

CYP4G19 基因在德国小蠊对菊酯类杀虫剂耐药中作用研究

郭广洲¹,王秋萍²,耿艺介³,黄达娜³,薛彩芳⁴,张仁利^{3*}

摘要:目的 通过 CYP4G19 基因调控表达探讨 CYP4G19 在德国小蠊对菊酯类杀虫剂耐药中的作用。方法 广口瓶内采用药膜接触法测定野生株和敏感株德国小蠊的耐药指数,RT-PCR 比较野生株和敏感株德国小蠊 CYP4G19 基因表达,免疫组织化学法测定 CYP4G19 蛋白表达。结果 深圳市现场采集野生型德国小蠊,用广口瓶药膜法测得其抗性指数为 3.88,提示野生品系对菊酯类杀虫剂具有抗药性;RT-PCR 检测野生株 CYP4G19 mRNA 表达水平对比敏感株显著上调($t=4.185$, $P<0.01$)。野生株 CYP4G19 基因沉默后 CYP4G19 蛋白表达明显下降但仍然具有一定的抗药性。结论 深圳市野生株德国小蠊已对菊酯类杀虫剂“家虫清”产生抗药性,对菊酯类杀虫剂产生抗药性的德国小蠊体 CYP4G19 基因的转录、翻译表达水平均有上调,野生株 CYP4G19 基因沉默后仍然表现一定的抗药性暗示德国小蠊抗药性可能涉及到多基因的调控表达。

关键词: 德国小蠊; 细胞色素 P450; CYP4G19 基因; 抗药性;

中图分类号: R-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-9727(2011)10-1184-03

Regulation effect of CYP4G19 gene on resistance of *Blattella germanica* to pyrethroid. GUO Guang-zhou, WANG Qiu-ping, GENG Yi-jie, et al. (1. Shenzhen Municipal Fifth People's Hospital, Shenzhen 518001, Guangdong, P. R. China)

Abstract: Objective To investigate the regulatory effect of CYP4G19 gene on the expression of resistance of *Blattella germanica* to pesticide. **Methods** Resistance index of wild strain *Blattella germanica* to pyrethroid called "Jiachongqing" was detected with method of sensitive layer, RT-PCR was applied to analyze the expression difference of CYP4G19 gene between wild strain and sensitive strain of *Blattella germanica*. Expression of CYP4G19 protein was detected by immunohistochemical method. **Results** Resistance of wild strain *Blattella germanica* to "Jiachongqing" was significant high that of sensitive strain with a resistance index of 3.88. The results of semiquantitative RT-PCR showed that CYP4G19 mRNA expression level in wild strain was obviously up-regulated as compared to that of sensitive strain. After silencing of CYP4G19 gene in wild strain, CYP4G19 protein expression level was obviously down-regulated. **Conclusion** The gene transcription and translation level of CYP4G19 were up-regulated in pyrethroid resistant strain. The pesticide resistance level of wild strain were slightly decreased after CYP4G19 gene silencing revealing that there was some relationship between CYP4G19 expression level and pesticide resistance level in *Blattella germanica*.

Key words: *Blattella germanica*; Cytochrome P450; CYP4G19 gene; Pesticide resistance

德国小蠊 (*Blattella germanica*) 是一种常见的家居害虫,可携带多种细菌、病毒,导致疾病的传播,并可引起哮喘等过敏反应^[1]。它对栖息场所的适应性强、繁殖快,易产生对化学杀虫剂的耐药性,已成为城市中难以防治的卫生害虫之一。研究表明,目前广泛使用的菊酯类杀虫剂,其抗性机制主要涉及代谢酶类—细胞色素 P450 (Cytochrome P450, CYP450)^[2]。对昆虫 P450 在耐药机制的研究可以为我国研究新的杀虫剂、监测杀虫剂的耐药性以及杀虫剂的合理运用提供重要信息,然而有关德国小蠊 P450 耐药机制的研究却很少,在 NCBI 被阐明生物学特征的德国小蠊 P450 基因仅有七种,CYP4G19 是德国小蠊 P450 基因家族中一个新成员,它在德国小蠊对菊酯类杀虫剂耐药株和敏感株之间表达存在很大差异,后来人们对 CYP4G19 生物学特征及 CYP4G19 对菊酯类杀虫剂耐药分子机制进行了研究^[3]。

1 材料和方法

1.1 实验材料 德国小蠊敏感株 GC209 由广东省疾病预防控制中心提供,野生株捕自中国深圳某农贸市场。

1.2 实验方法

1.2.1 德国小蠊抗药性的测定 在 500ml 广口瓶内采用药膜接触法^[4],将 8%家虫清原液用丙酮稀释成终浓度为 0.05%的标准液,取 2.5ml 标准溶液于瓶中,将瓶缓慢转动,使药液均匀分布在瓶内壁形成药膜,晾干待用。以丙酮溶液作空白对照,在瓶颈内涂一层液体石蜡防止蜚蠊逃逸。选择雄性成虫 10 只放入瓶内,每隔几分钟记录击倒数,试验重复 3 次,同时设空白对照。根据观察结果,求出 KT50 及其 95%可信限 (95%CI)。抗性指数 (R) = 野外品系 KT50 / 敏感品系 KT50。试验温度 25 ± 1 °C,相对湿度 60 ± 5 %。

作者单位: 1. 深圳市第五人民医院, 广东 深圳 518001; 2. 广州中医药大学祈福医院, 广东 广州 511495; 3. 深圳市疾病预防控制中心, 广东 深圳 518020; 4. 第四军医大学病原生物学教研室, 陕西 西安 710000

作者简介: 郭广洲(1964~),男,硕士,主任技师,主要从事医学检验、医学免疫学及分子生物学研究。

* 通讯作者: E-mail: renlizhang@tom.com

1.2.2 RT-PCR 检测 CYP4G19 基因 mRNA 表达 参照 TRIZOL 试剂(Invitrogen)说明书提取总 RNA,经 1%普通琼脂糖凝胶电泳检测无降解后,用 Biophotometer 测定含量,-80℃保存备用。使用 mRNA 反转录试剂盒(Perkin-Elmer, Branchburg, Calif.)用 1μg mRNA 在 20μl 的反应体积内合成 CYP4G19 和 actin 基因。PCR 在 50μl 反应体积内,为一个单位的 Tag DNA 聚合酶(Perkin,Elmer,Roche,NJ,USA)、30pmol 引物、10XPCR 缓冲液、1.5mM MgCl₂ 等,PCR 反应条件为:DNA 裂解在 94℃ 9min,PCR 扩增在 94℃ 45s、56℃ 1min、72℃ 1min、35 个循环,延伸在 72℃ 7min。目的基因 CYP4G19 上、下游引物,F:5'-acattttacatc ttcgcaactcc-3',R:5'-tctccttctgttcttgatgacctt-3',扩增片段为 423bp,内参对照 actin 基因作为内参对照,引物为 F:5'-atggaatcatcacca actgg-3',r:5'-ccttgatgctcacgaacgatt-3',扩增片段为 141bp。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测,用 UVI 凝胶扫描系统对凝胶进行扫描,以 UV band 软件对各电泳条带进行荧光 OD 值扫描,计算各样品 CYP4G19 mRNA 的基因表达相对量,以进行基因表达水平的相对定量。

1.3 免疫组化法检测蛋白表达差异

1.3.1 制备德国小蠊组织切片 将德国小蠊置-20℃冻晕,冰箱中取出后迅速剪除翅膀、脚支并将虫体剪为 2~3 段,投入固定液中 4℃过夜。固定后,用 PBS 液洗涤样品三次,每次至少 40min,再用 70%、80%乙醇脱水,4℃过夜,90%乙醇 4℃1h,95%乙醇 4℃30min,将样品浸入 4℃无水乙醇两次,4℃二甲苯两次,每次至少 20~30min 使样品透明,用 60℃液体石蜡 I 处理 1h,将整理好的德国小蠊硬壳放入液体石蜡 II 处理 1h,所有组织蜡封入金属盒中,用浸过液体石蜡的塑料网封盖,放入 0℃的容器冷却 30min 后,反转盒子倒出蜡块,切割成 6 μm 切片,使切片平展在水面上,用玻片捞起,置 37℃过夜烤干。

1.3.2 组织切片 HE 染色 将石蜡切片用 I,II,III 浓度二甲苯

各 5min 脱蜡,放入 100%,95%,80%,70%,50%乙醇各 1min,用水冲洗 2min,浸入蒸馏水 2min,干后,用苏木素染液染色 15~20min,用自来水冲洗 10s 使切片变蓝,将切片浸入 0.5%盐酸酒精溶液 30s 后用自来水冲洗 3 次,然后浸入蒸馏水 5min 使切片背景变蓝,干燥。加曙红染液染 2~3min 后,用 95%乙醇、各脱色 1min,再用无水乙醇、和二甲苯、各脱色 1min,在切片上滴加松香油加盖片镜检。

1.3.3 免疫组化染色(IHC) 切片经二甲苯脱蜡及乙醇溶液逐级复水后,切片组织上滴加含 3% H₂O₂ 的 PBS 溶液除内源性过氧化物酶后,置室温 5~8min,切片组织上滴加含 3% BSA 的 PBS 溶液室温放置 30min 封闭,用 PBS 溶液冲洗 3 次后晾干,加入 1:200 稀释的自制多克隆抗体血清及同样稀释的对照血清作为一抗体 4℃过夜,用 PBS 溶液冲洗 3 次,加羊抗鼠 IgG HRP 作为二抗室温反应 1h,用 PBS 溶液冲洗 3 次,加入现配制好的 DAB 显色液室温染色 2~5min 后,用蒸馏水冲洗终止反应,加苏木素复染 1~2min 后,用水冲洗,再脱水透明后镜检。

使用 IPP 软件(Image-pro plus5.1)对免疫组化图片进行光密度分析。选取图片上的棕黄色明显阳性染色区域 AOI(Area of interesting) 测量并统计计算该区域光密度平均值(Mean density =IOD/area)。计算同一实验组切片的 Mean density 平均值及标准差,用 t 检验分析各实验组的 Mean density 之间是否有显著性差异。

2 结果

2.1 野生型德国小蠊抗药性的测定结果 用广口瓶药膜法测得现场采集的野生型德国小蠊对“家虫清”的抗性系数为 3.88。根据药膜法的判定标准,当抗性系数大于 2 时,表明试虫对使用的杀虫剂有抗性,说明此野生品系已对菊酯类杀虫剂“家虫清”产生了抗药性。见表 1。

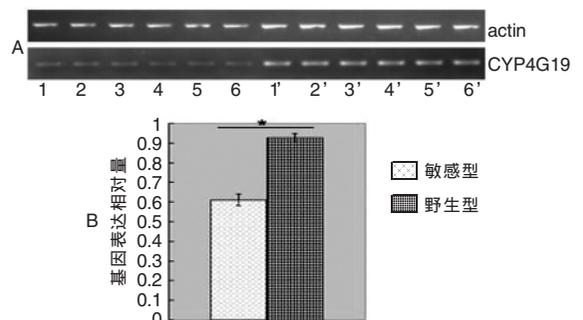
2.2 CYP4G19mRNA 差异表达 RT-PCR 扩增敏感型、野生型

表 1 “家虫清”对德国小蠊野生及敏感品系的毒力测定结果

试虫	回归方程 (y=ax+b)	相关系数 (r ²)	KT ₅₀ (min) 及 95% CI	抗性指数 (R)
敏感品系	y = 1.236x + 0.623	0.983	6.803 (5.4647~8.0795)	-
野生品系	y = 4.231x + 5.226	0.981	26.381 (23.3677~29.3893)	3.88

两组样品(6 个样品/组)的 CYP4G19 基因,actin 作为内部对照,扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳(图 1A)及条带荧光 OD 值扫描后,按公式计算出各自的 CYP4G19 基因表达相对量,实验重复 3 次。计算结果用配对 t 检验进行统计分析(图 1B)表明敏感型德国小蠊的 CYP4G19 基因表达量显著低于野生型(t=4.185, P<0.01)。

2.3 免疫组化检测 RNAi 后 CYP4G19 蛋白表达差异 采用免疫组化方法检测 RNAi 干扰前后 CYP4G19 蛋白表达,野生品系 RNAi 处理组组织切片 CYP4G19 蛋白反应强度和密度明显弱和少于非 RNAi 处理野生品系(图 2,见封 3),无论雄性还是雌性成虫的微粒体切片均显示相同的结果,用正置荧光照相机拍摄不同组织样品免疫组化照片,每个组织切片随机选取 10 组 AOI 阳性表达区域,通过 IPP 软件分析计数各 AOI 区的 Mean density 值,再用 SPSS 软件计算各切片 10 个 AOI 区的 Mean density 均值和标准差。野生品系 RNAi 处理组相应组织切片的 Mean density 均值经配对 t 检验分析。(图 3)



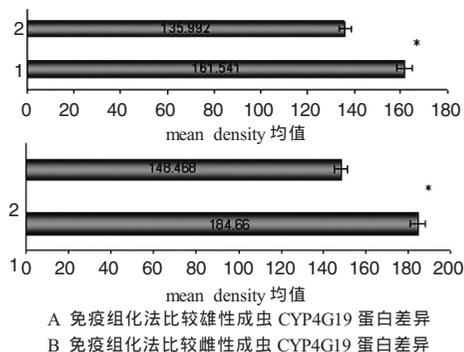
A:Gel 电泳分析 actin 和 CYP4G19 基因 PCR 产物;1~6:杀虫剂敏感型;1'~6':野生型;B:半定量 RT-PCR 分析显示显著性统计学差异 t=4.185,P<0.01(t test)柱状图

图 1 半定量 RT-PCR 检测 CYP4G19 mRNA 的表达量

3 讨论

德国小蠊抗药性监测方法目前尚未统一,我们这里采用 Cochran's 时间死亡数方法^[4]来反映野外收集德国小蠊(野生株与敏感株的比较)对被称作“家虫清”的杀虫剂的抗药性,认为

抗性倍数 <2, 表示敏感或有弱的耐药; 抗性倍数 >2, 为有抗性; 抗性倍数 >10, 为已产生高抗性^[3]。本研究测得现场采集的野生品系对“家虫清”的抗性指数为 3.88, 说明此品系已对“家虫清”产生了抗性。“家虫清”是含 2% 胺菊酯和 6% 氯氰菊酯的复合型菊酯类化学杀虫剂, 是近年深圳市卫生消杀工作常用的杀虫剂。这一结果提示防治工作者应考虑更换或轮换使用其他类型的杀虫剂来防治德国小蠊。同时, 采集的野生品系试虫也为下一步关于抗性机制的深入研究提供了宝贵的实验材料。



1: 非处理组; 2: 处理组; *: 配对 *t* 检验, $t=2.971, P<0.01$ ($n=10$)

图3 免疫组化法比较 RNAi 处理前后 CYP4G19 蛋白组织表达差异

来自野外的许多株德国小蠊对杀虫剂具有抵抗力, 其中一些株德国小蠊对菊酯类杀虫剂具有 2-10 倍的抵抗力^[5], 在一些地区, 由于德国小蠊对杀虫剂抵抗力较低, 菊酯类杀虫剂对德国小蠊还是非常有效的, 然而, 如果菊酯类杀虫剂长期使用就会导致德国小蠊对菊酯类杀虫剂产生较强的抗性, 大量采用化学制剂杀德国小蠊的前景令人担忧。

一些文献报道, 德国小蠊抗性改变程度与其基因突变及表达程度有关, 尤其是代谢酶类, 如细胞色素 P450 及其它相关酶类^[6], 一个新的细胞色素 P450 基因 -- CYP4G19, 通过采用 PCR 反向杂交和 cDNA 检测技术证实该基因在德国小蠊杀虫剂敏感株 ACY 和耐药株 Apyr-R 之间存在差异并被分离, CYP4G19 的 cDNA 序列其开放阅读框为 1638bp, 推测编码 546 个氨基酸, 该基因的过度表达与对杀虫剂耐药一致, 我们的结果显示野生株 CYP4G19 mRNA 的表达显著高于敏感株 ($t=4.185, P<0.01$)。

RNA 干扰技术是能够特异地使目的基因关闭或缄默 (Gene-silencing), 从而关闭或减弱目的基因相应蛋白的表达。2006 年 David 等^[7]通过 RNA 干扰技术来研究德国小蠊 20- 羟基蜕皮酮受体 RXR 在若虫发育过程中的作用, 发现特异沉默 BgRXR 基因的表达后, 大部分若虫的发育停滞在最后阶段, 不能发育形成成虫。目前, 还未见利用此项技术来研究德国小蠊细胞色素 P450 功能的报道。

本实验半定量 RT-PCR 和免疫组化结果分析初步显示: 在雌性和雄性成虫体内, RNA 干扰前 CYP4G19 蛋白表达水平显著高于 RNA 干扰后 ($t=2.971, P<0.01$); 耐药株 CYP4G19 基因

mRNA 的表达和 CYP4G19 蛋白表达水平显著高于敏感株, 研究显示耐药株 CYP4G19 基因复制水平和转录水平逐步增高。另外, 随着 CYP4G19 基因表达量的降低, 野生型德国小蠊对菊酯类杀虫剂的抗性有一定程度地减弱, 但这种抗性的减弱并没有完全改变野生品系具有耐药性的表型。细胞色素 P450 酶系是一个大的基因家族, 另外 CYP4G19 还有一些其他家庭成员: CYP4C21、CYP6K1、CYP6L1 和 CYP9E2, 这些 P450 的功能特点尚未见研究, 所以不能排除它们与德国小蠊抗性之间的潜在相关性。另外, 除细胞色素 P450 酶系外, 还存在非专一性酯酶系、谷胱甘肽-S- 转移酶系等解毒酶系, 它们也可能在德国小蠊的抗性中发挥解毒作用^[8]。我们研究结果提示在德国小蠊对菊酯类杀虫剂抗性方面, 还存在其它相关因素, 虽然减少 CYP4G19 基因 mRNA 表达可以降低野生型德国小蠊对菊酯类杀虫剂的抗性, 但它不能完全改变野生型德国小蠊对菊酯类杀虫剂的抗性。

参考文献:

- [1] Fu X, Ye L, Ge F . Habitat influences on diversity of bacteria found on German cockroach in Beijing [J] . Journal of Environmental Sciences, 2009, 21(2) : 249-254.
- [2] Scott JG, N.Liu, and Wen Z . Insect cytochromes P450 diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins [J] . Comparative Biochemistry and Physiology C, 1998, 121(1-3) : 147-155.
- [3] Pridgeon JW, N.Liu . Overexpression of the cytochrome c oxidase subunit I gene associated with a pyrethroid resistant Strain of German cockroaches, *Blattella germanica* [J] . Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2003, 33(10) : 1043-1048.
- [4] Cochran DG . Monitoring for insecticide resistance in field-collected strains of the German cockroach (*Dictyoptera: Blattellidae*) [J] . J Econ Entomol, 1989, 82(2) : 336-341.
- [5] Scharf ME, Hemingway J, Small GJ, et al . Examination of esterases from insecticide resistant and susceptible strains of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.) [J] . Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1997, 27(6) : 489-497.
- [6] Scharf ME, Neal JJ, and Bennett GW . Changes of insecticide resistance levels and detoxication enzymes following insecticide selection in the German cockroach, *Blattella germanica* (L.) [J] . Pesticide Biochemistry and Physiology, 1997, 59(2) : 67-69.
- [7] Martin D, Maestro O, Cruz J, et al . RNAi studies reveal a conserved role for RXR in molting in the cockroach *Blattella germanica* [J] . Journal of Insect Physiology, 2006, 52: 410-416.
- [8] Bennett M, Frank NC . Purification and cloning of a delta class glutathione S-transferase displaying high peroxidase activity isolated from the German cockroach *Blattella germanica* [J] . FEBS Journal, 2007, 274(7) : 1793-1803.

收稿日期 2011-05-09 编辑 谢永慧