

星豹蛛 *PaCYP3001U16* 基因的克隆与表达分析



王雅丽 赵 瑞 王 美 张晓晨 燕晶晶 李 锐*

(山西农业大学植物保护学院, 太谷 030801)

摘要: 为探究细胞色素P450基因在星豹蛛 *Pardosa astrigera* 体内的表达特性及对溴氰菊酯胁迫的响应, 采用反转录PCR技术克隆其细胞色素P450基因并进行序列分析, 采用实时荧光定量PCR (quantitative real-time PCR, RT-qPCR) 技术分析其在星豹蛛各发育阶段及雌雄成蛛不同部位的表达水平, 同时分析其在溴氰菊酯不同浓度胁迫下和不同处理时间后的表达模式。结果显示, 在星豹蛛雌成蛛中克隆得到1个细胞色素P450基因, 其开放阅读框为1 473 bp, 编码490个氨基酸, 命名为 *PaCYP3001U16* (GenBank 登录号为MZ643213)。*PaCYP3001U16* 基因在星豹蛛各发育阶段均有表达, 其中在成蛛期的表达量最高, 在6龄幼蛛期的表达量最低; 该基因在雌雄成蛛腹部的表达量显著高于在头胸部及足部的表达量。星豹蛛雄成蛛经 LC_{10} (5.151 mg/L)、 LC_{30} (8.619 mg/L) 和 LC_{50} (12.311 mg/L) 溴氰菊酯处理12 h, *PaCYP3001U16* 基因的表达量均被抑制, 且在 LC_{50} 处理下表达量最低。*PaCYP3001U16* 基因经 LC_{30} 溴氰菊酯处理不同时间后表达趋势不同, 在处理2 h和4 h表现为诱导效应, 且在处理4 h的基因表达量最高, 为对照的1.79倍; 在处理8、12和24 h表现为抑制效应, 在处理24 h的基因表达量最低; 而处理48 h的基因表达量又开始升高, 表现为诱导效应。表明星豹蛛 *PaCYP3001U16* 基因在不同发育阶段和成蛛不同部位的表达水平不同, 且溴氰菊酯可以诱导该基因的表达, 推测该基因参与星豹蛛的生长发育及对外源物质的代谢。

关键词: 星豹蛛; 细胞色素P450; 基因克隆; 序列分析; 溴氰菊酯; 表达分析

Cloning and expression analysis of cytochrome P450 gene *PaCYP3001U16* in a wolf spider *Pardosa astrigera*

Wang Yali Zhao Rui Wang Mei Zhang Xiaochen Yan Jingjing Li Rui*

(College of Plant Protection, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi Province, China)

Abstract: In order to explore the expression characteristics of cytochrome P450 gene in a wolf spider *Pardosa astrigera* and its response to deltamethrin stress, reverse transcription-PCR was used to clone the gene and its sequence was analyzed. Quantitative real-time PCR (RT-qPCR) was used to analyze the expression levels of cytochrome P450 gene at different developmental stages and in different body parts of female and male adults of *P. astrigera*. The expression pattern of cytochrome P450 gene in *P. astrigera* was analyzed under different concentrations of deltamethrin and different treatment durations. The results showed that a cytochrome P450 gene was cloned from female adults of *P. astrigera* with an open reading frame of 1 473 bp, encoding 490 amino acids, named *PaCYP3001U16* (GenBank accession no. MZ643213). The *PaCYP3001U16* gene was expressed at all developmental stages of *P. astrigera*; its expression was the highest at the adult stage and the lowest at the 6th-instar larval stage, and the expression in the abdomen of female and male adults of *P. astrigera* was significantly higher than those in

基金项目: 农业农村部农产品质量安全监管专项(15197063), 山西省高等学校科技研究优秀成果培育项目(2019KJ019), 山西省基础研究计划(自由探索类)项目(20210302124160)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: sxaulr@126.com

收稿日期: 2021-07-12

cephalothorax and legs. Exposure of male adults of *P. astrigera* to deltamethrin at three concentrations (LC_{10} : 5.151 mg/L, LC_{30} : 8.619 mg/L and LC_{50} : 12.311 mg/L) for 12 h led to the inhibition of the expression of *PaCYP3001U16* gene, and the lowest expression was found in LC_{50} treatment. The expression levels of *PaCYP3001U16* gene were different after LC_{30} deltamethrin treatment for different periods: the gene expression exhibited an induction effect at 2 h and 4 h, and the highest expression was detected at 4 h, 1.79 times of that in the control. The expression of *PaCYP3001U16* gene displayed an inhibition effect at 8, 12 and 24 h, and the lowest expression occurred at 24 h. Its expression rebounded at 48 h, showing an induction effect. The *PaCYP3001U16* gene had different expression levels at different developmental stages and in different body parts of adults of *P. astrigera*. Deltamethrin could induce the expression of *PaCYP3001U16* gene. It indicated that *PaCYP3001U16* gene was involved in the growth and development of *P. astrigera* and metabolism of exogenous substances.

Key words: *Pardosa astrigera*; cytochrome P450; gene cloning; sequence analysis; deltamethrin; expression analysis

蜘蛛是农林生态系统中主要的捕食性天敌,在害虫防控方面起着重要作用(赵学铭等,1989)。星豹蛛 *Pardosa astrigera* 隶属蛛形纲蜘蛛目狼蛛科,能捕食多种害虫,捕食量大且寿命长,种群数量多,分布范围广,是优势种蜘蛛之一,其种群数量的变化直接影响害虫的发生数量(李生才等,2006;李锐等,2014a)。杀虫剂被广泛应用于防治农林害虫,多选择可以杀死80%~95%靶害虫种群的高剂量,但高剂量杀虫剂的使用严重威胁着害虫天敌的生存(张珠凤,2001)。昆虫通常依靠体内解毒酶系代谢来自食物及环境中的有毒物质(Brattsten et al., 1986)。昆虫解毒酶系主要包括细胞色素P450、羧酸酯酶和谷胱甘肽-S-转移酶(Li et al., 2007)。其中细胞色素P450酶系是一相酶,在生物体对化学农药的初级代谢过程中起重要作用,参与对拟除虫菊酯类等多种杀虫剂的代谢(郭艳琼,2012)。

细胞色素P450是包含血红素结构的末端氧化酶,分布在内质网和线粒体内膜上(Nelson et al., 1993),包含螺旋C区、螺旋I区、螺旋K区、Mander区和血红素结合区5个重要结构域,血红素结合区是最保守的结构中心(Graham & Peterson, 1999)。细胞色素P450家族基因种类多且具有广泛的底物特异性,在昆虫生命过程中发挥着多种功能,目前对昆虫细胞色素P450的研究主要集中在2个方面,一是参与蜕皮激素、保幼类激素和保幼激素等的合成,与昆虫的生长、发育和防御密切相关(Qiu et al., 2012);二是参与杀虫剂和植物毒素等外源物质的代谢(Mansuy, 1998)。另外,细胞色素P450在昆虫体内的表达具有发育阶段及组织特异性。如中华按蚊 *Anopheles sinensis* CYP6Z2基因在化蛹30 h至成蚊3 h期间显著

高表达,该基因在腹部后端的表达量高于在其他部位的表达量(韩宝珠等,2020)。细胞色素P450还具有可诱导性,如苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* 两个细胞色素P450基因的表达量在幼虫取食含有槲皮素和香豆素的饲料后升高,推测其可能参与苹果蠹蛾代谢外源物质的过程(陈高满等,2020);对吡虫啉处理前后韭菜迟眼蕈蚊 *Bradysia odoriphaga* 的基因表达水平进行转录组测序分析,有4个细胞色素P450基因在杀虫剂处理后上调表达,对这4个基因进行干扰后,该虫对吡虫啉的敏感性显著增加(Chen et al., 2018)。

目前,对星豹蛛的研究主要集中在化学农药对其行为(袁泽斌等,2017)、捕食能力和酶活性的影响方面(李锐等,2014b)。而有关星豹蛛体内细胞色素P450的研究鲜有报道。本课题组对不同浓度溴氰菊酯处理的星豹蛛进行转录组测序,从中筛选出5个可能参与对溴氰菊酯代谢的细胞色素P450基因(李萨丽,2017),并成功克隆到其中2个细胞色素P450基因(任彦鸿等,2020a;b)。为明确星豹蛛体内细胞色素P450的作用机制,基于李萨丽(2017)所得转录组数据选择其中1个细胞色素P450基因进行克隆和序列分析,同时利用实时荧光定量PCR (quantitative real-time PCR, RT-qPCR)技术检测其在不同龄期及不同部位的表达特性,分析该基因在溴氰菊酯不同浓度胁迫下和不同处理时间后的表达模式,以期为该基因在星豹蛛体内的作用与功能研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试星豹蛛:星豹蛛雌成蛛采自山西省太谷区

山西农业大学农学院试验基地,带回室内在人工气候箱中饲养,待其产卵并孵化后,取孵化的2龄幼蛛单头饲养于内直径1.5 cm、高8 cm的指形管中,管底放入湿棉球保湿,饲养于温度(29±1)℃、相对湿度(75±5)%、光周期16 L:8 D的人工气候箱中,以黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 和黄粉虫 *Tenebrio molitor* 为主要食物,每2 d投喂1次,定期更换指形管,收集所需龄期的星豹蛛供试。黑腹果蝇于室外用水果诱集,在室内以玉米培养基繁殖;黄粉虫为市售。在同一地点采集星豹蛛雄性亚成蛛(6龄),在上述相同条件下饲养至成蛛供试。

玉米培养基:琼脂1.4 g、白糖10 g、玉米粉14 g、蒸馏水120 mL、丙酸0.8 mL。

试剂和药剂:柱式动物组织总RNA抽提纯化试剂盒、SanPrep柱式DNA胶回收试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司; *TransStart[®] FastPfu* DNA Polymerase、*pEASY[®]-Blunt Zero Cloning Kit*,北京全式金生物技术有限公司; *Talent qPCR PreMix (SYBR Green)*,天根生化(北京)科技有限公司; *HiScript[®] II 1st Strand cDNA Synthesis Kit*,南京诺唯赞生物科技股份有限公司;其余试剂均为国产分析纯。25 g/L溴氰菊酯(*deltamethrin*)乳油,拜耳作物科学(中国)有限公司。

仪器:MGC-300H人工气候箱,上海一恒科学仪器有限公司;Mx3000P荧光定量PCR仪,美国安捷伦 Stratagene 公司;T100 Thermal Cycler PCR仪和PowerPac HC164-5052电泳仪,美国Bio-Rad公司;Biodrop DUO超微量分光光度计,英国Biochrom公司;AT126SL凝胶成像仪,美国Alpha Innotech公司。

1.2 方法

1.2.1 星豹蛛细胞色素P450基因的克隆

选取3头未交配星豹蛛雌成蛛,液氮冻存备用。按照柱式动物组织总RNA抽提纯化试剂盒提取星豹蛛雌成蛛RNA,经1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性,有完整的18S和28S rRNA条带,经超微量分光光度计测定浓度, $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 值在1.80~2.20之间视为合格。检测合格后,将得到的RNA按照 *HiScript[®] II 1st Strand cDNA Synthesis Kit* 说明书合成cDNA,作为模板保存备用。

从本课题组建立的星豹蛛转录组数据库(未上传)中搜索细胞色素P450相关序列,依据搜寻序列信息利用Primer Premier 5.0软件设计特异性扩增引物 *PaCYP3001U16-F* (5'-TCTAGAAGTATCGCCGACT-3') 和 *PaCYP3001U16-R* (5'-TTAGAAATACAA-

AACGGGGGAA-3'),所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,以cDNA为模板,用高保真酶进行基因PCR扩增。50 μL PCR反应体系:cDNA 2 μL、5×*TransStart[®] FastPfu* Buffer 10 μL、10 μmol/L上下游引物各1 μL、2.5 mmol/L dNTPs 4 μL、*TransStart[®] FastPfu* DNA Polymerase 1 μL、无核酸酶水31 μL。PCR反应程序:95℃预变性1 min;95℃变性20 s,53.4℃退火20 s,72℃延伸1 min,40个循环;72℃终延伸5 min。利用1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,将目的条带进行割胶回收,回收产物连接转化至大肠杆菌 *Escherichia coli* 感受态细胞 *Trans1-T1*,挑取菌落进行PCR检测,将具有正确扩增条带的菌液送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将测序所得序列与转录组筛选的基因序列利用Clustal Omega在线程序进行比对,将验证后的序列提交P450国际命名委员对该基因进行命名,并上传至GenBank。

1.2.2 星豹蛛细胞色素P450基因的生物信息学分析

使用NCBI ORF Finder在线程序(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)查找1.2.1获得的星豹蛛细胞色素P450基因的开放阅读框;使用ExPasy-ProtParam tool在线程序(<https://web.expasy.org/prot-param/>)分析该基因编码蛋白的基本理化性质;使用SignalP 5.0在线工具(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)分析该基因编码蛋白的信号肽;使用NetNGlyc-1.0在线程序(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)预测该基因编码蛋白的N-糖基化位点;使用TMHMM在线程序(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)预测该基因编码蛋白的跨膜区;使用Cell-PLoc 2.0在线程序(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>)预测该基因编码蛋白的亚细胞定位;以该基因编码蛋白序列为搜索序列,在NCBI数据库中进行BLASTP比对,下载相似性高的其他物种细胞色素P450序列,使用MEGA 7.0软件以邻接法构建系统发育树,bootstrap值设为1 000。

1.2.3 星豹蛛各发育阶段和部位目的基因表达量测定

不同发育阶段样品采集:选取星豹蛛的卵袋3个(共重约60 mg)、2龄幼蛛80头、3龄幼蛛30头、4龄幼蛛15头、5龄幼蛛10头、6龄幼蛛6头、成蛛4头,其中2~5龄幼蛛未分雌雄,6龄及成蛛雌雄各半,每个发育阶段均设3次重复。不同部位样品采集:选取雌雄成蛛各6头,在冰上迅速取头胸部、腹部和足部3个部分,每个部位均设3次重复。所有样品采集后于液氮中冻存,备用。

以 β -Actin为内参基因进行RT-qPCR扩增,内参基因引物序列为 β -Actin-qF(5'-GCAATCCTTCGT-TTGACTT-3')/ β -Actin-qR(5'-TTCTCTTTCAGCA-GTGGTAGTGA-3')(李锐等,2015);目的基因引物序列为PaCYP3001U16-qF(5'-ATGATCCTGCATT-TACCAAGCC-3')/PaCYP3001U16-qR(5'-GCAGC-AACCAATTCTACGCTC-3')。星豹蛛各发育阶段和不同部位样品的RNA提取和cDNA合成同1.2.1,参照Talent qPCR PreMix(SYBR Green)试剂盒说明书进行RT-qPCR扩增。20 μ L RT-qPCR反应体系:2 $\times$ Talent qPCR PreMix 10 μ L、10 μ mol/L上下游引物各0.6 μ L、cDNA 1 μ L、50 $\times$ ROX Reference Dye 0.4 μ L、RNase-Free ddH₂O 7.4 μ L。RT-qPCR反应程序:95 $^{\circ}$ C预变性3 min;95 $^{\circ}$ C变性5 s,60 $^{\circ}$ C退火/延伸15 s,40个循环;以95 $^{\circ}$ C变性15 s、55 $^{\circ}$ C复性30 s、95 $^{\circ}$ C变性30 s程序监测荧光信号生成熔解曲线。所得数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法(Pfaffl,2001)计算星豹蛛目的基因的相对表达量。在不同发育阶段以该基因在6龄幼蛛中的表达量为基准进行比较分析,在不同部位中以该基因在雄成蛛足部的表达量为基准进行比较分析。

1.2.4 星豹蛛的溴氰菊酯胁迫试验

星豹蛛雄成蛛试验前饥饿处理24 h备用。参照本课题组前期对星豹蛛的毒力测定结果(李萨丽,2017),选择5.151 mg/L(LC₁₀)、8.619 mg/L(LC₃₀)、12.311 mg/L(LC₅₀)3个浓度进行溴氰菊酯浓度效应试验,用丙酮将溴氰菊酯稀释获得这3个浓度,并以丙酮为对照。采用药膜法(池仕运等,2009)处理星豹蛛,用注射器分别抽取约2 mL药液移入指形管内,手指堵住管口晃动指形管使药液充分浸润内壁并形成一层均匀的药膜,倒掉药液,置于阴凉处干燥备用。向干燥的管内转移1头饥饿24 h的星豹蛛雄成蛛,让其在管内活动1 h后再转移至正常管内,重新计时,收集处理12 h后仍存活的星豹蛛,液氮冻存备用。每个浓度处理13~23头。选择LC₃₀溴氰菊酯处理饥饿24 h的星豹蛛雄成蛛进行时间效应试验,以丙酮处理为对照,对照组处理约70头,试验组处理约100头,方法同浓度效应试验。分别于处理后2、4、8、12、24和48 h收集存活星豹蛛并用液氮冻存备用。每个浓度和时间处理均取3头,重复3次,即分别取9头,采用1.2.3方法检测各样品中目标基因的表达量。以12 h对照处理的表达量为基准进行比较分析。

1.3 数据分析

利用SPSS 25.0软件对数据进行统计分析,不同

处理之间基因表达的差异采用单因素方差分析,利用最小显著差数(LSD)法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 星豹蛛细胞色素P450基因的克隆及序列分析

从星豹蛛雌成蛛体内克隆获得1个细胞色素P450基因,命名为PaCYP3001U16(GenBank登录号为MZ643213)。星豹蛛PaCYP3001U16与大腹园蛛*Araneus ventricosus*和温室拟肥腹蛛*Parasteatoda tepidariorum*的细胞色素P450 18a1(GenBank登录号分别为GBM40298.1和XP_015904782.2)的氨基酸序列一致性分别为53.59%和53.48%。序列分析表明,克隆得到的PaCYP3001U16是全长基因,开放阅读框为1 473 bp,共编码490个氨基酸。该氨基酸序列具有5个家族标签序列,即螺旋C区(第119~123位)、螺旋I区(第295~300位)、螺旋K区(第352~358位)、Meander区(第403~411位)及血红素结合区(第428~437位)序列。星豹蛛PaCYP3001U16基因编码蛋白的分子量约为56.71 kD,预测的理论等电点为7.14,分子式为C₂₆₀₃H₄₀₃₄N₆₈₀O₇₁₅S₁₃,酸性氨基酸(亮氨酸+谷氨酸)数量为63,碱性氨基酸(精氨酸+赖氨酸)数量为63,不稳定指数为49.88,为不稳定蛋白,总平均亲水系数为-0.225,属于亲水蛋白。该基因编码的蛋白预测不含信号肽;存在N-糖基化位点;有1个跨膜结构域,位于3~20位氨基酸残基处;蛋白亚细胞定位预测位于内质网(图1)。

2.2 星豹蛛PaCYP3001U16基因的系统发育分析

于NCBI在线工具选择与PaCYP3001U16基因编码蛋白相似度大于40%的部分物种,包括隆头蛛*Stegodyphus mimosarum*、大腹园蛛、横纹金蛛*Argiope bruennichi*、穹蛛*Stegodyphus dumicola*、马蹄蟹*Limulus polyphemus*、肩突硬蜱*Ixodes scapularis*、血红扇头蜱*Rhipicephalus sanguineus*、森林革蜱*Dermacentor silvarum*、柑橘全爪螨*Panonychus citri*、二斑叶螨*Tetranychus urticae*的细胞色素P450蛋白序列,与星豹蛛PaCYP3001U16基因编码蛋白构建系统发育树,结果显示星豹蛛与蜘蛛目其他蜘蛛聚为一支,其中与隆头蛛和大腹园蛛的亲缘关系较近(图2)。

2.3 星豹蛛PaCYP3001U16基因的表达分析

PaCYP3001U16基因在星豹蛛整个生长发育阶段均有表达,其中在6龄幼蛛期的相对表达量最低,在成蛛期的相对表达量最高,是6龄幼蛛期表达量的7.78倍,在3~5龄幼蛛期的相对表达量次之且表达量相对稳定(图3-A)。

1 TCTAGAAGTATCGCCGACTCTCTCATCGGAGTAAGTCCGATAAAGTTTCAAGGATATTCGATTAAGATCACTGTAACAAAA
83 ATGGAACCTTTTGTGGCGCTCGTGGCTGGTTTGATTACAGTAGTCATATTATGGTGGTGTAATCAACTAACATTAAGGGTAATCTAAAA
1 M E L F V A L V A G L I T V V I L W W C K S T N I K G N L K
173 AAATTACGGGACCATGGGTTTACCTTTCTGGGTTACATCCCTTTTCATGCATTCAGGCTTATTTGACTTTACAGAATTGGCCAGA
31 K L P G P W G L P F L G Y I P F M H S K P Y L T F T E L A R
263 CGTTATGGAAGCGTATACAGCGTTCGCTGGGTAGCCGAAATATAGTGGTCTGAATGATTACCAATCGACAAAAGAAGCTTTCTCTCAA
61 R Y G S V Y S V R L G S R N I V V L N D Y Q S T K E A F S Q
353 GACGTATTTATAGGAGGCCACCGATACCTTTTGAACAAATAAGAACTGCGGAATCTGGAGCATTTTGGTTTGGGATGGAAG
91 D V F I G R P P D T P F E L N K E T A E S G A F F G L G W K
443 GAGCAGCGCAGATTTGTTCTACACATGTTGCGAGATCTGGGCTCGGAAGATCAAAGATGAAGGTTCTATACAGGAAGAAATAGTGCA
121 E Q R R F V L H M L R D L G L G R S K M E G S I Q E E I S A
螺旋 C 区 C-helix
533 TTGTTAGGACATTTAGAGAAAAACGAGAACAACCGTTCTGCGTCCGTGAGATATTGATTCCAAGTGATCAATAACATATCATCTCTC
151 L L G H L E K N E N K P F C V R E I L I P S V I N N I S S L
623 ATATTCGCAAAAGATTCAAGTATGATGATCCGAACGCCCTCATGATATCAAACCTTTGTGACGGAGACTTCCAAGGACGAGGTCAGT
181 I F G K R F K Y D D P E R L M I S N F V T E T S K A A G Q V
713 GTTTGGCTATTTTCTTCCCTGGATAAGGAGGACATTGATGTTCTTCAACATCGAAATCGACAAAGTTCGGATACTGGCCAGGGGCTT
211 V W L I F F P W I R T L M F F N I E I D K V R I L G Q G L
803 AAAAATATATCAAGAAAGAGATAGAGGAGCAGAACCAACATTCAACCCAGATAACATTCTGATTTTATTGATGCGTACATCTAGAA
241 K N Y I K K E I E E H E R T F N P D N I R D F I D A Y I L E
893 ATGAGGCAAAAGAGGATGATCTGCTGATTTCAAGCCGCTATTAGAAGATCTAGCGGGAGCAATATTGTTGGTGAAGCGAGACGGTC
271 M R Q K K D D P A F T K P V L E D L A G A I F G G G S E T V
螺旋 I 区 I-helix
983 AGACAGAGCGTAGAATGGTTGCTGCTCTTGCTGCATTCCACCTAGAAAGACAACGTCGAATTCAGTCTGAAATACAGGAAGTATTGGA
301 R Q S V E W L L L L A A F H L E R Q R R I Q S E I Q E V I G
1073 TCTGACAGATTTCCCGAGTGGATCGACAGAGAGCATGCCTTACACAACAGCTTTTATCCAAGAAATGCTGCGGTGGAGGACCTTATA
331 S D R F P E W I D Q K S M P Y T T A F I Q E M L R W R T L I
螺旋 K 区 K-helix
1163 CCGATCAACTTACTTAGATACACACTTGCTGACACAGAACTGAATGGATACTTTATACCAAAGCATTCAACATTCTCTCAAACTG
361 P I N L L R Y T L A D T E L N G Y F I P K H S T I L S N H W
1253 GCAATCCATCATGATCCTGAGTTTGGGGATCAGACGCTGAAGAGTTTCGACAGAAAGGTTCTCAACGAAAAAGGAGACCAACTGATA
391 A I H H D P E F W G S D A E E F R P E R F L N E K G D Q L I
Meander 区 Meander region
1343 AAGCTGGAGCAGTATGTACCATTTTCTACAGGCAAAAGAGCTTTCAGGAGAACCTATGGCAAAAGTAGAAGCTTTCTCTACTTTGTT
421 K L E Q Y V P F S T G K R A C P G E P M A K V E V F L Y F V
血红素结合区 Heme binding domain
1433 TCCATTCTTCAGAAATTCGATGTCAGGCTTCCAAAAGGAAGCAACCGGATTTCGAAGGAGAACTAGGAATTTGCTTCAATAAAAGCT
451 S I L Q K F D V R L P K G K E P D F E G E L G I G L Q I K A
1523 CAAGACATTGTGTTGACCAAAAGGACATCTAAATCTTTGATTAAATGACTGTTATTAGACTGTTAATTAGATTAGCTAATCGGAC
481 Q D I V L T K R T S *
1613 TGTAACATCATAATTTTCATTATGATTCCCGTTTTGTATTCTAA

灰色阴影为起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA, 星号所示为终止密码子; 黑色长方形框内为 N-糖基化位点; 下划线为 5 个保守序列。The initiation codon ATG and the stop codon TAA are in gray, and the stop codon is indicated with an asterisk; the inside of the black box indicates an N-glycosylation site; the underlined regions indicate the five conservative sequences of *PaCYP300IU16* gene.

图 1 星豹蛛 *PaCYP300IU16* 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 *PaCYP300IU16* gene in *Pardosa astrigera*

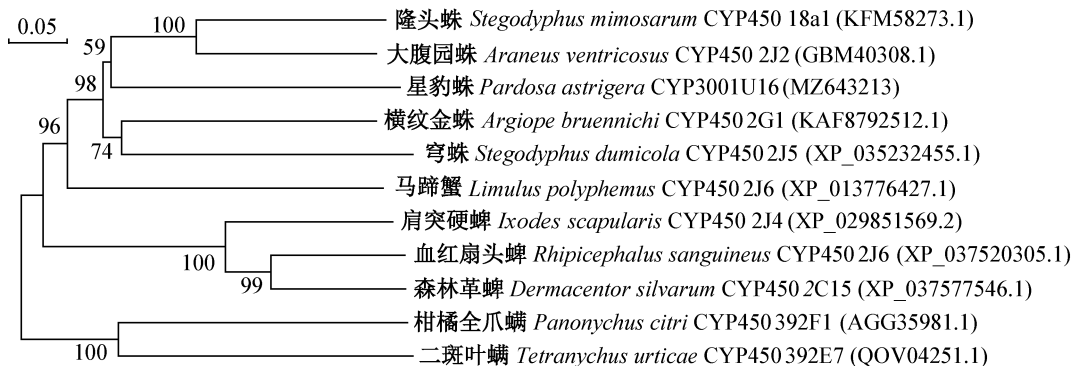
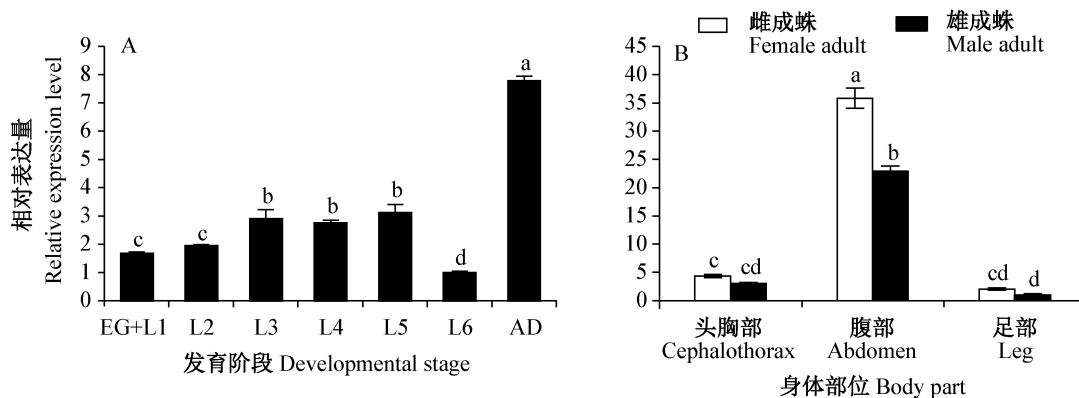


图 2 基于细胞色素 P450 以邻接法构建星豹蛛与其相关物种的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic analysis of *Pardosa astrigera* and representative species using neighbor-joining method based on cytochrome P450 sequences

*PaCYP3001U16*基因在星豹蛛不同部位均有表达,在腹部的相对表达量显著高于头胸部及足部,头胸部与足部中的相对表达量差异不显著;该基因在

雌成蛛腹部的相对表达量显著高于在雄成蛛腹部的相对表达量,而在雌雄成蛛的其他2个部位中的相对表达量差异不显著(图3-B)。



EG+L1: 卵+1龄幼蛛; L2: 2龄幼蛛; L3: 3龄幼蛛; L4: 4龄幼蛛; L5: 5龄幼蛛; L6: 6龄幼蛛; AD: 成蛛。EG+L1: Egg+1st-instar larva; L2: 2nd-instar larva; L3: 3rd-instar larva; L4: 4th-instar larva; L5: 5th-instar larva; L6: 6th-instar larva; AD: adult.

图3 星豹蛛*PaCYP3001U16*基因在不同发育时期(A)和不同部位(B)的相对表达量

Fig. 3 Relative expression levels of *PaCYP3001U16* in *Pardosa astrigera* at different developmental stages (A) and in different body parts (B)

图中数据为平均数±标准误。柱上不同字母表示经LSD法检验差异显著($P < 0.05$)。Data in the figure are mean±SE. Different letters on the bars indicate significant difference by LSD test ($P < 0.05$).

2.4 溴氰菊酯对星豹蛛*PaCYP3001U16*表达的影响

2.4.1 溴氰菊酯的浓度胁迫效应分析

利用 5.151 mg/L (LC_{10})、8.619 mg/L (LC_{30}) 和 12.311 mg/L (LC_{50}) 溴氰菊酯处理星豹蛛雄成蛛 12 h 后,与对照组相比,星豹蛛体内*PaCYP3001U16*基因的相对表达量均受到抑制,其中 LC_{10} 和 LC_{50} 溴氰菊酯处理后,*PaCYP3001U16*基因的相对表达量均显著低于对照组,且 LC_{50} 处理后该基因的相对表达量最低, LC_{30} 处理的相对表达量低于对照组,但两者差

异不显著(图4-A)。

2.4.2 溴氰菊酯的时间胁迫效应分析

采用 LC_{30} 溴氰菊酯处理星豹蛛雄成蛛后,其体内*PaCYP3001U16*基因的相对表达量在处理 2 h 和 4 h 表现为诱导效应,且在处理 4 h 的基因表达量最高,为对照的 1.79 倍;在处理 8、12 和 24 h 表现为抑制效应,在处理 8 h 和 24 h 的表达量显著低于对照,且在处理 24 h 的基因表达量降到最低;而在处理 48 h 的基因表达量又开始升高,表现为诱导效应(图4-B)。

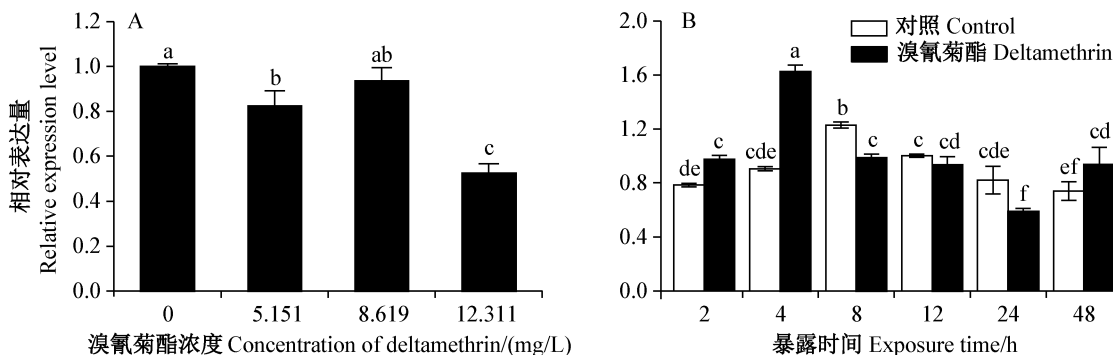


图4 溴氰菊酯对星豹蛛*PaCYP3001U16*基因相对表达量的浓度(A)和时间(B)效应

Fig. 4 Effects of deltamethrin with different concentrations (A) and different exposure time (B) on the relative expression level of *PaCYP3001U16* gene in *Pardosa astrigera*

图中数据为平均数±标准误。柱上不同字母表示经LSD法检验差异显著($P < 0.05$)。Data in the figure are mean±SE. Different letters on the bars indicate significant difference by LSD test ($P < 0.05$).

3 讨论

本研究克隆获得1个星豹蛛细胞色素P450基因 *PaCYP3001U16*, 序列分析结果显示该基因开放阅读框为1 473 bp, 编码490个氨基酸, 含有细胞色素P450家族的5个保守序列。螺旋C区参与细胞色素P450酶活性位点的形成, 与血红素的结合相关(Graham & Peterson, 1999), 螺旋I区可能参与P450与底物的结合(Deng et al., 2007), 螺旋K区可能参与核心结构的稳定(Chen & Zhou, 1992), Meander区又叫芳香区, 专属于微粒体细胞色素P450, 血红素结合区是活性中心结合区特有的固定保守序列(朱明, 2016), 也是判断细胞色素P450的标志(朱明亮等, 1999)。序列分析表明本研究中该基因属于细胞色素P450家族, 且克隆得到了该基因的cDNA全长序列。

星豹蛛 *PaCYP3001U16* 基因编码蛋白无信号肽, 不是分泌蛋白。该基因编码蛋白糖基化位点预测结果显示有1个N-糖基化位点, N-糖基化可能与酶活性位点的空间结构或稳定蛋白结构有关(Wheelock et al., 2005)。聚类分析结果显示星豹蛛 *PaCYP3001U16* 基因与蜘蛛目其他蜘蛛的细胞色素P450聚在一起, 说明星豹蛛 *PaCYP3001U16* 基因序列属于P450家族且保守性强。因此推测 *PaCYP3001U16* 基因具有稳定的结构和催化效率, 可以代谢某些内源或外源物质。

李沛蓉等(2020)研究了苹果蠹蛾 *CpCPR* 基因在不同发育阶段及4龄幼虫不同组织部位的表达谱, 发现该基因在各个发育阶段及各部位均有表达, 其中在幼虫期及中肠的表达量最高。朱明(2016)研究结果显示, 中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* *CYP18A1* 和 *CYP336A1* 基因在不同发育时期和不同组织部位的表达各异, 后续发现这2条基因不仅参与蜜蜂的变态发育, 而且还在其响应外界环境因素如低温刺激、紫外照射以及农药处理的过程中发挥着作用。本研究分析了星豹蛛 *PaCYP3001U16* 基因在不同发育阶段及不同部位的表达情况, 发现该基因在星豹蛛整个发育阶段均有表达, 在成蛛期的表达量最高, 可能是由于成蛛捕食量增大, 需要提高该基因的表达量来代谢外源物质, 在6龄幼蛛期该基因的表达量最低, 推测是由于6龄幼蛛发育历期长且生长缓慢(燕晶晶等, 2021)。活性氧容易在生长迅速的生物体中产生, 且活性氧过多会引起氧化损伤(Corona & Robinson, 2006), 细胞色素P450可以防御活性

氧对生物体造成的伤害(de Matteis et al., 2012), 因此推测 *PaCYP3001U16* 基因可能在星豹蛛生长发育过程中发挥着重要作用。朱文雅等(2017)检测了 *LMCYP6D3* 基因在飞蝗 *Locusta migratoria* 的5龄若虫不同组织部位的表达量, 发现该基因在马氏管、后肠及脂肪体中的表达量较高, 后续的RNA干扰试验表明该基因可能参与飞蝗对西维因农药的代谢。本研究对星豹蛛 *PaCYP3001U16* 基因在成蛛不同部位的表达量进行测定, 发现该基因的表达具有组织特异性, 且在腹部的表达量显著高于在头胸部及足部的表达量, 可能由于星豹蛛腹部包含马氏管等大部分组织。马氏管是排泄器官, 同时也在外源物质的解毒和代谢中起重要作用(Yang et al., 2007; Guo et al., 2016), 因此推测该基因可能在外源物质代谢中起重要作用。

利用昆虫解毒酶的可诱导性可以推测其是否参与对外源物质的代谢(Poupardin et al., 2008)。本试验利用RT-qPCR技术测定了溴氰菊酯胁迫下星豹蛛 *PaCYP3001U16* 基因的相对表达量, 结果显示处理后该基因在短时间内被显著诱导表达, 且高浓度溴氰菊酯能显著抑制该基因表达。徐鹿等(2017)研究也表明不同浓度的氟啶虫胺腈胁迫灰飞虱 *Laelodelphax striatellus* 后, 在特定时间点细胞色素P450基因的表达量显著增加, 从而使酶蛋白含量增加。本研究中, 星豹蛛 *PaCYP3001U16* 基因对不同浓度溴氰菊酯及在不同处理时间后表现出不同程度的应答, 表明该基因可能参与星豹蛛代谢溴氰菊酯的过程。为进一步阐明该基因是否参与溴氰菊酯代谢, 今后还需要利用RNA干扰技术对单个基因进行沉默间接验证或将基因体外表达后给予底物直接证明。

参 考 文 献 (References)

- Brattsten LB, Holyoke CW Jr., Leeper JR, Raffa KF. 1986. Insecticide resistance: challenge to pest management and basic research. *Science*, 231(4743): 1255-1260
- Chen CY, Wang CC, Liu Y, Shi XY, Gao XW. 2018. Transcriptome analysis and identification of P450 genes relevant to imidacloprid detoxification in *Bradysia odoriphaga*. *Scientific Reports*, 8: 2564
- Chen GM, Chen ZB, Ge H, Yang XQ, Wang XQ. 2020. Cloning and expression analysis of cytochrome P450 genes *CYP332A19* and *CYP337B19* in the codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Acta Entomologica Sinica*, 63(8): 941-951 (in Chinese) [陈高满, 陈展博, 葛辉, 杨雪清, 王小奇. 2020. 苹果蠹蛾细胞色素P450基因 *CYP332A19* 和 *CYP337B19* 的克隆及表达分析. *昆虫学报*, 63(8): 941-951]

- Chen S, Zhou D. 1992. Functional domains of aromatase cytochrome P450 inferred from comparative analyses of amino acid sequences and substantiated by site-directed mutagenesis experiments. *Journal of Biological Chemistry*, 267(31): 22587–22594
- Chi SY, Jiao LX, Zou J, Ke J, Peng Y. 2009. Measurement of the toxicity of insecticides to the spiders (Araneae) by using dry film bioassay. *Journal of Hubei University (Natural Science)*, 31(1): 86–87, 108 (in Chinese) [池仕运, 焦良轩, 邹晶, 柯剑, 彭宇. 2009. 利用药膜法测定杀虫剂对蜘蛛的毒性. 湖北大学学报(自然科学版), 31(1): 86–87, 108]
- Corona M, Robinson GE. 2006. Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny. *Insect Molecular Biology*, 15(5): 687–701
- de Matteis F, Ballou DP, Coon MJ, Estabrook RW, Haines DC. 2012. Peroxidase-like activity of uncoupled cytochrome P450: studies with bilirubin and toxicological implications of uncoupling. *Biochemical Pharmacology*, 84(3): 374–382
- Deng JX, Carbone I, Dean RA. 2007. The evolutionary history of cytochrome P450 genes in four filamentous Ascomycetes. *BMC Evolutionary Biology*, 7: 30
- Graham SE, Peterson JA. 1999. How similar are P450s and what can their differences teach us? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 369(1): 24–29
- Guo YQ. 2012. Molecular characterization and functional analysis of cytochrome P450s in *Locusta migratoria*. PhD thesis. Taiyuan: Shanxi University (in Chinese) [郭艳琼. 2012. 飞蝗细胞色素P450基因的分子特性及功能研究. 博士学位论文. 太原: 山西大学]
- Guo YQ, Wu HH, Zhang XY, Ma EB, Guo YP, Zhu KY, Zhang JZ. 2016. RNA interference of cytochrome P450 *CYP6F* subfamily genes affects susceptibility to different insecticides in *Locusta migratoria*. *Pest Management Science*, 72(11): 2154–2165
- Han BZ, Che LR, Chen XJ, Yan ZT, Qiao L, Chen B. 2020. Role of the cytochrome P450 gene *AsCYP6Z2* in the maintenance of deltamethrin resistance in *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae). *Acta Entomologica Sinica*, 63(8): 961–972 (in Chinese) [韩宝珠, 车林茸, 陈晓洁, 闫振天, 乔梁, 陈斌. 2020. 细胞色素P450基因 *AsCYP6Z2* 在中华按蚊溴氰菊酯抗性维持中的作用. 昆虫学报, 63(8): 961–972]
- Li PR, Chen GM, Yang XQ. 2020. Molecular cloning and expression profiles of NADPH-cytochrome P450 reductase (*CPR*) gene in the codling moth, *Cydia pomonella*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 57(4): 850–860 (in Chinese) [李沛蓉, 陈高满, 杨雪清. 2020. 苹果蠹蛾NADPH-细胞色素P450还原酶(*CPR*)基因的克隆及表达模式分析. 应用昆虫学报, 57(4): 850–860]
- Li R, Li N, Liu J, Li SC, Hong JP. 2014b. The effect of low-dose of pesticide on predation of spider and its preliminary mechanisms. *Acta Ecologica Sinica*, 34(10): 2629–2637 (in Chinese) [李锐, 李娜, 刘佳, 李生才, 洪坚平. 2014b. 低剂量杀虫剂对星豹蛛捕食效应的影响及其机理. 生态学报, 34(10): 2629–2637]
- Li R, Li SL, Li N, Li SC, Hong JP. 2014a. The effects of low doses of insecticides on predation of green peach aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) by a wolf spider *Pardosa astrigera* (Araneae: Lycosidae). *Journal of Plant Protection*, 41(6): 711–716 (in Chinese) [李锐, 李萨丽, 李娜, 李生才, 洪坚平. 2014a. 低剂量杀虫剂对星豹蛛捕食桃蚜功能模型的影响. 植物保护学报, 41(6): 711–716]
- Li R, Liu J, Li SL, Li N, Li SC, Hong JP. 2015. Effects of temperature induction on the expression level of *hsp70* and *hsp90* gene in *Pardosa astrigera* L. Koch. *Journal of Plant Protection*, 42(3): 321–326 (in Chinese) [李锐, 刘佳, 李萨丽, 李娜, 李生才, 洪坚平. 2015. 温度诱导对星豹蛛热激蛋白 *hsp70* 和 *hsp90* 基因表达的影响. 植物保护学报, 42(3): 321–326]
- Li SC, Gao F, Wang NB, Gong TK. 2006. Composition and niche of spider community in apple orchard. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 14(1): 181–184 (in Chinese) [李生才, 高峰, 王宁波, 巩田魁. 2006. 苹果园蜘蛛群落组成及其生态位研究初报. 中国生态农业学报, 14(1): 181–184]
- Li SL. 2017. Identification and differential analysis in cytochrome P450 of *Pardosa astrigera* based on transcriptome sequencing. Master thesis. Taigu: Shanxi Agricultural University (in Chinese) [李萨丽. 2017. 基于转录组测序的星豹蛛细胞色素P450的基因鉴定与差异表达分析. 硕士学位论文. 太谷: 山西农业大学]
- Li XC, Schuler MA, Berenbaum MR. 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annual Review of Entomology*, 52: 231–253
- Mansuy D. 1998. The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Pharmacology, Toxicology & Endocrinology*, 121(1/2/3): 5–14
- Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O. 1993. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA and Cell Biology*, 12(1): 1–51
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9): e45
- Poupardin R, Reynaud S, Strode C, Ranson H, Vontas J, David JP. 2008. Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: impact on larval tolerance to chemical insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(5): 540–551
- Qiu Y, Tittiger C, Wicker-Thomas C, le Goff G, Young S, Wajnberg E, Fricaux T, Taquet N, Blomquist GJ, Feyereisen R. 2012. An insect-specific P450 oxidative decarbonylase for cuticular hydrocarbon biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(37): 14858–14863
- Ren YH, Wang YL, Zhao R, Tian GQ, Yan JJ, Li R. 2020a. Cloning and bioinformatics analysis of *CYP3001U15* gene in *Pardosa astrigera* (Araneae: Lycosidae). *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 48(6): 842–846 (in Chinese) [任彦鸿, 王雅丽, 赵瑞, 田国

- 强, 燕晶晶, 李锐. 2020a. 星豹蛛细胞色素 *CYP3001U15* 基因克隆与生物信息学分析. 山西农业科学, 48(6): 842–846]
- Ren YH, Wang YL, Zhao R, Yan JJ, Tian GQ, Li R. 2020b. Gene cloning and bioinformatics analysis of *CYP3313A3* gene in *Pardosa astrigera* (Araneae: Lycosidae). Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition), 40(4): 59–65 (in Chinese) [任彦鸿, 王雅丽, 赵瑞, 燕晶晶, 田国强, 李锐. 2020b. 星豹蛛 *CYP3313A3* 基因克隆与生物信息学分析. 山西农业大学学报 (自然科学版), 40(4): 59–65]
- Wheelock CE, Shan GM, Ottea J. 2005. Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides. Journal of Pesticide Science, 30(2): 75–83
- Xu L, Zhao CQ, Xu DJ, Xu GC, Xu XL, Gu ZY. 2017. Effects of sublethal sulfoxaflor on cytochrome P450 of the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus*. Journal of Plant Protection, 44(4): 679–686 (in Chinese) [徐鹿, 赵春青, 徐德进, 徐广春, 许小龙, 顾中言. 2017. 亚致死剂量氟啶虫胺胍对灰飞虱细胞色素 P450 的影响. 植物保护学报, 44(4): 679–686]
- Yan JJ, Wang YL, Zhao R, Tian GQ, Li R. 2021. Analysis of population growth, development and fecundity dynamics of wolf spider *Pardosa astrigera* based on age-stage two-sex life table. Journal of Plant Protection, 48(3): 593–601 (in Chinese) [燕晶晶, 王雅丽, 赵瑞, 田国强, 李锐. 2021. 基于年龄-龄期两性生命表的星豹蛛种群生长发育和繁殖动态分析. 植物保护学报, 48(3): 593–601]
- Yang JL, McCart C, Woods DJ, Terhzaz S, Greenwood KG, Ffrench-Constant RH, Dow JAT. 2007. A *Drosophila* systems approach to xenobiotic metabolism. Physiological Genomics, 30(3): 223–231
- Yuan ZB, Guo GG, Bai XX, Chang JN, Li HF, Li R. 2017. Effects of herbicides on the behavior of spider *Pardosa astrigera* Koch. Journal of Plant Protection, 44(2): 324–330 (in Chinese) [袁泽斌, 郭钢钢, 白晓雪, 常俊楠, 李慧芳, 李锐. 2017. 除草剂对星豹蛛活动行为的影响. 植物保护学报, 44(2): 324–330]
- Zhang ZF. 2001. Effect of sublethal doses of pesticide on natural enemy of insect. Fujian Agricultural Science and Technology, (6): 29–30 (in Chinese) [张珠凤. 2001. 农药亚致死剂量对天敌昆虫的影响. 福建农业科技, (6): 29–30]
- Zhao XM, Qi JC, Yan RP. 1989. Preliminary study of biological characteristics and protection and utilization in *Pardosa astrigera*. Natural Enemies of Insects, 11(3): 110–115 (in Chinese) [赵学铭, 齐杰昌, 阎瑞萍. 1989. 星豹蛛生物学特性及保护利用初探. 昆虫天敌, 11(3): 110–115]
- Zhu CL, Wu GL, Zhang ZS. 1999. Research progress of insect cytochrome P450 in molecular biology. Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases, 17(1): 49–52 (in Chinese) [朱昌亮, 吴观陵, 张兆松. 1999. 昆虫细胞色素 P450 分子生物学研究进展. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 17(1): 49–52]
- Zhu M. 2016. Isolation and expression analysis of *AccCYP336A1* and *AccCYP18A1* genes in *Apis cerana cerana*. Master thesis. Tai'an: Shandong Agricultural University (in Chinese) [朱明. 2016. 中华蜜蜂 *AccCYP336A1* 和 *AccCYP18A1* 基因的分离与表达特性分析. 硕士学位论文. 泰安: 山东农业大学]
- Zhu WY, Wu HH, Zhang XY, Liu J, Zhang JZ, Ma EB. 2017. Expression profiles of the cytochrome P450 gene *LmCYP6FD3* in *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae) and its role in insecticide detoxification. Acta Entomologica Sinica, 60(7): 742–749 (in Chinese) [朱文雅, 吴海花, 张学尧, 刘娇, 张建珍, 马恩波. 2017. 飞蝗细胞色素 P450 基因 *LmCYP6FD3* 的表达及其在杀虫剂解毒中的作用. 昆虫学报, 60(7): 742–749]

(责任编辑: 李美娟)