应用昆虫学报 *Chinese Journal of Applied Entomology* 2016, 53(5): 953−961. DOI: 10.7679/j.issn.2095−1353.2016.118

棉铃虫过氧化物酶基因 *HaPOD* 的克隆和表达分析*

申忠健** 张松斗 刘彦君 张博宇 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* 过氧化物酶基因（*HaPOD*）并进行序列分析，研究 *HaPOD* 基因的时空表达模式以及在极端温度、双氧水处理和 HaNPV 感染后的基因表达变化模式。**【方法】** 基于转录组测序获得 *HaPOD* 基因序列，通过几种生物信息学软件对该基因的核苷酸和氨基酸序列进行分析。采用实时荧光定量 PCR 技术检测 *HaPOD* 基因在棉铃虫体内的时空表达模式及 4 种逆境处理后的表达变化情况。**【结果】** 序列分析显示该基因开放阅读框长 1 332 bp，编码 443 个氨基酸，含有一个细胞粘附蛋白序列，氨基酸序列与甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 同源物序列一致性为 85%，亲缘关系最近。*HaPOD* 基因在 5 龄以前表达量相对较低，5 龄后表达量开始升高，蛹第 5 天最高。在幼虫头和成虫翅中表达量相对较高。在高温、双氧水和 HaNPV 感染处理后，该基因表达量显著升高，而在低温处理后表达量显著下调。**【结论】** 本研究克隆得到了棉铃虫 *HaPOD* 基因序列并对其进行了分析，其表达量在高温、双氧水和 HaNPV 感染处理后上调而低温处理后下调，这些结果为进一步研究过氧化物酶在维持氧化还原平衡和抵抗氧化损伤方面的功能奠定基础。

关键词 棉铃虫，过氧化物酶基因，时空表达，逆境处理，基因克隆

Molecular identification and expression analysis of a peroxidase gene in *Helicoverpa armigeraera*

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

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

Abstract **[Objectives]** To clone the *HaPOD* peroxidase gene in *Helicoverpa armigera* and analyze its function, including its temporal and spatial expression profiles, and determine its expression after injecting H_2O_2, exposure to extreme temperature and HaNPV infection. **[Methods]** Full-length *HaPOD* cDNA was amplified using RT-PCR based on the transcriptome sequencing results for *H. armigera*. The gene and amino acid sequences of *HaPOD* were analyzed with several kinds of bioinformatics software. The spatio-temporal expression profiles of the *HaPOD* gene, and its expression patterns after 4 kinds of stress treatment (injection with H_2O_2, infection by HaNPV, and exposure to hot and cold temperatures) were determined by qRT-PCR. **[Results]** Sequence analysis revealed that the ORF of the *HaPOD* gene was 1 332 bp and encoded 443 amino acids containing a peroxinectin sequence. The qRT-PCR results showed that the transcription level of *HaPOD* genes was low in larvae < 5 days of age, but increased to a maximum on the fifth day of the pupal stage. Spatial expression profiling indicates that the *HaPOD* gene was mainly expressed in the heads of larvae and in the wings of adults. Transcription of *HaPOD* markedly increased following injection with H_2O_2, HaNPV, or exposure to high temperature (35℃), but decreased following exposure to cold (4℃). **[Conclusion]** The ORF of the *HaPOD* gene was successfully cloned and analyzed. Its expression was significantly upregulated by injection with H_2O_2, infection by HaNPV and exposure to high temperature, but was

*资助项目 Supported projects：国家科技支撑计划 2012BAD19B05

**第一作者 First author，E-mail：shenzhongjian0718@163.com

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

收稿日期 Received：2016-05-31，接受日期 Accepted：2016-08-10

downregulated by cold temperature. These results provide a foundation for further research on the mechanisms involved in maintaining the redox balance and protection against oxidative damage.

Key words *Helicoverpa armigera*ea, peroxidase, temporal-spatial expression, adversity treatment, molecular cloning

活性氧（Reactive oxygen species，ROS）是有氧生物进行有氧新陈代谢过程中产生的副产物（Droge，2002）。然而，持续高浓度的活性氧分子会引起细胞内的氧化压力从而导致 DNA、蛋白质、脂质等生物大分子的氧化损伤（Wiseman *et al.*，1996；Dandona *et al.*，2001）。为避免生物大分子（蛋白质、RNA、DNA 和不饱和脂肪酸）的氧化损伤，内生的酶类和非酶类抗氧化防御在控制 ROS 方面发挥重大作用（Beckman and Ames，1997；de Zwart *et al.*，1999；Stadtman and Levine，2000）。过氧化物酶是抗氧化系统中重要的组成部分，在清除 ROS，保护机体氧化平衡方面起着重要作用。

过氧化物酶包含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）和亚铁血红素过氧化物酶（Heme-containing peroxidases，HPX）等多种过氧化物酶。有关过氧化物酶在保护生物体免受氧化损伤方面的研究主要集中在 TPX 上。TPX 普遍存在于古细菌到人类，主要是通过将过氧化氢或其它过氧化物还原成水和其它物质来实现抗氧化作用（Kim *et al.*，1989）。目前人们普遍认为 TPX 是保护昆虫免受氧化损伤的重要的抗氧化物质。在中华蜜蜂中，*AccTpx1*、*AccTpx3*、*AccTpx4* 和 *AccTpx5* 这 4 种 TPX 基因被克隆出来并且研究发现它们在虫体抗氧化防御中均扮演着重要角色（Yu *et al.*，2011；Yao *et al.*，2013；Yan *et al.*，2014；Huaxia *et al.*，2015）。在家蚕中，*BmTpx1*、*BmTpx3*、*BmTpx4*、*BmTpx5* 和 *BmTpx6* 这 5 种 TPX 基因被证实在维持家蚕氧化还原平衡，降低农药引起的氧化损伤方面起着重要作用（Shi *et al.*，2014）。在棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 中，*HaTpx* 不仅受各种逆境环境的影响而且能够抵御核型多角体病毒对棉铃虫的侵染（Zhang *et al.*，2015b）。关于 GPX 和 HPX 的研究较少。在长红猎蝽 *Rhodnius prolixus* 中，*SeGPX* 能够调节血淋巴中的氧化还原平衡（Dias *et al.*，2016）。在哺乳动物中，HPX 能够通过 H_2O_2 催化各种底物，在先天免疫、炎症发病机理中起作用（Cheng *et al.*，2008）。这些研究结果表明过氧化物酶在维持机体的氧化还原的平衡以及抵抗氧化损伤起着重要作用。

先前的研究表明，当生物体遭受逆境时，机体内会产生大量的 ROS，影响生物体的氧化平衡以及正常的生理活动（Imlay，2003）。抗氧化系统在清除 ROS 和维持正常的生理活动中发挥着重要作用，而过氧化物酶是其重要的组成部分。棉铃虫属鳞翅目夜蛾科，是危害严重的世界性害虫，广泛分布在世界各产棉国（Wu *et al.*，2008）。Bt 棉的种植、药剂的使用和生物防治等防治技术均是通过影响棉铃虫的正常的生理活动来达到防治目的。因此了解和研究昆虫的过氧化物酶以及抗氧化系统，对防治害虫有着重要意义。本研究通过转录组测序和克隆验证得到 *HaPOD* 基因的全长，研究了该基因的时空表达模式，并检测了在双氧水、HaNPV 感染、低温和高温处理后的基因表达量的变化，以期进一步的研究 *HaPOD* 功能及其在抗氧化过程中的作用，为更好的研究抗氧化基因以及抗氧化系统提供一定的理论基础，同时也为寻找新的棉铃虫防控技术以及更有效的防治棉铃虫提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试虫源与试剂

本实验中使用的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%±10%。因棉铃虫自相残杀习性，从 3 龄阶段开始单头饲养。染毒前后的棉铃虫饲养条件与上述一致。

主要试剂为 RNA 提取试剂 TRIzol reagent（Invitrogen，USA），*Taq* DNA 聚合酶，限制性内切酶（*Eco*RI 和 *Bam*HI），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，PMD-18-T 连接试剂盒均购自 TaKaRa 公司；琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒和质粒提取试剂盒均购自北京天根生化有限公司；Trans1-T1 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司；其他均为国产或进口分析纯试剂。

1.2　实验方法

1.2.1　棉铃虫样品的收集　棉铃虫不同发育阶段的样品包括卵（50 粒）、1 龄幼虫（20 头）、2 龄幼虫（15 头）、3 龄幼虫（12 头）、4 龄幼虫（10 头）、5 龄 0 h（10 头）、5 龄 48 h（10 头）、5 龄 96 h（10 头）、蛹期第 1 天（10 头）、蛹期第 5 天（10 头）、蛹期第 9 天（10 头）、成虫第 1 天（雌雄各 5 头）。不同组织的样品包括幼虫组织和成虫组织。幼虫组织包括头、表皮、中肠、脂肪体、血淋巴、中枢神经系统。成虫组织包括头、胸、腹、足、翅、中肠。在温度处理的实验中，将 4 龄第 2 天的幼虫饲养在 4℃和 35℃条件下，以正常饲养在 27℃的同状态的健康幼虫作为对照（An *et al.*，2013；Kim *et al.*，2007）。在处理后 1、3、6、12 h 收集样品。在双氧水处理中，在棉铃虫幼虫 5 龄时，注射 5 μL 终浓度为 100 mmol/L 的 H_2O_2 并以相同剂量的 PBS 做对照，在处理后 1、3、6、10 和 24 h 收集样品。在 NPV 感染的实验中，挑选 3 龄蜕皮一致的棉铃虫幼虫进行过夜饥饿处理，然后将饲料切成 0.8 cm×0.8 cm×0.5 cm 的方块并滴加 10 μL 终浓度为 10^6 PIB/mL 的 NPV，以等量的无菌水作为对照进行饲喂（Zhang *et al.*，2015a）。等饲料吃完后换正常饲料进行饲养，在 0、24、48、72、96 h 进行取样。所有的样品进行 3 次生物学重复，每次至少 10 头虫子，收集的样品保存在 –80℃备用。

1.2.2　棉铃虫总 **RNA** 提取和 **cDNA** 合成　将收集的棉铃虫样品加入高温灭菌的均浆研磨器中，加入适量的 Trizol 进行研磨，然后参照 Trizol 试剂说明书提取 RNA。用 NannoDrop 2000 测定 RNA 浓度及纯度。根据反转录试剂盒（TaKaRa）说明书，以提取各样品的 RNA（1 μg）为模板合成 cDNA 的第一链并储存在 –80℃备用。

1.2.3　引物设计　根据转录组测序（本实验所测，数据未公布）拼接得到 POD 的基因序列，在 ORF（Open reading frame）外设计扩增基因整个开放阅读框的引物。然后以测序正确的 POD 序列（Genbank 登录号：KX244949）设计特异引物用于荧光定量 RT-PCR，选择棉铃虫核糖体蛋白 L32（Ribosomal proteins L32，RPL32，Genbank 登录号：JQ744274.1）作为内参基因（Zhang *et al.*，2015a）。利用 DNAman 和 DNAClub 软件设计实验中的引物，由上海生工生物工程有限公司合成（表 1）。

1.2.4　基因开放阅读框的扩增和序列验证　棉铃虫 POD 基因的开放阅读框是通过利用设计的特异性引物和棉铃虫反转录的 cDNA 进行 PCR 扩增所得。PCR 反应条件为：95℃预变性 3 min，95℃变性 40 s，52℃退火，72℃延伸 1 min，反应 35 个循环，最后 72℃延伸 10 min。反应结束

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 Primer length (bp)	扩增片段长度 Product length (bp)	目的 Purpose
HaPOD-RTF	CCTCAAGGAACTCAATGT	18	1 431	扩增全长
HaPOD-RTR	ATGTTAGCGGTAACGTCT	18		Amplification of full-length
HaPOD-qF	TGCGTGCTACAGACATCC	18	178	荧光定量 PCR
HaPOD-qR	ACCAGTTCCACATCTTGAGG	20		Real-Time PCR
RPL32-qF	CATCAATCGGATCGCTATG	19	152	荧光定量 PCR
RPL32-qR	CCATTGGGTAGCATGTGAC	19		Real-Time PCR

后，利用 2%的琼脂糖凝胶验证 PCR 产物，然后根据琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒的说明进行 DNA 回收。再根据 PMD-18-T 连接试剂盒说明，将纯化的 DNA 片段和 PMD-18-T 载体连接，然后转化到 Trans1-T1 感受态细胞，进行蓝白斑筛选。挑选白斑进行菌液 PCR 验证，然后接种于含有 Ampicillin 的 LB 液体培养基中，37℃下 200 r/min 培养过夜，提取质粒，经双酶切实验验证后将质粒送到华大基因进行测序。

1.2.5 序列分析 通过 DNAclub 软件将基因序列翻译成氨基酸序列，借助 NCBI 查找其它昆虫同源物蛋白序列，并利用 DNAman 软件进行氨基酸序列的多重联配分析。系统进化树是采用 MAGE5.10 软件中的 Neighbor-joinin 软件进行分析，其它的一些理化性质是通过 ProtParam tool（http://web.expasy.org/protparam/）进行分析。

1.2.6 荧光定量 **RT-PCR** 按照试剂盒 SYBR Primer Script RT-PCR Kit 方法（TaKaRa）以棉铃虫 RPL32 为内参基因，进行实时荧光定量 PCR 实验对基因表达水平进行检测。实验采用 20μL 荧光定量 PCR 反应体系。体系如下：2 × SYBR green supermix 10 μL，正向引物和反向引物均为 1 μL（终浓度为 0.5 μmol/L），cDNA 模板 1 μL (50 ng/μL)，RNase-Free ddH_2O 7 μL。反应条件如下：95℃预变性 3 min，95℃变性 15 s，60℃退火和延伸 30 s，共 40 个循环。实验在 Bio-RAD CFX Connect Real-Time System （Bio-RAD，USA）上进行，每个处理重复 3 次。

1.3 数据处理和统计

荧光定量 PCR 的结果采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算（Livak and Schmittgen，2001）。利用 SPSS 软件的 Turkey's HSD 多重比较的方法对该基因在不同发育阶段和不同组织的表达进行分析（P<0.05）。不同逆境处理后的表达分析是通过 t-检验分析（*表示 0.01<P<0.05；**表示 P< 0.01）。

2 结果与分析

2.1 棉铃虫 *HaPOD* 基因的克隆和序列分析

通过转录组测序获得基因序列，然后利用 DNAman 设计一对特异性引物克隆验证全长。经 NCBI 中 Open reading frame finder（ORF Finder）功能进行序列分析，结果表明该基因开放阅读框长 1 332 bp，编码 443 个氨基酸（图 1）；预测的蛋白分子量为 49.9 ku，等电点（pI）为 5.84。基因序列中含有一个细胞黏附蛋白序列（图 1）。氨基酸多重联配的结果表明，棉铃虫 *HaPOD* 基因分别与甜菜夜蛾、家蚕、玉带凤蝶的序列一致性高达 85%、83%、81%（图 2）。系统进化树分析表明，棉铃虫与甜菜夜蛾以及家蚕的亲缘关系最近，与氨基酸多重联配的结果一致（图 3）。

2.2 *HaPOD* 基因在棉铃虫不同发育阶段的表达分析

时间表达谱中结果表明，*HaPOD* 基因在棉铃虫不同发育时期的表达呈现出时间依赖性（图 4）。*HaPOD* 基因在 1~5 龄表达量较低且变化不明显，从 5 龄开始该基因的表达量升高，在整个蛹期和羽化前后保持较高的表达量，蛹期第 5 天最高（图 4）。

2.3 *HaPOD* 基因在棉铃虫幼虫和成虫组织内的转录表达

空间表达谱结果显示，该基因在棉铃虫幼虫和成虫组织中存在组织差异性表达（图 5：A，B）。在幼虫的头中表达量比在幼虫其它组织中高（图 5：A），而在成虫的翅中表达量最高，中肠中表达量最低（图 5：B）。这可能说明该基因在幼、成虫不同组织承担不同的职能。

2.4 不同逆境处理对 *HaPOD* 基因表达的影响

双氧水实验结果表明，该基因在双氧水处理后 1、3、24 h 表达量显著上升而在 6 h 和 10 h 没有显著变化（图 6：A）。HaNPV 感染实验结果显示，该基因在喂毒 24、48、72、96 h 表达量均显著上调（图 6：B）。极端温度实验结果表明，高低温处理对该基因表达量的影响是不同的（图 6：C，D），在高温处理后的 1、3、6 h 表达量显著上调，12 h 无显著变化（图 6：D）；而在低温处理后 6 h、12 h 的表达量显著下调（图 6：C）。

```
1       CCCAATGACCCCGTCCACGGGCCTCAAGGAACTCAATGTATGAACTTCGTGAGGACTGGTACAACCAGG
1                                                 M  N  F  V  R  T  G  T  T  R
70      GACAGGGGATGCACATCACCTAATGCTCCGGCTGAACCTATTACAACAGTCACAGCTTTCATGGACCTG
11       D  R  G  C  T  S  P  N  A  P  A  E  P  I  T  T  V  T  A  F  M  D  L
139     TCCCTGGTATACGGCAGCAGTGCTGGTCAAGCCAACCCCGTCAGAGCTTTTCAAGGAGGACGTCTGTTG
34       S  L  V  Y  G  S  S  A  G  Q  A  N  P  V  R  A  F  Q  G  G  R  L  L
208     ACCACCGTGAGAAGTGGCCGGGAGTGGCCCCCACAAGACCCGAACATCACCATCACCTGCGAATCAGCG
57       T  T  V  R  S  G  R  E  W  P  P  Q  D  P  N  I  T  I  T  C  E  S  A
277     CAGTCGCCAAATGAACCATGTTACCTGACTGGTGATATCCGTGTGAACCAAAACCCTCAGCTCACGGTC
80       Q  S  P  N  E  P  C  Y  L  T  G  D  I  R  V  N  Q  N  P  Q  L  T  V
346     CTCCAAGTGATTTTGTTACGTGAACACAACCGCATTGCCGACACTCTTGCGCATCTCAACCCTCATTGG
103      L  Q  V  I  L  L  R  E  H  N  R  I  A  D  T  L  A  H  L  N  P  H  W
415     AACGATGAGACTCTCTACCAAGAAGCAAGACGTATTCACATCGCGGAAATTCAGCACATCAACTATTAT
126      N  D  E  T  L  Y  Q  E  A  R  R  I  H  I  A  E  I  Q  H  I  N  Y  Y
484     GAATATCTGCCTATTTTGTTGGGCCACGAAAACATGGTGAAGAACAAACTGATCTACCCGGGGGCTCAT
149      E  Y  L  P  I  L  L  G  H  E  N  M  V  K  N  K  L  I  Y  P  G  A  H
553     GGCTACATCAACGATTACAACCCTGGAGTAGACCCTTCAGTACTTGACGAACATGCTACAGCTGCTTTC
172      G  Y  I  N  D  Y  N  P  G  V  D  P  S  V  L  D  E  H  A  T  A  A  F
622     AGACATTTCCATACATTAATTAGGGGTTACTTGAAATTAATTTCGGAGAACCGTCAAGTGGTTGGAACA
195      R  H  F  H  T  L  I  R  G  Y  L  K  L  I  S  E  N  R  Q  V  V  G  T
691     GTGCGTATGAGTGACTGGTTCAATAGGCCTCTTCTTCTAGAACTCGACAACGCCTTTGATCATTTAGCA
218      V  R  M  S  D  W  F  N  R  P  L  L  L  E  L  D  N  A  F  D  H  L  A
760     AGAGGCCTCGCAACTCAGGAACAAGACTTTAGCGATCAGTTCTGGGACTCCGAAATGACCCAATTCCTT
241      R  G  L  A  T  Q  E  Q  D  F  S  D  Q  F  W  D  S  E  M  T  Q  F  L
829     TTCAAACGAAACAATACCTTTGGAGGTGACTTGCGTGCTACAGACATCCAAAGAGGTCGTGACCATGGA
264      F  K  R  N  N  T  F  G  G  D  L  R  A  T  D  I  Q  R  G  R  D  H  G
898     TTGGGATCTTATTCAGCAACGAGAGCTGCTTGCGGCTTGTCTGTGCCCAAGTCTTTCCATGACATGCTG
287      L  G  S  Y  S  A  T  R  A  A  C  G  L  S  V  P  K  S  F  H  D  M  L
967     GACTTCATTTCTGAAGAGAATGTCGCAGTTCTTCAAGCTTTGTACGAAACCCCTCAAGATGTGGAACTG
310      D  F  I  S  E  E  N  V  A  V  L  Q  A  L  Y  E  T  P  Q  D  V  E  L
1036    GTAGTAGCTGGTTCTTTGGAACGCAACGTGCCCGGCGCGCAAGCTGGACCAACGTACTTATGCATCTTG
333      V  V  A  G  S  L  E  R  N  V  P  G  A  Q  A  G  P  T  Y  L  C  I  L
1105    ACTGAGCAGTTCTATAGAACTCGTGTCGGTGACCGGTACTTCTACGAAAATGGAGCCGACCCCGACATT
356      T  E  Q  F  Y  R  T  R  V  G  D  R  Y  F  Y  E  N  G  A  D  P  D  I
1174    GCTTTTACGCCAAGTCAGCTCGACACCATACGCAAAGGCGCATCTATGTCCCGTCTGCTCTGTGACAAC
379      A  F  T  P  S  Q  L  D  T  I  R  K  G  A  S  M  S  R  L  L  C  D  N
1243    GGTGACGGGATACGAGTCATGCAGCCTCGAGGCTTCCAGCAAATATCGCACGGGAACAAGGTCGTCCCA
402      G  D  G  I  R  V  M  Q  P  R  G  F  Q  Q  I  S  H  G  N  K  V  V  P
1312    TGCGATCAGCTGCCGTTTGTCGATCTAACGTTGTGGCAAGATGCTAGAGGTCACTTCTAAGTTTAGGTT
425      C  D  Q  L  P  F  V  D  L  T  L  W  Q  D  A  R  G  H  F  *
1381    ACAATTATGTAAAATAATGGCAAACAAAATAAATGAAATAATAATGACAAAATAAGACGTTACCGCTAA
1450    CATTTTTACTGTTATTTTGTAAATGACAAAATACTC
```

图 **1**　棉铃虫 ***HaPOD*** 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 *HaPOD* gene from *Helicoverpa armigera*

细胞黏附蛋白序列用实线标出。

The peroxinectin sequence is marked by solid lines.

3　讨论

虽然过氧化物酶在哺乳动物和几种模式昆虫中研究较多，但在棉铃虫中报道较少。本研究克隆了 *HaPOD* 基因（Genbank 登录号：KX244949），序列分析发现该基因开放阅读框长为 1 332 bp，编码 443 个氨基酸，含有一个类似动物亚铁血红素过氧化物酶的细胞粘附蛋白序列。氨基酸多重联配和系统进化树的结果表明，该基因与甜菜夜蛾等昆虫的序列一致性较高，氨基酸序列在进化中较为保守。通过序列分析得到，*HaPOD* 基因是一种新的过氧化物酶基因，在其它物种中没有统一的命名，因此将其命名为 *HaPOD* 基因。

从时间表达谱中可以看出，*HaPOD* 基因在棉铃虫不同发育时期的表达大致呈现时间依赖性。*HaPOD* 基因在 1~5 龄表达量较低，5 龄后表达量开始升高，在蛹期和羽化前后表达量较高。这可能是从 5 龄开始棉铃虫经历化蛹和羽化这两种变态过程，棉铃虫体内发生多种生理生化反应，造成体内活性氧及其它物质的积累，从而引起基因表达量升高。在其它昆虫中过氧化物酶的表达也存在类似的结果，比如中华蜜蜂的 *AccTpx3* 基因（Yao *et al.*，2013）等。空间表达谱显示，该基因在棉铃虫中存在组织差异性表达，在幼虫头和成虫翅表达量相对较高，均在中

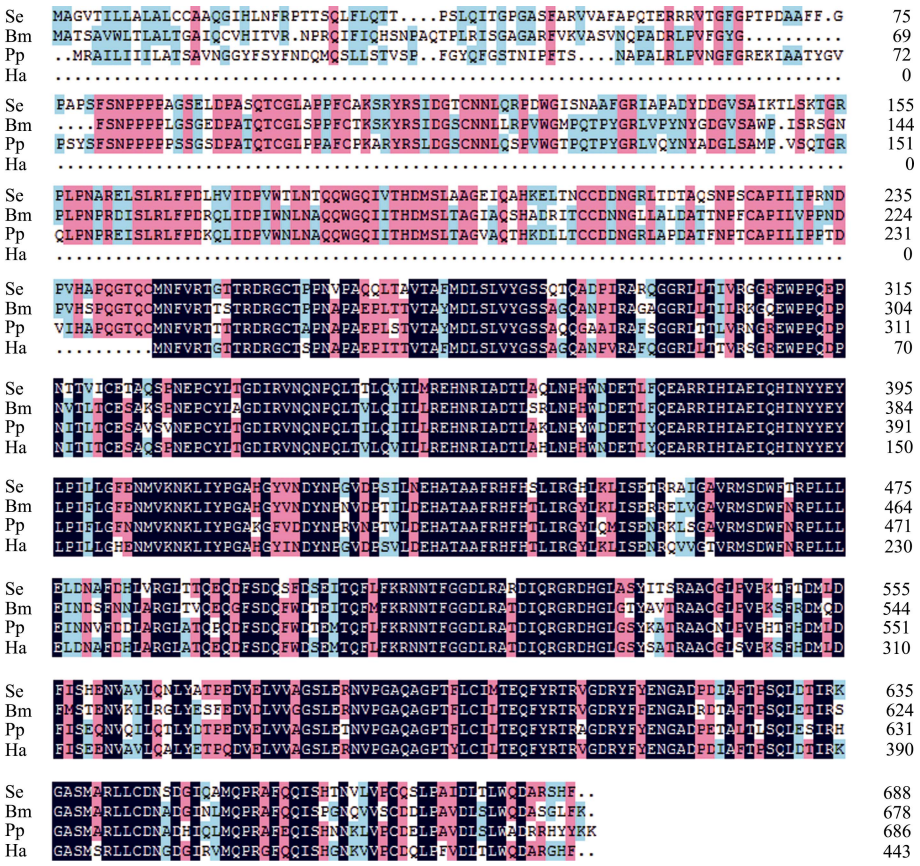
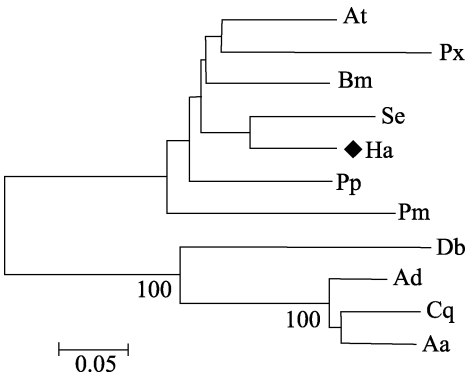


图 2 棉铃虫 ***HaPOD*** 基因和其他昆虫同源物的氨基酸序列多重联配

Fig. 2 Amino acid sequence multiple alignment of *HaPOD* 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。Ha：棉铃虫 *Helicoverpa armigera*，KX244949；Se：甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*，AIN39490.1；Bm：家蚕 *Bombyx mori*，XP_012549705.1；Pp：玉带凤蝶 *Papilio polytes*，XP_013139647.1。

Blue represents 100% identity, red represents 75% identity and green represents≤50% identity. Ha: *Helicoverpa armigerara*(KX244949); Se: *Spodoptera exigua* (AIN39490.1); Bm: *Bombyx mori* (XP_012549705.1); Pp: *Papilio polytes* (XP_013139647.1).



Ha：棉铃虫 *Helicoverpa armigera*，KX244949；Se：甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*，AIN39490.1；Bm：家蚕 *Bombyx mori*，XP_012549705.1；Pp：玉带凤蝶 *Papilio polytes*，XP_013139647.1；At：脐橙螟 *Amyelois transitella*，XP_013193948.1；Px：小菜蛾 *Plutella xylostella*，XP_011553109.1；Pm：金凤蝶 *Papilio machaon*，KPJ19443.1；Db：巴氏果蝇 *Drosophila busckii*，ALC47695.1；Ad：达氏按蚊 *Anopheles darlingi*，ETN66032.1；Cq：致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus*，EDS45917.1；Aa：埃及伊蚊 *Aedes aegypti*，AAC97504.1。

Ha: *Helicoverpa armigerara* (KX244949); Se: *Spodoptera exigua* (AIN39490.1); Bm: *Bombyx mori* (XP_012549705.1); Pp: *Papilio polytes* (XP_013139647.1); At: *Amyelois transitella* (XP_013193948.1); Px: *Plutella xylostella* (XP_011553109.1); Pm: *Papilio machaon* (KPJ19443.1); Db: *Drosophila busckii* (ALC47695.1); Ad: *Anopheles darlingi* (ETN66032.1); Cq: *Culex quinquefasciatus* (EDS45917.1); Aa: *Aedes aegypti* (AAC97504.1).

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

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of *HaPOD* and its homologs in insects

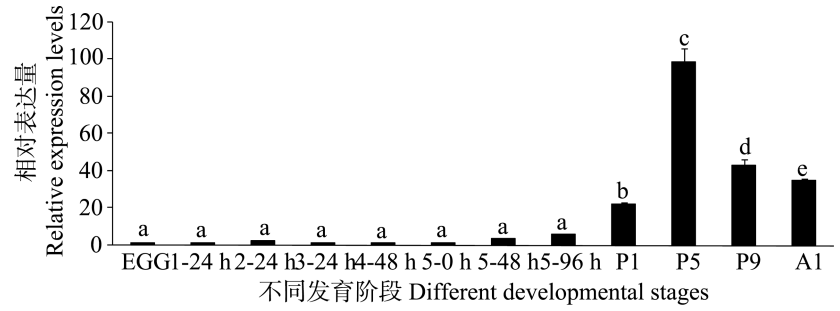


图 4　*HaPOD* 基因在棉铃虫不同发育时期的表达谱

Fig. 4　Expression profile of *HaPOD* in different developmental stages of *Helicoverpa armigera*

EGG：卵（50 粒）；1-24 h：1 龄 24 h（20 头）；2-24 h：2 龄 24 h（15 头）；3-24 h：3 龄 24 h（12 头）；4-48 h：4 龄 48 h（10 头）；5-0 h；5 龄 0 h（10 头）；5-48 h：5 龄 48 h（10 头）；5-96 h：5 龄 96 h（10 头）；P1：蛹期第 1 天（10 头）；P5：蛹期第 5 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）。数据均代表 3 次生物学重复的平均值±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差异显著（$P<0.05$，利用 SPSS17.0 软件根据 Turkey 多重比较检验法比较）。

EGG: Egg (50 grain); 1-24 h: 1st instar larvae at 24 h (20 larvae); 2-24 h: 2nd instar larvae at 24 h (15 larvae); 3-24 h: 3rd instar larvae at 24 h (12 larvae); 4-48 h: 4th instar larvae at 48 h (10 larvae); 5-0 h, 5-48 h and 5-96 h stand for 5th instar larvae at 0, 48 and 96 h (10 larvae),respectively; P1, P5 and P9 stand for 1, 5 and 9 day pupae (10 larvae), respectively; A1: 1 day adults (5 male and 5 female).The data are mean±SD. Each biology repeat includes 10 larvae or adult. Histograms with different letters indicate significant different at 0.05 level by Tukey's multiple-range test in SPSS17.0 software.

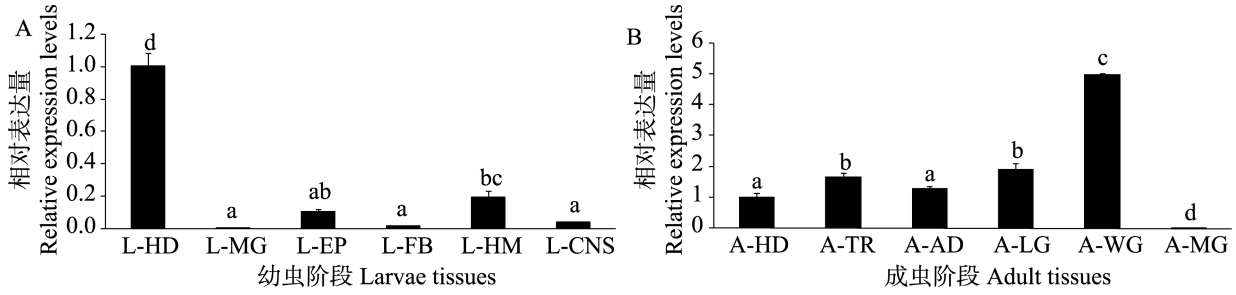


图 5　*HaPOD* 基因在棉铃虫幼虫组织（A）和成虫组织（B）内的转录分析

Fig. 5　Transcription analysis of *HaPOD* in different larvae tissues (A) and adult tissues (B) of *Helicoverpa armigera*

L-HD：幼虫头；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-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。数据均代表 3 次生物学重复的平均值±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差异显著（$P<0.05$，利用 SPSS17.0 软件根据 Turkey 多重比较检验法比较）。

L-HD: Heads of larvae; L-MG: Midgut of larvae; L-EP: Epidermis of larvae; L-FB: Fatbody of larvae; L-HM: Hemolymph of larvae; L-CNS: Central nervous system of larvae. A-HD: Heads of adult; A-TR: Thorax of larvae; A-AD : Abdomen of larvae; A-LG: Legs of larvae; A-WG: Wings of adult; A-MG: Midgut of adult. The data are mean±SD. Each biology repeat includes 10 larvae or adult. Histograms with different letters indicate significant different at 0.05 level by Tukey's multiple-range test in SPSS17.0 software.

肠表达量较低。这可能暗示该基因在幼虫、成虫不同组织中承担不同的抗氧化功能。相比较过氧化物酶在其他昆虫组织中表达，可以看出过氧化物酶组织差异性表达是很普遍的。比如，*AccTpx1* 主要在中华蜜蜂胸部表达（Yu *et al.*，2011）而 *AccTpx3* 相对于脑、表皮和中肠在肌肉中表达最高（Yao *et al.*，2013）。

大量文献报道环境条件如温度、重金属、杀虫剂和 UV 照射可以诱导氧化压力（Lushchak，2011；Kottuparambil *et al.*，2012）。昆虫积极或被动的利用酶类或非酶类抗氧化系统来调节氧化平衡，避免由活性氧引起的氧化损伤（Corona *et al.*，2006；Kobayashi-Miura *et al.*，2007）。本文中，荧光定量结果显示 *HaPOD* 基因的表达量

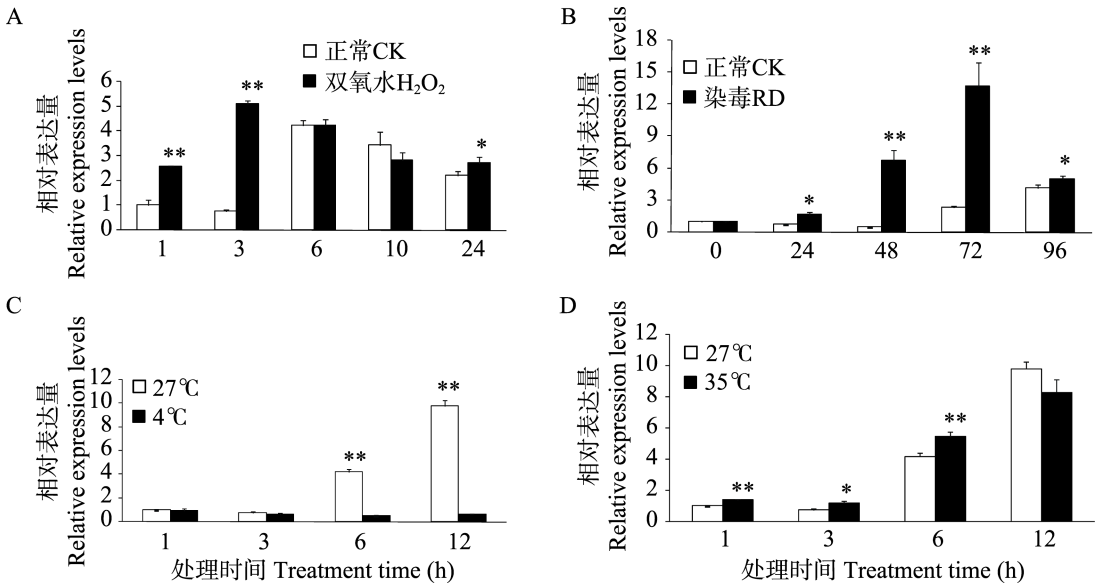


图 **6** 不同逆境处理对棉铃虫 ***HaPOD*** 基因转录水平的影响

Fig. 6 Effect of different types of adversity on the transcript levels of *HaPOD* gene

A~D：棉铃虫幼虫分别遭受双氧水、HaNPV 感染、低温和高温处理。数据均代表 3 次生物学重复的平均值±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*-检验差异显著（*0.01＜*P*＜0.05；**P*＜0.01）。

A, B, C and D. The larvae of *Helicoverpa armigera* were subjected to, H_2O_2, HaNPV infection, low temperature, and high temperature. The data are mean±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.

受环境条件的影响。双氧水处理、HaNPV 感染和高温处理显著诱导了该基因的表达而低温处理使该基因表达量显著下调，这可能暗示着该基因参与棉铃虫抗氧化防御。类似的结果在其它昆虫中也有所报道，例如在家蚕中，*BmTPX* 基因的转录和翻译均能受到 4℃和 37℃的温度诱导（Lee *et al.*，2005）。在中华蜜蜂中，*AccTpx1* 基因的表达受到紫外线、HgCl 和杀虫剂等非生物因素的影响（Yu *et al.*，2011）。这些结果均表明过氧化物酶可能在调控氧化还原过程和抵抗氧化损伤方面发挥着巨大作用。

抗氧化系统在生物体应对外界不良环境中发挥着巨大作用，是维持机体正常生理活动所必需的。深入研究抗氧化系统对高效防治害虫和寻找新的害虫防控技术有着重要意义。本文成功的克隆了棉铃虫一个新型的过氧化物酶基因，并分析了序列特征、时空表达模式以及 4 种逆境对其表达的影响，为下一步通过 RNAi 技术研究该基因在棉铃虫调节氧化平衡和抵抗氧化损伤方面的功能做铺垫。同时也希望通过本研究能为抗氧化基因和抗氧化系统的研究提供一定的理论基础。

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.

Beckman KB, Ames BN, 1997. Oxidative decay of DNA. *J. Biol. Chem.*, 272(32): 19633–19636.

Cheng G, Salerno JC, Cao Z, Pagano PJ, Lambeth JD, 2008. Identification and characterization of VPO1, a new animal heme-containing peroxidase. *Free Radic. Biol. Med.*, 45(12): 1682–1694.

Corona M, Robinson GE, 2006. Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny. *Insect Mol. Biol.*, 15(5): 687–701.

Dandona P, Mohanty P, Ghanim H, Aljada A, Browne R, Hamouda W, Prabhala A, Afzal A, Garg R, 2001. The suppressive effect of dietary restriction and weight loss in the obese on the generation of reactive oxygen species by leukocytes, lipid peroxidation, and protein carbonylation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86(1): 355–362.

de Zwart LL, Meerman JH, Commandeur JN, Vermeulen NP, 1999. Biomarkers of free radical damage applications in experimental

animals and in humans. *Free Radic. Biol. Med.*, 26(1/2): 202–226.

Dias FA, Gandara AC, Perdomo HD, Goncalves RS, Oliveira CR, Oliveira RL, Citelli M, Polycarpo CR, Santesmasses D, Mariotti M, Guigo R, Braz GR, Missirlis F, Oliveira PL, 2016. Identification of a selenium-dependent glutathione peroxidase in the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 69: 105–114.

Droge W, 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.*, 82(1): 47–95.

Huaxia Y, Wang F, Yan Y, Liu F, Wang H, Guo X, Xu B, 2015. A novel 1-Cys thioredoxin peroxidase gene in *Apis cerana cerana*: characterization of *AccTpx4* and its role in oxidative stresses. *Cell Stress and Chaperones*, 20(4): 663–672.

Imlay JA, 2003. Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol*., 57(1): 395–418.

Kim IH, Kim K, Rhee SG, 1989. Induction of an antioxidant protein of *Saccharomyces cerevisiae* by O_2, Fe^{3+}, or 2-mercaptoethanol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 86(16): 6018–6022.

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.

Kobayashi-Miura M, Shioji K, Hoshino Y, Masutani H, Nakamura H, Yodoi J, 2007. Oxygen sensing and redox signaling: the role of thioredoxin in embryonic development and cardiac diseases. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 292(5): H2040–H2050.

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: 206–213.

Lee KS, Kim SR, Park NS, Kim I, Kang PD, Sohn BH, Choi KH, Kang SW, Je YH, Lee SM, Sohn HD, Jin BR, 2005. Characterization of a silkworm thioredoxin peroxidase that is induced by external temperature stimulus and viral infection. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35(1): 73–84.

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.

Lushchak VI, 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.*, 101(1): 13–30.

Shi G, Zhang Z, Jia K, Zhang K, An D, Wang G, Zhang B, Yin H, 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(167): 24–31.

Stadtman ER, Levine RL, 2000. Protein oxidation. *Ann. N Y Acad. Sci.*, 899(1): 191–208.

Wiseman H, Halliwell B, 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.*, 313(Pt 1): 17–29.

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.

Yan Y, Zhang Y, Huaxia Y, Wang X, Yao P, Guo X, Xu B, 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*, 172/173(6): 39–48.

Yao P, Lu W, Meng F, Wang X, Xu B, Guo X, 2013. Molecular cloning, expression and oxidative stress response of a mitochondrial thioredoxin peroxidase gene (*AccTpx-3*) from *Apis cerana cerana*. *J. Insect Physiol.*, 59(3): 273–282.

Yu F, Kang M, Meng F, Guo X, Xu B, 2011. Molecular cloning and characterization of a thioredoxin peroxidase gene from *Apis cerana cerana*. *Insect Mol. Biol.*, 20(3): 367–378.

Zhang S, An S, Li Z, Wu F, Yang Q, Liu Y, Cao J, Zhang H, Zhang Q, Liu X, 2015a. 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.

Zhang S, Shen Z, Li Z, Wu F, Zhang B, Liu Y, Zhang Q, Liu X, 2015b. Identification of a thioredoxin peroxidase gene involved in resistance to nucleopolyhedrovirus infection in *Helicoverpa armigera* with RNA interference. *J. Insect Physiol.*, 82: 17–27.