

桔小实蝇烟碱型乙酰胆碱受体 β 亚基基因的克隆及 mRNA 表达分析*

杨文佳** 丛林 谢逸菲 陈力豆 威 王进军***

(西南大学植物保护学院 重庆 400716)

摘 要 烟碱型乙酰胆碱受体(nicotinic acetylcholine receptor, nAChR)在昆虫中枢神经系统的递质传递过程中起着重要作用。本研究采用 RT-PCR 和 RACE 技术,从桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* (Hendel)体内克隆获得 nAChR β 亚基的 cDNA 序列,命名为 *Bd β 3* (GenBank 登录号:JF974074)。测序结果表明,*Bd β 3* 的 cDNA 序列全长 1 602 bp,开放阅读框为 1 287 bp,编码 429 个氨基酸残基,预测蛋白质分子量和等电点分别为 48.8 ku 和 5.81。通过对氨基酸同源性分析表明,*Bd β 3* 具有 nAChR 亚基的典型特征,与其他昆虫 nAChR 亚基具有较高的氨基酸相似性,与黑腹果蝇 nAChR β 亚基具有 49.78% 的相似性。*Bd β 3* 在桔小实蝇的不同发育时期和成虫的不同体段的实时定量 PCR 结果表明,*Bd β 3* 在整个发育阶段均有表达,其中在成虫期的表达水平最高,这可能与 *Bd β 3* 主要在成虫期发挥作用有关;*Bd β 3* 在桔小实蝇头部表达量最高,显著高于胸部和腹部。研究结果为深入分析桔小实蝇 nAChR 亚基的功能以及对多杀菌素的靶标抗性机制提供了基础数据。

关键词 桔小实蝇, 烟碱型乙酰胆碱受体, 基因克隆, 序列分析, 实时定量 PCR

Cloning and mRNA expression analysis of the nicotinic acetylcholine receptor β subunit in *Bactrocera dorsalis*

YANG Wen-Jia** CONG Lin XIE Yi-Fei CHEN Li DOU Wei WANG Jin-Jun***

(College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract Nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) play major roles in the fast synapse cholinergic transmission in the insect central nervous system. Using the RT-PCR and RACE technique, the full-length cDNA sequence of the nicotinic acetylcholine receptor β subunit gene (*Bd β 3*) was cloned from *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (GenBank accession No. JF974074). The cloned gene was 1 602 bp, containing an open reading frame of 1 287 bp encoding 429 amino acid residues with a predicated molecular mass of 48.8 ku and isoelectric point of 5.81. Homology analysis indicated that *Bd β 3* has the typical features of a nAChR subunit. The deduced amino acid residues of *Bd β 3* had very high similarity with nAChR subunits from other insects and shared 49.78% identity with *Drosophila melanogaster* *D β 3*. Quantitative real-time PCR was employed to investigate *Bd β 3* gene expression levels during different developmental stages and body parts in adults. The result show that *Bd β 3* was expressed during all developmental stages. The highest expression was observed at the adult stage, which suggests that the gene might play an important role in adults. Furthermore, *Bd β 3* was expressed more in the head than in thorax and abdomen. These results may provide clues for understanding of the role of nAChR in spinosad resistance in *B. dorsalis*.

Key words *Bactrocera dorsalis*, nicotinic acetylcholine receptor, cloning, sequence analysis, quantitative real-time PCR

烟碱型乙酰胆碱受体(nicotinic acetylcholine receptor, nAChR)属于神经递质门控离子通道蛋

* 资助项目:国家 973 前期研究专项(2009CB125903)、重庆市杰出青年科学基金项目(CSTC2009BA1042)、教育部创新团队支持计划(IRT0976)、现代农业(柑橘)产业技术体系岗位科学家经费。

** E-mail: yangwenjia10@yahoo.com.cn

*** 通讯作者: E-mail: jjwang7008@yahoo.com

收稿日期:2012-02-19,接受日期:2012-02-29

白,在脊椎动物和非脊椎动物体内快速介导胆碱在突触间的传递 (Lester *et al.*, 2004)。nAChR 是由 5 个亚基以不同的组合形式构成的五聚体寡蛋白,在神经系统及肌肉中广泛表达 (Karlin, 2002)。昆虫 nAChR 广泛分布于中央神经系统的突触神经纤维网区,是新烟碱类杀虫剂及生物农药多杀菌素的作用靶标。

随着全基因组的测序以及生物信息学的深入发展,多种昆虫 nAChR 亚基的基因已经被陆续克隆。其中黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 有 7 个 α 亚基 ($D\alpha 1 - D\alpha 7$) 和 3 个 β 亚基 ($D\beta 1 - D\beta 3$) (Sattelle *et al.*, 2005),冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 有 9 个 α 亚基和 1 个 β 亚基 ($Ag\alpha 1$) (Jones *et al.*, 2005),赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 有 11 个 α 亚基 ($Tc\alpha 1 - Tc\alpha 11$) 和 1 个 β 亚基 ($Tc\beta 1$) (Jones and Sattelle, 2007),蜜蜂 *Apis mellifera* 有 9 个 α 亚基 ($Api\alpha 1 - Api\alpha 9$) 和 2 个 β 亚基 ($Api\beta 1 - Api\beta 2$) (Jones *et al.*, 2006),家蚕 *Bombyx mori* 有 9 个 α 亚基 ($Bm\alpha 1 - Bm\alpha 9$) 和 3 个 β 亚基 ($Bm\beta 1 - Bm\beta 3$) (Shao *et al.*, 2007)。另外,其他昆虫如褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Liu *et al.*, 2005)、小菜蛾 *Plutella xylostella* (赵宇等, 2009)、嗜卷书虱 *Liposcelis bostrychophila* (Tang *et al.*, 2009) 等 nAChR 亚基的基因 cDNA 全长序列被克隆出来,为深入研究昆虫神经递质传递的分子机制奠定了基础。

桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* (Hendel),属双翅目 (Diptera) 实蝇科 (Tetraphoridae)。该虫寄主范围广,可危害番石榴、芒果、柑橘等 46 科 250 多种水果、蔬菜和花卉,是一种重要的果蔬害虫 (梁光红等, 2003; 章玉苹等, 2007)。桔小实蝇主要以幼虫潜居果瓤取食,使果实腐烂、落果,对水果和蔬菜造成巨大的经济损失。目前桔小实蝇的防治主要依赖化学农药,其防治效果很差并具有严重的抗药性风险。由于大量不合理地使用化学杀虫剂,华南地区桔小实蝇种群已对有机磷杀虫剂、拟除虫菊酯和阿维菌素等农药产生了严重的抗药性 (潘志萍等, 2005; 章玉苹等, 2007)。生物农药多杀菌素也被用于控制桔小实蝇危害,其主要作用靶标为 nAChR,台湾地区通过实验室室内种群筛选,获得了抗性品系 (Hsu *et al.*, 2004)。因此,克隆桔小实蝇 nAChR 亚基,对于研究桔小实蝇对多杀菌素的靶标抗性机制具有重要意义。本研究

采用了 RT-PCR 和 RACE 技术,克隆获得桔小实蝇 nAChR β 亚基的一个新基因 *Bd $\beta 3$* ,并利用实时定量 PCR 技术研究其在桔小实蝇体内不同发育时期和不同体段的表达情况。

1 材料与方法

1.1 材料与主要试剂

供试昆虫:桔小实蝇于 2007 年采自福建省福州市,以人工饲料饲喂于实验室内并建立种群。饲养条件为温度 (27 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 ($70\% \pm 5\%$)、光周期 L:D = 14:10。

主要试剂:TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司;DNA 胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司;SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit 购自 Clontech 公司;反转录试剂盒 PrimeScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis Kit、DNase、PrimeScript[®] RT Reagent Kit Perfect Real Time、Taq 酶及其它 PCR 相关试剂购自 Takara 公司;pGEM-T Easy 载体购自 Promega 公司;感受态细胞 DH5 α 购自北京全式金公司;实时定量 PCR 试剂盒购自 BIO-RAD 公司。

1.2 总 RNA 的提取与反转录

取 5 头桔小实蝇成虫于液氮内速冻,然后放在研钵中磨碎成细粉,转移入无 RNA 酶离心管中,加入 1 mL TRIzol 试剂,提取总 RNA,具体步骤参见 TRIzol 试剂盒说明书。按照 Takara 公司 PrimeScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒的说明书将 1 μg 总 RNA 反转录成 cDNA。

1.3 引物设计与合成

根据桔小实蝇转录组数据库中 nAChR 亚基基因片段信息,设计 1 对特异性引物 (Bd1 和 Bd2) 进行 PCR 扩增,获得桔小实蝇 nAChR cDNA 片段。根据所得的 cDNA 序列设计引物 (表 1) 与试剂盒提供的接头引物分别进行 5' 端 3' 端扩增,采用巢式 PCR 增强 PCR 的特异性。根据扩增获得 5' 端和 3' 端序列设计一对特异性引物 (BdF 和 BdR) 用于桔小实蝇 *Bd $\beta 3$* 基因的开放阅读框扩增,引物合成由上海英骏生物技术有限公司完成。

1.4 PCR 扩增与 RACE 反应

以 1.2 中反转录合成的 cDNA 为模板,加入 $10 \times$ 聚合酶反应缓冲液 2.5 μL (含 Mg^{2+}),正向和反向引物各 1 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), dNTP (2.5 mmol/L) 2 μL , Taq 聚合酶 0.25 μL ,加水至 25

μL ,混匀,离心,放入 PCR 仪扩增。PCR 反应条件为:95℃ 预变性 3 min,然后 95℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,共 34 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。

依照 Clontech 公司 SMARTer™ RACE cDNA

Amplification Kit 试剂盒将总 RNA 分别合成可用于 5'-RACE 和 3'-RACE 扩增的第 1 链 cDNA。以其为模板,利用特异性引物(表 1)进行 RACE 扩增。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,回收目的片段。

表 1 本实验设计合成的引物及其用途

Table 1 Primers and their use in the experiment

引物名称 Primer name	引物序列(5' - 3') Primer sequence	用途 Purpose
Bd1	AAAGTGAAGCTCGGCTCATT	<i>Bdβ3</i> cDNA fragment
Bd2	GCTATAACATAGGAAGGCAA	
5GSP1	GGGGCAGCCAAAACGAGGAAAG	<i>Bdβ3</i> cDNA 5' end
5GSP2	CCAATGAGCCGACCTTCACTTT	
3GSP1	AGTGAAGGTCGGCTCATTGGCG	<i>Bdβ3</i> cDNA 3' end
3GSP2	ACGGCACTTACCTGAGTTTGTC	
BdF	ACTATGAGTCGGTCGTTAGCGC	<i>Bdβ3</i> cDNA ORF
BdR	AATTTAACTTAGACAGCATATA	
qBdF1	CATCGATGCACGTTATCTGG	Quantitative real-time PCR for <i>Bdβ3</i>
qBdR1	ACAGGAAGCTGGCGTAAAGA	
qBdF2	CGCATTTCATGTTGATAACG	Reference gene (α -Tubulin)
qBdR2	GGGCACCAAGTTAGTCTGGA	

1.5 PCR 和 RACE 产物克隆、鉴定及序列回收

PCR 产物经回收纯化后,将回收产物连接至 pGEM-T Easy 载体,转化到感受态大肠杆菌 DH5 α 中。经蓝白斑筛选,随机挑取多个白色菌落扩大培养,PCR 菌液鉴定阳性克隆送至上海英骏生物技术有限公司测序。

1.6 序列分析

采用 DNAMAN 5.22 (Lynnon BioSoft) 软件对测序结果进行编辑和分析,推导的氨基酸采用 Blast 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 和 ClustalW 进行同源性比较分析,并利用 MEGA5.04 软件中的邻位相连算法 (Neighbor-joining) 法构建系统发育树,各分支均进行 1 000 次的重复检验。采用 ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) 预测蛋白质的理化性质。用 SignalP 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 和 ScanProsite 软件 (<http://www.expasy.ch/prosite/>) 分析氨基酸结构。

1.7 桔小实蝇 *Bdβ3* 基因在不同发育时期的表达

采用实时定量 PCR 方法测定桔小实蝇 *Bdβ3* 基因在不同发育时期的相对表达量。分别提取

卵、1 龄、2 龄、3 龄幼虫、蛹和成虫的总 RNA,步骤同 1.2,然后用 DNase 去除 RNA 中的基因组 DNA,再按照 PrimeScript® RT Reagent Kit Perfect Real Time 试剂盒说明书反转录成 cDNA 后进行实时定量 PCR (以 α -Tubulin 基因为内参,GenBank 登录号:GU269902)。本研究中实时定量所用引物序列如表 1。PCR 反应体系为 25 μL :12.5 μL iQ™ SYBR® Green Supermix、10 $\mu\text{mol/L}$ 的上、下游引物各 1 μL ,cDNA 模板 1 μL ,灭菌双蒸水 9.5 μL ,混匀,离心,放入 Stratagene Mx 3 000P PCR 检测系统上进行操作,反应条件如下:95℃ 预变性 2 min,然后 95℃ 变性 15 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,共循环 40 次;接着 60~95℃ 的熔解曲线。实验重复 3 次。

1.8 桔小实蝇 *Bdβ3* 基因在成虫不同体段中的表达

分别提取新羽化的成虫头部、胸部、腹部总 RNA,反转录成 cDNA 后进行实时定量 PCR,方法同 1.7,共重复 3 次。

1.9 数据统计与分析

计算采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法进行分析 (Livak and

Schmittgen, 2001), 根据所得数值作柱形图, 并计算标准误(SE)。

2 结果与分析

2.1 桔小实蝇 *Bdβ3* 基因的 cDNA 克隆

通过 RACE 方法克隆获得桔小实蝇 nAChR 亚基基因的全长 cDNA (GenBank 登录号: JF974074, 缩写名为 *Bdβ3*), 序列总长度为 1 602 bp。 *Bdβ3* 基因 cDNA 编码区长 1 287 bp, 5' 端非编码区 149 bp, 3' 端非编码区 166 bp, 该序列推定的蛋白序列由 429 个氨基酸残基组成, 预测分子量为 48.8 ku, 理论等电点 pI 值为 5.81。将 *Bdβ3* 亚基的氨基酸序列进行 BlastP 分析, 结果表明, *Bdβ3* 亚基与同为双翅目的家蝇 *Musca domestica* β3 亚基 (GenBank 登录号: ABY40463) 具有最高的相似性, 为 58.76%; 与黑腹果蝇 β3 亚基 (GenBank

登录号: CAC48166) 和赤拟谷盗 α9 亚基 (GenBank 登录号: ACP31311) 的相似性分别为 49.78% 和 23.23%。将 *Bdβ3* 基因的氨基酸序列与 GenBank 上已登录的黑腹果蝇、蜜蜂 *A. mellifera* 的 nAChR 亚基的氨基酸序列进行 ClustalW 多序列比对, 并利用 MEGA5.04 构建了系统发育树 (图 2)。结果表明, 本文克隆的桔小实蝇 nAChR 亚基 *Bdβ3* 与黑腹果蝇 β3 亚基位于同一进化枝, 与 Blast 同源性比对的结果相一致, 说明它与黑腹果蝇的 β3 亚基亲缘关系较近, 故命名为 *Bdβ3*。

2.2 桔小实蝇 *Bdβ3* 的序列分析

桔小实蝇 *Bdβ3* 基因编码的 nAChR 亚基具有半胱氨酸环配体门控离子通道超家族的典型特征, 如图 1。这些特征包括: N-末端可能具有 19 个氨基酸的前导信号序列; 氮端胞外结构域中与配

```

1      ACATGGGGAGGAACCTCGGACGCTACACTTCTAGAAACGACTACAAAAATTTTCAATCTTAATTGAAAATACAAAGTGATTTTTGA
91     TAAAAAAGAAATACTACTTCCCTGCGATTTCTGTGCTTATCGCCATTGACTATGAGTCGGTCGTTAGCGCTTGAATTTGCT
1      M S R S L A L G I C
181    TATTTCTGTGCAATCTGCGCACTCACAAGATATCGTTGCCAATGGTACTAAATCTTGAACATAACCACTTGGATCGGTTGCATCTAC
11     L F L L Q S A N S Q D I V A N G T K S W N I T T L D R L H L
271    AGTTATTATCACTATGATGAAGAATGTACACCCCTCATATCAGGTATACCGACCAATATCACATTTGGGTATGTCGGTCAACTACGTGG
41     Q L F I N Y D K N V H P S Y H G I P T N I T L G M S V N Y V
361    ATATTGATGAATAAATGGGAAATGATTTTGCACCTCTGGTTAAAGATTGCGTGGATGGATGAGAACGTTCTGGACAGTGCCTGATT
71     D I D E I N G K M I L H S W L K I R W M D E K R S W N S A D
451    ATGACAATATAACGCAATCCATTTAAACCGAAAGAGTTTGGAAACGAGATTAACTCTTTAATAGCGCTGGCGACAGAGTGACT
101    Y D N I T Q I H L K P K E V W K P D L T L F N S A G D K S D
541    ACTTGGGTGATACAAATATTTATGTCGAACGATGGCAGCTCTTATGGGTACCACGCGTATATACCGCATACGTAGTTGGATT
131    Y L G D T Q I L L S N D G S F L W V P P A V Y T A Y C S L L D
631    TCCGCAATTTGGCCCTACGATACGCAAGTGTCAAAAGTGAAGGTCGGCTCATTGGCGCTCAGTACATCGATGCAGCTTATCTGGATTGA
161    F R I W P Y D T Q V C K V K V G S L A L T Y I D A R Y L D L
721    AGGAGAGCTTAGACTACAGTACCTAGTACATCGACACAGTGGGAAATCGTTGAAGGCGCCACATCATATCGAAAACAGGATTATTATA
191    K E S L D Y S D L V Q S T Q W E I V E G A T S Y R K Q D Y Y
811    ATTACATTGAGTTCAGATTAACTAAAGCGTCGTTCTCAATGTATACAGCGGTTATCTTTACGCGAGCTTCTGTATATATTTACCTGG
221    N Y I E F R F N L K R R S S M Y T A V I F T P A S C I I L L
901    CGCTTTCTCGTTTGGCTGCCCGCGCAATGGGTGAAAAAATACTATTGAACGGTGTGCTGATTGTACTCATAGCTGCTTCTCATGT
251    A L S S F W L P P Q M G E K I L L N G V L I V L I A F L M
991    ATTTCCGCACTACTCGCATCTTGGCGGAAATACACCCTTGTAGTACTGTTTACAGCTGTAGCTTGTGTTGCTCAGCATCTCAA
281    Y F A Q L L P I L A E N T P L V V L F Y S C S L L L L S I S
1081  CGATAATTGCCGTGTGTGTTATCTCTCAACGGCGAAGCATAAAGCGCACTTACCTGAGTTTGTCAAGACCATACTCAACGGACCGC
311  T I I A V C V L Y L S T A K H K R H L P E F V K T I L N G P
1171  TAAGCAAGATTCTTCTGCTAGAAAACCTTCACTTGAAGCGGACCGCACCGCTTAGCATGAATAACGGCACCAAGAGTTGGTCGAGC
341  L S K I L L L E N F T L E A E P H T V S M N N G T K E L V E
1261  ATCAATATGAGATCCTGATGGCATAACCGATGCAGCGGCGATGCAGCATCCTCCCGCTCTGCTAATCGTTTCAATCAATTTGAGT
371  H Q Y E N P D G I T D A A M H A S S P S S A N R F I Q F E
1351  GGATTTTATGGCCACAGCCATCGATCGTATTGCCTTTCTATGTTATAGCCTTACATCATAGTTTGTCTATTTATATGCTGTCTAAG
401  W I L L A T A I D R I A F L C Y S L T F I V L S I L Y A V *
1441  TTAAATTGGCTTTAGTAAATATGTTTTATGATTATTATCAATATCTATTGAAAAACATACATAATGATATATATGTACATATTGCTT
1531  TGAATAAAGTAAATAACATAAAAAACAAAGGATGTTAACTCTGAAGCTAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAG

```

图 1 桔小实蝇 *Bdβ3* 基因的 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1 The cDNA and deduced amino acid sequence of *Bdβ3* in *Bactrocera dorsalis*

图中起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA 加粗; * 表示对应核苷酸序列是终止密码子;双下划线为氮端信号肽序列;下划线为 4 个跨膜结构域;下划线虚线为 1 个半胱氨酸环 (Cys-loop);氮端糖基化位点用方框标示。The initial codon ATG and termination codon TAA are indicated in bold. * indicates that corresponding nucleotide sequence and amino acid sequence. The predicated signal peptide is underlined (double line). The position of putative transmembrane domains is underlined (single line). The Cys loop domain is underlined with a dotted line. N-linked glycosylation sites are boxed.

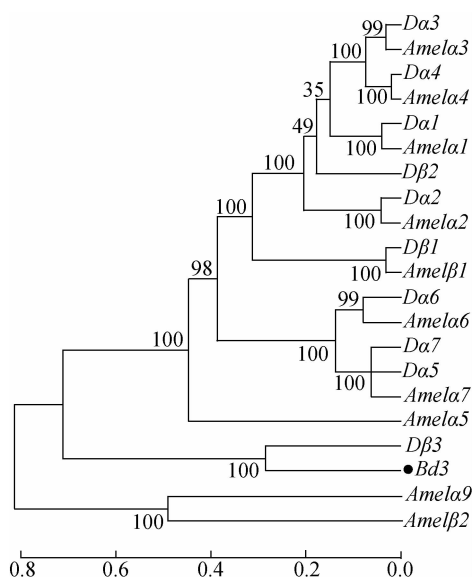


图 2 昆虫烟碱型乙酰胆碱受体亚基的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of insect nAChR subunits

所用序列 GenBank 登录号为:黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* $D\alpha 1$ (CAA30172), $D\alpha 2$ (CAA36517), $D\alpha 3$ (CAA75688), $D\alpha 4$ (CAB77445), $D\alpha 5$ (AAM13390), $D\alpha 6$ (AAM13393), $D\alpha 7$ (CAD86936), $D\beta 1$ (CAA27641), $D\beta 2$ (CAA39211), $D\beta 3$ (CAC48166);蜜蜂 *Apis mellifera* $Amel\alpha 1$ (AAY87890), $Amel\alpha 2$ (AAS48080), $Amel\alpha 3$ (AAY87891), $Amel\alpha 4$ (AAY87892), $Amel\alpha 5$ (AAS75781), $Amel\alpha 6$ (AAY87894), $Amel\alpha 7$ (AAR92109), $Amel\alpha 8$ (AAM51823), $Amel\alpha 9$ (AAY87896), $Amel\beta 1$ (AAY87897), $Amel\beta 2$ (AAY87898)。

体结合相关的 6 个环状结构 (LoopA-F)、2 个半胱氨酸以二硫键相连,中间间插 13 个氨基酸残基构成的半胱氨酸环 (Cys-Loop);具有 4 个保守的跨膜结构域 (TM1-TM4)。另外,对 $Bd\beta 3$ 蛋白质序列进行预测,表明其存在 6 个潜在的 N-糖基化位点,分别为 N25, N31, N60, N103, N349 和 N363;在第 3 跨膜结构域 TM3 与第 4 跨膜结构域 TM4 之间有 5 个潜在的磷酸化位点。

2.3 $Bd\beta 3$ 基因在桔小实蝇不同发育时期的表达分析

采用实时定量 PCR 的方法,以卵的 $Bd\beta 3$ mRNA 的含量为基准含量,对桔小实蝇不同发育时期的 mRNA 表达量进行了分析,结果如图 3 所示。由图 3 可知, $Bd\beta 3$ 基因在桔小实蝇的各个时期都有表达,但成虫期 $Bd\beta 3$ 基因 mRNA 的表达量

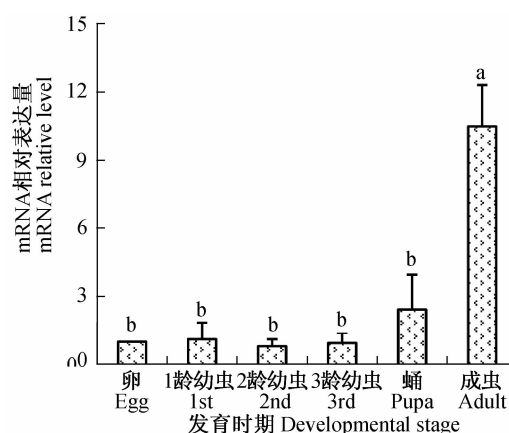


图 3 $Bd\beta 3$ 基因在桔小实蝇不同发育时期的相对表达水平

Fig. 3 The relative expression level of $Bd\beta 3$ gene at different development stages of *Bactrocera dorsalis*

图中数据以卵中的含量为基准量 Data is calibrated according to the mRNA level of egg.

柱上不同字母分别表示在 0.05 水平上的差异显著,下同。Different letters above bars indicate significant difference at 0.05 level. The same below.

要显著高于卵期、1 龄、2 龄、3 龄幼虫期以及蛹期 ($P < 0.05$),说明 $Bd\beta 3$ 可能主要在这一时期发挥作用。

2.4 $Bd\beta 3$ 基因在桔小实蝇不同体段中的表达分析

本研究以腹部中 $Bd\beta 3$ mRNA 的含量为基准含量,对成虫的不同体段中的 mRNA 表达量进行了分析,结果如图 4 所示。结果表明: $Bd\beta 3$ 基因在桔小实蝇成虫的头部、胸部和腹部均有表达,其中头部表达量最高,其次是胸部,可能与头部是脑部神经节 (包括脑和咽喉下神经节) 的主要分布位置,与中枢神经系统中的信号传递有关。

3 讨论

本研究利用桔小实蝇转录组信息结合 RACE 技术的方法对 $Bd\beta 3$ 基因进行了克隆,其序列具有 nAChR 亚基典型的特征:信号肽、环状结构 (LoopA-F)、半胱氨酸环 (Cys-Loop) 以及 4 个典型的跨膜区域 (TM1-4)。nAChR α 亚基和非 α 亚基的主要区别在于氮端胞外结构域的 LoopC 中是否具有 2 个相邻的半胱氨酸 (Corringer *et al.*, 2000),由图 1 可以看出 $Bd\beta 3$ 亚基不具有 2 个相

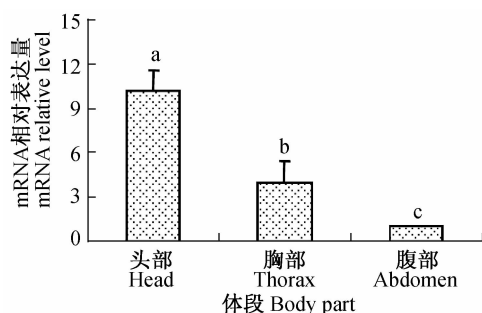


图4 *Bdb3* 基因在桔小实蝇成虫

不同体段的相对表达水平

Fig. 4 The relative expression level of *Bdb3* gene in different body parts of *Bactrocera dorsalis* adults

图中数据以腹部中的含量为基准量

Data is calibrated according to the mRNA level of abdomen.

邻的半胱氨酸,所以应为 β 亚基。同源性分析结果也表明,桔小实蝇 nAChR 亚基 *Bdb3* 的氨基酸序列与家蝇的 $\beta 3$ 亚基、黑腹果蝇的 $\beta 3$ 亚基、赤拟谷盗 $\alpha 9$ 亚基都具有很高的相似性,系统发育树也表明 *Bdb3* 与黑腹果蝇具有很近的亲缘关系。

在脊椎动物中,nAChR 亚基在不同发育时期的表达量存在很大的差异 (Gotti and Clementi, 2004)。昆虫的 nAChR 亚基在不同发育时期的表达量也具有一定的差异,说明其在生长发育过程中起着不同程度的作用,具有一定的特异性。研究表明黑腹果蝇 *D α 6* 在胚胎期表达量最高 (100%),幼虫期和成虫期均下降至 40% (Grauso *et al.*, 2002)。而嗜卷书虱 *Lb α 1* 和 *Lb α 8* 基因却在成虫期有较高的表达 (Tang *et al.*, 2009)。赵宇等 (2009) 应用半定量 RT-PCR 的方法分析了小菜蛾 *Px α 8* 基因在 4 龄幼虫、蛹、成虫期的表达情况,结果发现 *Px α 8* 基因在成虫期的表达量最高。本研究发现桔小实蝇 *Bdb3* 基因在成虫期的表达量最高,可能与该基因在成虫期发挥重要作用相关,具体作用机制尚有待于进一步研究。

在 nAChR 亚基基因的组织特异性表达研究中,Gao 等 (2007a) 分析了家蝇 *Md α 2*, *Md α 5*, 和 *Md α 6* 基因在成虫的头部、胸部和腹部的表达情况,结果发现均在头部的表达量最高。本研究也发现桔小实蝇头部的 *Bdb3* mRNA 表达量远大于胸部和腹部的表达量,这可能与头部是桔小实蝇中央神经系统的主要分布区域相关。最近发现蜜蜂 *Apis cerana cerana* *Acc β 1* 和 *Acc β 2* mRNA 在腹部

的表达量最高 (Yu *et al.*, 2011),说明 nAChR 亚基在昆虫中的作用部位具有特异性,与 nAChR 亚基功能多样性相关。

nAChR 是新烟碱类杀虫剂和多杀菌素的作用靶标,目前已有报道发现 nAChR 亚基发生突变使昆虫对新烟碱类杀虫剂和多杀菌素产生了抗药性。Liu 等 (2005) 研究发现褐飞虱 nAChR 的功能亚基 *Nl α 1* 和 *Nl α 3* 发生了 Y151S 的氨基酸点突变,降低了 nAChR 亚基对新烟碱类杀虫剂吡虫啉的结合能力,导致了褐飞虱对其产生了抗药性。Perry 等 (2007) 研究发现黑腹果蝇 nAChR 亚基 *D α 6* 发生功能缺失突变导致对多杀菌素产生了明显的抗药性,而家蝇 nAChR 亚基 *Md α 6* 在敏感品系和多杀菌素的抗性品系中没有差异,推测 *Md α 6* 在家蝇对多杀菌素的抗性中不起作用 (Gao *et al.*, 2007b, 2007c)。所以,不同昆虫对以 nAChR 为靶标的杀虫剂抗性机制不同,故有待于我们进一步研究。本研究获得了桔小实蝇 *Bdb3* 基因,解析了该基因的结构特点,并对其在不同发育时期和不同体段的差异表达进行了分析,针对 *Bdb3* 基因作用的时期和部位特异性,运用 RNAi、双向电泳等技术开展抗药性的相关研究,为进一步明确杀虫剂和靶标的相互关系,引导新型杀虫剂研发与监测治理均有重要的理论和实践意义。

参考文献 (References)

- Corringer PJ, Novere NL, Changeux JP, 2000. Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 40(1):431—458.
- Gao JR, Deacutis JM, Scott JG, 2007a. Characterization of the nicotinic acetylcholine receptor subunit gene *Md α 2* from the house fly, *Musca domestica*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 64(1):30—42.
- Gao JR, Deacutis JM, Scott JG, 2007b. The nicotinic acetylcholine receptor subunit *Md α 6* from *Musca domestica* is diversified via post-transcriptional modification. *Insect Mol. Biol.*, 16(3):325—334.
- Gao JR, Deacutis JM, Scott JG, 2007c. The nicotinic acetylcholine receptor subunits *Md α 5* and *Md β 3* on autosome 1 of *Musca domestica* are not involved in spinosad resistance. *Insect Mol. Biol.*, 16(6):691—701.
- Gotti C, Clementi F, 2004. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog. Neurobiol.*, 74(6):363—396.

- Grauso M, Reenan R, Culetto E, Sattelle D, 2002. Novel putative nicotinic acetylcholine receptor subunit genes, *D α 5*, *D α 6* and *D α 7*, in *Drosophila melanogaster* identify a new and highly conserved target of adenosine deaminase acting on RNA-mediated A-to-I pre-mRNA editing. *Genetics*, 160(4):1519—1533.
- Hsu JC, Feng HT, Wu WJ, 2004. Resistance and synergistic effects of insecticides in *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) in Taiwan. *J. Econ. Entomol.*, 97(5):1682—1688.
- Jones A, Grauso M, Sattelle D, 2005. The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Genomics*, 85(2):176—187.
- Jones A, Raymond-Delpech V, Thany S, Gauthier M, Sattelle D, 2006. The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the honey bee *Apis mellifera*. *Genome Res.*, 16(11):1422—1430.
- Jones A, Sattelle D, 2007. The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamily of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *BMC Genomics*, 8(1):327.
- Karlin A, 2002. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat. Rev. Neurosci.*, 3(2):102—114.
- Lester HA, Dibas MI, Dahan DS, Leite JF, Dougherty DA, 2004. Cys-loop receptors: new twists and turns. *Trends Neurosci.*, 27(6):329—336.
- Liu ZW, Williamson MS, Lansdell SJ, Denholm I, Han ZJ, Millar NS, 2005. A nicotinic acetylcholine receptor mutation conferring target-site resistance to imidacloprid in *Nilaparvata lugens* (brown planthopper). *PNAS*, 102(24):8420—8425.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} Method. *Methods*, 25:402—408.
- Perry T, McKenzie J, Batterham P, 2007. A *D α 6* knockout strain of *Drosophila melanogaster* confers a high level of resistance to spinosad. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37(2):184—188.
- Sattelle D, Jones A, Sattelle B, Matsuda K, Reenan R, Biggin P, 2005. Edit, cut and paste in the nicotinic acetylcholine receptor gene family of *Drosophila melanogaster*. *BioEssays*, 27(4):366—376.
- Shao Y, Dong K, Zhang C, 2007. The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics*, 8(1):324.
- Tang PA, Jiang HB, Xu YQ, An FM, Wang JJ, 2009. Molecular characterization of two nicotinic acetylcholine receptor subunits from *Liposcelis bostrychophila* Badonnel (Psocoptera: Liposcelididae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 72(1):34—47.
- Yu X, Wang M, Kang M, Liu L, Guo X, Xu B, 2011. Molecular cloning and characterization of two nicotinic acetylcholine receptor β subunit genes from *Apis cerana cerana*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 77(4):163—178.
- 梁光红, 陈家骅, 杨建全, 黄居昌, 季清娥, 2003. 桔小实蝇国内研究概况. 华东昆虫学报, 12(2):90—98.
- 潘志萍, 曾玲, 陆永跃, 2005. 华南地区桔小实蝇对几种农药的抗药性研究. 华南农业大学学报, 26(4):23—26.
- 章玉苹, 曾玲, 陆永跃, 梁广文, 2007. 华南地区桔小实蝇抗药性动态监测. 华南农业大学学报, 28(3):20—23.
- 赵宇, 杨亦桦, 武淑文, 吴益东, 2009. 小菜蛾烟碱型乙酰胆碱受体 α 亚基 cDNA 的克隆、序列分析与不同发育阶段表达分析. 昆虫学报, 52(1):17—26.