

黄野螟硫氧还蛋白过氧化物酶 *Tpx* 基因的鉴定及表达分析

程 杰 吕子豪 林 同

华南农业大学林学与风景园林学院, 广州 510642

摘要 为阐明硫氧还蛋白过氧化物酶 *Tpx* 基因的表达模式并研究温度胁迫对其表达的影响, 从黄野螟 (*Heortia vitessoides*) 成虫转录组文库中筛选获得黄野螟硫氧还蛋白过氧化物酶 *Tpx* 基因全长 cDNA, 命名为 *HvTpx* (GenBank: MF521978)。序列分析显示, 该序列开放阅读框长度为 588 bp, 共编码 195 个氨基酸。HvTpx 属于典型 2-Cys 类 Tpx。HvTpx 的氨基酸序列与棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) 同源性最高, 为 87%, 与其他昆虫的同源性在 75% 以上。黄野螟与棉铃虫处在系统发育树的同一分支。RT-qPCR 分析结果显示: *HvTpx* 在成虫中的表达量高于其他发育阶段; *HvTpx* 在幼虫中肠表达量最高; *HvTpx* 在成虫腹部表达量最高, 足部表达量最低; *HvTpx* 在 0 °C、10 °C 和 35 °C 的基因表达量显著高于对照 (25 °C)。结果说明这些温度可以诱导 *HvTpx* 表达上调。

关键词 黄野螟; 硫氧还蛋白过氧化物酶; 基因表达模式; 温度胁迫; RT-qPCR

中图分类号 Q 966 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)02-0056-08

温度是影响昆虫生长发育、繁殖、存活等生命活动最重要的生态因子, 适宜的温度能保证昆虫正常的生长发育, 过高或过低的温度均不利于昆虫的生长发育和繁殖^[1]。昆虫在长期进化过程中, 形成了多种对温度胁迫的耐受和适应机制, 例如通过调节热激蛋白的表达以及通过过氧化物酶 (peroxidase, POD)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutases, SOD) 和过氧化氢酶 (catalases, CAT) 构成的抗氧化酶系统的应激变化等来抵抗不良温度^[2-3]。

在昆虫中存在 3 种类型的过氧化物酶: 硫氧还蛋白过氧化物酶 (thioredoxin peroxidase, Tpx)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, Gpx) 和谷胱甘肽硫转移酶 (glutathione-S-transferases, GST)^[4]。其中, 硫氧还蛋白过氧化物酶 (Tpx) 又称为过氧化物还原酶 (peroxiredoxin, Prx), 是一类进化上高度保守且相对分子质量低的蛋白质^[5]。它可以利用硫氧还蛋白系统清除过氧化氢和烷基过氧化物, 不需要与金属离子结合便可发挥其抗氧化作用, 从而阻止强氧化剂羟自由基的产生, Tpx 在维持体

内氧化还原水平和保护有机体免受活性氧毒害方面发挥至关重要的作用^[6-7]。

黄野螟 *Heortia vitessoides* Moore 属鳞翅目 (Lepidoptera), 螟蛾科 (Pyralidae), 在我国主要分布于广东、广西、海南及云南等省。黄野螟是典型的寡食性害虫, 在我国目前仅发现为害土沉香。该害虫以幼虫咬食叶片, 单株虫数从几百头到一千多头。由于虫口密度大, 数天内便可把被害树叶吃光。在食料不足的情况下, 树干及枝条皮层也被吃掉, 严重影响土沉香结香和产量。近年来, 随着海南、广东和云南等地人工大规模种植土沉香面积的日益扩大, 黄野螟的危害日趋严重^[8-9]。

硫氧还蛋白过氧化物酶作为一种重要的抗氧化酶是否在黄野螟应对高低温胁迫下可以被诱导表达? 目前国内外对黄野螟的研究都集中在生物学特性、农药防治方法以及行为学方面^[10], 对黄野螟硫氧还蛋白过氧化物酶与不良温度适应的关系还未见报道。本次研究基于黄野螟成虫转录组文库数据, 经过 Blast 同源比对, 获得黄野螟硫氧还蛋白过氧

收稿日期: 2017-08-23

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31470653); 广东省自然科学基金项目 (2015A030313416)

程 杰, 硕士研究生, 研究方向: 昆虫分子生物学. E-mail: 18320722614@163.com

通信作者: 林 同, 博士, 教授, 研究方向: 昆虫分子生物学. E-mail: lintong@scau.edu.cn

化酶 *Tpx* 基因 cDNA 全长,命名为 *HvTpx*,对其进行生物信息学分析以及不同发育时期不同组织部位表达分析,同时检测了高温和低温胁迫下黄野螟幼虫体内 *Tpx* 基因表达量的变化,初步分析 *HvTpx* 在不同温度胁迫下的表达特点,以期为后续研究黄野螟 *Tpx* 的生理功能奠定前期基础,同时将有有助于了解 *Tpx* 在黄野螟抗逆境胁迫中的作用机制,为研究昆虫应对温度胁迫的分子机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1)供试虫源。黄野螟卵及幼虫采自广东省化州市平定镇(22°01'N,110°25'E),在人工气候箱中(饲养条件:温度为 27 °C,相对湿度为 75%,光照周期为 L/D=16 h/8 h)用新鲜的土沉香叶片饲养至5龄老熟幼虫,5龄老熟幼虫单头饲养于长 5 cm、宽 4 cm、高 6 cm 的塑料养虫盒中,盒底铺 2 cm 厚的沙土(相对湿度为 50%)为老熟幼虫提供化蛹场所,最后饲养获得蛹及成虫。除卵之外,健康的各个供试虫态均由此获得。

2)主要试剂。OMEGA 公司:总 RNA 提取试剂盒(E.Z.N. ATM Total RNA Kit II);TaKaRa 公司:反转录试剂盒(PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser)及实时荧光定量试剂盒(SYBR premix Ex TapTM)。

1.2 试验方法

1)样品处理。分别收集黄野螟各虫态虫体各 5 头(卵、幼虫、蛹、成虫),再选取 30 头 4 龄幼虫及 30 头 2 日龄成虫经 DEPC 水清洗、70%乙醇消毒、冰上麻醉后,解剖并获得幼虫头、体壁、脂肪体、中肠,成虫头、胸、腹、足、翅,将样品置于无菌去酶的 EP 管液氮速冻后,放于-80 °C 冰箱保存。

不同温度胁迫在人工气候箱中进行,4 龄幼虫作为温度胁迫对象,温度胁迫设置-15、-5、0、5、10、35、40 °C 分别处理 1 h,25 °C 恢复 1 h 后,用上述方法,冻存于-80 °C 保存。以 25 °C 恒温饲养的 4 龄幼虫作为对照,每个处理重复 3 次。

2)总 RNA 提取和反转录。各样本总 RNA 的提取严格按照 E.Z.N. ATM Total RNA Kit II 提取试剂盒说明书进行,将最后获得的 RNA 溶于 60 μL RNA-free DEPC 水中,取 3 μL 所得 RNA 用于琼脂糖凝胶电泳检测质量,取 1 μL 所得 RNA 用于微量

紫外分光光度计(Nanodrop 2000)检测浓度,符合后续实验要求的-80 °C 低温保存。按照 PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser 反转录试剂盒说明书进行第一链 cDNA 合成并稀释 10 倍后用作荧光定量 PCR(RT-qPCR)的模板,存放于-20 °C 冰箱供以后使用。

1.3 基因克隆

从黄野螟成虫转录组文库(NCBISRA 数据库登录号:SRX3035102)中克隆出 *Tpx* 基因完整编码序列。

1.4 生物信息学分析

1)基因及推测的编码蛋白特性分析。使用 NCBIORF Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)进行开放阅读框(ORF)分析;使用 ExPASy - ProtParamtool(<http://web.expasy.org/protparam/>)进行蛋白理化性质分析;使用(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>)进行信号肽分析;使用 NetPhos3.1Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)进行磷酸化修饰位点分析;使用 SubLoc v1.0 软件(<http://www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/SubLoc/>)进行亚细胞定位分析;使用 TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)进行跨膜区分析;使用 COILS Server (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html)进行卷曲螺旋分析;使用 SOPMA 软件 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)进行二级结构分析。

2)同源性比对及进化树构建。不同昆虫 *Tpx* 的氨基酸序列(表 1)检索并下载自 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) GenBank 数据库,使用 DNAMAN 软件对表 1 中 *Tpx* 氨基酸序列进行同源性比对,并使用 ClustalX 和 MEGA4.0 软件对其构建系统发育树(NJ 法)。

1.5 基因表达分析

实时荧光定量 PCR 反应(RT-qPCR)所用特异性引物 Forward: GTGCTTTTCTTCTACCCC 和 Reverse: CGATGATGAAGAGACCG 使用 Primer Premier 5.0 软件设计。使用微管蛋白(α -tubulin)基因(GenBank: MG132200)作为实时荧光定量 PCR 内参基因。实时荧光定量 PCR 反应在 Light-Cycler480 中进行,并采用 20 μL 反应体系(2.0 μL

的 cDNA 模板, 10.0 μL 的 SYBR Premix Ex Taq II, 上下游引物各 0.4 μL , 7.2 μL 的 ddH₂O)。

表 1 参与 Tpx 氨基酸序列比对及系统发育树构建的昆虫名与登录号

Table 1 Insect and GenBank accession numbers used for Tpx amino acid sequence alignment and phylogenetic tree

| 昆虫 Insect | GenBank 登录号 GenBank admission |
|-----------------------------|----------------------------------|
| 黄野螟 <i>H. vitessoides</i> | MF521978 |
| 棉铃虫 <i>H. armigera</i> | ABW96360.2 |
| 家蚕 <i>B. mori</i> | NP_001037083.1 |
| 黑腹果蝇 <i>D. melanogaster</i> | NP_477510.1 |
| 内华达古白蚁 <i>Z. nevadensis</i> | KDR08683.1 |
| 黑蚁 <i>L. niger</i> | KMQ99389.1 |
| 小蜜蜂 <i>A. florea</i> | XP_003696173.1 |
| 意蜂 <i>A. mellifera</i> | XP_003249289.1 |

实时荧光定量 PCR 反应条件如下: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 复性 20 s, 共 40 个循环; 40 °C 冷却 30 s。实时荧光定量 PCR 阴性对照: DEPC 水。

实时荧光定量 PCR 表达量测定: 以黄野螟

Tpx 在卵期的表达量为标准参量来测定其各虫态的表达量, 以黄野螟 *Tpx* 在 4 龄幼虫的表达量为标准参量来测定其在幼虫各组织的表达量, 以黄野螟 2 日龄成虫 *Tpx* 的表达量为标准参量测定其成虫各部位的表达量, 以 25 °C 恒温饲养的 4 龄黄野螟幼虫 *Tpx* 表达量为标准参量来测定其在不同温度胁迫下的表达量, 每个样本进行 3 次重复。每个 cDNA 模板中的 *Tpx* 相对表达量使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量法计算。RT-qPCR 数据使用 SPSS 18.0 软件进行 Duncan's 单因素方差分析 (ANOVA) 及显著性差异分析 (显著性检验水平 $\alpha = 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 基因序列及编码氨基酸序列分析

通过对黄野螟成虫转录组文库进行筛选, 再经 NCBI 在线 Blast 同源性比对, 筛选出一条具有完整 ORF 的序列, 鉴定为黄野螟 *Tpx* 基因, 命名为 *HvTpx* (GenBank: MF521978)。该序列开放阅读框长度为 588 bp, 共编码 195 个氨基酸 (图 1), 推测的编码蛋白质分子质量 21.816 ku, 等电点 pI 为

```

1 ATGCGCTCCAGTGCACCAAGCCGCGCCCAATTCAGACCACAGCTGTGGTGAATGGCGAGTTC AAGACATCTCGCTCCGACTAC
1 M P L Q L T K P A P Q F K T T A V V N G E F K D I S L S D Y
91 AAGGGCAAAATATGTCGCTTTTCTTCTACCCCTGGACTTCAGTTTCGTGTGCCAACTGAATATCATCGCTTCTCCGAGGCCGCTGAC
31 K G K Y V V L F F Y P L D F T F V C P T E I I A F S E A A D
181 GATTTCAAAAAGATCGGATGCGAAGTGATCGCCGCTCCACAGATTCGCACCTCACTCACTTGGCTTGGATCAACACTCCCCGCAAACAA
61 D F K K I G C E V I A A S T D S H F T H L A W I N T P R K Q
271 GCGGCTCCGGCCCATGAACATCCCGATCCTGAGCGACAAGTCGCACCGCATCGCGCGGACTACGGCGTGCTCAACGAGGAGTCCGGC
91 G G L G P M N I P I L S D K S H R I A R D Y G V L N E E S G
361 ATCCCATTCGCGGCTCTCTCATCTGACGACAGCAGAACCTGAGCGAGATCACAGTCAACGATCTGCGCGTCGGACGGTCCGTTGGAG
121 I P F R G L F I I D D K Q N L R Q I T V N D L P V G R S V E
451 GAGACGCTCGCCTGGTGCAGGCGTTCCAGTTCACGGACAAGAAGCGGAGGTGTGCCCGCCAATGGCGCGCGGGCGCAAGACCATC
151 E T L R L V Q A F Q F T D K N G E V C P A N W R P G A K T I
541 AAGCCGACACCAAGGCTGCGCAGGAGTACTTCGTGACGCAACTAACCGCGCAGCCCCCGCAGCCGCGCACCCCTCACCCCGCTCGC
181 K P D T K A A Q E Y F V D A N *
631 TAGGTGCTCGATGTACTTTTCTCGCGGTTTCGATGGAATAACTATGCAACCGTATTAATTATGTTCGTGAATATTCTCGAAATCGACA
721 ACTTGTAAGGATTTTCTTAGTGTTATGAGAACTATATATATGTTGGCTATAGTACTCTAGTTTACTACGCTGTTTATGAGACGTC
811 GCCGCTCTCAACGTTAGAGCTAAAAAATATCTAAATGTGTTTGAATCTCGGTAGCATGACTGAAAATCCCCCGGTTAGGAAAGAGC
901 GGGGTTTCGAATCCCATCGGAACCCGAGACGAGTTGATTTTCTAGAAAATATGCTTTAGTAGTTTACAAGTACATGATAGTAGACTTA
991 GTGATGGTTCGGAGTTGGTTAGTAGATGTCAGATCACTGTGAGATGTTGTTATACAAAAGCATAGTATTTATTTTTTACGTACCAAGTA
1 081 AAATGAAGTAAGTACAGCATTAGTAAATAGTAATCTACAAGTGAATTTATAATTTGTGCAACCTTTTACAATAATAATAGGCAACA
1 171 TCTGACTTCATATTCAGGCACTGTAGCAGGTCAAATTTTTTATGTTATTCGTCAGATGGAATGTTTTCGAACGTCGGTTCATGATT
1 261 ATTAGTTTATCTCATCCACAGCGAACTAATATCCACAGCGAAATAGTTGCAATCTCAGCTATATGTAATACAGTCTATTGAACAATA
1 351 AGTTAGGTGTTTACCAATGATCAGTATTACAGAGATCCTATGTAACCTACCGTGAATCGAGGCTGTAATAAATGCTATGTTTAATAA
1 441 AAAAAAAAAA
    
```

用方形、圆形及三角形分别注明丝氨酸 (Ser)、苏氨酸 (Thr)、酪氨酸 (Tyr) 磷酸化位点; 用下划线及星号分别注明起始密码子 (ATG) 及终止密码子 (TAA)。Serine phosphorylation sites, threonine phosphorylation sites, tyrosine phosphorylation sites are underlined with square, round and triangles respectively. The initiation and termination codons are indicated inlines below and asterisk respectively.

图 1 黄野螟 *Tpx* 核酸序列及编码的氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Tpx* cDNA from *H. vitessoides*

5.93, 不稳定系数为 30.37, 脂肪系数 83.03。疏水性分析结果表明该蛋白为亲水蛋白。信号肽预测结果表明该蛋白无信号肽。跨膜结构预测结果表明该蛋白无跨膜区。磷酸化修饰位点预测, *HvTpx* 含有 7 个丝氨酸磷酸化位点、11 个苏氨酸磷酸化位点、2 个酪氨酸磷酸化位点。

2.2 二级结构、亚细胞定位及保守结构域

对 *HvTpx* 蛋白进行二级结构预测, 表明该蛋

白的二级结构由无规则卷曲 (41.54%)、延伸链 (25.64%)、 α 螺旋 (21.03%)、 β 转角 (11.79%) 构成, 推测该蛋白的主要二级结构由无规则卷曲和延伸链构成。亚细胞定位显示 *Tpx* 蛋白定位在细胞质的可能性最大, 为 69.6%, 推测该蛋白存在于细胞质中。NCBI 的 CDD 对 *HvTpx* 蛋白保守结构域预测显示, *HvTpx* 蛋白在第 5 到 176 位为 PRX_Typ2cys 保守结构域 (图 2)。

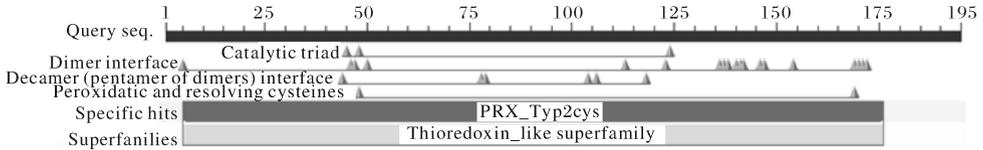


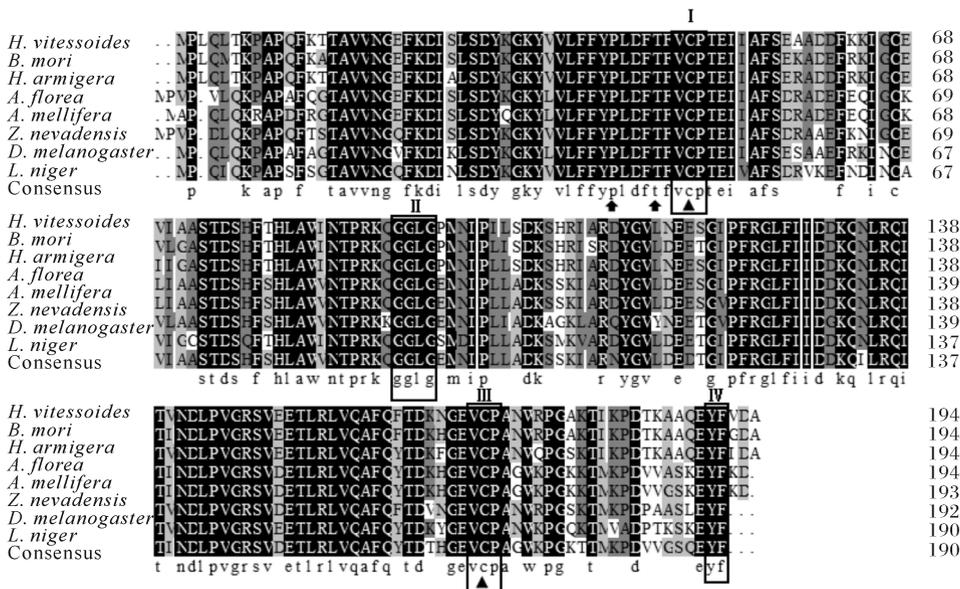
图 2 *HvTpx* 蛋白保守区预测

Fig.2 Conserved domains of *HvTpx* protein

2.3 同源性比对及进化树构建

将黄野螟 *Tpx* 氨基酸序列与 NCBI 数据库中其他 7 种鳞翅目、双翅目、等翅目、膜翅目昆虫的 *Tpx* 氨基酸序列进行同源性比对, 发现与棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) 同源性最高, 为 87%, 其次与家蚕 (*Bombyx mori*) 同源性次之, 为 86%, 与其它昆虫同源性都高于 75%。缬氨酸-脯氨酸-半胱氨酸 (VCP) 区域是两个高度保守的活性位点, 是

Tpx 必要的催化基序, 出现在 *HvTpx* 氨基酸的 I、III 区域, 在图中以三角形标注, 表明 *HvTpx* 属于典型 2-Cys 类 *Tpx*。Pro⁴¹ 和 The⁴⁵ 这 2 个氨基酸残基可以使活性部位稳定, 在图 3 中以箭头标注。在 II、IV 区域的 GGLG、YF 这 2 类残基可以增加 *Tpx* 对氧化过程的敏感性, 在图中以方框标注 (图 3)。基于 MEGA4.0 软件构建的 *Tpx* 氨基酸序列系统进化树 (图 4) 显示: 黄野螟与棉铃虫及家蚕遗传距



缬氨酸-脯氨酸-半胱氨酸 (VCP) 区域以三角形标注; Pro⁴¹ 和 The⁴⁵ 以箭头标注; GGLG、YF 以方框标注。The valine-cysteine-proline (VCP) regions are underlined with triangles; Pro⁴¹ and The⁴⁵ are marked with arrows; GGLG and YF are marked with boxes.

图 3 *HvTpx* 与其它昆虫 *Tpx* 氨基酸序列比对

Fig.3 Alignment of *HvTpx* amino acid sequence with other insect *Tpx* amino acid sequences

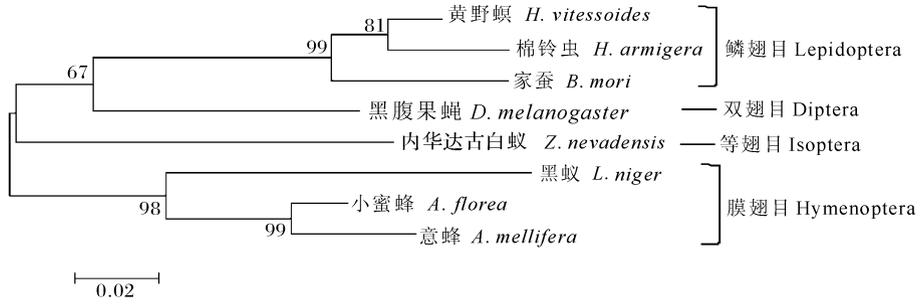


图 4 不同昆虫 Tpx 氨基酸序列的系统发育分析

Fig.4 Phylogenetic analysis of Tpx amino acids from other species

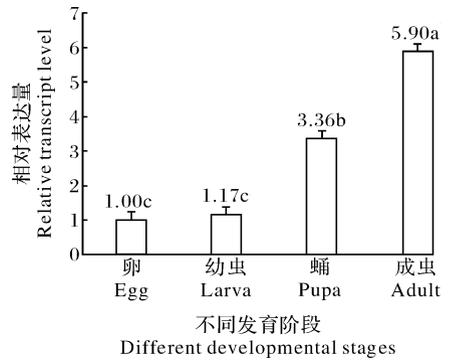
离最近,与同源性分析的结果一致。

2.4 黄野螟 Tpx 基因的表达特性

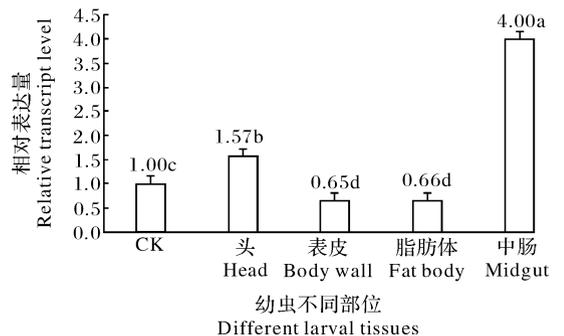
用 RT-qPCR 分析了黄野螟不同发育阶段、幼虫不同部位、成虫不同部位以及不同温度胁迫下 *HvTpx* 基因相对表达量。结果表明, *HvTpx* 基因在黄野螟各虫态, 幼虫及成虫各部位均有表达。该基因在成虫中表达量最高, 卵表达量最低, 成虫、蛹和幼虫表达量分别是卵的 5.9、3.36 和 1.17 倍, 卵和幼虫两者差异不显著 ($P > 0.05$), 蛹和成虫的表达量相比于卵差异显著 ($P < 0.05$) (图 5)。幼虫各部位的表达模式为: 中肠和头部基因表达量显著高于对照 ($P < 0.05$), 分别是对照的 4.00 和 1.57 倍, 而表皮和脂肪体基因表达量都显著低于对照 ($P < 0.05$), 分别是对照的 0.65 和 0.66 倍, 两者之间基因表达差异不显著 ($P > 0.05$) (图 6)。 *HvTpx* 基因在成虫的头部、胸部、腹部、足和翅中均有表达且有显著差异 ($P < 0.05$), 其中在腹部表达量最高, 为对照的 1.36 倍, 足表达量最低, 为对照的 0.09 倍 (图 7)。以 25 °C 作为对照温度, 温度胁迫可以分为低温胁迫和高温胁迫。在低温胁迫下, *HvTpx* 基因在 0 °C 和 10 °C 基因表达量显著高于对照 ($P < 0.05$), 在 -15 °C、-5 °C 低温胁迫下基因表达量显著低于对照 ($P < 0.05$), 两者之间基因表达差异不显著 ($P > 0.05$), 5 °C 低温胁迫下与对照之间基因表达差异不显著 ($P > 0.05$)。在高温胁迫下, *HvTpx* 基因在 35 °C 高温胁迫下基因表达量显著高于对照 ($P < 0.05$), 在 40 °C 该基因表达量与对照差异不显著 ($P > 0.05$) (图 8)。

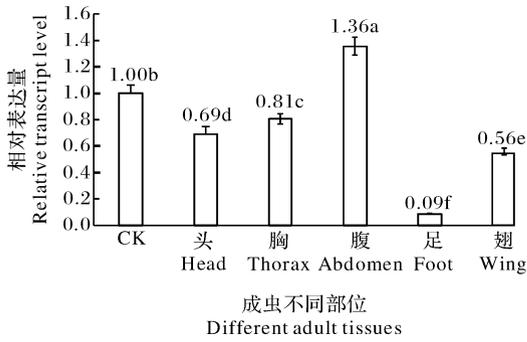
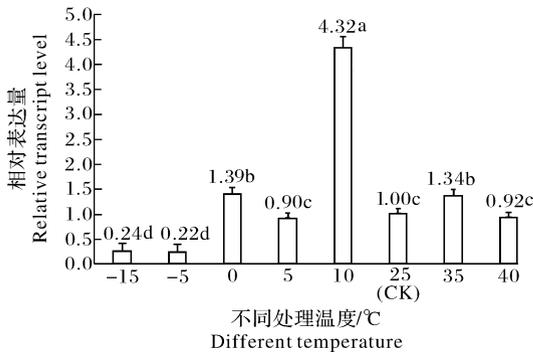
3 讨论

活性氧 (reactive oxygen species, ROS), 主要包



图中数据代表 3 次重复的平均数 ± 标准误, 根据 Duncan's 单因素方差分析 (ANOVA) 及显著性差异分析, 柱上不同小写字母代表差异显著 ($P < 0.05$); 图 6, 7, 8 同。Small letters indicate significant differences at $P < 0.05$ level, according to ANOVA and Tukey HSD, respectively. The data represent the mean ± SD of 3 biological repeats. The same as Fig. 6, 7, 8.

图 5 *HvTpx* 基因在黄野螟不同发育阶段中的表达Fig.5 Expression profiles of *HvTpx* in different developmental stages图 6 *HvTpx* 基因在黄野螟幼虫中的表达Fig.6 The expression level of *HvTpx* in the larvae of *H. vitessoides*

图 7 *HvTpx* 基因在黄野螟成虫中的表达Fig.7 The expression level of *HvTpx* in the adults of *H. vitessoides*图 8 不同温度处理下黄野螟 *Tpx* 基因的相对表达量Fig.8 The relative expression levels of *HvTpx* genes after exposure to different temperature

括过氧化氢(H_2O_2)、超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)和羟自由基(OH^{\cdot}),是生物体在有氧代谢过程中产生的一类具有较强氧化能力的含氧物质的总称,破坏细胞内氧化还原的平衡^[11]。生物体在进行呼吸作用或者接触促氧化剂、杀虫剂、重金属、辐射、热刺激等不良的外源性环境因子时,可以诱导 ROS 产生^[12]。为了防止 ROS 对机体引起的损伤,昆虫通过主动及被动的激活酶促抗氧化体系和非酶类小分子来调节氧化还原平衡,从而避免氧化损伤。酶促抗氧化体系主要包括硫氧还蛋白过氧化物酶(*Tpx*),谷胱甘肽过氧化物酶(*Gpx*),谷胱甘肽硫转移酶(*GST*),超氧化物歧化酶(*SOD*)和过氧化氢酶(*CAT*)等^[4,13]。

Tpx 广泛存在于原核生物与真核生物体内,根据催化过程中保守的半胱氨酸(*Cys*)残基的数目,*Tpx* 可以划分为两大类:1-*Cys Tpx* 和 2-*Cys Tpx*,另外,再根据半胱氨酸(*Cys*)残基位置,2-*Cys Tpx* 又可以分为典型和非典型 2 类^[14-15]。通过对黄野螟 *Tpx* 氨基酸序列分析,*HvTpx* 属于典型 2-*Cys* 类

Tpx。有关 *Tpx* 的功能,研究得最早且最深入的是酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)对过氧化氢和超氧化物的应激反应,这种从酵母中提取出来且具有抗氧化功能的蛋白质当时被称为巯基特异性抗氧化蛋白(thiol-specific antioxidant, *TSA*)或保护蛋白(protector protein, *PRR*)^[16],后改名为硫氧还蛋白过氧化物酶^[17]。对于高等动物 *Tpx* 的研究表明,*Tpx* 对机体的调节作用主要体现在维持体内氧化还原平衡、调节细胞的凋亡与增殖等,在机体中起着重要的抗氧化作用^[18]。对黑腹果蝇^[19]、斯氏按蚊^[20]、烟粉虱^[21]等昆虫的研究同样证明了 *Tpx* 在保护生物体免受氧化损伤中的作用。

在分析黄野螟不同发育阶段的 *HvTpx* 表达模式中发现,该基因在成虫中表达量最高,卵中最低。黄野螟 *HvTpx* 基因在幼虫各组织中均有表达,尤其在中肠组织中相对表达量最高,这可能与中肠是昆虫体内消化吸收食料的场所,同时也是重要的解毒场所有关^[22]。*HvTpx* 基因在成虫腹部中的表达量高于其他部位,可能与腹部是成虫的代谢中心有关。温度是影响昆虫生长发育、存活、繁殖等生命活动最重要的气候因子,同时有研究表明,低温或高温胁迫均会诱发细胞大量产生 ROS,从而严重破坏昆虫体内氧化还原平衡^[23-25]。在不同温度胁迫下,不同昆虫体内的 *Tpx* 都能被诱导表达以调节氧化还原平衡。如在 4 °C 和 37 °C 胁迫下,家蚕(*Bombyx mori*)*BmTpx* 基因表达量上升^[26];中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*)*AccTpx1*、*AccTpx3*、*AccTpx4* 和 *AccTpx5* 基因在 4 °C 和 42 °C 胁迫下表达量升高^[27-30];0 °C 和 40 °C 下,棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)*HaTpx* 基因明显被诱导上调表达^[31]。本研究中,黄野螟在 0 °C、10 °C 和 35 °C 温度胁迫下,*HvTpx* 基因表达量明显高于对照(25 °C),推测这些温度可以诱导 *HvTpx* 的表达。而在 -15 °C 和 40 °C 胁迫下,*HvTpx* 基因表达量明显低于对照(25 °C),推测原因可能是极端低温或高温超出了 *Tpx* 的作用范围。当然,*Tpx* 在黄野螟中的具体生物学功能还有待更进一步地深入研究。

参 考 文 献

- [1] 李品武,付雪莲,陈世春,等.温度胁迫对茶淡黄刺蛾四种保护酶活力和总抗氧化力的影响[J].应用昆虫学报,2016,53(4): 809-816.

- [2] 李爽,蔡梦婷,马婉颖,等.意大利蝗和西伯利亚蝗高温耐受能力及酶活性比较研究[J].应用昆虫学报,2016,53(5):1077-1083.
- [3] 张青,陆明星,祝树德.灰飞虱热激蛋白 Hsp90 基因的克隆、序列分析与表达模式[J].昆虫学报,2014,57(7):777-786.
- [4] CORONA M,ROBINSON G E.Genes of the antioxidant system of the honey bee; annotation and phylogeny[J].Insect Mol Biol,2006,15:687-701.
- [5] 尹才,骆学农,王帅,等.猪带绦虫硫氧还蛋白过氧化物酶的原核表达及其生物学特性分析[J].畜牧兽医学报,2014,45(9):1512-1517.
- [6] 王丽.不同温度对樟巢螟蛹体内氧化还原状态的影响[D].苏州:苏州大学,2011.
- [7] 姚朋波.中华蜜蜂硫氧还蛋白过氧化物酶、硫氧还蛋白和谷氧还蛋白相关基因功能分析[D].泰安:山东农业大学,2014.
- [8] 乔海莉,陆鹏飞,陈君,等.黄野螟生物学特性及发生规律研究[J].应用昆虫学报,2013,50(5):1244-1252.
- [9] WEN Y Z,JIN X F,ZHU C Q, et al.Effect of substrate type and moisture on pupation and emergence of *Heortia vitessoides* (Lepidoptera:Crambidae): choice and no-choice studies [J].J Insect Behav,2016,29:473-489.
- [10] CHENG J,CHEN J X,LIN T.*De novo* assembly and analysis of the *Heortia vitessoides* transcriptome via high-throughput illumina sequencing[J]. J Asia-pac Entomol,2017,20:1241-1248.
- [11] LIVNGSTONE D R.Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms [J].Mar Pollut Bull,2001,42(8):656-666.
- [12] IMLAY J A.Pathways of oxidative damage[J].Annu Rev Microbiol,2003,57:395-418.
- [13] 高现龙.烟粉虱超氧化物歧化酶功能基因研究[D].杭州:浙江大学,2013.
- [14] HU Z,LEE K S,CHOO Y M, et al.Molecular cloning and characterization of 1-Cys and 2-Cys peroxiredoxins from the bumblebee *Bombus ignitus* [J].Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol,2010,155(3):272-280.
- [15] WANG Q,CHEN K,YAO Q, et al.Identification and characterization of a novel 1-Cys peroxiredoxin from silkworm, *Bombyx mori* [J].Comp Biochem Phys B,2008,149:176-182.
- [16] CHAE H Z,KIM I H,KIM K, et al.Cloning, sequencing, and mutation of thiol-specific antioxidant gene of *Saccharomyces cerevisiae* [J].J Biol Chem,1993,268(22):16815-16821.
- [17] CHAE H Z,CHUNG S J,RHEE S G.Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast [J].J Biol Chem,1994,269(44):27670-27678.
- [18] RADYUK S N,SCOHAL R S,ORR W C.Thioredoxin peroxidases can foster cytoprotection or cell death in response to different stressors: over- and under-expression of thioredoxin peroxidase in *Drosophila* cells [J].Biochem J,2003,371(3):743-752.
- [19] RADYUK S N,KLICHKO V I,SPINOLA B, et al.The peroxiredoxin family in *Drosophila melanogaster* [J].Free Radical Biol Med,2001,31(9):1090-1100.
- [20] PETERSON T M L,LUCKHART S.A mosquito 2-Cys peroxiredoxin protects against nitrosative and oxidative stresses associated with *Malaria parasite* infection [J].Free Radical Biol Med,2006,40:1067-1082.
- [21] ASADUZZAMAN M,SHIM J K,LEE S, et al.Azadirachtin ingestion is lethal and inhibits expression of ferritin and thioredoxin peroxidase genes of the sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci* [J].J Asia-Pac Entomol,2016,19:1-4.
- [22] 蒋晴,苏宏华,杨益众.昆虫对 Bt 毒素的抗性中与肠蛋白酶、解毒酶及保护酶活性的关系 [J].环境昆虫学报,2013,35(1):95-101.
- [23] 王艳敏,仵均祥,万方浩.昆虫对极端高低温胁迫的响应研究 [J].环境昆虫学报,2010,32(2):250-255.
- [24] JIA F X,WEI D,HU F, et al.Effects of thermal stress on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) [J].Fla Entomol,2011,94(4):956-963.
- [25] KIM R O,RHEE J S,WON E J, et al.Ultraviolet B retrads growth, induces oxidative stress, and modulates DNA repair-related gene and heat shock protein gene expression in the monogonont rotifer, *Brachionus* sp. [J].Aquat Toxicol,2011,101(3/4):529-539.
- [26] LEE K S,KIM S R,PARK N S, et al.Characterization of a silkworm thioredoxin peroxidase that is induced by external temperature stimulus and viral infection [J].Insect Biochem Mol Biol,2005,35(1):73-84.
- [27] YU F,KANG M,MENG F, et al. Molecular cloning and characterization of a thioredoxin peroxidase gene from *Apis cerana cerana* [J].Insect Mol Biol,2011,20(3):367-378.
- [28] YAO P,CHEN X,YAN Y, et al.Glutaredoxin 1, glutaredoxin 2, thioredoxin 1, and thioredoxin peroxidase 3 play important roles in antioxidant defense in *Apis cerana cerana* [J].Free Radical Biol Med,2014,68:335-346.
- [29] HUAXIA Y F,WANG F,YAN Y, et al. A novel 1-Cys thioredoxin peroxidase gene in *Apis cerana cerana*: characterization of AccTpx4 and its role in oxidative stresses [J].Cell Stress Chapero,2015,20:663-672.
- [30] YAN Y,ZHANG Y, HUAXIA Y F, et al. Identification and characterization of a novel 1-Cys thioredoxin peroxidase gene (AccTpx5) from *Apis cerana cerana* [J].Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol,2014,172/173:39-48.
- [31] ZHANG S D,SHEN Z J,LI Z, et al. Identification of a thioredoxin peroxidase gene involved in resistance to nucleopolyhedrovirus infection in *Helicoverpa armigera* with RNA interference [J].J Insect Physiol,2015,82:17-27.

Identification and expression analysis of thioredoxin peroxidase gene in *Heortia vitessoides*

CHENG Jie LYU Zihao LIN Tong

College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University,
Guangzhou 510642, China

Abstract To elucidate the expression pattern and effect of temperature stress of thioredoxin peroxidase in *Heortia vitessoides* (*HvTpx*), the cDNA sequence of *HvTpx* was screened from the transcriptome of the adult *H. vitessoides*. The complete open reading frame (ORF) of *HvTpx* is 588 bp in length, encoding 195 amino acids. *HvTpx* is a typical member of the 2-Cys Tpxs family, which showed the highest similarity with *Helicoverpa armigera* (87%) and shared similarity above 75% with other insects. *H. vitessoides* and *H. armigera* were clustered in the same branch in the phylogenetic tree based on insect thioredoxin peroxidase amino acids. The results of RT-qPCR revealed that the expression levels of *HvTpx* were higher in adult than in other stages during development. In larvae, *HvTpx* had the highest expression level in midgut. *HvTpx* showed the highest expression level in the abdomen and lowest in the foot in adults. The expression levels of *HvTpx* at 0 °C, 10 °C and 35 °C were significantly increased than that in the control (25 °C), indicating that expression of *HvTpx* could be induced by temperature. The results provide further information in understanding the molecular mechanism of *H. vitessoides* response to temperature stress.

Keywords *Heortia vitessoides*; thioredoxin peroxidase; gene expression pattern; temperature stress; RT-qPCR

(责任编辑:边书京)