研究论文

家蚕 *para* 钠通道 cDNA 片段克隆与序列分析

何 琳* 刘丽花 汪 洋

(华东师范大学生命科学学院 上海 200062)

摘 要 昆虫神经系统 *para* 型钠离子通道是拟除虫菊酯类杀虫剂的主要靶标,已有的研究表明钠离子通道基因发生点突变与昆虫对菊酯类杀虫剂的抗性密切相关。本文通过 RT-PCR 方法克隆获得了编码家蚕 *Bombyx mori* L. 钠离子通道的 cDNA 片段(GenBank No. EF521818),该片段全长 4 882 bp,部分 ORF 包含 3 986 bp 核苷酸,翻译成 1 328 个氨基酸。蛋白序列分析表明,PCR 扩增获得的家蚕钠离子通道 cDNA 片段所编码的氨基酸与其他昆虫的 *para* 型钠离子通道 α 亚基的氨基酸具有很高的同源相似性,与棉铃虫 *Heliothis virescens* Fabricius、埃及伊蚊 *Aedes aegypti* L.、德国小蠊 *Blattella germanica* L.、果蝇 *Drosophila melanogaster* Meigen 和家蝇 *Musca domestica* L. 的相似性分别为 95%、82%、80%、79%、77%。

关键词 家蚕,*para* 型钠离子通道,基因克隆,序列分析

Cloning and sequence analysis of *para* sodium channel cDNA fragment from silkworm, *Bombyx mori*

HE Lin* LIU Li-Hua WANG Yang

(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract Previous studies have revealed that a point mutation of a target gene is related to insecticide resistance to pyrethroids. The *para* sodium channel in the insect central nervous system is the target of pyrethroid insecticides. We used the RT-PCR method to clone the *para* sodium ion channel in the silkworm, *Bombyx mori* L. (GenBank No. EF521818). The full length of this cDNA fragment is 4 882 base pairs and its partial ORF is 3 986 bp translated into 1 328 amino acids. BLAST analysis demonstrated that the cloned cDNA fragment is virtually identical to the *para* sodium channel α subunit gene amplified from other insects. Amino acid homology of the cloned fragment with *para* sodium channel α subunit genes from *Heliothis virescens* Fabricius, *Aedes aegypti* L., *Blattella germanica* L., *Drosophila melanogaster* Meigen and *Musca domestica* L. was 95%, 82%, 80%, 79% and 77% respectively.

Key words silkworm, *para*-sodium channel, gene clone, sequence analysis

电压门控钠离子通道(voltage-gated sodium channel)调节兴奋性组织动作电位形成,可使钠离子渗透性快速上升,作为生物体重要的兴奋性结构,钠离子通道也是很多神经毒剂的作用靶点(孙鲁娟等,2003)。神经生理研究已证实,拟除虫菊酯类杀虫剂的主要作用靶标是神经细胞膜上钠离子通道,干扰钠离子通道的门控动力学,在膜去极化期间减缓失活,延长钠离子电流,引起重复放电和神经传导的阻断(王建军等,2002)。化学杀虫剂的广泛使用使昆虫产生了高度的抗性,分子生物学研究表明,昆虫神经系统对拟除虫菊酯类杀虫剂产生抗性的主要原因是神经细胞膜上的钠离子通道敏感性降低(王义平和吴鸿,2002)。同时分子遗传学研究也表明,击倒抗性与钠离子通道位点连锁(Loughney *et al.*, 1989; Williamson *et al.* 1996)。最近的研究表明,昆虫神经系统对拟除虫

* 通讯作者,E-mail: hallie@126.com

收稿日期:2010-08-16,接受日期:2010-09-16

菊酯类杀虫剂的击倒抗性是钠离子通道结构基因的突变引起的(Smith *et al.*, 1997; Tan *et al.*, 2002)。

因此,对昆虫钠离子通道基因的克隆和序列分析将有助于阐明抗性机理和新靶点的研究开发。家蚕作为鳞翅目模式昆虫,基因组测序工作的完成为开展功能基因的研究奠定了基础,而且80%的害虫属于鳞翅目,在家蚕中借助基因组信息的研究成果将对鳞翅目害虫防治提供一定的理论依据。本文从基因结构水平分析了家蚕 *para* 钠通道的序列特征,以期对农药分子设计与害虫抗性机制,特别是靶标抗性分子检测提供理论依据(李飞和韩召军,2002;Zlotkin,1999)。

1　材料与方法

1.1　实验材料及主要试剂

1.1.1　家蚕和菌株　选取家蚕 P50 品系(中国农业科学院镇江蚕业研究所供种),桑叶喂养待其发育到 5 龄第 2 天时解剖家蚕取脑组织及腹下神经节收集于 EP 管中,加入液氮迅速冷冻,以备提取总 RNA 制备 RT-cDNA 模板。

1.1.2　主要试剂　TRIzol Reagent 购自 Invitrogen 公司,RNase Inhibitor、Ex Taq 酶、T4 DNA Ligase 和 pMD 18-T vector 购自 TaKaRa 公司,RT 反转录试剂盒购自 TOYOBO 公司,凝胶回收试剂盒为上海申能博彩公司产品,引物合成和测序由 Invitrogen 公司完成。其它化学试剂均为国产分析纯。

1.2　实验方法

1.2.1　家蚕脑组织 RNA 提取　选用桑叶喂养至 5 龄第 2 天的 P50 家蚕,解剖取脑组织及腹下神经节在生理盐水中冲洗收集于 EP 管中并加入液氮快速冷冻。解剖收集的约 30 头 5 龄家蚕幼虫脑及神经节组织在液氮中迅速研磨成冻干粉状,收集于 1.5 mL 进口 EP 管中,加入 800 μL 预冷 Trizol 振荡混匀,冰上静置 5 min;再加入约 300 μL 氯仿,混匀 15 s,静置 2 ~ 3 min 后 4℃ 条件下 12 000 g离心 15 min;取上清加入 1/2 体积的异丙醇混匀,静置 10 min;4℃ 条件下 12 000 g 离心 10 min 后弃上清;加入 800 μL 75% 乙醇,洗沉淀,4℃ 条件下 7 500 g 离心 5 min 后弃上清,空气中倒干放置 10 min,加 DEPC 水溶解,检测 $A_{260/280}$ 并进行凝胶电泳检测,然后放置于 -80℃ 冰箱保存备用。

1.2.2　第一链 cDNA 合成　选用 TOYOBO 公司的 First Strand cDNA Synthesis Kit ReverTra Ace-α 试剂盒进行第一链 cDNA 模板的合成,取 1 μg 总 RNA 加入 20 μL 反应体系中按照试剂盒说明书操作方法进行。反转录获得的 cDNA 模板稀释 10 倍取 1 μL 作为 25 μL PCR 扩增体系的模板。

1.2.3　家蚕基因组序列分析与引物设计　选择与家蚕亲缘关系较近的烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*,俗称绿棉铃虫的 α 亚基 1 695 个氨基酸的序列(GenBank 登录号:AAC26517)与家蚕基因组序列进行 BLAST 分析获得散布在基因组中的钠离子通道 cDNA 片段序列信息,根据这些序列信息设计引物,在 P50 家蚕脑组织 cDNA 中进行扩增,可以获得清晰条带的扩增产物进行克隆测序,测序结果通过 DNASTAR 软件进行拼接,从而获得钠离子通道 cDNA 序列信息。

1.2.4　PCR 扩增体系和条件　25 μL PCR 扩增体系中含有 10 × buffer 2.5 μL,25 mmol/L $MgCl_2$ 2 μL,10 mmol/L dNTP mix 0.5 μL,cDNA 模板约 3 ng,5 U/μL Ex Taq 酶 0.25 μL,10 μmol/L 上下游引物各 1 μL。PCR 扩增条件为 94℃ 预变性 3 min,然后 94℃ 50 s,Tm 50 s,72℃ 2 min,35 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。

1.2.5　PCR 产物克隆与测序　PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳割胶回收用胶回收试剂盒纯化后,将纯化片段与 pMD 18-T 载体进行连接,转化 *E. coli* Top 10 菌,挑取单个白色阳性克隆于 1 mL Amp^+ 液体 LB 培养基中扩大培养,取 2 μL 菌液作为模板,以 M13 引物来扩增插入片段包含插入位点的部分,扩增产物在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳,检测插入片段是否与目的片段大小相吻合,以确认是否为阳性克隆,挑选阳性克隆送到测序公司进行测序,本文的所有测序工作由 Invitrogen 上海分公司完成。

1.2.6　数据分析和序列比对　测序结果首先通过 DNASTAR 软件分析,去除载体序列以后的有效测序结果通过 SeqMan 软件进行拼接,拼接好的序列提交 GenBank 用 BLAST 软件进行比对分析。不同物种钠通道基因的蛋白相似性分析采用 ClustX 软件进行完全比对以后,用 Genedoc 读取比对结果进行分析。

2 结果与分析

2.1 家蚕 *para* 型钠通道 cDNA 片段扩增

根据烟芽夜蛾与家蚕 Scaffold 数据库比对获得的散布在基因组中的 cDNA 片段序列信息设计引物如表 1 所列，以 P50 家蚕脑及神经节组织提取总 RNA 制备的 cDNA 为模板，3 条正向引物分别与位点距离越来越远的反向引物匹配扩增的 PCR 产物经 1.0 % 琼脂糖凝胶电泳检测，获得清晰、稳定的条带与设计引物位点预期的片段大小一一对应，扩增产物电泳结果如图 1 所示。

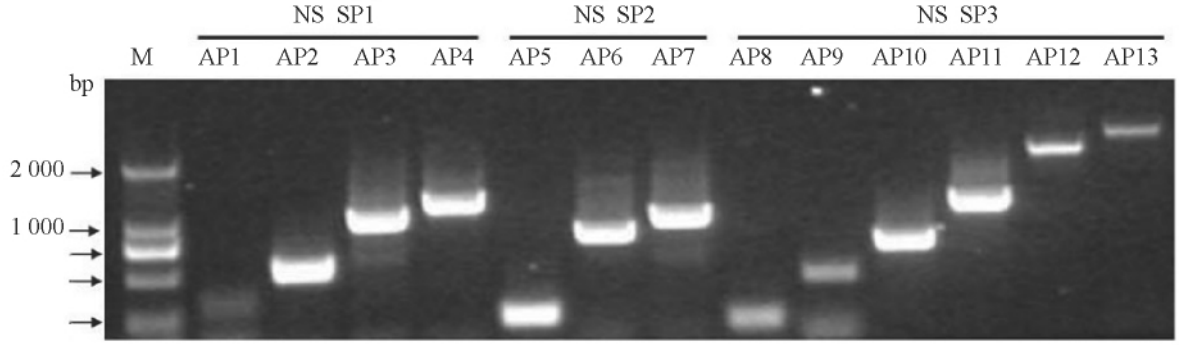


图 1 家蚕钠离子通道基因 cDNA 片段 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification results of the *para* sodium channel cDNA fragments in silkworm

表 1 根据家蚕 Scaffold 序列设计的引物

Table 1 Primers designed according to the scaffold sequence in silkworm

引物名称 Primer name	引物序列(5′-3′) Primer Sequence (5′-3′)
NS SP1	5′-GAGGACTTGGACTCGATCAGCG-3′
NS SP2	5′-CAGCCGAAGACGATGAAGATGG-3′
NS SP3	5′-CAGATAATCACAGGGACAATAG-3′
NS AP1	5′-GAGTGGTGTAGAGGCGAGTTCGAG-3′
NS AP2	5′-GTTGGCGTTGTAGGCATTATCA-3′
NS AP3	5′-TCGTTCTGACAAAACCTCTCCC-3′
NS AP4	5′-CCTGTGTCATTAGACGGAAAGC-3′
NS AP5	5′-TGGTCCAGAGCCATAAATAGTG-3′
NS AP6	5′-AACGACGGTTGCCAAGAAAAAT-3′
NS AP7	5′-CGTTCCGTTTTATCCAGTCAATG-3′
NS AP8	5′-TCTTCTCCATCTATCGTATCGG-3′
NS AP9	5′-GTTTTGAGCCGAAGAGTGCCCC-3′
NS AP10	5′-ATGAAATCAAGCCAGCACCAAG-3′
NS AP11	5′-ATCCAGCCTTTGAATGTTGCCA-3′
NS AP12	5′-CATACTCTGCACGAATGTTTTGAAG-3′
NS AP13	5′-GGTTTGTGGATTTGTAATGGCG-3′

由此证明作者设计引物的有效性，为了克服钠通道基因太长(通常 5 ~ 6 kb)而无法一次 PCR 扩增获得全长片段的问题，将钠离子通道预测 cDNA 片段分割为具有重叠区域的三大段，分别进行扩增，这里选用的 3 对引物分别是 NS SP1 和 NS AP5、NS SP2 和 NS AP8、NS SP3 和 NS AP13，3 对引物分别扩增获得 2.0 kb、1.5 kb 和 2.0 kb 的片段，这 3 个测序的片段包含重叠区域，可以保证序列之间的有效拼接。经纯化、克隆和鉴定阳性克隆测序结果分析和拼接，获得 cDNA 片段长度为 4 882 bp，包含一个 3 984 bp 开放阅读框(ORF)编码 1 328 个氨基酸(GenBank No. EF521818)。

2.2 基因序列分析

应用 DNASTAR 软件对拼接好的 4 882 bp 序列进行完整开放阅读框(ORF)分析，发现从 896 bp 位点开始到 4 882bp 位点构成一个最大的开放阅读框，而且通过软件推导获得相应的蛋白质序列，将该序列递交 GeneBank 进行蛋白与蛋白的 Blast 分析，与大多数物种的钠通道蛋白都有很高的相似性。尤其是与棉铃虫相似性高达 95%，更充分说明鳞翅目昆虫间基因具有高度保守性，因此，在家蚕中的研究结果完全可以直接应用于鳞翅目其他种类害虫的防治工作中去。为作者在家蚕研究中获得的信息更好的应用于害虫防治和新农药靶点开发提供了理论依据。家蚕 *para* 钠通道与埃及伊蚊、德国小蠊、果蝇和家蝇中该基因的相似性分别为 82%、80%、79%、77%，也从侧面应证

了钠通道基因在不同物种间同样具有较高的保守性。

2.3　基因结构分析

钠离子通道 α 亚基是该通道最基本的结构和功能单位,包个相似的多肽区(Ⅰ~Ⅳ),称为相似区,每个相似区又由 6 个氨基酸序列跨膜结构 S1~S6 组成。电压敏感的钠离子通道的电压依赖性激活是其最独特的特性,它需要在磷脂双层的膜电场内有带电荷的氨基酸或强的双极离子,这些闸门电荷的运动或电压感受其在电场力的作用下运动引起通道蛋白构型改变导致通道的激活。钠通道激活时需要多个电荷的跨膜运动,含有较多电荷又具有疏水性的 S_4 片段因膜电位变化而变化,被称为电压感受器,其中包含一个最保守的区段由正电荷氨基酸残基(通常是 Arg)紧接着 2 个疏水性氨基酸参加组成的重复单位构成。结构域Ⅲ和Ⅳ的胞内部分对钠通道的快速失活是必须的,因此形成一个钠通道灭活的开关位点。SS1 和 SS2 形成位于 S5、S6 结构域之间的胞外 Loop 结构,同时在膜内形成一个发夹结构行使离子传导通路的功能。

根据蛋白序列 Blast 结果,该片段包含 3 个离子跨膜结构域和 1 个钠离子转运相关单位(图 2),由此可以确认作者克隆获得的 cDNA 片段为家蚕 *para* 钠通道基因的部分片段,5′端缺少约 500 个氨基酸的一个结构域Ⅰ,其它 3 个结构域(图 2 Ion_trans 区段)都成功克隆获得,还包括一段起到钠离子转运的功能结构域(图 2 Na_trans_assoc 区段)。

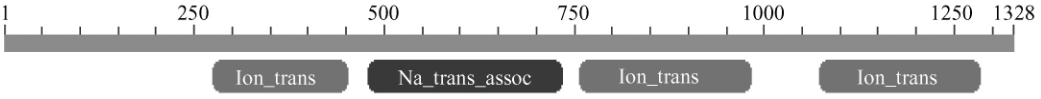


图 2　蛋白序列结构功能域预测

Fig. 2　Prediction of the protein structure and function domain

结合基因结构特点以及家蚕与埃及伊蚊、德国小蠊、果蝇、家蝇中这 5 种昆虫 *para* 钠通道蛋白序列的相似性分析发现,同为跨膜区域的结构域部分相似性非常高,不同的昆虫中只在少数位点存在差异(图 3:A、B、C、D),而负责钠离子转运的功能区段则存在较大的差异(图 3:B),这也说明不同物种间钠离子通道识别可通透离子的位点具有物种特异性,保证各自在正常生理功能方面的特异性,这一点也解释了杀虫剂选择性的分子机理所在,提示我们在开发新农药时应该控制在调节离子转运的区段作为作用靶点。

3　讨论

本文利用家蚕数据库信息结合 RT-PCR 的方法对家蚕 *para* 钠通道基因进行了克隆,但是由于离子通道基因结构复杂、序列庞大,通常要克隆其全长非常困难,作者巧妙的利用家蚕基因组信息数据库,将一个较大的基因人为分割成几个包含重叠区的片段,通过对这些片段的克隆、测序、拼接,实现全长基因的整合,进而实现对基因结构和功能的分析。作者克隆获得了编码家蚕 *para* 型钠离子通道的 cDNA 片段全长 4 882 bp,部分 ORF 包含 3 984 bp 核苷酸,翻译成 1 328 个氨基酸。通过蛋白序列分析结构与功能发现,作者克隆获得的家蚕钠通道 cDNA 包含了完整的第Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ结构域和负责钠离子转运相关的结构单元,只缺少 5′端约 500 个氨基酸的部分序列。并对起到电压感受器作用的 S4 区段中的保守 motif 进行了分析,通常由一个带正电的氨基酸(K、R、H)和 2 个非极性氨基酸通过 4~8 次重复形成(Catterall, 1992),在家蚕的 *para* 钠通道基因第Ⅱ结构域中该位点序列为 RLLRVFKLAKSW,与其它 5 种昆虫完全一致呈高度保守性;而第Ⅲ跨膜区段中该位点序列为 KTMRTLRALRPLRAM,在这一位点的比较中发现,只有家蝇中 RSMRTLRALRPLRAV 和其他物种昆虫存在差异,存在 3 个氨基酸的差异;而在第Ⅳ跨膜结构域中也呈现完全一致的高保守性,序列为 RVVRVAKVGRVLRLVKGAKGIRTL,而且 6 种昆虫中该位点附近的氨基酸也都非常保守。

Loughney 等(1989)首次从果蝇中分离克隆了 *para* 型钠离子通道基因,并通过行为反应、电生理和遗传研究等方法阐明了钠离子通道基因的突变

可能改变其功能，从而导致昆虫对菊酯类农药产生抗性。目前已在多种农业害虫和卫生害虫中发现与拟除虫菊酯类杀虫剂抗性相关的钠离子通道氨基酸突变（周婷等，2003）。这些突变通常发生在钠离子通道同源结构域Ⅱ和结构域Ⅲ，在结构域Ⅰ也有分布，在结构域Ⅳ至今为止没有发现；还有一些突变发生在结构域之间或结构域内跨膜蛋白之间（Catterall *et al.*，2007）。分子生物学研究表明，哺乳动物不同组织中至少存在 9 种不通的钠离子通道基因来保证钠离子通道功能方面的多样性，而昆虫的基因组中发现似乎只有一种钠离子通道基因，或许它们可以通过选择性剪切产生一系列功能和药理学方面存在差异的基因产物（Dong，2007；Olson *et al.*，2008）。Shao 等（2009）最近在家蚕研究中应用生物信息学方法和高通量测序 Solex 方法对不同剪切形式的家蚕钠离子通道基因进行了研究，对内含子外显子的剪切方式进行了系统分析，对鳞翅目昆虫钠离子通道基因结果研究分析做了有益补充。因此从分子水平分析钠通道基因将对阐明抗性形成机理提供理论依据，家蚕作为人工驯养几千年的经济昆虫，与暴露于野外的种群相比，对农药是高度敏感的，而且作者的结果也证明同属鳞翅目的棉铃虫和家蚕的同一个基因在蛋白水平是具有高度保守性的，因此在家蚕中的研究完全可以作为敏感品系与鳞翅目其它害虫的靶点基因进行对比分析，寻找其它害虫的相关靶点突变位点，为阐明抗性机理和抗性治理提供新的视野。

参考文献（References）

Catterall WA，1992. Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*，72：15—48.

Catterall WA，Cestele S，Yarov-Yarovoy V，Yu FH，Konoki K，Scheuer T，2007. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon*，49（2）：124—141.

Dong K，2007. Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invert. Neurosci.*，7（1）：17—30.

李飞，韩召军，2002. 棉蚜 *para* 钠通道 cDNA 和基因组 DNA 片段的克隆和序列分析. 武夷科学，18：86—92.

Loughney K，Kreber R，Ganetzky B，1989. Molecular analysis of the *para* locus，a sodium channel gene in *Drosophila*. *Cell*，58：1143—1154.

Olson RO，Liu Z，Nomura Y，Song W，Dong K，2008. Molecular and functional characterization of voltage-gated sodium channel variants from *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*，38（5）：604—610.

Shao YM，Dong K，Tang ZH，Zhang CX，2009. Molecular characterization of a sodium channel gene from the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*，39：145—151.

Smith TJ，Lee SH，Ingle PJ，Knipple DC，Soderlund DM，1997. The L1014F point mutation in the housefly Vssc1 sodium channel confers knockdown resistance to pyrethroid. *Insect Biochem. Mol. Biol.*，27：807—812.

孙鲁娟，高希武，郑炳宗，2003. 氰戊菊酯抗性和敏感品系棉蚜部分钠离子通道基因的克隆. 中国农业科学，36（11）：1301—1305.

Tan J，Liu Z，Tsai TD，Valles SM，Goldin AL，Dong K，2002. Novel sodium channel gene mutations in *Blattella germanica* reduce the sensitivity of expressed channels to deltamethrin. *Insect Biochem. Mol. Biol.*，32：445—454.

王建军，韩召军，王荫长，2002. 击倒抗性和钠离子通道. 昆虫学报，45（3）：391—396.

王义平，吴鸿，2002. 昆虫抗药性的分子机理. 中国森林病虫，21（5）：34—36.

Williamson MS，Martinez-Torres D，Hick CA，Devonshire AL，1996. Identification of mutations in the housefly *para*-type sodium channel gene associated with knockdown resistance（kdr）to pyrethroid insecticides. *Mol. Gen. Genet.*，252（1/2）：51—60.

周婷，王强，姚军，2003. 钠离子通道与蜜蜂狄斯瓦螨对氟胺氰菊酯的抗性机理. 昆虫知识，40（6）：491—495.

Zlotkin E，1999. The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides. *Annu. Rev. Entomol.*，44：429—455.

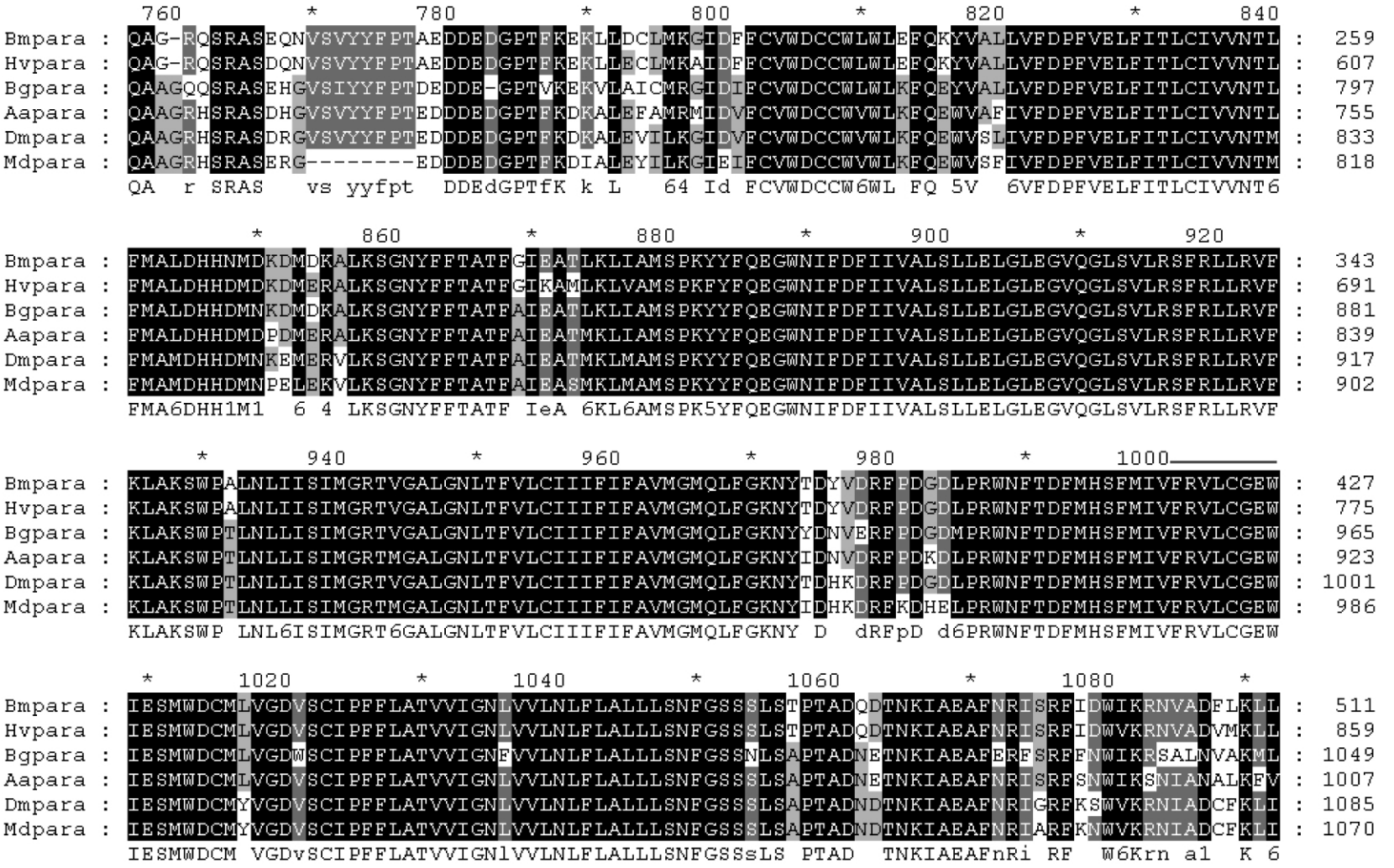


图 3（A） 家蚕 ***para*** 型钠离子通道基因与其它物种该基因蛋白相似性（第Ⅱ结构域，图中标记区段为 **S4** 保守 **motif**）

Fig.3 (A) Similar analysis of *para* sodium channel gene in silkworm with other species (The Ⅱ domain, the conserved motif S4 is marked with black line)

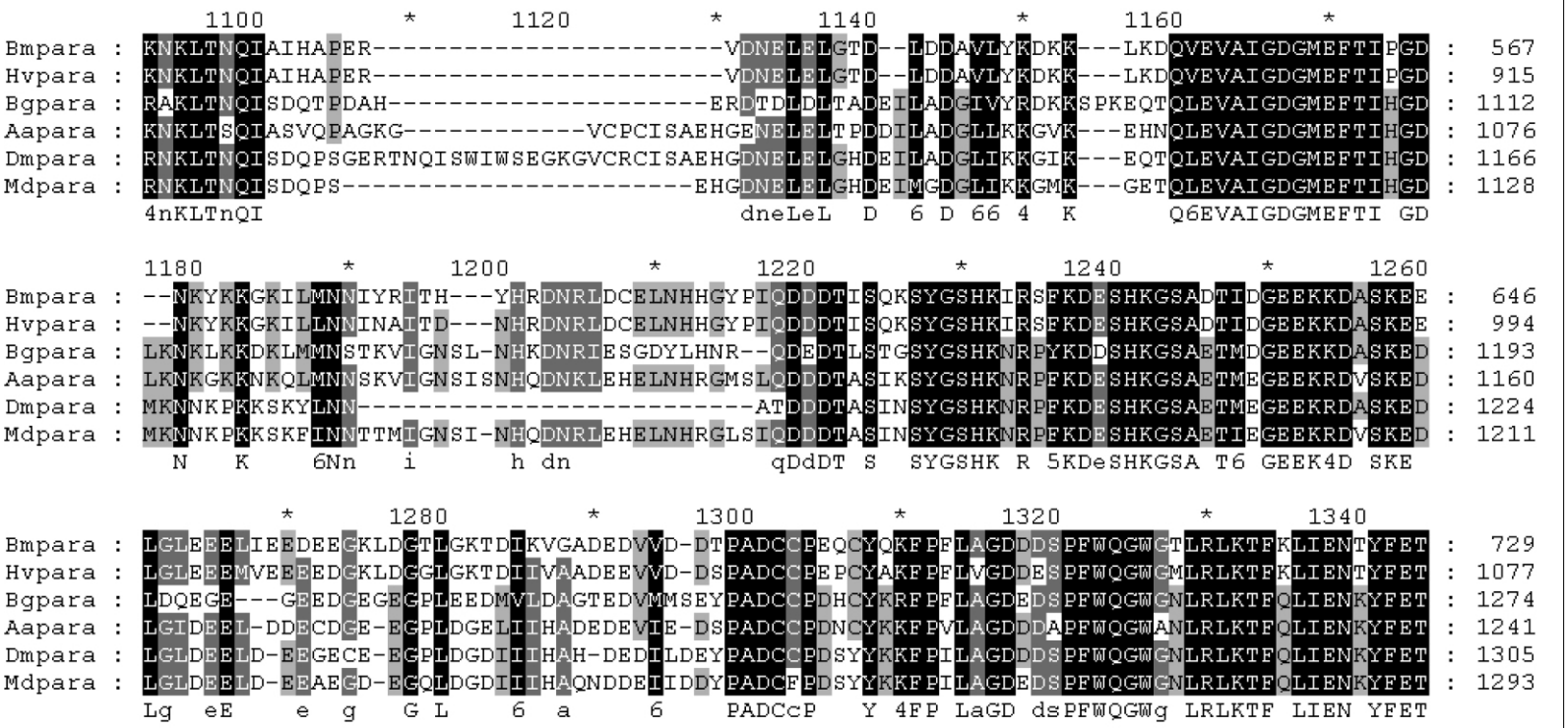


图 3（**B**） 家蚕 ***para*** 型钠离子通道基因与其它物种该基因蛋白相似性（钠离子转运结构域）

Fig.3 (B) Similar analysis of *para* sodium channel gene in silkworm with other species (The Na^+ transport domain)



图 3（C） 家蚕 ***para*** 型钠离子通道基因与其它物种该基因蛋白相似性（第 Ⅲ 结构域，图中标记区段为 **S4** 保守 **motif**）

Fig.3 (C) Similar analysis of *para* sodium channel gene in silkworm with other species (The Ⅲ domain, the conserved motif S4 is marked with black line)



图 3（**D**） 家蚕 ***para*** 型钠离子通道基因与其它物种该基因蛋白相似性（第 Ⅳ 结构域，图中标记区段为 **S4** 保守 **motif**）

Fig.3 (D) Similar analysis of *para* sodium channel gene in silkworm with other species (The Ⅳ domain, the conserved motif S4 is marked with black line)

Bmpara：*Bombyx mori*，Genebank No. EF521818

Hvpara：*Heliothis virescens*，Genebank No. AAC26517

Bgpara：*Blattella germanica*，Genebank No. AAC47484

Aapara：*Aedes aegypti*，Genebank No. AAT69681

Dmpara：*Drosophila melanogaster*，Genebank No. NP_001036281

Mdpara：*Musca domestica*，Genebank No. CAA654