

B、Q型烟粉虱对药剂敏感性差异 的分子机制研究

任课老师：罗静初 教授

小组成员：袁迎迎 肖姬玲 胡云艳 柳洋

报告人：柳洋

报告时间：2013.1.20

提纲

- 1. 烟粉虱和P450简介
- 2. 分析B型和Q型烟粉虱抗药性差异的方法
- 3. 生物信息学的运用

核酸序列翻译成蛋白序列

序列比对

二级结构的预测

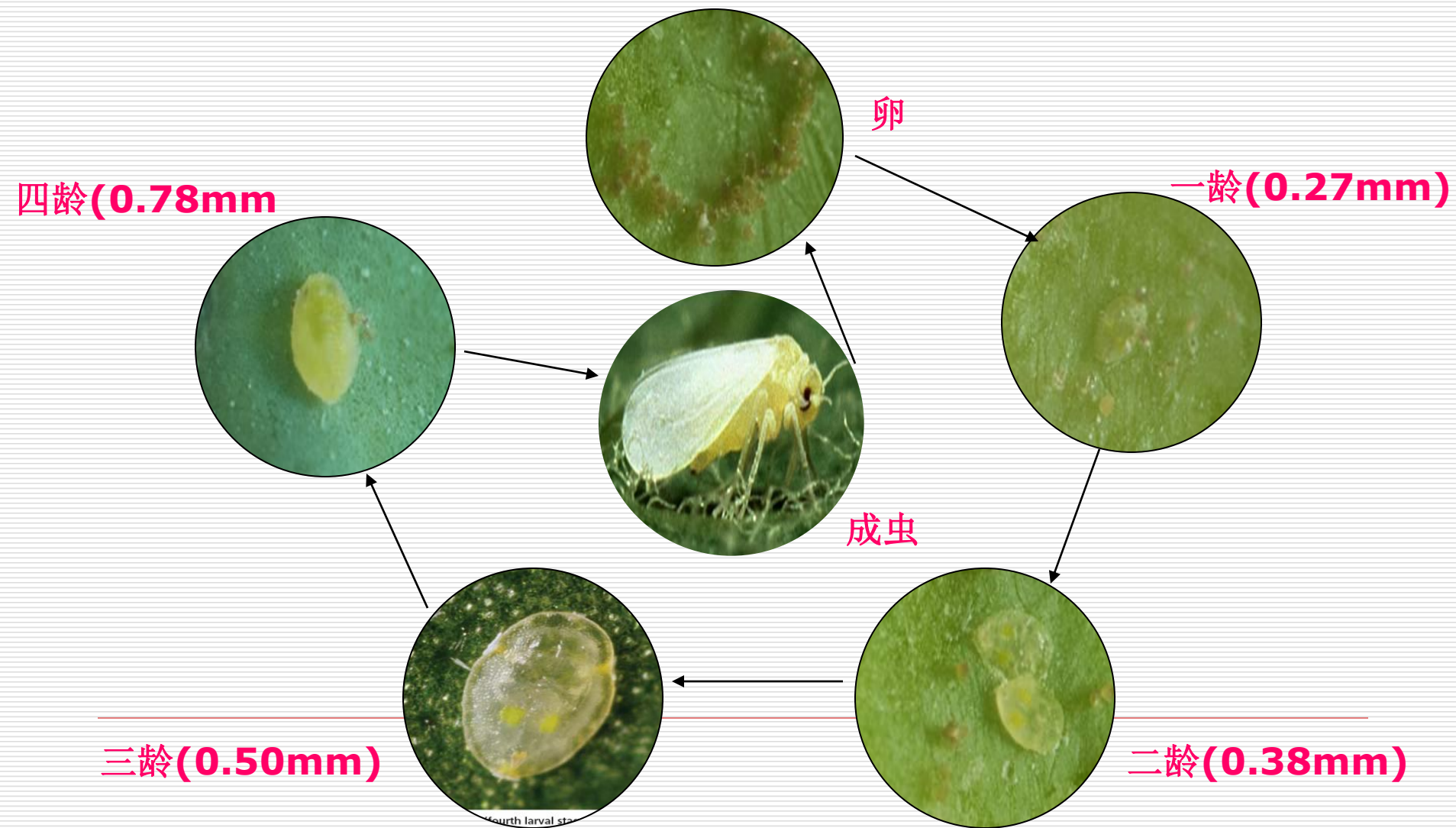
三级结构的预测

跨膜区域的预测

BLAST构建系统发育树

烟粉虱简介

烟粉虱 (*Bemisia tabaci*) 属半翅目粉虱科害虫



烟粉虱的危害：

- ❑ 全球**100**种最危险入侵物种之一（**IUCN**）
- ❑ **B**生物型—“超级害虫”（**Science, 1991**）；
- ❑ 危害**600**多种作物；常年损失**30-50%**；
- ❑ 传播**110**多种病毒；作物早期感病常导致绝产；据不完全统计，**2009**年，由烟粉虱传播的**TYLCV**造成的损失超过**150**亿人民币。



烟粉虱的危害与生物型



目前，已报道的生物型至少有**32**种，在中国广泛分布且危害严重的主要是**B**型和**Q**型。相对于**B**型烟粉虱，**Q**型烟粉虱有更强的传播植物病毒病能力和更强的抗药性，其危害性更大。



的烟粉虱危害生物型

□ 2011年底，B、Q型烟粉虱在我国的分布图

烟粉虱生物型与药剂敏感性问题

- 有研究发现，杀虫剂是Q型烟粉虱取代B型烟粉虱的主效因子，即Q型烟粉虱的抗药性比B型烟粉虱高，Q型烟粉虱有更好的环境适应性。
 - 本课题组前期对烟粉虱的生测实验也证明了Q型比B型的LC50值高。
 - 那么，杀虫剂驱动烟粉虱Q型取代B型的分子机制是什么呢？
-

P450基因简介

- 细胞色素P450单加氧酶(P450酶系)是生物体内一种多酶复合体。是整个酶系中的末端氧化酶。细胞色素P450的作用涉及到昆虫的生长,发育,取食等生理、生化过程,主导昆虫对杀虫剂的抗药性的形成和提高对植物有毒物质耐受性,在植食性昆虫与植物的协同进化进程中,细胞色素P450起了重要的作用。
-

-
- P450基因是一个超家族，有研究表明P450基因家族中的一个或几个基因的过量表达是氧化解毒代谢增强的一个主要机制。所以研究Q型和B型烟粉虱对药剂的敏感性差异，可以从此入手研究。
-

解释**B**型和**Q**型的抗药性差异的分子机制
可以从以下两个方面入手

1、P450基因表达量的差异

首先通过实验找出**P450**家族中的哪几个基因在**BQ**型烟粉虱抗药性差异中起作用，然后利用**RNAi**技术进行基因功能验证。

2、P450 蛋白结构的差异

利用生物信息学的工具进行分析

生物信息学的运用

1. 从NCBI中查找烟粉虱mRNA序列:

□ B型烟粉虱: CYP6CM1vB

□ Q型烟粉虱: CYP6CM1vQ

2. 两个序列mRNA的长度为1566bp, 有14个碱基差异。

Pairwise Alignment Result

LENGTH	SCORE	IDENTITY	SIMILARITY	GAPS
1566	7705.0	1552/1566 (99.1%)	1552/1566 (99.1%)	3/1566 (0.2%)

3.运用weblab中的transeq (v6.0.1) 将核酸序列翻译为氨基酸序列，结果表明两个氨基酸序列差异非常少，仅有6个位点产生差异，分别为19、70、185、218、340、366，其中340位的氨基酸是从组氨酸变为了天冬酰胺，由解离离变为了非解离的氨基酸。二级结构预测中显示了不同。

Pairwise Alignment Result

LENGTH	SCORE	IDENTITY	SIMILARITY	GAPS
522	2654.0	516/522 (98.9%)	517/522 (99.0%)	1/522 (0.2%)

```

EU642555.1_1 300 NDTELVFTDNIIGGVIGSFFSAGYEPTAAALTFCLYELARHPQVQAKLHE 349
      |||
EU344879.1_1 301 NDTELVFTDNIIGGVIGSFFSAGYEPTAAALTFCLYELARNPQVQAKLHE 350
  
```

HP

4.garnier(v6.0.1)预测两蛋白序列的二级结构。

发现在340位点处有差异。

□ **B type:**

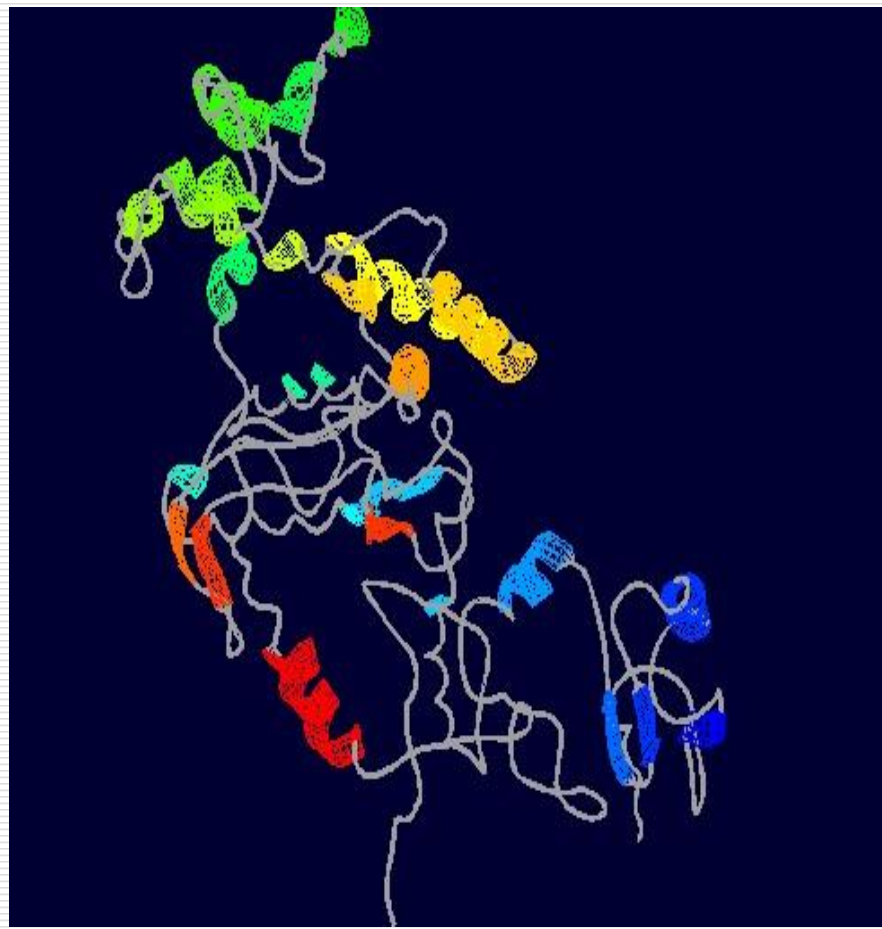
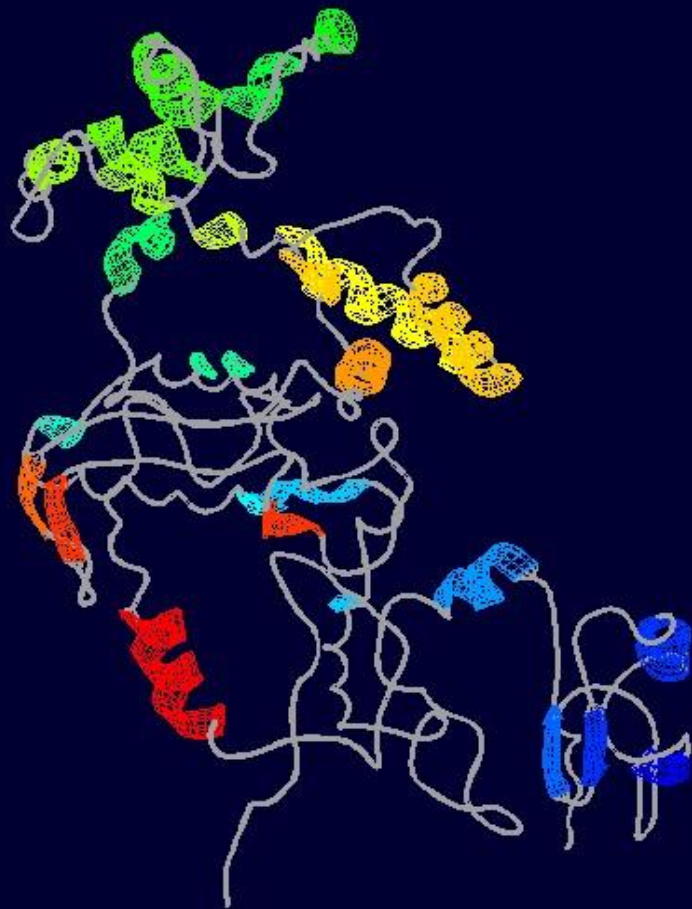
```
□           . 310   . 320   . 330   . 340   . 350
           DTELVFTDNIIGGVIGSFFSAGYEPTAAALTFCLYELARHPQVQAKLHEE
helix  H           HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
sheet  EEEEEEE  EEEEEEEEE
turns   TT
coil   C           CCCCCC
```

□ **Q type:**

```
□           . 310   . 320   . 330   . 340   . 350
           NDTELVFTDNIIGGVIGSFFSAGYEPTAAALTFCLYELARNPQVQAKLHE
helix  H           HHHHHHH  HHH  HHHHHHHHHH
sheet  EEEEEEE  EEEEEEEEE           E
turns   TT           TTT
coil   CC           CCCCCC           C
```

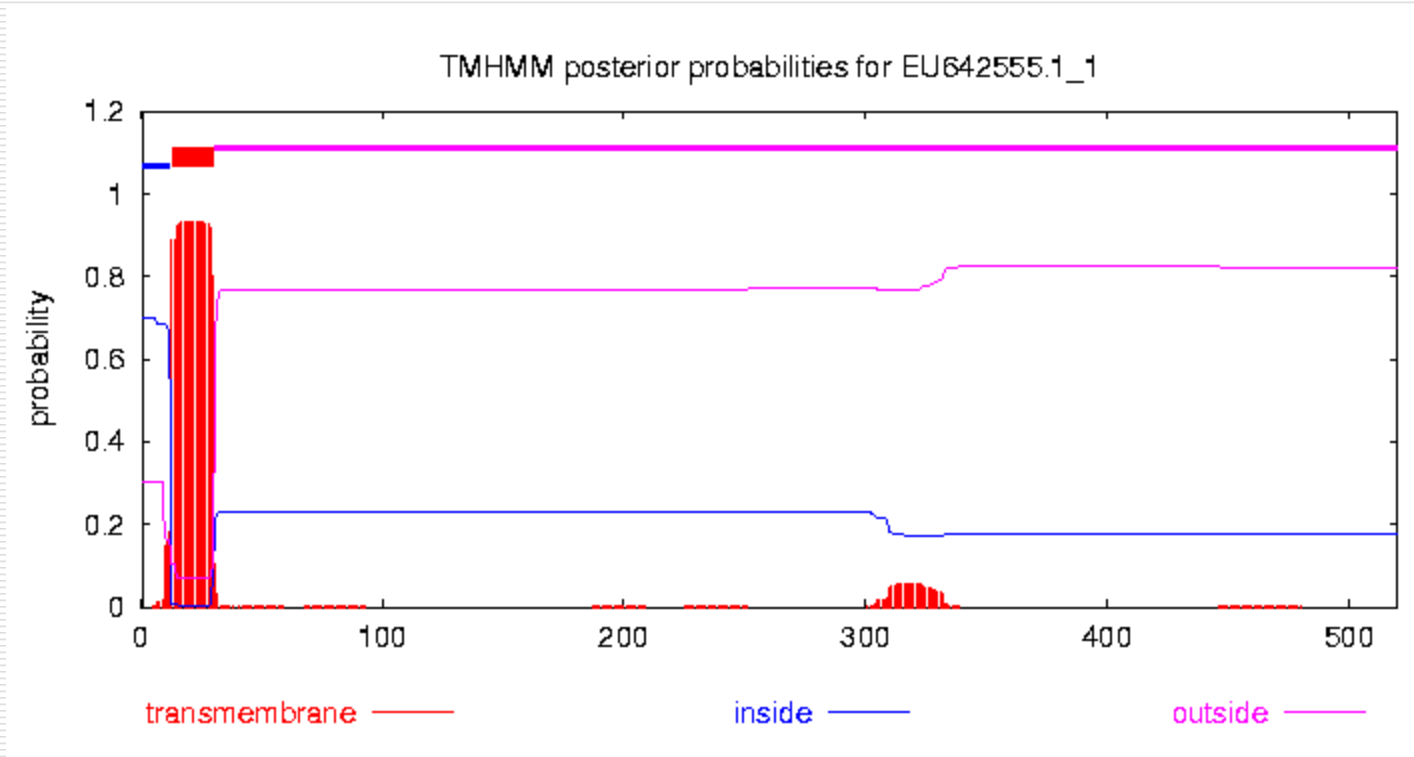
□ 由于340位点处的氨基酸有差异，导致二级结构的改变，推测这可能是Q型烟粉虱的抗药性增强的一个原因。需要进一步验证。

5. 三级结构预测 (SPDBV_4.01_PC)

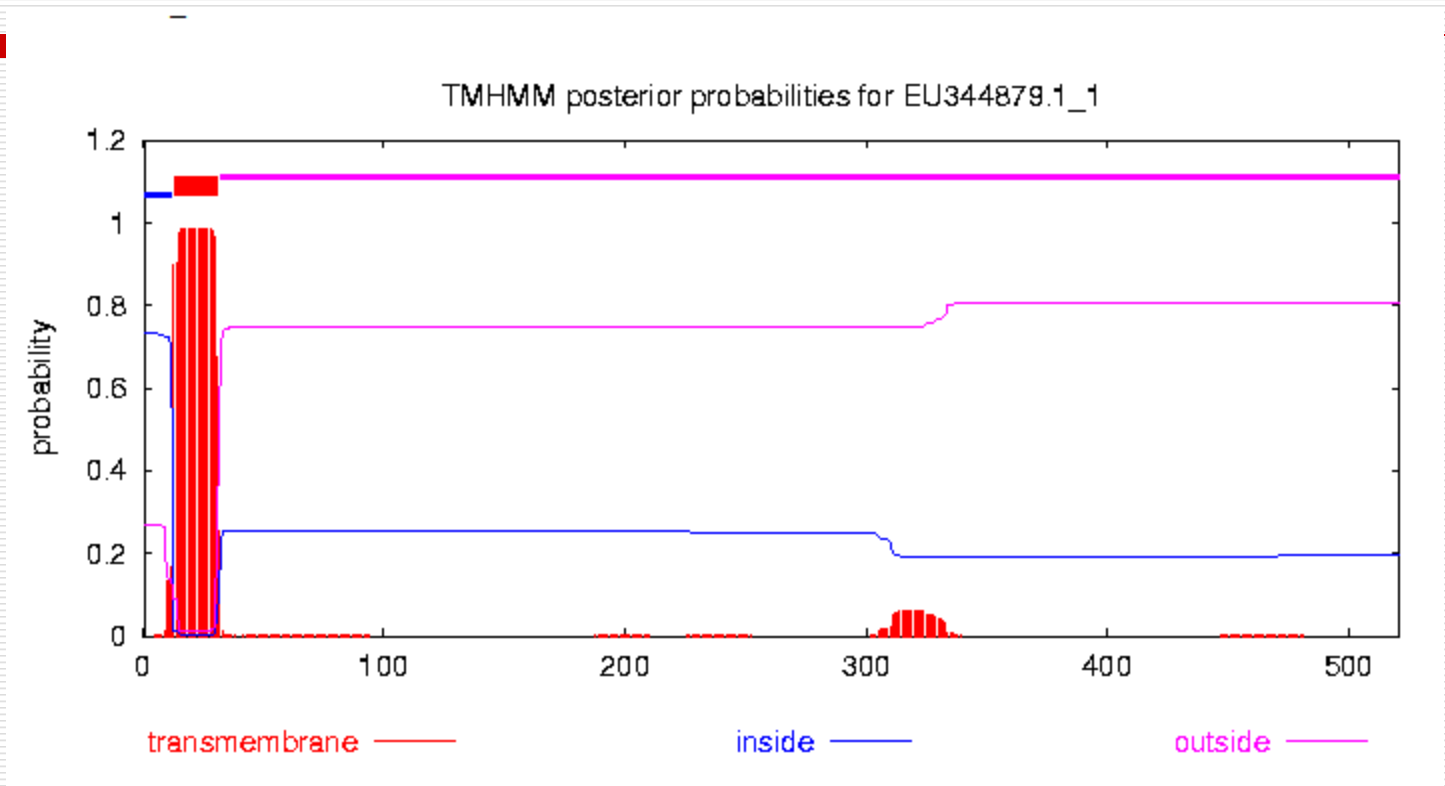


6. TMHMM 预测跨膜区域

B:



Q:



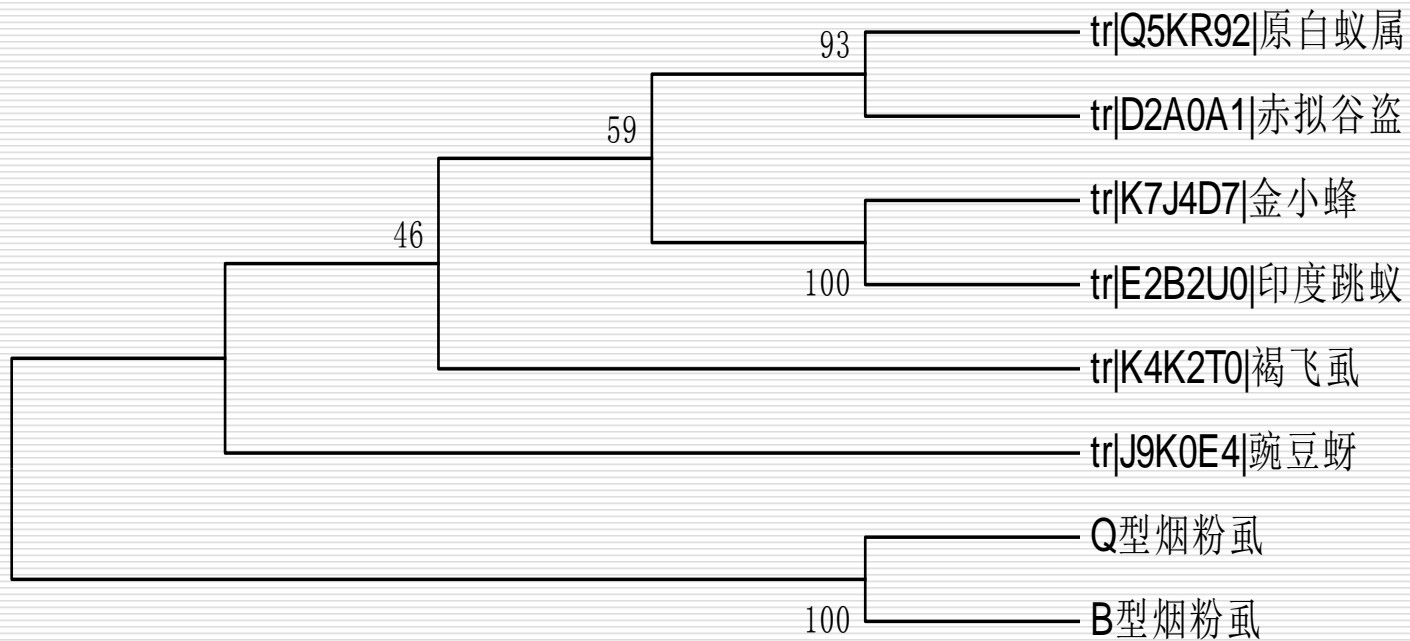
由上面的分析可知，此蛋白序列有跨膜区域，
大概在**0—50bp**处

7. BLAST及MEGA系统发育树的构建

Color code for identity 0 ————— 100% =

Accession	Entry name	0Query hit521	0Match hit (sqrt scale)1153	Name (Organism)
<input type="checkbox"/> Query	2013011925JKVNLLN2	—————	—————	
<input type="checkbox"/> B3FQ59	B3FQ59_BEMTA	—————	—————	Cytochrome P450 YP6CM1vQ (Bemisia tabaci)
<input type="checkbox"/> B3G430	B3G430_BEMTA	—————	—————	Cytochrome P450 (Bemisia tabaci)
<input type="checkbox"/> C6KH66	C6KH66_BEMTA	—————	—————	Cytochrome P450 CYP6cm1 (Bemisia tabaci)
<input type="checkbox"/> G1FCE0	G1FCE0_BEMTA	—————	—————	Cytochrome P450 (Bemisia tabaci)
<input type="checkbox"/> D8V034	D8V034_BEMTA	—————	—————	Cytochrome P450 CYP6CX1v1 (Bemisia tabaci)
<input type="checkbox"/> C7EZE3	C7EZE3_BEMTA	—————	—————	Cytochrome P450 CYP6CX1v2 (Bemisia tabaci)
<input type="checkbox"/> G1FCD8	G1FCD8_BEMTA	—————	—————	Cytochrome P450 (Bemisia tabaci)
<input type="checkbox"/> G1FCD9	G1FCD9_BEMTA	—————	—————	Cytochrome P450 (Bemisia tabaci)
<input type="checkbox"/> Q5KR92	Q5KR92_9NEOP	—————	—————	Cytochrome P450 (Hodotermopsis sjoestedti)
<input type="checkbox"/> G1FCC4	G1FCC4_BEMTA	—————	—————	Cytochrome P450 (Bemisia tabaci)
<input type="checkbox"/> D2A0A1	D2A0A1_TRICA	—————	—————	Cytochrome P450 6BQ5 (Tribolium castaneum)
<input type="checkbox"/> K4K2T0	K4K2T0_9HEMI	—————	—————	Cytochrome P450 CYP6AY3v2 (Laodelphax striatella)
<input type="checkbox"/> K7J4D7	K7J4D7_NASVI	—————	—————	Uncharacterized protein (Nasonia vitripennis)

用MEGA软件构建系统发育树



致谢

感谢罗老师半年来的谆谆教导！

感谢小组成员的互帮互助，通力合作！

Thanks!

欢迎大家批评指正!