

# 氰戊菊酯抗性和敏感品系棉蚜部分钠离子 通道基因的克隆

孙鲁娟, 高希武, 郑炳宗

(中国农业大学昆虫系, 北京 100094)

**摘要:** 在室内选育出了对氰戊菊酯抗性达 199.54 倍的棉蚜品系。设计了 3 条简并引物进行嵌套式 PCR 扩增, 得到了氰戊菊酯敏感品系和抗性品系棉蚜钠离子通道基因 IIS4-IIS6 区的基因片段。序列分析表明, 氰戊菊酯抗性品系棉蚜没有发生 *kdr* 或 *super-kdr* 突变, 但是与敏感品系相比, 抗性品系钠离子通道基因 IIS4-IIS6 区有 2 个核苷酸发生了突变 (T2A 和 A34T), 并由此导致了 1 个氨基酸的突变 (M12L), 推测该突变与棉蚜对氰戊菊酯产生抗性有关。

**关键词:** 棉蚜; 氰戊菊酯; 钠离子通道

S561 A

## Cloning of Partial Sodium Channel Gene From Strains of Fenvalerate-resistant and Susceptible Cotton Aphid (*Aphis gossypii* Glover)

SUN Lu-juan, GAO Xi-wu, ZHENG Bing-zong

(Department of Entomology, China Agricultural University, Beijing 100094)

**Abstract:** The strain of fenvalerate-resistant cotton aphid was selected using fenvalerate insecticide in the laboratory. The resistance factor of the strain was 199.54. Three degenerate primers were designed and used to perform PCR amplification. A cDNA encoding partial sodium ion channel gene was cloned from the fenvalerate-susceptible and -resistant strains. There were two nucleotide acid differences between fenvalerate-resistant strain and -susceptible strain, resulting in an amino acid mutation (Met→Leu). It is predicted that the mutation is related to the fenvalerate resistance of cotton aphid.

**Key words:** Cotton aphid; Fenvalerate; Sodium channel

20 世纪 70 年代末至 80 年代初, 拟除虫菊酯类农药的大量使用, 很好地控制了多种害虫的危害, 挽回了巨大的经济损失。但随之而来的是害虫对这类农药迅速地产生抗性。Busvine<sup>[1]</sup> 最早报道在 DDT 抗性家蝇 *Musca domestica* 中存在一种能抵抗 DDT 击倒的抗性因子, 并称其为击倒抗性 (knockdown resistance, *kdr*)。电生理研究表明, 这种抗性是由于昆虫神经敏感性降低而引起的。随后在其它多种 DDT 或菊酯类抗性昆虫中陆续报道了这种击倒抗性现象, 可以说击倒抗性是许多种害虫对菊酯类农药产生抗性的重要机制<sup>[2]</sup>。近年来, 新发展起来的分子生物学技术被广泛用于害虫抗药性的研究, 加快了

人们对害虫抗药性的分子机制的了解。已经明确, 拟除虫菊酯农药的主要作用靶标是神经膜上的电压门控钠离子通道, 正常昆虫神经膜钠离子通道发生突变后, 造成昆虫对菊酯类农药的敏感性降低, 从而产生抗性<sup>[3]</sup>。

棉蚜 *Aphis gossypii* Glover 属同翅目蚜科, 是世界性的棉花、瓜类害虫。一年中发生代数多, 繁殖力强, 在棉花苗期为害严重。为减少棉蚜给棉花生产带来的经济损失, 长期以来主要靠杀虫剂进行防治。随着杀虫剂广泛地大量使用, 棉蚜的抗药性也随之产生且日趋严重。特别是使用拟除虫菊酯农药以后, 棉蚜对该类药剂迅速产生了抗性, 如在山东聊城

收稿日期: 2003-01-07

基金项目: 国家重大基础研究“973”资助项目 (G2000016207) 和“863”害虫抗药性基因快速检测资助项目

作者简介: 孙鲁娟 (1975-), 女, 山东济宁人, 博士, 主要从事昆虫毒理学研究。高希武为通讯作者, Tel: 010-62892974; E-mail: gaoxiwu@263.net.cn

地区,1985年与1980年相比,棉蚜对溴氰菊酯的抗性增长了3 200倍<sup>[4]</sup>。1985年中国科学院动物研究所调查了山东省几个重要棉区的棉蚜,发现拟除虫菊酯抗性增长到160~3 600倍,个别地区棉蚜抗性增长达数万倍。田间用该农药1 000倍稀释液甚至几百倍已控制不住棉蚜的危害<sup>[5]</sup>。棉蚜抗药性的迅速形成和发展给化学防治带来了很大的困难。笔者在实验室筛选了氰戊菊酯抗性品系,通过RT-PCR的方法克隆了氰戊菊酯抗性和敏感品系棉蚜电压门控钠离子通道基因的cDNA片段,并对其进行了结构分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料与试剂

氰戊菊酯敏感品系由新疆石河子大学张东海先生提供,氰戊菊酯抗性棉蚜品系采自中国农业科学院植物保护研究所河北廊坊棉花基地,在室内用氰戊菊酯选育得到。

RNA提取试剂盒购自北京博大公司,cDNA合成试剂盒购自Promega公司,引物在由上海博亚生物技术有限公司合成。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 生物测定** 用0.05% (v/v) Triton X-100的溶液将氰戊菊酯丙酮母液稀释成系列浓度。以含0.05% (v/v) Triton X-100的水作对照。取室内种植未接触过药剂的棉叶在药液中浸渍5 s取出,挂在阴凉处晾干后,插在盛有营养液的试剂瓶中。用毛笔将无翅成蚜接在棉叶上。每浓度至少接50头,重复3次,放入25℃培养箱中,检查24 h死亡虫数。用POLO软件计算LC<sub>50</sub>值。

**1.2.2 棉蚜总RNA的提取及cDNA的合成** 分别取适量抗性和敏感品系棉蚜,在液氮中研磨成粉,将此粉末转移到1.5 ml的离心管中,然后按照试剂盒说明提取总RNA(博大公司)。加入适量的无RNase的DNase除去残存的DNA,然后测定RNA的OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>进行定量。

cDNA合成试剂盒购自Promega公司,按试剂盒使用说明进行操作,即取1 μg总RNA,加入1 μl OligdT(50 μmol·L<sup>-1</sup>)和适量DEPC处理的水,置70℃温浴5 min后,迅速冷冻2 min,再加入5 μl dNTP(10 mmol·L<sup>-1</sup>),0.75 μl RNase抑制剂(40 U·μl<sup>-1</sup>),5 μl 10×反转录酶buffer和1 μl反转录酶(200 U·μl<sup>-1</sup>),混匀后置42℃温浴1 h,94℃灭活5 min,以此作为PCR模板。

**1.2.3 引物设计和合成** 根据Martinez-Torres等<sup>[6]</sup>方法稍作改动,设计了3条简并引物用于PCR半嵌套式扩增,预期PCR产物包括了*kdr*和*super-kdr*抗性突变位点。

家蝇钠离子通道基因片段(包含有*kdr*和*super-kdr*抗性有关的突变位点):

```

KLAKSWPTNLLISIMVIGRIMGALGNLTFVLCIIIF
AVMGMQIFGKNYIDHKDRFKDHELPRWNFTDFMHS
FMIVFRVLCGEWIESMWDCMYVGDVSCIP:FLA7VV
IGNLIVNLEPI
  
```

简并引物:

```

K L A K S W P
AARYTNGCNAARTCDTGCC →
      FPI
A K S W P T
GCNAARTCDTGCCSAC →
      FP2
V V L N L F L
GTGGTNYTB AAYCTYTTCTT
CACCANRAVTRGARAAGAA
←      API
  
```

R = A + G, Y = C + T, N = A + C + G + T, D = not C, S = C or G, B = not A

**1.2.4 PCR反应** 第一次PCR以1.2.3中的cDNA(2 μl)为模板,加入10×PCR缓冲液5 μl,10 μmol·L<sup>-1</sup>的正向和反向引物(FP1和API)各1.5 μl,10 mmol·L<sup>-1</sup> dNTP 1 μl,20 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> 5 μl, *Taq* DNA聚合酶0.3 μl(5 U·μl<sup>-1</sup>),加水至50 μl,混匀,离心。然后在液面上加2滴石蜡油,放入PCR仪扩增。反应条件为:94℃变性3 min,接着进行25个循环,循环条件为94℃ 30 s,48℃ 1 min,72℃ 2 min;然后72℃保温10 min。第二次PCR以FP2和API为引物,1 μl第一次PCR产物为模板进行扩增,反应条件不变。同时,用DNA代替cDNA为模板进行PCR扩增。扩增完毕后,用1.2%琼脂糖凝胶电泳检查,回收目的片段。

**1.2.5 PCR产物的克隆和鉴定** PCR产物经电泳回收纯化后,克隆到T-easy载体上(按Kit说明进行),然后转化大肠杆菌DH5α,挑取白色菌落,培养后提取少量质粒,用*Eco*RI酶切和PCR扩增2种方法鉴定重组克隆。

**1.2.6 序列测定及分析** 挑选含有目的片段的克

隆,放入液体 LB 培养基中(含有  $200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  的氨苄青霉素)震荡过夜,碱法提取质粒,采用 ABI377 全自动测序仪测序。测序结果用 DNASIS 软件进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 氰戊菊酯抗性棉蚜的生物测定

表 敏感品系(SS)和氰戊菊酯抗性品系(FR)棉蚜的生物测定结果

Table Analysis of dose-mortality in the FR and SS strains of the cotton aphids treated with fenvalerate by leaf-dipping

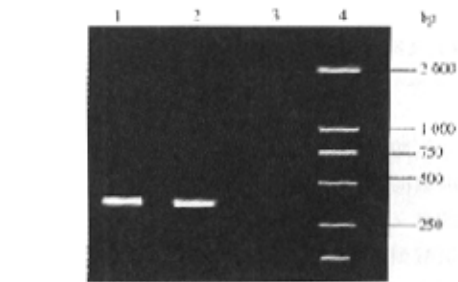
品系 Strain	斜率 Slope	IC <sub>50</sub> ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	抗性倍数 Resistance factor
敏感品系 SS	$1.00 \pm 0.20$	8.61(0.12 - 22.91)	1
抗性品系 FR	$1.53 \pm 3.15$	1718.52(1467.68 - 291.47)	199.54

### 2.2 棉蚜中部分钠离子通道基因的克隆

以氰戊菊酯抗性品系和敏感品系棉蚜的 cDNA 为模板,利用嵌套式 PCR 扩增得到了 1 条分子量为 340 bp 左右的特异性条带,与设计相符(图 1)。电泳回收纯化后,连接到 T-easy 载体上,得到重组子 pGEM/S 和 pGEM/R,根据蓝白斑筛选阳性重组子,用 *EcoRI* 酶切和 PCR 扩增方法进行鉴定,确定重组子中含有目的片段(图 2),然后进行测序。以 DNA 代替 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,没有出现任何条带,表明该片段中含有较大的内含子或者引物恰好跨越外显子和内含子。

以 T7 和 SP6 为测序引物,对 PCR 扩增获得的棉蚜抗性和敏感品系 cDNA 片段进行正向和反向测序。测序结果如图 3,核苷酸序列下面是氨基酸序

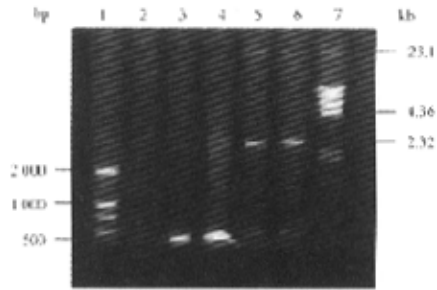
抗性品系是对从中国农业科学院植物保护研究所河北廊坊棉花基地采集来的棉蚜种群,在室内用氰戊菊酯选育而成。生物测定结果表明,敏感品系棉蚜的致死中浓度为  $8.61 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,氰戊菊酯抗性品系棉蚜的致死中浓度为  $1718.52 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,相对于敏感品系棉蚜的抗性倍数为 199.54 倍(表)。



泳道 1:敏感品系 cDNA 作为模板;泳道 2:抗性品系 cDNA 作为模板;泳道 3:阴性对照;泳道 4:标准分子量 DL2000  
lane 1: cDNA of susceptible strain as template; lane 2: cDNA of resistant strain as template; lane 3: control; lane 4: molecular weight marker DL2000

图 1 棉蚜钠离子通道基因 cDNA 片段的 PCR 扩增

Fig.1 PCR amplification of cDNA fragment from *para*-like gene in cotton aphid



泳道 1:标准分子量 DL2000;泳道 2:PCR 阴性对照;泳道 3:重组子 pGEM/S 为模板的 PCR 扩增;泳道 4:重组子 pGEM/R 为模板的 PCR 扩增;泳道 5:重组子 pGEM/S 经 *EcoRI* 酶切;泳道 6:重组子 pGEM/R 经 *EcoRI* 酶切;泳道 7:标准分子量  $\lambda$ /Hind III  
lane 1: molecular weight marker DL2000; lane 2: PCR without template; lane 3: PCR amplification with pGEM/S as template; lane 4: PCR amplification with pGEM/R as template; lane 5: pGEM/S was digested by *EcoRI*; lane 6: pGEM/R was digested by *EcoRI*; lane 7: molecular weight marker  $\lambda$ /Hind III

图 2 阳性重组子的鉴定

Fig.2 Identification of positive recombinants

列。序列分析结果表明,氰戊菊酯抗性品系棉蚜没有发生 *kdr* 或 *super-kdr* 突变,但是与敏感品系相比,抗性品系钠离子通道基因 IIS4-IIS6 区有核苷酸发生了突变(T2A 和 A34T),并由此导致了 1 个氨基酸的突变(M12L)。以前的研究表明昆虫钠离子通道基因高度保守,因此甲硫氨酸到亮氨酸的突变可能与棉蚜对氰戊菊酯的抗性有关<sup>[7]</sup>。在 GenBank 中进行同源搜寻,发现笔者获得的敏感品系棉蚜中钠离子通道基因的 IIS4-IIS6 片段,其编码的氨基酸序列与 Martinez-Torres 等<sup>[6]</sup>报道相一致。

		9		18		27		36		45		54						
SS:	<span style="border: 1px solid black;">TCT</span>	TGG	CCC	ACA	CTT	AAT	CTT	TTA	ATA	TCA	AIA	<span style="border: 1px solid black;">ATG</span>	GGT	CGA	ACC	ATT	GGT	GCT
RR:	<span style="border: 1px solid black;">TAA</span>	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	<span style="border: 1px solid black;">TTG</span>	---	---	---	---	---	---
	S	W	P	T	L	N	L	L	I	S	I	<span style="border: 1px solid black;">M</span>	G	R	T	I	G	A
		63		72		81		90		99		108						
	TTG	GGT	AAC	CTA	ACG	TTT	GTG	TTG	TGC	ATA	ATC	ATA	TTT	ATA	TTC	GCC	GTT	ATG
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	L	G	N	L	T	F	V	L	C	I	I	I	F	I	F	A	V	M
		117		126		135		144		153		162						
	GGT	ATG	CAG	TTA	TTT	GGA	AAA	AAC	TAC	ACA	GAA	AAA	ATG	TAC	TTA	TTC	AAA	CAC
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	G	M	Q	L	F	G	K	N	Y	T	E	K	M	Y	L	F	K	D
		171		180		189		198		207		216						
	CAC	GAG	CTT	CCC	CGG	TGG	AAC	TTC	ACC	GAT	TTT	TTG	CAC	TCG	TTT	ATG	ATA	GTA
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	H	E	L	P	R	W	N	F	T	D	F	L	H	S	F	M	I	V
		225		234		243		252		261		270						
	TTT	GGA	GTA	TTA	TGT	GGT	GAA	TGG	ATT	GAA	TCA	ATG	TGG	GAC	TGC	TTA	CAC	GTC
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	F	R	V	L	C	G	E	W	I	E	S	M	W	D	C	L	H	V
		279		288		297		306		315		324						
	GGA	GAA	CCA	ACG	TGT	AIA	CCA	TTC	TTC	TTG	GCT	ACT	GTT	GTC	AIC	GGT	AAC	CIT
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	G	E	P	T	C	I	P	F	F	L	A	T	V	V	I	G	N	L
		333		342														
	GTG	GTC	CTC	AAC	CTC	TTC	TT											
	---	---	---	---	---	---	---											
	V	V	L	N	L	F												

SS: 敏感品系; FR: 抗性品系; 核苷酸序列之下是推定的氨基酸序列; 方框表明该位点发生了突变, 在抗性品系中由亮氨酸取代甲硫氨酸  
 SS: Susceptible strain; FR: Resistant strain; below the nucleotide sequence is the deduced amino acid sequence; sequences in the frame suggest a mutation in the site, Met is replaced by Leu in the resistant strain

图 3 棉蚜钠离子通道基因部分片段的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig.3 Partia nucleotide and deduced amino acid sequence of para-like gene in cotton aphid

### 3 讨论

Loughney 等<sup>[8]</sup>首次从果蝇中分离克隆了 *para* 型钠离子通道基因, 并通过行为反应、电生理和遗传研究等方法阐明了钠离子通道基因的突变可能改变其功能, 从而导致昆虫对菊酯类农药产生抗性。Williamson 等<sup>[9]</sup>对家蝇敏感品系、*kdr* 品系和 *super-kdr* 品系棉蚜的钠离子通道基因序列进行了克隆和比较, 发现 *kdr* 品系和 *super-kdr* 品系棉蚜在同一位点都存在 1 个亮氨酸到苯丙氨酸的突变, 突变位于 IIS6 区域。随后在抗性家蝇、德国蜚蠊、烟蚜夜蛾、小菜蛾、棉铃虫及桃蚜等昆虫中也相继发现了 IIS6

区域的亮氨酸到苯丙氨酸的突变。由此可见, 亮氨酸到苯丙氨酸的突变在许多 *kdr* 抗性昆虫中具有较为普遍的意义<sup>[6]</sup>。笔者筛选的菊酯抗性棉蚜中虽然没有亮氨酸到苯丙氨酸的突变, 但是发现了 1 个甲硫氨酸到亮氨酸的突变, 该突变位点与家蝇 *super-kdr* 抗性位点一致, 所不同的是这个突变是甲硫氨酸到亮氨酸, 而并非家蝇 *super-kdr* 抗性品系中的从甲硫氨酸突变到苏氨酸。这种从同一氨基酸向不同氨基酸的突变在其它的昆虫中也有过报道, 如 Park 等<sup>[7]</sup>在 2 个氯菊酯汰选的抗性品系的钠离子通道上发现了 1 个突变, 这一突变与 *kdr* 抗性突变位点相同, 不同的是由组氨酸取代亮氨酸的突变, 而非一般

的亮氨酸到苯丙氨酸的突变。从已报道的结果看, 昆虫钠离子通道序列保守性非常高, 特别是在一些重要的位点(如 *kdr* 和 *super-kdr* 抗性位点), 氨基酸的突变通常会改变其功能, 影响昆虫的正常生存。当然, 笔者发现的钠离子通道中甲硫氨酸到亮氨酸的突变是否就是棉蚜对菊酯产生抗性的原因, 还有待于利用其它方法(如行为反应、基因表达结合电生理测定等)进一步鉴定。

## References

- [ 1 ] Busvine J R. Mechanism of resistance to insecticide in houseflies. *Nature*, 1951, 168: 193 - 195.
- [ 2 ] Shono T. Pyrethroid resistance: importance of the *kdr* - type mechanism. *Pesticide Science*, 1985, 10: 141 - 146.
- [ 3 ] Soderlund D M, Bloomquist T R, Wong F, Payne L L, Knipple D C. Molecular neurobiology: implications for insecticide action and resistance. *Pesticide Science*, 1989, 26 (4): 359 - 374.
- [ 4 ] 刘润玺. 棉蚜对拟除虫菊酯抗药性的研究. *中国棉花*, 1987, 14(1):42 - 45.  
Liu R X. Research on resistance of cotton aphid to pyrethroid. *China Cotton*, 1987, 14(1):42 - 45. (in Chinese)
- [ 5 ] 冯国蕾. 拟除虫菊酯杀虫剂与钠离子通道. 见:冷欣夫, 唐振华, 王荫长. 杀虫药剂分子毒理学与昆虫抗药性. 北京:农业出版社, 1996:72.  
Feng G L. Pyrethroid insecticide and sodium ion channel. In: Leng X F, Tang Z H, Wang M C. *Molecular Toxicology of Insecticides and Insect Resistance*. Beijing: Agricultural Press, 1996: 72. (in Chinese)
- [ 6 ] Martinez-Torres D, Devonshire A L, Williamson M S. Molecular studies of knockdown resistance to pyrethroides: cloning of domain II sodium channel gene sequences from insects. *Pesticide Science*, 1997, 51:265 - 270.
- [ 7 ] Park Y, Taylor M. A novel mutation L1029H in sodium channel resistance for *Heliothis virescens*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1997, 27(1):9 - 13.
- [ 8 ] Loughney K, Kreber R, Ganetzky B. Molecular analysis of the *para* locus, a sodium channel gene in *Drosophila*. *Cell*, 1989, 58: 1 143 - 1 154.
- [ 9 ] Williamson M S, Martinez-Torres D, Hieck C A. Identification of mutations in the housefly *para*-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides. *Molecular and General Genetics*, 1996, 252:51 - 60.

(责任编辑 王红艳)