

· 专论与综述 ·

靶标抗性点突变基因型检测技术

尚金燕^{1,2}, 唐振华^{2*}, 张传溪¹

(1 浙江大学 应用昆虫学研究所, 浙江 杭州 310029; 2 中国科学院 上海植物生理生态研究所, 上海 200032)

摘要: 杀虫剂的不合理使用导致害虫的抗药性日趋严重。抗药性是一种涉及一个或几个昆虫基因的遗传特征。靶标抗性通常与点突变相关, 对抗性相关的点突变的快速检测诊断是抗性治理的基础之一。评述了 5 种基因型检测技术——单链构象多态性、固相微型测序、双向等位特异 PCR 扩增、实时荧光定量 PCR 和焦磷酸测序的优缺点及其在突变检测中的应用。

关键词: 靶标抗性; 点突变; 基因型检测技术

中图分类号: Q754; S481.4

文献标识码: A

文章编号: 1008-7303 (2005) 03-0193-08

Genotyping Techniques of Identifying Point Mutation Associated with Target Resistance

SHANG Jin-yan^{1,2}, TANG Zhen-hua^{2*}, ZHANG Chuan-xi¹

(1. Institute of Applied Entomology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

2. Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract: Overapplication of insecticides made the insect pests serious resistance. Insecticide resistance is an inherited characteristic involving in one or more insect genes. Target resistance is usually associated with point mutation (s). Identifying the point mutation (s) is very important in resistance management. Comments on five genotyping techniques and their application in the identification of point mutation, including single-stranded conformational polymorphism, solid-phase minisequencing, bi-directional PCR amplification of specific alleles, real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction and pyrosequencing, were presented.

Key words: target resistance; point mutation; genotyping techniques

昆虫抗药性是一种微进化 (micro-evolution) 现象, 各种昆虫对高选择压杀虫剂均会产生抗性。据不完全统计, 至 2003 年已有 548 种昆虫对 310 种化合物产生抗药性, 其中报告抗性事例达 4782 起^[1]。

因昆虫抗药性的产生会带来如下影响: 农作物产量损失 20%~30%; 病媒介昆虫产生抗性后使

疟疾、登革热等传染病蔓延, 严重威胁人类的健康; 在美国, 因增加用药次数和用药量而增加的费用每年达 10 多亿美元; 据 WHO 统计, 全球每年死于农药中毒的人数高达 20 万; 在防治害虫的同时也杀灭了天敌, 从而造成次要害虫的再猖獗; 污染环境; 昆虫产生抗性的速度远远高于新杀虫剂的研发速度等。鉴于此, 昆虫抗药性一直是世界各

收稿日期: 2005-04-05; 修回日期: 2005-07-14.

作者简介: 尚金燕 (1974-), 女, 博士研究生, 主要研究方向为昆虫分子生物学; *通讯作者: 唐振华 (1939-), 男, 研究员, 博士生导师, 主要研究方向为杀虫剂分子毒理学. 联系电话: 021-54924264; E-mail: tangzh@public6.sta.net.cn

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目 (“973 项目”) (2003CB114403); 国家自然科学基金项目 (320230070).

国的研究热点之一。

自 20 世纪 90 年代以来,对害虫抗药性的研究已进入基因水平。研究表明,代谢抗性主要涉及解毒酶的基因扩增 (gene amplification) 和基因的过量表达 (over expression)^[1]; 靶标抗性主要涉及抗性基因点突变^[1]。因此对抗性相关基因的点突变的快速检测诊断以及对种群中基因型的测定是抗性治理的重要基础。最近,笔者与法国科学家合作,对世界各地 30 个黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 种群中的乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE) 的 *ace* 基因进行了克隆和测序,发现 18 个位点发生了突变,这些突变位点均用等位特异 PCR 扩增技术 (PCR amplification of specific alleles, PASA) 进行了验证,排除了 PCR 可能出现的假阳性^[2]。据笔者不完全统计,应用基因型检测技术,已鉴定了 12 种昆虫中与有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂抗性相关的 AChE 的点突变^[3], 14 种昆虫中与 DDT 和拟除虫菊酯抗性相关的钠离子通道的 *kdr* 基因突变^[4], 4 种昆虫中与环戊二烯抗性相关的 *Rdl* 基因突变^[5]。本文重点介绍 5 种检测方法: 单链构象多态性 (single-stranded conformational polymorphism, SSCP), 固相微型测序 (solid-phase minisequencing, SPMS), 双向等位特异 PCR 扩增技术 (bi-directional PCR amplification of specific alleles, bi-PASA), 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RFQ-PCR) 和焦磷酸测序 (pyrosequencing), 以及它们在靶标抗性点突变基因型检测中的应用。同时对这 5 种技术进行评述,旨在突出这 5 种技术的优缺点,以供研究者根据实际情况作出合理选择。

1 单链构象多态性 (SSCP)

自 Kanazawa 等^[6]证明可以根据 DNA 单链在非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳中的泳动行为探测点突变以来,经 Orita 等^[7]的发展完善,单链构象多态性逐渐成为一种成熟的探测点突变的方法,已经广泛地应用于基因突变的探测及各种基因的多态性研究。其原理是将 PCR 产物在加热或变性剂作用下生成单链,在非变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳,各单链根据一级结构折叠成不同的构象,各构象不同的片段迁移率不同,这样发生突变的待检片段就会因电泳迁移率不同而与野生型片段区分开来。

SSCP 技术操作简便、快速、经济、易于掌握,是突变分析中最为常用的方法。当分析的片段小于 200 bp 时,SSCP 灵敏度较高,但随着分析片段长度的增加,灵敏度呈下降趋势。此外,胶的组成成分、电泳温度、缓冲液组分、G + C 含量、缓冲液添加剂等都会影响 SSCP 的灵敏度^[8]。因此人们对该技术进行了改进,Maruya 等^[9]在低离子强度的条件下将 PCR 产物热变性,用非变性胶分析其 SSCP,结果发现产物的变性效率明显提高,检出了 3 种区别于野生型的含有突变的异常泳带。Iwahana 等^[10]用 MF-PCR-SSCP (multiple fluorescence-based PCR),使用两种荧光物质分别标记一对引物的正向和反向链的 5 端进行 PCR 扩增,然后进行 SSCP 分析,在同一电泳条件下对人的 7 个不同的 K-ras 突变进行了检测,突变位点全部被检出。荧光检测方法无需使用放射性同位素标记、银染等繁杂操作,电泳后应用计算机扫描分析结果,减少了后续操作中人为造成的差错,对重叠的 DNA 条带由于其颜色不同亦能分辨出来,提高了分辨率。近年来发展起来的将毛细管电泳技术 (capillary electrophoresis, CE) 与 SSCP 相结合的方法,是同时集高速度、自动化、高效分离于一体的突变分析方法。其原理是用 PCR 或双重 PCR 技术扩增待检测的 DNA 片段,扩增的产物经纯化后加入模板抑制剂,高温变性,冰浴冷却,毛细管电泳分离 PCR 产物,用计算机系统收集数据进行分析处理。Bosserhoff 等^[11]应用 CE-SSCP 成功地对与遗传性色素沉着症有关的 HFE 基因进行了突变分析。

在昆虫靶标抗性的点突变检测中,SSCP 技术是一种非常有用的工具。Coustau 等^[12]首先应用 SSCP 技术来检测昆虫对环戊二烯类杀虫剂的抗性。他们研究了黑腹果蝇、埃及伊蚊 *Aedes aegypti*、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 等昆虫中与靶标抗性有关的基因——抗狄氏剂基因 (resistant to dieldrin, *Rdl*),在黑腹果蝇、埃及伊蚊和赤拟谷盗的 *Rdl* 基因中发现了丙氨酸被色氨酸取代,在地中海实蝇 *Ceratitis capitata* 中发现丙氨酸被甘氨酸取代。Borsa 等^[13]利用 SSCP 检验了咖啡果小蠹 *Hypothenemus hampei* *Rdl* 基因外显子 7 的单链构象,证实 *Rdl* 基因的突变与环戊二烯类杀虫剂抗性相关。SSCP 技术在检测昆虫中存在的点突变时有如下优点: (1) 可以在预先不知道基因序列的前提下检测到已存在的突变; (2) 能够检测到与抗性相关的突变的多态性,然后识别不同的抗性表型;

(3)能够区分在形态上相似且具有不同核苷酸序列的近缘种昆虫。

2 固相微型测序 (SPMS)

固相微型测序是 Syvänen等^[14] 1990年发展起来的一种方法,用来检测扩增 DNA片段单个碱基的变化、小片段的删除或插入,是将 PCR和酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)相结合的基因突变检测技术。SPMS的基本原理是设计一个引物,其 3端结束在突变位点前一个碱基,然后在反应体系中加入 dNTP,只有 dNTP与模板 DNA被检测位点处的核苷三磷酸互补时,延伸反应才发生,但仅在连接一个碱基后就停止。标记的单链核苷酸残基与固定的靶片段结

合后即可检测碱基序列的变化。

在点突变的检测中,首先将含有已知突变的待测片段 PCR扩增,其中 5端引物用生物素标记。生物素标记的 PCR产物转移到链霉亲和素处理过的微量滴定孔中,也可用抗生物素蛋白对带有生物素标记的 PCR产物进行包埋,这样就可使 PCR产物固相化。变性除去未标记的链和多余的引物。然后加入设计的引物,再加入 dNTP开始测序反应。敏感品系模板能够与检测引物配对,dNTP能够被加上;抗性品系模板不能与检测引物配对,dNTP不能被加上。最后进行 ELISA显色反应,敏感品系能够被显色而抗性品系不能被显色,从而将二者鉴定出来。固相微型测序步骤如图 1所示。

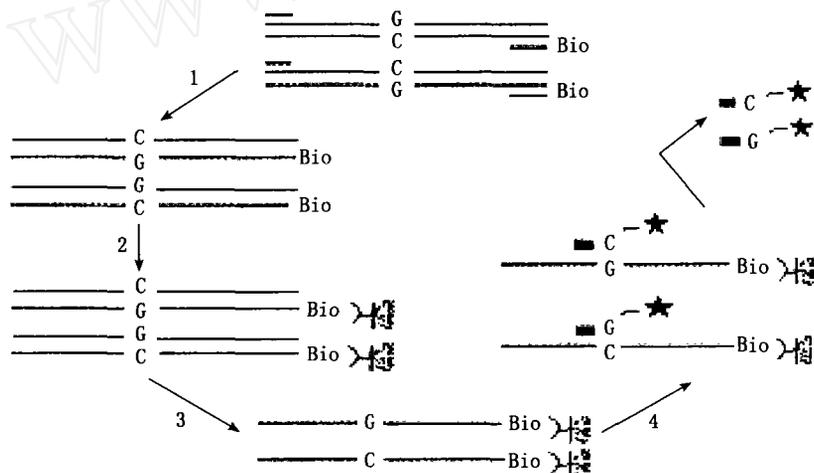


图 1 固相微型测序原理^[15]

Fig 1 Principle of solid-phase minisequencing

注: 1. 用一个生物素化引物和另一个非生物素化引物对横跨突变位点的 DNA 片段进行扩增。2 利用生物素与链霉亲和素和亲和吸附对 PCR 产物进行固相化。3 除去非生物素化的移动模板。4 在引物延伸反应中单个标记的核苷酸被整合进去,利用闪烁计数器对突变位点的核苷酸进行鉴定。图中的 Bio 为生物素标记,)-|表示链霉亲和素, 表示 ³H。

Note: 1. Amplification of a DNA fragment spanning the mutation with one biotinylated and one unbiotinylated primer 2. Affinity capture on a streptavidin-coated solid support 3. Removal of the unbiotinylated strand of the immobilized template 4. Identification of the nucleotide at the site of the mutation by the detection of scintillation counter based on the primer extension reaction, in which a single labeled nucleotide is incorporated Bio denotes biotin,)-| symbolizes streptavidin, and symbolizes ³H.

通常标记两种不同的 dNTP来检测核苷酸的变化,可以用同位素 [³H]^[15],也可使用地高辛配基^[16]或荧光标记^[17]。地高辛配基标记的测序反应还需进行抗过氧化物酶染色,再测定蓝色氧化产物的光密度值。固相微型测序的优点就是在同样的反应条件下,可以鉴定出所有的突变,而且一次可以分析大量的样品(96个样品)^[18]。该方法自建立以来,已广泛应用于遗传病基因的探测、诊断及各种基因的突变研究^[19-23]。

固相微型测序技术也能够快速有效地区分出抗性纯合子等位基因和敏感纯合子等位基因。Clark等^[24]使用地高辛配基标记的 dGTP和 dCTP对马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decem lineata*乙酰胆碱酯酶 *ace*基因突变 S291G和电压敏感性钠离子通道 *kdr*基因突变 L1014F进行固相微型测序时发现,抗性纯合子等位基因生成的蓝色氧化物的光密度值最高,而敏感纯合子等位基因生成的蓝色氧化物的光密度值最低,杂合子等位基因生成的蓝色

氧化物的光密度值则位于上述二者之间。Zhang 等^[16]利用固相微型测序技术分析了马铃薯甲虫谷硫磷抗性品系 (azinphosmethyl resistance, AZ-R) 和敏感品系 (SS) AChE 基因组 DNA 和 cDNA, 敏感品系 (SS) dATP 的 OD 值为抗性品系 (AZ-R) 的 10 倍。

3 双向等位特异 PCR 扩增技术 (bi-PASA)

双向等位特异 PCR 扩增技术是在快速检测单碱基突变的等位特异 PCR 扩增技术 (PCR amplification of specific alleles, PASA) 的基础上改进而成的^[25]。在等位特异 PCR 中, 关键是扩增引物的设计, 除一条共同引物外, 另一条引物的 3 端必须为抗性突变碱基或正常碱基, 通过扩增过程中严格控制 Mg^{2+} 浓度及退火温度, 选择性地扩增能严格配对的碱基序列。如以 3 端为突变碱基的引物扩增敏感个体时, 由于 3 端形成错配, 延伸反应就会受阻, 从而得不到特异长度的条带, 而对抗性个体则能正常扩增; 同样以 3 端为正常碱基的

引物进行扩增时, 敏感个体能正常扩增, 而抗性个体延伸反应受到抑制; 当 3 端为抗性突变碱基或正常碱基的引物均能正常扩增时, 则此个体为抗性的杂合子。因此 PASA 在一个 PCR 中只能检测出一个等位基因。

bi-PASA 需要设计两对引物, 一对为外部引物, 另一对为内部等位基因特异性引物。这对内部引物含有一个短的互补区, 5 端富含 G+C。在 bi-PASA 中, 等位基因之一是通过一个 PASA 反应按一个方向进行扩增, 而另一个等位基因则按另一个方向进行扩增, 产生两种大小不同的等位基因特异性的片段。杂合子有三条带被扩增, 而纯合子只能扩增出两条带。因此 bi-PASA 在一个 PCR 中就能区分出纯合子与杂合子。

双向等位特异 PCR 的扩增步骤如图 2 所示。4 个引物 (P, Q, A, B) 用箭头表示延伸方向, X 代表相对于另外一个等位基因的序列变化, 波浪线表示内部特异性引物之间 5 端的非互补序列。

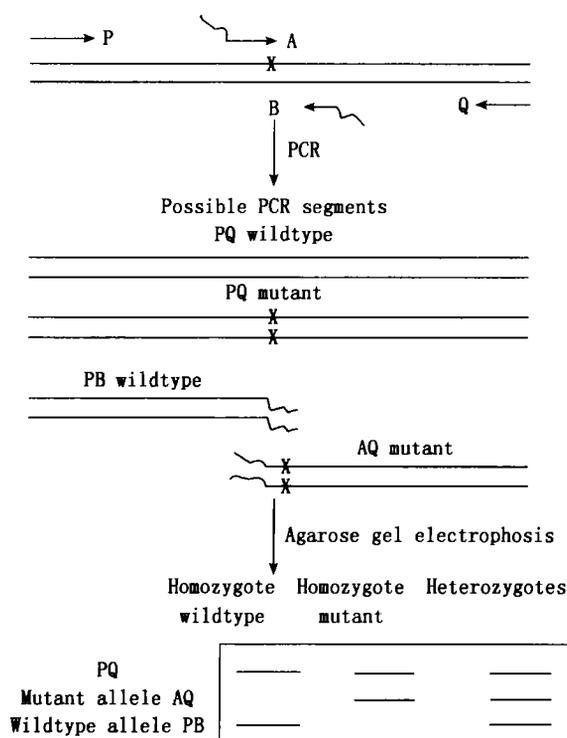


图 2 双向等位特异 PCR 扩增示意图^[25]

Fig 2 Sketch map of bi-directional PCR amplification of specific alleles

P, Q, A, B 为引物 (primer); PQ wildtype: PQ 野生型; PQ mutant: PQ 突变型; Possible PCR segments: 可能的 PCR 片段; PB wildtype: PB 野生型; AQ mutant: AQ 突变型; Agarose gel electrophoresis: 琼脂糖凝胶电泳; Homozygote wildtype: 同质体野生型; Homozygote mutant: 同质体突变型; Heterozygotes: 异质体; Mutant allele AQ: 突变型的等位基因 AQ; Wildtype allele PB: 野生型等位基因 PB.

PASA 技术用于证实不同虫种或种群中存在的抗性位点基因,或用来测定等位基因频率。在靶标抗性检测上,Steichen等^[26]首次利用 PASA 技术成功检测了环戊二烯类杀虫剂抗性黑腹果蝇

氨基丁酸受体 A (GABA_A) 基因外显子 7 的点突变。Zhu等^[27]采用 PASA 技术检测出抗 Bt 印度谷螟 *Plodia interpunctella* 的 ASP185 突变为 Glu185。王利华等^[28]对烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius) 成虫基因组 DNA 样品进行 PASA 检测,结果证实烟粉虱钠通道蛋白在 925 位的亮氨酸突变为异亮氨酸,该突变与拟除虫菊酯抗性密切相关。

4 实时荧光定量 PCR 技术 (RFQ-PCR)

实时荧光定量 PCR 技术于 1996 年由美国 Applied Biosystems 公司推出,它是一种在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程,数据收集是在 PCR 反应过程中进行而不是反应结束后。其反应的特征是用 PCR 产物第一次被测到的反应的循环数,即循环阈值 (cycle threshold, Ct 值) 来表示,因此,模板起始拷贝数越高,PCR 产物就越快被检测到。此外,该技术的一个重要特点是可以标准曲线对未知模板进行定量分析。该技术不仅实现了对 DNA 模板的定量,而且具有灵敏度高、特异性和可靠性更强、能实现多重反应、自动化程度高、无污染性、具实时性和准确性的特点。目前应用的几种实时荧光定量 PCR 技术有 SYBR green 荧光染料法^[29]、TaqMan 荧光探针法^[30,31]、Amplicon^[32]、分子信标法 (molecular beacon, MB)^[33]、LightCycler^[34]、复合探针法^[35]等。该项技术已被应用于病原体测定、肿瘤基因检测、免疫分析、基因表达、突变及其多态性研究等多个领域。

SYBR green 是一种双链特异性的 DNA 染料,只与双链 DNA 结合,在 PCR 反应体系中加入过量 SYBR green 荧光染料,该荧光染料特异性地掺入 DNA 双链后才发射荧光信号。当此双链 DNA 通过变性温度时,产生的荧光会快速衰减而形成特异的熔解曲线。如果扩增产物中存在序列突变,那么在变性过程中它与野生型序列之间的解链温度 (T_m) 就会产生差异; T_m 相差 2 以上,就可通过它们各自的熔解曲线将其分离。荧光染料的优势在于它能监测任何双链 DNA 序列的扩增,不需设计探针,使检测方法变得简便,同时也降低了检测

的成本。

TaqMan 荧光探针法的原理主要是利用 Taq 酶的 5'→3' 外切核酸酶活性,在 PCR 反应体系中加入荧光标记探针,该探针为一寡核苷酸,5' 端和 3' 端分别标记一个报告荧光基团和一个淬灭荧光基团。探针完整时,报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收;PCR 扩增时,Taq 酶的 5'→3' 外切酶活性将探针酶切降解,使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离,从而使荧光监测系统接收到荧光信号,即每扩增一条 DNA 链,就有一个荧光分子形成,实现了荧光信号的累积与 PCR 产物形成完全同步。突变检测时该探针横跨突变位点,如果所检测的靶序列中无突变,当溶液中有 PCR 产物 (模板) 时,该探针与模板退火,即产生了适合于核酸外切酶活性的底物,从而激活 Taq 酶的 5' 外切酶活性,将探针 5' 端连接的荧光分子从探针上切割下来,破坏了两个荧光分子间的荧光能量传递,从而发出荧光。切割的荧光分子数与 PCR 产物的数量成比例,因此,根据 PCR 反应液的荧光强度即可计算出初始模板的数量。TaqMan 探针根据其 3' 端标记的荧光淬灭基团的不同分为两种:常规 TaqMan 探针和 TaqMan MGB 探针。Anstead 等^[36]采用 TaqMan MGB 探针技术,设计了两条含有不同荧光染料的探针,成功地对桃蚜 *Myzus persicae* 中与击倒抗性有关的两个突变 L1014F (*kdr*) 和 M918T (*super-kdr*) 进行了高通量检测。

5 焦磷酸测序技术 (Pyrosequencing)

焦磷酸测序技术 (pyrosequencing) 是由 Nyren^[37] 于 1987 年发展起来的一种新型的酶联级联测序技术,是对短 (20~30 bp) 到中等长度 (50~100 bp) DNA 序列样品的高通量的、精确性和重复性好的分析方法。其反应原理是将测序引物与 PCR 扩增的单链 DNA 模板杂交,并与各种酶包括 DNA 聚合酶、ATP 硫酸化酶、荧光素酶、三磷酸腺苷双磷酸酶以及底物 5 磷酸硫酸 (APS)、荧光素一起共同孵育。当 4 种 dNTP 之一被加入反应体系,如与模板配对,则该 dNTP 与引物的末端形成共价键,dNTP 的焦磷酸基团被释放出来,ATP 硫酸化酶在 APS 存在的情况下催化焦磷酸生成 ATP。ATP 驱动荧光素酶介导的荧光素向氧化荧光素转化,氧化荧光素发出的可见光信号与 ATP 的量成正比,通过 CCD 光学系统即可获得一个特

异的检测峰,峰值的高低则和相匹配的碱基数成正比。ATP和未掺入的 dNTP由三磷酸腺苷双磷酸酶降解,光信号淬灭,并再生反应体系,然后再加入另一种 dNTP继续反应。这样模板序列就可以随聚合酶链式反应的进行而被实时地同步测定。

焦磷酸测序法适用于对已知短序列的 DNA 片段进行序列验证,重复性和精确性能与 Sanger DNA 测序法相媲美,而速度却大大提高。瑞典 Pyrosequencing AB 公司基于 Pyrosequencing 技术而研究开发的 PSQ 96 系统,10 min 内可分析 96 个样品。该技术对 DNA 的序列分析无需进行电泳,DNA 片段无需荧光标记,因此相应的仪器系统无需荧光分子的激发和检测装置。

Pyrosequencing 技术操作简单,结果准确可靠,可应用于 SNP 位点检测^[38]、基因突变检测^[39,40]、等位基因频率测定^[41,42]等领域。Benting 等^[43]利用焦磷酸测序技术成功地检测了棉蚜 *Aphis gossypii* 的拟除虫菊酯抗性品系钠通道 *kdr* 和 *super-kdr* 基因的突变,首次揭示了棉蚜的拟除虫菊酯抗性品系携带有杂合的 *kdr* 突变,同时也发现抗性品系的 *kdr* 位点处没有突变,但是却有纯合的 *super-kdr* 突变。

6 结语与展望

五种基于 PCR 的基因型检测技术在靶标抗性的点突变检测中各有优缺点。SSCP 是检测基因中点突变的一种快速而简便的方法,对小于 300 bp 的 DNA 片段,突变位点几乎可全部检出,敏感性达 90%~99%。该方法操作及技术条件易于掌握,与其他技术结合还可适用于大量样品的检测。其缺点在于不能确定突变的部位和性质,分析结果易受电泳及凝胶条件、缓冲液和扩增片段长度的影响。PASA 技术能区分表现型相同而基因型不同的杂合子和敏感纯合子,因而能够检测很低的抗性基因频率,可为抗性早期治理提供理论指导。但是,PASA 技术只能检测已知的突变,否则无法合成含有基因突变位点的 PASA 引物,必需依赖突变位点上下游序列,对模板 DNA 的质量敏感。SPMS 技术由于与 ELISA 技术相结合,具有较高的灵敏性,不受环境条件的影响,并能同时进行多个样品的分析。但与 PASA 技术相似,同样要求突变位点已知。其缺点是需要生物素标记,对抗性杂合子检测效果不好,费用昂贵。

Clark 等^[24]综合使用上述的 bi-PASA、SSCP 和 SPMS 对马铃薯甲虫中乙酰胆碱酯酶的 *ace* 基因突变 S291G、钠离子通道的 *kdr* 基因突变 L1014F 进行了分子检测比较。bi-PASA 在这 3 种技术中是最廉价的,每个样品的费用约为 0.8 美元,处理 96 个样品的时间大约为 5 h; SPMS 在 3 种技术中最昂贵,处理每个样品约需 5 美元,处理 96 个样品约需 4 h; SSCP 技术处理每个样品的费用约 1.2 美元,总费时 10.5~20.5 h。总之,这 3 种技术各有优缺点,况且目前若想使用单个技术要检测出所有的突变仍有一定的困难。

Kim 等^[44]应用 bi-PASA 和 SSCP 检测了马铃薯甲虫的 16 个田间种群中的氯菊酯抗性基因型,bi-PASA 和 SSCP 的可靠性分别为 95% 和 86%。

实时荧光定量 PCR 具有快速、灵敏、可靠、不需后处理和高通量检测的优点,但是也要求突变位点已知,测定条件严格,而且对探针设计合成的技术要求高。焦磷酸测序是一项非常有用的短序列适时检测技术,适合对大样本的快速检测,无需荧光标记,简单快速,但是在实际应用中需要特殊的设备,分析的长度有限。突变检测既是基因诊断的一种重要方法,也是分离和鉴定突变基因的必由之路。上述 5 种技术在突变分析中都有重要的应用价值,但这些技术都各有其优缺点,很难对某一技术进行综合性的评价,因此,在实际应用中要根据具体条件和要求作出最佳选择。从发展趋势看,使操作更简单、快速、敏感性和特异性更高,经济实用,更适合高通量、自动化检测仍是今后点突变检测技术的发展方向。随着计算机软件技术和网络信息的发展,非生物技术的广泛渗透,各种点突变检测技术可能会进一步优化组合,在突变检测中发挥更大的作用。例如,Kwon 等^[45]将 PASA 与 RQF-PCR 结合,发展成为一种简单精确的实时 PASA 检测法 (real-time PASA, rtPASA)。他们用 PASA 在抗性小菜蛾中检测到含有突变 T929 I 的抗性位点基因并以之为模板,通过调节退火温度、模板和引物浓度成为 rtPASA 的合适条件,应用敏感和抗性位点基因按各种比例混合获得标准 DNA 混合物进行实时检测,经等位基因频率对循环阈值 (Ct) 作图,即可获得抗性位点基因频率。在高严格条件下 (退火温度为 67 和 2 ng 模板 DNA),在抗性位点基因频率在 1%~80% 范围内,相关系数高达 0.997,其对数图呈直线。抗性位点基因频率低至 0.02% 时也可检测出。

基于抗性点突变的基因型检测技术不但可用于抗性基因的早期诊断,而且还可以从基因水平了解田间种群中与不同杀虫剂抗性相关的突变基因频率及其抗性发展趋势。Kwon等^[46]应用PASA技术在韩国检测了与*kdr*相关的两个突变,即T929I和L1041F在不同地区小菜蛾种群中的基因频率。L1041F和T929I突变的频率在所有检测的种群中分别为100%和70%~100%。为了考察这两个突变出现后的扩散速度,他们从1974年到1995年检测了该成虫的突变频率。早在1974年,尚未应用拟除虫菊酯防治该害虫前,就检测到L1041F突变,在大量使用拟除虫菊酯后,即1995年,开始出现T929I突变。这表明L1041F突变出现于T929I突变之前,也许这是由于以前使用DDT所致,而T929I突变的出现是由于随后换用拟除虫菊酯的结果。

这些抗性点突变基因型检测技术促进了对抗性分子遗传学的研究,通过对抗性点突变的测定,发现这些突变在种群中既可以单个突变出现,又可以组合方式出现^[47],揭示了它们的基因内重组的奥秘。这些发现不但有助于了解这些基因突变对抗性的影响,而且还有助于了解变构靶标的结构与功能的关系,可为设计新颖的、不易产生抗性的化合物开辟新途径,从而对新药的创制提供新的理论依据。

参考文献:

- [1] TANG Zhen-hua (唐振华), BI Qiang (毕强). Molecular Behavior of Insecticide Action (杀虫剂作用的分子行为) [M]. Shanghai (上海): Far East Publishers (上海远东出版社), 2003. 620-638, 639-657.
- [2] Menozzi P, Shi M A, Lougarre A, et al Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in *Drosophila melanogaster* populations[J]. *BMC Evol Biol*, 2004, 4: 4.
- [3] TANG Zhen-hua (唐振华), YUAN Jian-zhong (袁建忠), ZHUANG Pei-jun (庄佩君), et al 昆虫钠通道结构和击倒抗性有关的基因突变[J]. *Acta Entomol Sinica* (昆虫学报), 2004, 47(6): 830-836.
- [4] LN Jian-guo (林建国), ZHANG Chuan-xi (张传溪), TANG Zhen-hua (唐振华). 与昆虫抗药性相关的乙酰胆碱酯酶基因突变研究进展[J]. *Chin J Pestic Sci* (农药学报), 2005, 7(1): 1-6.
- [5] Hemingway J, Hawke N J, Mc L, et al The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes [J]. *Insect Biochem Mol*, 2004, 34: 653-665.
- [6] Kanazawa H, Nohmi T, Futai M. Analysis of Escherichia coli mutants of the H⁺-transporting ATPase: determination of altered site of the structural genes[J]. *Methods Enzymol*, 1986, 126: 595-603.
- [7] Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, et al Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1989, 86(8): 2766-2770.
- [8] Nataraj A J, Olivos-Glander I, Kusukawal N, et al SSCP and heteroduplex analysis for gel based mutation detection [J]. *Electrophoresis*, 1999, 20: 1177-1185.
- [9] Maruya E, Saji H, Yokoyama S PCR-LIS-SSCP (low ionic strength stranded conformation polymorphism) - a simple method for high resolution allele typing of HLA-DQB1 and DPB1 [J]. *Genet Res*, 1996, 6: 51-57.
- [10] Iwahana H, Yoshimoto K, Mizusawa N, et al Multiple fluorescence based PCR-SSCP analysis [J]. *BioTechniques*, 1994, 16: 296-305.
- [11] Bosserhoff A K, Seegers S, Hellerbrand C, et al Rapid genetic screening for hemochromatosis using automated SSCP-based capillary electrophoresis (SSCP-CE) [J]. *BioTechniques*, 1999, 26: 1106-1110.
- [12] Coustau C, French-Constant R. Detection of cyclohexene insecticide resistance-associated mutations by single-stranded conformational polymorphism analysis [J]. *Pestic Sci*, 1995, 43(4): 267-271.
- [13] Borsa P, Coustau C. Single-stranded DNA conformation polymorphism at the Rdl locus in *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) [J]. *Heredity*, 1996, 76: 124-129.
- [14] Syaänen A C, Alata-Setälä K, Harju L K, et al A primer-guided nucleotide incorporation assay in the genotyping of apolipoprotein E [J]. *Genetics*, 1990, 8: 684-692.
- [15] Syaänen A C, Ikonen E, Manninen T, et al Convenient and quantitative determination of the frequency of a mutant allele using solid-phase minisequencing: Application to aspartylglucosaminuria in Finland [J]. *Genetics*, 1992, 12: 590-595.
- [16] Zhang A G, Dunn J B, Clark J M. An efficient strategy for validation of a point mutation associated with acetylcholinesterase sensitivity to azinphosmethyl in Colorado potato beetle [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 1999, 65: 25-35.
- [17] Jaakkola E, Herzberg I, Crane A M, et al A novel human leucocyte antigen-DRB1 genotyping method based on multiplex primer extension reactions [J]. *Tissue Antigens*, 2004, 64(1): 88-95.
- [18] Pastinen T, Kurg A, Metspalu A, et al Minisequencing: A specific tool for DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide arrays [J]. *Genet Res*, 1997, 7(6): 606-614.
- [19] Bugalho M J, Domingues R, Sobrinho L. The minisequencing method: a simple strategy for genetic screening of MEN 2 families [J]. *BMC Genetics*, 2002, 3: 8.
- [20] Ferri G, Bini C, Ceccardi S, et al ABO genotyping by minisequencing analysis [J]. *Transfusion*, 2004, 44: 943-944.
- [21] Jalanko A, Kere J, Savilahti E, et al Screening for defined cystic fibrosis mutations by solid-phase minisequencing [J]. *Clin Chem*, 1992, 38(1): 39-43.
- [22] Suomalainen A, Syaänen A C. Quantitative analysis of human DNA

- sequences by PCR and solid-phase minisequencing [J]. *Mol Biotechnol*, 2000, 15: 123-131.
- [23] Fredriksson M, Barbany G, Liljedahl U, *et al* Assessing hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation by multiplexed SNP genotyping using microarrays and quantitative analysis of SNP alleles [J]. *Leukemia*, 2004, 18: 255-266.
- [24] Clark J M, Lee S H, Kim H J, *et al* DNA-based genotyping techniques for the detection of point mutations associated with insecticide resistance in Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* [J]. *Pest Manag Sci*, 2001, 57: 968-974.
- [25] Liu Q, Thorland E C, Heit J A, *et al* Overlapping PCR, for bidirectional PCR amplification of specific alleles: A rapid one-tube method for simultaneously differentiating homozygotes and heterozygotes [J]. *Genet Res*, 1997, 7: 389-398.
- [26] Steichen J C, French-Constant R H. Amplification of specific cydodiene insecticide resistance alleles by the detection of *Trypanosoma congolense* and *T. brucei* polymerase chain reaction [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 1994, 48: 1-7.
- [27] Zhu Y C, Kramer K J, Oppert B, *et al* cDNAs of aminopeptidase-like protein genes from *Plodia interpunctella* strains with different susceptibilities to *Bacillus thuringiensis* toxins [J]. *Insect Biochem Molec Biol*, 2000, 30: 215-224.
- [28] WANG Li-hua (王利华), WU Yi-dong (吴益东). 与拟除虫菊酯抗性相关的烟粉虱钠通道基因突变及其检测 [J]. *Acta Entomologica Sinica* (昆虫学报), 2004, 47 (4): 449-453.
- [29] Abe A, Inoue K, Tanaka T, *et al* Quantitation of hepatitis B virus genomic DNA by real-time detection PCR [J]. *J Clin Microbiol*, 1999, 37 (9): 2899-2903.
- [30] Weinberger K M, Wiedenmann E, Bohm S, *et al* Sensitive and accurate quantitation of hepatitis B virus DNA using a kinetic fluorescence detection system (TaqMan PCR) [J]. *J Virol Methods*, 2000, 85: 75-82.
- [31] Eun A J, Seoh M, Wong S. Simultaneous quantitation of two orchid viruses by the TaqMan real-time RT-PCR [J]. *J Virol Methods*, 2000, 87: 151-160.
- [32] Chen S, Yee A, Griffiths M, *et al* A rapid, sensitive and automated method for detection of *Salmonella* species in foods using AG-9600 Amplicon Analyzer [J]. *J Appl Microbiol*, 1997, 83: 314-321.
- [33] Tyagi S, Kramer F R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization [J]. *Nat Biotechnol*, 1996, 14 (3): 303-308.
- [34] Kreuzer K A, Lass U, Bohn A, *et al* LightCycler technology for the quantitation of bcr/abl fusion transcripts [J]. *Cancer Research*, 1999, 59 (13): 3171-3174.
- [35] Bertsch T, Zimmer W, Casarin W, *et al* Real-time PCR assay with fluorescent hybridization probes for rapid Interleukin-6 Promoter (174G C) Genotyping [J]. *Clin Chem*, 2001, 47 (10): 1873-1874.
- [36] Anstead J A, Williamson M S, Eleftherianos I, *et al* High-throughput detection of knockdown resistance in *Myzus persicae* using allelic discriminating quantitative PCR [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2004, 34 (8): 871-877.
- [37] Nyren P. Enzymatic method for continuous monitoring of DNA polymerase activity [J]. *Anal Biochem*, 1987, 167 (2): 235-238.
- [38] Zackrisson A L, Lindblom B. Identification of CYP2D6 alleles by single nucleotide polymorphism analysis using pyrosequencing [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2003, 59 (7): 521-526.
- [39] Ronaghi M, Elahi E. Discovery of single nucleotide polymorphisms and mutations by pyrosequencing [J]. *Comparative and Functional Genomics*, 2002, 3: 51-56.
- [40] Sivertsson A, Platz A, Hansson J, *et al* Pyrosequencing as an alternative to single-strand conformation polymorphism analysis for detection of N-ras mutations in human melanoma metastases [J]. *Clin Chem*, 2002, 48: 2164-2170.
- [41] Wasson J, Skolnick G, Love-Gregory L. Assessing allele frequencies of single nucleotide polymorphisms in DNA pools by pyrosequencing technology [J]. *Biotechniques*, 2002, 32 (5): 1144-1150.
- [42] Neve B, Froguel P, Corset L. Rapid SNP allele frequency determination in genomic DNA pools by pyrosequencing [J]. *Biotechniques*, 2002, 32 (5): 1138-1142.
- [43] Benting J, Häuser-Hahn I, Nauen R, *et al* Molecular diagnosis of resistance [J]. *Pflanzenschutz Nachrichten Bayer*, 2004, 57: 78-86.
- [44] Kim H J, Hawthorne D J, Peters T, *et al* Application of DNA-based genotyping techniques for the detection of *kdr*-like pyrethroid resistance in field populations of Colorado potato beetle [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 2005, 81: 85-96.
- [45] Kwon D H, Clark J M, Lee S H. Estimation of knockdown resistance in diamondback moth using real-time PASA [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 2004, 78: 39-48.
- [46] Kwon D H, Choi B R, Park H M, *et al* Knockdown resistance allele frequency in field populations of *Plutella xylostella* in Korea [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 2004, 80: 21-30.
- [47] Muterio A, Pralavorio M, Bride IM, *et al* Resistance-associated point mutations insecticide-insensitive acetylcholinesterase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91 (13): 5922-5926.

(Ed TANG J)