

小菜蛾 nAChR 靶标敏感性与沙蚕毒素类药物的抗性关系

程罗根¹, 于光², 李忠英³

(¹南京师范大学生命科学学院生物多样性与生物技术江苏省重点实验室, 南京 210097; ²南京中医药大学基础医学院, 南京 210046;

³贵州省农业科学院植保所, 贵阳 550006)

摘要: 【目的】研究抗杀虫双、杀螟丹和溴氰菊酯品系的神经乙酰胆碱受体及与它们对沙蚕毒素类药物的抗性间的关系。【方法】测定不同品系小菜蛾的神经乙酰胆碱受体与 ¹²⁵I 标记的 α -银环蛇毒素的结合率。【结果】抗杀虫双、杀螟丹品系小菜蛾的神经乙酰胆碱受体对沙蚕毒素类药物有显著的靶标不敏感性, 它们与配体的结合率大约分别是敏感品系的 66% 和 60%, 在溴氰菊酯抗性品系中没有明显变化。【结论】神经乙酰胆碱受体对杀虫剂敏感性下降可能是小菜蛾对沙蚕毒素类药物产生抗性的一种作用机理。

关键词: 小菜蛾; 杀虫双; 杀螟丹; 神经乙酰胆碱受体; 抗药性

Target Sensibility of Nerve Acetylcholine Acceptor and Nereistoxin Insecticides Resistance in Diamondback Moth, *Plutella xylostella* (L.)

CHENG Luo-gen¹, YU Guang², LI Zhong-ying³

(¹Jiangsu Key Laboratory for Biodiversity and Biotechnology, College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097;

²The Pre-clinical Medicine College, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046;

³Institute of Plant Protection, Guizhou Academy of Agricultural Science, Guiyang 550006)

Abstract: 【Objective】The relations between nerve acetylcholine receptor and three types of insecticide resistance in diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.), were analysed. 【Method】The combinative rate measurement of (3-[¹²⁵I] iodotyrosyl) α -bungarotoxin was applied in the analysis. 【Result】In the dimehypo resistant strain and the cartap resistant strain, the nerve acetylcholine receptor shown remarkable insensitivity to dimehypo and cartap, their binding rate to ligand was about 66% and 60% of the susceptible strain, respectively. 【Conclusion】The sensitivity to deltamethrin in the deltamethrin resistant strain did not show visible change. These results indicated that the decline in the sensitivity of nerve acetylcholine receptor to insecticide might be a potential mechanism to nereistoxin insecticides resistance in the diamondback moth.

Key words: Diamondback moth (*Plutella xylostella*); Dimehypo; Cartap; Nerve acetylcholine receptor; Insecticide resistance

0 引言

【研究意义】小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 是世界性十字花科蔬菜的主要害虫, 在中国各省区均有分布。据不完全统计, 小菜蛾大约已对 50 多种杀虫剂产生了抗性, 其中包括沙蚕毒素类药物、有机磷、有机氯、氨基甲酸酯、拟除虫菊酯、苯酰基硫脲类、昆虫生长调节剂类似物和苏云金杆菌 (Bt) 等。害虫抗药性是农

业害虫化学防治中面临的重大挑战。害虫产生抗药性后, 不科学地加大用量, 不仅会加速抗性的发展, 而且还会带来环境污染, 危及人体健康等问题。要有效地治理害虫的抗药性, 关键是要从根本上弄清抗性产生的机制。【前人研究进展】沙蚕毒素类药物是神经毒素类杀虫剂, 作用于神经乙酰胆碱受体, 对鳞翅目害虫有特效。随着沙蚕毒素类药物的广泛使用, 小菜蛾对这类药物已经有了很强的抗性, 而对其抗性研

收稿日期: 2007-02-05; 接受日期: 2007-04-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30160050)

作者简介: 程罗根 (1963-), 男, 安徽安庆人, 教授, 博士, 研究方向为抗药性遗传和抗性分子机理。Tel: 025-85891292; E-mail: chengluogen46@sohu.com

究主要集中在一些生化指标的检测和遗传分析等方面^[1-3],与作用靶标神经乙酰胆碱受体关系的研究尚未见报道。【本研究切入点】分离、纯化神经乙酰胆碱受体,观察其亚基组成,探讨纯化产物与¹²⁵I标记的沙蚕毒素类似物 α -银环蛇毒素的结合率,了解沙蚕毒素类药物对小菜蛾的抗性品系和敏感品系的神经乙酰胆碱受体的靶标敏感性;用¹²⁵I标记的 α -银环蛇毒素与头部全蛋白的结合实验,分析不同品系小菜蛾的神经乙酰胆碱受体的表达量。【拟解决的关键问题】通过结合率和表达量分析,进一步阐述小菜蛾神经乙酰胆碱受体与沙蚕毒素类药物的抗药性关系。

1 材料与方法

1.1 试材

抗溴氰菊酯、抗杀虫双、抗杀螟丹品系和敏感品系小菜蛾由贵州省农业科学院室内选育。供试昆虫的原始种群采自贵州省贵阳市花溪乡中曹村的甘蓝地,经室内饲养一代后测定4龄幼虫的LD₅₀值,与武汉市蔬菜研究所的敏感品系相比,对这3类药剂均属敏感种群。将此品系分成2部分,一部分保持其敏感性,另一部分在室内分别用杀虫双、杀螟丹和溴氰菊酯逐代选择培育抗性品系。经过119代的选育,抗性分别达到123、57和1276倍^[4,5]。

1.2 主要试剂

α -Bungarotoxin (SIGMA公司), 1 ml亲和层析柱、(3-[¹²⁵I]iodotyrosyl) α -Bungarotoxin (Amersham公司) (7.4 Bq/ml, 200 μ Ci/ml)。

1.3 方法

1.3.1 亲和层析柱的制备 参考说明书要求, 1 mmol·L⁻¹HCl洗柱,加 α -Bungarotoxin (5mg·ml⁻¹)于4℃保持4h;用缓冲液A (0.5 mol·L⁻¹ ethanolamine, 0.5 mol·L⁻¹ NaCl, pH 8.3)和缓冲液B (0.1 mol·L⁻¹ acetate, 0.5 mol·L⁻¹ NaCl, pH 4)反复洗柱,去除多余的未与 α -Bungarotoxin连接的活化位点;平衡缓冲液 (20 mmol·L⁻¹ PBS)平衡柱子备用。

1.3.2 头部全蛋白的提取 取若干小菜蛾的头部于裂解液 (1% TritonX-100, 50 mmol·L⁻¹ HEPES, 150 mmol·L⁻¹ NaCl, 0.5 mmol·L⁻¹ EDTA, 0.5 mmol·L⁻¹ EGTA, 1m mol·L⁻¹ NaF, 2 mmol·L⁻¹ PMSF)中冰上研磨30 min, 12 000 g离心10 min,取上清备用^[6]。

1.3.3 神经乙酰胆碱受体的纯化 将提取的小菜蛾头部的全蛋白加入到制备好的亲和层析柱中4℃共同孵育6h后,在冰中用10倍柱体积的平衡洗脱液 (20

mmol·L⁻¹ PBS)洗脱,去除未与 α -Bungarotoxin结合的杂蛋白。再用洗脱液 (20 mmol·L⁻¹ PBS, 1 mol·L⁻¹ NaCl)洗柱子收集目的蛋白,并立即于VDB (10 mmol·L⁻¹ MOPS, 100 mmol·L⁻¹ NaCl, 0.1 mol·L⁻¹ EDTA, 0.02% NaN₃)缓冲液中4℃反复透析,-70℃保存备用^[7]。

1.4 SDS-PAGE电泳

配制10%的SDS-PAGE胶,10 mA,130 V电泳,鉴定分离产物的亚基组成。电泳后用硝酸银染色,1%乙酸终止反应^[6]。测定分子量的标准蛋白从小到大为:鸡蛋清溶菌酶 (14.4 kD)、胰蛋白酶抑制剂 (20.1 kD)、牛碳酸肝酶 (31 kD)、兔肌动蛋白 (43 kD)、牛血清白蛋白 (66.2 kD)和兔磷酸化酶B (97.4 kD)。

1.5 放射性免疫反应

1.5.1 蛋白定量 5倍体积的考马斯亮蓝G-250加1倍体积的蛋白质样品 (2 ml, 1.6 mg·ml⁻¹), 均匀,静置10 min,595 nm检测光吸收值,对照标准曲线换算出蛋白质的浓度^[6]。

1.5.2 放射性免疫反应 将过量的(3-[¹²⁵I]iodotyrosyl) α -Bungarotoxin分别与等量纯化的4种品系的小菜蛾神经乙酰胆碱受体于4℃共同孵育过夜。在VDB缓冲液 (10 mmol·L⁻¹ MOPS, 100 mmol·L⁻¹ NaCl, 0.1 mmol·L⁻¹ EDTA, 0.02% NaN₃, pH 7.3)中反复透析,直至未与小菜蛾神经乙酰胆碱受体结合的多余(3-[¹²⁵I]iodotyrosyl) α -Bungarotoxin完全去除。 γ 射线测定仪检测试验结果^[8]。

2 结果与分析

2.1 小菜蛾神经乙酰胆碱受体的纯化

用10倍体积的平衡缓冲液洗涤已连接配基的亲和层析柱,提取各品系小菜蛾头部组织的全蛋白,G-250法检测洗脱产物,至无蛋白质洗出为止,换洗脱缓冲液 (20 mmol·L⁻¹ PBS, 1 mol·L⁻¹ NaCl)洗柱,洗脱产物在4℃保存3h以上,使神经乙酰胆碱受体可以与 α -Bungarotoxin充分结合。洗脱产物检测结果如图1所示。1~12管为平衡缓冲液洗脱产物,13~20管为洗脱缓冲液洗脱产物。从图1中可以看到不同品系小菜蛾均为单一的洗脱峰。由于纯化的是小菜蛾头部组织内源的神经乙酰胆碱受体,所以纯化的量较少,洗脱产物量大约为全蛋白的1/30。

2.2 纯化产物的SDS-PAGE电泳鉴定

将4种品系小菜蛾的纯化产物进行10%胶的SDS-PAGE电泳,从图2中可以看到4种品系纯化产

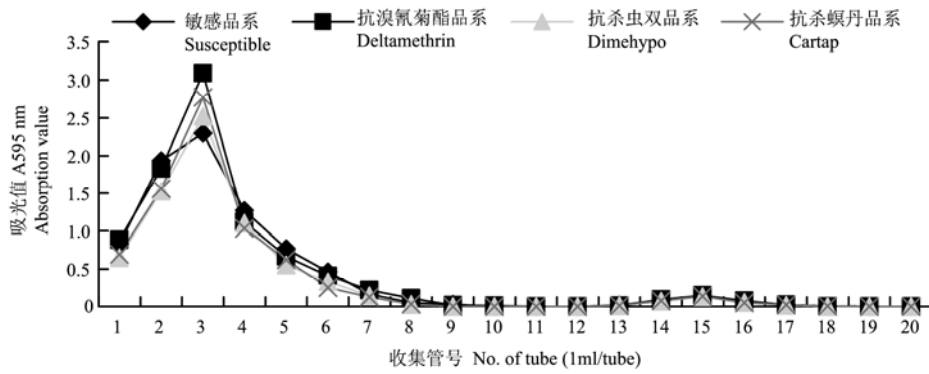
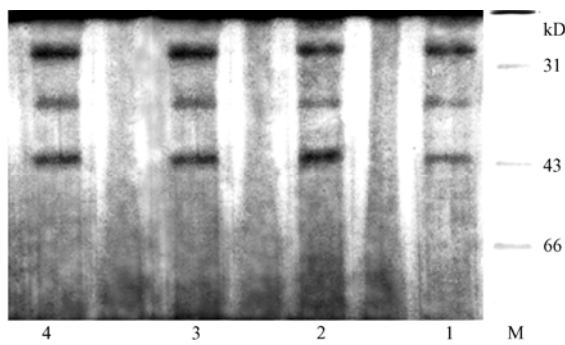


图 1 不同品系的小菜蛾的头部蛋白的洗脱图谱

Fig. 1 Elution curve of head proteins from different strains of diamondback moth



1: 敏感品系纯化产物; 2: 抗溴氰菊酯品系纯化产物; 3: 抗杀虫双品系纯化产物; 4: 抗杀螟丹品系纯化产物; M: 标准蛋白; 牛血清白蛋白, 66.2 kD; 兔肌动蛋白, 43 kD; 牛碳酸肝酶, 31 kD
1: Susceptible strain; 2: Deltamethrin resistant strain; 3: Dimehypo resistant strain; 4: Cartap resistant strain; M. Standard proteins: Bovine Serum Albumin, 66.2 kD; Rabbit Actin, 43 kD; Bovine Carbonic Anhydrase, 31 kD

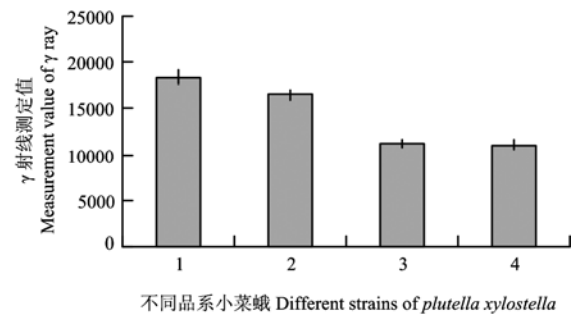
图 2 不同品系洗脱产物的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 2 SDS-PAGE of purification products of different strains

物均有 3 个不同亚基, 大小在 43、38 和 31 kD 左右。

2.3 放射性免疫实验鉴定

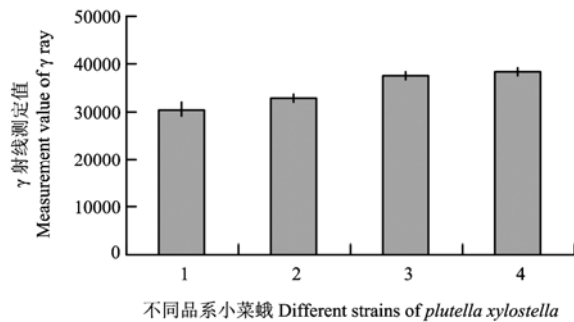
4 种不同品系的小菜蛾的神经乙酰胆碱受体与 (3-[¹²⁵I]iodotyrosyl) α-Bungarotoxin 的结合产物经过 γ 射线测定仪检测结果如图 3 所示。抗杀虫双与抗杀螟丹品系的小菜蛾神经乙酰胆碱受体有显著的靶标不敏感性, 方差检验 T 值分别达到 3.26 和 3.84。抗溴氰菊酯品系无显著的靶标不敏感性。4 种品系小菜蛾的头部全蛋白与 (3-[¹²⁵I]iodotyrosyl) α-Bungarotoxin 的结合实验表明抗杀虫双与抗杀螟丹品系的小菜蛾神经乙酰胆碱受体的表达量有所上升, 抗溴氰菊酯品系无显著的变化 (图 4)。



1: 敏感品系; 2: 抗溴氰菊酯品系; 3: 抗杀虫双品系; 4: 抗杀螟丹品系
1: Susceptible strain; 2: Deltamethrin resistant strain; 3: Dimehypo resistant strain; 4: Cartap resistant strain

图 3 神经乙酰胆碱受体放射性免疫实验结果

Fig. 3 Radioactivity immunity results of nerve acetylcholine receptor of four strains



1: 敏感品系; 2: 抗溴氰菊酯品系; 3: 抗杀虫双品系; 4: 抗杀螟丹品系
1: Susceptible strain; 2: Deltamethrin resistant strain; 3: Dimehypo resistant strain; 4: Cartap resistant strain

图 4 放射性免疫试验显示 4 种品系小菜蛾脑蛋白中的神经乙酰胆碱受体蛋白的表达量

Fig. 4 Radioactivity immunity results of nerve acetylcholine receptor combined with head protein to test the expression of nerve acetylcholine receptor of four strains

3 讨论

靶标不敏感性是昆虫抗药性的一个十分重要的机制。随着对害虫抗药性机制研究的深入,特别是分子生物学理论和技术的发展,害虫抗药性机制的研究也进入了分子水平。靶标不敏感机制不仅在生理、生化水平上进行了很多的研究,而且在一定程度和范围内从分子水平得到了阐述。有机磷、氨基甲酸酯、拟除虫菊酯和环戊二烯类杀虫剂的抗性都已先后被证明分别与它们的作用靶标乙酰胆碱酯酶、Na⁺离子通道和 GABA 受体的某些氨基酸的突变有关^[9-12]。

乙酰胆碱受体 (nAChR) 是昆虫神经系统的一个重要的杀虫剂作用靶标,作用于这个靶标的杀虫剂主要有沙蚕毒素类和烟碱类。沙蚕毒素类药物是一种神经毒素类杀虫剂,能降解为 DTT (1, 4-二硫苏糖醇) 类似物,以其巯基进攻身体阴离子部位及其附近的二硫键,占领受体,使二硫键还原为巯基,导致受体失活^[13]。

α -Bungarotoxin 是沙蚕毒素的结构类似物,在实验中我们通过以 α -银环蛇毒素为配基的亲亲和层析柱对小菜蛾脑组织蛋白质中的神经乙酰胆碱受体进行分离纯化,经过 SDS-PAGE 检测发现,4 种品系小菜蛾的神经乙酰胆碱受体均含有分子量为 40 kD 左右的 3 个亚基,与已经报道的大鼠脑中所含的亚基数相同^[14],而与已经报道的哺乳动物中的 4 种亚基,以及果蝇中的 2 种亚基不同^[14] (这种差异的功能效应需进一步研究)。但是在分子量上它们的大小相似,为 30 kD 到 60 kD 不等。通过 ¹²⁵I 标记的 α -银环蛇毒素与不同品系小菜蛾的神经乙酰胆碱受体的放射性免疫实验和方差分析结果表明,抗杀虫双品系和抗杀螟丹品系小菜蛾的乙酰胆碱受体与配体的结合率与敏感品系有显著差异 (图 3),而抗溴氰菊酯品系小菜蛾乙酰胆碱受体与配体的结合率基本接近敏感品系水平,从而证明杀虫双和杀螟丹等沙蚕毒素类杀虫剂的抗性品系小菜蛾的神经乙酰胆碱受体对沙蚕毒素类似物有显著的靶标不敏感性。但是,沙蚕毒素类杀虫剂的抗性水平和乙酰胆碱受体的靶标敏感性之间似乎没有对应关系,因为杀虫双的抗性水平高于杀螟丹,该抗性品系的乙酰胆碱受体与配体的结合率应低于抗杀螟丹品系,然而,实际得到的结果是杀虫双抗性品系 (66%) 略高于抗杀螟丹品系 (60%)。从小菜蛾全脑中乙酰胆碱受体的表达量分析,抗杀虫双品系和抗杀螟丹品系的表达量均高于敏感品系,而抗溴氰菊酯品系的表达水

平接近敏感品系 (图 4),表明乙酰胆碱受体的表达量升高可能与抗性水平以及靶标不敏感性有关。

昆虫 nAChRs 比较复杂,在分子水平的表现为,一些昆虫如果蝇至少有 10 个基因编码 nAChRs 亚基^[15]。另外,一些昆虫的 nAChRs 基因可以通过 RNA 编辑改变表达方式^[16]。在大多数情况下,昆虫 nAChRs 亚基基因可以实现功能性异质表达 (*Drosophila* D₂, D₃, D₄)^[17],人们对其亚基的组成和化学计量仍不太清楚^[18]。韩招久等^[19]利用简并引物,克隆出了小菜蛾 nAChR α 亚基的 3 种亚型,都具有典型的 α 亚基的结构,即 2 个相邻的半胱氨酸,由 2 个半胱氨酸之间二硫键形成包含 15 个氨基酸的胞外环,与烟碱和 α 银环蛇毒素结合有关的氨基酸残基。但是,nAChR 不敏感性与昆虫抗药性的关系目前还未见报道。因此,小菜蛾不同品系中 nAChRs 的变化机理和意义需进一步研究。

4 结论

沙蚕毒素类杀虫剂 (杀虫双和杀螟丹) 抗性品系小菜蛾的神经乙酰胆碱受体和 2 个对照品系-溴氰菊酯抗性品系和敏感品系的神经乙酰胆碱受体的亚基数量和分子大小基本相同;杀虫双和杀螟丹等沙蚕毒素类杀虫剂抗性品系的神经乙酰胆碱受体对沙蚕毒素类似物有显著的靶标不敏感性;乙酰胆碱受体的表达量升高可能与抗性水平以及靶标不敏感性有关。由于 nAChR 不敏感性与昆虫抗药性的关系目前尚少有文献报道,因此相关机理需进一步研究。

References

- [1] 程罗根,李凤良,韩招久,李忠英,陈之浩. 小菜蛾对杀虫双和杀螟丹抗性遗传的 DNA 随机扩增多态性研究. 昆虫学报, 2001, 44: 15-20.
Cheng L G, Li F L, Han Z J, Li Z Y, Chen Z H. Random amplified polymorphic DNA of resistance to dimehypo and cartap in diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Acta Entomologica Sinica*, 2001, 44: 15-20. (in Chinese)
- [2] 程罗根,李凤良,韩招久,李忠英,陈之浩. 小菜蛾对杀虫双和杀螟丹抗性的现实遗传力. 昆虫学报, 2001, 44: 263-267.
Cheng L G, Li F L, Han Z J, Li Z Y, Chen Z H. Realized heritability of resistance to dimehypo and cartap in diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Acta Entomologica Sinica*, 2001, 44: 263-267. (in Chinese)
- [3] 程罗根,李凤良,陈之浩,王荫长. 小菜蛾对杀虫双和杀螟丹抗性与艾氏剂环养化活性. 南京师范大学学报, 1999, 22(2): 78-81.

- Cheng L G, Li F L, Chen Z H, Wang Y C. Relation between resistance to dimehypo and cartap and aldrin epoxidase activities in diamondback moths. *Journal of Nanjing Normal University*, 1999, 22 (2): 78-81. (in Chinese)
- [4] Cheng L G, Zhang H, Chen Z H, Li Z Y. Genetic analysis of resistance to dimehypo in diamondback moth, *Plutella xylostella* L. (Lepid., Plutellidae), by representational difference analysis. *Journal of Pesticide Science*, 2005, 78: 117-122.
- [5] Cheng L G, Wang S Z, Chen Z H, Li Z Y. cDNA representational difference analysis of the deltamethrin-resistant and -susceptible populations in diamondback moth (*Plutella xylostella* L.). *Journal of Applied Entomology*, 2005, 129 (9/10): 515-520.
- [6] 萨姆布鲁克, 费里, 曼尼阿蒂斯著. 金冬雁, 梨孟枫译. 分子克隆. 北京: 科学出版社, 1992: 852-897.
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Translated by Jin D Y, Li M F. *Molecular Cloning* (2nd ed). Beijing: Science Press, 1992: 852-897. (in Chinese)
- [7] 郭晨云, 李卓玉, 袁静明. 乙酰胆碱受体结构与功能的研究进展. 中国生物工程杂志, 2002, 22(4): 40-43.
- Guo C Y, Li Z H Y, Yuan J M. The recent advances of the structure and function of acetylcholine receptor. *Journal of Chinese Biotechnology*, 2002, 22(4): 40-43. (in Chinese)
- [8] Peng J H, Fryer J D, Hurst R S, Schroeder K M, George A A, Morrissy S, Groppi V E, Leonard S S, Lukas R J. High affinity epibatidine binding of functional, human $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors stably and heterologously expressed *de novo* in human SH-EP1 cells. *JPET Fast Forward*. Published on December 8, 2004 as DOI: 10.1124/jpet.104.079004.
- [9] Zhu K Y, Lee S H, Clark J M. A point mutation of acetylcholinesterase associated with azinphosmethyl resistance and reduced fitness in Colorado potato beetle. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1996, 55(2): 100-108.
- [10] Williamson M S, Martinez Torres D, Hick C A, Devonshire A L. Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. *Molecular General Genetics*, 1996, 252(1-2): 51-56.
- [11] Ffrench-constant R H, Anthony N, Aronstein K, Rocheleall T, Stilwell G. Cyclodiene insecticide resistance: from molecular to population genetics. *Annual Review of Entomology*, 2000, 48: 449-466.
- [12] Sxhulz E, Bertrand S, Chamaon K, Gundelfinger E D, Bertrand D. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor from *Drosophila* two different types of α subunit coassemble within the same receptor complex. *Journal of Neurochemistry*, 2000, 74: 25370-2546.
- [13] 宫泽辉. 中枢烟碱样乙酰胆碱受体的分子药理学研究进展. 国外医学药学分册, 1997, 24(2): 65-69.
- Gong Z H. The recent advances of molecular pharmacology of acetylcholine receptor. *Foreign Medical Sciences Section on Pharmacy*, 1997, 24 (2): 65-69. (in Chinese)
- [14] 娄振军, 洪孝庄. 中枢烟碱型乙酰胆碱受体的分离纯化. 生命的化学, 1994, 14(3): 40-42.
- Lou Z J, Hong X Z. The separation and purification of acetylcholine receptor. *The Chemistry of Life*, 1994, 14 (3): 40-42. (in Chinese)
- [15] Sattelle D B, Culetto E, Grauso M, Raymond V, Franks C J, Towers P. Functional genomics of ionotropic acetylcholine receptors in *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*. *Novartis Found Symposium*, 2002, 245: 240-257.
- [16] Grauso M, Reenan R A, Culetto E, Sattelle D B. Novel putative nicotinic acetylcholine receptor subunit genes, Dalpha5, Dalpha6 and Dalpha7, in *Drosophila melanogaster* identify a new and highly conserved target of adenosine deaminase acting on RNA-mediated A-to-I2002pre-mRNA editing. *Genetics*, 2002, 160: 1519-1533.
- [17] Vermehren A, Trimmer B A. Expression and function of two nicotinic subunits in insect neurons. *Journal Neurobiol*, 2005, 62: 289-298.
- [18] Tomizawa M, Casida J E. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annual Review of Entomology*, 2003, 48: 339-364.
- [19] 韩招久, 韩召军, 李凤良, 李忠英, 陈之浩. 小菜蛾烟碱型乙酰胆碱受体 α 亚基 cDNA 片段的克隆和序列分析. 南京农业大学学报, 2003, 26(1): 29-32.
- Han Z J, Han Z J, Li F L, Li Z Y, Chen Z H. Cloning and sequence analysis of a cDNA fragment encoding α subunit of nicotinic acetylcholine receptor from *Plutella xylostella*. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2003, 26(1): 29-32. (in Chinese)

(责任编辑 赵利辉, 毕京翠)