

棉铃虫章鱼胺受体 2 基因的分子鉴定*

吴凤明^{1,2**} 巫鹏翔^{1,2} 王璇¹ 闫硕³

李贞¹ 张青文¹ 刘小侠^{1***}

(1. 中国农业大学昆虫系 北京 100193; 2. 中国科学院动物研究所, 北京 100101;

3. 全国农业技术推广服务中心, 北京 100125)

摘要 【目的】为了探讨章鱼胺受体 2 基因 (Octopamine receptor 2, OA2B2) 在棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 体内表达谱及激素对其调控作用, 为今后研究 *HaOA2B2* 受体基因在转录调控中的作用, 开发新型杀虫剂提供一定的理论依据。【方法】本实验采用 QRT-PCR 技术、激素处理、RNAi 介导的蜕皮激素相关核受体沉默等方法对 *HaOA2B2* 受体基因在棉铃虫不同发育阶段及组织中的表达谱与激素调控进行探究。【结果】生物信息学分析表明, *HaOA2B2* 受体基因编码框长度 1 191 bp, 编码 396 个氨基酸。*HaOA2B2* 受体基因氨基酸序列与家蚕 *Bombyx mori* 一致性高达 89%。*HaOA2B2* 受体基因在棉铃虫各时期均有表达, 尤其在 5 龄第 3 天转录水平达到最高; *HaOA2B2* 受体基因在棉铃虫幼虫头部表达量最高。蜕皮激素可促进 *HaOA2B2* 受体基因的表达。【结论】分析了该基因的序列特征和表达谱, 蜕皮激素对其表达量的影响, 为今后研究 *HaOA2B2* 受体基因在转录调控中的作用以及开发新型杀虫剂提供一定的理论依据。

关键词 棉铃虫, 章鱼胺受体, 蜕皮激素, RNA 干扰

Molecular identification of octopamine receptor 2 in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)

WU Feng-Ming^{1,2**} WU Peng-Xiang^{1,2} WANG Xuan¹ YAN Shuo³

LI Zhen¹ ZHANG Qing-Wen¹ LIU Xiao-Xia^{1***}

(1. China Agricultural University, Beijing 100193, China; 2. Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Beijing 100101, China; 3. National Agricultural Technology Extension and Service Center, Beijing 100125, China)

Abstract 【Objectives】To investigate the expression and hormone regulation of the octopamine receptor 2 gene (*HaOA2B2*) in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*, and thereby clarify the role of *HaOA2B2* in transcription regulation and provide a theoretical basis for the development of new pesticides. 【Methods】QRT-PCR, hormone treatment, and RNAi mediated ecdysone nuclear receptor silencing, were used to investigate the expression, and hormonal regulation, of *HaOA2B2* in different developmental stages and tissues of the cotton bollworm. 【Results】The ORF length of *HaOA2B2* is 1 191 bp, encoding 396 amino acids. *HaOA2B2* shares up to 89% amino acid sequence similarity with silkworm (*Bombyx mori*) octopamine receptors. *HaOA2B2* was expressed in all developmental stages and was most highly expressed on the 3rd day of the 5th instar. Expression was higher in the head than in other organs or tissues. Ecdysone can promote *HaOA2B2* receptor gene expression. 【Conclusion】The sequence characteristics and expression profiles of the *HaOA2B2* receptor gene were determined, plus the effect of ecdysone on the gene's expression. These results provide a theoretical basis for future research on the role of the *HaOA2B2* receptor gene in transcription regulation and the development of new pesticides.

Key words *Helicoverpa armigera*, octopamine receptor 2, moulting hormone, RNA interference

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金项目 (31572018)

**第一作者 First author, E-mail: wufengming2011@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: liuxiaoxia611@cau.edu.cn

收稿日期 Received: 2016-07-29, 接受日期 Accepted: 2016-08-09

昆虫体内的生物胺主要包括章鱼胺 (Octopamine, OA)、多巴胺 (Dopamine, DA)、酪胺 (Tyramine, TA) 和 5-羟色胺 (Serotonin, 5-HT) 等 (吴顺凡, 2013)。它们在昆虫体内协同或各自调控着昆虫的行为和生理过程, 包括学习与记忆等功能 (Roeder, 2003; Roeder, 2005)。昆虫体内 OA 具有调节生理活动、行为的重要功能, 如蜜蜂 *Apis mellifera* 的逃避行为 (Tahira *et al.*, 2003; Agarwal *et al.*, 2011) 与觅食行为 (Giray *et al.*, 2007), OA 也可能参与了蜜蜂 *Apis mellifera* 触角的嗅觉记忆 (Farooqui *et al.*, 2003)。

目前, 已在多种昆虫中成功克隆章鱼胺受体 (Octopamine receptors OARs) 基因, 包括黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (Han *et al.*, 1998)、烟草天蛾 *Tobacco hornworm*、家蚕 *Bombyx mori* (Dacks *et al.*, 2006) 等。OA 被相应的神经元释放, 并通过结合于各自的受体进而偶联不同的 G 蛋白引起下游信号反应以发挥其生理功能 (Blenau and Baumann, 2001; Roeder, 2005)。OARs 被激活后可导致细胞内钙离子和环腺苷酸 (cAMP) 的浓度发生改变 (Gudermann *et al.*, 1997)。近年来, 对于昆虫体内相关章鱼胺受体 (OARs) 研究日益增多, 对 OARs 的研究将有助于开发特异、高效的激动剂和拮抗剂, 不同类型 OARs 可作为农药作用靶标用来防治害虫 (Donly *et al.*, 2007)。研究发现 3 种神经性杀虫剂香精油及混合物对美洲大蠊 *Periplaneta americana*、德国小蠊 *Blattella germanica* 等均有显著毒杀效果, 其作用靶标可能是 OA 受体 (Malutan *et al.*, 2002)。

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 属鳞翅目夜蛾科, 是一种世界性害虫。研究发现 G 蛋白耦联受体 (G-protein-coupled receptors, GPCRs) 在昆虫体内调控着各种不同的生理反应 (Hill *et al.*, 2002), 其作为潜在的杀虫剂靶标用于害虫防治的研究备受关注 (Lange, 2009)。本实验比对了克隆得到的 *HaOA2B2* 受体基因序列, 并明确了 *HaOA2B2* 受体基因在棉铃虫体内的表达谱。借助蜕皮激素 (20-hydroxyecdysone)

过表达与蜕皮激素核受体 EcR (Ecdysone receptor) 和 USP (Ultraspiracle isoform) (Christoph *et al.*, 2011) 基因沉默技术, 探究了蜕皮激素对 *HaOA2B2* 受体基因表达的调控作用。本实验为今后研究 *HaOA2B2* 受体基因在转录调控中的作用, 开发新型杀虫剂提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试虫

供试棉铃虫采自河北省保定市棉田, 在本实验室内长期饲养。饲养温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, 光周期为 16L: 8D, 相对湿度为 $70\% \pm 10\%$ 。棉铃虫人工饲料配方参考李静雯 (2012)。

1.2 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

采用 Trizol 法提取总 RNA, 用微量紫外分光光度计 Nanodrop 2000c 测其浓度和纯度。参照 TaKaRa 公司的 PrimeScript® 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书合成 cDNA。

1.3 引物设计

根据本实验室棉铃虫转录组获得的 *OA2B2* 基因序列保守区域及蜕皮激素受体 USP 全序列 (EF174332.1)、EcR 序列 (EU526831.1), 利用 primer 5 和 DNAMAN 软件设计引物 (表 1), 设计好的引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.4 棉铃虫 *OA2B2* 受体基因序列的分子克隆

借助 *OA2B2*-F1 和 *OA2B2*-R1、*OA2B2*-F2 和 *OA2B2*-R2 引物进行 PCR 扩增, 反应条件为: 94°C 30 s, 58°C 45 s; 72°C 1 min; 40 个循环。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。经纯化的目的片段与 pMD18-T 载体连接, 转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 进行蓝白斑筛选。摇菌、提取质粒, 然后将双酶切鉴定重组成功的质粒送至上海生工测序。

1.5 序列分析及进化树构建

对 *HaOA2B2* 受体基因序列进行生物学分

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物用途 Primer use	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')
拼接引物 Splicing primers	OA2B2-F1	ACCGAGTCACTGAAATAC
	OA2B2-R2	GTATGTGAACAGCATTATGG
	OA2B2-F2	ACAAGCCATACGCAGTCA
	OA2B2-R2	CTCAAACCGTGGTCACCTC
qPCR 引物 Primers for qPCR	EF-RF	GAAGTCAAGTCCGTGGAGATG
	EF-RR	GACCTGTGCTGTGAAGTCG
	OA2B2-RF	TATGTGACCTCTGGAAGTC
	OA2B2-RR	AGGATACTTCAAGGGCTTC
	USP-RF	AGTTCCAGTTCCTCCGTG
	USP-RR	CGCTGCTATTTGTTTGTG
	EcR -RF	GCAGTCAGATCAGATCACGT
	EcR- RR	GGAGTACATGCACCGACAG
	USPRNAiF1	TACCTGACTGAAGAGCGAG
	USPRNAiR1	CGACGAGGTGGAAGAAGAAC
RNAi 引物 Primers for RNA interference	EcR RNAiF1	GCTGGTATAACAACGGAGG
	EcR RNAiR1	GCCGCAGACAAGACATAG
	GFP RNAiF1	TGGTCCCAATTCTCGTGGAAC
	GFP RNAiR1	CTTGAAGTTGACCTTGATGCC
	USPRNAiF2	TAATACGACTCACTATAGGTACCTGACTGAAGAGCGAG
	USPRNAiR2	TAATACGACTCACTATAGGCGACGAGGTGGAAGAAGAAC
	EcR RNAiF2	TAATACGACTCACTATAGGGCTGGTATAACAACGGAGG
	EcR RNAiR2	TAATACGACTCACTATAGGGCCGCAGACAAGACATAG
	GFP RNAiF2	TAATACGACTCACTATAGGTGGTCCCAATTCTCGTGGAAC
	GFP RNAiR2	TAATACGACTCACTATAGGCTTGAAGTTGACCTTGATGCC

析。利用 NCBI ORF finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 预测开放阅读框 (ORF) ; 将该序列采用生物信息学在线工具 http://www.expasy.org/tools/pi_t001.html 翻译成氨基酸序列 ; 运用 NCBI BLAST network server(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 在 GenBank 中对 *HaOA2B2* 氨基酸序列进行同源性分析 ; 利用 MEGA5.2 , 采用 Neighbor-joining 法构建系统进化树。

1.6 实时荧光定量 PCR (QRT-PCR)

以棉铃虫 EF 基因为内参基因 (闫硕等 , 2013 ; Yan *et al.* , 2013 , 2014) 。参照试剂盒 SYBR Primer Script RT-PCR Kit 方法操作 , 反应条件 : 95 °C 预变性 3 min , 95 °C 10 s , 55 °C 30 s , 共 40

个循环。基因的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算 , 其中 $\Delta C_t = C_{t \text{ 目标基因}} - C_{t \text{ 看家基因}}$, $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t - \Delta C_{t \text{ 参照物}}$ (唐永凯和贾永义 , 2008) 。每个样本 3 次重复。

1.7 棉铃虫 OA2B2 基因的时空表达模型

棉铃虫不同发育历期和不同组织 (幼虫组织均为 5 龄第 3 天取样) 样品 cDNA 作为模板 , 各处理重复 3 次。以 OA2B2-RF 和 OA2B2-RR 为引物进行荧光定量 PCR。

1.8 蜕皮激素对棉铃虫 OA2B2 基因表达的影响

借助 NANOJECT II 显微注射仪注射 300 ng (100 ng/μL) 的蜕皮激素至 4 龄第 2 天的棉铃虫幼虫 , 对照组注射等量的 DMSO , 注射后 8、

12、24、48 h 取样, 各处理重复 3 次。

根据 MEGA Script RNAi Kit 说明书体外合成 EcR 和 USP 双链 RNA (dsRNA), 以 GFP dsRNA 作为对照。借助 NANOJECT II 显微注射仪将 4 μ g 的 EcR 和 USP dsRNA 分别注射到 4 龄第 2 天的棉铃虫体内, 注射后 8、12、24、48、72 h 取样, 各处理重复 3 次。

1.9 数据处理

借助 SPSS17.0 软件包进行方差分析, 采用 Tukey 算法进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 视为显著性差异。

2 结果与分析

2.1 棉铃虫 OA2B2 序列分析及系统进化树构建

HaOA2B2 受体基因在 GenBank 上的登录号为 KR057964。*HaOA2B2* 受体基因的拼接比对表

明:*HaOA2B2* 受体基因开放阅读框全长 1 191 bp, 编码 396 个氨基酸 (图); 分子式 C2059H3201N541O553S28; 蛋白质分子量为 45.28 ku, 等电点 (pI) 为 9.21; 总平均疏水指数 (GRAVY) 0.249; 蛋白不稳定指数 (Instability index) 为 41.64, 属于不稳定蛋白。三级结构预测表明 *HaOA2B2* 受体基因编码的蛋白质是一个 α 螺旋的 7 次跨膜结构, 属于典型的 G 蛋白耦联受体家族。

NCBI 的 Blast 搜索结果表明 *HaOA2B2* 受体基因与其他昆虫 OARs 氨基酸序列具有较高的一致性, 同源性达到 55% 以上, 进一步证明所获得基因为 *HaOA2B2* 受体基因。将棉铃虫 *Helicoverpa armigera*、家蚕 *Bombyx mori* (89%)、二化螟 *Chilo suppressalis* (87%)、黑腹果蝇 *Drosophila elanogaster*、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 等的 OARs 基因的氨基酸序列进行多重比对 (图 2), 系统发育树 (图 3) 结果与传统

```

1      ATGGATCGGAAAATTTACCCACCACGCGGCAGTGAACGCGACTGTCAACGTGACCACC
1      M D R E N F T H H A A V N A T V N V T T
61     AACGGCACAGTCGCGGAGACAGAGGACGATGACTTGACGCAGAGCATATTCTCAAGCTG
21     N G T V A E T E D D D L T Q S I F F K L
121    AGGATCACGGTGTGTGCTCATCGTCATCATGGCGGTGTGGGCAATATGCTGGTCATA
41     R I T V L L L I V I M A V L G N M L V I
181    GTCAGTGTTATGAGGCACAGAAACTCCGCGTAATAACCAACTACTTCGTGGTCTCCCTC
61     V S V M R H R K L R V I T N Y F V V S L
241    GCGTTCGCCGACATCCTAGTGCCATGGTGGTGATGCCGTTCAACTTCAGCGTCCAATT
81     A F A D I L V A M V V M P F N F S V Q F
301    TACAACAGCTGGCTCTTCGGACCAACGATATGTGACCTCTGGAACCTCCGATGTGTAC
101    Y N S W L F G P T I C D L W N S S D V Y
361    TTCACTCCACGTCGATTCTACATCTGTGTGCATATCGGTGGATAGGTACTACGCTATT
121    F T S T S I L H L C C I S V D R Y Y A I
421    GTGAAGCCCTGAAGTATCCTATTAGATGACGAAGAAGATGGCATTTCATCATGTTAGCA
141    V K P L K Y P I K M T K K M A F I M L A
481    GCAACATGGTTAAGTCCAATTACGATATCCTACGTCCTCAATATTTCATGGGCTGGTATACA
161    A T W L S P I T I S Y V P I F M G W Y T
541    ACCAGTGACCATTTGAAAGTCCAAAAGCCGACGAGTGCAGATTCATAGTCAACAGCCA
181    T S D H L K V Q K A D E C E F I V N K P
601    TACGCAGTCATCCAGCTCAATATCTTCTGGATTCTGTACCATATGCTGTTTCACA
201    Y A V I S S S I S F W I P C T I M L F T
661    TACTACGCTATATCCGAGAAGCGAATCGACAGGAGAAAAATCTTCACGCCAGAGCTGGC
221    V Y A I F R E A N R Q E K N L H A R A G
721    AATGCTATGCTCATGCATAGACATTCTCGAGAAGTGGGCGACAAAATGGCGCCTTACAC
241    N A M L M H R H S R E V G D K N G A L H
781    ATAAACGCCCACTCCTACGAAGGATAGGAATATCTCAAAATGAAGAGAGAACATAAG
261    I N A T T P T K D R N I L K M K R E H K
841    GCAGCCAGGACTTAGGCATTATCATGGGAGCCTTCATCCTCTGCTGGTGGCTTTCCTTC
281    A A R T L G I I M G A F I L C W L P F F
901    CTATTCTACGTGTCAACGTCATTGTGTGACTCGTGCCGGTGTCCGGAAGTCGTACAGTG
301    L F Y V S T S L C D S C R C P E V V T V
961    ATCATGTTCTGGACTGGTTACTTCAACTCAGCGTTGAACCCAATCATTTACGCGTATTTC
321    I M F W T G Y F N S A L N P I I Y A Y F
1021   AATAGAGACTTCCGTAATGCGTTCAAGAACACTTTAGCTTGTGCGTTCTGCAAGTTTGT
341    N R D F R N A F K N T L A C A F C S F C
1081   AGGAGAAGTCTTCGGACCTTGATGCTCTAGACCGGTAGATAGGAGAGGTTACGCGAAC
361    R R S A S D L D A L E R L D R R G S A N
1141   TTGAGGGTGCCAGTACCTTCTAGGAGAATCAGACCTAGCATCGCTTTGA
381    L R V P V P S R R T S D L A S L *

```

图 1 *HaOA2B2* 受体基因全长序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 1 The nucleic acid sequence of *HaOA2B2* and the deduced amino acid (AA) sequence

*: 终止子, 跨膜结构用下划线代表。

*: Terminator; The underline represents the transmembrane structure.

<i>AmOA2B2</i>	MTTIVTSSESSEVVS.....SVDVTTLLNGISTEDGQLGTNASYSSEE...KLSVPVTVKGCVLGSIIVTAVE	66
<i>BmOAR1</i>	...MDRENVTHH.....AVNATVSATINGTAEEYD..VTQGV.....FFKLRLMSVILLIVITAVL	51
<i>CsOA2B2</i>	...MDPINGSHS.....GANATISDITNGAYNATDAGEWTSV.....MFKLRCTCVILLIVIMAVL	53
<i>DpOA2B2</i>	MAVL	4
<i>FaOA2B2</i>	MATTPDSSHMDTTTTPAKLINTFENTVKNKTTTTTATTTSTTTTATTTTNGTLLWPEMPVALSKGCFLGFTIIAAVF	80
<i>HaOA2B2</i>	...MDRENFTHHA.....AVNATVNVTNGTVAETEDDDLTQSI.....FFKLRTVILLIVIMAVL	54
<i>IsOAR1</i>	SWES.....VLKLVKTLAIVTIISSAVF	24
<i>MdOA2B2</i>	MATTTDP.NPSDTS.....LDPSASNLTNSSSDNNLNYTTQPP.....WPDLSVSVFKGCILGFTIIAAVF	61
<i>AmOA2B2</i>	CNLLVMVSVVRHRKLRITITNYFVVSALADMLVAMFAMTFNASVLTGKMLFGYFMCVWNSLDVVFSTSSIIHLMCISV	146
<i>BmOAR1</i>	CNMLVIVSVVRHRKLRVITITNYFVVSALADMLVAMVVPFNFBSVQFYQGWVFGPIICDLWNSSDVMFTSTSIHLCCISV	131
<i>CsOA2B2</i>	CNMLVIVSVVRHRKLRVITITNYFVVSALADMLVAMVVPFNFBSVQFYQGWVFGETICDLWNSSDVMFTSTSIHLCCISV	133
<i>DpOA2B2</i>	CNMLVIVSVVRHRKLRVITITNYFVVSALADMLVAMVVPFNFBSVQFYQGWVFGPVICDLWNSSDVMFTSTSIHLCCISV	84
<i>FaOA2B2</i>	CNLLVIVSVVRHRKLRITITNYFVVSALADMLVAMFAMTFNLSVQVTGRWLFGLFMCVWNSLDVVFSTSSIIHLMCISV	160
<i>HaOA2B2</i>	CNMLVIVSVVRHRKLRVITITNYFVVSALADMLVAMVVPFNFBSVQFYNSWLFGRPTICDLWNSSDVMFTSTSIHLCCISV	134
<i>IsOAR1</i>	CNLLVVTISVVRHRKLRITITNYFVVSALADMLVAMFAMTFNASVTSISGRWLFNQTVCEFWNSCDVLFSTASIIHLMCISV	104
<i>MdOA2B2</i>	CNLLVIVSVVRHRKLRITITNYFVVSALADMLVAMFAMTFNLSVQVTGRWLFGLFMCVWNSLDVVFSTSSIIHLMCISV	141
<i>AmOA2B2</i>	DRYMAIVKPLKYPPIIMTRRLAAYMLLACWILEAFISFVPIFMGWYTTAENSMRRONHPEICFKNKIVIFSSSVFWI	226
<i>BmOAR1</i>	DRYMAIVKPLKYPKMTKKVAFIMLAATWLSFIIISYVPIFMGWYTTNDYLTQAS..SDQCEFKVKNKYAVISSSSIFWI	209
<i>CsOA2B2</i>	DRYMAIVKPLKYPKMTKKMAFVMLAATWLSFIIISYVPIFMGWYTTDFLESRR..DDQCEFKVKNKYAVISSSSIFWI	211
<i>DpOA2B2</i>	DRYMAIVKPLKYPKMTKKMAFVMLAATWLSFIIISYVPIFMGWYTTSEYLLKTRV..LNQCEFKVKNKYAVISSSSIFWI	162
<i>FaOA2B2</i>	DRYMAIVKPLKYPRTYMTKRVVAYMIMACWLAHAFVIFLPIFNGWYTTSDNNKHRRONHPDICEFKVNEFYAILSSSSIFWI	240
<i>HaOA2B2</i>	DRYMAIVKPLKYPKMTKKMAFIMLAATWLSFIIISYVPIFMGWYTTSDHLKQVK..ADECFIVNKKFYAVISSSSIFWI	212
<i>IsOAR1</i>	DRYMAIKPLKYPKMTKRTVAIMLTCWVSSGLISFPIFELCWYTTNEHLVYKVEHPDECIFVKNKYAVISSSSIFWI	184
<i>MdOA2B2</i>	DRYMAIVKPLKYPKMTKRVVAYMMLACWVSEAFISFVPIFNGWYTTSDNDHFRHLHPVCEFKVNEFYAILSSSSIFWI	221
<i>AmOA2B2</i>	PCTIMLTITLYFAVFKKANROEKQMH..SRMGNVLLSHRPSKDLNNLNGELNSAGSSKTLTLNEISTNHLHTPTKDKNIMKM	305
<i>BmOAR1</i>	PCTIMLTITLYLAIFKCANROEKALH..ARAGNAMLM.HRHSRDVSDKNGALHINAT.....TPTKDRNIMKM	272
<i>CsOA2B2</i>	PCTIMLTITLYLAIFKCANROEKALH..ARAGNAMLM.HRHSREVSDKNGALHINAT.....TPTKDRNIMKM	274
<i>DpOA2B2</i>	PCTIMLTITLYLAIFKCANROEKALH..ARAGNAMLM.HRHSRDVSDKNG..LHINAN.....TPTKDRNIMKM	224
<i>FaOA2B2</i>	PCSIMALTITLYLAIFKCANROEKQMH..SRMGNAMLLSHRPSDLNNLNGELNSGSSKTLTLNEVNIDHLHTPTKDKNIMKM	319
<i>HaOA2B2</i>	PCTIMLTITLYLAIFKCANROEKNLH..ARAGNAMLM.HRHSREVSDKNGALHINAT.....TPTKDRNIMKM	275
<i>IsOAR1</i>	PCTIMLTITLYRIYVEATROEKMLCKSQMGPMLC..RNSTQSMENR.....	229
<i>MdOA2B2</i>	PCTIMLTITLYLAIFKCANROEKQMH..SRMGNAMLLSHRPSDLNNLNGELNSGSSKTLTLNEINTDHLHTPTKDKNIMKM	300
<i>AmOA2B2</i>	KREHKAARTLGIIMGTFLCWLPPFLFYVITITLQGESCPDPDVIALLFWICGYTNSALNPILYAYFNRFRAFAKNTLQC	385
<i>BmOAR1</i>	KREHKAARTLGIIMGAFILCWLPPFLFYVSTSLQDT..CKCPDVVTVIMFWTGYFNSALNPILYAYFNRFRAFAKNTLAC	351
<i>CsOA2B2</i>	KREHKAARTLGIIMGAFILCWLPPFLFYVSTSLQDS..CNCPEVVTVMFWTGYFNSALNPILYAYFNRFRAFAKNTLAC	353
<i>DpOA2B2</i>	KREHKAARTLGIIMGAFILCWLPPFLFYVSTSLQDS..CTYPEFVTVIMFWTGYFNSALNPILYAYFNRFRAFAKNTLAC	303
<i>FaOA2B2</i>	KREHKAARTLGIIMGTFTVLCWLPPFLFYVITITSLQGYQNCPCDIIVHIVFWTGYTNSALNPILYAYFNRFRAFAKNTLQC	399
<i>HaOA2B2</i>	KREHKAARTLGIIMGAFILCWLPPFLFYVSTSLQDS..CNCPEVVTVMFWTGYFNSALNPILYAYFNRFRAFAKNTLAC	354
<i>IsOAR1</i>	..EHKAARTLGIIMGAFILCWLPPFLFYVSTITMCGDAPCEPFLVVDLLFWICGYLNSALNPVLYAYFNRFRAFAKNTLQA	307
<i>MdOA2B2</i>	KREHKAARTLGIIMGTFTLCLWLPFLFYVITITSLQSKHCEPFLVVSIVFWTGYTNSALNPILYAYFNRFRAFAKNTLQC	380
<i>AmOA2B2</i>	AFCSLORREPSDLEALD..FRRPSLSFEMQSMLEQENKANNREPFNPPIANF	434
<i>BmOAR1</i>	AFCSLORRNSDLDALERLDRRGSALRVVPASRRASDLASL.....	393
<i>CsOA2B2</i>	AFCSLORRSASDLDAERLDRRGSALRVVPIPSRRASDLASL.....	395
<i>DpOA2B2</i>	AFCSLORRNPMDSEATERLERRSSALRVVPLPSRRASDLASL.....	345
<i>FaOA2B2</i>	AFCSLORREPLDLEALD..IRRPSSLIPGYL.....	428
<i>HaOA2B2</i>	AFCSLORRSASDLDAERLDRRGSANLRVVPFSRRTSLASL.....	396
<i>IsOAR1</i>	IFCSLORCLPAHGDSRAIRFKCTYRSTQDIGLVENKYLRLD.....	349
<i>MdOA2B2</i>	AFCSLORREPLDLEALD..IRRPSSLIPVHFKNLNFIV.....	415

图2 *HaOA2B2* 和其它昆虫同源物的氨基酸序列多重比对Fig. 2 Amino acid sequence multiple alignments of *HaOA2B2* with other insects homologs

黑色代表 100% 的序列一致性，深灰色代表 75% 的序列一致性，浅灰色代表小于或等于 50% 的序列一致性。

Black represents 100% identity, dark grey represents 75% identity and light grey represents $\leq 50\%$ identity.

AmOA2B2 (XP_003249218.1): 意蜂 *A. mellifera*; *BmOAR1* (NP_001171666.1): 家蚕

B. mori; *CsOA2B2* (AE089318.1): 二化螟 *C. suppressalis*; *DpOA2B2* (EHJ70958.1): 帝王斑蝶 *D. plexippus*; *FaOA2B2* (XP_011300804.1): 阿里山潜蝇茧蜂 *F. arisanus*; *HaOA2B2* (KR057964): 棉铃虫 *H. armigera*; *IsOAR1* (XP_002411135.1): 肩突硬蜱 *I. scapularis*; *DpOA2B2* (XP_008548224.1): 毁例沟茧蜂 *D. plexippus*.

分类一致，棉铃虫、家蚕、二化螟等亲源关系较近的鳞翅目昆虫的 OARs 基因均归到一组。

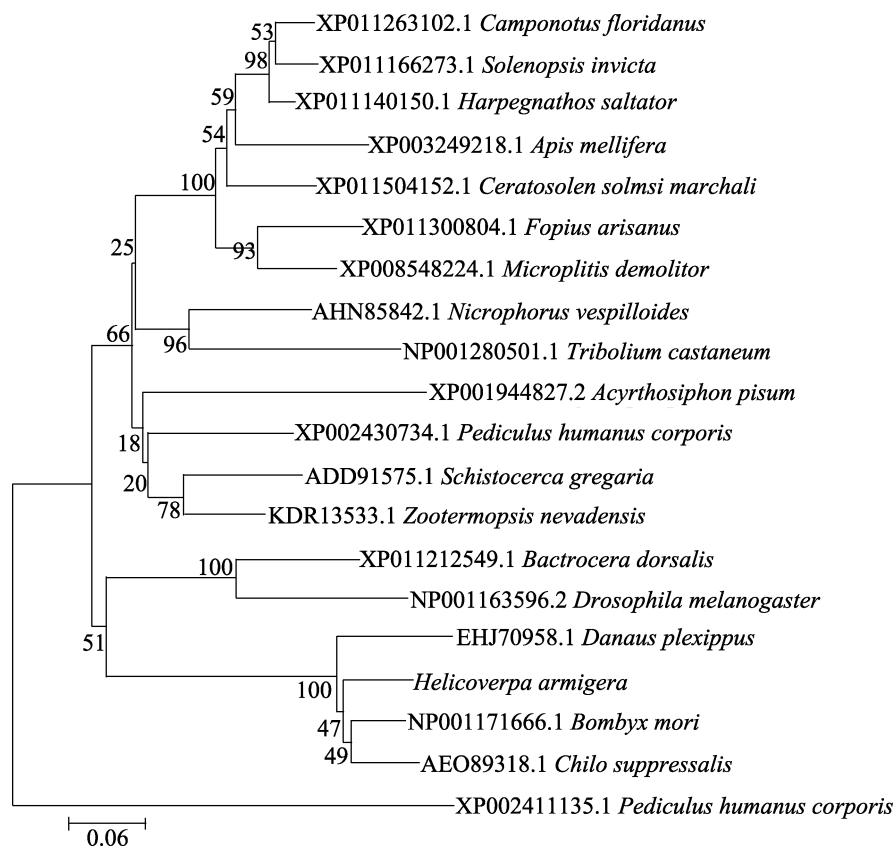
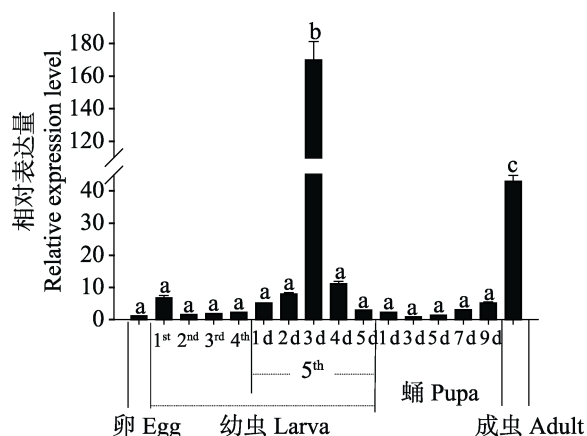
2.2 *HaOA2B2* 受体基因在不同发育阶段的表达模式

QRT-PCR 结果表明：*HaOA2B2* 受体基因在棉铃虫不同发育阶段均有表达，但不同发育时期

间存在显著性差异 ($F=206.973$, $df=15, 32$, $P<0.001$)，在棉铃虫 5 龄第 3 天表达量最高，其次是成虫体内 (图 4)。

2.3 *HaOA2B2* 受体基因在不同组织中的表达模式

取棉铃虫 5 龄第 3 天的幼虫不同组织，

图 3 基于 *HaOA2B2* 受体基因的氨基酸序列构建的进化树Fig. 3 Phylogenetic tree based on the deduced amino acid sequences of *HaOA2B2* isoform genes from various orders of insect图 4 *HaOA2B2* 受体基因在棉铃虫不同发育阶段的表达谱Fig. 4 The expression profile of *HaOA2B2* gene in the different stages of *Helicoverpa armigera*

以卵的相对表达量作为基准进行统计学分析；柱上标有不同字母表示 Turkey 比较存在显著性差异 ($P < 0.05$)。图 5 同。

With relative expression of egg as a benchmark for statistical analysis. Histograms with different letters indicate significantly different at 0.05 level by Turkey test. The same as Fig. 5.

QRT-PCR 结果显示：幼虫不同组织中 *HaOA2B2* 受体基因的表达量存在显著性差异 ($F=457.596$, $df=5, 6$, $P < 0.001$)，在头部的表达量最高，在神经中枢、体壁的表达量也相对较高，表达量最低的组织为中肠（图 5）。

2.4 蜕皮激素处理对 *HaOA2B2* 受体基因表达量的影响

注射蜕皮激素可促进 *HaOA2B2* 受体基因的表达，尤其在处理 24 h 后促进效率最显著 ($F=3.337$, $df=2, 902$, $P=0.073$) (图 6)。

2.5 蜕皮激素受体基因沉默对 *HaOA2B2* 受体基因表达的影响

2.5.1 干扰效率检测 与对照组相比，注射 dsRNA 24、48、72 h 后，EcR 和 USP 基因的表达量均受到了抑制（图 7），48 h 后干扰效率均达到最高，其中 EcR、USP 基因干扰效率与对照组相比有显著降低（EcR： $F=168.5$, $df=2, 6$,

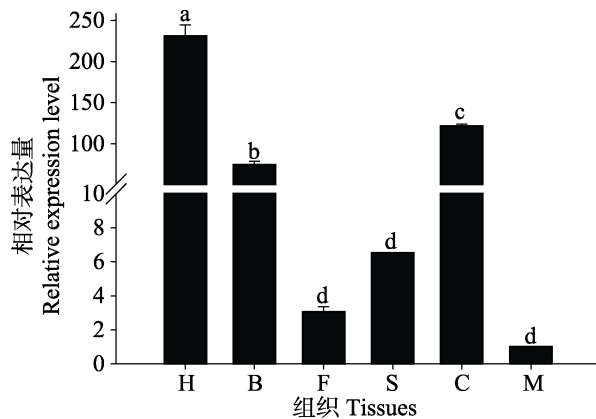


图5 *HaOA2B2* 受体基因在棉铃虫 5 龄幼虫不同组织的表达谱

Fig. 5 The expression profile of *HaOA2B2* in different tissues of the 5th instar larva of *Helicoverpa armigera*

H: 头 Head; B: 体壁 Body wall; F: 脂肪体 Fat body; S: 唾液腺 Salivary glands; C: 神经中枢 Central nervous system; M: 中肠 Midgut; 以 M (中肠) 的相对表达量作为基准进行统计学分析 With relative expression of M (midgut) as a benchmark for statistical analysis.

$P < 0.001$; USP: $F = 615.161$, $df = 2, 6$, $P < 0.001$), 由此说明 EcR 基因和 USP 基因能够被沉默掉, 并可用于下一步的实验的研究分析。

2.5.2 蜕皮激素受体基因沉默对 *HaOA2B2* 受体基因表达的影响 蜕皮激素受体 EcR 和 USP 基因被沉默后, *HaOA2B2* 受体基因的表达量与对照组相比在 8、12、24、48 h 有显著性降低。EcR

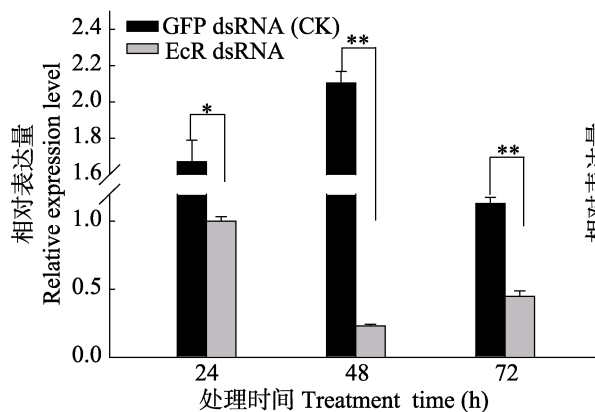


图7 注射 EcR dsRNA/USP dsRNA 后不同时间棉铃虫幼虫 EcR/USP 基因的相对表达量
Fig. 7 Effect of EcR dsRNA/USP dsRNA interference on the transcript level of EcR/USP in the instar larvae of *Helicoverpa armigera*

以 24 h EcR dsRNA/USP dsRNA 的相对表达量作为基准进行统计学分析。*表示 Turkey 比较存在显著性差异 ($P < 0.05$)

**表示 Turkey 比较差异极显著 ($P < 0.001$)。下同。

With relative expression of 24 h EcR dsRNA as a benchmark for statistical analysis. * indicates significantly different at 0.05 level by Turkey test, ** indicates extremely significantly different at 0.001 level by Turkey test. The same below.

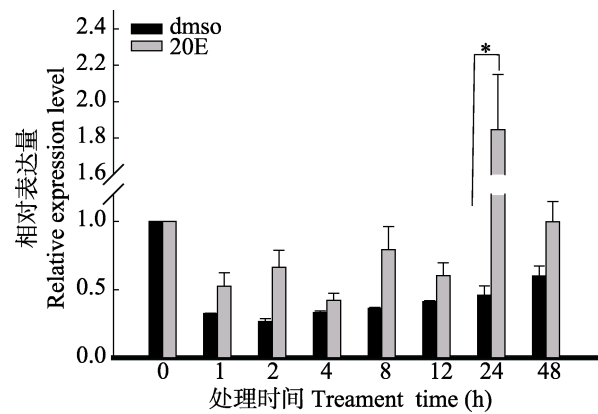


图6 蜕皮激素处理对棉铃虫 5 龄幼虫 *OA2B2* 受体基因转录水平的影响

Fig. 6 Effect of 20-E on the transcript level of *OA2B2* in the 5th instar larvae of *Helicoverpa armigera*

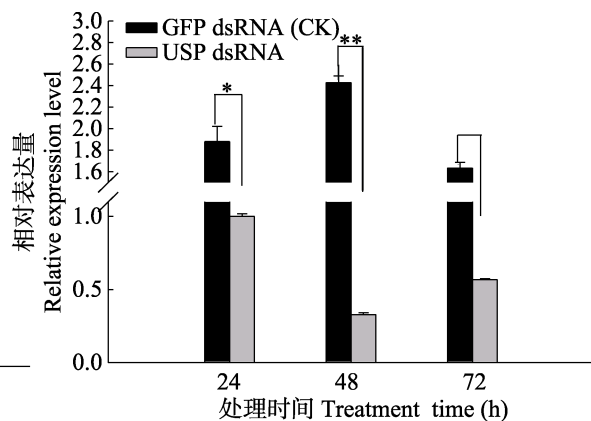
以 0 h 的相对表达量作为基准进行统计学分析。*表示 Turkey 比较存在显著性差异 ($P < 0.05$)

With relative expression of 0 h as a benchmark for statistical analysis. * indicates significantly different at 0.05 level by Turkey test.

基因和 USP 基因被沉默后, *HaOA2B2* 受体基因的表达量与对照组相比均显著降低 (EcR: $F = 8.247$, $df = 3, 8$, $P = 0.008$; USP: $F = 13.676$, $df = 3, 8$, $P = 0.002$) (图 8)。

3 结论与讨论

随着分子生物学的发展, OA 在昆虫体内的作用逐渐引起重视 (孟培培等, 2013)。OA 是



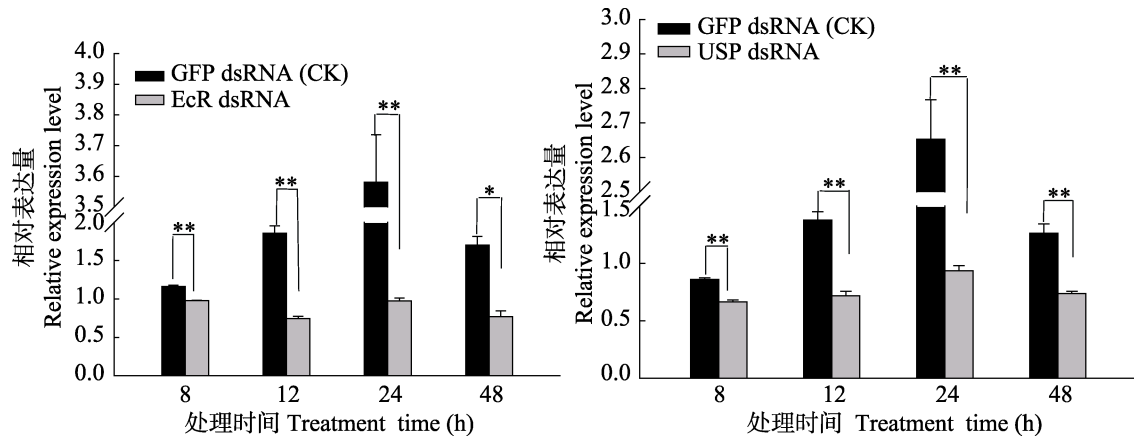


图 8 沉默 EcR/USP 基因后 5 龄幼虫 *HaOA2B2* 受体基因的相对表达量

Fig. 8 The transcript level of *HaOA2B2* in the 5th instar larvae after treatment with EcR/USP dsRNA

以 24 h EcR/USP dsRNA 的相对表达量作为基准进行统计学分析。

With relative expression of 24 h EcR/USP dsRNA as a benchmark for statistical analysis.

无脊椎动物神经系统中存在的多种微量生物胺之一, OA 作为神经递质需要通过细胞膜或者细胞内部的受体来传递神经信号(潘灿平和陈馥衡, 1999; 潘灿平等, 2005), 因此昆虫体内的生物胺受体一直被视为杀虫剂的潜在作用靶标。本研究旨在探讨 *HaOA2B2* 受体基因在棉铃虫不同发育阶段与组织的表达谱, 以及蜕皮激素对其表达的调控作用, 为防治棉铃虫、研制新型杀虫剂提供一定的理论基础。

通过在线软件预测其编码的蛋白质为一个 α 螺旋的 7 次跨膜结构, 属于典型的 G 蛋白耦联受体家族 (Peter and Braudel, 2005)。OA 被相应的神经元释放, 并通过结合于各自的受体进而偶联不同的 G 蛋白引起下游信号反应以发挥其生理功能 (Roeder, 2005; Blenau and Baumann, 2001), 因此暗示 *HaOA2B2* 受体在 OA 对棉铃虫多种生理活动的调控过程中发挥重要作用。将得到的 *HaOA2B2* 受体基因的氨基酸序列与其它昆虫中克隆得到的章鱼胺受体 (OARs) 基因的氨基酸序列共同构建系统发育树, 结果表明, 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*、家蚕 *Bombyx mori*、二化螟 *Chilo suppressalis* 等亲源关系较近的鳞翅目昆虫的 OARs 基因均归到一组, 这种结果可能是由它们的基因结构决定的。果蝇体内的 DmOct132R 也主要在果蝇头部表达 (Roeder,

2005), 而在 CNS 中, OA 具有调控昆虫运动、昼夜节律、学习、和记忆等生理活动 (Schwaerzel *et al.*, 2003; Farooqui *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2010)。吴顺凡 (2013) 研究发现在二化螟体内, *CsOA2B2* 受体基因在不同发育阶段均有表达, 在所测幼虫各组织中也均有表达, 而在神经组织中的表达量最高, 说明其在二化螟的神经系统中扮演着调控作用。该基因表达谱实验表明, *HaOA2B2* 受体基因在棉铃虫不同虫态和组织中也均有表达, 其中尤其头部、CNS 中表达量较高, 暗示其可能参与了 OA 对棉铃虫多种生理活动的调控, 尤其在神经系统中扮演着重要作用有关。

在昆虫体内, 蜕皮激素是调控昆虫发育和变态的重要的昆虫激素。已有研究证实当昆虫体内蜕皮激素滴度达到阈值时, 核受体 EcR 与 USP 在细胞核内形成 EcR/USP 异源二聚体, 随后蜕皮激素与 EcR/USP 异源二聚体形成转录复合体, 调控 EcR、USP、激素接受子 3 (HR3)、E75、Broad Complex (BR-C)、E93、 β FTZ-F1、E74 等 20E 初级应答基因的表达 (Cherbas *et al.*, 1991; Clayton, 2001; Beckstead, 2005; Hiruma and Riddiford, 2009), 进一步调控下游效应基因如细胞凋亡蛋白酶的表达, 最终导致昆虫变态和蜕皮过程中的细胞自噬和凋亡 (Thummel, 1996; Riddiford and Zhou, 1999; Schwedes *et al.*,

2011)。在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中通过阻断蜕皮激素与其受体 EcR 和 USP 的结合则会显著抑制下游转录因子的表达 (Riddiford *et al.*, 2003)。在棉铃虫表皮细胞系中通过 RNAi 沉默 EcR 和 USP 基因, 也会导致蜕皮激素信号途径中的转录因子的基因表达受阻 (赵小凡, 2010)。本研究结果表明 *HaOA2B2* 受体基因在棉铃虫发育阶段 5 龄第 3 天表达量最高, 这一时期为棉铃虫由幼虫到育蛹期的转变, 蜕皮激素表达量会显著增加, 推测蜕皮激素有可能影响 *HaOA2B2* 受体基因的表达。外源注射蜕皮激素后, 成功抑制了 EcR 和 USP 基因的表达, 并可促进 *HaOA2B2* 受体基因的表达, 这充分证明了蜕皮激素在一定程度上可调控 *HaOA2B2* 受体基因的表达。研究虽然从生物信息学方面与转录方面分析了 *HaOA2B2* 受体基因的一些基本特性以及蜕皮激素对其表达的调控, 但 *HaOA2B2* 受体基因具体的调控机制仍需要更深入的研究。

参考文献 (References)

- Agarwal M, Guzman MG, Morales-Matos C, Del Valle D í az RA, Abramson CI, Giray T, 2011. Dopamine and octopamine influence avoidance learning of honey bees in a place preference assay. *Plos ONE*, 6(9): 120.
- Beckstead RB, Lam G, Thummel CS, 2005. The genomic response to 20-hydroxyecdysone at the onset of *Drosophila metamorphosis*. *Genome Biology*, 6(12): 1–13.
- Blenau W, Baumann A, 2001. Molecular and pharmacological properties of insect biogenic amine receptors: lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*. *Arch. Archives of Insect Biochemistry & Physiology*, 48(1): 13–38.
- Chen X, Ohta H, Ozoe E, Miyazawa K, Huangb J, Ozoe Y, 2010. Functional and pharmacological characterization of a β -adrenergic-like octopamine receptor from the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 40(6): 476–486.
- Cherbas L, Lee K, Cherbas P, 1991. Identification of ecdysone response elements by analysis of the *Drosophila* Eip28/29 gene. *Genes & Development*, 5(1): 120–131.
- Christoph S, Siddharth T, Carney GE, 2011. Ecdysone receptor expression and activity in adult *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 57(7): 899–907.
- Clayton GM, Peak-Chew SY, Evans RM, Schwabe JW, 2001. The structure of the ultraspiracle ligand-binding domain reveals a nuclear receptor locked in an inactive conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(4): 1549–1554.
- Dacks AM, Dacks JB, Christensen TA, Nighorn AJ, 2006. The cloning of one putative octopamine receptor and two putative serotonin receptors from the tobacco hawkmoth, *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 36(9): 741–747.
- Donly, C, Verellen, L, Cladman, W, 2007. Functional comparison of full-length and N-terminal-truncated octopamine transporters from Lepidoptera. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37(9): 933–940.
- Farooqui T, Vaessin H, Smith BH, 2004. Octopamine receptors in the honeybee (*Apis mellifera*) brain and their disruption by rna-mediated interference. *Journal of Insect Physiology*, 50(8): 701–713.
- Giray T, Galindo-Cardona A, Oskay D, 2007. Octopamine influences honey bee foraging preference. *Journal of Insect Physiology*, 53(7): 691–698.
- Gudermann T, Schöneberg T, Schultz G, 1997. Functional and structural complexity of signal transduction via g-protein-coupled receptors. *Annual Review of Neuroscience*, 20: 399–427.
- Han KA, Millar NS, Davis RL, 1998. A novel octopamine receptor with preferential expression in drosophila mushroom bodies. *Journal of Neuroscience*, 18(10): 3650–3658.
- Hill CA, Nicole FA, Jason PR, Kent LB, Tan PL, Chrystal MA, Cravchik A, Collins FH, Robertson HM, Zwiebel LJ, 2002. G protein-coupled receptors in anopheles gambiae. *Science*, 298(5591): 176–178.
- Hiruma K, Riddiford L, 2009. The molecular mechanisms of cuticular melanization: the ecdysone cascade leading to dopa decarboxylase expression in manduca sexta. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 39(4): 245–253.
- Lange AB, 2009. Tyramine: from octopamine precursor to neuroactive chemical in insects. *General & Comparative Endocrinology*, 162(1): 18–26.
- Li JW, 2012. Effects of nuclear polyhedrosis virus on cannibalism in *Helicoverpa armigera*. Master dissertation. Beijing: China Agricultural University. [李静雯, 2012. 核型多角体病毒感染对棉铃虫幼虫行为的影响. 硕士学位论文. 北京: 中国农业大学.]
- Malutan T, McLean H, Caveney S, 2002. A high-affinity octopamine transporter cloned from the central nervous system of cabbage looper *Trichoplusia ni*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32(3): 343–357.
- Meng PP, Wei MM, Xiong YN, Huang LN, Ai DY, Hong Y, Wu ML, Cheng XC, Lin JJ, Fu ZQ, 2013. Identification and characterization of *Schistosoma japonicum* octopamine receptor. *Chinese Veterinary Science*, 43(8): 776–781. [孟培培, 魏梅梅,

- 熊雅念, 黄莉妮, 艾德宙, 洪炆, 伍妙梨, 程相朝, 林矫矫, 傅志强, 2013. 日本血吸虫章鱼胺受体基因的克隆表达及分析. *中国兽医科学*, 43(8): 776–781.]
- Pan CP, Li WX, Zhang LJ, Wang JF, 2005. Distribution, function and research progress of octopamine in insects. *Chinese Bulletin of Entomology*, 42(4): 369–373. [潘灿平, 李维喜, 张卢军, 王金芳. 昆虫体内章鱼胺的分布、功能、及其研究进展. *昆虫知识*, 42(4): 369–373.]
- Pang CP, Chen FH, 1999. Research developments on the octopaminergic mechanism and oa receptors. *Chinese Journal of Pesticide Science*, (3): 1–7. [潘灿平, 陈馥衡, 1999. 章鱼胺的作用机理及其受体的研究进展. *农药学报*, (3): 1–7.]
- Peter DE, Braudel M, 2005. Insect octopamine receptors: a new classification scheme based on studies of cloned *Drosophila* G-protein coupled receptors. *Invert. Neurosci.*, (5): 111–118.
- Riddiford LM, Hiruma K, Zhou X, Nelson CA, 2003. Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 33(12): 1327–1338.
- Riddiford LM, Zhou B, 1999. Regulation and role of nuclear receptors during larval molting and metamorphosis of Lepidoptera. *Integrative & Comparative Biology*, 39(4): 736–746.
- Roeder, T, Seifert, M, Kahler, C, Gewecke M, 2003. Tyramine and octopamine: antagonistic modulators of behavior and metabolism. *Arch Insect Biochem. Physiol.*, 54(1): 1–13.
- Roeder T, 2005. Tyramine and octopamine: ruling behavior and metabolism. *Annual Review of Entomology*, 50: 447–477.
- Schwaerzel M, Monastirioti M, Scholz H, Friggi-Grelin F, Birman S, Heisenberg M, 2003. Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in *Drosophila*. *Journal of Neuroscience the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(33): 10495–10502.
- Schwedes C, Tulsiani S, Camey GE, 2011. Ecdysone receptor expression and activity in adult *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 57(7): 899–907.
- Tahira F, Kellie R, Harald V, Smith BH, 2003. Modulation of early olfactory processing by an octopaminergic reinforcement pathway in the honeybee. *Journal of Neuroscience the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(12): 5370–5380.
- Tang YK, Jia YY, 2008. Method of processing real time PCR data. *Biotechnology*, 18 (3): 89–91. [唐永凯, 贾永义, 2008. 荧光定量 PCR 数据处理方法的探讨. *生物技术*, 18 (3): 89–91.]
- Thummel CS, 1996. Flies on steroids—*Drosophila* metamorphosis and the mechanisms of steroid hormone action. *Trends in Genetics*, 12(8): 306–310.
- Tugrul G, Alberto GC, Devrim O, 2007. Octopamine influences honey bee foraging preference. *Journal of Insect Physiology*, 53(7): 691–698.
- Wu SF, 2013. Studies on the pharmacological properties and physiological roles of biogenic amine receptors in the rice stem borer *Chilo suppressalis*. Doctoral dissertation. Zhejiang: Zhejiang University. [吴顺凡, 2013. 二化螟体内生物胺受体的药理学与生理学研究. 博士学位论文. 浙江: 浙江大学.]
- Yan S, Ni H, Li HT, Zhang J, Liu XX, Zhang QW, 2013. Molecular cloning, characterization, and mRNA expression of two cryptochrome genes in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 106(1): 450–462.
- Yan S, Zhu JL, Zhu WL, Pan LL, Zhang QW, Liu XX, 2013. Molecular cloning, sequence analysis and expression pattern detection of α -tubulin gene from *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Scientia Agricultural Sinica*, 46(9): 1808–1817. [闫硕, 朱家林, 朱威龙, 潘李隆, 张青文, 刘小侠, 2013. 棉铃虫 α -微管蛋白基因的克隆、序列分析及表达模式检测. *中国农业科学*, 46(9): 1808–1817.]
- Yan S, Zhu JL, Zhu WL, Zhang XF, Li Z, Liu XX, Zhang QW, 2014. The expression of three opsin genes from the compound eye of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) is regulated by a circadian clock, light condition and nutritional status. *PLoS ONE*, 9(10): e111683.
- Zhao XF, 2010. Progress in insect molting hormone signaling transduction pathways. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 22 (12): 1209–1214. [赵小凡, 2010. 昆虫蜕皮激素信号转导途径研究进展. *生命科学*, 22 (12): 1209–1214.]