

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2011.01.004

三种家蝇酚氧化酶基因表达差异研究

刘永春 张东顺

(济宁医学院基础医学与法医学院, 山东 济宁 272067; 兖州市大安中心卫生院, 山东 兖州 272100)

摘要 目的 进行不同品系家蝇酚氧化酶基因表达量差异的分析研究。方法 根据酚氧化酶基因序列设计引物扩增基因片段, 荧光定量 PCR 检测在家蝇抗性品系、敏感品系、现场采集品系家蝇体内酚氧化酶的表达水平差异。结果 酚氧化酶基因在抗性品系蝇体内的表达量是敏感品系的 13.38 倍, 现场品系是敏感品系的 6.24 倍。结论 家蝇酚氧化酶基因可作为新的抗性检测及治理基因靶标。

关键词 家蝇; 酚氧化酶; 荧光定量 PCR

中图分类号: R384.2 **文献标志码**: A **文章编号**: 1000-9760(2011)02-012-03

Expression difference analysis of the phenol oxidase gene in 3 strains of musca domestica

LIU Yong-chun, ZHANG Dong-shun

(Basic Medical Science and Forensic college, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: Objective The phenol oxidase gene expression levels in different stains of *Musca domestica* were analyzed. **Methods** Primers were designed on the basis of phenol oxidase sequence, the expression level differences between resistant strain, sensitive strain and local strain of *Musca domestica* were detected with fluorescence quantitative PCR. **Results** The phenol oxidase gene of *Musca domestica* resistant strain is 13.38 times as high as that of sensitive strain, while the expression level of local strain is 6.24 times as high as that of sensitive strain. **Conclusion** *Musca domestica* phenol oxidase gene can be used as a new gene target for resistance detection and treatment.

Key words: *Musca domestica*; phenol oxidase; fluorescence quantitative PCR (FQ-PCR)

杀虫剂的连续、大量使用导致了媒介昆虫抗药性的发生和发展^[1], 抗药性基因的分离与鉴定一直是媒介生物防治研究的热点。酚氧化酶基因与昆虫抗药性之间的关系是目前比较新的研究切入点。由多酚氧化酶(PO)参与的昆虫表皮的硬化反应所形成的坚固的几丁质表皮是其结构和生理屏障, 从而在阻止、抵抗已入侵的病原体中可能发挥重要的作用, 而且 PO 也是昆虫最重要的免疫因子之一, 在昆虫体内是以无活性酶原(PPO)形式存在的, 当病原体入侵时通过 PPO 级联被活化, PPO 级联是昆虫分子识别防御系统的一个重要部分, PPO 活化是昆虫对入侵病原体的一种防御反应^[2]。本实验设计的目的是探讨二者的相关性, 为现场防治的新靶标研究奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试蝇 敏感品系家蝇引自中国科学院动物研究所, 未接触过任何杀虫剂。抗性品系由氯氰菊酯逐代筛选而成, 筛选 30 余代。现场家蝇成虫采自济宁市唐口镇, 带回实验室饲养。

1.1.2 试剂 FQ-PCR、DNA marker、Taq 聚合酶、Sybgreen 荧光探针购自 TaKaRa 公司; RNA 提取、凝胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司; Rotor Gene 3000 PCR 仪购自美国 Orbett Research 公司。

1.2 方法

1.2.1 抗性品系家蝇氯氰菊酯逐代筛选方法 敏感品系家蝇用高效氯氰菊酯原药(纯度 97.3%)筛选, 用丙酮稀释成一定浓度, 选择压力 40%~80%, 处理 24h 内羽化的家蝇, 并选育每代同时进行毒力测定。测定方法: 将原药用丙酮等比例稀释

成系列浓度溶液,用 0.04 μ l 毛细管微量点滴器将药液滴于羽化后第 4 天成虫胸部背板,每次处理 30 头,重复 3 次,以丙酮作为对照。24h 检查结果,并用 POLO 生物测定数据软件分析。

1.2.2 总 RNA 提取及 RT-PCR 分别取 100mg 左右氯氰菊酯抗性品系、敏感品系、现场品系家蝇成虫,加液氮研为粉末后匀浆,Trizol 提取总 RNA。标准 25 μ L 反应体系进行 RT-PCR 反应,条件:95 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 40s,58 $^{\circ}$ C 40s,72 $^{\circ}$ C 1min,重复 25 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min 终止延伸。PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳。

1.2.3 荧光定量 PCR 据报道基因序列设计引物,上游:5'-TCACCTCTCAGTAGAGGT',下游:5'-CTGTATGCTGAGCGTGCTGT-3'。内参 β -actin 上游:5'-AGCGTGAAGTACGGCTCTG-3',下游:5'-ACTCGTCGTAAGTCTGCTCGG-3'。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 1min;然后 95 $^{\circ}$ C 30s,58 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 30s,重复 40 个循环;72 $^{\circ}$ C 10min 终止反应。反应结束后,将结果导入 Excel 计算表达差异。公式:目的基因在抗性品系和敏感品系中的表达差异倍数=2^{- $\Delta\Delta$ CT},其中 $\Delta\Delta$ CT=抗性 Δ CT-敏感 Δ CT=(抗性品系中目的基因的 CT 值-内参照基因的 CT 值)-(敏感品系中目的基因的 CT 值-内参照基因的 CT 值)。

2 结果

2.1 家蝇对氯氰菊酯的抗性测定

敏感品系的 LC₅₀ 为 0.0004mg/L,抗性品系的 LC₅₀ 为 0.0355mg/L,抗性倍数达到了敏感品系的 88.75 倍,现场品系的 LC₅₀ 为 0.0146mg/L,抗性倍数达到了敏感品系的 36.50 倍,结果见表 1。

表 1 家蝇对氯氰菊酯的抗性测定结果

品系	LC ₅₀ (mg/L)	R/S
敏感品系	0.0004	1.00
氯氰菊酯抗性品系	0.0355	88.75
现场品系	0.0146	36.50

2.2 总 RNA 提取

见图 1。

2.3 荧光定量 PCR

计算结果显示,酚氧化酶基因在抗性品系中的表达量是敏感品系的 13.38 倍,在现场品系中的表达量是敏感品系的 6.24 倍,见图 2。

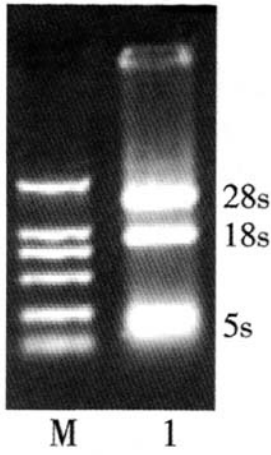


图 1 家蝇总 RNA 电泳图
M:marker 1:总 RNA

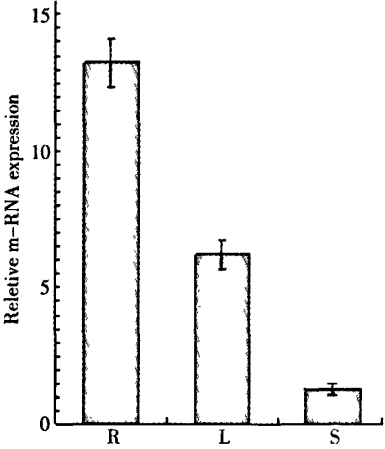


图 2 荧光定量 PCR 结果
R:抗性品系;L:现场品系;S:敏感品系

3 讨论

现场家蝇抗性测试结果显示,氯氰菊酯抗性倍数高达 6.24 倍,我们认为除与用药频率相关外,其原因可能与菊酯类杀虫剂的化学结构和昆虫的遗传因子有关^[3]。

酚氧化酶是细胞氧化酶的一种,在细胞内主要功能是催化氧化反应。节肢动物酚氧化酶具有如下多种功能:1)参与黑色素形成。PO 是黑色素形成的关键酶,黑色素通过愈合伤口和封闭病原菌,在节肢动物的防御反应中起重要作用;2)通过硬化反应来硬化角质。PO 是唯一参与角质硬化的酶,高度硬化的角质可以阻断微生物和异物的入侵;3)伤口的愈合。当昆虫受伤时,pro (下转第 16 页)

3 讨论

棕榈的根、皮、果实和子花古人早用于中医临床。李时珍的《本草纲目》记载棕榈笋及子花有治疗崩中带下的功效^[2]。本课题组在大量收集资料的基础上,未发现棕榈花蕾抗生育作用的研究,遂制订具体方案,进行立项研究。现已证实棕榈花蕾水提物对动物离体子宫平滑肌有兴奋作用^[3],但离体子宫平滑肌的收缩,只能反映某一走行方向肌群的运动变化,不能反映整个子宫的机械运动。本文通过观察棕榈花蕾水提物对在体子宫平滑肌的影响,则能把药物对整个子宫机械运动的影响反映出来。实验结果显示中、高剂量棕榈花蕾水提物直接注入浴管内均可增加家兔在体子宫平滑肌的收缩幅度和活动力,但对频率和张力无明显影响。为进一步观察机体对药物代谢动力学的影响,发现棕榈花蕾水提物经十二指肠给药后可使大鼠子宫平滑肌收缩幅度增强,且随剂量增加起效时间缩短,维

持时间延长。以上结果均可说明棕榈花蕾水提物对动物在体子宫平滑肌有兴奋作用。子宫收缩作用增强可干扰受精卵的着床,因此推测棕榈花蕾水提物对子宫的兴奋作用也是产生抗生育作用的原因之一。同时棕榈花蕾水提物通过加强子宫平滑肌的收缩可压迫血管产生止血作用,并促进宫腔内容物的排出而达到治疗崩漏带下的作用。因此具有临床应用价值。棕榈花蕾中有效成分和兴奋子宫平滑肌的确切作用机制还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1996:471-472.
- [2] 李时珍. 本草纲目[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社, 2004: 1935.
- [3] 刘善庭,王清,齐汝霞,等. 3种棕榈花蕾提取液对大鼠离体子宫平滑肌作用的比较[J]. 中国中医药科技, 2003, 10(4): 228-229.

(收稿日期 2010-12-11)

(上接第13页) PO被蛋白水解酶激活形成了PO, 将酚氧化成醌, 最终形成黑色素, 可防止血淋巴流失, 阻止微生物的进一步入侵; 4) 酚氧化酶是昆虫防御细胞的标志酶, 在宿主的防御反应中可作为非自身识别系统发挥免疫功能^[4]。节肢动物缺乏脊椎动物体内起特异性免疫反应的相应分子(比如免疫球蛋白、T细胞受体和MHC等), 但存在着可诱导的防御系统, 如酚氧化酶原转变成酚氧化酶就是通过识别特异性的微生物分子而实现的一种诱导反应。

许多昆虫的血淋巴都具有抑菌活性, 通常认为是抗菌蛋白和抗菌肽起作用。家蝇具有较强的免疫系统, 其体液免疫因子包括抗菌蛋白、多酚氧化酶(PO)、溶菌酶、褪黑素、凝集素等^[5]。其中多酚氧化酶以无活性的酶原形式—多酚氧化酶原(PPO)存在于昆虫血淋巴中, 当病原生物入侵时, 通过特异性丝氨酸蛋白酶的级联反应(PPO级联)被活化, 参与机体的免疫防御反应^[6]。研究酚氧化酶的特性及其在昆虫生长发育过程中的活性变化和生理功能对开发以酚氧化酶为靶标的新型害虫控制剂具有重要的理论意义。本实验验证酚氧化酶基因在家蝇氯氰菊酯抗性品系高表达, 并且现场品系结果表明酚氧化酶基因的表达水平与家蝇对

杀虫剂的LC50之间有一定的一致性, 提示该基因与家蝇对菊酯类杀虫剂产生抗性的机理具有一定的相关性。该结果为昆虫抗药性机理研究及抗药性的分子检测提供了新的思路。

参考文献:

- [1] Coelho S, Agriculture. European pesticide rules promote resistance, researchers warn[J]. Science, 2009, 323(5913): 450.
- [2] Sun S, Liu W, Wang J, et al. Endonuclease activity of phenol oxidase from *Musca domestica* larvae[J]. Biol Bull, 2008, 215(1): 108-114.
- [3] 龚坤元. 害虫抗性问题的概述[J]. 昆虫知识, 1992, 19(1): 44-46.
- [4] Kutuzova NM, Deviatnikov DD, Ianykina EA. Proteolytic activation of prophenoloxidase in the imago of *Musca domestica* [J]. Biomed Khim, 2009, 55(1): 98-105.
- [5] Cross J H, Chi JCH. ELISA for the detection of *Anopheles gambiae* antibodies in patients with eosinophilic meningitis[J]. Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth, 1982, 13(1): 73-78.
- [6] Sun L, Li B, Paskewitz SM. Cloning and characterization of a putative inhibitor of melanization from *Anopheles gambiae* [J]. Insect Mol Biol, 2006, 15(3): 313-20.

(收稿日期 2010-12-23)