

·基础研究·

白纹伊蚊溴氰菊酯抗性株 CYP6 基因 cDNA 片段的克隆与鉴定

周国理¹, 黄炯烈¹, 姚其方², 詹希美¹, 葛春喜¹, 王玲¹

(1. 中山医科大学寄生虫学教研室, 广东 广州 510089; 2. 广东药学院寄生虫学教研室, 广东 广州 510240)

摘要:【目的】获得白纹伊蚊溴氰菊酯抗性株 CYP6 基因家族中的一个 cDNA 片段。【方法】根据家蝇 CYP6A1、CYP6D1 以及致倦库蚊 CYP6E 同源区氨基酸序列, 设计 1 对简并引物, 进行反转录 PCR, 获得一大小与设计的细胞色素 P450 基因片段相符合的 cDNA 片段。将该片段与 pUC19 质粒重组, 并克隆至 JM109 大肠杆菌中, 经筛选后测序; 将推导的氨基酸序列进行同源性分析, 并用 PC/GENE 软件绘制系统树。【结果】获得了 1 条长 240 bp 的核酸序列; 所得序列与昆虫 CYP6 家族的同源性在 36.3%~46.8% 之间, 但 CYP6D1 除外, 其同源性为 29.1%; 而与 CYP4 家族同源性较低, 与 CYP4C1、CYP4D1、CYP4D2 同源性分别为 33.3%、32.9% 和 29.9%; 与哺乳动物 CYP3A 亚家族同源性亦较高; 所绘制的系统树显示出与同源性分析相一致的结果。【结论】该序列为 CYP6 家族中某一成员的结构基因片段。

关键词: 伊蚊属; CYP6; 杀虫剂抗性; 序列同源性; 细胞色素 P450; 基因扩增**中图分类号:** R384.1; Q965.9**文献标识码:** A**文章编号:** 1000-257X(2000)01-0001-05

Clone and identification of a cDNA fragment of CYP6 gene from deltamethrin-resistant strain of *Aedes albopictus*

ZHOU Guo-li¹, HUANG Jiong-lie¹, YAO Qi-fang², ZAN Xi-mei¹, GE Chun-xi¹, WANG Ling¹

(1. Department of Parasitology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China;

2. Department of Parasitology, Guangdong Pharmacy College, Guangzhou 510240, China)

Abstract: 【Objective】To obtain a cDNA fragment of CYP6 gene from deltamethrin-resistant strain of *Aedes albopictus*. 【Method】A pair of degenerate primers according to the homologous amino acid sequences of CYP6A1, CYP6D1 in *Musca domestica* and CYP6E in *Culex quinquefasciatus* were designed and used to amplify CYP6 gene from total RNA of deltamethrin-resistant strain of *Ae. albopictus* by RT-PCR technique. The cDNA fragment was recombined with pUC19, and cloned into JM109. A positive clone was selected for sequencing. The deduced amino acid sequence was subjected to homologous analysis. A dendrogram was constructed by the use of PC/GENE sequence analysis software. 【Results】A nucleotide sequence of 240 bp was obtained. The cloned sequence identity to members of CYP6B, CYP6A and CYP6E is from 36.3% to 46.8%, to CYP6D1 is 29.1%, to CYP4C1, CYP4D1 and CYP4D2 is 33.3%, 32.9% and 29.9% respectively. The constructed dendrogram showed a similar result to homologous analysis. 【Conclusions】The cloned sequence is a structural gene fragment from one of members of CYP6 family.

Key words: *Aedes*; CYP6; insecticide resistance; sequence homology; cytochrome P450; gene amplification

昆虫对杀虫剂产生抗性的一个重要机理就是通过微粒体细胞色素 P450 单加氧酶介导的解毒作

用增强。研究昆虫细胞色素 P450 参与杀虫剂抗性的分子机理, 首先就必须寻找和鉴定昆虫中与杀虫

收稿日期: 1999-07-30

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(970092); “211 工程”重点学科建设基金资助项目(98124)

作者简介: 周国理(1964-), 男, 安徽枞阳人, 讲师, 在职博士研究生。

剂抗性有关的 P450。已知细胞色素 P450 蛋白是一个超家族,各家族成员众多,而且昆虫中 P450 含量低且极不稳定,易变性为无活性的 P 420^[1]。因此如何解决上述矛盾是广大昆虫学工作者所面临的一个重要课题。过去 20 年中已分离、鉴定的昆虫 P450 成员将近 200 个,并分属于 CYP4、CYP6、CYP9、CYP12、CYP15、CYP18、CYP28 和 CYP29 8 个家族中^[2]。已有许多研究表明其中 CYP6 家族成员与昆虫抗药性有关^[1],但这些研究仅见于家蝇、果蝇及某些农业昆虫,而关于蚊虫中与抗药性有关的 CYP6 家族成员,目前国内外均未见报道。因此,本实验直接从 CYP6 家族入手,根据昆虫中已知的 CYP6 家族成员氨基酸序列同源区,设计简单引物,进行 RT-PCR,以寻找蚊虫中与抗药性有关的 CYP6 家族成员,为进一步研究蚊虫 P450 介导的解毒增强的分子机理奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 实验虫株

白纹伊蚊溴氰菊酯抗性株(以下简称抗性株)由广东药学院寄生虫学教研室惠赠,抗性倍数达 50 倍。

1.2 引物设计

参照黄炯烈等(1998)^[3]及王迅等(1996)^[4]简并引物设计原理,根据家蝇 CYP6A1、CYP6D1 以及致倦库蚊 CYP6E1 同源区氨基酸序列^[5~7],设计了如下引物:正向引物(forward primer)为 5'-CG-GAATTCGAA(G)CAN C(AT)T(C)N A(C)GN AAA(G)TAT(C)CC-3',相应的氨基酸序列为 ETL(T)RKYP;反向引物(reverse primer)为 5'-CGGAATTCGGN CCN A(T)CN CCG(A)AAN GG-3',相应的氨基酸序列为 P(G)FGE(DL)GP(Q)。因克隆策略的需要,两个引物的 5'端均引入 *EcoR* I 酶切位点,并加 2 个保护性碱基。

1.3 主要试剂、材料

组织中总 RNA 抽提试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒均为 Qiagen 公司产品;RT-PCR 试剂盒为 Clontech 公司产品;载体 pUC19、宿主菌 JM109 均购自华美公司;琼脂糖、各种限制性内切酶、牛小肠碱性磷酸酶(CIAP)及 T4 DNA 连接酶均购自基因公司;细菌培养用酵母提取物、胰蛋白胨及琼脂粉均为 Oxtid 公司产品。

1.4 成蚊总 RNA 抽提、纯化

取刚羽化 3 d 内的成蚊 15 只,液氮速冻,并立即液氮研磨,用 Qiagen Total RNA 抽提试剂盒进行抽提、纯化,具体操作步骤见试剂盒说明书。

1.5 RT-PCR

上述抽提的成蚊总 RNA,立即用于 RT-PCR。根据试剂盒说明书,对其推荐的 PCR 条件略加修改:50 μ L 反应体积中含 2.5 μ L 20 \times RT-PCR buffer、6 μ L 25 mmol/L MgCl₂、1 μ L 25 mmol/L MnSO₄、0.5 μ L Polymerase、8 μ L dNTP Mix、1.5 μ L Primer 1、1.5 μ L Primer 2、5 μ L RNA 模板、24 μ L 灭菌水,混匀,上层加石蜡油 25 μ L,快速离心分层,在英国 Techne 公司 PROGENE 型 DNA 扩增仪上进行反转录(60 $^{\circ}$ C, 20 min),以合成第一链 cDNA,然后再进行 PCR 扩增反应,循环参数如下:90 $^{\circ}$ C 30 s、45 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 5 min,扩增完毕置 4 $^{\circ}$ C 终止反应。

1.6 PCR 产物的克隆与测序

参照文献[8],RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳,选择大小与所设计的细胞色素 P450 基因片段相符合的单一 cDNA 条带,回收、纯化;PCR 产物的 *EcoR* I 酶切,载体 pUC 19 的 *EcoR* I 酶切及牛小肠碱性磷酸酶(CIAP)去磷酸化;T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接过夜后,转化入 JM109 大肠杆菌中;挑取单个白色菌落以碱裂解法快速小量抽提质粒 DNA,经电泳初筛后,重组质粒 *EcoR* I 酶切鉴定和 PCR 鉴定,择其中一个阳性克隆,送交中科院微生物所 M13 反向引物测序。

1.7 序列分析

用 PC/GENE 序列分析软件将所得 cDNA 序列翻译成蛋白质序列,并输入计算机网络,查询 Swissprot 数据库,以获得昆虫中已知的细胞色素 P450 蛋白质序列数据和部分同源性分析数据,并与 PC/GENE 软件分析的部分同源性资料汇总,绘制系统树。

2 结 果

2.1 克隆基因 cDNA 片断序列测定

选取一阳性克隆,用 M13 反向引物进行测序,核酸序列及按三联密码子推导出的氨基酸序列见图 1,包括除去 *EcoR* I 酶切位点的引物在内,所得 cDNA 序列总长度为 240 bp,氨基酸序列中共有 80

个氨基酸残基, 所得片断长度与文献上 P450 片断大小相符。

```

10      20      30      40      50      60
|       |       |       |       |       |
GAAACTTTGAGGAAGTACCCCGGCATCCAATCTAACAGAACAGTATCTAAGGATTAC
E T L R K Y P P A S N L T R T V S K D Y
70      80      90      100     110     120
|       |       |       |       |       |
AAGCTCCCAATAGTAAATGTAAGTCCCGCAGCAAGGGTCCAAGTGGTTACCGGTGTAC
K L P N S N V V P Q Q G S K V V V P V Y
130     140     150     160     170     180
|       |       |       |       |       |
GCCCTCCATCAGATCCAGAGTACTACCCCAAACCGGATAAGTACGATCCGGATCGATTTC
A L H H D P E Y Y P K P D K Y D P D R F
190     200     210     220     230     240
|       |       |       |       |       |
ACACCGGAAGAGGTGGCGAAGCGAATCCGTAAGTCTGCTGCGCTCGGTGAAGGCCCC
T P E E V A K R N P Y C F L P L R - R P
    
```

图 1 白纹伊蚊抗性株细胞色素 P450 cDNA 片断序列及推导的氨基酸序列

加有下划线的为引物序列, cDNA 片断序列长度为 240 bp, 共有 80 个氨基酸残基

Fig. 1 The cloned sequence data from *Aedes albopictus* resistant strain and deduced sequence of amino acid.

The underlined sequences represent primers. The cloned sequence consists of 240 bp. Amino acid residues are deduced

2.2 所得序列的同源性分析

所推导的氨基酸序列(AEDR)与昆虫中部分已知的 CYP6、CYP4 家族成员以及脊椎动物中部分已知的 CYP3 家族成员同源性分析见图 2; 根据图 2, 分别计算所得氨基酸序列与其它已知细胞色素 P450 成员氨基酸序列中相同氨基酸残基数所占的百分比(表 1), 并以此作为同源性分析的指标; 由 PC/GENE 序列分析软件绘制系统树(图 3)。

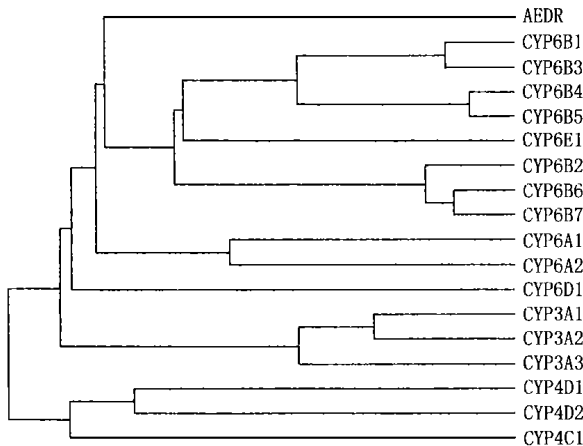


图 3 P450 基因家族部分成员系统树

Fig. 3 Dendrogram of certain members in P450 gene family

表 1 本实验所得序列与其它细胞色素 P450 成员同源性比较

Table 1 Homologous comparison of the cloned sequence with corresponding part of other members of P450 gene

Member	Source	Identical number of residues	Homology (%)
CYP6A1	家蝇 ^[5]	37	46.3
CYP6A2	果蝇 ¹⁾	29	36.3
CYP6B1	黑凤蝶 ¹⁾	32	40.5
CYP6B2	棉铃虫 ¹⁾	32	40.0
CYP6B3	黑凤蝶 ¹⁾	30	38.0
CYP6B4	东方虎凤蝶 ¹⁾	37	46.8
CYP6B5	东方虎凤蝶 ¹⁾	37	46.8
CYP6B6	棉铃虫 ¹⁾	32	40.5
CYP6B7	棉铃虫 ¹⁾	31	39.2
CYP6D1	家蝇 ^[6]	23	29.1
CYP6E	致倦库蚊 ^[7]	37	46.3
CYP4C1	蟑螂 ¹⁾	26	33.3
CYP4D1	果蝇 ¹⁾	26	32.9
CYP4D2	果蝇 ¹⁾	23	29.9
CYP3A1	鼠 ¹⁾	32	41.0
CYP3A2	鼠 ¹⁾	34	43.6
CYP3A3	人 ¹⁾	30	38.5

1) These data are obtained from Swissprot Database. CYP6 A 2 derives from Waters LC, et al. 1992. CYP6B1 from Prapaipong H, et al. 1994. CYP6B2 from Wang X P, et al. 1995. CYP6B3 from Hung C F, et al. 1995. CYP6B4 from Hung C F, et al. 1997. CYP6B5 from Hung C F, et al. 1996. CYP6B6, CYP6B7 from Ranasinghe C, et al. 1998. CYP4C1 from Bradfield J Y, et al. 1991. CYP4D1 from Gandhi R, et al. 1992. CYP4D2 from Frolov M V, et al. 1994. CYP3A1 from Gonzalez F J, et al. 1985. CYP3A2 from Gonzalez F J, et al. 1986. CYP3A3 from Watkins P B, et al. 1985

3 讨论

由表 1 可以看出, 本实验所得序列(AEDR)与昆虫 CYP6 家族的同源性在 36.3%~46.8%之间, 但 CYP6D1 除外, 其同源性为 29.1%; 而与 CYP4 家族同源性较低, 例如与 CYP4C1 为 33.3%、与 CYP4D1 为 32.9%、与 CYP4D2 为 29.9%。根据 P450 命名法, 一个家族内部各成员 P450 蛋白序列的同源性一般要大于 40%, 但许多学者认为这样划一条绝对的界限, 在细胞色素 P450 家族划分的实际工作中是不现实的, 应该结合诸如基因的内含子与外显子的组成、数目和位置以及生物来源等情况综合考虑^[9]。本序列是以昆虫 CYP6 家族中已知成员的保守区氨基酸序列设计引物, 用白纹伊蚊抗性株总 RNA 为模板, 通过反转录 PCR 方法而获得的, 因此应首先考虑该序列为昆虫 CYP6 家族中某一成员的结构基因片段。

的同源性很高,但并不表示它们在各自的生物体内执行着相同的功能,因为 CYP6 的一些氨基酸结构明显地与 CYP3 不同。

用 PC/GENE 序列分析软件绘制出本序列与其它已知的部分 CYP6、CYP4 和 CYP3 家族成员之间的进化系统树(图 3)。由图 3 可以看出,本实验所获得的序列(AEDR)与昆虫 CYP6B、CYP6E 和 CYP6A 等亚家族亲缘关系较近,而与 CYP6D1 及 CYP4 家族亲缘关系较远,这与前面的同源性分析结果是相一致的。

由于本实验所得序列只是细胞色素 P450 结构基因中一个片断(240 bp),虽然它与其它已知 P450 序列的同源性比较并不能代表 P450 全长 cDNA 的同源性,但由于本序列两端引物序列是根据昆虫 CYP6 中的保守区氨基酸序列所设计的,因此比较该段序列的同源性在划分 P450 家族成员的关系上仍具有较大的参考价值。对本序列的最后确定则有待于进行下一步的研究工作,以获得其全长 cDNA 序列。本实验所获得的序列以及所建立的从抗性昆虫中寻找与抗性有关的细胞色素 P450 成员的基本方法,为今后开展抗性基因的检测和筛选等研究工作奠定了基础。

参考文献:

- [1] 冷欣夫,唐振华,王荫长. 杀虫药剂分子毒理学及昆虫抗药性[M]. 北京:中国农业出版社,1996. 1~171.
[2] Scott J G, Liu N, Wen Z. Insect cytochromes P450: diver-

sity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins. [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1998, 121(Part C): 147.

- [3] 黄炯烈,王 迅. 致倦库蚊溴氰菊酯抗性株细胞色素 P450 基因的克隆、鉴定及同源性分析[J]. *寄生虫与医学昆虫学报*, 1998, 5(3):166.
[4] 王 迅,黄炯烈. 简并引物 PCR 在致倦库蚊细胞色素 P450 基因研究中的应用[J]. *广东寄生虫学会年报*, 1996, 18:11.
[5] Feyereisen R, Koener J F, Farnsworth D E, et al. Isolation one sequence of cDNA encoding a cytochrome P450 from an insecticide-resistant strain of the house fly, *Musca domestica* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(5):1465.
[6] Tomita T, Scott J G. cDNA and deduced protein sequence of CYP6D1: the putative gene for cytochrome P450 responsible for pyrethroid resistance in house fly[J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 1995, 25(2):275.
[7] Kasai S, Shono T, Yamakawa M. Molecular cloning and nucleotide sequence of a cytochrome P450 cDNA from a Pyrethroid-resistant mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say [J]. *Insect Mol Biol*, 1998, 7(2):185.
[8] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T(金冬雁,黎孟枫,林 枫,等译). 分子克隆实验指南[M]. 北京:科学出版社,1993. 1~1062.
[9] Nelson D R, Kamataki T, Waxman D J, et al. The P450 superfamily: update on new sequence, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes and nomenclature[J]. *DNA Cell Biol*, 1993, 12(1):1.
[10] Nelson D R, Strobel H W. Evolution of cytochrome P450 proteins [J]. *Mol Biol Evol*, 1987, 4(6):572.

(编辑 张敏瑞)

热烈祝贺 李绍珍教授当选为中国工程院院士

李绍珍教授在中国工程院公布的新增院士中,于一九九九年十二月二十七日榜上有名,在此谨致以热烈祝贺!

李绍珍教授是我国眼科界的知名专家,中山医科大学中山眼科中心眼科教授、原眼科医院院长、眼科医院白内障专科主任,中山医科大学学术委员会和学位委员会副主任委员。中华医学会眼科学会副主任委员、《眼科学报》主编、《中华眼科学报》副主编。

李绍珍教授 40 多年来一直奋战在眼科医疗、教学、科研和防盲第一线,眼科知识丰富而全面,基础知识坚实,尤其在常见致盲眼病白内障的病因和防治研究方面有高深造诣。在白内障病因实验研究方面开展了一系列研究……;近年来,开展并指导眼免疫学研究,取得显著的成绩。

此外,李绍珍教授会同他人先后发表 150 多篇论文;于 1996~1999 年间荣获国家级、卫生部科技进步奖 II~III 等奖共 6 次,并撰写专著《眼科手术学》、《白内障防治技术》,后者面向农村和基层推广白内障的防治技术有一定的指导作用。

(本文摘自中山医科大学校报 1999-12-27 713 期刊登)