

亚洲玉米螟幼虫 P450 基因片断 的克隆与序列分析^{*}

冯纪年, 邓雪华

(西北农林科技大学 植保资源与病虫害防治教育部重点实验室; 昆虫博物馆, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 根据 GenBank 中昆虫 P450 氨基酸保守序列设计了 1 对简并引物, 以亚洲玉米螟田间自然种群基因组 DNA 为模板, 扩增得到一条长度为 603 bp 的特异性 DNA 片段, 编码 201 个氨基酸。将此氨基酸序列与 GenBank 中已知序列采用 Blast 及 ClustalW/EBI 软件进行同源性分析, 结果表明该氨基酸序列与 CYP4 家族的同源性较高, 达 37%~53%, 初步推测此序列为 CYP4 家族的一员。

[关键词] 亚洲玉米螟; 细胞色素 P450; 基因克隆; 同源性分析

[中图分类号] S435.132; Q785

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)06-0115-05

细胞色素 P450 是一类广泛分布于生物体内的重要氧化酶系, 在许多内源和外源化合物的氧化、过氧化物和还原代谢中起着重要作用^[1]。1967 年 Ray 首先在家蝇 *Musca domestica* 中确定了 P450 的存在^[2]。1989 年 Feyereisen 从抗 DDT、有机磷和氨基甲酸酯杀虫剂的 Ruterger 家蝇品系中克隆出第一个全序列 P450 cDNA^[3]。此后, 有关昆虫 P450 基因的研究迅速发展。昆虫中 P450 不仅参与蜕皮激素、保幼激素、信息素及植物次生性化合物的代谢, 而且在有机合成化合物, 如杀虫剂等分解代谢中起着重要作用, 与昆虫对各种杀虫剂的抗药性密切相关^[4]。已有大量研究表明^[5], 害虫抗药性的产生与细胞色素 P450 含量升高及其活性增强有关。

亚洲玉米螟 (*Ostrinia furnacalis* (Guenee)) 是一种分布广泛, 危害严重的农业害虫, 是玉米生产的重要防治对象。由于长期依赖杀虫剂来防治玉米螟, 导致玉米螟抗药性的产生, 特别是对拟除虫菊酯类杀虫剂的抗性在田间表现尤为突出。本研究根据 GenBank 中昆虫 P450 氨基酸保守序列设计 1 对简并引物, 以亚洲玉米螟田间自然种群基因组 DNA 为模板, 利用 PCR 扩增对亚洲玉米螟细胞色素 P450 cDNA 片段进行了克隆和序列分析, 以为亚洲玉米螟的抗性研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试虫源: 亚洲玉米螟 3 龄幼虫, 采于陕西杨凌玉米地的自然种群。

试剂: EDTA, Tris-Cl, SDS, 蛋白酶 K 等为上海生物工程公司产品。dNTP、Taq DNA 聚合酶、DNA 回收试剂盒、Pgm-Teasy 载体、限制性内切酶 *EcoR* I、IPTG 和 X-gal 均为宝生物工程(大连)有限公司产品。引物交由上海生物工程公司合成。PCR 扩增仪为 PTC-200 DNA EngineTM。

1.2 试验方法

1.2.1 亚洲玉米螟基因组 DNA 的提取 参考文献[6]的方法。取亚洲玉米螟幼虫置于 1.5 mL 离心管中, 用手术剪剪碎, 加入 500 μ L 裂解液 A (Tris 0.05 mol/L, NaCl 0.1 mol/L, EDTA 0.1 mol/L, pH 8.0); B (5% SDS); C (2 g/L 蛋白酶 K), A、B 和 C 的体积比 8:1:1, 小杵研磨至清亮, 于 60 $^{\circ}$ C 水浴加热 2 h; 加等体积水饱和酚, 充分混匀后, 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清; 加等体积氯仿: 异戊醇混合溶液 ($V_{\text{氯仿}}:V_{\text{异戊醇}}=24:1$), 混匀后以 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清; 加 2 倍体积预冷无水乙醇沉淀 DNA, 置 -20 $^{\circ}$ C 1 h, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清。在留有沉淀的离心管中加等体积 70%

* [收稿日期] 2005-11-14

[基金项目] 西北农林科技大学研究生教育创新计划项目(05ych007)

[作者简介] 冯纪年(1957-), 男, 陕西白水人, 教授, 博士生导师, 主要从事昆虫分类及昆虫分子生物学研究。E-mail: jinianf@cnipm.com

冰乙醇, 10 000 r/min 离心 5 min, 弃上清。自然干燥, 加 100 μ L TE 溶解, 于 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2 引物设计和合成 引物设计参照黄炯烈等^[7]的方法, 根据 GenBank 中昆虫 P450 氨基酸保守序列和 Scott 等^[5]报道的 P450 引物, 参考艾颖等^[8]的方法设计 1 对简并引物。

F₁: 5'-GAG GTI GA (CT) ACI TTC ATG TTC GA (AG) GGICAC GA (CT) AC-3';

R₂: 5'-CTG ICC GAT (AG) CAG TTICG (GCT) GGI CCI GC (GC) I(AT) GAA (GCT) GG-3'。

1.2.3 PCR 扩增 PCR 反应体系: 10 $\times$ Buffer 缓冲液 5 μ L, 10 mmol/L dNTP 5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 3 μ L, Taq DNA 聚合酶 0.3 μ L (5 U/ μ L), F₁ 和 R₂ 引物各 2 μ L, 亚洲玉米螟基因组 DNA 4 μ L, 加水至 50 μ L。混匀, 离心。PCR 扩增反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 54 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 保温 10 min; 4 $^{\circ}$ C 终止反应。

1.2.4 PCR 产物的克隆和测序 PCR 产物纯化后经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离, 切下目的片段, 用 DNA 回收试剂盒进行回收纯化。纯化产物采用 T/A 直接克隆法与 Pgen⁺-Teasy 载体进行连接, 转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中。在含有氨苄 (AMP^r) 的 LB 培养基上生长过夜, 进行蓝白斑筛选, 挑取白色菌落, 扩大培养后提取少量质粒^[9], 用限制性内切酶 EcoR I 鉴定并分析, 排除假阳性。选择其中 1 个阳性克隆送交上海生物工程公司测序。

1.2.5 序列分析 采用 DNA Club 软件将测序所得到的 DNA 序列翻译成氨基酸序列, 查询 GenBank 数据库, 采用 Blast 在线工具进行相似性比较, 并用 ClustaW EB I 软件进行同源性分析。

2 结果与分析

2.1 PCR 电泳图谱

PCR 产物纯化后经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 结果见图 1。与 DNA 分子量标记相比较可知, 得到的 cDNA 片段 600 bp 左右, 与预期目标相符合。

2.2 cDNA 片段序列的测定

切下目的片段, 经回收纯化后直接克隆转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中。随机挑取 1 个阳性克隆进行测序, 所得到的片段核苷酸序列及编码氨基酸序列见图 2。由图 2 可见, 亚洲玉米螟核酸序列总长 603 bp, 编码 201 个氨基酸, 除去引物, 有 177 个氨基酸残基。已登录 GenBank, 序列号为

DQ 282635。

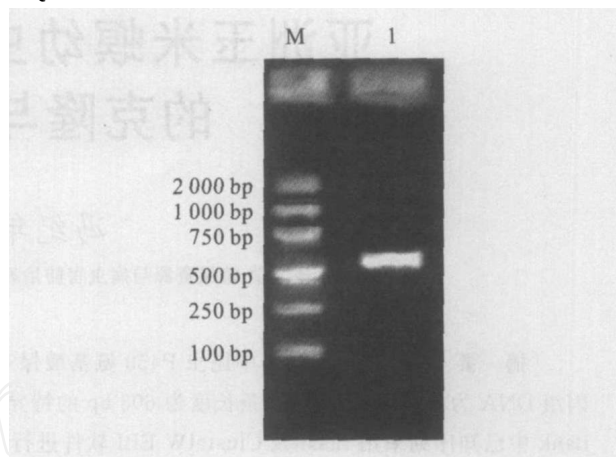


图 1 亚洲玉米螟 cDNA 的 PCR 电泳结果

M. DNA 标准分子量; 1 PCR 产物

Fig 1 PCR product from cDNA of *Ostrinia furnacalis*

M. DNA marker; 1. PCR product

2.3 cDNA 片段序列的同源性分析

将所得的氨基酸序列与昆虫中部分已知 CYP4 成员及 CYP6 成员的同源性进行比较和分析, 结果见图 3。所得到的氨基酸序列与 CYP4 家族同源性的比较结果见表 1。

表 1 所克隆的 P450 氨基酸序列与昆虫中其他 P450 成员的同源性比较

Table 1 Homologous comparison of the cloned sequence with corresponding part of other members of P450 gene

成员 Member	来源 Source	同源性/% Homology
CYP4G16 (AAL 58550)	疟蚊 <i>Anopheles gambiae</i>	42
CYP4M 4 (AAT 08965)	棉铃虫 <i>Helicoverpa armigera</i>	53
CYP4 (AAT 08963)	棉铃虫 <i>Helicoverpa armigera</i>	41
CYP4M 1 (AAA 58251)	烟草天蛾 <i>Manduca sexta</i>	47
CYP4M 7 (AAM 54723)	玉米穗虫 <i>Helicoverpa zea</i>	37
CYP4M 6 (AAM 54722)	玉米穗虫 <i>Helicoverpa zea</i>	40
CYP6A 1 (AAA 57305)	家蝇 <i>Musca domestica</i>	19

注: CYP4G16 来自 Ranson H; CYP4, CYP4M 4 来自 Ai Y; CYP4M 1 来自 Snyder M J; CYP4M 7, CYP4M 6 来自 Sasabe M, CYP6A 1 来自 Cherbas L。

Note: The cited data of CYP4G16 from Ranson H; CYP4, CYP4M 4 from Ai Y; CYP4M 1 from Snyder M J; CYP4M 7, CYP4M 6 from Sasabe M, CYP6A 1 from Cherbas L.

由表 1 可以看出, 本实验所得序列与 CYP4 家

族的同源性较高, 在 37%~53%。按照 P450 命名法则, 只要两个序列的同源性在 46% 以上, 就可以将其划归为一个亚家族^[1]。同时, 本序列是以昆虫

P450 氨基酸保守序列为引物扩增的, 因此初步判定所得到的序列为 CYP4 家族中的一员。

```

1  E V D T F M F E G H D T T A T G L I F L
1  GAGGTGGATACGTTTCATGTTCTGAAGGGCACGACACAACAGCGACGGGACTAATATTTTG
21 L M L L A N N K D A Q V N * N Q N N C I
61 TTAATGTTACTGGCTAATAATAAAGATGCTCAGGTAAATTGAAATCAAAATAATTGTATA
41 L R L V N S I Y S S * K C F L L L Q D K
121 CTTGGCTTGTAAATAGTATATATTCAAGTTAAAAGTGTTCCTTTTATTACAGGATAAA
61 I A A E L K E I F G Q S K Q P L T M D D
181 ATCGCAGCTGAATTAAAGGAAATATTTGGGCAGTCTAAACAACCTCTTACCATGGATGAC
81 L S K M K Y L D C C I K E G L R L Y P P
241 CTGTCCAAGATGAAGTATTTGGATTGTTGTATTAAGGAGGGCCTACGTCTTTATCCTCCA
101 V P F I S R N I T E S V E L S M F V E C
301 GTACCTTTTATTAGCCGCAATATTACTGAAAGCGTCGAACTGAGTATGTTTGTAGAGTGT
121 V * V R Y I R I I L H F * I L F N F Q A
361 GTATGAGTAAGGTATATTCGTATAATCTTACATTTCTAAATTTTATTTAACTTTTCAGGCA
141 I L P Y Q L V R C V T F I F M I Y I V E
421 ATTTTACCGTACCAGTTGGTACGATGTGTACATTCATTTTATGATTACATCGTAGAG
161 R I C T K T Q M S L F P K G F Y R K I A
481 AGGATTTGTACGAAAACCCAAATGAGTTTATTCCCGAAAGGTTTTTACCGGAAAATAGCG
181 S A D T P T H T Y P F S A G P R N C I G
541 TCGGCAGACACCCCTACGCATACATACCCCTTTTGCGCCGGCCCCCGCAACTGTATTGGC
201 Q
601 CAA

```

图2 亚洲玉米螟 P450 基因片断核酸序列及相应的氨基酸序列

加下划线的为引物序列, 核酸序列总长为 603 bp, 编码 201 个氨基酸残基, * 表示终止密码子

Fig. 2 Cloned sequence data from *Ostrinia furnacalis* and deduced sequence of amino acid

The underlined sequence represents primers the cloned sequence consists of 603 bp,

201 amino acid residues are deduced, * means terminator

3 讨论

本实验以亚洲玉米螟基因组 DNA 为模板, 所用引物根据 CYP4 家族的保守序列设计, 具有 CYP4 的保守残基和两个相对保守区域, 经 PCR 扩增得到了 603 bp 基因片段。虽然本实验得到的序列仅为片段, 不能代表整个 P450 总长度的同源性, 但已有研究表明, 用编码 P450 蛋白疏水螺旋 I 和编码血红素结合域的 1 对简并引物扩增得到的 PCR 片段, 具有很高的 SDI (Segmental divergence

index) 值, 能够反映其全长基因的氨基酸的真实性^[10]。因此, 比较此片段序列与昆虫其他序列的同源性, 在划分 P450 家族成员的关系上仍具有一定的参考价值。

细胞色素 P450 基因家族是一个庞大的家族, 结构复杂。要明确 P450 基因的结构及功能, 必须克隆出全长基因。由于本实验所得到的序列是亚洲玉米螟田间自然种群细胞色素 P450 cDNA 基因中的部分片段, 因此其最终命名与归类还有待全长基因的克隆和鉴定。

query	-----EVDTFMFEGHDTTATGLIFLLMLLANNKDAQVNZNQNNCILRLVNSIYSSZKC	53
CYP4G16	-----EVDTFMFEGHDTTAAGSSFFLSMMG-----VHQQ---	29
CYP4	-----EVDTFMFEGHDTTAGGLTYCFMLLANHKE-----	29
CYP4M6	-----EEVDTFMFEGHDTTAGGLTYCFMLLANHKE-----	30
CYP4M7	-----QEEVDTFMFEGHDTTASGLTFMFMLLAHHKD-----	31
CYP4M4	-----EVDTFMFEGHDTTAAGLTFCFMLIANHKD-----	29
CYP4M1	-----TASGLTFCFMLLANNKH-----	17
CYP6A1	TFNELAAQVFVFFLGGFETSSSTMGFALYELAQNQQ-----	36
query	FLLLQDKIAAELKEIFGQSKQ-PLTMDLSKMKYLDCCIKERLRLYPVPVFISRNITESV	112
CYP4G16	---IQDKVIQELDEIFGESDR-PATFQDTLEMKYLERCLMETLRMYPPVPIIARSLKQDL	85
CYP4	---AQDKILEELKEILGDNKR-PITMEDLPKMKYLERCIKESLRLFPVVFISRSLNETV	85
CYP4M6	---AQDKILEELKEILGDDKR-PITMEDLPKMKYLERCIKESLRLFPVVFISRSLNETV	86
CYP4M7	---IQDKIVEELNEILGDSR-WLTMDLAKMKYMERCIKESLRIYPPVHFISRKLNETT	87
CYP4M4	---IQDKIVQELDDIFGDSR-PIKMEDLSKMKYLECCIKESLRMYPPVHFISRNLNETD	85
CYP4M1	---IQDKIVAELDDIFGDSTR-PANMEDFAKMYLECCIKESLRLYPVPVHFISRNINEPV	73
CYP6A1	---LQDRLREEVNEVFDQFKEDNISYDALMNIPLYDQVLNETLRKYPVGSALTRQTLNDY	93
query	ELSMFVECVZVRYIRIILHFZILFNFQAILPYQLVRCVTFIFMIYIVERICTKTQMSLFP	172
CYP4G16	KLASSDIVVPAGATITVATF-KLHRLESYIPNPVDV-----FNP	122
CYP4	TLSNYKIPA---GTFCHIPIYDLHRRADLFKNPTA-----FDP	120
CYP4M6	TLSNYKIPA---GTLCHIPIYDLHRRADLFKNPTS-----FDP	121
CYP4M7	VLSGYQVPA---DTLCHIPIYDMHHRDLFEDPER-----FDP	122
CYP4M4	VLSKYTVPA---GTFCHILILDLHYRPDLFKNPHQ-----FDP	120
CYP4M1	KLNNYEGQG---DTSCFVFIYDLHRRSDLFKNPSV-----FDP	108
CYP6A1	VVPHNPKYVLPKGTLVFIPVLGIHYDPELYPNPEE-----FDP	131
query	KGfYRKIASADTPHTYTPFCAGPRNCIGQ-----	201
CYP4G16	DNFLPEKQANRHYYAFVPFTAGPRNCIGQ-----	151
CYP4	DRFLPENSVRHPYAYIPFSAGPRNCIGQKFAMMEMKIAVAEVLREFELQPVTRPSDIRM	180
CYP4M6	DRFLPENSVRHPYAYIPFSAGPRNCIGQKFAMMEMKIAVAEVLREFELQPVTRPSDIRM	181
CYP4M7	DRFLPENSVRHPYAYIPFSAGPRNCIGQKFAMLEMKIAVAEVLRFKELKPVTKPSEIEF	182
CYP4M4	DRFLPENSVRHPYAYIPFTAGPRNCIGQ-----	149
CYP4M1	DRFLPENSVRHPYSYIPFSAGPR-----	132
CYP6A1	ERFSPPEMVKQRDSVDWLFGFDGPRNCIGMRFGKMQSRLGLALVIRHFRFTVCSRTDIPMK	191
query	IADAVFRNEGPVEVTFVKRQ-----	200
CYP4G16	IADAVFRNDGPVEVTFVKRQ-----	201
CYP4	IADLVLRNNGPVKNVNFVKRK-----	202
CYP4M6	INPESLAWTPKNNLYLNVQAIIRKMK	217

图 3 克隆的 P450 氨基酸序列与昆虫中相关序列的比较

“-”代表缺失的氨基酸残基;“*”代表相同的氨基酸残基;“:”代表保守性替换;“.”代表半保守性替换

Fig 3 Homologous analysis of cloned P450 amino acid sequence from *Ostrinia furnacalis* and corresponding sequences of other sources of P450 member

“-” means the missing amino acid residues; “*” means that the identical residues; “:” means conserved substitutions;

“.” means semi-conserved substitution

[参考文献]

- [1] Nelson D R, Kamataki T, Waxman D J, et al The P450 super family: update on new sequence, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes and nomenclature[J]. DNA Cell Biol, 1993, 2: 1-51.
- [2] Ray J W. The epoxidation of aldrin by housefly microsomes and its inhibition by carbon monoxide[J]. Biochem Pharmacol, 1967, 16: 99-107.
- [3] Feyereisen R. Isolation and sequence of cDNA encoding a cytochrome P450 from an insecticide resistant strain of the housefly, *Musca domestica*[J]. PNAS, 1989, 86: 1465-1469.
- [4] Feyereisen R. Cytochrome P450 in insects[C]//Schenkman J B, Greim H. Cytochrome P450 U S: Springer, 1993: 311-324.
- [5] Scott J G, Liu N N, Wen Z. Insect cytochromes P450: diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins[J]. Comp Biochem Physiol, 1998, 121: 147-155.
- [6] 代金霞, 郑哲民. 拟步甲基因组DNA 提取的比较研究[J]. 宁夏大学学报, 2004, 25(1): 65-68.
- [7] 黄炯烈, 王 迅. 致倦库蚊溴氰菊酯抗性株细胞色素P450 基因的克隆、鉴定及同源性分析[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 1998, 5(3): 166-173.
- [8] 艾 颖, 邱星辉, 何凤琴. 棉铃虫CYP4 家族基因片段克隆及序列分析[J]. 河北农业大学学报, 2004, 27(6): 60-64.
- [9] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 俞炜源, 译. 北京: 科学出版社, 2002.
- [10] Fogelman J C, Danielson P B. A analysis of fragment homology among DNA sequences from cytochrome P450 families 4 and 6[J]. Genetics, 2001, 110: 257-265.
- [11] 冷欣夫, 邱星辉. 细胞色素P450 酶系的结构功能与应用前景[M]. 北京: 科学出版社, 2001.

Cloning and sequence of cDNA fragments of cytochrome P450 from *Ostrinia furnacalis*

FENG J i-n ian, DENG Xue-hua

(Key Laboratory of Plant Protection and Pest Management, Ministry of Education & Entomology Museum,
Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: With genomic DNA of *Ostrinia furnacalis* field natural population as the template, and a pair of degenerate primers were designed according to the conservative amino acid sequences of insect P450 from GenBank, a specific DNA fragment with 603 bp was obtained, encoding 201 amino acid residues. Homologous analysis was done on the deduced amino acid sequence to GenBank through Blast and ClustalW EB I software, and the results demonstrated that the sequence had as high as 37% - 53% identity to members of CYP4 family, and suggested that the sequence belongs to CYP4 family.

Key words: *Ostrinia furnacalis*; cytochrome P450; gene cloning; homologous analysis