

葱蝇谷胱甘肽 S-转移酶基因的克隆与序列分析*

夏洁, 陈斌, 郝友进, 司风铃

(重庆师范大学昆虫与分子生物学研究所 重庆高校生物活性物质工程研究中心
重庆市动物生物学重点实验室, 重庆 401331)

摘要:谷胱甘肽 S-转移酶(GST)是昆虫体内广泛存在的一类解毒酶,可以保护机体免受内源性或氧化物的损害。昆虫对一些杀虫剂的抗性与 GST 表达水平增高有关。GST 的研究主要集中在杀虫剂抗性上,可将其作为昆虫的药物靶标,设计和开发新型的杀虫剂。采用 RACE 的方法,克隆了葱蝇(*Delia antiqua*) GST 基因 cDNA 的全长序列(GenBank 登录号:JQ625502),获得的 cDNA 全长 874 bp,其中阅读框 ORF 627 bp,编码 208 个氨基酸,推测其相对分子质量为 23.9 kD,等电点为 5.83。通过该基因推导的氨基酸序列与其它物种的 GST 蛋白进行相似性比较和系统发育分析,发现葱蝇与丝光绿蝇(*Lucilia cuprina*)的谷胱甘肽转移酶氨基酸序列同源性最高。该结果进一步丰富了 GST 基因的基础数据,有助于葱蝇的杀虫剂抗性机理和发育机理的相关研究。

关键词:葱蝇;谷胱甘肽 S-转移酶;GST 基因;序列分析;系统发育树

中图分类号:Q966;Q785

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2012)04-0024-05

葱蝇(*Delia antiqua*)是双翅目(Diptera)、花蝇科(Anthomyiidae)、地种蝇属(*Delia*)的一种世界性农业害虫,广泛分布于亚洲、欧洲和北美,主要危害北半球温带地区百合科蔬菜。葱蝇幼虫钻入鳞茎内取食,使蔬菜腐烂,最终导致萎蔫死亡^[1-2]。上世纪早期,有机氯杀虫剂还可有效控制葱蝇幼虫,但是由于长期大量地使用导致葱蝇幼虫产生了抗药性。因此传统的有机氯、有机磷和氨基甲酸酯类等化学农药已不能满足当今防治虫害的需求^[3],人类急需新型药剂和方法来有效控制葱蝇。

谷胱甘肽 S-转移酶(Glutathione S-transferase, GST)又称谷胱甘肽巯基转移酶,作为一类以二聚体形式存在的重要的同工酶超家族,广泛分布于哺乳动物、鸟类、昆虫、植物以及微生物等生物体中。它能消除内源还原性谷胱甘肽(GSH)与有害亲电底物的结合作用,从而增加底物的可溶性使其排出细胞^[4],在拮抗外源性毒物、调节机体免疫功能、抑制细胞凋亡上发挥着重要作用。研究表明,激素在细胞内的合成、运输,杀虫剂产生有害氧自由基的清除也都与 GST 有关^[5]。同时,GST 还与药物的抗性和疾病的易感性有关。

目前,昆虫 GST 的研究热点主要集中于杀虫剂抗性。果蝇和家蝇中证实 GST 基因与 DDT 抗性有关^[6];在埃及伊蚊(*Aedes aegypti*) DDT 抗性品系中,两个免疫特性上完全不同的 GST 基因都过量表达^[7];冈比亚按蚊一个 DDT 抗性品系中有多个 Epsilon 类 GST 基因过量表达^[8];过量表达的重组按蚊 GST 基因产物在体外能催化 DDT 脱氯化氢降解生成 DDE。

葱蝇是昆虫冬滞育和夏滞育分子机理比较研究的模式种,对于葱蝇饲养、生命表、滞育分子特性等已有较多的研究^[9-11]。利用现有实验室种群,研究葱蝇 GST 基因序列,表达模式和调控机制,对阐明 GST 基因与杀虫剂抗性的关系,以及防治农林害虫有着重要的理论和实践意义。本研究基于早前测序的葱蝇 EST 文库获得了一个 GST cDNA 片段,根据此片段克隆并测序获得了葱蝇 GST 基因(*DaGST*)全长 cDNA 序列,然后对该序列作了生物信息学分析,通过与其它昆虫 GST 基因序列对比,并运用邻连法(Neighbor-joining, NJ)构建了系统发育树。

* 收稿日期:2012-02-15 修回日期:2012-03-11 网络出版时间:2012-07-04 11:15:00

资助项目:国家自然科学基金(No. 30870340);重庆市教委科学技术研究项目(No. KJ100620);重庆师范大学校级基金重点项目(No. 2011XLZ12)

作者简介:夏洁,女,硕士研究生,研究方向为昆虫分子生物学;通讯作者:陈斌,E-mail: c_bin@hotmail.com

网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20120704.1115.201204.24_004.html

1 材料与方法

1.1 虫源和试剂

研究材料来自于日本东京大学应用昆虫学实验室,由日本东京大学 Ishikawa 教授惠赠,再由本研究团队的陈斌等人在重庆师范大学昆虫与分子生物学研究所建立实验室种群^[9]。成虫饲养在温度为(23±1)℃、光周期为16 h光照:8 h黑暗和相对湿度为50%~70%的条件下。葱蝇幼虫和蛹饲养条件类似成虫,但饲养温度为20℃。

研究用菌株为本实验室保存的大肠杆菌(*E. coli*)JM109。酶和试剂方面:3'-RACE试剂盒SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 购于Clothech公司;pMD19-T、Taq DNA聚合酶、dNTPs、Marker、Primerscript 逆转录试剂盒等购于TaKaRa公司。总RNA提取使用Trizol Reagent (Invitrogen)试剂。DNA胶回收试剂盒购于上海生工。其它试剂为国产分析纯试剂。

1.2 葱蝇 GST 基因的 cDNA 克隆

收集葱蝇不同发育时期的蛹,用无菌双蒸水冲洗3次,并在液氮中充分研磨,用Trizol (Invitrogen)试剂提取总RNA,将所得总RNA溶解于经DEPC处理的纯净水中,保存于-80℃备用。

采用20 μL Primerscript 反转录体系,以1 μg总RNA为模板按照试剂盒说明合成第一链cDNA,并以此为模板进行PCR扩增,所有步骤均按试剂的使用说明书进行。

早前本实验室建立了葱蝇的cDNA文库,并对文库测序获得了GST基因5'端的cDNA片段序列^[12]。根据该片段设计了一条特异性引物GST3':5'-GCTCAATCCCAACA TACCATTCCCAC-3',以葱蝇cDNA为模板,按照SMART™ RACE cDNA Amplification 试剂盒操作说明进行3'-RACE扩增。3'-RACE扩增体系包括:2.5 μL的cDNA为模板以及通用引物UMP和UCC-3。先使用引物GST3'和UMP扩增,PCR反应条件为94℃预变性4 min;94℃、30 s,59℃、40 s,72℃、30 s,35个循环;72℃延伸10 min。然后取1 μL的PCR产物作为模板,使用引物GST3'和UCC-3进行第2次PCR扩增,扩增条件与第1次相同。

PCR产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳分离、切胶回收后,将目的DNA片段连接到pMD19-T载体上,并转化到大肠杆菌JM109中,将阳性克隆菌株送华大基因科技股份有限公司进行DNA序列测定,并对序列结果进行分析。

1.3 序列分析

使用Bioedit软件(<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>)拼接*DaGST* cDNA对应的氨基酸序列、搜索开放阅读框、翻译成氨基酸序列、预测理论分子量和等电点。以*DaGST* cDNA序列推断的氨基酸序列作为询问序列使用NCBI网站的BlastP程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)全面搜索GenBank无冗余的蛋白质数据库,然后选择和分析双翅目的同源GST蛋白。使用Clustal X的Multiple Alignment Mode(<http://www.clustal.org/>)进行多序列的比较分析,然后把秀丽线虫(*Caenorhabditis elegans*)的GST蛋白序列(GenBank登录号:NP_491070.1)对齐到已对齐的双翅目GST蛋白序列上。参考黑果蝇(*Drosophila virilis*)的GST蛋白序列(GenBank登录号:XP_002054337.1)推断所有GST蛋白的保守和功能区。使用PAUP version 4.0b10软件(<http://www.sinauer.com/detail.php?id=8060>)基于NJ法推断所分析GST蛋白序列的系统发育关系,以秀丽线虫的同源GST蛋白作为外群,设置1000个bootstrap重复检测系统发育树各分支的统计显著性。

2 结果与分析

2.1 cDNA 的克隆及序列分析

根据引物GST3'和UCC-3进行第2次PCR扩增,扩增产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳分析出现与预计大小相一致的特异带(图1),克隆测序得到一条686 bp的片段。将此片段与已知片段拼接得到一条874 bp的cDNA序列,将该序列登录到GenBank(登录号:JQ625502),此序列包含627 bp完整的开放阅读框(ORF),5'末端非翻译区54 bp,3'末端有一个多聚腺苷酸加尾信号序列(AATAAA,747~752 bp)和一个polyA的尾部,终止密码子后有193 bp的非翻译区(UTR)(图2)。

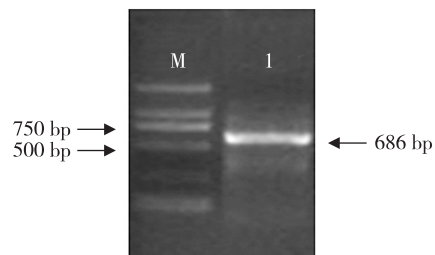


图1 葱蝇 GST 基因 3'端 cDNA 序列的 PCR 扩增结果

Fig. 1 The PCR amplification product of 3' end of cDNA of *D. antiqua* GST gene (*DaGST*)

```

1 AOGTTGAATATCACACGCTCACACCAAGGCAACCTAAAGCACGTGAACTAOC
55 ATGGATTTTATTATTACCCGGTTCOCCTGCCGTTCAGTCATTATGACT
1 M D F Y Y L P G S A P C R S V I M T
109 GCCAAGGCCOCTTGGCATTAAACCTCAATAAGAAATTTATGGATTGGAGCGTGGT
19 A K A L G I K L N K K L L D L D A G
163 GAACATTTGAAGCCGTAATTTATCAAGCTCAATCCOCCAACATAOCATTCCOACC
37 E H L K P E F I K L N P Q H T I P T
217 TTGGTTGATGGTGATTTTGTCTATGGGAATCTCGTGCCATTTTGGTGTACTTG
55 L V D G D F V L W E S R A I L V Y L
271 GTTGAGAAAGTACGGTAAGAACGACTCATGTACCCOAAAGTTCOCCAAGAAGCAT
73 V E K Y G K N D S L Y P K C P K K H
325 GCOGTAGTCAATCAACGCTTTTACTTTGATATGGGTACCTTGTACTTTCAGTTTC
91 A V V N Q R L Y F D M G T L Y F S F
379 TCAGAATACTACTATCCACAATACTTTGCTAAGGCTOCGTGATOCOGAAAAG
109 S E Y Y Y P Q I F A K A P A D P E K
433 TACAAGAAAATGGAAGCTGCTTTCGAATCTTCAACATCTTCTGGAGGTCACAA
127 Y K K M E A A F E F F N I F L E G Q
433 CAATACGGCGCTGGTATTTCTTGAGTGTTGCGCATTTGGCTTTATTTGGCCACC
145 Q Y A A G D F L S V A D L A L L A T
487 GTCAGCCOATTTGAAGTTGCTGGTTTGTACTTTAGCAAATATGCAAATGTAGCC
163 V S P F E V A G F D F S K Y A N V A
541 AAGTGGTAOCTCATGTTAAGACTGTGCTCCOCTTTCGATGAAAAGTGGGAA
181 K W Y A H V K T V A P A F D E N W E
649 GGTGCTTGGAGTTCAAGAAATATTTTGTAAATTTTAAAGTTTTTTTTTATA
199 G C L E F K K Y F D *
703 TAAAAATTTCTATATTTTTTAAATATATTTTTTAAAAAGTTTAAATAAATA
757 TGCTAAAAACGCTCTTTTGTCTTTGAAAAAATAGCACGTGCAACAAAAAATA
811 AAAAAAATAAAAAACGAGCGGGAATGTCGAOCTGCAGGCATGCAAGCTGGCG
865 TAATCAGTCA

```

注:预测的多聚腺苷酸加尾信号序列(AATAAA)用方框标出。左侧数字为核苷酸和氨基酸编号

图 2 葱蝇 GST cDNA 及其推断的氨基酸序列

Fig. 2 cDNA and deduced amino acid sequences of *DaGST*

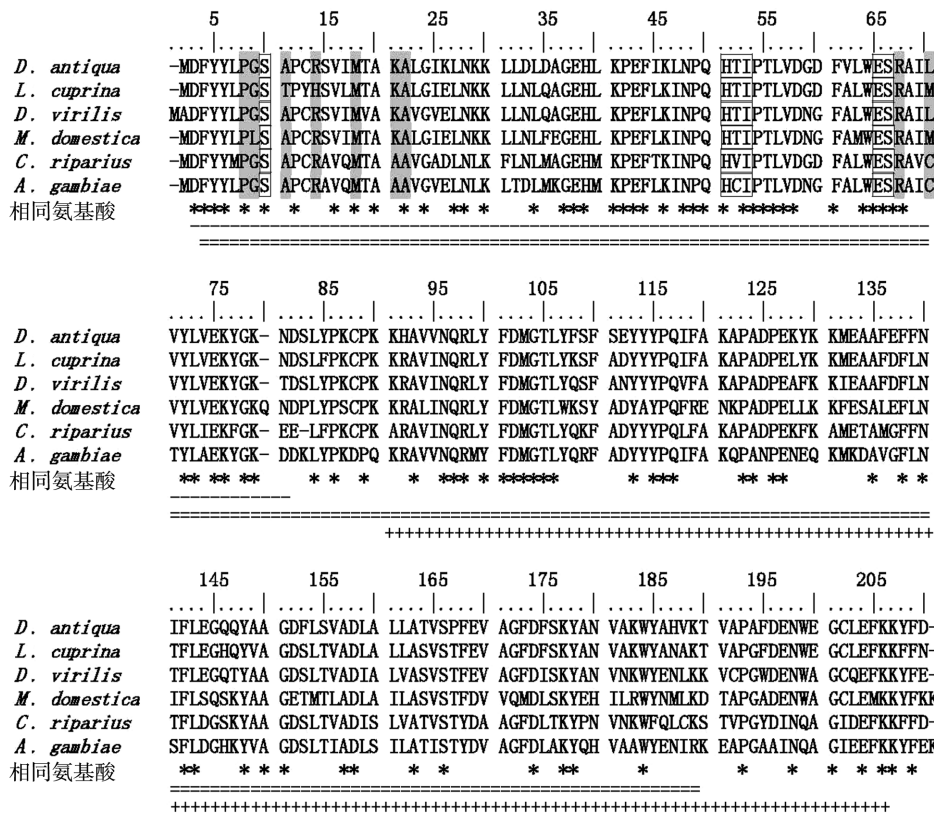
此 627 bp 完整的开放阅读框推断出的葱蝇 GST 蛋白多肽序列由 208 个氨基酸残基组成。进行 Blastp 同源搜索,获得了 100 个氨基酸序列,这 100 个序列都属于 GST 蛋白,证明克隆出的 cDNA 就是 *DaGST* 基因。经过相似性比较,结果表明所得葱蝇 GST 氨基酸序列与丝光绿蝇 (*Lucilia cuprina*)GST 氨基酸序列相似性最高,两者一致率为 84.6%,相似率为 92.3%;其次依次为刺舌蝇 (*Glossina morsitans morsitans*)、黑果蝇、拟果蝇 (*Drosophila simulans*) 和木瓜实蝇 (*Bactrocera papayae*),其一致性分别为 81.3%、78.9%、78% 和 76.1%(表 1)。葱蝇 GST 蛋白分子量为 23.9 kD,等电点 5.83。

通过搜索到的双翅目昆虫 GST 蛋白序列的比对和分析,及与黑果蝇已注释了的保守功能区 and 位点的对比分析,鉴定出葱蝇 GST 蛋白有 3 个保守功能区:GST N 基因家族 Delta 和 Epsilon 亚族保守功能区(第 2~74 个氨基酸)、谷胱甘肽 S-转移酶保守功能区(第 3~187 个氨基酸)和 3' 端 Delta 和 Epsilon 谷胱甘肽 S-转移酶 alpha 螺旋域(第 88~205 个氨基酸)(图 3)。

表 1 葱蝇 GST 与 14 个其它双翅目昆虫及秀丽线虫同源 GST 的氨基酸一致率和相似率

Tab. 1 The GST proteins 14 Dipteran species and *C. elegans* that are homologous to *DaGST* and used for sequence and phylogenetic analysis, with percent identity and similarity compared with GST proteins of *D. antiqua*

物种	GenBank 访问号码	一致率 /%	相似率 /%	物种	GenBank 访问号码	一致率 /%	相似率 /%
丝光绿蝇 <i>L. cuprina</i>	AAA29287.1	84.6	92.3	伸展双叶摇蚊 <i>Chironomus tentans</i>	ACP27595.1	67.3	79.8
刺舌蝇 <i>G. morsitans morsitans</i>	ADD20585.1	81.3	91.8	摇蚊 <i>Chironomus riparius</i>	ADK66959.1	66.8	80.8
黑果蝇 <i>D. virilis</i>	XP_002054337.1	78.9	88.5	大劣按蚊 <i>Anopheles dirus</i>	AAG38507.1	64.6	77.0
拟果蝇 <i>D. simulans</i>	AAK66764.1	78.0	89.0	致倦库蚊 <i>Culex quinquefasciatus</i>	BAH59438.1	64.4	78.3
木瓜实蝇 <i>B. papayae</i>	AAO19738.1	76.1	88.0	冈比亚按蚊 <i>Anopheles gambiae</i>	CAB03592.1	64.1	78.5
黑带食蚜蝇 <i>Episyrphus balteatus</i>	CAH58743.1	72.0	81.5	黑森瘦蚊 <i>Mayetiola destructor</i>	ABG56084.1	63.3	77.6
黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	AAM52032.1	69.8	79.3	秀丽线虫 <i>C. elegans</i>	NP_491070.1	30.3	45.7
家蝇 <i>Musca domestica</i>	CAA63945.1	67.6	79.5				



注:每个氨基酸残基上方标注了相应的数字,“*”代表相同的氨基酸,灰色部分为功能区 C 端结构域, GSH 结合位点用方框标出。“-”“=”和“+”分别代表 GST N 家族、谷胱甘肽 S-转移酶和 C 终端域的 Delta 和 Epsilon 亚族保守区域。“-”代表一个空格,拉丁学名所对应的物种中文名参见表 1。

图 3 葱蝇 GST 蛋白序列与其它 5 个双翅目同源氨基酸序列比较

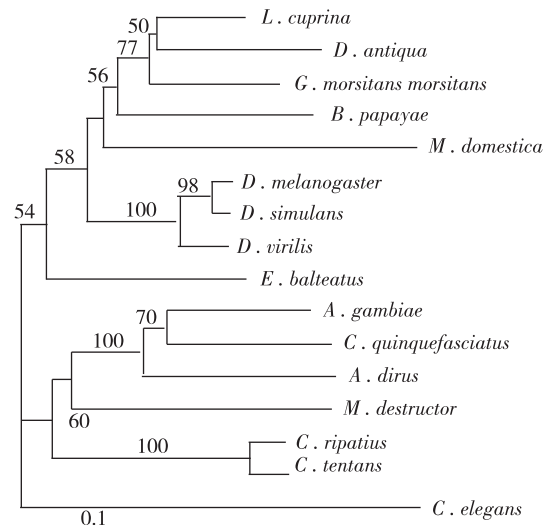
Fig. 3 Alignment of GST of *D. antiqua* with other 5 homologous Dipteran GSTs

2.2 系统发育分析

选择表 1 所列物种并包括葱蝇在内的 15 个双翅目中具代表性的 GST 蛋白,使用秀丽线虫的同源 GST 蛋白作为外群构建了系统发育树,并用 bootstrap 1 000 次重复对其分支作了统计检测(图 4)。结果表明葱蝇和丝光绿蝇的 GST 蛋白最近,其次是刺舌蝇的 GST 蛋白,它们形成一个单系,bootstrap 值达 77%。果蝇、蚊科昆虫、摇蚊分别形成单系,bootstrap 值达 100%。

3 讨论

昆虫在受到外源或内源化合物的危害下,其体内都会发生一系列的信号转导,从而引起应激反应^[13-14]。研究昆虫抗性的机制对病虫害防治、新型杀虫剂的研制以及指导农业生产具有十分重要的理论意义和实践意义。但是,由于昆虫的种类多、分布广以及形态特征、生理特性的多样性,使得许多昆虫抗性机制尚不清楚。谷胱甘肽 S-转移酶是广泛存在于细胞内的二聚体蛋白质,涉及到细胞内的解毒,蛋白质转运和伴侣等,是昆虫杀虫剂抗性机理研究和杀虫剂开发的重要靶标。目前有关 GST 基因表



注:使用秀丽线虫的同源 GST 序列作为外群,大于 50% 的 bootstrap 值标记在树的分支节点上,拉丁学名所对应的物种中文名参见表 1。

图 4 15 个双翅目昆虫 GST 蛋白的邻连(N-J)树。

Fig. 4 The neighbor-joining (NJ) tree of 15 Dipteran GSTs
达的调控机制研究在哺乳动物中取得了相当大的进展,但是在昆虫中的研究相对较少^[15]。

基于本实验室早前测序的葱蝇 EST 文库获得的一个 GST cDNA 片段,本研究通过 RACE 方法从葱蝇的蛹中克隆并测序获得了 *DaGST* 基因全长 cDNA 序列,该 cDNA 的序列分析有助于进一步丰富 GST 基因的基础数据;而系统发育分析表明葱蝇的 GST 蛋白与丝光绿蝇和刺舌蝇的 GST 蛋白最近。这对于葱蝇的杀虫剂抗性机理和发育机理研究具有一定的理论意义。

参考文献:

- [1] 何振昌. 葱蝇生物学特性的观察研究[J]. 沈阳农业大学学报,1989,20(2):89-94.
- [2] 王永卫,徐继明. 葱蝇的发生及防治[J]. 新疆农垦技术,1990(3):17-18.
- [3] 张云霞,薛明,宋增明. 葱蝇 *Delia antiqua* (Meigen) 的研究进展[J]. 山东农业大学学报:自然科学版,2003,34(3):455-458.
- [4] Hemingway J. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance [J]. Insect Biochem Molec Biol,2000,30(11):1009-1015.
- [5] Enayati A A, Ranson H, Hemingway J. Insect glutathione transferases and insecticide resistance [J]. Insect Mol Biol, 2005,14(1):3-8.
- [6] Tang A H, Tu C P. Biochemical characterization of *Drosophila* glutathione S-transferases D1 and D21 [J]. J Biol Chem,1994,269(45): 27876-27884.
- [7] Grant D F, Hammock B D. Genetic and molecular evidence for a trans-acting regulatory locus controlling glutathione S-transferase-2 expression in *Aedes aegypti* [J]. Mol Gen Genet,1992,234:169-176.
- [8] Ortelli F, Rossiter L C, Vontas J, et al. Heterologous expression of four glutathione S-transferase genes genetically linked to a major insecticide-resistance locus from the malaria vector *Anopheles gambiae* [J]. Biochem J, 2003,373:957-963.
- [9] 陈斌,黎万顺,冯国忠,等. 葱蝇的实验室饲养、生物学特性及滞育诱导[J]. 重庆师范大学学报:自然科学版,2010,27(2):9-13.
- [10] 周鑫,陈斌,杜相东,等. 葱蝇实验种群生命表及矩阵模型的组建与分析[J]. 重庆师范大学学报:自然科学版,2011,28(2):19-22.
- [11] Chen B, Kayukawa T, Monteiro A, et al. Cloning and characterization of the HSP70 gene, and its expression in response to diapauses and thermal stress in the onion maggot, *Delia antiqua* [J]. J Biochem Mol Biol,2006,39: 749-758.
- [12] 黎万顺,陈斌,冯国忠,等. 葱蝇非滞育蛹的全长 cDNA 文库的构建[J]. 重庆师范大学学报:自然科学版,2010,27(1): 21-25.
- [13] Huang H S, Hu N T, Yao Y E, et al. Molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide the diamondback moth, *Plutella xylostella* [J]. Insect Biochem Molec Biol,2001,28(9): 651-658.
- [14] Wei S H, Clark A G, Syvanen M. Identification and cloning of a key insecticide-metabolizing glutathione S-transferase from a hyper insecticide-resistant strain of the housefly *Musca domestica* [J]. Insect Biochem Molec Biol,2001,31: 1145-1153.
- [15] Fernandez-canon J M, Penalva M A. Characterisation of a fungal maleylacetoacetate isomerase genes and identification of its human homologue [J]. J Biol Chem, 1998,273(1):328-337.

Animal Sciences

Cloning and Sequence Analysis of Glutathione S-transferase Gene in *Delia antiqua*

XIA Jie, CHEN Bin, HAO You-jin, SI Feng-ling

(Institute of Entomology and Molecular Biology, Chongqing Engineering Research Center of Bioactive Substances, Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: Glutathione S-transferase (GST) is a kind of detoxifying enzymes widely existing in insects. Its peroxidase vitality can protect the organisms against endogenous or oxide damage. The insect resistance to some pesticides is relative to the expression quantity of GST, and past research of insect GST mainly focused on the important role in the formation of pesticides resistance. This kind of genes can be used as the target of insecticide to design and develop new pesticides. In this research, the full length of GST cDNA of the onion maggot (*Delia antiqua*) was cloned using RACE technique (GenBank access number: JQ625502). The result showed that the full length of cDNA is 874 bp long, with an open reading frame (ORF) of 627 bp, encoding a protein of 208 amino acids with a calculated molecular weight of 23.9 kD and theoretical isoelectric point of 5.83. The deduced amino acid sequence has the highest identity with that of *Lucilia cuprina* based homological analysis, and a phylogenetic tree was inferred with homological GST sequences from other insects. The results provide a base and information frame for further research of the GST gene, and contribute to the related research of the insecticide resistance mechanism and development mechanism about *Delia antiqua*

Key words: *Delia antiqua*; Glutathione S-transferase; GST gene; sequence analysis; phylogenetic tree