

杀虫药剂抗性家蝇品系乙酰胆碱酯酶基因的特征分析

黄 瑶 乔传令*

(中国科学院动物研究所虫鼠害国家重点实验室 北京 100080)

Williamson M S Devonshire A L

(Rothamsted Experimental Station Harpenden, Herts., AL 5 2JQ, UK)

摘 要 乙酰胆碱酯酶(AChE)是有机磷和氨基甲酸酯类杀虫药剂的作用靶标,这两大类杀虫药剂的广泛应用导致了昆虫对抗性的选择。靶标的修饰是某些昆虫产生抗性的分子机理,这种抗性是和 AChE 的变更型相关的,这些变更型的酶显示出对杀虫药剂的不敏感性。利用 RT-PCR 和 Streptavidin 偶联磁珠技术从两种抗性家蝇(*Musca domestica*)品系 D3 和 Kash 中分别分离了 AChE 基因并测定了其核苷酸顺序, cDNA 的可读框长 2082bp,由此推导出了 AChE 的氨基酸顺序,通过与敏感家蝇品系 Cooper 的比较,发现了一些核苷酸顺序差异和 4 个氨基酸点突变,其中 3 个替代可能与杀虫药剂不敏感性有关,这一结果表明 D3 和 Kash 均属于 CH₂ 抗性类型。

关键词 家蝇,乙酰胆碱酯酶(AChE)基因,突变,杀虫药剂抗性

乙酰胆碱酯酶(AChE)通过迅速水解神经递质乙酰胆碱而终止神经突触传递。在昆虫中, AChE 是两类主要杀虫药剂(有机磷和氨基甲酸酯)的作用靶标。有机磷和氨基甲酸酯在与酶作用时,其方式与乙酰胆碱类似,先与酶形成复合物,然后再将酶磷酸化或氨基甲酰化。这两类农药的广泛应用已经导致了許多昆虫种群对抗性的选择。AChE 在量和质上的变化均可能与杀虫剂抗性有关^[1]。直到现在,有关杀虫药剂抗性在分子水平上的遗传起源尚未受到广泛的关注。一方面,研究表明某些抗性涉及到基因的扩增或过量转录^[2,4];另一方面,抗性也可能与酶质的变化相关,在某些抗性品系中,靶标的修饰被认为是一种重要的分子机制^[5,6]。现已经知道多数抗性常常与 AChE 的变更型相关,这些变更型酶表现出对抑制剂的敏感度降低。

在果蝇中,编码 AChE 的基因被定位在一个单一的位点(ace)上,已用染色体步查法克隆了 ace 基因,其 cDNA 可读框编码一个 70kDa 的多肽,它是 18kDa 和 55kDa 多肽的前体^[7]。在家蝇中,一个敏感品系和多个抗性品系的 AChE 基因最近已被克隆和测序,结果表明这些家蝇品系中存在着一系列核苷酸顺序差异,其中 4 个点突变导致的氨基酸替代正好位于酶的活性部位,这 4 个编码区突变可能与杀虫药剂不敏感性有关,并把家蝇品系分为两种抗性类型:49R 和 CH₁^[8]。

国家自然科学基金资助项目。

* 责任作者。

本文于 1996 年 5 月 15 日收到。

在本研究中,我们用反转录多聚酶链式反应(RT-PCR)的方法对中国抗性家蝇品系 D3 和日本抗性品系 Kash 的 AChE 基因进行了序列分析,并将这些数据与敏感家蝇品系 Cooper 比较,发现了一些核苷酸顺序和氨基酸顺序的差异,这些序列差异表明 D3 和 Kash 均属于 CH₂ 抗性类型。

1 材料和方法

1.1. 家蝇品系

Cooper 是敏感参考品系,在 ace 位点的等位基因为野生纯合型,77M 为有机磷和氨基甲酸酯抗性品系,D3 为中国抗性品系,Kash 为日本抗性品系。

1.2 AChE 生物测定

用 Ellman 技术测定 AChE 的活性和抑制,参照 Moores 等人^[9]的微量滴度分析法进行。本研究用 DDVP、谷硫磷、马拉硫磷、对硫磷和恶虫威等 5 种杀虫药剂来鉴定基因型,其最佳抑制浓度分别为 10, 0.2, 10, 40 和 50 $\mu\text{mol/L}$,测定时间为 10min。分析在 V_{max} 酶联免疫酶标仪上进行,酶标仪与带有 SOFT_{max} 软件的 Packard-Bell (IBM-type) 微机相连,可自动进行吸收值的测定。

1.3 总 RNA 的提取

用改进的异硫氰酸胍法^[10]从家蝇成体中提取总 RNA。3~5 头家蝇于 1 只 Eppendorf 管中用液氮碾碎,然后加入 0.5ml Gu-HCl 缓冲液(8mol/L 胍, 20mmol/L MOPS 和 20mmol/L EDTA, pH7.0),悬浮液依次用等体积的酚、酚/氯仿,氯仿抽提,最后加入 0.2 体积的 1mol/L 醋酸和 0.7 体积的无水乙醇,于 -20℃ 沉淀 RNA。总 RNA 经含甲醛的琼脂糖凝胶电泳后,吡啶橙染色检测。

1.4 多聚酶链式反应(PCR)

PCR 用 DyNAZymeTM IIDNA 聚合酶,根据产品说明书进行,94℃ 变性 45s, 55℃ 退火 1.15min, 72℃ 延伸 2min, 共循环 30 次。第一轮 PCR 以反转录的 cDNA 第一链为模板,每种专一性引物的浓度均为 200ng,这对引物是根据 Cooper 品系 AChE 的 cDNA 顺序设计的,总反应体积为 50 μl 。第二轮 PCR 的总反应体积为 100 μl ,每种引物浓度均为 125ng,其中一种引物的 5' 末端用生物素标记。PCR 扩增的 DNA 片段经 1% 的琼脂糖凝胶电泳后,用溴化乙锭染色检测扩增是否成功。

1.5 PCR 扩增片段的双向固相序列分析

每个 PCR 反应需用 20 μl Dynabeads M280 Streptavidin (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 磁珠, Dynabeads 磁珠要根据 Dynabeads 生物磁性分离系统(DYNAL)的说明书进行预洗。将第二轮 PCR 产物与预洗的磁珠在 37℃ 混合 15min,用 Dyna IMPC-E 弃去上清液,加入 10 μl 新鲜配制的 0.15mol/L NaOH,于 37℃ 混合 10min。将碱性上清液(含有与生物素标记的 DNA 互补的互补链)转移到 1 只新的 Eppendorf 管中,磁珠用 50 μl 的 0.15mol/L NaOH 于 37℃ 再次洗涤 5min,这 60 μl 两次洗涤的上清液经 1mol/L HCl 中和后,用乙醇沉淀 DNA。含生物素标记 ssDNA 的磁珠依次用 50 μl 的 0.15mol/L NaOH 和 TE 缓冲液进行洗涤。与磁珠相连的 ssDNA 及其互补链最后分别悬浮在合适体积的 TE 缓冲液(1mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH8)中。根据 PRISMTM Ready Reaction DyeDeoxyTM Terminator

Cycle Sequencing Kit(ABI 公司)的产品说明书进行序列反应。

1.6 DNA 序列排列及分析

序列排列及分析用 GAP(基因组排列程序)版本 2.5(1994 年 11 月, MRC 分子生物学实验室注册)进行。

2 结果和讨论

2.1 AChE 不敏感性的生化分析

AChE 催化底物硫代乙酰胆碱与 DTNB 反应释放硫醇基(Ellman 反应), 通过比色法测定 405nm 处的吸收值(A_{405})计算酶活和抑制, 将没有加入抑制剂的匀浆液中 AChE 的酶活与存在各种浓度抑制剂的酶活进行比较。图 1 显示了 96 个反应曲线的结果及其线性衰变的特征, 49R 和 CH₂ 品系对谷硫磷和 DDVP 具有相反的抗性类型^[8]。生化分析的结果表明 D3 品系抗 DDVP 和马拉硫磷, 而对谷硫磷、对硫磷和恶虫威敏感, 与 77M 类似, 这暗示着 D3 属于 CH₂ 类型。

某些昆虫对杀虫药剂的敏感性与其 AChE 的含量相关, 有关酶的过量表达引起抗性机理的研究很多^[2-4]。点突变同样也可以引起抗性的产生, 研究表明许多昆虫品系, 如蚊虫、家蝇和蚜虫都具有对杀虫药剂不敏感的 AChE。

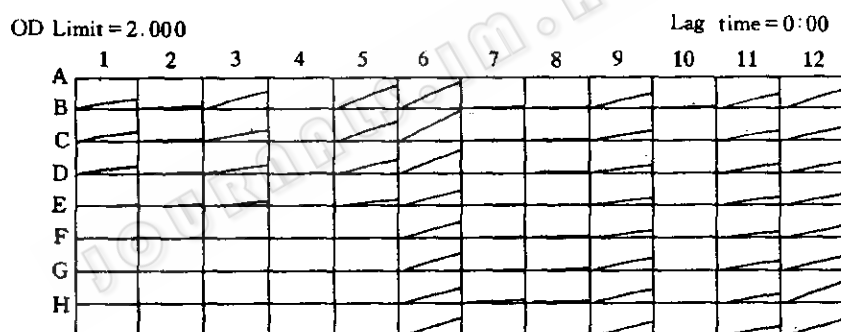


图 1 家蝇 AChE 的微量滴定分析, 曲线所示的是 A_{405} 随时间的变化情况

Fig. 1 Kinetic plots showing changes in absorbance (A_{405}) with time for 96 reactions in individual wells of a microtitre plate.

Four replicate 77M (rows A - D left), four Cooper (rows E - H left) and eight D3 (row3 A - H right) were assayed in the presence of 50 $\mu\text{mol/L}$ bendiocarb (column 1 and 7), 40 $\mu\text{mol/L}$ paraoxon (column 2 and 8), 10 $\mu\text{mol/L}$ malaoxon (column 3 and 9), 0.2 $\mu\text{mol/L}$ azamethiphos (column 4 and 10), 10 $\mu\text{mol/L}$ dischlorvos (column 5 and 11) or without inhibitor (column 6 and 12). Reactions were monitored for 10 min with an absorbance limit of 2.000(OD).

2.2 AChE 变更型基因的扩增及其序列分析

我们根据 Cooper 品系的 AChE 基因的 cDNA 核苷酸顺序^[8]设计了一系列专一性引物用于 RT-PCR, 直接扩增 AChE 变更型基因片段, 应用 Streptavidin 偶联磁珠法快速分离测定这些 PCR 产物的核苷酸顺序(图 2)。结果显示 D3 和 Kash 品系 AChE 基因的核苷酸序列, 其开放阅读框起始于第 8 位核苷酸残基而终止于第 2089 位的终止密码子

TAA,共编码 693 个氨基酸,它们与 Cooper 品系的 AChE 序列具有高度(99%)的同源性。但是,与果蝇的 AChE 顺序^[7]相比,所推导的蛋白质序列的前 81 个氨基酸小肽不符合从成熟蛋白上切下来的信号肽的原则,它太长而且不够疏水,以致于不能形成一个跨膜片段,而这个跨膜片段又是蛋白质转运至细胞膜以及之后在细胞外信号肽从成熟蛋白上切除所必需的^[11]。假设第 229 位的 ATG 为起始密码子,那么信号肽仅含有 7 个氨基酸残基,又太短了。因此,信号肽尚需进一步研究确定。

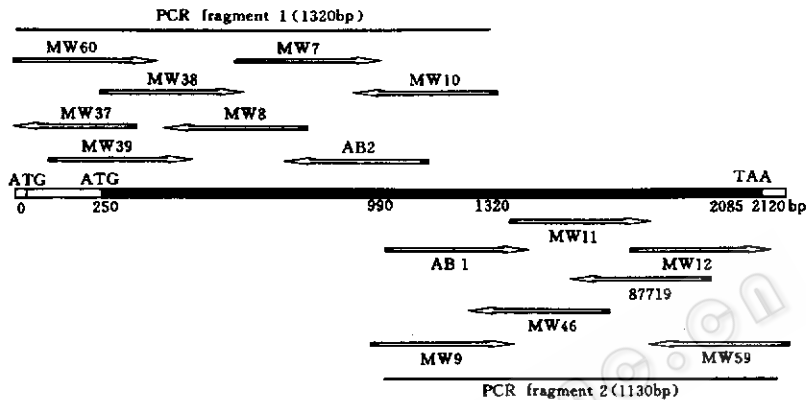


图 2 家蝇 AChE cDNA 片段 PCR 扩增和测序的策略

Fig.2 Strategy for amplification and sequencing of a housefly AChE cDNA fragment

2.3 点突变与杀虫药剂抗性

我们测定了 D3 和 kash 品系 AChE 基因编码区的核苷酸顺序,通过与野生型参考品系 Cooper 比较,发现了 4 个有义突变,它们分别是 ATA 为 ATG 替代、GTC 为 CTC 替代、GGC 为 GCC 替代、TTT 为 TAT 替代,从而导致第 163 位的异亮氨酸突变为甲硫氨酸、第 261 位的缬氨酸突变为亮氨酸、第 343 位的甘氨酸突变为丙氨酸、第 408 位的苯丙氨酸突变为酪氨酸(图 3)。由此可见,D3 和 Kash 与 CH₂ 和 77M 品系类似而与 49R 品系不同,在 49R 品系中存在着另一个 GGC 为 GCC 替代,从而导致第 446 位的甘氨酸突变为丙氨酸^[8]。

AChE 是一种丝氨酸水解酶,其活性位点由一个酯解部位和一个阴离子部位组成,酯解部位专门催化乙酰胆碱的水解,阴离子部位使乙酰胆碱分子结合到酶分子上,因此可将 AChE 的作用部位描绘成两个“口袋”,其中酯“口袋”里的一个丝氨酸、一个组氨酸和一个谷氨酸被认为参与电荷交换系统,阴离子“口袋”结合季胺残基。参照果蝇^[7]和电鱼^[12]的 AChE 序列,我们推断第 316 位的丝氨酸、第 445 位的谷氨酸和第 558 位的组氨酸可能参与酯解部位(图 3)。电鱼 AChE 的三维结构显示酶的活性位点位于一个深而窄的“峡谷”或“井”的底部附近,“峡谷”里存在着几个芳香族氨基酸残基,因此得到如下假设:当底物在“井”的顶部被俘获时,芳香环可以使底物快速地进入^[13]。果蝇 AChE 第 368 位苯丙氨酸被一个酪氨酸取代而导致抗性的产生和酶催化特性的改变^[1],这一苯丙氨酸靠近酶活性位点的“口袋”,但其侧链与“口袋”相对^[13]。最近,家蝇 AChE 的一级结构顺序已在发

Cooper:	<u>MARSVRTPI</u> <u>S</u> P S S S S S S S R S S W S S P S S S * F Y S L L S S F K A S L T R P S S S S S V A H H L A A R N N D	60
D3:	-----T- S-----W**-----SY-----	
Kash:	-----T- S-----W**-----SY-----	
Cooper:	I C R G L F A T L V I L L R M S A L T S A M T D H L T V Q T T S G P V R G R S V T V Q G R D V H V F T G I P Y A K P P V	120
D3:	-----	
Kash:	-----	
Cooper:	DDLRFKRPVP AEPWHGVLD A TRLPATCVQE RYEFYFGFSG EEIWNPNNTNV SEDCLFMNIW	180
D3:	-----	
Kash:	-----	
Cooper:	APAKARLRHG RGTNGGEHSS KTDQDHLIHS ATPQNTTNGL PILIWIYGGG FMTGSATLDI	240
D3:	-----	
Kash:	-----	
Cooper:	YNAEIMSAVG NVIVASFQYR VGAFGFLHLS PVMPGFEEEA PGNVGLNDQA LALRWLKENA	300
D3:	-----	
Kash:	-----	
Cooper:	RAFGGNPEWM TLPGESAGSS SVNAQLMSPV TRGLVKRGM QSGTMNAPWS HMTSEKAVEI	360
D3:	-----	
Kash:	-----	
Cooper:	GKALVNDNC NASLLPENPQ AVMACMRQVD AKTISVQOWN SYSGILSFPS APTIDGAFLP	420
D3:	-----	
Kash:	-----	
Cooper:	ADPMTLLKTA DLSGYDILIG NVKDEGTYFL LYDFIDYFDK DDATSLPRDK YLEIMNNIFQ	480
D3:	-----	
Kash:	-----	
Cooper:	KASQAEREAI IFQYTSWEGN PGYQNQQQIG RAVGDHFFTC PTNEYAQALA ERGASVHYYY	540
D3:	-----	
Kash:	-----	
Cooper:	FTHRTSTSLW GEWMGVLHGD EIEYFFGQPL NNSLQYRPVE RELGKRMLNS VIEFAKSGNP	600
D3:	-----	
Kash:	-----	
Cooper:	AVDGEWPNF SKEDPVYYVF STDEKIEKLQ RGPLAKRCSE WNDYLPKVR S WIGSECENKS	660
D3:	-----	
Kash:	-----	
Cooper:	STSASAAIYE MKMQQLTLLA VAILTMVNS IFQ	693
D3:	-----	
Kash:	-----	

图 3 家蝇 AChE 基因 PCR 扩增 cDNA 片段的氨基酸顺序

Fig. 3 Comparison of the amino acid sequences of housefly AChE cDNA in the PCR amplified region. The numbers at the end of each line refer to amino acid sequences. Predicted signal peptide is underlined. - indicates residues identical to the Cooper sequence. * indicates deleted residues. ↓ indicates 6 cysteines which form intra-subunit disulphide bonds. ↓ indicates 3 residues which probably take part in the esterase site. ▼ indicates a different mutation in 49R from that in CH₂.

表的电鱼 AChE 的 X 射线晶体结构的基础上进行模拟, 不敏感 AChE 中的 4 个点突变正

好位于酶的活性部位。这个模型解释了为什么 AChE 变更型在有某些相对大的杀虫药剂分子存在的条件下,仍能继续水解正常的小分子底物乙酰胆碱,其原因是在 AChE 变更型中,替换的这 4 个氨基酸分子比敏感型 AChE 中相应的 4 个氨基酸分子要大,从而缩小了活性位点“口袋”有效的空间位置,因此,尽管杀虫药剂分子在化学结构上与乙酰胆碱非常相似,但由于活性部位空间位置的改变使得这些杀虫药剂分子不能进入而与酶结合。

参 考 文 献

- [1] Fournier D, Bride J M, Hoffmann F *et al.* J Biol Chem, 1992a, 267:14270~14274.
- [2] Mouches C, Pasteur N, Berge J B *et al.* Science, 1986, 233:778~780.
- [3] Field L M, Devonshire A L, Forde B G. Biochem J, 1988, 251:309~312.
- [4] Fournier D, Bride J M, Poirie M *et al.* J Biol Chem, 1992b, 267:1840~1845.
- [5] Amichot M, Castella C, Cuang A *et al.* Pestic Biochem Physiol, 1992, 44:183~190.
- [6] Williamson M S, Denholm I, Bell C A *et al.* Mol Gen Genet, 1993, 240:17~22.
- [7] Hall L M C, Spierer P. EMBO J, 1986, 5:2949~2954.
- [8] Williamson M S, Crick S E, Moores G D *et al.* In: the Conference of Molecular Genetics, Ecology of Pesticides Resistance, 1995, pp. 2~6.
- [9] Moores G D, Devonshire A L, Denholm I. Bull Ent Res, 1988, 78:537~544.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [11] Watson M E E. Nucleic Acids Res. 1984, 12:5145~5164.
- [12] Schumacher M, Camp S, Maulet Y *et al.* Nature, 1986, 319:407~409.
- [13] Sussman J L, Harel M, Frolow F *et al.* Science, 1991, 253:872~879.

Characterization of Acetylcholinesterase Gene from Insecticide-resistant Housefly (*Musca domestica*)

Huang Yao Qiao Chuanling

(Institute of Zoology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Williamson M S Devonshire A L

(Rothamsted Experimental Station, Harpenden, Herts. AL5 2JQ, UK)

Abstract Acetylcholinesterase (AChE) is the target site for the organophosphates and carbamates in insects. Widespread use of these two classes of insecticides has led to the selection of resistance. Target modification was regarded as a molecular mechanism in some resistance species. The altered AChEs with reduced sensitive to inhibition are related to this resistance. AChE genes from two insecticide-resistant housefly (*Musca domestica*) strains D3 and Kash were isolated and sequenced using RT-PCR and streptavidin-linked magnetic bead techniques. The cDNAs have a 2082 bp open reading frame from which the complete amino acid sequence of AChE has been deduced. Some differences of nucleotide sequence and four point mutations of amino acid were found compared with that of a susceptible strain Cooper. Three substitutions are likely to confer insecticide insensitivity, which seems that D3 and Kash belong to CII2 pattern of resistance.

Key words *Musca domestica*, acetylcholinesterase gene, mutation, insecticide resistance