

## 研究报告

## 淡色库蚊细胞色素 P450 基因研究\*

朱昌亮\*\* 李建民 高晓红 田海生 李秀兰 沈波 吴观陵

(南京医科大学寄生虫学教研室, 南京 210029)

**摘要** 采用一对昆虫细胞色素 P450 简并引物, 以反转录-聚合酶链反应从淡色库蚊对溴氰菊酯敏感品系和抗性品系成虫 RNA 扩增到约 485 bp 和 510 bp 两个片段, 将这两个片段与 PinPoint™ Xa-1 T 质粒重组, 然后克隆至大肠杆菌 JM109 菌株, 筛选获得 68 个阳性克隆; 其中 24 个阳性克隆测序后与 GenBank 资料对照, 显示为细胞色素 P450 新序列; 分子系统学研究显示, 24 个新基因 (等位基因) 分别属 CYP4 家族 CYP4C、CYP4D、CYP4H 和 CYP4J 等 4 个亚家族, 其已由细胞色素 P450 命名委员会命名和 GenBank 登录上网; 其中 CYP4C23 可能是一个假基因, CYP4H13 具有一段 58 个碱基长度的内含子, CYP4J4V1 在近 3' 端具有一个终止密码子 TAG。

**关键词** 淡色库蚊, 抗药性, 细胞色素 P450, 反转录-聚合酶链反应, 基因克隆

**学科分类号** R384.1

细胞色素 P450 单加氧酶系是昆虫体内参与各类杀虫剂以及其他外源性和内源性化合物代谢的主要解毒酶系。细胞色素 P450 (以下简称“P450”或“CYP”) 是细胞色素 P450 单加氧酶系的末端氧化酶, 起着与底物结合以及从 NADPH 传递电子到 NADPH 细胞色素 P450 还原酶的重要作用<sup>[1]</sup>。Ray (1965 年) 首次报道昆虫中存在 P450。其后 20 年间, 由于昆虫 P450 含量低且不稳定, 从昆虫中纯化、鉴定 P450 难度大, 研究一直停留在理化性质与酶学特征方面。近些年来, 随着分子生物学及其技术的发展, 克隆昆虫 P450 基因、研究其系统进化以及与抗药性的关系越来越引起重视。人们已从家蝇 (*Musca domestica*)、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 等 20 余种昆虫中鉴定了约 60 个 P450 基因<sup>[2,3]</sup>。

淡色库蚊 (*Culex pipiens pallens*) 是分布广、种群密度高的家栖性病媒蚊种之一。迄今为止, 淡色库蚊 P450 基因尚未见报道。本文采用反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 法, 从淡色库蚊对溴氰菊酯敏感品系和抗性品系克隆 P450 cDNA 片段, 并进行了序列分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 供试蚊虫

淡色库蚊敏感品系引自中国科学院上海昆虫研究所, 并在本室经传 80 余代; 抗性品系由本室逐

代汰选而成, 抗性系数 519<sup>[4]</sup>。

#### 1.1.2 试剂

异硫氰酸胍购自上海伯奥生物科技公司;  $\beta$ -巯基乙醇购自 Fluka 公司; SDS (十二烷基肌氨酸钠) 购自 Sigma 公司; DEPC (焦碳酸二乙酯) 购自 Serva 公司; PolyATtract<sup>R</sup> Series9600™ mRNA Isolation System Kit、cDNA Synthesis System Kit、反转录酶 (AMV)、JM109 菌株、PinPoint™ Xa-1 T 质粒载体、Sma I、Taq 聚合酶等均为 Promega 公司产品。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 RNA 提取与纯化

分别取约 1 g (约 800 只) 淡色库蚊对溴氰菊酯敏感品系和抗性品系的羽化 3 d 的未吸血雌成虫, 加入液氮在研钵内研为粉末移至匀浆器内, 采用异硫氰酸胍一步法提取总 RNA<sup>[5]</sup>, 1% 琼脂糖凝胶电泳观察结果, 分光光度计比色测定总 RNA 纯度。

用 PolyATtract™ mRNA Isolation System Kit 从 0.5 mg 总 RNA 中纯化 mRNA, 操作按产品说明书。

#### 1.2.2 cDNA 合成

分别取 1  $\mu$ g 敏感品系和抗性品系 mRNA, 采

\* 国家自然科学基金资助项目 (39970666)。

\*\* 通讯联系人。

Tel: 025-6662875, E-mail: czhu@njmu.edu.cn

收稿日期: 1999-12-04, 接受日期: 2000-04-10

用 cDNA Synthesis System Kit 按说明书合成 cDNA.

1.2.3 引物合成

根据 GenBank 中的昆虫 P450 氨基酸保守序列和 Scott 等<sup>[6]</sup> (1994 年) 报告的 P450 引物设计一对简并引物. 上游引物 P1 编码 P450 蛋白疏水螺

P1: 5'-GAG GTI GAC(T) ACI TTC ATG TTC GAA(G) GGI CAC GAC(T) AG-3'  
 E V D T F M F E G H D T

P2: 5'-CTG ICC GAT G(A) CA GTT ICG C(G/T) GG ICC IGC C(G) IT(A) GAA C(G/T) GG-3'  
 Q G I C N R P G A S F P

1.2.4 目的片段的扩增与纯化

以合成的引物和 cDNA 模板作 PCR 扩增. PCR 反应体系基本参照文献 [7]. 扩增条件为 94℃ 预变性 5 min, 然后 94℃ 变性 30 s、55℃ 复性 30 s、72℃ 延伸 1 min, 计 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 20 min.

用 1.5% 低熔点琼脂糖凝胶电泳回收目的 DNA 片段, 并作 2 次 PCR 扩增, 获得纯化的目的 DNA 片段.

1.2.5 目的片段的克隆

目的 DNA 片段用 T/A 直接克隆法进行克隆<sup>[8]</sup>. 在 PCR 反应中, Taq DNA 聚合酶能在产物的 3' 端随机加上不依赖于模板的 A、G、C、T, 理论上以 A 的概率较大. 经纯化的目的片段以具有 T 粘性末端的 PinPoint™ Xα-1 T 质粒载体克隆, 转化至大肠杆菌 JM109 菌株, 在含氨苄青霉素 (AMP<sup>+</sup>) 的平板上生长过夜, 挑选白斑, 用 SP6/PinPoint 引物经 PCR 扩增获取阳性克隆.

1.2.6 目的片段的测序及其分析

随机挑取淡色库蚊敏感品系和抗性品系阳性克隆, 以碱裂解法提取质粒 DNA, 用 SP6/PinPoint 引物制备双链 DNA 目的片段, 经 Quick PCR Purification Kit 纯化后, 送大连宝生物技术公司全自动 DNA 测序仪以 SP6 引物进行测序. 测序结果经 Gene Runner 软件推导出氨基酸序列<sup>[9]</sup>, 经 Cluster 软件作对位排列图, 再由 Mega 软件进行类平均法 (unweighted pair-group arithmetic average, UPGMA) 聚类分析<sup>[10, 11]</sup>.

2 结 果

2.1 目的基因片段的扩增

以敏感品系和抗性品系 mRNA 反转录合成第一链 cDNA, 用合成的 1 对简并引物作 RT-PCR 扩增, 两品系均获得约 485 bp 和 510 bp 2 个片段,

该螺旋区在对 P450 激活分子氧的催化活性方面起重要作用, 被认为是 CYP4 家族的特异序列; 下游引物 P2 位于与血红素结合的半胱氨酸残基周围部位, 其 F - - G - - - C - G 结构是 P450 超家族的共同特征. 引物由大连宝生物工程公司合成.

经纯化及 2 次 PCR 扩增后, 均获得了较强的片段.

2.2 目的基因片段的克隆

在 T4 DNA 连接酶的作用下, 敏感品系和抗性品系的 2 个目的基因片段分别被插入 PinPoint™ Xα-1 T 克隆载体上, 用质粒 PinPoint™ Xα-1 T 多克隆位点上下游的测序引物 (PinPoint 测序引物: 5'-CGTGACGCGGTGCAGGGCG-3'; SP6 测序引物: 5'-CATAGCGATTTAGGTGACACTATAG-3') 作为 PCR 引物, 直接挑取白斑进行 PCR 反应. 2 个测序引物至 EcoR V 克隆位点的距离之和为 144 bp, 重组子克隆扩增出约 630 bp 和 655 bp 2 个片段, 与克隆前的目的基因片段大小相符 (图 1).

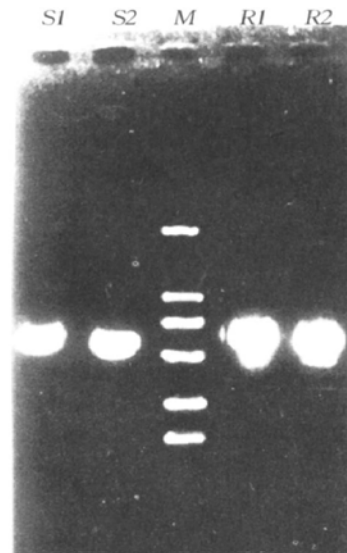


Fig. 1 Clone products of cytochrome P450 gene from *Culex pipiens pallens*

S1: clone products 1 of susceptible strain (about 630 bp); S2: clone products 2 of susceptible strain (about 655 bp); R1: clone products 1 of resistant strain (about 630 bp); S2: clone products 2 of resistant strain (about 655 bp); M: λDNAI (HindIV+ EcoRI).

2.3 目的基因片段序列测定和分析

本实验进行 2 次克隆, 共获得 68 个阳性斑,

随机挑取其中敏感品系 6 个和抗性品系 23 个克隆测序, 测序结果 (去除引物) 经与 GenBank 中的 P450 比较, 显示 24 个为新序列 (另 5 个为重复相同序列), 已由 GenBank 登录上网. 进一步 24 个

新序列递呈细胞色素命名委员会, 被鉴定为 24 个新基因 (等位基因), 分别属 CYP4 家族 CYP4C、CYP4D、CPY4H 和 CYP4J 等 4 个亚家族 (表 1).

Table 1 Characteristics of 24 new cytochrome P450 genes (alleles) from *Culex pipiens pallens*

Gene (allele) <sup>1)</sup>	GenEMBL accession number	Strain <sup>2)</sup>	Number of nucleotide	Number of residues	Number of clone	Best match and homology	Others
CYP4C22 V1	AF157093	R	378	126	1	4C2, 81%	
V2	AF208659	S	378	126	1	4C22V1, 97%	
CYP4C23	AF157090	S	444	148	1	AF117650 G-terminal 44 amino acids, 84%	possible pseudogene
CYP4D18 V1	AF190775	S	444	148	1	4D6, 66%	
V2	AF191728	R	444	148	1	4D18V1, 95%	
CYP4D19 V1	AF190786	R	378	126	1	4D5, 54%	
V2	AF190789	R	381	127	1	4D19V1, 97%	
V3	AF190777	S	381	127	1	4D19V1, 97%	
CYP4H12 V1	AF157091	R	390	130	1	4H7, 73%	
V2	AF191731	R	390	130	1	4H12V1, 98%	
CYP4H13	AF160259	R	439	127	1	4H5, 74%	intron containing 58 nucleotides
CYP4H21	AF208660	R	381	127	2	4H13, 79%	
CYP4H22 V1	AF190782	R	381	127	1	4H3, 57%	
V2	AF190784	R	381	127	1	4H22V1, 96%	
CYP4H23 V1	AF190787	R	381	127	2	4D14, 50%	
V2	AF191729	R	381	127	1	4H23V1, 99%	
V3	AF190783	R	381	127	1	4H23V1, 98%	
CYP4J4 V1	AF157092	R	387	129	1	4J2, 63%	containing ending codon TAG at 3' terminal
V2	AF190778	S	387	129	1	4J4V1, 96%	
CYP4J6 V1	AF190776	S	369	123	1	4J3, 59%	
V2	AF190781	R	369	123	1	4J6V1, 95%	
CYP4J7 V1	AF190780	R	384	128	4	4J3, 60%	
V2	AF190785	R	384	128	1	4J7V1, 96%	
CYP4J8	AF190788	R	384	128	1	4J6V2, 61%	

注: <sup>1)</sup>Named by Cytochrome P450 Nomenclature Committee; <sup>2)</sup>S as susceptible strain; R as resistant strain.

其中, CYP4H23V1 虽然与 4D14 的同源性为 50%, 与 4H7 的同源性为 48%, 但其归属为 4H 亚家族 (Nelson 私人通讯, 1999 年). 对 24 个新

序列比较分析发现, CYP4H13 在碱基 232 和 290 间存在一段 58 个碱基长度的内含子, 以 gt-ag 形式插入天冬酰胺 (Asn) 残基:

ATG GAG ATG A ↓ gtgagt..... 58..... ttaag ↓ AT GGC GTA  
Met Glu Met A sn Gly Val

由 24 个 P450 新基因 (等位基因) 的氨基酸序列作对位排列图 (图 2) 和聚类分析图 (图 3).

### 3 讨 论

本研究鉴定的序列虽仅为 P450 总长度的 1/3,

但上游引物 P1 所在的疏水螺旋 I 为 CYP4 的共有特征, 下游引物 P2 所在的血红素结合部位在 P450 中通常是普遍存在的, 一直被认为可作为 P450 家族成员的鉴别特征. 本实验室克隆的 24 个新序列的结构中均含有 CYP4 家族共有的两个相对保守

区: \*\*KETLR\*-P区(\*和均为氨基酸残基,其中\*为疏水残基)和PERF区<sup>[6]</sup>(图2),已由细胞色素P450命名委员会鉴定属CYP4家族的CYP4C、CYP4D、CYP4H和CYP4J等4个亚家族。

图2可见,24个新序列在相同位置共同具有10个氨基酸残基,其中5个为脯氨酸(Pro);Scott等<sup>[6]</sup>(1994年)报告了17个CYP4新序列,在共有的15个氨基酸残基中,4个为脯氨酸。以上结果提示,脯氨酸相较于其他氨基酸更为保守,在P450基因的遗传稳定性方面可能起重要作用。

本实验中,在9个基因中各克隆到2~3个等位基因,其2~6个氨基酸残基发生替换。CYP4D19和CYP4H23均具有3个等位基因,同一位置的残基置换均仅见于三者之一,未发现各自不同的3个残基情况。CYP4D19V1、4D19V2和4D19V3分别有1、3和3个氨基酸的变异;CYP4H23V1、4H23V2和4H23V3分别有0、1和2个残基置换,表明4H23V1在三者中最为古老,4H23V2和4H23V3是在长期进化过程中由4H23V1分出的两支。

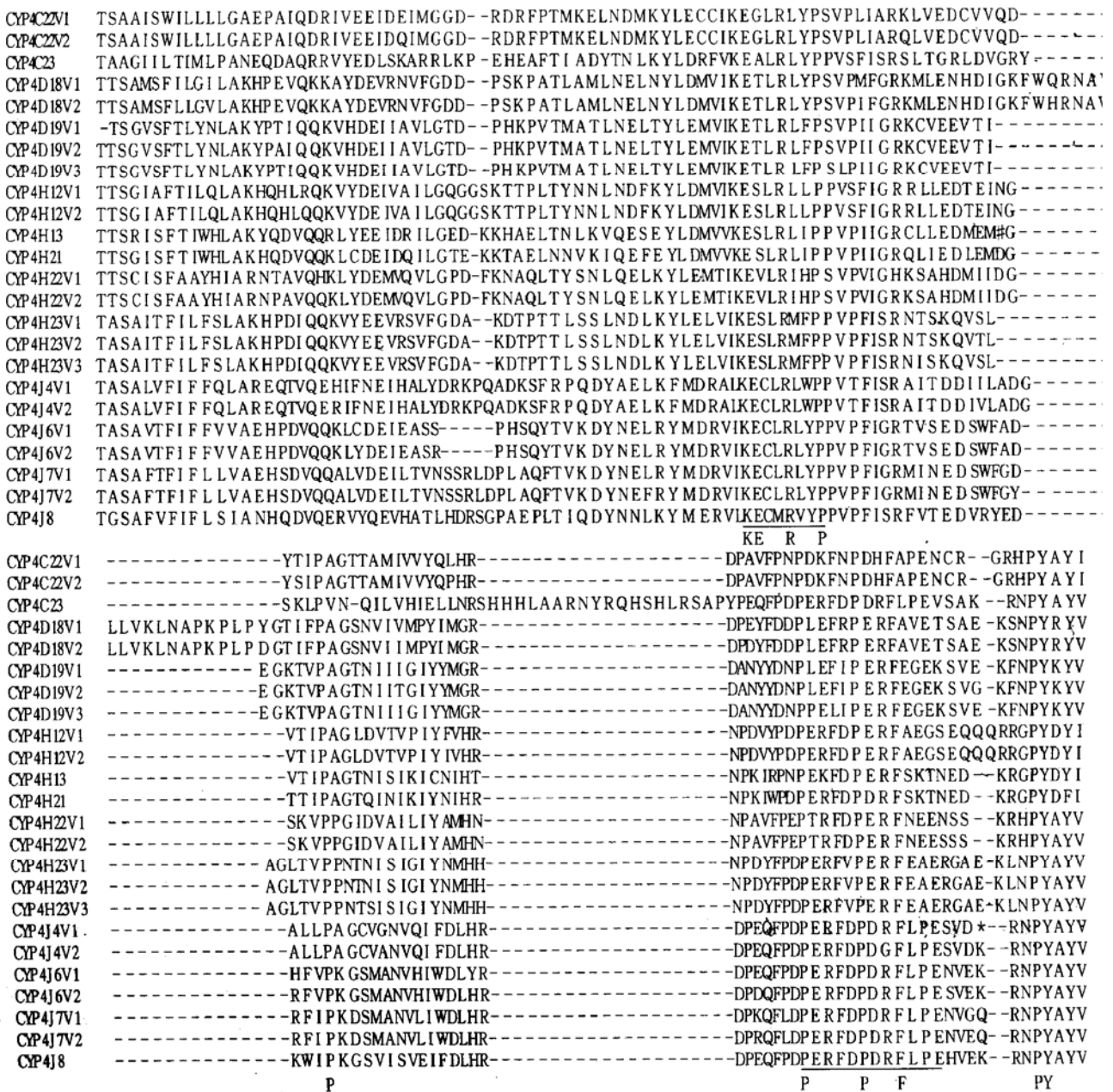


Fig. 2 Alignment of deduced amino acid sequence for the 24 new cytochrome P450 genes (alleles) of *Culex pipiens pallens*  
 # as intron (CYP4H13); \* as termination coden (CYP4J4V1); - respectively as\*\* KETLR\*-P region and PERF region.

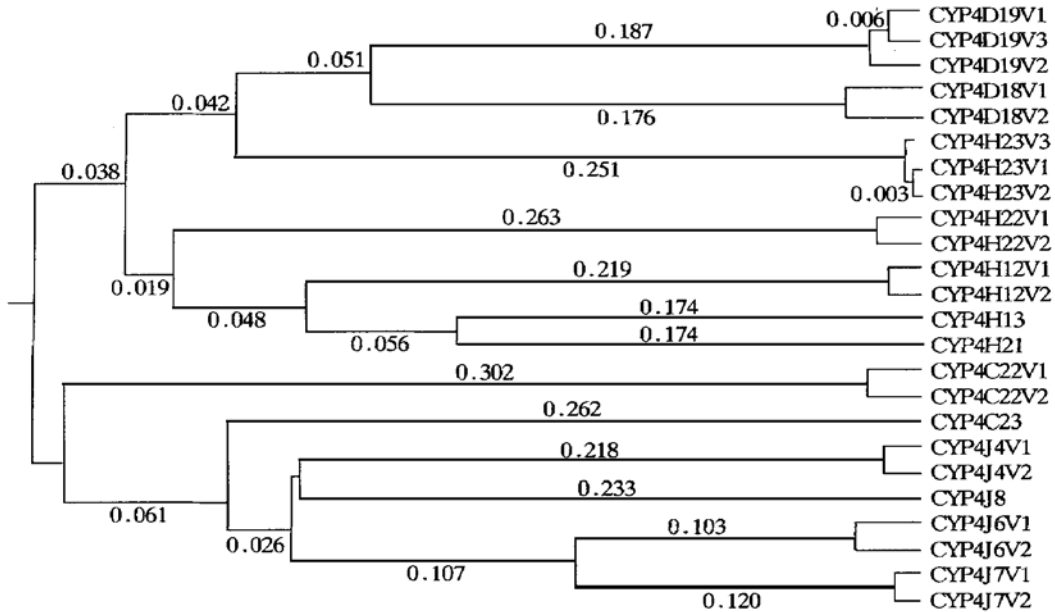


Fig. 3 UPGMA dendrogram of amino acid sequences deduced from 24 new cytochrome P450 genes (alleles) of *Culex pipiens pallens*.

与其他 23 个基因 (等位基因) 相比, CYP4C23 变异最大. 其虽然保持了 P450 基因的共有特征, 在部分区段的序列高度同源, 但部分区段结构存在大量移码和部分插入或缺失, 如其在 PERF 区前插入 20 个氨基酸残基 (图 2). 据推测, 它可能是一个假基因 (Nelson 私人通讯, 1999 年). CYP4C23 与其他 P450 功能基因的关系及其在 P450 进化选择中的作用值得进一步研究.

据报道, 真核生物核基因 mRNA 前体的内含子拼接点序列为 ↓ gu. . . . . ag ↓, 即普遍适用的所谓 Breathnach-Chambon 规则<sup>[12]</sup>. 本实验 CYP4H13 具有一段 58 个碱基的内含子 (Nelson 私人通讯, 1999 年), 其拼接点序列与之相同, 并且拼接点前后的两个氨基酸与白足按蚊 (*Anopheles albimanus*) 和果蝇 (*Drosophila*) 基因组 DNA 克隆的内含子的前后氨基酸序列相同. 然而有趣的是, 本文的 24 个序列 (包括 CYP4H13) 均经由总 RNA → mRNA → cDNA 再 PCR 扩增后克隆所得, 出现内含子可能的解释是作为一种特殊的基因表达调控方式, 内含子的一对拼接点不参与拼接反应, 而直接将内含子保留至成熟 mRNA 中. 据报道, 在大鼠的 r-纤维蛋白原基因的 mRNA 中, 有 10% 保留了第 7 个内含子序列; 在逆转录病毒中, 从原病毒 DNA 上转录的 RNA 在拼接后作为 mRNA 使用, 但没有拼接的才能包装到病毒粒子中<sup>[13]</sup>.

CYP4H13 基因的内含子“滞留”现象有待进一步实验观察.

基因通常只有一个终止信号, 少数情况下亦存在两个终止信号的双保险现象, 但一般两个终止密码子相距较近. 本实验中, CYP4J4V1 在近 3' 端具有一个终止密码子 T (U) AG 但随后出现通读, 对照 GenBank 其他 P450 全序列, CYP4J4V1 的 T (U) AG 位置后还有约 70 个氨基酸残基长度. UAG 是一个被利用频率相对较低的终止密码子, 其在 CYP4J4V1 的肽链终止中的确切作用尚待深入探讨.

通常认为, 在已知的昆虫 P450 超家族中, CYP6 家族成员与杀虫剂抗性关系密切. 如家蝇 *Rutgers* 抗性品系幼虫和成虫的 CYP6A1 mRNA 含量分别为 Sb0 敏感品系的 12 倍和 10 倍<sup>[14]</sup>. 在本实验中, 淡色库蚊 RNA 经 RT-PCR 后获得 2 个 DNA 片段, 其中敏感品系的片段明显较抗性品系为弱, 经增大模板量电泳对照, 仅为抗性品系片段的约 1/10, 提示 CYP4 家族亦可能与昆虫抗药性有关; 并进一步佐证 P450 mRNA 的高表达可能是昆虫抗药性的分子机理之一. 本研究结果表明, 引物 P1 和引物 P2 作为昆虫拟除虫菊酯抗性的分子诊断探针具有一定的应用价值, 值得进一步研究.

本文首次从淡色库蚊克隆到 24 个 P450 基因 (等位基因) 片段, 这是迄今为止从一个昆虫种中

分离到最多 P450 基因及等位基因的报告。目前, 克隆 P450 全长 cDNA 的工作正在进行。

**致谢** 本文新序列由细胞色素 P450 命名委员会 Nelson 博士帮助命名, 特此致谢!

### 参 考 文 献

- 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. *DNA Cell Biol*, 1993, **12** (1): 1~ 51
- Ray J W. Pest infestation research, HMSO, London, 1965. 69~ 74
- 朱昌亮, 吴观陵, 张兆松. 昆虫细胞色素 P450 分子生物学研究进展. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 1999, **17** (1): 46~ 49  
ZHU C L, WU G L, ZHANG Z S. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 1997, **17** (1): 46~ 49
- 朱昌亮, 李建民, 王荣芝, 等. 溴氰菊酯选育淡色库蚊和中华按蚊的研究. *南京医科大学学报*, 1994, **14** (4): 515~ 517  
ZHU C L, LI J M, WANG R Z, *et al.* *Acta Academiae Medicinae Nanjing*, 1994, **14** (4): 515~ 517
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 343~ 361
- Scott J G, Collins F H, Feyereisen R. Diversity of cytochrome P450 genes in the mosquito, *Anopheles albimanus*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, **205** (2): 1452~ 1459
- Danielson P B, Fogleman J C. Isolation and sequence analysis of cytochrome P450 12B1: the first mitochondrial insect P450 with homology to alpha, 25 dihydroxy-D3 24-hydroxylase. *Insect Biochem Mol Biol*, 1997, **27** (6): 595~ 604
- 王 瑛. PCR 产物直接分子克隆的比较研究. *生物工程进展*, 1996, **16** (5): 55~ 57  
WANG Y. Comparison in direct cloning methods of PCR products. *Progress in Biotechnology*, 1996, **16** (5): 55~ 57
- Dunkov B C, Rodriguez-Arnaiz R, Pittendari B. Cytochrome P450 gene clusters in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet*, 1996, **251** (3): 290~ 297
- Danielson P B, Macintyre R T, Fogleman J C. Molecular cloning of family of xenobiotic-inducible drosophilid cytochrome P450: evidence for involvement in host-plant allelochemical resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (20): 10797~ 10802
- Devereux J, Haeblerli P, Smithies O. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acid Res*, 1984, **12** (1): 387~ 395
- Breathnach R, Chambon R. Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Ann Rev Biochem*, 1981, **50**: 349~ 383
- 孙乃恩, 孙东旭, 朱德煦. *分子遗传学*. 南京: 南京大学出版社, 1995. 364~ 368  
SU N E, SU D X, ZHU D X. *Molecular Genetics*. Nanjing: Nanjing University Press, 1995. 364~ 368
- Carino F A, Koener J F, Plapp F W. Constitutive overexpression of the cytochrome P450 gene CYP6A1 in a house fly strain with metabolic resistance to insecticides. *Insect Biochem Mol Biol*, 1994, **24** (4): 411~ 418

## Studies on Cytochrome P450 Genes in the Mosquito, *Culex pipiens pallens*, in China\*

ZHU Chang-Liang\*\*, LI Jian-Ming, GAO Xiao-Hong, TIAN Hai-Sheng, LI Xiur-Lan, SHEN Bo, WU Guan-Ling

(Department of Parasitology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

**Abstract** 24 new cDNA sequences encoding cytochrome P450 were amplified respectively from deltamethrin-susceptible and -resistant strains of the mosquito, *Culex pipiens pallens*, with a pair of degenerate primers according to the conservative amino acid sequences of CYP4 in insects by RT-PCR. Studies of molecular systematics show that the 24 new genes (alleles) belong to CYP4C, CYP4D, CYP4H and CYP4J subfamilies of the CYP4 family, and they were named by Cytochrome P450 Nomenclature Committee. Among the new genes (alleles), CYP4C23 may be a pseudogene, CYP4H13 has a retained intron 58 nucleotides in length, and CYP4J4V1 has a stop codon (TAG) in frame near the 3'-end.

**Key words** *Culex pipiens pallens*, insecticide resistance, cytochrome P450, RT-PCR, gene cloning

\* This work was supported by The National Natural Science Foundation of China (39970666).

\*\* Corresponding author. Tel: 86-25-6662875, E-mail: clzhu@njmu.edu.cn

Received: December 4, 1999 Accepted: January 29, 2000