



周昕雨, 李金萍, 黄聪, 许博, 崔建臣, 万方浩, 张毅波, 桂富荣, 张桂芬. 番茄潜叶蛾谷胱甘肽-S-转移酶基因 *TabsGSTs2* 的克隆及与 α -番茄碱的分子对接分析 [J]. 环境昆虫学报, 2025, 47 (1): 56–65. ZHOU Xin-Yu, LI Jin-Ping, HUANG Cong, XU Bo, CUI Jian-Chen, WAN Fang-Hao, ZHANG Yi-Bo, GUI Fu-Rong, ZHANG Gui-Fen. Gene cloning of glutathione-S-transferase (*TabsGSTs2*) in *Tuta absoluta* and its molecular docking analysis with α -tomatine [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2025, 47 (1): 56–65.

番茄潜叶蛾谷胱甘肽-S-转移酶基因 *TabsGSTs2* 的克隆及与 α -番茄碱的分子对接分析

周昕雨^{1,2*}, 李金萍^{3*}, 黄聪², 许博², 崔建臣³, 万方浩²,
张毅波², 桂富荣^{1**}, 张桂芬^{2**}

(1. 云南农业大学植物保护学院, 云南生物资源保护与利用国家重点实验室, 昆明 650201;

2. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害综合治理国家重点实验室, 北京 100193; 3. 北京市植物保护站, 北京 100029)

摘要: 谷胱甘肽-S-转移酶 (Glutathione-S-transferases, GSTs) 在昆虫适应植物次生代谢物质中发挥重要作用, 为明确番茄潜叶蛾 *Tuta absoluta* 的 GSTs 基因在其响应 α -番茄碱胁迫中的作用。本研究利用 PCR 技术克隆了番茄潜叶蛾 *TabsGSTs2* 基因全长, 通过生物信息学方法分析了 *TabsGSTs2* 基因的序列特征、理化特性、保守结构域、基因结构和进化关系, 通过 RT-qPCR 技术测定了 α -番茄碱胁迫下 *TabsGSTs2* 基因的表达情况, 利用同源建模和分子对接研究了 *TabsGSTs2* 和 α -番茄碱的结合能力与结合模式。结果表明, *TabsGSTs2* 基因的 CDS 全长为 609 bp, 编码 203 个氨基酸, 理论等电点为 8.47, 分子量为 23.895 kDa; *TabsGSTs2* 具有 4 个 β -折叠和 9 个 α -螺旋, 具有典型的 GSTs 保守结构域, 包括 GSH 结合位点 (G-site) 和底物结合位点 (H-site); *TabsGSTs2* 属于 sigma 亚家族成员, 与苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* 的 *CpGSTs2* 亲缘关系较近; α -番茄碱胁迫下, *TabsGSTs2* 基因在 72 h 的表达量显著高于对照; *TabsGSTs2* 与 α -番茄碱的结合能力较强, 主要以氢键、疏水作用力和盐桥等相互作用维持稳定的结合。研究结果可为后续研究番茄潜叶蛾适应 α -番茄碱的分子机制提供参考, 为进一步挖掘番茄潜叶蛾防控新靶标提供基础。

关键词: 番茄潜叶蛾; α -番茄碱; 谷胱甘肽-S-转移酶; 解毒代谢; 分子对接

中图分类号: Q963

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2025) 01-0056-10

Gene cloning of glutathione-S-transferase (*TabsGSTs2*) in *Tuta absoluta* and its molecular docking analysis with α -tomatine

ZHOU Xin-Yu^{1,2*}, LI Jin-Ping^{3*}, HUANG Cong², XU Bo², CUI Jian-Chen³, WAN Fang-Hao², ZHANG Yi-Bo², GUI Fu-Rong^{1**}, ZHANG Gui-Fen^{2**} (1. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bioresources in Yunnan, Plant Protection College of Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; Beijing Plant Protection Station, Beijing 100029, China)

Abstract: Glutathione-S-transferases (GSTs) play an important role in insect adaptation to plant secondary metabolites. To clarify the role of the GST gene in the detoxification of *Tuta absoluta* to α -tomatine, we first

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2021YFD1400200); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (S2023XM27); 云南省科学技术厅基础研究专项 (202301AT070485)

*共同第一作者: 周昕雨, 女, 硕士研究生, 研究方向为入侵生物学, E-mail: 840403250@qq.com; 李金萍, 女, 博士, 正高级农艺师, 研究方向为农作物病虫害生物防治, E-mail: lijinpings0011@163.com

**共同通讯作者 Author for correspondence: 张桂芬, 女, 博士, 研究员, 研究方向为入侵生物学, E-mail: guifenzhang3@163.com; 桂富荣, 男, 博士, 教授, 研究方向为入侵生物学, E-mail: furonggui18@sina.com

收稿日期 Received: 2024-08-16; 修回日期 Revision received: 2024-11-08; 接受日期 Accepted: 2024-11-09

cloned the full-length sequence of *TabsGSTs2* gene. Bioinformatic analysis was employed to analyze the sequence characteristics, physicochemical properties, conserved domains, gene structure, and evolutionary relationships of the *TabsGSTs2* gene. The expression levels of *TabsGSTs2* under α -tomatine stress were measured using RT-qPCR, and the binding capacity and mode of *TabsGSTs2* to α -tomatine were investigated using homology modeling and molecular docking. The results showed that the CDS of *TabsGSTs2* was 609 bp, encoding 203 amino acids, with a theoretical isoelectric point of 8.47 and a molecular weight of 23.895 kDa. *TabsGSTs2* contains four β -sheets and nine α -helices, and had the typical conserved domains of GST genes, including the GSH binding site (G-site) and the substrate binding site (H-site). Phylogenetic analysis indicated that *TabsGSTs2* belongs to the sigma subfamily and was closely related to *CpGSTs2* of *Cydia pomonella*. Under α -tomatine stress, the expression level of *TabsGSTs2* was significantly higher than that of the control at 72 h. Molecular docking results suggested that *TabsGSTs2* bind strongly to α -tomatine, with the interaction being stabilized primarily by hydrogen bonds, hydrophobic forces, and salt bridges. Our study provides reference for subsequent studies of the molecular mechanisms of *T. absoluta* adaptation to α -tomatine and provides a basis for further exploration of new targets for the control of *T. absoluta*.

Key words: *Tuta absoluta*; α -tomatine; glutathione-S-transferase; detoxification metabolism; molecular docking

植物次生代谢物是植物在长期进化过程中形成的一类非直接参与日常生理功能的化合物,但对植物生存和适应环境起到重要作用,尤其是起到对昆虫和病原菌的防御作用 (Beran and Petschenka, 2022)。植物次生代谢物质主要包括黄酮类、萜类和生物碱类化合物,生物碱是一种生物活性较强的含氮化合物,主要分为糖苷生物碱 (Steroidal glycoalkaloids, SGAs)、烟碱 (尼古丁)、萜类吲哚生物碱 (Terpenoid indole alkaloids, TIAs) 和苄基异喹啉生物碱 (Benzylisoquinoline alkaloids, BIAs) (熊安平等, 2021)。糖苷生物碱是番茄 *Solanum lycopersicum* 和马铃薯 *Solanum tuberosum* 等茄科植物中广泛存在的一类重要的次生代谢产物,其中, α -番茄碱 (α -tomatine) 是番茄中特异的一类 SGA,可有效抵御病原菌和昆虫的侵害。例如, α -番茄碱对甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 和马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 的生长发育具有显著抑制作用,同时,损害甜菜夜蛾羽化、导致畸形、影响体重和寿命 (Campbell and Duffey, 1981; Kowalski *et al.*, 2000)。用含有 α -番茄碱的人工饲料饲喂斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 幼虫,随着 α -番茄碱含量增加,斜纹夜蛾幼虫体重增长率显著下降 (Sun *et al.*, 2019)。da Silva 等 (2022) 测定了 4 种植物次生代谢物对番茄潜叶蛾 *Tuta absoluta* 的毒性,发现 α -番茄碱对番茄潜叶蛾毒性最强,依次是香豆素 (Coumarin)、对伞花炔

(p-cymene)、十三烷酮 (Tridecanone)。

植食性昆虫在与植物长期协同进化过程中,也发展出一套针对植物次生代谢物毒性的反防御策略,即通过各种解毒代谢酶来降低次生物质的毒性,这些解毒代谢酶包括:谷胱甘肽-S-转移酶 (Glutathione S-transferases, GSTs)、羧酸酯酶 (Carboxylesterases, CarEs) 和细胞色素 P450 酶 (Cytochrome P450s, CYP450s) 等解毒酶 (Zhang *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2022, 2023)。GSTs 作为一种关键的解毒代谢酶,在昆虫的反防御机制中起重要作用,是昆虫应对环境压力和保护自身免受损害的重要机制之一。GSTs 对次生物质解毒代谢主要有以下几种方式:(1) 直接代谢;(2) 将次生物质包裹起来,避免与靶标位点接触;(3) 抗氧化活性 (Koirala *et al.*, 2022)。如斜纹夜蛾在受到 α -番茄碱胁迫时,中肠和脂肪体中有大量基因上调表达,其中包括 7 个 P450s、8 个 GSTs 和 3 个 CarEs 等解毒代谢酶基因 (Li *et al.*, 2019)。

番茄潜叶蛾 *Tuta absoluta* (Meyrick) 属鳞翅目 Lepidoptera 麦蛾科 Gelechiidae, 是一种世界范围内的入侵害虫,该虫原产于南美洲的秘鲁,2017 年 8 月首次被发现入侵我国新疆伊犁地区 (张桂芬等, 2019; Zhang *et al.*, 2020), 目前已在我国新疆、云南、贵州等 20 余个省 (自治区、直辖市) 发生与危害,严重威胁“菜篮子”保供安全。2023 年 11 月 10 日,农业农村部将番茄潜叶蛾增补

纳入《一类农作物病虫害名录》管理。番茄潜叶蛾主要危害茄科植物,包括番茄、马铃薯、茄子 *Solanum melongena* 和烟草 *Nicotiana tabacum* 等,尤其嗜食番茄,当防治不及时时,可造成80%~100%的番茄产量损失,是番茄的毁灭性害虫 (Biondi *et al.*, 2018, 张桂芬等, 2018)。目前,番茄潜叶蛾的防控主要以使用化学农药为主,然而,高强度和大量使用杀虫剂导致该虫已对有机磷类、拟除虫菊酯类、阿维菌素、双酰胺类、多杀菌素和几丁质合成抑制剂等化学农药和生物农药产生了严重抗药性 (Biondi *et al.*, 2018; Guedes *et al.*, 2019; 李晓维等, 2022)。因此,亟需挖掘新的防控靶标进而研发环境友好型的防治方法。 α -番茄碱是番茄主要次生代谢物,对多种害虫具有很强的毒性,但番茄潜叶蛾却能够耐受 α -番茄碱,因此,研究明确番茄潜叶蛾适应 α -番茄碱的解毒代谢机制将能够为其有效防控提供新的靶标。

本团队前期研究发现一个GST基因 (*Tabs013460.1*) 在以番茄为寄主植物的番茄潜叶蛾中肠中高表达,且该基因也在脂肪体中高表达 (黄聪等, 待发表数据),推测该基因可能参与番茄潜叶蛾对 α -番茄碱的解毒代谢。因此,本研究以该基因为靶标基因,克隆获得其CDS全长序列,并对其理化特性、序列特征等进行分析,通过构建进化树明确该基因属于Sigma亚家族,利用RT-qPCR技术测定该基因在 α -番茄碱胁迫下的表达情况,最后通过同源建模和分子对接研究该基因与 α -番茄碱的结合能力和结合模式。结果可为后续研究番茄潜叶蛾适应 α -番茄碱的分子机制提供基础支撑。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

本试验所用虫源为2018年12月采自云南省玉溪市红塔区阳瑞农业科技发展有限公司有机果蔬生产基地的番茄潜叶蛾种群,并在室内利用番茄幼苗饲养至25代以上,饲养条件为温度 $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$,相对湿度 $60\%\pm 5\%$,光周期L:D=16:8。选择同批次发育整齐的番茄潜叶蛾2龄幼虫进行相关试验。

1.2 供试试剂及仪器

试剂:98% α -番茄碱 (α -tomatine) 标准品为

北京华越洋生物科技有限公司产品;二甲基亚砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO) 为北京索莱宝科技有限公司产品;小量RNA提取试剂为简石生物技术 (浙江) 有限公司产品;琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒为日本TaKaRa公司产品;Hifair[®] III 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (gDNA digester plus)、Hieff[®] qPCR SYBR[®] Green Master Mix (Low Rox)、2 \times Hieff Canace Gold PCR Master Mix 高保真酶预混液、DH5 α 化学感受态细胞为上海翌圣生物科技有限公司产品;零背景pTOPO-TA/Blunt 通用克隆试剂盒为北京艾德莱生物科技有限公司产品;Trans2K[®] DNA Marker为北京全式金生物技术有限公司产品。

仪器:ABI 7500 实时荧光定量PCR仪,美国Thermo Fisher Scientific公司;超微量紫外可见分光光度计,杭州遂真生物技术有限公司;T100 PCR仪,美国BIO-RAD公司。

1.3 总RNA提取与cDNA合成

用小量RNA提取试剂盒 (简石生物技术 (浙江) 有限公司) 提取番茄潜叶蛾3龄幼虫的总RNA。利用超微量紫外可见分光光度计 (杭州遂真生物技术有限公司) 检测RNA样品的完整性及浓度,并用1%琼脂糖凝胶电泳检测总RNA的质量。使用Hifair[®] III 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (gDNA digester plus) 反转录试剂盒合成cDNA第1链于 -20°C 冰箱保存备用,剩余RNA于 -80°C 低温冰箱保存。

1.4 基因克隆

使用Primer Premier 5.0软件根据*TabsGSTs2*基因全长信息设计引物扩增基因的完整开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 序列。PCR反应体系 (25 μL): 2 \times Hieff Canace Gold PCR Master Mix 12.5 μL , 上游和下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各1.25 μL , cDNA 1 μL , ddH₂O 9 μL 。扩增条件: 95°C 预变性3 min; 98°C 变性10 s, 55°C 退火20 s, 72°C 延伸30 s, 35个循环; 72°C 终延伸5 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶后,于紫外光下用消毒干净刀片切下含目的片段的胶块,使用胶回收试剂盒回收纯化。目的片段连接至pTOPO-TA/Blunt载体,转化至大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞后,挑取单克隆并在液体LB培养基中振荡培养6 h,菌液经PCR验证后送至北京睿博兴科生物技术有限公司测序。

表1 实验中所用引物

Table 1 Primers used in the experiment

引物名称 Primers	引物序列(5'-3') Primer sequence	产物大小(bp) Product size	引物用途 Primer usage
<i>TabsGSTs2</i> -F	TGGTCAACGCAGCAACA	630	cDNA cloning
<i>TabsGSTs2</i> -R	GATTAACACGAGTAAGG		
<i>TabsGSTs2</i> -qF	AGAACAGGACCCCGTG	115	RT-qPCR
<i>TabsGSTs2</i> -qR	TCCGAAGAATCCGCCA		
<i>RpL5</i> -F	CAGTCGTCGAGCCAGCAACA	129	
<i>RpL5</i> -R	TCCCGCATTGAAGGAGACCA		

1.5 生物信息学分析

利用在线网站 ExPASy Compute pI/Mw (https://web.expasy.org/compute_pi/) 预测 *TabsGSTs2* 的蛋白质分子量、等电点等理化特性。利用 Python 脚本 (<https://github.com/jackiexls/ChrLocPlotter>) 绘制 *TabsGSTs2* 基因在染色体上的定位图, 从基因组 GFF3 文件中提取 *TabsGSTs2* 基因结构信息, 提交至在线网站 GSDS 2.0 (<https://gsds.gao-lab.org/>) 绘制基因结构图。为鉴定 *TabsGSTs2* 基因保守结构域, 将其氨基酸序列提交至 NCBI CDD 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), 分析 *TabsGSTs2* 的保守结构域、GSH 结合位点 (G-site) 和底物结合位点 (H-site) 等活性位点。为鉴定 *TabsGSTs2* 的二级结构, 将 *TabsGSTs2* 的氨基酸序列和褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 谷胱甘肽-S-转移酶 *NlugGSTs2* 基因 (pdb: 5h5l) 氨基酸序列合并后, 利用 MAFFT v7 软件 (默认参数) 软件进行比对 (Kato et al., 2002), 比对后的序列提交至 ESPript 3.0 (<https://espript.ibcp.fr/ESPrript/cgi-bin/ESPrript.cgi>) 进行可视化, 并鉴定 α 螺旋和 β 折叠位置。

将 *TabsGSTs2* 基因的氨基酸序列与家蚕 *Bombyx mori* (Yu et al., 2008) 和苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* (Hu et al., 2022) 的 GSTs 基因共计 39 条氨基酸序列合并后构建系统发育树, 首先, 利用 MAFFT v7 软件 (默认参数) 对这些基因的氨基酸序列进行多重比对 (Kato et al., 2002), 比对后的序列利用 trimAl v1.2 软件 (参数设置为: -automated1) 进行裁剪 (Capella-Gutiérrez et al., 2009), 利用 ProtTest3 v3.4.2 软件 (Darriba et al., 2011) 计算最佳氨基酸替代模型为 “I+LG”, 随后利用 RAxML 软件 (Stamatakis, 2014) 构建系统发

育树, bootstrap 值设置为 1 000。

1.6 α -番茄碱胁迫下 *TabsGSTs2* 基因表达水平分析

参照先前的研究利用 DMSO 配置浓度为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 α -番茄碱溶液 (da Silva et al., 2022)。供试番茄品种为 “口感番茄”, 番茄植株生长至 50 cm 高时, 取植株中部羽状复叶, 将番茄羽状复叶从叶柄处剪下, 自然晾干, 然后用裁纸刀将叶柄斜切后将叶片插入打好孔的 1.5 mL 离心管中, 处理组离心管内添加 1 mL 番茄碱溶液, 置于直径 15 cm 的塑料培养皿中, 待溶液被叶片完全吸收后, 挑选生长状况基本一致的番茄潜叶蛾 2 龄幼虫进行试验, 对照为等体积的 DMSO 溶剂处理和清水处理, 其他条件相同。每个培养皿放置 5 头幼虫, 30 头为一个生物学重复, 每个处理设 3 次生物学重复, 分别于 12 h、24 h、48 h、72 h 取样。

样品经液氮速冻后放置于 -80°C 冰箱保存。RNA 提取同 1.3, 以番茄潜叶蛾 *RPL5* 基因作为内参基因, 采用 RT-qPCR 方法分析番茄潜叶蛾 *TabsGSTs2* 基因的表达水平。*TabsGSTs2* 基因 RT-qPCR 引物由上海生工生物有限公司合成。采用 7500 Real Time System PCR 仪进行两步法扩增。反应体系 (10 μL): Hieff qPCR SYBR Green Master Mix (Low Rox Plus) 5 μL , 上下游引物 (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 各 0.2 μL , cDNA 模板 0.5 μL , ddH₂O 4.1 μL 。反应条件: 95°C 5 min, 95°C 10 s, 60°C 34 s, 共 40 个循环。

1.7 同源建模与分子对接

将 *TabsGSTs2* 基因的氨基酸序列提交至在线网站 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 进行同源建模获得其三维结构, 随后利用在线网站 SAVES v6.1 (<https://saves.mbi.ucla.edu/>) 中的

ERRAT、WHATCHECK 和 PROCHECK 程序对所构建的模型进行评估, 确保同源建模所获得的模型可靠性, 利用 PyMOL v2.2.3 软件可视化 TabsGSTs2 的三维结构 (DeLano, 2002)。从 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中下载 α -番茄碱的结构文件。利用 Molecular Operating Environment (MOE) 对 TabsGSTs2 和 α -番茄碱进行分子对接以研究它们的结合模式和结合能力, 对接方法参照先前的研究 (Chen *et al.*, 2022; Zhou *et al.*, 2024); 利用在线服务器 PLIP (Protein-Ligand Interaction Profiler, <https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>) 分析与 α -番茄碱结合的相互作用力和关键氨基酸残基。

1.8 数据分析

番茄潜叶蛾 *TabsgSTs2* 基因相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算。试验结果以平均值 \pm 标准误差 (Mean \pm SE) 表示, 并采用 SPSS 26 (IBM) 软件对不同处理间的结果进行单因素方差分析 (One-way ANOVA), 平均数差异以 Duncan 氏新复极差检验法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 番茄潜叶蛾谷胱甘肽-S-转移酶 *TabsgSTs2* 基因克隆及序列特征分析

通过 PCR 克隆和基因测序, 获得了番茄潜叶蛾 1 个 GST 基因 (基因组 ID: Tabs013460.1) 的全长 cDNA 序列, 通过保守结构域分析, 发现其具有 N 端保守结构域 “GST_N_Sigma_like” 和 C 端保守结构域 “GST_C_Sigma_like”, 且属于 sigma 亚族, 因此, 将其命名为 *TabsgSTs2*。*TabsgSTs2* 基因的 CDS 全长 609 bp, 编码 203 个氨基酸, 理论等电点为 8.47, 分子量为 23.895 kDa。染色体定位和基因结构分析结果表明, *TabsgSTs2* 基因位于 11 号染色体, 包含 5 个外显子和 4 个内含子 (图 1-A)。二级结构分析表明, *TabsgSTs2* 具有 4 个 β -折叠和 9 个 α -螺旋 (图 1-B)。CD-search 预测结果表明, *TabsgSTs2* 蛋白的 GSH 结合位点 (G-site) 包括 Tyr7、Leu13、Gln49、Leu50、Pro51、Gln62 和 Ser63 等氨基酸残基, 底物结合位点 (H-site) 包括 Tyr95、Trp98、Lys99、Val102、Val103、Ile158 和 Thr161 等氨基酸残基 (图 1-B)。

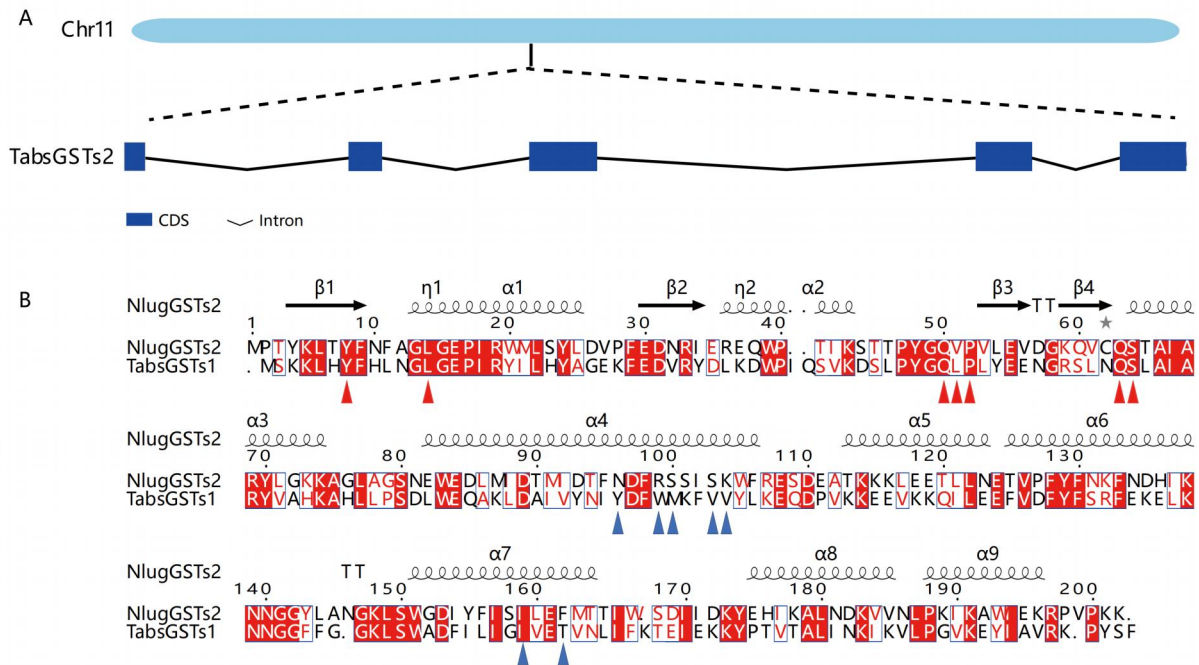


图 1 *TabsgSTs2* 基因染色体定位、基因结构和序列特征

Fig.1 Chromosomal localization, gene structure, and sequence characteristics of *TabsgSTs2*

注: 红色三角表示 GSH 结合位点 (G-site), 蓝色三角表示底物结合位点 (H-site)。Note: The red triangle represented the GSH binding site (G-site), and the blue triangle represents the substrate binding site (H-site).

2.2 *TabsGSTs2* 基因与家蚕和苹果蠹蛾 GST 基因家族系统发育分析

为进一步明确 *TabsGSTs2* 基因与其他昆虫 GSTs 基因之间的进化关系, 下载了 19 个家蚕 GSTs 基因氨基酸序列和 19 个苹果蠹蛾 GSTs 基因的氨基酸序列, 并结合 *TabsGSTs2* 基因的氨基酸序列, 经 MAFFT 软件比对和 TRIMAL 软件裁剪后, 利用

RAxML 软件最大似然法构建系统发育树。结果表明, 所有 GSTs 基因被划分为 6 个亚家族 (Delta, Epsilon, Theta, Zeta, Omega 和 Sigma), 不同亚家族的 GSTs 各自聚为小类群, 说明 GSTs 在进化上相对保守, *TabsGSTs2* 与苹果蠹蛾的 *CpGSTs2* 亲缘关系较近, 并与 *CpGSTs1*、*CpGSTs3*, 以及家蚕的 *BmGSTs1* 和 *BmGSTs2* 一起聚在 Sigma 亚家族分支 (图 2)。

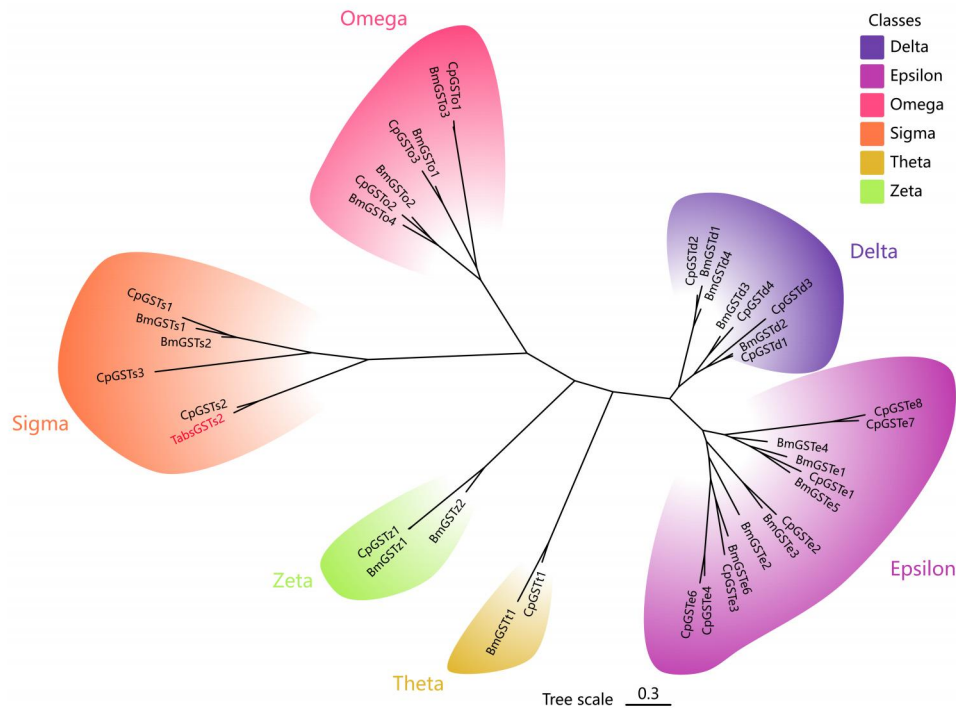


图 2 *TabsGSTs2* 基因和家蚕、苹果蠹蛾 GST 基因家族进化树分析

Fig.2 Phylogenetic relationship of *TabsGSTs2* and the GSTs of *Bombyx mori* and *Cydia pomonella*

2.3 α -番茄碱胁迫下 *TabsGSTs2* 基因表达谱

为进一步探究 *TabsGSTs2* 基因是否参与番茄潜叶蛾对 α -番茄碱的解毒代谢过程, 将通过叶柄吸收 α -番茄碱的番茄叶片用来饲喂番茄潜叶蛾 2 龄幼虫, 待取食 12 h、24 h、48 h 和 72 h 后提取 RNA, 利用 RT-qPCR 技术测定 *TabsGSTs2* 基因的表达量。结果表明, 在幼虫取食 12 h、24 h 和 48 h 后, *TabsGSTs2* 基因在 α -番茄碱、DMSO 和清水 3 种处理下表达量无显著差异 (12 h: $F_{2,6} = 0.615$, $P = 0.572$; 24 h: $F_{2,6} = 1.093$, $P = 0.394$; 48 h: $F_{2,6} = 2.033$, $P = 0.212$), 但在取食 72 h 后, α -番茄碱处理下 *TabsGSTs2* 基因的表达量显著高于 DMSO 处理 ($P = 0.002$) 和清水处理 ($P = 0.001$) 下的表达量, 分别上调了 2.42 倍和 4.06 倍, 而 DMSO 处理与清水处理间差异不显著 ($P = 0.265$) (图 3)。

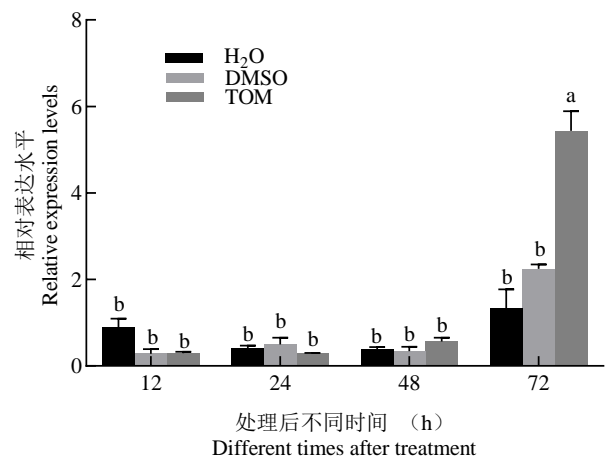


图 3 α -番茄碱胁迫下 *TabsGSTs2* 基因在不同时间段表达情况

Fig.3 Expression level of *TabsGSTs2* at different times under α -tomatine stress

2.4 TabsGSTs2 同源建模及与 α -番茄碱分子对接分析

通过同源比对发现 TabsGSTs2 与 SWISS-MODEL 数据库中褐飞虱的谷胱甘肽-S-转移酶 GSTs2 (pdb: 5h5l.1.A) 一致性较高 (38.38%), 因此, 利用该模板构建了 TabsGSTs2 的 3D 模型, 结果表明, TabsGSTs2 由 4 个 β -折叠和 9 个 α -螺旋组成 (图 4-A)。利用 SAVES v6.1 服务器中的 ERRAT、WHATCHECK 和 PROCHECK 程序对所构建的模型进行评估, 结果表明, ERRAT 值为 98.96%, 远大于 50%; WHATCHECK 评估结果为完整; PROCHECK 结果表明, TabsGSTs2 有 95.6%、3.3% 和 1.1% 的氨基酸残基分别位于合理

区、比较合理区和勉强接受区。由此说明, 所构建的 TabsGSTs2 蛋白结构合理。进一步, 利用 MOE 软件对 TabsGSTs2 和 α -番茄碱进行分子对接, 结果表明, TabsGSTs2 与 α -番茄碱对接打分为 -8.3968, 说明具有较好的结合能力, α -番茄碱位于由 TabsGSTs2 的 $\alpha 1$ 、 $\beta 2$ 和 $\alpha 9$ 组成的口袋处, 相互作用的氨基酸残基包括: His9、His22、Tyr23、Ala24、Gly25、Glu26、Lys27、Phe28、Glu29、Asp30、Arg32、Pro189、Gly190、Glu193、Tyr194、Lys199 (图 4-B)。其中, Tyr23、Glu26 和 Pro189 分别与 α -番茄碱形成氢键作用力, His22 与 α -番茄碱形成盐桥, Lys199 与 α -番茄碱形成疏水作用力 (图 4-C)。

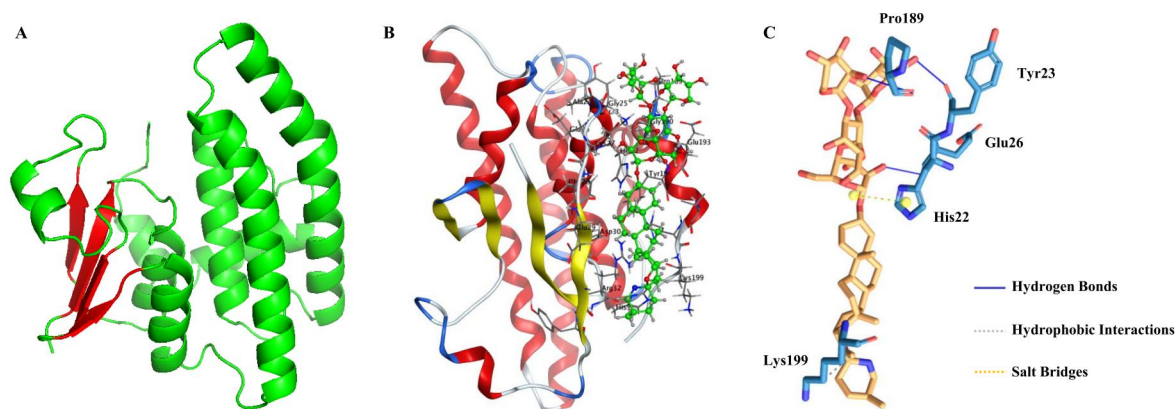


图4 TabsGSTs2蛋白三维结构及与 α -番茄碱分子对接研究

Fig.4 Three-dimensional structure of TabsGSTs2 and molecular docking with α -tomatine

注: A, TabsGSTs2 蛋白三维结构; B, TabsGSTs2 与 α -番茄碱结合模式; C, TabsGSTs2 与 α -番茄碱结合的关键氨基酸残基。Note: A, Three-dimensional structure of TabsGSTs2; B, Binding mode of TabsGSTs2 to α -tomatine; C, Key amino acid residues of TabsGSTs2 binding to α -tomatine

3 结论与讨论

GSTs 是昆虫体内三大解毒酶之一, 在昆虫响应植物次生代谢物等外源有毒化合物中发挥重要作用。 α -番茄碱是番茄中最丰富的一类糖苷生物碱, 会严重影响昆虫的生长发育, 导致畸形甚至死亡。番茄潜叶蛾是番茄的毁灭性害虫, 在长期进化过程中已经形成了对 α -番茄碱的耐受能力, 然而, 其耐受机制尤其是 GSTs 在其解毒代谢过程中的作用与功能尚未明确。

本研究以前期筛选获得的在脂肪体和中肠中高表达的 sigma 亚家族的 GST 基因 (TabsGSTs2) 为靶标, 通过 PCR 技术克隆获得了该基因的 CDS 全

长序列, 编码 203 个氨基酸, 理论等电点为 8.47, 分子量为 23.895 kDa, 二级结构表明, 该基因具有 4 个 β -折叠和 9 个 α -螺旋, 基因结构显示, 含有 5 个外显子和 4 个内含子, 结果与其他昆虫 GSTs 基因的序列特征和理化特性一致 (Hu *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2023a; Ma *et al.*, 2023), 表明该基因属于典型的 GST 基因。二级结构分析结果表明, TabsGSTs2 包括 N 端和 C 端功能结构域, 即 N 端含有与 GSH 结合的 G-site, C 端含有底物结合位点 H-site (Liu *et al.*, 2023b)。多序列比对结果表明, G-site 处氨基酸残基相对保守, 有研究表明 sigma 亚家族中 Tyr8 在不同物种中高度保守 (TabsGSTs2 为 Tyr7), 对于结合 GSH 具有重要作用 (Yamamoto *et al.*, 2006); 底物结合位点 H-site 处

氨基酸残基多样化, 说明该基因功能多样化 (Yamamoto *et al.*, 2012)。

系统发育树结果表明, *TabsGSTs2* 属于 sigma 亚家族, 与苹果蠹蛾的 *CpGSTs1*、*CpGSTs2* 和 *CpGSTs3*, 以及家蚕的 *BmGSTs1* 和 *BmGSTs2* 聚为一支, 其中, 与 *CpGSTs2* 的亲缘关系最近。前期研究表明, *CpGSTs2* 基因参与苹果蠹蛾对高效氯氟氰菊酯的抗药性 (Hu *et al.*, 2020; Hu *et al.*, 2022), *BmGSTs1* 基因具有前列腺素 E 合成酶活性, 可将前列腺素 H₂ 转化为其 E₂ 形式 (Yamamoto *et al.*, 2013), *BmGSTs2* 基因具有抗氧化胁迫功能 (Hirowatari *et al.*, 2017), 因此, 推测 *TabsGSTs2* 基因具有多样化的功能。

昆虫主要通过解毒代谢酶基因的上调表达来对外源有毒物质进行解毒代谢, 如用单宁酸处理豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* 后, 多个 GSTs 基因表达量发生上调 (王继祖等, 2024); 舞毒蛾 *Lymantria dispar* 在寄主植物次生物质黄酮和槲皮素胁迫下, 沉默 *LdGSTe2*、*LdGSTs1*、*LdGSTs2* 和 *LdGSTz1* 等基因后显著降低幼虫存活率和影响生长发育 (齐琪等, 2021); 斜纹夜蛾在取食芥菜或吡啶-3-甲醇和烯丙基异硫氰酸酯等植物次生代谢物时, *SlGSTe1* 基因显著上调表达 (Zou *et al.*, 2016), 进一步研究表明, *SlGSTe1* 基因的表达受 miRNA (Sli-miR-34-5p) 的调控, 进而参与斜纹夜蛾对植物次生物质胁迫的响应 (马康等, 2019)。在本研究中, 番茄潜叶蛾在受到 α -番茄碱胁迫下, *TabsGSTs2* 基因在 72 h 时显著上调表达, 该结果与其他昆虫 GSTs 基因对外源物质响应模式相似, 如: 菵草谷网蚜 *Sitobion miscanthi* 成蚜在 20 mg/L、50 mg/L 和 100 mg/L 浓度真菌毒素脱氧雪腐镰刀菌烯醇胁迫下, *SmisGSTs2* 基因在 72 h 才显著上调表达 (郭娇, 2024); 使用 LC₃₀ 浓度氯虫苯甲酰胺处理美国白蛾 *Hyphantria cunea* 3 龄幼虫, GST 酶活在前 48 h 均被抑制, 而在处理 72 h 显著诱导 GST 酶活性 (范程程, 2023); 使用甲维盐亚致死剂量 (LC₃₀) 处理龟纹瓢虫 *Propylaea japonica* 发现, 不同的酶响应不同, GST 酶活在前 48 h 无显著变化, 72 h 时显著上升, 而羧酸酯酶 (CarE) 12 h 时酶活性无显著变化, 24 h 和 48 h 时酶活性显著上升, 72 h 时酶活性无显著变化 (田碧婷, 2024), 因此, 推测 *TabsGSTs2* 基因参与番茄潜叶蛾对 α -番茄碱的解毒代谢过程。

为进一步明确 *TabsGSTs2* 与 α -番茄碱的结合能力与结合模式, 通过同源建模构建了 *TabsGSTs2* 的三维结构, 利用 MOE 软件进行分子对接分析, 对接打分为 -8.3968, 结合模式结果表明, *TabsGSTs2* 和 α -番茄碱主要以氢键、疏水作用力, 以及盐桥等形式进行结合, 其中 Tyr23、Glu26 和 Pro189 分别与 α -番茄碱形成氢键作用力, 说明 *TabsGSTs2* 与 α -番茄碱具有较强的结合能力。值得注意的是, α -番茄碱位于由 *TabsGSTs2* 的 $\alpha 1$ 、 $\beta 2$ 和 $\alpha 9$ 组成的口袋处, 并不在 G-site 和 H-site 及其附近, 推测可能原因是番茄碱分子量较大, 不易进入 *TabsGSTs2* 的内部。也有研究报道 GST 以二聚体形式存在 (Oakley *et al.*, 2001), G-site 和 H-site 及附近氨基酸残基参与二聚体形成, 而 N 端和 C 端氨基酸残基主要暴露在外, 易于大分子的化合物结合。此外, 外源化合物并非只与 G-site 或 H-site 结合, 如松褐天牛 *Monochamus alternatus* 的 MaGSTs1 与噻虫啉结合位点也不在 G-site 和 H-site 及其附近 (Yuan *et al.*, 2024)。本研究利用 α -番茄碱胁迫处理和分子对接等技术与方法探讨了 *TabsGSTs2* 基因在番茄潜叶蛾对 α -番茄碱解毒代谢中的潜在作用, 为番茄潜叶蛾 GSTs 基因的功能研究以及番茄潜叶蛾对 α -番茄碱的解毒代谢研究提供了基础数据, 后续将利用蛋白纯化、酶动力学特性分析、酶活抑制检测、体外代谢分析和 RNAi 等技术与方法, 进一步明确 *TabsGSTs2* 基因在番茄潜叶蛾适应 α -番茄碱胁迫的分子机制。

参考文献 (References)

- Beran F, Petschenka G. Sequestration of plant defense compounds by insects: From mechanisms to insect-plant coevolution [J]. *Annual Review of Entomology*, 2022, 67: 163-180.
- Biondi A, Guedes RNC, Wan FH, *et al.* Ecology, worldwide spread, and management of the invasive South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*: Past, present, and future [J]. *Annual Review of Entomology*, 2018, 63: 239-258.
- Campbell BC, Duffey SS. Alleviation of α -tomatine-induced toxicity to the parasitoid, *Hyposoter exiguae*, by phytosterols in the diet of the host, *Heliothis zea* [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 1981, 7 (6): 927-946.
- Capella-Gutiérrez S, Silla-Martínez JM, Gabaldón T. TrimAl: A tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses [J]. *CCF TCBI*, 2009, 25 (15): 1972-1973.
- Chen ZL, Huang C, Li XS, *et al.* Behavioural regulator and molecular reception of a double-edge-sword hunter beetle [J]. *Pest*

- Management Science*, 2022, 78 (6): 2693–2703.
- da Silva TL, Terenciano RM, da Cruz CG, *et al.* Resistance, hybrid vigor, genetic diversity, and toxicity of chemical constituents of tomatoes to *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) [J]. *Arthropod–Plant Interactions*, 2022, 16 (6): 677–689.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, *et al.* ProtTest 3: Fast selection of best-fit models of protein evolution [J]. *CCF TCBI*, 2011, 27 (8): 1164–1165.
- DeLano WL. PyMOL: An open-source molecular graphics tool [J]. *CCP4 Newsl. Protein Crystallogr*, 2002, 40 (1): 82–92.
- Fan CC. The Molecular Mechanism of Glutathione S-transferase and Carboxylesterase Mediated Chlorantraniliprole Stress Response in *Hyphantria cunea* [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2023. [范程程. 美国白蛾 GST 和 CarE 介导氯虫苯甲酰胺胁迫响应分子机制 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2023]
- Guedes RNC, Roditakis E, Campos MR, *et al.* Insecticide resistance in the tomato pinworm *Tuta absoluta*: Patterns, spread, mechanisms, management and outlook [J]. *Journal of Pest Science*, 2019, 92 (4): 1329–1342.
- Guo J. Biochemical and Molecular Basis of *Sitobion miscanthi* Response to Mycotoxin Deoxynivalenol [D]. Yanan: Yanan University, 2024. [郭娇. 荻草谷网蚜响应脱氧雪腐镰刀菌烯醇的生化及分子基础 [D]. 延安: 延安大学, 2024]
- Hirawatari A, Nagaoka S, Yamada N, *et al.* Identifying a sigma class glutathione S-transferase 2 from the silkworm *Bombyx mori* [J]. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, 2017, 86 (1): 1–7.
- Hu C, Liu JY, Wang W, *et al.* Glutathione S-transferase genes are involved in lambda-cyhalothrin resistance in *Cydia pomonella* via sequestration [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70 (7): 2265–2279.
- Hu C, Wei ZH, Li PR, *et al.* Identification and functional characterization of a sigma glutathione S-transferase *CpGSTs2* involved in lambda-cyhalothrin resistance in the codling moth *Cydia pomonella* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68 (45): 12585–12594.
- Katoh K, Misawa K, Kuma K, *et al.* MAFFT: A novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform [J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30 (14): 3059–3066.
- Koirala BKS, Moural T, Zhu F. Functional and structural diversity of insect glutathione S-transferases in xenobiotic adaptation [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2022, 18 (15): 5713–5723.
- Kowalski SP, Domek JM, Sanford LL, *et al.* Effect of alpha-tomatine and tomatidine on the growth and development of the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae): Studies using synthetic diets [J]. *Journal of Entomological Science*, 2000, 35 (3): 290–300.
- Li Q, Sun Z, Shi Q, *et al.* RNA-Seq analyses of midgut and fat body tissues reveal the molecular mechanism underlying *Spodoptera litura* resistance to tomatine [J]. *Frontiers in Physiology*, 2019, 10: 8.
- Li XW, Ma L, Lv YB. Susceptibility of Xinjiang and Yunnan populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) to six insecticides and its relationship with detoxification enzyme activities [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2022, 65 (8): 1010–1017. [李晓维, 马琳, 吕要斌. 新疆和云南番茄潜叶蛾种群对六种杀虫剂的敏感性及其与解毒酶活性的关系 [J]. 昆虫学报, 2022, 65 (8): 1010–1017]
- Liu XY, Sun HM, Luo YH, *et al.* Identification of 14 glutathione S-transferase genes from *Lasioderma serricornne* and characterization of *LsGSTe1* involved in lambda-cyhalothrin detoxification [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2023b, 193: 105425.
- Liu Z, Zhang Y, Zheng Y, *et al.* Genome-wide identification glutathione-S-transferase gene superfamily in *Daphnia pulex* and its transcriptional response to nanoplastics [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023a, 230: 123112.
- Ma K, Zou XP, Cen YJ, *et al.* Sli-miR-34-5p positively regulates the expression of the glutathione S-transferase gene *SlGSTe1* in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) in response to secondary plant substances [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2019, 62 (1): 1–8. [马康, 邹晓鹏, 岑永杰, 等. Sli-miR-34-5p 响应植物次生物质正调控斜纹夜蛾谷胱甘肽 S-转移酶基因 *SlGSTe1* 的表达 [J]. 昆虫学报, 2019, 62 (1): 1–8]
- Ma M, Zhai XD, Xu HQ, *et al.* Genome-wide screening and expression of glutathione S-transferase genes reveal that *GSTe4* contributes to sensitivity against beta-cypermethrin in *Zeugodacus cucurbitae* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 227: 915–924.
- Oakley AJ, Harnnoi T, Udomsinprasert R, *et al.* The crystal structures of glutathione S-transferases isozymes 1–3 and 1–4 from *Anopheles dirus* species B [J]. *Protein Science*, 2001, 10 (11): 2176–2185.
- Qi Q, Sun LL, Xu LS, *et al.* Response of glutathione S-transferase (GST) genes in *Lymantria dispar* to flavone and quercetin stresses based on RNAi analysis [J]. 2021, 43 (6): 1359–1367. [齐琪, 孙丽丽, 许力山, 等. RNAi 分析舞毒蛾谷胱甘肽 S-转移酶(GST)基因对黄酮和槲皮素胁迫响应 [J]. 环境昆虫学报, 2021, 43 (6): 1359–1367]
- Shi Y, Liu Q, Lu W, *et al.* Divergent amplifications of *CYP9A* cytochrome P450 genes provide two noctuid pests with differential protection against xenobiotics [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2023, 120 (37): e2308685120.
- Shi Y, Qu Q, Wang C, *et al.* Involvement of CYP2 and mitochondrial clan P450s of *Helicoverpa armigera* in xenobiotic metabolism [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2022, 140: 103696.
- Stamatakis A. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30 (9): 1312–1313.
- Sun Z, Shi Q, Li Q, *et al.* Identification of a cytochrome P450 *CYP6AB60* gene associated with tolerance to multi-plant allelochemicals from a polyphagous caterpillar tobacco cutworm (*Spodoptera litura*) [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2019, 154: 60–66.

- Tian BT. Effects of Sublethal doses of Three Insecticides on Development and Detoxification Enzyme Activity of *Propylaea japonica* (Thunberg) [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2024. [田碧婷. 3种农药亚致死剂量对龟纹瓢虫生长发育及解毒酶活性的影响 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2024]
- Wang JZ, Liu L, Wang SS, *et al.* Effect of tannic acid on glutathione-S-transferase activity and gene expression in *Acyrtosiphon pisum* [J]. *Pratacultural Science*, 2024, 41 (2): 459-467. [王继祖, 刘磊, 王森山, 等. 单宁酸对豌豆蚜谷胱甘肽-S-转移酶活性与基因表达的影响 [J]. 草业科学, 2024, 41 (2): 459-467]
- Xiong AP, Jiang YF, Peng YL, *et al.* Advances of transcription factors regulating alkaloid biosynthesis in plant [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2021, 19 (17): 5720-5728. [熊安平, 姜艳芳, 彭亚丽, 等. 调控植物生物碱生物合成的转录因子研究进展 [J]. 分子植物育种, 2021, 19 (17): 5720-5728]
- Yamamoto K, Higashiura A, Suzuki M, *et al.* Crystal structure of a *Bombyx mori* sigma-class glutathione transferase exhibiting prostaglandin E synthase activity [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013, 1830 (6): 3711-3718.
- Yamamoto K, Usuda K, Kakuta Y, *et al.* Structural basis for catalytic activity of a silkworm delta-class glutathione transferase [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012, 1820 (10): 1469-1474.
- Yamamoto K, Zhang PB, Banno Y, *et al.* Identification of a sigma-class glutathione-S-transferase from the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Journal of Applied Entomology*, 2006, 130 (9-10): 515-522.
- Yu Q, Lu C, Li B, *et al.* Identification, genomic organization and expression pattern of glutathione S-transferase in the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, 38 (12): 1158-1164.
- Yuan H, Wu MT, Deng JD, *et al.* Swift regulation of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) and glutathione S-transferase (GST) enables the rapid detoxification of thiacloprid in pine sawyer beetles [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2024, 203: 105996.
- Zhang GF, Liu WX, Wang FH, *et al.* Bioecology, damage and management of the tomato leafminer *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), a worldwide quarantine pest [J]. *Journal of Biosafety*, 2018, 27 (3): 155-163. [张桂芬, 刘万学, 万方浩, 等. 世界毁灭性检疫害虫番茄潜叶蛾的生物生态学及危害与控制 [J]. 生物安全学报, 2018, 27 (3): 155-163]
- Zhang GF, Ma DY, Liu WX, *et al.* The arrival of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), in China [J]. *Journal of Biosafety*, 2019, 28 (3): 200-203. [张桂芬, 马德英, 刘万学, 等. 中国新发现外来入侵害虫——南美番茄潜叶蛾(鳞翅目: 麦蛾科) [J]. 生物安全学报, 2019, 28 (3): 200-203]
- Zhang GF, Ma DY, Wang YS, *et al.* First report of the South American tomato leaf miner, *Tuta absoluta* (Meyrick), in China [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2020, 19 (7): 1912-1917.
- Zhang M, Fang T, Pu G, *et al.* Xenobiotic metabolism of plant secondary compounds in the English grain aphid, *Sitobion avenae* (F.) (Hemiptera: Aphididae) [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2013, 107 (1): 44-49.
- Zhou Y, Huang C, Fu G, *et al.* Molecular and functional characterization of three general odorant-binding protein 2 genes in *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25 (3): 1746.
- Zou X, Xu Z, Zou H, *et al.* Glutathione S-transferase SIGSTE1 in *Spodoptera litura* may be associated with feeding adaptation of host plants [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2016, 70: 32-43.