

文章编号: 1000-7423(2001)-04-0209-04

【论著】

# 白纹伊蚊乙酰胆碱酯酶基因片段克隆及鉴定

吴明玮<sup>1</sup> 张玲敏<sup>1</sup> 黄炯烈<sup>2</sup> 周国理<sup>2</sup> 吴瑜<sup>2</sup> 赵双星<sup>1</sup>

**【摘要】** 目的 从白纹伊蚊中分离、克隆及鉴定乙酰胆碱酯酶(AChE)基因片段。方法 根据已知的果蝇和斯氏按蚊 AChE 氨基酸序列保守区域设计简并引物,对白纹伊蚊 AChE 基因片段进行扩增,将凝胶回收的 PCR 产物经与 T-载体质粒连接进行 T/A 克隆,用  $\alpha$  互补筛选法筛选重组质粒克隆,用碱裂解法提取重组质粒 DNA 并对重组质粒进行酶切鉴定和 PCR 鉴定。结果与结论 获得与设计相符的白纹伊蚊 AChE 基因片段 PCR 扩增产物并对其作出鉴定。

**【关键词】** 白纹伊蚊;乙酰胆碱酯酶;抗药性;克隆

中图分类号: R384.113, R392.11

文献标识码: A

## *Aedes albopictus*; Cloning and Identification of the Acetylcholinesterase Gene Fragment from the Mosquito

WU Ming-wei<sup>1</sup>, ZHANG Ling-min<sup>1</sup>, HUANG Jiong-lie<sup>2</sup>, ZHOU Guo-li<sup>2</sup>,  
WU Yu<sup>2</sup>, ZHAO Shuang-xing<sup>1</sup>

(1 Department of Parasitology, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632;

2 Department of Parasitology, Sun Yat-Sen University of Medical Science, Guangzhou 510089)

**【Abstract】 Objective** To isolate, clone and identify the acetylcholinesterase (AChE) fragment from the mosquito, *Aedes albopictus*, in relation to exploring mechanism of insecticide resistance. **Methods** The genome DNA extracted from the mosquito was used for degenerate polymerase chain reaction (PCR) and the two pairs of oligonucleotides encoding the highly conserved protein sequences were used as primers. The reaction products were cloned to T-vector and transfected into *E. coli* JM 109. The replicative form DNA of recombinant vector extracted from *E. coli* JM 109 through alkalilysis was identified by the methods of digestion with *Eco*R 1 and *Sal* 1 and PCR. **Results** The products of degenerate primers polymerase chain reaction were obtained and the identified clone belongs to the AChE fragment of the mosquito. **Conclusion** The clone was identified as the AChE fragment of *Aedes albopictus*.

**【Key words】** *Aedes albopictus*, acetylcholinesterase, insecticide resistance, clone.

抗药性在媒介昆虫防治领域已成为世界性的难题<sup>[1,2]</sup>。抗药性的形成主要有基因突变<sup>[3-6]</sup>和基因扩增<sup>[7-9]</sup>两种分子机制。基因突变是生物对有害物质产生抗性的一种重要机制,其中蚊乙酰胆碱酯酶(AChE)基因突变与抗药性产生有密切关系。AChE 是生物神经传导中的一个关键性的酶,也是有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的作用靶部位。AChE 对杀虫剂敏感性降低是蚊对杀虫剂产生抗性的一个重要原因。许多证据表明不敏感 AChE 对于杀虫剂的抗性归因于乙酰胆碱酯酶基因(Ace)突变导致氨基酸替代,这种变化也改变了酶对底物以及杀虫剂的催

化活性<sup>[10-13]</sup>。本实验采用 PCR 及分子克隆技术,拟从白纹伊蚊基因组 DNA 中获得 AChE 基因片段,为进一步研究蚊 AChE 与抗药性的关系打下基础。

### 材料与方法

#### 1 材料

白纹伊蚊敏感株及实验菌株 JM-109 均由中山大学医科大学寄生虫学教研室惠赠。

引物 Forward:

5'-TGGGA[CT]CA[AG]GC[AGCT][CT]T[AGCT]GC[AGCT]AT-3';

引物 Reward:

5'-AT[AGCT]GT[CT]TT[AGCT]GC[AG]TC[AGCT]AC-3'

由上海生工生物工程有限公司合成,使用浓度为 25  $\mu$ m。

作者单位: 1 暨南大学医学院寄生虫学教研室,广州 510632;

2 中山医科大学寄生虫学教研室,广州 510089

主要试剂: SDS、RNA 酶 A、Taq 酶、dNTP 均为上海生工生物工程有限公司产品, PCR marker、X-gal、IPTG、*EcoR* I、*Sal* I 为华美公司产品, DNA 凝胶回收试剂盒为 Qiagen 公司产品, PMD-18 T vector 试剂盒为大连宝生物公司产品, 其余均为国产分析纯试剂。

## 2 方法

### 2.1 提取基因组 DNA<sup>[14]</sup>

取白纹伊蚊成蚊 10 只,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冷冻 30 min 后置匀浆试管中, 各管中分别加入 1.2 ml 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB)、 $2\text{ }\mu\text{l}$   $\beta$ -巯基乙醇, 用匀浆机研磨成匀浆, 取匀浆置 1.5 ml 离心管中,  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴裂解 2 h 后, 用酚/氯仿/异戊醇 (25/24/1) 常规抽提 DNA; 将 DNA 提取管中加  $30\text{ }\mu\text{l}$  TE 缓冲液, 摇匀至溶解,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 2.2 基因组 DNA PCR 扩增

在 0.2 ml PCR 反应管中依次加入  $10\times$  Buffer  $5\text{ }\mu\text{l}$ ,  $\text{MgCl}_2$   $5\text{ }\mu\text{l}$ , 10 mmol/L dNTP  $2\text{ }\mu\text{l}$ , 引物  $2\text{ }\mu\text{l}$ , 模板 DNA  $2\text{ }\mu\text{l}$ , Taq 酶  $1\text{ }\mu\text{l}$ , 加  $\text{ddH}_2\text{O}$  使总反应体积至  $50\text{ }\mu\text{l}$ , 然后扩增:  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  7 min,  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s,  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  1 min 共 30 个循环后,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  10 min。

### 2.3 PCR 产物的克隆与鉴定

#### 2.3.1 PCR 产物的凝胶回收<sup>[15]</sup>

根据上述 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳, 选择与已知的斯氏按蚊 AChE DNA 大小 (约 400 bp) 相应的电泳条带, 紫外灯下切胶并回收。PCR 产物的凝胶回收采用 Qiagen 公司的凝胶回收试剂盒, 回收产物  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

#### 2.3.2 载体与目的基因的连接<sup>[16]</sup>

载体与目的基因的连接采用大连宝生物公司的 PMD-18 T vector 试剂盒, 操作步骤: 在 0.2 ml PCR 反应管中分别加入 PCR 回收产物  $4\text{ }\mu\text{l}$ 、PMD-18 T vector  $1\text{ }\mu\text{l}$  及 solution I  $5\text{ }\mu\text{l}$ ,  $16\text{ }^{\circ}\text{C}$  下连接 10~12 h, 反应结束后  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

#### 2.3.3 用氯化钙制备新鲜的大肠杆菌感受态细胞

按文献<sup>[17]</sup>进行。

#### 2.3.4 质粒的转化

钙转化法制备重组质粒, 并用  $\alpha$  互补筛选法筛选重组克隆, 挑选单一白色的菌落接种于含 3 ml ( $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) 氨苄青霉素的 LB 液体培养基的试管

中, 剧烈振摇下  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养过夜<sup>[17]</sup>。

#### 2.3.5 用碱裂解法提取重组质粒 DNA<sup>[17]</sup>

用碱裂解法提取重组质粒 DNA<sup>[17]</sup> 并加入  $4\text{ }\mu\text{l}$  ( $2\text{ mg/ml}$ ) RNA 酶 A 溶液,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴 30 min,  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴 30 min,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

#### 2.3.6 重组质粒的电泳检测

分别取  $3\text{ }\mu\text{l}$  重组质粒 DNA 和空载体 PUC18 DNA 于 1% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下检测, 与空载体比较, 取片段增大者进行酶切鉴定和 PCR 鉴定。

#### 2.3.7 重组质粒的酶切鉴定

取空质粒 PUC18 为阴性对照, 取电泳片段增大者用 *Sal* I、*EcoR* I 进行酶切。

#### 2.3.8 重组质粒的 PCR 鉴定

分别取  $2\text{ }\mu\text{l}$  重组质粒 DNA 为模板, 进行 PCR 反应, 反应体系及扩增条件同 2.2。

## 结 果

### 1 基因组 DNA 抽提

经抽提纯化的白纹伊蚊敏感株 DNA  $\text{OD}_{260} = 0.033$ ,  $\text{OD}_{280} = 0.019$ , 浓度为  $0.66\text{ mg/ml}$ , 纯度为 1.7; 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳均显示为单一清晰的条带 (图 1), 分子量约 21 kb, 表明基因组 DNA 完整无降解, 无 RNA 污染。

### 2 基因组 DNA PCR 扩增

PCR 扩增后, 取  $5\text{ }\mu\text{l}$  扩增产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶中进行电泳, 紫外灯下观察, 结果显示在 PCR 标志物 515 bp 与 377 bp 间有一较特异的 DNA 条带 (图 2), 片段大小与设计相符。

### 3 PCR 产物的克隆与鉴定

#### 3.1 质粒的转化

凝胶回收的 PCR 产物经与 T-载体连接并转化至宿主菌 JM-109 后, 在含氨苄青霉素、X-gal (5-溴-4-氯-3-吡啶- $\beta$ -D-半乳糖苷) 和 IPTG (异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖) 的 LB 平板上获得分离良好的白色菌落。

#### 3.2 重组质粒的电泳检测

将经抽提纯化的质粒 DNA 进行 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察。结果显示所选克隆的质粒 DNA 分子量大于空质粒 PUC18 (图 3), 表明



## 讨 论

### 1 利用简并引物对白纹伊蚊 AChE 基因片段的 PCR 扩增<sup>[16,17]</sup>

昆虫 AChE 首先在果蝇中得到克隆及测序。除果蝇外,目前已知的 DNA 序列只有斯氏按蚊<sup>[18]</sup>。我们目前仅借助果蝇和斯氏按蚊 AChE 氨基酸序列保守区域来设计简并引物,对白纹伊蚊 AChE 基因片段进行扩增。结果表明该方法有效可行。但是在实验中我们也发现由于简并引物的特异性较差,其扩增的成功率较特异引物 PCR 差很多。我们先后使用了 4 对不同的简并引物,前 3 对均发生非特异扩增,即便不同组的引物间进行组合也很难扩增成功。因此我们的经验是:① 选择引物设计区域时应尽可能降低其引物库之简并度,② 引物 3' 端不应存在简并性,③ 可设计多对简并引物,分别进行扩增,并相互搭配组合,以提高成功率。

### 2 白纹伊蚊 Ace 的克隆与鉴定<sup>[16,17]</sup>

PCR 之后,通常要将扩增出的 DNA 片段克隆到质粒载体上,通常使用限制性酶切位点添加法和平端克隆法。

本实验采用 T/A 克隆法,其克隆效率虽较高,但特异性较低,因此对 PCR 产物特异性要求相对较高。同时克隆前要对产物进行凝胶电泳纯化,以提高其特异性。我们采用的柱回收式凝胶纯化试剂盒,实验表明可提高克隆的特异性。简并引物 PCR 和 T/A 克隆法特异性较低,因此在克隆成功之后要进一步对其进行酶切鉴定和 PCR 鉴定。

AChE 基因现已从包括果蝇和斯氏按蚊在内的多种昆虫中克隆出来<sup>[18]</sup>,但迄今为止尚无直接与不敏感 AChE 有关的点突变 Ace 克隆的报道。本实验以白纹伊蚊为模型,对其 AChE 基因片段进行 PCR 扩增、克隆及测序。将其与抗性蚊相应区域进行比较是否有基因突变,以及 AChE 基因突变与抗药性产生的关系有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] 刘维德. 中华按蚊抗药性发展态势. 昆虫学研究集刊, 1984, (4): 313-319.  
[2] 刘维德. 我国蚊类抗药性发展的动向. 中国媒介生物学及控制

杂志, 1990, 1: 41-44.

[3] 姜家良. 抗药性机理的分子生物学进展. 昆虫学研究集刊, 1988, (8): 239-245.

[4] 徐建农. 酯酶基因扩增与库蚊有机磷抗性. 国外医学寄生虫病分册, 1993, 20: 100-104.

[5] Hoffmann F, Fournier D, Spierer P, et al. Minigene rescues acetylcholinesterase lethal mutations on *Drosophila melanogaster*. J Mol Biol, 1992, 223: 17-22.

[6] Mutero A, Pralavorio M, Bride JM, et al. Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 5922-5926.

[7] Vaughan A, Hawkes N, Hemingway J. Co-amplification explains linkage disequilibrium of two mosquito esterase genes in insecticide-resistant *Culex quinquefasciatus*. Biochem J, 1997, 325(2): 359-365.

[8] Heyse D, Catalan J, Nance F, et al. Unconventional organization of amplified esterase B gene in insecticide-resistant mosquitoes of the *Culex pipiens* complex. J Am Mosq Contr Assoc, 1996, 12(2 Pt 1): 199-205.

[9] Qiao CL, Sun ZQ, Liu JE. New esterase enzymes involved in organophosphate resistance in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from Guangzhou, China. J Med Entomol, 1999, 36: 666-670.

[10] Vaughan A, Rocheleau T, French-Constant R. Site-Directed mutagenesis of an acetylcholinesterase gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* confers insecticide insensitivity. Exp Parasitol, 1997, 87: 237-244.

[11] Bourguet D, Pasteur N, Bisset J, et al. Determination of Ace-1 genotypes in single mosquitoes: Toward an ecumenical biochemical test. Pestic Biochem Physiol, 1996, 55: 122-128.

[12] Bracco JE, Barata JM, Marinotti O. Evaluation of insecticide resistance and biochemical mechanisms in a population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Sao Paulo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1999, 94: 115-120.

[13] Bourguet D, Roig A, Toutant JP, et al. Analysis of molecular forms and pharmacological properties of acetylcholinesterase in several mosquito species. Neurochem Int, 1997, 31: 65-72.

[14] 王迅. 致倦库蚊细胞色素 CYP4 基因的克隆、鉴定及其在蚊虫抗药性研究中的应用探讨. 中山医科大学硕士学位论文集, 1996: 15-16.

[15] 周国理. 白纹伊蚊细胞色素 P450 CYP6 家族新成员全长 cDNA 序列的克隆与鉴定. 中山医科大学博士学位论文集, 1999: 44-45.

[16] 迪芬巴赫 CW, 德维克斯勒 GS 著. 黄培堂等译. PCR 技术实验指南. 北京: 科学出版社, 1998: 98-100, 380-414.

[17] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T, 等著. 金冬雁等译. 分子克隆实验指南. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1995: 19-59, 674-681.

[18] Hall LM, Malcolm CA. The acetylcholinesterase gene of *Anopheles stephensi*. Cell Mol Neurobiol, 1991, 11: 131-141.

(收稿日期: 2000-12-26 编辑: 富秀兰)



## 讨 论

### 1 利用简并引物对白纹伊蚊 AChE 基因片段的 PCR 扩增<sup>[16,17]</sup>

昆虫 AChE 首先在果蝇中得到克隆及测序。除果蝇外,目前已知的 DNA 序列只有斯氏按蚊<sup>[18]</sup>。我们目前仅借助果蝇和斯氏按蚊 AChE 氨基酸序列保守区域来设计简并引物,对白纹伊蚊 AChE 基因片段进行扩增。结果表明该方法有效可行。但是在实验中我们也发现由于简并引物的特异性较差,其扩增的成功率较特异引物 PCR 差很多。我们先后使用了 4 对不同的简并引物,前 3 对均发生非特异扩增,即便不同组的引物间进行组合也很难扩增成功。因此我们的经验是:① 选择引物设计区域时应尽可能降低其引物库之简并度,② 引物 3' 端不应存在简并性,③ 可设计多对简并引物,分别进行扩增,并相互搭配组合,以提高成功率。

### 2 白纹伊蚊 Ace 的克隆与鉴定<sup>[16,17]</sup>

PCR 之后,通常要将扩增出的 DNA 片段克隆到质粒载体上,通常使用限制性酶切位点添加法和平端克隆法。

本实验采用 T/A 克隆法,其克隆效率虽较高,但特异性较低,因此对 PCR 产物特异性要求相对较高。同时克隆前要对产物进行凝胶电泳纯化,以提高其特异性。我们采用的柱回收式凝胶纯化试剂盒,实验表明可提高克隆的特异性。简并引物 PCR 和 T/A 克隆法特异性较低,因此在克隆成功之后要进一步对其进行酶切鉴定和 PCR 鉴定。

AChE 基因现已从包括果蝇和斯氏按蚊在内的多种昆虫中克隆出来<sup>[18]</sup>,但迄今为止尚无直接与不敏感 AChE 有关的点突变 Ace 克隆的报道。本实验以白纹伊蚊为模型,对其 AChE 基因片段进行 PCR 扩增、克隆及测序。将其与抗性蚊相应区域进行比较是否有基因突变,以及 AChE 基因突变与抗药性产生的关系有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] 刘维德. 中华按蚊抗药性发展态势. 昆虫学研究集刊, 1984, (4): 313-319.
- [2] 刘维德. 我国蚊类抗药性发展的动向. 中国媒介生物学及控制

杂志, 1990, 1: 41-44.

[3] 姜家良. 抗药性机理的分子生物学进展. 昆虫学研究集刊, 1988, (8): 239-245.

[4] 徐建农. 酯酶基因扩增与库蚊有机磷抗性. 国外医学寄生虫病分册, 1993, 20: 100-104.

[5] Hoffmann F, Fournier D, Spierer P, et al. Minigene rescues acetylcholinesterase lethal mutations on *Drosophila melanogaster*. J Mol Biol, 1992, 223: 17-22.

[6] Mutero A, Pralavorio M, Bride JM, et al. Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 5922-5926.

[7] Vaughan A, Hawkes N, Hemingway J. Co-amplification explains linkage disequilibrium of two mosquito esterase genes in insecticide-resistant *Culex quinquefasciatus*. Biochem J, 1997, 325(2): 359-365.

[8] Heyse D, Catalan J, Nance E, et al. Unconventional organization of amplified esterase B gene in insecticide-resistant mosquitoes of the *Culex pipiens* complex. J Am Mosq Contr Assoc, 1996, 12(2 Pt 1): 199-205.

[9] Qiao CL, Sun ZQ, Liu JE. New esterase enzymes involved in organophosphate resistance in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from Guangzhou, China. J Med Entomol, 1999, 36: 666-670.

[10] Vaughan A, Rocheleau T, Ffrench-Constant R. Site-Directed mutagenesis of an acetylcholinesterase gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* confers insecticide insensitivity. Exp Parasitol, 1997, 87: 237-244.

[11] Bourguet D, Pasteur N, Bisset J, et al. Determination of Ace-1 genotypes in single mosquitoes: Toward an ecumenical biochemical test. Pestic Biochem Physiol, 1996, 55: 122-128.

[12] Bracco JE, Barata JM, Marinotti O. Evaluation of insecticide resistance and biochemical mechanisms in a population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Sao Paulo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1999, 94: 115-120.

[13] Bourguet D, Roig A, Toutant JP, et al. Analysis of molecular forms and pharmacological properties of acetylcholinesterase in several mosquito species. Neurochem Int, 1997, 31: 65-72.

[14] 王迅. 致倦库蚊细胞色素 CYP4 基因的克隆、鉴定及其在蚊虫抗药性研究中的应用探讨. 中山医科大学硕士学位论文集, 1996: 15-16.

[15] 周国理. 白纹伊蚊细胞色素 P450 CYP6 家族新成员全长 cDNA 序列的克隆与鉴定. 中山医科大学博士学位论文集, 1999: 44-45.

[16] 迪芬巴赫 CW, 德维克斯勒 GS 著. 黄培堂等译. PCR 技术实验指南. 北京: 科学出版社, 1998: 98-100, 380-414.

[17] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T, 等著. 金冬雁等译. 分子克隆实验指南. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1995: 19-59, 674-681.

[18] Hall LM, Malcolm CA. The acetylcholinesterase gene of *Anopheles stephensi*. Cell Mol Neurobiol, 1991, 11: 131-141.

(收稿日期: 2000-12-26 编辑: 富秀兰)