

利用 Bac-to-Bac 系统表达棉蚜的乙酰胆碱酯酶

董双林^{1,2}, 韩召军¹, Martin S WILLIAMSON^{2,*}

(1. 南京农业大学 农业部病虫监测与治理重点开放实验室, 江苏 南京 210095;

2. Department of Biological Chemistry, Rothamsted Research, Harpenden, Herts, AL5 2JQ, United Kingdom)

摘要: Bac-to-Bac 昆虫杆状病毒表达系统是一种高效真核表达系统。采用重组 DNA 技术构建棉蚜乙酰胆碱酯酶 1 (AChE1) 表达质粒, 应用该系统在昆虫 Sf9 细胞系中成功表达了棉蚜的 AChE1。表达的 AChE 以可溶性形式释放于细胞培养液中, 对其自然底物类似物 ATChI 的 K_m 值为 $(144.5 \pm 28.6) \mu\text{M}$; 对抗蚜威、啉蚜威、氧化乐果和灭赐松等 4 种杀虫剂的敏感性指数 (K_i 值) 分别为 513、1 883、5 和 23 $(\text{mM} \cdot \text{min})^{-1}$, 与文献报道的测定结果基本一致。昆虫细胞被重组病毒感染后第 2~3 天所得产物的活性最高; 该产物在 -20°C 保存 90 d 后活性没有明显下降, 4°C 保存 60 d 后下降 40%, 室温 (22°C) 保存 7 d 后即下降 70%。

关键词: Bac-to-Bac 昆虫杆状病毒表达系统; 棉蚜; 乙酰胆碱酯酶; Sf9 细胞系

中图分类号: S433.3; S852.659.1; Q965.8 文献标识码: A 文章编号: 0254–5853 (2006) 01–0075

– 06

Expression of the *Aphis gossypii* AChE1 Gene Using the Baculovirus Expression System

DONG Shuang-lin^{1,2}, HAN Zhao-jun¹, Martin S WILLIAMSON^{2,*}

(1. Key Laboratory of Monitoring and Management of Plant Diseases and Insects, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Department of Biological Chemistry, Rothamsted Research, Harpenden, Herts, AL5 2JQ, United Kingdom)

Abstract: Using the Bac-to-Bac baculovirus expression system, the acetylcholinesterase 1 gene (*ace1*) of *Aphis gossypii* was successfully expressed in Sf9 cells. The enzyme was secreted into the cell culture medium and tested. The affinity (K_m) of the expressed AChE1 for the substrate analog ATChI was $144.5 \pm 28.6 \mu\text{M}$. The sensitivity index (indicated by K_i value) of expressed AChE1 to 2 carbamate insecticides (pirimicarb and triazamate) and 2 organophosphate insecticides (omethoate and demeton-S-methyl) were 513, 1 883, 5 and 23 $(\text{mM} \cdot \text{min})^{-1}$, respectively, which is in agreement with previously reported values obtained with the natural enzyme. The expressed enzyme showed highest activity when harvested at 2–3 d after infection of the insect cells. The expressed AChE1 was very stable without obvious loss in enzyme activity after 90 d when stored at -20°C , although 70% of the enzyme activity was lost after 7 d when stored at room temperature.

Key words: Bac-to-Bac baculovirus expression system; *Aphis gossypii*; Acetylcholinesterase; Sf9 cell strain

Bac-to-Bac 昆虫杆状病毒表达系统是一种快速、高效真核表达系统 (Anderson et al, 1996; Invitrogen Life Technologies, 2002)。该系统利用转座子 Tn7 的位点特异性, 大大简化并加快了重组病毒的过程; 使用杆状病毒结构基因中多角体蛋白的强启

动子, 可使真核目的基因得到高效表达; 具有对表达产物进行正常的翻译后加工和糖基化修饰等功能, 因此, 广泛用于外源基因的表达。

乙酰胆碱酯酶 (Acetylcholinesterase, AChE) 是神经突触传导中的关键酶, 起水解神经递质乙酰

* 收稿日期: 2005–08–16; 接受日期: 2005–11–21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30370943); 英国洛桑国际奖学金 (Rothamsted International Fellowship); 教育部博士点基金 (20030307038)

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: martin.williamson@bbsrc.ac.uk

胆碱和维持突触正常生理功能的作用。在昆虫中, AChE 是有机磷和氨基甲酸酯两类杀虫剂的主要作用靶标, 杀虫剂通过与 AChE 结合, 使酶活性中心的丝氨酸羟基发生不可逆的磷酸化或氨基甲酰化, 从而抑制酶对乙酰胆碱的水解活性, 阻断了神经正常的去极化作用 (Eldefrawi, 1985)。由 AChE 变构 (substitution) 而引起的对有关杀虫剂的不敏感性是昆虫抗药性的一个重要机制, 迄今已从多种昆虫, 如家蝇 (Devonshire & Moores, 1984)、烟粉虱 (Byrne & Devonshire, 1997)、蚊子 (Weill et al, 2002) 及棉蚜 (Moores et al, 1996; Andrews et al, 2004) 和桃蚜 (Moores et al, 1994; Nabeshima et al, 2003) 等发现了不敏感的 AChE, 并且这些不敏感的 AChE 在一级序列上存在一个或多个“保守”的突变位点, 因而推测正是这些位点的突变导致了 AChE 对杀虫剂的不敏感。如对棉蚜的研究 (Li & Han, 2004; Andrews et al, 2004) 表明, 棉蚜 AChE1 中的两处氨基酸突变与其对有机磷和氨基甲酸酯两类杀虫剂的抗性紧密相关。其中, S431F 突变品系对抗蚜威表现较高的抗性; 而 S431F 和 A302S 并存的突变品系除对抗蚜威表现高度抗性外, 还对多种其他有机磷和氨基甲酸酯杀虫剂具有抗性。

然而, 目前报道的 AChE 抗药性突变, 绝大多数都是根据抗药性相关性以及突变氨基酸的位置推测的, 要证实昆虫 AChE 这些“保守”的突变位点与抗药性间的关系, 则需要进行功能表达研究才能提供直接证据。目前已在多种昆虫中发现两个 AChE 基因 (*ace1* 和 *ace2*), 但对于这两个基因的功能差异尚不清楚。另外, 体外表达可以提供大量一致的 AChE, 也有助于弄清两个不同基因在昆虫体内的作用, 这对于建立 AChE 靶标杀虫剂的高通量筛选技术, 也是必要的。为此, 我们利用棉蚜 AChE1 基因 (*ace1*), 对 AChE 在昆虫杆状病毒表达系统中的表达进行了研究。

1 材料和方法

1.1 棉蚜 *ace1* 的扩增、质粒连接、转化及克隆鉴定

1.1.1 棉蚜 *ace1* cDNA 的扩增和克隆 根据已报道的棉蚜 *ace1* 的基因序列 (Li & Han, 2002), 合成两对特异引物 (Ag1-1, Ag1-2 和 Ag1-3, Ag1-4), 利用巢式 PCR 技术, 使用高保真聚合酶进行 *ace1* 序列的扩增。其中, 后一对引物分别带有一个专一酶

切位点序列 *Sal* I 和 *Xba* I (方框内), 以便酶切后与特异性载体 (含相同的酶切位点) 进行连接。Ag1-1 (上游引物 1): 5'-CTGTATTTAATAATGGACCAGTG-3', Ag1-2 (下游引物 1): 5'-GAATCAAACGAAATTTATAACATCA-3', Ag1-3 (上游引物 2): 5'-CTA GTCCGAC CATGGACCAGTGTTATTATGG-3', Ag1-4 (下游引物 2): 5'-GAG TCTAGA CGAAATTATAACATCAAACGGC-3'。

所用载体为 Bac-to-Bac 昆虫杆状病毒表达系统的特性质粒 pFastBacTM1。它带有来自于昆虫病毒的多角体强启动子, 可使目的基因在昆虫细胞中高效表达, 两边各有一个 Tn7 臂, 同时含有一个庆大霉素抗性基因和一个 SV40 polyA 信号序列, 共同构成 Tn7 区域。将载体和扩增的棉蚜 *ace1* cDNA 产物分别酶切后进行连接, 然后按常规方法转化细菌、挑取克隆、摇菌培养、质粒提取和琼脂糖电泳初步检测。对经电泳检测初步确定的质粒进一步测序, 以确认正确的 *ace1* 以正确的方向插入 pFastBacTM1。

1.1.2 棉蚜 *ace1* 重组杆状病毒的构建 所用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统的各种试剂均购自 Invitrogen 公司。按照公司的操作指南 (Invitrogen, 2002), 经测序检验的 pFastBacTM1 重组质粒进一步转化 Bac-to-Bac 系统专用的 DH10BacTM 细菌菌株。该菌株带有一个病毒穿梭质粒 (bacmid), 主要包括一个 Tn7 的转座目标位点和一个辅助质粒。转化反应时, pFastBacTM1 进入细菌, 它携带的 Tn7 的转座因子通过与 DH10BacTM 的靶位点发生转座反应 (需要辅助质粒产生的转座蛋白的参与), 将目标序列插入到病毒基因组中。

对转化的 DH10BacTM 细菌进行蓝白斑选择, 白斑经扩大培养后提取重组病毒 DNA (Bacmid DNA)。以 0.5% 的琼脂糖电泳初步鉴定, 再以来自于病毒 DNA 的 M13 (-40) 序列 (5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3') 作为上游引物, 以来自于棉蚜 *ace1* 的特异性序列 (5'-ACGTTTTCTTCCGATACGA-3') 作为下游引物, 对小量制备的重组病毒 DNA 进行 PCR 扩增。对 PCR 产物进行电泳检测, 如能得到目标条带则证明重组病毒构建成功。

1.2 昆虫 Sf9 细胞的转染及鉴定

1.2.1 昆虫 Sf9 细胞的培养 昆虫细胞系为 Sf9, 所用两种培养液分别为 Sf-900 II 和 HyQSF-X-IN-SECT。培养液内不含 FBS, 使用前每毫升培养液添

加 100 单位的青霉素和 100 μg 的链霉素。使用 25 mL 的细胞培养瓶，培养温度为 27 ~ 27.5 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.2 昆虫 Sf9 细胞的转染及病毒粒子的扩增
按照公司的实验指南，采用脂质体 (CellFECTIN Reagent) 包裹含有目的基因重组转移载体的线状病毒 DNA 的方法，转染昆虫细胞。光镜下每日观察细胞形态的变化，4 ~ 5 d 后收取培养液，500 g 离心 5 min 所得上清即为第一代病毒液 (P1)。P1 中所含病毒粒子的浓度可能较低，被感染昆虫细胞的数量也较少，导致酶的表达量较低。因此，取 P1 感染新的昆虫细胞得到 P2，由 P2 再得到 P3，这样使病毒粒子的浓度迅速增加。

1.2.3 昆虫 Sf9 细胞转染重组病毒后 *ace1* 的 PCR 鉴定
收集 P3 病毒液 (含有重组病毒)，加 0.1% SDS 煮沸 5 ~ 10 min 作为模板，以来自于棉蚜 *ace1* 的特异序列 5'-CCAATAGGTGATCTTAGGTT-3' 和 5'-TTAAGTTGTCCAATAGCTTTAA-3' 分别作为上游和下游引物进行 PCR 扩增，1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 酶液的制备
一般在 P3 ~ P4 时收取培养后 2 ~ 3 d 的细胞培养液，500 g 离心 5 min 得到上清液作为酶液，-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存用于酶的相关分析。

1.3 棉蚜 *ace1* 表达产物的生化测定

1.3.1 乙酰胆碱酯酶活力测定
参照 Han et al (1998) 方法。25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下，在 96 孔酶标板加样孔中依次加入 30 μL 酶液、100 μL DTNB 溶液 (75 $\mu\text{mol/L}$) 和 100 μL ATChI 溶液 (1.5 mmol/L)，混匀后即开始测定。每 30 s 读取一次光密度值 (吸收峰 405 nm)，共读取 40 个值。重复 3 次。ATChI 和 DTNB 溶液均以 0.02 mol/L、pH 7.0 的磷酸缓冲液配制。

1.3.2 乙酰胆碱酯酶 K_m 的测定
参照 Han et al (1998) 方法。配制 8 个不同浓度 (9 ~ 1 400 mmol/L) 的底物 ATChI 溶液，按照上述方法测定酶活。以双倒数法求 K_m 值。

1.3.3 酶液中蛋白总量的测定
参照 Bradford (1976) 方法，用考马斯亮蓝染色，以牛血清白蛋白 (BSA) 为标准蛋白。

1.4 表达产物棉蚜 AChE1 对不同杀虫剂敏感性的测定

1.4.1 杀虫剂及其来源
选用代表性杀虫剂 4 种，其中抗蚜威和啉蚜威为氨基甲酸酯类，氧化乐果和灭赐松为有机磷类。所有药剂购自 Sigma 公司的原

药。

1.4.2 双分子速率常数 (K_i) 的测定
参考 Moores et al (1996) 的方法，在 96 孔酶标板加样孔中先加入 30 μL 酶液，再加入 50 μL 不同浓度 (8 ~ 10 个) 的杀虫剂，混匀后 25 $^{\circ}\text{C}$ 静置 10 min，然后依次加入 100 μL DTNB 溶液 (75 μM) 和 100 μL ATChI 溶液 (1.5 mM)，混匀后即开始测定各孔中的剩余酶活力，计算 I_{50} ，参照 I_{50} 设定杀虫剂浓度进一步测定 K_i 值。测定 K_i 值时，首先在加样孔中加入 30 μL 酶液，再加入 50 μL 杀虫剂 (浓度略大于 I_{50})，不同时间 (0、1、2、4、6、8、10、12 min) 后加入 DTNB 溶液 (75 μM) 和 ATChI 溶液 (1.5 mM) 各 100 μL ，混匀后测定各孔中的剩余酶活力。各处理均重复 3 ~ 4 次。 K_i 的计算方法为，以剩余酶活的百分率对数 ($\log P$ ， P 为剩余酶活的百分率) 为纵坐标，以抑制剂浓度 (mM) 与作用时间 (min) 的乘积为横坐标，求得线性回归方程，则 $K_i = \text{斜率} \times 2.303$ 。ATChI 和 DTNB 溶液均以 0.02 M、pH 7.0 的磷酸缓冲液配制。

2 结果与分析

2.1 重组病毒 DNA 的电泳及 PCR 鉴定结果

对 3 个小量制备的重组病毒 DNA 样品直接进行电泳，结果均符合重组 Bacmid DNA 的图谱特征 (图 1A)，图中箭头所指条带为插入 pFastBacTM1 重组载体后的病毒 DNA。以来自于病毒 DNA 的 M13 (-40) 序列作为上游引物，以来自于棉蚜 *ace1* 的特异性序列作为下游引物，对小量制备的重组病毒 DNA 进一步进行 PCR 扩增，结果得到预期大小 (约 2 100 bp) 的扩增片段 (图 1B)，进一步表明重组病毒中成功插入了棉蚜 *ace1*。

2.2 重组病毒感染昆虫 Sf9 细胞后的 PCR 鉴定结果

以棉蚜 *ace1* 的特异性序列作引物，以 P3 病毒感染液为模板进行 PCR 扩增，产物经电泳检测，得到预期 970 bp 的目标条带 (图 2)。经进一步测序证实为 *ace1* 序列片段。

2.3 表达产物棉蚜 AChE1 的酶学特性

酶动力学测定 (表 1) 表明，表达产物表现出很高的 AChE 酶活性 (V_m)，而对照 (未经重组病毒感染的细胞的培养液) 基本没有活性，说明活性 AChE1 在昆虫细胞中得以成功表达；但由于棉蚜粗提液中 AChE 占总蛋白的比例可能与细胞培养上清

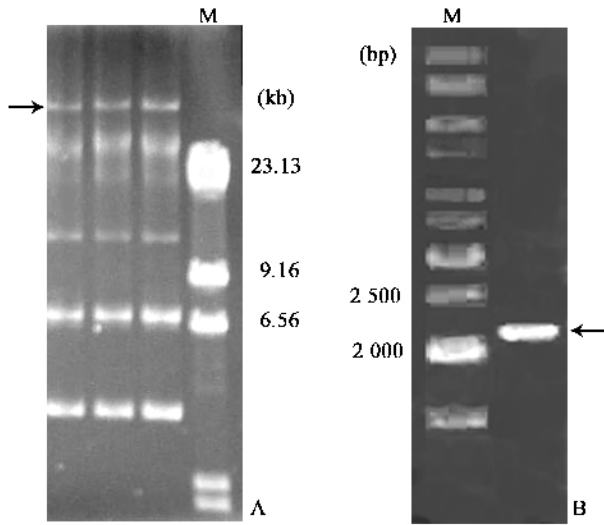


图 1 重组杆状病毒 DNA 的琼脂糖电泳图谱 (A) 和特异性引物对重组 Bacmid DNA 进行 PCR 扩增产物的琼脂糖电泳图谱 (B)

Fig. 1 Agrose gel electrophoretic analysis of the recombinant Bacmid DNA (A) and PCR product of the recombinant Bacmid DNA with specific primers (B) [The arrow indicated the band of recombinant Bacmid DNA (A) and the band of expected PCR fragment (B)]

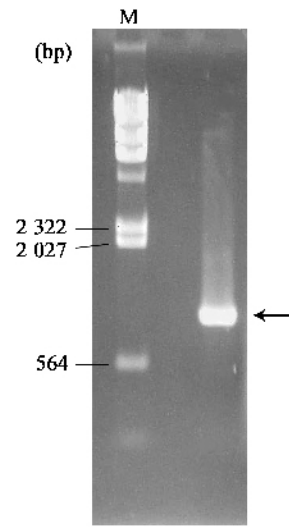


图 2 重组病毒感染后昆虫 Sf9 细胞培养液中 *ace1* 的 PCR 电泳图谱

Fig. 2 Agrose gel electrophoretic analysis of PCR product for *ace1* fragment using the culture medium after the Sf9 cells infected with the recombinant virus [The arrow indicated the expected band of *ace1* fragment]

液中的不同, 两者间的 V_m 值差异仅作参考。酶与底物亲和力测定结果显示, 表达产物的 K_m 为 (144.5 ± 28.6) mM, 明显高于敏感虫体 AChE 粗提物的 K_m , 其原因可能是蚜虫提取物中还有 AChE2、酯酶和其他干扰组分, 导致 K_m 值偏低。

2.4 表达产物对几种杀虫剂的敏感性

AChE 是有机磷和氨基甲酸酯两类杀虫剂的主

要作用靶标。几种有机磷和氨基甲酸酯杀虫剂对表达产物 K_i 的测定结果 (表 2) 表明, 棉蚜 AChE1 对这些杀虫剂的敏感性存在很大差异, 以对氧化乐果的敏感性最低, 对啶蚜威的敏感性最高; 若以氧化乐果的敏感性为 1 计算, 则灭赐松、抗蚜威和啶蚜威的敏感性倍数分别为 5、113 和 415 倍。

表 1 表达产物棉蚜 AChE1 的 K_m 和 V_m

Tab. 1 K_m and V_m of AChE1 obtained from the expression system and the cotton aphids

	K_m (μ M)	V_m [mOD ($\text{min} \cdot \mu\text{g}$) $^{-1}$]
表达 ACh E1 Expressed AChE1	144.5 ± 28.6	88.6 ± 5.5
虫体 AChE 粗提物 Crude AChE preparation from cotton aphids	43.0 ± 5.8	26.7 ± 0.9
未感染细胞的培养液 Uninfected cell culture medium	—	0.9 ± 0.2

表 2 表达 AChE1 对四种杀虫剂的敏感性指数 (K_i) 和相对敏感倍数 (IF)

Tab. 2 Sensitivity index (K_i) and the relative insensitivity ratios (IF) of expressed AChE1 to different carbamate or organophosphate inhibitors

	抗蚜威 Pirimicarb	啶蚜威 Triazamate	氧化乐果 Omethoate	灭赐松 Demeton-S-methyl
K_i 值 K_i value [($\text{mM} \cdot \text{min}$) $^{-1}$]	512.92 ± 53.06	$1\ 883.44 \pm 46.41$	4.54 ± 0.37	23.24 ± 0.75
相对敏感倍数 (倍) Relative insensitivity ratio (fold)	112.98	414.85	1	5.12

2.5 两种细胞培养液和细胞感染后不同时间所得表达产物的酶活性

对昆虫细胞被感染后不同时间所得上清液的测定结果(图3)表明, AChE1 的活性在第1天(24 h)很低, 第2天大幅度增加, 至第3天达到高峰, 此后由于昆虫细胞老化和破裂而释放出一些蛋白酶, 从而使活性逐渐降低。两种细胞培养液相比较, Sf-900 II 所得表达产物的活性除在第2天较 HyQSFX-INSECT 的明显为低外, 第3~6天均较后者高, 但在高峰期的第3天并未有显著差异。

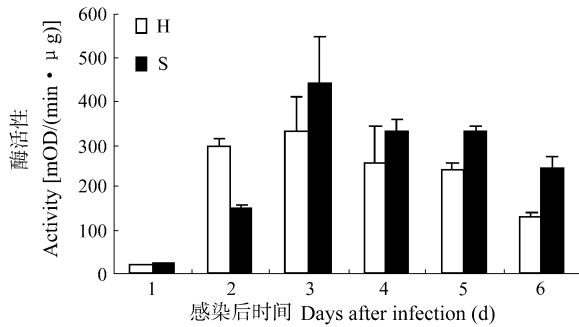


图3 两种细胞培养液(H:HyQSFX-INSECT; S:Sf-900 II)在细胞被感染后不同时间所得 AChE1 的活性

Fig. 3 Enzyme activities of the expressed AChE1 using Sf-900 II (S) and HyQSFX-INSECT (H) cell culture medium at different days after the infection of the Sf9 cells

3 小结

本研究通过重组 DNA 技术构建棉蚜 AChE1 表达质粒, 利用 Bac-to-Bac 昆虫杆状病毒表达系统, 在昆虫 Sf9 细胞系中成功表达了棉蚜的 AChE1。用该方法表达的 AChE 以可溶性形式释放于昆虫细胞培养液中, 因其不含其他的酯酶, 因此, 收集细胞培养液通过简单的离心后, 即可作为酶源进行相关的生化和药理学研究。我们以此酶液测定了两种氨基甲酸酯类和两种有机磷杀虫剂的相对敏感性, 表明棉蚜 AChE1 对有机磷杀虫剂啮蚜威的敏感性最高, 而对氧化乐果的敏感性最低, 两者相差约 400 倍。这一结果与棉蚜活体和棉蚜 AChE 纯化酶液对这些药剂的敏感性测定结果 (Morres, 1996) 的趋势基本一致。

2.6 不同存放温度下表达产物 AChE1 活性随时间的变化

取细胞感染后第3天的培养上清液, 在不同存放温度下保存, 定期取样测定酶活性的变化(图4)。在 -20 °C 保存条件下, 40 d 后活性未降低, 90 d 后有所降低, 活性仍有 80% 以上; 4 °C 条件下, 2 周以内活性没有下降, 20~40 d 有所降低, 60 d 后明显降低, 90 d 后活性已降到 50% 以下; 室温 (22 °C) 下, 酶活性很快丧失, 第7天已不足 30%, 90 d 后仅剩 5%。

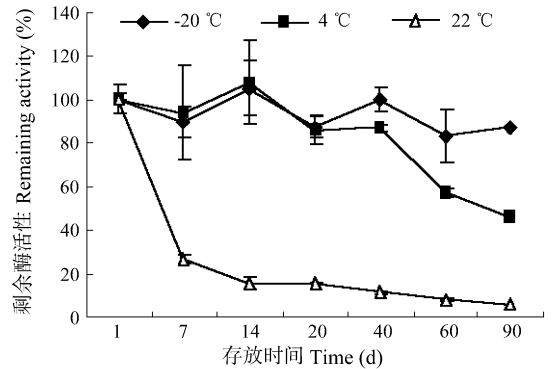


图4 不同存放温度下表达产物 AChE1 活性随时间的变化

Fig. 4 Enzyme activities of the expressed AChE1 stored for different time at different temperatures

该方法所得表达产物在 -20 °C 保存非常稳定, 100 d 后活性没有明显下降, 因此, 可大量制备分装后, 置于 -20 °C 长期使用。表达产物在室温 (22 °C) 条件下极为不稳定, 其活性一周后即损失大半, 因此, 表达产物收取后宜马上置于 -20 °C 保存。此外, 我们的研究表明, 昆虫细胞被感染第3天时活性达最高, 此后, 由于细胞的老化和破裂使多种杂质酶进入细胞培养液中, 不但分解表达的目标产物, 同时也给表达蛋白的进一步纯化带来麻烦。因此, 我们一般在细胞感染后 2~3 d 收取培养液, 保存备用。

该方法的成功建立, 为进一步证实棉蚜 AChE 抗药性功能突变位点、研究两种 AChE 基因的功能差异, 以及建立 AChE 靶标杀虫剂的高通量筛选技术, 奠定了良好的工作基础。

参考文献：

- Anderson D, Harris R, Plyayes D, Ciccarone V, Donahue R, Gerard G, Jessee J. 1996. Rapid generation of recombinant baculoviruses and expression of foreign genes using the Bac-to-Bac baculovirus expression system [J]. *Focus*, **17**: 53 - 58.
- Andrews MC, Callaghan A, Field LM, Williamson MS, Moores GD. 2004. Identification of mutations conferring insecticideinsensitive AChE in the cotton-melon aphid, *Aphis gossypii* Glover [J]. *Insect Mol Biol*, **13**: 555 - 561.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quatitation of microgram quantities of protein, utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, **72**: 248 - 254.
- Byrne FJ, Devonshire AL. 1997. Kinetics of insensitive acetylcholinesterases in organophosphate-resistant tobacco whitefly, *Bemisia tabaci* (gennadius) (Homoptera : Aleyrodidae) [J]. *Pestic Biochem Physiol*, **58**: 119 - 124.
- Devonshire AL, Moores GD. 1984. Different forms of insensitive acetylcholinesterase in insecticide-resistant houseflies (*Musca domestica*) [J]. *Pestic Biochem Physiol*, **21**: 336 - 340.
- Eldefrawi AT. 1985. Acetylcholinesterases and Anticholinesterases [A]. In : Kerkut GA, Gilbert LI. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Vol. 12 [M]. New York : Pergamon, 115 - 130.
- Han ZJ, Moores GD, Denholm I, Devonshire AL. 1998. Association between biochemical markers and insecticide in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover [J]. *Pest Biochem Physi*, **62**: 164 - 171.
- Invitrogen Life Technologies. 2002. Bac-to-Bac baculovirus expression system : An effective site-specific transposition system to generate baculovirus for high-level expression of recombinant proteins [EB/OL]. www. invitrogen. com.
- Li F, Han ZJ. 2002. Two different genes encoding acetylcholinesterase existing in cotton aphid (*Aphis gossypii*) [J]. *Genome*, **45**: 1134 - 1141.
- Li F, Han ZJ. 2004. Mutations in acetylcholinesterase associated with insecticide resistance in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, **34**: 397 - 405.
- Moores GD, Devine GJ, Devonshire AL. 1994. Insecticide-insensitive acetylcholinesterase can enhance esterase-based resistance in *Myzus persicae* and *Myzus nicotianae* [J]. *Pestic Biochem Physiol*, **49**: 114 - 120.
- Moores GD, Gao XW, Denholm I, Devonshire AL. 1996. Characterization of insensitive acetylcholinesterase in the insecticide-resistant cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover (Homoptera : Aphididae) [J]. *Pestic Biochem Physiol*, **56**: 102 - 110.
- Nabeshima T, Kozaki T, Tomita T, Kono Y. 2003. An amino acid substitution on the second acetylcholinesterase in the pirimicarb-resistant strains of the peach potato aphid, *Myzus persicae* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **307**: 15 - 22.
- Weill M, Fort P, Berthomieu A, Dubois MP, Pasteur N, Raymond M. 2002. A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the ace gene in *Drosophila* [J]. *Proc R Soc Lond B*, **269**: 2007 - 2016.

《动物学研究》最新相关指标

根据中国科学技术信息研究所《2005年版中国科技期刊引证报告》提供的信息，2004年本刊影响因子为0.500，在所列56种生物类期刊中排名第23位，在1608种中国科技期刊中排名第379位；他引率为0.88，地区分布数为20，基金论文比0.89。

2005年本刊收稿412篇，刊发稿件106篇，利用率为26%；年平均发表周期196天，年平均报道时差108天。

本刊编辑部