Aethina tumida</i>	XP_019881247	74.5
	赤拟谷盗 <i>Tribolium castaneum</i>	XP_970881	74.0

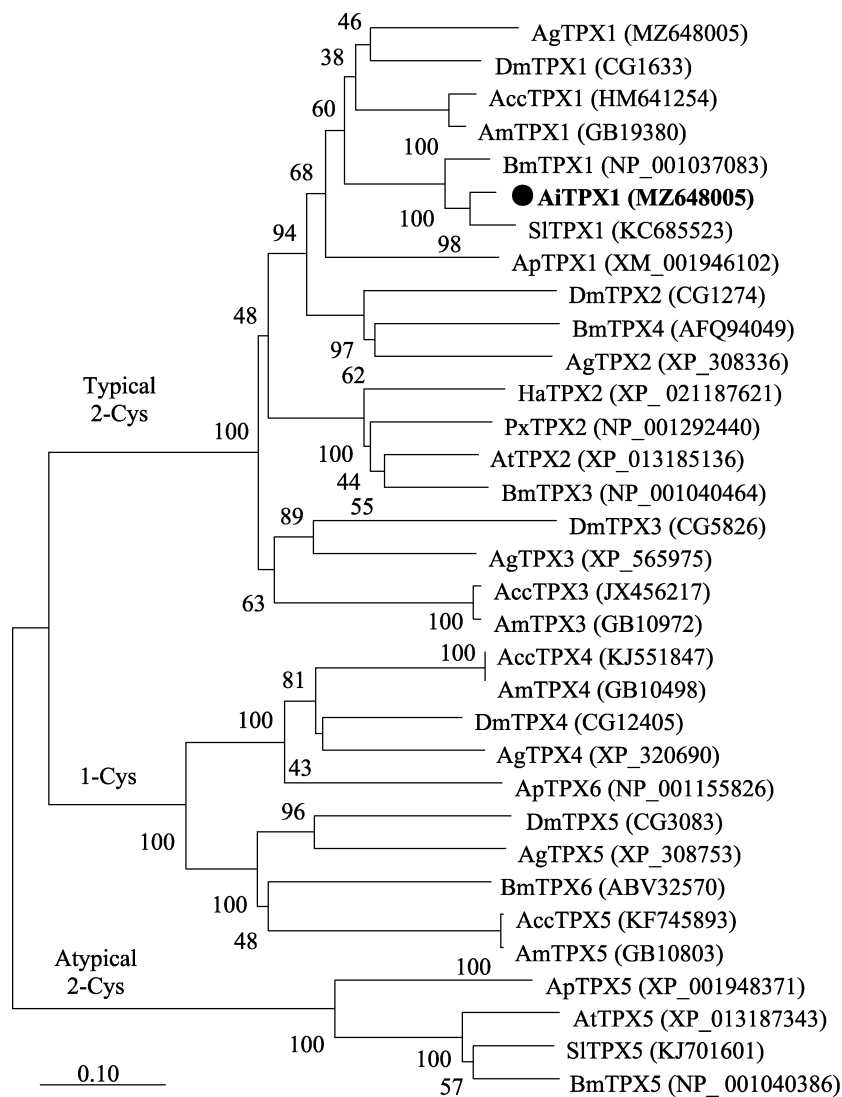


图 2 昆虫 TPX 系统进化分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of insect TPXs

AiTPX1 以实心圆形标注。Ap: 豌豆蚜; At: 脐橙螟; Ha: 棉铃虫; Px: 小菜蛾; Bm: 家蚕; Sl: 斜纹夜蛾; Acc: 中华蜜蜂; Am: 意大利蜜蜂; Dm: 黑腹果蝇; Ag: 冈比亚按蚊。括号中为 GenBank 登录号。

AiTPX1 is indicated with a solid circle. Ap: *Acyrtosiphon pisum*; At: *Amyelois transitella*; Ha: *Helicoverpa armigera*; Px: *Plutella xylostella*; Bm: *Bombyx mori*; Sl: *Spodoptera litura*; Acc: *Apis cerana cerana*; Am: *Apis mellifera*; Dm: *Drosophila melanogaster*; Ag: *Anopheles gambiae*. GenBank accession numbers are shown in parentheses.

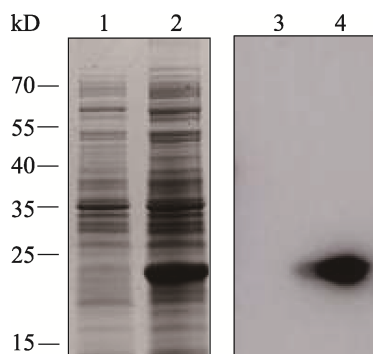


图 3 AiTPX1 重组蛋白的原核表达与免疫印迹分析

Fig. 3 Prokaryotic expression and western blotting analysis of recombinant AiTPX1 protein

1: SDS-PAGE 分析转化 pCold II 空载体的大肠杆菌表达产物; 2: SDS-PAGE 分析转化 pCold II -AiTPX1 载体的大肠杆菌表达产物; 3: Western blot 分析转化 pCold II 空载体的大肠杆菌表达产物; 4: Western blot 分析转化 pCold II -AiTPX1 载体的大肠杆菌表达产物。

1: Analysis of expression products from *E. coli* transformed with pCold II empty vector using SDS-PAGE; 2: Analysis of expression products from *E. coli* transformed with pCold II -AiTPX1 vector using SDS-PAGE; 3: Analysis of expression products from *E. coli* transformed with pCold II empty vector using Western blot; 4: Analysis of expression products from *E. coli* transformed with pCold II -AiTPX1 vector using Western blot.

AiTPX1 重组蛋白的表达显著增强了大肠杆菌细胞抗氧化胁迫的能力。当在培养液中加入 H_2O_2 或 CHP 之后, 表达 AiTPX1 的大肠杆菌的 OD_{600} 值均明显高于对照组 (图 4: A, B)。将菌液稀释后涂布 LB 培养平板, 表达 AiTPX1 的大肠杆菌长出的菌落数也明显多于对照组 (图 4: C, D)。统计结果表明, 在 H_2O_2 和 CHP 胁迫下, 表达 AiTPX1 的大肠杆菌菌落数分别是对照组菌落数的 5.90 和 3.75 倍 (图 4: E, F)。

2.3 AiTPX1 时空表达模式分析

使用实时荧光定量 PCR 分析了 AiTPX1 在小地老虎不同发育阶段的表达模式。结果显示, 在所有样本中均能检测到 AiTPX1 的表达 (图 5: A)。AiTPX1 在 1 龄幼虫期表达水平较低, 但从 2 龄幼虫期至蛹期该基因表达水平逐渐升高。但在成虫期, 该基因表达水平显著降低 ($P < 0.05$, 图 5: A)。同时检测了 AiTPX1 在小地老虎幼虫不同组织中的相对表达量, 结果表明该基因在中

肠的表达水平最高, 且显著高于该基因在表皮、马氏管和脂肪体中的表达水平 ($P < 0.05$, 图 5: B)。

2.4 杀虫剂胁迫对小地老虎 H_2O_2 浓度的影响

测定了 LC_{50} 剂量的高效氯氟氰菊酯、辛硫磷和氯虫苯甲酰胺处理对小地老虎幼虫体内 H_2O_2 浓度的影响。结果表明, 高效氯氟氰菊酯处理后 3 和 6 h, 幼虫 H_2O_2 水平与对照组差异不显著 ($P > 0.05$), 但处理后 12, 24 和 48 h, 幼虫 H_2O_2 水平均显著高于对照组 ($P < 0.05$, 图 6: A)。辛硫磷处理后 3 h, 幼虫 H_2O_2 水平与对照组无显著性差异 ($P > 0.05$), 但处理后 6-48 h 幼虫 H_2O_2 水平均显著上升 ($P < 0.05$, 图 6: B)。氯虫苯甲酰胺处理后, 在所有检测时间段 (3-48 h), 幼虫体内 H_2O_2 水平均显著高于对照组 ($P < 0.05$, 图 6: C)。其中辛硫磷处理 12 h 后幼虫 H_2O_2 浓度达到最高, 为对照组的 2.7 倍 (图 6: B), 而高效氯氟氰菊酯和氯虫苯甲酰胺均在处理 24 h 后幼虫 H_2O_2 浓度达到最高, 分别为对照组的 2.4 倍和 3.0 倍 (图 6: A, C)。

2.5 杀虫剂胁迫对 AiTPX1 表达的影响

检测了高效氯氟氰菊酯、辛硫磷和氯虫苯甲酰胺 (LC_{50} 剂量) 处理小地老虎 3 龄幼虫后 AiTPX1 基因表达水平的变化。结果表明, AiTPX1 对高效氯氟氰菊酯的响应相对较慢, 药剂处理 3、6 和 12 h, 该基因表达量与对照组均无显著差异 ($P > 0.05$); 处理 24 h 后, 该基因表达量显著上升至对照组的 8.13 倍, 处理 48 h 后该基因表达量仍显著高于对照组 ($P < 0.05$, 图 7: A)。AiTPX1 对辛硫磷和氯虫苯甲酰胺的响应较迅速, 药剂处理 6 h 后该基因表达量即显著上调 ($P < 0.05$), 但这 2 种药剂处理 24 h 后, AiTPX1 的表达量均下降至与对照组无显著差异的水平 ($P > 0.05$, 图 7: B, C)。

3 结论与讨论

昆虫的 TPX 在抵御由环境胁迫因子 (如极端低温和高温、紫外线、病原微生物及杀虫剂等) 引起的氧化损伤方面发挥着重要作用 (张永栋等, 2017; Cao *et al.*, 2018; 程杰等, 2018; 田

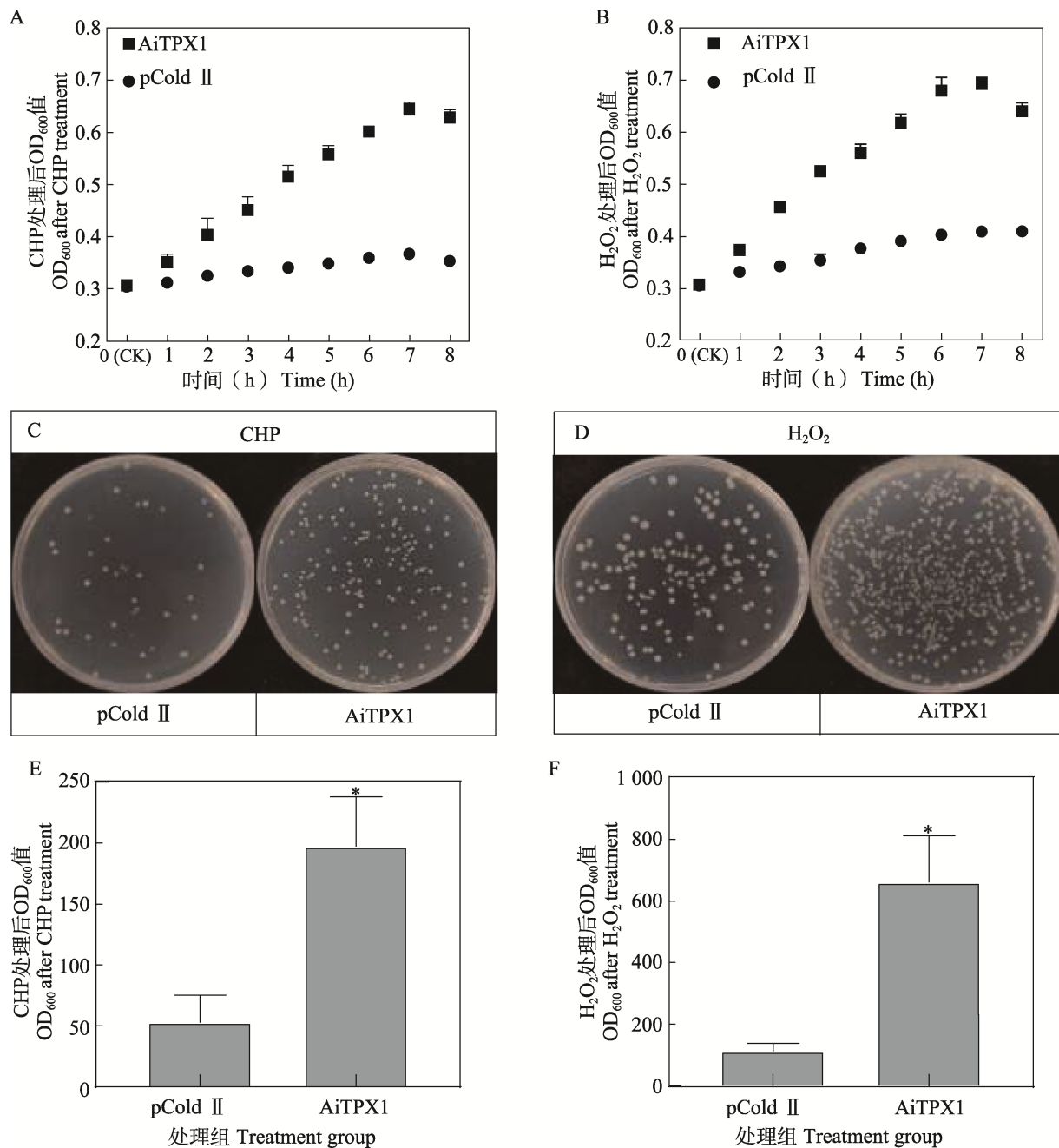


图4 AiTPX1 重组蛋白抗氧化性质分析

Fig. 4 Antioxidative property of recombinant AiTPX1 protein

A 和 B 分别为表达 AiTPX1 重组蛋白的大肠杆菌分别在过氧化氢异丙苯 (CHP) 和 H₂O₂ 胁迫下的生长曲线, 以转化 pCold II 空载体的大肠杆菌为对照;

C 和 D 分别为经过 CHP 和 H₂O₂ 处理 8 h 后, 表达 AiTPX1 的大肠杆菌和对照组大肠杆菌的菌落生长情况; E 和 F 分别为 C 和 D 中培养平板上的菌落数量。

数据为平均值±标准误, *表示经 Student's *t* 检验差异显著 ($P < 0.05$)。

A and B represent the growth curve of AiTPX1-overexpressed *E. coli* cells under stress of CHP and H₂O₂, respectively. *E. coli* containing pCold II empty vector are used as controls; C and D show the colony growth of AiTPX1-overexpressed *E. coli* cells and control cells after an 8-hour treatment with CHP and H₂O₂, respectively; E and F show the number of bacterial colony-forming units (CFUs) on the plates in C and D. Data are mean±SE.

* denotes significant difference between two groups (Student's *t*-test, $P < 0.05$).

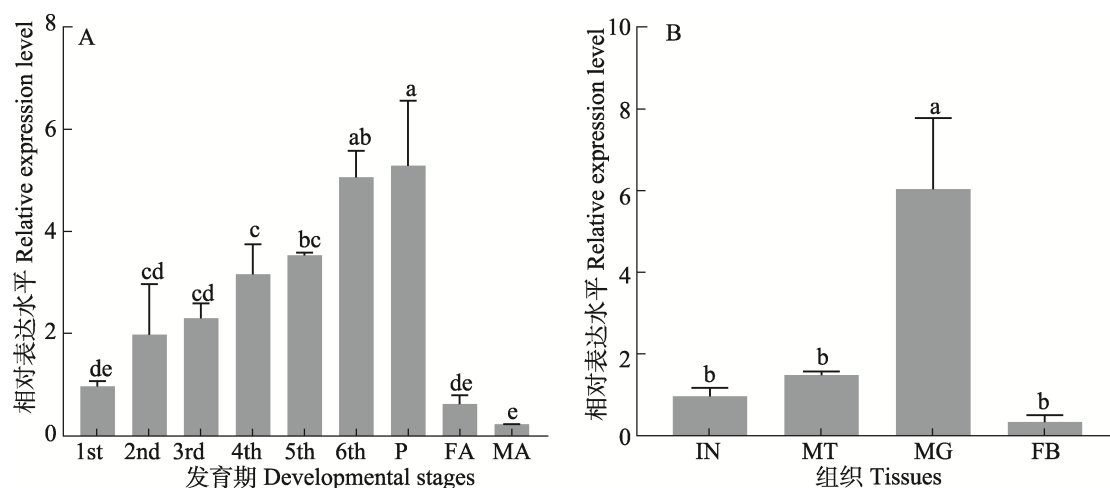


图 5 *AiTPX1* 在小地老虎不同发育期 (A) 和不同组织 (B) 的表达模式

Fig. 5 Expression profile of *AiTPX1* during different developmental stages (A) and in various larval tissues (B)

1st-6th: 1 龄-6 龄幼虫; P: 蛹; FA: 雌成虫; MA: 雄成虫; IN: 表皮; MT: 马氏管; MG: 中肠; FB: 脂肪体。

1st to 6th: First- to sixth-instar larva; P: Pupa; FA: Female adult; MA: Male adult; IN: Integument;

MT: Malpighian tubule; MG: Midgut; FB: Fat body.

柱上标有不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$, 单因素方差分析和 Tukey's HSD 法)。下图同。

Different lowercase letters above bars indicate significant difference ($P < 0.05$, one-way ANOVA with Tukey's HSD method). The same below.

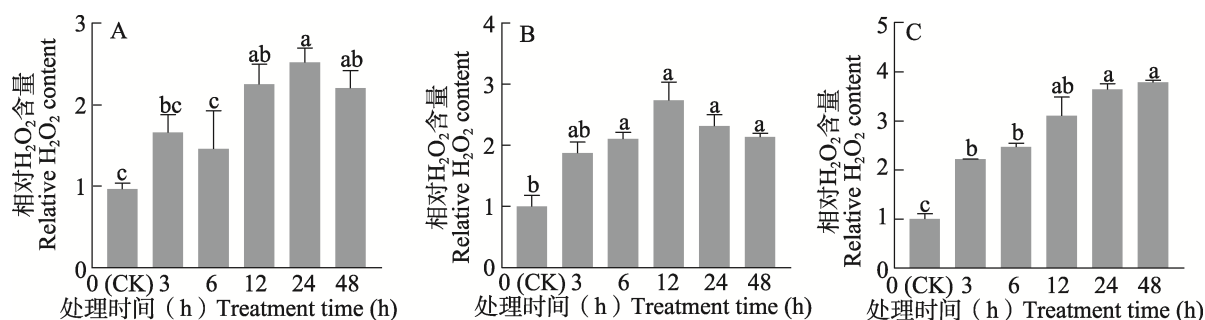


图 6 高效氯氟氰菊酯 (A)、辛硫磷 (B) 和氯虫苯甲酰胺 (C) 处理后小地老虎体内 H_2O_2 的相对含量

Fig. 6 Relative H_2O_2 content in *Agrotis ipsilon* larvae after treatment with lambda-cyhalothrin (A), phoxim (B), and chlorantraniliprole (C)

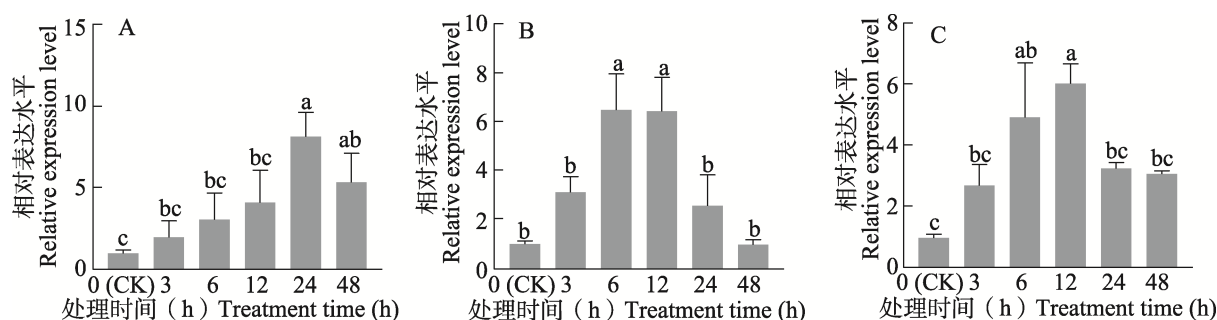


图 7 高效氯氟氰菊酯 (A)、辛硫磷 (B) 和氯虫苯甲酰胺 (C) 处理后 *AiTPX1* 的表达模式

Fig. 7 Expression profiles of *AiTPX1* after treatment with lambda-cyhalothrin (A), phoxim (B), and chlorantraniliprole (C)

志强等, 2021)。虽然 TPX 的抗氧化功能已在黑腹果蝇、家蚕和中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 等

昆虫中得到揭示 (Radyuk *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2014; Zhang and Lu, 2015), 但小地老虎的 TPX

目前仍然缺乏研究。本论文利用同源检索的方法获得了小地老虎 *AiTPX1* 的 cDNA 序列, 其编码的 *AiTPX1* 蛋白与其他昆虫物种 *TPXs* 具有较高的氨基酸一致性, 并具有一些共同的结构特征, 包括 4 个位置保守的活性氨基酸残基 (Pro₄₁、Thr₄₅、Cys₄₈ 和 Arg₁₂₄) 和 YF 基序, 这些氨基酸残基和基序与 *TPX* 的活性密切相关 (Wang *et al.*, 2012; Lu and Holmgren, 2014)。*AiTPX1* 蛋白中存在两个位置保守的半胱氨酸 (Cys₄₈ 和 Cys₁₆₉), 根据这一特征, 结合系统发育分析结果, 证明 *AiTPX1* 属于典型的 2-Cys 家族。*AiTPX1* 序列的获得, 为研究其对杀虫剂和其他环境胁迫因子的响应模式及生理功能奠定了基础。

前人研究表明, 在中华蜜蜂、家蚕和斜纹夜蛾等昆虫中, *TPXs* 能保护细胞抵御杀虫剂、重金属离子以及病原微生物侵染引起的氧化胁迫 (Chen *et al.*, 2014; Yao *et al.*, 2014; Mao *et al.*, 2020)。本研究在大肠杆菌中成功表达了 *AiTPX1* 重组蛋白, 并考察了 *AiTPX1* 对 H₂O₂ 和 CHP 的耐受性。H₂O₂ 是活性氧的一种, CHP 也已被证明能够诱导细胞内过量产生活性氧 (何承帅等, 2021), 因此选择这 2 种化合物来明确 *AiTPX1* 的抗氧化胁迫能力。结果显示, 较之于对照组大肠杆菌, 表达 *AiTPX1* 的大肠杆菌细胞更为耐受 H₂O₂ 和 CHP 的胁迫。这一结果证明, *AiTPX1* 能够通过自身的抗氧化能力缓解不利环境因子对小地老虎的氧化损伤, 进而增强小地老虎对环境的适应性。在其他昆虫中也观察到类似的结果, 如 Pang 等 (2021) 认为 *TPX* 基因过表达是褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 种群对吡虫啉产生抗性的原因之一。

TPX 基因在不同昆虫中的表达模式存在差异, 如菜粉蝶 *Pieris rapae* *PrTPX1* 基因在 3-5 龄幼虫阶段转录水平最高 (Zhao *et al.*, 2022), 而黄野螟 *Heortia vitessoides* *HvTPX* 的表达峰值出现在成虫期 (程杰等, 2018)。本研究发现, 随着小地老虎龄期的增长, *AiTPX1* 表达量逐渐升高, 在蛹期达到最高。小地老虎是完全变态昆虫, 蛹期会进行幼虫组织解离和成虫组织发生 (Truman *et al.*, 2019), 这一过程可能会产生大量的活性

氧, *AiTPX1* 在蛹期高表达可能是为了维持体内活性氧的平衡。本研究还发现当小地老虎进入成虫期后, *AiTPX1* 表达水平显著下降, 导致这一现象的机制目前尚不明确。在棉铃虫中, *TPX* 基因的转录与保幼激素和蜕皮激素的相对水平有关 (Zhang *et al.*, 2015)。*AiTPX1* 的表达可能也受到昆虫激素的调控, 但这一假设需要通过深入研究来证实。

已有一些研究表明, 昆虫和其它节肢动物暴露于亚致死剂量的高效氯氟氰菊酯、辛硫磷和氯虫苯甲酰胺中会产生过量的 H₂O₂, 导致氧化损伤 (Yu *et al.*, 2011; Cui *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2017)。本研究也发现这 3 种杀虫剂在亚致死剂量下能够诱导小地老虎幼虫 H₂O₂ 含量显著增加, 并引起 *AiTPX1* 基因表达水平显著上调, 表明该基因在抵御杀虫剂诱导的氧化胁迫中发挥重要作用。在其它昆虫也发现类似的现象, 如杀虫剂处理会引起家蚕、二化螟和菜粉蝶 *TPX* 基因转录水平上升 (Cao *et al.*, 2018; Mao *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2022); 利用 RNAi 沉默赤拟谷盗和梨小食心虫的 *TPX* 基因后, 2 种昆虫对杀虫剂的耐受性显著降低 (Kim *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2021)。但截至目前, 杀虫剂引起小地老虎 *AiTPX1* 基因表达水平增加的分子机制尚不明确。针对黑腹果蝇、家蚕和棉铃虫的研究表明, *TPX* 基因的转录调控可能涉及 JNK/FoxO 和 CncC/Maf 信号途径 (Lee *et al.*, 2009; Mao *et al.*, 2020; Tian *et al.*, 2022)。但这些途径是否参与对小地老虎 *AiTPX1* 的调控, 还有待于进一步探究。

需要说明的是, 昆虫 *TPX* 是一个多基因家族, 如黑腹果蝇和家蚕基因组中均有 5 个 *TPX* 基因 (Radyuk *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2014)。小地老虎可能也表达多个 *TPX* 基因, 这些基因编码的蛋白在保护小地老虎抵御杀虫剂与其它环境胁迫中可能具有重要作用。本论文研究了 *AiTPX1* 基因, 为解析小地老虎其它 *TPX* 基因的功能奠定了基础。目前小地老虎的基因组已完成测序 (Jin *et al.*, 2023), 在后续研究中将利用这一序列资源对小地老虎 *TPX* 开展深入分析, 以明确小地老虎 *TPX* 基因家族的生物学功能。

综上所述, 本研究阐明了小地老虎 *AiTPX1* 的序列特征、系统进化关系和表达模式, 明确了 *AiTPX1* 重组蛋白的抗氧化能力, 发现高效氯氟氰菊酯、辛硫磷和氯虫苯甲酰胺能够诱导小地老虎产生大量 H_2O_2 并引起 *AiTPX1* 表达量显著上调, 表明 *AiTPX1* 参与抵御杀虫剂造成的氧化损伤。但本研究只从蛋白和基因表达水平对 *AiTPX1* 进行了初步探索, 在后续研究中, 将利用 RNA 干扰技术在活体水平上阐明 *AiTPX1* 的功能, 并通过荧光素酶报告和酵母杂交等手段深入了解转录因子对 *AiTPX1* 的调控机制, 以期为全面理解 *AiTPX1* 的生物学功能以及利用 *AiTPX1* 为靶标开发新型害虫防治手段提供理论依据。

参考文献 (References)

- Cao Y, Yang Q, Tu XH, Li SG, Liu S, 2018. Molecular characterization of a typical 2-Cys thioredoxin peroxidase from the Asiatic rice borer *Chilo suppressalis* and its role in oxidative stress. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 99(1): e21476.
- Chen H, Yin YP, Feng EY, Li Y, Xie X, Wang ZK, 2014. Thioredoxin peroxidase gene is involved in resistance to biocontrol fungus *Nomuraea rileyi* in *Spodoptera litura*: Gene cloning, expression, localization and function. *Developmental and Comparative Immunology*, 44(1): 76–85.
- Chen JM, Yu XP, Chen LZ, Lv ZX, Zheng XS, Xu HX, Zhang JF, 2004. Occurrence, damage of the soil-dwelling pests and its management strategy in China. *Acta Agriculture Zhejiangensis*, 16(6): 389–394. [陈建明, 俞晓平, 陈列忠, 吕仲贤, 郑许松, 徐红星, 张珏锋, 2004. 我国地下害虫的发生为害和治理策略. 浙江农业学报, 16 (6): 389–394.]
- Cheng J, Lv ZH, Lin T, 2018. Identification and functional analysis of Tpx gene in *Heortia vitessoides*. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 37(2): 56–63. [程杰, 吕子豪, 林同, 2018. 黄野螟硫氧还蛋白过氧化物酶 Tpx 基因的鉴定及表达分析. 华中农业大学学报, 37(2): 56–63.]
- Corona M, Robinson GE, 2006. Genes of the antioxidant system of the honey bee: Annotation and phylogeny. *Insect Molecular Biology*, 15(5): 687–701.
- Cui F, Chai TT, Qian L, Wang CJ, 2017. Effects of three diamides (chlorantraniliprole, cyantraniliprole and flubendiamide) on life history, embryonic development and oxidative stress biomarkers of *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 169: 107–116.
- Gu SH, Wu KM, Guo YY, Pickett JA, Field LM, 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 CS, Xie LF, Xu L, Duan XL, Ren QQ, Guo JJ, Wu YB, Li DZ, 2021. Metabolic activity of SIGSTO2 in *Spodoptera litura* to pyrethroids and organophosphates and its antioxidant activity. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 23(6): 1132–1139. [何承帅, 谢兰芬, 徐莉, 段雪莲, 任青青, 郭佳佳, 吴艳兵, 李冬植, 2021. 斜纹夜蛾 SIGSTO2 对拟除虫菊酯类和有机磷类杀虫剂体外代谢及其抗氧化活性. 农药学报, 23(6): 1132–1139.]
- 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.]
- Jin MH, Liu B, Zheng WG, Liu CH, Liu ZX, He Y, Li XK, Wu C, Wang P, Liu KY, Wu SG, Liu HW, Chakrabarty S, Yuan HB, Wilson K, Wu KM, Fan W, Xiao YT, 2023. Chromosome-level genome of black cutworm provides novel insights into polyphagy and seasonal migration in insects. *BMC Biology*, 21(1): 2.
- Kim Y, Park J, Kumar S, Kwon H, Na J, Chun Y, Kim W, 2015. Insecticidal activity of chlorine dioxide gas by inducing an oxidative stress to the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Journal of Stored Products Research*, 64: 88–96.
- Kumar S, Park J, Kim E, Na J, Chun YS, Kwon H, Kim W, Kim Y, 2015. Oxidative stress induced by chlorine dioxide as an insecticidal factor to the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 124: 48–59.
- Lee KS, Iijima-Ando K, Iijima K, Lee WJ, Lee JH, Yu K, Lee DS, 2009. JNK/FoxO-mediated neuronal expression of fly homologue of peroxiredoxin II reduces oxidative stress and extends life span. *Journal of Biological Chemistry*, 284(43): 29454–29461.
- Li MY, Huang Y, Jiang XY, He JX, Liu S, 2021. Molecular characterization of glutathione-S-transferase (AiGSTs₁) in *Agrotis ipsilon* subject to insecticide stress. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 58(4): 938–948. [李茂业, 黄岩, 蒋秀云, 何佳弦, 刘苏, 2021. 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. 应用昆虫学报, 58(4): 938–948.]
- Liu JL, Yu JF, Wu JC, Yin JL, Wu DH, 2006. Insect reactive oxygen metabolism. *Chinese Bulletin of Entomology*, 43(6): 752–756. [刘井兰, 于建飞, 吴进才, 尹建莉, 吴东浩, 2006. 昆虫活性氧代谢. 昆虫知识, 43(6): 752–756.]
- Liu S, Cao Y, Zhang YX, Pan YM, Li SG, 2017. 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 YJ, Zhu F, Shen ZJ, Moural TW, Liu LN, Li Z, Liu XX, Xu HL, 2021. Glutaredoxins and thioredoxin peroxidase involved in defense of emamectin benzoate induced oxidative stress in *Grapholita molesta*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 176: 104881.
- Lu J, Holmgren A, 2014. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radical Biology and Medicine*, 66: 75–87.

- Mao TT, Cheng XY, Fang YL, Li MX, Lu ZT, Qu JW, Chen J, Wang H, Li FC, Li B, 2020. Induction of ER stress, antioxidant and detoxification response by sublethal doses of chlorantraniliprole in the silk gland of silkworm, *Bombyx mori*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 170: 104685.
- Pang R, Xing K, Yuan LY, Liang ZK, Chen M, Yue XZ, Dong Y, Ling Y, He XL, Li XC, Zhang WQ, 2021. Peroxiredoxin alleviates the fitness costs of imidacloprid resistance in an insect pest of rice. *PLoS Biology*, 19(4): e3001190.
- Perkins A, Nelson KJ, Parsonage D, Poole LB, Karplus PA, 2015. Peroxiredoxins: Guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. *Trends in Biochemical Sciences*, 40(8): 435–445.
- Pfaffl MW, 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9): e45.
- Radyuk SN, Klichko VI, Spinola B, Sohal RS, Orr WC, 2001. The peroxiredoxin gene family in *Drosophila melanogaster*. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(9): 1090–1100.
- Shi GQ, Zhang Z, Jia KL, Zhang K, An DX, Wang G, Zhang BL, Yin HN, 2014. Characterization and expression analysis of peroxiredoxin family genes from the silkworm *Bombyx mori* in response to phoxim and chlorpyrifos. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 114: 24–31.
- Tamura K, Stecher G, Kumar S, 2021. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7): 3022–3027.
- 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.
- Tian ZQ, Zha M, Cai LM, Michaud JP, Cheng J, Shen ZJ, Liu XM, Liu XX, 2022. FoxO-promoted peroxiredoxin1 expression induced by *Helicoverpa armigera* single nucleopolyhedrovirus infection mediates host development and defensive responses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 234: 113414.
- Tian ZQ, Zha M, Zhu L, Shen ZJ, Liu XM, Liu XX, 2021. Identification and functional analysis of Prx4 gene in cotton bollworm *Helicoverpa armigera*. *Journal of Plant Protection*, 48(5): 1008–1015. [田志强, 查萌, 祝琳, 申忠健, 刘孝明, 刘小侠, 2021. 棉铃虫过氧化物还原酶基因 Prx4 的鉴定及功能分析. *植物保护学报*, 48(5): 1008–1015.]
- Truman JW, 2019. The evolution of insect metamorphosis. *Current Biology*, 29(23): R1252–R1268.
- Wang X, Wang LK, Wang Xe, Sun F, Wang CC, 2012. Structural insights into the peroxidase activity and inactivation of human peroxiredoxin 4. *Biochemical Journal*, 441(1): 113–118.
- Wu YJ, 2020. Advances in insecticide toxicology in China in the last two decades(I): Insecticide toxicity and environmental safety. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 57(4): 767–780. [伍一军, 2020. 近二十年我国杀虫剂毒理学研究进展 (I): 杀虫剂的毒性与环境安全性研究. *应用昆虫学报*, 57(4): 767–780.]
- Yan Y, Zhang YY, Huaxia YF, Wang XL, Yao PB, Guo XQ, Xu BH, 2014. Identification and characterisation of a novel 1-Cys thioredoxin peroxidase gene (*AccTpx5*) from *Apis cerana cerana*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 172: 39–48.
- Yao PB, Chen XB, Yan Y, Liu F, Zhang YY, Guo XQ, Xu BH, 2014. Glutaredoxin 1, glutaredoxin 2, thioredoxin 1, and thioredoxin peroxidase 3 play important roles in antioxidant defense in *Apis cerana cerana*. *Free Radical Biology and Medicine*, 68: 335–346.
- Yu QY, Fang SM, Zuo WD, Dai FY, Zhang Z, Lu C, 2011. Effect of organophosphate phoxim exposure on certain oxidative stress biomarkers in the silkworm. *Journal of Economic Entomology*, 104(1): 101–106.
- 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. *Journal of Plant Protection*, 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 L, Lu Z, 2015. Expression, purification and characterization of an atypical 2-Cys peroxiredoxin from the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Molecular Biology*, 24(2): 203–212.
- Zhang SD, Shen ZJ, Li Z, Wu FM, Zhang BY, Liu YJ, Zhang QW, Liu XX, 2015. Identification of a thioredoxin peroxidase gene involved in resistance to nucleopolyhedrovirus infection in *Helicoverpa armigera* with RNA interference. *Journal of Insect Physiology*, 82: 17–27.
- Zhang W, Qi SZ, Xue XF, Qiu LH, 2022. Research progress of the effects and toxicology mechanisms of pesticides on bees. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 24(5): 1125–1138. [张伟, 齐素贞, 薛晓峰, 邱立红, 2022. 农药对蜜蜂的影响及毒理学机制研究进展. *农药学报*, 24(5): 1125–1138.]
- Zhang YD, Li JL, Chen JH, Ma L, Chen KK, Lv ZQ, 2017. Identification and characterization of peroxiredoxin 2 involved in the antioxidative response induced by bacterial infection in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae). *Acta Entomologica Sinica*, 60(3): 254–263. [张永栋, 李君兰, 陈金红, 马力, 陈康康, 吕志强, 2017. 豌豆蚜体内参与抵御细菌感染引起的氧化胁迫的过氧化物氧化还原酶 2 的鉴定及分子特性分析. *昆虫学报*, 60(3): 254–263.]
- Zhao L, Cao Y, Wang DD, Chen N, Li SG, Liu S, Li MY, 2022. A thioredoxin peroxidase protects *Pieris rapae* from oxidative stress induced by chlorantraniliprole exposure. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 111(4): e21964.
- Zhou DS, Teng T, Liu JH, Long JM, 2021. Cross-habituation to deterrents correlates with desensitisation of the corresponding deterrent neuron in the larva of the black cutworm, *Agrotis ipsilon*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 169(11): 1039–1048.
- Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ, 2014. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiological Reviews*, 94(3): 909–950.