

• 研究论文 •

抗氰戊菊酯棉铃虫细胞色素 P450 CYP6B7 基因的克隆及分析

唐 涛, 成玉红, 王成菊, 张文吉, 邱立红*

(中国农业大学 理学院 应用化学系, 北京 100094)

摘 要:以抗氰戊菊酯棉铃虫六龄幼虫中肠组织总 RNA 为模板, 采用特异性引物, 通过对反转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 的条件进行不断探索和优化, 成功克隆出全长为 1 557 bp 的基因片段 (GenBank 登录号 DQ 497428)。该片段包括一个完整的开放阅读框架 (1 515 bp) 及 5'端的 42 个碱基, 编码 504 个氨基酸残基。与国外报道的细胞色素 P450 CYP6B7 基因 (GenBank 登录号 AF031468) 的核苷酸、氨基酸同源性分别为 97.75% 和 98.81%, 为 CYP6B7 的等位基因。Northern 杂交分析表明, 抗性品系棉铃虫中肠组织中 CYP6B7 mRNA 的表达量明显高于敏感品系的, 初步表明 CYP6B7 在棉铃虫对氰戊菊酯的抗药性中起着重要作用。

关键词: 棉铃虫; 氰戊菊酯; 抗药性; 细胞色素 P450 CYP6B7; RT-PCR

中图分类号: Q78 S481.4

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2007)04-0370-06

Cloning and Characterization of Cytochrome P450 CYP6B7 from Fenvalerate Resistant Cotton Bollworm, *Helicoverpa armigera*

TANG Tao, CHENG Yu-hong, WANG Cheng-ju, ZHANG Wen-ji, QIU Li-hong*

(Department of Applied Chemistry, College of Science, China Agricultural University, Beijing 100094 China)

Abstract After optimizing the reaction condition and parameters of RT-PCR, a cDNA clone of cytochrome P450s was obtained from total RNA of midgut of 6th instar larvae of fenvalerate resistant strain of *Helicoverpa armigera*, using specific primers from CYP6B7 gene. The cDNA has an open reading frame of 1515 nucleotides encoding a protein of 504 amino acids residues (GenBank No. DQ497428). Comparing with previously reported CYP6B7 (GenBank No. AF031468), the similarity of nucleotides and identity of amino acids of sequence were 97.75% and 98.81%, respectively. The sequence was classified as an allele of CYP6B7. Northern Blotting analysis showed that the expression of CYP6B7 mRNA in HDFS strains of *H. armigera* was significantly higher than that of the HDS strain, suggesting that CYP6B7 played an important role in the resistance of *H. armigera* to fenvalerate.

Key words *Helicoverpa armigera*; fenvalerate; resistance; cytochrome P450 CYP6B7; RT-PCR

细胞色素 P450 基因家族是古老的超基因家族, 由其编码的 P450 酶系是自然界中最具催化类

型多样性的生物催化剂^[1]。这为生物体催化降解外源物质和代谢体内有毒物质提供了可选择的途

收稿日期: 2007-04-20; 修回日期: 2007-11-20.

作者简介: 唐涛 (1980-), 男, 湖南邵阳人, 硕士研究生, E-mail: tanson_1@163.com; * 通讯作者 (Author for correspondence): 邱立红 (1969-), 女, 博士, 副教授, 主要从事农药毒理与生物活性评价研究. 联系电话: 010-62733924 E-mail: lihongqiyang@126.com

基金项目: 国家自然科学基金 (30400293) 资助; 教育部留学回国人员启动基金资助.

径, 对保障生物体的正常生理机能具有重要作用。研究表明, P450酶系的含量及活性的增强是多种害虫对杀虫剂产生抗药性的主要原因之一^[2~5]。

棉铃虫是一种世界性农业害虫, 20世纪90年代中期该虫大发生曾造成我国棉花生产的巨大损失^[6]。目前, 对棉铃虫细胞色素 P450基因的研究主要是围绕可能与抗药性相关的 CYP4G8^[7]、CYP6B2^[8]和 CYP6B7^[9]等基因展开, 但有关其对杀虫剂的催化代谢能力及规律还尚未见研究报告。将 P450基因克隆并异源表达是进行该研究的有效手段。作者根据国外报道的棉铃虫 CYP6B7基因 (GenBank AF031468) 的核苷酸序列设计特异性引物, 以室内选育的抗氰戊菊酯棉铃虫 6龄幼虫中肠组织总 RNA 为模板, 经过对 RT-PCR 方法的条件进行优化, 成功地克隆出国内抗性棉铃虫的 CYP6B7等位基因片段。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 相对敏感品系 (HDS): 1988年采自河北邯郸, 于室内无药剂接触条件下连续饲养。氰戊菊酯对该品系的 LD₅₀值为 0.098 μg/头。

抗氰戊菊酯品系 (HDFR): 将采自河北田间、对菊酯类杀虫剂有一定抗性水平的棉铃虫, 在室内用氰戊菊酯连续选育而得。氰戊菊酯对抗性品系的 LD₅₀值为 24.58 μg/头, 抗性倍数为 250.26。

饲养条件: 温度 27℃ ±1℃, 相对湿度 (RH) 75%~85%, 光周期 (L:D) 为 14 h:10 h。选取 6龄中期幼虫用于实验。

1.2 主要试剂和仪器

1.2.1 主要试剂 总 RNA 提取试剂盒 (SV Total RNA Isolation System)、RT-PCR 试剂盒 (Access RT-PCR System) 和 Primer-α-Gene Labeling System 均为 Promega 公司产品; NorthernMax Kit 购自 Ambion 公司; α-[³²P] dATP 购自北京福瑞生物工程公司; 焦碳酸二乙酯 (DEPC) 和溴化乙锭 (EB) 为 Sigma 公司产品 (进口分装); 琼脂糖为 OXO D 公司产品; PCR 特异性引物由上海生工生物技术服务有限公司合成。

1.2.2 主要仪器 Sorvall RC 26 Plus 立式高速冷冻离心机 (美国索福公司); Sigma 3-18K 台式高

速冷冻离心机 (德国 Sigma 公司); Mastercycler Gradient 5331 型梯度 PCR 仪 (德国 Eppendorf 公司); 低温冰箱 (海信 BCD-219GBR 荣事达 BCD-265F); 超低温冰箱 (Thermo 电子公司); DYY-6C 型电泳仪 (北京市六一仪器厂); Lambda Bio-40 UV 紫外可见分光光度计 (美国 PE 公司); GK-330C⁺ 凝胶影像分析系统 (美国联合生物技术公司); HB-1000 杂交炉 (美国 UVP 公司); Storm 820 型储存磷屏放射自显影系统 (美国 Molecular Dynamics 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 总 RNA 提取 挑取棉铃虫 6龄中期幼虫 5~10 头, 解剖取中肠, 用手动匀浆器匀浆, 采用 SV Total RNA Isolation System 进行提取和纯化, 具体操作步骤见试剂盒用户手册。将得到的总 RNA (经紫外分光光度计测定 A₂₆₀/A₂₈₀ = 2.1) 重悬于 100 μL 无核酸酶 (Nuclease Free) 水中, 贮存于 -80℃ 超低温冰箱, 备用。

1.3.2 引物序列设计 根据报道的棉铃虫 CYP6B7 (AF031468) 基因^[9]的核苷酸序列设计特异性引物。上游引物 (P₁): 5'-TCATAAC AAGGTCATCAACG-3'; 下游引物 (P₂): 5'-TTAAGATACAATCTTCCTAGG-3'。

1.3.3 RT-PCR 条件优化 根据 RT-PCR 试剂盒 (Access RT-PCR System, Promega) 的使用说明, 在 0.2 mL PCR 管中建立总体积为 25 μL 的反应体系, 并在一定范围内调整不同组份的量及其他参数, 使体系中含有不同浓度的总 RNA、聚合酶、引物、Mg²⁺ 等, 并采用不同的退火温度 (见表 1), 分别进行 RT-PCR 扩增, 直至克隆出目的片段。

1.3.4 PCR 产物回收、纯化与克隆 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测不同条件下的 RT-PCR 产物, 采用低熔点凝胶纯化回收目的条带 (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega), 并用回收产物进行二次 PCR 扩增。纯化回收目的 DNA 片段, 然后将 DNA 片段连接到载体质粒 pGEM-T Easy 上, 再转化到大肠杆菌 *E. coli* JM 109 感受态细胞中, 经 Ampicillin/X-Gal/IPTG 的 LB 平板筛选后, 挑取白色阳性单克隆菌落扩大培养。

1.3.5 目的片段序列分析 将含有质粒 DNA 的菌液送北京诺赛基因组研究中心有限公司测序。采用 DNAMAN 软件分析所得序列, 并用 Blast 搜索引擎在 GenBank 中进行同源性查找分析。

表 1 RT-PCR 条件的优化

Table 1 Optimization of the parameters of RT-PCR

RT-PCR 参数 Parameters of RT-PCR	调整范围 /Adjustment range
总 RNA 量 Total RNA / μ L	0.125; 0.25; 0.5
引物 Primer/(μ mol/L)	0.5; 1.0; 1.5
dNTP Mix/(mmol/L)	0.1; 0.2; 0.4
Mg ²⁺ 浓度 Concentration of Mg ²⁺ /(mmol/L)	1.0; 1.3; 1.5; 1.8; 2.0
Tfl DNA 聚合酶 Polymerase/(U/ μ L)	0.06; 0.10
退火温度 Annealing temperature/°C	45; 48; 60
延伸温度 Extension temperature/°C	68; 72
延伸时间 Extension time/min	2; 2.5
最终延伸时间 Final extension time/min	7; 10; 15

1.3.6 Northern 杂交分析敏感与抗性品系棉铃虫 CYP6B7 mRNA 表达量 按照 Northern 杂交试剂盒的说明书进行转膜和杂交,将敏感与抗性品系棉铃虫的总 RNA (10 μ g)进行 1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳,并转到尼龙膜上,以 α -[³²P] dATP 标记的 578 bp 的 CYP6B7 cDNA 片段为探针,进行 Northern 杂交。杂交条件为 42℃ 16 h,洗膜条件:用 15 mL 低严紧性洗膜溶液 (Low stringency wash)室温洗 2 次,每次洗 5 min,再用 15 mL 高严紧性洗膜溶液 (High stringency wash)洗 2 次,每次洗 20 min 将洗好的膜夹到磷板中,置于 -80℃ 曝光 24 h。通过磷屏放射自显影系统检测 CYP6B7 mRNA 的表达量。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 结果

以所设计的特异性引物进行 RT-PCR 扩增。经过不断优化,最终电泳检测发现与预期片段大小一致的目的条带 (约 1 560 bp) (图 1),此时 RT-PCR 扩增体系为: (1) 25 μ L 的反应体系中含 Amv/Tfl 5 $\times$ 反应缓冲液 5.0 μ L, dNTP 混合液 (10 mmol/L) 0.5 μ L, 上、下游引物 (20 μ mol/L) 各 1.25 μ L, 25 mmol/L MgSO₄ 1.5 μ L, AMV 反转录酶 (5 U/ μ L) 0.5 μ L, Tfl DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.5 μ L, 总 RNA 0.25 μ L, 无 RNA 酶水 14.5 μ L; (2) RT-PCR 扩增条件为 45℃ 反转录 45 min, 94℃ 预变性 2 min, 94℃ 变性 30 s, 48℃ 退火 1 min, 68℃ 延伸 2 min, 循环 40 次, 68℃ 延伸 10 min, 4℃ 保温。

2.2 目的片段的克隆与序列分析

将目的片段克隆后测序,发现该序列全长 1 557 bp,其中编码区为 1 515 bp,编码 504 个氨基

酸残基 (图 2)。该片段具有细胞色素 P450 基因典型的特征保守区,主要包括 P450 的血红素结合区 (FGLGQRNCIG)、I 螺旋 (AGYET)、K 螺旋区 (ETLR) 和 “PKQFN” 保守区。

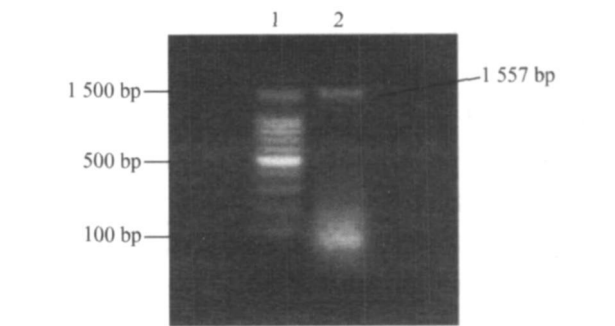


图 1 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 RT-PCR 产物

Fig 1 RT-PCR product in 1.0% agarose gel

注: 1: DNA 分子量标准; 2 RT-PCR 产物

Note 1: DNA marker 2: RT-PCR product

将所得序列与 GenBank 中的棉铃虫 CYP6B7 基因 (AF031468) 的核苷酸、氨基酸序列进行对比,发现核苷酸相似性为 97.75%, 氨基酸同源性为 98.81%。表明所得片段为 CYP6B7 的等位基因。HDFR 品系的 CYP6B7 基因有 35 个核苷酸、6 个氨基酸 (Y68D、F87L、H88D、M180T、K355R 和 T486I) 与 GenBank 中的 CYP6B7 基因不同 (图 3)。

2.3 Northern 杂交检测敏感与抗性品系棉铃虫 CYP6B7 mRNA 表达量

Northern 杂交分析 (图 4) 表明, CYP6B7 mRNA 在敏感与抗性品系棉铃虫中均有表达,但其在敏感品系中的表达量很低。抗性品系棉铃虫 HDFR 的 CYP6B7 mRNA 表达量约是敏感品系 HDS 的 3.5 倍。

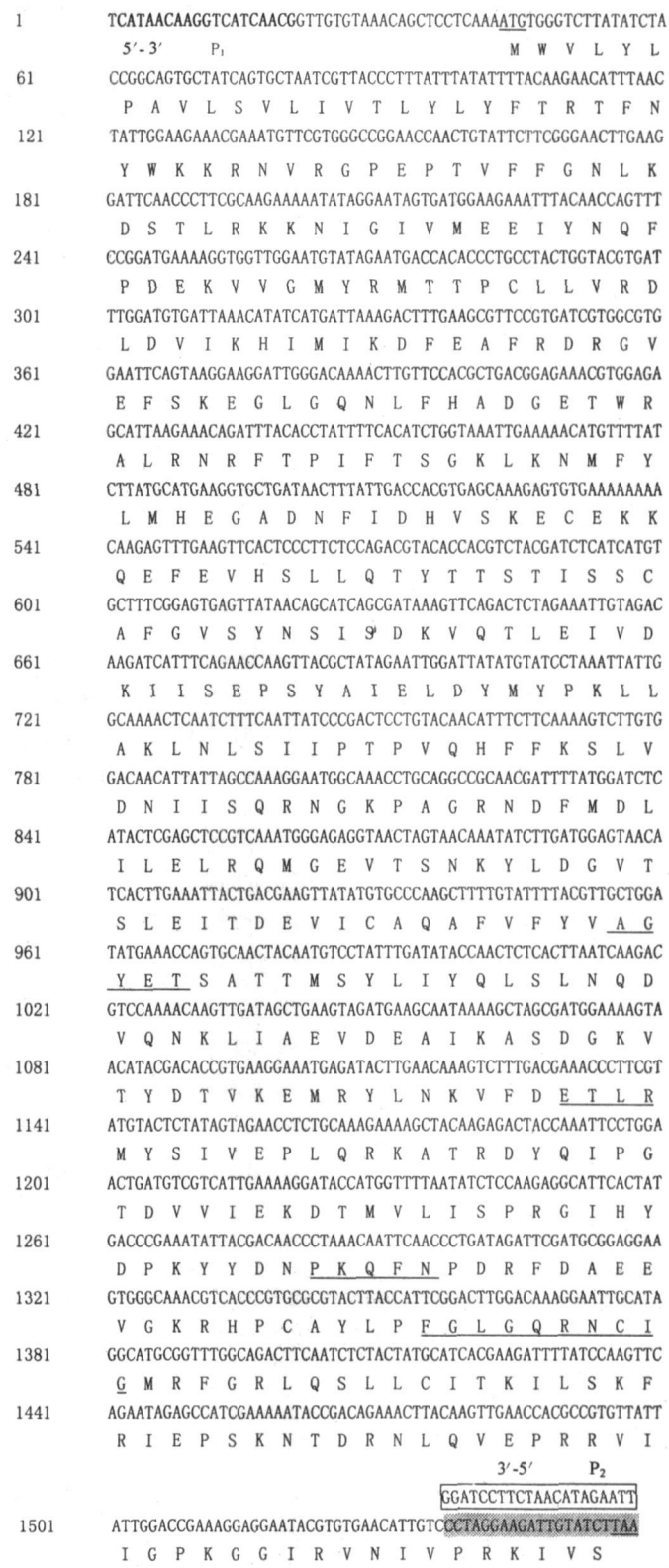


图 2 HDFR 品系棉铃虫中肠组织 P450 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

Fig. 2 cDNA sequences and deduced amino acid encoding cytochrome P450 cDNA from midgut of *H. armigera*
注: 起始密码子、终止密码子、螺旋区、K 螺旋区、保守区和特征命名序列用下划线标出; 上游引物 (P₁) 用粗体标记, 下游引物 (P₂) 用方框标记。

Note: The translation start and stop codon, the conserved I, K helix and PKQFN domain hem e-binding domains were underlined

The upstream primer was in bold and downstream primer was boxed

MWVLYLPAVLSVLIVTLTYLYFTRTFNYWKKRNVRGPEPTVFFGNLKDSTLRKKNIGIVME	60	CYP6B7
-----		HDFR
EIYNQFPYKVVGMRYMTTPCLLVRFHVIKHIKIDFEAFDRGVFEFSKEGLGQNLFHA	120	CYP6B7
-----D-----LD-----		HDFR
DGETWRALRNRFPTIFTSGKLKNMFYLMHEGADNFIDHVSKECKKQEFVHSLLTQYTM	180	CYP6B7
-----T-----		HDFR
STISSCAFGVSYNISIDKVQTL EIVDKIISEPSYAI ELDYMPKLLAKLNL SIPTPVQH	240	CYP6B7
-----		HDFR
FFKSLVDNIISQRNGKPAGRND FMDLILELRQMGEVTSNKYLDGVTSL EITDEVI CAQAF	300	CYP6B7
-----		HDFR
VFYVAGYETSATTMSYLIYQLSLNQDVQNKLIAEVD EAIKASDGKV TYD TVKEMQYLNKV	360	CYP6B7
-----R-----		HDFR
FDETLRMYSIVEPLQRKATRDYQIPGTDV VIEKDTMVLISPRGIHYDPKY YDNPKQFNPD	420	CYP6B7
-----		HDFR
RFDAEEVGKRHP CAYLPFGLGQRNCIGMRFGRLQSLLCITKILSKFRIEPSKNTDRNLQV	480	CYP6B7
-----		HDFR
EPRRVIGPKGGIRVNIVPRKIVS 504		CYP6B7
-----I-----		HDFR

图 3 HD FR 品系棉铃虫 CYP 6B7 基因推导的氨基酸序列与 GenBank 中 CYP 6B7 (AF031468) 基因的氨基酸序列比较

Fig.3 Comparison of the deduced amino acid of cytochrome P450 gene in HD FR strain of *H. armigera* with that of CYP 6B7 (AF031468) in GenBank
注: 不一致处以方框标记。 Note: The different amino acids were boxed

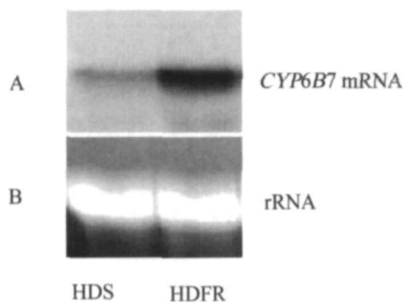


图 4 Northern 杂交分析结果

Fig. 4 Northern Blotting analysis of expression of CYP 6B7 mRNA in HDS and HD FR strains of *H. armigera*

注: A Northern 杂交检测到的 CYP 6B7 mRNA;

B. 1% 甲醛变性凝胶电泳后检测到的 rRNA (10 μg/泳道)。

Note: A. CYP 6B7 mRNA; B. Relative rRNA amounts per well on the 1% agarose gel following electrophoresis and visualized with ethidium bromide (10 μg/lane).

3 讨论

细胞色素 P450 基因在自然界生物体中广泛存在。研究表明,细胞色素 P450 基因可能与多种害虫的抗药性相关,如家蝇 *Musca domestica* 的 CYP 6A1^[10] 和 CYP 6D1^[11],德国蜚蠊 *Blattella germanica* 的 CYP 4G19^[12],果蝇 *Drosophila melanogaster* 的 CYP 6A2^[13],玉米耳虫 *Helicoverpa*

zea 的 CYP 6B8^[14]、CYP 6B9 和 CYP 312A1^[15],五带淡色库蚊 *Culex quinquefasciatus* 的 CYP 6I1^[16],美国牧草盲蝽 *Lygus lineolaris* 的 CYP 6X1^[17],冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 的 CYP 6Z1^[18],烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 的 CYP 9A1^[19] 等。与棉铃虫抗药性相关的细胞色素 P450 基因主要有 CYP 4G8^[7] 和 CYP 6B7^[9,20] 等,其中 CYP 6B7 是目前研究得较为深入的棉铃虫 P450 基因之一。Ranasinghe 和 Hobbs 曾报道 CYP 6B7 在澳大利亚田间抗性棉铃虫中过量表达,而且该过量表达与棉铃虫对拟除虫菊酯的抗药性共分离 (co-segregated),因此推测 CYP 6B7 与棉铃虫对拟除虫菊酯的抗药性有关^[20]。

在研究过程中,Ranasinghe 等^[9]认为棉铃虫一些 CYP 6B 家族的 mRNA 编码区存在二级结构,它可阻止反转录生成全长 cDNA。马彩霞应用 RT-PCR 法也未能以 RNA 为模板直接克隆得到 CYP 6B7^[21]。Ranasinghe 等及马彩霞最终是通过以基因组 DNA 为模板克隆得到 CYP 6B7 的。本研究根据 Ranasinghe 等报道的棉铃虫 CYP 6B7 核苷酸序列设计特异性引物,以抗氰戊菊酯棉铃虫 6 龄幼虫中肠组织总 RNA 为模板,通过对 RT-PCR 试剂盒提供的方法进行改进,调整各影响因素,进而得出较理想的 RT-PCR 反应条件,直接一

步成功克隆出 CYP6B7 的等位基因, 优化的条件可为克隆抗性棉铃虫其他 P450 基因提供参考。

研究虽然是根据 Ranasinghe 等报道的澳大利亚棉铃虫 P450 基因设计引物, 克隆得到抗氰戊菊酯棉铃虫 CYP6B7 等位基因, 但所得序列表明二者的核苷酸、氨基酸同源性仅分别为 97.75% 和 98.81%, 说明国内抗性棉铃虫的 P450 基因与澳大利亚棉铃虫的并不完全相同。应用 Northern 杂交法检测敏感和抗氰戊菊酯品系棉铃虫 6 龄幼虫中 CYP6B7 等位基因的 mRNA 表达量, 结果发现抗性棉铃虫中肠组织中 CYP6B7 mRNA 的表达量明显高于敏感品系 (约 3.5 倍), 初步表明 CYP6B7 在棉铃虫对氰戊菊酯的抗药性中起着重要作用。

在酵母中异源表达 CYP6B7 蛋白, 并测定其对氰戊菊酯等拟除虫菊酯类杀虫剂的代谢作用将是下一步的研究内容, 旨在明确 CYP6B7 对杀虫剂的代谢能力及其在棉铃虫对氰戊菊酯抗药性中的真正作用。

参考文献:

- [1] COON M J, VAZ A D, BESTERVELT L L. Cytochrome P450: Peroxidative Reactions of Diversozymes [J]. *FASEB J*, 1996, 10: 428-434.
- [2] ROSE R T, BARBHAIYA L. Cytochrome P450 Associated Insecticide Resistance and the Development of Biochemical Diagnostic Assays in *Heliothis virescens* [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 1995, 51: 178-191.
- [3] SCOTT J G. Cytochrome P450 and Insecticide Resistance [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 1999, 29: 757-777.
- [4] QIU Li-hong (邱立红), ZHANG Wen-ji (张文吉). 棉铃虫微粒体多功能氧化酶系与棉铃虫对氰戊菊酯抗药性的关系 [J]. *Acta Entomologica Sinica* (昆虫学报), 2001, 44(4): 447-453.
- [5] YANG Y H, WU Y D, CHEN S, et al. The Involvement of Mitochondrial Oxidases in Pyrethroid Resistance in *Helicoverpa armigera* from Asia [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2004, 34: 763-773.
- [6] WU K M, GUO Y Y. The Evolution of Cotton Pest Management Practices in China [J]. *Annu Rev Entomol*, 2005, 50: 31-52.
- [7] PIITENDRICH B, ARONSTEIN K, ZNKOVSKY E, et al. Cytochrome P450 Genes from *Helicoverpa armigera*: Expression in a Pyrethroid-susceptible and -resistant Strain [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 1997, 27: 507-512.
- [8] WANG X P, HOBBS A A. Isolation and Sequence Analysis of a cDNA Clone for a Pyrethroid Inducible Cytochrome P450 from *Helicoverpa armigera* [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 1995, 25: 1001-1009.
- [9] RANASINGHE C, HOBBS A A. Isolation and Characterization of Two Cytochrome P450 cDNA Clones for CYP6B6 and CYP6B7 from *Helicoverpa armigera* (Hübner): Possible

- Involvement of CYP6B7 in Pyrethroid Resistance [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 1998, 28: 571-580.
- [10] FEYEREISEN R, ANDERSEN J F. Cytochrome P450 in the House Fly: Structure, Catalytic Activity and Regulation of Expression of CYP6A1 in an Insecticide-resistant Strain [J]. *Pestic Sci*, 1995, 43: 233-239.
- [11] FEYEREISEN R, KOENER J F, FAN SW ORTH D E, et al. Isolation and Sequence of cDNA Encoding a Cytochrome P450 from an Insecticide Resistant Strain of the House Fly, *Musca domestica* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 1465-1469.
- [12] PRIDGEON J W, ZHANG L, LIU N. Overexpression of CYP4G19 Associated with a Pyrethroid Resistant Strain of the German Cockroach *Blattella germanica* (L.) [J]. *Gene*, 2003, 314: 157-163.
- [13] WATERS L C, ZELHOF A C, SHAW B J. Possible Involvement of the Long Terminal Repeat of Transposable Element in Regulating Expression of an Insecticide Resistance-Associated P450 Gene in *Drosophila* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 4855-4858.
- [14] LIX, MAY R, BERENBAUM S, et al. Molecular Cloning and Expression of CYP6B8 A Xanthoxin Inducible Cytochrome P450 cDNA from *Helicoverpa zea* [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2000, 30: 75-84.
- [15] MASATAKA S, WEN Z, MAY R, et al. Molecular Analysis of CYP321A1, a Novel Cytochrome P450 Involved in Metabolism of Plant Allelochemicals (Furanocoumarins) and Insecticides (Cypermethrin) in *Helicoverpa zea* [J]. *Gene*, 2004, 388: 163-175.
- [16] KASAI S, WEERASINGHE L S, SHONO T. Molecular Cloning, Nucleotide Sequence and Gene Expression of a Cytochrome (CYP6F1) from the Pyrethroid-resistant Mosquito *Culex quinquefasciatus* Say [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2000, 30: 163-171.
- [17] ZHU Y C, SNODGRASS G L. Cytochrome P450 CYP6X1 cDNAs and mRNA Expression Levels in Three Strains of the Tarnished Plant Bug *Lygus lineolaris* (Heteroptera: Miridae) Having Different Susceptibilities to Pyrethroid Insecticide [J]. *Insect Mol Biol*, 2003, 12(1): 39-49.
- [18] NIKOU D, RANSON H, HEMNGWAY J. An Adult-specific CYP6 P450 Gene is Over Expressed in a Pyrethroid-resistant Strain of the Malaria Vector *Anopheles gambiae* [J]. *Gene*, 2003, 318: 91-102.
- [19] ROSE R L, GOH D. Cytochrome P450 CYP9A1 in *Heliothis virescens*: the First Member of a New CYP Family [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 1997, 27: 605-615.
- [20] RANASINGHE C, CAMPBELL B, HOBBS A A. Overexpression of Cytochrome P450 CYP6B7 mRNA and Pyrethroid Resistance in Australian Populations of *Helicoverpa armigera* [J]. *Pestic Sci*, 1998, 54: 195-202.
- [21] MA Caixia (马彩霞). Cloning and Expression of Cytochrome P450 from *Helicoverpa armigera* (棉铃虫细胞色素 P450 基因的克隆与表达) [D]. Yangling (杨凌): Northwest A & F University (西北农林科技大学), 2005.

(Ed. JIN SH)