

高分辨率熔解曲线分析检测家蝇 *cyp6d1* 基因突变

王英红, 孔庆鑫, 邱丽华, 韦凌娅, 沈林海, 倪晓平

杭州市疾病预防控制中心消毒监测与媒介生物防治所, 浙江 杭州 310021

摘要: **目的** 探讨家蝇溴氰菊酯抗性机制。**方法** 使用高分辨率熔解曲线(high-resolution melting, HRM)分析与半分析定量PCR相结合的方法, 分析家蝇抗性基因 *cyp6d1* 突变和扩增情况。通过对扩增的PCR产物进行测序来验证HRM准确性。**结果** 与敏感品系相比, 抗性品系 *cyp6d1* 基因的mRNA表达量显著增加($P=0.0002$), 抗性品系 *cyp6d1* 基因的mRNA表达量是敏感品系的50.7倍; 使用HRM对 *cyp6d1* 进行突变分析, 将其分为3种基因型, 分别为A型($T_m=85.5\text{ }^\circ\text{C}$)、B型($T_m=87.3\text{ }^\circ\text{C}$)和C型($T_m=88.5\text{ }^\circ\text{C}$); 经测序, 该HRM分析结果分别与3类基因序列型相对应。A型基因型为纯合的1087G、1101T和1155A(对应GenBank序列号U22367.1); C型基因型为纯合的1087A、1101G和1155G; B型基因型为A型和C型的杂合型。生物信息学分析表明, 该突变为无意义突变。**结论** 杭州市家蝇抗性品系 *cyp6d1* 基因mRNA表达量显著增加, 可能是家蝇抗性增加的原因之一。

关键词: 高分辨率熔解曲线; 家蝇; 抗性; 基因突变; *cyp6d1*

中图分类号: R384.2; S481*.4 文献标志码: A 文章编号: 1003-4692(2012)06-0499-04

Determination of *cyp6d1* gene mutation in *Musca domestica* by high-resolution melting analysis

WANG Ying-hong, KONG Qing-xin, QIU Li-hua, WEI Ling-ya, SHEN Lin-hai, NI Xiao-ping

Hangzhou Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310021, Zhejiang Province, China

Corresponding author: NI Xiao-ping, Email: nixp@sohu.com

Supported by the Scientific Research Fund of Health Bureau in Zhejiang Province (No. 2009A176)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of deltamethrin resistance in *Musca domestica*. **Methods** The mutation and amplification of *cyp6d1*, a deltamethrin resistance gene in *M. domestica*, were determined by high-resolution melting (HRM) analysis and semiquantitative PCR. The accuracy of HRM analysis was validated by sequencing of PCR products. **Results** The mRNA expression of *cyp6d1* in deltamethrin-resistant strain was 50.7-fold that in deltamethrin-sensitive strain, showing significant difference between the two strains ($P=0.0002$). The PCR products were classified into three genotypes, type A ($T_m=85.5\text{ }^\circ\text{C}$), type B ($T_m=87.3\text{ }^\circ\text{C}$), and type C ($T_m=88.5\text{ }^\circ\text{C}$), according to the mutation analysis of *cyp6d1* by HRM. The results from HRM corresponded to the sequences of the three genotypes. As for the genotypes, type A was homozygous 1087G, 1101T, and 1155A (GenBank No. U22367.1), type C was homozygous 1087A, 1101G, and 1155G, and type B was heterozygous for type A and type C. Bioinformatic analysis revealed that this mutation was non-sense mutation. **Conclusion** The mRNA expression of *cyp6d1* is significantly increased in the deltamethrin-resistant strain of *M. domestica* in Hangzhou, China, which may be one of the mechanisms of deltamethrin resistance increase in *M. domestica*.

Key words: High-resolution melting; *Musca domestica*; Deltamethrin resistance; Gene mutation; *cyp6d1*

家蝇(*Musca domestica*)是我国主要卫生害虫之一,能够携带数十种病菌^[1]。溴氰菊酯为现阶段我国室内灭蝇的常用杀虫剂之一。由于该种药物的广泛使用,我国家蝇对溴氰菊酯的抗性水平不断升高。开展家蝇抗性监测,合理使用灭蝇药物,是减缓家蝇抗性水

平增长的有效手段。李志等^[2]发现辽宁省4个城市的家蝇对溴氰菊酯抗性最为突出,是敏感品系的61.60倍。我们对杭州市家蝇开展溴氰菊酯、高效氯氰菊酯、二氯苯醚菊酯、EBT、敌敌畏、胺菊酯6种杀虫剂抗性监测发现,与敏感品系相比,野外家蝇种群对溴氰菊酯的抗性水平最高,抗性倍数为338.00倍($LD_{50}=0.1014\text{ }\mu\text{g/只}$),其次为高效氯氰菊酯,抗性倍数为86.77倍($LD_{50}=0.7983\text{ }\mu\text{g/只}$)。与1982年的历史资料比较,两者抗性水平分别升高144.00倍和319.32倍。

基金项目:浙江省卫生厅科研项目(2009A176)

作者简介:王英红(1979-),女,博士,主管技师,从事病媒生物防治工作。

Email: wyinghong723@hotmail.com

通讯作者:倪晓平, Email: nixp@sohu.com

但是目前关于其抗性水平增加的原因还未知。笔者使用半定量 PCR 与高分辨率熔解曲线 (high resolution melting, HRM) 分析相结合的方法, 检测家蝇抗性基因 *cyp6d1* 的表达和基因突变情况, 本研究不仅探讨家蝇抗性水平增加时 *cyp6d1* 基因的变化情况, 同时为今后抗性基因的筛选和检测建立一个操作简便、快速、高通量和低成本的技术方法。

1 材料与方法

1.1 试虫 家蝇敏感品系, 引自浙江省疾病预防控制中心 (CDC) 病媒生物防治所; 家蝇抗性种群, 采集于杭州市区某农贸市场附近的成蝇, 经鉴定系家蝇后带回浙江省 CDC 昆虫饲养室, 繁殖至第 1~2 代。

1.2 mRNA 提取 取羽化后 4~5 d 的敏感品系和抗性品系成蝇 (体重 18~20 mg/只) 各 24 只, 冷冻致死, 去离子水清洗 3 次, 然后分别匀浆混匀, 按 RNeasy Plus Mini Kit (美国 Qiagen 公司) 试剂盒操作提取 mRNA。mRNA 的反转录按照 RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 (日本 TaKaRa 公司) 试剂盒操作。测定 cDNA 浓度, -20 °C 保存。

1.3 引物设计 根据已报道文献以及抗药性相关基因序列^[3], 使用 NCBI primer blast 设计的引物 (表 1), 由生工 (上海) 生物工程技术服务有限公司合成。其中引物 *cyp106-f/cyp106-r* 用于 PCR 及 HRM 检测, 引物 *cyp-f/cyp-r* 用于测序。引物 *gapdh-f/gapdh-r* 用于内参基因扩增。

表 1 家蝇 *cyp6d1* 及 *gapdh* 基因 PCR 扩增引物
Table 1 Primers for PCR amplification of *cyp6d1* and *gapdh* in *M. domestica*

基因	引物名称	引物序列	位置(bp)	参照序列	产物长度
<i>gapdh</i>	<i>gapdh-f</i>	CTGCTTCTACCGGTGCCGCC	410~547	AY675185.1	138
	<i>gapdh-r</i>	TGGCTGGCTTGCCAAGACGG			
<i>cyp6d1</i>	<i>cyp106-f</i>	AAGGCACGGTCTCAAGCCGC	1078~1164	U22367.1	106
	<i>cyp106-r</i>	CAGGCCGGGTATTGCGGG			
	<i>cyp-f</i>	CAAGCCGGCCCTACTGCTGC	216~1320		1105
	<i>cyp-r</i>	ATCGGCAAAGCGTTCTGGCCT			

1.4 半定量 PCR 及 HRM 反应体系: 5×PCR 缓冲液 4 μl, dNTPs (2.5 mmol/L) 0.4 μl, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.5 μl, 引物 (20 μmol/L) 各 0.4 μl, Taq DNA 聚合酶 (5 U/μl) 0.2 μl, 10×LC Green 2 μl, cDNA 20 μg, 双蒸水补足至 20 μl。在 ABI 7500 Real-time PCR 系统 (美国 Life technologies 公司) 中用如下反应程序进行扩增: 95 °C 2 min; 94 °C 30 s, 65 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40 个循环; 72 °C 10 min; 94 °C 30 s。PCR 结果使用 LightScanner 进行扫描, 温度扫描范围 70~95 °C, 升温斜率为 0.2 °C/s。扫描结果用 LightScanner call 软件进行分析。

1.5 测序和统计数据 将引物 *cyp-f/cyp-r* 的扩增产物送生工 (上海) 生物技术有限公司测序。使用 NCBI 在线工具 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 将不同基因型的 mRNA 序列翻译成蛋白序列, 并对其进行比对。PCR 结果用 SPSS 13.0 软件分析。

2 结果

2.1 半定量 PCR *cyp6d1* 基因的 mRNA 在抗性家蝇的相对表达量 ΔCt 为 -3.07 ± 1.39, 在敏感家蝇的相对表达量 ΔCt 为 0.95 ± 0.38, 两者之间差异有统计学意义 ($F=22.43, P=0.0002$)。抗性家蝇中 *cyp6d1* 基因的 mRNA 表达量是敏感品系家蝇的 50.7 倍。

2.2 基因型分析 根据 HRM, 家蝇 *cyp6d1* 基因的分型结果显示, 24 个样品中有 3 类基因型, 分别为 A 型

(T_m=85.5 °C)、B 型 (T_m=87.3 °C) 和 C 型 (T_m=88.5 °C) (图 1)。

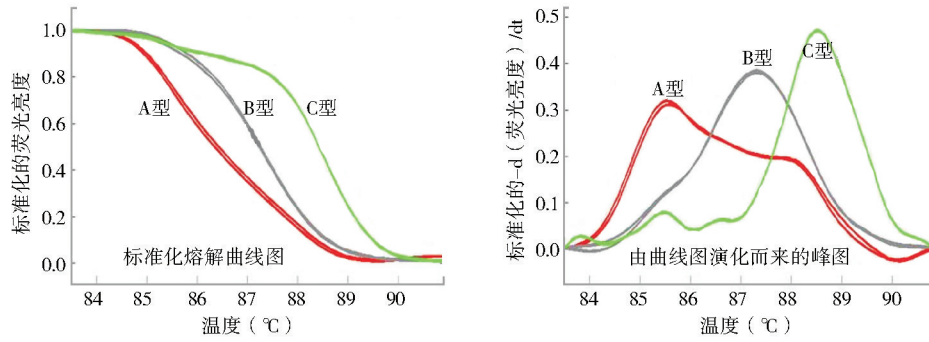
2.3 测序结果 将全部样品进行测序, 结果发现该区域有 3 个突变位点 (表 2、图 2), 分别对应序号为 U22367.1 的 *cyp6d1* 基因的第 1087、1101 和 1155 位。A 型基因型为纯合的 1087G、1101T 和 1155A, C 型基因型为纯合的 1087A、1101G 和 1155G, B 型基因型为 A 型和 C 型的杂合型。经过 NCBI 分析后, 所有基因型对应的蛋白序列均为 GRL TYE AIQ DMK LDL CVM ETT RKY PGL, 以上 3 个突变点均为无意突变。

表 2 HRM 基因分型
Table 2 Three genotypes by HRM

基因型	突变位点	样品数	
		敏感品系 (n=12)	抗性品系 (n=12)
A 型	1087G、1101T 和 1155A	10	0
B 型	1087A/G、1101G/T 和 1155G/A	2	10
C 型	1087A、1101G 和 1155G	0	2

3 讨论

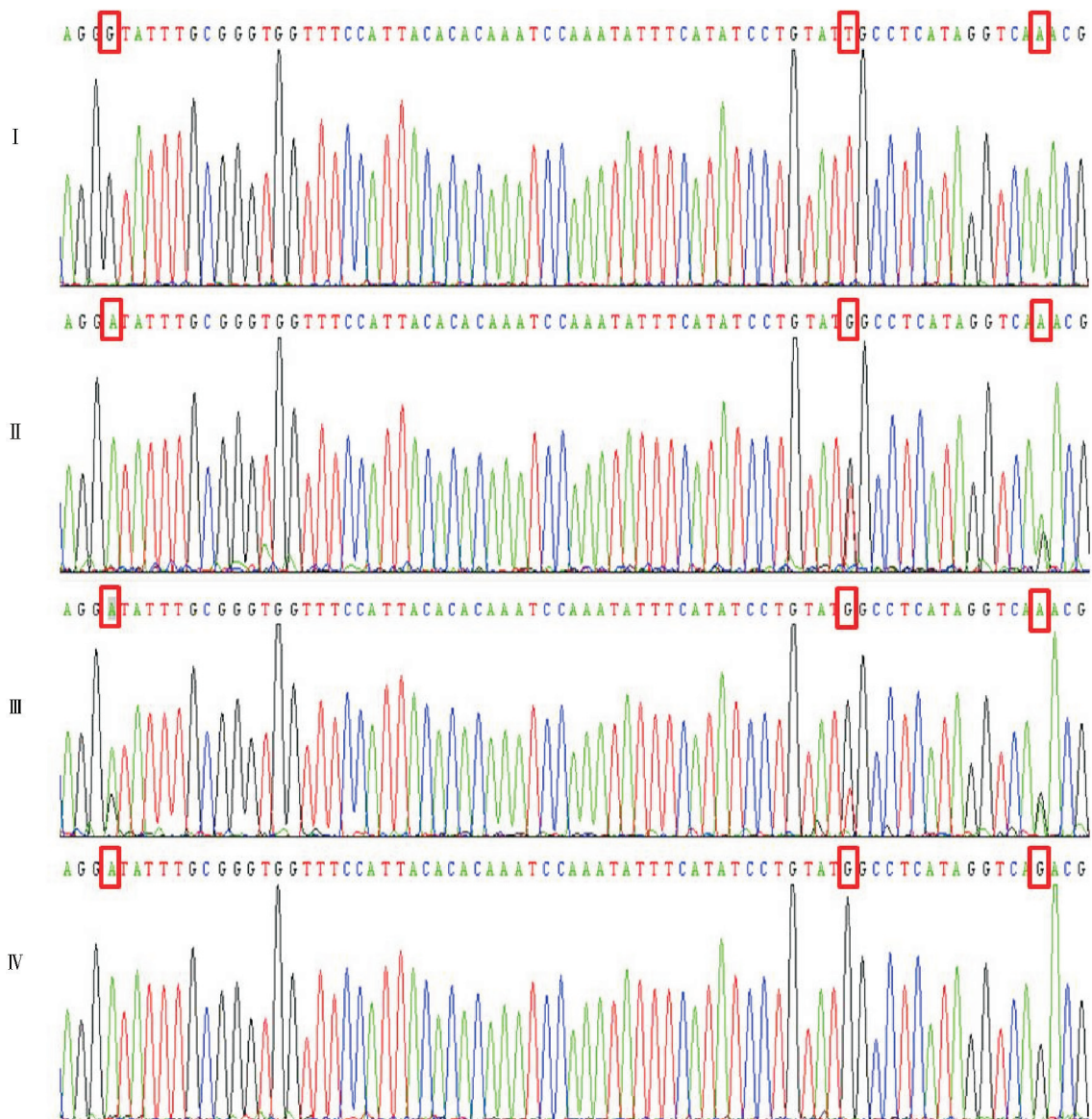
cyp6d1 是家蝇中发现的一个与菊酯类抗性有关的 P450 基因。Lin 和 Scott^[4] 发现抗性品系中 *cyp6d1* 的表达量与敏感品系相比显著增加。王金明^[5] 发现与敏感品系相比, 家蝇抗溴氰菊酯品系 *cyp6d1* 基因 DNA 水平上无明显变化, 而反转录活性升高。本研究利用 Real-



注:HRM根据基因突变情况将 *cyp6d1* 基因分为3个基因型,10个样品为A型(红色,熔解温度为85.5 °C),2个样品为C型(绿色,熔解温度为88.5 °C),其他12个样品均为B型(灰色,熔解温度为87.3 °C)。

图1 HRM基因分型图谱

Fig. 1 Genotype map by HRM



注: I. A型基因型,3个突变位点的基因分别为1087G、1101T和1155A; II、III为B型基因型,是A型和C型的杂合型; II. 3个突变位点的基因分别为1087A、1101G/T和1155G/A; III. 3个突变位点的基因分别为1087A/G、1101G/T和1155G/A; IV. C型基因型,3个突变位点的基因分别为1087A、1101G和1155G。

图2 *cyp6d1* 的cDNA测序结果

Fig. 2 cDNA sequencing results of *cyp6d1*

time PCR对家蝇抗性品系和敏感品系 *cyp6d1* 的表达量进行半定量分析。结果显示,抗性品系的 *cyp6d1* 表达量是敏感品系的50.7倍。提示抗性品系 *cyp6d1* 的过量表达可能是其抗性增加的重要原因。

2002年,犹他大学和爱德华科技公司合作开发出一项新的突变/SNP检测分析方法——HRM^[6]。这种技术可同时对扩增片段进行未知突变扫描和已知突变基因型分析,还可以进行甲基化分析、序列匹配等^[7]。Vezzenegho等^[8]和Bass等^[9]分别将HRM应用于按蚊分类和蚊虫对拟除虫菊酯类杀虫剂抗性基因突变的研究,并且一致认为HRM可以有效地进行突变基因筛选。目前还未见HRM在家蝇相关研究中使用的报道。本研究首次将HRM应用到家蝇抗药性基因研究中,并检测到3种HRM,每种熔解曲线T_m值差距>1.2℃。该HRM与其基因序列型具有很高的一致性。A型和C型的基因型为纯合型,B型基因型为A型和C型的杂合型。B型基因序列与A型和C型的差异为2~3个核苷酸。本研究结果显示,HRM可以将单核苷酸突变有效地区分出来,应用到以后家蝇抗药性突变检测中。

很多研究证明,家蝇抗性品系和敏感品系之间存在 *cyp6d1* 等位基因突变,例如土耳其两个地区的等位基因突变率分别为0.65和0.56^[10],但是这种突变是否与抗性相关仍然未知。本研究中发现家蝇不同个体中存在 *cyp6d1* 等位基因突变,与以前实验结果一致。但是将3个突变基因序列转换成氨基酸序列后发现,氨基酸序列没有改变,因此推论该段等位基因突变与抗性不相关。本研究结果表明,实时荧光定量PCR与HRM分析相结合的方法为一套简单高效的家蝇抗性基因检测方法,该方法的建立将为菊酯类抗性家蝇的

检测提供技术参考。

参考文献

- [1] 张国芳. 蝇的传病与调查[J]. 寄生虫病防治与研究, 1998, 27(3): 181-182.
- [2] 李志, 白玉银, 李鑫, 等. 辽宁省4市城区家蝇抗药性调查[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2011, 22(1): 65-66, 69.
- [3] Rinkevich FD, Zhang L, Hamm RL, et al. Frequencies of the pyrethroid resistance alleles of *Vssc1* and *CYP6D1* in house flies from the eastern United States[J]. *Insect Mol Biol*, 2006, 15(2): 157-167.
- [4] Lin GG, Scott JG. Investigations of the constitutive overexpression of CYP6D1 in the permethrin resistant LPR strain of house fly (*Musca domestica*) [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 2011, 100(2): 130-134.
- [5] 王金明. 家蝇抗溴氰菊酯的分子机制研究[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2010, 21(2): 155-156.
- [6] Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations [J]. *Hum Mutat*, 2009, 30(6): 857-859.
- [7] Arthofer W, Steiner FM, Schlick-Steiner BC. Rapid and cost-effective screening of newly identified microsatellite loci by high-resolution melting analysis [J]. *Mol Genet Genomics*, 2011, 286(3-4): 225-235.
- [8] Vezzenegho SB, Bass C, Puinean M, et al. Development of multiplex Real-time PCR assays for identification of members of the *Anopheles funestus* species group[J]. *Malar J*, 2009, 8: 282.
- [9] Bass C, Nikou D, Donnelly MJ, et al. Detection of knockdown resistance (*kdr*) mutations in *Anopheles gambiae*: a comparison of two new high-throughput assays with existing methods[J]. *Malar J*, 2007, 6: 111.
- [10] Taşkın V, Başkurt S, Doğan E, et al. Frequencies of pyrethroid resistance - associated mutations of *Vssc1* and *CYP6D1* in field populations of *Musca domestica* L. in Turkey [J]. *J Vector Ecol*, 2011, 36(2): 239-247.

收稿日期: 2012-05-28

·读者·作者·编者·

欢迎订阅2013年《中华卫生杀虫药械》杂志

《中华卫生杀虫药械》杂志创刊于1995年,是国家级卫生杀虫灭鼠药械领域的专业期刊,国内外公开发行人。本刊为中国科技核心期刊,已被中国科技论文统计源期刊、中国期刊全文数据库、美国化学文摘、波兰哥白尼索引、英国动物学记录、英国国际农业与生物科学研究中心等国内外多个数据库收录,内容丰富,可读性强,具有较高的学术研究和实际应用价值。本刊及时报道我国卫生杀虫药械最新研究进展,密切关注国内外卫生杀虫药械机构、品种及市场的最新动态,着力展示我国卫生杀虫药械行业发展水平、促进药械技术交流与进步。刊载的内容主要有卫生杀虫灭鼠药械和有害生物防制研究、生产、应用与管理的新成果、新技术、新方法、新产品和新信息等。适用于疾病预防、爱国卫生、交通与物业管理、有害生物防制服务业(PCO)、卫生杀虫灭鼠药械生产与应用、高等院校、科研机构及生态与环保单位的专业技术和管理人员等。热忱欢迎订阅、投稿与信息发布。对基金课题论文等文章给予优先录用。

本刊为双月刊,国际标准A4开本,80页,逢双月20日出版。统一刊号:CN32-1637/R,ISSN1671-2781。全年¥108.00元(含18元挂号费)。全国各地邮局均可订阅,邮发代号:28-308;漏订者可直接与编辑部联系,也可在网上“下载中心”直接下载订单(<http://www.chines.cn>, www.zhwsscy.com);若您注册本网站VIP会员(全年会员费200元)即可获赠全年杂志一套并可享受VIP会员全文在线下载。

邮局汇款请寄至:南京市中山东路293号,《中华卫生杀虫药械》杂志社收,邮编:210002。

银行汇款汇至:《中华卫生杀虫药械》杂志社,开户行:南京市工行长江路支行,账号:4301010519100288791。

电话:025-84417522 传真:025-84456881 E-mail: zhwsscy@chines.cn; zhwsscy@163.com