# 苹果蠹蛾 NAPDH-细胞色素 P450 还原酶（*CPR*）基因的克隆及表达模式分析*

李沛蓉[1,2**] 陈高满[1,2] 杨雪清[1,2***]

（1. 沈阳农业大学植物保护学院，沈阳 110866； 2. 辽宁省经济与应用昆虫教育厅重点实验室，沈阳 110866）

**摘 要** **【目的】** 本研究通过克隆苹果蠹蛾 *Cydia pomonella CPR* (*CpCPR*) 基因 cDNA 序列，并对该基因的表达模式进行分析，为深入研究 P450 酶系在苹果蠹蛾对植物次生物质和杀虫剂解毒代谢过程中的作用提供理论基础。**【方法】** 以近缘昆虫的 CPR 氨基酸序列作为询问序列，在苹果蠹蛾转录组（SRX371333）中进行筛查比对，获得了苹果蠹蛾 *CPR*（*CpCPR*）基因的 cDNA 序列。采用 RT-PCR 技术克隆目的基因的开放阅读框（ORF）。利用生物信息学软件分析目的基因的序列特征、3D 结构和与其他昆虫 CPR 基因的系统进化关系。采用 RT-qPCR 技术测定 *CpCPR* 基因在苹果蠹蛾不同发育阶段（卵、幼虫、蛹和成虫）及幼虫不同组织部位（头部、表皮、脂肪体、中肠和马氏管）的表达水平。**【结果】** 克隆获得的苹果蠹蛾 *CpCPR* 基因的 ORF 为 2 052 bp，编码 683 个氨基酸残基，预测的蛋白质分子量（Mw）为 77.326 ku，理论等电点（pI）为 5.65。CpCPR 包含 FMN 区域、NADPH 区域和 FAD 等昆虫 CPR 的典型特征。系统发育分析表明，苹果蠹蛾 *CpCPR* 与鳞翅目昆虫 *CPR* 基因聚在一枝。RT-qPCR 结果表明，*CpCPR* 基因在苹果蠹蛾的整个发育阶段均有表达，在幼虫期表达量最高；*CpCPR* 基因在 4 龄幼虫的各部位均有表达，在中肠中的表达量最高。**【结论】** 克隆获得了苹果蠹蛾 *CpCPR* 基因的 ORF 序列，该基因在苹果蠹蛾主要取食阶段和消化器官中高表达，表明其可能在苹果蠹蛾对植物次生物质和杀虫剂解毒代谢过程中扮演重要作用。

**关键词** 苹果蠹蛾；细胞色素 P450 还原酶；解毒代谢；抗药性；基因克隆

# Molecular cloning and expression profiles of NADPH-cytochrome P450 reductase (*CPR*) gene in the codling moth, *Cydia pomonella*

LI Pei-Rong[1,2**] CHEN Gao-Man[1,2] YANG Xue-Qing[1,2***]

(1. College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China;
2. Key Laboratory of Economical and Applied Entomology of Liaoning Province, Shenyang 110866, China)

**Abstract** **[Objectives]** In order to improve understanding of the role of cytochrome P450 in the detoxification of plant secondary substances and insecticides, the *CPR* gene (*CpCPR*) of the codling moth, *Cydia pomonella*, was cloned and its expression profile was analyzed. **[Methods]** The amino acid sequences of *CPR* genes from closely-related insect species were used as queries to search against the *C. pomonella* transcriptome database (SRX371333) and obtain the sequence of the *C. pomonella CPR* gene. RT-PCR was then used to amplify the Open Reading Frame (ORF) of the target gene. Bioinformatics software was used to compare the sequence characteristics, 3D structure and phylogenetic relationship of CpCPR to those of CPR from other insects. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to determine the relative expression level of *CpCPR* in different developmental stages (eggs, 1-5 instar larvae, pupae, and adults) and in various tissues (head, cuticle, fat body,

*资助项目 Supported projects：国家自然科学基金（31972299）；兴辽英才计划（XLYC1907097）；辽宁省高等学校“创新人才支持计划”（LCR2018024）

**第一作者 First author，E-mail：lpr666lpr@126.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：sling233@hotmail.com

收稿日期 Received：2020-03-12；接受日期 Accepted：2020-05-17

midgut, and Malpighian tubes). **[Results]** The length of the *CpCPR* gene is 20 252 bp, which encodes 683 amino acids with a predicted molecular mass of 77.326 ku and a theoretical isoelectric point of 5.65. CpCPR contains typical insect CPR gene characteristics, such as an FMN region, an NADPH region and a FAD region. Phylogenetic analysis indicates that *CpCPR* clusters with the *CPR* gene of other Lepidoptera. RT-qPCR results show that the *CpCPR* gene is expressed in all developmental stages but is most abundant in the larval stage. In addition, *CpCPR* mRNA was detected in all tissues but was most abundant in the midgut in fourth-instar larvae. **[Conclusion]** The ORF of the *CpCPR* gene was successfully cloned. This gene was most highly expressed during the larval stage and in the midgut of *C. pomonella*, indicating that it may play an important role in the detoxification of plant secondary substances and insecticides.

**Key words** *Cydia pomonella*; NADPH cytochrome P450 reductase; detoxification; insecticide resistance; gene cloning

苹果蠹蛾 *Cydia pomonella*（L），属鳞翅目卷蛾科(Tortricidae)，是全球最重要的果树害虫之一，也是我国一类进境检疫性有害生物（杨雪清，2014）。该虫寄主范围广，主要危害苹果、梨、桃等 30 多种果树，每年造成巨大的经济损失（靳生杰，2015；张鸿斌，2018）。随着世界贸易的迅速发展，以及各国果品种植业的迅速崛起，起源于欧洲的苹果蠹蛾被人为的传播到世界各地。1957 年，我国首次报道苹果蠹蛾在新疆地区的发生（张学祖等，1958）。此后，该虫沿着河西走廊逐渐扩散至甘肃大部分地区；2006 年苹果蠹蛾在黑龙江发生，后迅速向西、向南扩散至吉林省、辽宁省等部分地区（徐婧等，2015）。苹果蠹蛾在我国的入侵传播速度之快、危害程度之大，对我国黄土高原和环渤海湾两大苹果优势产区水果安全生产造成严重威胁（房阳等，2015）。

包括生物防治、物理防治和化学防治等在内的害虫综合治理策略是防控苹果蠹蛾主要措施，其中喷施化学杀虫剂是目前最简单、最快速、最有效和最普遍的防治方法（Eduardo *et al.*，2007；Voudouris *et al.*，2011）。由于苹果蠹蛾具有蛀果危害和世代重叠等特性，防治上经常对防治适期把握不准确，导致过量或不合理使用化学杀虫剂，引发苹果蠹蛾对多种化学杀虫剂产生了不同程度的抗性（Sauphanor *et al.*，1998；Pasquier and Charmillot，2003；Reyes *et al.*，2007；Rodríguez *et al.*，2011）。代谢抗性是昆虫对杀虫剂产生抗药性的主要机制。在昆虫代谢抗性中起主要作用的有 3 种解毒酶：细胞色素 P450 酶系（P450 或 CYP）、谷胱甘肽-*S*-转移酶（GST）和酯酶（EST）（Rodríguez *et al.*，2011；Voudouris *et al.*，2011）。前人研究表明苹果蠹蛾解毒代谢作用增强主要是由于 P450 和 GST 活性的升高所致（Sauphanor *et al.*，1998；Bouvier *et al.*，2002；Eduardo *et al.*，2007；Reyes *et al.*，2007）。P450 作为重要的解毒酶，已成为国内外苹果蠹蛾研究工作者广泛关注的焦点和研究话题（Ioriatti *et al.*，2007；杨雪清，2014）。在苹果蠹蛾抗性相关基因的研究中，通过对抗药性相关基因家族的进化分析发现，苹果蠹蛾基因组中大量的 P450 基因可能增强其对杀虫剂的解毒代谢能力（Wan *et al.*，2019）。

研究表明，P450 参与昆虫对植物次生物质和杀虫剂等异源物质的解毒代谢（杨雪清，2014）。NADPH-细胞色素 P450 还原酶（NADPH-cytochrome P450 reductase，*CPR*）是细胞色素 P450 酶系的重要组成部分，在 P450 代谢内、外源物质的过程中起到重要的作用。*CPR* 通过多种氧化还原偶联反应将电子从 NADPH 转移到 P450 的血红素结合区，促使 P450 完成其代谢功能（Paine *et al.*，2005；Gillam，2008）。近年来，一些昆虫的 *CPR* 基因的功能得到解析。例如，*CPR* 基因被干扰成功后，小菜蛾 *Plutella xylostella* 对 β-氯氰菊酯和其他杀虫剂的抗性下降，说明该基因可能在杀虫剂的抗性中起重要作用（Chen and Zhang，2015）；沉默东亚飞蝗 *Locusta migratoria* 的 *CPR* 基因后发现，蝗虫对西维因的抗药性明显下降（Zhang *et al.*，2017）。这些研究表明，*CPR* 在害虫抗药性中起到了至关重要的作用。然而，目前还未见关于苹果蠹蛾 *CPR*（*CpCPR*）基因的克隆和功能研究的报道。

本研究通过在苹果蠹蛾转录组数据库中比

对，鉴定并克隆得到苹果蠹蛾 *CpCPR* 基因，利用生物学信息学软件分析其序列特征、3D 结构和与其他昆虫 CPR 基因的系统进化关系，以明确 *CpCPR* 基因在不同发育阶段和幼虫不同组织部位的表达模式，为进一步探究 *CpCPR* 基因功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试昆虫

供试苹果蠹蛾由中国农业科学院植物保护研究所农业入侵生物预防与监控实验室提供，在实验室内不接触杀虫剂连续饲养了 50 代以上。人工饲养箱（MLR-352H-PC，Panasonic）条件设置为温度（26±1）℃、相对湿度 60%±5%、光周期 16L∶8D。幼虫以人工饲料喂养，成虫用 10%的蜂蜜溶液饲养。

### 1.2 基因鉴定

苹果蠹蛾转录组数据（SRX371333）下载于 NCBI（https://www.ncbi.nlm.nih.gov）。以斜纹夜蛾 *Spodoptera litura SlCPR*（GenBank 登录号：XP_022820266.1）、家蚕 *Bombyx mori BmCPR*（GenBank 登录号：NP_001104834.1）、棉铃虫 *Helicoverpa armigera HaCPR*（GenBank 登录号：XP_021181364.1）以及甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua SeCPR*（GenBank 登录号：ADX95746.1）的蛋白序列为询问序列，在苹果蠹蛾转录组数据库中进行筛查比对，筛选出与询问序列有较高相似性（E-value≤$10^{-5}$）的序列。利用 ORFfinder 软件预测所获得的核酸序列的开放阅读框（ORF），再在 NCBI 中进行比对验证以判断其序列的完整性和家族归属。最后使用 Clustal X 进行多序列校准，手动去除重复序列。采用 Primer premier 5.0 软件设计扩增引物，引物由上海生工生物工程股份有限公司合成，序列信息见表 1。使用 RNAiso Plus（Takara）提取总 RNA。采用 GoScriptTM Reverse Transcription Mix（Promega）合成第 1 链 cDNA。以稀释 10 倍的 cDNA 作为模版进行 PCR 扩增，反应条件为：94 ℃预变性 30 s；98 ℃变性 10 s，55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 1 min，共循环 40 次；72 ℃终延伸 2 min。反应体系（20 μL）：Premix Taq 10 μL，上、下游引物（10 μmol·$L^{-1}$）各 1 μL，cDNA 1 μL，$ddH_2O$ 7 μL。PCR 产物经 1%琼脂胶电泳分析后，将目的条带切割后用胶回收试剂盒（Gel Extraction Kit, Omega）进行回收。将纯化后的 PCR 产物连接至 pMD 19-T 载体（Takara），转化至 DH5α 感受态细胞，涂布于含 100 μg/mL 氨苄青霉素、40 μg/mL X-Gal 和 24 μg/mL IPTG 的固体 LB 培养基上进行蓝白斑筛选，挑取单菌落至液体 LB 中培养扩繁，选取 M13 引物（表 1）进行菌液 PCR 验证。将阳性结果的菌液送至上海生工生物有限公司测序。测序结果用 Clustal X 软件与从转录组中鉴定出的序列进行比对，验证后的序列上传至 GenBank（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）。

**表 1 本研究中所用到的引物**
**Table 1 Primers used in this study**

| 基因 Gene | 引物序列（5′-3′） Primer sequence | 用途 Purpose |
|---|---|---|
| *CpCPR*-ORF | F：ATGCACGTTTTGAAAATGAGTACAG | ORF 克隆 |
| | R：CTATGTTCTCGGGACGAAGCGGACA | TA 克隆测序 |
| *M13* | F：GTTTTCCCAGTCACGAC | |
| | R：CAGGAAACAGCTATGAC | |
| *CpCPR* | F：AGTCTATGAAGTGGGTTTGGG | RT-qPCR |
| | R：GCTCCTCCTCGCCTGTG | |
| *β-Actin* | F：CGGCATCCACGAAACCACCT | |
| | R：TGGAAGGAGCCAGTGCGG | |

### 1.3　基因序列分析

利用 ExPASy 在线网站（http://ca.expasy.org/tools/）对 CpCPR 的蛋白分子量和理论等电点进行预测。使用 DNAMAN 对 CpCPR 的氨基酸组成和疏水性进行分析，并用该软件将推导的苹果蠹蛾 CpCPR 氨基酸序列与其他昆虫的 CPR 氨基酸序列进行序列比对。使用在线软件 TMHMM（http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/）对 CpCPR 蛋白的跨膜结构进行预测分析。采用 SignalP-5.0 Server（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/）对 CpCPR 可能存在的信号肽进行分析。使用 PSIPRED（http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/）对 CpCPR 进行二级结构分析（Arnold *et al.*，2006）。利用 SWISS-MODEL（http://swissmodel.expasy.org）构建 CpCPR 的 3D 结构。为了分析苹果蠹蛾 Cp*CPR* 与近缘昆虫 CPR 的进化关系，使用 MEGA 6.0（Tamura *et al.*，2013）软件中的邻接法（NJ）构建 CpCPR 与近缘昆虫的 CPR 氨基酸序列的系统发育树，采用默认设置，Bootstrap 设置成 1 000。

### 1.4　苹果蠹蛾 *CpCPR* 基因表达水平分析

选取苹果蠹蛾不同发育阶段样本，以卵 200 粒，1 龄和 2 龄幼虫各 50 头，3 龄幼虫 10 头，4 龄和 5 龄幼虫各 5 头，雌、雄蛹各 5 头，雌、雄成虫各 5 头作为 1 次取样重复，共重复 3 次。以 30 头 4 龄幼虫作为 1 次取样重复，分别解剖其头部（HE）、表皮（CU）、脂肪体（FB）、中肠（MD）和马氏管（MT），重复 3 次。分别将每次重复的同一发育阶段、同一组织部位的样本混在一起，提取总 RNA。总 RNA 的提取和 cDNA 的合成同 1.2 节。

采用实时定量 PCR（Real-time quantitative PCR，RT-qPCR）技术，分析不同发育阶段和不同组织部位 *CpCPR* 基因的表达水平。RT-qPCR 反应在 Bio-Rad CFX96（BioRad）上进行。在 20 μL 的 PCR 反应体系中依次加入 TB GreenTM Premix Ex TaqTM 2（Takara）10 μL，cDNA（稀释 10 倍）1 μL，10 μmol·L$^{-1}$ 上、下游引物各 0.8 μL 和 7.4 μL $ddH_2O$。反应条件为 95 ℃预变性 30 s；95 ℃变性 5 s，60 ℃退火 30 s，共 40 个循环。参考前人研究结果，选取苹果蠹蛾 *β-Actin*（KC832921）基因作为内参基因（杨雪清和张雅林，2014）。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 *CpCPR* 基因的相对表达量。反应设无 cDNA 模板的阴性对照，即以无 RNase 的 $ddH_2O$ 作为反应模板替代 cDNA。每个样品设 3 次技术重复。

### 1.5　数据分析

所有数据均采用 SPSS Statistics 20（IBM）进行统计分析，使用单因素方差分析（ANOVA）和 Duncan's 检验分析基因表达水平的差异。结果使用 GraphPad.Prism 5 软件进行作图。

## 2　结果与分析

### 2.1　苹果蠹蛾 *CPR* 基因的克隆及序列分析

通过对苹果蠹蛾转录组数据的筛查、比对和克隆，获得了苹果蠹蛾 *CpCPR* 基因（GenBank 登录号：MT159663），该基因的 ORF 为 2 052 bp，编码 683 个氨基酸残基，其预测的蛋白质分子量为 77.326 ku，理论等电点为 5.65。

通过 DNAMAN7.0 软件分析，得到 CpCPR 的氨基酸组成。其中，亮氨酸（Leu）的数量最多，占总数的 9.81%；其次是谷氨酸（Glu）数量为 55 个，占总数的 8.05%；含量最少的是色氨酸（Trp），数量只有 10 个，仅占总数的 1.46%（表 2）。

利用 DNAMAN7.0 软件分析了 CpCPR 的疏水性，结果显示，CpCPR 在序列的 N 端存在明显的疏水性区域，而亲水性区域大多在序列的中间部分（图 1）。

蛋白跨膜分析结果显示，苹果蠹蛾 CpCPR 的 1-20 位氨基酸在胞内（Inside），21-43 位氨基酸位于跨膜区（Transmembrance），剩下的 44-683 位氨基酸在胞外（Outside）（图 2）。上述结果符合昆虫 CPR 基因的特点。

信号肽预测分析结果表明，苹果蠹蛾 CpCPR 没有信号肽（图 3）。

通过与近源昆虫氨基酸序列比对，结果显示

**表 2　苹果蠹蛾 CpCPR 蛋白的氨基酸组成**

**Table 2　The amino acid composition of CpCPR protein in *Cydia pomonella***

| 氨基酸 Amino acid | 数量 Number | 比例（%） Composition | 氨基酸 Amino acid | 数量 Number | 比例（%） Composition |
|---|---|---|---|---|---|
| 丙氨酸 Ala | 44 | 6.44 | 亮氨酸 Leu | 67 | 9.81 |
| 精氨酸 Arg | 31 | 4.54 | 赖氨酸 Lys | 49 | 7.17 |
| 天冬氨酸 Asp | 43 | 6.30 | 甲硫氨酸 Met | 14 | 2.05 |
| 天冬酰胺 Asn | 28 | 4.10 | 苯丙氨酸 Phe | 26 | 3.81 |
| 半胱氨酸 Cys | 11 | 1.61 | 脯氨酸 Pro | 31 | 4.54 |
| 谷氨酰胺 Gln | 27 | 3.95 | 丝氨酸 Ser | 40 | 5.86 |
| 谷氨酸 Glu | 55 | 8.05 | 苏氨酸 Thr | 37 | 5.42 |
| 甘氨酸 Gly | 45 | 6.59 | 色氨酸 Trp | 10 | 1.46 |
| 组氨酸 His | 18 | 2.64 | 络氨酸 Tyr | 27 | 3.95 |
| 异亮氨酸 Ile | 37 | 5.42 | 缬氨酸 Val | 43 | 6.30 |

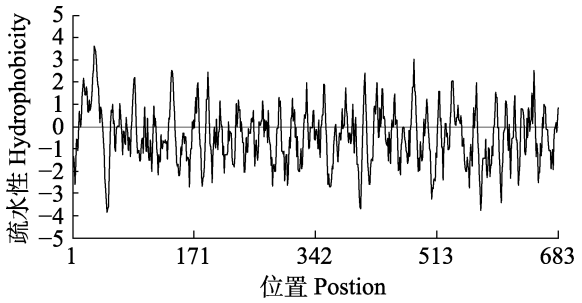


**图 1　苹果蠹蛾 CpCPR 的疏水性分析**

**Fig. 1　The hydrophobicity of *Cydia pomonella* CpCPR**

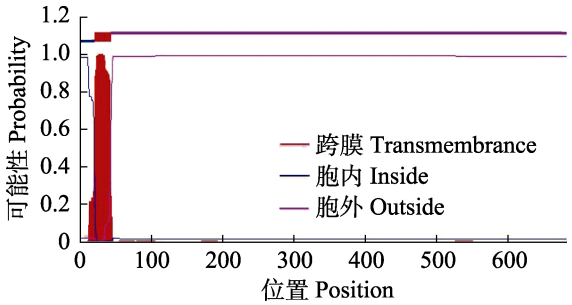


**图 2　苹果蠹蛾 CpCPR 蛋白序列跨膜结构预测**

**Fig. 2　Prediction of the transmembrane structure of *Cydia pomonella* CpCPR**

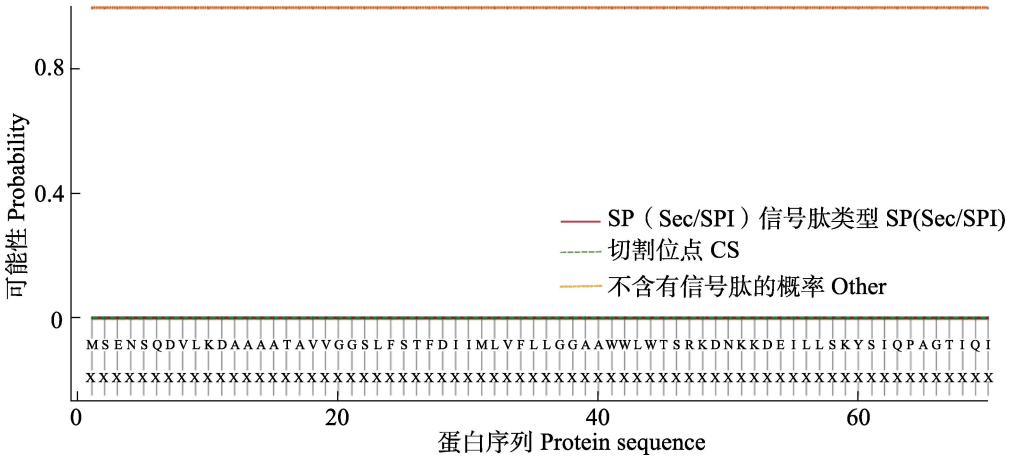


**图 3　苹果蠹蛾 CpCPR 蛋白的信号肽预测**

**Fig. 3　Prediction of the signal peptide of *Cydia pomonella* CpCPR**

苹果蠹蛾 CpCPR 与斜纹夜蛾 *S. litura* SlCPR（GenBank 登录号：XP_022820266.1）、家蚕 *B. mori* BmCPR( GenBank 登录号:NP_001104834.1）、棉铃虫 *H. armigera* HaCPR（GenBank 登录号：XP_021181364.1），以及甜菜夜蛾 *S. exigua* SeCPR（GenBank 登录号：ADX95746.1）的氨

基酸同源性分别高达 85.05%、84.13%、86.03%、84.33%。二级结构分析显示，苹果蠹蛾 CpCPR 包含 CPR 的典型特征：黄酮单核苷酸（Flavin mononucleotide，简称 FMN），黄酮腺嘌呤核苷酸（Flavin-adenine dinucleotide，简称 FAD）和烟酰胺-腺嘌呤-二核苷酸磷酸酯（Fnicotinamide adenine dinucleotide phosphate，简称 NADP）（图 4）。

为了更好地了解苹果蠹蛾 CPR 蛋白的功能区域划分，使用在线软件 SWISS-MODEL 构建 CpCPR 的 3D 模型（图 5）。预测结果显示，苹果蠹蛾 CpCPR 由 23 个 α-螺旋和 19 个 β-折叠组成，并包含 CPR 完整的功能区，即 FMN，FAD 和 NADP（图 5）。

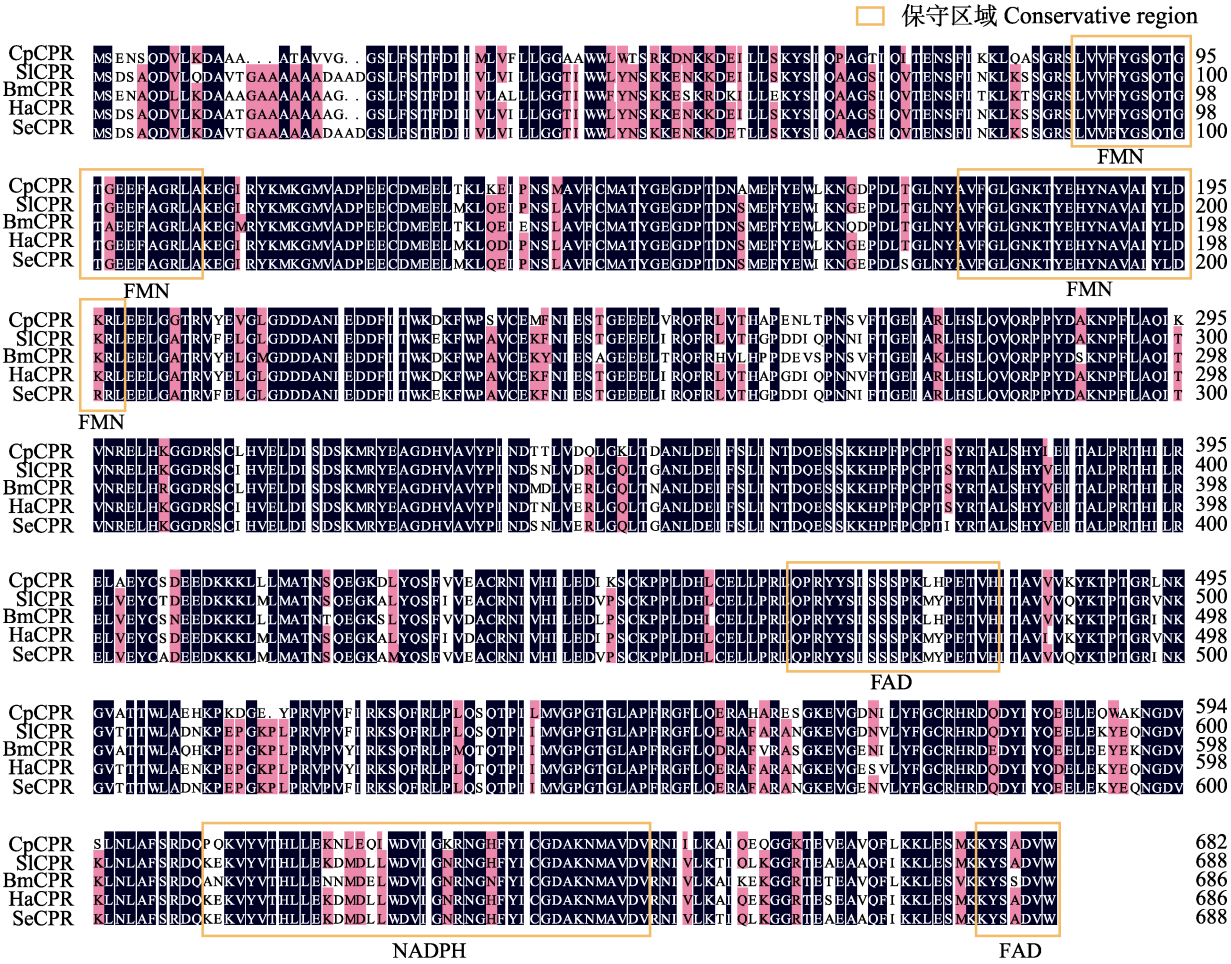


图 4　苹果蠹蛾 CpCPR 与近缘昆虫 CPR 氨基酸序列对比

**Fig. 4　Alignment of the amino acid sequences of CPR from *Cydia pomonella* and closely-related insect species**

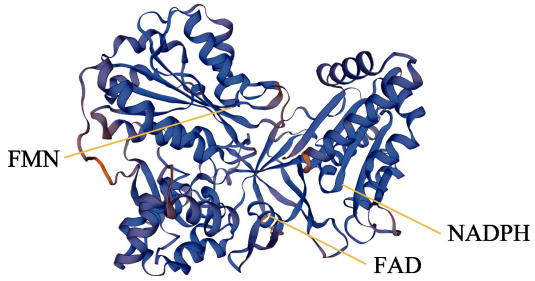


图 5　苹果蠹蛾 CpCPR3D 结构的同源建模

**Fig. 5　3D structure of CpCPR constructed by using homology modeling**

## 2.2　苹果蠹蛾 *CpCPR* 基因的系统发育分析

系统发育树显示，苹果蠹蛾 CpCPR 与其他鳞翅目昆虫如斜纹夜蛾 *S. litura*、家蚕 *B. mori*、棉铃虫 *H. armigera* 等的 CPR 聚在一支；双翅目和半翅目昆虫的 CPR 各自聚为一支（图 6）。

## 2.3　苹果蠹蛾 *CpCPR* 在不同生长发育阶段的表达模式

RT-qPCR 结果显示，*CpCPR* 基因在苹果蠹

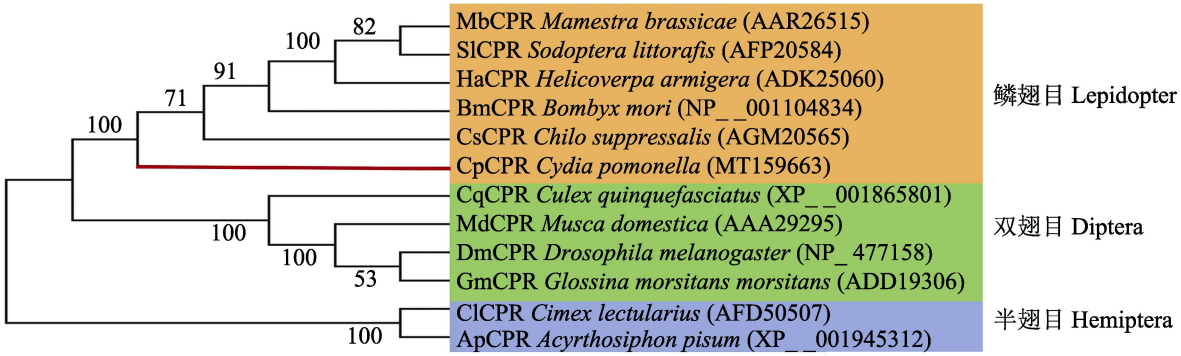


**图 6　邻接法构建的基于 CPR 氨基酸序列的苹果蠹蛾和近缘昆虫的系统进化树（1 000 次重复）**

**Fig. 6　Phylogenetic relationship of *Cydia pomonella* CpCPR with CPR from other insects amino acid sequence by neighbor-joining method (1 000 replicates)**

不同的颜色代表不同的昆虫科目，黄色代表鳞翅目，绿色代表双翅目，蓝色代表半翅目；苹果蠹蛾的 CPR 序列用红色线标注。

Different colors represent different insects. Yellow, green, and blue represent insects in Lepidoptera, Diptera, and Hemiptera, respectively; The CPR sequence of codling moth is marked with red lines.

蛾的整个生长发育阶段均有表达。在幼虫期的表达量最高，在苹果蠹蛾的 1 龄幼虫期表达量最为显著，随后呈现出先下降后上升的趋势；在卵期和蛹期表达量最低；在蛹期和成虫期，雌雄之间无差异（图 7）。

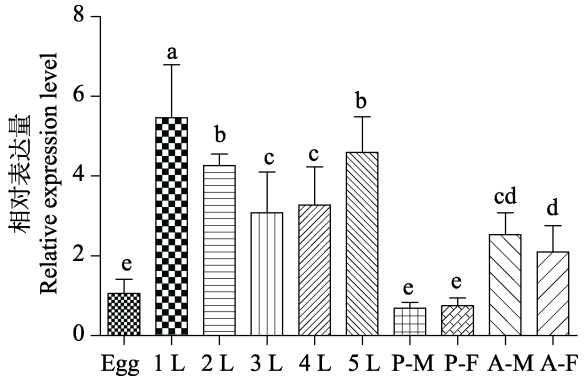


**图 7　苹果蠹蛾不同发育阶段中 *CpCPR* 的表达量分析**

**Fig. 7　Expression profiles of *CpCPR* in different developmental stages of *Cydia pomonnella***

Egg：卵期；1-5L：分别为 1-5 龄幼虫；P-M：雄蛹；P-F：雌蛹；A-M：雄成虫；A-F：雌成虫。

Egg: Egg; 1-5L: 1st-5th instar larva; P-M: Male pupa; P-F: Female pupa; A-M: Male adult; A-F: Female adult.

图中数据为平均值±标准差；柱上标有不同字母表示不同发育阶段基因表达量差异显著（$P$<0.05, Duncan 氏检验法）。下图同。

Data in the figure are mean±SD. Histograms with different letters indicate significant difference in the gene expression among different developmental stages at the 0.05 level by Duncan's test. The same below.

## 2.4　苹果蠹蛾 *CpCPR* 组织特异性表达模式

RT-qPCR 结果显示，*CpCPR* 基因在所检测的 4 龄幼虫的头、表皮、脂肪体、中肠和马氏管均有表达。在中肠的表达量最高，其次是在表皮中，在头部的表达量最低（图 8）。

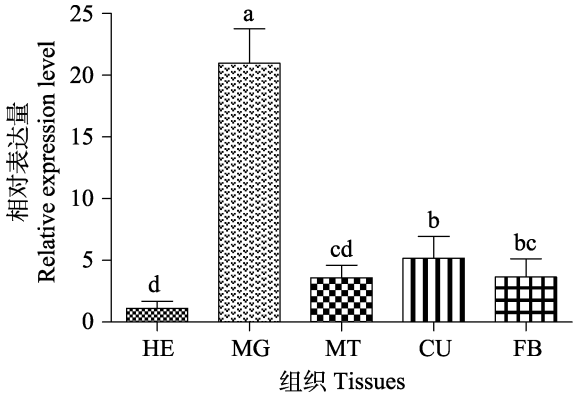


**图 8　苹果蠹蛾 4 龄幼虫不同组织中 *CpCPR* 的表达模式分析**

**Fig. 8　Expression profiles of *CpCPR* in different tissues of fourth-instar *Cydia pomonnella* larvae**

HE：头；CU：表皮；FB：脂肪体；MG：中肠；MT：马氏管。

HE: Head; CU: Cuticle; FB: Fat body; MG: Midgut; MT: Malpighian tubes.

# 3　讨论

细胞色素 P450 与昆虫对植物次生物质和杀虫剂的解毒代谢密切相关（杨雪清，2014），因

此受到了国内外学者的广泛关注与研究。例如，烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 的 *CYP9A1* 基因被证实了与杀虫剂的解毒代谢有关（Rose *et al.*，1997）；棉铃虫的 *CYP4G8* 基因在拟除虫菊酯类杀虫剂诱导后表达量上升了两倍（Pittendrigh *et al.*，1997）；体外代谢试验表明，果蝇的 *CYP6G1* 基因参与了对多种农药的抗药性（Cheesman *et al.*，2013）。在苹果蠹蛾中，*CYP9A61* 基因可能参与对高效氯氟氰菊酯的解毒代谢（杨雪清，2014）；*CYP6B2* 已被证实是苹果蠹蛾对甲基谷硫磷和溴氰菊酯抗性形成的 P450 基因（Wan *et al.*，2019）。P450 在催化反应中需要 CPR 作为电子供体（Feyereisen，1999），其在将电子从 NADPH 转移到 P450 中起着重要作（Pompon，1996）。因此，对 *CPR* 基因的深入研究有助于解析 *CPR* 在 P450 酶系中的生物学功能，并为开发新型的害虫防治手段提供思路。

在本研究中，我们鉴定并克隆了苹果蠹蛾的 *CpCPR* 基因，其 ORF 为 2 052 bp，编码了 683 个氨基酸。其氨基酸组成中，亮氨酸（Leu）含量最多，其次为谷氨酸（Glu），含量最少的是色氨酸（Trp），该结果与棉铃虫 *H.armigera* 的 *HaCPR* 的分析结果一致（赵春青，2014），说明这可能是昆虫 *CPR* 普遍的氨基酸组成模式。疏水性分析结果也与 *HaCPR*（赵春青，2014）、稻飞虱 *Nilaparvata lugens*（梁庆梅，2014）、Q 型烟粉虱 *Bemisia tabaci*（He *et al.*，2020）的分析结果一致，均在 N 端形成了明显的疏水性区域，说明这可能也是判断一个基因是否为昆虫 *CPR* 的一个典型特征。CpCPR 氨基酸的序列比对结果表明，苹果蠹蛾的 *CPR* 基因与其他鳞翅目昆虫的 *CPR* 基因的序列一致性很高，在 86.03%-84.13%之间，表明昆虫 CPR 基因高度保守。此外，二级结构预测和 3D 模型预测的结果显示，苹果蠹蛾 CpCPR 和棉铃虫 *H.armigera*（汪丹，2011；赵春青，2014）、白背飞虱 *Sogatella furcifera*（余杭等，2016）、温带臭虫 *Cimex lectularius*（Zhu *et al.*，2012）、亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis*（康晓林，2018）等昆虫 CPR 均包含的 FAD, FMN 和 NADPH 结合域，说明这些结构域是昆虫 CPR 普遍的结构特征，推测苹果蠹蛾 CpCPR 可能具有和这些昆虫 CPR 相同的再 P450 介导的氧化还原反应中起着电子传递链的作用。

为了进一步了解 *CpCPR* 基因的功能，我们采用了 RT-qPCR 技术分析了苹果蠹蛾不同发育时期以及不同身体部位 *CpCPR* 基因的表达量。结果显示，*CpCPR* 基因在苹果蠹蛾的各个生长发育时期都存在，且在苹果蠹蛾主要的取食阶段即幼虫期的表达量最高，在卵期和蛹期的表达量最低，且成虫雌雄之间没有差异，这与棉铃虫 *H. armigera* 的 *HaCPR* 基因的表达模式相似（汪丹，2011；赵春青，2014）。但与烟粉虱 *Bemisia tabaci* 随龄期增长表达量不断升高，在成虫时表达量最高，且在雄性个体中的表达量高于雌性个体的表达模式（He *et al.*，2020）存在差异。组织特异性表达结果显示，*CpCPR* 在苹果蠹蛾的 4 龄幼虫的中肠的表达量最高，这个结果与棉铃虫 *H. armigera*（汪丹，2011）、二化螟 *Chilo suppressalis*（Liu *et al.*，2013）和小菜蛾 *P. xylostella*（Chen and Zhang，2015）的 *CPR* 基因在肠道或中肠中有较高表达的表达结果一致。由于中肠是昆虫的消化器官（杨雪清，2014；Yang *et al.*，2017），由此可以说明 *CpCPR* 基因可能参与苹果蠹蛾对植物次生物质和杀虫剂等异源物质的解毒代谢。

*CPR* 作为催化 P450 进行各种氧化还原反应的关键因子，任何细微的变化可能都会对 P450 的活性造成很大的影响 (Cheng *et al.*，2006)。有研究表明，*CPR* 可能参与到了杀虫剂解毒代谢的过程中，例如敲除 *AgCPR* 基因后，按蚊 *Anopheles gambiae* 对氯氰菊酯的抗药性降低（Lycett *et al.*，2006）；干扰棉铃虫 *H.armigera HaCPR* 基因后，试虫对氰戊菊酯杀虫剂的敏感性增强（Tang *et al.*，2012）；*CPR* 基因被干扰后，温带臭虫 *C.lectularius* 在溴氰菊酯处理后的存活率远低于 *CPR* 未被干扰的对照组（Zhu *et al.*，2012）。上述研究结果一定程度上表明了 *CPR* 基因与杀虫剂的抗性有关，这一推断的主要依据是 *CPR* 基因的敲除降低了表皮对触杀性杀虫剂拟除虫菊酯分子的穿透性，使杀虫剂穿透力增加，从而导

致了昆虫对于杀虫剂的抗药性降低 (Balabanidou *et al.*，2016，2018)。该推断是否适用于胃毒杀虫剂有待进一步研究确认。此外，P450 在解毒代谢过程中需要 *CPR* 来进行电子的传递，*CPR* 基因的敲除降低了 P450 的解毒代谢能力，从而使昆虫对杀虫剂的敏感性升高。

目前，有关苹果蠹蛾的 P450 基因以及 *CPR* 基因的功能研究还滞后于其它昆虫。本研究仅对苹果蠹蛾 *CpCPR* 基因的功能进行了初步探索，其在 P450 的解毒代谢中具体扮演了什么样的角色仍需要后续 RNAi 和体外与 P450 共表达等实验来进一步研究与验证。本研究结果为更进一步探究苹果蠹蛾 *CpCPR* 基因的功能和利用 *CpCPR* 开发针对苹果蠹蛾的新型防治技术奠定基础。

## 参考文献 (References)


Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T, 2006. The SWISS-MODEL workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22(2): 195–201.

Balabanidou V, Kampouraki A, MacLean M, Blomquist GJ, Tittiger C, Juárez MP, Mijailovsky SJ, Chalepakis G, Anthousi A, Lynd A, Antoine S, Hemingway J, Ranson H, Lycett GJ, Vontas J, 2016. Cytochrome P450 associated with insecticide resistance catalyzes cuticular hydrocarbon production in *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113 (33): 9268–9273.

Balabanidou V, Grigoraki L, Vontas J, 2018. Insect cuticle: A critical determinant of insecticide resistance. *Current Opinion in Insect Science*, 27: 68–74.

Bouvier JC, Boivin T, Beslay D, Sauphanor B, 2002. Age-dependent response to insecticides and enzymatic variation in susceptible and resistant codling moth larvae. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 51(2): 55–66.

Cheesman MJ, Traylor MJ, Hilton ME, Richards KE, Taylor MC, Daborn PJ, Russell RJ, Gillam EMJ, Oakeshott JG, 2013. Soluble and membrane-bound *Drosophila melanogaster CYP6G1* expressed in *E. coli*: Purification, activity, and binding properties toward multiple pesticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43(5): 455–465.

Chen X, Zhang Y, 2015. Identification and characterization of NADPH-dependent cytochrome P450 reductase gene and cytochrome b5 gene from *Plutella xylostella*: Possible involvement in resistance to beta-cypermethrin. *Gene*, 558(2): 208–214.

Cheng J, Wan DF, Gu JR, Gong Y, Yang SL, Hao DC, Yang L, 2006. Establishment of a yeast system that stably expresses human cytochrome P450 reductase: Application for the study of drug metabolism of cytochrome P450s in vitro. *Protein Expression and Purification*, 47(2): 467–476.

Eduardo FC, Reyes M, Barros W, Sauphanor B, 2007. Evaluation of azinphos-methyl resistance and activity of detoxifying enzymes in codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) from central Chile. *Journal of Economic Entomology*, 100(2): 551–556.

Fang Y, Cai M, Ke X, Xing JC, Yang XQ, Wang XQ, 2018. Occurrence regularity of codling moth *Cydia pomonella* (Lepidoptera) on pear fruits in Zhangwu county of Liaoning province. *Journal of Plant Protection*, 45(4): 724–730. [房阳, 蔡明, 可欣, 邢竣策, 杨雪清, 王小奇, 2018. 苹果蠹蛾在辽宁省彰武县梨树上的发生规律. 植物保护学报, 45(4): 724–730.]

Feyereisen R, 1999. Insect P450 enzymes. *Annual Review of Entomology*, 44: 507–533.

Gillam EM, 2008. Engineering cytochrome P450 enzymes. *Chemical Research in Toxicology*, 21(1): 220–223.

He C, Liang JL, Liu SN, Zeng Y, Wang SL, Wu QJ, Xie W, Zhang YJ, 2020. Molecular characterization of an NADPH cytochrome P450 reductase from *Bemisia tabaci* Q: Potential involvement in susceptibility to imidacloprid. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 162: 29–35.

Ioriatti C, Tasin M, Charmillot PJ, Reyes M, Sauphanor B, 2007. Early detection of resistance to tebufenozide in field populations of *Cydia pomonella* L.: Methods and mechanisms. *Journal of Applied Entomology*, 131(7): 453–459.

Jin SJ, 2015. Occurrence and control of codling moth. *Modern Agricultural Science and Technology*, (13): 152. [靳生杰, 2015. 苹果蠹蛾的发生与防治. 现代农业科技, (13): 152.]

Kang XL, 2018. Functional study of cytochrome P450 reductase and cytochrome P450 genes in locust and corn borer. Master dissertation. Shanxi: Shanxi University. [康晓林, 2018. 飞蝗和玉米螟中细胞色素 P450 还原酶和细胞色素 P450 基因的功能研究. 硕士学位论文. 山西：山西大学.]

Liang QM, 2014. RNAi study on the odorant binding proteins and NADPH-cytochrome P450 reductase gene of *Nilaparvata lugens*. Mast dissertation. Zhejiang: Zhejiang Agricature University. [梁庆梅, 2014. 稻飞虱气味结合蛋白与P450还原酶的RNAi研究.

硕士学位论文. 浙江: 浙江大学.]

Liu S, Liang QM, Huang YJ, Huang YJ, Yuan X, Zhou WW, Qiao F, Cheng JA, Gurr GM, Zhu ZR, 2013. Cloning, functional characterization, and expression profiles of NADPH-cytochrome P450 reductase gene from the Asiatic rice striped stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry*, 166(3/4): 225–231.

Lycett GJ, McLaughlin LA, Ranson H, Hemingway J, Kafatos FC, Loukeris TG, Paine MJI, 2006. *Anopheles gambiae* P450 reductase is highly expressed in oenocytes and in vivo knockdown increases permethrin susceptibility. *Insect Molecular Biology*, 15(3): 321–327.

Paine MJI, Scrutton NS, Munro AW, Gutierrez A, Roberts GCK, Wolf CR, 2005. Electron Transfer Partners of Cytochrome P450. Boston: Springer. 115–148.

Pasquier D, Charmillot PJ, 2003. Effectiveness of twelve insecticides applied topically to diapausing larvae of the codling moth, *Cydia pomonella* L. *Pest Management Science*, 60(3): 305–308.

Pittendrigh B, Aronstein K, Zinkovsky E, Andreev O, Campbell B, Daly J, Trowell S, Ffrench-Constant RH, 1997. Cytochrome P450 genes from *Helicoverpa armigera*: Expression in a pyrethroid-susceptible and-resistant strain. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27(6): 507–512.

Pompon D, 1996. Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments. *Methods Enzymol*, 272(351): 51–64.

Reyes M, Frank P, Charmillot PJ, loriatti C, Olivares J, Pasqualini E, Sauphanor B, 2007. Diversity of insecticide resistance mechanisms and spectrum in European populations of codling moth, *Cydia pomonella*. *Pest Management Science*, 63(9): 890–902.

Rodríguez MA, Marques T, Bosch D, Avilla J, 2011. Assessment of insecticide resistance in eggs and neonate larvae of *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100 (2): 151–159.

Rose R, Goh D, Thompson DM, Verma KD, Heckle DG, Gahan LJ, Roe RM, Hodgson E, 1997. Cytochrome P450 *(CYP)9A1* in *Heliothis virescens*: The first member of a new *CYP* family. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27(6): 605–615.

Sauphanor B, Bouvier JC, Brosse V, 1998. Spectrum of insecticide resistance in *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) in Southeastern France. *Journal of Economic Entomology*, 91(6): 1225–1231.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S, 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6. 0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12): 2725–2729.

Tang T, Zhao C, Feng X, Liu X, Qiu L, Tang T, Zhao C, Feng X, Liu XY, Qiu LH, 2012. Knockdown of several components of cytochrome P450 enzyme systems by RNA interference enhances the susceptibility of *Helicoverpa armigera* to fenvalerate. *Pest Management Science*, 68(11): 1501–1511.

Voudouris CC, Sauphanor B, Frank P, Reyes M, Mamuris Z, Tsitsipis JA, Vontas J, Margaritopoulos JT, 2011. Insecticide resistance status of the codling moth *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) from Greece. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100(3): 229–238.

Wan FH, Yin C, Tang R, Chen MH, Wu Q, Huang C, Qian WQ, Stabelli O, Yang NW, Wang SP, Wang GR, Zhang GF, Guo JY, Gu LQ, Chen LF, Xing LS, Xi Y, Liu FL, Lin KJ, Guo MB, Liu W, He K, Tian RZ, Joly E, Franck P, Siegwart M, Ometto L, Anfora G, Blaxter M, Meslin C, Nguyen P, Dalíková M, Marec F, Olivares J, Maugin S, Shen JR, Liu JD, Guo JM, Luo JP, Liu B, Fan W, Feng LK, Zhao XX, Peng X, Wang K, Liu L, Zhan HX, Liu WX, Shi GL, Jiang CY, Jin JS, Xian XQ, Lu S, Ye ML, Li MZ, Yang ML, Xiong RC, Walters J, Li F, 2019. A chromosome-level genome assembly of *Cydia pomonella* provides insights into chemical ecology and insecticide resistance. *Nature Communications*, 10(1): 1–14.

Wang D, 2011. Cloning, spatiotemporal expression and RNA interference of NADPH-cytochrome P450 reductase gene in *Helicoverpa armigera*. Master dissertation. Nanjing: Nanjing Agricature University. [汪丹, 2011. 棉铃虫 NADPH-细胞色素 P450 还原酶基因的克隆、时空表达及 RNA 干扰. 硕士学位论文. 南京: 南京农业大学.]

Xu J, Liu W, Liu H, Wu LF, Zhang RZ, 2015. Spread and harm of codling moth in China. *Journal of Biosafety*, 24(4): 327–336. [徐婧, 刘伟, 刘慧, 吴立峰, 张润志, 2015. 苹果蠹蛾在中国的扩散与危害. 生物安全学报, 24(4): 327–336.]

Yang XQ, Wang W, Tan XL, Wang XQ, Dong H, 2017. Comparative analysis of recombinant cytochrome P450 *CYP9A*61 from *Cydia pomonella* expressed in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(11): 2337–2344.

Yang XQ, Zhang YL, 2014. Molecular cloning, sequence analysis

and mRNA expression stability detection of *β-actin* gene in codling moth *Cydia pomonella* (L.). *Journal of Northwest A & F University* (*Natural Science Edition*), 42(11): 135–140. [杨雪清, 张雅林, 2014. 苹果蠹蛾 *β-actin* 基因 cDNA 的克隆、序列分析及 mRNA 表达稳定性检测. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 42(11): 135–140.]

Yang XQ, 2014. Molecular cloning and function study of detoxifying genes from *Cydia pomonella* (L.). Doctoral dissertation. Yangling: Northwest A&F University. [杨雪清, 2014. 苹果蠹蛾解毒酶基因克隆及功能研究. 博士学位论文. 杨凌: 西北农林科技大学.]

Yu H, Liu S, Zhu QZ, Zhou WW, Liang QM, Shi XX, Zhu ZJ, Zhu ZR, 2016. Molecular characteristics and expression analysis of cytochrome P450 reductase gene in *Sogatella furcifera*. *Journal of Zhejiang University*(*Agriculture & Life Sciences*), 42(4): 391–400. [余航, 刘苏, 朱晴子, 周文武, 梁庆梅, 史肖肖, 祝梓杰, 祝增荣, 2016. 白背飞虱细胞色素 P450 还原酶基因的分子特征与表达模式分析. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 42(4): 391–400.]

Zhao CQ, 2014. Cloning, heterologous co-expression and effects on different compounds on the GABA receptor of *Helicoverpa armigera* cytochrome P450 enzyme related genes. Doctoral dissertation. Beijing: China Agricultural University. [赵春青, 2014. 棉铃虫细胞色素 P450 酶系相关基因克隆、异源共表达及不同化合物对 GABA 受体结合作用影响研究. 博士学位论文. 北京: 中国农业大学.]

Zhang HB, 2018. Monitoring and control of codling moth in Qinzhou District, Tianshui City. *Agricultural Science-Technology and Information*, (16): 56–57. [张鸿斌, 2018. 天水市秦州区苹果蠹蛾监测与防控. 农业科技与信息, (16): 56–57.]

Zhang XZ, Zhou SL, Wang YJ, 1958. A preliminary study on the codling moth. *Acta Entomologica Sinica*, 8(2): 136–150. [张学祖, 周绍来, 王庸俭, 1958. 苹果蠹蛾的初步研究. 昆虫学报, 8(2): 136–150.]

Zhang XY, Wang JX, Liu J, Li YH, Liu XJ, Wu HH, Ma EB, Zhang ZB, 2017. Knockdown of NADPH-cytochrome P450 reductase increases the susceptibility to carbaryl in the migratory locust, *Locusta migratoria*. *Chemosphere*, 188: 517–524.

Zhu F, Sams S, Moural T, Haynes KF, Potter MF, Palli SR, 2012. RNA interference of NADPH-cytochrome P450 reductase results in reduced insecticide resistance in the bed bug, *Cimex lectularius*. *PLoS ONE*, 7(2): e31037.