

文章编号: 1003-4692(2009)05-0419-04

【论著】

通过基因表达谱芯片检测寻找德国小蠊抗药性的相关基因

赵岩¹, 钱坤², 曾晓芃², 高希武¹

【摘要】 目的 通过比较德国小蠊野外抗性品系与敏感品系的基因表达差异,以筛选出抗性相关基因。方法 根据NCBI数据库公布的德国小蠊所有已知序列信息,设计、合成 oligo 探针并点制基因芯片,利用该芯片对野外抗性品系与敏感品系德国小蠊进行表达谱检测,筛选与抗性相关的差异表达基因,并用实时定量 RT-PCR 进行确认。结果 共筛选出差异表达基因 5 个,其中上调(ratio \geq 2)基因 3 个,分别为 *CYP6K1*、 α -amylase mRNA 和 aspartic protease precursor; 下调(ratio \leq 0.5)基因 2 个,即 allergen Bla g 6.0101 mRNA 和 allergen Bla g 8 mRNA。结论 通过自制的德国小蠊基因芯片能够筛选出差异表达基因,其中 *CYP6K1* 可能与抗性密切相关。

【关键词】 德国小蠊; 基因芯片; 抗药性

中图分类号: R384.9; S481^{+.4}

文献标识码: A

Exploration on resistance-related gene of German cockroaches (*Blattella germanica*) by gene chip ZHAO Yan*, QIAN Kun, ZENG Xiao-peng, GAO Xi-wu. *China Agricultural University, Beijing 100094, China

Corresponding author: ZENG Xiao-peng, E-mail: zengxp@yahoo.cn

【Abstract】 **Objective** To screen resistance-related gene from the susceptible strains and field resistant strains of *Blattella germanica* by comparing their gene expression products. **Methods** Based on the known *B.germanica* sequence information released by NCBI database, the oligonucleotide probes were designed and synthesized. The oligonucleotide microarray was employed to analyze the expression profile of susceptible and resistant strains and differential expression genes associated with resistance were screened out. The results were confirmed by real time RT-PCR. **Results** Five differential expression genes were screened out, including three of up-regulated genes (fold change \geq 2) such as *CYP6K1*, α -amylase mRNA and aspartic protease precursor and two of down-regulated genes (fold change \leq 0.5) like allergen Bla g 6.0101 mRNA and allergen Bla g 8 mRNA. **Conclusion** It is possible to screen out differential expression gene by self-made gene chip, and *CYP6K1* is perhaps closely related to resistance.

【Key words】 *Blattella germanica*; Gene chip; Resistance

德国小蠊(*Blattella germanica*)是一种重要的病媒生物,能够携带细菌、病毒、寄生虫卵等,导致多种疾病的传播,同时德国小蠊分泌物或死亡虫体可导致机体过敏。随着各种卫生杀虫剂的使用,德国小蠊的抗药性问题也日趋严重,但目前在其抗性机制研究上主要集中在宏观毒理水平,而深入的分子水平研究较少。基因芯片(gene chip)可以同时进行多基因,甚至全基因组规模检测,彻底改变了传统的分子生物学方法只能对某一个或某几个基因进行研究的局限。昆虫对杀虫剂的抗性是一个复杂的生命现象,涉及到多个基因的协调作用。目前,基因芯片在昆虫抗药性方面已有一些应用,Le Goff等^[1]利用基因芯片技术对果蝇(*Drosophila melanogaster*)的细胞色素 P450 家族多个基

因进行研究,发现拟果蝇的一个野生抗性品系 CYP6 家族的基因发生了过表达,其中 *CYP6A8* 基因的过表达与果蝇对烟碱类杀虫剂的抗性相关,但并不会导致抗性果蝇对马拉硫磷产生交互抗性;而 *CYP6G1* 基因则被发现可能与果蝇对多种杀虫剂的交互抗性相关。Shen 等^[2]利用基因芯片技术,对 24 个 *CYP4* 基因在淡色库蚊(*Culex pipiens pallens*)抗溴氰菊酯品系及敏感品系中的差异表达情况进行检测,发现 6 个表达水平发生显著差异的基因,即 *CYP4H21*、*CYP4H22v1*、*CYP4H23v2*、*CYP4J4v2*、*CYP4J6v1* 和 *CYP4J6v2*,均在抗性品系中过表达,可达 3.1~97.0 倍。Wu 等^[3]利用抑制性差减杂交技术对淡色库蚊的溴氰菊酯抗性品系和敏感品系进行研究,得到 809 个表达水平有差异的克隆,并利用这些克隆制备成基因芯片对库蚊进行检验。结果发现,有 16 个克隆在抗性和敏感品系中的表达水平差异达到 3 倍以上;其中 2 个只在抗性品系中表达,8 个在抗性品系中表达水平上调,6 个在敏感品系中上调。David 等^[4]利用构建而成的基因芯片对冈比

作者单位:1 中国农业大学农学与生物技术学院(北京 100094); 2 北京市疾病预防控制中心(北京 100013)

作者简介:赵岩(1983-),男,辽宁人,硕士研究生,主要从事媒介生物学研究。E-mail: zhaoyancdc@163.com

通信作者:曾晓芃, E-mail: zengxp@yahoo.cn

亚按蚊(*Anopheles gambiae*)的抗药性进行研究。与敏感品系相比,在抗 DDT 的按蚊品系中,有 5 个基因发生了过表达,包括 2 个 P450 基因,1 个 GST 基因以及 2 个 POD 基因。

目前,虽然基因芯片在果蝇、淡色库蚊等昆虫抗药性方面有初步应用,但是国内外未见关于德国小蠊基因芯片方面的研究。笔者根据 NCBI 数据库公布的德国小蠊所有已知序列信息,设计、合成 oligo 探针并点制基因芯片,利用该芯片对抗性品系与药物敏感品系小蠊进行表达谱检测,筛选与抗性相关的差异表达基因,并用实时定量 RT-PCR 进行确认,进一步揭示德国小蠊抗性的分子机制。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫 德国小蠊敏感品系(S),引自军事医学科学院微生物流行病学研究所,由北京市疾病预防控制中心(CDC)消毒与有害生物防治所医学昆虫饲养室饲养,选用健康、活跃的雄性成虫。德国小蠊野外抗性品系(X),由西城区 CDC 提供,在本实验室医学昆虫饲养室建立种群(至少饲养 1 代以上),选其中健康、活跃的雄性成虫。

1.2 主要仪器 基因芯片点样仪-晶芯® Smart Arrayer 136,基因芯片扫描分析系统-晶芯® LuxScan 10K-A,均为博奥生物有限公司生产;实时荧光定量 PCR 仪 7300,美国 ABI 公司;核酸蛋白浓度测定仪 ND-1000,美国 Nanodrop 公司生产;低温冷冻离心机 Microtec 1524R,梯度基因扩增仪,凝胶成像仪 DQ334,均为日本 ASTEC 公司生产。

1.3 主要试剂 cRNA 扩增标记试剂盒,荧光定量 PCR 通用试剂盒(不含 UNG),光学级氨基基片, DNA 点样液,芯片杂交盒,均为博奥生物有限公司生产; RNeasy plus Mini Kit,德国 QIAGEN 公司生产; RNA 纯化试剂盒 Nucleospin® RNA Clean-up, DNA 纯化试剂盒 Nucleospin® Extract II,均为德国 MN 公司生产; Cy3-dCTP 及 Cy5-dCTP,美国 GE 公司生产。

1.4 基因芯片的制备 为了全面筛选德国小蠊抗药性相关基因,将德国小蠊所有已登录基因设计合成 oligo 探针,去除冗余序列后共 85 条,利用基因芯片点样仪点制在氨基基片上,每个点重复 3 次,制成德国小蠊基因芯片。

1.5 生物学测定(WHO 果酱瓶药膜法) 以丙酮为溶剂将各种杀虫原液配制成 0.05% 稀释液,并取 2.5 ml 稀释液于 500 ml 锥形瓶中,不断转动瓶子,使药液均匀于瓶底和瓶壁,放置一夜,使丙酮全部挥发。每种杀虫剂均做 3 次重复实验,再统一设置单纯丙酮的无药对照组。之后于各瓶颈处涂石蜡油和凡士林的等量混合

物。每瓶放入试虫 10 只,在规定时间内观察其击倒数,直至全部击倒,并观察 24 h 死亡率。利用 POLO 软件(POLO-PC, Leora Software 1987)进行数据统计处理,求出 KT_{50} 及其 95% 置信区间(95%CI)。

1.6 总 RNA 的提取及测定 取敏感品系和西城野外抗性品系雄性成虫各 3 只,分别编号为 S1、S2、S3、X1、X2、X3。由于德国小蠊组织较特殊,本研究首先在 Trizol(Invitrogen)溶液中进行研磨,使其充分裂解,然后氯仿抽提,再用 RNeasy plus Mini Kit 试剂盒进行提取。这种方法提取的 RNA 质量好,纯度、浓度高。

1.7 RNA 样品的标记 采用 cRNA 扩增标记试剂盒。取 Total RNA 2 g 反转录合成 cDNA,进一步体外扩增合成 cRNA,再取 cRNA 纯化产物 5 g 反转录,然后进行标记反应,敏感品系(S1、S2、S3)和抗性品系(X1、X2、X3)分别标记 Cy3 和 Cy5 荧光素,纯化后准备杂交。

1.8 芯片预处理、杂交和清洗 芯片在杂交前要进行预处理:先清洗,然后放在紫外交联仪中 250 mJ 交联,放入杂交盒中盖上盖片准备杂交。

沿盖片孔加入荧光素标记样品杂交液,杂交液上样体积为 12 μ l。密封杂交盒,42 $^{\circ}$ C 水浴杂交过夜。杂交结束后,清洗芯片,甩干,准备扫描。

1.9 芯片的扫描及数据分析 采用 LuxScan™ 10K-A 双通道激光共聚焦扫描仪进行芯片的扫描,利用 LuxScan3.0 提取数据,计算基因表达荧光强度的比值(本实验中就是 Cy5/Cy3 的比值),然后用 SAM 软件挑选出差异常表达基因,本研究以 Cy5/Cy3 比值 ≥ 2 和 ≤ 0.5 分别作为显著性上调和显著性下调,最后筛选出各对样品共同上调或下调的基因。

1.10 利用实时荧光定量 RT-PCR 仪对实验结果进行验证 选取 *CYP6K1* 基因进行 RT-PCR 验证,验证芯片实验结果,引物序列如下:*CYP6K1* 上游:AAG AAG GTG ATT CCT GGA TAC GA,下游:GGA GAA ATG CCA GTC ACA ACA。内参基因选德国小蠊 voucher IB1 16S ribosomal RNA gene,上游:GTA ACC TGA CCG TGC AAA GG,下游:GGT CTT CTC GTC CCA TAA CAA TA。使用晶芯® EvaGreen 荧光定量 RT-PCR 通用试剂盒,每个样品 3 次重复,实验步骤:用 DNase I 消化基因组 DNA,然后使用 Nucleospin® RNA Clean-up 纯化,纯化后反转录成 cDNA,以 cDNA 为模板进行 RT-PCR 扩增。程序为 95 $^{\circ}$ C 3 min,95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1 min,共进行 40 个循环。75~95 $^{\circ}$ C 绘制溶解曲线。采用比较阈值法对实时定量 RT-PCR 结果进行定量分析。

2 结果

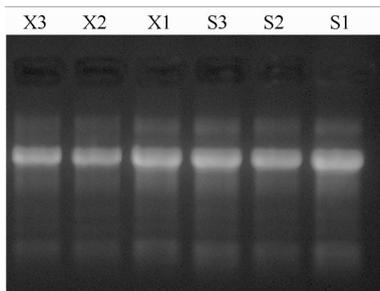
2.1 生物学测定 药膜法测定西城区德国小蠊对残

杀威的抗性系数为2.33倍;对高效氯氰菊酯的抗性系数为2.88倍(表1)。

表1 西城区德国小蠊抗性品系监测结果(药膜法)

杀虫剂	品系	KT ₅₀ 及其95%CI(min)	抗性系数
残杀威	S	13.040(12.140~14.040)	1.00
	X	30.410(27.158~33.789)	2.33
高效氯氰菊酯	S	3.888(3.338~4.461)	1.00
	X	11.194(8.237~14.280)	2.88

2.2 RNA提取质量检测 采用二步法提取德国小蠊组织RNA样品,用甲醛变性胶电泳,结果显示RNA质量良好,无降解(图1)。样品满足芯片实验要求。



X1、X2、X3. 抗性品系; S1、S2、S3. 敏感品系

图1 RNA甲醛变性胶电泳图

2.3 表达谱芯片检测及数据分析结果 以抗性与敏感信号强度比值 ≥ 2 和 ≤ 0.5 分别作为上调和下调的评判标准,SAM分析后共筛选出5个差异表达基因,其中3个上调,分别为CYP6K1、alpha-amylase mRNA和aspartic protease precursor; 2个下调分别为allergen Bla g 6.0101 mRNA和allergen Bla g 8 mRNA(表2)。

2.4 实时荧光定量PCR验证结果

2.4.1 RT-PCR熔解曲线 由内参基因16S rRNA和CYP6K1的熔解曲线(图2、3)可以看出,RT-PCR产物单一,无非特异性扩增。

2.4.2 定量RT-PCR验证CYP6K1表达量与芯片结果对比 为验证芯片数据的可靠性,我们挑选CYP6K1基因做定量RT-PCR分析,结果显示,定量RT-PCR检测结果与基因芯片检测结果在变化趋势上是一致的,说明芯片数据比较可靠(表3)。

3 讨论

通过数据分析,共筛选出5条差异表达基因,上调

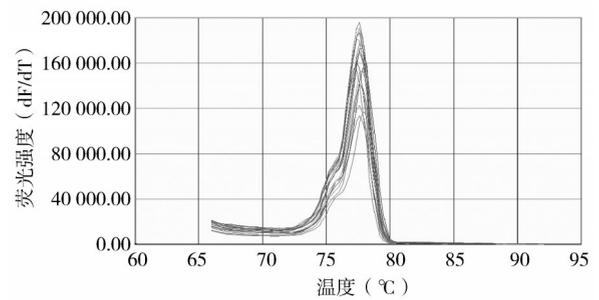


图2 16S rRNA熔解曲线

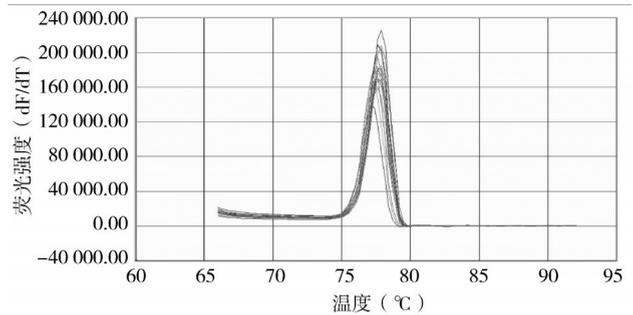


图3 CYP6K1熔解曲线

基因3条:即CYP6K1、alpha-amylase mRNA和aspartic protease precursor; 下调基因2条,为allergen Bla g 6.0101 mRNA和allergen Bla g 8 mRNA。

CYP6K1是细胞色素P450解毒酶基因,CYP6K1是Wen和Scott^[5]从德国小蠊中克隆出的一个基因,其是否与抗性有关尚未见报道,但迄今为止与抗药性关系最为密切的就是CYP6家族,如:Daborn等^[6]利用基因芯片技术和RT-PCR技术对黑腹果蝇(Drosophila melanogaster) DDT抗性品系进行研究发CYP6G1高转录,mRNA的水平是敏感品系的10~100倍。Brandt等^[7]对果蝇DDT抗性和敏感品系6个P450基因的表达进行研究后发现:(1)DDT抗性是显著的(>30倍)和显性的;(2)抗性可被P450抑制剂PBO减弱;(3)cn-vg区有2个P450结构基因过表达(CYP6G1和CYP12D1);(4)CYP12D1被DDT诱导高表达,而CYP6G1则不被诱导,提示二者的调控机制不同。Qiu和Li^[8]对北京地区家蝇(Musca domestica)溴氰菊酯的抗性研究表明,导致其抗性产生的可能是CYP6D1和钠离子通道联合作用的结果。另外,Bautista等^[9]对小菜蛾P450 CYP6家族和CYP4家族对氯菊酯抗性关系

表2 西城区野外抗性品系与敏感品系德国小蠊差异表达基因

基因编号	描述	ratio值(Cy5/Cy3)			平均ratio值	上调/下调
		X1/S1	X2/S2	X3/S3		
AF281328	德国小蠊细胞色素P450 CYP6K1基因	2.9949	5.1742	2.4761	3.3728	上调
DQ355516	德国小蠊α-淀粉酶基因	1.7710	3.4547	2.5328	2.4931	上调
BGU28863	德国小蠊天冬氨酸蛋白酶前体基因	2.3503	3.0344	1.7753	2.3307	上调
DQ279092	德国小蠊变应原Bla g 6.0101基因	0.4721	0.4875	0.6220	0.5231	下调
DQ389157	德国小蠊变应原Bla g 8基因	0.5738	0.2863	0.4988	0.4343	下调

表3 RT-PCR 验证 *CYP6K1* 基因表达量差异结果

编号	基因名称	平均CT值	E	CT (con-sam)*	比值(X/S)		
					归一化前	归一化后	芯片
1	S1-16S rRNA	14.06					
2	S2-16S rRNA	14.42					
3	S3-16S rRNA	15.03					
4	X1-16S rRNA	13.82	2	0.24	1.185		
5	X2-16S rRNA	14.73	2	-0.30	0.811		
6	X3-16S rRNA	13.76	2	1.27	2.406		
7	S1-CYP6K1	23.19					
8	S2-CYP6K1	24.00					
9	S3-CYP6K1	25.63					
10	X1-CYP6K1	22.23	2	0.96	1.945	1.641	2.99
11	X2-CYP6K1	21.43	2	2.58	5.963	7.351	5.17
12	X3-CYP6K1	22.34	2	3.29	9.776	4.063	2.48

注:CT值. 反应的实时荧光强度显著大于背景值时的循环数; E. 扩增效率; *CT(con-sam). 对照样品的CT值减去检测样品的CT值得到的差值; X/S. 表示西城区抗性品系与敏感品系的比值。

的研究发现,抗性品系中 *CYP6BG1* 和 *CYP6BG2* 的表达量分别是其敏感品系表达量的4.9倍和3.8倍,结果表明, *CYP6BG1* 和 *CYP6BG2* 的超量表达可能导致了小菜蛾的抗性产生。通过 *CYP6G1* 的转基因试验发现其高水平转录与抗性密切相关。综上所述可以看出 *CYP6* 家族的基因与抗性关系密切,所以德国小蠊 *CYP6K1* 的表达量增高很可能是西城区野外抗性品系德国小蠊产生抗性的原因之一。

α -amylase 即 α -淀粉酶基因,该基因可能与抗性关系不大,很可能是食物的适应性不同而导致其高表达。aspartic protease precursor 即天冬氨酸蛋白酶基因,它的生物学功能很广泛,包括降解抗原、促进其他酶的活化、位点特异性水解反转录酶病毒前体蛋白以产生病毒体复制所必须的酶蛋白、调整血压、消化食物蛋白等^[10]。天冬氨酸蛋白酶基因的表达量升高是否与昆虫抗药性有一定关系还需进一步研究。下调的2个基因都是变应原基因,变应原是指能诱发 IgE 类抗体产生并导致变态反应的抗原,Bernton 等 1964 年首次报道蜚蠊是引起 I 型变态反应的一种重要昆虫变应原。蜚蠊引起的变态反应疾病包括过敏性哮喘、过敏性鼻炎、过敏性皮炎及过敏性眼结膜炎等,是临床的常

见病,严重影响患者的健康和生活质量^[11],目前该基因在过敏性疾病方面研究较为广泛,但该基因与抗性关系应该不大。

结合已有研究和目前数据,我们认为 *CYP6K1* 基因最有可能与德国小蠊抗药性有关,但其具体的抗性机制还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Le Goff G, Boundy S, Daborn PJ, et al. Microarray analysis of cytochrome P450 mediated insecticide resistance in *Drosophila* [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2003, 33(7): 701-708.
- [2] Shen B, Dong HQ, Tian HS, et al. Cytochrome P450 genes expressed in the deltamethrin-susceptible and -resistant strains of *Culex pipiens pallens* [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 2003, 75(1-2): 19-26.
- [3] Wu HW, Tian HS, Wu GL, et al. *Culex pipiens pallens*: identification of genes differentially expressed in deltamethrin - resistant and susceptible strains [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 2004, 79(3): 75-83.
- [4] David JP, Strode C, Vontas J, et al. The *Anopheles gambiae* detoxification chip: a highly specific microarray to study metabolic-based insecticide in malaria vectors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(11): 4080-4084.
- [5] Wen Z, Scott JG. Cloning of two novel cDNAs from German cockroaches, *Blattella germanica* (L.): *CYP6K1* and *CYP6J1* [J]. *Insect Mol Biol*, 2001b, 10: 191-196.
- [6] Daborn P, Boundy S, Yen J, et al. DDT resistance in *Drosophila* correlates with *CYP6G1* over-expression and confers cross-resistance to the neonicotinoid imidacloprid [J]. *Mol Genet Genomics*, 2001, 266(4): 556-563.
- [7] Brandt A, Scharf M, Pedra JH, et al. Differential expression and induction of two *Drosophila cytochrome P450* genes near the *Rst* (2) DDT locus [J]. *Insect Mol Biol*, 2002, 11(4): 337-341.
- [8] Qiu XH, Li M. Molecular analysis of resistance in a deltamethrin-resistant strain of *Musca domestica* from China [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 2007, 89: 146-150.
- [9] Bautista MAM, Tanaka T, Miyata T. Identification of permethrin-inducible cytochrome P450 s from the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) and the possibility of involvement in permethrin resistance [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 2007, 87(1): 85-93.
- [10] 吕刚, 韩笑, 张秀娟, 等. 天冬氨酸蛋白酶的研究进展 [J]. 吉林化工学院学报, 2008, 25(1): 13-14.
- [11] 马慧, 刘志刚. 蟑螂重组变应原的研究进展 [J]. 热带医学杂志, 2007, 7(3): 288-289.

[收稿日期: 2009-03-10]