

文章编号:1000-7423(2002)-03-0187-01

【论著摘要】

白纹伊蚊乙酰胆碱酯酶基因片段序列分析

吴明玮¹ 张玲敏^{2*}

中图分类号:R384.113

文献标识码:A

媒介昆虫抗性已成为当前虫媒病防制中的突出问题^[1-3],作者曾报道白纹伊蚊乙酰胆碱酯酶(AChE)基因片段的克隆及鉴定^[4],本实验选择白纹伊蚊基因组 DNA AChE 基因片段克隆进行 DNA 测序,并分析其序列特征,为进一步研究其 AChE 与抗药性的关系提供依据。

1 材料与方法

- 1.1 实验蚊株 白纹伊蚊敏感株由中山医科大学寄生虫学教研室惠赠。
- 1.2 实验菌株 JM-109 由中山医科大学寄生虫学教研室惠赠。
- 1.3 质粒载体 PMD 18-T vector 试剂盒为大连宝生物公司产品。
- 1.4 主要试剂 CTAB 为 Serva 公司产品, RNA 酶 A、Tag 酶、DNTP 均为上海生工公司产品, PCR 标志物、X-gal、IPTG、EcoRI、SalI、BSA 为华美公司产品, DNA 凝胶回收试剂盒为 Qiagen 公司产品,其余均为国产分析纯试剂。
- 1.5 分析软件 DNA CLUB 软件, PCGENE 软件
- 1.6 白纹伊蚊 AChE 基因片段简并引物 PCR、克隆及鉴定实验方法见文献^[4]。
- 1.7 克隆基因的序列测定及分析 选取经酶切鉴定和 PCR 鉴定的重组质粒阳性克隆送上海生工公司用双脱氧测序法(Sanger 法)进行 DNA 双向测序。将测出的基因片段 DNA 序列用 DNA CLUB 软件翻译成氨基酸序列,输入因特网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>),与部分已知物种的 AChE 氨基酸序列进行同源性分析。

2 结果

将测出的基因片段 DNA 序列共 394 bp 用 DNA CLUB 软件翻译成氨基酸序列,依据内含子 GT-AG 法则并参照近缘种的 AChE 基因片段确定内含子的位置,从而确定所测基因的氨基酸序列共 107 个氨基酸残基,并参照文献找出了 AChE 的特征性保守序列 FGESAG^[5-7](图 1);将所获的白纹伊蚊 AChE 基因片段与部分已知物种(包括:埃及伊蚊、斯氏按蚊、意蜂、马铃薯叶甲、黑尾叶蝉、黑腹果蝇、铜绿蝇、家蝇、电鳐)的 AChE 氨基酸序列进行同源性分析,其与埃及伊蚊相应片段的同源性高达 96%,与斯氏按蚊同源性为 87%,与黑腹果蝇同源性为 69%。

```

TGGGATCAAGGATTTGCGATAAGGTGGCTGAAAGAAAATGCCAAAGCCTTGGAGGCCGAA  60
W D G A F A I R W L K E N A K A F Q G E

CGABAOGTAATAAGCTOTTCGGCGAATCGGCGGCGGCGABTTGGTGAATTTACAAGCTG  120
P D L I T L F G E S A G G S S V S L H L

GTGTGCGCGGTCAOGGCGGCGCTGTGCGGAAAGGCGGATCGCAATCCGGAACGCTGAAG  180
L S P V T R Q L S R R Q I L Q S Q T L N

GCAOGGTGAGCCAGATGTGTGCGGAAAGGCGGCTGTGCGGTTGCTGAGGCGACTAATGAT  240
A P W S H M S A E K A L S V A E A L I D

GACTGTAACTGCAATGTGAGATATTTAAAGGADAATCCAAATATGTAATGAATTGTATG  300
D C M C N V T Y L K D M P S Y V M N Q M

AGGAACTGGAGCGCAAAACAAT  323
R N V D A K I
    
```

图 1 白纹伊蚊 AChE 基因片段编码区 DNA 及其氨基酸序列 上行 核酸序列 下行 氨基酸序列 FGESAG AChE 保守序列 下划线 引物序列

3 讨论

本实验测出的白纹伊蚊 AChE 片段含有一 AChE 基因序列的保守特征即围绕活性位点丝氨酸的 6 个氨基酸序列是 FGESAG,该片段与目前研究的所有脊椎动物和无脊椎动物的胆碱酯酶完全一致^[6,7],证明本实验所得到的序列确为 AChE 基因片段。

通过对 AChE 基因片段克隆的测序结果进行同源性分析,其氨基酸序列与埃及伊蚊相应片段的同源性高达 96%,与斯氏按蚊同源性为 87%,与黑腹果蝇同源性为 69%。从种系发生上看,其与伊蚊最近,与按蚊次之,与果蝇较远,这从另一个侧面反映出本实验所获基因片段来自于蚊 AChE 基因。

参 考 文 献

- [1] 刘维德. 我国蚊类抗药性发展的动向[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 1990, 1: 41-44.
- [2] Coto MM, Lazcano JA, de Fernandez DM, et al. Malathion resistance in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* after its use in *Aedes aegypti* control programs[J]. J Am Mosq Contr Assoc, 2000, 16: 324-330.
- [3] Rodriguez MM, Bisset JA, Mila LH, et al. Levels of insecticide resistance and its mechanisms in a strain of *Aedes aegypti* of Santiago de Cuba [J]. Rev Cubana Med Trop, 1999, 51: 83-88.
- [4] 吴明玮, 张玲敏, 黄炯烈, 等. 白纹伊蚊乙酰胆碱酯酶基因片段克隆及鉴定[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2001, 19: 209-212.
- [5] Vaughan A, Rocheleau T, French-Constant R. Site-directed mutagenesis of an acetylcholinesterase gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* confers insecticide insensitivity[J]. Exp Parasitol, 1997, 87: 237-244.
- [6] Anthony N, Rocheleau T, Mocelin G, et al. Cloning, sequencing and functional expression of an acetylcholinesterase gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*[J]. FEBS Lett, 1995, 368: 461-465.
- [7] Hall LM, Malcolm CA. The acetylcholinesterase gene of *Anopheles stephensi*[J]. Cell Mol Neurobiol, 1991, 11: 131-141.

(收稿日期:2001-11-05 编辑:盛慧锋)

基金项目:广东省医学科研基金(No. A1997276)
 作者单位:1 中山大学肿瘤防治中心实用技术研究室, 广州 510060; 2 暨南大学医学院寄生虫学教研室, 广州 510632
 * 通讯作者