

黏虫 *CYP9A113* 基因的克隆及外源物质对基因表达的诱导效应

张雅男, 刘月庆, JUNAID S M, 王智琪, 樊东*

(东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030)

摘要 黏虫是我国作物上最重要的害虫之一。细胞色素 P450 能够参与昆虫外源物质代谢。本研究采用 RACE 技术克隆了一条编码黏虫 P450 基因的 cDNA 序列, 并通过 Real-time PCR 技术, 检测了 4 种外源物质对该基因表达的诱导效应。该基因被国际 P450 命名委员会命名为 *CYP9A113*, GenBank 登录号为 KY436739。利用 2.5% 高效氯氟氰菊酯乳油的 LD₅₀ 处理黏虫 3 h, LD₁₀、LD₃₀ 和 LD₅₀ 处理 12 h 和 24 h, 可诱导表达 *CYP9A113* 基因; 20% 氯虫苯甲酰胺悬浮剂的 LD₁₀ 处理黏虫 12、24 和 48 h, LD₃₀ 和 LD₅₀ 处理 24 h, *CYP9A113* 基因表达呈诱导效应; 0.1 和 0.5 mg/mL 香豆素处理 6、12、24 和 48 h, *CYP9A113* 基因表达均呈诱导效应; 0.1 和 0.5 mg/mL 吲哚-3-甲醇处理 3、6、12、24 和 48 h, *CYP9A113* 基因表达均呈诱导效应。

关键词 黏虫; *CYP9A113* 基因; 克隆; 外源物质; 诱导效应

中图分类号: S 435.132 文献标识码: A DOI: 10.16688/j.zwbh.2018358

Cloning of *CYP9A113* and inductive effect of exogenous substances on the gene expression in *Mythimna separata*

ZHANG Yanan, LIU Yueqing, JUNAID S M, WANG Zhiqi, FAN Dong

(College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract *Mythimna separata* is one of the most important pests in China. Cytochrome P450 participates in the metabolism of exogenous substances in insects. In this study, a cytochrome P450 cDNA sequence was cloned, and its induction by four exogenous substances were detected. The gene was named *CYP9A113* by P450 Nomenclature Committee (GenBank accession no. KY436739). *CYP9A113* could be induced by *lambda*-cyhalothrin 2.5% EC at LD₅₀ for 3 h and LD₁₀, LD₃₀ and LD₅₀ for 12 and 24 h. Treated with LD₁₀ of chlorantraniliprole 20% SC for 12, 24, 48 h and with LD₃₀ and LD₅₀ for 24 h, *CYP9A113* could be induced. Moreover, *CYP9A113* could be induced by 0.1 and 0.5 mg/mL of indole-3-carbinol for 3, 6, 12, 24, 48 h and coumarin for 6, 12, 24 and 48 h.

Key words *Mythimna separata*; *CYP9A113*; cloning; exogenous substance; inductive effect

细胞色素 P450 酶(P450s 或 CYPs)是一类亚铁血红素-硫醇盐蛋白^[1], 在哺乳动物的肝微粒体中首次被发现^[2], 现已证明几乎在所有生物体内广泛存在。自 1965 年 Ray 在昆虫体内发现 P450 后^[3], 目前已经克隆得到分属于 CYP2、CYP3、CYP4 和线粒体 P450s 的多个昆虫细胞色素 P450 基因序列^[4], 其中 CYP3 分支又包括 CYP6 和 CYP9 家族^[5], 这些基因既能催化激素、信息素、脂肪酸等内源物质的合成, 又能参与杀虫剂、诱变剂、植物次生代谢物质等

外源物质的代谢, 对昆虫的生长发育起着非常重要的作用^[6-8]。采用 98% 氯氟氰菊酯(55 ng/ μ L)对野桑蚕 *Bombyx mandarina* 点滴 1 μ L 处理后, 脂肪体中 *CYP9A20* 和 *CYP9A21* 基因表达量均升高^[9]; 甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* 经 0.5 μ L 2.5% 溴氰菊酯水乳剂(0.152 ng/g)处理后, *CYP9A90* 基因表达量总体呈诱导趋势^[10]; 甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 经 95% 氯虫苯甲酰胺(0.01 mg/kg 和 0.02 mg/kg)处理后, *CYP9A9* 基因相对表达量升高^[11]; 香豆素

收稿日期: 2018-08-16 修订日期: 2018-10-14

基金项目: 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12531045); 东北农业大学大学生创新实践训练计划项目(201810224271)

* 通信作者 E-mail: dnfd@163.com

可诱导斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 脂肪体中 CYP4M14 和 CYP6AB14 基因的表达^[12-13]。吲哚-3-甲醇处理可诱导飞蝗 *Locusta migratoria* 体内 CYP6HL1 和 CYP6FE12 基因的表达^[14]。

黏虫 *Mythimna separata* 属于鳞翅目,夜蛾科,是粮食作物上的重要害虫之一^[15],在多个国家广泛分布,我国除西藏地区未见报道外,其他各地均有报道^[16]。本研究克隆黏虫 CYP9 家族的一条 P450 基因,选取生产上常用于防治黏虫的杀虫剂 2.5% 高效氯氟氰菊酯乳油、20% 氯虫苯甲酰胺悬浮剂和黏虫豆科寄主植物中含有的次生代谢物质香豆素^[17]、十字花科蔬菜活性成分吲哚-3-甲醇^[18],对其进行诱导效应的研究,探究该基因在黏虫外源物质解毒和对自然环境的适应性方面的重要作用,为利用分子手段防治该害虫奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

黏虫 *M. separata* 采自东北农业大学向阳实验基地,黑光灯诱集成虫后于实验室以 5% 的蜂蜜水饲养,幼虫用玉米叶饲养,均放入恒温培养箱中,温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,相对湿度为 70%,光周期为 L//D=16 h//8 h。在实验室饲养 2 代后用作试验材料。

1.2 供试试剂与药剂

TRIzol® Reagent 试剂购自 Invitrogen 公司;反转录试剂盒、低熔点琼脂糖购于 Promega 公司;3' RACE 试剂盒、5' RACE 试剂盒、DNA 纯化试剂盒和 Taq DNA 聚合酶购于 TaKaRa 公司;ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix 购于 TOYOBO 公司;2.5% 高效氯氟氰菊酯乳油(EC)购于青岛星牌作物科技有限公司,20% 氯虫苯甲酰胺悬浮剂(SC)购于美国杜邦公司;香豆素(coumarin)和吲哚-3-甲醇(indole-3-carbinol)购于合肥博美生物科技有限公司;其余试剂为国产或进口的分析纯。由上海生工生物有限公司完成基因的测序和引物合成。

1.3 CYP9A113 基因序列的克隆及分析

1.3.1 总 RNA 的提取以及 cDNA 的合成

选择健康的 4 龄黏虫幼虫为样本,采用 TRIzol 提取法提取总 RNA,按照反转录试剂盒的说明书合成 cDNA,并保存于 -20°C 冰箱,剩余的 RNA 保存于 -80°C 冰箱备用。

1.3.2 全长基因序列的克隆

将 GenBank 上已经登录的甘蓝夜蛾 *M. brassicae* CYP9A90(KR676343)和棉铃虫 *Helicoverpa armigera* CYP9A12(AY371318)基因的序列进行比对,设计黏虫保守区上下游特异性引物 Ms9A-F 和 Ms9A-R(表 1)。以 1.3.1 中合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,将得到的 PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳上检测,目的片段胶回收测序。根据 3' RACE 和 5' RACE 试剂盒中自带的引物 3' RACE-Ro、3' RACE-Ri 和 5' RACE-Ro、5' RACE-Ri,分别设计对应的嵌套引物 Ms9A-3' RACE-Ro、Ms9A-3' RACE-Ri 和 Ms9A-5' RACE-Ro、Ms9A-5' RACE-Ri(表 1)。按照试剂盒说明书,分别进行 3' 端序列和 5' 端序列的扩增,并进行胶回收测序。通过 AlignX 软件将保守区序列、3' 端序列和 5' 端序列进行拼接,得到完整的基因序列。再设计全长引物 Ms9A-Full-F 和 Ms9A-Full-R(表 1)克隆全长序列进行验证,确定最终序列。

1.3.3 序列分析

该基因由国际 P450 命名委员会命名,利用 NCBI 中的 Open Reading Frame Finder (ORF Finder) 将基因开放阅读框翻译成氨基酸序列;利用在线网站 ExPASy (<https://www.expasy.org/>)进行功能域的预测;利用 BioXM 2.6 软件进行蛋白质分子量和等电点的计算;利用 MEGA 5.1 软件采用邻接(neighbor-joining)法构建系统进化树。

1.4 杀虫剂的诱导效应

1.4.1 高效氯氟氰菊酯的诱导效应

选取 4 龄第 1 天黏虫幼虫,称量单个虫体的重量,计算平均值,将 2.5% 高效氯氟氰菊酯 EC 用丙酮稀释成 5 个不同浓度,分别为 33.33、16.67、8.33、4.17、2.08 $\mu\text{g/mL}$,以丙酮为对照。每个浓度药剂和对照均点滴 0.5 μL 于虫体的第 2~3 腹节之间,每处理 20 头,3 次重复,于培养箱中正常饲养条件培养。24 h 后检查死亡虫数,求出 2.5% 高效氯氟氰菊酯 EC 对黏虫的 LD_{10} 、 LD_{30} 和 LD_{50} 。

选择 4 龄第 1 天黏虫幼虫进行试验,分别点滴 0.5 μL LD_{10} 、 LD_{30} 和 LD_{50} 的 2.5% 高效氯氟氰菊酯 EC 于黏虫幼虫 2~3 腹节之间,每处理和对照均点滴 40 头,共设 3 个重复,放在实验室饲养条件下培养,于 3、6、12、24 和 48 h 分别收集 3 头存活的幼虫,于液氮中速冻,放在 -80°C 冰箱中保存。每个重

复的 3 头幼虫混合提取 RNA 后,根据荧光定量反转录试剂盒制备 cDNA 模板。采用 SYBR Green 染料 3 步法进行荧光定量,利用 Primer 5.0 软件设计荧光定量上下游引物 Ms9A-RT-F 和 Ms9A-RT-R(表 1),以黏虫 β -actin 作为内参基因,设计上下游引物 β -actin-F 和 β -actin-R(表 1)。在荧光定量 PCR 仪(BIO-RAD CFX Connect)中进行反应,反应结束记录熔解曲线和相关数据,检测 LD₁₀、LD₃₀ 和 LD₅₀ 的 2.5% 高效氯氟氰菊酯 EC 处理不同时间 CYP9A113 基因的表达情况。

1.4.2 氯虫苯甲酰胺的诱导效应

选择 4 龄第 1 天黏虫幼虫进行试验,饥饿处理 12 h 后利用 ddH₂O 将 20% 氯虫苯甲酰胺 SC 稀释成 5 个不同浓度,分别为 5、2.5、1.25、0.625 和 0.312 5 μ g/mL,以 ddH₂O 为对照,每个浓度 20 头黏虫,3 个重复。将玉米叶用打孔器打成直径为 1 cm 的叶碟,其上点 10 μ L 药液晾干备用,每个培养皿中均放入 1 头黏虫和 1 片叶碟,叶碟吃光后用未处理正常叶片喂饲。24 h 后检查死亡虫数,求出 20% 氯虫苯甲酰胺 SC 对黏虫幼虫的 LD₁₀、LD₃₀ 和 LD₅₀。

供试虫体的选择和试验方法同上,分别用 LD₁₀、LD₃₀ 和 LD₅₀ 进行处理,以 ddH₂O 作为对照,每处理和对照均饲喂 40 头,设 3 个重复,于 3、6、12、24 和 48 h 分别收集 3 头存活的幼虫,于液氮中速冻,放在 -80℃ 冰箱中保存。提取 RNA 后,通过 Real-time PCR 检测 LD₁₀、LD₃₀ 和 LD₅₀ 的 20% 氯虫苯甲酰胺 SC 处理不同时间 CYP9A113 基因的表达情况,具体步骤参照 1.4.1。

1.5 植物次生代谢物质的诱导效应

选取 4 龄第 1 天幼虫进行试验,香豆素和吲哚-3-甲醇均设两个浓度,分别为 0.1 和 0.5 mg/mL,用加热的无菌 ddH₂O 稀释到所需浓度,对照为加热的无菌 ddH₂O。待溶液温度降到室温时,开始试验,之后的试验方法均参照 1.4.2。提取 RNA 后,通过 Real-time PCR 检测不同浓度的 2 种植物次生代谢物质处理不同时间 CYP9A113 基因的表达情况,具体步骤参照 1.4.1。

1.6 数据处理与分析

利用 DPS 软件进行回归统计分析;采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算荧光定量 PCR 相对定量数据结果;数据的多重比较和差异显著性分析利用 SAS 9.4 软件 Duncan 氏检验法进行($P < 0.05$);数值均以平均值 $\pm$ 标准误差(SE)表示;图表的制作以及相关数据的计算均在

Excel 2010 中进行;将每一时间点 CK 均设为 1,同一时间点进行差异显著性分析作图。

表 1 本研究中所用的引物序列
Table 1 Primer sequences used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')
Ms9A-F	AAAGGTCAAGAATGGAAAGACA
Ms9A-R	TTCTGAATGGAGTTGAAGTCGA
Ms9A-3' RACE-Ro	CTACGAACTGGCGTTGAACCTGATATC
Ms9A-3' RACE-Ri	CGGCTTAGATTTCAACTCCATCCAGA
Ms9A-5' RACE-Ro	ATGAATCATATCAGGCCTCATAATAT
Ms9A-5' RACE-Ri	ACCACTAAACATGGATTGAGCGACTG
Ms9A-Full-F	TGGGTGGCGGTCTCTGATCG
Ms9A-Full-R	CTTAGCCAAAAGCCTCCGTCT
Ms9A-RT-F	AGTGTGGAGTGACGATGA
Ms9A-RT-R	ATGTTCTGGATGGAGTTGAA
β -actin-F	CCAACGGCATCCACGAGACCA
β -actin-R	TCGGCGATACCAGGTACAT

2 结果与分析

2.1 CYP9A113 基因的鉴定及序列分析

通过克隆测序后拼接,进行序列全长的验证后,得到一条包含 1 752 个碱基的 P450 基因序列,在 NCBI 上比对发现其属于昆虫 CYP9A 亚家族,经国际 P450 命名委员会命名为 CYP9A113 (GenBank 登录号:KY436739)。CYP9A113 基因编码 529 个氨基酸,分子量约为 60.4 kDa,等电点为 8.81。在编码的氨基酸序列中,具有 P450 基因的保守序列,分别为血红素结合域(FGVGPRNCIG)、meander 结合域(PEKFDPERF)、螺旋 C(WKDMR)、螺旋 I (AGFETV)和螺旋 K(ELLR)(图 1)。

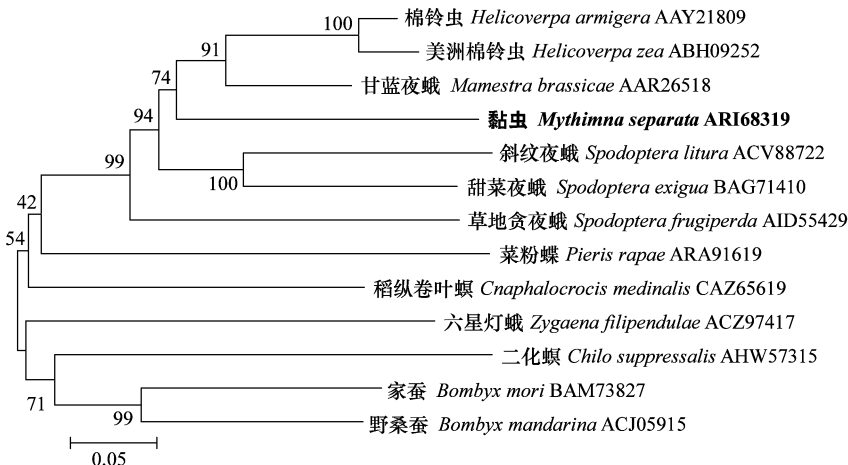
翻译后的氨基酸在 NCBI 的 BLAST 上比对,找出与之相似的其他鳞翅目昆虫的氨基酸序列,进行系统进化树的构建。结果发现,克隆的黏虫 *M. separata* CYP9A113 (ARI68319) 与甘蓝夜蛾 *M. brassicae* CYP9A13 (AAR26518)、棉铃虫 *H. armigera* CYP9A17 (AAY21809) 和美洲棉铃虫 *H. zea* CYP9A12 (ABH09252) 首先聚类,然后与斜纹夜蛾 *S. litura* CYP9A39 (ACV88722) 和甜菜夜蛾 *S. exigua* CYP9A9 (BAG71410) 聚类,再与草地贪夜蛾 *Spo-doptera frugiperda* CYP9A58 (AID55429) 聚类,与六星灯蛾 *Zygaena filipendulae* CYP9A36 (ACZ97417) 和家蚕 *Bombyx mori* CYP9A19 (BAM73827) 等其他鳞翅目非夜蛾科昆虫 CYP9 家族基因遗传距离较远,聚类结果基本符合形态分类特征(图 2)。

1 AATAC CAGTT TTAAT ACTAA GCAGT ATTTT GTAAA TTAGT GTACC ATTTT TTGTAAATTAGTGTT GTGCT AGTGA CGAAA TAATC
91 ATG ATAGT TTT CATCT GGTG GCGGT CCTGATCGCG GTTCT AGTGT TATAC TCCTG GCAAGTCTACT TCCAGTCTCAGTCGCAATG GCATC
1 M I V F I W V A V L I A V L V L Y L R Q V Y S S F S R N G I
181 AAGCA TTTAA AACCC ATCCC CTGTT TGGGCAACAT GGGGCAATG TTGTT TCGTACTAAA CACTT TGCTGATGAT GTGGC GAATCAATAT
31 K H L K P I P L L G N M G P M L F R T K H F A D D V A N Q Y
271 AACAG CTTC CTGAA GAAAGATTCG TGGGAATGTATCAAT TCGTC TCCGAGTCTT TCTTA CTCCGTGACG TCGAT CTGAT AAAGAAGGTC
61 N S F P E E R F V G M Y Q F V S E S F L R D V D L I K K V
361 GGTGT CAAAGACTTC GAGCA CTTC TCGAC CATCG GCCAT TTTCAGTAC CACTGACACAT TCTT CTCCA GAATC TTGTT CTCTT TGCAA
91 G V K D F E H F L D H R P I F S T T D T F F S R I L F S L Q
451 GGTCAAGAAT GGAAA GACAT GCGCT CCTCA TTGAG TCCAG CGTTT ACCAG TTCCA AAAATG CGTCT GATGG TGCCT TTCAT GGTGGAGGTC
121 G Q E W K D M R S S L S P A F T S S K M R L M V P F M V E V
541 GGGAA CCAGA TGTTT AATTC GGTC AAAAG AAGT CAAAG AATCT AAGTC TGGAT ACACA GACAT AGAAT GCAAA GACCT GACTA CTCGG
151 G N Q M V N S V Q K K I K E S K S G Y T D I E C K D L T T R
631 TACAC CAGT GACGTAG CACCT GTGCC TCGG CCGTGAAGGTG GATTCTCACAACGAC GTAGA CAAATAAGTTC TAGCG CATGG GCAAT
181 Y T N D V I A T C A F G L K V D S H N D V D N K F Y A M G N
721 GCGGC CTCTACCTTC AACTT CCTTC AGTCG CTC AATCCA TGTTT AGTGG TACTT TACC AAAACT TGCTAAGGCT TTAAGATAGAAATC
211 A A S T F N F L Q S L K S M F S G T L P K L A K A L K I E I
811 TTTTCGGAGGAGCAAAAGAAATTTT TCAGA ACCAT AGTTC TAGAT ACGAT GCGAATCGT GAGAA GAAAAATATT ATGAG GCCTGATATG
241 F S E E Q K K F F R T I V L D T M A N R E K K N I M R P D M
901 ATTCA TTTACTTATG GAAGC TAAGA AAGGT AAATC GACCCATGAA GATAA CAAAT CTACT GATGAGGCTG CTGGA TTCGC GACCG TTGAA
271 I H L L M E A K K G K L T H E D N K S T D E A A G F A T V E
991 GAATC TGCTG TTGGT CAGAAAAAG TTAAT AGAGT GTGGA GTGAC GATGA CCTCG TCGCG CAAGC AGTGA GTTCT TTCAT TGCTG GTTTC
301 E S A V G Q K K V N R V W S D D D L V A Q A V M F F I A G F
1081 GAAAC TGCTC CAGCT GGTCT GTCAT TCCTG CTCTA CGAAT TGGCG TTGAA CCCTGATATC CAGGAGCGAC TGGCG CAAGA GATCAAGGAG
331 E T V S A G L S F L Y E L A L N P D I Q E R L A Q E I K E
1171 ACTGA CGCTAAGAAC GCGCG CTTAG ATTTC AACTC CATCC AGAATATGCC GTATA TGGAC ATGGT TATTT CTGAA TTATT GCGAC TATGG
361 T D A K N G G L D F N S I Q N M P Y M D M V I S E L L R L W
1261 CCACC TGGTT TTGTT CTAGA CAGGA TTTCG ACAAAGAT ACAAT GTGGG AAAAC CTAAT GAAAA GGCTG AAAAG GATTT CATCATTCGC
391 P P G F V L D R I C T K D Y N V G K P N E K A E K D F I I R
1351 AAAGG TACAC CCGTC TTCAT ACCAG TAATT GCTAT CCACC GTGAC CCACA GACTT TCTCC AACCC TGAGA AGTTC GACCC AGAGC GCTTT
421 K G T P V F I P V I A I H R D P Q Y F S N P E K F D P E R F
1441 TCAGACGAGAACAAAG CATAAAATCC AGTCG GCGCG GTACA TGCCC TTGTTGTTG GACCAAGAAA CTGTA TAGGA TCCAGATTGCTTTC
451 S D E N K H K I Q S A A Y M P F G V G P R N C I G S R F A F
1531 AGCGA GATGAAGGTGATGCAATACC AGATC CTCCT GCACT TGGAG GTCTC CCCTT GTGAGAAGAC CACAA TCCCG GCTAC GCTTGACAAA
481 S E M K V A Y Q I L L H L E V S P C E K T T I P A T L D K
1621 AAGACCT TTAAC CTAA GCTAG ACGGA GGCTT TTGGC TAAGA TTTAGAGCAAGAAAT TAA AACACT ACTGA GACAA TTTAA CTAA GACA A
511 K T F N L K L D G G F W L R F R A R N *
1711 ATAAAACAGTCATTTTATAAAAAA AAAAAA AAAAAA

起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA)用方框标出; 血红素结合域、meander结合域、螺旋C、螺旋I和螺旋K用灰色阴影标出; 多聚腺苷酸信号序列粗体加下划线标出
The start codon (ATG) and stop codon (TAA) are indicated with the box. Heme-binding domain, meander domain, helix C, helix I and helix K are shaded in grey. The multiple polyadenylation signal sequence is underlined in bold

图 1 黏虫 CYP9A113 基因核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of CYP9A113 from *Mythimna separata*



利用邻位相连法1 000次重复构建系统进化树; 以0.05遗传距离作为标尺; 分支上数字代表自展值; 拉丁名后为GenBank登录号; 加粗的为本试验克隆得到基因的氨基酸序列
Phylogenetic tree is constructed by the neighbor-joining method with 1 000 replications; the genetic distance of 0.05 is used as the scale bar. Numbers above branches are bootstrap values; the GenBank accession numbers are shown after the scientific names; the cloned amino acid sequence in this study is in bold

图 2 鳞翅目昆虫 P450 基因氨基酸序列系统进化分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of P450 amino acid sequences in Lepidoptera insects

2.2 杀虫剂对 CYP9A113 基因表达的诱导效应

2.2.1 高效氯氟氰菊酯对 CYP9A113 基因表达的诱导效应

经过室内毒力测定,2.5%高效氯氟氰菊酯 EC

对黏虫 4 龄幼虫的 LD₁₀、LD₃₀和 LD₅₀分别为 4.370 7 (1.142 5~9.114 9)、18.771 4(8.957 0~28.947 1)和 51.507 9(34.761 9~69.128 3)ng/g(表 2)。

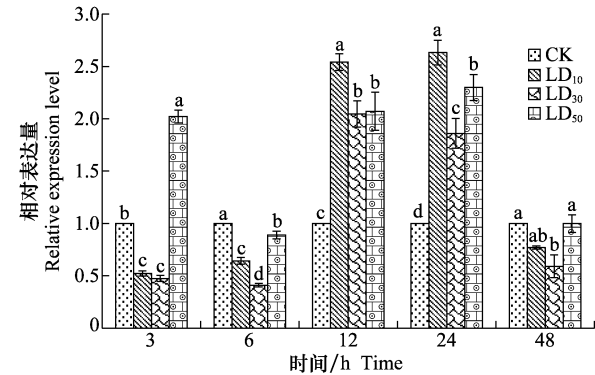
表 2 杀虫剂对黏虫 4 龄幼虫的毒力¹⁾

Table 2 Toxicity of insecticides against the 4th-instar larvae of *Mythimna separata*

药剂 Insecticide	LD ₁₀ (CI ₉₅)/ ng·g ⁻¹	LD ₃₀ (CI ₉₅)/ ng·g ⁻¹	LD ₅₀ (CI ₉₅)/ ng·g ⁻¹	毒力回归方程 Toxicity regression equation	相关系数(r) Correlation coefficient
2.5%高效氯氟氰菊酯 EC <i>lambda</i> -cyhalothrin 2.5% EC	4.370 7 (1.142 5~9.114 9)	18.771 4 (8.957 0~28.947 1)	51.507 9 (34.761 9~69.128 3)	$y=2.952\ 2+1.196\ 2x$	0.984 1
20%氯虫苯甲酰胺 SC chlorantraniliprole 20% SC	10.664 4 (2.287 3~24.028 8)	49.980 0 (21.438 3~80.395 8)	145.690 2 (94.027 3~199.318 4)	$y=2.558\ 3+1.128\ 6x$	0.993 6

1) CI₉₅:95%的置信限。
CI₉₅: 95% confidence interval.

黏虫幼虫经 LD₁₀和 LD₃₀的 2.5%高效氯氟氰菊酯 EC 处理 3 h,CYP9A113 基因表达均被抑制,经 LD₅₀处理 3 h,CYP9A113 基因相对表达量升高,呈现诱导效应;LD₁₀、LD₃₀和 LD₅₀处理 6 h,CYP9A113 基因表达均被抑制;LD₁₀、LD₃₀和 LD₅₀处理 12 h,CYP9A113 基因表达均呈诱导效应,相对表达量分别为对照组的 2.5、2.0 和 2.1 倍;LD₁₀、LD₃₀和 LD₅₀处理 24 h,CYP9A113 基因表达均呈诱导效应,相对表达量分别为对照组的 2.6、1.9 和 2.3 倍;LD₁₀和 LD₅₀处理 48 h,CYP9A113 基因相对表达量无明显变化,LD₃₀处理下,CYP9A113 基因表达被抑制(图 3)。结果说明,2.5%高效氯氟氰菊酯 EC 对 CYP9A113 基因表达产生诱导效应与时间和剂量有关。



不同时间对照组的 CYP9A113 基因表达量归为 1, 用 2^{-ΔΔCT} 方法进行相对表达量的计算, 小写字母表示不同剂量 2.5% 高效氯氟氰菊酯 EC 经过不同时间后, 基因表达量的差异显著性 ($P<0.05$)
The expression level of CYP9A113 in the control group at different time points is designated as 1. The relative expression levels are measured by using the 2^{-ΔΔCT} method; different lowercase letters indicate statistical differences in the gene expression level at different doses of *lambda*-cyhalothrin 2.5% EC for different time points at $P<0.05$

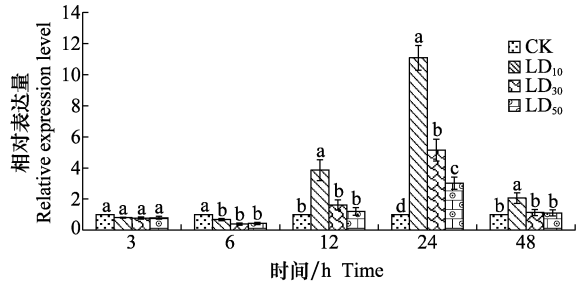
图 3 2.5% 高效氯氟氰菊酯乳油对黏虫 CYP9A113 基因表达的影响

Fig. 3 Effects of *lambda*-cyhalothrin 2.5% EC on the expression of CYP9A113 in *Mythimna separata*

2.2.2 氯虫苯甲酰胺对 CYP9A113 基因表达的诱导效应

经过室内毒力测定,20%氯虫苯甲酰胺 SC 对黏虫 4 龄幼虫的 LD₁₀、LD₃₀和 LD₅₀分别为 10.664 4 (2.287 3~24.028 8)、49.980 0(21.438 3~80.395 8)和 145.690 2(94.027 3~199.318 4)ng/g(表 2)。

黏虫幼虫经 LD₁₀、LD₃₀和 LD₅₀的 20%氯虫苯甲酰胺 SC 处理 3 h,CYP9A113 基因相对表达量无明显变化;3 个剂量处理 6 h,CYP9A113 基因相对表达量均明显降低;LD₁₀处理 12 h,CYP9A113 基因表达呈诱导效应,为对照组的 3.9 倍,LD₃₀和 LD₅₀处理下无明显变化;LD₁₀、LD₃₀和 LD₅₀处理 24 h,均对 CYP9A113 基因表达有诱导效应,分别为对照组的 11.1、5.1 和 3.0 倍;LD₁₀处理 48 h,CYP9A113 基因表达呈诱导效应,为对照组的 2.1 倍,LD₃₀和 LD₅₀处理下与对照相比无显著差异(图 4)。



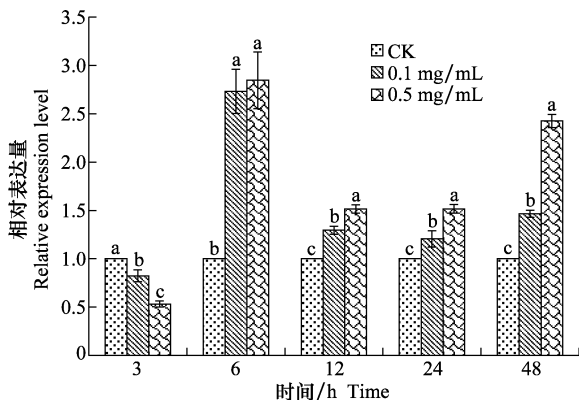
不同时间对照组的 CYP9A113 基因表达量归为 1, 2^{-ΔΔCT} 方法进行相对表达量的计算, 小写字母表示饲喂不同剂量 20% 氯虫苯甲酰胺 SC 经过不同时间后, 基因表达量的差异显著性 ($P<0.05$)
The expression level of CYP9A113 in the control group at different time points is designated as 1. The relative expression levels are measured by using the 2^{-ΔΔCT} method; different lowercase letters indicate statistical differences in the gene expression levels at different doses of chlorantraniliprole 20% SC for different time points at $P<0.05$

图 4 20% 氯虫苯甲酰胺悬浮剂对黏虫 CYP9A113 基因表达的影响

Fig. 4 Effects of chlorantraniliprole 20% SC on the expression of CYP9A113 in *Mythimna separata*

2.3 植物次生代谢物质对 *CYP9A113* 基因表达的诱导效应

黏虫幼虫经 0.1 和 0.5 mg/mL 香豆素处理 3 h, *CYP9A113* 基因表达均被抑制; 处理 6、12、24 和 48 h, 均对 *CYP9A113* 基因的表达有诱导效应, 且均在处理 6 h 诱导作用最强, 分别为对照组的 2.7 和 2.8 倍; 高浓度处理 12、24 和 48 h, *CYP9A113* 基因表达量均显著高于低浓度处理(图 5)。结果说明, 不同浓度香豆素处理 6 h 后, 可能对 *CYP9A113* 基因表达均产生诱导效应, 并且在 12 h 后, 高浓度处理诱导效应高于低浓度处理。



不同时间对照组的 *CYP9A113* 基因表达量归为 1, 用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法进行相对表达量的计算, 小写字母表示饲喂不同浓度香豆素经过不同时间后, 基因表达量的差异显著性 ($P < 0.05$)

The expression level of *CYP9A113* in the control group at different time points is designated as 1. The relative expression levels are measured by using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method; different lowercase letters indicate statistical differences in the gene expression levels at different concentrations of coumarin for different time points at $P < 0.05$

图 5 香豆素对黏虫 *CYP9A113* 基因表达的影响

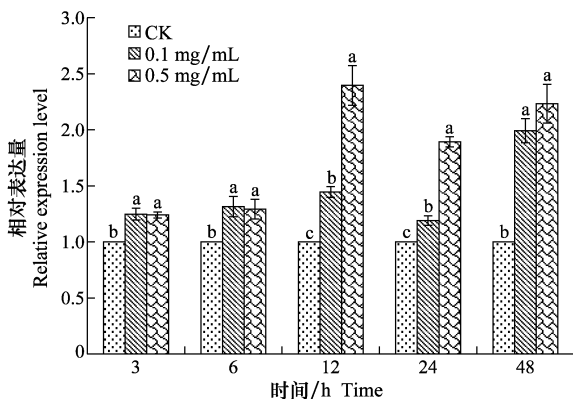
Fig. 5 Effects of coumarin treatment on the expression of *CYP9A113* in *Mythimna separata*

黏虫幼虫经 0.1 和 0.5 mg/mL 的吲哚-3-甲醇处理 3、6、12、24 和 48 h, *CYP9A113* 基因表达均呈诱导效应, 低浓度处理 48 h 诱导作用最大, 为对照组的 2.0 倍。高浓度处理 12 h 诱导作用最大, 为对照组的 2.4 倍(图 6)。结果说明, 不同浓度吲哚-3-甲醇处理不同时间, 可能对 *CYP9A113* 基因表达均产生诱导效应。

3 结论与讨论

细胞色素 P450 在合成具有关键生物学功能的内源物质和代谢天然或合成的外源化学物质方面起重要作用^[6], 长期以来一直是研究的热点。本研究克隆黏虫的一条 P450 基因 *CYP9A113*, 属于在异物

代谢和杀虫剂抗性中起重要作用的 CYP9 家族基因, 研究了其在合成杀虫剂和植物次生代谢物质诱导后的表达情况, 结果发现外源物质对其有诱导效应, 而且是在一定剂量下经过一定时间才产生, 具有时间和剂量效应。



不同时间对照组的 *CYP9A113* 基因表达量归为 1, 用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法进行相对表达量的计算, 小写字母表示饲喂不同浓度吲哚-3-甲醇经过不同时间后, 基因表达量的差异显著性 ($P < 0.05$)

The expression level of *CYP9A113* in the control group at different time points is designated as 1. The relative expression levels are measured by using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method; different lowercase letters indicate statistical differences in the gene expression levels at different concentrations of indole-3-carbinol for different time points at $P < 0.05$

图 6 吲哚-3-甲醇对黏虫 *CYP9A113* 基因表达的影响

Fig. 6 Effects of indole-3-carbinol on the expression of *CYP9A113* in *Mythimna separata*

已有研究表明, 家蚕 *B. mori* 经 1 μ L 的 98% 氯氰菊酯 (5 ng/ μ L) 处理 24 h, 脂肪体中 *CYP9A22* 基因相对表达量升高^[19]。飞蝗 *L. migratoria* 用 3 μ L 溴氰菊酯 (0.01、0.02、0.04、0.08 和 0.12 μ g/mL) 处理 12 h, 在 3 个较高浓度处理下 *CYP9A22* 基因表达量升高, 存在剂量效应^[20]。甜菜夜蛾 *S. exigua* 经 0.01 mg/kg 的 95% 氯虫苯甲酰胺原药处理 36 h, *CYP9A9* 基因表达诱导效应最高, 0.02 mg/kg 处理 12 h 诱导效应最高, 存在时间和剂量效应^[11]。不同药剂对不同昆虫的同一家族 P450 基因产生的效应也可能不同。在本研究中, 黏虫经 LD₁₀ 和 LD₃₀ 的 2.5% 高效氯氟氰菊酯 EC 处理 12 h 和 24 h, 对 *CYP9A113* 基因表达有诱导作用, LD₅₀ 处理 3、12 和 24 h 均可产生诱导效应, 说明基因的诱导反应与时间和剂量有关。LD₅₀ 处理 6 h, 基因表达量降低, 可能是由于虫体特殊生理过程对其造成影响, 3 个剂量处理 48 h 均无诱导反应, 可能因为细胞色素 P450 酶系的合成是个耗能过程, 不会一直保持高含量, 当需要时产生诱导作用, 药剂毒性逐渐消失, 诱导作用也会慢慢消失。黏虫经 LD₁₀ 的 20% 氯虫苯甲酰胺 SC 处理 12、

24 和 48 h, CYP9A113 基因表达呈诱导效应, LD₃₀ 和 LD₅₀ 处理 24 h 产生诱导效应, 同样具有时间和剂量效应, 在开始的时间点没有诱导效应产生, 并且剂量高, 产生诱导效应时间晚, 可能是由于虫体产生中毒反应, 无法及时进行调整。

植物产生有毒物质防止被侵害, 昆虫体内物质也会相应调节进行解毒进而能够取食植物, 二者相辅相成, 共同进化^[12]。已有研究表明香豆素和吲哚-3-甲醇可对昆虫 P450 基因产生诱导效应。吲哚-3-甲醇处理飞蝗 *L. migratoria* 24 h, 可诱导 CYP6HL1 和 CYP6FE12 基因的表达^[14]; 斜纹夜蛾 *S. litura* 脂肪体中 CYP4M14 和 CYP4S9 基因表达均可被香豆素诱导^[12], 并且用高浓度香豆素处理 48 h, CYP6AB14 基因在中肠和脂肪体中的表达量均高于低浓度处理时的表达量, 表现出剂量效应^[13]。本试验将黏虫用 0.1 和 0.5 mg/mL 香豆素处理 3 h, 基因表达无诱导效应, 可能是由于其对虫体产生较大刺激, 未能及时做出反应。处理 6、12、24 和 48 h, 均有诱导效应, 并且高浓度处理 12、24 和 48 h 基因相对表达量均显著高于低浓度处理, 与之前研究结果相似, 存在时间和剂量效应。0.1 和 0.5 mg/mL 吲哚-3-甲醇处理每个时间点, 基因表达均被诱导, 说明可能在一定时间和剂量范围内, 吲哚-3-甲醇对 CYP9A113 基因表达均产生诱导效应。

本试验克隆了黏虫的一条 P450 基因 CYP9A113, 并对外源物质对该基因表达的诱导效应进行了研究, 初步探索了 CYP9A113 基因的功能及其与外源物质的相互作用, 为今后该基因的系统研究及其应用于黏虫的防治提供基础依据。

参考文献

- NELSON D R, KAMATAKI T, WAXMAN D J, et al. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes and nomenclature[J]. DNA & Cell Biology, 1993, 12(1): 1-51.
- ASPERGER O, KLEBER H P. Distribution and diversity of bacterial cytochromes P450 [C]//RUCKPAUL K. Microbial and Plant Cytochrome P-450. London: Taylor and Francis, 1991: 1-53.
- RAY J W. The epoxidation of aldrin by housefly microsomes and its inhibition by carbon monoxide [J]. Biochemical Pharmacology, 1967, 16: 99-107.
- FEYEREISEN R. Arthropod CYPomes illustrate the tempo and mode in P450 evolution [J]. Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics, 2011, 1814(1): 19-28.
- LI Xianchun, SCHULER M A, BERENBAUM M R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics [J]. Annual Review of Entomology, 2007, 52: 231-253.
- FEYEREISEN R. Insect P450 enzymes [J]. Annual Review of Entomology, 1999, 44: 507-533.
- DING Tianbo, NIU Jinzhi, YANG Lihong, et al. Transcription profiling of two cytochrome P450 genes potentially involved in acaricide metabolism in citrus red mite *Panonychus citri* [J]. Pesticide Biochemistry & Physiology, 2013, 106: 28-37.
- ANNE J, ANDERS M B G, LENE J R, et al. Biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine polychaetes [J]. Marine Environmental Research, 2008, 65(2): 171-186.
- 赵华强, 宋丽莉, 李兵, 等. 野桑蚕细胞色素 P450 氧化酶活性测定及 CYP9 家族基因的诱导转录 [J]. 浙江农业学报, 2010, 22(3): 287-291.
- 刘月庆, 樊星, 周夏, 等. 甘蓝夜蛾 CYP9A90 基因的克隆及溴氰菊酯对其诱导表达 [J]. 植物保护, 2017, 43(1): 54-60.
- 王学贵, 余慧灵, 梁沛, 等. 氯虫苯甲酰胺诱导甜菜夜蛾细胞色素 P450 基因上调表达 [J]. 昆虫学报, 2012, 58(3): 281-287.
- 王瑞龙, 孙玉林, 梁笑婷, 等. 6 种植物次生物质对斜纹夜蛾解毒酶活性的影响 [J]. 生态学报, 2012, 32(16): 5191-5198.
- WANG Ruilong, XIA Qingqing, BAERSON S R, et al. A novel cytochrome P450 CYP6AB14 gene in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) and its potential role in plant allelochemical detoxification [J]. Journal of Insect Physiology, 2015, 75: 54-62.
- 李亚红. 杀虫剂及植物次生代谢物对飞蝗细胞色素 P450 基因的诱导表达 [D]. 太原: 山西大学, 2015.
- 江幸福, 张蕾, 程云霞, 等. 我国粘虫研究现状及发展趋势 [J]. 应用昆虫学报, 2014, 51(4): 881-889.
- 张智. 北方地区重大迁飞性害虫的监测与种群动态分析 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.
- 龚蕾, 刘雁雨, 焦必宁, 等. 植物中天然香豆素类化合物的提取纯化技术研究进展 [J]. 食品工业科技, 2015, 36(20): 377-383.
- 周颖, 朱伟, 杨杏芬. 肿瘤化学预防剂吲哚-3-甲醇作用的靶点 [J]. 热带医学杂志, 2007(8): 824-827.
- 赵华强, 王东, 李兵, 等. 家蚕细胞色素 P450 基因 CYP9A22 的克隆及在中肠和脂肪体的诱导转录 [J]. 蚕业科学, 2008, 34(4): 634-641.
- GUO Yanqiong, ZHANG Xueyao, WU Haihua, et al. Identification and functional analysis of a cytochrome P450 gene CYP9AQ2 involved in deltamethrin detoxification from *Locusta migratoria* [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2015, 122: 1-7.

(责任编辑: 田 喆)