

杀虫剂的选择作用对小菜蛾表达蛋白质的影响

程罗根¹, 许勤², 于光¹, 李忠英³

- (1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210097)
(2. 南京师范大学电气与电子工程学院, 江苏 南京 210042)
(3. 贵州省农业科学院植物保护研究所, 贵州 贵阳 550006)

[摘要] 运用蛋白质双向电泳分析技术, 通过对成虫蛋白质的提取, 分离出水溶性的蛋白质组分, 对比研究了溴氰菊酯抗性品系、杀螟丹抗性品系、杀虫双抗性品系和敏感品系小菜蛾成虫的蛋白质在表达上的差异。通过对电泳图谱分析, 在溴氰菊酯的抗性和敏感品系中获得了 8 个特异的蛋白质斑点, pH 5.0 ~ 8.1, 相对分子质量为 46 000 ~ 23 000; 在抗杀螟丹品系中得到了 8 个特异斑点, pH 4.6 ~ 8.1, 相对分子质量为 92 000 ~ 18 000; 在杀虫双的抗性品系和敏感品系中产生了 6 个特异斑点, pH 5.5 ~ 7.1, 相对分子质量为 31 000 ~ 28 000。虽然抗性品系是敏感品系通过多年的室内逐代的药剂选择获得的, 但是在杀虫剂选择压力作用下所引起的表达蛋白质的差异是否与溴氰菊酯、杀螟丹和杀虫双的抗性有关还需进一步证实。

[关键词] 小菜蛾, 抗药性, 蛋白质, 双向电泳

[中图分类号] S 481+.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2006)04-0101-04

Protein Changes in Response to Insecticides Selection Pressure in Diamondback Moth

Cheng Luogen¹, Xu Qin², Yu Guang¹, Li Zhongying³

- (1. School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)
(2. School of Electrical and Automation Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210042, China)
(3. Institute of Plant Protection, Guizhou Academy of Agriculture Science, Guiyang 550006, China)

Abstract: The diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.), has developed resistance to various insecticides. Changes induced in moth proteins of one susceptible strain and three strains selected for resistance to deltamethrin, cartap and dimehypo, respectively, were compared with protein's two-dimensional gel electrophoresis. After the analysis of the spectrum of gel electrophoresis, eight proteins, pH 5.0 ~ 8.1 and molecular weight 46 000 ~ 23 000, showed different expressions in deltamethrin resistant strain and its susceptible strains; Eight proteins, pH 4.6 ~ 8.1 and molecular weight 92 000 ~ 18 000, were expressed specially in cartap resistant strain; and Six proteins, pH 5.5 ~ 7.1 and molecular weight 31 000 ~ 28 000, were expressed differently in dimehypo resistant strain and its susceptible strains. Though all resistant strains were selected by the action of insecticides on the basis of susceptible strain, whether these different expressed proteins are related to the resistance to deltamethrin, cartap and dimehypo should be studied further.

Key words: diamondback moth, resistance, proteins, two-dimensional gel electrophoresis

0 引言

蛋白质作为生物体功能的体现者和执行者, 既具有表达的动态性, 又具有结构与功能的高度复杂性, 但是这些差异难以从生物体的遗传信息上去全面预测, 因此需要从差异表达的蛋白质水平研究基因与功能的关系。

收稿日期: 2006-01-15.

基金项目: 江苏省高校自然科学基金资助项目(03KJD180112).

作者简介: 程罗根, 1963—, 博士, 副教授, 主要从事遗传学领域的教学和研究. E-mail: chengluogen@njnu.edu.cn

杀虫剂作为害虫防治的主要手段,在杀死害虫的同时,也使害虫产生了越来越高的抗药性,从而给害虫防治工作带来了很大的困难.抗药性的产生和不断增强显然是在杀虫剂作用下害虫自身的生理生化改变所引起的,归根结底是体内蛋白质差异表达的结果.因此,分析杀虫剂作用后害虫体内蛋白质表达的差异,不仅有利于阐明抗药性的发生机制,还有可能分离、鉴定出与抗性相关的蛋白质,从而为抗性治理和新型高效杀虫剂的开发提供理论基础.

小菜蛾对溴氰菊酯的抗药性发展非常快,而且抗性也比较强,比较难治理,在有些地区已失去了防效.杀虫双和杀螟丹属于沙蚕毒素类仿生药物,两者的毒害机理相似,可以防治多种农业害虫.目前在田间小菜蛾对这两种药物的抗药性不是很高,我们通过室内筛选培育出对这两种药剂具有高水平抗性的小菜蛾品系,对其抗性的发生与发展规律进行前瞻性研究,以便收到更好的防效,并延长其有效使用寿命.

本研究以多年选育的抗杀虫双、抗杀螟丹和抗溴氰菊酯小菜蛾品系和敏感品系为材料,采用双向电泳技术比较分析抗性品系和敏感品系蛋白质组的差异,研究在抗性选育过程中杀虫剂所引起的小菜蛾组织蛋白质的变化,拟分离鉴定出与抗性相关的蛋白质,进一步阐明小菜蛾对上述药剂的抗性机理.

1 材料与方法

1.1 试材

供试小菜蛾的原始种群采自贵阳市花溪区中曹乡的甘蓝地,经室内饲养1代后测定四龄幼虫的 LD_{50} 值,与武汉市蔬菜研究所提供的敏感种群比较确定其为溴氰菊酯、杀虫双和杀螟丹的敏感品系.将此品系分成两部分,一部分保持其敏感性,另一部分在室内分别用溴氰菊酯、杀虫双和杀螟丹逐代选择培育抗性品系.经过119代的选育,抗性分别达到123、57和1276倍.

1.2 方法

1.2.1 蛋白质样品的制备

根据Peng等^[1]方法略作改进.分别取溴氰菊酯抗性品系、杀虫双抗性品系、杀螟丹抗性品系和敏感品系小菜蛾成虫8只,置于玻璃匀浆器中,加蛋白质变性剂(0.5 mol/L Tris-HCl、10% SDS、5% β -巯基乙醇、10% 甘油、0.05% 溴酚蓝、0.1% NP40)匀浆,研磨至糊状,沸水下变性3 min,冷却后500 g离心5 min,取上清液备用.

1.2.2 IEF-PAGE

参照O'Farrell^[2]和Peng等^[1]方法进行.凝胶浓度为3%,内含9 mol/L 尿素、2% NP40、Ampholytes(pH 5~7, pH 3~10, 2:1)、TEMED、AP.将凝胶注入凝胶管(120 mm \times 3 mm),预聚胶(120 V, 15 min; 300 V, 30 min; 400 V, 60 min)后,加入蛋白质样品于400 V下等电聚胶16 h.最后将样品胶放入平衡液(6 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8, β -巯基乙醇, 10% 甘油, 2% SDS)中平衡20 min.

1.2.3 SDS-PAGE

按照Laemmli方法^[3],分离胶浓度为12.5%,浓缩胶浓度为2.5%.40 mA条件下电泳至溴酚蓝前沿距胶底部1 cm处停止电泳.

2 结果与分析

2.1 蛋白质定量

4种品系小菜蛾蛋白质的提取物用G-250法定量,上样量均为100 μ g.

2.2 双向电泳结果

敏感品系和抗性品系小菜蛾的蛋白质双向电泳结果如图1、图2和图3所示.电泳图中约有150个蛋白质斑点,等电点和分子量的分布范围较广,但在相对分子质量32 000~97 000区域蛋白质比较丰富.抗性品系和敏感品系的蛋白质表现出明显的质和量的差异.

2.2.1 敏感品系与溴氰菊酯抗性品系的比较

双向电泳的结果表明,敏感品系和抗溴氰菊酯品系在蛋白质水平的差异非常明显(见图1、表1所示).在抗性品系中有DT1、DT2、DT3和DT4等4个明显的特异蛋白斑点,其pH 5.3~8.1,相对分子质量为31 000~23 000;在敏感品系中有S1、S2、S3和S4等4个明显的特异蛋白斑点,其pH 5.3~8.1,相对分

子质量为 31 000 ~23 000.

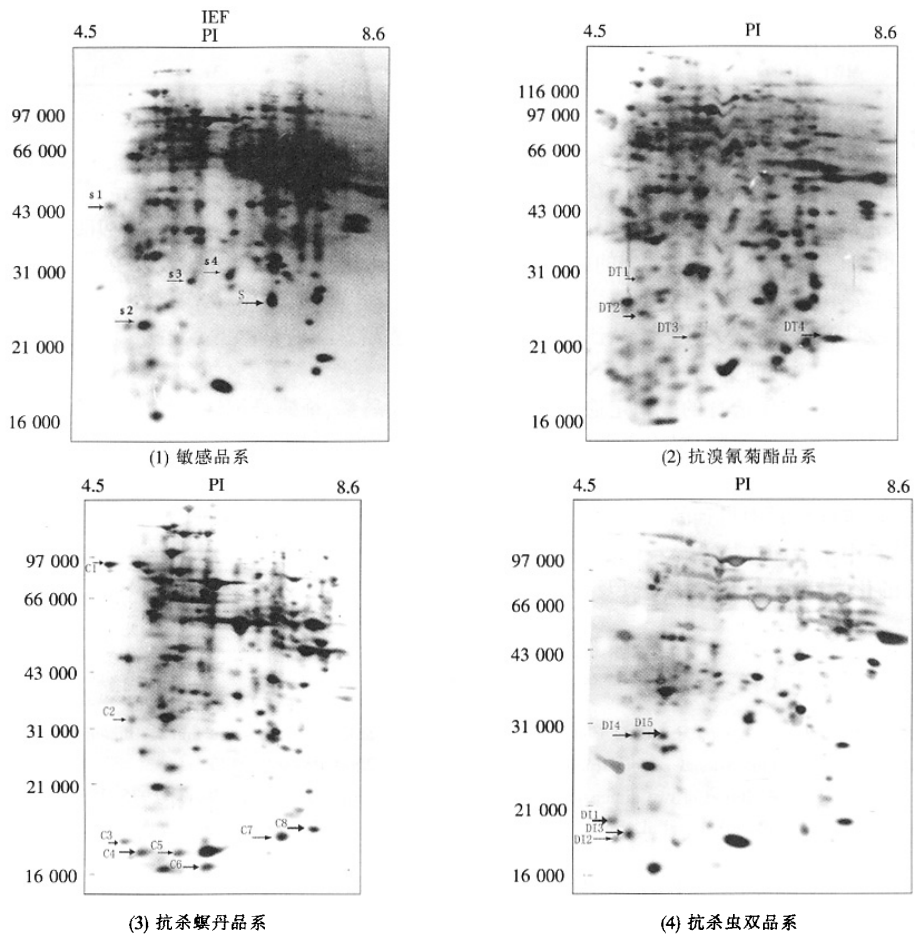


图 1 敏感品系和抗性品系小菜蛾蛋白质双向电泳比较图

表 1 小菜蛾敏感品系和抗溴氰菊酯品系差异蛋白质

差异斑点	S1	S2	S3	S4	DT1	DT2	DT3	DT4
pH	5.0	5.9	6.5	6.6	5.3	5.4	6.1	8.1
MW(×1000)	46	30	24	32	31	27	23	23

2. 2. 2 敏感品系与杀虫双抗性品系和杀螟丹抗性品系的比较

表 2 小菜蛾敏感品系和抗杀螟丹品系差异蛋白

差异斑点	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
pH	4.6	5.0	4.9	5.2	5.8	6.3	7.6	8.1
MW(×1000)	92	33	18	17	17	16	18	18

双向电泳结果表明抗杀虫双和抗杀螟丹品系与敏感品系在蛋白质水平差异明显,而两种抗性品系的双向电泳图谱比较相似. 在杀螟丹抗性品系中产生了 C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7 和 C8 等 8 个特异斑点, pH 4. 6 ~8. 1,相对分子质量为 92 000 ~18 000 (如图 1 和表 2 所示);在杀虫双抗性品系中产生了 D11、D12、D13、D14 和 D15 等 5 个特异斑点, pH 4. 8 ~5. 5, 相对分子质量为 31 000 ~20 000,敏感品系中出现了 1 个特异斑点, pH 7. 1, 分子量为 28 000 (如图 1 和表 3 所示).

表 3 小菜蛾敏感品系和抗杀虫双品系差异蛋白

Different sports	S	D11	D12	D13	D14	D15
pH	7.1	4.8	4.8	5.0	5.1	5.5
MW(×1000)	28	20	19	19	31	31

3 讨论

利用蛋白质组学方法研究不同个体在不同生境和不同发育阶段蛋白质表达的差异,是蛋白质组学研究的一项重要内容.对动物^[4]、植物^[5]和昆虫^[6,7]等生物的研究表明,逆境或化学物质均能诱导生物表达蛋白质的质和量的改变.昆虫对杀虫剂的抗药性是在长期的选择压力下形成的,已经公认的作用机理包括:对杀虫剂解毒代谢的增强、行为的改变、表皮穿透性的减少和靶标作用部位敏感性的降低,这些作用方式无不与相关基因的表达有关.因此,从比较抗性品系和敏感品系功能基因的表达产物入手,研究昆虫的抗药性机理,将是本领域研究的一个快捷有效的途径.

本研究利用室内多年选育的能稳定遗传的溴氰菊酯抗性品系、杀螟丹抗性品系、杀虫双抗性品系和同步隔离饲养的敏感品系为材料,对成虫期的蛋白质做了比较分析,获得了清晰的蛋白质图谱,在抗性品系和敏感品系中都获得了特异的蛋白质斑点.由于抗性品系是敏感品系通过多年的药剂逐代选择获得的,因此可以认为,在抗性品系中得到的这些特异表达的蛋白质分别与溴氰菊酯、杀螟丹和杀虫双的诱导作用有关,在敏感品系中出现而在抗性品系中消失的蛋白质斑点也是杀虫剂选择作用的结果.但是,这些差异表达的蛋白质的化学性质、氨基酸序列以及功能尚需进一步研究.

[参考文献]

[1] Peng Y K, Wang Z Y, Cheng J S, et al. Comparative studies on metaphase chromosome and nonhistone protein scaffold of common wheat by two-dimensional gel-electrophoresis[J]. Cytologia, 2000,65:365-370.

[2] O'Farrell P H. High resolution of two dimensional electrophoresis of protein[J]. J Bio Chem, 1975,250:4 007-4 021.

[3] Wary W, Bouliskas T, Wary V P, et al. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels[J]. Anal Biochem, 1981,118:197-203.

[4] 赵锐,纪建国,郝守进,等. 正常与重金属铅注射的兔脑蛋白质双向电泳图谱比较与鉴定[J]. 生物化学与生物物理进展, 2001,28(6):874-879.

[5] Frederique R, Pascale G, Dominique de V, et al. Protein changes in response to progressive water deficit in maize[J]. Plant Physiol, 1998,117:1 253-1 263.

[6] 赵瑞君,李国锦,殷国荣,等. 抗性家蝇蛹期多肽的双向电泳分析[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 1997,8(2):108-110.

[7] Son X, Song Q, Barrett B. Effect of ecdysone agonists on the expression of EcR,USP and other specific proteins in the ovaries of the codling moth(Cydia pomonella L.) [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2003,33:829-840.

[责任编辑:孙德泉]