

褐飞虱细胞色素 P450 单加氧酶基因 *CYP4CE1* 的克隆及表达谱

杨之帆*, 刘晓黎, 张艳艳

(湖北大学生命科学学院, 武汉 430062)

摘要: 为了解 P450 基因在褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 适应水稻品种过程中的重要作用, 利用反转录聚合酶链式反应 (RT-PCR), 快速扩增 cDNA 末端 (RACE) 和长距离聚合酶链式反应 (LD-PCR) 技术, 克隆了褐飞虱 4 龄若虫的 CYP4 家族的一个 P450 单加氧酶基因, 被命名为 *CYP4CE1*。该基因的全长 cDNA 序列 (2 160 bp) 含有一个 1 626 bp 的开放阅读框 (ORF), 编码 541 个氨基酸残基的蛋白质。通过 GenBank 数据库中的 blastx 搜索引擎进行同源性分析, 结果表明 *CYP4CE1* 编码的蛋白与岸蟹 *Carcinus maenas* 的 CYP4C39 (GenBank 登录号: JC8026) 的相似性最高, 两者的氨基酸序列同源性达 43%; 其次与热带蟑螂 *Blaberus discoidalis* 的 CYP4C1 (AAA27819) 及黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的 CYP4C3 (NP_524598) 的相似性也较高, 氨基酸序列同源性分别达 42%。氨基酸序列比对表明该蛋白含有 CYP4 家族成员的所有保守特征序列, 如螺旋 K (E--R--P), 氧结合结构域即螺旋 I (AG--T), 血红素结合区 (PF--G---C-G--F) 以及 CYP4 成员的特有特征序列 (EVDTFMFEGHDTT) 等。使用 Northern 杂交检测 *CYP4CE1* 随时间的表达变化, 结果表明: 与饲养于感虫水稻中 1 号 (Taichung Native 1, TN1) 上的若虫相比, 在取食中度抗性水稻 Minghui 63 (MH63) 秧苗 12, 24, 48, 72 h 的各时间段的褐飞虱体内, 该基因有 2.1 倍的过量表达且表达水平保持稳定。进一步通过 Northern 杂交检测该基因的组织表达特异性, 结果显示: 该基因在取食 TN1 秧苗的若虫脂肪体中表达量最高, 在肠道组织及体壁中的表达水平较低; 褐飞虱取食 MH63 秧苗 24 h 后, 该基因在体壁及脂肪体中的表达量略有上升 (各约 1.2 倍), 而在肠道组织中的表达量则大幅升高 (约 12 倍)。肠道整体原位杂交表明, *CYP4CE1* 在取食 TN1 秧苗的若虫的肠道组织及马氏管中均有本底水平的表达; 若虫取食 MH63 秧苗后, 该基因在上述肠道各区段表达水平明显增强。结果提示, 在褐飞虱与水稻互作过程中 *CYP4CE1* 的重要功能之一可能是参与水稻有毒次生物质的代谢。

关键词: 褐飞虱; 解毒酶; 细胞色素 P450 单加氧酶; 基因克隆; 表达谱; 水稻品种; 抗虫性

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2010)03-0257-12

Molecular cloning and expression profiling of cytochrome P450 monooxygenase gene *CYP4CE1* in *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae)

YANG Zhi-Fan*, LIU Xiao-Li, ZHANG Yan-Yan (School of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, China)

Abstract: To elucidate the function of P450 genes in *Nilaparvata lugens*, a novel P450 gene *CYP4CE1* was cloned from the 4th instar nymphs of brown planthopper *N. lugens* by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), rapid amplification of cDNA ends (RACE) and long-distance polymerase chain reaction (LD-PCR). The full-length cDNA (2 160 bp) of *CYP4CE1* has an open reading frame (ORF) of 1 626 nucleotides encoding a protein of 541 amino acids. BLAST similarity searches in GenBank databases with command blastx revealed the deduced protein is most similar to CYP4C39 (GenBank accession no. : JC8026) of the common shore crab (*Carcinus maenas*) with amino acid identity of 43%, with the second highest-level identity (42%) to CYP4C1 (AAA27819) of the tropical cockroach (*Blaberus discoidalis*) and CYP4C3 (NP_524598) of *Drosophila melanogaster*, respectively. Multiple alignment of amino acid sequences revealed that *CYP4CE1* is a typical microsomal P450 sharing conserved structural and functional domains with other insect CYP4 members, such as helix K (E--R--P), helix I (AG--T), heme-binding domain (PF--G---C-G--F) and CYP4 specific region (EVDTFMFEGHDTT). Temporal expression analysis indicated *CYP4CE1* was induced up to 2.1-fold and kept at a constant level in nymphs exposed to

基金项目: 国家自然科学基金项目(30500328)

作者简介: 杨之帆, 男, 1971 年生, 博士, 副教授, 主要从事昆虫分子生物学、植物分子生物学研究, E-mail: sailyangzhf@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: sailyangzhf@yahoo.com.cn

收稿日期 Received: 2009-08-24; 接受日期 Accepted: 2010-02-18

moderately resistant rice Minghui 63 (MH63) seedlings during the time course from 12, 24, 48 to 72 h, compared to the nymphs fed on the susceptible rice Taichung Native 1 (TN1) seedlings. Further spatial gene expression analysis demonstrated that *CYP4CE1* was expressed at a high level in fat body and at a low level in integument and gut tissue in nymphs fed on TN1 seedlings. However, after exposure of the nymphs to MH63 seedlings for 24 h, *CYP4CE1* was slightly unregulated in integument and fat body (about 1.2-fold, respectively), but dramatically activated up to 12-fold in gut tissue. Whole mount *in situ* hybridization revealed that *CYP4CE1* was expressed at a basal level in gut tissue and Malpighian tubules in nymphs fed on TN1 seedlings. After exposure to MH63 seedlings, *CYP4CE1* transcripts were significantly accumulated in whole gut tissue including Malpighian tubules. The results suggest a potential role for *CYP4CE1* in determining patterns of *N. lugens*-rice relationships through toxic allelochemical detoxification.

Key words: *Nilaparvata lugens*; detoxification enzyme; cytochrome P450 monooxygenase; gene cloning; expression profile; rice variety; insect resistance

水稻是最重要的粮食作物之一, 全世界约有一半的人口以稻米为主食。褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 是水稻的主要害虫之一 (Watanabe and Kitagawa, 2000)。褐飞虱的迁飞习性是造成监测与控制褐飞虱发生较难的原因。人们注意到合适的化学防治与提高水稻本身的抗虫能力相结合, 能一定程度上避免褐飞虱的为害, 成为防治褐飞虱的重要策略之一 (王传之等, 2008; 陈峰等, 2008)。但由于目前培育推广的水稻新品种所带的抗性位点往往较单一或太少或太弱, 大面积种植后, 在品种抗性胁迫下, 褐飞虱的致害性会迅速发生变化, 在短期内 (2~3 年) 演化出新的“生物型”, 导致水稻品种抗性丧失 (Matteson, 2000)。尽管褐飞虱适应水稻品种并产生新“生物型”的分子机理仍有待深入研究, 但此过程中代谢酶特别是三大解毒酶的活性变化已引起人们的重视和研究。褐飞虱在取食抗虫品种后, 羧酸酯酶活性会上升 (吕仲贤等, 1997)。取食抗虫水稻的褐飞虱体内谷胱甘肽转移酶活力也会明显升高 (周亦红等, 2003)。在分子水平上这两个酶的基因被证实受水稻抗性诱导 (Yang *et al.*, 2005)。我们对褐飞虱 4 龄若虫的两个 P450 基因 *CYP6AX1* 和 *CYP6AY1* 的初步研究表明, 这两个 P450 基因受水稻品种抗性诱导, 推测相应的 P450 的合成量会增加 (Yang *et al.*, 2007)。这些研究结果提示了三大解毒酶系在褐飞虱对抗水稻品种抗性的过程中发挥了重要作用。

P450 基因的克隆与表达研究是揭示 P450 功能的重要基础。人们较早克隆了鳞翅目昆虫 (包括东方虎凤蝶 *Papilio glaucus*、香芹黑凤蝶 *Papilio polyxenes*、加拿大虎凤蝶 *Papilio canadensis* 和美洲棉铃虫 *Helicoverpa zea* 等) 的 CYP6B 亚家族的 P450 基因, 详细研究了这些基因在昆虫取食宿主植物后

的表达变化 (Li *et al.*, 2004); 通过异源表达在体外重建了若干 P450 单加氧酶体系, 对相应的 P450 在体外代谢呋喃香豆素类 (furanocoumarins) 植物有毒化合物的生化特性进行了研究 (Li *et al.*, 2007)。昆虫中被克隆的 P450 基因还包括: 褐飞虱的 *CYP6AX1* 和 *CYP6AY1* (Yang *et al.*, 2007)、埃及斑蚊 *Aedes aegypti* 的 *CYP6AL1* (David *et al.*, 2006)、沙漠果蝇 *Drosophila mettleri* 的 *CYP4D10* (Danielson *et al.*, 1998)、烟草天蛾 *Manduca sexta* 的 *CYP4M1* 和 *CYP4M3* (Snyder *et al.*, 1995) 及 *CYP9A* 亚家族的 P450 基因 (Stevens *et al.*, 2000)、两种果蝇 *D. mettleri* 和 *D. nigrospiracula* 的 *CYP28A* 亚家族的 P450 基因 (Danielson *et al.*, 1997; Fogleman *et al.*, 1998) 以及美洲棉铃虫 *H. zea* 的 *CYP321A1* (Sasabe *et al.*, 2004; Niu *et al.*, 2008) 等。这些基因都被证实受宿主植物的诱导, 可能在昆虫与植物互动中发挥了重要作用。此外, 人们还从各种昆虫中克隆到多条与抗药性相关、激素及脂肪酸代谢相关的 P450 基因, 并研究了它们的表达谱 (Li *et al.*, 2007)。我国研究人员从家蚕 *Bombyx mori* 中克隆了 P450 新基因包括 *CYP6B29* 和 *CYP6AE2* 等 (王东等, 2006; 艾均文等, 2007), 从棉铃虫 *H. armigera* 中克隆了 P450 新基因 *CYP6AE12* (岳丽娜等, 2007), 其中部分基因的表达谱得到了研究。本研究拟通过克隆褐飞虱 CYP4 家族的 P450 基因, 进而研究其时空表达特性, 特别是对水稻品种抗性的反应, 以了解褐飞虱 P450 基因的功能, 为水稻抗性育种提供一定的理论参考。

1 材料和方法

1.1 水稻品种、试虫饲养及取样

褐飞虱 (生物型 I) 饲养在感虫水稻品种台中 1

号 [TN1, 对褐飞虱的抗性级别为 9 (Huang *et al.*, 1972)] 植株上。TN1 和中度抗虫水稻品种 MH63 [抗性级别为 8 (Ren *et al.*, 2004)] 的发芽种子播种于塑料杯中, 每杯 10 粒, 待秧苗长至 2 叶 1 芯时, 将刚发育至 4 龄的褐飞虱若虫分别投放于两种秧苗上, 密度为每株秧苗 10 头虫。于 0, 12, 24, 48, 72 h 后, 分别回收 20 头活体若虫, 用 TRIzol Reagent 试剂盒 (Invitrogen, USA) 提取总 RNA。另分离取食 TN1 和 MH63 秧苗 24 h 的 20 头若虫的完整肠道组织、脂肪体及体壁, 分别提取总 RNA。用不同时间培养的 3 批次 4 龄若虫为材料, 实验重复 3 次。

选取取食 MH63 和 TN1 秧苗的褐飞虱若虫的完整肠道组织各 20 个, 先在 MEMFA (0.1 mol/L MOPS, 2 mmol/L EDTA, 1 mmol/L MgSO₄, 3.7% 甲醛) 溶液里固定 1 h, 依次用 25%, 50%, 75%, 100% 的乙醇溶液脱水, 每步 5 min, 保存于 -20℃ 备用。

1.2 CYP4 家族 P450 基因全长 cDNA 序列的克隆

使用 SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA), 及 oligo dT (15) 引物将取食 MH63 的若虫的总 RNA 0.5 μg 反转录成 cDNA。根据文献 (Dauphin-Villemant *et al.*, 1999) 合成简并性引物 dCYP4-F/dCYP4-R (所有引物见表 1), 用于扩增 CYP4 家族 P450 基因的核心片断。反应条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 30 s, 循环 35 轮; 72℃ 延伸 8 min。PCR 产物在 0.8% 的琼脂糖凝胶上电泳分离, 将预期的目的 DNA 条带从凝胶中切下, 使用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (AxyPrep, USA) 回收 DNA。将回收的 DNA 连接到 pGEM-T Easy vector (Promega, USA) 上。连接产物转化大肠杆菌 DH5 (感受态细胞。用涂有 IPTG 和 X-gal 的平板对重组克隆进行蓝白斑筛选。随机挑选 20 个白色菌落进行重组克隆鉴定, 选送 10 个阳性重组克隆到北京奥科生物技术公司测序。

使用 GenBank 中 blastx 搜索引擎进行同源性分析。根据其中一个 P450 基因的 cDNA 的碱基序列设计基因特异性引物 (GSP-F/GSP-R)。使用 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, USA) 扩增 3' 和 5' cDNA 末端, 扩增产物经电泳分离后, 回收最亮的 DNA 条带, 克隆并测序。将所测的 3' 和 5' cDNA 序列进行拼接获得 cDNA 全长。为避免所扩增的 3' 和 5' cDNA 末端来自于不同的基因, 根据 cDNA 的 5' 和 3' 非翻译区 (UTR) 序列设计

长距离 PCR 引物 (ldprimer-F / ldprimer-R), 用以扩增长片段 cDNA。反应体系同扩增 5' cDNA 末端, 用 ldprimer-F 和 ldprimer-R 替换 GSP-R 和通用引物混合物 (UPM) 即可。反应条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 2 min, 循环 35 轮; 72℃ 延伸 8 min。扩增的 DNA 条带经克隆后测序。

表 1 本研究中所用的引物

Table 1 Primer pairs used in this study

引物 Primers	序列 Sequence (5' - 3')
dCYP4-F	GAYACNTTYATGTTYRARGGNCAYG
dCYP4-R	GCRAAYTTYTGNCDDATRCART
GSP-F	GCAACCCCAAGCACTTCCTGAGCCT
GSP-R	AGGCTCAGGGAAGTCTTGGGGTTGC
ldprimer-F	CTCCAACCTTCCTACGCCTTCT
ldprimer-R	GGGGGGAGTTGTAAGGATGC
Actin-F	ACGCCATCCTCCCTCTGGACIT
Actin-R	CAAAGTCCAGGGCAACCTAGCA
iCYP4-F	CGACGCTGGCCAAGATCAAGT
iCYP4-R	TGCCATTTTGATCCTGTGCTGA

R = A/G, Y = C/T, N = A/G/C/T.

用 DNAtools6 软件进行核苷酸序列的翻译, 得到相应的氨基酸序列。使用 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 网页 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中的 BLAST 搜索引擎 blastx 进行蛋白质序列相似性及氨基酸同源性查找。用在线工具 ExPASy Compute pI/Mw tool (http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html) 预测蛋白质的等电点和分子量; 用 TMHMM Server v. 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测蛋白质的穿膜螺旋结构域。用软件 Clustal X v. 1.8 (Thompson *et al.*, 1997) 进行同源蛋白质序列的比对分析; 在序列比对中所引用的 CYP4 家族的 3 个 P450 是: 热带蟑螂 (tropical cockroach, *Blaberus discoidalis*) 的 CYP4C1 (AAA27819), 岸蟹 (common shore crab, *Carcinus maenas*) 的 CYP4C39 (JC8026) 和黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的 CYP4C3 (NP_524598)。

1.3 P450 基因表达随时间变化的检测

将取食 MH63 和 TN1 秧苗的不同时间段的 20 头褐飞虱若虫的总 RNA (15 μg) 在 1.5% (w/v) 的甲醛变性琼脂糖胶上电泳分开, 转移至硝酸纤维素 (NC) 膜上, 以 α- [³²P] dCTP 标记的全长 cDNA 片段为探针, 进行分子杂交。杂交条件为 65℃ 16 h;

洗膜条件: 用含有 0.2% (w/v) SDS 的 $1 \times$ 标准柠檬酸盐缓冲液 (standard saline citrate buffer, SSC), 于 65°C 洗 15 min, 再用含有 0.1% (w/v) SDS 的 $0.5 \times$ SSC, 于 65°C 洗涤 15 min; 将洗好的膜与 X 光片夹于增感屏中, 置于 -20°C 曝光 7 d。使用引物 Actin-F/Actin-R 扩增 β -actin 的 cDNA (AM931964), 扩增条件为: 95°C 3 min; 95°C 30 s, 54°C 30 s, 72°C 1 min 循环 35 轮; 72°C 延伸 8 min。扩增产物 (153 bp) 通过 0.8% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 回收克隆并经测序予以确认。该 cDNA 片段标记后在杂交中作为内参, 以确定电泳时所用总 RNA 的量。曝光后的 X 光片经显影定影后, 用 Typhoon 9400 Scanner (Amersham Biosciences, USA) 扫描杂交信号。实验重复 3 次, 所用的总 RNA 分别来源于 3 批次的 4 龄若虫。使用扫描仪附带的软件对杂交信号进行量化。先对各泳道的 *actin* 杂交信号进行均一化, 再计算取食 MH63 的褐飞虱的 *CYP4CE1* 与相应时间段取食 TN 的褐飞虱的 *CYP4CE1* 表达量的比值, 最后求出 3 次 Northern 杂交中该比值的平均值及其标准差, 代表受抗性水稻诱导后 *CYP4CE1* 在各时间段表达水平升高的倍数。

1.4 P450 基因在肠道组织、脂肪体及体壁中的表达检测

为检测 P450 基因的组织表达特异性, 将取食 TN1 和 MH63 秧苗的 20 头褐飞虱若虫的肠道组织、脂肪体及体壁的总 RNA (5 μ g) 经电泳分开, 转移至 NC 膜上, 与标记的 P450 的全长 cDNA 探针进行分子杂交。用 β -actin 作内参。实验重复 3 次, 所用的总 RNA 分别来源于 3 批次的 4 龄若虫。杂交信号的量化方法如前所述。最后求出 3 次 Northern 杂交中, 取食 MH63 秧苗的褐飞虱若虫的特定组织中 *CYP4CE1* 表达量与取食 TN 秧苗的褐飞虱若虫的相应组织中 *CYP4CE1* 表达量比值的平均值及其标准差, 代表受抗性水稻诱导后 *CYP4CE1* 在该组织中表达水平升高的倍数。

1.5 P450 基因在肠道组织的原位杂交定位

以取食 MH63 秧苗的褐飞虱若虫的肠道组织总 cDNA 为模板, 使用基因特异性引物 (iCYP4-F/iCYP4-R) 扩增 P450 基因的 3' UTR。扩增条件为: 95°C 3 min; 95°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 1 min 循环 35 轮, 72°C 延伸 8 min。扩增产物经克隆后测序。挑选 DNA 片段以正向及反向连接于 T7 启动子之后的重组质粒各一个, 用限制性内切核酸酶 *Pst* I (Promega, USA) 完全线性化后作模板, 以

digoxigenin-labeled dNTP mix (Roche, Germany) 为底物, 使用 T7 RNA polymerase (TaKaRa, 中国大连) 合成正义及反义链 RNA 探针。

从 -20°C 取出保存的两种肠道组织各 20 个, 分别用 95%, 85%, 70%, 50%, 25% 的乙醇进行复水, 每种浓度的乙醇中保持 5 min。用 PBST 缓冲液 (NaCl 137 mmol/L, KCl 2.7 mmol/L, Na_2HPO_4 4.3 mmol/L, KH_2PO_4 1.4 mmol/L, 0.1% (v/v) Tween, pH 7.4) 洗涤 4 次, 每次 5 min; 用 10 mg/mL 的 proteinase K 于室温处理 1 min。PBST 洗涤两次, 每次 5 min。加适当体积 (以淹没肠道组织为准) 杂交缓冲液于 60°C 进行预杂交 3 h, 杂交液成分为: 50% 甲酰胺, $5 \times$ SSC, 5 mg/mL Troula yeast RNA Type VI (Sigma, USA), 100 mg/mL heparin, $1 \times$ Denhardt's, 0.1% (v/v) Tween, 0.1% (v/v) CHAPS 和 10 mmol/L EDTA。将两种肠道组织各分为两组, 共 4 组。将正义及反义链 RNA 探针分别加入杂交液, 60°C 温育 10 min, 以消除探针 RNA 的二级结构, 总探针浓度不应超过 1 ng/ μ L; 用预热过的含有探针的杂交液代替预杂交液, 使肠道组织与探针于 60°C 杂交 18 h。通常 5~10 个肠道组织使用 400 μ L 杂交液。随后分别用 $2 \times$ SSC 和 $0.2 \times$ SSC 于 60°C 各洗涤 30 min, 接着用马来酸缓冲液 (0.1 mol/L 马来酸, 0.15 mol/L NaCl, 0.1% Tween pH 7.5) 于室温洗涤 5 min。样品用 2% (w/v) 的抗体封闭液 [含有 5% (w/v) BSA] (Boehringer Mannheim, Germany) 于室温封闭 2 h。换成含 1:2 000 稀释的地高辛抗体偶联的碱性磷酸酶 (Roche, Germany) 的封闭液于 4°C 保温 16 h; 用 PBST 洗涤 6 次, 每次 10 min; 用 BCIP/NBT (Sigma, USA) 显色试剂避光进行显色反应 5 min。用 PBST 漂洗肠道组织 2 次, 每次 2 min, 终止反应。每组样品选择 5 个完整的肠道组织, 使用 SZX10 型体视显微镜 (OLYMPUS, Japan) 进行观察及图片拍摄。

2 结果与分析

2.1 P450 cDNA 片段的扩增及序列分析

使用简并 RT-PCR 扩增的褐飞虱若虫 CYP4 家族 P450 基因的 cDNA 片段约 450 bp (图 1: A)。经克隆测序及在 GenBank 中进行同源性查找, 结果发现有代表 3 个 P450 基因的不同克隆 (DNA 序列), 这 3 个克隆的名称及 GenBank 登录号分别

为: CPY4-2, AM931961; CPY4-6, AM931962; CPY4-8, AM931963。根据克隆 CPY4-8 的碱基序列设计基因特异性引物 GSP-F/GSP-R, 通过 RACE 扩增出 3' 和 5' cDNA 末端, 扩增产物的电泳结果见图 1(B), 其中 5' cDNA 末端长度约为 1.85 kb, 3'

cDNA 末端长度约为 0.5 kb。将目标 DNA 条带回收后, 进行克隆测序。拼接 5' 和 3' cDNA 序列获得全长 cDNA。根据 cDNA 的 3' 和 5' UTR 序列设计 LD-PCR 引物, 扩增出的全长 cDNA 约为 2.0 kb (图 1: C)。将凝胶中的 DNA 条带回收后测序。

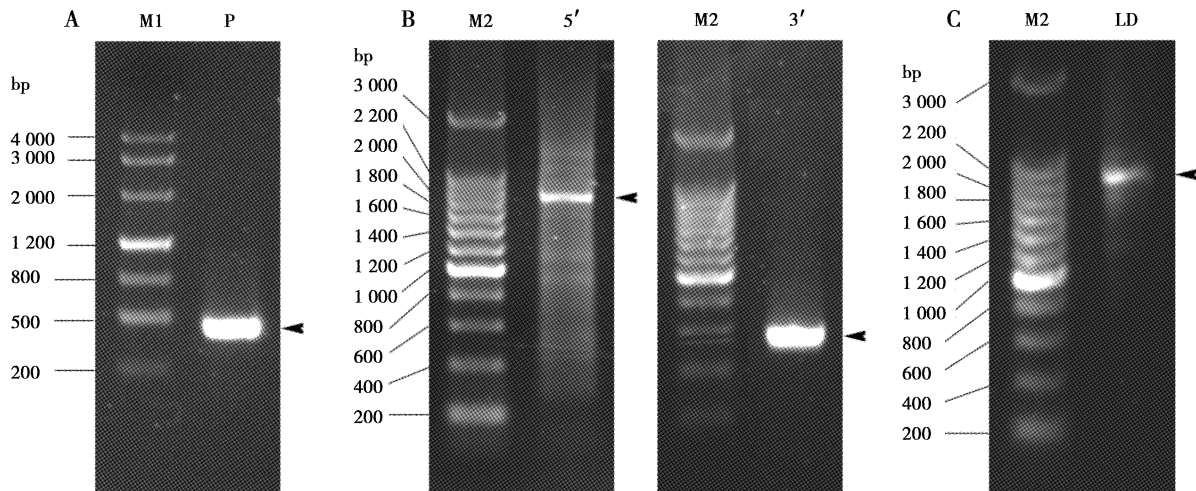


图 1 利用 RT-PCR(A)、RACE(B) 和 LD-PCR(C) 克隆褐飞虱若虫 CYP4 家族 P450 基因

Fig. 1 Amplification of a CYP4 family gene from *Nilaparvata lugens* nymphs with RT-PCR(A), RACE(B) and LD-PCR(C). P, LD: 扩增产物 The amplified products; 5': 5'RACE 扩增产物 The amplified product in 5' RACE; 3': 3'RACE 扩增产物 The amplified product in 3' RACE; M1, M2: DNA 分子量标准 DNA molecular weight standards. 箭头指示目标 DNA 条带; 扩增产物均在 0.8% 的琼脂糖凝胶中电泳分离。The arrowheads indicate the target DNA bands in each amplification reaction. Electrophoresis was performed on a 0.8% agarose gel.

该 P450 基因的 cDNA 全长为 2 160 bp, 含有一个编码 541 个氨基酸残基的开放阅读框(图 2)。在 cDNA 序列的 3' 端有 31 个脱氧腺苷酸组成的 polyA 尾巴, 3'UTR 长度为 160 bp, 5'端 UTR 长度为 374 bp。由 LD-PCR 扩增的 cDNA 片段的长度为 2 048 bp, 经测序后证实该序列与 3' 和 5' cDNA 末端拼接的全长序列的内部序列完全一致, 表明所扩增的 3' 和 5' cDNA 末端来自同一个基因。根据该 cDNA 预测的 P450 由 P450 国际命名委员会(D. R. Nelson and D. W. Nebert) 命名为 CYP4CE1。该 cDNA 全长序列已被登录到 EMBL 数据库(GenBank 登录号: FN356974)。

CYP4CE1 的 N 端存在跨膜螺旋结构域, 长度为 60 aa(图 2), 其功能是将 P450 锚定于微粒体膜或线粒体膜上, 结果使得 CYP4CE1 的 1~37 位的氨基酸序列定位于膜内, 38~60 区段为跨膜区, 嵌于磷脂双分子膜中, 而 61~541 部分则定位于膜外。这一定位特点与 P450 降解和代谢底物的功能是密切相关的。用 ExPASy Compute pI/Mw tool 预

测 CYP4CE1 的理论等电点和分子量分别为 6.05 和 62 731.51 Da。

使用 blastx 搜索引擎在 GenBank 中进行序列同源性查找, 结果表明 CYP4CE1 与岸蟹的 CYP4C39(JC8026) 相似性最高, 两者的氨基酸同源性达 43%; 此外与热带蟑螂的 CYP4C1(AAA27819) 及黑腹果蝇 *D. melanogaster* 的 CYP4C3(NP_524598) 的相似性也较高, 同源性分别达 42%。进一步通过同源序列比对, 确定了 CYP4CE1 的重要的保守结构域及氨基酸残基(图 3)。CYP4CE1 含有 CYP4 家族成员的所有保守的特征序列, 如氧结合区(the helix I, AG--T)、螺旋 K 区(the helix K, E--R--P), 血红素结合区(the heme-binding motif, PF--G---C-G--F) 以及 CYP4 家族成员的特有特征序列(EVDTFMFEGHDTT)。此外有 95 个氨基酸残基在 4 个 P450 中完全保守, 主要分别在于各个保守的结构域(图 3)。因此 CYP4CE1 代表了 CYP4 家族中 CYP4CE 亚家族的一个新成员。

```

3 TTT CTA ACT CCT ATA TCT TCT ACC ACA TTT TCT CGT ATA TTT CCT ACG CCT CTT ACA TCT TCT ACA TCT CCA ACA TTC TCT CCA ACC TTC
93 CCT ACG CCT TCT ATA TCT CCC TCG CTT CCT GTA TCT ACT ACA TAA TTA GAA CGT CCT CTA CAT CTT CTA CTT CTT CTA GCC TAC ATC TTG
183 TAC TAC TTC TAC ATC TTC TAG CCT ATG TAT TCT AAA TCT TCT AGC CTA CGT CTC CCA CAT CTC TAA CGT CCT CTT TAC GTT CCC CAA GTC
273 TTC TAC TTC TAG ACT CCA TCT TCT ACA TCT TGT AGC CTA ACG TCG TCT ACA TCT TCA ACA TCC CCC ACG TTC CCT AAA AGA CTT GTA CAA
363 GCC GCC GGC GCC ATG TTT GTG TTT GTT ACA GAG CCG CAA ACC ATC GTG CTA CCG GCG AGT ATC GTA AGC GAG CCG GCG TCA GCG GCG GAG
      M F V F V T E P Q T I V L P A S I V S E P A S A A E
453 GAC GAC AAA TGT TTT GTG CGC TTC GTG ACT AAG ATG CTG CTG GAG CTG TTG GGT GTC TGT CTG CTG CTG CTG ATT GTG CTG ATT GTG CAC
      D D K C F V R F V T K M L L E L L G V C L L L L I V L I V H
543 TTT CAT GAA TGG CCG TCG CTG CGC ACG ATG CGC GTC ATG AAG CGG CTT CCC GGG CCG CCT GAG GCG TTC TTC TTC GGC CAC TCG CCG ACG
F H E W P S L R T M R V M K R L P G P P E A F F F G H S P T
633 CTG GCC AAG ATC AAG TTT GAA GAT TTG CTG GTT TTT TTC GGC CAG CTA ATA CCG GAG TAT CCA CCT GTT TTC AAA ATA TGG ACA CTT GGC
      L A K I K F E D L L V F F G Q L I R E Y P P V F K I W T L G
723 ATT CCA ATA GTT GTT CTA ACA GAG CCG GAA GAC GTT GAA GTA TTA CTG AGC AGT GTT CAG TAC ATA AAA AAA GGA ATC GAC TAC GAT GCG
      I P I V V L T E P E D V E V L L S S V Q Y I K K G I D Y D A
813 TTC CTA GAC TGG CTG AAT GAG GGT CTA CTT GTC AGC ACA GGA TCA AAA TGG CAG TAC AGA CGA AAA CTA CTG ACG CCA GCA TTC CAT TTC
      F L D W L N E G L L V S T G S K W Q Y R R K L L T P A F H F
903 AAA ATT CTG GAG CAC TGC ATT CCA ATA TTC AAC ACA AAC GGA GCA CTG CTT TGC AAT GAA CTG CTC GAA ACA AAA AAC GAA GAG ATC GAA
      K I L E H C I P I F N T N G A L L C N E L L E T K N E E I E
993 ATT GAG CCT TTC ATT TCA AAG TGT ACA CTG GAT ATA ATT TGT GAG GCA GCT ATG GGC TGC TCA TTG AGA AAT TTG CCA GAC AAA GGA GAA
      I E P F I S K C T L D I I C E A A M G C S L R N L P D K G E
1083 CAG TAT GTG AGA GCT ACA AAA AAG ATG AAC AAT TTG ATA ATT GAA AGG ATT CTG ACT CCT TGG CTG GCC AAA GAC TGG CTG TTT CAT TTA
      Q Y V R A T K K M N N L I I E R I L T P W L A K D W L F H L
1173 TCA CCC ACC GGC AGG GAG CAG AAA AAA ATT GTG GAT ATC CTT CAT TCA TTC ACA CAG ATG ATA ATT GAA GAG AGG AAA ACG CAG TGG AGA
      S P T G R E Q K K I V D I L H S F T Q M I I E E R K T Q W R
1263 AAA AGC AGT AAA GAG GAC CTG GAA GAC GAT GAA TAT GGA AGA CAC AGA CCC AAG ACA TTC CTG GAC TGT GTT ATA GAA CTC AGT GAA AAG
      K S S K E D L E D D E Y G R H R P K T F L D C L I E L S E K
1353 GAC TCT GAA TCT CTA ACG TTG ACT GAT ATA AGA GAA GAA GTC GAC ACT TTT ATG TTT GAG GGC CAT GAC ACC ACT TCA GCA GCA ATA ACT
      D S E S L T L T D I R E E V D T F M F E G H D T T S A A I T
1443 GCT ACC ATA TTC ATG ATT GGT CAC CAT CCT GAA GTA CAG GAA AGG ATA CAC GAA GAG CTT GAT GAC GTC TTT GGC GGC TCG GAG AGA GAG
      A T I F M I G H H P E V Q E R I H E E L D D V F G G S E R E
1533 ATA ACA ATG GAC CAG CTG CAC TAT CTC ACT TAC TTG GAG AGA GTC ATC AAA GAG TCA CTT CGT CTA TTT CCC AGT GTA CCC ATG ATG ACT
      I T M D D L H Y L T Y L E R V I K E S L R L F P S V P M M T
1623 AGG CGA CTG CAG ACT GAT CTA CAG TTG AAC AGT TCT CAA CAC ATG GTG CCG TCG ACG GCT AAC GTG ATT GTT TTC TCC TAC TGG CTG CAC
      R R L Q T D L Q L N S S Q H M V P S T A N V I V F S Y W L H
1713 CGC AAC CCC AAG CAC TTC CCT GAG CCT GAC CTT TTC AAC CCC GAC CGC TTC CTG CCC GAT GAA GTC CCC AGG CGA CAC CCC TTT GCC TAC
      R N P K H F P E P D L F N P D R F L P D E V P R R H P F A Y
1803 ATC CCC TTC AGT GGC GGG CCT CGC AAC TGC ATA GGC CAG AAG TTC GCC ATG ATG GAG ATG AAA ATC GTG CTA GCA ACG GTG ATG CGG AAA
      I P F S G G P R N C I G Q K F A M M E M K I V L A T V M R K
1893 GTG CGC ATG GAA TCG ATA ACC AAG ATG GAG GCC ATT AAG TTG ATA CCA GCT GTC ATT TTG CGA CCG CAA AAA CCA TTC AAG ATC AAA GTG
      V R M E S I T K M E A I K L I P A V I L R P Q K P F K I K V
1983 TCG CCT AGA ACC AAA TAG ACT ATT CCA TTC ATC ATT TTT ATA GTG AAA CTC TCG TTA TCT CGT TTT AAA GTC ATA CAA ACC TTG GTT TGC
      S P R T K *
2073 TAT CCT TGT CTG TCA TCA GTC AAT AAA GAT AGC TCC ATC CTT TTA CAA CTC CCC CCC AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA A

```

图2 *CYP4CE1* 基因的全长 cDNA 序列和所编码的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *CYP4CE1* cDNA

方框中显示预测蛋白质 N 端的穿膜结构域; 3'UTR 中的腺苷酸加尾信号 (AATAAA) 以下划虚线标示; 基因特异性引物 (GSP) 在核苷酸序列中以双下划线标示; 长距离 PCR 引物 (ldprimers) 以下划线标示。The transmembrane region in the N-terminal of the predicted protein is boxed; putative polyadenylation signals (AATAAA) in 3'UTR are marked with a discrete underline; the GSP in the nucleotide sequence is marked with a double underline; the ldprimers are marked with underlines.

2.3 取食不同水稻的褐飞虱 P450 基因随时间的 mRNA 水平的比较

通过 Northern 印迹杂交检测了 *CYP4CE1* 随时间的表达变化。结果表明: 在所检测的 5 个时间段内, *CYP4CE1* 在取食感虫水稻 TN1 秧苗的褐飞虱若虫体内的表达水平相对较低, 且表达水平相对稳定。在褐飞虱取食抗虫水稻 MH63 后, 自 12 h 起的各时间段内, 表达明显增强, 且表达水平保持相对稳定。一次代表性的杂交结果见图 4(A)。根据杂交信号的强弱及斑点面积, 对杂交结果进行量

化, 则该基因自 12 h 起的各时间段均有 2.1 倍的过量表达, 并且 3 次重复杂交结果一致 (图 4: B)。

2.4 *CYP4CE1* 基因组织表达特异性分析

通过 Northern 杂交检测了褐飞虱若虫取食 TN1 和 MH63 秧苗 24 h 后, *CYP4CE1* 在肠道组织、脂肪体及体壁组织中的表达量。结果表明, 在取食 TN1 秧苗的若虫体内, 该基因在脂肪体中表达量较高, 而在体壁及肠道组织中表达量较低; 当若虫取食 MH63 秧苗后, 该基因在体壁及脂肪体中表达水

平略微上升,而在肠道组织中的表达水平则大幅上升。一次代表性杂交结果见图 5(A)。对杂交信号进行量化,则该基因在体壁及脂肪体中表达量分别升高约 1.2 倍,在肠道组织中的表达量则升高 12 倍,且 3 次重复杂交结果一致(图 5: B)。

2.5 CYP4CE1 在肠道组织的表达定位

2.5.1 探针的制备: 由于 P450 在生物体内以超家族、家族及亚家族的形式存在,同一家族中的不同

成员的核苷酸序列特别是编码区,及氨基酸序列均存在一定的同源性,为避免杂交过程中由于探针“脱靶”而出现假阳性的杂交信号,选择基因的 3' UTR(此区在不同基因之间差异性最大)作为杂交定位的对象。对扩增的代表 3'UTR 的 cDNA 进行克隆测序,确定 cDNA 片段以正、反向连接于 T7 启动子之后的重组质粒,并对其进行线性化(图 6: A)。结果显示,在电泳中未线性化的对照质粒 DNA

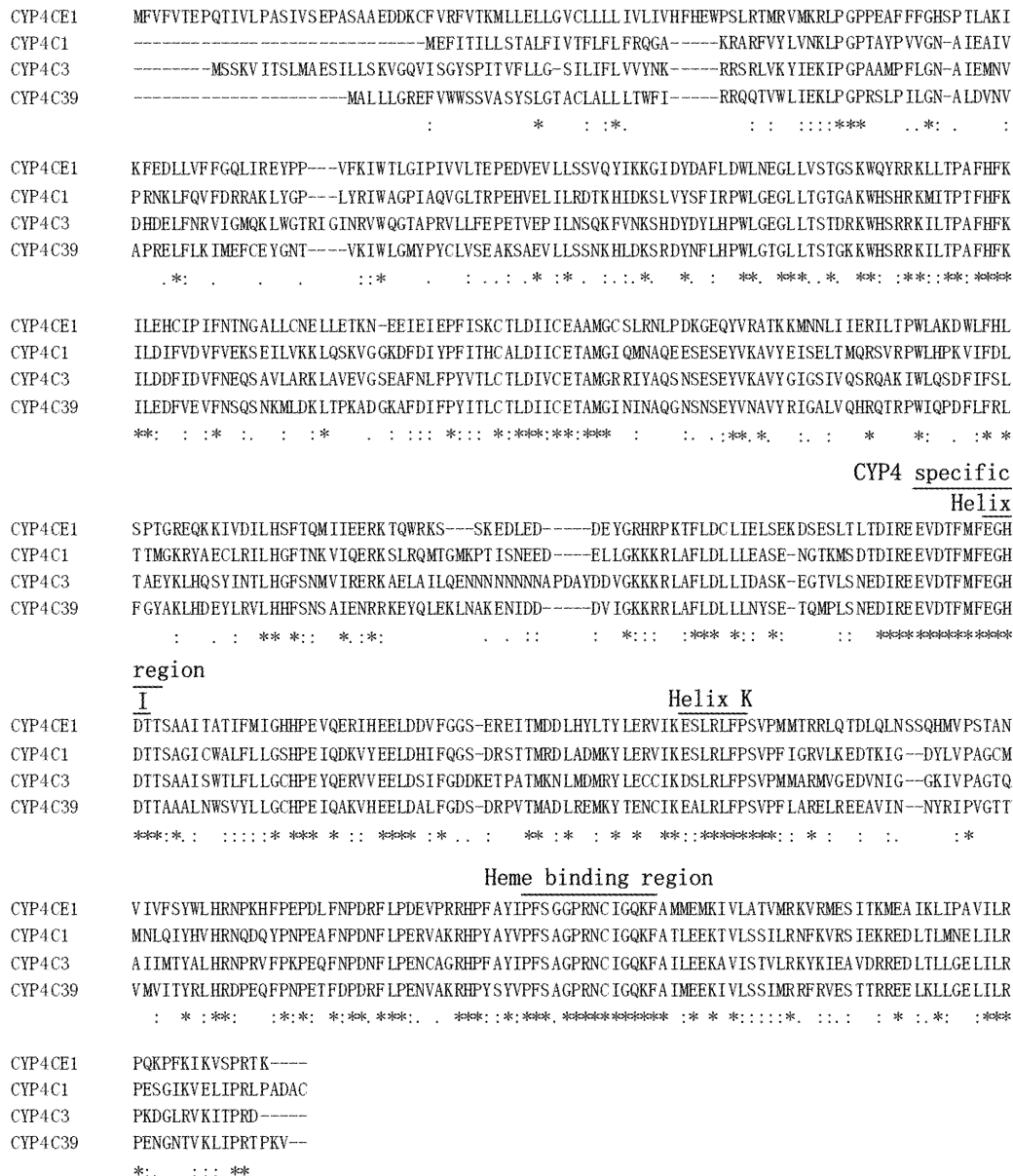


图3 CYP4CE1 与 CYP4 家族的其他 3 个 P450 的氨基酸序列比对

Fig. 3 Alignment of CYP4CE1 and the other three P450s from CYP4 family

各序列中螺旋 I、螺旋 K、血红素结合区以及 CYP4 成员特有序列等保守区均以单线标示并作了相应的标注;各序列中相同的氨基酸用星号标示而保守的氨基酸用单点或双点(较保守)标示。Conservative regions associated with the helix I, helix K, heme-binding decapeptide and the CYP4 specific region are covered by lines and marked with corresponding words; identical amino acids are indicated by asterisks and conservative substitutions by single dots or double dots (more conservative).

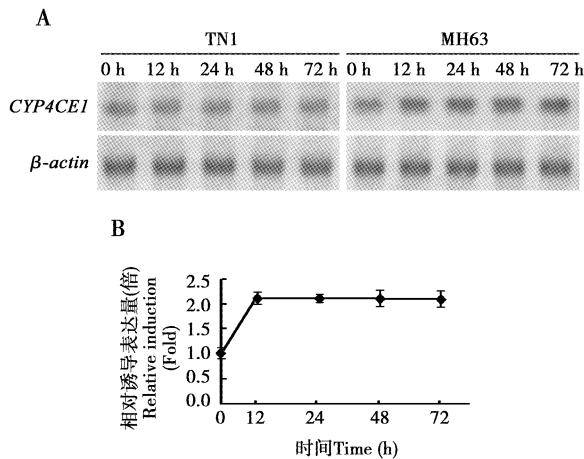


图 4 Northern 印迹杂交检测 CYP4CE1 基因在褐飞虱若虫取食 TN1 和 MH63 秧苗后随时间的相对表达量

Fig. 4 Temporal expression level of CYP4CE1 in Nilaparvata lugens nymphs exposed to TN1 and MH63 seedlings by Northern blot analysis

A: 一次代表性的 Northern 印迹杂交结果 Example of result obtained from one representative Northern blot experiment. 以 β -actin 的表达量作为内参; “ β -actin 和 CYP4CE1” 代表杂交中所用的探针种类。用于处理各样品的时间段(单位: h)标于相应泳道上方。TN1 代表取食 TN1 秧苗的若虫; MH63 代表取食 MH63 秧苗的若虫。The expression level of β -actin acts as inner reference; β -actin and CYP4CE1 represent probes used in each hybridization experiment. The time course (h) used in treatment of each nymph sample is labeled in each lane on the gel. TN1 indicates the nymphs fed on TN1 seedlings, while MH63 indicates the nymphs exposed to MH63 seedlings. B: Northern 印迹杂交检测取食 MH63 秧苗后褐飞虱若虫体内 CYP4CE1 基因的诱导表达水平随时间的变化 Time-course of CYP4CE1 mRNA induction in *N. lugens* nymphs exposed to MH63 seedlings measured by Northern blot hybridization. 图中每个点代表在 3 次 Northern 杂交中取食 MH63 秧苗的褐飞虱若虫的 CYP4CE1 与相应时间段取食 TN 秧苗的褐飞虱若虫的 CYP4CE1 表达量比值的平均值 (\pm 标准差)。Each point represents the mean \pm SD of 3 determinations of CYP4CE1 expression level in *N. lugens* nymphs subjected to MH63 seedlings relative to that in nymphs ingested TN1 seedlings at the indicated time course.

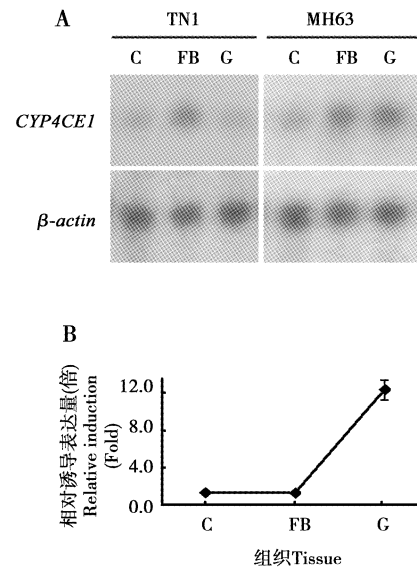


图 5 通过 Northern 杂交检测 CYP4CE1 在取食 TN1 和 MH63 秧苗 24 h 后的褐飞虱若虫的各组织中的表达量

Fig. 5 Detection of CYP4CE1 expression in the indicated tissues of Nilaparvata lugens nymphs fed on TN1 and MH63 for 24 h with Northern blot hybridization

A: 一次代表性的 Northern 印迹杂交结果 Example of result obtained from one representative Northern blot experiment. β -actin 的表达量作为内参; 图中 “ β -actin 和 CYP4CE1” 代表试验中所使用的探针。The expression level of β -actin acts as inner reference; β -actin and CYP4CE1 indicate the labeled probes used in the experiment. G, FB, C: 分别代表肠道组织、脂肪体及体壁组织 The gut tissue, fat body and integument, respectively. TN1 代表取食 TN1 秧苗的若虫; MH63 代表取食 MH63 秧苗的若虫。TN1 indicates the nymphs fed on TN1 seedlings, while MH63 indicates the nymphs exposed to MH63 seedlings. B: Northern 印迹杂交检测取食 MH63 秧苗后褐飞虱若虫体内各组织中 CYP4CE1 的诱导表达水平 Spatial induction of CYP4CE1 in *N. lugens* nymphs exposed to MH63 seedlings measured by Northern blot hybridization. 图中每个点代表在 3 次 Northern 杂交中, 取食 MH63 秧苗的褐飞虱若虫各组织中的 CYP4CE1 与取食 TN1 秧苗的褐飞虱若虫相应组织中的 CYP4CE1 表达量比值的平均值 (\pm 标准差)。Each point represents the mean \pm SD of 3 determinations of CYP4CE1 expression level in each tissue of *N. lugens* nymphs subjected to MH63 seedlings relative to that in the corresponding tissue of nymphs ingested TN1 seedlings.

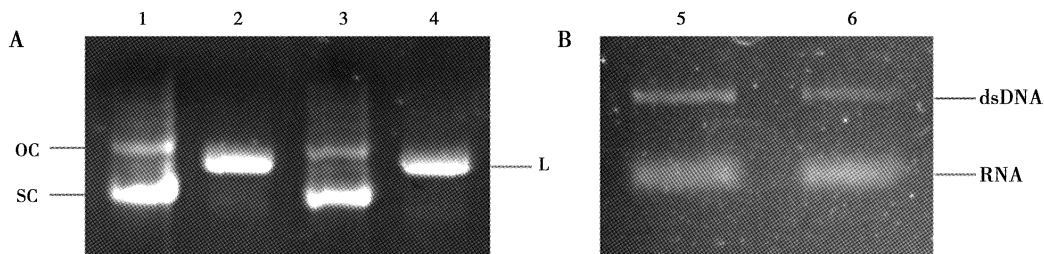


图 6 Pst I 完全线性化质粒 DNA(A) 以及体外转录 RNA 探针(B) 的琼脂糖凝胶电泳检测

Fig. 6 Detection of linearization of recombinant plasmids(A) and transcription of RNA probes(B) by electrophoresis

1, 3: 未线性化的重组质粒 DNA Unlinearized plasmids; 2, 4: 线性化的质粒 DNA Linearized plasmids; 1, 2: cDNA 正向插入的重组质粒 The recombinant plasmid DNA containing the forward inserts; 3, 4: cDNA 反向插入的重组质粒 The recombinant plasmid DNA containing the reverse inserts. OC: 开环质粒 DNA Open circle plasmid DNA; SC: 超螺旋质粒 DNA Supercoiled plasmid DNA; L: 线性化的质粒 DNA Linearized plasmid DNA. 5: 正义链 RNA 探针 The sense RNA probe; 6: 反义链 RNA 探针 The anti-sense RNA probe. 每个泳道中泳动较慢的带是线性化的质粒 DNA, 泳动较快的带是合成的 RNA 探针。In each lane, the DNA band moving slower represents the linearized plasmid DNA, and the faster one represents the newly synthesized RNA probe.

有两条带, 泳动较快的带对应于超螺旋质粒 DNA (supercoiled DNA, SC), 泳动较慢的带对应于开环质粒 DNA (open circle DNA, OC); 而两种线性化的质粒 DNA 在凝胶中均呈现一条线性单带 (linearized DNA, L)。这表明重组质粒线性化比较完全, 达到了作转录模板的要求。随后进行体外转录, 用乙醇沉淀合成的 RNA 探针, 溶于适当体积的 RNase-free H₂O 并进行电泳检测(图 6: B)。结果显示, 合成的 RNA 带型单一、清晰, 表明转录成功, 合成的探针 RNA 分子完整且没有发生降解。

2.5.2 *CYP4CE1* 基因的转录本在肠道组织的原位杂交定位: 通过整体原位杂交技术检测了 *CYP4CE1* 在取食 TN1 和 MH63 秧苗后的褐飞虱若虫肠道组织的表达部位。结果显示, 每组样品中的 5 个肠道组织的染色结果一样, 特别是染色信号的深浅和分布完全一致。代表性杂交结果见图 7。用正义链 RNA 探针与取食两种水稻的褐飞虱的肠道组织杂交后, 均检测不到杂交信号(图 7: A, C)。用反义链 RNA 探针与取食 TN1 秧苗的褐飞虱若虫肠道组织杂交后, 可以检测到较弱的杂交信号, 分布于前肠、中肠、后肠及马氏管, 表明该基因在整个肠道组织存在本底水平的表达(图 7: B); 用反义链 RNA 探针与取食 MH63 秧苗的褐飞虱若虫肠道组织杂交后, 可以检测到较强的杂交信号, 同样分布于前肠、中肠、后肠及马氏管, 这表明 *CYP4CE1* 受抗性水稻的诱导, 在肠道组织各区段表达水平明显升高(图 7: D)。

3 讨论

本研究中所使用的水稻 TN1 是一种籼稻品种 (Huang *et al.*, 1972), 田间表现完全感虫, 常被选作饲养褐飞虱等水稻害虫的材料或试验对照。水稻 MH63 在第 2 号染色体上有 1 个弱小的抗性位点 (Ren *et al.*, 2004)。与相同条件下相同生长期的 TN1 秧苗或植株相比, MH63 由于这个弱小的抗性位点的存在, 不会因褐飞虱的取食而快速衰老或死亡, 但在褐飞虱取食后, MH63 需要经历大幅度的分子反应和生理变化才能补偿褐飞虱取食造成的伤害, 并对褐飞虱的后续取食产生耐受性和一定的抗性 (Zhang *et al.*, 2004; Yuan *et al.*, 2005)。另一方面, 褐飞虱取食抗性较弱的 MH63 后, 体内也发生了分子水平的广泛变化, 包括一些解毒酶(如谷胱甘肽转移酶、羧酸酯酶及 CYP6 家族的 P450 单加

氧酶等)基因受诱导 (Yang *et al.*, 2005, 2006), 从而增强了褐飞虱的适应能力, 使得褐飞虱可以在 MH63 水稻上持续取食。褐飞虱与 MH63 的互作正反映了昆虫与宿主植物在进化中基于化学物质进行“军备竞赛”, 进而形成的相互斗争相互适应的“战争”格局 (Després *et al.*, 2007)。褐飞虱的 P450 是这场战争的重要参与者之一。本研究中比较了取食 TN1 与 MH63 秧苗的褐飞虱若虫 *CYP4CE1* 的表达量, 结果显示取食 MH63 秧苗后, 自 12 h 起的各时间段内, *CYP4CE1* 有 2.1 倍的过表达(图 4)。这表明 *CYP4CE1* 受抗性水稻 MH63 的诱导, 且由于褐飞虱的持续取食, 使得 *CYP4CE1* 始终维持高表达水平。

昆虫的肠道组织担负着消化食物和吸收营养的重要功能, 同时该组织也是病原微生物、杀虫剂及植物化合物的重要靶标。植食性昆虫取食后, 食物进入体内首先接触到的组织就是肠道, 除了其中的营养成分被吸收外, 其他的化合物包括有毒次生化合物也会直接在肠道被降解, 从而避免这些化合物的扩散对身体其他组织器官造成伤害 (Wigglesworth, 1972)。本研究利用 Northern 杂交分析显示, *CYP4CE1* 在取食 MH63 水稻的褐飞虱肠道组织的表达量大幅上升(图 5); 进一步通过整体原位杂交技术对 *CYP4CE1* 在褐飞虱肠道组织的表达部位及强度进行了检测。结果表明, 该基因在整个肠道组织包括马氏管都有表达, 并且取食抗性水稻 MH63 后表达水平明显增强(图 7)。据此推测 *CYP4CE1* 代谢来自 MH63 水稻的某种化合物的主要场所是肠道组织。此外, 褐飞虱取食 MH63 秧苗后, *CYP4CE1* 在脂肪体和体壁的表达水平略有上升, 可能是有少量的化合物扩散至这两类组织中的缘故(图 5)。

昆虫体内的脂肪体是能量代谢及能量物质转换的关键场所, 高海藻糖激素可调控脂肪酸氧化以获得能量, 进一步用于脂肪体中的糖原转化成海藻糖的生化过程, 海藻糖是昆虫体内常见的物质转化的中间体二糖分子。热带蟑螂的 *CYP4C1* 受高海藻糖激素的诱导, 因而 *CYP4C1* 可能参与脂肪酸的氧化过程 (Bradfield *et al.*, 1991)。本研究结果显示, *CYP4CE1* 在取食 TN1 水稻秧苗的褐飞虱的脂肪体表达量最高, 而后在取食 MH63 的褐飞虱的脂肪体依然保持高表达水平且略有上升(图 5)。又由于 *CYP4CE1* 与 *CYP4C1* 的氨基酸序列存在较高的同源性, 推测 *CYP4CE1* 除了参与水稻次生物质的代

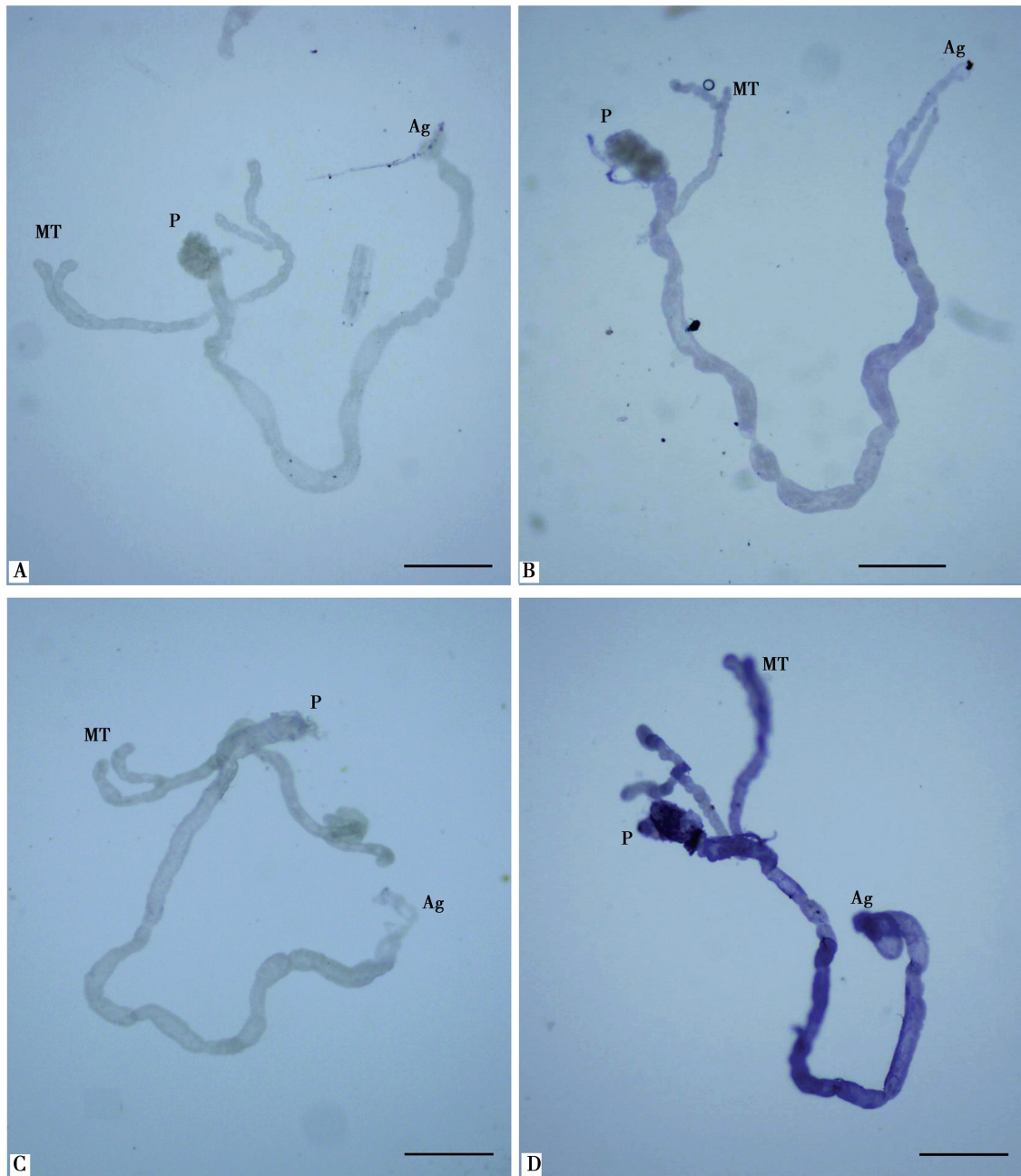


图 7 *CYP4CE1* 的转录本在褐飞虱若虫肠道组织中的原位杂交定位

Fig. 7 Localization of *CYP4CE1* transcripts in gut tissue of *Nilaparvata lugens* nymph by whole mount *in situ* hybridization

A: 用地高辛标记的正义链 RNA 探针与取食 TN1 秧苗的褐飞虱若虫肠道组织杂交的结果 Hybridization of a dissected gut of *N. lugens* nymph fed on TN1 seedlings by using sense RNA probe labeled with Digoxin; B: 用地高辛标记的反义链 RNA 探针与取食 TN1 秧苗的褐飞虱若虫肠道组织杂交的结果 Hybridization of a gut of *N. lugens* nymph fed on TN1 seedlings by using ant-sense RNA probe labeled with Digoxin; C: 用地高辛标记的正义链 RNA 探针与取食 MH63 秧苗的褐飞虱若虫肠道组织杂交的结果 Hybridization of a dissected gut of *N. lugens* nymph fed on MH63 seedlings by using sense RNA probe labeled with Digoxin; D: 用地高辛标记的反义链 RNA 探针与取食 MH63 秧苗的褐飞虱若虫肠道组织杂交的结果 Hybridization of a gut of *N. lugens* nymph subjected to MH63 seedlings by using ant-sense RNA probe labeled with Digoxin. Ag: 肠道前端 Anterior end of gut; P: 肠道末端 Posterior end of gut; MT: 马氏管 Malpighian tubules. 比例尺 Bar = 100 μ m.

谢之外, 很可能在褐飞虱正常的生长发育过程中参与脂肪体中的脂肪酸氧化。另有一些研究表明, 昆虫的一些 CYP4 家族的 P450 基因的表达受其他激素调控。如灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis* 的 P450 基

因 *CYP4L8* 和 *CYP4MI2* 以及黑腹果蝇 *D. melanogaster* 的 P450 基因 *CYP4AC1*, *CYP4AC3*, *CYP4AD1* 及 *CYP4DI* 的表达均受到蜕皮激素的强烈抑制 (Davies *et al.*, 2006)。蟑螂的 *CYP4C1* 表达

受保幼激素的抑制(Lu *et al.*, 1999)。我们将在近期利用添加不同激素的人工饲料饲喂褐飞虱若虫, 进一步研究 *CYP4CE1* 受不同激素调控的表达谱。

此前我们还证实了褐飞虱 CYP6 家族的两个 P450 基因 *CYP6AX1* 和 *CYP6AY1* 受水稻抗性诱导(Yang *et al.*, 2007)。这些研究结果表明褐飞虱体内至少有 CYP4、6 家族的多个基因参与褐飞虱与抗性水稻的互作过程, 揭示了褐飞虱体内 P450 基因种类的多样性及功能的复杂性; 从一个侧面反映了抗性水稻产生的次生物质的数量、种类及毒性强弱一定程度上决定了该水稻品种的抗性, 这在抗性育种中是一个值得考虑的问题。

参 考 文 献 (References)

- Ai JW, Dong YL, Kong WQ, Yang JH, Liu J, Zhang YL, Zhang XS, Liu ZY, Zhu Y, 2007. Molecular cloning and sequence analysis of a novel cytochrome P450 gene, CYP6AE2, from silkworm, *Bombyx mori*. *Sci. Sericul.*, 33(3): 380–386. [艾均文, 董元凌, 孔卫青, 杨金宏, 刘劲, 张永亮, 张学松, 柳照应, 朱勇, 2007. 家蚕细胞色素 P450 基因 CYP6AE2 的分子克隆与序列分析. *蚕业科学*, 33(3): 380–386]
- Bradfield JY, Lee YH, Keeley LL, 1991. Cytochrome P450 family 4 in a cockroach: Molecular cloning and regulation by regulation by hypertrehalosemic hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 4 558–4 562.
- Chen F, Fu Q, Luo J, Gui LY, 2008. Progress in research of rice variety resistance to *Nilaparvata lugens* and virulence variation of *Nilaparvata lugens*. *J. Yangtze Uni.*, 5(1): 5–10. [陈峰, 傅强, 罗举, 桂连友, 2008. 水稻品种对褐飞虱的抗性及褐飞虱致害性变异研究进展. *长江大学学报*, 5(1): 5–10]
- Danielson PB, Foster JL, McMahlil MM, Smith MK, Fogleman JC, 1998. Induction by alkaloids and phenobarbital of Family 4 cytochrome P450s in *Drosophila*: Evidence for involvement in host plant utilization. *Mol. Gen. Genet.*, 259: 54–59.
- Danielson PB, Macintyre RJ, Fogleman JC, 1997. Molecular cloning of a family of xenobiotic-inducible drosophilid cytochrome P450s: Evidence for involvement in host-plant allelochemical resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 10 797–10 802.
- Dauphin-Villemant C, Böcking D, Tom M, Maibèche M, Lafont R, 1999. Cloning of a novel cytochrome P450 (CYP4C15) differentially expressed in the steroidogenic glands of an arthropod. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 264: 413–418.
- David JP, Boyera S, Mesneub A, Ballc A, Ransonc H, Dauphin-Villemant C, 2006. Involvement of cytochrome P450 monooxygenases in the response of mosquito larvae to dietary plant xenobiotics. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 36: 410–420.
- Davies L, Williams DR, Aguiar-Santana IA, Pedersen J, Turner PC, Rees HH, 2006. Expression and down-regulation of cytochrome P450 genes of the CYP4 family by ecdysteroid agonists in *Spodoptera littoralis* and *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 36: 801–807.
- Després L, David JP, Gallet C, 2007. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. *Trends Ecol. Evol.*, 22: 298–307.
- Fogleman JC, Danielson PB, MacIntyre RJ, 1998. The molecular basis of adaptation in *Drosophila* – the role of cytochrome P450s. *Evol. Biol.*, 30: 15–77.
- Huang CH, Chang WL, Chang TT, 1972. Ponlai varieties and Taichung Native 1. In: Rice Breeding. IRRI. 31–46.
- Li XC, Baudry J, Berenbaum MR, Schuler MA, 2004. Structural and functional divergence of insect CYP6B proteins: from specialist to generalist P450. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 2 939–2 944.
- Li XC, Schuler MA, Berenbaum MR, 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Ann. Rev. Entomol.*, 52: 231–253.
- Lu KH, Bradfield JY, Keeley LL, 1999. Juvenile hormone inhibition of gene expression for cytochrome P450C1 in adult females of the cockroach, *Blaberus discoidalis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29: 667–673.
- Lü ZX, Yu XP, Zheng XS, Chen JM, 1997. Variation in virulence of the brown planthopper to resistant rice varieties and its relation to the changes in the activities of endogenous enzymes. *Acta Entomol. Sin.*, 40(Suppl.): 122–127. [吕仲贤, 俞晓平, 郑许松, 陈建明, 1997. 褐飞虱致害性变异过程及其体内酶的变化. *昆虫学报*, 40(增刊): 122–127]
- Matteson PC, 2000. Insect pest management in tropical Asian irrigated rice. *Annu. Rev. Entomol.*, 45: 549–574.
- Niu G, Wen Z, Rupasinghe SG, Zeng RS, Berenbaum MR, Schuler MA, 2008. Aflatoxin B1 detoxification by CYP321A1 in *Helicoverpa zea*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 69: 32–45.
- Ren X, Weng QM, Zhu LL, He GC, 2004. Dynamic mapping of quantitative trait loci for brown planthopper resistance in rice. *Cereal Res. Commun.*, 32: 31–38.
- Sasabe M, Wen Z, Berenbaum MR, Schuler MA, 2004. Molecular analysis of CYP321A1, a novel cytochrome P450 involved in metabolism of plant allelochemicals (furanocoumarins) and insecticides (cypermethrin) in *Helicoverpa zea*. *Gene*, 338: 163–175.
- Snyder MJ, Stevens JL, Andersen JF, Feyereisen R, 1995. Expression of cytochrome P450 genes of the CYP4 family in midgut and fat body of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 321: 13–20.
- Stevens JL, Snyder MJ, Koener JF, Feyereisen R, 2000. Inducible P450s of the CYP9 family from larval *Manduca sexta* midgut. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30: 559–568.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG, 1997. The ClustalX windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 24: 4 876–4 882.
- Wang CZ, Yu J, Pei QL, Liu PQ, Cai ZQ, Zhang L, Wu SM, 2008. Research progress on breeding of rice varieties for resistance to brown planthopper. *J. Anhui Agric. Sci.*, 36(8): 3 170–3 173. [王传之, 于洁, 裴庆利, 刘丕庆, 蔡中全, 张磊, 吴世民,

2008. 水稻品种抗稻褐飞虱育种的研究进展. 安徽农业科学, 36(8): 3 170 - 3 173]
- Wang D, Xu YX, Wei ZG, Zhao HQ, Chen YH, Li B, Shen WD, 2006. Cloning and sequence analysis of CYP6B29 gene - a member of cytochrome P450 family from silkworm, *Bombyx mori*. *Sci. Sericul.*, 32(3): 328 - 332. [王东, 许雅香, 卫正国, 赵华强, 陈玉华, 李兵, 沈卫德, 2006. 家蚕细胞色素 P450 家族 CYP6B29 的克隆与序列分析. 蚕业科学, 32(3): 328 - 332]
- Watanabe T, Kitagawa H, 2000. Photosynthesis and translocation of assimilates in rice plants following phloem feeding by the planthopper *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). *J. Econ. Entomol.*, 93: 1 192 - 1 198.
- Wigglesworth VB, 1972. *The Principles of Insect Physiology*. 7th ed. Chapman & Hall, London. 827 pp.
- Yang ZF, Yang HY, He GC, 2007. Cloning and characterization of two cytochrome P450 CYP6AX1 and CYP6AY1 cDNAs from *Nilaparvata lugens* Stål (Homoptera: Delphacidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 64: 88 - 99.
- Yang ZF, Zhang FT, He Q, He GC, 2005. Molecular dynamics of detoxification and toxin-tolerance genes in brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål., Homoptera: Delphacidae) feeding on resistant rice plants. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 59: 59 - 66.
- Yang ZF, Zhang FT, Zhu LL, He GC, 2006. Identification of differentially expressed genes in brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) responding to host plant resistance. *Bull. Entomol. Res.*, 96: 53 - 59.
- Yuan HY, Chen XP, Zhu LL, He GC, 2005. Identification of genes responsive to brown planthopper *Nilaparvata lugens* Stål (Homoptera: Delphacidae) feeding in rice. *Planta*, 221: 105 - 112.
- Yue LN, Yang YH, Wu SW, Wu YD, 2007. Cloning and mRNA expression levels of cytochrome P450 genes *CYP6AE12* and *CYP9A18* in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Acta Entomol. Sin.*, 50(3): 234 - 240. [岳丽娜, 杨亦桦, 武淑文, 吴益东, 2007. 棉铃虫 P450 基因 *CYP6AE12* 和 *CYP9A18* 的克隆与 mRNA 表达水平. 昆虫学报, 50(3): 234 - 240]
- Zhang FT, Zhu LL, He GC, 2004. Differential gene expression in response to brown planthopper feeding in rice. *J. Plant Physiol.*, 161: 53 - 62.
- Zhou YH, Han ZJ, Zhang XM, Pang C, 2003. Influence of rice varieties on the metabolizing enzymes of *Nilaparvata lugens* Stål. *J. Nanjing Agric. Uni.*, 26(2): 24 - 28. [周亦红, 韩召军, 张小敏, 庞超, 2003. 水稻品种对褐飞虱代谢酶的影响. 南京农业大学学报, 26(2): 24 - 28]

(责任编辑: 赵利辉)