

绿盲蝽 P450 基因的克隆及增效醚对 P450 酶活性的抑制作用^{*}

许新新 谭 瑶 高希武^{**}

(中国农业大学昆虫系 北京 100193)

摘 要 为探讨 P450 介导的绿盲蝽 *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür) 抗药性机制, 合理使用杀虫药剂, 本研究通过活体和离体抑制实验发现, 增效醚(PBO)对绿盲蝽 P450 酶活性有显著的抑制作用: 在处理时长为 24 h 时, P450 酶活性由未处理时的 12.02 pmol/min/mgPro. 下降至 1.63 pmol/min/mgPro., PBO 对 P450 酶的抑制中浓度为 0.256 mmol/L。生物测定结果表明, PBO 对三氟氯氰菊酯具有显著增效作用, 增效 7.2 倍, 而对吡虫啉、灭多威、马拉硫磷无显著增效作用。利用 RT-PCR 及 RACE 技术对绿盲蝽 P450 基因进行克隆, 获得了 2 条 *CYP4* 家族基因, 全长均为 1 631 bp, 含有完整的开放阅读框, 编码 501 个氨基酸; 序列比对表明这是一对等位基因, 含有 *CYP4* 家族所有保守特征序列; 同源性比较及系统发育分析显示这 2 个基因编码的氨基酸序列与褐飞虱 *Nilaparvata lugens* *CYP4CE1* 亲缘关系最近, 同源性分别为 41.5% 和 41.1%。

关键词 绿盲蝽, 增效醚, P450, 基因克隆

Cloning of the P450 genes of *Apolygus lucorum* and the inhibition of piperonyl butoxide by cytochrome P450

XU Xin-Xin TAN Yao GAO Xi-Wu^{**}

(Department of Entomology, China Agriculture University, Beijing 100193, China)

Abstract The inhibition of cytochrome P450 activity by piperonyl butoxide (PBO), and its synergistic effects against insecticides, were investigated *in vivo* and *in vitro* in *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür). Results show that PBO synergized cyhalothrin toxicity; the synergistic ratio was 7.2. PBO possessed the potential to inhibit the activity of cytochrome P450 *in vitro* and *in vivo*. The IC_{50} of PBO was 0.256 mmol/L. 24 h after the topical application of PBO, the activity of cytochrome P450 decreased from 12.02 pmol/min/mg Pro. to 1.63 pmol/min/mg Pro. Two novel full-length *CYP4* cDNAs of cytochrome P450 were isolated from *A. lucorum* using the RACE method. Each *CYP4* cDNA sequence is 1 631 bp and contains an open reading frame encoding 501 amino acids. Multiple sequence alignment demonstrated that the consistent homology rate of the prognosis within the two amino acid sequences was 98.7%, indicating that they are a pair of alleles. Phylogenetic analysis showed that the two genes were most homologous with *CYP4CE1* of *Nilaparvata lugens* with homologies of 41.5% and 41.1%, respectively.

Key words *Apolygus lucorum*, piperonyl butoxide, cytochrome P450, insecticide

绿盲蝽 *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür) 属半翅目 (Hemiptera) 盲蝽科 (Miridae) 后丽盲蝽属 (*Apolygus*), 寄主范围广泛, 有 38 科 147 种之多, 其中主要有锦葵科、豆科、菊科、十字花科及多种果树林木等 (徐文华等, 2007)。近年来, 由于农业

产业结构的调整, 果树和蔬菜种植面积的大幅度增加, 为绿盲蝽提供了丰富的寄主植物和适宜的越冬场所, 同时由于转 *Bt* 基因棉的大量种植, 防治棉铃虫的杀虫药剂的使用量减少, 导致刺吸性害虫数量急剧上升, 而长期以来一直处于次要地

^{*} 资助项目: 国家重点基础研究发展规划项目 (973 计划) (2009CB119200)、公益性行业 (农业) 科研专项 (201103012)。

^{**} 通讯作者, E-mail: gaowu@263.net.cn

收稿日期: 2012-02-06, 接受日期 2012-02-20

位的绿盲蝽已成为棉田的主要害虫 (Men *et al.*, 2005; 陆宴辉等, 2007; 门兴元等, 2008; 魏书艳等, 2010)。目前, 化学防治是控制绿盲蝽危害的主要手段, 但是, 化学农药的长期大量使用容易引起害虫产生抗药性, 而使用增效剂可降低农药的使用量, 是延缓害虫抗药性产生的一种重要手段 (赵宝祥, 1989)。

增效醚 (piperonyl butoxide, 简称 PBO) 属于亚甲基二氧苯基化合物 (简称 MDP 类化合物), 是目前国际公认的最好的增效剂之一, 其增效作用与药剂品种、害虫种类、害虫对农药的抗性状况及抗性机制密切相关, 并常作为多功能氧化酶的专一性抑制剂被广泛应用于昆虫抗药性机制研究 (Jewess, 1999; 吴益东等, 2000)。而细胞色素 P450 (cytochrome P450, 简称 P450) 是多功能氧化酶系的核心部分, 在整个酶系的氧化代谢中起着末端氧化的作用 (Isin and Guengerich, 2007)。研究发现, P450 能够参与昆虫体内多种外源物质和内源物质的代谢, 其含量的升高和活性的增强是害虫抗药性产生的主要原因之一 (艾国民等, 2009)。Baek 等 (2010) 通过 PBO 对 P450 酶活性抑制作用实验发现小菜蛾对拟除虫菊酯的抗性与 P450 酶活性增强有关, 吴益东等 (2000) 亦通过研究发现 PBO 处理可使棉铃虫细胞色素 P450 含量下降。然而, 关于 PBO 对绿盲蝽 P450 酶抑制作用的研究尚未见报道。

近年来, 昆虫 P450 研究取得了显著进展, 特别是 P450 基因的发现, 为我们从分子水平了解 P450 的多样性、结构与功能以及 P450 在昆虫抗药性中的作用机制奠定了基础。至 2009 年 Genbank 中注册的昆虫 P450 基因序列已超过 1 000 个, 而其中的全长序列大部分属于 *CYP4* 和 *CYP6* 家族 (郭亭亭等, 2009)。通常认为 *CYP6* 家族基因与杀虫药剂抗性关系密切, 但也有报道表明 *CYP4* 家族基因在昆虫抗性品系中过量表达 (李秀兰, 2006; Lyndsay *et al.*, 2006), 说明 *CYP4* 家族基因亦与昆虫抗药性的产生有关。尽管目前已经有大量关于鳞翅目、双翅目、同翅目昆虫 P450 基因克隆及其与抗药性关系的报道 (艾颖, 2004; Diana *et al.*, 2004; 张云华, 2010), 但对绿盲蝽 P450 基因克隆及其 PBO 对 P450 活性离体和活体的抑制作用还未见报道。

本研究通过对绿盲蝽 P450 基因克隆、PBO 预

处理对 P450 活性的抑制作用及其对不同类型药剂的增效作用对 P450 介导的绿盲蝽抗药性机制进行探讨, 为合理使用杀虫药剂防治绿盲蝽提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试虫源及饲养

绿盲蝽由中国农业科学院植物保护研究所廊坊试验站于 2008 年 5 月提供, 以新鲜四季豆为饲料, 在本实验室内连续多代饲养, 未接触任何农药, 饲养温度 (26 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 50% ~ 60%, 光周期 L:D = 16:8。

1.2 试剂与器材

98% 增效醚 (piperonyl butoxide) 购自美国 Chem Service 公司; 90% 灭多威 (methomyl) 原药; 95.25% 吡虫啉 (imidacloprid) 原药、96% 三氟氯氰菊酯 (cyhalothrin) 原药均购自江苏常隆化工有限公司; 96% 马拉硫磷 (malathion) 原药购自德州植东农药化工有限公司; 苯甲基磺酰氟 (PMSF, 99.0% 纯度)、NADPH (98% 纯度)、牛血清白蛋白 (BSA) 均为 Sigma-Aldrich 公司产品; Tris-base、二硫苏糖醇 (DTT, 99% 纯度) 为美国 Promega 公司产品; 7-乙氧基香豆素 (7-ethoxycoumarin)、7-羟基香豆素 (7-hydroxycoumarin) 购自 Alfa Aesar 公司; 考马斯亮蓝 G-250 为 Fluka 公司进口, 上海化学试剂公司分装; 乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)、甘氨酸 (Gly)、三氯乙酸 (TCA)、甘油、85% 磷酸、丙酮、 KH_2PO_4 及 Na_2HPO_4 为北京化学试剂公司产; TRIzol[®] Reagent 购自 Invitrogen 公司, PrimeScript[™] 1st Strand cDNA Synthesis Kit、3' Full RACE Core Set Ver. 2.0、rTaq 聚合酶、LA Taq 聚合酶、dNTP Mix、DNA 快速回收纯化试剂盒、DNA Marker DL2000 购自 TaKaRa 公司, pGEM[®] -T Easy Vector System1、IPTG、X-gal 购自 Promega 公司, SMART[™] RACE cDNA Amplification Kit 购自 Clontech 公司, 大肠杆菌 DH5 α 感受态购自 Biomed 公司, 蛋白胨和酵母粉购自 OXOID 公司, 琼脂糖购自 Spanish 公司, Tris 饱和酚购自北京鼎国生物技术发展中心, EB 和氨苄青霉素购自 Sigma 公司。

5417C/R 型台式高速冷冻离心机 (Eppendorf, Germany); LS-55 荧光分光光度计 (Perkin Elmer,

USA); Bio-40 紫外-可见分光光度仪 (Perkin Elmer, USA); Sartorius 2004M 电子天平 (Opton, Germany); SPH-100B 型摇床 (上海世平实验设备有限公司); 水浴锅 (上海科技器材有限公司)。Biometra Tcradient PCR 仪、mini-sub cell GT 型电泳槽、power/PAC 3000 型电泳仪 (Bio-Rad 公司); 紫外成像仪 Multimage Light Cabinet (Alpha Innotech 公司); HZQ-C 型空气浴恒温振荡器 (哈尔滨市东联电子技术开发有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 生物测定 选取发育整齐的绿色盲蝽 3 日龄成虫若干, 将药剂用丙酮稀释成 5~8 个浓度梯度, 用半自动点滴仪点滴在虫体腹面, 每个浓度处理 10 头, 重复 3 次, 以丙酮处理作为对照。处理过的试虫转入放有新鲜四季豆的生测杯中, 用纱布将生测杯罩口封好, 皮筋绑紧, 置于环境条件为温度 $(26 \pm 2)^\circ\text{C}$ 、相对湿度 50%~60%、光周期 L:D=16:8 的温室内, 24 h 后检查死亡率, 以锐器轻触虫体, 无明显反应者视为死亡。在测定 PBO 的增效作用时, 将 PBO 以 30 ng/头的亚致死剂量预处理试虫 1 h 后, 再进行药剂的毒力测定。参照陈娇 (2007) 的方法, 利用 POLO 软件计算 LD_{50} 和 95% 置信限, 并计算增效比 (SR), 利用增效比和 95% 置信限是否有重叠来判断 PBO 对药剂的增效作用。

1.3.2 PBO 对 P450 酶活性抑制作用的研究 利用荧光分光光度计检测 P450 对 7-乙氧基香豆素 (7-ethoxycoumarin) 的脱乙基活性以测定 P450 酶活性 (William *et al.*, 1978; 郑炳宗等, 1989), 具体方法如下:

(1) 取样 参照于彩虹等 (2002) 的方法, 略作改进: 绿色盲蝽按 6 头/mL 比例加入 0.1 mol/L、pH 为 7.5 的磷酸盐缓冲液 (含 1 mmol/L EDTA、1 mmol/L PMSF、1 mmol/L DTT 和 10% 甘油) 匀浆, 4°C , 10 800 r/min 离心 15 min, 过滤上清液作为酶液用于 ECOD 活性和蛋白含量的测定。其中, 活体抑制实验选取经过 PBO 亚致死剂量 (30 ng/头) 预处理 6、12、24 h 后, 保存于 -80°C 冰箱的绿色盲蝽材料; 离体抑制实验则用未用药剂处理的绿色盲蝽为材料, 以 Tris-HCl 缓冲液稀释 PBO 母液 (0.097 mol/L) 成 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} mol/L 6 个浓度梯度作为抑制剂进行测定。酶液蛋白含

量测定用 Bradford (1976) 方法。

(2) ECOD 活性测定 参照 William 等 (1978) 的方法, 略作改进: 总反应体系为 910 μL , 其中含 pH 7.8 Tris-HCl 缓冲液 650 μL 、10 mmol/L NADPH 5 μL 、0.05 mmol/L 7-乙氧基香豆素 25 μL 、酶液 230 μL , 对照中不加酶液; 于 35°C , 220 r/min 恒温摇床中孵育 15 min, 以 300 μL 15% 的 TCA 溶液终止反应, 并向对照管中补加 230 μL 酶液; 转入 1.5 mL 离心管中, 4°C , 10 800 r/min 离心 1 min, 加入 1.6 mol/L、pH 10.5 的 Gly-NaOH 溶液 500 μL , 充分混匀, 用荧光分光光度计测定荧光值 (激发波长 356 nm, 散发波长 465 nm)。

(3) 数据统计分析 根据比活力公式计算绿色盲蝽 ECOD 的活性:

比活力 (pmol/min/mgPro.) = $(\text{OD} \times V_{\text{总}}) / (T \times \text{Pro.} \times V_{\text{酶}})$ 。

其中, OD 为反应产物 7-羟基香豆素含量 (pmol/mL); $V_{\text{总}}$ 为反映总体积 (mL); T 为反应时间 (min); Pro. 为原酶液蛋白含量 (mg/mL); $V_{\text{酶}}$ 为反应酶液体积 (mL)。

根据不同浓度 PBO 对绿色盲蝽 ECOD 体外抑制曲线求出 PBO 对绿色盲蝽 ECOD 体外抑制中浓度 IC_{50} 。

1.3.3 CYP4 家族 P450 基因全长 cDNA 序列的克隆 取绿色盲蝽 3 日龄成虫 8 头用 TRIzol® Reagent 试剂盒提取总 RNA。按 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒说明将提取的总 RNA 反转录成 RT-PCR cDNA。根据文献 (杨芸, 2009) 设计合成简并引物 FP、RP, 用于克隆绿色盲蝽 P450 CYP4 家族基因的核心片段, 反应条件为: 94°C 预变性 5 min; 94°C 30 s, 50°C 30 s, 72°C 30 s, 35 个循环; 72°C 延伸 10 min; 4°C 保持。PCR 产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测、分离目的条带, 使用 DNA 快速回收纯化试剂盒回收 DNA, 将其连接到 pGEM-T Easy Vector 上, 并转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 用涂有 IPTG 和 X-gal 的平板通过蓝白斑筛, 选取阳性重组子, 送由 Invitrogen 公司完成测序。利用 DNAMAN Version 5.2.2 软件进行序列分析和比较。

在 NCBI 网站上进行 Blast 同源性分析, 根据其中 1 条 cDNA 片段使用 Primer Premier 5.0 软件设计 2 条 3'RACE 特异性引物 GSP3-1、GSP3-2, 以及 2 条 5'RACE 特异性引物 GSP5-1、GSP5-1, 使用

3'Full RACE Core Set Ver. 2.0 及 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 进行巢式 PCR,扩增出 3'和 5'cDNA 末端,将扩增产物克隆并测序。将获得的 3'及 5'cDNA 末端序列拼接得到 cDNA 全长,设计全长特异性引物 CL-F、CL-R 用以进行 cDNA 全长扩增,以避免拼接产物的 3'和 5' cDNA 末端来自于不同的基因,反应条件为:94℃ 预变性 5 min; 94℃ 30 s,50℃ 30 s,72℃ 30 s,35 个循环;72℃ 延伸 10 min;4℃ 保持。将扩增产物克隆并测序。以上引物皆由 Invitrogen 公司合成,具体序列见表 1。

利用 DNAMAN Version 5.2.2 软件对核苷酸序列进行翻译,得到相应的氨基酸序列;Blast 同源比对在 NCBI 网站进行 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>);利用 Protparam 软件 (<http://expasy.org/tools/protparam.html>) 分析氨基酸序列的理化性质;利用在线工具 SignalP 3.0 Server 分析 N 末端信号肽序列 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>);从 GenBank 数据库中收集其它昆虫细胞色素 P450 基因序列,利用 MEGA4.0 构建 P450 的分子进化树。

表 1 基因克隆所用引物

Table 1 Primers used in cDNA cloning

引物名称 Primer name	寡核苷酸序列 Oligonucleotide sequence(5'→3')
FP	GAYACNTTYATGTTYRARGGNCAYG
RP	GCRAAYTTYTGNCDDATRCARTT
GSP3-1	CCTTCCATTGCCAGGTTATT
GSP3-2	ATCTACATCATCCTTACCCACC
GSP5-1	GAACCTTGGCACCCGCAGGAATAATA
GSP5-2	GAACCTTGGCACCCGCAGGAATAATA
CL-F	CTTCCTACATTCTGCGTGATTTTCT
CL-R	CCCCTCCCCACCTCATATTTATTACT

2 结果与分析

2.1 PBO 对 4 种杀虫药剂的增效作用

表 2 显示出 PBO 对拟除虫菊酯类杀虫药剂三氟氯氰菊酯具有显著的增效作用,增效比为 7.2:1 且 95% 置信限无重叠,而对新烟碱类杀虫药剂吡虫啉、氨基甲酸酯类杀虫药剂灭多威、有机磷类杀虫药剂马拉硫磷的增效作用不显著。

表 2 PBO 对绿盲蝽对 4 种杀虫药剂的增效作用

Table 2 Synergism of PBO to four types of insecticides in *Apolygus lucorum*

混合物 Compound	斜率 Slope(± SE)	χ^2	LD ₅₀ (95% FL) (ng/individual)	增效比率 SR ^a
吡虫啉 Imidacloprid	2.679 ± 0.640	11.88	6.067 (6.529—14.777)	1.8
+ PBO	1.807 ± 0.481	20.68	3.421 (2.645—8.120)	
灭多威 Methomyl	2.338 ± 0.550	10.16	9.392 (9.229—21.824)	1.6
+ PBO	3.565 ± 0.884	12.87	5.709 (5.831—12.629)	
马拉硫磷 Malathion	3.198 ± 0.740	5.89	5.632 (6.307—12.207)	1.0
+ PBO	3.150 ± 0.919	12.41	5.367 (5.446—11.693)	
三氟氯氰菊酯 Cyhalothrin	1.391 ± 0.243	7.20	5.132 (4.387—14.066)	7.2
+ PBO	0.689 ± 0.177	6.56	0.709 (0.097—3.554)	

注:a:增效比率 Synergism ratio = LD₅₀ of CK/LD₅₀ of PBO.

2.2 PBO 对绿盲蝽 P450 的抑制作用

图 1 显示出 PBO 处理绿盲蝽后绿盲蝽 P450 7-乙氧基香豆素去乙基化 (ECOD) 活性抑制作用随时间的变化。在 24 h 内,处理初期随着 PBO 处理时间增加,对 ECOD 活性抑制率增大,抑制作用增强;在处理 6 h 时,PBO 处理使绿盲蝽 ECOD 活性由 12.02 pmol/min/mgPro. 迅速下降至 3.37 pmol/min/mgPro.,抑制率为 71.9%,随后抑制率缓慢增加,至 24h 时达到 86.5%;与丙酮处理组相

比,在 6、12、24 h 时 PBO 处理组酶活性分别为丙酮处理组酶活性的 60.7%、76.2% 和 63.9%。

图 2 显示出 PBO 对绿盲蝽 ECOD 活性离体抑制作用。在 PBO 浓度达到 10⁻² mol/L 时,其对 ECOD 活性的抑制率也仅有 68.1%;随 PBO 浓度的降低,其对绿盲蝽 ECOD 活性的抑制率下降。PBO 对绿盲蝽 ECOD 的抑制中浓度 (IC₅₀) 为 0.256 mmol/L。

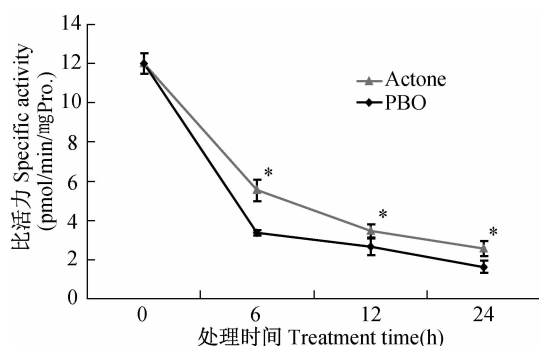


图1 PBO 不同处理时间对绿盲蝽
ECOD 活性的影响

Fig.1 Effect of PBO pre-treatment times on
ECOD activity against *Apolygus lucorum*

* 表示同一时间点对照组和 PBO 处理组 ECOD
比活力差异显著 (t -检验, $P = 0.05$)。

* : The specific activity of ECOD in *Apolygus lucorum*
treated with acetone and PBO are significantly different
(t -test, $P = 0.05$) at same time point.

2.3 CYP4 家族 P450 基因全长 cDNA 序列的克隆

利用简并引物扩增出一条与目的片段大小一

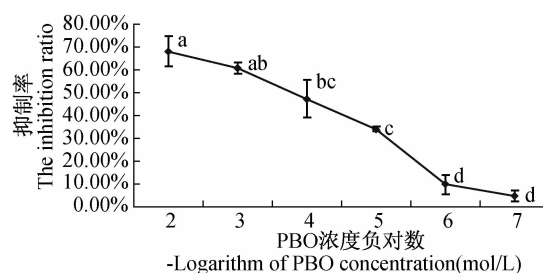


图2 不同浓度 PBO 对绿盲蝽 ECOD
活性的抑制率

Fig.2 *In vitro* inhibition of ECOD activity
with different concentrations of PBO

显著性分析方法为单因素方差分析;

同行中不同小写字母代表不同处理差异显著。

Significant difference analytical method is One-Way
ANOVA; data in the same line followed by different
letters are significantly different.

致的 DNA 条带 (图 3:A), 经回收纯化、连接、转
化、测序得到 3 条不同的核苷酸序列, 长约 450
bp, 分别记作 F1、F14、F15。将这 3 条序列提交到
NCBI 上进行 BlastP 比对发现它们与 P450 CYP4
家族同源性最高。根据 F15 的核苷酸序列设计合

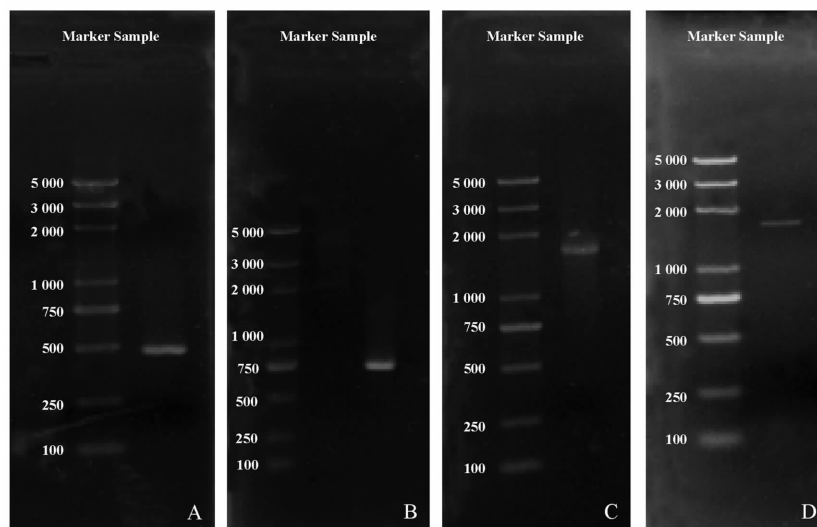


图3 Cyt P450 基因 PCR 产物琼脂糖电泳图谱

Fig.3 Agarose gel electrophoresis for the Cyt P450 gene

A: Cyt P450 基因片段 PCR 产物琼脂糖电泳图谱 agarose gel electrophoresis for the fragment of Cyt P450
gene; B: 3'-RACE Inner PCR 产物琼脂糖电泳图谱 agarose gel electrophoresis for the product of 3'-RACE
Inner PCR; C: 5'-RACE Inner PCR 产物琼脂糖电泳图谱 agarose gel electrophoresis for the product of 5'-
RACE Inner PCR; D: cDNA 全长 PCR 产物琼脂糖电泳图谱 agarose gel electrophoresis for the
product of the full-length cDNA PCR.

成 3'-RACE 特异性引物 GSP3-1、GSP3-2 及 5'-RACE 特异性引物 GSP5-1、GSP5-2, 分别进行 3'-RACE 巢式 PCR 和 5'-RACE 巢式 PCR, 皆获得单一的目的条带, 电泳结果如图 3(B, C) 所示, 其中 3'cDNA 末端长约 750 bp, 5'cDNA 末端长约 1 800 bp。将目的条带的克隆测序结果拼接获得全长 cDNA, 并据此设计全长特异性引物 CL-F、CL-R 进行 cDNA 全长扩增, 电泳结果如图 3(D) 所示。将扩增产物克隆并测序, 得到 2 条长度皆为 1 631 bp 的核苷酸序列, 与 3'-RACE、5'-RACE 拼接序列的一致性皆在 98% 以上, 暂将这 2 条序列命名为 *CYP4v1* 和 *CYP4v2*。

利用 DNAMAN Version 5. 2. 2 软件对 *CYP4v1*、*CYP4v2* 进行序列分析(图 4, 5), 结果表明这 2 条全长 1 631 bp 的 cDNA, 均包括 5'非编码区 67 bp, 3'非编码区 119 bp(具有典型的加尾信号 aataa), 开放阅读框(ORF) 1 503 bp, 推导的氨基酸序列以甲硫氨酸为起始氨基酸, 长为 501 个氨基酸残基。根据 SignalP 3. 0 Server 在线分析, 预测 *CYP4v1*、*CYP4v2* 氨基酸序列的 N 端信号肽位置, 其中, *CYP4v1* 氨基酸序列从起始的甲硫氨酸开始, 可能的切割位点位于第 22 位甘氨酸与第 23 位苏氨酸之间, 说明前 22 个氨基酸残基为信号肽序列; 而 *CYP4v2* 氨基酸序列可能的切割位点位于第 23 位苏氨酸与第 24 位缬氨酸之间, 因此预测前 23 个氨基酸残基为其信号肽序列。利用 ProtParam 在线软件预测 *CYP4v1* 氨基酸序列的理论分子量为 57. 33 ku, 等电点为 8. 36; *CYP4v2* 氨基酸序列的理论分子量为 57. 41 ku, 等电点为 8. 35。

氨基酸多重序列比对发现 *CYP4v1*、*CYP4v2* 推导的氨基酸序列同源性高达 98. 7%, 根据国际细胞色素 P450 命名委员会规定, P450 基因编码蛋白的同源性在 97% 以上便可认定为等位基因, 因此认为 *CYP4v1* 和 *CYP4v2* 是等位基因。氨基酸序列分析发现这 2 条序列都含有细胞色素 P450 的特征序列, 如: 血红素结合区保守序列 F × × G × × × C × G(439 ~ 448)、C 螺旋 N 端保守序列 W × × × R(128 ~ 132)、K 螺旋保守序列 E × × R(365 ~ 368)、以及微粒体 P450 酶保守区 PERF 序列, 从而确认基因 *CYP4v1*、*CYP4v2* 是绿盲蝽的 P450 基因。同时发现这 2 条序列皆含有 *CYP4* 家族特有的 13 个氨基酸序列 EVDTFMFE/AGHDT/ST(300

~ 312), 同源性分析亦表明它们与褐飞虱 *CYP4CE1* 相似性最高, 分别为 41. 50% 和 41. 11%, 因此认为这 2 个基因属于细胞色素 P450 第 4 家族基因。

从 Genbank 数据库中收集了来自 12 种昆虫的 20 条细胞色素 P450 *CYP4* 家族相关基因的氨基酸序列, 采用 MEGA 4 软件的 Neighbor-Joining 方法构建系统发育树(图 6)。结果显示 *CYP4v1*、*CYP4v2* 推导的氨基酸序列与来源于褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 的 *CYP4CE1* 被聚类在同一进化分支, 表明它们的亲缘关系最近, 其次是来源于德国小蠊 *Blattella germanica* 的 *CYP4C21*、果蝇 *Drosophila melanogaster* 的 *CYP4C3*、盘状蟑螂 *Blaberus discoidalis* 的 *CYP4C1*; 与致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* 的 *CYP4A7* 亲缘关系最远。

3 讨论

PBO 对杀虫药剂的增效作用与防治对象、药剂品种、增效剂的使用剂量和预处理时间有关。本研究通过生物测定选择 PBO 对绿盲蝽的最高不致死剂量(30 ng/头)对绿盲蝽进行预处理 1 h, 然后分别对 4 种药剂进行生物测定, 结果表明 PBO 对拟除虫菊酯类杀虫药剂三氟氯氰菊酯具有显著的增效作用, 增效比为 7. 2: 1, 而对吡虫啉、灭多威、马拉硫磷无增效作用。在周程爱等(2000)和李春生等(2006)的研究也得到了类似的结论, PBO 对拟除虫菊酯类杀虫药剂的增效作用较其他种类杀虫药剂显著。

在昆虫毒理学研究中, 常通过增效剂对某种杀虫药剂增效情况的研究初步判断害虫对该杀虫药剂产生抗性的可能机制(梁沛, 2001)。一般认为 PBO 是多功能氧化酶的抑制剂, 依据本研究结果可间接推断多功能氧化酶系是拟除虫菊酯类杀虫药剂的重要解毒酶系。国内外已有大量研究通过 PBO 增效作用实验推断多功能氧化酶系解毒活性与昆虫对拟除虫菊酯类杀虫药剂的抗性有关(Katsuya *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2004), 但也有研究表明, PBO 对昆虫拟除虫菊酯抗性的影响与酯酶有关(Susan *et al.*, 2005, 2006)。因此, 为证实多功能氧化酶参与了绿盲蝽对拟除虫菊酯类杀虫药剂的解毒作用, 本研究利用荧光分光光度计检测 P450 的 O-脱乙基酶活性的方法测定了 PBO 对绿盲蝽 P450 酶活性的影响。PBO 活体抑制实验

```

1      ctctctacattcctcgctgattttctgcatagtagaatttcgtgtgtgtcgaccaatagtcggtgaccATGATACC
1      M I P
76      TTGGCTCTTTGCGGTACACTTTGCTTCCTCGTTTACCTGATTGCAAAGTCGGTGGGCACAGTGCCGTCTCTCAG
4      W L F A C T L C F L V Y L I A K S V G T V P S L R
151     AACCGTCTGGATGTTCAACAAGCTTCCCGGGCCCAACGATTGGCCCTTTTCTTCGGATCAGCTTGGCATTGTTT
29      T V W M F N K L P G P N D L P F F F G S A W H L F
226     CAGGATAAATATGGATGATGTTTCCTTACATACAGAAAAGACTTGGCGAGTTTGGAGGCATGACGCTGTTA
54      R I N M D D V F P Y I Q K R L A E F G G M Y A C Y
301     CTTATGGGTCTGCCGACCGTTATTGCTCAGATCCTGAAGTTATCGAGGTTATCTTGACTAGCAACAAGAACAT
79      F M G L P T V I C S D P E V I E V I L T S N K N I
376     CGATAAAGGACCTGAGTATAAATTCATCGGGAGGTGGCTGGCAACGGGATTTACTCAGCACTGGGGAAAAATG
104     D K G P E Y K F I G R W L A N G I L L S T G E K W
451     GAGGCAAGGAGGAAGATGCTTACGCCAAGTTCCATTTCAGATTCTCGAAGCGGTATGGGTCGATGTCGAG
129     R Q R R K M L T P S F H F K I L E D G M G C M S R
526     GGGTTGGAGAAAACTGGAAATCTACTCGCTACCAAGGACAACCTGTCGATCTTCAGCCCATTTTGGGAAA
154     G W R K T L E V L L A T K G Q P V D L Q P I L G K
601     AGGAGCCCTCGACATTATTTGTGAGTCTGCTATGGGATATGCTTGGAGATAACGACGATCGTTCCAACGAGTA
179     G A L D I I C E S A M G Y V L E D N D D R S N E Y
676     CGTTGCTGCAGTGAACGAGCCACTCGAGATTCTACGAAGAGAGTGATAACCCCTCTGCTCAAGAGCGATTTCAT
204     V A A V K R A T R D S T K R V Y N P L L K S D F I
751     ATTTGATTAACTCCATTATCAAGATCACACGCCAAGGACTTGGGAATTTGCATGGATTTCAGGAAAGATTAT
229     F D L T P L S R S H A K D L G I L H G F T G K I I
826     CAGGAAAGAAAGCTGCATTCGACGAAGAAAAACAATTGGAGTATTGACACCGGATGGTAAGAAGCGTCAGGT
254     R E R K A A F D E E K Q L E Y S D A D G K K R Q V
901     ATTTTGGATACCTCTCTCGAGATGTCAAAAAGGAGAAATCTGAATGATAATGATATCCGTGAAGAGTCGACAC
279     F L D T L L E M S K K E N L N D N D I R E E V D T
976     ATTTATGTTTGCCGCGCCAGATTTCGACTTCTACGGCTCTGCAGTTCCTCATGATGCACCTGGCCGAAAAATCCTGA
304     F M F A G H D S T S T A L Q F L M M H L A E N P E
1051    AGTGCAAGAGAAAGCCTACAAGGAGCAACAAGAAATATTTGGCTACAGCGATCGGGACCCCTACGAAAGAGGACCT
329     V Q E K A Y K E Q Q E I F G Y S D R D P T K E D L
1126    GTCGAAGATGCACTACTAGACCAAGTATTAAAGAAAGTCTAAGACTACACCCGCCAGCTCCTTCCATTGCCAG
354     S K M H Y L D Q V I K E S L R L H P P A P S I A R
1201    GTTATTGTGTGAAGACGTTCATTGCCTAATGGACATATTATTCCTGCGGGTGCCAAAGTTCTGATCTACATCAT
379     L L C E D V Q L P N G H I I P A G A K V L I Y I I
1276    CCTTACCCACCGAATCCAAAGTACTGGGATGACCCCGACGCTTTCAAACCTGAAAGATTGATCGGATCTGTG
404     L T H R N P K Y W D D P D A F K P E R F D P D L C
1351    CAAGACTCGTCACCGTACTCGTACATCCGTTTCAGCGCGGGGCCAGGAACGATCGGACAGAAATTCGCTCT
429     K T R H P Y S Y I P F S A G P R N C I G Q K F A L
1426    TCTCGAGATGAAAAATCGGCGTCTCCACAATCCTCAGGGCGTCAAGTTGACCACCAACGACAGTAGAGATCT
454     L E M K I G V S T I L R A C K L T T T T N S R D L
1501    CAAGTACAAAATGCTCATATTTTGCAGCCAGCGGCCATCAAAAATCGCGTATTTCCCGAGGAATCAGTGAga
479     K Y K M L I I L Q P S A P I K I A V F P R N Q *
1576    tatttagttcgaacgaatcagctcggtttcagtaataaaatagaggtggggagggg

```

图4 cDNA 全长序列 *CYP4v1* 及其推导的氨基酸序列 (包括 5' 和 3' 非翻译区)Fig. 4 Nucleotide acid and deduced aminoacid sequences of the full-length cDNA (*CYP4v1*) (contains the 5' and 3' UTR)

阴影区所示为 P450 保守区序列, 下划线所示为 N-端信号肽, 黑体所示为起始密码子、终止密码子及加尾信号, 方框所示为差异氨基酸残基。

P450 conservation regions are shaded; putative N-termial signal peptides are lined; the start codon, stop codon and polyadenylation signal are bold; the different amino acids are boxed.

结果表明, 对绿盲蝽进行处理 24 h 内, 随着处理时间的增长, PBO 对 P450 酶活性的抑制率逐渐增

大, 并且在前 6 h 内抑制最为显著, 随后抑制率增加速度减缓; 同时亦发现丙酮处理也会使绿盲蝽

```

1      ctctctacattcctcgctgattttctgcatagtagaatttcgtggtgacgaatagtcggtgaccATGAATACC
1      M I P
76      TTGGCTCTTTGCGTGTGCACCTTGCTTCCTCGTTTACCTGATTGCAAAGTCGGTGGACACAGTGCCGTCTCTCAG
4      W L F A C A L C F L V Y L I A K S V D T V P S L R
151     AACCGTCTGGATGTTCAACAAGCTTCCCGGGCCCAACGATTGCCCCTTTTCTTCGGATCAGCTTGGCATTGTGT
29      T V W M F N K L P G P N D L P F F F G S A W H L F
226     CAGGATAAATATGGATGATGTGTTCTTACATACAGAAAAGACTTGGGAGTTTGGAGGCATGTACGCCTGTTA
54      R I N M D D V F P Y I Q K R L A E F G G M Y A C Y
301     CTTCTAGGGTCTGCCGACCGTTATTGCTCAGATCCTGAAGTCATCGAGGCTATCTTGACTAGCAACAAGAAT
79      F M G L P T V I C S D P E V I E A I L T S N K N I
376     CGATAAAGGACCCGAGTATAAATTCATCGGAAGGTGGCTGGCAACGGGATTTACTCAGCACTGGGGAATAATG
104     D K G P E Y K F I G R W L A N G I L L S T G E K W
451     GAGGCAAGGAGGAAGATGCTTACGCCAAGTTCCATTTCAGATTCTCGAAGACGATGCGGTGCATGTCGAG
129     R Q R R K M L T P S F H F K I L E D G M G C M S R
526     GGGATGGAGGAAACACTGGAAGTTCTACTCGCTACCAAGGACAACTGTCATCTCAGCCCATTTTGGGAAA
154     G W R K T L E V L L A T K G Q P V D L Q P I L G K
601     AGGAGCCCTCGACATTATTTGTGAGTCTGCTATGGGATATGTTTGGAAAGATAACGACGATCGTTCCACGAGTA
179     G A L D I I C E S A M G Y V L E D N D D R S N E Y
676     CGTTGCTGCTGTGAACGAGCCACTCGAGATTCTACGAAGAGAGTGATAACCCCTGCTCAAGAGCGATTTCAT
204     V A A V K R A T R D S T K R V Y N P L L K S D F I
751     ATTTGATTAACTCCATTATCAAGATCACACGCCAAGGACTTGGGAATTTGTCATGGATTACTGGAAAGATTAT
229     F D L T P L S R S H A K D L G I L H G F T G K I I
826     CAGGAAAGAAAGCTGCATTCGACGAAGAAAAACAATTGGAGTATTGAGACCGGATGGTAAGAAGCGTCAGGT
254     R E R K A A F D E E K Q L E Y S D A D G K K R Q V
901     ATTTTGGATACCCCTTCTCGAAATGTCAAAAAGGAGAATCTGAATGATAATGATATCCGTGAAGAAGTCGACAC
279     F L D T L L E M S K K E N L N D N D I R E E V D T
976     ATTTATGTTTCCCGCCACGATTGCACTTCTACGGCTCTGCAGTTCTCATGATGACCTGGCCGAAATCCCTGA
304     F M F A G H D S T S T A L Q F L M M H L A E N P E
1051    AGTCAAGAGAAAGCCTACAAGGAGCAACAAGAAATATTGGCTACAGCGATCGGGACCCCTACGAAAGAGGACCT
329     V Q E K A Y K E Q Q E I F G Y S D R D P T K E D L
1126    GTCGAAGATGCACTACTTAGACCAAGTGATTAAGAAGTCTAAGACTACACCCGCCAGCTCCTTCCATTGCGCTG
354     S K M H Y L D Q V I K E S L R L H P P A P S I A W
1201    GTTATTGTGTGAAGACGTCCAATTGCCTAATGGACGTATTATTCTGCGGGTGCCAAGGTTCTGATCTACATCAT
379     L L C E D V Q L P N G R I I P A G A K V L I Y I I
1276    CCTTACCCACCGGAATCCAAAGTACTGGGATGATCCGACGCTTCAAACCTGAAAGATTGATCCGGATTGTG
404     L T H R N P K Y W D D P D A F K P E R F D P D L C
1351    CAAGACTCGTCACCCGTACTCGTACATCCCGTTACGCGCAGGGCCAGGAAGTGCATCGGACAGAAATTCGCTCT
429     K T R H P Y S Y I P F S A G P R N C I G Q K F A L
1426    TCTCGAGATGAAAATCGGGCTCTCCACAATCCTCAGGGCGTGCAAGTTGACCAACCAACGACAGTAGAGATCT
454     L E M K I G V S T I L R A C K L T T T T N S R D L
1501    CAAGTACAAAATGCTCATCATTTTGACGCCAGCAGCCCATCAAAATCGCCGTATCCCGAGGAATAAGTGAga
479     K Y K M L I I L Q P S T P I K I A V F P R N K *
1576    tatttagttcgaacgaatcagctcgggtttcagtaataaataatgaggtggggagggg

```

图5 cDNA 全长序列 *CYP4v2* 及其推导的氨基酸序列 (包括 5' 和 3' 非翻译区)

Fig.5 Nucleotide acid and deduced aminoacid sequences of the full-length cDNA (*CYP4v2*) (contains 5' and 3' UTR)

阴影区为 P450 保守区序列,下划线所示为 N-端信号肽,黑体所示为起始密码子、终止密码子及加尾信号,方框所示为差异氨基酸残基。

P450 conservation regions are shaded; putative N-termial signal peptides are lined; the start codon, stop codon and polyadenylation signal are bold; the different amino acids are boxed.

P450 酶活性急剧下降;PBO 离体抑制实验结果表明,随着 PBO 浓度的升高,其对绿盲蝽 P450 酶活

性抑制作用增强,但其抑制率无法达到 100%。总之,从本研究的结果来看,PBO 对细胞色素 P450

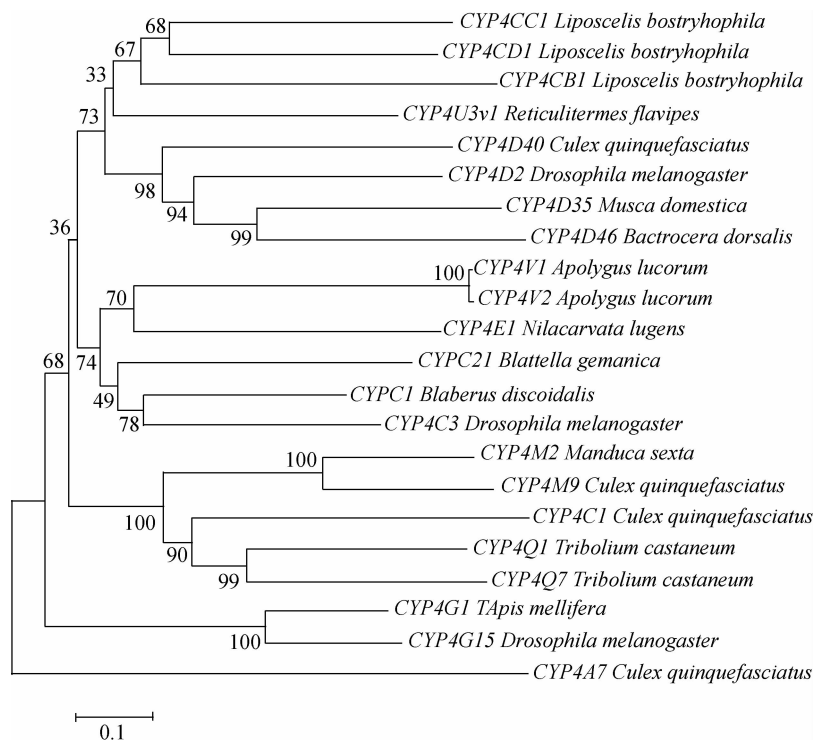


图 6 13 种昆虫 Cyt P450 CYP4 家族基因系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic relationship of Cyt P450 CYP4 family gene from 13 species of insects

酶具有抑制作用,并且此抑制作用受 PBO 浓度和处理时间影响。这一结果与 Kinsler 等 (1990) 的研究结果相似。而以绿盲蝽为试虫的增效实验发现 PBO 对拟除虫菊酯杀虫药剂具有显著的增效作用,初步判断绿盲蝽对拟除虫菊酯杀虫药剂的抗性与细胞色素 P450 有关。但也有研究发现 PBO 对昆虫的生物活性不是专一的,其对酯酶亦有显著的抑制作用 (Andrew *et al.*, 2007; Ashraf and Subrahmanyam, 2010), 因此,绿盲蝽对拟除虫菊酯杀虫药剂的代谢是否与其他解毒酶有关还有待进一步实验证实。

近年来,越来越多的学者开始从基因水平上探讨细胞色素 P450 酶系与昆虫抗药性间的关系。如 Diana 等 (2007) 发现摇蚊的一种特殊的 P450 第 4 家族基因的过表达与阿特拉津诱导有关,并成功克隆出这条基因的全长序列,同时通过 Northern 杂交技术发现这条基因虽然在摇蚊发育的各个阶段都有表达,但在老熟幼虫中表达量最高;Shen 等 (2003) 利用 RT-PCR、cDNA 芯片和 Northern 杂交等技术,成功地从淡色库蚊抗性及敏感品系中克隆出 24 条新的基因序列,对其中 6 条

序列进行微阵列分析,发现 *CYP4H21*、*4H22v1*、*4J22v1*、*4J4v2*、*4J6v1* 和 *4J6v1* 的抗性探针信号值较敏感探针信号值高 3.1 ~ 7.7 倍,而 *4H23v1* 只有抗性探针信号,这一结果与 Northern 杂交结果相似,说明 *CYP4* 可能与淡色库蚊的溴氰菊酯抗性有关;张云华等 (2010) 通过生物信息学方法对豌豆蚜全基因组 P450 进行分析,发现了 69 个 P450 基因,与豌豆蚜 ESTs 数据库进行比对分析,结果表明参与基因转换的基因均为 *CYP4* 家族成员。本研究利用 RT-PCR 结合 RACE 技术对绿盲蝽 *CYP4* 家族 cDNAs 进行全长克隆,最终获得的 2 条绿盲蝽 P450 *CYP4* 家族 cDNAs 全长为 1 631 bp,包括由 67 个核苷酸组成的 5'非编码区序列、由 1 503 个核苷酸组成的开放阅读框 (ORF) 以及由 119 个核苷酸组成的 3'非编码区序列。对这 2 条 cDNAs 全长进行分析发现它们都含有细胞色素 P450 的特征序列,如: W × × × R、E × × R、PERF、F × × G × × × C × G 以及 *CYP4* 家族特有的 13 个氨基酸序列 EVDTFMFE/AGHDT/ST (邱星辉和冷欣夫, 1998; 王九辉等, 2007)。与其他昆虫 *CYP4* 家族序列进行同源性及系统发育分析,结果表明

它们与褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 的 *CYP4CE1* 亲缘关系最近,而与致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* 的 *CYP4A7* 亲缘关系最远。在本实验的基础上,可进一步筛选获得绿盲蝽对杀虫药剂的抗性及其敏感品系,并利用实时定量 PCR 技术检测不同 P450 基因在绿盲蝽各品系间或绿盲蝽各组织中的表达量差异,从而了解 P450 与绿盲蝽抗药性的关系。

参考文献 (References)

- Andrew YL, Felix DG, John HP, 2007. Involvement of esterases in diazinon resistance and biphasic effects of piperonyl butoxide on diazinon toxicity to *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 87 (2):147—155.
- Ashraf OAE, Subrahmanyam B, 2010. Pyrethroid synergists suppress esterase-mediated resistance in Indian strains of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Pest Manag. Sci.*, 97 (3):279—288.
- Baek JH, Clark JM, Lee SH, 2010. Cross-strain comparison of cypermethrin-induced cytochrome P450 transcription under different induction conditions in diamondback moth. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 96 (1):43—50.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72 (1/2):248—254.
- Diana KL, Blair DS, Michael JL, 2004. Atrazine induction of a family 4 cytochrome P450 gene in *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). *Chemosphere*, 56 (7):701—706.
- Diana KL, Herbert AA, Haichuan W, Gautam S, Michael JL, Blair DS, 2007. Cloning and expression of an atrazine inducible cytochrome P450, *CYP4G33*, from *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 89 (2):104—110.
- Isin EM, Guengerich FP, 2007. Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1770 (3):314—329.
- Jewess PJ, 1999. Piperonyl butoxide: the insecticide synergist. *Integrated Pest Manag. Rev.*, 5 (2):147—148.
- Katsuya N, Kei S, Toshiharu T, Miyata T, 2004. Phenobarbital induction of permethrin detoxification and phenobarbital metabolism in susceptible and resistant strains of the beet armyworm *Spodoptera exigua* (Hübner). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 79:33—41.
- Kinsler S, Levi PE, Hodgson E, 1990. Relative contributions of the cytochrome P450 and flavincontaining monooxygenases to the microsomal oxidation of phorate following treatment of mice with phenobarbital, hydrocortisone, acetone, and piperonyl butoxide. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 37:174—181.
- Lyndsay D, Daryl RW, Lone AA, Julia P, Philip CT, Huw HR, 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 (10):801—807.
- Men X, Ge F, Edwards CA, Yardim EN, 2005. The influence of pesticide applications on *Helicoverpa armigera* Hübner and sucking pests in transgenic Bt cotton and non-transgenic cotton in China. *Crop Prot.*, 24 (4):319—324.
- Shen B, Dong HQ, Tian HS, Ma Lei, Li XL, Wu GL, Zhu CL, 2003. Cytochrome P450 genes expressed in the deltamethrin-susceptible and -resistant strains of *Culex pipiens pallens*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 75 (1/2):19—26.
- Susan JY, Robin VG, Moores GD, 2005. The effect of piperonyl butoxide on pyrethroid-resistance-associated esterases in *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Pest Manag. Sci.*, 61:397—401.
- Susan JY, Robin VG, Moores GD, 2006. Effect of pretreatment with piperonyl butoxide on pyrethroid efficacy against insecticide-resistant *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Bemisia tabaci* (Sternorrhyncha: Aleyrodidae). *Pest Manag. Sci.*, 62:114—119.
- William FG, Alan P, 1978. An improved assay of 7-ethoxycoumarin *O*-deethylase activity: induction of hepatic enzyme activity in C57BL/6J and DBA/2J mice by Phenobarbital, 3-methylcholanthrene and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 205 (3):596—605.
- Yang YH, Wu YD, Chen S, Devine GJ, Denholm I, Jewess P, Moores GD, 2004. The involvement of microsomal oxidases in pyrethroid resistance in *Helicoverpa armigera* from Asia. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34 (8):763—773.
- 艾国民, 王庆敏, 邹东云, 高希武, 李富根, 2009. 高效液相色谱法测定家蝇细胞色素 P450 *O*-脱甲基活性. 分析化学, 37 (8):1157—1160.
- 艾颖, 邱星辉, 何凤琴, 2004. 棉铃虫 *CYP4* 家族基因片段克隆及序列分析. 河北农业大学学报, 27 (6):60—64.
- 陈娇, 2007. 渗透剂对杀虫药剂的增效机理研究. 硕士学位论文. 北京:中国农业大学.

- 郭亭亭, 姜辉, 高希武, 2009. 昆虫细胞色素 P450 基因的多样性, 进化及表达调控. 昆虫学报, 52 (3): 301—311.
- 李春生, 刘怀, 邓新平, 2006. 5 种增效剂与 3 种杀虫药剂对甜菜夜蛾的增效作用. 西南农业大学学报, 28 (3): 450—453.
- 李秀兰, 腾达, 马磊, 朱昌亮, 2006. 淡色库蚊抗溴氰菊酯品系 *CYP4E2r6* 基因的克隆与生物信息学分析. 中国病原生物学杂志, 1 (2): 110—112.
- 梁沛, 2001. 小菜蛾对阿维菌素抗性的分子机制研究. 博士学位论文. 北京: 中国农业大学.
- 陆宴辉, 梁革梅, 吴孔明, 2007. 棉盲蝽综合治理研究进展. 植物保护, 33 (6) 10—15.
- 门兴元, 于毅, 张安盛, 李丽莉, 张君亭, 戈峰, 2008. 不同温度下绿盲蝽实验种群生命表研究. 昆虫学报, 51 (11): 1216—1219.
- 邱星辉, 冷欣夫, 1998. 昆虫细胞色素 P450 研究: P450 基因. 昆虫知识, 35 (1): 48—51.
- 王九辉, 黄俊生, 方晓东, 2007. 椰心叶甲 *CYP4* 基因的克隆及绿僵菌侵染后的诱导表达研究. 昆虫学报, 50 (1): 14—19.
- 魏书艳, 肖留斌, 谭永安, 赵洪霞, 柏立新, 2010. 不同寄主受绿盲蝽危害后生理代谢指标的变化. 植物保护学报, 37 (4): 359—364.
- 吴益东, 杨亦桦, 陈进, 李爱玫, 沈晋良, 沈文飏, 2000. 增效醚 (PBO) 对棉铃虫细胞色素 P450 的抑制作用及对拟除虫菊酯的增效作用. 昆虫学报, 43 (2): 138—142.
- 徐文华, 王瑞明, 林付根, 刘标, 臧慧, 2007. 棉盲蝽的寄主种类、转移规律、生态分布与寄主的适合度. 江西农业学报, 19 (12): 45—50.
- 杨芸, 连惠婷, 刘斌, 孙向英, 2009. 敌百虫分子印迹聚合物的合成及其性能. 华侨大学学报 (自然科学版), 30 (3): 284—288.
- 于彩虹, 高希武, 郑炳宗, 2002. 2-十三烷酮对棉铃虫细胞色素 P450 的诱导作用. 昆虫学报, 45 (1): 1—7.
- 张云华, 王强, 刘静, 张鹏飞, 陈建群, 2010. 豌豆蚜基因组 P450 基因家族的分析. 昆虫学报, 53 (8): 849—856.
- 赵宝祥, 1989. 农药增效剂的应用. 农药, 28 (4): 45.
- 郑炳宗, 高希武, 王政国, 梁同庭, 曹本均, 高洪, 1989. 瓜-棉蚜对有机磷及氨基甲酸酯杀虫药剂抗性机制研究. 植物保护学报, 16 (2): 131—137.
- 周程爱, 王小平, 陈章发, 向延平, 张友军, 王奎武, 朱国仁, 2000. 长沙地区小菜蛾田间种群抗药性及增效作用. 湖南农业大学学报, 26 (5): 358—362.