

# 灰飞虱雌激素相关受体基因的克隆、序列分析及在氟啶虫胺胍胁迫下的表达模式

徐鹿<sup>1,2</sup>, 赵春青<sup>2</sup>, 徐德进<sup>1</sup>, 徐广春<sup>1</sup>, 许小龙<sup>1</sup>, 张亚楠<sup>3</sup>, 韩召军<sup>2</sup>, 顾中言<sup>1,\*</sup>

(1. 江苏省农业科学院植物保护研究所, 南京 210014; 2. 南京农业大学植物保护学院, 农作物生物灾害综合治理教育部重点实验室, 南京 210095; 3. 淮北师范大学生命科学学院, 安徽淮北 235000)

**摘要:**【目的】雌激素相关受体(estrogen-related receptor, ERR)是一类依赖配体激活的转录因子,能感受外源物质胁迫调控靶基因的转录,参与外源物质的代谢过程。本研究旨在通过克隆灰飞虱 *Laodelphax striatellus* ERR 基因,分析其序列和在氟啶虫胺胍胁迫下表达谱,探析其生理功能及在杀虫剂代谢中的作用。【方法】根据灰飞虱转录组数据信息,利用 RT-PCR 克隆灰飞虱 ERR 基因,并进行生物信息学分析;通过实时荧光定量 PCR,分析暴露于氟啶虫胺胍(0.76 ng/头)后,灰飞虱 4 龄若虫 ERR 基因在不同时间点和不同组织中的表达量。【结果】从灰飞虱中克隆到 ERR 基因,命名为 *LsERR*(GenBank 登录号: KY210878),其 cDNA 序列全长 1 854 bp,开放阅读框长 1 260 bp,编码 419 个氨基酸,预测编码蛋白的分子量为 47.70 kD。序列分析显示, *LsERR* 具有核受体(nuclear receptors, NRs)家族成员的共同特征性结构:DNA 结合区(DNA-binding domain, DBD)(第 75–168 位氨基酸)和配体结合区(ligand-binding domain, LBD)(第 194–416 位氨基酸)。采用 APSSP2 法预测 *LsERR* 蛋白二级结构,其中  $\alpha$  螺旋占 43.53%,  $\beta$  折叠占 5.49%, 无规则卷曲占 50.98%。其中,在 DBD 区,有 6 个  $\beta$  折叠和 3 个  $\alpha$  螺旋;在 LBD 区,有 3 个  $\beta$  折叠和 11 个  $\alpha$  螺旋。系统发育分析表明, *LsERR* 与褐飞虱 *Nilaparvata lugens* ERR 亲缘关系最近。灰飞虱 4 龄若虫暴露于氟啶虫胺胍后,12 h 时其体内 *LsERR* 基因上调表达,24 h 时达到表达高峰,48 h 时表达量下调; *LsERR* 在头部微弱表达,在腹部特异性高表达。【结论】*LsERR* 是参与灰飞虱代谢氟啶虫胺胍的候选基因。本研究为解毒酶基因的调控和新分子靶标农药的研制提供分子基础。

**关键词:** 灰飞虱; 雌激素相关受体; 基因克隆; 序列分析; 表达模式; 氟啶虫胺胍

**中图分类号:** Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2017)03-0264-10

## Molecular cloning and sequence analysis of the estrogen-related receptor (ERR) gene in the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus* (Delphacidae: Hemiptera) and its expression profiles under the stress of sulfoxaflor

XU Lu<sup>1,2</sup>, ZHAO Chun-Qing<sup>2</sup>, XU De-Jin<sup>1</sup>, XU Guang-Chun<sup>1</sup>, XU Xiao-Long<sup>1</sup>, ZHANG Ya-Nan<sup>3</sup>, HAN Zhao-Jun<sup>2</sup>, GU Zhong-Yan<sup>1,\*</sup> (1. Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Key Laboratory of Integrated Management of Crop Diseases and Pests, Ministry of Education, College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing, 210095, China; 3. College of Life Sciences, Huaibei Normal University, Huaibei, Anhui 235000, China)

**Abstract:** 【Aim】 Estrogen-related receptors (ERRs) are a class of transcription factors that are

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK20150539); 国家科技支撑计划课题(2012BAD14B12-5); 江苏省农业科技自主创新资金(CX(15)1004); 农作物生物灾害综合治理教育部重点实验室开放课题基金(IMCDP201603)

作者简介: 徐鹿, 男, 1982年6月生, 山东淄博人, 博士, 助理研究员, 研究方向为昆虫分子毒理学, E-mail: xulupesticide@163.com

\* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhongyan@yeah.net

收稿日期 Received: 2017-01-04; 接受日期 Accepted: 2017-02-05

dependent on ligand activation, which can respond to the stress of xenobiotic by regulating transcription levels of target genes and being involved in xenobiotic metabolism. In order to define the physiological functions of ERR in *Laodelphax striatellus* and its roles in insecticide metabolism, we cloned and characterized its ERR gene and analyzed its expression profiles after exposure to sulfoxaflor. 【Methods】 The ERR gene of *L. striatellus* was cloned using RT-PCR according to transcriptome data of *L. striatellus* and analyzed by bioinformatic tools, and its mRNA levels at different time and in different tissues of the 4th instar nymphs of *L. striatellus* after exposure to sulfoxaflor (0.76 ng/individual) were detected via real-time PCR. 【Results】 The ERR gene was cloned from *L. striatellus*, and named *LsERR* (GenBank accession no.: KY210878), its complete cDNA is 1 854 bp in length with a 1 260 bp of open reading frame, encoding a 47.70 kD protein with 419 amino acids. *LsERR* has the common conserved domains of NRs family, including the DNA-binding domain (DBD) (75–168 aa) and the ligand-binding domain (LBD) (194–416 aa). By using APSSP2 method, the predicted secondary structure of *LsERR* showed that the alpha helix accounts for 43.53%, the beta fold accounts for 5.49%, and the random coil accounts for 50.98%. There are six beta folds and three alpha helices in the DBD region while there are three beta folds and 11 alpha helices in the LBD region. Phylogenetic tree analysis indicated that *LsERR* is most closely related to *Nilaparvata lugens ERR*. In the 4th instar nymphs of *L. striatellus* exposed to sulfoxaflor, the expression level of *LsERR* increased at 12 h, reached the peak at 24 h, and decreased at 48 h. *LsERR* had weak expression in the head and high expression in the abdomen. 【Conclusion】 *LsERR* is a candidate gene involved in sulfoxaflor metabolism of *L. striatellus*. This study provides a molecular basis for the study of regulation of detoxification enzyme genes and the development of a novel molecular target of insecticides.

**Key words:** *Laodelphax striatellus*; estrogen-related receptor; gene cloning; sequence analysis; expression profile; sulfoxaflor

核受体(nuclear receptors, NRs)属于依赖配体的超家族转录因子,作为转录开关,调控靶基因转录,影响众多的生理途径(Francis *et al.*, 2003)。高度保守的DNA结合域(DNA-binding domain, DBD)和较保守的配体结合域(ligand binding domain, LBD)被认为是核受体家族成员共同的特征性结构。DBD由两个C4型锌指组成,LBD包含一个配体结合口袋、二聚化结构域和激活结构域(Bain *et al.*, 2007)。核受体可以绑定小分子的亲脂性配体,能够在感受外源性化合物和调控解毒基因表达方面起到关键作用。核受体调控外源性物质代谢发展为成熟的研究领域。研究表明,在雌激素相关受体(estrogen-related receptor, ERR)的配体结合域插入甘氨酸密码子的转基因果蝇 *Drosophila melanogaster* 品系中 *CYP12DL* 和 *CYP6G2* 过量表达(Sun *et al.*, 2015)。ERR在脊索动物、节肢动物和一些触手担轮类中被发现,在测序的昆虫基因组中仅仅有一个ERR。在脊椎动物中ERR有多样的表达样式,影响许多生理过程,ERR与雌激素受体(estrogen receptor, ER)有相似的结构和功能特征,包括绑定

合成的雌激素配体,如反向激动剂4-羟基他莫昔芬(4-hydroxytamoxifen, OHT)和己烯雌酚(diethylstilbestrol, DES)(Giguère, 2002; Bardet *et al.*, 2006)。一些证据表明,昆虫中的ERR可能是经典的激素受体,ERR的LBD具有广泛和动态的配体依赖性活性。果蝇ERR配体绑定域突变增加了对OHT和DES的敏感性(Östberg *et al.*, 2003)。研究结果阐明了ERR在外源性和内源性物质稳态调控中的功能,ERR介导外源性物质调控是一个复杂的调控网络,可能涉及到多个外源性核受体参与。

杀虫剂代谢的生化过程涉及多种解毒酶的参与,I相代谢酶细胞色素P450,主要执行氧化、还原等初级反应,其代谢产物作为II相代谢酶的底物(Perry *et al.*, 2011)。细胞色素P450基因过表达可以改变杀虫剂毒理效应,增强机体的自我保护和环境适应能力及增加杀虫剂的耐受性,细胞色素P450介导的杀虫剂代谢解毒作用的增强是昆虫产生抗药性的重要机制(Bao *et al.*, 2016)。对于过表达P450基因的调控因子和信号途径,已有假设认为诱导剂进入生物体,自身与相应的核酸受体(一种半专一

性的细胞溶质蛋白)结合形成“配体-受体”复合物,该复合物进入细胞核后与细胞色素 P450 基因 5' 端上游启动子的响应元件结合,引发细胞色素 P450 基因的表达。研究表明 ERR 的主要作用是调节代谢基因网络,特别是那些与线粒体的生物合成和功能相关的(Eichner and Giguère, 2011)。

灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 属半翅目飞虱科,主要分布在亚洲和欧洲的温带和亚热带地区(Xu *et al.*, 2014)。近十多年来,亚洲地区的灰飞虱已经成为造成禾本科经济作物减产甚至绝产的主要害虫,如水稻、小麦和玉米等;危害方式除了以成、若虫刺吸作物汁液外,还作为植物病毒媒介传播水稻条纹叶枯病和玉米粗缩病等,造成区域性的大面积损失,其传毒引起的间接损害大于直接刺吸(徐秋芳等, 2011)。目前,主要以化学农药防治灰飞虱,已造成其对常用的各类杀虫剂产生了不同水平的抗性而导致其频繁暴发(Wang *et al.*, 2010)。细胞色素 P450 基因过表达介导灰飞虱抗药性的形成,但过表达的细胞色素 P450 基因的调控因子和途径不明确。因此,研究调控因子与过表达的细胞色素 P450 基因的互作机制,可以认识抗药性的发生机制,开发潜在的农药靶标和推动新型高效控虫策略的建立。本研究克隆了灰飞虱 ERR 基因的 cDNA 全长序列,并对其序列及表达模式进行了分析,为深入揭示核受体调控代谢酶解析灰飞虱形成抗药性的机理提供了理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试虫

2011 年采自江苏省南京市江苏省农业科学院试验田的灰飞虱,在不接触任何杀虫剂情况下于以南粳 5055 水稻在室内连续饲养。饲养方法采用无土水稻育苗法(Xu *et al.*, 2013)。饲养条件为温度  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、光周期 16L:8D、相对湿度 50% ~ 70%。

### 1.2 药剂及试剂

氟啶虫胺胍 97.9% 原药,美国陶氏益农公司;SV Total RNA Isolation System Kit,普洛麦格(北京)生物技术有限公司;反转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit, SMARTer® RACE 5'/3' Kit, SYBR® Premix<sup>Ex</sup> Taq™, Taq DNA 聚合酶和 DL2000 DNA Marker, 宝生物工程大连有限公司; pEASY®-T3 Cloning Kit 和 Trans1-T1 感受态细胞,北京全式金生物技术有限公司;凝胶回收试剂盒, Axygen 公司;所

有引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

### 1.3 仪器

手持式微量点滴器,英国 Burkard 仪器公司;Mastercycler® Nexus Gradient PCR 仪和 Centrifuge 5424R 高速台式离心机, Eppendorf 中国有限公司; ZWY-2102C 双层恒温摇床和 ZHJH-C1109C 超净工作台,上海智城分析仪器制造有限公司;ABI Prism 7300 定量 PCR 仪,美国应用生物系统公司;Nanodrop 2000 核酸蛋白定量仪,赛默飞世尔科技公司;DYY-6C 电泳仪,北京六一仪器厂;Tanon1600 凝胶成像系统,上海天能科技有限公司。

### 1.4 灰飞虱总 RNA 提取和 cDNA 第 1 链合成

总 RNA 提取采用 SV Total RNA Isolation System Kit 试剂盒,提取灰飞虱卵、1-5 龄若虫和成虫混合的总 RNA,用 1% 琼脂糖凝胶电泳和核酸蛋白定量仪检测 RNA 的完整度、纯度与浓度,  $-80^\circ\text{C}$  保存备用。cDNA 第 1 链的合成采用 PrimeScript™ RT Reagent Kit 试剂盒,参照试剂盒步骤,提取的总 RNA 取 1  $\mu\text{g}$  为模板,在反转录酶作用下合成 cDNA 第 1 链,  $-20^\circ\text{C}$  下保存备用。

### 1.5 灰飞虱 ERR 基因片段 RT-PCR 扩增

根据本实验灰飞虱转录组数据库筛选出 ERR 基因片段序列(unigene 8043),设计特异性引物 Lserrfp 和 Lserrrp(表 1),验证序列的准确性,以 1.4 节合成 cDNA 为模板,利用 rTaq 聚合酶进行 PCR 扩增,反应体系和反应条件依据说明书步骤操作。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测,溴化乙锭(EB)染色后将目标条带切下,使用 DNA 凝胶回收试剂盒纯化,回收产物连接到 pEASY®-T3 载体上进行 TA 克隆,转化到感受态细胞中。经蓝白斑和氨苄青霉素筛选,挑取白斑扩大培养;经菌落 PCR 检测为阳性后,送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

### 1.6 灰飞虱 ERR 基因末端序列的 RACE 扩增

根据上述克隆获得的灰飞虱 ERR 基因片段序列,设计合成两对特异性嵌套引物 Lserr-3' 和 Lserr-3'N 以及 Lserr-5' 和 Lserr-5'N(表 1),以 SMARTer® RACE 5'/3' Kit 合成的 3' 和 5' cDNA 为模板,分别用于灰飞虱 ERR 基因的 3' 和 5' RACE 扩增。3' 和 5' RACE 的反应依据试剂盒步骤操作。RACE 产物回收后,依据上述方法进行连接、转化和测序。

### 1.7 序列分析和进化树构建

测序结果在 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)中利用 BLAST 进行序列同源

表 1 研究所用引物  
Table 1 Primers used in the study

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequences	引物用途 Purpose
Lserrfp	TTCACTACGGTGTGCGATCC	RT-PCR
Lserrrp	CTCGCACATTGTCAACATTTCT	
Lserr-3'	GCTGTGCTTGTCTGCGGGGATGT	RACE
Lserr-3'N	CGCAACCCCGACCAGCCCTATCAC	
Lserr-5'	TGTTGAAGGCGCGGCATAGTTGT	
Lserr-5'N	CGTGATAGGGCTGGTCCGGGTTGC	
Lserrqfp	CAATGTGCGAGCCAGAAGTG	荧光定量 PCR
Lserrqrp	AGCCTATTATGCCGACCAGTTC	Real-time PCR
$\beta$ -actinqfp	TCCGAGACATCAAGGTGAAACTG	
$\beta$ -actinqrp	TGCTTCCATACCCAAGAAAGACG	
G3PDHqfp	GTGTGCCAGTGCCCAATGTATC	
G3PDHqrp	ATGCCCTTCAGTGGTCCTTCG	

搜索对比,并利用 NCBI 数据库中的 ORF Finder 工具(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)分析序列潜在的 ORF,对预测出具有完整 ORF 的基因,提交 GenBank 数据库。利用 ClustalX 2.0 和 GeneDoc 软件对氨基酸序列进行多重比对。采用 ExPASy (<http://www.expasy.org/>)在线软件 ProtParam 和 APSSP2 进行理化性质分析和蛋白质二级结构预测。利用 SignalP 4.0 预测 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)信号肽。利用 TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)预测氨基酸序列的跨膜区。利用 MEGA 5.0 对 ERR 基因序列进行分子系统进化分析,采用邻接法 (neighbor-joining, NJ),1 000 次重复构建分子系统进化树。

### 1.8 氟啶虫胺胍对灰飞虱 ERR 基因时空表达的影响

氟啶虫胺胍原药用丙酮溶解于 EP 管中作为母液 (18 601 mg/L),从中稀释出用于灰飞虱的氟啶虫胺胍工作液,浓度为 0.76 ng/头 (致死中量,另文发表)。选取灰飞虱 4 龄若虫在蜕皮 12 h 内获取同一批次进行试验,用 CO<sub>2</sub> 麻醉 30 ~ 50 s。迅速取出放在托盘上,用手持式微量点滴器吸取 0.5  $\mu$ L 的氟啶虫胺胍工作液点滴 4 龄若虫,处理后放入塑料杯中。用橡皮筋扎紧尼龙网封口,分别在处理后 6, 12, 24, 48, 72 和 144 h 收集存活个体。收集 24 h 存活的个体在冰上解剖,收集头部、胸部和腹部等组织 (Wan *et al.*, 2015),并用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) (含 140 mmol/L NaCl, 27 mmol/L KCl, 8 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 1.5 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) 冲洗,不同时间点和不同组织的处理以 30

头灰飞虱作为 1 组,处理 3 组,均以丙酮和清水处理作为对照。存活个体和解剖的不同组织均于液氮速冻后于 -80℃ 保存。

依次从处理的不同时间存活的个体和不同组织中提取总 RNA,并在反转录酶作用下合成 cDNA 第 1 链, -20℃ 下保存备用。采用荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术分析灰飞虱 ERR 基因在氟啶虫胺胍处理下的时间和组织表达效应。利用 Beacon Designer 7 软件设计灰飞虱 ERR 和内参基因引物 (表 1),内参基因为  $\beta$ -actin (GenBank 登录号: AY192151) 和 G3PDH (GenBank 登录号: HQ385974)。根据 SYBR Green Premix Ex Taq 的试剂盒说明书进行 qRT-PCR 扩增。采用 PCR 仪自带软件对数据记录分析,设 3 个生物学重复 (Livak and Schmittgen, 2001)。

### 1.9 数据统计与分析

在 Excel 软件中使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算不同时间点和不同组织灰飞虱 ERR 基因的 mRNA 相对表达水平 (Livak and Schmittgen, 2001)。不同样本或处理之间的差异比较采用 One-way ANOVA 法,使用 SPSS 13.0 软件进行试验数据的统计分析 ( $P \leq 0.05$ , Tukey 氏多重比较)。

## 2 结果

### 2.1 灰飞虱 ERR 基因克隆及序列分析

根据灰飞虱转录组数据筛选的 ERR 基因片段序列,进行 RT-PCR 验证,获得大小为 335 bp 中间条带 (图 1: A)。基于验证的 ERR 基因片段序列分别进行 3' 和 5' RACE 扩增,得到大小为 748 bp (图 1: B) 和 984 bp 特异性条带 (图 1: C),将测序得到

的序列进行比对拼接,得到 1 854 bp 全长序列,命名为 *LsERR* (GenBank 登录号: KY210878), 开放阅读框长 1 260 bp, 3'端非编码区 216 bp, 5'端非编码区 378 bp, 编码 419 个氨基酸, 存在一个 25 bp 的 ploy (A) 尾巴。预测编码蛋白分子量 47.70 kD, 等电点 6.75, 其中极性氨基酸 250 个, 强酸氨基酸 (Asp 和 Glu) 52 个, 强碱氨基酸 (Arg 和 Lys) 51 个, 疏水性氨基酸 169 个。 *LsERR* 半衰期为 30 h, 分子式为  $C_{2080}H_{3332}N_{588}O_{625}S_{35}$ , 总平均疏水性为 -0.391。预测未发现信号肽和跨膜区域。在线 NCBI 结构域分析结果表明, *LsERR* 编码产物的第 75 - 168 位氨基酸和

第 194 - 416 位氨基酸之间分别有一个 NR\_LBD\_ERR 和 NR\_DBD\_ERR 结构域。 *LsERR* 蛋白二级结构预测采用 APSSP2 法, 其中  $\alpha$  螺旋占 43.53%,  $\beta$  折叠占 5.49%, 无规则卷曲占 50.98%。其中, 在 DBD 区, 有 6 个  $\beta$  折叠和 3 个  $\alpha$  螺旋; 在 LBD 区, 有 3 个  $\beta$  折叠和 11 个  $\alpha$  螺旋。灰飞虱与烟粉虱 *Bemisia tabaci*、内华达古白蚁 *Zootermopsis nevadensis*、赤拟谷盗 *T. castaneum*、西方蜜蜂 *Apis mellifera* 和欧洲熊蜂 *Bombus terrestris* 的 ERR 氨基酸序列一致性分别为 70%, 69%, 60%, 65% 和 65%。由此可以推断该序列属于核受体 ERR 基因。

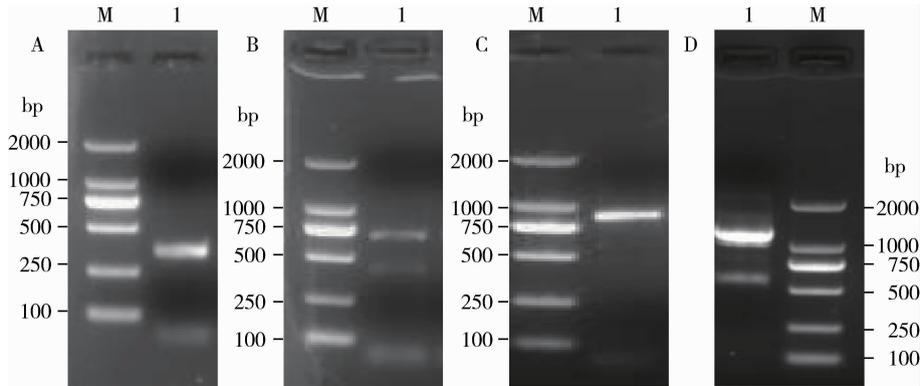


图 1 灰飞虱 *LsERR* cDNA 克隆

Fig. 1 cDNA cloning of *LsERR* from *Laodelphax striatellus*

M: DNA 分子量标准 DL2000 DNA molecular weight marker DL2000. I: 扩增产物 Amplification product. A: *LsERR* 的中间片段产物 Intermediate product of *LsERR*; B: *LsERR* 的 3'RACE 扩增产物 3'RACE product of *LsERR*; C: *LsERR* 的 5'RACE 扩增产物 5'RACE product of *LsERR*; D: *LsERR* 的编码区扩增产物 Amplification product of the open reading frame of *LsERR*.

## 2.2 灰飞虱 ERR 基因多序列比对及进化分析

GenBank 同源序列比对结果如图 2 所示, *LsERR* 与果蝇 *D. melanogaster* (GenBank 登录号: AF359421.1)、赤拟谷盗 *T. castaneum* (GenBank 登录号: NM\_001141934.1)、家蚕 *B. mori* (GenBank 登录号: KT268294.1) 和西方蜜蜂 *A. mellifera* (GenBank 登录号: EF506198.1) 模式昆虫的 ERR 氨基酸序列一致性分别为 45%, 67%, 62% 和 68%, 并且 ERR 氨基酸序列在不同昆虫种中高度保守, 很多保守区域的位置非常一致。另外, 图 2 结果显示, 比较的 5 种昆虫的 ERR 有保守的 DBD 和 LBD, 进一步确定了图 1 中预测的灰飞虱 ERR 结构特征的准确性, 还说明 DBD 和 LBD 关键区域在不同昆虫中有更高的进化保守性。

不同昆虫种的 ERR 氨基酸序列以 NJ 法构建的分子系统进化树如图 3 所示, *LsERR* 和褐飞虱 ERR

聚在同一个进化分支上, 亲缘关系近, 同源性高。赤拟谷盗和烟粉虱 ERR 聚在同一个分支上。其他目的昆虫各自聚成小类群, 这说明 ERR 在进化上具有很好的保守性, 同时相同目的昆虫又分成了不同的亚群组, 也显示了不同目昆虫 ERR 蛋白进化上的差异性。

## 2.3 氟啶虫胺胍处理后灰飞虱 ERR 基因的表达模式

为了初步确定 *LsERR* 在杀虫剂代谢中的功能, 氟啶虫胺胍处理灰飞虱后, 利用荧光定量 PCR 检测不同时间点和不同组织的 *LsERR* 基因的表达情况。标准曲线数据显示, *LsERR*,  $\beta$ -actin 和 *G3PDH* 基因的定量引物扩增效率分别为 2.035, 1.998 和 2.013, 都接近 100%; 对应的标准曲线的相关性分别为 0.992, 1.000 和 0.998, 符合  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法的条件, 因此实验中设计的定量引物可以用于荧光定量 PCR。

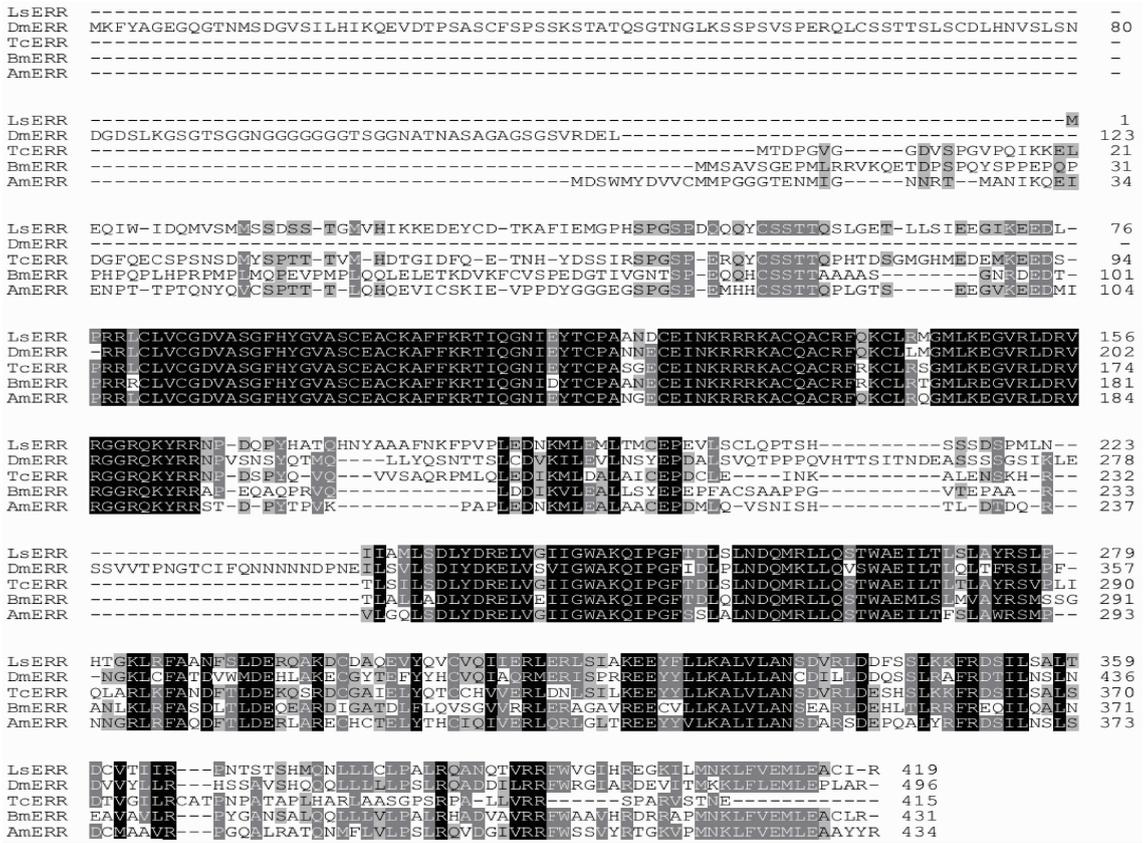


图2 灰飞虱与黑腹果蝇、赤拟谷盗、家蚕和西方蜜蜂 ERR 氨基酸多序列比对

Fig. 2 Alignment of the deduced amino acid sequences of ERRs from *Laodelphax striatellus*, *Drosophila melanogaster*, *Tribolium castaneum*, *Bombyx mori* and *Apis mellifera*

ERR 蛋白来源及 GenBank 登录号 Origin of ERRs and their GenBank accession numbers: DmERR: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (AF359421.1); TcERR: 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (NM\_001141934.1); BmERR: 家蚕 *Bombyx mori* (KT268294.1); AmERR: 西方蜜蜂 *Apis mellifera* (EF506198.1). 比对采用 Clustal X 1.83 软件, 黑色细线示 DNA 结合域, 黑色粗线表示配体结合域. 保守结构域 ZnF\_C4 和 HOL1 分别用实心和空心三角号表示. 黑色、灰色和白色阴影分别表示氨基酸序列一致性为 100%, 80% 和 80% 以下. Multiple sequence alignment was performed with Clustal X 1.83. Black thin line indicates DNA binding domain. Black thick line indicates ligand binding domain. The conserved domain ZnF\_C4 and HOL1 are indicated by solid and hollow triangles, respectively. Black, grey and white shades denote the amino acid sequences with 100%, 80% and below 80% identity, respectively.

致死中量氟啶虫胺胍(0.76 ng/头)处理灰飞虱 4 龄若虫后不同时间点 *LsERR* 的转录水平如图 4 (A) 所示, 与氟啶虫胺胍处理灰飞虱 6, 72 和 144 h 相比, 灰飞虱在处理 12 - 48 h 时间段之间表达量显著上调 ( $P < 0.05$ ), *LsERR* 基因 12 h 时启动上调表达, 24 h 达到表达高峰, 48 h 表达量下调, 但大于 12 h 时的表达量, 72 h 和 144 h 时恢复到正常表达水平. 灰飞虱不同组织暴露氟啶虫胺胍 24 h 后 *LsERR* 的转录水平如图 4 (B) 所示, 头部中检测到微弱表达, 胸部中未有表达, 然而在腹部中特异性高表达 ( $P < 0.05$ ). 丙酮与清水处理灰飞虱不同时间点和不同组织中 *LsERR* 的相对表达量均没有显著差异.

### 3 讨论

本研究克隆了 *LsERR* 基因的全长 cDNA, 其编码的蛋白序列与其他昆虫 ERR 大小及结构基本一致, 具有核受体家族的 5 个经典功能域: A/B 区, N 末端高度可变的配体非依赖性转录激活区 (第 1 - 74 位氨基酸); C 区, DNA 结合区, 是核受体高度保守的区域, 包括两个高度保守的锌指结构 (第 75 - 168 位氨基酸); D 区, 铰链区, DBD 和 LBD 区之间受体二聚体结构弹性区 (第 169 - 193 位氨基酸); E 区, LBD 区, C 端配体结合区 (第 194 - 416 位氨基酸); F 区, 配体依赖性转录激活域 AF-2, 其功能包

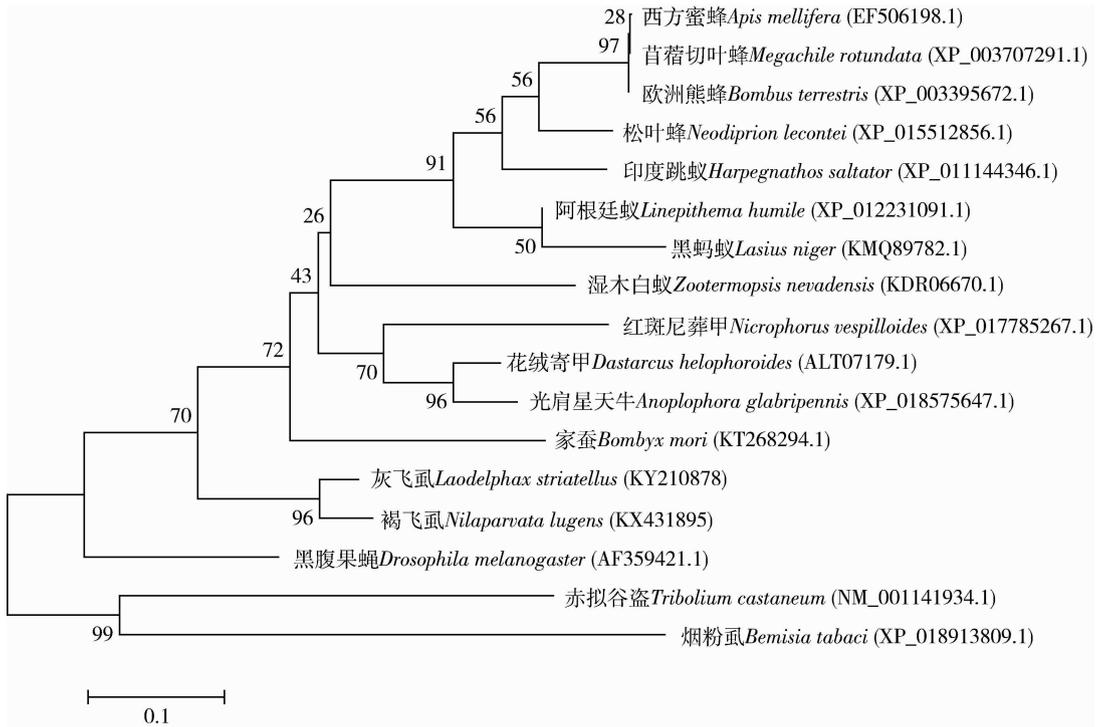


图3 灰飞虱和其他昆虫种 ERR 基因发育进化树构建分析

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of ERR gene in *Laodelphax striatellus* and other insect species

系统发育树用邻位相接法进行了 1 000 次重复构建;以 0.1 的遗传距离作为标尺,各节点旁数值表示 ERR 基因在该标度枝进化过程中变化的程度;物种名称后为序列的 GenBank 登录号。Phylogenetic tree was constructed by the neighbor-joining method with 1 000 replications. The genetic distance of 0.1 is used as the scale bar. Numbers next to each node indicate the extent to which the ERR gene changed during the evolution of the scale branch. GenBank accession number is given after the species name.

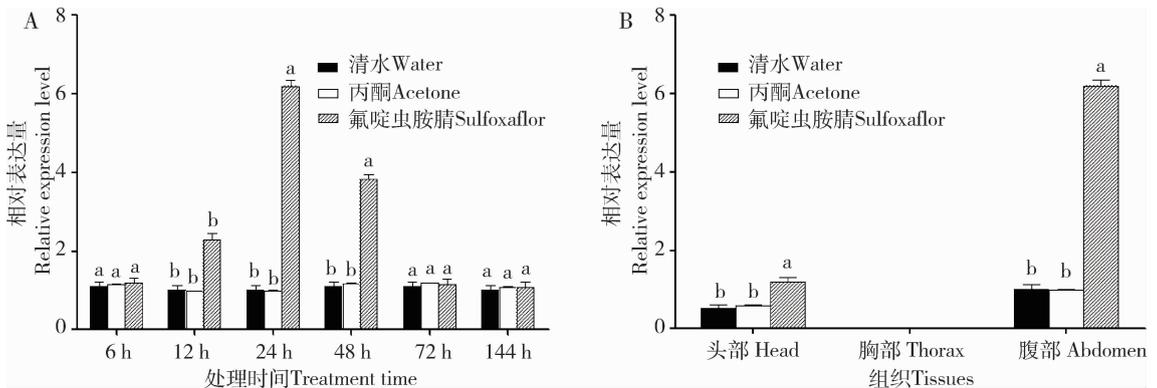


图4 灰飞虱4龄若虫 *LsERR* 基因在致死中量氟啶虫胺脒(0.76 ng/头)处理下不同时间点(A)和不同组织中(B)的相对表达量

Fig. 4 Expression profiles of *LsERR* in the 4th instar nymphs of *Laodelphax striatellus* exposed to the LD<sub>50</sub> of sulfoxaflor (0.76 ng/individual) at different time (A) and in different tissues (B)

图中数据为平均数 ± 标准误。不同字母表示经采用 One-way ANOVA 法检验差异显著 ( $P < 0.05$ , Tukey 氏多重比较)。Data are mean ± SD. Different letters above bars indicate significant difference by One-way ANOVA ( $P < 0.05$ , Tukey's range test).

括形成受体二聚体,配体识别以及结合辅助因子(第 417 - 419 位氨基酸)。ERR 最早是以 ER 的 DNA 结合区作为探针在筛选人心脏和肾脏 cDNA

文库时获得的(Giguère *et al.*, 1988),目前在哺乳动物中共发现 3 种 ERR,即  $ERR\alpha$ ,  $ERR\beta$  和  $ERR\gamma$ 。由于该基因与 ER 具有很强的同源性,因此其蛋白

被命名为雌激素相关受体,与 ER 共同构成核受体超家族第 3 亚族(NR3),3 种 *ERR* 组织表达及功能存在一定的特异性(欧阳霞辉等, 2015)。ERRs 不与雌激素结合,在没有配体的情况下与共激活因子作用而激活目标基因的表达,哺乳动物 *ERR* 的生物学功能主要体现在参与雌激素信号途径,在骨骼组织和乳腺组织中与 ER 拥有共同的靶基因。研究发现 *ERR* 可以调节果蝇的糖酵解途径,对调控果蝇生殖发育和新陈代谢起作用(Luo *et al.*, 2003),至今未在生物体内找到 *ERR* 的小分子配体,被称为孤儿核受体(Hong *et al.*, 1999)。昆虫中不存在雌激素及其受体,所以昆虫 *ERR* 不可能通过雌激素信号途径发挥作用,*ERR* 的功能除了糖酵解途径,是否可以在杀虫剂代谢解毒中发挥作用? 研究发现,DDT 抗性果蝇中甘氨酸插入在 *ERR* 基因的铰链区接近 LBD 的 5' 末端,导致多个细胞色素 P450 基因(*Cyp12d1*, *Cyp6g2* 和 *Cyp9c1*)过表达,甘氨酸插入等位基因在一些果蝇品系是普遍现象(Sun *et al.*, 2015)。Tennessen 等(2011)研究发现,*ERR* 双突变果蝇幼虫中 *Cyp6a8* 和 *Cyp9c1* 表达量上升。细胞色素 P450 酶在代谢系统中作为初级代谢酶系,可以催化多类外源物质,在解毒酶系中占有重要位置,是害虫产生抗性的重要机制(Scott, 1999)。P450 基因具有可诱导性,在化学物质的胁迫下加速合成正常水平的 P450 蛋白,从而代谢高毒化合物。烯啶虫胺和二嗪磷可以诱导果蝇的 *Cyp6g2* 过表达,DDT、环虫腈、苯巴比妥和过氧化氢可以诱导 *Cyp12d1* 的过表达,由此可知 *Cyp12d1* 和 *Cyp6g2* 响应外源物质胁迫并代谢之(Sun *et al.*, 2015)。*PXR* 和 *CAR* 在果蝇中的同源性基因 *DHR96* 被证实涉及一些苯巴比妥诱导的基因调控,包括 P450,然而只有 10% 的基因被 *DHR96* 的突变调控,同时在果蝇的氯菊酯抗性品系中 *DHR96* 表达没有涉及 *CYP6D1* 表达的上调(King-Jones *et al.*, 2006)。在甲壳类淡水枝角水蚤相似的研究表明,*DHR96* 同源基因能够被内源和外源性物质激活(Karimullina *et al.*, 2012),表明 *DHR96* 在脂类代谢和外源物质感受中的作用,然而 *DHR96* 绑定外源物质和激活代谢酶表达的证据需要进一步支撑。这些研究表明,*HR96* 在调控外源物质代谢中有局限性。灰飞虱转录组中尚未发现 *HR96*,豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* 基因组中缺失 *HR96*,*HR96* 功能冗余允许蚜虫发展其他核受体替代功能(Christiaens *et al.*, 2010),可以推测灰飞虱体内存在替代 *HR96* 的代谢性核受体应对外源性物

质胁迫,本研究对农业害虫灰飞虱 *ERR* 的全长 cDNA 进行克隆并采用生物信息学方法进行分析,为深入研究昆虫 *ERR* 在外源物质代谢中的功能提供一定的理论基础。

根据 Blast 和 GeneDoc 序列比对,灰飞虱与烟粉虱的 *ERR* 氨基酸序列一致性为 70%,与黑腹果蝇 *ERR* 氨基酸序列一致性较低(45%),但与黑腹果蝇的 DBD 和 LBD 的位置区域一致,表明 *LsERR* 的关键功能性特征高度保守。灰飞虱与烟粉虱的 *ERR* 氨基酸序列一致性高,可能因为半翅目与同翅目的进化关系较近。通过构建氨基酸序列进化树可以看出,灰飞虱与褐飞虱 *ERR* 聚为一支,同源性高,亲缘关系较近,步长值为 96%,与黑腹果蝇等双翅目昆虫遗传距离相对较远,但与来自灰飞虱的遗传分支,保持平行的进化关系,这为解释与果蝇 *ERR* 氨基酸序列相似性较低但保守区域一致性提供了理论依据。脊椎动物 *ERR* 的配体结合区是由 12 个  $\alpha$  螺旋(H1 - H12)形成的一个三明治式的结构,*LsERR* 比脊椎动物 *ERR* 少一个  $\alpha$  螺旋。然而,西方蜜蜂和拟黑多刺蚁 *ERR* 的配体结合区也是由 11 个  $\alpha$  螺旋组成(欧阳霞辉等, 2015),推测 *LsERR* 具有完整氨基酸序列,和其他昆虫的 *ERR* 相匹配。

为了初步了解灰飞虱 *LsERR* 的功能特征,本研究使用 qPCR 分析氟啶虫胺胍致死中量处理灰飞虱 4 龄若虫后 *LsERR* 时空表达特征。氟啶虫胺胍是美国陶氏益农公司在 2010 年开发出包含独特化学结构的磺酰亚胺类杀虫剂,用于防治刺吸式昆虫,与其他类似杀虫剂相比,显示出高水平的致死效应(Babcock *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2011)。目前,灰飞虱已对毒死蜱和吡虫啉产生抗性和交互抗性,这意味着第 3 代新烟碱类杀虫剂吡虫啉存在抗性风险。拟除虫菊类杀虫剂在水稻上被禁止,然而在小麦上喷洒易导致灰飞虱抗性(Xu *et al.*, 2013);甲维盐、阿维菌素和氯虫苯甲酰胺已在水稻田中使用较长时间,将来防治效率可能下降;因此,笔者推测氟啶虫胺胍可能将成为灰飞虱综合治理的候选药剂,同时也是本文选用其诱导 *LsERR* 表达,探索核受体在杀虫剂代谢中作用的重要原因。研究发现,*LsERR* 在 12 h 表达量提高 1.33 倍,表现出其对氟啶虫胺胍胁迫信号的快速响应,在 24 h 达到表达高峰(6.57 倍),推测 *LsERR* 调控解毒酶降解氟啶虫胺胍的效率达到高峰,在 48 h 表达下降(3.96 倍),在 72 h 表达恢复至正常水平,这些结果表明灰飞虱 *LsERR* 暴露在氟啶虫胺胍下表现出时间效应,诱导

的 *LsERR* 高表达可能参与杀虫剂的代谢过程。同样地,诱导 P450 基因表达也表现出时间效应,研究显示马拉硫磷亚致死剂量  $LD_{15}$  处理飞蝗, *CYP4G62* 的相对表达量呈现先升高后降低的趋势,在 24 h 基因表达最高; *CYP6EL1* 的相对表达量呈现先降低后升高的趋势,在 48 h 基因表达量最高; *CYP9AQ1* 基因的相对表达水平在 6 ~ 24 h 受到一定的抑制,48 h 基因表达水平显著提高(于荣荣等, 2012),相似的诱导特性可以推测 *LsERR* 和 P450 基因存在相关性。灰飞虱不同组织暴露氟啶虫胺腈后, *LsERR* 在腹部的相对表达量(6.57 倍)显著高于头部(0.33 倍),在胸部未检测到 *LsERR* 表达。昆虫脂肪体、中肠和马氏管集中在昆虫腹部,这些器官在外源物质代谢中扮演着重要作用,限制了杀虫剂扩散和减小了毒理效应(Zhou *et al.*, 2012)。可以推测除了 *ERR* 在昆虫生殖、胚胎发育、蜕皮和变态中的角色,过量表达的 *LsERR* 有助于昆虫适应寄主植物和幸存在化学环境中(Cruzeiro *et al.*, 2016)。

灰飞虱作为危害水稻生产的主要害虫,化学防治是控制其暴发传病的有效手段。然而,抗药性的发生导致常用杀虫剂防效下降。灰飞虱的 *CYP2*, *CYP3* 和 *CYP4* 家族普遍参与到杀虫剂的抗性形成中,如 *CYP6AY3v2*, *CYP306A2v2* 和 *CYP353DIv2* 参与灰飞虱对毒死蜱的抗性(Xu *et al.*, 2014);灰飞虱抗溴氰菊酯品系发现多个 P450 基因过表达如 *CYP439A1v3*, *CYP6AY3v2*, *CYP314A1v2*, *CYP6FU1* 和 *CYP353DIv2* (Xu *et al.*, 2013);灰飞虱的 *CYP4DE1* 和 *CYP6CW3v2* 导致吡虫啉抗性形成(Elzaki *et al.*, 2015),但过表达的细胞色素 P450 基因的调控因子和途径不明确。核受体作为代谢和毒理传感器,使生物体能够快速地适应环境变化,诱导相应的代谢基因和转运途径(Lin *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2015)。因此本研究克隆了灰飞虱的 *LsERR* 全长,其研究不仅为探索昆虫的 *ERR* 的生理功能奠定了理论基础,更为核受体调控解毒酶基因表达提供了科学依据。核受体在配体诱导下具有转录因子活性,LBD 区结合配体后,诱导核受体 AF-2 区发生构象变化,热休克蛋白解离,核受体发生核转位形成二聚体结合在激素应答元件上,促使染色质的高级结构的解散,染色质发生重建,激活目的基因转录,因此核受体还可能成为防治灰飞虱的潜在靶标,为发展新型高效的核受体配体抑制剂类杀虫剂提供科学依据,为揭示灰飞虱杀虫剂抗性形成提供一个新方向。

## 参考文献 (References)

- Babcock JM, Gerwick CB, Huang JX, Loso MR, Nakamura G, Nolting SP, Rogers RB, Sparks TC, Thomas J, Watson GB, Zhu YM, 2011. Biological characterization of sulfoxaflor, a novel insecticide. *Pest Manag. Sci.*, 67(3): 328–334.
- Bain DL, Heneghan AF, Connaghan-Jones KD, Miura MT, 2007. Nuclear receptor structure: implications for function. *Annu. Rev. Physiol.*, 69: 201–220.
- Bao HB, Gao HL, Zhang YX, Fan DZ, Fang JC, Liu ZW, 2016. The roles of CYP6AY1 and CYP6ER1 in imidacloprid resistance in the brown planthopper: expression levels and detoxification efficiency. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 129: 70–74.
- Bardet PL, Laudet V, Vanacker JM, 2006. Studying non-mammalian models? Not a fool's ERRand! *Trends Endocrinol. Metab.*, 17(4): 166–171.
- Christiaens O, Iga M, Velarde RA, Rougé P, Smaghe G, 2010. Halloween genes and nuclear receptors in ecdysteroid biosynthesis and signalling in the pea aphid. *Insect Mol. Biol.*, 19(Suppl. 2): 187–200.
- Cruzeiro C, Lopes-Marques M, Ruivo R, Rodrigues-Oliveira N, Santos MM, Rocha MJ, Rocha E, Castro LFC, 2016. A mollusk VDR/PXR/CAR-like (NR1J) nuclear receptor provides insight into ancient detoxification mechanisms. *Aquat. Toxicol.*, 174: 61–69.
- Eichner LJ, Giguère V, 2011. Estrogen related receptors (ERRs): a new dawn in transcriptional control of mitochondrial gene networks. *Mitochondrion*, 11(4): 544–552.
- Elzaki MEA, Zhang WF, Han ZJ, 2015. Cytochrome P450 CYP4DE1 and CYP6CW3v2 contribute to ethiprole resistance in *Laodelphax striatellus* (Fallén). *Insect Mol. Biol.*, 24(3): 368–376.
- Francis GA, Fayard E, Picard F, Auwerx J, 2003. Nuclear receptors and the control of metabolism. *Annu. Rev. Physiol.*, 65(65): 261–311.
- Giguère V, 2002. To ERR in the estrogen pathway. *Trends Endocrinol. Metab.*, 13(13): 220–225.
- Giguère V, Yang N, Segui P, Evans RM, 1988. Identification of a new class of steroid hormone receptor. *Nature*, 331(6151): 91–94.
- Hong H, Yang L, Stallcup MR, 1999. Hormone-independent transcriptional activation and coactivator binding by novel orphan nuclear receptor ERR3. *J. Biol. Chem.*, 274(32): 22618–22626.
- Karimullina E, Li Y, Gijupalli GK, Baldwin WS, 2012. Daphnia HR96 is a promiscuous xenobiotic and endobiotic nuclear receptor. *Aquat. Toxicol.*, 116–117(2): 69–78.
- Kim YH, Issa MS, Cooper AMW, Zhu KY, 2015. RNA interference: applications and advances in insect toxicology and insect pest management. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 120: 109–117.
- King-Jones K, Horner MA, Lam G, Thummel CS, 2006. The DHR96 nuclear receptor regulates xenobiotic responses in *Drosophila*. *Cell Metab.*, 4: 37–48.
- Lin GGH, Kozaki T, Scott JG, 2011. Hormone receptor-like in 96 and

- broad-complex modulate phenobarbital induced transcription of cytochrome P450 *CYP6D1* in *Drosophila* S2 cells. *Insect Mol. Biol.*, 20(1): 87–95.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Luo J, Sladek R, Carrier J, Bader JA, Richard D, Giguère V, 2003. Reduced fat mass in mice lacking orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha. *Mol. Cell. Biol.*, 23(22): 7947–7956.
- Östberg T, Jacobsson M, Attersand A, Mata de Urquiza A, Jendeberg L, 2003. A triple mutant of the *Drosophila* ERR confers ligand-induced suppression of activity. *Biochemistry*, 42(21): 6427–6435.
- Ouyang XH, Gao DD, Bai JL, Chen H, 2015. Cloning and analysis of estrogen related receptor gene from *Apis mellifera*. *Genom. Appl. Biol.*, 34(3): 488–494. [欧阳霞辉, 高丹丹, 柏家林, 陈红, 2015. 意大利蜜蜂雌激素相关受体基因全 cDNA 的克隆及分析. 基因组学与应用生物学, 34(3): 488–494]
- Perry T, Batterham P, Daborn PJ, 2011. The biology of insecticidal activity and resistance. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 41(7): 411–422.
- Scott JG, 1999. Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 29(9): 757–777.
- Sun WL, Valero MC, Seong KM, Steele LD, Huang IT, Lee CH, Clark JM, Qiu XH, Pittendrigh BR, 2015. A glycine insertion in the estrogen-related receptor (ERR) is associated with enhanced expression of three cytochrome P450 genes in transgenic *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE*, 10: e0118779.
- Tennessen JM, Baker KD, Lam G, Evans J, Thummel CS, 2011. The *Drosophila* estrogen-related receptor directs a metabolic switch that supports developmental growth. *Cell Metab.*, 13(2): 139–148.
- Wan PJ, Jia S, Li N, Fan JM, Li GQ, 2015. A Halloween gene shadow is a potential target for RNA-interference-based pest management in the small brown planthopper *Laodelphax striatellus*. *Pest Manag. Sci.*, 71(2): 199–206.
- Wang LH, Zhang YL, Han ZJ, Liu YH, Fang JC, 2010. Cross-resistance and possible mechanisms of chlorpyrifos resistance in *Laodelphax striatellus* (Fallén). *Pest Manag. Sci.*, 66(10): 1096–1100.
- Xu L, Wu M, Han ZJ, 2013. Overexpression of multiple detoxification genes in deltamethrin resistant *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae) in China. *PLoS ONE*, 8(11): e79443.
- Xu L, Wu M, Han ZJ, 2014. Biochemical and molecular characterization and cross resistance in field and laboratory chlorpyrifos-resistant strains of *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae) from eastern China. *Pest Manag. Sci.*, 70(7): 1118–1129.
- Xu QF, Le WJ, Zhang JF, Xiong RY, Zhou YJ, 2011. The expression analysis of *mucin* gene from *Laodelphax striatellus* under *Rice stripe virus* invasion. *J. Plant Prot.*, 38(4): 289–297. [徐秋芳, 乐文静, 张金凤, 熊如意, 周益军, 2011. 水稻条纹病毒胁迫对灰飞虱 *mucin* 基因表达量的影响. 植物保护学报, 38(4): 289–297]
- Yu RR, Guo YQ, Zhang JZ, Ma EB, Guo YP, 2012. Effect of sublethal doses of malathion and carbaryl on the P450 genes of *Locusta migratoria*. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 49(3): 693–699. [于荣荣, 郭艳琼, 张建珍, 马恩波, 郭亚平, 2012. 亚致死剂量马拉硫磷和西维因对飞蝗 P450 基因表达研究. 应用昆虫学报, 49(3): 693–699]
- Zhou WW, Li XW, Quan YH, Cheng JA, Zhang CX, Gurr G, Zhu ZR, 2012. Identification and expression profiles of nine glutathione S-transferase genes from the important rice phloem sap-sucker and virus vector *Laodelphax striatellus* (Fallén) (Hemiptera: Delphacidae). *Pest Manag. Sci.*, 68(9): 1296–1305.
- Zhu YM, Loso MR, Watson GB, Sparks TC, Rogers RB, Huang JX, Gerwick BC, Babcock JM, Kelley D, Hegde VB, Nugent BM, Renga JM, Denholm I, Gorman K, DeBoer GJ, Hasler J, Meade T, Thomas JD, 2011. Discovery and characterization of sulfoxaflo, a novel insecticide targeting sap-feeding pests. *J. Agric. Food Chem.*, 59(7): 2950–2957.

(责任编辑: 马丽萍)