




华夏英才基金学术文库

高希武 主编

# 害虫抗药性 分子机制与治理策略



科学出版社

 华夏英才基金学术文库

# 害虫抗药性分子机制与治理策略

高希武 主编

科学出版社

北京

## 内 容 简 介

本书介绍近年来害虫抗药性主要靶标蛋白和杀虫药剂解毒代谢蛋白变异的抗药性机制研究进展以及抗药性治理策略。抗药性机制部分主要包括钠离子通道、乙酰胆碱受体、 $\gamma$ 氨基丁酸受体以及乙酰胆碱酯酶等常见杀虫药剂的分子靶标、靶标变异导致的抗药性、细胞色素 P450、谷胱甘肽 S-转移酶和羧酸酯酶三大解毒代谢酶系及其与抗药性的关系。抗药性治理策略包括害虫对杀虫药剂抗性遗传和治理策略。全书共分 10 章,第 1 章介绍杀虫药剂抗性的百年史;第 2~5 章分别介绍昆虫电压门控钠离子通道、昆虫乙酰胆碱受体、昆虫  $\gamma$ 氨基丁酸受体和乙酰胆碱酯酶与害虫抗药性;第 6~8 章分别介绍细胞色素 P450、谷胱甘肽 S-转移酶、羧酸酯酶及其介导的昆虫抗药性;第 9~10 章综述了害虫对杀虫药剂抗性遗传和害虫抗药性治理策略。

本书适合从事杀虫药剂和昆虫毒理学研究人员以及大专院校师生参考。

### 图书在版编目(CIP)数据

害虫抗药性分子机制与治理策略 / 高希武主编. —北京:科学出版社,2012

ISBN 978-7-03-034755-8

I. ①害… II. ①高… III. ①植物害虫-抗药性-研究 IV. ①S481

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 124439 号

责任编辑:王海光 孙 青 / 责任校对:钟 洋

责任印制:钱玉芬 / 封面设计:陈 敬

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

中国科学院印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2012 年 6 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2012 年 6 月第一次印刷 印张:16 插页:2

字数:360 000

定价:75.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《害虫抗药性分子机制与治理策略》  
编委会名单

主 编

高希武 中国农业大学昆虫学系

编 委(按姓氏汉语拼音排序)

郭惠琳 北京市出入境检验检疫局

梁 沛 中国农业大学昆虫学系

刘晓宁 新疆大学生命科学学院

汤 芳 南京林业大学森林保护系

张 兰 中国农业科学院植物保护研究所

## 前 言

杀虫药剂一直是农林害虫/螨和公共卫生领域病媒害虫/螨控制的主要手段。随着杀虫药剂的大量使用,害虫/螨的抗药性在数量和程度上逐渐增加,目前已经成为决定杀虫药剂退出市场的一个重要因子。截至目前,害虫抗药性产生已经有 100 年的历史,人们很难说新药剂发现的速度能赶上害虫产生抗药性的速度。从田间种群生态水平到实验室分子水平,世界上许多科学家致力于害虫抗药性的研究,生物学家试图寻找出害虫抗药性有效的治理措施,而化学家也总想发现一种对害虫抗药性“免疫”的化合物。但是,杀虫药剂投入市场,害虫总是能够找到一种策略来对付新化合物的“毒杀”作用。从第一个合成的 DDT 到目前的新烟碱类药剂以及所谓的生物农药,无一幸免于抗药性的挑战。近年来随着现代仪器分析技术、生物技术的发展,在新分子靶标及其专一性作用化合物发现、基于抗药性分子遗传和种群遗传的治理策略等方面都取得了应有的进展,特别是在抗药性机制及其基因的发现方面,近几年来论文数量显著增加,一些基于害虫抗药性机制及其发生规律的抗药性治理策略得到了普遍认可。关于该领域的研究文献数量浩如烟海,不从事该领域的研究人员或学生如坠云雾,基于这种情况,作者一直想从入门到进展写一本篇幅不长的小册子以供参考,直到动笔时才发现这对我是一个挑战。因此,只能割舍了一些内容,结合作者基础进行了章节调整,邀请我们实验室的老师以及在我们实验室做过研究的人员撰写了本书。

本书的目的不是为了追求全面,也不是为了追求多么高深,宗旨是呈献给读者我们的研究涉及的一些领域。在文章撰写中基本上尊重编写者的风格和观点,主编没有做进一步的删改。

本书分 9 章。第 1 章杀虫药剂抗性的百年史,用很短的篇幅介绍了害虫抗药性发展的历史以及除了防治失败以外的其他一些问题。第 2~5 章主要介绍钠离子通道、乙酰胆碱受体、昆虫  $\gamma$  氨基酸受体以及乙酰胆碱酯酶等常见杀虫药剂的分子靶标及其靶标变异导致的抗药性。第 6~8 章主要介绍细胞色素 P450、谷胱甘肽 S-转移酶和羧酸酯酶三大解毒代谢酶系及其与抗药性的关系。第 9 章介绍害虫对杀虫药剂抗性遗传。第 10 章是害虫抗药性治理策略。有些内容在科学的未来发展中可能比较重要,但是限于目前取得的研究成就以及作者从事研究的熟悉程度就没有包括进来。例如,昆虫生长调节剂的抗药性机制问题、鱼尼汀受体问题以及药剂对昆虫表皮穿透性降低导致抗性等问题等,这些内

容只能容后再叙了。

书中部分内容的研究结果得到了国家重点基础研究发展计划(“973”计划)项目(2009CB119200)、国家自然科学基金项目(30871661,30571232)和公益性行业(农业)科研专项(201203038,200903033)的资助,在此表示感谢!

在本书完稿之际,作者要感谢本书引用的参考文献的作者,如有遗漏请谅解。感谢郭亭亭女士和博士生张雷同学在本书资料整理过程中付出的劳动。最后作者要特别感谢华夏英才出版基金对该书出版的资助。

高希武

2012年春节

# 目 录

## 前言

<b>1 杀虫药剂抗性的百年史</b> .....	1
参考文献 .....	4
<b>2 昆虫电压门控钠离子通道与抗药性</b> .....	5
2.1 引言 .....	5
2.2 钠离子通道的结构和功能 .....	5
2.3 钠离子通道进化历史与基因 .....	10
2.4 昆虫钠离子通道结构与功能 .....	11
2.4.1 昆虫钠离子通道结构与功能 .....	11
2.4.2 昆虫钠离子通道转录子的选择性剪接 .....	13
2.4.3 昆虫钠离子通道转录子的 RNA 编辑 .....	13
2.4.4 选择性剪接与 RNA 编辑后钠离子通道蛋白的功能 .....	13
2.5 钠离子通道与昆虫对拟除虫菊酯类杀虫药剂抗性 .....	15
2.5.1 天然钠离子通道变异对拟除虫菊酯的敏感性 .....	15
2.5.2 击倒抗性相关的钠通道基因突变 .....	15
参考文献 .....	20
<b>3 昆虫乙酰胆碱受体与抗药性</b> .....	25
3.1 引言 .....	25
3.2 烟碱型乙酰胆碱受体 .....	25
3.2.1 nAChR 的结构 .....	25
3.2.2 nAChR 的门控机制 .....	27
3.2.3 昆虫 nAChR 的多样性 .....	27
3.2.4 作用于昆虫乙酰胆碱受体的杀虫药剂 .....	29
3.2.5 nAChR 与害虫抗药性 .....	31
3.3 蕈毒碱型 AChR .....	34
3.3.1 昆虫的 mAChR .....	35
3.3.2 昆虫 mAChR 的结构 .....	36
3.3.3 昆虫 mAChR 潜在的杀虫药剂靶标 .....	36
3.4 展望 .....	37
参考文献 .....	37
<b>4 昆虫 <math>\gamma</math>-氨基丁酸 (GABA) 受体与抗药性</b> .....	40
4.1 引言 .....	40
4.2 脊椎动物的 GABA 受体 .....	40

4.3	昆虫 GABA 受体的药理学 .....	42
4.4	昆虫 GABA 受体的多样性 .....	43
4.5	昆虫 GABA 受体的分子生物学 .....	44
4.6	作用于 GABA 受体的杀虫药剂 .....	46
4.6.1	木防己苦毒素 .....	46
4.6.2	多氯环烷烃类 .....	46
4.6.3	二环磷酸酯和二环邻苯甲酸 .....	46
4.6.4	苯并吡啶类 .....	46
4.6.5	阿维菌素类 .....	47
4.7	GABA 受体与害虫抗药性 .....	47
4.8	针对 A302S 的抗性基因检测 .....	49
4.9	GABA 受体与昆虫的行为 .....	49
4.10	结语 .....	50
	参考文献 .....	50
<b>5</b>	<b>乙酰胆碱酯酶(AChE)与害虫抗药性 .....</b>	<b>53</b>
5.1	引言 .....	53
5.2	作用于 AChE 的杀虫药剂 .....	53
5.2.1	有机磷酸酯类杀虫药剂 .....	58
5.2.2	氨基甲酸酯类杀虫药剂 .....	58
5.2.3	AChE 其他抑制剂 .....	59
5.3	AChE 变构引起害虫抗药性的实例与交互抗性 .....	61
5.4	AChE 变构引起的两类抗性模式 .....	63
5.5	变构 AChE 的动力学参数变化 .....	67
5.6	AChE 抗性等位基因与 AChE 变构的机理 .....	68
5.6.1	AChE 抗性等位基因 .....	68
5.6.2	AChE 变构的机理 .....	69
5.6.3	AChE 的抗性遗传 .....	70
5.7	变构 AChE 的分子学特征 .....	70
5.8	昆虫 AChE 的基因结构 .....	75
5.9	AChE 的催化部位及其催化机理 .....	79
5.9.1	ACh 水解机理 .....	79
5.9.2	AChE 的催化部位及其相互关系 .....	79
5.10	展望 .....	83
	参考文献 .....	83
<b>6</b>	<b>细胞色素 P450 介导的昆虫抗药性 .....</b>	<b>88</b>
6.1	引言 .....	88
6.2	细胞色素 P450 的分类及一般特性 .....	89
6.2.1	细胞色素 P450 的命名及其分类 .....	89



6.2.2	细胞色素 P450 的结构特征	90
6.2.3	细胞色素 P450 的光谱特征和配体结合	91
6.2.4	细胞色素 P450 的可诱导性	93
6.3	昆虫细胞色素 P450 基因的多样性和进化	95
6.3.1	昆虫细胞色素 P450 种类的多样性	95
6.3.2	昆虫细胞色素 P450 分布、表达的多样性	96
6.3.3	昆虫细胞色素 P450 基因的进化	97
6.4	细胞色素 P450 酶的复杂性	100
6.4.1	经典的生物化学研究方法	100
6.4.2	细胞色素 P450 的异源表达	101
6.4.3	细胞色素 P450 的催化机制	104
6.5	细胞色素 P450 的主要功能	109
6.5.1	细胞色素 P450 催化内源性物质代谢	109
6.5.2	细胞色素 P450 催化外源性物质代谢	110
6.6	细胞色素 P450 与害虫抗药性的关系	113
6.6.1	细胞色素 P450 与抗药性	113
6.6.2	P450 介导的害虫抗药性的分子基础	117
	参考文献	117
7	谷胱甘肽 S-转移酶介导的昆虫抗药性	126
7.1	引言	126
7.2	昆虫 GST 的分类	126
7.3	昆虫 GST 的命名	128
7.4	昆虫 GST 的功能	128
7.5	昆虫 GST 最适反应条件	129
7.6	昆虫 GST 的多型性和纯化	129
7.6.1	GST 的多型性	129
7.6.2	GST 的分离纯化	130
7.7	昆虫 GST 发育期变化及其组织特异性	133
7.7.1	GST 发育期的变化	133
7.7.2	GST 的组织特异性	134
7.8	昆虫 GST 的亚细胞分布	135
7.9	昆虫 GST 基因结构及其调控机制	136
7.9.1	昆虫 GST 基因结构	136
7.9.2	昆虫 GST 基因的调控机制	140
7.10	昆虫 GST 与昆虫抗药性的相互关系	142
7.10.1	昆虫 GST 与有机磷杀虫药剂抗性的关系	142
7.10.2	昆虫 GST 与有机氯杀虫药剂抗性的关系	143
7.10.3	昆虫 GST 与拟除虫菊酯杀虫药剂的抗性关系	143

7.10.4	抗性品系和敏感品系 GST 性质差异 .....	144
7.10.5	药剂-昆虫 GST 抗药性之间的相互关系 .....	144
7.10.6	植物次生物质诱导作用对杀虫药剂毒力影响研究 .....	148
7.11	GST 参与抗性的分子机制 .....	150
	参考文献 .....	151
<b>8</b>	<b>羧酸酯酶介导的昆虫抗药性 .....</b>	<b>158</b>
8.1	绪论 .....	158
8.2	羧酸酯酶介导的有机磷和氨基甲酸类杀虫剂的抗性 .....	159
8.2.1	昆虫对有机磷和氨基甲酸类杀虫剂抗性的实例 .....	159
8.2.2	有机磷和氨基甲酸类杀虫剂抗性品系昆虫羧酸酯酶的生物化学特性 .....	162
8.2.3	有机磷和氨基甲酸类杀虫剂抗性品系昆虫羧酸酯酶的分子特性 .....	165
8.3	羧酸酯酶介导的马拉硫磷抗性 .....	175
8.3.1	昆虫对马拉硫磷杀虫剂抗性的实例 .....	175
8.3.2	马拉硫磷抗性品系昆虫羧酸酯酶的生物化学特性 .....	177
8.3.3	马拉硫磷抗性品系昆虫羧酸酯酶的分子特性 .....	179
8.4	羧酸酯酶介导的拟除虫菊酯类杀虫剂的抗性 .....	180
8.4.1	昆虫对拟除虫菊酯类杀虫剂抗性的实例 .....	180
8.4.2	拟除虫菊酯类杀虫剂抗性品系昆虫羧酸酯酶的生物化学特性 .....	182
8.5	展望 .....	183
	参考文献 .....	184
<b>9</b>	<b>害虫对杀虫药剂抗性遗传 .....</b>	<b>196</b>
9.1	前言 .....	196
9.2	遗传型的检测 .....	196
9.2.1	LD- <i>P</i> 线的制作 .....	196
9.2.2	区分剂量 .....	200
9.2.3	时间-反应测试 .....	201
9.3	种群遗传在抗性研究和治理中的作用 .....	201
9.3.1	抗性遗传学基础 .....	202
9.3.2	遗传数据的应用 .....	211
9.4	遗传学在实际抗性治理应用的展望 .....	217
9.4.1	抗性治理策略分类 .....	217
9.4.2	两种抗性治理项目的遗传学基础 .....	218
9.4.3	预测抗性表达 .....	221
9.5	结论与展望 .....	222
	参考文献 .....	223
<b>10</b>	<b>害虫抗药性治理策略 .....</b>	<b>226</b>
10.1	害虫抗药性的形成 .....	226
10.1.1	野生种群中抗药性基因的遗传平衡 .....	226

---

10.1.2 抗药性的形成 .....	227
10.2 影响害虫抗药性形成的因子.....	229
10.2.1 遗传学方面的因子 .....	230
10.2.2 生物学方面的因子 .....	231
10.2.3 药剂施用方面的因子 .....	231
10.3 抗药性治理策略.....	231
10.3.1 适度治理.....	232
10.3.2 饱和治理.....	233
10.3.3 多向进攻治理 .....	234
10.3.4 根据我国目前的状况制定克服抗性的策略.....	238
参考文献.....	239
附录 抗药性治理杀虫药剂选择分类表.....	241
彩图	

# 1 杀虫药剂抗性的百年史

高希武

中国农业大学昆虫学系

害虫抗药性是随着杀虫药剂使用出现的自然现象,也就是所谓的“微进化”。自从1908年发现抗药性的现象以来,到现在已经有100余年历史,几乎涉及所有投入市场的药剂。害虫抗药性产生给农业生产以及公共卫生病媒昆虫防治带来了重大损失。据国际杀虫药剂抗性行动委员会(Insecticide Resistance Action Committee, IRAC)统计,2001年由于抗药性问题美国杀虫药剂的投入增加4000万美元;1991年美国仅马铃薯甲虫造成的损失就达1600万美元;在美国由于棉铃虫对菊酯类药剂的抗性,如果替代50%后,防治费用需要增加1倍,产量仍然降低11%(Riley, 1990)。在我国杀虫药剂抗性造成的损失也是巨大的,如20世纪六七十年代的棉蚜,20世纪90年代的棉铃虫,21世纪的水稻褐飞虱、烟粉虱等。

杀虫药剂的使用一直是害虫防治的主要手段,其环境和抗药性风险是导致杀虫药剂品种退出市场的主要因子。1908年石灰硫磺合剂防治一种介壳虫失败后,1914年A. L. Melander首次以“*Can insects become resistant to sprays?*”为标题在美国昆虫学会主办的*Journal of Economic Entomology*杂志上做了报道。1914~1946年,对无机农药抗性的报道又增加了11例。以DDT为代表的有机杀虫药剂由于其极高的活性给人们带来了错误的信息,认为抗性只是过去的事情。但是,家蝇对DDT产生抗性的事实使当初认为昆虫对有机杀虫药剂不产生抗性的幻想很快破灭。随着环戊二烯类、氨基甲酸酯类、甲醚类、有机磷类、拟除虫菊酯类,甚至生物农药[如苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)]等的商品化,在引入市场后2~20年后抗性问題都逐渐显现出来。2008年统计有553种害虫(包括螨类)对331种杀虫药剂产生了抗性,抗药性报道的事例达到7747起,主要分布在鞘翅目、双翅目、同翅目、鳞翅目等(表1.1,图1.1)(Whalon et al., 2008)。到目前为止,至少有600种以上的昆虫产生了抗药性,还没有对抗药性“免疫”的药剂。目前比较有效地统计抗性事例的数据库见美国密歇根州立大学的Arthropod Pesticide Resistance Database (APRD) (<http://www.pesticideresistance.com>),这是一个免费的网站,可以按药剂种类、害虫(包括螨类)种类、国家或地区等检索害虫抗药性发生的情况。

害虫对杀虫药剂产生抗性的倍数一般在几十倍到几千倍不等,甚至上万倍。抗药性的产生使药剂对靶标生物的最低有效剂量随之增加,农民不可避免地要通过增加施药的剂量(浓度)达到原来的防治效果,这就导致了环境污染的加重。最终的结果是制定的施药安全间隔期等没有实际意义,即使符合安全间隔期要求,由于施药剂量的加大,农产品残留仍然超标。图1.2显示出对靶标害虫的最低有效剂量、最大允许残留量和安全间隔期的关系。一般是依据农药的最低有效剂量制定其登记剂量,一般登记剂量要高于最低有效剂量。依据药剂对高等动物的毒理学参数(如由毒性试验制定的每日允许摄入量)

表 1.1 重要抗药性节肢动物事例数和种数 (Whalon et al., 2008)

节肢动物	抗药性事例数						抗药性种数					
	总数	农业	医学	寄生	其他	传粉	总数	农业	医学	寄生	其他	传粉
螨类	1025	708	248	69	0	0	76	41	23	12	0	0
蜘蛛类	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0
鞘翅目	884	860	13	8	3	0	74	68	1	3	2	0
桡足类	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0
革翅目	222	0	220	0	2	0	4	0	3	0	1	0
双翅目	2265	291	1937	4	33	0	187	26	149	2	10	0
蜉蝣目	2	0	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0
半翅目	162	85	77	0	0	0	22	17	5	0	0	0
同翅目	992	989	3	0	0	0	58	57	1	11	0	1
膜翅目	37	6	2	26	0	3	16	3	1	11	0	1
鳞翅目	1799	1799	0	0	0	0	85	85	0	0	0	0
脉翅目	21	0	00	21	0	0	1	0	0	1	0	0
食毛目	114	4	110	0	0	0	9	1	8	0	0	0
蚤目	89	0	89	0	0	0	9	0	9	0	0	0
缨翅目	133	133	0	0	0	0	8	8	0	0	0	0
总和	7747	4875	2701	128	40	3	553	306	202	29	15	1
所占比例/%	100	62.9	34.9	1.7	<1	<1	100	55.3	36.5	5.2	2.7	<1

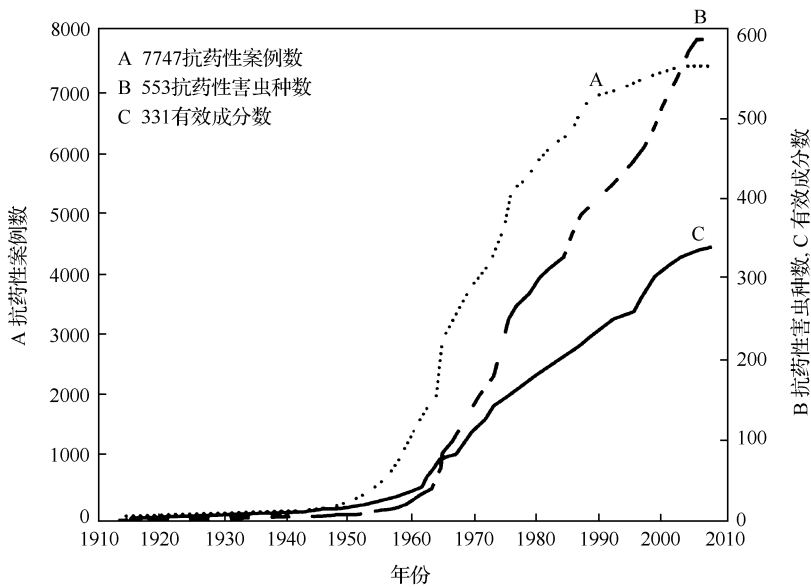


图 1.1 杀虫剂抗药性百年进化 (Whalon et al., 2008)

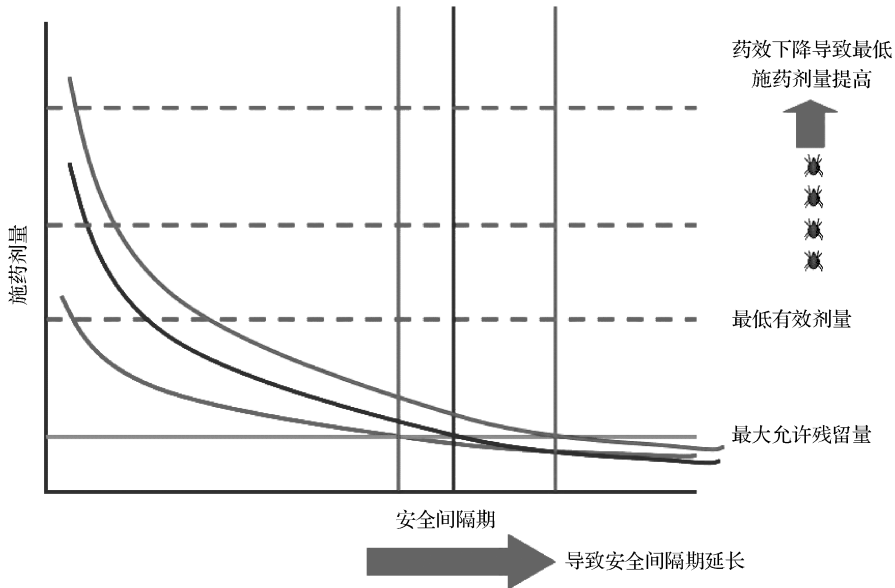


图 1.2 害虫抗药性对农药使用安全间隔期的影响(见文后彩图)

以及人们的膳食结构制定药剂在每种作物上的最大允许残留量。然后依据登记剂量通过药剂品种在田间作物上的降解动态和最大允许残留量来制定安全间隔期。靶标生物产生抗药性后,农民会不自觉地增加施药剂量(或与其他药剂混合使用),这样施药后即使达到了当时制定的安全间隔期,药剂在作物上的残留也有可能超过最大允许残留量,尽管制定最大允许残留量时可能用的是登记剂量的倍剂量或更高。

昆虫为应对杀虫药剂产生抗药性的策略主要有 4 种:①在体内合成能够分解杀虫药剂分子的酶;②用新的蛋白质替代杀虫药剂的靶标蛋白或靶标蛋白缺失;③增加表皮的厚度或改变表皮的结构,阻止药剂进入;④害虫发展了识别药剂的能力,通过行为逃避减少与药剂的接触。过去几十年来,杀虫药剂的分子靶标 90% 以上集中在昆虫的神经系统。由于市场上用于害虫防治的杀虫药剂分子靶标单一,害虫发展抗药性后很容易对其他品种的杀虫药剂产生交互抗性(表 1.2)。自从发现了 DDT 的杀虫活性以来,人们创制了一系列作用于昆虫神经细胞轴突膜受体、影响细胞膜内外离子浓度梯度的药剂,应用最广泛的一类就是拟除虫菊酯类。应该说抑制神经细胞突触间隙乙酰胆碱酯酶的药剂是研发种类最多的,主要包括磷酸酯和氨基甲酸酯两大类。作用于神经细胞突触间隙的乙酰胆碱受体的药剂近 10 年来有了迅速的发展,新烟碱类药剂的发现彻底改变了过去沙蚕毒素类药剂活性低的局面。阿维菌素的发现大大促进了 GABA-Cl 离子通道复合体靶标的研究。

表 1.2 杀虫药剂的交互抗性(Casida and Quistad,1998)

抗药性机制	交互抗性
靶标敏感度降低	
电压门依赖性钠离子通道(击倒抗性,kdr 因子)	DDT、菊酯类药剂
GABA 门控氯离子通道	环戊二烯类药剂、林丹等
乙酰胆碱酯酶(AChE)	有机磷、氨基甲酸酯类药剂
解毒作用加强	
细胞色素 P450	广谱
脂族酯酶及其他水解酶	广谱
谷胱甘肽转移酶(GST)	广谱

比较生理生化和分子生物学推进了选择性杀虫药剂新靶标的发现。昆虫生长发育、行为活动、飞行活动的调控机制将为发展生物合理性药剂提供重要的信息。生物化学和分子生物学知识和技术对于新化合物或植物保护因子的发现显得越来越重要(如毒素的发现与利用、转植物保护因子作物等)。相关生物基因组测序的完成为新药剂的创制提供了重要的分子靶标信息,通过搜索基因组—药物基因发现—转移基因—修饰基因(基因改造)等途径创制新的生物/生物源农药。通过分析昆虫基因组寻找新的蛋白质靶标,再通过蛋白质与新化合物互作研究发展新的杀虫药剂。

新技术的出现使害虫抗药性的研究得到了快速的发展。基因组测序以及生物信息学的发展大大促进了害虫抗药性的研究。一些昆虫基因组的测序,使大规模寻找害虫抗药性基因有了希望,可利用 RNAi 等分子生物学技术验证其功能及其调控机理。

许多科学家一直致力于害虫抗药性的研究,试图阻止或延缓害虫抗药性的产生;通过种群、个体、蛋白质以及分子水平研究,在抗药性出现前提出预警,提出有效的治理策略,为新杀虫药剂的创制提供分子学基础。

害虫抗药性引起的防治失败频繁发生,使杀虫药剂抗药性治理引起了世界广泛关注,特别是一些跨国农药企业更是以此为工作重点。最初以跨国农药企业为主成立杀虫药剂抗药性行动委员会(<http://www.irac-online.org/>),目的是为预防和治理杀虫药剂抗性提出合理的建议。

### 参 考 文 献

- 高希武. 1996. 棉铃虫的化学防治技术和抗药性治理. 见:张青文,高希武,蔡青年. 棉铃虫综合防治新技术. 北京:北京农业大学出版社,39-70.
- Casida J E, Quistad G B. 1998. Golden age of insecticide research: past, present, or future? *Annu Rev Entomol*, 43: 1-16.
- Gilbert L I, Gill S S. 2010. *Insect Pharmacology: Channels, Receptors, Toxins and Enzymes*. Salt lake City: Academic Press.
- Riley M. 1990. Pyrethroid resistance in *Heliothis* spp. *In*: Green M B, le Baron H M, Moberg W K. *Managing Resistance to Agrochemicals*. Washington. American Chemical Society Symposium Series 421: 134-148.
- Whalon M E, Mota-Sanchez D, Hollingworth R M. 2008. *Global Pesticide Resistance in Arthropods*. Trowbridge: Cromwell Press.

## 2 昆虫电压门控钠离子通道与抗药性

张 兰

中国农业科学院植物保护研究所

### 2.1 引 言

电压依赖性钠通道(voltage-dependent sodium channel)是存在于脊椎动物和无脊椎动物可兴奋细胞膜上的一种糖基化大分子蛋白质,主要调控细胞膜钠离子的瞬时通透性,参与形成细胞膜动作电位的上升相,在细胞兴奋性的传导上具有重要作用,是多种脂溶性神经毒素,如蟾毒素、藜芦定、乌头碱、木藜芦素、拟除虫菊酯类杀虫剂、短裸甲藻毒素以及雪卡毒素等的作用靶标。这些毒素促进钠离子通道打开,引起静止膜电位的去极化,从而严重影响神经、肌肉以及心脏组织的应激性。这类脂溶性神经毒素中毒导致动物体应激组织的过度兴奋,伴随着抽搐、麻痹以致死亡。脂溶性神经毒素影响钠离子门的机制尚未研究清楚。近年来利用定点诱变技术对钠离子通道蛋白的受体位点定位为这一问题的解释提供了线索。值得一提的是,蟾毒素和藜芦定的电位门钠离子通道 $\alpha$ 亚基受体位点似乎毗连或重叠于局部麻醉剂、抗抑郁药和抗痉挛药等治疗性药物的受体位点。

拟除虫菊酯(pyrethroids)是一类重要的合成杀虫剂,具有高效、广谱、低毒和能生物降解等特性,被广泛应用于农业和卫生害虫的防治。迄今已商品化的拟除虫菊酯有 50 多种,占全世界杀虫剂市场份额的 25% 左右(毛协良,2001;Shafer et al.,2005)。神经生理学研究表明,钠通道是拟除虫菊酯的主要毒理基础,拟除虫菊酯主要是干扰电位依赖的钠离子通道闸门开闭的动力学,使得钠离子通道延迟关闭,引起重复后放(repetitive after discharge)和突触传递的阻断(Salgado et al.,1983c; Soderlund and Bloomquist,1989)。由钠通道靶标部位敏感度降低而引起的对 DDT 和拟除虫菊酯抗性称为击倒抗性或击倒型抗性(*kdr*-type resisatnce),这类抗性首先在一个 DDT 抗性家蝇品系中被发现(Busvine,1951),后来 Sawicki(1978)报道了一个家蝇品系对 II 型拟除虫菊酯——溴氰菊酯的抗性高达 500 倍,称之为超击倒抗性(super-*kdr*)。 *kdr* 和 super-*kdr* 神经不敏感的分子基础还不十分清楚,但普遍认为,由于被修饰的钠通道减少了拟除虫菊酯与之结合的敏感性,因而导致抗性的发生(Bloomquist and Miller,1986)。

### 2.2 钠离子通道的结构和功能

脊椎动物与非脊椎动物的神经细胞膜上有大的糖基化蛋白形成的跨膜小孔,称为离子通道(图 2.1B)。它们是具有高度选择性的亲水性通道,可让适当大小、适当电荷的离子通过。与拟除虫菊酯击倒抗性有关的钠离子通道是一类因膜电位的变化而打开或关闭



的电压门控性离子通道(曹晓梅和孙晨熹,2001)。根据功能钠离子通道由三部分组成:①选择性滤器(selectivity filter),位于细胞外膜,允许适当大小和适当电荷的离子通过,钠离子有高度的选择性,最易通过;②电压传感器(voltage sensor),位于内膜、外膜之间,对膜电位变化敏感,可控制闸门的开关;③闸门,位于内膜,为通道的内侧口,当膜上带电粒子做电荷运动时引起一个电压依赖性变化,因此在钠离子通透之前的瞬间,产生微弱的门控电流或门电流(gating current),其大小为钠电流的0.3% (唐振华等,2004)。

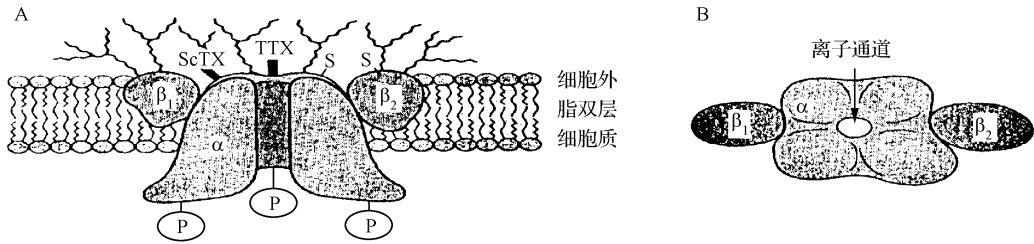


图 2.1 钠通道的横切面(唐振华等,2004)

A. 大鼠脑  $\text{Na}^+$  通道的拓扑模型,图示 3 个亚基推导的跨膜方向,河豚毒素(TTX)和蝎毒素(ScTX)的结合部位,寡糖链(图中以波纹线表示)和依赖 cAMP 的磷酸化部位(P);B. 细胞外侧表现图,图示  $\alpha$  亚基的 4 个跨膜结构域中的一个跨膜离子孔的形成

已报道至少有 5 种不同的  $\alpha$  亚单位基因编码不同的钠离子通道,一种最初由电鳗电传导组织分离,3 种来源于鼠脑(I、II 和 III 型),一种来源于小鼠肌肉组织,所有这些通道都包括 1 个 240~260kDa(1800~2000 个氨基酸)的大型糖基化  $\alpha$  亚基跨膜多肽。鼠脑的钠离子通道不仅有 1 个  $\alpha$  亚基(260kDa),还有 2 个小的亚基  $\beta_1$  (36kDa)和  $\beta_2$  (33kDa) (Catterall,1988)。纯化出具有功能的电鳗钠离子通道仅具 1 个  $\alpha$  亚基,这就意味着  $\alpha$  亚基至少包含通道的大部分功能区域(Catterall,1992)。根据果蝇 *para* 电压门控钠离子通道  $\alpha$  亚单位一级结构的克隆和测序结果,得到基于表达序列的钠离子通道的结构模型(图 2.2)(Nicholson,2007)。

如图 2.2 所示,钠离子通道的主要亚基—— $\alpha$  亚基有 4 个同源重复的结构域(I、II、III、IV 区),每一结构域均有 6 个相似的跨膜螺旋片段(S1~S6)以及一个 S5 与 S6 之间保守序列元件。这 4 个结构域以顺时针方向折叠,使的结构域 I 和 IV 最近,形成选择性过滤器,S5 与 S6 之间保守序列元件形成外孔庭(pore)。在每个同源结构域中最保守的跨膜螺旋片段是 S4,这个区域由 1 个带正电荷的氨基酸跟随 2 个非极性氨基酸残基在每一螺旋中重复 4~8 次,形成通道的电压敏感元件,称为电压传感器(voltage sensor)。在同源结构域 III 和 IV 之间有一个短的保守序列片段(Ile-Phe-Met, IFM),它是通道的失活门(inactivation gate)。 $\beta_1$  亚基以非共价键附着于  $\alpha$  亚基,而  $\beta_2$  亚基是以二硫键共价的方式附着于  $\alpha$  亚基。 $\beta$  亚基是完整的膜糖蛋白,这些糖蛋白与磷脂双层互相作用。糖基化对神经元中的功能性通道的生物合成和组成是必需的,如果糖基化被抑制,则新合成的  $\alpha$  亚基迅速被降解,就不能插入膜。至今在昆虫中未发现辅助亚基  $\beta_1$  和  $\beta_2$ ,但最近在家蝇中发现了一个辅助亚基,该亚基使果蝇 *tipE* 基因的直向同源基因,在功能上类同于脊椎动物中的  $\beta$  亚基,而在结构上却是不相关的,该亚基称为  $V_{ssc} \beta$  亚基(Lee et al.,2000)。

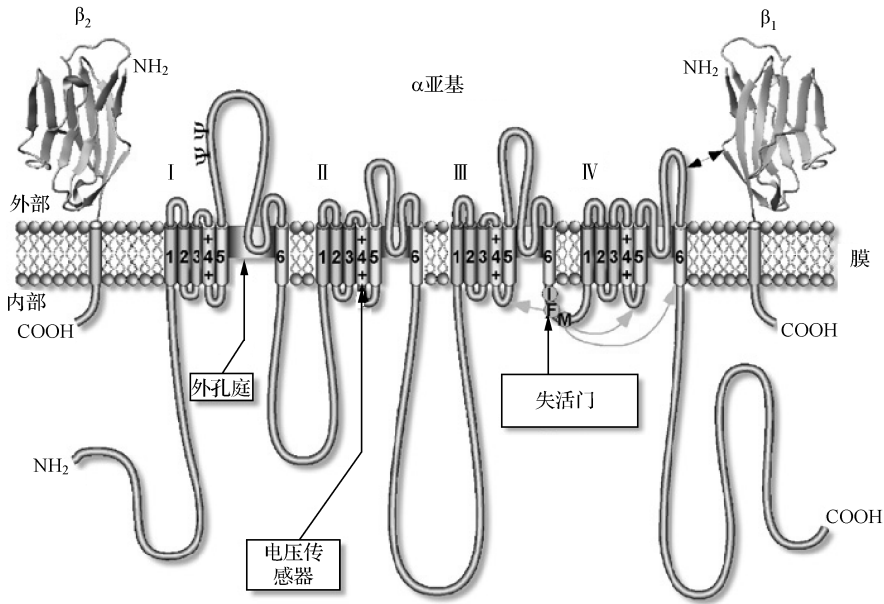


图 2.2 钠离子通道结构示意图 (Nicholson, 2007)

图 2.3 描述了钠通道从关闭到开放的门控反应过程。每个结构域都可由于电子的移动而引起电压变化,使 S4 片段(电压传感器)移动,从而使其构象发生改变(Yang et al., 1996; Chanda and Bezanilla, 2002; Cestèle et al., 2006)。在 4 个结构域的构象都发生改变后,跨膜口才开启,最终导致通道开放。无论是关闭状态还是开放状态均可因连接结构域 III 和 IV 的细胞内环向内折叠而使通道失活。在开放状态,内环向内折叠产生快速失活,在关闭状态时产生慢失活。在突变或其他抑制失活的钠通道恢复实验中证实,这个细胞内环是一个包含关键疏水序列 IFM 的连接片段。据推测 IFM 疏水片段在通道失活的时候向内折叠进入开闭孔内部(Eaholtz et al., 1994)。

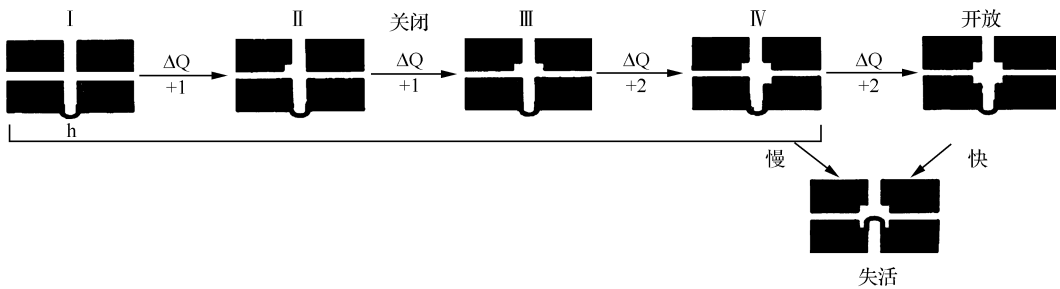


图 2.3 Na<sup>+</sup> 通道门控的程序 (唐振华等, 2004)

图 2.3 描述了 Na<sup>+</sup> 通道从关闭到开放的反应途径。每个方框表示 α 螺旋的一个同源结构域。每个结构域都经历由电压促使 S4 片段移动,从而引发构象改变,最终导致通道开放的过程。最后的关闭状态和开放状态均可因连接结构域 III 和 IV 的细胞内环向内折叠入跨膜孔的细胞内口而使通道失活。在开放状态向内折叠引起快速失活,在关闭状态向

内折叠引起慢失活。

Payandeh 等(2011)报道了一种来自弓形杆菌(*Acrobacter butzleri*)外孔庭关闭形态的电压门控钠离子通道的晶体结构(Na<sub>v</sub>Ab)。他们的研究表明电压传感器中的精氨酸门控反应控制着多亲水性相互作用,包括氢原子与蛋白质骨架连接。电压传感器和跨膜螺旋片段S4~S5的连接区通过围绕外孔庭底部的枢纽旋转,使得外孔庭膨胀。选择性过滤器是一种短的、约4.6Å宽、充满水的四方酸链结构,围绕在离子通路的最狭窄部分。这种独特结构形成一种高空间强度阴离子配位位点,凭借与谷氨酸侧链的直接作用使Na<sup>+</sup>部分失水,保证Na<sup>+</sup>的选择性。外孔庭侧面的空洞可被脂肪酸穿透直到中央腔,这些通道允许小的、疏水性孔阻遏药物的通过。

Na<sub>v</sub>Ab是NaChBac家族中的一员,具有电压门控钠离子选择性离子通道功能。钠离子通道由4个重复的结构域组成,每一结构域均由6个相似的跨膜螺旋片段(1~6)以及一个S5~S6保守序列元件(P2和P)组成(图2.4A)。对Na<sub>v</sub>Ab的结构分析进一步论证了S1N螺旋与S2-S3环能覆盖电压传感器(VSD)结构的内表面。电压门控离子通道中的S2-S3环较为保守,同时两侧的Phe肽链可能参与电压门闭-开过渡中的电压传感器在膜中的稳定作用。S1N-S3区域可能涉及电压门激活的调节功能(图2.4B)。电压门控传感器内表面被隐藏后,大量的亲水基团从外表面转移至疏水膜控区(HCS)近10Å的距离。疏水膜控区有高度保守的基团(Ile 22、Phe 56、Val 84),这些保守的基团有助于封闭电压传感器,从而保证在S4移动过程中离子的渗漏发生。因此,电压门控钠离子通道的结构与功能分析揭示出关于电压传感器作用的两个方面:钠离子通道存在大量结合亲水性物质的外表面;电压传感器被覆盖的一半面积集中着电场能。

Na<sub>v</sub>Ab的激活控门是预先封闭的。Met221能彻底关闭离子通道。Na<sub>v</sub>Ab的S6螺旋与其他闭孔结构有一定重叠,这与KV1.2开孔结构有所不同。激活控门处发生的类似虹膜微妙膨胀一样足以开启孔道,而周边S5-S6链接区可能会妨碍孔道直径的进一步扩大。在0mV下,Na<sub>v</sub>Ab中的电压感受器被激活,但是其VGIC上的孔道却是封闭的。本研究中的Na<sub>v</sub>Ab结构分析是在S6内表面附近的Cys(Ile217Cys或Met221Cys)实现的。基于VGIC电压门的动力模型分析,Cys的取代显然能锁住离子通道预开状态。

VGIC对特定的阳离子有一定选择性,而这些离子的传导速率几近于自由扩散速率。本实验的Na<sub>v</sub>Ab的结构分析表明Na<sub>v</sub>离子通道的选择特异性与高传导率极为相关。Na<sub>v</sub>Ab孔道模型由漏斗状的外管、选择性透膜、中央大孔及细胞内激活控门组成。中央大孔通过水合作用结合钠离子并能在疏水表面快速扩散。孔道中的P1螺旋规则有序,通过电荷互作稳定中央孔道中的阳离子快速转运,其过程与钾离子通道类似。另外,P2螺旋在细胞外形成外漏斗状的小管。但此类结构未见于钾离子通道中,这可能是由于钠离子通道与钙离子通道外表面有一个保守结构元件。

Na<sub>v</sub>Ab中的离子传导通道有大量负电荷分布,而且其选择性透膜会在膜外形成最狭窄的有效受控区域。离子传导研究表明,Na<sub>v</sub>Ab中的选择性透膜上分布着面积约为3.1×5.1Å<sup>2</sup>的负电荷场强,而钙离子通道中其面积约为5.5×5.5Å<sup>2</sup>。突变模型研究表明,Glu侧链与离子通道中离子选择性有极大关系。在Na<sub>v</sub>Ab中,4条Glu177侧链构成约6.5×6.5Å<sup>2</sup>的区域,其中还包含着~4.6×4.6Å<sup>2</sup>的孔口。Glu177侧链间相互作用决定钠

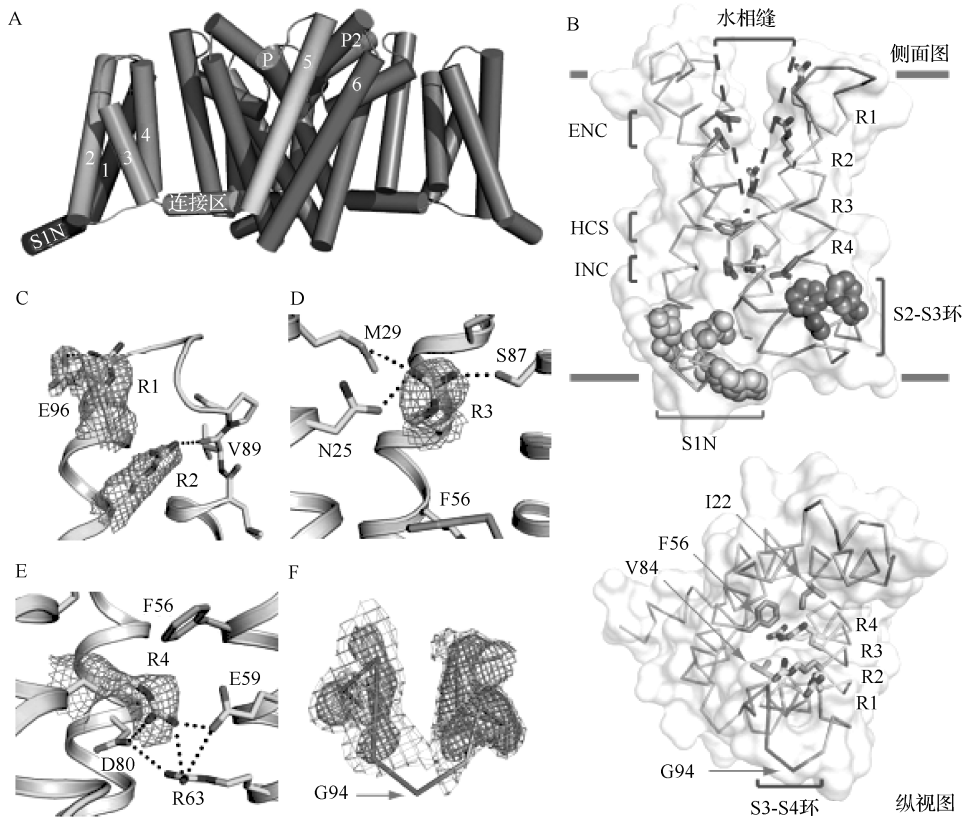


图 2.4  $\text{Na}_v \text{Ab}$  分子结构和 VSD 激活后的分子结构(Payandeh et al., 2011)(见文末彩图)

A.  $\text{Na}_v \text{Ab}$  的结构元件。由 6 个跨膜片段(S1~S6)组成的一个亚基显示图中,同时紧邻着的 VSD 没有显示出。  
 B. VSD 横纵向内部结构分布。ENC(红色),INC(红色),HCS(绿色),S1N 螺旋上的氨基酸基团(天蓝色)及 S2-S3 环上的苯丙氨酸(紫色),S4 结构及门控电位(R1-R4)(黄色)。  
 C~E. 门控电荷间的氢键交联(点线距 $<3.5\text{\AA}$ )。  
 FO-FC 等高线网分布于 E96 和 R1-R4(其面积分别为  $1\sigma$ ,  $1\sigma$ ,  $1.5\sigma$ ,  $2.5\sigma$  和  $1.75\sigma$ )。  
 F. S3-S4 环。根据其主链成晶温度分布着色(蓝色 $<50\text{\AA}^2$ ;红色 $>150\text{\AA}^2$ )。FO-FC 等高线网分布面积为  $1.5\sigma$ (灰色)和  $2.5\sigma$ (粉红色)

离子通道和钙离子通道的离子选择性。

对  $\text{Na}_v \text{Ab}$  的结构分析加强了我们对于 Glu177 侧链重要性的认识。其中 P 螺旋终止于 Thr175,而 Thr175 又与邻亚基的 Trp179 相互作用,从而能紧紧将其锁定在选择性透膜区域。同时,Thr175 和 Trp179 间的小肽链会形成一个紧密的转角以暴露 Thr175 和 Leu176 中的羰基基团来通透离子。另外,Glu177 侧链还能与 P2 螺旋上 Ser180( $2.6\text{\AA}$ )和 Met181( $3.1\text{\AA}$ )的氨基形成氢键。P 螺旋上 Gln172 和 Glu177 中的羰基形成的氢键有助于维持选择性透膜的结构稳定。但是,因不同亚基间可能重组, $\text{Na}_v \text{Ab}$  中的 Glu177 和 Ser178 的侧链处于两个不同的微环境,这与在钙离子通道蛋白中对应氨基酸的不同功能是一致的。

除了 Glu177 侧链,钠离子通道蛋白其他部位都无法检测到电荷密度,这与检测到的钠离子通道低亲和力( $\text{Na}^+$  的  $K_d > 350\text{mmol/L}$ )是一致的。相反,在 Glu 177 侧链部位检测有强电荷密度( $>4\text{\AA}$ )。这些电荷密度可能是阳离子或溶剂分子分布于选择透过膜上

造成的强信号。

## 2.3 钠离子通道进化历史与基因

钠离子通道是首批发现的离子通道蛋白超家族中的第一个成员,其离子通道超家族还包括如下成员:电压门控钾离子通道、电压门控钙离子通道、色氨酸相关的通道(一类丰富的阳离子通道家族)和环核苷酸门控通道。但是在分子进化地位上,钠离子通道家族是电压门控离子通道中最新的一类,其分化于结构相似的钙离子通道蛋白,两者有着较多的同源结构。然而,钙离子通道可能起源于钾离子通道及环核苷酸门控通道,而且期间还经过两轮的基因拷贝重组才出现钙离子通道。因为钾离子通道及环核苷酸门控通道只有经过四聚体的组装才能形成功能性的离子通道。四聚体钠离子通道的发现与后生动物的进化时间相冲突,因为后者存在专门的神经元。尽管典型的四聚体钠离子通道至今尚未发现于原核生物中,但近年有报道证实嗜盐菌属碱芽孢杆菌(*Bacillus halodurans*)钠离子通道的存在。这个单结构域构成的电压门控钠离子通道与钙离子通道有着序列同源性及相似药理动力学特征,这可能表明钠离子通道与钙离子通道间的起源与远祖离子通道的进化相似。

在许多动物中都已发现电压门控钠离子通道基因的存在,如家蝇、水蛭、乌贼、水母、哺乳动物及非哺乳类的脊椎动物。无脊椎动物的钠离子通道蛋白与哺乳动物钠离子通道蛋白的生物物理特性、药理动力学特征、基因结构,甚至和内含子剪切位点很大部分都相似,这进一步证实了远祖钠离子通道在脊椎动物门与无脊椎动物门分化前就已存在。

编码人和啮齿动物的钠离子通道的脊椎动物 $\alpha$ 亚基基因是现今研究的最成熟的一类基因。这些钠离子通道的跨膜区与细胞外结构域的氨基酸序列同源性在50%以上,从而被归类于一个亚家族。根据国际药理学联合会药物动力学惯例,钠离子通道的命名要包括主要通透离子的化学式简称,主要的生理调节因子,该亚家族的序号及其再亚家族内的专门序号,如 $Na_v1.1$ 。据统计,至少有20个外显子参与编码这9类钠离子通道(图2.5)。进化分析表明,该9个基因分为4组,每组的成员都位于同一染色体上。而且含有 $\alpha$ 亚基基因的4个染色体是同源染色体,同时每个染色体上都还存在编码参与模式发育调控的转录因子相关基因簇Hox。 $Na_v1.1$ 、 $Na_v1.2$ 、 $Na_v1.3$ 和 $Na_v1.7$ 都位于人和小鼠的2号染色体。这4个通道具有序列同源性和相似的生物物理特性,同时都能为纳米级别浓度的河豚毒素所抑制,并广泛表达于神经元中。另一簇基因 $Na_v1.5$ 、 $Na_v1.8$ 、 $Na_v1.9$ 位于小鼠3号染色体上。尽管3号染色体上的钠离子通道与2号染色体上的钠离子通道有着近75%的氨基酸同源性,但相对于2号染色体,3号染色体上钠离子通道蛋白中某些氨基酸的变化会导致不同程度河豚毒素抗性的发生。例如, $Na_v1.5$ 作为心脏中的一类主要钠离子通道蛋白,而其结构域I中孔道区域的一个苯丙氨酸(Phe)为半胱氨酸(Cys),这一单一氨基酸的替换能造成其钠离子通道蛋白对河豚毒素的敏感性降低近200倍。 $Na_v1.8$ 和 $Na_v1.9$ 相应的氨基酸都是丝氨酸(Ser),这个氨基酸的改变甚至会造成更高的河豚毒素抗性的出现。后两个钠离子通道倾向表达于外围感受神经元细胞中。其他的等位蛋白 $Na_v1.4$ (骨骼肌)和 $Na_v1.6$ (中央神经元)与2号染色体上的钠离子通道蛋白有

着近 85% 的氨基酸同源性和相似的功能特征,甚至包括对河豚毒素的敏感浓度范围。尽管它们存在这么高的相似性,最大简约法进化分析表明 *Na<sub>v</sub>1.4* 和 *Na<sub>v</sub>1.5* 与 2 号染色体上的钠离子通道蛋白进化距离较远,这与 *Na<sub>v</sub>1.4* (人 11 号染色体,小鼠 17 号染色体)和 *Na<sub>v</sub>1.4* 人 15 号染色体,小鼠 12 号染色体在不同物种中染色体定位差异是一致的。

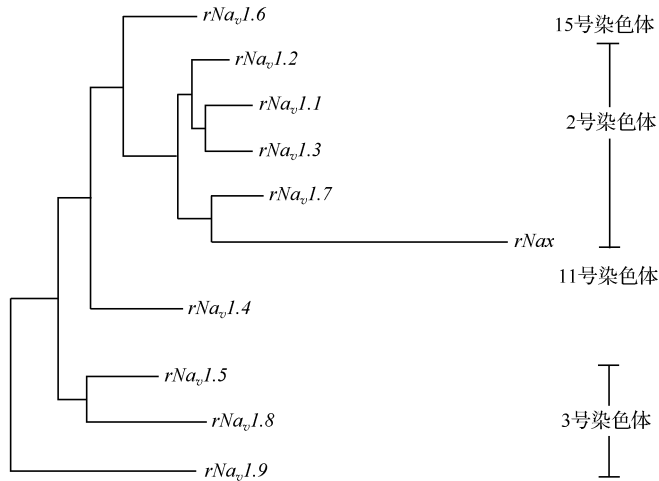


图 2.5 电压门控钠离子通道  $\alpha$  亚基进化树 (Frank and William, 2003)

使用 ClustalW 软件对鼠电压门控钠离子通道基因进行比对,进化树用 PAUP 软件绘制。

与鼠钠离子通道基因相对的人类直系同源基因在人类染色体的位置标注在右侧

现如今已又发现第 10 个钠离子通道 NaX,其定位于 2 号染色体其他钠离子通道附近,但是进化分析表明其与先前的序列相差太远。其主要差异在于电压感受器及门控激活诱导,同时无法检测到其在不同类型细胞的表达状况。这意味着 NaX 可能并不是作为电压门控钠离子通道而存在的。经证实,*NaX* 基因敲除的小鼠下丘脑不能感受到细胞外的盐浓度压力,这深刻地表明 NaX 可能作为盐浓度感受器而不是电压门控通道蛋白。

$\beta$  亚基在人染色体上的位置现在都已知, $\beta 1$  基因定位于 19 号染色体,而  $\beta 2$  和  $\beta 3$  都定位于染色体 11。尽管  $\beta 3$  和  $\beta 1$  序列同源性和功能相似性较高,但是  $\beta 3$  似乎与  $\beta 2$  的进化关系相对更近些。

## 2.4 昆虫钠离子通道结构与功能

### 2.4.1 昆虫钠离子通道结构与功能

在 20 世纪 80 年代末,*DSCI* 和 *para* 两个可能的钠离子通道基因在果蝇中鉴定出。其中 *DSCI* 基因是由 Larry Salkoff 及其助手使用黄鳃钠离子通道基因探针从果蝇基因组文库检测出来的,从而确定其可能与钠离子通道基因相关。另一类 *DSCI* 同源基因随后也在德国小蠊 (*Blattella germanica*) 中鉴定出并命名为 *BSCI* (Liu et al., 2001)。两个基因的  $\alpha$  亚基具有 4 个同源结构域,而且都跨膜 6 次。近年有人根据 *DSCI* 和 *BSCI* 这两个钠离子通道蛋白与黄鳃及哺乳动物的钠离子通道蛋白结构相似性从而推测 *DSCI* 和

*BSCI* 可能是电压门控钠离子通道。但是,又有最新研究表明 *DSCI* 和 *BSCI* 编码的是新型钙离子通道蛋白,而并非钠离子通道蛋白。对所有的电压门控钠离子通道,包括昆虫钠离子通道,其结构域 I、II、III 和 IV 中连接 S5-S6 片段的环上对应的氨基酸分别为 D、E、K 和 A,而在该离子通道蛋白上对应的氨基酸分别为 E、E、E 和 E。点突变诱导实验表明在结构域 III 上的 E 氨基酸决定着 *BSCI* 的钙离子选择性。同时,无脊椎动物中其他的可能的钠离子通道蛋白 ApCSN1 (*Aiptasia pallid*, 海葵)、CYNA1 (*Cyanea capillata*, 水母)、PpSCN1 (*Polyorchis penicillatus*, 海蜇) 和 LbNav1 (*Loligo bleekeri*, 乌贼) 都在其结构域 III 上发现 E 氨基酸的存在。尽管这些通道蛋白仍需要功能表达分析才能进一步确定,但是依此类推,无脊椎动物中其他的类 *DSCI*/*BSCI* 基因有可能也是钙离子通道蛋白。同时,*DSCI*/*BSCI* 通道在昆虫中的生物学功能还需要进一步测定。有研究表明果蝇某种嗅觉缺失后遗症与 *DSCI* 的部分抑制性表达相关,表明该 *DSCI* 可能参与嗅觉的调节作用(Zhou et al., 2004; Kulkarni et al., 2002)。

*Para* 基因是由 Barry Ganetzky 实验室从温度敏感的麻痹表型突变体中分离到的(Loughney et al., 1989)。*Para* 钠离子通道蛋白与哺乳动物钠离子通道蛋白  $\alpha$  亚基具有较高的同源性及相似整体结构。哺乳动物钠离子通道蛋白维持其正常功能的关键位点,如钠离子选择性相关的氨基酸,也保守于 *Para* 钠离子通道蛋白。在非洲爪蟾卵母细胞中的对 *Para* 钠离子通道蛋白功能表达与鉴定证实该基因编码的是钠离子通道蛋白。除了其与 *DSCI* 通道蛋白有着较高序列同源性并于钙离子通道蛋白  $\alpha 1$  有着有限序列相似性外,果蝇基因组中没有任何其他基因再与 *Para* 基因相似(Litteton and Ganetzky, 1989)。因此,*Para* 基因似乎是果蝇中唯一编码钠离子通道蛋白的基因,而且可能也存在于其他昆虫基因组中。

因钠离子通道与农药抗性的发生密切相关,类 *Para* 基因也在几个医学或农业重要昆虫中鉴定出。但是,获得的 cDNA 并不完整,完整的 cDNA 目前只有 3 个:家蝇 *Vssc1*、德国小蠊 *BgNav* 和蜂虱 *VmNav*。序列完整性有利于在非洲爪蟾卵母细胞成功表达这些类 *Para* 基因,从而彻底验证其是否也为功能性的钠离子通道。

在非洲爪蟾卵母细胞过量表达昆虫钠离子通道蛋白需要一小段的跨膜蛋白 *TipE*, 其片段跨膜 2 次形成胞质环,而且羧基端与氨基端都在细胞内表面。将 *TipE* 和 *Para* 共表达于非洲爪蟾卵母细胞,增加了表达丰度并改变了蛋白质活化动力参数,这表明 *TipE* 可能作为哺乳动物钠离子通道中  $\beta$  亚基一样的辅助性亚基(Feng et al., 1995; Warmke et al., 1997)。从家蝇克隆出的 *TipE* 同源基因似乎也能充当 *TipE* 的角色。*TipE* 也能增强 *BgNav* 在卵母细胞的表达。这些结果都证实了不同物种间跨膜蛋白功能保守性的存在。

近年,在果蝇中鉴定到 4 个 *TipE* 同源基因(*TEH1*、*TEH2*、*TEH3*、*TEH4*),而且这些同源蛋白的二级结构也与 *TipE* 的结构类似。*TEH1*、*TEH2*、*TEH3* 都能像 *TipE* 那样增加 *Para* 基因表达量,而 *TEH4* 却不能。*TEH1* 也能改变 *Para* 通道蛋白突变体的电压门控激活与抑制功能。有趣的是,除了 *TEH1* 只在中央神经系统中表达外,*TEH2*、*TEH3*、*TEH4* 都普遍表达于神经组织与非神经组织中(Derst et al., 2006)。这些蛋白质在昆虫组织细胞中调控钠离子流或其他离子流的作用仍待深入研究。

### 2.4.2 昆虫钠离子通道转录子的选择性剪接

*Para* 转录子的选择性剪接机制第一次报道于果蝇中 (Thacheray and Ganetzky, 1994)。迄今为止,该基因已发现有 9 个选择性剪接位点-a、b、c/d、I、j、e、f、h、l/k。位于细胞内连接子中外显子 a、b、I、j、e、f、h 都是可选的,同时两个特有外显子 c/d 和 l/k 在跨膜区域。这些选择性剪接位点在 *Drosophila virilis*、家蝇 *Vssc1*、德国小蠊 *BgNa<sub>v</sub>* 也是保守的。这些保守位点似乎只局限于昆虫钠离子通道。例如,果蝇中仅仅 2 个剪接位点 b 和 l/k 与 *VmNa<sub>v</sub>* 中对应的剪接位点一样,而后者有 3 个自身独特的剪接位点。尽管剪接位点在昆虫中是高度保守的,但是外显子的使用频率却是不尽相同的。例如,60% 的 *Para* 转录子与 *Vssc1* 转录子都包括有外显子 b,但不到 20% 的 *BgNa<sub>v</sub>* 转录子没有外显子 B(大写字母表示选择性外显子)。

在结构域 III S3-S4 上果蝇 l/k 剪接位点对应处,*BgNa<sub>v</sub>* 有 3 个专有外显子 G1、G2 和 G3。外显子 G1 和 G2 具有 65% 的序列同源性,并与果蝇中的外显子 l 和 k 相对应。然而,外显子 G3 与 G1 或 G2 无序列同源性,而且其内还有一个终止密码子,导致只含前 2 个结构域的部分蛋白质的产生。有趣的是,在保守的剪接位点处,*VmNa<sub>v</sub>* 含有一个选择性外显子 3,其编码结构域 III S3-S4。因结构域 III S4 为钠离子通道蛋白功能所必需,所以外显子的切除很可能导致非功能性的离子通道。此外,昆虫中这个区域的外显子/内含子重排与脊椎动物钠离子通道 *Na<sub>v</sub> 1.6* (小鼠、人、鱼)对应的区域的重排方式是一致的。像 *BgNa<sub>v</sub>* 的 G3,哺乳动物对应的外显子也存在一个终止子,产生一个类似的只有前 2 个结构域的部分蛋白质 (Plummer et al., 1997)。因此,这个区域的选择性剪接位点及剪接方式似乎起源于共同的祖先,而且普遍保守于各大类物种中。

### 2.4.3 昆虫钠离子通道转录子的 RNA 编辑

RNA 编辑是一类普遍的转录后修饰,其可以通过改变转录子中特定位点来显著改变蛋白质的功能。RNA 编辑导致碱基的替换、插入或缺失。特别是 A-I 和 U-C 编辑曾报道于昆虫钠离子通道基因中 (Bass, 2001)。通过直接的测序或限制性内切核酸酶酶切位点的分析可得果蝇中 *para* 转录子存在 10 个 A-I 编辑位点。其实际的编辑位点可能大于 10,因为研究中涉及的基因只是部分片段。10 个 RNA 编辑位点中有 8 个位点涉及跨膜区域或细胞内链接区的氨基酸位点变化。其中一些 RNA 编辑位点也保守于 *D. virilis*。但是,因氨基酸的替换所造成的功能性缺失仍需进一步确定。奇怪的是,A-I 编辑位点不存在 *BgNa<sub>v</sub>*。相反,在 *BgNa<sub>v</sub>* 中发现有 2 个独特的 A-I 和 3 个 U-C 编辑位点,其碱基替换会影响跨膜区域的氨基酸变化。其中,一个 U-C 编辑位点 F/S<sup>1919</sup> 也发现于 *para* (Liu et al., 2004; Hanrahan et al., 2000)。不过目前还不清楚是否类似的 RNA 编辑也会存在于哺乳动物钠离子通道转录子中。

### 2.4.4 选择性剪接与 RNA 编辑后钠离子通道蛋白的功能

正如上文所述,不同哺乳动物组织及细胞中钠离子通道蛋白的功能多样性与不同钠离子通道基因的选择性表达有关 (Yu and Catterall, 2003)。类似地,不同昆虫神经元中



记录的电生理信息也证实了不同的钠离子电流的存在及昆虫钠离子通道的异质性。目前仍不清楚这些不同的钠离子电流是否来自同一个单一钠离子通道。据推测,其可能归因于选择性剪接及 RNA 编辑会形成特定门控的钠离子通道(Dong,2007)。近年来非洲爪蟾卵母细胞中的功能表达揭示出几个蟑螂钠离子通道变异体都与 RNA 选择性剪接或 RNA 编辑有关(Song et al.,2004)。例如,非洲爪蟾卵母细胞中表达的 20 个 BgNa<sub>v</sub> 剪接变异体所表现出的电生理数据揭示这些不同的剪接体表达后会产生不同的钠离子电流及门控特性。其中一个变异体 BgNa<sub>v</sub> 11 在高负电势下会有所激活(-60mV),而其他的需要更多膜去极化进行激活(-45mV)。类似地,其稳定的最大半受抑电势( $V_{1/2}$ )为-37~60mV。BgNa<sub>v</sub> 7 的激活电势与受抑电势趋于重叠,其  $V_{1/2}$  分别为-36.7mV 和-37.2mV。因此,该变异体所需的电势能阈值不在-45~25mV 范围内,从而会在亚能阈值引发膜去极化,引发相关的振荡效应,突触离子内流或反复的极化调节(Crill,1996)。

现已都证实转录子选择性剪接机制在调节钠离子通道门控激活与受抑状态起着重要的作用。BgNa<sub>v</sub> 中的外显子 B 能编码一段连接结构域 I 和 II 的 8 氨基酸序列。在非洲爪蟾卵母细胞中表达 BgNa<sub>v</sub> 的变异体中很少见到外显子 B,但直接的删除外显子 B 会引发钠离子流急剧增加(Song et al.,2004)。类似地,将外显子 B 重装配到无外显子 B 的变异体中,则会重新降低其钠离子流到最初水平。这些结果都证实外显子 B 在非洲爪蟾卵母细胞中对钠离子通道蛋白的表达水平和离子电流的强度调节起重要作用。基于该外显子 B 在果蝇 *para* 和家蝇 *Vssc1* 中的位置与序列较为保守,其调节昆虫钠离子通道离子流强度的作用也可能就很常见了。外显子 b/B 位于第一个细胞内链接区,含有保守序列以供磷酸化修饰调控。哺乳动物中钠离子通道在该区域可以受到蛋白激酶的下调支配而降低其钠离子转运强度(Smith and Goldlin,1996;1997;2000)。这意味着该外显子可以作为一个调控开关,用以根据不同细胞生理信号来调节神经元细胞的兴奋强度。不过要注意,昆虫中主要的可选择的外显子都位于细胞内链接区,这些链接区序列似乎能和细胞内其他蛋白,如 G 蛋白和蛋白激酶相互作用,最终在细胞和组织特异性信号网络控制下调节这些钠离子通道蛋白。

近年已证实存在着昆虫钠离子通道转录子会发生一系列的 RNA 编辑以改变其功能。BgNa<sub>v</sub> 羧基末端的 F/S 位点发生 U-C 碱基替换后会导致持久的钠离子流而无法激活。消除在结构域 III S3 上 L/P 位点的 U-C 碱基替换后,其变异体 BgNa<sub>v</sub> 1-1 则需要更多的电势能来激活和沉默。类似地,在结构域 I S2 上 K/R 位点上的 A-I 碱基替换被消除后,BgNa<sub>v</sub> 1-2 变异体需要更多的超级化的电势能来激活。很显然,这些 RNA 编辑能改变 BgNa<sub>v</sub> 1-1 和 BgNa<sub>v</sub> 1-2 的激活/沉默特性。RNA 编辑能参与调节钠离子通道的门控特性,从而支持了 RNA 可能参与神经元活性的假说(Seeburg,2000)。

简言之,近年来相关研究表明昆虫中钠离子通道蛋白所表现的功能多样性主要与单基因转录子的选择性剪接及 RNA 编辑相关。然而,在哺乳动物中,其不同功能的钠离子通道是多基因受控调节的,昆虫钠离子通道蛋白似乎只依靠这两种方式来统一不同细胞组织中的钠离子通道活性。

## 2.5 钠离子通道与昆虫对拟除虫菊酯类杀虫药剂抗性

### 2.5.1 天然钠离子通道变异对拟除虫菊酯的敏感性

众所周知,哺乳动物钠离子通道变异体对拟除虫菊酯类化合物存在着不均一的敏感性。例如,小鼠背神经节中同一神经元细胞中的河豚毒素敏感型钠离子通道对拟除虫菊酯类化合物敏感性稍微差一些。小鼠  $Na_v 1.2$  和  $Na_v 1.4$  离子通道对拟除虫菊酯类化合物不敏感,而  $Na_v 1.8$  离子通道则对拟除虫菊酯类化合物更敏感些(Ginsburg and Narahashi,1993; Song and Narahashi,1996)。有趣的是,小鼠  $Na_v 1.2$  离子通道中结构域 II S4-S5 的甲硫氨酸替换异亮氨酸后则增强了其通道蛋白对拟除虫菊酯类化合物的敏感性。但是,异亮氨酸保守于哺乳动物钠离子通道蛋白中,因此不能充分说明异亮氨酸的替换会引发哺乳动物钠离子通道蛋白变异体对拟除虫菊酯类化合物的不均一敏感性。显然,将来的一个重要研究方向就是发现多种哺乳动物钠离子通道蛋白变异体中调节其对拟除虫菊酯类化合物不均一敏感性的其他氨基酸。

近年来关于昆虫钠离子通道变异体也表现出对拟除虫菊酯类化合物不均一的敏感性的报道也有所发展。相比蟑螂  $BgNa_v 1-1$  变异体, $BgNa_v 2-1$  变异体对溴氰菊酯的敏感性仅为其 1% (Tan et al.,2002)。从上述可知, $BgNa_v 2-1$  变异体中存在特有的外显子 G2 片段而  $BgNa_v 1-1$  变异体中存在着另一外显子 G1。这两个通道蛋白变异体的差异可能取决于外显子 G1 和 G2 的存在与否。近年来,有研究表明外显子 G2 上的 V1356A 氨基酸替换会导致  $BgNa_v 2-1$  变异体对拟除虫菊酯类化合物的敏感性降低(Tan et al.,2002)。因为在  $BgNa_v 1-1$  和  $BgNa_v 2-1$  变异体上存在着共同的独立于外显子 G 的 10 个随机分布的氨基酸,所以要借助特定位点突变实验来验证是否还有其他氨基酸参与这两个变异体对拟除虫菊酯类化合物表现出不均一敏感性的作用(Du et al.,2006)。 $BgNa_v 2-1$  变异体似乎并不常见于蟑螂中,而且主要表达于肠道和卵巢中。 $BgNa_v 2-1$  变异体对拟除虫菊酯类化合物的低敏感性可能归因于其特有的门控特性,从而专用于肠道与卵巢钠离子调节活动中(Tan et al.,2002)。不管这些钠离子通道在哺乳动物与昆虫神经生理学中的具体作用是怎样的,拟除虫菊酯类化合物抗性钠离子通道变异体显然是唯一可以阐述钠离子通道蛋白与拟除虫菊酯类化合物相互作用关系的分子基础。

### 2.5.2 击倒抗性相关的钠通道基因突变

钠离子通道是几种神经毒剂的分子靶标,这些神经毒剂具有高度的亲和性和选择性,可以与钠离子通道专一的结合位点结合而改变钠离子通道的功能。已经鉴定的位点至少有 7 个与 9 种不同的神经毒剂结合,包括拟除虫菊酯类杀虫剂和 DDT(Nicholson,2007)。神经毒理实验表明,拟除虫菊酯引起神经兴奋性毒性是因为延迟神经细胞钠通道的关闭过程,也就是拟除虫菊酯占领钠通道结构域 II 和 VI 的 S6 片段(位于钠通道内外两侧之间的疏水性区域),延迟钠通道的失活过程,产生持久的活化,导致重复后放和神经传导的阻断(Wang et al.,2001;Wang and Wang,2003)。拟除虫菊酯类杀虫剂对钠离子通道的作

用与其结构密切相关(Soderlund et al., 2002)。天然的除虫菊素和不含有 $\alpha$ -氰基-3-苯氧苄基醇( $\alpha$ -cyano-3-phenoxybenzyl alcohol moiety)的合成拟除虫菊酯(I型拟除虫菊酯)引起活性电压的长久延续(重复后放),而对静止电位有很小的或者几乎没有影响,经这类拟除虫菊酯处理的昆虫很快依次出现兴奋、抽搐和麻痹的症状,即击倒。含有 $\alpha$ -氰基-3-苯氧苄基醇的拟除虫菊酯(II型拟除虫菊酯)则通过重复的神经刺激和静止膜电位的去极化而阻断活性电位,经这类拟除虫菊酯处理的昆虫不出现兴奋状态,而出现运动失调以后的中毒症状。

1951年, Busvine首先观察到家蝇成虫对 DDT 和拟除虫菊酯类杀虫剂的快速麻痹(击倒)和毒杀作用表现抗性。Milani (1954) 对其进行了遗传学分离,认为控制此抗性的基因位于家蝇第 III 染色体上,为一隐性的击倒抗性基因(knock-down resistance gene, *kdr*),并把此抗性称为“击倒抗性”。1978年, Sawicki 等则发现了对溴氰菊酯超过 500 倍高抗品系的超击倒抗性(*super-kdr*)。自此以后,通过增效试验、代谢抗性研究、对 DDT 和拟除虫菊酯类杀虫剂的交互抗性测定等间接方法和电生理学研究等直接方法,在许多昆虫中证实了 *kdr* 型抗性的存在,如斯氏按蚊(*Aedes aegypti*)、德国小蠊、微小牛虻(*Boophilus microplus*)、烟芽夜蛾(*Heliothis virescens*)、小菜蛾(*Plutella xylostella*)、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)、甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)、伪钝绥螨(*Amblyseius fallacis*)、棉蚜(*Aphis gossypii*)、棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)、马铃薯甲虫(*Leptinotarsa decemlineata*)、致倦库蚊(*Culex quinquefasciatus*)、猫栉首蚤(*Ctenocephalides felis*) (Farnham et al., 1987; 唐振华等, 2004; Soderlund and Knipple, 2003; Bassa et al., 2004)。

目前对 *kdr* 抗性的机理有 3 种假说(王建军等, 2002)。第一个假说由 Chiang 和 Devonshire (1982) 提出,认为神经膜流动性的改变与 *kdr* 抗性有紧密的联系。尽管他们的研究表明神经膜的流动性与抗性有紧密的联系,却不能解释其因果关系。第二个假说认为神经膜中钠离子通道密度的减小降低了神经敏感性。这已在果蝇突变 *naps* 品系(无动作电位,温度敏感型)中证实,钠离子通道密度的减小延缓了击倒作用,以致有足够长的时间供解毒机制起作用,最终引起了低水平的抗性(Kasbekar and Hall, 1988; Bloomquist et al., 1989)。在家蝇中利用放射性标记的钠离子通道部位 I 药物 [ $^3\text{H}$ ] 蛤蚌毒素(saxitoxin)与敏感和 *Kdr* 型抗性家蝇脑质膜的结合,发现 *kdr* 型家蝇的钠离子通道量下降了 40%~60% (Rossignol, 1988)。但其他研究却发现, *kdr* 型抗性家蝇和敏感家蝇的钠离子通道密度差异很小或没有差异(Grubs et al., 1988; Pauron et al., 1989)。在烟芽夜蛾和德国小蠊中也发现, *kdr* 型抗性品系的钠离子通道密度与敏感品系相比没有差异或差异很小(Dong and Scott, 1991; Church and Knowles, 1992)。第三个假说认为 *kdr* 家蝇中神经敏感性的变化是由钠离子通道的结构变化引起的,钠离子通道有选择地改变杀虫剂的结合部位,降低了钠离子通道对拟除虫菊酯类杀虫剂的亲和力(Salgado et al., 1983a; 1983b)。这已经通过药理学实验得到间接证实(Pauron et al., 1989)。

近年来,随着昆虫分子生物学技术的发展,对多种昆虫敏感和 *kdr* 抗性品系 *para* 同源基因进行了分子克隆,表明 *kdr* 抗性与钠离子通道氨基酸突变密切相关(表 2.1)。

1987年,Salkoff等用电鳗cDNA探针从果蝇(*Drosophila melanogaster*)中分离到了一个钠离子通道基因 *DSCI*,它与脊椎动物钠离子通道一样,含有4个相似区,每个相似区由6个跨膜片段组成。Loughney等(1989)则分离到了第二个钠离子通道基因 *para*,该基因位于X染色体上,编码钠离子通道基因的 $\alpha$ 亚基。该基因的发现使研究击倒抗性与钠通道基因突变的关系跨出了一大步。关于 *para* 钠通道的知识为设计分子探针而分离其他节肢动物的 *para* 同源钠通道基因提供了重要的基础(Doyle and Knipple,1991; Knipple et al.,1991)。Williamson等(1993)首先用编码果蝇钠通道 *para* 基因IV结构域S4、S5部分的一段cDNA(P15)片段作探针,筛选家蝇成虫头部cDNA文库,获得2070bp的pSCP2片段,并命名为 *Vssc1* 基因。进一步的限制性片段多态性(RFLP)分析研究表明, *kdr* 和 *super-kdr* 抗性与 *Vssc1* 基因紧密连锁。1994年,Knipple等用PCR/RFLP诊断分析单个家蝇的DNA样品,同样发现 *kdr* 抗性与家蝇 *Vssc1* 基因紧密连锁。这两个发现不但为家蝇击倒抗性与钠通道基因突变之间的联系提供了有力的遗传证据,也为被广泛猜测的家蝇 *kdr* 抗性和 *super-kdr* 抗性的对等关系提供了第一次实验证据(Soderlund and Knipple,2003)。遗传连锁研究也表明 *kdr* 和 *super-kdr* 抗性位点同样与 *para* 同源钠离子通道基因紧密连锁(Dong and Scott,1994; Taylor et al.,1993; Lee et al.,1999b; Morin et al.,2002)。

在上述遗传分析结果“*Vssc1* 钠离子通道基因的突变与击倒抗性密切相关”的推动下,钠通道基因全长克隆与分析得到了广泛的研究(Ingles et al.,1996; Williamson et al.,1996)。通过对比15个家蝇品系钠通道基因的部分或者全长,一致发现突变L1014F存在于 *kdr* 和 *super-kdr* 抗性家蝇中,而突变M918T只存在于 *super-kdr* 抗性家蝇品系中(Ingles et al.,1996; Miyazaki et al.,1996; Williamson et al.,1996)。至今M918T突变也没有被发现单独存在于家蝇钠通道中,而总是和L1014T突变联系在一起(Soderlund and Knipple,2003)。自1996年发现家蝇 *kdr* 抗性与 *para* 型钠通道基因(*Vssc1*)的突变有关后,同样利用相似的技术,在其他昆虫上,如烟芽夜蛾、埃及伊蚊、小菜蛾、舞毒蛾(*Lymantria dispar*)、粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)、美洲大蠊(*Periplaneta americana*)和二点叶螨(*Tetranychus urticae*)中相继分离到了类似 *para* 的钠离子通道基因。

至今已在包括家蝇在内的14种昆虫的 *para* 直向同源钠通道基因序列中作了鉴定,共发现了20个突变(唐振华等,2004)。如图2.6所示,20个突变中的大多数出现于结构域II~III,而结构域IV尚未发现与 *kdr* 抗性有关的突变。从图2.6还可以看出,8个突变分布于S5~S6跨膜片段(I S6有1个,II S5有2个,II S6有3个和III S6有2个),其中鉴定为单个突变的有3个(I S6的V410M,II S6的L1014F和III S6的F1538I)。在S6跨膜片段有6个突变(I S6的V410M,II S6的L1014F、L1014S、L1014H和III S6的M1524I、F1538I)。根据结构分析,这6个突变位于通道孔周围,位于通道孔的还有一个第9个突变位点,即A1494V,该位点处于III S5~S6的通道孔形成区。分布于连接结构域I、II和III的短的细胞内环的突变有4个I S4~S5的I253N、II S4~S5的M918V、M918T和III S4~S5的A1410V,其中A1410V可起增效作用,增加由位于III S6的M1524I所引起的抗性。4个突变(E435K、C785R、D1549V和E1553G)位于各同源结构

域细胞内接头的开端或末端。不适用于上述各种类型的一些独特的突变是 D59G 和 P1999L,它们仅发现于德国小蠊的个别高抗性品系中,推测是次要突变位点(唐振华等, 2004)。

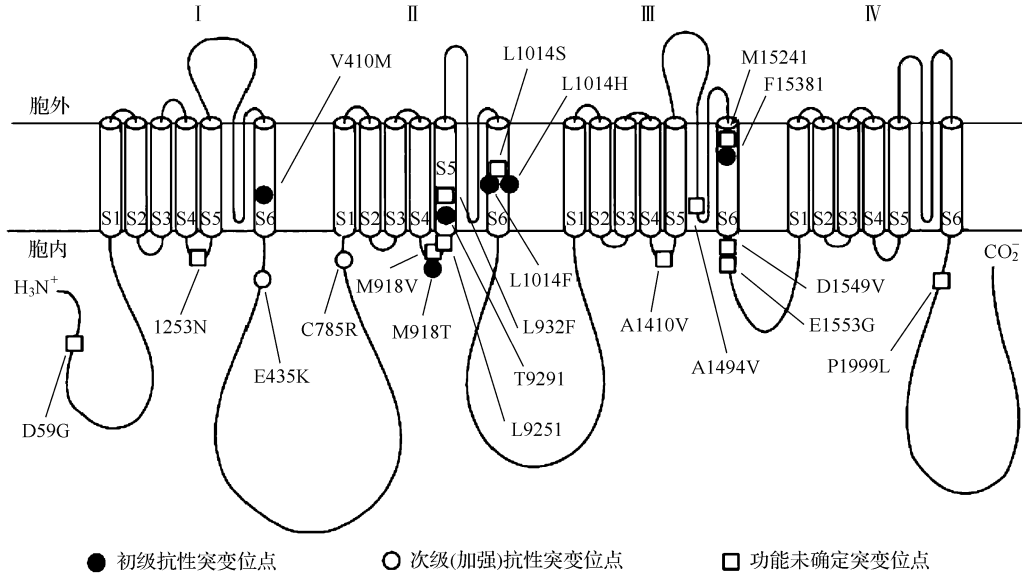


图 2.6 与 *kdr* 抗性相关的突变及其在钠通道  $\alpha$  亚基上位置(Soderlund and Knipple, 2003)

在家蝇中有 2 个突变,即 L1014F 和 M918T,前者位于 II S6 跨膜片段,呈现中等 *kdr* 抗性(10~30 倍)(Williamson et al., 1996; Dong, 1997)。后者位于 II S4~S5 接头,与前者组合(L1014F 和 M918T)时,呈 *super-kdr* 抗性(Williamson et al., 1996)。L1014 突变对拟除虫菊酯敏感性的影响已在一个钠通道序列中进行了考察。通过对家蝇 *Vssc1* 钠通道的定向突变,使其含有 L1014F 取代,然后与果蝇 *tipE* 蛋白一起在爪蟾卵母细胞中表达,成为“*Vssc1/tipE*”通道,电压膜片钳实验结果表明,含有 L1014F 突变的钠通道对不同类型的拟除虫菊酯的敏感性比不含有该突变的都会明显降低(Simth and Goldin, 1997)。而通过定向突变和功能表达研究表明,M918T 突变对由 L1014F 突变引起的抗性并不是以相加或增效的方式增加其抗性,而是其本身可提供一种高抗性,其效果超过 L1014 单个突变(唐振华等, 2004)。而将 M918T 和 L1014F 突变同时引入钠通道 *Vssc1*, 获得含有双突变的 *Vssc1/tipE* 钠通道,结果发现该通道对高浓度的生物苄呋菊酯和苄呋菊酯完全不敏感(Lee et al., 1999b)。含有 M918T 和 L1014F 双突变的 *para/tipE* 钠通道则对溴氰菊酯的敏感性降低,仅为野生型的 1%,还产生了呈单相而不是双相的尾电流衰退动力学(Vais et al., 2000),说明双突变使每个通道与溴氰菊酯的结合位点从 2 降为 1 个(唐振华等, 2004; Soderlund and Knipple, 2003)。

表 2.1 昆虫 *kdr* 抗性涉及的钠通道氨基酸序列的多态性(Soderlund and Knipple,2003)

种类	鉴定的突变 <sup>①</sup>	参考文献
冈比亚按蚊	L1014F	Martinez-Torres 等(1998)
<i>Anopheles gambiae</i>	L1014S	Ranson 等(2000)
烟粉虱 <i>Bemisia tabaci</i>	M918V ; L925I	Morin 等(2002)
	L1014F <sup>②</sup>	Miyazaki 等(1996) ; Dong (1997)
德国小蠊	L1014F+E435K+C785R <sup>②</sup>	Liu 等(2004)
<i>Blattella germanica</i>	L1014F + D59G + E435K + C785R +P1999L	Liu 等(2004)
微小牛虻 <i>Boophilus microplus</i>	F1538I	He 等(1999)
尖音库蚊 <i>Culex pipiens</i>	L1014F ; L1014S	Martine-Torres 等(1999a)
果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	I253N ; A1410V ; A1494V ; M1524I	Pittendrigh 等(1997)
棉铃虫 <i>Helicoverpa armigera</i>	D1549V+E1533G	Head 等(1998)
	L1014H	Park 和 Taylor (1997)
烟蚜夜蛾 <i>Heliothis virescens</i>	V410M	Park 等(1997)
	D1549V+E1533G	Head 等(1998)
骚扰角蝇 <i>Haematobia irritans</i>	L1014F+M918T	Guerrero 等(1997)
马铃薯甲虫 <i>Leptinotarsa decemlineata</i>	L1014F	Lee 等(1999b)
		Ingles 等(1996) ; Miyazaki 等(1996)
家蝇 <i>Musca domestica</i>	L1014F ; L1014F+M918T	Williamson 等(1996)
桃蚜 <i>Myzus persicae</i>	L1014F	Martinez-Torres 等(1999b)
人头虱 <i>Pediculus capitis</i>	T929I+L932F	Lee 等(2000b)
小菜蛾 <i>Plutella xylostella</i>	L1014F+T929I	Schuler 等(1998)

① 氨基酸位点根据家蝇 *Vssc1* 钠离子通道标注 ;

② D58G、E434K、C764R、L993F 和 P1880L 突变首次在德国大蠊中发现。

在家蝇钠离子通道中与击倒抗性相关的 L1014 和 M918T 两个突变被发现以后,在德国小蠊(Miyazaki et al. ,1996 ; Dong,1997)、烟芽夜蛾(Park and Taylor,1997)、骚扰角蝇(Guerrero et al. ,1997)、小菜蛾(Schuler et al. ,1998)、桃蚜(Martinez-Torres et al. ,1999a)、冈比亚按蚊(Martinez-Torres et al. ,1998 ; Ranson et al. ,2000)、尖音库蚊(Martinez-Torres et al. ,1999b) 和马铃薯甲虫(Lee et al. ,1999b) 中发现了 *kdr* 突变 L1014F。反之,家蝇 *super-kdr* 突变 M918T 仅在骚扰角蝇高抗品系中发现,并再一次发