

doi:10.3969/j.issn.1005-0507.2014.02.011

# 家蝇抗药性的分子机制：乙酰胆碱酯酶介导的抗药性\*

邱星辉\*\*

(中国科学院动物研究所, 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100101)

**摘要** 乙酰胆碱酯酶 (AChE) 是有机磷和氨基甲酸酯杀虫剂的主要作用靶标, 该酶氨基酸残基的替换可以降低 AChE 对这两类杀虫剂的敏感性, 从而使昆虫表现出对这两类杀虫剂的抗性。至今在抗性家蝇 AChE 中鉴定出多个不同位点的点突变, 以 G262A/V 和 F327Y 突变最为普遍。262 和 327 两位点上的氨基酸残基靠近 AChE 的活性位点三联体, G262A/V 和 F327Y 替换可以通过改变起催化作用的丝氨酸的定位或通过降低酰基-结合袋的空间来改变酶的活性, 在抗性进化过程中起着重要的作用。家蝇 AChE 点突变的效用是累加, 多突变组合往往导致更高水平且更广谱的抗性。从不同抗性家蝇种群中检测出相同的 AChE 遗传突变, 表明这一抗性进化机制的保守性; 多种抗性位点共存于家蝇种群中, 反映了杀虫剂使用的多重性。家蝇乙酰胆碱酯酶抗性位点种类分布因地区而不同, 但也有重叠。家蝇种群表现出抗性位点的演替, 推测是杀虫药剂的轮替使用的结果。

**关键词** 家蝇; 乙酰胆碱酯酶; 抗药性; 有机磷; 氨基甲酸酯

突触乙酰胆碱酯酶 Acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) 是生物神经传导行为中的一个重要酶, 通过快速水解神经递质乙酰胆碱 (acetylcholine, Ach), 终止神经冲动以保持正常的神经信号传导。该酶促水解反应在生物体中非常快速, 这也提示该酶活性的降低极有可能带来显著的适合度代价。AChE 酶是有机磷和氨基甲酸酯杀虫剂的主要作用靶标, 有机磷和氨基甲酸酯杀虫剂作为不可逆抑制剂通过抑制昆虫乙酰胆碱的活性, 降低其对乙酰胆碱的水解活性, 使神经递质乙酰胆碱在突触处积累, 从而破坏正常的神经传导, 最终导致昆虫的死亡。

自上世纪 60 年代开始, 作用于乙酰胆碱酯酶的有机磷类和氨基甲酸酯类化合物被用于许多重要的农业和人畜疾病传媒昆虫 (如家蝇) 的控制。使用这些类型的杀虫剂之后不久, 家蝇抗药性事例不断出现, 至今家蝇对常用有机磷和氨基甲酸酯杀虫剂抗性已是普遍现象, 成为家蝇控制工作的一大障碍。以 1970 年采集后经杀虫威 (Tetrachloroviphos) 筛选的 Cornell-R 品系家蝇为

材料获得的生物化学数据首次证明了乙酰胆碱酯对杀虫剂的不敏感性是有机磷抗性的一个重要因素 (Tripathi *et al.*, 1973), 随后的遗传学、生物化学与分子生物学的研究进一步揭示了乙酰胆碱酯酶介导抗性的分子基础。现就这一领域取得的研究进展从 3 个方面综合介绍如下。

## 1 家蝇乙酰胆碱酯酶抗性相关的遗传变异及其进化起源

家蝇基因组发现了单一的乙酰胆碱酯酶基因 (*mdace*), 位于常染色体 2 上, 编码由 692 或 693 个氨基酸残基组成的前体蛋白, 其 N-端信号肽序列被切除后形成含 612 氨基酸残基的成熟蛋白 (Kozaki *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003)。本文叙述的氨基酸位点是以 AChE 成熟蛋白的氨基酸残基编号。

与敏感家蝇相比, 从抗性家蝇的 *mdace* 基因鉴定出多个不同位点的点突变。Kim 等 (2003) 发现对有机磷农药敌百虫 (Trichlorphon) 表现

收稿日期: 2013-12-17

\* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (31172160); 国家科技重大专项课题 (2012ZX10004219)

\*\* 通讯作者: E-mail: qiuXH@ioz.ac.cn

抗性的家蝇的 *mdace* 基因编码的蛋白除 3 个点突变外 (I82M、G262A、F327Y)，其蛋白序列的其他氨基酸残基与敏感家蝇相同。Kristensen 等 (2006) 分析了 21 个田间种群和 9 个实验室种群，共鉴定出 10 个氨基酸突变位点 (I82M、T180L、T230M、G262A、G262V、F327Y、G365A、A583D、A596T、L597V)，其中 7 个氨基酸替换 (I82M、T180L、T230M、G262A、G262V、F327Y、G365A) 发生在活性中心或其附近，推测其中 V180L、G262A、G262V、F327Y 和 G365A 5 个氨基酸替换可导致抗性，而 I82M 和 T230M 对抗药性的贡献不大。Kozaki 等 (2009) 除发现 V180L、G262A/V、F327Y 突变外，还发现另一抗性相关的氨基酸替换 (A236S)。在我国，从 2003 年上海采集的经残杀威 (Propoxur) 和灭多威 (Methomyl) 筛选的抗性品系中鉴定了 5 个突变 (P118S、V180L、G262A、F327Y) (Tao *et al.*, 2006)，从 2009 年广东、上海、山东、北京和吉林 5 个省市采集的野生家蝇中发现了 4 个抗性变异点突变 (V180L、G262A/V 和 F327Y) (Wang *et al.*, 2012)。

生物化学证据显示某些位点的氨基酸残基替换可以导致一定程度的乙酰胆碱酯酶对杀虫剂的不敏感性 (Walsh *et al.*, 2001)。如乙酰胆碱酯酶 G262A 突变体对敌敌畏的敏感性下降 4.3 倍；G262V 突变效应更强，突变体对敌敌畏和 bendiocarb 的敏感性分别下降了 58 和 100 倍 (Walsh *et al.*, 2001)。反过来，262A 和 327Y 分别定点突变为 262G 和 327F 可以很大程度地恢复乙酰胆碱酯酶对杀虫剂的敏感性，表明这两个氨基酸残基是决定乙酰胆碱酯酶敏感性的关键位点 (Kim *et al.*, 2003)。除这些氨基酸残基外，在乙酰胆碱酯酶的保守序列 (FGESAG) 中的谷氨酸 (E-234) 和丙氨酸 (A-236) 被认为在调节对有机磷的敏感性方面发挥作用 (Kim *et al.*, 2003)。对 20 头家蝇的基因型和 AchE 活性的抑制相关分析发现，G262A/V 和 F327Y 与家蝇对杀螟氧磷 (Fenitroxon) 的不敏感性相关，另外两个点突变 I82M 和 V180L，对不敏感性没有明显的效应 (Kozaki *et al.*, 2001)。A236S 变异对不敏感性的效用还不清楚。

氨基酸替换对抗性的贡献与该氨基酸残基的空间位置和大小有关。家蝇乙酰胆碱酯酶 180 位

的氨基酸残基距离催化中心较远，对抗性的贡献不大 (Walsh *et al.*, 2001)。262 位的甘氨酸 (G) 在不同物种中的乙酰胆碱酯酶中是保守的，在空间结构上与活性位点 235 的丝氨酸 (S-235) 距离很近，说明其在维持酶的构象和活性中具有重要的地位 (Walsh *et al.*, 2001)。甘氨酸的 R 基团为 H，该氨基酸如突变为丙氨酸 (A) 或缬氨酸 (V) 则引入更大的 R 基团 (甲基或异丙基)，会对 S-235 产生作用力，从而改变酶活性位点的三维结构，继而改变酶的活性。相对于丙氨酸，缬氨酸具有更大且疏水的基团，推测 G262V 突变的效应比 G262A 更加强烈，这一推测得到了实验数据的支持 (Walsh *et al.*, 2001)。365 位点的氨基酸与催化三连体的 E-364 相连，推测对酶活性也将产生影响 (Walsh *et al.*, 2001)。327 位点的氨基酸残基临近乙酰胆碱酯酶与底物结合的乙酰基，乙酰胆碱酯酶抗性突变体 327 位的 R 基团为酪氨酸，相比对应的敏感体的苯丙氨酸多了一个羟基，可以降低乙酰胆碱酯酶的酰基-结合袋的空间，从而改变该酶的代谢活性 (Walsh *et al.*, 2001)。

乙酰胆碱酯酶氨基酸替换可能降低酶的稳定性，且多重替换的效用是累加的 (Shi *et al.*, 2004)。在所有的研究案例中，多突变组合导致更高水平的抗性，但组合效应并不是每个突变效应的简单叠加 (Walsh *et al.*, 2001)。单一突变赋予对大多数杀虫剂的抗性，同时也造成对少数杀虫剂的敏感性，突变组合会消除这种负交互抗性，而使昆虫对所有杀虫剂产生抗性，只是抗性程度有所不同 (Fournier, 2005)。

系统树分析显示，家蝇 AchE 抗性相关的氨基酸替换 G262A 和 F327Y 有多重的进化起源，V180L、A236S、G262V 进化起源单一，F327Y 和 G362A 是 V180L 和 A236S 的共同的进化前体 (Kozaki *et al.*, 2009)。

## 2 家蝇乙酰胆碱酯酶等位基因的多样性与分布

基因测序分析表明，*mdace* 在大多数品系 (或种群) 中都包含多个等位基因。多个等位基因并存反映出杀虫剂使用的多重性。Kozaki 等 (2009) 分析了 13 个来源于北美、欧洲和亚洲的实验室种群，鉴定出 15 个不同的等位基因，

其中 11 个为敏感等位基因 (编码 V180-A236-G262-F327), 4 个为不敏感等基因 (v10: V180-A236-A232-Y407; v11: V180-S236-A232-Y407; v14: V180-A236-V232-Y407; v15: L180-A236-A232-Y407)。大多数品系为杂合品系, 包含 2 个或 2 个以上等位基因, 但 LPR 和 *rspin* 品系为抗性纯合 (V180-A236-A262-Y407)。通过对 2002 年采集于 New York 州 (53 只) 和 Florida (62 只) 的野外家蝇的检测, 只发现一种不敏感等位基因 (v10 =  $Ace^1$ ), 其他等位基因为敏感等位基因 ( $Ace^s$ ), 种群中存在 3 种基因型的个体, 即  $Ace^s/Ace^s$ ,  $Ace^s/Ace^1$  和  $Ace^1/Ace^1$  (Kozaki *et al.*, 2009), 其中大多数个体为杂合基因型 (敏感纯合基因型的个体很少), 种群偏离 Castle-Hardy-Weinberg 平衡, 说明杂合子具有适合度方面的优势。

抗性等位基因可能出现生态演替。例如, 虽然在 2002 年野外采集的家蝇中没有发现 v10 之外的其他抗性等位基因, 但 v11 在 1980 年从 New York 州采集、v14 在 1998 年 Georgia 州采集的家蝇品系中检测到 (Kozaki *et al.*, 2009), 这可能是因为某些杀虫剂不再使用, 从而降低了对 v11 和 v14 抗性等位基因的选择压, 导致这些等位基因频率下降的缘故。

*mdace* 等位基因的分布因地区而不同, 但也有重叠。比如, 抗性等位基因 v10 和 v11 在美国家蝇中存在, 但在来源于欧洲的田间或实验室品系未发现; 等位基因 v15 在一些日本品系中存在, 在美国的野生种群中却没有检测到 (Kozaki *et al.*, 2009)。值得注意的是, 在我国 5 个省市采集的样品中没有一个是敏感纯合基因型个体, 其中 327Y 突变的频率几乎达到 100% (Wang *et al.*, 2012)。我国家蝇呈现 6 种不同的 *mdace* 基因点突变组合, 以组合 1 (260L-342A-407Y) 和组合 5 (260V/L-342A/V-407Y) 最为普遍 (Wang *et al.*, 2012), 其中组合 1 也见于 1991 年英国采集的一个品系 (77M) 中, 该品系表现出 48 倍的对敌敌畏的不敏感性 (Walsh *et al.*, 2001)。

### 3 家蝇乙酰胆碱酯酶抗性变异的分子检测方法

家蝇乙酰胆碱酯酶抗性突变在原理上可以通

过基因测序的方法, 也可以通过其他基因分型的方法来检测。笔者实验室建立了 PCR-RFLP 方法, 可用于快速准确地检测抗药性中起关键作用的 262 位的基因型 (Qiu *et al.*, 2012)。该方法的原理是通过 *ace* 基因序列设计引物, PCR 扩增出大小约 609 bp 的产物; 再分别用限制性内切酶 Bsp1286I 和 Eae I 来酶解 PCR 产物; 根据两个酶切反应的酶酶图谱可以很好地区分家蝇个体乙酰胆碱酯酶基因的基因型 (Qiu *et al.*, 2012)。

### 4 结语

抗性家蝇 *mdace* 基因的非中性突变 (Non-neutral mutations) 导致其编码的乙酰胆碱酯酶发生多个位点的氨基酸替换, 这些替换单独或联合效应赋予家蝇具有不同的杀虫剂抗性谱 (Kozaki *et al.*, 2001)。抗性家蝇种群中乙酰胆碱酯酶普遍存在 G262A/V 和 F327Y 突变, 表明该两位点上的氨基酸残基在抗性进化过程中起着重要的作用。氨基酸残基 G262 和 F327 靠近 AchE 的活性位点三联体 (triad, 即 S235-E346-H447), G262A/V 点突变被认为可以通过改变起催化作用的丝氨酸的定位, F327Y 则通过降低酰基-结合袋的空间来改变酶的活性 (Mutero *et al.*, 1994)。家蝇的不同抗性种群具有相同的遗传突变表明该类抗性进化机制的保守性。多种不同抗性位点共存于家蝇种群中反映了杀虫剂使用的多重性, 也意味着逆转抗性是非常困难的。更深入分析各点突变及突变组合对乙酰胆碱酯酶对有机磷和氨基甲酸酯杀虫剂的不敏感性的贡献, 加强抗性位点基因频率及其扩散途径的监测具有重要的意义。

### 参考文献

- Devonshire AL, Moores GD. Different forms of insensitive acetylcholinesterase in insecticide-resistant house-flies (*Musca domestica*). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 1984, 21 (3): 336-340.
- Fournier D. Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in insect populations. *Chem. Biol. Interact.*, 2005, 157-158: 257-261.
- Kim CS, Kim WT, Boo KS, Kim SI. Cloning, mutagenesis, and expression of the acetylcholinesterase gene from a strain of *Musca domestica*; The change from a drug-resistant to a sensitive enzyme. *Mol. Cells*, 2003, 15 (2): 208-215.
- Kozaki T, Brady SG, Scott JG. Frequencies and evolution of

- organophosphate insensitive acetylcholinesterase alleles in laboratory and field populations of the house fly, *Musca domestica* L. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 2009, 95 (1): 6-11.
- Kozaki T, Shono T, Tomita T, Kono Y. Fenitroxon insensitive acetylcholinesterases of the housefly, *Musca domestica* associated with point mutations. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2001, 31 (10): 991-997.
- Kristensen M, Huang J, Qiao CL, Jespersen JB. Variation of *Musca domestica* L. acetylcholinesterase in Danish housefly populations. *Pest Manag. Sci.*, 2006, 62 (8): 738-745.
- Mutero A1, Pralavorio M, Bride JM, Fournier D. Resistance associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91: 5 922-5 926.
- Qiu X, Pan J, Li M, Li Y. PCR-RFLP methods for detection of insecticide resistance-associated mutations in the house fly (*Musca domestica*). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 2012, 104 (3): 201-205.
- Shi MA, Lougarre A, Alies C, Frémaux I, Tang ZH, Stojan J, Fournier D. Acetylcholinesterase alternations reveal the fitness cost of mutations conferring insecticide resistance. *BMC Evol. Biol.*, 2004, 4: 5.
- Tao LM, Shi MG, Yuang JZ, Zhuang PJ, Zhang CX, Tang ZH. Resistance pattern and point mutations of insensitive acetylcholine sterase in a carbamate-resistant strain of housefly (*Musca domestica*). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 2006, 86 (1): 1-6.
- Tripathi RK, O'Brien RD. Insensitivity of acetylcholinesterase as a factor in resistance of houseflies to the organophosphate Rabon. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 1973, 3: 495-498.
- Walsh SB, Dolden TA, Moores GD, Kristensen M, Lewis T, Devonshire AL, Williamson MS. Identification and characterization of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance. *Biochem. J.*, 2001, 359: 175-181.
- Wang Q, Li M, Pan J, Di M, Liu Q, Meng F, Scott JG, Qiu X. Diversity and frequencies of genetic mutations involved in insecticide resistance in field populations of the house fly (*Musca domestica* L.) from China. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 2012, 102 (2): 153-159.

## MOLECULAR MECHANISM OF INSECTICIDE RESISTANCE MEDIATED BY THE ACETYLCHOLINESTERASE IN THE HOUSE FLY, *MUSCA DOMESTICA*

QIU Xing-Hui

(State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology,  
Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract** This review summarizes the current findings on the molecular basis of acetylcholinesterase (AChE) mediated insecticide resistance in the house fly (*Musca domestica*). Several mutations in housefly acetylcholinesterase gene (*mdace*) associated with organophosphate or carbamate resistance have been identified. Biochemical evidences have demonstrated that substitutions of amino acids (G262A/V, F327Y) in AChE are critical for conferring insecticide resistance. Various insensitive alleles exhibiting unique and overlapping distribution have been described. A PCR-based method is available for genotyping the mutations at site 262 of AChE.

**Key words** House flies; *Musca domestica*; Acetylcholinesterase; Insecticide resistance; mechanism

## 家蝇抗药性的分子机制:乙酰胆碱酯酶介导的抗药性

作者: [邱星辉, QIU Xing-Hui](#)  
作者单位: [中国科学院动物研究所, 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京100101](#)  
刊名: [寄生虫与医学昆虫学报](#)   
英文刊名: [Acta Parasitology et Medica Entomologica Sinica](#)  
年, 卷(期): 2014, 21(2)

本文链接: [http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_jscyxxkxb201402011.aspx](http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_jscyxxkxb201402011.aspx)