

DOI: 10.13718/j.cnki.xdsk.2023.03.008

巴氏新小绥螨章鱼胺受体基因鉴定与表达模式分析

方云洪¹, 王珍², 戴建修³, 程明明¹, 成禄艳¹,
黎思辰¹, 雷双¹, 丁莉莉¹, 潘琦¹, 冉春¹

1. 西南大学 柑桔研究所, 重庆 400712; 2. 重庆市荣昌区昌元街道办事处, 重庆 荣昌 402460;
3. 重庆市云阳县果品产业发展中心, 重庆 云阳 404500

摘要: 为明确巴氏新小绥螨(*Neoseiulus barkeri*)章鱼胺受体基因的分子特征, 探明其药理学和生理功能, 运用转录组数据和生物信息学软件分析并鉴定章鱼胺受体基因的 cDNA 全长, 利用 qRT-PCR(Quantitative real-time polymerase chain reaction)比较章鱼胺受体基因在巴氏新小绥螨不同发育阶段、不同温度及饥饿胁迫条件下的表达模式。结果表明: 于转录组数据库筛选鉴定到 6 个章鱼胺受体基因, 分别命名为 *NbOcta1R1*, *NbOcta1R2*, *NbOct-TyrR*, *NbOct β 2R1*, *NbOct β 2R2*, *NbOct β 3R*, 其完整开放阅读框为 936~1 983 bp, 编码 312~661 个氨基酸, 在进化关系上与西方静走螨(*Galendromus occidentalis*)最为接近。 *NbOcta1R1*, *NbOcta1R2*, *NbOctTyrR*, *NbOct β 2R1*, *NbOct β 3R* 都具备 G 蛋白偶联受体的典型特征。 6 个章鱼胺受体基因在巴氏新小绥螨不同螨态均有表达, 且在幼螨和若螨中表达水平较高。在不同温度胁迫条件下, 不同章鱼胺受体基因在成螨和幼螨中受低温、高温影响后, 仅有 *NbOct β 2R1*, *NbOct β 2R2* 在高温时表达量上调, 低温时表达量下调。饥饿胁迫诱导时, 除 *NbOct β 3R* 表达量随饥饿时间延长而降低外, 其余章鱼胺受体基因表达量在饥饿开始的不同时间段出现不同程度的增加, 最终随饥饿时间进一步增加而下降。从巴氏新小绥螨转录组中鉴定到的 6 个章鱼胺受体基因, 在不同发育阶段、不同温度和饥饿胁迫下其表达量存在差异, 推测巴氏新小绥螨章鱼胺受体基因在不同发育阶段和逆境胁迫中承担着不同的生理功能。

关键词: 巴氏新小绥螨; 章鱼胺受体; 发育阶段; 温度;

饥饿胁迫

中图分类号: S435.79

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 1673-9868(2023)03-0100-10

Identification and Expression Pattern Analysis of Octopamine Receptor Genes of *Neoseiulus barkeri* (Acari: Phytoseiidae)

FANG Yunhong¹, WANG Zhen², DAI Jianxiu³,
CHENG Mingming¹, CHENG Luyan¹, LI Sichen¹,
LEI Shuang¹, DING Lili¹, PAN Qi¹, RAN Chun¹

收稿日期: 2022-04-27

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFD1002100, 2020YFD10001020); 重庆市技术创新与应用发展专项(cstc2019jscx-gksb0218);

重庆市科技创新领军人才支持计划项目(cstc2018kjcxljrc0040); 重庆市自然科学基金项目(cstc2020jcyj-msxmX0980)。

作者简介: 方云洪, 硕士研究生, 主要从事昆虫生理生化与分子生物学研究。

通信作者: 冉春, 博士, 研究员。

1. Citrus Research Institute, Southwest University, Chongqing 400712, China;
2. Changyuan Subdistrict Office of Rongchang Distruct, Rongchang Chongqing 402460, China;
3. Yunyang County Fruit Industry Development Center, Yunyang Chongqing 404500, China

Abstract: In order to clarify the molecular characteristics of octopamine receptor genes of *Neoseiulus barkeri* and explore its physiological and pharmacological functions, bioinformatic programs were applied to analyze the transcriptome data of *N. barkeri* to identify the full-length cDNA of octopamine receptor gene. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to estimate the expression pattern of the octopamine receptor genes in the different developmental stages, temperatures, and starvation stress. The results show that: Six octopamine receptor genes were identified in *N. barkeri* and named as *NbOcta1R1*, *NbOcta1R2*, *NbOctTyrR*, *NbOctβ2R1*, *NbOctβ2R2* and *NbOctβ3R*. Their complete open reading frames ranged from 936 to 1 983 bp. Encoding 312 to 661 amino acids, it is the closest evolutionary relation to *Galendromus occidentalis*. *NbOcta1R1*, *NbOcta1R2*, *NbOctTyrR*, *NbOctβ2R1* and *NbOctβ3R* all possess the typical characteristics of G protein-coupled receptors. The 6 octopamine receptor genes of *N. barkeri* were expressed in all development stages, and the highest expression was observed in larva and nymphs. The temperature affected the expression of the octopamine receptor gene of *N. barkeri*, but the pattern was not obvious. The expression of *NbOctβ3R* gradually decreased with the increase of starvation time. The expression of other octopamine receptor genes increased in different degrees at different periods of time during the early stage of starvation, and finally decreased with the extension of starvation time. Six octopamine receptor genes were identified in *N. barkeri*. The expressions of octopamine receptor genes were different under different developmental stages, temperatures, and starvation stress times. This research indicated that octopamine receptor genes might play different role in different developmental stages, which can be affected by external conditions.

Key words: *Neoseiulus barkeri*; octopamine receptor; development stages; temperatures; starvation stress

生物胺是无脊椎动物体内具有重要生物活性的小分子化合物,主要包括章鱼胺(octopamine, OA)、酪胺(tyramine, TA)、组胺(histamine, HA)、多巴胺(dopamine, DA)和5-羟色胺(serotonin, 5-HT)^[1]。章鱼胺作为昆虫体内不可或缺的一类生物胺,参与昆虫的昼夜节律、内分泌、好斗、飞行以及学习与记忆等重要生理活动^[2]。此外,还有研究证实,章鱼胺在应对不同环境胁迫时也发挥着积极的功能。

章鱼胺的功能行使需特异性地结合章鱼胺受体^[3](octopamine receptor, OARs)。章鱼胺受体是典型的G蛋白偶联受体(G-protein coupled receptor, GPCR)。自第一个章鱼胺受体基因从黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)中成功克隆以来^[4],目前已在烟草天蛾(*Manduca sexta*)、家蚕(*Bombyx mori*)、赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)、棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)等多种昆虫中发现^[5-8]。随着基因组学的快速发展,章鱼胺受体基因研究更加系统全面。章鱼胺受体除了与OA结合发挥重要生理功能外,还是多种杀虫(螨)剂的作用靶标,如杀虫剂杀虫脒和杀螨剂双甲脒^[9]。因此,针对昆虫、螨类章鱼胺受体特异性开发激动剂和拮抗剂,可以创制高效、安全的新型杀虫剂。

巴氏新小绥螨(*Neoseiulus barkeri*),隶属于蛛形纲(Arachnida)蜱螨亚纲(Acari)寄型螨目(Parasitiformes)植绥螨科(Phytoseiidae)新小绥螨属(*Neoseiulus*)^[10]。其分布范围广、捕食能力强、易规模化生产,是目前应用最为广泛的生物防治天敌之一^[11],对叶螨、蚜虫、粉虱等害虫(螨)具有理想的控制作用^[12]。研究巴氏新小绥螨章鱼胺受体基因,可以针对性地研发对其安全的新型杀虫(螨)剂,而目前有关其章鱼胺受体基因的研究还未见报道。鉴于此,本研究鉴定了巴氏新小绥螨6个章鱼胺受体基因,分析巴氏新小绥螨章鱼胺受体基因不同发育阶段、不同温度及饥饿胁迫下的表达模式,为进一步深入研究章鱼胺受体的生理功能和药理学提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 供试生物材料

供试螨源：巴氏新小绥螨为西南大学柑桔研究所实验室多年继代饲养种群. 以椭圆食粉螨(*Aleuroglyphus ovatus*)进行饲喂, 并于人工气候箱(温度 25±1 ℃, 相对湿度 75%~85%, 光周期 14L/10D)中饲养.

1.2 不同螨态、胁迫条件的收集和保存处理方法

挑取足量的巴氏新小绥螨雌成螨于洁净的凹槽玻璃板中饲养, 任其产卵. 不同发育阶段螨源和不同温度处理后螨源定期饲喂足量椭圆食粉螨, 饥饿处理螨源的收集则待卵孵化至成螨后停止饲喂椭圆食粉螨.

不同发育阶段螨源的收集: 分别收集巴氏新小绥螨 800 粒卵, 500 头幼螨, 500 头若螨, 200 头雌成螨, 重复 3 次.

不同温度处理后雌成螨和幼螨的收集: 将光照培养箱的温度分别设置为 15 ℃, 20 ℃, 25 ℃, 30 ℃和 35 ℃, 24 h 后分别收集巴氏新小绥螨幼螨 500 头, 雌成螨 200 头, 重复 3 次.

饥饿处理后雌成螨的收集: 将饥饿处理时间分别设置为 0 h, 6 h, 12 h, 18 h 和 24 h, 每个处理分别收集巴氏新小绥螨雌成螨 200 头.

使用 ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System (普洛麦格)试剂盒提取巴氏新小绥螨样本总 RNA, 利用紫外分光光度计和 1%无核酶的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量和浓度. 将质量合格的 mRNA 样本按照反转录试剂盒 HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+ gDNA wiper) (诺唯赞)的步骤, 合成 cDNA 模板.

1.3 巴氏新小绥螨章鱼胺受体基因的鉴定和生物信息学分析

从巴氏新小绥螨转录组数据(西南大学柑桔研究所实验室构建, NCBI 数据库登录号: SRP333450)中筛选出注释为章鱼胺受体基因的序列, 使用 NCBI 在线软件 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 对筛选的章鱼胺受体基因进行开放阅读框预测和蛋白质翻译, 将翻译后的氨基酸序列用 Smart BLAST 来验证, 验证为章鱼胺受体的基因再次进行 BLASTX 比对, 确认候选章鱼胺受体基因的命名.

利用 Primer Premier 5.0 软件设计 PCR 引物(表 1), 引物由北京擎科生物技术有限公司进行合成. 以巴氏新小绥螨雌成螨 cDNA 为模板, 利用高保真 DNA 聚合酶(诺唯赞)进行 PCR 扩增. PCR 反应体系(50 μL): 反转录产物 2 μL, 上游引物和下游引物各 2 μL, 酶 25 μL, RNase-free dd H₂O 19 μL. 反应程序: 95 ℃ 30 s; 95 ℃ 15 s, 72 ℃ 15 s, 72 ℃延伸 30 s, 35 个循环. 将目的片段通过 DNA 回收试剂盒(诺唯赞)纯化后连接至 T/A Blunt Vector 载体, 然后转化至大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 感受态细胞. 在含有卡那霉素的 LB 固体培养基上过夜培养, 挑取阳性克隆于 LB 液体培养基中, 37 ℃下 180 r/min 孵育 3 h 后进行菌液 PCR 鉴定, 将验证正确的菌液送至北京擎科生物技术有限公司进行测序.

表 1 巴氏新小绥螨章鱼胺受体基因引物信息

引物名称	引物序列	引物用途
<i>NbOcta1R1</i> -F	GTAAAGTGAAGCGACCAG	PCR
<i>NbOcta1R1</i> -R	GACAATCACCCAATGAACTA	
<i>NbOcta1R2</i> -F	TAGTGCGGGCGTTGAGT	
<i>NbOcta1R2</i> -R	GCTGGTAAGCGGAAACAT	
<i>NbOctTyrR</i> -F	TCGGATTTCCTATTGTTG	
<i>NbOctTyrR</i> -R	CTCCCGTGTTTGTTTCGTC	
<i>NbOctβ2R1</i> -F	GCGGTGGTCGGTAAAGG	
<i>NbOctβ2R1</i> -R	AAATGCTGGACGGTGTT	
<i>NbOctβ2R2</i> -F	ATTGGCAACTGCGGACAT	
<i>NbOctβ2R2</i> -R	GGAAAGCAAGGCGAGGAT	
<i>NbOctβ3R</i> -F	AGCAGCACCGCTACCAAC	
<i>NbOctβ3R</i> -R	CCGGCAAACAGAATAATCAA	

将测序验证的 ORF 序列利用 TMHMM Server v. 2.0 等在线软件进行跨膜结构域、分子量和等电点预测; 然后使用 DNAMAN V6 软件进行多重序列比对; 再应用 MEGA 7.0 软件中的邻接法构建系统发育树, 1 000 次检测; 最后应用 DNAMAN V6 软件对不同无脊椎动物中章鱼胺受体基因的氨基酸序列进行同源性比对.

1.4 定量 PCR

提取样品的 RNA 并合成 cDNA 模板. 利用 Primer Premier 5.0 软件设计 qRT-PCR 引物(表 2), 根据 ChamQ Universal SYBR[®] qPCR Master Mix (诺唯赞)试剂盒进行 qRT-PCR 检测. qRT-PCR 在 qTOWER qPCR system (Analytik Jena)上进行, 反应体系(20 μ L): 2 $\times$ ChamQ SYBR qPCR Master Mix 10 μ L, 上游引物和下游引物各 0.25 μ L, ChamQ Universal SYBR [®] qPCR Master Mix 5 μ L, cDNA 模板 0.4 μ L, RNase-free dd H₂O 4.1 μ L. 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火延伸 30 s, 40 个循环; 熔解曲线 60 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 2 min. 选择泛素结合酶 UBC(Ubiquitin Conjugating Enzyme, KP310123)基因作为内参基因^[13], 采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法^[14] 计算基因的相对表达量. 每个样品设置 3 个生物学重复, 每个生物学重复进行 2 次技术重复.

表 2 巴氏新小绶螨章鱼胺受体基因定量引物信息

引物名称	引物序列	引物用途
<i>NbOcta1R1</i> -qF	TAGGTGCCAGTGTCTTCCG	qPCR
<i>NbOcta1R1</i> -qR	GGTCGCGTGACGCCAATAT	
<i>NbOcta1R2</i> -qF	TTCCGCTCTAAACCCGCTAA	
<i>NbOcta1R2</i> -qR	AGGGCAGAACATCTTCGTCA	
<i>NbOctTyrR</i> -qF	ACCTGACGGAGACACTATGGG	
<i>NbOctTyrR</i> -qR	CGCTTTGGCTTCAACCTG	
<i>NbOctβ2R1</i> -qF	TGCGAACCCACTGATTGTC	
<i>NbOctβ2R1</i> -qR	GCGGTTGAAGTAGGCGTAGA	
<i>NbOctβ2R2</i> -qF	CCTTACGAAGTCCGCACCA	
<i>NbOctβ2R2</i> -qR	CCTCCATTCCAGCGACAGA	
<i>NbOctβ3R</i> -qF	CGTGTATCACTCCCTTCTGCC	
<i>NbOctβ3R</i> -qR	GCTACATTTGTTCTTAAGGTTTCG	
<i>UBC</i> -qF	ATGAAACCCCGCCCTACCTG	
<i>UBC</i> -qR	TTCCCATAGGCCGTCACTCG	

1.5 数据分析

采用 SPSS 26.0 软件对实验数据进行统计分析, 通过单因素方差分析法(one-way ANOVA)和 Duncan 氏新复极差法($p<0.05$)对候选基因的相对表达量进行差异显著性分析, 以 $\bar{x}\pm s$ 表示.

2 结果与分析

2.1 巴氏新小绶螨章鱼胺受体基因的鉴定和生物信息学分析

根据在线软件 TMHMM Server v. 2.0 分析, 巴氏新小绶螨 *NbOcta1R1*, *NbOcta1R2*, *NbOctTyrR*, *NbOct β 2R1*, *NbOct β 3R*(图 1)都具备 7 个跨膜结构域(TM1-TM7)、胞内 C 端、胞外 N 端、胞内环和胞外环各 3 个, 位于 TM5 和 TM6 之间的第 3 个胞内环最长, 这些都是 G 蛋白偶联受体的典型特征, 表明上述基因的 cDNA 序列完整. *NbOct β 2R2* 拥有 5 个跨膜结构域, 无 TM1 和 TM2. 筛选鉴定获得的 6 个章鱼胺受体基因分别命名为 *NbOcta1R1* (GenBank 登录号: MZ855515), *NbOcta1R2* (GenBank 登录号: MZ855512), *NbOctTyrR* (GenBank 登录号: MZ855514), *NbOct β 2R1* (GenBank 登录号: MZ855513),

NbOctβ2R2 (GenBank 登录号: MZ855511), *NbOctβ3R* (GenBank 登录号: MZ855516). 由表 3 可知, 巴氏新小绶螨 6 个章鱼胺受体基因序列的完整开放阅读框(ORF)为 936~1 983 bp, 编码 312~661 个氨基酸, 分子量为 35.24~72.43 kD, 等电点为 8.47~9.63.

<i>NbOctα1R1</i>	MGTSTTTTSPVLVLENGPGSLTTRSSSVAMAAANETLLVVLVDKVISPNASNYTDLMLCQPAEVNMTLMALPSTLLLLIITLLITGNNLLVLVATFNNPNLR	100
<i>NbOctα1R2</i>	MATFEESLGAPVATAGRLFCGEMPFWEKLRNWTSLATLVVLVVFVVFVFGNVLIIAAVLASNKLR	65
<i>NbOctTyrR</i>	MMTVATTSSLNHSFEWDEVARSLLEGLGGFEGGNDPTGNVYIPGPFPAKTPEIGFIVTAVLVTLMIVIVVGNMLVCIATAEKSLK	87
<i>NbOctβ2R1</i>	MSLEVGTSGSPADLEVPEWQTLAKTITKSVVLLISIIILTAIFGNLLVVTSVIRHHKLR	57
<i>NbOctβ2R2</i>		0
<i>NbOctβ3R</i>	MDWSCRNLDDGGHNLTFVPLSQWERDVGAFIVASEAFLAFGNNLLVLVITFIDKVRQH	59
TM1		
<i>NbOctα1R1</i>	TTTNTFIVNLAIADLLLGASVLPFSATLELLDKQWYFGQ.IFCNVWAATDVLCCTASINSLCVISVRYIGVIRPLTYSSIVTHRRVATTCVVVVVLSFF	199
<i>NbOctα1R2</i>	TVTNTFVISLAVADLLVG.LTVMPYSITLVEFRAWPFEG.YFCKIWLAVDVWLCTSSILNLCAISIDRYLAITREMKYRTLMSSKRAILLIVLVWVTAFL	163
<i>NbOctTyrR</i>	TTQNTFIASLAVSDFLIG.LLIMPFSLARELMGYWIFGE.IWQDIHAALDVLICTASINNLCLISLDRYVSWTHAVEYLRKRTASRAVVMICGVWLLSAL	185
<i>NbOctβ2R1</i>	VTTNTFIVLSALADTLVA.LFAMTFNASFTITGTWLFNQ.LVQDFWNSSCDVLFSTASIMHLCCISVDRYYAIKPLEYPTKITTRVFMILALAWTVSLL	155
<i>NbOctβ2R2</i>	MPFTIIVDVVREWRFR.VAQYMWISCDVMCCTASILHLCEVSLDRFLAVTRPLRYRACVSKKRLSVVIFFIWTMSAS	77
<i>NbOctβ3R</i>	KAMSLISSLAVNDIITAVLVMAPSAYSSSHPRGFPFLCQPVQVSHGVFNVYWMATTSSITLAMISIDRNIAIQKPLLYAAHIYASRSRVIKMVLLFWTLG	159
Consensus		
TM2		
<i>NbOctα1R1</i>	ISVGPFLFG.WADPPNPDLKYSCEV.....TKQKGVIYFVSFLSEFIPTLVILVYQRIYRAATROTAFLETGVKIVKSGGSGNSGNGELTLRVHQGNSK	293
<i>NbOctα1R2</i>	ICFPPLVGWNLDLDASAGSVSQP.....TPPKSTIERSEFSSLAGNASGFNSTAGDGNETCEYPRCGLVNSLGVYVVSAMGSFYIPFMFFMLFFNYRIYV	258
<i>NbOctTyrR</i>	ISLPPLIGWRKRSEQKNSLPQCSV.....SEDLGYVLYSALGSFVPMVMVFVYIKIFMAARKRARAMEKKTLAARNKAAIVATQQPLAAQHSVASS	280
<i>NbOctβ2R1</i>	ISFLPIFTGWITTEGHRQWQAEHPNECVFKVNYIAISSSSISFWIPCSVMLFYWRIYLEATRQECMLCKTQMGGGGEHQVIAHAPP.....	243
<i>NbOctβ2R2</i>	ISFIPIFCGWFGPEGQWDDDTCEL.....AVNPTYALISSLSIFYLPLFVMFYVARILAVAERQAREIRVLERSLIQSGQGIDTNR.....	159
<i>NbOctβ3R</i>	IYISLIPFSLQWMTYQLDNIACDVNNWPEPGYRIYYAACFSLCEFIAPAMILIQYSRIIWSIHKLKARTPQESRNGMVKSPSGISLK.....	246
TM3		
TM4		
TM5		
<i>NbOctα1R1</i>	SSSGNQLENSSNPKVVTMGLQGRlakFRQKKAATLGIIVGVYFICWFPPFFILPLGTACEA..CTIPELLFDVIFWTGYFNSCLNPFIIYATCSREYNR	391
<i>NbOctα1R2</i>	SAIRTGQALERGFILAKNRGGSSSSNQMQMTLRVVRGNAKSTIATNQASVSETCMVDGIVTG..RRRPAKNSLVPETRSAPPSPFGNADLKSGSGSKRR	356
<i>NbOctTyrR</i>	CDNNSLRRRGGCEKKFSPPIIVIVNTEVEEGSPESIASPPISPDPDGTMGVSAIEAEHHLR..ASHPENLTQLAQQHANTNMSQLALQHQQVEAKARA	378
<i>NbOctβ2R1</i>	..HRNSHGADDTESGGSTFKRNTITMKREHKAATLGLIIMGAFILCWLPFFLWYVITSCEPTDCPCPEIVVDLLFWIGYINSSLNPIIYAYFNDRFRM	341
<i>NbOctβ2R2</i>	RGSRLRRRSQQLLVDTKAIITLGIIVMGVFSACWLPPFIMYLVSACFET..CQPEVEVRTSITWLGIVNSAFNFCIYAFINTEFRE	241
<i>NbOctβ3R</i>	LIGRRPSPVEEDNSMKLVLSVLILVVFVFACITPFCLTKLIKVYGP..HRVPEWCDMLSTIIQFSASVINPVVYSLSLKHQCE	328
TM6		
TM7		
<i>NbOctα1R1</i>	AFRTVLRCNWLRCRSGNREHNATDYQCFGRSNKTVTYTIIRGSSSSQRCSTASTMRESPLPNHHFFKDIA.....	462
<i>NbOctα1R2</i>	SSSAKTNGQQSSHQKRTSSSNKSLRWQARRFRTEAKATKTGVSIVGAFICCWLPFFFTVYLVKAFCESCIHDIVGVFWFLGYLNSALNPLIYALVSKDF	456
<i>NbOctTyrR</i>	QRQATNSSSGEFFVDNASSSSSSGEPHQQQQQAPPEHQLPLPNEADNSREKQTHQQQQQQEQPTPHVVSQVTQVNPGVEMDSLKPLRMHRSCEGSGLS	478
<i>NbOctβ2R1</i>	AFKKTLQDLFCSCPKLWQSRHRHPGGAAGFGGNHVVHQANSATTNFTCKLPPKNMVAMNKTNKICESKV.....	412
<i>NbOctβ2R2</i>	AFRRVLGCSRDRDSTATAASVAGMAEHRSSSCSPPIQIKIPRASPARTPDGAAPNPIIGQLDKGKHDLI.....	311
<i>NbOctβ3R</i>	ALVRLWRNLNRKCSIYFFSSWX.....	350
TM6		
TM7		
<i>NbOctα1R1</i>		462
<i>NbOctα1R2</i>	RHAFKKILCRCCLRGGISSLIKQVHQLTVLDDVANVDEDVLPAAQFSP.....	506
<i>NbOctTyrR</i>	LSTQDFGIDEGGTTNSSSHTSSKNAKTDLEKETRALIGCQRVPEQNTDVPKTTGSTSSQSPPTATATATMTSPTFANSNAALVAKQRRTQTEAERNRK	578
<i>NbOctβ2R1</i>		412
<i>NbOctβ2R2</i>		311
<i>NbOctβ3R</i>		350
TM6		
TM7		
<i>NbOctα1R1</i>		462
<i>NbOctα1R2</i>		506
<i>NbOctTyrR</i>	IAKARERRATMILGLTMAAFILAWLPFFLFYVLGALCESCKVNETMFAVAFWLGYCNSAVNPTIIYTFNDRFRAFRKILF	659
<i>NbOctβ2R1</i>	..HRNSHGADDTESGGSTFKRNTITMKREHKAATLGLIIMGAFILCWLPFFLWYVITSCEPTDCPCPEIVVDLLFWIGYINSSLNPIIYAYFNDRFRM	412
<i>NbOctβ2R2</i>		311
<i>NbOctβ3R</i>		350

红色标注为跨膜结构域 TM1-TM7.

图 1 巴氏新小绶螨章鱼胺受体基因氨基酸序列比对

表 3 巴氏新小绶螨章鱼胺受体基因信息

蛋白名称	类型	开放阅读框/	登录号	蛋白长度/	分子量/	等电点
		bp		AA	kD	
<i>NbOctα1R1</i>	肾上腺素能 α1 受体	1 389	MZ855515	463	50.98	9.49
<i>NbOctα1R2</i>	肾上腺素能 α1 受体	1 521	MZ855512	507	55.65	9.63
<i>NbOctTyrR</i>	肾上腺素能 α2 受体	1 983	MZ855514	661	72.43	8.47
<i>NbOctβ2R1</i>	肾上腺素能 β 受体	1 239	MZ855513	413	46.69	8.98
<i>NbOctβ2R2</i>	肾上腺素能 β 受体	936	MZ855511	312	35.24	9.08
<i>NbOctβ3R</i>	肾上腺素能 β 受体	1 062	MZ855516	354	40.09	9.36

为确定上述 6 个章鱼胺受体基因的分类地位和进化关系, 将其与已报道的 17 个无脊椎动物的 55 个 OARs 家族的氨基酸序列构建系统进化树(图 2). 结果表明, 巴氏新小绶螨 *NbOcta1R1*, *NbOcta1R2*, *NbOctTyrR* 与西方静走螨(*G. occidentalis*)*GoOcta1R1* 同源性达 86.57%~95.73%, 与其他几种无脊椎动物同源基因的同源性在 70.00%~90.00% 之间; 同属肾上腺素能 β 受体的 *NbOct β 2R1*, *NbOct β 2R2*, *NbOct β 3R* 章鱼胺受体基因与西方静走螨、雅氏瓦螨(*Varroa jacobsoni*)、狄氏瓦螨(*Varroa destructor*) 的章鱼胺受体基因同源性较高, 均在 80.00% 以上.

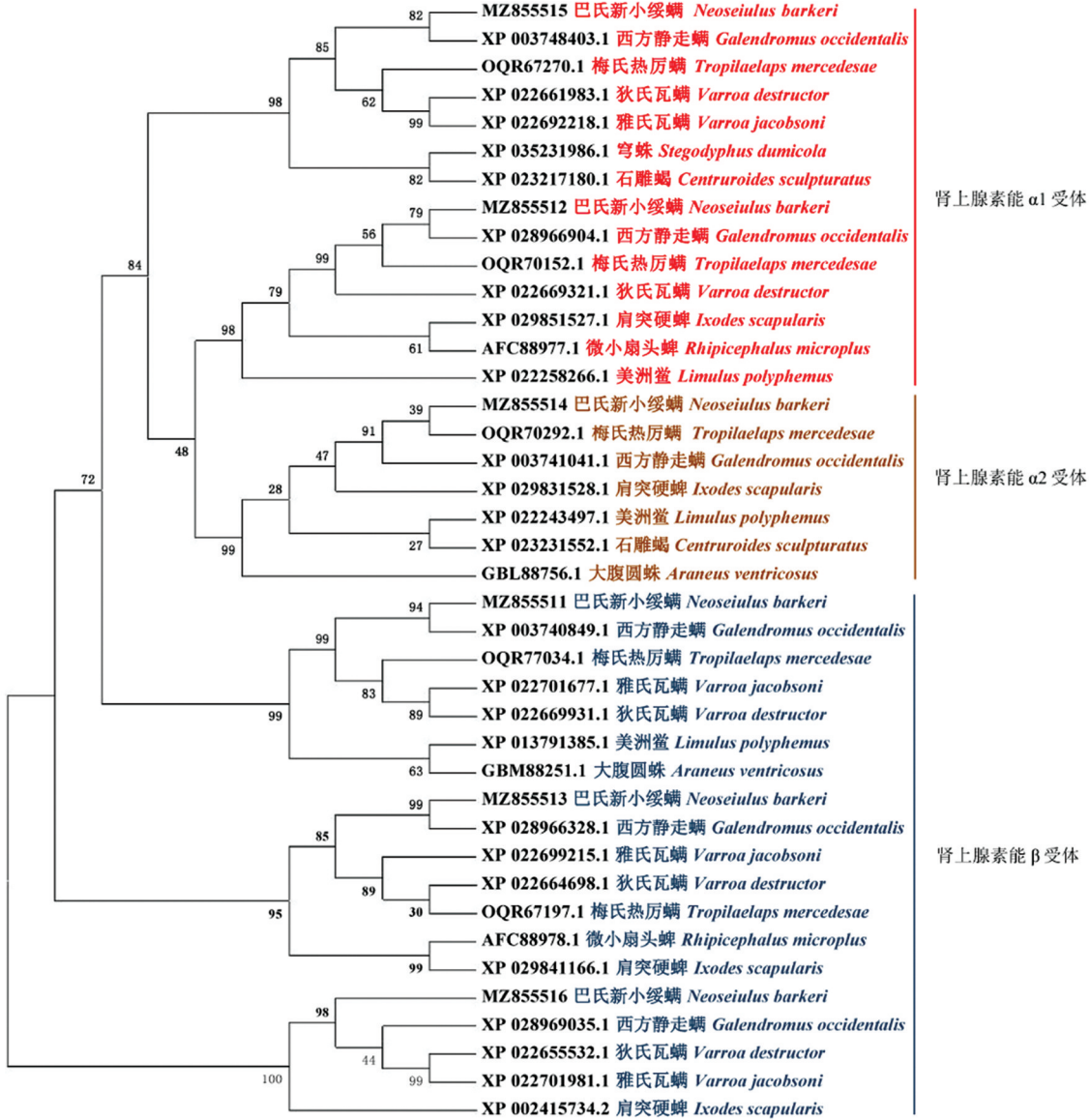


图 2 巴氏新小绶螨与其他无脊椎动物章鱼胺受体的进化关系

2.2 巴氏新小绶螨不同发育阶段、不同温度及饥饿胁迫下的表达模式分析

巴氏新小绶螨 6 个章鱼胺受体基因在卵、幼螨、若螨和成螨中都有所表达(图 3). 同属肾上腺素能 α 1 受体的 *NbOcta1R1*, *NbOcta1R2* 在不同螨态中的表达模式与属于肾上腺素能 α 2 受体的 *NbOctTyrR* 具有相似性, 均在幼螨中表达量最高($p < 0.05$). 同属肾上腺素能 β 受体的 *NbOct β 2R1*, *NbOct β 2R2* 和 *NbOct β 3R* 在不同发育阶段的表达情况具有一定的差异, 其中 *NbOct β 2R1* 在成螨中表达量最低, 在若螨中表达量最高($p < 0.05$); *NbOct β 2R2* 在幼螨中表达量最高($p < 0.05$), 在卵中表达量最低; *NbOct β 3R* 在卵和幼螨中表达量高($p < 0.05$).

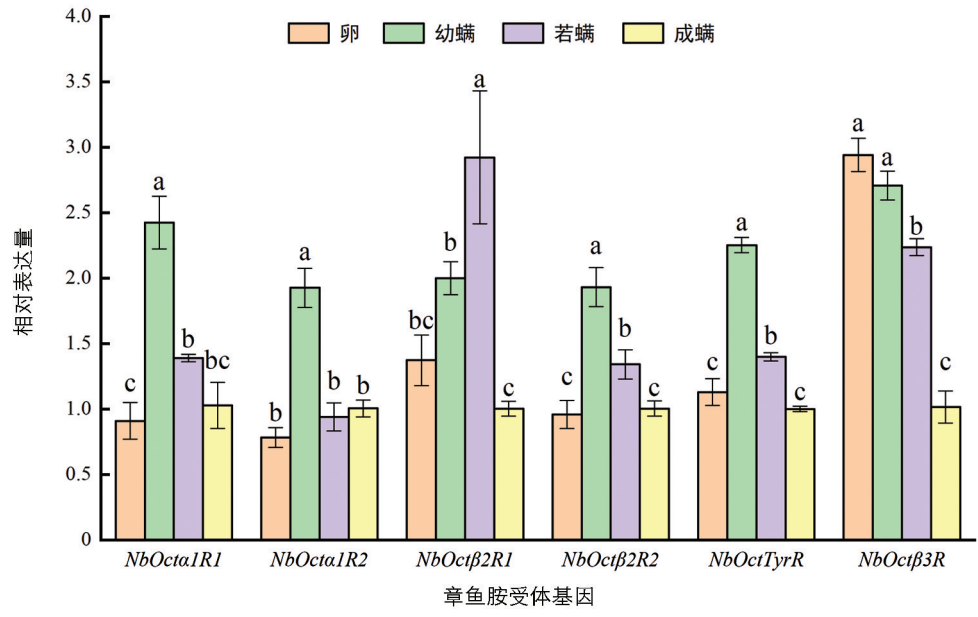


图 3 不同发育阶段巴氏新小绥螭章鱼胺受体基因表达水平

温度对巴氏新小绥螭成螭章鱼胺受体基因的影响如图 4。 *NbOcta1R2*， *NbOctβ2R1*， *NbOctβ2R2* 的表达量随温度的升高而升高， 30 ℃ 时的表达量最高； *NbOcta1R1*， *NbOctTyrR* 在 25 ℃ 时的表达量最高， 随后随温度的升高表达量下降； *NbOctβ3R* 在 35 ℃ 时表达量显著高于其他温度下的表达量 ($p < 0.05$)。 幼螭中(图 5)章鱼胺受体基因 *NbOctβ2R1*， *NbOctβ2R2* 在高温时表达量上调， 低温时表达量下调； 在 *NbOctTyrR* 下的表达量均没有显著变化 ($p > 0.05$)； *NbOctβ3R* 的表达量在低温时最低， 在 25 ℃ 时最高 ($p < 0.05$)； 其他基因表达量在低温和高温下没有明显规律性。

经过 6 h， 12 h， 18 h 和 24 h 的饥饿处理后， 巴氏新小绥螭 6 个章鱼胺受体基因的表达情况如图 6， *NbOctβ3R* 表达量随饥饿时间增加而逐渐下降， 其余章鱼胺受体基因表达量先有不同程度的升高， 在 24 h 的表达量均显著低于 0 h ($p < 0.05$)。

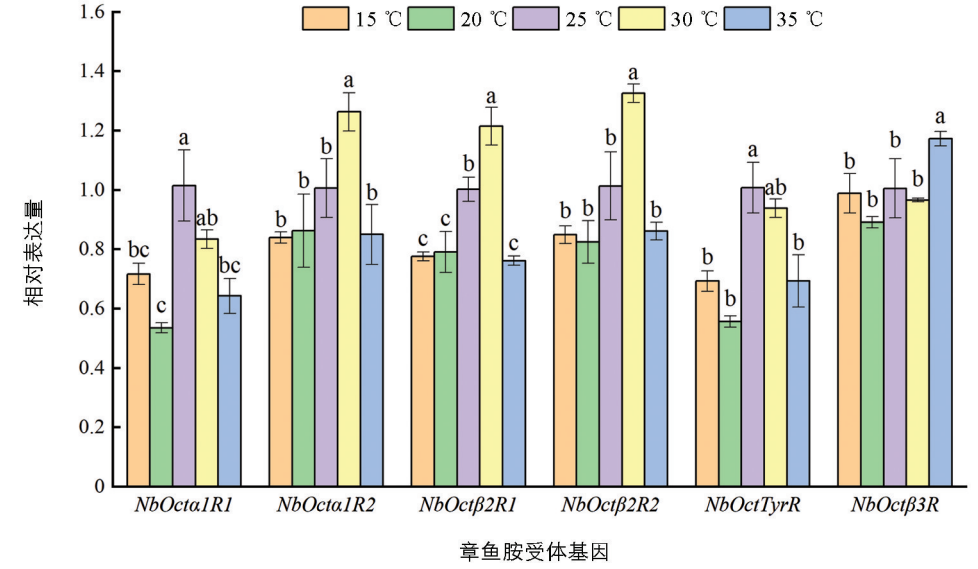


图 4 温度对巴氏新小绥螭成螭章鱼胺受体基因的影响

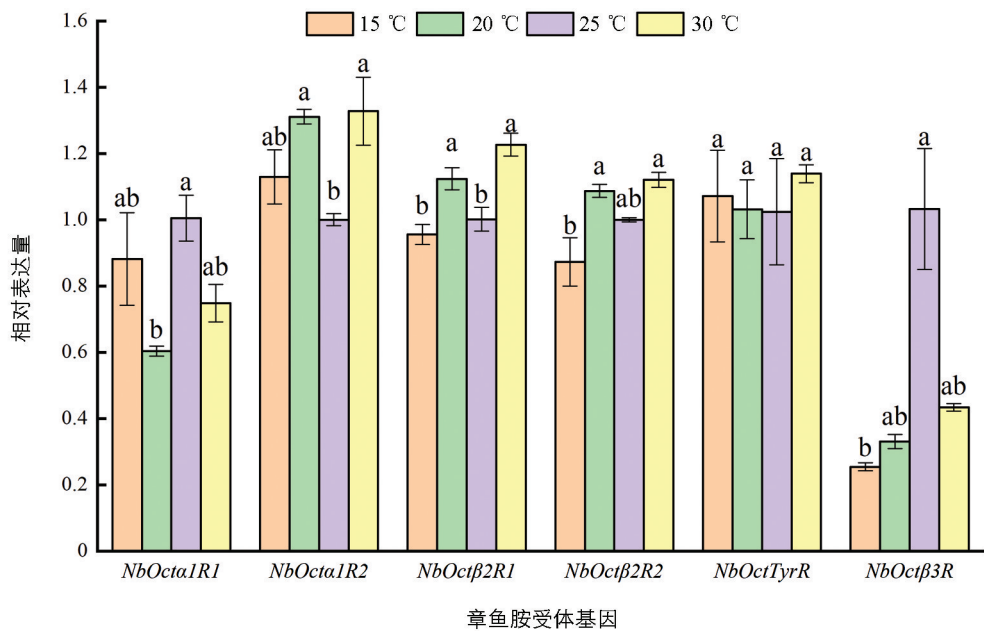


图 5 温度对巴氏新小绶螨幼螨章鱼胺受体基因的影响

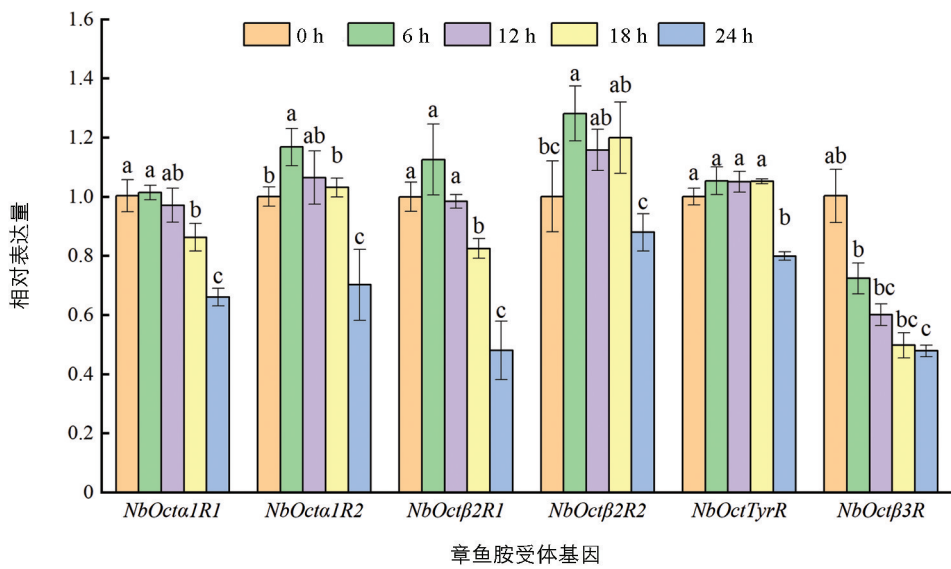


图 6 饥饿胁迫下巴氏新小绶螨章鱼胺受体基因的表达水平

3 讨论

章鱼胺对特定器官或细胞的调控依赖于细胞膜上的章鱼胺受体传递神经信号。随着研究的不断深入,越来越多的章鱼胺受体在不同的昆虫物种中得到鉴定,依据结构和信号传递方式将章鱼胺受体分为 3 类:肾上腺素能 α 受体(α -adrenergic-like octopamine receptors),肾上腺素能 β 受体(β -adrenergic-like octopamine receptors)和章鱼胺酪胺受体(octopamine/tyramine receptors)^[15]。本研究从巴氏新小绶螨(*N. barkeri*)转录组数据库中鉴定到 6 个章鱼胺受体基因,分别为 *NbOcta1R1*, *NbOcta1R2*, *NbOctTyrR*, *NbOctβ2R1*, *NbOctβ2R2*, *NbOctβ3R*, 其中肾上腺素能 β 受体 OARs 家族有 2 类(*NbOctβ2R* 和 *NbOctβ3R*),未发现 Octβ1R 类受体,这与果蝇(*Drosophila*)^[16]肾上腺素能 β 受体家族拥有 Octβ1R, Octβ2R 和 Octβ3R 共 3 类受体不同,同时意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*)肾上腺素能 β 受体家族存在第 4 类受体基因 *AmOctβ4R*^[17],这表明不同昆虫的章鱼胺受体存在种间特异性。巴氏新小绶螨章鱼胺受体基因在进化关系

上与西方静走螨最为接近,目前关于西方静走螨章鱼胺受体基因功能的研究较少。在黑腹果蝇(*D. melanogaster*)^[18]、二化螟(*Chilo suppressalis*)^[19]、褐飞虱(*Nilaparvata lugens*)^[20]的研究中,发现章鱼胺受体均存在两个剪切体,而在巴氏新小绥螨 Octa1R 类受体基因(*NbOcta1R1*, *NbOcta1R2*), Octβ2R 受体基因(*NbOctβ2R1*, *NbOctβ2R2*)中不存在剪切体,可能是由于不同昆虫的章鱼胺受体的功能存在差异。

昆虫中不同基因在不同组织和发育阶段的表达量存在差异,还受多种外界因素的影响,这与其功能息息相关。本研究结果表明巴氏新小绥螨 6 个章鱼胺受体基因在不同螨态均有表达,且在幼螨和若螨中表达水平较高,这与黑腹果蝇 *DmOctβR1* 在幼虫中高表达相似^[21]。其他昆虫也有相似结果,赤拟谷盗^[7]、棉铃虫^[8]、二化螟^[22]体内 *OctβR2* 在不同发育阶段均有所表达,尤其在幼虫期高表达。本研究结果表明巴氏新小绥螨章鱼胺受体基因 *NbOcta1R1*, *NbOcta1R2*, *NbOctTyrR*, *NbOctβ2R2* 可能在幼螨阶段发挥着重要的作用, *NbOctβ2R1* 可能在若螨阶段发挥着重要的作用,这可能与不同发育阶段独特的生活习性相关。除在幼螨和若螨中高表达外, *NbOctβ3R* 在卵中表达水平也较高,这与黑腹果蝇 *DmOctβ2R* 表达模式相似^[23],推测 *NbOctβ3R* 可能具有诱导虫体产卵和促进卵发育的重要作用。此外,温度、药剂胁迫等外界条件的改变会引起昆虫体内章鱼胺含量的改变,有研究发现赤拟谷盗章鱼胺的含量随着温度的变化发生改变^[24]。本研究结果表明成螨中 *NbOctβ3R* 受高温影响大,在 35 ℃ 时表达量最高,其所调控的功能可能受到高温的影响而增强,而其他基因的表达量在 15 ℃ 和 35 ℃ 下均较低,表明高温和低温很可能会减弱基因调控的功能;而在幼螨中, *NbOctβ2R1*, *NbOctβ2R2* 在 15 ℃ 下的表达量显著低于 35 ℃ 下的表达量($p < 0.05$),表明低温可能会抑制基因的表达,高温可能会增强基因的表达。在对巴氏新小绥螨进行饥饿胁迫后发现,6 个章鱼胺受体基因在 24 h 的表达量都最低, *NbOcta1R2* 在 6 h 的表达量显著高于 0 h($p < 0.05$)。有研究发现果蝇在饥饿条件下,体内章鱼胺(OA)含量升高,机能亢进,虫体活动能力增强^[25],黑腹果蝇中 *DmOctβ2R* 已被证明对昆虫运动行为具有重要的调控作用^[26]。由此推测饥饿胁迫 6 h 时引起巴氏新小绥螨 OA 水平升高, *NbOcta1R2* 表达量显著上调($p < 0.05$),活动能力增强,有利于寻觅猎物。章鱼胺受体基因在幼螨和若螨阶段总体高表达,受温度和饥饿胁迫影响变化情况存在差异,可能是由于不同的章鱼胺受体基因功能存在差异以及响应外界变化的机制不一。

大量研究表明,章鱼胺受体在特定组织中有特异性功能,后被证实与视觉和嗅觉信息处理有关^[27]。黑腹果蝇输卵管上皮细胞表达的章鱼胺受体 OAMB,参与调控输卵管中卵的运输^[28];美洲大蠊(*Periplaneta americana*)触角中的 *PaOA1* 则与嗅觉功能相关^[29]。然而巴氏新小绥螨体型较小,无法人工解剖分离其器官组织,这就限制了对巴氏新小绥螨不同组织中章鱼胺受体表达模式的研究。本实验仅从转录水平上揭示不同章鱼胺受体基因间表达的差异性,未来还可根据巴氏新小绥螨章鱼胺受体的特异性开发激动剂和拮抗剂,并进行药理学分析,进而研制出可以高效防治害螨并对益螨安全的新型杀虫剂。

参考文献:

- [1] 吴顺凡,郭建洋,黄佳,等. 昆虫体内章鱼胺和酪胺的研究进展 [J]. 昆虫学报, 2010, 53(10): 1157-1166.
- [2] ROEDER T. Octopamine in Invertebrates [J]. Progress in Neurobiology, 1999, 59(5): 533-561.
- [3] NATHANSON J A, GREENGARD P. Octopamine-Sensitive Adenylate Cyclase: Evidence for a Biological Role of Octopamine in Nervous Tissue [J]. Science, 1973, 180(4083): 308-310.
- [4] ARAKAWA S, GOCAYNE J D, MCCOMBIE W R, et al. Cloning, Localization, and Permanent Expression of a *Drosophila* Octopamine Receptor [J]. Neuron, 1990, 4(3): 343-354.
- [5] DACKS A M, CHRISTENSEN T A, AGRICOLA H J, et al. Octopamine-Immunoreactive Neurons in the Brain and Subesophageal Ganglion of the Hawkmoth *Manduca sexta* [J]. The Journal of Comparative Neurology, 2005, 488(3): 255-268.
- [6] ROTTE C, KRACH C, BALFANZ S, et al. Molecular Characterization and Localization of the First Tyramine Receptor of the American Cockroach (*Periplaneta americana*) [J]. Neuroscience, 2009, 162(4): 1120-1133.
- [7] 刘小强,蒋红波,李慧敏,等. 赤拟谷盗章鱼胺受体 3(*TcOctβR3*)cDNA 克隆、表达及功能 [J]. 中国农业科学, 2018, 51(7): 1315-1324.
- [8] 吴凤明,巫鹏翔,王璇,等. 棉铃虫章鱼胺受体 2 基因的分子鉴定 [J]. 应用昆虫学报, 2016, 53(5): 972-981.

- [9] 殷伯海, 马凤. 双甲脒及其代谢产物的高效液相色谱分析 [J]. 色谱, 1985, 3(2): 117-120.
- [10] 吴伟南, 欧剑峰, 黄静玲. 中国动物志 [M]. 北京: 北京科学出版社, 2009.
- [11] 徐学农, 吕佳乐, 王恩东. 捕食螨繁育与应用 [J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(5): 647-656.
- [12] 徐学农, 吕佳乐, 王恩东. 捕食螨在中国的研究与应用 [J]. 中国植保导刊, 2013, 33(10): 26-34.
- [13] WANG C, YANG J, PAN Q, et al. Screening of Reference Genes Using Real-Time Quantitative PCR for Gene Expression Studies in *Neoseiulus barkeri* Hughes (Acari: Phytoseiidae) [J]. Bulletin of Entomological Research, 2019, 109(4): 443-452.
- [14] LIVAK K J. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [15] HUANG J, HAMASAKI T, OZOE Y. Pharmacological Characterization of a *Bombyx mori* Alpha-Adrenergic-Like Octopamine Receptor Stably Expressed in a Mammalian Cell Line [J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2010, 73(2): 74-86.
- [16] OHHARA Y, KAYASHIMA Y, HAYASHI Y, et al. Expression of β -Adrenergic-Like Octopamine Receptors during *Drosophila* Development [J]. Zoological Science, 2012, 29(2): 83-89.
- [17] BALFANZ S, JORDAN N, LANGENSTÜCK T, et al. Molecular, Pharmacological, and Signaling Properties of Octopamine Receptors from Honeybee (*Apis mellifera*) Brain [J]. Journal of Neurochemistry, 2014, 129(2): 284-296.
- [18] BALFANZ S, STRÜNKER T, FRINGS S, et al. A Family of Octopamine Receptors that Specifically Induce Cyclic AMP Production or Ca^{2+} Release in *Drosophila melanogaster* [J]. Journal of Neurochemistry, 2005, 94(4): 1168.
- [19] WU S F, XU G, QI Y X, et al. Two Splicing Variants of a Novel Family of Octopamine Receptors with Different Signaling Properties [J]. Journal of Neurochemistry, 2014, 129(1): 37-47.
- [20] WU S F, JI X M, HUANG J M, et al. Molecular Features and Expression Profiles of Octopamine Receptors in the Brown Planthopper, *Nilaparvata lugens* [J]. Pest Management Science, 2019, 75(10): 2663-2671.
- [21] EL-KHOLY S, STEPHANO F, LI Y, et al. Expression Analysis of Octopamine and Tyramine Receptors in *Drosophila* [J]. Cell and Tissue Research, 2015, 361(3): 669-684.
- [22] WU S F, YAO Y, HUANG J, et al. Characterization of a β -Adrenergic-Like Octopamine Receptor from the Rice Stem Borer (*Chilo suppressalis*) [J]. The Journal of Experimental Biology, 2012, 215(15): 2646-2652.
- [23] 许静静, 常永梅, 任梦圆, 等. 豌豆蚜可溶型海藻糖酶基因克隆及 RNA 干扰效应 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2022, 44(11): 88-98.
- [24] HIRASHIMA A, NAGANO T, ETO M. Stress-Induced Changes in the Biogenic Amine Levels and Larval Growth of *Tribolium castaneum* herbst [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1993, 57(12): 2085-2089.
- [25] YANG Z, YU Y, ZHANG V, et al. Octopamine Mediates Starvation-Induced Hyperactivity in Adult *Drosophila* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(16): 5219-5224.
- [26] KOON A C, BUDNIK V. Inhibitory Control of Synaptic and Behavioral Plasticity by Octopaminergic Signaling [J]. 2012, 32(18): 6312-6322.
- [27] CHAIMANEE V, PETTIS J S. Gene Expression, Sperm Viability, and Queen (*Apis mellifera*) Loss Following Pesticide Exposure under Laboratory and Field Conditions [J]. Apidologie, 2019, 50(3): 304-316.
- [28] LU H, LEUNG H, WANG N, et al. Role of Ca^{2+} /Calmodulin-Dependent Protein Kinase II in *Drosophila* Photoreceptors [J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(17): 11100-11109.
- [29] ZHUKOVSKAYA M I. Modulation by Octopamine of Olfactory Responses to Nonpheromone Odorants in the Cockroach, *Periplaneta americana* L [J]. Chemical Senses, 2012, 37(5): 421-429.