

李长春, 宁青, 戴余军, 等. 拟环纹豹蛛谷胱甘肽 S-转移酶基因的克隆及表达分析[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(5): 1068-1074.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2019.05.010

拟环纹豹蛛谷胱甘肽 S-转移酶基因的克隆及表达分析

李长春¹, 宁青^{1,2}, 戴余军¹, 王立华¹, 李国元¹, 彭宇²

(1. 湖北工程学院特色果蔬质量安全控制湖北省重点实验室, 湖北 孝感 432000; 2. 湖北大学生命科学学院省部共建生物催化与酶工程国家重点实验室, 湖北 武汉 430062)

摘要: 为研究拟环纹豹蛛谷胱甘肽 S-转移酶(GST)基因碱基序列及其对镉胁迫的响应, 本研究在转录组测序的基础上, 通过 RT-PCR 克隆了拟环纹豹蛛的 GST 基因(*PpGST*), 用生物信息学方法对其序列特征进行分析, 并采用荧光定量 PCR 检测了镉胁迫下 *PpGST* 基因的相对表达量。结果表明, 克隆获得的 *PpGST* (GenBank 登录号为 KY454857) 基因编码区长 654 bp, 可编码 1 个 217 个氨基酸的蛋白质, 该蛋白质理论分子量为 24 900, 等电点为 5.98, 具有 GST 蛋白家族保守的 N 端结构域和 C 端结构域, 与温室拟肥腹蛛(*Parasteatoda tepidariorum*) GST 蛋白 Delta 型有较高的相似性(65%)。荧光定量 PCR 分析结果显示, 镉胁迫下 *PpGST* 基因的表达量显著增加($P < 0.05$), 暗示其在抵御镉胁迫中可能发挥了重要作用。

关键词: 拟环纹豹蛛; 谷胱甘肽 S-转移酶; 基因克隆; 表达分析

中图分类号: Q785 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2019)05-1068-07

Cloning and expression analysis of glutathione S-transferase gene in *Pardosa pseudoannulata*

LI Chang-chun¹, NING Qing^{1,2}, DAI Yu-jun¹, WANG Li-hua¹, LI Guo-yuan¹, PENG Yu²

(1. Hubei Key Laboratory of Quality Control of Characteristic Fruits and Vegetables, Hubei Engineering University, Xiaogan 432000, China; 2. The State Key Laboratory of Biocatalysis and Enzyme Engineering of China, College of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, China)

Abstract: To analyze glutathione S-transferase (GST) gene sequence of the wolf spider *Pardosa pseudoannulata* and its response to cadmium (Cd) stress, GST gene of the *P. pseudoannulata* (*PpGST*) was cloned using RT-PCR technique, based on the transcriptomic data. The sequence characteristics of *PpGST* gene were analyzed by bioinformatics. The relative expression levels of *PpGST* gene under cadmium stress were investigated by real-time fluorescent quantitative RT-PCR. The coding region of the *PpGST* gene (GenBank accession No. KY454857) was 654 bp in length, and the gene could encode a protein of 217 amino acid residues. The theoretical molecular weight of the protein was 24 900, and the isoelectric point was 5.98. The predicted protein contained the conservative N-terminal domain and C-terminal domain of the GST protein family. The deduced amino acid sequence of *PpGST* shared high homology with GST Delta of *Parasteatodapedariorum* (65%). Fluorescence quantitative PCR analysis

results showed that the expression level of *PpGST* increased significantly under Cd stress, suggesting that it might play an important role in response to Cd stress.

Key words: *Pardosa pseudoannulata*; glutathione S-transferase; gene cloning; expression analysis

收稿日期: 2019-01-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(31672317); 湖北省自然科学基金面上项目(2017CFB609); 区域开发与环境响应湖北省重点实验室(湖北大学)开放基金项目(2016C002); 特色果蔬质量安全控制湖北省重点实验室(湖北工程学院)开放基金项目(2017K02)

作者简介: 李长春(1976-), 男, 湖北广水人, 博士, 副教授, 主要从事动物毒理学研究。(E-mail) lcc386@163.com

通讯作者: 彭宇, (E-mail) pengyu@hubu.edu.cn

谷胱甘肽 S-转移酶(GST)是广泛存在于脊椎动物和无脊椎动物的多功能超家族酶, 在细胞抵御不同的环境污染过程中发挥解毒和抗氧化功能^[1-2]。GST

作为Ⅱ相代谢酶,主要催化内源或外源性物质的亲电子基团与还原型谷胱甘肽的巯基结合,形成易溶解或无毒性的衍生物,从而降低其毒害。某些 GST 还具有谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)活性,可以清除脂氧化的次级产物,在抵抗环境污染物的防御机制中发挥核心作用^[3]。昆虫体内 GST 清除自由基的能力大小可影响昆虫在高浓度有毒化学物质处理时的适应性^[4]。用杀虫畏、林丹和乐果等杀虫剂筛选的家蝇(*Musca domestica*)体内 GST 活性显著提高^[5]。暗豹蛛(*Pardosa lugubris*)雄蛛体内 GST 活性与栖息地土壤 Pb、Zn 含量显著相关^[6]。褐飞虱(*Nilaparvata lugens*) GST 通过发挥 GPx 活性消除脂质过氧化中间体,降低细胞氧化损伤^[7]。近年来,关于动物 GST 基因克隆和功能分析的研究越来越多,主要集中在水生动物和昆虫^[8],如日本扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)^[9]、二化螟(*Chilo suppressalis*)^[10]、飞蝗(*Locusta migratori*)^[11]等,关于蜘蛛 GST 基因的研究鲜有报道。

蜘蛛在中国农田广泛分布,种类多、数量大、繁殖快,是重要的农业害虫捕食性天敌^[12-15]。大量研究结果表明,环境中的重金属能够通过摄食、呼吸和表皮接触等途径在蜘蛛体内大量富集。由于蜘蛛独特的生理适应机制,使其成为一种具有潜在应用价值的环境重金属指示生物^[16-19]。本研究在通过高通量测序获得拟环纹豹蛛(*Pardosa pseudoannulata*)转录组数据的基础上^[20],利用 RT-PCR 技术对拟环纹豹蛛 GST 基因进行了克隆和序列分析,并分析了其在不同浓度镉胁迫下的表达,为深入研究拟环纹豹蛛 GST 基因响应重金属胁迫的分子机理以及利用蜘蛛作为农田害虫天敌和重金属污染指示生物提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

拟环纹豹蛛亚成蛛采自武汉马鞍山森林公园(30°52'N, 114°31'E),单头置于试管后放人工气候箱饲养,温度为(26±1)℃,相对湿度为70%,光照周期为14 h:10 h(昼:夜)。雌蛛成熟2 d后,用0.2 mmol/L和2.0 mmol/L CdCl₂溶液为饮用水染毒处理,对照以 ddH₂O 为饮用水。每处理3个生物学重复,每个重复不少于6头蜘蛛。处理7 d后液氮速冻保存备用。

RNA 提取试剂盒、PrimerScript[®] RT Reagent Kit With gDNA Eraser 基因组 DNA 去除及反转录试剂盒、

dNTP、ExTaq 酶、DL2000 DNA marker 购自大连宝生物(TaKaRa)工程有限公司,EasyPure[®] Quick Gel Extraction Kit 胶回收试剂盒、pEASY[®] -T1cloning Kit 克隆载体、Trans 5α 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司, SanPrep 柱式质粒小量提取试剂盒购自上海生工生物工程股份有限公司, Gray-96G 基因扩增仪购自上海山富科学仪器有限公司, Bio-Best 200M 凝胶成像系统购自美国西蒙公司, Viia[™] 7 实时荧光定量 PCR 仪购自美国应用生物系统公司。

1.2 试验方法

1.2.1 RNA 提取与 cDNA 的制备 参照大连宝生物试剂盒说明书,提取拟环纹豹蛛雌成蛛的总 RNA。以提取的 RNA 为模板,用 Random 6 mers 和 OligodT primer 引物反转录合成 cDNA。

1.2.2 GST 基因的扩增 根据转录组测序和注释获得的 GST 基因序列用 Primer5.0 软件设计引物, GST-F: 5'-GTTATCGGTCGCTGAAAGAGGC-3', GST-R: 5'-AAGTTATGGAGGAGAAATATCAA-3, 以拟环纹豹蛛 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。20.0 μl 反应体系为: cDNA 模板 1.0 μl、10×PCR buffer 2.0 μl、MgCl₂ (25 mmol/L) 1.6 μl、dNTPs mixture (10 μmol/L) 1.0 μl、上下游引物各 1.0 μl、DNA 聚合酶 0.2 μl、ddH₂O 12.2 μl。反应条件为: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环后 72℃ 反应 7 min。

1.2.3 基因克隆与测序 扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳纯化, EasyPure[®] Quick Gel Extraction Kit 回收后连接克隆载体 pEASY-T1, 转化大肠杆菌 Trans 5α 感受态细胞, 氨苄青霉素筛选阳性克隆。重组子鉴定后送武汉天一辉远生物科技有限公司测序。

1.2.4 生物信息学分析 用 NCBI BLAST 工具(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行 BLAST 分析, 采用在线软件 NCBI ORF Finder 分析克隆基因的 ORF, 用 ProtParam (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam>)分析编码蛋白质的分子式、分子量和等电点等, 用 ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale>)分析该蛋白质的疏水性, 用 SWISS-MODEL 数据库 (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>)预测蛋白质的三级结构, 用 MEGA5.2 软件采用 Neighbour-Joining 法构建系统发育树, 其中 bootstrap 值设置为 1 000。

1.2.5 Cd 胁迫下 PpGST 基因的表达分析 根据测序

结果,用 Primer5.0 软件设计定量分析引物,*ppGST-F*: 5'-GCCAAAAGAGTGGCCGATGTC-3', *ppGST-R*: 5'-GAAAGCCGTGCTGTCCAAA-3',分别用镉处理组和对照蜘蛛的 cDNA 为模板,参照 SYBR Premix *Ex Taq*TM II(TliRNaseH Plus, ROX plus)手册进行定量扩增。20.0 μ l 反应体系为:SYBR Premix *Ex Mix* 10.0 μ l、上下游引物各 0.8 μ l、cDNA 模板 2.0 μ l、ddH₂O 6.4 μ l。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s;95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,40 个循环;在 60 $^{\circ}$ C 到 95 $^{\circ}$ C 温度范围采集熔解曲线分析数据。所有样品 3 次技术重复和 3 次生物学重复。用 β -actin 基因做内参,内参引物为: β -actin-F: 5'-TGTCGCCCTTGGACTTTGAGC-3', β -actin-R: 5'-CATTGCCGATGGTGATAACT-3'。反应结束后,用 2^{- $\Delta\Delta$ CT}法计算处理组和对照组各基因的表达水平。不同浓度镉胁迫下 *PpGST* 基因表达量差异用 Student's *t* 检验,采用 SPSS 20.0 软件进行数据显著性分析。

2 结果及分析

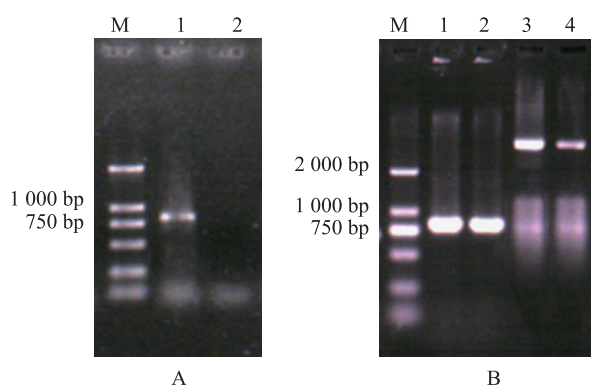
2.1 拟环纹豹蛛 *GST* 基因克隆与测序

本研究前期通过对拟环纹豹蛛的转录组测序、组装和注释,获得了 1 条长度为 909 bp 的 Unigene (c91520.graph_c0),被注释为 *GST* 基因。根据该组装序列设计 *GST* 基因特异性引物,以拟环纹豹蛛雌成蛛总 RNA 逆转录合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。电泳检测图谱(图 1A)显示,在 850 bp 处扩增出清晰、明亮的条带,大小符合预期。

凝胶回收 PCR 扩增得到的基因碱基序列,克隆到 *pEASY*[®]-T1 克隆载体,菌落 PCR 筛选阳性克隆,质粒 PCR 电泳检测结果(图 1B)表明,PCR 扩增条带大小在 850 bp 左右,条带清晰,无杂带,符合进一步测序检测要求。

2.2 拟环纹豹蛛 *GST* 基因及其推导的氨基酸序列

将 PCR 筛选得到的阳性菌落接种到 LB 液体培养基中培养,取 1 ml 菌液测序。测序结果与转录组测得序列经 Genetool 软件比对显示碱基序列一致。将获得的序列在 GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) 在线分析,结果表明,所克隆的拟环纹豹蛛 *GST* 基因包含 1 个 654 bp 的 ORF,共编码 217 个氨基酸(图 2),命名为 *PpGST*。将所得的序列提交 GenBank,注册号为 KY454857。利用 NCBI BlastP 检索拟环纹豹蛛 *GST* 蛋白的氨基酸序列,分析结果表明,拟环纹豹蛛



A: *GST* 基因的 PCR 扩增产物;B: *GST* 重组质粒载体电泳检测。M:DL2000 DNA Marker;A 图,1:以 cDNA 为模板的 PCR 扩增产物;2:阴性对照;B 图,1,2:以重组质粒为模板的 PCR 扩增产物;3,4: *GST* 重组载体质粒

图 1 *GST* 基因扩增结果

Fig.1 The amplification results of *GST* gene

GST 蛋白与温室拟肥腹蛛 (*Parasteatoda tepidariorum*, GenBank: XP_015908377.1) 氨基酸序列相似度最高,相似性为 65%,其次是隆头蛛 (*Stegodyphus mimosarum*, GenBank: KFM73999.1),相似性为 64%。

```

1   cagaatagaactcaacctttttatgttatcggtcgtcgaagaggcttgataataagccg
61  tgaatctgtgtattattttactctcatcgtctgtgtcgaaggtacacgcttcgagttaa
121 aagatgccattgattgttactcgtctccgccagcgccgctgcgggctgtcattatg
    M P I D L Y S L P A S G P C R A V I M
181 acagctcagcatctaaaagtgaacgtgaacgtgaacgtgaacgtgaacgtgaacgt
    T A Q H L K V K L N V K N M D L F G G D
241 cagaatgaacacagagttccttcgaatgaatccacacacgtgttctctacgattgacgac
    Q M K P E F L R M N P Q H C V P T I D D
301 gatgttttacttattgggaagccgtgtgtccaaacttacttggtaataaatatgca
    D G F Y L W E S R A V Q T Y L V N K Y A
361 cctgacagttccctttatcccaagatcccaagcaagagctgtgtgtgatagatgctt
    P D S S L Y P K D P Q A R A V V D R M L
421 tactttgacatcgacactcttttcgcgactcaggagaatgctgtgccccgagttattc
    Y F D I G T L F A T Q G E W L R P Q L F
481 tatgtaaacacatctgaccctgtaaggaagaagccttcgagaagccttgaactacta
    Y G K P S D P V R E E A F E K A L E L L
541 gaagaatttttgagcaagacactttacgtgctgagcagaatcatctgtagctgatttc
    E E F L S K T L Y V A G E N I T V A D F
601 tccgtcttttcaactctgacattcgtgagacggttgcgatttcaacttcaaatcttc
    S V F S T L T F A E T V A D F N F K S F
661 ccgaaacacaaatgcattgctgcagaagtgaacacagaagtgccttaactacaaagagac
    P K T N A W L Q K L K T E V P N Y K E I
721 catgaaggtccctcctcagttcaaggaattattgaaatcgagatccaagaataaaca
    H E G P L L Q F K E L L K S R S K K *
781 attaaaaacattccgtgacacatacatgatttttacctaatacctaattgectgaa
841 tagtatttgatatttctctccataacttttaaaaaatattacttataactgttaaaa
901 aaaaaaaa

```

下划粗黑线的为 N 末端保守序列,下划双线的为 C 末端保守序列。

图 2 *PpGST* 基因核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig.2 The nucleotide and deduced amino acid sequences of *PpGST*

2.3 拟环纹豹蛛 GST 蛋白的生物信息学

用 NCBI 的 Conserved Domains 数据库对拟环纹豹蛛 GST 蛋白保守结构域预测,结果显示,拟环纹豹蛛 GST 蛋白属于 GST 家族蛋白,在第 3~76 位为保守的 N 端结构域 GST_N_Delta_Epsilon,是 GSH 的结合位点(G 位点),第 90~208 位为 C 端结构域

GST_C_Delta_Epsilon,是亲电子物质结合位点(H 位点)(图 3)。ProtParam 软件在线预测所得拟环纹豹蛛 GST 分子式为: $C_{1141}H_{1753}N_{285}O_{324}S_8$,分子量 24 090,等电点为 5.98。GST 蛋白含量最高的氨基酸为 Leu,占 11.5%,不稳定指数为 38.58,表明该蛋白质比较稳定。

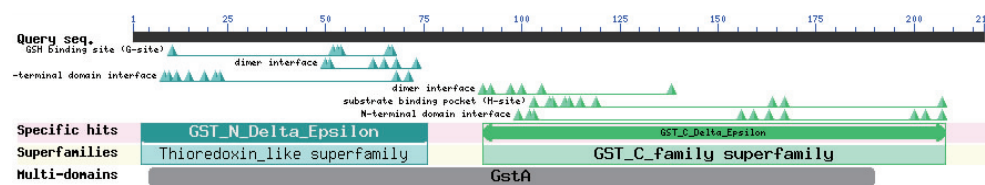


图 3 PpGST 蛋白保守区预测

Fig.3 The predicted conserved domain of PpGST protein

ProtScale 预测 GST 蛋白 126 位氨基酸处亲水性最强,得分 -2.078,158 位氨基酸处疏水性最强,得分 1.700,平均亲水系数 -0.309,整体表现为亲水性(图 4)。

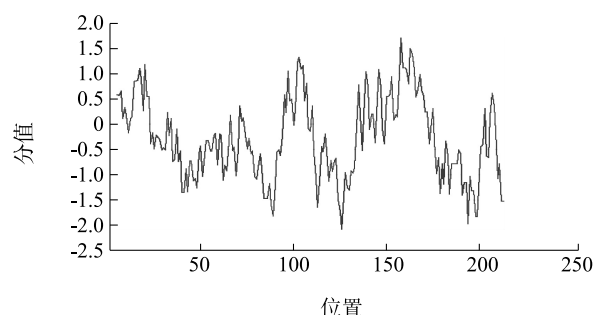


图 4 PpGST 基因推导氨基酸疏水性分析

Fig.4 Hydrophobic positions of PpGST gene

PredictProtein 预测蛋白质二级结构以 α 螺旋 (43.32%) 和无规则卷曲 (45.62%) 为主。SWISS-MODEL 预测蛋白质三级结构,结果表明拟环纹豹蛛 GST 与数据库目标蛋白质 3vk9.1A 相似度为 50.46%,匹配氨基酸范围为 1~215 位氨基酸,GMQE 值为 0.77,QMEAN4 值为 -1.94,三级结构如图 5。

从 Genbank 中下载了与 PpGST 基因质编码蛋白质相似度较高的 4 种类型 (Delta、Epsilon、Theta 和 Omega 型) 的无脊椎动物 GST 蛋白氨基酸序列 12 条,利用 NJ 法构建系统发育树,结果显示,拟环

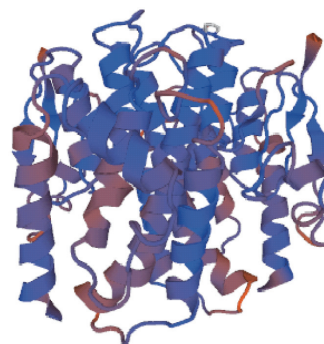


图 5 PpGST 蛋白三级结构预测

Fig.5 The predicted tertiary structure of PpGST protein

纹豹蛛与温室拟肥腹蛛 (*Parasteatoda tepidariorum*, XP_015908389.1)、东亚飞蝗 (*Locusta migratoria*, ADR30117.1)、家蚕 (*Bombyx mori*, NP_001037546.1) 和黄粉虫 (*Tenebrio molitor*, AIL23532.1) 5 个 GST 为 Delta 型,聚为一类。家蚕 (NP_001037197.1) 和黄粉虫 (AIL23537.1) 2 个 GST 为 Epsilon 型,聚为一类。黄粉虫 (AIL23552.1)、东亚飞蝗 (AHC08064.1) 和家蚕 (BAO51944.1) 3 个 GST 为 Theta 型,聚为一类。家蚕 (NP_001037406.1)、东亚飞蝗 (AHC08061.1) 和黄粉虫 (AIL23546.1) 3 个 GST 为 Omega 型,聚为一类。且拟环纹豹蛛和温室拟肥腹蛛可以明显与东亚飞蝗、家蚕和黄粉虫等分开,由此推断所克隆的 PpGST 基因为 Delta 型(图 6)。

2.4 Cd 胁迫下 PpGST 基因的表达分析

以 0.2 mmol/L 和 2.0 mmol/L $CdCl_2$ 溶液作饮用

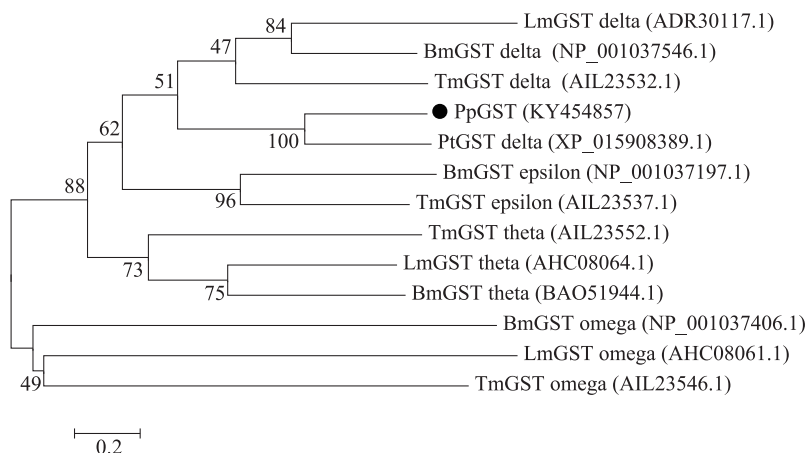
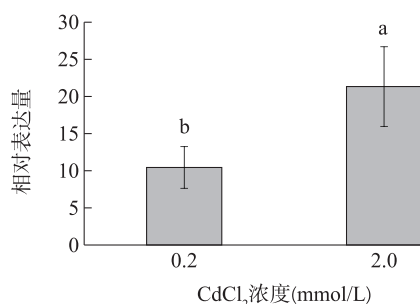


图 6 基于 GST 氨基酸序列构建的系统进化树

Fig.6 Phylogenetic tree constructed by the amino acid sequence of GST

水处理 7 d 的拟环纹豹蛛雌成蛛和对照蜘蛛的 cDNA 为模板, *PpGST*-F 和 *ppGST*-R 为引物, β -actin 为内参基因进行实时荧光定量 PCR 反应, 检测不同浓度 Cd 胁迫下 *PpGST* 基因转录水平的相对表达量。结果显示, 0.2 mmol/L 和 2.0 mmol/L CdCl₂ 胁迫下 *PpGST* 基因在转录水平的表达量分别是对照组的 10.44 倍和 21.33 倍, 均显著高于对照。2.0 mmol/L CdCl₂ 处理下 *PpGST* 基因相对表达量显著高于 0.2 mmol/L CdCl₂ 处理组 ($P < 0.05$) (图 7), 表明 Cd 胁迫诱导了拟环纹豹蛛体内 *GST* 基因的表达。



所有数据均为平均值 \pm 标准差 ($n = 3$)。柱上不同小写字母表示不同浓度 CdCl₂ 胁迫下的相对表达量存在显著差异 ($P < 0.05$)。

图 7 镉对 *PpGST* 基因表达的影响Fig.7 Effects of cadmium on expression levels of *PpGST* gene

3 讨论

本研究克隆得到的拟环纹豹蛛 *PpGST* 基因, 包含 1 个 654 bp 的完整开放阅读框, 编码 217 氨基

酸。生物信息学分析结果显示, *PpGST* 编码的蛋白质分子量约 24 900, 理论等电点为 5.98, 氨基酸序列中含有 GST 蛋白家族特有的 N 端结构域和 C 端结构域。荧光定量 PCR 分析结果表明, *PpGST* 基因在镉胁迫下表达量显著上升, 可作为拟环纹豹蛛响应环境重金属胁迫的指示标记。

目前, 研究发现昆虫体内可溶性 *GST* 至少包括 Delta、Epsilon、Omega、Sigma、Theta、Zeta 几种亚型^[21], 其中与杀虫剂等抗性相关的为昆虫特异的 Delta 和 Epsilon 家族^[22], 但蛛形纲中对 *GST* 的报道很少。利用 NCBI BlastP 分析, 结果显示, 拟环纹豹蛛 *GST* 蛋白与温室拟肥腹蛛和隆头蛛蛋白质氨基酸序列相似度最高, 分别为 65% 和 64%。系统进化分析结果显示, 本研究中所克隆的拟环纹豹蛛 *GST* 与温室拟肥腹蛛、东亚飞蝗、家蚕和黄粉虫 Delta 型 *GST* 聚为一类, 推定其为 Delta 亚型。不同亚型的 *GST* 聚成一簇, 区分明显, 说明不同亚型 *GST* 蛋白家族成员间相似性较低^[23], 这与林群等^[24] 对近江牡蛎和刘慧慧等^[25] 对厚壳贻贝 *GST* 基因的分析结果相似。本研究克隆的 *PpGST* 基因编码的蛋白质具备典型的 *GST* 结构域特征, 分别为在第 3~76 位 N 端结构域和 90~208 位的 C 端结构域。N 端结构域保守, 是由 α 螺旋和 β 折叠构成的 β - α - β - α - β - α 结构, 是 *GST* 与 GSH 结合的位点 (G 位点), C 端结构域含有约 10 个氨基酸组成的纯 α 螺旋, 为结合疏水底物的位点 (H 位点), 它们在 *GST* 解毒过程中发挥关键作用^[26-27]。

环境中的有毒物质(重金属、农药等)能够诱导生物体细胞内活性氧(Reactive oxygen species, ROS)的大量产生,过量的 ROS 会对细胞造成氧化压力,引起 DNA 损伤、蛋白质氧化和脂质过氧化^[28-29]。GST 基因编码的解毒酶在减少 ROS 产生的氧化压力和保护细胞方面发挥重要作用^[28,30]。由于 GST 对污染物反应敏感,常作为生物标记物。如,厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*) 在 Cu 和 Cd 胁迫下 GST 基因表达水平均显著升高,但 GST 对不同重金属的反应能力稍有不同^[25]。一些研究表明,Delta 和 Epsilon 家族 GST 对提高昆虫抗逆性有重要作用^[31]。二斑叶螨(*Tetranychus urtica*) 2 个 Delta 家族 GST 基因在二斑叶螨抗螺螨酯品系中的相对表达量分别为敏感品系的 5.60 倍和 3.75 倍^[32]。另有研究发现,飞蝗(*Locusta migratori*) 的解毒器官马氏管和脂肪体中 Omega 型 GST 基因的表达量远高于其他器官,推测其在解毒过程中发挥重要作用^[11]。本研究中,在 0.2 mmol/L 和 2.0 mmol/L Cd 胁迫下,拟环纹豹蛛 Delta 型 GST 活性均表现为显著上调,表明该基因在缓解 Cd 胁迫时发挥了作用。由于 GST 家族成员众多,有关其他亚型的 GST 对 Cd 胁迫的响应机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] PICKETT C B, AYH L U. Glutathione S-transferases: gene structure, regulation and biological function[J]. Annu Rev Biochem, 1989, 58(1): 743-764.
- [2] BLAGOJEVIĆ D P, GRUBOR-LAJŠIĆ G. Multifunctionality of antioxidant system in insects[J]. Arch Biol Sci, 2000, 52(4): 185-194.
- [3] SHEEHAN D, MEADE G, FOLEY V M, et al. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily[J]. Biochem J, 2001, 360(1): 1-16.
- [4] MIRČIĆ D, BLAGOJEVIĆ D, MATARUGA V P, et al. Cadmium effects on the fitness-related traits and antioxidative defense of *Lymantria dispar* L. larvae[J]. Environ Sci Pollut Res, 2013, 20(1): 209-218.
- [5] KRISTENSEN M. Glutathione S-transferase and insecticide resistance in laboratory strains and field populations of *Musca domestica* [J]. J Econ Entomol, 2005, 98(4): 1341-1348.
- [6] WILCZEK G, BABCZYŃSKA A, AUGUSTYŃIAK M, et al. Relations between metals (Zn, Pb, Cd and Cu) and glutathione-dependent detoxifying enzymes in spiders from a heavy metal pollution gradient[J]. Environ Pollut, 2004, 132(3): 453-461.
- [7] VONTAS J G, SMALL G J, HEMINGWAY J. Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*[J]. Biochem J, 2001, 357(1): 65-72.
- [8] 李绍娟, 王一泉, 赵欢, 等. 水生生物谷胱甘肽相关酶对持久性有毒物质响应机理的研究[J]. 生物技术通报, 2013(7): 24-28.
- [9] MENG X L, LIU M, JIANG K Y, et al. De novo characterization of Japanese scallop *Mizuhopecten yessoensis* transcriptome and analysis of its gene expression following cadmium exposure[J]. PLoS ONE, 2013, 8(5): e64485.
- [10] 金燕璐, 张邦贤, 林华峰. 二化螟谷胱甘肽-S-转移酶基因的鉴定与表达模式分析[J]. 应用昆虫学报, 2018, 55(3): 349-359.
- [11] 张学尧, 王建新, 郭艳琼, 等. 飞蝗谷胱甘肽 S-转移酶基因克隆、序列分析及表达特征[J]. 昆虫学报, 2012, 55(5): 520-526.
- [12] 陈莲水, 袁凤辉, 饶军, 等. 江西永修云居山有机茶园蜘蛛多样性的调查与分析[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(7): 95-99.
- [13] 赵敬钊. 中国棉田蜘蛛[M]. 武汉: 武汉出版社, 1993.
- [14] 王小强, 曹馨月, 刘虹玲, 等. 辣椒田蜘蛛混合种群空间分布型分析[J]. 南方农业学报, 2018, 49(11): 2204-2209.
- [15] LOU Y G, ZHANG G R, ZHANG W Q, et al. Biological control of rice insect pests in China[J]. Biol Control, 2013, 67(1): 8-20.
- [16] LI C C, LI G Y, YUN Y L, et al. The effect of cadmium exposure on fitness-related traits and antioxidant responses in the wolf spider, *Pardosa pseudoannulata* [J]. Bull Environ Contam Toxicol, 2016, 97: 31-36.
- [17] CHEN X Q, ZHANG Z T, LIU R, et al. Effects of the metals lead and zinc on the growth, development, and reproduction of *Pardosa astrigera* (Araneae: Lycosidae) [J]. Bull Environ Contam Toxicol, 2011, 86: 203-207.
- [18] JUNG C S, LEE S B, JUNG M P, et al. Accumulated heavy metal content in wolf spider, *Pardosa astrigera* (Araneae: Lycosidae), as a bioindicator of exposure[J]. J Asia-Pac Entomol, 2005, 8(2): 185-192.
- [19] SHAO X L, PENG Y, HOSE G C, et al. Spider webs as indicators of heavy metal pollution in air[J]. Bull Environ Contam Toxicol, 2006, 76(2): 271-277.
- [20] LI C C, WANG Y, LI G Y, et al. Transcriptome profiling analysis of wolf spider *Pardosa pseudoannulata* (Araneae: Lycosidae) after cadmium exposure[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17: 2033.
- [21] FROVA C. Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives[J]. Biomol Eng, 2006, 23(4): 149-169.
- [22] CHELVANAYAGAM G, PARKER MW, BOARD PG. Fly fishing for GSTs: a unified nomenclature for mammalian and insect glutathione transferases[J]. Chem-Biol Interact, 2001, 133: 256-260.
- [23] 易乐飞, 郝伟, 李信书, 等. 条斑紫菜 Mu 型谷胱甘肽 S-转移酶基因克隆与分析[J]. 水产科学, 2016, 35(1): 67-71.
- [24] 林群, 梁旭方, 胡永乐, 等. 近江牡蛎 4 种类型 GST 基因 cDNA 全序列的克隆与分析[J]. 生态毒理学报, 2009, 4(2):

- 237-243.
- [25] 刘慧慧, 何建瑜, 赵荣涛, 等. 重金属胁迫下厚壳贻贝谷胱甘肽 *S*-转移酶基因表达分析[J]. 海洋与湖沼, 2014, 45(2): 274-280.
- [26] SINGH M, SILV A E, SCHULZE S, et al. Cloning and characterization of a new theta-class glutathione *S*-transferase (*GST*) gene, *gst-3*, from *Drosophila melanogaster* [J]. Gene, 2000, 247(1/2): 167-173.
- [27] YAMAMOTO K, ZHANG P, MIAKE F, et al. Cloning, expression and characterization of the theta-class glutathione *S*-transferase from the silkworm *Bombyx mori* [J]. Comp Biochem Phys B, 2005, 141(3): 340-346.
- [28] RANI A, KUMAR A, LAL A, et al. Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review [J]. Int J Environ Health Res, 2014, 24(4): 378-399.
- [29] WANG Y, FANG J, LEONARD S S, et al. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species [J]. Free Radic Biol Med, 2004, 36(11): 1434-1443.
- [30] KETTERMAN A J, SAISAWANG C, WONGSANTICHON J. Insect glutathione transferases [J]. Drug Metab Rev, 2011, 43(2): 253-265.
- [31] LUMJUAN N, RAJATILEKA S, CHANGSOM D, et al. The role of the *Aedes aegypti* epsilon glutathione transferases in conferring resistance to DDT and pyrethroid insecticides [J]. Insect Biochem Mol Biol, 2011, 41(3): 203-209.
- [32] LUY J J, WANG J J, ZHANG S F, et al. Cloning and expression profiling of glutathione *S*-transferase genes in the spirodiclofen-resistant of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) [J]. Acta Entomologica Sinica, 2013, 56(6): 438-445.

(责任编辑:陈海霞)