

棉铃虫正性调节区锌指类似蛋白10基因的克隆及表达分析

张亚林 胡得琴 李源 皇甫慧琳 加恩力斯尼·那扎尔 余睿 刘小宁*

新疆大学 生命科学与技术学院/新疆生物资源基因工程重点实验室, 乌鲁木齐 830046

*通讯作者, liuxn0103@sina.com

摘要 棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)是一种杂食性害虫,可对多种农作物产量造成严重损失。目前Bt作物的大面积种植和化学农药的大量使用使得棉铃虫进化出应对杀虫剂和植物次生物质而保护自身的防御机制。为了开发绿色杀虫剂,对棉铃虫进行无害化防控,本研究以棉铃虫细胞色素P450(cytochrome P450 proteins, CYP) *CYP6B6*启动子上响应2-十三烷酮(2-Tridecanone, 2-TD)的核心序列HE1做探针,利用DNA pull down技术筛选出1个棉铃虫正性调节区锌指类似蛋白10(positive regulatory domain zinc finger protein 10 like, *PRDM10l*)基因。对该基因进行克隆、生信分析和融合蛋白的原核表达,同时利用qPCR检测其时空表达谱及2-TD胁迫下该基因在6龄棉铃虫中肠中的表达规律。结果显示,*HaPRDM10l*(GenBank No. XM_021334552.1)的ORF为2 067 bp,编码688个氨基酸,蛋白分子质量和理论等电点分别为77.96 kD和8.84。*HaPRDM10l*在棉铃虫的不同发育阶段均有表达,在5龄幼虫中表达量最高;在6龄幼虫不同组织中,中肠表达量最高。不同浓度的2-TD处理后,*HaPRDM10l*和*CYP6B6*均能响应2-TD的诱导。*HaPRDM10l*在10 mg/g的2-TD处理12 h时表达量达到最大值,为对照组的7.6倍;*CYP6B6*在5 mg/g的2-TD处理6 h后表达量达到最大值,为对照组的4.6倍。相关性分析显示在6 h处理组中*HaPRDM10l*和*CYP6B6*的表达呈正相关($r=0.749$, $P<0.01$)。上述结果表明*HaPRDM10l*可能调控*CYP6B6*的表达以应对2-TD的胁迫。本研究为明晰棉铃虫应对植物次生物质的胁迫机制提供参考。

关键词 棉铃虫;正性调节区锌指类似蛋白10(*PRDM10l*);克隆;时空表达;2-十三烷酮(2-TD)

中图分类号 S435.6 文献标识码 A

Cloning and Expression Analysis of the Positive Regulatory Domain Zinc Finger Protein 10 Like Gene of *Helicoverpa armigera*

ZHANG Ya-Lin HU De-Qin LI Yuan HUANGFU Hui-Lin JIAENLISINI·Na-Zha-Er YU Rui

LIU Xiao-Ning*

Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering/College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China

* Corresponding author, liuxn0103@sina.com

Abstract *Helicoverpa armigera* is an omnivorous pest that causes severe yield loss of many crops. The current planting of Bt crops and the extensive use of chemical pesticides have enabled the cotton bollworm to evolve a defense mechanism that protects itself against pesticides and plants secondary substances. In order to develop an environment friendly insecticide for harmless control of *H. armigera*, the core sequence HE1, which can respond to 2-tridecanone (2-TD), of the cytochrome P450 *CYP6B6* promoter was used as a probe to

基金项目:国家自然科学基金(31972279);国家级大学生创新训练计划项目(202110755087);新疆维吾尔自治区天山雪松计划(2017xs02)

收稿日期:2021-09-17 接受日期:2021-11-08

screen out a positive regulatory domain zinc finger protein 10 like (*PRDM10l*) gene by using DNA pull down technology. The sequence of *HaPRDM10l* were cloned from 6th instar larvae of *H. armigera*, analysed by bioinformatics and its fusion protein expressed by using a prokaryotic expression system. qPCR was used to detect the spatial-temporal expression profile of *HaPRDM10l* in *H. armigera*, and its expression pattern in the midgut of the 6th instar larvae of *H. armigera* was detected after 2-TD treatment. The results showed that the ORF of *HaPRDM10l* (GenBank No XM_021334552.1) was 2 067 bp, encoded 688 amino acids. The molecular weight and theoretical isoelectric point of the protein were 77.96 kD and 8.84, respectively. *HaPRDM10l* was expressed at all developmental stages of *H. armigera*, with the highest expression in 5th instar larvae, and among different tissues the highest expression in the midgut of 6th instar larvae. After the cotton bollworm was treated with different concentrations of 2-TD, both *HaPRDM10l* and *CYP6B6* could respond to the induction of 2-TD. The expression of *HaPRDM10l* reached the maximum when 10 mg/g of 2-TD treatment for 12 h, which was 7.6 folds of that in the control group, and the expression level of *CYP6B6* reached the maximum at 6 h after 5 mg/g 2-TD treatment, which was 4.6 folds that of the control group. Further analysis revealed that there was a positive correlation between the expression of *HaPRDM10l* and *CYP6B6* in the 6 h treatment group ($r=0.749$, $P<0.01$). The above results suggested that *HaPRDM10l* may regulate the expression of *CYP6B6* in response to the stress of 2-TD. This study provides a reference for clarifying the mechanism of the *H. armigera* in response to the stress of plant secondary substances.

Keywords *Helicoverpa armigera*; Positive regulatory domain zinc finger protein 10 like (PRDM10l); Cloning; Temporal and spatial expression; 2-tridecane (2-TD)

正性调节区锌指蛋白 10 (positive regulatory domain zinc finger protein 10, PRDM10)属于锌指蛋白家族中的PRDM家族。PRDM家族存在一个与组蛋白甲基转移酶(histone methyltransferase, HMT) SET结构域密切相关的保守的N-末端PR (positive regulatory)同源结构域,还包括数量可变的C2H2型锌指结构(Han et al., 2020)。迄今为止,在人体中发现具有PR/SET结构域的PRDM基因家族编码19个不同的转录因子,是控制细胞生命活动的重要转录调节因子(Sorrentino et al., 2018)。*PRDM10*可在多种胚胎和发育相关的神经系统中表达,可能是小鼠(*Mus musculus*)胚胎发育过程中正常组织分化的转录调节因子(Park, Kim, 2010; Woo et al., 2021)。大规模表型筛选显示,在敲除410个小鼠致死基因后,只有*PRDM10*的纯合缺失可导致胚胎致死(Dickinson et al., 2016);同样,小鼠胚胎干细胞*PRDM10*缺失会造成真核生物翻译起始因子3 (eukaryotic translation initiation factor 3, eIF3)复合体核心组分的Eif3b翻译效率下降,从而在早期发育期间影响细胞生长和存活(Han et al., 2020)。上述研究结果表明,PRDM10胚胎发育过程中发挥着重要作用。

棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)是一种世界范围内的杂食性经济作物害虫,可对多种农作物造成严重的产量损失。目前对害虫主要的防治措施仍依赖种植Bt作物和施用化学农药,但Bt作物的大面积种植和杀虫剂的长期使用导致害虫对Bt棉(*Gossypium*)和杀虫剂产生不同程度的抗性(赵洁等, 2018; Ahmad et al., 2019; Zhang et al., 2019)。在植物和害虫的协同进化中,植物通过产生次生性物质如萜烯天然产物(Gershenzon, Dudareva, 2007)、印楝素(azadirachtin)(Mordue, Blackwell, 1993; McKenzie et al., 2010)、棉酚(Gossypol)(Krempl et al., 2021)和芥子苷(glucosinolates)(Bruce, 2014)等来阻止害虫取食。而害虫为保护自身进化出应对杀虫剂和植物次生物质的防御机制,表现为害虫体内细胞色素P450s (cytochrome P450 proteins, CYP)等解毒酶活性的增强或表达量的增加,导致害虫对杀虫剂和植物次生物质产生耐受性。如花椒毒素(xanthotoxin)可诱导美洲棉铃虫(*H. zea*)中的*CYP6B8*和*CYP321A1* (Li et al., 2004)、小菜蛾(*Plutella xylostella*)中肠和脂肪体的*CYP6B1* (Petersen et al., 2001)、棉铃虫中肠中4种和脂肪体中5种细胞色素P450s基因(Zhou et al., 2010)和北美黑凤蝶(*Papilio polyx-*

enes)中的CYP6B1 (Feyereisen, 1999)等多种昆虫解毒酶表达量的增加。番茄(*Solanum lycopersicum*)中的植物次生物质2-十三烷酮(2-Tridecanone, 2-TD)可诱导烟草天蛾(*Manduca sexta*)中肠中的CYP4M1和CYP4M3的过量表达(Feyereisen, 1999),以增强害虫对次生物质甚至杀虫剂的耐受性。

本课题组前期研究发现2-TD能诱导P450超家族中的CYP6B6基因的过量表达,进而发现该基因的启动子上存在响应2-TD的元件,并将其命名为HE1 (Liu et al., 2006; 李芬等, 2012; Li et al., 2014)。本研究利用DNA pull down技术,以CYP6B6启动子上响应2-TD的核心序列HE1作为探针,筛选获得可能与其互作的棉铃虫正性调节区锌指类似蛋白10 (positive regulatory domain zinc finger protein 10 like, PRDM101)。对HaPRDM101进行克隆及表达分析,研究HaPRDM101在棉铃虫不同发育阶段、不同组织中的表达模式以及2-TD处理后的表达变化,以期阐明该基因在响应2-TD中发挥的作用,为开发绿色杀虫剂、乃至无害化防控棉铃虫提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料

棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)来自新疆生物资源基因工程重点实验室长期饲养种群(Liu et al., 2006)。在相对湿度为(65±5)%、温度为(26±2) °C的条件下,用人工饲料在光周期为16光照:8黑暗的昆虫室内进行饲养。收集5 mg/g 2-TD处理6 h的6龄棉铃虫中肠组织作为DNA pull down的实验材料。收集24 h内产的棉铃虫卵,生长状态良好且大小一致的1~6龄棉铃虫幼虫、蛹和成虫进行实验。

PCR法DNA探针生物素标记试剂盒购于上海联迈生物工程有限公司;DNA pull down试剂盒购于广州伯信生物科技有限公司;表达载体pET32a由本课题组保存;TRIZol Up Plus RNA Kit、Perfect-Start Green qPCR SuperMix Kit、pEASY-T1 Simple Vector Kit、大肠杆菌(*Escherichia coli*) Trans1-T1感受态细胞、BL21(DE3)感受态细胞、ECL显色液、一抗(鼠抗His-Tag)、二抗(HRP标记的羊抗鼠IgG)均购于北京全式金生物技术有限公司;反转录试剂盒、限制性核酸内切酶和Solution I购自宝生物工程(大连)有限公司;质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒

购自OMEGA公司(美国);2-TD购自上海拜力生物技术有限公司;引物合成与测序送至生工生物有限公司(上海);其他化学试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 DNA pull down

DNA pull down实验按照试剂盒说明书进行操作。分别制备HE1的生物素(实验组)和未用生物素(对照组)标记的探针,再与链霉亲和素磁珠结合,其比例为1 000 bp探针/2 μg磁珠。然后用裂解缓冲液提取5 mg/g 2-TD处理6 h的6龄棉铃虫中肠组织中的蛋白,二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法对上清液的蛋白浓度定量后转移100 μL作为总蛋白溶液,经DNase酶解DNA,琼脂糖磁珠预洗后,再次离心总蛋白样品,将新的上清液转移到标记为实验组和对照组的两支EP管中。最后,将总蛋白提取液与经过预处理的链霉亲和素磁珠孵育进行pull down,磁力架上静置并收集磁珠,去除上清液。用洗脱液洗脱,-80 °C保存上清液。实验组和对照组进行SDS-PAGE验证后,在Q Exactive™质谱仪和液相色谱仪Dionex UltiMate 3000上进行液相色谱-质谱(LC/MS)分析(此部分由广州辉骏生物完成),然后利用棉铃虫蛋白数据库([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein?term=txid29058\[Organism\]](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein?term=txid29058[Organism]))与LC/MS检测的多肽质荷比进行匹配。质谱检测数据中的实验组扣除对照组后即HE1特异性结合的蛋白,对这些蛋白进行生物信息学分析,筛选CYP6B6的潜在调控因子。

1.2.2 HaPRDM101的克隆及序列分析

HaPRDM101 ORF区的引物HaPRDM101-F和HaPRDM101-R用Primer Premier 5.0软件设计(表1)。以6龄棉铃虫中肠为材料,参照试剂盒的说明提取总RNA并合成cDNA。PCR反应体系(20 μL): ddH₂O 14.3 μL, 10×ExTaq Buffer 2 μL, dNTP Mix 1.5 μL, ExTaq酶0.2 μL、10 μmol/L的HaPRDM101-F和HaPRDM101-R引物各0.5 μL, cDNA 1 μL。反应程序:95 °C 3 min;95 °C 30 s, 57 °C 25 s, 72 °C 2 min,共35个循环;72 °C 5 min, 12 °C保温。1%琼脂糖凝胶电泳检测后切胶回收与pEASY-T1 Simple Vector连接得到pEASY-T1-Simple-HaPRDM101,再转化到大肠杆菌Trans1-T1,挑取单克隆PCR鉴定正确后进行测序。

1.2.3 HaPRDM101的氨基酸序列及结构分析

利用DNAMAN比对翻译测序正确的序列,并在线网站SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)分析结构域;利用在线网站ProtParam (<https://web.expasy.org/protscale/>)和ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>)分别预测HaPRDM101的理化性质和亲疏水性;HaPRDM101的亚细胞定位根据氨基酸组成在PSORTII网站(<https://www.genscript.com/psort.html>)预测;信号肽和跨膜结构域分别用SignalP 4.1 (<http://split.pmfst.hr/split/4/>)和THMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)预测;HaPRDM101二级结构的主要分布形式用SABLE预测;蛋白的三级结构用Phyre2 Server (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)预测。

1.2.4 HaPRDM101蛋白的原核表达

pEASY-T1-Simple-HaPRDM101和pET32a空载体经EcoR I和Sal I酶切回收后用Solution I将HaPRDM101与pET32a相连,转化到感受态细胞Trans1-T1后用菌液PCR筛选;双酶切鉴定重组质粒pET32a-HaPRDM101正确后将其转化至感受态细胞BL21(DE3)中;菌液PCR与酶切鉴定后在37℃,200 r/min扩大培养至 OD_{600} 为0.5~0.7;加入异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl β -D-thiogalactoside, IPTG)(0.5 mmol/L)37℃继续诱导培养4~5 h;收集菌体并用1×PBS吹打清洗沉淀,超声破碎至相对透亮(5 s/5 s,持续30 min);分别取诱导前、诱导后和超声破碎后的上清液和沉淀,利用10%的

SDS-PAGE检测融合蛋白的表达情况。将纯化后的总蛋白转印至硝酸纤维素膜上,5%脱脂奶粉室温封闭1 h,4℃冰箱过夜孵育一抗(1:1000),室温摇床缓慢孵育1 h二抗(1:4000),用吐温磷酸缓冲液清洗,最后在Amersham Imager 600超灵敏多功能成像仪(美国)显色拍照。

1.2.5 棉铃虫HaPRDM101的表达模式分析

根据HaPRDM101序列,利用Primer Premier 5.0软件设计qPCR引物(表1),产物长198 bp,选择棉铃虫Tubulin基因做为内参基因。分别提取卵、1~6龄幼虫(蜕皮第2天)、预蛹、蛹和成虫(第3天)的全虫以及头部、体壁、中肠及脂肪体(6龄幼虫)的RNA并逆转录合成cDNA,qPCR反应体系和程序按照PerfectStart Green qPCR SuperMix Kit说明书操作,每个样品设3个生物学重复和3个技术重复。不同发育时期以卵期作为参照,不同组织以头为参照,HaPRDM101的相对表达量按照公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算。

1.2.6 HaPRDM101和CYP6B6响应2-TD的诱导

将2-TD溶于棉铃虫人工饲料中,蒸馏水加热溶解,配制成5、10、15和20 mg/g的人工饲料。选取6龄的棉铃虫幼虫(蜕皮第1天),饥饿2 h后,用含不同浓度2-TD的饲料饲喂。分别在处理6、12、20、30和48 h时取棉铃虫的中肠组织,用qPCR检测中肠中HaPRDM101和CYP6B6在不同时间(6、12、20、30和48 h)的表达情况。以饲喂正常饲料的样品作为对照,用Tubulin作内参基因,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 公式计算HaPRDM101的相对表达量。

表1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence	用途 Purpose
PRDM101-F	CCGGAATTCATGAACCGTGCCGATTCTC	开放阅读框扩增
PRDM101-R	TGACGTCGACTCATTGTTTGTAGTATTTCTATT	ORF amplification
PRDM101-QF	TATCTGACCGAGTCGTTCCC	qPCR
PRDM101-QR	GTGGCTTCTTATTTGATGTTGC	
CYP6B6-QF	TTCAAACCTTATACCATGTCCACAA	
CYP6B6-QR	CCAATTGACGGAGCTCTAGAATCA	
Tubulin-QF	TCCAACCTCACACTCGCT	内参基因
Tubulin-QR	GGAAGCAGATGTCGTATAATG	Reference gene

下划线为酶切位点

The enzyme cleavage sites are underlined

1.3 数据分析

用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计分析,用单因素方差分析(One Way ANOVA)检验 *HaPRDM10l* 在棉铃虫不同龄期和组织中表达量的显著性,用 Turkey 进行多重比较分析。利用 Pearson 相关系数法分析 *HaPRDM10l* 和 *CYP6B6* 的相关性。

2 结果与分析

2.1 利用 HE1 探针捕获调控 *CYP6B6* 表达的蛋白

利用 *CYP6B6* 启动子上 394 bp 的核心序列 HE1, 在 DNA pull down 中捕获所有可能调控 *CYP6B6* 表达的蛋白。将生物素标记的 HE1 探针(图 1A)与蛋白提取物孵育后,在实验组观察到大量 DNA-蛋白质复合物条带,与对照组相比存在多个特异性条带(图 1B)。采用 LC/MS 方法对探针上的蛋白质进行了鉴定。用棉铃虫蛋白数据库与 LC/MS 检测的多肽质荷比进行匹配,相似度在 identity \geq 30%, coverage \geq 50% 的认为是匹配上,质谱检测数据中的实验组去除对照组后检测到 HE1 特异性结合蛋白多于 60 种,利用 animal TFDB3 (<http://bioinfo.life.hust.edu.cn/AnimalTFDB/#/>)在线预测结合蛋白有无转录因子基序,结果显示在特异性结合的 60 多种蛋白中有 5 个蛋白含有转录因子家族的基序。其中 A0A2W1C1Y7 和 A0A2W1BDD8 属于

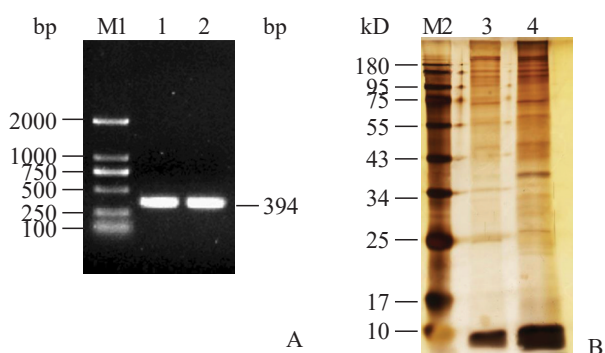


图 1 DNA Pull down 的 DNA 探针(A)和 SDS-PAGE (B)
Figure 1 DNA probe (A) and SDS-PAGE (B) of DNA pull down

M: DL2000 DNA Marker; 1: 非标记探针; 2: 生物素标记探针; M2: 蛋白分子量标准(10~180 kD); 3: 对照组(非标记探针); 4: 实验组(生物素标记探针)

M: DL2000 DNA Marker; 1: Luna Probe; 2: Biotin-Labeled Probe; M2: Protein Marker (10~180 kD); 3: Control group (Luna Probe); 4: Experimental group (Biotin-Labeled Probe)

C2H2 型锌指(zinc finger, zf)蛋白家族、A0A2W1BVZ9 属于碱性亮氨酸拉链(basic region-leucine zipper, b-ZIP)家族、A0A2W1BM06 属于 V-myb 禽成髓细胞瘤病毒癌基因同源物(v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog, MYB) 家族、A0A2W1C3A6 属于 T-box 家族。根据蛋白得分,注释功能及定位于细胞核等因素选择 A0A2W1C1Y7 进行研究。在 NCBI 里 Blast 检索到与 A0A2W1C1Y7 匹配度最高的是棉铃虫全基因组测序中预测的 PRDM10l (XP_021190227.1), 相似度为 98.47%。推测 A0A2W1C1Y7 即 PRDM10l, 因此选择该蛋白进行后续克隆研究。

2.2 *HaPRDM10l* 的克隆及序列分析

以棉铃虫 6 龄幼虫的中肠组织 cDNA 为模板克隆 *HaPRDM10l*, PCR 扩增获得 2 067 bp 的 *HaPRDM10l* 特异性条带(图 2)。切胶回收后与克隆载体连接并送公司测序。测序正确的序列利用 DNA-MAN 翻译后,发现该蛋白 N 端有一个 SET 结构域, C 端有 6 个 C2H2 锌指结构域(图 3), 且与 NCBI 数据库中棉铃虫 PRDM10l (XP_021190227.1) 的相似性为 96.08%, 表明本研究成功克隆获得了棉铃虫体内的正性调节区锌指类似蛋白 10, 即 *HaPRDM10l*。

2.3 *HaPRDM10l* 的氨基酸序列及结构分析

ProlParam 预测的 *HaPRDM10l* 蛋白分子质量为 77.96 kD、理论 pI 为 8.84; 其蛋白序列中亮氨酸(9.3%)、丝氨酸(9.0%)、赖氨酸(7.9%)含量较高; Proscale 预测的不稳定系数为 53.87 (>40 为不稳定蛋白), 平均亲水性为 -0.754, 因此推测 *HaPRDM10l*

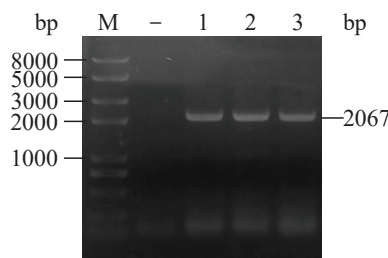


图 2 *HaPRDM10l* 的 PCR 扩增
Figure 2 PCR amplification of *HaPRDM10l*

-: 阴性对照; 1~3: *HaPRDM10l*; M: Trans2K Plus II DNA Marker; 下同

-: Negative control; 1~3: *HaPRDM10l*; M: Trans2K Plus II DNA Marker; The same below

为不稳定的亲水性蛋白。HaPRDM10l 100%定位于细胞核中,推测 HaPRDM10l 主要在细胞核中发挥其生物学功能。SignalP 5.0 预测发现棉铃虫 HaPRDM10l 没有信号肽。THMM 预测结果显示 HaPRDM10l 该蛋白不具有跨膜区域,不属于跨膜蛋白,这与 PSORTII 分析的 HaPRDM10l 在细胞核中表达的结果一致。

SABLE 二级结构预测显示,HaPRDM10l 无规则卷曲的序列占比最大,达到 55.67%,延伸链占 18.02%,20.35% 为 α -螺旋, β -转角最低,为 5.96% (图 4A)。Phyre2 Server 预测 HaPRDM10l 的三级结构发现甲基转移酶 SET 结构域位于 N 端第 164~291 位氨基酸残基处,以最匹配模板人 (*Homo sapiens*) 的 PR 结构域锌指蛋白 10 (c3ihxB) 建模,最佳匹配区域是 HaPRDM10l 蛋白序列的 SET 结构域,该模板在 PDB 数据库中显示为人类的 PRDM10,说明 HaPRDM10l 与 PRDM10 相似(图 4B)。

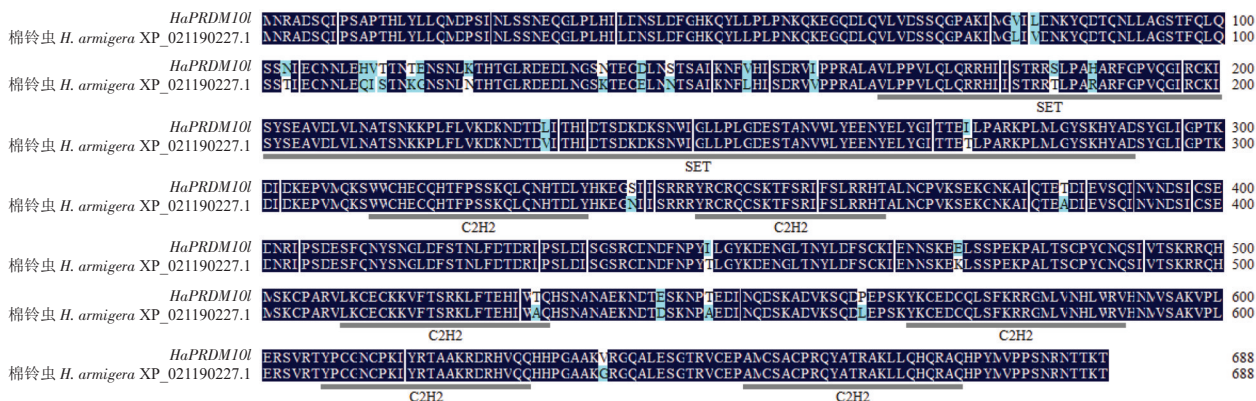


图3 HaPRDM10l与棉铃虫正性调节区锌指类似蛋白10 (XP_021190227.1)的氨基酸序列比对

Figure 3 Alignment of the amino acid sequence of HaPRDM10l and PR domain zinc finger protein 10 like (XP_021190227.1) of *H. armigera*

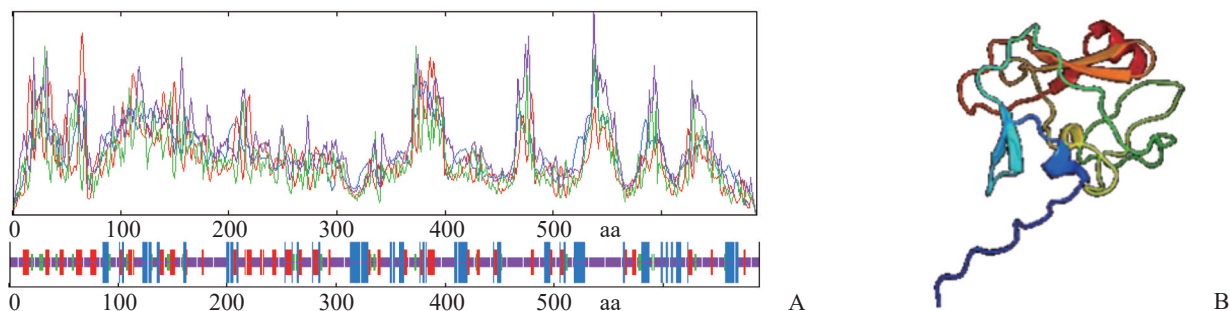


图4 棉铃虫 HaPRDM10l 蛋白二级结构(A)和三级结构(B)预测

Figure 4 Secondary (A) and tertiary structure (B) prediction for HaPRDM10l of *H. armigera*

橘色:随机卷曲;红色:延伸链;蓝色: α -螺旋;绿色: β -转角

Orange: Random coilin; Red: Extension chain; Blue: α -helixes; Green: β -turn

2.4 重组蛋白 His-HaPRDM10l 的表达

将 *HaPRDM10l*/pEASY-T1 simple 和 pET32a 空载体分别用 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切,回收后连接并转化到 Trans1-T1,测序验证后转到 BL21 中,获得重组菌株(图 5A)。IPTG 诱导蛋白表达并收集菌体。SDS-PAGE (图 5B)显示,诱导后的样品和超声处理后的沉淀在约 100 kD 处出现表达量增加的条带,说明该融合蛋白不是可溶性蛋白。Western blot (图 5C)结果显示,该蛋白与 His-Tag 的单克隆抗体在 100 kD 处能发生特异性免疫反应,表明 His-HaPRDM10l 融合蛋白成功表达。

2.5 HaPRDM10l 在不同发育时期和组织中的表达规律

通过荧光定量方法检测棉铃虫不同发育时期和组织中 *HaPRDM10l* 的表达量,结果表明 *HaPRDM10l* 在棉铃虫的不同发育阶段均有表达,其中 5

龄表达量最高,其次是卵期、6龄、蛹和成虫,在1龄的表达量最低,且与5龄相比差异显著($P<0.05$),而其他龄期中表达量变化不大(图6A)。*HaPRDM10l*在6龄棉铃虫幼虫的中肠、头部、体壁和脂肪体中均有表达,且表达量依次降低,其中中肠与脂肪体相比差异显著($P<0.05$),是脂肪体的4.6倍(图6B)。

2.6 2-TD对*HaPRDM10l*和*CYP6B6*表达的影响

利用 qPCR 方法检测 2-TD 对棉铃虫 *HaP-*

RDM10l 和 *CYP6B6* 表达的影响。4种浓度的2-TD处理6龄棉铃虫不同时间的结果显示,*HaPRDM10l*的相对表达量总体随着时间延长先升高后逐渐降低。其中处理6和12 h后*HaPRDM10l*的相对表达量均随2-TD浓度的增加呈先上升后下降趋势,当浓度分别为5和10 mg/g时*HaPRDM10l*的相对表达量最高,分别为对照的3.9和7.6倍。而处理20和48 h后*HaPRDM10l*的相对表达量均随2-TD浓度的增加呈先上升后下降再上升再下降的趋势,当

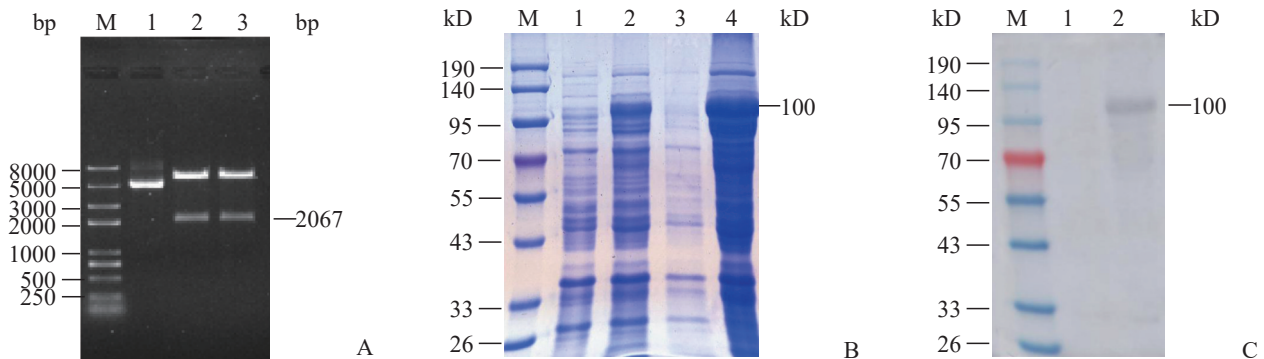


图5 重组质粒pET32a-*HaPRDM10l*的双酶切与融合蛋白His-*HaPRDM10l*的诱导表达

Figure 5 Double digestion of the recombinant plasmid pET32a-*HaPRDM10l* and induced expression of the His-*HaPRDM10l* fusion protein

A. 重组质粒pET32a-*HaPRDM10l*的双酶切。B. SDA-PAGE检测融合蛋白的表达。M: 预染蛋白分子量标准;1~4: 重组菌株诱导前、诱导后、超声处理后上清和沉淀的总蛋白;C. Western blot验证。1~2: IPTG诱导前和诱导后的重组菌株

A. Double digestion of the recombinant plasmid pET32a-*HaPRDM10l*. B. Induced expression product of the fusion protein by SDS-PAGE: M: Prestained Protein Marker; 1~4: The total proteins of recombinant strain without IPTG induced, with IPTG induced, ultrasonic supernatant induced with IPTG and ultrasonic precipitation induced with IPTG; C. Western blot verification. 1~2: Total proteins from non-induced recombinant strain, and induced recombinant strain, respectively

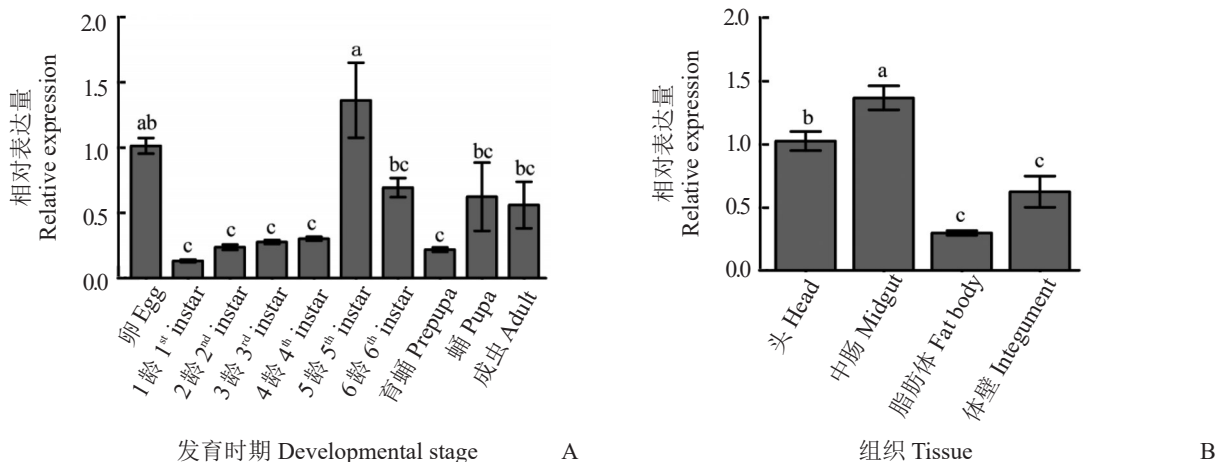


图6 *HaPRDM10l*在棉铃虫不同发育时期(A)及6龄幼虫不同组织(B)中的相对表达量

Figure 6 Relative expression level of *HaPRDM10l* in different developmental stages (A) and tissues of the 6th instar larvae (B) of *H. armigera*

不同字母表示在 $P<0.05$ 水平差异显著;内参基因:*Tubulin*; n=3; 下同

Different letters indicate significant difference at $P<0.05$ level; Reference gene: *Tubulin*; n=3; The same below

浓度分别为5和15 mg/g时 *HaPRDM10l* 的相对表达量最高,分别为对照的4.3和3.8倍。处理30 h则随着2-TD浓度增加呈先降低后升高再降低的趋势,在浓度为10 mg/g时表达量达到最大,是对照的2.7倍。上述结果说明 *HaPRDM10l* 可以响应2-TD的诱导(图7A)。

同样的, *CYP6B6* 的相对表达量总体趋势与 *HaPRDM10l* 相似,随着2-TD浓度增加呈先升高后降低的趋势。其中处理6和48 h后 *CYP6B6* 的相对表达量均随2-TD浓度增加呈先上升后下降趋势,

当浓度为5 mg/g时, *CYP6B6* 的相对表达量最高,分别为对照的4.6和3.2倍。而处理12、20和30 h后, *CYP6B6* 的相对表达量均随2-TD浓度增加呈先下降后上升再下降的趋势,当2-TD浓度为10 mg/g处理20和30 h时 *CYP6B6* 的相对表达量最高,分别为对照的4.9和3倍。上述结果说明 *CYP6B6* 也可以响应2-TD的诱导(图7B)。因此,为研究 *HaPRDM10l* 和 *CYP6B6* 有无调控关系,对二者的相对表达量做相关性分析,结果表明4种浓度的2-TD处理6 h后 *CYP6B6* 和 *HaPRDM10l* 的相对表达量呈正

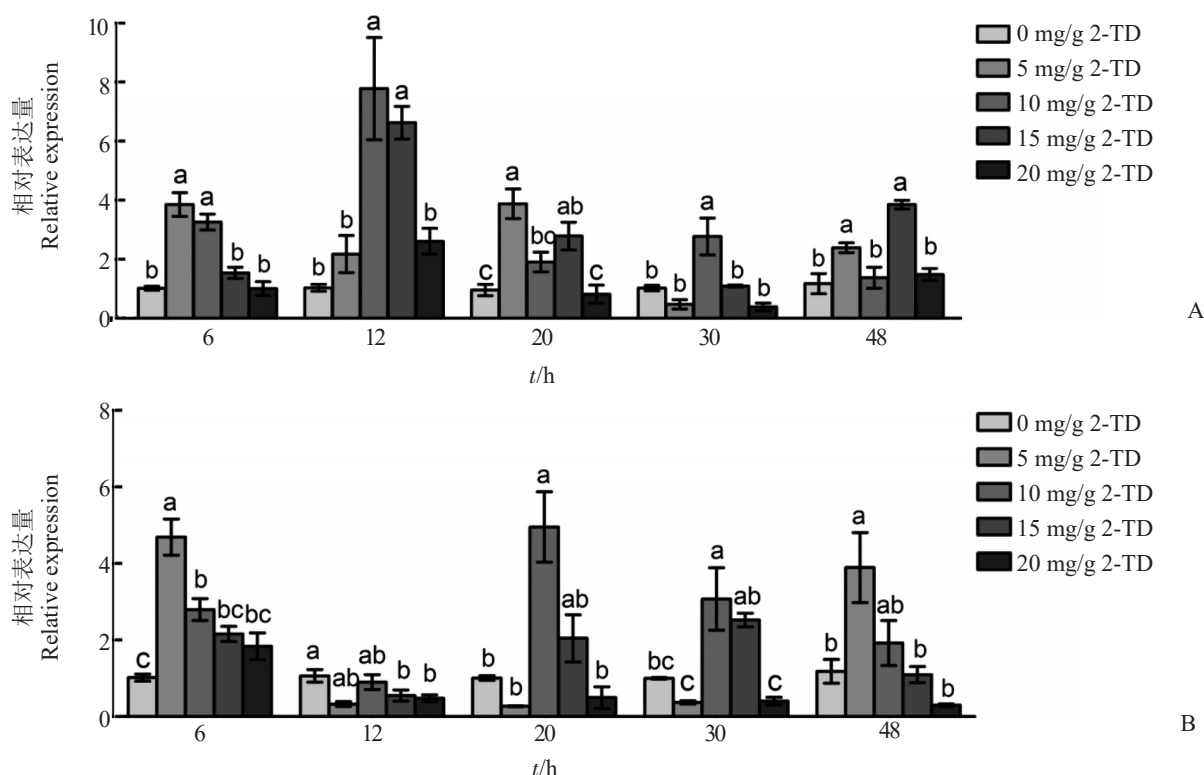


图7 2-TD处理下棉铃虫6龄中肠 *HaPRDM10l* (A)和 *CYP6B6* (B)的相对表达量

Figure 7 Relative expression level of *HaPRDM10l* (A) and *CYP6B6* (B) in the midgut of the 6th instar larvae of *H. armigera* treated with 2-TD

表2 2-TD处理棉铃虫6 h后 *HaPRDM10l* 与 *CYP6B6* 相对表达量的相关性分析

Table 2 Correlation analysis between the relative expression levels of *HaPRDM10l* and *CYP6B6* in *H. armigera* treated with 2-TD for 6 h

项目	<i>HaPRDM10l</i> 的相对表达量	<i>CYP6B6</i> 的相对表达量
Item	Relative expression of <i>HaPRDM10l</i>	Relative expression of <i>CYP6B6</i>
<i>HaPRDM10l</i> 的相对表达量	1	0.749**
Relative expression of <i>HaPRDM10l</i>		
<i>CYP6B6</i> 的相对表达量	0.749**	1
Relative expression of <i>CYP6B6</i>		

** : 0.01 水平(双侧)上显著相关

** : Significant correlation at the 0.01 level (two-sided)

相关($r=0.749$, $P<0.01$)(表2),说明 HaPRDM10l 可能调控 *CYP6B6* 的表达以响应 2-TD 的诱导。

3 讨论

昆虫和植物在共同进化过程中具有复杂而精密的机制来相互适应。为了躲避食草性昆虫的袭击,植物不仅具有物理防御机制,还可以合成有毒的化合物。而食草害虫会增强某些解毒和代谢酶的生物活性,以降解毒物产生的有毒物质(Li et al., 2004; Zhou et al., 2010; Liu et al., 2006)。野生番茄(*Solanum lycopersicum*)依靠高浓度的植物次生物质 2-TD 来抵抗棉铃虫、棉蚜(*Aphis gossypii*)、烟草天蛾和马铃薯甲虫(*Leptinotarsa decemlineata*)的摄食(Goncalves et al., 1998; 吕敏等, 2012; 刘小宁等, 2014),而害虫体内存在的解毒酶系如细胞色素 P450s 可以被植物次生物质诱导过量表达,来应对植物次生物质和杀虫剂,还有可能对杀虫剂产生耐受性(Li et al., 2017; Ma et al., 2019; 石鑫等, 2021)。因此,为了探究 2-TD 诱导 *CYP6B6* 过表达的机制,本研究基于前期获得的 *CYP6B6* 基因启动子上的 2-TD 响应元件 HE1,利用 DNA pull down 技术从 2-TD 处理的棉铃虫中肠总蛋白中筛选可以与 HE1 探针互作的潜在调控因子,经分析获得了 *HaPRDM10l*,对其进行克隆并研究了其在棉铃虫不同发育阶段与不同组织中的表达模式和 2-TD 胁迫下的表达规律。

DNA pull down 是将目标 DNA 序列用生物素标记后与链霉亲和素标记的磁珠结合,与蛋白提取物孵育,洗脱结合在磁珠上的蛋白,再用质谱技术鉴定即可分析得到已知 DNA 序列的结合蛋白,多用于反式因子的筛选(杨希晨, 2016; Zhou et al., 2020)。在本研究中,通过 DNA pull down 技术捕获与 HE1 结合的蛋白,联合质谱技术在棉铃虫蛋白数据库中匹配到与 HE1 探针特异性结合的蛋白质多于 60 种,经过注释发现没有已知的转录因子且大多为未知蛋白。石津(2018)在家蚕(*Bombyx mori*)中也利用此技术捕获与 Homeobox 相关基因 A (special homeobox genes, *ShxA*)特异性结合的 8 个蛋白,注释后均为非已知转录因子。本研究通过预测转录因子基序筛选出 5 个含有转录因子基序的蛋白。其中 A0A2W1C1Y7 属于 zf-C2H2 锌指家族,定位于细胞核且质谱得分最高。在川桑(*Morus notabilis*)中利用该技术筛选获得 1 个 MYB 家族转录因

子,注释为 R1R2R3 型的 MYB 转录因子(Mn-MYB3R1),也定位于细胞核中且质谱得分与 A0A2W1C1Y7 相当(刘丹, 2020)。本研究在 NCBI 里 Blast 检索到与 A0A2W1C1Y7 匹配度最高的是棉铃虫 PRDM10l (GenBank No. XP_021190227.1),推测 A0A2W1C1Y7 是 PRDM10l,因此克隆获得 *PRDM10l* 基因,翻译后进行蛋白结构分析,发现 HaPRDM10l 有 1 个 SET 结构域和 6 个 C2H2 型锌指结构域,这与含有 1 个 SET 结构域和数量可变的 C2H2 型锌指结构的 PRDM 家族结构特征是一致的(Han et al., 2020)。此外,三级结构预测发现 HaPRDM10l 最匹配的模板是人的 PRDM10 (c3ihxB),说明 HaPRDM10l 与 PRDM10 相似,均属于 PRDM 家族。

本研究发现 *HaPRDM10l* 在棉铃虫不同发育阶段均有表达,卵期相对表达量较高,可能是该基因参与了卵内胚胎发育相关途径,涉及大量的细胞分化,促进虫卵到 1 龄幼虫的发育。Park 等(2010)发现 *PRDM10* 可在小鼠的多种胚胎中表达,推测 *PRDM10* 可能是胚胎发育过程中正常组织分化的转录调节因子。同样 *HaPRDM10l* 的表达也存在组织差异性,其在 6 龄棉铃虫的头部、体壁、脂肪体和中肠中均有表达,且在中肠中相对表达量最高,中肠作为主要的消化器官要进行食物到能量的转换,可能涉及较多的物质与能量的代谢。因此,推测 *HaPRDM10l* 可能在棉铃虫的生长发育和关键代谢过程中发挥作用。同时,用不同浓度 2-TD 处理棉铃虫后,发现 *HaPRDM10l* 和 *CYP6B6* 的相对表达量总体随着时间先升高后降低。*HaPRDM10l* 和 *CYP6B6* 在低浓度的 2-TD 短时间处理时相对表达量增加,而随着 2-TD 浓度增大处理时间延长相对表达量减少,诱导作用减弱,甚至出现抑制效果,该结果与前期研究 2-TD 胁迫后棉铃虫 P450s 家族基因表达的规律相似,低浓度短时间处理表现为诱导增加,高浓度长时间处理则一般表现为诱导抑制(刘小宁, 2005; Liu et al., 2006)。*HaPRDM10l* 和 *CYP6B6* 的相关性分析发现,不同浓度的 2-TD 处理 6 h 后二者呈正相关($r=0.749$, $P<0.01$),表明 2-TD 短时间处理时 *HaPRDM10l* 相对表达量增加可能正向调控使 *CYP6B6* 的表达量也增加,说明 HaPRDM10l 可能是 *CYP6B6* 的正调控因子。石津(2018)也经过功能验证及相关性分析后成功筛选出 *ShxA* 的负调控因子。本课题组后续将通过 RNA

干扰实验对 *HaPRDM10l* 功能进行进一步解析,以期明确 *HaPRDM10l* 如何调控 *CYP6B6* 表达来响应 2-TD 的诱导。本研究不仅为棉铃虫代谢 2-TD 的机制提供了素材,也为棉铃虫生态绿色防控提供了新思路。

4 结论

本研究通过 DNA pull down 技术以 *CYP6B6* 启动子上响应 2-十三烷酮的核心序列 HE1 作为探针,筛选出棉铃虫正性调节区锌指类似蛋白 10 (*HaPRDM10l*)。通过 PCR 方法克隆并鉴定了 *HaPRDM10l* 基因,qPCR 分析表明 *HaPRDM10l* 在 5 龄幼虫表达量最高;在 6 龄幼虫的不同组织中,中肠表达量最高。2-TD 对 *HaPRDM10l* 的诱导作用随着处理时间延长而逐渐减弱,在 10 mg/g 处理 12 h 后达到最大值,处理 6 h 时与 *CYP6B6* 呈正相关,说明 *HaPRDM10l* 可以响应 2-TD 的诱导,可能调控 *CYP6B6* 的表达。本研究结果可以为棉铃虫耐药性形成的机制提供参考,并为棉铃虫的无害化防控提供分子靶标。

参考文献

李芬,马纪,刘小宁. 2012. 棉铃虫细胞色素 P450 *CYP6B6* 基因启动子的活性分析[J]. 新疆大学学报:自然科学版, 29(1): 13-18. (Li F, Ma J, Liu X N. 2012. Activity analysis of the promoter of cytochrome P450 *CYP6B6* gene in *Helicoverpa armigera*[J]. Journal of Xinjiang University: Natural Science Edition, 29(1): 13-18.)

刘丹. 2020. 桑树多酚氧化酶基因抗逆功能研究[D]. 博士学位论文,西南大学,导师: 向仲怀,何宁佳, pp. 60-74. (Liu D. Study on the anti-stress function of mulberry polyphenol oxidase gene[D]. Thesis for Ph.D, Southwest University, Supervisor: Xiang Z H, He N J, pp. 60-74.)

刘小宁. 2005. 植物次生物质对棉铃虫细胞色素 P450s 的诱导及 *CYP6B6* 基因的克隆与表达[D]. 博士学位论文,中国农业大学,导师: 高希武, pp. 67-73. (Liu X N. 2005. Induction of *Helicoverpa armigera* cytochrome P450s by plant secondary materials and cloning and expression of *CYP6B6* gene[D]. Thesis for Ph.D, China Agricultural University, Supervisor: Gao X W, pp. 67-73.)

刘小宁,李芬,张学涛,等. 2014. 2-十三烷酮诱导棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)细胞色素 P450 *CYP6B6* 时空表达规律的研究[J]. 干旱区研究, 31(5): 978-983. (Liu X N, Li

F, Zhang X T, et al. 2014. Study on the spatiotemporal expression of cytochrome P450 *CYP6B6* in *Helicoverpa armigera* induced by 2-tridecane[J]. Arid Zone Research, 31(5): 978-983.)

吕敏,孙姗姗,王丽红,等. 2012. 植物次生物质对棉蚜谷胱甘肽 S-转移酶和羧酸酯酶活性的诱导作用[J]. 中国农业通报, 28(3): 253-256. (Lv M, Sun H H, Wang L H, et al. 2012. Effects of secondary metabolites on activities of glutathione s-transferases, carboxylesterase in Aphid [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 28(3): 253-256.)

石津. 2018. 家蚕 *ShxA*, *ShxC1* 基因启动子鉴定及表达调控研究[D]. 硕士学位论文,西南大学,导师: 童晓玲,代方银, pp. 39-50. (Shi J. 2018. Identification and expression regulation of *ShxA* and *ShxC1* gene promoters in silkworm, *Bombyx mori*[D]. Thesis for M.S., Southwest University, Supervisor: Tong X L, Dai F Y, pp. 39-50.)

石鑫,李莎,王志敏,等. 2021. 新疆马铃薯甲虫对噻虫嗪的抗性监测及其细胞色素 P450 基因表达分析[J]. 中国农业科学, 54(14): 3004-3016. (Shi X, Li S, Wang Z M, et al. 2021. Resistance monitoring to thiamethoxam and expression analysis of cytochrome P450 genes in *Leptinotarsa decemlineata* from Xinjiang[J]. Scientia Agricultura Sinica, 54(14): 3004-3016.)

杨希晨. 2016. 大肠杆菌 *esrE* 基因转录调控解析[D]. 硕士学位论文,华东理工大学,导师: 张惠展, pp. 31-33. (Yang X C. 2016. Analysis of transcription regulation of *Escherichia coli esrE* gene[D]. Thesis for M.S., East China University of Science and Technology, Supervisor: Zhang H Z, pp. 31-33.)

赵洁,任苏伟,刘宁,等. 2018. 棉铃虫磷脂酰乙醇胺结合蛋白的克隆及表达分析[J]. 中国农业科学, 51(8): 1493-1503. (Zhao J, Ren S W, Liu N, et al. 2018. Cloning and expression of phosphatidylethanolamine binding protein in *Helicoverpa armigera*[J]. Scientia Agricultura Sinica, 51(8): 1493-1503.)

Ahmad S, Cheema H M N, Khan A A, et al. 2019. Resistance status of *Helicoverpa armigera* against Bt cotton in Pakistan[J]. Transgenic Research, 28(2): 199-212.

Bruce T J A. 2014. Glucosinolates in oil seed rape: Secondary metabolites that influence interactions with herbivores and their natural enemies[J]. Annals of Applied Biology, 164(3): 348-353.

Dickinson M E, Flenniken A M, Xiao J, et al. 2016. High-throughput discovery of novel developmental phenotypes[J]. Nature, 537(7621): 508-514.

Feyereisen R. 1999. Insect P450 enzymes[J]. Annual Review

- of Entomol, 44(1): 507-533.
- Gershenzon J, Dudareva N. 2007. The function of terpene natural products in the natural world[J]. Nature Chemical Biology, 3(7): 408-414.
- Goncalves M, Maluf W R, Gomes L, et al. 1998. Variation of 2-Tridecanone level in tomato plant leaflets and resistance to two mite species (*Tetranychus* sp.) [J]. Euphytica, 104(1): 33-38.
- Han B Y, Seah M, Brooks I R, et al. 2020. Global translation during early development depends on the essential transcription factor PRDM10[J]. Nature Communications, 11(1): 3603.
- Krempl C, Joupen N, Reichelt M, et al. 2021. Consumption of gossypol increases fatty acid-amino acid conjugates in the cotton pests *Helicoverpa armigera* and *Heliothis virescens*[J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 108(3): e21843.
- Li F, Liu X N, Zhu Y, et al. 2014. Identification of the 2-tridecanone responsive region in the promoter of cytochrome P450 *CYP6B6* of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. Bulletin of Entomological Research, 104(6): 801-808.
- Li X, Baudry J, Berenbaum M R, et al. 2004. Structural and functional divergence of insect CYP6B proteins: From specialist to generalist cytochrome P450[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 101(9): 2939-2944.
- Li X, Berenbaum M R, Schuler M A. 2000. Molecular cloning and expression of *CYP6B8*: A xanthotoxin-inducible cytochrome P450 cDNA from *Helicoverpa zea*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 30(1): 75-84.
- Li X X, Li R, Zhu B, et al. 2017. Overexpression of cytochrome P450 *CYP6BG1* may contribute to chlorantraniliprole resistance in *Plutella xylostella* (L.) [J]. Pest Management Science, 74(6): 1386-1393.
- Liu X N, Liang P, Gao X W, et al. 2006. Induction of the cytochrome P450 activity by plant allelochemicals in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 84(2): 127-134.
- Ma K, Tang Q, Zhang B, et al. 2019. Overexpression of multiple cytochrome P450 genes associated with sulfoxaflor resistance in *Aphis gossypii* Glover[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 157: 204-210.
- Mckenzie N, Helson B, Thompson D, et al. 2010. Azadirachtin: An effective systemic insecticide for control of *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae)[J]. Journal of Economic Entomology, 103(3): 708-717.
- Mordue A J, Blackwell A. 1993. Azadirachtin: An update[J]. Journal of Insect Physiology, 39(11): 903-924.
- Park J A, Kim K C. 2010. Expression patterns of PRDM10 during mouse embryonic development[J]. Biochemistry and Molecular Biology, 43(1): 29-33.
- Petersen R A, Zangerl A R, Berenbaum M R, et al. 2001. Expression of *CYP6B1* and *CYP6B3* cytochrome P450 monooxygenases and furanocoumarin metabolism in different tissues of *Papilio polyxenes* (Lepidoptera: Papilionidae) [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 31(6-7): 679-690.
- Sorrentino A, Federico A, Rienzo M, et al. 2018. PR/SET Domain Family and Cancer: Novel Insights from the Cancer Genome Atlas[J]. International Journal of Molecular Sciences, 19(10): 32-50.
- Woo J, Jin B H, Lee M, et al. 2021. Investigation of PRDM10 and PRDM13 expression in developing mouse embryos by an optimized pact-based embryo clearing method[J]. International Journal of Molecular Sciences, 22(6): 2892.
- Zhang B L, Wang Z, Guo T Z. 2019. Inheritance of transgenes in transgenic Bt lines resistance to *Helicoverpa armigera* in upland cotton[J]. Methods in Molecular Biology, 1902: 199-210.
- Zhou C X, Zhou H Y, Fang H L, et al. 2020. Spo0A can efficiently enhance the expression of the alkaline protease gene *aprE* in *Bacillus licheniformis* by specifically binding to its regulatory region[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 159: 444-454.
- Zhou X, Sheng C, Mei L, et al. 2010. Expression responses of nine cytochrome P450 genes to xenobiotics in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera*[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 97(3): 209-213.