

禾谷缢管蚜阳离子通道基因 *RSC1* 的克隆、分子特性及诱导表达分析

林芳菲, 左亚运, 赵 奇, 段辛乐, 李玉婷, 陈茂华*

(西北农林科技大学植物保护学院, 农业部西北黄土高原作物有害生物综合治理重点实验室, 陕西杨凌 712100)

摘要:【目的】SC1 通道(sodium channel 1)是昆虫体内一种重要的离子通道,被认为是一种开发新型杀虫剂的神经靶标。本研究拟克隆禾谷缢管蚜 *Rhopalosiphum padi* 的 SC1 通道基因,并初步分析其生理功能及其与 SC1 类通道、电压门控钠离子通道、电压门控钙离子通道的进化关系。【方法】采用 RT-PCR 技术,克隆了禾谷缢管蚜 SC1 基因完整的开放阅读框;利用实时荧光定量 PCR 技术,分析禾谷缢管蚜成蚜在不同浓度的高效氯氟氰菊酯诱导下 SC1 基因表达变化。【结果】获得了禾谷缢管蚜 SC1 基因(命名为 *RSC1*)完整的开放阅读框(GenBank 登录号为 KU640190),其长度 6 687 bp,编码 2 228 个氨基酸。*RSC1* 具有 SC1 通道的结构特征,有一个不同于电压门控钠离子通道和电压门控钙离子通道的特殊 DEEA 模体(motif)。系统进化分析结果显示,*RSC1* 与电压门控钠离子通道组成一个进化枝,电压门控钙离子通道组成另外一个进化枝,SC1 与电压门控钠离子通道在进化上有更近的起源关系。实时荧光定量 PCR 分析结果表明,LC₁₅, LC₃₅ 和 LC₅₀ 3 种剂量的高效氯氟氰菊酯处理 6 h 后,禾谷缢管蚜 *RSC1* 基因表达量相对于清水对照显著下调,表达量分别为对照的 0.57, 0.82 和 0.78 倍;3 种剂量的高效氯氟氰菊酯处理 24 h 后,禾谷缢管蚜 *RSC1* 基因表达量分别为对照的 2.19, 1.33 和 1.19 倍,其中 LC₁₅ (0.1484 mg/L)胁迫下 *RSC1* 基因的表达量显著上调。【结论】SC1 类通道与电压门控钠离子通道在进化起源上有更近的关系。*RSC1* 通道可能是高效氯氟氰菊酯的次级靶标。由于 *RSC1* 和其同源基因只存在于节肢动物中,脊椎动物尚未发现该类基因,因此这类通道可能作为开发新型杀虫剂的神经靶标。

关键词: 禾谷缢管蚜; *RSC1* 通道; 基因克隆; 诱导表达; 农药靶标

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2016)07-0716-08

Molecular cloning, characterization and induced expression analysis of ion channel gene *RSC1* in *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae)

LIN Fang-Fei, ZUO Ya-Yun, ZHAO Qi, DUAN Xin-Le, LI Yu-Ting, CHEN Mao-Hua* (Key Laboratory of Crop Pest Integrated Pest Management on the Loess Plateau of Ministry of Agriculture, College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Aim】SC1 (sodium channel 1) is an important ion channel in arthropods including insects. It is considered as a possible new neuro target. This study aims to investigate the SC1 gene from *Rhopalosiphum padi*, and to analyze the primary biological functions of the gene and the evolutionary relationship of SC1 channels with voltage-gated sodium channel and voltage-gated calcium channel. 【Methods】RT-PCR technique was used to clone the full-length ORF of RC1 gene from *R. padi*. After *R. padi* adults were exposed to different concentrations of λ -cyhalothrin for 6 and 24 h, respectively, the expression levels of SC1 were analyzed by real-time quantitative PCR. 【Results】The ORF of *RSC1*

基金项目: 国家自然科学基金项目(31471766, 31272036)

作者简介: 林芳菲, 女, 1992 年生, 广西贵港人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫毒理学与分子生物学, E-mail: tuotuofei@gmail.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: maohua.chen@nwsuaf.edu.cn

收稿日期 Received: 2016-03-25; 接受日期 Accepted: 2016-06-05

(GenBank accession no: KU640190) is 6 687 bp in length with the deduced amino acid sequence of 2 228 residues. Structural analysis showed that the *RSC1* has the typical structural feature of *SC1* channel, and contains a unique DEEA motif, which is different from the motif of sodium channel and calcium channel. Phylogenetic analysis indicated that *RSC1* and its orthologs from other animals consist of a sub-group, which is more similar to the sodium channel family. In *R. padi* adults exposed to λ -cyhalothrin for 6 h, the expression level of *RSC1* gene significantly decreased to 0.57-, 0.82- and 0.78-fold that of the control, respectively, while increased to 2.19-, 1.33- and 1.19-fold that of the control, respectively, after 24 h insecticide exposure. The expression level of *RSC1* significantly increased in *R. padi* adults exposed to λ -cyhalothrin at the dosage of LC_{15} (0.1484 mg/L). 【Conclusion】 The *SC1* channel family are evolutionarily closer to the voltage-gated sodium channel family. *RSC1* is the possible secondary target of λ -cyhalothrin. Since *RSC1* gene and its orthologs have been found in invertebrates but not in vertebrates, these channels can be used as neurotarget to develop novel insecticides.

Key words: *Rhopalosiphum padi*; *RSC1* channel; gene cloning; induced expression; insecticide target

拟除虫菊酯是一类重要的化学农药,因其对哺乳动物低毒而被广泛用于农业害虫和卫生害虫的防治之中,其作用靶标为昆虫电压门控钠离子通道(voltage-gated sodium channel, Na_v) (Picollo *et al.*, 2005; Davies *et al.*, 2007)。长期大量地使用拟除虫菊酯类杀虫剂,已经导致许多昆虫的钠离子通道基因发生突变,从而对不同的拟除虫菊酯类杀虫剂产生了抗药性(Dong *et al.*, 2014)。因此,研究新的杀虫剂靶标对于新农药的开发以及害虫的抗药性治理具有重要的意义。*DSC1* (*Drosophila* sodium channel 1 或 sodium channel protein 60E)是一种和钠离子通道非常相似的离子通道,其在多种昆虫基因组中存在,但在脊椎动物中尚未发现编码该通道的基因,因此,该离子通道可能成为设计和开发新型高效、安全杀虫剂的神经靶标(Cui *et al.*, 2012)。

DSC1 离子通道基因最初从黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* DNA 文库中分离得到(Salkoff *et al.*, 1987)。很多研究发现,*DSC1* 离子通道与电压门控钠离子通道的拓扑结构和序列很相似,都包含 4 个重复的同源结构域,每个结构域包含 6 个跨膜区,因此有研究者认为,*DSC1* 是另外一个电压门控钠离子通道基因(Catterall, 2000; Kulkarni *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2011)。Liu 等(2001)克隆了德国小蠊 *Blattella germanica* 的 *DSC1* 同源基因,命名为 *BSC1*。利用爪蟾 *Xenopus laevis* 卵母细胞系统分析发现,*BSC1* 并非典型的电压门控钠离子通道基因,其对 Ca^{2+} 有很高的选择性透过性,且钠离子通道的阻断剂河豚毒素(tetradotoxin, TTX)不能抑制 *BSC1*,因此有研究者认为,*BSC1* 可能属于一个电压门控阳离子通道基因新家族成员(Zhou *et al.*, 2004; Zhang *et*

al., 2011)。Zhang 等(2013)研究发现,敲除黑腹果蝇 *DSC1* 基因后,该虫对拟除虫菊酯杀虫剂更为敏感。

禾谷缢管蚜 *Rhopalosiphum padi* 是世界各地广泛分布的重要小麦害虫,其刺吸小麦汁液,导致小麦不能灌浆或籽粒不饱满,并造成千粒重下降,同时传播大麦黄矮病毒(barley yellow dwarf virus, BYDV),每年造成小麦生产重大经济损失(Simon *et al.*, 1991)。化学杀虫剂是防治禾谷缢管蚜的主要方法,但长期大量的使用化学杀虫剂导致该虫产生抗药性(Chen and Han, 2006)。面对日益严重的抗性问题的迫切需要研发作用于禾谷缢管蚜等蚜虫新靶标位点的化学杀虫剂。禾谷缢管蚜等蚜虫的 *DSC1* 同源基因尚缺乏研究。本研究依据豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* 基因组中的 *DSC1* 同源基因序列设计引物,克隆了禾谷缢管蚜的 *DSC1* 同源基因 *RSC1* (*R. padi* sodium channel 1 gene)完整开放阅读框,构建 *RSC1* 及其同源 *SC1* 通道(sodium channel 1)、电压门控钙离子通道(voltage-gated calcium, Ca_v)、电压门控钠离子通道的系统发育树,分析 *SC1* 通道进化起源;利用 qRT-PCR 技术,分析 *RSC1* 基因在高效氯氟氰菊酯诱导下的表达量变化。本研究对于进一步研究 *RSC1* 通道在禾谷缢管蚜抗药性产生中的作用,以及利用 *RSC1* 通道作为靶标开发防治该虫的新型农药奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试昆虫: 供试禾谷缢管蚜为室内长期饲养种群。该种群最初为采自陕西省杨凌的无翅成

蚜,在室内使用小麦(品种为小偃22)幼苗饲养。在不接触药剂的情况下,置于温度 $22\pm1^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度60%~70%、光周期16L:8D的人工气候箱内饲养。

1.1.2 主要试剂:Trizol-RNA 抽提试剂盒购于天根生化科技有限公司;反转录 cDNA 合成试剂盒和 pGEM-T Easy 载体购自 Promega 公司;DNA 胶回收试剂盒购于生工生物工程(上海)股份有限公司;*Taq* 酶及其他 PCR 相关试剂购自 TaKaRa 公司;大肠杆菌 *Escherichia coli* 菌株 DH5 α 为本实验室保存;荧光定量试剂盒购置瑞士 Roche 公司。实时荧光定量 PCR 仪 Bio-Rad iQ5 和 C1000™ Thermal Cycler PCR 仪购于美国 Bio-Rad 公司。96% 高效氯氟氰菊酯(λ -cyhalothrin)原药购于江苏盐城农药化工有限公司。

1.2 禾谷缢管蚜 RSC1 基因克隆

随机选取不同龄期禾谷缢管蚜的无翅蚜15头(约30 mg)。按照 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA,选取 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值在 1.8~2.0 之间的 RNA。取 1 μL 的总 RNA 为模板,按照 HiScript® 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒操作说明合成 cDNA。

根据豌豆蚜的钠离子通道 SC1 基因(GenBank 登录号:XM_001943495.3)设计9对特异性引物(表1),以反转录的 cDNA 为模板,PCR 扩增禾谷缢管蚜 SC1 基因。PCR 产物回收纯化后,与 pGEM-T Easy 载体连接,并转化到感受态大肠杆菌 DH5 α 中,经蓝白斑筛选,随机挑取白色菌落扩增培养,将菌液送至上海生工进行双向测序,将测得的序列进行 BLAST 比对,确定获得的克隆序列是否为禾谷缢管蚜 SC1 基因。测序获得的目标基因序列用 DNAMAN 软件拼接为完整的序列后,根据所获得的全长序列,设计3对 ORF F/R 引物进行 RSC1 基因开放阅读框验证(表1),获得的禾谷缢管蚜 SC1 基因命名为 RSC1。

1.3 禾谷缢管蚜 RSC1 基因序列的分析与比较

使用 ORF finder 分析 RSC1 基因序列的开放阅读框及蛋白质序列;通过 BLAST X 和 BLAST P 搜索 NCBI 的核苷酸和蛋白质数据库,进行禾谷缢管蚜 RSC1 基因序列相似性分析及氨基酸保守性预测;用 Clustal X2.1 进行氨基酸序列比对;利用 MEGA 6.0 中的极大似然法(maximum likelihood, ML)进行1000次重复(Cui *et al.*, 2012),构建 RSC1 与其他物种电压门控钠离子和钙离子通道基因蛋白序列的系统进化树;使用 ProtParam 软件分析 RSC1 基因编码的氨基酸序列组成和理化性质;利用 Expasy 软件中的 TMHM-M-2.0 程序分析蛋白质序列的跨膜区。

表 1 本研究所用引物		
Table 1 Primers used in this study		
引物名称 Primer name	引物序列 (5' - 3') Primer sequence	引物用途 Use of primers
RSC1 F1	GTCGTCCGCTGTTTCGTTTATCC	克隆 RSC1 基因片段 Cloning of the fragments of RSC1 gene
RSC1 R1	AAGAAAAGACTGGGTGGCTGTGA	
RSC1 F2	ATAAAGTGAGCGTGTTAGATGG	
RSC1 R2	GAGCAAATACCATCAGACAAAAAT	
RSC1 F3	CTGGCTGGATTTCATCGTCATC	
RSC1 R3	CCGAAGACAGTAGCACACCT	
RSC1 F4	TCAATCTGATGTTGGCTGTCGTCG	
RSC1 R4	TTGCTGCTGCTGTGGTGAAGTGT	
RSC1 F5	CAGAGCAGTGCGAATACCACT	
RSC1 R5	CCGTGTCACTAGAATCTTCCGTC	RSC1 ORF 克隆与验证 Cloning and validation of RSC1 ORF
RSC1 F6	TGACGGAAGATTCTACTGACAC	
RSC1 R6	TCGGAGTATCTACTATCACGAGAGT	
RSC1 R7	GTCTACACCACGAGCATCTACAG	
RSC1 F8	TGGCAGATGCTGTAGATGCTCGT	
RSC1 R8	GCTGCTGAAGTAGCTGGTTTTCG	
RSC1 F9	TGGAGGAGGTATCGGTAGTACT	
RSC1 R9	GCTCCGGCGGTATAGCATAT	
ORF F1	GGTGATGATGTGAGAATAGC	荧光定量 PCR Quantitative Real-time PCR
ORF R1	GAGTCGTCCAGTGATGAAT	
ORF F2	AGCAGCAACATCACACTT	
ORF R2	CACGAGCATCTACAGCAT	
ORF F3	TTGAAGGATGGATGGAAGTA	
ORF R3	GTCCGTTATGCTGATGCT	
QRSC1 F	TTTGAGAGTAGTTCGCGTGTTC	
QRSC1 R	GACATGCCCCGAAAACAGACATA	
β -actin-F	CTGCCGCTTCCACCTCATT	
β -actin-R	GATACCGCAAGATTCCATTCC	

1.4 高效氯氟氰菊酯对禾谷缢管蚜毒力测定

毒力测定参考段辛乐等(2015)的方法进行:确定高效氯氟氰菊酯对禾谷缢管蚜的致死中浓度。用少量的丙酮将高效氯氟氰菊酯原药溶解后,用含有0.1%吐温-80的蒸馏水配制制成10 g/L的母液,再稀释为5个浓度梯度:2, 1, 0.5, 0.25 和 0.125 mg/L,以含有0.1%吐温-100的蒸馏水为对照。挑取30头无翅禾谷缢管蚜成蚜于放有麦苗叶片的灭菌培养皿中,24 h后待所有禾谷缢管蚜成虫全部爬上叶片后,将叶片浸入稀释药液中10 s后取出,用滤纸将多余的药液吸去,并置于带有保湿滤纸的培养皿内待其自然风干,将培养皿置于温度 $22\pm1^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度60%~70%、光周期16L:8D条件下的培养箱内饲养。每处理重复3次。24 h后检查毒力测定结果,用毛笔轻触成蚜,不能活动的视为死亡,并统计不同浓度处理的禾谷缢管蚜存活与死亡数。

1.5 高效氯氟氰菊酯诱导下禾谷缢管蚜 RSC1 基因表达量分析

根据生物测定结果,采用两个亚致死浓度 LC₁₅

和 LC_{35} ,及致死中浓度 LC_{50} 的高效氯氟氰菊酯处理禾谷缢管蚜成蚜,分别在 6 和 24 h 后挑取存活的成蚜,按照 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA,并参照 cDNA 合成试剂盒说明书进行 cDNA 合成。采用荧光定量 PCR 技术分析在高效氯氟氰菊酯诱导下禾谷缢管蚜成蚜 *RSC1* 基因表达动态。反转录后的 cDNA 进行 10 倍稀释,作为荧光定量的模板,每个阶段 3 次重复,以清水处理的禾谷缢管蚜成蚜的 cDNA 作为空白对照模板。

根据 *RSC1* 基因设计荧光定量特异性引物,以 β -*actin* 基因作为内参基因(表 1)。以不同浓度的高效氯氟氰菊酯诱导禾谷缢管蚜成蚜的 cDNA 为模板,PCR 扩增含 *RSC1* 和 β -*actin* 定量基因序列的条带,转入 pGEM-T Easy 载体,并测序验证。以 *RSC1* 和 β -*actin* 的质粒为模板,稀释成 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} 和 10^{-7} 共 5 个梯度,分别绘制 *RSC1* 和 β -*actin* 的标准曲线。使用 SYBRGreen I 嵌合荧光法进行 Real-time PCR 扩增反应,采用 20 μ L 体系: SYBR Green Supermix 10 μ L, ddH₂O 7.4 μ L, cDNA 模板 1 μ L, 上下游引物各 0.8 μ L。Real-time PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 58 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 15 s 共 40 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。Real-time PCR 反应结束后,通过溶解曲线判断其特异性。采用相对定量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法(Schmittgen and Livak, 2008)分析数据。

1.6 数据分析

用 DPS 软件计算高效氯氟氰菊酯的毒力回归方程(其中 y 为机率值, x 为剂量值),并计算出相关

系数、致死中浓度 LC_{50} 和亚致死浓度 LC_{35} 和 LC_{15} 的值及其置信区间。采用 SPSS 20.0 软件进行定量数据分析,利用 Duncan 氏新复极差法对不同浓度高效氯氟氰菊酯在同一时间诱导的禾谷缢管蚜成蚜 *RSC1* 基因表达量进行差异显著性检验分析;同一亚致死浓度在不同时间下其相对表达水平差异用 t 检验。

2 结果与分析

2.1 禾谷缢管蚜 *RSC1* 基因的克隆和序列分析

成功克隆得到禾谷缢管蚜 *SC1* 基因完整的 ORF 序列,将该基因命名为 *RSC1*。*RSC1* 编码区长 6 687 bp,编码 2 228 个氨基酸。*RSC1* 蛋白分子量为 252.97 kD,等电点为 6.71,酸性氨基酸 241 个,碱性氨基酸 235 个,GenBank 登录号为 KU640190。

利用 TMHM-M-2.0 软件对 *RSC1* 的跨膜结构分析,发现其具有典型的钙离子和钠离子通道的一些结构特征: 整个蛋白序列包括 4 个同源结构域(I – IV),每个结构域有 6 个跨膜区(S1 – S6)(图 1)。通过与其他 9 种昆虫(黑腹果蝇,德国小蠊,西方蜜蜂 *Apis mellifera*,赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*,印度跳蚁 *Harpegnathos saltator*,熊蜂 *Bombus terrestris*,佛罗里达弓背蚁 *Camponotus floridanus*,切叶蚁 *Acromyrmex echinator* 及豌豆蚜)的序列对比发现,*RSC1* 和其他同源通道蛋白在其 4 个结构域的成孔区均有一个特殊的 DEEA 模体(motif)(图 2)。

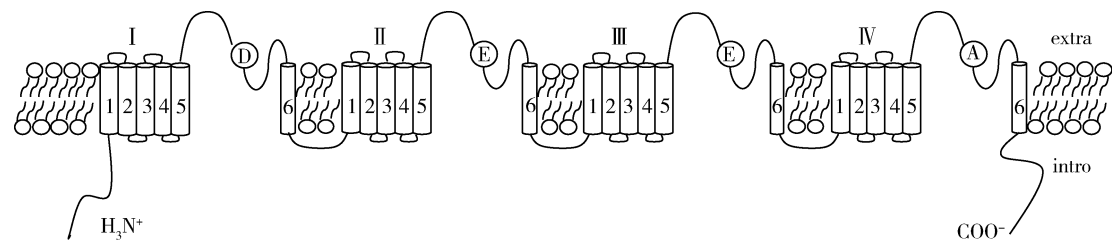


图 1 *RSC1* 及其同源通道的跨膜结构

Fig. 1 Transmembrane topology of *RSC1* and its orthologous channels

2.2 *SC1* 类通道与 Na_v 和 Ca_v 通道的系统进化关系

将获得序列在 NCBI 中进行 BLAST 搜索,发现该序列与豌豆蚜 *SC1* 蛋白(GenBank 登录号 XM_001943495.3)基因的核苷酸序列一致性为 93%,与其他物种钠离子通道蛋白 60E-like 序列一致性在 74% ~76% 之间。用极大似然法(maximum likelihood, ML)的 Jones-Taylor-Thornton (JTT) 模型构建 *RSC1*

与其他物种的 *SC1*、电压门控钙离子通道和电压门控的钠离子通道基因的氨基酸序列系统进化树(图 3),结果表明,所用的通道组成两个分支,*RSC1* 和其他物种的 *SC1* 同源物单独聚集在一个亚分支中,并与电压门控钠离子通道组成其中一个分支,而电压门控钙离子通道组成另外一个分支,说明 *SC1* 类通道与电压门控钠离子通道在进化起源上有更近的关系。

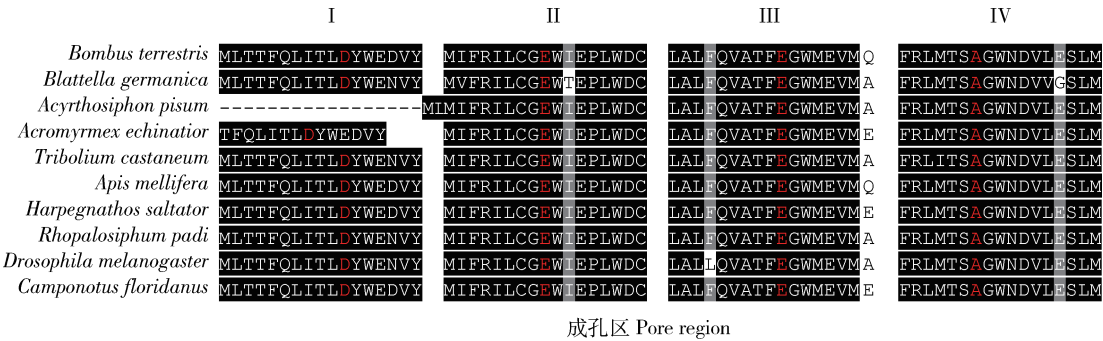


图2 9种昆虫 SC1 蛋白 I–IV 结构域中孔道区连接 S5 和 S6 的部分 loop 环序列比对

Fig. 2 Alignment of partial sequences of SC1 loop connecting S5 and S6 in the pore regions of the domains I–IV from 9 insects
图中红色加粗为 DEEA 模体。DEEA motifs are indicated in red.

2.3 高效氯氟氰菊酯对禾谷缢管蚜毒力分析

结果表明,高效氯氟氰菊酯对禾谷缢管蚜的毒力方程为 $y = 1.9174x + 5.5521$,致死中浓度 (LC₅₀) 分别为 0.5153 mg/L;高效氯氟氰菊酯对禾谷缢管蚜成蚜的 LC₁₅ 浓度为 0.1484 mg/L, LC₃₅ 浓度为 0.3244 mg/L。

2.4 禾谷缢管蚜 RSC1 基因在高效氯氟氰菊酯诱导下表达特性分析

通过 qRT-PCR 分析,RSC1 基因和内参基因的扩增效率均接近 100%,溶解曲线均为单峰,相应标准曲线的直线相关性均在 0.995 以上。qRT-PCR 结果显示,LC₁₅ (0.1484 mg/L)、LC₃₅ (0.3244 mg/L) 两个亚致死浓度和致死中浓度 LC₅₀ (0.5153 mg/L) 的高效氯氟氰菊酯处理禾谷缢管蚜成蚜,6 h 后 RSC1 基因表达量分别为对照的 0.57、0.82 和 0.78 倍,3 个浓度处理的表达量显著低于清水对照组,LC₃₅ (0.3244 mg/L) 和 LC₅₀ (0.5153 mg/L) 施药处理组的表达量差异不显著;药剂处理 24 h 后 RSC1 基因表达量相对于清水对照处理为上调趋势,表达量分别为对照的 2.19、1.33 和 1.19 倍,其中 LC₁₅ (0.1484 mg/L) 施药处理组表达量显著高于清水对照组,LC₃₅ (0.3244 mg/L) 和 LC₅₀ (0.5153 mg/L) 施药处理组的表达量与清水对照组表达量差异不显著 (图 4)。

3 讨论

DSC1 及其同源离子通道基因的初步功能研究仅在黑腹果蝇 (Kulkarni *et al.*, 2002)、烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* (Field *et al.*, 1999)、德国小蠊 (Liu *et al.*, 2001)、褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Cui *et al.*, 2012)、家蚕 *Bombyx mori* (Cui *et al.*, 2012) 和嗜卷书

虱 *Liposcelis bostrychophila* (Jiang *et al.*, 2013) 有报道,蚜虫的 SC1 离子通道基因相关研究未见报道。本研究克隆了禾谷缢管蚜 RSC1 基因,序列分析表明,其编码的蛋白具有 DSC1 及其同源通道的典型特征。根据禾谷缢管蚜 RSC1 基因序列,本研究分析了 GenBank 中所有的基因组序列,发现该序列只局限于节肢动物中,未在哺乳动物和其他脊椎动物中发现 (Cui *et al.*, 2012)。Zhou 等 (2004) 通过爪蟾卵母细胞系统发现,德国小蠊 BSC1 通道基因对 Ca⁺ 有很高的选择透过性,说明 BSC1 基因编码一个对钙离子有选择性的阳离子通道。本研究构建的 SC1 类通道与电压门控钙离子通道、电压门控钠离子通道的氨基酸序列系统进化树显示,SC1 类通道与电压门控钠离子通道在进化起源上关系较近。SC1 类通道在 4 个结构域的成孔区有一个特殊的 DEEA 模体,豌豆蚜和桃蚜 *Myzus persicae* 的钠离子通道是 DENS 模体 (Dale *et al.*, 2010; Amey *et al.*, 2015),而钙离子通道包含的模体为 EEEE (Zhang *et al.*, 2013),说明这一特殊成孔区模体可能是 SC1 类通道的一个重要标志 (Cui *et al.*, 2012),并且 DEEA 模体可能决定 SC1 类通道的选择透过性。

其他相关研究也表明,SC1 类基因可能是拟除虫菊酯类杀虫剂的次级靶标。Zhang 等 (2013) 发现,敲除黑腹果蝇 DSC1 基因后,DSC1 通道并不是拟除虫菊酯类杀虫剂、茚虫威和氟虫氰的初级靶标,但敲除 DSC1 基因的黑腹果蝇对拟除虫菊酯类杀虫剂更为敏感,这说明 DSC1 通道通常抑制神经系统对拟除虫菊酯类杀虫剂的应答。本研究发现,禾谷缢管蚜在不同浓度的高效氯氟氰菊酯处理 6 和 24 h 后,RSC1 基因的相对表达趋势不同。处理 6 h 后相对表达量显著下调,这说明 RSC1 基因可能是高效氯氟氰菊酯的次级靶标,其降低表达量可以有效地

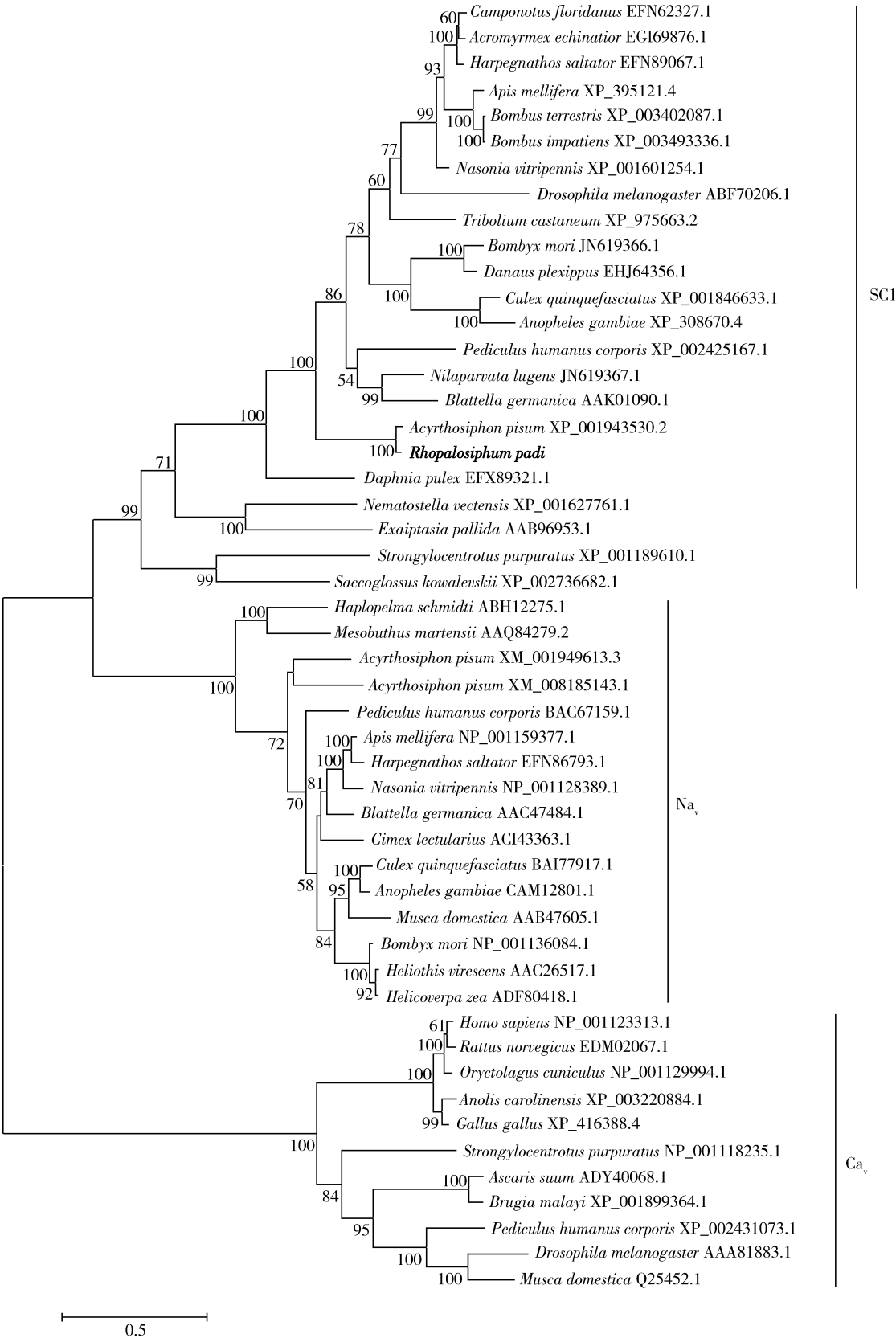


图 3 基于氨基酸序列构建的不同物种 SC1 与电压门控钙离子通道和电压门控钠离子通道的系统进化树 (极大似然法)

Fig. 3 Phylogenetic tree of SC1 orthologs, voltage-gated sodium channels and voltage-gated calcium channels based on the amino acid sequence (maximum likelihood method)

进化树分支上数值表示 1 000 次循环检验的置信度, 节点值 > 50% 显示在树枝上, 拉丁学名后为登录号, 标尺示遗传距离。Numbers above branches are support values (%) based on bootstrap method with 1 000 replications. Bootstrap values > 50% are showed on each node of the tree, the GenBank accession numbers are behind Latin names, and the scale bar represent 0.5% amino acid substitutions per site.

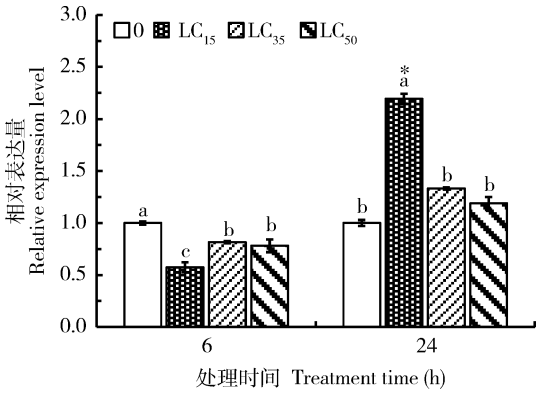


图4 不同浓度高效氯氟氰菊酯诱导下不同时间后禾谷缢管蚜 *RSC1* 基因的相对表达水平

Fig. 4 Relative expression levels of *RSC1* in *Rhopalosiphum padi* adults at different time after exposure to different concentrations of λ -cyhalothrin

图中数据为3次生物学重复的平均值±标准误;不同浓度的药剂处理相同时间后 *RSC1* 表达量存在显著性差异 (ANOVA, $P < 0.05$);柱上星号表示同一浓度的药剂处理不同时间组基因表达量差异 (t -检验, $P < 0.05$)。Data are shown as means $\pm$ SE of 3 replications, and those at the same time point followed by different small letters are significantly different among treatments with different concentrations of the insecticide (ANOVA, $P < 0.05$). The asterisk above bars indicates significance difference between 6 and 12 h under the stress of the same concentration of λ -cyhalothrin (t -test, $P < 0.05$).

减少与高效氯氟氰菊酯药剂结合。

Kulkarni 等 (2002) 研究发现,减少黑腹果蝇 *DSC1* 基因的表达,其嗅觉对苯甲醛的反应降低 2 倍。Zhang 等 (2013) 认为黑腹果蝇 *DSC1* 通道可调节神经回路的稳定性和维持突触的可持续传导。因此,敲除 *DSC1* 通道型黑腹果蝇表现出神经上的缺陷 (Dong *et al.*, 2015)。本研究发现,高效氯氟氰菊酯处理 24 h 后, *RSC1* 相对表达量为上调趋势,并且亚致死浓度 LC_{15} (0.1484 mg/L) 诱导下的 *RSC1* 基因表达量显著大于 LC_{35} (0.3244 mg/L) 和 LC_{50} (0.5153 mg/L) 两个浓度处理后的表达量。高效氯氟氰菊酯处理 24 h 时后药剂可能已被禾谷缢管蚜代谢,上调 *RSC1* 基因的表达量用以维持昆虫神经回路的稳定性, *RSC1* 基因及其同源基因对维持昆虫神经系统的稳定性起到重要的作用。而在较低亚致死浓度 LC_{15} (0.1484 mg/L) 诱导下, *RSC1* 基因上调量最高,这可能是 *RSC1* 基因能维持昆虫神经系统的稳定,但较高的亚致死浓度 LC_{35} (0.3244 mg/L) 和致死中浓度 LC_{50} (0.5153 mg/L) 可使神经系统产生一定的紊乱,致使 *RSC1* 基因上调水平显著小于较低的亚致死浓度。

RSC1 及其同源通道可调节昆虫神经系统的稳定性和维持神经突触的持续传导,并且该类通道基

因只存在于节肢动物中,尚未在脊椎动物中发现该类基因。因此 *RSC1* 和其同源通道可能成为一个理想的农药靶标,在未来的高效、低毒新农药开发中,可研究相应的 *SC1* 类通道的靶标抑制剂,应对日益增长的害虫抗性问题的。

参考文献 (References)

Amey JS, O'Reillyb AO, Burton MJ, Puinean AM, Mellor IR, Duce IR, Field LM, Wallace BA, Williamson MS, Davies TGE, 2015. An evolutionarily-unique heterodimeric voltage-gated cation channel found in aphids. *FEBS Lett.*, 589(5): 598–607.

Catterall WA, 2000. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 26(1): 13–25.

Chen M, Han Z, 2006. Cloning and sequence analysis of 2 different acetylcholinesterase genes in *Rhopalosiphum padi* and *Sitobion avenae*. *Genome*, 49(3): 239–243.

Cui YJ, Yu LL, Xu HJ, Dong K, Zhang CX, 2012. Molecular characterization of *DSC1* orthologs in invertebrate species. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 42(5): 353–359.

Dale RP, Jones AK, Tamborindeguy C, Davies TGE, Amey JS, Williamson S, Wolstenholme A, Field LM, Williamson MS, Walsh TK, Sattelle DB, 2010. Identification of ion channel genes in the *Acyrtosiphon pisum* genome. *Insect Mol. Biol.*, 19(s2): 141–153.

Davies TGE, Field LM, Usherwood PNR, Williamson MS, 2007. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB Life*, 59(3): 151–162.

Dong K, Du Y, Rinkevich F, Nomura Y, Xu P, Wang LX, Silver K, Zhorov BS, 2014. Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 50: 1–17.

Dong K, Du Y, Rinkevich F, Wang L, Xu P, 2015. The *Drosophila* sodium channel 1 (*DSC1*): the founding member of a new family of voltage-gated cation channels. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 120: 36–39.

Duan XL, Qiao XF, Chen MH, 2015. Effects of sub-lethal concentrations of chlorpyrifos and isoprocarb on experimental population of *Rhopalosiphum padi*. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 23(3): 329–336. [段辛乐, 乔宪风, 陈茂华, 2015. 亚致死浓度毒死蜱和异丙威对禾谷缢管蚜试验种群的影响. 中国生态农业学报, 23(3): 329–336]

Field LM, James AA, Park Y, Taylor MFJ, Feyereisen R, 1999. Voltage-gated sodium channel genes *hscp* and *hDSC1* of *Heliothis virescens* F-genomic organization. *Insect Mol. Biol.*, 8(2): 161–170.

Jiang XZ, Wei DD, Yang WJ, Dou W, Chen SC, Wang JJ, 2013. Molecular characterization and alternative splicing of a sodium channel and *DSC1* ortholog genes in *Liposcelis bostrychophila* Badonnel (Psocoptera: Liposcelidae). *Int. J. Biol. Sci.*, 9(9): 989–1003.

Kulkarni NH, Yamamoto AH, Robinson KO, Mackay TF, Anholt RR, 2002. The *DSC1* channel, encoded by the *smi60E* locus, contributes to odor-guided behavior in *Drosophila melanogaster*.

Genetics, 161(4): 1507–1516.

Liu Z, Chung I, Dong K, 2001. Alternative splicing of the *BSC1* gene generates tissue-specific isoforms in the German cockroach. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31(6–7): 703–713.

Picollo MI, Vassena C, Santo OP, Barrios S, Zaidemberg M, Zebra E, 2005. High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Northern Argentina. *J. Med. Entomol.*, 42(4): 637–642.

Salkoff L, Butler A, Wei A, Scavarda N, Giffen K, Ifune C, Goodman R, Mandel G, 1987. Genomic organization and deduced amino acid sequence of a putative sodium channel gene in *Drosophila*. *Science*, 237(4816): 744–749.

Schmittgen TD, Livak KJ, 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.*, 3(6): 1101–1108.

Simon DJC, Blackman RL, Gallic JFL, 1991. Local variability in the life cycle of the bird Cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphidiae) in western France. *Bull. Entomol. Res.*, 81(3): 315–322.

Zhang T, Liu Z, Song W, Du Y, Dong K, 2011. Molecular characterization and functional expression of the DSC1 channel. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 41(7): 451–458.

Zhang T, Wang Z, Wang L, Luo N, Jiang L, Liu Z, Wu C, Dong K, 2013. Role of the DSC1 channel in regulating neuronal excitability in *Drosophila melanogaster*: extending nervous system stability under stress. *PLoS Genet.*, 9(3): e1003327.

Zhou W, Chung I, Liu Z, Goldin AL, Dong K, 2004. A voltage-gated calcium-selective channel encoded by a sodium channel-like gene. *Neuron*, 42(1): 101–112.

(责任编辑：袁德成)