

DOI: 10.13332/j.1000-1522.20150418

转 *LdOA1* 基因果蝇品系 *GSTs* 基因表达及对溴氰菊酯胁迫响应孙丽丽¹ 刘鹏¹ 王志英¹ 梁斌² 曹传旺¹

(1 东北林业大学林学院 2 河南省新乡市牧野区农林畜牧局)

摘要:舞毒蛾是重要林业食叶害虫,揭示其G蛋白偶联受体介导G蛋白对*GSTs*的调控,这对于挖掘分子靶标开发新型杀虫剂具有重要意义。本文构建转*LdOA1*基因果蝇载体,获得表达*LdOA1*基因果蝇品系,分析了转基因果蝇*GSTs*基因表达量及对溴氰菊酯胁迫的响应,为明确昆虫*OA1*基因功能提供理论依据。通过传统的酶切-连接方法构建重组载体pUAST-attB-*LdOA1*,采用转基因技术构建表达*LdOA1*基因的纯合果蝇品系;利用PCR技术验证转基因果蝇品系;并运用实时荧光定量RT-PCR技术测定转基因果蝇*GSTs* Delta家族基因表达量及低浓度溴氰菊酯胁迫对*GSTs*基因表达量的影响。PCR扩增条带显示转*LdOA1*基因果蝇品系均能检测到453 bp目的基因条带。与非转基因果蝇相比,转*LdOA1*基因果蝇品系中*GSTs* Delta家族基因(除*GSTd4*和*GSTd7*)均上调表达,为非转基因组1.01~3.27倍。低浓度溴氰菊酯胁迫6 h,非转基因果蝇*GSTd6*和*GSTd10*基因被显著诱导激活,而其他*GSTs*基因被显著抑制,抑制率为6.48%~95.84%;胁迫12~72 h,*GSTs*基因(除*GSTd1*和*GSTd10*外)均被显著抑制。低浓度溴氰菊酯胁迫转基因果蝇*GSTs*表达量变化趋势与非转基因果蝇基本一致,但转基因果蝇品系*GSTs*表达量显著高于非转基因果蝇品系(除12~48 h *GSTd1*和*GSTd10*),且胁迫6 h表达量最大。这些结果表明*LdOA1*基因可能介导G蛋白信号通路调控下游*GSTs* Delta亚家族基因表达响应溴氰菊酯胁迫。

关键词:转基因果蝇;舞毒蛾;*LdOA1*; *GSTs*

中图分类号:S763.42 文献标志码:A 文章编号:1000-1522(2016)06-0072-07

SUN Li-li¹; LIU Peng¹; WANG Zhi-ying¹; LIANG Bin²; CAO Chuan-wang¹. **Glutathione S-transferase gene expression in transformant *Drosophila* expressing ocular albinism type 1 from gypsy moth and its response to deltamethrin stress.** *Journal of Beijing Forestry University* (2016) **38** (6) 72-78 [Ch, 31 ref.].

1 College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang, 150040, P. R. China;

2 Agriculture, Forestry, and Animal Husbandry Bureau, Muye District, Xinxiang, Henan, 453000, P. R. China.

The Asian gypsy moth (*Lymantria dispar*) is a key forest defoliator throughout the world. Study on regulation of G protein for *GST* genes mediated by G protein coupled receptor contributes to exploring molecular targets for developing novel pesticides to control gypsy moth. In the present study, transformant *Drosophila* vector was constructed and transformant *Drosophila* lines expressing *LdOA1* were successfully obtained; *GSTs* gene expression levels in transformant *Drosophila* and its response to deltamethrin stress were analyzed. These results provided basic information for elucidating insect *OA1* gene functions. The recombinant vector pUAST-attB-*LdOA1* was constructed by traditional enzyme digestion and ligation technology. The transformant *Drosophila* lines were obtained by transgenic technology and validated using PCR technology. The expression levels of *GSTs* Delta family genes and the effects of deltamethrin on *GSTs* gene expressions in transformant *Drosophila* were analyzed by real-time RT-PCR technology. The RT-PCR results showed that the 453 bp band of *LdOA1* gene was detected in transformant *Drosophila* lines

收稿日期:2015-11-24 修回日期:2016-01-21

基金项目:国家自然科学基金项目(31570642和31101676)、黑龙江省自然科学基金面上项目(C201409)。

第一作者:孙丽丽,博士生。主要研究方向:昆虫毒理学。Email: 253035020@qq.com 地址:150040 黑龙江省哈尔滨市和兴路26号东北林业大学林学院。

责任作者:曹传旺,副教授。主要研究方向:昆虫毒理学。Email: chuanwangcao@126.com 地址:同上。

本刊网址: http://j.bjfu.edu.cn; http://journal.bjfu.edu.cn

expressing *LdOA1* gene. Compared with untransformant *Drosophila*, the expression levels of *GSTs* Delta family genes, except for *GSTd4* and *GSTd7* genes, in transformant *Drosophila* lines were up-regulated with 1.01- to 3.27-fold of untransformant *Drosophila* using qRT-PCR analysis. Under low concentration of deltamethrin stress for 6 h, the *GSTd6* and *GSTd10* were obviously induced while other *GSTs* genes were significantly inhibited in untransformant *Drosophila*, and the inhibition ratios were 6.48% - 95.84%. Under deltamethrin stress for 12-72 h, the expressions of *GST* genes, except for *GSTd1* and *GSTd10*, were significantly inhibited in untransformant *Drosophila*. Compared with untransformant *Drosophila*, the expressions of *GSTs* genes in transformant *Drosophila* varied in similarity under low concentration of deltamethrin stress. However, the *GST* gene expressions in transformant *Drosophila* were significantly higher than those in untransformant *Drosophila* except for *GSTd1* and *GSTd10* for 12-48 h; and the *GST* gene expressions in transformant *Drosophila* were highest under low concentration of deltamethrin stress for 6 h. These results indicated *LdOA1* may mediate G protein signal transduction to regulate *GSTs* Delta subfamily genes in response to deltamethrin stress.

Key words transformant *Drosophila*; gypsy moth; *LdOA1*; *GSTs*

G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptors, GPCR) 在昆虫体内分布广泛且数量巨大, 参与了昆虫生长发育 (生长、发育、繁殖等) 过程中的各种化学反应^[1-3], 由于 GPCRs 调控着重要的生物功能, 一旦被破坏或者过度激活都可能直接导致昆虫发育停滞或繁殖力下降, 甚至会造成昆虫死亡^[4]。GPCR 家族中眼白化 I 型蛋白 (Ocular albinism type 1 protein, OA1), 是一种黑素小体膜整合性糖蛋白, 具有 7 个跨膜结构, 3 个胞内环和 3 个胞外环, 其中胞外环是配体的结合位点, 胞内环通过与 G 蛋白的不同亚基结合来传递信号, 而跨膜区则通过维持受体结构的稳定以及改变构象传递信息^[5-9]。OA1 (GPR143) 是最常见的眼白化病 I 型, 该基因突变是其致病原因, 其功能障碍能引起黑色素小体生长增大而诱发病变^[10]。目前, 有关 OA1 功能研究主要集中于人和小鼠 (*Mus musculus*) 方面, 而有关昆虫 OA1 生理功能以及分子机制仍不明确。昆虫体色的主导色是黑色素, 在昆虫生命活动中具有重要功能, OA1 基因产物可能参与昆虫体内黑色素的形成、运输及其代谢途径, 该基因的缺陷也可能导致昆虫眼、体表的白化现象^[11-12]。一直以来, 关于昆虫体色系统的研究都是发育生物学和进化生物学的研究热点, 但昆虫 OA1 基因鲜有报道, 仅在黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 黑色素代谢途径略有研究^[12-13]。曹传旺等^[14]首次克隆了舞毒蛾 (*Lymantria dispar*) *LdOA1* 基因, 并测定了对杀虫剂溴氰菊酯、甲萘威和氧化乐果的胁迫响应, 分析表明 *LdOA1* 的表达均表现为显著抑制。Sun 等^[15]利用转基因果蝇技术研究了舞毒蛾 OA1 基因对热激蛋白家族基因调控响应溴氰菊酯胁迫。然而 GPCR 家族基因 OA1 是否影响和调控下游解毒酶 *GSTs* Delta 家

族基因响应杀虫剂的胁迫? 为此, 本文将舞毒蛾 *LdOA1* 基因转入黑腹果蝇中, 建立转基因果蝇品系, 采用实时荧光定量 RT-PCR 法研究 *LdOA1* 基因介导 *GSTs* 家族基因表达对杀虫剂溴氰菊酯的胁迫响应, 为明确昆虫 OA1 基因功能及开发新型杀虫剂作用靶标提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

供试舞毒蛾卵块和人工饲料均购自于中国林科院森林生态环境与保护研究所, 放置于温度 (25 ± 1) °C, 光照 14L:10D, 相对湿度 60% 的条件下人工饲养。

供试黑腹果蝇用人工饲料在人工气候箱中継代饲养, 饲养条件与舞毒蛾一致。人工饲料主要成份: 蔗糖 31.00 g, 玉米粉 8.25 g, 酵母粉 3.50 g, 琼脂 2.50 g, 380 mL 水, 丙酸 2.5 mL, 每 3 ~ 4 d 更换 1 次饲料。用脱脂棉封住培养瓶口以保持空气流通, 防止成虫飞出。

1.2 主要试剂

溴氰菊酯原药 (98.2%), 由南开大学国家农药工程中心赠予; *EcoRI* 和 *XhoI* DNA 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNase I 购自于 Promega 公司; RNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司; pMD18-T 载体和 PrimeScript™ RT reagent Kit cDNA 合成试剂盒购自 TaKaRa 公司、SYBR Green Real-time PCR Master mix 购自 Toyobo 公司、西班牙琼脂糖购自 Gene 公司。

1.3 表达载体构建

根据舞毒蛾 *LdOA1* 核苷酸序列设计载体引物, 上游引物 OA1-F: 5'-CCGGAATTCATGATTGTGAAC-CCAATTAT-3' (*EcoRI*), 下游引物 OA1-R: 5'-CTAG-

CTCGAGCAAAGTTGAATAATTATTGA3' (*XhoI*) (下划线为酶切位点)。提取舞毒蛾总 RNA, 经 DNaseI 消化去除基因组 DNA, 参照 PrimeScript™ RT reagent Kit cDNA 试剂盒说明合成 cDNA, PCR 扩增 *LdOA1*, 经胶回收试剂盒回收后, 与 pMD18-T 载体连接 (16 °C, 16 h), 将连接产物转化 *DH5 α* 感受态细胞; 检测阳性克隆菌液, 送至北京六合华大生物科技有限公司测序, 重组载体命名为 *OA1/pMD18-T*。限制性内切酶 *EcoRI* 和 *XhoI* 分别对 *OA1/pMD18-T* 质粒与 pUAST-attB (美国 Auburn 大学 Nannan Liu 赠予) 载体进行双向酶切, 回收 *LdOA1* 基因片段与 pUAST-attB 载体, 经 T4 DNA 连接酶连接 (16 °C, 16 h), *DH5 α* 感受态细胞转化 (Amp 抗性), 经菌液 PCR 和质粒酶切分析筛选阳性克隆, 并送至北京六合华大生物科技有限公司测序验证, 成功构建的重组质粒命名为 pUAST-attB-*LdOA1*。

1.4 转 *LdOA1* 基因果蝇

定点微量注射 pUAST-attB-*OA1* 重组质粒果蝇 3#染色体 [UAS- ϕ 2b2a; VK5] G0 代胚胎中, 注射后的卵置于琼脂培养基中, 18 °C 培养 72 h, 并于 36 ~ 72 h 间将孵化的果蝇幼虫转移入玉米培养基饲养, 幼虫饲养 3 ~ 4 d 后, 转至 25 °C 化蛹和羽化, 及时挑选果蝇雄成虫与 *ywR13s = yw; sp/Cyo; MKRS/TM2* 品系处女蝇杂交, 获得带 1/2balancers 的转基因 G1

代果蝇, 红眼表型为转基因果蝇品系, 命名为 3#染色体果蝇 (中科院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所果蝇资源与技术平台提供), 利用 RT-PCR 法检测果蝇品系体内 *LdOA1* 基因。

1.5 转 *LdOA1* 基因果蝇致毒处理

采用药膜法进行致毒处理^[16], 溴氰菊酯对果蝇亚致死浓度参考 Sun 等^[15], 取 200 μ L 1.77 μ g/mL 溴氰菊酯应用液于闪烁瓶中, 水平转动形成均匀药膜, 加入少量人工饲料。分别挑取 120 头大小、颜色一致 (同一养虫瓶、同一天羽化、形态特征一致) 的对照果蝇品系 [UAS- ϕ 2b2a; VK5] 和转基因果蝇成虫放入处理的闪烁瓶中, 以丙酮处理为对照组, 每个处理 20 头, 6 个重复, 分别于 6、12、24、48 和 72 h 时间点挑取 10 头活泼的果蝇放入预冷的离心管中, 液氮冷冻后放置于 -80 °C 备用。

1.6 实时荧光定量 RT-PCR

采用 RNeasy Mini 动物组织总 RNA 提取试剂盒提取对照 (丙酮)、1.77 μ g/mL 溴氰菊酯处理的果蝇成虫的总 RNA, 经 DNaseI 消化去除基因组 DNA, 采用 PrimeScript™ RT reagent Kit cDNA 合成试剂盒说明书合成 cDNA, 将合成 cDNA 稀释成 10X, 用作实时荧光定量 PCR 模板。实时荧光定量 RT-PCR 使用试剂盒 SYBR Green Real-time PCR Master mix。RpL32、ATP 作为内参基因^[17], 引物序列见表 1。

表 1 实时荧光定量 RT-PCR 引物序列

Tab. 1 Primers sequences for real-time RT-PCR

基因 Gene	正向引物序列 (5'-3') Sense primer (5'-3')	反向引物序列 (5'-3') Antisense primer (5'-3')
<i>GSTd1</i>	GCCCTGTGGCAACCGTG	GGAGACAGCGCAATTTGGAATTGTTG
<i>GSTd2</i>	CCGTGGCGGACATGCGCA	GTGATACCGATCACTTAGCCGC
<i>GSTd3</i>	GGAGGCTCAGGACTACGTGG	CCTCGATCCTCTTCTTACATCC
<i>GSTd4</i>	GCTGCCTTTGAATTCCTGGACA	CCCTTCCAGTTTTTCATCCCATC
<i>GSTd5</i>	GTGACCACCTCACAGTGGCTGA	GCTTCGCCGCCGCGCTGAC
<i>GSTd6</i>	CTGAACGCTGCCTTCGATCTTC	GCCAAGTTCTCGTCCCAACCC
<i>GSTd7</i>	GGTCAGGACTTCGTGGCCG	GGCCTTACTTCCTTTTCTTTTGC
<i>GSTd8</i>	GCCTCACCATGCGGACATTG	GGCAATAATTTGCCGAGGTATGTGG
<i>GSTd9</i>	GTCAGCAGTACGCCGCCCTC	CCCGTCATTGTTTGTCAAAATCG
<i>GSTd10</i>	CTTTCGATGTGGCTGCCTTCG	CGAAATCCAGCCAGTCTTAATC
<i>GSTd11</i>	CGGATCTCACGCTTTTGGTGACC	GAACTGTTAGCCGCCGCGATTG
<i>RpL32</i>	GGCCCAAGATCGTGAAGAAGCG	CAGCTCGCCACGTTGTGC
<i>ATP</i>	GTCCGCCAATACGGAGTTCTTC	CCCAGCTCTGTTTAAATGACAGC

实时荧光定量 RT-PCR 反应体系为: 10 μ L 2 \times SYBR premix Ex Taq 酶、正向和反向引物 (10 μ mol/L) 各 1、2 μ L 稀释后 cDNA 模板, 加去离子水补至 20 μ L。实时荧光定量 PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 30 s, 94 °C 变性 12 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 40 s, 81 °C 读板 1 s, 45 个循环, 每个样品重复 3 次, 用

2^{- $\Delta\Delta$ Ct}} 方法进行基因的相对定量分析^[18]。

1.7 数据统计与分析

运用 SPSS17.0 软件, 采用 Duncan 方法对溴氰菊酯胁迫下同一基因不同时间点基因表达水平进行差异分析, 显著水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 转 *LdOA1* 基因果蝇表型和分子验证

以重组转基因质粒 pUAST-attB-*LdOA1* 为模板, 经 PCR 及 *EcoRI*、*XhoI* 双酶切检测, 产物凝胶电泳和测序显示为目的基因 *LdOA1*, 大小为 453 bp, 表明

pUAST-attB-*LdOA1* 载体成功构建。带 1/2 balancers 的转基因 G1 代果蝇眼睛为红色, 表明 *LdOA1* 基因成功表达(图 1)。提取表征为红眼的转基因果蝇总 RNA, 反转录成 cDNA, 经 RT-PCR 检测, 有明显条带, 且条带大小与目的条带大小一致, 表明舞毒蛾 *LdOA1* 基因成功整合到黑腹果蝇基因组中并成功表达。

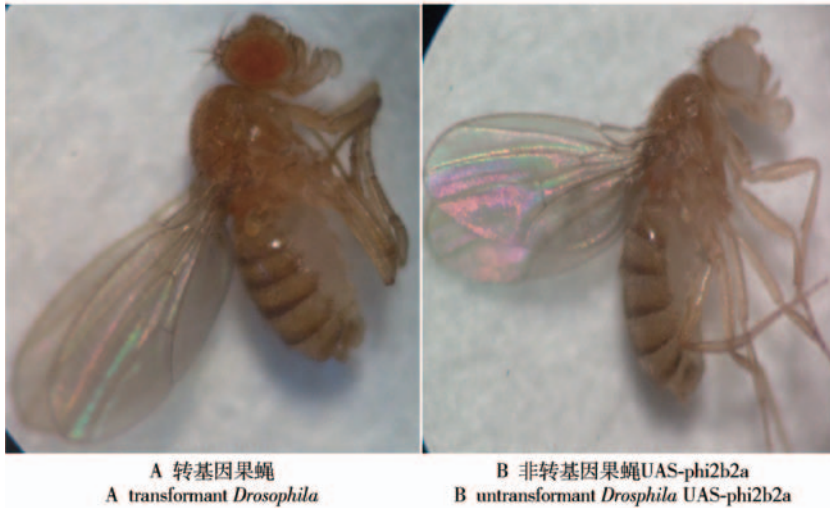


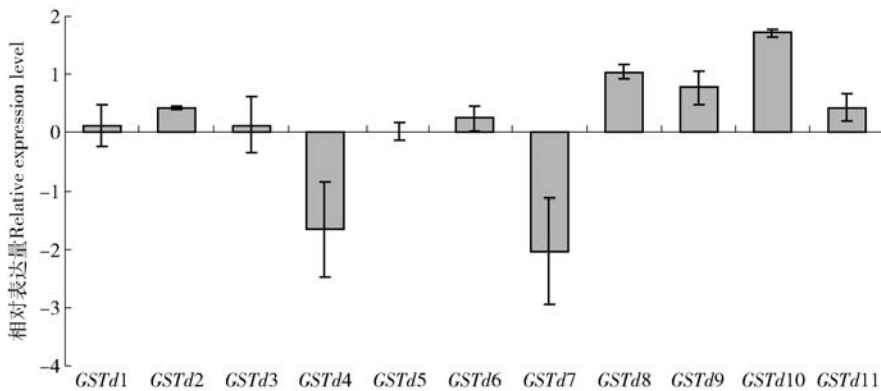
图 1 转基因和非转基因果蝇品系表现型

Fig. 1 Phenotype of untransformed and transformant *Drosophila*

2.2 转 *LdOA1* 基因果蝇 *GSTs* 家族基因表达分析

表达 *LdOA1* 基因果蝇对内源 *GSTs* 家族基因的表达影响如图 2。转基因果蝇品系中 Delta 家族的

11 个 *GSTs* 基因(除 *GSTd4* 和 *GSTd7*)均表现为上调, 上调倍数为对照 1.01 ~ 3.27 倍, 而 *GSTd4* 和 *GSTd7* 相对表达量分别为对照的 31.7% 和 24.3%。



表达量进行了 \log_2 转化。下同。The relative expression levels were \log_2 transformed. The same below.

图 2 转基因果蝇品系 *GSTs* 表达量

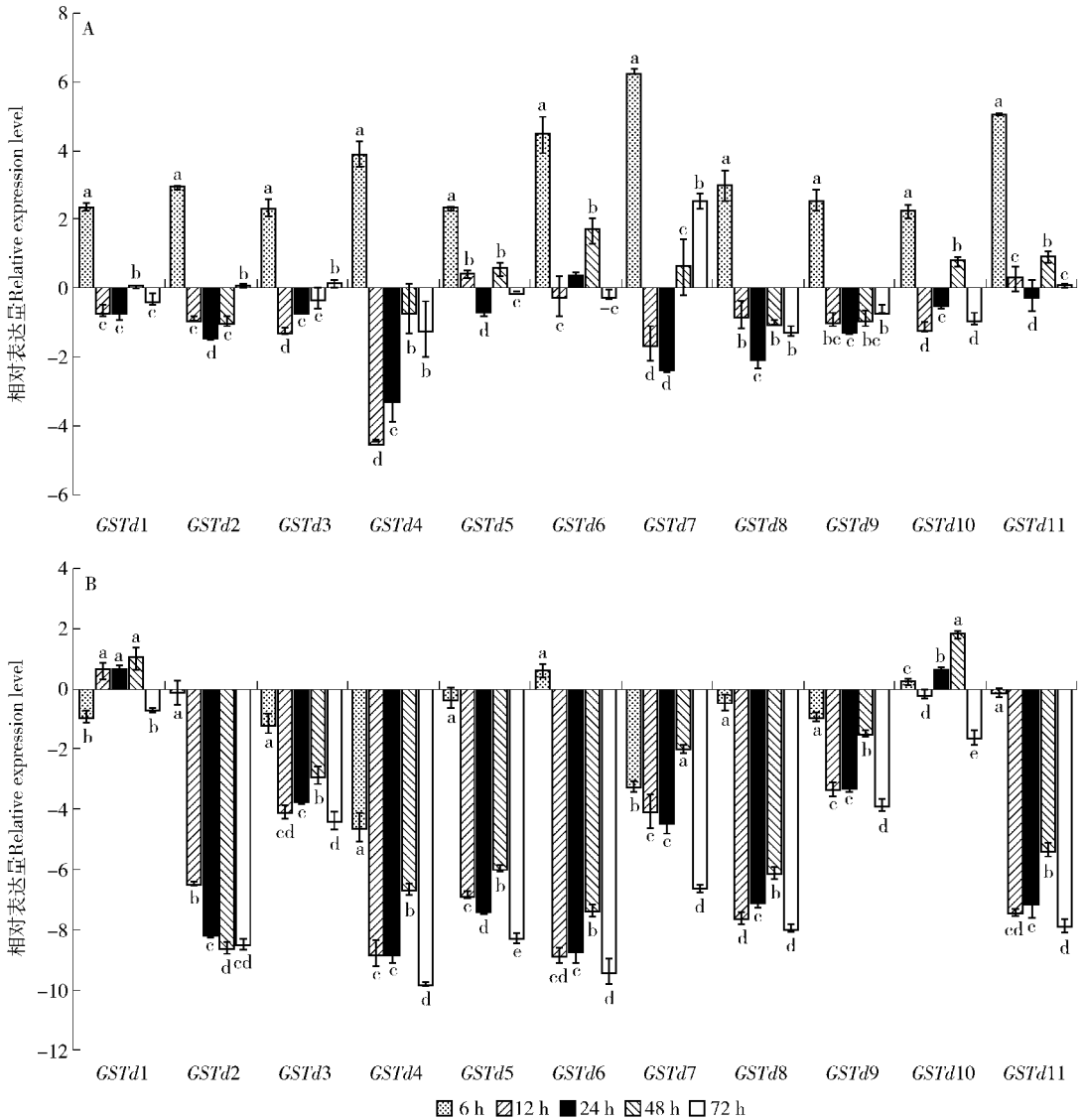
Fig. 2 Relative expression levels of *GST* genes in transformant *Drosophila*

2.3 转 *LdOA1* 基因果蝇 *GSTs* 基因对溴氰菊酯胁迫响应

采用实时荧光定量 RT-PCR 技术, 测定了低浓度溴氰菊酯 ($1.77 \mu\text{g}/\text{mL}$) 胁迫下转基因果蝇体内 *GSTs* Delta 家族基因表达量(图 3)。溴氰菊酯胁迫 72 h, 非转基因果蝇品系 *GSTs* Delta 家族基因显著下调表达(除 12 ~ 48 h *GSTd1*, 6 h *GSTd6*, 6、24 和 48 h *GSTd10* 外), 其相对表达量为对照的 0.11% ~

93.52%。胁迫 6 h, *GSTd6* 和 *GSTd10* 基因显著诱导激活, 激活率分别为 52.81% 和 17.83%; 其他 *GSTs* 基因被显著抑制, 抑制率范围为 6.48% ~ 95.84%。胁迫 12 ~ 72 h, *GSTd2*、*GSTd4*、*GSTd5*、*GSTd6*、*GSTd8*、*GSTd11* 抑制率均高达 99.00% 以上, 而 *GSTd1* ~ *GSTd11* 72 h 的表达量最低, 分别为 6 h 的 0.30% ~ 27.68%。

转基因果蝇 *GSTs* Delta 家族基因的相对表达量



A. 转 *LdOa1* 基因果蝇品系, B. 非转基因果蝇品系, 不同字母表示同一基因不同时间点差异显著 ($P < 0.05$)。A. transformant *Drosophila* expressing *LdOa1* gene, B. untransformant *Drosophila*, different letters indicate significant difference at 0.05 level at the same gene among different time points by the Duncan's multiple range test.

图3 溴氰菊酯对非转基因和转基因果蝇 GSTs 表达量的影响

Fig.3 Effects of deltamethrin on GST gene expressions in untransformant and transformant *Drosophila*

显著高于非转基因果蝇品系(图3A)。胁迫6 h, GSTs 基因被显著诱导激活,表达量为非转基因果蝇的3.98~687.40倍;胁迫72 h, *GSTd1*~*GSTd11* 基因的表达量分别为非转基因果蝇的1.28~588.13倍。由图3可知,溴氰菊酯胁迫下转基因和非转基因果蝇 GSTs 表达量变化趋势基本一致,但转基因果蝇 GSTs 表达量显著高于非转基因果蝇品系(除12~48 h *GSTd1* 和24~48 h *GSTd10* 外)。溴氰菊酯胁迫下,非转基因果蝇 GSTs 基因主要表现出显著的抑制下调表达,而表达 *LdOa1* 基因果蝇 GSTs 基因表达量显著增加。

3 讨论

GPCRs 是广泛存在于真核生物体内的一类受体蛋白,特异性地在不同种类的细胞中表达,通过与膜内侧的异源三聚体结合 G 蛋白的耦联作用而将信号传递给下游的效应分子系统,从而使细胞完成相应外界刺激下的正常生理功能^[19]。Li 等^[20]首次揭示了抗性库蚊 (*Culex quinquefasciatus*) 视紫质样 GPCR 基因沉默导致库蚊对氯菊酯抗性减小,同时降低2个环磷酸腺苷(cAMP)通路蛋白激酶 A 基因 (*PKAs*, *PKA000798*, *PKA018257*) 和4个抗性相关的细胞色素 P450 基因 (*CYP6AA7*, *CYP6BY3*, *CYP9M10*, *CYP9J34*) 表达水平;果蝇表达视紫红质

样 GPCR 基因对氯菊酯耐受性和抗性 P450 基因表达均增加;揭示了视紫红质样 GPCR 基因介导的调控 P450 基因的表达和库蚊 P450 介导的抗性。眼白化 I 型蛋白作为一种黑素小体膜整合性糖蛋白,具有 7 个跨膜结构,且在 OA1 蛋白跨膜区和环上含有许多 GPCR 的保守性氨基酸,被认为是 GPCR 超级家族中的一员^[21-25]。研究表明 OA1 蛋白和 G 蛋白可发生特殊的反应,进行信息的传导,从而调节黑素小体的生长与成熟^[26]。然而,OA1 蛋白在黑色素形成中的作用还不十分清楚,而有关昆虫 OA1 蛋白功能及介导 G 蛋白调控下游基因的研究更鲜有报道。

曹传旺等^[14]首次克隆了舞毒蛾 *LdOA1* 基因,并研究表明氧化乐果、溴氰菊酯和甲萘威显著抑制 *LdOA1* 表达。Sun 等^[15]报道了溴氰菊酯胁迫下非转基因果蝇品系 *Hsp* 基因转录水平主要表现为抑制下调,而转 *LdOA1* 基因果蝇 *Hsp* 家族基因表达量显著上调,推测可能是过表达 *LdOA1* 基因激活了细胞内信号通路,从而导致 *Hsp* 蛋白过量表达响应外源化合物的胁迫,缓解细胞应激反应,保护细胞免于凋亡的作用,维持细胞正常构造。为了进一步研究舞毒蛾 OA1 偶联 G 蛋白对下游效应分子解毒酶调控作用,比较研究了表达 *LdOA1* 基因果蝇 *GSTs* Delta 家族基因表达量及对溴氰菊酯的胁迫影响。谷胱甘肽 S-转移酶 (Glutathione S-transferases, *GSTs*), 作为昆虫解毒酶系之一,是一类以二聚体形式普遍存在于需氧生物体的多功能的超家族酶,具有对异源物质的解毒代谢、抗氧化应激、参与激素的胞内运输和合成等生物功能^[6-10]。目前已知昆虫特有的 *GSTs* Delta 和 Epsilon 亚家族成员,因其参与了对杀虫剂抗性的形成,继而成为研究焦点。大量的研究显示昆虫 *GSTs* Delta 亚家族基因主要参与杀虫剂抗性,特别是对有机磷、有机氯和拟除虫菊酯类杀虫剂的代谢脱毒,例如:冈比亚按蚊 (*Anopheles gambiae*) 中一个 Delta 家族 *GSTs* 显示有代谢 DDT 活性^[27-31]。

将外源舞毒蛾 *LdOA1* 基因导入黑腹果蝇,研究 GPCR OA1 对 *GSTs* Delta 家族基因调控,转 *LdOA1* 基因果蝇 *GSTs* Delta 家族基因 (除 *GSTd4* 和 *GSTd7* 外) 表现为上调表达,表明外源舞毒蛾 *LdOA1* 基因可能参与了下游 *GSTs* 基因表达的调控。低浓度溴氰菊酯胁迫下,非转基因果蝇 *GSTs* Delta 家族基因主要呈下调表达,而转 *LdOA1* 基因果蝇品系 *GSTs* 表达量的变化趋势与非转基因果蝇基本一致,但 *GSTs* 的表达量均高于非转基因果蝇品系,这些结果表明 *LdOA1* 能够影响下游 *GSTs* 基因的表达,并通过增加 *GSTs* 表达量增加对溴氰菊酯解毒能力,但有关 OA1 偶联 G 蛋白介导具体的通路调控下游效应

因子表达还有待进一步的研究。

4 结 论

本文成功构建了转舞毒蛾 *LdOA1* 果蝇品系;采用实时荧光定量 RT-PCR 法测定了转基因果蝇品系 *GSTs* Delta 家族基因的表达量,以及低浓度溴氰菊酯胁迫下转基因果蝇品系和非转基因果蝇的 *GSTs* 表达量。转 *LdOA1* 基因果蝇品系中 *GSTs* Delta 家族基因 (除 *GSTd4* 和 *GSTd7*) 均上调表达;而低浓度溴氰菊酯胁迫下,转基因果蝇 *GSTs* Delta 家族基因表达显著高于非转基因果蝇,推测导入的 *LdOA1* 基因参与调控 *GSTs* 基因表达响应溴氰菊酯的胁迫。这些初步研究结果丰富了昆虫 OA1 基因功能,同时为挖掘新作用靶标创制杀虫剂防治害虫提供了理论依据。

参 考 文 献

- [1] SIMONET G, POELS J, CLAEYS I, et al. Neuroendocrinological and molecular aspects of insect reproduction [J]. *Journal of Neuroendocrinology*, 2004, 16(8): 649-659.
- [2] HAUSER F, CAZZAMALI G, WILLIAMSON M, et al. A review of neurohormone GPCRs present in the fruit fly *Drosophila melanogaster* and the honey bee *Apis mellifera* [J]. *Progress in Neurobiology*, 2006, 80(1): 1-19.
- [3] BAI H, ZHU F, SHAH K, et al. Large-scale RNAi screen of G protein-coupled receptors involved in larval growth, molting and metamorphosis in the red flour beetle [J]. *BMC Genomics*, 2011, 12(1) [2015-10-11]. DOI: 10.1186/1471-2164-12-388. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/12/388>.
- [4] SPIT J, BADISCO L, VERLINDEN H, et al. Peptidergic control of food intake and digestion in insects [J]. *Canadian Journal of Zoology*, 2012, 90(4): 489-506.
- [5] KOSTAROPOULOS I, PAPAPOPOULOS A I, METAXAKIS A, et al. Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroids in insects [J]. *Insect Biochemistry Molecular Biology*, 2001, 31(4-5): 313-319.
- [6] LOW W Y, FEIL S C, NG H L, et al. Recognition and detoxification of the insecticide DDT by *Drosophila melanogaster* glutathione S-transferase D1 [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2010, 399(3): 358-366.
- [7] VONTAS J G, SMALL G J, HEMINGWAY J. Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens* [J]. *Biochemical Journal*, 2001, 357: 65-72.
- [8] BERRUECO R, RIVES S, CAMÓS M, et al. Syndromic albinism and haemophagocytosis [J]. *British Journal of Haematology*, 2010, 148(6) [2015-10-09]. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2009.07885.x.
- [9] MARTINEZ-GARCIA M, RIVEIRO-ALVAREZ R, VILLAVERDE-MONTERO C, et al. Identification of a novel deletion in the OA1 gene: report of the first Spanish family with X-

- linked ocular albinism [J]. *Clinical and Experimental Ophthalmology*, 2010, 38(5):489-495.
- [10] FALLETTA P, BAGNATO P, BONO M, et al. Melanosome-autonomous regulation of size and number: the OAI receptor sustains PMEL expression [J]. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2014, 27(4): 565-579.
- [11] SCHIAFFINO M V. Signaling pathways in melanosome biogenesis and pathology [J]. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2010, 42(7): 1094-1104.
- [12] WITTKOPP P J, WILLIAMS B L, SELEGUE J E, et al. *Drosophila* pigmentation evolution: divergent genotypes underlying convergent phenotypes [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2003, 100(4): 1808-1813.
- [13] 周琦, 余国春, 蒋岸岸. 眼白化病1型的遗传基础研究进展 [J]. *医学综述*, 2013, 19(24): 4433-4435.
- ZHOU Q, YU G C, JIANG A A. Research progress in genetic basis of ocular albinism type I [J]. *Medical recapitulate*, 2013, 19(24): 4433-4435.
- [14] 曹传旺, 孙丽丽, 问荣荣, 等. 舞毒蛾 *LdOAI* 基因克隆分析及对3种杀虫剂胁迫的响应 [J]. *林业科学*, 2014, 50(8): 102-107.
- CAO C W, SUN L L, WEN R R, et al. Cloning and analysis of *LdOAI* in *Lymantria dispar* and its response to the stress of three kinds of insecticides [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2014, 50(8): 102-107.
- [15] SUN L L, WANG Z Y, WU H Q, et al. Role of ocular albinism type I (OAI) GPCR in Asian gypsy moth development and transcriptional expression of heat-shock protein genes [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2016, 126:35-41.
- [16] ZHU F, PARTHASARATHY R, BAI H, et al. A brain-specific cytochrome P450 responsible for the majority of deltamethrin resistance in the QTC279 strain of *Tribolium castaneum* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(19): 8557-8562.
- [17] WILLIS D K, WANG J, LINDHOLM J R, et al. Microarray analysis of juvenile hormone response in *Drosophila melanogaster* S2 cells [J]. *Journal of Insect Science*, 2010, 10 [2015-10-02]. DOI:10.1673/031.010.6601.
- [18] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [19] HILL C A, FOX A N, PITTS R J, et al. G protein-coupled receptors in *Anopheles gambiae* [J]. *Science*, 2002, 298:176-178.
- [20] LI T, CAO, C W, YANG T, et al. A G-protein-coupled receptor regulation pathway in cytochrome P450-mediated permethrin-resistance in mosquitoes, *Culex quinquefasciatus* [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5 [2015-10-01]. DOI:10.1038/srep17772.
- [21] MEYER J M, EJENDAL K F K, AVRAMOVA L V, et al. A “genome-to-lead” approach for insecticide discovery: pharmacological characterization and screening of *Aedes aegypti* D(1)-like dopamine receptors [J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2012, 6(1) [2015-10-05]. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001478.
- [22] HILL C A, MEYER J M, EJENDAL K F K, et al. Reinvigorating the insecticide discovery pipeline for vector control: GPCRs as targets for the identification of next gen insecticides [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2013, 106(3): 141-148.
- [23] SHEN B, SAMARAWEEERA P, ROSENBERG B, et al. Ocular albinism type 1: more than meets the eye [J]. *Pigment Cell Research*, 2001, 14(4): 243-248.
- [24] LOPEZ V M, DECATUR C L, STAMER W D, et al. I-DOPA is an endogenous ligand for OAI [J]. *PLoS Biology*, 2008, 6(9) [2015-10-10]. DOI: 10.1371/journal.pbio.0060236.
- [25] GHOSH A, SONAVANE U, ANDHIRKA S K, et al. Structural insights into human GPCR protein OAI: a computational perspective [J]. *Journal of Molecular Modeling*, 2012, 18(5): 2117-2133.
- [26] 吴维青, 李洪义, 郑辉. 眼白化病1型的分子病理生理基础 [J]. *中国病理生理杂志*, 2004, 20(2):278-282.
- WU W Q, LI H Y, ZHENG H. Molecular pathophysiological basis of the ocular albinism type 1 [J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2004, 20(2): 278-282.
- [27] ENAYATI A A, RANSON H, HEMINGWAY J. Insect glutathione transferases and insecticide resistance [J]. *Insect Molecular Biology*, 2005, 14(1): 3-8.
- [28] OAKLEY A J, JIRAJAROERU' AT K, HAMNOI T, et al. Crystallization of two glutathione S-transferases from an unusual gene family [J]. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2001, 57(6): 870-872.
- [29] CHEN L, HALL P R, ZHOU X E, et al. Structure of an insect δ -class glutathione S-transferase from a DDT-resistant strain of the malaria vector *Anopheles gambiae* [J]. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 2003, 59(12): 2211-2217.
- [30] UDOMSINPRASERT R, PONGJAROENKIT S, WONGSANTICHON J, et al. Identification, characterization and structure of a new Delta class glutathione transferase isoenzyme [J]. *Biochemistry Journal*, 2005, 388(3): 763-771.
- [31] WANG Y J, QIU L, RANSON H, et al. Structure of an insect epsilon class glutathione S-transferase from the malaria vector *Anopheles gambiae* provides an explanation for the high DDT-detoxifying activity [J]. *Journal of Structural Biology*, 2008, 164(2): 228-235.

(责任编辑 李 契 范 娟
责任编辑 戴玉成)