

棉铃虫细胞色素 P450 *CYP6B7* 基因的克隆与融合表达马彩霞<sup>1,2</sup>, 李梅<sup>1</sup>, 邱星辉<sup>1,\*</sup>, 何凤琴<sup>1</sup>, 刘惠霞<sup>2</sup>

(1. 中国科学院动物研究所, 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100080;

2. 西北农林科技大学农药研究所, 陕西杨凌 712100)

**摘要:** 细胞色素 P450 *CYP6B7* 被推测与棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 对拟除虫菊酯类杀虫剂的抗性有关, 但至今尚无 *CYP6B7* 参与杀虫剂代谢方面的直接证据。为揭示 *CYP6B7* 的代谢功能, 作者以棉铃虫幼虫基因组 DNA 为模板, 以 *CYP6B7* 基因设计特异性引物, 扩增出包含 321 bp 内含子的 *CYP6B7* 基因。用反向 PCR 的方法消除内含子, 获得包含完整的 *CYP6B7* 基因的开放阅读框。将 *CYP6B7* 基因与 pMAL-c2X 载体连接, 并转化 *E. coli* TB1 细胞, 在 IPTG 诱导下, *CYP6B7* 能与载体基因编码的麦芽糖结合蛋白 (MBP) 在大肠杆菌中融合表达, 表达产物经直链淀粉 (amylose) 柱亲和层析分离洗脱后, 得到 SDS-PAGE 电泳纯的融合蛋白。

**关键词:** 棉铃虫; 细胞色素 P450; *CYP6B7*; 基因克隆; 融合表达

中图分类号: Q965.9 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2006)06-0944-06

**Cloning and fusion expression of *CYP6B7* gene from *Helicoverpa armigera***

MA Cai-Xia<sup>1,2</sup>, LI Mei<sup>1</sup>, QIU Xing-Hui<sup>1,\*</sup>, HE Feng-Qin<sup>1</sup>, LIU Hui-Xia<sup>2</sup> (1. State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China; 2. Institute of Pesticide, Northwest Sci-Tech University of Agricultural and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** Although it has been suggested that *CYP6B7* in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*, is probably responsible for resistance to pyrethroids, there is no direct evidence showing that *CYP6B7* is involved in the metabolism of pyrethroid pesticides. To explore the function of *CYP6B7* gene, we attempted to produce *CYP6B7* enzyme through heterologous expression of the *CYP6B7* gene. The open reading frame of *CYP6B7* gene was isolated by PCR with genomic DNA as the template and using a pair of *CYP6B7* gene-specific primers, followed by reverse PCR aiming at deleting the intron sequence of 321 bp. A fusion plasmid (*CYP6B7*-pMAL) was constructed by inserting the *CYP6B7* gene into the *Bam*H I - *Sal*I restriction sites of pMAL-c2X vector. *CYP6B7*-pMAL plasmid was transformed into *E. coli* TB1. A fusion protein (*CYP6B7* fused with maltose binding protein) was expressed after induction by IPTG. SDS-PAGE pure fusion protein was isolated with an amylose column.

**Key words:** *Helicoverpa armigera*; cytochrome P450; *CYP6B7*; gene cloning; fusion expression

细胞色素 P450 是生物体中的一类重要的代谢酶类, 在昆虫中不仅参与激素和脂肪酸等具重要生理功能的物质的代谢, 还对杀虫剂和植物次生物质具有降解作用, 由细胞色素 P450 介导的杀虫剂代谢作用的增强被证明是昆虫产生抗药性的主要而普遍的机制 (Scott, 1999), 抗性相关的细胞色素 P450 的结构功能与调控是抗药性研究的一个主题。

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 是重要的经济害虫,

它对许多不同类型的杀虫剂产生了不同程度的抗药性 (Wu and Gou, 2005), 由此带来的棉铃虫防治工作的失败造成了重大的经济损失, 因此开展棉铃虫抗性机制的研究具有重要意义。许多学者用实验证明棉铃虫对除虫菊酯抗药性与细胞色素 P450 有关 (Yang *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2005)。由于昆虫中存在许多不同的细胞色素 P450 (Feyereisen, 1999), 预计棉铃虫的 P450 种类不下 80 种, 要确证抗性相

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30370946, 30270885)

作者简介: 马彩霞, 女, 1975 年生, 博士, 主要从事昆虫分子生物学研究, E-mail: macx@ioz.ac.cn

\* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: qjuxh@ioz.ac.cn

收稿日期 Received: 2006-06-05; 接受日期 Accepted: 2006-10-23

关的细胞色素 P450,首先需要区分不同的细胞色素 P450 并鉴定其功能。认定 P450 导致抗性,需要满足 2 个标准:一是该 P450 在抗性昆虫中超量表达,二是该 P450 具有代谢某杀虫剂的作用(Scott, 1999)。细胞色素 P450 是膜结合蛋白,且不稳定,用蛋白分离纯化的方法从昆虫中直接分离纯化 P450 蛋白并重组有活性的酶系来鉴定其功能具有相当的难度(郑明奇等, 2005),因此,现在常采用的有效方法是先分离克隆细胞色素 P450 基因,然后通过基因的异体表达方法来获得编码蛋白。有关棉铃虫细胞色素 P450 基因的克隆工作国内外有所开展(Wang and Hobbs, 1995; Pittendrigh *et al.*, 1997; Ranasinghe and Hobbs, 1998; 艾颖等, 2004a, 2004b),在 GenBank 登录的全长基因数也在不断增加,遗憾的是,至今还没有一种 P450 的功能得到鉴定,也就无法确定是何种或哪些 P450 在棉铃虫的抗药性中发挥作用。

*CYP6B7* 基因是 Ranasinghe 和 Hobbs (1998)首先从棉铃虫中克隆的细胞色素 P450 基因,也是目前研究最多的棉铃虫的细胞色素 P450。用棉铃虫田间抗性种群(抗拟除虫菊酯)和敏感种群的比较研究发现,*CYP6B7* 不但在抗性种群中超量表达,而且 *CYP6B7* 的超量表达与棉铃虫的抗性性状相连锁(Ranasinghe *et al.*, 1999)。*CYP6B7* 的表达不仅被氯菊酯等拟除虫菊酯类杀虫剂所诱导,还能被可诱导棉铃虫对氯菊酯和氰戊菊酯产生抗性(诱导抗性)的单萜类化合物所诱导(Ranasinghe and Hobbs, 1999),据此推测 *CYP6B7* 可能代谢拟除虫菊酯或与棉铃虫对拟除虫菊酯产生抗性有关。虽然以往的工作证明了 *CYP6B7* 在抗性昆虫中超量表达,但确定 *CYP6B7* 是否与棉铃虫对拟除虫菊酯的抗性相关还需证明该基因产物具有代谢拟除虫菊酯的功能。基因的异体表达为研究者获得研究功能所需的蛋白材料提供了一条有效的途径。在本研究中,我们试图建立该基因的原核表达体系,以获得 *CYP6B7* 蛋白,为分析其功能及评价其在棉铃虫抗药性中的作用打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试虫和试剂

棉铃虫为本实验室饲养,饲养温度( $25 \pm 1$ ) $^{\circ}\text{C}$ ,光周期 14L:10D,选取 6 龄第 3 天的幼虫用于实验。

Access Quick<sup>TM</sup> RT-PCR 试剂盒、Wizard PCR DNA 纯化试剂盒、pGEM-T Easy 载体、琼脂糖均为 Promega

公司产品,pfu DNA 聚合酶为 TaKaRa 公司产品,pMAL-c2X、*E. coli* TB1 为 New England Biolabs (NEB)公司产品。DNA 胶回收试剂盒为 Tiangen 公司产品。

### 1.2 方法

**1.2.1 棉铃虫中肠组织 DNA 的提取:**取棉铃虫中肠组织用预冷的玻璃匀浆器研碎,每 100 mg 组织用 1.2 mL 消化缓冲液(100 mol/L NaCl, 25 mmol/L EDTA, 0.1 mg/mL 蛋白酶 K, 10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0 0.5% SDS)悬浮,样品在 50 $^{\circ}\text{C}$  振荡下温育 12~18 h 后用等体积的酚/氯仿/异戊醇抽提样品,1 700  $\times$  g 离心 10 min,加入 1/2 体积 7.5 mol/L 乙酸铵和 2 倍体积 100% 乙醇,1 700  $\times$  g 离心 2 min,用 70% 乙醇洗涤,晾干,沉淀用 TE 缓冲液重新溶解,调整到终浓度约为 1 mg/mL。

**1.2.2 *CYP6B7* 基因的 PCR 扩增:**PCR 引物根据已报道的棉铃虫 *CYP6B7* 的 cDNA 序列(AF031468)设计。上游引物序列:5'-CGGGATCCATGTGGGCTCTATATCTACCG-3'(下划线部分为 *Bam*H I 酶切位点),下游引物序列:5'-GCGTCCGACTTAAGATAC AATCTTCCTAGG-3'(下划线部分为 *Sal*I 酶切位点),体系组成为 5  $\mu\text{L}$  10  $\times$  PCR 缓冲液、4  $\mu\text{L}$  10 mmol/L dNTPs、1  $\mu\text{L}$  DNA 模板。取 10  $\mu\text{mol/L}$  上游引物和下游引物各 2  $\mu\text{L}$  和 2.5 单位的 Taq DNA 聚合酶,最后用双蒸水补足至 50  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$  变性 5 min 后 94 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$  1 min,完成 30 个扩增循环,最后于 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min,冷却至 4 $^{\circ}\text{C}$  保存备用。取 20  $\mu\text{L}$  PCR 产物,通过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 结果。

**1.2.3 目的条带的回收、亚克隆与测序:**胶纯化 PCR 产物,用试剂盒回收相应的目的条带。回收产物与载体 pGEM-T Easy 连接,4 $^{\circ}\text{C}$  连接过夜,连接产物转化感受态 *E. coli* TOP10,铺平板,进行蓝/白斑筛选,挑取白色的阳性菌落,于 LB 液体培养基 37 $^{\circ}\text{C}$  300 r/min 摇菌过夜,并取 1 mL 进行质粒提取和酶切,以鉴定重组子,将阳性重组子进行测序(由上海博亚公司完成)。

**1.2.4 反向 PCR:**反向 PCR 引物根据已克隆的 *CYP6B7* 的内含子序列进行设计,上游引物:5'-GACAAAGGAATTGCATAGGT-3',下游引物:5'-TGAAG TCTGCCAAACCGCAT-3'。先将合成的内含子两端引物进行 5'端磷酸化,3'端去磷酸化,所用酶为 T4 polynucleotide kinase (T4 PNK),反应体系为:2.5  $\mu\text{L}$  上下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ ),1  $\mu\text{L}$  T4 PNK 10  $\times$  缓冲

液 2  $\mu\text{L}$  的 10 mmol/L ATP, 1  $\mu\text{L}$  T4 PNK (5 ~ 10 U/ $\mu\text{L}$ ), 无核酸酶的无菌水 1  $\mu\text{L}$ , 37 $^{\circ}\text{C}$  保温 10 min, 然后在 90 $^{\circ}\text{C}$  煮沸 2 min 以灭活 T4 PNK, 轻微离心后, 保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。

以 1.2.3 节获得的包含有 *CYP6B7* 的质粒为模板进行反向 PCR 扩增, 扩增体系包括模板 0.5  $\mu\text{L}$ ; 磷酸化引物 2  $\mu\text{L}$ ; 10  $\times$  PCR buffer 5  $\mu\text{L}$ ; 2.5 mmol/L dNTPs 4  $\mu\text{L}$ ; ddH<sub>2</sub>O 37.5  $\mu\text{L}$ ; pfu DNA 聚合酶 1  $\mu\text{L}$ 。94 $^{\circ}\text{C}$  变性 3 min, 30 个循环 (94 $^{\circ}\text{C}$ , 1 min; 45 $^{\circ}\text{C}$ , 1 min; 72 $^{\circ}\text{C}$ , 2 min) 反应, 再在 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min, 反应混合物保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 。

**1.2.5 反向 PCR 产物的克隆与鉴定:** 将反向 PCR 的产物进行回收, 连接, 转化后进行蓝白斑筛选, 提取质粒进行酶切鉴定, 将酶切鉴定后的阳性克隆进行序列分析。

**1.2.6 *CYP6B7*-pMAL 重组质粒的构建:** 用 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切包含正确序列的 *CYP6B7* 的 PCR 产物以及 pMAL-c2X 质粒, 将双酶切的表达载体 pMAL-c2X 和 *CYP6B7* 进行胶纯化回收, 然后用 T4 连接酶 4 $^{\circ}\text{C}$  连接过夜, 再转化至感受态的 *E. coli* TB1 细胞, 涂平板, 挑取白色单菌落, LB 液体培养基 37 $^{\circ}\text{C}$  250 r/min 摇床培养, 提取重组质粒, 采用 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切鉴定, 再对阳性克隆进行测序, 以验证插入片段是否正确。

**1.2.7 重组质粒的原核表达:** 将鉴定正确的阳性克隆, 划线纯化 37 $^{\circ}\text{C}$  平板培养, 从平板上挑取单菌落接种于 10 mL LA 培养基 (100 mL: 1 g 胰化蛋白胨, 0.5 g 酵母提取物, 0.5 g 氯化钠, 0.2 g 葡萄糖, 115 $^{\circ}\text{C}$  高压灭菌 30 min 后待溶液冷却至约 55 $^{\circ}\text{C}$  时加入氨苄青霉素至终浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 37 $^{\circ}\text{C}$  培养过夜。次日, 将过夜培养物以 1:100 的比例转接于 50 mL 新鲜的 LA 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$  培养至菌液 OD<sub>600</sub> = 0.535 时, 加入 IPTG 至终浓度 0.3 mmol/L, 然后在 30 $^{\circ}\text{C}$  继续培养 4 h, 随后离心菌液 (4 $^{\circ}\text{C}$ , 6 000 r/min, 6 min), 收集菌体, 将菌体于 -20 $^{\circ}\text{C}$  冻存备用。

**1.2.8 融合蛋白的纯化:** 将冻存的菌体 (50 mL) 于室温融化后, 加入 10 mL 过柱缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 200 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA) 悬浮菌体。在冰水浴上进行超声波破碎细胞 (脉冲为 10 s, 隔 10 s, 共 6 次), 然后离心 (4 $^{\circ}\text{C}$ , 12 000 r/min, 30 min) 收集上清液。将在 4 $^{\circ}\text{C}$  存放的 amylose 层析柱用 12 倍柱床体积的水清洗, 然后用 9 倍柱床体积的过柱缓冲液平衡; 将 10 mL 上清蛋白样品液加入到柱床内, 流速控制为 1 mL/min (每次上 2 mL, 共 5

次); 用 12 倍柱床体积 (共 24 mL) 的过柱缓冲液淋洗未结合的蛋白, 每次用 6 mL, 共 4 次; 用 3 倍柱床体积洗脱缓冲液洗脱与 amylose 树脂结合的 MBP 融合蛋白; 收集洗脱样品液每管 1 mL; SDS-PAGE (4% 浓缩胶, 8% 分离胶) 检测洗脱样品。

## 2 结果与分析

### 2.1 棉铃虫细胞色素 P450 *CYP6B7* 基因的克隆

以棉铃虫中肠组织提取的 DNA 为模板, 用 *CYP6B7* 基因特异性引物进行 PCR 扩增, 扩增产物在 1.0% 琼脂糖胶上有一大小在 1 500 ~ 2 000 bp 间的特异条带 (图 1)。

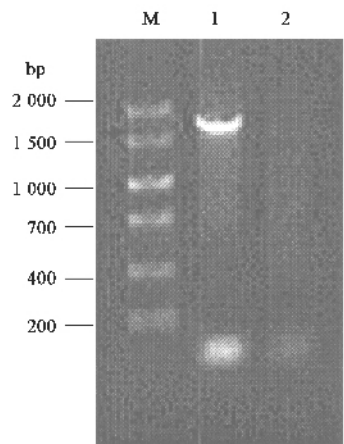


图 1 PCR 扩增产物电泳图谱

Fig. 1 PCR product in 1% agarose gel

M: DNA 梯度 DNA ladder; 1: PCR 产物 PCR product; 2: 阴性对照 Negative control.

对以上 PCR 产物进行测序分析 (AY593871), 并与 GenBank 收录的棉铃虫 *CYP6B7* 基因序列 (AF031468) 进行比较 (图 2), 可以看到, 基因组 DNA 的扩增产物为含有一个长度为 321 bp 的内含子的 *CYP6B7* 基因。

### 2.2 基因组 *CYP6B7* 基因内含子的消除

由于以基因组 DNA 为模板对 *CYP6B7* 进行扩增的产物除包含 *CYP6B7* 的编码序列外, 还含有一个内含子, 为了对该基因进行功能表达, 要得到其开放读框, 所以需要将内含子消除。我们采用反向 PCR 的方法, 以 1 对磷酸化引物和含 *CYP6B7* 的质粒为模板, 以高保真的平末端的 pfu DNA 聚合酶进行反向 PCR 扩增。

将目的片段进行回收、与载体连接、转化后, 涂平板, 经 X-gal 筛选蓝白菌落。阳性克隆进行序列测定, 测序结果显示, 获得的克隆已消除了内含子。推导的氨基酸序列与参考的 *CYP6B7* (AF031468) 进

```

1   ATGTGGGTCTTATATCTACCGGCAGTGTATCAGTGTAAATCGTTACCCCTTATTTATATTTTACAAGAACATTTAACTATTGGAAGAAA
1   ATGTGGGTCTTATATCTACCGGCAGTGTGTAGTGTAAATCGTTACCCCTTATTTATATTTTACAAGAACATTTAACTATTGGAAGAAA
91  CAAAATGTCGTGGGCCGGAACCAACTGTTTCTTCGGGAAGTGAAGGATTCAACCCCTCGCAAGAAAAACATAGGAATAGTGATGGAA
91  CGAAATGTCGTGGGCCGGAACCAACTGTATTTCTTCGGGAAGTGAAGGATTCAACCCCTCGCAAGAAAAACATAGGAATAGTGATGGAA
181 GAAATTTACAACCAAGTTCCGGATGAAAAGGTGGTTGGAATGTATAGAATGACCACACCCCTGCTACTGGTACGTGATTTGGATGTGAT
181 GAAATTTACAACCAAGTTCCATATGAAAAGGTGGTTGGAATGTATAGAATGACCACACCCCTGCTACTGGTACGTGATTTCCATGTGAT
271 TAAACATATCATGATTAAGACTTTGAAGCGTTCGTGATCGTGGCGTGAATTTCAGCAAAGAAGGATTGGGACAAAACCTGTTCCATGCT
271 TAAACATATCATGATTAAGACTTTGAAGCGTTCGTGATCGTGGTGTGGAATTTCAGCAAAGAAGGATTGGGACAAAATTTGTTCCATGCT
361 GACGGAGAAACGTGGAGAGCATTAAAGAACAGATTTACACCTATTTTACATCTGGTAAATGAAAAACATGTTCTATCTTATGCATGAA
361 GACGGAGAAACGTGGAGAGCATTAAAGAACAGATTTACACCTATTTTACATCTGGTAAATGAAAAACATGTTTATCTTATGCATGAA
451 GGTGCTGATAACTTTATTGACCACGTGAGCAAAGAGTGTGAAAAAAAACAAGAGTTTGAAGTTCACCTCCCTTCTCCAGACGTACACCAT
451 GGTGCTGATAACTTTATTGACCACGTGAGCAAAGAGTGTGAAAAAAAACAAGAGTTTGAAGTTCACCTCCCTTCTCCAGACGTACACCAT
541 GTCTACGATCTCATCATGTGCTTTCGGAGTGAGTTATAACAGCATCAGCGATAAAGTTCAGACTCTAGAAAATGTAGACAAGATTATTTCT
541 GTCTACGATCTCATCATGTGCTTTCGGAGTGAGTTATAACAGCATCAGCGATAAAGTTCAGACTCTAGAAAATGTAGACAAGATCATTTC
631 AGAACCAAGTTATGCTATAGAATGGATTATATGTACCCTAAATTTGGCAAAACTCAATCTTTCAATAATCCCGACTCCTGTACAACA
631 AGAACCAAGTTACGCTATAGAATGGATTATATGTATCCTAAATTTGGCAAAACTCAATCTTTCAATAATCCCGACTCCTGTACAACA
721 TTTCTTCAAAGTCTTGTGGACAACATTATCAGCCAAAGGATGGCAAACCTGCAGGCCGCAATGATTTTATGGATCTCATACTCGAGCT
721 TTTCTTCAAAGTCTTGTGGACAACATTATAGCCAAAGGATGGCAAACCTGCAGGCCGCAACGATTTTATGGATCTCATACTCGAGCT
811 CCGTCAAATGGGAGAGTAACTAGTAACAAATATCTTGATGGAGTAACATCACTTGAAAATTAAGTACGAAAGTAAATATGTGCCAAAGCTTT
811 CCGTCAAATGGGAGAGTAACTAGTAACAAATATCTTGATGGAGTAACATCACTTGAAAATTAAGTACGAAAGTAAATATGTGCCAAAGCTTT
901 TGTATTTTACGTTGCTGGATATGAAACCAGCGCAACTACAATGTCTATTTGATATACCAACTCTCACTTAATCAAGACGTCCAAAACAA
901 TGTATTTTACGTTGCTGGATATGAAACCAGTCAACTACAATGTCTATTTGATATACCAACTCTCACTTAATCAAGACGTCCAAAACAA
991 GTTGATAGCTGAAGTAGATGAAGCAATAAAAGCTAGTGTGAAAAGTAAACATACGACACCGTGAAGGAAATGAAATACTTGAACAAAGT
991 GTTGATAGCTGAAGTAGATGAAGCAATAAAAGCTAGTGTGAAAAGTAAACATACGACACCGTGAAGGAAATGAAATACTTGAACAAAGT
1081 CTTTGACGAAACCCTTCGTATGTAAGTCTATAGTAGAACCACTGCAAAGAAAAGTTACAAGAGACTACCAGATTCCTGGAAGTATGATGTCGT
1081 CTTTGACGAAACCCTTCGTATGTAAGTCTATAGTAGAACCACTGCAAAGAAAAGTTACAAGAGACTACCAGATTCCTGGAAGTATGATGTCGT
1171 CATTGAAAAGGACACTATGGTATTAATATCTCCACGAGGCATTCACTATGACCCGAAATATTACGACAACCCTAAACAATTCAACCCCTGA
1171 CATTGAAAAGGACACTATGGTATTAATATCTCCACGAGGCATTCACTATGACCCGAAATATTACGACAACCCTAAACAATTCAACCCCTGA
1261 TAGATTTGATGCGGAGGAAAGTGGGCAAGCGTACCCGTGCGGCTACTTACCATTGCGACTTGGACAAAGGAATTGCATAGGTAAGCAAAAT
1261 TAGATTTGATGCGGAGGAAAGTGGGCAAGCGTACCCGTGCGGCTACTTACCATTGCGACTTGGACAAAGGAATTGCATAGGTAAGCAAAAT
1351 CTTCAATAGCAGTTAATTTCTCATTAAAAATAAGTTCATAAAGTCTGATAAAGATGTCAAGCGTCAAGTGTGCAACTAAACAACA
1342 -----
1441 TTAGATATAAAAAATTAACCGCGTTTAAAATAGTAAAAAAAATATTTGTTGACTAGACTAGAGTATCTCCTGTCTTTGAATATCAA
1342 -----
1531 GAGGTTTTTGTCTAGTTTTCTATTTTGTGGTGCATAATCACGCGTAGCAAATAAACACACAAAGTCACTTGTACCTTTATAACTTATT
1342 -----
1621 ATTCTTTCTATTTTAAACCGTCAAATTTTCGTTTCAGGCATGCGGTTTGGCAGACTTCAGTCCCTATTATGCATCACGAAGATTTTA
1342 -----GTATGCGGTTTGGCAGACTTCAGTCTCTACTATGCATCACGAAGATTTTA
1711 TCCAAGTTTAGAATAGAGCCATCGAAGAATACCGACAGAACTTGAAGTTGAACCAGCGCGATTATTATTGGACCGAAAGGAGGAATA
1390 TCCAAGTTTAGAATAGAGCCATCGAAGAATACCGACAGAACTTGAAGTTGAACCAGCGCGATTATTATTGGACCGAAAGGAGGAATA
1801 CGTGTAAACATTGTTCTAGGAAGATTGTATCTTAA
1480 CGTGTAAACATTGTTCTAGGAAGATTGTATCTTAA

```

图 2 克隆的片段 (AY593871, 上行) 与 *CYP6B7* (AF031468, 下行) 的核苷酸序列比对分析

Fig. 2 Alignment of the genomic DNA PCR product (AY593871, top line) with *CYP6B7* cDNA (AF031468, bottom line)

"|" 表示上下两序列碱基相同 Identical base in both sequences; "-" 表示碱基缺失 Without base.

行比较(图3),在504个氨基酸残基中存在4个氨基酸替换(D68Y, L87F, D88H和 I486T),序列相似性为99%;与GenBank中DQ497428序列存在2个氨基酸替换(K355R和 M180T),说明本研究克隆得到的基因是棉铃虫 *CYP6B7*(AF031468)的等位基因。

### 2.3 *CYP6B7*-MBP的融合表达与纯化

pMAL-c2X载体本身包含编码麦芽糖结合蛋白基因(maltose-binding protein, MBP),分子量为42.4 kD,目标基因可以插入到载体中,与MBP蛋白融合表达。SDS-PAGE结果显示,用棉铃虫 *CYP6B7* 基因

(编码分子量为58.181 kD的蛋白)与表达载体pMAL-c2X构建的重组体可在大肠杆菌TB1中表达,当IPTG为0.3 mmol/L,30℃培养4 h时,融合基因得到诱导表达(图4)。融合蛋白是破碎细胞的离心上清液中的主要成分,离心沉淀中也检测有相同位置的条带(100 kD)。融合蛋白能与 amylose 柱结合,用含麦芽糖的洗脱缓冲液洗脱融合蛋白,8% SDS-PAGE分析发现得到单一条带的融合蛋白,融合蛋白主要出现于1~1.5柱床体积(本实验的柱床体积为2 mL)的洗脱样品中。

```

1  MWVLYLPAVLSVLIVTLVLYFTRTFNYYWKKRNVRGPEPTVFFGNLKDSTLRKKNIGIVMEEIYNQFPDEKVVGMRYMTTPCLLVRDLVDVI  90
1  MWVLYLPAVLSVLIVTLVLYFTRTFNYYWKKRNVRGPEPTVFFGNLKDSTLRKKNIGIVMEEIYNQFPYKVVGMRYMTTPCLLVRDFHVI  90

91  KHIMIKDFAEFRDRGVFESKEGLGQNLPHADGETWRALRNRFPTIFTSGKLNMFYLMHEGADNFIDHVSKECEKKQEFVHSLQLQTYTM  180
91  KHIMIKDFAEFRDRGVFESKEGLGQNLPHADGETWRALRNRFPTIFTSGKLNMFYLMHEGADNFIDHVSKECEKKQEFVHSLQLQTYTM  180

181  STISSCAFVGSYNSISDKVQVLEIVDKIISEPSYATIELDYMYPKLLAKLNLSIIPTPVQHFFKSLVDNIIISQRNGKPAGRNDFMDLILEL  270
181  STISSCAFVGSYNSISDKVQVLEIVDKIISEPSYATIELDYMYPKLLAKLNLSIIPTPVQHFFKSLVDNIIISQRNGKPAGRNDFMDLILEL  270

271  FQMGEVTSNKYLDGVTSLLEITDEVICAQAFVVFYVAGYETSATTMSYLIYQLSLNQDVQNKLIAEVDEAIKASDGKVTYDVTVKEMKYLNVK  360
271  RQMGEVTSNKYLDGVTSLLEITDEVICAQAFVVFYVAGYETSATTMSYLIYQLSLNQDVQNKLIAEVDEAIKASDGKVTYDVTVKEMKYLNVK  360

361  FDETLRMYSIVEPLQRKATRDYQIPGTDVVIKDTMVLISPRGIHYDPKYDNPQKQFNPDRFDAEEVQGRHPCAYLPFGLGQRNCIGMRF  450
361  FDETLRMYSIVEPLQRKATRDYQIPGTDVVIKDTMVLISPRGIHYDPKYDNPQKQFNPDRFDAEEVQGRHPCAYLPFGLGQRNCIGMRF  450

451  GRLQSLLCITKILSKFRIEPSKNTDRNLQVEPRRVIIGPKGGIRVNIIVPRKIVS  504
451  GRLQSLLCITKILSKFRIEPSKNTDRNLQVEPRRVTIGPKGGIRVNIIVPRKIVS  504
    
```

图3 克隆的 *CYP6B7* 与 GenBank 中的 *CYP6B7* 的氨基酸序列比对分析

Fig. 3 Alignment of the putative amino acid sequences encoded by the cloned gene in this study (top line) and *CYP6B7* (AF031468, bottom line)

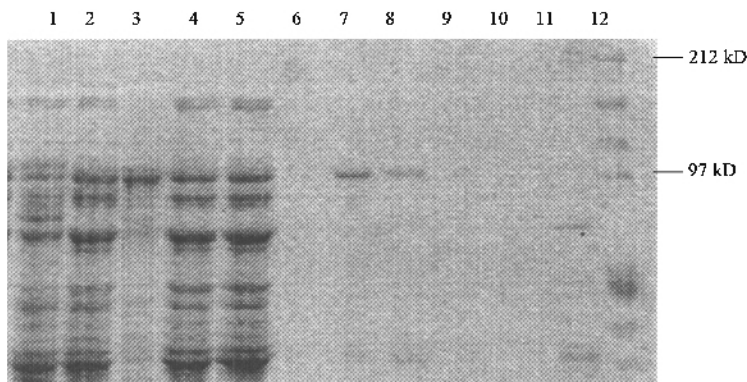


图4 8% SDS-PAGE 图谱

Fig. 4 8% SDS-PAGE of fractions from the purification of *CYP6B7*-MBP expressed in *E. coli*

1: 30℃ 诱导前细胞 Uninduced cells by IPTG at 30℃ ; 2: 30℃ 诱导后细胞 Induced cells at 30℃ ; 3: 超声波破碎上清液 Crude extract ; 4: 超声波破碎沉淀 Insoluble matter ; 5: 上样时未与介质结合的蛋白 Flow through after loading on the amylose resin column ; 6~10: 收集洗脱液第1~5管 No. 1-5 tubes of maltose eluate ; 11: 淋洗未结合的蛋白 Unbinding proteins in the wash fractions ; 12: 蛋白分子量标准 Standard protein marker.

### 3 讨论

用 PCR 方法获得基因可以以 RNA 或 DNA 为模板,我们在克隆棉铃虫 *CYP6B7* 基因时首先以棉铃虫中肠组织的 RNA 作为模板,根据已报道的棉铃虫 *CYP6B7* 的序列设计了上下游引物进行 RT-PCR 扩增,但没有获得目标产物。Ranasinghe 和 Hobbs (1998) 从棉铃虫中肠组织中克隆该基因时,以 RNA 为模板试图获得全长基因时,也遇到类似的困难。在此情况下,我们选择了以棉铃虫中肠组织的基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,得到了包含长度为 321 bp 内含子的目标基因,该内含子的插入符合 AG-GT 规则。利用基因组 DNA 为模板,我们在扩增获得目的基因的同时,还获得了 *CYP6B7* 基因的基因组结构信息,首次发现棉铃虫基因组 *CYP6B7* 基因是包含一个内含子的断裂基因。

要对 *CYP6B7* 进行表达研究,必须将该片段中的内含子进行消除。内含子的消除一般有 2 种方法,一是通过基因突变的方法,另一种是通过反向 PCR 的方法。我们选择了比较简单而又有效的反向 PCR 的方法来消除该片段中的内含子,并取得了成功。需要指出的是,在利用反向 PCR 来消除内含子时,使用质量好的高保真的 pfu DNA 聚合酶才能保证所扩增产物的忠实性,在消除内含子的同时,避免非特异性的扩增。

目标基因与 pMAL-c2X 表达载体连接后的融合质粒可在大肠杆菌中融合表达,其表达可被 IPTG 诱导,表达产物的大小为预期大小(100 kD)(图 4)。经亲和层析,我们可以获得 SDS-PAGE 电泳纯的融合蛋白。*CYP6B7* 基因在 pMAL 表达系统的有效融合表达和纯化,为进一步研究 P450 蛋白的功能打下了基础,也为建立其他细胞色素 P450 的表达系统和选择 P450 基因表达产物的纯化方法提供了参考。融合蛋白或其酶解产物(蛋白酶 Factor Xa 可以将融合蛋白切开),可用于与细胞色素 P450 还原酶等酶系成分来重组细胞色素 P450 酶系以分析 *CYP6B7* 的底物特异性,也用于制备抗血清,用免疫抑制的方法来鉴定 *CYP6B7* 的功能,这将是我们的下一步的工作内容。

### 参 考 文 献 (References)

Ai Y, Qiu XH, He FQ, 2004a. Cloning and sequence analysis of cytochrome

P450 cDNA fragment of CYP4 family from *Helicoverpa armigera*. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 27(6): 60-64. [艾颖, 邱星辉, 何凤琴, 2004a. 棉铃虫 CYP4 家族基因片段克隆及序列分析. 河北农业大学学报, 27(6): 60-64]

Ai Y, Qiu XH, Zhang LL, Li M, He FQ, 2004b. Cloning and sequence analysis of cDNA fragments of cytochrome P450 from *Helicoverpa armigera*. *Entomological Knowledge*, 41(3): 227-231. [艾颖, 邱星辉, 张巍巍, 李梅, 何凤琴, 2004b. 棉铃虫细胞色素 P450 cDNA 片段的克隆及序列分析. 昆虫知识, 41(3): 227-231]

Feyereisen R, 1999. Insect P450 enzymes. *Annu. Rev. Entomol.*, 44: 507-533.

Pittendrigh B, Aronstein K, Zinkovsky E, Andreev O, Campbell B, Daly J, Trowell S, French-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. Characterization of two cytochrome P450s from *Helicoverpa armigera* CYP6B6 and CYP6B7, one of which is overexpressed in pyrethroid resistant insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 28: 571-580.

Ranasinghe C, Hobbs AA, 1999. Isolation and characterization of a cytochrome b5 cDNA clone from *Helicoverpa armigera* (Hübner): Possible involvement of cytochrome b5 in cytochrome P450 CYP6B7 activity towards pyrethroids. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29: 145-151.

Ranasinghe C, Campbell B, Hobbs AA, 1999. Overexpression of cytochrome P450 CYP6B7 mRNA and pyrethroid resistance in the Australian populations of *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Pestic. Sci.*, 54: 195-202.

Scott J, 1999. Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29: 757-777.

Wang XP, Hobbs AA, 1995. Isolation and sequence analysis of a cDNA clone for a pyrethroid inducible cytochrome P450. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 25: 1001-1009.

Wu KM, Guo YY, 2005. The evolution of cotton pest management practices in China. *Annu. Rev. Entomol.*, 50: 31-52.

Yang Y, Wu Y, Chen S, Devine GJ, Denholm I, Jewess PG, Moores GD, 2004. The involvement of microsomal oxidases in pyrethroid resistance in *Helicoverpa armigera* from Asia. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34: 763-773.

Yang E, Yang Y, Wu S, Wu Y, 2005. Relative contribution of detoxifying enzymes to pyrethroid resistance in a resistant strain of *Helicoverpa armigera*. *J. Appl. Entomol.*, 129: 521-529.

Zheng MQ, Zhang WJ, Qiu XH, Leng XF, 2005. Partial purification of microsomal P450s from midgut of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Acta Entomologica Sinica*, 48(3): 359-364. [郑明奇, 张文吉, 邱星辉, 冷欣夫, 2005. 棉铃虫中肠微粒体 P450 的分离纯化. 昆虫学报, 48(3): 359-364]

(责任编辑:黄玲巧)