

昆虫谷胱甘肽 S-转移酶的基因结构及其表达调控

陈凤菊, 高希武*

(中国农业大学昆虫学系, 北京 100094)

摘要: 谷胱甘肽 S-转移酶 (glutathione S-transferases, GSTs) 属于一个超家族, 目前已从 20 多种昆虫中克隆得到了近百个 GSTs 基因序列。这些基因分属于至少 3 个类别, I (Delta) 类, II 类和 III (Epsilon) 类, 其中 I 类和 III 类是昆虫特异性的类别。昆虫 I 类 GSTs 基因通常由多基因家族编码, 基因多态性在不同昆虫种类中差异很大。II 类基因的种类较少, 基因的结构较简单, 通常是单拷贝基因。III 类基因是最近才鉴定出来的新类别, 目前仅在黑腹果蝇和冈比亚按蚊中明确了其在染色体上的定位。基因簇、可变剪接和基因融合等机制是导致昆虫 GSTs 基因多态性的主要原因。在抗性昆虫种群中, GSTs 表达量的增加有 mRNA 水平的提高和基因扩增两种机制, 但后一种机制的报道很少。GSTs 活性的增加是由于属于一类或多类的多个同工酶的增量调控, 也有少数是由于单个同工酶的增量调控。GSTs 的表达受反式调控元件和顺式调控元件的调控。目前仅有少数含有调节基因的染色体大致位点和可能的调控元件得到鉴定。

关键词: 谷胱甘肽 S-转移酶; 昆虫; 基因结构; 表达调控

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2005)04-0600-09

Gene structure and expression regulation of glutathione S-transferase genes in insects

CHEN Feng-Ju, GAO Xi-Wu* (Department of Entomology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: The glutathione S-transferases (GSTs) belong to a superfamily in which almost 100 sequences have been identified from more than 20 species of insects. All the GST genes belong to at least 3 classes, I (Delta) class, II class and III (Epsilon) class, among which I and III are insect-specific class. Genes in GST class I are usually encoded by multigene family and the complexity in different species of insects are variable. Fewer genes in GST class II are reported; their genomic organization is simple, generally having only one copy. Class III are newly identified class and their genomic organization is only clear in *Drosophila melanogaster* and *Anopheles gambiae*. Mechanisms of gene cluster, alternative-splicing and gene fusion are involved in generating multiple functional GST genes. There are two molecular mechanisms for increased expression of GSTs in resistant insects: elevation in mRNA level and gene amplification while the latter is rarely reported. Elevation of GST activity is involved in upregulation of multiple enzymes belonging to one more GST classes or more rarely upregulation of a single enzyme. The expression is regulated by *trans*-acting regulators and *cis*-acting regulating elements. So far only a few crude chromosomal locations which should contain these regulatory genes and some putative regulatory elements have been identified.

Key words: Glutathione S-transferase; insect; gene structure; expression regulation

谷胱甘肽 S-转移酶 (glutathione S-transferases, GSTs; EC2.5.1.18) 是催化还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 与各种亲电子化合物进行亲核加成反应的一类酶 (Nay *et al.*, 1999)。它们在生物体内广泛分布, 而且几乎所有的生物体内都有多种同工酶, 每个同工酶都是由同源或异源的亚基组成的

二聚体蛋白。GSTs 的功能非常多样, 主要表现为以下 3 个方面: 1) 对异源有毒物质解毒; 2) 保护细胞免受氧化损伤; 3) 对激素、内源代谢物和外源化合物进行细胞间运输 (Feng *et al.*, 1999)。GSTs 活性最早是在大鼠中发现的 (Boyland and Sims, 1961), 后来发现它们对药物的生物转化起重要作用

基金项目: 国家重点基础研究发展规划“973”项目 (G200016207) / 国家自然科学基金项目 (30170621, 39970496)

作者简介: 陈凤菊, 女, 1976 年生, 博士, 昆虫毒理学专业, E-mail: chfengju@sohu.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: gaoxiwu@263.net.cn

收稿日期 Received: 2004-07-18; 接受日期 Accepted: 2004-11-08

(Matsumura, 1985), 因此对哺乳动物特别是大鼠 GSTs 的研究最多也最为深入, 这为其他生物 GSTs 的研究提供了不少借鉴和启发(Kostaropoulos *et al.*, 1996)。关于高等动物 GSTs 的生化特性、诱导特性、结构与功能的关系以及基因结构和表达调控已有一些研究综述(Rushmore and Pickett, 1993; Daniel, 1993; Hayes and Pulford, 1995; Eaton and Bammler, 1999; Coughlin and Hall, 2002; Townsend and Tew, 2003; Valles *et al.*, 2003; Rauch and Nauen, 2004)。

近年来, 对于非哺乳动物如植物、细菌、线虫和昆虫的 GSTs 的研究报道越来越多。Sheehan 等(2001)对非哺乳动物 GSTs 基因家族的结构、功能和进化进行了综述, 其中包括昆虫 GSTs。对昆虫 GSTs 的研究主要集中于其在杀虫剂抗性中的作用。在对有机磷、有机氯和拟除虫菊酯类杀虫剂产生抗性的昆虫中发现 GSTs 的活性增加(Fournier *et al.*, 1992; Grant and Hammock, 1992; Kostaropoulos *et al.*, 2001; Vontas *et al.*, 2001)。有关昆虫 GSTs 的生化特性以及诱导与抗性的关系已有一些综述(Yu, 1996; 陈凤菊和高希武, 2002; 吕敏等, 2003)。

近几年来, 分子生物学手段成为研究昆虫 GSTs 与杀虫剂抗性关系的主要工具。大量的 GSTs 基因得到克隆和鉴定, 特别是果蝇和按蚊基因组序列的测序完成(Aultman *et al.*, 2002; Holt *et al.*, 2002), 使 GSTs 的基因数目激增。目前已从 20 多种昆虫中克隆得到近百个 GSTs 基因序列。它们分属于至少 3 个类别。另外, 昆虫 GSTs 基因的表达调控也取得了初步的进展。其中双翅目昆虫 GSTs 基因水平的研究报道最多, 其次是鳞翅目昆虫, 其他种类的研究很少。对于昆虫 GSTs 基因的结构和表达, 唐振华和吴士雄(2000)、Hemingway(2000)以及唐振华和毕强(2003)曾经进行过比较全面的综述。但该领域的研究进展非常快, 本文主要对昆虫 GSTs 的基因结构和表达调控的最新进展进行综述。

1 昆虫 GSTs 基因的种类

GSTs 是一个复杂的广泛分布的超家族, 根据氨基酸残基/核酸序列、免疫特性、酶动力学和三/四级结构特性等标准分成多个类别(Sheehan *et al.*, 2001), 而且随着大规模 EST 和全基因组测序项目的启动, 不断有新的类别被发现(Ding *et al.*, 2003)。

目前哺乳动物中发现了 8 类细胞质 GSTs 亚基(Alpha、Mu、Pi、Theta、Sigma、Zeta、Kappa 和 Omega) 和 1 类微粒体 GSTs 亚基。

与哺乳动物一样, 多数昆虫含有多个 GSTs 基因序列。以冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 为例, 已克隆得到的 GSTs 基因达 28 个, 它们在基因组中的排列也已经清楚(Ding *et al.*, 2003)。起初昆虫 GSTs 基因通常被分成免疫上不同的 2 类(I 类和 II 类)(Fournier *et al.*, 1992; Franciosa and Berg, 1995; Hemingway, 2000), 但最近又发现 1 类新的昆虫 GSTs 基因(III 类)(Ranson *et al.*, 2001)。所以现在被明确划分的昆虫 GSTs 基因有 3 类: I 类、II 类和 III 类。另外, 在昆虫中, 也发现了微粒体 GSTs 或微粒体 GSTs 类似基因。本文所涉及的均为细胞质 GSTs 基因。

近年来, 对昆虫 GSTs 基因的命名采用 Chelvanayagam 等(2001)提出的哺乳动物和昆虫普遍适用的命名系统。以前认为 I 类 GSTs 基因与哺乳动物的 Theta 类近似(Pemble and Taylor, 1992; Wilce *et al.*, 1995; Ranson *et al.*, 1997) 现被划分为昆虫特异性的 Delta 类(Board *et al.*, 1997)。II 类 GSTs 基因的研究较少, Snyder 和 Maddison(1997)认为与 Sigma 类相似。Ranson 等(2001)系统分析的结果则表明昆虫 II 类 GSTs 基因包括 Theta、Sigma、Omega 和 Zeta 类。因此可以将现有的分类系统应用到昆虫, 即 I 类 GSTs 基因归为 Delta 类, II 类则归为 Omega/Zeta/Sigma/Theta 类(Sheehan *et al.*, 2001)。III 类 GSTs 基因是昆虫特异性的, 称为 Epsilon 类。除了这 3 大类以外, Ranson 等(2001)认为昆虫中还存在其他第 4 类 GSTs 基因, 它们都是来自果蝇基因组数据库的基因序列, 但这些基因的生物活性还没有得到鉴定。冈比亚按蚊中也存在其他的 GSTs 基因类别有待进一步鉴定(Ding *et al.*, 2003)。

2 昆虫 I 类(Delta 类) GSTs 基因的结构及其多态性

昆虫 I 类 GSTs 基因的种类最多, 基因的结构也最为清楚。它们通常是由多基因家族编码, 基因的多态性在不同昆虫种类中差异较大。

果蝇的 Delta 类 GSTs 基因以前被称为 *GSTD* 基因家族, 位于果蝇多线染色体 3R 的 87B11 ~ 87B13

区,在约 18 kb 的 DNA 片段内紧密连锁。目前发现这个基因家族有 10 个方向不同的无内含子基因 (Toung *et al.*, 1993; Ranson *et al.*, 1997; Sawicki *et al.*, 2003), 但 Lougarre 等 (1999) 发现果蝇中的 7 个 *GSTD* 家族的无内含子基因在 5' 非翻译区存在内含子。按照最新的命名系统, 这 10 个基因分别被命名为 *DmGSTD1* ~ *DmGSTD10*。其中 *DmGSTD3* 和 *DmGSTD7* 的结构非常特殊。*DmGSTD7* 在 N 端比其他序列延长 47 个氨基酸残基, 在 C 端却少了约 50 个氨基酸残基, 而 *DmGSTD3* 在 N 端少了 15 个氨基酸残基, 因此以前它们被认为是假基因, 即不表现任何功能。但 Sawicki 等 (2003) 的最新研究结果表明可以检测到它们的转录本, 它们在大肠杆菌中的表达产物也具有酶活性, 证明它们可能是功能基因。*DmGSTD1*、*DmGSTD9* 和 *DmGSTD10* 位于一条 DNA 链上, 而其余的 7 个基因位于另一条链上。Ding 等 (2003) 从果蝇的基因组中鉴定出第 11 个可能的 Delta 类 GSTs 基因 (CG17639), 位于 *DmGSTD8* 的下游, 与 *DmGSTD8* 的方向相同, 与冈比亚按蚊的 *GSTd7* 同源。

已知冈比亚按蚊的 I 类 GSTs 基因有 12 个 (Ranson *et al.*, 1998; Abdallah *et al.*, 2000; Ranson *et al.*, 2001; Ortelli *et al.*, 2003; Ding *et al.*, 2003)。这 12 个基因位于两个紧密相连的基因簇上, 分别在染色体 2R 上的 18B 和 19D 区。其中 *GSTd1* (*Aggst1a*) 为可变剪接基因, 由 6 个外显子组成, 其中 5 个为编码外显子。编码 5' 端的外显子 (exon2) 是相同的, 它与 4 个不同的编码 3' 端的外显子 (3A、3B、3C 和 3D) 通过可变剪接生成 4 个不同的转录本。在冈比亚按蚊的幼虫、蛹和成虫中, 这 4 种转录本都表达。另外泰国疟疾的媒介昆虫大劣按蚊 *Anopheles dirus* 也有类似的可变剪接机制, 而且基因产物与冈比亚按蚊的相应的基因产物高度同源 (Pongjaroenkit *et al.*, 2001)。果蝇和冈比亚按蚊 Delta 类 GSTs 基因的结构见 Ding 等 (2003)。

家蝇的 I 类 GSTs 基因的结构可能更为复杂 (Pemble and Taylor, 1992; Syvanen *et al.*, 1994; Syvanen *et al.*, 1996; Zhou and Syvanen, 1997)。在家蝇抗性品系 Comell-R 中, 分离了 4 个不同的 I 类 GSTs 基因, 并在大肠杆菌中获得表达 (Wang *et al.*, 1991; Syvanen *et al.*, 1994)。其中 *MdGST-3* 是有机磷杀虫剂抗性的一个主要因子, 而且对林丹也有一定作用。

以一个 650 bp 片段构成的探针筛选该品系的 λ 噬菌体基因组库, 结果获得了 9 个独立的噬菌体克隆。这 9 个克隆带有从 5 个不同基因组区来的家蝇 DNA。其中 4 个基因组区的每个区都带有 *MdGST-3* 序列的多个基因座位。对这些基因座位进行亚克隆并对它们的核苷酸测序, 结果表明它们虽然与 *MdGST-3* 的 cDNA 序列不完全相同, 但 6 个基因是与 *MdGST-3* 相关的 (Syvanen *et al.*, 1996)。种群异质性不能解释如此多种 GSTs 基因, 这是由于在筛选抗性的过程中不仅产生了 *MdGST-3* 基因的扩增作用, 而且还产生了扩增拷贝之间序列的趋异性。

家蝇基因组中还存在一个新的 Theta 类 (Delta 类) GSTs 基因即 *MdGST-5*。在 3 个不同的基因座位上, 还存在融合基因, 它们是由 *MdGST-3* 的 5' 端序列和 *MdGST-4* 或 *MdGST-5* 的 3' 端序列融合而成 (图 1)。融合基因的发现显示 GSTs 基因家族可能有特殊的遗传重组机制。这些基因在 5' 非翻译区相对于开放读框 (ORF) 起始密码子 ATG 的同一位置都有一个内含子。GST-3、GST-4、GST-5 和融合基因的推测基因座位都有一个 CAGCCATG 序列, 其后为 202 ~ 211 个氨基酸残基的 GSTs 开放读框。CAGCC 序列与真核生物内含子 3' 剪接位点的保守序列相近 (Zhou and Syvanen, 1997)。

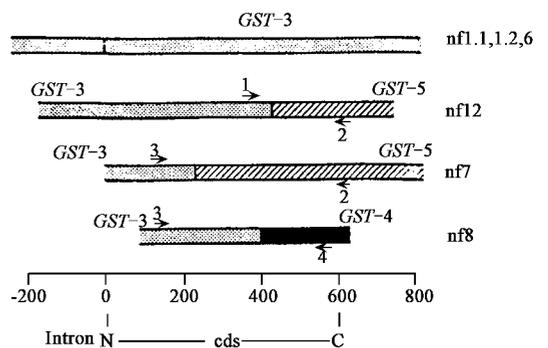


图 1 家蝇谷胱甘肽 S-转移酶 Delta 类融合基因的结构 (Zhou and Syvanen, 1997)

Fig. 1 Structure of fusion genes of Delta class glutathione S-transferases in *Musca domestica* (Zhou and Syvanen, 1997) 箭头指示检测基因组位点时进行 PCR 扩增的引物的位置 Arrows show the locations of primers used in PCR experiments for probing genomic loci; cds: 编码序列 Coding sequence.

3 昆虫 II 类 GSTs 基因的结构

昆虫 II 类 GSTs 基因研究的较少。它们多是单

拷贝基因,在染色体上的结构较为简单。在冈比亚按蚊中, Sigma 类 GSTs 基因 *AgGSTs1* (*Aggst2-1*) 通过可变剪接形成 2 个转录本, *GSTs1-1* 和 *GSTs1-2*。与 *GSTd1* 一样, *GSTs1* 的 2 个转录本 5' 端的外显子相同, 3' 端的外显子不同(在氨基酸残基水平上有 64% 的一致性)。这一基因编码的蛋白与果蝇 *DmGST-2* 有 57% 的同源性。Northern 杂交分析的结果显示 *Aggst2-1* 在幼虫、蛹和成虫中存在许多转录产物。Southern 杂交和原位杂交的结果表明至少有 2 个位点与其 cDNA 互补, 一个位点在染色体臂 3L 的基部, 38~40 区之间; 另一区域, 即染色体臂 21 的 26D 区。这表明有多个基因座位与 *Aggst2-1* 相似 (Reiss and James, 1993)。

黑腹果蝇 GSTs 的 Sigma 类基因也仅有一个,

DmGSTs1 (*DmGST2*), 位于染色体 II 的 53F 区。与果蝇 I 类和 III 类 GSTs 基因不同, *DmGST2* 在编码区存在内含子, 编码一个具有 249 个氨基酸残基的蛋白。该基因的蛋白是由 4 个外显子编码的, 分别编码氨基酸残基 1~90, 91~146, 147~194 和 195~249。该基因在其 N 端还有 46~50 个氨基酸残基, 在大鼠、线虫和 *DmGST1* 序列中都没有此序列 (Beall *et al.*, 1992)。这段 N 端延伸序列不是催化活性所必需的, 但可能在将果蝇的蛋白附着在间接飞行肌的过程中起作用 (Singh *et al.*, 2001)。Southern 杂交的结果显示 *DmGST2* 在果蝇基因组中仅有一个染色体基因座位。冈比亚按蚊和黑腹果蝇 GSTs 的 Sigma 类基因的结构见图 2。

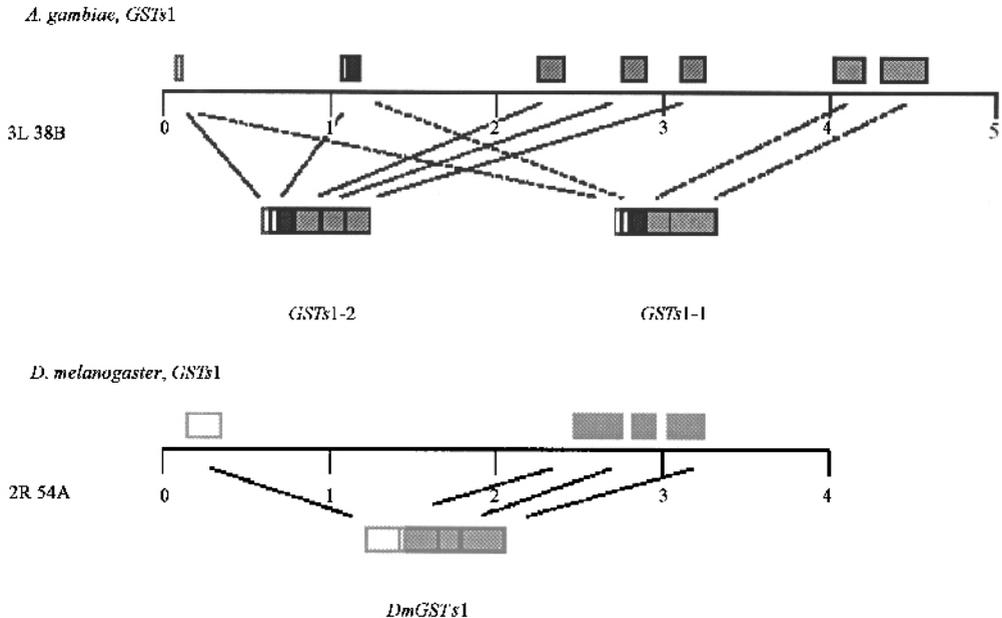


图 2 冈比亚按蚊和黑腹果蝇谷胱甘肽 S-转移酶 Sigma 类基因的结构 (Ding *et al.*, 2003)

Fig. 2 The organisation of the Sigma glutathione S-transferases genes in *A. gambiae* and *D. melanogaster* (Ding *et al.*, 2003)
 直线上的长方形表示不同的外显子 Each rectangle above the scale bar represents a different exon; 无颜色的长方形表示 5' UTR, 有颜色的长方形表示编码区 The empty rectangles indicate 5' UTR regions whilst the rectangles in solid colours are coding sequence; 基因剪接产生的 cDNA 在直线下方 The cDNAs produced by splicing of these genes are shown beneath the scale bar.

另外从鳞翅目昆虫烟草天蛾 *Manduca sexta* 和云杉色卷蛾 *Choristoneura fumiferana* 中各分离出一个 II 类 GSTs cDNA 序列 (*MsGST2* 和 *CfGST2*)。 *MsGST2* cDNA 编码一个 203 个氨基酸残基的蛋白, 推测分子量为 23 596, 等电点为 5.5。 *MsGST2* 序列与家蝇、黑腹果蝇和冈比亚按蚊 II 类 GSTs 基因有 44.8% ~ 50.0% 的一致性 (Syder *et al.*, 1995)。 *CfGST2* 也编码一个 203 个氨基酸残基的蛋白, 推测分子量为 23 371, 等电点为 8.91。它与昆虫 GSTs II 类基因的同源

性较低, 为 26.1% ~ 32.5% (Feng *et al.*, 1999)。这些 GSTs 基因在染色体上的结构还不清楚。

4 昆虫 GSTs III 类 (Epsilon 类) 基因的结构

昆虫 GSTs III 类基因是近年才划分出来的一个新类别, 对它们的基因结构了解得还不多。

Ranson 等 (2001) 从冈比亚按蚊的基因组中克隆

出 2 个 GSTs 基因, *aggst3-1* 和 *aggst3-2*。它们与 I 类和 II 类基因的同源性都很小, 因此将它们定为一个新的类别(III 类)。这 2 个 GSTs 基因位于染色体 3R 的 33c 区。该区域含有一个重要的 DDT 抗性基因(*Ranson et al.*, 2000), 因此这一基因家族可能参与了对 DDT 的抗性。 *aggst3-1* 和 *aggst3-2* 的 5' 端编码区在与按蚊 GSTs 可变剪接基因相同的位置有一个内含子, 在其他位置还有一个内含子。在按蚊中, GSTs III 类基因也是由一个基因簇编码的(*Ortelli et al.*, 2003)。在冈比亚按蚊 ZAN/U 品系染色体 3R 的 33B 区, 有 8 个 III 类 GSTs 基因(*GSTe1 ~ GSTe8*), 它们的氨基酸残基同源性在 22.6% ~ 65.2% 之间。 *GSTe1* 和 *GSTe2* 就是上述的 *aggst3-1* 和 *aggst3-2*。其他的 5 个基因与这 2 个基因以及果蝇 III 类基因的同源性都大于 40%, 因此也属于 III 类基因, 命名为 *GSTe3 ~ GSTe7*。还有一个基因(*GSTe8*)与它们的同源性小于 40%, 按现有的分类标准, 应该不属于此类, 但仍将它作为 III 类基因(*Ortelli et al.*, 2003)。在这 8 个 GSTs III 类基因中, 有 5 个参与了冈比亚按蚊对 DDT 的抗性(*Ding et al.*, 2003)。

在果蝇染色体 2R 的 55C9 区大约 13 kb 的范围

有一个由 10 个 III 类基因组成的基因簇(*GSTe1 ~ GSTe10*), *DmGSTe10* 与其他 9 个基因的方向相反。与果蝇 I 类 GSTs 基因一样, 果蝇 III 类 GSTs 基因在编码区均没有内含子。它们在染色体上的物理距离远近基本可以反映基因之间的系统进化关系, 即相距较近的基因之间的亲缘关系也较近, 这说明在 Epsilon 基因簇上, 单个基因进行复制, 复制后没有进行基因重排(*Sawicki et al.*, 2003)。 *DmGSTe1* 的 cDNA(920 bp) 含有 672 bp 的开放读框(ORF), 编码 224 个氨基酸残基的蛋白。基因组 5' 非翻译区(5' UTR) 有一保守的 TATA 盒和帽子位点。起始密码子 ATG 上游 42 bp 处是 RNA 的起始位点。在 3' 非翻译区(3' UTR) 终止密码子下游 92 bp 到 170 bp, 含有 poly-A 加尾信号(*Singh et al.*, 2000)。除 *DmGSTe1* 外, 其他 9 个基因的功能还没有被鉴定。另外通过搜索果蝇的基因组文库, 又鉴定出另外 4 个此家族的基因, 他们也位于染色体 2R 上, 但与前 10 个基因的距离较远, 与 10 个基因组成的基因簇不能形成单源的进化枝(*clade*)(*Ding et al.*, 2003)。冈比亚按蚊和果蝇 III 类 GSTs 基因的结构见图 3。

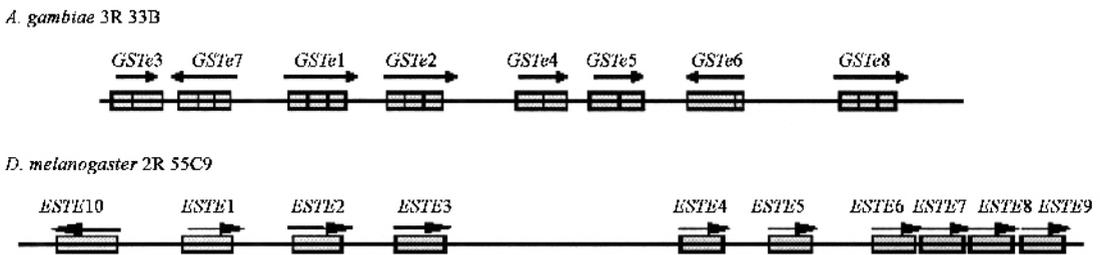


图 3 果蝇和冈比亚按蚊谷胱甘肽 S-转移酶 Epsilon 类基因簇的结构(*Ding et al.*, 2003)

Fig. 3 Epsilon class glutathione S-transferases arrangement in *A. gambiae* and *D. melanogaster* (*Ding et al.*, 2003)

箭头表示基因转录的方向 Arrows mark directions of transcription; 实心长方形表示基因, 基因中间的垂直线表示大致的内含子位置 The solid bars denote the genes and the vertical lines within these bars mark the approximate introns position.

根据 Singh 等(2000)的分类方法, 鳞翅目昆虫小菜蛾 *Plutella xylostella* 中的 *PxGST3*(*Huang et al.*, 1998), 烟草天蛾中的 *MdGST1*(*Syder et al.*, 1995)也属于 III 类 GSTs 基因, 但还没有发现由多个基因组成的基因簇。它们在染色体上的基因结构还不清楚。

5 昆虫 GSTs 基因的调控机制

昆虫 GSTs 在昆虫对杀虫剂、植物次生物质和其他外源有毒物质的抗性中起重要的作用。GSTs 表达的增加与昆虫对杀虫剂抗性之间的关系在许多

昆虫中都有报道。GSTs 表达增加可能有 2 种机制, 即 mRNA 水平的增加和基因扩增, 但基因扩增仅有少量报道(*Wang et al.*, 1991; *Zhou and Syvanen*, 1997; *Vontas et al.*, 2002)。由于昆虫 GSTs 含有多个同工酶, 研究抗性与单个同工酶的关系尤为重要。分子生物学手段为这种研究提供了可能。目前已有少量确切的证据可证明 GSTs 的过量表达与抗性有关。如小菜蛾的 *PxGST3* 基因所编码的酶可以降解有机磷杀虫剂, 它的表达量增加与抗性有关(*Huang et al.*, 1998)。 *MdGST6A* 在家蝇的有机磷杀虫剂抗性品系中过量表达, 重组酶可以与甲基对硫磷和林丹

共轭(Wei *et al.*, 2001)。果蝇的 *GSTD1* 基因在 DDT 抗性品系中表达量增加,重组 *GSTD1* 有 DDT 脱氯化氢酶活性(Tang and Tu, 1995)。Ranson 等(2001)研究发现在冈比亚按蚊抗性品系中 III 类 GSTs *aggst3-2* 过量表达 5 倍,表达的重组酶可以降解 DDT。

昆虫 GSTs 表达的调控机制在双翅目昆虫中研究最多。研究表明抗性种群中一种或多种 GSTs 表达增加是受反式调节因子的增量调控。目前许多实验室正在对这些调节因子进行研究,但仅有少数含有调节基因的染色体大致位点得到鉴定。另外,利用基因分析软件,推测得到一些启动子序列和调控位点。

果蝇 *GSTD* 基因家族含有 10 个基因,各个基因可能是由不同的启动子分别表达的。基因间区域,即指 2 个相邻基因之间的核苷酸序列,富含 AT (63% ~ 73%),远比编码区(41% ~ 52%)高,这与果蝇中的启动子/调控序列是一致的。*gstD1* 和 *gstD21* 的基因间区域(IGS1 ~ 21)可能是这 2 个方向不同的基因的启动子序列。其他基因间序列 IGS21 ~ 22 和 IGS22 ~ 23 等含有上游基因的 3'非翻译区和下游基因的 5'非翻译区。在 IGS1 ~ 21 上还有一些转录因子的保守序列,如在 *gstD21* 的 5'非翻译区有 2 个激活蛋白-1 的结合位点,起始密码子上游 376 ~ 369 核苷酸序列 5'-GTGACTCA-3'和上游 528 ~ -535 核苷酸序列 5'-CTGAGTAA-3'。在 *gstD1* 的 mRNA 的启动子 ATG 上游 0.6 kb 和 2.2 kb 处有 2 个 2-O-十四酰佛波醇-13-醋酸的应答元件的类似序列。这可能是 *gstD* 基因对外源有毒物质起反应的特异性信号。在基因间区域还有 RNA 聚合酶 III 的转录信号。在 *gstD23* 的启动子 ATG 上游 53 ~ 47 bp 和 *gstD24* 启动子上游 47 ~ 41 bp 都有一个帽子位点的保守序列 ATCA(G/T)T(C/T)。在 *gstD23* 和 *gstD24* 的 mRNA 启动子上游 29 bp 处有 TATA 盒位点,在 TATA 盒位点上游还有一 CAAT 盒的保守位点(Toung *et al.*, 1993)。

果蝇 *gstD1* 和 *gstD21* 的表达和诱导可能是通过 mRNA 的稳定性和转录水平来调控的。在果蝇对照品系中,虽然转录速率很低,但 *gstD1* mRNA 比 *gstD21* mRNA 高 20 倍。*GSTD1* 蛋白是 *GSTD21* 蛋白的 4 倍。苯巴比妥诱导 30 min 内 *gstD1* 和 *gstD21* 的 mRNA 即出现诱导效应,达最大诱导时 mRNA 分别提高 3 倍和 20 倍。*gstD1* mRNA 增加的主要机制是转录激活。但 *gstD21* 转录速度增加 2 倍,不能完全说明其 mRNA 20 倍的增加量。由于 *gstD21* mRNA

在正常状态下很不稳定,苯巴比妥对它的诱导主要是使其稳定性增加(Tang and Tu, 1995)。*gstD21* 通常条件下不稳定,但它去掉 5'UTR(非翻译区)后稳定性增加,而 *gstD1* 则相反,通常条件下很稳定,但去掉 5'UTR 后甚至比 *gstD21* 还不稳定。因此 Akgül 和 Tu(2002)研究认为 *gstD1* 的编码区含有不稳定元件,而它的稳定性主要依靠 5'UTR 的强稳定元件(STE)而 *gstD21* 则相反。在同一个 mRNA 中既有不稳定元件又有稳定元件表明存在一种调控机制,使一种本来就很丰富的 mRNA 在化学刺激下可被诱导增加,而刺激消除后又可以恢复到正常水平。*gstD1* 和 *gstD21* mRNAs 的 UTRs 可能都含有顺式调控元件,但它们作用方式却很不相同。

蚊子 GSTs 的基因调控也有了一些研究结果。埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 对 DDT 的代谢抗性主要与一种 II 类 GSTs 基因的表达水平提高有关。Grant 和 Hammock(1992)用遗传和分子生物学方法证明埃及伊蚊 *GST-2* 的表达受一个反式调节因子(抑制因子)调控,抗性品系 *GST-2* 的表达可能是由于反式调控位点等位基因的分离,另外也可能有其他位点的改变。Pongjaroenkit 等(2001)综合 TSSW 和 MatInspector 程序分析的结果,推测 *A. dirus* I 类 GSTs 的可变剪接基因的 2 个启动子序列, Ad214(-1 868 到 -2 074)和 Ad211X(+32 到 -268)和可能的转录因子结合位点。MatInspector 结果表明,Ad214 区域含有 2 个驼背(hunchback)结合位点,2 个背成形成素(dorsal morphogen χ d1)结合位点,2 个 Broad-Complex(BR-CZ4)结合位点和 3 个 fork head domain 蛋白(Croc, HFH3 和 FREAC7)结合位点,还有 1 个 C/EBP 的结合位点,2 个 Homotic selector(HOM)基因产物结合位点 Deformed(Dfd)和 GATA。Ad2112 区含 2 个 Dfd 识别位点,3 个组织特异性的转录因子结合位点,2 个 GATA 结合位点和 1 个 NF1。此区域还有 3 个调节因子,包括 1 个 AP-1 和 2 个 Arnt(Ah 受体核转移定位子)识别位点,调节外源有毒物质的代谢,和 3 个转录激活子结合位点(C-Myb, V-Myb 和 HB)。另外,在 5'UTR 区域还有 122 个核苷酸的内含子存在。在 Ad2112 附近存在转录起始位点说明 Ad2112 至少在 4 龄幼虫中调控 *aggst1AS1* 的表达。*A. dirus* 的另一类 GSTs 基因(*adGST4-1*)的启动子序列以及可能的调控蛋白结合位点也得到鉴定,这些结合位点或调控元件可能控制 GSTs 基因在不同组织和不同发育期的表达变化(Udomsinprasert and Ketterman, 2002)。

6 昆虫 GSTs 研究的展望

最近 10 年来,昆虫 GSTs 分子水平的研究进展很快。但与哺乳动物相比,昆虫 GSTs 的基因结构和表达调控的研究很少,调控的确切机制还不清楚。而且昆虫 GSTs 分子水平的研究多集中在双翅目和鳞翅目昆虫,其他类别的研究很少,仍需进行大量的研究工作。随着基因克隆技术的进步尤其是 DNA 微芯片技术和全基因组测序技术的应用,将会有更多的基因得到克隆。大量基因的获得使我们认识到昆虫 GSTs 基因多态性远比以前认识的复杂(Pemble and Taylor, 1992; Ranson *et al.*, 2001)。由此对昆虫各类基因的分类以及系统发育关系会有更多的研究和探讨。

单个基因的获得促进了对 GSTs 的结构和功能关系的研究,目前已有许多的 GST 晶体结构得到鉴定(Wilce *et al.*, 1995; Robertson *et al.*, 1999; Oakley *et al.*, 2001; Agianian *et al.*, 2003)。基因水平的研究极大地促进了对 GSTs 参与抗药性的作用机制的研究。虽然 GSTs 在昆虫抗药性中的作用早得到证实,但目前仅有少量的证据表明抗性与单个同工酶的关系。随着更多基因序列的获得,抗药性与单个同工酶表达增加的关系将会成为研究的重要方向。

GSTs 基因的调控位点和调控机制研究为阐明 GSTs 与杀虫药剂抗性的关系,或与植物次生物质诱导的关系,并最终调控 GSTs 的表达,延缓抗性提供了依据。目前虽然已有近百个 GSTs 基因序列得到克隆,但多数是 cDNA 序列,它们在染色体上的结构和基因排列以及可能的顺式调控元件和反式调节因子的研究报道较少。目前许多实验室正积极开展这方面的研究,这也将是今后研究的热点。

参考文献 (References)

Abdallah MA, Pollenz RS, Droog FN, Nunamaker RA, Tabachnick WJ, Murphy KE, 2000. Isolation and characterization of a cDNA clone coding for a glutathione S-transferase class delta enzyme from the biting midge *Culicoides variipennis sonorensis* Wirth and Jones. *Biochem. Genet.*, 38(11-12): 377-390.

Adams MD, Celniker SE, Holt RA, *et al.*, 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287(5461): 2185-2195.

Agianian B, Tucker PA, Schouten A, Leonard K, Bullard B, Gros P, 2003. Structure of a *Drosophila* sigma class glutathione S-transferase reveals a novel active site topography suited for lipid peroxidation products. *J. Mol. Biol.*, 326(1): 151-165.

Akgil B, Tu CPD, 2002. Evidence for a stabilizer element in the untranslated regions of *Drosophila* glutathione S-transferase D1 mRNA. *J. Biol. Chem.*, 277(38): 34700-34707.

Aultman KS, Gottlieb M, Giovanni MY, Fauci AS, 2002. *Anopheles gambiae* genome: completing the malaria triad. *Science*, 298: 13.

Beall C, Fyrberg C, Song S, Fyrberg E, 1992. Isolation of a *Drosophila* gene encoding glutathione S-transferase. *Biochem. Genet.*, 30: 515-527.

Board PG, Baker RT, Chelvanayagam G, Jermin LS, 1997. Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. *Biochem. J.*, 328: 929-935.

Boylard BJ, Sims P, 1961. An enzyme from rat liver catalyzing conjugations with glutathione. *Biochem J.*, 79: 516-526.

Chelvanayagam G, Parker MW, Board PG, 2001. Fly fishing for GSTs: a unified nomenclature for mammalian and insect glutathione transferases. *Chem. Biol. Interact.*, 133: 256-260.

Chen FJ, Gao XW, 2002. Advances in glutathione S-transferases in insects. In: Zhang X ed. *Advances in Plant Pesticides and Toxicology*. Shaanxi: Northwest Agricultural University Press. 39-48. [陈凤菊, 高希武, 2002. 昆虫谷胱甘肽 S-转移酶研究进展. 见: 张兴主编. 植物农药与药剂毒理学研究进展. 陕西: 西北农业大学出版社. 39-48]

Coughlin SS, Hall IJ, 2002. Glutathione S-transferase polymorphisms and risk of ovarian cancer: a HuGE review. *Genet Med.*, 4(4): 250-257.

Daniel V, 1993. Glutathione S-transferases: gene structure and regulation of expression. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 28(3): 173-207.

Ding Y, Ortelli F, Rossiter LC, Hemingway J, Ranson H, 2003. The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. *BMC Genomics*, 4(1): 35.

Eaton DL, Bammler TK, 1999. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol. Science*, 49: 156-164.

Feng QL, Davey KG, Pang ASD, Primavera M, Ladd TR, Zheng SC, Soli SS, Retnakaran A, Palli SR, 1999. Glutathione S-transferase from the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*: identification, characterization, localization, cDNA cloning, and expression. *Insect Biochem. Physiol.*, 29: 779-793.

Fournier D, Bride JM, Poire M, Berge JB, Plapp FW, 1992. Insect glutathione S-transferases-biochemical characteristics of the major forms from houseflies susceptible and resistant to insecticides. *J. Biol. Chem.*, 267(3): 1840-1845.

Franciosa H, Bergé JB, 1995. Glutathione S-transferases in housefly (*Musca domestica*): Location of GST-1 and GST-2 families. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 25(3): 311-317.

Grant DF, Hammock BD, 1992. Genetic and molecular evidence for a trans-acting regulatory locus controlling glutathione S-transferase-2 expression in *Aedes aegypti*. *Mol. Gen. Genet.*, 234: 169-176.

Hayes JD, Pulford DJ, 1995. The glutathione S-transferase super-gene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 30: 445-600.

- Hemingway J, 2000. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochem. Physiol.*, 30 : 1 009 – 1 015.
- Holt RA, Subramanian GM, Halpern A, et al., 2002. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science*, 298 : 129 – 148.
- Huang HS, Hu NT, Yao YE, Wu CY, Chiang SW, Sun CN, 1998. Molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 28 : 651 – 658.
- Kostaropoulos I, Mantzari AE, Paradopoulos A, 1996. Alterations of some glutathione S-transferases characteristics during the development of *Tenebrio molitor* (Insecta : Coleoptera). *Insect Biochem. Physiol.*, 26 (8 – 9) : 963 – 969.
- Lougarre A, Bride JM, Fournier D, 1999. Is the insect glutathione S-transferase I gene family intronless. *Insect Mol. Biol.*, 8 : 141 – 143.
- Lu M, Liu HX, Wu WJ, 2003. Relationships between of glutathione S-transferases and insect resistance. *Entomological Knowledge*, 40 (3) : 204 – 207, 228. [吕敏, 刘惠霞, 吴文君, 2003. 谷胱甘肽 S-转移酶与昆虫抗药性的关系. *昆虫知识*, 40 (3) : 204 – 207, 228]
- Matsumura F, 1985. Metabolism of insecticides by animals and plants. In : Matsumura F ed. *Toxicology of Insecticides*. New York : Plenum Press. 203 – 298.
- Nay B, Fournier D, Baudras A, Baudras B, 1999. Mechanism of an insect glutathione S-transferase : kinetic analysis supporting a rapid equilibrium random sequential mechanism with housefly II isoform. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29 (1) : 71 – 79.
- Oakley AJ, Jirajaroenrat K, Harmoi T, Ketterman AJ, Wilce MCJ, 2001. Crystallization of two glutathione S-transferases from an unusual gene family. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 57 (Pt 6) : 870 – 872.
- Ortelli F, Louise CR, Vontas J, Ranson H, Hemingway J, 2003. Heterologous expression of four glutathione transferase genes genetically linked to a major insecticide resistance locus, from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochem. J.*, 373 : 957 – 963.
- Pemble SE, Taylor JB, 1992. An evolutionary perspective on glutathione transferases inferred from class-Theta glutathione transferase cDNA sequences. *Biochem. J.*, 287 : 957 – 963.
- Pongjaroenkit S, Jirajaroenrat K, Boonchay C, Chanama U, Leetachewa S, Prapanthadara LA, Ketterman A, 2001. Genomics organization and putative promoters of highly conserved glutathione S-transferases originating by alternative splicing in *Anopheles dirus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31 : 75 – 85.
- Ranson H, Collins FH, Hemingway J, 1998. The role of alternative mRNA splicing in generating heterogeneity within the *Anopheles gambiae* class I GST family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95 : 14 284 – 14 289.
- Ranson H, Cornel AJ, Fournier D, Vaughan A, Hemingway J, 1997. Cloning and localization of a glutathione S-transferase class I gene from *Anopheles gambiae*. *J. Biol. Chem.*, 272 : 5 464 – 5 468.
- Ranson H, Jensen B, Wang X, Prapanthadara L, Hemingway J, Collins FH, 2000. Genetic mapping of two loci affecting DDT resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol.*, 9 : 499 – 507.
- Ranson H, Rossiter L, Ortelli F, Jensen B, Wang X, Roth CW, Collins FH, Hemingway J, 2001. Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochem. J.*, 359 (Pt 2) : 295 – 304.
- Rauch N, Nauen R, 2004. Characterization and molecular cloning of a glutathione S-transferase from the whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera : Aleyrodidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34 (4) : 321 – 329.
- Reiss RA, James AA, 1993. A glutathione S-transferase gene of the vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol.*, 2 (1) : 25 – 32.
- Robertson HM, Martos R, Sears CR, Todres EZ, Walden KKO, Nardi JB, 1999. Diversity of odorant binding proteins revealed by an expressed sequence tag project on male *Manduca sexta* moth antennae. *Insect Mol. Biol.*, 8 (4) : 501 – 518.
- Rushmore TH, Pickett EB, 1993. Glutathione S-transferases, structure, regulation, and therapeutic implications. *J. Biol. Chem.*, 268 (16) : 11 475 – 11 478.
- Sawicki R, Singh SP, Mondal AK, Benes H, Zimniak P, 2003. Cloning, expression and biochemical characterization of one Epsilon-class (GST-3) and then Delta-class (GST-1) glutathione S-transferases from *Drosophila melanogaster*, and identification of additional nine members of the Epsilon class. *Biochem. J.*, 370 (Pt 2) : 661 – 669.
- Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA, 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases : implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.*, 360 (Pt 1) : 1 – 16.
- Singh M, Silva E, Schulze S, Sinclair DA, Fitzpatrick KA, Honda BM, 2000. Cloning and characterization of a new theta-class glutathione-S-transferase (GST) gene, *gst-3*, from *Drosophila melanogaster*. *Gene*, 247 (1 – 2) : 167 – 173.
- Singh SP, Coronella JA, Benes H, Cochrane BJ, Zimniak P, 2001. Catalytic function of *Drosophila melanogaster* glutathione S-transferase DmGSTS1-1 (GST-2) in conjugation of lipid peroxidation end products. *Eur. J. Biochem.*, 268 : 2 912 – 2 923.
- Snyder MJ, Maddison DR, 1997. Molecular phylogeny of glutathione-S-transferases. *DNA Cell Biol.*, 16 (11) : 1 373 – 1 384.
- Snyder MJ, Walding JK, Feyerisen R, 1995. Glutathione S-transferases from larval *Manduca sexta* midgut : sequence of two cDNAs and enzyme induction. *Insect Biochem. Physiol.*, 25 (4) : 455 – 465.
- Syvanen M, Zhou Z, Wharton J, Goldsbury C, Clark A, 1996. Heterogeneity of the glutathione transferase genes encoding enzymes responsible for insecticide degradation in the housefly. *J. Mol. Evol.*, 43 : 236 – 240.
- Syvanen M, Zhou ZH, Wang JY, 1994. Glutathione transferase gene family from the housefly *Musca domestica*. *Mol. Gen. Genet.*, 245 : 25 – 31.
- Tang AH, Tu CPD, 1995. Pentobarbital-induced changes in *Drosophila* glutathione S-transferases D21 mRNA stability. *J. Biol. Chem.*, 270 (23) : 13 819 – 13 825.
- Tang ZH, Bi Q, 2003. *Molecular Behavior of Insecticide Action*. Shanghai : Shanghai Yuandong Press. 200 – 240. [唐振华, 毕强, 2003. 杀虫剂作用的分子行为. 上海 : 上海远东出版社. 200 – 240]

- Tang ZH, Wu SX, 2000. Heredity and Evolution of Insect Resistance to Pesticides. Shanghai: Shanghai Sciencetech Literature Press. 157 – 190. [唐振华, 吴士雄, 2000. 昆虫抗药性的遗传与进化. 上海: 上海科学技术文献出版社. 157 – 190]
- Toung YP, Hsieh TS, Tu CP, 1993. The glutathione S-transferase D genes: a divergently organized, intronless gene family in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.*, 268: 9 737 – 9 746.
- Townsend DM, Tew KD, 2003. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*, 22(47): 7 369 – 7 375.
- Udomsinprasert R, Ketterman AJ, 2002. Expression and characterization of a novel class of glutathione S-transferase from *Anopheles dirus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32: 425 – 433.
- Valles SM, Perera OP, Strong CA, 2003. Purification, biochemical characterization, and cDNA cloning of a glutathione S-transferase from the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33: 981 – 988.
- Vontas JG, Small GJ, Hemingway J, 2001. Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochem. J.*, 357(Pt 1): 65 – 72.
- Vontas JG, Small GJ, Nikou DC, Ranson H, Hemingway J, 2002. Purification, molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Biochem. J.*, 362: 329 – 337.
- Wang JY, McCommas S, Syvanen M, 1991. Molecular cloning of a glutathione S-transferase overproduced in an insecticide-resistant strain of the housefly (*Musca domestica*). *Mol. Gen. Genet.*, 1 227: 260 – 266.
- Wei SH, Clark AG, Syvanen M, 2001. Identification and cloning of a key insecticide-metabolizing glutathione S-transferase (MdGST-6A) from a hyper insecticide-resistant strain of the housefly *Musca domestica*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31(12): 1 145 – 1 153.
- Wilce MCJ, Board PG, Feil SC, Parker MW, 1995. Crystal structure of a theta-class glutathione transferase. *EMBO J.*, 14: 2 133 – 2 143.
- Yu SJ, 1996. Insect glutathione S-transferases. *Zool. Studies*, 35(1): 9 – 19.
- Zhou ZH, Syvanen M, 1997. A complex glutathione transferase gene family in the housefly *Musca domestica*. *Mol. Gen. Genet.*, 256: 187 – 194.

(责任编辑: 黄玲巧)