研究论文

小菜蛾碱性磷酸酶基因 cDNA 片段的克隆及其序列分析*

刘 洁[1,2]** 文礼章[1] 王少丽[2] 吴青君[2] 张友军[2]***

(1. 湖南农业大学生物安全科学技术学院 长沙 410128; 2. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所 北京 100081)

Cloning and sequence analysis of alkaline phosphatase gene in the diamondback moth, *Plutella xylostella*.

LIU Jie[1,2]**, WEN Li-Zhang[1], WANG Shao-Li[2], WU Qing-Jun[3], ZHANG You-Jun[2]***(1. *Hunan Agricultural University College of Bio-safety Sciences and Technology*, *Hunan Agricultural University*, Changsha 410128, China; 2. *Institute of Vegetables and Flowers*, *Chinese Academy of Agricultural Sciences*, Beijing 100081, China)

Abstract Alkaline phosphatase genes were cloned from the resistant and susceptible strains of *Plutella xylostella*(L.) through RT-PCR technique using degenerate primers and sequenced. The cDNA length was 403 bp and the sequence was confirmed to be the alkaline phosphatase gene by blast alignment(BLAST). The nucleotide similarity of the resistant and susceptible strains was 99.5% and the amino acids identity was 99%. Compared with the susceptible strain, 18 nucleotides were changed in the resistant strain, resulting in one amino acid changed (V to T). These results are helpful for further study of the full sequence and function of alkaline phosphatase gene in *P. xylostella*.

Key words *Plutella xylostella*, alkaline phosphatase, cloning, sequence analysis

摘 要 利用 DNAman 设计简并引物,通过反转录一多聚酶链式反应(RT-PCR)克隆小菜蛾 *Plutella xylostella*(L.)抗性、敏感种群中可能与苏云金芽孢杆菌(Bt)抗性相关的碱性磷酸酶基因。琼脂糖电泳结果显示扩增条带与预期片段长度一致,阳性克隆经测序获得了 403 bp 的基因片断。经 blast 比较得出所克隆基因属于碱性磷酸酶基因。与敏感种群相比,抗性种群中该基因片段有 18 个碱基发生变化,有 1 个氨基酸发生替换(缬氨酸转变为苏氨酸)。研究结果对于进一步研究小菜蛾全基因结构、功能有重要的意义。

关键词 小菜蛾,碱性磷酸酶酶基因,克隆,序列分析

小菜蛾 *Plutella xylostella*(L.)属鳞翅目菜蛾科,是十字花科蔬菜的主要害虫之一,每年全世界由此而造成的经济损失达 10 亿美元[1]。苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)是目前世界上用途最广、产量最大的微生物杀虫剂,占微生物杀虫剂总量 95% 以上,因其对害虫高效、对人畜安全、对环境友好而在世界范围内得到广泛的应用[2,3]。编码 Bt 杀虫蛋白的基因已被转入到了多种重要棉粮作物中,其在减少害虫危害、增加作物产量、减少化学农药对环境的污染等方面发挥了重要作用[2,4]。小菜蛾作为一种重要的农业害虫,早在 1990 年,Tabashnik 等首先报道了夏威夷田间小菜蛾对 Bt 杀虫剂产生了明显的抗性[5]。Ferre 等发现在菲律宾,Bt 对小菜蛾的防效降低并预测可能是由于小菜蛾对 Bt 产生抗性的结果[6]。在我国,冯夏等也对广东省部分菜区小菜蛾对 Bt 的

* 资助项目:"973"计划(2006CB102000);国家自然科学基金项目(30871659);863 计划(2007AA10Z421)。

** E-mail: niuniu-4621430@163.com

*** 通讯作者, E-mail: zhangyj@mail.caas.net.cn

收稿日期:2009-04-29,修回日期:2009-07-09

抗性进行了研究,表明广东深圳、东莞地区等供港菜区小菜蛾对 Bt 的抗药性在 17.97 ~ 30.65 倍[7]。而 Zhao 等报道了田间采集的小菜蛾已对 CrylC 原毒素产生 31 倍的抗性[8]。

关于害虫对 Bt 产生抗性的主要机制,目前普遍认为 Bt 杀虫蛋白与昆虫中肠细胞膜上的受体亲和性降低是抗性产生的主要原因[9~11]。目前研究表明昆虫中肠氨肽酶 N(aminopeptidases, APN)、类钙粘蛋白(cadherin-like protein)和碱性磷酸酶(alkaline phosphatases,ALP)和糖脂类(glycolipid)等多种蛋白都是 Bt 毒素 Cry1A 的受体[12~15]。Jurat-Fuentes 等认为中肠碱性磷酸酶的活性降低与烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 对 Cry1Ac 的抗性密切相关[16]。基于免疫印迹和碱性磷酸酶活性测定等试验又证实昆虫中肠m-ALP的活性与昆虫抗性有直接关系[17,18]。

小菜蛾对 Bt 的抗性形成是否与碱性磷酸酶受体基因有关,抗性种群与敏感种群的碱性磷酸酶基因相比发生了哪些改变,目前尚未见相关报道。本研究利用反转录多聚酶链式反应(reverse-transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)的方法对小菜蛾敏感、抗性种群的碱性磷酸酶基因 cDNA 片断进行了克隆,比较了二者之间的序列差异,为获得小菜蛾碱性磷酸酶基因全序列以及深入研究碱性磷酸酶基因与小菜蛾对 Bt 抗性之间的分子机理奠定基础。

1　材料与方法

1.1　供试虫源与寄主植物

1.1.1　供试虫源　小菜蛾敏感种群(S):室内饲养多年,期间从未施用过任何杀虫剂。室内饲养温度为(25 ± 1)℃,相对湿度为 60% ~ 70%,光周期为光照∶黑暗 = 16 h∶8 h。小菜蛾抗性种群(R):最初于室内以转 Cry1Ac 基因甘蓝选育约 300 代,期间未接触任何农药,之后在中国农业科学院蔬菜花卉研究所提供的 Cry1Ac 汰选 50 代后得到的种群。上述 2 个种群均由康奈尔大学赵建周研究员提供。

1.1.2　寄主植物　甘蓝品种:京丰一号,中国农业科学院蔬菜花卉所提供。甘蓝苗长成 6 ~ 8 片叶时,即可供小菜蛾取食。

1.2　主要试剂

TRIzol 试剂和反转录酶 SuperScript™ Ⅲ First-Strand Synthesis System 购自 Invitrogen 公司,引物合成于上海英骏生物技术有限公司。PCR 扩增所用试剂和 DNA 回收试剂盒购自 Invitrogen 公司,pEASY-T1 载体为北京全式金生物技术有限公司产品。DNA 分子量 Marker 购自北京天根生化有限公司。

1.3　方法

1.3.1　生物测定　参照 Tabashnik 等[19]的叶片浸渍法。先用 0.1% TritonX-100 水溶液稀释 Bt 毒素,按等比级数稀释法,顺次配制成 5 ~ 7 个系列浓度,以清水作为对照。新鲜甘蓝苗嫩叶片用打孔器制成直径为 4.8 cm 的圆片,将叶片在系列浓度的药液中浸 10 s,于平板上自然晾干,后将叶片转入培养皿中,皿底铺一层浸过蒸馏水的滤纸保湿。每皿接入 10 头 3 龄初期幼虫,每处理 4 次重复。放回相同条件的培养箱中饲养。于 72 h 后检查虫口死亡情况,并计算 72 h 的校正死亡率和 LC_{50}的值,对照死亡率控制在 10% 以内。同时计算美国抗性小菜蛾种群对 Cry1Ac 毒蛋白的抗性倍数。

1.3.2　引物设计　根据已经发表的鳞翅目昆虫的碱性磷酸酶基因的保守区段(家蚕 *Bombyx mori*, AB379673.1、棉铃虫 *Helicoverpa armigera*, EU729322.1、埃及伊蚊 *Aedes aegypti*, XM001663428.1),利用 DNAMAN(6.0)软件设计简并引物。其中正向引物为 Alp-f (5′-GGDGGGCGCATCGACCACGCGCA-3′),反向引物为 Alp-r (5′-ACGTCDTCKCCGCCGTGCGTC-TC-3′)。

1.3.3　中肠总 RNA 提取与 cDNA 第一链合成　采用 TRIzol 一步法提取小菜蛾敏感种群中肠 RNA(参照试剂盒说明书)。第一链 cDNA 合成反应体系 50 μL 包括 1 μg 中肠总 RNA、50 μmol/Oligo(dT)$_{16}$引物 1 μL、5 × M-MLV buffer 10 μL、2.5 mmol/L each dNTP 5 μL、40 U/μL Rnase Inhibitor 0.5 μL、200 U/μL RTase M-

MLV 1 μL,42℃反应 1 h,然后 70℃ 15 min 使 M-MLV 反转录酶失活。

1.3.4 RT-PCR 扩增及克隆鉴定 RT-PCR 反应程序为:预变性 94℃,6 min,然后进行 35 个循环,循环的条件为:94℃,变性 30 s,50.6℃,退火 30 s,72℃延伸 1 min,最后在 72℃条件下延伸 10 min。扩增结果在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳,凝胶成像系统中拍照保存。

将所扩增得到的目的片断以 SilverBeads 纯化试剂盒进行纯化、回收,然后克隆到 pEASY-T1 质粒载体中,转化感受态细胞 TOP-10,经蓝白斑筛选后,挑取 10 个以上的白斑,进行菌液 PCR 检测(扩增反应及条件同 RT-PCR 反应),同时以 ddH_2O 作空白对照以排除污染,然后随机挑选扩增信号较好的克隆送交北京诺赛基因组研究中心有限公司、上海英骏生物技术有限公司、北京三博远志生物有限公司等进行测序。

2 结果与分析

2.1 小菜蛾敏感及抗性种群的生物测定

用 Cry1Ac 毒蛋白对小菜蛾进行生物测定,抗性、敏感小菜蛾种群的 LC_{50} 值分别是 11.6701 μg/mL 和 0.0476 μg/mL,抗性倍数达 245.20,为下一步试验中克隆敏感及抗性小菜蛾的碱性磷酸酶基因提供了良好的实验材料(表 1)。

表 1 小菜蛾幼虫对 Cry1Ac 毒素的敏感性

种群	致死中浓度 (μg/mL)	(95% 置信限)	斜率	抗性倍数
S	0.0476	(0.0225 ~ 0.0989)	1.08 ± 0.20	1.00
R	11.6701	(5.7861 ~ 24.8582)	1.05 ± 0.21	245.20

2.2 碱性磷酸酶基因的克隆及鉴定

用引物 Alp-f 和 Alp-r 进行 RT-PCR 扩增,琼脂糖电泳检测结果见图 1,表明扩增片段大小为 400 bp 左右,与预期的扩增片断大小相符。克隆到载体上之后,重组质粒经 PCR 检测,抗性与敏感的泳道均出现了 400 bp 左右的片段,空白对照没有出现条带,证实载体中插入了该片断。

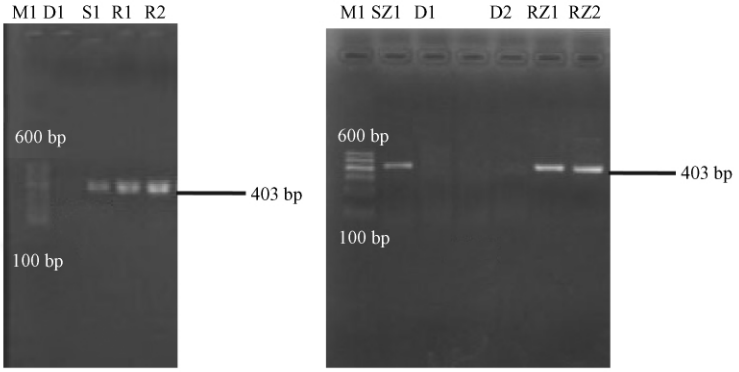

图 1 小菜蛾碱性磷酸酶基因的 RT-PCR 结果及质粒 PCR 鉴定结果

左图:种群 ALP 基因 RT-PCR 结果; 右图: 重组质粒 PCR 检测。

(M1:标准分子量 Marker 1;S1:敏感种群;R1,R2:抗性种群;SZ1:敏感种群;RZ1,RZ2:抗性种群;D1,D2:空白对照)

2.3 小菜蛾碱性磷酸酶基因片断分析及比对

重组质粒测序之后,发现所克隆基因片断大小均为 403 bp 左右。通过 blast 比较该片段与其它昆虫碱性磷酸酶基因的同源性大小,结果表明:小菜蛾敏感种群与鳞翅目昆虫家蚕的 m-ALP 基因相似性为 93%,与其 s-ALP 基因相似性为 82%,与野桑蚕、烟芽夜蛾、棉铃虫的 ALP 相似性分别为 93%、86% 和 79%,而与双翅目昆虫埃及伊蚊的 ALP 相似性为 69%。因此确定此基因片断为小菜蛾碱性磷酸酶基因。

将核苷酸序列翻译成蛋白质,从第一位可翻译出连续的氨基酸序列,从第二、三位翻译均

出现终止或错配,所以认为该片断从第一位碱基翻译是正确的。对抗性、敏感种群中碱性磷酸酶基因片段进行核苷酸序列比对(图 2),发现存在 18 个碱基的差异。图 3 是小菜蛾敏感、抗性种群氨基酸序列比对图,发现有 1 个氨基酸发生了替换,由缬氨酸转变为苏氨酸。

```
S   GGTGGGCGCATCGACCACGCGCACCACGATAGTCTGGCAC   40
R   ----------------------------c--------g-   40
S   ATCTCGCTTTAGACGAAACAGTTGAATACGCGAAAGCTGT   80
R   ----------------g-----------------------   80
S   TGAAAAAGCGAAGTGTTTGACCAGTCGAGAGGACACCCTC  120
R   c-------------------------------------- 120
S   ATAGTCGTGAGCTCTGACCACGCCCATGTTATGACTGTAG  160
R   --------------------t--a--cacc-----c----  160
S   CAGGTTATCCGTCCAGAGGGAATGATATCCTAGGAACTGT  200
R   ----a----------------------------------- 200
S   TGACACGGCTTTGGGATCCGATGACATTCCGTACACGACC  240
R   g------------------------------------- 240
S   ATCAGTTACGCAAACGGGAAGGGGCAGTCGGTTGGAGCTG  280
R   -----------t-----a----------------------  280
S   ACGGCAAGAGGATTGATGTTACGAAGAGCCAATCGTTTTT  320
R   -------------c-----c--------------------  320
S   GACAAGAAGCCTAGATTACGAGTACCCAGGCATGGTTCCC  360
R   ---c--------------------------------g---  360
S   ATGGATTCGGAGACGCACGGCGGAGAAGACGTAAGGGCAA  400
R   ------------------------------------- 400
S   TTC                                      403
R   ---                                      403
```

图 2　小菜蛾敏感种群与抗性种群碱性磷酸酶基因片段的核苷酸序列对比

相同核苷酸序列以“-”表示,阴影部分为引物序列

```
S-AA GGRIDHAHHDSLAHLALDETVEYAKAVEKAKCLTSREDTL   40
R-AA ----------------------------------------   40
S-AA IVVSSDHAHVMTVAGYPSRGNDILGTVDTALGSDDIPYTT   80
R-AA ---------T------------------------------   80
S-AA ISYANGKGQSVGADGKRIDVTKSQSFLTRSLDYEYPGMVP  120
R-AA ---------------------------------------- 120
S-AA MDSETHGGEDVRAI                            134
R-AA --------------                            134
```

图 3　小菜蛾美国敏感与美国抗性种群碱性磷酸酶基因片段的氨基酸序列对比

相同氨基酸序列以“-”表示

3　讨论

碱性磷酸酶是一类催化水解磷酸酯、磷酸核苷以及 6-磷酸核糖等含磷酸单酯键的非特异性水解酶,其广泛存在于人体、动物、植物与微生物中,是生物磷代谢的重要酶类[20]。就昆虫来说,ALP 被认为对虫体发育、神经功能与肾脏功能及表皮骨化等有促进作用[21,22];同时,ALP 也是昆虫体内重要的水解酶,在对内源或外源化合物(包括植物产生的次生物质)的解毒代谢和对杀虫剂的抗性形成起着重要作用[23]。目前,鳞翅目昆虫中已克隆出家蚕的 m-ALP受体,其 cDNA 全长 1 974 bp,编码 547 个氨基酸;所克隆的棉铃虫和烟芽夜蛾 ALP 受体基因均编码 481 个氨基酸。

本研究克隆了对 Cry1Ac 毒素敏感与抗性小菜蛾品系的碱性磷酸酶受体基因片断,并进行了比对分析,抗性品系与敏感品系相比有 18 个碱基发生变化;抗性种群相对敏感种群,有 1 个氨基酸发生改变,由缬氨酸(V)变为苏氨酸(T)。该研究对 Bt 抗性分子机理研究的意义在于,从分子水平来分析小菜蛾对 Bt 的可能抗性受体及其可能的突变位点,为进一步阐明小菜蛾的抗性机理奠定了基础。本研究中发现的核苷酸变化及导致的 1 个氨基酸替换是与小菜蛾对 Cry1Ac 的抗性形成相关,还是种群之间存在的多态性,需要进一步试验证明。

该研究获得的小菜蛾碱性磷酸酶基因片段序列,为进一步筛选 cDNA 文库或利用 RACE 技术获取全长基因提供了前提条件。采用 RNAi 技术检测该碱性磷酸酶基因是否对小菜蛾的 Bt 抗性产生决定性的影响,将可明确该基因的功能,为进一步明确小菜蛾的抗性分子机制打下基础。研究结果对转 Bt 基因植物、Bt 制剂的抗药性治理,新型 Bt 杀虫蛋白的开发与可持续应用均有重要的理论和实践意义。

参　考　文　献

1　Talekar N. S., Shelten A. M. Biology, ecology and management of diamondback moth. *Annu. Rev. Entomol.*, 1993, **38**: 275 ~ 301.

2　Soberon M., Pardo-Lopez L., Lopez I., *et al*. Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance. *Science*, 2007, **318** (5 856):1 640 ~ 1 642.

3　Romeis J., Meissle M., Bigler F. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiens* is toxins and biological

control. *Nature Biotechnol*. ,2006, **24**: 63 ~ 71.

4 Romeis J., Bartsch D., Bigler F., *et al*. Assessment of risk of insect-resistant transgenic crops to non target arthropods. *Nature Biotechnol*., 2008, **26**(2):203 ~ 208.

5 Tabashnik B. E., Cushing N. L., Finson N., *et al*. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback month. *J. Econ. Entomol*., 1990, **83**(5): 1 671 ~ 1 676.

6 Georghiou G. P., Talor C. E. Proceedings of XVth International Congress of Entomology. Washington D. C. College Park, 1976. 759 ~ 785.

7 **冯夏,陈焕瑜,帅应恒,等. 广东小菜蛾对苏云金杆菌的抗性研究. 昆虫知识**,1996, **39**(3): 238 ~ 244.

8 Zhao J. Z., Collins H. L., Tang J. D., *et al*. Development and characterization of diamondback moth resistance to transgenic broccoli expressing high levels of CrylC. *Appl. Environ. Microbiol*., 2000, **66**(9): 3 784 ~ 3 789.

9 Tabashnik B. E., Gassmann A. J., Crowder D. W., *et al*. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. *Nature Biotechon*. ,2008,**26**(2):199 ~ 202.

10 Ferre J., Van Rie J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol*., 2002, **47**: 501 ~ 533.

11 Jurat-Fuentes J. L., Adang M. J. Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *J. Invertebr. Pathol*., 2006, **92**(3): 166 ~ 171.

12 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. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 2000, **30**(3): 215 ~ 224.

13 Gahan L. J., Gould F., Heckel D. G. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science*, 2001, **293**(5 531):857 ~ 860.

14 Xu X. J., Yu L. Y., Wu Y. D. Disruption of acadherin gene associated with resistance to Cry1Ac-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armiqera*. *Appl. Environ. Microbiol*., 2005, **71**(2): 948 ~ 954.

15 Griffitts J. S., Whitacra J. L., Stevens D. E., *et al*. Bt toxin resistance from loss of a putative carbohydrate-modifying enzyme. *Science*, 2001, **293** (5 531): 860 ~ 864.

16 Jurat-Fuentes J. L., Adang M. J. Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens larvae*. *Eur. J. Biochem*., 2004, **271** (15): 3 127 ~ 3 135.

17 Heckel D. G., Gahan L. J., Tabashnik B. E., *et al*. The diversity of Bt resistance genes in species of Lepidoptera. *J. Invertebr. Pathol*., 2007, **95**(3):192 ~ 197.

18 Pigott C. R., Ellar D. J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol. Mol. Biol. R*., 2007, **71**(2):255 ~ 281.

19 Tabashnik B. E., Cushing N. L., Johnson M. W. Diamondback moth resistance to insecticides in Hawaii: intra-island variation and cross-resistance. *J. Econom. Entomol*., 1987, **80**(6):1 091 ~ 1 099.

20 Chen Q. X., Yan S. X. Substrate specificity of Amphioxus ALPase and on the influence of some effectors on the enzyme. *J. Xiamen Univ*. (*Natural Scienc*),1989,**28**(1):92 ~ 93.

21 Rao N. M., Nagaraj R. Anomalous stimulation of *Escherichia coli* alkaline phosphatase activity in guanidiniun chloride. *J. Biol. Chem*., 1991, **266**: 5 018.

22 Besman M., Coleman J. E. Isozyme of bovine intestinal alkaline phosphatase. *J. Biol. Chem*., 1985, **260** (20): 11 190 ~ 11 193.

23 Misbahuddin R. S., Ehteshamuddin S. Effect of phosphamidon on the alkaline phosphatase activity in the haemalymph of sap feeding insect pests *Aspongopus janus*, *Chrysocoris stollii* and *Dysdercus cingulatus*. *Environ. Ecol*., 2000, **18**(2): 323 ~ 325.