

网络出版时间:2015-12-02 14:25

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2016.01.017

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20151202.1425.034.html

金纹细蛾细胞色素 CYP6 家族基因的克隆及表达

田 甜,李 鑫,郭长宁,侯 茜,王冠华,于建光

(西北农林科技大学 植物保护学院,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] **【目的】**克隆并鉴定金纹细蛾(*Phyllonorycter ringoniella*)细胞色素 CYP6 家族基因,并观察氯氟氰菊酯药剂处理后 mRNA 相对表达量的变化,为金纹细蛾细胞色素 CYP6 家族基因全长 cDNA 的获得,以及防止或延缓金纹细蛾抗药性的产生提供理论依据。**【方法】**以 GenBank 上公布的 CYP6 家族基因编码区序列为基础设计并合成简并引物;利用 RT-PCR 扩增获得序列后在 NCBI 上进行 Blastx 对比,根据 P450 基因命名法进行命名并向 GenBank 提交序列获得登录号;利用点滴法和 qRT-PCR 技术,将金纹细蛾 3 龄幼虫在氯氟氰菊酯($LC_{50} = 12.88 \text{ mg/L}$)条件下处理 24 h 后,观察其体内细胞色素 P450 基因的相对表达量。**【结果】**成功扩增出 3 个长度分别为 415,412 和 421 bp 的 cDNA 片段。同源性分析表明,3 条基因序列与 CYP6AN5、CYP6B5 和 CYP6ab 氨基酸相似性分别达 61%,59%和 71%,可将其初步均归类为 CYP6 家族,并分别命名为 *phCYP6AN5*、*phCYP6B5* 和 *phCYP6ab*,将序列信息提交至 GenBank,获得 GenBank 登录号分别为 KJ559411、KJ559412 和 KJ559413。药剂处理对 3 种基因发生了不同的诱导或抑制作用,*phCYP6AN5* 基因在受到药剂处理后相对表达量显著上升,而 *phCYP6B5* 和 *phCYP6ab* 在受到药剂处理后相对表达量显著下降。**【结论】**成功获得 3 条金纹细蛾细胞色素 CYP6 家族基因片段;诱导剂的诱导作用存在一定程度的特异性,对某种或几种 P450 酶有效应的化合物并不一定诱导其他类型的 P450。

[关键词] 金纹细蛾;细胞色素 P450;序列分析;基因表达

[中图分类号] Q785

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2016)01-0111-07

Cloning and expression of cytochrome CYP6 gene from *Phyllonorycter ringoniella*

TIAN Tian, LI Xin, GUO Chang-ning, HOU Qian, WANG Guan-hua, YU Jian-guang

(College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** This study cloned and identified cytochrome CYP6 gene from *Phyllonorycter ringoniella*, and observed the change of mRNA relative expression after cyhalothrin treatment to provide information for obtaining full length cDNA of CYP6 gene and preventing or delaying its drug resistance. **【Method】** Degenerate primers were designed and synthesized based on the available coding region of CYP6 family genes in GenBank database. Blastx comparison on NCBI was conducted after getting the fragments by RT-PCR method, and they were named according to P450 gene nomenclature before being submitted to GenBank for registration number. At last, the relative expression of cytochrome P450 genes was quantified after the 3rd instars of *Phyllonorycter ringoniella* were disposed in cyhalothrin($LC_{50} = 12.88 \text{ mg/L}$) for 24 hours by spot method and qRT-PCR. **【Result】** Three cDNA fragments with lengths of 415, 412, and 421 bp

[收稿日期] 2014-05-23

[基金项目] 陕西省农业攻关项目(2008K01-04);世界银行资助项目(Y/SHYL/XY/050)

[作者简介] 田 甜(1988—),女,天津蓟县人,在读硕士,主要从事果树害虫分子生物学研究。

E-mail: tian14720962@hotmail.com

[通信作者] 李 鑫(1957—),男,陕西岐山人,副教授,博士,硕士生导师,主要从事果树害虫管理与农业标准化研究。

E-mail: Lixin57@hotmail.com

were successfully obtained, and the similarities of amino acids were 61%, 59% and 71%, respectively by homology analysis. They were named *phCYP6AN5*, *phCYP6B5* and *phCYP6ab* and preliminarily grouped to CYP6 family. The login numbers of KJ559411, KJ559412 and KJ559413 were obtained from GenBank. The expression of *phCYP6AN5* after treatment increased, while that of *phCYP6B5* and *phCYP6ab* decreased.

【Conclusion】 This study successfully constructed three cytochrome CYP6 family genes and they had specificity to inducing agents. The compounds that were effective to P450 enzyme may not necessarily work for other types of P450.

Key words: *Phyllonorycter ringoniella*; cytochrome P450; sequence analysis; gene expression

P450 为一基因超家族,由多个基因家族组成,每个基因家族又包含若干个基因亚家族。随着分子生物学技术的发展,昆虫 P450 基因不断被分离、克隆并体外表达,其结构、功能、表达的调控及与昆虫抗药性关系的研究也不断深入^[1]。细胞色素 P450 是昆虫体内参与各类杀虫剂及其他外源性和内源性化合物代谢的主要解毒酶系——多功能氧化酶系的末端氧化酶,其可与底物结合,从 NADPH 传递电子到 NAD-PH 细胞色素 P450 还原酶^[2]。

金纹细蛾(*Phyllonorycter ringoniella*)是苹果树上一种常见的潜叶性害虫,是东亚特有种。自 20 世纪 70 年代以来,金纹细蛾的危害在我国日渐严重,已成为果园的主要害虫之一。目前,国内外关于金纹细蛾的研究主要集中在田间发生规律、越冬蛹保存及其寄生蜂等方面^[3-4],而有关其分子生物学方面的研究却鲜有报道。

细胞色素 P450 与昆虫的抗药性关系密切^[5-6],但目前有关细胞色素 P450 基因的克隆及其解毒作用的研究主要集中于家蝇、果蝇、棉铃虫上^[7]。本研究利用 RT-PCR 技术克隆了金纹细蛾细胞色素 P450 基因片段,并通过 qRT-PCR 技术检测了细胞色素 P450 基因在氯氟氰菊酯胁迫处理后的表达,为金纹细蛾细胞色素 P450 基因全长的获得,以及防止或延缓金纹细蛾抗药性的产生提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

供试虫源来自西北农林科技大学应用昆虫学重点实验室温室。金纹细蛾虫疤叶采自陕西洛川果园,解剖虫疤叶,将得到的蛹置于 4℃ 冰箱保存。翌年 4 月,将蛹接种到苹果树上,在西北农林科技大学应用昆虫学重点实验室温室内进行饲养。饲养温度为(25±2)℃,光周期为 16L/8D,相对湿度为(70±10)%。7 月收集健康虫源进行试验。

抗药试验虫源处理参照毛细管点滴法^[8]。首先

在双筒解剖镜下挑取正在取食活动的 3 龄幼虫带叶供试。将氯氟氰菊酯用丙酮稀释后,用毛细管点滴器点滴处理幼虫腹部后半部分的背面,并在点滴前先揭去这部分的外叶膜,以丙酮点滴处理为对照。毛细管点滴器容积为 0.050~0.067 μL,每处理 30 头,3 个重复。处理后将试虫放入培养皿内保湿,并置于恒温室((25±2)℃)中,24 h 后镜检死亡率。

1.2 主要试剂

上海生工生物公司的 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒、SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒;Thermo 公司的 RevertAid First Stand cDNA Synthesis Kit;康为世纪的 DM 2000 DNA Marker、琼脂糖、2×ES Master mix Taq 酶、UltraSYBR Mixture。本试验所用的 PCR 引物均由上海生工生物公司合成。

1.3 P450 基因克隆及 mRNA 表达水平检测

1.3.1 引物设计 本试验所用到的引物均使用 Primer 5.0 软件设计,引物序列见表 1。*phA*、*phB* 和 *phC* 为根据 P450 基因保守序列设计的 3 对简并引物,预期 cDNA 扩增产物长度为 400 bp 左右。*phCYP6AN5-R* 和 *phCYP6AN5-F*、*phCYP6B5-R* 和 *phCYP6B5-F*、*phCYP6ab-R* 和 *phCYP6ab-F*、 β -actin-R 和 β -actin-F 为基因特异性引物,分别用于 qRT-PCR 分析。

1.3.2 总 RNA 的提取及反转录 1)灭菌和无菌处理。将试验器具用 1/1 000 DEPC 水浸泡 24 h,在 120℃、0.1 MPa 下高温灭菌 20 min,之后置于烘箱内 60℃ 处理至干燥备用。

2)总 RNA 的提取。取 30 头 3 龄中期金纹细蛾幼虫快速放入经液氮预冷的研钵中并快速向研钵中加入液氮。先缓缓研磨,待液氮挥发殆尽时加速研磨,如此反复 2~3 次,直至样品完全变成白色粉末。将白色粉末用小勺小心移至盛有 500 μL Trizol 试剂的 1.5 mL 无菌离心管中,轻微振荡混匀后室温放置 10 min。之后 12 000 r/min、4℃ 离心 10

min。将上清液用移液枪移至另一新的 1.5 mL 离心管中,加入 0.2 mL 氯仿,剧烈振荡 30 s,室温放置 3 min,12 000 r/min、4 ℃离心 10 min。将上清液用移液枪移至另一新的 1.5 mL 离心管中,加入 1/2 倍上清液体积的无水乙醇,轻微颠倒混匀。同时将吸附柱放入收集管中,用移液枪将溶液全部加至吸附柱中,静置 2 min,12 000 r/min 室温离心 3 min,倒掉收集管中的废液。将吸附柱放回收集管中,加入 500 μ L RPE Solution,静置 2 min,10 000 r/min 室温离心 30 s,倒掉收集管中废液。重复该步骤一次。将吸附柱放回收集管中,10 000 r/min 室温空离心 2 min,去除残余的乙醇。将吸附柱放入另一干净的 1.5 mL 离心管中,在吸附膜中央悬空加入 30 μ L DEPC-treated ddH₂O,静置 5 min,12 000 r/min

室温离心 2 min,将所得到的 RNA 溶液置于-70 ℃保存,用于后续试验。

3)第 1 链合成。在冰浴的无核酸酶的 PCR 管中加入 2 μ g 总 RNA,2 μ L Oligo (dT)15,2 μ L(2.5 mmol/L) dNTP,再加 RNA-free ddH₂O 至 14.5 μ L,将上述溶液于 PCR 仪中 70 ℃温浴 5 min 后迅速在冰上冷却 2 min。然后 12 000 r/min 室温离心 1 min,按顺序加入以下组分:4 μ L 5 $\times$ Firststand Buffer(含 DTT),0.5 μ L Rnasin,1 μ L(200 U) TIANScript M-MLV,用移液枪轻轻混匀。然后于 PCR 仪中 42 ℃温浴 50 min,之后加热至 95 ℃终止反应。加入 RNA-free ddH₂O 将反应体系稀释至 50 μ L,所得 cDNA 模板于-20 ℃保存待用。

表 1 本研究中所用引物
Table 1 Primers used in the study

引物名称 Primer name	引物碱基序列(5'→3') Sequence of primer	目标片段长度/bp Fragment size
<i>ph</i> Δ-R	CGGARACNHYNMGNAARTAYCC	350~400
<i>ph</i> Δ-F	CGGGNCCNKCNCRAANGG	
<i>ph</i> B-R	GCGYGGNTTYGARACNTCNTCNAC	
<i>ph</i> B-F	CGNGGNCCYTCNCCNAARGG	350~400
<i>ph</i> C-R	GARACNCTNCGNAARTAYCCYC	
<i>ph</i> C-F	CCRAANCGCATNCCDATRC	
<i>ph</i> CYP6AN5-R	TGATCCCGGTACATTCCATACAAAA	90~200
<i>ph</i> CYP6AN5-F	TAGGTCCTTCTCCAAATGGCAAATA	
<i>ph</i> CYP6B5-R	TCAGGAATCCCAAAGACGGAACAG	90~200
<i>ph</i> CYP6B5-F	CTTCTACATCAACTGGCGTATCATC	
<i>ph</i> CYP6ab-R	CCATTGACGATAGCGTTGTAGTGAT	90~200
<i>ph</i> CYP6ab-F	CTTCTCCAAAAGGCAAATAAGCAAA	
β -actin-R	CGTGATCTCACCGATTACCTTA	100~150
β -actin-F	GCAGCAGTAGCCATTTCTTGTT	

1.3.3 RT-PCR 的扩增 PCR 反应体系(25 μ L): 12.5 μ L 2 $\times$ ES Master mix *Taq* 酶,1 μ L 上游引物(10 μ mol/L),1 μ L 下游引物(10 μ mol/L),1 μ L cDNA 模板,9.5 μ L RNase-free water。PCR 反应条件:94 ℃预变性 1 min;94 ℃ 30 s,45 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,30 个循环;最后 72 ℃延伸 5 min。PCR 产物检测:均用 1.5%的琼脂糖凝胶进行电泳检测。电泳条件:100 V,40 min。电泳结束后用 EB 染色并照相观察。

1.3.4 基因克隆与测序 基因克隆采用上海生工生物公司的克隆试剂盒。将已纯化的 3 对引物的 PCR 产物分别连接到 pUCm-T 载体后转入感受态细胞。根据蓝白斑筛选原理,选择白色菌落,用 LB 液体培养后选择其菌液抽提质粒 DNA。3 组产物每组挑取 5 个单克隆送至上海生工生物公司进行测序,测序结果经 NCBI 数据库中的 Blastx 比对,进行

序列鉴定。

1.3.5 实时定量 PCR 扩增和定量方法 qRT-PCR 反应体系为(25 μ L):12.5 μ L 2 $\times$ UltraSYBR Mixture,1 μ L cDNA,上、下游引物各 1 μ L,9.5 μ L RNase-free water。反应条件:95 ℃ 3 min;95 ℃ 20 s,56 ℃ 20 s,72 ℃ 20 s,50 个循环;熔解步骤:65 ℃开始收集信号,每 10 s 升高 0.5 ℃,到 95 ℃结束。定量方法采用比较 C_T 相对定量法^[9]。该方法在假设目标基因片段和持家基因片段扩增效率一致的情况下,cDNA 表达量为 2^{- $\Delta\Delta C_T$} ($\Delta C_T = C_{T\text{目标基因}} - C_{T\text{持家基因}}$, $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T\text{样品}} - \Delta C_{T\text{参照物}}$)。本研究采用组成性表达延伸因子 β actin 作为内参基因。

1.4 数据分析

本试验通过 BIO-RAD IQ5 荧光定量读取数据,采用比较 C_T 相对定量法^[9]作为基因表达的相对指标进行数据分析,数据统计分析采用

SPSS 17.0 软件中单因素方差分析,进行 Duncan 多重比较,通过 OriginProPorable 8.5 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 金纹细蛾 CYP6AN5、CYP6B5 和 CYP6ab 基因的克隆及序列分析

2.1.1 总 RNA 的提取与检测 以金纹细蛾幼虫

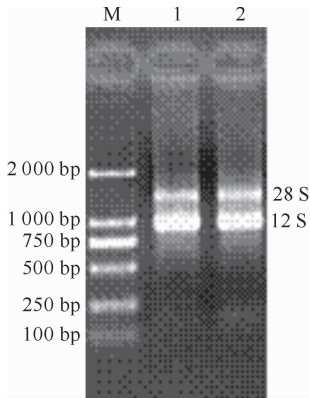


图 1 金纹细蛾总 RNA 提取结果

1,2. 提取的总 RNA;M. DNA Marker DL2000

Fig. 1 Total RNA from *Phyllonorycter ringoniella*

1,2. Extraction of total RNA;M. DNA Marker DL2000

2.1.3 序列鉴定与分析 测序所得的 3 条序列片段经 NCBI 数据库的 Blastx 比对,结果见表 2。表 2 结果显示;所克隆的基因片段全部属于 P450 基因超家族,按照 P450 基因的命名法则^[10],可将其初步均

提取的总 RNA 检测结果(图 1)显示,经 NanoDrop 2000 微量紫外分光光度计测得 A_{260}/A_{280} 均在 1.8~2.0,表明 RNA 纯度较高,可用于后续试验。

2.1.2 RT-PCR 扩增检测 以金纹细蛾总 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板,用简并引物进行扩增后经凝胶电泳检测,3 条序列长度分别为 415,412 和 421 bp(图 2),与预期结果相符。

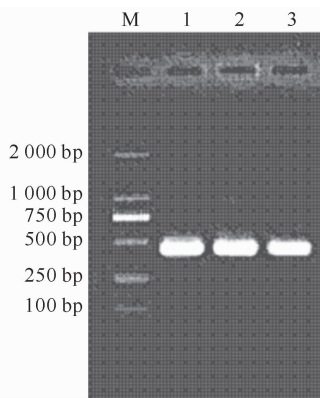


图 2 RT-PCR 扩增产物凝胶电泳结果

1~3. 不同引物的 PCR 扩增产物;M. DNA Marker DL2000

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products

1—3. Amplified fragments of different primers;

M. DNA Marker DL2000

归类为 CYP6 家族,并分别命名为 *phCYP6AN5*、*phCYP6B5* 和 *phCYP6ab*,将序列信息提交至 GenBank,获得 GenBank 登录号分别为 KJ559411、KJ559412 和 KJ559413。

表 2 所得 3 条金纹细蛾 P450 序列的最佳匹配

Table 2 Best matches of the 3 P450 clones of *Phyllonorycter ringoniella*

基因片段 Fragment	物种 Species	最佳匹配基因 Best match	最大相似值/% Maximum similarity	GenBank 登录号 Accession number of GenBank
I	烟草天蛾 <i>Manduca sexta</i>	CYP6AN5	61	KJ559411
II	家蚕 <i>Bombyx mori</i>	CYP6B5	59	KJ559412
III	甘蓝夜蛾 <i>Mamestra brassicae</i>	CYP6ab	71	KJ559413

表 3 中 9 条氨基酸序列与所得的 3 条氨基酸序列进行的同源性比对结果如图 3 所示。

表 3 不同物种 9 个 P450 基因片段的最佳匹配

Table 3 Best matches of the selected 9 P450 cDNA fragments

序列 Fragment	物种 Species	GenBank 登录号 Accession number of GenBank	最佳匹配基因 Best match	最大相似性/% Maximum similarity
A1	家蚕 <i>Bombyx mori</i>	XP_004934109.1	CYP6B5-like	59
A2	地中海实蝇 <i>Ceratitis capitata</i>	XP_004521370.1	CYP6a13-like	50
A3	甘蓝夜蛾 <i>Mamestra brassicae</i>	AGB93713.1	CYP6ab	71
A4	花翅摇蚊 <i>Chironomus kiiensis</i>	AHJ10931.1	CYP6EV10	49
A5	灰翅夜蛾 <i>Spodoptera littoralis</i>	AFP20585.1	CYP6AN4	60
A6	家蚕 <i>Bombyx mori</i>	BAM73815.1	P450	52
A7	舞毒蛾 <i>Lymantria dispar</i>	AHH92935.1	CYP6AB33	56
A8	烟草天蛾 <i>Manduca sexta</i>	ADE05585.1	CYP6AN5	61
A9	野桑蚕 <i>Bombyx mandarina</i>	ACN88551.1	CYP6AB5	51

由图 3 可知,这 12 条序列上游均含有对应引物的 AGFETSST(残基 1—8)区域,下游均含有对应引物的 P(F/L)GEGPR(残基 135—141)区域,氨基

酸序列中部还含有 P450 蛋白的特征区域 ExxR(残基 69—72)和 PERF(残基 116—119)。

I	1	AGFETSST	-T	SYLIHELALN	PEIQRKVQED	IDNVLARYDN	KLCYEAVAEM
II	1	AGFETSS	-T	SFLHLQLAYH	PDIQIQCCQE	IDLVISKHGG	NLCYDAIKEL
III	1	AGFETSST	TS	SYTLHQLAFN	PECQEKVHKE	IDTVLAKHGN	KITYDAIQEM
A1	1	AGFETSSS	AT	SFTLHQLAFH	PEIQEKVQKE	LDQVLAKYNN	KLCYDAIKEM
A2	1	AGFETSSSNM		SYGLFEMAKN	PHVQEKVRAE	ILSVLEKHNG	ELTYEAMMEM
A3	1	AGFETSSTAS		SYTLHQLAFN	PECQEKQTKE	IDEVLSKHNN	KITYDAIKEM
A4	1	AGFETSSSAT		SFMLHQLAFH	PEEQRKIQEN	IDQVLAKYDN	KLCYDSISEM
A5	1	AGFETSSSAS		SYTLHQLAYN	PDIQRQVQEN	IDEVLNKYNG	ELCYDAIAEM
A6	1	AGFETSSTAS		SYALHQLAFH	PEYQKKVQQE	IDTVLAKHNN	KITYDAVKEM
A7	1	AGFETSSSAS		SFTLHQLAYN	QDIQKKAQAE	VDRVLNLYNG	KLCYDAIKEM
A8	1	AGFETSSSAM		TFCTYELALN	QTIQDRLRDE	IEEVLRRYNG	ELTYDAISEM
A9	1	AGFETSSTAS		SYTLHQLAFN	PECQEKQTKE	IDEVLSKHNN	NITYDAIKEM
I	60	-YLDMA	LKES LR	LFPSLGLV	NRVCTR-KYT	FPGD	TLTIDP GVKVMIPVHS
II	60	KYLEM	CFKKEG LR	LFPSLGLF	IRKCVR-KYR	IPNTD	VVVVDK GVSIMIPVHA
III	60	SYLMA	FAFSEAM	MYPSVGFL	IRKCVTPDYT	IPEDV	LTID SVVVMIPVQA
A1	60	RYLES	AFKKEAM	MFPSLGLF	IRECAR-QYT	FPEL	NLTIDE GVGIIIPLQA
A2	60	TYLDQ	VITET LR	LKHPALAAL	N-RCANEDFK	VGTD	ITILEK GTNIYIPVKE
A3	60	TYLEMA	FNEMAR	LYPSVGYL	VRMCTVPEYT	FPEIN	LTINE DVKLMIPPIQA
A4	60	TALSN	GFKEAMR	LFPSLGT	LHRVCAQ-KYT	IPEMG	ITLDP GVKIIVPVQA
A5	60	KLLSMA	FAFKEAM	MFPSLGLV	SRVCAR-RYT	IPELN	ITINP GVKILIPLEG
A6	60	KYLEMA	FYESMR	MYPSVGYL	IRMCCVPEYT	IPED	LTIN DVKVIIPPIQA
A7	60	TYLEWA	FAFKEGMR	MFPSLGLF	MRQCTK-PYT	FPELN	LTIDE NIRIMIPLQA
A8	60	KYLDM	VFKET LR	RYPILD	SHMRKCVK-DYK	IPNTN	LVIPS GVTILVPVYA
A9	60	TYLEMA	FNEMAR	LYPSVGYL	VRMCTVPEYT	FPEIN	LTINE DVKLMIPPIQA
I	101	IQNDE	KYYDN	PTEFR	PERFL	PEEVQ	KRH-K FVYLPLGEGPR
II	101	MQNDER	YFDS	PEEFR	PERFH	-PD	LAVDLKK HVYLPLGEGPR
III	101	LHNDA	KYFKE	PDKFI	PERFS	-NENK	KHIPK FAYLPPFEGPR
A1	101	LHNDP	EYFDS	PNEFR	PERFM	PSEYN	NHNKTK FVYLPPFEGPR
A2	101	IHYD	PDIYDN	PSEFR	PERFN	PEEAQ	KRHP QAFLPPFEGPR
A3	101	IHKDE	KYFKD	PERFH	PERFS	SGAKA	NLKP YTFLPPFEGPR
A4	101	IQVDG	KYFEN	PTEFN	PD	RNF -DTS	ADRH-K FAYLPPFEGPR
A5	101	IQNDE	KYFTN	PKEFR	PERFS	PDAMK	EQQ-K FSYMPFEGPR
A6	101	IHRDE	KYFRE	PHKFD	PERFS	DG	TKEDIKN FVYLPPFEGPR
A7	101	MHNDE	KYFDN	PQEFQ	PERFD	PDEFD	VNN-K YVYLPPFEGPR
A8	101	IQNDE	EYFTN	PEKFD	PERFT	EENVK	KQIP FTYMPFEGPR
A9	101	IHKDE	KYFKD	PERFH	PERFS	SGAKA	NLKP YTFLPPFEGPR

图 3 金纹细蛾 CYP6 氨基酸序列与其他物种氨基酸序列比对结果

上游均含有对应引物的 AGFETSST(残基 1—8)区域,下游均含有对应引物的 P(F/L)GEGPR(残基 135—141)区域,

氨基酸序列中部还含有 P450 蛋白的特征区域 ExxR(残基 69—72)和 PERF(残基 116—119)。I ~ III 和 A1~A9 代表的序列同表 2 和表 3

Fig. 3 Comparison of acid sequences between *Phyllonorycter ringoniella* and other species

Upstream contains the corresponding primer AGFETSST (residues 1—8),downstream contains corresponding primer P(F/L)

GEGPR(residues 135—141),central amino acid sequence contains P450 protein characteristic regions ExxR (residues 69—72) and

PERF (residues 116—119). The suquenle of I—III and A1—A9 are the same with table 2 and 3

2.2 药剂处理后金纹细蛾细胞色素 P450 基因表达的变化

2.2.1 PCR 产物熔解曲线及荧光定量 PCR 扩增效率的一致性 研究采用荧光染料 SYBR Green I 作为实时定量 PCR 检测的荧光化学物质,由于它可以与任何双链 DNA(如引物二聚体或非特异目标产物)结合,易产生假阳性信号^[11]。因此,必须利用熔解曲线观察产物的生成情况,确认检测基因所用引物的特异性。本试验中所比较的 3 个 P450 基因和 1 个持家基因(β actin)的熔解曲线都只有 1 个峰,表明其扩增产物只有 1 个。用 cDNA 系列稀释液测定这 4 个基因的荧光定量 PCR 扩增标准曲线,检测目标基因与持家基因扩增效率的一致性,结果见图

4。从图 4 可以看出,各标准曲线的斜率一致,表明这 3 个 P450 基因的扩增效率是一致的,因此可以采用比较 C_T 相对定量法(即 2^{- $\Delta\Delta$ C_T} 法)进行基因表达量的比较。

2.2.2 细胞色素 P450 基因相对表达量的比较 金纹细蛾 3 龄幼虫在氯氟氰菊酯 LC₅₀ = 12.88 mg/L 条件下处理 24 h 后,其体内细胞色素 P450 基因的相对表达量如图 5 所示。由图 5 可见,细胞色素 P450 基因在未受到药剂处理和受到药剂处理条件下均有表达。*phCYP6AN5* 基因在受到药剂处理后相对表达量显著上升,说明该药剂在 LC₅₀ = 12.88 mg/L 条件下处理 24 h 后对 *phCYP6AN5* 基因起到一定诱导作用,而 *phCYP6B5* 和 *phCYP6ab* 在受

到药剂处理后的相对表达量显著下降,说明该药剂处理 24 h 后,对这 2 个基因产生了抑制作用,并且

前者大于后者。

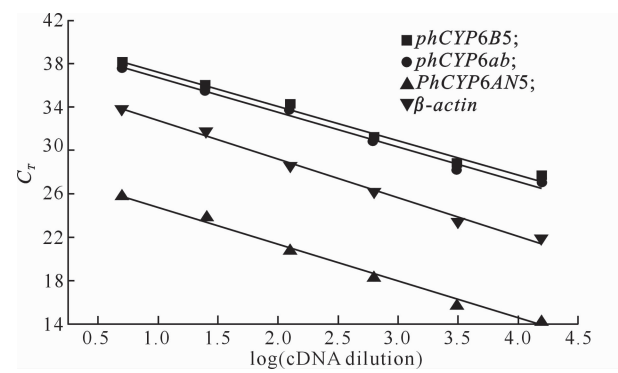


图 4 金纹细蛾 *phCYP6AN5*、*phCYP6B5* 和 *phCYP6ab* 和 β -actin 基因实时定量 PCR 扩增标准曲线

Fig. 4 Standard curves of *phCYP6AN5*, *phCYP6B5*, and *phCYP6ab* of *Phyllonorycter ringoniella* and β -actin by real-time PCR amplification

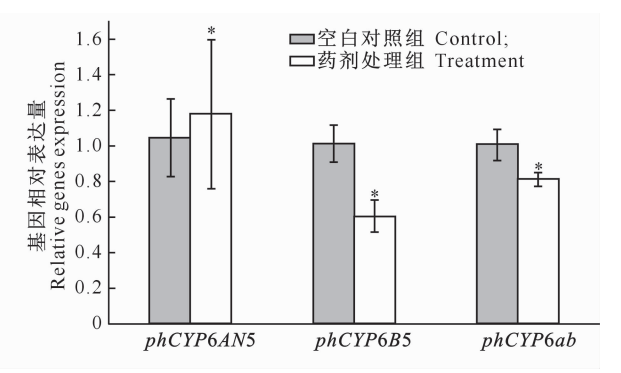


图 5 金纹细蛾 3 龄幼虫细胞色素 P450 基因的相对表达情况

* 表示与空白对照组相比差异显著 ($P < 0.05$)

Fig. 5 Relative expression of cytochrome P450 genes of *Phyllonorycter ringoniella* 3rd larvae exposed Compared with blank control, * indicates significant difference ($P < 0.05$)

3 讨 论

本研究利用 RT-PCT 技术克隆得到 3 条金纹细蛾细胞色素 P450 CYP6 家族基因序列,同源性分析表明,3 条基因序列与 CYP6AN5、CYP6B5 和 CYP6ab 氨基酸相似性分别为 61%,59%和 71%。

从第一个昆虫 CYP6 家族基因 CYP6A1 被分离鉴定,迄今为止,已有大量研究证明 CYP6 家族与昆虫的抗性密切相关。而这一特性与 CYP6 家族成员的作用底物密不可分。例如,家蝇(*Musca domestica*) CYP6A1 的诱导物为苯巴比妥和胡椒基丁醚^[2];CYP6A2 和 CYP6D1 的作用底物为苯巴比妥和吡虫啉^[12];CYP6A8 和 CYP6A9 的诱导底物为巴比妥^[13];黑凤蝶(*Papilio protenor*) CYP6B1 和 CYP6B3 的诱导物为花椒毒素^[14];棉铃虫(*Helicoverpa armigera*) CYP6B2 的诱导物则为薄荷油^[15]。不同种类的诱导底物使得这些 CYP6 家族成员可以介导多种外源有害化合物的代谢。于是,对昆虫抗性的重视也使得 CYP6 家族成为过去几十年昆虫 P450s 研究的重点。本研究对金纹细蛾细胞色素 CYP6 家族基因进行克隆与分析,从而为后续对其抗性研究提供依据。

诱导剂的诱导作用存在一定程度的特异性,对某种或几种 P450 酶有效应的化合物并不一定诱导其他类型的 P450。例如,家蝇 CYP6A1 mRNA 和 CYP6D1 编码的蛋白 P450LPR 均可被苯巴比妥

(PB)和增效醚(pbo)诱导,但均不被萘、环戊二烯类(如狄氏剂或艾氏剂)、DDT 诱导,而乙醇仅能诱导 CYP6A1^[16]。在黑凤蝶(*Papilio polyxenes*)中,CYP6B1 只能被线性呋喃香豆素所诱导,而 CYP6B3 也可以被角型的呋喃香豆素诱导^[17]。另外,同一诱导剂也可能同时对多种酶产生诱导,表现出诱导效应的重叠性。例如北美黑尾凤蝶(*Palio polyxene*)CYP6B1 基因 mRNA 的诱导剂黄原毒素(xanthotoxin)^[17],也可诱导 P450LPR^[16]。

本研究通过 qRT-PCR 技术研究发现,在 $LC_{50} = 12.88$ mg/L 的氯氟氰菊酯诱导处理 24 h 后,金纹细蛾体内不同细胞色素 P450 基因的相对表达量不同,可能是因为氯氟氰菊酯某种成分与这 3 种细胞色素 P450 基因的某些作用位点发生了结合,抑制或促进了相关基因的表达。至于细胞色素 P450 基因之间的具体功能和调控模式,以及在不同种类药剂或者同一种药剂不同质量浓度处理后是否具有同样的表达趋势,还需要进一步的探讨和研究。

【参考文献】

[1] 程 鹏,曹银光,公茂庆.细胞色素 P450 介导的昆虫抗药性研究进展 [J]. 中国病原生物学杂志,2009,4(1):62-65.
Cheng P, Cao Y G, Gong M Q. The progress of cytochrome P450 mediated insecticide resistance [J]. Journal of Pathogen Biology, 2009, 4(1): 62-65. (in Chinese)

[2] Feyerisen R. Insect P450 enzymes [J]. Ann Rev Entomol, 1999, 44: 507-533.

[3] 孟 芳,李 鑫,张金钰,等.金纹细蛾及其优势寄生蜂主要行

为的研究 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2010,38(5):90-100.

Meng F,Li X,Zhang J Y,et al. Behaviors of the asiatic apple leaf-miner, *Lithocolletis ringoniella* Mats. and its dominant parasitic wasps [J]. Journal of Northwest A&F University: Nat Sci Ed,2010,38(5):90-100. (in Chinese)

[4] 马 丽,刘玉玉,赵微微,等. 陕西洛川苹果树冠金纹细蛾幼虫空间结构分析 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2009,37(3):169-174.

Ma L,Liu Y Y,Zhao W W,et al. Spatial distribution pattern of larvae of *Lithocolletis ringoniella* in the crown of apple trees [J]. Journal of Northwest A&F University: Nat Sci Ed,2009,37(3):169-174. (in Chinese)

[5] 陈秋霞,黄炯烈. 昆虫细胞色素 P450 的诱导和抗药性 [J]. 热带医学杂志,2001,1(1):67-71.

Chen Q X,Huang J L. Induction and resistance of insect cytochrome P450 [J]. Journal of Tropical Medicine,2001,1(1):67-71. (in Chinese)

[6] 邱星辉,何凤琴,李 梅. 昆虫细胞色素 P450 研究的一些新进展 [J]. 生命的化学,2003,23(4):279-281.

Qiu X H,He F Q,Li M. Cytochrome P450 mediated insect resistance [J]. Chemistry of Life,2003,23(4):279-281. (in Chinese)

[7] Shen B C,Zhao D X,Qiao C L,et al. Cloning of CYP9G2 from the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidopera: Yponomeutidae) [J]. DNA Sequence,2004,15(3):228-233.

[8] 王 强,赵学平,吴长兴. 柑桔潜叶蛾对两种拟除虫菊酯类杀虫剂的抗性测定 [J]. 浙江农业学报,1996,8(5):290-293.

Wang Q,Zhao X P,Wu C X. On resistance of citrus leafminer, *Phyllocnistis citrellastainton*, to two pyrethroids and screening of new insecticides for its control [J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis,1996,8(5):290-293. (in Chinese)

[9] Livak K J,Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method [J]. Methods,2001,25(4):402-408.

[10] Nelson D R. The P450 superfamily; Update on new sequences, gene mapping,aaccession numbers,early trivial names of enzymes,and nomenclature [J]. DNA and Cell Biology,1993,12:1-51.

[11] 岳丽娜,杨亦桦,武淑文. 棉铃虫 P450 基因 CYP6AE12 和 CYP9A18 的克隆与 mRNA 表达水平 [J]. 昆虫学报,2007,50(3):234-240.

Yue L N,Yang Y H,Wu S W. Cloning and mRNA expression levels of cytochrome P450 genes CYP6AE12 and CYP9A18 in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) [J]. Acta Entomologica Sinica,2007,50(3):234-240. (in Chinese)

[12] Dunkov B C,Guzov V M,Mocelin G,et al. The drosophila cytochrome P450 gene CYP6A2; Structure,localization,heterologous expression, and induction by phénobarbita [J]. DNA and Cell Biology,2011(16):1345-1356.

[13] Helviga C,Tijet N,Feyereisen R,et al. *Drosophila melanogaster* CYP6A8,an insect P450 that catalyzes lauric acid (w-1)-hydroxylation [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications,2004,325:1495-1502.

[14] Wauthier V,Verbeeck R K,Calderon P B. The effect of ageing on cytochrome P450 enzymes;Consequences for drug biotransformation in the elderly [J]. Curr Med Chem,2007,14:745-757.

[15] Feyereisen R. Insect CYP genes and P450 enzymes [J]. Insect Biochem Molec Biol,2012:236-316.

[16] Scott J G. Cytochrome P450 monooxygenase-mediated resistance to insecticides [J]. J Pestic Sci,1996,21:241-245.

[17] Prapaipong H,Berenbaum M R,Schuler M A. Transcriptional regulation of the *Papilio polyxenes* CYP6B1 gene [J]. Nucl Acid Res,1994,22:3201-3217.