

DOI:10.13350/j.cjpb.221203

• 论著 •

基于转录组测序的冈田绕眼果蝇 *mdr65* 基因克隆与分析^{*}

吴芳^{1,2}, 刘晖¹, 汤红日¹, 王灵军^{1***}, 晏容^{1**}

(1. 遵义医科大学寄生虫学教研室, 贵州遵义 563006; 2. 遵义医药高等专科学校病免教研室)

【摘要】 目的 对冈田绕眼果蝇(*Phortica okadai*)*mdr65*基因进行克隆及生物信息学分析。方法 基于转录组测序分析杀虫剂胁迫下ABC转运蛋白基因表达谱,筛选出一个差异最大且表达上调的基因,并进行PCR验证;应用RT-qPCR(实时荧光定量PCR)检测该基因经高效氯氰菊酯亚致死浓度胁迫前后在冈田绕眼果蝇体内的表达差异;利用在线软件对冈田绕眼果蝇*mdr65*基因编码蛋白的结构特征进行生物信息学预测分析,并利用MEGA.X软件构建系统进化树,通过String数据库及KEGG在线软件分别对其互作蛋白网络及相关通路进行预测分析。结果 基于转录组测序分析筛选出一个差异最大且表达上调的ABCB基因,通过PCR验证及NCBI在线Blast分析,确定该基因为冈田绕眼果蝇*mdr65*基因;RT-qPCR检测*mdr65*基因在冈田绕眼果蝇经高效氯氰菊酯亚致死浓度胁迫0 h和1 h体内的相对表达量差异有统计学意义($P<0.01$)。该基因含有1 497 bp的蛋白质编码区(CDS),编码492个氨基酸,蛋白相对分子质量为 54.11×10^3 ,等电点为9.09,存在4个跨膜区,无信号肽,其二级结构为 α 螺旋(43.5%),伸展主链(16.67%)及c无规则卷曲(39.84%),存在Walker A和B基序及Q环及H基序保守结构域,主要富集在嘌呤代谢、糖代谢途径、味觉传导等代谢途径。同源序列比对和系统进化树分析显示,该基因与厩螫蝇(*Stomoxys calcitrans*)*mdr65*基因同源性高,与其他果蝇*mdr65*基因同源性均较高。结论 筛选的冈田绕眼果蝇*mdr65*基因在受到杀虫剂胁迫后呈现高表达,具有跨膜区域,为阐明ABC转运蛋白*mdr65*基因在冈田绕眼果蝇杀虫剂解毒代谢中的作用提供了理论依据,有助于进一步研究该基因在冈田绕眼果蝇抗性形成过程中发挥的作用及其杀虫剂抗性产生的分子生物机制。

【关键词】 冈田绕眼果蝇;ABC转运蛋白;*mdr65*基因;杀虫剂胁迫**【中图分类号】** R384.2**【文献标识码】** A**【文章编号】** 1673-5234(2022)12-1374-07[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 Dec;17(12):1374-1380.]**Cloning and analysis of *mdr65* gene in *Phortica okadai* based on transcriptome sequencing**WU Fang^{1,2}, LIU Hui¹, TANG Hong-ri¹, WANG Ling-jun¹, YAN Rong¹ (1. Department of Parasitology, Zunyi Medical University, Zunyi 563006, Guizhou, China; 2. Department of Pathogen Biology and Immunology, Zunyi Medical and Pharmaceutical College)^{***}

【Abstract】 **Objective** The cloning and bioinformatics analysis the *mdr65* gene in *Phortica okadai*. **Methods** Based on an analysis of transcriptome data on *Phortica okadai* exposed to beta-cypermethrin, the expression profile of ABC transporter gene was analyzed, and the highest up-regulated gene was selected and verified by PCR. RT-qPCR was used to detect the expression difference of this gene in *Phortica okadai* before and after sublethal concentration stress of beta-cypermethrin. RT-qPCR(real-time fluorescence quantitative PCR) was used to detect the expression level of this candidate gene in *Phortica okadai* with exposed to the sublethal concentration of beta-cypermethrin stress; The structural characteristics of the protein encoded by the *mdr65* in *Phortica okadai* were predicted using online software, and the phylogenetic tree was constructed by MEGA. X software, and the protein-protein interaction networks and related pathways were predicted by String database and KEGG online software, respectively. **Results** An ABCB gene with the highest up-regulated was selected from the transcriptome database of *Phortica okadai*, that was identified as the *mdr65* gene with PCR validation and NCBI online Blast analysis; RT-qPCR showed that compared with 0h, the relative expression of *mdr65* was significantly upregulated after 1 h with exposed to sublethal concentration of beta-cypermethrin ($P<0.01$). The complete coding sequence (CDS) of *mdr65* is 1 497 bp, encoding 492 amino acids with a predicted mass and pI of 54.11×10^3 and 9.09. MDR65 protein has 4 transmembrane regions, no signal peptide, and its secondary structure is composed with α helix (43.5%), extended strand (16.67%) and random coil (39.84%), it also has Walker A and B motifs, Q ring and H motif conservative domains. Metabolic pathways of MDR65 were mainly enriched in purine metabolism, glucose metabolism pathway and taste conduction. The sequence similarity alignment and analysis showed that *mdr65* in *Phortica okadai*

^{*} 【基金项目】 国家自然科学基金地区基金项目(No. 82060374)。^{**} 【通讯作者】 晏容, E-mail:yanrong@zmu.edu.cn; 王灵军, E-mail:1437830397@qq.com

【作者简介】 吴芳(1986-),女,贵州遵义人,在读硕士,讲师。研究方向:医学昆虫。E-mail:351342619@qq.com

had a high similarity with the mdr65 gene of drosophila especially *Stomoxys calcitrans*. **Conclusion** The mdr65 gene with transmembrane region in *Phortica okadai* showed high expression under insecticide stress. These results provide a theoretical basis for further clarify the role of mdr65 gene in insecticide detoxification metabolism and contribute to further research on the role of mdr65 gene in the formation of resistance and the molecular biological mechanism of insecticide resistance in *Phortica okadai*.

【Key words】 *Phortica okadai*; ABC transporter; mdr65 gene; Insecticide stress

冈田绕眼果蝇(*Phortica okadai*)是人兽共患眼部寄生虫结膜吸吮线虫(*Thelazia callipaeda*)的中间宿主和传播媒介,我国是结膜吸吮线虫病例报道较多的国家之一^[1]。结合该病的流行病学特征,防制冈田绕眼果蝇对切断结膜吸吮线虫的传播尤为重要。冈田绕眼果蝇多分布在果园周边,喜食腐烂瓜果,以幼虫潜入果实为害,对瓜果品质造成影响。农业生产中需定期喷洒农药杀灭害虫,以保证水果品质和产量。研究表明,高剂量、高频率地使用化学杀虫剂导致了昆虫的抗药性产生和发展,这也成为当今农业害虫和疾病虫媒控制中的一大障碍,同时造成了严重的环境污染^[2]。

近来研究表明,ABC 转运蛋白(ATP-binding cassette)具有代谢杀虫剂的能力,在昆虫抗药性形成中也发挥着重要作用^[3]。ABC 转运蛋白通过将杀虫剂等异源性物质转运出细胞,促使杀虫剂从靶神经细胞向细胞色素 P450 和其他解毒酶部位移动,从而加速杀虫剂的代谢,进而增加昆虫对杀虫剂的代谢解毒能力,增强对杀虫剂的耐受性^[4]。ABC 转运蛋白在烟草夜蛾(*Heliothis assulta*)中首次发现,随后证实科罗拉多马铃薯甲虫(*Leptinotarsa decemlineata*)幼虫 *Ld-ABCB1* 基因在苏云金芽孢杆菌 Cry3 毒素代谢中发挥重要作用^[5]。另有研究表明小菜蛾的敏感株和耐药株之间存在 *PxABCB1* 基因的差异表达,因此间接说明 *PxABCB1* 与小菜蛾抗药性的产生有关^[6]。作者曾在定期喷洒农药的果园中诱捕到冈田绕眼果蝇,因此推测冈田绕眼果蝇对杀虫剂的代谢能力可能有所增强,但关于冈田绕眼果蝇是否与上述报道的昆虫一样,能通过 ABC 转运蛋白基因的表达增强从而促进机体对杀虫剂代谢解毒能力的增强,进而促进冈田绕眼果蝇对杀虫剂抗性产生,尚不清楚。

本研究基于高效氯氰菊酯亚致死浓度胁迫后的冈田绕眼果蝇差异转录组的数据分析,筛选出表达差异最大的 ABC 转运蛋白候选基因,通过 PCR 验证与 NCBI 在线 Blast 分析,确定其为 mdr65 基因,为阐明 ABC 转运蛋白 mdr65 基因在冈田绕眼果蝇杀虫剂解毒代谢中的作用提供了理论依据,有助于进一步研究该基因在冈田绕眼果蝇抗性形成过程中发挥的作用及其杀虫剂抗性产生的分子生物机制。

材料与方法

1 材料

1.1 供试果蝇 冈田绕眼果蝇采自遵义市周边果园,在室内不接触任何药剂的状态下饲养。

1.2 主要试剂 RNAiso Plus 试剂, Prime Script™ RT Reagent Kit, SYBR Premix Ex Taq(日本 TaKaRa 公司);琼脂糖(北京索莱宝科技有限公司);DL2000 DNA Marker, 2×Taq Plus PCR MasterMix(北京庄盟国际生物基因科技有限公司)。引物设计与合成均由上海生工生物工程股份有限公司完成。

1.3 主要仪器 AB-PCR 仪(北京世纪科信科学仪器有限公司);DYY-8C 电泳仪(北京六一生物科技有限公司);Tanon-1600 凝胶成像仪(广州誉维生物科技仪器有限公司);荧光定量 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司)。

2 方法

2.1 目的基因筛选 使用药膜法在高效氯氰菊酯亚致死浓度下胁迫 3~5 日龄未交尾冈田绕眼果蝇成蝇,1 h 后将存活个体与 0 h 个体用于转录组测序。通过差异转录组测序分析,以 $P < 0.05$, Log2FoldChange > 1 为阈值,筛选所有差异表达的 ABC 转运蛋白家族基因,并利用 FPKM 表达量进行差异表达分析,构建表达量热图,挑选表达差异最大的高表达基因作为目的基因。

2.2 RNA 提取与 cDNA 合成 以冈田绕眼果蝇 3~5 日龄未交尾成蝇为材料,按照 RNAiso Plus 试剂盒说明,采用 Trizol 法提取总 RNA,检测合格后按照 Prime Script™ RT Reagent Kit 逆转录试剂盒说明书合成 cDNA。

2.3 目的基因的 PCR 验证 上游引物: 5'-AT-GATCTTAAAGCAATGATAACGTCAAGAA-3'; 下游引物: 5'-TTAATGATCTCTGAGTTTGTC-GCAA-3'。以上述合成的 cDNA 为模板进行候选目的基因的 PCR 验证。PCR 反应体系(25 μl): cDNA 1 μl, MasterMix 12.5 μl, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μl, ddH₂O 9.5 μl。取 PCR 产物 5 μl 进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,剩余产物交由北京擎科生物科技有限公司重庆分公司测序。

2.4 冈田绕眼果蝇 mdr65 基因差异表达分析 通过 RT-qPCR 检测 mdr65 基因在冈田绕眼果蝇(高效氯

氰菊酯亚致死浓度胁迫 0 h/1 h)体内的相对表达量。高效氯氰菊酯浓度:0.166 mg/L^[7]。上游引物:5'-TTTACGCCGCATTACCG-3';下游引物:5'-AAGCGTGTGTTGGGTGGAC-3'。内参基因选择β-Actin。上游引物:5'-CAAGAATGAAGGCTG-GAAGAG-3';下游引物:5'-CTGCTGAGCGT-GAAATCGT-3'。以上述逆转录的cDNA为模板进行RT-qPCR。反应体系(20 μl):上、下游引物各0.8 μl,TB Green Premix Ex TaqII 10 μl,ROX Reference Dye(50×)0.4 μl,cDNA 2 μl,ddH₂O 6 μl。反应程序:94℃3 min;94℃30 s;54℃30 s;72℃1 min;72℃10 min;循环30次,4℃贮存。采用2^{-ΔΔCt}法对获得的数据进行计算,采用SPSS 26.0对数据进行分析,目的基因差异表达分析采用t检验,采用Graphpad prism 9.0软件作图。

2.5 冈田绕眼果蝇^{mdr65}基因生物信息学分析

冈田绕眼果蝇^{mdr65}基因生物信息学分析的内容及工具见表1。

表1 冈田绕眼果蝇^{mdr65}基因生物信息学分析
Table 1 Bioinformatics analysis of *mdr65* gene of *Phortica okadai*

| 分析内容 Analysis | 分析工具 Analysis tools |
|------------------|--|
| 蛋白基本理化性质分析 | ExPASy-PortParam tool (http://web.expasy.org/protparam/) |
| 亲水性预测 | ExPASy-PortScale(http://web.expasy.org/protscale) |
| 跨膜结构域预测 | TMHMM Server2.0(http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM) |
| 信号肽预测 | SignalP5.0 server (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP) |
| 亚细胞定位分析 | TargetP-2.0 server (http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP) |
| 潜在磷酸化位点预测 | NetPhos3.1(http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos) |
| 蛋白的二级结构预测 | GOR4 (http://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.htm) |
| 蛋白的三级结构预测 | SWISS-MODLE (http://swissmodel.expasy.org/interactive) |
| 相互作用蛋白预测 | Srtng(https://string-db.org/) |
| 相关通路预测 | KEGG(https://www.genome.jp/kegg/) |
| 序列相似性分析 | NCBI 在线 Blastx(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) |
| 系统进化树 | MEGA X 软件邻接(NJ)法 |

注(Note):C/T 高效氯氰菊酯亚致死浓度胁迫 0/1 h(beta-cypermethrin sublethal concentration stress 0/1 h)。

结 果

1 目的基因的筛选与验证

以 $P < 0.05$, $\text{Log}_2\text{FoldChange} > 1$ 为标准进行高效氯氰菊酯亚致死浓度胁迫下的冈田绕眼果蝇差异转录组分析显示,存在 25 个差异表达的 ABC 转运蛋白基因,分属于 ABCA、ABCB、ABCC、ABCD、ABCF、

ABCG 等 6 个亚家族,其中有 4 个基因表达增强,21 个基因表达下调,差异表达增强最大($\text{Log}_2\text{FoldChange} = 1.945$)的为 ABCB 亚家族中的^{mdr65} 基因(图 1)。将该候选基因通过 NCBI 进行在线 Blast 分析,其与多种果蝇^{mdr65} 基因同源性较高,因此确定该基因为冈田绕眼果蝇^{mdr65} 基因。



图1 ABC 转运蛋白基因筛选结果及表达差异分析
Fig. 1 ABC transporters gene screening results and expression difference analysis

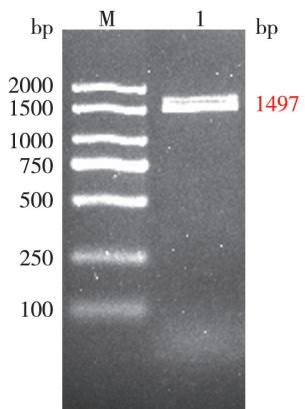
2 冈田绕眼果蝇^{mdr65}基因克隆

冈田绕眼果蝇^{mdr65}基因编码区全长为 1 497 bp,编码 492 个氨基酸。以提取的 cDNA 为模板,对^{mdr65} 基因进行 PCR 扩增,1%琼脂凝胶电泳检测显示扩增产物大小为 1 497 bp,与预期一致(图 2)。

3 冈田绕眼果蝇^{mdr65}基因编码蛋白 MDR65 的生物信息学分析

3.1 理化性质 用 NCBI 在线 ORF 软件将^{mdr65} 碱基序列翻译成氨基酸序列(图 3),使用该氨基酸序列预测该蛋白理化性质。结果为:蛋白相对分子质量为 54.11×10^3 ,等电点为 9.09。氨基酸组成:占比最高的氨基酸为 Leu,共 51 个,占比 10.4%;最低为 Trp,共 3 个,占比 0.6%。分子式为 C₂₄₀₀H₃₈₉₄N₆₈₂O₇₀₀S₁₉。原子总数为 7 695,在哺乳动物网织红细胞(体外)半衰期为 30 h,在酵母(体内)半衰

期为>20 h,在大肠埃希菌(体内)半衰期为>10 h,不稳定指数为40.96(>40),为不稳定蛋白。亲水性总平均值为0.054,该蛋白为疏水性蛋白。



M DNA 标志物(DL2000) 1 *mdr65* 的 PCR 产物
 图 2 候选基因 PCR 产物 1% 琼脂凝胶电泳分析

M DNAmarker(DL2000) 1 The PCR product of *mdr65*

Fig. 2 Detection of candidate genes by 1% agarose gel electrophoresis

```

1 MIFKAMIRQEIGWF DREENAVGALSARLSGDAAGVQGAIGYPLSGLIQAF
51 SNFVVGV TIAFYY SWKL ALLCLSMCPIVGSV VIEAKLMTTAMIREKQVI
101 EEA CRIATEA ITNIRT IAGL RREA QVIR QYSDE VRV RVEVL RQKL RWGV
151 INST MQAS VFFAYA VALMYGG VLVS QGQL PFDII KVSET LLYGSMM LAQ
201 SLAFT PAFTA ALVAGH HRLF QILD RKP KI QSPG PPKNT LAKQLNL FEGVR
251 FRDID FRYPT RSDV KVLNG LDLE VLGK TVALVG HSGCGK STCV QLLQ RY
301 YDPD SGTI IIHD HDDI QNDL TDGV RRQL GIVS QEPT L FERTIA ENIAY GD
351 QSRT VPMAE IAAKS ANAHS FIISLP NGYDT KM GARGT QLS GGQ KQRIA
401 IARAL VRNP KILL DEAT SADL LQSE QLV QQAL DACT GRT CLVIAH RLS
451 TVQN ADLIC VIQNG RVVE QGTH HQ LIAK SGYI YAKL LHKT QRDH

```

图 3 冈田绕眼果蝇 MDR65 氨基酸序列

Fig. 3 amino acid sequence of MDR65 of *Phortica okadai*

3.2 疏水性 K-D 法分析该蛋白疏水性最大值为2.600,位于第57位;最小值为2.511,位于第488位(图4)。亲水性总平均值为0.054。表明该蛋白为疏水性蛋白。

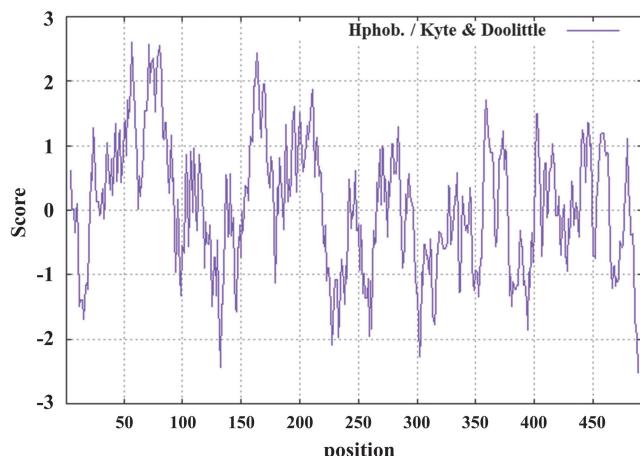


图 4 冈田绕眼果蝇 MDR65 亲水性分析

Fig. 4 Hydrophilicity analysis of MDR65 in *Phortica okadai*

3.3 跨膜区 通过在线软件 TMHMM 模型分析 MDR65 蛋白共有 4 个跨膜结构,分别在第 41-63、67-84、150-172、192-214 位氨基酸的位置各有一处跨膜结构(图 5),与亲水性分析结果一致。

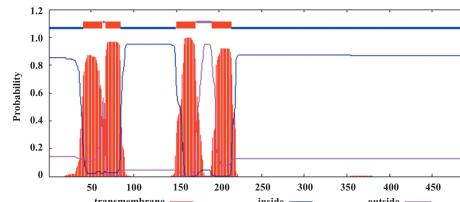


图 5 冈田绕眼果蝇 MDR65 跨膜区分析

Fig. 5 Analysis of MDR65 transmembrane area in *Phortica okadai*

3.4 信号肽预测 通过 Signal 5.0 server 平台预测该蛋白为无信号肽,S-score<0.5,故判定该蛋白为非分泌型蛋白(图 6)。

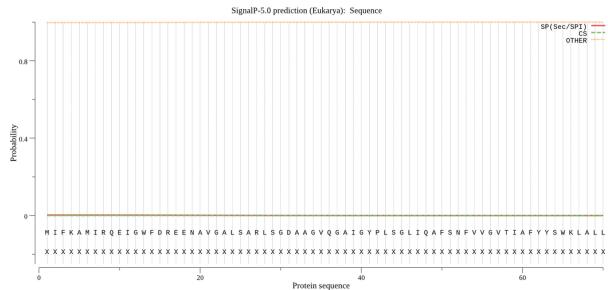


图 6 冈田绕眼果蝇 MDR65 信号肽分析

Fig. 6 Analysis of MDR65 signal peptide in *Phortica okadai*

3.5 亚细胞定位 TargetP-2.0 预测 TCP-TRE 蛋白的分泌通路信号肽(Secretory pathway signal peptide,SP)为 0.0001,与上述通过 Signal 5.0 server 平台对信号肽的预测结果吻合,即 MDR65 无信号肽。从结果可知,目的蛋白的分泌途径为其他型,即不是定位在细胞核,而是定位在其他细胞器。

3.6 磷酸化位点 使用 NetPhos 3.1 在线分析软件分析冈田绕眼果蝇 MDR65 蛋白的潜在磷酸化位点。该软件使用神经网络集成预测真核蛋白质中的丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸磷酸化位点,主要进行一般性和激酶特异性预测。预测的激酶包括以下 17 种:ATM、CKI、CKII、CaM II、DNAPK、EGFR、GSK3、INSR、PKA、PKB、PKC、PKG、RSK、SRC、cdc2、cdk5 和 p38MAPK。冈田绕眼果蝇 MDR65 蛋白预测有 29 个潜在磷酸化位点,其中包括 18 个丝氨酸(S)位点,分别位于 25、29、51、64、131、153、175、188、201、230、232、291、305、332、392、419、450、479 位氨基酸;9 个苏氨酸(T)位点,分别位于 205、260、336、341、382、389、438、451、488 位氨基酸;2 个酪氨酸(Y)位点,分别位于 348、482 位氨基酸。

3.7 二、三级结构及结构功能域 通过在线网站

GOR4 对蛋白的二级结构进行预测, α 螺旋区、伸展链区以及无规则卷曲区域几个二级结构交替出现。二级结构在氨基酸所占比例: α 螺旋(Hh)占 43.5%, 伸展链(Ee)占 16.67%, c 无规则卷曲(Cc)占 39.84%。其中无规则卷曲区域位于 N 端第 1-6、29-31、36-55、71-76、152-155、176-183、223-238、248-264、268-271、276-278、286-293、299-306、311-319、328-336、347-355、376-386、391-395、434-442、447-456、462-465、468-472 和 486-489 位氨基酸, 这些肽段形成抗原表位的可能性较大(图 7A)。蛋白三级结构预测利用在线 SWISS-MODLE 软件进行, 采用同源建模方法, 选择 6ujs. 1. A 为同源模板序列, 生成预测蛋白三级结构模型(图 7B)。预测显示, 预测模型与同源模板序列同源性为 49.48%, GMQE(全局模型质量评估)为 0.7, 表示本次预测的模型有较高的可靠性。通过 NCBI Conserved Domain Search 在线分析保守结构域, 结果表明第 1350-1840 位氨基酸位点为该蛋白的保守结构域, 包括 Walker A 和 B 基序、Q 环、D 环及 H 基序等。

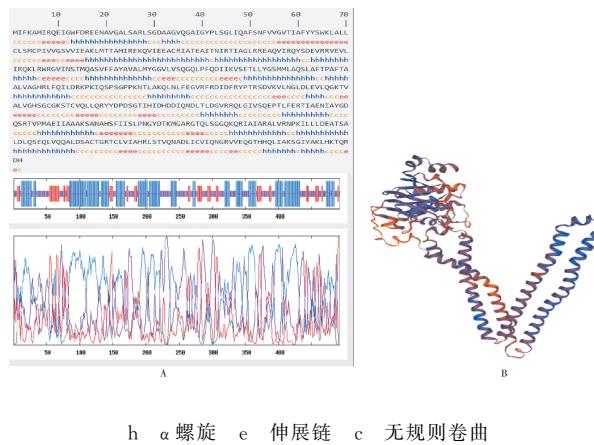


图 7 冈田绕眼果蝇 MDR65 二级(A)、三级(B)结构预测
h Alpha helix e Extended strand c Random coil

Fig. 7 Prediction of the secondary(A) and tertiary(B) structure of MDR65 in *Phortica okadai*

3.8 互作蛋白与相关信号通路 利用在线软件 string 预测冈田绕眼果蝇 MDR65(FBpp0076719)的相互作用蛋白, 最低要求交互分数: high confidence0.7 得出与 MDR65 相关的核心蛋白, 其中 nrV2、Mdr50、CG10226 等蛋白可与 MDR65 产生相互作用(图 8)。运用 KEGG 在线软件分析, 与 MDR65 相关信号通路共 3 条: KO00230 嘌呤代谢、KO01100 糖代谢途径、KO04742 味觉传导。

4 冈田绕眼果蝇 MDR65 同源序列比对及系统进化分析

通过 NCBI 搜索同源序列, 将冈田绕眼果蝇 mdr65 基因核酸序列与之进行在线比对, 其与其他蝇类的核酸序列同源性较高, 其中与厩螫蝇(*Stomoxys calcitrans*)序列相似性为 92%, 与黑腹果蝇相似性为 79.2%; 利用 MegAlign 软件对冈田绕眼果蝇 mdr65 基因核酸序列与二化螟(*Chilo suppressalis*)序列进行同源性比对, 相似性为 75.4%。利用 MEGA. X 软件构建系统进化树, 结果如图 9。冈田绕眼果蝇 mdr65 基因与多种蝇类的 mdr65 基因同源性较高, 其中与厩螫蝇(*Stomoxys calcitrans*)的 mdr65 基因同源性最高, 与二化螟(*Chilo suppressalis*)的 mdr65 基因同源性最低。

(*calcitrans*)序列相似性为 92%, 与黑腹果蝇相似性为 79.2%; 利用 MegAlign 软件对冈田绕眼果蝇 mdr65 基因核酸序列与二化螟(*Chilo suppressalis*)序列进行同源性比对, 相似性为 75.4%。利用 MEGA. X 软件构建系统进化树, 结果如图 9。冈田绕眼果蝇 mdr65 基因与多种蝇类的 mdr65 基因同源性较高, 其中与厩螫蝇(*Stomoxys calcitrans*)的 mdr65 基因同源性最高, 与二化螟(*Chilo suppressalis*)的 mdr65 基因同源性最低。

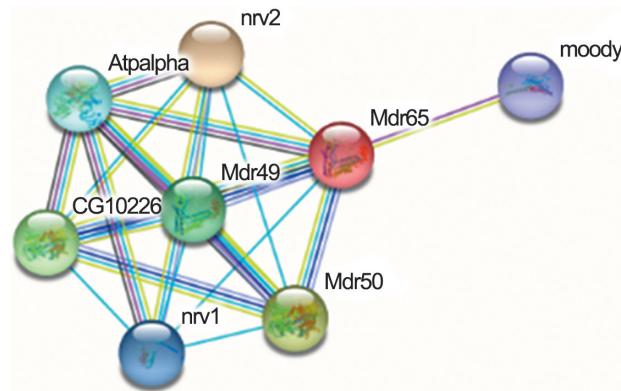


图 8 冈田绕眼果蝇 MDR65 相互作用蛋白预测
Fig. 8 Prediction results of MDR65 interacting protein in *Phortica okadai*

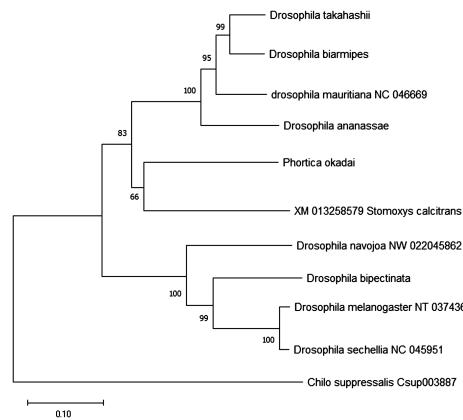


图 9 冈田绕眼果蝇 MDR65 系统发育树
Fig. 9 Phylogenetic tree analysis diagram of MDR65 in *Phortica okadai*

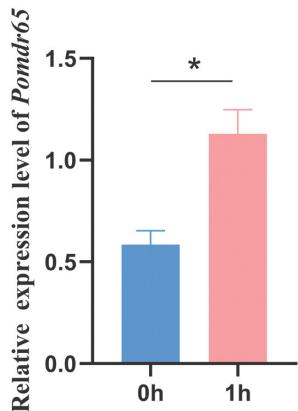
5 高效氯氰菊酯亚致死浓度胁迫对冈田绕眼果蝇 mdr65 基因表达的影响

采用 RT-qPCR 检测 mdr65 基因在冈田绕眼果蝇(高效氯氰菊酯亚致死浓度胁迫 0 h/1 h)体内的相对表达量。结果显示, 亚致死浓度的高效氯氰菊酯胁迫 1 h 后冈田绕眼果蝇体内 mdr65 基因相对表达量较胁迫 0 h 时增高(图 10)。

讨 论

ABC 转运蛋白是最大的跨膜蛋白家族之一, 存在

于从细菌到人的所有生物中^[8]。ABC 转运蛋白主要由两个疏水结构域(TMD)和两个核苷酸结合结构域(NBD)组成^[9]。根据 NBD 序列的同源性,ABC 转运蛋白分为 A-H(ABCA-ABCH)八个亚型^[10]。ABC 转运蛋白家族参与多种生物过程,并在异生代谢和生物合成中起关键作用^[11]。在异生代谢中主要起作用的 ABC 转运蛋白有:多药耐药(MDR)、多药耐药相关蛋白(MRP)及乳腺癌耐药蛋白(BCRP)^[12]。目前对于 ABC 转运蛋白的研究主要集中在其与哺乳动物的关系,对昆虫 ABC 转运蛋白的研究及其对杀虫剂抗性产生的作用机制方面研究相对较少^[13]。已有研究证实,ABC 转运蛋白在昆虫抗药性的发生和发展过程中发挥重要作用,昆虫通过 ABC 转运蛋白将许多农药、药物及其他异源性物质转运出细胞,以此增强昆虫对杀虫剂的抗药性^[14]。在果蝇体内的 ABC 转运蛋白可通过清除昆虫体内的杀虫剂,减少阿维菌素与靶标蛋白的结合,从而增加昆虫对杀虫剂的解毒代谢^[15]。



注:胁迫 1 h 时与胁迫 0 h 时比较, $P < 0.01$ 。

图 10 高效氯氰菊酯亚致死浓度胁迫 0 h/1 h *mdrl65* 相对表达量
Note: Stress at 1 h versus stress at 0 h, $P < 0.01$.

Fig. 10 Relative expression of *mdrl65* under sublethal cypermethrin stress for 0 h/1 h

ABC 转运蛋白研究主要集中在 ABCB 亚家族^[16]。在 ABCB 亚家族中,已发现了 3 个完整的转运蛋白 MDR49、MDR50 和 MDR65,其中 MDR49 和 MDR65 与杀虫剂抗性产生相关,特别是 MDR65 对果蝇杀虫剂抗性的产生具有显著特异性^[8]。Kim 等^[17]应用 RNAi 技术靶向击倒 ABCB 亚家族中的 *mdrl65* 基因,发现黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)对 DDT 敏感性会增强。Sun 等^[18]研究发现,在 *mdrl49*、*mdrl50*、*mdrl65* 基因中,沉默 *mdrl65* 基因对提高黑腹果蝇对 9 种不同杀虫剂敏感性的效果最为显著, *mdrl65* 基因是大量杀虫剂毒性的主要调节基因。

蛋白的结构决定其功能,因此研究蛋白的高级结构对其功能的解析有着重要的指导意义^[19]。本研究通过分析高效氯氰菊酯亚致死浓度胁迫下的冈田绕眼

果蝇差异转录组数据,筛选到表达差异最大的基因为 ABCB 亚家族的 *mdrl65* 基因。预测分析显示,冈田绕眼果蝇 MDR65 蛋白包括了 Walker A 和 B 基序、Q 环及 H 基序等几个 ABC 转运蛋白的高度保守区域,且存在 4 个跨膜结构域,符合 ABC 跨膜蛋白家族的共同特性。依据对 MDR65 潜在磷酸化位点及亚细胞定位的预测结果推测 MDR65 可能通过磷酸化位点影响冈田绕眼果蝇杀虫剂代谢及代谢杀虫剂的途径^[3]。冈田绕眼果蝇 MDR65 蛋白的三级结构模型展示,跨膜区以 β 折叠、无规则卷曲常见,其空间结构对功能的发挥起重要作用,为了解该蛋白的结构及与杀虫剂的结合位点提供了理论依据,结合冈田绕眼果蝇 *mdrl65* 基因体内表达量的差异,有助于研究冈田绕眼果蝇 *mdrl65* 基因在杀虫剂解毒代谢中的作用及代谢速度^[20]。系统进化分析显示,冈田绕眼果蝇 *mdrl65* 基因与其他果蝇 *mdrl65* 基因相似性均较高,其中与黑腹果蝇的 *mdrl65* 基因序列相似性为 79.2%。有研究证明,黑腹果蝇 *mdrl65* 表达量的增加能增强其对杀虫剂代谢的能力。本研究证实经高效氯氰菊酯亚致死浓度胁迫后,冈田绕眼果蝇体内的 *mdrl65* 基因相对表达量增高,因此推测冈田绕眼果蝇同黑腹果蝇一样通过 *mdrl65* 基因的高表达增强其对杀虫剂的敏感性,在杀虫剂抗性的发生发展中发挥重要作用。

本研究筛选到一个最具差异性的与冈田绕眼果蝇抗药性相关的 ABC 转运蛋白 *mdrl65* 基因,并对其蛋白性质预测分析和 *mdrl65* 基因的表达特征分析,为对冈田绕眼果蝇 MDR65 的功能及抗性相关的潜在靶点研究提供了理论基础,以利于深入揭示冈田绕眼果蝇杀虫剂抗药性的分子机制。

【参考文献】

- [1] 张玺,姜鹏,刘若丹,等. 结膜吸吮线虫病原学流行病学及遗传多样性研究进展[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2019, 31(1): 86-93.
- [2] Shabana W, Ali SS. Development of fipronil resistance, fitness cost, cross-resistance to other insecticides, stability, and risk assessment in *Oxycarenus hyalinipennis*(Costa)[J]. Sci Total Environ, 2022(803): 150026.
- [3] Denecke S, Fusetto R, Batterham P. Describing the role of *Drosophila melanogaster* ABC transporters in insecticide biology using CRISPR-Cas9 knockouts [J]. Insect Biochem Mol Biol, 2017 (91): 1-9.
- [4] Chen XD, Neupane S, Gill TA, et al. Comparative transcriptome analysis of thiamethoxam susceptible and resistant Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae), using RNA-sequencing[J]. Insect Sci, 2021(28): 1708-1720.
- [5] Gözde G, Doğa C, Sabine H, et al. Silencing of an ABC transporter, but not a cadherin, decreases the susceptibility of *Colorado potato* beetle larvae to *Bacillus thuringiensis* ssp. *tenebrionis* Cry3Aa toxin [J]. Arch Insect Biochem Physiol, 2021, 108: e21834.
- [6] Qin JY, Guo L, Ye F, et al. MAPK-activated transcription factor PxJun suppresses PxABCBl expression and confers resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in *Plutella xylostella* (L.)

- [J]. Appl Environ Microbiol, 2021, 87(13): e0046621.
- [7] 程梅, 吕思颖, 熊雄, 等. 两种菊酯类杀虫剂对冈田绕眼果蝇成虫的室内毒力测定[J]. 医学动物防制, 2019, 35(6): 575-577.
- [8] 王莉君, 马培玉, 马元芬, 等. ABC 转运子介导果蝇杀虫剂抗药性的研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2020, 15(8): 991-994.
- [9] Charbel AK, Nabil N, Georges N. Beauvericin potentiates the activity of pesticides by neutralizing the ATP-binding cassette transporters in arthropods[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 10865.
- [10] Carmona-Antonzanas G, Carmichael SN, Heumann J, et al. A Survey of the ATP-binding cassette(ABC) gene superfamily in the Salmon Louse(*Lepeophtheirus salmonis*). [J]. PLoS One, 2015, 10(9): e0137394.
- [11] Xiao LF, Zhang W, Jing TX, et al. Genome-wide identification, phylogenetic analysis, and expression profiles of ATP-binding cassette transporter genes in the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) [J]. Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics, 2018(25): 1-8.
- [12] Jeong CB, Kim DH, Kang HM, et al. Genome-wide identification of ATP-binding cassette (ABC) transporters and their roles in response to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the copepod *Paracyclopsina nana*[J]. Aquat Toxicol, 2017(183): 144-155.
- [13] Peng YC, Zhao J, Sun Y, et al. Insights into chlorantraniliprole resistance of *Chilo suppressalis*: Expression profiles of ATP-binding cassette transporter genes in strains ranging from low to high-level resistance[J]. J Asia Pacific Entomol, 2021, 24(2): 224-231.
- [14] 吴有刚, 金京, 杨胜祥, 等. 昆虫抗药性产生机制[J]. 生物安全学报, 2019, 28(3): 159-169.
- [15] Luo L, Sun YJ, Wu YJ. Abamectin resistance in *Drosophila* is related to increased expression of P-glycoprotein via the dEGFR and dAkt pathways[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2013, 43(8): 627-634.
- [16] Hodges LM, Markova SM, Chinn LW, et al. Very important pharmacogenes summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein) [J]. Pharmacogenet Genomics, 2011, 21(3): 152-161.
- [17] Kim JH, Moreau JA, Zina JM, et al. Identification and interaction of multiple genes resulting in DDT resistance in the 91-R strain of *Drosophila melanogaster* by RNAi approaches[J]. Pestic Biochem Physiol, 2018, 151: 90-99.
- [18] Sun H, Buchon N, Scott JG. Mdr65 decreases toxicity of multiple insecticides in *Drosophila melanogaster*[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2017(89): 11-16.
- [19] 黄琳, 王金仙, 廖德君, 等. 冈田绕眼果蝇丝氨酸蛋白酶抑制蛋白生物信息学分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2020, 15(10): 1165-1170.
- [20] 郑明辉, 叶昌林, 李先春, 等. 结膜吸吮线虫海藻糖酶筛选及其生物信息学分析[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2020, 32(1): 60-68.

【收稿日期】 2022-08-08 【修回日期】 2022-10-25

(上接 1373 页)

【参考文献】

- [1] Kreye J, Reincke SM, Kornau HC, et al. A therapeutic non-self-reactive SARS-CoV-2 antibody protects from lung pathology in a COVID-19 hamster model[J]. Cell, 2020, 183(4): 1058-1069.
- [2] Hodgson J. The pandemic pipeline[J]. Nat Biotechnol, 2020, 38(5): 523-532.
- [3] WHO Coronavirus(COVID-19) Dashboard With Vaccination Data [Web]. World Health Organization, 2022. <https://covid19.who.int/>
- [4] Shi J, Wen Z, Zhong G, et al. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS Coronavirus 2[J]. Science, 2020, 368(6494): 1016-1020.
- [5] Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor[J]. Cell, 2020, 181(2): 271-280.
- [6] Roberts A, Vogel L, Guarner J, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection of golden syrian hamsters[J]. J Virol, 2005, 79(1): 503-511.
- [7] Boudejwans R, Thibaut HJ, Kaptein SJF, et al. STAT2 signaling restricts viral dissemination but drives severe pneumonia in SARS-CoV-2 infected hamsters[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 5838.
- [8] Muñoz-Fontela C, Dowling WE, Funnell SGP, et al. Animal models for COVID-19[J]. Nature, 2020, 586(7830): 509-515.
- [9] Imai M, Iwatsuki-Horimoto K, Hatta M, et al. Syrian hamsters as a small animal model for SARS-CoV-2 infection and countermeasure development[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2020, 117(28): 16587-16595.
- [10] Chan JF, Zhang AJ, Yuan S, et al. Simulation of the clinical and pathological manifestations of coronavirus disease 2019(COVID-19) in a golden syrian hamster model: implications for disease pathogenesis and transmissibility[J]. Clin Infect Dis, 2020, 71(9): 2428-2446.
- [11] Damas J, Hughes GM, Keough KC, et al. Broad host range of SARS-CoV-2 predicted by comparative and structural analysis of ACE2 in vertebrates[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117(36): 22311-22322.
- [12] Miao J, Chard LS, Wang Z, et al. Syrian hamster as an animal model for the study on infectious diseases [J]. Front Immunol, 2019(10): 2329.
- [13] Iwatsuki-Horimoto K, Nakajima N, Ichiko Y, et al. Syrian hamster as an animal model for the study of human influenza virus infection[J]. J Virol, 2018, 92(4): e01693-17.
- [14] Wold WSM, Toth K. Chapter three-syrian hamster as an animal model to study oncolytic adenoviruses and to evaluate the efficacy of antiviral compounds[J]. Adv Cancer Res, 2012(115): 69-92.
- [15] Rockx B, Kuiken T, Herfst S, et al. Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model[J]. Science, 2020, 368(6494): 1012-1015.
- [16] Osterrieder N, Bertzbach LD, Dietert K, et al. Age-dependent progression of SARS-CoV-2 infection in Syrian Hamsters[J]. Viruses, 2020, 12(7): 779.
- [17] He X, Hong W, Pan X, et al. SARS-CoV-2 Omicron variant: characteristics and prevention[J]. MedComm(2020), 2021, 2(4): 838-845.
- [18] Zhang X, Wu S, Wu B, et al. SARS-CoV-2 Omicron strain exhibits potent capabilities for immune evasion and viral entrance[J]. Signal Transduct Target Ther, 2021(6): 430.

【收稿日期】 2022-07-16 【修回日期】 2022-10-10