

## 小菜蛾乙酰胆碱酯酶 cDNA 片段的克隆和序列分析

王建军<sup>1,2</sup>, 韩召军<sup>1</sup>, 王荫长<sup>1</sup>

(1. 南京农业大学植保系, 农业部病虫监测与治理重点开放实验室, 南京 210095;

2. 扬州大学农学院植保系, 扬州 225009)

**摘要:** 利用反转录-多聚酶链式反应 (RT-PCR) 的方法对小菜蛾 *Plutella xylostella* 的乙酰胆碱酯酶基因 cDNA 片段进行了克隆和序列分析。通过简并性上游引物和下游引物扩增出了小菜蛾乙酰胆碱酯酶基因 281 bp 的 cDNA 片段。同源性分析表明, 该 cDNA 片段与其它昆虫乙酰胆碱酯酶基因序列具有较高的同源性。

**关键词:** 小菜蛾; 乙酰胆碱酯酶基因; 反转录-多聚酶链式反应; 序列分析

中图分类号: Q965 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296 (2002) 04-0544-04

### cDNA fragment clone and sequence analysis of acetylcholinesterase gene in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.)

WANG Jian-Jun<sup>1,2</sup>, HAN Zhao-Jun<sup>1</sup>, WANG Yin-Chang<sup>1</sup> (1. Key Laboratory of Monitoring and Management of Plant Diseases and Insects of Agricultural Ministry, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China; 2. Department of Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**Abstract:** Using RT-PCR, the partial cDNA sequence of the acetylcholinesterase gene in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) was analyzed. With the use of a pair of degenerate primers, one fragment of 281 bp was amplified from the fourth instar larva. Homologous analysis of the cloned cDNA amino acid sequence of acetylcholinesterase in diamondback moths and corresponding sequences of other source of amino acid sequences of acetylcholinesterase revealed that there is high degree of amino acid sequence homology between the diamondback moth and other insects.

**Key words:** *Plutella xylostella*; acetylcholinesterase gene; RT-PCR; sequence analysis

乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE, EC 3.1.1.7) 通过迅速水解神经递质乙酰胆碱而终止胆碱能突触传递。在昆虫中, AChE 是有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的作用靶标。有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的广泛使用已导致了許多昆虫种群对这两类杀虫剂产生了抗性, 而一些重要农业和卫生害虫对这两类杀虫剂的抗药性又推动了对害虫乙酰胆碱酯酶的研究。

小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.) 是甘蓝、花椰菜和小白菜等十字花科蔬菜上的主要害虫, 在我国局部地区对目前应用的包括有机磷杀虫剂在内的几乎

所有类型的常用杀虫剂都已产生了抗性。关于小菜蛾对有机磷杀虫剂的抗性机理, 国内虽然有一些研究, 但除了 Huang 等 (1998) 对抗性相关谷胱甘肽 S-转移酶进行了克隆和表达外, 主要局限于酶学水平。在本研究中, 我们利用反转录多聚酶链式反应 (reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR) 的方法对小菜蛾乙酰胆碱酯酶基因 cDNA 片段进行了克隆和序列分析, 为获取小菜蛾乙酰胆碱酯酶基因全序列以及研究其变构乙酰胆碱酯酶的分子机制奠定基础。

基金项目: 973 国家重点基础研究项目 (J200016207), 江苏省 95 重点攻关课题 (BE96370)

第一作者简介: 王建军, 男, 1970 年 1 月生, 江苏海安人, 博士, 现在扬州大学农学院植保系工作, 研究方向为害虫抗药性和杀虫剂毒理,

E-mail: phdwj@hotmail.com

收稿日期 Received: 2000-08-29; 接受日期 Accepted: 2001-05-10

## 1 材料与方法

### 1.1 供试虫源

敏感品系由湖北农科院植保所惠赠。室内用萝卜苗饲养,饲养温度为 25℃,光照 16 h。

### 1.2 主要试剂和仪器

M-MLV 反转录酶, Taq DNA 聚合酶, Wizard PCR Preps DNA 纯化试剂盒, pGEM-T vector 均为 Promega 公司产品, PCR 引物由大连 TaKaRa 公司合成, PCR 扩增仪为 Hybaid Omnigene thermocycler (英国)。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 总 RNA 的提取:** 用改进的异硫氰酸胍法从小菜蛾 4 龄幼虫中提取总 RNA。小菜蛾置于 1 只 Eppendorf 管中,用液氮碾碎,然后加入 100  $\mu$ L Gu-HCl 缓冲液 (8 mol/L 胍、20 mmol/L MOPS 和 20 mmol/L EDTA, pH 7.0), 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 1 mol/L 醋酸和 0.7 体积的无水乙醇, 于 -20℃ 沉淀 RNA。

**1.3.2 单链 cDNA 合成:** 取 1~2  $\mu$ g RNA, 1  $\mu$ g Oligo (dT<sub>15</sub>) (2  $\mu$ L), 以及 10  $\mu$ L 矿物油于 0.2 mL 扩增管中, 离心 2 min 后, 扩增管于 70℃ 水浴 7 min, 然后立即置于冰浴中冷却 10 min。再向扩增管中加入下列试剂: 5  $\times$  RT 缓冲液 5.0  $\mu$ L, dNTP (10 mmol/L) 1.25  $\mu$ L, RNasin (40 U/ $\mu$ L) 1.0  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 1.75  $\mu$ L。将上述混合物于 42℃ 加热 2 min 后, 再加入逆转录酶 M-MLVRT (200 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L。在 PCR 仪内完成下述逆转录过程: 42℃ 保温 60 min, 99℃ 灭活 5 min, 冷却至 4℃。

**1.3.3 引物序列:** 根据已发表的乙酰胆碱酯酶氨基酸序列的保守性区域 (Hall and Spierer, 1986; Fournier *et al.*, 1989; Zhu and Clark, 1995; Hall and Malcom, 1991; Anthony *et al.*, 1995; Malcolm *et al.*, 1998; Takashi *et al.*, 2000; Williamson *et al.*, 1992), 分别设计简并性上游引物和下游引物。

上游引物: 5'-TGGATHAYGGNGGNGG-3'

下游引物: 5'-CCNGCNSWYTCNCCRAA-3'

**1.3.4 PCR 扩增小菜蛾乙酰胆碱酯酶基因 cDNA 片段:** 50  $\mu$ L 反应体系中含: 第一链 cDNA 产物 2  $\mu$ L, 5 mL Taq DNA 聚合酶缓冲液, 2.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mmol/L dNTP, 2  $\mu$ mol/L 上游引物和下游引物, 和 2.5 U Taq DNA 多聚酶。反应条件为 94℃ 预变性

3 min, 94℃ 变性 1 min, 50℃ 退火 2 min, 72℃ 延伸 3 min, 循环 35 次, 72℃ 延伸 10 min。

**1.3.5 PCR 产物的克隆与测序:** PCR 产物经低熔点琼脂糖凝胶电泳回收和基因纯化试剂盒纯化后, 克隆于 pGEM-T 载体上, 用通用引物进行序列测定。

**1.3.6 序列分析:** 用 PC/GENE 序列分析软件将 DNA 序列翻译成蛋白质序列, 用 BLAST 软件做同源性比较分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 小菜蛾乙酰胆碱酯酶基因 cDNA 片段核苷酸序列及推导的氨基酸序列

通过 RT-PCR, 扩增出与预期 280 bp 相符的 cDNA 片段 (图 1)。将 PCR 产物克隆到 PGEM-T 载体中, 选取 3 个阳性克隆, 用通用引物测序。核苷酸序列及推导出的氨基酸序列见图 2。包括引物在内, 所得 cDNA 片段总长度为 281 bp, 推导出 94 个氨基酸残基, 与 Zhu 等 (1995) 报道的马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 乙酰胆碱酯酶基因 cDNA 片段大小完全相同。

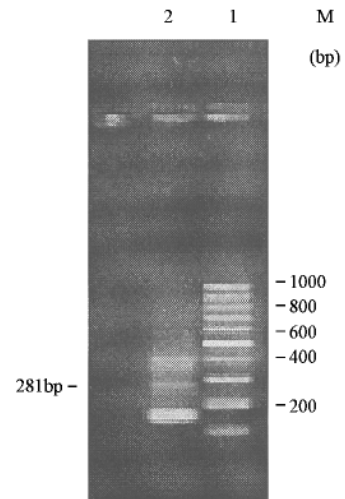


图 1 小菜蛾乙酰胆碱酯酶基因 cDNA 片段的 PCR 扩增  
Fig. 1 Amplification of cDNA fragment of acetylcholinesterase gene in *Plutella xylostella*

泳道 1: 标准分子量对照; 泳道 2: PCR 扩增产物

Lane 1: molecular weight marker; Lane 2: product of PCR amplification

### 2.2 同源性比较

将小菜蛾乙酰胆碱酯酶基因 cDNA 片段推导出

W I Y G G G Y M S G T A T L D L Y K A D I M  
 1 TGGATTATGGTGGGGGTTACATGAGTGGCACGGCAACACTTGATCTATATAAAGCCGACATAATG 66  
 A S S S D V I V A S M Q Y R V G A F G F L Y  
 67 GCGTCTTCGGGTGATGTGATCGTAGCCTCGATGCAGTATAGGGTTGGCGGTTCCGATTTTGTAC 132  
 L N K Y F S P G S E E A A G N M G L W D Q Q  
 133 CTTAACAATACTTTTCCACCTGGTAGCGAGGAAGCGGCAGAAATATGGGCTTGTGGGATCAACAG 198  
 L A I R W I K D N A R A F G G D P E L I T L  
 199 CTGGCTATTCGTTGGATAAAAAGATAACGCCCGAGCGTTTGGAGGTGACCTGAACCTATAACGTTG 264  
 F G E S A G  
 265 TTGGGGAATCAGCAGG 281

图 2 小菜蛾乙酰胆碱酯酶基因 cDNA 片段核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 2 The partial cDNA sequence and deduced amino acid sequence of acetylcholinesterase in the diamondback moth, *P. xylostella*

加有下划线的为引物序列, 核苷酸序列总长为 281 bp, 除引物外共有 82 个氨基酸

The underlined sequences represent primers. The cloned sequence consists of 281 bp;

82 amino acid residues are deduced when primer sequences are exclusive

<i>Plutella xylostella</i>	1	WIYGGGYMSGTATLDLYKADIMASSSDVIVASMQYRVGAFGLYLNKYF-S	50
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	162	*****V**D**I*AT*****L*S*****R**	211
<i>Nephotettix cincticeps</i>	205	*****I**D**MV*AT*****SPEL-	254
<i>Anopheles stephensi</i>	170	*****F***S***I*N*E*L*AVGN*****AP*I-N	219
<i>Aedes aegypti</i>	169	*****F***S***V*N*EML*AVGN*****S***F**AP*L-N	216
<i>Drosophila melanogaster</i>	281	*****F**I*S***I*N*****AVGN*****F*****H*APEMP*	330
<i>Musca domestica</i>	223	*****F*T*S***I*N*E**SAVGN*****I***L*****H*SPVM-P	272
Chicken	141	*****FTG*SVS**V*DGRYL*AAEEAV*V*N***SL***A*-----	185
<i>Torpedo californica</i>	127	*****FY**SS***V*NGKYL*YTEE*VLV*LS*****A*H-----	171
<i>Plutella xylostella</i>	51	PGSEEAAGNMGLWDQQLAIRWIKDNARAFGGDPELITLFGESAG	94
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	212	R**D*TP*****I*****A*****D*****	255
<i>Nephotettix cincticeps</i>	255	*****P**L*****A***Q***A*IAN*****C*****	298
<i>Anopheles stephensi</i>	220	GYE*D*P***M***A*****I*E**K*****D*****	263
<i>Aedes aegypti</i>	217	--DDD*P**V*****A*****L*E**K*****D*****	260
<i>Drosophila melanogaster</i>	331	EFA***P***V*****A*****L***H***N**WM*****	375
<i>Musca domestica</i>	273	GFE***P**V*****A**L**L*E*****N**WM*****	316
Chicken	186	A*HIRD*P**V*****R**LQ*VR***E*****D*****	229
<i>Torpedo californica</i>	172	--*Q**P**V**L**RM*LQ*VH**IQF*****KTV*I*****	215

图 3 小菜蛾乙酰胆碱酯酶基因 cDNA 片段氨基酸序列与其它生物相关序列的同源性分析

Fig. 3 Homologous analysis of cloned cDNA amino acid sequence of acetylcholinesterase in *P. xylostella* and corresponding sequences of acetylcholinesterase from other sources

\* 代表与小菜蛾乙酰胆碱酯酶对应位置相同的氨基酸

Asterisks (\*) indicate an amino acid identity compared to the sequence in *P. xylostella*

的 94 个氨基酸残基, 与已知的昆虫和鸡、电鳐等生物乙酰胆碱酯酶氨基酸序列进行同源性分析, 结

果见图 3。从图中可以看出, 本实验所得小菜蛾乙酰胆碱酯酶基因 cDNA 片段氨基酸序列与鞘翅目昆

虫马铃薯叶甲 *Leptontarsa decemlineata* 的同源性最高, 达到 83%, 与同翅目昆虫黑尾叶蝉 *Nephotettix cincticeps* 的同源性为 79%, 与双翅目昆虫斯氏按蚊 *Anopheles stephensi*、埃及伊蚊 *Aedes aegypti*、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、家蝇 *Musca domestica* 的同源性分别为 73%、69%、69% 和 67%, 与脊椎动物鸡和电鳐 *Torpedo californica* 的同源性分别为 56% 和 54%。同源性分析结果表明, 我们获得的 281 bp 核苷酸序列编码小菜蛾乙酰胆碱酯酶部分氨基酸序列。

### 3 讨论

到目前为止, 已经从黑腹果蝇、家蝇、马铃薯叶甲、黑尾叶蝉、埃及伊蚊、斯氏按蚊、尖音库蚊 *Culex pipiens* 等 7 种昆虫中克隆和测序了乙酰胆碱酯酶基因 (Hall and Spierer, 1986; Fournier *et al.*, 1989; Zhu and Clark, 1995; Hall and Malcom, 1991; Anthony *et al.*, 1995; Malcolm *et al.*, 1998; Takashi *et al.*, 2000; Williamson *et al.*, 1992), 并且在果蝇、家蝇和马铃薯叶甲中发现了与抗性相关的 AChE 点突变。Zhu 等 (1997) 还利用专一性等位基因 PCR 扩增技术就马铃薯叶甲对二嗪农的靶标抗性进行了分子监测的尝试。但昆虫 AChE 的分子生物学研究仍然比较滞后, 许多重要农业害虫的 AChE 的分子特征、与外源药物的互作机理和变异 AChE 的分子机制尚不明确, 这种现状无疑是与 AChE 在昆虫和杀虫剂毒理学研究中的重要地位不相称的。在本研究中, 我们以重要农业害虫小菜蛾作为研究对象, 通过 RT-PCR 方法获得了 281 bp 的乙酰胆碱酯酶基因 cDNA 片段, 为进一步利用 cDNA 末端快速扩增和筛选 cDNA 文库获取小菜蛾乙酰胆碱酯酶基因全序列奠定了基础, 从而可能最终

明确小菜蛾变构乙酰胆碱酯酶的分子生物学机制。

### 参 考 文 献 (References)

- Anthony N, Rocheleau T, Mocelin G, Lee H L, French-Constant R H, 1995. Cloning, sequencing and functional expression of an acetylcholinesterase gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *FEBS Letts.*, 368: 461 - 465.
- Fournier D, Karch F, Bride J M, Hall L M, Berge J B, Spierer P, 1989. *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase gene structure: evolution and mutations. *J. Mol. Biol.*, 210: 15 - 22.
- Hall L M, Spierer P, 1986. The Ace locus of *Drosophila melanogaster*: structural gene for acetylcholinesterase with an unusual 5' leader. *EMBO J.*, 5: 2 949 - 2 954.
- Hall L M, Malcom C A, 1991. The acetylcholinesterase gene of *Anopheles stephensi*. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 11: 131 - 141.
- Huang H S, Hu N T, Yao Y E, Wu C Y, Chiang S W, Sun C N, 1998. Molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 28: 651 - 658.
- Malcolm C A, Bourguet D, Ascillo A, Rooker S J, Garvey C F, Hall L M C, Pasteur N, Raymond M, 1998. A sex-linked Ace gene, not linked to insensitive acetylcholinesterase-mediated insecticide resistance in *Culex pipiens*. *Insect Mol. Biol.*, 7: 107 - 120.
- Takashi T, Osamu H, Yoshiaki K, 2000. Absence of protein polymorphism attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30: 325 - 333.
- Williamson M S, Moores G D, Devonshire A L, 1992. Altered forms of acetylcholinesterase in insecticide-resistant houseflies (*Musca domestica*). In: Shafferman A, Velan B eds. *Multidisciplinary Approaches to Cholinesterase Functions*. New York: Plenum Press. 83 - 86.
- Zhu K Y, Clark J M, 1995. Cloning and sequencing of a cDNA encoding acetylcholinesterase in Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 25: 1 129 - 1 138.
- Zhu K Y, Lee S H, Clark J M, 1997. Validation of a point mutation of Acetylcholinesterase in Colorado potato beetle by polymerase chain reaction coupled to enzyme inhibition assay. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 57 (1): 28 - 35.