- 17 Tilley C. A., Oldroyd B. P. Anim. Behav., 1997, 54 (6): 1 483~1 490.
- 18 Chaline N., Arnold G., Papin C., Ratnieks F. L. W. *Insectes Soc.*, 2003, 50(3): 234 ~ 236.
- 19 Chaine N., Ratnieks F. L. W., Burke T. Mol. Ewl., 2002, 11(9), 1 795~1 803.
- 20 Meixner M. D., Moritz R. F. A. Insect. Soc., 2004, 51(1): 43 ~ 47
- 21 Oldroyd B. P., Ratnieks F. L. W. Behav. Ecol. Sociobiol., 2000, 47(4); 268 ~ 273.
- 22 Osbome K. E., Oldroyd B. P. Anim. Behav., 1999, 58(2); 267 ~ 272.
- 23 Moritz R. F. A., Kryger P., Allsopp M. H. Nature (London). 1996, 384(11):31.
- 24 Zayed A. Harality, 2004, 93(11): 627 ~ 630.
- 25 Verma S., Ruttner F. Apidologie, 1983, 14(1): 41 ~ 57.

- 26 Tucker K. W. Genetics, 1958 43(3): 299~316.
- 27 余林生, 孟祥金, 陈宏权. 中国养蜂, 2004, 55(6):7~9.
- 28 Hasselmann M., Fondrk M. K., Page R. E., Beye M. Insect Mol. Biol., 2001, 10(6); 605 ~ 608.
- 29 Cowan D. P., Stahhut J. K. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004, 101 (28); 10 374 ~ 10 379.
- Kerr W. E., Akahira Y., Camargo C. A. Genetics 1975 81
 (4), 749 ~ 756.
- Neumann P., Hepbum R. Apidologie, 2002, 33(2): 165 ~
 192.
- 32 Adams J., Rothman E. D., Kerr W. E., Paulino Z. L. Genetics, 1977, 86(3): 583 ~ 396.
- 33 Dietz A. Evolution. In: Rinderer T. E. (ed.), Bee Genetics and Breeding. A cademic Press, Orlando, Florida, USA, 1986. 1~19.

酯酶基因扩增及突变与昆虫抗药性

曲明静^{1,2**} 许新军³ 韩召军² 陈茂华²

(1. 山东省花生研究所 青岛 266100; 2. 南京农业大学农业部病虫监测与治理重点开放实验室 南京 210095; 3. 山东出入境检验检疫局 青岛 266002)

Esterase gene amplification and mutation associated with insecticide resistance. QU Ming-Jing^{1,2**}, XU Xin-Jun³, HAN Zhao-Jun², CHEN Mao-Hua² (1. *Shandong Peanut Research Institute*, Qingdao 266100, China; 2. *Key Laboratory of Monitoring and Management of Plant Diseases and Insects, Nanjing Agricultural University*, Nanjing 210095, China; 3. *Shandong Entry-Exit Inspection and Ouarantine Bureau*, Qingdao 266002 China)

Abstract Extensive use of organophosphate and carbamate insecticides led to development of resistance in many insects. Esterase is an important metabolism enzyme. Increasing expression and point mutation of esterase gene are the two most important reasons which make its metabolism and binding activity increase. Here esterase gene mutation and amplification conferring resistance in the insects are summarized. Furthermore the effects of esterase mutation on protein structure and function are discussed.

Key words esterase gene amplification, point mutation

摘要有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的大量使用导致昆虫对其产生抗药性。酯酶是昆虫体内重要的解毒代谢酶, 酯酶基因表达量上升和点突变使其代谢或结合杀虫剂的能力增强是昆虫对常用农药产生抗药性的2个重要原因。文章概述昆虫酯酶基因扩增及突变所导致的抗药性。进一步分析了酯酶突变对蛋白结构和功能的影响。

关键词 酯酶,基因扩增,点突变

酯酶是昆虫体内一种重要的解毒酶系,它可以通过水解酯类化合物的酯键,或与亲脂类有毒化合物结合,降低有毒化合物的有效浓度来降低其毒性。,许多杀虫剂分子是含有酯键的

酯类化合物,如有机磷、氨基甲酸酯和拟除虫菊

收稿日期: 2005[12-05A修回日期:2006-02-20d. http://www.cnki.

^{*} 粮食丰产科技工程资助项目(2004BA520A15)。

^{**} E-mail: cygnet@njau. edu. cn

酯类杀虫剂。从分子水平上来讲, 酯酶基因扩增及基因突变往往与害虫对这些杀虫剂的抗性 有关。

1 酯酶基因扩增与抗药性

酯酶是代谢多种杀虫剂的一大类酶,在很 多情况下抗性与酯酶水平的提高有关。酯酶水 平提高既可由基因扩增,也可能由于基因表达 改变引起的,但目前暂时还未见酯酶基因表达 改变而产生抗性的报道。非特异性酯酶的基因 扩增在库蚊属 Culex 蚊虫对有机磷的抗性机制 中非常普遍, 酯酶快速和杀虫药剂结合并且转 化数较低, 使得杀虫剂和酯酶的基本反应是 1: 1。因此这种抗性机制需要产生大量的酶,而基 因扩增则是库蚊酯酶过量产生的分子基础[1,2]。 Mouches 等用免疫技术对有机磷抗性库蚊的解 毒酶合成进行定量分析,发现 Tem-R(抗双硫磷 的库蚊品系) 品系酯酶 B1 和 S54 品系(抗毒死 蜱的库蚊品系)酯酶 A1 的量分别是敏感品系 的500和70倍,而它们对毒死蜱的抗性分别为 800 和 100 倍[1], 这说明酯酶量的增加是库蚊对 毒死蜱产生抗性的重要原因之一。在致倦库蚊 Culex quinquefascitatus 中,大量扩增的酯酶基因 使酯酶的总蛋白量增加,从而可以更快地结合 杀虫剂^[3]。Zhu 等研究得到酯酶基因表达量的 提高是美国牧草盲蝽 Lyygus pratensis 对马拉硫 磷产生抗性的主要机制, DEF 和 TPP 皆明显的 抑制其酯酶活性,而且这2种酯酶抑制剂均大 大提高了马拉硫磷对抗性试虫的毒力作用,进 一步分子生物学研究表明,抗性牧草盲蝽的酯 酶基因没有发生突变,实时定量 PCR 实验发现 抗性酯酶基因表达量是敏感基因的 5.1 倍[4]。 Zhu 等对马拉松抗性金小蜂 Anisopteromalus calandrae 的酯酶基因进行了研究, Northern 杂交 结果显示抗性品系酯酶的 mRNA 表达量是敏感 品系的30倍^[5]。在微小牛蜱 Boophilus microplus 中, Hernandez 等利用 Northern 杂交和核酸酶保 护分析法(RPA)对抗、感品系的羧酸酯酶的 mRNA 的表达水平进行研究, 发现在抗拟除虫 菊酯类的微小牛蜱品系 Cz 中, 酯酶的 mRNA 的 表达量明显上升^[8]。 Paton 等采用实时定量 PCR 的方法来确定库蚊 Est 基因及其 mRNA 的 拷贝数, 研究表明 Est α 21 和 Est β 21 基因在抗性品系库蚊 Pel RR 中共同扩增了 80 $G^{[7]}$ 。这2个基因尽管是以 1:1 的比例共同扩增的, 但是转录水平不同, 在所有测试的单个蚊虫中Est β 21 的转录水平都比 Est α 21 高, 转录比是 10:1。从库蚊匀浆中纯化的 Est β 21、Est α 21 的比例为 3:1,结合 mRNA 数据证明转录和翻译 2种调节机制共同来调节抗性库蚊中酯酶基因的表达。

2 酯酶点突变与抗药性

Newcomb 等研究发现澳大利亚铜绿蝇 Lucilia Cuprina 对有机磷杀虫剂的抗性源于编 码羧酸酯酶 E3 的基因 $Lc\alpha$ E7 的突变[8]。 Newcomb 等、Campbell 等进一步研究发现 Lca E7 基因的 2 种类型突变: 其一是由于 137 位 $Gv \rightarrow$ Asp 的替代,使得其水解有机磷杀虫剂的活性 增加,使害虫对二乙基类有机磷杀虫剂(如二嗪 农)产生抗性; 其二是 $Trp \rightarrow Leu$ |ser 的替换, 使 得其对马拉硫磷羧酸酯酶活性和有机磷水解活 性增加,而后者更能产生高水平的有机磷抗性 ▷100 倍),特别是对马拉硫磷等既有羧酸酯 键又有磷酸酯键的有机磷农药^[9,10]。Claudianos 等在有机磷抗性家蝇 Musca domestica 的 Mda E7 基因中也发现了与铜绿蝇相同的突变, 137 位 $G_{V} \rightarrow A_{SP}$, 而该位置是 3 个形成氧负离子孔的 氨基酸之一。原核表达证实了表达出的酯酶具 备水解活性,而 Western 杂交结果显示抗性酯酶 与有机磷杀虫剂存在更大的结合作用[11]。 Rama 等表达验证了酯酶 E3 基因发生突变是导 致酯酶活性上升,是铜绿蝇对有机磷杀虫剂产 生抗性的重要原因^[12], 其 137 位的 $Gb \rightarrow Asp$ 和 251 位的 *Trp→Leu* 的作用也已被验证^[11]。作 者同时系统的对有可能水解拟除虫菊酯杀虫剂 的这2个位置的系列突变进行研究,发现 137 位的大多数突变体均可明显的参与拟除虫菊酯 类杀虫剂的水解, 而 251 位的 $Trp \rightarrow Leu$ 则是有 效的突变位点,该突变使其对顺式氯菊酯的活 性提高了 10 倍,对反式氯菊酯的活性提高 130 倍以上;其他接近活性中心位点附近的突变也不同程度的提高了酯酶对拟除虫菊酯类杀虫剂的水解能力,尤其是位于酰基口袋附近的 309 位的 Phe
ightharpoonup Leu,该突变所导致对反式氯菊酯活性升高的能力大于 251 位的 Trp
ightharpoonup Leu。除此以外,这些突变也极有可能使昆虫对拟除虫菊酯类杀虫剂和有机磷类杀虫剂产生交互抗性。 20 公的 20 公司 20 公

Chen 等对抗性铜绿蝇的乙酰胆碱酯酶基 因诱变后产生了 5 个[13] 与已报道的果蝇中相 似的点突变[14],但将这些突变单个或联合表达 后发现,与果蝇相比这几个突变所产生的抗性 水平较低: Southern blot 结果表明铜绿蝇中仅存 在一个乙酰胆碱酯酶基因,这说明铜绿蝇体内 不存在其他的乙酰胆碱酯酶基因参与抗性。因 此铜绿蝇对有机磁和氨基甲酸酯类杀虫剂在已 有抗性倍数的情况下, 抗性似乎与乙酰胆碱酯 酶关系不大。进一步有研究表明铜绿蝇的编码 羧酸酯酶 E3 的酯酶基因 Rop-1 存在一个点突 变 Glv 137 (119) D, 而该羧酸酯酶 E3 与果蝇中 的羧酸酯酶 E23 相对应, 离体抑制实验表明 E3 敏感性远大于 E23。将铜绿蝇酯酶与乙酰 胆碱酯酶的 Iso、Ki 比较发现酯酶比乙酰胆碱酯 酶更加敏感。因此铜绿蝇酯酶 E3 在保护靶标 酶乙酰胆碱酯酶免受有机磷和氨基甲酸酯类杀 虫剂攻击中起重要的作用,这一点与果蝇有所 不同。与之类似的研究结果有:在一种水蚤 Daphnia magna 中,酯酶活性比乙酰胆碱酯酶高 50 倍, 对有机磷杀虫剂的敏感性与 乙酰胆碱酯 酶相等或更敏感[12],且当少量杀虫剂存在时, 酯酶比乙酰胆碱酯酶受到有机磷和氨基甲酸酯 类杀虫剂的抑制更迅速,表明酯酶对有机磷和 氨基甲酸酯类杀虫剂存在巨大的结合潜力,解 毒代谢酶酯酶以这种方式来保护靶标酶乙酰胆 碱酯酶免受杀虫剂抑制,最终达到对杀虫剂产 生抗性的目的。

另外值得一提的是: 在人的丁酰胆碱酯酶中 117 位的 $Gly \rightarrow His$ 突变后使酶具备了水解有机磷杀虫剂酯键的能力[15]。在冈比亚按蚊 Anopheles gambiae 与尖音库蚊 Culex pipiens中[16],对应于电鳐 119 位的 Gly 突变为Sar 发生在保守性结构 WIF (Y) GGG 中,导致其突变为WIF (Y) GGS,这一突变对乙酰胆碱酯酶的催化活性中心有显著影响。这一位置与铜绿蝇酯酶突变 137 位的 $Gly \rightarrow Agp$ 位点相同,因此这不仅从进化上反映出酯酶与乙酰胆碱酯酶基因之间的亲缘关系,更进一步证实该位点产生突变的意义,这无论对于酯酶还是乙酰胆碱酯酶都是强有力的解释。

参 考 文 献

- Mouches C., Pasteur N., Berge J. B., Georghiou G. P. Science, 1986 233 (4 765); 778 ~ 780.
- Raymond M., Beyssat A. V., Sivasubramanian N., Mouches C., Georghiou G., P., Biochen, J., 1989, 27 (78): 417 ~ 423.
- Adriana E. F., Walter A. V., Ildefonso F. S., Mohammad H. B., Haydeé L. B. Pestic. Biochem. Physiol., 2005 82(1): 66 ~ 78.
- 4 Zhu Y. C., Snodgrass G. L., Chen M. S. Insect Biochen. Mol. Biol., 2004, 34(11); 1 175~1 186.
- 5 Zhu Y. C., Dowdy A. K., Baker J. E. Insea Biochem. Mol. Biol., 1999, 29(5); 417~425.
- 6 Hemandez R., Guerrero F. D., George J. E., Wagner G. G. Invest Biochem. Mol. Biol., 2002, 32(9): 1 009 ~ 1 016.
- 7 Paton M. G., Karunaratne S. H., Giakoumaki E., Roberts N., Hemingway J. Biochen. J., 2000 346(1): 17 ~ 24.
- Newcomb R. D., Campbell P. M., Ollis D. L., Cheah E., Russell R. J. Proc. Natl. Acad. Sci., 1997, 94(7): 7 464 ~ 7 468.
- Newcomb R. D., Campbell P. M., Russell R. J., Oakeshott J.
 G. Insect Biochen. Mol. Biol., 1997, 27(1): 15~25.
- Campbell P. M., Newcomb R. D., Russell R. J., Oakeshott J.
 G. Insect Biochem. Mol. Biol., 1998, 28(3): 139 ~ 150.
- Claudianos C., Russell R. J., Oakeshott J. G. *Insect Biochem*. Mol. Biol., 1999. 29(8): 675 ~ 686.
- 12 Heidari R., Devonshire A.L., Campbell B. E., Donian S. J., Oakeshott J. G. Insact Biochem. Mol. Biol., 2005, 35(6): 597 ~ 609.
- Chen Z., Newcomb R., Forbes E., McKenzie J., Batterham
 P. Insact Biochem. Mol. Biol., 2001, 31(8): 805 ~ 846.
- 14 Mutero A., Pralavorio M., Bride J. M., Fournier D. Proc. Natl. Acad. Sci., 1994 91(13):5 922~5 926.
- 15 Guerrero F. D. Insact Biochem. Mol. Biol., 2000, 30 (11): 1 107 ~ 1 115.
- Weill M., Lutfalla G., Mogensen K., Chandre F., Berthomieu A. Nature, 2003, 423(6 936); 136 ~ 137.

倾睛鳄起家本巴利坦则d感杀冷制和乔思利fiic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.