



棉铃虫硫氧还蛋白类似基因 *HaTrx-like* 的分子鉴定和抗逆特征*

张松斗** 张博宇 申忠健 刘彦君 李 贞 张青文 刘小侠***

(中国农业大学昆虫系, 北京 100193)

摘 要 【目的】克隆棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 硫氧还蛋白类似基因 (*HaTrx-like*) 的 cDNA 全长并进行序列分析, 研究 *HaTrx-like* 基因的时间和空间表达模式以及参与抵抗机械损伤、紫外线照射和极端温度等逆境的特征。【方法】利用 RT-PCR 的方法扩增得到 *HaTrx-like* 基因的全长 cDNA 并通过测序进行验证, 运用几种生物信息学软件对基因和氨基酸序列进行分析, 利用荧光定量 PCR 检测 *HaTrx-like* 基因的时间和空间分布以及 4 种逆境条件处理后的表达模式。【结果】棉铃虫 *HaTrx-like* 基因的 cDNA 全长为 526 bp, 其中开放阅读框长度为 381 bp, 编码 126 个氨基酸, 含有一个保守的氧化还原活性位点 CXXC, 其氨基酸序列和帝王斑蝶 *Danaus plexippus* 以及家蚕 *Bombyx mori* 同源物的序列一致性为 72% 和 71%。*HaTrx-like* 基因在幼虫 5 龄 0 h 和 5 龄 96 h, 蛹期第 1 天和第 5 天, 以及成虫第 1 天的表达量相对较高, 在幼虫的中肠、马氏管和成虫的肌肉中的表达量相对较高。在机械损伤、紫外线照射、极端低温和高温处理后, 该基因的表达均显著地升高。【讨论】获得了棉铃虫 *HaTrx-like* 基因的 cDNA 全长, 并初步鉴定该基因为硫氧还蛋白家族成员, 其表达水平受到机械损伤、紫外线照射和极端温度的上调, 为进一步深入研究昆虫中硫氧还蛋白家族基因的各种生理功能提供理论基础。

关键词 棉铃虫, 硫氧还蛋白类似基因, 基因克隆, 时空表达, 逆境处理

Molecular identification of a thioredoxin-like gene in *Helicoverpa armigera* and its expression following different kinds of stress

ZHANG Song-Dou** ZHANG Bo-Yu SHEN Zhong-Jian LIU Yan-Jun
LI Zhen ZHANG Qing-Wen LIU Xiao-Xia***

(Department of Entomology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract [Objectives] To clone the full-length cDNA of a thioredoxin-like (*HaTrx-like*) gene in *Helicoverpa armigera*, to analyze its spatio-temporal distribution in different developmental stages and different tissues, and to determine its expression patterns following mechanical injury, exposure to UV radiation and extreme temperatures. [Methods] The full-length cDNA of *HaTrx-like* gene was amplified using the RT-PCR method and further validated by sequencing. The gene and protein sequences of *HaTrx-like* were analyzed with several kinds of bioinformatics software. The spatio-temporal distribution of *HaTrx-like* and its expression patterns after the different stress treatments were determined by qRT-PCR. [Results] The full-length cDNA of *HaTrx-like* was 526 bp and contained a 381 bp ORF encoding a 126-residue amino acid sequence. Sequence analysis indicates that *HaTrx-like* shares high sequence identity with its counterpart in other insects and contains a highly conserved CXXC active site in the N-terminal. The results of temporal transcript profiling indicate that *HaTrx-like* was more highly expressed in the 0 h and 96 h of the 5th instar, on the first and fifth day of the pupal, and on the first day of the

* 资助项目 Supported projects: 国家重点基础研究发展计划 973 项目 (2012CB114103)

**第一作者 First author, E-mail: zhangsongdou128@126.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: liuxiaoxia611@cau.edu.cn

收稿日期 Received: 2015-03-19, 接受日期 Accepted: 2015-03-25

adult, life stages. Spatial expression profiling shows that the gene was mainly expressed in the midgut and malpighian tubules of larvae, and in the muscles of adults. Meanwhile, the transcription of *HaTrx-like* was obviously induced by mechanical injury, ultraviolet light, cold (0°C), or high (37°C), temperatures. **[Conclusion]** The full-length cDNA of *HaTrx-like* gene was successfully cloned and preliminarily identified as a member of the thioredoxin family. Its expression is significantly upregulated by different kinds of stress. These results will contribute to further studies on the features and functions of insect thioredoxin.

Key words *Helicoverpa armigera*, thioredoxin-like, molecular cloning, temporal-spatial expression, adversity treatment

氧化压力是活性氧种类 (Reactive oxygen species, ROS) 产生的副产物, 能够破坏需氧生物体内的氧化还原平衡, 因此被认为是导致生物体衰老和死亡的重要因素 (Droge, 2002)。为了应对氧化压力以及抵抗由 ROS 产生的有毒氧化中间产物, 需氧生物体已经进化出了一系列的保护酶系统来维持体内的氧化还原平衡, 包括抗氧化酶系统和非酶系统 (Holmgren, 1989)。硫氧还蛋白系统是其中的一个重要的抗氧化酶系统, 能够参与细胞内的氧化还原平衡调节系统, 主要包括 NADPH、硫氧还蛋白 (Thioredoxin, Trx) 和硫氧还蛋白还原酶 (Thioredoxin reductase, TrxR)。

硫氧还蛋白广泛地分布于从古生菌到哺乳动物中, 属于小分子还原酶家族成员 (大小约为 12 ku), 包含一个高度保守的 CXXC 活性位点 (Powis and Montfort, 2001)。硫氧还蛋白作为核苷酸还原酶的电子供体首次鉴定于大肠杆菌 *Escherichia coli* 中, 在抵抗氧化压力、促进细胞生长、调控细胞凋亡和转录后调控方面起着非常重要的作用 (Aurent *et al.*, 1964; Arner and Holmgren, 2000)。氧化态的硫氧还蛋白带有一个二硫键, 而还原态的硫氧还蛋白带有一个硫醇基。可逆的二硫键的转换速度非常快, 很适合调节蛋白质的功能 (Holmgren, 1989)。通常情况下, 硫氧还蛋白的抗氧化功能主要表现在两个方面: 首先, 硫氧还蛋白能够作为过氧化物的电子供体来应对 ROS 的影响, 因此, 能够降低 DNA 的损伤程度、蛋白质的失活和脂肪的氧化; 其次, 它能直接还原许多蛋白 (比如蛋白激酶、磷酸化酶和转录因子) 的二硫键, 从而使它们恢复生理功能 (Kalinina *et al.*, 2008)。

关于硫氧还蛋白参与保护生物体免受氧化损伤的报道比较多, 主要集中在哺乳动物 (Chen *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2013)、植物 (Schurmann and Jacquot, 2000; Benitez-Alfonso *et al.*, 2009) 和细菌 (Mishra and Imlay, 2012; Serata *et al.*, 2012), 然而在昆虫中的报道相对较少, 主要集中在几种模式昆虫中。在果蝇 *Drosophila melanogaster* 中鉴定出了 3 个硫氧还蛋白基因 (Trx1、Trx2 和 TrxT) (Kanzok *et al.*, 2001; Bauer *et al.*, 2002; Svensson *et al.*, 2003), Trx-2 基因的缺失能够促进其他抗氧化酶基因的表达, 并且加剧了果蝇抗氧化压力依赖的表型 (Tsuda *et al.*, 2010)。在家蚕 *Bombyx mori* 中, *BmTrx* 被证明参与抵抗极端温度和病原微生物感染引起的氧化压力 (Kim *et al.*, 2007)。在意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 中, 也鉴定出了 3 个 Trxs 基因, *AmTrx1* 被定位于线粒体中, *AmTrx2* 是果蝇 Trx2 基因的同源物, 还有 *AmTrx3* (Corona and Robinson, 2006)。在中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 中, 3 个 Trxs 被证明参与抗氧化防御, 分别是 *AccTrx-like1* (Lu *et al.*, 2012)、*AccTrx2* (Yao *et al.*, 2013) 和 *AccTrx1* (Yao *et al.*, 2014)。这些研究结果表明 Trxs 在维持昆虫体内的氧化还原平衡和抵抗逆境危害的过程中起着重要的作用。

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 属于鳞翅目夜蛾科, 是广泛分布在中国及世界各地的一种杂食性害虫, 能够引起棉花、玉米、蔬菜等多种农作物的巨大经济损失 (Wu *et al.*, 2008)。在中国, 自从 1997 年广泛种植 Bt-棉花后大大降低了棉铃虫的种群数量 (Wu *et al.*, 2008), 但是棉铃虫可以通过遗传变异而产生抗性 (Cao *et al.*, 2014), 因此加强棉铃虫的基础研究寻找新的生物防控

方法仍然迫在眉睫。本研究根据棉铃虫转录组测序拼接得到的基因片段,设计引物通过 RT-PCR 方法克隆得到 Thioredoxin-like (*HaTrx-like*) 基因全长,研究了该基因在棉铃虫不同发育阶段和不同组织的表达谱,分析了该基因在机械损伤、紫外线照射、低温和高温处理条件下的转录变化,希望这些研究结果能够为进一步深入研究昆虫硫氧还蛋白家族基因的特征和功能提供一定理论基础,为开发寻找新的棉铃虫生物防控技术提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫与试剂

棉铃虫为中国农业大学害虫综合治理实验室饲养,饲养条件为温度 (26 ± 1) ,光周期为 16L:8D,相对湿度为 $75\% \pm 10\%$ 。为了避免自相残杀,从 3 龄阶段单头饲养在长玻璃管中 (5.5 cm 长 $\times$ 2.0 cm 直径)。载体 pDM-19T 购自 TaKaRa 公司 (Kyoto, Japan),大肠杆菌 DH5 α 为中国农业大学昆虫实验室保存。主要试剂为总 RNA 抽提试剂 TRIzol reagent (Invitrogen, USA),限制性内切酶 (*EcoR* I 和 *Hind* III), TaqDNA 聚合酶, DL2000 Marker, 荧光定量试剂盒 (SYBR Primer Script RT-PCR Kit), PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒均购自 TaKaRa 公司;PCR 产物纯化试剂盒和质粒提取试剂盒购自 Axygen 公司 (中国,杭州);其他均为国产或进口分析纯试剂。

1.2 试验方法

1.2.1 棉铃虫总 RNA 的提取和第一链 cDNA 的合成 将收集的各样品分别放入经 DEPC 处理过的 Eppendorf 管中匀浆,参照 TaKaRa 公司试剂说明书,用 RNAiso Reagent 法提取总 RNA。用紫外分光光度计 (Abs260) 检测 RNA 样品的纯度和浓度。根据反转录试剂盒说明,以棉铃虫不同发育时期、不同组织和各处理样品的总 RNA ($1 \mu\text{g}$) 为模板合成第一链 cDNA 并储存于 -80°C 备用。

1.2.2 引物设计 棉铃虫 *HaTrx-like* 基因的 GenBank 登录号为 KP771808。根据基因序列,利用 DNAClub 软件 (<http://www.softpedia.com/get/Science-CAD/DNA-Club.shtml>) 设计基因全长扩增的引物和 Real-time PCR 的引物。棉铃虫核糖体蛋白 L32 (Ribosomal proteins L32, *RPL32*) (JQ744274.1) 用作实时荧光定量 PCR 的内参基因 (Zhang *et al.*, 2005)。引物序列均由上海生工生物工程有限公司合成 (表 1)。

1.2.3 基因全长的扩增和测序验证 根据转录组拼接得到的棉铃虫 *HaTrx-like* 基因序列信息,利用设计的特异性引物和棉铃虫反转录 cDNA 进行基因全长的扩增。PCR 反应条件为:94 预变性 3 min,随后 35 个循环的扩增,扩增条件为 94 变性 40 s, 56 退火 35 s, 72 延伸 40 s,最后再 72 延伸 10 min。反应结束后,将上述 PCR 反应液通过琼脂糖凝胶电泳 (质量浓度比为 1.3%) 进行验证,然后进行 PCR 产物纯化,再

表 1 本研究所用的引物
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	引物长度 (bp) Primer length (bp)	扩增片段长度 (bp) Product length (bp)	目的 Purpose
HaTrxL-RTF	TAGTGTCAGTCAGAAATTGCA	21	526	扩增全长
HaTrxL-RTR	CAGAATGTTCTGTTAAGCCA	20		Amplification of full-length
HaTrxL-qF	CATACCTGAGTGAGCTGAAG	20	127	荧光定量 PCR
HaTrxL-qR	TAGGGATGACCATGAGCTTC	20		Real-Time PCR
RPL32-qF	CATCAATCGGATCGCTATG	19	152	荧光定量 PCR
RPL32-qR	CCATTGGGTAGCATGTGAC	19		Real-Time PCR

按照载体 PDM 19-T 连接试剂盒说明书, 将纯化的目的片段与 PDM 19-T 载体连接, 重组质粒转化入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 进行蓝白斑筛选。挑取阳性克隆白斑接种于附有 Ampicillin 80 mg/L 的 LB 液体培养基中, 37 °C 下 180 r/min 过夜培养后, 进行质粒的提取, 再通过双酶切进行重组质粒的验证, 最后将质粒送至上海生工进行测序。

1.2.4 序列分析 棉铃虫 *HaTrx-like* 基因的部分理化特征采用在线工具 ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>) 进行分析。其他昆虫同源物蛋白序列来自于 NCBI 数据库。氨基酸序列多重联配采用 DNAMAN 软件 6.0.3.48 (Lynnon Biosoft, Quebec, Canada) 进行分析。选用 MAGE5.10 软件的 Neighbor-joinin 软件构建进化树。运用在线蛋白结构同源建模服务 SWISS-MODEL 结合 PyMOL-v1.3r1 软件对 *HaTrx-like* 蛋白的三级结构进行预测 (Li *et al.*, 2011)

1.2.5 实时荧光定量 PCR 的检测 根据 Bio-Rad CFX ConnectTM Real-Time PCR System (Bio-Rad, USA) 说明书, 运用 SYBR green supermix (TaKaRa) 进行 qRT-PCR 的扩增来检测基因表达水平。棉铃虫 RPL32 基因作为标准化的内参基因。反应条件为: 95 °C 预变性 3 min, 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火和延伸 30 s, 共 40 个循环。qRT-PCR 的结果进一步使用标准曲线和溶解曲线进行验证。标准曲线的构建是以 10 倍浓度稀释的 cDNA 为模板, 进行实时荧光定量 PCR 扩增, 根据 CT 值 (Cross threshold, the PCR cycle number in which the signal threshold is crossed) 计算出标准曲线 (Pfaffl *et al.*, 2004)。溶解曲线的构建是在正常的 qRT-PCR 程序结束后添加一个 65~95 °C 的反应程序。基因的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算 (Livak and Schmittgen, 2001)。

1.2.6 时空转录分析 棉铃虫不同发育阶段的样品包括卵、1 龄取食期幼虫、1 龄蜕皮期幼虫、2 龄取食期幼虫、2 龄蜕皮期幼虫、3 龄取食期幼虫、3 龄蜕皮期幼虫、4 龄取食期幼虫、4 龄蜕

皮期幼虫、5 龄 0 h、5 龄 24 h、5 龄 48 h、5 龄 72 h、5 龄 96 h、5 龄 120 h、蛹期 0 天、蛹期第 1 天、蛹期第 3 天、蛹期第 5 天、蛹期第 7 天 (10 头); P9: 蛹期第 9 天 (10 头); A1 成虫第 1 天。幼虫组织包括头、表皮、中肠、唾液腺、马氏管、脂肪体、血淋巴和中枢神经系统。成虫组织包括头、胸、腹、足、翅、中肠和肌肉。

按照上面提到的方法将棉铃虫不同发育时期、幼虫和成虫不同组织提取总 RNA 和合成第 1 链 cDNA, 然后利用合成的 cDNA 作为模板, 以 HaTrxL-qF 和 HaTrxL-qR 为引物进行 Real-time PCR 扩增, 以 RPL32 为内参基因进行基因表达量的分析。

1.2.7 不同逆境处理 为了研究 *HaTrx-like* 基因的抗逆特征, 选择 4 龄第 2 天的棉铃虫分别遭受机械损伤、紫外线照射、低温和高温处理。

在机械损伤的试验中, 用昆虫针 (长 30 mm $\times$ 直径 0.5 mm) 将昆虫的身体扎破 10 次, 健康的幼虫用作对照 (An *et al.*, 2013)。在紫外线照射的试验中, 利用波长为 300 nm 的紫外灯照射 4 龄第 2 天的虫子, 同样状态的健康幼虫保持在正常的光照条件下作为对照 (Yao *et al.*, 2014)。在温度处理的试验中, 4 龄第 2 天的幼虫保持在 0 °C 和 37 °C 条件下, 同样状态的健康幼虫保持在 27 °C 作为对照 (Kim *et al.*, 2007; An *et al.*, 2013)。各处理均分别在处理后 0、2、6 和 12 h 收集样品并储存于 -80 °C 备用。每个样品重复 3 次, 每次包括 10 头虫子。然后按照上面的方法进行总 RNA 的提取、cDNA 的合成和 qRT-PCR 的扩增, 继而根据内参基因 RPL32 基因的扩增情况进行基因表达量的分析。

1.3 数据处理与统计分析

荧光定量 PCR 的试验均进行 3 次独立的生物学重复, 数据表示平均值 $\pm$ 标准偏差。*HaTrx-like* 基因在不同发育阶段和不同组织的表达分析中, 不同处理间的统计分析均运用 SPSS17.0 的 Turkey's HSD 多重比较的方法进行分析 ($P < 0.05$)。*HaTrx-like* 基因在不同逆

境处理后的表达分析中,使用 t 测验分析 qRT-PCR 结果 (*表示 $0.01 < P < 0.05$; **表示 $P < 0.01$)。

2 结果与分析

2.1 棉铃虫 *HaTrx-like* 基因的克隆和序列分析

利用 RT-PCR 的方法扩增 *HaTrx-like* 基因的全长序列,测序结果进一步通过 NCBI-ORF Finder 找到开放阅读框架和 NCBI-BLAST 序列比对分析,结果表明该基因 cDNA 全长 526 bp, 包含一个 381 bp 的开放阅读框架(图 1), 编码 126 个氨基酸, 和其他昆虫的 Thioredoxin-like 基因序列具有较高的同源性。理化性质分析结果表明该基因编码的氨基酸分子质量为 14.45 ku, 等电点为 4.77。将 *HaTrx-like* 的氨基酸序列和其他 9 种昆虫的同源物序列进行氨基酸序列多重联配, 结果表明棉铃虫 *HaTrx-like* 的氨基酸序列与帝王斑蝶 *Danaus plexippus* 和家蚕 *Bombyx mori* 的序列一致性相对较高, 分别达到 72% 和 71%, 而与其他昆虫同源物的序列一致性较低, 大概为 41%~54%, 在该序列的 N-末端发现了非常保守的氧化还原活性位点 CXXC(图 2)。进

化树分析也表明, 棉铃虫 *HaTrx-like* 基因和帝王斑蝶以及家蚕的亲缘关系最近, 这也进一步的验证了氨基酸序列多重联配的结果(图 3), 说明该基因在进化上是相对比较保守的。为了进一步了解保守的活性位点和阐明酶催化机制, 预测了 *HaTrx-like* 的蛋白质三级结构, 两个保守的半胱氨酸活性位点 Cys⁴³ 和 Cys⁴⁵ 也在图中以被标出(图 4)。

2.2 *HaTrx-like* 基因引物特异性的验证

标准曲线结果表明, 模板浓度和检测到的荧光信号循环数呈显著的线性关系(图 5:A, B), *HaTrx-like* 和 *RPL32* 的相关系数 R^2 分别为 0.9974 和 0.9960, 扩增效率分别为 90.49% 和 89.24%。溶解曲线结果表明, 目的基因和内参基因的扩增产物的溶解温度均在 80~85 °C, 且都是单峰(图 5:C, D), 这表明引物特异性较好, 反应体系稳定, 可以进行基因的定量分析。

2.3 *HaTrx-like* 基因在棉铃虫不同发育阶段的表达分析

荧光定量 PCR 结果表明, *HaTrx-like* 基因的表达属于时间依赖型, 在各发育阶段的转录水平变化

```

1   TAGTGTCTCAGTCAGAAATTGCATTGCTTGTGTGTCGTTTTCGTATACTCGTAAAGTAAATC
61  AAAATATTAGTCGTGTACGATACCGGTCATAGCAGGCTAAACTGTAATCTAATAGAAAC
121 AAAATGGTGAATACAGTTCAATTGCACGGGTACGATGAGTTCTCGAAATACATTGAAACC
1   M V N T V Q L H G Y D E F S K Y I E T
181 GTAGATCCAAAAGGCCCGCCAGTACTTTTATATTTTCAGTGGTTCTAAGCTACCGTCGGGC
20  V D P K G P P V L L Y F S G S K L P S G
241 GAAAGCTGGTGTCTGATTGTGTGCAAGCCGAGCCTGTGGTTAATGCATACCTGAGTGAG
39  E S W C S D C V E A E P V V N A Y L S E
301 CTGAAGAAGGATATCATTGCTTATGTTGATGTTGGCAATAGGGAAACGTGGAAGGAC
59  L K K D I I F A Y V D V G N R E T W K D
361 ATGGCCTGTTTCATTGAGAAGAGATTCTCGCTTGAAGCTCATGGTCATCCCTACAATGATT
79  M A C S F R T D S R L K L M V I P T M I
421 GTCTGGAAGGGTGTGCAAAGACTGGAAGGTTCCCAATGTAACAAGAGGGACCTACTTCAA
99  V W K G V Q R L E G S Q C N K R D L L Q
481 ATGCTATTTGAAGATGAAGAGTAATATGGCTTAACAGAACATTCTG
120 M L F E D E E *

```

图 1 棉铃虫 *HaTrx-like* 基因的核苷酸序列和推测的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *HaTrx-like* gene from *Helicoverpa armigera*

氧化还原催化活性位点 CXXC 用实线方框标出。

The redox catalytic active sites CXXC are boxed.

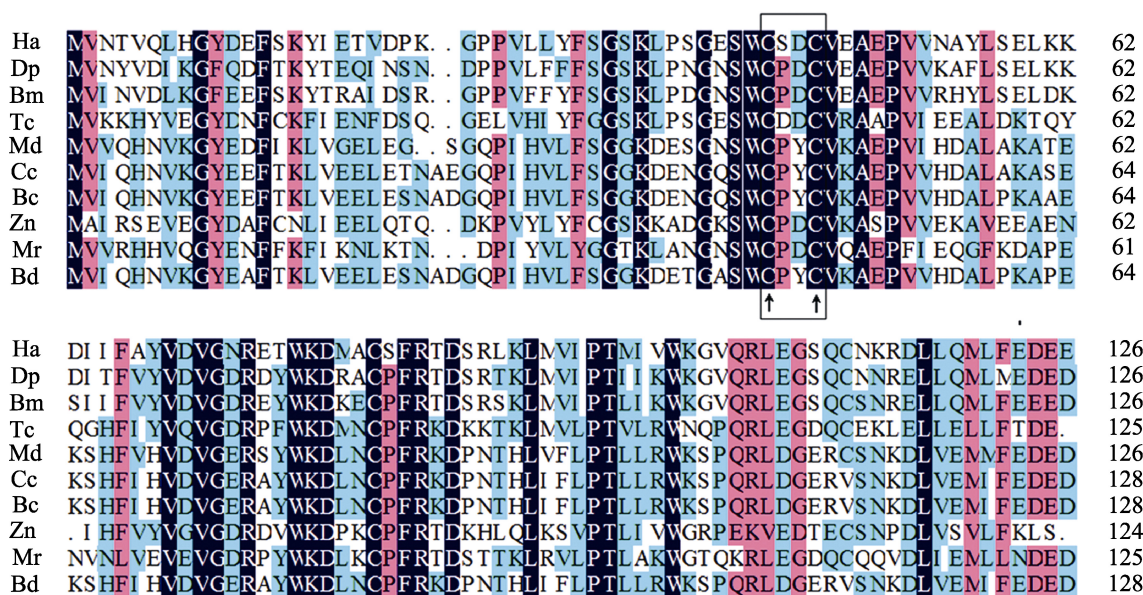


图 2 棉铃虫 *HaTrx-like* 基因和其他昆虫同源物的氨基酸序列多重联配

Fig. 2 Amino acid sequence multiple alignment of *HaTrx-like* with other insects homologs

蓝色代表 100% 的序列一致性, 红色代表 75% 的序列一致性, 绿色代表小于或等于 50% 的序列一致性。保守的 CXXC 催化活性位点用方框标出, 有活性的半胱氨酸残基用 ↑ 标记。Ha: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*, KP771808; Dp: 帝王斑蝶 *Danaus plexippus*, EHJ75979.1; Bm: 家蚕 *Bombyx mori*, XP_004930376.1; Tc: 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*, XP_967120.2; Md: 家蝇 *Musca domestica*, XP_005184688.1; Cc: 地中海实蝇 *Ceratitis capitata*, XP_004531229.1; Bc: 瓜实蝇 *Bactrocera cucurbitae*, XP_011192212.1; Zn: 内华达古白蚁 *Zootermopsis nevadensis*, KDR20080.1; Mr: 苜蓿切叶蚁 *Megachile rotundata*, XP_003706122.1; Bd: 桔小食蝇 *Bactrocera dorsalis*, XP_011214705.1。下图同。Blue represents 100% identity, red represents 75% identity and green represents ≤ 50% identity. The conserved CXXC motif is boxed and the active sites are marked by ↑. Ha: *Helicoverpa armigera* (KP771808); Dp: *Danaus plexippus* (EHJ75979.1); Bm: *Bombyx mori* (XP_004930376.1); Tc: *Tribolium castaneum* (XP_967120.2); Md: *Musca domestica* (XP_005184688.1); Cc: *Ceratitis capitata* (XP_004531229.1); Bc: *Bactrocera cucurbitae* (XP_011192212.1); Zn: *Zootermopsis nevadensis* (KDR20080.1); Mr: *Megachile rotundata* (XP_003706122.1); Bd: *Bactrocera dorsalis* (XP_011214705.1). The same below.

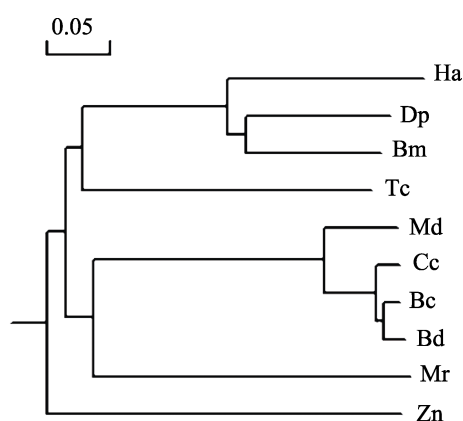


图 3 棉铃虫 *HaTrx-like* 基因和其他昆虫同源物的系统进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of *HaTrx-like* and its homologs in insects

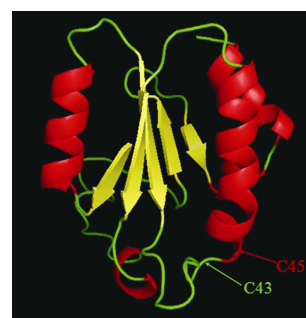


图 4 棉铃虫 *HaTrx-like* 的蛋白质三级结构预测

Fig. 4 Predicted tertiary structure of *HaTrx-like*

利用 SWISS-MODEL 在线服务器和 PyMOL 软件构建三级结构, 活性位点 (Cys⁴³ 和 Cys⁴⁵) 被标记出来。The SWISS-MODEL server and PyMOL software are used to construct the tertiary structure, and the active sites (Cys³² and Cys³⁵) are marked.

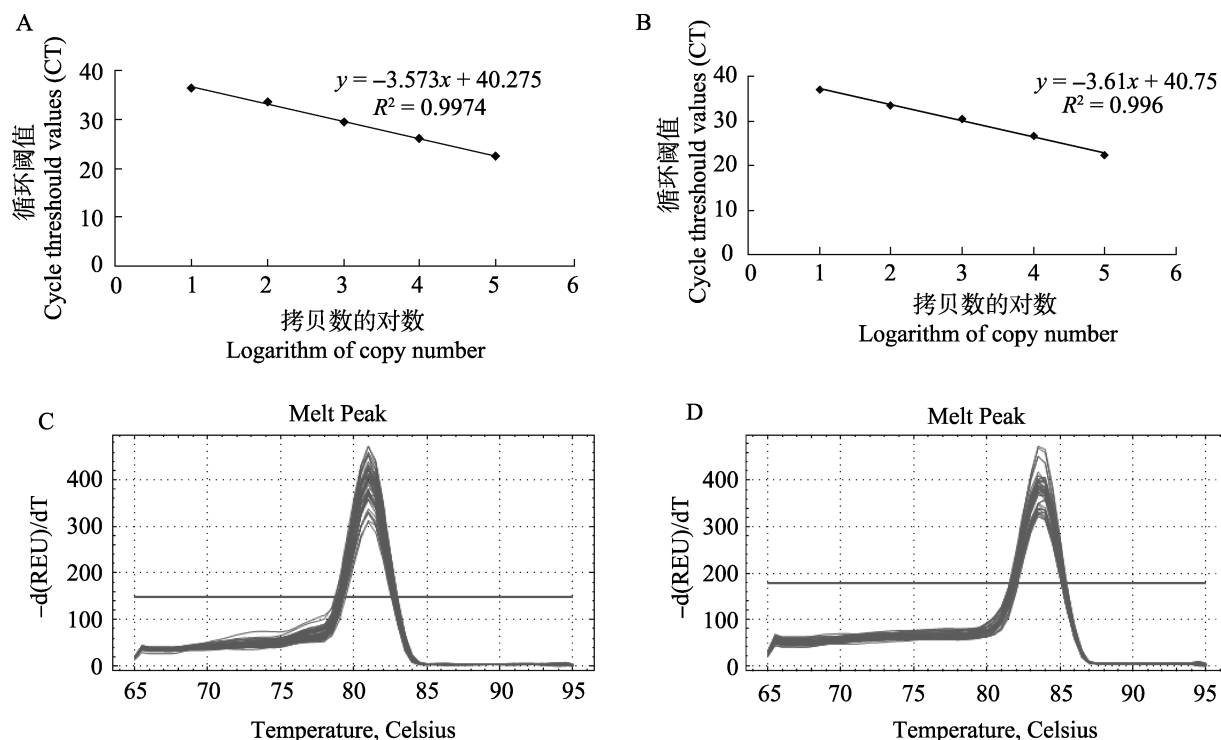


图 5 棉铃虫 *HaTrx-like* 和 *RPL32* 基因的实时荧光定量 PCR 的标准曲线和溶解曲线

Fig. 5 Standard curve and melting curve of *HaTrx-like* and *RPL32* for quantitative real-time PCR

A. *HaTrx-like* 基因的标准曲线 ; B. *RPL32* 基因的标准曲线 ; C. *HaTrx-like* 基因的溶解曲线 ; D. *RPL32* 基因的溶解曲线。

A. The standard curve of *HaTrx-like* gene; B. The standard curve of *RPL32* gene; C. The melting curve of *HaTrx-like* gene; D. The melting curve of *RPL32* gene.

很大,但是总的来说从幼虫、蛹到成虫呈现出逐渐增长的趋势(图6)。在5龄0 h、96 h、蛹期第1天、蛹期第9天和成虫第1天的表达量相对较高,而在1龄取食阶段、1龄蜕皮阶段和2龄取食阶段的表达量最低(图6)。这可能是随着棉铃虫的生长发育,该基因在虫体内起的作用越来越大。

2.4 *HaTrx-like* 基因在棉铃虫幼虫和成虫组织内的转录表达

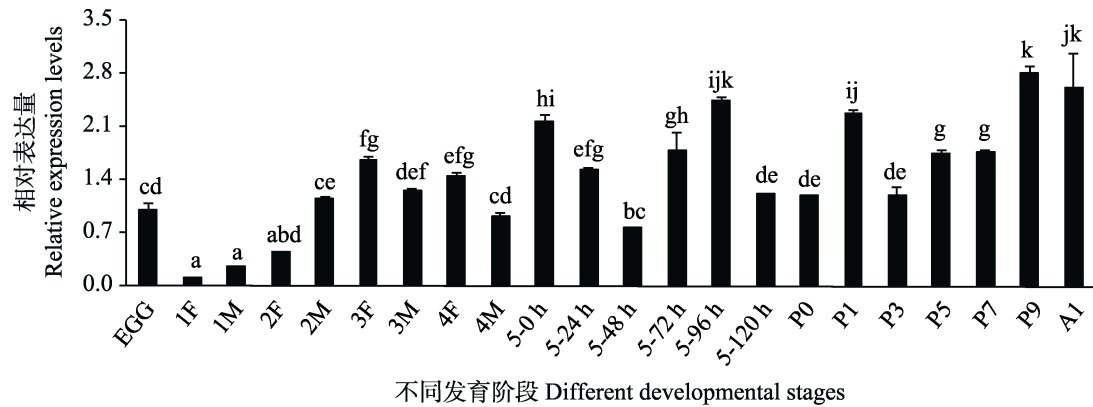
空间表达谱结果表明,该基因在所检测的幼虫组织和成虫组织中均有所表达,并且呈现出组织特异性(图7:A,B)。在幼虫的中肠和马氏管中的表达量比其他幼虫组织中均高(图7:A),而在成虫的肌肉中表达量最高,在成虫的足和翅中表达量最低(图7:B)。这些结果也可能暗示着该基因在棉铃虫的不同组织中扮演着不同的角色。

2.5 不同逆境处理对 *HaTrx-like* 基因表达的影响

机械损伤结果表明,该基因在机械损伤后2、6和12 h后其表达量显著地升高(图8:A)。紫外线照射结果表明,该基因在紫外线照射2 h和6 h后表达量明显地上升,而在12 h却没有显著变化(图8:B)。极端温度处理结果表明,该基因在0 低温和37 高温处理2、6和12 h后均显著地上调(图8:C,D)。

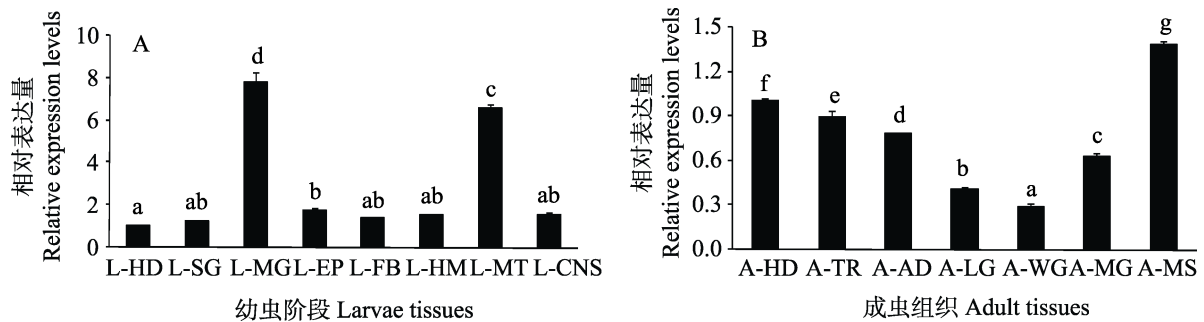
3 讨论

硫氧还蛋白在哺乳动物(Holmgren and Lu, 2010; Chen *et al.*, 2014)和几种模式昆虫(Kim *et al.*, 2007; Yao *et al.*, 2013)中都有报道,其能参与调控细胞内的氧化还原平衡和抵抗氧化压力。但是关于硫氧还蛋白的研究还没有在鳞翅

图 6 *HaTrx-like* 基因在棉铃虫不同发育时期的表达谱Fig. 6 Expression profile of *HaTrx-like* in different developmental stages of *Helicoverpa armigera*

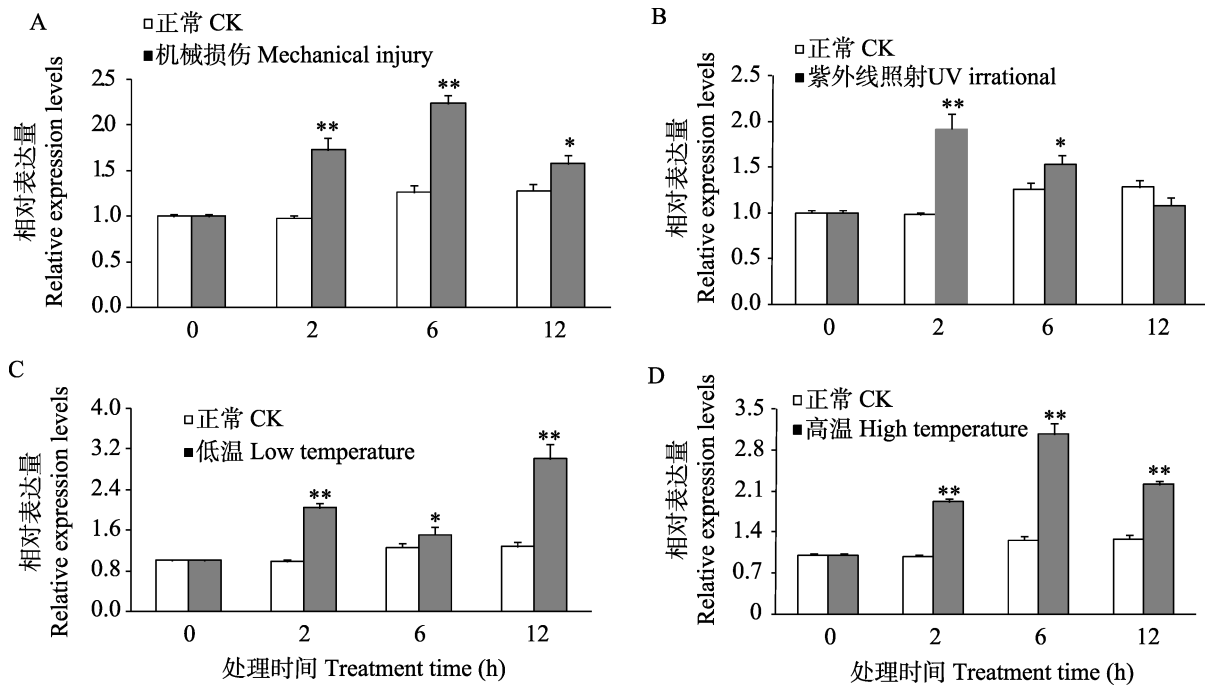
EGG : 卵 (50 粒); 1F : 1 龄取食期 (20 头); 1M : 1 龄蜕皮期 (20 头); 2F : 2 龄取食期 (15 头); 2M : 2 龄蜕皮期 (15 头); 3F : 3 龄取食期 (12 头); 3M : 3 龄蜕皮期 (12 头); 4F : 4 龄取食期 (10 头); 4M : 4 龄蜕皮期 (10 头); 5-0 h; 5 龄 0 h (10 头); 5-24 h : 5 龄 24 h (10 头); 5-48 h : 5 龄 48 h (10 头); 5-72 h : 5 龄 72 h (10 头); 5-96 h : 5 龄 96 h (10 头); 5-120 h : 5 龄 120 h (10 头); P0 : 蛹期 0 天 (10 头); P1 : 蛹期第 1 天 (10 头); P3 : 蛹期第 3 天 (10 头); P5 : 蛹期第 5 天 (10 头); P7 : 蛹期第 7 天 (10 头); P9 : 蛹期第 9 天 (10 头); A1 : 成虫第 1 天 (5 头雄虫和 5 头雌虫)。下图同。数据均代表 3 次生物学重复的平均值 $\pm$ 标准偏差, 每次生物学重复包括 10 头虫子。柱上标有不同字母表示 5% 显著性差异 ($P < 0.05$, 利用 SPSS17.0 软件根据 Turkey 多重比较检验法比较)。

EGG: Egg (50 grain); 1F: Feeding stage of 1st instar (20 larvae); 1M: Molting stage of 1st instar (20 larvae); 2F: Feeding stage of 2nd instar (15 larvae); 2M: Molting stage of 2nd instar (15 larvae); 3F: Feeding stage of 3rd instar (12 larvae); 3M: Molting stage of 3rd instar (12 larvae); 4F: Feeding stage of 4th instar (10 larvae); 4M: Molting stage of 4th instar (10 larvae); 5-0 h, 5-24 h, 5-48 h, 5-72 h, 5-96 h, and 5-120 h stand for 5th instar larvae at 0, 24, 48, 72, 96, and 120 h (10 larvae), respectively; P0, P1, P5, and P9 stand for 0, 1, 5, and 9 day pupae (10 larvae), respectively; A1: 1 day adults (5 male and 5 female). The same as below. The data are represented the mean $\pm$ SD. Each biology repeat includes 10 larvae or adult. Histograms with different letters indicate significant different at 0.05 level ($P < 0.05$) by Tukey's multiple-range test in SPSS 17.0 software.

图 7 *HaTrx-like* 基因在棉铃虫幼虫组织 (A) 和成虫组织 (B) 内的转录分析Fig. 7 Transcription analysis of *HaTrx-like* in different larvae tissues (A) and adult tissues (B) of *Helicoverpa armigera*

L-HD : 幼虫头; L-SG : 幼虫唾液腺; L-MG : 幼虫中肠; L-EP : 幼虫表皮; L-FB : 幼虫脂肪体; L-HM : 幼虫血淋巴; L-MT : 幼虫马氏管; L-CNS : 幼虫中枢神经系统。A-HD : 成虫头; A-TR : 成虫胸; A-AD : 成虫腹; A-LG : 成虫足; A-WG : 成虫翅; A-MG : 成虫中肠; A-MS : 成虫肌肉。

L-HD: Heads of larvae; L-SG: Salivary glands of larvae; L-MG: Midgut of larvae; L-EP: Epidermis of larvae; L-FB: Fat body of larvae; L-HM: Hemolymph of larvae; L-MT: Malpighian of larvae; L-CNS: Central nervous system of larvae. A-HD: Heads of adult; A-TR: Thorax of adult; A-AD: Abdomen of adult; A-LG: Legs of adult; A-WG: Wings of adult; A-MG: Midgut of adult; A-MS: Muscles of adult.

图 8 不同逆境处理对棉铃虫 *HaTrx-like* 基因转录水平的影响Fig. 8 Effect of different types of adversity on the transcript levels of *HaTrx-like* gene

A、B、C 和 D：4 龄第 2 天的棉铃虫分别遭受机械损伤、紫外线照射、低温和高温处理，处理后 0、2、6 和 12 h 后收集样品储存于 -80°C 。数据均代表 3 次生物学重复的平均值 $\pm$ 标准偏差，每次生物学重复包括 10 头虫子。* 和 ** 表示处理和对照之间 *t*-test 差异显著 ($*0.01 < P < 0.05$; $**P < 0.01$)。

A, B, C, and D: The second day larvae of 4th instar were subjected to mechanism injury, UV irrational, low temperature, and high temperature. The samples were collected after treatment 0, 2, 6, and 12 h and stored at -80°C . The data represent the mean $\pm$ SD. Each biological repeat includes 10 larvae or adult. Significance of pairwise comparisons (treatment vs. control) are marked with * or ** ($*0.01 < P < 0.05$; $**P < 0.01$) as determined by the Student's *t*-test.

目害虫棉铃虫中有报道。本研究克隆了 *HaTrx-like* 基因 (GenBank 登录号: KP771808)，该基因 cDNA 全长 526 bp，包含 381 bp 的开放阅读框，编码 126 个氨基酸，含有一个保守的氧化还原活性催化位点 CXXC。氨基酸序列多重联配和进化树分析结果显示其氨基酸序列在进化中并不是特别保守，和帝王斑蝶和家蚕的序列一致性相对较高，亲缘关系也最近。这些结果表明 *HaTrx-like* 基因含有一个氧化还原催化位点，属于典型的硫氧还蛋白家族成员。

时间表达谱结果表明，*HaTrx-like* 基因的表达属于时间依赖型，在不同发育阶段的转录水平变化非常大，这可能暗示着该基因在棉铃虫不同发育阶段所起的作用不太一样，或者说棉铃虫在不同发育时期对外界环境的反应也是不一样的。

这些结果也可能暗示着该基因在棉铃虫的不同组织中扮演着不同的角色。其他昆虫的硫氧还蛋白基因的表达也同样是时间依赖型的，比如中华蜜蜂 *AccTrx-like1* 基因 (Lu *et al.*, 2012)、*AccTrx2* 基因 (Yao *et al.*, 2013) 和 *AccTrx1* 基因 (Yao *et al.*, 2014) 等。空间表达谱结果表明，*HaTrx-like* 基因的表达属于组织依赖型的，在幼虫的解毒代谢器官中肠和马氏管中的表达量相对较高，而在成虫的肌肉中的表达量也相对较高。这个结果可能暗示着该基因在这些组织中起着重要的抗氧化作用。相比较于硫氧还蛋白基因在其他昆虫组织内的表达模式，可以知道硫氧还蛋白的组织分布模式还是种类依赖型的。比如，*BmTrx* 主要在家蚕脂肪体和丝腺中表达 (Kim *et al.*, 2007)；*AccTrx1* 和 *AccTrx-like1* 在中华蜜蜂表皮中的表

达量比其他组织都要高 (Lu *et al.*, 2012; Yao *et al.*, 2014); 而 *AccTrx2* 则是在头和中肠中表达量最高 (Yao *et al.*, 2013)。

多篇文献中已经报道逆境因子能够导致生物体的氧化损伤, 比如杀虫剂、重金属、UV 辐射和极端温度等 (Lushchak, 2011; Kottuparambil *et al.*, 2012)。而一系列的抗氧化酶组成了一个主要的初期防御体系来清除细胞内过多的活性氧和氧化剂, 比如过氧化物酶和过氧化氢酶 (Switala and Loewen, 2002)。本文中, 荧光定量结果显示 *HaTrx-like* 基因的表达明显地受到机械损伤、紫外线照射、低温和高温的诱导, 这可能暗示着该基因参与棉铃虫体内的抗氧化机制, 在以前的研究中, 家蚕 *BmTrx* 基因的转录受到 H_2O_2 、百草枯、低温、高温和病原微生物的明显诱导 (Kim *et al.*, 2007)。在中华蜜蜂中, *AccTrx-like1* 基因的表达也被发现受到 H_2O_2 、4、15 和 25 等逆境的诱导 (Lu *et al.*, 2012); *AccTrx2* 和 *AccTrx1* 的表达也受到多种逆境条件的诱导 (Yao *et al.*, 2013, 2014)。这些结果均表明硫氧还蛋白在保护生物体免受各种逆境条件引起的氧化压力损伤的过程中扮演着重要的角色。硫氧化蛋白参与昆虫体内抗氧化防御的机制可能如下: 首先, 逆境压力使昆虫产生大量的活性氧种类 ROS, ROS 然后作用于昆虫体内对氧化压力比较敏感的生物大分子, 而硫氧还蛋白则通过清除过量的 ROS 来保护昆虫的正常生长发育 (Grant, 2001; Radyuk *et al.*, 2001)。

总之, 本文克隆并鉴定了一个典型的棉铃虫硫氧化蛋白家族成员 *HaTrx-like* 基因, 分析了该基因的序列特征, 时空表达模式以及 4 种不同的逆境压力处理后的转录变化, 使我们对棉铃虫硫氧还蛋白基因有了初步的了解, 但是关于该基因在棉铃虫体内的功能方面还有待进行深入的研究。因此, 本文的下一步研究计划有两方面: 第一方面是通过原核表达将 *HaTrx-like* 蛋白表达出来从蛋白水平研究该基因的转录后特征; 第二方面是利用 RNAi 技术研究该基因参与抗氧化防御方面的功能。

参考文献 (References)

- An S, Zhang Y, Wang T, Luo M, Li C, 2013. Molecular characterization of glutaredoxin 2 from *Ostrinia furnacalis*. *Integr. Zool.*, 8(Suppl 1): 30–38.
- Arner ES, Holmgren A, 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.*, 267(20): 6102–6109.
- Aurent TC, Moore EC, Reichard P, 1964. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. Iv. isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli*. *B. J. Biol. Chem.*, 239 (10): 3436–3444.
- Bauer H, Kanzok SM, Schirmer RH, 2002. Thioredoxin-2 but not thioredoxin-1 is a substrate of thioredoxin peroxidase-1 from *Drosophila melanogaster*: isolation and characterization of a second thioredoxin in *D. Melanogaster* and evidence for distinct biological functions of Trx-1 and Trx-2. *J. Biol. Chem.*, 277(20): 17457–17463.
- Benitez-Alfonso Y, Cilia M, San Roman A, Thomas C, Maule A, Hearn S, Jackson D, 2009. Control of *Arabidopsis* meristem development by thioredoxin-dependent regulation of intercellular transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106(9): 3615–3620.
- Cao GC, Feng HQ, Guo F, Wu KM, Li XC, Liang GM, Desneux N, 2014. Quantitative analysis of fitness costs associated with the development of resistance to the Bt toxin Cry1Ac in *Helicoverpa armigera*. *Sci. Rep.*, 4 (7): 5629; DOI:10.1038/srep05629.
- Chen Y, Cai J, Jones DP, 2006. Mitochondrial thioredoxin in regulation of oxidant-induced cell death. *FEBS Lett.*, 580(28/29): 6596–6602.
- Chen H, Yin Y, Feng E, Li Y, Xie X, Wang Z, 2014. Thioredoxin peroxidase gene is involved in resistance to biocontrol fungus *Nomuraea rileyi* in *Spodoptera litura*: gene cloning, expression, localization and function. *Dev. Comp. Immunol.*, 44(1): 76–85.
- Corona M, Robinson GE, 2006. Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny. *Insect Mol. Biol.*, 15(5): 687–701.
- Droge W, 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.*, 82(1): 47–95.
- Grant CM, 2001. Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Mol. Microbiol.*, 39(3): 533–541.
- Holmgren A, 1989. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J. Biol. Chem.*, 264(24): 13963–13966.
- Holmgren A, Lu J, 2010. Thioredoxin and thioredoxin reductase: current research with special reference to human disease.

- Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 396(1): 120–124.
- Kalinina EV, Chernov NN, Saprin AN, 2008. Involvement of thio-, peroxi-, and glutaredoxins in cellular redox-dependent processes. *Biochemistry (Mosc)*, 73(13): 1493–1510.
- Kanzok SM, Fechner A, Bauer H, Ulschmid JK, Muller HM, Botella-Munoz J, Schneuwly S, Schirmer R, Becker K, 2001. Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in *Drosophila melanogaster*. *Science*, 291(5504): 643–646.
- Kim YJ, Lee KS, Kim BY, Choo YM, Sohn HD, Jin BR, 2007. Thioredoxin from the silkworm, *Bombyx mori*: cDNA sequence, expression, and functional characterization. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem Mol. Biol.*, 147(3): 574–581.
- Kottuparambil S, Shin W, Brown MT, Han T, 2012. UV-B affects photosynthesis, ROS production and motility of the freshwater flagellate, *Euglena agilis* Carter. *Aquat. Toxicol.*, 122/123 (10): 206–213.
- Lee S, Kim SM, Lee RT, 2013. Thioredoxin and thioredoxin target proteins: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxid Redox Signal*, 18(10): 1165–1207.
- Li Z, Liu X, Chu Y, Wang Y, Zhang Q, Zhou X, 2011. Cloning and characterization of a 2-cys peroxiredoxin in the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, a putative genetic factor facilitating the infestation. *Int. J. Biol. Sci.*, 7(6): 823–836.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Lu WJ, Kang MJ, Liu XF, Zhao XC, Guo XQ, Xu BH, 2012. Identification and antioxidant characterisation of thioredoxin-like1 from *Apis cerana cerana*. *Apidologie*, 43 (3): 737–752.
- Lushchak VI, 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.*, 101(1): 13–30.
- Mishra S, Imlay J, 2012. Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide? *Arch. Biochem. Biophys.*, 525(2): 145–160.
- Powis G, Montfort WR, 2001. Properties and biological activities of thioredoxins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 41: 261–295.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP, 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.*, 26(6): 509–515.
- Radyuk SN, Klichko VI, Spinola B, Sohal RS, Orr WC, 2001. The peroxiredoxin gene family in *Drosophila melanogaster*. *Free Radic. Biol. Med.*, 31(9): 1090–1100.
- Schurmann P, Jacquot JP, 2000. Plant thioredoxin systems revisited. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 51: 371–400.
- Serata M, Iino T, Yasuda E, Sako T, 2012. Roles of thioredoxin and thioredoxin reductase in the resistance to oxidative stress in *Lactobacillus casei*. *Microbiology*, 158(4): 953–962.
- Switala J, Loewen PC, 2002. Diversity of properties among catalases. *Arch. Biochem. Biophys.*, 401(2): 145–154.
- Svensson MJ, Chen JD, Pirrotta V, Larsson J, 2003. The ThioredoxinT and deadhead gene pair encode testis- and ovary-specific thioredoxins in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*, 112(3): 133–143.
- Tsuda M, Ootaka R, Ohkura C, Kishita Y, Seong KH, Matsuo T, Aigaki T, 2010. Loss of Trx-2 enhances oxidative stress-dependent phenotypes in *Drosophila*. *FEBS Lett.*, 584(15): 3398–3401.
- Wu KM, Lu YH, Feng HQ, Jiang YY, Zhao JZ, 2008. Suppression of cotton bollworm in multiple crops in China in areas with Bt toxin-containing cotton. *Science*, 321(5896): 1676–1678.
- Yao P, Chen X, Yan Y, Liu F, Zhang Y, Guo X, Xu B, 2014. Glutaredoxin 1, glutaredoxin 2, thioredoxin 1, and thioredoxin peroxidase 3 play important roles in antioxidant defense in *Apis cerana cerana*. *Free Radic. Biol. Med.*, 68 (1): 335–346.
- Yao P, Hao L, Wang F, Chen X, Yan Y, Guo X, Xu B, 2013. Molecular cloning, expression and antioxidant characterisation of a typical thioredoxin gene (*AccTrx2*) in *Apis cerana cerana*. *Gene*, 527(1): 33–41.
- Zhang SD, An SH, Li Z, Wu FM, Yang QP, Liu YC, Cao JJ, Zhang HJ, Zhang QW, Liu XX, 2015. Identification and validation of reference genes for normalization of gene expression analysis using qRT-PCR in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Gene*, 555(2): 393–402.