

罗光华, 宋俊贤, 姚 静, 等. 三化螟两个乙酰胆碱酯酶基因克隆及序列分析[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(3): 521-527.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2016.03.006

三化螟两个乙酰胆碱酯酶基因克隆及序列分析

罗光华¹, 宋俊贤², 姚 静¹, 郑少秋¹, 方继朝¹

(1. 江苏省农业科学院植物保护研究所, 江苏 南京 210014; 2. 江苏省溧阳市植保植检站, 江苏 溧阳 213300)

摘要: 乙酰胆碱酯酶(AChE)是有机磷(Organophosphate, OP)和氨基甲酸酯(Carbamate, CB)类杀虫剂的作用靶标。昆虫乙酰胆碱酯酶基因(*ace*)表达量的上升或基因突变导致其对杀虫剂的敏感性下降是昆虫产生抗药性的重要原因。本研究利用 RT-PCR 技术和 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术成功克隆到三化螟(*Scirpophaga incertulas* Walker)的两个乙酰胆碱酯酶基因, 分别命名为 *Siace1* 和 *Siace2*。*Siace1* 的完整开放阅读框(Open reading frame, ORF)长2 085 bp, 编码含 694 个氨基酸的乙酰胆碱酯酶 1(*SiAChE1*)。*Siace2* 的 ORF 长1 917 bp, 编码含 638 个氨基酸的乙酰胆碱酯酶 2(*SiAChE2*)。将三化螟的两个乙酰胆碱酯酶与已报道的各物种的乙酰胆碱酯酶进行相似性比较, 结果显示在蛋白水平上, *SiAChE1* 与台湾稻螟的 *AChE1* 有最高的相似性, 达到 94%; *SiAChE2* 与二化螟的 *AChE2* 具有最高的相似性, 为 98%。本研究为水稻上重要螟虫的乙酰胆碱酯酶基因对比研究提供了基础。

关键词: 三化螟; 乙酰胆碱酯酶基因; 克隆

中图分类号: S435.112⁺.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2016)03-0521-07

Cloning and molecular characterization of two acetylcholinesterase genes from *Scirpophaga incertulas* (Lepidoptera: Pyralidae)

LUO Guang-hua¹, SONG Jun-xian², YAO Jing¹, ZHENG Shao-qiu¹, FANG Ji-chao¹

(1. Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Liyang Plant Protection and Quarantine Station of Jiangsu, Liyang 213300, China)

Abstract: Acetylcholinesterase (AChE) is the target of organophosphate (OP) and carbamate (CB) insecticides. Mutations in the AChE gene (*ace*) leading to decreased insecticide susceptibility is responsible for decreased insecticides resistance in insects. In this study, two *Scirpophaga incertulas* Walker acetylcholinesterase genes, *Siace1* and *Siace2*, were cloned using RT-PCR and RACE. The open reading frame(ORF) of *Siace1* is 2 085 bp in length, encoding acetylcholinesterase 1 (*SiAChE1*) protein containing a calculated 694 amino acid (aa) residues. *Siace2* is 1 917 bp in length, encoding an acetylcholinesterase 2 (*SiAChE2*) containing 638 aa residues. At the aa level, *SiAChE1* shares the highest similarity (94%) with the *Chilo auricilius* AChE1, and *SiAChE2* shares the highest similarity with the *C. suppressalis* AChE2 (98%). This study provides a basis for future comparison of ace genes in different pyralididae insects in rice.

Key words: *Scirpophaga incertulas*; acetylcholinesterase; cloning

收稿日期: 2015-10-15

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201303017); 国家自然科学基金项目(31201505); 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(15)1055]

作者简介: 罗光华(1982-), 男, 江苏溧阳人, 博士, 副研究员, 主要从事农业害虫综合防控研究。(Tel)025-84390172; (E-mail) ghluo@jaas.ac.cn。宋俊贤为共同第一作者。

通讯作者: 方继朝, (E-mail) fangjc@jaas.ac.cn

昆虫的乙酰胆碱酯酶(Acetylcholinesterase, AChE)是有机磷和氨基甲酸酯类农药的作用靶标。昆虫对有机磷和氨基甲酸酯类农药产生抗药性的重要原因之一是乙酰胆碱酯酶基因(*ace*)保守区域内碱基突变使得相应氨基酸发生改变, 其产物 AChE 发生变构, 导致昆虫对杀虫剂的敏感性下降, 由此使

昆虫产生抗药性^[1-2]。随着广泛而持续地使用有机磷和氨基甲酸酯类农药,已发现多种昆虫的 *ace* 产生了与这两类药剂抗性相关的突变^[3-6]。昆虫 *ace* 上形成的抗性相关突变,有单个位点的突变,也有多个位点的同时突变。在二化螟(*Chilo suppressalis*)对三唑磷高抗的品系中,*AChE1* 的 A314S 单点突变使二化螟对三唑磷的抗性达数百倍或上千倍^[6]。在埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)的 *ace* 中,与抗性相关的突变数目越多,其 *AChE* 对杀虫剂的敏感性降低就越大。同时含有 G285Y 和 F350Y 两个突变与同时含有 F105S、G285Y 和 F350Y 3 个突变的埃及伊蚊对对氧磷和残杀威均有很高的抗性^[7]。在果蝇(*Drosophila melanogaster*)抗性品系中,果蝇 *AChE* 上的多个突变组合比单个突变所导致的对药剂敏感性的影响要大。这些研究结果表明 *ace* 的多个突变可导致昆虫产生更高水平的抗性^[3,7-8]。

自从第一个昆虫 *ace* 从黑腹果蝇中克隆出来后,如今已经有超过 30 种昆虫的 *ace* 被克隆^[9-10]。早期从果蝇、铜绿蝇(*Lucilia cuprina*)和家蝇(*Musca domestica*)体内只克隆到一个 *ace*,当时普遍认为昆虫体内只存在一个 *ace*。当从尖音库蚊(*Culex pipiens*)、冈比亚按蚊(*Anopheles gambiae*)和棉蚜(*Aphis gossypii*)体内克隆到两种 *ace* 后便改变了昆虫体内只有一种 *ace* 的观念^[11-14]。此后在越来越多的昆虫体内发现有两种 *ace* 基因。在有两种 *ace* 的昆虫中,如小菜蛾(*Plutella xylostella*)、烟青虫(*Helicoverpa assulta*)、德国小蠊(*Blattella germanica*)、温带臭虫(*Cimex lectularius*)等,他们 *ace1* 的转录水平明显高于 *ace2*^[15-18]。此外,昆虫对有机磷和氨基甲酸酯类农药的抗性突变绝大多数出现在 *ace1* 上。据此认为,在含有两种 *ace* 的昆虫体内,*ace1* 基因所编码的 *AChE1* 是行使生理功能的主效功能蛋白^[10]。

三化螟(*Scirpophaga incertulas* Walker)曾是中国长江流域及其以南各水稻生产区的重要害虫之一。近年来随着耕作制度等的改变,三化螟的分布范围有了较大的变化,现主要分布在南方沿海等水稻生产区,三化螟在这些地区局部常年严重危害^[19]。对三化螟的防控,仍旧是以化学药剂为主。有机磷类和氨基甲酸酯类农药是防治三化螟的重要药剂^[20]。为了研究三化螟的乙酰胆碱酯酶基因对有机磷和氨基甲酸酯类农药是否出现了抗性相关的突变,本研究克隆了三化螟的两个 *ace*,并对这两个

ace 进行序列分析。以期为对比研究水稻上几种重要螟虫的乙酰胆碱酯酶基因提供了基础。

1 材料和方法

1.1 三化螟采集

三化螟采自江西瑞昌,液氮速冻后于-80℃冰箱保存。

1.2 总 RNA 提取及第一链 cDNA 合成

单头三化螟,利用 Promega 公司的 SV Total RNA Isolation Kit 总 RNA 提取试剂盒(Promega, Madison, WI, USA)提取总 RNA。所有操作按说明书进行。提取的总 RNA 于-80℃保存备用。

提取的三化螟总 RNA,利用 TaKaRa 公司的 PrimerScript RT Master Mix 反转录试剂盒(宝生物大连科技有限公司产品)进行第一链 cDNA 合成。取约 1 μg 的总 RNA,20 μl 的反应体系,反应条件如下:首先 37℃温育 15 min,随后 85℃孵育 5 s,最后冰上孵育 5 min。合成的 cDNA 于-20℃保存备用。

1.3 三化螟 *ace1* 和 *ace2* 的 cDNA 片段扩增

基于已报道的鳞翅目昆虫的 *ace1* 和 *ace2* 核酸序列,设计兼并引物 Siace1JB-F:5'-ACTATGTGGAAYCC-NAA-3'、Siace1JB-R:5'-TGATCRAANARNCCNGCRTT-NCC-3'和 Siace2JB-F:5'-GGAATWCCSTWYGCYRA-RCCYCC-3'、Siace2JB-R:5'-AVCCNCCDCRTAWAT-CCA-3',分别用于扩增三化螟的 *ace1* 和 *ace2* 序列片段。

扩增三化螟的 *ace1* 和 *ace2* 序列片段的 PCR 反应条件如下:95℃预变性 3 min;再 94℃变性 30 s,退火采用 Touchdown 程序,从 56℃降至 46℃,每 2 个循环降低 2℃,退火时间为 30 s,然后 72℃延伸 40 s;再 94℃变性 30 s,46℃退火 30 s,72℃延伸 40 s,按此运行 24 个循环;最后 72℃延伸 10 min。PCR 所使用的酶为 TaKaRa 公司生产的 LA Taq 酶。扩增反应体系为 25 μl。

1.4 三化螟 *ace1* 和 *ace2* 的 5'RACE 和 3'RACE 扩增

利用 RACE 技术扩增三化螟 *ace1* 和 *ace2* 5'末端和 3'末端序列。分别基于已扩增得到的 *ace1* 和 *ace2* 的序列片段,设计用于 RACE 扩增的特异引物。设计的均是巢式 PCR 引物。扩增 *ace1* 5'末端的两条特异引物分别是:5ace1-P1:5'-GAGAAAC-CCTAGCGAAGCAACTCTGT-3'和 5ace1-P2:5'-AGC-

CACCACCGAATACCCACAACA-3'。扩增 *ace1* 3' 末端的两条特异引物分别是:3*ace1*-P1: 5'-ATGTTGTGGGTATTCGGTGGT-3'和 3*ace1*-P2: 5'-GAGTTGCTTCGCTAGGGTTTCT-3'。扩增 *ace2* 5'末端的两条特异引物分别是:5*ace2*-P1: 5'-GTCAGTGGTTTATCTTGGTGGTGACG-3' 和 5*ace2*-P2: 5'-ACTGGTAGCTTCAAGAACTCCATGCC-3'。扩增 *ace2* 3'末端的两条特异引物分别是:3*ace2*-P1: 5'-AGCTACCACTATGCCAAATAGC-3' 和 3*ace2*-P2: 5'-AGGGTACGT-CACCACCAAGAT-3'。相应 PCR 扩增体系中所使用的另一条引物即为 RACE 试剂盒内提供的引物:UPM 和 NUP。具体序列请参见试剂盒说明书。

使用 Clontech 公司的 SMARTer RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒(Clontech, Mountain View, CA, USA)进行 5'末端和 3'末端序列扩增。首先制备 5'-RACE cDNA 模板和 3'-RACE cDNA 模板,相关操作按照说明书进行。然后利用试剂盒内的 DNA 扩增酶进行 5'末端和 3'末端序列扩增。进行两轮巢式 PCR 扩增,第 1 轮扩增的条件为:94 °C 预变性 3 min;再 94 °C 变性 30 s,退火采用 Touchdown 程序,从 73 °C 降至 66 °C,每个循环降低 1 °C,退火时间为 30 s,然后 72 °C 延伸 2 min,再 94 °C 变性 30 s,67 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 2 min,按此运行 30 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。第 2 轮扩增条件为:94 °C 预变性 3 min;再 94 °C 变性 30 s,退火采用 Touchdown 程序,从 75 °C 降至 67 °C,每个循环降低 1 °C,退火时间为 30 s,然后 72 °C 延伸 2 min,再 94 °C 变性 30 s,68 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 2 min,按此运行 30 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。第一轮扩增产物稀释 10 倍后作为第二轮扩增的模板。第一轮和第二轮的反应体系均为 50 μ l,相关组分按照说明书配制。

1.5 PCR 产物电泳检测与克隆测序

所有 PCR 产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳后溴化乙锭染色检测。将潜在的目标产物条带切胶回收。凝胶回收试剂盒由北京天根生物技术有限公司生产,操作按说明书进行。回收的 PCR 产物连接到北京全式金生物技术有限公司生产的 pEASY-T3 克隆载体上进行转化,然后挑取 5 个单克隆,摇菌培养后送至南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序。测序结果在 NCBI 数据库中进行 blastx 和 tblastx 分析。

1.6 序列比对与系统进化分析

从 NCBI 的 GenBank 数据库中搜索已报道的昆虫 AChE 氨基酸序列,将本研究克隆的三化螟的两个 AChE 氨基酸序列利用 CLUSTAL X 1.8 软件进行多重序列比对分析。以此确定三化螟 AChE 氨基酸序列上重要的家族特征结构和序列。此外,基于多重序列比对结果,利用 MEGA 5.1 软件,采用邻接法(Neighbor-joining)构建 AChE 的分子系统进化树。

2 结果与分析

2.1 三化螟两个 *ace* 的 cDNA 序列

对于三化螟 *ace1* (*Siace1*),通过兼并引物 RT-PCR 扩增,克隆得到一条序列片段。随后基于该序列片段,利用 RACE 技术成功获得该片段的 5' 末端序列和 3' 末端序列,最终得到该基因的完整开放阅读框(Open reading frame, ORF)。该 ORF 长 2 085 bp,编码含 694 个氨基酸残基的蛋白(GenBank: KT893313)。该编码蛋白包含乙酰胆碱酯酶 1 家族重要的结构特征(图 1A):第一是催化三联体结构,由 Ser313、Glu439、His553 3 个氨基酸残基组成;第二是酰基口袋结构,由 Trp346、Phe402、Phe443 3 个氨基酸残基构成;第三是胆碱结合位点为 Trp198 氨基酸残基;第四是氧负离子洞,由 Gly231、Gly232、Ala314 这 3 个残基构成;第五是 3 个保守的分子内部二硫键,分别是 Cys181-Cys208、Cys367-Cys380、Cys515-Cys637;第六是“FGESAG”保守结构域。该蛋白序列与台湾稻螟的 AChE1 序列具有最高的相似性,达到 94%。

对于三化螟 *ace2* (*Siace2*),先后通过兼并引物 RT-PCR 和利用 RACE 技术进行扩增,最终得该基因的完整 ORF 序列。*Siace2* 的完整 ORF 长 1 917 bp,编码含 638 个氨基酸残基的蛋白(GenBank: KT893314)。该编码蛋白包含乙酰胆碱酯酶 2 家族重要的结构特征(图 1B):第一是催化三联体结构,由 Ser266、Glu395、His509 3 个氨基酸残基组成;第二是酰基口袋结构,由 Trp299、Phe358、Phe399 3 个氨基酸残基构成;第三是胆碱结合位点为 Trp133 氨基酸残基;第四是氧负离子洞,由 Gly178、Gly179、Ala267 3 个残基构成;第五是 3 个保守的分子内部二硫键,分别是 Cys116-Cys143、Cys320-Cys335、Cys471-Cys590;第六是“FGESAG”保守结构域。该蛋白序列与二化螟的 AChE2 序列具有最高的相似性,达到 98%。

A

Csu-AChE1:	MRVVLALALAAARALAGPHEHRARHAPDHLEHFAFANDECPYRGHGEAARYNPELDTIPRIEDHETSSKRAKFAETSSKRE--DDRFSYNHERHDEGFLADEFCGPEE	114
Cau-AChE1:	MRVVLALALAAARALAGPHEHRARHAPDHLEHFAFANDECPYRGHGEAARYNPELDTIPRIEDHETSSKRAKFAETSSKRE--DDRFSYNHERHDEGFLADEFCGPEE	114
Sin-AChE1:	MRVVLALALAAARALAGPHEHRARHAPDHLEHFAFANDECPYRGHGEAARYNPELDTIPRIEDHETSSKRAKFAETSSKRE--DDRFSYNHERHDEGFLADEFCGPEE	115
Csu-AChE1:	DDPLIVTRTKGRVGRGILTATGKKVDANFGIPYACKPLGDLRFRHPRFESWGEEILNNTTTLPHSCVQIIDTVFGDFPGAMMNPNTIMQEDCLYINIVSRPRPKNAAVMLNVF	230
Cau-AChE1:	DDPLIVTRTKGRVGRGILTATGKKVDANFGIPYACKPLGDLRFRHPRFESWGEEILNNTTTLPHSCVQIIDTVFGDFPGAMMNPNTIMQEDCLYINIVSRPRPKNAAVMLNVF	230
Sin-AChE1:	DDPLIVTRTKGRVGRGILTATGKKVDANFGIPYACKPLGDLRFRHPRFESWGEEILNNTTTLPHSCVQIIDTVFGDFPGAMMNPNTIMQEDCLYINIVSRPRPKNAAVMLNVF	231
Csu-AChE1:	GGGFGSGTATLDVYDPKIMVSEKIVVSMQYRVASLGFLFFETPDVPGNAGMFDQMLALQWVKDNIAYFGGNPHNVTLEGE	346
Cau-AChE1:	GGGFGSGTATLDVYDPKIMVSEKIVVSMQYRVASLGFLFFETPDVPGNAGMFDQMLALQWVKDNIAYFGGNPHNVTLEGE	346
Sin-AChE1:	GGGFGSGTATLDVYDPKIMVSEKIVVSMQYRVASLGFLFFETPDVPGNAGMFDQMLALQWVKDNIAYFGGNPHNVTLEGE	347
Csu-AChE1:	ATISREESILRGTRLAFAVCPHSLKDMGPMIEGLRKKSADELVNNEWGTGLGICEFVFPIDGSGFLDEMPTRSLAHQNFKKTNIILMGSNTEG	462
Cau-AChE1:	ATISREESILRGTRLAFAVCPHSLKDMGPMIEGLRKKSADELVNNEWGTGLGICEFVFPIDGSGFLDEMPTRSLAHQNFKKTNIILMGSNTEG	462
Sin-AChE1:	ATISREESILRGTRLAFAVCPHSLKDMGPMIEGLRKKSADELVNNEWGTGLGICEFVFPIDGSGFLDEMPTRSLAHQNFKKTNIILMGSNTEG	463
Csu-AChE1:	ECYLQAVRELNPYVSDVGRCAIVFEYTDWLNPEDFVNRNRLDKMVGDIYHFGVNEFHRYAETGNNVYTYKHSKNNPWSWTGVMDEINYYVGEPLNPGKNYSPEEVEF	578
Cau-AChE1:	ECYLQAVRELNPYVSDVGRCAIVFEYTDWLNPEDFVNRNRLDKMVGDIYHFGVNEFHRYAETGNNVYTYKHSKNNPWSWTGVMDEINYYVGEPLNPGKNYSPEEVEF	578
Sin-AChE1:	ECYLQAVRELNPYVSDVGRCAIVFEYTDWLNPEDFVNRNRLDKMVGDIYHFGVNEFHRYAETGNNVYTYKHSKNNPWSWTGVMDEINYYVGEPLNPGKNYSPEEVEF	579
Csu-AChE1:	SKRIMRYWANFARSGNPSLNGDMTKVHWPVHTAFGEYLSLAVNSSAVGHGLKVKCAFQWKYLPQLMAATTKPEPIQCTNSGTRHYGVNLSLVTVFGLQPTILKYIIT	694
Cau-AChE1:	SKRIMRYWANFARSGNPSLNGDMTKVHWPVHTAFGEYLSLAVNSSAVGHGLKVKCAFQWKYLPQLMAATTKPEPIQCTNSGTRHYGVNLSLVTVFGLQPTILKYIIT	693
Sin-AChE1:	SKRIMRYWANFARSGNPSLNGDMTKVHWPVHTAFGEYLSLAVNSSAVGHGLKVKCAFQWKYLPQLMAATTKPEPIQCTNSGTRHYGVNLSLVTVFGLQPTILKYIIT	694

B

Csu-AChE2:	MSRNLKIVFTKLLCFFVSGAFGRSWANHHDTTSTTCTTPTTSPLPKNIHSDPLIVETKSGLIKGYAKTVMGREVHIFTGIPFAKPLPLGRFRKFPVPIDPWHGVLEATAMPNSC	116
Cau-AChE2:	MSRNLKIVFTKLLCFFVSGAFGRSWANHHDTTSTTCTTPTTSPVPKNIHSDPLIVETKSGLIKGYAKTVMGREVHIFTGIPFAKPLPLGRFRKFPVPIDPWHGVLEATAMPNSC	116
Sin-AChE2:	MSRNLKIVFTKLLCFFVSGAFGRSWANHHDTTSTTCTTPTTSPLPKNIHSDPLIVETKSGLIKGYAKTVMGREVHIFTGIPFAKPLPLGRFRKFPVPIDPWHGVLEATAMPNSC	116
Csu-AChE2:	YQERYEYFPFGEFGEEMNPNTNISECLYLNIWVPQHLRVRHHCCKPLTEKPKVPILVWIGGGYMSGTATLDLYKADIMASSSDVIVASMCYRVGAFGLYLKRYFSAGEEAPG	232
Cau-AChE2:	YQERYEYFPFGEFGEEMNPNTNISECLYLNIWVPQHLRVRHHCCKPLTEKPKVPILVWIGGGYMSGTATLDLYKADIMASSSDVIVASMCYRVGAFGLYLKRYFSAGEEAPG	232
Sin-AChE2:	YQERYEYFPFGEFGEEMNPNTNISECLYLNIWVPQHLRVRHHCCKPLTEKPKVPILVWIGGGYMSGTATLDLYKADIMASSSDVIVASMCYRVGAFGLYLKRYFSAGEEAPG	232
Csu-AChE2:	NMGLWDQCLAIRNIKENARAFGGDELTITLFGESGGGSVSLHMLSPENKGLFKRGILQSGTINARNSWMTGERACDICKVLVDDCNSSLLADPSLVMLMRGVDAKTISVQC	348
Cau-AChE2:	NMGLWDQCLAIRNIKENARAFGGDELTITLFGESGGGSVSLHMLSPENKGLFKRGILQSGTINARNSWMTGERACDICKVLVDDCNSSLLADPSLVMLMRGVDAKTISVQC	348
Sin-AChE2:	NMGLWDQCLAIRNIKENARAFGGDELTITLFGESGGGSVSLHMLSPENKGLFKRGILQSGTINARNSWMTGERACDICKVLVDDCNSSLLADPSLVMLMRGVDAKTISVQC	348
Csu-AChE2:	WNSYTGILGPSAPTVDGVFLPKDPTMMKEGFHNTEVLLGSNQCECTYLLYDFLDYFEKDGSPFLQREKFLIVDTIFKEFSKIKREAIVFCYTDWEEITDGYLNQKMIADV	464
Cau-AChE2:	WNSYTGILGPSAPTVDGVFLPKDPTMMKEGFHNTEVLLGSNQCECTYLLYDFLDYFEKDGSPFLQREKFLIVDTIFKEFSKIKREAIVFCYTDWEEITDGYLNQKMIADV	464
Sin-AChE2:	WNSYTGILGPSAPTVDGVFLPKDPTMMKEGFHNTEVLLGSNQCECTYLLYDFLDYFEKDGSPFLQREKFLIVDTIFKEFSKIKREAIVFCYTDWEEITDGYLNQKMIADV	464
Csu-AChE2:	GDYFFVCPTNYFAEILADAGVDVYYYYFTHRTSTSLGGEWMGVMDEMEYVFGHPLNMSLCYHTREDRDLAAHIMQSFTRFALTGKPHKPDKEWPLYSRSSPHYTYTADGTSGPA	580
Cau-AChE2:	GDYFFVCPTNYFAEILADAGVDVYYYYFTHRTSTSLGGEWMGVMDEMEYVFGHPLNMSLCYHTREDRDLAAHIMQSFTRFALTGKPHKPDKEWPLYSRSSPHYTYTADGTSGPA	580
Sin-AChE2:	GDYFFVCPTNYFAEILADAGVDVYYYYFTHRTSTSLGGEWMGVMDEMEYVFGHPLNMSLCYHTREDRDLAAHIMQSFTRFALTGKPHKPDKEWPLYSRSSPHYTYTADGTSGPA	580
Csu-AChE2:	GPRGRPRASAFWNDFLNKLEHVPDRAVTPGYSSVAGTTLPILLTALATSVAI	638
Cau-AChE2:	GPRGRPRASAFWNDFLNKLEHVPDRAVTPGYSSVAGTTLPILLTALATLAI	638
Sin-AChE2:	GPRGRPRASAFWNDFLNKLEHVPDRAVTPGYSSVAGTTLPILLTALATTVAI	638

黄色标注氨基酸组成催化三联体结构;红色标注氨基酸组成酰基口袋结构;粉色标注氨基酸是胆碱结合位点;绿色标注氨基酸组成氧负离子洞;青色标注氨基酸是三个保守的分子内部二硫键;白框内是“FGESAG”保守结构域。

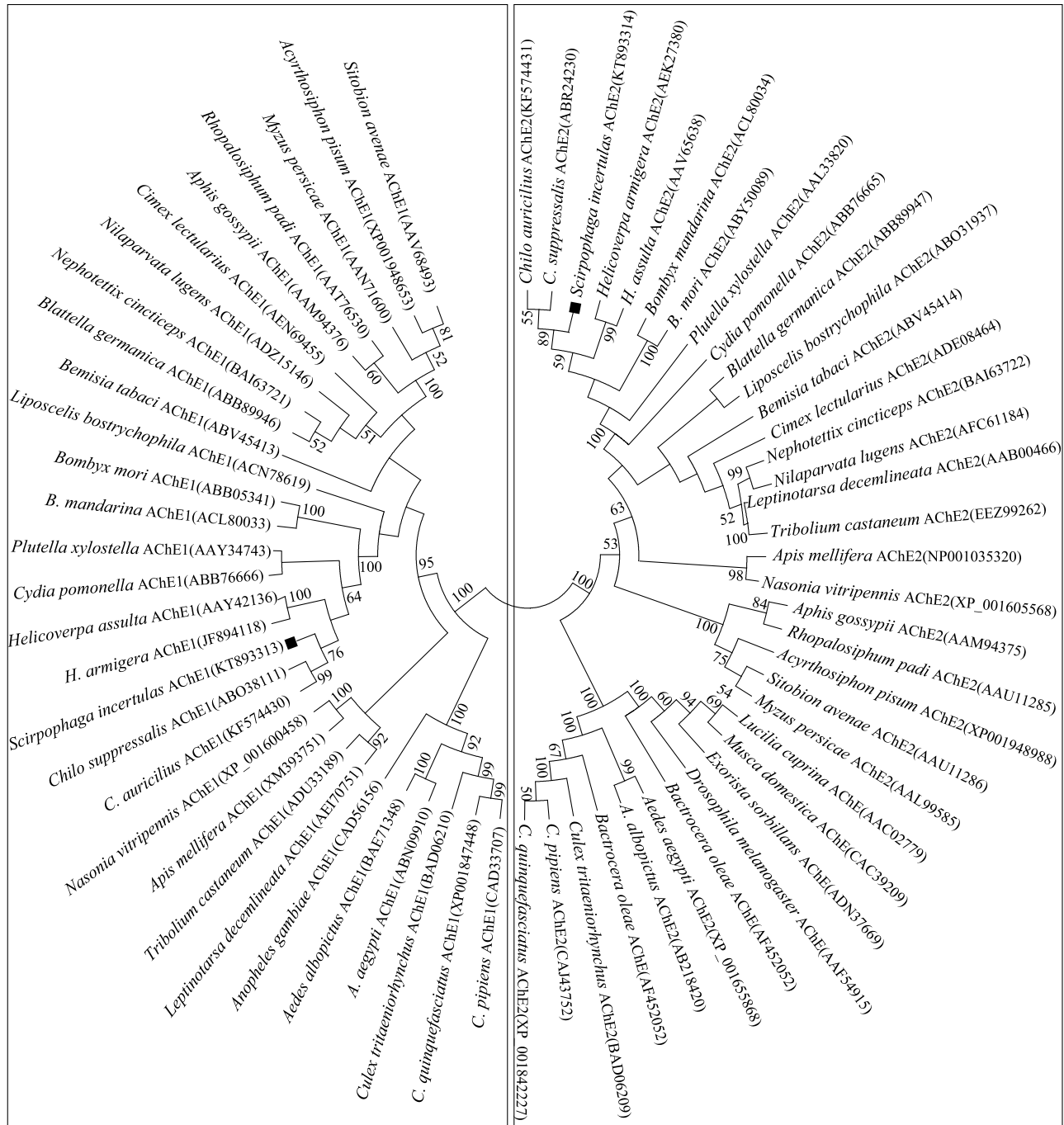
图 1 三化螟、二化螟及台湾稻螟的 AChE1 (A)、AChE2 (B) 氨基酸序列对比

Fig.1 The amino acid sequence alignment of AChE1 (A) and AChE2 (B) from *Scipophaga incertulas*, *C. suppressalis* and *C. auriculus*

2.2 系统进化关系分析

从 NCBI 数据库中搜索得到已报道的 34 种昆虫的 AChEs 氨基酸序列,然后利用 MEGA 5.1 软件构建分子系统进化树。从分子系统进化树(图 2)可以看出, AChE1 和 AChE2 被清晰地划分成两大分支,本研究得到的 SiAChE1 和 SiAChE2 分别都被归类到各自的一支

之中。这进一步表明,我们所克隆到的基因 *Siace1* 和 *Siace2* 确实是三化螟的乙酰胆碱酯酶 1 基因和乙酰胆碱酯酶 2 基因。另外, SiAChE1 和 SiAChE2 在各分支中均与已报道的二化螟和台湾稻螟的乙酰胆碱酯酶紧密相邻,表明三化螟与二化螟、台湾稻螟等水稻重要螟虫在进化关系上很近。



左边框内是 AChE1, 右边框内是 AChE2。黑色方块标注的是三化螟的 AChE1 和 AChE2。括号内是 GenBank 登录号。各物种是: 豌豆蚜 (*Acyrthosiphon pisum*)、埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*)、白纹伊蚊 (*A. albopictus*)、冈比亚按蚊 (*Anopheles gambiae*)、棉蚜 (*Aphis gossypii*)、西方蜜蜂 (*Apis mellifera*)、油橄榄果实蝇 (*Bactrocera oleae*)、烟粉虱 (*Bemisia tabaci*)、德国小蠊 (*Blattella germanica*)、野桑蚕 (*Bombyx mandarina*)、家蚕 (*B. mori*)、台湾稻螟 (*Chilo auricilius*)、二化螟 (*C. suppressalis*)、温带臭虫 (*Cimex lectularius*)、尖音库蚊 (*Culex pipiens*)、致倦库蚊 (*C. quinquefasciatus*)、三带喙库蚊 (*C. tritaeniorhynchus*)、苹果蠹蛾 (*Cydia pomonella*)、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*)、家蚕追寄蝇 (*Exorista sorbillans*)、棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*)、烟草夜蛾 (*H. assulta*)、马铃薯甲虫 (*Leptinotarsa decemlineata*)、嗜卷书虱 (*Liposcelis bostrychophila*)、铜绿蝇 (*Lucilia cuprina*)、家蝇 (*Musca domestica*)、桃蚜 (*Myzus persicae*)、丽蝇蝇集金小蜂 (*Nasonia vitripennis*)、黑尾叶蝉 (*Nephotettix cincticeps*)、褐飞虱 (*Nilaparvata lugens*)、小菜蛾 (*Plutella xylostella*)、禾谷缢管蚜 (*Rhopalosiphum padi*)、麦长管蚜 (*Sitobion avenae*)、赤拟谷盗 (*Tribolium castaneum*)。

图 2 AChE1 和 AChE2 氨基酸序列分子系统进化分析

Fig.2 Phylogenetic relationships of *Scirpophaga incertulas* and other insects based on amino acid sequence of AChE1 and AChE2

3 讨论

本研究克隆了三化螟的两个乙酰胆碱酯酶基因 *Siace1* 和 *Siace2*, 并分别在核酸水平和蛋白水平对他们的相关特征进行了分析。基于乙酰胆碱酯酶家族保守结构特征的分析, 确认本研究所克隆的两个基因是三化螟的两个乙酰胆碱酯酶基因。

三化螟是水稻上的重要危害螟虫之一。三化螟会与二化螟、大螟等螟虫同时在稻田内发生危害。对于水稻螟虫的防治, 目前还是主要依赖化学农药。近年来, 水稻螟虫防控使用最广泛的化学药剂是酰胺类农药。不过, 有机磷类和氨基甲酸酯类农药在多数地区仍旧是水稻螟虫防治的重要药剂^[20-21]。昆虫乙酰胆碱酯酶是有机磷类和氨基甲酸酯类化学药剂的作用靶标。已有较多报道显示, 二化螟已对这两种类型药剂产生抗性相关的突变^[3-6]。台湾稻螟也检测到了与有机磷农药(三唑磷)抗性相关的突变^[22]。由于三化螟、二化螟、台湾稻螟等螟虫在水稻上的为害方式以及生活史周期等差异不大, 故对这些螟虫通常是使用相同的药剂进行同时防治。此外, 分子系统进化关系分析显示这三类水稻螟虫在进化关系上比较近。由此导致这三种类型螟虫对相同药剂同时产生抗性, 并且具有相似的抗性机制。在台湾稻螟的 *AChE1* 上发现了与二化螟 *AChE1* 上相同的突变(A314S), 该突变与三唑磷的抗性相关^[22]。因此, 本研究克隆获得了三化螟的两个乙酰胆碱酯酶基因, 为后续深入研究三化螟对有机磷和氨基甲酸酯类农药的抗性机理提供了重要基础。

研究结果显示, 大多数昆虫体内具有两个乙酰胆碱酯酶基因, 仅极少数昆虫只含有一个乙酰胆碱酯酶基因^[10]。水稻上的几种重要螟虫, 如二化螟和台湾稻螟, 以及本试验所研究的三化螟, 都含有两种乙酰胆碱酯酶基因(*ace1* 和 *ace2*)。此外, *AChE1* 和 *AChE2* 的分子系统进化分析显示, 这3种水稻螟虫在进化关系上距离很近。不过, 虽然这3种水稻螟虫都是以水稻作为主要寄主, 但二化螟和台湾稻螟属于寡食性昆虫, 而三化螟是单食性昆虫。因此, 这3种水稻螟虫的 *ace1* 和 *ace2* 时空表达特征是否相似值得进行对比研究。

参考文献:

- [1] KWON D H, CHA D J, KIM Y H S, et al. Cloning of the *acetylcholinesterase 1* gene and identification of point mutations putatively associated with carbofuran resistance in *Nilaparvata lugens* [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2012, 103: 94-100.
- [2] LOW V L, CHEN C D, LIM P E, et al. First molecular genotyping of insensitive acetylcholinesterase associated with malathion resistance in *Culex quinquefasciatus* Say populations in Malaysia [J]. *Pest Management Science*, 2013, 69: 1362-1368.
- [3] MUTERO A, PRALAVORIO M, BRIDE J M, et al. Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91: 5922-5926.
- [4] WALSH S B, DOLDEN T A, MOORES G D, et al. Identification and characterization of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance [J]. *Biochemical Journal*, 2001, 359: 175-181.
- [5] 王敦, 唐振华, 尚金燕, 等. 昆虫乙酰胆碱酯酶基因研究进展 [J]. *昆虫学报*, 2006, 49(3): 497-503.
- [6] JIANG X, QU M, DENHOLM I, et al. Mutation in acetylcholinesterase1 associated with triazophos resistance in rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae) [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 378: 269-272.
- [7] FFRENCH-CONSTANT R H, PITTENDRIGH B, VAUGHAN A, et al. Why are there so few resistance-associated mutations in insecticide target genes? [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 1998, 353: 1685-1693.
- [8] SHI M A, LOUGARRE A, ALIES C, et al. Acetylcholinesterase alterations reveal the fitness cost of mutations conferring insecticide resistance [J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2004, 4: 5.
- [9] LI B, WANG Y H, LIU H T, et al. Genotyping of acetylcholinesterase in insects [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2010, 98: 19-25.
- [10] KIM Y H, LEE S H. Which acetylcholinesterase functions as the main catalytic enzyme in the Class Insecta? [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 43: 47-53.
- [11] BOURGUET D, RAYMOND M, FOURNIER D, et al. Existence of two acetylcholinesterases in the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) [J]. *Journal of Neurochemistry*, 1996, 67(5): 2115-2123.
- [12] LI F, HAN Z J. Two different genes encoding acetylcholinesterase existing in cotton aphid (*Aphis gossypii*) [J]. *Genome*, 2002, 45: 1134-1141.
- [13] WEILL M, FORT P, BERTHOMIEU A, et al. A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the ace gene in *Drosophila* [J]. *Proceedings Biological Sciences*, 2002, 269(1504): 2007-2016.
- [14] CHEN M, HAN Z J. Cloning and sequence analysis of 2 different acetylcholinesterase genes in *Rhopalosiphum padi* and *Sitobion avenae* [J]. *Genome*, 2006, 49: 239-243.
- [15] BAEK J H, KIM J I, LEE D W, et al. Identification and characterization of ace1-type acetylcholinesterase likely associated with

- organophosphate resistance in *Plutella xylostella* [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2005, 81: 164-175.
- [16] KIM J I, JUNG C S, KOH Y H, et al. Molecular, biochemical and histochemical characterization of two acetylcholinesterase cDNAs from the German cockroach *Blattella germanica* [J]. *Insect Molecular Biology*, 2006, 15: 513-522.
- [17] LEE D W, KIM S S, SHIN S W, et al. Molecular characterization of two acetylcholinesterase genes from the oriental tobacco budworm, *Helicoverpa assulta* (Guenée) [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006, 1760: 125-133.
- [18] SEONG K M, KIM Y H, KWON D H, et al. Identification and characterization of three cholinesterases from the common bed bug, *Cimex lectularius* [J]. *Insect Molecular Biology*, 2012, 21: 149-159.
- [19] 张振飞, 黄炳超, 肖汉祥, 等. 4 种农业措施对三化螟种群动态的控制作用[J]. *生态学报*, 2013, 33(22): 7173-7180.
- [20] 罗文辉. 9 种药剂防治水稻三化螟田间试验[J]. *农药管理与科学*, 2008, 29(8): 34-36.
- [21] 张振飞, 黄炳超, 张 扬, 等. 几种药剂对三化螟室内与田间防治效果研究[J]. *现代农药*, 2011, 10(1): 51-54.
- [22] LUO G H, LI X H, ZHANG Z C, et al. Cloning of two acetylcholinesterase genes and analysis of point mutations putatively associated with triazophos resistance in *Chilo auricilius* (Lepidoptera: Pyralidae) [J]. *Journal of Economic Entomology*, 2015, 108(3): 1289-1297.

(责任编辑:陈海霞)