

网络出版时间:2014-04-25 15:48

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.05.025

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.05.025.html

淡色库蚊 *XND-P450* 基因 cDNA 全长克隆及表达

郑文亮,李边征华,刘应保,王晓宇,刘虎岐

(西北农林科技大学 生命科学学院,陕西 杨凌 712100)

[摘要] 【目的】克隆淡色库蚊氯菊酯抗性相关 *XND-P450* 基因,并对其进行生物信息学分析,研究其在敏感品系和抗性品系淡色库蚊中表达量的差异,为阐明 *XND-P450* 的功能和抗性机制奠定基础。【方法】依据淡色库蚊抗性品系与敏感品系差异表达的 EST 片段设计 PCR 引物,采用 RACE 技术克隆淡色库蚊氯菊酯抗性相关基因 *XND-P450* 全长 cDNA 序列,并对其进行生物信息学分析;采用半定量 PCR 技术,对 *XND-P450* 基因在敏感品系和抗性品系淡色库蚊中的表达量差异进行检测。【结果】经过克隆获得长度为 1 679 bp 的淡色库蚊氯菊酯抗性相关基因 *XND-P450* 全长 cDNA,编码 523 个氨基酸。生物信息学分析表明,该基因与致倦库蚊、埃及伊蚊 *CYP450* 基因的同源性在 70% 以上,其编码蛋白相对分子质量为 33 244.9 u,理论等电点为 8.10,属于不稳定的亲水蛋白,氨基酸序列与致倦库蚊及冈比亚按蚊 *CYP450* 蛋白的同源性在 40% 以上。半定量 PCR 电泳分析显示,抗性品系淡色库蚊中的 *XND-P450* 基因表达量较敏感品系高。【结论】克隆了淡色库蚊氯菊酯抗性相关 *XND-P450* 基因,该基因在抗性品系淡色库蚊中的表达量高于敏感品系,推测其与氯菊酯抗性相关。

[关键词] 淡色库蚊;氯菊酯;*XND-P450* 基因;RACE;半定量 PCR

[中图分类号] Q969.44⁺2.2;Q785

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2014)05-0211-06

Cloning and expression of *XND-P450* gene from *Culex pipiens pallens*

ZHENG Wen-liang, LIBIAN Zheng-hua, LIU Ying-bao,

WANG Xiao-yu, LIU Hu-qi

(College of Life Science, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】The full length cDNA sequence of permethrin-resistance associated *XND-P450* gene of *Culex pipiens pallens* was obtained and analyzed using bioinformatics methods. Its expression levels in susceptible and resistant strains were detected for clarification of the function and resistance mechanism of *XND-P450* gene. 【Method】PCR primers were designed according to expressed sequence tag from the different expressions of permethrin-susceptible and resistant strains of *Culex quinquefasciatus*. Full length cDNA of permethrin-resistance associated gene *XND-P450* of *Culex pipiens pallens* was cloned using RACE method and bioinformatics analysis was conducted. The expression of *XND-P450* gene in susceptible and resistant strains was detected using semi-quantitative RT-PCR. 【Result】The obtained sequence of cDNA of *XND-P450* gene of *Culex pipiens pallens* was 1 679 bp coding 523 amino acids. Bioinformatics analysis showed that the full length cDNA of *XND-P450* gene of *Culex pipiens pallens* shared more than 70% identity in nucleotide sequence with *CYP450* of *Culex fatigans* and *Aedes aegypti*. The

[收稿日期] 2013-04-19

[基金项目] 西北农林科技大学青年学术骨干研究基金项目(01140302)

[作者简介] 郑文亮(1988—),男,甘肃天水人,在读硕士,主要从事昆虫杀虫剂抗性分子机理研究。E-mail: zwl880311@126.com

[通信作者] 刘虎岐(1968—),男,陕西宝鸡人,副教授,博士,硕士生导师,主要从事植物分子遗传学、昆虫杀虫剂抗性分子机理和脑缺氧损伤分子机理研究。E-mail: liuhuqi@yahoo.com.cn

XND-P450 gene was an unstable hydrophilic protein with a relative molecular mass of 33 244.9 u and an isoelectric point of 8.10. Phylogenetic analysis showed that the full length cDNA of *XND-P450* gene of *Culex pipiens pallens* shared more than 40% identity in amino acids sequence with CYP450 of *Culex fatigans* and *Anopheles gambiae*. Semi-quantitative PCR electrophoresis showed that mRNA expression levels of *XND-P450* gene in resistant strains were higher than in susceptible strains. 【Conclusion】 The permethrin-resistance associated gene *XND-P450* of *Culex pipiens pallens* was cloned. Its mRNA expression levels in resistant strains were higher than in susceptible strains, indicating that *XND-P450* gene was related to permethrin-resistance.

Key words: *Culex pipiens pallens*; permethrin; *XND-P450* gene; RACE; semi-quantitative RT-PCR

淡色库蚊是多种病毒病和寄生虫病的传播媒介,也是我国北方入室吸血骚扰的主要蚊种。近年来,拟除虫菊酯长期、广泛、大量的使用以及昆虫对环境的适应性^[1],使得许多昆虫对拟除虫菊酯产生了抗性,如蚊虫、蚜虫和果蝇等^[2]。因此,对昆虫抗药机制的研究显得尤为重要,在分子水平上探究其抗性作用机制是近年来研究的主要手段。

随着分子生物学技术的发展和基因测序的大规模应用,相关功能基因克隆表达技术已近成熟^[3-6],根据表达序列标签(EST)进一步克隆单个基因并研究其相关功能的方法被广泛使用^[7-15]。Liu 等^[10]采用 SSH 结合基因芯片技术,构建了 HAmCq-Slab 品系蚊子抗性基因差减文库,发现抗性库蚊品系 Hamcq 对氯菊酯的抗性较敏感性品系 S-Lab 高 1 700 多倍,并进一步克隆了蚊子抗性品系与敏感性品系之间表达差异的 EST 序列(400~600 bp),通过比对分析确定了这些基因所属的家族。

本研究以抑制性消减杂交技术得到的 *XND-P450* 基因 EST 序列为基础,设计基因特异性引物,用 RACE 方法克隆其全长 cDNA 序列进行生物信息学分析,采用半定量 PCR 技术对该基因在敏感品系和抗性品系淡色库蚊中 mRNA 表达量的差异进行检测,旨在为深入研究 *P450* 基因的抗药性机制及寻找和研制新型杀虫剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 淡色库蚊(*Culex pipiens pallens*)抗性品系 Hamcq 和敏感品系 S-Lab 均引自西北农林科技大学农药研究中心,抗性品系 Hamcq 用氯菊酯逐代淘汰选育,其对氯菊酯的半致死浓度(LC₅₀)为 7.5 mg/L。蚊虫饲养在 25℃、相对湿度 80%、光照时间 12 h 的养虫室内,以小鼠饲血产卵传代。

1.1.2 主要试剂 RNAiso™Plus、SMART RACE cDNA amplification Kit、Advantage2 PCR Kit、凝胶回收试剂盒、pMD18-T 载体、Plasmid mini Kit、Marker DL2000 和 Trizol 均购自 TaKaRa 公司。

1.1.3 引物设计与合成 根据获得的库蚊氯菊酯抗性相关 EST 序列,设计 *XND-P450* 基因 3' 和 5' 末端的 RACE 引物为 Forward Primer: 5'-CGGT TGGTTAGGCCGAGGGGAGCCCA-3', Reverse Primer: 5'-AACCTCCGTCGTTGGGCTCCCCTC GG-3'。

根据淡色库蚊 *XND-P450* 基因 3' 和 5' 末端拼接的基因全长序列,设计引物克隆淡色库蚊 *XND-P450* 基因全长,引物及序列为 Forward Primer: 5'-CGAAGTAATCGAAGGAGGC-3'; Reverse Primer: 5'-CCAGAACCTACTCAACGTATC-3'。

根据克隆出的 *XND-P450* 基因 cDNA 全长,设计半定量 RT-PCR 基因特异性引物,内参引物依据淡色库蚊 *βactin* (GenBank 登录号: AY100005) 设计。*XND-P450* 引物序列为 Forward Primer: 5'-AACCGAGCCTGCACCAAGCC-3'; Reverse Primer: 5'-CGGCCCACTTCCGAATGGCA-3'。*βactin* 引物序列为 Forward Primer: 5'-TCCGTCTGGAC-TTGGCCGGT-3'; Reverse Primer: 5'-CGGCGGT-GGCCATTTCCTGT-3'。

引物序列均由上海生工公司合成。

1.2 方法

1.2.1 *XND-P450* 基因 cDNA 全长的克隆及生物信息学分析 使用 RNAiso™Plus 试剂提取淡色库蚊个体总 RNA,琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。按照 SMART RACE cDNA amplification Kit 说明书合成 cDNA 第 1 链。

用设计好的 3' 和 5' RACE 引物,根据 RACE 试剂盒使用说明进行 3' 和 5' 末端扩增。PCR 扩增体系为: 10×Buffer 2.5 μL、dNTP Mix 0.5 μL、Ad-

vantage2 PCR Kit 0.5 μ L,混匀后,加入 3'cDNA (5'cDNA)1 μ L、3'RACE(5'RACE)引物 0.5 μ L,加双蒸水至 25 μ L。PCR 程序为:94 $^{\circ}$ C 5 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 2 min,5 个循环;94 $^{\circ}$ C 30 s,70 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 2 min,5 个循环;94 $^{\circ}$ C 30 s,67.5 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 2 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。

扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后,用凝胶回收试剂盒回收目的条带,将回收产物与 pMD18-T 载体连接,转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞,经蓝白斑筛选,将阳性克隆用 TaKaRa Plasmid mini Kit 试剂盒抽提质粒,经鉴定后,菌液送华大基因科技公司测序。

将测序结果拼接组装为全长 cDNA,并依此设计特异性引物扩增全长 cDNA。参照 SMART RACE cDNA amplification Kit 说明书配制 25 μ L PCR 反应体系,PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 2 min;94 $^{\circ}$ C 50 s,55 $^{\circ}$ C 50 s,72 $^{\circ}$ C 2 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。将 PCR 产物纯化后连接至 pMD18-T 载体,并转化、测序。

将测序结果拼接后,对得到的 cDNA 序列进行生物信息学分析,利用 NCBI 中的 ORF Finder 查找基因的开放阅读框(ORF);利用 DNAMAN 软件将目的基因与其他蚊种的 *CYP450* 基因序列进行同源性比较;利用 Prot-Param 软件,分析 *XND-P450* 基因编码蛋白的氨基酸残基数目、组成、蛋白质相对分子质量、理论等电点等参数;利用 ProtScale 软件在

线分析编码蛋白的疏水性;应用 SOSUI 软件对跨膜区进行预测;利用 <http://psort.hgc.jp/form2.html> 在线软件预测蛋白的亚细胞定位;利用 <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/> 进行磷酸化位点预测。

1.2.2 *XND-P450* 基因表达的半定量 PCR 分析

以淡色库蚊总 RNA 为模板,加入 Dnase I 降解可能存在的 DNA 之后,按照 TaKaRa Primer ScriptTM RT-PCR Kit 试剂盒说明书反转录 cDNA 第 1 链,以此为模板用 *XND-P450* 和 β *actin* 基因特异性引物进行 PCR 扩增,PCR 产物用 1.5 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳鉴定;采用 22,24,26,28,30,32,34,36,38,40 等 10 个循环梯度,以抗性品系蚊的 cDNA 为模板,扩增 *XND-P450* 和 β *actin* 基因片段,确定循环数,利用 Quantityone 软件检测抗性品系和敏感品系蚊中 *XND-P450* 及 β *actin* 基因片段的灰度值,重复 5 次,对测得的灰度值采用 SPSS 16.0 软件进行统计与分析,对试验数据进行检验,以假定值 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 淡色库蚊 *XND-P450* 基因全长序列的克隆

根据 *XND-P450* 基因 EST 序列设计引物进行 3'、5'末端的扩增。结果(图 1)显示,3'端序列长 531 bp,5'端序列长 1 352 bp,将 3'、5'扩增产物拼接后,得到 *XND-P450* 基因全长序列为 1 679 bp。

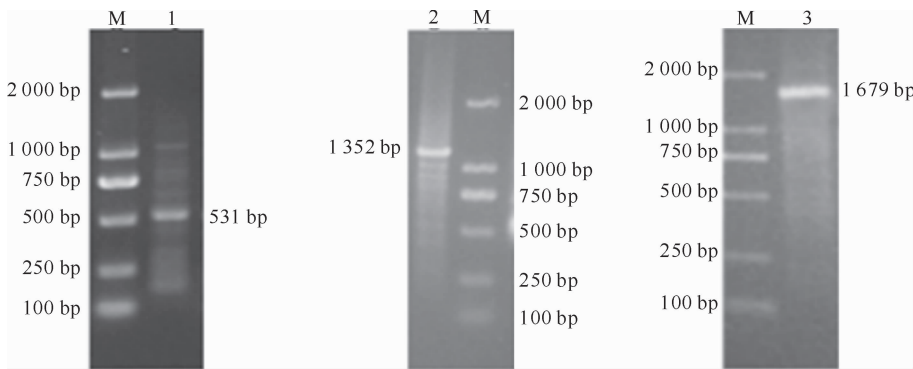


图 1 淡色库蚊 *XND-P450* 基因全长序列的克隆

M. Maker DL2000;1. 3'RACE 产物;2. 5'RACE 产物;3. 基因全长产物

Fig. 1 Cloning of full-length sequence of *XND-P45* gene of *Culex pipiens pallens*

M. Maker DL2000;1. 3' RACE product;2. 5' RACE product;3. Full length cDNA product

序列分析显示,*XND-P450* 基因全长序列(图 2)符合全长基因的基本特征,具有完整的开放阅读框和起始密码子 ATG,终止密码子符合生物学中终止密码子的偏好性以及其旁侧序列的使用特

征,同时该序列具有明显的 AATAAA 加尾信号,具有 polyA 尾,可判定为全长基因。通过 NCBI ORF Finder 软件分析,得到了该序列的开放阅读框(ORF)和对应的氨基酸序列。

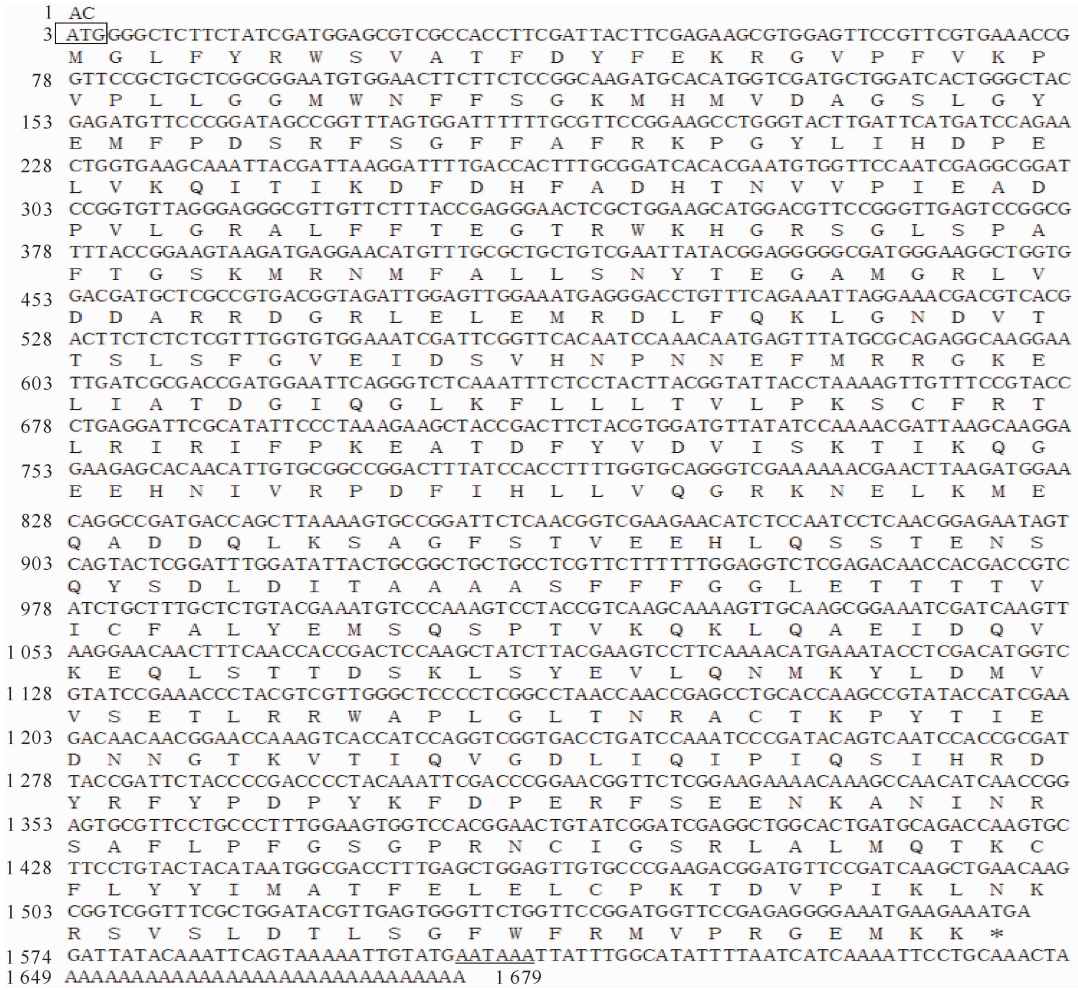


图 2 淡色库蚊 XND-P450 基因全长及其编码的氨基酸序列
方框区为起始密码子；* 为终止密码子；下划线区为加尾信号

Fig. 2 Full length sequence and putative amino acid sequence of XND-P450 gene of *Culex pipiens pallens*
Box represents the initiation code; Asterisk means terminal code; Underlined area indicates polyadenylation signal

2.2 淡色库蚊 XND-P450 基因序列的生物信息学分析

通过同源性比对及对淡色库蚊 XND-P450 基因编码蛋白保守域 (Conserved domain) 的预测, 推测淡色库蚊 XND-P450 基因属于 P450 家族。核酸比对结果显示, XND-P450 基因与致倦库蚊 (*Culex fatigans*)、埃及伊蚊 (*Aedine mosquitoes*) 的 CYP450 基因有较高的同源性, 一致性在 90% 以上。DNASar 比对结果显示, XND-P450 蛋白与致倦库蚊的 CYP9b2、CYP9M10、CYP4503A19、CYP45052D1 蛋白及埃及伊蚊和冈比亚按蚊 (*Anopheles gambi-ae*) 的 CYP450 蛋白具有较高的同源性, 一致性均在 40% 以上。应用 NCBI 提供的 CDD (Conserved Domain Database) 数据库进行在线搜寻, 结果显示, 该蛋白的 40~320 位氨基酸序列高度保守, 与细胞色素 P450 超家族的保守域高度一致。

生物信息学分析结果显示, 淡色库蚊 XND-P450 基因编码蛋白的分子质量为 33 244.9 u, 理论等电点为 8.10, 酸性氨基酸数目 (Asp+Glu) 为 41, 碱性氨基酸 (Arg+Lys) 数目为 43, 分子式为 C_{1 710} H_{2 703} N₄₅₅ O₅₀₆ S₁₆, 原子总数 5 390; N-末端为蛋氨酸, 不稳定指数为 49.70, 属于不稳定蛋白; 脂肪指数为 82.60, 总平均亲水性为 -0.339, 属亲水蛋白; 亚细胞定位结果表明, 质膜 (Plasma membrane) 占 65.2%, 内质网 (Endoplasmic reticulum) 占 26.1%, 液泡 (Vacuolar) 占 4.3%, 高尔基体 (Golgi) 占 4.3%, 因此该蛋白很可能位于细胞质膜; 该蛋白不包括信号肽序列, 具有 16 个磷酸化位点, 分别为 10 个丝氨酸位点和 6 个酪氨酸位点。据此可以初步推测, 淡色库蚊 XND-P450 蛋白可能与胞内的某种 P450 家族酶有关。

2.3 淡色库蚊 *XND-P450* 基因表达谱的半定量 PCR

梯度 PCR 检测结果显示,*XND-P450* 和 β *actin* 基因分别在 36 和 32 个循环之前为指数期,其后进入平台期,因此确定 *XND-P450* 和 β *actin* 基因的循环数分别为 36 和 32。据此对 *XND-P450* 和 β *actin* 基因进行半定量 PCR 检测,结果(图 3)显示,*XND-P450* 基因在抗药品系及敏感品系淡色库蚊中的表达水平差异显著,在抗性品系淡色库蚊中的表达水平强于敏感品系。利用 Quantityone 软件检测抗性品系、敏感品系中 *XND-P450* 及 β *actin* 基因片段的灰度值,比值分别为 $0.215\pm0.006\ 4$ 和 $0.052\pm0.006\ 3$,其中敏感品系淡色库蚊中 *XND-P450* 基因的表达显著低于抗性品系淡色库蚊。

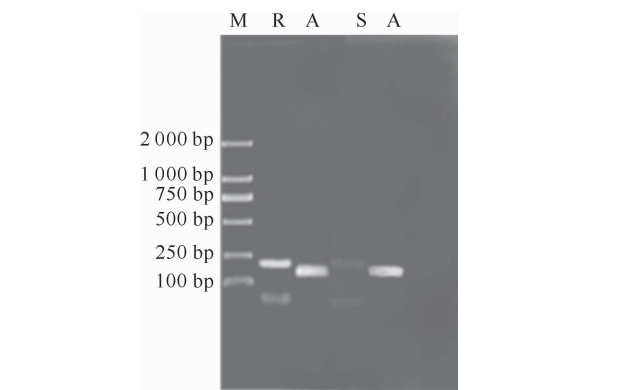


图 3 *XND-P450* 基因在抗性品系和敏感品系淡色库蚊中表达水平的半定量 RT-PCR

M. Maker DL2000;R. 抗性品系淡色库蚊;
S. 敏感品系淡色库蚊;A. β *actin*

Fig. 3 Semi-quantity RT-PCR of *XND-P450* gene expression levels in resistant and sensitive strains

M. Maker DL2000;R. Resistant strain;
S. Sensitive strain;A. β *actin*

3 讨 论

细胞色素 *CYP450* 为一类多基因家族,是一种极为重要的参与生物内、外源物质合成与分解的代谢酶系,广泛存在于多种生物中。昆虫体内存在 100 多种 *CYP450* 基因,其可发挥钝化杀虫剂或者提高昆虫解毒能力的作用。在抗药性昆虫中,*CYP450* 蛋白表达水平仅提高 1 倍左右,然而抗性比率(Resistance ratios)却可高达 1 000 倍^[16-20]。可以看出,*XND-P450* 作为 *P450* 基因家庭的一员,在抗药机制中也发挥着一定的作用。

本研究根据前期分离鉴定的淡色库蚊氯菊酯抗性相关 EST 片段设计引物,采用 RACE 技术克隆

得到淡色库蚊氯菊酯抗性相关基因 *XND-P450*,其 cDNA 序列全长 1 679 bp,编码 523 个氨基酸。生物信息学分析结果表明,*XND-P450* 基因与致倦库蚊、埃及伊蚊的 *CYP450* 基因有较高的同源性,*XND-P450* 蛋白与致倦库蚊、埃及伊蚊和冈比亚按蚊相关 *CYP450* 蛋白也具有较高的同源性,且该蛋白的 40~320 位氨基酸序列高度保守,与细胞色素 *P450* 超家族的保守域高度一致,可推知该基因属于 *P450* 基因家庭;该基因编码蛋白位于细胞质膜且具有 16 个磷酸化位点,提示该基因参与细胞内信号转导。本研究结果发现,在抗性品系和敏感品系淡色库蚊中均能扩增出 *XND-P450* 基因片段,但其在抗性品系淡色库蚊中的表达水平强于敏感品系,因此推测 *XND-P450* 基因与氯菊酯抗性相关。

本研究结果显示,*XND-P450* 基因可能在淡色库蚊氯菊酯抗性中发挥作用,但其作用机制尚不清楚。在后续的研究中,可以运用荧光显微技术,在细胞水平上定位其作用位置,进一步探究其作用机制。

[参考文献]

[1] 崔峰,乔传令. 蚊虫抗药性分子机理 [J]. 昆虫知识, 2007, 44 (5): 621-626.

Cui F, Qiao C L. The molecular mechanisms of insecticide resistance in mosquitoes [J]. Chinese Bulletin of Entomology, 2007, 44 (5): 621-626. (in Chinese)

[2] Tolle M A. Mosquito-borne diseases [J]. Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care, 2009, 39: 97-140.

[3] Liu H Q, Xu Q, Zhang L, et al. Chlorpyrifos resistance in the mosquito, *Culex quinquefasciatus* [J]. Journal of Medical Entomology, 2005, 42 (5): 815-820.

[4] 刘虎岐, 刘应保, 宋云鹏, 等. 淡色库蚊氯菊酯抗性相关基因 PR-OP 全长 cDNA 的克隆及生物信息学分析 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2010, 38 (9): 109-116.

Liu H Q, Liu Y B, Song Y P, et al. Cloning and bioinformatics analysis of full length cDNA of permethrin-resistance associated opsin gene PR-OP of *Culex pipiens pallens* [J]. Journal of Northwest A&F University: Nat Sci Ed, 2010, 38 (9): 109-116. (in Chinese)

[5] Liu H Q, Liu N N, Zhang L, et al. Insecticide resistance and cross-resistance in Alabama and Florida strains of *Culex quinquefasciatus* [J]. Med Entomol, 2004, 41 (3): 408-413.

[6] 孙俊, 褚宏亮, 陈亚东, 等. 淡色库蚊对拟除虫菊酯类抗性与 *kdr* 等位基因频率的关系 [J]. 南京农业大学学报, 2010, 3 (5): 87-89.

Sun J, Zhu H L, Chen Y D, et al. Relationship between pyrethroid resistance and *kdr* alleles in *Culex pipiens pallens* [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2010, 3 (5): 87-89. (in Chinese)

[7] Xu Q, Liu H Q, Zhang L, et al. Resistance in the mosquito, *Cu-*

- lex quinquefasciatus* and possible mechanisms for resistance [J]. Pest Management Science, 2005, 61(11): 1096-1102.
- [8] 宋深伟, 刘永香, 肖平阔, 等. 昆虫抗药性遗传的研究进展 [J]. 农药研究与应用, 2007, 11(5): 17-19.
Song S W, Liu Y X, Xiao P K, et al. Insect resistance genetic research progress [J]. Agrochemicals Research & Application, 2007, 11(5): 17-19. (in Chinese)
- [9] Denholm I, Devine G J, Williamson M S. Insecticide resistance on the move [J]. Science, 2002, 297(5590): 2222-2223.
- [10] Liu N N, Liu H Q, Zhu F, et al. Differential expression of genes in pyrethroid resistant and susceptible mosquitoes, *Culex quinquefasciatus* [J]. Gene, 2007, 39(4): 61-68.
- [11] Liu H Q, Liu N N, Zhang L, et al. Insecticide resistance in Alabama and Florida mosquito strains of *Aedes albopictus* [J]. Med Entomol, 2004, 41(5): 946-952.
- [12] 刑剑飞, 刘 艳, 颜冬云. 昆虫对拟除虫菊酯的抗性研究进展 [J]. 环境科学与技术, 2010, 33(10): 68-74.
Xing J F, Liu Y, Yan D Y. Progress on insect resistance to pyrethroid insecticides [J]. Environmental Science & Technology, 2010, 33(10): 68-74. (in Chinese)
- [13] 滕 达, 李秀兰, 公茂庆, 等. 淡色库蚊抗溴氰菊酯品系 CYP4 家族新成员基因克隆及序列分析 [J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2004, 17(2): 65-67.
Teng D, Li X L, Gong M Q, et al. *Culex pipiens* deltamethrin resistance strain CYP4 family new member gene cloning and sequence analysis [J]. Chinese Journal of Prevention and Control of Parasitic Diseases, 2004, 17(2): 65-67. (in Chinese)
- [14] 郭 丽, 沈孝兵. 病媒昆虫抗药性产生的分子机制 [J]. 中国媒介生物学及控制, 2005(16): 232-234.
Guo L, Shen X B. Disease medium insect resistance produce molecular mechanism [J]. Chinese Media Biology and Control, 2005(16): 232-234. (in Chinese)
- [15] Hu X B, Sun Y, Wang W J, et al. Cloning and characterization of NYD-OP7, a novel deltamethrin resistance associated gene from *Culex pipiens pallens* [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2007, 88: 82-91.
- [16] 翁景然, 张 宏, 耿美英. 真核基因起始与终止密码子旁侧序列特征分析 [J]. 生物信息学, 2004(4): 10-14.
Weng J R, Zhang H, Geng M Y. Characteristic analysis of flanking sequence of start codon and stop codon in eukaryotic genes [J]. China Journal of Bioinformatics, 2004(4): 10-14. (in Chinese)
- [17] Rosenbaum D M, Rasmussen S G, Kobilka B K. The structure and function of G-protein-coupled receptors [J]. Nature, 2009, 459: 356-363.
- [18] 林元震, 张志毅, 林善枝, 等. 运用基因组和 EST 数据库进行电子克隆分离杨树功能基因的策略 [J]. 分子植物育种, 2007, 5(4): 583-587.
Lin Y Z, Zhang Z Y, Lin S Z, et al. Strategies for in silico cloning populus functional genes based on populus genome sequence and EST database [J]. Molecular Plant Breeding, 2007, 5(4): 583-587. (in Chinese)
- [19] Oldham W M, Hamm H E. Heterotrimeric G-protein activation by G-protein-coupled receptors [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2008, 9: 60-71.
- [20] Gong Z J, Zhou W W, Yu H Z, et al. Cloning expression and functional analysis of a general odorant-binding protein 2 gene of the rice striped stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae) [J]. Insect Molecular Biology, 2009, 18(3): 405-417.

(上接第 210 页)

- [7] Blazek D, Celer V. The production and application of single-chain antibody fragments [J]. Folia Microbiol, 2003, 48(5): 687-698.
- [8] Jiang W, Bonnert T P, Venugopal K, et al. A single-chain antibody fragment expressed in bacteria neutralized tick-borne flaviviruses [J]. Virol, 1994, 200(1): 21-28.
- [9] Mason P, Berinstein A, Baxt B, et al. Cloning and expressing of a single chain antibody fragment specific for foot-and-mouth disease virus [J]. Virol, 1996, 224(2): 548-554.
- [10] Zhou T Q, Xu L, Barna D, et al. Structural definition of a conserved neutralization epitope on HIV-1 gp120 [J]. Nature, 2007, 445(7129): 732-737.
- [11] Nuc P, Nuc K. Recombinant protein production in *Escherichia coli* [J]. Postepy Biochem, 2006, 52(4): 448-456.
- [12] Chen H Y, Xu X D, Bishop A, et al. Reintroduction of the 2G12 epitope in an HIV-1 clade C gp120 [J]. AIDS, 2005, 19(8): 833-835.
- [13] Klein J S, Gnanapragasam P N, Galimidi R P, et al. Examination of the contributions of size and avidity to the neutralization mechanisms of the anti-HIV antibodies b12 and 4E10 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(18): 7385-7390.
- [14] West A P J, Galimidi R P, Gnanapragasam P N, et al. Single-chain Fv-based anti-HIV proteins: Potential and limitations [J]. J Virol, 2012, 86(1): 195-202.