

分类号: S443

单位代码: 10335

密级: 无

学号: 21316111

浙江大学

硕士学位论文



**RDV 感染诱导黑尾叶蝉乙酰胆碱酯酶过表达研究**  
**Overexpression of acetylcholinesterases induced by Rice**  
**Dwarf Virus in the green rice leafhopper, *Nephotettix***  
***cincticeps* (Uhler)(Homoptera: Cicadellidae)**

作者姓名: 陈利鹏

指导教师: 姚洪渭 副教授

叶恭银 教授

专业名称: 植物保护

研究方向: 农业昆虫与害虫防治

所在学院: 农业与生物技术学院

论文提交日期: 二〇一六年六月

# RDV 感染诱导黑尾叶蝉乙酰胆碱酯酶过表达研究



论文作者签名:

指导教师签名:

论文评阅人: 双向隐名评阅

答辩委员会主席: 俞晓平 教授 中国计量大学

委员: 万方浩 研究员 中国农业科学院

张传溪 教授 浙江大学

陈学新 教授 浙江大学

叶恭银 教授 浙江大学

答辩日期: 二〇一六年六月九日

---

**Overexpression of acetylcholinesterases induced by  
Rice Dwarf Virus in the green rice leafhopper,  
*Nephotettix cincticeps* (Uhler) (Homoptera:  
Cicadellidae)**



**Author signature: Li-peng Chen**

**Supervisor signature: Hong-wei Yao**

**Gong-yin Ye**

Thesis reviewr: Anonymous

Chair: Prof. Xiao-ping Yu, China Jiliang University

Prof. Fang-hao Wan, Chinese Academy of

Committeeman: Agricultural Sciences

Prof. Chuan-xi Zhang, Zhejiang University

Prof. Xue-xin Chen, Zhejiang University

Prof. Gong-yin Ye, Zhejiang University

Date of Defence: 9 June, 2016

---

## 浙江大学研究生学位论文独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得浙江大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名：

签字日期： 年 月 日

## 学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解浙江大学有权保留并向国家有关部门或机构送交本论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权浙江大学可以将学位论文的全部或部分内 容编入有关数据库进行检索和传播，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

（保密的学位论文在解密后适用本授权书）

学位论文作者签名：

导师签名：

签字日期： 年 月 日

签字日期： 年 月 日

---

本研究承蒙

973 项目

“农作物重要病毒病昆虫传播与致害的生物学基  
础”（2014CB138404）

资助

## 致谢

光阴似箭，岁月如梭，三年的研究生时光转眼就结束了，回想起刚刚进入研究生的时刻，仍然历历在目。三年经历很多。在此离别之际，我真挚的感谢每一位关心我、帮助我、支持我的老师、同学、朋友、亲人。

首先，我要感谢我的导师姚洪渭副教授和叶恭银教授。三年来，两位导师的关怀与教诲让我深深受益。姚洪渭老师的细心严谨，悉心教导让我学习到科研的基本功，叶恭银教授渊博的知识，高屋建瓴的眼界让我深深敬佩。论文的选题，设计直至撰写修改都凝聚了导师们的心血与汗水。特别是在实验遇到困难时，导师们的宽容、指点与鼓励让我深受鼓舞，让我有更大的勇气与毅力去克服困难。值此论文完成之际，谨向他们表示我最衷心的感谢和最崇高的敬意。

在论文完成过程中，得到了本课题组黄佳副教授，方琦老师的指导与帮助，在此表示最诚挚的谢意。我还要感谢昆虫所的各位老师，感谢他们在传授知识以及科研上的帮助，让我得以顺利完成学业。

同时我还要感谢本实验室兄弟姐妹的关心与帮助，他们是卢增斌、汪芳、王飞、朱宇、徐刚、刘玉娥、严智超、齐易香、韩乃顺、巨青松、滕子文、夏仁英、刘洋、王前进、杜玉萍、宁铎、武亚苏、贾文茜、杨蕾、方绍亮、陈晓昂、党聪、王蓓蓓、肖山、李萌琪、李晶晶、王龙、常学飞、熊时娇、顾桂香、王佳乐、杨磊、毛芬。特别要感谢杜玉萍对我支持与鼓励。

感谢我的父母和家人对我始终如一的支持。他们无私的爱让我深受感动，他们是我前进的动力。我还要感谢我的舍友，他们是刘帅、赵俊生、阮斌杰、廖燕华、李春阳、程新来，感谢他们的陪伴。

最后，再一次感谢所有给予我帮助、关心的人。同时，向参加论文评阅以及答辩的专家致以诚挚的谢意。

陈利鹏

2016年6月于浙江大学启真湖畔

## 摘要

水稻普通矮缩病是水稻上重要的病毒性病害，在我国稻区多有发生，可造成严重的经济损失。水稻普通矮缩病的病原物为水稻矮缩病毒（Rice Dwarf Virus, RDV），由黑尾叶蝉 *Nephotettix cincticeps*(Uhler)等昆虫媒介传播。在长期的进化过程中，植物病毒、媒介昆虫和植物之间形成了复杂的互作关系。前期研究表明，黑尾叶蝉感染 RDV 后对有机磷杀虫剂的敏感性显著降低。为此，本论文在测定比较了感染与未感染 RDV 黑尾叶蝉体内解毒酶与靶标酶活性差异的基础上，克隆获得了有机磷杀虫剂靶标—乙酰胆碱酯酶（Acetylcholinesterases, AChEs）全长基因，分析了黑尾叶蝉感染 RDV 后 AChE 基因的表达水平差异。主要结果如下：

### 1. RDV 感染对黑尾叶蝉抗药性相关酶活性的影响

采用生化酶学技术，测定并比较了感染与未感染 RDV 黑尾叶蝉体内代谢解毒酶如细胞色素 P450 氧化酶（cytochrome P450s, P450s）、酯酶（esterases, Ests）和谷胱甘肽 S-转移酶（glutathione S-transferases, GSTs）以及靶标酶 AChEs 的活性。黑尾叶蝉感染 RDV 后代谢解毒酶 P450s、Ests 和 GSTs 等的活性无显著性变化，而 AChEs 活性则显著增高。这表明 RDV 感染可引起黑尾叶蝉 AChEs 活性增强，进而导致对有机磷杀虫剂的敏感性显著降低。

### 2. 黑尾叶蝉 AChEs 基因克隆与时空表达分析

采用 RT-PCR 技术，克隆获得了 2 条黑尾叶蝉乙酰胆碱酯酶基因 *Ncace1* 和 *Ncace2* 的 cDNA 全长序列。*Ncace1* 开放阅读框 2,034 bp，编码 677 个氨基酸，前 19 个氨基酸为信号肽，预测蛋白分子量 75.7 kD，6 个糖基化位点。*Ncace2* 开放阅读框 1,899bp，编码 632 个氨基酸，前 21 个氨基酸为信号肽，预测蛋白分子量 71.2 kD，5 个糖基化位点。这 2 个 AChE 基因均含有胆碱标识序列（FGESAG）。

采用实时荧光定量 PCR 技术，分析了 *Ncace1* 和 *Ncace2* 基因在黑尾叶蝉体内的时空表达特征。结果表明，这 2 个基因在黑尾叶蝉不同发育

阶段均有表达,以卵期表达水平相对较高;不同组织中也均有表达,以脑部表达水平显著较高;*Ncace2*的表达水平显著高于*Ncace1*。

### 3. 黑尾叶蝉 AChEs 基因原核表达与多克隆抗体制备

以 pET-32a 为表达载体,构建获得了 *Ncace1* 和 *Ncace2* 重组原核表达质粒;转化大肠杆菌 Rosetta 菌株后,经 IPTG 诱导成功表达获得 *Ncace1* 和 *Ncace2* 重组蛋白;分别经兔免疫后,制备获得相应的多克隆抗体。采用蛋白 Western 杂交技术证实 2 种多克隆抗体的有效性。

### 4. RDV 侵染对黑尾叶蝉 AChEs 表达的影响

采用实时荧光定量 PCR 技术,比较分析了感染与未感染 RDV 黑尾叶蝉 *Ncace1* 和 *Ncace2* 基因在转录水平的差异变化。黑尾叶蝉感染 RDV 后,*Ncace1* 和 *Ncace2* 基因转录水平显著高于未感染 RDV 的。采用蛋白 Western 杂交技术,分析了黑尾叶蝉感染 RDV 后 *Ncace1* 和 *Ncace2* 基因翻译水平的差异变化。结果表明感染 RDV 的黑尾叶蝉 AChEs 蛋白表达水平明显高于未感染 RDV 的。

### 5. 黑尾叶蝉 AChEs 基因真核表达

以 pFastBac-HTE 为表达载体,构建获得了 *Ncace1* 和 *Ncace2* 重组真核表达质粒;转染昆虫 Sf9 细胞后,获得重组杆状病毒;再经感染 Sf9 细胞获得重组表达产物。采用 Western 杂交技术,检测发现 *Ncace1* 和 *Ncace2* 基因在 Sf9 细胞中被成功表达。

论文结果为今后黑尾叶蝉 AChEs 的功能研究奠定了基础。

**关键词:** 黑尾叶蝉; RDV; 乙酰胆碱酯酶; 基因克隆; 原核表达; 实时荧光定量 PCR; 表达分析; 真核表达

## Abstract

Rice dwarf disease is one of the most serious rice virus diseases. In recent decades, this disease has occurred in some rice growing areas of China, causing serious economic losses. The pathogen, rice dwarf virus (RDV), is mainly spread by the green leafhoppers, *Nephotettix cincticeps* (Uhler) (Homoptera: Cicadellidae). The complex interactions between plant viruses and insect vectors have been received great attention worldwide. The previous studies showed that the susceptibility to organophosphorus insecticides significantly decreased after *N. cincticeps* infected with RDV. In this thesis, we firstly compared the difference in the activity of metabolic enzymes between *N. cincticeps* with and without RDV infection. Then, we cloned the full length cDNA sequences of *N. cincticeps* acetylcholinesterase (AChE) genes and analyzed the expression level of these genes in *N. cincticeps* with or without RDV infection. The main results are shown as follows:

### **1. Effect of RDV infection on activity of insecticidal resistance related enzymes**

The activity of metabolic enzymes, cytochrome P450s (P450s), esterases (Ests), glutathione S-transferases (GSTs), and AChEs was measured in the RDV-infected and non-RDV-infected *N. cincticeps* using biochemical analysis technology. After infected by RDV, *N. cincticeps* has no significant change in the activity of P450s, Ests and GSTs. However, the activity of AChEs in RDV-infected *N. cincticeps* was significantly higher than that in non-RDV-infected *N. cincticeps*. It indicated that RDV infection may cause the increase of AChE activity of *N. cincticeps*, and lead to the decrease of susceptibility to organophosphorus insecticides.

## 2. Gene cloning and expression pattern of AChE genes

The full length cDNAs of *N. cincticeps* AChE genes, *Ncace1* and *Ncace2* were cloned using RT-PCR. The ORF length of *Ncace1* is 2,034 bp, which encodes a predicted molecular mass of 75.7 kD with 677 aminoacids, including 6 glycosylation sites and a signal peptide of 19 amino acids at N-terminal. The ORF length of *Ncace2* is 1,899 bp, which encodes a predicted molecular mass of 71.2 kD with 632 aminoacids, including 5 glycosylation sites and a signal peptide of 21 amino acids at N-terminal. Choline conserved motif (FGESAG) is found in both *Ncace1* and *Ncace2* genes.

The temporal and spatial expression of AChE genes in *N. cincticeps* was analyzed using real-time quantitative PCR. *Ncace1* and *Ncace2* genes were expressed at all developmental stages, in which expression level was significantly higher in egg stage. *Ncace2* gene had a significantly higher transcription level than *Ncace1*. The higher transcription level of *Ncace1* and *Ncace2* genes was found in brain.

## 3. Prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of AChE genes

The prokaryotic expression vectors of *Ncace1* and *Ncace2* genes were constructed using pET-32a. Their recombinant proteins were successfully expressed in the *Escherichia coli* Rosetta strain and used to prepare polyclonal antibodies. The quality of polyclonal antibodies was detected by Western blot.

## 4. Effect of RDV infection on expression of AChE genes

The expression of AChE genes at both RNA and protein levels in *N. cincticeps* with or without RDV infection was determined by real-time quantitative PCR and Western blot, respectively. After infected RDV, the significantly higher transcriptional levels of *Ncace1* and *Ncace2* genes were

found, so were the translational levels.

## 5. Eukaryotic expression of AChE genes

The eukaryotic expression vectors of *Ncace1* and *Ncace2* genes were constructed using pFastBac-HTE. Their recombinant proteins were successfully expressed in the insect Sf9 cells and confirmed by Western blot.

These above results contribute to the future studies on the function of AChEs in *N. cincticeps*.

**Key words:** *Nephotettix cincticeps*, RDV, acetylcholinesterase, gene cloning, prokaryotic expression, real-time quantitative PCR, expression analysis, eukaryotic expression

# 目录

|                                   |    |
|-----------------------------------|----|
| 致谢 .....                          | I  |
| 摘要 .....                          | II |
| Abstract .....                    | IV |
| 第一章 文献综述 .....                    | 1  |
| 1.1 昆虫乙酰胆碱酯酶 .....                | 1  |
| 1.1.1 生理功能 .....                  | 2  |
| 1.1.2 AChE 基因 .....               | 3  |
| 1.1.3 AChE 结构 .....               | 6  |
| 1.1.4 AChE 与抗药性 .....             | 9  |
| 1.1.5 开发新型杀虫剂的潜在靶标 .....          | 10 |
| 1.1.6 小结 .....                    | 16 |
| 1.2 水稻普通矮缩病毒 .....                | 17 |
| 1.2.1 简介 .....                    | 17 |
| 1.2.2 RDV .....                   | 17 |
| 1.2.3 RDV 基因组结构 .....             | 18 |
| 1.2.4 RDV 传播机制 .....              | 19 |
| 1.3 研究目的与意义 .....                 | 20 |
| 第二章 RDV 感染对黑尾叶蝉抗药性相关酶活性的影响 .....  | 21 |
| 2.1 材料与方法 .....                   | 21 |
| 2.1.1 供试昆虫 .....                  | 21 |
| 2.1.2 供试水稻 .....                  | 21 |
| 2.1.3 带毒黑尾叶蝉种群的建立 .....           | 22 |
| 2.1.4 带毒水稻和带毒黑尾叶蝉的 RDV 检测 .....   | 22 |
| 2.1.5 黑尾叶蝉抗药性相关代谢酶活性测定 .....      | 24 |
| 2.1.6 数据分析 .....                  | 27 |
| 2.2 结果与分析 .....                   | 27 |
| 2.2.1 带毒与不带毒黑尾叶蝉 AChEs 活性比较 ..... | 27 |

|                                      |    |
|--------------------------------------|----|
| 2.2.2 带毒与不带毒黑尾叶蝉代谢解毒酶活性比较 .....      | 29 |
| 2.3 讨论 .....                         | 30 |
| 第三章黑尾叶蝉 AChEs 基因克隆与序列分析 .....        | 32 |
| 3.1 材料与方法 .....                      | 32 |
| 3.1.1 供试材料 .....                     | 32 |
| 3.1.2 主要实验仪器 .....                   | 32 |
| 3.1.3 黑尾叶蝉 AChE 基因克隆 .....           | 32 |
| 3.1.4 黑尾叶蝉 AChE 基因序列的生物信息学分析 .....   | 36 |
| 3.1.5 黑尾叶蝉 AChE 基因表达的时间动态分析 .....    | 36 |
| 3.1.6 黑尾叶蝉 AChE 基因表达的组织分布分析 .....    | 37 |
| 3.1.7 数据分析 .....                     | 37 |
| 3.2 结果 .....                         | 38 |
| 3.2.1 黑尾叶蝉 AChE 基因克隆 .....           | 38 |
| 3.2.2 黑尾叶蝉 <i>Ncace1</i> 序列分析 .....  | 38 |
| 3.2.3 黑尾叶蝉 <i>Ncace2</i> 序列分析 .....  | 43 |
| 3.2.4 黑尾叶蝉 AChE 基因多序列比对及功能位点分析 ..... | 47 |
| 3.2.5 黑尾叶蝉 AChE 基因的系统进化 .....        | 47 |
| 3.2.6 黑尾叶蝉 AChE 基因表达的发育动态分析 .....    | 51 |
| 3.3 讨论 .....                         | 52 |
| 第四章黑尾叶蝉 AChE 基因原核表达及多克隆抗体制备 .....    | 55 |
| 4.1 材料与方法 .....                      | 55 |
| 4.1.1 主要试剂 .....                     | 55 |
| 4.1.2 黑尾叶蝉 AChE 基因原核表达载体的构建 .....    | 55 |
| 4.1.3 黑尾叶蝉 AChE 基因的原核表达 .....        | 58 |
| 4.1.4 黑尾叶蝉重组 AChE 蛋白的多克隆抗体制备 .....   | 60 |
| 4.1.5 多克隆抗体的 Western blot 检测 .....   | 60 |
| 4.2 结果与分析 .....                      | 61 |
| 4.2.1 黑尾叶蝉 AChE 基因原核表达载体的构建 .....    | 61 |

|                                              |    |
|----------------------------------------------|----|
| 4.2.2 黑尾叶蝉 AChE 基因的原核表达 .....                | 61 |
| 4.2.3 黑尾叶蝉重组 AChE 蛋白的多克隆抗体制备 .....           | 62 |
| 4.3 讨论 .....                                 | 65 |
| 第五章 RDV 感染对黑尾叶蝉 AChE 表达的影响 .....             | 66 |
| 5.1 材料与方法 .....                              | 66 |
| 5.1.1 供试材料 .....                             | 66 |
| 5.1.2 RDV 感染对黑尾叶蝉 AChE 基因表达的影响 .....         | 66 |
| 5.1.3 数据分析 .....                             | 67 |
| 5.2 结果与分析 .....                              | 67 |
| 5.2.1 RDV 感染对黑尾叶蝉 AChE 基因转录的影响 .....         | 67 |
| 5.2.2 RDV 感染对黑尾叶蝉 AChE 蛋白表达的的影响 .....        | 70 |
| 5.3 讨论 .....                                 | 70 |
| 第六章黑尾叶蝉 AChE 基因的真核表达 .....                   | 72 |
| 6.1 材料与方法 .....                              | 72 |
| 6.1.1 主要试剂 .....                             | 72 |
| 6.1.2 黑尾叶蝉 AChE 基因的 PCR 扩增 .....             | 72 |
| 6.1.3 供体质粒的构建 .....                          | 73 |
| 6.1.4 重组 Bacmid DNA 的获得 .....                | 74 |
| 6.1.5 昆虫 Sf9 细胞的转染及重组蛋白表达 .....              | 75 |
| 6.1.6 蛋白纯化 .....                             | 77 |
| 6.1.7 蛋白浓缩 .....                             | 77 |
| 6.1.8 重组蛋白的 SDS-PAGE 和 Western blot 检测 ..... | 78 |
| 6.2 结果与分析 .....                              | 78 |
| 6.2.1 供体质粒的构建 .....                          | 78 |
| 6.2.2 重组 Bacmid 的构建 .....                    | 78 |
| 6.2.3 昆虫 Sf9 细胞的转染及重组蛋白的表达 .....             | 81 |
| 6.2.4 重组蛋白的纯化和检测 .....                       | 81 |
| 6.3 讨论 .....                                 | 83 |

---

|                         |    |
|-------------------------|----|
| 总 结 .....               | 84 |
| I. 研究结果 .....           | 84 |
| II. 本论文的创新之处 .....      | 84 |
| III. 不足之处及今后的研究方向 ..... | 85 |
| 参 考 文 献 .....           | 86 |

## 第一章 文献综述

### 1.1 昆虫乙酰胆碱酯酶

乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterases, AChEs, EC3.1.1.7) 是一种丝氨酸水解酶, 存在于哺乳动物、鱼类、爬行动物、鸟类、线虫、昆虫等具有胆碱能神经的神经元与神经肌肉接头处, 能够特异性将神经元突触间兴奋性神经递质乙酰胆碱 (acetylcholine, ACh) 水解成乙酸和胆碱, 在神经传导中起重要作用 (Katz, 1966; Barnard, 1974; Quinn, 1987; Sussman *et al.*, 1991; Raves *et al.*, 1997; Taylor & Radic, 1994; Soreq & Seidman, 2001; Tsim & Soreq, 2012)。该水解酶存在一个外周排列着芳香族氨基酸的深而狭长的活性位点峡谷, 使得带正电的 ACh 或带阳离子的抑制剂得以进入谷内进行催化 (Pang *et al.*, 1996; Raves *et al.*, 1977; Sussman *et al.*, 1991), 谷内存在催化三联体, 能够高效催化底物水解。AChE 具有很高的催化效率, 是现今已知最高效的酶, 每秒钟能够水解 25,000 个 ACh 分子 (Quinn, 1987; Taylor & Radic, 1994)。AChE 还是有机磷 (organophosphorus pesticides, OPs) 和氨基甲酸酯 (carbamates, CBs) 类农药的靶标, 这两种农药通过不可逆磷酸化 AChE 中的丝氨酸, 抑制 AChE 水解 ACh, 使神经传导不能正常进行, 直至昆虫死亡。

由于 AChEs 具有独特的生物特性及其在疾病治疗 (Taylor & Radic, 1994; Li *et al.*, 2015)、农药残留检测 (Fulton & Key, 2001; Schulze *et al.*, 2003)、害虫抗药性 (Fournier, 2005; Oakeshott *et al.*, 2005)、高效友好型农药研发 (Pang *et al.*, 2009b, 2011, 2012) 等方面的重要作用, 受到了科学家越来越多的关注。目前在分子结构、生理功能和高效催化机制等方面展开了越来越多的研究。

### 1.1.1 生理功能

AChEs 能特异性水解神经递质 ACh, 终止 ACh 对神经后膜的兴奋作用, 保证神经信号在生物体内正常传递 (Katz, 1966; Barnard, 1974; Quinn, 1987; Sussman *et al.*, 1991; Raves *et al.*, 1997; Taylor & Radic, 1994; Soreq & Seidman, 2001; Tsim & Soreq, 2012)。AChE 和 ACh 在神经突触的位置如图 1.1 所示。在突触前神经元中, ACh 被包裹在突触小泡 (synaptic vesicle)。当神经冲动通过神经元的轴突传至前突触膜时, 推动突触小泡向前移动。突触小泡接触突触后膜后, 发生破裂, 将 ACh 释放到突触间隙。ACh 立即与突触后膜上的乙酰胆碱受体 (acetylcholine receptor, AChR) 结合, 激活 AChE, 改变膜的通透性, 使膜外的  $\text{Na}^+$  和膜内的  $\text{K}^+$  分别往内外通过, 使膜去极化, 产生动作电位, 即兴奋性后突触电位, 这就是 ACh 和 AChR 所引起的信号传递过程。信号传递后, 激活状态的 AChEs 催化 ACh 水解为乙酸和胆碱 (choline, Ch)。其中胆碱通过高亲和性胆碱吸收机制重新回到突触前神经元, 在乙酰胆碱转移酶 (cholineacetyltransferase, ChAT) 催化作用下, 与乙酰辅酶 A (CoA) 一起合成 ACh, 合成的 ACh 经胞吞作用进入突触小泡, 再次进行信号传递。

有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂作为 AChEs 的抑制剂, 能够使 AChEs 中的丝氨酸残基不可逆磷酸化, 失去水解 ACh 的作用; 导致大量 ACh 与 AChR 结合, AChR 无法恢复功能; 神经冲动的传递不能及时终止, 昆虫过度兴奋而死。

除了水解 ACh 之外, AChEs 还有其他非经典的功能, 如神经生长与突触形成 (Olivera *et al.*, 2003)、神经胶质细胞活化调节与 Tau 蛋白磷酸化 (Ballard *et al.*, 2005)、学习/记忆 (Gauthier *et al.*, 1992; Shapira *et al.*, 2001) 等。另外, AChEs 抑制剂能够治疗多种神经肌肉疾病, 成为第一代治疗阿尔兹海默症 (Alzheimer's disease, AD) 的药品 (Taylor & Radic, 1994)。

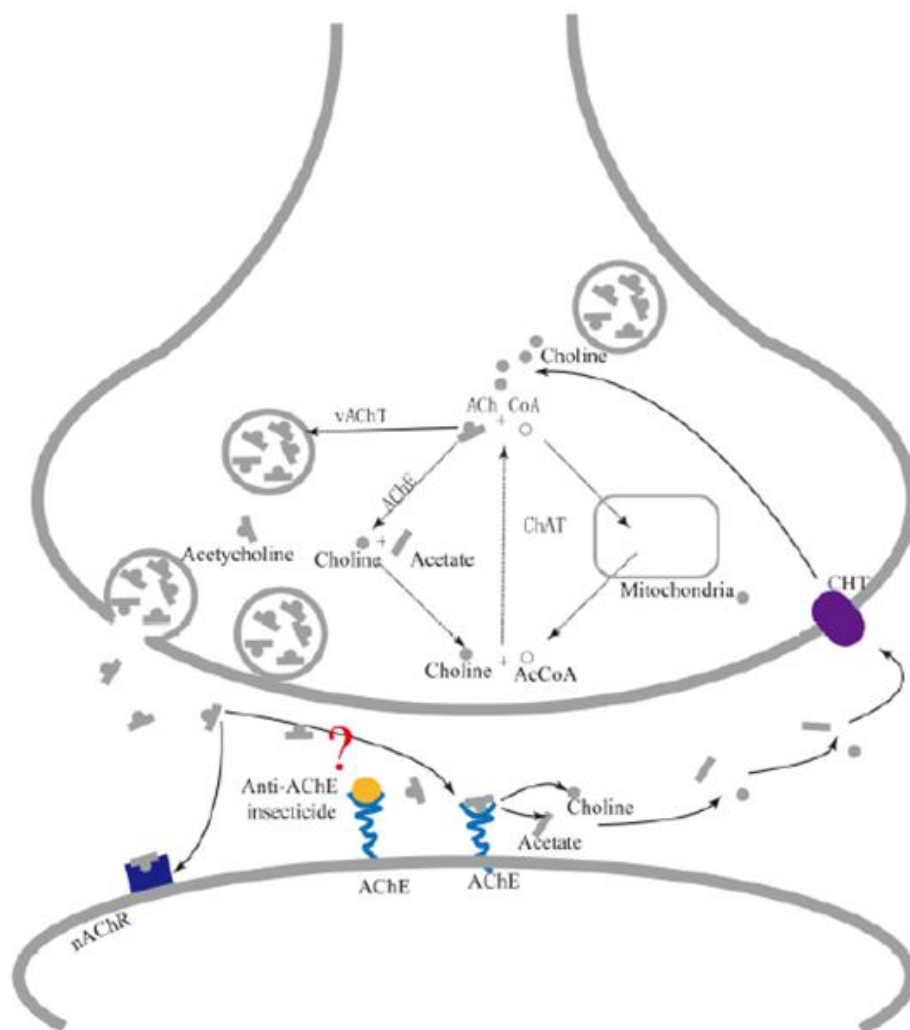


图 1.1 乙酰胆碱酯酶的作用机制（王举梅，2013）

Fig.1.1 The action mechanism of acetylcholinesterase

### 1.1.2 AChE 基因

昆虫 AChE 基因最早在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中被克隆（Hall & Spierer, 1986; Pang *et al.*, 1996），随后在麦二叉蚜 *Schizaphis graminum* 中克隆出第一条黑腹果蝇 *ace* 旁系同源基因（Gao *et al.*, 2002）。到目前为止，已经有克隆和测序来自半翅目、双翅目、鞘翅目、鳞翅目和膜翅目等 43 种昆虫 *ace* 基因，其中至少 27 种昆虫中发现了两条 *ace*

基因 (Lu *et al.*, 2012)。除了双翅目环裂亚目 (Cyclorrhaphan) 昆虫如黑腹果蝇 (Weill *et al.*, 2002) 和家蝇 *Musca domestica* (Fournier *et al.*, 1998a) 只有 1 条 *ace* 基因外, 其他昆虫均含有 2 条 *ace* 基因。此外, 在脊椎动物中只发现一条 *ace* 基因, 而在线虫和蛛形纲中则有多条 *ace* 基因, 如线虫 *Caenorhabditis elegans* 有 4 条 *ace* 基因 (*ace-1*、*ace-2*、*ace-x* 和 *ace-y*) (Selkirk *et al.*, 2005)、微小扇牛蜱 *Rhipicephalus microplus* 至少含有 3 条 *ace* 基因。根据与果蝇 *ace* 基因序列的相似性, 可将昆虫 *ace* 基因分为两类: 与黑腹果蝇 *ace* 基因直系同源的, 被称为 AO-AChE (Ace-orthologous AChE), 又称为 II 型乙酰胆碱酯酶 (AChE2), 编码基因为 *ace2*; 与黑腹果蝇 *ace* 基因旁系同源的, 被称为 (Ace-paralogous AChE), 又被称为 I 型乙酰胆碱酯酶 (AChE1), 编码基因为 *ace1* (Kono & Tomita, 2006; Lee *et al.*, 2006; Seino *et al.*, 2007)。研究表明, 环裂亚目只有 *ace2* 基因, 而 *ace1* 基因可能在进化过程中已丢失 (Weill *et al.*, 2002; Huchard *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2009)。Lu 等 (2012) 通过序列比对发现, 同种昆虫 *ace1* 或 *ace2* 之间的序列同源性仅在 31%~36% 之间, 而不同昆虫间的序列同源性却在 48%~96% 之间。该结果支持了进化丢失的假说。

### 1.1.2.1 *ace1* 和 *ace2*

虽然绝大多数昆虫含有两种 AChE, 但是一般以 AChE1 起主要作用。在小菜蛾 *Plutella xylostella*、德国小蠊 *Blattella germanica*、棉铃虫 *Helicoverpa assulta*、体虱 *Pediculus spp.* 和臭虫 *Cimex lectularius* 中, *ace1* 转录水平约为 *ace2* 的 2~250 倍 (Baek *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006, 2007; Seong *et al.*, 2012)。另外, 对有机磷和氨基甲酸酯类农药的抗性种群中, 也是在 *ace1* 中发现有点突变现象, 进而导致对农药的不敏感性 (Alon *et al.*, 2008; Baek *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2009; Nabeshima *et al.*, 2003, 2004; Oh *et al.*, 2006; Russell *et al.*, 2004; Weill *et al.*, 2003)。在 *ace2* 中尚未发现有导致农药不敏感性的点突变 (Malcolm *et al.*, 1998; Mori *et al.*, 2001)。

通过对 18 个目 100 种昆虫的 AChE 酶活和蛋白表达水平进行研究, 结果表明除了环裂亚目以外, 其余昆虫均能检测到 AChE1 和 AChE2 的蛋白表达 (Kim & Lee, 2013)。其中, 有 67 种昆虫的 AChE1 活性较高, 是最主要的催化酶; 其余 33 种昆虫从低等的石蛎目到高等的膜翅目, 则以 AChE2 为主要的催化酶。在豆娘 *Microstigma Rotundatum* 中, AChE1 和 AChE2 的活性相似, 表明可能均参与突触传递。

### 1.1.2.2 *ace1* 丢失

昆虫 AChE1 和 AChE2 的具体生理功能至今尚未完全明了。双翅目昆虫除环裂亚目以外, 都含有 2 个 *ace* 基因。这表明 2 个 AChE 在双翅目昆虫中可能均起着重要作用。但是, 在双翅目较为古老的种群虻类 (Orthorrhaphan) 中, 是以 AChE1 为最主要的催化酶, 这表明 AChE1 可能在绝大多数双翅目昆虫中都具有突触传递的作用 (Kim & Lee, 2013)。AChE1 在蚊类中也是最主要的胆碱催化酶, 而 AChE2 在突触传递中的功能有限, 可能具有其他功能 (Weill *et al.*, 2002; Huchard *et al.*, 2006)。德国小蠊 AChE1 占神经组织总 AChE 活性 65~75%, 是有机磷杀虫剂的靶标; AChE2 可能具有其他功能 (Kim *et al.*, 2006, 2010; Revuelta *et al.*, 2009)。赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 的 *ace1* 基因表达被干扰沉默后, 可导致 100% 致死率, 且对有机磷杀虫剂的敏感性也相应增加 (Lu *et al.*, 2012)。在双翅目进化相对高等的环裂亚目中, 既未检测到 AChE1 酶活, 也未检测到 AChE1 蛋白表达。若 AChE1 如前所述具有重要功能, 那该基因为什么会在环裂亚目中出现丢失, 而且仅有的 AChE2 的作用机制又会是如何?

根据已有报导, *ace1* 可能在环裂亚目进化出现以前就已丢失 (Kim 和 Lee, 2013)。在 *ace1* 完全丢失以前, 其功能可能被其他的酶或蛋白所取代。研究表明, 黑腹果蝇 *ace2* 能通过可变剪切产生多个分子亚型 (Gnagey *et al.*, 1987; Fournier *et al.*, 1988b)。Kim 和 Lee (2013) 在黑腹果蝇中检测到 AChE2 两种不同的分子亚型: A 亚型和 B 亚型。其中, A 亚型锚定在膜上, 具有强催化活性, 而 B 亚型以可溶性形式存在, 缺乏

催化活性。2 种型的时空表达模式各不相同，如 A 亚型在头部特异性表达，而 B 亚型则在若虫期和蛹期的表达水平较高。由此推测，黑腹果蝇可能通过可变剪切产生 AChE2 的多种亚型，从而弥补 AChE1 缺失，尤其是可溶性蛋白 AChE2 的 B 亚型产生可能取代了 AChE1 的功能。

### 1.1.3 AChE 结构

AChEs 属分泌性蛋白，在核糖体中翻译后运输到内质网，随后信号肽被切除、糖基化并进一步折叠，最后经 GPI 锚定在神经细胞膜上。在赤拟谷盗 *ace1* 和 *ace2* 基因中分别发现 6 个和 4 个糖基化位点（N-X-S 或 N-X-T），但 GPI 锚只在 *ace1* 基因中被预测到（D619），*ace2* 中并未发现 GPI 锚位点。这说明两者发挥功能的方式和位置可能各不相同。

Sussman 等（1991）利用 X 射线衍射阐释了加州电鳐 *Torpedo californica* 的 AChE 催化亚基晶体结构。该亚基三维结构呈椭球形，大小  $4.5\text{nm} \times 6.0\text{nm} \times 6.5\text{nm}$ ，由 15 个  $\alpha$  螺旋、11 个中央混合  $\beta$  折叠和一个 N 端的 3 束短  $\beta$  折叠组成（Sussman *et al.*, 1991）。同时，发现了电鳐 AChE 若干个功能区域，如底物结合口袋、催化三联体、乙酰胆碱酯酶终止域等。加州电鳐 AChE 的三维结构模型加速了其他生物 AChE 理论研究。迄今，已经获得人、小鼠和果蝇等 AChE 三维结构，并发现在结构上的相似性，即具有相同的保守结构域和功能位点。

对加州电鳐 AChE 的立体结构分析显示（图 1.2），AChE 表面有一个深而窄的峡谷，称为活性部位谷（active site gorge）。谷深约整个分子长度的一半，谷内分布着众多活性位点，如催化三联体（catalytic triad）、氧阴离子洞（oxyanion hole）、酰基口袋（acyl pocket）和外周阴离子位点（peripheral anionic site, PAS）等；谷内表面 60% 被芳香族氨基酸残基所占据。这些芳香族氨基酸在不同昆虫的 *ace* 基因中均高度保守。

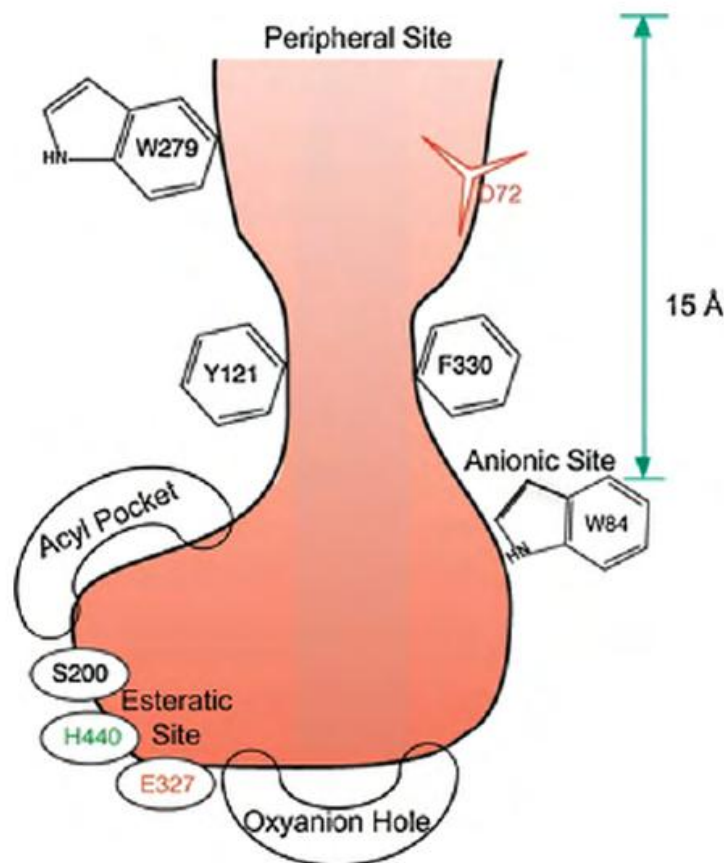


图 1.2 电鳐 AChE 活性位点示意图 (Dvir *et al.*, 2010)

Fig.1.2 Schematic view of the active-site gorge of TcAChE (Dvir *et al.*, 2010)

根据加州电鳐 AChE 的三维结构分析, AChE 共具有 7 个功能位点 (唐振华和毕强, 2003):

- (1) 催化三联体: 加州电鳐 AChE 的催化三联体为 Ser200、His440 和 Glu327 (氨基酸位置已去除信号肽, 下同), 位于活性谷内。所有昆虫 AChE 催化三联体在序列上都高度保守。昆虫的胆碱酯酶 (cholinesterase) 和脂酶 (lipase)、哺乳动物的丁酰胆碱酯酶 (butyrylcholinesterase)、以及两者的羧酸酯酶 (carboxylesterase) 活性位点与昆虫 AChE 一致, 而哺乳动物胆固醇酯酶 (cholesterol esterase) 的活性位点为 Ser、Asp 和 His。AChE 催化三联体在活性谷内水平排列, 底物 ACh 的季铵离子通过静电作用与阴离子位点结合, 使其更易于催化。电鳐 AChE 与 ACh 的相对位置如图 1.3。

AChE 的 Ser200 通过攻击 ACh 羧基上的碳原子，形成乙酰化酶，并释放胆碱。乙酰化酶被水分子中电负性的羟基负离子攻击，迅速去乙酰化，形成正常的酶和乙酸。ACh 的水解通过乙酰化和去乙酰化循环来完成（施明安等，2000）。

- (2) 外周阴离子位点：主要由催化谷入口处的带负电的氨基酸 Tyr70、Tyr121、Trp279 和 Asp72 组成。ACh 首先与位于谷边缘的 PAS 结合，然后与谷壁残基相互作用并滑入谷中，进一步扩散到活性中心被水解。十烷双胺(decamethonium, DECA)和丙吡啶(propidium)等化合物与外周阴离子位点有很强的亲和性。这些物质与外周阴离子结合后，可通过变构调节影响活性中心与底物或其他配基的亲和性。
- (3) 胆碱结合位点(choline binding site)：由 Trp84、Tyr330 或 Phe330、Tyr442 和 Glu199 构成。这 4 个氨基酸中任何残基发生突变都会显著降低 AChE 与底物的亲和性和酶活性，因此又称为胆碱结合位点。其中，第 330 位氨基酸并不保守，可能是 Tyr 或 Phe。Tyr330 到 Ala 的突变对于不同配体具有不同的亲和性。
- (4) 酰基口袋：在与催化三联体相邻的谷内壁分布着两个苯丙氨酸 Phe288 和 Phe290，一起构成了 AChE 的酰基口袋。Phe 侧链深入活性中心，能够限制较大的底物或配体进入，对活性中心的空间范围有一定约束作用。
- (5) 氧阴离子洞：可能是由 Gly118、Gly119 和 Ala201 的主链氮原子与羧基氧相互作用，以及酯键的氧与 His440 的咪唑基相互作用共同构成。
- (6) 芳香族氨基酸形成谷内表面：主要是由 14 个保守的疏水氨基酸组成的，分别是 Tyr（70、121、130、334 和 442）、Trp（84、114、233、279 和 432）和 Phe（288、290、330 和 331）。这些残基在不同昆虫 *ace* 基因中都很保守，构成谷内表面氨基酸的 40%。其主要功能是加速底物向活性中心扩散，把 ACh 吸收到低亲和性位

点，再扩散至活性部位。这一过程被称为芳香族引导机制。AChE 三维结构中，谷口较小，内部空间较大，底物 ACh 在谷口受到限制，但通过芳香族引导机制可快速扩散到活性中心。

(7) 后门：由 Cys67~Cys95 之间的“Ω”环组成，不仅有利于底物进入活性位点峡谷，也有利于产物排出，极大地提高了酶的催化效率。

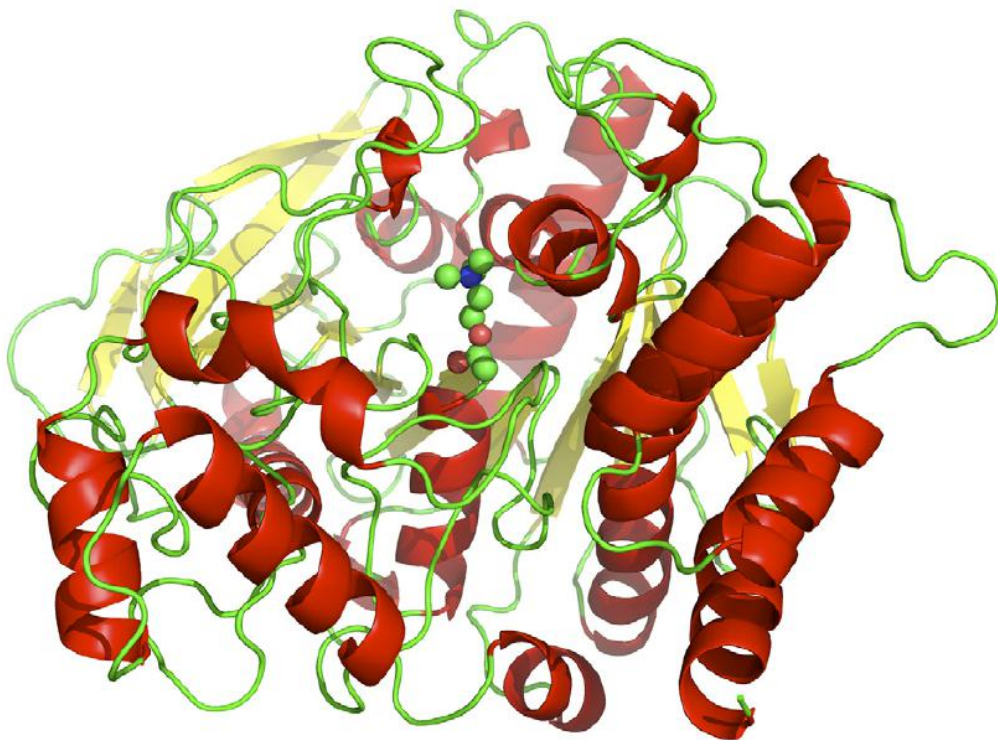


图 1.3 电鳗 AChE 与 ACh 的互作图解 (Silman& Sussman, 2008)

**Fig.1.3 Ribbon Diagram of TcAChE and ACh (Silman & Sussman, 2008)**

图中带状的为电鳗 AChE，球棍状的为 ACh

TcAChE showed as a ribbon and ACh displayed as a ball-and-stick model.

#### 1.1.4 AChE 与抗药性

昆虫抗药性产生的分子机理主要有两种：基因突变和基因扩增。目前，很多昆虫对有机磷和氨基甲酸酯类农药产生了明显的抗药性，而有机磷和氨基甲酸酯类农药的靶标是 AChE。伴随着 AChE 动力学参数改变的基因突变是抗药性产生的主要原因。与抗药性相关的点突变一般发

生在酶活性附近的关键点，即通过氨基酸的替换改变酶的空间结构或者活性位点（Mutero *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1996; Walsh & Dolden, 2001）。

基因突变可导致 AChE 对农药的不敏感性。在马铃薯叶甲 *Leptinotarsa decemlineata* 对有机磷的抗性种群中，AChE 酶 980 位丝氨酸（Ser）突变为甘氨酸（Gly），导致蛋白质折叠变化，进而破坏了 AChE 结构稳定性，改变了 AChE 空间构象，使其活性区及周边的结合位点受到冲击，最终导致酶结合位点与有机磷杀虫剂和其他配合体的结合能力改变（Zhu & Clark, 1995; Zhu *et al.*, 1996）。在尖音库蚊 *Culex pipiens*（N'Guessan *et al.*, 2003; Weill *et al.*, 2003）和冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*（Bourguet *et al.*, 1996a;b）的抗性是由于 *ace* 基因第 19 位 Gly 突变为 Ser，而在三带缘库蚊 *Culex tritaeniorhynchus* 中第 331 位 Phe 突变为 Trp 导致了对氨基甲酸酯类杀虫剂的抗性（Nabeshima *et al.*, 2004）。

AChE 表达量增高是另一个昆虫抗药性机制。通过在果蝇中构建 AChE 表达量依次下降的 4 个种群，对马拉硫磷的敏感性依次相应上升（Fournier *et al.*, 1992）。这表明随着 AChE 活性增加，对有机磷的抗性水平越高。在麦二叉蚜中，抗性品系 *ace* 基因虽然没有发生突变，但是其基因的 mRNA 表达量为敏感品系的 1.5 倍（Gao *et al.*, 2002）。抗性品系中 AChE 量的增加可能补偿了被杀虫剂所抑制的 AChE 功能，从而维持正常的神经传导。

### 1.1.5 开发新型杀虫剂的潜在靶标

当前，半翅目、鳞翅目和鞘翅目等农业害虫为害给作物生产带来了巨大的损失；病原传播媒介昆虫如埃及伊蚊 *Aedes aegypti*、冈比亚按蚊等通过吸食血液、传播病毒给人们带来了疾病的困扰。使用传统化学农药不仅导致害虫产生抗药性，而且会严重污染环境，并对哺乳动物和经济昆虫等造成危害。如使用杀螨剂控制螨的同时，对意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 会产生更严重的危害（Mullin *et al.*, 2010; Palmer *et al.*, 2013）。

因此，研究和开发新农药迫在眉睫。

然而，据统计开发一种传统杀虫剂大约需要 7 千万美元（Heminway *et al.*, 2006）。而且，高投入低产出严重制约了新型杀虫剂的开发。随着 AChE 基因及三维结构的深入研究，在 AChE 上发现了新的特异性的杀虫剂作用潜在靶标位点。

#### 1.1.5.1 昆虫 AChE 特异性 Cys

对冈比亚按蚊、麦二叉蚜、棉蚜 *Aphis gossypii*、桃蚜 *Myzus persicae*、意大利蜜蜂、电鳐、文昌鱼 *Branchiostoma belcheri* 和人等 9 种生物 AChE 序列的研究发现，麦二叉蚜 AChE 三维结构中有一个在昆虫和文昌鱼中保守而在人类中缺失的 Cys289 位点（Pezzeменти *et al.*, 2006）。对 76 种昆虫 AChE 序列进行分析，鉴定获得相同的昆虫特异性 Cys，这在 17 种昆虫的 AP-AChE 中保守，但在哺乳动物、鱼类和鸟类中突变为 Phe（图 1.4）（Pang, 2006; 2007）。对 135 种昆虫 AP-AChE 序列的分析发现，至少 50 个序列中存有与麦二叉蚜 Cys289 相同的 Cys 位点，但在蛛形纲蜱螨中却不存在（Anazawa *et al.*, 2003; Baxter & Barker, 1998; Hernandez *et al.*, 1999; Temeyer *et al.*, 2004; Khajehali *et al.*, 2010）。另外，除德国小蠊 *Blattella germanica*、体虱 *Pediculus humanus*、书虱 *Liposcelis entomophila*、和温室烟粉虱 *Trialeurodes vaporariorum* 及弹尾目跳虫 *Orchesella villosa* 等之外，昆虫 AO-AChE 序列中同样存在保守的 Cys，其位置上等同于果蝇 Cys290。通过序列比对，发现在麦二叉蚜 AP-AChE 序列中存在的 37 个 Cys 残基在其他昆虫中均未发生突变，而在其他生物体内却被突变成为其他的氨基酸残基。因此，昆虫 AP-AChE 或 AO-AChE 中存在的这个特异性 Cys 残基，可能成为被用于开发高效、环境友好型杀虫剂的靶标。

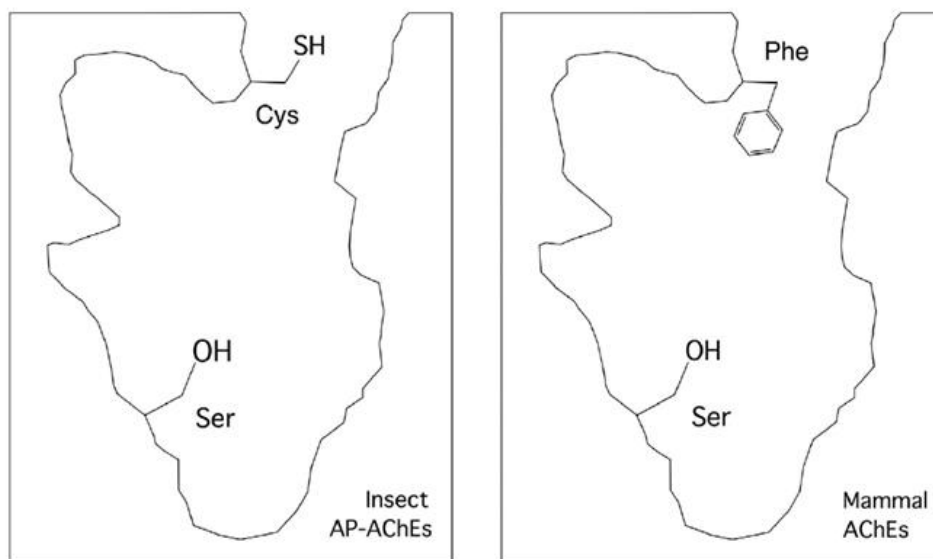


图 1.4 昆虫和哺乳动物 AChE 活性位点谷的结构差异 (Pang, 2012)

**Fig.1.4 Structure difference at the peripheral site of the active-site gorge in AChE between insect and mammals (Pang, 2012)**

#### 1.1.5.2 昆虫 AChE 特异性 Cys 的活性

通过模拟麦二叉蚧和人的 AChE 空间结构发现 (图 1.5), 麦二叉蚧 Cys289 位于 AChE 活性位点谷的入口处, 并且未被附近的氨基酸所覆盖, 可与任何 Cys 残基结合而形成二硫键; 而人 AChE 在对应的位置却是 Phe295。这说明昆虫 AP-AChE 中 Cys289 可以作为杀虫剂潜在的攻击位点 (Pang *et al.*, 2012)。昆虫和哺乳动物在 AChE 结构上的差异可以为开发高效、环境友好型杀虫剂提供分子靶标。

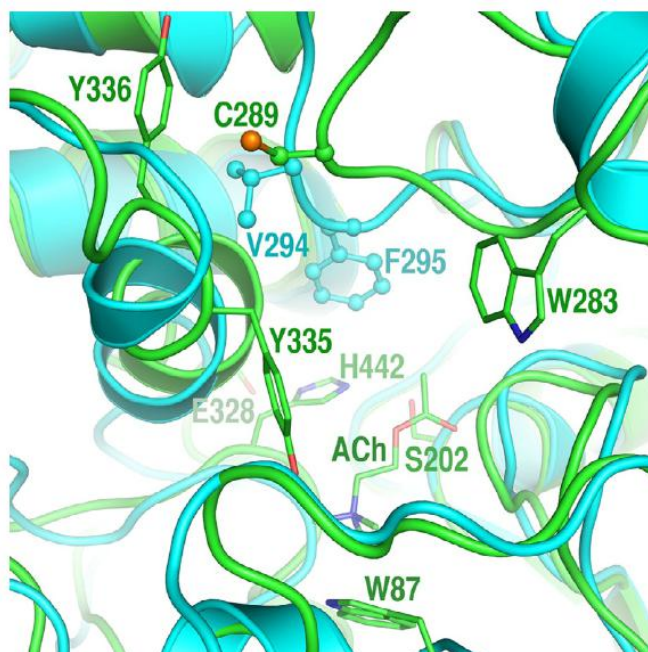


图 1.5 麦二叉蚜与人的 AChE 的电脑模拟图的叠加 (Pang, 2012)

**Fig.1.5 Superimposition of AChE in the greenbug and human from a perspective looking down onto substrate acetylcholine at the catalytic site (Pang, 2012)**

绿色代表麦二叉蚜的部位，蓝绿色代表人的部位

Green: greenbug; Blue-green: human

以昆虫 *ace1* 特异性 Cys 为靶标设计开发新型杀虫剂可对以 *ace2* 为主的膜翅目社会性昆虫蜜蜂等要有益昆虫选择性无害。此外，果蝇 Cys290 残基被 Val311、Thr315 和 Gln319 完全掩盖，是由 Cys290 附近的 Cys292 与 Cys307 形成二硫键（图 1.6）（Pang *et al.*, 2012）。这表明果蝇 *ace2* 中存在的这个昆虫特异性的半胱氨酸可能无法与其他分子结合，进而导致人们质疑 *ace1* 中该残基在杀虫剂靶标应用中的可能性。

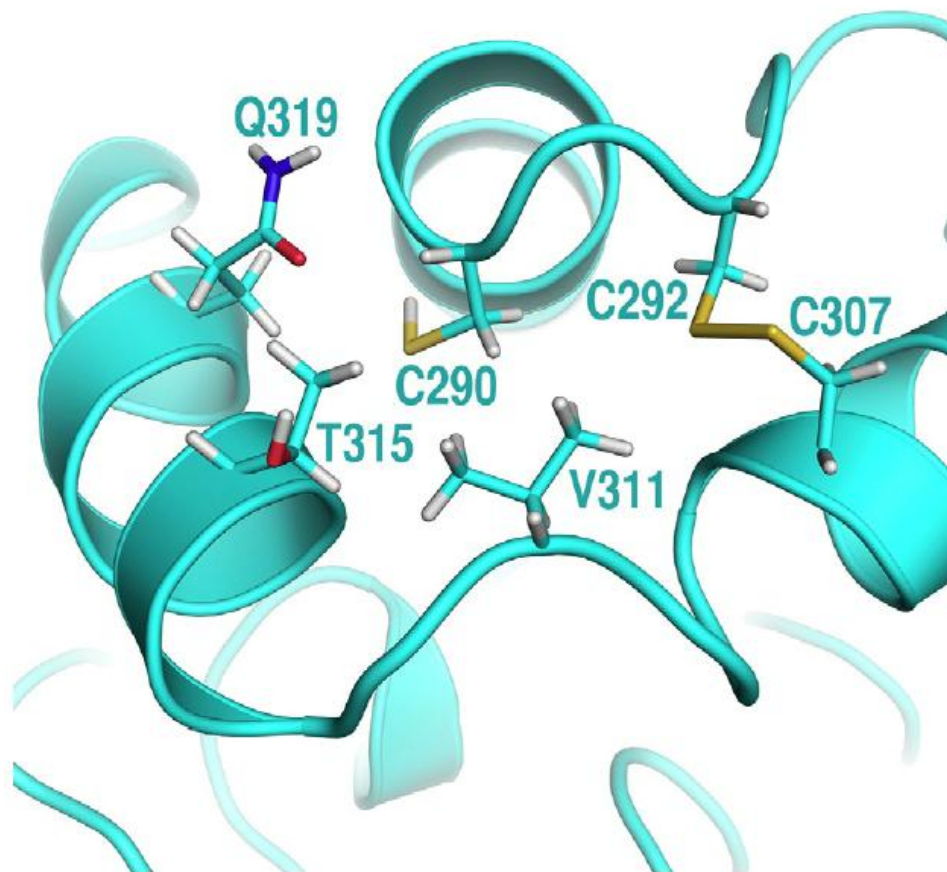


图 1.6 果蝇 AChE 晶体结构 (Pang, 2012)

**Fig.1.6 The buried insect-specific cysteine in the crystal structure of AChE in the fruit fly (Pang, 2012)**

研究表明, 酶活性位点附近的 Cys 残基能与带有巯基的小分子共价结合, 从而导致酶活被不可逆地抑制。蚜虫 *Aphis citricola* 和西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* 的 AChE 粗提物对含巯基抑制剂都非常敏感 (Brestkin *et al.*, 1985; Liu *et al.*, 1994; Manulis *et al.*, 1981; Smissaert, 1976; Zahavi *et al.*, 1972)。AMTS7~AMTS20 作为第一代以半胱氨酸为靶标的抑制剂, 在浓度为  $6\mu\text{m}$  时能不可逆地抑制臭虫 AChE 活性, 而在相同条件下对人 AChE 却没有明显影响。此外, AMTS7~AMTS20 在相同条件下也能分别抑制冈比亚按蚊和埃及伊蚊 AChE 总活性的 95% 和 80% 以上。而这种不可逆抑制 AP-AChE 活性的机制通过对麦二叉蚜的研究得到了阐释, 即 AMTS13 的  $[(\text{Me})_3\text{N}^+(\text{CH}_2)_{13}\text{S}-]$  基团能够与昆虫特异性

Cys 残基结合，从而抑制 AChE 水解活性（Pang *et al.*, 2009a）。将麦二叉蚧 AChE 粗提物分别经巯基乙醇和 AMTS13 处理，AChE 活性均不同程度降低；而将先经 AMTS13 预处理再用巯基乙醇处理后，AChE 活性却有不同程度的恢复。这说明巯基乙醇不仅能通过破坏 AChE 内部二硫键而降低 AChE 活性，还能通过破坏[(Me)<sub>3</sub>N<sup>+</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>S-]与 Cys 形成的二硫键而使被 AMST13 抑制的活性得到恢复。

由于 AMST7~20 与昆虫 AChE 中 Cys 形成的结合物不稳定，容易被巯基乙醇或二硫苏糖醇破坏。因此才有了第二代以半胱氨酸为靶标的抑制剂 PM20 和 PY18。这些抑制剂能与 AChE 强力结合，形成稳定的中间体。PM20 和 PY18 的马来酰亚胺基团被琥珀酰亚胺替换后的产物 PYS18 和 PMS20 具有相似的空间结构，但却不能与 Cys 结合，因此可作为 PM20 和 PY18 试验的对照（结构如图 1.7）。将 AChE 与 PM20、PY18、PYS20、PYS18 和有机磷杀虫剂对氧磷（paraoxon）等分别反应，结果表明 PM20 和 PY18 均能不可逆抑制重组埃及伊蚊 AChE 活性，但对重组人 AChE 活性却没有影响；对氧磷能不可逆地抑制两种 AChE 活性；PMS20 和 PYS18 均无抑制作用（Dou *et al.*, 2013）。此外，Dou 等（2013）还使用 NanoLCD-ESI-MS/MS 观察到重组埃及伊蚊 AP-AChE 与 PM20 结合的中间产物，并证实只有 Cys286 才能与 PM20 结合，而其他的 Cys 及 His 均不能与 PM20 反应。上述研究结果表明昆虫 AChE 的特异性 Cys 可用于开发选择性杀虫剂的潜在靶标。

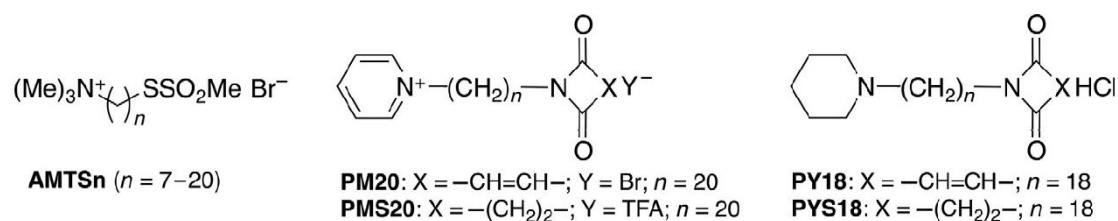


图 1.7 AMTS7~20、PM20、PY18、PYS18 和 PMS20 的化学结构（Pang, 2012）

**Fig.1.7 Chemical structures of AMTS7~20, PM20, PY18, PYS18 and PMS20**

（Pang, 2012）

### 1.1.5.3 以 Cys 为靶标杀虫剂的特点

以昆虫 AChE 的 Cys 为靶标的杀虫剂具有如下优点：①相对有机磷和氨基酸甲酸酯类农药,该杀虫剂只特异性作用于昆虫 AChE 特异性 Cys 残基,而对哺乳动物等其他生物无影响；②该杀虫剂能够改善目前对以丝氨酸为靶标的杀虫剂抗性问题的,因为二者的杀虫机制完全不同；③对于以 AO-AChE 为主的益虫如意大利蜜蜂和黄蜂等无影响,因为以 Cys 为靶标的杀虫剂对 AO-AChE 无抑制作用；④Cys 比 Ser 更具亲核性和活泼性,相对于有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂,可以使用活性相对较低的抑制剂,并且不易产生脱靶效应。

然而这类杀虫剂也有局限性,即既不适用于防治以 AO-AChE 为主的如蚂蚁、胡蜂、大黄蜂和双翅目蝇类等害虫,也不适用于防治蛛形纲蜱螨等。这是由于上述害虫 AChE 中不含有与昆虫 AP-AChE 特异性残基等同效应的 Cys 残基。此外,以昆虫 AChE 特异性 Cys 为靶标的杀虫剂也有可能对以 AP-AChE 为主的独栖性昆虫如木蜂科 Xylocopidae 等造成潜在危害。不过,相对于这类杀虫剂的局限性来说,其优势更为吸引人。

### 1.1.6 小结

AChE 是神经系统中最基本的胆碱调节因子,其通过水解神经递质 ACh,终止后者对神经后膜的兴奋作用,以保证神经信号的正常传递过程。AChE 同时也是有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的作用靶标,其基因突变可产生对杀虫剂不敏感的 AChE,或其基因过表达可产生过量 AChE 以补偿被杀虫剂抑制部分的活性,均可产生抗药性。目前,对昆虫 AChE 的研究颇受关注,不仅可作为特异性靶标而用于新型安全、环境友好的选择性杀虫剂;而且还可用作生物传感器来检测农药残留;还可以 AChE 抑制剂为先导物来开发用于治疗人类阿兹海默症的药剂。

## 1.2 水稻普通矮缩病毒

### 1.2.1 简介

1883 年，水稻普通矮缩病首先在日本被发现（Nault *et al.*, 1989），1895 年确认其病原为水稻矮缩病毒（rice dwarf virus, RDV）。我国首次报道水稻矮缩病是在 20 世纪 30 年代。水稻矮缩病广泛分布于东亚、东南亚稻区。在我国南方各稻区都有发生（李毅和陈章良，2001）。自上世纪 30 年代我国首次报道该病后，其发病面积不断扩大，曾在长江中下游稻区大面积发生。例如，1971 年仅浙江就有超过 1,000 亩稻田发病（李毅和陈章良，2001）。近几年来，在广西和云南的发病面积有增加趋势，如仅环江县的发病面积就达 1,000 多亩（顾永林等，2012）。

水稻矮缩病在发病初期，新叶叶脉上出现黄绿色或黄白色小点，随后小点沿叶脉逐渐延长，形成排列成行的断续条点。在发病后期，叶片短而质地僵硬，植株明显矮缩，节间缩短，分蘖增加，形成簇状。病株根系发育不良，一般为朽根。此外，发病植株比健康株明显矮缩，不到健康植株的一半，且分蘖增加，叶片短而僵硬。水稻苗期和分蘖期易感病，一般不抽穗；水稻后期发病的植株矮缩，形成“包颈穗”或“半包穗”，且穗小瘪谷多、结实率差（阮义理等，1981；Kimura *et al.*, 1987）。水稻矮缩病流行可造成稻区大面积减产，产量损失达到 30%-50%；严重时，甚至颗粒无收（顾永林等，2012）。

### 1.2.2 RDV

RDV 隶属于呼肠孤病毒科（*Reoviridae*），植物呼肠孤病毒属（*Phytoreovirus*）。呼肠孤病毒科寄主广泛分布于动物界和植物界。该科包括 150 多个成员，分属于正呼肠孤病毒属（*Orthoreovirus*）、环状病毒属（*Orbivirus*）、轮状病毒属（*Rotavirus*）、植物呼肠孤病毒属、胞浆多角体病毒属（*Cypovirus*）和一个未命名的属。

植物呼肠孤病毒科的特点：①20 面对称体，有双层衣壳，直径一般在 60-80nm；②无脂蛋白外膜；③基因组为双链 RNA，有 10-12 个基因组份，双链 RNA 末端都有一段保守序列；④外壳有 3 种蛋白质，核心蛋白 4-6 种。

RDV 寄主范围较窄，以禾本科常见植物为主，如水稻、野生稻、稗、看麦娘、早熟禾和雀麦等（顾永林，2012）。RDV 主要通过昆虫媒介吸汁传播，包括黑尾叶蝉 *Nephotettix cincticeps*、电光叶蝉 *Inazuma dorsalis* 和两点黑尾叶蝉 *N. virescens* 等，田间以黑尾叶蝉为主（阮义理，1985）。此外，RDV 还可通过媒介昆虫产卵传播(Fukushi, 1962; 阮义理等, 1981)。叶蝉取食发病植株获毒的最短时间为 5 min；取食 48 小时后的获毒率可达 80%以上。叶蝉获毒后需再经过循环期才能传毒，即具有间歇传毒特性。在 20℃条件下，其循环期为 17 天；29.2℃循环期为 12.4 天（阮义理等，1981）。RDV 可在叶蝉体内复制、增殖。叶蝉一旦获毒后，终身可以传毒，且其传毒能力具有持久性(阮义理等，1981)。此外，RDV 可经卵传播给下一代，即具有垂直传播特性。RDV 经卵传播的效率可高达 85%(Fukushi *et al.*, 1962)。

### 1.2.3 RDV 基因组结构

RDV 是正二十面体球状病毒，直径 60-80nm，无脂蛋白外膜，有双层蛋白外壳，外层含 260 个 P8 三聚体，内层含 60 个 P3 二聚体(Lu *et al.*, 1998)。病毒中心包含基因组、病毒 RNA 转录酶与甲基化酶。RDV 基因组由 12 条双链 RNA 组成。除 S12 外，每条双链 RNA 均只有一个开放阅读框，其中 S1~3、S5 和 S7~9 编码结构蛋白。S1 编码的病毒 RNA 依赖 RNA 聚合酶(RNA dependent RNA Polymerase, RDRP)；S2 和 S8~9 编码外壳蛋白，其中 S2 编码的 P2 蛋白是 RDV 感染昆虫细胞所必需的，S8 编码的 P8 蛋白构成外壳的主体；S3、S5 和 S7 编码核心结构蛋白，其中 S3 编码的 P3 蛋白构成内层衣壳的主体；S4、S6 和 S10~12 编码非结构蛋白。

#### 1.2.4 RDV 传播机制

昆虫对植物病毒的传播方式可分为循环型和非循环型两种。循环型传播指病毒被摄入昆虫体内后，必须穿越细胞膜进入昆虫血腔后方能传播；非循环型传播中病毒则不必穿越细胞膜，仅附着于昆虫口器或前肠表皮细胞上即可传播。循环型传播又可分为增殖型和非增殖型。增殖型传播的病毒能在昆虫体内复制，而非增殖型传播的病毒尽管不能复制，但仍可在昆虫体内长期存活。黑尾叶蝉传播 RDV 的方式为循环增殖型，而且 RDV 不但可进入昆虫血腔复制增殖，还可通过叶蝉卵传递给下一代。

有关黑尾叶蝉传播 RDV 的分子机制已较多研究，主要集中在 RDV 入侵黑尾叶蝉细胞的分子机制及其在虫体内的转运 (Wei *et al.*, 2006a)。Wei 等 (2006a) 通过电镜观察发现，RDV 是通过网格蛋白受体介导的内吞作用而侵入昆虫细胞的。当用丹磺酰戊二胺 (dansylcadaverine) 抑制网格蛋白 (Clathrin) 后，RDV 对昆虫细胞的入侵会受到影响，而用氯丙嗪 (chlupromazine) 抑制囊膜小泡介导的内吞作用后，不能影响 RDV 的侵染。Tomaru 等 (1997) 研究发现，RDV 传播缺陷株 (transmission-defective) 不能被黑尾叶蝉传播，原因是该病毒粒子缺失 P2，导致其 RDV 病毒粒子无法侵入黑尾叶蝉细胞。*et al* 由此可确定，P2 蛋白对 RDV 侵染昆虫宿主是必须的 (Tomaru *et al.*, 1997)。Zhou 等 (2007) 研究发现 P2 具有膜融合蛋白的结构特点。可见，RDV 侵入宿主细胞主要通过受体介导的内吞作用，其中 P2 起着膜融合的关键作用。

Wei 等 (2007) 研究发现，在带毒黑尾叶蝉体内细胞中存在含有病毒粒子的囊泡。这些囊泡通常位于被侵染细胞的边缘。用布雷菲德菌素 A (Brefeldin A) 等药物抑制囊泡运输，病毒粒子的胞内释放受到抑制，导致病毒不能被大量复制；而用动力蛋白解聚剂等抑制肌丝蛋白，则不会对囊泡形成和病毒释放产生影响。这表明 RDV 在胞内通过囊泡运输，而胞间则通过含 Pns10 的微管以完成次级侵染。

### 1.3 研究目的与意义

黑尾叶蝉属半翅目叶蝉科，是水稻常见害虫。其不仅通过直接取食水稻韧皮部造成直接危害，还能传播多种植物病毒，给水稻生产带来严重的经济损失。RDV 属呼肠孤病毒科植物呼肠孤病毒属，主要由黑尾叶蝉、电光叶蝉和二条黑尾叶蝉等以持久增殖方式传播。感染 RDV 的水稻发病时植株矮缩，根系发育不良，一般不能抽穗。

先前报道在水稻矮缩病毒病流行地区的黑尾叶蝉已经比没有流行的地区的具有更高的有机磷农药抗性(Shinkai, 1962)。梁莉(2010)室内生测实验结果也表明，相对于健康黑尾叶蝉，感染 RDV 的叶蝉种群对多种有机磷杀虫剂具有更高水平的抗性。为探讨 RDV-黑尾叶蝉-抗药性三者关系，本文分析比较了黑尾叶蝉带毒与不带毒种群体内主要抗药性相关代谢酶的活性，并克隆、分析了黑尾叶蝉 *ace* 基因序列及其转录与表达水平。论文结果可为揭示黑尾叶蝉与 RDV 互作机制奠定基础，并为黑尾叶蝉防治提供依据。

## 第二章 RDV 感染对黑尾叶蝉抗药性相关酶活性的影响

黑尾叶蝉感染 RDV 后，对有机磷农药的敏感性显著降低（梁莉，2010），但其中的内在机制尚不明确。为此，本章测定、比较了黑尾叶蝉带毒与不带毒种群体内抗药性相关代谢酶（如 P450s、Ests、GSTs 和 AChEs 等）活性，以明确黑尾叶蝉感染 RDV 所引起有机磷抗性的生化机制。

### 2.1 材料与方法

#### 2.1.1 供试昆虫

黑尾叶蝉采自浙大紫金港西区试验农场稻田。试虫采集地近年一直未发现有水稻 RDV 发病情况。采集的黑尾叶蝉在室内连续饲养三代以上。饲养条件为：温度  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ ；相对湿度  $70 \pm 5\%$ ；光周期 16h: 8h(光照: 黑暗)；光强度 3500-4,000Lux。

#### 2.1.2 供试水稻

供试水稻品种为感虫品种 TN1 (台中在来 1 号, Taichung Native 1)。水稻种子浸泡、催芽 7 天后，置于玻璃温室中用水稻培养液进行培养。温室培养条件为：温度  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ；光周期 L: D=14 h: 10h；光照 60%；光强度 12,000-14,000 Lux；相对湿度  $75 \pm 5\%$ 。

水稻培养液成分与配制方法（Yoshida *et al.*, 1976）如下：

|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 储备液 I      | $\text{NH}_4\text{NO}_3$ : 91.6 g/L; $\text{CaCl}_2$ : 88.6 g/L                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 储备液 II     | $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : 40.3 g/L; $\text{K}_2\text{SO}_4$ : 71.4 g/L                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 储备液 III    | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 324 g/L                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 微量元素储备液 IV | $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ : 1.5 g/L; $\text{H}_3\text{BO}_3$ (硼酸): 0.934 g/L<br>$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ : 0.031 g/L;<br>$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (七钼酸氨): 0.074 g/L<br>$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 0.035 g/L; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ : 7.7 g/L |

---

柠檬酸（一水合物）：11.9 g/L

以上试剂分别溶解，然后加入 50 mL 浓硫酸，加蒸馏水至 1 L。

---

配方储备液 1：1.25 ml/L；储备液 2：1.25 ml/L；

储备液 3：1.25 ml/L；微量元素储备液：1 ml/L

注：用 NaOH 将 PH 值调至 4.5~5.0，不超过 6.0，稍偏酸无碍。

---

### 2.1.3 带毒黑尾叶蝉种群的建立

田间采集的黑尾叶蝉健康种群在 TN1 水稻品种上饲养 3 代后，取 1~2 龄黑尾叶蝉若虫 200 头，接虫于感染 RDV 的 TN1 水稻上（感病水稻由北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室李毅教授提供）。饲毒 2 天后，移至健康的 TN1 水稻上饲养 1-2 周。叶蝉在感病水稻上经循环期后，发育成 4-5 龄若虫。取单头感毒若虫接于苗龄 15 天左右的单株 TN1 水稻苗上后编号，隔天更换稻苗，换下稻苗编号后移栽到玻璃温室中。根据出现发病症状的稻苗编号，收到相应黑尾叶蝉，集中饲养后建立带毒种群（陈茂，2005）。

### 2.1.4 带毒水稻和带毒黑尾叶蝉的 RDV 检测

带毒黑尾叶蝉的 RDV 检测：取单头黑尾叶蝉的腹部于 2ml 离心管中，采用 Trizol 试剂（美国 Invitrogen）法提取黑尾叶蝉总 RNA。取 3  $\mu$ l 总 RNA 作为模板，采用 PrmeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit（北京全式金）进行 cDNA 合成。以 RDVS8 片段设计引物（表 2.1）进行 PCR，经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测是否有 RDV 特异性条带。如有，则说明该黑尾叶蝉已感染 RDV。

带毒水稻的 RDV 检测：取新鲜水稻叶片，剪碎后加入液氮研磨，总 RNA 提取、cDNA 合成和 PCR 检测方法参考带毒黑尾叶蝉的检测方法。

表 2.1 RDV 检测的 PCR 引物

Table 2.1 PCR primers for RDV detection

| 名称                    | 序列                             |
|-----------------------|--------------------------------|
| RDV S8 forward primer | 5'-CAAAGATCTCCACCTGCCACTATG-3' |
| RDV S8 reverse primer | 5'-GCGCTCGAGATTCAGGACCG-3'     |

#### 2.1.4.1 总 RNA 提取

- (1) 将样品放入 2ml 离心管中，加入 1 粒不锈钢珠和 1 ml Trizol 提取液，用组织研磨仪 Tissue Lyser（美国 QIAGEN）破碎，频率为每秒 25 次，破碎 1 min，室温静置 2 min。
- (2) 加入 0.2ml 氯仿，充分震荡混匀。静置 2 min。12,000×g 4℃ 离心 15 min。离心后混合物分为三层，上层水相，中间为白色固相，最下层红色苯酚-氯仿层。
- (3) 取上层水相于新离心管，加入 0.2ml 氯仿，充分震荡混匀。静置 2 min。12,000×g 4℃ 离心 15 min。
- (4) 离心后取上层水相于新离心管中，加入 0.5ml 异丙醇，温和上下颠倒 6-8 次，4℃ 下静置 10 min，10,000×g 4℃ 离心 10 min。离心后 RNA 呈白色沉淀。
- (5) 去上清，加入 1ml 75%乙醇，上下颠倒 4-6 次使沉淀悬浮。7,500×g 4℃ 离心 5 min。
- (6) 去上清，注意不要将 RNA 沉淀倒出。在超净工作台中通风干燥 RNA，注意不能完全干燥。加入适量的 RNA-free-water 溶解 RNA。
- (7) 用 NanoDrop 2000 微量紫外分光光度计测定 RNA 浓度和纯度，-70℃ 保存，或直接用于相关实验。

#### 2.1.4.2 第一链 cDNA 合成

采用 TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒（北京全式金）。在 PCR 管中依次加入：

Total RNA 1 μg

|                              |             |
|------------------------------|-------------|
| Anchored Oligo(dT) Primer    | 1 μl        |
| Random Primer                | 1 μl        |
| 2xTS Reaction Mix            | 10 μl       |
| TransScript RT/RI Enzyme Mix | 1 μl        |
| gDNA Remover                 | 1 μl        |
| RNase-free Water             | Up to 20 μl |

离心混匀。PCR 仪中设置程序：25℃, 10 min; 42℃, 30 min; 85℃, 5 min; 4℃, forever。

2.1.4.3 PCR 扩增

采用 TaKaRa LA Taq 试剂盒（大连宝生）扩增目的片段。在 PCR 管中依次加入：

|                                              |             |
|----------------------------------------------|-------------|
| TaKaRa LA Taq(5U/μl)                         | 0.5 μl      |
| 10x LA Taq Buffer II (Mg <sup>2+</sup> Plus) | 5 μl        |
| dNTP Mixture(2.5mM each)                     | 8 μl        |
| cDNA Template                                | < 1 μg      |
| Forward Primer                               | 2 μl        |
| Forward Primer                               | 2 μl        |
| ddH <sub>2</sub> O                           | Up to 50 μl |

PCR 反应条件：

|         |          |             |
|---------|----------|-------------|
| 94℃     | 5 min    |             |
| 94℃     | 30 sec   | } 30 cycles |
| (Tm-5)℃ | 30 sec   |             |
| 72℃     | 1 min/kb |             |
| 72℃     | 10 min   |             |

PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳进行检测。

2.1.5 黑尾叶蝉抗药性相关代谢酶活性测定

2.1.5.1 样品的制备

取带毒与不带毒黑尾叶蝉各 30 头，冰上按每头分别取头胸部与腹部，头胸部用于酶活检测，腹部用于 RDV 检测。取经 PCR 检测明确的带毒或不带毒黑尾叶蝉头胸部于预冷的 1.5ml 离心管中，每管 10 个头胸部，加入 200 $\mu$ l 含 0.1%Triton-X 100 的 0.1M PBS pH7.5，用匀浆器充分碾碎，16,000 $\times$ g 4 $^{\circ}$ C 离心 20 min，取上清作为酶原液。

#### 2.1.5.2 蛋白浓度测定

参照蛋白浓度测定试剂盒（上海生工）说明书测定样品的可溶性蛋白含量。

#### 2.1.5.3 AChEs 活性测定

参照高希武（1987），采用 Ellman 胆碱酯酶活力测定改进法。取 10 $\mu$ l 酶源液加 120  $\mu$ l 0.1M PBS 缓冲液（pH7.5），再加 20 $\mu$ l 1.0 mM 碘化硫代乙酰胆碱，37 $^{\circ}$ C 保温 20min，加入 150 $\mu$ l(LDTNB-磷酸盐乙醇显色剂（5.0mg DTNB, 48mL 96%乙醇和 32 ml 水，用 0.1M PBS 缓冲液 pH7.5 定容至 100 ml）终止反应，用酶标仪于 412nm 处测定吸光值。以 GSH 制作标准曲线。

#### 2.1.5.4 ESTs 活性测定

取 10 $\mu$ l 酶源液，加 150 $\mu$ l 0.1M PBS 缓冲液 pH7.4，再加 1 $\mu$ l 150mM 1-萘酯，于 37 $^{\circ}$ C 下保温反应 10min。然后加入 40 $\mu$ l 显色剂（取 1%坚固蓝 B 盐和 5%SDS 以 2: 5 比例进行混合）终止反应，用酶标仪在 600nm 处测定吸光值。制作标准曲线，x 为 OD 值，y 为底物量（单位 mmol）。

#### 2.1.5.5 GSTs 活性测定

按照 GSTs 测定试剂盒（南京建成）说明书。

##### （1）酶促反应

测定管和对照管中按下表分别加入：

|                                    | 测定管 | 对照管 |
|------------------------------------|-----|-----|
| 基质液(ml)                            | 0.3 | 0.3 |
| 待测匀浆上清液(ml)                        | 0.1 |     |
| 混匀，37 $^{\circ}$ C 水浴 10 min（准确计时） |     |     |

|             |   |     |
|-------------|---|-----|
| 试剂二应用液(ml)  | 1 | 1   |
| 无水乙醇(ml)    | 1 | 1   |
| 待测匀浆上清液(ml) |   | 0.1 |

混匀，3,500~4,000×g，离心 10 min，取上清液作显色反应。

(2) 显色反应

各管中分别加入：

|                      | 空白管 | 标准管 | 测定管 | 对照管 |
|----------------------|-----|-----|-----|-----|
| GSH 标准溶剂应用液(ml)      | 2   |     |     |     |
| 20μmol/LGSH 标准溶液(ml) |     | 2   |     |     |
| 上清液(ml)              |     |     | 2   | 2   |
| 试剂三应用液(ml)           | 2   | 2   | 2   | 2   |
| 试剂四应用液(ml)           | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |

混匀，室温放置 15 min，于 412nm 处测各管 OD 值。

(3) 单位定义和计算公式

单位定义：规定每毫克组织蛋白，在 37℃ 反应 1 min，扣除非酶促反应，使反应体系中 GSH 浓度降低 1μM 为一个酶活力单位。

计算公式：

$$\text{组织中GST活力(U/mgprot)} = \frac{\text{对照OD值} - \text{测定OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(20\mu\text{mol/L})} \times \frac{\text{反应体系稀}}{\text{释倍数(6倍)}} \div \frac{\text{反应时间}}{(10\text{分钟})} \div \left[ \frac{\text{样本取样量(0.1ml)} \times \text{匀浆液蛋白浓度(mgprot/ml)}}{\text{}} \right]$$

[注]：OD 值表示吸光值；mgprot/ml 表示蛋白浓度为毫克蛋白/毫升。

2.1.5.6 P450s 活性测定

按照 P1731 Luciferin-MultiCYP、V9510 NADPH Regeneration System、V8930 Luciferin Detection Reagent with esterase 试剂盒（美国普罗麦格）说明书。

- (1) 在 96 孔板中依次加入 2.5 μl 1 mM Luciferin-MultiCYP（终浓度为 100 μM）、5 μl 1 M 磷酸缓冲液（pH7.4，终浓度为 200 mM）和 17.5 μl 酶液，总体积为 25 μl。空白对照使用等体积的热灭活酶

- 液。
- (2) 37℃ 平衡 10 min。
  - (3) 加入 25 μl 2x NADPH 体系。
  - (4) 37℃ 反应 30 min。
  - (5) 加入 50 μl 酯酶体系，室温（22-25℃）孵育 20 min。
  - (6) 用 luminometer or CCD camera 检测荧光值。

2.1.6 数据分析

采用 DPS 14.50 软件（唐启义和冯明光，2007），用 Student *t* 测验对结果进行分析，显著性差异以星号标出。

2.2 结果与分析

2.2.1 带毒与不带毒黑尾叶蝉 AChEs 活性比较

根据 RDV S8 基因设计特异性引物，在带毒与不带毒黑尾叶蝉种群中取供试个体腹部分别进行 RT-PCR 检测。结果表明，带毒供试个体均能检测到 RDV 特异性扩增，而不带毒个体未发现有 RDV 感染(如图 2.1)。

通过对检测过带毒与不带毒黑尾叶蝉头胸部进行 AChEs 活性测定。结果表明，感染 RDV 的黑尾叶蝉雌虫、雄虫、5 龄若虫 AChE 的酶活比未感染 RDV 的黑尾叶蝉要高，达到差异显著水平，且雌虫之间的差异最为明显（图 2.2）。

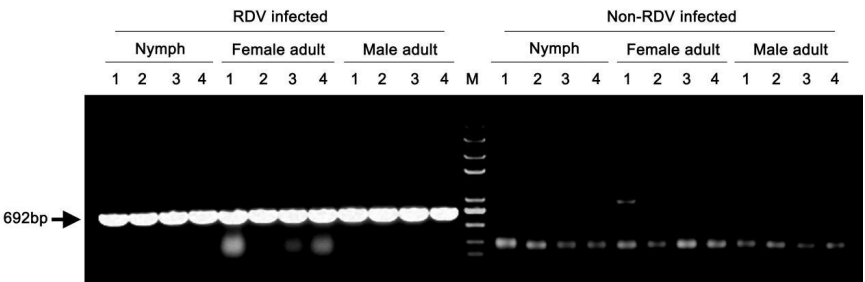
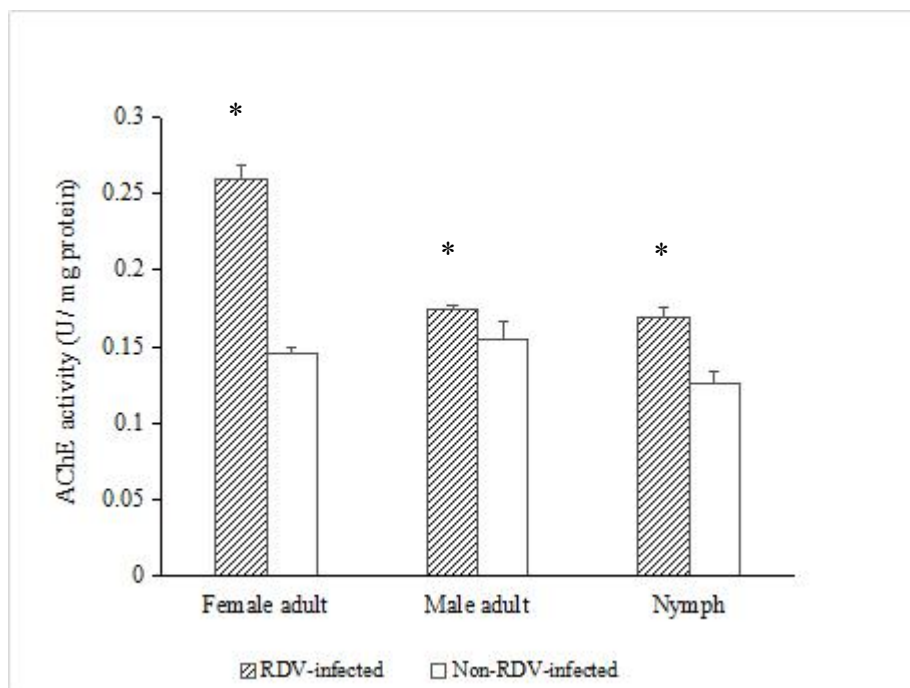
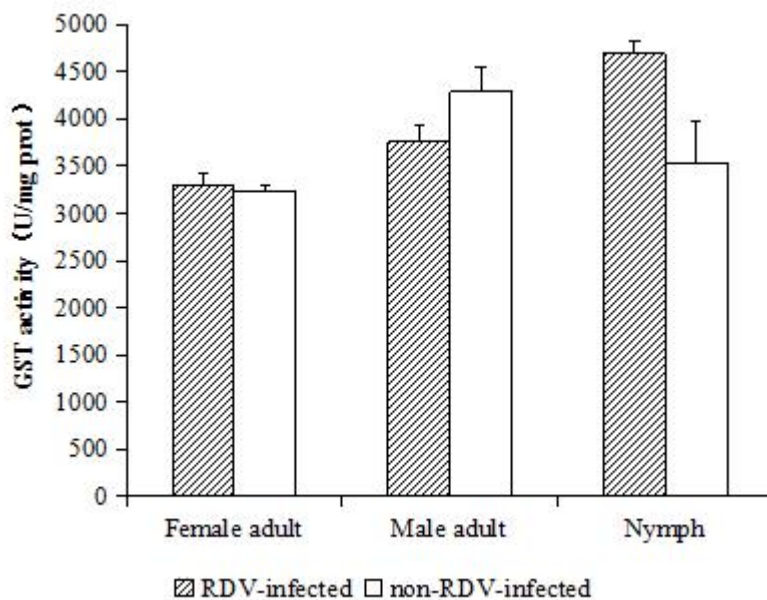


图 2.1 带毒与不带毒黑尾叶蝉的 PCR 检测结果

**Fig.2.1 PCR Detection of RDV infection in individuals of *Nephotettix cincticeps*****图 2.2 RDV 侵染对黑尾叶蝉 AChEs 活性的影响****Fig.2.2 Effects of RDV infection on AChEs activity of *Nephotettix cincticeps*****图 2.3 RDV 侵染对黑尾叶蝉 GSTs 活性的影响****Fig.2.3 Effects of RDV infection on glutathione S-transferase activity of**

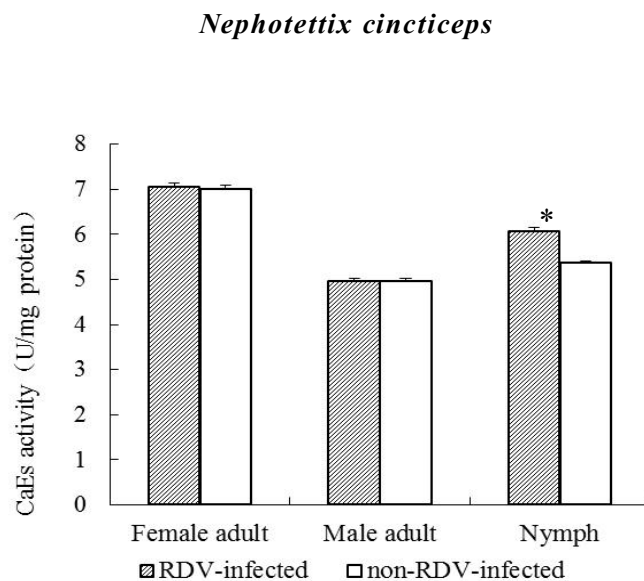


图 2.4 RDV 侵染对黑尾叶蝉 ESTs 活性的影响

Fig.2.4 Effects of RDV infection on esterase activity of *Nephotettix cincticeps*

### 2.2.2 带毒与不带毒黑尾叶蝉代谢解毒酶活性比较

对带毒与不带毒黑尾叶蝉雌成虫、雄成虫和 5 龄若虫代谢解毒酶 (GSTs、Ests 和 P450s) 活性进行检测。结果表明, 带毒与不带毒黑尾叶蝉雌成虫和雄成虫体内 3 种解毒酶活性均无显著差异, 而带毒 5 龄若虫 GSTs 和 Ests 活性均显著低于不带毒的(图 2.3~2.5)。其中, 不带毒 5 龄若虫 GSTs 活性为带毒叶蝉的 1.32 倍, 不带毒 5 龄若虫 Ests 活性为带毒叶蝉的 1.14 倍。

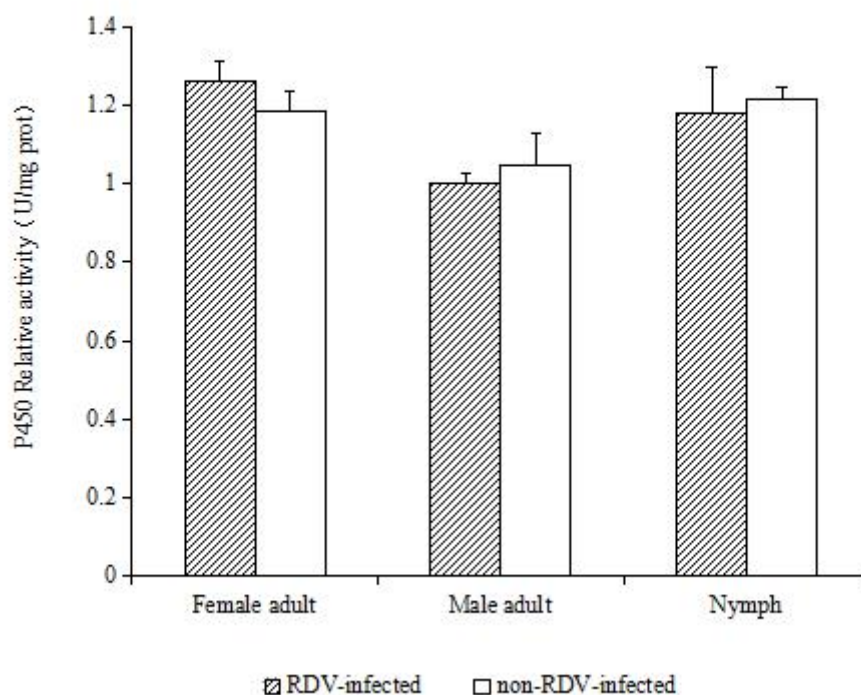


图 2.5 RDV 侵染对黑尾叶蝉 P450s 活性的影响

Fig.2.5 Effects of RDV infection on P450 activity of *Nephotettix cincticeps*

### 2.3 讨论

害虫抗药性是目前农业生产中遇到的主要问题之一。害虫抗药性产生的机制主要包括代谢抗性和靶标不敏感性。代谢抗性主要是通过增强代谢解毒酶活力而加速杀虫剂代谢或排阻。目前，与抗药性相关的代谢解毒酶主要有：P450s、Ests 和 GSTs 等。代谢抗性的分子机制主要涉及解毒酶基因扩增或突变而导致酶活增强。AChE 是有机磷杀虫剂的靶标，其相关的抗性分子机制也主要涉及基因扩增与突变，即基因扩增导致酶量增加而补偿被杀虫剂抑制的酶活部分以及基因突变导致对杀虫剂的不敏感。

黑尾叶蝉感染 RDV 后对有机磷敏感性显著降低（梁莉，2010）。根据害虫抗药性产生的机制推测，带毒黑尾叶蝉体内代谢解毒酶及 AChEs

活性增强或 AChEs 发生基因突变。鉴于叶蝉感染 RDV 前后的药剂敏感性变化, 发生基因突变的可能性较小。本章测定、比较带毒与不带毒叶蝉体内代谢解毒酶 (P450s、Ests 和 GSTs) 和 AChEs 的活性差异发现, 带毒叶蝉 AChEs 活性显著高于不带毒叶蝉, 而两种叶蝉在代谢解毒酶活性上差异不明显。这表明 RDV 侵染黑尾叶蝉后, 可诱导其体内 AChEs 活性增强, 进而补偿有机磷所抑制的活性。

### 第三章 黑尾叶蝉 AChEs 基因克隆与序列分析

黑尾叶蝉感染 RDV 后对有机磷的敏感性显著降低（梁莉，2010）。对带毒黑尾叶蝉体内代谢解毒酶（P450s、Ests 和 GSTs）及靶标酶（AChEs）活性测定结果发现，AChEs 活性增强是导致对有机磷敏感性降低的主要生化机制（见第二章结果）。代谢酶活性增强通常与其基因扩增或转录及翻译水平升高有关。为探讨 RDV 侵染对黑尾叶蝉 AChEs 基因表达的影响，本章在检索 GenBank 发现已有 2 条黑尾叶蝉 AChE 基因序列信息的基础上，采用 RT-PCR 技术克隆获得这 2 条 AChE 基因（*Ncace1* 和 *Ncace2*）的全长 cDNA 序列，并就其序列特征作了分析。结果如下。

#### 3.1 材料与方法

##### 3.1.1 供试材料

供试的黑尾叶蝉同第二章 2.1.1。试验用主要试剂有：Trizol 试剂（美国 Invitrogen）；凝胶回收纯化试剂盒和质粒提取试剂盒（美国 Axygen）；反转录试剂盒和 pEASY-T1 载体（北京全式金）；X-gal、IPTG 和氨苄（Amp）（上海生工）；PCR 相关试剂和 T4 连接酶（北京全式金）；荧光定量 PCR SYBR@ Premix Ex Taq II（大连宝生）。

##### 3.1.2 主要实验仪器

Eppendorf 移液枪、琼脂糖电泳仪、PCR 仪、凝胶成像系统、CFX 96 real-time 荧光定量 PCR 仪（美国 Bio-Rad）、Tissuelyser II 研磨仪、高速冷冻离心机（德国 Eppendorf）等。

##### 3.1.3 黑尾叶蝉 AChE 基因克隆

采用 Trizol 法提取黑尾叶蝉总 RNA（第二章 2.1.4.1），并合成 cDNA

(第二章 2.1.4.2)。根据 Genbank 中 Ncace1(登录号 AF145235)及 Ncace2(登录号 AY256851)基因的序列信息分别设计特异性引物(表 3.1),以合成的黑尾叶蝉 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增(第二章 2.1.4.3)。PCR 程序为:

|         |          |             |
|---------|----------|-------------|
| 94℃     | 5 min    |             |
| 94℃     | 30 sec   | } 30 cycles |
| (Tm-5)℃ | 30 sec   |             |
| 72℃     | 1 min/kb |             |
| 72℃     | 10 min   |             |

PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶进行电泳检测,并切胶回收。

采用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒进行 PCR 产物回收,过程如下:

- (1) 取 PCR 产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳,电泳后根据条带大小,确定目的条带,在紫外光下,切下目的条带所在的凝胶,放入 1.5ml 离心管中(先称重 1.5ml 空离心管),称重。根据该重量确定 1 个凝胶体积(如称重 100mg,则 1 个凝胶体积为 100  $\mu$ l)。
- (2) 加入 3 个凝胶体积的 Buffer DE-A, 75℃加热,每 2 min 间歇震荡,直至凝胶完全融化。
- (3) 加入 1.5 个凝胶体积的 Buffer DE-B,混匀后,转移至制备管中,制备管放入 2 ml 离心管, 12,000 $\times$ g 离心 1min。弃滤液。
- (4) 将制备管放回到 2 ml 离心管中,加入 500  $\mu$ l Buffer W1, 12,000 $\times$ g 离心 1 min。弃滤液。
- (5) 将制备管放回到 2 ml 离心管中,加入 700  $\mu$ l Buffer W2, 12,000 $\times$ g 离心 1 min。弃滤液。再次加入 700  $\mu$ l Buffer W2, 12,000 $\times$ g 离心 1 min。弃滤液。
- (6) 将制备管放回 2 ml 离心管中, 12,000 $\times$ g 离心 1min。
- (7) 将制备管放回 1.5ml 的离心管中,加入 30  $\mu$ l 65-70℃预热的 Eluent Buffer 或 ddH<sub>2</sub>O。静置 1min。12,000 $\times$ g 离心 1min。弃制备管,离心下来的液体即为回收的 DNA。

(8) 用 NanoDrop2000 微量紫外分光光度计测定 DNA 的浓度和纯度，-20℃ 保存或用与接下来的实验。

取经纯化的目的基因 PCR 产物 4μl 和克隆载体在 pEASY-T1 1μl 于 PCR 管中，25℃ 孵育 20min，即可完成连接。

将连接产物按以下步骤进行转化：

- (1) 自 -76℃ 冰箱中取出 Trans-T1 感受态细胞（北京全式金），用指尖轻揉解冻后插在冰上，分装为 50μl/管。
- (2) 取连接产物 5 μl 加入 50μl Trans-T1 感受态细胞，冰浴 20-30min，42℃ 热激 30sec，立即置于冰上 2min，不要晃动离心管。
- (3) 加 500 μl 平衡至室温的 LB 培养液，37℃ 下 200rpm 振荡培养 1h 复苏。
- (4) 期间，取 8μl 500mM IPTG 和 40μl 20mg/ml X-gal 混合，均匀地涂布于含有 Amp<sup>+</sup> 的 LB 平板上，在 37℃ 放置 30min。
- (5) 待 IPTG 和 X-gal 被吸收后，取 200 μl 菌液铺板，37℃ 倒置培养过夜（为得到较多克隆，4,000 rpm 离心 1 min，弃掉部分上清，保留 100-150μl，轻弹悬浮菌体，取全部菌液涂板，培养过夜）。

对阳性菌落进行 PCR 鉴定。采用 2xEasyTaq PCR SuperMix（北京全式金）进行 PCR 扩增，检测目的片段是否成功插入。

- (1) 取 M13 正向引物（10μM）和 M13 反向引物（10μM）等体积混合成 M13 引物混合液，

取 250 μl PCR 管，依次加入以下：

|                         |             |
|-------------------------|-------------|
| 2x Easy-aq PCR SuperMix | 10 μl       |
| M13 引物混合液（10μM）         | 2 μl        |
| ddH <sub>2</sub> O      | Up to 20 μl |

- (2) 取室温平衡的 LB/Amp<sup>+</sup> 平板，用枪头挑出白色菌落后，在 LB/Amp<sup>+</sup> 平板上轻点、触碰培养基后，于装有 PCR 反应的 PCR 管中来回抽打枪头，将菌落洗落于 PCR 管反应液中，点样的 LB/Amp<sup>+</sup> 平板于 37℃ 下培养过夜。

PCR 程序：

|                        |          |             |
|------------------------|----------|-------------|
| 94 °C                  | 5 min    |             |
| 94 °C                  | 30 sec   | } 30 cycles |
| (T <sub>m</sub> -5) °C | 30 sec   |             |
| 72 °C                  | 1 min/kb |             |
| 72 °C                  | 10 min   |             |

菌落 PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

- (3) 将经菌落 PCR 检测确认包含重组子的克隆，扩大培养，菌液一方面用于 M13 引物测序，测序由铂尚生物公司完成。将测序成功的菌液样品抽提质粒于 -20 °C 中保存。构建成功 *Ncace1* 及 *Ncace2* 重组质粒分别命名为 *Ncace1/ pEASY-T1*、*Ncace2/ pEASY-T1*。

按以下步骤抽提质粒 DNA：

- (1) 取经测序验证序列正确的菌液接入含 Amp 的 20ml LB 培养液中，37 °C，300rpm 培养 5h。
- (2) 12,000 × g 离心 1min 收集菌体。
- (3) 去上清，加入 0.5ml S1 重悬菌体。转移至 2ml 的离心管中。
- (4) 加入 0.5ml 的 S2，温和上下颠倒 4-6 次。溶液变得透亮。
- (5) 加入 0.7ml 的 S3，温和上下颠倒 6-8 次，出现白色沉淀。  
12,000 × g 离心 10min。
- (6) 将上清转移至制备管中，制备管放入 2 ml 离心管，12,000 × g 离心 1 min。弃滤液。
- (7) 将制备管放回到 2ml 离心管中，加入 500 μl Buffer W1，12,000 × g 离心 1min。弃滤液。
- (8) 将制备管放回到 2ml 离心管中，加入 700 μl Buffer W2，12,000 × g 离心 1min。弃滤液。再次加入 700 μl Buffer W2，12,000 × g 离心 1min。弃滤液。
- (9) 将制备管放回 2ml 离心管中，12,000 × g 离心 1min。
- (10) 将制备管放回 1.5ml 的离心管中，加入 30 μl 65-70 °C 预热的 Eluent Buffer 或 ddH<sub>2</sub>O。静置 1min。12,000 × g 离心 1min。弃制备管，

离心下来的液体即为质粒 DNA。用 NanoDrop2000 微量紫外分光光度计测定 DNA 的浓度和纯度, 20℃ 保存或直接用与接下来的实验。

### 3.1.4 黑尾叶蝉 AChE 基因序列的生物信息学分析

- (1) 利用 ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 开放阅读框
- (2) 使用在线序列工具包 (<http://www.bio-soft.net/sms/index.html>)
- (3) 信号肽预测使用 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)
- (4) TMHMM Server v. 2.0 预测跨膜域  
(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)
- (5) 通过 NCBI 上 conserved domains 查找保守序列 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)
- (6) SWISS-MODEL 预测三维结构 (<http://swissmodel.expasy.org/>)

### 3.1.5 黑尾叶蝉 AChE 基因表达的时间动态分析

分别取黑尾叶蝉卵、各龄期若虫、雌成虫、雄成虫, 提取总 RNA。以 500 ng 总 RNA 为模板逆转录合成第一链 cDNA。将 cDNA 稀释 100 倍。利用 CFX96 Real-time PCR 检测系统, 对感染与未感染 RDV 的黑尾叶蝉 *Ncace1* 及 *Ncace2* 基因的表达水平进行检测, 以 28S 为内参基因。qPCR 反应采用 SYBR@Premix Ex Taq II (大连宝生), 反应体系如下:

|                       |            |
|-----------------------|------------|
| SYBR Premix EX Taq II | 12.5μl     |
| Former Primer         | 1μl        |
| Reveser Primer        | 1μl        |
| cDNA                  | 2μl        |
| ddH <sub>2</sub> O    | Up to 25μl |

qPCR 的程序为: 95℃, 30 s; (95℃, 5s; 60℃, 30s) x 40 cycles; 溶解

曲线(95℃, 10 s; 65℃, 5 s; 95℃, 50 s)。反应完成后, 通过( $2^{-\Delta\Delta CT}$ )方法, 将得到的 Ct 值转换成各个样品中基因的相对表达量(Livak *et al.*, 2001)。

### 3.1.6 黑尾叶蝉 AChE 基因表达的组织分布分析

取黑尾叶蝉雌成虫, 在解剖镜下滴加含 RNA 抑制剂的 RNase free water, 解剖脑、卵巢、中肠、脂肪体, 取黑尾叶蝉雄虫, 解剖精巢。解剖出的组织放入 Trizol 提取液中, 每 100 头为一个样品, 提取总 RNA。逆转录, 荧光定量 PCR 方法参考本章 3.1.5。

表 3.1 基因克隆、筛选及荧光定量 PCR 中使用的引物

| Table 3.1 Primers used to cloning, screening and real-time qPCR |              |                           |
|-----------------------------------------------------------------|--------------|---------------------------|
| 引物用途                                                            | 名称           | 序列 (序列 (5'-3'))           |
| 克隆                                                              | NcAChE01-SP3 | TCAAGGTTTCAGGAGACACGA     |
|                                                                 | NcAChE01-AP3 | TCGGTACAAAAGTGCTGTCG      |
|                                                                 | NcAChE02-SP3 | GGAGACAGACGACAGCCCTA      |
|                                                                 | NcAChE02-AP3 | TCGGCGGCAATTCATTATAG      |
| 筛选阳性克隆                                                          | M13F         | CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC  |
|                                                                 | M13R         | AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA |
| 定量                                                              | Ncace1-SP1   | AGTACAACGCTCGGGAGAGA      |
|                                                                 | Ncace1-AP1   | GGCACTCTGGATCTGGTTGT      |
|                                                                 | Ncace2-SP1   | TGGGAAGCAATACGGAAGAG      |
|                                                                 | Ncace2-AP1   | GTCATCAGGGTTGAGCCAGT      |
|                                                                 | Nc28S-SP     | TCAGCGATGTCAGTTTGAGG      |
|                                                                 | Nc28S-AP     | CCTCCTCTCGCAATGAGAAC      |

### 3.1.7 数据分析

采用 DPS 14.50 软件 (唐启义和冯明光, 2007) 对各处理进行分析。采用方差分析中 Tukey 法进行显著性检验。

## 3.2 结果

### 3.2.1 黑尾叶蝉 AChE 基因克隆

以黑尾叶蝉成虫 cDNA 为模板，对 AChE 基因进行 PCR 扩增，扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶分离检测出一条与预期大小一致的目的条带（如图 3.1~3.2），将此 2 条带进行 DNA 凝胶回收，TA 克隆测序，获得基因 cDNA 序列，分别命名为 *Ncace1* 和 *Ncace2*。

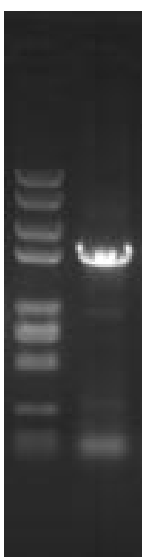


图 3.1 *Ncace1* 的 PCR 扩增

**Fig.3.1 PCR amplification of  
*ace1* in *Nephotettix cincticeps***



图 3.2 *Ncace2* 的 PCR 扩增

**Fig.3.2 PCR amplification of  
*ace2* in *Nephotettix cincticeps***

### 3.2.2 黑尾叶蝉 *Ncace1* 序列分析

*Ncace1* 全长 2,210bp，ORF finder 显示开放阅读框为 2,034bp，5'端非编码区域为 45bp，3'端非编码区域为 131bp，编码氨基酸 677 个，其中 54 个强碱性氨基酸，75 个强酸性氨基酸，231 个疏水性氨基酸，186 个极性氨基酸（如图 3.3），预计编码蛋白分子量大小为 75.7kD，预计

等电点为 5.5。SignalP 4.1 Server 预测 1~19 为信号肽，剪切位点在 T19 和 Q20 之间（图 3.4）。6 个糖基化位点（N-X-S 或 N-X-T）。具有胆碱标识序列（FGESAG）。TMHMM Server v. 2.0 预测无跨膜域（图 3.5）。黑尾叶蝉 *Ncace1* 属于酯酶家族，具有底物结合口袋和催化三联体（图 3.6）。根据其他昆虫 *ace* 空间结构构建的黑尾叶蝉 *Ncace1* 三维结构如图所示（图 3.7）。

```

1 M A R L R F S T L S L S L L V A V A T Q
1 ATGGCGAGGTTGAGGTTCTCCACGTTGTCACGTGTCACCTTCTGGTTGCGGTCGCCACACAA
21 P Q P S T P R T L H S N D H N H G F L N
61 CCCCAGCCGAGCACTCCGCGTACCCTTCACAGCAATGACCACAACCACGGCTTCCTCAAC
41 E H K H S H A H A Y K S H D R A H N T H
121 GAGCACAAGCACAGCCACGCTCACGCGTACAAGTCGCACGACCGTGCGCACAACACGCAC
61 A Q F A E A T G P A S T P S G G T P K H
181 GCCCAGTTTCGCGGAAGCCACCGGGCCGGCCAGTACCCGAGCGCGGGACTCCCAAGCAC
81 G D P L I V E T T S G L V R G L S K T V
241 GGGGATCCGTTGATCGTGGAGACCACGAGCGGTCTAGTGCGGGGGCTCAGTAAGACTGTT
101 L G R E V H V F T G I P F A K P P V G P
301 CTCGGTCGAGAGGTTTCATGTGTTACCGGCATACCGTTTCGCCAAGCCGCGCCGTCGGACCG
121 L R F R R P V P V D P W H G V Y D A T T
361 CTGCGGTTCCGCAGACCTGTGCCCCTGGACCCCTGGCACGGGGTGACGACGCCACCACC
141 L S N S C Y Q E R Y E Y F P G F E G E E
421 CTCTCCAACCTCTGCTATCAGGAGCGGTACGAGTACTTCCCCGGGTTTCGAGGGAGAGGAG
161 M W N P N T _ _ _ _ _ N _ _ _ _ _ I _ _ _ _ _ S _ _ _ _ _ E D C L Y L N I W V P
481 ATGTGGAACCCCAACACTAACATCAGCGAGGACTGTCTGTACCTCAACATCTGGGTGCCT
181 Q R L R I R H K S S S E E N T Y R Q K V
541 CAGCGGCTGCGGATCAGGCACAAGAGTTCCTCCGAGGAAAACACTTACAGGCAGAAGGTC
201 P V L I W I Y G G G Y M S G T A T L D I
601 CCTGTGCTGATCTGGATCTACGGCGGTGGCTACATGTCCGGCACTGCCACCTTGGACATC
221 Y D A D M V A A T S D V I V A S M Q Y R
661 TACGACGCGGACATGGTTGCTGCCACCAGTGACGTGATCGTCGCCTCCATGCAGTACCGG
241 V G A F G F L Y L S P E L P P G S E E A
721 GTGGGCGCCTTTGGGTTCTCTACCTGTCTCCGAGCTTCCCCAGGCAGCGAGGAGGCC
261 P G N L G L W D Q A L A I Q W I K A N I
781 CCAGGAAACCTCGGCCTCTGGGACCAGGCTCTGGCCATCCAATGGATCAAGGCGAACATC
281 A N F G G D P E L C T L F G E S A G G G
841 GCTAACTTCGGTGGTGACCCGGAGCTGTGCACTCTGTTTCGGAGAATCCGCGGGCGGAGGA
301 S V S L H L V S P V T R G L V R R G I M
901 TCCGTGAGCTTACACCTTGTGTACCTGTGACTAGAGGACTGGTAAGGCGAGGTATCATG

```

```

321 Q S G T L N A P W S Y M T G E R A V E I
961 CAGTCCGGGACCCCTCAACGCCCCCTTGGAGCTACATGACTGGTGAGAGAGCCGTTGAGATC
341 A K T L I D D C G C _N_A_S_ M L I E S P S
1021 GCCAAGACTCTAATTGACGACTGTGGATGCAATGCTTCCATGCTCATTGAGAGCCCTTCG
361 R V M S C M R A V D A K T I S V Q Q W N
1081 AGGGTGATGTGATGTATGAGAGCAGTGGATGCCAAGACCATATCCGTGCAGCAGTGGAAAT
381 S Y F G I L G F P S A P T I D G V F L P
1141 TCCTACTTCGGCATCTTGGGTTTCCCTTCGGCGCCCACCATAGACGGGGTTTTCTTCCT
401 K H P L D L L K E G D F Q D T E I L I G
1201 AAACACCCCTTTAGATCTGTTGAAAGAGGGCGATTTCCAGGACACGGAGATCCTTATTGGC
421 S N Q D E G T Y F I L Y D F I D Y F E K
1261 AGTAATCAGGACGAAGGGACGTATTTTCATACTGTACGACTTCATAGACTACTTTGAGAAA
441 D G P S F L Q R D K F L D I I N T I F K
1321 GACGGGCGCGAGTTTCTTGCAAAGAGACAAGTTTTTTGGACATAATCAACACAATATTCAAG
461 _N_F_T_ R L E R D A I I F Q Y T D W E H A
1381 AACTTCACGAGGCTTGAAAGGGACGCCATCATATTCCAGTATACCGACTGGGAACACGCC
481 N D G Y L N Q K M I G D V V G D Y F F I
1441 AACGACGGCTACCTGAATCAGAAGATGATTGGCGATGTTGTGGGAGACTACTTCTTCATC
501 C P T N L F A Q A F S D H G L K V F Y Y
1501 TGCCCTACTAACCTGTTGCTCAGGCGTTTTCTGACCACGGACTTAAAGTTTTCTACTAT
521 F F T Q R T S T S L W G E W M G V M H G
1561 TTTTTCCTCAGAGAACGAGTACGAGCCTCTGGGGGAATGGATGGGAGTGATGCACGGG
541 D E I E Y V F G H P L _N_M_S_ L Q Y N A R
1621 GATGAGATAGAGTACGTGTTTCGGCCACCCTCTCAACATGTCTCTGCAGTACAACGCTCGG
561 E R D L S L R I M Q A Y S R F A L T G K
1681 GAGAGAGACCTGAGTTTACGCATCATGCAGGCCTACTCTAGGTTTCGCCCTCACAGGGAAA
581 P V S D D I N W P I Y S R E Q P Q Y Y I
1741 CCGGTGTCGGACGATATCAACTGGCCGATATATTCAAGGGAGCAGCCACAGTATTACATC
601 F N A E K S G I G K G P R A T A C A F W
1801 TTCAACGCGGAGAAGAGTGGAATTGGAAGGGACCGCGGGCGACGGCGTGTGCTTTCTGG
621 N E F L P R L R G Q P D P E C L A D V A
1861 AACGAATTCTGCCAAGGCTTAGAGGACAACCAGATCCAGAGTGCCTGGCGGACGTCGCC
641 E V E T S S P L V D _N_V_S_ D _N_S_T_ S T T
1921 GAGGTGGAGACGAGCAGTCCTCTGGTAGACAACGTCAGCGACAACCTCCACGTCCACGACG
661 F K P C T V I T V L G L L L L T I *
1981 TTCAAGCCATGCACAGTCATCACCGTGCTGGGACTCCTGCTGCTGACGATATAAGGCGAC
2041 TTCATCGTATTTCGACAGCACTTTTGTACCGACATTTTGTATTTTATTTTCGAATACGAGGC
2101 CCGAAAGGACTGTGTAAAAATGTACTTGTATGATTTAGGCCTAACTAGAAATAATCACTTG
2161 TTTTA

```

图 3.3 黑尾叶蝉 *Ncace1* 的 cDNA 序列及推导氨基酸序列**Fig.3.3 Nucleotide and deduced amino acid sequences of the ace1 cDNA of**

*Nephotettix cincticeps.*

划线部分为信号肽序列；虚线部分为糖基化位点；灰色部分为胆碱标识序列；双线部分为聚腺苷酸信号

The putative signal peptide is underlined; glycosylation site are shown with a dotted line. and the cholinesterase signature sequence are gray-shaded. A consensus polyadenylation signal is indicated by a double underline.

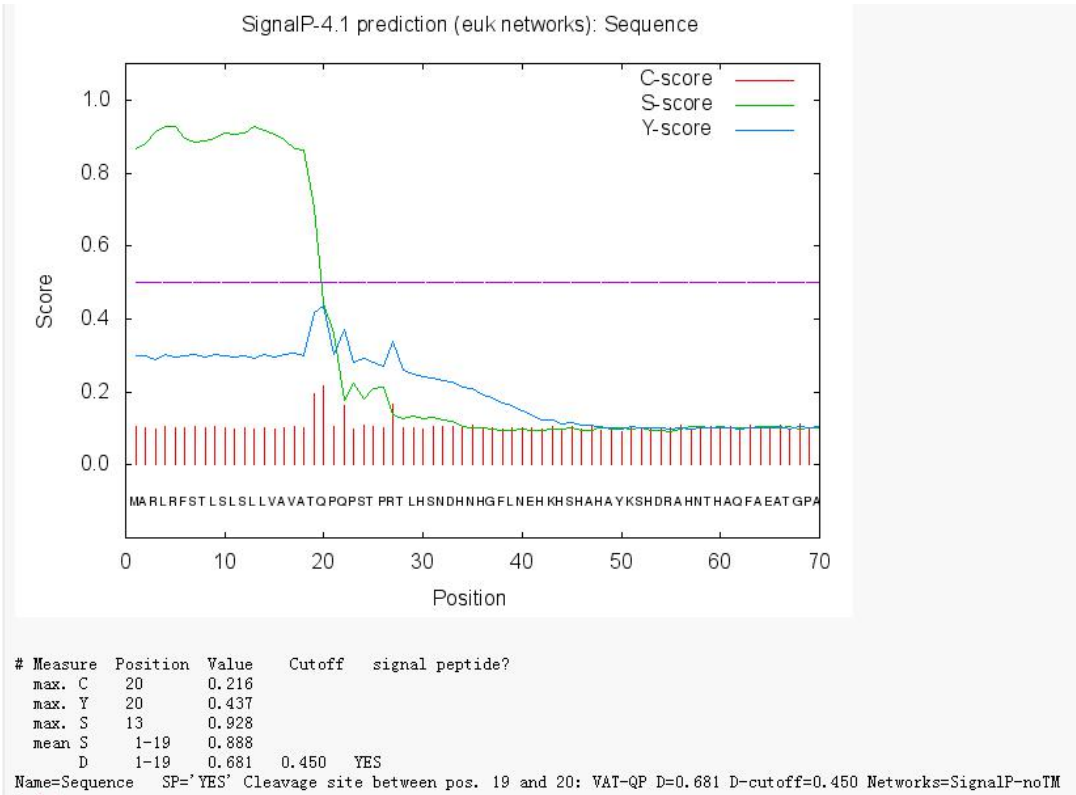


图 3.4 黑尾叶蝉 *Ncace1* 基因编码氨基酸信号肽预测结果

**Fig.3.4 Predicted result of *Ncace1* signal peptide in *Nephotettix cincticeps* through signal 4.1 server**

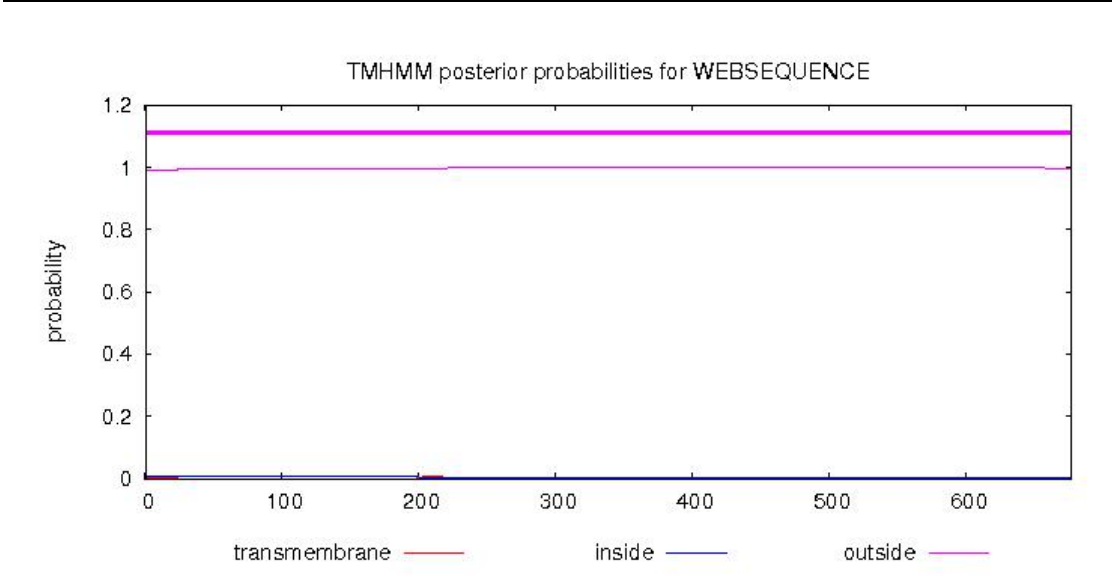


图 3.5 黑尾叶蝉 *Ncace1* 基因跨膜域预测结果

Fig.3.5 Transmembrane domains of *Ncace1* gene in *Nephotettix cincticeps*.

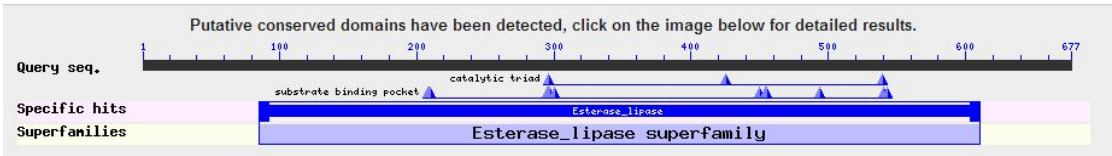


图 3.6 黑尾叶蝉 *Ncace1* 基因的保守区域

Fig.3.6 Conserved domains of *Ncace1* gene in *Nephotettix cincticeps*.

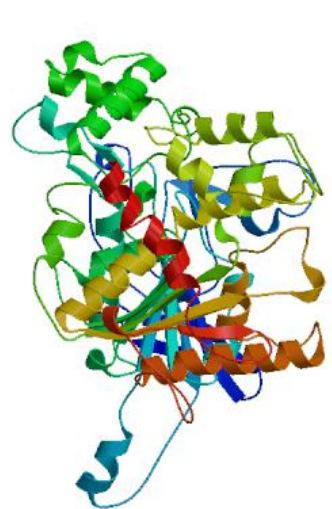


图 3.7 黑尾叶蝉 *Ncace1* 基因蛋白质三维结构同源建模分析

Fig.3.7 3-Demension structure analysis of *Ncace1* gene in *Nephotettix cincticeps*

### 3.2.3 黑尾叶蝉 *Ncace2* 序列分析

*Ncace2* 全长 2,248 bp, ORF finder 显示开放阅读框为 1,899 bp, 5' 端非编码区域为 149 bp, 3'端非编码区域为 200 bp, 编码氨基酸 632 个, 其中 52 个强碱性氨基酸, 69 个强酸性氨基酸, 232 个疏水性氨基酸, 161 个极性氨基酸, 预计编码蛋白分子量大小为 71.2 kD, 预计等电点为 5.5 (图 3.8)。SignalP 4.1 Server 预测 1~21 为信号肽, 剪切位点在 A21 和 A22 之间 (图 3.9)。5 个糖基化位点 (N-X-S 或 N-X-T)。具有胆碱标识序列 (FGESAG)。TMHMM Server v. 2.0 预测无跨膜域 2~24 个氨基酸, 第一个氨基酸位于膜内, 25~632 个氨基酸位于膜外, 显示 NcAChE2 为膜蛋白 (图 3.10)。黑尾叶蝉 *Ncace2* 属于酯酶家族, 具有底物结合口袋和催化三联体 (图 3.11)。根据其他昆虫 *ace* 空间结构构建的黑尾叶蝉 *Ncace2* 三维结构如图所示 (图 3.12)。

```

1 M V W L C P V Y V L V C T M T C T C G F
1 ATGGTGTGGCTGTGCCCTGTGTACGTGCTGGTCTGCACGATGACGTGTACGTGCGGGTTC
21 A A T L R H A R H Q A A P P P D R L S P
61 GCAGCAACGCTCAGGCATGCGCGCCACCAAGCCGCCCTCCGCCTGACAGACTATCTCCA
41 L D I P S R Y E M D M T D D V V E D A P
121 CTAGACATTCTTCAAGATACGAGATGGACATGACAGATGACGTGGTGGAGGACGCGCCG
61 A P E D P L L I H T L K G K V R G Q T M
181 GCTCCAGAGGACCCCTGCTCATAACACGCTCAAGGGCAAGGTGCGTGGCCAGACCATG
81 T A A T G K L V D A W L G I P Y A Q K P
241 ACTGCTGCCACGGGCAAGTTGGTGGACGCCTGGCTCGGCATCCCGTATGCGCAGAAACCC
101 L G P L R F K H P R P P D R W D Y V Y N
301 CTAGGTCCCCTTAGATTTAAACACCCGCGGCCGCGCCAGACCGGTGGGACTACGTGTACAAC
121 A T K Q P N S C V Q I F D T V F G D F S
361 GCCACCAAACAACCCAATTCTTGTGTTCAAATCTTCGACACTGTGTTGCGGAGATTTCTCC
141 G A M M W N P N T Q I S E D C L Y L N V
421 GGCGCAATGATGTGGAACCCCAACACGCAAATATCCGAAGACTGCCTCTACCTGAACGTG
161 V A P K P R P S N A A V M V W V F G G G
481 GTCGCACCTAAGCCGCGGCCGAGCAACGCTGCCGTCATGGTCTGGGTGTTTGGCGGTGGC
181 F Y S G S A T L D V Y D P R I L V S E E
541 TTCTACTCGGGCTCCGCCACCCTGGACGTCTACGACCCACGTATCCTTGTTTCCGAAGAG
201 N V I Y V S M Q Y R V A S L G F L F F D
601 AACGTCATCTACGTGTCAATGCAGTATCGTGTAGCATCACTGGGTCTTGTTTTTTTGAT

```

221 T P E V P G N A G L F D Q L M A L Q W V  
661 ACGCCCGAGGTACCCGGAACGCAGGTTTATTTCGATCAGCTTATGGCGCTGCAATGGGTC  
241 H D N I H F F G G N P H \_ \_ N \_ V \_ T \_ \_ L F G E S  
721 CATGACAACATCCACTTCTTCGGCGGTAATCCGCACAATGTGACATTGTTTCGGGGAATCA  
261 A G A V S V S L H L L S P L S R N L F S  
781 GCTGGTGCCGTGTCCGTCTCACTACACCTCCTATCACCCCTTAGCAGGAACCTGTTTCAGC  
281 Q A I M E S G S A T A P W A I I S R D E  
841 CAGGCGATCATGGAGTCCGGATCAGCGACAGCGCCTTGGGCGATCATCTCCCGTGACGAG  
301 S F V R G L R L A E A V G C P H T R A E  
901 AGCTTCGTACGCGGCCTCAGGCTTGCCGAGGCGGTGGGCTGTCCTCACACGCGCGCCGAG  
321 I H E A I D C L R K K \_ \_ N \_ A \_ S \_ \_ E L V E N E  
961 ATACACGAGGCAATCGACTGTCTAAGGAAGAAAAATGCCTCAGAACTAGTCGAGAACGAG  
341 W G T L G I C E V P F V P I V D G A F L  
1021 TGGGGCACACTAGGAATTTGCGAGGTCCCTTTTCGTTCCGATCGTCGACGGTGCGTTTCTC  
361 D D L P V R S L A T K N F K K T N I L M  
1081 GACGACCTCCCGGTGCGATCCTTGGCAACCAAGAACTTCAAGAAGACTAACATTCTGATG  
381 G S N T E E G Y Y F I I Y Y L T E L F R  
1141 GGAAGCAATACGGAAGAGGGATACTACTTTATAATCTACTACCTCACAGAACTGTTTtagG  
401 K E E N V Y V N R D E F L H A V H E L N  
1201 AAAGAAGAGAACGTGTACGTAAACCGTGACGAGTTCTTGACGCTGTTTCATGAGCTGAAC  
421 P Y V N N V A R Q A I V F E Y T D W L N  
1261 CCCTACGTCAACAACGTGGCCAGACAAGCTATCGTGTTTGAATATACAGACTGGCTCAAC  
441 P D D P I R N R D A L D K M V G D Y H F  
1321 CCTGATGACCCGATCCGCAACAGAGACGCCCTGGACAAGATGGTGGGTGACTATCACTTT  
461 T C N V N E F A H R Y A E T G N N V Y M  
1381 ACCTGTAACGTCAACGAGTTTCGCCCACAGATACGCCGAGACCGGCAACAACGTCTACATG  
481 Y Y F K Y R S I G N P W P S W T G V M H  
1441 TACTACTTCAAGTACCGTAGCATAGGCAACCCGTGGCCGTCGTGGACGGGAGTGATGCAC  
501 A D E I N Y I F G E P L N P I L N Y H P  
1501 GCGGACGAGATCAACTACATATTCGGAGAGCCTCTTAACCCTATCCTCAACTACCACCCC  
521 Q E V E L S R R M M R Y W A N F A K T G  
1561 CAGGAGGTAGAGCTGAGCCGTCGCATGATGCGCTACTGGGCTAACTTCGCTAAGACCGGA  
541 \_ \_ N \_ \_ P \_ \_ \_ S \_ \_ M S E D G T W T A T Y W P V H T A  
1621 AATCCGAGCATGTTCGGAGGACGGTACATGGACAGCTACGTATTGGCCTGTTTCACACGGCA  
561 Y G R E Y L T L D V \_ \_ N \_ \_ S \_ \_ T \_ \_ A T G R G P R  
1681 TACGGCAGAGAGTACCTCACATTAGACGTCAACTCCACAGCGACGGGCCGAGGACCAAGA  
581 L K Q C A F W K K Y L P Q L I A A T E K  
1741 CTTAAGCAGTGCGCCTTCTGGAAGAAATATCTGCCCCAATTAATAGCCGCGACAGAGAAG  
601 L Q A P V V E T C T G A A G E A R V A W  
1801 CTGCAAGCGCCAGTGGTGGAGACGTGCACGGGTGCGGCGGGCGAGGCGCGAGTGCGGTGG  
621 S L I A M A F A L C V V \*  
1861 TCCCTGATCGCAATGGCATTTCGCGCTCTGTGTCGTGTAAACTGACGTCTACTTTCCCGCT

```
1921  GGGAAAAACGTTTCATTTAAAATAGTAGAAAATAAAGGTTCTTTTATTTTATATTTGTGA
1981  GGATATTGAGTTTGACAATAAATAATATTACGAACATAATGAATTGCCGCCGAACATGG
2041  AGCGTTCGCACACCGAACAGTTGTGTATCATAGAGAGTGTAAGTGTATAAACAGA
```

图 3.8 黑尾叶蝉 *Ncace2* 的 cDNA 序列及推导氨基酸序列

**Fig.3.8 Nucleotide and deduced amino acid sequence of the *Ncace2*cDNA of *Nephotettix cincticeps***

划线部分为信号肽序列；虚线部分为糖基化位点；灰色部分为胆碱标识序列；双线部分为聚腺苷酸信号

The putative signal peptide is underlined; glycosylation site are shown with a dotted line. andthe cholinesterase signature sequence are gray-shaded. A consensus polyadenylation signal is indicated by a double underline.

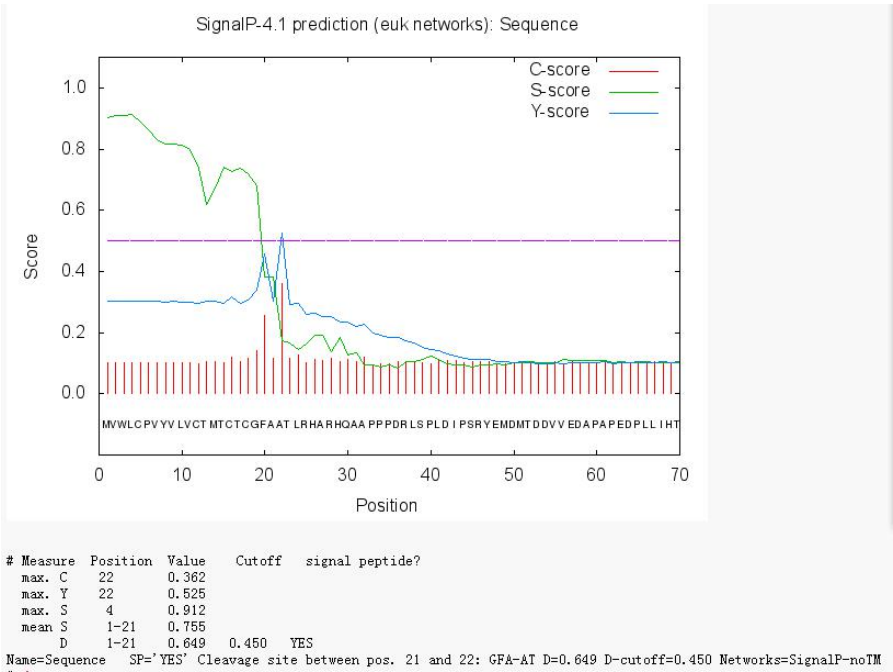


图 3.9 黑尾叶蝉 *Ncace2* 基因编码氨基酸信号肽预测结果

**Fig.3.9 Predicted result of *Ncace2* signal peptide in *Nephotettix cincticeps* through signal 4.1 server**

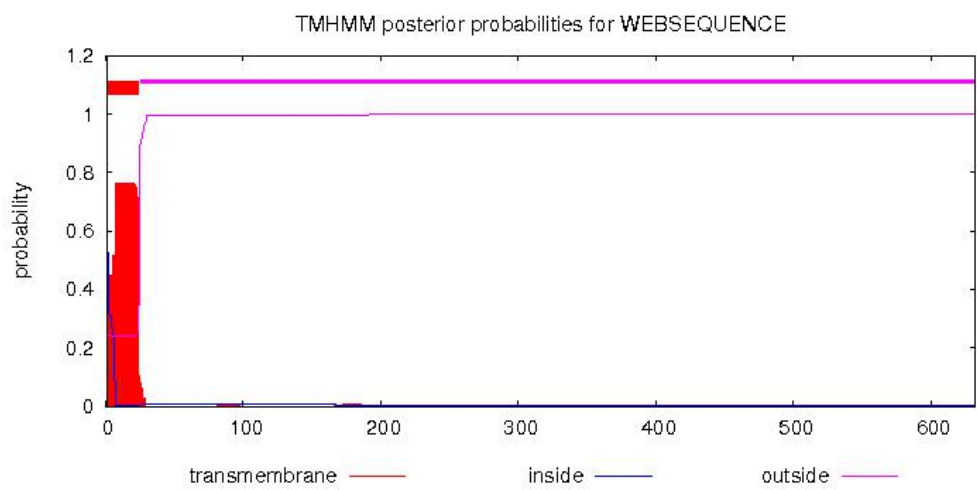


图 3.10 黑尾叶蝉 *Ncace2* 基因的保守区域

Fig.3.10 Conserved domains of *Ncace2* gene in *Nephotettix cincticeps*.

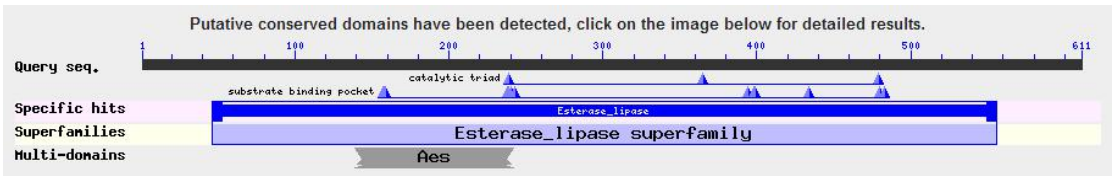


图 2.11 黑尾叶蝉 *Ncace2* 基因的保守区域

Fig.3.11 Conserved domains of *Ncace2* gene in *Nephotettix cincticeps*.

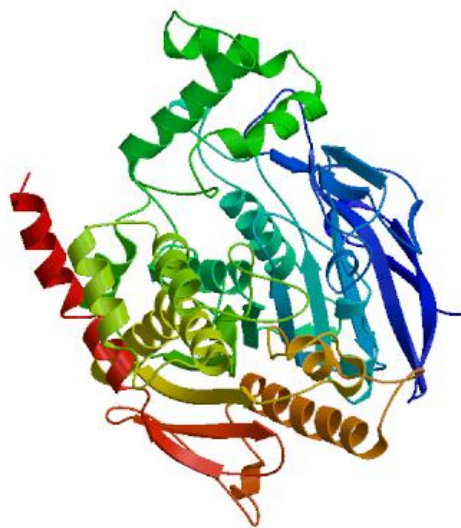


图 3.12 黑尾叶蝉 *Ncace2* 基因蛋白质三维结构同源建模分析

Fig.3.12 3-Demension structure analysis of *Ncace2* gene in *Nephotettix cincticeps*

### 3.2.4 黑尾叶蝉 AChE 基因多序列比对及功能位点分析

通过黑尾叶蝉两种 *ace* 基因与家蝇、黑腹果蝇、赤拟谷盗、电鳐 *ace* 基因的多序列比对, 结果如图 3.13。多序列比对显示, 不同物种 *ace* 基因之间存在较多的保守位点, 可能来自共同的祖先。黑尾叶蝉 *ace* 基因具有其他昆虫及哺乳动物相同的保守功能域, 主要有:

(1) 催化三联体: 从图中可以看出, 催化三联体的位置高度保守。

*Ncace1* 的催化三联体为 Ser296、Glu425 和 His539; *Ncace2* 的催化三联体为 Ser260、Glu386 和 His500。

(2) 氧阴离子洞: *Ncace1* 的氧阴离子洞有 Gly208、Gly209 和 Ala297 的主链 N 原子与羧基氧相互作用, 以及酯键的氧与 His539 的咪唑基相互作用共同构成; *Ncace2* 各自对应的氨基酸为 Gly178、Gly179 和 Ala501。

(3) 用于形成分子内部二硫键的半胱氨酸: *Ncace1* 中的位置分别为 Cys145、Cys172、Cys350、Cys365、Cys501 和 Cys617; *Ncace2* 中的位置分别为 Cys128、Cys155、Cys314、Cys327、Cys462 和 Cys584。

(4) 昆虫中果蝇旁系同源基因 *ace1* 特异性半胱氨酸: 黑尾叶蝉 *Ncace1* 存在一个与果蝇 Cys290 位置相同的昆虫特异性 Cys312, 而 *Ncace2* 中该位点为 Val。

### 3.2.5 黑尾叶蝉 AChE 基因的系统进化

应用 Clustal X 1.81 和 MEGA 5.05 构建了乙酰胆碱酯酶的系统发育进化树 (图 3.14)。从图中可以看出, 昆虫乙酰胆碱酯酶分为两个进化分枝, 一个与黑腹果蝇直系同源; 一个与黑腹果蝇旁系同源, 这也是传统昆虫 *ace* 基因分类的方法。黑尾叶蝉 *Ncace2* 基因与黑腹果蝇 *ace* 基因旁系同源, 而黑尾叶蝉 *Ncace1* 与黑腹果蝇 *ace* 基因直系同源。黑尾叶蝉 *Ncace1* 与 *Ncace2* 基因序列均与褐飞虱的最为相似。

```

Md-ace : -----MARSVRTPISSSSSSSSSSSSSSSSSFYLLSSFKASLTRPSSSSSVAHHLAARNNDICRGLFATLVILL : 72
Im-ace : -----MAISCRQ-----SR-----VLPMSLPLPLTIP-----LPLVLVLSL : 31
Tc-ace2 : MG-----SNLVVVVVVVVVVASLSAS-----VRAYSWPSEE-----TTT : 35
Nc-ace1 : MARLRFSTLSLSLLVAVATQPQPSTPRTLHSDHNNHGFLEHKKSHAHAYKSHDRAHNTHAQ-----FAEATGPAS : 71
Tc-ace1 : -----MTGAAACLLVILLPSCIPSPHRGRHHPPEPHAEAYHMSRDPDPHRS-----EEFRRDAPDDK : 60
Nc-ace2 : -----MVWLCPVYVLVCTMTCTCGFAATLRHARHQAPPDRLS--PLDIP-----SRYEMDMTDDV : 55
Tc-ace : -----MNLVLTSSLGVLLHLVLCQAD----- : 22

Md-ace : RMSALTSAMTDHLTVQTTSGPVRGRSVTVQG-RDVHVFTGIPYAKPPVDDLRFKRPVPAEPWHGVLDATRLPATVQCHRY : 151
Im-ace : HLSGVCG-VIDRLVVQTTSSGPVRGRSVTVQG-REVHVFTGIPYAKPPVEDLRFKRPVPAEPWHGVLDATRLSATVQCHRY : 109
Tc-ace2 : RPPQARDFHSDPLVETTSGLARGKAKTVLG-REVHVFTGIPFAKPPIEQLRFRKPVPIDPWHGTLDTATKLPNSYCHRY : 114
Nc-ace1 : TPGSGTPKHGDPLIVETTSGLVRGLSKTVLG-REVHVFTGIPFAKPPVGLRFRFPVDPWHGVYDATLTSNSYCHRY : 150
Tc-ace1 : REFTRRDSDDPLVIQTKKGKVRGISLTAATGKKVDWLGIPIYAKPLGNLRFHRPRPAEKWEGVMNTTSQPNSCVQID : 140
Nc-ace2 : VEDAP--APEDPLLHTLKGKVRGQMTAATGKLVDAWLGIPYAKPLGNLRFKHPRPDRWDVYVNAATKQNSCVQID : 133
Tc-ace : -----DHSELLVNTKSGKVMGTRVPVLS-SHISAFGLGIPFAEPPVGNMFRFRPEPKKPWSGVWNASTYPNNQCCVD : 93

Md-ace : EYFPGFSGEEINPNPTNVSEDCLFMNIWAPAKARLRHGRGTNGGEHSS--KTDQDHLIHSATPQNTTNGLPILIIYCGG : 229
Im-ace : EYFPGFSGEEINPNPTNVSEDCLYINWAPAKARLRHGRGANGGEHPNGKQADTDHLIHNGNPQNTTNGLPILIIYCGG : 189
Tc-ace2 : EYFPGFEGEEMNPNPTNISEDCLYLNIWVPQRLRIRHHG-EKLPQDRP-----KVPVLIIYCGG : 173
Nc-ace1 : EYFPGFEGEEMNPNPTNISEDCLYLNIWVPQRLRIRHKSSEENTYRQ-----KVPVLIIYCGG : 210
Tc-ace1 : TVFGDFPGATMNPNTPLNEDCLYLVNVVVKPRPT-----SAVMVVIYCGG : 187
Nc-ace2 : TVFGDFSGAMMNPNTQISEDCLYLVNVVVKPRPS-----NAVMVVIYCGG : 180
Tc-ace : EQFPGFSGSEMNPNTNRESEDCLYLNIWVPSPRKP-----STTVMVVIYCGG : 140

Md-ace : FMTGSATLDIYNADIMAAVGNVIVASFQYRVGAFGLHLSFVMP-GFEEAPGNVGLWDQALALRWLKENARAFGGNPEW : 308
Im-ace : FMTGSATLDIYNADIMAAVGNVIVASFQYRVGAFGLHLSFVMP-GFEEAPGNVGLWDQALALRWLKDNAHAFGGNPEW : 269
Tc-ace2 : YMSGTSTLDIYNADIIAATSDVIVASMQYRVGAFGLYLSKYFP-RGSEAPGNMGMDQALAIRWIKENAAAFGGDPDL : 252
Nc-ace1 : YMSGTATLDIYNADIMAAATSDVIVASMQYRVGAFGLYLSPELP-PGSEAPGNLGLWDQALAIQWIKIANAFGGDPDL : 289
Tc-ace1 : FMSGNTLEVYDHNILVSEENIILVSMQYRVASLGLFYFG-----TPDVPGNAGLFDQMMALQWVRDNIAAFGGNPN : 260
Nc-ace2 : FMSGATLDVYDPRILVSEENVIVSMQYRVASLGLFFD-----TPEVPGNAGLFDQMLALQWVHDNIHFFGGNPHN : 253
Tc-ace : FMSGSTLDVYNGKYLAYTEEVVLSVSRVGAFFGLALHG-----SQEAPGNVGLLDQRMALQWVHDNIHFFGGDPKT : 214

Md-ace : MTLFGESAGSSSVNAQLMSPVTRGLVKRGMMSGTMMNAPSHMTSEKAVEIGKALVNDNCNASLLPENPQAVMAQMRQV : 388
Im-ace : MTLFGESAGSSSVNAQLMSPVTRGLVKRGMMSGTMMNAPSHMTSEKAVEIGKALINDCNCNASMLKTNPAHVMSQMRQV : 349
Tc-ace2 : ITLFGESAGGGSVSLILLSPVTKGLARRGILQSGTMNAPSYMSEGERAPQIGKVLVEDCCGNVSLLETRPHEVIDCMRAV : 332
Nc-ace1 : CTLFGESAGGGSVSLHLVSPVTRGLVRRGIMQSGTLMNAPSYMTERAVEIAKTLIDCCGNASMLIESPSRVMSCMRAV : 369
Tc-ace1 : ITLFGESAGAVSVSLHLLSPLSRNLFSQAIMESSSATAPAAISREESILRGLRLAEAVGCPHERHEL--SAVIDCLKKK : 338
Nc-ace2 : VTLFGESAGAVSVSLHLLSPLSRNLFSQAIMESSSATAPAAISRDESFVRGLRLAEAVGCPHTRAEI--HEAIDCLKKK : 331
Tc-ace : VTIFGESAGGASVGMHILSPGSRDLFRRAILQSGSPNCBPASVSVAEGRRRAVELGRNLNCLNSDE----ELIHCLREK : 290

Md-ace : DAKTISVQQWNSYS--GILSEPSAPTIDGAFLPADPMTLLKTADLSGYDILIGNVKDEGTMEILYDFIDYFDKDDATSLP : 466
Im-ace : DAKTISVQQWNSYS--GILSEPSAPTIDGAFLPADPMTLMKTADLDKYDILMGNVRDEGTMEILYDFIDYFDKDDATSLP : 427
Tc-ace2 : EAKTISLQQWNSYS--GILSEPSAPTIDGVFMPKHPMDMLAEGDYEDMEILVGSNQDEGTMEILYDFIDYFDKDGPSFLQ : 410
Nc-ace1 : DAKTISVQQWNSYF--GILSEPSAPTIDGVFLPKHPLDLLKEGDFQDTEILIGSNQDEGTMEILYDFIDYFDKDGPSFLQ : 447
Tc-ace1 : DPIDLVNNMFGTL--GICESPEVPVIDGAFLDESPTRALANKNFKKTNILMGSNTEEGYMEIITYLTELFRKEENVYVN : 415
Nc-ace2 : NASELVENMFGTL--GICEVPEVPVIDGAFLDDLPRVSLATKNFKKTNILMGSNTEEGYMEIITYLTELFRKEENVYVN : 408
Tc-ace : KPQELIDVENNVLPFDSIFRSEVPVIDGEFFPTSLSEMLNSGNFKKTQILLGVNKDEGSHELLYAGP-FSKDSESKIS : 369

Md-ace : RDKYLEIMNNIFQKASQAEREAIIFQYTSWE-GNPGYQNNQQIGRAVGDHFFTPTNEYAQAALAEERGASVHYFFTHRTS : 545
Im-ace : RDKYLEIMNNIFGKATQAEREAIIFQYTSWE-GNPGYQNNQQIGRAVGDHFFTPTNEYAQAALAEERGASVHYFFTHRTS : 506
Tc-ace2 : RDKYHDIIDTIFKNMSRLERDAIVFYQTDWEHVNDGYLNQKMGVDVVDGYFFIQTPTNDFAEALAEERGKMYFFTHRTS : 490
Nc-ace1 : RDKFLDIINTIFKNFTRLERDAIFQYTDWEHANDGYLNQKMGVDVVDGYFFIQTPTNLFQAQAFSDHGLKVFYFFTHRTS : 527
Tc-ace1 : RQEFLLRAVELNPFYFNAISRQAIVFYETDNLNPDVPSNRDSDLMVGDYHFTCNVNEFAHRYAETGNTVVMYXXKHRTV : 495
Nc-ace2 : RDEFLHAVHELNPFYVNNVARQAIVFYETDNLNPDVPSNRDSDLMVGDYHFTCNVNEFAHRYAETGNTVVMYXXKYSI : 488
Tc-ace : REDFMGKVLSPVPHANDGLDAVTLYQTDWMDNNGIKNRDGLDDIVGDHNVICPLMHFVNKYTFKNGTYLYFFNHRAS : 449

Md-ace : TSLGGEWMGVVHGDEIEYFFGQPLNNSLQYRPVERELGKRMLNSVIEFAKSGNPAVDGE-----EWPNFKSKEDPVYYVF : 619
Im-ace : TSLGGEWMGVVHGDEIEYFFGQPLNNSLQYRPVERELGKRMLNSAVIEFAKTGNPAQDGE-----EWPNFKSKEDPVYYVF : 580
Tc-ace2 : TSLGGEWMGVVHGDEIEYVFGHPLNMSLQFNSRERELSLKIMQAFARFAATGKPVTDV-----NWPLYIKDQPYFIF : 564
Nc-ace1 : TSLGGEWMGVVHGDEIEYVFGHPLNMSLQYNARERDLSLRIMQAYSRFALTGKPVSDI-----NWPYISREQPYFIF : 601
Tc-ace1 : ANPWSWTGVVHDAEINNVFGPELNPTKSHTAQEVVLSKRIMRYWANFAKTGNPSQSPNGVWTPPTFWPPHTAFGREFTL : 575
Nc-ace2 : GNPWSWTGVVHDAEINNVFGPELNPILNYHPQEVLSKRIMRYWANFAKTGNPSMEDGTWTATYVWHTAYGREYLT : 568
Tc-ace : NLVWPEWMGVVHGDEIEYVFGPLVVKELNYTAEELSSRRIMHYWATFAKTGNPNPEHS--QESKWPLFTTKEQKFIDL : 526

Md-ace : STDEKIEKLQRGPLAKRCSFWNDYLPKVRSWIGSEC----ENKSSTSASAAIYEMKMQQLTLLAVAILTMVNSIFQ-- : 692
Im-ace : STDDKIEKLARGPLAARCSFWNDYLPKVRSWAGTCD----GDSGSASISPLQLLGLIAALIYICAAALTRKRV----- : 649
Tc-ace2 : NADK--NGIGKGPRTACAFWNDFLPKLRDNP-----KFNRCSLHH----- : 604
Nc-ace1 : NAEK--SGIGKGPRTACAFWNDFLPRLRGQPDPECLADVAEVETSSPLVDNVSDNSTSTTFKPCVTITVLGLLLTI-- : 677
Tc-ace1 : DVNS--TATGRGPRLKQAFWKYLPQLQQTSSELLNQ--PPRQNCDA--SSLRWSRDGAAGLLMVSTVAALLAGPF : 648
Nc-ace2 : DVNS--TATGRGPRLKQAFWKYLPQLIAAT--EKIQA--PVVETCTGAA--GEARVAWSLIAMAFALCVV----- : 632
Tc-ace : NTEP--MKVHQRLRVQMCVFWNQFLPKLLNAT--ETIDE--AERQWKTEFHRWSSYMMHWKNQFDHYSRHESCAEL---- : 596

```

图 3.13 黑尾叶蝉 *Ncace1*、*Ncace2* 与家蝇、黑腹果蝇、电鳐、赤拟谷盗 *ace* 基因的多序列比对。

**Fig.3.13 Comparison of the deduced amino acids sequence of *Ncace1* and *Ncace2* with those of *Musca domestica*, *Drosophila melanogaster*, *Tetronarce californica* *Tribolium castaneum* and *Blattella germanica*.**

比对采用 ClustalX 软件。红色框内为催化三联体；蓝色框内为 14 个芳香族氨基酸（芳香族氨基酸谷内表面）；绿色框内为氧阴离子洞；紫色框内为形成二硫键的半胱氨酸；昆虫

AP-AChE 特异性半胱氨酸上方有星号标记

The alignment was performed using ClustalX program. The catalytic triads are framed by red box; 14 aromatic residues are suggested by blue box; Oxianion hole are shown in green box; Cys for three inter disulfide bonds are in violet box; insect-specific Cys in the AP-AChE are shown with a star.

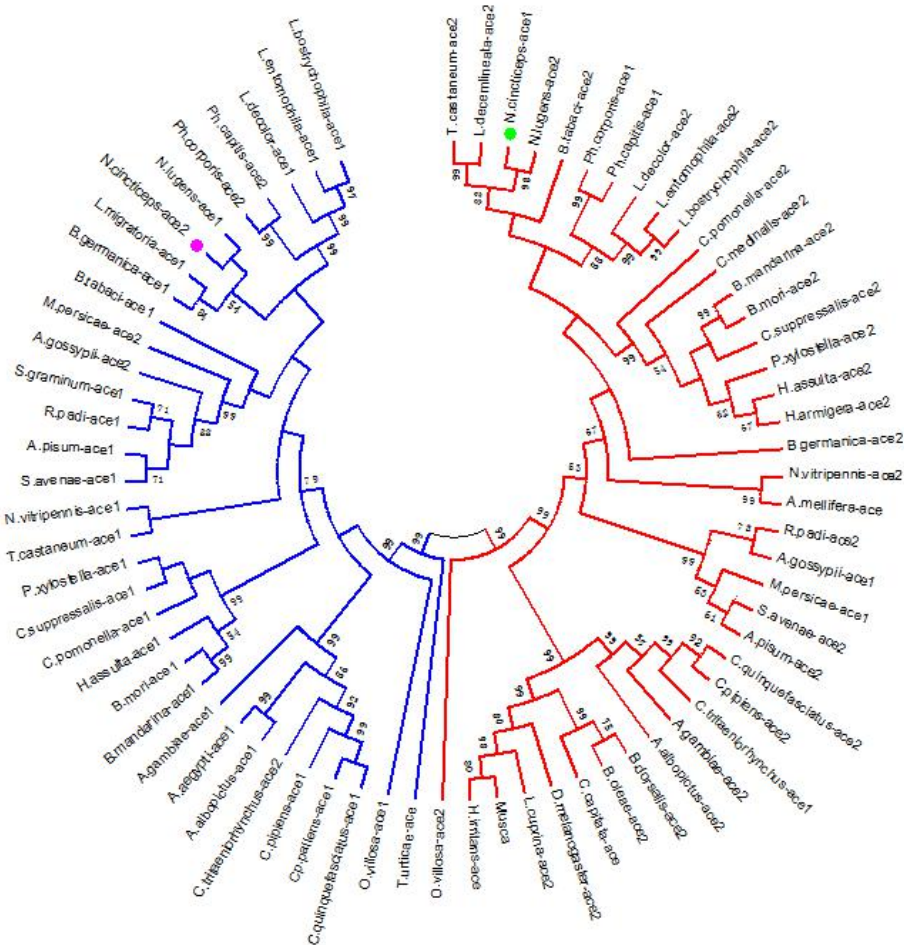


图 3.14 黑尾叶蝉与其他昆虫及非昆虫 *ace* 的系统进化分析

**Fig.3.14 Phylogenetic tree of deduced *ace* amino acid sequence from *Nephotettix cincticeps* and other species.**

多序列对比采用 Clustal X 1.81, 进化树构建使用 Mega 5.05。结点上数字表示 1,000 次重复的引导值。

Multiple sequence alignment used Clustal X 1.81, and phylogenetic tree was constructed by Mega 5.05. Numbers in the nodes correspond to bootstrap values in 1,000 replicates.

*Tribolium castaneum* ace1: HQ260968; *Tribolium castaneum* ace2: HQ260969; *Bombyx mandarina* ace1: EU262633; *Bombyx mandarina* ace2: EU262632; *Sitobion avenae* ace1: AY819704; *Sitobion avenae* ace2: AY707319; *Rhopalosiphum padi* Ace1: AY667435; *Rhopalosiphum padi* ace2: AY707318; *Drosophila melanogaster* ace2: X05893; *Anopheles gambiae* ace1: XM\_321792; *Anopheles gambiae* ace2: BN000067; *Liposcelis decolor* ace1: FJ647186; *Liposcelis decolor* ace2: FJ647187; *Orchesella villosa* ace1: FJ228227; *Orchesella villosa* ace2: FJ228228; *Liposcelis entomophila* ace1: EU854149; *Liposcelis entomophila* ace2: EU854150; *Blattella germanica* ace1: DQ288249; *Blattella germanica* ace2: DQ288847; *Bemisia tabaci* ace1: EF675188; *Bemisia tabaci* ace2: EF675190; *Culex quinquefasciatus* ace1: XM\_001847396; *Culex quinquefasciatus* ace2: XM\_001842175; *Bombyx mori* ace1: NP\_001037380; *Bombyx mori* ace2: NP\_001108113; *Acyrtosiphon pisum* ace1: XM\_001948618; *Acyrtosiphon pisum* ace2: XM\_001948953; *Nasonia vitripennis* ace1: XM\_001600408; *Nasonia vitripennis* ace2: XM\_001605518; *Pediculus humanus corporis* ace1: AB266605; *Pediculus humanus corporis* ace2: AB266606; *Cydia pomonella* ace1: DQ267977; *Cydia pomonella* ace2: DQ267976; *Helicoverpa assulta* ace1: DQ001323; *Helicoverpa assulta* ace2: AY817736; *Aedes albopictus* ace1: AB218421; *Aedes albopictus* ace2: AB218420; *Aphis gossypii* ace1: AF502081; *Aphis gossypii* ace2: AF502082; *Culex tritaeniorhynchus* ace1: AB122151; *Culex tritaeniorhynchus* ace2: AB122152; *Schizaphis graminum* ace1: AF321574; *Myzus persicae* ace1: AF287291; *Myzus persicae* ace2: AY147797; *Culex pipiens* ace1: AJ489456; *Culex pipiens* ace2: AM159193; *Musca domestica* ace2: AY134873; *Plutella xylostella* ace1: AY970293; *Plutella xylostella* ace2: AY061975; *Chilo*

*suppressalis ace1*: EF453724; *Chilo suppressalis ace2*: EF470245; *Cnaphalocrocis medinalis ace2*: FN538987; *Pediculus humanus capitis ace1*: AB266614; *Pediculus humanus capitis ace2*: AB266615; *Tetranychus urticae ace*: AY188448; *Aedes aegypti ace1*: EF209048; *Locusta migratoria manilensis ace1*: EU231603; *Liposcelis bostrychophila ace1*: FJ647185; *Liposcelis bostrychophila ace2*: EF362950; *Nilaparvata lugens ace1*: HQ605041; *Nilaparvata lugens ace2*: JN688930; *Apis mellifera ace*: AB181702; *Bactrocera dorsalis ace2*: AY155500; *Haematobia irritans ace*: AY466160; *Culex pipiens pallens ace1*: AY762905; *Helicoverpa armigera ace2*: AF369793; *Bactrocera oleae ace*: AF452052; *Lucilia cuprina ace*: U88631; *Nephotettix cincticeps ace1*: AF145235; *Nephotettix cincticeps ace2*: AY256851; *Leptinotarsa decemlineata ace2*: L41180.

### 3.2.6 黑尾叶蝉 AChE 基因表达的发育动态分析

黑尾叶蝉不同时期、不同组织 *Ncace1* 和 *Ncace2* 的相对表达水平如图 3.15 和图 3.16。总体来说, *Ncace2* 的表达水平高于 *Ncace1*, 并且在卵、二龄若虫中差异性显著。卵中 *Ncace1* 和 *Ncace2* 的表达水平均显著高于其他时期。黑尾叶蝉 *Ncace1* 和 *Ncace2* 均在脑中高表达, 且 *Ncace2* 表达水平高于 *Ncace1*。

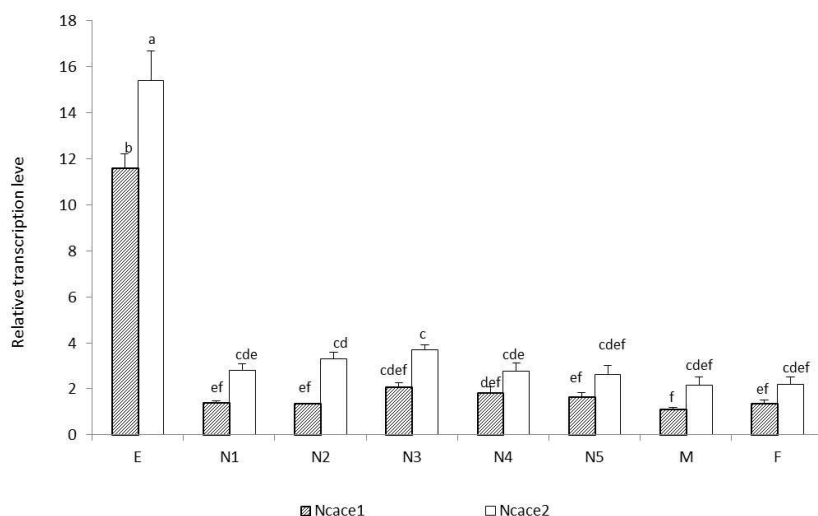


图 3.15 黑尾叶蝉不同时期 *Ncace1* 和 *Ncace2* 基因的表达水平

**Fig.3.15 qPCR analysis of *Ncace1* and *Ncace2* mRNA levels in the *Nephrotettix cincticeps* at different stages**

差异分析方法采用 t 检测，不同字母代表了在 0.05 水平上存在显著性差异，下图同之

T test was used to analyze the significance level of difference. Means  $\pm$  SE followed by different letters are significantly different at the 5% significance level for *Ncace1* or *Ncace2*, as the same with later.

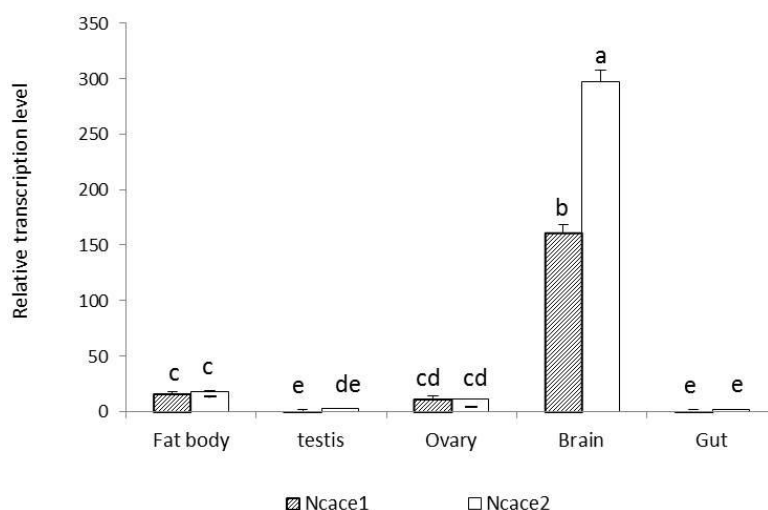


图 3.16 黑尾叶蝉不同组织 *Ncace1* 和 *Ncace2* 的表达水平

**Fig.3.16 qPCR of *Ncace1* and *Ncace2* in different tissues of *Nephrotettix cincticeps***

### 3.3 讨论

AChEs 是一种丝氨酸水解酶，存在于哺乳动物、鱼类、爬行动物、鸟类、线虫和昆虫等具有胆碱能神经的神经元与神经肌肉接头处，能够特异性将神经元突触间兴奋性神经递质 ACh 水解成乙酸和胆碱，在神经传导中起重要作用（Katz, 1966; Barnard, 1974; Quinn, 1987; Sussman *et al.*, 1991; Raves *et al.*, 1997; Taylor & Radic, 1994; Soreq & Seidman, 2001; Tsim & Soreq, 2012）。最早在黑腹果蝇克隆出第一条昆虫 *ace* 基因(Hall

& Spierer, 1986; Pang *et al.*, 1996), 2002 年在麦二叉蚜中克隆出第一条黑腹果蝇 *ace* 旁系同源基因 (Gao *et al.*, 2002)。到目前为止, 已经和克隆和测序了 43 种昆虫 *ace* 基因, 其中至少 27 种昆虫中发现了两条 *ace* 基因 (Lu *et al.*, 2012)。除了双翅目环裂亚目部分昆虫如黑腹果蝇 (Weill *et al.*, 2002) 和家蝇 (Fournier *et al.*, 1998a) 等只含有一条 *ace* 基因外, 其他昆虫都含有两个 *ace* 基因。

与大多数昆虫相似, 黑尾叶蝉体内有两条 *ace* 基因。推导的氨基酸序列分别编码 677 和 632 个氨基酸, 具有 *ace* 基因的保守功能域, 如催化三联体、酰基口袋、芳香族氨基酸形成的谷内表面、氧阴离子洞、六个高度保守的 Cys 形成分子内二硫键、保守的胆碱标识序列 FGESAG 等。黑尾叶蝉 *ace1* 存在一个与果蝇 Cys290 位置相同的昆虫特异性 Cys312。该 Cys 在果蝇 *ace* 基因旁系同源的昆虫 AChE 中特异性存在, 而人类 *ace* 基因中改为点突变为 Phe, 因此可以用于开发特异性、环境友好型的新型农药响 (Pang *et al.*, 2009b, 2011, 2012)。

黑尾叶蝉 *Ncace1* 基因最早由 Tomita 等 (2000) 上传, 而 *Ncace2* 基因则为 Nabesima 等 (2003) 上传。Tomit 等 (2000) 克隆了对氨基甲酸酯类杀虫剂抗性和敏感种群黑尾叶蝉 *Ncace1* 序列, 发现敏感种群并未发生突变, 而敏感种群中却发现了氨基酸的替换, 因此推测氨基酸多态性的缺失导致了抗性种群 *Ncace1* 对杀虫剂的不敏感性。在昆虫的两条 *ace* 基因中, 一般 *ace1* 是有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的靶标, 同时与杀虫剂抗性相关的突变也发生在 *ace1* 上。通过进化分析发现, 黑尾叶蝉 *ace* 的基因编号与传统昆虫 *ace* 分类不一致, 其 *ace1* 基因与果蝇 *ace* 直系同源, 应属 *ace2*, 而 *ace2* 基因与果蝇 *ace* 旁系同源, 应属 *ace1*。本文沿用前人已报道的编号。在抗性与敏感黑尾叶蝉种群中, 如果 *ace* 基因发生突变, 导致了对氨基甲酸酯类杀虫剂的抗性, 那么突变应该发生在黑尾叶蝉 *Ncace2* (相当于其他昆虫 *ace1*), 而非 *Ncace1* 中, 因此 Tomita 等的结果可能还需要进一步在抗性与敏感种群 *ace2* 中验证。

昆虫中两条 *ace* 基因的表达模型也不尽相同。在小菜蛾、德国小蠊、

棉铃虫、体虱和臭虫等中, *ace1* 的转录水平约为 *ace2* 的 2~250 倍 (Baek *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006, 2007; Seong *et al.*, 2012)。一般情况下, *ace1* 主要在神经中转录, 而 *ace2* 则广泛存在各个组织, 这意味着两种 AChE 可能承担着不同的功能。黑尾叶蝉两个 *ace* 基因均在脑中高表达, 且 *ace2* 基因在不同时期、不同组织中转录水平均高于 *ace1*, 这与褐飞虱的表达模型基本一致。褐飞虱 *ace* 基因表达量最高的组织均为头部, 且 *ace1* 在不同时间昆虫中均高于 *ace2* (Li *et al.*, 2012)。

AChE 是目前发现催化效率最高的水解酶, 其抑制剂是第一代治疗阿兹海默症的药品 (Taylor & Radic, 1994; Li *et al.*, 2015)。在昆虫中, AChE 是杀虫剂有机磷及氨基甲酸酯类农药的靶标, *ace* 基因突变可是昆虫产生对杀虫剂的抗药性 (Fournier, 2005; Oakeshott *et al.*, 2005), 体外表达的重组 AChE 可用来检测农药残留 (Fulton & Key, 2001; Schulze *et al.*, 2003)。昆虫 *ace* 基因特异性半胱氨酸可以用于开发高效安全的新型农药 (Pang *et al.*, 2009b, 2011, 2012)。由于 AChE 独特的分子特性及其广泛的应用前景, 目前受到了科学家越来越多的关注, 本文克隆了黑尾叶蝉 *ace* 基因, 为昆虫 AChE 的应用奠定分子基础, 并为农药害虫黑尾叶蝉的防治提供理论依据。

## 第四章 黑尾叶蝉 AChE 基因原核表达及多克隆抗体制备

为探讨黑尾叶蝉感染 RDV 后对有机磷敏感性显著降低（梁莉，2010）的产生机制，本文检测、比较了带毒与不带毒叶蝉体内解毒酶（P450s、Ests 和 GSTs）和靶标酶（AChEs）的活性。结果发现带毒叶蝉体内 AChEs 活性显著增高（本文第二章）。为此，本文在检索 GenBank 数据库中已登录黑尾叶蝉 AChEs 基因序列信息的基础上，设计特异性引物，克隆获得了该叶蝉的 *Ncace1* 和 *Ncace2* 基因 cDNA 全长序列，并检测发现带毒叶蝉体内该 2 条 AChE 基因的转录水平均有显著提高（本文第三章）。为明确 RDV 感染对叶蝉 AChE 基因在蛋白水平上的影响，本章将获得的 2 条 AChE 基因克隆至原核表达载体中，进而转化至大肠杆菌 *Escherichia coli* 中诱导表达，利用获得的重组 AChE 蛋白制备得到相应的多克隆抗体。本章结果为进一步研究黑尾叶蝉 AChE 的功能提供基础。

### 4.1 材料与方法

#### 4.1.1 主要试剂

试验用的主要试剂包括：克隆所用 *Ncace1* 和 *Ncace2* 引物（表 4.1）（上海生工合成），限制性内切酶（*NcoI* 和 *XhoI*）、T4 连接酶等（大连宝生），PCR 纯化试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒（美国 Axygen）。IPTG、氨苄青霉素（Amp）（上海生工），BugBuster Master Mix（德国 Novagen）。TransStart FastPfu PCR SuperMix、2xEasyTaq PCR SuperMix（北京全式金）。

#### 4.1.2 黑尾叶蝉 AChE 基因原核表达载体的构建

根据克隆获得的 *Ncace1* 及 *Ncace2* 基因序列设计、合成相应的特异

性引物：上游引物带有 *Nco*I，下游引物带有 *Xho*I 酶切位点。以黑尾叶蝉 cDNA 作 PCR 模板，用 TransStart Fastpfu PCR SuperMix 试剂盒（北京全式金）进行 PCR 扩增。

取 0.2 mlPCR 管，依次加入以下：

|                                    |             |
|------------------------------------|-------------|
| Template                           | 4μl         |
| SP（10μM）                           | 2μl         |
| AP（10μM）                           | 2μl         |
| 2x TransStart FastPfu PCR SuperMix | 25μl        |
| ddH <sub>2</sub> O                 | Up to 50 μl |

PCR 程序：

|     |        |             |
|-----|--------|-------------|
| 94℃ | 5 min  |             |
| 94℃ | 20 sec | } 30 cycles |
| 54℃ | 20 sec |             |
| 72℃ | 2 min  |             |
| 72℃ | 5 min  |             |

取 5μl PCR 产物进行 1% Agarose 凝胶电泳。如有相应分子量的条带，将 PCR 体系放大到 200μl（分 4 管，各 50μl）扩增。

表 4.1*Ncace1* 和 *Ncace2* 原核表达中使用的引物

| Table 4.1 Primers used toprokaryotic expression of <i>Ncace1</i> and <i>Ncace2</i> gene |                                         |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 引物名称                                                                                    | 引物序列                                    |
| Ncace1-NcoI-SP                                                                          | 5'-CATGCCATGGCGAGGTTGAGGTTCTCCACGTTG-3' |
| Ncace1-XhoI-AP                                                                          | 5'CCGCTCGAGTTATATCGTCAGCAGCAG-3'        |
| Ncace2-NcoI-SP                                                                          | 5'-CATGCCATGGTGTGGCTGTGCC-3'            |
| Ncace2-XhoI-AP                                                                          | 5'-CCGCTCGAGTTACGCGACACAGAGC-3'         |

采用 AxyPrep PCR Clear up Kit 试剂盒（美国 Axygen）在室温下操作。步骤如下：

（1）取 PCR 产物，加入 5 倍体积的溶液 Buffer PCR-A（若 Buffer PCR-A

- 不足 100  $\mu\text{l}$ ，加至 100  $\mu\text{l}$ ），混匀后加入到制备管中，将制备管置于 2 ml 离心管（试剂盒提供）中，12,000 $\times$ g 离心 1 min，弃滤液。
- (2) 将制备管放回 2 ml 离心管中，加入 700  $\mu\text{l}$  的 W2，12,000 $\times$ g 离心 1 min，弃滤液。
- (3) 重复步骤 (2)
- (4) 将制备管放回 2 ml 离心管，12,000 $\times$ g 离心 1 min。
- (5) 将制备管置于洁净的 1.5 ml 的离心管中，在制备管膜中央加 25-30  $\mu\text{l}$  65-70 $^{\circ}\text{C}$  预热的 Eluent 或去离子水，室温静置 1 min。12,000 $\times$ g 离心 1 min 洗脱 DNA。洗脱 DNA 即可用于后续实验或于 -20 $^{\circ}\text{C}$  保存。

取纯化的 PCR 产物以及原核表达载体 pET-32a 采用 *Nco*I 和 *Xho*I 内切酶（大连宝生）进行双酶切。

|              |                        |
|--------------|------------------------|
| <i>Nco</i> I | 5 $\mu\text{l}$        |
| <i>Xho</i> I | 5 $\mu\text{l}$        |
| 10xK Buffer  | 6 $\mu\text{l}$        |
| 0.1% BSA     | 6 $\mu\text{l}$        |
| DNA          | 3 $\mu\text{g}$        |
| 灭菌水          | up to 60 $\mu\text{l}$ |

37 $^{\circ}\text{C}$  过夜。

PCR 产物和质粒双酶切后分别进行切胶纯化、回收，并对双酶切质粒末端采用磷酸酶（*Alkaline Phosphatase Calf intestine*，大连宝生）进行去磷酸化。在 250  $\mu\text{l}$  PCR 管中依次加入：

|                                  |                        |
|----------------------------------|------------------------|
| pET-32a DNA                      | 30 $\mu\text{l}$       |
| 10xAP Buffer                     | 5 $\mu\text{l}$        |
| CIAP(0-30 units/ $\mu\text{l}$ ) | 2 $\mu\text{l}$        |
| ddH <sub>2</sub> O               | up to 50 $\mu\text{l}$ |

在 PCR 仪上设置程序：37 $^{\circ}\text{C}$ ，15 min; 50 $^{\circ}\text{C}$  15 min。

将酶切质料的去磷酸化产物进行纯化、回收，再与经纯化的双酶切

PCR 产物进行连接反应。在 250  $\mu$ l PCR 管中依次加入：

|                       |                  |
|-----------------------|------------------|
| 10x DNA Ligase Buffer | 2.5 $\mu$ l      |
| PCR DNA               | 10 $\mu$ l       |
| pET-32a DNA           | 2.5 $\mu$ l      |
| T4 DNA Ligase         | 1 $\mu$ l        |
| ddH <sub>2</sub> O    | Up to 25 $\mu$ l |

16℃ 过夜。将连接产物转化至大肠杆菌 Rosetta 菌株中（第三章 3.1.3.6），并进行菌落 PCR 筛选（第三章 3.1.3.7）。确认包含重组子的克隆，扩大培养，获得的菌液一部分送上海铂尚生物公司用 T7promoter 和 T7terminator 引物测序（若载体自连，通用引物扩增，自连带大小为 700bp）。将测序确认重组正确的相应另一部分菌液进行抽提质粒，置于 -20℃ 中保存。构建成功 *Ncace1* 及 *Ncace2* 重组质粒分别命名为 *Ncace1/pET-32a*、*Ncace2/pET-32a*。

#### 4.1.3 黑尾叶蝉 AChE 基因的原核表达

##### 4.1.3.1 重组蛋白的诱导表达

- (1) 挑取含重组单菌落于含 100ug/ml Amp 的 LB 培养液中，在水平摇床上 37℃、300 rpm 培养 5h。
- (2) 取 10ml 上述菌液，加入到 1L 含 100ug/ml Amp 的新鲜 LB 培养液中，37℃、300 rpm 培养 2h，至 OD<sub>600</sub> 值约为 0.6。
- (3) 加入 500mmol/L 的 IPTG 至终浓度为 0.5mmol/L，18℃、180rpm 低温诱导 16h。

##### 4.1.3.2 重组表达蛋白的纯化

- (1) 将诱导表达的菌液转移至 50ml 离心管中，5,000×g、4℃ 离心 10min。去上清，收集菌体。
- (2) 加入 BugBuster Master Mix（德国 Novagen），每 50ml 菌液加 1ml。用枪头吹打使菌体完全悬浮，室温下，缓慢摇晃孵育 20min。4℃、12,000×g 离心 15min。

- (3) 将上清转移至新的离心管中，沉淀一部分用 0.01M PBS 重新悬浮，用于 SDS-PAGE 检测。沉淀即为包涵体。
- (4) 通过 SDS-PAGE 检测，可根据条带的分子量大小，粗细判断重组蛋白是否表达，及主要在上清还是沉淀中。若在上清中，则可溶解后直接用 Ni-柱纯化，若在上清中则按一下步骤继续。
- (5) 用蒸馏水 10 倍稀释的 BugBuster Master Mix 重悬浮沉淀，加入体积与（2）中加入的 BugBuster Master Mix 的体积相同。充分震荡混匀。4℃、5,000×g 离心 15min。将上清转移至新离心管中保存备用检测。
- (6) 重复步骤（4）三次。最后一次离心为 4℃、15,000×g 离心 15min。所得沉淀即为包涵体。用 Protein Refolding Kit 试剂盒（德国 Novagen 70123）溶解包涵体。根据试剂盒说明书配制包含体溶解液（5 ml 10x IB solubilization buffer + 0.5ml 30%N-lauroylsarcosine + 50ul 1M DTT + 44.45ml 双蒸水）。称量步骤（5）所得沉淀的重量，根据称重加入配好的包含体溶解液重新悬浮沉淀，预计蛋白终浓度为 10-20mg/ml。室温静置 15min。4℃、15,000×g 离心 15min。上清即为溶解的重组蛋白。

#### 4.1.3.3 重组表达蛋白的 SDS-PAGE 检测

(1) SDS-PAGE 凝胶配制：配制 10%的分离胶和 5%的浓缩胶。

(2) 样品处理

分别取 30  $\mu$ l 上清和重悬的沉淀于不同 1.5 ml 离心管，加入 10  $\mu$ l 4xSDS-PAGE 上样缓冲液，混匀后煮沸 5 min，12,000×g 离心 1 min。

(3) 上样和电泳

上清和沉淀各取 10  $\mu$ l 上样，蛋白标准分子量上样 5  $\mu$ l，进行 SDS-PAGE。程序为：80V，15 min；180 V，40-60 min。

(4) 染色和脱色

SDS-PAGE 结束后，取出胶于大培养皿中，加入考马斯亮蓝 R250 染色液染色 30 min（浸没胶即可）。然后倒掉染色液，加入 50-80 ml 考马斯亮蓝脱色液，经常换脱色液，直到条带清晰。

#### 4.1.4 黑尾叶蝉重组 AChE 蛋白的多克隆抗体制备

通过 SDS-PAGE 检测，确定重组蛋白以包涵体的形式存在，通过纯化，溶解包涵体后，用 PBS 透析，更换缓冲液，即可用于多克隆抗体的免疫原。将纯化好的重组蛋白送杭州华安生物有限公司制备多克隆抗体。

#### 4.1.5 多克隆抗体的 Western blot 检测

多克隆抗体制备获得后，对重组表达蛋白和黑尾叶蝉可溶性蛋白提取液进行 Western blot 验证。步骤如下：

- (1) 转膜：将重组表达纯化后的蛋白及黑尾叶蝉可溶性蛋白提取液进行 SDS-PAGE 后，测量蛋白胶的大小，剪取与蛋白胶大小相同的 PDVF 膜 1 块、厚滤纸 2 块。PDVF 膜先用甲醇充分润湿，然后在半干转缓冲液中浸泡 15min。同时将滤纸、胶放入半干转缓冲液中，充分浸泡。在半干电转印仪上将其中一块滤纸放在最底层，然后依次放 PVDF 膜、蛋白胶、滤纸。对其，然后用干净的玻璃棒碾压赶走气泡。恒压电转，一般为 16V，16min，根据分子量大小调节电转时间长度。
- (2) 封闭：电转结束后，将 PVDF 膜放入干净的玻璃培养皿中，用 50ml TBS-T 洗膜 2 次，每次 5min。加入 50ml 5% BSA 的 TBS-T 封闭液，封闭 1h，或 4℃ 过夜。
- (3) 一抗孵育：封闭结束后，用 60ml TBS-T 洗膜 3 次，每次 5min。用含 5% BSA 的 TBS-T 稀释的一抗，一抗即制备的多克隆抗体，稀释倍数根据抗体浓度和效价。一抗室温孵育 1h。
- (4) 二抗孵育：用 50ml TBS-T 洗膜 5 次，每次 5min。用含 5% BSA 的 TBS-T 稀释的二抗，二抗为辣根过氧化物酶（HRP）标记的羊抗兔 IgG。二抗室温孵育 1h。
- (5) 显色：用 50ml TBS-T 洗膜 4 次，每次 5min，然后用 TBS 洗膜 5min。化学发光法显色。

## 4.2 结果与分析

### 4.2.1 黑尾叶蝉 AChE 基因原核表达载体的构建

通过设计特异性引物，正向引物末端添加 *Nco*I 酶切位点，反向引物末端添加 *Xho*I 酶切位点，克隆出 *Ncace1* 及 *Ncace2* 基因的开放编码框，琼脂糖凝胶电泳检测结果与预期一致（*Ncace1* 为 2,034bp，*Ncace2* 为 1,899bp，如图 3.1）。利用 *Nco*I 和 *Xho*I 双酶切目的基因 *Ncace1*、*Ncace2* 和 pET-32a 载体；回收目的条带与 pET-32a，用 T4 连接酶连接；并转化至 Trans-T1 感受态细胞，PCR 检测筛选阳性克隆，重组表达质粒经测序证实构建成功。

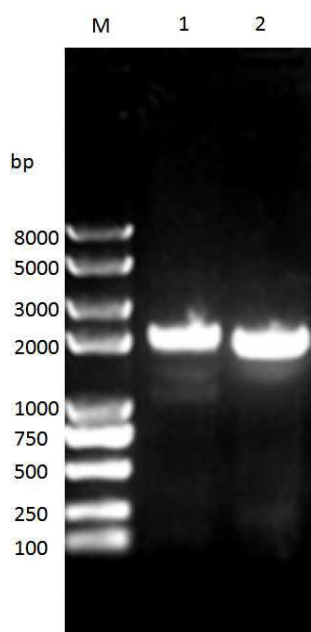


图 4.1 黑尾叶蝉 *Ncace1* 及 *Ncace2* 基因的 PCR 扩增

**Fig.4.1 PCR amplification of *Ncace1* and *Ncace2***

**genein *Nephotettix cincticeps***

M: DNA 分子量标准；

泳道 1: *Ncace1* PCR 扩增片段；

泳道 2: *Ncace2* PCR 扩增片段；

M: DNA molecular weight marker；

Lane1: PCR amplification of *Ncace1* fragment.

Lane2: PCR amplification of *Ncace2* fragment.

### 4.2.2 黑尾叶蝉 AChE 基因的原核表达

将构建好的表达载体转入大肠杆菌 Rosetta 菌株中，挑取阳性菌落振荡培养，加 IPTG 诱导表达。采用 BugBuster Master Mix(德国 Novagen)提取蛋白，经 SDS-PAGE 检测发现均有特异性条带出现，分子量大小在

70-100 kD 之间,与目的蛋白大小一致(图 4.2)。这表明 *Ncace1* 及 *Ncace2* 基因均已在大肠杆菌中成功表达。AChE 重组蛋白主要以包涵体的形式存在于沉淀中。用 10 倍稀释的 BugBuster Master Mix (德国 Novagen) 洗涤包涵体,纯化获得重组目的蛋白。

#### 4.2.3 黑尾叶蝉重组 AChE 蛋白的多克隆抗体制备

通过原核表达得到的重组 *Ncace1* 及 *Ncace2* 蛋白都以包涵体的形式存在,没有活性,但是可以作为抗原用于制备多克隆抗体。将纯化后的 *Ncace1* 及 *Ncace2* 蛋白送杭州华安生物有限公司制备相应的抗体。用纯化的 *Ncace1* 和 *Ncace2* 重组蛋白为样品进行 Western blot 验证(图 4.4)。结果表明, *Ncace1* 和 *Ncace2* 抗体均有效识别各自的重组蛋白,且分子量在 70-100 kD 左右。这表明 *Ncace1* 和 *Ncace2* 抗体制备成功。

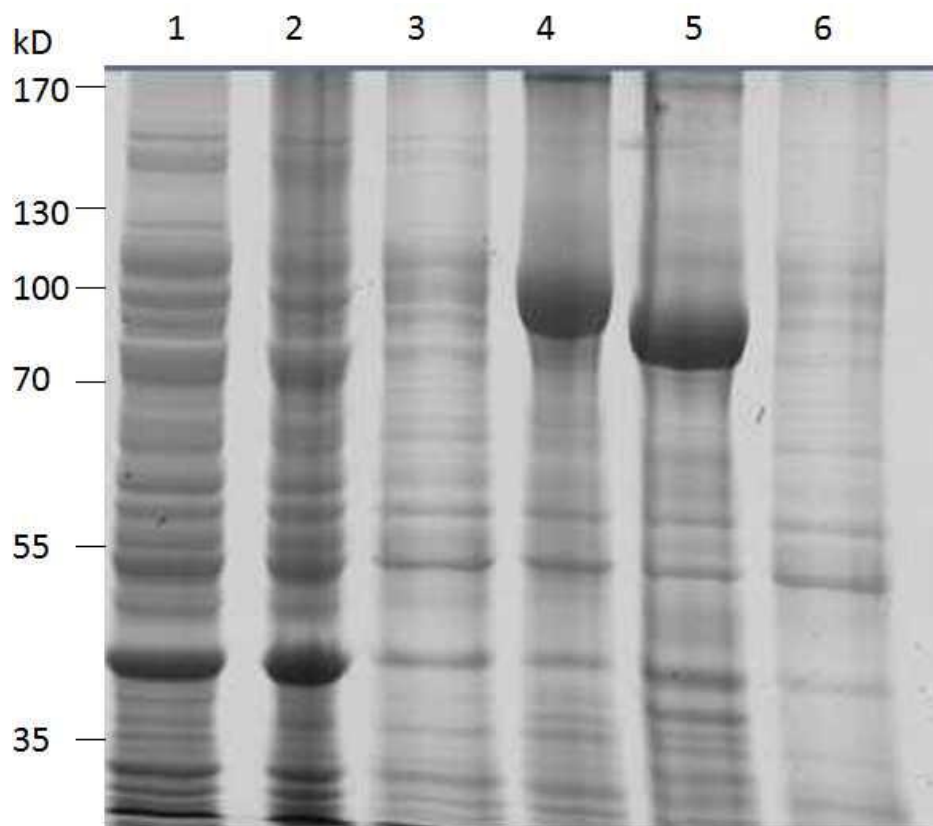


图 4.2 *Ncace1* 及 *Ncace2* 基因表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.4.2 SDS-PAGE analysis of expressed product for *Ncace1* and *Ncace2* gene

泳道 1：未诱导 *Ncace1*/pET-32a 菌体；泳道 2：未诱导的 *Ncace*/pET-32a 菌体；

泳道 3：诱导 *Ncace1*/pET-32a 菌体的上清；泳道 4：诱导 *Ncace1*/pET-32a 菌体的沉淀；

泳道 5：诱导 *Ncace2*/pET-32a 菌体的沉淀；泳道 6：诱导 *Ncace2*/pET-32a 菌体的上清。

lane 1: uninduced *E. coli* Rosetta cells containing *Ncace1*/pET-32a;

Lane 2:uninduced *E. coli* Rosetta cells containing *Ncace1*/pET-32a;

Lane 3: supernatant of the induced lysate of *E. coli* Rosetta cells containing *Ncace1*/pET-32a;

Lane 4: pellet of the induced lysate of *E. coli* Rosetta cells containing *Ncace1*/pET-32a;

Lane 5: pellet of the induced lysate of *E. coli* Rosetta cells containing *Ncace2*/pET-32a;

Lane 6: supernatant of the induced lysate of *E. coli* Rosetta cells containing *Ncace2*/pET-32a

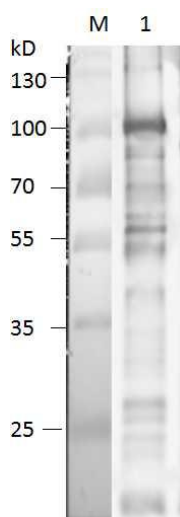


图 4.3 *Ncace1* 基因多克隆抗体的 Western blot 验证

**Fig.4.3 Western blotting verification of *Ncace1* polyclonal antibodies**

M: 标准蛋白样品；

泳道 1：稀释 1,000 倍的多克隆抗体 Western Blotting 结果；

M: molecular weight marker;

Lane1: Dilution 1,000 times of Polyclonal antibodies

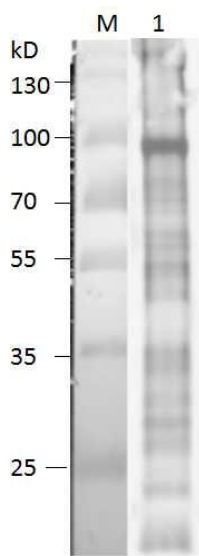


图 4.4 *Ncace2* 基因多克隆抗体的 Western blot 验证

**Fig.4.4 Western blotting verification of *Ncace2* polyclonal antibodies**

M: 标准蛋白样品；

泳道 1：稀释 1000 倍的多克隆抗体 Western Blotting 结果；

M: molecular weight marker;

Lane1: Dilution 1000 times of Polyclonal antibodies

以黑尾叶蝉可溶性蛋白提取液为样品对 Ncace1 及 Ncace2 蛋白的多克隆抗体进行 Western blot 验证 (图 4.5)。结果表明, 两个抗体都能杂交到特异性条带, 但 Ncace1 结合条带位置为 50kD 左右, 与通过基因预测蛋白分子量不相符, 可能是 *Ncace1* 基因存在可变剪切, 或形成亚基。而 Ncace2 结合条带位置为 70kD 左右, 与通过基因预测蛋白分子量相符。

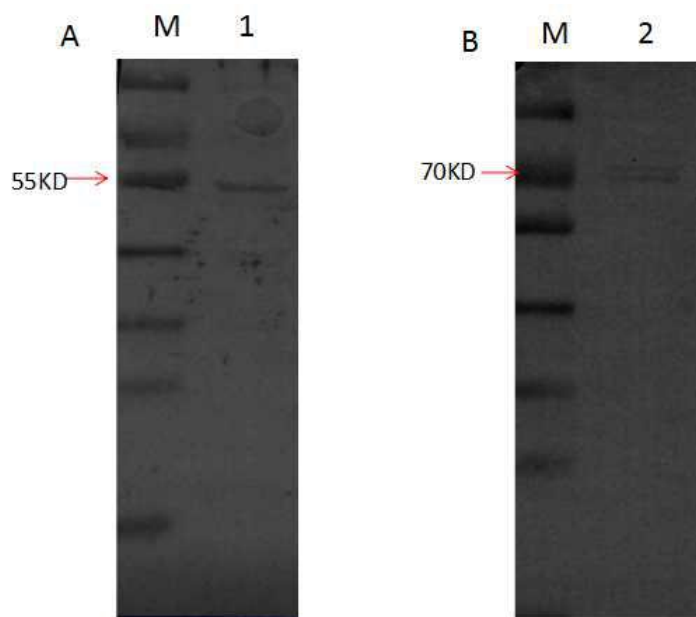


图 4.5 以黑尾叶蝉提取蛋白检测 Ncace1 及 Ncace2 抗体

**Fig.4.5 Detection of Ncace1 and Ncace2 antibody with green leafhopper extracted protein**

A: Ncace1 抗体泳道 M: 标准蛋白样品; 泳道 1: 黑尾叶蝉提取蛋白

B: Ncace2 抗体泳道 M: 标准蛋白样品; 泳道 2: 黑尾叶蝉提取蛋白

A: Ncace1 antibody

M:molecular weight marker;Lane1:green leafhopper extracted protein ;

B: Ncace2 antibody

M:molecular weight marker;Lane2:green leafhopper extracted protein .

### 4.3 讨论

本文用大肠杆菌 Rosetta 菌株诱导表达得到重组的 *Ncace1* 及 *Ncace2* 蛋白, 纯化并制备了多克隆抗体。对制备的多克隆抗体进行检测, 发现制备的两个多克隆抗体均能识别相应的重组蛋白。这可能是由于 *Ncace1* 及 *Ncace2* 同属于乙酰胆碱酯酶序列, 含有相同的酯酶保守域、底物结合位点及催化功能位点, 天然结构也十分相似, 因此具有相似的免疫原性。

SDS-PAGE 检测发现, *Ncace1* 和 *Ncace2* 均在大肠杆菌 Rosetta 菌株的包涵体中表达。包涵体的产生主要是由于重组蛋白合成速度太快, 来不及正确折叠、二硫键不能正确配对、蛋白之间非特异性结合增加、蛋白无法达到足够的溶解度等造成的, 也和重组蛋白本身的特性密切相关。包涵体中含有 50% 以上的重组蛋白, 其余均为核糖体原件、RNA 聚合酶、内毒素、外膜蛋白、质粒 DNA 以及多糖等, 密度很大, 无固定形状, 不溶于水, 可溶于变性剂如尿素、盐酸胍等。包涵体蛋白一般不具有生物学功能, 只具有目的蛋白的一级序列特征。*Ncace1* 和 *Ncace2* 属于膜蛋白, 疏水性较强, 因此较难表达。本研究制备了 *Ncace1* 和 *Ncace2* 多克隆抗体, 为 AChE1 和 AChE2 的功能研究奠定了基础, 也为 *Ncace1* 和 *Ncace2* 的真核表达做了铺垫。

目前只有东亚飞蝗、埃及伊蚊等少数昆虫的乙酰胆碱酯酶通过外源表达, 得到具有活性的重组乙酰胆碱酯酶, 这严重限制了 AChE 的生物学功能及高级结构的研究。另外, 具有活性的重组乙酰胆碱酯酶还能够用作生物传感器检测农药残留。因此乙酰胆碱酯酶的重组表达具有重要的意义。

## 第五章 RDV 感染对黑尾叶蝉 AChE 表达的影响

为进一步明确 RDV 感染对黑尾叶蝉 AChE 基因表达的影响,本章在克隆获得黑尾叶蝉 AChE 基因 *Ncace1* 和 *Ncace2* 全长 cDNA 序列以及使用原核重组表达蛋白制备获得多克隆抗体的基础上,采用实时定量 RT-PCR 技术和 Western 杂交技术,从基因转录水平和蛋白翻译水平分别检测、比较了带毒与不带毒叶蝉 AChE 基因表达水平的差异。。

### 5.1 材料与方法

#### 5.1.1 供试材料

供试黑尾叶蝉与水稻同第二章 2.1.1 和 2.1.2。

#### 5.1.2 RDV 感染对黑尾叶蝉 AChE 基因表达的影响

##### 5.1.2.1 取样

取单头感染与未感染 RDV 的黑尾叶蝉雌虫、雄虫和 5 龄若虫编号后,在冰上解剖获得头胸部和腹部。叶蝉腹部提取总 RNA,逆转录后用于 RDV 检测;对应编号的叶蝉头胸部提取总 RNA 和蛋白,分别用于 AChE 基因转录和的蛋白表达的检测。

检测时,以 10 个头胸部作为混合样品,每样品至少重复 3 次。蛋白表达分析时,在每样品中加入冰冷的 200  $\mu$ l 0.1M PBS(pH7.5),用匀浆品冰上浆后,4 $^{\circ}$ C 16,000 $\times$ g 离心 20 min,取上清。采用 BCA 法测定总蛋白浓度(第二章 2.5.2)。

##### 5.1.2.2 实时荧光定量 PCR 分析

RDV 的实时荧光定量 PCR 检测见第二章 2.1.4。*Ncace1* 和 *Ncace2* 基因实时荧光定量 PCR 检测见第三章 3.1.5。

检测 RDV 侵染影响黑叶蝉 AChE 基因转录时间动态时,将初羽化的

叶蝉成虫接到感染 RDV 的水稻上饲养，在接虫 2 d、4 d、6 d、10 d、14 d 和 18 d 后分别取样，按前述 5.1.2.1 和第三章 3.1.5 方法提取总 RNA、逆转录和实时荧光定量 PCR 检测 *Ncace1* 和 *Ncace2* 基因转录水平。

### 5.1.2.3 Western 杂交分析

将上清液用 PBS 稀释至相同蛋白浓度，加入 4x SDS-PAGE 上样缓冲液，混匀后煮沸 5 min， $12,000\times g$  离心 1 min。取等量上清上样进行 SDS-PAGE。用制备的 *Ncace2* 的多克隆抗体进行 Western 杂交。以  $\beta$ -actin 作为内参，通过比较目的条带灰度，分析带毒与不带毒黑尾叶蝉 AChE 蛋白含量的差异。

### 5.1.3 数据分析

采用 DPS 软件（唐启义和冯明光，2007）对各处理结果进行统计分析。其中，两样本平均数比较采用 Student *t* 检验，多样本平均数比较采用方差分析及其 Turkey 法检验。

## 5.2 结果与分析

### 5.2.1 RDV 感染对黑尾叶蝉 AChE 基因转录的影响

感染与未感染 RDV 的黑尾叶蝉 AChE 基因的转录水平如图 5.1 所示。与健康黑尾叶蝉相比，感染 RDV 的黑尾叶蝉 *Ncace1* 及 *Ncace2* 转录水平均显著升高，其中以雌虫体内 AChE 基因转录水平增加倍数最高，即 *Ncace1* 和 *Ncace2* 在感染 RDV 的黑尾叶蝉雌虫中分别提高 4.57 倍和 9.14 倍。

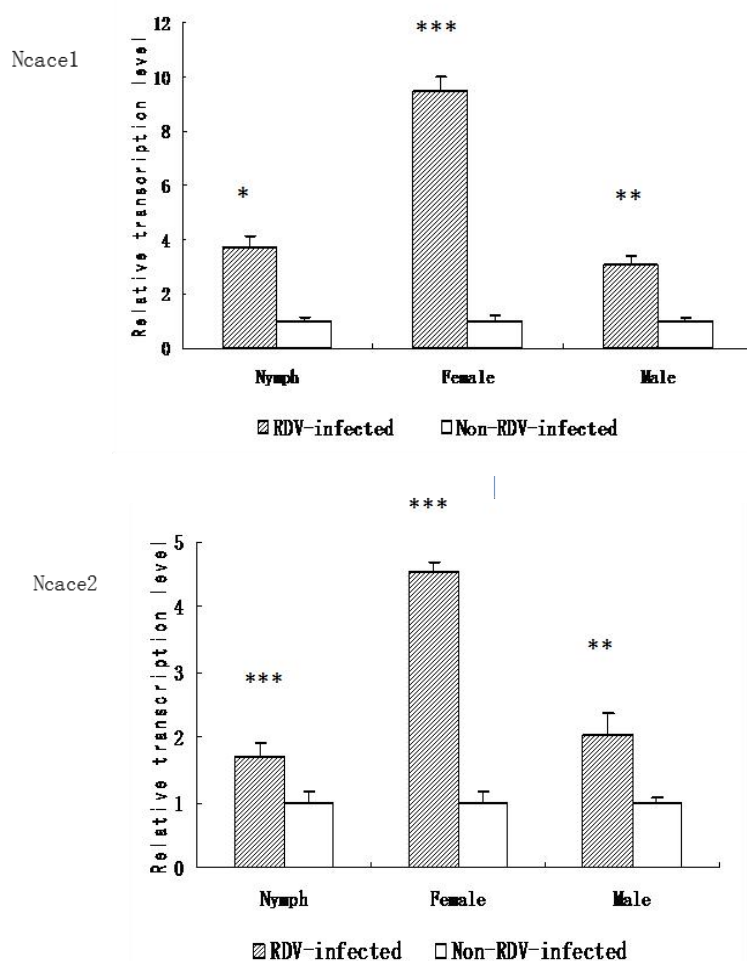


图 5.1 感染与未感染 RDV 黑尾叶蝉 *Ncace1* 及 *Ncace2* 基因转录水平的比较

**Fig.5.1 Comparison with the *Ncace1* and *Ncace2* transcription level of RDV infection and uninfected *N. cincticeps***

采用实时荧光定量 PCR 分析黑尾叶蝉取食健康和感染 RDV 水稻不同时间后 *Ncace1* 和 *Ncace2* 基因的转录水平变化 (图 5.2-5.3)。取食 RDV 水稻 2d 以后, 黑尾叶蝉 *Ncace1* 和 *Ncace2* 基因转录水平多比取食健康水稻的显著较高, 其中以 *Ncace1* 基因转录水平增高幅度相对较高。

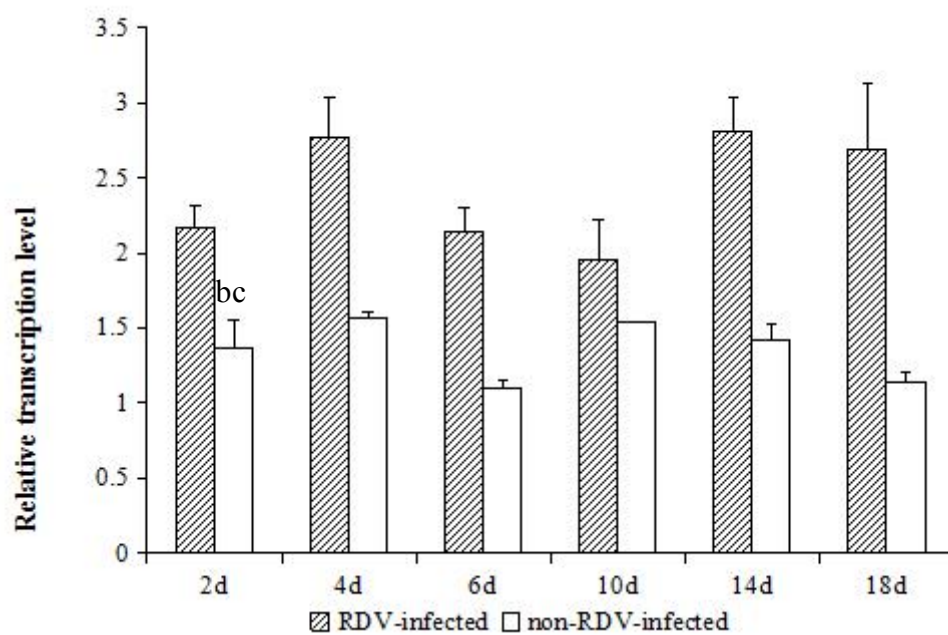


图 5.2 RDV 感染引起黑尾叶蝉 *Ncace1* 基因转录水平变化的时间动态

**Fig.5.2 Time dynamic development of transcription level of *Ncace1* gene caused by RDV infection**

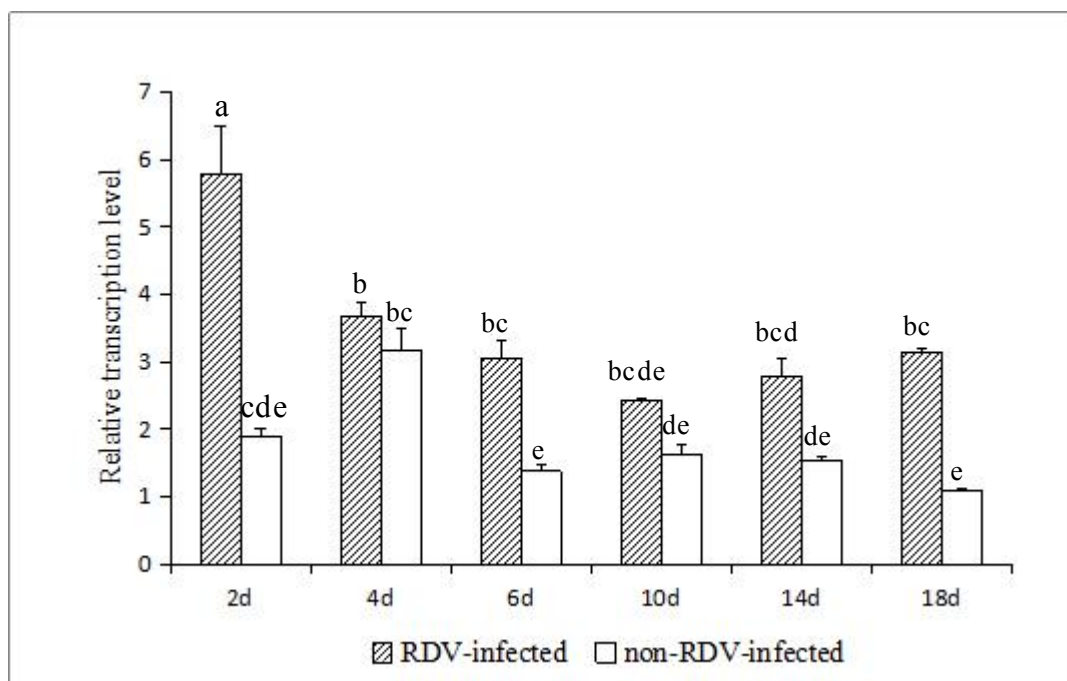


图 5.3 RDV 感染引起黑尾叶蝉 *Ncace2* 基因转录水平变化的时间动态

**Fig.5.3 Time dynamic development of transcription level of *Ncace2* gene caused by RDV infection**

### 5.2.2 RDV 感染对黑尾叶蝉 AChE 蛋白表达的的影响

以 $\beta$ -actin 作为内参，应用 Western 杂交方法测定、比较了带毒与不带毒黑尾叶蝉 AChE2 蛋白表达水平（图 5.4）。通过比较 Western 杂交条带深浅的灰度值差异，明确感染 RDV 的黑尾叶蝉 AChE2 蛋白表达水明显比未感染 RDV 的为高。

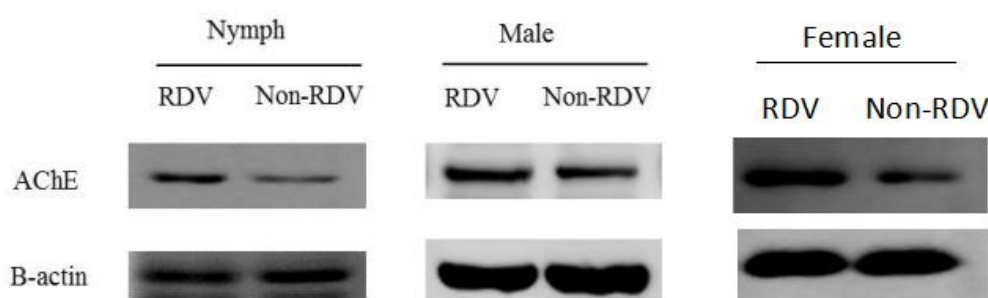


图 5.4 感染与未感染 RDV 黑尾叶蝉 *Ncace2* 蛋白表达水平的比较

**Fig.5.4 Comparasion with *Ncace2* expression level of RDV infection and non-infection *N. cincticeps***

## 5.3 讨论

植物病毒是农田生态系统的重要生态因子，不仅影响寄主植物的产量和品质等，还能够对其传播介体的生长发育、生物学特性和生态适应性等造成影响。研究植物病毒与媒介昆虫的相互影响有助于明确二者间的互作机制，为农业病虫害的防治提供新思路。从进化角度上来看，病毒对媒介昆虫的直接或者间接影响更倾向于促进植物病毒的流行和扩散。研究表明，多种植物病毒与媒介昆虫建立互利共生关系，并通过对媒介昆虫的偏利影响以增强其传播。Jiu 等（2007）发现在番茄黄化曲叶病毒（TYLCCNV）侵染的普通烟上发育羽化的 B 型烟粉虱雌成虫的产卵量比对照增加 18 倍，寿命也延长 7 倍。携带南方水稻黑条矮缩病毒（SRBSDV）的白背飞虱在稻株韧皮部的取食次数显著增加，有利于

SRBSDV 向健康植株的传播与扩散。前期研究表明, 感染 RDV 的黑尾叶蝉发育时间显著延长和产卵量显著增高 (梁莉等, 2010), 并对有机磷杀虫剂的敏感性显著低于未感染 RDV 的 (梁莉, 2010)。这说明 RDV 感染促进了黑尾叶蝉的生态适应性。本文研究发现, 带毒黑尾叶蝉体内有机磷靶标酶 (AChEs) 活性增强可能导致其对有机磷的敏感性显著降低 (见第二章结果)。为此, 本章克隆获得黑尾叶蝉 *Ncace1* 和 *Ncace2* 基因 cDNA 全长序列并经原核表达获得重组蛋白及其多克隆抗体的基础上, 分析比较了带毒与不带毒叶蝉体内 AChE 基因在转录和翻译水平上的差异。结果表明, 带毒叶蝉 AChE 基因 *Ncace1* 和 *Ncace2* 的转录水平均有显著提高, 并进而导致 AChE 蛋白表达量增高。这说明 RDV 感染可诱导黑尾叶蝉 AChE 基因转录与蛋白表达, 而 AChE 数量增多补偿了被有机磷抑制的活性部分, 从而降低了对有机磷的敏感性。有关 RDV 感染对黑尾叶蝉 AChE 基因表达的诱导机制至今尚不明了, 有待今后进一步研究。

## 第六章 黑尾叶蝉 AChE 基因的真核表达

为探讨 RDV 感染对黑尾叶蝉 AChE 功能的影响, 本文在检索 GenBank 获得黑尾叶蝉 AChE 基因序列信息的基础上, 克隆得到 *Ncace1* 和 *Ncace2* 基因的全长 cDNA 序列, 并在大肠杆菌中诱导表达获得重组原核表达蛋白。由于 AChE 为跨膜蛋白, 而且在大肠杆菌表达系统中缺乏基因翻译后的修饰功能, 因此获得的 AChE 重组原核表达蛋白缺少活性, 无法进行酶学功能研究。为此, 本章利用以杆状病毒表达载体系统 (Baculovirus expression vector system, BEVS) 为基础的 Bac-To-Bac 系统, 构建黑尾叶蝉 AChE 的真核重组表达载体, 转染昆虫 sf9 细胞后获得重组病毒, 并能在昆虫细胞中稳定表达黑尾叶蝉 *Ncace1* 和 *Ncace2* 基因。

### 6.1 材料与方法

#### 6.1.1 主要试剂

试验用真核表达质料载体 pFastBac-HTE 为本所张传溪教授惠赠, 含有 GFP 基因, 转染昆虫细胞后在荧光显微镜下能检测到荧光。所用的大肠杆菌 DH10Bac 菌株和昆虫 Sf9 细胞为本实验室保存, Trans-T1 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司。

#### 6.1.2 黑尾叶蝉 AChE 基因的 PCR 扩增

根据黑尾叶蝉 *Ncace1* 和 *Ncace2* 基因序列设计真核表达引物 (表 6.1)。在引物 5' 端添加了 15 个 pFastBac-HTE 酶切位点两端的碱基序列, 通过重组酶识别该段质粒与目的基因共有的碱基序列可实现两者的连接。引物扩增的为黑尾叶蝉 AChE 基因删去信号肽序列的 ORF。

以克隆获得的黑尾叶蝉 AChE 基因全长 cDNA 为模板, 采用高保真

DNA 聚合酶进行 PCR 扩增。PCR 过程参考第二章 2.1.4.3。PCR 程序：94℃, 5 min; (94℃, 30s; 55℃, 30 s; 72℃, 2 min)x30 cycles; 72℃, 10 min; 4℃, forever。PCR 产物纯化参考第三章 3.1.3。

表 6.1 黑尾叶蝉 AChE 基因真核表达克隆的引物

Table 6.1 Primers used to Eukaryotic expression of *Ncace1* and *Ncace2*

| 基因            | 引物名称          | 引物序列                                                    |
|---------------|---------------|---------------------------------------------------------|
| <i>Ncace1</i> | Ncace1-HTE-SP | 5'-ctggttcgcgctggatccGCGAGGTTGAGGTTCTCCAC<br>GTTG-3'    |
|               | Ncace1-HTE-AP | 5'-cttggtaccgcatgcctcgagTTATATCGTCAGCAGCAG<br>GAGTCCC-3 |
| <i>Ncace2</i> | Ncace2-HTE-SP | 5'-ctggttcgcgctggatccGTGTGGCTGTGCC-3'                   |
|               | Ncace2-HTE-AP | 5'-cttggtaccgcatgcctcgagTTACGCGACACAGAGC-3'             |

### 6.1.3 供体质粒的构建

#### 6.1.3.1 pFastBac-HTE 双酶切

将 pFastBac-HTE 空载质粒转入大肠杆菌 Trans-T1 中，大量培养后抽提质粒，用于双酶切。采用 *Bam*HI 和 *Xho*I 限制性内切酶对质粒载体 pFastBac-THE 进行双酶切，反应体系如下：

|                    |             |
|--------------------|-------------|
| pFastBac-THE       | 1-5 µg      |
| <i>Bam</i> HI      | 5 µl        |
| <i>Xho</i> I       | 5 µl        |
| FastDigest Buffer  | 5 µl        |
| ddH <sub>2</sub> O | Up to 50 µl |

37℃ 孵育 30 min。

酶切产物纯化参照第三章 3.1.3。

#### 6.1.3.2 目的基因与载体连接

用同源重组酶（南京诺唯赞）对目的基因与载体进行连接。反应体系如下：

|                         |                  |
|-------------------------|------------------|
| 5x CEII Buffer          | 4 $\mu$ l        |
| 线性化载体                   | 50-200 ng        |
| 插入片段纯化产物                | 20-200 ng        |
| Exnase <sup>TM</sup> II | 2 $\mu$ l        |
| ddH <sub>2</sub> O      | Up to 20 $\mu$ l |

吹打混匀，切勿震荡，37℃反应 30 min，立即置于冰上 5 min，即可用于转化或-20℃保存。

#### 6.1.3.3 连接产物的转化

取 5  $\mu$ l 连接产物转入到 Trans-T1 感受态细胞中，转化后，菌液涂布于含有 Amp 的 LB 平板中。过程参考第三章 3.1.3。

#### 6.1.3.4 重组供体质粒的筛选

挑选出白色单菌落，以 pFastbac-F: 5'-TAT TCC GGA TTA TTC ATA CC, pFastBac-R: 5'-ACA AAT GTG GTA TGG CTG A-3'进行菌落 PCR 验证，过程参考第三章 3.1.3。菌落 PCR 筛选序列与目的条带大小一致的菌落扩大培养，送上海铂尚公司测序，序列正确的样品抽提质粒，-20℃保存备用。

### 6.1.4 重组 Bacmid DNA 的获得

#### 6.1.4.1 供体质粒转化 DH10Bac 感受态细胞中

将经过验证正确的供体质粒转化 DH10Bac 大肠杆菌感受态细胞中。转化过程参考第三章 3.1.3。热激后 37℃，200 rpm 培养 4h，使细菌复苏。然后涂布于含 50  $\mu$ g/ml Kan、7  $\mu$ g/ml Gentamicin 和 10  $\mu$ g/ml Tetracycline 的 LB 固体培养基平板上。平板加入 40  $\mu$ L 20 mg/mL X-gal 和 8  $\mu$ L 100 mg/mL IPTG 溶液，37℃培养 48h 以上。

#### 6.1.4.2 重组 Bacmid DNA 的筛选与验证

挑选白斑在含 Kan、Genta 和 Tetr 三种抗生素的 LB 培养液中培养，37℃，300 rpm 培养 5h，用 M13-F: 5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC-3', M13-R: 5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'作为下游引物进行菌液 PCR

验证。具体操作参考第三章 3.1.3。根据条带位置判断是否转座成功。将琼脂糖电泳检测后与目的条带大小一致的菌液送上海铂尚生物公司测序。

#### 6.1.4.3 重组 Bacmid DNA 提取

将验证转化成功且序列正确的 DH10Bac 菌液扩大培养后,大量抽提质粒,步骤如下:

- (1) 取经测序验证序列正确的 DH10Bac 菌液接入含 50  $\mu\text{g/ml}$  Kana, 7  $\mu\text{g/ml}$  Genta, 10  $\mu\text{g/ml}$  tetra 的 20 ml LB 培养液的 50 ml 离心管中, 37 $^{\circ}\text{C}$ , 300 rpm 培养 5 h。
- (2) 12,000x g 离心 1 min 收集菌体。
- (3) 去上清, 加入 0.5 ml S1 重悬菌体。转移至 2 ml 的离心管中。
- (4) 加入 0.5 ml 的 S2, 温和上下颠倒 4-6 次直到溶液变得透亮。
- (5) 加入 0.7 ml 的 S3, 温和上下颠倒 6-8 次, 出现白色沉淀。
- (6) 12,000 $\times$ g 离心 10 min。
- (7) 将上清转移至新的离心管中, 切勿洗到沉淀, 每 1 ml 上清加入 0.8 ml 异丙醇。混匀后冰浴 10 min。
- (8) 15,000 $\times$ g 离心 10 min。取上清。每 1 ml 上清加入 0.5 ml 70%乙醇清洗沉淀。
- (9) 15,000 $\times$ g 离心 5 min, 取上清, 风干沉淀, 不要过分干燥。
- (10) 加入适量的无菌水溶解即可得到重组 Bacmid DNA。用 NanoDrop 2000 微量紫外分光光度计测定 DNA 的浓度和纯度, 即可用与接下来的实验或 4 $^{\circ}\text{C}$ 短期保存, 长期保存放于-20 $^{\circ}\text{C}$ , 但冻融会对重组 Bacmid 造成伤害, 所以应尽量避免反复冻融。

#### 6.1.5 昆虫 Sf9 细胞的转染及重组蛋白表达

##### 6.1.5.1 昆虫 Sf9 细胞的培养及转染

重组 Bacmid 为穿梭质粒, 既可以在大肠杆菌中复制, 又可以在昆虫细胞中复制, 作为病毒粒子侵染昆虫细胞。细胞培养液为 Sf-900II (美

国 Invitrogen)。重组 Bacmid 转染 Sf9 细胞步骤如下：

- (1) 将处于生长对数期贴壁生长的 Sf9 细胞更换新鲜培养液，悬浮，使细胞数密度在  $4 \times 10^5$  cell/ml。取 2 ml 加入六孔板中，每孔约加入  $8 \times 10^5$  个 Sf9 细胞。
- (2) 将 8  $\mu$ l Mix CellfectinII Reagent 与 100  $\mu$ l 无血清的培养液进行混合，轻轻吹打，在室温孵育 30 min；
- (3) 将 1  $\mu$ g 重组的 Ncace1/Bacmid 及 Ncace1/Bacmid DNA 与 100  $\mu$ l 无血清的培养液进行混合。以 GFP/Bacmid 作为对照。
- (4) 将稀释了的重组 Bacmid DNA 和稀释了的 Mix CellfectinII Reagent 的培养基轻轻混合，在室温下孵育 15 min。
- (5) 步骤 (4) 中混合液滴到步骤 (1) 中的细胞中，27°C 培养 2-3 天。观察病毒的侵染情况。观察细胞荧光量，细胞形态。

#### 6.1.5.2 P1 病毒株的提取与扩增

侵染 2-3 天后，细胞会产生荧光，通过观察荧光，判断重组蛋白的表达。将 6 孔板中的细胞重新悬浮，转移到 1.5 ml 的离心管中， $500 \times g$  离心 5 min。将上清转移至新的离心管中，上清就是 P1 病毒株。一部分放 4°C 避光保存，一部分用于扩增。P1 病毒是低滴度株，需要将其继续侵染，产生高滴度的 P2 病毒株。将 P1 病毒株加入到对数生长期的 Sf9 细胞中，培养 2-3 天，收集病毒株即可得到，经过多次侵染，可得到大量含有病毒粒子的培养基。

#### 6.1.5.3 重组蛋白的大量表达

在培养瓶中贴壁培养 100 ml 生长对数期的 Sf9 细胞，然后在细胞中加入含有病毒粒子的培养基，在 27°C 培养箱中培养 72 h。然后将培养细胞转移 50 ml 离心管中， $500 \times g$  离心 5 min，收集细胞。

#### 6.1.5.4 重组蛋白的提取

将离心收集的细胞用与培养液等体积的 PBS 清洗，重悬浮细胞，用枪头吹打混匀。 $800 \times g$  离心 5 min。重复清洗 3 次。按每  $5 \times 10^6$ - $2 \times 10^7$  个细胞加入 1 ml I-PER™ Insect Cell Protein Extraction Reagent (美国

Thermo), 用枪头吹打混匀, 漩涡震荡 5 s, 冰上孵育 10 min, 4℃, 15,000 × g 离心 15 min。将上清转移至新离心管中, 保留沉淀备用。

### 6.1.6 蛋白纯化

使用 ProteinIso™ Ni-NTA Resin (北京全氏金) 对提取的蛋白进行纯化。具体操作步骤包括:

- (1) 装柱: 悬浮介质, 根据待纯化的蛋白量, 将适量的介质加入层析柱内静置 5 min。
- (2) 平衡: 用 5~10 倍柱体积的平衡缓冲液平衡层析柱。为了提高特异性结合, 平衡缓冲液中可加入低浓度的咪唑 (10-20 mM)。
- (3) 上样: 样品缓冲液应尽可能与平衡缓冲液一致。为了避免层析柱堵塞, 样品应经离心或微滤处理 (0.45 μM)。
- (4) 洗涤: 用 5~10 倍柱体积的平衡缓冲液洗涤层析柱 (80-100 mM 咪唑), 收集流出液。
- (5) 洗脱: 不同浓度的咪唑洗脱目的蛋白。平衡液配制不同浓度的咪唑, 进行梯度洗脱。

### 6.1.7 蛋白浓缩

为了去除高浓度咪唑, 减少对后续实验的影响, 获得高浓度的蛋白, 使用 For Concentration and Purification of Biological Solutions Centrifugal Filter Units (美国 Thermo) 对纯化的蛋白进行浓缩, 步骤如下:

- (1) 将纯化的蛋白样品分批加入超滤管中, 8,000x g 离心 20 min;
- (2) 在样品离心完后加入 2 ml PBS 缓冲液, 8,000x g 离心 20 min;
- (3) 重复步骤 2 两次;
- (4) 超滤管中最后剩下的溶液即为浓缩后的蛋白, 吸取至无菌的 1.5 ml 离心管中, 测定蛋白浓度。

### 6.1.8 重组蛋白的 SDS-PAGE 和 Western blot 检测

将提取的重组蛋白进行 SDS-PAGE 检测。用制备的多克隆抗体及 His-tag 抗体进行 Western blot 检测，具体操作参考第四章 4.1.5。

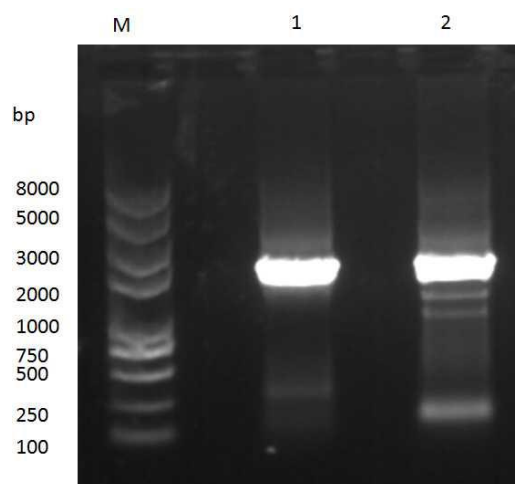
## 6.2 结果与分析

### 6.2.1 供体质粒的构建

用添加了 15 个 pFastBac-HTE 载体酶切位点片段的引物，以 *Ncace1* 和 *Ncace2* 原核表达重组质粒为模板进行 PCR 扩增，经琼脂糖凝胶电泳检测，*Ncace1* 和 *Ncace2* 均在 2,000 bp 左右有单一条带，与目的基因大小相符（图 6.1）。将 PCR 产物与经限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Xho*II 双酶切后的 pFastBac-HTE 载体用重组酶连接，转入大肠杆菌 Trans-T1 感受态细胞中，经菌落 PCR 验证筛选出阳性克隆，送上海铂尚公司测序，序列拼接正确，说明供体质粒构建成功，命名为 *Ncace1*/pFast 和 *Ncace2*/pFast。

### 6.2.2 重组 Bacmid 的构建

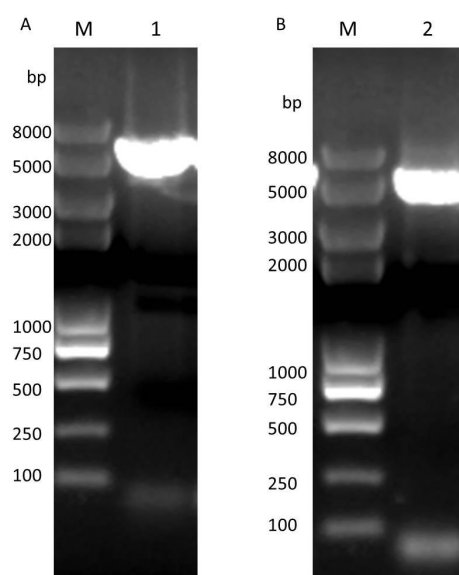
将重组的供体质粒转入大肠杆菌 DH10Bac 中，挑出白斑，用根据 Bacmid 上的 M13 序列设计的引物及供体质粒的引物 pFastBac F/R 进行菌落 PCR 验证。可以确定供体质粒与 Bacmid 是否发生双交换。琼脂糖凝胶电泳结果显示，条带大小约 5,000 bp（图 6.2），与预期相符（目的基因约 2,000 bp + Egfp 732 bp + 杆状病毒 2,430 bp）。这说明目的基因成功转入杆状病毒载体中。

图 6.1 *Ncace1* 及 *Ncace2* 基因的 PCR 扩增**Fig.6.1 PCR amplification of *Ncace1* and *Ncace2* gene**

M: DNA 分子量标准；泳道 1: *Ncace1* PCR 扩增的目的片段；泳道 2: *Ncace2* PCR 扩增的目的片段

M: DNA molecular weight marker; Lane1: PCR amplification of *Ncace1* gene target fragment;

Lane2: PCR amplification of *Ncace2* gene target fragment

图 6.2 重组 *Ncace1* 及 *Ncace2* Bacmid 菌液 PCR 鉴定**Fig.6.2 Characterization of recombinant *Ncace1* and *Ncace2* Bacmid by PCR**

M: DNA 分子量标准；泳道 1: *Ncace1*/Bacmid 菌液 PCR 扩增产物；

泳道 2: *Ncace2*/Bacmid 菌液 PCR 扩增产物

M: DNA molecular weight marker; Lane1: PCR products of recombinant of Ncace1/Bacmid fragment; Lane2: PCR products of recombinant of Ncace2/Bacmid fragment

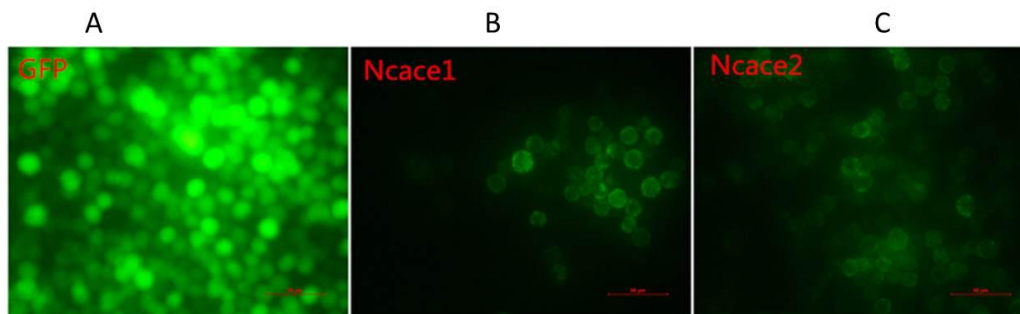


图 6.3 P1 病毒株：重组病毒感染 Sf9 细胞

**Fig.6.3 P1 viruses: recombinant viruses infection Sf9 cells**

(A) 重组 GFP/Bacmid 感染 Sf9 细胞；(B) 重组 Ncace1/Bacmid 感染 Sf9 细胞；(C) 重组 Ncace2/Bacmid 感染 Sf9 细胞

(A) Recombinant GFP/Bacmid infects Sf9 cells; (B) Recombinant Ncace1/Bacmid infects Sf9 cell;  
(C) Recombinant Ncace2/Bacmid infects Sf9 cells

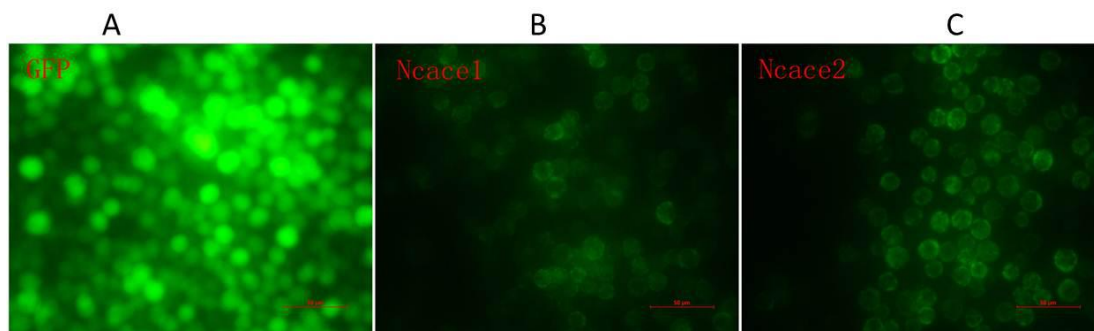


图 6.4 重组病毒的蛋白表达

**Fig.6.4 Protein expression of recombinant viruses**

(A) 重组病毒 GFP/Bacmid 的表达；(B) 重组病毒 Ncace1/Bacmid 的表达；(B) 重组病毒 Ncace1/Bacmid 的表达

(A) Protein expression of recombinant viruses GFP/Bacmid;

(B) Protein expression of recombinant viruses Ncace1/Bacmid; (B)Protein expression of recombinant viruses Ncace2/Bacmid

### 6.2.3 昆虫 Sf9 细胞的转染及重组蛋白的表达

将提取的重组 Bacmid DNA 转染到昆虫 Sf9 细胞中，培养 2-3 天，在荧光显微镜下可以看到荧光，不过显示荧光的细胞比较少（图 6.3），收集细胞，离心，上清即为 P1 代病毒株，以 P1 代病毒继续感染大体积昆虫 Sf9 细胞，培养 2-3 天，大量细胞出现荧光。这说明重组蛋白在昆虫细胞中大量表达（图 6.4）。

### 6.2.4 重组蛋白的纯化和检测

将大量表达重组蛋白的 Sf9 昆虫细胞离心收集，用 I-PER™ Insect Cell Protein Extraction Reagent 破碎细胞，离心后发现，重组 *Ncace1* 及 *Ncace2* 蛋白沉淀为绿色，表达的重组蛋白主要在沉淀中，而作为对照的 GFP 重组蛋白主要在上清中。以沉淀为样品进行 SDS-PAGE，并用 His-tag 抗体(图 6.5)和第三章中制备的 *Ncace1* 和 *Ncace2* 多克隆抗体（图 6.6）进行 Western blot 检测。发现用 His-tag 抗体杂交，GFP、*Ncace1* 及 *Ncace2* 均有单一条带，GFP 大小在 26 kD 左右，重组 *Ncace1* 及 *Ncace2* 蛋白在 100 kD 左右，与目的蛋白大小相符。用 *Ncace2* 抗体杂交，可以看到仅 *Ncace2* 重组蛋白有特异条带。证明 *Ncace1* 及 *Ncace2* 基因在 Sf9 细胞中成功表达。

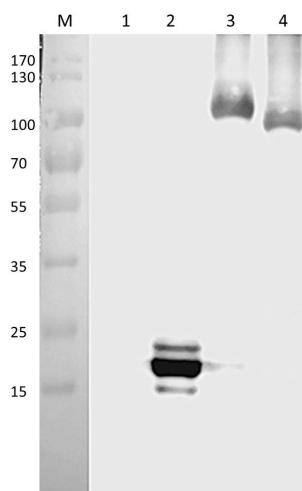


图 6.5 His-tag 抗体检测重组蛋白表达

**Fig 6.5 Characterization of protein expression of recombinant viruses by anti-his-tag antibody**

M: 蛋白标准分子量；1: 未感染的 Sf9 细胞；2: GFP 表达产物；3: *Ncace1* 表达产物  
4: *Ncace2* 表达产物

M: Standard protein marker; 1: Sf9 cells uninfected Bacmid; 2: Sample from Sf9 cells infected with GFP/Bacmid; 3: Sample from Sf9 cells infected with *Ncace1*/Bacmid; 4: Sample from Sf9 cells infected with *Ncace2*/Bacmid

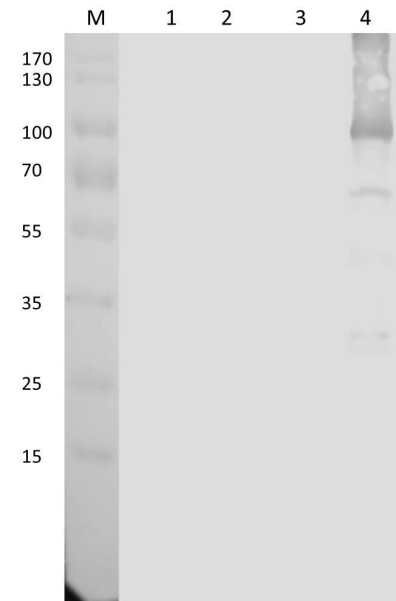


图 6.6 *Ncace2* 抗体检测重组蛋白表达

**Fig.6.6 Characterization of protein expression of recombinant viruses by anti-his-tag antibody**

M: 蛋白标准分子量；1: 未感染的 Sf9 细胞；2: GFP 表达产物；3: *Ncace1* 表达产物；4: *Ncace2* 表达产物

M: Standard protein marker; 1: Sf9 cells uninfected Bacmid; 2: Sample from Sf9 cells infected with GFP/Bacmid; 3: Sample from Sf9 cells infected with *Ncace1*/Bacmid;4 Sample from Sf9 cells infected with *Ncace2*/Bacmid

### 6.3 讨论

杆状病毒表达载体系统是一种高效产生大量重组蛋白，而且保持重组蛋白活性的蛋白表达系统，其杆状病毒中含有的多角体蛋白启动子（Polyhedrin promoter）为强启动子，能使外源基因大量表达。Sf9 细胞还能对重组外源基因产生蛋白进行翻译后加工，包括磷酸化、糖基化、去信号肽、多聚体组合等。因此用此系统表达的蛋白能有天然构象，具有生物活性。pFastBac-HTE 供体质粒中含有 GFP 标签，因此可以直接观察荧光来检测重组蛋白是否表达。

AChE 有多种分子型，最早报道的黑腹果蝇 AChE 的为双聚体蛋白，由两个亚基组成。本研究以 pFastBac-THE 为供体质粒，Sf9 昆虫细胞为表达细胞，表达重组 *Ncace1* 及 *Ncace2* 基因，均得到的大量重组表达蛋白。但是重组蛋白主要以沉淀方式存在，且并未检测到 AChE 活性。原因可能是 *Ncace1* 及 *Ncace2* 基因的 C 端均有疏水序列，容易与膜结合而不容易溶解；另外 GFP 标签可能对重组蛋白的翻译后加工有一定的影响。还需进一步研究，为黑尾叶蝉 AChE 的研究打下基础。

## 总结

### I. 研究结果

为探讨黑尾叶蝉感染 RDV 后对有机磷杀虫剂的敏感性显著降低的机制, 本文在测定比较了感染与未感染 RDV 黑尾叶蝉体内解毒酶与靶标酶活性差异的基础上, 克隆获得了有机磷杀虫剂靶标—乙酰胆碱酯酶 (Acetylcholinesterases, AChEs) 全长基因, 进而分析了黑尾叶蝉感染 RDV 后 AChE 基因的表达水平差异。主要结果包括: (1) 比较了感染与未感染 RDV 黑尾叶蝉体内解毒酶与靶标乙酰胆碱酯酶活性差异, 发现黑尾叶蝉感染 RDV 后代谢解毒酶 P450、Ests 和 GSTs 等的活性无显著性变化, 而 AChEs 活性则显著增高。(2) 克隆获得了黑尾叶蝉 *Ncace1* 及 *Ncace2* 基因全长 cDNA 序列, 并分析了这 2 条基因的序列特点、系统进化树和在叶蝉体内的时空表达分布特征。(3) 在大肠杆菌中重组表达了黑尾叶蝉 *Ncace1* 及 *Ncace2* 基因, 并制备了相应的多克隆抗体。(4) 利用实时荧光定量 PCR 和 Western 杂交技术分析了感染与未感染 RDV 黑尾叶蝉 *Ncace1* 及 *Ncace2* 基因转录及翻译水平的差异变化。黑尾叶蝉感染 RDV 后, *Ncace1* 和 *Ncace2* 基因转录水平及翻译水平显著增高。(5) 采用 Bac-to-Bac 系统在昆虫 Sf9 细胞中表达获得了黑尾叶蝉 *Ncace1* 及 *Ncace2* 重组蛋白。

### II. 本论文的创新之处

(1) 目前, 有关植物病毒与媒介昆虫互作关系的研究主要集中传毒 (识别) 机制和传毒效率及其影响因素等方面, 有关病毒在媒介昆虫体内的增殖、转运以及病毒对媒介昆虫生物学、生理学影响及其互作机制等方面尚乏研究。本文在发现 RDV 侵染可引起黑尾叶蝉对有机磷敏感性显著降低的基础上, 率先开展 RDV 侵染对黑尾叶蝉 AChE 基因表达水

平的影响研究,明确了 RDV 侵染诱导黑尾叶蝉 AChE 基因转录及翻译水平增强是导致其对有机磷敏感性降低的主要原因。

(2)明确了黑尾叶蝉 *Ncace1* 及 *Ncace2* 基因的序列特征及不同昆虫间的系统进化关系。同时,制备获得了黑尾叶蝉 *Ncace1* 及 *Ncace2* 基因的多克隆抗体。本文结果不仅为促进 RDV 与黑尾叶蝉以及水稻之间的互作机制研究提供基础,而且还为昆虫 AChE 深入研究提供了有益补充。

### III. 不足之处及今后的研究方向

(1) 未能获得黑尾叶蝉 AChE 的活性重组蛋白,以明确黑尾叶蝉 AChE 的酶学特征。今后需继续通过 AChE 抗体分离提纯黑尾叶蝉体内的 AChE 蛋白,以进一步研究与 RDV 的互作机制。

(2) 本文研究了 RDV 对黑尾叶蝉 AChE 的影响,但未能深入探讨 RDV 对 AChE 基因表达的诱导机理。今后可继续 RDV 侵染引起黑尾叶蝉 AChE 的分子机制。

## 参考文献

- 陈茂. 2005. 转基因抗虫、抗病水稻对非靶标生物的生态安全性评价. 浙江大学博士论文.
- 高希武. 1987. Gorun 等改进的 Ellman 胆碱酯酶活性测定方法介绍. 昆虫知识, 24(4): 245 - 246
- 顾永林. 2012. 水稻矮缩病的研究. 农业灾害研究 2: 1-5.
- 韩乃顺. 2015. Bt 水稻-RDV-黑尾叶蝉三者关系的初探. 浙江大学硕士论文.
- 李毅, 陈章良. 2001. 水稻病毒的分子生物学. 科学出版社, 中国, 北京.
- 梁莉, 郭建洋, 田俊策, 等. 2010. 水稻矮缩病毒对黑尾叶蝉卵巢发育与产卵量的影响. 植物保护学报, 37(4) :375 - 376.
- 梁莉. 2010. 水稻、黑尾叶蝉与水稻矮缩病毒三者间关系的初步探究. 浙江大学硕士论文.
- 彭潞波, 魏春红, 方琦, 等. 云南 3 个不同地区水稻矮缩病毒 S8 片段的序列分析. 云南大学学报(自然科学版), 2008, 30: 21 - 24.
- 曲林. 1996. 水稻矮缩病毒(RDV)部分片段的克隆和表达研究. 硕士论文.
- 阮义理, 蒋文烈, 林瑞芬. 1981. 稻病毒病介体昆虫灰稻虱的研究. 昆虫学报, 24: 283 - 289.
- 阮义理. 1985. 水稻叶蝉. 北京:农业出版社.
- 施明安, 袁建忠, 唐振华. 2000. 乙酰胆碱酯酶的晶体结构及功能位点. 农药学学报.
- 唐启义, 冯明光. 2007. 使用统计分析及其 DPS 数据处理系统. 北京: 科学出版社.
- 唐振华, 毕强. 2003. 杀虫剂作用的分子行为. 上海: 上海远东出版社. 243 - 324.

- 王举梅. 2013. 家蚕 1 型乙酰胆碱酯酶基因 (acel) 的结构及其功能研究. 苏州大学博士论文.
- 吴云锋, 曹雪松. 2011. 稻麦主要病毒病识别与控制. 中国农业出版社, 中国, 北京.
- 肖锦, 李毅, 张净, 刘劲锋, 陈章良. 1998. 水稻矮缩病毒第一号组份基因和编码蛋白的序列分析. 微生物学报, 38: 348 - 358.
- 尹哲, 吉栩, 吴云锋, 李毅. 2007. 水稻矮缩病毒外壳蛋白 P9 具有体内转录激活活性. 中国农业科技导报, 9(3): 61 - 65.
- Alon M, Alon F, Nauen R, Morin S, 2008. Organophosphates' resistance in the B-biotype of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) is associated with a point mutation in an ace1-type acetylcholinesterase and overexpression of carboxylesterase. *Insect biochemistry and molecular biology*, 38 (10): 940-949.
- Anazawa Y, Tomita T, Aiki Y, Kozaki T, Kono Y, 2003. Sequence of a cDNA encoding acetylcholinesterase from susceptible and resistant two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 33 (5): 509-514.
- 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*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 81 (3): 164-175.
- Ballard CG, Greig NH, Guillozet Bongaarts AL, Enz A, Darvesh S, 2005. Cholinesterases: roles in the brain during health and disease. *Current Alzheimer Research*, 2 (3): 307-318.
- Barnard EA, 1974. Neuromuscular transmission—enzymatic destruction of acetylcholine, pp. 201-224, The peripheral nervous system. Springer.
- Baxter GD, Barker SC, 1998. Acetylcholinesterase cDNA of the cattle tick, *Boophilus microplus*: characterisation and role in organophosphate

- resistance. *Insect biochemistry and molecular biology*, 28 (8): 581-589.
- Bourguet D, Capela R, Raymond M, 1996a. An insensitive acetylcholinesterase in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from Portugal. *Journal of economic entomology*, 89 (5): 1060-1066.
- Bourguet D, Pasteur N, Bisset J, Raymond M, 1996b. Determination of Ace1 Genotypes in Single Mosquitoes: Toward an Ecumenical Biochemical Test. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 55 (2): 122-128.
- Brestkin A, Maizel E, Moralev S, Novozhilov K, Sazonova I, 1985. Cholinesterases of aphids—1: Isolation, partial purification and some properties of cholinesterases from spring grain aphid *Schizaphis graminum* (Rond.). *Insect biochemistry*, 15 (2): 309-314.
- Cao X, Zhou P, Zhang X, Zhu S, Zhong X, Xiao Q, Ding B, Li Y, 2005. Identification of an RNA silencing suppressor from a plant double-stranded RNA virus. *Journal of virology*, 79 (20): 13018-13027.
- Chen HJ, Liao Z, Hui XM, Li GQ, Li F, Han ZJ, 2009. Ace2, rather than ace1, is the major acetylcholinesterase in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Science*, 16 (4): 297-303.
- Dou D, Park JG, Rana S, Madden BJ, Jiang H, Pang YP, 2013. Novel selective and irreversible mosquito acetylcholinesterase inhibitors for controlling malaria and other mosquito-borne diseases. *Scientific reports*, 3.
- Dvir H, Silman I, Harel M, Rosenberry TL, Sussman JL, 2010. Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. *Chemico-biological interactions*, 187 (1): 10-22.
- Fournier D, 2005. Mutations of acetylcholinesterase which confer

- insecticide resistance in insect populations. *Chemico-biological interactions*, 157): 257-261.
- Fournier D, Bergé JB, Almeida MLC, Bordier C, 1988a. Acetylcholinesterases from *Musca domestica* and *Drosophila melanogaster* brain are linked to membranes by a glycopospholipid anchor sensitive to an endogenous phospholipase. *Journal of neurochemistry*, 50 (4): 1158-1163.
- Fournier D, Bride J-M, Karch F, Bergé J-B, 1988b. Acetylcholinesterase from *Drosophila melanogaster* Identification of two subunits encoded by the same gene. *FEBS letters*, 238 (2): 333-337.
- Fournier D, Bride J-M, Hoffmann F, Karch F, 1992. Acetylcholinesterase. Two types of modifications confer resistance to insecticide. *Journal of Biological Chemistry*, 267 (20): 14270-14274.
- Fukushi T, Shikata E, Kimura I, 1962. Some morphological characters of rice dwarf virus. *Virology*, 18 (2): 192-205.
- Fulton MH, Key PB, 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20 (1): 37-45.
- Gao J-R, Kambhampati S, Zhu K, 2002. Molecular cloning and characterization of a greenbug (*Schizaphis graminum*) cDNA encoding acetylcholinesterase possibly evolved from a duplicate gene lineage. *Insect biochemistry and molecular biology*, 32 (7): 765-775.
- Gauthier M, Belzunces LP, Zaoujal A, Colin ME, Richard D, 1992. Modulatory effect of learning and memory on honey bee brain acetylcholinesterase activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 103 (1): 91-95.

- Gnagey A, Forte M, Rosenberry TL, 1987. Isolation and characterization of acetylcholinesterase from *Drosophila*. *Journal of Biological Chemistry*, 262 (27): 13290-13298.
- Gorun V, Proinov I, Băltescu V, Balaban G, Bârză O, 1978. Modified Ellman procedure for assay of cholinesterases in crude enzymatic preparations. *Analytical biochemistry*, 86 (1): 324-326.
- Hall L, Spierer P, 1986. The Ace locus of *Drosophila melanogaster*: structural gene for acetylcholinesterase with an unusual 5'leader. *The EMBO journal*, 5 (11): 2949.
- Hemingway J, Beaty BJ, Rowland M, Scott TW, Sharp BL, 2006. The Innovative Vector Control Consortium: improved control of mosquito-borne diseases. *Trends in parasitology*, 22 (7): 308-312.
- Hernandez R, He H, Chen AC, Ivie GW, George JE, Wagner GG, 1999. Cloning and sequencing of a putative acetylcholinesterase cDNA from *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of medical entomology*, 36 (6): 764-770.
- Huchard E, Martinez M, Alout H, Douzery EJ, Lutfalla G, Berthomieu A, Berticat C, Raymond M, Weill M, 2006. Acetylcholinesterase genes within the Diptera: takeover and loss in true flies. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 273 (1601): 2595-2604.
- Jiang X, Qu M, Denholm I, Fang J, Jiang W, Han Z, 2009. Mutation in acetylcholinesterase1 associated with triazophos resistance in rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Biochemical and biophysical research communications*, 378 (2): 269-272.
- Jiu M, Zhou XP, Tong L, Xu J, Yang X, Wan F-H, Liu S-S, 2007. Vector-virus mutualism accelerates population increase of an invasive whitefly. *PLoS One*, 2 (1): e182.

- Kano H, Koizumi M, Noda H, Mizuno H, Tsukihara T, Ishikawa K, Hibino H, Omura T, 1990. Nucleotide sequence of rice dwarf virus (RDV) genome segment S3 coding for 114 K major core protein. *Nucleic acids research*, 18 (22): 6700.
- Katz B, 1966. Nerve, muscle, and synapse.
- Khajehali J, Van Leeuwen T, Grispou M, Morou E, Alout H, Weill M, Tirry L, Vontas J, Tsagkarakou A, 2010. Acetylcholinesterase point mutations in European strains of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) resistant to organophosphates. *Pest management science*, 66 (2): 220-228.
- Kim JI, Jung CS, Koh YH, Lee SH, 2006. Molecular, biochemical and histochemical characterization of two acetylcholinesterase cDNAs from the German cockroach *Blattella germanica*. *Insect molecular biology*, 15 (4): 513-522.
- Kim YH, Choi JY, Je YH, Koh YH, Lee SH, 2010. Functional analysis and molecular characterization of two acetylcholinesterases from the German cockroach, *Blattella germanica*. *Insect molecular biology*, 19 (6): 765-776.
- Kimura I, Minobe Y, Omura T, 1987. Changes in a nucleic acid and a protein component of rice dwarf virus particles associated with an increase in symptom severity. *Journal of general virology*, 68 (12): 3211-3215.
- Kono Y, Tomita T, 2006. Amino acid substitutions conferring insecticide insensitivity in Ace-paralogous acetylcholinesterase. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 85 (3): 123-132.
- Lee D-W, Kim S-S, Shin SW, Kim WT, Boo KS, 2006. Molecular characterization of two acetylcholinesterase genes from the oriental tobacco budworm, *Helicoverpa assulta* (Guenee). *Biochimica*

- etBiophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1760 (2): 125-133.
- Lee S-W, Kasai S, Komagata O, Kobayashi M, Agui N, Kono Y, Tomita T, 2007. Molecular characterization of two acetylcholinesterase cDNAs in *Pediculus human* lice. *Journal of medical entomology*, 44 (1): 72-79.
- Li BL, Chen W, Liu L, Zhang XC, Bao YY, Cheng JA, Zhu ZR, Zhang CX, 2012. Molecular characterization of two acetylcholinesterase genes from the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 102 (3): 198-203.
- Li Y, Zhang Xx, Jiang Lj, Yuan L, Cao Tt, Li X, Dong L, Li Y, Yin SF, 2015. Inhibition of Acetylcholinesterase (AChE): A Potential Therapeutic Target to Treat Alzheimer's Disease. *Chemical biology & drug design*, 86 (4): 776-782.
- Li Y, Bao YM, Wei CH, Kang ZS, Zhong YW, Mao P, Wu G, Chen ZL, Schiemann J, Nelson RS, 2004. Rice dwarf phyto-reovirus segment S6-encoded nonstructural protein has a cell-to-cell movement function. *Journal of virology*, 78 (10): 5382-5389.
- Liu W, Zhao G, Knowles CO, 1994. Substrate specificity and inhibitor sensitivity of cholinesterases in homogenates of western flower thrips. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 49 (2): 121-131.
- Lu Y, Pang Y-P, Park Y, Gao X, Yao J, Zhang X, Zhu KY, 2012. Genome organization, phylogenies, expression patterns, and three-dimensional protein models of two acetylcholinesterase genes from the red flour beetle. *PLoS One*, 7 (2): e32288.
- 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 molecular biology*, 7 (2): 107-120.
- Manulis S, Ishaaya I, Perry AS, 1981. Acetylcholinesterase of *Aphis citricola*: properties and significance in determining toxicity of systemic organophosphorus and carbamate compounds. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 15 (3): 267-274.
- Mori A, Tomita T, Hidoh O, Kono Y, Severson D, 2001. Comparative linkage map development and identification of an autosomal locus for insensitive acetylcholinesterase - mediated insecticide resistance in *Culex tritaeniorhynchus*. *Insect molecular biology*, 10 (3): 197-203.
- Mullin CA, Frazier M, Frazier JL, Ashcraft S, Simonds R, Pettis JS, 2010. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PLoS One*, 5 (3): e9754.
- Mutero A, Pralavorio M, Bride J-M, Fournier D, 1994. Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. *Proceedings of the national academy of sciences*, 91 (13): 5922-5926.
- N'Guessan R, Darriet F, Guillet P, Carnevale P, Traore Lamizana M, Corbel V, Koffi A, Chandre F, 2003. Resistance to carbosulfan in field populations of *Anopheles gambiae* from Côte d'Ivoire based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase. *Med Vet Entomol*, 17): 19-25.
- Nabeshima T, Kozaki T, Tomita T, Kono Y, 2003. An amino acid substitution on the second acetylcholinesterase in the pirimicarb-resistant strains of the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Biochemical and biophysical research communications*, 307 (1): 15-22.
- Nabeshima T, Mori A, Kozaki T, Iwata Y, Hidoh O, Harada S, Kasai S,

- Severson DW, Kono Y, Tomita T, 2004. An amino acid substitution attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in a Japanese encephalitis vector mosquito, *Culex tritaeniorhynchus*. *Biochemical and biophysical research communications*, 313 (3): 794-801.
- Nault LR, Ammar ED, 1989. Leafhopper and planthopper transmission of plant viruses. *Annual review of entomology*, 34 (1): 503-529.
- Novozhilov K, Brestkin A, Khovanskikh A, Maizel E, Moralev S, Nikanorova E, Sazonova I, 1989. Cholinesterases of aphids—III. Sensitivity of acetylcholinesterases to several inhibitors as a possible phylogenetic character. *Insect biochemistry*, 19 (1): 15-18.
- Oakeshott JG, Devonshire AL, Claudianos C, Sutherland TD, Horne I, Campbell PM, Ollis DL, Russell RJ, 2005. Comparing the organophosphorus and carbamate insecticide resistance mutations in cholin- and carboxyl-esterases. *Chemico-biological interactions*, 157(2): 269-275.
- Oh S-H, Kozaki T, Mizuno H, Tomita T, Kono Y, 2006. Expression of Ace-paralogous acetylcholinesterase of *Culex tritaeniorhynchus* with an amino acid substitution conferring insecticide insensitivity in baculovirus-insect cell system. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 85 (1): 46-51.
- Olivera S, Rodriguez-Ithurralde D, Henley JM, 2003. Acetylcholinesterase promotes neurite elongation, synapse formation, and surface expression of AMPA receptors in hippocampal neurones. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 23 (1): 96-106.
- Omura T, Ishikawa K, Hirano H, Ugaki M, Minobe Y, Tsuchizaki T, Kato H, 1989. The outer capsid protein of rice dwarf virus is encoded by

- genome segment S8. *Journal of general virology*, 70 (10): 2759-2764.
- Palmer MJ, Moffat C, Saranzewa N, Harvey J, Wright GA, Connolly CN, 2013. Cholinergic pesticides cause mushroom body neuronal inactivation in honeybees. *Nature Communications*, 4): 1634.
- Pang Y-P, 2006. Novel acetylcholinesterase target site for malaria mosquito control. *PLoS One*, 1 (1): e58.
- Pang Y-P, 2007. Species marker for developing novel and safe pesticides. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 17 (1): 197-199.
- Pang Y-P, Quiram P, Jelacic T, Hong F, Brimijoin S, 1996. Highly Potent, Selective, and Low Cost Bis-tetrahydroaminacrine Inhibitors of Acetylcholinesterase Steps toward Novel Drugs for Treating Alzheimer's Disease. *Journal of Biological Chemistry*, 271 (39): 23646-23649.
- Pang Y-P, Brimijoin S, W Ragsdale D, Yan Zhu K, Suranyi R, 2012. Novel and viable acetylcholinesterase target site for developing effective and environmentally safe insecticides. *Current drug targets*, 13 (4): 471-482.
- Pang Y-P, Singh SK, Gao Y, Lassiter TL, Mishra RK, Zhu KY, Brimijoin S, 2009a. Selective and irreversible inhibitors of aphid acetylcholinesterases: steps toward human-safe insecticides. *PLoS One*, 4 (2): e4349.
- Pang Y-P, Ekström F, Polsinelli GA, Gao Y, Rana S, Hua DH, Andersson B, Andersson PO, Peng L, Singh SK, 2009b. Selective and irreversible inhibitors of mosquito acetylcholinesterases for controlling malaria and other mosquito-borne diseases. *PLoS One*, 4 (8): e6851.
- Pezzementi L, Rowland M, Wolfe M, Tsigelny I, 2006. Inactivation of an invertebrate acetylcholinesterase by sulfhydryl reagents: the roles of

- two cysteines in the catalytic gorge of the enzyme. *Invertebrate Neuroscience*, 6 (2): 47-55.
- Quinn DM, 1987. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chemical Reviews*, 87 (5): 955-979.
- Raves ML, Harel M, Pang YP, Silman I, Kozikowski AP, Sussman JL, 1997. Structure of acetylcholinesterase complexed with the nootropic alkaloid,(-)-huperzine A. *Nature structural biology*, 4 (1): 57-63.
- Revuelta L, Piulachs MD, Bellés X, Castañera P, Ortego F, Díaz-Ruiz JR, Hernández Crespo P, Tenllado F, 2009. RNAi of ace1 and ace2 in *Blattella germanica* reveals their differential contribution to acetylcholinesterase activity and sensitivity to insecticides. *Insect biochemistry and molecular biology*, 39 (12): 913-919.
- Russell RJ, Claudianos C, Campbell PM, Horne I, Sutherland TD, Oakeshott JG, 2004. Two major classes of target site insensitivity mutations confer resistance to organophosphate and carbamate insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 79 (3): 84-93.
- Schulze H, Vorlová S, Villatte F, Bachmann TT, Schmid RD, 2003. Design of acetylcholinesterases for biosensor applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 18 (2): 201-209.
- Seino A, Kazuma T, Tan AJ, Tanaka H, Kono Y, Mita K, Shiotsuki T, 2007. Analysis of two acetylcholinesterase genes in *Bombyx mori*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88 (1): 92-101.
- Selkirk ME, Lazari O, Hussein AS, Matthews JB, 2005. Nematode acetylcholinesterases are encoded by multiple genes and perform non-overlapping functions. *Chemico-biological interactions*, 157): 263-268.
- Seong KM, Kim YH, Kwon DH, Lee SH, 2012. Identification and

- characterization of three cholinesterases from the common bed bug, *Cimex lectularius*. *Insect molecular biology*, 21 (2): 149-159.
- Shapira M, Thompson CK, Soreq H, Robinson GE, 2001. Changes in neuronal acetylcholinesterase gene expression and division of labor in honey bee colonies. *Journal of Molecular Neuroscience*, 17 (1): 1-12.
- Shinkai A, 1962. Studies on insect transmission of rice virus diseases in Japan. *Bull Nat Inst Agric Sci Ser C*, 14): 1-112.
- Silman I, Sussman JL, 2008. Acetylcholinesterase: How is structure related to function? *Chemico-biological interactions*, 175 (1): 3-10.
- Smissaert H, 1976. Reactivity of a critical sulfhydryl group of the acetylcholinesterase from aphids (*Myzus persicae*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 6 (3): 215-222.
- Soreq H, Seidman S, 2001. Acetylcholinesterase—new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience*, 2 (4): 294-302.
- Sussman JL, Harel M, Frolov F, Oefner C, Goldman A, Toker L, Silman I, 1991. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, 253 (5022): 872-879.
- Suzuki N, Sugawara M, Kusano T, 1992. Rice dwarf phyto-reovirus segment S12 transcript is tricistronic in vitro. *Virology*, 191 (2): 992-995.
- Suzuki N, Watanabe Y, Kusano T, Kitagawa Y, 1990. Sequence analysis of the rice dwarf phyto-reovirus segment S3 transcript encoding for the major structural core protein of 114 kDa. *Virology*, 179 (1): 455-459.
- SUZUKI N, KUSANO T, MATSUURA Y, OMURA T, 1996. Novel NTP binding property of rice dwarf phyto-reovirus minor core protein P5. *Virology*, 219 (2): 471-474.
- Taylor P, Radic Z, 1994. The cholinesterases: from genes to proteins.

- Annual review of pharmacology and toxicology*, 34 (1): 281-320.
- Temeyer KB, Davey RB, Chen AC, 2004. Identification of a third *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) cDNA presumptively encoding an acetylcholinesterase. *Journal of medical entomology*, 41 (3): 259-268.
- Tomaru, M., Maruyama, W., Kikuchi, A., Yan, J., Zhu, Y., Suzuki, N., ...& Omura, T. (1997). The loss of outer capsid protein P2 results in nontransmissibility by the insect vector of rice dwarf phytoreovirus. *Journal of virology*, 71(10), 8019-8023.
- Tomita T, Hidoh O, Kono Y, 2000. Absence of protein polymorphism attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 30 (4): 325-333.
- Tsim K, Soreq H, 2013. Acetylcholinesterase: old questions and new developments. *Acetylcholinesterase: Old Questions and New Developments*): 4.
- Ueda S, Masuta C, Uyeda I, 1997. Hypothesis on particle structure and assembly of rice dwarf phytoreovirus: interactions among multiple structural proteins. *Journal of general virology*, 78 (12): 3135-3140.
- Walsh SB, Dolden TA, Moores GD, Kristensen M, Lewis T, Alan L, Williamson MS, 2001. Identification and characterization of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance. *Biochemical Journal*, 359 (1): 175-181.
- Wei T, Shimizu T, Omura T, 2008. Endomembranes and myosin mediate assembly into tubules of Pns10 of Rice dwarf virus and intercellular spreading of the virus in cultured insect vector cells. *Virology*, 372 (2): 349-356.

- Wei T, Kikuchi A, Suzuki N, Shimizu T, Hagiwara K, Chen H, Omura T, 2006a. Pns4 of rice dwarf virus is a phosphoprotein, is localized around the viroplasm matrix, and forms minitubules. *Archives of virology*, 151 (9): 1701-1712.
- Wei T, Kikuchi A, Moriyasu Y, Suzuki N, Shimizu T, Hagiwara K, Chen H, Takahashi M, Ichiki-Uehara T, Omura T, 2006b. The spread of Rice dwarf virus among cells of its insect vector exploits virus-induced tubular structures. *Journal of virology*, 80 (17): 8593-8602.
- Weill M, Fort P, Berthomieu A, Dubois MP, Pasteur N, Raymond M, 2002. A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the ace gene *Drosophila*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 269 (1504): 2007-2016.
- Weill M, Lutfalla G, Mogensen K, Chandre F, Berthomieu A, Berticat C, Pasteur N, Philips A, Fort P, Raymond M, 2003. Comparative genomics: Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature*, 423 (6936): 136-137.
- Xu H, Li Y, Mao Z, Li Y, Wu Z, Qu L, An C, Ming X, Schiemann J, Casper R, 1998. Rice dwarf phyto-reovirus segment S11 encodes a nucleic acid binding protein. *Virology*, 240 (2): 267-272.
- Yan J, Tomaru M, Takahashi A, Kimura I, Hibino H, Omura T, 1996. P2 protein encoded by genome segment S2 of rice dwarf phyto-reovirus is essential for virus infection. *Virology*, 224 (2): 539-541.
- Yoshida S, Forno D, Cock J, Ka G. 1976. Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice (International Rice Research Institute, Manila, Philippines).
- Zahavi M, Tahori A, Klimer F, 1972. An acetylcholinesterase sensitive to sulfhydryl inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta*

- (*BBA*)-*Enzymology*, 276 (2): 577-583.
- Zhang F, Li Y, Liu Y, An C, Chen Z, 1997. Molecular cloning, sequencing, functional analysis and expression in *E. coli* of major core protein gene (S3) of rice dwarf virus Chinese isolate. *Acta virologica*, 41 (3): 161-168.
- Zhong B, Kikuchi A, Moriyasu Y, Higashi T, Hagiwara K, Omura T, 2003. A minor outer capsid protein, P9, of Rice dwarf virus. *Archives of virology*, 148 (11): 2275-2280.
- Zhou F, Wu G, Deng W, Pu Y, Wei C, Li Y, 2007a. Interaction of rice dwarf virus outer capsid P8 protein with rice glycolate oxidase mediates relocalization of P8. *FEBS letters*, 581 (1): 34-40.
- Zhou F, Pu Y, Wei T, Liu H, Deng W, Wei C, Ding B, Omura T, Li Y, 2007b. The P2 capsid protein of the nonenveloped rice dwarf phytoeovirus induces membrane fusion in insect host cells. *Proceedings of the national academy of sciences*, 104 (49): 19547-19552.
- Zhu KY, Clark JM, 1995. Cloning and sequencing of a cDNA encoding acetylcholinesterase in Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Insect biochemistry and molecular biology*, 25 (10): 1129-1138.
- Zhu KY, Lee SH, Clark JM, 1996. A point mutation of acetylcholinesterase associated with azinphosmethyl resistance and reduced fitness in Colorado potato beetle. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 55 (2): 100-108.
- Zhu S, Gao F, Cao X, Chen M, Ye G, Wei C, Li Y, 2005. The rice dwarf virus P2 protein interacts with ent-kaurene oxidases in vivo, leading to reduced biosynthesis of gibberellins and rice dwarf symptoms. *Plant physiology*, 139 (4): 1935-1945.