

PCR 技术在农药学研究中的应用

谭仕禄, 曾鑫年*, 黎卓莹, 熊忠华, 张 帅

(华南农业大学 农药与化学生物学教育部重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要 聚合酶链式反应具有灵敏度高、特异性强和操作简便等优点,是应用最为广泛的分子生物技术之一。目前,农药学越来越多的研究涉及分子和基因,PCR 技术有着广泛的应用前景。本文简要介绍 PCR 技术的基本原理和特点,以及其在靶标生物抗药性研究、农药环境毒理、农药作用机理、生物农药的开发等方面的应用。

关键词 农药学; PCR 技术; 抗药性; 环境毒理; 作用机理

中图分类号 S 481

Application of polymerase chain reaction to pesticide science

TAN Shi-lu, ZENG Xin-nian, LI Zhuo-ying, XIONG Zhong-hua, ZHANG Shuai

(*Key Laboratory of Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China*)

Abstract Because of its ability to amplify particular DNA sequences in a relatively short time and its characters of high sensitivity, veracity and easy operation, the technology of polymerase chain reaction (PCR) has been widely applied in the biological fields and other related subjects since its birth, and now it has been further combined into more and more research fields. Pesticide science has been developing in the direction of microcosm, and more and more studies is focusing on the bio-macromolecules and genes. The keystones and components of PCR and its applications in the study of insect resistance, environmental toxicology of pesticide, mechanism of pesticide and the exploitation of bio-pesticides are introduced in this paper.

Key words pesticide science; polymerase chain reaction; insect resistance; environmental toxicology; mechanism

聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 是一种根据生物体内 DNA 复制的特点而设计

的在体外对特定 DNA 序列进行快速扩增的新技术。自 1985 年诞生以来^[1,2], PCR 技术不断完善,特别是随着热稳定性的 Taq DNA 聚合酶的应用和自动化 PCR 仪的设计成功,PCR 技术的操作程序大大简化,目前在分子生物学及其相关学科中得到广泛的应用^[3-6]。随着学科的交叉发展,分子生物学和农药学的联系越来越紧密,许多分子生物学研究技术在农药学研究中的应用也越来越广泛。PCR 技术可以应用到农药学研究的许多领域,在国外已广泛应用,我国不久的将来也将成为农药学研究的常用技术之一。

1 PCR 技术简介

PCR 反应体系的基本构成包括 5 个部分:模板 DNA、引物、DNA 聚合酶、4 种脱氧核苷酸(dNTPs)和缓冲液。PCR 反应时,首先在高温下双链的 DNA 变性形成两条单链 DNA,然后在低温下引物与单链 DNA 互补序列结合形成双链,最后在适温下 DNA 聚合酶将脱氧核苷酸加到引物末端,合成新的互补链。在整个反应中,这 3 个步骤反复循环,每一循环中所合成的新链,都可以作为下一循环中的模板。特定 DNA 序列的产量随着循环次数呈指数增加。

PCR 反应技术在分子生物学及其相关学科中广泛应用的同时,不断深入发展,形成了新的技术体系^[10]。人们对 PCR 反应技术不断进行改进,使其功能更加完善,如巢式引物 PCR(nested primer PCR)先后使用两套引物进行扩增,既增加了反应的特异性,又提高了靶序列的丰度;定量 PCR(quantitative PCR)使用同位素或光标记探针可以对模板进行定量扩增;通常 PCR 扩增的模板是 DNA,反转录 PCR(reverse transcription PCR, RT-PCR)的模板可以是 RNA,它是先将 RNA 进行反转录得到 cDNA 后再进行扩增;此外还有免疫-PCR(immune-PCR),反向 PCR(reverse PCR),长 PCR(long PCR)等。

以 PCR 反应技术为基础,结合其他的技术形成了许多先进的分子标记技术。随机扩增多态性 DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)是以随机引物通过 PCR 反应非定点扩增 DNA 片段,然后用凝胶电泳进行分离,再经染色显示扩增 DNA 片段的多态性,同时反映基因组相应区域 DNA 的多态性^[11]。RAPD 技术简单,容易掌握,可

以在没有任何分子遗传背景的情况下对物种基因组进行 DNA 多态性分析,还可多种引物对基因组间微小的变异进行检测^[12]。

扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)是限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)与 PCR 相结合的产物,其基本原理是将基因组 DNA 进行限制性内切酶酶切,然后选择特定的片段进行 PCR 扩增,再进行序列分析。AFLP 既有 RFLP 的可靠性也有 RAPD 的灵敏性,它快速、经济、简便,重复性高,可同时对随机分布在染色体上的许多不同的 DNA 区域(多位点)进行分析,获得高密度的标记和较高的信息含量^[13]。

DNA 单链构象多态性 PCR(single strand conformation polymorphism PCR, SSCP-PCR)分析,利用 PCR 技术定点扩增出基因组 DNA 分子上的某一目的序列,然后进行变性处理,再用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。目的片段上所发生的突变,甚至单个碱基的替换、缺失或插入等微小变化,将导致其构象改变,这些 DNA 特异性通过在电泳图谱上不同的位置表现出来。

2 PCR 技术在农药科学中的应用

农药学研究涉及昆虫、病菌等生物,要进行基因方面的研究,直接从生物体中分离特定 DNA 片断异常困难,也难以满足实验的需求。PCR 技术能在短时间内对极少量的特定 DNA 进行扩增,使其数量迅速增长而满足实验的需求。目前农药学研究中,PCR 技术已经在靶标生物抗药性、农药环境毒理、生物农药开发等方面得到应用。

2.1 靶标生物抗药性研究

2.1.1 抗性机制

害虫的抗性机理中最主要的是代谢抗性(metabolic resistance)和靶标抗性(target resistance)。代谢抗性涉及多种解毒酶系,每一个酶系的任何组成部分发生改变都可能改变其对杀虫剂的解毒作用或作用程度^[14]。酶是一种蛋白质,其合成是由基因控制的,因而其分子结构的改变通常是由其控制基因序列的改变而引起,同时酶分子结构的改变也会表现在基因序列的改变上。如果抗性品系的某种解毒酶的 DNA 序列和敏感品系相比发生了改变,就可以推测抗性的产生可能涉及了该解毒酶活性的改变。抗性品系中发生突

变的基因是很微量的,往往需要用 PCR 技术进行扩增后才能测定其序列。乔传令等应用快速 PCR 等技术进行研究发现,对有机磷抗性的上海致倦库蚊和 PellIR 蚊虫种群中单个蚊虫酯酶 $\alpha 2$ 和 $\beta 2$ 定量基因拷贝数均不同,其同一蚊虫个体的酯酶 $\alpha 2$ 比酯酶 $\beta 2$ 基因的拷贝数高,说明酯酶结构基因的扩增是上海致倦库蚊种群对有机磷杀虫药剂抗性的主要机理^[15]。Bo 等使用 RT-PCR 技术对淡色库蚊(*Culex pipiens pallens*)敏感和溴氢菊酯抗性品系中编码细胞色素 P₄₅₀ 的 cDNA 片段进行扩增和序列分析,发现淡色库蚊对溴氢菊酯的抗性可能与 CYP4 有关^[16]。

靶标抗性的分子机理是靶标的修饰引起杀虫剂对其敏感性降低,而靶标结构的改变是由编码这些靶标的基因发生改变而引起的。使用 PCR 技术对编码靶标的基因进行扩增后测定序列,若抗性品系的基因产生了改变,则说明抗性品系的靶标可能发生了改变,由此可以推测抗性的产生可能与靶标的不敏感性有关。黄瑶等利用 RT-PCR 等技术从两种抗性家蝇(*Musca domestica*)品系中分离 AChE 基因并测定其核苷酸顺序,通过与敏感品系比较,发现了核苷酸序列变化引起 3 个氨基酸替代,这可能与杀虫药剂的不敏感性有关^[17]。对靶标基因突变的数量和位点进行分析,还可以确定靶标的结构变化情况。Li 等采用 RT-PCR 技术对棉蚜的两个乙酰胆碱酯酶基因进行研究,分析发现抗性蚜虫中都发生了基因突变,这些突变可能降低了酶的敏感性,从而导致杀虫剂的抗药性^[18]。Zhu 等对马铃薯甲虫的研究也发现抗性品系中 AChE 基因发生了碱基 A→G 的突变,导致了 Ser→Gly 的氨基酸替换,从而引起了抗性。相反,如果抗性品系中靶标基因的序列没有发生改变,则说明抗性形成与该靶标无关^[19]。为了研究二化螟可能存在的对沙蚕毒素杀虫剂作用靶标的不敏感机制,韩招久等采用 RT-PCR 等技术对敏感和抗性个体中烟碱型乙酰胆碱受体 $\alpha 1$ 亚基(nAChR α subunit1)的 cDNA 序列进行分析,没有发现与抗性有关的特有的碱基突变,说明二化螟抗性的形成与 AChR 没有直接联系^[20]。董育新应用 PCR 技术对棉铃虫钠通道的 IIS6 序列、IIS5 和 IIS6 连接片段等进行分析发现,抗性和敏感品系在氨基酸水平没有任何差异,这表明该抗性棉铃虫品系不涉及击倒抗性(*kdr*)^[21]。

2.1.2 抗性检测

通常情况下,害虫对杀虫剂的抗性机理是固定的,抗性涉及的基因也是相对固定的。在某个抗性已经确定的种群中可以检测到引起抗性的这一特定的基因突变。反过来,在一个抗性未知的种群中如果能检测到该基因突变则说明这种抗性的存在,如没有发现该基因改变则可否定这种抗性的存在。抗性基因监测方法与常规生测方法相比有很多优点:准确率高,能鉴别个体的基因型(RR、RS 或 SS),对试虫的虫龄、虫态、发育状况无特殊要求,无需大量饲养等^[22]。噻菌酯的抗性与 cytochrome b(*cyt b*)基因上的一个突变有关,这个突变引起了氨基酸位点 143 上甘氨酸向丙氨酸转变。Ma 等对 3 种交链孢属病菌 *Alternaria alternata*, *A. tenuissima* 和 *A. arborescens* *cyt b* 基因的 DNA 片段进行 AFLP 分析,结果检测到多种 DNA 片段的变异,从而确定这 3 种交链孢属病菌对噻菌酯的抗性^[23]。编码乙酰 CoA 羧化酶的基因发生突变引起亮氨酸对异亮氨酸的替代能导致一些禾本科植物对除草剂产生抗性。Délye 等通过检测含亮氨酸的乙酰 CoA 羧化酶的基因,很容易地从田间看麦娘种群中找到抗性植株^[24]。Deok 等也通过 PCR-PASA 技术来检测小菜蛾的 T929I 和 L1014F 突变基因,以此监测其对拟除虫菊酯类杀虫剂的击倒抗性^[25,26]。

2.2 农药环境毒理

在自然环境中农药会以多种方式进行分解,微生物的降解作用是其中最重要方式之一,主要是通过各种水解酶来完成。某种水解酶可以水解某一类或几类农药或化合物,同时编码这些水解酶的基因也是可以知道的。如果在某种细菌体内检测到某种水解酶基因存在,则说明这种细菌能够产生这种水解酶,也就是说这种细菌能水解某些农药或化合物。Selvaratnam 等采用 PCR 技术研究编码苯酚单加氧酶的 *dmpN* 基因,检测废水中降解酚的假单胞杆菌。该研究不仅检测出微生物降解酶的能力,还测量出 *dmpN* 基因的转录水平,从而确定该假单胞杆菌特殊的分解活性^[27]。PCR 分析还有助于细菌未知的降解机理的研究。蔡宝立等从农药厂废水中分离到能有效降解阿特拉津的假单胞杆菌。以菌株的总 DNA 为模板进行 PCR 分析,发现这些细菌含有与假单胞杆菌 ADP 菌株的阿特拉津水解酶基因(*atzA*)相似的

基因,为进一步研究这些细菌降解阿特拉津的机理奠定基础^[28]。

在农药对动物的毒害中,人们关注较多的是农药的“三致性”。三致作用的实质是药剂作用改变了动物正常的基因序列,导致这些基因错误表达而引起病变。所以要判断是否产生了三致作用最直接的方法就是测定是否有突变基因存在。进一步对突变基因进行分析,还可以知道“三致性”的类型和性质。赵玉元等探讨有机磷农药在先天性巨结肠症发病中的作用,对胎鼠的DNA标本进行PCR分析发现有泳动变位,V906密码子存在GTG→GTT的同义突变,进而推论有机磷农药敌百虫可能导致RET基因突变^[29]。

2.3 农药作用机理

同类杀虫剂的作用机理是相对一致的,其作用靶标是相同的。但在不同种的生物上作用靶标的结构和性质会有所差别,甚至同种生物内不同种群不同个体间都会存在差异。作为一种蛋白质,这些作用靶标的差异通常与编码这些蛋白质结构的基因有关,同时作用靶标的差异也会在基因上表现出来。对这些基因进行分析对深入研究作用靶标的结构和性质具有重大意义。李飞等采用降落PCR技术成功地克隆了棉蚜para型钠离子通道cDNA和基因组DNA片段。序列分析表明,这些DNA片段所编码的氨基酸与其他昆虫的para型钠通道氨基酸具有很高的同源相似性^[30]。因而指出棉蚜para型钠离子通道cDNA和基因组DNA片段对于农药的作用机理、分子设计及害虫抗性机制有重要意义。AChE是有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的重要作用靶标,任晓霞、王建军等利用RT-PCR技术分别对棉铃虫和小菜蛾的AChE基因的cDNA片段进行克隆和序列分析,为获取AChE基因全序列以及研究其变构AChE的分子机制奠定基础^[31,32]。韩招久等对小菜蛾nAChR α 亚基的cDNA片段进行PCR分析,发现这些基因片段在氨基酸序列上和其他昆虫nAChR α 亚基基因之间有高达65%~99%的同源性,从而确定小菜蛾nAChR功能亚基(α 亚基)的3个亚型片段序列,从分子水平明确了小菜蛾nAChR功能亚基的分子性质^[33]。

2.4 生物农药的开发

生物农药由于与环境有很好的相容性而日益受到人们的重视。在生物农药的开发过程中需要对生物产生的活性物质进行研究。这些活性物质在生物

体内的合成受到某些基因的控制,其结构与性质和对应基因的结构与性质存在着必然的联系。可以通过基因分析来了解活性物质的结构与性质,为生物农药的开发利用提供理论依据。崔龙等从昆虫病原线虫共生菌*Xenorhabdus nematophilus* BP品系中筛选到对棉铃虫初孵幼虫有口服抑杀作用的cos83毒素。经PCR扩增并测序结果显示,cos83毒素与*X. nematophilus* PMF1296和*Photorhabdus luminescens* W14毒素相应区间的平均同源性为94%,说明它是共生菌口服毒素家族的一员,具有对其杀虫谱、作用机理等进行进一步研究的价值^[34]。陈月华等用AFLP方法对筛选得到的苏云金芽孢杆菌野生菌株15A3进行分析,发现其含有cryI Aa, cryI Ac, cryI Ca, cryI D, 1cryII及cry2 6种cry基因,证明了我国野生的苏云金芽孢杆菌资源中也有具国外工程菌所特有的高效杀虫晶体蛋白基因组合的优良菌株^[35]。

将PCR与生物工程技术结合,使活性蛋白的基因在其他载体上得到表达,这对于菌株的改良以及提高活性蛋白的生产效率具有重大意义。姚江等应用PCR技术对Bt菌Ly30株的cryI Aa基因进行扩增后,与表达载体pKK233-2相应酶切产物连接获得含有cryI Aa基因重组质粒pKKLyI Aa。对该重组质粒进行诱导表达得到了具良好生物活性的CryI Aa蛋白^[36]。黄菁等用RT-PCR克隆了大肠杆菌酯酶B1 5'端B1(a),并构建了完整融合表达载体pET-ESTB1。转化大肠杆菌BL21并诱导,酯酶B1的融合表达率达到27%。通过纯化获得重组蛋白,用粗酶对马拉硫磷的降解显示,降解率在15min内即达到22.1%,具有较高降解有机磷酸酯类农药的能力^[37]。

3 讨论

应用PCR技术解读DNA序列上的信息,可以从本质上认识生物生命活动的规律。对于农药学来说,在分子和基因水平上对昆虫、微生物和农作物等的生命物质进行研究,从本质上认识农药对某种生物生命活动的影响是今后研究的趋势之一。在我国PCR技术的应用与国外相比还没有那么广泛,主要集中在靶标生物抗药性研究方面。随着我国农药科学的不断发展,设备与技术的不断完善,PCR技术在农药的分子生物学研究中必然会得到广泛的应用。

参考文献

- [1] Saiki R K, Scharf S, Faloona F, *et al.* Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis diagnosis of sickle cell anemia[J]. *Science*, 1985, (230): 1350 – 1354.
- [2] Mullis K, Faloona F, Scharf S, *et al.* Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction, cold spring harbor symp[J]. *Quant Biol*, 1986, (51): 263 – 273.
- [3] Saiki R K, Gelfand D H, Stoffel S, *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase[J]. *Science*, 1988, (239): 487 – 491.
- [4] Innis M A, Gelfand D H. Optimization of PCRs in PCR protocols: a guide in methods and applications[M]. New York: Academic Press, 1990, 3 – 12.
- [5] 林万明. PCR 技术操作和应用指南[M]. 北京: 人民军医出版社, 1993, 35.
- [6] Dieffenbach C W. PCR 技术实验指南, 第 2 版[M]. 北京: 科学出版社, 2004, 12.
- [7] 苏慧慈, 刘彦仿. 原位 PCR[M]. 北京: 科学出版社 1997, 20 – 25.
- [8] Saiki R K, Bugawan T L, Horn G T, *et al.* Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLA-DQ α DNA with allele-specific oligonucleotide probes[J]. *Nature*, 1986, (324): 163 – 166.
- [9] Kogan S C, Doherty M, Gitschier J. An improved method for prenatal diagnosis of genetic disease by analysis of amplified DNA sequences[J]. *N Engl J Med*, 1987, (317): 985 – 990.
- [10] 潘耀谦, 金春彬. 聚合酶链反应(PCR)技术体系研究进展[J]. *动物医学进展*, 1999, 20(4): 11 – 17.
- [11] 胡艳红, 迟德富. RAPD 技术在昆虫学研究中的进展[J]. *应用生态学报*, 2004, 15(8): 1481 – 1486.
- [12] 王桂荣. RAPD 技术及其在昆虫学研究中的应用[J]. *昆虫知识*, 1999, 36(3): 184 – 188.
- [13] 张民照, 康 乐. AFLP 标记的特点及其在昆虫学研究中的应用[J]. *昆虫学报*, 2002, 45(4): 538 – 543.
- [14] 刘维德. 蚊虫抗药性及其测定[M]. 北京: 科学出版社, 1979.
- [15] 乔传令, Hemingway J. 有机磷抗性致倦库蚊种群中酯酶基因扩增的定量分析[J]. *昆虫学报*, 2003, 46(1): 11 – 17.
- [16] Bo S, Hui Q D, Hai S T. Cytochrome P450 genes expressed in the deltamethrin-susceptible and resistant strains of *Culex pipiens pallens*[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2003, (75): 19 – 26.
- [17] 黄 瑶, 乔传令. 杀虫药剂抗性家蝇品系乙酰胆碱酯酶基因的特征分析[J]. *生物工程学报*, 1997, 13(3): 258 – 263.
- [18] Li F, Han Z J. Mutations in acetylcholinesterase associated with insecticide resistance in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, (34): 397 – 405.
- [19] Zhu K Y, Si H L, Clark J M. A point mutation of acetylcholinesterase associated with azinphosmethyl resistance and reduced fitness in *Colorado potato beetle*[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1996, (55): 100 – 108.
- [20] 韩招久, 韩召军, 王荫长, 等. 二化螟抗杀虫单和甲胺磷品系的生化特性[J]. *昆虫学报*, 2003, 46(2): 161 – 170.
- [21] Dong Y X, Tang Z H. Molecular mechanisms of target resistance in the organophosphate- and pyrethroid resistant *helicoverpa armigera* (hubner) [J]. *Entomologia Sinica*, 2000, 7(1): 58 – 64.
- [22] 张友军, 姜 辉. 杀虫剂抗性监测技术研究进展[J]. *农药科学与管理*, 1998, (1): 20 – 23.
- [23] Ma Z H, Dan F, Themis J M. Resistance to azoxystrobin in *Alternaria* isolates from pistachio in California[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2003 (77): 66 – 74.
- [24] Délye C, Matějček A, Gasquez J. PCR-based detection of resistance to acetyl-CoA carboxylase-inhibiting herbicides in black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds) and ryegrass (*Lolium rigidum* Gaud) [J]. *Pest Manag Sci*, 2002, (58): 474 – 478.
- [25] Deok H K, Byung R C, Hyung M P, *et al.* Knockdown resistance allele frequency in field populations of *Plutella xylostella* in Korea[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2004 (80): 21 – 30.
- [26] Deok H K, Si H L. Estimation of knockdown resistance in diamondback moth using real-time PASA[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2004 (78): 39 – 48.
- [27] 李 凤, 刘世贵. 分子生物学技术在环境微生物研究中的应用[J]. *世界科技研究与发展*, 2003, 25(4): 88 – 92.
- [28] 蔡宝立, 黄金勇. 阿特拉津降解菌株的分离和鉴定[J]. *微生物学通报*, 2001, 28(2): 22 – 26.
- [29] 赵玉元, 李 涛. 有机磷对胎鼠 RET 基因转录和致突变作用的研究[J]. *兰州医学院学报*, 2002, 28(3): 9 – 13.
- [30] 李 飞, 韩召军. 棉蚜 para 钠通道 cDNA 和基因组 DNA 片段的克隆和序列分析[J]. *武夷科学*, 2002, (18): 86 – 92.
- [31] 任晓霞, 韩召军, 王荫长. 棉铃虫乙酰胆碱酯酶 cDNA 片段的克隆和序列分析[J]. *动物学报*, 2002, 48(1): 121 – 124.
- [32] 王建军, 韩召军, 王荫长. 小菜蛾乙酰胆碱酯酶 cDNA 片段的克隆和序列分析[J]. *昆虫学报*, 2002, 45(4): 544 – 547.
- [33] 韩招久, 韩召军. 小菜蛾烟碱型乙酰胆碱受体 α 亚基 cDNA 片段的克隆和序列分析[J]. *南京农业大学学报*, 2003, 26(1): 29 – 32.
- [34] 崔 龙, 邱礼鸿. *Xenorhabdus nematophilus* BP 品系杀虫毒素基因的克隆与鉴别[J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 2003, 42(3): 47 – 51.
- [35] 陈月华, 任改新, 吴卫辉, 等. 苏云金芽孢杆菌科默尔亚种 15A3 株的 cry 基因分析及杀虫特性[J]. *微生物学报*, 2002, 42(2): 169 – 174.
- [36] 姚 江, 张 杰, 陈中义, 等. 对鳞翅目害虫高毒力的 Bt cryI Aa 基因的分离克隆及表达[J]. *昆虫学报*, 2003, 46(2): 150 – 155.
- [37] 黄 菁, 乔传令, 李 暄, 等. 解毒酶基因的克隆及在大肠杆菌中的融合表达[J]. *遗传学报*, 2001, 28(6): 583 – 588.