

意大利蜜蜂幼虫细胞色素 P450 单氧酶 CYP9q1 在吡虫啉胁迫下的表达分析*

王悦弟, 陈兰春, 秦启倩, 李 治

(重庆师范大学 生命科学院 媒介昆虫重点实验室, 重庆 401331)

摘要:【目的】通过生物信息学方法鉴定一种意大利蜜蜂(*Apis mellifera*)细胞色素 P450 单氧酶(CYP450)即 AmCYP9q1, 分析吡虫啉暴露后不同时间点蜜蜂幼虫体内该蛋白编码基因的表达模式, 探讨在吡虫啉胁迫下该蛋白的解毒作用。【方法】利用生物信息学程序, 分析 AmCYP9q1 的氨基酸序列特征、结构域、高级结构以及蛋白互作网络, 预测该蛋白的生物学功能; 构建系统进化树, 分析 AmCYP9q1 在昆虫 CYP450 家族中的分类和进化关系; 通过 RT-qPCR 测定幼虫经吡虫啉口服暴露后 24, 72 h 时 *AmCYP9q1* 基因的表达情况。【结果】AmCYP9q1 由 510 个氨基酸残基组成, 相对分子质量为 58.8 kDa, 等电点为 8.91。AmCYP9q1 为亲水性蛋白, 不具有信号肽和跨膜结构域。多重序列比对和系统进化分析结果表明, AmCYP9q1 为 CYP450 家族中 CYP3 Clan 成员, 具有典型的 CYP450 家族共有的保守结构域特征。RT-qPCR 分析表明, 与对照组相比, 吡虫啉口服暴露组的 *AmCYP9q1* 基因均呈统计学意义上的上调表达 ($p < 0.05$), 并且暴露后 72 h 时的相对表达量显著高于暴露后 24 h。【结论】AmCYP9q1 属于 CYP450 家族中的 CYP3 Clan, 可能在意大利蜜蜂幼虫对吡虫啉的代谢解毒过程扮演了重要的角色。

关键词: 吡虫啉; 意大利蜜蜂幼虫; 半致死剂量; 细胞色素 P450 单氧酶系; CYP9q

中图分类号: Q175

文献标志码: A

文章编号: 1672-6693(2022)03-0067-11

吡虫啉^[1]是最常见的一种新烟碱类杀虫剂, 被广泛应用于 140 多种农作物的种植与生产过程中^[2]。许多文献中已经证实了新烟碱农药会对蜂群产生不利的影响^[3-6]。吡虫啉暴露与蜜蜂个体和群体的损失存在紧密联系^[4,7]。当昆虫遭遇杀虫剂等不利环境时, 通常会激起解毒系统的响应。在代谢解毒过程中, 昆虫体内的各类解毒酶系起着极为重要的作用。解毒酶基因表达或活性的上升与昆虫对杀虫剂的代谢解毒功能密切相关^[8]。昆虫体内主要有 3 大解毒酶家族: 细胞色素 P450 单氧酶系(CYP450s)、羧酸酯酶系(COEs)和谷胱甘肽 S-转移酶系列(GSTs)^[9]。CYP450s 介导的解毒作用有助于昆虫耐受杀虫剂。与其他大多数昆虫相比, 蜜蜂基因组中只有 1/3 到 1/2 的 CYP450 基因, 这种解毒基因的缺陷可能是造成蜜蜂对外源性药物敏感性的主要原因^[10]。已有不少研究讨论了蜜蜂可以使用 CYP450 来解毒外源化学物质和真菌毒素的证据^[11-14]。但在蜜蜂幼虫中负责解毒吡虫啉的特定 CYP450 尚未被确定^[13]。

对于传粉媒介昆虫而言, 幼虫生存所受到的扰动是对群体的主要威胁^[15-16]。蜜蜂幼虫作为蜂群的基础, 会通过接触受污染蜂巢和工蜂或者食用受污染的食物而暴露在农药中^[5,17-18]。吡虫啉对蜜蜂幼虫的影响必然会导致整个蜂群结构和未来群势的发展受到影响。然而, 过去的研究大多集中在吡虫啉对成年工蜂的影响, 而对幼虫的影响的研究却未得到重视^[19]。因此, 测试吡虫啉对蜜蜂幼虫的毒性效应并研究内在的分子机制非常重要^[15,20]。

本研究对一种意大利蜜蜂(*Apis mellifera*)CYP450 即 AmCYP9q1 氨基酸序列进行了生物信息学分析, 预测了该蛋白的结构和功能特征, 分析了该蛋白在 CYP450 家族成员中的分类和系统进化关系。同时, 采用实时

* 收稿日期: 2021-11-02 修回日期: 2021-12-16 网络出版时间: 2022-05-17 09:40

资助项目: 国家自然科学基金(No. 31101770; No. 31302037); 现代农业产业技术体系建设专项资金(No. CARS-44-KXJ21); 重庆市教育委员会科学技术研究重点项目(No. KJZD-K202100502); 重庆市自然科学基金面上项目(No. cstc2021jcyj-msxmX0422); 重庆高校创新研究群体项目(No. CXQT21013); 重庆市大学生创新创业训练计划项目(国家级)(No. 202110637013)

第一作者简介: 王悦弟, 女, 研究方向为微生物基因组学, E-mail: 896225104@qq.com; 通信作者: 李治, 男, 副教授, 博士, E-mail: lizhicqnu@gmail.com

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20220516.1545.010.html>

荧光定量 PCR(RT-qPCR)方法,分析了 *AmCYP9q1* 基因在意大利蜜蜂幼虫口服暴露于吡虫啉后体内的表达情况,探讨了该蛋白在蜜蜂幼虫解毒吡虫啉中的作用,以便为蜜蜂对杀虫剂代谢解毒的分子机制提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料及主要试剂

研究用蜜蜂幼虫均为重庆师范大学学生命科学学院资源昆虫重点实验室养殖。实验用试剂氯仿、异丙醇、无水乙醇均购于重庆化学试剂有限公司, *Evo M-MLV* 反转录试剂盒, *Rro TaqHS* 预混型 qPCR 试剂盒购于重庆艾科瑞生物公司。

1.2 *AmCYP9q1* 的氨基酸序列特征和系统进化分析

AmCYP9q1 的氨基酸序列(GenBank 登录号:XP_006562364.1)下载自 NCBI。使用 NCBI 蛋白保守区数据库预测 *AmCYP9q1* 的保守功能结构域;通过线上程序 ExPASy ProtParam(<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>)预测该蛋白的氨基酸数量、分子质量、理论等电点、脂溶指数、总平均亲水指数以及不稳定指数等理化性质;使用 ExPASy ProtScale(<http://web.expasy.org/protscale/>)线分析该蛋白的亲、疏水性;利用在线程序 TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)预测该蛋白的跨膜结构域;使用 SignalP 5.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)分析该蛋白是否具有信号肽;通过 GlycoMine(<https://glycomine.erc.monash.edu/Lab/GlycoMine/>)预测该蛋白的糖基化位点;通过(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetPhos-3.1>)预测该蛋白的磷酸化位点;通过 Novopro 在线工具(<https://www.novopro.cn/tools/secondary-structure-prediction.html>)在线预测该蛋白的二级结构;使用 SWISS-MODEL Repository(<https://www.expasy.org/resources/swiss-model-repository>)在线预测该蛋白的三级结构;运用 PSORT(<http://psort1.hgc.jp/form.html>)在线预测该蛋白的亚细胞定位特征;利用 STRING(<https://www.expasy.org/resources/swiss-model-repository>)在线预测蛋白互作网络。此外,在 NCBI 中下载不同物种(表 1)CYP450 家族的氨基酸序列,利用 MUSCLE 软件^[21]进行氨基酸序列多重序列比对,分析保守氨基酸区域和位点,比对的结果通过 MEGA 6.06 软件以邻接法构建系统进化树。

表 1 不同物种 CYP450 氨基酸序列信息

Tab.1 Amino acid sequence information of CYP450 of different species

物种	CYP450 简写	GeneBank 登录号	物种	CYP450 简写	GeneBank 登录号
意大利蜜蜂 (<i>A. mellifera</i>)	AmCYP306A1	XP_016771307.1	中华蜜蜂 (<i>Apis cerana cerana</i>)	AcCYP306A1	QGV13001.1
	AmCYP9q1	XP_006562364.1		AcCYP4G11	AGQ03779.1
	AmCYP6A13	XP_026300602.1		AcCYP314A1	AZK16205.1
	AmCYP4G11	NP_001035323.1	飞蝗 (<i>Locusta migratoria</i>)	LmCYP303A1	AVL92820.1
	Am302A1	XP_026300416.1		LmCYP9Aq1	AFU75896.1
直胸跳甲 (<i>Agasicles hygrophila</i>)	AhCYP306A1	AZR39406.1	LmCYP4G102	ANW46746.1	
	AhCYP6A8	AZR39415.1	LmCYP302A1	AVL92819.1	
	AhCYP4G123	AZR39471.1	烟草天蛾 (<i>Manduca sexta</i>)	MsCYP306A1	ABC96068.1
家蚕 (<i>Bombyx mori</i>)	BmCYP306A1	BAD23844.1		MsCYP6AB13	ABC96068.1z
	BmCYP6AB5	NP_001104007.1		MsCYP4G4	ADE05582.1
	BmCYP4G25	NP_001106223.1	MsCYP302A1	ABC96069.1	
	BmCYP302A1	NP_001036953.1	赤拟谷盗 (<i>Tribolium castaneum</i>)	TcCYP306A1	EFA10665.2
果蝇 (<i>Drosophila melanogaster</i>)	DmCYP306A1	NP_001285414.1		TcCYP6BK2	EFA12636.1
	DmCYP6A13	NP_610390.1		TcCYP4G14	NP_001107791.1
	DmCYP4G15	NP_572721.1		TcCYP302A1	XP_974252.1
	DmCYP302A1	NP_524810.2			

1.3 幼虫饲养

选择未感染病原体和未接触农药的意大利蜜蜂作为实验蜂群。蜂王被限制在空脾中产卵 12 h,以控制幼虫的年龄,大约 96 h 后,蜂卵孵化为 2 日龄幼虫。将幼虫转移到 24 孔无菌组织培养板上(孔底面积为 2 cm^2)。在将幼虫嫁接到培养板之前,将提前预热至 $35\text{ }^\circ\text{C}$ 的幼虫饲料移入每个孔的底部,每个孔添加 $20\text{ }\mu\text{L}$ 食物。幼虫食物由 50% 的蜂王浆、6% 的葡萄糖、6% 的果糖、37% 的双重蒸馏水和 1% 的酵母提取物组成^[22]。分别在 3 日龄投喂 $20\text{ }\mu\text{L}$ 食物,4 日龄投喂 $30\text{ }\mu\text{L}$ 食物,5 日龄投喂 $40\text{ }\mu\text{L}$ 食物,6 日龄投喂 $50\text{ }\mu\text{L}$ 食物^[23]。整个饲养过程都在 $35\text{ }^\circ\text{C}$,相对湿度为 96% 的黑暗环境中进行。

1.4 意大利蜜蜂幼虫吡虫啉 48 h 半致死剂量(LD₅₀)测定

将幼虫培养至 3 日龄,设置 6 个吡虫啉梯度,分别为:50,100,200,400,800 和 $1\ 600\text{ ng}\cdot\text{头}^{-1}$,同时设置 6 个添加不同梯度丙酮的组为溶剂对照组,将以上试剂分别混入 $2\text{ }\mu\text{L}$ 幼虫食物中。阴性对照组只添食纯幼虫食物 $2\text{ }\mu\text{L}$ 。每组 3 个生物学重复,1 个重复有 24 头幼虫,共 72 头幼虫。使用 Probit 对 LD₅₀ 进行分析。

1.5 吡虫啉暴露和存活情况监测

1.5.1 吡虫啉暴露 当幼虫培养至 3 日龄时,将实验幼虫随机平均分为对照组和处理组,每组各 96 头幼虫,其中 72 头用于存活率统计,24 头用于不同时间点的取样。处理前将孔中幼虫前一天未吃完的食物移除。处理组的幼虫每头饲喂 $2\text{ }\mu\text{L}$ 含吡虫啉的食物,食物中吡虫啉的终质量浓度为 $1.66\text{ }\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。对照组的幼虫每只饲喂 $2\text{ }\mu\text{L}$ 含丙酮的食物(丙酮含量与处理组中相同)。待幼虫吃完后,在孔中补足足量的正常食物 $18\text{ }\mu\text{L}$ 。

1.5.2 存活情况监测 处理的当天视为第 0 d,此后每 12 h 记录一次幼虫的存活情况,一共记录 96 h。触碰无反应,有体色变黑、变透明等明显征兆的幼虫被视为死亡。统计所得数据通过 GraphPad 软件进行存活率统计,并采用 t 检验进行存活率的统计分析,当 $p < 0.05$ 时, t 检验结果具有统计学意义。

1.6 RNA 提取、反转录和 q-PCR 分析

1.6.1 RNA 提取和反转录 从对照组和处理组各取 6 头幼虫,采用 Trizol 法提取总 RNA,通过电泳以及吸光值测定检验 RNA 的质量。将 $1\text{ }\mu\text{g}$ RNA 与试剂盒提供的 5X gDNA Clean Reaction Mix 在 $42\text{ }^\circ\text{C}$ 反应 5 min 去除残留的基因组 DNA,保证定量结果的准确性。反应结束后,在管中加入 $4\text{ }\mu\text{L}$ 5X Evo M-MLV RT Reaction Mix, $4\text{ }\mu\text{L}$ RNase free water 进行逆转录反应,总体积为 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。将混合物在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 15 min,然后加热至 $85\text{ }^\circ\text{C}$ 并维持 5 s,以使逆转录反应失活,将得到的 cDNA 稀释 5 倍后分装备用。

1.6.2 q-PCR 分析 引物序列取自文献或利用 Primer 5 自行设计,所用引物的序列如表 2 所示。在所有进行的分析中,核糖体蛋白 49(RP49)被用作正常的管家基因。在 96 孔板中配制以下反应体系:2X SYBR Green Pro Taq HS Premix $10\text{ }\mu\text{L}$;上游引物、下游引物各 $0.4\text{ }\mu\text{L}$;cDNA 模板 $1\text{ }\mu\text{L}$;无酶水 $8.2\text{ }\mu\text{L}$,共 $20\text{ }\mu\text{L}$ 反应体系。设置 PCR 反应体系:第 1 步为扩增程序,即 $95\text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 30 s;第 2 步为 $95\text{ }^\circ\text{C}$ 下变性 5 s, $60\text{ }^\circ\text{C}$ 下退火 30 s,进行 40 个循环;第 3 步为添加溶解曲线。样品分析采用 CFX Maestro 软件,通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因的相对表达量。通过 GraphPad 软件的 t 检验对统计的数据进行差异性分析,当 $p < 0.05$ 时,检验结果具有统计学意义。

表 2 引物序列信息

Tab.2 Sequence information of primer pairs

基因	方向	引物序列(5'—3')	来源
RP49	正向	AATGGCTATTCGTCCAGTAT	自行设计
	反向	TTAGGTTTACGCCAGTTTCT	
AmCYP9q1	正向	TCGAGAAGTTTTTCCACCG	文献[20]
	反向	CTCTTTCCTCCTCGATTG	

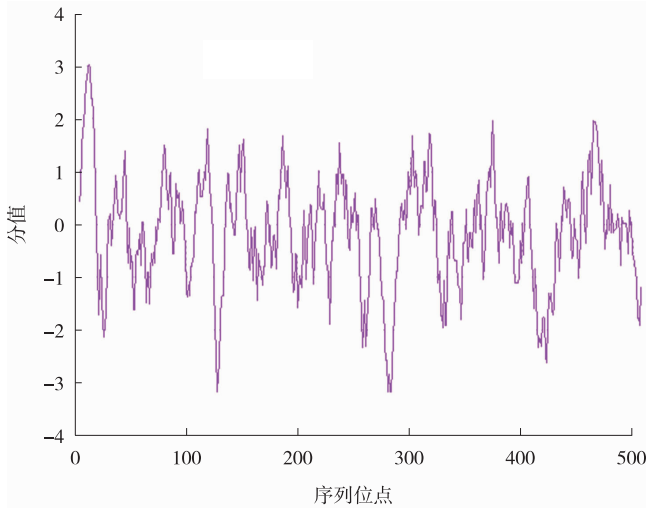
2 结果与分析

2.1 AmCYP9q1 的序列特征

2.1.1 AmCYP9q1 的理化性质分析 AmCYP9q1 分子式为 $\text{C}_{2648}\text{H}_{4174}\text{N}_{720}\text{O}_{731}\text{S}_{32}$,共编码 510 个氨基酸,相对分子质量为 58.8 kDa,PI 为 8.91。构成该蛋白的氨基酸中,亮氨酸(Leu)所占比例最大,为 9.8%,色氨酸(Trp)所

占比例最少,仅为 0.6%。其中,该蛋白携带的负电荷残基(Asp+Glu)总数为 60,正电荷残基(Arg+Lys)总数为 68。总平均亲水指数(Grand average of hydropathicity)为-0.158,脂肪族氨基酸指数(Aliphatic index)为 89.39,表明该蛋白为亲水性蛋白。从 AmCYP9q1 蛋白的亲/疏水区分析结果(图 1)可以看出该蛋白亲水区较丰富。该蛋白的不稳定系数(Instability index)为 42.83(大于 40),表明它为不稳定蛋白。

2.1.2 AmCYP9q1 的高级结构及互作靶蛋白预测分析 利用 SOPMA 在线进行二级结构预测分析(图 2)发现:AmCYP9q1 的 α -螺旋占比为 51.96%,无规则卷曲占比为 37.06%, β -折叠占比为 10.98%。基于 SWISS-MODEL 综合 Seq identity 值、GMQE 值和 QMEAN 值预测该蛋白的三级结构模型见图 3;AmCYP9q1 的三级结构主要是由 21 个 α -螺旋、13 个 β -折叠以及许多无规则卷曲构成。



注:高数值表示疏水区,低数值表示亲水区

图 1 AmCYP9q1 的亲/疏水性预测分析结果

Fig. 1 The prediction results of AmCYP9q1 in hydrophilic/hydrophobic

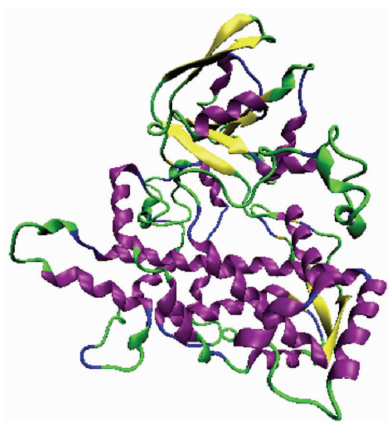


注:黑线区域表示无规卷曲;红色螺旋区域表示 α -螺旋;蓝色箭头区域表示 β -折叠;两侧数字表示氨基酸序列范围

图 2 AmCYP9q1 的二级结构预测结果

Fig. 2 The prediction results of secondary structure of AmCYP9q1

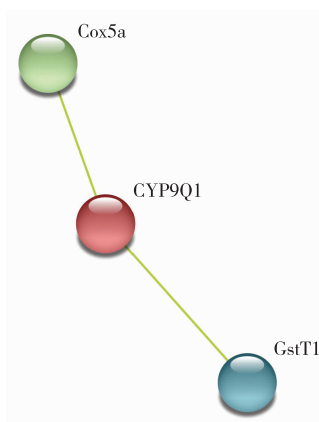
通过 String 蛋白互作在线数据库对 AmCYP9q1 进行分析,图 4 结果表明:AmCYP9q1 可能与细胞色素 C 氧化亚基蛋白 Cox-5A(XP_392368.7)和谷胱甘肽巯基转移酶 GstT1(XP_624692.2)存在互作关系。CYP450 家族和 Gst 谷胱甘肽巯基转移酶是昆虫体内重要的解毒酶家族,在昆虫代谢外源毒素代谢中起着重要的作用^[24]。本研究的结果提示它们可能共同参与了意大利蜜蜂对某些外源物质的代谢解毒过程。



注:蓝线区域表示无规卷曲;紫色螺旋区域表示 α -螺旋;黄色箭头区域表示 β -折叠

图 3 SWISS-MODEL 分析 AmCYP9q1 的三级结构预测结果

Fig. 3 The tertiary structure prediction results for the AmCYP9q1 by SWISS-MODEL



注:Cox5a:细胞色素 C 氧化酶亚基 5A (Cytochrome C oxidase subunit 5a); GstT1: 谷胱甘肽巯基转移酶 (Glutathione S-transferase);黄线表示从文本挖掘证据证明的基因

图 4 AmCYP9q1 的蛋白互作预测结果

Fig. 4 Prediction analysis results of AmCYP9q1

2.1.3 AmCYP9q1 的功能域特征 糖基化和磷酸化蛋白质翻译后重要的修饰方式^[25-26],磷酸化位点及糖基化位点预测结果(图 5)表明 AmCYP9q1 有 51 个 O-糖基化位点,17 个 N-糖基化位点,3 个 C-糖基化位点。此外,该蛋白中共有丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸残基磷酸化位点共计 35 个,具体位点信息见表 2。表明该蛋白可能在蛋白酶活性调节、细胞信号转导、生长周期、生长发育中具有一定的功能。PSORT 亚细胞定位预测分析表明该蛋白定位在内质网,亚细胞定位通常与功能相关,表明该蛋白可能参与了机体在内质网中的解毒功能。此外,生物信息学分析表明该蛋白无信号肽,也无跨膜结构域。

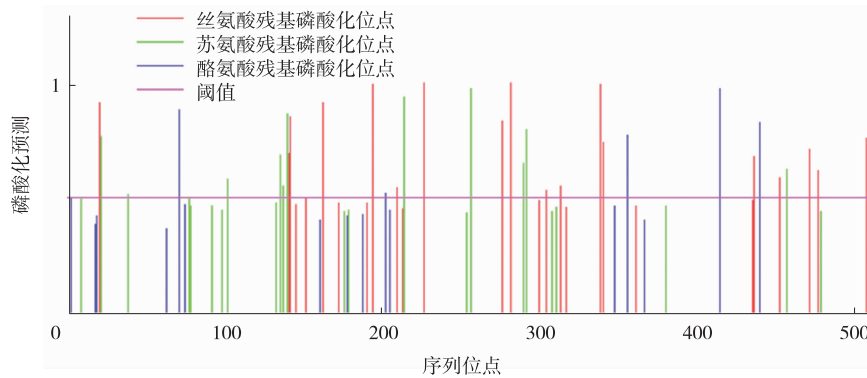


图 5 AmCYP9q1 的磷酸化位点预测分析结果

Fig. 5 Prediction analysis results of phosphorylation site (P-site) of AmCYP9q1

表 2 AmCYP9q1 的修饰位点信息

Tab. 2 Modification site information of AmCYP9q1

修饰位点类型	位置	共计
O-糖基化位点	9, 21, 22, 39, 78, 79, 92, 99, 102, 133, 136, 137, 140, 141, 142, 146, 152, 163, 173, 176, 179, 191, 194, 210, 213, 214, 227, 254, 257, 277, 282, 290, 292, 300, 305, 308, 311, 314, 317, 339, 341, 362, 381, 436, 437, 453, 458, 472, 477, 479, 508	51
N-糖基化位点	24, 44, 100, 103, 180, 196, 200, 218, 226, 235, 296, 323, 401, 418, 466, 491, 496, 507	17
C-糖基化位点	128, 403, 499	3
丝氨酸残基磷酸化位点	21, 141, 142, 163, 194, 210, 227, 277, 282, 305, 314, 339, 341, 437, 453, 472, 477, 508	18
苏氨酸残基磷酸化位点	22, 39, 102, 136, 137, 140, 214, 257, 290, 292, 458	11
酪氨酸残基磷酸化位点	3, 71, 203, 356, 415, 440	6

2.1.4 AmCYP9q1 的多重序列比对 通过 NCBI 功能位点搜索 (Conserved domain database) 分析发现: AmCYP9q1 属于 CYP450 超家族中的 CYP3 Clan^[27-29],具有 CYP450s 的保守结构域之一的血红素结合位点 (Heme-binding site) 以及多个假定的化合物结合位点。多重序列同源性比对结果表明 AmCYP9q1 的序列较为保守,与其他昆虫 CYP450 家族成员具有共同的结构特征:K 螺旋、C 螺旋和血红素结合区域(图 6)。

2.1.5 AmCYP9q1 的系统进化树特征 基于昆虫代表物种 CYP450 家族的氨基酸序列,对意大利蜜蜂 AmCYP9q1 进行了聚类分析,系统进化上按照昆虫 CYP450 家族的分类(CYP2 Clan、CYP3 Clan、CYP4 Clan 和线粒体 CYP Clan)的不同分别聚为 4 支。结果如图 7 所示:意大利蜜蜂 AmCYP9q1 与其他昆虫 CYP3 Clan 聚为一个 大类。其中,相同 Clan 的 CYP450 具有更高的相似性。意大利蜜蜂 AmCYP9q1 与飞蝗 LmCYP9q1 聚为一支,而意大利蜜蜂 AmCYP6A13 与其他昆虫的 CYP6A 亚家族距离更近。

2.2 LD₅₀ 吡虫啉暴露对蜜蜂幼虫死亡率的验证

本研究通过不同剂量梯度吡虫啉处理得到吡虫啉对意大利蜜蜂幼虫 48 h LD₅₀ 理论值为 3.32 ng·头⁻¹。对该理论值进行死亡情况检验,得到的结果如图 8 所示:对照组幼虫与 LD₅₀ 吡虫啉处理组幼虫的死亡情况在 24 h 时开始出现具有统计学意义的差异($p < 0.05$);48 h 时幼虫的死亡率分别为 12.5% 和 48.6%,处理组幼虫死亡率接近 50%,表明该 48 h LD₅₀ 符合实际情况;84 h 和 96 h 两个时间点幼虫未出现死亡情况。

1. AmCYP9q1
 2. AmCYP306A1
 3. AmCYP4G11
 4. AmCYP302A1
 5. AmCYP6A13
 6. ACCYP306A1
 7. ACCYP314A1
 8. AcCYP4G11
 9. AhCYP306A1
 10. AhCYP4G123
 11. AhCYP6A8
 12. BmCYP306A1
 13. BmCYP6AB5
 14. Bm302A1
 15. BmCYP4G25
 16. DmCYP6A13
 17. DmCYP4G15
 18. DmCYP302A1
 19. DmCYP306A1
 20. LmCYP9Aq1
 21. LmCYP4G102
 22. LmCYP302A1
 23. LmCYP303A1
 24. MsCYP306A1
 25. MsCYP4G4
 26. MsCYP302A1
 27. MsCYP6AB13
 28. TeCYP306A1
 29. TeCYP6BK2
 30. TeCYP4G14
 31. TeCYP302A1

K螺旋

1. AmCYP9q1
 2. AmCYP306A1
 3. AmCYP4G11
 4. AmCYP302A1
 5. AmCYP6A13
 6. ACCYP306A1
 7. ACCYP314A1
 8. AcCYP4G11
 9. AhCYP306A1
 10. AhCYP4G123
 11. AhCYP6A8
 12. BmCYP306A1
 13. BmCYP6AB5
 14. Bm302A1
 15. BmCYP4G25
 16. DmCYP6A13
 17. DmCYP4G15
 18. DmCYP302A1
 19. DmCYP306A1
 20. LmCYP9Aq1
 21. LmCYP4G102
 22. LmCYP302A1
 23. LmCYP303A1
 24. MsCYP306A1
 25. MsCYP4G4
 26. MsCYP302A1
 27. MsCYP6AB13
 28. TeCYP306A1
 29. TeCYP6BK2
 30. TeCYP4G14
 31. TeCYP302A1

血红素结合区

1. AmCYP9q1
 2. AmCYP306A1
 3. AmCYP4G11
 4. AmCYP302A1
 5. AmCYP6A13
 6. ACCYP306A1
 7. ACCYP314A1
 8. AcCYP4G11
 9. AhCYP306A1
 10. AhCYP4G123
 11. AhCYP6A8
 12. BmCYP306A1
 13. BmCYP6AB5
 14. Bm302A1
 15. BmCYP4G25
 16. DmCYP6A13
 17. DmCYP4G15
 18. DmCYP302A1
 19. DmCYP306A1
 20. LmCYP9Aq1
 21. LmCYP4G102
 22. LmCYP302A1
 23. LmCYP303A1
 24. MsCYP306A1
 25. MsCYP4G4
 26. MsCYP302A1
 27. MsCYP6AB13
 28. TeCYP306A1
 29. TeCYP6BK2
 30. TeCYP4G14
 31. TeCYP302A1

C螺旋

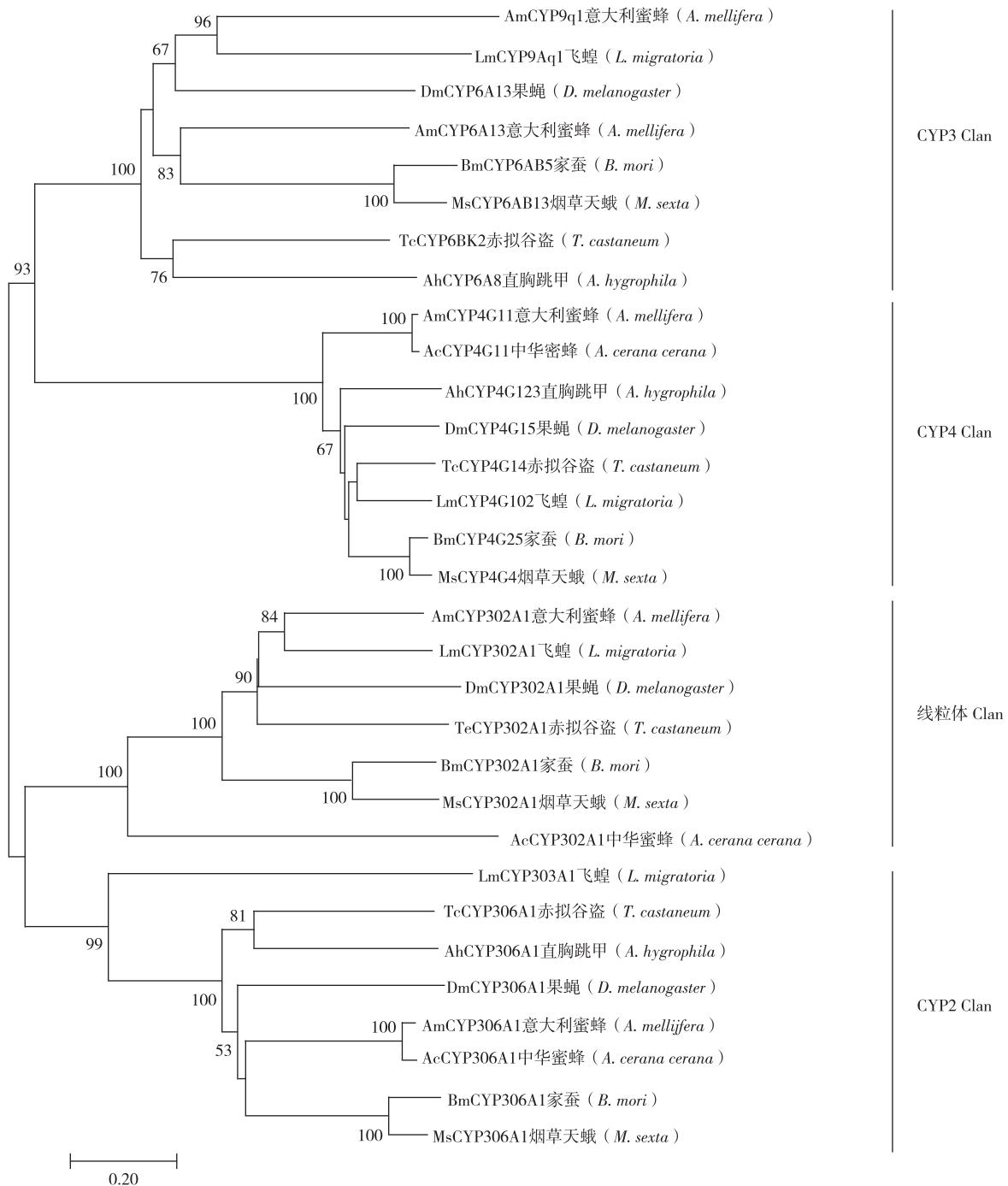
注:黑色“△”表示磷酸化位点;黑色“○”表示糖基化位点;红色“○”表示血红素结合位点

图 6 AmCYP9q1 的氨基酸序列特征和多重序列比对分析

Fig. 6 Amino acid sequence characteristics and multiple alignment of AmCYP9q1

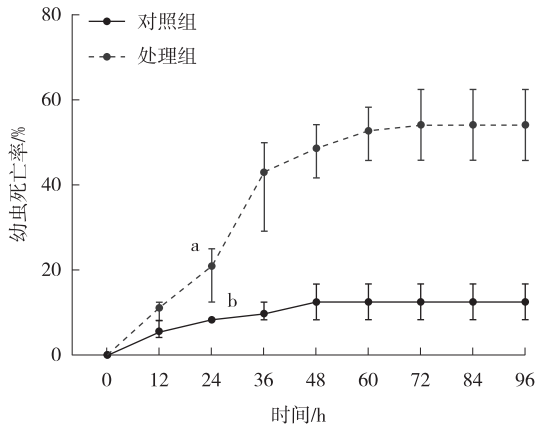
2.3 LD₅₀ 吡虫啉暴露下意大利蜜蜂不同日龄幼虫 *AmCYP9q1* 基因的表达

结合图 8 中幼虫的死亡情况,对对照组与处理组幼虫死亡率出现差异的时间点(24 h)和处理组最后一次死亡情况发生的时间点(72 h)的样本进行了 *AmCYP9q1* 基因的表达量检测。结果如图 9 所示,吡虫啉暴露后 24 h,与对照组相比,处理组 *AmCYP9q1* 基因相对表达量呈明显上调,约为对照组的 2 倍,组间差异具有统计学意义($p < 0.01$);吡虫啉暴露后 72 h,处理组的 *AmCYP9q1* 基因相对表达量约为对照组的 3.5 倍,组间差异具有统计学意义($p < 0.01$);处理组吡虫啉暴露 24 h 后与处理组吡虫啉暴露 72 h 后的 *AmCYP9q1* 基因相对表达量差异具有统计学意义($p < 0.05$)。



注: 各蛋白 GeneBank 收录号见表 1

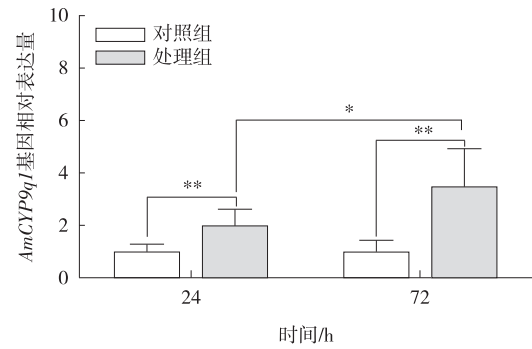
图 7 基于邻接法构建意大利蜜蜂和其他 7 种昆虫 CYP450 家族蛋白的系统进化树
 Fig. 7 Phylogenetic tree of CYP450 family from *A. mellifera* and 7 other insect species constructed using neighbor-joining method



注:不同字母表示某时间点两组幼虫死亡率出现具有统计学意义的差异($p < 0.05$)

图 8 吡虫啉暴露后意大利蜜蜂幼虫各时间点的总死亡率

Fig. 8 Total mortality of *A. mellifera* larval after exposed to imidacloprid



注:24 h/72 h 分别为经处理后 24 h/72 h; * 表示组间差异在 $p < 0.05$ 水平具有统计学意义; ** 表示组间差异在 $p < 0.01$ 水平具有统计学意义

图 9 吡虫啉暴露后意大利蜜蜂幼虫

AmCYP9q1 基因的相对表达量

Fig. 9 Relative expression levels of *AmCYP9q1* in *A. mellifera* larvae exposed to imidacloprid

3 讨论

3.1 AmCYP9q1 的生物信息学分析

CYP450 是一类生物体中普遍存在的蛋白^[30]。本研究通过多重序列比对分析发现 AmCYP9q1 与其他昆虫 CYP450 拥有 CYP450 家族中高度保守的 K 螺旋结构(EXXR)、C 螺旋结构(WXXXR)和红素结合位点中心区域(FXXGXXXCXG)(X 表示任何一个氨基酸)^[31],表明该蛋白属于 CYP450 家族。此外,除了高度保守的结构区域,AmCYP9q1 还拥有多个假定的化学结合位点和修饰位点,表明该蛋白可能参与了不同的生理过程。根据进化分类,昆虫中的 CYP450 共分为 4 个大家族:CYP2、CYP3、CYP4 和线粒体 CYP^[32]。本研究通过进化树结合 NCBI 保守结构域分析表明该蛋白与其他昆虫 CYP3 亚家族成员被分为一类,属于 CYP3 Clan 中的 CYP6 亚家族。CYP6 通常与昆虫对外源物质的代谢解毒功能有关^[33]。蛋白互作网络预测分析表明,该蛋白与 GST 存在一定的互作关系,推测它们可能共同参与了蜜蜂的代谢解毒过程。在进化关系上,该蛋白与飞蝗 LmCYP9q1 距离较近。综上所述,AmCYP9q1 具有 CYP450 家族成员典型的序列和结构特征,可将它归类为 CYP450 家族中的 CYP3 Clan。

3.2 意大利蜜蜂幼虫吡虫啉 48 h LD₅₀ 的测定及验证

在本研究中建立的标准化幼虫饲养条件^[22]下,对照组幼虫存活率超过 85%,表明本研究中的饲养条件较稳定,可以用于蜜蜂幼虫毒理实验等方面的研究^[8]。通过设置不同梯度的吡虫啉剂量添加,分析计算了吡虫啉对意大利蜜蜂幼虫 48 h LD₅₀,结果为 $3.22 \mu\text{g} \cdot \text{头}^{-1}$ 。根据 GB/T 31270.10—2014《化学农药环境安全评价试验准则第 10 部分:蜜蜂急性毒性试验》指定的毒性评价标准,上述指标为 $2.00 \sim 11.0 \mu\text{g} \cdot \text{头}^{-1}$ 的农药为中毒农药。2017 年 Dai 等人^[34]在实验中测得吡虫啉对意大利蜜蜂幼虫的 LD₅₀ 为 $4.17 \mu\text{g} \cdot \text{头}^{-1}$,同样被定位为中毒农药。由于通过了处理后 48 h 幼虫死亡率的检验(图 8),因而不仅验证了本研究测定的 48 h LD₅₀ 理论值符合实际情况,也表明该结果是可靠的。

3.3 LD₅₀ 吡虫啉暴露后不同时间点意大利蜜蜂幼虫体内 AmCYP9q1 基因表达的影响

已有研究表明,昆虫中 CYP450s 主要参与对外源有害物质的代谢解毒^[35]。例如,当蜜蜂暴露于新烟碱类杀虫剂时,会通过上调 CYP450s 相关基因的表达以抵抗杀虫剂的毒害^[36-37]。此外,农药蝇毒磷暴露下,蜜蜂 CYP6AS3、CYP6AS4、CYP9S1 基因呈大量上调表达。还有研究发现,蜜蜂 CYP6AS14 基因也会被百里酚(一种杀螨剂)诱导表达上调^[38]。Mao 等人^[13]在研究中发现 CYP9q1 和 CYP9q2 基因可以参与成年工蜂对拟除虫菊酯类农药的解毒代谢。本研究发现在吡虫啉暴露前期(24 h)和后期(72 h),AmCYP9q1 基因均呈明显上调表达,这一结果与 Mao 等人^[13]的研究相似,初步表明该基因可能参与了蜜蜂幼虫对吡虫啉的代谢解毒。此外,还观察到吡虫啉暴露后 72 h 的 AmCYP9q1 基因相对表达量明显高于 24 h 时。结合幼虫的死亡率数据(图 8),推测在 LD₅₀ 吡虫啉急性暴露下,前期(24 h)AmCYP9q1 基因的相对表达量并不足以将吡虫啉的毒性代谢完全,这

使得幼虫的死亡情况一直持续至 72 h。在吡虫啉暴露后 72 h, *AmCYP9q1* 基因的表达水平持续上调甚至高于 24 h, 表明在 72 h 时幼虫体内可能仍在大量对吡虫啉进行代谢解毒。尽管如此, *AmCYP9q1* 基因是否真正在意大利蜜蜂幼虫抵抗吡虫啉毒性中扮演了代谢解毒作用, 仍需要通过 RNAi 处理和蛋白水平获得更确凿的证据来加以证实。

总之, 本研究结果表明 *AmCYP9q1* 基因在吡虫啉胁迫下呈现积极响应, 可能在意大利蜜蜂幼虫对吡虫啉的代谢解毒中起着重要的作用。这一结果为了解吡虫啉对意大利蜜蜂的毒性机制以及抗性蜜蜂选种提供了基础资料。

参考文献:

- [1] TESOVNIK T, ZORC M, RISTANIC M, et al. Exposure of honey bee larvae to thiamethoxam and its interaction with *Nosema ceranae* infection in adult honey bees[J]. *Environmental Pollution*, 2020, 256: 113441-113443.
- [2] RODRÍGUEZ Y A, CHRISTOFOLETTI C A, PEDRO J, et al. *Allium cepa* and *Tradescantia pallida* bioassays to evaluate effects of the insecticide imidacloprid[J]. *Chemosphere*, 2015, 120: 438-442.
- [3] CRALL J S D, SWITZER C M, OPPENHEIMER R L, et al. Neonicotinoid exposure disrupts bumblebee nest behavior, social networks, and thermoregulation[J]. *Science*, 2018, 362(6415): 683-686.
- [4] GILL R J, RAMOS-RODRIGUEZ O, RAINE N E. Combined pesticide exposure severely affects individual and colony-level traits in bees[J]. *Nature*, 2012, 491(7422): 105-108.
- [5] SANCHEZ-BAYO F, GOKA K, GUEDES R N C. Pesticide residues and bees: a risk assessment[J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e94482.
- [6] WOODCOCK B A, ISAAC N J B, BULLOCK J M, et al. Impacts of neonicotinoid use on long-term population changes in wild bees in England[J]. *Nature Communications*, 2016, 7(1).
- [7] BUDGE G E, GARTHWAITE D, CROWE A, et al. Evidence for pollinator cost and farming benefits of neonicotinoid seed coatings on oilseed rape[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5(1).
- [8] 庄安祥. 新烟碱类杀虫剂及其类似物的毒力分析与毒理特性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
ZHUANG A X. Toxicity evaluation and pharmacological property analysis of neonicotinoid insecticides and their analogues[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015.
- [9] 任娜娜, 谢苗, 尤燕春, 等. 羧酸酯酶及其介导昆虫抗药性的研究进展[J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2014, 43(4): 337-344.
REN N N, XIE M, YOU Y C, et al. An overview on the study of insect carboxylesterases (COEs) and the COE-mediated resistance to insecticides[J]. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 2014, 43(4): 337-344.
- [10] CLAUDIANOS C, RANSON H, JOHNSON R M, et al. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee[J]. *Insect molecular biology*, 2006, 15(5): 615-636.
- [11] MAO W F, RUPASINGHE S G, JOHNSON R M, et al. Quercetin-metabolizing CYP6AS enzymes of the pollinator *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 154(4): 427-434.
- [12] MAO W F, SCHULER M A, BERENBAUM M R. Honey constituents up-regulate detoxification and immunity genes in the western honey bee *Apis mellifera*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(22): 8842-8846.
- [13] MAO W F, SCHULER M A, BERENBAUM M R. CYP9Q-mediated detoxification of acaricides in the honey bee (*Apis mellifera*)[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(31): 12657-12662.
- [14] NIU G, JOHNSON R M, BERENBAUM M R. Toxicity of mycotoxins to honeybees and its amelioration by propolis[J]. *Apidologie*, 2011, 42(1): 79-87.
- [15] DESNEUX N, DECOURTYE A, DELPUECH J. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods[J]. *Annual Review of Entomology*, 2007, 52(1): 81-106.
- [16] LÓPEZ J H, KRAINER S, ENGERT A, et al. Sublethal pesticide doses negatively affect survival and the cellular responses in American foulbrood-infected honeybee larvae[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 40853.
- [17] BÖHME F, BISCHOFF G, ZEBITZ C P W, et al. From field to food: will pesticide-contaminated pollen diet lead to a

- contamination of royal jelly?[J]. *Apidologie*,2018,49(1):112-119.
- [18] MARTÍNEZ-DOMÍNGUEZ G, ROMERO-GONZÁLEZ R, GARRIDO-FRENICH A. Multi-class pesticide determination in royal jelly by gas chromatography coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry[J]. *Analytical methods*,2014,6(14):5376-5386.
- [19] DAI P L, CAMERON J J, MORTENSEN A N, et al. Chronic toxicity of clothianidin, imidacloprid, chlorpyrifos, and dimethoate to *Apis mellifera* L. larvae reared *in vitro*[J]. *Pest Management Science*,2019,75(1):29-36.
- [20] DECOURTYE A, HENRY M, DESNEUX N. Environment: overhaul pesticide testing on bees[J]. *Nature*,2013,497(7448):188.
- [21] EDGAR R C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput[J]. *Nucleic Acids Research*,2004,32(5):1792-1797.
- [22] AUPINEL P, FORTINI D, DUFOUR H, et al. Improvement of artificial feeding in a standard *in vitro* method for rearing *Apis mellifera* larvae[J]. *Bulletin of Insectology*,2005,58(58):107-111.
- [23] AUPINEL P, FORTINI D, MICHAUD B, et al. Toxicity of dimethoate and fenoxycarb to honey bee brood (*Apis mellifera*), using a new *in vitro* standardized feeding method[J]. *Pest Management Science*,2007,63(11):1090-1094.
- [24] 周文武. 稻飞虱化合物感觉系统和代谢酶的分子解析[D]. 杭州:浙江大学,2013.
ZHOU W W. Molecular analysis of chemosensory system and metabolic enzymes of rice planthoppers[D]. Hangzhou: Zhejiang University,2013.
- [25] 梁前进,王鹏程,白燕荣. 蛋白质磷酸化修饰研究进展[J]. *科技导报*,2012,30(31):73-79.
LIANG Q J, WANG P C, BAI Y R. Summarization on the progress in protein phosphorylation[J]. *Science & Technology Review*,2012,30(31):73-79.
- [26] 王晓龙,王秀然,卢天成. 蛋白质糖基化修饰的研究进展[J]. *基因组学与应用生物学*,2017,36(10):4380-4384.
WANG X L, WANG X R, LU T C. The research progress of protein glycosylation modification[J]. *Genomics and Applied Biology*,2017,36(10):4380-4384.
- [27] 艾均文,龚昕,薛宏,等. 不同鳞翅目昆虫细胞色素 P450 基因(CYPs)的比较基因组学分析[J]. *农业生物技术学报*,2015,23(2):244-252.
AI J W, GONG X, XUE H, et al. Comparative genomic analysis of cytochrome P450 genes (CYPs) in different lepidopteran insects[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*,2015,23(2):244-252.
- [28] 奚玲玉. 取食三种寄主后扶桑绵粉蚧 P450 基因的表达模式及 RNAi 研究[D]. 合肥:安徽农业大学,2020.
XI L Y. Expression pattern and RNAi study of P450 genes of *Phenacoccus solenopsis* after feeding on three hosts[D]. Hefei: Anhui Agricultural University,2020.
- [29] 黄勇. 桔小实蝇细胞色素 P450 酶系及其在马拉硫磷抗性中的作用[D]. 重庆:西南大学,2016.
HUANG Y. Cytochrome P450 enzyme system and its functions in malathion resistance in the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel)[D]. Chongqing: Southwest University,2016.
- [30] WERCK-REICHHART D, FEYEREISEN R. Cytochromes P450: a success story[J]. *Genome Biology*,2000,1(6):1-9.
- [31] 丁天波. 柑橘全爪螨细胞色素 P450 及其相关基因的鉴定和表达模式研究[D]. 重庆:西南大学,2014.
DING T B. Identification and transcription profile analysis of P450 and its relative genes in citrus red mite, *Panonychus citri* (McGregor) (Acari: Tetranychidae)[D]. Chongqing: Southwest University,2014.
- [32] FEYEREISEN R. Insect Cytochrome P450[J]. *Comprehensive Molecular Insect Science*,2005,4:1-77.
- [33] 胡波. 甜菜夜蛾细胞色素 P450 和谷胱甘肽-S-转移酶基因的转录调控机制[D]. 南京:南京农业大学,2019.
HU B. The transcription regulation mechanism of cytochrome P450 and glutathione-S-transferase genes in *Spodoptera exigua* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University,2019.
- [34] DAI P L, CAMERON J J, MORTENSEN A N, et al. Acute toxicity of five pesticides to *Apis mellifera* larvae reared *in vitro* [J]. *Pest Management Science*,2017,73(11):2282-2286.
- [35] 刘娇. 飞蝗细胞色素 P450 的杀虫剂代谢解毒特性及其表达调控研究[D]. 太原:山西大学,2020.
LIU J. Insecticide metabolism and expression regulation of the cytochrome P450s in *Locusta migratoria* [D]. Taiyuan: Shanxi University,2020.
- [36] RADWAN M A, MOHAMED M S. Imidacloprid induced alterations in enzyme activities and energy reserves of the land snail, *Helix aspersa* [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*,2013,95:91-97.
- [37] WU M, CHANG Y, LU K, et al. Gene expression changes in honey bees induced by sublethal imidacloprid exposure during the

larval stage[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, 88:12-20.

[38] BERENBAUM M R, JOHNSON R M. Xenobiotic detoxification pathways in honey bees[J]. *Current Opinion in Insect Science*, 2015, 10:51-58.

Animal Sciences

Expression Analysis of Cytochrome P450 Monooxidase AmCYP9q1 in Honeybee under Imidacloprid Stress

WANG Yuedi, CHEN Lanchun, QIN Qiqian, LI Zhi

(Chongqing Key Laboratory of Vector Insects, College of Life Sciences,

Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: [Purposes] Cytochrome P450 monooxidase (CYP450) has been widely confirmed to play important role in insect detoxification pesticides. The purpose was to characterize a CYP450, AmCYP9q1, from honey bee *Apis mellifera*. To analyze its encoding gene expression pattern in *A. mellifera* larvae under imidacloprid stress and explore its detoxification effect under imidacloprid stress. [Methods] Using bioinformatic methods analyzed the sequence characteristics, domain, advanced structure, and interaction network, predicted biological function of AmCYP9q1 protein. Construct a phylogenetic tree to analyze the classification and evolution relationship of AmCYP9q1 protein in the insect CYP450 family. Use the real-time quantitative PCR technology to analyze the *AmCYP9q1* gene expression pattern after imidacloprid treated 24 h and 72 h in *A. mellifera* larvae. [Findings] AmCYP9q1 protein consists of 510 amino acids residues, is predicted to have a molecular mass of 58.8 kDa and a theoretical pI of 8.91. The hydrophilic-hydrophobic analysis showed that this protein was hydrophilic but without the signal peptide and the transmembrane domains. Multiple sequence alignment and phylogenetic analysis showed that AmCYP9q1 could be classified into the CYP450 family of the CYP3 Clan with the typical domain characteristics of the CYP450 family. The real-time quantitative PCR analysis showed that compared with the control group, the expression of *AmCYP9q1* genes of *A. mellifera* larvae after imidacloprid treated 24 h and 72 h are statistically significantly increased ($p < 0.05$). And the expression of *AmCYP9q1* genes was significantly higher at 72 h than 24 h ($p < 0.05$). [Conclusions] AmCYP9q1 protein belongs to the CYP3 Clan, a member of the CYP450 family, and may play an essential role in imidacloprid metabolic detoxification of *A. mellifera* larvae.

Keywords: imidacloprid; *Apis mellifera* larvae; median lethal dose; cytochrome P450 monooxidases; CYP9q

(责任编辑 黄颖)