

禾谷缢管蚜田间种群 *Ace1* 基因选择性剪切*

左亚运¹ 潘红燕¹ 乔宪凤^{1,2} 陈茂华^{1**}

(1. 西北农林科技大学 植物保护学院, 农业部西北黄土高原作物有害生物综合治理重点实验室, 植保资源与病虫害治理教育部重点实验室, 杨凌 712100; 2. 西北农林科技大学 动物医学院, 杨凌 712100)

摘 要 【目的】 为了分析我国不同地区禾谷缢管蚜 *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus) 田间种群 *Ace1* 基因的选择性剪切、*Ace1* 基因选择性剪切频率及 *Ace1* 基因选择性剪切对其 AChE1 结构的影响。【方法】 从我国 11 个省(市)的 16 个地区采集田间试虫, 通过 RT-PCR 技术, 克隆各个地区及室内敏感品系各 15 头禾谷缢管蚜试虫的 *Ace1* 基因序列的全长, 分析并鉴定 *Ace1* 的选择性剪接, 在 SABLE 服务器和 I-TASSER 服务器上分别分析选择性剪切对 AChE1 的二级结构和三级结构的影响。【结果】 16 个地理种群中, 9 个地理种群都存在选择性剪切, 不同地理种群该选择性剪切的频率不同; 剪切位点靠近 *Ace1* 基因的 5' 端, 其对应的核苷酸序列为 5'-ATCCGAATTTAG-3', 导致 4 个氨基酸 (RSEF) 缺失; 选择性剪切改变了局部的二级结构, 并在一定程度上改变其三级结构。【结论】 禾谷缢管蚜田间种群中较为普遍地存在一个 *Ace1* 基因的选择性剪切, 该 *Ace1* 基因选择性剪切改变了 AChE1 的空间结构, 并可能改变 AChE1 的代谢特性。**关键词** 禾谷缢管蚜, 乙酰胆碱酯酶, 选择性剪切, 选择性剪切频率, 三级结构

Alternative splicing of the *Ace1* gene in *Rhopalosiphum padi* field populations

ZUO Ya-Yun¹ PAN Hong-Yan¹ QIAO Xian-Feng^{1,2} CHEN Mao-Hua^{1**}

(1. College of Plant Protection, Key Laboratory of Crop Pest Integrated Pest Management on the Loess Plateau of Ministry of Agriculture, Northwest A & F University, Yangling 712100, China; 2. College of Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract [Objectives] Acetylcholinesterase (AChE) plays a vital role in the nervous system of insects and serves as the target for various organophosphate and carbamate insecticides. The aims of this study were to identify alternative splicing of the *Ace1* gene in *R. padi* field populations sampled in different regions of China and the effect of alternative splicing on the secondary and tertiary structure of AChE1. [Methods] *R. padi* field populations were collected from 16 different regions of 11 Chinese provinces. RT-PCR was used to clone the cDNA sequences of the *Ace1* gene from 15 individuals from each field population and a susceptible laboratory strain. The deduced amino acid sequences of *R. padi* AChE1 were submitted to the SABLE online and I-TASSER online servers to analyze the effect of alternative splicing on the secondary and tertiary structure of AChE1. [Results] Alternative splicing was found in individuals from nine field populations. This occurred near the 5' end of the AChE1 coding region, resulting in the deletion of "ATCCGAATTTAG" and the amino acids "RSEF". Results of structural analysis showed that alternative splicing changed the secondary structure and tertiary structure of AChE1. [Conclusion] Alternative splicing is common in wild populations of *R. padi*. This can change the spatial structure and catalytic properties of AChE 1.

Key words *Rhopalosiphum padi*, acetylcholinesterase, alternative splicing, frequency of alternative splicing, tertiary structure

* 资助项目: 国家自然科学基金 (31272036, 31471766); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金 (20110204110001)

**通讯作者, E-mail: maohua.chen@nwsuaf.edu.cn

收稿日期: 2014-10-13, 接受日期: 2014-10-28

禾谷缢管蚜 *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus) 是小麦重要的害虫之一,在我国各地都有分布(刘爱芝等,2001;鲁艳辉等,2009;谢佳燕和林佳,2013)。化学农药的使用是防治禾谷缢管蚜的主要方法,而农药的长期不合理使用导致禾谷缢管蚜对有机磷类和氨基甲酸酯类等多种农药产生抗药性(Chen *et al.*, 2007; Lu and Gao, 2009; Lu *et al.*, 2013)。乙酰胆碱酯酶(Acetylcholinesterase, AChE, EC3.1.1.7)是有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的作用靶标(唐振华和周成理,1992;Fournier and Mutero, 1994)。大量的研究表明,多数昆虫体内存在两个AChE基因,即 *Ace1* 和 *Ace2*,其编码的酶分别为AChE1和AChE2。一般认为,当昆虫体内同时存在 *Ace1* 和 *Ace2* 两个基因时, *Ace1* 基因编码的AChE1酶为杀虫剂的作用靶标(Baek *et al.* 2005; Lee *et al.*, 2007; Kim and Lee, 2013);研究发现, *Ace1* 基因的转录异构体丰富,这可能是其导致昆虫抗药性的重要原因之一(Kim and Lee, 2013)。

选择性剪切(Alternative splicing)是一种在转录后RNA水平调控基因表达的重要机制,也是蛋白质组多样性的重要机制(Modrek and Lee, 2002; Johnson *et al.*, 2003; Kornblihtt *et al.*, 2013)。通过选择性剪切,基因可以表达出功能各异,甚至具有相互拮抗的蛋白质亚型(Stamm *et al.*, 2005)。目前,很多基因的选择性剪接的机制还有待研究,而鉴定选择性剪接体是所有这些工作的基础。在脊椎动物中,选择性剪接可使一个胆碱酯酶基因的mRNA产生两个具有相同催化活性的多肽(Malcolm *et al.*, 1998)。在人类体内,选择性剪切产生了3个具有不同的羧基末端的AChE亚型(AChE synaptic: AChE-S、AChE erythrocytic: AChE-E 和 AChE readthrough: AChE-R)(Soreq and Seidman, 2001)。在石纹电鳐 *Torpedo marmorata* (Sikorav *et al.*, 1985, 1987)和太平洋电鳐 *T. californica*

(Schumacher *et al.*, 1986)中,发现来源于同一AChE基因的多个mRNAs编码不同催化亚基,这些催化亚型均通过选择性剪切产生。目前,在微小牛虻 *Boophilus microphu* (Baxter and Barker, 1998)、血红扇头虻 *Rhipicephalus sanguineus* (Xu *et al.*, 2003)、棉蚜 *Aphis gossypii* (Li and Han, 2002)、淡色库蚊 *Culex pipiens pallens* (李春晓等,2007)、东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilens* (Zhou and Xia, 2009)中均发现了AChE基因存在选择性剪切。深入阐明AChE基因选择性剪切产生的机理及其对该酶结构与功能的影响,对于分析杀虫剂的作用机理以及害虫抗药性治理具有重要的意义(Revuelta *et al.*, 2011)。目前,很少有报道某种昆虫AChE基因选择性剪切在田间种群中的分布频率,本研究将从我国不同地区采集禾谷缢管蚜样本,研究该虫 *Ace1* 基因的选择性剪切及其分布频率,研究结果对于进一步阐明 *Ace1* 选择性剪切产生的机理及其对AChE1功能的影响具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 试虫采集

供试禾谷缢管蚜于2013年采自我国11个省(市)16个不同地区的小麦田,每个地点采集蚜虫50头以上,同一地点不同采集样点相隔30m以上,采集的试虫放入装有麦苗的指形管内,每个管内放置一头,采集的试虫带回实验室备用,同一个地区采集的试虫视为一个种群。禾谷缢管蚜相对敏感品系为本实验室长期饲养,饲养条件为:温度(25±1)℃,相对湿度70%~85%,光周期16L:8D。田间采集的禾谷缢管蚜样品信息见表1。

1.2 主要试剂

RNA提取用TRIzol试剂购自Invitrogen公

* 资助项目:国家自然科学基金(31272036, 31471766);教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20110204110001)

**通讯作者, E-mail: maohua.chen@nwsuaf.edu.cn

收稿日期:2014-10-13, 接受日期:2014-10-28

司；DNA 胶回收试剂盒购自生工生物工程（上海）股份有限公司；感受态细胞 DH5 α 购自北京全式金公司；pGEM-T Easy 载体购自 Promega

公司；反转录试剂盒 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit、*Taq* 酶及其它 PCR 相关试剂购自 Takara 公司。

表 1 禾谷缢管蚜 16 个田间种群的采集信息

Table 1 Sample information of 16 *Rhopalosiphum padi* field populations

采集区域 Sample region	采集地点 Sample location	种群代码 Population code	经纬度 Coordinate	采集日期 Collecting date
吉林 Jinlin	白城 Baicheng	JLB	122°52'E, 45°39'N	2013.07
甘肃 Gansu	兰州 Lanzhou	GSL	103°41'E, 36°05'N	2013.06
陕西 Shanxi	咸阳 Xianyang	SAX	108°05'E, 34°17'N	2013.07
	汉中 Hanzhong	SAH	107°27'E, 33°11'N	2013.04
重庆 Chongqing	北碚 Beibei	CQB	106°25'E, 29°49'N	2013.04
贵州 Guizhou	贵阳 Guiyang	GZG	106°32'E, 26°28'N	2013.04
河南 Henan	南阳 Nanyang	HNN	112°36'E, 33°14'N	2013.04
湖北 Hubei	武汉 Wuhan	HBW	114°19'E, 30°29'N	2013.04
	枣阳 Zaoyang	HBZ	112°47'E, 32°08'N	2013.04
河北 Hebei	保定 Baoding	HEB	115°26'E, 38°49'N	2013.06
山西 Shanxi	太谷 Taigu	SXT	112°34'E, 37°25'N	2013.05
	洪洞 Hongdong	SXH	111°41'E, 36°13'N	2013.05
山东 Shandong	淄博 Zibo	SDZ	118°02'E, 37°06'N	2013.05
	泰安 Taian	SDT	117°14'E, 36°06'N	2013.05
	菏泽 Heze	SDH	115°29'E, 35°10'N	2013.05
安徽 Anhui	滁州 Chuzhou	AHC	118°20'E, 32°21'N	2013.04

1.3 总 RNA 的提取与反转录

分别在采集的 16 个地理种群及室内敏感品系中，各自随机取 15 头禾谷缢管蚜无翅成虫，并分别单头提取各头试虫总 RNA，总 RNA 具体步骤参见 TRIzol 试剂盒说明书。按照 Takara 公司 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒的说明书将提取的 RNA 反转录成 cDNA 备用。

1.4 *Ace1* 基因的 PCR 扩增、克隆与测序

参照 Chen 等（2007）的方法，分别合成禾谷缢管蚜乙酰胆碱酯酶 *Ace1* 基因特异性上游引物（5'-GGAGTCGTTAGCCGTCGCTCGTAT-3'）和下游引物（5'-TGAAATTCATAACATCAAAACGGCA-3'）。扩增 *Ace1* 基因的 25 μ L PCR 反应体

系中含：14.25 μ L dd H₂O；5.0 μ L 5 $\times$ PCR Buffer；2.0 μ L 2.5 mmol/L dNTP (Mg⁺)；10 μ mol/L 上游和下游引物各 1.0 μ L；0.25 μ L 5 U/ μ L LA-*Taq* DNA polymerase；1.5 μ L cDNA。PCR 扩增条件为 94℃ 预变性 3 min；94℃ 变性 30 s，57℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 2 min 30 s，循环 32 次；72℃ 延伸 10 min；4℃ 保存。PCR 产物回收纯化后，连接至 pGEM-T Easy 载体，并转化到感受态大肠杆菌 DH5 α 中，经蓝白斑筛选后，随机挑取白色菌落扩大培养，经过酶切鉴定后的阳性克隆送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行双向序列测定。

1.5 数据分析

运用 ClustalX2 软件对所得的序列进行分析；使用 SABLE 在线服务器 (<http://sable.cchmc.org/>)

进行 AChE1 的二级结构预测。使用 I-TASSER 在线服务器 (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>) 进行 AChE1 的三级结构预测(Mao *et al.*, 2013), 并构建禾谷缢管蚜 AChE1 的三级结构模型。运用 C 值得分评估预测模型质量的置信得分, C 值得分越高, 表明构建的三级结构模型置信度越高, 可靠的 C 值得分范围在 -5~2 之间; 运用 TM 得分预测模型拓扑结构的正确性, $TM > 0.5$ 表明预测模型具有正确的拓扑结构 (Kozaki *et al.*, 2001); 运用 RMSD (Root mean square deviation) 评判两个结构之间对应原子间的位置差异, RMSD 值越小, 预测越精确。将预测最精确的 PDB (Protein data bank) 文件用 PyMOL 软件显示, 并制作 AChE1 的三维结构。

2 结果与分析

2.1 禾谷缢管蚜不同地理种群 *Ace1* 基因的选择性剪切

将获得的田间种群的 *Ace1* 基因序列与敏感品系的 *Ace1* 基因全序列进行比对, 结果显示, 16 个地理种群的样本中, 有甘肃兰州 (GSL)、陕西汉中 (SAH)、重庆北碚 (CQB)、贵州贵阳 (GZG)、湖北枣阳 (HBZ)、山西洪洞 (SXH)、河北保定 (HEB)、山东菏泽 (SDH) 和山东淄博 (SDZ) 9 个地理种群的样本中发现一个相同的选择性剪切, 该选择性剪切造成 *Ace1* 12 个碱基缺失, 缺少的序列为 5'-ATCCGAATTTAG-3' (图 1:A); 选择性剪切剪切位点靠近 *Ace1* 基因的 5'端, 位于编码区的 225~236 处, 该缺少序列编码“RSEF”4 个氨基酸残基, 这 4 个氨基

酸位于成熟蛋白的第 75~78 个氨基酸处(图 1:B)。进一步分析显示, 甘肃兰州种群发生该 *Ace1* 基因选择性剪切的频率最高, 选择性剪切频率为 46.7%, 其次为陕西汉中 (SXH) 和河北保定 (HEB) 种群, 选择性剪切频率均为 33.3% (图 2)。

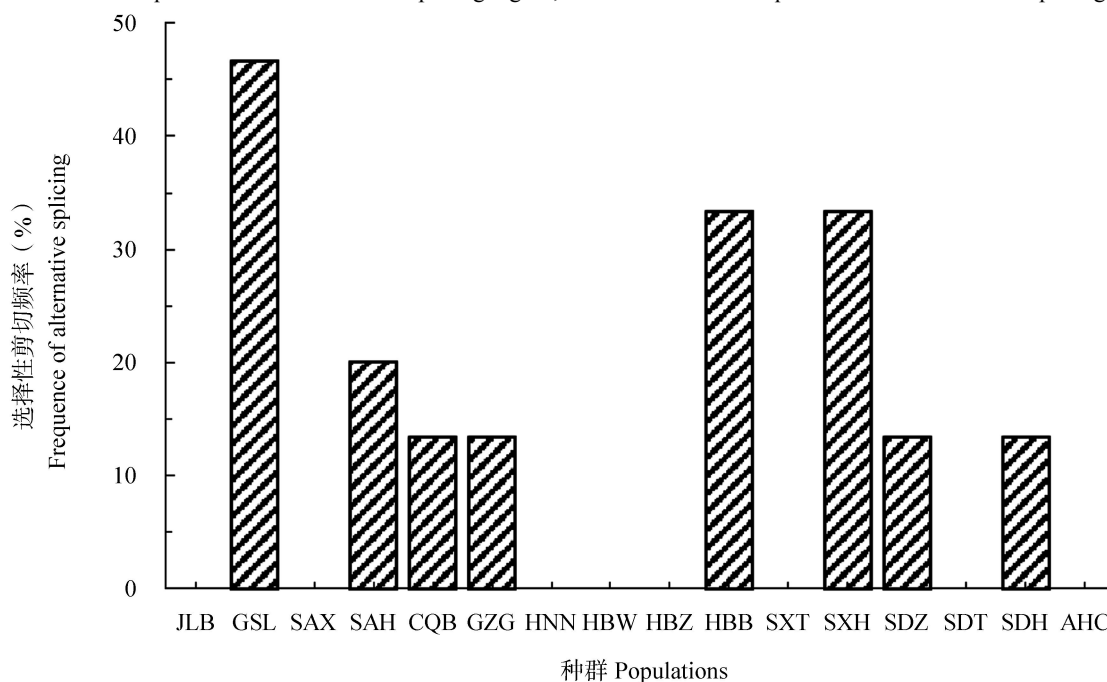
2.2 禾谷缢管蚜 *Ace1* 基因选择性剪切对 AChE1 二级结构的影响

二级结构预测结果显示, 与未发生选择性剪切的 *Ace1* 的二级结构的比较, 发现选择性剪切的 *Ace1* 编码的 AChE1 在编码区起始端形成了 26 个氨基酸的跨膜区(见图 3:B 的中黄色区域), 并且第 19~23 氨基酸的二级结构由无规则卷曲转变为 α 螺旋; 在起始端第 33~35 个氨基酸的位置, 又形成了一个 α 螺旋区 (图 3:A)。

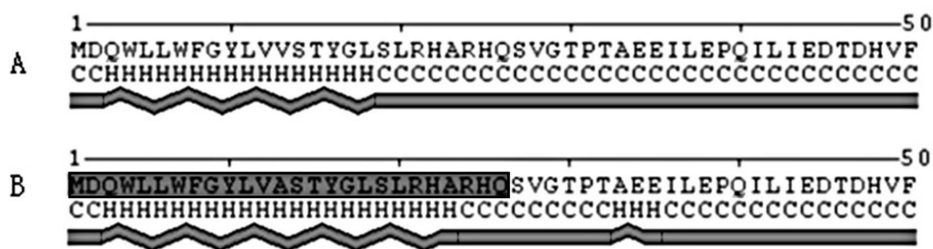
2.3 禾谷缢管蚜 *Ace1* 基因选择性剪切对 AChE1 三级结构的影响

通过 I-TASSER 在线服务器构建禾谷缢管蚜 AChE1 三级结构, 选择性剪切和未选择性剪切的 AChE 三级结构的 C 值分别为 -1.30 和 -1.7.0, TM 值分别为 0.55 ± 0.15 和 0.51 ± 0.15 , RMSD 值分别为 $(11.1 \pm 4.6) \text{ \AA}$ 和 $(12.1 \pm 4.4) \text{ \AA}$, 可见构建的 AChE1 三级结构模型具有较高的置信度。Pymol 软件显示三维结构图表明, 发生选择性剪切一定程度上改变了 AChE1 的三维结构, 使代谢三联体的三个氨基酸残基(丝氨酸 S、谷氨酸 E 和组氨酸 H)之间的距离发生了改变。丝氨酸 (S) 与谷氨酸 (E) 之间的距离由原来的 9.94 $\text{\AA}$ 变为 10.15 $\text{\AA}$; 丝氨酸 (S) 与组氨酸

A		220	*	240	*	260	
<i>R. padi</i>	:	TCATAGACGGAGATCCGAATTTAGTGGAAACCAAGATACTGATTTTGCATCTT				:	265
Alter	:	TCATAGACGGAG-----TGGAAACCAAGATACTGATTTTGCATCTT				:	253
		TCATAGACGGAGTGGAAACCAAGATACTGATTTTGCATCTT					
B		60	*	80	*	100	
<i>R. padi</i>	:	ASDMFAQEPEYTEKRNLNHRRSFSGNQDTEFASSGETYSAYTSDDPLIIHT				:	106
Alter	:	ASDMFAQEPEYTEKRNLNHR-----SGNQDTEFASSGETYSAYTSDDPLIIHT				:	102
		ASDMFAQEPEYTEKRNLNHRSGNQDTEFASSGETYSAYTSDDPLIIHT					

图 1 禾谷缢管蚜 *Ace1* 基因选择性剪切产生区域的核苷酸与氨基酸序列Fig. 1 The nucleotide sequence and amino acid sequence of *Ace1* gene alternative splicing regionA. *Ace1* 选择性剪切产生区域的核苷酸序列；B. *Ace1* 选择性剪切产生区域的氨基酸序列。A. The nucleotide sequence of *Ace1* alternative splicing region; B. The amino acid sequence of *Ace1* alternative splicing region.图 2 不同地理种群禾谷缢管蚜 *Ace1* 基因选择性剪切频率Fig. 2 The frequency of *Rhopalosiphum padi* *Ace1* gene alternative splicing in different field populations

图中的种群代码见表 1。The population code are same with Table 1.

图 3 禾谷缢管蚜 *Ace1* 选择性剪切对 AChE1 二级结构的影响Fig. 3 The effect of alternative splicing on the secondary structure of *Rhopalosiphum padi* AChEA. 未发生选择性剪切的 AChE1 序列的二级结构；B. 发生选择性剪切的 AChE1 序列的二级结构；方框内灰色区域部分为跨膜区；H 为 α 螺旋；C 为无规则卷曲。A. Indicates the secondary structure of AChE1 without alternative splicing; B. Indicates the secondary structure of AChE1 with alternative splicing; Transmembrane region is shown in the gray area of the box; H. α -helix; C. Coil or turn.

(H) 之间的距离由原来的 7.70 Å 变为 5.41 Å；
谷氨酸 (E) 与组氨酸 (H) 之间的距离由原来的
4.90 Å 变为 8.17 Å (图 4)。

3 讨论

选择性剪切在真核生物体基因中普遍存在，
但其具体的生物学功能还不明确(张晓娜和肖华

胜, 2008)。本研究发现, 采自我国 9 个不同地区的禾谷缢管蚜的部分样本中都有一个相同的 *Ace1* 选择性剪切, 这是首次在禾谷缢管蚜中发现 *Ace1* 选择性剪切。有意思的是, 在棉蚜 *Ace1*

中曾经报道与本研究禾谷缢管蚜相同的选择性剪切 (Li and Han, 2002), 这一选择性剪切是否在蚜虫 *Ace1* 中普遍存在, 还有待进一步研究。

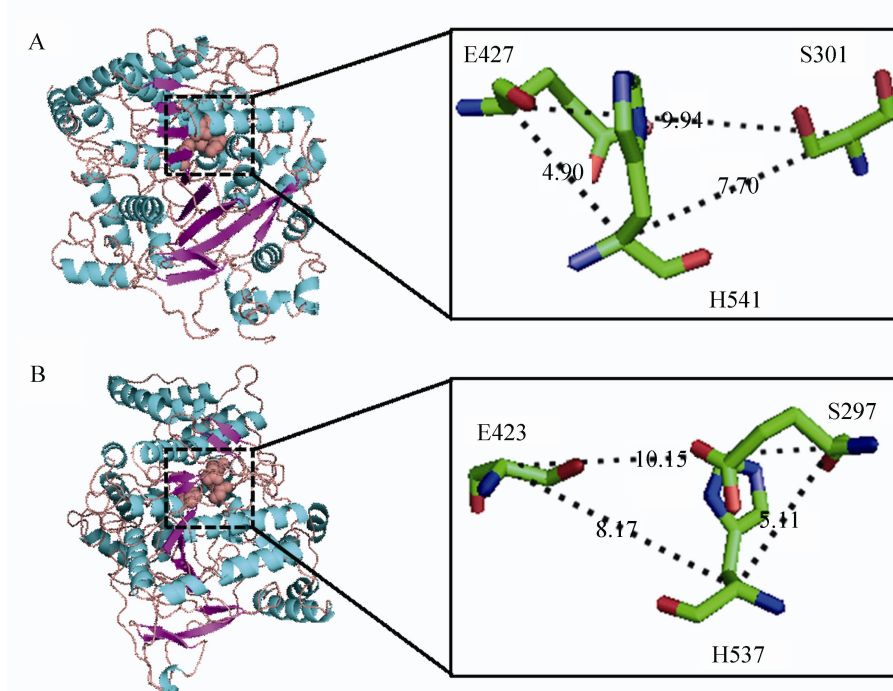


图 4 选择性剪切对禾谷缢管蚜 AChE1 三级结构的影响

Fig. 4 The effect of alternative splicing on the tertiary structure of AChE1 in *Rhopalosiphum pad*

A. 未发生选择性剪切的结构; B. 发生选择性剪切的结构; 代谢三联体位于虚线方框类, 实线方框内为放大的代谢三联体的空间结构图。

A. Indicates the tertiary structure of sequences without alternative splicing; B. Indicates the tertiary structure of sequences with alternative splicing. The catalytic triads are enclosed in dotted boxes, and the enlarged tertiary structure of catalytic triads is enclosed in bold boxes.

Ace1 基因的选择性剪切在其他节肢动物中也有报道, 但是不同物种之间存在差异。Baxter 和 Barker (1998) 发现 *Ace1* 两个选择性剪切分别发生在 5' 端编码区和 3' 端非编码区, 其中 5' 端的选择性剪切导致 6 个氨基酸缺失; Xu 等 (2003) 在血红扇头蜉体内发现的两个 *Ace1* 选择性剪切均位于蛋白序列的 N-末端, 其 5' 端因选择性剪切而缺失的 6 个氨基酸与 Baxter 和 Barker (1998) 在微小牛蜉中发现的相同; Zhou 和 Xia (2009) 在东亚飞蝗 *Ace1* 的 N-末端发现了由可变剪切导致的 50 个氨基酸缺失, 这些氨基酸残基的缺失对成熟的多肽的影响仍然不清

楚; 李春晓等 (2007) 在淡色库蚊 *Ace1* 编码区发现了 24 个碱基的选择性剪切, 该剪切位点靠近 5' 端。

选择性剪切导致氨基酸序列的变化, 可能会改变蛋白质的空间结构。本研究发现, 发生选择性剪切的禾谷缢管蚜 AChE1 在 5' 起始端形成了一段跨膜区, 而 Baxter 和 Barkerr (1998) 发现微小牛蜉 *Ace1* 的选择性剪切导致疏水区域的起始端的 6 个氨基酸缺失, 从而形成了一个新的疏水区域, 而 3' 端的选择性剪切在非编码区, 没有对蛋白的编码区造成影响, 但有研究指出, 5' 端和 3' 端的非编码区的长度会影响 mRNA 的稳定性

和转录效率 (Standart and Jackson, 1994)。空间结构的变化可能导致蛋白结合性质的改变, 甚至影响酶蛋白的活性。李春晓等 (2007) 在淡色库蚊 *Ace1* 基因的编码区也发现了 24 个碱基的选择性剪切, 该剪切位点靠近 5' 端, 并且经过昆虫杆状病毒表达系统表达, 结果发现选择性剪切产生的乙酰胆碱酯酶的活性明显高于正常的乙酰胆碱酯酶。在线预测结果表明, 选择性剪切改变了 AChE1 的三级结构, 并且改变了其代谢三联体三个氨基酸残基之间的距离, 但这种改变是否影响禾谷缢管蚜 AChE1 的活性, 还有待进一步研究。

参考文献 (References)

- Baek JH, Kim JI, Lee DW, Chung BK, Miyata T, Lee SH, 2005. Identification and characterization of *ace1*-type acetylcholinesterase likely associated with organophosphate resistance in *Plutella xylostella*. *Pestic. Biochem. Phys.*, 81(3): 164–175.
- Baxter GD, Barker SC, 1998. Acetylcholinesterase cDNA of the cattle tick, *Boophilus microplus*: characterisation and role in organophosphate resistance. *Insect Biochem. Mol.*, 28(8): 581–589.
- Chen M, Han Z, Qiao X, Qu M, 2007. Resistance mechanisms and associated mutations in acetylcholinesterase genes in *Sitobion avenae* (Fabricius). *Pestic. Biochem. Phys.*, 87(3): 189–195.
- Fournier D, Mutero A, 1994. Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. *Comp. Biochem. Phys. A*, 108(1): 19–31.
- Johnson JM, Castle J, Garrett-Engle P, Kan Z., Loerch PM, Armour CD, Santos R, Schadt EE, Stoughton R, Shoemaker DD, 2003. Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. *Science*, 302(5653): 2141–2144.
- Kim YH, Lee SH, 2013. Which acetylcholinesterase functions as the main catalytic enzyme in the Class Insecta? *Insect Biochem. Mol.*, 43(1): 47–53.
- Kornblihtt AR, Schor IE, Alló M, Dujardin G, Petrillo E, Muñoz MJ, 2013. Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 14(3): 153–165.
- Lee DW, Choi JY, Kim WT, Je YH, Song JT, Chung BK, Boo KS, Koh YH, 2007. Mutations of acetylcholinesterase1 contribute to prothiofos-resistance in *Plutella xylostella* (L.). *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 353(3): 591–597.
- Li F, Han ZJ, 2002. Two different genes encoding acetylcholinesterase existing in cotton aphid (*Aphis gossypii*). *Genome*, 45(6): 1134–1141.
- Lu Y, Gao X, 2009. Multiple mechanisms responsible for differential susceptibilities of *Sitobion avenae* (Fabricius) and *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus) to pirimicarb. *Bull. Entomol. Res.*, 99(06): 611–617.
- Lu Y, He Y, Gao X, 2013. Comparative studies on acetylcholinesterase characteristics between the aphids, *Sitobion avenae* and *Rhopalosiphum padi*. *J. Insect Sci.*, 13(9): 1–9.
- Malcolm CA, Bourguet D, Ascolillo A, Rooker S, Garvey C, Hall L, Pasteur N, Raymond M, 1998. A sex-linked *Ace* gene, not linked to insensitive acetylcholinesterase-mediated insecticide resistance in *Culex pipiens*. *Insect Mol. Biol.*, 7(2): 107–120.
- Mao Y, Tan F, Yan SG, Wu GX, Qiao CL, Zhang WX, Cui F, 2013. High-throughput genotyping of single-nucleotide polymorphisms in *ace-1* gene of mosquitoes using MALDI-TOF mass spectrometry. *Insect Sci.*, 20(2): 167–174.
- Modrek B, Lee C, 2002. A genomic view of alternative splicing. *Nat. Genet.*, 30(1): 13–19.
- Revuelta L, Ortego F, Díaz-Ruiz JR, Castañera P, Tenllado F, Hernández-Crespo P, 2011. Contribution of Ld *ace1* gene to acetylcholinesterase activity in Colorado potato beetle. *Insect Biochem. Mol.*, 41(10): 795–803.
- Schumacher M, Camp S, Maulet Y, Newton M, MacPhee-Quigley K, Taylor SS, Friedmann T, Taylor P, 1986. Primary structure of *Torpedo californica* acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence. *Nature*, 319(6052): 407–409.
- Sikorav JL, Valletta F, Grassi J, Massoulié J, 1985. Isolation of a cDNA clone for a catalytic subunit of *Torpedo marmorata* acetylcholinesterase. *FEBS Lett.*, 193(2): 159–163.
- Sikorav J, Krejci E, Massoulié J, 1987. cDNA sequences of *Torpedo marmorata* acetylcholinesterase: primary structure of the precursor of a catalytic subunit; existence of multiple 5'-untranslated regions. *EMBO J.*, 6(7): 1865.
- Soreq H, Seidman S, 2001. Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2(4): 294–302.
- Stamm S, Ben-Ari S, Rafalska I, Tang Y, Zhang Z, Toiber D, Thanaraj T, Soreq H, 2005. Function of alternative splicing. *Gene*, 344: 1–20.
- Standart N, Jackson R, 1994. Regulation of translation by specific protein/mRNA interactions. *Biochemistry*, 76(9): 867–879.
- Xu G, Fang QQ, Keirans JE, Durden LA, 2003. Cloning and

- sequencing of putative acetylcholinesterase cDNAs from the American dog tick, *Dermacentor variabilis*, and the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.*, 40(6): 890–896.
- Zhou X, Xia Y, 2009. Cloning of an acetylcholinesterase gene in *Locusta migratoria manilensis* related to organophosphate insecticide resistance. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 93(2): 77–84.
- 李春晓, 董言德, 刘美德, 赵彤言, 2007. 淡色库蚊乙酰胆碱酯酶基因上的可变剪接及对酶活性的影响. *寄生虫与医学昆虫学报*, 14(3): 153–157. [Li CX, Dong YD, Liu MD, Zhao TY, 2007. Alternative splicing of ace1 gene in *Culex pipiens pallens* and its effect to enzyme activity. *Acta Parasitologica et Medica Entomologica Sinica*, 14(3): 153–157.]
- 刘爱芝, 茹桃勤, 王晓军, 李世功, 2001. 两种麦蚜对杀虫剂的敏感性测定. *植物保护*, 27(05): 20–21. [Liu AZ, Ru TQ, Wang XJ, Li SG, 2001. Sensibility of *Macrosiphum avenae* (Fabricius) and *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus) to seven insecticides. *Plant Protection*, 27(05): 20–21.]
- 鲁艳辉, 杨婷, 高希武, 2009. 禾谷缢管蚜和麦长管蚜玻璃管药膜法敏感毒力基线的建立. *昆虫学报*, 52(1): 52–58. [Lu YH, Yang T, Gao XW, 2009. Establishment of baseline susceptibility data to various insecticides for aphids *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus) and *Sitobion avenae* (Fabricius) (Homoptera: Aphididae) by the method of residual film in glass tube. *Acta Entomologica Sinica*, 52(1): 52–58.]
- 唐振华, 周成理, 1992. 抗性小菜蛾的乙酰胆碱酯酶敏感性. *昆虫学报*, 35(4): 385–392. [Tang ZH, Zhou CZ, 1992. Acetylcholinesterase sensitivity in resistant *Plutella xylostella* (L.). *Acta Entomologica Sinica*, 35(4): 385–392]
- 谢佳燕, 林佳, 2013. 吡虫啉亚致死剂量对禾谷缢管蚜生长和繁殖的影响. *应用昆虫学报*, 50(5): 1378–1382. [Xie JY, Lin J, 2013. Sublethal effects of imidacloprid on the reproduction and survival of *Rhopalosiphum padi*. *Chinese Bulletin of Entomology*, 50(5): 1378–1382.]
- 张晓娜, 肖华胜, 2008. 真核生物 mRNA 选择性剪接体检测方法研究进展. *生命科学仪器*, 6(3): 8–11. [Zhang XN, Xiao HS, 2008. Progress on the method of identification of alternative splicing. *Life Science Instruments*, 6(3): 8–11.]