



朱砂叶螨硒代谢通路基因筛选及硒磷酸合成酶 TcSPS1 的原核表达和特性分析

张梦宇[#], 戚翠翠[#], 胡 佳, 徐志峰^{*}

(西南大学植物保护学院, 重庆 400715)

摘要:【目的】本研究旨在筛选朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus* 硒代谢通路的关键基因, 探究其在朱砂叶螨硒代谢中的功能。【方法】使用基因克隆技术对 8 条朱砂叶螨硒代谢通路基因进行克隆; 利用 qPCR 技术检测这些基因在不同浓度(0, 5, 20 和 50 $\mu\text{mol/L}$) 亚硒酸钠(Na_2SeO_3) 处理的豇豆苗上饲养 3 d 的朱砂叶螨品系(短期硒饲养品系)雌成虫间以及朱砂叶螨普通品系(豇豆苗饲养)和长期硒饲养品系(20 $\mu\text{mol/L}$ Na_2SeO_3 处理的豇豆苗饲养超 1 年)雌成虫间的表达量差异, 并分析它们对硒诱导的表达响应; 原核表达差异表达基因 *TcSPS1*, 并测定获得的重组蛋白生化特性。【结果】成功克隆了朱砂叶螨硒代谢通路的 8 条基因 *TcTxnrd1*, *TcTxnrd2*, *TcSPS1*, *TcSPS2*, *TcSPS2-1*, *TcSPS2-2*, *TcSG* 和 *TcPSTK*。qPCR 结果表明 *TcSPS1* 和 *TcTxnrd2* 在短期硒饲养和长期硒饲养朱砂叶螨品系中均上调表达, 且 *TcSPS1* 的表达量变化与硒浓度变化密切相关。原核表达系统成功获得 *TcSPS1* 可溶性重组蛋白, 测得其重组蛋白比活力为 2.366 ± 0.046 nmol/mg pro·min, K_m 和 $V_{\max}$ 值分别为 10.054 ± 0.062 $\mu\text{mol/L}$ 和 29.633 ± 1.777 nmol/mg pro·min。【结论】通过硒代谢通路基因分析, 初步解释了朱砂叶螨对硒的适应的分子机制, 并证明了上调表达的 *TcSPS1* 基因在朱砂叶螨产生对硒的适应中起着重要的功能。

关键词: 朱砂叶螨; 硒; 硒代谢通路; 硒磷酸合成酶; 差异表达基因; 原核表达; 酶活性

中图分类号: S433.7 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2021)05-0566-08

Screening of selenium metabolism pathway genes in *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae) and the prokaryotic expression and characterization of selenophosphate synthetase TcSPS1

ZHANG Meng-Yu[#], QI Cui-Cui[#], HU Jia, XU Zhi-Feng^{*} (College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: 【Aim】 This study aims to screen the key genes in the selenium metabolism pathway of *Tetranychus cinnabarinus* and to explore their functions in selenium metabolism in *T. cinnabarinus*.

【Methods】 The gene cloning technology was used to clone eight genes in the selenium metabolism pathway of *T. cinnabarinus*. The differences in the expression levels of these genes in female adults of the short-term selenium-reared strain of *T. cinnabarinus* with different concentrations of Na_2SeO_3 (fed with cowpea seedlings treated with 0, 5, 20 and 50 $\mu\text{mol/L}$ Na_2SeO_3 for 3 d), and in female adults of the normal strain (fed with cowpea seedlings) and the long-term selenium-reared strain (fed with cowpea

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0200505-2, 2017YFD0202002-7); 国家自然科学基金项目(31972297, 31801759)

作者简介: 张梦宇, 女, 1996 年 5 月生, 河南焦作人, 硕士研究生, 研究方向为农药毒理学, E-mail: zmy9658@163.com; 戚翠翠, 女, 1995 年 9 月生, 河南郑州人, 硕士研究生, 研究方向为农药毒理学, E-mail: qcc1101@163.com

[#]共同第一作者 Authors with equal contribution

^{*}通讯作者 Corresponding author, E-mail: xzf2018@swu.edu.cn

收稿日期 Received: 2020-08-31; 接受日期 Accepted: 2020-12-17

seedlings treated with 20 $\mu\text{mol/L}$ Na_2SeO_3 for over one year) were detected by qPCR, and the expression responses of these genes to selenium induction were analyzed. Finally, the prokaryotic expression system was used to express one differentially expressed gene *TcSPS1*, and the biochemical characteristics of the obtained recombinant protein were assayed. 【Results】 Eight selenium metabolism pathway genes of *T. cinnabarinus* were successfully cloned, including *TcTxnrd1*, *TcTxnrd2*, *TcSPS1*, *TcSPS2*, *TcSPS2-1*, *TcSPS2-2*, *TcSG*, and *TcPSTK*. qPCR results showed that only *TcSPS1* and *TcTxnrd2* were up-regulated in both the short-term selenium-reared strain and long-term selenium-reared strain of *T. cinnabarinus*. Among them, the expression level of *TcSPS1* was closely dependent on the selenium concentration. The soluble recombinant protein of *TcSPS1* was successfully obtained using the prokaryotic expression system. The specific activity and the K_m and $V_{\max}$ values of the recombinant TcSPS1 were measured to be 2.366 ± 0.046 nmol/mg pro $\cdot$ min, 10.054 ± 0.062 $\mu\text{mol/L}$ and 29.633 ± 1.777 nmol/mg pro $\cdot$ min, respectively. 【Conclusion】 Through the analysis of selenium metabolism pathway genes, the molecular mechanism of the adaptation of *T. cinnabarinus* to selenium was preliminarily explained, and it was proved that the up-regulated expression of the TcSPS1 gene plays an important function in the adaptation of *T. cinnabarinus* to selenium.

Key words: *Tetranychus cinnabarinus*; selenium; selenium metabolism pathway; selenophosphate synthetase; differentially expressed gene; prokaryotic expression; enzyme activity

硒是哺乳动物和许多细菌、藻类等生物的一种必需微量元素,在自然界中主要以亚硒酸盐的形式存在(韩晓霞等, 2012)。在选择性取食研究中,植食性害虫在取食了富硒植物后,选择转移到低硒植物上取食,例如甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 对不同形式和浓度的硒的摄食反应中,添加到饲料中的硒会影响甜菜夜蛾对宿主植物的选择,一定浓度下的硒可以作为甜菜夜蛾幼虫的拒食剂(Vickerman and Trumble, 1999)。在非选择性取食研究中,大量的植食性昆虫被迫食用富含硒的超积累体植物后都表现出中毒和高死亡率,例如蟋蟀取食富硒植物芥菜 *Brassica juncea* 后会大量死亡(Freeman *et al.*, 2007)。这些研究表明,植物可以通过富集硒来防御食草动物和病原体的攻击,植物硒含量的增加会影响食草动物的取食、生长、繁殖,甚至导致其死亡。硒在昆虫生理上的最适范围很窄,超过临界浓度则毒性很强,因此硒在植物对害虫的防御中具有重要意义。

耐硒的小菜蛾 *Plutella xylostella* 取食十字花科植物醉蝶花羽叶 *Stanleya pinnata* 后同样积累了甲基硒代半胱氨酸,而对硒敏感的小菜蛾则以积累硒代半胱氨酸为主,研究人员推测出现这种差异的原因是耐硒小菜蛾具有防止甲基硒代半胱氨酸转化或降解为其他更有毒形式的能力(Freeman *et al.*, 2006)。在甜菜夜蛾的成虫中发现了类似于三甲基硒化物的物质,表明甜菜夜蛾成虫可以通过甲基化

和挥发来解毒过量的硒(Vickerman *et al.*, 2004)。相对于其他害虫,叶螨对硒有着更强的适应能力,二斑叶螨 *Tetranychus urticae* 可以为害含有 200 mg/kg 硒的黄芪属植物,而该浓度对许多其他植食性害虫都是有一定毒性的,可能是由于二斑叶螨通过体内富集一种类似甲基硒代半胱氨酸的有机硒化物从而增加了对高浓度硒的耐受性(Quinn *et al.*, 2010)。这些研究说明,面对植物的硒耐受性,植食性昆虫也通过各种方式去适应,有的通过改变取食行为,有的则通过把高毒的硒解毒为低毒形式的硒。但目前节肢动物中并未完全阐明硒代谢途径,已有的研究主要集中于生态学水平,其中硒代谢机制和产物的分析都是基于微生物和哺乳动物硒代谢通路的推测。

在微生物和哺乳动物硒代谢通路中,硒代蛋氨酸(SeMet)通过两条代谢途径转化为硒化物,由胱硫醚 γ -裂解酶非特异性地转化为甲基硒醇(MeSeH),然后去甲基化为硒化物。甲基硒醇也是由某些植物中含有的甲基硒代半胱氨酸(MeSeCys)通过非特异性 β 消除而产生的。另一方面,转硫途径酶产生硒代半胱氨酸(Sec),随后被硒半胱氨酸裂解酶(SCLY)分解为硒化物。硫氧还蛋白(Trx)和硫氧还蛋白还原酶(TrxR)或谷胱甘肽还原酶(GSH)通过中间硒二谷胱甘肽(GSSeGS)可以催化无机亚硒酸盐还原为硒化物(Cupp-Sutton and Ashby, 2016; Tobe and Mihara, 2018)。而硒化物在硒磷酸合成酶(SPS)的作用下转化为硒磷酸(SeP),

并在硒代半胱氨酸合酶的作用下结合各种因子合成硒蛋白,进而被生物体所利用 (Tobe and Mihara, 2018)。

面对植物的防御体系,植食性昆虫及害螨在选择压力的作用下演化出多种反防御机制以维持种群发展,朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus* 属于蛛形纲 (Arachnida) 真螨总目 (Acariformes) 叶螨科 (Tetranychidae),在我国分布广泛,是一种严重危害棉花、蔬菜等经济作物的农业害螨 (洪晓月, 2012; van Leeuwen *et al.*, 2012)。本研究所使用的朱砂叶螨对植物的硒耐受性也同样可以形成适应能力。基于朱砂叶螨普通和硒适应品系,本研究拟分析朱砂叶螨硒通路基因在短期硒处理和长期硒适应中的表达量变化,进而鉴定硒通路响应基因的功能,探究朱砂叶螨对高浓度硒耐受性的分子机制。研究结果不仅可初步明确叶螨适应植物硒耐受性的机制,也可探索硒对植食性害螨的防控方法提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试虫

朱砂叶螨普通品系 Tc 采自重庆北碚田间,一直在室内以珍珠土培育的豇豆 *Vigna unguiculata* 隔离饲养。饲养设备为恒温光照培养箱,温度控制在 $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$,相对湿度控制在 $55\% \sim 75\%$,光周期设定为 14L: 10D。

朱砂叶螨长期硒饲养品系 (TcSe) 为用 $20 \mu\text{mol/L}$ 亚硒酸钠 (Na_2SeO_3) 溶液和珍珠土培育的豇豆苗长期饲喂 (已超过 1 年) 的朱砂叶螨。饲养条件为恒温光照培养箱,温度控制在 $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$,相对湿度控制在 $55\% \sim 75\%$,光照周期设定为 14L: 10D。短期硒处理朱砂叶螨为在 0, 5, 20 和 $50 \mu\text{mol/L}$ 亚硒酸钠 (Na_2SeO_3) 处理的豇豆苗上接入 200 头朱砂叶螨成螨,处理 3 d 后采集雌成螨。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成

采集 1.1 节中 Tc 和 TcSe 品系的朱砂叶螨雌成螨以及短期硒处理 3 d 的雌成螨,采用 Trizol (Life Technologies) 法提取总 RNA,150 头朱砂叶螨为一个提取样本,每个样本 3 个生物学重复。选择 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 值在 $1.8 \sim 2.0$ 的 RNA 用 RQ1 (RNA Qualified) RNase-Free DNase 试剂盒 (Promega) 去基因组进行纯化,之后用 PrimeScript™ RT Reagent Kit 9 (TaKaRa) 反转录试剂盒合成 cDNA。

1.3 朱砂叶螨硒代谢通路基因的克隆与序列分析

通过文献查找并结合二斑叶螨基因组 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/orcae/overview/Tetur>) 筛选获得硒代谢通路基因共 8 条 (Tobe and Mihara, 2018) (表 1)。使用 Primer Premier 5.0 软件设计 8 条目的基因的全长引物 (表 1)。以 1.2 节合成的 cDNA 为模板进行 PCR,扩增体系: $1.1 \times \text{T3 Super PCR Mix}$ (北京擎科生物公司) $2 \mu\text{L}$,上下游引物 ($10 \mu\text{mol/L}$) 各 $1 \mu\text{L}$, Tc 品系 cDNA $1 \mu\text{L}$ 。扩增条件: 98°C 预变性 2 min; 98°C 变性 10 s, $T_m \pm 5^{\circ}\text{C}$ 退火

表 1 引物信息
Table 1 Primer information

基因 Gene	基因 ID Gene ID	上游引物 (5' - 3') Forward primer	下游引物 (5' - 3') Reverse primer	用途 Purpose
<i>Txnrd1</i>	tetur27g00720	ATGAGACACAGTTTACTC	TCAGCAACCTTGAGCATC	基因克隆 Gene cloning
<i>Txnrd2</i>	tetur02g03190	ATGAGAAGAGCTTTTATAACTC	TTAACCACAGCAACCAGCCTGT	
<i>SPS1</i>	tetur668g00010	CAGTTCTTGTTGAATTAGATG	CATCATGGGAGACAAACCAAA	
<i>SPS2</i>	tetur668g00020	ATGTTTTIAGGTGCACGCTCTTA	TTACCATAGTTCACCATCTTT	
<i>SPS2-1</i>	tetur32g00770	ATGCACCAACATATGGG	TTACCATAGTTCACC	
<i>SPS2-2</i>	tetur32g00780	ATGGTTCAAACAGTTGAT	TTACCATAGTTCACCATC	
<i>SG</i>	tetur16g00550	ATGGATAACATCGATAGTATTTG	TTATCGTTCACTAACAAC	
<i>PSTK</i>	tetur05g08570	ATGAACAGATGTTGTATTGTTTT	TTAATTAGCCTTTTTTTCAGCT	
<i>TcRPS18</i>	tetur01g03850	TGCCTATTCAAGAACCAAAGTGGG	ACGTGCTGCTGAACCTTACCGAAGA	qPCR
<i>Txnrd1</i>	tetur27g00720	CTTTGCCTCATCGTCCTG	TTCGCTTTGTGACCGCTA	
<i>Txnrd2</i>	tetur02g03190	CAACCAACAATCCGCCTGTG	AAAGGAACTCGGCCATGAGG	
<i>SPS1</i>	tetur668g00010	CCTTTTGATCCGGAAGAATATGGT	TCGGCAAATTTGGTCAACCG	
<i>SPS2</i>	tetur668g00020	CAGGATTCGGCATTCTTGCTC	CGCTTGTTCTCGTGCTAAACA	
<i>SPS2-1</i>	tetur32g00770	GGTGTTCGCTCGAGTGTTTG	CTCATGCTGTCCATTGCTCG	
<i>SPS2-2</i>	tetur32g00780	ACAGGATTCGGCATTCTTGGT	GCCGCTTGTTCTCGTGGTAA	
<i>SG</i>	tetur16g00550	GCATCTCGACCTGACGCTAA	TCATCGGGAATTCGTGGAGC	
<i>PSTK</i>	tetur05g08570	AGCTGCTCCAAGGAACAATC	TGAAAGAGATGAGGGCGAATCC	

10 s, 72℃ 延伸 5 ~ 15 s/kb, 33 个循环; 72℃ 加尾 2 min。根据已有的核苷酸和氨基酸序列, 使用 ExPASy - ProtParam Tool (<http://web.expasy.org/protparam/>) 在线软件对其基因编码蛋白质的理化性质(相对分子质量、理论等电点等)进行分析和预测。

1.4 qPCR 检测朱砂叶螨硒代谢通路基因表达量

根据 1.3 节克隆获得的朱砂叶螨硒代谢通路基因序列, 并以 *TcRPS18* 为内参基因 (Sun *et al.*, 2010), 使用 Primer Premier 3.0 软件设计 8 条目的基因的定量引物并由北京擎科生物公司合成(表 1)。以 1.2 节合成的 cDNA 为模板进行 qPCR, 扩增体系: SYBR Green Supermix (Promega 公司) 10 μ L, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, cDNA 1 μ L, ddH₂O 7 μ L。扩增条件: 预变性 95℃ 2 min; 95℃ 15 s, 60℃ 30 s, 循环 40 次, 每个样品进行 3 次生物重复, 每个生物重复设置 3 次技术重复。相对表达量使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析。

1.5 朱砂叶螨 SPS1 原核表达及分离纯化

根据 1.3 节获得朱砂叶螨 *TcSPS1* 的全长序列, 以 pET-28b 为表达载体 (pET-28b 载体引物序列: F: 5'-GATGCCATGGGCATGGATATAGATGCATAAT ACTCTTGATTT-3'; R: 5'-CCGCTCGAGGCCTCTCAA TTCGGCAAA-3'), 分别在 5' 端和 3' 端引入酶切位点 *Xho* I 和 *Nco* I, 进行 PCR 扩增, 反应体系同 1.3 节。PCR 产物进行双酶切 (*Xho* I 和 *Nco* I) 后使用通用型 DNA 回收试剂盒 DP214 (TIANGEN) 回收酶切产物, 回收后的 pET-28b 表达载体与目的片段按照试剂盒 Trelief™ SoSoo Cloning Kit (北京擎科生物公司) 步骤进行同源重组。

将测序正确的重组质粒 *TcSPS1*-pET-28b 转化至表达菌株大肠杆菌 *Escherichia coli* Rosetta (DE3) (北京擎科生物公司), 之后挑选含重组质粒的单菌落至 3 mL LB 液体培养基中, 37℃ 培养过夜后 -20℃ 保种; 取保存于 -20℃ 的菌种 100 μ L 接种于 100 mL LB 液体培养基中震荡培养过夜; 取 10 mL 菌液接种于 200 mL LB 液体培养基中, 37℃ 扩大培养至 OD₆₀₀ 值约 0.6, 降低培养温度到 30℃; 加入 IPTG 诱导剂至终浓度 0.5 mmol/L, 30℃ 继续震荡培养 3 h, 8 000 r/min 离心 3 min 收集菌体, 重悬于 50 mL 预冷 NTA-0 缓冲液 (pH 8.0) 中, 冰浴 30 min; 超声破碎菌体, 参数设置为功率 200 W、工作 8 s、暂停 4 s, 99 个循环; 16 000 r/min, 4℃ 离心 50 min, 收集上清以及沉淀进行 SDS-PAGE (康为世纪生物科技有限公司) 检测。

根据上一步 SDS-PAGE 电泳结果, 上清中出现目的条带, 则表明存在可溶蛋白, 接着采用 Ni-NTA Sefinose™ Resin Kit (生工生物工程上海股份有限公司) 进行亲和层析预装柱来纯化重组蛋白上清。首先将预装柱垂直放置于试验台, 取下塞子, 使保存液自然流出; 接着用 1 个柱体积的 Washing Buffer 平衡柱子; 之后将上述含有重组蛋白的上清液缓缓加入柱中, 用 3 ~ 5 个柱体积的 Washing Buffer 来洗涤柱子; 最后, 加 1 柱体积的 Elution Buffer 来洗脱目的蛋白, 并收集纯化后的蛋白。

1.6 Western blot 检测

取 1.5 节中镍亲和层析柱纯化后的 *TcSPS1* 重组表达蛋白样品进行 SDS-PAGE (康为世纪生物科技有限公司) 电泳。按照转膜操作说明书将 SDS-PAGE 凝胶上的蛋白通过湿转的方式转移到 PVDF 膜上。从电泳槽中将膜取出, 用 1 × TBST (康为世纪生物科技有限公司) 震荡洗涤 3 次 (每次 10 min), 放入事先配好的 5% 脱脂奶粉 (北京索莱宝科技有限公司) 中, 缓慢震荡 1 ~ 2 h 进行封闭。事先配制 1:10 000 稀释的 His-tag 多克隆抗体 (康为世纪生物科技有限公司), 将封闭完的 PVDF 膜 (康为世纪生物科技有限公司) 用 1 × TBST 清洗 3 次后, 置于一抗中, 4℃ 过夜进行一抗孵育。将过夜孵育后的 PVDF 膜用 1 × TBST 洗涤 3 次。加入 1:20 000 稀释的 Goat Anti-Rabbit IgG (H + L) 二抗 (康为世纪生物科技有限公司), 室温缓慢摇床 1 h, 进行二抗孵育。最后将膜用 1 × TBST 洗涤 3 次; 用吸水纸略吸掉过多的液体, 平铺于一次性 PE 手套上。按照 ECL 化学发光底物试剂盒 (Bio-Rad 公司) 1:1 (v/v) 的比例混匀底物配制显影液, 将显影液均匀涂在 PVDF 膜上, 避光孵育 2 min 后, 置于全能型凝胶成像系统 (Bio-Rad 公司) 中使目的蛋白显影, 观察结果并拍照。

1.7 重组蛋白 TcSPS1 生化特性测定

挑取约 200 头 3 日龄雌成螨, 于液氮冷处理的 1.5 mL 离心管中, 加入 500 μ L 40 mmol/L PBS 缓冲液, 置于冰上充分研磨, 然后以 4℃ 10 000 r/min 离心 10 min, 上清即为粗酶液。依照 Bradford 使用的考马斯亮蓝染色法和酶标仪测定粗酶液中酶源蛋白含量 (Bradford, 1976)。将 1 000 μ g/mL 的牛血清白蛋白标准溶液用 0.5 mol/L Tris-HCl (pH 7.5) 稀释为 5, 10, 20, 40, 60, 80 和 100 μ g/mL 7 个浓度梯度。在酶标板中加入上述各浓度梯度的牛血清白蛋白液 50 μ L, 对照为 50 μ L 0.5 mol/L Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液, 再加入考马斯亮蓝 G-250 溶液

200 μL , 37℃ 反应 10 min, 在 595 nm 波长下测定其 OD 值, 重复 3 次实验。以牛血清白蛋白浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 为 X 轴, 所测 OD 值与对照 OD 值之差 (ΔOD 值) 为 Y 轴, 得到标准曲线。

参照 Ehrenreich 等 (1992) 的方法, 使用多功能微孔板分析仪测定 TcSPS1 的活性。把 ATP 标准溶液用 ATP 检测裂解液稀释成 0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.2 和 1.6 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 6 个浓度梯度的标准溶液。将 100 μL ATP 检测工作液加入检测孔中, 室温放置 3 ~ 5 min, 用排枪加入上述不同浓度的 50 μL ATP 标准溶液, 迅速混匀, 测定其相对光单位 (relative light unit, RLU)。在 TcSPS1 的催化下, 底物 ATP 与硒供体硒化物发生水解反应, 生成 AMP 和 SeP (Ehrenreich *et al.*, 1992)。具体操作如下: 在无氧条件下将 5 μL 0.5 mol/L K_3PO_4 , 5 μL 50 mmol/L 醋酸镁 (pH 7.0), 0.2 μL 1 mmol/L Na_2SeO_3 , 10 μL 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ATP, 5 μL 20 mmol/L DTT, 22.3 μL H_2O 和 2.5 μL TcSPS1 纯化蛋白 (对照组为粗酶和水两组) 加入 PCR 管中, 28℃ 反应 30 min, 通过检测 ATP 的减少量, 来反映 TcSPS1 的酶活性。配制不同浓度梯度的底物 (ATP 终浓度为 0.2 ~ 2 $\mu\text{mol}/\text{L}$), 并测定重组蛋白 TcSPS1 的动力学参数。利用双倒数作图法计算出重组蛋白 TcSPS1 的米氏常数 (K_m) 和最大反应速度 (V_{max})。

1.8 数据分析

运用统计软件 SPSS 8.0 进行数据分析, 其中基

因在不同硒浓度处理下的表达量差异显著性采用单因素方差分析 Duncan 氏新复极差法进行分析, 基因在 Tc 和 TcSe 品系之间的表达量差异显著性采用配对样本 t 检验进行分析。

2 结果

2.1 基因克隆

成功在朱砂叶螨中克隆得到硒代谢通路上的 8 条基因 (表 2), 图 1 为 TcSPS1 的基因序列信息。

2.2 硒代谢通路基因表达差异

为了明确硒代谢通路基因的功能, 本研究检测了取食经不同浓度亚硒酸钠短期处理 (处理 3 d) 的豇豆苗的朱砂叶螨雌成虫间以及常规豇豆饲养的朱砂叶螨普通品系与长期硒饲养品系雌成虫间硒代谢通路中 8 个基因的表达量差异。结果如图 2 显示, 朱砂叶螨取食不同浓度亚硒酸钠短期处理豇豆苗后, 硒代谢通路基因中的 5 条基因的 mRNA 表达水平发生不同程度的无规律变化, 且总体变化幅度不大。其中, 只有 TcSPS1 随着亚硒酸钠浓度的增大表达量不断增多, 有明显的剂量效应。同样, TcSPS1 在长期硒饲养品系中的表达量极显著高于在普通品系中 ($P < 0.01$), 上调表达 4.4 倍, TcTxnrd1 也显著性上调表达 2.2 倍 ($P < 0.05$) (图 3)。结果表明相对于其他基因, TcSPS1 可能在朱砂叶螨硒代谢中起着更重要作用。

表 2 朱砂叶螨 8 条硒代谢通路基因信息
Table 2 Information of eight selenium metabolism pathway genes in Tetranychus cinnabarinus

基因 Genes	核苷酸长度 (bp) Nucleotide length	编码氨基酸长度 Coded amino acid length	蛋白质分子量 (kD) Protein molecular weight	等电点 Isoelectric point
TcTxnrd1	1 992	663	73.16	6.85
TcTxnrd2	1 962	653	71.83	6.46
TcSPS1	150	49	5.43	4.24
TcSPS2	408	135	14.83	8.83
TcSPS2-1	987	328	36.17	6.71
TcSPS2-2	909	302	33.44	6.01
TcSG	2 658	885	100.18	8.52
TcPSTK	1 008	335	39.02	5.71

1ATGGATAATACTCTTGATTTGGCCTTGCAAGCGTTGATCTAGAACTCTCTGGGCCATCTCTTGATGCTATTTCAT

1M D N T L D L A L Q A V D L E V S G P S L D A I H

76AAACCTTTTGATCCGGAAGAATATGGTTTATAGTCCTTCATTCCGGTTGACCAAATTGCCGAATTGAGAGGCTGA

26K P F D P E E Y G L D P S F R L T K F A E L R G *

图 1 朱砂叶螨 TcSPS1 基因序列信息

Fig. 1 TcSPS1 gene sequence information in Tetranychus cinnabarinus

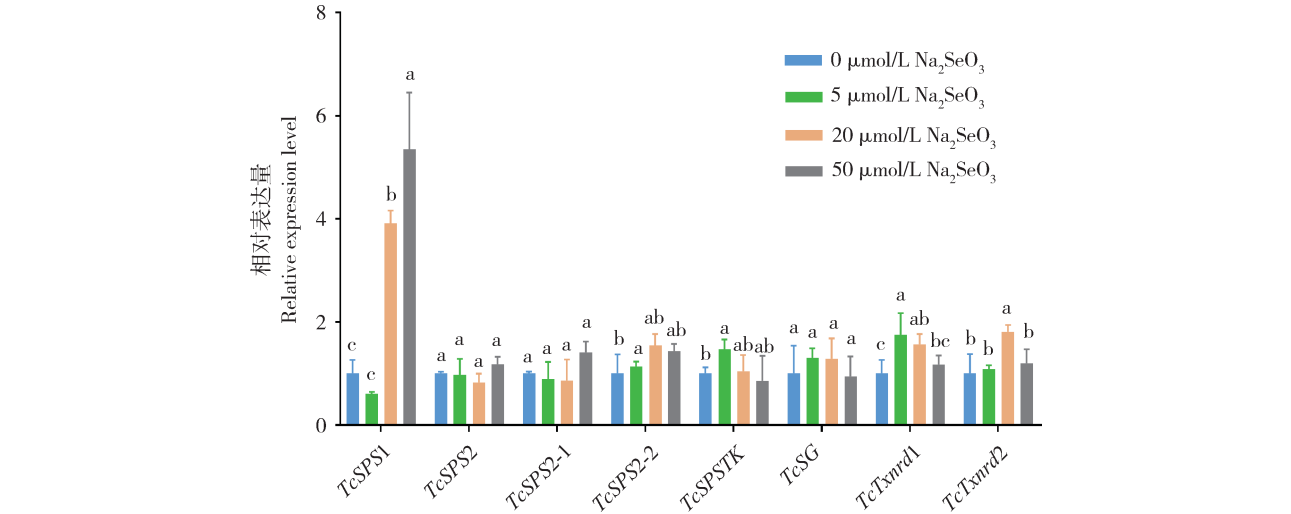


图2 不同亚硒酸钠浓度短期诱导的朱砂叶螨雌成螨中硒代谢通路基因的相对表达量

Fig. 2 Relative expression levels of selenium metabolism pathway genes in female adults of *Tetranychus cinnabarinus* induced by different concentrations of Na_2SeO_3 for short term

朱砂叶螨成螨用 0, 5, 20 和 50 $\mu\text{mol/L}$ Na_2SeO_3 处理的豇豆苗饲养,3 d 后检测基因表达量。图中数据为平均值 $\pm$ 标准误;柱上小写字母不同表示同一基因不同亚硒酸钠浓度处理组间表达量差异显著 ($P < 0.05$, Duncan 氏新复极差法)。 *T. cinnabarinus* adults were fed with cowpea seedlings treated with 0, 5, 20 and 50 $\mu\text{mol/L}$ Na_2SeO_3 , the expression levels of genes were detected at 3 d after treatment. Data in the figure are mean $\pm$ SE. Different small letters above bars indicate significant difference ($P < 0.05$, Duncan's multiple range test) in the expression level of the same gene between different Na_2SeO_3 concentration groups.

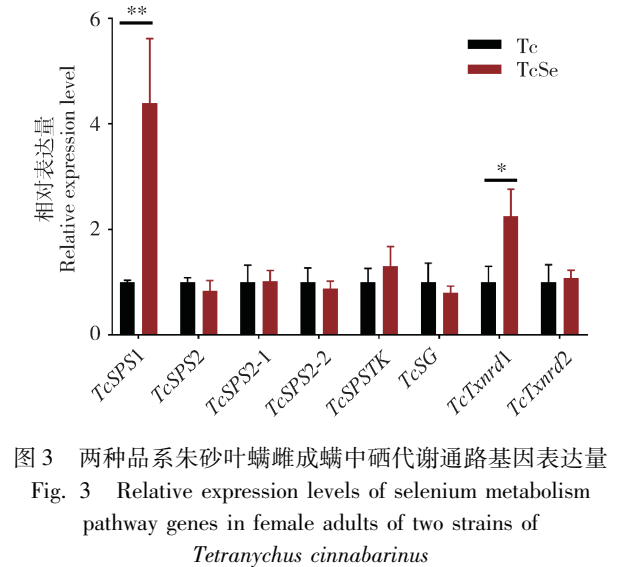


图3 两种品系朱砂叶螨雌成螨中硒代谢通路基因表达量

Fig. 3 Relative expression levels of selenium metabolism pathway genes in female adults of two strains of *Tetranychus cinnabarinus*

Tc: 朱砂叶螨普通品系 (豇豆苗饲养) Normal strain of *T. cinnabarinus* (fed with cowpea seedlings); TcSe: 朱砂叶螨长期硒饲养品系 [20 $\mu\text{mol/L}$ 亚硒酸钠 (Na_2SeO_3) 处理的豇豆苗饲养超 1 年] Long-term selenium-reared strain of *T. cinnabarinus* (fed with cowpea seedlings treated with 20 $\mu\text{mol/L}$ Na_2SeO_3 for over one year). 图中数据为平均值 $\pm$ 标准误;星号表示两种品系间差异显著 (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; t 检验)。 Data in the figure are mean $\pm$ SE, and the asterisks indicate significant difference (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; t -test) between two strains.

2.3 朱砂叶螨 TcSPS1 基因原核表达和重组蛋白生化特性

TcSPS1 重组蛋白以可溶蛋白的形式存在,纯化

检测到目的蛋白分子量大约在 7 kD,与预测的蛋白分子量 6.3 kD 相近,Western blot 也得到相同结果 (图 4)。为了检测重组蛋白的活性,构建了牛血清白蛋白标准曲线 (图 5: A) 和 ATP 标准曲线 (图 5: B),其中:牛血清白蛋白标准曲线的方程为 $Y = 0.0034X + 0.1081$ ($R^2 = 0.9770$);ATP 标准曲线的方程为 $Y = 6\,417\,966.2105X + 199\,782.9860$ ($R^2 = 0.9987$)。重组 TcSPS1 蛋白比活力为 2.366 ± 0.046 nmol/mg pro $\cdot$ min,高于粗酶的比活力 0.223 ± 0.017 nmol/mg pro $\cdot$ min;动力学参数 K_m 和 V_{max} 值分别为 10.054 ± 0.062 $\mu\text{mol/L}$ 和 29.633 ± 1.777 nmol/mg pro $\cdot$ min。结果表明原核表达获得了具有硒磷酸合成酶活性的可溶蛋白。

3 讨论

自然界的硒主要以亚硒酸盐的形式存在,对亚硒酸盐代谢和生物利用度的研究主要集中在人类中,目前已被广泛和成功地用于人类疾病的治疗 (Meuillet *et al.*, 2004; Micke *et al.*, 2010; Jirong *et al.*, 2012)。硒也是植物必需的微量元素之一,既可以提高农作物的营养价值,也可帮助植物抵抗害虫的危害。而植食性害虫经硒处理后,硒代谢通路基因的表达量上调是降低亚硒酸钠毒性,提高硒适应

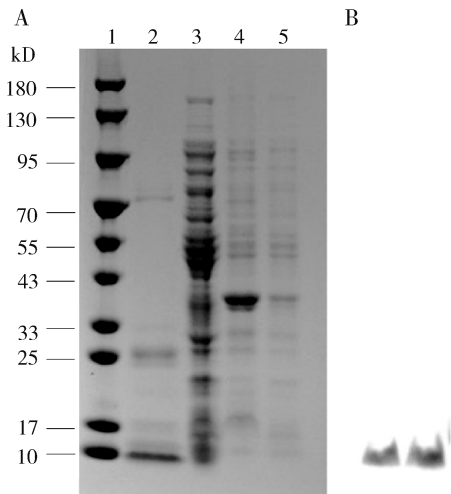


图4 重组蛋白 TcSPS1 的 SDS-PAGE (A) 和 Western blot (B) 分析

Fig. 4 SDS-PAGE (A) and Western blot (B) analysis of the recombinant TcSPS1

1: 蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker; 2: 纯化蛋白 Purified protein; 3: 超声波破菌上清 Supernatant after ultrasonic treatment; 4: 0.5 mmol/L IPTG 诱导后的 pET-28b 对照 pET-28b control after induction with 0.5 mmol/L IPTG; 5: 未经 IPTG 诱导的 TcSPS1-pET-28b Recombinant TcSPS1-pET-28b without IPTG induction.

能力的关键。本研究中朱砂叶螨在不同浓度的硒短期诱导时, *TcSPS1*, *TcSPS2-2*, *TcPSTK*, *TcTxnrd1* 和 *TcTxnrd2* 基因的 mRNA 水平发生了变化(图2), 表明它们可能与朱砂叶螨对植物硒耐受性的适应性有关。因此我们推测朱砂叶螨取食高毒性的亚硒酸钠后, 亚硒酸钠被 *TcTxnrd* 催化还原为具有较高毒性的硒化物; 而硒化物进一步在 *TcSPS1* 的催化作用下能够催化产生一种硒的活化生物形式——硒磷酸; 硒磷酸同时在 L-Serly-tRNA^{Sec}, *TcPSTK* 和 *TcSG* 的作用下转化为携带硒半胱氨酸的 Sec-tRNA, 从而生成各类低毒的硒代氨基酸并合成硒蛋白。

但除了 *TcSPS1* 以外, 其余差异表达的基因在不同高浓度硒诱导下的表达量差异并不大(图2), 原因可能是这些基因只在朱砂叶螨适应较低硒浓度时发挥作用。而在长期硒饲养品系中, 发现 *TcSPS1* 和 *TcTxnrd1* 显著上调表达(图3), 表明 *TcSPS1* 和 *TcTxnrd1* 与朱砂叶螨对植物硒耐受性的适应力增强有关。且 *TcSPS1* 基因在短期硒处理和长期硒适应品系中均上调表达, 其表达量与硒处理浓度有一定的相关性, 因此我们推测 *TcSPS1* 基因在朱砂叶螨对硒的适应过程中起着十分重要的作用。随后的原核

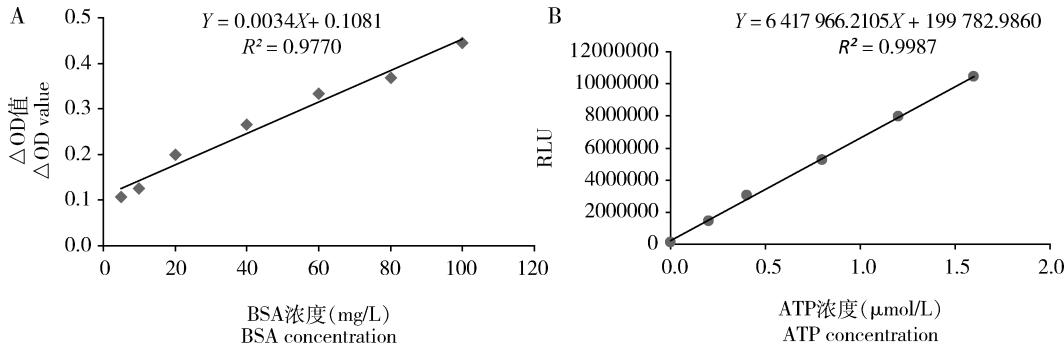


图5 牛血清白蛋白(BSA)(A)和ATP(B)标准曲线

Fig. 5 Standard calibration curves of bovine serum albumin (BSA) (A) and ATP (B)

RLU: 相对光单位 Relative light unit.

表达实验通过该酶的专一性底物 ATP 检测了朱砂叶螨重组蛋白 TcSPS1 的比活力, 表明朱砂叶螨的 TcSPS1 能够催化亚硒酸钠生成新的硒化合物, 证明了 *TcSPS1* 基因在硒代谢中有着重要的功能。但在前期哺乳动物的研究中发现只有 *TcSPS2* 能够催化硒化物合成硒磷酸, 而 *TcSPS1* 可能利用了不同的底物, *TcSPS1* 在生物体内合成硒蛋白中的作用机制并不清楚, 这种 *TcSPS1* 功能的差异极有可能是螨和哺乳动物之间的物种差异导致的(Xu *et al.*, 2007)。

本研究通过对朱砂叶螨硒代谢通路基因的克隆

与分析推测了朱砂叶螨硒代谢通路关键基因, 并发现多条基因对亚硒酸钠处理具有响应能力; 其中 *SPS1* 在短期亚硒酸钠处理和长期硒饲养品系中均上调表达, 且对亚硒酸钠具有一定剂量效应; 进一步通过原核表达获得了 *TcSPS1* 重组蛋白, 并测定了其部分生化特性。本研究首次在节肢动物中分析了硒代谢通路基因, 并初步解释了朱砂叶螨对硒的适应的分子机制, 研究结果可为节肢动物硒代谢通路的研究以及硒防控害虫的新技术开发提供一定的理论依据。

参考文献 (References)

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248 – 254.

Cupp-Sutton KA, Ashby MT, 2016. Biological chemistry of hydrogen selenide. *Antioxidants*, 5(4): 42.

Ehrenreich A, Forchhammer K, Tormay P, Veprek B, Böck A, 1992. Selenoprotein synthesis in *E. coli*: Purification and characterization of the enzyme catalyzing selenium activation. *Eur. J. Biochem.*, 206(3): 767 – 773.

Freeman JL, Lindblom SD, Quinn CF, Fakra S, Marcus MA, Pilon-Smits EAH, 2007. Selenium accumulation protects plants from herbivory by Orthoptera via toxicity and deterrence. *New Phytol.*, 175(3): 490 – 500.

Freeman JL, Quinn CF, Marcus MA, Fakra S, Pilon-Smits EAH, 2006. Selenium-tolerant diamondback moth disarms hyperaccumulator plant defense. *Curr. Biol.*, 16(22): 2181 – 2192.

Han XX, Yao ZW, Wei HY, 2016. Research progress on toxicity biology of selenium. *Jiangsu Agric. Sci.*, 44(12): 24 – 28. [韩晓霞, 姚志文, 魏洪义, 2016. 硒的毒性生物学研究进展. *江苏农业科学*, 44(12): 24 – 28]

Hong XY, 2012. Agricultural Acarology. China Agriculture Press, Beijing. 190 – 193. [洪晓月, 2012. 农业螨类学. 北京: 中国农业出版社. 190 – 193]

Jirong Y, Huiyun P, Zhongzhe Y, Birong D, Weimin L, Ming Y, Yi S, 2012. Sodium selenite for treatment of Kashin-Beck disease in children; A systematic review of randomised controlled trials. *Osteoarthr. Cartil.*, 20(7): 605 – 613.

Meuillet E, Stratton S, Cherukuri DP, Goulet AC, Kagey J, Porterfield B, Nelson MA, 2004. Chemoprevention of prostate cancer with selenium; An update on current clinical trials and preclinical findings. *J. Cell. Biochem.*, 91(3): 443 – 458.

Micke O, Schomburg L, Buentzel J, Kisters K, Muecke R, 2010. Selenium in oncology – An update. *Trace Elem. Electroly.*, 27(10): 250 – 257.

Quinn CF, Freeman JL, Reynolds RJB, Cappa JJ, Fakra SC, Marcus MA, Lindblom SD, Quinn EK, Bennett LE, Pilon-Smits EAH, 2010. Selenium hyperaccumulation offers protection from cell disruptor herbivores. *BMC Ecol.*, 10: 19.

Sun W, Jin Y, He L, Lu WC, Li M, 2010. Suitable reference gene selection for different strains and developmental stages of the carmine spider mite, *Tetranychus cinnabarinus*, using quantitative real-time PCR. *J. Insect Sci.*, 10: 208.

Tobe R, Mihara H, 2018. Delivery of selenium to selenophosphate synthetase for selenoprotein biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, 1862(11): 2433 – 2440.

van Leeuwen T, Demaeght P, Osborne EJ, Dermauw W, Gohlke S, Nauen R, Grbic M, Tirry L, Merzendorfer H, Clark RM, 2012. Population bulk segregant mapping uncovers resistance mutations and the mode of action of a chitin synthesis inhibitor in arthropods. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109(12): 4407 – 4412.

Vickerman DB, Trumble JT, 1999. Feeding preferences of *Spodoptera exigua* in response to form and concentration of selenium. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 42(1): 64 – 73.

Vickerman DB, Trumble JT, George GN, Pickering IJ, Nichol H, 2004. Selenium biotransformations in an insect ecosystem: Effects of insects on phytoremediation. *Environ. Sci. Technol.*, 38(13): 3581 – 3586.

Xu XM, Carlson BA, Mix H, Zhang Y, Saira K, Glass RS, Berry MJ, Gladyshev VN, Hatfield DL, 2007. Biosynthesis of selenocysteine on its tRNA in eukaryotes. *PLoS Biol.*, 5: 96 – 105.

(责任编辑：马丽萍)