

棉铃虫过氧化物还原酶基因 *Prx4* 的鉴定及功能分析



田志强 查萌 祝琳 申忠健 刘孝明 刘小侠*

(中国农业大学植物保护学院昆虫学系, 北京 100193)

摘要: 为探究过氧化物还原酶(peroxidase, Prx)在棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 幼虫体内的功能, 利用转录组数据鉴定得到了棉铃虫 *Prx4* 基因, 并对其进行生物信息学分析, 采用实时荧光定量 PCR(real-time quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR)测定该基因在棉铃虫不同发育阶段和 5 龄幼虫不同组织中的相对表达, 利用原核表达和 RNA 干扰方法探究该基因的功能。结果表明, *Prx4* 基因开放阅读框长为 744 bp, 编码 248 个氨基酸, 系统进化树和同源序列多重比对结果显示该基因属于典型的 2-Cys 过氧化物酶家族; *Prx4* 基因广泛分布于棉铃虫幼虫各组织和发育阶段中; 当感染核型多角体病毒(nucleopolyhedrovirus, NPV)后, 棉铃虫 *Prx4* 基因相对表达量上调; 重组蛋白的体外试验表明 *Prx4* 蛋白具有一定的抗氧化活性; 与对照相比, 小干扰 RNA 处理 6、8 和 10 d 后感病棉铃虫的死亡率分别较对照显著提高了 4.46%、22.42% 和 38.68%。表明 *Prx4* 基因作为一种抗氧化酶保护棉铃虫免受氧化损伤, 同时在抵御 NPV 感染过程中发挥着重要的免疫作用。

关键词: 棉铃虫; 过氧化物还原酶; 抗氧化活性; RNA 干扰; 免疫; 基因表达; 核型多角体病毒

Identification and functional analysis of *Prx4* gene in cotton bollworm *Helicoverpa armigera*

Tian Zhiqiang Zha Meng Zhu Lin Shen Zhongjian Liu Xiaoming Liu Xiaoxia*

(Department of Entomology, College of Plant Protection, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: In order to explore the function of peroxidase in cotton bollworm *Helicoverpa armigera* larvae, the peroxidase (Prx) 4 was identified and analyzed by using bioinformatics methods based on our transcriptome data; then the temporal and spatial expression level of *Prx4* was measured using real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR), and the function of *Prx4* was verified using prokaryotic expression and RNA interference (RNAi). The results showed that *Prx4* gene contained an open reading frame of 744 bp, which encoded 248 amino acids. The phylogenetic analyses and homology indicated that *Prx4* gene belonged to the atypical 2-Cys peroxidase family; qRT-PCR assay demonstrated that *Prx4* gene was widely distributed in different tissues and at all developmental stages of larvae, and was upregulated after infection with nucleopolyhedrovirus (NPV). The *in vitro* experiments demonstrated that the *Prx4* protein displayed an antioxidant activity. Compared with the control group, RNAi results showed that the mortality rate of larvae infected by NPV was significantly increased by 4.46%, 22.42% and 38.68% after six, eight and ten days of treatment with small interfering RNA, respectively. These data indicated that *Prx4* gene could be used as an antioxidant enzyme to protect the cotton bollworm from oxidative damage and played an important role in NPV infection.

Key words: *Helicoverpa armigera*; peroxidase; antioxidant; RNA interference; immunity; gene

expression; nucleopolyhedrovirus (NPV)

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 是世界粮食作物上的重大农业害虫之一,可为害蔬菜、棉花和玉米等超过 300 种作物,严重威胁粮食安全(任苏伟等, 2019)。目前防治措施仍然主要是化学防治,而在农药等逆境环境胁迫下,通常会诱使昆虫细胞产生大量的活性氧(reactive oxygen species, ROS)(Lu et al., 2019; 杨航等, 2019)。ROS 是生物体正常代谢活动中产生的重要物质,并且在昆虫生长发育、繁殖与先天性免疫等方面发挥着重要作用(Tatar et al., 2001; Yang & Hekimi, 2010)。适量 ROS 能够保障机体正常运行(Luckhart et al., 2013),但是当其浓度过高时,除了会对细胞造成氧化胁迫外,还将致使 DNA、脂类和蛋白质等产生不同程度的氧化损伤。因此,生物体需要过氧化物还原酶(peroxiredoxin, Prx)、硫氧还蛋白还原酶(thioredoxin reductase, TrxR)和硫氧还蛋白(thioredoxin, Trx)调节或降解过氧化物,从而防止高浓度 ROS 带来的毒害作用(Zhang et al., 2017a; Apirajkamol et al., 2020)。

Prx 是一类广泛存在于真核和原核生物中的过氧化物还原酶家族,蛋白大小约为 25 kD,根据蛋白 Cys 数目的不同主要分为 1-Cys 和 2-Cys 两类(Bo-gacz et al., 2020)。黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、家蚕 *Bombyx mori* 和中华蜜蜂 *Apis cerana* 等多种昆虫体内 Prx 基因功能被广泛研究(Radyuk et al., 2010; Wang et al., 2016),如将 H_2O_2 外源注射到家蚕体腔中,将会引起其 Prx 基因转录水平上调,此外高低温处理以及被 NPV 感染后家蚕体内 Prx 基因的表达水平也会急剧上调(Lee et al., 2005);当受到紫外线照射或者施用杀虫剂后,中华蜜蜂体内 Prx1 基因的转录水平也会相应上调。此外,哺乳动物和昆虫体内 Prx 均还具有抗细菌或病毒的作用,如当人体细胞受到人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)刺激后, Prx1 和 Prx2 基因均表现出上调趋势(Adeyanju et al., 2018);而鱼类被病毒或细菌侵染后其体内部分 Prx 基因也会出现先上升后下降的趋势(Yu et al., 2011; Zhu et al., 2019)。目前越来越多的研究表明 Prx 蛋白除了有效降解过剩的 ROS 外,还在生长发育及免疫等信号传递方面发挥着重要作用(Chu et al., 2019; Kim et al., 2020)。虽然关于 Prx 的研究较多,但关于棉铃虫 Prx4 基因功能的研究较少,尤其是其在棉铃虫感染 NPV 过程中的作用尚不清楚。

为探究棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 幼虫 Prx4 基因的功能,本研究拟对棉铃虫 Prx4 基因进行鉴定,并对其进行生物信息学分析,采用实时荧光定量 PCR (real-time quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR) 技术分析其在棉铃虫不同发育阶段和 5 龄幼虫不同组织中的相对表达量,通过原核表达的技术方法获得重组蛋白 Prx4,并测定其体外活性,通过 RNA 干扰方法验证其在棉铃虫感染 NPV 过程中的作用,以期为后续棉铃虫 Prx 的生理功能以及为抗氧化防御研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试虫源和病毒:棉铃虫为中国农业大学有害生物综合治理实验室内继代饲养种群,于温度 $(27\pm 1)^\circ\text{C}$ 、相对湿度 $(75\pm 10)\%$ 和光周期 14 L:10 D 的人工气候箱中饲养,幼虫采用人工饲料(Wu & Gong, 1997)饲喂,成虫使用 10% 蜂蜜水补充营养。浓度为 5×10^9 OBs/mL 的棉铃虫 NPV 原液,购于河南济源白云实业有限公司,于 4°C 储存备用。

培养基:LB(Luria-Bertani)液体培养基成分为酵母提取物 5 g/L、胰蛋白胨 10 g/L、氯化钠 10 g/L、蒸馏水 1 L;LB 固体培养基为 LB 液体培养基中加入 15 g 琼脂粉。

试剂及仪器:RNAiso Plus、Prime Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒、pMD19-T 克隆载体和 TB Green Premix Ex Taq™ II 荧光定量试剂盒,日本 TaKaRa 公司;DH5 α 感受态细胞、pET-30a(+) 质粒和大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 感受态细胞,北京全式金生物技术有限公司;Tris 缓冲液、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)和异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG),德国 Merck 公司;其他试剂均为国产或者进口分析纯。NanoDrop2000 紫外分光光度计,美国赛默飞公司;DYCP-31DN 琼脂糖凝胶电泳仪,北京六一仪器厂;Micro17R 高速冷冻离心机,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;CFX96 实时定量 PCR 仪和 Mini-PROTEAN® Tetra 聚丙烯酰胺凝胶电泳仪,美国 Bio-Rad 公司;GBOX-F3 全自动凝胶成像系统,英国 Syngene 公司;SZ810 体视显微镜,重庆奥特光学仪器有限责任公司;JY98-IIIN 超声波细胞粉碎机和 RXZ-380 人工气候箱,宁波新芝生物科技股份有限

公司。

1.2 方法

1.2.1 棉铃虫 *Prx4* 基因的鉴定与生物信息学分析

按照 RNAiso Plus 试剂盒说明书提取棉铃虫 3 龄幼虫的总 RNA, 采用紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量及浓度, 检测合格后按照 Prime-Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒说明书合成第一链 cDNA。以设计的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 的全长引物 F (5'-TG-CATTGGTTAGCCGGTGAT-3')/R (5'-GTGGCAGC-AGTTCCATGTTG-3')、以合成的第一链 cDNA 为模板进行反转录-聚合酶链式扩增反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR), 所有引物均委托北京擎科生物科技有限公司合成。25 μL RT-PCR 体系: 200 ng/μL cDNA 模板 1 μL、2×TB Green Premix Ex Taq II 12.5 μL、正反向引物各 1 μL、ddH₂O 9.5 μL; RT-PCR 反应条件: 98℃ 预变性 1 min; 94℃ 变性 30 s, 62℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环; 72℃ 充分延伸 10 min。将获得的片段进行纯化后与 pMD19-T 载体连接, 然后转化至 DH5α 感受态细胞, 采用通用引物进行蓝白斑筛选并测序, 基于棉铃虫转录组数据与 NCBI 库中基因序列的 BLAST 结果进行生物信息学分析, 获得棉铃虫 *Prx4* 基因的 ORF 全长序列。

将获得的 *Prx4* 基因的 ORF 序列利用 SignalIP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalIP/>) 等在线软件进行信号肽序列、分子量和等电点进行预测, 应用 MEGA 10.0 软件中的邻接法构建系统发育树, 1 000 次检测, 应用 DNAMAN 6.0 软件对不同鳞翅目昆虫中 *Prx4* 基因的氨基酸序列进行同源性比对。

1.2.2 棉铃虫不同发育阶段和组织中 *Prx4* 基因的表达

棉铃虫不同发育阶段中 *Prx4* 基因的相对表达量测定: 取卵 10 粒、1~4 龄取食期 (蜕皮后第 1 天) 和蜕皮期 (头壳开裂期) 幼虫、1~3 日龄 5 龄幼虫各 10 头进行 RNA 提取和 cDNA 合成, 方法同 1.2.1。以 qPrx4-F (5'-ACTCACTCCATCGCCAAAGA-3')/qPrx4-R (5'-ACTGATCGCCC-TACGGGTAA-3') 为引物、以合成的 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR (real-time quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测。25 μL qRT-PCR 反应体系: 2×SYBR® Premix Ex Taq™ II 12.5 μL、10 μmol/L 正反向引物各 0.4 μL、200 ng/μL cDNA 1 μL、ddH₂O 10.7 μL。qRT-PCR 反应程序: 95℃ 预变性 30 s; 95℃ 变性 5 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 20 s, 40 个循环, 之后从 65~95℃

之间进行熔解曲线分析以排除非特异性 PCR 产物的污染。每个样品 3 个生物学重复和 4 个技术重复。利用 2^{-ΔΔC_t} 方法对不同样本的相对表达量进行分析。

棉铃虫 5 龄幼虫不同组织中 *Prx4* 基因的相对表达量测定: 在显微镜下各取 15 头 2 日龄棉铃虫 5 龄幼虫的头、表皮、脂肪体、血细胞、中肠、马氏管和唾液腺组织, 进行总 RNA 提取、cDNA 合成及 qRT-PCR 检测, 方法同上。

1.2.3 *Prx4* 蛋白的体外活性试验

目的蛋白的获得: 根据棉铃虫 *Prx4* 基因编码序列和表达载体 pET-30a 设计带有限制性酶切位点的正向引物 *EcoR* V (5'-ACGATATCTCACTATTTGATAGTGATTC-3')/反向引物 *Xho* I (5'-CGACTCGAGCTAAATTTTCGCCACCTTTTC-3'), 下划线为酶切位点。以 1.2.2 获得的棉铃虫中肠 cDNA 为模板采用 RT-PCR 程序扩增 *Prx4* 基因, 方法同 1.2.1, PCR 产物经纯化及胶回收后连接到 pMD19-T 克隆载体, 转化到 DH5α 感受态细胞中。通过蓝白斑筛选、*EcoR* V 和 *Xho* I 双酶切验证无误后, 随机挑选 5 个质粒进行测序验证。将连有目的基因的 pMD19-T 质粒和 pET-30a(+) 质粒进行双酶切, 连接转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中, 经筛选获得正确连接的重组菌株, 将重组菌株放入含 50 μg/mL 卡那霉素的 5 mL LB 液体培养基中, 于 37℃ 下摇床过夜培养, 将培养后的菌液按照 1:100 体积比接种至 500 mL 含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 于 37℃ 下继续培养, 当吸光度 OD_{600nm} 达到 0.6~0.8 时, 加入终浓度为 1 mmol/L IPTG 诱导 8 h, 然后于 4℃、12 000 r/min 下离心, 收集菌体, 经超声波破碎后分别收集上清液和沉淀, 采用 SDS-PAGE 方法检测蛋白的表达形式, 按照阴离子交换柱说明书进行蛋白纯化, 最终获得纯度单一且浓度较高的目的蛋白。

棉铃虫 *Prx4* 蛋白抗氧化活性的测定: 将重组质粒 pET-30a-*Prx4* 及对照质粒 pET-30a(+) 分别转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中, 待其 OD_{600nm} 达到 0.6 时, 加入终浓度为 1 mmol/L IPTG 诱导 5 h, 取诱导后的菌液 80 μL 涂在含有 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 固体培养基中培养, 将直径为 3 mm 的无菌滤纸置于平板中央, 分别加入 10 μL 浓度为 3%、6%、10%、15% 和 30% 的 H₂O₂, 以无菌水为对照, 37℃ 过夜培养, 分别测定各处理的抑菌圈直径, 每个处理 3 个重复。

Prx4 对 H₂O₂ 的催化活性: 参照 Yu et al. (2011) 方

法采用硫氰酸铁法测定(Zhang & Lu, 2015)。加入 10 μL 不同浓度梯度的 H_2O_2 与其硫酸亚铁铵和硫氰酸钾反应,在波长 490 nm 处测定吸光度,制作 H_2O_2 标准曲线。将 20 μL 浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Prx4 蛋白加入到 980 μL 含 10 mmol/L DTT、pH 7.0、4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸(4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid, HEPES)缓冲液中,使得每个反应体系的终体积为 1 mL;37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min 后,在每个反应体系中分别加入 10 μL 浓度为 0、25、50、100、125、150、200 和 300 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 H_2O_2 , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min 后,加入 100% 三氯乙酸 100 μL 终止反应;在每个反应体系中分别加入 10 mmol/L 硫酸亚铁铵 200 μL 和 2.5 mol/L 硫氰酸钾 100 μL , 与剩余 H_2O_2 反应后形成红色络合物,在波长 490 nm 处测定吸光度,绘制 H_2O_2 标准曲线。

Prx4 蛋白对 H_2O_2 反应趋势的测定:将 10 μL 浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Prx4 蛋白在 50 mmol/L 的 HEPES 缓冲液中孵育 10 min,加入 10 μL 浓度为 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 H_2O_2 , 分别于反应 0、5、10、15、20、25、30、35 min 后加入 100% 的三氯乙酸 100 μL 终止反应,根据 H_2O_2 标准曲线检测剩余 H_2O_2 的含量。

1.2.4 感染 NPV 后棉铃虫体内 Prx4 基因的表达

取蜕皮期棉铃虫 3 龄幼虫,饥饿 12 h 后,在 4 龄期第 1 天饲喂浓度为 1×10^7 OBs/mL 的病毒 2.5 μL , 以饲喂等量无菌水为对照,分别于接种后 24、48 及 72 h 后收集试虫的中肠组织,每个处理取 10 头试虫,置于 1.5 mL 无 RNA 酶离心管中,用液氮速冻后于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。对样品进行总 RNA 提取、cDNA 合成及 qRT-PCR 检测,方法同 1.2.2,每个处理重复 3 次。

1.2.5 Prx4 基因在棉铃虫感染 NPV 过程中的作用

根据 Prx4 基因序列委托苏州吉玛制药技术有限公司合成小干扰 si-Prx4(5'-GCGGUAGUUAAC-GGCGAAATT-3')。用自制的毛细管微量注射器将 2 μL 浓度为 40 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 si-Prx4 通过第 3 腹足注射到 1 日龄棉铃虫 5 龄幼虫血淋巴中对其进行干扰,以注射等量线虫 native control siRNA(si-NC)为对照,每个处理至少 30 头幼虫,分别于处理后 24 h 和 48 h 后,每个处理各取 10 头幼虫的中肠组织,采用 qRT-PCR 技术对其干扰后的相对表达量进行测定以表明 si-Prx4 有效,方法同 1.2.2。

按照 1.2.4 方法用浓度为 1×10^7 OBs/mL 的病毒 2.5 μL 饲喂 4 龄棉铃虫,在接毒处理 48 h 后,分别注射 si-NC 和 si-Prx4,方法和剂量同上,处理 0、2、4、6、

8 和 10 d 后每天观察幼虫的虫体液化死亡或者化蛹情况并记录,直到所有的幼虫液化死亡或者化蛹。每个处理至少观察 30 头幼虫,每个处理重复 3 次。

1.3 数据分析

采用 SPSS 21.0 软件对试验数据进行统计分析,不同发育阶段和不同组织中表达量应用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验,不同处理之间采用 Student's *t* 法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 棉铃虫 Prx4 基因序列的生物信息学分析

序列分析结果显示,棉铃虫 Prx4 基因序列 ORF 全长为 744 bp,编码 248 个氨基酸,预测的蛋白分子量为 25.56 kD,等电点为 6.08, N 末端有 20 个氨基酸组成的信号肽,含有 2 个保守的半胱氨酸残基,属于典型 2-Cys 亚型 Prx 家族蛋白。系统发育树结果显示,棉铃虫 Prx4 与斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*、粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 和家蚕等鳞翅目昆虫 Prx4 聚集在同一进化支上(图 1)。与鳞翅目昆虫的氨基酸序列进一步比对结果显示,棉铃虫 Prx4 与斜纹夜蛾 Prx4 的同源性最高,氨基酸序列一致性高达 96.0%,与粉纹夜蛾、家蚕、烟草天蛾 *Manduca sexta* 及菜粉蝶 *Pieris rapae* 氨基酸序列的一致性分别为 93.5%、92.3%、91.1% 和 88.3%;此外,Prx4 基因序列均具有高度保守的 motif (FYPLDFTFVCPTEI 和 GEVCPA),分别位于第 89~102 个氨基酸和第 216~221 个氨基酸(图 2)。

2.2 棉铃虫不同发育阶段及组织中 Prx4 基因的表达

Prx4 基因在棉铃虫卵和各幼虫发育阶段均有表达,并且差异显著($P < 0.05$);随着龄期的增加幼虫取食期和蜕皮期 Prx4 基因相对表达量呈波动性变化,且同一龄期取食期的 Prx4 基因相对表达量均显著低于蜕皮期的($P < 0.05$,图 3-A);Prx4 基因广泛分布于棉铃虫 5 龄幼虫的各个组织中,其中在中肠中的相对表达量最高($P < 0.05$),为其他组织的 2.38~6.80 倍,在血淋巴和脂肪体中的相对表达量次之(图 3-B)。

2.3 棉铃虫 Prx4 蛋白体外的活性

2.3.1 棉铃虫 Prx4 重组蛋白的获得

SDS-PAGE 电泳检测结果显示,目的蛋白主要在上清液中表达,且目的条带与预测的结果一致,约 26 kD,通过离子交换法对其进行纯化并成功获得单一的目的条带(图 4-A)。

2.3.2 棉铃虫 Prx4 蛋白体外的抗氧化活性

随着 H_2O_2 浓度的增加,转入 pET-30a 和 pET-

30a-Prx4 的大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株抑菌圈直径均增大,且当 H₂O₂ 浓度为 3%、6%、10%、15% 和 30% 时,转入 pET-30a-Prx4 的大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株抑菌圈直径均显著低于转入 pET-30a 的(图 4-B);随

着时间的延长, H₂O₂ 含量逐渐降低,在 20 min 时有 50% H₂O₂ 被降解,说明 Prx4 蛋白对 H₂O₂ 具有较高的催化效率(图 4-C)。

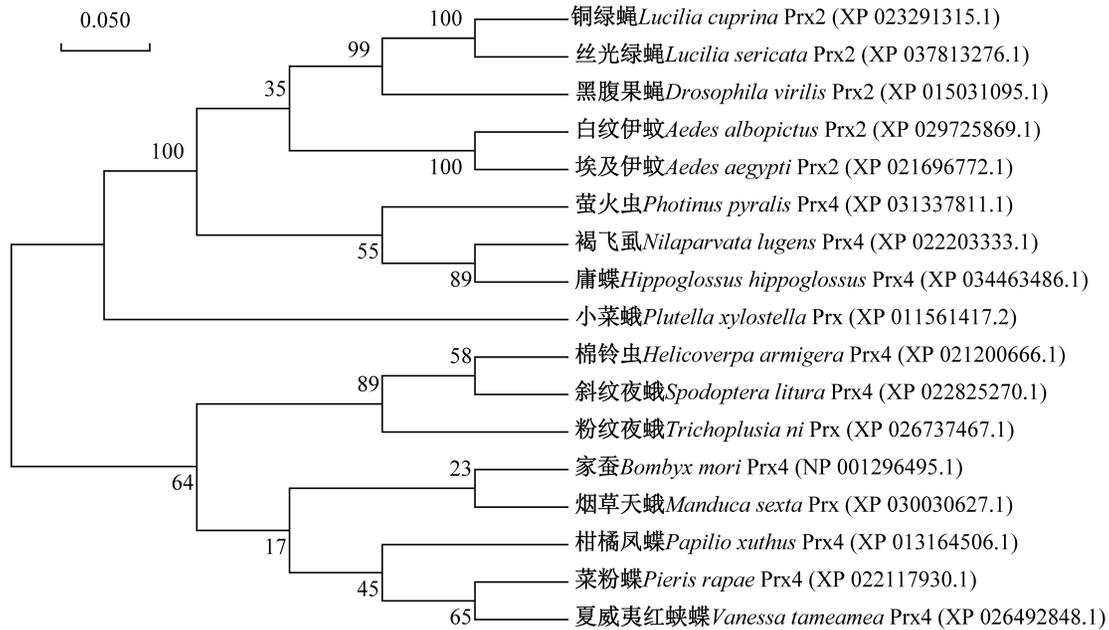
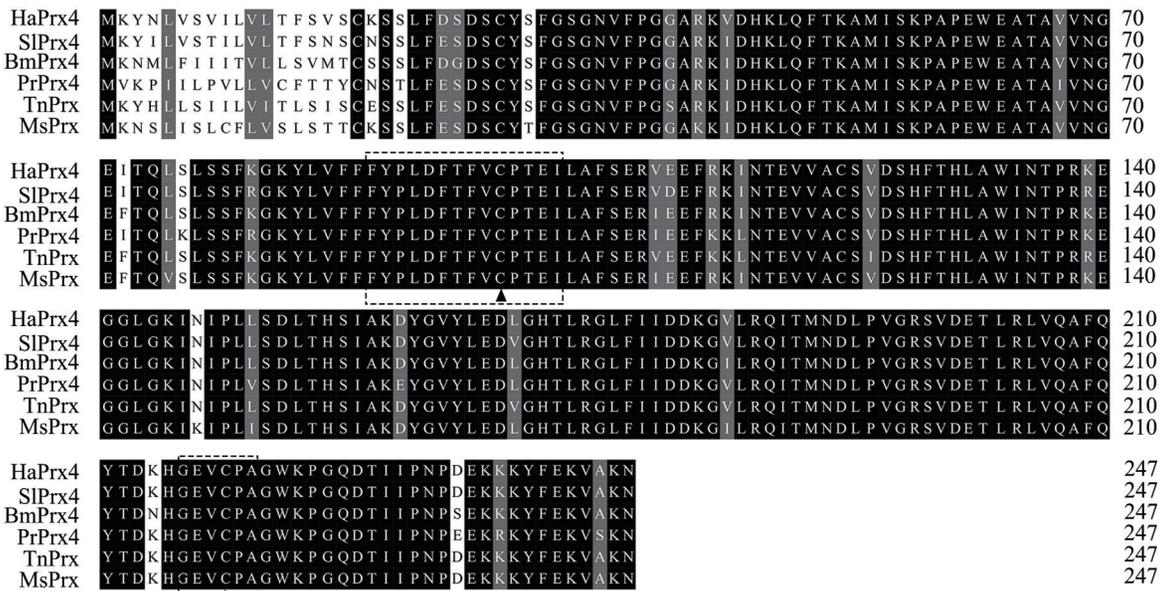


图 1 基于 Prx4 蛋白序列采用邻接法构建棉铃虫与其他昆虫的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on Prx4 protein sequences of *Helicoverpa armigera* and other insects by using neighbor-joining method



HaPrx4、SIPrx4、BmPrx4、PrPrx4、TnPrx4 和 MsPrx4: 分别为棉铃虫、斜纹夜蛾、家蚕、菜粉蝶和粉纹夜蛾的 Prx4。黑色阴影: 100% 一致性; 灰色和白色阴影: 差异氨基酸; 虚线框: Prx4 的 motif 序列; ▲: 2 个保守的半胱氨酸。HaPrx4、SIPrx4、BmPrx4、PrPrx4、TnPrx4 and MsPrx4: Prx4 from *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera litura*, *Bombyx mori*, *Pieris rapae*, *Trichoplusia ni* and *Manduca sexta*. Black shadows: 100% identity; gray and white shadows: the differential amino acids; dotted box: Prx4 motif; ▲: the two conserved Cys.

图 2 棉铃虫与其他鳞翅目昆虫的 Prx4 氨基酸序列比对

Fig. 2 Amino acid sequence alignment of Prx4 from *Helicoverpa armigera* and other Lepidoptera insects

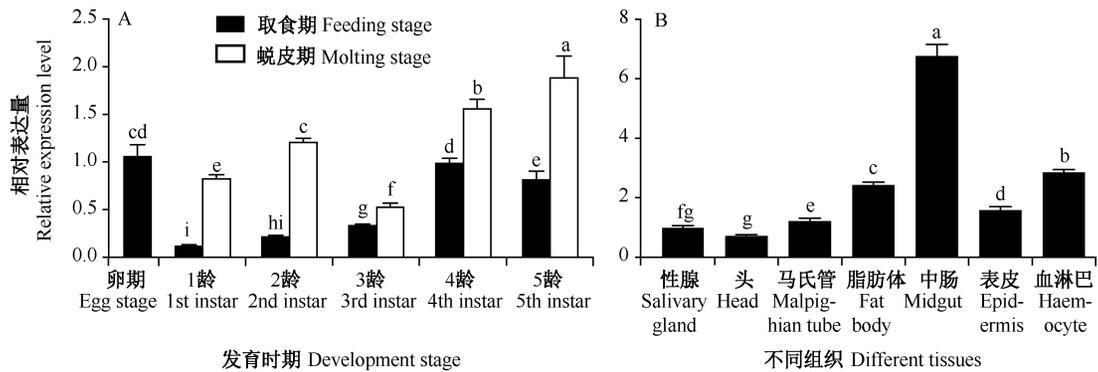
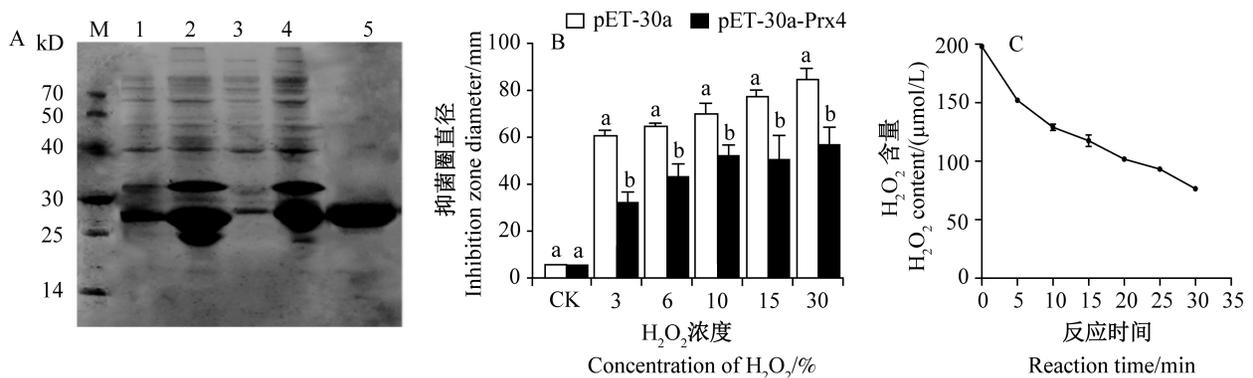


图3 棉铃虫不同发育阶段(A)及5龄幼虫不同组织中(B)*Prx4*基因的相对表达量

Fig. 3 Relative expression levels of *Prx4* gene at different development stages (A) and in different tissues of the 5th instar larvae of *Helicoverpa armigera* (B)

图中数据为平均数±标准误。不同小写字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SE. Different lowercase letters indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.



M: 标准蛋白 marker; 1~2: 未经和经IPTG诱导的融合蛋白; 3~4: 破碎后融合蛋白的包涵体和上清液; 5: 纯化后的蛋白。B: 抑菌圈直径; C: *Prx4*蛋白对H₂O₂的催化活性。M: Protein marker; 1~2: uninduced and induced over-expression of recombinant protein; 3~4: inclusion body and supernatant of *Escherichia coli* cell lysate, respectively; 5: purified protein. B: Inhibition zone diameter; C: catalytic activity of *Prx4* protein against H₂O₂.

图4 *Prx4*重组蛋白SDS-PAGE分析(A)及棉铃虫*Prx4*蛋白的体外抗氧化活性(B~C)

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the recombinant *Prx4* (A) and the *in vivo* antioxidant activity assay of *Prx4* (B~C)

图中数据为平均数±标准误。不同小写字母表示同浓度下2个处理经Student's *t*法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SE. Different lowercase letters indicate significant difference between two treatments under the same concentration at $P<0.05$ level by Student's *t* test.

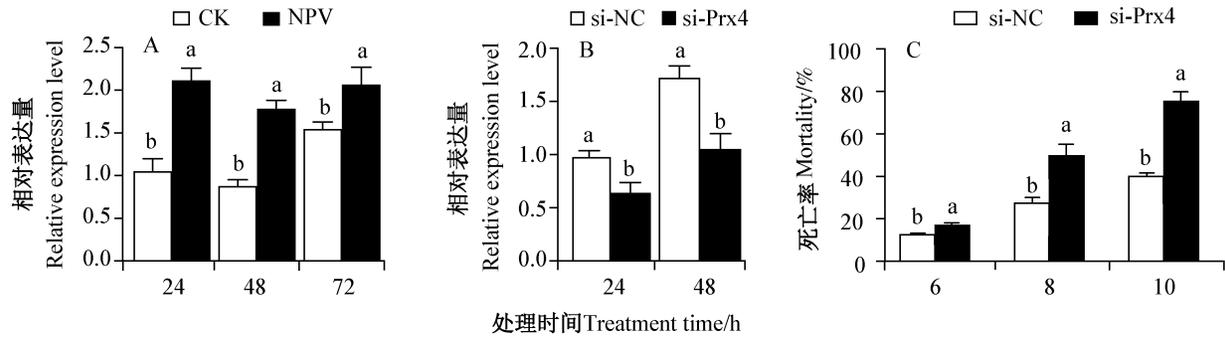
2.4 *Prx4*基因在棉铃虫幼虫感染NPV过程中的作用

棉铃虫经NPV处理24、48和72 h后,其体内*Prx4*基因的相对表达量较对照显著升高(图5-A); si-*Prx4*干扰24 h和48 h后,棉铃虫体内*Prx4*基因的相对表达量分别较对照下降了36.25%和33.12%(图5-B);接种NPV后 si-*Prx4*处理6、8和10 d后棉铃虫的死亡率分别为17.32%、50.10%和79.00%,分别较对照显著提高了4.46%、22.42%和38.68% ($P<0.05$,图5-C)。

3 讨论

本研究结果显示棉铃虫*Prx4*基因序列具有高

度保守的2个半胱氨酸和 motif 序列,与豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* 等其他昆虫中的研究类似 (Zhang et al., 2017b),并且这些保守的结构可能是其作为还原剂来减少细胞代谢和氧化应激过程中产生 ROS 所必需的特征 (Wood et al., 2003)。通过构建进化树发现棉铃虫 *Prx4* 基因序列与斜纹夜蛾、粉纹夜蛾等鳞翅目昆虫 *Prx4* 基因序列聚为一支,说明它们之间具有较近的进化关系;棉铃虫 *Prx4* 基因序列与已研究的其他鳞翅目昆虫 *Prx4* 基因序列的平均一致性为92.24%,说明 *Prx4* 基因在可能由同一基因分化而来,并且在进化过程中高度保守。



A~B: 分别为感染 NPV 后和 si-Prx4 干扰后棉铃虫体内 *Prx4* 基因的相对表达量; C: si-Prx4 处理后感感染 NPV 棉铃虫的存活率。A~B: Relative expression levels of the *Prx4* gene after NPV infection and si-Prx4 interference; C: effects of si-Prx4 on survival rate of *H. armigera* infected by NPV.

图 5 *Prx4* 基因在棉铃虫幼虫感染 NPV 过程中的作用

Fig. 5 Role of *Prx4* gene in the *Helicoverpa armigera* larvae infected by NPV

图中数据为平均数±标准误。不同小写字母表示同时间 2 个处理经 Student's *t* 法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SE. Different lowercase letters indicate significant difference between treatments at the same time at $P < 0.05$ level by Student's *t* test.

本研究结果显示 *Prx4* 基因一个广泛表达的基因,在棉铃虫卵和各龄期幼虫及 5 龄幼虫的各组织中均有表达,其可能作为管家基因来调控棉铃虫体内 ROS 水平,并且可能在不同生理过程中发挥着不同作用(Shi et al., 2012)。本研究结果显示 *Prx4* 基因能够保护 BL21 菌株免受 H_2O_2 的损害,并且对 H_2O_2 有较高的降解能力,与 Zhu et al. (2019) 在草鱼中的研究结果一致。已有研究表明低温、高温、紫外及杀虫剂等生物或非生物因子的干扰均能够诱导氧化压力的产生,而棉铃虫在感染 NPV 后 *Prx4* 基因呈显著上调趋势,可能与病毒造成的胁迫有关(Lee et al., 2005)。另有研究表明家蚕 *Prx4* 基因在气味系统中也表达,表明在面临有害化学物质损伤时,同样家蚕可能也需要 *Prx4* 基因的保护作用(Shi et al., 2012)。与此不同的是,在多种非生物压力下中华蜜蜂体内 *Prx5* 基因表达量却呈下调趋势(Yan et al., 2014),以上结果表明, *Prx* 基因具有多种转录调控方式,何种调控方式取决于 *Prx* 基因的类型及不同物种收到的压力胁迫强度。

本研究通过注射 siRNA 以及 H_2O_2 对 *Prx4* 基因进行干扰,干扰后感感染 NPV 的棉铃虫的存活率降低,表明 *Prx4* 基因能够通过调节体内 H_2O_2 变化来参与棉铃虫抗病毒反应,这与 Zhang et al. (2016) 的研究结果一致。此外,除了参与氧化压力调节外, *Prx4* 基因也参与调节昆虫寿命,如在黑腹果蝇中过表达 *Prx1* 和 *Prx4* 基因后不仅提高其抵抗氧化压力的能力,而且还使其寿命延长 30% 和 20%(Radyuk et al., 2013)。但是, *Prx* 蛋白通过调节体内 H_2O_2 后如何调

控上下游以及对免疫或者代谢通路产生的具体影响仍有待研究。

棉铃虫能够为害多种作物且为害严重,这给防治工作带来诸多困难。深入了解生物胁迫对其造成的氧化影响及对棉铃虫的影响,将为棉铃虫的防治工作提供依据。但是本研究只从蛋白及干扰水平进行了初步探索,随着科研技术的日新月异,今后可以通过基因编辑、测序等技术对转录因子的调控方式以及与其相互作用的蛋白及其机制进行更深入的研究,以期新型杀虫剂的开发提供重要的理论基础和参考依据。

参 考 文 献 (References)

- Adeyanju K, Bend JR, Rieder MJ, Dekaban GA. 2018. HIV-1 tat expression and sulphamethoxazole hydroxylamine mediated oxidative stress alter the disulfide proteome in Jurkat T cells. *Virology Journal*, 15(1): 82
- Apirajkamol N, James B, Gordon KHJ, Walsh TK, McGaughan A. 2020. Oxidative stress delays development and alters gene expression in the agricultural pest moth, *Helicoverpa armigera*. *Ecology and Evolution*, 10(12): 5680–5693
- Bogacz M, Dirdjaja N, Wimmer B, Habich C, Krauth-Siegel RL. 2020. The mitochondrial peroxiredoxin displays distinct roles in different developmental stages of African trypanosomes. *Redox Biology*, 34: 101547
- Chu SH, Liu L, Abbas MN, Li YY, Kausar S, Qian XY, Ye ZZ, Yu XM, Li XK, Liu M, et al. 2019. Peroxiredoxin 6 modulates Toll signaling pathway and protects DNA damage against oxidative stress in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Fish & Shellfish Immunology*, 89: 170–178
- Kim JY, Kim MH, Lee HJ, Huh JW, Lee SR, Lee HS, Lee DS. 2020.

- Peroxiredoxin 4 inhibits insulin-induced adipogenesis through regulation of ER stress in 3T3-L1 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 468(1/2): 97–109
- Lee KS, Kim SR, Park NS, Kim I, Kang PD, Sohn BH, Choi KH, Kang SW, Je YH, Lee SM, et al. 2005. Characterization of a silkworm thioredoxin peroxidase that is induced by external temperature stimulus and viral infection. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(1): 73–84
- Lu Y, Zhang XS, Zhou XM, Gao YY, Chen CL, Liu JP, Ye ZN, Zhang ZH, Wu LY, Li W, et al. 2019. Peroxiredoxin 1/2 protects brain against H₂O₂-induced apoptosis after subarachnoid hemorrhage. *The FASEB Journal*, 33(2): 3051–3062
- Luckhart S, Giulivi C, Drexler AL, Antonova-Koch Y, Sakaguchi D, Napoli E, Wong S, Price MS, Eigenheer R, Phinney BS, et al. 2013. Sustained activation of Akt elicits mitochondrial dysfunction to block *Plasmodium falciparum* infection in the mosquito host. *PLoS Pathogens*, 9(2): e1003180
- Radyuk SN, Klichko VI, Michalak K, Orr WC. 2013. The effect of peroxiredoxin 4 on fly physiology is a complex interplay of antioxidant and signaling functions. *The FASEB Journal*, 27(4): 1426–1438
- Radyuk SN, Michalak K, Klichko VI, Benes J, Orr WC. 2010. Peroxiredoxin 5 modulates immune response in *Drosophila*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1800(11): 1153–1163
- Ren SW, Zhao J, Liu N, Nijjati-Dilimulati, Liu XN. 2019. Cloning and expression of fatty acid-binding protein from cotton bollworm *Helicoverpa armigera*. *Journal of Plant Protection*, 46(3): 522–529 (in Chinese) [任苏伟, 赵洁, 刘宁, 尼加提·迪里木拉提, 刘小宁. 2019. 棉铃虫脂肪酸结合蛋白的克隆与表达. *植物保护学报*, 46(3): 522–529]
- Shi GQ, Yu QY, Shi L, Zhang Z. 2012. Molecular cloning and characterization of peroxiredoxin 4 involved in protection against oxidative stress in the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Molecular Biology*, 21(6): 581–592
- Tatar M, Kopelman A, Epstein D, Tu MP, Yin CM, Garofalo RS. 2001. A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends lifespan and impairs neuroendocrine function. *Science*, 292(5514): 107–110
- Wang Q, Zhou Y, Chen K, Ju X. 2016. Identification and characterization of an atypical 2-cys peroxiredoxin from the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Molecular Biology*, 25(4): 347–354
- Wood ZA, Schröder E, Harris JR, Poole LB. 2003. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(1): 32–40
- Wu KJ, Gong PY. 1997. A new and practical artificial diet for the cotton boll-worm. *Entomologia Sinica*, 4(3): 277–282
- Yan Y, Zhang YY, Huaxia YF, Wang XL, Yao PB, Guo XQ, Xu BH. 2014. Identification and characterisation of a novel I-Cys thioredoxin peroxidase gene (*AccTpx5*) from *Apis cerana cerana*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 172/173: 39–48
- Yang H, Wang XY, Pei HY, Fan D. 2019. Cloning a peroxidase cDNA sequence from the oriental armyworm, *Mythimna separata* Walker and its induction to different temperature stress. *Chinese Journal of Biological Control*, 35(1): 44–52 (in Chinese) [杨航, 王晓云, 裴海英, 樊东. 2019. 粘虫过氧化物酶 *MsPOD* 基因的克隆及不同温度胁迫的诱导效应. *中国生物防治学报*, 35(1): 44–52]
- Yang W, Hekimi S. 2010. Two modes of mitochondrial dysfunction lead independently to lifespan extension in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*, 9(3): 433–447
- 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 Molecular Biology*, 20(3): 367–378
- Zhang L, Lu Z. 2015. Expression, purification and characterization of an atypical 2-Cys peroxiredoxin from the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Molecular Biology*, 24(2): 203–212
- Zhang SD, Shen ZJ, Liu XM, Li Z, Zhang QW, Liu XX. 2016. Molecular identification of three novel glutaredoxin genes that play important roles in antioxidant defense in *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 75: 107–116
- Zhang XS, Wang T, Lin XW, Denlinger DL, Xu WH. 2017a. Reactive oxygen species extend insect life span using components of the insulin-signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(37): E7832–E7840
- Zhang YD, Li JL, Chen JH, Ma L, Chen KK, Lü ZQ. 2017b. Identification and characterization of peroxiredoxin 2 involved in the antioxidative response induced by bacterial infection in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae). *Acta Entomologica Sinica*, 60(3): 254–263
- Zhu DH, Huang R, Yang C, Fu PP, Chen LM, Jiang YJ, He LB, Li YM, Liao LJ, Zhu ZY, et al. 2019. Identification and molecular characterization of peroxiredoxin 2 in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish & Shellfish Immunology*, 92: 570–582

(责任编辑:张俊芳)