基于杆状病毒表达系统的烟粉虱CYP4C64体外表达条件优化及其对呋虫胺的代谢活性

程文涵 陆汉唐 张友军 杨 鑫*

（蔬菜生物育种全国重点实验室，中国农业科学院蔬菜花卉研究所，北京 100081）

摘要：为解决烟粉虱*Bemisia tabaci*细胞色素P450（简称P450）体外异源表达不稳定、重复性差的问题，以*CYP4C64*为模型基因，基于杆状病毒表达系统对其体外表达条件进行优化，并进一步对其进行体外代谢检测及种群水平功能验证。结果表明：P450与细胞色素P450还原酶（cytochrome P450 reductase，CPR）共表达时存在最适比例50∶1，CPR表达过高或不足均会显著降低功能性P450的形成效率；同时，P450活性表达具有明显的时间依赖性，在转染粉纹夜蛾*Trichoplusia ni* H5细胞系后约44 h达到峰值，随后迅速下降。基于此，通过CPR比例优化和表达时间窗口构建P450体外表达体系。该表达体系可获得具有稳定催化活性的功能性CYP4C64蛋白，能够催化呋虫胺发生N-脱甲基反应生成低毒代谢物呋虫胺脲。同时，*CYP4C64*在烟粉虱抗性种群中显著高表达，RNA干扰降低其表达后显著提高了烟粉虱对呋虫胺的敏感性，而在转基因黑腹果蝇*Drosophila melanogaster*中过表达*CYP4C64*则显著增强了其对呋虫胺的耐受性。表明本研究所建烟粉虱CYP4C64体外表达体系具有较好的可重复性，可用于烟粉虱相关代谢机制研究。

关键词：昆虫P450；杆状病毒表达系统；体外表达；烟粉虱；新烟碱类杀虫剂

Optimization of tobacco whitefly *Bemisia tabaci* CYP4C64 expression condition using a baculovirus expression system and its metabolic activity toward dinotefuran

Cheng Wenhan Lu Hantang Zhang Youjun Yang Xin*

（Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences; State Key Laboratory of Vegetable Biobreeding, Beijing 100081, China）

Abstract: To address the instability and poor reproducibility of heterologous *in vitro* expression of cytochrome P450 (P450) from tobacco whitefly *Bemisia tabaci*, *CYP4C64* was selected as a model gene and its *in vitro* expression conditions was systematically optimized using a baculovirus expression system. Its metabolic activity was subsequently evaluated *in vitro*, and its function was further validated at the population level. The results showed that co-expression of P450 with cytochrome P450 reductase (CPR) required an optimal P450 ratio of 50∶1. Both excessive and insufficient CPR expression significantly reduced the efficiency of functional P450 formation. In addition, P450 activity exhibited a pronounced time-dependent pattern, reaching a peak approximately 44 h after transfection of *Trichoplusia ni* H5 cells, followed by a rapid decline. An *in vitro* P450 expression system was established by optimizing the CPR ratio and expression time window. This system produced functional CYP4C64 protein with stable catalytic activity and catalyzed the *N*-demethylation of dinotefuran to generate the less toxic metabolite dinotefuran-urea. Furthermore, *CYP4C64* was significantly overexpressed in resistant populations of *B.*

基金项目：国家重点研发计划−政府间国际科技创新合作项目（2025YFE0114900）

* 通信作者（Author for correspondence），E-mail：yangxin@caas.cn

收稿日期：2026-05-24

tabaci. RNA interference-mediated knockdown of *CYP4C64* significantly increased the susceptibility of *B. tabaci* to dinotefuran, whereas overexpression of *CYP4C64* in transgenic *Drosophila melanogaster* significantly enhanced tolerance to dinotefuran. These findings collectively validate the role of CYP4C64 at both the metabolic-function and resistance-phenotype levels. These results indicate that the *B. tabaci* CYP4C64 *in vitro* expression system established in this study has good reproducibility and can be used for studies of metabolic mechanisms in *B. tabaci*.

Key words: insect cytochrome P450; baculovirus expression system; *in vitro* expression; *Bemisia tabaci*; neonicotinoid insecticides

烟粉虱*Bemisia tabaci*是一类由30多个隐种组成的重要农业害虫复合体(罗晨,2016),其主要通过刺吸韧皮部取食汁液损伤植物,同时能传播番茄黄化曲叶病毒(tomato yellow leaf curl virus,TYLCV)等多种植物病毒,并通过分泌蜜露诱发煤污病,严重影响作物产量和品质(胡明鑫等,2023)。目前,化学防治仍是烟粉虱防控的主要措施,但长期、高频率施用杀虫剂导致其抗药性问题日益突出,并已成为影响防治效果的重要因素(刘佰明等,2016)。在已报道的多种抗药性机制中,由细胞色素P450(简称P450)介导的代谢抗性被认为是最主要的机制之一(陈澄宇等,2016)。P450是生物体内规模最大且功能最多样的一类酶超家族之一,广泛参与内源性代谢物及外源性化合物的生物转化过程(Feyereisen,2005)。在昆虫中,P450不仅参与植物次生代谢物的解毒,还在多种杀虫剂抗性形成过程中发挥着关键作用,尤其在对新烟碱类杀虫剂的代谢中发挥了重要作用(Nauen et al.,2022)。昆虫P450基因表达水平上调或催化功能增强,是其对杀虫剂产生抗性的主要分子机制之一(Li et al.,2007)。其中,P450家族成员对多种杀虫剂具有代谢能力,并与昆虫抗药性进化密切相关(Dermauw et al.,2020;Bass & Nauen,2023;尹飞等,2023)。在众多P450家族中,CYP4家族成员已被证实参与对新烟碱类、拟除虫菊酯类等多种农药的代谢过程(Feyereisen,2012;Xie et al.,2018)。

随着基因组学和转录组学技术的发展,越来越多的昆虫P450基因被鉴定(Zhang et al.,2018)。然而仅依赖氨基酸序列信息难以准确预测其代谢功能,体外功能表达仍是解析P450催化特性的关键手段。目前,常用的表达体系包括大肠杆菌*Escherichia coli*、酵母及昆虫细胞表达系统。其中,基于杆状病毒的Bac-to-Bac表达系统用于Sf9、High Five等昆虫细胞时具有较强的真核表达能力,更有利于膜结合型P450蛋白的正确折叠与功能维持,因此被认为是获得功能性P450蛋白的主要平台(Emery,1992;Karunker et al.,2009;Bass et al.,2013)。P450作为典型的膜结合蛋白,其催化功能依赖于细胞色素P450还原酶(cytochrome P450 reductase,CPR)提供电子,其翻译、折叠以及形成具有活性构象的过程都高度复杂(Guengerich,2004)。在实际表达过程中,即使在相似条件下,不同P450蛋白或同一蛋白在不同批次中常表现出明显差异:部分蛋白可形成具有特征性450 nm吸收峰的功能状态,而部分则转变为420 nm特异性吸收峰的失活形式(Munro et al.,2007)。此外,CPR共表达效率、蛋白稳定性及体系条件等因素均可能影响P450的功能形成(Guengerich,2008;Murataliev et al.,2008)。这表明除感染复数、细胞密度等传统优化参数(Bernal et al.,2009;Cronin,2023)外,P450表达体系中可能存在尚未被解析的关键调控因素。

在P450催化体系中,CPR不仅作为电子供体参与催化循环过程,还可能在蛋白构象稳定及功能维持过程中发挥着重要作用。然而,目前关于CPR与P450之间关系的研究多集中于酶动力学和电子传递效率层面,对其在表达过程中是否由于比例不同导致调控P450的功能状态有所差异,仍缺乏系统认识(Guengerich,2008;Murataliev et al.,2004)。特别是CPR与P450之间是否存在一个影响蛋白功能形成的最优比例区间,以及表达体系在时间维度上是否存在功能状态转折点,尚未得到全面解析。基于上述问题,本研究以烟粉虱*CYP4C64*基因为对象,通过基因克隆、表达分析、RNA干扰试验及体外表达体系构建,系统评估其在烟粉虱对呋虫胺抗性形成中的作用;同时,利用Bac-to-Bac杆状病毒表达系统构建CYP4C64体外表达体系,通过调控与CPR共表达比例和表达时间来探究体外表达体系中CYP4C64功能状态的可调节性,以期揭示P450功能形成过程中潜在的调控规律,为理解昆虫P450在抗药性中的作用机制提供新的视角,

也为构建稳定、可重复的P450体外表达体系提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试昆虫：供试烟粉虱包括4个品系，其中敏感品系$S^{\#1}$于2011年8月采集自浙江省杭州市番茄田，敏感品系$S^{\#2}$于2021年7月采集自广西壮族自治区南宁市茄子田；抗性品系$R^{\#1}$于2023年3月采集自湖南省岳阳市辣椒田，抗性品系$R^{\#2}$于2023年4月采集自海南省三亚市茄子田，4个品系经鉴定均为地中海（Mediterranean，MED）隐种，在中国农业科学蔬菜花卉研究所实验室内以棉花为寄主植物，在室内温度25 ℃、相对湿度70%、光周期14 L∶10 D条件下饲养建立种群，每隔1月采用2.0 mmol/L呋虫胺灌根棉花汰选上述抗性种群，以保持其抗性水平。4个品系均取成虫（雌雄随机）供试。供试黑腹果蝇*Drosophila melanogaster*由启东芳景生物科技有限公司提供，包括两种具有相同w^{1118}遗传背景的转基因品系，一种是*Tub-GAL4*/$^{+}$品系（基因型为w^{1118}；P[αTub84B-GAL4]attP2/TM6B，简称G品系），另一种是*UAS-CYP4C64*/$^{+}$品系（基因型为w^{1118}；P[UAS-CYP4C64]attP40/CyO，简称U品系）。

供试细胞系、载体及抗体：草地贪夜蛾*Spodoptera frugiperda* Sf9细胞系、粉纹夜蛾*Trichoplusia ni* High Five（H5）细胞系，美国Invitrogen公司。载体pFast-Bac 1，北京擎科生物科技有限公司；杆状病毒DNA，北京索莱宝科技有限公司。CYP4C64抗体参照Yang et al.（2021）方法，在武汉普健生物科技有限公司定制，抗原结合位点为NKRIQLVRTMN；*β*-actin抗体，美国Invitrogen公司。

供试培养基：LB（Luria-Bertani）液体培养基成分为胰蛋白胨10 g/L、酵母提取物5 g/L和氯化钠10 g/L；LB固体培养基即在LB液体培养基中添加琼脂粉15 g/L。

试剂和仪器：TRIzol试剂、酵母提取物、Super-Signal™ West Pico PLUS化学发光底物、乙二胺四乙酸（ethylenediaminetetraacetic acid，EDTA）、甲酸，美国Thermo Fisher公司；PrimeScript RT试剂盒，日本TaKaRa公司；Power SYBR Green PCR Master Mix，北京康润诚业生物科技有限公司；T7 RiboMax™ Expression RNAi System、Fugene转染试剂、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（nicotinamide adenine dinucleotide phosphate，NADPH）再生系统，美国Promega公司；十二烷基硫酸钠–聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE）上样缓冲液、一抗（兔源多克隆抗体）、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗，江苏康为世纪生物科技股份有限公司；pEASY®-Blunt Cloning Kit Blunt基因克隆试剂盒，北京全式金生物技术有限公司；IB905昆虫细胞培养基，浙江壹生科生物技术有限公司；细胞色素P450酶总活性荧光定量检测试剂盒，深圳子科生物技术有限公司；ProteinExt哺乳动物总蛋白提取试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒、胎牛血清、苯甲基磺酰氟（phenylmethylsulfonyl fluoride，PMSF）、蛋白酶抑制剂混合物、Western一抗稀释液、Western二抗稀释液，上海碧云天生物技术有限公司；4%~20%梯度预制胶，北京兰博利德商贸有限公司；聚偏二氟乙烯（polyvinylidene difluoride，PVD）膜，德国Merck Millipore公司；Clon Express Ultra一步克隆试剂盒，南京诺唯赞生物科技股份有限公司；大肠杆菌DH10Bac感受态细胞、二硫苏糖醇（1，4-dithio-DL-threitol，DTT），北京索莱宝科技有限公司；2×ES *Taq* Master Mix（Dye）、无内毒素质粒小提中量试剂盒，北京天根生化科技有限公司；BacPAK™杆状病毒快速滴度试剂盒，美国TaKaRa Bio公司；连二亚硫酸钠，德国默克集团；增强型绿色荧光蛋白（enhanced green fluorescent protein，EGFP）DNA，北京擎科生物科技有限公司；其余试剂均为国产分析纯。QuantStudio 1实时荧光定量PCR仪、NanoDrop 2000c超微量分光光度计、Countess™ 3自动细胞计数器，美国Thermo Fisher公司；Tanon-5200成像系统，上海天能科技有限公司；SCIENTZ-650J集成式超声波细胞粉碎机，宁波新芝生物科技股份有限公司；Acquity UPLC I-Class/Xevo TQ-S Micro超高效液相色谱–串联质谱（ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry）联用系统、Atlantis T3色谱柱，美国Waters公司；DM IL LED倒置显微镜，德国海德堡Leica公司；iMark吸收光酶标仪，美国Bio-rad公司。

供试药剂：99%呋虫胺（dinotefuran）标准品，上海源叶生物科技有限公司；98%呋虫胺脲（dinotefuran-urea）标准品，天津阿尔塔科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 供试烟粉虱品系对呋虫胺的抗性水平鉴定

为明确*CYP4C64*与烟粉虱抗呋虫胺的关联，本研究采用饲喂法对供试4个烟粉虱品系进行生物测

定。将呋虫胺标准品溶于甲醇配制成1 000 mg/L的母液，用人工饲喂液（30%蔗糖+5%酵母粉）梯度稀释6个浓度，敏感种群处理浓度分别为0.1、0.2、0.4、0.8、1.6和3.2 mg/L，抗性种群处理浓度分别为2、4、8、16、32和64 mg/L。在玻璃管一端制作双层Parafilm药膜夹层，在每管的夹层中加入药液60 μL，每管接入20~25头5~10日龄雌雄混合成虫，另一端封膜并扎孔透气。置于温度25 ℃、相对湿度70%、光周期14 L∶10 D条件下饲养48 h后统计死亡情况，并计算死亡率。以不添加呋虫胺的饲喂液为空白对照，每个浓度设3次生物学重复，每个重复为4管，当对照组死亡率<10%为有效试验。采用POLO Plus 2.0软件计算致死中浓度LC_{50}及95%置信区间。以呋虫胺对敏感品系的LC_{50}建立敏感基线，计算抗性倍数（resistance ratio，RR）。*RR*=药剂对田间种群的LC_{50}/药剂对敏感品系的LC_{50}，类型并参考Zheng et al.（2021）分级标准鉴定抗性，*RR*<3为敏感，3≤*RR*≤5为敏感性下降，5<*RR*≤10为低抗，10<*RR*≤40为中抗，40<*RR*≤160为高抗，*RR*>160为超高抗。

1.2.2　*CYP4C64*基因的克隆与表达分析

取4个烟粉虱品系的成虫（雌雄随机），使用TRIzol法提取其总RNA，采用PrimeScript RT试剂盒反转录合成cDNA作为后续相关试验的模板。每个品系设置4个生物学重复，每个重复50头成虫。根据烟粉虱基因组网站（http://www.whiteflygenomics.org/cgi-bin/bta/blast.cgi）查找烟粉虱*CYP4C64*基因序列并设计特异性引物C64-F/C64-R（表1），使用上述制备的cDNA作为模板进行*CYP4C64*基因的PCR扩增。本研究所有引物均委托生工生物工程（上海）股份有限公司合成。20 μL反应体系：2×ES *Taq* Master Mix（Dye）12.5 μL、cDNA 1 μL、正反向引物各0.5 μL、RNase-free水5.5 μL。反应程序：95 ℃预变性3 min；98 ℃变性15 s，60 ℃退火30 s，68 ℃延伸2 min，循环35次；68 ℃终延伸5 min。将PCR产物经纯化后按照pEASY®-Blunt Cloning Kit Blunt基因克隆试剂盒说明书将克隆产物连接至Blunt载体，委托生工生物工程（上海）股份有限公司进行测序验证，确认扩增片段是完整准确的目标基因*CYP4C64*。

为分析*CYP4C64*在不同烟粉虱品系中的表达量，以上述制备的各品系样本的cDNA为模板，以*EF-1α*和*RPL29*作为内参基因（表1），以设计合成的qC64-F/qC64-R为引物进行实时荧光定量PCR扩增。20 μL反应体系：2×SuperReal PreMix Plus 10.0 μL、50×ROX Reference Dye 0.4 μL、cDNA 1.0 μL、正反向引物各0.6 μL、RNase-Free水7.4 μL。反应程序：95 ℃预变性10 min；95 ℃变性15 s，60 ℃退火30 s，72 ℃延伸30 s，循环40次。采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法计算目的基因的相对表达量（Yang et al.，2017）。试验均设4个生物学重复，4个技术重复。

1.2.3　CYP4C64蛋白的Western blot分析

为检测CYP4C64蛋白的表达水平，采用Western blot方法进行分析。每个烟粉虱品系取约300头成虫（雌雄随机），使用ProteinExt哺乳动物总蛋白提取试剂盒提取各样品的总蛋白，用BCA蛋白浓度测定试剂盒参照说明书对其进行定量。每个品系取2 μg蛋白加入到SDS-PAGE上样缓冲液中，100 ℃变性10 min。随后在4%~20%梯度预制胶上于160 V进行电泳分离，将蛋白转移至PVD膜上，于4 ℃孵育一抗（兔源多克隆抗体）过夜。洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗室温孵育45 min。根据SuperSignal™ West Pico PLUS化学发光底物说明书，使用Tanon-5200成像系统对孵育样品进行图像采集。以*β*-actin作为内参蛋白用于校正不同样品间CYP4C64的表达差异。Western blot使用的所有抗体在使用前均经相应抗体稀释液按体积比1∶5 000进行稀释。

1.2.4　*CYP4C64*功能验证及其与抗药性的关系分析

为验证*CYP4C64*在烟粉虱抗药性中的功能，采用RNA干扰（RNA interference，RNAi）及异源表达相结合的方法进行分析。根据*CYP4C64*基因序列设计特异性引物dsC64-F/dsC64-R（表1），利用T7 RiboMAX™ Expression RNAi System体外合成ds*CYP4C64*，以相同方法制备获得ds*EGFP*（阴性对照）。dsRNA浓度通过NanoDrop 2000c超微量分光光度计测定，于−80 ℃保存备用。采用饲喂法对供试4个烟粉虱品系进行RNAi处理，将制备好的ds*CYP4C64*和ds*EGFP*分别加入人工饲喂液（30%蔗糖+5%酵母粉）中，使其终浓度为0.8 g/mL（Upadhyay et al.，2011）。饲喂后36 h收集存活个体，进一步采用饲喂法测定其对呋虫胺的敏感性。参照1.2.1方法将呋虫胺标准品用人工饲喂液稀释至0.3 mmol/L和0.8 mmol/L。每个处理取25头存活个体置于1个开口玻璃管中，两端以封口膜密封，并在一端制作夹层加入50 μL含药饲喂液以构建刺吸式取食系统。每4个玻璃管为1个重复，每个处理3次重复。各处理装置置于避光条件下，仅保留饲料端受光以引导取食。分别于饲喂后24 h和48 h记录死亡试虫数，计算各处理试虫死亡率。

表1 本研究中使用的引物

Table 1 Primers used in this study

用途 Usage	基因 Gene	引物名称 Primer name	引物序列(5′−3′) Primer sequence (5′−3′)	产物 Product/bp	熔解温度 Melting temperature/℃
基因克隆 Gene cloning	*CYP4C64*	C64-F	TTTCTCGGGGTCAGCCTTGC	1 533	62
		C64-R	CTAAAATAGTAGGTAAAGTAATCGC		63
	BtCPR	CPR-F	ATGAAATACCTGCTGCCGACCG	2 048	61
		CPR-R	GCTTGACTGTCTGTCATGTTACCT		59
qPCR	*CYP4C64*	qC64-F	TCGGATTACGTCAGAGCTATTTAC	138	62
		qC64-R	GTGGAGCACGCTTAGACA		63
	EF-1α	EF-F	TAGCCTTGTGCCAATTTCCG	110	60
		EF-R	CCTTCAGCATTACCGTCC		60
	RPL29	RP-F	TCGGAAAATTACCGTGAG	144	60
		RP-R	GAACTTGTGATCTACTCCTCTCGTG		60
	RPL11	RP11-F	GTATTCGCCGTAACGAGAAGAT	146	60
		RP11-R	GATGCCGAAACCGAAGTTGC		62
RNA干扰 RNAi	*CYP4C64*	dsC64-F	TAATACGACTCACTATAGGGAGAATTTGTGAGACCGCTATGGG	421	57
		dsC64-R	TAATACGACTCACTATAGGGAGATGGTTGTATCGTGTCCCTCA		56
	EGFP	dsEGFP-F	TAATACGACTCACTATAGGGAGACAGTGCTTCAGCCGCTAC	288	57
		dsEGFP-R	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTTCACCTTGATGCCGTTC		57

为进一步验证*CYP4C64*的功能，本研究构建了高表达*CYP4C64*的转基因黑腹果蝇表达体系。将黑腹果蝇G品系的雌蝇与黑腹果蝇U品系的雄蝇进行杂交，获得子代即为G×U杂交品系，其基因型为*UAS-CYP4C64*/*Tub-GAL4*。在该品系中，*Tub-GAL4*驱动子能够识别并结合UAS序列，从而启动*CYP4C64*的转录与翻译，实现该基因在黑腹果蝇体内的持续高表达。分别参照1.2.1中实时荧光定量PCR扩增方法和1.2.3中Western blot技术，以*RPL11*（表1）作为内参基因（MacKay et al.，2012），对G×U杂交品系中*CYP4C64*的mRNA及蛋白表达水平进行定量检测，以确保过表达效果满足后续功能分析的要求。另外，采用饲喂法检测黑腹果蝇G品系、U品系和G×U杂交品系在0.4 mmol/L和1.0 mmol/L呋虫胺处理下暴露48 h后的死亡数量，计算死亡率，方法同上。通过比较3个黑腹果蝇品系的死亡率，评估*CYP4C64*在黑腹果蝇抗呋虫胺中的作用。

1.2.5 重组杆状病毒的构建

将1.2.2获得的*CYP4C64*序列克隆至杆状病毒表达载体pFast-Bac HTA中，构建重组转移载体pFast-Bac HTA-CYP4C64，并经测序验证插入序列正确。随后将重组质粒转化至大肠杆菌DH10Bac感受态细胞中进行培养。大肠杆菌DH10Bac感受态细胞内含有杆状病毒穿梭载体Bacmid及辅助质粒Helper，在辅助质粒编码的Tn7转座酶作用下，目的基因表达盒由pFast-Bac HTA载体转座至Bacmid基因组的特异位点，从而获得含有*CYP4C64*基因的重组Bacmid（Luckow et al.，1993）。

将含有*CYP4C64*基因的重组Bacmid菌液涂布于含1%氨苄西林的LB固体培养基上，37 ℃培养48 h。挑取阳性单克隆接种于LB液体培养基中，37 ℃、220 r/min振荡培养过夜后，对目的基因插入情况进行PCR验证。反应体系及程序同1.2.2。对鉴定正确的重组Bacmid，采用无内毒素质粒小提中量试剂盒提取其DNA，检测其浓度及纯度后，获得用于后续昆虫细胞转染及重组蛋白表达的质粒。

1.2.6 重组杆状病毒的Sf9细胞转染与扩增

为获得高滴度的病毒储存液，用Fugene转染试剂进行病毒的Sf9细胞转染与扩增。按照Fugene转染试剂说明书配制溶液A（8 μL细胞转染试剂+100 μL IB905昆虫细胞培养基）和溶液B（2 μg质粒+100 μL IB905昆虫细胞培养基），静置15 min后，将两者十字混匀后于27 ℃孵育15 min。转染前需确认Sf9细胞处于对数生长期且存活率高于95%。使用自动细胞计数器将Sf9细胞稀释至2×10^6个/mL，六孔板中每孔加入3 mL细胞液，静置15 min贴壁培养。然后在每孔中轻柔滴入200 μL溶液A、B的混合液，十字混匀后用医用胶布封口。在27 ℃下孵育

至少72 h，此步骤可延长至120 h以提高病毒产量。

每天使用放大倍数为250~400的显微镜检查细胞是否有病毒感染迹象。感染迹象包括细胞直径增加25%~50%、从底部脱落、形态改变及细胞裂解。培养后收集细胞，以500 *g*离心10 min，收集上清病毒储存液，加入1/3体积的胎牛血清获得重组零号病毒储存液（P0）。取10 mL浓度稀释至2×10^6个/mL的Sf9细胞置于125 mL锥形瓶中（细胞总数为2×10^7个），以体积比20∶1用P0代病毒储存液转染Sf9细胞。在27 ℃、135 r/min条件下孵育72 h，取培养液以500 *g*离心10 min，收集上清病毒储存液，加入1/3体积的胎牛血清获得一号病毒储存液（P1）。重复操作此步骤，获得二号病毒储存液（P2）和三号病毒储存液（P3）。使用BacPAK™杆状病毒快速滴度试剂盒测定P3储存液的杆状病毒滴度，以每毫升中感染灶形成单位（infectious focus unit，IFU）来表征。病毒滴度=每孔平均感染数/稀释倍数×40，其中稀释倍数的取值范围为10^{-4}~10^{-6}。

1.2.7　*重组杆状病毒的H5细胞转染及蛋白活性检测*

为优化电子传递系统，本研究引入CPR平衡点概念，通过设置不同CYP4C64和CPR体积比，比较两者比例对CYP4C64表达的影响，以确定适宜的CPR供给水平。按照1.2.2方法克隆得到烟粉虱*CPR*基因序列，所使用特异性引物为CPR-F/CPR-R（表1）（He et al.，2020）。采用1.2.6方法得到CPR的P3代病毒储存液来进行体外共表达，将含目标基因*CYP4C64*与*CPR*的P3代病毒液按不同比例共同转染H5细胞，分别将两者按照体积比2∶1、10∶1和50∶1进行混配，即在10 mL含*CYP4C64*的P3代病毒储存液中分别加入5.0、1.0、0.2 mL含*CPR*的P3代病毒储存液。将H5细胞在27 ℃、135 r/min条件下悬浮培养，转染前需确保其处于对数生长期，存活率高于95%，且传代次数控制在5~20代。取100 mL浓度稀释至2×10^6个/mL的H5细胞置于250 mL锥形瓶中（细胞总数为2×10^8个）。将含不同比例*CYP4C64*和*CPR*的P3代病毒混合液分别加入到装有H5细胞的250 mL锥形瓶中，同时加入终浓度均为4 mmol/L的5-氨基乙酰丙酸盐酸盐与柠檬酸亚铁，辅助CYP4C64蛋白表达。在整个培养过程中，控制H5细胞密度不超过8×10^6个/mL。自转染后24 h起每4 h取样1次，监测CYP4C64蛋白的表达水平，测定方法同1.2.3。初步筛选发现蛋白表达峰值出现在转染44 h左右，因此进一步选择40、42、44、46、48和56 h作为取样时间进行精细分析，以确定最佳收获时间。将转染后不同培养时间收集的H5细胞，在4 ℃下以500 *g*离心10 min，回收细胞沉淀。用20 mL 0.1 mol/L PBS（pH 7.4）洗涤所得沉淀，4 ℃下以500 *g*离心10 min，弃上清液。重复操作此过程两次。将获得的细胞样品经液氮速冻后于−80 ℃保存备用。同时按照上述方法制备空载病毒转染的H5细胞备用。

使用0.1 mol/L PBS配制PBS缓冲液（PBS 315.6 mL、20%甘油80 mL、1% DTT 0.4 mL、1 mmol/L EDTA 4 mL及20 mmol/L Tris 0.969 g）。将上述回收的含CYP4C64蛋白的H5细胞沉淀于2 mL蔗糖缓冲液A（0.1 mol/L PBS缓冲液315.6 mL、蔗糖68.46 g）中重悬，采用集成式超声波细胞粉碎机于100 W、4 s开/6 s关条件下持续破碎3 min，加入2 mL氯化钠缓冲液B（0.1 mol/L PBS缓冲液315.6 mL、NaCl 3.5 g）继续进行破碎，以提高膜蛋白释放效率。两种缓冲液在使用前需加入1 mmol/L PMSF和1%蛋白酶抑制剂混合物，以防止蛋白降解。将破碎后的细胞裂解液于4 ℃以1 200 *g*离心10 min，去除未破碎细胞及大颗粒碎片，收集上清液。将上清液于4 ℃下以12 000 *g*离心20 min，收集上清液，该部分富含CYP4C64微粒体组分。CYP4C64蛋白的表达量及构象状态通过还原CO差光谱法测定（Guengerich et al.，2009）。用0.1 mol/L PBS将所得富含CYP4C64的上清液稀释5倍，加入保险粉连二亚硫酸钠至1 mg/mL，通入CO气体，在分光光度计下记录450 nm与490 nm波长处的吸收差值。当450 nm处出现特征吸收峰时，表明CYP4C64蛋白处于活性构象；而420 nm吸收峰则对应失活形式。CYP4C64蛋白浓度根据Omura & Sato（1964）方法进行计算，并参考相关改进方法进行数据处理（Shi et al.，2023）。以空载病毒转染的H5细胞沉淀作为阴性对照。所得CYP4C64蛋白样品经液氮速冻后于−80 ℃保存，用于后续分析。

1.2.8　*CYP4C64活性鉴定及代谢功能验证*

为评估1.2.7所得CYP4C64蛋白样品的活性，参照1.2.3方法对其进行定量分析，并使用细胞色素P450酶总活性荧光定量检测试剂盒测定其活性。即将7-乙氧基香豆素-O-脱乙基酶（7-ethoxycoumarin O-deethylase，ECOD）反应体系（50 mmol/L Tris-HCl缓冲液、NADPH再生系统、底物7-乙氧基香豆素、20 μL蛋白样品）于37 ℃避光孵育30 min后加入终止液终止反应，并添加信号增强试剂后通过荧光法检测CYP4C64蛋白的活性。以PBS替代蛋白样

品的反应体系作为空白对照。使用酶标仪在激发波长368 nm、发射波长456 nm处测定产物7-羟基香豆素的生成量，评估CYP4C64蛋白的活性。另外，为明确CYP4C64对呋虫胺的催化效率，分别以0、10、20、30、40、50 μmol/L浓度的呋虫胺为底物，使用细胞色素P450酶总活性荧光定量试剂盒测定其催化反应速率v，采用米氏动力学方程拟合底物浓度与反应速率v之间的关系，v表示每皮摩尔蛋白质每分钟催化生成的7-羟基香豆素的皮摩尔数（pmol·min^{-1}·pmol$_{P450}^{-1}$）。$v=\frac{v_{max}[S]}{K_m+[S]}$，$K_{cat}=v_{max}/E_T$，式中，$v_{max}$为最大反应速率，[$S$]为底物7-乙氧基香豆素的浓度，$K_m$为米氏常数，$K_{cat}$为催化常数，$E_T$为总活性酶浓度。

体外代谢试验参照Shi et al.（2018）方法进行，并略有修改。整个反应体系包含约50 pmol重组CYP4C64蛋白、NADPH再生系统（10 μL反应液A+2 μL反应液B）及1 μL呋虫胺标准品，混合后以1 200 r/min涡旋1 h，随后加入800 μL 80%甲醇并继续涡旋15 min。之后以20 000 g离心20 min，取上清液经0.22 μm注射器滤膜过滤后转移至超高效液相色谱样品瓶中，备用。参照Xue et al.（2023）方法，使用Acquity UPLC I-Class/Xevo TQ-S Micro UPLC-MS/MS联用系统进行检测，配备Atlantis T3色谱柱（填充物粒剂3 μm，直径2.1 mm×长50 mm）。检测条件：流动相A（80%甲醇）和流动相B（200 mL超纯水、77 mg乙酸铵、200 μL甲酸），流速0.2 mL/min，进样量1 μL。梯度洗脱程序：20%流相A保持5 min，随后在10 min内升至95%流相A，之后恢复至20%流相A并保持3 min，再在0.5 min内由95%降至20%流相A，柱平衡6.5 min。柱温30 ℃，自动进样器温度4 ℃。选择呋虫胺脲作为呋虫胺的靶向代谢物进行UPLC-MS/MS分析（Casida，2011）。将CYP4C64介导的新烟碱类底物代谢产生的产物峰与呋虫胺脲标准品的峰进行比较，以确认其具体类型。通过参考同一批次样品中纯代谢物标准品绘制的标准曲线实现定量分析。基于计算得到的浓度，确定新烟碱类代谢物与母体新烟碱类化合物的比例。以未添加NADPH的含CYP4C64微粒体孵育组作为对照组。

为验证体内生理条件下烟粉虱CYP4C64对呋虫胺的代谢功能，本研究对饲喂ds*CYP4C64*与ds*EGFP*烟粉虱分泌蜜露中的呋虫胺脲进行定量检测。在一根管底为塑料材质、覆盖锡箔纸垂直放置的玻璃管中放入10头雄成虫、40头雌成虫，待其分泌蜜露后，用500 μL 80%甲醇冲洗锡箔纸以收集蜜露。ds*CYP4C64*与ds*EGFP*处理至少6个生物学重复，每个重复1管。将收集的蜜露甲醇液以12 000 r/min离心5 min，取上清液经0.22 μm注射器滤膜过滤后转移至超高效液相色谱样品瓶中，采用UPLC-MS/MS方法进行呋虫胺脲的定量检测，方法同上。

1.3 数据分析

试验数据使用Origin 2024软件进行处理和方差分析，采用Tukey's HSD法进行成对比较间的差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 供试烟粉虱品系对呋虫胺的抗性水平

抗性测定结果显示，呋虫胺对烟粉虱杭州品系、南宁品系、岳阳品系、三亚品系的LC_{50}分别为0.54、0.22、17.38和11.92 mg/L，其中南宁品系对呋虫胺最敏感，因此以其为基准计算其他3个品系对呋虫胺的抗性倍数，杭州品系、岳阳品系、三亚品系对呋虫胺的抗性倍数分别为2.45倍、79.00倍和54.18倍（表2），表明南宁品系和杭州品系为敏感品系，岳阳品系和三亚品系为高抗品系。

表2 烟粉虱供试品系对呋虫胺的抗性倍数

Table 2 Resistance ratios of *Bemisia tabaci* strains to dinotefuran

品系 Strain	试虫数 No. of tested	斜率±标准误 Slope±SE	LC_{50}（95%置信限） LC_{50} (95% confidence interval)/(mg/L)	χ^2	抗性倍数 Resistance ratio
杭州品系 Hangzhou strain ($S^{\#1}$)	351	1.93±0.35	0.54(0.20-1.08)	1.44	2.45
南宁品系 Nanning strain ($S^{\#2}$)	343	1.33±0.29	0.22(0.15-0.37)	1.20	1.00
岳阳品系 Yueyang strain ($R^{\#1}$)	333	1.23±0.11	17.38(11.66-26.81)	1.24	79.00
三亚品系 Sanya strain ($R^{\#2}$)	454	1.56±0.13	11.92(6.94-19.01)	1.22	54.18

2.2 *CYP4C64*在呋虫胺抗性烟粉虱品系中上调表达

与2个敏感品系相比，2个抗性品系中*CYP4C64*的mRNA相对表达量均极显著上调（P<0.001），上调倍数达6~7倍（图1-A）。Western blot检测结果与

转录水平检测结果一致，抗性品系中CYP4C64蛋白的表达量高于敏感品系，内参β-actin的表达量则无明显差异（图1-B）。这表明*CYP4C64*的高表达与烟粉虱对呋虫胺的高水平抗性显著相关。

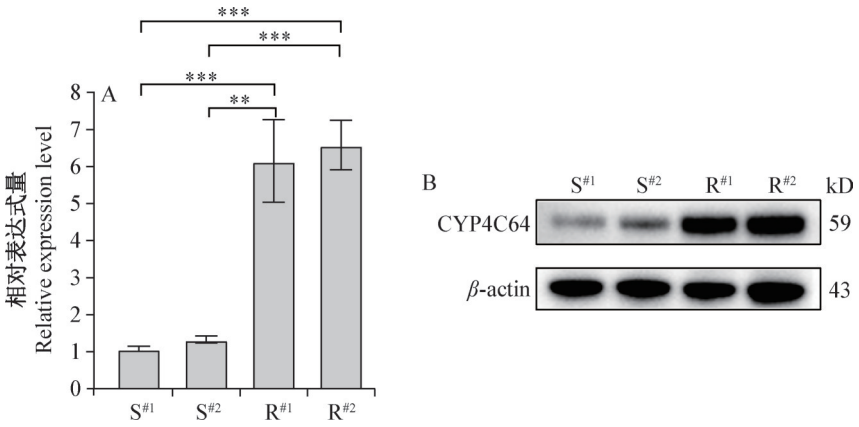


图1　烟粉虱敏感品系$S^{\#1}$、$S^{\#2}$和抗性品系$R^{\#1}$、$R^{\#2}$中*CYP4C64*基因的相对表达量（A）及其编码蛋白的Western blot检测（B）

Fig. 1　Relative expression levels of the *CYP4C64* (A) and Western blot analysis of the encoded protein (B) in susceptible ($S^{\#1}$, $S^{\#2}$) and resistant ($R^{\#1}$, $R^{\#2}$) strains of *Bemisia tabaci*

图中数据为平均数±标准误。**和***分别表示两个处理间经Tukey's HSD法检验差异显著（P<0.01和P<0.001）。Data are mean±SE. ** and *** indicate significant differences according to Tukey's HSD test (P<0.01 and P<0.001, respectively).

2.3　沉默*CYP4C64*显著降低了烟粉虱对呋虫胺的抗性

在无药剂处理条件下，饲喂ds*CYP4C64*与ds*EGFP*的烟粉虱24 h和48 h时的死亡率均无显著差异；而在0.3 mmol/L和0.8 mmol/L呋虫胺处理下，饲喂ds*CYP4C64*的烟粉虱死亡率极显著高于饲喂ds*EGFP*的对照组，且随药剂浓度升高和处理时间延长，两组间的死亡率差异更明显（图2-A）。表明沉默*CYP4C64*可显著降低烟粉虱对呋虫胺的解毒能力，显著恢复其对药剂的敏感性。

2.4　过表达*CYP4C64*黑腹果蝇对呋虫胺的敏感性

检测结果显示，过表达*CYP4C64*的黑腹果蝇G×U品系中*CYP4C64*的mRNA水平和其编码蛋白的表达量均极显著高于G品系和U品系（P<0.001）（图2-B），表明成功构建了过表达*CYP4C64*的转基因黑腹果蝇品系。生测结果显示，在0.4 mmol/L呋虫胺处理下，过表达*CYP4C64*的黑腹果蝇G×U品系死亡率仅为17.92%，较G品系对照死亡率显著下降了76.3%（P<0.01），较U品系对照死亡率显著下降了73.2%（P<0.001）；在1.0 mmol/L呋虫胺处理下，过表达*CYP4C64*的黑腹果蝇G×U品系死亡率为49.88%，较G品系对照死亡率显著下降了49.2%（P<0.001），较U品系对照死亡率显著下降了37.1%（P<0.01，图2-C）。该结果从功能获得层面证实*CYP4C64*过表达可直接赋予昆虫对呋虫胺的抗性。

2.5　杆状病毒体外表达体系优化与CYP4C64活性鉴定

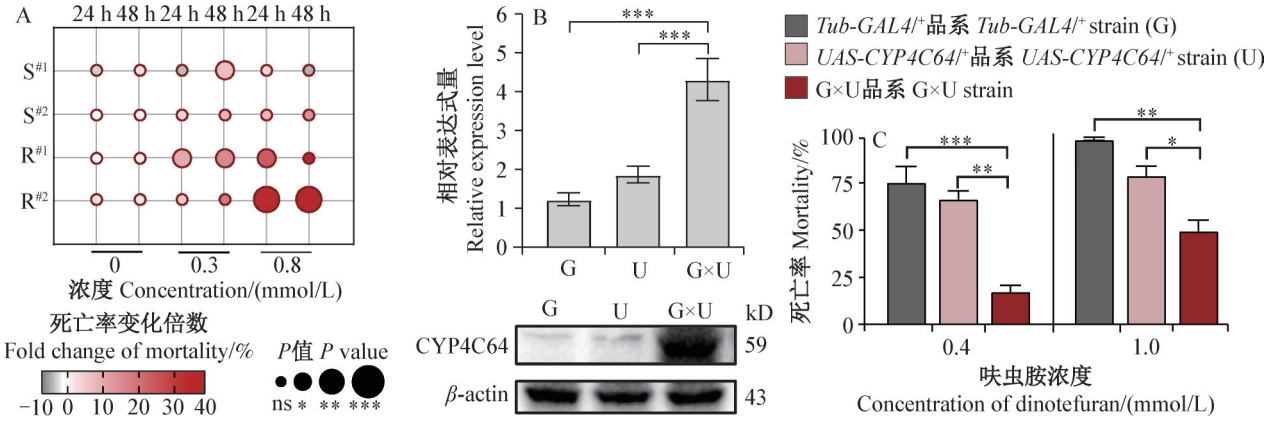
本研究成功构建了携带烟粉虱*CYP4C64*和*CPR*基因的重组杆状病毒，并获得P3代高滴度病毒储存液。将携带*CYP4C64*的P3代杆状病毒液与携带*CPR*的P3代杆状病毒液分别按体积比2∶1、10∶1和50∶1共同转染H5细胞，提取微粒体后通过CO差光谱检测其活性，当转染比例为2∶1和10∶1时，450 nm处无明显的P450特征吸收峰；当转染比例提升至50∶1时，450 nm处出现典型且强烈的P450特征吸收峰，表明在该比例下CYP4C64的表达量及活性构象最高（图3-A）。

基于最优共转染比例，检测转染40、42、44、46、48、56 h共6个时间梯度CYP4C64的表达情况，发现在转染后40~44 h，450 nm处的特征峰信号随时间延长逐渐增强，44 h时达到峰值；46 h后特征峰信号逐渐减弱，56 h时已无明显特征峰（图3-B）。

综上，确定CYP4C64在杆状病毒–昆虫细胞表达体系中的最优表达条件：CYP4C64与CPR病毒体积比为50∶1，在27 ℃下转染H5细胞44 h时可获得具有典型P450活性构象的高活性重组CYP4C64蛋白，为后续体外代谢功能研究提供了材料基础。

2.6　重组CYP4C64的活性鉴定与酶动力学分析

Western Blot检测结果显示，重组CYP4C64载体转染H5细胞组在59 kD处出现清晰的特异性蛋白条带，与CYP4C64的预期分子量一致，而空载病毒转染H5细胞对照组无对应条带；内参β-actin在两组中表达稳定，证实CYP4C64在H5昆虫细胞中实现了高效异源表达（图4-A）。



A：饲喂 ds*CYP4C64* 或 ds*EGFP*（对照）后，烟粉虱敏感品系（$S^{\#1}$、$S^{\#2}$）与抗性品系（$R^{\#1}$、$R^{\#2}$）在空白对照、0.3 mmol/L 和 0.8 mmol/L 呋虫胺处理下 24 h 与 48 h 的死亡率热图。B：上图为转基因黑腹果蝇中 *CYP4C64* 的 mRNA 相对表达量检测（n=6），下图为 CYP4C64 蛋白的 Western blot 检测，β-actin 为内参。C：GAL4-UAS 系统介导的过表达 *CYP4C64* 黑腹果蝇对 0.4、1.0 mmol/L 呋虫胺的敏感性检测（n=3）。A: Heatmaps showing the mortality of susceptible ($S^{\#1}$, $S^{\#2}$) and resistant ($R^{\#1}$, $R^{\#2}$) strains of *Bemisia tabaci* at 24 h and 48 h after treatment with dinotefuran (0, 0.3, and 0.8 mmol/ L) following feeding with ds*CYP4C64* or ds*EGFP* (control). B: The upper panel shows the relative mRNA expression level of *CYP4C64* (n=6), and the lower panel shows Western blot of CYP4C64 protein expression, with β-actin used as the internal reference. C: Susceptibility of GAL4/UAS-mediated *CYP4C64*-overexpressing transgenic *D. melanogaster* to dinotefuran at 0.4 and 1.0 mmol/L (n=3).

图2 *CYP4C64* 介导呋虫胺抗性的体内功能验证

Fig. 2 *In vivo* functional validation of *CYP4C64*-mediated dinotefuran resistance

图中数据为平均数±标准误。*、**和***分别表示两个处理间经 Tukey's HSD 法检验差异显著（P<0.05、P<0.01 和 P<0.001），ns 表示无显著差异。Data are mean±SE. *, *** and *** indicate significant differences according to Tukey's HSD test (P<0.05, P<0.01 and P<0.001, respectively), ns indicates no significant difference.

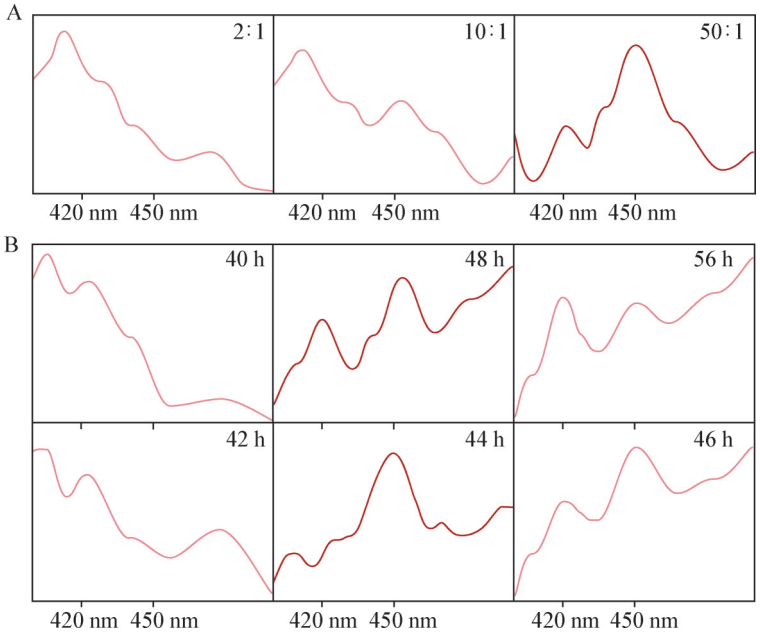


图3 在P450与细胞色素P450还原酶不同转染比例下（A）和不同表达时间下（B）重组CYP4C64蛋白的CO差光谱检测结果

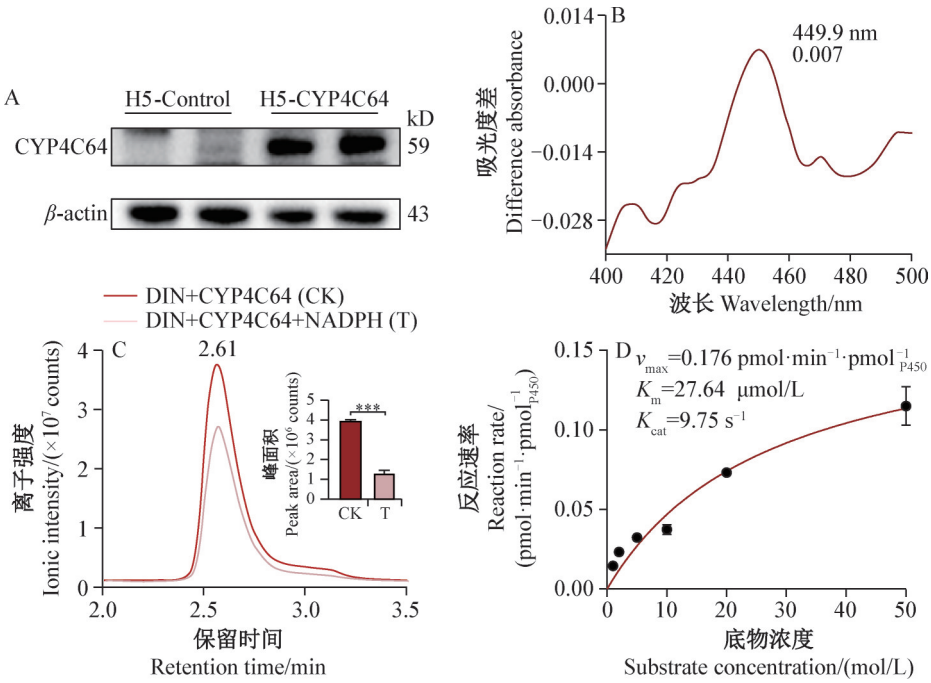
Fig. 3 CO-difference spectra of recombinant CYP4C64 produced by co-infection with P450 and cytochrome P450 reductase at different ratios (A) and different post-infection time points (B)

CO 差光谱检测结果显示，重组 CYP4C64 蛋白在 449.9 nm 处出现典型的 P450 特征吸收峰，吸光度达 0.007，420 nm 处无明显失活蛋白的吸收峰，表明重组表达的 CYP4C64 具有完整的血红素结构，无明

显变性，具备P450蛋白酶学活性，可用于后续体外代谢试验（图4-B）。

UPLC-MS/MS检测结果显示，无NADPH的对照组中，呋虫胺在2.61 min处出现强特异性呋虫胺离子峰；而加入NADPH的反应组中，呋虫胺的峰面积极显著降低了66.7%（P<0.001），表明CYP4C64对呋虫胺的降解严格依赖NADPH电子供体，可特异性催化呋虫胺的代谢反应（图4-C）。

催化反应测定结果显示，CYP4C64催化呋虫胺代谢的过程符合典型米氏动力学特征，其v_{max}为0.18 pmol·min^{-1}·pmol$^{-1}_{P450}$（95%置信区间为0.14~0.24 pmol·min^{-1}·pmol$^{-1}_{P450}$），K_m为27.64 μmol/L（95%置信区间为16.89~48.08 μmol/L），催化常数K_{cat}为9.75 s^{-1}，拟合优度R^2达到0.941，表明模型能够较好地解释试验数据（图4-D）。综合动力学参数分析，CYP4C64对吡虫胺具有较高的结合能力和一定的催化转化能力，进一步证实其在烟粉虱对呋虫胺的代谢解毒过程中发挥着重要作用。



A：H5细胞中CYP4C64蛋白表达水平的Western blot检测。H5-Control为空载病毒转染H5细胞对照组，H5-CYP4C64为重组CYP4C64转染H5细胞处理组，β-actin为内参。B：重组CYP4C64蛋白的CO差光谱检测结果。C：UPLC-MS/MS检测结果，内嵌图为两组呋虫胺的峰面积定量统计结果（n=3）。D：CYP4C64代谢呋虫胺的米氏动力学拟合曲线。A: Western blot analysis of CYP4C64 expression in H5 cells. H5-Control indicates H5 cells infected with the empty baculovirus vector (control), whereas H5-CYP4C64 indicates H5 cells infected with the recombinant CYP4C64 baculovirus; β-actin was used as the internal reference. B: CO-difference spectrum of recombinant CYP4C64 protein. C: UPLC-MS/MS analysis of dinotefuran (DIN) metabolism by CYP4C64, and the inset shows quantitative analysis of dinotefuran peak areas in the two groups (n=3). D: Michaelis-Menten kinetics of CYP4C64-mediated dinotefuran metabolism.

图4　重组CYP4C64的体外表达、活性鉴定及其对呋虫胺的代谢酶动力学分析

Fig. 4　*In vitro* expression, functional characterization, and enzyme kinetic analysis of recombinant CYP4C64 toward dinotefuran

图中数据为平均数±标准误。***分别表示两个处理间经Tukey's HSD法检验差异显著（P<0.001）。Data are mean±SE. *** indicates a significant difference between treatments according to Tukey's HSD test (P<0.001).

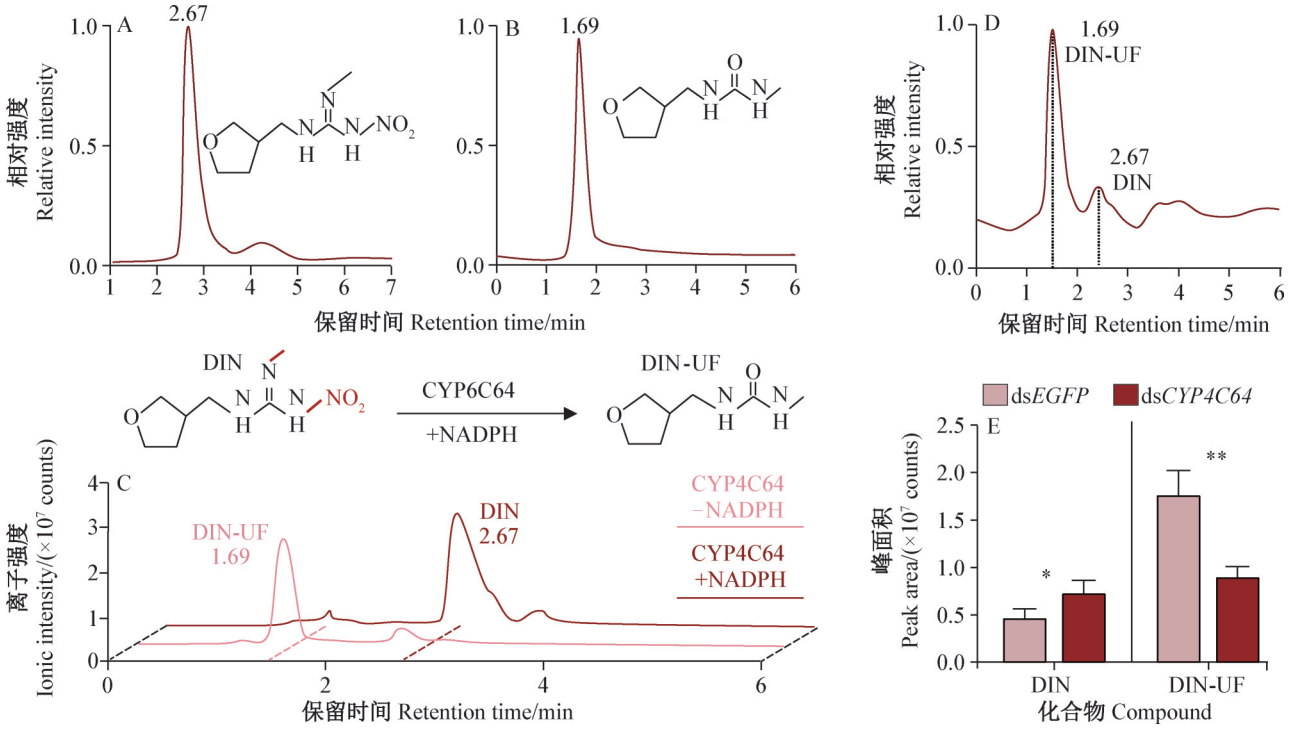
2.7　CYP4C64代谢呋虫胺的产物鉴定与代谢功能验证

UPLC-MS/MS检测结果显示，呋虫胺标准品的洗脱时间为2.67 min，峰形良好，无杂峰干扰（图5-A）；其N-脱甲基代谢产物呋虫胺脲标准品的洗脱时间为1.69 min，分离度良好，可用于后续代谢样品的定性与定量检测（图5-B）。

CYP4C64催化呋虫胺的体外代谢产物检测结果显示，在CYP4C64+NADPH的反应体系中，除呋虫胺离子峰（洗脱时间2.67 min）外，在1.69 min处出现明显的特异性产物峰，与呋虫胺脲标准品的保留时间一致；而无NADPH的阴性对照组中仅检测到呋虫胺离子峰，无代谢产物生成（图5-C）。对照组

同样仅检测到呋虫胺离子峰，无代谢产物生成，进一步证实代谢反应由活性CYP4C64蛋白特异性介导（图5-D）且代谢产物为呋虫胺脲。

烟粉虱蜜露中呋虫胺脲的定量检测结果显示，呋虫胺处理36 h后，饲喂ds*CYP4C64*烟粉虱分泌蜜露中呋虫胺脲的丰度均显著低于饲喂ds*EGFP*对照组（P<0.01）（图5-E）。该结果从体内层面证实，*CYP4C64*是烟粉虱体内代谢呋虫胺的关键P450基因，其表达水平直接决定烟粉虱对呋虫胺的体内代谢解毒效率。



A~B：分别为呋虫胺标准品及其特征代谢产物呋虫胺脲的色谱图及化学结构式。C：CYP4C64催化呋虫胺的代谢路径及体外代谢产物呋虫胺脲的UPLC-MS/MS总离子流图，红色曲线为添加NADPH的反应组，浅红色曲线为未添加NADPH的阴性对照组。D：CYP4C64蛋白与呋虫胺孵育后的色谱图。E：ds*CYP4C64*饲喂组烟粉虱经呋虫胺处理36 h时蜜露中呋虫胺和呋虫胺脲的定量检测，ds*EGFP*为阴性对照（n=3）。A–B: Chromatograms and chemical structures of dinotefuran and its characteristic metabolite dinotefuran-urea, respectively. C: Proposed metabolic pathway of dinotefuran (DIN) and its characteristic metabolite dinotefuran-urea (DIN-UF) catalyzed by CYP4C64 and UPLC-MS/MS total ion chromatograms of the *in vitro* metabolism assay, and the red trace indicates the NADPH-supplemented reaction, while the light-red trace indicates the reaction without NADPH. D: Chromatogram of dinotefuran after incubation with recombinant CYP4C64 protein. E: Quantification of dinotefuran (DIN) and dinotefuran-urea (DIN-UF) in honeydew excreted by *Bemisia tabaci* at 36 h after dinotefuran treatment following feeding with ds*CYP4C64* or ds*EGFP* (negative control) (n=3).

图5 CYP4C64催化呋虫胺的代谢产物鉴定与体内代谢功能验证

Fig. 5 Identification of metabolites from CYP4C64-catalyzed dinotefuran metabolism and validation of its *in vivo* metabolic function

图中数据为平均数±标准误。*和**分别表示两个处理间经Tukey's HSD法检验差异显著（P<0.05和P<0.01）。Data are mean±SE. * and ** indicate significant differences according to Tukey's HSD test (P<0.05 and P<0.01, respectively)

3 讨论

大量研究表明，昆虫P450不仅参与其对杀虫剂的代谢解毒，还与其对寄主植物及其他外源化合物的适应密切相关。不同寄主植物显著影响烟粉虱解毒酶系统的表达与活性（杨金键等，2017；衡森等，2023），不同隐种之间也存在明显的P450表达和解毒能力差异。因此，鉴定参与杀虫剂代谢的关键P450基因并解析其作用机制，对于阐明烟粉虱抗药性的形成机制以及制订科学防控策略具有重要意义。昆虫P450在外源化合物适应与抗药性形成中发挥着核心作用，但其体外功能表达长期受限于蛋白折叠、辅因子匹配及表达体系不稳定等因素。P450蛋白活性的获得不仅依赖于杆状病毒感染条

件如病毒滴度和感染复数（Emery，1992；Lu et al.，2013；Manjon et al.，2018），还受到不同P450蛋白自身结构差异的显著影响，包括活性位点构型、底物通道及膜定位特性等（David et al.，2013；Nauen et al.，2022）。此外，P450在翻译后折叠、血红素整合及内质网定位过程中涉及复杂的分子调控（Denisov et al.，2005；Munro et al.，2007；Nelson，2018），进一步增加了建立通用体外表达体系的难度。在此基础上，本研究提出CPR平衡点和P450表达点两个关键概念：前者强调NADPH-CPR在电子传递及构象稳定中的适量需求，其比例失衡将显著降低催化偶联效率甚至诱导P450向非活性构象转化（Omura，2006；Murataliev et al.，2008；Das & Sligar，2009；Riddick et al.，2013）；后者则揭示P450活性存在一个短暂的时间窗口，在该阶段蛋白丰度与催化能力达到峰值，随后由于代谢废物积累及细胞状态恶化而迅速下降（Ikonomou et al.，2003；Murhammer，2016）。这两个因素共同决定了P450体外表达体系的功能状态，强调了在不同P450基因间需进行针对性优化，而非依赖统一表达策略。

Bac-to-Bac杆状病毒表达系统通过在供体质粒上设计mini-Tn7转座元件及多克隆位点，使目标基因在转座酶作用下整合至穿梭载体Bacmid特定位点，从而避免传统同源重组的低效率问题。随后，利用重组载体Bacmid DNA转染昆虫细胞如Sf9或H5细胞，在细胞内复制并产生具有感染性的重组杆状病毒，实现目标蛋白的高水平表达。在Bac-to-Bac杆状病毒表达系统中，昆虫细胞尤其是H5细胞，不仅作为重组杆状病毒扩增的宿主，同时也是外源蛋白高效表达的核心平台。H5细胞来源于粉纹夜蛾，具有较高的病毒易感性和蛋白表达能力，当杆状病毒侵染后能够快速进入高表达状态，从而显著提升重组蛋白产量（Lynn & Robert，2007）。相较于Sf9细胞，H5细胞对杆状病毒具有更高的感染敏感性，并在多种重组蛋白（包括分泌蛋白和膜蛋白）表达中表现出更高的产量和表达效率（Kost & Condreay，1999；Harwood，2007；Wilde et al.，2014）。此外，H5细胞具备较完善的密码子使用体系和翻译后修饰能力，能够支持来源于不同生物（包括真核和原核）的蛋白高效表达，同时在糖基化及信号肽加工等方面表现出良好的适配性（Murataliev et al.，2008；Aumiller et al.，2012；Yu et al.，2016）。在Bac-to-Bac杆状病毒表达系统介导下，Sf9细胞生成的重组杆状病毒进入H5细胞后，可利用其内质网及分泌通路完成蛋白折叠、修饰及定位，从而获得更接近天然构象和功能状态的重组蛋白（Berger et al.，2004；Fitzgerald et al.，2006）。基于此，本研究采用Bac-to-Bac杆状病毒表达系统构建了烟粉虱CYP4C64的体外表达体系，并围绕CPR共表达比例及表达时间窗口两个关键因素开展系统优化，最终获得具有稳定活性的功能性重组蛋白。

本研究从功能与生化两个层面系统验证了*CYP4C64*在烟粉虱抗呋虫胺中的关键作用。尽管已有研究报道该基因在新烟碱类抗性品系中显著上调表达（Yang et al.，2021），但其是否直接参与对呋虫胺的代谢尚缺乏明确的生化证据。本研究通过体外代谢试验结合UPLC-MS/MS检测结果，明确了CYP4C64能够在NADPH依赖条件下催化呋虫胺发生N-脱甲基反应，该反应主要发生于呋虫胺侧链的N-甲基基团（即连接于脲基结构上的甲基氮原子），通过去除该甲基形成去甲基化代谢产物呋虫胺脲（Casida，2011）。这一结构转化显著改变了分子的极性与空间构象，通常会降低其对烟粉虱烟碱型乙酰胆碱受体的亲和力，从而削弱其神经毒性效应。本研究通过重组蛋白体外代谢试验及代谢产物鉴定，从生化层面直接证实了CYP4C64具有催化呋虫胺向呋虫胺脲转化的解毒代谢功能。同时，转基因黑腹果蝇过表达试验表明，单一*CYP4C64*基因的过表达即可显著降低个体对呋虫胺的敏感性，赋予昆虫明显的抗性表型。上述结果从表达–代谢–抗性表型3个层面建立了完整的功能关联，明确了*CYP4C64*在烟粉虱抗呋虫胺中的核心作用。

本研究发现CYP4C64的功能性表达高度依赖于其与CPR的表达比例。不同于传统研究中提高CPR表达量可增强P450蛋白活性的简单认知，本研究结果表明P450与CPR之间存在一个最优表达比例区间（Manoj et al.，2010），即CPR平衡点。当CPR表达不足时，CYP4C64主要以失活形式存在，说明电子供体不足限制了其功能性构象的形成；而当CPR过量表达时，功能性CYP4C64比例同样下降，表明过量CPR可能干扰P450蛋白的稳定性或电子传递过程，使得P450一直处于活跃的状态。这表明CPR不仅作为电子供体参与催化反应，还在P450蛋白的正确折叠与构象维持中发挥着重要作用。CPR平衡点的提出，从机制层面解释了以往昆虫P450异源表达中活性波动大、重复性差的现象，即随机的CPR表达并不适用于所有P450功能性表达，反而可能导致体系失衡，每种P450均存在符合自身电子传

递链背景的CPR丰度。

除表达比例外，本研究进一步发现CYP4C64的功能性表达受时间维度严格限制，该蛋白在转染后约44 h达到活性峰值，随后在数小时内迅速下降，至后期几乎未再检测到功能性P450特征峰。这一现象表明P450蛋白的功能形成并非持续累积过程，而是一个动态平衡过程，涉及蛋白成熟与失活的快速转变。据此，本研究提出P450表达点的概念，用以描述功能性P450产量达到最大值的关键时间窗口。该发现对传统表达策略提出了重要修正：延长表达时间并不能提高功能性蛋白产量，反而可能增加失活比例。同时，这也为不同实验室之间P450表达结果差异较大的问题提供了解释，即若未准确控制该时间窗口，即使其他条件一致，也可能获得明显不同的试验结果。

基于CPR平衡点和P450表达点的表达优化策略，本研究建立了一套稳定且可重复的昆虫P450体外表达体系。该体系可为不同P450的功能研究提供可靠技术支撑，尤其适用于解析其在杀虫剂代谢中的作用。在应用层面，CYP4C64被明确为介导呋虫胺代谢的关键酶，为烟粉虱抗药性监测提供了重要的分子靶标。同时，该体系可用于筛选针对关键P450酶的抑制剂，为开发杀虫剂增效剂提供试验平台，从而有助于恢复药剂防效并延缓害虫抗药性发展。然而，本研究仍存在一定局限性。首先，CPR平衡点和P450表达点主要基于烟粉虱的解毒系统分析建立，其在不同类型昆虫P450中的适用范围有待进一步验证。其次，CPR在调控P450蛋白折叠与稳定性中的具体分子机制尚不清晰，有待通过结构生物学及蛋白互作研究进一步解析。未来研究可基于本体系，对烟粉虱及其他农业害虫中更多P450基因开展系统功能分析，并探索其在多药剂抗性中的协同作用。同时，针对关键代谢酶的抑制策略也值得进一步探索，以服务于害虫抗药性综合治理。

参 考 文 献（References）

Aumiller JJ, Mabashi-Asazuma H, Hillar A, Shi XZ, Jarvis DL. 2012. A new glycoengineered insect cell line with an inducibly mammalianized protein *N*-glycosylation pathway. Glycobiology, 22(3): 417−428

Bass C, Nauen R. 2023. The molecular mechanisms of insecticide resistance in aphid crop pests. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 156: 103937

Bass C, Zimmer CT, Riveron JM, Wilding CS, Wondji CS, Kaussmann M, Field LM, Williamson MS, Nauen R. 2013. Gene amplification and microsatellite polymorphism underlie a recent insect host shift. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110(48): 19460−19465

Berger I, Fitzgerald DJ, Richmond TJ. 2004. Baculovirus expression system for heterologous multiprotein complexes. Nature Biotechnology, 22(12): 1583−1587

Bernal V, Carinhas N, Yokomizo AY, Carrondo MJT, Alves PM. 2009. Cell density effect in the baculovirus-insect cells system: a quantitative analysis of energetic metabolism. Biotechnology and Bioengineering, 104(1): 162−180

Casida JE. 2011. Neonicotinoid metabolism: compounds, substituents, pathways, enzymes, organisms, and relevance. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59(7): 2923−2931

Chen CY, Shi XY, Gao XW. 2016. Mechanism of insect metabolic resistance to pyrethroid insecticides. Chinese Journal of Pesticide Science, 18(5): 545−555 (in Chinese) [陈澄宇, 史雪岩, 高希武. 2016. 昆虫对拟除虫菊酯类杀虫剂的代谢抗性机制研究进展. 农药学学报, 18(5): 545−555]

Cronin CN. 2023. Optimization of genetic code expansion in the baculovirus expression vector system (BEVS). Protein Expression and Purification, 210: 106314

Das A, Sligar SG. 2009. Modulation of the cytochrome P450 reductase redox potential by the phospholipid bilayer. Biochemistry, 48(51): 12104−12112

David JP, Ismail HM, Chandor-Proust A, Paine MJI. 2013. Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on earth. Philosophical Transactions of the Royal Society of London: Biological Sciences, 368(1612): 20120429

Denisov IG, Makris TM, Sligar SG, Schlichting I. 2005. Structure and chemistry of cytochrome P450. Chemical Reviews, 105(6): 2253−2278

Dermauw W, Van Leeuwen T, Feyereisen R. 2020. Diversity and evolution of the P450 family in arthropods. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 127: 103490

Emery VC. 2003. Baculovirus expression vectors: choice of expression vector//Practical molecular virology. New Jersey: Humana Press, pp 287−308

Feyereisen R. 2005. Insect cytochrome P450//Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS. Comprehensive molecular insect science. Amsterdam: Elsevier, pp. 1−77

Feyereisen R. 2012. Insect CYP genes and P450 enzymes//Gilbert LI. Insect molecular biology and biochemistry. San Diego: Academic Press, pp. 236−316

Fitzgerald DJ, Berger P, Schaffitzel C, Yamada K, Richmond TJ, Berger I. 2006. Protein complex expression by using multigene baculoviral vectors. Nature Methods, 3(12): 1021−1032

Guengerich FP. 2004. Cytochrome P450: what have we learned and what are the future issues? Drug Metabolism Reviews, 36(2): 159−197

Guengerich FP. 2008. Cytochrome P450 and chemical toxicology. Chemical Research in Toxicology, 21(1): 70−83

Guengerich FP, Martin MV, Sohl CD, Cheng Q. 2009. Measurement of cytochrome P450 and NADPH-cytochrome P450 reductase. Nature Protocols, 4(9): 1245−1251

Harwood S. 2007. Small-scale protein production with the baculovirus expression vector system//Murhammer DW. Baculovirus and insect cell expression protocols. 2nd edition. New Jersey: Humana Press, pp. 211−224

He C, Liang JJ, Liu SN, Zeng Y, Wang SL, Wu QJ, Xie W, Zhang YJ. 2020. Molecular characterization of an NADPH cytochrome P450 reductase from *Bemisia tabaci* Q: potential involvement in susceptibility to imidacloprid. Pesticide Biochemistry and Physiology, 162: 29−35

Heng S, Ren JY, Han DB, Chen XR, Wu XX, Su HH, Zhou FC. 2023. Effects of intercropping with celery on the resistance of pepper to tobacco whitefly *Bemisia tabaci*. Journal of Plant Protection, 50(1):146−152 (in Chinese) [衡森, 任锦彦, 韩杜斌, 陈向荣, 吴晓霞, 苏宏华, 周福才. 2023. 间作芹菜对辣椒抗烟粉虱特性的影响. 植物保护学报, 50(1):146−152]

Hu MX, Yang ZZ, Li Y, Zhang N, Wang F, Bai YC, Jiao XG, Zhang LX, Liu BM. 2023. Cryptic *Bemisia tabaci* species harboring tomato yellow leaf curl virus and endosymbionts and insecticide resistance monitoring in Tianjin. Journal of Plant Protection, 50(1): 101−110 (in Chinese) [胡明鑫, 杨泽众, 李妍, 张楠, 王芳, 白义川, 焦晓国, 张李香, 刘佰明. 2023. 天津市烟粉虱隐种鉴定及其携带TYLCV、内共生菌情况和抗药性监测. 植物保护学报, 50(1): 101−110]

Ikonomou L, Schneider YJ, Agathos SN. 2003. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. Applied Microbiology and Biotechnology, 62(1): 1−20

Karunker I, Morou E, Nikou D, Nauen R, Sertchook R, Stevenson BJ, Paine MJI, Morin S, Vontas J. 2009. Structural model and functional characterization of the *Bemisia tabaci* CYP6CM1vQ, a cytochrome P450 associated with high levels of imidacloprid resistance. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 39(10): 697−706

Kost TA, Condreay JP. 1999. Recombinant baculoviruses as expression vectors for insect and mammalian cells. Current Opinion in Biotechnology, 10(5): 428−433

Li XC, Schuler MA, Berenbaum MR. 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. Annual Review of Entomology, 52: 231−253

Liu BM, Jiao XG, Yang X, Yang NN, Zhang YJ. 2016. Effects of resistance to thiamethoxam on the feeding behavior of *Bemisia tabaci* biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae). Journal of Plant Protection, 43(1): 175−176 (in Chinese) [刘佰明, 焦晓国, 杨鑫, 杨妮娜, 张友军. 2016. 噻虫嗪对B型烟粉虱抗性种群取食行为的影响. 植物保护学报, 43(1): 175−176]

Lu HY, Qiu LL, Yang XJ, Zhang XM, Zhang Z, Wang SL. 2013. Optimization of heme precursors for the expression of human cytochrome P450 2A13 and its co-expression with oxidoreductase in baculovirus/Sf9 system. Journal of Biochemistry, 153(6): 555−563

Luckow VA, Lee SC, Barry GF, Olins PO. 1993. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. Journal of Virology, 67(8): 4566−4579

Luo C. 2016. *Bemisia tabaci* species complex: small insect pests cause great damage. Journal of Plant Protection, 43(1): 1−4 (in Chinese) [罗晨. 2016. 烟粉虱复合种: 小昆虫, 大危害. 植物保护学报, 43(1): 1−4]

Lynn DEH, Robert L. 2007. Available lepidopteran insect cell lines// Murhammer DW. Baculovirus and insect cell expression protocols. 2nd edition. New Jersey: Humana Press, pp. 117−138

MacKay TFC, Richards S, Stone EA, Barbadilla A, Ayroles JF, Zhu DH, Casillas S, Han Y, Magwire MM, Cridland JM, et al. 2012. The *Drosophila melanogaster* genetic reference panel. Nature, 482(7384): 173−178

Manjon C, Troczka BJ, Zaworra M, Beadle K, Randall E, Hertlein G, Singh KS, Zimmer CT, Homem RA, Lueke B, et al. 2018. Unravelling the molecular determinants of bee sensitivity to neonicotinoid insecticides. Current Biology, 28(7): 1137−1143

Manoj KM, Gade SK, Mathew L. 2010. Cytochrome P450 reductase: a harbinger of diffusible reduced oxygen species. PLoS ONE, 5(10): e13272

Munro AW, Girvan HM, McLean KJ. 2007. Variations on a (t)heme: novel mechanisms, redox partners and catalytic functions in the cytochrome P450 superfamily. Natural Product Reports, 24(3): 585−609

Murataliev MB, Feyereisen R, Walker FA. 2004. Electron transfer by diflavin reductases. Biochimica et Biophysica Acta, 1698(1): 1−26

Murataliev MB, Guzov VM, Walker FA, Feyereisen R. 2008. P450 reductase and cytochrome b5 interactions with cytochrome P450: effects on house fly CYP6A1 catalysis. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 38(11): 1008−1015

Murhammer DW. 2016. Useful tips, widely used techniques, and quantifying cell metabolic behavior//Murhammer D. Baculovirus and insect cell expression protocols. New York: Humana Press, pp. 3−22

Nauen R, Bass C, Feyereisen R, Vontas J. 2022. The role of cytochrome P450s in insect toxicology and resistance. Annual Review of Entomology, 67: 105−124

Nelson DR. 2018. Cytochrome P450 diversity in the tree of life. Biochimica et Biophysica Acta, 1866(1): 141−154

Omura T. 2006. Mitochondrial P450s. Chemico-Biological Interactions, 163(1/2): 86−93

Omura T, Sato R. 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes, I: evidence for its hemoprotein nature. Journal of Biological Chemistry, 239: 2370−2378

Riddick DS, Ding XX, Wolf CR, Porter TD, Pandey AV, Zhang QY, Gu J, Finn RD, Ronseaux S, McLaughlin LA, et al. 2013. NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase: roles in physiology, pharmacology, and toxicology. Drug Metabolism and Disposition, 41(1): 12−23

Shi Y, Liu QQ, Lu WJ, Yuan J, Yang YH, Oakeshott J, Wu YD. 2023.

Divergent amplifications of CYP9A cytochrome P450 genes provide two noctuid pests with differential protection against xenobiotics. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 120(37): e2308685120

Shi Y, Wang HD, Liu Z, Wu SW, Yang YH, Feyereisen R, Heckel DG, Wu YD. 2018. Phylogenetic and functional characterization of ten P450 genes from the CYP6AE subfamily of *Helicoverpa armigera* involved in xenobiotic metabolism. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 93: 79−91

Upadhyay SK, Chandrashekar K, Thakur N, Verma PC, Borgio JF, Singh PK, Tuli R. 2011. RNA interference for the control of whiteflies (*Bemisia tabaci*) by oral route. Journal of Biosciences, 36(1): 153−161

Wilde M, Klausberger M, Palmberger D, Ernst W, Grabherr R. 2014. Tnao38, high five and Sf9 evaluation of host-virus interactions in three different insect cell lines: baculovirus production and recombinant protein expression. Biotechnology Letters, 36(4): 743−749

Xie W, Yang X, Chen CH, Yang ZZ, Guo LT, Wang D, Huang JQ, Zhang HL, Wen YN, Zhao JY, et al. 2018. The invasive MED/Q *Bemisia tabaci* genome: a tale of gene loss and gene gain. BMC Genomics, 19(1): 68

Xue H, Fu BL, Huang MJ, He C, Liang JJ, Yang J, Wei XG, Liu SN, Du TH, Ji Y, et al. 2023. CYP6DW3 metabolizes imidacloprid to imidacloprid-urea in whitefly (*Bemisia tabaci*). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 71(5): 2333−2343

Yang JJ, Wang C, Jiao XG. 2017. Effects of pepper varieties on detoxification enzymes of B and Q biotypes of *Bemisia tabaci*. Journal of Plant Protection, 44(4):695−696 (in Chinese) [杨金键, 王超, 焦晓国. 2017. 不同辣椒品种对B型和Q型烟粉虱主要解毒酶的影响. 植物保护学报, 44(4):695−696]

Yang X, Wei XG, Yang J, Du TH, Yin C, Fu BL, Huang MJ, Liang JJ, Gong PP, Liu SN, et al. 2021. Epitranscriptomic regulation of insecticide resistance. Science Advances, 7(19): eabe5903

Yang X, Xie W, Li RM, Zhou XM, Wang SL, Wu QJ, Yang NN, Xia JX, Yang ZZ, Guo LT, et al. 2017. RNA interference-mediated knockdown of the hydroxyacid-oxoacid transhydrogenase gene decreases thiamethoxam resistance in adults of the whitefly *Bemisia tabaci*. Scientific Reports, 7: 41201

Yin F, Xiao Y, Peng ZK, Li ZY. 2023. Regulation of the resistance of diamondback moth *Plutella xylostella* to chlorantraniliprole by four cytochrome P450 genes. Journal of Plant Protection, 50(5): 1193−1201 (in Chinese) [尹飞, 肖勇, 彭争科, 李振宇. 2023. 四种P450基因调控小菜蛾对氯虫苯甲酰胺的抗性. 植物保护学报, 50(5): 1193−1201]

Yu K, Yu Y, Tang XY, Chen HM, Xiao JY, Su XD. 2016. Transcriptome analyses of insect cells to facilitate baculovirus-insect expression. Protein & Cell, 7(5): 373−382

Zhang H, Zhao MT, Liu YR, Zhou ZS, Guo JY. 2018. Identification of cytochrome P450 monooxygenase genes and their expression in response to high temperature in the alligatorweed flea beetle *Agasicles hygrophila* (Coleoptera: Chrysomelidae). Scientific Reports, 8(1): 17847

Zheng HX, Xie W, Fu BL, Xiao S, Tan X, Ji Y, Cheng JX, Wang R, Liu BM, Yang X, et al. 2021. Annual analysis of field-evolved insecticide resistance in *Bemisia tabaci* across China. Pest Management Science, 77(6): 2990−3001

（责任编辑：李美娟）