

昆虫细胞色素 P450 基因的多样性、进化及表达调控

郭亭亭¹, 姜 辉², 高希武^{1,*}

(1. 中国农业大学农学昆虫学系, 北京 100193; 2. 农业部农药检定所, 北京 100024)

摘要: 细胞色素 P450 单加氧酶 (cytochrome P450 monooxygenases, P450s) 是由多个功能相关的亚铁血红素-硫醇盐蛋白基因组成的一个基因超家族, 在各种内源和外源物质的代谢中起着主要作用。目前 GenBank 中注册的昆虫 P450 基因序列已超过 1 000 个, 其中双翅目占序列总数的 74%, 鳞翅目占序列总数的 16%。而昆虫 P450 基因序列已克隆的全长序列中大部分属于 CYP4 和 CYP6 家族, 两个家族成员分别占总数的 20% 和 45%。利用 GenBank 中现已注册的昆虫 P450 基因的 cDNA 全长序列进行比对并绘制进化树, 揭示不同种类昆虫 P450 的亲缘关系。结果显示基于 P450 基因的昆虫部分目的进化关系与大部分先前依据其他分子数据或形态分类学得到的昆虫系统进化关系基本吻合。现有研究表明, 细胞色素 P450 基因的表达可能受顺式作用元件 (*cis*-acting element)、反式作用因子 (*trans*-acting factor) 或两者共同调控, 调控可能涉及转录增强的转录机制或 mRNA 稳定性增加的转录后机制。

关键词: 细胞色素 P450; 多样性; 亲缘关系; 基因表达与调控

中图分类号: Q965.9 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2009)03-0301-11

Diversity, evolution and expression regulation of cytochrome P450 monooxygenase genes in insects

GUO Ting-Ting¹, JIANG Hui², GAO Xi-Wu^{1,*} (1. Department of Entomology, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 2. Institute for the Control of Agrochemicals, Ministry of Agriculture, Beijing 100024, China)

Abstract: Cytochrome P450 monooxygenases (P450s) are a superfamily of genes encoding multifunctional heme-thiolate proteins that play a dominant role in the metabolism of a wide variety of both endogenous and xenobiotic substances. The total number of P450 genes in insects registered in the GenBank is over 1 000. Most of the registered P450 gene sequences are from Diptera (74%) and Lepidoptera (16%). Of the total full-length sequences of P450 genes of insects registered, 20% are CYP6 members and 45% CYP4 members. A novel phylogenetic tree of the insect P450 superfamily which expounds evolutionary relationship of different subfamilies and orders was here constructed using a multiple alignment of the registered insect P450 sequences. The relationships of insect orders revealed by the phylogenetic tree most match the evolutionary relationships of insect orders based on other molecular data or morphological taxonomy. The present research indicates that the expression of cytochrome P450 genes may be regulated by *cis*-acting element or/and *trans*-acting factor, and the regulation mechanisms may involve the transcription enhancement (transcriptional mechanism) or an increase in mRNA stability (post-transcriptional mechanism).

Key words: Cytochrome P450; diversity; evolutionary relationship; gene expression and regulation

细胞色素 P450 单加氧酶系是一种广泛分布于需氧生物体内的氧化酶系, 由细胞色素 P450 单加氧酶、细胞色素 b_5 和 NADPH-细胞色素 P450 还原酶等多种成分组成。细胞色素 P450 单加氧酶

(cytochrome P450 monooxygenase, P450) 是一类含血红素和硫羟基的蛋白, 它是微粒体多功能氧化酶的末端氧化酶, 从 NAD(P)H 获得电子后, 催化单加氧反应 (Green *et al.*, 2004; Hoshi and Lahiri,

基金项目: 国家重大基础研究规划 (“973” 计划) 项目 (2006CB102003); 高等学校科技创新工程重大项目培育资金项目; 国家 “十一五” 国家科技支撑计划项目 (2006BAD08A03); 国家自然科学基金项目 (30170621)

作者简介: 郭亭亭, 女, 1983 年 5 月生, 硕士研究生, 主要从事昆虫毒理学和分子生物学研究, E-mail: guott830506@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: gaowu@263.net.cn

收稿日期 Received: 2008-11-03; 接受日期 Accepted: 2009-02-15

2004)。但由于昆虫 P450 含量低且不稳定,从昆虫中纯化、鉴定 P450 难度较大。80 年代末以后,昆虫 P450 新基因不断被克隆出来,对于昆虫 P450 的研究才取得了迅速的发展。

细胞色素 P450 是参与外源和内源化合物合成、分解的一种重要代谢酶系 (Feyereisen, 1999; Scott, 1999)。P450 在生物体中分布广泛,1967 年 Ray 首先在家蝇 *Musca domestica* 中确定 P450 的存在。由于生物体中 P450 种类的多样性和 P450 广泛的底物特异性,细胞色素 P450 在昆虫的生命过程中有多种功能。包括参与杀虫剂和植物次生物质的代谢以及蜕皮激素、保幼激素、性信息素的合成,与昆虫的生长、发育和防御密切相关 (Feyereisen, 1999; Scott and Wen, 2001)。昆虫利用 P450 的调控作用对寄主植物产生适应性 (Liu *et al.*, 2006)。昆虫通过集中于中肠的解毒系统 (包括 P450s、谷胱甘肽-S-转移酶和酯酶等) 对摄入的有毒物质 (包括植物次生物质) 快速代谢,而脂肪体有利于代谢经表皮或气管进入体内的有毒物质 (于彩虹等, 2002)。P450 单加氧酶在昆虫的各个组织中广泛分布,中肠、脂肪体和马氏管中活性较高 (Scott, 2008)。在昆虫的各个发育阶段, P450 单加氧酶的活性有显著的变化,在各个龄期的幼虫中活性变化明显 (Scott, 1999, 2008)。虽然细胞色素 P450 家族成员之间的一级结构差异较大,氨基酸序列同源性很低,但是越来越多的证据表明,细胞色素 P450 的空间结构却有着较大的相似性,并且含有由含铁血黄素和半胱氨酸组成的活性中心 (Weller and Foster, 1993; Sagmi and Shimizu, 1998)。有关昆虫 P450 生化特性、诱导特性、结构与功能的关系以及基因的表达调控已有一些综述 (Brattsten *et al.*, 1986; Scott, 1999; Feyereisen, 2005)。

细胞色素 P450 起着对杀虫剂解毒和活化的双重作用 (Hardstone *et al.*, 2007; Scott, 2008)。P450 单加氧酶作为昆虫体内三大解毒酶系 (细胞色素 P450、谷胱甘肽-S-转移酶和乙酰胆碱酯酶) 之一,现已证明是大多数重要害虫对杀虫剂产生高水平抗性和交互抗性的主要原因。代谢抗性的化学本质是杀虫剂代谢活性的增强,归因于相关酶在数量或质量上的改变,可能涉及的机制包括基因扩增、酶基因突变以及基因转录的增强等 (Liu and Scott, 1998)。对于昆虫抗性的产生和调控机制唐振华和吴士雄 (2000) 以及邱星辉和冷欣夫 (1999) 已经作过比较全面的综述。

近年来随着科技的发展,大量的 CYP 基因得到克隆和鉴定。本文总结了昆虫各个目在 GenBank 中已注册的 P450 基因 cDNA 序列,利用软件进行序列比对并构建进化树,用以研究不同种类昆虫 P450 的亲缘关系。并对 P450 基因的表达调控机制的最新进展进行综述。

1 昆虫 P450 基因的种类多样性

细胞色素 P450 是有 35 亿年进化历史的古老基因家族 (Nelson, 1998), 有极大的种类多样性 (Wojtasek and Leal, 1999)。细胞色素 P450 单加氧酶是由多个基因家族组成的一个基因超家族 (superfamily), 并被进一步分成许多基因家族 (family), 每个基因家族又包括数个基因亚族 (subfamily)。昆虫 P450 基因家族分别拥有众多的亚家族成员和等位基因突变体,对于 P450 的命名曾经比较混乱。Nebert 等提出的 P450 系统命名法现已广泛接受 (Nebert *et al.*, 1987, 1989, 1991; Nelson *et al.*, 1993, 1996)。在该系统中所有物种的细胞色素 P450 同工酶 (除果蝇及鼠基因用 Cyp 外) 均以字母“CYP”为词首。随后的阿拉伯数字表示不同家族,阿拉伯数字后的大写字母表示不同亚家族,字母后面的数字表示不同的同工酶。细胞色素 P450 的氨基酸若有 40% 以上的一致性 (identity), 归于同一家族,如 CYP6; 氨基酸序列若有 55% 以上的一致性则归于同一亚家族,如 CYP6A。用正体大写代表基因产物、mRNA 或蛋白质; 基因用斜体表示。

已发现的昆虫 P450 基因分属于 CYP4, CYP6, CYP9, CYP12, CYP18, CYP28, CYP49 和 CYP301 - 34148 个家族 (Amenya *et al.*, 2008)。其中 CYP6, CYP9, CYP12, CYP18 和 CYP28 5 个基因家族为昆虫特有 (Berge *et al.*, 1998)。大量的 CYP6 以及 CYP4 家族成员在抗性品系品系中表现出过量表达因而被认为是抗性相关的 P450 基因。

截止至 2007 年 12 月, GenBank 中注册的昆虫 P450 cDNA 已超过 1 000 个。黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 和冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 基因组测序的完成为双翅目昆虫 P450 数目的迅速增长奠定基础。鳞翅目因为包含多种农业害虫也进行了较多的研究。已注册的昆虫 P450 cDNA 全长序列及片段共有 1 043 个,其中全长序列 259 个,片段 784 个。双翅目已克隆的 P450 全长 cDNA 152 个,

表 1 已克隆的昆虫 P450 基因 cDNA
Table 1 Cloned P450 cDNA in insects

种类 Species	cDNA 全长序列 cDNA full-length sequences	片段数 Number of segments
鳞翅目 Lepidoptera		20
家蚕 <i>Bombyx mori</i>	CYP4G25, CYP4M5, CYP4M9, CYP6AB4, CYP6AB5, CYP6AE, CYP6AE2, CYP6AE9, CYP6AE8, CYP6AE22, CYP6AE21, CYP6AE7, CYP6AU1, CYP6B29, CYP9A20, CYP9A19, CYP9A19 (strain Dazao), CYP9A19 (strain Laos), CYP9A22, CYP9A22 (strain Dazao), CYP9A22 (strain Laos), CYP9A21, CYP18A1, CYP302A1, CYP315A1, CYP306A1, CYP305B1, CYP337A1	
小菜蛾 <i>Plutella xylostella</i>	CYP6BF1 (v1, v2, v4)	8
野桑蚕 <i>Bombyx mandarina</i>	CYP4M9, CYP6AB4, CYP6B29, CYP9A19, CYP9A22, CYP305B1v1,	1
烟芽夜蛾 <i>Heliothis virescens</i>	CYP9A1v2	1
烟草天蛾 <i>Manduca sexta</i>	CYP4M2, CYP307A1, CYP314A1, CYP315A1, CYP302A1, CYP306A1	9
斜纹夜蛾 <i>Spodoptera litura</i>	CYP4M14v1, CYP4S9v1	14
香芹黑凤蝶 <i>Papilio polyxenes</i>	CYP6B3 (v5, v4, v3c, v3b, v3a), CYP6B1 (v2, v1)	0
天蚕 <i>Antheraea yamamai</i>	CYP4G25	1
欧洲防风草结网毛虫 <i>Depressaria pastinacella</i>	CYP6AB3v2, CYP6AB7, CYP6AB3, CYP6AE1C	2
棉铃虫 <i>Helicoverpa armigera</i>	CYP6AE12, CYP6B2, CYP6B6 (midgut), CYP6B6 (fat body) CYP6B7, CYP9A12, CYP9A14, CYP9A17, CYP9A18	25
美洲棉铃虫 <i>Helicoverpa zea</i>	CYP4M6, CYP4M7, CYP6B8, CYP321A1	0
凤蝶 <i>Papilio canadensis</i>	CYP6B25, CYP6B26	1
北美黑条黄凤蝶 <i>Papilio glaucus</i>	CYP6B4, CYP6B23, CYP6B24	1
甘蓝夜蛾 <i>Mamestra brassicae</i>	CYP4L4, CYP4S4	0
烟青虫 <i>Helicoverpa assulta</i>	1	
小计 Subtotal	78	84
双翅目 Diptera		109
黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	CYP4AC1, CYP4AC2, CYP4AC3, CYP4AD1, CYP4C3, CYP4D1A, CYP4D1B, CYP4D2, CYP4D8, CYP4D14, CYP4D21, CYP4E1, CYP4E2, CYP4E3, CYP4G1, CYP4AE1, CYP4G15A, CYP4G15B, CYP4P1, CYP4P2, CYP4P3, CYP4S3, CYP6A2, CYP6A8, CYP6A9, CYP6A13, CYP6A14, CYP6A17, CYP6A18, CYP6A19, CYP6A20, CYP6A21, CYP6A22, CYP6A23, CYP6D2, CYP6D4, CYP6D5A, CYP6D5B, CYP6G1, CYP6G2, CYP6T1, CYP6T3, CYP6U1, CYP6V1, CYP6W1, CYP9B1, CYP9B2, CYP9C1, CYP9F2, CYP9H1, CYP12A4, CYP12A5, CYP12B2, CYP12C1, CYP18, CYP18A1A, CYP18A1B, CYP28A5, CYP28C1, CYP28D1, CYP28D2, CYP301A1, CYP303A1, CYP304A1, CYP305A1, CYP307A1, CYP308A1, CYP309A1, CYP309A2, CYP310A1, CYP311A1A, CYP311A1B, CYP312A1, CYP313A1, CYP313A2, CYP313A3, CYP313A4, CYP313A5, CYP313B1, CYP314A1, CYP315A1, CYP316A1, CYP317A1, CYP318A1	
拟暗果蝇 <i>Drosophila pseudoobscura</i>		59
冈比亚按蚊 <i>Anopheles gambiae</i>	CYPM3R9, CYPM3R5, CYP6AA1, CYP6M1, CYP6N1, CYP6N2, CYP6P1, CYP6P2, CYP6P3, CYP6P4, CYP6R1, CYP6S1, CYP6S2, CYP6Y1, CYP6Z1, CYP6Z2, CYP6Z3, CYP9K1, CYP12F1, CYP12F2, CYP12F3, CYP12F4	162
家蝇 <i>Musca domestica</i>	CYP4D3v2, CYP4D4v2, CYP4D35, CYP4D36, CYP4G2v1, CYP4G13v2, CYP6A5v2, CYP6A24, CYP6A36, CYP6A37, CYP6A38v1, CYP6D1, CYP6D3v2, CYP6D3v3, CYP12A1, CYP12A2, CYP28B1	5

续表 1 Table 1 continued

种类 Species	cDNA 全长序列 cDNA full-length sequences	片段数 Number of segments
埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>	<i>CYP6A11</i> , <i>CYP9J1</i> , <i>CYP9J2</i> , <i>CYP302A1</i> , <i>CYP314A1</i> , <i>CYP315A1</i>	197
淡色库蚊 <i>Culex pipiens</i>	<i>CYP6E1</i> , <i>CYP6F1</i>	26
白纹伊蚊 <i>Aedes albopictus</i>	<i>CYP6N3</i> (<i>v1</i> , <i>v2</i> , <i>v3</i>)	7
蚊虫 <i>Ochlerotatus sollicitans</i>	<i>CYP6P1</i> (<i>v1</i> , <i>v2</i> , <i>v3</i> , <i>v4</i> , <i>v5</i>), <i>CYP6BB1</i> (<i>v1</i> , <i>v2</i> , <i>v3</i> , <i>v4</i> , <i>v5</i>)	18
果蝇 <i>Drosophila mettleri</i>	<i>CYP4D10</i> , <i>CYP4E5</i> , <i>CYP9B3</i> , <i>CYP28A1</i> , <i>CYP28A2</i>	0
果蝇 <i>Drosophila pachea</i>		9
海德氏果蝇 <i>Drosophila hydei</i>		1
微小按蚊 <i>Anopheles minimus</i>	<i>CYP6P7</i> , <i>CYP6P8</i>	0
不吉按蚊 <i>Anopheles funestus</i>	<i>CYP6B9</i>	17
白腹丛蚊 <i>Armigeres subalbatus</i>		5
小计 Subtotal	152	615
鞘翅目 Coleoptera		3
赤拟谷盗 <i>Tribolium castaneum</i>	<i>CYP4Q4</i> , <i>CYP4Q7</i>	
马铃薯甲虫 <i>Leptinotarsa decemlineata</i>	<i>CYP4G29</i> , <i>CYP6BH1</i> (<i>v1</i> , <i>v2</i>), <i>CYP6BJ1</i> , <i>CYP9V1</i>	33
青杨虎天牛 <i>Xylotrechus rusticus</i>		1
椰心叶甲 <i>Brontispa longissima</i>		5
异发丽金龟 <i>Phyllopertha diversa</i>		3
玉米根茎叶甲 <i>Diabrotica virgifera</i>		3
小计 Subtotal	7	48
膜翅目 Hymenoptera		3
意大利蜂 <i>Apis mellifera</i>	<i>CYP4G11</i> , <i>CYP6AS5</i> , <i>CYP314A1</i>	
红火蚁 <i>Solenopsis invicta</i>	<i>CYP4AB1</i> , <i>CYP4AB2</i>	0
小计 Subtotal	5	3
半翅目 Hemiptera		0
美国牧草盲蝽 <i>Lygus lineolaris</i>	<i>CYP6X1</i> (<i>v1</i> , <i>v2</i> , <i>v3</i>)	0
长红锥蝽 <i>Rhodnius prolixus</i>		1
柑橘木虱 <i>Diaphorina citri</i>		1
桑粉介壳虫 <i>Maconellicoccus hirsutus</i>		1
小计 Subtotal	3	3
等翅目 Isoptera		0
山林原白蚁 <i>Hodotermopsis sjostedti</i>	<i>CYP6AM1</i>	
澳大利亚矛顎家白蚁		4
<i>Coptotermes acinaciformis</i>	<i>CYP4U1</i>	
达尔文澳白蚁		5
<i>Mastotermes darwiniensis</i>		12
黄肢散白蚁 <i>Reticulitermes flavipes</i>		12
小计 Subtotal	2	21

续表 1 Table 1 continued

种类 Species	cDNA 全长序列 cDNA full-length sequences	片段数 Number of segments
蜚蠊目 Blattaria		4
太平洋折翅蠊 <i>Diploptera punctata</i>	<i>CYP9E1</i> , <i>CYP15A1</i>	
德国小蠊 <i>Blattella germanica</i>	<i>CYP4G15</i> , <i>CYP4C21</i> , <i>CYP6J1</i> , <i>CYP6K1</i> , <i>CYP6L1</i> , <i>CYP9E2P1</i> , <i>CYP9E2</i> , <i>CYP9E2P2</i>	4
小计 Subtotal	10	8
啮虫目 Psocoptera		2
嗜卷书虱 <i>Liposcelis bostrychophila</i>	<i>CYP6CE1</i> , <i>CYP6CE2</i>	
小计 Subtotal	2	2
总计 Total	259	784

cDNA 片段 615 个，共占序列总数的 74%；鳞翅目已克隆的全长 cDNA 序列 78 个，cDNA 片段 84 个，共占序列总数的 16%。这两个目昆虫的 P450 占昆虫 P450 cDNA 总数的 90%。双翅目 P450 全长序列及片段大部分来自黑腹果蝇、冈比亚按蚊和埃及伊蚊 *Aedes aegypti*；鳞翅目 P450 则大多来自家蚕 *Bombyx mori*。其余几个昆虫目的 P450 基因全长序列集片段以鞘翅目(55 个)、等翅目(23 个)、蜚蠊目(18 个)居多，这 3 个目的序列数占总数的 9%。CYP4 和 CYP6 家族与昆虫抗药性相关，所以有大量的基因被克隆。在已克隆的全长序列中大部分属于 CYP4 和 CYP6 家族，CYP4 家族已克隆的全长序列有 51 个，CYP6 家族已克隆的全长序列有 116 个分别占全长 cDNA 的 20% 和 45%。

随着研究的深入，细胞色素 P450 家族正在不断扩充，基因数目不断增加。但研究集中在双翅目和鳞翅目等少数几个目的几个昆虫种，对于昆虫纲 P450 的整体情况还需进一步研究。

2 昆虫 P450 基因的进化关系

虽然细胞色素 P450 有 35 亿年的进化历史，而古生物学及地质学证据表明，昆虫及其他陆生节肢动物起源于距今约 3 亿年以前。Nelson 等(1998)构建的包括 70 个动物细胞色素 P450 的系谱发生树显示：在 CYP3 CLAN 中包含的昆虫 CYP6 家族和 CYP9 家族与哺乳动物 CYP3 和 CYP5 家族亲缘关系较近。有学者推测昆虫 CYP6 家族约在 3 亿~7 亿年前从 CYP3 家族中分化出来的(Nelson and Strobel, 1987)。Rewitz 等(2007)研究了双翅目、鳞

翅目、膜翅目、鞘翅目等 4 个目部分昆虫的 CYP307, CYP306, CYP302 等 P450 Halloween 家族基因的系统发生关系，发现它们和脊椎动物 P450 来源于共同的祖先。为了解昆虫 P450 基因的系统进化关系，利用 GenBank 现已注册的大部分昆虫 P450 全长基因序列构建系统进化树(图 1)。构建系统进化树之前首先采用 ClustalX 1.83 对 P450 的核苷酸序列进行序列比对，然后利用 MEGA version 3.1 进行系统进化树的构建。系统进化树的构建方法为最大简约法(maximum parsimony method, MP),参数选择软件默认的缺省参数(bootstrap 检验重复 500 次)。昆虫细胞色素 P450 系统进化树包括 8 个目 34 个种。如图 1 所示，CYP12 和 CYP314, CYP315 等线粒体 P450 家族很早就分化出来了，这一支系可能在真核和原核生物分化之前就已生成了。CYP4 家族可能是昆虫 CYP 家族中最早分化出来的一个，与先前报道的研究结果(Degtyarenko and Archakov, 1993)一致。已测出全长序列的昆虫 P450 基因中，接近半数的基因属于 CYP6 家族。CYP6 是与昆虫抗性的产生关系最密切的一个基因家族，因而不断有新的基因被克隆出来。图 1 显示，CYP6 家族中 CYP6D 亚族是优先于其他 CYP6 亚家族分化出来的，与 CYP4 亲缘关系较其他 CYP6 亚族近。推测 CYP6D 亚族可能是最早从 CYP4 家族中分化出来的一个 CYP6 亚家族。

图 1 显示，与 CYP6 和 CYP9 等昆虫特有家族相比，CYP4 家族在进化关系上属于单独的一支，这一支包括了所有已知全长序列的 CYP4 家族成员。已有文献报道昆虫细胞色素 P450R 的 CYP4 家族比 CYP6 家族更接近于哺乳动物 CYP3 家族，

CYP4 与 CYP6 可能是在哺乳动物与昆虫分化之前通过基因复制而产生的 (Wang and Hobbs, 1995)。Ono 等 (2005) 研究发现, 几种昆虫的 CYP4 家族基因和果蝇 CYP311A1, CYP312A1 亚族亲缘关系较近, 与图 1 显示的结果一致。CYP6 家族的进化关系较为复杂, 虽然所有的家族成员都属于在进化关系上和 CYP4 并列的一个大的支系, 但这个支系里包括 CYP6, CYP9, CYP18, CYP28 等多个基因家族。这与 Feyereisen (2005) 的研究结果一致。CYP6 家族中的各个亚族的进化关系也错综复杂,

CYP6B, CYP9, CYP18 和 CYP28 等在另一个进化支系上。CYP6B 和 CYP9 亲缘关系较近, 而 CYP18 和 CYP28 的亲缘关系较近。在分化时间上, CYP18 和 CYP28 的分化早于 CYP6B 和 CYP9。CYP6B 亚族可能是 CYP6 家族最晚分化出来的一个亚族, 有可能是其他亚族的祖先。Tomita 和 Scott (2005) 通过比较不同 CYP6 亚族基因的内含子也推断 CYP6A1, CYP6A2 和 CYP6B1 可能是由 CYP6D1 进化而来。

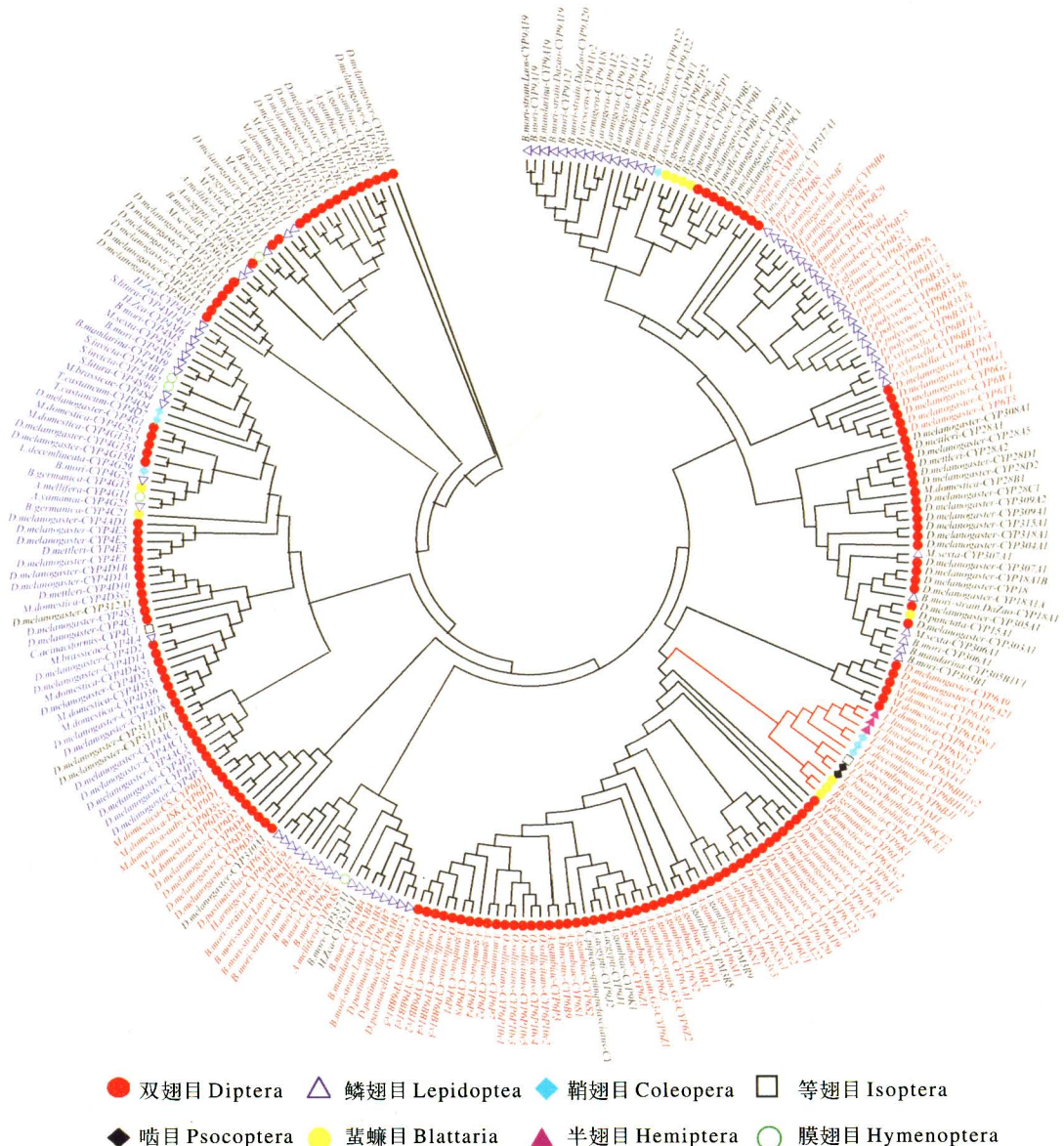


图 1 Genbank 中已注册的昆虫网 P450 全长 cDNA 序列系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of full-length insect P450 cDNA registered in GenBank

在 GenBank 中输入“种名 + P450”进行检索得到 cDNA 全长序列。用 ClustalX 1.83 和 MEGA3.1, 进行序列比对和进化树构建。进化树构建方法为 MP 法, bootstrap 检验重复 500 次。Search for full-length P450 cDNA in GenBank with the search word “specific name + P450”. Sequence alignment is done by ClustalX 1.83 and the phylogenetic tree is built by MEGA3.1. The MP method was used to form the tree and the bootstrap value is 500.

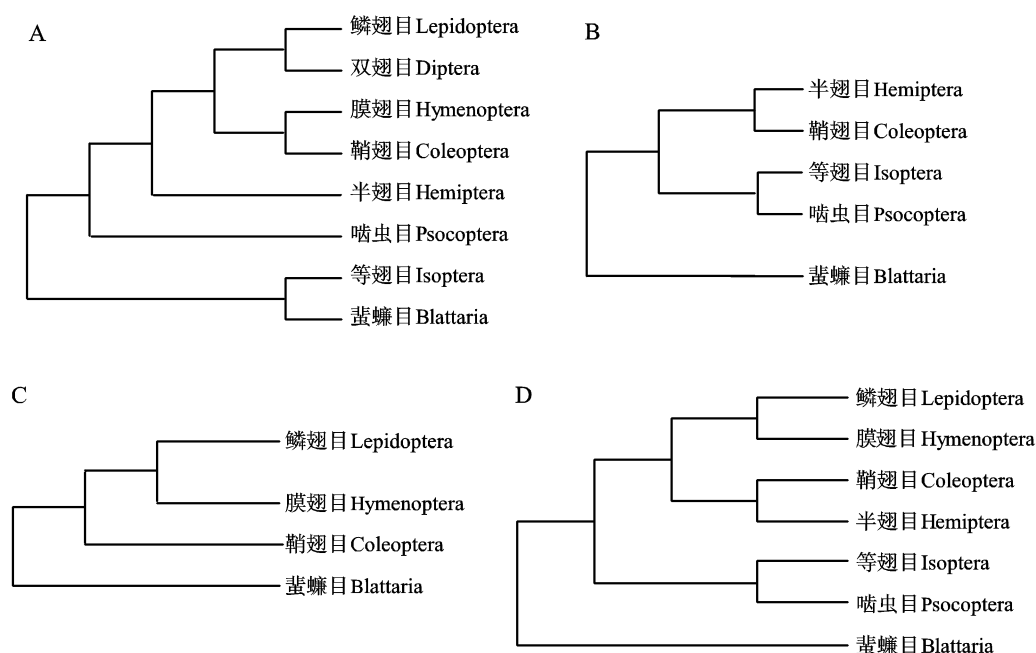


图 2 昆虫纲若干目的进化关系

Fig. 2 Evolutionary relationships of several orders in insecta

A: 8 个目的形态学进化关系 (仿周尧, 2001) Morphological relationships of 8 insect orders (adapted from Zhou, 2001); B: 由图 1 中 CYP6 亚族的进化树显示的昆虫 5 个目 P450 进化关系 Evolutionary relationships of P450s in 5 insect orders according to the phylogenetic tree of CYP6 in Fig. 1; C: 由图 1 中 CYP4 亚族的进化树显示的昆虫 4 个目 P450 进化关系 Evolutionary relationships of P450s in 4 insect orders according to the phylogenetic tree of CYP4 in Fig. 1; D: 由图 1 中 CYP6 和 CYP4 亚族的进化树显示的昆虫 7 个目 P450 进化关系 Evolutionary relationships of P450s in 7 insect orders according to the phylogenetic tree of CYP6 and CYP4 in Fig. 1.

由于黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*, 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 等双翅目昆虫基因组测序的完成和对棉铃虫, 香芹黑凤蝶 *Palio polyxene*, 北美黑条黄凤蝶 *Papilio glaucus* 等鳞翅目农业昆虫广泛研究的深入, 现已分离和鉴定的大部分 P450 基因都集中在双翅目和鳞翅目。图 1 包括的已知全长序列的 P450 基因中, CYP6A 亚族成员大多来自双翅目, 而 CYP6B 亚族的成员基本都来自鳞翅目。证明 CYP6A 和 CYP6B 两个亚族可能是在双翅目和鳞翅目分化出来后才生成的。

与 CYP6A 亚族同源的一个进化支系包含多个目的 CYP6 家族基因, 分别是半翅目美国牧草盲蝽 *Lygus lineolaris* 的 CYP6X 亚族, 鞘翅目马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 的 CYP6BH 和 CYP6BJ 亚族, 等翅目 *Hodotermopsis sjoestedti* 的 CYP6AM 亚族, 啮虫目嗜卷书虱 *Liposcelis bostrychophila* 的 6CE 亚族和蜚蠊目德国小蠊 *Blattella germanica* 的 CYP6J, CYP6K, CYP6L 亚族。从图 1 的显示的亲缘关系来看, 这几个目的 CYP6 基因很早就与大多数双翅目 CYP6A 亚族基因分化成两个不同的支系了, 这与这些基因所属目的形态学分类关系大致相似 (图 2:A)。由昆虫 CYP6 系统进化树显示的各目进

化关系 (图 2:B) 可得, 蜚蠊目的 CYP6 族基因相对于上述其他几个目是较早分化出来的。等翅目和啮虫目的 CYP6 族基因表现出一定的同源性, 在分化时间上也在蜚蠊目 CYP6 族之后。半翅目和鞘翅目是真变态群中较晚分化的目, 两者的 CYP6 族基因有同源性, 相对于上述其他几个目的 CYP6 族基因也是最晚分化出来的。但由于这几个目已分离的 P450 全长基因数目很少, 它们确切的进化关系仍需进一步研究。CYP4 亚族系统进化树显示, 各目 P450 分化的时间从早到晚分别是: 蜚蠊目、鞘翅目及膜翅目和鳞翅目 (图 2:C)。由 CYP6 和 CYP4 家族进化树推测的各目 P450 进化关系如图 2(D)。

3 昆虫 P450 基因的调控

昆虫细胞色素 P450 可被药物、植物次生性物质、杀虫剂等诱导。关于昆虫 P450 的调控邱星辉和冷欣夫 (1999) 已经作出较详细的综述。研究发现, P450 介导昆虫抗性的可能机制包括 P450 的过量表达 (Hemingway *et al.*, 2004) 和氨基酸残基改变。调控基因的突变引起的 P450 的过量表达可能是 P450 介导抗性的主要机制。

近几年又不断有新的研究结果证明 P450 的过量表达在介导昆虫抗性产生方面的重要作用。Bautista 等 (2008) 发现氯菊酯抗性品系小菜蛾 *Plutella xylostella* 4 龄幼虫体内的 P450 基因 *CYP6BG1* 过量表达, 并通过基因沉默证明过量表达的 *CYP6BG1* 增强了氯菊酯的代谢, 从而导致抗性的产生。Karunker 等 (2008) 发现, B 型和 Q 型烟粉虱对吡虫啉的抗性由 *CYP6CM1* 过量表达引起的。Willoughby 等 (2006) 利用微阵列技术证明了在杀虫剂抗性的果蝇中, P450 基因的过量表达起着重要作用。Strode 等 (2008) 通过构建埃及伊蚊的 P450, GSTs 及酯酶和胆碱酯酶等 235 个抗性有关的基因的微阵列芯片, 表明了 CYP9 亚族在抗性品系中高度表达。Daborn 等 (2007) 利用 GAL4/UAS 系统研究表明果蝇 P450 *Cyp6g1*, *Cyp6g2* 和 *Cyp12d1* 基因的过量表达导致了其对 DDT、烯啶虫胺、环虫腈、二嗪农的抗性。Le Goff 等 (2006) 利用微阵列技术对 86 个果蝇 P450 基因的表达差异研究, 发现苯巴比妥或莠去津可以诱导 *Cyp6a2*, *Cyp6w1* 和 *Cyp12d1* 基因过量表达。

细胞色素 P450 基因系统是一个十分复杂的体系, 它的表达调控是生物体内和体外多种因素相互作用的结果。其中基因激活和转录水平的调节是基因调控的最主要环节。发生在基因转录水平上的调控涉及顺式作用元件 (*cis*-acting element) 和反式作用因子 (*trans*-acting factor) 两个因素 (唐振华和吴士雄, 2000)。P450 的表达可能受顺式调控元件, 反式作用因子或顺式、反式因子的共同调控, 调控可能涉及转录增强的转录机制或 mRNA 稳定性增加的转录后机制 (邱星辉和冷欣夫, 1999)。上述几种 P450 表达调控机制在昆虫中都已经发现。抗性品系的昆虫受到诱导后往往在顺式调控元件或反式作用因子的调控下产生 P450 的过量表达。

3.1 受顺式元件调控的昆虫 P450 基因

香芹黑凤蝶 *P. polyxene* 的 *CYP6B1v3* (Prapaipong *et al.*, 1994)、北美黑条黄凤蝶 (*P. glaucus*) 的 *CYP6B4* (Mcdonnell *et al.*, 2004)、家蝇的 *CYP28B1* 和 *CYP4G13v2* (Liu and Zhang, 2002)、不吉按蚊 *A. Funestus* 的 *CYP6P9* (Amenya *et al.*, 2008) 等 P450 基因都受顺式元件调控。

Prapaipong 等 (1994) 对香芹黑凤蝶 *P. polyxene* 的研究发现 *CYP6B1v3* 基因启动子序列包含 TATA 和 CAAT 盒等顺式元件, 这些顺式元件在昆虫受到花椒毒素 (xanthotoxin) 诱导时调控该基因的过量表达。

Hung 等 (1996) 通过分析来自 *P. polyxene* 的 *CYP6B4v2*、*CYP6B5v1* 和来自 *P. glaucus* 的 *CYP6B1v3* 和 *CYP6B3v2* 等 4 个基因的 5' 端上游序列发现, 它们的启动子区存在 XRE-xan (xanthotoxin responsive element) 等相似的转录调控元件。Petersen 等 (2003) 通过研究 *CYP6B1v3* 启动子区操控报告基因 CAT 在 Sf9 细胞中的表达证明, 在香芹黑凤蝶 *CYP6B1v3* 基因启动子存在重叠的 EcRE/ARE/XRE-xan 元件, 用于激活过量表达。Mcdonnell 等 (2004) 研究发现, 在北美黑条黄凤蝶 *P. glaucus* 中代谢呋喃香豆素的 P450 基因 *CYP6B4* 和 *CYP6B1* 启动子在某些区域高度相似, 也存在 EcRE/ARE/XRE-xan 元件, 这些转录调控元件在花椒毒素或苯并芘诱导下调控 *CYP6B4* 基因的过量表达。Brown 等 (2004) 发现 C/EBP 和 Inr 等更接近启动子的元件也在花椒毒素的诱导下调控 *CYP6B1v3* 的过量表达。Liu 和 Zhang (2002) 通过对家蝇的研究发现, P450 基因 *CYP28B1* 和 *CYP4G13v2* 受顺式元件调控。这两个基因的启动子不仅与 *CYP6D1* 启动子同源, 而且还有与 *CYP6B1* 相似的启动子元件。Amenya 等 (2008) 发现, 不吉按蚊 *A. Funestus* 中的 *CYP6P9* 基因也受顺式元件的调控发生过量表达从而产生对拟除虫菊酯的抗性。

3.2 受反式作用因子调控的昆虫 P450 基因

一些研究表明, 家蝇的 *CYP6A1* (Feyereisen *et al.*, 1995), 果蝇的 *Cyp6a2* (Maitra *et al.*, 2000), *Cyp6a9* (Maitra *et al.*, 1996), *Cyp6a8* (Maitra *et al.*, 2002) 基因的过量表达受反式因子的调控。反式因子突变可能发生在调节基因的启动子区、基因编码区, 或通过突变影响反式作用因子的转录后修饰。

CYP6A1 作为从抗性品系家蝇中分离的第一个 P450 基因 (Feyereisen *et al.*, 1989), 在抗性品系中 mRNA 的表达量至少高出敏感品系 10 倍 (Carino *et al.*, 1994)。Feyereisen 等 (1995) 研究发现, *CYP6A1* 过量表达受反式作用因子调控。Maitra 等 (2000) 通过基因杂交和染色体置换研究了位于果蝇 II 号染色体上的 *Cyp6a2* 和 *Cyp6a8* 的过量表达机制, 发现敏感品系中两基因的表达均受到位于 III 号染色体上的反式作用因子的抑制, 而抗性品系的反式作用因子发生基因突变失去抑制功能从而产生过量表达。Maitra 等 (2002) 将 *Cyp6a8* 启动子上游序列与荧光素报告基因融合, 用以检测 *Cyp6a8* 启动子活性。结果表明抗性品系 91-R *Cyp6a8* 的 -11/-761 区域能够与有活性的反式作用因子结合, 再次证明果蝇抗性品系 *Cyp6a8* 的过量表达由反式作

用因子突变引起。

3.3 受顺式元件和反式因子共同调控的 P450 基因

CYP6D1 是从家蝇中分离的与拟除虫菊酯抗性有关的一个 P450 基因 (Liu and Scott, 1996)。Liu 和 Scott (1996, 1997) 的研究结果表明, 抗性品系 *CYP6D1* 的过量表达同时受位于 I 号染色体上的顺式作用元件和位于 II 号染色体上的反式因子的调控。

CYP6D1 基因的反式作用因子为锌指蛋白 (mdGfi-1), 它是 *CYP6D1* 基因表达的阻遏物。Scott 等 (1999) 的研究发现家蝇拟除虫菊酯抗性品系 LRP 品系 *CYP6D1* 基因 5' 端旁侧序列转录起始区附近位于 -15 ~ -29 位核苷酸处的一个 15 bp 的片段的突变可能导致该品系中 *CYP6D1* 的过量表达。Gao 和 Scott (2006) 利用凝胶迁移技术证实了在家蝇抗性品系中位于 *CYP6D1* 启动子上的 mdGfi-1 结合位点被一个 15 bp 的插入物破坏, 导致抗性品系家蝇 mdGfi-1 结合效率大大降低, 从而解除了 mdGfi-1 对 *CYP6D1* 的抑制。这一突变引发 *CYP6D1* 基因过量表达并产生抗性。*CYP6D3* 是位于家蝇 I 号染色体上与 *CYP6D1* 相距 20 kb 的抗性相关基因, 两者的核苷酸序列相似度为 77%, *CYP6D3* 和 *CYP6D1* 在抗性家蝇中的表达量均为敏感品系的 10 倍以上 (Kasai and Scott, 2001)。Kasai 和 Scott (2001) 推测 *CYP6D3* 和 *CYP6D1* 的过量表达可能存在相似的调控方式, 而比对各个品系 *CYP6D3* 的 5' 端旁侧序列并未发现有插入片段存在, 因此 *CYP6D3* 的调控方式仍然需要进一步研究。

P450 基因表达的调控涉及到许多步骤, mRNA 转录后的稳定性以及翻译后的调控也可能起着重要的作用。

4 小结与展望

细胞色素 P450 是一个基因超家族, 具有丰富的生物多样性。目前对于昆虫 P450 的研究成果集中在双翅目和鳞翅目昆虫, 以及 CYP4 和 CYP6 等一些与抗性相关的基因家族。未来将有更多的昆虫基因组测序成功, 将极大地扩充 P450 的家族成员。随着分子生物学的发展, 将会有越来越多的 P450 基因被发现。微阵列分析技术等分子生物学高新技术被越来越多的应用于昆虫抗性基因的筛选及表达差异等的研究。DNA 微阵列分析技术在研究果蝇和冈比亚按蚊抗性基因的表达差异中已经得到广泛

应用 (Daborn *et al.*, 2002; Le Goff *et al.*, 2003; Pedra *et al.*, 2004; David *et al.*, 2005; Vontas *et al.*, 2005; Strode *et al.*, 2006)。对 P450 基因超家族进化机制的研究将起到促进作用。对于 P450 的各个家族成员间的亲缘关系和进化机制的研究较少, 应综合运用分子生物学和形态分类学的研究成果进行分析。对于昆虫 P450 基因的表达和调控机制的研究很多解释目前还处于推测阶段, 关于 P450 基因的顺式、反式调控机制尚需要大量的证据来支持这些推测。鉴于昆虫 P450 在抗药性产生过程中的重要作用, 研究昆虫 P450 的进化和表达调控机制对于昆虫抗药性的治理大有裨益。

参 考 文 献 (References)

- Amenya DA, Naguran R, Lo TC, Ranson H, Spillings BL, Wood OR, Brooke BD, Coetzee M, Koekemoer LL, 2008. Over expression of a cytochrome P450 (CYP6P9) in a major African malaria vector, *Anopheles Funestus*, resistant to pyrethroids. *Insect Mol. Biol.*, 17 (1): 19–25.
- Bautista MA, Miyata T, Miura K, Tanaka T, 2008. RNA interference-mediated knockdown of a cytochrome P450, *CYP6BG1*, from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, reduces larval resistance to permethrin. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39(1): 38–46.
- Berge JB, Feyereisen R, Amichot M, 1998. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B*, 353: 1 701–1 705.
- Brattsten LB, Holyoke CW Jr, Leeper JR, Raffa KF, 1986. Insecticide resistance: Challenge to pest management and basic research. *Science*, 231: 1 255–1 260.
- Brown RP, Berenbaum MR, Schuler MA, 2004. Transcription of a lepidopteran cytochrome P450 promoter is modulated by multiple elements in its 5'UTR and repressed by 20-hydroxyecdysone. *Insect Mol. Biol.*, 13(4): 337–347.
- Carino FA, Koener JF, Pla PFW Jr, Feyereisen R, 1994. Constitutive overexpression of the cytochrome P450 gene *CYP6A1* in a house fly strain with metabolic resistance to insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 24(4): 411–418.
- Daborn PJ, Lumb C, Boey A, Wong W, Blasetti A, ffrench-Constant RH, Batterham P, 2007. Evaluating the insecticide resistance potential of eight *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes by transgenic over-expression. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37: 512–519.
- Daborn PJ, Yen JL, Bogwitz MR, Le Goff G, Feil E, Jeffers S, Tijet N, Perry T, Heckel D, Batterham P, Feyereisen R, Wilson TG, ffrench-Constant RH, 2002. A single P450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. *Science*, 297: 2 253–2 256.
- David JP, Strode C, Vontas J, Nikou D, Vaughan A, Pignatelli PM, Louis C, Hemingway J, Ranson H, 2005. The *Anopheles gambiae* detoxification chip: a highly specific microarray to study metabolic-

- based insecticide resistance in malaria vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 4 080 – 4 084.
- Degtyarenko KN, Archakov AI, 1993. Molecular evolution of P450 superfamily and P450-containing monooxygenase systems. *FEBS Lett.*, 332: 1 – 8.
- Feyereisen R, 1999. Insect P450 enzymes. *Annu. Rev. Entomol.*, 44: 507 – 533.
- Feyereisen R, 2005. Insect cytochrome P450. In: Gilbert LI, Latrou K, Gill SS eds. *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier, Oxford. 1 – 77.
- Feyereisen R, Andersen JF, Carino FA, Cohen MB, Koener JF, 1995. Cytochrome P450 in the house fly: Structure, catalytic activity and regulation of expression of *CYP6A1* in an insecticide-resistant strain. *Pestic. Sci.*, 43: 233 – 239.
- Feyereisen R, Koener JF, Farnsworth DE, Nebert DW, 1989. Isolation and sequence of cDNA encoding a cytochrome P450 from an insecticide-resistant strain of the house fly, *Musca domestica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86(5): 1 465 – 1 469.
- Gao J, Scott JG, 2006. Role of the transcriptional repressor mdGfi-1 in *CYP6D1v1*-mediated insecticide resistance in the house fly, *Musca domestica*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 36: 387 – 395.
- Green MT, Dawson JH, Gray HB, 2004. Oxoiron (IV) in chloroperoxidase compound II is basic: Implications for P450 chemistry. *Science*, 304: 1 653 – 1 656.
- Hardstone MC, Leichter C, Harrington LC, Kasai S, Tomita T, Scott JG, 2007. Cytochrome P450 monooxygenase-mediated permethrin resistance confers limited and larval specific cross-resistance in southern house mosquito, *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 89: 175 – 184.
- Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H, 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34(7): 653 – 665.
- Hoshi T, Lahiri S, 2004. Oxygen sensing: It's a gas! *Science*, 306: 2 050 – 2 051.
- Hung CF, Holzmacher R, Connolly E, Berenbaum MR, Schuler MA, 1996. Conserved promoter elements in the CYP6B gene family suggest common ancestry for cytochrome P450 monooxygenases mediating furanocoumarin detoxification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 12 200 – 12 205.
- Karunker I, Benting J, Lueke B, Ponge T, Nauen R, Roditakis E, Vontas J, Gorman K, Denholm I, Morin S, 2008. Over-expression of cytochrome P450 *CYP6CMI* is associated with high resistance to imidacloprid in the B and Q biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38: 634 – 644.
- Kasai S, Scott JG, 2001. Expression and regulation of *CYP6D3* in the house fly, *Musca domestica* (L.). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32: 1 – 8.
- Le Goff G, Boundy S, Daborn PJ, Yen JL, Sofer L, Lind R, Sabourault C, Madi-Ravazzi L, ffrench-Constant RH, 2003. Microarray analysis of cytochrome P450 mediated insecticide resistance in *Drosophila*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33(7): 701 – 708.
- Le Goff G, Hilliou F, Siegfried BD, Boundy S, Wajnberg E, Sofer L, Audant P, ffrench-Constant RH, Feyereisen R, 2006. Xenobiotic response in *Drosophila melanogaster*: Sex dependence of P450 and GST gene induction. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 36: 674 – 682.
- Liu N, Scott JG, 1996. Genetic analysis of factors controlling high-level expression of cytochrome P450, CYP6D1, cytochrome b5, P450 reductase, and monooxygenases activities in LPR house flies, *Musca domestica*. *Biochem. Genet.*, 34(3–4): 133 – 148.
- Liu N, Scott JG, 1997. Phenobarbital induction of CYP6D1 is due to a *trans* acting factor on autosome 2 in house flies, *Musca domestica*. *Insect Mol. Biol.*, 6 (1) : 77 – 81.
- Liu N, Scott JG, 1998. Increased transcription of CYP6D1 causes cytochrome P450 mediated insecticide resistance in house fly. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 28: 531 – 535.
- Liu N, Zhang L, 2002. Identification of two new cytochrome P450 genes and their 5'-flanking regions from the housefly, *Musca domestica*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32: 755 – 764.
- Liu NN, Zhu F, Xu Q, Pridgeon JW, Gao XW, 2006. Behavioral change, physiological modification, and metabolic detoxification: Mechanisms of insecticide resistance. *Acta Entomologica Sinica*, 49 (4): 671 – 679.
- Maitra S, Dombrowski SM, Basu M, Raustol O, Waters LC, Ganguly R, 2000. Factors on the third chromosome affect the level of *Cyp6a2* and *Cyp6a8* expression in *Drosophila melanogaster*. *Gene*, 248: 147 – 156.
- Maitra S, Dombrowski SM, Water LC, Ganguly R, 1996. Three second chromosome-linked clustered Cyp6 genes show differential constitutive and barbital-induced expression in DDT-resistant and susceptible strains of *Drosophila melanogaster*. *Gene*, 180: 165 – 171.
- Maitra S, Price C, Ganguly R, 2002. *Cyp6a8* of *Drosophila melanogaster*: Gene structure, and sequence and functional analysis of the upstream DNA. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32: 859 – 870.
- Medonnell CM, Brown RP, Berenbaum MR, Schuler MA, 2004. Conserved regulatory elements in the promoters of two allelochemical-inducible cytochrome P450 genes differentially regulate transcription. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34: 1 129 – 1 139.
- Nebert DW, Adesnik M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Kemper B, Levin W, Phillips IR, Sato R, Waterman MR, 1987. The P450 gene superfamily: Recommended nomenclature. *DNA Cell Biol.*, 6: 1 – 11.
- Nebert DW, Nelson DR, Adesnik M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Kemper B, Levin W, Phillips IR, Sato R, Waterman MR, 1989. The P450 superfamily: Updated listing of all genes and recommended nomenclature for the chromosomal loci. *DNA Cell Biol.*, 8(1): 1 – 13.
- Nebert DW, Nelson DR, Coon MJ, Estabrook RW, Feyereisen R, Fujii-Kuriyama Y, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson

- EF, Loper JC, Sato R, Waterman MR, Waxman DJ, 1991. The P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol.*, 10(1): 1–14.
- Nelson DR, 1998. Metazoan cytochrome P450 evolution. *Comp. Biochem. Physiol.*, 121(Pt C): 15–22.
- Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O, Okuda K, Nebert DW, 1993. The P450 superfamily: Update on new sequence, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes and nomenclature. *DNA Cell Biol.*, 12(1): 1–51.
- Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW, 1996. P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 6: 1–42.
- Nelson DR, Strobel HW, 1987. Evolution of cytochrome P450 proteins. *Mol. Biol. Evol.*, 4(6): 572–593.
- Ono H, Ozaki K, Yoshikawa H, 2005. Identification of cytochrome P450 and glutathione-S-transferase genes preferentially expressed in chemosensory organs of the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus* L. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35: 837–846.
- Pedra JH, McIntyre LM, Scharf ME, Pittendrigh BR, 2004. Genome-wide transcription profile of field- and laboratory-selected dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT)-resistant *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 7 034–7 039.
- Petersen RA, Niamsu PH, Berenbaum MR, Schuler MA, 2003. Transcriptional response elements in the promoter of *CYP6B1*, an insect P450 gene regulated by plant chemicals. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1 619: 269–282.
- Prapaipong H, Berenbaum MR, Shuler MA, 1994. Transcriptional regulation of the *Papilio polyxenes* CYP6B1 gene. *Nucleic Acids Res.*, 22(15): 3 210–3 217.
- Qiu XH, Leng XF, 1999. Expression regulation of cytochrome P450 genes and the molecular basis of P450 monooxygenase-mediated insecticide resistance in insect. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 1(1): 7–14. [邱星辉, 冷欣夫, 1999. 昆虫细胞色素 P450 基因的表达与调控及 P450 介导抗性的分子机制. 农药学报, 1(1): 7–14]
- Rewitz KF, O'Connor MB, Gilbert LI, 2007. Molecular evolution of the insect Halloween family of cytochrome P450s: Phylogeny, gene organization and functional conservation. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37: 741–753.
- Sagmi I, Shimizu T, 1998. The crucial roles of Asp-314 and Thr-315 in the catalytic activation of molecular oxygen by neuronal nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.*, 273(4): 2 105–2 108.
- Scott JG, 1999. Molecular basis of insecticide resistance: Cytochromes P450. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29: 757–777.
- Scott JG, 2008. Insect cytochrome P450s: Thinking beyond detoxification. In: Liu N ed. *Recent Advances in Insect Physiology, Toxicology and Molecular Biology*. Research Signpost, Kerala, India. 117–124.
- Scott JG, Liu N, Wen Z, Smith FF, Kasai S, Horak CE, 1999. House fly cytochrome P450 CYP6D1: 5' flanking sequences and comparison of alleles. *Gene*, 226(2): 347–353.
- Scott JG, Wen Z, 2001. Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg. *Pest Manag. Sci.*, 57: 958–967.
- Strode C, Steen K, Ortell F, Ranson H, 2006. Differential expression of the detoxification genes in the different life stages of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol.*, 15(4): 523–530.
- Strode C, Wondji CS, David JP, Hawkes NJ, Lumjuan N, Nelson DR, Drane DR, Karunaratne SH, Hemingway J, Black WC 4th, Ranson H, 2008. Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38(1): 113–123.
- Tang ZH, Wu SX, 2000. Heredity and Evolution of Insect Resistance to Pesticides. Shanghai Scientific and Technical Literature Press, Shanghai. 129–156. [唐振华, 吴士雄, 2000. 昆虫抗药性的遗传与进化. 上海: 上海科学技术文献出版社. 129–156]
- Tomita T, Scott JG, 1995. cDNA and deduced protein sequence of CYP6D1: the putative gene for cytochrome P450 responsible for pyrethroid resistance in house fly. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 25(2): 275–283.
- Vontas J, Blass C, Koutsos AC, David JP, Kafatos FC, Louis C, Hemingway J, Christophides GK, Ranson H, 2005. Gene expression in insecticide resistant and susceptible *Anopheles gambiae* strains constitutively or after insecticide exposure. *Insect Mol. Biol.*, 14: 509–521.
- Wang XP, Hobbs AA, 1995. Isolation and sequence analysis of a cDNA clone for a pyrethroid inducible cytochrome P450 from *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 25: 1 001–1 009.
- Weller GL, Foster GG, 1993. Genetic maps of the sheep blowfly *Lucilia cuprina*: Linkage group correlations with other dipteran genera. *Genome*, 36(3): 495–506.
- Willoughby L, Chung H, Lumb C, Robin C, Batterham P, Daborn PJ, 2006. A comparison of *Drosophila melanogaster* detoxification gene induction responses for six insecticides, caffeine and phenobarbital. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 36: 934–942.
- Wojtasek H, Leal WS, 1999. Degradation of an alkaloid pheromone from the pale-brown chafer, *Phyllopertha diversa* (Coleoptera: Scarabaeidae), by an insect olfactory cytochrome P450. *FEBS Lett.*, 458: 333–336.
- Yu CH, Gao XW, Zheng BZ, 2002. Induction of the cytochrome P450 by 2-tridecanone in *Helicoverpa armigera*. *Acta Entomologica Sinica*, 45(1): 1–7. [于彩虹, 高希武, 郑炳宗, 2002. 2-十三烷酮对棉铃虫细胞色素 P450 的诱导作用. 昆虫学报, 45(1): 1–7]
- Zhou Y, 2001. Zhou Yao Kunchong Tuji (Atlas of Insects by Zhou Yao). Henan Science and Technology Press, Zhengzhou. [周尧, 2001. 周尧昆虫图集. 郑州: 河南科学技术出版社]

(责任编辑:赵利辉)