

棉铃虫细胞色素 P450 337B3 (CYP337B3) 的表达、纯化及结晶*

王璐璐^{1,2**} 王静敏^{2,3} 傅 晟^{2***} 汪 颖^{2***}

(1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300222; 2. 天津国际生物医药联合研究院, 天津 300457; 3. 南开大学, 天津 300071)

摘 要 【目的】以抗性棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 体内发现的一种基因重组导致的嵌合型 P450 酶 CYP337B3 作为研究对象, 通过基因克隆、体外重组表达、蛋白质结晶等技术手段, 获得 CYP337B3 ($\Delta 23$) 的晶体结构, 为深入了解棉铃虫 P450 酶 CYP337B3 的结构与功能奠定基础。【方法】对 CYP337B3 编码基因进行了密码子优化, 通过基因重组, 将其转化至 BL21(DE3) 感受态细胞中进行原核表达尝试, 通过亲和层析及 RESOURCE™ Q 离子交换层析对 CYP337B3 ($\Delta 23$) 进行体外纯化, 利用气相悬滴结晶方法对 CYP337B3 ($\Delta 23$) 进行结晶条件的筛选及 X 射线晶体衍射。【结果】通过密码子优化, 实现了 CYP337B3 ($\Delta 23$) 在大肠杆菌原核表达系统内的大量表达, 经过体外纯化及十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, CYP337B3 ($\Delta 23$) 蛋白纯度可达到 95% 左右, 我们对 CYP337B3 ($\Delta 23$) 进行了蛋白结晶条件的筛选, 最终获得了 CYP337B3 ($\Delta 23$) 的结晶条件和蛋白晶体。【结论】本文利用气相悬滴结晶方法获得了 CYP337B3 ($\Delta 23$) 的蛋白晶体, 为今后 CYP337B3 的三维结构解析、功能研究以及最终阐述该种新型的棉铃虫抗药机制奠定了良好的基础。

关键词 棉铃虫, CYP337B3, 蛋白质晶体学

Expression, purification and crystallization of *Helicoverpa armigera* CYP337B3

WANG Lu-Lu^{1,2**} WANG Jing-Min^{2,3} FU Sheng^{2***} WANG Ying^{2***}

(1. College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300222; 2. Tianjin International Joint Academy of Biotechnology and Medicine, Tianjin 300457, China; 3. NanKai University, Tianjin 300071, China)

Abstract [Objectives] CYP337B3 is a unique P450 enzyme that arose from unequal crossing-over between two parental P450 genes. In order to conduct further research on this enzyme, we expressed and purified it to obtain the CYP337B3 ($\Delta 23$) crystal. [Methods] The gene of CYP337B3 ($\Delta 23$) was optimized and cloned into pET-28a expression vector. The protein was successfully expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) and purified using Ni-NTA affinity chromatography and RESOURCE™ Q. The hanging drop vapor diffusion method was used for crystallization after which preliminary X-ray crystallographic analysis was carried out. [Results] CYP337B3 ($\Delta 23$) fused with an N-terminal His-tag was expressed in *E. coli* BL21 (DE3). The purified CYP337B3 ($\Delta 23$) was calculated to be > 95% pure based on SDS-PAGE analysis. We also performed mass spectrum analysis to confirm the correct expression of the target protein. Furthermore, initial crystals were obtained by the hanging-drop vapor-diffusion process. [Conclusions] After optimization of the crystallization process, rod-like crystals were obtained using 1, 6-Hexanediol as precipitant. Structure determination is underway. CYP337B3 provides

* 资助项目: 天津市科技支撑计划重点项目 (10ZCKFSY08700; 11ZCKFSY06800)

** E-mail: lulu.wang@htmdc.org

*** 通讯作者, E-mail: ying.wang@htmdc.org; sheng.foo@gmail.com

收稿日期: 2013-12-17, 接受日期: 2014-03-12

a potential target for anti-*Helicoverpa armigera* drug development.

Key words *Helicoverpa armigera*, CYP337B3, protein crystallography

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 是一种在世界范围内危害性极大且分布极广的夜蛾科昆虫,其抗药性的产生和不断加剧严重威胁着农业的发展。近年来,杀虫剂抗药机制的探索越来越多,研究表明,大部分害虫之所以对杀虫剂具有较高的抗性,重要原因之一是由于 P450 酶系代谢活性的增强 (Scott, 1996)。

细胞色素 P450 酶由于底物的广泛性和功能的多样性,一直是生物学上的研究热点 (冷欣夫和邱星辉, 2001)。从昆虫体内分离单独的 P450 酶比较困难,利用传统的代谢和酶的研究方法很难对 P450 酶进行深入细致的研究 (郑明奇等, 2001)。1989 年, Feyereisen 等从家蝇 *Musca domestica* 体内分离出第一个昆虫细胞色素 P450 基因,便开始了分子水平上对昆虫细胞色素 P450 的研究 (陈义昆等, 2013)。近年来,大量的昆虫细胞色素 P450 新基因不断得到克隆和鉴定, GenBank 所注册的昆虫细胞色素 P450 已达到 1 000 多个 (郭亭亭等, 2009)。细胞色素 P450 结构类似而又不尽相同,性质相似而又有所差异,分子质量大约在 40~60 ku (唐振华, 1990; 黄俊勇和冷欣夫, 1991)。随着生物技术的发展,越来越多的学者采用分子生物学和蛋白质晶体学方法研究 P450 的结构与功能 (赵伊英等, 2012)。至 2013 年,已有 29 个真核生物细胞色素 P450 酶的 X-射线晶体结构得到解析,其中包括真核微粒体、叶绿体或线粒体细胞色素 P450 酶及两个非单加氧酶细胞色素 P450 酶 (Johnson and Stout, 2013), 这为 P450 酶复杂的功能研究奠定了坚实的基础。

2012 年,德国马克斯·普朗克化学生态学研究室的科学家研究了对氰戊菊酯产生了抗药性的棉铃虫品系 TWB, 发现在 7 种氰戊菊酯代谢相关的候选酶中,只有一种酶 CYP337B3 对氰戊菊酯进行羟基化反应而产生 4'-羟基氰戊菊酯,证明 CYP337B3 是使棉铃虫产生抗药性的解毒

酶。目前已证实基因 *CYP337B3* 是由两个 P450 基因 *CYP337B1* 和 *CYP337B2* 通过不平等交换 (Unequal crossing-over) 的方式形成的嵌合型基因 (Chimeric gene)。 *CYP337B1* 或 *CYP337B2* 单独编码的酶不能让氰戊菊酯丧失毒性,而 CYP337B3 能够使其失去毒性, CYP337B3 的存在让棉铃虫对氰戊菊酯产生了 42 倍的抗药性 (Joußen *et al.*, 2012)。这是目前研究人员捕捉到的为数不多的具有清晰和显著意义的进化突变,同时也为 P450 家族蛋白的结构组成与生物学功能研究提出了新的命题。

对于 P450 酶进行晶体结构研究,有助于深入了解 P450 的结构与功能的关系,从而为明确 P450 介导的昆虫抗药性作用机制奠定理论基础。基于 CYP337B3 对棉铃虫抗氰戊菊酯的重要性,本课题主要针对 CYP337B3 ($\Delta 23$) 进行了蛋白结晶及功能研究,我们将该棉铃虫的 *CYP337B3* ($\Delta 23$) 基因进行基因克隆和体外的重组表达。同时,我们利用蛋白结晶技术,获得了 CYP337B3 ($\Delta 23$) 的蛋白晶体,为衍射数据收集和蛋白结构解析奠定了良好基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和载体

菌株:感受态细胞 *E.coli* DH5 α 、*E.coli* BL21 (DE3) 均购自北京全式金生物技术有限公司。

载体:pET-28a-SUMO 为本实验室保藏。

基因:棉铃虫 *CYP337B3* 由 Choon W. Wee 提供。

1.2 主要试剂和仪器

DNA 聚合酶 (Fast pfu enzyme)、限制性内切酶、*T4* DNA 连接酶均购自 Fermentas 公司; ÄKTA 层析系统 (GE Healthcare); JN-3000 低温高压超声细胞破碎仪 (宁波新芝生物科技股份

有限公司); Rigaku X-ray 衍射仪 (Rigaku); ULPase 为本实验室自制备。

1.3 CYP337B3 ($\Delta 23$) 基因重组质粒的构建及

其表达

1.3.1 CYP337B3 ($\Delta 23$) 基因的体外扩增及原核表达载体的构建 棉铃虫 CYP337B3 基因是由 Choon W. Wee 提供, 他们尝试在真核细胞 (sf9) 系统中进行了 CYP337B3 蛋白的表达。为了提高表达效率, 我们优先选用了原核表达系统, 考虑到昆虫基因在原核系统中可能存在的稀有密码子问题, 我们对所得基因序列进行了密码子优化, 使用点突变试剂盒 (Easy Mutagenesis System) 设计引物, 进行所需优化基因的聚合酶链式反应 (PCR) 扩增, 引物均由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成。设置 PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 10 min, 然后 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 3 min 循环进行, 循环数设置为 25, 72℃ 延伸 10 min。将获得 PCR 产物进行 DMT 消化及转化反应, 得到优化好基因。据文献报道, 几乎所有的细胞色素 P450 都保留着跨膜信号保守序列, 一般由氨基端的 15~20 个疏水性的氨基酸组成, 经 Tmap 软件预测在 CYP337B3 中也存在这一跨膜序列, 为避免由于跨膜序列存在导致蛋白以沉淀形式表达, 结合二级结构预测结果, 截掉 CYP337B3 序列前 22 个氨基酸, 以期获得 CYP337B3 ($\Delta 23$) 这一截短体蛋白的可溶性表达。因此在获得密码子优化好基因后, 设计 CYP337B3 ($\Delta 23$) 这一截短体蛋白的引物, 进行常规 PCR 反应获得目的片段, 上游引物为: 5'-CGGGATCCAATAGTAAATATTGGAAGAAAG-3'; 下游: 5'-CGCTCGAGTTAGATGTCGCGCAG-3'。设置 PCR 反应条件为: 95℃ 预变性 5 min, 然后 95℃ 50 s, 56℃ 50 s, 72℃ 3 min 循环进行, 循环数设置为 30, 72℃ 延伸 10 min。对扩增出的目的基因片段及 pET-28a-SUMO 载体使用 BamH I 和 Xho I 两种酶在 37℃ 恒温水浴

锅中进行双酶切, 酶切 6 h, 将酶切后产物胶回收, 使用 T4 DNA 连接酶将酶切后的基因片段和载体连接 6 h, 连接反应于 16℃ 恒温环境进行。将连接产物转入感受态细胞 *E.coli* DH5 α , 涂布于卡那霉素浓度为 1 mmol/L 的 LB 固体培养基平板上, 于 37℃ 恒温箱中培养 14 h, 挑取单克隆, 提取质粒, 通过双酶切对重组质粒进行鉴定, 并通过测序验证插入序列的正确性。

1.3.2 CYP337B3 ($\Delta 23$) 蛋白的表达纯化 将重组质粒转化至 *E.coli* BL21 (DE3), 涂布于卡那霉素浓度为 1 mmol/L 的 LB 固体培养基平板上, 37℃ 恒温箱中培养 10 h, 挑取单克隆进行试表达, 通过 SDS-PAGE 蛋白电泳检测 CYP337B3 ($\Delta 23$) 是否能够表达。

试表达成功, 挑取单克隆, 接种于 5 mL 的液体 LB 培养基中, 转入含 1 mmol/L 卡那霉素的 800 mL LB 液体培养基中 37℃、200 r/min 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.5~0.6, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 16℃、200 r/min 培养 16 h, 诱导目的蛋白表达。将菌体细胞离心分离, 裂解缓冲液 (20 mmol/L HEPES-pH 7.6, 500 mmol/L NaCl) 重悬菌体, 使用超低温高压细胞破碎仪裂解细胞, 使用高速离心机将裂解液在 12 000 r/min 转速下离心 25 min, 弃沉淀, 将破菌上清液经过 Ni²⁺-NTA 亲和层析柱, 用 20 mmol/L HEPES-pH 7.6, 500 mmol/L NaCl, 50 mmol/L 咪唑及 20 mmol/L HEPES-pH 7.6, 500 mmol/L NaCl, 70 mmol/L 咪唑洗脱杂蛋白, 将目的蛋白换至 20 mmol/L HEPES-pH 7.6, 500 mmol/L NaCl 的缓冲液中, 加入 ULPase, 4℃, 过夜酶切。ULPase 为 ULP 蛋白酶, 也称为 SUMO 蛋白酶, 是一种高活性的半胱氨酸蛋白酶, 它能够高效地把 SUMO 标签蛋白从融合蛋白上切割下来。次日, 用 20 mmol/L HEPES-pH 7.6, 500 mmol/L NaCl 缓冲液洗脱目的蛋白, 浓缩, 利用 1 mL 预装 RESOURCE™ Q 进行离子交换层析, 20 mmol/L HEPES-pH 7.6, 420 mmol/L NaCl 缓冲液梯度洗脱目的蛋白, 根据紫外吸收峰收集目的蛋白, 浓缩, 将目的蛋白换至结晶缓冲液 (20

mmol/L HEPES-pH 7.6, 200 mmol/L NaCl) 中, 浓缩, 测定蛋白浓度, 液氮速冻, 于 -80℃ 冰箱保藏。

1.4 蛋白结晶

目的蛋白 CYP337B3 经过浓缩后溶解在结晶缓冲液中进行结晶条件筛选, 筛选条件来自于 Index I & II、Crystal Screen I & II、PEG/Ion Screen I & II 等商业结晶筛选试剂盒。采用悬滴式蒸气扩散法进行结晶条件的筛选和优化, 将蛋白溶液与结晶池液各取 1 μ L 混合均匀, 与 200 μ L 的池液进行气相平衡, 于 16 $^{\circ}$ C 恒温条件下, 静置, 观察晶体生长。

2 结果与分析

2.1 原核表达载体的构建

细胞色素 CYP337B3 由 ORF *CYP337B3*

(NCBI Accession No. JQ284029) 编码, 由于在大肠杆菌中进行异源蛋白表达时, 大肠杆菌对偏爱密码子与稀有密码子的利用率具有差异性, 因此, CYP337B3 所含有的密码子可能不是大肠杆菌进行 CYP337B3 蛋白表达所偏爱的密码子, 致使蛋白表达具有不可预测性, 不能进行高水平表达, 因此需要对原有基因序列进行密码子优化, 以便于利用大肠杆菌的偏爱密码子并消除稀有密码子, 从而达到蛋白高产量表达。图 1 所示即为密码子优化前后序列对比结果。通过点突变试剂盒进行引物设计及 PCR 获得优化后基因序列, 截掉 CYP337B3 序列前 22 个氨基酸, 然后进行常规 PCR 反应成功扩增出目的基因片段, 如图 2 所示, 泳道 1 即为 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图, 图 2 中所示较亮条带即为目的基因片段, 条带大小为 1 410 bp。将构建好的重组质粒经 *Bam*H I

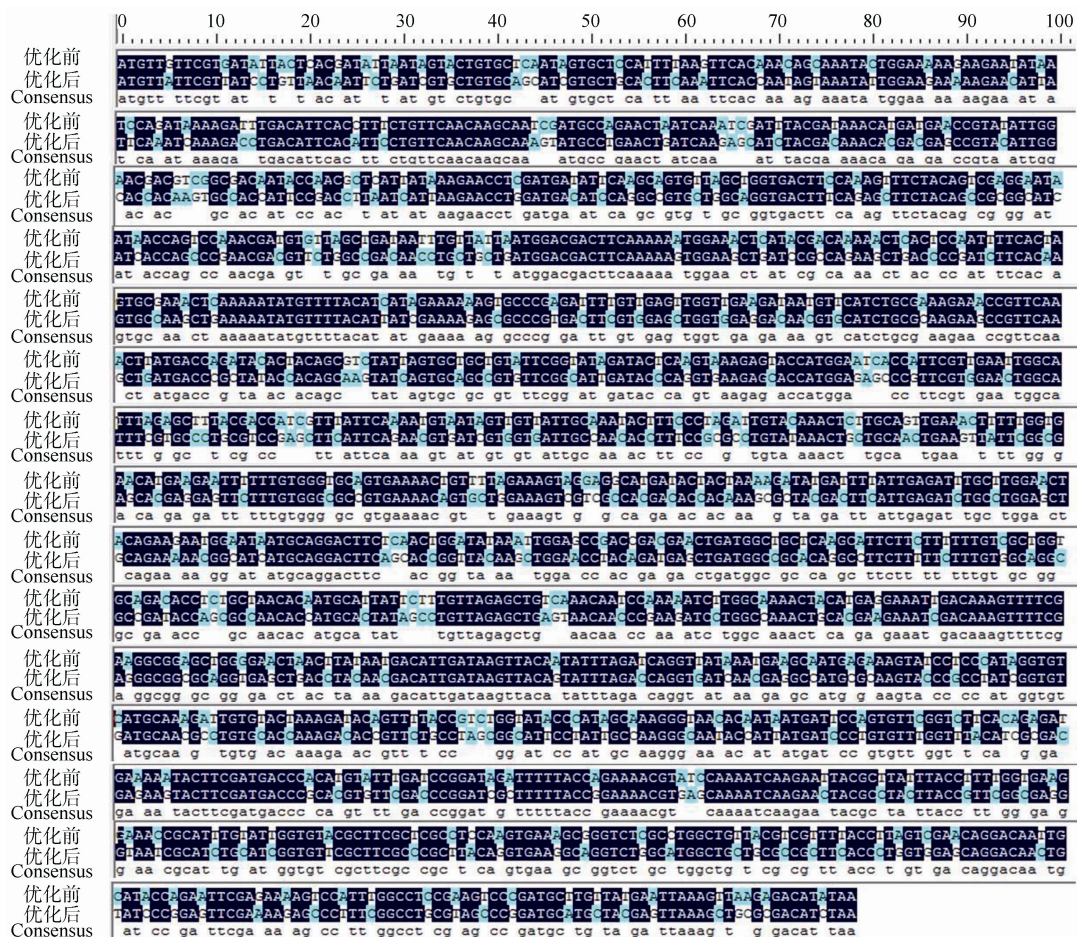
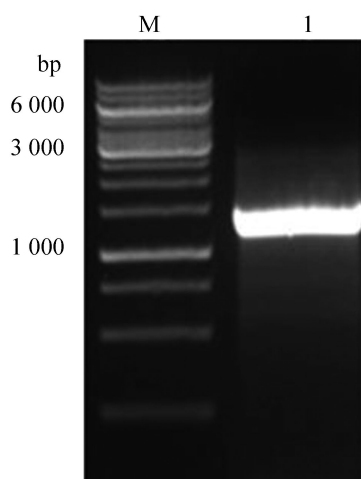


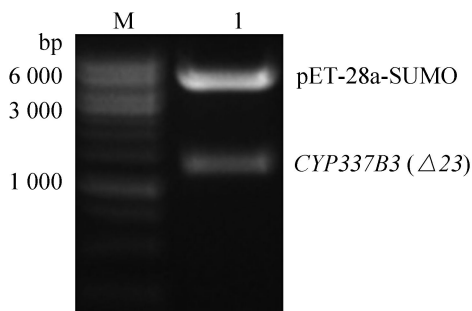
图 1 *CYP337B3* 基因进行密码子优化后结果Fig. 1 The codon optimization of *CYP337B3*

和 *Xho* I 两种内切酶进行双酶切, 双酶切的电泳结果见图 3, 图 3 中两条条带, 其中 5.6 kb 大小条带为载体条带, 1 410 bp 大小条带即为目的基因条带。后经测序证明, 测序结果完全正确, 没有出现氨基酸替换, 因此, 重组质粒 pET-28a-SUMO-*CYP337B3* ($\Delta 23$) 构建成功。

图 2 *CYP337B3* ($\Delta 23$) 基因 PCR 扩增结果Fig. 2 Result of PCR amplification of the *CYP337B3* ($\Delta 23$)

M: DNA 分子量标准; 1: *CYP337B3* ($\Delta 23$) 基因片段。

M: DNA marker; 1: The gene segment of *CYP337B3* ($\Delta 23$).

图 3 pET-28a-SUMO-*CYP337B3* ($\Delta 23$) 经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切鉴定Fig. 3 Restriction analysis for pET-28a-SUMO-*CYP337B3* ($\Delta 23$) with *Bam*H I and *Xho* I

M: DNA 分子量标准; 1: pET-28a-SUMO-*CYP337B3* ($\Delta 23$) / *Bam*H I + *Xho* I。

M: DNA marker; 1: pET-28a-SUMO-*CYP337B3* ($\Delta 23$) / *Bam*H I + *Xho* I。

2.2 重组 *CYP337B3* 的表达与纯化

在 37℃ 的 LB 培养基培养含有重组质粒 pET-28a-SUMO-*CYP337B3* ($\Delta 23$) 的大肠杆菌中, 大肠杆菌经 IPTG 诱导, 目的蛋白 *CYP337B3* ($\Delta 23$) 得到可溶性大量表达。

将细菌进行低温高压破碎后, 在裂解液的上清液中可溶性蛋白仍较少。将上清中可溶性蛋白经过 Ni-NTA 亲和层析柱进行初步纯化及浓缩, 得到较纯的目的蛋白。后经过 ÄKTA 蛋白纯化系统 (GE Healthcare), 进行 RESOURCE™ Q 离子交换层析, 对目的蛋白进一步纯化, 在 20 mmol/L HEPES-pH 7.6, 420 mmol/L NaCl 缓冲液梯度洗脱目的蛋白。经 SDS-PAGE 鉴定, 获得均一性良好、纯度较高的 *CYP337B3* ($\Delta 23$) 蛋白, 大小约为 54 ku, 如图 4 所示。RESOURCE™ Q 离子交换层析图见图 5。为确定纯化的蛋白为正确构建的目的蛋白, 我们取纯化所得蛋白进行质谱分析, 质谱分析结果显示, 纯化蛋白的序列与目的蛋白序列覆盖率为 77.234%, 鉴定结果可靠, 结果如图 6 所示。

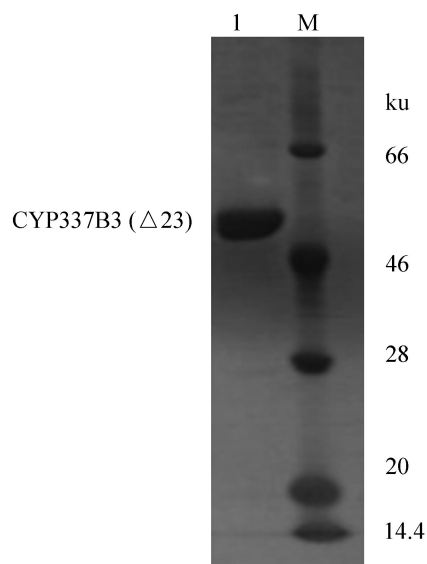
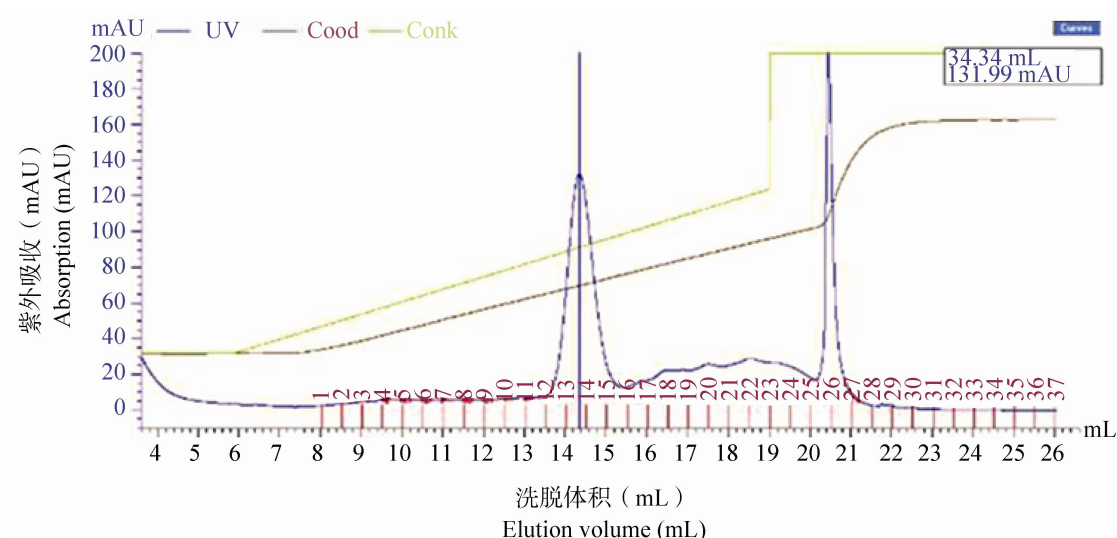
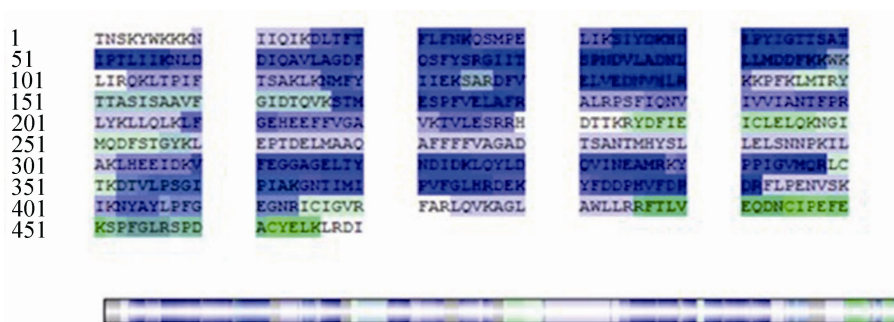
图 4 *CYP337B3* ($\Delta 23$) 蛋白纯化结果

Fig. 4 Purification result of CYP337B3 ($\Delta 23$)M: 蛋白分子量标准; 1: CYP337B3 ($\Delta 23$) 蛋白。M: Protein molecular weight marker; 1: CYP337B3 ($\Delta 23$).图 5 CYP337B3 ($\Delta 23$) 蛋白 RESOURCE™ Q 离子交换层析图Fig. 5 Resource Q purification result of CYP337B3 ($\Delta 23$)图 6 CYP337B3 ($\Delta 23$) 蛋白质谱分析结果Fig. 6 The mass spectrum of CYP337B3 ($\Delta 23$)

2.3 蛋白结晶

将 CYP337B3 ($\Delta 23$) 蛋白进行结晶条件的筛选, 利用 mosquito 自动化晶体筛选机械臂进行了商业结晶试剂盒 IndexScreen I & II、Crystal Screen I & II、PEG/Ion Screen I & II 结晶条件的筛选, 在 Crystal screen I & II 92 号结晶条件 (0.2 mol/L Magnesium chloride hexahydrate, 0.1 mol/L Tris pH 8.5, 3.4 mol/L 1,6-Hexanediol) 中获得了初步的蛋白晶体, 由于初筛得到的晶体衍射较差, 几乎看不到衍射点的规律分布, 不能进行结构解析, 因此, 对于 CYP337B3 ($\Delta 23$) 蛋白结晶条件进行了优化, 首先进行了结晶添加试

剂的筛选, 经过多轮条件的筛选后, 发现在初始结晶条件中添加 3% DMSO 后晶体状态有明显变化, 最终确定 CYP337B3 ($\Delta 23$) 蛋白结晶条件为 0.1 mol/L Tris (pH8.5), 0.2 mol/L $MgCl_2$, 3.4 mol/L 1,6-Hexanediol, 添加 3% DMSO, 16℃ 悬滴生长, 蛋白浓度为 1.6 mg/mL 时, 晶体生长 3 d, 所培养出晶体较好, 所培养晶体如图 7, 晶体大小约为 0.57 mm×0.17 mm×0.1 mm。将此晶体进行 X 射线晶体衍射, 见图 8。

3 讨论

化学农药的使用导致了昆虫抗药性的产生,

已经成为当今农业害虫和疾病虫媒控制工作的一大障碍,给人类生产生活造成了巨大的损失。根据抗性分子机制不同,昆虫抗药性主要分为代谢抗性和靶标抗性。细胞色素 P450 酶系是昆虫

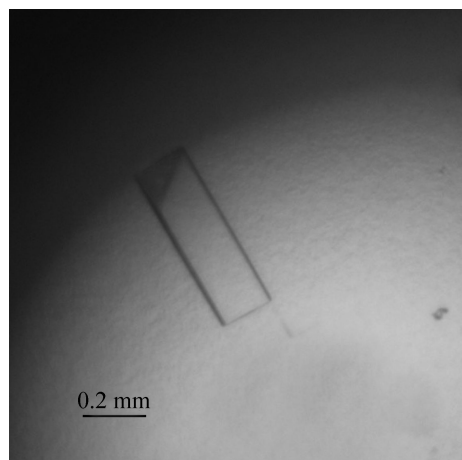


图 7 CYP337B3 ($\Delta 23$) 蛋白晶体
Fig. 7 Typical crystals of CYP337B3 ($\Delta 23$)

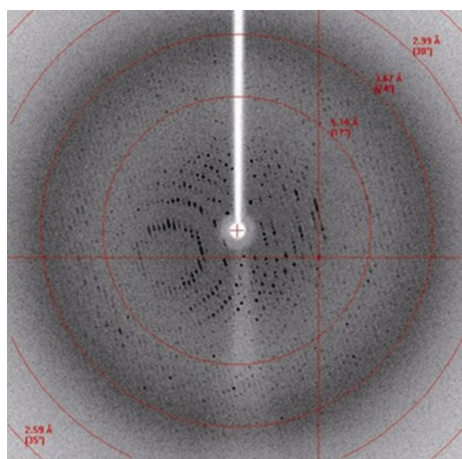


图 8 CYP337B3 ($\Delta 23$) 晶体衍射图
Fig. 8 The typical X-ray diffraction pattern from a CYP337B3 ($\Delta 23$) crystal

体内参与各类杀虫剂和其他内、外源化合物代谢的主要解毒酶系,是昆虫代谢抗性产生的主要介导者。

细胞色素 P450 是一类在自然界广泛分布的血红素分子依赖的酶蛋白家族,其主要功能是参与机体内源分子的生物合成及异源分子的代谢。该家族成员在催化反应过程中所具有的高度

特异性使其在环保、化工和药物代谢等领域都具有极大的应用价值,从而成为生物催化研究的热点。细胞色素 P450 的相关研究已历经半个世纪,但对其进化历程、底物识别特异性、突变体影响酶活性的机制等方面认识还极为有限。

随着近年来越来越多的 P450 蛋白的三维晶体结构被解析,人们通过三维结构的比对发现, P450 活性中心在结构上的可塑性是 P450 结合多种底物的基础,这种结构上的可塑性主要是由活性中心关键位置上的氨基酸组成控制的,对 P450 分子的精细三维结构开展分析成为理解其生物催化活性的重要途径。本研究成果为嵌合型 P450 蛋白的结构解析奠定了良好的基础,目前已完成了从分子克隆至蛋白结晶及优化的全部工作,后续工作将利用 X 射线晶体衍射技术,解析获得嵌合型 P450 蛋白 CYP337B3 的蛋白结构及其与底物结合的复合物三维结构,嵌合来源 CYP337B1 与 CYP337B2 可能无法与底物进行有效结合,但对二者单独结构的研究将形成其与嵌合型 CYP337B3 分子结构上的对比,有助于分析后者的底物识别催化机制,因此我们也会开展这两方面的研究。

通过结构比较分析以及生物化学反应、质谱、热力学等方法分析 3 种 P450 蛋白与底物的相互作用模式,寻找介导二者结合的关键氨基酸,据此设计单点及多点氨基酸突变,结合生物大分子相互作用分析 (BIAcore) 等微量热滴定 (ITC)、液质联用质谱等物理学实验检测手段,确认其对底物结合能力的影响。在前述工作的基础上,揭示嵌合型 P450 蛋白 CYP337B3 对底物氰戊菊酯的结合、催化修饰机制,这对于发现在抗药作用过程中棉铃虫嵌合型 P450 蛋白的详细作用机制是必要的。

由于世界范围内拟除虫菊酯的广泛过量使用,抗药性棉铃虫群体正在快速增加,并显现在地区间不断传播的形式。我国是传统的产棉大国,棉制品在我国国民生活和工业生产当中占有重要地位,为保障我国棉花等农作物的生产安全,有必要对此类有进一步扩散恶化趋势的农业危害进行一定的前瞻性研究。同时,该型突变有非常典型的科学研究意义,对进一步了解和应对

同类型威胁具有显著的指导意义。

参考文献 (References)

- Johnson EF, Stout CD, 2013. Structural diversity of eukaryotic membrane cytochrome P450s. *Journal of Biological Chemistry*, 288(24): 17082–17090.
- Joußen N, Agnolet S, Lorenz S, Schöne SE, Ellinger R, Schneider B, Heckel DG, 2012. Resistance of Australian *Helicoverpa armigera* to fenvalerate is due to the chimeric P450 enzyme CYP337B3. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA.*, 109(38): 15206–15211.
- Scott JG, 1996. Cytochrome P450 monooxygenase-mediated resistance to insecticides. *Nippon Noyaku Gakkaishi*, 21(2): 241–245.
- 陈义昆, 邬玉兰, 李荔, 连国云, 刘志刚, 2013. 东亚飞蝗细胞色素 P450 基因的克隆及表达分析. *应用昆虫学报*, 50(2): 441–446. [Chen YK, Wu YL, Li L, Lian GY, Liu ZG, 2013. Cloning, expression of cytochrome P450 from locusta migratoria manilensis. *Chinese Bulletin of Entomology*, 50(2): 441–446.]
- 郭亭亭, 姜辉, 高希武, 2009. 昆虫细胞色素 P450 基因的多样性、进化及表达调控. *昆虫学报*, 52(3): 301–311. [Guo TT, Jiang H, Gao XW, 2009. Diversity, evolution and expression regulation of cytochrome P450 monooxygenase genes in insect. *Acta Entomologica Sinica*, 52(3): 301–311.]
- 黄俊勇, 冷欣夫, 1991. 细胞色素 P450 酶系的研究进展. *昆虫知识*, 28(5): 308–312. [Huang JY, Leng XF, 1991. Advances on metabolisms of cytochrome P450. *Entomological Knowledge*, 28(5): 308–312]
- 冷欣夫, 邱星辉, 2001. 细胞色素 P450 酶系的结构功能与应用前景. 北京: 科学出版社. 1–7. [Leng XF, Qiu XH, 2001. Function, structure, and future of cytochrome P450. Beijing: Science Press. 1–7]
- 唐振华, 1990. 昆虫中的细胞色素 P-450 及其特性. *昆虫知识*, 27(1): 52–55. [Tang ZH, 1990. The characteristics of cytochrome P450 in insect. *Entomological Knowledge*, 27(1): 52–55]
- 赵伊英, 武万锋, 汪小东, 张建华, 2012. 棉铃虫细胞色素 P450 家族 CYP6AE14 基因克隆、序列分析及蛋白原核表达. *西北农业学报*, 21(12): 181–187. [Zhao YY, Wu WF, Wang XD, Zhang JH, 2012. Cloning, sequence analysis and prokaryotic expression of cytochrome P450 CYP6AE14 gene from *Helicoverpa armigera*. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 21(12): 181–187.]
- 郑明奇, 邱星辉, 张文吉, 2001. 棉铃虫细胞色素 P450 的分子生物学. *生命的化学*, 21(3): 229–231. [Zheng MQ, Qiu XH, Zhang WJ, 2001. The molecular biology of cytochrome P450 from *Helicoverpa armigera*. *Chemistry of Life*, 21(3): 229–231.]