

棉铃虫 P450 基因 *CYP6AE12* 和 *CYP9A18* 的克隆与 mRNA 表达水平

岳丽娜 杨亦桦 武淑文 吴益东*

(南京农业大学植物保护学院昆虫学系, 农业部病虫监测与治理重点开放实验室, 南京 210095)

摘要: 采用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆到 2 个新的棉铃虫细胞色素 P450 基因: *CYP6AE12* 和 *CYP9A18*。 *CYP6AE12* 的 cDNA 编码区长 1 569 bp, 编码 523 个氨基酸; *CYP9A18* 的 cDNA 编码区长 1 590 bp, 编码 530 个氨基酸。用实时定量 PCR 技术分析了这 2 个基因在棉铃虫 YS 敏感品系和 YS-FP 抗性品系(由氰戊菊酯加辛硫磷混剂筛选 YS 品系而得) 6 龄幼虫脂肪体和中肠中 mRNA 的表达水平。结果表明: *CYP6AE12* 和 *CYP9A18* 的 mRNA 表达具有组织特异性, *CYP6AE12* 在脂肪体中表达量较高, 而 *CYP9A18* 在中肠中的表达量较高。与相对敏感品系 YS 相比, *CYP6AE12* 在 YS-FP 抗性品系中肠和脂肪体中的 mRNA 表达量分别为 YS 品系的 3.6 倍和 1.3 倍; *CYP9A18* 在 YS-FP 品系中肠和脂肪体的 mRNA 表达量分别为 YS 品系的 0.3 倍和 1.0 倍。 *CYP6AE12* 的过量表达与 YS-FP 品系棉铃虫的抗药性可能有一定关系。

关键词: 棉铃虫; 细胞色素 P450; 实时定量 PCR; P450 基因

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2007)03-0234-07

Cloning and mRNA expression levels of cytochrome P450 genes *CYP6AE12* and *CYP9A18* in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner)

YUE Li-Na, YANG Yi-Hua, WU Shu-Wen, WU Yi-Dong* (Department of Entomology, College of Plant Protection, Key Laboratory of Monitoring and Management of Plant Diseases and Pest Insects, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Two novel P450 genes (*CYP9A18* and *CYP6AE12*) from the insecticide-resistant strain (YS-FP) of *Helicoverpa armigera* (Hübner) were cloned with RT-PCR and RACE. The coding region of *CYP6AE12* cDNA is 1 569 bp, encoding a protein of 523 amino acids, while that of *CYP9A18* cDNA is 1 590 bp, encoding a protein of 530 amino acids. Using real-time quantitative PCR, mRNA expression levels of *CYP6AE12* and *CYP9A18* were compared between the resistant strain YS-FP (derived from a susceptible strain YS through laboratory selection) and the YS strain respectively. The results showed that the expression of *CYP6AE12* was higher in fat body than in midgut in the 6th instar larvae of both strains, whereas the expression of *CYP9A18* was higher in midgut than in fat body. Compared with the YS strain, *CYP6AE12* in fat body and midgut of the YS-FP strain was 1.3- and 3.6-fold over-expressed respectively, while *CYP9A18* was not over-expressed in both midgut and fat body of the YS-FP strain. The results suggested that *CYP6AE12* was probably involved in pyrethroid resistance in the resistant YS-FP strain of *H. armigera*.

Key words: *Helicoverpa armigera*; cytochrome P450; real-time PCR; P450 genes

细胞色素 P450 氧化酶是一类在细菌、真菌、植物和动物体内广泛存在的代谢系统。在昆虫体内, 它既参与保幼激素、蜕皮激素和脂肪酸等内源化合物的生物合成和调节, 同时又是代谢外源化合物如

杀虫剂、植物次生代谢物等的主要解毒酶 (Feyereisen, 1999)。而细胞色素 P450 基因作为一个最古老和最庞大的超基因家族之一, 现有研究表明它至少由 70 个家族和 127 个亚家族组成。目前在

基金项目: 国家自然科学基金项目(30471154); 高校博士点专项基金(20040307022)

作者简介: 岳丽娜, 女, 1980 年生, 硕士研究生, 研究方向为昆虫分子毒理学, E-mail: linayue_80@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: wyd@njau.edu.cn

收稿日期 Received: 2006-06-05; 接受日期 Accepted: 2006-08-08

昆虫中已发现 28 个 P450 基因家族和数百个 P450 基因。黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 和冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 分别具有 90 个和 111 个 P450 基因(含假基因)(Feyereisen, 2005)。由于一个或几个 P450 基因过量表达导致 P450 解毒酶量的增加是导致昆虫对杀虫剂产生抗性的重要原因之一(Scott, 1999; Feyereisen, 1999, 2005)。

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 是一种公认的世界性农业害虫。在过去的 40 年里,由于大量使用各种不同的农药进行棉铃虫的田间防治,使得它在亚洲、非洲、欧洲南部和澳大利亚等广大地区均对常用药剂如有机磷类、氨基甲酸酯类和拟除虫菊酯类杀虫剂产生了抗性(McCaffery, 1998),特别是对拟除虫菊酯产生了严重的抗性,使得这类药剂在田间防治中基本失效,严重影响着棉花的生产。并且正是由于这一重要原因,直接导致了 Bt 抗虫棉在上述许多地方的推广。棉铃虫对拟除虫菊酯类药剂的抗性机制涉及到药剂的穿透速率降低、神经敏感性下降和解毒酶的代谢能力增强三个方面。目前绝大多数的研究结果均证实,细胞色素 P450 氧化酶活力增强是棉铃虫对拟除虫菊酯最重要的代谢抗性机理(Ahmad and McCaffery, 1991; 吴益东等, 1995; Martin *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2005)。

目前从棉铃虫中共克隆了 42 个 P450 基因(片段或全长),其中可能与抗药性相关的 P450 基因有 *CYP6B7* (Ranasinghe *et al.*, 1998; Ranasinghe and Hobbs, 1998), *CYP4G8* (Pittendrigh *et al.*, 1997), *CYP9A12*、*CYP9A14* 和 *CYP9A17v2* (Yang *et al.*, 2004; 杨亦桦, 2005)。Yang 等(2005)用氰戊菊酯-辛硫磷混剂在室内连续筛选获得一个对拟除虫菊酯具高水平抗性的棉铃虫品系(YS-FP),并且从生测和生化水平上证实了氧化代谢增强是其抗性形成的主要机理。我们以棉铃虫 YS-FP 高抗品系为材料,克隆到两个新的 P450 基因(*CYP6AE12*, *CYP9A18*),并通过实时定量 PCR(real-time PCR)比较了这两个基因在敏感和抗性品系中的 mRNA 表达量,探讨了这两个 P450 基因在棉铃虫对拟除虫菊酯抗性形成中的作用,结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

棉铃虫 YS 品系为一个相对敏感品系,1991 年

采自河南偃师,在室内饲养期间不接触任何农药,毒力测定结果表明该品系对常用杀虫剂为低水平抗性(<5 倍)。棉铃虫 YS-FP 抗性品系由 YS 品系在室内经氰戊菊酯-辛硫磷混剂筛选获得,对氰戊菊酯抗性倍数高于 2 000 倍(Yang *et al.*, 2005)。

棉铃虫饲养方法参照谭福杰(1987)方法。

1.2 主要试剂

SV Total RNA Isolation System Kit、pGEM-T Easy Vector、M-MLV 和限制性内切酶 *EcoR* I 均为 Promega 公司产品;BD SMART™ RACE cDNA 扩增试剂盒为 BD Biosciences 公司产品;rTaqDNA 聚合酶、dNTPs (10 mol/L)为 TaKaRa 公司产品;DNA 凝胶回收和质粒提取试剂盒为 OMEGA 公司产品;Real-time PCR Master Mix 试剂为日本东洋纺(TOYOBO)产品;引物由上海英俊生物技术有限公司合成;琼脂糖、RNase、DEPC、IPTG、X-Gal 均为南京赛吉公司进口分装产品。

1.3 P450 基因克隆及 mRNA 表达水平检测

1.3.1 引物:本实验所用到的引物均使用 Primer5.0 软件设计,引物序列见表 1。GDP-F 和 GDP-R 为根据 P450 基因保守序列设计的一对简并引物,预期 cDNA 扩增产物长度为 450 bp 左右。GSP6AE-F 和 GSP6AE-R、GSP9A18-F 和 GSP9A18-R、EF-F 和 EF-R(扩增持家基因 *EF-1 α* cDNA 片段)为基因特异性引物,分别用于进行实时定量 PCR 分析。Full_6AE-F 和 Full_6AE-R 用于扩增 *CYP6AE12* 编码区 cDNA, Full_9A18-F 和 Full_9A18-R 用于扩增 *CYP9A18* 编码区 cDNA。

表 1 本研究中所用到的引物

Table 1 Primers used in the study

| 引物名称 Primer name | 引物碱基序列 Primer base | 目标片段长度 Fragment size (bp) |
|---------------------|-------------------------------|------------------------------|
| GDP-F | 5'-TTYTWCRTIGCBGGHTWYGA-3' | ~ 450 |
| GDP-R | 5'-CCDATRCARTTBCKIKGHCC-3' | |
| GSP6AE-F | 5'-GAAGGTGCTGCGTCAGAAATCTG-3' | 171 |
| GSP6AE-R | 5'-CAGTCCATAGTAAGCCAGCCA-3' | |
| GSP9A18-F | 5'-TTAGCAGGTCAAGAATGG-3' | 190 |
| GSP9A18-R | 5'-CGTAGCGAGTGTGTTAGAT-3' | |
| Full_6AE-F | 5'-CTACTGCTGCTGCTGTTAT-3' | 1 642 |
| Full_6AE-R | 5'-AGTACCTATATCGACCATGT-3' | |
| Full_9A18-F | 5'-AACTTTTACAGATGACGATAC-3' | 1 686 |
| Full_9A18-R | 5'-CACACTTCACATATCACTTG-3' | |
| EF-F | 5'-GACAAACGTACCATCGAGAAG-3' | 279 |
| EF-R | 5'-GATACCAGCCTCGAACTCAC-3' | |

1.3.2 总 RNA 提取及 cDNA 第 1 链合成 :解剖 5 头 6 龄中期棉铃虫中肠和脂肪体组织,采用 SV Total RNA Isolation System Kit 试剂盒进行抽提、纯化(具体操作步骤见 Progema 试剂盒说明书)。第 1 链合成:先将 5 μL 总 RNA 和 2 μL Oligo(dT)₅ (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 混匀,在 70 $^{\circ}\text{C}$ 下水浴 5 min, 0 $^{\circ}\text{C}$ 冰浴 5 min, 然后分别加入 5 μL buffer (5 \times), 5 μL dNTPs (2.5 mmol/L), 1 μL RNase (40 U/ μL), 1 μL M-MLV (200 U/ μL) 和 6 μL 去离子水。在 PCR 仪中 42 $^{\circ}\text{C}$ 温育 60 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 15 $^{\circ}\text{C}$ 保持。

1.3.3 RT-PCR 扩增 :PCR 反应体系中含模板 cDNA 2 μL , 10 \times buffer 5 μL , 25 mmol/L MgCl₂ 4 μL , 10 mmol/L dNTP 1 μL , 上、下游引物各 1 μL , 5 U/ μL rTaq DNA 聚合酶 0.3 μL 。反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3 min, 80 $^{\circ}\text{C}$ 保持, 加入 rTaq; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 47 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 最后在 15 $^{\circ}\text{C}$ 保持。cDNA 末端快速扩增方法:按照 BD 试剂盒要求进行, 扩增 *CYP6AE12* 和 *CYP9A18* 基因的 3'-端片段退火温度分别为 53 $^{\circ}\text{C}$ 和 54 $^{\circ}\text{C}$, 扩增 5'-端片段的退火温度分别为 66 $^{\circ}\text{C}$ 和 67 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.3.4 cDNA 全长验证 :根据扩增得到的 5'-和 3'-端片段的序列分别设计扩增全长 cDNA 的引物, 以验证基因的完整性。PCR 反应体系同 1.3.3 节, 扩增条件除退火温度为 55 $^{\circ}\text{C}$ 外, 其余同 1.3.3 节。

1.3.5 PCR 产物的克隆与测序 :PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分离和 DNA 纯化回收试剂盒纯化目标片段后进行连接, 通过蓝白斑筛选, 质粒酶切和 PCR 检测获得阳性克隆, 送至上海英俊生物技术有限公司测序。

1.3.6 实时定量 PCR 扩增和定量方法 :实时定量 PCR 反应采用荧光染料 SYBR GREEN I, 用 0.2 mL 薄壁管 (AXYGEN, 美国) 在 ABI7000 PCR 仪 (美国应用生物系统公司) 上进行。反应体系为去离子水 11.24 μL , master mix 12.5 μL , 上下游引物各 0.13 μL , cDNA 1 μL 。反应程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 随后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 退火 30 s (*CYP6AE12*、*CYP9A18* 和 *EF-1 α* 的退火温度分别是 56 $^{\circ}\text{C}$ 、56 $^{\circ}\text{C}$ 和 58 $^{\circ}\text{C}$), 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 共 40 个循环。定量方法采用比较 C_T 相对定量法 (Livak and Schmittgen, 2001)。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 模板量为 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ($\Delta C_T = C_{T\text{目标基因}} - C_{T\text{持家基因}}$, $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T\text{样品}} - \Delta C_{T\text{参照物}}$)。本研究采用组成性表达延伸因子 *EF-1 α* 作为持家基因。

2 结果与分析

2.1 棉铃虫 *CYP6AE12* 和 *CYP9A12* 基因的克隆及序列分析

采用 RT-PCR 方法, 用简并引物 GDP-F 和 GDP-R 从 YS-FP 抗性品系中扩增出约为 450 bp 的目标片段。经克隆测序后发现有两个新的 P450 基因片段, 其中一个片段与一种结网毛虫 *Depressaria pastinacella* 的 *CYP6AE1* 相似性达 80%, 另一片段与棉铃虫的 *CYP9A12* 基因具有 73% 的相似性。根据已获得的基因序列, 分别设计两个 P450 基因的特异性引物, 通过 RACE 策略, 成功获得含有 5'-及 3'-非编码区的序列, 将 5'-和 3'-序列拼接, 获得两个基因的全序列。为了进一步验证拼接基因序列的正确性, 我们通过已获得的序列设计了两个基因编码区的特异性引物以扩增全长 cDNA 片段。PCR 扩增获得了与预期大小相符的条带, 克隆测序结果同拼接序列比较, 氨基酸序列并无差异, 进一步验证了这两个基因序列的准确性和完整性。将获得的全长序列全长提交 P450 基因命名委员会, 分别命名为 *CYP6AE12* (GenBank 登录号 DQ256407) 和 *CYP9A18* (GenBank 登录号 DQ256408)。

CYP6AE12 cDNA 全长 1 944 bp, 含有 12 bp 和 363 bp 的 5'-和 3'-非编码区, 编码区长 1 569 bp, 编码 523 个氨基酸残基, 在 1 906 bp 至 1 911 bp 位置含有多聚腺苷酸信号 (polyadenylation signal) (图 1)。*CYP9A18* cDNA 全长 1 971 bp, 含有 121 bp 和 260 bp 的 5'-和 3'-非编码区, 编码区长 1 590 bp, 编码 530 个氨基酸残基, 在 1 936 bp 至 1 941 bp 位置含有多聚腺苷酸信号 (图 2)。*CYP6AE12* 和 *CYP9A18* 氨基酸残基中都含有 P450 蛋白的保守结构域, 如血红素结合区 FGXGXXXCIGX 螺旋 K 的保守序列 EXXR 和氨基酸 N 端开始的大约 15~20 个由疏水氨基酸组成的跨膜锚定区域。氨基酸序列相似性分析表明, *CYP6AE12* 与 *Depressaria pastinacella* 的 *CYP6AE1* 的氨基酸序列相似性为 55%, 与棉铃虫 6 家族 P450 基因氨基酸序列相似性 32%~33%, 与棉铃虫 9 家族 P450 基因氨基酸序列相似性为 24%~25%。*CYP9A18* 与棉铃虫的 9 家族基因 (*CYP9A1*, *CYP9A12* 和 *CYP9A14*) 氨基酸序列相似性在 49%~66% 之间, 与 6 家族基因 (*CYP6B2* 和 *CYP6B7*) 的氨基酸序列相似性在 25%~29% 之间。

GAAACGTTCAAAATGATTACTCTACTGCTGCTCGTATACCTTTAGTCTTTTTTCGCGATATATATACATCAAAAGAGAAAGTATGAA 90
 M I T L L L S L V I P L V F F A I Y I T S K R K Y E
 CATTTGGGAAAAAAGAAAAATACCGCATTGAAACCAGTCCCATTCTGGGTAATTTTAGCGAATACATATACAAAAAACTTACCTAGGG 180
 H W E K K K I P H L K P V P I L G N F S E Y I L Q K T Y L G
 CAGGTAGCACAAAAAATATGTAAGAAATTTCCCAACGAACCATTTATTTGGAGCCTATTATGGCAGGAAACAGCGCTCATCGTCCAAGAT 270
 Q V A Q K I C K K F P N E P F I G A Y Y G T E P L L I V Q D
 CCTGAACCTCATTAAAGATCGTGATGACAAAGGATTTCTACTTCTTCAGCGCGCTGAAGTTTCTAACTACTCGCATAAAGAAATGTTTACG 360
 P E L I K I V M T K D F Y F F S G R E V S N Y S H K E M F T
 CAGAACCTTTTCTTCACTTACGGAGACAGGTGGAAGGTGCTGCGTCAGAAATCTGACTCCGCTGTCTCTTCCGCGAAGATGAAGAACAATG 450
 Q N L F F T Y G D R W K V L R Q N L T P L F S S A K M K N M
 TTCCATTTAATTTGAGAAGTGCCTCGAGTGTGAGAAAGTTCTTGACAAGGAAACAAAAATGTGATGAAATTTGAAGTGAAGGCCCCTT 540
 F H L I E K C S R V F E K V L D K E T Q K C D E I E V R A L
 ATGGCTGGCTTCACTATGGCATGCATCGGGTCTTGTGCATTTGGAGTTGACACAAACCTGATGGAAAAGCAGAAAACAATATTTTATAGG 630
 M A G F T M D C I G S C A F G V D T N V M E K T E N N I F R
 AAAATTTGCTGACCTTATCTTTGATATTCAGGGGTTTCAAGAAATTTGCTGGGCTATTTTGGCCATCTGTATTCTACGGACTA 720
 K I A D L I F D I Q G F R A F K N V A R A I W P S V F Y G L
 GGATTCAGAGCAATTTCCAAAGAGAAATCGATAATTTCTTCAATAATTTGATGAGTGAATATTTCAAAGGACGAGAATATAAGCCGACAAAT 810
 G F R A F P R E I D N F F N N L M S G I F K G R E Y T K T N
 AGAAATGATTTTGTGGATCTCGTATTGAAATTTGTCGAATAACAAACATGACTGGAGACAGTTTGTGAACATGAAATCTGATGCAGAT 900
 R N D F V D G L V L K L S N N K T M T G D S L L N M K S D A D
 AAAAAGGTGGTTCTCGAGGTAGACGAAATGTTAGTGGCCAGTGTGCTGCTATTTTTCGCTGCGAATTCGAAACTTCGTCGACCCACA 990
 K K V V L E V D E E M L V A Q C V L F F A **A G F E T S S T T**
 TTGAGTTACGCTCTGTACGAGTTGGCGAAGAAATCCTGAAGCTCAAGAAAAAGCTTTGGCAGAAGTGGACGAGTACCTGCGTCTGATGAC 1080
 L S Y A L Y E L A K N P E A Q E K A L A E V D E Y L R R H D
 AACAGGTTGAAGATTTGAGTTCGCTCGGGGACTCCATACCTCGAAGCTTGGCTAGTAGGCTCTGCGTCTATACCCAGTACTAGGGCTT 1170
 N T L K Y E C V A G T P Y L E A C V D E A L R L Y P V L G L
 CTCATCTGTTGAGGTGGCAGAAGACTACACGTTCCCTTCTGCTGTTGAAAGTGAAGAAAGGCTGAGGGTGCATCTGCCAGTGTACCCTG 1260
 L T R E V A E D Y T F P S G L E V E K G L R V H L L P V Y H L
 CATCATCACCCAGCACTTCCCAGCCTGAGCAGTTCCGACCTGAGAGGTTTGTAGCTGAGAATAAGCGAATAATTAACCATACACCC 1350
 H H H P E H F P D P E Q F R P E R F L A E N K Q N I K P Y T
 TACATCCGTTTGGTGAAGGCTCTAGAATTTGTATAGGAATGAGGTTTGTCTCGCATGCAAAATGGCGGCAGGTCTGTAACTTGTCTGAAG 1440
 Y M P **F G E P R I C I G M R F** A R M Q M A A A G L L L T L L K
 AAGTACCGAGTGAAGTGGCTCCAGGCATGAAGAGAGAAGTGGTCTTCGAGCCAGGAGCCATCGTCACGCAGCCCATTTGGTGAATCAAG 1530
 K Y R V E L A P G M K R E L V F E P G A I V T Q P I G G I K
 CTGAAGTTTGTGAAAGAGAAAAGTGGAAAGGAAAGGCTTTTGAAGACCGCGTGAATAATTTTCAGTAGTAATTAATTAATTTATTTAT 1620
 L K F V E R E R E N W K E R L L K T P *
 TGCCAGAAATAGCTACATGATAACATGGTTCGATATAGGTACTAAAATATGGTCTCACTATATTTGACTTGAATTTGTTTATAAAATGGT 1710
 TATGAAAACGAAGTAAACCATTTTATGTGGGAGTATATAAGCTCTTATATAAAGTTACAAATTTTAAAGGTGCAGTAGATATAACCTA 1800
 TTCATTCTATAAACCATTTTGGAGAAAAGAACTGTTGAAAATATGTTAATATATTATTAACCTGTTACCACAGACTAGACATAATTAT 1890
 TTATTTTCAGTAATCTAATTAACCTTGGTATAACTTTGAAAAAATAAAAAAAAAA 1944

图 1 棉铃虫 *CYP6AE12* cDNA 序列(GenBank 登录号 DQ256407)和推测的氨基酸序列

Fig. 1 *CYP6AE12* cDNA sequence (GenBank accession no. DQ256407) and the deduced amino acid sequence from *Helicoverpa armigera*

起始密码子和多聚腺苷酸信号序列(AATAAA,位于3'非翻译区)用下划线标出, I 螺旋保守区(AGFETS)和血红素结合区(FGEGRICIGMRF)用粗体和下划线标出,终止密码子用*标出;图2同。The translation start codon and the multiple polyadenylation signal sequences (AATAAA) present in the 3' untranslated region are underlined, the conserved I helix (AGFETS), heme-binding domain (FGEGRICIGMRF) are underlined in bold, and the stop codon is present in *.

真核生物的翻译起始点 ATG 周围的序列具有一定的保守性(Kozak, 1986),真核生物的保守序列是 CCACCATG,果蝇的保守序列为 CAAAACATG,如果以起始密码子的第 1 个碱基 A 为 +1,则 -3 位置的碱基最为保守。Rose 等(1997)比较了不同昆虫的 17 条全长 P450 基因序列,发现这 17 条序列有 15 条 P450 基因序列的 -3 位置为 A,只有 2 条序列为例外,这 2 个例外分别是烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* *CYP9A1* -3 位置的 G 和果蝇 *CYP4E2* 的 T。本研究克隆的 *CYP6AE12* 的 -3 位置为 A,与真核生物大部分 P450 基因 -3 位置为 A 相一致,而 *CYP9A18* 的 -3 位置为 C,与真核生物 P450 基因 -3 位置 A 不一致,与 *CYP9A1*(G)和 *CYP4E2*(T)的也各不相同。这表明,昆虫 P450 基因的表达调控不如绝大部分真核生物基因严格,也反映出 P450 基因表达调控的多样

性和复杂性。

2.2 Real-time PCR 检测 *CYP6AE12* 和 *CYP9A18* 在抗性和敏感品系中的表达量

2.2.1 PCR 产物熔解曲线及荧光定量 PCR 扩增效率一致性分析

本研究采用荧光染料 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。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。本实验中所比较的 2 个 P450 基因和 1 个持家基因(*EF-1 α*)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 *CYP6AE12*、*CYP9A18* 和 *EF-1 α* 3 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。从图

GGCGTCCGTCAGTGAATTAAGTACCACAAAACATTAATTAATTGTAATCGCTTAAATGTTTTTCATTTAAATTTATATTTTTATCGGCAT 90
 ATCATTCTTATATAAGAAAACTTTTACAGATGACGATACCTCTGTTAATCTGGGCGTTAGTCTAGCTGTCCATAGTGTACGGGACCT 180
 M T I L L L I W A L V L A V I V L R D L
 GAGGCGACTGTACTCGACATTTAGTAAGGATGGCATCAAGCACTTCAAGCCAGTCCCAGTCTGGGCAACATGAGTTCGGTCATATTTCCG 270
 R R L Y S T F S K D G I K H F K P V P L L G N M S S V I F R
 AAGAAACCATTCAGTGAATATTTCTCAAGTTTTACAAAAGTTTTCCAGATGAAAAGTTCGTCGGCAGATTTGAATTTGTTAACCACTC 360
 R N H Y A D N I L K F Y K S F P D E K F V G R F E F V N Q S
 CATTGTGATCCTAGATTTAGAGTTGGTGAAGAAGATTACTATCAAAGACTTTTGGAGCATTTTCCCGATTCGCAACTTTGGAGNCTGAATC 450
 I V I L D L E L V K K I T I K D F E H F P D H R N F G A E S
 TTTTTTAGCAGAACCTTTGTTCTTATTAGCAGGTCAAGAATGGAAAGACATGCGGTCACACTGACTCCAGCATTACCAGTTCGAAGAT 540
 F F S R T L F L L A G Q E W K D M R S T L T P A F T A S S K I
 ACGTCTGATGGTGCCTTTTCATGGTAGAAGTTGGAGATCAGATTTTTGTCTCTCAAAAAGAAGATCGAAGATCGAAGTACTACAT 630
 R L M V P F M V E V G D Q M I L S L K K K L E E S K D D Y I
 CGAGTTGATTTGCAAGGATCTAAACAACCTGCTACGCCAATGACGTGATAGCCTCTTTGTCCCTTCGGCCTGAAGGTAGACTCTCACATGGA 720
 E V D C K D L T T R Y A N D V I A S C A F G L K V D S H M D
 TCGAGACAACCGATTCATGCAATGGGCGGCTCACTATTTGAGTTCGGTTTTTCGCACAATGATCATGTTCTTTGTTCTTCTGAATGCACC 810
 R D N R F Y A M G G S L F E F G F R T M I M F F V L L N A P
 GAAAGTTGCTAAGTTTTTCAAATGGGATATTTGTCCAGCTTCAGTCAGAAAATCTTTCACAAAATTTGGTGTGGATACAATGAAGGATCG 900
 K V A K F F K W D I V P A S V R K F F T N L V L D T M K D R
 TGAGATCGCACATTTATCAGACCAGAGATGATTCATTTGCTTATGGAAGCCAAATAAAGTAAACTAACCCATGAAGATATAATGCCTAA 990
 E M R H I I R P E M I H L L M E A N K G K L T H E D I M P N
 TGACAATGCTGTGGATTTGCTACTGTGAAGAGTCTGCAATTTGGATTAATTTCTTCAAAAAGAGTATGGACGGACGAGGATATAGTTGC 1080
 D N A V G F A T V E E S A I G L N S S K R V W T D E D I V A
 TCAAGCATTGTATTTTTTCGCTCTGCTGTTTTGAAACCGTATCAGCGACGATGCGCTTCTTATTGTACGAGCTGGCAGTTACCCTGAGGT 1170
 Q A F V F F A **A G F E T V** S A T M A F L L Y E L A V H P E V
 ACAGGAGCGATTGGCACAGGAGATCAGGGAATATGATGATAAAGATGATGGCAAGTTTGACTTCAACTCAAATCCAGGATGAAAGTATAT 1260
 Q E R L A Q E I R E Y D D K N D G K F D F N S I Q D M K Y M
 GGACATGTTGTTTCTGAGGTTCTGAGGAAATGGCCAGCACCTTTGGTTTTGGATAGAATATGCCTAAAGATTATAATCTTGGGAAACC 1350
 D M V V S E V L R K W P A P L V L D R I C T K D Y N L G K P
 AAACAATGCAGCTGAAAAGATTTTATCATTTCGCAAAGGTTTCAGGAGTCCAATCCAGTCTATGCCTTCCACAATGACCCTCGGTACTT 1440
 N N A A E K D F I I R K G S G V Q I P V Y A F H N D P R Y F
 TCCTAATCCTGAGAAGTTCCAGCCTGAACGTTTCTCTCCAGATAACAAACACAAATTCAAATGCAAATGCGTATATGCCTTTTGGTGTGG 1530
 P N P E K F D P E R F S P D N K H K F N A N A Y M P **F G V G**
 ACCAAGAAAACGTATAGGATCGAGGTTGCTCTCTGCGAGGTGAAGGTGATAACATACCAGATTTCTACGTCCACATGGAGGTGTCTCCCTG 1620
P R N C I G S R F A L C E V K V I T Y Q I L R H N D E V S P C
 CAAGAGTACATGATTTCTGCCAAAACCTGCGACTAACAATTTAAACCTCAGACTGAAAGGTGGACACTCTCTTAGGTTTAAACTGAGGAA 1710
 K S T C I P A K L A T N N L N L R L K G G H S L R F K L R K
 GTAGATTCAACTACACGTATCAAACCGCTCATTTTTGTATGTAGTTTAAAGTTGACGTTGTTTATTCAAGTGATATGTGAAGTGTGTATA 1800
 *
 GTTTATTGAATATTTTTAGAATGTAACCTATTTACCATATGATATTAAGATGTTATGATACCAATAGTTAACTAGGGTTTTAGCGTT 1890
 ACAATATTTTTGTTTATAAGTCGATTTATTCTACTGATGAATTAATAAATGATAAACATACAAAAAATAAAAAAAAAAAAAA 1971

图 2 棉铃虫 *CYP9A18* cDNA 序列 (GenBank 登录号 DQ256408) 及推测的氨基酸序列

Fig. 2 *CYP9A18* cDNA sequence (GenBank accession no. DQ256408) and the deduced amino acid sequences from *Helicoverpa armigera*

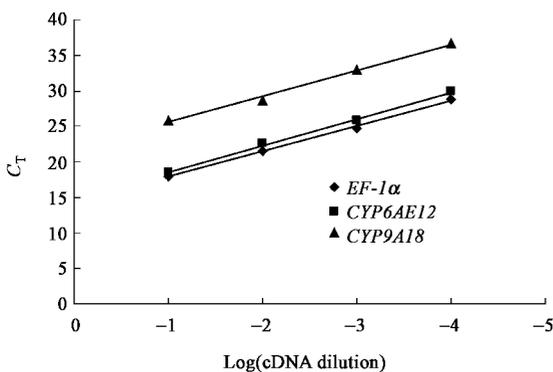


图 3 *CYP6AE12*、*CYP9A18* 和 *EF-1α* 3 个基因实时定量 PCR 扩增标准曲线

Fig. 3 Standard curve of *CYP6AE12*, *CYP9A18* and *EF-1α* with real-time PCR amplification

3 中可以看出,各标准曲线的斜率一致,表明这 3 个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 mRNA 相对表达量的比较: 以相对敏感品系 YS 中肠中 *CYP6AE12* 基因作为参照物,通过 C_T 相对定量法计算各 P450 基因的相对表达量。表 2 为 *CYP6AE12* 和 *CYP9A18* 基因在抗性和敏感品系中的相对表达量。*CYP6AE12* 和 *CYP9A18* 基因的表达具有组织特异性,*CYP6AE12* 在脂肪体中的表达量较高,*CYP9A18* 在中肠中的表达量较高。与相对敏感品系 YS 相比,*CYP6AE12* 在 YS-FP 抗性品系中肠中的 mRNA 表达量为 3.6 倍,在脂肪体中为 1.3 倍;*CYP9A18* 在 YS-FP 品系中肠和脂肪体的表达量分别为 YS 品系的 0.3 倍和 1.0 倍。*CYP6AE12* 的过量表达可能与棉铃虫 YS-FP 品系的抗药性有关。

3 讨论

昆虫细胞色素 P450 氧化酶在杀虫剂的代谢中

表 2 *CYP6AE12* 和 *CYP9A18* 基因在棉铃虫 6 龄幼虫中肠和脂肪体中的相对表达量Table 2 Relative expression of *CYP6AE12* and *CYP9A18* in midgut and fat body of the 6th instar larvae of *Helicoverpa armigera*

| 品系 Strain | 组织 Tissue | <i>CYP6AE12</i> | | <i>CYP9A18</i> | |
|--------------|--------------|-------------------------------|-------------|-------------------------------|-------------|
| | | 相对表达量 Relative expression* | <i>R</i> ** | 相对表达量 Relative expression* | <i>R</i> ** |
| YS | 中肠 Midgut | 1.0 (0.41 - 2.44) | | 4.76 (2.18 - 10.36) | |
| YS-FP | 中肠 Midgut | 3.57 (2.24 - 5.69)** | 3.6 | 1.51 (1.06 - 2.16)** | 0.3 |
| YS | 脂肪体 Fat body | 15.44 (13.88 - 17.19) | | 0.72 (0.68 - 0.77) | |
| YS-FP | 脂肪体 Fat body | 20.35 (18.60 - 22.27) | 1.3 | 0.75 (0.35 - 1.60) | 1.0 |

* : 基因表达量的相对范围 The range of gene expression determined by evaluating $2^{-\Delta\Delta C_T}$ with $\Delta\Delta C_T + SE$ and $\Delta\Delta C_T - SE$; ** : *R* 为 YS-FP 品系与 YS 品系相对表达量的比值 $R = \text{Relative expression in YS-FP strain} / \text{Relative expression in YS strain}$; *** : 与敏感品系中肠表达量具有显著差异 ($P < 0.05$) Significantly different from the expression levels in the midgut of the YS strain ($P < 0.05$).

有着重要的作用,是昆虫对多种杀虫剂产生抗性的重要机制,许多研究表明抗性昆虫中的 P450 基因转录水平比敏感品系要高。Feyereisen 等(1989)从苯巴比妥诱导的家蝇 *Musca domestica* 二嗪农抗性品系(Rutgers)中克隆出第 1 个昆虫细胞色素 P450 基因 *CYP6A1*, Northern blot 分析表明 *CYP6A1* 在该品系中的表达量是敏感品系的 3 倍,在 LPR 品系中的表达量更高,被认为可能与有机磷的抗性相关(Carino *et al.*, 1992)。 *CYP6D1* 是从对拟除虫菊酯高抗的家蝇品系 LPR 中分离出来的 P450 基因, Western blot 分析表明其表达产物量是敏感品系的 10 倍(Wheelock and Scott, 1990), Southern 杂交实验研究表明这种过量表达不是基因扩增引起的,而是转录增强的结果(Tomita and Scott, 1995)。 Amichot 等(1994)研究发现在对 DDT 抗性大于 10 000 倍的一个果蝇抗性品系中,至少有 *CYP6A2* 和 *CYP4E2* 两个基因存在组成性过量表达。 Daborn 等(2002)分析了 90 个果蝇细胞色素 P450 基因在 20 个 DDT 田间抗性种群中的表达情况,发现 *CYP6G1* 基因与敏感品系相比有 10~100 倍的过量表达。在传播疟疾的冈比亚按蚊中发现 *CYP6Z1* 基因在抗性品系中过量表达(Nikou *et al.*, 2003)。这些研究充分表明了单个 P450 或多个 P450 基因的过量表达是氧化解毒代谢增强的一个主要机制。

是不是 P450 基因过量表达就一定与抗药性相关呢? Scott 等(1998)认为,判断一个 P450 基因是否与抗药性相关有 2 个标准:(1) P450 必须能够解毒或降解诱导该品系抗性形成的药剂;(2) 抗性品系中 P450 的含量和催化活力比敏感品系高。因此要全面系统地理解 P450 在昆虫抗药性中的作用,还需要对过量表达的基因进行异源表达实验,通过对表达产物的酶学研究和药剂代谢实验来研究特定 P450 基因与某杀虫剂的关系。 Andersen 等(1994)用

大肠杆菌表达系统表达了 *CYP6A1*, 表达产物能够降解艾氏剂和七氯。 Dunkov 等(1997)采用杆状病毒介导的昆虫细胞表达系统表达了 *CYP6A2* 基因, 表达产物具有代谢艾氏剂、七氯和二嗪农的能力。 Guzov 等(1998)通过大肠杆菌系统表达了家蝇线粒体 *CYP12A1* 基因, 纯化后的 *CYP12A1* 酶能够代谢多种底物, 如艾氏剂、七氯、二嗪农、谷硫磷、amitraz 和 7-pentoxycoumarin 等。因此, 研究单个 P450 基因表达产物对药剂的代谢作用是判断该基因是否参与抗药性的一个直接证据。

目前,在棉铃虫抗药性品系中存在过量表达的 P450 基因有多个,在不同背景的棉铃虫抗性品系中,过量表达的基因各不相同。棉铃虫对拟除虫菊酯抗性的形成可能涉及多个 P450 的过量表达。本研究结果提供了 2 个新的 P450 基因 cDNA 全长序列,为研究棉铃虫 P450 基因结构和功能的多样性提供了新材料。另外,定量 PCR 分析结果表明 *CYP6AE12* 存在一定程度的过量表达,推测该基因可能参与了抗药性的形成,但其究竟能否代谢杀虫剂还需要进一步的异源表达实验进行验证。

参 考 文 献 (References)

- Ahmad M, McCaffery AR, 1991. Elucidation of detoxication mechanisms involved in resistance to insecticides in the third instar larvae of a field-selected strain of *Helicoverpa armigera* with the use of synergists. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 41: 41-52.
- Amichot M, Brun A, Cuany A, Helvig C, Salaun JP, Durst F, Berge JB, 1994. Expression study of CYP genes in *Drosophila* strains resistant or sensitive to insecticides. In: Lechner MC ed. *Cytochrome P450*. Paris: John Libbey Eurotext. 689-692.
- Andersen JF, Utermohlen JG, Feyereisen R, 1994. Expression of house fly *CYP6A1* and NADPH-cytochrome P450 reductase in *Escherichia coli* and reconstitution of an insecticide-metabolizing P450 system. *Biochemistry*, 33: 2 171-2 177.
- Carino F, Koener JF, Plapp FW Jr, Feyereisen R, 1992. Expression of the

- cytochrome P450 gene CYP6A1 in the housefly, *Musca domestica*. In : Mullin CA, Scott JG eds. *Molecular Mechanisms of Insecticide Resistance: Diversity among Insects*. ACS Symposium Series 505. Washington, DC : American Chemical Society. 31 – 40.
- Chen S, Yang YH, Wu YD, 2005. Correlation between fenvalerate resistance and cytochrome P450 mediated O-demethylation activity in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera : Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, 98(3) : 943 – 946.
- Daborn PJ, Yen JL, Bogwitz MR, Goff GL, Fei E, Jeffers S, Tijet N, Perry T, Heckel D, Batterham P, Feyereisen R, Wilson TG, Ffrench-Constant RH, 2002. A single P450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. *Science*, 297 : 2 253 – 2 256.
- Dunkov BC, Guzov VM, Mocelin G, Shotkoski F, Brun A, Amichot M, Ffrench-Constant RH, Feyereisen R, 1997. The *Drosophila* cytochrome P450 gene *Cyp6a2* : structure, localization, heterologous expression, and induction by phenobarbital. *DNA Cell Biol.*, 16(11) : 1 345 – 1 356.
- Feyereisen R, Koener JF, Farnsworth DE, Nebert DW, 1989. Isolation and sequence of cDNA encoding a cytochrome P450 from an insecticide-resistant strain of the house fly, *Musca domestica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86(5) : 1 465 – 1 469.
- Feyereisen R, 1999. Insect P450 enzymes. *Annu. Rev. Entomol.*, 44 : 507 – 533.
- Feyereisen R, 2005. Insect cytochrome P450. In : Gilbert L, Iatrou K, Gill S eds. *Comprehensive Molecular Insect Science*. Oxford : Elsevier Pergamon. 4 : 1 – 77.
- Guzov VM, Unnithan GC, Chernogolov AA, Feyereisen R, 1998. CYP12A1, a mitochondrial cytochrome P450 from the house fly. *Arch. Biochem. Biophys.*, 359(2) : 231 – 240.
- Kozak M, 1986. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*, 44 : 283 – 292.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25 : 402 – 408.
- Martin T, Chandre F, Ochoa OG, Vaissayre M, Fournier D, 2002. Pyrethroid resistance mechanisms in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera : Noctuidae) from West Africa. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 74 : 17 – 26.
- McCaffery AR, 1998. Resistance to insecticides in heliothine Lepidoptera : a global view. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 353 : 1 735 – 1 750.
- Nikou D, Ranson H, Hemingway J, 2003. An adult-specific CYP6 P450 gene is over expressed in a pyrethroid-resistant strain of the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Gene*, 318 : 91 – 102.
- Pittendrigh B, Aronstein K, Zinkovsky E, Andreev O, Campbell BC, Daly J, Trowell S, Ffrench-Constant RH, 1997. Cytochrome P450 genes from *Helicoverpa armigera* : expression in a pyrethroid-susceptible and -resistant strain. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27 : 507 – 512.
- Ranasinghe C, Hobbs AA, 1998. Isolation and characterization of two cytochrome P450 cDNA clones for CYP6B6 and CYP6B7 from *Helicoverpa armigera* (Hübner) : possible involvement of CYP6B7 in pyrethroid resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 28 : 571 – 580.
- Ranasinghe C, Campbell B, Hobbs AA, 1998. Over-expression of cytochrome P450 CYP6B7 mRNA and pyrethroid resistance in Australian populations of *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Pestic. Sci.*, 54 : 195 – 202.
- Rose RL, Goh D, Thompson DM, Verma KD, Heckel DG, Gahan LJ, Roe RM, Hodgson E, 1997. Cytochrome P450 (CYP) 9A1 in *Heliothis virescens* : the first member of a new CYP family. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27(6) : 605 – 615.
- Scott JG, 1999. Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29 : 757 – 777.
- Scott JG, Liu N, Wen Z, 1998. Insect cytochromes P450 : diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, 121(1 – 3) : 147 – 155.
- Tan FJ, 1987. Methods for testing resistance of agricultural pests to pesticides. *J. Nanjing Agri. Univ.*, 10(Suppl.) : 107 – 122. [谭福杰, 1987. 农业害虫抗药性测定方法. 南京农业大学学报, 10(增刊) : 107 – 122]
- Tomita T, Scott JG, 1995. cDNA and deduced protein sequence of CYP6D1 : the putative gene for a cytochrome P450 responsible for pyrethroid resistance in the housefly. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 25 : 275 – 283.
- Wheelock GD, Scott JG, 1990. Immunological detection of cytochrome P450 from insecticide resistant and susceptible house flies (*Musca domestica*). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 38 : 130 – 139.
- Wu YD, Shen JL, Tan FJ, You ZP, 1995. Mechanism of fenvalerate resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner). *J. Nanjing Agri. Univ.*, 18(2) : 63 – 68. [吴益东, 沈晋良, 谭福杰, 尤子平, 1995. 棉铃虫对氟戊菊酯抗性机理研究. 南京农业大学学报, 18(2) : 63 – 68]
- Yang EH, Yang YH, Wu S, Wu YD, 2005. Relative contribution of detoxifying enzymes to pyrethroid resistance in a resistant strain of *Helicoverpa armigera*. *J. Appl. Entomol.*, 129(9) : 521 – 525.
- Yang YH, Wu YD, Chen S, Devine GJ, Denholm I, Jewess P, Moores GD, 2004. The involvement of microsomal oxidases in pyrethroid resistance in *Helicoverpa armigera* from Asia. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34(8) : 763 – 773.
- Yang YH, 2005. Biochemical and Molecular Mechanisms of Oxidative Metabolism for Pyrethroid Resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner). PhD Dissertation, Nanjing Agricultural University. 66 – 72. [杨亦桦, 2005. 棉铃虫对拟除虫菊酯氧化代谢抗性的生化与分子机理. 南京农业大学博士学位论文. 66 – 72]