

· 研究论文 ·

Cry1Ac 敏感和抗性小菜蛾 *bre-3* 和 *bre-5* 基因 mRNA 的表达差异研究

李 拓^{1,2}, 张友军², 王少丽², 吴青君²,
徐宝云², 杨中侠², 王 沫^{*1}

(1. 华中农业大学 湖北省昆虫资源利用与害虫可持续治理重点实验室 武汉 430070;

2. 中国农业科学院 蔬菜花卉研究所 北京 100081)

摘 要: 在室内选用 Cry1Ac 对小菜蛾 *Plutella xylostella* 3 龄幼虫进行抗性选育, 获得相对抗性为 356 倍的抗性种群 DBM1Ac-R 品系。应用实时定量基因扩增荧光检测(real time quantitative PCR, real-time qPCR) 技术检测敏感小菜蛾 DBM1Ac-S 和抗性小菜蛾 DBM1Ac-R 品系鞘糖脂 (Glycosphingolipids, GSLs) 合成酶基因 *bre-3* 和 *bre-5* mRNA 在 2 龄、3 龄、4 龄和老熟幼虫、蛹及 4 龄中肠的表达情况。结果显示: *bre-3* 和 *bre-5* 在两个品系的 5 个时期和 4 龄中肠均有表达, 其中 DBM1Ac-S 品系的 *bre-3* mRNA 在 3 龄、4 龄和老熟幼虫的相对表达量显著高于 DBM1Ac-R 品系 ($P < 0.05$), 分别为 DBM1Ac-R 品系的 2.36、5.54 和 2.68 倍; DBM1Ac-S 品系的 *bre-5* mRNA 在 2 龄至蛹期的相对表达量分别为 DBM1Ac-R 品系的 1.19、3.13、1.78、1.75 和 1.65 倍, 其中由 3 龄到蛹期差异显著 ($P < 0.05$)。DBM1Ac-R 品系 3 龄至老熟幼虫的 *bre-3* 和 *bre-5* mRNA 相对表达量降低可能与小菜蛾长期的 Cry1Ac 汰选有一定的关系。比较同一种群、同一龄期(包括 4 龄中肠)的 *bre-3* 和 *bre-5* mRNA 相对表达量差异时, 发现 *bre-5* 相对表达量均高于 *bre-3*。研究结果为苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 杀虫晶体蛋白受体之一 GSLs 的进一步研究提供了一定的基础。

关键词: 鞘糖脂; 苏云金芽孢杆菌; 受体; *bre-3*; *bre-5*

DOI: 10.3969/j.issn.1008-7303.2011.01.03

中图分类号: S481.4; Q78

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2011)01-0013-08

Research in expression differences of *bre-3* and *bre-5* mRNA in *Plutella xylostella* susceptible and resistant to Cry1Ac

LI TUO^{1,2}, ZHANG You-jun², WANG Shao-li², WU Qing-jun²,
XU Bao-yun², YANG Zhong-xia², WANG Mo^{*1}

(1. Key Laboratory of Insect Resources Utilization and Sustainable Pest Management in Hubei, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: DBM1Ac-R strain of *Plutella xylostella* was selected with Cry1Ac in laboratory and showed

收稿日期: 2010-03-30; 修回日期: 2010-07-05.

作者简介: 李拓(1985-), 女, 湖北人, 硕士, E-mail: lituo1234@yahoo.com.cn; * 通讯作者(Author for correspondence): 王沫(1956-), 男, 湖北人, 硕士, 教授, 主要研究方向为昆虫毒理学, 电话: 027-87280543, E-mail: wangmo@mail.hzau.edu.cn

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2007AA10Z421); 国家自然科学基金项目(30871659). http://www.cnki.net

356-fold resistance to Cry1Ac compared with a susceptible strain (DBM1Ac-S). The relative expression of synthetase gene of Glycosphingolipid (GSLs) *bre-3* and *bre-5* mRNA of DBM1Ac-S and DBM1Ac-R strains were determined using real-time qPCR from 2nd-instar to mature larvae, pupa and midgut of 4th-instar. The results showed that both *bre-3* and *bre-5* mRNA were found to express in different development stages and midgut; The relative expression of *bre-3* mRNA in DBM1Ac-S strain was significant higher than DBM1Ac-R strain, exhibiting 2.36, 5.54 and 2.68 times in 3th-instar, 4th-instar and mature larvae respectively; The relative expression of *bre-5* mRNA in DBM1Ac-S strain were 1.19, 3.13, 1.78, 1.75 and 1.65 times respectively compared with DBM1Ac-R strain from 2th-instar to mature larvae. The results suggested that there may be a correlation between the lower relative expression of *bre-3* and *bre-5* mRNA in DBM1Ac-R from 3th to mature larvae and the long-term Cry1Ac toxin selection to DBM1Ac-R strain. In the same stage of DBM1Ac-S and DBM1Ac-R strains, the mRNA level expression of *bre-5* was higher than *bre-3*, showing obvious advantage of gene expression. These findings will provide important basis for further study on GSLs, one of the receptors of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins.

Key words: Glycosphingolipid; *Bacillus thuringiensis*; receptor; *bre-3*; *bre-5*

鞘糖脂 (Glycosphingolipids, GSLs) 是苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 杀虫晶体蛋白受体之一, 影响靶标生物对 Bt 毒素的敏感性。GSLs 首先通过特异糖基被 Bt 毒素识别, 然后引导毒素插入靶标生物细胞膜, 导致靶标生物中肠穿孔, 最终死亡^[1-2]。关于 Bt 毒素通过识别特异糖基来完成其毒杀作用的研究早有报道。Knowles 等^[3]发现, 原本对 Cry1A 敏感的鳞翅目昆虫细胞, 在 *N*-乙酰半乳糖胺 (*N*-acetylgalactosamine, GalNAc) 存在下, 对 Cry1A 不再敏感, 同时 GalNAc 能够影响 Cry1Ac 的 domain III 与舞毒蛾 *Lymantria dispar* 氨肽酶 *N* (aminopeptidase *N*, APN) 的结合^[4]。Jurat 等^[5-6]通过改变烟草夜蛾 *Heliothis virescens* 63 kDa 和 68 kDa 两类糖基蛋白的糖基位点, 发现该种群不再对 Cry1Ac 敏感, 推测其糖基位点的降低可能影响了昆虫对 Cry1Ac 的敏感性; 在进一步的实验中, Jurat 发现碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 可通过特异糖基识别 Cry1Ac。

GSLs 以神经酰胺为母体, 通过一系列的糖基转移酶来完成其特异性糖基的添加^[7]。昆虫和线虫的 GSLs 都拥有一个 Bt 毒素识别保守位点“四糖核心区”^[1, 8], 这个核心区上任意糖基转移酶的变化都会影响 GSLs 上特异糖基添加和 GSLs 的合成量, 最终导致靶标生物对 Bt 毒素产生抗性^[9]。Griffitts 等^[8]总结了参与模式生物秀丽小杆线虫 *Caenorhabditis elegans* GSLs 合成的相关糖基转移酶, 其中 *bre-2*、*bre-3*、*bre-4* 和 *bre-5* 分别编码 β 1, 3-糖基转移酶 (β 1, 3-Glycosyltransferase)、 β 1, 4-甘露糖基转移酶 (β 1, 4-Mannosyltransferase, β 1, 4-ManT)、 β 1, 4-*N*-乙酰半乳糖氨基转移酶 (β 1, 4-GalNAcTransferase, β 1, 4GalNAcT) 和 β 1, 3-*N*-乙酰葡萄糖氨基转移酶 (β 1, 3-GlcNAcTransferase, β 1, 3-GlcNAcT)。Kumaraswami 等^[10]发现, 对 Cry1Ac 相对抗性为 1.3×10^5 倍的小菜蛾 *Plutella xylostella* GSLs 表达量明显低于 Cry1Ac 敏感种群, 推测小菜蛾 Cry1Ac 抗性可能与其体内 GSLs 的含量有关。鉴于昆虫对 Bt 毒素抗性的产生可能与其体内 GSLs 的合成量有关, 而 GSLs 合成量又受到各种糖基转移酶的影响, 因此比较昆虫 Bt 毒素敏感和抗性种群糖基转移酶基因表达差异是一项很有意义的工作。糖基转移酶的表达调控主要发生在转录水平上, 检测糖基转移酶 mRNA 最能代表糖基转移酶的表达情况。

本研究以敏感小菜蛾 (DBM1Ac-S) 和抗性小菜蛾 (DBM1Ac-R) 为研究对象, 选取 *bre-3* 和 *bre-5* 作为目的基因, 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 为内参基因, 建立了小菜蛾 *bre-3* 和 *bre-5* 实时定量基因扩增荧光检测 (real time quantitative PCR, real-time qPCR) 体系, 通过比较不同种群、不同龄期 (包括 4 龄中肠) 条件下 *bre-3* 和 *bre-5* mRNA 的表达差异, 完成 GSLs 合成量的差异分析。

1 材料与方法

1.1 供试材料

甘蓝品种: 京丰一号, 中国农业科学院蔬菜花卉

研究所提供。

1.2 仪器与药剂

BioRad S-1000 普通 PCR 仪; ABI 7500 荧光定量 PCR 仪; BioRad ChemiDoc™ XRS + 凝胶成像仪; UNIC UV2800 紫外分光光度计。

Triton X-100 购自 SIGMA 公司; Bt 毒素 Cry1Ac 晶体蛋白, 从 HD-73 菌株中提取, 由中国农业科学院植物保护研究所惠赠, 其质量浓度为 2.5 mg/mL。总 RNA 抽取试剂盒(Trizol Reagent 试剂盒, 美国 Invitrogen); Real time PCR Master Mix (SYBR Green I) 试剂盒(购自天根生化科技有限公司)。

1.3 Cry1Ac 对 DBM1Ac-R 的汰选

敏感小菜蛾(DBM1Ac-S) [11]: 由美国康奈尔大学赵建周研究员提供, 原命名为 Geneva 88, 室内饲养多代, 期间未施用任何杀虫剂; 抗性小菜蛾(DBM1Ac-R) [12]: 亦由赵建周研究员提供, 为 Geneva 88 与 Cry1Ac 抗性种群(长期喂食转 Cry1Ac 基因甘蓝) 交配后代, 后在室内以涂布 Cry1Ac 蛋白甘蓝选育。

具体汰选参照杨峰山等 [12] 报道的方法, 但稍有改动。当群体饲养的小菜蛾幼虫多数进入 3 龄时, 根据上一代毒力测定结果, 吸取 Cry1Ac 原液, 用 0.05% 的 Triton X-100 溶解, 配制能杀死种群 60%~70% 个体的药液, 将甘蓝叶片放入相应处理药液中浸渍 10 s, 晾干后置于恒温养虫室内隔离饲养。若因选择压力较大而导致种群数量较少时, 间隔一代再用药剂处理, 以保持种群具有较大数量。

1.4 生物测定

采用叶片浸渍饲喂法 [13]。用质量分数为 0.05% 的 Triton X-100 溶解 Cry1Ac, 按等比稀释法配制系列浓度药液, 以 0.05% 的 Triton X-100 水溶液为对照。取新鲜甘蓝苗嫩叶, 用打孔器打下直径 9 cm 的圆片, 分别在各种供试药液中浸渍约 10 s, 自然晾干后, 放入直径 9 cm 的培养皿中(垫有 3 层滤纸保湿), 并接入供试 DBM1Ac-S 和 DBM1Ac-R 品系 3 龄幼虫。每处理 4 次重复, 每重复接虫 10 头。饲养条件: 温度 25 °C ± 1 °C, 光周期 16L:8D 相对湿度 70%。于 72 h 后统计幼虫死亡情况, 用农药室内试验数据处理系统处理试验数据, 计算致死中浓度(LC₅₀)。

1.5 总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成

采用 Trizol reagent 试剂盒提取 RNA [14]。分别

3 龄(L3)、4 龄(L4) 和老熟幼虫(ML)、蛹(Pupa) 及 4 龄中肠的总 RNA, 每组 RNA 分别选用 5 头虫或 5 条中肠, 每组 3 次重复。cDNA 第一链的合成参照 Invitrogen 公司的逆转录试剂盒(SuperScript III First-Strand synthesis system for RT-PCR) 使用程序。

1.6 引物设计、PCR 产物扩增及克隆

根据美国基因序列数据库(GenBank) 中登录的小菜蛾 *bre-3* 和 *bre-5* 核苷酸完整的 CDS 序列(登录号分别为 GU321343 和 GU321345) 设计目的片段引物, 以 GAPDH 为内参基因(登录号为 AJ489521) 设计引物, 引物设计软件为 Primer 5.0。 *bre-3*、*bre-5* 和 GAPDH 目的片段上下游引物分别为: *bre-3*F(5'-TGATAAAGAGAAGGCAGAAATCG-3') 和 *bre-3*R(5'-AATTAACAGCACTTGTGGCAAT-3'); *bre-5*F(5'-GGTCGACACATCTCTGTAACCA-3') 和 *bre-5*R(5'-GGGTAATGGAATTCATCCTCAA-3'); GAPDH F(5'-GTATGGCATTCCGTGTTCCCGTCCC-3') 和 GAPDH R(5'-CCTGGTCTCGGTGTAGCCCAAGA-TTC-3'); 预期片段长度分别为 116、149 和 153 bp。PCR 产物在 1.0% (0.01 g/mL) 的琼脂糖凝胶上进行电泳, 并采集图片。

1.7 标准曲线的制作

按照 Real time PCR Master Mix(SYBR Green I) 试剂盒操作指导, 采用 real-time qPCR 技术对反转录所得到的 DBM1Ac-S 品系 4 龄幼虫中肠 cDNA 浓度分别进行 5 倍稀释(1、1:5、1:25、1:125), 然后绘制 *bre-3*、*bre-5* 和 GAPDH 标准曲线, 确定各自的扩增效率。 *bre-3*、*bre-5* 和 GAPDH 的 real-time qPCR 反应体系为 25 μL, 包括: 11.25 μL Real Master Mix 混合液、0.15 μg cDNA 模板、0.4 μL 上下游引物(10 μmol/L)、11.95 μL 双蒸水(ddH₂O)。同时进行阴性对照, 反应体系为 25 μL, 模板改加 2 μL ddH₂O, 以确定所选引物无非特异扩增, PCR 体系无污染。

为了避免目的基因和内参基因同管扩增时引物对之间可能的竞争, 本实验采用了分管扩增目的基因和内参基因的方法。 *bre-3*、*bre-5* 和 GAPDH 的反应条件为: 94 °C 预变性 6 min; 94 °C 30 s, 59 °C 30 s, 72 °C 35 s, 共 40 个循环; 在 72 °C 延伸 35 s 阶段收集荧光值, 并在上述扩增条件后加 60 °C 至 95 °C 的溶解曲线分析步骤。

1.8 real-time qPCR 结果分析

采用 real-time qPCR 技术对 DBM1Ac-S 和 DBM1Ac-R 品系的 *bre-3* 和 *bre-5* mRNA 在 L2、L3、

L4、ML、Pupa 和 4 龄中肠的相对表达量进行分析。每处理 4 个重复,不同处理得到的数据经内参基因均一化处理后,以 DBM1Ac-S 品系的 *bre-3* L2 mRNA 为标准,参照文献 [15-17] 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 *bre-3* 和 *bre-5* 的相对表达量。相对表达量用 SAS 统计软件进行方差分析 $P < 0.05$ 表明有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 Bt 毒素 Cry1Ac 对 DBM1Ac-S 和 DBM1Ac-R 品系的生物测定

从表 1 可以看出,Cry1Ac 毒素对 DBM1Ac-R

品系的 LC_{50} 值为 111.58 mg/L,对 DBM1Ac-S 品系的 LC_{50} 值为 0.31 mg/L,相对抗性为 356.00 倍,DBM1Ac-R 品系对 Cry1Ac 表现出了高水平的抗性。

2.2 *bre-3*、*bre-5* 和 GAPDH 的 PCR 产物鉴定和标准曲线绘制

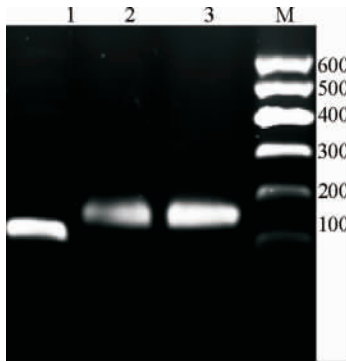
用扩增的 *bre-3*、*bre-5* 和 GAPDH 基因片段的引物进行 PCR,得到特异的 116、149 和 153 bp 的扩增条带(图 1),同时对阳性菌落的测序分析证明,所得序列是目的条带(未列出)。

表 1 Bt 毒素 Cry1Ac 对 DBM1Ac-S 和 DBM1Ac-R 品系的生物测定

Table 1 Susceptibility of DBM1Ac-S and DBM1Ac-R strains to Cry1Ac toxin

| 品系 Strain | 回归方程 Regression equation | 相关系数 Correlation coefficient r | LC_{50} (95% CL) / (mg/L) | 相对抗性倍数* Relative resistance ratio* |
|--------------|-----------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|
| DBM1Ac-S | $Y = 5.88 + 1.74x$ | 0.99 | 0.31(0.25 ~ 0.40) | 1.00 |
| DBM1Ac-R | $Y = 2.90 + 1.03x$ | 0.99 | 111.58(48.49 ~ 256.76) | 356.00 |

注:* 为 DBM1Ac-R 品系 LC_{50} 与 DBM1Ac-S 品系 LC_{50} 的比值。* Was LC_{50} of DBM1Ac-R strain/ LC_{50} of DBM1Ac-S strain.



M: Marker I; 1: *bre-3*; 2: *bre-5*; 3: GAPDH

图 1 RT-PCR 产物电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram of RT-PCR products

分别分析 *bre-3* 和 GAPDH 目的片段及 *bre-5* 和 GAPDH 目的片段扩增曲线的相关性,如图 2 和图 3 所示。*bre-3* 目的片段的标准曲线为: $Y = 3.37x + 21.06$,相关系数 $R^2 = 1.00$; GAPDH 目的片段的标准曲线为: $Y = 3.29x + 15.30$, $R^2 = 1.00$ 。*bre-5* 目的片段的标准曲线为: $Y = 3.46x + 20.00$, $R^2 = 1.00$; GAPDH 目的片段的标准曲线为: $Y = 3.37x + 15.06$, $R^2 = 1.00$ 。其中, Y 代表每个反应管内的荧光信号达到设定阈值时所经历的循环数(threshold value, Ct), x 代表模板量的负对数值。在绘制 *bre-3* 标准曲线时,*bre-3* 和 GAPDH 的扩增效率分别为 0.98 和 1.01;在绘制 *bre-5* 标准曲线时,*bre-5* 和

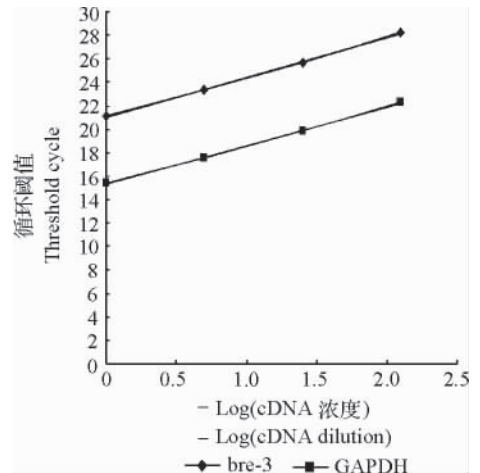


图 2 *bre-3* 和 GAPDH 标准曲线

Fig. 2 Standard curve of *bre-3* and GAPDH

GAPDH 的扩增效率分别为 0.95 和 0.98。*bre-3* 和 *bre-5* 同 GAPDH 的扩增效率差值均小于 0.1,认为有相似的扩增效率;从熔解曲线(图 4)可以看出,3 个基因的扩增特异性非常好,熔解温度(T_m)值分别为 79.7、84.1 和 88.2 $^{\circ}C$ 。荧光曲线能够准确地反映目的产物的扩增,据王海鸿等^[18]方法可以判断,所选片段可用于小菜蛾 *bre-3* 和 *bre-5* mRNA 表达分析。

2.3 不同龄期 DBM1Ac-S 和 DBM1Ac-R 品系 *bre-3* mRNA 表达量分析

以 DBM1Ac-S *bre-3* 的 S1 泳道产物表达量为

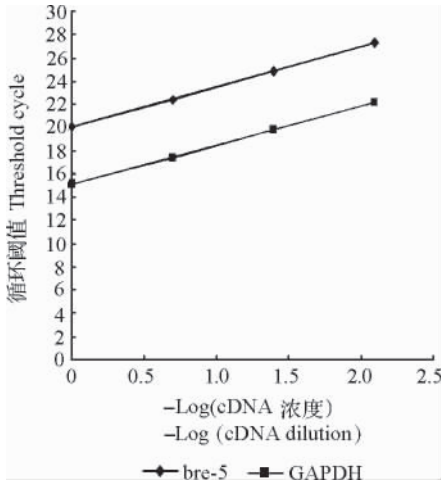


图3 *bre-5* 和 GAPDH 标准曲线

Fig. 3 Standard curve of *bre-5* and GAPDH

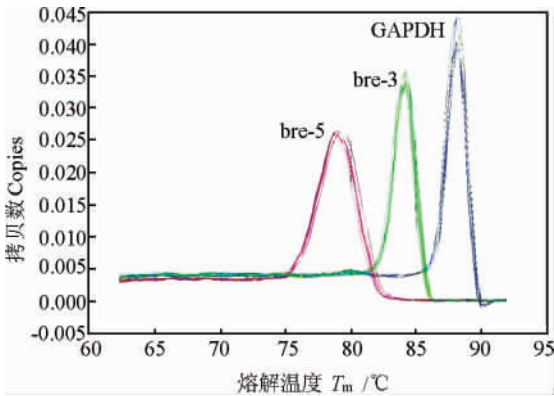


图4 *bre-5*、*bre-3* 和 GAPDH 的熔解曲线

Fig. 4 Melt curve of *bre-5*, *bre-3* and GAPDH

标准量 (1.00), 通过 real-time qPCR 鉴定了 *bre-3* mRNA 在 DBM1Ac-S 和 DBM1Ac-R 品系 L2、L3、L4、ML 和蛹期的表达 (图 5A), 并对该表达进行了相对定量分析 (图 5B)。结果表明, *bre-3* 在 DBM1Ac-S 和 DBM1Ac-R 品系供试 5 个时期均有表达。DBM1Ac-S 品系 *bre-3* 在 L3、L4 和 ML 相对表达量均显著高于 DBM1Ac-R 品系, 分别为 DBM1Ac-R 品系的 5.54、2.36 和 2.68 倍 ($P < 0.05$), 其中 *bre-3* 最高表达量出现在 DBM1Ac-S 品系 L3; 在 L2 和蛹期, DBM1Ac-R 品系 *bre-3* 表达量均显著高于 DBM1Ac-S 品系 ($P < 0.05$)。

2.4 不同龄期 DBM1Ac-S 和 DBM1Ac-R 品系 *bre-5* mRNA 表达量分析

以 DBM1Ac-S 品系 *bre-3* 的 S1 泳道产物表达量为标准量 (1.00), 利用 real-time qPCR 研究 *bre-5* mRNA 在 DBM1Ac-S 和 DBM1Ac-R 品系 L2、L3、L4、ML 和蛹期的表达 (图 6A), 并对该表达进行了

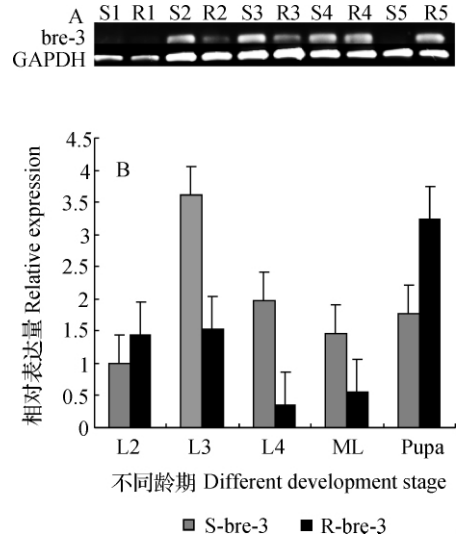


图5 不同龄期 DBM1Ac-S 和 DBM1Ac-R *bre-3* 的相对表达

Fig. 5 Expression of *bre-3* in different development stages of DBM1Ac-S and DBM1Ac-R strains

A. DBM1Ac-S 和 DBM1Ac-R 品系 *bre-3* 在不同龄期表达产物电泳图; B. DBM1Ac-S 和 DBM1Ac-R 品系 *bre-3* 在不同龄期表达分析。S: DBM1Ac-S; R: DBM1Ac-R; S1/R1: L2; S2/R2: L3; S3/R3: L4; S4/R4: ML; S5/R5: Pupa。

A. Electrophoretogram of expression products of *bre-3* of DBM1Ac-S and DBM1Ac-R in different developmental stages; B. The expression analysis of *bre-3* of DBM1Ac-S and DBM1Ac-R in different developmental stages.

相对定量分析 (图 6B)。结果表明, *bre-5* 在 DBM1Ac-S 和 DBM1Ac-R 品系以上 5 个时期均有表达, 且 DBM1Ac-S 品系 *bre-5* 相对表达量均高于 DBM1Ac-R 品系, 分别为 DBM1Ac-R 品系的 1.19、3.13、1.78、1.75 和 1.65 倍, 其中 L3、L4、ML 和蛹期差异显著 ($P < 0.05$)。

比较 *bre-3* 和 *bre-5* 相对表达量差异时, 发现 *bre-5* 在 DBM1Ac-S 品系 L2、L3、L4、ML 和蛹期相对表达量均高于 *bre-3*, 在 DBM1Ac-R 品系也表现出同样的趋势。无论在 DBM1Ac-S 和 DBM1Ac-R 品系, *bre-3* 和 *bre-5* 最高相对表达量均出现在蛹期, DBM1Ac-S 品系 *bre-5* 蛹期相对表达量约为 DBM1Ac-S 品系 *bre-3* 的 L2 (标准量 1.00) 的 64.30 倍。

2.5 DBM1Ac-S 和 DBM1Ac-R 品系 4 龄中肠 *bre-3* 和 *bre-5* mRNA 表达量分析

以 DBM1Ac-S 品系 *bre-3* 的 S1 泳道产物表达量为标准量 (1.00), 研究 *bre-3* 和 *bre-5* mRNA 在 DBM1Ac-S 和 DBM1Ac-R 品系 4 龄中肠的表达。

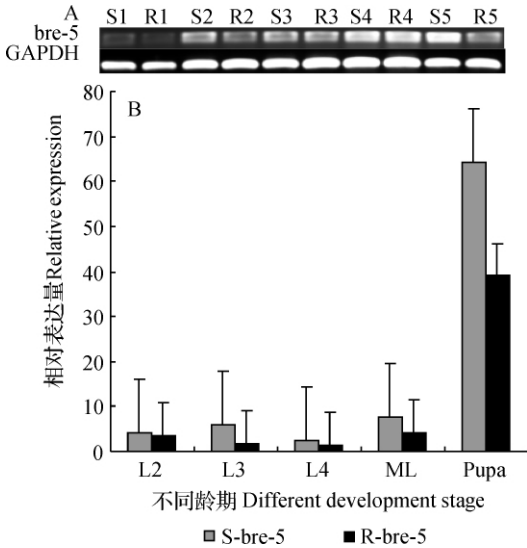


图 6 不同龄期 DBM1Ac-S 和 DBM1Ac-R 品系 *bre-5* 表达

Fig. 6 Expression of *bre-5* in different developmental stages of DBM1Ac-S and DBM1Ac-R

A. DBM1Ac-S 和 DBM1Ac-R 品系 *bre-5* 在不同龄期表达产物电泳图; B. DBM1Ac-S 和 DBM1Ac-R 品系 *bre-5* 在不同龄期表达分析。S: DBM1Ac-S; R: DBM1Ac-R; S1/R1: L2; S2/R2: L3; S3/R3: L4; S4/R4: ML; S5/R5: Pupa.

A. Electrophoretogram of expression products of *bre-5* of DBM1Ac-S and DBM1Ac-R in different developmental stages; B. The expression analysis of *bre-5* of DBM1Ac-S and DBM1Ac-R in different developmental stages.

如图 7 所示, *bre-3* 和 *bre-5* mRNA 在 DBM1Ac-S 和 DBM1Ac-R 品系 4 龄中肠均有表达。无论在 DBM1Ac-S 和 DBM1Ac-R 品系 *bre-3* 4 龄中肠相对表达量均显著低于 *bre-5* ($P < 0.05$), 其中 DBM1Ac-R 品系 *bre-5* 4 龄中肠相对表达量最高, 其次分别为 DBM1Ac-S 品系 *bre-5*, DBM1Ac-S 品系 *bre-3* 和 DBM1Ac-R 品系 *bre-3*。比较 DBM1Ac-S 和 DBM1Ac-R 品系 4 龄中肠 *bre-3* 和 *bre-5* 相对表达量时, 发现 DBM1Ac-S 品系 *bre-3* 和 *bre-5* 相对表达量分别为 DBM1Ac-R 品系的 1.42 倍和 0.60 倍。

3 讨论

bre-3 编码 $\beta 1, 4\text{ManT}$, 该酶的保守模块为 QRXRW^[19], *bre-5* 编码 $\beta 1, 3\text{GlcNAcT}$, 对应保守模块为 DXD 和 DDVFLG^[20]。在线虫中, *bre-3* 的缺失和 *bre-5* N 端第 249 位 R 突变造成线虫对 Cry5B 产生抗性^[2, 21]。根据 GenBank 中登录的小菜蛾 *bre-3* 和 *bre-5* 核苷酸完整的 CDS 序列(登录号分别为 GU321343 和 GU321345) 设计引物克隆本实验室 DBM1Ac-S 和 DBM1Ac-R 品系 *bre-3* 和 *bre-5*, 与已

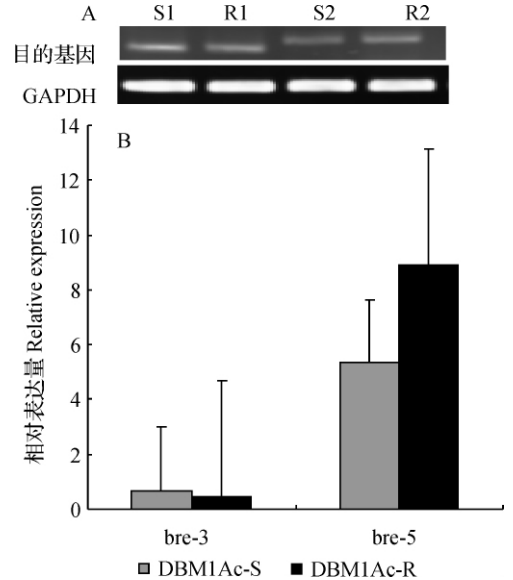


图 7 DBM1Ac-S 和 DBM1Ac-R 品系 4 龄中肠 *bre-3* 和 *bre-5* 表达

Fig. 7 Expression of *bre-3* and *bre-5* in 4th midgut of DBM1Ac-S and DBM1Ac-R

A. DBM1Ac-S 和 DBM1Ac-R 品系 4 龄中肠 *bre-3* 和 *bre-5* 表达产物电泳图; B. DBM1Ac-S 和 DBM1Ac-R 品系 4 龄中肠 *bre-3* 和 *bre-5* 表达分析。S: DBM1Ac-S; R: DBM1Ac-R; S1/R1: *bre-3* midgut; S2/R2: *bre-5* midgut.

A. Electrophoretogram of expression products of *bre-3* and *bre-5* of DBM1Ac-S and DBM1Ac-R in 4th instar larvae midgut; B. The expression analysis of *bre-3* and *bre-5* of DBM1Ac-S and DBM1Ac-R in 4th instar larvae midgut.

登录的小菜蛾序列同源性均达 99% (未列出), 保守模块区同源性为 100%。虽然小菜蛾 DBM1Ac-S 和 DBM1Ac-R 品系 *bre-3* 和 *bre-5* 氨基酸存在差异位点, 但这些差异位点均不在酶的保守模块区。根据重复性实验推测差异位点可能为多态位点。

相对于昆虫 Bt 毒素敏感种群, 抗性种群表现出一定的适合度代价, 这种代价除了表现在存活率降低、产卵量下降、发育迟缓等外, 还存在基因表达代价^[22]。与传统基因转录水平研究方法 RNA 印记杂交 (Northern blot) 和半定量逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 相比, real-time qPCR 技术的优势是对不同条件或处理下目的基因的准确定量, 只要设计合适的引物, 就能实现高度特异和高度灵敏的扩增, 区分密切相关基因。早在 2006 年, Carrière 就发现棉红铃虫 *Pectinophora gossypiella* 的 Bt 抗性由钙粘蛋白基因突变引起; 在进一步研究中, 他应用 real-time qPCR 等技术证实该基因突变直接影响昆虫体内精子的移动^[23-24]。岳丽娜等^[25]采用 real-time qPCR

技术检测棉铃虫 *Helicoverpa armigera* P450 基因 CYP6AE12 的 mRNA 表达水平时发现, CYP9A12 的 YS-FP 品系中肠和脂肪体的 mRNA 表达量分别为 YS 品系的 3.6 倍和 1.3 倍。CYP9A12 的过量表达与 YS-FP 品系棉铃虫的抗药性可能有一定关系。高贵田等^[26]应用 real-time qPCR 技术检测不同家蚕 *Bombyx mori* 品系中肠内羧酸酯酶表达差异时发现, 羧酸酯酶基因可能与家蚕抗浓核病毒有一定的关系。目前有关糖基转移酶在有害生物 Bt 抗性方面的研究报道还比较少, 研究对象主要以线虫为主^[21-22]。本研究用 real-time qPCR 系统比较了 GSLs 合成酶基因 *bre-3* 和 *bre-5* mRNA 在小菜蛾 DBM1Ac-S 和 DBM1Ac-R 品系 L2、L3、L4、ML、蛹和 4 龄中肠表达的差异。鉴定 *bre-3* mRNA 在 DBM1Ac-S 和 DBM1Ac-R 品系这 5 个时期表达差异时, 发现 DBM1Ac-S 品系 *bre-3* 在 L3、L4 和 ML 表达量显著高于 DBM1Ac-R 品系 ($P < 0.05$)。虽然在 L2 和蛹期 DBM1Ac-R 品系 *bre-3* 相对表达量均显著高于 DBM1Ac-S 品系的结果, 考虑到 *bre-3* 参与 GSLs 合成, 影响生物体内 GSLs 的合成量^[21], 而 GSLs 作为脂筏组成成分之一影响细胞膜的致密性和结构稳定性^[27], 昆虫通过降低农药穿透性影响其抗药性^[28], 因此 DBM1Ac-R 品系 *bre-3* 在 L2 的表达量高于 DBM1Ac-S 品系可能是其为抵抗 3 龄幼虫期的 Cry1Ac 汰选而做出的降低农药穿透性的结果。考虑到昆虫蛹期也要进行一系列复杂的细胞内信号转导和代谢调节等^[29], 长期的 Cry1Ac 毒素汰选可能在一定程度上影响了 DBM1Ac-R 品系 L3、L4 和 ML 的 *bre-3* 表达。

为了进一步研究 GSLs 与靶标生物对 Bt 毒素的抗性机制, 笔者对参与 GSLs 合成第三步的基因 *bre-5* 进行了研究。以 Bre-3 合成产物为底物进一步完成 GSLs 特异糖基的添加, *bre-3* 和 *bre-5* 的缺失导致了 GSLs 三糖核心区合成量减少, 影响了生物体内 GSLs 的合成量, 引起靶标生物对 Bt 毒素产生抗药性^[1, 2, 8]。研究发现: *bre-5* mRNA 在 DBM1Ac-S 和 DBM1Ac-R 品系 5 个时期均有表达, 且同时期的 DBM1Ac-S 品系 *bre-5* 相对表达量均高于 DBM1Ac-R 品系, 分别为 DBM1Ac-R 品系的 1.19、3.13、1.78、1.75 和 1.65 倍, 其中 L3、L4、ML 和蛹期差异显著 ($P < 0.05$)。DBM1Ac-R 3 龄至老熟幼虫的 *bre-3* 和 *bre-5* mRNA 相对表达量降低可能与小菜蛾长期的 Cry1Ac 汰选有关。

在比较同一种群、同一龄期(包括 4 龄中肠)

bre-3 和 *bre-5* mRNA 表达量差异时, 发现 *bre-5* 在同一龄期(4 龄中肠)的相对表达量均高于 *bre-3*; 其中 *bre-5* 中肠表达量仅低于蛹期, 高于其他任何幼虫期的相对表达量。前面已经介绍昆虫蛹期要进行一系列复杂的细胞内信号转导和代谢调节等^[29], 推测该基因可能大量参与了中肠中一些糖脂类受体的合成, 这与 Coates 等^[30]在研究亚洲玉米螟 *bre-5* 同源基因 *Onb3GalT 5* 在不同组织间 mRNA 表达量的试验时得出的结论是一致的, 可为进一步研究昆虫对 Bt 的抗性同 GSLs 之间潜在机制提供基础。

考虑到 GSLs 作为 Bt 毒素的一类新受体, 仅参与 GSLs 五糖核心区就需要 4 种糖基转移酶, 还不涉及 GSLs 糖链进一步延伸所需酶, 因此 GSLs 合成受多种糖基转移酶共同调节, 而每种糖基转移酶又隶属于对应的超基因家族, 可见 GSLs 对靶标生物对 Bt 的抗药性的影响十分复杂^[2, 8, 21], 还有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] GRIFFITTS J S, HASLAM S M, YANG T *et al.* Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin [J]. *Science*, 2005a, 307(5711): 922-925.
- [2] GRIFFITTS J S, HUFFMAN D L, WHITACRE J L, *et al.* Resistance to a bacterial toxin is mediated by removal of a conserved glycosylation pathway required for toxin-host interactions [J]. *J Biol Chem* 2003, 278(46): 45594-45602.
- [3] KNOWLES B H, THOMAS W E, ELLAR D J. Lectin-like binding of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* lepidopteran-specific toxin is an initial step in insecticidal action [J]. *FEBS Lett* 1984, 168(2): 197-202.
- [4] JENKIN J L, LEE M K, VALIATIS A P, *et al.* Bivalent sequential binding model of a *Bacillus thuringiensis* toxin to gypsy moth aminopeptidase N receptor [J]. *J Biol Chem* 2000, 275(19): 14423-14431.
- [5] JURAT-FUENTES J L, GOULD F L, ADANG M J. Altered glycosylation of 63- and 68-kilodalton microvillar proteins in *Heliothis virescens* correlates with reduced Cry1 toxin binding, decreased pore formation, and increased resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins [J]. *Appl Environ Microbiol* 2002, 68(11): 5711-5717.
- [6] JURAT-FUENTES J L, ADANG M J. Characterization of a Cry1Ac receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae [J]. *Eur J Biochem* 2004, 271: 3127-3135.
- [7] FULLER M D, SCHWIENTEK T, WANDALL H H, *et al.* Structure elucidation of neutral, di-, tri-, and teraglycosylceramide from high five cell: identification of a novel (non-arthro-series) glycosphingolipid pathway [J]. *Glycobiology*, 2005, 15(12): 1286-1301.

- [8] GRIFFITTS J S ,AROIAN R V. Many roads to resistance: how invertebrates adapt to Bt toxins[J]. *Bio Essays* 2005b 27(6): 614 - 624.
- [9] BARROWS B D ,GRIFFITTS J S ,AROIAN R V. *Caenorhabditis elegans* carbohydrates in bacterial toxin resistance [J]. *Methods Enzymol* 2006 417: 58 - 340.
- [10] KUMARASWAMI N S ,MARUYAMA T ,KURABE S ,et al. Lipids of brush border membrane vesicles (BBMV) from *Plutella xylostella* resistant and susceptible to Cry1Ac δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* [J]. *Comp Biochem Physiol* 2001 129(1): 173 - 183.
- [11] ZHAO J Z ,CAO J ,LI Y X ,et al. Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution [J]. *Nat biotechnol* 2003 21(12): 1493 - 1497.
- [12] YANG Feng-shan(杨峰山) ,WU Qing-jun(吴青君) ,ZHANG Yong-jun(张友军) ,et al. 小菜蛾对 Bt 毒素 Cry1Ac 和 Bt 制剂抗性的选育及其抗性种群的生物学适应性[J]. *Acta Entomol Sin(昆虫学报)* 2006 49(1): 64 - 69.
- [13] TABASHNIK B E ,CUSHING N L. Leaf residue topical bioassays for assessing insecticide resistance in the diamondback moth (*Plutella xylostella* L.) [J]. *FAO Plant Protect Bull* 1987 , 35: 11 - 14.
- [14] YANG Z X ,WEN L Z ,ZHANG Y J ,et al. Effects of injecting cadherin gene dsRNA on growth and development in diamondback moth *Plutella xylostella* (Lep.: Plutellidae) [J]. *J Appl Entomol* 2009 133: 75 - 81.
- [15] HEID C A ,STEVENS J ,WILLIAMS P M ,et al. Real-time quantitative PCR[J]. *Genome Res* 1996 6: 986 - 994.
- [16] LIVAK K J ,SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method[J]. *Methods* 2001 25: 402 - 408.
- [17] LIU Chen-ti(刘衬丽) ,WANG Dong(王东) ,SHEN Wei-de(沈卫德) ,et al. 家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 serpin-6 的克隆、序列分析和组织表达[J]. *Acta Entomol Sin(昆虫学报)* 2009 , 52(1): 1 - 9.
- [18] WANG Hai-hong(王海鸿) ,LEI Zhong-ren(雷仲仁). 用荧光定量 RT-PCR 方法分析 B 型和 ZHJ-1 型烟粉虱热休克基因 hsp70 和 hsp90 的表达[J]. *Sci Agric Sin(中国农业科学)* , 2008 41(11): 3636 - 3644.
- [19] SAXENA I M ,BROWN R M ,DANDEKAR T. Structure-function characterization of cellulose synthase: relationship to other glycosyltransferases [J]. *Phytochemistry* ,2001 ,57(7): 1135 - 1148.
- [20] HENNET T. The galactosyltransferase family [J]. *Cell Mol Life Sci* 2002 59(7): 1081 - 1095.
- [21] GRIFFITTS J S ,WHITACRE J L ,STEVENS D E ,et al. Bt toxin resistance from loss of a putative carbohydrate-modifying enzyme [J]. *Science* 2001 293(5531): 860 - 864.
- [22] GASSMANN A J ,CARRIÈRE Y ,TABASHNIK B E. Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* [J]. *Annu Rev Entomol* 2009 54: 63 - 147.
- [23] CARRIÈRE Y ,ELLERS-KIRK C ,BIGGS R W ,et al. Cadherin-based resistance to Bt cotton in hybrid strains of pink bollworm: fitness costs and incomplete resistance[J]. *J Econ Entomol* 2006 , 99: 1925 - 1935.
- [24] CARRIÈRE Y ,SHOWALTER A M ,TABASHNIK B E ,et al. Cadherin gene expression and effects of Bt resistance on sperm transfer in pink bollworm [J]. *J Insect Physiol* 2009 55: 1058 - 1064.
- [25] YUE Li-na(岳丽娜) ,YANG Yi-hua(杨亦桦) ,WU Yi-dong(吴益东) ,et al. 棉铃虫 P450 基因 CYP6AE12 和 CYP9A18 的克隆与 mRNA 表达水平 [J]. *Acta Entomol Sin(昆虫学报)* , 2007 50(3): 234 - 240.
- [26] GAO Gui-tian(高贵的) ,CHEN Ke-ping(陈克平) ,CHEN Hui-qing(陈慧卿) ,et al. 家蚕羧酸酯酶基因克隆及差异表达 [J]. *Acta Entomol Sin(昆虫学报)* 2006 49(6): 930 - 937.
- [27] GILLARD B K ,THURMON L T ,MARCUS D M. Variable Subcellular Localization of Glycosphingolipids [J]. *Glycobiology* 1993 3(1): 57 - 67.
- [28] CHIU Shin-foon(赵善欢). *Insect Toxicology(昆虫毒理学)* [M]. Beijing(北京): China Agricultural Press(中国农业出版社) ,1995: 124 - 132.
- [29] WANG Meng-chang(王萌长). *Insect Physiology(昆虫生理学)* [M]. Beijing(北京): China Agricultural Press(中国农业出版社) 2004: 120 - 158.
- [30] COATES B S ,SUMERFORD D V ,HELLMICH R L ,et al. A β -1,3-galactosyltransferase and brainiac/bre5 homolog expressed in the midgut did not contribute to a Cry1Ab toxin resistance trait in *Ostrinia nubilalis* [J]. *Insect Biochem Mol Biol* 2007 37(4): 346 - 355.

(责任编辑: 金淑惠)

• 新书介绍 •

由申继忠主编的《农药出口登记实用指南》于 2011 年 1 月由化学工业出版社出版,全书共分为 10 章,是在搜集、整理农药出口登记工作中常用农药知识的基础上,从实用的角度重点介绍和分析了当前亚洲、非洲、拉丁美洲等地区相关国家的农药登记管理概况和登记要求,包括农药的原药全分析与残留分析方法、国际实验室认可与 GLP 实验室认证、毒理学与毒性试验、剂型与加工、产品质量与分析方法、使用技术、对环境及生态的影响等。

(杨新玲 提供)