

桃蚜电压门控钠离子通道基因cDNA克隆及其生物信息学分析

王 颢^{1,2*}, 段文波^{1,2*}, 李 芬², 李为争^{1**}, 吴少英^{1,2**}

(1. 河南农业大学植物保护学院, 郑州 450002; 2. 海南大学植物保护学院, 海口 570228)

摘要: 克隆获得桃蚜电压门控钠离子通道基因 cDNA 序列, 明确钠离子通道的典型特征, 为研究桃蚜抗性分子机理奠定基础。采用实验技术主要有 RT-PCR 和 PCR, 克隆桃蚜钠离子通道基因 cDNA 序列, 利用相关软件对其序列进行生物信息学分析。克隆得到两段 cDNA 序列 MpNa_v-1 (NCBI 登录号: MN124170) 和 MpNa_v-2 (NCBI 登录号: MN176136)。MpNa_v-1 长度为 2945 bp, 包括 2877 bp 的完整开放阅读框, 共编码 958 个氨基酸; MpNa_v-2 长度为 3546 bp, 包括 3486 bp 的完整开放阅读框, 共编码 1161 个氨基酸。MpNa_v-1 和 MpNa_v-2 共同组成桃蚜的钠离子通道 α 亚基, MpNa_v-1 包含同源结构域 I 和同源结构域 II, MpNa_v-2 包含同源结构域 III 和同源结构域 IV。同源比对发现, 桃蚜与豌豆蚜和高粱蚜钠离子通道基因相似度分别高达 97.67% 和 97.65%, 所克隆序列包含昆虫钠离子通道 α 亚基典型特征, 具有 MFM 模块, 并含有蚜虫类钠通道特有模块 DENS。成功地克隆桃蚜钠离子通道基因, 为阐明其对拟除虫菊酯类药剂产生靶标抗性的分子机制奠定基础。

关键词: 桃蚜; 钠离子通道; 基因克隆; 生物信息分析; 系统发育分析

中文分类号: S476 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-9261 (2020) 03-0443-09

Cloning and Bioinformatics Analysis of Voltage-gated Sodium Channel Gene of *Myzus persicae*

WANG Hao^{1,2*}, DUAN Wenbo^{1,2*}, LI Fen², LI Weizheng^{1**}, WU Shaoying^{1,2}

(1. College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou, 450002, China; 2. College of Plant Protection, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: The cDNA sequence of the voltage-gated sodium channel gene of *Myzus persicae* was cloned and the typical characteristics of sodium channel were determined, which laid a foundation for studying the molecular mechanism of resistance to *Aphis gossypii*. The experimental techniques were mainly RT-PCR and PCR, and the cDNA sequence of the sodium ion channel gene was cloned, and the sequence bioinformatics analysis was carried out by using relevant software. Cloning two cDNA sequences MpNa_v-1 (NCBI accession number: MN124170) and MpNa_v-2 (NCBI accession number: MN176136). MpNa_v-1 is 2945 bp in length and includes a 2877 bp complete open reading frame encoding a total of 958 amino acids. MpNa_v-2 is 3546 bp in length and includes a 3486 bp complete open reading frame encoding a total of 1161 amino acids. MpNa_v-1 and MpNa_v-2 together form the sodium channel of *Myzus persicae*, MpNa_v-1 contains a homologous domain I and a homologous domain II, MpNa_v-2 contains a homology domain III and a homologous domain IV. The homology alignment found that the similarity between the *Acyrtosiphon pisum* and the *Melanaphis sacchari* sorghum sodium channel was as high as 97.67% and 97.65%, respectively. The cloned sequence contains typical features of the insect sodium ion channel and contains DENS and MFM. Successfully cloned the sodium ion channel gene of *Myzus persicae*, laying the foundation for elucidating its molecular mechanism of target resistance to pyrethroids.

收稿日期: 2019-07-15

基金项目: 海南大学启动基金 (KYQD-ZR-1963); 中国博士后基金 (2018M640675)

作者简介: *共同第一作者, 王颢, 硕士研究生, E-mail: 2387226387@qq.com; 段文波, 硕士研究生, E-mail: 1339032169@qq.com。 **通信作者, 李为争, 副教授, E-mail: wei-zhengli@163.com; 吴少英, 教授, E-mail: wsywsy6000@hainanu.edu.cn。

DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2020.03.029

Key words: *Myzus persicae*; sodium channel; gene cloning; bioinformatics analysis; phylogenetic analysis

桃蚜 *Myzus persicae*, 又叫桃赤蚜, 是一种广食性世界性害虫, 寄主植物多达 70 余科 285 种^[1]。桃蚜营转主寄生的生活周期, 分为冬寄主和夏寄主, 其中冬寄主植物主要有梨、桃等蔷薇科果树等; 夏寄主作物主要有白菜、甘蓝等多种蔬菜作物。国内主要分布在华北地区和长江流域, 对作物和水果造成不可逆转的影响^[2]。

据报道, 桃蚜现在已经对高效氯氰菊酯等拟除虫菊酯类药剂产生了较严重的抗药性, 导致拟除虫菊酯类药剂效果降低。钠离子通道基因与击倒抗性直接相关, 因此国内外学者对抗性突变进行了多方面的研究^[3]。钠离子通道是亲水性的跨膜蛋白复合体, 镶嵌在细胞的磷脂双分子层中, 存在于脊椎动物和无脊椎动物的神经系统, 是神经细胞传递电脉冲的重要通道, 负责神经细胞、肌细胞和内分泌细胞等电刺激兴奋性细胞膜动作电位的产生和传导, 是一个多聚复合体^[4]。哺乳动物的钠离子通道由两部分组成, 1 个 α 亚基和 5 个 β 亚基。单个 α 亚基即可表达钠离子通道的功能, β 亚基的主要功能有两个, 一个是起调节钠离子通道门控的作用, 另一个增加钠离子通道的表达丰富度的作用^[5]。钠离子通道 α 亚基是一个分子量为 260 kD 的跨膜糖蛋白, 由 4 部分组成, 包括细胞内 N 端、C 端片段、同源跨膜结构域和多肽链 (Linker) 组成, 而同源跨膜域又由同源跨膜结构域 I、II、III、IV 4 部分组成, 这 4 个同源跨膜结构域围绕成一个圆柱体, 命名为钠离子通道中央孔洞。各个跨膜区域之间, 跨膜片段之间都由多肽链相互连接, 组成一个四联体, 形成 Na^+ 通道的结构基础。每个结构域由 6 个疏水性跨膜螺旋体 (S1~S6) 组成, 每个跨膜片段含有 19~27 个氨基酸。S1~S4 组成电压感受模块, 可以感受跨膜电场的强度, S5、S6 以及连接 S5 和 S6 的 LOOP (P-LOOP) 组成供钠离子通过的孔模块, 电压感受模块和孔模块之间由 S4 和 S5 中间的短肽 (L-45) 连接^[6]。研究表明钠离子通道构象因基因突变而产生变化, 导致昆虫对高效氯氰菊酯等拟除虫菊酯类药剂的击倒抗性^[7]。桃蚜钠离子通道基因的克隆对其田间抗性检测、分子诊断工具的设计、抗性相关突变位点的筛选以及桃蚜抗性机制的深入研究具有重要的意义。此外, 鉴于钠离子通道在不同科属的昆虫间高度的保守性, 桃蚜钠离子通道基因 cDNA 序列的获得对其他蚜虫科昆虫钠离子通道基因的克隆具有重要的参考意义。自 Loughney 等^[10]从黑腹果蝇中克隆出首条昆虫钠离子通道基因后, 目前已有数百种昆虫较完整的钠离子通道基因在 GenBank 中公布, 如黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、家蝇 *Musca domestica* L、德国蜚蠊 *Blattella germanica* 和家蚕 *Bombyx mori* 等^[8-11]。对昆虫钠离子通道基因的研究主要集中在 para 同源的 α 亚基的克隆和体外表达, 其中 α 亚基选择性剪切和 RNA 编辑极大地丰富了昆虫钠离子通道, 昆虫与拟除虫菊酯抗性相关突变位点的筛选、鉴定和杀虫剂结合位点的确定也是昆虫钠离子通道研究的热点^[12]。以 NCBI 桃蚜钠离子通道序列设计引物, 克隆桃蚜钠离子通道基因。对克隆得到的桃蚜钠离子通道基因克隆子进行序列比对分析, 鉴定桃蚜钠离子通道的典型特征, 明确其钠离子通道序列。构建系统发育树, 明确桃蚜钠离子通道在进化上是否保守以及与不同物种钠离子通道在进化树的关系。

1 材料与方法

1.1 试验时间和地点

试验于 2018 年 9 月至 2019 年 3 月在河南农业大学植物保护学院昆虫神经毒理实验室完成。

1.2 供试材料

1.2.1 供试昆虫 桃蚜采自河南省郑州市郊区 (113° E、35° N、海拔 99 m), 室内饲养温度条件: 温度 (24±0.5) °C, 相对湿度 68%~79%, 光周期 14L:10D^[13]。

1.2.2 主要试剂 运用 Trizol 法提取桃蚜 RNA, 试剂盒 Trizol Reagent 来自美国 Ambion 公司; 用反转录试剂盒将提取的 RNA 反转录为 cDNA, 反转录试剂盒 Prime Script TM 1st Strand cDNA Synthesis Kit 来自日本 TaKaRa 公司; 运用 PCR 技术将目的片段扩增, 扩增试剂盒 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase、Cycle Pure Kit 来自美国 OMEGA 公司; 将链接产物转入感受态细胞 XL-10-gold, 感受态细胞 XL-10-gold 来自北京博迈德公司; 运用质粒小提试剂盒 Plasmid DNA Minni Kit 提取质粒, 质粒小提试剂盒 Plasmid DNA

Minni Kit 来自南京诺唯赞公司。其他供试试剂：Tris 饱和酚来自北京索莱宝公司，DNA Marker 来自北京全式金公司，StarGreen 核酸染料来自北京康润公司，用于验证的酶 *Xma* I、*Hind* III-HF、*Eco*Rv-HF 均来自北京 NEB。

表 1 桃蚜钠离子通道基因克隆所用引物
Table 1 Primers used for the cloning of *Myzus persicae* sodium channel

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')
R1	TTGCCAGAGCAATTCCTCCGGGGCAACCATTTCATTGCTGACACGGATTC
R2	AGTGGTAAGGAGATCAAGCTTCATGCATTTTAACTATCCAGATCATGTC
R3	TTGGCAGATCAAAATGGCCCCGGGGCCACCATGAGTGTGTACAGTAGTGAGGAAC
R4	AGTGGTAACCGGTCATCGAATTCTTAGACGTCGGCGAGTCTTGAGC

1.3 桃蚜总 RNA 的提取

选取 80 头桃蚜成虫，按照 Trizol 法提取桃蚜 RNA。检测总 RNA 琼脂糖电泳完整性（图 1）。RNA -80 ℃ 保存备用。

1.4 第一链 cDNA 的合成及片段的扩增

根据 NCBI 序列，利用 Primer 5.0 软件设计特异性引物（表 1）进行 PCR 扩增，引物 R1 和引物 R2 用于扩增 MpNa_v-1，引物 R3 和引物 R4 用于扩增 MpNa_v-2，分离得到多个重叠片段。PCR 反应在 50 μL 体系中进行，每个反应包含 cDNA 模板 1 μL、dNTP Mix（10 mmol/L Meach）1 μL、Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 1 μL、上游引物 2 μL、下游引物 2 μL、ddH₂O 18 μL、2X Phanta Max Buffer 25 μL。扩增条件：预变性温度 94 ℃，时间 3 min；变性温度 94 ℃，时间 30 s；复性温度 56.5 ℃，时间 15 s；延伸温度 72 ℃，时间 4.5 min，共 32 个循环。延伸温度 72 ℃，时间 8 min。

PCR 产物 1%琼脂糖凝胶进行电泳检测，用 Cycle-Pure Kit (200)试剂盒回收 PCR 产物，回收产物通过双酶切方法连接到 PGH19 质粒上，再转化到感受态细胞 stbl2 中。阳性克隆送往南京擎科基因公司进行测序，序列利用 SeqMan 软件拼接。

1.5 DNA 序列和编码的氨基酸序列分析

DNA 序列通过在线网站 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行 Blast 比对，用 MegAlign 软件进行同源比对分析；用 Protparam 软件 (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) 分析编码蛋白质的氨基酸序列组成、相对分子质量、等电点等理化性质。

1.6 构建系统进化树

采用与桃蚜同源性较高的 21 种昆虫的钠离子通道氨基酸序列进行比对。应用 MEGA7.0 对该氨基酸数据进行进化模型的选择。用最大似然法（ML 法）和临近法（NJ 法）构建分子系统发育树。ML 法系统发育树采用在线软件 PhyML (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>)，NJ 法系统发育分析使用 Maga 5.0 软件，并进行 1000 次的自展检验评估。

2 结果与分析

2.1 桃蚜钠离子通道基因克隆

桃蚜 PCR 产物经过琼脂糖电泳检测，与预期的片段大小相符合。克隆和质粒 DNA 提取酶切检验后测序，克隆获得 2 条桃蚜钠离子通道基因 cDNA 片段（图 2），MpNa_v-1 长为 2945 bp，包括 2877 bp 的开放阅读框，共编码 958 个氨基酸（GenBank 登录号为 MN124170），分子量为 110.4 kD，理论等电点为 5.27；MpNa_v-2 长为 35466 bp，包括 3486 bp 的完整阅读框，共编码 1161 个氨基酸（GenBank 登录号为 MN176136），分子量为 130 kD，理论等电点为 5.39。

2.2 桃蚜钠离子通道基因序列分析

克隆所得序列包含了电压门控钠离子通道的 4 个典型跨膜结构域 I-IV 拓扑图，涵盖了昆虫钠离子通

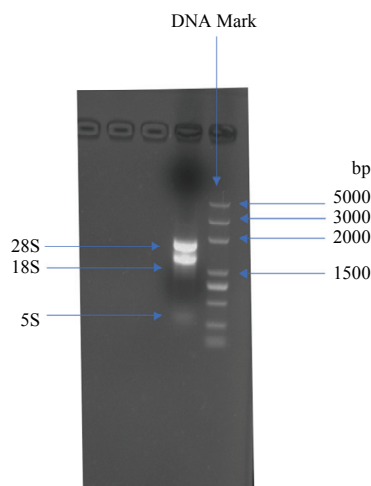
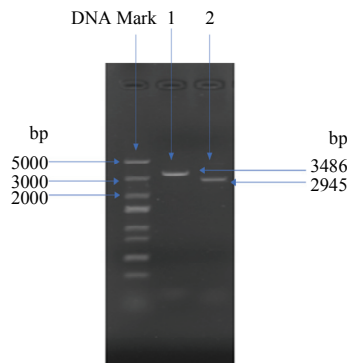


图 1 桃蚜总 RNA 电泳图

Fig. 1 Total RNA electrophoresis map of *Myzus persicae*

泳道 Lane 1: MP-Part-i 电泳图 MP-Part-i electropherogram; 泳道 Lane 2: MP-Part-ii 电泳图 MP-Part-ii electropherogram

图 2 桃蚜钠离子通道全长基因电泳图

Fig. 2 Electrophoresis map of full-length gene of sodium ion channel of *Myzus persicae*

道的典型特征。构成电压感受器的 S4, 含有 4~8 个带正电的氨基酸的重复基序, 每个正电氨基酸被 2 个不带电的氨基酸隔开, 这种特征在 4 个结构域中较为保守; 桃蚜钠离子通道第三和第四结构域之间的“MFM”疏水域是钠离子通道快速失活所必需残基(失活门); 蚜虫钠离子选择性的关键残基“DENS”在桃蚜钠离子通道中同样高度保守。通过对获得桃蚜钠通道氨基酸序列进行分析, 获得蚜虫钠通道序列信息(图 3)。

2.3 建立分子系统进化树

从系统发育树上可以看出, 哺乳动物钠离子通道单独聚为一支, 蜂类与其他昆虫钠离子通道遗传距离相对较近, 桃蚜钠离子通道基因与豌豆蚜和高粱蚜钠离子通道基因遗传距离最近, 且半翅目昆虫钠离子通道基因聚为一支(图 4)。该系统进化树分支与分类学上物种分类吻合, 且钠离子通道基因具有高度保守性。

3 讨论

19 世纪 80 年代, Salkoff 和 Loughney 分别从黑腹果蝇中分离得到 2 个编码钠离子通道的候选基因, 命名为“*DSC1*”(Drosophila sodium channel 1)和“*para*”。之后, 从德国小蠊中克隆了 *DSC1* 的同源基因, 命名为 *BSC1*^[14](Blattella sodium channel 1)。由于 *DSC1* 和 *BSC1* 基因和编码电鳗和哺乳动物的钠离子通道基因同源性很高, 而且它们的拓扑结构都和钠离子通道相似, 所以两者都被认为是编码钠离子通道的基因^[15]。研究发现, 虽然 *DSC1*、*BSC1* 和 *para* 基因编码的蛋白质结构和钠离子通道相似, 都有 4 个同源跨膜结构域, 并且每个结构域含有 6 个跨膜片段, 但在 *DSC1* 家族中并未发现决定钠离子选择性的 DEKA 模块, 而是存在 DEEA 模块, 并且很保守。之后在烟蚜夜蛾 *Heliothis virescens* 中发现的 *hDSC1* (homologous Drosophila sodium channel 1)中也存在 DEEA 模块^[16]。DEKA 模块是指氨基酸 D、E、K、A 分别位于结构域 I、结构域 II、结构域 III 和结构域 IV 连接 S5 和 S6 的 loop, 该模块决定钠离子通道离子选择性, 在哺乳动物和昆虫中保守性极高, 而钙离子通道中则存在选择性通过钙离子的 EEEE 模块。*DSC1* 和 *BSC1* 在爪蟾卵母细胞体系中功能性表达, 经电压钳检测表明 *DSC1* 家族对钙离子和钡离子的渗透性比钠离子和钾离子高, 其门控与钠离子通道有显著差异, 通道激活和失活比钠离子通道慢很多, 所以 *DSC1* 家族并不是钠离子通道, 而是一类新的可以渗透钙离子的电压门控阳离子通道^[17]。

与哺乳动物多个基因编码钠离子通道 α 亚基不同, 大部分昆虫只有一个基因编码钠离子通道 α 亚基。目前为止, 只有少数昆虫含有 2 个编码钠离子通道的基因, 比如赤拟谷盗 *Tribollum castaneum* 和豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum*。赤拟谷盗中有 2 个编码钠离子通道的基因 (NM_001165908 和 NM_001165909),

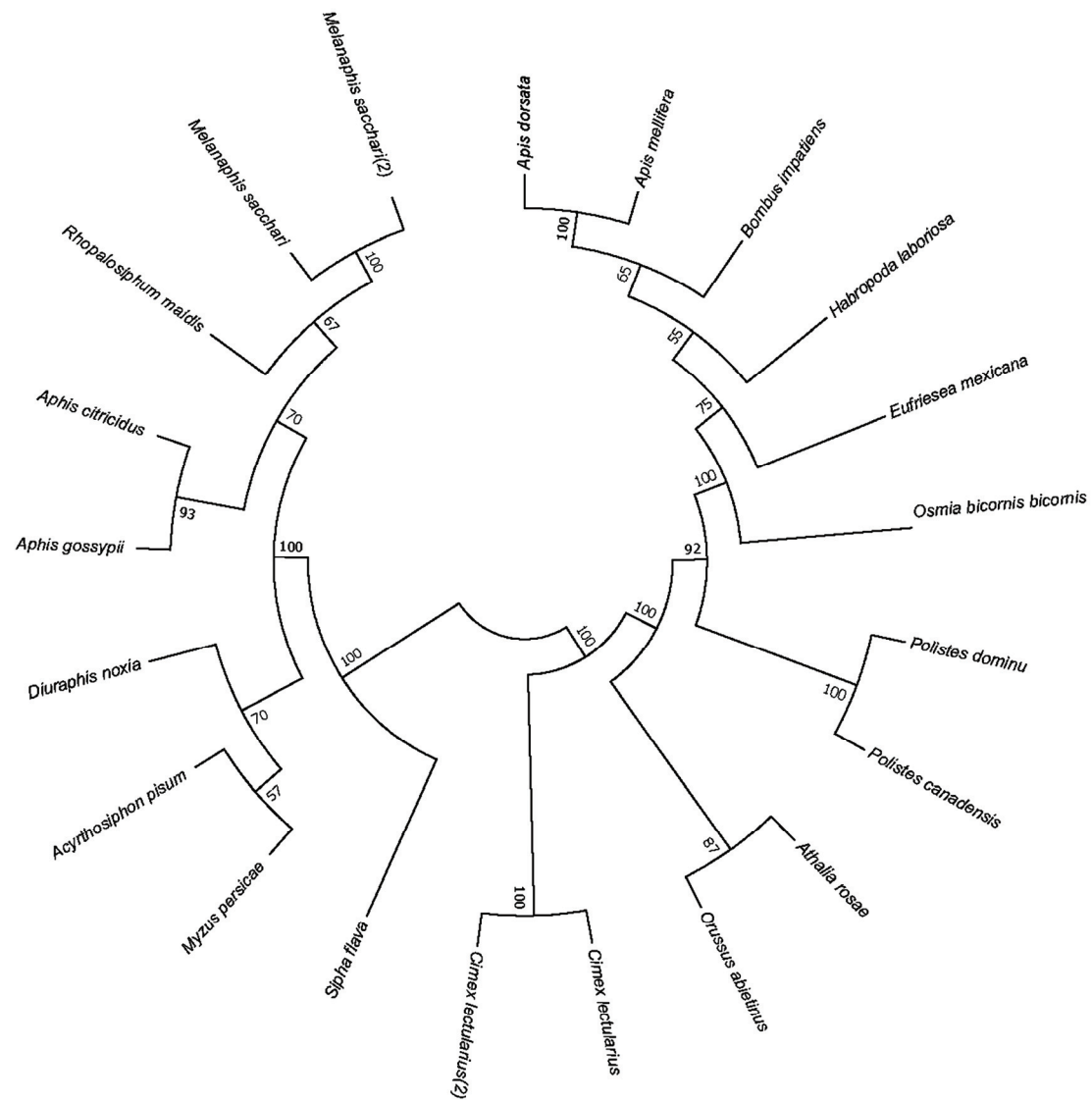
MP I	MSVYSSEELL	DAGIIYRNKK	EQLDVTIGDG	MELLIRGEKN	KKKKPPTSSS	YNSFGMHQSS	TDENYYLKDK	YEYDTRSTKS	80	
MP I	YGSHEHDPYD	SESHRGSKRS	LHNAEEKKDP	CKEDVETNQ	VLGGNDIAIA	EEINDDEYKE	QGPVEMVEDV	FEETEEYPEDC	160	
					IIIS1			IIIS2		
MP I	FPPNCYKKFP	FLAGDDETPF	WLGWGQLRLK	TFQLIENKYF	ETAVITMILL	SSLALALEDV	HLQHRFVLQD	ILYYMDRIFT	240	
						IIIS3		IIIS4		
MP I	VIFFLEMLIK	WLALGFRNYF	TNAWCWLDFI	IVMVSLINLV	AALLGASGIQ	AFKTMRTLRA	LRPLRAMARM	QGMRVVVNAL	320	
			IIIS5							
MP I	VQAIPSIFNV	LLVCLIFWLI	FAIMGVQLFA	GKYYKCVDDI	GKTLNHEIIP	DNVNCIAENY	KWENSKMNF	HVGNAYLCLF	400	
					IIIS6					
MP I	QVATFNWME	IMRDAVDSRD	TYGKQPIREI	NNYMYFFYVF	FIIFGSFFTL	NLFIGVLIIDN	FNEQKKKTGA	SLEMFMTEDQ	480	
					IVS1			IVS2		
MP I	KKYYNAMKRM	SSKKPLKAIP	RPRWKPQSIV	FQIVTDKKFD	MLIMLFIGFN	MLTMTLDHYQ	QTKLFTDVLE	RLNQIFIAIF	560	
			IVS3					IVS4		
MP I	STECCLKIFA	LRNYYFKEPG	NLFDFVGGIL	SLAGLVLSDL	ISKYFVSPTL	LRVVRVAKVG	RVLRLVKGAK	GIRTLLFALA	640	
		IVS5						IVS6		
MP I	MSLPALFNIC	LLFLVMEFIF	AIFGMSFFMN	VDSHGGLDDD	YNFRTFGQSM	ILFLMLSTSS	GWDAVLGKIT	NEEDCDKPNL	720	
MP I	EMGITGSCGS	SAVGTAFLLS	YLVINFLIVI	NMYIAVILEN	YSQATEDVQE	GLTDDDDYDMY	YEIWQHFDPN	GTRYIRYDQL	800	
MP I	SDFLDILEPP	LKIHKPNKYK	IVSMDIPICK	GDLIYCVLIL	DALTKDFFAR	KGNPIIETVA	EIGEMQTRPE	EAGYEFISSS	880	
MP I	LWRMREYVCA	TIIQSSWRKY	TMAAKQQTAD	DDRS DGAASP	DGRETAVLVE	SDGFVTKNGH	KVVIHSRSSH	KSSRLADV	958	
MP II	MSIADTSSSF	SSEKSLFRP	FTRDSLRAIE	QRIADHAKQ	KELEEKRAEG	EVRYEDED	EGPQPDATLE	QGAPLPVRLV	80	
						IS1				
MP II	GTFPPELASV	PLEDIDPYH	NQKTFVVISK	GKDIFRSAT	DGLWALDPFN	PIRRVAIYIL	VHPIFSVTII	TTILTNCVFM	160	
			IS2			IS3		IS4		
MP II	IMPPTPTIEA	SEVIFTGIYT	FESAVKVMAR	GFILEHFTYL	RDANWLDIFI	VIALAYVTMG	IELGNLAVLR	TFRVLRALKT	240	
				IS5						
MP II	VAIVPGLKTI	VGAVIESVKM	LRDVIILTIF	SLSVFALLGL	QIYMGVLTQK	CIKYFPLDGS	AGNLTNENWV	AFMSNKSNNQ	320	
MP II	PGDEEPEDYP	LCNGTGTAGQ	CKEGYMCIQG	FGKNPNYGYT	SFDTFAWALL	SAFRLMTQDN	WEALYQQVLR	AAGPWHMFFF	400	
			IS6							
MP II	IVIIIFLGSFY	LVNLILAI	VA	MSYDELQKKA	EEEEAAEEEA	IREAEQAAD	REVRQAHEE	RVAERAERAR	HVTQHPKSPS	480
						exon a				
MP II	DFSCQSYDNM	FASGQDRGMG	NDHHREKMSL	RSVSITSHDK	HSDTGSVDRQ	SGKTRKASLS	LPGSPFNIRR	ASRGSHQLSH	560	
						exon m				
MP II	RNGRPRTGA	DTKPLVLNTL	LDAEEHLPYA	DDSNVTPMS	EENGAIIVPV	SYANFGSRHS	SYTSHTSRIT	YTSHADLFKP	640	
MP II	PMTKERQLRS	RSARNYFNPS	DQRYNRDDY	DSSSMSKSKQ	QVDECGYND	QKHTVVDMRD	VMVLNDIEQ	AAGRQSRGSE	720	
			exon b					IIIS1		
MP II	KAVSTVYVFP	TDEDAVIDGED	EGEEDDEPTF	REKFQVWLK	FIDTFCVWDC	GWPWLKFQQG	LAFIVFDPFV	ELYITLCIVV	800	
			IIIS2			IIIS3				
MP II	NTLFMALDHH	EMDPKLDIFI	NKANVFESAT	FGVEAALKLM	AMSPKYFQ	GNIFDFIIV	ILSVVELLSA	GYQGLSVLRS	880	
			IIIS4		IIIS5					
MP II	FRLLRVFKLA	KSWPTLNLLI	SIIGRTIGAL	GNLTFVLCII	IFIFAVMGMQ	LFGKNYTEKM	YMFKDHELPR	WNFTDFLHSF	960	
				IIIS6						
MP II	MIVFRVLCGE	WIESMWDCLH	VGEPTCIPFF	LATVVIGNFV	VLNLFALLL	SNFGSSNLSV	PTADSDTNKI	TEAFERIGRF	1040	
MP II	NKWKTRIMD	FLKAIRAKLT	NQISVQASGR	DRDIDLVD	E TIVDVIAPFK	DTKEPVEMTI	GDGMEFTIPG	DVKQKTKKNQ	1120	
MP II	VGNSIGNHQG	NKVGNDYKKE	SFDLDSLKC						1149	

注: 黄色和红色标记代表同源结构域和选择性剪切。

Note: Yellow and red indicated homology domains and alternative splicing.

图3 桃蚜 part i 和 part ii 钠离子通道氨基酸序列

Fig. 3 Part i and part ii sodium ion channel amino acid sequences of *Myzus persicae*



注 Note: 用于构建进化树所用物种的 NCBI 登录号: 豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* (XP016660066), 玉米蚜 *Rhopalosiphum maidid* (XP0268006611), 高粱蚜 *Melanaphis sacchari* (XP025206082), 小麦蚜虫 *Diuraphis noxia* (XP015366151), 棉蚜 *Aphis gossypii* (XP027840100), 橘蚜 *Aphis citricidus* (ANS71557), 黄色甘蔗蚜虫 *Siphia flava* (XP025407766), 内华达古白蚁 *Zootermopsis nevadensis* (XP021935658), 臭虫 *Cimex lectularius* (XP024082489), 蜜蜂 *Habropoda laboriosa* (XP0177797364), 排蜂 *Apis dorsata* (XP006613076), 野生蜜蜂 *Osmia bicornis* (XP029047871), 意大利蜜蜂 *Apis mellifera* (XP006561600), 温带臭虫 *Cimex lectularius* (XP014251555), 美洲东部熊蜂 *Bombus impatiens* (XP_003488828), 兰花蜂 *Eufriesea Mexicana* (XM012402388), 种蜂 *Athalia rosae* (XM012402388), 造纸胡蜂 *Polistes dominula* (XM0147753012), 马蜂 *Polistes canadensis* (XM015329608), 寄生木黄蜂 *Orussus abietinus* (XM012417411)。

图 4 基于部分物种钠离子通道基因构建的分子系统发育树

Fig. 4 Molecular phylogenetic tree based on the construction of sodium ion channel genes in some species

未发现决定钠离子选择性的 DEKA 模块,而是存在 DENS 模块,该模块对钠离子通道的失活起重要作用。豌豆蚜中,钠通道的结构域 I、结构域 II、结构域 III 和结构域 IV 被不同的基因所编码,然而这些结构域是否能体外形成功能性的钠离子通道尚未可知,有待体外表达验证。除蚜虫类和赤拟谷盗外,其他昆虫都只有一个编码钠离子通道的基因,通过基因的选择性剪切和 RNA 编辑,最终在昆虫体内形成许多功能性的钠离子通道同工型。目前为止,已经从黑腹果蝇中分离得到 64 种同工型;德国蜚蠊中分离得到 69 种同工型^[10]。

蚜虫的钠离子通道是由独立的两条基因组成,这是蚜虫所特有的性质。本论文研究桃蚜钠离子通道序列,克隆得到两条钠通道序列,具有昆虫钠离子通道基因的典型特征,其钠离子选择性关键氨基酸

“DENS”与其他蚜虫类昆虫钠离子通道一致。本研究所克隆的桃蚜钠离子通道 α 亚基有两条基因, *MpNa_v-1* 序列包含结构域III和结构域IV, 另一条 *MpNa_v-2* 基因包含结构域 I 和结构域 II, 4 个结构域模块决定昆虫钠离子通道离子选择性, 在哺乳动物和昆虫中保守性都极高^[18]。

昆虫主要通过选择性剪切和转录后的 RNA 编辑两种机制产生功能多样的钠离子通道功能^[19]。基因的选择性剪切是指选择性的对 Pre-mRNA 不同的剪切位点的组合剪切加工, 形成不同的成熟的 mRNA, 进而产生结构和功能不同的蛋白质的过程^[20], 而最终的蛋白质产物也会表现出不同或者相互拮抗的功能和结构特性, 或者在相同的细胞中由于表达水平的不同表型。钠离子通道基因选择性剪切通过改变其编码区剪切位点和拼接方式产生多个不同的转录本, 从而增加编码钠离子通道蛋白的多样性, 这些受体蛋白不仅在氨基酸序列长度方面不同, 而且在通道门控和药理学性质方面也有所不同^[21]。

黑腹果蝇的钠离子通道基因有 9 个可剪切的外显子, 其中包括 7 个在细胞内连接肽上的选择性外显子 (a、b、e、f、h、i 和 j) 和 2 个在结构域 II 和结构域 III 跨膜区的互斥外显子 (c/d 和 k/l), 其中后者含有很多突变位点。在黑腹果蝇成虫钠离子克隆获得 64 种 mRNA variants, 呈现 29 种选择性剪切方式^[22], 在黑腹果蝇胚胎中有 50 种 mRNA variants, 呈现 27 种选择性剪切方式。选择性剪切在昆虫不同发育阶段和不同部位有变化。选择性外显子不仅与钠离子通道的表达量有关, 还可改变钠通道的激活和失活的电压。比如黑腹果蝇中的选择性外显子 f 可以导致电压依赖性钠离子向超极化偏移, 外显子 j 和 e 则导致钠离子通道活化向去极化偏移, 外显子 h 导致钠离子通道失活向去极化偏移。在德国小蠊钠离子通道中选择性剪切具有高度保守性^[21]。德国小蠊钠离子通道中外显子 b 也与钠离子通道的表达量相关, 若构建缺失外显子 b, 则钠离子通道的表达量显著增加^[23]; 而将外显子 b 引入本不存在外显子 b 的其他同工型中, 则钠离子通道的表达量显著降低^[24]。两个互斥外显子在很多物种中都具有保守性, 但是对应果蝇中的外显子 c/d, 德国小蠊却只有外显子 c, 而没有外显子 d。序列比对显示钠离子通道基因的选择性外显子在物种之间具有保守性, 现已发现在果蝇中存在的选择性剪切位点在家蝇 *Musca domestica* L. *vssc1* 基因^[24]、德国蜚蠊 *Blattella germanica* *BgNa_v* 基因^[21]、蜂螨的 *VmNa_v* 基因^[25]、埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 的 *AaNa_v* 基因^[26]、斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 的 *hpara* 基因^[27]、家蚕 *Bombyx mori* L. 的 *BmNa_v* 基因^[28] 和赤拟谷盗^[29]等昆虫中都具有保守性。虽然不同的物种中有相同的选择性外显子, 但选择性外显子在不同物种中的使用率不同。

RNA 编辑是一种基因转录产物所包含的信息在转录中或转录后被改变的过程, 从某种意义上是对中心法则的一种扩展。在 mRNA 水平上改变遗传信息的过程, 通常在基因转录产生的 mRNA 分子中, 由于核苷酸的缺失, 插入或置换, 基因转录物的序列不与基因编码序列互补, 使翻译生成的蛋白质的氨基酸组成, 不同于基因序列中的编码信息现象^[32]。RNA 编辑是基因转录后在 mRNA 中插入、缺失或核苷酸的替换而改变 DNA 模板来源的遗传信息, 翻译出多种氨基酸序列不同的蛋白质, RNA 编辑的结果不仅扩大了遗传信息, 而且使生物更好地适应生存环境^[30]。在黑腹果蝇中, 已经鉴定出 11 个 A 至 I 编辑位点, 有 9 个位点发生了氨基酸突变, 在不同的物种中, 一些 RNA 编辑位点具有保守性^[31]。除了 A 至 I 编辑, U 至 C 编辑也是在果蝇中存在的另一类 RNA 编辑, 在黑腹果蝇中发现的 F1919S, 属于 U 至 C 编辑导致的氨基酸突变, 该 RNA 编辑位点在德国小蠊钠离子通道中也存在^[32]。

基因选择性剪切和 RNA 编辑是两种重要的转录后修饰作用, 在形成昆虫钠离子通道的结构和功能多样性方面尤为重要, 即使是一个碱基的改变, 发生表达和功能上很微小的改变, 在生物学上都是非常重要的, 可能会导致行缺陷^[33]。选择性剪切和 RNA 编辑导致门控的改变, 在钠离子通道与杀虫剂、毒素作用的时候也起重要作用^[34]。

克隆得到桃蚜电压门控钠离子通道两个基因 *MP Na_v-1* 和 *MP Na_v-2*, 对克隆得到的桃蚜钠离子通道基因克隆子进行序列比对分析, 鉴定具有桃蚜钠离子通道的典型特征, 含有 DENS 和 MFM, 明确其桃蚜钠离子通道序列组成。构建系统发育树, 明确桃蚜钠离子通道在进化上保守以及与其他昆虫物种钠离子通道在进化方面关系。钠离子通道介导的靶标抗性机理的阐明对拟除虫菊酯类杀虫剂抗性的高效治理和持续使用具有十分重要的意义。桃蚜钠离子通道基因的克隆是阐明其对拟除虫菊酯类药剂产生靶标抗性的分子机制的关键一步, 但其中具体机制还有待深入研究。

参 考 文 献

- [1] 蒲颇. 基于微卫星标记的烟蚜种群遗传结构分析[D]. 重庆: 西南大学, 2016..
- [2] 贾京州. 基于混合推理技术的蚜虫危害诊断与防治专家系统关键技术研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2009.
- [3] Williamson M S, Denholm I, Bell C A, *et al.* Knockdown resistance (kdr) to DDT and pyrethroid insecticides maps to a sodium channel gene locus in the housefly (*Musca domestica*)[J]. *Molecular and General Genetics*, 1993, 240(1): 17-22.
- [4] 沈荣. 钠钾离子通道蛋白质结构与功能关联的分子物理力学研究[D]. 南京: 南京航空航天大学, 2012.
- [5] Goldin A L. Evolution of voltage-gated Na⁺ channels[J]. *Journal of Experimental Biology* 2002, 205(5): 575-584.
- [6] Catterall W. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels[J]. *Neuron* 2000, 26(1): 13-25.
- [7] Soderlund D M, Knipple D C. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 33(6): 570-577.
- [8] Loughney K, Kreber R, Ganetzky B. Molecular analysis of the para locus, a sodium channel gene in *Drosophila*[J]. *Cell*, 1989, 58(6): 1143-1154.
- [9] Ingles P J, Adams P M, Knipple D C, *et al.* Characterization of voltage-sensitive sodium channel gene coding sequences from insecticide-susceptible and knockdown-resistant house fly strains[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1996, 26(4): 320-326.
- [10] Dong K. A single amino acid change in the para sodium channel protein is associated with knockdown-resistance (kdr) to pyrethroid insecticides in German cockroach[J]. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 1997, 27(2): 93.
- [11] Shao Y M, Dong K, Tang Z H, *et al.* Molecular characterization of a sodium channel gene from the silkworm *Bombyx mori*[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 39(2): 150-151.
- [12] Dong K. Insect sodium channels and insecticide resistance[J]. *Invertebrate Neuroscience*, 2007, 7(1): 17-30.
- [13] 张建亮. 桃蚜的农药生态学研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2001.
- [14] Liu N, Yue X. Genetics of pyrethroid resistance in a strain (ALHF) of house flies (Diptera: Muscidae)[J]. *Pestic Biochem Physiol* 2001, 70(3): 151-158.
- [15] Littleton J, Ganetzky B. Ion channels and synaptic organization: analysis of the *Drosophila* genome[J]. *Neuron*, 2000, 26(1): 35-43.
- [16] Field L M, Blackman R L, Tyler-Smith C, *et al.* Relationship between amount of esterase and gene copy number in insecticide-resistant *Myzus persicae* (Sulzer)[J]. *Biochemical Journal*, 1999, 339(3): 737-742.
- [17] Zhou W, Chung I, Goldin A, *et al.* A voltage-gated calcium-selective channel encoded by a sodium channel-like gene[J]. *Neuron* 2004, 42(1): 101-112.
- [18] Song W, Liu Z, Tan J, *et al.* RNA editing generates tissue-specific sodium channels with distinct gating properties[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(31): 32554-32561.
- [19] Catterall W A. From ionic currents to molecular review mechanisms: The structure and function of voltage-gated sodium channels[J]. *Neuron*, 2000, 26(1): 13-25.
- [20] 万敬员, 张力, 叶笃筠. 选择性剪接调控机制的研究进展[J]. *医学分子生物学杂志*, 2003, 25(6): 342-345.
- [21] Tan J, Liu Z, Nomura Y, *et al.* Alternative splicing of an insect sodium channel gene generates pharmacologically distinct sodium channels[J]. *Journal of Neuroscience*, 2002, 22(13): 5300-5309.
- [22] Rachel O'Donnell Olson, Liu, Z, *et al.* Molecular and functional characterization of voltage-gated sodium channel variants from *drosophila melanogaster*[J]. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 2008, 38(5): 0-610.
- [23] Song W, Liu Z, Tan J, *et al.* RNA editing generates tissue-specific sodium channels with distinct gating properties[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(31): 32554-32561.
- [24] Lee S, Ingles P J, Knipple D C, *et al.* Developmental regulation of alternative exon usage in the house fly *vssc1* sodium channel gene[J]. *Invertebrate Neuroscience*, 2002, 4(3): 125-133.
- [25] Wang R, Huang Z Y, Dong K. Molecular characterization of an arachnid sodium channel gene from the varroa mite (*Varroa destructor*)[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 33(7): 730-739.
- [26] Chang C, Shen W K, Wang T T, *et al.* A novel amino acid substitution in a voltage-gated sodium channel is associated with knockdown resistance to permethrin in *aedes aegypti*[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 39(4): 270-278.
- [27] Field L M, James A A, Park Y, *et al.* Voltage-gated sodium channel genes *hscp* and *hDSC1* of *Heliothis virescens* F. genomic organization[J]. *Insect Molecular Biology*, 1999, 8(2): 161-170.
- [28] Shao Y M, Dong K, Tang, Z H, *et al.* Molecular characterization of a sodium channel gene from the silkworm *bombyx mori*[J]. *Insect Biochemistry and*

Molecular Biology, 2009, 39(2): 150-151.

- [29] Davies T G E, Field, L M, Usherwood P N R, *et al.* A comparative study of voltage - gated sodium channels in the insecta: implications for pyrethroid resistance in anopheline and other neopteran species[J]. *Insect Molecular Biology*, 2010, 16(3): 361-375.
- [30] Palladino M J, Keegan L P, O'Connell M A. Reenan RNA: A-to-I pre-mRNA editing in *Drosophila* is primarily involved in adult nervous system function and integrity[J]. *Cell*, 2000, 102(4): 437-449.
- [31] Rieder L E, Staber C J, Hoopengardner B, *et al.* Tertiary structural elements determine extent and specificity of messenger RNA editing[J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 2232.
- [32] Liu Z, Song W, Dong K. Persistent tetrodotoxin-sensitive sodium current resulting from u-to-c RNA editing of an insect sodium channel[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, 101(32): 11862-11867.
- [33] Lindsay H A, Baines R, French-Constant R, *et al.* The dominant cold-sensitive out-cold mutants of *Drosophila melanogaster* have novel missense mutations in the voltage-gated sodium channel gene paralytic[J]. *Genetics*, 2008, 180(2): 873-884.
- [34] Song W, Du Y, Liu Z, *et al.* Substitutions in the domain III voltage sensing module enhance the sensitivity of an insect sodium channel to a scorpion beta-toxin[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 18(286): 15781-15783.