山西大学

2015 届博士学位论文

**金属胁迫下中华稻蝗金属硫蛋白分子特性及功能研究**

作者姓名 刘耀明

指导教师 马恩波 教授

学科专业 动物学

研究方向 动物生化与分子生物学

培养单位 生命科学学院

学习年限 2010 年 9 月至 2015 年 6 月

本论文研究得到国家自然科学基金面上项目（Grant No. 31071980）和国家自然科学基金重大国际合作项目（Grant No. 31320103921）的资助

二〇一五年六月

**Thesis for Doctor's degree, Shanxi University, 2015**

Molecular characterization and functional analysis of metallothionein exposured to metal in *Oxya chinensis* (Orthoptera: Acridoidea)

Student Name Liu Yaoming

Supervisor Prof. Ma Enbo

Major Zoology

Specialty Animal Biochemistry and Molecular Biology

Department School of Life Science Research Duration 2010.09-2015.06

**This dissertation was supported by National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31071980 and 31320103921).**

June 2015

目 录

**[Abstract: in Chinese](#_Toc686373635)** [I](#_Toc686373635) 5

**[Abstract: in English](#_Toc686373636)** [III](#_Toc686373636) 5

[中文摘 要](#_Toc686373637) 7

**[Abstract](#_Toc686373638)** 8

[第一章 前言](#_Toc686373639) 9

[1.1 重金属概述](#_Toc686373640) 9

[1.1.1 镉](#_Toc686373641) 10

[1.1.2 铜](#_Toc686373642) 10

[1.1.3 锌](#_Toc686373643) 10

[1.2 金属硫蛋白基因概述](#_Toc686373644) 10

[1.2.1 金属硫蛋白的特点](#_Toc686373645) 10

[1.2.2 金属硫蛋白的Th理功能](#_Toc686373646) 10

[1.2.3 金属硫蛋白在昆虫中的研究现状](#_Toc686373647) 10

[1.3 中华稻蝗](#_Toc686373648) 10

[1.3.1 中华稻蝗的Th活习性](#_Toc686373649) 11

[1.3.2 中华稻蝗的Th活史](#_Toc686373650) 11

[1.4 镉染毒对中华稻蝗的影响及基因数字表达谱（DGE）分析](#_Toc686373651) 11

[1.5 RNA干扰应用](#_Toc686373652) 11

[1.6 研究内容及意义](#_Toc686373653) 11

[1.6.1 研究内容](#_Toc686373654) 11

[1.6.2 研究意义](#_Toc686373655) 11

[1.7 本文创新之处及与所发表论文的相关性](#_Toc686373656) 11

[第二章 中华稻蝗金属硫蛋白基因的分子特性](#_Toc686373657) 13

[2.1 实验材料](#_Toc686373658) 13

[2.1.1 供试昆虫](#_Toc686373659) 13

[2.1.2 相关试剂和仪器](#_Toc686373660) 13

[( MJ research）；NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo, USA)；光学显微镜](#_Toc686373661) 13

[2.2 实验方法](#_Toc686373662) 13

[2.2.1 转录组测序的样品制备](#_Toc686373663) 13

[2.2.2 中华稻蝗总RNA提取和反转录](#_Toc686373664) 13

[2.2.3 中华稻蝗金属硫蛋白基因的验证](#_Toc686373665) 13

[2.2.4 引物设计和基因扩增](#_Toc686373666) 13

[2.2.5 转化](#_Toc686373667) 14

[2.2.6 中华稻蝗金属硫蛋白基因的表达](#_Toc686373668) 15

[2.2.7 统计学分析](#_Toc686373669) 15

[2.3 实验结果](#_Toc686373670) 15

[2.3.1 中华稻蝗金属硫蛋白基因的验证](#_Toc686373671) 15

[NP650882,](#_Toc686373672) *[DmMTD](#_Toc686373672)*[: NP788695,](#_Toc686373672) *[DmMTE](#_Toc686373672)*[: NP001189254), 家蝇：](#_Toc686373672)*[Musca domestica](#_Toc686373672)* 16

[2.3.2 中华稻蝗金属硫蛋白基因序列的分析](#_Toc686373673) 16

[个Cys-X-Cys和3个Cys-X-Y-Z-Cys结构。OcMT2分子的N端中含有1个Cys-Cys 和](#_Toc686373674) 16

[2.3.3 采用RT-qPCR引物及其扩增效率检测](#_Toc686373675) 16

[序运行后得到如图（D）所示的的熔解曲线。](#_Toc686373676) 16

[2.4 讨论](#_Toc686373677) 17

[第三章 中华稻蝗金属硫蛋白基因功能研究](#_Toc686373678) 18

[3.1 实验材料](#_Toc686373679) 18

[3.1.1 主要试剂和仪器](#_Toc686373680) 18

[3.2 试验方法](#_Toc686373681) 18

[3.2.1 引物的设计](#_Toc686373682) 18

[3.2.2 体外合成dsRNA](#_Toc686373683) 20

[3.2.3 中华稻蝗MT基因沉默效率的检测](#_Toc686373684) 20

[3.2.4 采用RNAi技术验证金属硫蛋白基因在中华稻蝗体内的解毒能力](#_Toc686373685) 20

[3.2.5 制备CaCl2感受态细胞](#_Toc686373686) 21

[3.2.6 构建重组质粒进行OcMT异源表达](#_Toc686373687) 21

[3.2.7 表达OcMT融合蛋白的大肠杆菌对金属的耐受能力](#_Toc686373688) 21

[3.3 实验结果](#_Toc686373689) 22

[3.3.1 中华稻蝗](#_Toc686373690)*[MT](#_Toc686373690)*[基因沉默效率](#_Toc686373690) 22

[3.3.2 中华稻蝗MT基因沉默效率后不同浓度重金属的耐受能力](#_Toc686373691) 22

[3.3.3 中华稻蝗MT基因的异源表达](#_Toc686373692) 22

[3.3.4 OcMT融合蛋白对重金属镉的耐受性](#_Toc686373693) 23

[3.4 讨论](#_Toc686373694) 23

[第四章 金属急性染毒对中华稻蝗MT基因及解毒酶的影响](#_Toc686373695) 24

[4.1 实验材料](#_Toc686373696) 24

[4.1.1 供试昆虫](#_Toc686373697) 24

[4.1.2 主要药品和仪器](#_Toc686373698) 24

[4.2 实验方法](#_Toc686373699) 24

[4.2.1 三种金属对中华稻蝗半致死浓度测定](#_Toc686373700) 24

[4.2.2 中华稻蝗急性金属处理](#_Toc686373701) 24

[4.2.3 中华稻蝗不同组织的收集](#_Toc686373702) 24

[4.2.4 中华稻蝗体内不同解毒酶酶活测定](#_Toc686373703) 25

[4.2.5 三种金属急性处理后中华稻蝗脂肪体和马氏管的观察](#_Toc686373704) 25

[4.3 实验结果](#_Toc686373705) 25

[4.3.1 三种金属对中华稻蝗的半致死浓度](#_Toc686373706) 25

[4.3.2 镉对中华稻蝗解毒酶活性的影响](#_Toc686373707) 26

[4.3.3 镉对中华稻蝗金属硫蛋白的诱导表达](#_Toc686373708) 26

[图4.9 3种金属急性处理中华稻蝗成虫后马氏管形态变化。](#_Toc686373709) 28

[4.4 讨论](#_Toc686373710) 28

[第五章 镉染毒对中华稻蝗组织形态的影响](#_Toc686373711) 29

[5.1 实验材料](#_Toc686373712) 29

[5.1.1 小麦染毒](#_Toc686373713) 29

[5.1.2 实验昆虫](#_Toc686373714) 29

[5.1.3 试剂和仪器](#_Toc686373715) 29

[5.2 实验方法](#_Toc686373716) 29

[5.2.1 光镜观察中华稻蝗血细胞](#_Toc686373717) 29

[5.2.2 中华稻蝗不同组织的收集](#_Toc686373718) 29

[5.2.3 石蜡切片的制备和光镜观察](#_Toc686373719) 29

[5.2.4 半薄切片的制备和电镜观察](#_Toc686373720) 30

[5.3 实验结果](#_Toc686373721) 30

[5.3.1 染毒期间试虫行为观察](#_Toc686373722) 31

[5.3.2 镉慢性染毒后中华稻蝗血细胞分析](#_Toc686373723) 31

[5.3.3 中华稻蝗消化道的总体特征](#_Toc686373724) 32

[5.3.4 镉慢性染毒对中华稻蝗胃盲囊和中肠微绒毛的影响](#_Toc686373725) 32

[5.3.5 镉慢性染毒对中华稻蝗马氏管的影响](#_Toc686373726) 33

[整个切面清晰分明；而镉染毒组马氏管切面变形，细胞核变小，细胞质中出现溶解](#_Toc686373727) 33

[5.3.6 镉慢性染毒对中华稻蝗中肠和围食膜的影响](#_Toc686373728) 33

[合在中肠内侧（图5.6 A）；镉染毒组中肠上皮细胞层局部断裂且有部分脱落，围食](#_Toc686373729) 33

[5.4 讨论](#_Toc686373730) 33

[第六章 中华稻蝗金属硫蛋白原核表达及功能分析](#_Toc686373731) 34

[6.1 实验材料](#_Toc686373732) 34

[6.1.1 主要试剂和仪器](#_Toc686373733) 34

[6.2 实验方法](#_Toc686373734) 34

[6.2.1 中华稻蝗金属硫蛋白基因原核表达引物的设计](#_Toc686373735) 34

[6.2.2 构建重组质粒](#_Toc686373736) 35

[6.2.3 重组质粒通过感受态转化及验证（鉴定）](#_Toc686373737) 36

[照Plasmid Mini Kit（OMEGA）说明提取上述震荡培养10 h后菌液质粒，采用限制性内切酶双酶切方法进行检测。酶切体系如下：含有目的基因的质 粒](#_Toc686373738) 36

[融合蛋白的浓度和含量。](#_Toc686373739) 37

[全文总结](#_Toc686373740) 39

[参 考 文 献](#_Toc686373741) 40

[攻读学位期间的研究成果](#_Toc686373742) 47

[个人简 介](#_Toc686373743) 48

[承诺 书](#_Toc686373744) 49

[学位论文使用授权声明](#_Toc686373745) 49

表格目录

表 2.1 本研究中RT-PCR、RT-qPCR引物列表 13

表 3.1 引物表 18

表3.1 ），酶切位点由6个碱基HindII（I 21

表 4.1 三种金属对中华稻蝗的急性毒理学生物测定 25

表 4.2 三种金属处理中华稻蝗48 h后马氏管和脂肪体的变化 28

表 5.1 中华稻蝗血细胞分析 31

表 6.1 中华稻蝗金属硫蛋白扩增引物 34

表 6.2 中华稻蝗OcMT基因扩增体系 35

**Contents**

[**Abstract: in Chinese** I](#_bookmark0)

[**Abstract: in English** III](#_bookmark1)

[**Chapter 1 Introduction** 1](#_bookmark2)

[1.1 Introduction for heavy metal 1](#_bookmark3)

[1.1.1 Cadmium 2](#_bookmark4)

[1.1.2 Copper 2](#_bookmark4)

[1.1.3 Zinc 3](#_bookmark5)

[1.2 Introduction for metallothionein 3](#_bookmark5)

[1.2.1 Metallothionein(MT) 4](#_bookmark6)

[1.2.2 Physiological function of metallothionein 5](#_bookmark7)

[1.2.3 Research of insect metallothionein 6](#_bookmark8)

[1.3 Oxya chinensis 6](#_bookmark8)

[1.3.1 Habits of *O. chinensis* 6](#_bookmark8)

1.3.2 The life history of *O. chinensis* 7

[1.4 Digital Gene Expression (DGE) analysis of Cd treatment for *O. chinensis* 7](#_bookmark9)

[1.5 Application of RNA interference 8](#_bookmark10)

[1.6 Contents and significance of this research 9](#_bookmark10)

[1.6.1 Contents 8](#_bookmark10)

[1.6.2 Significance 9](#_bookmark11)

[1.7 Innovation of this article and the correlation of published papers 9](#_bookmark11)

[**Chapter 2 Molecular characteristics of *O. chinensis* metallothionein gene** 11](#_bookmark12)

[2.1 Materials 11](#_bookmark13)

[2.1.1 Insects 11](#_bookmark13)

[2.1.2 Reagents and instruments 11](#_bookmark13)

[2.2 Methods 12](#_bookmark14)

[2.2.1 Samples collection for DGE 12](#_bookmark14)

[2.2.2 Total RNA extraction and cDNA synthesis 12](#_bookmark14)

[2.2.3 Analysis of OcMT gene 12](#_bookmark14)

[2.2.4 Primers design 12](#_bookmark14)

[2.2.5 Amplification of OcMT gene 13](#_bookmark15)

[2.2.6 Transformation of CaCl2 vecter 14](#_bookmark16)

[2.2.7 Heterelogous expression of OcMT 15](#_bookmark17)

[2.3 Results 15](#_bookmark17)

[2.3.1 OcMT gene cloning 15](#_bookmark17)

[2.3.2 Identification of two OcMT cDNA fragments 17](#_bookmark18)

[2.3.3 Analysis of OcMT gene 18](#_bookmark19)

[2.3.4 Efficiency detectoin of RT-qPCR primers 19](#_bookmark20)

[2.3.5 Transcriptional patterns of OcMT at the developmental stages 19](#_bookmark20)

[2.4 Discussion 20](#_bookmark21)

[**Chapter 3 Functional study on *O. chinensis* metallothionein gene** 24](#_bookmark22)

[3.1 Materials 24](#_bookmark23)

[3.1.1 Reagents and instruments 24](#_bookmark23)

[3.2 Methods 25](#_bookmark24)

[3.2.1 DsRNA primers design 25](#_bookmark24)

[3.2.2 DsRNA synthesis in vitro 26](#_bookmark25)

[3.2.3 Efficiency detectoin of RNAi of OcMT 27](#_bookmark26)

[3.2.4 Detectoin of tolerance activity by RNAi 27](#_bookmark26)

[3.2.5 Preparation of CaCl2 vecter 27](#_bookmark26)

[3.2.6 Construction of the recombinant plasmids 28](#_bookmark27)

[3.2.7 Tolerance detectoin of the host bacteria to Cd 29](#_bookmark28)

[3.3 Results 30](#_bookmark29)

[3.3.1 Efficiency of RNAi by OcMT dsRNA 30](#_bookmark29)

[3.3.2 Tolerance analysis of tolerance activity by RNAi 31](#_bookmark30)

[3.3.3 Heterologous expression of OcMT 31](#_bookmark30)

[3.3.4 Tolerance analysis of the host bacteria to Cd 33](#_bookmark31)

[3.4 Discussion 33](#_bookmark31)

[**Chapter 4 Acute effects of metals on detoxification enzymes and *O. chinensis***](#_bookmark32)

# 中文摘 要

快速发展的工业化和城市化导致重金属的污染日益严重，这关系到人类健康和环境安全。被重金属污染的土壤和水体可通过农业灌溉进入食物链并转移到植物和动物体内。水稻是我国种植面积最广的粮食作物，稻田是目前重金属污染最为严重的农业区域。

金属硫蛋白（Metallothionein MT），是一类金属结合蛋白。自1957年首次在马肾中发现以来，研究者们陆续在不同生物类群中展开了对MT的研究，所涉及的领域包括生命科学、物理化学、应用医学和环境监测等。MT是细胞内一类低分子量、高半胱氨酸含量的蛋白分子，对具有10个电子的金属具有极高的亲和力，包括必需金属（锌和铜等）和非必需微量元素（镉和汞等）。MT普遍存在于微生物、植物、动物以及人类细胞中，在金属代谢中起着重要的作用。近年来，对昆虫MT的研究仅限于果蝇、土壤跳虫、蚊虫等少数物种，目前很少见对农业害虫MT分子特性及功能方面的系统研究。

中华稻蝗（*Oxya chinensis*, *O. chinensis*）是以水稻叶片和茎杆为食的重要农业害虫，重金属可通过中华稻蝗取食富集重金属的水稻植株后在虫体内不同组织中蓄积。本文以重金属镉、铜和锌为胁迫诱导因子，研究重金属作用下中华稻蝗金属硫蛋白基因（*Oxya chinensis* Metallothionein, OcMT）的分子特性和功能以及对中华稻蝗解毒酶系和组织形态结构的影响。本文通过深入开展以上研究，对阐明中华稻蝗金属硫蛋白基因功能和重金属解毒机制具有重要意义。本文主要内容如下：

1、中华稻蝗金属硫蛋白的分子特性分析

基于中华稻蝗经重金属镉染毒后构建的数字基因表达谱，采用生物信息学方法系统分析得到2个OcMT基因（*OcMT1*和*OcMT2*）的全长序列。已知*OcMT1*分子全长552 bp，开放阅读框为123 bp，编码40个氨基酸残基；*OcMT2*分子全长363 bp，开放阅读框为195 bp，编码64个氨基酸残基；将这2个MT基因序列与目前已知的其他昆虫

MT序列进行比对和分析，发现*OcMT1*和*OcMT2*具有与其他物种MT蛋白类似的氨基酸特征，半胱氨酸（Cys）含量分别为22.5%和25%，这些半胱氨酸在氨基酸分子中以Cys-Cys, Cys-X-Cys, Cys-X-Y-Cys或Cys-X-Y-Z-Cys的结构式存在，这样的分子组成和特征使半胱氨酸的巯基容易与金属离子结合形成M-MT复合物。

2、中华稻蝗金属硫蛋白基因mRNA转录特性分析

采用RT-qPCR技术检测了金属硫蛋白基因在中华稻蝗不同发育阶段和不同组织

部位mRNA转录表达特性，结果表明：*OcMT1*和*OcMT2*均在中华稻蝗卵期转录水平最高，而在孵化后的整个发育时期稳定表达，且转录表达量较卵期低；*OcMT1* 和

*OcMT2*具有不同的组织分布，*OcMT1*在视叶中表达最高，而*OcMT2*在脑中高表达，其次是脂肪体，表明中华稻蝗2个OcMT基因在生理功能具有差异性。

3、中华稻蝗金属硫蛋白基因和蛋白功能研究

利用RNA干扰技术进一步从分子水平研究了*OcMT1*和*OcMT2*的功能，中华稻蝗注射双链RNA(dsRNA) 48 h后，用不同浓度的3种金属处理试虫，结果表明：

*OcMT1*和*OcMT2* mRNA转录表达量在63.1-70.9%的有效沉默时，金属毒性导致试虫死亡率增加8.5-16.7%；异源表达OcMT1和OcMT2蛋白的大肠杆菌在含铜培养基的生长测试实验表明，OcMT1和OcMT2蛋白可增强宿主细菌对铜的耐受性；采用荧光光谱法检测OcMT1和OcMT2蛋白对不同金属的结合能力，结果表明，异源表达OcMT1和OcMT2蛋白均可螯合镉、铜和锌3种金属，且OcMT1与锌的结合能力最强，OcMT2与铜的结合能力最强。

4、重金属对中华稻蝗解毒酶活性和组织形态的影响

慢性镉染毒后中华稻蝗体内磷酸酯酶、羧酸酯酶、谷胱甘肽硫转移酶等解毒酶活性普遍上升；镉毒性可导致中肠、胃盲囊、马氏管以及围食膜组织结构严重受损；慢性镉染毒后中华稻蝗不同类型血细胞形态和组成发生变化；中华稻蝗经镉、铜、锌急性染毒后，发现虫体脂肪体的脂肪滴直径变小；马氏管内均出现不同形态的颗粒物质。结果表明，中华稻蝗相关组织通过不同形式参与重金属的解毒，对降低重金属毒性，保护虫体发挥重要的作用。

综上所述，本文通过对重金属胁迫下中华稻蝗金属硫蛋白基因、蛋白、组织形态和解毒酶变化等系列研究，揭示在重金属胁迫下虫体基因水平、蛋白水平以及组织学水平的适应性变化规律。研究结果对昆虫重金属解毒机制研究具有一定的理论意义，同时也为检测和评估农业环境中重金属的污染和危害提供实践依据。

**关键词：**中华稻蝗； 金属硫蛋白； 重金属； 转录应答； 形态变化； 原核表达

II

**Abstract**

The rapid industrialization and urbanization in developing countries have increased pollution by heavy metals, which is a concern for human health and safety of the environment. The increasing presence of heavy metals in water, soil and air is directly linked to the food chain and transfer to animals through polluted irrigation water. Rice is the largest grain crop and paddy fields are still contaminated with heavy metals in china.

Metallothionein (MT) is first isolated in 1957 from horse kidney, subsequently different isoforms are characterized depending on the species. Studies focus on myriad topics from life science, physical chemistry, applied medicine and environmental monitoring. MTs are a low molecular weight cysteine-rich proteins characterized by high affinity for heay metals, including essential (Zn and Cu) and non-essential (Cd and Hg) trace metals. MTs are ubiquitous and have been isolated in a wide variety of organisms from bacteria to humans playing a key role in metal metabolism. Few studies have examined the molecular characteristics of MTs in Diptera (*Drosophila melanogaster, Anopheles gambiae*) and Collembola (*Orchesella cincta*) insects. By contrast, less information is available on MTs in agricultural pest.

*Oxya chinensis*, which is an agricultural pest, feeds on the leaves of gramineous plants, particularly rice, and inhabits rice-growing areas of China. Due to grasshopper behavior in the farmland ecosystems, heavy metals (such as cadmium) in the agricultural environment transfer into the bodies of the grasshoppers through the food chain. In this thesis, the molecular characteristics and functional of metallothionein were analyzed in *O. chinensis* exposured to metal stress. Acute effects of heavy metals on detoxification enzymes and Histopathological alterations in *O. chinensis* were studied under laboratory control condition. The present study will help to elucidate the characteristics and functions of MTs in *O. chinensis* and demonstrate the potential value of heavy metal pollution prevention. The main contents are as follows:

1. Analysis of *OcMT* molecular characteristics

Two full-length cDNA sequences were obtained from the *O. chinensis* transcriptome database putatively encoding two different OcMTs, which were named *OcMT1* and *OcMT2.* The full-length cDNA sequence of *OcMT1* was 552 base pairs (bp) long, with an open reading frame of 123 bp that encoded a 40-amino acid peptide. The full-length cDNA sequence of *OcMT2* was 363 bp, with an open reading frame (ORF) of 195 bp that encoded a 64-amino acid peptide. The deduced amino acid sequences of the MTs from *O. chinensis* were compared with the other insect MTs using the GeneDoc FASTA sequence comparison program. The two OcMTs shared low amino acid sequence similarities but high identities. The cysteines of the deduced OcMT1 and OcMT2 protein sequences were 22.5% and 25%, respectively. All cysteine residues were in the characteristic Cys-Cys, Cys-X-Cys, Cys-X-Y-Cys or Cys-X-Y-Z-Cys configuration similar to that observed in other *MTs*. Thus the complex M-MT were formed by metal-thiolate clusters of *MT* molecule and metal ions.

2. Tissue and Stage-dependent transcription patterns of OcMT

To determine the expression characteristics of the *OcMT1* and *OcMT2* genes, transcription analysis of OcMT mRNA were detected in the eleven different tissues and at the seven developmental stages. The RT-qPCR analysis indicated that *OcMT1* mRNA was widely expressed in all tissues examined and the seven life stages. The highest transcription levels of *OcMT1* and *OcMT2* were detected at the egg stage. The OcMT higher transcription were detected at the 2nd-instar nymphs and adults. The highest transcription of *OcMT1* and *OcMT2* were detected in the brain and optic lobe, respectively. This may suggest that the OcMTs in insects are different responsive to harmful environmental stresses.

3. Analysis of OcMT gene and protien functions

To evaluate their vital biological functions, an RNA interference analysis of both the *OcMT1* and *OcMT2* was performed by injecting sequence-specific double-stranded RNA (dsRNA) into *O. chinensis*. After the

IV

Injections of the dsRNAs, the *OcMT1* and *OcMT2* transcript levels in the whole bodies of the adults decreased by approximately 63.1% to 70.9% by 48 h post-injection. The mortalities of each group displayed dose-dependent increases of 8.5% to to16.7% after the silencing of *OcMT1* and *OcMT2*, respectively. Enhanced tolerance to the heavy metal in a recombinant strain expressing an OcMTs has also been demonstrated in *E. coli*. which may have been due to the chelation of OcMTs protein.

4. Effects of the metals on detoxification enzymes activity and morphology The effects of the Cd concentration on ACP, AKP, CarE and GST

Activity were increased generally. Grasshoppers exposed to Cd, midguts, gastric caeca, Malpighian tubule and peritrophic membrane were damage, and morphological changes in the differential haemocyte have been assessed. The diameter of fat body were decreased after Cd and Zn treatment. Accumulation of crystal or flocculent deposits in Malpighian tubules were observed. Studies have demonstrated that several tissues participated in heavy metals detoxification in different forms and protect the insects from metals damage.

**Key words***: Oxya chinensis*; Heavy metal; Metallothionein (MT); Transcriptional response; Structure change; Prokaryotic expression

VI

# 第一章 前言

近30年来，快速的工业化和城市化导致空气、水体和土壤污染，其污染源复杂，污染面积大，已经成为发展中国家面临的严重环境问题[1,2]。其中人为活动导致的重金属污染尤为严重[3]，因污染源的暴露，随降雨迁移到河流，重金属最终随着灌溉水进入农田，经农作物吸收后进入食物链，在植食性生物体内传递和富集，这种不断放大且不可逆转的重金属污染已威胁到动植物的生存和人类的安全[4,5]。研究证实人类摄入过量的镉可对神经、骨骼、内分泌、代谢酶和免疫等多个系统造成毒害，引起多种疾病甚至死亡[6]。近年来有关重金属污染问题已日益引起环境科学、食品科学、生物学以及医学等领域的关注，从重金属污染对生物体危害的评估深入到生物体对重金属的耐受性以及代谢解毒机制的探索[7]。大量研究发现金属结合蛋白在非必需金属解毒和必需微量金属代谢中发挥着重要作用，其中最为典型的一类蛋白为金属硫蛋白（metallothionein MT）。目前不同生物体内金属硫蛋白基因和蛋白的功能以及与此相关的基因调控成为重金属代谢解毒机制研究的重点。

## 1.1 重金属概述

重金属在冶金工业、环境工程和生物学领域中的定义有所不同，科学界一般将密度大于5 g/cm3的金属称之为“重金属”[8]，而生命科学领域将对生物具有明显毒性的金属（镉、铅、铬、铜、锰等）或类金属（砷、硒等）称之为重金属，重金属普遍存在于地球土壤、岩石和自然界的任何物体中。随着工业化和城市化的进程，原本埋藏在地下或被暴露后污染的表层土壤中的重金属，通过工业运输逐渐扩散造成空气污染，或经过雨水冲刷和加工提炼过程中形成废液排放造成水体污染，最终进入河流，再经过灌溉造成农田污染，被作物吸收后进入食物链逐渐富集并对动植物造成毒性效应。根据Ross（1994）综合分析和总结重金属污染主要由以下5种途径[9]：

1）金属矿物的开采和冶炼（砷、镉、铅、铝等）；2）以金属为材料的工业生产（砷、镉、铅、汞、铜、镍、锌等）；3）排放或飘逸的大气沉积（铬、镉、铜、铅、汞、锌等）；4）农业施肥和施药；5）废水处理。随着交通的发展，车辆尾气排放、轮胎与地面摩擦和运输抛洒导致道路污染已成为新的污染途径。2009年对我国广东省某市稻田重金属污染调查报告表明：铜（502 mg/kg）、锌（498 mg/kg）、镉（3.92 mg/kg）的含量已高出国家标准（GB15618-1995: 铜50、锌200、镉0.3 mg/kg,）数倍或数十倍不等[10]。

1

在造成环境污染的重金属中，有部分金属是生物体维持正常生命活动所必需的，例如锌和铜，其在生物体内含量或需要量很低，但却是生命活动中必不可少的；部分金属是目前尚未明确其生理功能的，例如镉和铅。迄今为止，科学研究尚未发现其对生物体的普遍有利作用，但不能排除其在低浓度时具有一定的生理作用。有研究发现海洋中几乎不存在锌元素，而硅藻（diatoms）中的碳酸酐酶（Carbonic anhydrase）能够在缺少锌的条件下利用镉来代替锌作为碳酸酐酶起催化中心的金属原子[11]，这项研究表明在海洋硅藻中碳酸酐酶的一种特殊形式中镉具有一定的功能，而更多的研究表明镉是对生物体有毒的重金属。当超过一定的阈值，所有的金属都是有毒的，并通常以金属离子的形式存在。因此，重金属污染的毒性效应不仅取决于金属的浓度，也取决于金属的状态。

### 1.1.1 镉

镉（Cadmium Cd），是一种具有延展性和韧性的银白色金属，19世纪初被发现并很快进行了毒性实验[12]。在最为危险的20种优先级别的剧毒物质中镉排名第8 位

[13]. 镉和锌属于同一族元素，在自然界中镉和锌、铅等气体在金属矿物中共同存在，

因此在开发其他金属时镉常被当做废物遗弃或者排出到环境中，导致镉的扩散和污染。此外工业排放和磷肥施用也会导致镉的污染[14]。由于其极高的危害性，欧洲国际公共卫生组织（World Health Organization WHO）和美国国家毒理学计划组织

（[National Toxicology Program NTP](http://www.baidu.com/link?url=3rWaUtTlWGqo_3DlffTWrUCLHBwyQD_RjWBeIUA8jObM6WKgBRqhZDKtjIsixf3l&amp;ie=utf-8&amp;f=8&amp;tn=sitehao123&amp;wd=%E7%BE%8E%E5%9B%BD%E5%9B%BD%E5%AE%B6%E6%AF%92%E7%90%86%E5%AD%A6%E8%AE%A1%E5%88%92%E7%BB%84%E7%BB%87&amp;inputT=1672&amp;bs=%E6%AC%A7%E6%B4)）将其列为第一类致癌物[15-17]。镉的毒理学实验表明其在极低浓度下也具有毒性，一般不参与任何生理学过程。在日本，因锌矿开采过程中导致大规模的镉泄漏进入河流，导致沿岸人群出现骨质疏松、骨软化和肾脏功能紊乱等症状，尤以骨痛病为典型。对该地区的患病人群的尿检发现，尿镉浓度高达20–30µg/g，后续的研究发现镉具有强的抑制抗氧化酶活性[18]。大量研究表明，镉可诱导肾脏、前列腺，肺、肝脏和骨组织等多个内脏器官的肿瘤[19]。目前最为严重的镉污染是其进入河流后通过灌溉导致农田污染，农作物吸收镉以后，镉由此进入食物链而转移到植食性昆虫体内，引起昆虫体内一系列的酶活性变化[20]，组织器官损伤，诱发DNA突变，甚至导致机体死亡[21-24]。

### 1.1.2 铜

铜（Copper Cu）属于生物体必需的微量金属元素，也是自然界广泛分布的金属，虽然在自然界土壤中浓度很低，却是植物生长的必要元素。生物体内各种蛋白质组成、C4植物光合作用中电子转移、线粒体的呼吸作用、氧化还原反应、维持酶的正常构象和功能以及细胞的新陈代谢等生理过程中均具有极其重要的作用[25]。铜也是

2

重要的含金属酶的辅助因子，如在超氧化物歧化酶（Cu/Zn-SOD）、细胞色素C氧化酶以及赖氨酸氧化酶中铜具有其他金属不可替代的重要生理功能[26, 27]。生物体内铜缺乏会导致各种生理功能的障碍，出现生理性代谢紊乱，各种酶失去活性，引发多种疾病[28]。其中影响最大的是铜蓝蛋白（Ceruloplasmin），这是一类血浆中含量最多的铜结合蛋白，也是机体急性感染后细胞内合成最多的一类蛋白，与免疫系统功能直接相关[29]。随着铜矿工业的开采和冶炼，含铜杀虫剂的使用，城市污泥堆积等导致铜由土壤污染随流水不断扩大，导致水体污染甚至是地下水污染[30]，给水产养殖造成重大损失，甚至威胁居民生活用水和饮水安全。迄今为止，这类污染已持续超过20年，使得农田土壤中的铜含量远远超过自然界原始浓度，局部地区已经严重影响土壤微生物以及植物的正常生长。研究显示，过量的铜对生物体的毒性是由于破坏了生物体铜平衡和稳态，引起氧化应激产生大量活性氧和自由基，从而损伤了类脂、核酸和蛋白质[31, 32]。

### 1.1.3 锌

锌（Zinc Zn）是生物体第二大必需的微量金属元素，是重要的抗氧化剂[33]，但其未被认为是自由基清除剂，却是超过300种含金属酶的催化活性中心必需的金属，以稳定酶类结构或作为酶的辅助因子而广泛存在，也是磷酸酯酶、谷氨酸脱氢酶、过氧化物歧化酶等的重要组成部分[34]，Valle等已经鉴定以锌为伴侣的酶多达200多种[35]，同时锌还参与免疫系统、DNA合成、蛋白合成、创伤愈合、神经调节、激素代谢、细胞增殖和保护细胞免受自由基的侵害等[36,37]。此外，锌也是细胞内很多转录因子的组成部分，由锌组成的转录调控因子数量远远多于目前所了解的酶的数量[38]。由于锌在生物体内具有广泛的生理用途，机体锌缺乏和摄入不足会引起多种生物分子、蛋白、细胞、组织和生理水平症状，临床医学上常见的症状是锌摄取不足所导致的。研究发现锌和铜具有拮抗代谢关系，在高剂量铜暴露时，锌的摄入可以抑制铜的吸收；缺少铜的情况下机体对锌的吸收出现障碍，研究许多锌中毒是由于铜的摄入不足导致的[39]，同时低水平的锌会加重铜的毒性[40]。锌只有暴露在高剂量时才会产生毒性，但急性中毒极为罕见[39]。研究显示，细胞内锌过量主要影响线粒体内某些酶的活性导致机能障碍，延滞活性氧（Reactive oxygen species ROS）的解毒过程，导致ROS在细胞内积累，增加了细胞内被氧化的谷胱甘肽（GSSG）含量[41, 42]。另外，锌还能够激活MT的合成，这被认为是MT能够控制氧化压力的重要机制

## 1.2 金属硫蛋白基因概述

金属硫蛋白（metallothionein MT），是细胞内一类分子量较小的金属结合蛋白，

3

于1957年作为镉结合蛋白被Vallee和Margoshes在马肾中发现[43]，由于其分子中富含半胱氨酸且容易与重金属离子结合，因此被命名为金属硫蛋白[44]。科学家陆续在不同的物种中进行了大量的研究和探讨后发现其存在于细菌、植物、无脊椎动物和脊椎动物等几乎所有的生物体内[45,46]。因其分子中含有较多数量的半胱氨酸残基，使其分子有较高的硫含量且对重金属具有较高的亲和力。MT分子中所含有的半胱氨酸在绝大多数生物体MT中是高度保守的，这些半胱氨酸残基通常以配位键形成Cys-Xaa-Cys的排列方式（Xaa是除半胱氨酸以外的其他氨基酸），其中X和Y多为

Ser或Thr，其次为Arg和Lys。尽管金属硫蛋白具有一些共有的性质和特点，但来自不同物种的MT蛋白质的大小和氨基酸组成差别很大，甚至同一物种的不同亚型间其组成也不尽不同。目前研究最多且较为清楚的是人类MT，人类MT位于第16号染色体且分为4个类型（*MT1*, *MT2*, *MT3*和*MT4*），*MT1*和*MT2*在全身表达，*MT3*特异性的表达于脑，*MT4*则只发现存在于复层鳞状上皮[47]。

### 1.2.1 金属硫蛋白的特点

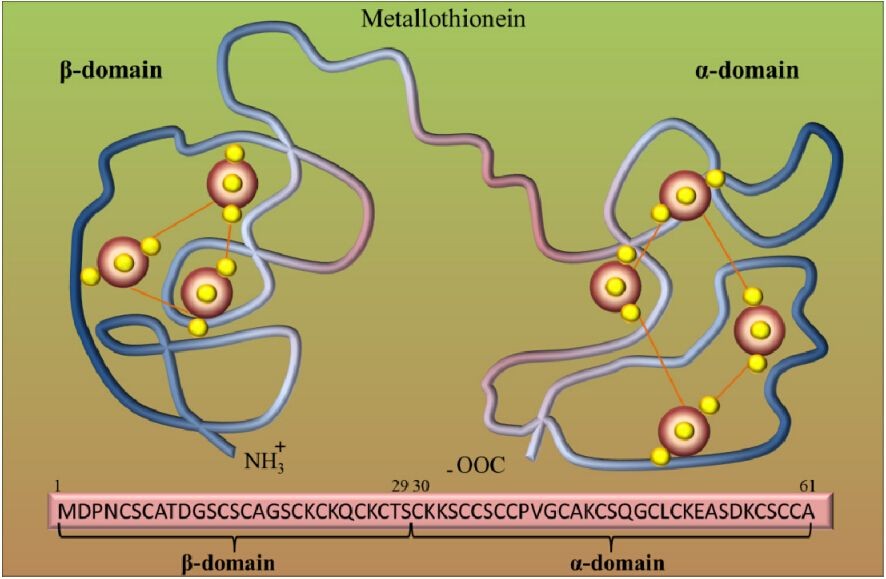


图1.1 金属硫蛋白的结构模式。α和β两个结构域的金属离子结合位点（Petrlova, J; 2006）Figure 1.1. Metallothionein (MT) structure. Model ofα-domain andβ-domain of binding

Sites of metallothionein.

金属硫蛋白发现至今近60年的研究中，陆续在不同物种发现并鉴定了MT基因，通过归纳和总结，目前认为MT具有以下特点：低分子质量（0.5-10 KDa），一般含有40-100个氨基酸残基；高半胱氨酸（Cys）含量，半胱氨酸含量接近30%，具有较强的金属结合能力[48]；分子中不含有组氨酸（His）和芳香族氨基酸，便于进行光

4

谱分析；容易被重金属离子、糖皮质激素，氧化压力等多种因子诱导；基因启动子区特异性序列调控其诱导表达[49]。已知的MT被分成3类，第一类与哺乳动物的MT1和MT2亚型具有同源性，第二类与哺乳动物的MT1和MT2亚型不具有同源性，第三类具有植物螯合肽-富含Cys的谷胱甘肽酶促合成肽[50]。高等生物MTs具有

bidominial结构（蛋白折叠形成2个功能依赖性结构域且均含有一个金属簇），可与二价金属结合，而低等生物MTs则有monodominial结构（蛋白折叠成单一金属簇的结构域）[51]。研究发现，哺乳动物典型的MT结构域模型有2个金属硫醇簇（亚基），即2个结构域，对金属的结合能力不同。其中C端的α结构域由11个半胱氨酸形成的金属硫醇簇（4-metal cluster），可结合4个Cd2+或Zn2+（二价金属离子）或者6 个

Cu+（一价金属离子）；位于N端的β结构域通过9个半胱氨酸形成的金属硫醇簇可结合3个Cd2+或Zn2+（二价金属离子）或者6个Cu+（一价金属离子）[52]。2个金属硫醇簇被确定为蛋白的2个结构域：即C端的α结构域和N端的β结构域，这些金属硫醇簇通过不含半胱氨酸的铰链序列相连接[53]。

### 1.2.2 金属硫蛋白的Th理功能

在MT蛋白分子中2个结构域的半胱氨酸残基上硫醇基可以与不同的金属离子结合，表现出不同的生理功能。正常生理条件下，MT总是伴随着Zn2+的存在，当有其他金属离子存在时，由于MT与其他金属离子具有更高的亲和力，导致Zn2+很容易被其他离子取代。金属硫蛋白可以结合并储存金属离子，具有重金属解毒和维持必需金属稳态的功能，也参与抵御自由基和氧化应激作用[54-56]. MT分子中半胱氨酸残基的巯基可以捕获有害的氧化基团，如过氧化物和羟基自由基[57]，在这个反应中半胱氨酸被氧化成胱氨酸，金属离子被半胱氨酸结合并释放到介质中。

综合分析MT的功能主要有：

1）维持必需微量金属的平衡：在不受其他因子胁迫的细胞内，MT与锌、铜、硒等具有生理学功能的金属离子结合，将这些金属离子暂时储存起来，为含金属酶类、金属蛋白和转录因子等提供缓冲和储备一定量的必需金属，如锌的平衡[58]，是细胞内必需金属的供体，同时也是受体[59]；

2）对有毒重金属的解毒：当细胞受到二价重金属如镉、汞、铬等胁迫时，MT蛋白可以与这些重金属离子结合并将其固定，从而避免重金属离子继续扩散对细胞造成急性毒害，起到重金属解毒的作用[60]，Thornalley认为MT可调节和清除自由基而对其进行解毒[61]；

5

3）清除自由基和抗氧化作用：MT具有抗氧化活性[62]，可以保护DNA免受HO•自由基的伤害，其清除自由基的能力是谷胱甘肽(GSH)的38倍[63]，还可以调节基因表达、清除细胞产生内的各种活性氧（ROS）[64]；

4）其他功能：MT还参与神经系统保护[65]，MT可以与细胞膜绑定来调节细胞的增殖、程序性死亡、炎症[66]和组织再生[67]等。

### 1.2.3 金属硫蛋白在昆虫中的研究现状

昆虫MT基因与哺乳动物典型的MT1/MT2具有极为类似的结构特点，目前已报道的昆虫MT基因有：黑腹果蝇（*Drosophila melanogaster*）中有5个MT基因，土壤跳虫（*Orchesella cincta*）有1个，冈比亚按蚊（*Anopheles gambiae*）2个，家蝇（*Musca*

*domestica*）1个，虻（*Tabanus yao*）2个，摇蚊（*Chironomus riparius*）1个。其中以果蝇MT研究最为清楚，1985年发现果蝇的第1个*MtnA*(*Mtn*)，1987年发现果蝇的第2个*MtnB*(*Mto*)[68,69]，2003年发现*MtnC*和*MtnD*[70]，证实了果蝇每个MT含有1个金属结合簇[71]。随后发现了果蝇第5个MT，即*MTE*[72]。目前对昆虫MT的研究已从分子组成和结构特点深入到不同因子对MT在mRNA水平上的转录调控等，Giedroc D等（1988）发现金属调节转录因子（Metal-regulatory transcription factor 1 MTF-1）需要一定浓度的锌才能与DNA结合[73]并调控MT的表达[74]，且MTF-1是金属诱导MT表达必须的元件[70]。随后的研究发现具有高度保守序列的金属应答元件（metal-response elements MREs）也参与MT的转录，MTF-1与MT的DNA分子和MREs结合后才能启动转录程序[75]。通过基因敲除、RNAi、突变体和转基因等手段进一步证明果蝇MT基因具有与哺乳动物一样的重金属解毒功能。

## 1.3 中华稻蝗

### 1.3.1 中华稻蝗的Th活习性

中华稻蝗（*Oxya chinensis*），属节肢动物门、昆虫纲、直翅目、斑腿蝗科、稻蝗属昆虫，在我国广大水稻种植区域均有分布，主要以禾本科植物叶片和幼茎为食，如水稻、小麦、甘蔗、[高粱](http://baike.baidu.com/view/25831.htm)、玉米等多种农作物[76]，也取食芦苇和狗尾草等。在太原地区，中华稻蝗一年繁育一代，其不同龄期的若虫和成虫咬食作物叶片、茎秆和幼芽，在高温湿热的天气条件时，以成虫的取食量最大，水稻被害时叶片被咬成不同程度的缺刻，严重时[稻叶](http://baike.baidu.com/view/4607749.htm)和茎杆被吃光，也不同程度的咬食稻穗，特别为害发生在水稻灌浆期，会导致水稻减产。

6

### 1.3.2 中华稻蝗的Th活史

中华稻蝗成虫雌虫体长25-38 mm，雄虫体长20-31 mm。初春孵化的蝗蝻，在自然条件下约10-15天一个龄期，一般经过4次蜕皮后羽化出完全的翅成为成虫，不久性成熟即可交配产卵。在太原地区，经过冬季低温滞育期[后越冬卵](http://baike.baidu.com/view/4704123.htm)于翌年4月中旬开始[孵化](http://baike.baidu.com/view/35554.htm)，5月上中旬1龄蝗蝻出现，1-2龄[若虫](http://baike.baidu.com/view/147065.htm)常多集中在[田埂](http://baike.baidu.com/view/541320.htm)杂草上取食，3龄食量逐渐增加并趋向稻田开始取食[稻苗幼叶](http://baike.baidu.com/view/4607749.htm)；待4龄期食量大增，成虫期开始咬食稻苗茎叶和灌浆[谷粒](http://baike.baidu.com/view/3110078.htm)，成虫时取食量最大。7月第一代成虫陆续出现并具有飞行能力，在8-10月可见雌雄抱对交配，交配一周后开始产卵。中华稻蝗产卵多在稻田田埂及其附近杂草丛根部疏松土壤中，常选择[向阳](http://baike.baidu.com/view/304695.htm)低湿的草丛或土质较松的田埂处产卵。产卵时依靠产卵瓣将其腹部插入土中，深度一般为2-3厘米，先分泌泡沫状物质包裹着卵粒形成卵囊，每个卵囊内含卵20-40粒不等，卵囊在土中越冬。

## 1.4 镉染毒对中华稻蝗的影响及基因数字表达谱（DGE）分析

本课题组前期已经通过对小麦镉染毒，发现用不同浓度重金属镉浇灌小麦7天后，小麦苗茎叶中镉的累积浓度随溶液中镉浓度的升高而显著增加，通过喂食含镉小麦对中华稻蝗进行慢性染毒后，其体内镉含量高出对照14-20倍，其中4龄和5龄若虫与其他日龄相比体内镉积累最为显著，对应的昆虫排泄物中镉含量显著增加，

MT蛋白含量显著增加[77]。在中华稻蝗不同组织中镉的蓄积规律为消化道高于其他组织，超过对照组试虫中肠中镉含量100倍，消化道中尤其是中肠最高，相应的中肠

MT蛋白的含量是对照组的40多倍，中华稻蝗中肠镉蓄积量和MT蛋白合成量之间具显著的线性关系[77]。

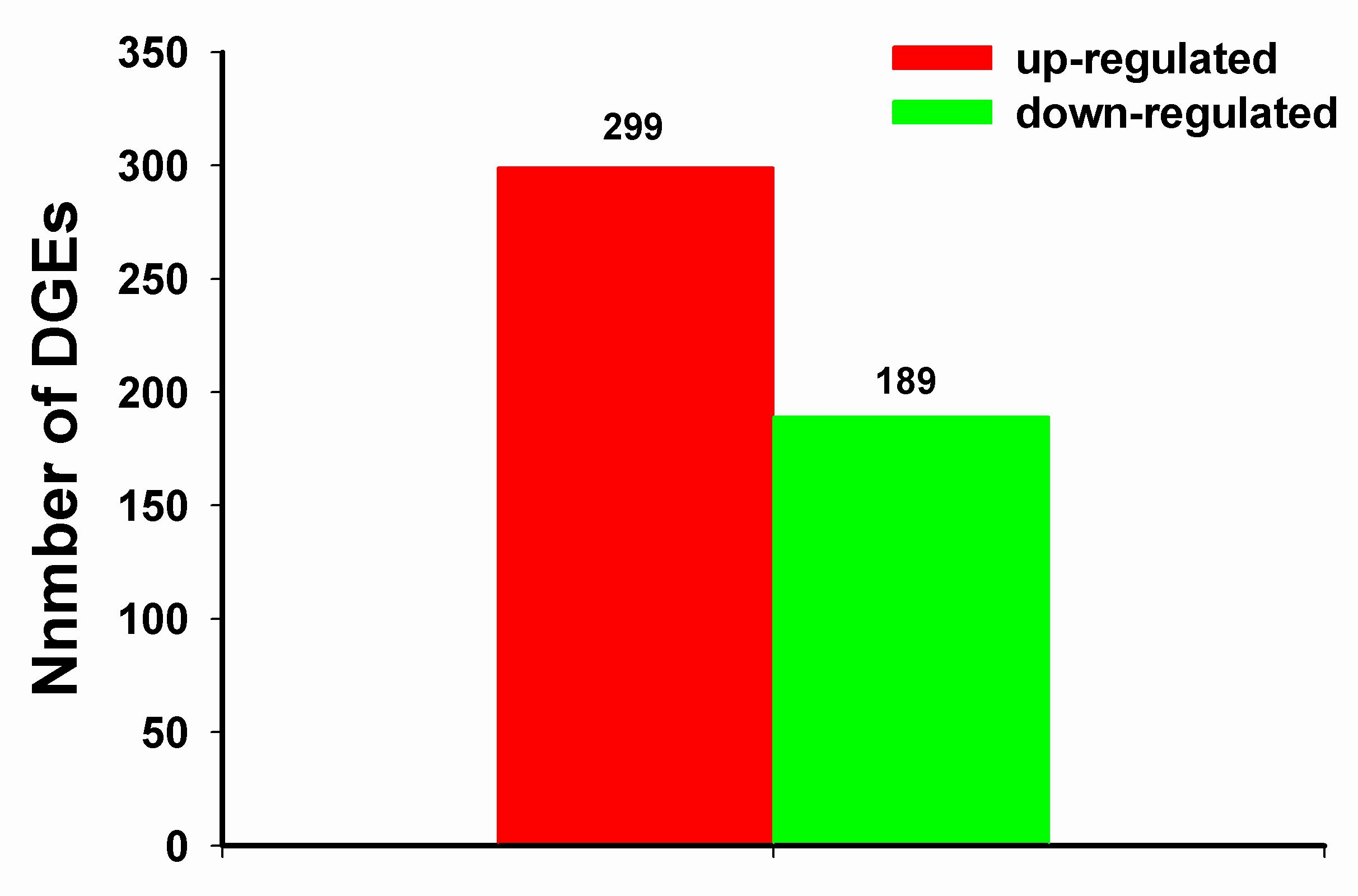


图 1.2 镉处理后中华稻蝗数字基因表达谱中基因变化图

Fig 1.2 Up or down-regulated effect of Cd on transcriptions of genes of *O. chinensis* for DGEs

7

本研究延续前期的工作，首先进行中华稻蝗转录组测序，进一步对镉染毒前后中华稻蝗基因的表达差异进行数字基因表达谱（Digital Gene Expression DGE）分析，结果显示，差异表达的基因主要与中华稻蝗新陈代谢和解毒相关，涉及部分解毒酶、抗氧化酶和消化酶等变化；其中热休克蛋白（HSP）和金属硫蛋白（MT）基因等应激蛋白类相关基因有显著的变化。如图1.2所示，上调表达的基因有299个，下调表达的基因有189个，其中有2个基因被注释为MT基因，分别为*OcMT1*和*OcMT2*，分别上调279和483倍，在DGE数据库中显示为显著诱导高表达，基于这个特征数据，本文进一步对中华稻蝗2个MT基因进行深入的研究和探讨。

## 1.5 RNA干扰应用

RNA干扰（RNA interference, RNAi）是由双链RNA诱导的特异性序列的转录后基因沉默现象，是一个强有力的生物学工具，从发现到应用只有10年的新生技术。1995年Guo和Kemphues首次证实了RNA干扰现象的存在[78]，三年后Fire等人第一次将RNA干扰应用于秀丽隐杆线虫的研究，发现向线虫体内导入dsRNA便能够明显降解mRNA分子，特异性地抑制相关基因表达，并首次提出了RNA

interference的概念[79]。2006年，Andrew Z. Fire和Craig C. Mello因此被授予诺贝尔生理学或医学奖。由于RNA干扰可以有效阻断特定基因的表达，具有高效性和特异性等优点，接下来的几年时间，RNA干扰在多个物种上进行了应用，逐步发现用于沉默目的基因的dsRNA分子可以根据不同昆虫类群采取不同的导入方式，如组织定位注射、虫体浸泡和喂食等，如此便利高效的技术使得RNA干扰成为分析基因或蛋白质功能的便利技术。目前RNA干扰已经被应用到基因功能验证、基因治疗、害虫防治、作物育种和药物开发等诸多领域。

随着RNA干扰技术的深入研究和应用，越来越多的证据已经证实RNA干扰在鳞翅目昆虫中出现不稳定性或沉默效率低下的现象，推测这可能与鳞翅目昆虫先天的免疫反应和免疫功能相关[80]。本课题组前期的实验表明向中华稻蝗血腔中注射一定量的特定基因dsRNA分子24-48 h后，采用qPCR技术检测该基因mRNA的转录水平，发现在中华稻蝗成虫期基因沉默效率可达63.1-70.9%[81]，因此，本课题中将RNA干扰技术应用于中华稻蝗金属硫蛋白基因（OcMT）的功能的研究。

## 1.6 研究内容及意义

### 1.6.1 研究内容

本文以环境污染物中常见的重金属镉、铜和锌为胁迫因子，以金属硫蛋白基因

8

为研究对象，以中华稻蝗为研究材料，开展如下几方面的研究工作：

1）采用qPCR技术研究中华稻蝗2个OcMT基因的分子特性和在中华稻蝗不同发育阶段和不同组织部位的表达模式；

2）通过RNAi技术研究中华稻蝗2个OcMT基因的功能；

3）采用RT-qPCR技术研究不同金属对中华稻蝗2个OcMT基因mRNA转录表达水平的影响；

4）检测金属镉对中华稻蝗体内解毒酶活性变化和血细胞的影响；

5）通过显微镜技术研究中华稻蝗马氏管和脂肪体对不同金属的响应；

6）通过大肠杆菌原核表达OcMT蛋白，验证OcMT蛋白对重金属的结合功能。

### 1.6.2 研究意义

水稻是我国种植面积最大的粮食作物之一，重金属通过多种途径污染农田，进而被水稻吸收并分布于茎叶和稻米中，危及人类的健康。中华稻蝗栖息于稻田且以水稻茎叶为食，重金属可通过食物链转移到中华稻蝗体内。本研究以中华稻蝗为材料，以具有重金属解毒功能的OcMT基因为对象，研究OcMT基因在中华稻蝗重金属解毒方面的作用，为阐明昆虫重金属解毒代谢在分子水平的调控模式提供理论基础，也为揭示昆虫对摄入过量重金属后的代谢解毒方式和机制提供参考，同时，鉴于重金属作用下中华稻蝗OcMT基因mRNA转录水平的敏感变化，OcMT基因可作为农田金属污染特别是稻田污染的检测的生物标志物，在农业环境重金属监测方面具有重要的实践价值。

## 1.7 本文创新之处及与所发表论文的相关性

本文首次对不同重金属胁迫下中华稻蝗2个OcMT基因和蛋白的分子特性及功能、解毒酶活性变化、重金属对中华稻蝗消化道及血细胞的影响等进行了深入研究，本研究阐明了中华稻蝗在重金属胁迫下，通过不同的途径和代谢系统进行解毒，保护机体免受重金属的损害。本研究结果为揭示昆虫在重金属胁迫下解毒代谢提供理论数据，为农田污染风险评估提供实践参考。

围绕本文第二章至第六章研究结果整理撰写如下4篇学术论文及1项发明专利：1）Liu Yaoming, Wu Haihua, Kou Lihua, Liu Xiaojian, Zhang Jianzhen, Guo Yaping,

Ma Enbo. 2014. Two Metallothionein Genes in *Oxya chinensis*: Molecular Characteristics, Expression Patterns and Roles in Heavy Metal Stress. *PLoS ONE*. 9, (11) e112759.

2）Yaoming Liu, Haihua Wu, Zhitao Yu, Yaping Guo, Jianzhen Zhang, Kun Yan Zhu,

9

Enbo Ma. 2015. Transcriptional response of two metallothionein genes (OcMT1 and OcMT2) and histological changes in *Oxya chinensis* (Orthoptera: Acridoidea) exposed to three trace metals. *Chemosphere*.

3）刘耀明， 余志涛， 朱文雅，李亚红， 郭亚平， 张建珍， 吴海花， 马恩波. 2015.

三种重金属对中华稻蝗金属硫蛋白基因表达的影响. 农业环境科学学报. 34(2)，277-232.

4）刘耀明， 杨慧敏， 张育平， 吴海花， 张建珍， 马恩波， 郭亚平, 2013。 镉和铬急

性染毒对中华稻蝗解毒酶和多酚氧化酶的影响. 农业环境科学学报. 32(7)，1321-1327.

5）发明专利. 一种生物解剖蜡盘及其制作方法. 刘耀明， 张小民， 吴海花， 马恩

波，郭亚平. ft西大学. 申请号：201410674090. 公开号：CN104356656A

10

# 第二章 中华稻蝗金属硫蛋白基因的分子特性

本课题组前期对中华稻蝗进行慢性镉染毒后发现，中华稻蝗各个龄期发育延迟，各龄期较对照组延迟2-4天不等，从卵孵化为若虫开始，处理组需要饲养55天左右才能蜕变为五龄若虫，而对照组仅需41天。为深入探究镉染毒对中华稻蝗相关基因变化的影响，课题组将慢性镉染毒后中华稻蝗样品进行转录组测序分析，构建了中华稻蝗转录组数据库和数字基因表达谱，经分析获得中华稻蝗2个金属硫蛋白

*OcMT1/2*基因全长序列。为了进一步分析了这2个MT基因在中华稻蝗不同发育阶段和不同组织部位的转录表达特性，本章中采用RT-qPCR技术检测并分析2个OcMT基因在成虫不同组织和不同发育阶段mRNA转录表达，对OcMT基因在中华稻蝗体内不同组织或器官mRNA表达规律进行探讨，旨在了解OcMT基因在不同组织中的转录差异，以探究中华稻蝗OcMT基因的分子特性和生物学功能，为揭示OcMT基因功能及其在昆虫体内的调控机制奠定基础。

## 2.1 实验材料

### 2.1.1 供试昆虫

本实验所用中华稻蝗虫卵于太原市晋源区（北纬34.28，东经112.45，）水稻种植田间挖取，4月份农田解冻后在稻田田垄杂草着生处，可挖掘获得前一年秋天中华稻蝗成虫所产的卵囊，将蝗卵置于底部铺有湿润沙土的浅盘内，在人工气候培养箱中进行孵化，培养箱内温度为28±1℃，湿度为70-75%，光照与黑暗时间比为14 h:10

h. 大约10天后，1龄若虫开始孵化，孵化出的若虫置于纱笼中以新鲜小麦苗饲喂，每天更换麦苗直至若虫经过4次蜕皮后成为成虫。各个龄期选择活力旺盛的雌雄个体（性别比为1: 1）作为实验材料。

### 2.1.2 相关试剂和仪器

RNA提取及反转录相关试剂：RNAisoTM Plus (TaKaRa, Japan)、RNase-free

DNase、M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, USA)、oligo-(dT) 18 primer by using RNAisoTM Plus (TaKaRa, Japan); RT-qPCR: SYBR Premix Ex Taq ( TOYOBO)；*pEASY*-T3 Cloning Vector (Beijing TransGen Biotech Co., Ltd.); PCR Master Mix

(TIANGEN)；Gel Extraction Kit; Plasmid Mini Kit（OMEGA）。

所用仪器：恒温培养箱（DHP-9082, 上海）；PCR仪（Thermo），微量高速台式离心机（Thermo），冷冻离心机3K15（Sigma），凝胶成像系统（Bio-rad），体视显微镜（XTL-Ⅱ型，中国）；ABI Prism 7300(Applied Biosystems Inc)，PTC-200 PCR 仪

11

## ( MJ research）；NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo, USA)；光学显微镜

（OLYMPUS BX51, Japan）；3K15型离心机（Sigma）；水浴锅（DK-8D，上海）。

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 转录组测序的样品制备

从中华稻蝗蝗卵孵化出1龄若虫开始饲喂一定浓度镉溶液浇灌栽培的小麦苗，一直饲养到发育至五龄若虫。期间分别收集1-5龄若虫共5组不同龄期的样品。若虫每次蜕皮进入下一龄期后第3天取样，对照组饲喂用自来水浇灌培育的小麦苗，取

包括卵和成虫在内的7组龄期样品。每个龄期（每组）为3个重复，每个生物学重复取20头虫体且雌雄各半。将20头中华稻蝗成虫迅速置于液氮中，再转入-80℃冰箱保存。处理组和对照组均为3个生物学重复。样品收集完整后进行总RNA提取并将各龄期样品混合，提交华大基因公司进行转录组测序和数字基因表达谱的初步分析。

严格按照RNAisoTM Plus的说明书进行总RNA提取，所提取的总RNA经RNase free-DNAase I严格处理，提取完毕后，总RNA的完整性一方面通过1.5%琼脂糖凝胶电泳检测，同时使用NanoDrop 2000 Spectrophotometer检测其纯度并对总RNA进行定量，260/280值在1.9-2.1之间认为质量良好。合成第一链cDNA用1.5µg总RNA进行反转录，具体操作按照M-MLV Reverse Transcriptase说明书进行。

### 2.2.2 中华稻蝗总RNA提取和反转录

实验室前期研究表明，中华稻蝗在金属镉诱导下，中肠中的MT蛋白含量最高[77]，由此推测MT基因在中肠有较高的转录水平。选取中华稻蝗成虫进行解剖，并剔除中肠内的食物残渣后立刻将组织置于液氮中研磨，再转入盛有RNAisoTM Plus的匀浆器在冰浴中充分研磨组织样品提取总RNA。具体操作参照试剂盒说明书进行。

### 2.2.3 中华稻蝗金属硫蛋白基因的验证

为了验证从转录组得到的2个OcMT基因，以中华稻蝗RNA反转录得到的cDNA适当稀释后为模板，使用对应的引物进行PCR扩增，然后将纯化后的目的DNA片段连接到特定的质粒上，再将质粒通过转化大肠杆菌感受态，LB固体培养基上过夜，抗生素培养，挑取阳性单克隆测序。

### 2.2.4 引物设计和基因扩增

本实验中，中华稻蝗2个OcMT基因与已知昆虫及哺乳动物MT基因比对分析后，分别命名*OcMT1*和*OcMT2*。使用Primer 3.0软件设计扩增引物，由于OcMT 基

12

因富含半胱氨酸，引物设计时尽量选取较低的G-C含量的区段，同时兼顾其他参数。引物由上海英骏公司合成，引物信息见表2.1。

表 2.1 本研究中RT-PCR、RT-qPCR引物列表

Table 2.1 The primers used in RT-PCR and RT-qPCR

引物用途

Application of primers

基因名称

Gene name

引物序列

Primer sequence

F: GTTGCTGAAGCCGCCTACT

产物大小

Product size (bp)

CDNA cloning *OcMT1*

R: CATCTTGGGTGGCTGGTG

134

*OcMT2*

F: CCGCTCTGACAAGCAGGAAC R: CTGCCTGGTGATCTATGGGT

206

RT-qPCR analysis *OcMT1*

F: GTTGCTGAAGCCGCCTACT R: CATCTTGGGTGGCTGGTG

172

*OcMT2*

F: ATGTCGTCTCCGTGCTGT R: GCCCTTTGTTTCCTCCTT

123

*β-*actin

F: CGAAGCACAGTCAAAGAGAGGTA R: GCTTCAGTCAAGAGAACAGGATG

156

F: GTTTTCCCACTCACGA

*M13*

R: CAGGAAACAGCTATGAC

3791

以上述中华稻蝗中肠cDNA为模板，进行PCR扩增，具体反应体系和程序如下：

12.5μL PCR Master Mix；上游/下游引物OcMT1F /OcMT1R各0.5μL（引物浓度10

µM）；cDNA 2μL；无菌去离子水10.5μL，轻轻混匀。使用的PCR反应程序为：

94℃预变性3 min；94℃30 s，57℃30 s，72℃20 s，进行40个循环；72℃延伸5 min

后，将扩增产物置于4℃保存。

用1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物：准确称取0.2 g琼脂糖加入20 ml TBE中，摇匀后微波炉内加热40 s，冷却2 min后制胶，等待琼脂糖冷却凝结后点样进行电泳，再用凝胶成像系统观察和拍照。

### 2.2.5 转化

#### 1）取OcMT连接产物（DNA）5μL加入到在冰上解冻的50μL的Trans1-T1感受态细胞中，轻轻混匀，置于冰浴中20-30 min；

#### 2） 冰浴结束，置于42℃水浴中热激30 s后再置于冰上5 min；

13

#### 3） 向感受态细胞中加入300μL灭菌LB液体培养基（常温且不含抗体），置于

37℃震荡培养箱内150 r/min，孵育1 h；

#### 4） 3000 g/min离心2 min，弃部分上清液，混匀菌体后取50-80μL于LB固体平板培养基上，用涂布棒均匀铺板；

#### 5） 将平板置于37℃培养箱过夜培养；

PCR检测阳性克隆：37℃蓝白斑过夜培养10 h后，挑取白色单克隆菌斑于10μL双蒸水中，漩涡混合，取1μL混合液作为模板，用表2.1中M13引物进行PCR扩增：94℃预变性8 min；94℃30 s，55℃30 s，72℃20 s，循环数30; 72℃延伸6 min；

PCR产物用1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测分子大小。检测确认后，从上述过夜培养的平板上挑取白色单克隆菌斑于含有适当浓度Amp的LB液体培养基中37℃培养8 h，按照Plasmid Mini Kit（OMEGA）说明提取质粒，由上海英骏公司进行测序。

### 2.2.6 中华稻蝗金属硫蛋白基因的表达

本实验所用1-5龄若虫样品分别在若虫每次蜕皮进入下一龄期后第3天取样，用洁净自来水浇灌培育的小麦苗饲养，取包括卵和成虫在内的7组龄期样品。每个龄期（每组）设3个重复，每个生物学重复20头虫体，雌雄各半。饲养中华稻蝗由5龄若虫蜕皮为成虫后第3天，将虫体置于冰上解剖，得到脑、视叶、肌肉、前肠、胃盲囊、中肠、马氏管、后肠、脂肪体、精巢和卵巢共11个组织部位的样品，每样品均进行3个生物学重复。将不同组织和龄期样品迅速置于液氮中，再转入-80℃冰箱保存。总RNA提取见本章2.2，第一链cDNA的合成严格按照RNAisoTM Plus的说明书进行操作。

RT-qPCR：使用ABI Biosystems 7300仪器进行测定。以中华稻蝗不同龄期和不同组织部位的cDNA为模板，用特异性RT引物进行实时荧光定量PCR扩增，各龄期和组织样品均设3个生物学重复，每个生物学重复样本再进行2个技术重复，混

匀的样品在96孔板内进行反应，为保证反应质量，将96孔板置于专用的黑色底座上，操作过程中尽量使含有SYBR GREEN PCR mix的混合液避光，具体的操作过程参照SYBR Premix Ex TaqTM说明书。采用20μL反应体系为：SYBR GREEN PCR mix (TaKaRa) 10μL；去离子灭菌水6.4μL, cDNA模板（经20倍稀释）2μL，RT上/下游引物各0.8μL；按照相关试剂用量体积大小一次加入混合总体积为20μL. PCR程序为：94℃15 s, 94℃15 s, 60℃31 s共38个循环，便于考察PCR质量，同时采集熔解曲线，其程序为：95℃15 s, 60℃1 min, 99℃15 s, 60℃1 min。

14

### 2.2.7 统计学分析

qPCR数据结果采用2-ΔΔCt法进行分析处理，结果以平均值±标准误（Means±S. E.）表示，并用SPSS16.0软件进行ANOVA分析比较。设定不同组织或不同生长发育阶段的所有样品中表达量最低的样品的表达量为1，其他各个样品的mRNA转录表达量即为1的倍数，用相对表达水平表征。所有实验结果分析后以平均数±标准误表示，同时采用Tukey's HSD法（SPSS）对实验结果进行分析。基因相对表达量柱形图上标示的不同字母代表基因表达具有显著性差异（*P* <0.05），不同数据间没有显著性差异，用相同字母代表。

## 2.3 实验结果

### 2.3.1 中华稻蝗金属硫蛋白基因的验证

本研究在前期工作基础上，采用重金属镉慢性染毒处理中华稻蝗后，构建数字基因表达谱，分析差异基因表达情况。结果表明，镉慢性染毒后有299个基因上调表达，下调表达基因有189个，其中2个OcMT基因分别上调表达279倍和483倍。初步分析这2个OcMT基因的转录上调可能与重金属镉处理中华稻蝗有关。将2个OcMT基因的cDNA序列输入Genbank数据库进行Blast分析，并与其他已知昆虫MT氨基酸序列进行比对，初步判断2个基因可能为中华稻蝗OcMT基因，因此进行了验证和分析。



图 2.1 *pEASY*-T3克隆载体结构图

Fig 2.1 *pEASY*-T3 Blunt Zero cloning vecter

2个OcMT基因扩增产物通过琼脂糖凝胶检测，结果如下图所示：Marker由上而下依次为600、500、400、300、200、100（bp），左侧为*OcMT2* 理论分子大小为206 bp，右侧为*OcMT1*，理论分子大小134 bp。

15



图 2.2 中华稻蝗2个MT基因表核苷酸和对应的氨基酸序列图

Fig 2.2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *OcMT1* and *OcMT2* cDNAs

注：蓝色字母分别表示核苷酸的起始密码子和终止子，红色字母表示氨基酸序列中的半胱氨酸残基。

如图2.2显示，测序结果与转录组得到的OcMT基因序列进行比对验证，再通过NCBI网站在线Blast比对，初步确认2条序列为中华稻蝗MT基因系列*OcMT1*和*OcMT2*。

将中华稻蝗MT蛋白的氨基酸序列与已报道的昆虫MT蛋白的氨基酸序列进行比对分析，得到如下结果：



图 2.3 中华稻蝗两个MT基因与部分已知昆虫MT基因氨基酸序列比对图

Fig 2.3 Multiple sequence alignments of the deduced amino acid sequences of OcMT1 and OcMT2 with other known insects

如图2.3所示，红色和蓝色标注的是金属硫蛋白的富含半胱氨酸残基（C）的特征区域，可见中华稻蝗MT蛋白半胱氨酸残基与已报道的昆虫MT蛋白的半胱氨酸残基一致，具有相同的结构特征。参与MT氨基酸序列比对的部分昆虫物种及氨基酸序列登录号分别为：中华稻蝗：*Oxya chinensis* (*OcMT1* KJ153014 and *OcMT2*

KJ153015), 黒腹果蝇：*Drosophila melanogaster* (*DmMTB*: NP524413, *DmMTC*:

16

### NP650882, *DmMTD*: NP788695, *DmMTE*: NP001189254), 家蝇：*Musca domestica*

(*MdMT2*: AEO50699), 冈比亚按蚊：*Anopheles gambiae* (*AgMT1*: AAX86006, *AgMT2*:

AAX86007), 摇蚊：*Chironomus riparius* (*CrMT*: ADZ54163), 姚虻：*Tabanus yao*

(*TyMT1*: ABX80078, *TyMT2*: AAX860079).



图 2.4 昆虫MT基因的系统发育分析

Fig 2.4 Phylogenetic analyses of insect MTs.

注：采用Mega 5进行Neighbor-Joining聚类分析。图中只显示bootstrap values大于50%的值（1000次独立分析）。中华稻蝗：*Oxya chinensis* (*OcMT1*: KJ153014, *OcMT2*: KJ153015), 黒腹果蝇：*Drosophila melanogaster* (*DmMTB*: NP524413, *DmMTC*: NP650882, *DmMTD*: NP788695, *DmMTE*: NP001189254), 家蝇：*Musca domestica* (*MdMT2*:

AEO50699), 冈比亚按蚊：*Anopheles gambiae* (*AgMT1*: AAX86006, *AgMT2*: AAX86007), 摇蚊：*Chironomus riparius*

(*CrMT*: ADZ54163), 姚虻：*Tabanus yao* (*MTTy1*: ABX80078, *MTTy2*: AAX860079)。

由图2.4可见，中华稻蝗2个MT氨基酸（OcMT1和OcMT2）与其他昆虫MT的进化关系分析显示，OcMT1与家蝇MT1以及黒腹果蝇MTA聚为一支，而OcMT2与虻的MTTy2聚为另一支。

### 2.3.2 中华稻蝗金属硫蛋白基因序列的分析

将2个OcMT基因cDNA全长序列提交NCBI官方网站，并获得GenBank注释号分别为：KJ153014和KJ153015. 这2个OcMT基因具有完整结构，包括起始密码子ATG，终止密码子TGA和PloyA尾(AATAAA). *OcMT1*全长为552 bp, 其开放阅读框为123bp，编码40个氨基酸，其蛋白的理论分子大小为3.74 KDa, 等电点为8.11，分子中含有1个Cys-Cys三个Cys-X-Cys 结构（CCXXXXXCXXXXCKCX

-XXCTCTNCAC); *OcMT2*全长为363 bp, 其开放阅读框为195bp，编码64个氨基酸，其蛋白的理论分子量大小为6.92 KDa, 等电点为4.88，分子中含有2个Cys-Cys, 3

17

### 个Cys-X-Cys和3个Cys-X-Y-Z-Cys结构。OcMT2分子的N端中含有1个Cys-Cys 和

3个Cys-X-Y-Z-Cys结构(CCDVCXXXCKEEEKCXXXCKCXXXCK), C端含有 1

个Cys-Cys和3个Cys-X-Cy(s CCQSGKEETKGSPCECKQGDDAPCVCPE NSCKCE)。

OcMT1和OcMT2 中分别含有9和16个半胱氨酸，分别占整个氨基酸残基总数的

22.5%和25%, 这些特征符合目前已报道的典型的MT分子结构特征。

### 2.3.3 采用RT-qPCR引物及其扩增效率检测

本实验采用Real-time-qPCR（RT-qPCR）技术进行不同发育阶段和不同组织部位

mRNA转录检测时，选用β-actin为内参基因。由图2.6可见PCR程序在略高于退火温度时开始采集到荧光信号，单一主峰代表该基因的特征峰值，出现特征峰对应的温度即为该基因DNA的熔解温度（Tm）。Real-time qPCR程序为：94℃15 s,94℃15 s,60℃31 s共38个循环，采集熔解曲线程序为：95℃15 s,60℃1 min,95℃15 s,60 ℃

1 min。



图 2.5 Real-time qPCR扩增中华稻蝗金属硫蛋白基因的熔解曲线

Fig 2.5 Dissolution curves of *MT* genes of *O. chinensis* by Real-time qPCR

图2.5为RT-qPCR采集到的熔解曲线（随着温度升高DNA分子的双螺旋结构降解程度的曲线），（A）为*OcMT2*的熔解曲线，（B）为*OcMT1*的熔解曲线。可见，*OcMT1*熔解曲线不完整，在90-95℃间没有采集到完整的峰，而*OcMT2*在85℃时出现单一的峰值，更换引物后得到类似的结果。采集熔解曲线的程序中将熔解温度（Tm为总的DNA分子双螺旋结构降解一半的温度，称为熔解温度）由95℃提高到99℃后，得到如图（C）所示的完整的溶解曲线，后续的RT-qPCR中*OcMT1*和*OcMT2*经相同程

18

### 序运行后得到如图（D）所示的的熔解曲线。

2.3.4 MT基因在中华稻蝗不同发育阶段的表达模式



图 2.6 中华稻蝗金属硫蛋白基因在不同发育阶段的表达

Fig 2.6 Analysis of stage-dependent transcript transcriptions of *OcMT1* and *OcMT2*

注：卵期：egg (EG), 一龄若虫：1st instar nymphs (1st), 二龄若虫：2nd instar nymphs (2nd), 三龄若虫：3rd instar nymphs (3rd), 四龄若虫：4th instar nymphs (4th), 五龄若虫：5th instar nymphs (5th), 成虫：adult (AD).

RT-qPCR分析显示：中华稻蝗2个OcMT在各个发育阶段均有不同程度的转录表达，且2个基因转录水平显示出类似的趋势。其中，卵期转录水平最高，大约是

其他龄期表达量的2-6倍不等，与其他龄期相比有显著差异。在虫体孵化以后的各龄期，*OcMT1*在除卵期以外的其他龄期均无差异；*OcMT2*的转录水平在卵期最高，2龄次之，与其他龄期相比差异显著。

2.3.5 MT基因在中华稻蝗不同组织部位的表达模式

19



图 2.7 中华稻蝗金属硫蛋白基因不同组织部位的表达

Fig 2.7 Analysis tissue-specific transcriptions of *OcMT1* and *OcMT2* in adults

注：脑：brain (BR), 视叶：optic lobe (OL), 肌肉：muscle (MU), 前肠：foregut (FG), 中肠：midgut (MG), 后肠：hindgut (HG), 胃盲囊：gastric caeca (GC), 马氏管：Malpighian tubule (MT), 脂肪体：fat body (FB), 精巢：testis (TE),卵巢：ovary (OV).

中华稻蝗2个MT基因在虫体11个不同组织的转录水平如图所示：*OcMT1* 和

*OcMT2*在中华稻蝗所检测的各个不同组织有不同程度的表达，视叶和脑中转录水平最高。*OcMT1*在视叶中的转录水平最高，大约是脑和脂肪体中表达量的2.5-3.1倍，是其他组织中转录表达量的7-30倍，其他组织中的转录水平虽有不同，但没有显著性差异。*OcMT2*最高的转录表达量出现在脑中，其次是视叶，在脑中的表达量是视叶中的5.3倍，是其他组织中转录表达量的30-128倍，除脑和视叶外，其他组织部位之间无显著性差异(*p* <0.05)。

## 2.4 讨论

1957年，MT蛋白作为镉结合蛋白第一次在马肾中发现之后，有关MT基因和

20

蛋白功能等的诸多研究陆续展开，所研究的生物类群包括细菌在内的多个物种。在昆虫和其他动物的一些物种中也有报道，如在果蝇（*Drosophila melanogaster*）中有

5个MT基因，土壤跳虫（*Orchesella cincta*）1个，冈比亚按蚊（*Anopheles gambiae*）

2个，家蝇（*Musca domestica*）1个，虻（*Tabanus yao*）2个，摇蚊（*Chironomus riparius*）

1个。已知其他昆虫MT蛋白氨基酸序列的长度大约为58-61氨基酸残基之间，而果蝇MT蛋白氨基酸序列的长度在40- 44个氨基酸残基之间，较其他昆虫要短一些[82]，而中华稻蝗OcMT1的氨基酸序列长度为40个氨基酸残基，OcMT2的氨基酸序列长度为64氨基酸残基，可见本研究中所获得的2个MT基因其核苷酸序列和氨基酸序列大小与已知其他昆虫的MT相似。更为重要的是中华稻蝗OcMT具有所有生物MT共有的氨基酸残基和保守结构。作为金属硫蛋白的特征结构C-C, C-X-C和C-X-Y-C等，富含半胱氨酸残基常常会形成这样的特殊结构，该结构使得MT蛋白具有重要的生物学功能。OcMT1中有CCX(5) CX(4) CXCGASCXCTNCXCX（10）组成结构和排布方式，在OcMT2氨基酸分子的N端有CCXXCKDTCKX(4) CGKQCKCPETCK，在C端有CCX(11) CECX(7) CVCX(4) CKC结构；不含半胱氨酸的区域在氨基酸定位和代谢方面起着重要的功能，如赖氨酸（Lys, K）是MT形成2个结构域的铰链节点[83]。本文

OcMT2分子中共有16个半胱氨酸残基，其中4个半胱氨酸与赖氨酸为邻，在MT分子与金属离子结合时的结构中具有重要的功能。中华稻蝗2个OcMT分子中这些氨基酸的分布与结构特点[84]，可能直接与MT分子捕获有害金属离子有关，通过这些残基形成螯合位点并与金属离子相结合从而表现出对重金属的解毒功能[85]。

根据本实验室前期对中华稻蝗和飞蝗基因中常用的内参基因的稳定性研究和优选结果[86]，本研究中选择β-actin作为内参基因，因其具有良好的稳定性和重复性，熔解曲线圆滑且整齐一致，无杂峰。本实验中*OcMT1*在Tm值为95℃时采集不到完整的熔解曲线，将95℃调整为99℃，得到完整的熔解曲线。分析认为：可能由于*OcMT1*特殊的核苷酸组成中G-C含量较高，即123个碱基中GC数量为84，含量高达68%；而*OcMT2*基因195个碱基中GC数量100，占基因全长的51%。可知在反应过程中*OcMT1*基因需要更多的能量，而95℃-15 s不能得到采集熔解曲线，将95℃调整为99℃，才能满足DNA解链需要的能量。

本课题组前期的研究已经证实，中华稻蝗MT蛋白在不同发育阶段均有分布，且随着重金属种类和剂量不同，组织间MT蛋白含量有显著的差异，一定程度上表明中华稻蝗通过MT蛋白的大量转录和表达来缓减有害重金属对机体的毒害作用[77]。本研究从MT分子水平展开研究，首先测定了中华稻蝗取食无金属污染的食物后，

21

其不同发育阶段（卵期、1-5龄若虫及成虫期）和不同组织部位OcMT基因的转录表达水平。结果表明，2个MT基因（*OcMT1*和*OcMT2*）在卵期的转录水平最高，分别是其他龄期表达量的100-400倍不等，而中华稻蝗的卵块并不是重金属直接毒害的首要靶标。在雌性成虫体内生殖系统有特殊的屏障，能够很大程度上阻止对生殖细胞有害物质的进入。当发育成熟，蝗卵产出体外时，蝗卵卵壳是有效的物理保护屏障，周围环境中的重金属不易进入蝗卵，而我们的实验证实中华稻蝗卵期2个OcMT基因的转录水平却很高，这可能是OcMT基因参与氧化应激反应有关，因为卵期蝗卵内的卵黄物质是发育成为蝗蝻的物质基础，机体极有可能通过较高的抗氧化机制来保护卵黄物质，从而保证卵的正常发育[87]。此外有资料显示，卵期或者胚胎时期

MT基因对金属的反应更为敏感[88]，MT基因可能参与调节氧化还原反应，起到缓冲作用，因为在卵期和胚胎期，氧化还原的水平和梯度在胚胎发育中极为重要[89]。对水生生物（*Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis*）的研究发现，在胚胎至幼虫早期，

MT基因对外界的异源化合物具有特殊的敏感性，尤其是金属离子[90]。在水生无脊椎动物日本鳟（*Charybdis japonica*）的卵期，MT对自由基和氢氧基（O2−和•OH）的清除速度是过氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的8, 000-10,000倍[91, 92]。在哺乳动物中通过MT水平的增高来应对重金属和氧化压力的胁迫，研究发现敲除小鼠MT基因的细胞系对金属紊乱及氧化应激的敏感性大大增强[93]。由于MT对金属具有很高的亲和力，MT蛋白对体内必需金属的稳态和分布具有重要的调节作用[94]，因此

MT被认为具有对非必需有害金属解毒、维持和调节必需微量金属平衡、清除自由基并抗氧化的功能[95]。在中华稻蝗体内，MT基因抗氧化应激和金属稳态的功能还需要进一步的研究来验证。

中华稻蝗2个MT基因在所测定的11个不同组织部位均有转录和表达，可见在中华稻蝗体内具有普遍性的表达。本实验室前期研究发现OcMT在神经系统转录水平较高，本研究发现在脑和视叶中的转录水平显著高于其他组织部位，这表明OcMT基因在神经系统的敏感性更高，这可能与金属暴露的方式有关，腹腔注射方式使得神经系统更容易感应有害物质的环境压力。目前有关MT在神经系统的研究仅限于人类、实验动物和水生动物中，如人类有3个主要的MT基因亚型在中枢神经系统中广泛表达，在眼睛的视网膜内MT高表达[96, 97]，哺乳动物脑炎和氧化压力发生时，其MT基因的表达水平也相应升高，如在急性脑损伤的病人或者动物脑组织中[98, 99]，这些研究表明，MT基因在中枢神经和脑中高表达，因为*MT-1*和*MT-2*可以保护中枢神经免受由物理或者化学来源的损害[100, 101]。本研究发现*OcMT*基因在消化道中广

22

泛表达，该结果与已有的研究结果一致。在果蝇（*D. melanogaster*）、蓝蟹（*Callinectes*

*sapidus*）和土壤跳虫（*Orchesella cincta*）幼虫中肠是MT表达的主要组织部位[101, 103]，因为肠道是昆虫摄取营养物质的区段，昆虫从口摄入的食物经过整个肠道消化吸收后将残渣经后肠和直肠排出体外[104]。本研究中发现，MT基因在消化道的转录水平相对低于神经系统的脑和视叶，这种特殊的表达模式可能与金属暴露方式有关，也与昆虫的物种、生活环境以及摄取的食物有关，也可能是昆虫在自然条件下，为适应恶劣环境的变化而进化的神经系统高度敏感的适应性机制相关。MT基因在昆虫神经系统普遍表达，但迄今为止，有关MT基因在昆虫神经系统中的高表达现象尚缺乏系统分析，这可能是研究者对神经系统关注较少，更多的研究集中于消化道[81]，这方面的研究工作还有待进一步深入探索。

中华稻蝗2个MT基因在脂肪体的表达高于除脑和视叶之外的其他组织，其原因是脂肪体具有较为敏感的应激能力，*OcMT2*在卵巢中的转录水平高于*OcMT1*，表明*OcMT2*对保护生殖系统免受金属和氧化压力的损害方面具有重要作用[105]，这与胚胎期MT的高表达是一致的，类似的而研究在家兔和三疣梭子蟹（*Portunus*

*trituberculatus*）中得到证实，可见MT是多功能的应激蛋白[106]，除了金属解毒还具有诱导基因表达和生殖保护以及其他方面的作用。

23

# 第三章 中华稻蝗金属硫蛋白基因功能研究

本文第二章验证了2个OcMT基因的核苷酸和氨基酸序列，与目前已经报道的其他昆虫MT基因一样，也具有由半胱氨酸形成的特征序列。通过检测*OcMT1* 和

*OcMT2*在不同发育期和不同组织部位的表达情况，结果表明：2个OcMT基因在中华稻蝗的整个生长发育期均有转录和表达，但存在组织转录表达水平差异，推测它们在生物体内的功能有所分化和区别。

MT基因在清除体内自由基，解除重金属毒性，调节必需金属的稳态方面具有的重要的生物学作用，本研究中为了探讨OcMT基因分子功能，采用RNAi方法对中华稻蝗2个OcMT基因进行干扰后用不同浓度金属处理试虫，观察并统计昆虫的死亡率；同时采用异源表达方法，将中华稻蝗MT基因克隆到大肠杆菌体内，表达MT蛋白，并用不同浓度的金属溶液处理菌液，通过检测菌液的吸光值（OD）考察菌液的生长趋势。从中华稻蝗体内、体外两方面进行比较研究，进一步验证中华稻蝗MT基因对重金属的解毒功能。

## 3.1 实验材料

中华稻蝗虫卵采集于太原市晋源区晋祠景区附近水稻田间，虫卵在光照培养箱中进行孵化，培养箱内温度为28±1℃，湿度为70-75%，光照：黑暗时间比为14: 10

h. 孵化出的若虫置于纱笼中用新鲜小麦苗饲喂，每天更换麦苗直至若虫经过5次蜕皮后成为成虫，选取健康的中华稻蝗成虫雌雄各半，将虫体清洗干净后迅速置于液氮中速冻后在研钵中研磨成粉末，再进行总RNA提取，用于合成dsRNA。此实验进行3个生物学重复，每个生物学重复包含至少10头成虫和30粒蝗卵。所有样品-80℃保存备用。

### 3.1.1 主要试剂和仪器

RNAisoTM Plus, T4 DNA ligase(Promega)，DNA Marker(TAKARA)，M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, USA), SYBR Premix Ex Taq(TOYOBO)，RNase-free Dnase; PCR Master Mix(TIANGEN)，T7 RiboMAX Express RNAi System (Promega, USA); *pEASY*- T3 Cloning kit ( TransGen)；Gel Extraction Kit、Plasmid Mini Kit

(OMEGA)，DNA Gel Extraction Kit、Plasmid Mini Kit(OMEGA)，BamHI和HindIII

（NEB），protein Marker（Fermentas），大肠杆菌感受态细胞：DH5a（克隆型）和

BL21（表达型），牛血清蛋白(Solarbio)，质粒pET28a（实验室保存），CaCl2和MgCl2

分析纯，IPTG，

24

光学显微镜（OLYMPUS BX51）；pH计（Orion® 3-Star, Germany）；体视显微镜（XTL-Ⅱ型，日本）；凝胶成像系统：（Bio-rad），NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo, USA)，酶标仪SpectraMAX 190 (USA), Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR system(Applied Biosystems)，3K15型离心机（Sigma），恒温培养箱（DHP-9082, 上海）。

## 3.2 试验方法

### 3.2.1 引物的设计

本研究中所用的引物均通过Primer Premier 5.0软件并参考E-RNAi网站

（[http: //www. dkfz. de/signaling/e-rnai3/idseq. php](http://www.dkfz.de/signaling/e-rnai3/idseq.php)）与中华稻蝗MT基因的核苷酸序列相结合进行dsRNA的引物设计，为保证合成RNAi产物序列的特异性，尽量选择

cDNA序列的中间区段，设计对照组*GFP*引物，具体引物信息见表1。

表 3.1 引物表

Table 3.1 List of primers used in this study

引物用途

Application

RT-qPCR

analysis

引物序列

Primer sequence

*OcMT1*F: GTTGCTGAAGCCGCCTACT *OcMT1*R: CATCTTGGGTGGCTGGTG *OcMT2*F: ATGTCGTCTCCGTGCTGT *OcMT2*R: GCCCTTTGTTTCCTCCTT

*β-*actin F: CGAAGCACAGTCAAAGAGAGGTA

*β-*actin R: GCTTCAGTCAAGAGAACAGGATG

产物大小

Product size (bp) 172

123

156

*OcMT1*F: TAATACGACTCACTATAGGGGCTGAAGCCGCCTACTTCTA *OcMT1*R: TAATACGACTCACTATAGGGCATCTTGGGTGGCTGGTG

169

DsRNA synthesis

*OcMT2*F: TAATACGACTCACTATAGGGCGCTCTGACAAGCAGGAACT *OcMT2*R: TAATACGACTCACTATAGGGATCGTCTCCCTGTTTGCACT

*GFP-*F: TAATACGACTCACTATAGGGGTGGAGAGGGTGAAGG *GFP-*R: TAATACGACTCACTATAGGGGGGCAGATTGTGTGGAC

193

712

Heterologous gene expression

*OcMT1*F: GTGGGATCCATGCCTGACCCGTG *OcMT1*R: ACGAAGCTTTCACTTAGAGGTGGT *OcMT2*F: GTGGGATCCATGTCGTCTCCGTGC *OcMT2*R: ATTAAGCTTTCATTCACATTTGCAGC

141

213

25

### 3.2.2 体外合成dsRNA

经测序确认含有MT基因的质粒DNA为模板，以含有GFP的质粒DNA为对照，通过PCR反应体系制备用于体外转录dsRNA的专用模板。其PCR反应如下：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 模板 | 含 dsDNA 质粒 | 1.0 L |
| 上游引物 | Ds *OcMT1*F/ ds *OcMT1*F | 0.5 L |
| 下游引物 | Ds *OcMT2*F/ ds *OcMT2*F | 0.5 L |
| Buffer | 2×Taq PCR Master Mix | 12.5 L |
|  | ddH2O | 10.5L |

PCR扩增程序为：94℃预变性1 s，40个循环包括94℃30 s，60℃30 s，72℃45 s，然后72℃延伸5 min, PCR扩增完成后通过琼脂糖（1%）凝胶电泳检测PCR产物的质量，要求条带单一且含量较高，然后在紫外灯下割取条带并按Gel Extraction

Kit说明书回收并纯化PCR扩增产物。通过微量定量仪对纯化后的产物进行定量，根据要求最终稀释定量为0.2μg/μL浓度，-80℃保存备用。

dsRNA合成:

经PCR扩增得到的*OcMT1*和*OcMT2*基因DNA按照试剂盒纯化回收并定量，再进行后续合成反应。合成反应严格按照T7 RiboMAX™Express RNAi System说明书。PCR扩增体系和程序为：

1）将RiboMA×Expression T2 2×Buffer 10μL, DNA模板3μL, T7 Enzyme Mix T2 Express 2μL; ddH2O 5.5μL混匀，42℃-60 s, 70℃-10 min, 4℃保存；

2）上述PCR完毕后产物瞬时离心，分别向其中加入1μL稀释的RNAase和1μL DNAase；

3）置于PCR仪中或恒温37℃水浴温育30 min；

4）依次加入1倍体积的异丙醇和乙酸钠，轻轻混匀后冰浴5-8 min；

5）4℃，6,000 g/min离心5 min，弃上清；

6）用已经预冷的70%乙醇洗涤一次，弹起沉淀；

7）再经过4℃、6, 000 g离心5 min，弃掉上清，倒置于通风橱内风干，加适量的去30-45μL离子水溶解dsRNA；

通过微量定量仪对纯化后的产物进行定量，最终稀释定量为浓度为1.5μg/μL，

-80℃保存备用。

26

### 3.2.3 中华稻蝗MT基因沉默效率的检测

为确保合成的dsRNA特异性和高效性，选择活力旺盛的成虫用于RNAi测试，同时设置空白对照。共3组平行实验，每组注射40头成虫，雌雄各半，实验组注射3μL事前合成的MTdsRNA，对照组注射等量的dsGFP。注射后将昆虫置于养虫室内饲养，分别在12、24和48 h时间点取虫测试，通过RT-qPCR检测不同时间点

RNA沉默效率，5头虫体为一个生物学重复，以*β-actin*为内参基因，检测

*OcMT1*/*OcMT2*转录表达效率。PCR反应体系及程序详见本文第二章2.6。

### 3.2.4 采用RNAi技术验证金属硫蛋白基因在中华稻蝗体内的解毒能力

确保中华稻蝗注射dsRNA后MT基因在中华稻蝗整虫体内的沉默效率达到70%以上，同时确定*OcMT1*和*OcMT2*没有相互交叉干扰和影响的前提下进行重金属耐受性检测。在中华稻蝗成虫注射dsRNA室温下作用24 h后，再向中华稻蝗注射3种重金属：镉、铜和锌，每种金属分别设置如下5个不同浓度梯度：镉（CdCl2: 0.87，

1.74, 2.61, 3.48, 4.35 mM），铜（CuCl2: 8.79, 11.73, 14.67, 17.61, 20.55 mM），锌（ZnSO4:

15.65, 19.13, 22.61, 26.09, 29.57 mM），每个浓度金属溶液注射4μL，对照组注射等量蒸馏水。48 h后统计不同浓度金属处理后各个处理和对照组中华稻蝗虫体死亡率。

### 3.2.5 制备CaCl2感受态细胞

在超净工作台中分别接种BL 21和DH5α感受态细胞各1μL于1 mL无抗LB液体培养基中，在37℃震荡培养3-4 h，再分别取该菌液300μL接种于30 mL无抗LB

液体培养基中震荡培养3-4 h，离心收菌制备感受态细胞。制备方法如下：

1）用双蒸水配置0.1 mol/L的CaCl2和MgCl2（MgCl2 80 mol/L, 20 mol/L CaCl2）溶液，通过滤膜过滤后置于冰浴中冷却备用；

2）将37℃震荡培养3-4 h后（大肠杆菌正处于对数增长期，活性较好）的BL 21

和DH5α菌液分别置于冰浴中冷却10 min；

3）4℃，4100 r/min离心10 min，弃掉上层培养基，倒置沥干残留培养基；

4）12.5 mL初始培养基用7.5 mL预冷的0.1 mol/L的CaCl2溶液（MgCl2 80 mol/L，

20 mol/L CaCl2）重悬浮洗涤，目的是去除残留培养基；

5）4℃，4100 r/min离心10 min，弃掉上清沥干残留培养基；

6）每12.5 mL初始培养基用600μL预冷的0.1 mol/L的CaCl2溶液（MgCl2 80 mol/L, 20 mol/L CaCl2）重悬浮即为感受态细胞；

7）将感受态细胞按50μL分装后置于-80℃保存待用。

27

### 3.2.6 构建重组质粒进行OcMT异源表达

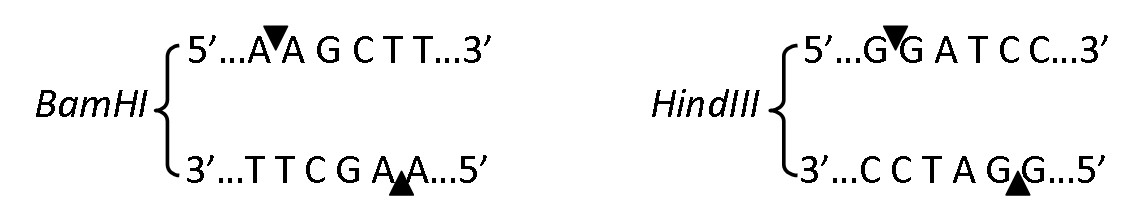
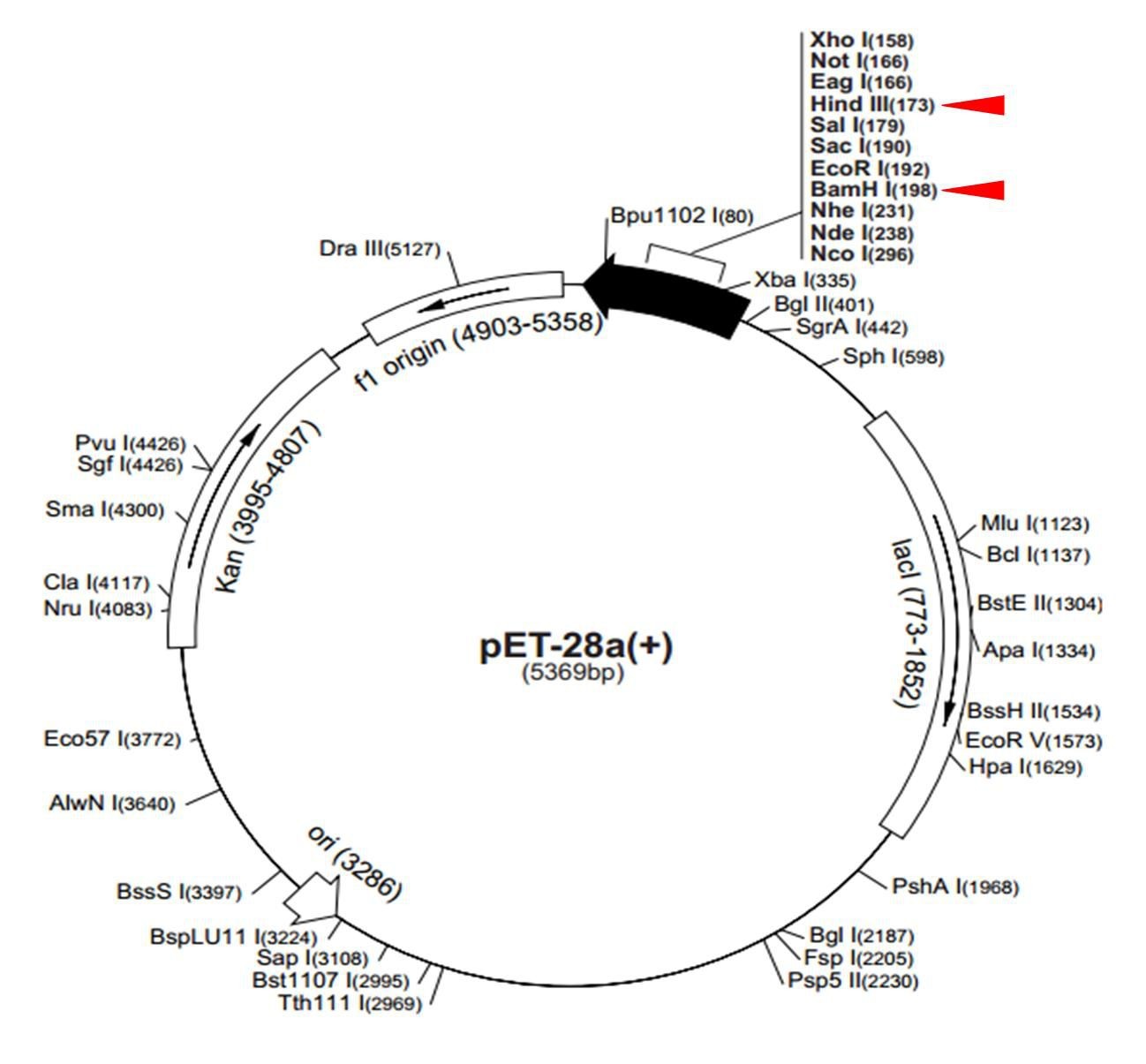


图 3.1 pET-28a克隆载体结构图

Fig. 3.1 The structure of pET-28a vector

注：本研究中选用的质粒及其两个酶切位点分别为BamHI和HindIII由红色三角符号标注，酶切位点酶切碱基用黑色三角标示。

构建含有*OcMT1*和*OcMT2*基因的重组质粒进行异源融合表达：设计含有2个酶切位点BamHI和HindIII的特异性引物，分别为OcMT1BamHI/OcMT1BamHI 和

OcMT2HindIII/OcMT2 HindII(I

表3.1 ），酶切位点由6个碱基HindII（I

ACG-AAGCTT)

和BamH（I GTG-GGATCC）组成，前面的3个碱基为保护碱基。以中华稻蝗整虫cDNA

为模板，进行PCR扩增，PCR程序见[81]，将PCR扩增产物与*pEASY*-Blunt Zero cloning

vecter质粒进行连接并转化，然后通过蓝白斑筛选，挑取白色单克隆菌斑在液态培养基中培养，提取质粒进行测序，具体方法如本文第二章2.5-2.6。

28

经测序确认*OcMT1*或*OcMT2*的单克隆后，再进行扩大培养，提取质粒，并与pET-28a质粒分别使用限制性内切酶进行酶切，酶切方法按照快切酶说明书要求进行，向EP管内依次加入纯化回收的质粒DNA（含*OcMT1*或*OcMT2*）26μL，灭菌双蒸水17μL，10 x NEB缓冲液5μL，内切酶HindIII和BamHII各1μL，共50μL；pET-28a质粒20μL，灭菌双蒸水22μL, 10x NEB缓冲液5μL，内切酶HindIII 和

BamHII各1.5μL，共50μL；37℃水浴中酶切6 h。酶切后的产物经1.5%的琼脂糖凝胶电泳进行检测并进行纯化回收，并测定各自的浓度。

连接：纯化回收目的DNA和pET-28a质粒产物进行连接，连接体系为：*OcMT*基因7.5μL, pET-32a载体质粒7.5μL，T4 DNAligase1 DNA 10xbuffer 2.5μL，T4 DNA ligase 1μL，灭菌双蒸水0.5μL，混匀后置于PCR仪中22℃连接3-4 h。

连续转化：取连接产物5μL加入冰上解冻的50μL DH5α感受态细胞中，轻轻混匀；置于冰浴中30 min，42℃水浴中热激30-35 s，后置于冰上5 min；加入300μL常温无抗LB培养基，37℃，150 r/min孵育1 h；4000转离心2 min后，弃部分上清液留100μL菌液混匀后取80μL涂于含有Amp的LB平板培养基上，涂布均匀；37℃培养箱过夜培养。挑取白色单克隆菌斑于1000μL LB液体培养基中，37℃，150 r/min培养8 h后提取质粒，再用相同方法将此质粒转化BL21(DE3)感受态，挑取菌斑与

LB液体培养基（含0.1%氨苄）中置于37℃震荡培养箱内扩大培养。震荡培养2-4

h后，按LB培养基总体积0.1%浓度加入诱导剂IPTG，并降低温度至28-30℃诱导培养6 h，将菌液分装于1.5 ml体积的EP管中12, 000 g离心5 min，弃上清培养基，加入Washing Buffer，用移液器吹打重悬浮后在离心，将装有菌斑的EP管置于冰浴中超声破碎细胞，然后在4℃离心（15,000 g）离心15 min，取上清液和沉淀，通过15% SDS-PAGE电泳分离不同大小的蛋白，确认OcMT1和OcMT2在大肠杆菌中可以表达。

### 3.2.7 表达OcMT融合蛋白的大肠杆菌对金属的耐受能力

为了进一步测试OcMT1和OcMT2蛋白对金属的解毒作用，准备足量的干净试管，向试管中接入5 ml液体LB培养基，在灭菌锅内经120℃蒸汽灭菌20 min，自然冷却后在紫外线灭菌后的超净台内分别接入含有OcMT1或OcMT2的BL21(DE3)菌种（pET-28a-MT-IPTG）20μL（含0.1%卡那kanamycin）。配置5个浓度重金属镉溶液，本实验设置两个对照：一个以加入20μL灭菌培养基的试管作为对照，同时设置不含OcMT基因但含有空载pET-28a质粒的BL21(DE3)大肠杆菌为对照，每个实验处理同时设置3个生物学重复。

29

将上述含有pET-28a-*OcMT1*和pET-28a-*OcMT2*基因的菌液试管置于37℃培养箱内培养，使用酶标仪（SpectraMAX 190）每隔60 min测定一次OD值，直到其OD600达到0.50-0.55时分为两组，一组加入1 mM的IPTG诱导OcMT蛋白表 达

（pET-28a-MT-IPTG），另一组不加入IPTG（pET-28a-MT），置于28℃恒温培养箱培养30 min后加入不同浓度的CdCl2溶液（0, 0.82, 1.64和3.27 mM），每隔1 h测定一次OD值，连续监测11 h直到OD600值不再变化为止。

## 3.3 实验结果

### 3.3.1 中华稻蝗*MT*基因沉默效率



图 3.2 中华稻蝗2个MT基因注射双链RNA后的沉默效率

Fig 3.2 Efficiency of RNAi of *OcMT1 and OcMT2*.

注：分别注射*OcMT1*或*OcMT2*的dsRNA作用12、24、48h后，检测中华稻蝗整虫*OcMT1*和*OcMT2*表达水平，

“\*"表示与对照相比具有显著性差异（*P* <0.05, Tukey's HSD test; n = 3）

设定对照组中*OcMT1*和*OcMT2*的RNA表达量为100%，实验结果显示，与对照相比，中华稻蝗分别注射MT基因dsRNA 12 h后，*OcMT1*和*OcMT2*的RNA转录水平没有显著性差异；而24到48 h之间*OcMT1*和*OcMT2*的转录水平为63.1%和

70.9%，与对照相比，转录水平有显著性差异(*p* <0.05)。可见，向中华稻蝗成虫体

30

内注射dsRNA作用24 h后，可以显著干扰*OcMT1*和*OcMT2*的RNA转录水平，可在此基础上进行后续的金属耐受性测试。

### 3.3.2 中华稻蝗MT基因沉默效率后不同浓度重金属的耐受能力

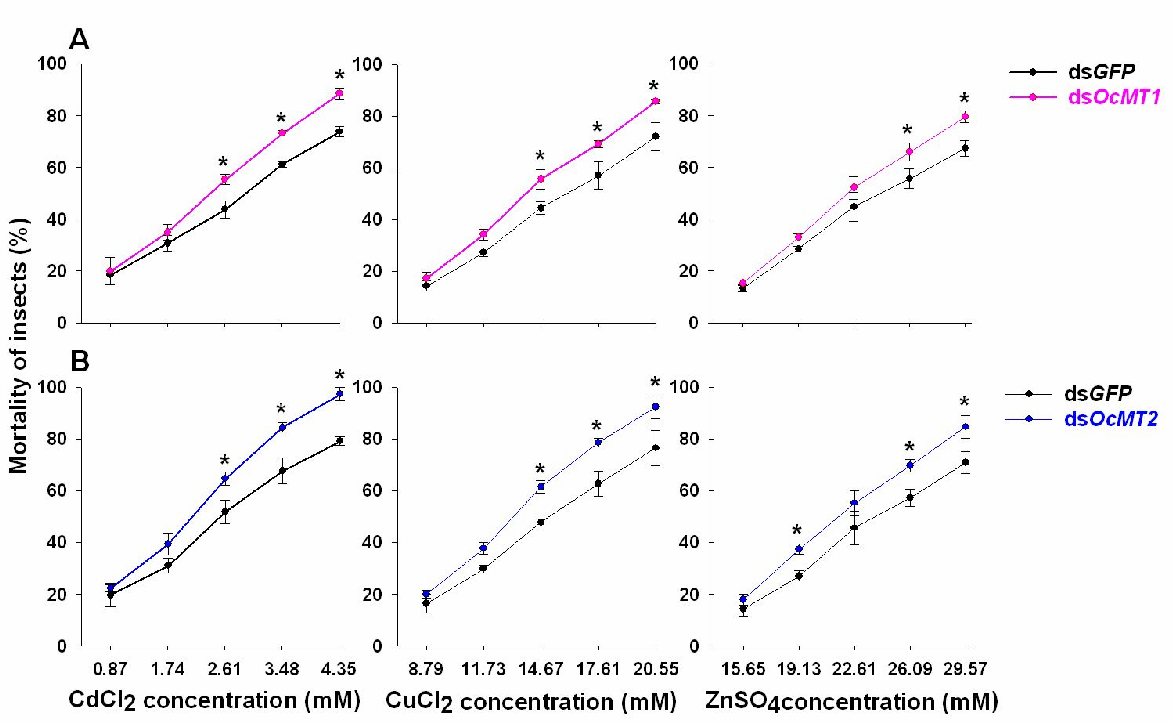


图 3.3 中华稻蝗2个MT基因沉默后不同金属作用后的死亡率

Fig.3.3 Mortalities of *O. chinensis* adults injected with different heavy metals after OcMT gene silencing by RNAi.

通过腹节向中华稻蝗成虫体内分别注射两种特异性的双链RNA(OcMT1dsRNA和OcMT2dsRNA) 48 h后，再分别注射不同浓度的3种重金属溶液，观察12 h，同时统计各实验组中华稻蝗虫体死亡率。结果发现与对照相比，干扰*OcMT1*后注射

CdCl2导致成虫的死亡率从64.0%上升到72.5%，注射CuCl2后成虫的死亡率从72.3%上升到83.7%，注射ZnSO4后成虫的死亡率从69%上升到79.5%；干扰*OcMT2*后，与对照相比，不同浓度CdCl2作用后成虫的死亡率从80.5%上升到97.2%，不同浓度

CuCl2作用后成虫的死亡率从76.5%上升到91.5%, ZnSO4作用后成虫的死亡率从

70.9%上升到84.7%；由此可见，干扰*OcMT1*和*OcMT2*后，试虫死亡率分别上升了

8.5%-11.4%和13.8%-16.7%，与对照组相比差异显著(*p* <0.05)。

### 3.3.3 中华稻蝗MT基因的异源表达

MT基因异源表达融合蛋白经15% SDS-PAGE电泳检测，结果如下图3.4，结果

31

显示中华稻蝗2个MT融合蛋白通过大肠杆菌成功实现异源表达，如下图3.4。



图 3.4 中华稻蝗两个MT融合蛋白检测图

Fig.3.4 SDS-PAGE analysis of two His-OcMT fusion proteins expressed in *E. coli* BL21 (DE3) cells注：中华稻蝗2个MT蛋白（OcMT1和OcMT2）经考马斯亮蓝染色后再经15% SDS-PAGE分布图，从左向右分别为蛋白Marker，第一泳道为不含质粒经IPTG诱导的BL21(DE3)大肠杆菌，第二泳道为pET-28a-OcMT2且经IPTG诱导的大肠杆菌，第三泳道为空pET-28a-OcMT2未经IPTG诱导的大肠杆菌，第四泳道为含有空pET-28a质粒且经IPTG诱导的大肠杆菌，第五泳道为pET-28a-OcMT1经IPTG诱导的大肠杆菌，第六泳道为pET-28a-OcMT1未经IPTG诱导的大肠杆菌。

*OcMT1*基因的开放阅读框编码40个氨基酸残基，其氨基酸的理论分子质量为

3.74 kDa, *OcMT2*编码64个氨基酸，其理论分子质量为6.92 kDa。本研究中将OcMT

与pET-28a构建重组质粒，pET-28a质粒的核苷酸序列中融合标签的大小为17.3 kDa，

15%的SDS-PAGE分布图中含有His标签的OcMT1分子质量为21.04 kDa, OcMT2分子质量为24.22 kDa。可见通过将目的蛋白与含有His标签pET-28质粒构建的重组质粒在表达型大肠杆菌BL21(DE3)中经IPTG低温诱导后表达的2个OcMT蛋白是正确的，2个OcMT蛋白的分子质量符合理论值。

32

### 3.3.4 OcMT融合蛋白对重金属镉的耐受性



图 3.5 表达中华稻蝗MT融合蛋白的大肠杆菌对镉的耐受性

Fig. 3.5 Cadmium tolerance of *E. coli* BL21 cells expressing OcMT1 and OcMT2

转入中华稻蝗MT基因的大肠杆菌在不同浓度重金属的作用下在37℃进行连续培养后发现，对照组（不含有MT基因含有空质粒pET-28a的大肠杆菌（LB21**）**不含重金属的对照组，随着培养时间延长其生长曲线为“S”型，经过8-9 h培养生长曲线呈现快速上升趋势，OD值从0.6迅速上升至1.8，之后上升速度变缓，11 h后达到顶点且1.88之后开始下降，在重金属作用下，生长呈现下降趋势，且随着重金属浓度的升高下降趋势加剧；未经过IPTG诱导的处理组pET-28a-MT（pET-28a-MT1和pET-28a-MT2）在有重金属存在时，大肠杆菌可以维持一定数量或略有增长，其

OD值由0.6上升至0.9，金属浓度越高其增长程度越低；经适当浓度IPTG诱导的处理组pET-28a-MT-IPTG（pET-28a-MT1和pET-28a-MT2）在不同浓度重金属作用下其生长曲线类似，其OD值由0.6上升至0.7-1.4不等，液体培养基中金属浓度更低，大肠杆菌（LB21）培养液的光密度（OD）值越高，即使在最高浓度金属作用下，随培养时间延长，其菌液的OD值有所增高。

## 3.4 讨论

大量的研究和报道已证实不同生物类群中金属硫蛋白不论在基因水平还是蛋白

33

水平均具有高度保守性，决定其功能的主要因子是氨基酸中半胱氨酸残基的数量和分布特点以及蛋白质的空间构想，如C-C, C-X-C和C-X-Y-C等[83]，因此MT被认为是惟一一种在生物体金属代谢中起明确作用的低分子蛋白。MT蛋白分子中的半胱氨酸所含有的大量巯基对二价金属离子特别是二价重金属离子的亲和力极高，研究报道MT与重金属结合能力顺序强弱顺序依次为：Hg2+> Cu2+> Cd2+> Pb2+> Zn2+（均为二价金属离子）[107]，同时MT极易被暴露于环境中的各种重金属诱导并产生反应[108]，重金属可以诱导生物体内MT在基因水平（mRNA的转录水平）和蛋白质水平的表达变化已经被许多研究所证实[109]。

MT在生物体内的重要生理功能可归纳为三点：1）调节和维持生物体必需金属的稳态平衡；2）螯合并固定金属；3）重金属解毒[110]。其作用不仅仅是直接与金属发生反应，同时也参与各种金属或非金属的异常代谢引起的次生生化反应，如自由基引起的氧化胁迫等，以缓减各种类型的生物胁迫和氧化损伤[111]、发育调控[112]和清除活性氧(ROS)等[113]。

目前在昆虫MT研究领域存在着两方面的技术难题，1）MT基因序列不易克隆；

2）MT蛋白分离纯化后，其自然活性不易维持，这使得MT在昆虫体内的功能仍不完全明确。本课题组前期研究发现中华稻蝗取食含有镉、铜或锌的食物后，虫体内的MT蛋白含量显著升高[77]，为了进一步探讨金属作用后OcMT在转录水平和蛋白水平的功能，我们采用RNAi技术沉默目标基因后探索其功能。RNAi是研究功能基因的有力工具，通过向中华稻蝗体腔注射一定浓度的双链RNA（dsRNA），有效沉默

OcMT基因的转录水平后，再向昆虫体内注射不同浓度的镉、铜或锌溶液，与对照相相比，dsRNA注射组的中华稻蝗死亡率显著上升。推测OcMT基因沉默后，虫体内不能合成足够的MT蛋白来螯合或者清除过量的有害金属离子，导致机体金属稳态紊乱，可见*OcMT1*或*OcMT2*在体内过量金属的解毒过程中发挥了重要作用。Enger等发现当人类细胞系不能合成MTs时，表现出对镉的极强敏感性[114]，通过转基因或敲除MT基因小鼠的实验动物模型进一步证明MTs可保护机体免受镉毒性作用[115]。

MT基因在金属解毒方面的功能，已经从低等的真菌到高等的哺乳动物在内的大量研究中得到证实[116]。如在黒腹果蝇（*Drosophila melanogaster*）、家蝇（*Musca domestica*）、冈比亚按蚊（*Anopheles gambiae*）、摇蚊（*Chironomus riparius*）、家鼠（*Mus musculus*）爱胜蚯蚓（*Lumbricus rubellus*）、多齿围沙蚕（*Perinereis nuntia*）、秀丽隐杆线虫

（*Caenorhabditis elegans*）、四膜虫（*Tetrahymena pigmentosa*）和麻疯树（*Jatropha*

*curcas*）等物种中所有的MT亚型都具有类似的金属结合能力和结构功能关系[45, 117]。

34

研究报道MT除直接参与螯合和清除有害金属离子外，还可清除由金属应激产生的自由基[118]，此外在转基因小鼠和植物中也已证实MT可清除机体产生的自由氧。

镉能够显著抑制对照组（pET-28a）大肠杆菌的增殖，含有重组OcMT基因但没有经IPTG诱导的大肠杆菌（pET-28a-MT）OD值有所增长，出现了渗漏表达，分析可能是LB培养基组分中含有的少量半乳糖苷酶（*β*-galactosidase）在一定程度上产生诱导作用，使得MT蛋白变大从而增强了对镉的耐受性。通过OcMT基因在大肠杆菌中异源表达并产生OcMT融合蛋白，发现转化重组质粒的大肠杆菌对镉的耐受性增强，表明OcMT基因表达后可以降低镉对大肠杆菌的毒性，大肠杆菌表达的

OcMT融合蛋白可能螯合并清除镉或者清除由镉胁迫产生的自由基作用。已有研究表明，转MT基因家蝇可显著增强对镉的耐受性[119]，在高浓度的镉作用下，过表达

MT基因的转基因小鼠对镉具有极高的抗性[120]，向缺失MT基因的酵母基因中转入人类MT基因，酵母便恢复了抗铜表型[121]，表达麻疯树（*Tamarix hispida*）MT蛋白的酵母显著增强了对镉、铜、锌和银的抗性[122]，可见MT基因的转录和表达可以提高生物体对金属的耐受力并保护机体免受金属的毒害。本研究采用RNAi技术和异源表达OcMT蛋白，分别从体内和体外两方面证实OcMT基因对不同重金属的解毒功能，目的是揭示中华稻蝗2个MT基因及其蛋白的作用机理，进一步探讨中华稻蝗金属硫蛋白的分子功能。

35

# 第四章 金属急性染毒对中华稻蝗MT基因及解毒酶的影响

前期的研究表明中华稻蝗在金属胁迫下可通过MT基因转录水平的变化对金属解毒，一定程度上缓减和避免金属对细胞的损伤。其实金属作用于机体后，除了引起基因水平的变化外，还会引发生理水平的应激解毒途径，如相关解毒酶活性变化，或通过合成或释放更多的酶对不良因子进行快速分解等。为了进一步研究机体对一定浓度金属的应激反应，本章采用不同浓度的3种常见环境污染金属镉、铜和锌分

别对中华稻蝗急性染毒48 h，检测了镉染毒后中华稻蝗体内相关解毒酶的活性变化，

运用实时荧光定量PCR（RT-qPCR）技术检测3种金属染毒后中华稻蝗2个金属硫蛋白（*OcMT1*和*OcMT2*）基因mRNA在11个不同组织部位的转录变化，同时对染毒后中华稻蝗脂肪体和马氏管形态结构变化进行观察分析。结果显示，酸性磷酸酶

（ACP）、碱性磷酸酶（AKP）、羧酸酯酶（CarE）和谷胱甘肽S-转移酶（GST）的活性在不同浓度镉的作用下显著上升；3种金属在大多数组织中均可诱导*OcMT1* 和

*OcMT2*转录表达水平上升，且OcMT转录水平会随着金属浓度的加大而呈现上升趋势。这一结果表明，在金属胁迫下，中华稻蝗既可通过增强体内相关解毒酶活性对金属代谢解毒，也可通过提高OcMT转录水平缓减金属毒性，从而保护机体免受金属的毒害。此外，体内主要的排泄和代谢解毒组织器官通过生理代谢水平的调节，将有毒金属固定后排出体外，从而减轻金属对机体的不利影响。

## 4.1 实验材料

### 4.1.1 供试昆虫

本实验用中华稻蝗5龄若虫于7月下旬在太原市晋源区晋祠景区稻田采获，分装在70×70×40的尼龙网笼内，在养虫室内用芦苇和狗尾草饲养，每天更换新鲜饲料，待其蜕变为成虫后，进行适应性饲养3天后，选取个体体型一致且健康有活力的成虫（性别比为1: 1）作为实验材料。

### 4.1.2 主要药品和仪器

RNA提取、反转录、RT-qPCR试剂同第三章。

CdCl2、CuCl2、ZnSO4均为分析纯试剂，购自Sigma上海公司。本实验所用仪器同第三章。

36

## 4.2 实验方法

### 4.2.1 三种金属对中华稻蝗半致死浓度测定

为了测定3种金属（CdCl2、CuCl2、ZnSO4）对中华稻蝗的半致死浓度，本实验先将3种金属分别稀释一定浓度，在此基础上继续逐级稀释为3个数量级系列6个浓度。由于中华稻蝗雌雄个体体型大小和体重差异较大，按照平均体重用药量的原则确定雌雄虫差别用药，将稀释好的金属溶液按雌虫6μL雄虫4μL（每头）使用微量注射器从腹部第2-3背板节间膜处缓缓注入血淋巴中。每个浓度组注射试虫30头为一个生物学重复，共进行3个生物学重复。注射过金属溶液的试虫分别置于单独的尼龙网笼内在养虫室内饲养，分别在12、24、48 h时统计各组虫体的死亡率。通过测定发现最低浓度镉、铜、锌作用48 h后的死亡率分别为77%、67%和82%，以此浓度作为最高浓度继续设置5个浓度梯度，相同的方法再次进行测定，48 h后统计试虫死亡数量并计算死亡率。

### 4.2.2 中华稻蝗急性金属处理

选取经过适应性饲养3天后的中华稻蝗成虫，以镉（CdCl2）的半致死浓度3.48

mM为最高浓度，此浓度以下设3个浓度：0.87、1.74、2.61 mM，同时以不含金属的蒸馏水为对照。用微量注射器将溶液从试虫腹部第2-3腹节间的节间膜处注入血

腔，雌虫用量为6μL，雄虫用量为4μL。共设置4个生物学重复，每个生物学重复注射40头试虫。对照组注射等量蒸馏水。注射完毕，将试虫分别置于单独的纱笼内，在养虫室内用新鲜芦苇或者狗尾草饲养。48小时解剖分离各个组织，进行后续实验。同时取2个较高浓度组2.61和3.48 mM试虫样品，用于测定镉对中华稻蝗体内解毒酶活性变化，分别取处理组中华稻蝗20头（雌雄各半），立即置于液氮中，对照组试虫在同样条件下速冻后再转移至-80℃冰箱内冻存。

选择经适应性饲养3天后的中华稻蝗成虫，以铜（CuCl2）对成虫的半致死浓度

17.61 mM做为最高浓度，再设置3个较低浓度：8.79，11.73, 14.67 mM；以蒸馏水为对照。实验设置4个生物学重复，每个重复注射40头虫体。注射后饲养条件和管理方法如4.2.2，饲养48小时后解剖并分离各个组织进行后续实验。

ZnSO4的浓度设置为：15.65，19.13, 22.61和26.09 mM（LC50）。注射方法和对照设置同4.2.2.

### 4.2.3 中华稻蝗不同组织的收集

按照上述方法注射不同浓度金属48 h后，每个浓度组选取6-8头活虫，雌雄各半，先对试虫虫体进行冲洗，喷洒75%酒精进行消毒。将试虫置于事前准备好的冰

37

上进行解剖，使用小剪刀剪开试虫虫体，分别收集脑、视叶、肌肉、前肠、胃盲囊、中肠、马氏管、后肠、脂肪体、精巢和卵巢，特别是体积较小的脑、视叶、马氏管和脂肪体，解剖动作需准确快速。将解剖得到的单个组织迅速置于事前穿孔的EP管内，浸泡于液氮中，整个解剖过程尽量避免组织在室温下长时间暴露，确保组织新鲜且保证RNA不降解。借助体视镜准确进行组织解剖，避免粘连其他异物，提前用酒精对解剖工具消毒，解剖到的组织样品速冻于液氮中，解剖完毕后全部转移至-80℃保存备用。RNA提取及反转录，cDNA的准备和定量如第二章。RT-qPCR试剂和方法同第三章。

解剖过程中分别收集经三种金属最高浓度（LC50）处理后试虫的脂肪体和马氏管，将其置于昆虫生理盐水中（PBS: pH 7.4, 0.138 M NaCl, 0.0027 M KCl, 0.0073 M Na2HPO4, 0.00147 M KH2PO4），待测。

### 4.2.4 中华稻蝗体内不同解毒酶酶活测定

将本文第三章2.2中镉急性染毒不同时间冻存的中华稻蝗成虫样品20头（雌雄各半），称量计重后立即用匀浆器按虫体重量和缓冲液体积比（w/v）1比9加入缓冲液，在冰浴中快速匀浆后将组织液经4℃、15, 000 r/min离心20 min，轻轻吸取上清酶液于新的管内，置于-80℃冰箱速冻备用。

磷酸酯酶（酸性磷酸酯酶：Acid phosphatase，ACP；碱性磷酸酯酶：Alkaline

phosphatase，AKP）：根据磷酸酯酶一定条件下分解磷酸苯二钠后产生的游离酚在碱性溶液中与4-氨基安替吡啉发生反应，生成的物质被铁氰化钾氧化产生红色醌衍生物，根据醌衍生物的红色深浅来标定磷酸酯酶活性的强弱。

羧酸酯酶（Carboxylesterase, CarE）：参照朱坤炎等的测定方法[123]，以**-NA为底物，取酶液15μL，加入0.3 mM的底物135μL，向缓冲液中加入标定的毒扁豆碱（10-5

mol/L），混合液置于37℃恒温孵育30 min后取出，加入固蓝B-SDS溶液50μL以终止反应后15 min，用酶标仪在600 nm处混合液测定OD值。

谷胱甘肽S-转移酶（Glutathione S-transferases, GST）：以CDNB为底物，采用改良法进行测定。1）取酶液10L加入到谷胱甘肽（200 mM）与CDNB（10.35 mM）混合液（以体积比188: 2）190L中轻轻混匀；2）取酶液20L与谷胱甘肽和DCNB的混合液（GSH: DCNB=178比2）180L中轻轻混匀。在酶标仪340 nm处测量并记录OD值，每隔10 s计数一次，连续计数1 min。

### 4.2.5 三种金属急性处理后中华稻蝗脂肪体和马氏管的观察

经3种金属LC50浓度处理中华稻蝗成虫48 h后，在体视镜下解剖试虫并分别取

38

出脂肪体和马氏管，将其置于滴有昆虫生理盐水的载玻片上，每个载玻片上放置适量脂肪体，使其平铺于生理盐水表面，体视镜下用镊子夹取分离气管等杂物后，加盖片置于显微镜下观察。观察时先在低倍镜下对组织定位，然后切换至较高倍物镜下观察脂肪滴的形态和颜色并采集数码图像。本实验中分别观察来自对照组和急性处理组的样品各10个，采用Osman等[124]的方法测量并统计设定的单位视野面积（100

μm2）内脂肪滴的数量，通过相关软件测定该视野内脂肪滴的直径；同样的方法取对照组和急性处理组的中华稻蝗各10头虫体的马氏管分别置于单独的盛有昆虫生理盐水的载玻片上，分离气管等杂物后，加盖片置于显微镜下观测记录马氏管内容物并测量马氏管的直径。

## 4.3 实验结果

### 4.3.1 三种金属对中华稻蝗的半致死浓度

镉、铜、锌3种金属对中华稻蝗成虫急性处理48 h的结果如表4.1所示，3种金属的半致死浓度剂量依赖性方程为y = 5.06x-2.71 (R2 = 0.97), y = 3.97x-4.95 (R2 = 0.98), and y = 5.51x - 7.80 (R2 = 0.98)，本测定采用以3种金属浓度的[常用对数](http://baike.baidu.com/view/594789.htm)做为横坐标，死亡率的[概率](http://baike.baidu.com/view/45320.htm)值为纵坐标，通过[回归方程](http://baike.baidu.com/view/693090.htm)，采用寇氏法（Karber氏法）分别求得3种金属48h的半致死浓度（LC50）和95%的置信限。通过Χ**2**值可知3个方程的有效性，由此可见3种金属的毒性不同。

表 4.1 三种金属对中华稻蝗的急性毒理学生物测定

Table 4.1 Acute toxicity bioassay forO. chinensis adult exposed to Cd, Cu and Zn

| Metal | n | Slope (±SE) | Χ2(df) | P | LC50 ( 95% CI) (mM) |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| CdCl2 | 248 | 5.06±0.36 | 10.66 (13) | 0.639 | 3.48 (3.26-3.63) |
| CuCl2 | 243 | 3.97±0.30 | 15.92 (13) | 0.253 | 17.61 (16.47-18.85) |
| ZnSO4 | 256 | 5.51±0.40 | 11.82 (13) | 0.542 | 26.09 (24.78-27.34) |

SD= standard error; 95% CI= 95% conﬁdence intervals; *df*: Degrees of freedom.

39

### 4.3.2 镉对中华稻蝗解毒酶活性的影响



图 4.1 急性镉处理对中华稻蝗解毒酶活性影响

Fig. 4.1 Acute effects of Cd2+ on detoxification enzymes in *Oxya chinensis*

注：酸性磷酸酯酶：Acid phosphatase (ACP)，羧酸酯酶：Carboxylesterase (CarE)，碱性磷酸酯酶：Alkaline phosphatase (AKP)，谷胱甘肽S-转移酶：Glutathione S-transferases (GST)。

经ANOVA分析显示，4种解毒酶经不同浓度镉处理48 h后出现了不同的变化趋势，ACP活性在不同处理浓度间无显著差异，基本稳定地处于一定范围内（图4.1

A）；与对照或低浓度相比，高浓度镉（3.48 mM）作用可激活AKP活性显著升高（*p*

< 0.05），而低浓度对AKP活性影响不大（图4.1 C）；当酶作用底物为α-NA时，高浓度镉作用48 h后CarE活性显著升高，低浓度反而抑制CarE活性（图4.1 B）；与对照相比，GST活性容易被镉激活，镉处理48 h后，不同浓度镉作用均可激活GST活性大幅度显著升高（图4.1 D）。

### 4.3.3 镉对中华稻蝗金属硫蛋白的诱导表达

40



图 4.2 不同浓度镉对中华稻蝗2个金属硫蛋白在3种器官组织的诱导表达分析

Fig. 4.2 Analysis of induced transcriptions of two OcMT in three tissues of*O. chinensis* in the different concentrations of Cd

注：图4.2中数值为算术平均数加标准误，不同小写字母表示不同浓度处理间差异性显著（*P* <0.05）。精巢：testis

（TE）, 卵巢：ovary (OV), 肌肉：muscle (MU)。

中华稻蝗成虫急性镉处理后，11个不同组织中mRNA的转录水平如图4.2和4.3所示，不同浓度的镉均可诱导11个组织部位*OcMT1*基因转录上调，呈现整体上升趋势；但在不同组织中诱导*OcMT1*转录上调的金属浓度不同。在肌肉、前肠、胃盲囊、中肠、马氏管、后肠、脂肪体、精巢和卵巢中随着镉浓度升高*OcMT1*转录水平呈现剂量依赖性的转录上调趋势；而在脑和视叶中则是低浓度抑制表达高浓度诱导，在不同组织中的诱导转录上调在1-15.6倍不等。*OcMT2*在脑、视叶、肌肉、前肠、中肠、马氏管、后肠、脂肪体组织中，随镉浓度升高转录显著上调(*p* <0.05)，在最高浓度镉（3.48 mM）诱导下其转录水平最高，在精巢和卵巢中则是某一中间浓度

（1.74或2.61 mM）显著诱导高转录表达，转录上升1-12倍不等；而在胃盲囊中不同浓度镉却显著抑制了*OcMT2*的表达，其转录表达水平下降。

41



图4.3 不同浓度镉对中华稻蝗2个金属硫蛋白在8种器官组织的诱导表达分析

Fig. 4.3 Analysis of induced transcriptions of two OcMT in eight tissues of*O. chinensis*

In the different concentrations of Cd

注：脑：brain (BR), 视叶：optic lobe (OL), 马氏管：Malpighian tubule (MT), 脂肪体：fat body (FB),前肠：foregut

（FG）, 胃盲囊：gastric caeca (GC), 中肠：midgut (MG), 后肠：hindgut (HG)。

4.3.4铜对中华稻蝗金属硫蛋白的诱导表达

中华稻蝗急性铜处理48 h后，2个OcMT基因的转录表达变化如图4.5，除前肠外，其他10个组织中，随着铜浓度增大*OcMT1*转录水平升高，在最高浓度（17.61 mM）时转录水平最高，诱导上调为对照组的2-27.3倍不等；在前肠中，最低浓度（8.79 mM）的铜可诱导*OcMT1*转录显著上调，其他浓度诱导作用不显著。*OcMT2*在视叶、马氏管、脂肪体、中肠、精巢、卵巢和肌肉中的表达量随铜浓度升高而显著上调，最高浓度的铜可以诱导*OcMT2*显著高表达，其转录水平上调了2-25.6倍；在脑组织中铜可以诱导其转录升高，但不同浓度间没有差异（*p*> 0.05）；在胃盲囊中，铜抑制*OcMT2*的表达，其转录水平随着铜浓度的增高而下降。

42



图 4.4 不同浓度铜对中华稻蝗2个金属硫蛋白在3种器官组织的诱导表达分析

Fig. 4.4 Analysis of induced transcriptions of two OcMT in three tissues of *O. chinensis* in the different concentrations of Cu



图4.5不同浓度铜对中华稻蝗2个金属硫蛋白在8种器官组织的诱导表达分析Fig.4.5 Analysis of induced transcriptions of two *OcMTs* in eight tissues of *O. chinensis* in the

Different concentrations of Cu

43

4.3.5锌对中华稻蝗金属硫蛋白的诱导表达



图 4.6 不同浓度锌对中华稻蝗2个金属硫蛋白在3种器官组织的诱导表达分析

Fig. 4.6 Analysis of induced transcriptions of two OcMT in three tissues of *O. chinensis* in the different concentrations of Zn



图4.7不同浓度锌对中华稻蝗2个金属硫蛋白在8种器官组织的诱导表达分析Fig.4.7 Analysis of induced transcriptions of two OcMT in eight tissues of *O. chinensis* in the different concentrations of Zn

44

锌急性处理中华稻蝗48 h后2个MT基因的表达变化如图4.6和4.7所示，*OcMT1*在脑、视叶、肌肉、马氏管、脂肪体、前肠、胃盲囊、中肠和后肠中随锌浓度增高其转录水平上升，在最高浓度时*OcMT1*转录水平最高，与对照相比，诱导转录上升2-81.3倍不等，整体而言，即使低浓度的锌也能诱导*OcMT1*转录上升；在精巢和卵巢中，最低浓度（15.65 mM）的锌可以诱导*OcMT1*转录水平显著升高( *p* <0.05)，随着锌离子浓度增高其转录水平呈下降趋势，但与对照相比显著上升；*OcMT2*在所检测的11个组织部位中，随锌浓度增高显示表达水平不程度的上调，在最高浓度

（26.09 mM）时其转录水平也显著升高，与对照相比上调倍数为2-40.7不等。

4.3.6三种金属对中华稻蝗脂肪体形态的影响



图 4.8 三种金属处理后中华稻蝗脂肪体形态变化

Fig.4.8 Histopathological alterations in the fat bodies of *O. chinensis* after exposure to Cd, Cu and Zn注：A：对照组脂肪组织中脂肪滴形态；B：镉处理后脂肪组织中出现的红色细小颗粒物，脂肪滴直径变小；C：锌处理后脂肪滴包裹的褐色颗粒物形态，脂肪滴直径变小；D铜处理后没有发现脂肪体的显著变化。

(A) typical morphologies of fat bodies from the control group; (B and C) reduced cell size and the number observed in fat bodies in Cd and Zn treatment group. Many red or brown tiny particles distributed in fat bodies exposed to 3.48 mM of Cd or 27.09 mM of Zn; (D) virtually no effect on both the size and the number of adipocytes in fat bodies from the insects injected with 17.61 mM Cu respectively. Scale bar: 50μm.

由图4.8和表4.2可见，对照组（图4.8 A）中华稻蝗脂肪体（脂肪滴）有白色和黄色两种类型，脂肪滴分布均匀大小不一，经计数，100μm**2**视野内直径大于5μm

45

的脂肪滴数量为137.26±6.69个，脂肪滴的平均直径为9.68±3.34μm。与对照相比，镉处理后单位面积内脂肪滴数量为69.53±4.55个，显著减少了48%（*p* <0.05），脂肪滴直径显著变小，同时脂肪组织中出现了大量的红色细小颗粒（图4.8 B）；锌处理后，单位面积的脂肪滴数量减少（*p* <0.05），而脂肪滴直径没有显著变化（图4.8 C），脂肪组织中出现了由脂肪滴包裹的褐色颗粒物；铜处理后如表4.2和（图4.8 D），单位面积的脂肪滴数量和脂肪滴直径没有显著变化（*p*> 0.05）。

表 4.2 三种金属处理中华稻蝗48 h后马氏管和脂肪体的变化

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Measurements | Control | Cd | Cu | Zn |
| Mt diameter(μm) | 63.35±4.90 C | 74.47±6.89 A | 69.66±5.63 BC | 71.95±4.23 AB |
| Fb adipocyte diameter(μm) | 9.68 ±3.34 A | 6.16±2.67 B | 9.52±2.79 A | 8.47±3.04 A |
| adipocyte numbers/100 μm2 | 137.26±6.69 A | 69.53±4.55 C | 132.28±7.69 A | 113.75±7.14 B |

Table 4.2 Changes in *Oxya chinensis* Malpighian tubule and fat body after cadmium, copper or zine treatments for 48 hours\*

\*Means±SEM (n=12); Mt= Malpighian tubule, Fb= fat body; means within each measurement following the same letter are not significantly different (Tukey's test, *p*> 0.05).

表4.2所示，与对照相比，3种金属处理中华稻蝗48 h后，其马氏管的直径均有变化，其中镉作用后变化最为显著，由对照组的平均值63.35μm变为74.47μm，增大了17.6%，其次为锌处理，增大了13.6%，而铜处理对马氏管直径变化无显著影响

（*P*> 0.05）。

4.3.7三种金属对中华稻蝗马氏管的影响

对照组中华稻蝗马氏管呈白色或浅黄色，如图4.9（A），在显微镜下可以看到其管腔和管壁，平均直径为63.35μm，粗细均匀；如图4.9（B）镉处理后，马氏管直径显著变大，管壁细胞内出现了棕色细小颗粒；如图4.9（C）铜处理后，马氏管直径略微增大，管腔内出现了结晶物，该结晶物呈典型的几何立体结构，结晶体的体积大小不一，或长方体，或正方体；锌处理后，直径显著变大，管腔内出现了棕色絮状物质，如图4.9（D）。

46



## 图4.9 3种金属急性处理中华稻蝗成虫后马氏管形态变化。

Fig. 4.9 Photomicrographs of the Malpighian tubule of *O. chinensis* after exposure to Cd, Cu and Zn. 注：A为对照组马氏管的形态，B为镉处理48 h后马氏管内出现的棕色颗粒物，C为铜处理48 h后马氏管管腔内出现的结晶物，D为锌处理48 h后马氏管内出现的棕色絮状物质。

(A) the typical morphologies of Malpighian tubule from the control group; (B) the red tiny particles distributed in the Malpighian tubule lumen exposed to Cd; (C) a number of rectangular or square parallelopiped intraluminal chemical crystals accumulation were observed from insects exposed to Cu, It is the Organic Copper Salts or other metal salts; (D) Malpighian tubule after treated with Zn, filled with the dark brown flocculent material. Scale bar: 50μm.

## 4.4 讨论

酸性磷酸酶、碱性磷酸酶、羧酸酯酶（CarE）和谷胱甘肽S-转移酶是昆虫体内重要的解毒酶，进入昆虫体内毒物和昆虫自身代谢产生的次生有毒物质通常经过氧化、还原和水解等多种生化反应降解后将代谢物排出体外，这一过程需要在包括上述酶在内的多种酶的催化作用下完成[125]。昆虫体内的解毒酶在不同组织部位、不同代谢阶段以不同的底物参与对内源或异源性有毒物质的分解代谢和解毒[126]。磷酸酶是一种能够对底物去磷酸化的酶，通过水解底物生成磷酸根离子和自由羟基，是生物体内核苷酸和磷脂等含磷蛋白代谢必需的酶[127]。本研究中发现镉作用48 h对中华稻蝗体内ACP活性变化没有有显著影响，而AKP活性有显著升高，表明镉可以诱导或者激活AKP酶活性。研究显示，镉溶液染毒舞毒蛾（*Lymantria dispar*）4龄幼虫72 h后发现ACP活性下降；负子蝽（*Sphaerodema urinator*）暴露于20 mM的铅

47

和铜溶液后，AKP活性下降，ACP活性升高，这可能是二价重金属离子与体内的必需金属离子发生置换反应，使必需金属离子脱离酶的结合位点失去对解毒酶的调节作用[128]。CarE是一类能够水解代谢羧基类酯的所有酶的通称，其天然底物的化学结构差别很大，研究中通常以**-NA 或**-NB 为底物考察其酶活。本研究以**-NA 为底物时发现一定浓度的镉可以激活CarE活性。有报道显示重金属处理斜纹夜蛾

（*Prodenia litura*）五龄幼虫、十字园蛛（*Araneus diadematus*）、三角皿蛛（Linyphia

triangularis）、华北雏蝗（*Chorthippus brunneus*）后CarE活性变化多样[129]，可见，重金属引起昆虫CarE活性的变化可能与昆虫种类、金属类型、染毒浓度、作用时间和作用底物等相关。GST是催化谷胱甘肽结合反应的关键酶，能够催化还原性谷胱甘肽（GSH）的硫醇基与亲电化合物相结合，通过增加后者的可溶性将其从细胞内清除，同时也可以清除由重金属作用机体后产生的氧自由基，保护机体免遭氧化压力的胁迫[130]。本文研究结果显示，镉作用中华稻蝗后GST活性上升，推测可能是GST参与清除由镉作用机体后产生的自由基反应，保护昆虫免受由重金属引起的氧化压力和毒性胁迫[131]。例如用镉处理红裸须摇蚊（*Propsilocerus akamusi*）后GST活性升高，可见镉可诱导红裸须摇蚊引起氧化应激和解毒酶活性[132]，另外GST可能通过其蛋白N端的GSH结合区绑定重金属离子，而不是与C端的疏水性底物结合[133]，本课题组前期的研究证实铬急性染毒同样可以引起中华稻蝗上述酶活性的升高[134]。

前期的研究表明，中华稻蝗OcMT基因在中华稻蝗不同发育阶段和不同组织具有广泛的表达，可见OcMT的分布不具有组织特异性，但在不同的组织和器官中

mRNA转录水平不同[81]。本文第三章中研究表明OcMT在中华稻蝗体内和体外对金属解毒具有重要作用，本章中重点研究2个OcMT基因在11个组织部位经不同金属急性暴露时的转录应答反应，结果显示*OcMT1*和*OcMT2*在绝大多数组织中呈现上调表达，证明了2个OcMT基因在虫体免受金属损害方面发挥重要的保护作用，其中*OcMT1*显示出比*OcMT2*更高的转录表达水平，意味着*OcMT1*可能起着更加突出的作用。关于金属对MT基因转录表达的影响在多种昆虫中均有报道，Mireji等（2010）研究冈比亚按蚊幼虫（*Anopheles gambiae*）暴露于Cd、Cu和Pb中，其体内MT表达水平显著提高[135]；家蝇(*Musca domestica*) 3龄取食含有CdCl2的食物24 h后*MdMT1*和*MdMT2*显著上调表达，MT基因在转录水平的上调，表明生物体通过转录更多的

MT来应对金属的胁迫，由此提高对金属耐受能力和增强对金属的解毒能力[119]。在对无脊椎动物的研究中，发现MT的转录主要集中于消化道，这是因为一般情况下金属离子随昆虫取食、消化和吸收而进入消化道，并引起消化道MT的转录表达变

48

化，如埃及伊蚊（*Aedes aegypti*）消化道MT基因mRNA的增加可显著降低金属胁迫带来的影响[136]。Badiou-Beneteau等（2013）发现在Cu、Mn、Zn、As和Cd等金属污染区的意大利蜜蜂*Apis mellifera*工蜂中肠MT水平明显高于无污染地区虫体MT的水平[137]。本研究发现金属对MT的影响不是特异性地作用于消化道，金属诱导神经系统（脑和视叶）MT较高水平的转录上调，这可能与金属暴露的条件和方式有关，因为金属溶液通过体腔注射进入体内以后，浸泡于血淋巴中的组织成为金属作用的第一靶标，比消化道内腔更先接触到金属，这意味着神经系统对金属具有更高的应答能力。其他昆虫主要通过消化道取食含金属食物后金属经消化道吸收后MT基因的转录变化研究，在多种生理作用下，金属离子通过消化道进入血淋巴的量大大降低，神经系统接触到金属或以和生物大分子结合，从而降低了神经系统的敏感性。类似的研究在哺乳动物中已有报道，用有害药物处理*Mt-1*和*Mt-2*无效突变的小鼠

（MT-I/II null mice）后中枢神经系统(central nervous system, CNS)梗死面积比野生型小鼠大3倍，同时MT无效突变小鼠的学习和选择能力显著降低[138]。

本研究中发现，镉和铜急性处理后*OcMT2*在胃盲囊中的转录表达下调，即出现了表达抑制，这可能是组织特异性的转录元件与*OcMT2*启动子区的特殊序列作用从而调节转录的结果，而不是金属在组织间的不均匀分布所致。黒腹果蝇*MtnA*和*MtnB*被金属Cu和Cd特异性诱导与基因启动子区的序列有关[139]，秀丽隐杆线虫MT基因启动子区转录因子的多态性决定肠道特异性表达模式[140]，可见MT的表达特征可能与生物体组织中存在的金属或组织特异性的转录因子有关。3种金属急性处理中华稻蝗后，不同金属特有的物理、化学特性使其通过不同的机制诱导OcMT基因不同程度的上调表达。OcMT基因的这些转录变化参与铜和锌的稳态平衡，保护机体免受镉的毒性和氧化损伤，同时调节金属相关的解毒代谢[141, 142]。锌是生物体的必需元素，是细胞维持正常生理功能和运转所需酶的重要组成，也是细胞内信号转导的元件[143]，所以锌诱导OcMT转录提高的能力高于镉和铜。中华稻蝗急性染毒后*OcMT1*对3种金属的敏感性和容易被诱导的特点，表明中华稻蝗*OcMT1*可以作为检测环境中金属污染的指示物或潜在标志物。早期的一些研究已经提出由于昆虫具有一定的迁飞和活动能力，其MT基因表达水平作为环境中重金属污染的标志是有科学依据的[135, 144]，我们的研究进一步证实中华稻蝗*OcMT1*对金属的敏感性和易诱导表达性，可作为农田特别是稻田金属污染的检测指标，具有良好的稳定性和可操作性。

昆虫脂肪体类似于脊椎动物的肝脏，是昆虫体内蓄积和释放能量的主要结缔组织，也是糖原、甘油三酯以及蛋白质的储存和代谢中心[145, 146]。通过解剖可见中华稻

49

蝗体内脂肪体主要附着在体表皮膈膜内侧，集中分布于精巢、卵巢以及胃盲囊等组织周围，呈黄色或透明颗粒状。经急性染毒后，脂肪细胞的直径大小和单位面积内的数量发生显著变化，并出现由脂肪滴包裹的红色或褐色的颗粒物，可见脂肪体可将血淋巴中有害的镉或锌转化成颗粒物，或者将血腔中经过其他途径转化后的金属固定并包裹在脂肪滴内，以避免和减少有害金属离子的扩散，降低血腔中有害金属离子的浓度，从而减轻对机体的毒害作用。这可能是金属离子在昆虫体内解毒代谢的一种策略。Ana Maria Costa-Leonardo研究白蚁（*Heterotermes tenuis*）兵蚁脂肪体功能时，在其脂肪体内发现了含有金属的尿酸盐细胞[147]；研究显示镉暴露2周后小鼠白色脂肪体的数量和重量显著减少，分析可能是镉抑制了脂肪体的形成并破坏脂肪体的滋养过程[148, 149]；此外重金属还可诱导和激活脂肪体细胞启动程序性细胞死亡导致脂肪体破裂[150]。

昆虫马氏管类似于脊椎动物的肾脏，具有重要的排泄和渗透调节功能[151]。中华稻蝗马氏管着生于中肠和后肠交界处，其一端为盲端另一端开口于后肠，数量为数十条甚至超过100条，这些细长的马氏管悬浮于血腔中，便于从血淋巴中吸收代谢产物和有害物质以形成原尿，通过管腔运输到后肠排出体外。在此过程中马氏管发挥生理排泄、内环境稳态和基于氯化钠等渗溶液的离子调节等生理功能[152]。马氏管

OcMT基因被金属离子诱导，引起其转录水平的表达上调[153]。通过光学显微镜观察马氏管石蜡切片，马氏管为中空管状，腔内壁具微绒毛如图5.3。马氏管不仅可以从血淋巴中吸收代谢产物，也可以根据生理需要从中肠内的消化的食糜中选择性地吸收某些物质并释放到血淋巴中，为血淋巴提供必要的水份、营养物质和能量物质等，同时调节血腔内各种盐和有机物维持渗透压稳态[154]。本研究中3种不同金属处理稻蝗后，马氏管内出现不同的物质，推测血淋巴中过量的金属离子可能被马氏管吸收并发生复杂的生化反应，最终形成生理条件下不溶性的盐，将金属固定并运输到后肠再排出体外，从而减轻有害金属对机体的毒性。Joe Miller等在研究人类肾结石时发现果蝇马氏管的遗传组成和解剖结构与人类肾单元十分相似，于是以果蝇马氏管为模型，用含有草酸钠的食物饲养果蝇，同时结合基因表达、遗传检测和环境诱导等具体条件的控制，在果蝇马氏管内成功观察到草酸钙结石的形成[155]，为人类了解和医治肾结石疾病建立了很好的研究模型。本课题组正在对金属处理后马氏管内不同物质的形成过程、化学组成和性质等进行进一步的深入研究，相信这一结果可能为了解昆虫对体内有害金属和过量金属的代谢解毒提供一定的理论依据。

50

# 第五章 镉染毒对中华稻蝗组织形态的影响

当微量的有害金属进入生物体内，生物体在器官、组织、细胞和基因等多个层次上通过多种方式将其固定或排出体外，从而避免对机体造成损害。研究表明，即使是生物体的必需微量金属，在体内的分布也存在一个阈值，过量和不足都会在一定范围内导致生理学功能的异常。目前最常见的金属污染物主要有镉、铜、锌等，当生物体接触或摄入一定量的金属时，可对机体细胞或组织造成损伤，导致其结构发生变化，影响其正常的生理功能。

本文上一章研究了3种金属进入中华稻蝗体内48 h后对金属硫蛋白基因表达的影响，在剖取中华稻蝗各组织器官时发现某些形态结构出现了异常变化，为了深入了解金属对中华稻蝗机体的毒性效应，本章围绕镉染毒对中华稻蝗组织形态的影响开展了深入研究。本实验室前期采用慢性镉染毒处理中华稻蝗后，发现镉在虫体头、足、翅、前肠、中肠、胃盲囊、精巢、卵巢和表皮等多个组织器官内均有蓄积，其中中肠的镉浓度高达6.7984 mg·kg-1干重。本章着重研究3种金属通过消化道进入中华稻蝗体内后，对血细胞、消化道、马氏管和脂肪体等组织器官形态结构的影响，为深入探讨中华稻蝗体内镉的累积和排泄解毒机制提供理论依据。

## 5.1 实验材料

### 5.1.1 小麦染毒

本实验选择中华稻蝗5龄若虫，经饲喂镉溶液培育的小麦幼苗进行急性染毒。小麦种子选用ft西省农科院作物研究所选育的晋太0708，麦种先用自来水淘洗2次，再经0.1%高锰酸钾溶液浸泡消毒10 min，用单蒸水冲洗3-4次，再用蒸馏水浸泡5-6

h后，用干净的多层棉布湿水后覆盖麦种催芽24 h。用塑料盘（25cm×18cm×8cm）

内平铺3-5层粗纤维吸水纸，用事先配置好的氯化镉（CdCl2·2.5H2O）溶液将吸水纸

全部浸透后，将经过24 h催芽的麦种平铺于盘内吸水纸上保持黑暗环境待其发芽，发芽后的小麦置于装有灯管并可控制光照时间的培养室内生长。根据实验室前期的实验基础本研究设置80 mg·L-1的镉浓度[156]，设置3个重复，同时以浇灌自来水培养的小麦为对照。每天定量向浅盘中浇氯化镉溶液以保持吸水纸的湿度满足小麦生长。培养7 d后的小麦幼苗用于饲喂中华稻蝗5龄若虫。

### 5.1.2 实验昆虫

将野外采集的中华稻蝗蝗卵置于气候培养箱内孵化，培养箱设置温度为白天

30±2°C，晚间24±2°C，光周期为14: 10 (L: D)，相对湿度为70-75%。孵化出若虫后

51

放入70 cm×40 cm×40 cm的纱笼内，用蒸馏水浇灌培养的新鲜麦苗饲喂。待若虫蜕变成5龄若虫后，将若虫分别放于12个纱笼中（40 cm×30 cm×30 cm），每笼放

80头虫体，采用镉染毒的小麦苗饲喂，饲喂过程中需定期更换新鲜麦苗并清理食物和排泄残渣，饲养直至成虫。

### 5.1.3 试剂和仪器

2.5%的戊二醛（0.5 M，1 M，由蒸馏水配置标准磷酸缓冲液（PBS），pH7.2），

4%的甲醛（由蒸馏水配置标准磷酸缓冲液，pH7.2），苏木精染液，1%伊红酒精溶液，

1%盐酸乙醇液，梯度等级酒精（30%、50%、70%、80%、90%、95%、100%），二甲苯，甘油蛋白粘片剂，中性树胶、甲苯胺蓝染液，丙酮，醋酸铀染色液，柠檬酸铅染色液，Wright's染液，Giemsa染液。DY89-Ⅱ型电动玻璃匀浆机（宁波新芝），Spectra MAX 190型酶标仪（美国Molecular Device）。莱卡全自动石蜡切片机及附属制样设备，莱卡超薄切片机

## 5.2 实验方法

### 5.2.1 光镜观察中华稻蝗血细胞

分别取上述对照组和镉染毒组中华稻蝗各10头（雌雄各半），用蒸馏水冲洗其体表，先用小剪刀剪去中华稻蝗一条后足，有浅绿色或浅黄色血淋巴流出，用移液枪吸取约20μL血淋巴，置于清洗干净的载玻片近磨砂端，用另一块载玻片以桌面呈45度夹角接触血淋巴远磨砂端，缓缓向前推动载玻片，血淋巴由载玻片推成薄膜均匀分布于下面的载玻片上，室温干燥3 min后Wright's和Giemsa染液双重染色 3

min，用蒸馏水漂洗残留染液，室温下干燥48 h后用中性树胶封片，置于35˚C恒温箱内干燥一周，使用显微镜（Olympus BX51）观察血细胞形态并拍照。

血液学分析：为了考察镉染毒对中华稻蝗血淋巴中血细胞的影响，分别选取对照组和最高镉浓度处理组中华稻蝗进行血细胞相关数值测定。血细胞总数（Total hemocyte count THC）使用血淋巴稀释液（1μL血淋巴注入到5μL 0.1M的PBS中混匀，pH值为7.2），以血细胞计数器观察计数，采用每微升血淋巴中的细胞数量表示。分类血细胞计数（Differential hemocyte count DHC），经Wright's和Giemsa染液双重染色后，使用Olympus显微镜观察并计数，记录载玻片上200个血细胞中各类型细胞的平均数，血细胞的形态通过Olympus BX51显微镜观察并通过自动图像采集仪获取形态图片。

52

### 5.2.2 中华稻蝗不同组织的收集

分别取对照组和镉染毒组中华稻蝗各8头（雌雄各半），用蒸馏水冲洗其体表，将其置于冰上的培养皿中借助体视解剖镜，准确解剖获取中华稻蝗前肠、胃盲囊、中肠、马氏管、后肠、精巢和卵巢，一份迅速置于4%的甲醛中，12 h后更换一次固定液，用于制作石蜡切片等材料；另一份迅速置于2.5%戊二醛中，轻轻摇动溶液使其充分固定，用于制作透射电镜样品，同时取中华稻蝗腹部脂肪体置于事先配置好的昆虫生理盐水中备用。

### 5.2.3 石蜡切片的制备和光镜观察

解剖得到的中华稻蝗成虫组织经固定液充分固定后，进行后续的脱水、浸蜡和石蜡包埋等程序，整个操作过程在通风橱内进行，具体操作方法和步骤如下：

1）将组织样品分装于10 mL体积的玻璃瓶内，加入4%的甲醛固定液淹没组织，常温下固定12 h更换固定液，再置于4℃固定24 h；

2）依次梯度脱水：将样品转移至透明带盖专用脱水缸内，依次通过30%、50%、

70%、80%和95%乙醇溶液中分别浸泡30 min后、100%乙醇溶液中分别浸泡2次，注意：更换高一级的酒精时，用吸管吸出脱水缸内的酒精，然后加入浓度更高一级的酒精，尽量不移动材料以免在夹取过程中受到损坏，更换酒精时避免组织样品暴露于空气中；

3）透明样品：通过100%无水乙醇：二甲苯（2:1）浸泡15 min、100%无水乙醇：二甲苯（1:1）浸泡20 min、二甲苯溶液浸泡两次各30 min，可见组织样品呈不同程度的透明状态；

4）组织透蜡：二甲苯：石蜡（3:1）浸泡10 min、二甲苯：石蜡（2:1）浸泡10 min、

二甲苯：石蜡（1:1）浸泡10 min、纯石蜡溶液中各浸泡30 min，整个过程在恒温箱

中进行，箱内温度设置为55-58℃，恒温箱置于通风橱内，并保持单向通风；

5）石蜡包埋：将含有塑料包埋框的金属模型盒置于38-40℃的热台表面，透蜡的组织连同熔化的石蜡倒入包埋框中，用镊子将组织姿态摆放端正到位；

6）冷却：将含有包埋好的模型盒轻轻转移至盛有冷水塑料浅盘中，石蜡迅速冷却，凝固后用镊子轻轻从模型侧面翘起即可；

7）修片：将冷却后的包埋块取出，保留组织在中心位置，用小刀切削周边石蜡使包埋块呈梯形方块；

8）切片：修成梯形的包埋块固定再莱卡连续轮转式切片机上，慢慢调整转轮连续切片直至看到切面上呈现出组织轮廓，必要时根据组织位置，适当调整包埋块与

53

刀口的切面，调试合适后进行连续切片，厚度一般控制在5-7µm；

9）展片：观察连续切片所切到的组织部位，选择无空洞且连续的条带。一般情况下，靠刀面的一面较光滑，朝下，较皱的一面朝上，用毛笔轻轻挑起后顺势置于

42℃恒温水浴中，蜡条薄膜受热后舒展于热水表面；

10）固定：将事先用75%无水乙醇清洗干净、涂抹好粘片剂并做好对应编号的载玻片深入水浴中展片平整的切片下面，将石蜡薄膜赶于水浴锅边缘，载玻片与水面向上倾斜70度时迅速向上提起载玻片，切片薄膜即可粘附在载玻片上；

11）将展布好组织样品的载玻片置于40-42℃热台支架上烘烤干燥。

切片结束后再进行后续脱蜡和染色处理，该过程在通风橱内进行，具体操作如下：

1）脱蜡复水：干燥后的石蜡切片一次经二甲苯Ⅰ、Ⅱ脱蜡各5-8 min，然后依

次通过梯度酒精（100%、95%、90%、80%、70%、50%）溶液，每级5 min，最后

放入蒸馏水使其复水3-5 min不等；

2）组织染色：复水后的切片浸入事先配置并熟化30 d以上的苏木精中染色8-12 min；

3）水洗：将染色后的切片用自来水冲洗至洗水清澈，注意观察该冲洗过程中切片颜色逐渐变蓝，不能开大水龙头以防切片脱落，可用显微镜检查组织变蓝即可；

4）组织分色：将切片放入1%盐酸乙醇溶液（盐酸1份+70%乙醇99份）中约

5-15 s，可观察到切片变浅红色，镜检可见细胞质着色褪去，细胞核着色更加鲜色；

5）漂洗：将切片再通过流动自来水润洗使其恢复蓝色，低倍镜检可见组织中结构清楚且细胞核呈蓝色，同时细胞质及其他结缔组织、纤维等为无色为宜。然后放入蒸馏水中漂洗5-8 min。

6）脱水Ⅰ：切片依次通过50%、60%、70%、80%的乙醇，各3-4min。

7）复染：切片经0.5%的伊红乙醇溶液（熟化）染色3 min，细胞核与细胞质颜色获得鲜明的对比；

8）脱水Ⅱ：切片经95%乙醇漂洗2-3 min，然后再用无水乙醇漂洗2-3 min；

9）透明：将切片放入二甲苯：乙醇（1:1）混合液中5min，然后分别经二甲苯浸泡两次，每次各3 min；

10）封片：经染色、脱水、透明的切片从二甲苯中取出并置于干净平整的桌面上，载玻片中央组织旁滴一滴中性树胶，然后将盖玻片倾斜接触树胶后慢慢放开，使树胶在盖玻片压力下缓缓浸润组织并铺展开来；

54

11）镜检：低倍镜观察组织切片可见，细胞核被苏木素染成后在树胶浸润过程颜色由紫红色变为紫色，细胞质被伊红染色后呈粉红色。

制作好的组织石蜡切片根据需要在OLYMPUS BX51显微镜的相同倍数的物镜下进行定位观察，采集图像并通过软件测量相关细胞或细胞器的相关参数。

### 5.2.4 半薄切片的制备和电镜观察

在体视显微镜下解剖获取中华稻蝗前肠、胃盲囊、中肠、马氏管组织，将组织在体视镜下切割为3-4 mm的小段样品，浸入由0.5 M的PBS配置的2.5%戊二醛中4˚C下固定48h，用于透射电镜样品制备。透射电镜样品制备如下：

1）将各组样品转移至2 mL的EP管内，用0.5 M且pH=7.2的PBS洗涤经戊二醛固定过的样品一次，再转入1 M且pH=7.2的PBS中每隔5 min、10 min、15 min、30 min、30min更换一次PBS；

2）将样品分别用30%、50%、75%、85%、90%、100%、100%乙醇溶液洗涤15 min，然后加入50%乙醇：50%专用树脂（1:1），置于4˚C过夜；

3）样品经4˚C过夜浸润12-16 h后更换30%乙醇：70%树脂浸润1 h，100%纯树脂3-6 h，再次更换100%纯树脂浸泡3 h；

4）包埋：用镊子夹取样品置于空胶囊内，并摆好样品的方位姿态，便于切到目标切面，用吸管将纯树脂从胶囊侧壁慢慢注入后盖好，将样品置于60˚C恒温箱内凝固48 h；

5）修块：凝固后的树脂包埋块剥去胶囊外壳，用小刀切削样品所在的一端呈锥形尖端；

6）半薄切片定位：将树胶包埋好的样品固定在切片机支架上，安装好玻璃刀，在操作控制面板上设置好程序，包括切片速度、推进距离（切片厚度）等参数，半薄切片厚度为80-100 nm；

7）贴片：用毛刷挑取经切片机稳定运行后切下的样品置于滴有蒸馏水的载玻片上，并放置于热台上，切片在水滴表面铺展开来，水滴加热蒸发后样品切片贴于载玻片上；

8）切片定位：在切片样品上滴一滴事前配置好的甲苯胺蓝染色1-2 min，用自来水慢速冲洗后，用体视镜观察样品是否切到预期的区段和部位，组织和细胞结构是否完整。

选择贴片完整，清晰，定位目标符合要求的样品，在37˚C恒温箱内烘干，然后用中性树胶封片，显微镜下观察。

55

## 5.3 实验结果



图 5.1 慢性镉染毒后中华稻蝗血细胞染色后的形态

Fig. 5.1 Light microscopy of different types of *Oxya chinensis* hemocytes exposed to chronic Cd注：中华稻蝗血细胞经Wright's和Giemsa双重染色，A、B、C、G、H、I和L为对照组，D、E、F、J和K为镉染毒组；A和D为原血细胞, B和E为浆血细胞, C和F为类绛色血细胞, G、H、J和K为粒血细胞；I和L为正处于有丝分裂末期和后期的粒血细胞。

A, B, C, G, H and I were control, D, E, F, J, K and L were exposed to chronic Cd. (A and D) Prohemocyte, (B and E) plasmatocytes, (C and F) oenocytoid, (G, H, J and K) granulocyte, (J and K) cytoplasm disruption and presence of granules, (I and L) granulocyte on anaphase or telophase presenting features suggestive of mitoticﬁgures. Scale bar: 15μm.

### 5.3.1 染毒期间试虫行为观察

用原子吸收法测得经上述方法培养的小麦麦苗中镉含量为89.55 mg·kg-1，取食染毒小麦10天后中华稻蝗整虫镉含量为128.42 mg·kg-1干重[157]。观察发现中华稻蝗

56

染毒期间，试虫出现厌食，跳跃活动减少，持续用染毒小麦喂食4天后，生长停滞且体重不再增长。本课题组前期测量了镉处理后中华稻蝗成虫体重和体长的变化，发现雌虫和雄虫的体重与对照组相比明显降低了20.6%-28.8%（*P* <0.05），中华稻蝗体长显著变短2.2%-5.8%(*P* <0.05)[77]。

### 5.3.2 镉慢性染毒后中华稻蝗血细胞分析

通过对中华稻蝗血涂片观察并分类，发现中华稻蝗共有4种典型的血细胞，分别为原血细胞、浆血细胞、类绛色血细胞和粒血细胞。

原血细胞也称之为原始血细胞（Prohemocytes），是最小的一类血细胞，如图5.1

（A）所示。细胞呈圆形，其直径为2.85 x 4.03μm，经Wright's和Giemsa双重染色后细胞核呈深蓝色，核质比大，细胞膜紧贴着细胞核，显微镜下几乎看不到细胞质；慢性镉染毒后细胞直径变小5.1（D），细胞核呈深蓝色。

浆血细胞（Plasmatocytes）是中华稻蝗血淋巴中常见的血细胞类型，见图5.1（B），通常情况下是数量最多的血细胞。浆血细胞呈梭形或纺锤形，其长度直径为28.36±1.85μm，大小范围为24.44-35.72μm，其宽度直径为11.2±2.31μm，大小范围

为8.3-13.82μm，细胞膜向外延伸形成的两头具尖端状伪足是其典型的特点，有的浆

血细胞有3个以上伪足，双重染色后可以看到细胞核为深紫色椭圆形，细胞核呈现凸起颗粒，细胞质呈均匀分布。通过大量的观察发现，有些血细胞大小和形态介于原血细胞和浆血细胞之间，具有两种血细胞的形态特点；镉染毒后，浆血细胞的细胞核稍微浓缩变小，细胞质颜色变深变浓厚，伪足变钝失去尖端5.1（E），其长度直径缩短为24.2±2.17μm，直径大小变化范围为21.2-27.37μm。

类绛色血细胞（Oenocytoid）是一类体型较大的血细胞，见5.1（C）。染色后细胞核为较为均匀紫色，细胞膜包被着深灰色的细胞质，细胞质中常含有不易着色的白色空泡。细胞呈椭圆形或卵圆形，其直径平均长度为25.8±2.07μm（19.83-28.6μm），其宽度平均直径大小为13.3±2.21μm（10.3-18.77μm）。镉染毒后，可以观察到类绛色血细胞，见5.1（F），看不到细胞膜界限或已解散破裂，细胞质松散或其中出现小型蓝色颗粒物质和白色囊泡，细胞核浓缩变小，颜色变浅，核物质均质化，细胞轮廓变大。

粒血细胞（Granulocyte）是一类细胞质中含有颗粒物质的血细胞，见5.1（G 和

H），这类血细胞经Wright's和Giemsa双重染色后细胞核呈紫色或紫红色，由于其细胞质中含有红色致密颗粒物而容易辨认，这些大小不等的红色颗粒物由细胞膜包裹着，均匀分布于细胞质中，细胞膜边缘界限清晰。粒血细胞形状和大小多变，细胞

57

呈梭形，其长度直径平均大小为27.45±1.63μm（24.18-32.47μm），其宽度平均直径大小为13.67±2.04μm（11.5-20.02μm）。镉染毒后，粒血细胞细胞核浓缩变小且着色变浅呈红色，细胞呈肿胀松散状椭圆形，见5.5（K），红色细小颗粒物充满细胞质，细胞大小变为15.65×28.4μm，也有部分粒血细胞膜破裂，细胞质因失去细胞膜的包被使红色细小颗粒物和其他细胞器飘逸分散开来，出现脱颗粒现象，如图5.1（J）。

此外，在对照组和镉染毒组血涂片上还见到一些正处于分裂期的血细胞，可以观察到细胞核中的染色体被染成蓝色或深紫色，并在纺锤丝的牵引下正向两极移动，浅蓝色细胞质中出现白色空囊泡，如图5.1（I和L），正处于细胞分裂的末期和后期。

表 5.1 中华稻蝗血细胞分析

Table 5.1 Variation and analysis of hemocyte types percentage in Oxya chinensis

| 血细胞类型  Hemocytes types | 对 照 Control | 血细胞数 Number of hemocytes  镉处理 Cd treated |
| --- | --- | --- |
| THC (cells /μL) | 1261.4 ± 71.6 | 1194.5 ± 39.2 |
| DHC (100%) | 100 | 100 |
| Prohemocyte | 5.2±2.1 | 9.3±3.6 |
| Plasmatocyte | 54.4±12.4 | 40.5±9.3\* |
| Oenocytoid | 4.1±1.0 | 5.5±1.2 |
| Granulocyte | 36.3±9.2 | 44.7±7.6\* |

注：对照组和镉慢性染毒组血细胞数量变化，血细胞总数（THC: total hemocyte count）差异血细胞数（DHC: differential hemocyte count）, 原血细胞（Pro）,浆血细胞（Pla）, 类绛色血细胞（Oen），粒血细胞（Gra）。“\*”两组之间具有显著性差异，ANOVA (*p* <0.05)，血细胞数量用平均数±标准差（mean±sd）表示，对照和处理组来自5个不同个体的样品。

Analysis of hemocyte types percentage in *Oxya chinensis* adult. (THC) total hemocyte count, (DHC) differential hemocyte count, (Pro) Prohemocyte, (Pla) Plasmatocyte, (Oen) Oenocytoid and (Gra) Granulocyte," \*" indicates signiﬁcant differences between groups (ANOVA, *p* <0.05). Values are shown as mean + S. D. (n = 5).

对中华稻蝗血淋巴中血细胞的数量变化统计和分析结果如表5.1所示，镉染毒后每微升血淋巴中血细胞总数（THC）由1261.4±71.6个减少到1194.5±39.2个，无显著性差异，差异血细胞数（DHC: differential hemocyte count）百分比统计分析显示，镉染毒后原血细胞数量有所增加，浆血细胞由53.4±12.4减少到40.5±9.3，显著下降12.9个百分点(*p* <0.05)，粒血细胞显著增加了8.4个百分点（*p* <0.05），类绛色血细胞数量增加了1.4%，与对照相比变化不显著（*p*> 0.05）。

58

### 5.3.3 中华稻蝗消化道的总体特征



图 5.2 中华稻蝗1龄若虫纵切剖面消化道示意图

Fig. 5.2 Histological observation of the longitudinal section of the alimentary canal of the 1st instar nymphs of *Oxya chinensis*

注：前肠(FG)，中肠(MG)，后肠(HG)，胃盲囊(GC)，马氏管(MT)，Scale bar: 1 mm.

由图5.2和图5.3可见，中华稻蝗消化道主要由前肠、中肠和后肠等部分组成，是中华稻蝗取食后食物由前向后移动的管腔，中肠是中华稻蝗消化吸收的主要区段。



图 5.3 中华稻蝗（雌性）成虫消化道扫描图

Fig. 5.3 Histological observation of the alimentary canal of *Oxya chinensis* the adult

注：前肠foregut (FG)，中肠midgut (MG)，后肠hindgut (HG)，胃盲囊gastric caeca (GC)。

中肠肠壁由单层柱状上皮细胞形成，由于食物的摄取与消化过程，中肠纵向与横向的伸缩性较大。本研究观察到中华稻蝗1龄若虫取食后中肠膨大，首次发现中

肠的肠壁厚度在中肠的中后区段变薄（如图5.2中黑色三角标志）；后肠是食物消化

59

吸收后食物残渣的排泄通道，同时也可以对部分水分等物质进行再吸收。在前肠和中肠交界处着生有由六个单瓣组成的胃盲囊，可以向内腔分泌消化酶释放到中肠；马氏管着生在中肠和后肠的交界处且开口向后肠，游离的一端为盲端。中华稻蝗有数十条甚至超过一百条细长的马氏管，在中华稻蝗体腔血淋巴中游离蠕动，可从血淋巴中吸收代谢废物进入管内形成原尿并运输到后肠，再排出体外。

### 5.3.4 镉慢性染毒对中华稻蝗胃盲囊和中肠微绒毛的影响



图 5.4 慢性镉染毒后中华稻蝗胃盲囊、中肠和马氏管形态观察

Fig. 5.4 Histological observation of the cross section of gastric caeca, midgut and Malpighian tubule of *Oxya chinensis*

注：A、B和C为对照组，对照组上皮细胞（柱状细胞）的微绒毛发达且排列整齐；D、E和F为镉染毒组，分别为中华稻蝗胃盲囊上皮柱状细胞、中肠上皮柱状细胞和马氏管上皮细胞的微绒毛，可见部分微绒毛变短、凌乱和脱落等现象，中肠肠壁变薄，马氏管上皮细胞中出现红色细小颗粒，微绒毛消失。红色箭头指示微绒毛（Mv），肠腔（Lu），上皮细胞（Ep）。

A, B and C were control group, Numerous well-developed microvilli were arranged in a regular array along with the apical membrane of epithelial cells of gastric caeca, midgut and Malpighian tubule, respectively. D, E and F were exposed to Cd, microvilli exhibited irregular arrangement, and got thick, part of tissues were broken; (D) the microvilliﬂowed away from the columnar cells of gastric caeca; (F) Many red granular material distributed in epithelial cells of Malpighian tubule. Red arrows: microvilli. Lu: Lumen, Ep: epithelium cell, Mv: microvilli, Scale bar: 15μm.

中华稻蝗经慢性镉染毒后，胃盲囊柱状细胞、中肠肠壁柱状上皮细胞以及马氏管管壁细胞的形态发生了显著变化，组织石蜡切片如图5.4所示，3种组织器官细胞的微绒毛处均出现显著变化（红色箭头所示）。对照组胃盲囊的上皮柱状细胞排列紧密整齐有序（A），其近腔端部微绒毛排列均匀整齐，微绒毛基部界限清晰，而镉染

60

毒组（D）胃盲囊柱状细胞排列松散，部分柱状上皮细胞细胞质稀薄出现空洞囊泡，端部微绒毛长短不一，甚至有部分微绒毛脱落；对照组中肠柱状上皮细胞围合而成的肠壁较厚，柱状细胞端部微绒毛排列整齐均匀，而镉染毒后胃盲囊柱状上皮细胞的细胞质稀薄，细胞基底层消失，柱状细胞端部微绒毛稀疏，部分断裂出现缺口。

### 5.3.5 镉慢性染毒对中华稻蝗马氏管的影响



图 5.5 慢性镉染毒后中华稻蝗马氏管横切面形态结构

Fig. 5.5 Histological observation of the semithin section of Malpighian tubule of *Oxya chinensis*注：半薄切片（甲苯胺蓝染色）A为对照组，由图中可见，马氏管微绒毛发达且排列整齐；B、C和D为镉染毒组，部分马氏管上皮细胞的细胞质溶解，细胞质中出现空泡，基底膜变薄，管腔内出现致密物质。微绒：microvilli

（Mv），肠腔: Lumen （Lu），基底膜: basement membrane（Bm），空泡: vacuoles（Va），致密颗粒: dense granule

（Dg）。

A was control group, Numerous well-developed microvilli were arranged in a regular array along with the apical membrane of epithelial Malpighian tubule. B, C and D, were exposed to Cd, microvilli exhibited irregular arrangement, and got thick, part of cytoplasm were broken ( B) basement membrane of epithelial layer appears thicker; (C) the

Vacuoles displaied in the cytoplasm of epithelial cell; (D) the dense granules of the lumen of Malpighian tubule. Mv: microvilli, Lu: Lumen, Bm: basement membrane, Va: vacuoles, Dg: dense granule, Scale bar: 30μm.

镉处理影响马氏管上皮细胞的微绒毛和细胞质形态结构，对照组（5.5 A）马氏管细胞核较大，细胞质染色较浅且均匀，基底层较厚，管腔内微绒毛排列紧密均匀，

61

### 整个切面清晰分明；而镉染毒组马氏管切面变形，细胞核变小，细胞质中出现溶解

（5.5 B），基底层变薄或消失，细胞质中出现空泡（5.5 C和D），管腔内出现匀质致密物质（5.5 D），马氏管外壁粘附有器官等不明组织碎片。图5.4可见，镉处理后马氏管微绒毛着生处出现红色细小颗粒物质。

### 5.3.6 镉慢性染毒对中华稻蝗中肠和围食膜的影响



图 5.6 慢性镉染毒对中华稻蝗中肠和围食膜形态的影响

Fig. 5.6 Histological observation of midgut and peritrophic matrix of *Oxya chinensis*

注：A为对照组中华稻蝗成虫中肠横切面，可见中肠肠壁上皮柱状细胞排列均匀，细胞核清晰可见，围食膜完整而连续；B为镉染毒组，中肠肠壁上皮柱状细胞核混乱，部分细胞脱落，断裂，围食膜松散断裂不连续，一些含有内容物的小泡出现在肠腔中（Lu）。围食膜（PM），上皮细胞（Ep）。

In the control group (A), the peritrophic membrane (PM) was integrity and continuous. A limitation could be observed obviously between the epithelial cells and PM, and the intestinen contents were completely wrapped in PM; (B) PM of insect exposed to Cd, was not connective, and some vesicles contained the contents distributed dispersedly in the gut

Lumen. Lu: Lumen, PM: peritrophic matrix, Ep: epithelium cell, Scale bar: 100μm.

中肠是消化食物的主要区段，肠壁由单层上皮细胞着生于基底膜上构成，上皮细胞分为柱状细胞、杯状细胞和分泌细胞，柱状细胞的顶端有微绒毛，分泌细胞能够分泌多种消化酶。中肠可将消化后的营养物质运输到血淋巴中为机体提供营养和能量。围食膜是中华稻蝗中肠内侧的一层由几丁质组成的薄膜，由中肠柱状上皮细胞向内分泌的几丁质和蛋白形成[158]，围食膜呈网状结构，中肠细胞分泌的消化液可以穿透围食膜浸润食物，消化后的小分子可以穿过围食膜进入肠腔被中肠细胞吸收。由于中华稻蝗以禾本科植物叶片为食物，叶片中含有大量的植物纤维，较为坚硬，围食膜可包裹食物使得中肠柱状上皮细胞免受植物纤维的机械损伤，从而保护中肠肠壁细胞的微绒毛，因此昆虫围食膜是昆虫消化食物的重要器官。对照组中肠上皮细胞均匀整齐，柱状细胞细胞核清晰排列有序，围食膜包裹着食物，均匀完整地围

62

## 合在中肠内侧（图5.6 A）；镉染毒组中肠上皮细胞层局部断裂且有部分脱落，围食

膜不完整，有部分缺失，在肠壁和围食膜之间出现有内容物的囊泡（图5.6 B）。

## 5.4 讨论

本文第四章研究了3种金属对中华稻蝗急性染毒48 h后，中华稻蝗2个OcMT基因在转录表达水平升高，同时发现不同类型血细胞数量和形态发生了相应的变化，解剖发现脂肪体和马氏管内出现了不同形态的微小颗粒物或结晶体。可见当有害的金属进入中华稻蝗血腔时，金属胁迫使机体从基因水平、细胞水平和组织水平同时启动金属代谢解毒机制。不同的重金属物理化学性质不同，但对生物体具有相似的毒性效应。本章经镉处理中华稻蝗，研究镉亚急性或慢性染毒对中华稻蝗血细胞（免疫系统）、胃盲囊、中肠、围食膜（消化系统）以及马氏管（排泄系统）形态结构的影响。

昆虫免疫系统主要有细胞免疫和体液免疫，其中细胞免疫主要依靠血淋巴中的血细胞来执行，在抵抗外源性入侵异物过程中起着重要作用[159]。目前有不少研究关注农药和微生物对昆虫血细胞的影响[160]，更多的研究是通过用人工合成的微小颗粒物来模拟异物，观察昆虫血细胞对这些颗粒物的作用[161]。2003年凌尔军等研究了重金属离子对家蚕造血器官再生和分化的影响[162]，目前尚未见有关重金属离子对昆虫血细胞类型和形态变化与代谢解毒的相关性研究，本文通过血涂片观察对中华稻蝗血细胞进行了分类，发现中华稻蝗有4种类型血细胞，分别为原血细胞，浆血细胞，粒血细胞和类绛色血细胞。在野生型中华稻蝗体内每种类型血细胞的形态和数量是相对恒定的，当金属镉进入中华稻蝗体内，每种类型血细胞的形态和数量发生了变化，Wright's和Giemsa染色后可以观察到，浆血细胞由典型的纺锤状具伪足形态变为长椭圆形，失去具有尖端的伪足；粒血胞由卵圆形变为椭圆形，细胞肿胀膨大，细胞质中出现了大量的红色细小颗粒和不可染色的空泡。分析认为这种形态变化一方面可能是血细胞自身免疫反应的结果，如浆血细胞吞噬了金属离子后失去了伪足，血细胞变成长椭圆形；也可能是金属的毒性使血细胞细胞膜或细胞内的细胞器功能丧失，细胞失去活性后呈现的形态[163]。昆虫血细胞类型少于脊椎动物，不同类型的血细胞通过不同方式参与对异物的吞噬和清除，如吞噬作用和包囊过程。本研究中发现镉处理中华稻蝗后，浆血胞数量显著减少，粒血细胞增加了8.4个百分点，表明原血胞和粒血胞参与了对镉的代谢解毒作用。在果蝇中有3种血细胞，但只有浆血细胞参与吞噬作用[164]，烟草天蛾（*Manduca sexta*）血细胞中浆血细胞和粒血细胞参与

63

对异物的吞噬[165]。粒血细胞出现典型的脱颗粒现象，释放出大量含有酶的颗粒物参与对外源物质的包被作用，也有研究发现，在某些异物的作用下粒血细胞会变成“超大吞噬细胞”参与吞噬作用[166]。镉处理后血淋巴中原血细胞增加4%，分析可能是因为原血细胞的重要作用，作为血细胞中的“干细胞”通过分化形成其他类型的血细胞

[167]. Yamashita等2001发现在家蚕（*bombyx mori*）原血细胞可以分化成浆血细胞和粒血细胞[168]。本研究主要从镉处理后中华稻蝗不同类型血细胞的形态和数量方面做了观察和统计分析，还不足以完全解释中华稻蝗对重金属解毒的行为和机理，目前正在对血细胞的超微切片进行观察和分析，并计划通过断层扫描技术对血细胞内金属进行定位分析，有关金属离子对血细胞的具体影响及其毒性机制的研究正在进行中。

中华稻蝗消化道是摄取食物后进行消化、吸收以及排泄的管道，如图5.3所示，消化道纵向贯穿于稻蝗的整个血腔，前肠内具有坚硬齿状的凸起可以将食物磨碎。中肠还可细分为前中后三段，Erin M Leonard等研究证实中肠前段可以从中肠内吸收镉进入血淋巴，而中肠的后段则可以从中肠肠腔和血淋巴中吸收镉转运到其他组织中[169]，胃盲囊是中肠的衍生物，其着生于前肠和中肠交界处，扩大了中肠的消化吸收面积，其可分泌消化酶也可以吸收部分消化后的物质。正常情况下，非必需金属离子不能通过肠壁细胞，本文中将镉溶液从稻蝗第2和第3背板注入血腔进行染毒，中华稻蝗胃盲囊、中肠肠壁以及马氏管出现显著变化，发现为柱状细胞基底膜出现了断裂和空洞，这可能为镉进入中肠肠腔提供了通道，镉处理还破坏了肠壁外层的肌肉组织，可见镉离子可以通过胃盲囊、中肠和马氏管的上皮细胞进入消化道肠腔内并对微绒毛造成不同程度的损伤。

本研究中我们发现重金属染毒导致中华稻蝗体内多个组织和器官发生了显著的形态变化，这将为考察和评估重金属对昆虫毒性损伤提供了有利证据。中华稻蝗取食染毒小麦（镉浓度89.55 mg·kg-1）10天后，试虫取食量下降，但没有死亡，可见该染毒小麦所含的金属镉对试虫尚未达到致死剂量，张育平等测定了试虫的体重后发现，在染毒期间试虫体重和体长基本没有增长，可能是由于营养缺乏所致。通过对中华稻蝗消化道常见几种解毒酶的酶活性测定，发现相关解毒酶活性升高。由此我们推测，由于消化道是镉进入中华稻蝗体内最先接触的组织，是主要的消化、吸收区段，也是病原微生物、杀虫剂和其他毒物的攻击靶标[170]，上述实验结果可能是由于镉对试虫消化道造成的毒性效应所致。

通过石蜡切片观察到，中肠上皮细胞出现肿胀、囊泡化和溶解缺失等现象，类似于某种细菌性杀虫蛋白所引起的形态变化，如来自苏云金芽孢杆菌内毒素[171]和

64

Vip3A以及来自发光杆菌的毒素复合物[172]。镉对中华稻蝗中肠肠壁的损伤导致组成肠壁的上皮柱状细胞排列混乱并出现空洞、微绒毛脱落、基底膜增厚等形态变化，可能导致上皮细胞基底部干细胞的快速增殖[171]，这种增殖可能会修复损伤的上皮细胞，使中肠得到一定程度的恢复。通过光学显微镜可以观察到镉作用后，胃盲囊、中肠上皮细胞和马氏管腔内细胞表面的微绒毛遭到破坏，出现脱落和凌乱，这将大大减少吸收表面和相关消化酶的分泌，试虫出现厌食，必将影响试虫的正常取食量，导致营养缺乏，进一步影响体重和体长的增长，这一结果类似于铜对棕尾别麻蝇

（*Boettcherisca peregrina*）子代生长的影响[173]和镉对乳草蝽（*Oncopeltus fasciatus*）的生长发育的影响[174]，也类似于植物性有毒蛋白对棉铃虫（[*Helicoverpa*](http://www.baidu.com/link?url=4p-71UKSiaZv6zy5xHhbW7my4gURQhlg5ZSxveUXFaMOcJUXghPvjjwy4gt6d1z4idknRkcV57pU0Xa1-5h7u_)*. armigera*）生长发育以及消化道形态的影响[175]。另外营养摄取不足也可能与围食膜的受损有关，围食膜在食物消化过程起着重要的作用，其功能在于保护肠上皮细胞免受植物性食物的机械损伤[176]。镉处理后中华稻蝗围食膜被破坏或者消失，可能是由于镉破坏了围食膜的几丁质结构或者中肠上皮细胞溶解物对围食膜的作用[177]，如许多植物性杀虫剂的靶标是围食膜所含的消化酶和几丁质[178]。

马氏管着生于中肠和后肠的过渡区，近百条马氏管游离于血淋巴中，其功能主要功能是从血淋巴中吸收代谢废物形成原尿与中肠消化后的食物残渣汇合后进入后肠，最终排出体外。Postma等在1996年最早报道了摇蚊马氏管可以吸收隔并将其从血淋巴中离镉[179]，Erin M. Leonard等研究发现除中肠前段外，马氏管和后肠都参与从血淋巴中吸收并清除镉，已有研究证实马氏管可从血淋巴中高效吸收镉，所以马氏管在镉代谢解毒方面具有重要作用[169]。由此可见，马氏管从血淋巴中吸收镉使得马氏管内镉浓度大大增高，这也可以解释马氏管在高浓度镉的胁迫下其细胞受到严重的损伤，相比之下，马氏管对镉具有更高的耐受性，同时马氏管内镉的高浓度显示了其对镉解毒代谢的重要性。

65

# 第六章 中华稻蝗金属硫蛋白原核表达及功能分析

本研究前期通过RNA干扰技术和不同金属急性诱导等方法从基因水平揭示了中华稻蝗2个OcMT的功能，为进一步研究中华稻蝗2个OcMT蛋白的功能特征，本研究采用原核表达策略，将中华稻蝗OcMT基因克隆到带有His标签的表达载体pET-32a上，形成重组质粒，再通过转化表达型宿主菌株大肠杆菌BL21，在诱导剂

IPTG作用下，选择适当的低温条件进行诱导表达，获得带有标签的融合蛋白，通过镍柱亲和层析分离纯化后，成功表达出2个OcMT蛋白。重组蛋白经过透析纯化处理后，采用荧光分光光度计分别检测其对不同金属的结合能力，从而探索其分子功能。

## 6.1 实验材料

### 6.1.1 主要试剂和仪器

中华稻蝗成虫作为实验材料用于RNA提取，反转录后得到cDNA，以稀释后适当浓度cDNA为模板进行PCR扩增，获得中华稻蝗2个OcMT基因*OcMT1*和*OcMT2*进行本研究。

RNA提取、反转录相关试剂和仪器同本论文第三章3.1.1所列。

RNA提取、反转录相关试剂和仪器同本论文第三章3.1.1所列。

PCR Master Mix(TIANGEN)，Gel Extraction Kit, Plasmid Mini Kit(OMEGA)，T4 DNA连接酶（Promega），*pEASY*- T3 Cloning kit ( TransGen)，DNA Marker

（TAKARA），标准蛋白Marker（Fermentas），限制性内切酶NcoI和XhoI（NEB），大肠杆菌感受态细胞DH5a和BL21，牛血清蛋白(Solarbio)，质粒pET32a实验室保存，CaCl2和MgCl2分析纯，IPTG，SCIENTZ-IID超声波细胞破碎仪（宁波），3K15型低温离心机（SIGMA公司），DK-8D电热恒温水槽（上海），EC250-90蛋白电泳仪（Thermo公司）Gel DocTM XR凝胶成像系统（BIO-RAD）；CHB-100恒温金属浴

（杭州），LDZX-30KBS立式蒸汽灭菌锅，DHP-9082恒温培养箱（上海），H2Q-F100震荡培养箱（哈尔滨），BT-100恒流泵（上海），ORION 3 STAR pH仪（Thermo）荧光分光光度计（日立，F4500）TC-XP型PCR仪（BIOER）；

## 6.2 实验方法

### 6.2.1 中华稻蝗金属硫蛋白基因原核表达引物的设计

66



图 6.1 中华稻蝗MT基因重组选用的酶切位点（黑色三角标示）

根据中华稻蝗2个MT基因的核苷酸序列组成和特征，运用在线软件NEBcutter

V2.0（[http: //tools. neb. com/NEBcutter2/](http://tools.neb.com/NEBcutter2/)）对基因序列中的的酶切位点进行分析，同时与本文第二章中2.4验证的*OcMT1*和*OcMT2*全长序列信息和表达载体（质粒）序列信息相结合，选用NcoI和XhoI酶切位点（图6.1），再运用Primer Premier 5.0软件设计带有酶切位点的特异引物，委托上海生工合成，详细信息见表6.1。

表 6.1 中华稻蝗金属硫蛋白扩增引物

Table 6.1 Primers for PCR amplification of OcMT

引物Primer引物序列Primer sequence产物大小Product size (bp) OcMT1FW NcoI CATGCCATGGATGCCTGACCCGTG

OcMT1RV XhoI GGCCTCGAGTCACTTAGAGGTGGT OcMT2FW NcoI CATGCCATGGATGTCGTCTCCGTGC OcMT2RV XhoI GGCCTCGAGTCATTCACATTTGCAGC

M13F GTTTTCCCACTCACGA

M13R CAGGAAACAGCTATGAC

131

211

3791

### 6.2.2 构建重组质粒

通过分析中华稻蝗金属硫蛋白核苷酸序列和表6.1所列引物特征，本研究选用表达载体pET-32a，其结构如图6.2所示，表达载体的克隆位点上游有一段融合表达标签（His-Tag标签）、pET-32a为氨苄抗性、质粒含有T7启动子、N端有肠激酶

（Enterokinase）酶切位点。

67



图 6.2 pET-32a克隆载体结构图

Fig. 6.2 The structure of pET-32a vector

注：本研究中选用的两个酶切位点由红色方框和三角符号标注，分别为NcoI和XhoI。

以中华稻蝗成虫整虫提取的RNA反转录得到的cDNA为模板，分别使用表6.1中所列引物：OcMT1FW NcoI/ OcMT2FW NcoI和OcMT1RV XhoI /OcMT2RV XhoI，进行PCR扩增反应，该PCR体系见表6.2，反应程序如下：

PCR扩增程序包括94℃预变性3 min, 38个循环：94℃30 s，59℃30 s，72℃

40 s；然后72℃延伸5 min。

酶切：测定OcMT的PCR扩增产物和重组骨架（质粒: pET-32a）的浓度并定量（OcMT的PCR产物0.0911μg/μL）后进行酶切，酶切按材料的浓度要求进行，体系为50μL。骨架：pET-32a质粒15μL，灭菌双蒸水28μL，10 x NEB缓冲液5μL，内切酶NcoI和XhoI各1μL，共50μL；目的DNA: OcMT的PCR产物22μL，灭菌双蒸水21μL，10 x NEB缓冲液5μL，内切酶NcoI和XhoI各1μL，共50μL；将以上反应物一次加入EP管内，置于37℃水浴中酶切6 h。酶切后的产物（pET-32a骨架和OcMT基因）通过1.5%的琼脂糖凝胶电泳进行检测并进行回收纯化。

68

表 6.2 中华稻蝗OcMT基因扩增体系

Table 6.2 PCR amplification of OcMT

相关试剂用量

2×Taq PCR Master Mix 25μL OcMT1FW NcoI/ OcMT2FW NcoI(10μmol/L) 1μL OcMT1RV XhoI/ OcMT2RV XhoI(10μmol/L) 1μL OcMT cDNA模板（1µL）1μL

去离子水（21µL）补至50μL

连接：纯化后的产物进行连接，连接体系为：OcMT基因10μL, pET-32a骨架6μL，缓冲液2.5μL，T4专用DNA连接酶1.5μL，混匀后置于16℃或者室温下过夜连接10-14h。

### 6.2.3 重组质粒通过感受态转化及验证（鉴定）

转化：由表达载体构建重组质粒为：pET-32a-OcMT1/ pET-32a-OcMT2，转化菌株DH5α感受态细胞制备方法见本文第三章2.4，通过最新制备的DH5α感受态细胞进行转化，具体操作如下：

1）将连接产物3-5μL加入到在刚刚冰上解冻的50μL的DH5α感受态细胞中，

用移液枪轻轻旋转混匀，立即置于冰浴中30 min；

2）冰浴结束，将感受态细胞DH5α置于42℃水浴中热激30-35 s此过程中不得摇晃，后置于冰上5 min；

3）加入300μL常温无抗LB液体培养基，置于37℃培养箱内孵育1 h；

4）4000 g离心30 s后，弃部分上清液混匀下面菌液，取50-80μL涂于含有Amp

的LB固体培养基上，用涂布玻璃棒均匀铺板；

5）将平板置于37℃培养箱内2 h后翻转倒置平板过夜培养。**验证：**

1）PCR检测阳性克隆。挑取经37℃过夜培养白色单克隆菌斑于500μL含有Amp**+**的LB液体培养基中，37℃震荡培养1 h，取1μL混合液作为模板进行PCR，其余菌液继续震荡培养10 h。用表6.1中M13引物进行PCR检测：94℃预变性5 min；94℃30 s，57℃30 s，72℃30 s，35个循环；72℃延伸5 min；反应结束后用1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。

2）双酶切检测重组质粒。为了进一步确认重组质粒中连接有目的基因片段，按

69

### 照Plasmid Mini Kit（OMEGA）说明提取上述震荡培养10 h后菌液质粒，采用限制性内切酶双酶切方法进行检测。酶切体系如下：含有目的基因的质 粒

（pET-32a-OcMT1/ pET-32a-OcMT2）28μL（1μg），内切酶NcoI和XhoI各1μL，NEBuffer 5μL，双蒸水13μL，置于37℃水浴中反应30 min后，1.5%琼脂糖电泳检测。

3）测序验证。委托上海生工对上述震荡培养10 h后菌液进行测序验证。

6.2.4 OcMT基因的原核表达

原核表达载体为pET-32a，目的基因为*OcMT1*和*OcMT2*，构建成功的质粒为：

pET-32a-OcMT1/ pET-32a-OcMT2，表达菌株为BL 21感受态细胞。

选择5.2.5测序验证准确的菌株，扩大培养，提取质粒pET-32a-OcMT1/ pET-32a-OcMT2，转化表达菌株BL21感受态细胞中，同时将不含OcMT基因的空质粒pET-32a用同样的方法进行转入，涂布于Amp的LB固体培养基上37℃培养箱内过夜培养进行蓝白斑筛选。从过夜培养的平板上挑取白色单克隆表达菌斑于1 mL含有氨苄的LB液体培养基中，置于37℃震荡培养箱中，转速150 r/min条件下培养约4小时，用酶标仪检测菌液光密度，当菌液OD600接近0.5时，向菌液中加入诱导剂IPTG使其终浓度为0.2 mg/mL。调节培养箱温度为25℃，转速150 r/min过夜震荡诱导培养。

培养8-10 h后8000 r/min离心收集菌体，加入浓度为0.1 mol/L的PBS缓冲液（0.1 mol, pH 7.5）300µL漂洗残留培养基，离心收菌，加入0.1 mol/L的PBS缓冲液500

µL，超声波破碎3-5 min，用4℃，11000 r/min离心20 min，取上清于另一管内备用，向带有沉淀的蛋白液加入1 mL PBS缓冲液漂洗，离心30 min后弃掉上清液体，加入PBS缓冲液100µL用移液枪吹打或漩涡混匀，所有样品置于4℃或冰上保存备用。

SDS-PAGE电泳检测：分别取上清和沉淀各15µL于单独的EP管内，加入5µL

蛋白上样缓冲液混匀，沸水中煮2-3 min后取出，静置2 min后瞬间离心，向SDS-PAGE

胶点样后电泳检测。

SDS-PAGE胶点样后电泳后胶体通过考马斯亮蓝染色4 h，通过由30%甲醇和

10%冰醋酸配置的蛋白液在水平摇床上震荡脱色后，将蛋白胶置于扫描仪上扫描成像，根据不同样品中带型分析蛋白表达情况。上清液中有目的条带的即为可溶性表达的融合蛋白，选取可溶性表达良好的菌株，向其克隆性菌株（DH5α）所在菌液中等比例加入灭菌的50%的甘油后置于-80℃保存备用。

70

6.2.5重组OcMT蛋白（融合蛋白）对铜的耐受性

取含有氨苄（Amp+: ampicillin）抗生素的LB固体培养基置于37℃培养箱内20

min，然后向平板中加入30µL浓度为200 mM的CuCl2溶液和1 mM 的诱导剂IPTG 2µL，涂布均匀后将平板置于培养箱内30 min，使CuCl2溶液和IPTG溶液充分吸收，然后去上述经过测序验证含有重组质粒pET-32a-OcMT1/ pET-32a-OcMT2的大肠杆菌BL21(DE3) 0.2µL稀释于20µL的双蒸水中，均匀涂布于平板上，同时以不含

OcMT重组质粒（空pET-32a）的BL21（DE3）细胞为对照，每组设置3个生物学重复，即每组涂3个平板。将平板置于37℃恒温培养箱内培养2 h后调节温度至28℃继续培养5-6 h，观察菌斑生长情况。

6.2.6重组OcMT蛋白（融合蛋白）的分离纯化

通过本章2.5对蛋白胶检测确定中华稻蝗2个MT融合蛋白成功表达且存在于上清液之后，即可继续扩大培养以便获得大量产物。根据实验需要配置一定体积LB培养基，在超净台内分装于三角瓶中（每瓶220-250 mL），按LB培养基体积加入氨苄使其终浓度为50μg/L，向每瓶培养基（250 mL）中加入500µL菌株。参见本章2.5中方法，并在相同的温度、转速和诱导条件下诱导表达，离心收菌，超声破碎，离心后留上清液经镍柱亲和层析技术纯化，同时采用SDS-PAGE检测确定目的蛋白可溶性表达。留取15µL上清、沉淀（用上清相同体积的PBS重悬浮），用于纯化后SDS-PAGE检测。

融合蛋白的分离纯化：

1）镍柱先经过3倍体积的Binding Buffer（0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl. PH: 7.5）清洗;

2）将超声破碎后经离心得到的上清液加入层析柱，打开导流管观察层析柱中材料与蛋白结合后的颜色变化速度控制流速，收集首次经过层析柱的液体（穿透液），根据情况可将此穿透液重复过柱；

3）透液完毕依次用10、20、40、100、250 mmol/L的咪唑洗脱液洗脱（各浓度咪唑由Binding Buffer配置），分别收集各浓度洗脱液，其中250 mmol /L 咪唑洗脱液分前、后单独收集；

4）各浓度咪唑洗脱液完毕，依次用EDTA、蒸馏水、硫酸镍溶液洗脱进行柱材料清洗和再生。

目的蛋白通过镍柱纯化结束后，分别取穿透液和各浓度咪唑洗脱后收集液，250

mmol/L咪唑（前、后）的洗脱液15µL，加入4X的蛋白上样缓冲液5µL，沸水中

71

煮5 min，进行SDS-PAGE电泳、蛋白胶染色和脱色，扫描成像后观察不同样品的条带分布。

6.2.7酶切融合蛋白的6-His标签

由于中华稻蝗OcMT蛋白分子质量较小，本研究选用载体pET-32a核苷酸序列上的6-His Tag作为蛋白亲和纯化的结合工具，当纯化完成后，为了尽量避免标签对

OcMT蛋白的功能的影响，本研究利用融合蛋白末端的肠激酶（Enterokinase）位点，在一定条件下可以利用肠激酶的切割作用，将OcMT蛋白切割后分离出来。酶切方法按照Bovine Enterokinase的说明书，配置Buffer (25 mM Tris-HCl, PH: 7.6, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl2)将Bovine Enterokinase稀释后置于4℃备用。

将经过纯化、透析并通过SDS-PAGE电泳检测后，将Bovine Enterokinase加入到确定表达OcMT1/ OcMT2蛋白的洗脱组分中，按照说明书中建议酶切时间16 h，重新将融合蛋白加入到镍柱上，然后用含有肠激酶的缓冲液通过镍柱洗脱适当控制慢速过柱，收集经镍柱洗脱后的组分，该洗脱操作在4℃层析柜中进行。

将通过酶切纯化后的洗脱液（OcMT1/ OcMT2蛋白组分），装于适当孔径的半透膜透析袋中，放入盛有500 mL的PBS（0.1mol, pH: 7.0）中，在磁力搅拌下透析，每隔3 h更换一次PBS，透析4次，经透析后的洗脱液置于4℃保存备用。

6.2.8测定融合蛋白的浓度和含量

融合蛋白的浓度测定采用BCA法测定：

1）先用蒸馏水精确配置4%硫酸铜溶液，并按1: 49的体积比加入BCA酸液配成工作液；

2）用PBS缓冲液（灭菌，0.1 mmol/L，pH 7.0，与上述透析缓冲液相同）配置标准蛋白液，即浓度为1 mg/mL的胎牛血清蛋白；

3）将标准蛋白液稀释成7个梯度浓度（分别为0、0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、

0.8、1 mg /mL的系列浓度）；

4）使用专用96孔板进行浓度测定，每个样品做3个技术重复，向每孔中加入

BCA工作液200µL；

5）将标准蛋白液和待测蛋白样品依次加入对应的池中，并将96孔板放置在黑暗的小盒子内，置于37℃恒温培养箱孵育30 min；

6）孵育结束后，将96孔板置于酶标仪的进样平台，设置程序562 nm测定并读取样品OD值；

7）根据每个样品测得的3个OD值取平均数，绘制标准曲线，进一步计算待测

72

### 融合蛋白的浓度和含量。

6.2.9 OcMT蛋白对不同金属的结合能力

为了进一步探究中华稻蝗2个OcMT蛋白的功能，特别是与金属结合的能力，在适当的条件下向纯化后和透析的OcMT蛋白溶液（pH: 7.5）中分别加入200 mM的CdCl2, CuCl2, ZnSO4溶液200µL，置于25℃恒温培养箱内缓慢搅拌使其充分4-5

h，然后再装入透析袋中在PBS（0.1mol, pH: 7.0）中透析，缓慢磁力搅拌下，每隔2 h更换一次PBS，透析4次，目的是将尚未与蛋白结合的剩余金属离子通过半透膜透析出来，然后测定透析后的蛋白液浓度和含量（方法同6.2.8），取透析后蛋白液通过荧光分光光度计（日立，F4500）测定金属离子特征光谱。同时以未加金属的蛋白液为对照，且稀释系列浓度绘制荧光强度和浓度的工作曲线。

6.3实验结果

6.3.1酶切验证重组质粒中含有OcMT基因



图 6.3 重组质粒双酶切检测

Fig 6.3 The recombinant plasmid was identified by double enzyme digestion

*OcMT1*: 131 bp; *OcMT2*:211 bp

构建的pET-32a-OcMT质粒经酶切后通过1.5%的琼脂糖凝胶电泳进行检测，结果如图6.3所示，琼脂糖凝胶中间泳道为DNA Marker，左侧两个泳道为目的质粒pET-32a-OcMT1（理论片段大小131 bp），右侧2个泳道为目的pET-32a- OcMT2（预期片段大小211 bp），参考Marker大小确认凝胶底端条带为酶切得到的OcMT基因

DNA片段，由此确认2个OcMT重组质粒构建成功。

6.3.2 SDS-PAGE电泳检测融合蛋白的表达

73



图 6.4 SDS-PAGE电泳检测

Fig 6.4 SDS-PAGE analysis of two His-OcMT fusion proteins expressed in *E. coli* BL21 (DE3) cells.

OcMT1: 7.74 KDa, OcMT2: 9.92 KDa

镍柱亲和层析纯化后，通过SDS-PAGE电泳用含有目的OcMT融合蛋白洗脱液进行检测，预期蛋白大小为OcMT1: 7.74 KDa，OcMT2: 9.92 KDa。结果如图6.4所示，左侧分子质量较小的条带OcMT1（前3个泳道），右侧3个泳道为OcMT2，与Marker对比相对分子接近于2个OcMT融合蛋白的理论分子大小，表明2个OcMT通过重组质粒在BL21 (DE3)中可以进行可溶性表达。

6.3.3重组OcMT蛋白（融合蛋白）的功能验证



图 6.5 含有重组质粒pET-32a-OcMT1/ pET-32a-OcMT2的菌株在铜胁迫下的生长情况

Fig. 6.5 Tolerance of recombination strain to Cu on IPTG medium

注：A:对照组，含有pET-32a质粒的大肠杆菌BL(DE3)；B: 含有重组质粒pET-32a-OcMT1的大肠杆菌BL(DE3)；

C: 含有重组质粒pET-32a-OcMT2的大肠杆菌BL(DE3)。

A: the negative control pET-32a on medium containing 200 mM Cu2+; B: pET-32a-MT1 recombinant on medium containing 200 mM Cu2+; C: pET-32a a-MT2 recombinant on medium containing 200 mM Cu2+.

74

如图6.5所示，在适当浓度诱导剂（IPTG）诱导下，含有转基因重组质粒pET-32a-OcMT1 /pET-32a-OcMT2的大肠杆菌BL(DE3)在含有200 mM Cu2+的LB培养基上置于30℃培养6 h后有单克隆菌斑长出，且菌斑数量均超过40个，而只含有pET-32a质粒的对照组大肠杆菌BL(DE3)只有4个单克隆菌斑，处理组和对照组差异显著。

6.3.4 OcMT蛋白对不同金属的结合能力



图 6.6 OcMT1与不同金属结合后的荧光光谱图

Fig. 6.6 Fluorescence spectra of in the presence OcMT1 and M-OcMT1 complex

注：所测样品在331 nm处的发射光谱（Ex）。图A: MT1-CK为对照（黑色），MT1-Cu（红色）为经铜处理后的MT1蛋白，B为MT1蛋白分别于镉、铜和锌处理后的荧光光谱。

Fluorescence intensity was recorded at 331 nm and reached a peak maximum. MT1-CK is control, M stand for Metal.



图 6.7 OcMT2与不同金属结合后的荧光光谱图

Fig. 6.7 Fluorescence spectra of in the presence OcMT1 and M-OcMT1 complex at 331 nm.

注：图A: MT2-Ck为对照（黑色）未经金属处理的蛋白溶液，MT2-Cd（红色）为经镉处理后的MT1蛋白；B为MT2蛋白分别于镉、铜和锌处理后的荧光光谱。

MT2-CK is control, M stand for Metal

75

经计算，融合表达得到的OcMT1和OcMT2蛋白的浓度分别为2.932±0.191和2.913±0.052µg/µL（n=4, Y=0.7752x, R2=0.9981），根据检测要求，进行稀释后进行相关测试。

采用荧光光谱法检测了中华稻蝗2个OcMT蛋白对常见3种不同金属的结合能力。如图6.6 A所示，对照组OcMT1蛋白在327 nm处的荧光强度为726.4 （a. u.），铜处理OcMT蛋白后荧光强度为747.2（a. u.），与对照相比其荧光强度增强，说明蛋白结合了铜离子；图6.6 B 显示，OcMT蛋白经3种金属处理后，荧光强度均大于

726.4，锌最高达到761.1，与对照相比荧光强度增强，可知OcMT蛋白与3种不同金属均可以结合。

由图6.7 A发射光谱图所示，OcMT2蛋白的荧光强度为701.1，经镉处理后OcMT2蛋白荧光强度为749.3，荧光强度增强；图6.7 B显示经镉、铜、锌处理后OcMT2蛋白荧光强度增强。相比之下OcMT2蛋白与铜结合后荧光强度高达757.9，可见OcMT2蛋白对3种金属都有结合作用，但结合后的荧光强度不同。

6.4讨论

有关MT蛋白功能的研究多见于哺乳动物、水生动物、植物和真菌中，昆虫中研究较少，且集中于模式昆虫果蝇（*Drosophila melanogaster*）、家蝇（*Musca*

*domestica*）、冈比亚按蚊（*Anopheles gambiae*）、摇蚊（*Chironomus riparius*）等。在昆虫中MT基因结构和表达模式具有高度保守性，由半胱氨酸形成的巯基分布和含量决定了其功能的多样性和对不同金属结合能力的差异性。一般认为MT蛋白具有重金属解毒、必需金属储存、维持金属稳态、抗氧化和清除自由基等[111]。

MT基因对金属的耐受性及其对重金属的解毒功能研究大多采用原核表达系统，原核表达系统研究目的蛋白功能具有一定的优越性，目前所构建的质粒载体结构特点多样，带有多种信号肽和特殊标签，具有特定的启动子和酶切位点等，极大地方便了研究工作的需要。利用原核表达系统表达MT蛋白是常用的手段，构建合理有效的表达载体是异源表达目的基因的基本条件。选择合适的质粒载体、构建重组质粒和使用合适的诱导表达条件对于得到能够满足后续功能分析的蛋白十分重要[180]。大肠杆菌表达系统因具有基因背景和表达特性清楚、培养操作简单、成本较低、生长速度快等特点而被广泛使用。有效的大肠杆菌表达载体必须具有基本的结构元件，如启动子、翻译起始区、融合Tag、多克隆位点、终止密码以及抗性筛选标记等，并要求在转录和翻译水平上可以控制目的基因的表达[181]。除表达载体的有效调控之外，

76

还需要向载体中插入辅助的基因序列使其与目的基因一起构成具有特征标签的融合蛋白。通常情况下，根据亲和层析的配体来选择适当的纯化标签，如His、GST等，以便进一步亲和纯化得到均一性较高的产物，此外，在纯化标签与目的蛋白之间插入特定的短肽作为融合剪切位点，利用融合剪切酶可在目的蛋白纯化操作中剪切融合标签得到单一的目的蛋白。配置高效的大肠杆菌表达系统可使目的蛋白的表达量超过细菌总蛋白的80%[182]，但在高效表达的同时容易形成包涵体，翻译后修饰不完全等，为此多通过人为控制调节等措施加以克服，如采用降低温度和调节震荡摇床速度等进行诱导表达，选择中等强度或低强度的启动子等[183]。基于这些优点和便利条件，综合考虑表达载体，宿主菌株和诱导条件，构建合适的表达系统等因素，以获得满意的表达效果。本文采用大肠杆菌表达系统，将中华稻蝗*OcMT1*和*OcMT2*基因通过重组质粒转化大肠杆菌后成功表达了OcMT1和OcMT2蛋白，并进行后续的功能研究。

中华稻蝗*OcMT1*和*OcMT2*基因经转化大肠杆菌表达蛋白后，在含铜培养基上培养，与对照组相比，单克隆菌斑数量显著增多，表明含有OcMT基因的大肠杆菌对铜具有一定的耐受性，使用荧光分光光度计检测到2个OcMT蛋白与不同金属作用后的发射光谱明显增强。本文第三章中检测了表达OcMT蛋白的大肠杆菌在不同浓度镉作用下可继续生长和繁殖，证实2个OcMT蛋白均可与金属结合，且与不同金属的结合能力有所差异，这说明OcMT基因在大肠杆菌中表现出对金属的抗性和耐受性。目前已在多个物种中通过原核表达系统对其MT基因与蛋白和金属的作用进行了研究，并证明表达MT基因的细菌或其他模式生物具有对金属的耐受性和与金属结合的能力[184]。类似的研究发现，向缺失MT基因的酵母基因组中转入人类MT基因，酵母便恢复了抗铜表型[121]。在高浓度镉作用下，与对照相比，过表达MT基因的转基因小鼠对镉具有极高的抗性[120]。在MT基因缺陷型突变体酵母菌中转入植物MT基因使得酵母恢复了对铜、锌、镉的耐受性[185,186]。通过重组质粒在大肠杆菌中表达家蝇(*Musca domestica*) MT基因*MdMT1*和*MdMT2*，发现融合表达MdMT1蛋白后显著增强了宿主对镉的耐受性，而表达MdMT2蛋白的宿主细胞对镉的耐受性没有改变[119]。草履虫镉MT基因（*PMCd1syn*）通过大肠杆菌融合表达后对镉的结合能力是对照组的9.11-14.8倍[187]。在植物中，融合表达的木榄（*ruguiera gymnorrhiza*）

BgMT2蛋白的大肠杆菌分别再用一定浓度的锌、铜、铅和镉处理后，检测发现菌液中不同金属的含量显著高于对照组，且结合量由多到少依次为锌、镉、铜、铅[188]。大麦（*Hordeum vulgare*）MT3和MT4基因在酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）

77

中表达后，通过质谱法测定了对不同金属的结合量，发现*MT4*对锌的结合能力优先于镉和铜[189]。表达了麻风树（*Tamarix hispida*）MT蛋白的酵母菌显著增强了对镉、铜、锌和银的抗性[190]。由此可见，MT基因的转录和蛋白表达可以有效提高生物体对金属的耐受力，其作用机制是由于MT蛋白分子中的巯基可与金属离子结合，形成金属-MT复合物（M-MTs，M代表金属）将金属离子固定下来，使金属离子失去自由扩散功能，从而保护了机体免受金属的毒害[191, 192]。

当重金属计入生物体内是，可通过不同的途径引起细胞的损伤，如妨碍水的代谢，改变细胞膜的渗透性，引起电子失衡，与其他底物竞争活性位点导致酶类失活，改变DNA的构象等[193]。镉对机体的毒性之一就是可诱导细胞产生氧自由基和过氧化物对细胞膜上磷脂分子产生过氧化作用而破坏膜系统，因此，以活性氧为代表的自由基是导致细胞损伤的主要分子[194]，金属硫蛋白被称为与金属代谢相关的应急蛋白，其作用不仅仅是直接与重金属结合对机体进行代谢解毒，参与清除金属胁迫作用下产生的自由基，也可以与金属胁迫产生的活性氧（Reactive oxygen species ROS），包括氧离子、过氧化物和含氧自由基相结合并将其从细胞内清除[195]。怪柳（*Tamarix*

*androssowii*）MT基因转入烟草（*Nicotiana tobacum*）中，与对照相比，在镉的胁迫下，转基因烟草超氧化物歧化酶（superoxide dismutase SOD）活性和叶绿素的含量显著增加，然而过氧化物酶（peroxidase POD）的活性与丙二醛（malondialdehyde

MDA）累积量却有所降低，转基因烟草的长势良好，产量显著提高[196]。MT并不是生物体所必须的蛋白，但越来越多的证据表明其对于自由基和毒性金属胁迫的抗性方面具有重要功能。MT的功能多样化包括螯合有害重金属和过量的必需金属（金属解毒和维持内环境稳态），清除各种自由基和活性氧ROS[197]。总之，金属硫蛋白在金属等的胁迫下，除可以通过本身在基因水平、蛋白水平上进行解毒外，还可以诱导和协同其他相关蛋白一起参与解毒过程[130]，最大程度上保护机体免受金属本身以及次生危害。

78

### 全文总结

本文以重要农业害虫中华稻蝗（*Oxya chinensis*）为实验材料，以常见的环境污染物镉、铜和锌3种重金属为胁迫因子，围绕重金属胁迫下OcMT基因和蛋白的分子特性和功能、金属对中华稻蝗解毒酶、消化道和免疫细胞形态结构的影响进行了深入研究，揭示了重金属胁迫下中华稻蝗的代谢解毒机制，本文的创新之处及研究结论如下：

一、本研究首次克隆到中华稻蝗2个OcMT基因全长序列，对中华稻蝗OcMT

基因在重金属解毒中的作用和解毒机制进行了深入研究。结果表明，中华稻蝗2 个

OcMT基因在不同发育阶段和不同组织器官内均有转录和表达，其中在神经系统转录水平远高于其他组织。目前对昆虫MT的研究多集中于消化道各区段，而本研究在不仅对消化系统进行了研究，同时也关注了神经系统（脑和视叶）、代谢解毒系统（脂肪体）以及排泄系统（马氏管）MT基因（mRNA转录水平）的分子特性，首次采用RNAi技术研究OcMT在昆虫重金属代谢解毒中的功能。

二、本研究首次运用生物体必需的微量金属元素铜和锌以及非必需重金属镉对中华稻蝗进行染毒，通过RT-qPCR技术研究不同重金属对OcMT基因mRNA转录水平的影响。结果显示，3种重金属均可诱导OcMT基因在mRNA转录水平上调，其中锌对OcMT基因诱导转录的强度高于其他2种金属，可见中华稻蝗OcMT基因参与对重金属的代谢解毒过程；本研究中发现3种重金属处理试虫后，中华稻蝗脂肪体、马氏管和后肠内均出现了不同形态特征的颗粒物或晶体，表明虫体可通过排泄系统将有害物质固定后排出体外，本结果为揭示昆虫对有害重金属代谢解毒功能提供了新的证据。

三、本研究经对中华稻蝗镉急性或慢性染毒过程中发现，试虫取食含镉麦苗后较对照组生长缓慢。经石蜡切片后观察发现，中华稻蝗中肠、胃盲囊、马氏管等组织形态发生严重损伤，上皮柱状细胞受损微绒毛脱落，马氏管内蓄积大量颗粒物，围食膜断裂或残缺。表明中华稻蝗在镉胁迫下可通过不断更新局部组织和组织再生来缓减机体损伤，同时也可通过生理代谢排泄有害物质。此外，中华稻蝗还可以通过调节体内相关解毒酶活性、通过血细胞的免疫作用来应对体内的重金属的胁迫，进行代谢解毒。上述研究从细胞、组织和生理水平揭示了重金属对中华稻蝗的损害以及试虫对重金属的解毒机制，为昆虫重金属解毒提供一定的理论基础。

四、本研究采用原核表达策略在大肠杆菌系统中成功表达了OcMT蛋白，测试

79

了表达OcMT蛋白的大肠杆菌在含有金属培养基上的生长状况，分离纯化得到的

OcMT蛋白并测定了其与不同重金属的结合能力。这些研究结果表明：OcMT蛋白在体内和体外都具有与重金属离子结合的能力，表达OcMT蛋白的大肠杆菌可大大增强对重金属的耐受能力，可见中华稻蝗OcMT蛋白在体内和体外都可通过螯合重金属离子保护机体免受重金属的毒害效应。

五、后续工作展望：本文研究从基因、蛋白、组织、生理和生化水平为农业害虫重金属代谢解毒研究提供了理论与实验依据。后续研究工作还需要继续跟进，如中华稻蝗OcMT蛋白的体外结晶及分析；OcMT蛋白对重金属离子的结合特性研究；重金属染毒后马氏管内蓄积的颗粒物的形成过程、颗粒物的化学成分以及生理学意义等均有待进一步深入研究，继续开展上述科研工作对进一步阐明昆虫重金属解毒的生理学机制具有重要的理论意义和现实指导作用。

80

参 考 文 献

[1] Wei B, Yang L. A review of heavy metal contaminations in urban soils, urban road dusts and agricultural soils from China. *Microchem J*, 2010, 94(2): 99-107.

[2] Zhiyuan Li, Zongwei Ma, Tsering Jan van der Kuijp, *et al*. A reviewof soil heavymetal pollution frommines in China: Pollution and health risk assessment. *Science of the Total Environment*, 2014, 843-853.

[3] Liu WX, LF Shen, JW Liu, *et al*. Uptake of toxic heavymetals by rice (*Oryza sativa L.*) cultivated in the agricultural soils near Zhengzhou City, People's Republic of China. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2007, 79: 209-213.

[4] Nagajyoti PC, LeeKD, Sreekanth TVM. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ Chem Lett*, 2010, 8(3): 199-216.

[5] Dong J, Yang QW, Sun LN, *et al*. Assessing the concentration and potential dietary risk of heavy metals in vegetables at a Pb/Zn mine site, China. *Environ Earth Sci*, 2011, 64: 1317-1321.

[6] Zhang XW, Yang LS, Li YH, *et al*. Impacts of lead/zinc mining and smelting on the environment and human health in China. *Environ Monit Assess*, 2012, 184: 2261-2273.

[7] Abolghassem Emamverdian, Yulong Ding, Farzad Mokhberdoran, *et al*. Heavy Metal Stress and Some Mechanisms of Plant Defense Respons. *The Scientiﬁc World Journal*, 2015, 1-18.

[8] Nico M, van Straalen, Dick Roelofs. Cadmium tolerance in a soil arthropod--a model of real-time microevolution. *Entomologische Berichten*, 2005, 65(4): 105-111.

[9] Ross S. Toxic metals in soil-plant systems. Wiley, Chichester, (1994)

[10] Zhuang P, Zou B, Li N, *et al*. Heavy metal contamination in soils and food crops around Dabaoshan mine in Guangdong, China: implication for human health. *Environ. Geochem. Health*, 2009b, 31: 707-715.

[11] Yan Xu, Liang Feng, Philip D Jeffrey, *et al*. Structure andmetal exchange in the cadmium carbonic anhydrase of marine diatoms. *Nature*, 2008, 452.

[12] Nordberg GF. Historical perspectives on cadmium toxicology. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009, 238: 192-200.

[[13] http: //www. atsdr. cdc. gov](http://www.atsdr.cdc.gov/), ATSDR, 199981

[14] Chaney RL, Ryan JA, Li YM, *et al*. Soil cadmium as athreat to human health. Cadmium in soils and plants. Kluwer, Dordrecht, 1999, 219-256,

[15] Oh SH, Choi JE, Lim SC. Protection of betulin against cadmium-induced apoptosis in hepatoma cells. *Toxicology*, 2006, 220: 1-12.

[16] Program NT. Ninth report on carcinogens. National Toxicology Program, Research Triangle Park, NC, USA, 2000.

[17] WHO. Cadmium. Environmental health criteria. Geneva: World Health Organization; 1992

[18] Ezaki T, Tsukahara T, Moriguchi J, *et al*. No clear-cut evidence for cadmium-induced renal tubular dysfunction among over 10, 000 women in the Japanese general population: a nationwide large-scale survey. *Int Arch Occup Environ Health*, 2003, 76: 186-196.

[19] Dejan Mircic. Dusko Blagojevic, Vesna Peric Mataruga. Cadmium effects on the fitness -related traits and antioxidative defense of *Lymantria dispar L*. larvae. *Environ Sci Pollut Res*, 2013), 20: 209-218.

[20] 杨慧敏, 张育平, 马恩波, 郭亚平. 镉急性染毒对中华稻蝗（*Oxya chinensis*）羧酸酯酶和谷胱甘肽S-转移酶活性的影响. 应用昆虫学报, 2012, 49(3): 604-608.

[21] Devkota B, Schmidt GH. Accumulation of heavy metals in grass and grasshoppers from the Taigetos Mountains, Greece. *Agric Ecosyst Environ*, 2000a, 78: 85-91.

[22] Devkota B, Schmidt GH. Life span and fecundity of Aiolopus thalassinus exposed to dietary heavy metals (Hg, Cd, Pb). *Boll Zool Agr Bachic II*, 2000b, 32(2): 119-134.

[23] Li LJ, Liu XM, Duan YH, *et al*. Accumulation of cadmium and copper by female *Oxya chinensis* (Orthopteta: Acridoidae) in soil-plant-insect system. *J Environ Sci,* 2006, 18(2): 341-346.

[24] Pedersen S A, Kristiansen E, Andersen R A, *et al*. Cadmium is deposited in the gut content of larvae of the beetle *Tenebrio molitor* and involves a Cd-binding protein of the low cysteine type. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2008, 148: 217-222.

[25] Yruela I. Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 2005, 17: 145- 156.

[26] Davis G K, Mertz W. Copper: Trace Elements in Human and Animal Nutrition. (Fifth

82

Edition) *Academic Press, San Diego*, 1987, 301-364.

[27] Linder M C, Lomeli N A, Donley S, *et al*. Copper transport in mammals. *Adv Exp Med Biol*, 1999, 448: 1-16.

[28] 倪吾钟, 马海燕, 余慎, 等. 土壤-植物系统的铜污染及其生态健康效应. 广东微量元素科学, 2003, 10(1): 1-5.

[29] Wyatt AR, Wilson MR. Acute phase proteins are major clients for the chaperone action ofα2-macroglobulin in human plasma. *Cell Stress Chaperones*, 2013, 18: 161-170.

[30] Hong, S, Candelone, J P, Patterson, CC, *et al*. History of ancient copper smelting pollution during roman andmedieval times recorded in Greenland ice. *Science*, 1996, 272, 246.

[31] Ozdemir E, Cetinkaya S, Ersan S, *et al*. Serum selenium and plasma malondialdehyde levels and antioxidant enzyme activities in patients with obsessive-compulsive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2009, 33: 62-65.

[32] Pinto E, Sigaud-Kutner TCS, Leitao MAS, *et al*. Heavy-metal induced oxidative stress in algae. *J Phycol*, 2003, 39: 1008-1018.

[33] Russo A J, deVito R. Analysis of copper and zinc plasma concentration the efficacy of zinc therapy in individuals with Asperger's syndrome, pervasive develop-mental disorder not otherwise specified (PDD-NOS) and autism. *Biomark Insights*, 2011, 6: 127-133.

[34] Prasad A S. Discovery of human zinc deficiency: 50 years later. *J Trace Elem Med Biol*, 2012, 26, 66-69.

[35] Vallee B L, Coleman J E, Auld D S. Zincﬁngers, zinc clusters, and zinc twists in DNA-binding protein domains. *Proc Natl Acad Sci*, 1991, 88: 999-1003.

[36] Prasad A S. Zinc: an overview. *Nutrition,* 1995, 11: 93-99.

[37] Prasad A S, Beck F W, Grabowski S M, *et al*. Zinc deficiency: changes in cytokine production and T-cell subpopulations in patients with head and neck cancer and in noncancer subjects. *Proc Assoc Am Physicians*, 1997, 109: 68-77.

[38] Oteiza P I, Mackenzie G G. Zinc, oxidant-triggered cell signaling, and human health. *Mol Aspects Med*, 2005, 26: 245-255.

*[39]* Plum L M, Rink L, Haase H. The essential toxin: Impact of zinc on human health. *Int*

83

*J Environ Res Public Health*, 2010, 7: 1342-1365.

[40] Blaurock-Busch E, Amin O R, Dessoki H H, *et al*. Toxic metals and essential elements in hair and severity of symptoms among children with autism. *Maedica* (Buchar), 2012, 7: 38-48.

[41] Kim D, Joe C O, Han PL. Extracellular and intracellular glutathione protects astrocytes from Zn2+-induced cell death. *Neuroreport*, 2003, 14, 187-190.

[42] Bishop G M, Dringen R, Robinson S R. Zinc stimulates the production of toxic reactive oxygen species (ROS) and inhibits glutathione reductase in astrocytes. *Free Radic Biol Med*, 2007, 42, 1222-1230.

[43] Margoshes M, Vallee B. A cadmium protein from equine kidney cortex. *J Am Chem Soc*, 1957, 79: 4813-4814.

[44] Kagi J H R, Vallee B L. Metallothionein: a cadmium and zinc-containing protein from equine renal cortex. *J Biol Chem*, 1960, 235: 3460-3465.

[45] Coyle P, Philcox J C, Carey L C, *et al*. Metallothionein: The multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci*, 2002, 59: 627-647.

[46] Vasak M. Advances in metallothionein structure and functions. *J Trace Elements Med Biol*, 2005, 19: 13-17.

[47] Meloni G, Zovo K, Kazantseva J, *et al*. Organization and assembly of metal-thiolate clusters in epithelium-specific metallothionein-4, *J Biol Chem*, 2006, 281: 14588-14595.

[48] Sigel H, Sigel A. Metallothioneins and Related Chelators. Metal Ions in Life Sciences5. Cambridge, England, Royal Society of Chemistry. 2009, ISBN1-84755-899-2.

[49] Yves Nzengue, Serge M Candeias, Sylvie Sauvaigo. The toxicity redox mechanisms of cadmium alone or together with copper and zinc homeostasis alteration: Its redox biomarkers. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2011, 25: 171- 180.

[50] Fowler B A, Hildebrand C F, Kojima Y, *et al*. Nomenclature of metallothionein. *Experientia Suppl*, 1987, 52: 19-22.

[51] Oscar Palacios, Silvia Atrian, Merce Capdevila. Zn- and Cu-thioneins: a functional classiﬁcation for metallothioneins*JBiolInorgChem*, 2011, 16: 991-1009.

[52] Sutherland D E K, Stillman M J. The" magic numbers" of metallothionein.

*Metallomics*, 2011, 3: 444-463.

84

[53] Petrlova, J, Potesil, D, Mikelova, R, *et al*. Attomole voltammetric determination of metallothionein. *Electrochim*, 2006, 51: 5112-5119.

[54] Sato M, Bremner I. Oxygen free-radicals and metallothionein. *Free Radic Biol Med*, 1993, 14: 325-337.

[55] Chiaverini N, De Ley M. Protective effect of metallothionein on oxidative stress-induced DNA damage. *Free Radic Res*, 2010, 44: 605-613.

[56] Sato M, Kawakami T, Kondoh M, *et al*. Development of high-fat-diet-induced obesity in female metallothionein-null mice. *FASEB J*, 2010, 24: 2375-2384.

[57] Kumari MV, Hiramatsu M, Ebadi M." Free radical scavenging actions of metallothionein isoforms I and II". *Free Radic. Res*, 1998, 29(2): 93-101.

[58] Colvin R A, Holmes W R, Fontaine C P, et al. Cytosolic zinc buffering and muffling: Their role in intracellular zinc homeostasis. *Metallomics*, 2010, 2: 306-317.

[59] Ruttkay-Nedecky B, Nejdl L, Gumulec J, *et al*. The role of metallothionein in oxidative stress. *Int J Mol Sci*, 2013, 14: 6044-6066.

[60] Sushil Sharma, Afsha Rais, Ranbir Sandhu, *et al*. Clinical signifcance of metallothioneins in cell therapy and nanomedicine. *International Journal of Nanomedicine*, 2013, 8: 1477-1488.

[61] Thornalley P J, Vasak M. Possible role for metallothionein in protection against Radiation -induced oxidative stress- kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim. Biophys Acta*, 1985, 827: 36-44.

[62] Hector Gonzalez-Iglesias, Lydia Alvarez, Montserrat Garci, *et al*. Metallothioneins (MTs) in the human eye: a perspective article on the zinc-MT redox cycle. *Metallomics*, 2014, 6(2): 201-208.

[63] Abel J, de Ruiter N. Inhibition of hydroxyl-radical-generated DNA degradation by metallothionein. *Toxicol Lett*, 1989, 47: 191-196.

[64] Klaassen C D, Liu J, Diwan B A. Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicol Appl Pharmaco*, 2009, l238: 215-220.

[65] Chung R S, Hidalgo J, West A K. New insight into the molecular pathways of metallothionein -mediated neuroprotection and regeneration. *J. Neuro. chem.*, 2008, 104: 14-20.

[66] Bell. S G, Vallee B L. The metallothionein/thionein system: an oxidoreductive

85

Metabolic zinc link. *Chem Bio Chem*, 2009, 10(1): 55-62.

[67] West KAdrian, Hidalgo Juan, Eddins Donnie, *et al*. Metallothionein in the central nervous system: Roles in protection, regeneration and cognition. *Neuro Toxicology*, 2008, 29: 489-503.

[68] Lastowski-Perry D, Otto E, Maroni G.. Nucleotide sequence and expression of a*Drosophila* metallothionein. *Journal of Biological Chemistry*, 1985, 260: 1527-1530.

[69] Mokdad R, Debec A, Wegnez M. Metallothionein genes in *Drosophila melanogaster* constitute a dual system. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1987, 84: 2658-2662.

[70] Egli D, Selvaraj A, Yepiskoposyan H, *et al*. Knockout of 'metal-responsive transcription factor' MTF-1 in *Drosophila* by homologous recombination reveals its central role in heavy metal homeostasis. *EMBO J*, 2003, 22: 100-108.

[71] Valls M, Bofill R, Romero-Isart N, *et al*. *Drosophila* MTN: a metazoan copper-thionein related to fungal forms. *FEBS Letters*, 2000, 467: 189-194.

[72] Lilit Atanesyan, Viola Gu¨nther, Susan E. Celniker, *et al*. Characterization of MtnE, theﬁfth metallothionein member in *Drosophila*. *J Biol Inorg Chem*, 2011, 16: 1047-1056.

[[73] Chen X](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Chen%20X%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9698361) l, [Agarwal A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Agarwal%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9698361), [Giedroc D P](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Giedroc%20DP%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9698361). Structural and functional heterogeneity among the zinc fingers of human MRE-binding transcription factor-1[*.*](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9698361)[*Biochemistry*,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9698361) 1998, 37(32): 11152-11161.

[74] Giedroc D, Chen X, Apuy J. Metal response element (MRE) -binding transcription factor-1 (MTF-1): structure, function, and regulation. *Antioxid Redox Signal*, 2001, 3: 577-596.

[75] Culotta V, Hamer D. [Fine mapping of a mouse metallothionein gene metal response element.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2725504) *Mol Cell Biol*, 1989, 9: 1376-1380.

[76] Li Lijun, Zhang Feng, Liu Xuemei, et al. Oxidative stress related enzymes in response to chromium ( VI) toxicity in *Oxya chinensis* (Orthoptera: Acridoidae). *Journal of Environmental Sciences*, 2005, 17(5): 823-826.

[77] 张育平, 中华稻蝗对重金属镉的解毒机制研究. 博士学位论文, 2012, 32-37.

*[78]* Guo S, Kemphues K J. Par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans*

Embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*,

86

1995, 81(4): 611-620.

[79] Fire A, Xu S Q, Montgomery M K, *et al*. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391: 806-811.

[8080] Olle Terenius, Alexie Papanicolaou, Jennie S Garbutt. RNA interference in Lepidoptera: An overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *Journal of Insect Physiology*, 2011, 57: 231-245.

[81] Yaoming Liu, Haihua Wu, Lihua Kou, *et al*. Two Metallothionein Genes in *Oxya chinensis*: Molecular Characteristics, Expression Patterns and Roles in Heavy Metal Stress. *PLoS ONE*, 2014, 9(11): e112759.

[82] Egli D, Yepiskoposyan H, Selvaraj A, *et al*. [A family knockout of all four *Drosophila* metallothioneins reveals a central role in copper homeostasis and detoxification](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16508004). *Mol Cell Biol*, 2006, 26: 2286-2296.

[83] Chung WP, Dewan JC, Walters MA. Models of lysine–cysteine hydrogen bonding in metallothionein: hydrogen bonding between ammonium and benzenethiolate in [(C6H11) 2NH2] 2[Co(SC6H5) 4]. *J Am Chem Soc*, 1991, 113: 525-530.

[84] Ren F, Jiang H, Sun J, *et al*. Cloning, characterization, expression, and copper sensitivity of the metallothionein-1 gene in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Mol Biol Rep*, 2010, 38: 2383-2393.

[85] Mayo KE, Warren R, Palmiter RD. The mouse metallothionein-I gene is transcriptionally regulated by cadmium following transfection into human or mouse cells. *Cell*, 1982, 29: 99-108.

[86] 崔淼, 刘晓健, 李涛, 等. 五龄飞蝗不同发育时间实时定量PCR内参基因的筛选. 应用昆虫学报. 2014, 51(3): 733-740.

[87] Roesijadi G, Hansen KM, Unger M. Cadmium-induced metallothionein expression during embryonic and early larval development of the mollusc *Crassostrea virginica*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1996, 140: 356-363.

[88] De S K, Dey S K, Andrews G K. Cadmium teratogenicity and its relationship with metallothionein gene expression in midgestation mouse embryos. *Toxicology*, 1990, 64: 89-104.

*[89]* Amiard JC, Amiard-Triquet C, Barka S, *et al*. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxication and their use as biomarkers. *Aquat*

87

*Toxicol*, 2006, 76: 160-202.

[90] Martin M, Osborn KE, Billig P, *et al*. Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and *Cancer magister* larvae. *Mar Pollut Bull*, 1981, 12: 305-308.

[91] Pan L, Zhang H. Metallothionein, antioxidant enzymes and DNA strandbreaks as biomarkers of Cd exposure in a marine crab, *Charybdis japonica*. *Comp Biochem Physiol C: Toxicol Pharmacol*, 2006, 144: 67-75.

[92] Huan Mao, DaHui Wang, WanXi Yang. The involvement of metallothionein in the development of aquatic invertebrate. *Aquatic Toxicology*, 2012, 110-111: 208-213.

[93] Jean-Marc Moulis. Cellular mechanisms of cadmium toxicity related to the homeostasis ofessential metals. *Biometals*, 2010, 23: 877-896.

[94] Banci L, Bertini I, Ciofi-Baffoni S, *et al*. Affinity gradients drive copper to cellular destinations. *Nature*, 2010, 465: 645-648.

[95] Viarengo A, Burlando B, Cavaletto M, *et al*. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Am J Physiol*, 1999, 277: 1612-1619.

[96] Aras M A, Aizenman E. Redox regulation of intracellular Zinc: molecular signaling inthe life and death of neurons. *Antioxidants and redox signaling*, 2011, 15(8): 2249-2263.

[97] Thirumoorthy N, Shyam Sunder A, Manisenthil Kumar K, *et al*. A Review of Metallothionein isoforms and their role in pathophysiology. *World Journal of Surgical Oncology*, 2011, 9: 54.

[98] Manso Y, Adlard PA, Carrasco J, *et al*. Metallothionein and brain inflammation. *J Biol Inorg Chem*, 2011, 16(7): 1103-1113.

[99] Hidalgo J, Aschner M, Zatta P, *et al*. Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system. *Brain Research Bulletin*, 2001, 55 (2): 133-145.

[100] West AK, Hidalgo J, Eddins D, *et al*. Metallothionein in the central nervous system: Roles in protection, regeneration and cognition. *Neuro Toxicology*, 2008, 29: 489-503.

[101] Levin E D, Perraut C, Pollard N, *et al*. Metallothionein expression and neurocognitive function in mice. *Physiology & Behavior*, 2006, 87: 513-518.88

[102] Durliat M, Bonneton F, Boissonneau E, *et al*. Expression of metallothionein genes during the postembryonic development of *Drosophila melanogaster*. *Biometals*, 1995, 8: 339-351.

[103] Hensbergen P J, van Velzen M J, Nugroho R A, *et al*. Metallothionein-bound cadmium in the gut of the insect *Orchesella cincta* in relation to dietary cadmiumexposure. *Comp BiochemPhysiol C Toxicol Pharmacol*, 2000, 125: 17-24.

[104] Molto E, Bonzon-Kulichenko E, del Arco A, *et al*. Cloning, tissue expression and metal inducibility of an ubiquitous metallothionein from *Panulirus argus*. *Gene*, 2005, 361: 140-148.

[105] Maremanda K P, Khan S, Jena G. Zinc protects cyclophosphamide-induced testicular damage in rat: Involvement of metallothionein, tesmin and Nrf2. [*Biochemical and Biophysical Research Communications*](http://www.sciencedirect.com/science/journal/0006291X), 2014, 41 (3): 591-596.

[106] Xiang D F, Zhua J Q, Jin S, *et al*. Expression and function analysis of metallothionein in the testis of *Portunus trituberculatus* exposed to cadmium. *Aquatic Toxicology*, 2013, 140-141: 1-10.

[107] Vasak M. Metal removal and substitution in vertebrate and invertebrate metallothioneins. [*Methods Enzymol*](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Metal%2Bremoval%2Band%2Bsubstitution%2Bin%2Bvertebrate%2Band%2Binvertebrate%2Bmetallothioneins), 1991, 205: 452-458.

[108] Rhee J S, Rais uddin S, Hw ang D S, *et al*. Differential expression of metallothionein (MT) gene by tracemetals and endocrine disrupting chemicals in the hermaphroditic mangrove killifish, *Kryptolebias marmoratus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2009, 72( 1): 206-212.

[109] Brulle F, Mitta G, Cocquerelle C, *et al*. Cloning and real-time PCR testing of 14 potential biomarkers in *Eisenia fetida* following cadmium exposure. *Environ Sci Technol*, 2006. 40: 2844-2850.

[110] Usha B, Venkataraman G, Parida A. Heavy metal and abiotic stress inducible metallothionein isoforms from *Prosopis juliﬂora* (SW) D. C. show differences in binding to heavy metals in vitro. *Mol Genet Genomics*, 2009, 281: 99-108.

[111] Branislav Ruttkay-Nedecky. The Role of Metallothionein in Oxidative Stress. *In J Mol Sci*, 2013, 14: 6044-6066.

*[112]* Guo WJ, Bundithya W, Goldsbrough PB. Characterization of the *Arabidopsis*

Metallothionein gene family: tissue-speciﬁc expression and induction during

89

Senescence and in response to copper. *New Phytol*, 2003, 159: 369-381.

[113] Akashi K, Nishimura N, Ishida Y, *et al*. Potent hydroxyl radical scavenging activity of drought -induced type-2 metallothionein in wild watermelon. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 323: 72-78.

[114] Enger M D; Tesmer J G, Travis G L, *et al*. Clonal variation of cadmium response in Human -tumor cell-lines. *Am J Phys*, 1986, 250: 256-263.

[115] Masters BA, Kelly EJ, Quaife C J, *et al*. Targeted disruption of metallothionein-I and metallothionein-II genes increases sensitivity to cadmium. *Proc Natl Acad Sci* USA, 1994, 91: 584-588.

[116] Carpene E, Andreani G, Isani G. Metallothionein functions and structural characteristics. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2007, 21: 35-39.

**[117]** Won E J, Rhee J S, Ra K, *et al*. Molecular cloning and expression of novel metallothionein (MT) gene in the polychaete *Perinereis nuntia* exposed to metals. *Environ Sci Pollut Res*, 2012, 19: 2606-2618**.**

[118] Sato M, Kondoh M. Recent studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals. [*The Tohoku Journal of Experimental Medicine*](http://europepmc.org/search?page=1&amp;query=ISSN%3A%220040-8727%22&amp;restrict=All%2Bresults), 2002, 196 (1): 9-22.

[119] Tang T, Huang DW, Zhang D, *et al*. Identiﬁcation of two metallothionein genes and their roles in stress responses of *Musca domestica* toward hyperthermy and cadmium tolerance. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 2011, 160: 81-88.

[120] Liu YP, Liu J, Iszard MB, *et al*. Transgenic mice that overexpress metallothionein-I are protected from cadmium lethality and hepatotoxicity. *Toxico Appl Pharmacol*, 1995, 135: 222-228.

[121] Thiele DJ, Walling MJ, Hamer DH. Mammalian metallothionein is functional in yeast. *Science*, 1986, 231: 854-856.

[122] Yang J, Wang Y, Liu G, *et al*. *Tamarix hispida* metallothionein-like ThMT3, a reactive oxygen species scavenger, increases tolerance against Cd2+, Zn2+, Cu2+ and NaCl in transgenic yeast. *Mol Biol Rep*, 2011, 38 (3): 1567-1574.

[123] Zhu KY, Gao JR, Starkey SK. Organophosphate resistance mediated by alterations

90

Of acetylcholinesterase in resistant clone of the greenbug, *Schizaphis graminum*

(Homoptera: Aphiditae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2000, 68: 138-147.

[124] Osman OS, Selway JL, Kepczynska MA, *et al*. A novel automated image analysis method for accurate adipocyte quantification. *Adipocyte*, 2002, 3: 160-164.

[125] Wilczek G, Kramarz P, Babczyńska A. Activity of carboxylesterase and glutathione S-transferase in different life-stages of carabid beetle (*Poecilus cupreus*) exposed to toxic metal concentrations. *Comp Biochem Physiol*, *Part C*, 2003, 134: 501-512.

[126]宗静， 张帆， 孙广志，等. 繁殖寄主对赤眼蜂羧酸酯酶和乙酰胆碱酯酶的影响.

昆虫学报，2000, 43(增刊): 70-76.

[127] Barford D. Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases.

*Trends Bioch Sci*, 1996, 21(11): 407

[128] Bream A S. Laboratory evaluation of heavy metals stress on certain biochemical parameters of the aquatic insect, Sphaerodema urinator Duf. (Hemiptera: Belostomatidae). *Commun Agric Appl Biol Sci*, 2003, 68: 291-297.

[129] Augustyniak M, Babczynska A, Migula P, *et al*. Joint effects of dimethoate and heavy metals on metabolic responses in a grasshopper (*Chorthippus brunneus*) from a heavy metals pollution gradient. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2005, 141: 412-419.

[130] Enayati A A, Ranson H, Hemingway J. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology*, 2005, 14: 3-8.

[131] ZhiBin Xu, XiaoPeng Zou, Ni Zhang, *et al*. Detoxiﬁcation of insecticides, allechemicals and heavy metals by glutathione S-transferase SlGSTE1 in the gut of *Spodoptera litura*. *Insect Science*, 2014, 00: 1-9.

[132] Zheng X Y, Long W M, Guo Y P, *et al*. Effects of cadmium exposure on lipid peroxidation and the antioxidant system in fourth-instar larvae of *Propsilocerus akamusi* (Diptera: Chironomidae) under laboratory conditions. *Journal of Economic Entomology*, 2011, 104: 827-832.

[133] Salazar-Medina A J, Garcia-Rico L, Garcia-Orozco, K D, *et al*. Inhibition by Cu2+ and Cd2+ of a mu-class glutathione S-transferase from shrimp Litopenaeus vannamei. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2010, 24: 218-222.

[134]刘耀明， 杨慧敏， 张育平，等. 镉和铬急性染毒对中华稻蝗解毒酶和多酚氧化酶

91

的影响. 农业环境科学学报, 2013, 32(7): 1321-1327.

[135] Mireji P O, Keating J, Hassanali A, *et al*. Expression of metallothionein and alpha-tubulin in heavy metal-tolerant *Anopheles gambiae* sensu stricto (Diptera: Culicidae). E*cotoxicol Environ Saf*, 2010, 73: 46-50.

[136] Mario H Perez, Fernando G Noriega. *Aedes aegypti* pharate 1st instar quiescence affects larvalﬁtness and metal tolerance. *Journal of Insect Physiology*, 2012, 58: 824-829.

[137] Badiou-Beneteau A, Bennev eau A, Geret F, *et al*. Honeybee biomarkers as promising tools to monitor environmental quality. *Environ. Int*, 2013, 60: 31-41.

[138] Adrian K West, Juan Hidalgo, Donnie Eddins. Metallothionein in the central nervous system: Roles in protection, regeneration and cognition. *NeuroToxicology*, 2008, 29: 489-503

[139] Egli D, Domenach J, Selvaraj A, *et al*. The four members of the *Drosophila* metallothionein family exhibit distinct yet overlapping roles in heavy metal Homeostasis and detoxification. *Genes Cells*, 2006a, 11: 647-658.

[140] Swain S C, Keusekotten K, Baumeister R, *et al*. C. elegans metallothioneins: new insights into the phenotypic effects of cadmium toxicosis. *J Mol Biol*, 2004, 341: 951-959.

[141] Palmiter R D. Regulation of metallothionein genes by heavy metals appears to be mediated by a zinc-sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active transcription factor, MTF-1. *Proc Natl Acad Sci*, USA, 1994, 91:1219-1223.

[142] Moulis ean-Marc. Cellular mechanisms of cadmium toxicity related to the

Homeostasis of essential metals. *Biometals*, 2010, 23: 877-896.

[143] Wong C P, Ho E. Zinc and its role in age-related inflammation and immune dysfunction. *Mol Nutr Food Res*, 2012. 56: 77-87.

[144] Kafel A, Rozpedek K, Szulinska E. Zawisza-Raszka, *et al*. The effects of cadmium or zinc multigenerational exposure on metal tolerance of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ. Sci. Pollut. Res*, 2014. 21: 4705-4715.

[145] Estela L Arrese, Jose L Soulages. Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. *Annu Rev Entomol*, 2010. 55: 207-225.

[146] Odunayo Ibraheem Azeez, Roy Meintjes, Joseph Panashe Chamunorwa. Fat body,

92

Fat pad and adipose tissues in invertebrates and vertebrates: the nexus. *Lipids in Health and Disease*, 2014, 13: 71.

[147] Ana Maria Costa-Leonardo, Lara Teixeira Laranjo, Vanelize Janei, *et al*. The fat body of termites: Functions and stored materials. *Journal of Insect Physiology*, 2013, 59: 577-587.

[148] Takashige Kawakami, Hiroyuki Sugimoto, Rie Furuichi, *et al*. Cadmium reduces adipocyte size and expression levels of adiponectin and Peg1/Mest in adipose tissue. *Toxicology*, 2010, 267: 20-26.

[149] Takashige Kawakami, Kaori Nishiyama, Yoshito Kadota, *et al*. Cadmium modulates adipocyte functions in metallothionein-null mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2013, 272: 625-636.

[150] Sorisky A, Magun R, Gagnon AM. Adipose cell apoptosis: death in the energy depot.

*Int J Obes Relat Metab Disord*, 2000, 24: S3-7.

[151] Julian A T Dow, Shireen A Davies. The Malpighian tubule: Rapid insights from post-genomic biology. *Journal of Insect Physiology*, 2006, 52: 365-378.

[[152] Martini SV](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Martini%20SV%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17401478)1, [Nascimento SB](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Nascimento%20SB%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17401478), [Morales MM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Morales%20MM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17401478). *Rhodnius prolixus* Malpighian tubules and control of diuresis by neurohormones. [*An Acad Bras Cienc*,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17401478) 2007, 79(1): 87-95.

[153] M Helena Vasconcelos, Shuk-Ching Tam, John E. Hesketh, *et al*. Metal- and Tissue

-Dependent Relationship between Metallothionein mRNA and Protein. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2002, 182: 91-97.

[154] Wessing A, Zierold K, Hevert F. Two types of concretions in *Drosophila* Malpighian tubules as revealed by X-ray microanalysis: a study on urine formation. *J Insect Physiol*, 1992, 38: 543.

[155] Joe Miller, Thomas Chi, Pankaj Kapahi, *et al*. *Drosophila Melanogaster* as an Emerging Translational Model of Human Nephrolithiasis. *Journal of Urology*, 2013, 190(5): 1648-1656.

[156] Y P Zhang, D N Song, H H Wu, *et al*. Effect of Dietary Cadmium on the Activity of Glutathione S-Transferase and Carboxylesterase in Different Developmental Stages of the *Oxya chinensis* (Orthoptera: Acridoidea). *Environmental Entomology*, 2014, 43(1): 171-177.

[157]张育平， 孙鸽， 王跃， 等.重金属镉和铬在中华稻蝗(*Oxya chinensis*)体内的组织

93

分布. 农业环境科学学报, 2011, 12: 2440-2445.

[158] Tellam LR, Eisemann, C, Casu R, *et al*. The intrinsic peritrophic matrix protein peritrophin-95 from larvae of *Lucilia cuprina* is synthesised in the cardia and regurgitated or excreted as a highly immunogenic protein. *Insect Biochem Mol Biol*, 2000, 30: 9-17.

[159] Carlos Ribeiro, Michel Brehelin. Insect haemocytes: What type of cell is that?

*Journal of Insect Physiology*, 2006, 52: 417-429.

[160] El-Sayed H Shaurub, Afaf Abd El-Meguid, Nahla M Abd El-Aziz. Quantitative and Ultrastructural changes in the haemocytes of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) treated individually or in combination with *Spodoptera littoralis* multicapsid nucleopolyhedro- virus (SpliMNPV) and azadirachtin. *Micron*, 2014, 65: 62-68.

[161] Barbara Manachini, Vincenzo Arizza, Daniela Parrinello, *et al*. Hemocytes of *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae) and their response to *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2011, 106: 360-365.

[162] Ling E, Fukamoto K, Xu S, *et al*. Regeneration of hemopoietic organs in the silkworm, *Bombyx mori*, after locally targeted irradiation with heavy ion beams. J Insect. *Biotechnol Sericol*, 2003a, 72: 95-100.

[163] Dean P, Potter U, Richards EH, *et al*. Hyperphagocytic haemocytes in *Manduca sexta*. *J Insect Physiol*, 2004, 50: 1027-1036.

[164] Meister M, Lagueux M. *Drosophila* blood cells. *Cell Microbiol*, 2003, 5: 573-580.

*[165]* Erjun Ling, XiaoQiang Yu. Hemocytes from the tobacco hornworm *Manduca sexta*

Have distinct functions in phagocytosis of foreign particles and self dead cells.

*Developmental and Comparative Immunology*, 2006, 30: 301-309

[166] F A Brayner, H R C Arau joa, M G S Cavalcanti, *et al*. Ultrastructural characterization of the hemocytes of *Culex quinquefasciatus* (DIPTERA: Culicidae). *Micron*, 2005, 36: 359-367.

[167] Chapman R F, The Insect: Structure and Function. CambridgeUniversity Press. 1998.

[168] Yamashita M, Iwabuchi K. *Bombyx mori* prohemocyte division and differentiation in individual microcultures. *J Insect Physiol*, 2001, 47: 4-5.

94

[169] Erin M. Leonard, Laura M. Pierce, *et al*. Cadmium transport by the gut and Malpighian tubules of *Chironomus riparius*. *Aquatic Toxicology*, 2009, 92: 179-186.

[170] Dow J A T, Insect midgut function. *Adv Insect Physiol*, 1986,19: 187-328.

[[171] A G Spies](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0040816685900564), [K D Spence](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0040816685900564). Effect of sublethal Bacillus thuringiensis crystal endotoxin treatment on the larval midgut of a moth, *Manduca*: SEM study. [*Tissue and Cell*](http://www.sciencedirect.com/science/journal/00408166), 1985, [17:](http://www.sciencedirect.com/science/journal/00408166/17/3) 379-391.

[[172] Blackburn M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Blackburn%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9687470) 1, [Golubeva E](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Golubeva%20E%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9687470), [Bowen D](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Bowen%20D%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9687470), *et al*. A novel insecticidal toxin from photorhabdus luminescens, toxin complex a (Tca), and its histopathological effects on the midgut of *manduca sexta*. [*Appl Environ Microbiol*,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9687470) 1998, 64(8): 3036-3041.

[173]吴国星， 高熹， 叶恭银， 等. 取食重金属铜对棕尾别麻蝇亲代及子代生长发育

与繁殖的影响. 昆虫学报, 2007, 10: 1042-1048.

[174] Cervera A, Maym A C, Sendra M, *et al*. Cadmium effects on development and reproduction of *Oncopeltus fasciatus* ( Heteroptera: Lygaeidae). *J Insect Physiol*, 2004, 8: 737-749.

[175] Barbara L. Barbeta, Alan T. Marshall, Amanda D. Gillon, *et al*. Plant cyclotides disrupt epithelial cells in the midgut of lepidopteran larvae. *PNAS*, 2007, 105(4): 1221-1225.

[176] Z Y Nangong, QY Wang, P Song, *et al*. Histopathological effects of the protein toxin from *Xenorhabdus nematophla* on the midgut of *Helicoverpa armigera*. *Agric Sci China*, 2006, 5: 685-690.

[177] Ryerse J S, Purcell J P, Sammons R D, *et al*. Peritrophic membrane structure and formation in the larva of a moth, *Heliothis*. [*Tissue and Cell*](http://www.sciencedirect.com/science/journal/00408166), 1992, [24(5)](http://www.sciencedirect.com/science/journal/00408166/24/5): 751-771.

[178] Carlini C R, Grossi-de-Sa M F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, 2002, 40: 1515-1539.

[179] Postma J F, van Nugteren P, Buckert-de Jong B, Increased cadmium excretion in metal-adapted populations of the midge *Chironomus riparius* (Diptera). *Environ Toxicol Chem*, 1996, 15: 332-339.

[180]徐崇利， 杨梅， 许崇波.大肠杆菌表达系统的影响因素. 中国动物检疫, 2010，

27(8): 66-68.

[181]戎晶晶，刁振宇，周国华. 大肠杆菌表达系统的研究进展. 药物生物技术, 2005, 12(6)：416-420.

95

[182] Suzuki S M, Stevens R C. Engineering Human PON1 in an *E. coli* Expression System. *Adv Exp Med Biol*, 2010, 660: 37-45.

[183]吴乃虎. 基因工程原理. 第二版， 北京科学出版社, 2001, 117-119.

[184] Amit Kumar Chaturvedi, Avinash Mishra, Vivekanand Tiwari, *et al*. Cloning and analysis of type 2 metallothionein gene (*SbMT-2*) from extreme halophyte

*Salicornia brachiata* and its heterologous expression in *E. coli*. *Gene*, 2012, 499: 280-287.

[185] Lee J, Shim D, Song W Y, *et al*. *Arabidopsis* metallothioneins 2a and 3 enhance resistance to cadmium when expressed in Vicia fabaguard cells. *Plant Mol Biol*, 2004, 54(6): 805- 815.

[186] Zhang HY, Xu WZ, Dai WT, *et al*. Functional characterization of cadmium- responsive garlic gene *AsMT2b*: A new member of MT family. *Chinese Science Bulletin*, 2006, 51(4): 409-416.

[187] Saira Dar, Rukhsana N Shuja, Abdul Rauf Shakoori. A synthetic cadmium metallothionein gene (*PMCd1syn*) of *Paramecium species*: expression, puriﬁcation and characteristics of metallothionein protein. *Mol Biol Rep*, 2012, 10(4): 399-419.

[188] Huang G Y, Wang Y S, Ying G G. Cadmium-inducible *BgMT2*, a type 2 metallothionein gene from mangrove species (*Bruguiera gymnorrhiza*), its encoding protein shows metal-binding ability. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2011, 405:128-132.

[189] Joseﬁne Nymark Hegelund, Michaela Schiller, Thomas Kichey, *et al*. Barley Metallothioneins: *MT3* and *MT4* are Localized in the *Grain Aleurone* Layer and Show Differential Zinc Binding. *Plant Physiology*, 2012, 159: 1125-1137.

[190] Yang J, Wang Y, Liu G, *et al*. *Tamarix hispida* metallothionein-like ThMT3, a reactive oxygen species scavenger, increases tolerance against Cd2+, Zn2+, Cu2+ and NaCl in transgenic yeast. *Mol Biol Rep*, 2011, 38 (3): 1567-1574.

[191] Palacios O, Atrian S, Capdevila M. Zn-and Cu-thioneins: a functional classification for metallothioneins*JBiolInorgChem*, 2011, 16(7): 991-1009.

[192] Capdevila M, Bofill R, Palacios O, *et al*. State-of-the-art of metallothioneins at the beginning of the 21st century. *Coordin Chem Rev*, 2012, 256(1-2): 46-62.

[193] Wierzbicka, M. The effect of lead on the ultrastructure changes in the root tip of

96

Onion. *Cytobiology*, 1986, 24: 340-341.

[194] Fridovich I. Superoxide dismutase. *Annu Rev Biochem*, 1975, 44: 147-159.

[195] Zhang YX, Zhang LP. Effects of antioxidant enzymes activities in *hordeum vulgar* seedling under Cd2+, Pb2+, Hg2+, Ni2+ stresses. *J Agro-Environ Sci*, 2005, 24, 217-221.

[196] Boru Zhou, Wenjing Yao, Shengji Wang, *et al*. The Metallothionein Gene, *TaMT3*, from *Tamarix androssowii* Confers Cd2+ Tolerance in Tobacco. *Int J Mol Sci*, 2014, 15:10398-10409.

[197] Armida Torreggiani, Chryssostomos Chatgilialoglu, Carla Ferreri, *et al*. Non- enzymatic modifications in metallothioneins connected to lipid membrane damages: Structural and biomimetic studies under reductive radical stress. *Journal of proteomics*, 2013, 92: 204-215.

97

### 攻读学位期间的研究成果

1) Liu Yaoming, Wu Haihua, Kou Lihua, Liu Xiaojian, Zhang Jianzhen, Guo Yaping, Ma Enbo. 2014. Two Metallothionein Genes in *Oxya chinensis*: Molecular Characteristics, Expression Patterns and Roles in Heavy Metal Stress. *PLoS ONE*. 9, (11) e112759.

2) Yaoming Liu, Haihua Wu, Zhitao Yu, Yaping Guo, Jianzhen Zhang, Kun Yan Zhu, Enbo

Ma. 2015. Effects of three heavy metals on two metallothioneins mRNA expression and tissue histology in *Oxya chinensis* (Orthoptera: Acridoidea). *Chemosphere*.

3）Yuping Zhang, Yaoming Liu, Jianzhen Zhang, Yaping Guo, Enbo Ma. 2015. Molecular characteristics of four heat shock protein genes in *Oxya chinensis* and their response to Cd stress. *PLoS ONE*.

4））Lihua Kou, Haihua Wu, Yaoming Liu, Xiaojian Liu, Taoli, Xueyao Zhang, Jianzhen

Zhang, Yaping Guo, Enbo Ma. 2015. Molecular characterization of six small heat shock proteins and their responses under cadmium stress in *Oxya chinensis*. Environmental Entomology.

5）刘耀明， 余志涛， 朱文雅， 李亚红， 郭亚平， 张建珍， 吴海花， 马恩波. 2015. 三种

重金属对中华稻蝗金属硫蛋白基因表达的影响. 农业环境科学学报. 34(2)：277-232.

6）刘耀明， 杨慧敏， 张育平， 吴海花， 张建珍， 马恩波， 郭亚平, 2013。 镉和铬急性染

毒对中华稻蝗解毒酶和多酚氧化酶的影响. 农业环境科学学报. 32(7)：1321-1327.

7）寇利花，吴海花，刘耀明，张育平， 张建珍， 郭亚平， 马恩波, 2015。 镉急性染毒对中华稻蝗精卵巢小分子热休克蛋白基因表达的影响. 34(1)：7-14.

8）郭媛， 刘耀明， 邵有全.密林熊蜂雄性成蜂生殖系统发育动态. 2012. 昆虫学报.

55(11): 1322-1330.

9）发明专利. 一种生物解剖蜡盘及其制作方法. 刘耀明，张小民， 吴海花， 马恩波，郭亚平. ft西大学. 申请号：201410674090。公开号：CN104356656A.

98

致谢

5月春末夏初ft西大学校园里绿树成荫花香四溢杨柳飘絮从2008年9月到2015年6月近7年时光不长不短刚刚好回想在ft西大学7年来的诸多往事记忆犹新感触深切收获更多

完成了博士学位论文结束了硕博连读的时光此时此刻百感交集

7年来，家人、师长、同学和朋友给予我太多的照顾，给予我坚持的动力和希望，我衷心感谢大家通过各种形式对我的关心、鼓励、支持和帮助！

感谢我的父母和家人长期以来对我无私的支持和关心！多年来，我的父母付出太多的关爱和支持。

感谢我的导师马恩波教授和郭亚平副教授，硕博连读的7年间，从论文选题、实验设计，到分析讨论是在他们的悉心指导下完成的，科研上的进步和成果凝聚了他们关怀和付出的心血。他们对科学研究严谨认真的态度和精益求精的精神，感染和教育了我。他们在思想上和生活上也给予我关心和帮助，这样的关心是师如母。

感谢美国堪萨斯州立大学朱坤炎教授、应用生物生物学研究所张建珍教授和吴海花副教授，他们在我博士期间的实验过程、论文写作、修改以及投稿过程中给我的热情无私的帮助和指导，使我的科研工作得以顺利完成直到毕业。他们对科学问题的高度把握和独到见解，总能给予我指明正确的方向，他们对科研的热情是我学习的榜样。

感谢应用生物学研究所各位老师和2008年以来在应用生物学研究所学习过的所有师弟师妹们，有你们的热情帮助，我的实验中多了一份乐趣并得以顺利进行。

硕博期间的科研工作是艰苦的，不仅仅需要个人全身心的投入，更需要强大的充满激情和活力的团队协作。应用生物学研究所师生形成的团队，具有活跃的学术气氛，相互帮助的热情和积极向上的活力。有大家的陪伴，我得到的不仅仅是学历，还有更重要的友谊，于我，这才是此生最真最重的收获！

刘耀明

2015年6月.

99

### 个人简 介

**姓名**：刘耀明，男，ft西省柳林县人。

**教育及工作背景**：

2008.9-2015.6，ft西大学生命科学学院动物学专业硕博连读，获理学博士学位

2005.6-2008.8，ft西省农业科学院园艺研究所蜜蜂研究室工作

2001.9-2005.6，福建农林大学蜂学学院，蜂学专业本科，获农学学士学位

**联系电话：**18734812885

**电子邮箱：**[liuyaoming1022@163. com](mailto:liuyaoming1022@163.com)

100

### 承诺 书

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是在导师指导下独立完成的，学位论文的知识产权属于ft西大学。如果今后以其他单位名义发表与在读期间学位论文相关的内容，将承担法律责任。除文中已经注明引用的文献资料外，本学位论文不包括任何其他个人或集体已经发表或撰写过的成果。



101

### 学位论文使用授权声明

本人完全了解ft西大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留并向国家有关机关或机构送交论文的复印件和电子文档，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等手段保存、汇编学位论文。同意ft西大学可以用不同方式在不同媒体上发表、传播论文的全部或部分内容。

保密的学位论文在解密后遵守此协议。



102