

分类号: Q965;Q966
密 级: 无

单位代码: 10335
学 号: 21316101

浙江大学

硕士学位论文



甲脒类杀虫剂分子靶标的探索研究

A study on molecular target of formamidines

申请人姓名: 武亚苏

指导教师: 黄佳 副教授

叶恭银 教授

专业名称: 植物保护

研究方向: 农业昆虫与害虫防治

所在学院: 农业与生物技术学院

论文提交日期: 二〇一六年六月

甲脒类杀虫剂分子靶标的探索研究



论文作者签名: _____

指导教师签名: _____

论文评阅人: 双向隐名评阅

答辩委员会主席: 俞晓平 教授 中国计量大学

委员: 万方浩 研究员 中国农业科学院

张传溪 教授 浙江大学

陈学新 教授 浙江大学

叶恭银 教授 浙江大学

答辩日期: 二〇一六年六月九日

A study on molecular target of formamidines



Author signature: Yasu Wu

Supervisor signature: Jia Huang

Thesis reviewer: Anonymous

Chair: Prof. Xiaoping Yu, Chinese Jiliang University

Prof. Fanghao Wan, Chinese Academy of

Committeeman: Agricultural Sciences

Prof. Chuanxi Zhang, Zhejiang University

Prof. Xuexin Chen, Zhejiang University

Prof. Gongyin Ye, Zhejiang University

Date of Oral Defence: 9 June, 2016

浙江大学研究生学位论文独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得浙江大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名：

签字日期： 年 月 日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解浙江大学有权保留并向国家有关部门或机构送交本论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权浙江大学可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索和传播，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

（保密的学位论文在解密后适用本授权书）

学位论文作者签名：

签名：

签字日期： 年 月 日

签字日期： 年 月 日

本研究承蒙

国家自然科学基金

(批准号: 31572039)

国家高技术研究发展计划

(863 计划, 批准号: 2011AA10A204)

国家自然科学基金创新研究群体基金

(批准号: 31321063)

资助

致 谢

时间如光似箭，转瞬即逝，三年的浙江大学研究生生活马上就要结束了。犹记得刚入学时青涩懵懂的自己，而今已成长成熟许多。三年的时间里，我学到的不仅是学科知识、实验技能，更学到了为人处事的道理与准则。我的硕士论文能够顺利完成，得益于导师、同学、朋友及家人的帮助和鼓励。在这里，向所有关心帮助我的老师、同学、朋友和家人致以最诚挚的谢意。

本论文的工作是在导师黄佳副教授和叶恭银教授的悉心指导和关怀下完成的。黄佳老师才思敏捷，积极进取，务实创新且平易近人，每当我在实验中遇到困难，都会去寻求黄老师的帮助指点。在他的耐心指导下我的实验思维方式和实验技能都有所提升。叶老师学识渊博，治学严谨且勤奋忘我。思维清晰敏捷，后人多不敢望其项背。更重要的是叶老师把实验室的兄弟姐妹当成自己的孩子般教导提携，不仅授予我们立于世的技能，更以身作则，授予我们立于世的道理和准则，是我辈学习的榜样。正是在两位优秀的老师谆谆教导和无私帮助下，我从一个迷茫的本科生长为一个积极认真，踏实自信的研究生。恩师如灯塔，他们身上的优良品质，将会一直鼓舞指引我前行。本课题组的姚洪渭副教授和方琦老师在实验的推进中也给予了很多帮助和关心，在此郑重的向他们道一声谢谢！

在我的实验和论文写作中，还得到了多方的支持和帮助。首先，我要衷心感谢我的师姐齐易香，她踏实认真，聪明勤奋，有高超的实验技能和严格务实的实验态度，在我的实验实施和论文写作构思方面给予了莫大的帮助。感谢徐刚师兄，徐刚师兄积极进取，勤勉谦逊，乐于助人，在将自己的实验做好的同时，总会在第一时间向需要帮助的同学伸出援手，也给予我很多帮助。此外，我要感谢实验室的其他兄弟姐妹，包括已经毕业的师姐夏仁英、刘玉娥、刘洋，师兄巨青松、韩乃顺、朱宇、卢增斌。在读的博士生王飞、汪芳、严智超、滕子文、王前进、贾文茜、杨蕾、肖山、毛芬、熊时姣、王嘉乐，在读的硕士生宁铎、顾桂香、陈力鹏、杜玉萍、陈晓昂、王蓓蓓、方少亮、党聪、黄天宇、常学飞、王龙、李晶晶，感谢我的室友易汀、吕务云、杨咏研三年的陪伴和关照。此外还要感谢杨小航老师实验室赠予的果蝇和给予的帮助。感谢昆虫所师生对我的帮助和关心。除此之外，我要感谢我的家人，一直以来对我的支持和鼓励。

最后，向所有关心，支持，帮助和鼓励我的老师、同学、朋友、家人致以最诚挚的谢意和最真诚的祝福！同时向参加论文评阅及答辩委员会的各位专家、教授致以诚挚的谢意！

武亚苏

2016年4月 于浙江大学启真湖畔

摘 要

甲脒类杀虫剂是一类广谱型杀虫剂,包括杀虫脒、双甲脒等,由于对螨虫具有很好的防治效果而被广泛应用。科学家通过体内的生理学和药理学实验研究,发现该类杀虫剂特异的作用于昆虫的章鱼胺(Octopamine, OA)受体。但昆虫体内的章鱼胺受体有 OA1, OA2 和 OA3 三个家族,其对应的下游信号通路也不同,具体是哪一类或哪几类受体在发挥作用,目前还不清楚。明确该类杀虫剂的作用机制,可以为以章鱼胺受体为靶标的农药开发设计和合成提供依据。

甲脒类杀虫剂可被用于防治二化螟等鳞翅目害虫,对二化螟有较高的毒力,而其对果蝇的毒力却很低,产生这种差异效应的机制还不清楚。本实验室于 2013 年从二化螟 *Chilo suppressalis* 体内克隆得到了一类新的 OA 受体基因,并将其命名为 *CsOA3*, 药理学实验发现该类受体可以被很低浓度的杀虫脒 ($EC_{50}=2.15\times 10^{-11}$ M) 和双甲脒 ($EC_{50}=8.39\times 10^{-11}$ M) 特异的激活,预测它可能是甲脒类杀虫剂的作用靶标。本研究从果蝇 *Drosophila melanogaster* 体内克隆得到了编码 *CsOA3* 受体基因的同源基因 *CG18208*, 将其命名为 *DmOA3*。药理学实验发现,果蝇体内的该类受体也可以被双甲脒 ($EC_{50}=2.74\times 10^{-8}$ M) 和杀虫脒 ($EC_{50}=2.31\times 10^{-8}$ M) 特异的激活,但 EC_{50} 值明显低于二化螟,于是我们猜测甲脒类杀虫对二化螟和果蝇毒力的差异是由靶标生物的药理学差异引起的。

因为鳞翅目昆虫血淋巴中含有很多的核酸酶,很难通过 RNAi 的方式研究甲脒类杀虫剂具体作用于二化螟的哪一类 OA 受体。于是,我们将二化螟的 OA 受体基因转入果蝇体内,通过转基因果蝇生物毒力测定的方法研究甲脒类杀虫剂的具体分子靶标。这种“功能获得型”的研究方法更能明确的验证是哪一类受体的激活导致了致死效应。

1 果蝇 *DmOA3* (*CG18208*) 的信号通路和药理学研究

为了研究 *DmOA3* 偶联的信号通路以及药理学性质,从果蝇体内克隆得到了编码 *DmOA3* 的 ORF 全长,并构建到 pcDNA3 载体中。将融合质粒 pcDNA3-*CG18208* 转染于 HEK-293 细胞中,通过筛选获得了稳定表达该受体的细胞系。研究发现 OA 和 TA 均可以降低由 forskolin 升高的胞内 cAMP 的水平,且 OA 的抑制效率高于 TA,说明 *DmOA3* 在胞内偶联 G_i 蛋白。进一步测定了双

甲脒和杀虫脒对表达 DmOA3 细胞的影响, 结果显示, 双甲脒和杀虫脒浓度在 10^{-8} M 能引起胞内 cAMP 的显著下降, 我们推测双甲脒和杀虫脒在果蝇体内的作用靶标可能是 OA3 受体。

2 转基因果蝇品系的构建及验证

从二化螟体内克隆得到 *CsOA1*、*CsOA2B2* 和 *CsOA3* 三类章鱼胺受体基因的 cDNA 全长, 并将其构建到 pUAST 质粒中。通过显微注射的方法导入野生果蝇 (*w¹¹¹⁸*) 体内, 转基因果蝇经过平衡定位后, 分别和 *Elav-Gal4* 和 *24B-Gal4* 果蝇品系进行杂交, 获得可以表达目的基因的杂交果蝇。通过基因组 PCR 和 RT-PCR 的方法对杂交果蝇的 F₁ 代进行验证, 实验结果表明, *UAS-CsOA* 果蝇品系和 *Gal4* 果蝇品系杂交得到的 F₁ 代果蝇, 可以稳定表达二化螟章鱼胺受体基因。

3 双甲脒对转基因果蝇毒力的测定

以 *UAS-CsOA* 和 *Elav-Gal4*、*24B-Gal4* 杂交果蝇的 F₁ 代为研究对象, 用点滴法研究并计算双甲脒对被测试果蝇的 LC₅₀ 值。结果显示, 转入二化螟章鱼胺受体后, 果蝇对双甲脒的敏感性均有所提高。其中, 双甲脒对 *Elav-Gal4>UAS-CsOA* 果蝇品系的 LC₅₀ 值比对 *24B-Gal4>UAS-CsOA* 果蝇品系的 LC₅₀ 值低。鉴于 *Elav-Gal4* 在果蝇的神经组织中特异的表达, 而 *24B-Gal4* 在果蝇肌肉组织中特异的表达, 于是我们认为果蝇体内在神经组织表达的受体对双甲脒可能更敏感。通过比较不同的 CsOA 受体发现, 双甲脒对 *Elav-Gal4>UAS-CsOA3* 果蝇品系的 LC₅₀ 值最低, 说明该品系对双甲脒有较高的敏感性, 于是我们推测双甲脒可能主要作用于二化螟的 OA3 受体。

关键词: 甲脒类杀虫剂; 转基因果蝇; 章鱼胺受体; 靶标; 毒力测定

Abstract

Formamidines are broad-spectrum insecticides including chlorodimeform and amitraz. This kind of pesticide has been widely used as excellent acaricide. Through the physiology and pharmacology experiments, scientists learned that formamidines specially act on octopamine receptors. But there are three octopamine families in insects which correspond to different downstream signaling pathways. It is not clear which one or several octopamine receptors are the exactly receptor formamidines act on. Clarity the mechanism of formamidines can provide basis for design and synthesis pesticide acting on octopamine receptors.

By the biological toxicity measurement we learned that formamidines pesticide have a high toxicity to *Chilo suppressalis* while a relatively low toxicity to *Drosophila melanogaster*, the mechanism of these differential effects is not clear yet. Our laboratory has cloned a new octopamine gene from *Chilo suppressalis* in 2013 and named it as *CsOA3*. Pharmacological experiments showed *CsOA3* receptor can be specifically activated by chlorodimeform ($EC_{50}=2.15\times 10^{-11}$ M) and amitraz ($EC_{50}=8.39\times 10^{-11}$ M) in very low concentration, and been predicted of the target of formamidine pesticide. The study cloned a homologous gene of *CsOA3* from *Drosophila melanogaster*, *CG18208* and named it as *DmOA3*. Pharmacological experiments showed the receptor can also be activated by amitraz ($EC_{50}=2.74\times 10^{-8}$ M) and chlorodimeform ($EC_{50}=2.31\times 10^{-8}$ M), but the EC_{50} value was significantly lower than that of *Chilo suppressalis*, so we guess that is the reason why formamidines pesticide have high toxicity to *Chilo suppressalis* than to *Drosophila melanogaster*.

Because there contains a lot of nuclease in Lepidoptera insects hemolymph, making it hard to study the exactly octopamine receptor of formamidines pesticide in *Chilo suppressalis*. Then, we transferred the *Chilo suppressalis* octopamine receptor genes to *Drosophila melanogaster*, and study the formamidines pesticide target with the biological toxicity measurement of transgene fruit fly. Through the gain-of-function research method, we can more explicitly verify the receptor leading

to death.

1 Signaling and pharmacolgy of *DmOA3* (CG18208) in the fruit fly, *D. melanogaster*

In order to study the signaling and pharmacolgy of *DmOA3*, we cloned the full length ORF of *DmOA3* and constructed it into pcDNA3. The fusion plasmid pcDNA3-CG18208 were transfected into HEK-293 cells, screening cell lines stably expressing the receptor. The results showed that both OA and TA could decrease the level of intracellular cAMP increased by forskolin, and the inhibition efficiency of OA was higher than that of TA, stating that *DmOA3* coupling of G_i protein in the intracellular. We measured the effects on cells expressing *DmOA3* with amitraz and chlorodimeform, and learned that both of amitraz and chlorodimeform could significantly decrease the intracellular cAMP level at 10^{-8} M, based on which we speculated OA3 receptor was the target of amitraz and chlorodimeform in fruit fly.

2 Construction and validation of transgenic fruit fly, *D. melanogaster*

We cloned *CsOA1*, *CsOA2B2* and *CsOA3* from *Chilo suppressalis* and constructed them into pUAST plasmid, micro-injecting the plasmid into wild fruit fly (w^{1118}). In order to obtain the hybrid flies expressing target gene, making transgenic fruit fly cross with *Elav-Gal4* and *24B-Gal4* fly lines respectively after balancing and locating them. Verify the hybrid flies offspring(F_1) with PCR and RT-PCR. The results showed the flies of F_1 generation crossing *UAS-CsOA* and *Gal4* could expressing the octopamine receptor genes of *Chilo suppressalis*.

3 Determination of amitraz toxicity in transgenic fruit fly, *D. melanogaster*

Taking F_1 generation of hybrid flies from crossing *UAS-CsOA* with *Elav-Gal4* and *24B-Gal4* as study subject, we studied and counted the LC_{50} of amitraz to transgenic fruit fly with micro-drop method. The fruit fly showed more sensitive to amitraz after transferred the *Chilo suppressalis* octopamine receptor genes, and the LC_{50} of amitraz to *Elav-Gal4>UAS-CsOA* was smaller than it to *24B-Gal4>UAS-CsOA*. As *Elav-Gal4* specially expressing in the nervous tissue of fruit fly whereas *24B-Gal4* specially expressing in the muscle, we deemed that receptors expressing in the nervous tissue was more sensitive to amitraz. Furthermore,

the LC_{50} of amitraz to *Elav-Gal4>UAS-CsOA3* was the smallest among all the fruit fly lines, so we speculated the amitraz may mainly acting on OA3 receptor of *Chilo suppressalis*.

Key words: formamidines, transgenic fruit fly, octopamine receptor, target; toxicity test.

目 录

致 谢.....I

摘 要.....I

Abstract.....III

第一章 综述.....1

 1 昆虫体内的章鱼胺受体研究进展.....1

 1.1 引言.....1

 1.2 合成与分解.....1

 1.3 分布.....4

 1.4 再摄取.....4

 1.5 生理功能及作用机制.....5

 1.6 受体.....6

 1.7 展望.....10

 2 甲脒类杀虫剂概况.....11

 2.1 甲脒类杀虫剂简介.....11

 2.2 甲脒类杀虫剂特点.....12

 2.3 甲脒类杀虫剂作用机制.....13

 3 转基因果蝇的构建.....15

 3.1 果蝇简介.....15

 3.2 果蝇遗传学简介.....15

 3.3 转基因果蝇模型的建立.....16

 3.4 果蝇 GAL4/UAS 异位表达系统.....20

 3.5 展望.....22

第二章 *CG18208* 的信号通路和药理学研究.....23

 1 引言.....23

 2 材料与方法.....23

 2.1 供试昆虫.....23

 2.2 RNA 抽提.....24

 2.3 克隆 *CG18208* cDNA 序列全长.....25

2.4 PCR 产物的纯化.....25

2.5 目的片段与克隆载体连接.....26

2.6 连接产物的转化.....26

2.7 转化子的鉴定和测序.....27

2.8 质粒抽提.....27

2.9 pcDNA3-CG18208 融合质粒的构建.....27

2.10 细胞培养及转染.....28

2.11 cAMP 测定.....29

3 结果与分析.....30

3.1 *DmOA3* cDNA 序列分析.....30

3.2 *DmOA3* (CG18208) 偶联胞内 cAMP 测定结果.....36

4 讨论.....40

第三章 转二化螟章鱼胺受体基因果蝇的构建及验证.....41

1 引言.....41

2 材料和方法.....41

2.1 供试昆虫.....41

2.2 RNA 抽提.....41

2.3 基因克隆.....42

2.4 PCR 产物的纯化、目的片段与克隆载体连接及连接产物的转化...42

2.5 转化子的鉴定和测序.....42

2.6 质粒抽提.....43

2.7 pUAST-*CsOA* 表达载体的构建.....43

2.8 反应产物转化、涂板.....44

2.9 克隆鉴定和测序.....44

2.10 质粒抽提.....44

2.11 果蝇胚胎的显微注射.....45

2.12 注射后的培养.....47

2.13 转基因果蝇的筛选、平衡、定位.....47

2.14 转基因果蝇的纯合.....47

2.15 果蝇品系的杂交.....48

2.16 PCR 验证.....48

2.17 RT-PCR 验证.....50

3 结果和分析.....51

3.1 二化螟章鱼胺受体基因的分析.....51

3.2 质粒构建的结果与分析.....51

3.3 显微注射结果.....52

3.4 杂交果蝇的 PCR 验证结果及分析.....53

3.5 果蝇品系杂交后的 RT-PCR 结果及分析.....53

4 讨论.....54

第四章 双甲脒对转二化螟章鱼胺受体基因果蝇毒力的测定.....55

1 引言.....55

2 材料和方法.....55

2.1 实验材料.....55

2.2 实验方法.....56

3 结果与分析.....58

4 讨论.....59

总 结.....61

2 本研究存在的问题.....61

3 今后的研究方向.....62

参考文献.....63

作者简历.....76

第一章 综述

1 昆虫体内的章鱼胺受体研究进展

1.1 引言

章鱼胺 (Octopamine, OA) 是无脊椎动物体内特有的生物胺, 它是脊椎动物体内去肾上腺素 (Noradrenaline, NE) 的同类物, 化学结构为对-羟苯- β -羟乙胺, 因 1951 年由前苏联科学家 Espamer 和 Boretti 在真蛸 *Octopus vulgaris* 的唾液腺体中发现而得名(Erspermer and Boretti, 1951)。自 OA 被发现以来, 多名研究者对其进行了研究并获得诺贝尔奖, 他们在 OA 受体 (Octopamine receptor, OAR) 的识别研究(Saavedra *et al.*, 1974; Evans, 1981; Nathanson and Greengard, 1973)、线虫体内 OA 的功能研究(Horvitz *et al.*, 1982)和脊椎动物体内痕量生物胺研究(Axelrod and Saavedra, 1977)等领域取得突破进展。科学家们研究发现 OA 参与生物体多种生命活动, 包括昆虫的昼夜节律(Crocker *et al.*, 2010)、好斗和飞行(Barron *et al.*, 2007, Zhou *et al.*, 2008)、内分泌(Roeder, 1999)、学习以及记忆(Mizunami *et al.*, 2009)等。它主要通过特异性 OA 受体结合, 调节胞内钙离子 (Ca^{2+}) 水平或环腺苷酸 (Cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 浓度发挥作用(Blenau and Baumann, 2001; Nathanson and Greengard, 1973)。脊椎动物体内的去肾上腺素与昆虫体内的章鱼胺功能类似, 但二者受体的药理学特性却有一定区别。据此我们可以知道 OA 受体是一种选择性的作用靶标, 对 OA 受体药理学特性的研究也因而备受关注(吴顺凡等, 2010)。

1.2 合成与分解

昆虫体内的章鱼胺与脊椎动物体内的去肾上腺素不仅功能相似, 分子结构也只有一个羟基的差别。二者都是以酪氨酸 (Tyr) 为底物, 经过一系列的酶促反应生成。首先, Tyr 在酪氨酸羟化酶 (TH) 的作用下生成多巴 (DOPA), 接着 DOPA 在多巴脱羧酶 (DDC) 作用下生成多巴胺 (Dopamine, DA), DA 在多巴胺羟化酶 (D β H) β -羟基化作用下生成去肾上腺素 NE, NE 在苯乙醇胺-N-甲基转移酶作用下可进一步生成肾上腺素 (Adrenaline, AE)。该条合成通路主要发生在脊椎动物体内。另一条合成通路中, Tyr 经酪氨酸脱羧酶 (TDC) 脱羧基作用生成酪胺 (Tyramine, TA), TA 在酪胺 β -羟化酶 (T β H) 作用下生成 OA(Cazzamali

et al., 2005)。如果生物体内没有酪氨酸脱羧酶 (TDC)，还有一些补救途径来合成 OA(Roeder, 2005) (图 1.1)。

TDC 和 T β H 是 OA 合成过程中关键的中间酶，迄今为止，只在果蝇和线虫 (Alkema *et al.*, 2005)体内克隆到了编码 TDC 的基因。果蝇中存在两个编码 TDC 的基因，它们均能催化 Tyr 生成 TA，而表达模式却不相同。其中的 TDC1 主要表达于非神经系统，而 TDC2 则在神经组织中有较高的表达量(Cole *et al.*, 2005)。OA 合成过程中 T β H 作为关键的限速酶，已经在包括果蝇、蟑螂、蜜蜂、和烟草天蛾等多种昆虫体内克隆得到(Monastirioti *et al.*, 1996; Lehman *et al.*, 2000; Lehman *et al.*, 2006)。

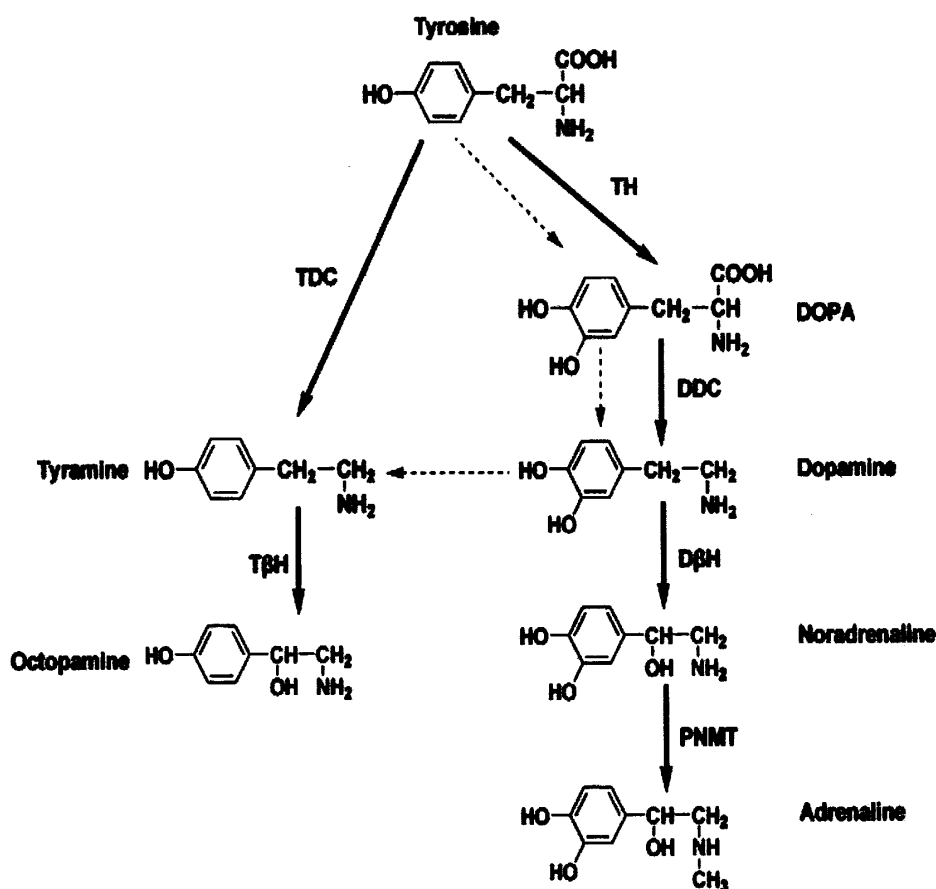


图 1.1 生物体内由酪氨酸生成不同生物胺的合成途径

Fig. 1.1 The biosynthetic pathway from tyrosine leads to the production of different biogenic catecholamines and phenolamine

Tyrosine: 酪氨酸; Tyramine: 酪胺; Octopamine: 章鱼胺; DOPA: 多巴; Dopamine: 多巴胺; Norpinephrine: 去肾上腺素; Adrenaline: 肾上腺素; TDC, 酪氨酸脱羧酶 tyrosine decarboxylase; TβH, 酪胺 β-羟化酶 tyramine β-hydroxylase; TH, 酪氨酸羟化酶 tyrosine hydroxylase; DDC, 多巴脱羧酶 dopa decarboxylase; DβH, 多巴胺 β-羟化酶 dopamine β-hydroxylase; PNMT, 苯乙醇胺-N-甲基转移酶 phenylethanolamine N-methyltransferase (吴顺凡, 2013)

1.3 分布

章鱼胺最早在章鱼的唾液腺体中发现(Erspamer and Boretti, 1951), 后来发现它在无脊椎动物如节肢动物、软体动物等的各种组织中也大量存在(Orchard *et al.*, 1982)。科学家们在昆虫的神经和血液中都发现了 OA, 如: 美洲大蠊的头部和血液(Harmar and Horn, 1977), 果蝇的头部中枢神经系统(Stevenson and Sporhase-Eichmann, 1995), 蝗虫的脑部中枢神经系统(Seyfarth *et al.*, 1993)、血液(Harris-Warrick and Kravitz, 1984)和胸神经索(Massry *et al.*, 1989), 蜜蜂脑中中枢神经系统等(Swart *et al.*, 1993; Orchard and Lange, 1985)。Roeder 对 OA 在昆虫神经中的分布情况做了详尽的描述(Roeder *et al.*, 2003), 他发现蝗虫体内含有 OA 的神经元约有 100 个, 而果蝇成虫神经系统中则只有约 40 个, 它们分布在果蝇的脑、胸部和腹部的神经元中, 他还发现果绳幼虫脑部没有章鱼胺神经元(Roeder, 2005; Stern, 1999)。2009 年, Busch 等通过免疫组织化学染色等方法, 找到了果绳成虫脑部 27 种独特的 OA 神经元(Busch *et al.*, 2009)。大部分的神经元有明显的树突和突触前结构, 并且树突大都存在于大脑的特定区域。因为每个神经元的作用对象都不同, 且它们都集中分布在 CNS 内, 所以它们构成了一个整体, 并被分配到不同的神经中行使相应的功能。

1.4 再摄取

昆虫体内, 当 OA 完成生理作用后就需要被终止, 它最主要的被终止方式是被重吸收进入突触前结构(Donly and Caveney, 2005)。这个过程需要特异的神经递质转运体 (Neurotransmitter transporters) 来实现, 生物胺完成自己的作用后, 将被存在于细胞质膜上的转运体蛋白移除。脊椎动物的转运体体系被研究的较多, 它们是一些糖蛋白, 含 12 个跨膜结构域 (Transmembrane domains), 不同转运体间有较高的序列相似性(Giros *et al.*, 1992; Shafqat *et al.*, 1993)。无脊椎动物体内, 科学家们也已经识别出了 DA(Chen *et al.*, 2006), 5-HT(Corey *et al.*, 1994), OA 和 TA 的转运体(Donly and Caveney, 2005; Malutan *et al.*, 2002)。昆虫体内首个 OA 转运体 (OA transporters, OAT) 是从粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 中克隆得到的。OAT 和 T β H 在神经元中是共表达的, 所以 OAT 存在于含有 OA 的所有神经元中。目前已在鳞翅目、鞘翅目、半翅目等昆虫体内克隆得到了 OAT 基因, 膜翅目和双翅目类昆虫体内却没有发现 OAT(Donly and Caveney, 2005; Lange, 2009)。

在果蝇体内 OA 发挥着重要的生理作用,但果蝇中却不存在相应的 OA 转运体(OAT)基因,因此我们推测在膜翅目和双翅目的昆虫体内存在其它替代途径来完成 OA 的转运,具体的转运方式还有待研究。脊椎动物体内的 AE, NE 和 DA 可以被单胺氧化酶(Monoamine oxidase, MAO)降解(Shih *et al.*, 1999),或者被神经胶质细胞吸收储存,那么昆虫体内是否也存在用来降解 OA 的 MAO 呢,这个问题还存在争议(Roeder, 2005)。昆虫体内的 OAT 在结构和药理学性质上都与脊椎动物的单胺转运体存在差异,因此可把它作为理想的杀虫剂靶标研究(Donly *et al.*, 2007; Malutan *et al.*, 2002)。

1.5 生理功能及作用机制

OA 是无脊椎动物体内重要的神经递质,在生物体内发挥着极其重要的作用(表 1.1)。关于 OA 生理功能的研究最著名的是它在北美萤火虫 *Photinus pyralis* 发光器官中的神经传递作用(Nathanson, 1979)。敲除果蝇体内的 T β H 基因(催化 TA 生成 OA)后,果蝇行为几乎不受影响,只表现为雌性个体不能正常产卵从而不可育,该结果表明 OA 有可能参与了调控输卵管肌肉组织的生理过程(Monastirioti, 2003; Monastirioti *et al.*, 1996)。在昆虫的外围神经系统(Peripheral nervous system, PNS), OA 调控着昆虫体内几乎所有的感觉器官功能以及飞翔肌和外周淋巴器官(脂肪体和血淋巴等)。而在昆虫的中枢神经系统(Central nervous system, CNS)中, OA 则起着调控运动、脱敏、觉醒、学习与记忆以及昼夜节律等生理活动的功能(Farooqui *et al.*, 2003; Stern, 1999; Schwaerzel *et al.*, 2003)。另外, OA 在昆虫的记忆力回复、好斗性、嗅觉识别等方面的生理功能是近年来研究的热点(Farooqui *et al.*, 2003; Roeder, 1999; Schwaerzel *et al.*, 2003; Mizunami *et al.*, 2009)。

已有足够的实验表明, OA 的作用机制是与受体专一性结合,激活 G 蛋白,引发腺苷酸环化酶(Adenylate cyclase, AC)发生级联反应产生环腺苷酸等胞内信号分子,或者引发磷酸肌醇(Inositol phosphate, IP)发生级联反应。

表 1.1 章鱼胺在昆虫体内参与的生物功能
Table 1.1 Biological functions regulated by octopamine in insects

功能 Function	昆虫种类 Species	参考文献 References
产卵 Ovulation	果蝇 <i>D. melanogaster</i>	(Monastirioti, 2003; Monastirioti <i>et al.</i> , 1996; Li <i>et al.</i> , 2015)
发光 Flashing	北美萤火虫 <i>Photinus pyralis</i>	(Nathanson, 1979)
觉醒机理 Arousal mechanism	沙漠蝗 <i>Schistocerca gregaria</i>	(Crocker <i>et al.</i> , 2010; Stern, 1999)
	果蝇 <i>D. melanogaster</i>	
嗅觉 Olfactory processing	蜜蜂 <i>A. mellifera</i>	(Farooqui <i>et al.</i> , 2003; Sun <i>et al.</i> , 2013; Riffell <i>et al.</i> , 2013)
	烟草天蛾 <i>Manduca sexta</i>	
好斗 Aggression	果蝇 <i>D. melanogaster</i>	(Hoyer <i>et al.</i> , 2008; Zhou <i>et al.</i> , 2008)
免疫反应 Immune response	蟋蟀 <i>Gryllus texensis</i>	(Adamo, 2010)
学习和记忆 Learning and memory	蜜蜂 <i>A. mellifera</i>	(Hammer and Menzel, 1995; Hammer and Menzel, 1998; Mizunami <i>et al.</i> , 2009)
	蟋蟀 <i>G. himaculatus</i>	
相变 Phase transition	沙漠蝗 <i>Schistocerca gregaria</i>	(Verlinden <i>et al.</i> , 2010; Rogers <i>et al.</i> , 2004)
争斗与飞行 Fight or flight	果蝇 <i>D. melanogaster</i>	(Roeder, 1999)
调控与信息素识别相关的嗅觉感器 Modulate pheromone-sensitive olfactory sensilla	烟草天蛾 <i>M. sexta</i>	(Flecke and Stengl, 2009)
受精作用 Fertilization	东亚飞蝗 <i>L. migratoria</i>	(Da and Lange, 2008)

1.6 受体

神经递质、神经调质和神经激素都需要通过细胞膜上或细胞内部的受体来传递神经信号。众多膜受体中，最大的受体家族是 G 蛋白偶联受体家族（G-protein-coupled receptors, GPCRs），它有七个跨膜区，可以识别并传递胞外信号，引起细胞内的反应。昆虫体内的 GPCRs 调控着许多重要的生理活动(Hill *et al.*, 2002)，包括外界信号分子，如气味、光以及细胞外的信号分子，如神经递质、Ca²⁺、生物胺等。在不同的物种中 GPCRs 分化成具备不同功能的受体，这也是科研人员在积极研究的一个热点。昆虫体内 GPCRs 调控着多种重要的生理行为，

一直被认为是杀虫剂的潜在靶标,更是吸引了很多的研究者对其进行研究(Lange, 2009)。

1.6.1 信号转导

研究者们已经在多种昆虫中克隆得到了编码 OA 受体的 cDNAs, 包括黑腹果蝇 *D. melanogaster*(Han *et al.*, 1998), 美国大蠊 *Periplaneta americana*(Rotte *et al.*, 2009), 意大利蜜蜂 *A. mellifera*(Blenau *et al.*, 2000)和一些蛾类, 如家蚕 *Bombyx mori*(Chen *et al.*, 2010)和二化螟 *Chilo suppressalis*(Wu *et al.*, 2013)等。伴随着基因组测序技术及分子克隆技术的不断发展前进, 科学家们将克隆得到更多昆虫体内的 OA 受体基因。

OA 受体被激活后会引起胞内第二信使(如 cAMP 和胞内 Ca^{2+})浓度的变化, 它有多种途径改变胞内信号分子的浓度(图 1.2): 一种是结合 G_s 蛋白, G_s 蛋白与质膜上的腺苷酸环化酶(Adenylate cyclase, AC)作用并激活该酶的活性, 导致 ATP 生成 cAMP, 引起胞内 cAMP 浓度升高, 进一步激活蛋白激酶 A (Protein kinase A, PKA)。PKA 能将特定蛋白质的苏氨酸或丝氨酸磷酸化, 而且调控着很多种分子底物特性, 如胞质蛋白, 配体门控型的离子通道等; 另外, 一些受体通过偶联 G_i 蛋白, 降低细胞内的 cAMP 浓度; 还有一种途径是受体偶联 G_q , 引起胞内 Ca^{2+} 浓度发生变化。 G_q 能结合并激活磷脂酶 C (Phospholipase C, PLC), 该酶可以水解磷脂酰肌醇二磷酸(Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate)(一种膜结合底物), 产生两种第二信使——二酰基甘油(Diacylglycerol, DAG)和三磷酸肌醇(Inositol triphosphate, IP3)。其中, IP3 能结合到内质网膜上的门控 Ca^{2+} 通道的特异受体, 使通道打开从而引起胞内 Ca^{2+} 浓度的上升, 通过控制酶或离子通道的活性, Ca^{2+} 在细胞中扮演着重要的角色。此外, Ca^{2+} 通过与多种蛋白(如钙调蛋白, 钙结合蛋白等)的结合, 调控许多蛋白效应器的活化。DAG 能够与 Ca^{2+} 一起激活蛋白激酶 C (Protein kinase C, PKC) 的活性, PKC 和蛋白激酶 A (PKA) 一样, 也能使特定蛋白的丝氨酸和苏氨酸残基磷酸化, 进而改变这些蛋白质的功能(Blenau and Baumann, 2001)。

综上所述, G 蛋白偶联受体的激活可以引起胞内各级信号分子浓度的变化, 且不同的信号途径可能在同一个细胞中被激活, 导致胞内信号的放大或缩小, 从而达到传递信号的目的。

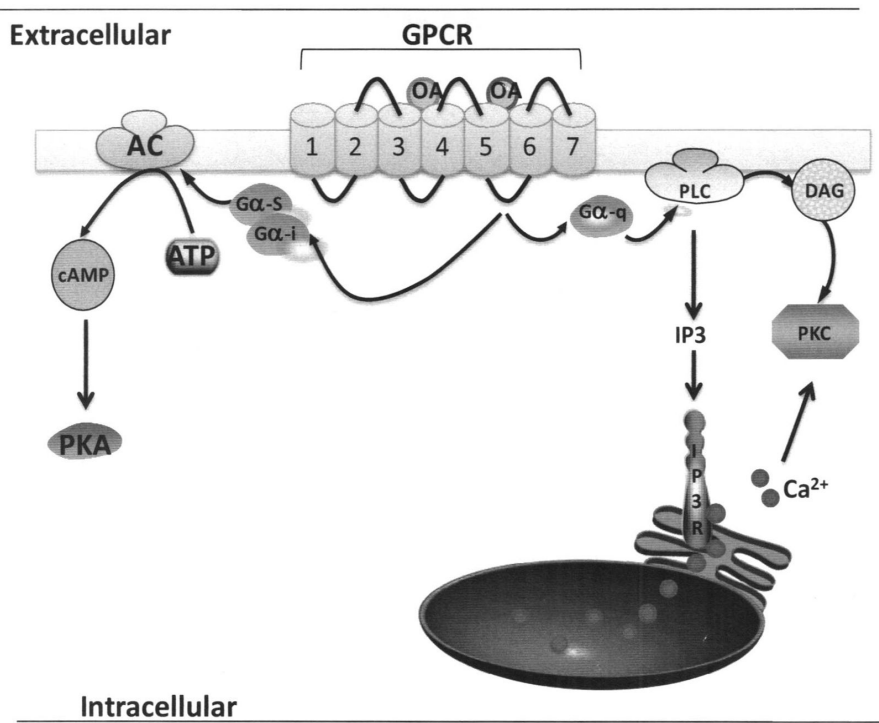


图 1.2 昆虫体内 OA 受体所偶联的信号转导途径

Fig. 1.2 Insect OA receptors coupled to different signaling pathways

AC: 腺苷酸环化酶 adenylyl cyclase; OA: 章鱼胺 octopamine; GPCR: G 蛋白偶联受体 G protein-coupled receptors; PLC: 磷脂酶 C phospholipase C; DAG: 二酰基甘油 diacylglycerol; PKA: 蛋白激酶 A protein kinase A; PKC: 蛋白激酶 C protein kinase C; IP3: 肌醇三磷酸 1,4,5-trisphosphate; IP3-R: 肌醇三磷酸偶联受体 1,4,5-trisphosphate receptors; ER: 内质网 endoplasmic reticulum

1.6.2 受体分类

OA 受体分类时要考虑受体的天然配体以及序列的同源性(Evans and Maqueira, 2005)。2013 年, 本实验室从二化螟 *Chilo suppressalis* 体内克隆得到一类新的 OA 受体, 将其视为新的 OA3 受体家族(Wu *et al.*, 2013)。它在果蝇体内的同源基因为 CG18208。通过构建系统进化树表明, 该类受体和已知的 OA 受体存在差异, 在结构上同人体的 $\alpha 2$ -肾上腺素受体亲缘关系较近。因此, 在以前 OA 受体分类的基础上, 又增加了一类新的受体, 对分类系统进行了补充修订(图 1.3)。

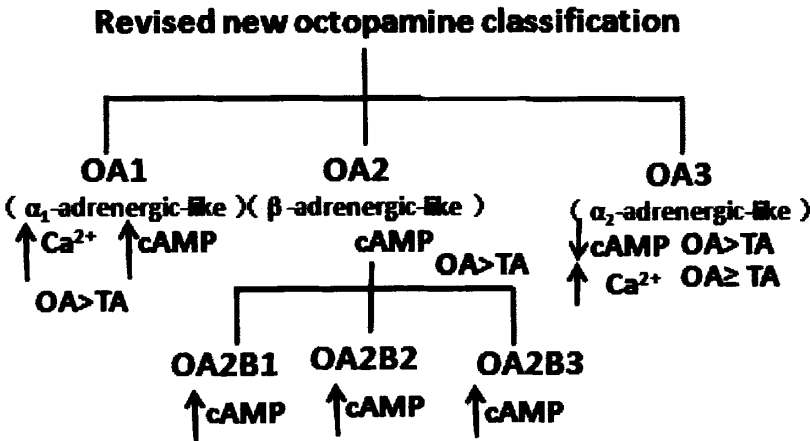


图 1.3 昆虫体内章鱼胺受体分类 (修改自吴顺凡, 2013)

Fig. 1.3 Classification schemes of octopaminergic receptors.

Abbreviations: Ca²⁺: calcium; cAMP: cyclic adenosine monophosphate; OA: octopamine

1.6.3 受体功能

如前面所述, OA 在昆虫体内有很多的生理功能, 但关于哪些受体在完成这些功能方面的研究较少(Farooqui, 2012)。OA 受体的功能研究主要在果蝇中开展。Kim 等在果蝇中通过激活 DmOA1 受体, 完成了调控果蝇对嗅觉奖赏行为的学习和记忆的行为(Kim *et al.*, 2013)。Crocker 通过激活 DmOA1 受体调控了果蝇的觉醒等行为(Crocker *et al.*, 2010)。OA 在昆虫先天免疫行为方面的研究有很多, 如 OA 在调控血细胞数量(Kim and Kim, 2010)上的作用以及在吞噬和结节形成(Kim *et al.*, 2009)上的作用等。所以 OA 被认为在昆虫神经系统与免疫系统的交叉中发挥着重要的作用。Huang 对二化螟 *Chilo suppressalis* 的 OA 受体生理学研究发现, *CsOA1* 表达于血细胞表面, 能够偶联两种信号通路, 低浓度 OA 刺激时偶联 Ca^{2+} 信号通路, 高浓度刺激时又引起 cAMP 的升高。用 OA 刺激血细胞做的功能实验显示, 低浓度的 OA 能激活免疫反应, 高浓度的 OA 则抑制免疫反应。所以推测 OA 引起的细胞免疫反应可能是由于结合了 *CsOA1* 受体进而偶联两种信号通路造成的(Huang *et al.*, 2012)。果蝇体内 OA 通过激活谷氨酸运动神经元上的 DmOA2B2 受体调控谷氨酸神经元的扩张, 进而影响果蝇的爬行速度等行为特征。因此可以说 OA 及 DmOA2B2 受体在神经元的可塑性方面发挥着重要作用(Koon *et al.*, 2011)。而且果蝇体内, Oct β 2 型受体对果蝇的产卵发挥着极其重要的作用(Li *et al.*, 2015)。Wu 等对 *CsOA2B2* 的药理学和生理学方面的研究也表明, 该类受体的特异性拮抗剂处理的幼虫运动行为变缓慢(Wu *et al.*, 2012)。研究者发现, 果蝇体内的 Oct β 2 型受体调控着果蝇的排卵行为(Lim *et al.*, 2014)。*CsOA3* 是新发现的一类受体, 有 *CsOA3L* 和 *CsOA3S* 两个剪切体。昆虫体内, 它可能不仅是和其它章鱼胺受体家族一起发挥作用, 还可能跟其中一个受体的两个剪切体一起发挥作用。为了研究其在昆虫神经系统中具体的生理功能, 需要对其组织特异性和表达特异性进行研究, 目前还不能确定其具体的功能(Wu *et al.*, 2014)。

1.7 展望

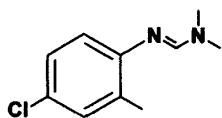
OA 受体广泛分布在昆虫的中枢神经系统 (Central nervous system, CNS) 和外围神经系统 (Peripheral nervous system, PNS) 中, 参与调控昆虫体内的诸多生理反应与行为过程。OA 被相应的神经元释放并通过结合自身受体, 偶联不同的 G 蛋白引起下游信号变化, 完成调控生理功能的过程。不同昆虫体内 OA 受体的

功能是不尽相同的, OA 参与影响的生理活动和行为过程机制也存在差异。研究者们可以通过反向遗传学的方法, 如 RNA 干扰, DNA 芯片等技术手段对其进行深入的研究。虽然我们目前已经得知一些药物的靶标是 OA 受体, 但昆虫体内 OA 受体又可分为几类, 具体是 OA 受体家族的哪一类或哪几类在起作用, 值得研究。

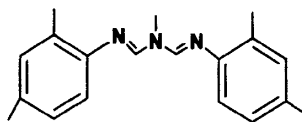
2 甲脒类杀虫剂概况

2.1 甲脒类杀虫剂简介

甲脒类杀虫剂 (Formamidine) 是化学结构属于甲脒类化合物的农药, 包括杀虫脒 (Chlordimeform, CDM)、双甲脒 (Amitraz, AMZ) 等。该类杀虫剂具有包括内吸、胃毒、触杀在内的多种作用机制, 可用来防治棉花、果树、蔬菜和茶等作物上的螨虫及鳞翅目幼虫 (Hollingworth, 1976; Corta *et al.*, 1999)。1966 年 V.Dittrich 明确了杀虫脒的杀螨活性后, Schering AG 和 Ciba-Geigy AG 开始对其进行生产, 我国从 70 年代也开始大规模的生产和应用。后来研究发现它的代谢产物 4-氯邻甲苯胺有致癌作用, 于 1993 年停止生产。1972 年, 英国的 I.R.Harrison 研制出了双甲脒, 并证明其具有优良的杀虫、杀螨效果, 双甲脒很快在农业害虫害螨的防治和狗以及家畜的外寄生虫防治方面得到广泛应用 (Jorens *et al.*, 1997; Pekmezci *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2015)。结构式见图:



杀虫脒



双甲脒

1996 年, 美国环保署 (Environmental Protection Agency) 根据双甲脒农药的急性经口和经皮 LD₅₀ 值, 将其定义为经口和吸入为 III 级, 即低毒农药。皮肤接触为 II 级, 即中等毒性的农药。根据其对眼睛的刺激测试将其定义为 IV 级, 即微毒农药 (表 1.2)。

表 1.2 双甲脒的急性毒性

Fig.1.2 The acute toxicity of amitraz

动物	染毒途径	LD ₅₀ (mg/kg)
狗	经口	100
小鼠	经口	>1600
大鼠	经口	600
	经皮	>1600
	吸入 (6 h)	65
	经腹膜	800
豚鼠	经口	400~800
兔	经口	100
狒狒	经口	100~250

双甲脒被哺乳类经口吸入后能在体内迅速的被吸收，扩散，代谢并以尿液的形式排出体外，不同的物种和性别排出体外的频次和途径没有差异。在所有被研究的物种中，被摄入体内的双甲脒，24 小时内 55%~74%的量可以通过尿液的形式被排出。在尿液中发现的重要代谢物有单甲脒 (BTS-27271)，2,4-二甲基甲酰苯胺 (BTS-27919)，2,4-二甲基苯胺 (BTS-24868)，4-甲酰基-3-甲基苯甲酸 (BTS-39098)，4-氨基-3-甲基苯甲酸 (BTS-28369) 和其它一些代谢物。其中，BTS-27271 和 BTS-27919 是双甲脒的主要代谢物，因为成分中含有 2,4-二甲基苯胺(可导致发育和基因毒性效应)而被关注,并且在杀螨和对哺乳动物的毒性上，BTS-27271 比双甲脒毒力更强(Pass and Mogg, 1991; Chen and Hsu, 1994)。这些代谢物的具体作用机制和对机体的影响还有待于进一步实验验证(Del Pino *et al.*, 2015)。

2.2 甲脒类杀虫剂特点

在多年的使用和研究过程中，人们总结出甲脒类杀虫剂的几个显著的特点：

2.2.1 药效好

中国农业科学院柑桔研究所等农业科学部门对甲脒类农药进行了一系列的药效试验，结果表明甲脒类农药可以有效地防治苹果、柑桔、棉花、茶叶及蔬菜

等作物上的有害螨类和家畜体外的寄生虫,对螨的各个虫期和抗性螨都有很好的防治效果,还能兼治 1-2 龄的红蜡蚧、矢尖蚧幼虫,棉铃虫和蚜虫等害虫(徐振元, 1983a)。

2.2.2 对天敌、蜜蜂等安全

甲脒类杀虫剂对捕食螨以外的天敌较安全,是综合防治的理想选择。将不同浓度的单甲脒药液直接喷洒在桑叶上,晾干后饲喂家蚕,对家蚕影响不大。双甲脒对蜜蜂也很安全,可以用来防治蜂螨(李秀玲, 2006)。此外单甲脒对鲤鱼、蝌蚪、鹌鹑、蚯蚓和赤眼蜂等均为低毒。

2.2.3 害虫产生抗药性较慢

因为甲脒类杀虫剂对螨虫的各个虫期均有防治效果,所以对害虫防治的较为彻底,而且它们对天敌安全,所以天敌可控制没有被杀死或新迁移过来的害螨。该类杀虫剂因为出色的防治螨虫效果而广受好评,尤其在福建、广西、四川等省,广泛用于防治柑桔红蜘蛛、锈蜘蛛。

2.2.4 对人畜安全

中国医学科学院对甲脒类杀虫剂的急性、亚急性和慢性毒性进行了深入的研究,结果表明双甲脒原药属低毒农药,杀虫脒和单甲脒原药属于中毒农药,但它们的制剂都属低毒。这类农药在动物体内降解为 3-甲基-4-氨基苯甲酸,并通过尿液排出体外,无“致畸、致癌、致突变”的作用。

2.2.5 对环境污染小

甲脒类杀虫剂的合成工艺基本无“三废”,且溶剂能回收套用,乙醇和甲酸乙酯副产物可作为合成农药中间体原甲酸三乙酯和甲基甲酰胺的原料,盐酸和磷酸副产物又可作为产品的稳定剂。单甲脒和杀虫脒都可以加工成水制剂,减少有机溶剂对环境的污染。

2.3 甲脒类杀虫剂作用机制

在脊椎动物体内,双甲脒的最主要作用机制被认为是 α_2 -adrenergic 受体的激活作用。科学家们通过体外实验发现杀虫脒(CDM)和双甲脒(AMZ)可以抑制 [3 H]clonidine, [3 H]yohimbine 与大鼠前脑 α_2 -adrenergic 受体结合的效应,这与大鼠体外脑细胞的试验结果结论一致(Costa and Murphy, 1987)。Chen 和 Hsu 假设双甲脒及其代谢物是通过降低胞内 cAMP 的水平来激活 α_2 -adrenergic 受体的

(Chen and Hsu, 1994), 这个假设得到实验验证, 体外实验中, 双甲脒及其代谢物 BTS-27271 能抑制由 forskolin 激活的胰岛素的释放, 从而降低了胞内 cAMP 的水平(Chen and Hsu, 1994)。虽然双甲脒在脊椎动物体内的作用机制一直备受科学家们关注, 并提出一系列猜测和验证, 但双甲脒及其代谢物在机体内的具体作用机制还有待于进一步的研究(Del Pino *et al.*, 2015)。

昆虫体内, 1980 年, Hollingworth 发现杀虫脒 (CDM) 及 demethylchloridimeform(DMCDM)可以影响北美萤火虫 *Photinus pyralis* 的发光器官发光, 而 1979 年已有科学家发现章鱼胺参与了北美萤火虫发光的生理活动(Nathanson, 1979), 这个发现增加了昆虫体内的章鱼胺系统响应甲脒类杀虫剂的可能(Hollingworth and Murdock, 1980)。1983 年, Downer 发现 DMCDM 和双甲脒 (AMZ) 能够模拟 OA 激活蟑螂神经组织内的腺苷酸环化酶活性, 从而初步确定甲脒类杀虫剂的作用靶标为 OA 受体(Gole *et al.*, 1983)。果蝇体内, DMCDM 和杀虫脒 (CDM) 能够抑制 OA 诱导的腺苷酸环化酶 (Adenylate cyclase, AC), 双甲脒却能将此酶激活(Dudai *et al.*, 1987)。因此, 甲脒类杀虫剂的作用靶标是 OA 受体(Roeder, 2005)。一些甲脒类杀虫剂对昆虫神经系统的毒性甚至比 OA 本身灵敏(Hiripi *et al.*, 1994; Roeder, 1995)。甲脒类杀虫剂与 OA 受体作用后, 害虫主要表现为极度兴奋, 行为异常, 致残进而死亡(Dudai *et al.*, 1987)。由于长期使用双甲脒防治螨虫, 造成螨虫对此农药产生了一定的抗性(Jonsson and Hope, 2007)。为了探索抗性产生的分子机理, 从具环牛蜱 *Boophilus microplus* 中克隆得到一类 TA 受体(Baxter and Barker, 1999), 在两个对双甲脒产生抗性的蜱类品系中发现有氨基酸位点的替换, 而在敏感性的品系内则无此氨基酸替换(Chen *et al.*, 2007)。

综上所述, 在昆虫体内通过科学家的努力可以初步确定甲脒类杀虫剂的作用靶标为 OA 受体(Roeder, 2005), 但章鱼胺受体可以分为 OA1, OA2, OA3 三个受体家族(Wu *et al.*, 2014), 它们的生理功能和各自的下游信号通路也不尽相同, 具体哪一个或哪几个 OA 受体是甲脒类杀虫剂的作用靶标, 还有待于科学实验的验证。

3 转基因果蝇的构建

3.1 果蝇简介

果蝇 *Drosophila*, 属节肢动物门昆虫纲双翅目果蝇科果蝇属。体型较小, 成虫体长仅 3~4 mm, 黄褐色; 复眼有光泽; 前翅透明, 在前缘脉上有 2 个缘褶, 具臀室, 后翅退化成平衡棒。雌果蝇体型较雄果蝇大, 腹末较尖削, 背面环纹 5 节。雄果蝇体型小, 腹末圆钝。腹部背面有 3 条黑纹, 后 1 条粗且延伸至腹面呈黑斑。雄蝇前足跗节基部有黑色鬃毛状性梳, 是区分果蝇雌雄可靠的标志。

果蝇因其生活史短, 易饲养, 染色体数目少等特点被作为研究遗传学和细胞生物学的模式生物。它在生物学研究方面占有重要的地位, 为人类探索生命科学的奥秘做了杰出的贡献。

3.2 果蝇遗传学简介

3.2.1 果蝇遗传学概况

1910 年, 汤玛斯·亨特·摩尔根(Thomas Hunt Morgan)开始在实验室内对果蝇进行培育和系统的科学研究。1926 年他发表了著名的《基因论》, 提出并论证了遗传学的三大规律, 使孟德尔遗传规律的物质特性得到落实, 奠定了现代遗传学的基础。1925 年, 赫尔曼·约瑟夫·穆勒(Hermann Joseph Muller)发现 X 射线能诱发果蝇的突变, 于是他通过该方法获得了很多果蝇的突变种, 研究了果蝇的突变率, 并设计了检测致死突变的 CIB 法(Muller and Jacobs-Muller, 1925)。这个发现为研究果蝇遗传变异提供了丰富的材料。1933 年, Painter 发现果蝇的幼虫体内存在唾液腺巨大染色体(Painter, 1933), 这一发现使得研究者可以在显微镜下直接观察染色体形态结构和遗传变异的关系。随后, 研究者们在 DNA 结构模型的建立和遗传密码的破译等方面取得的成就, 使果蝇的遗传学发展到核酸和蛋白质分子水平(Wensink *et al.*, 1974; Grunstein and Hogness, 1975)。

随着科学技术的发展, 研究者们对果蝇的基因功能(Lewis, 1978)、胚胎发育过程(Nusslein-Volhard *et al.*, 1980)、生物节律(Konopka and Benzer, 1971)等进行了深入的研究。2000 年 3 月, 科学家们基本完成了果蝇全基因组的测序工作, 并发现果蝇的部分基因和人类的基因极其相似, 果蝇 DNA 中存在类似人类致癌基因或潜在致癌基因(Adams *et al.*, 2000)。果蝇研究造就了许多出色的科学家。

迄今为止，从事果蝇研究的科学家先后 5 次获得诺贝尔奖。

3.2.2 果蝇平衡染色体

果蝇体内共有 4 对同源染色体，其中 3 对常染色体，1 对性染色体。果蝇遗传学一个明显的特征是，雄蝇体内没有同源重组现象，雌蝇体内却存在重组现象。但是研究者可以利用果蝇体内的染色体平衡子（Balance factor）来对染色体重组进行控制。

1918，穆勒最早提出平衡子的概念，他通过研究发现平衡染色体能抑制染色体的交换，他根据该现象成功分离出新染色体上的致死基因(Muller, 1918)。现在我们把由于射线诱导等因素引发的染色体多点断裂和重接，形成序列混乱的染色体称之为平衡染色体。它具有三个明显的特征：抑制同源染色体间的重组；带有显性（或隐性）突变标记；常常纯合致死或致不育。研究中平衡染色体一般用于果蝇等位基因突变的检测，基因型分离分析，定向基因型果蝇的合成和构建“平衡致死”品系。在平衡致死体系中，只有致死突变的杂合子可以存活，因此可以用来保存一些隐性致死（纯合致死）基因(Gowen, 1931; Ananiev *et al.*, 1974; Patterson *et al.*, 1937)。

3.3 转基因果蝇模型的建立

基因表达受多种因素的调控，生物体通过众多基因和信号分子的相互作用来调控自身的生命活动。在目前遗传学和发育生物学研究中，转基因技术是重要的研究手段之一(Meng *et al.*, 1999)。它是将外源基因导入受体生物体基因组内，使外源基因整合到宿主细胞中并稳定表达，根据转基因生物体的表型变化，达到揭示基因功能目的的技术。

果蝇的基因组大小约为 1.65×10^5 kb，其中可转座因子占 10%~20%。果蝇体内常见的转座子种类见表 1.3。这些转座因子中因为 *P* 因子（*Pelement*）转座频率高，可操作性强，改造后成为了理想的分子生物学工具。1982 年，Rubin 等首次从果蝇的 *white* 位点克隆到了 *P* 因子（图 1.4），并研究了其结构和功能，建立了 *P* 转座子和转座辅酶系统(Rubin *et al.*, 1982)，该转座子只在果蝇体内起作用，对果蝇以外的昆虫不起作用(Handler *et al.*, 1993)。

表 1.3 果蝇中常见的转座子

Table 1.3 Transposons of *Drosophila melanogaster*

Transposon	Inverted repeats(bp)	Insertion site preference	Targetsite duplication(bp)	Species compatibility
<i>Pelement</i>	31	5'end of genes	8	<i>Drosophila</i> only
<i>piggyBac</i>	13	TTAA	4	Broad
<i>Minos</i>	255	TA	2	Broad
<i>Mariner</i>	28	TA	2	Broad
<i>Hermes</i>	17	Low sequence specificity	8	Broad
<i>hobo</i>	12	Low sequence specificity	8	Broad

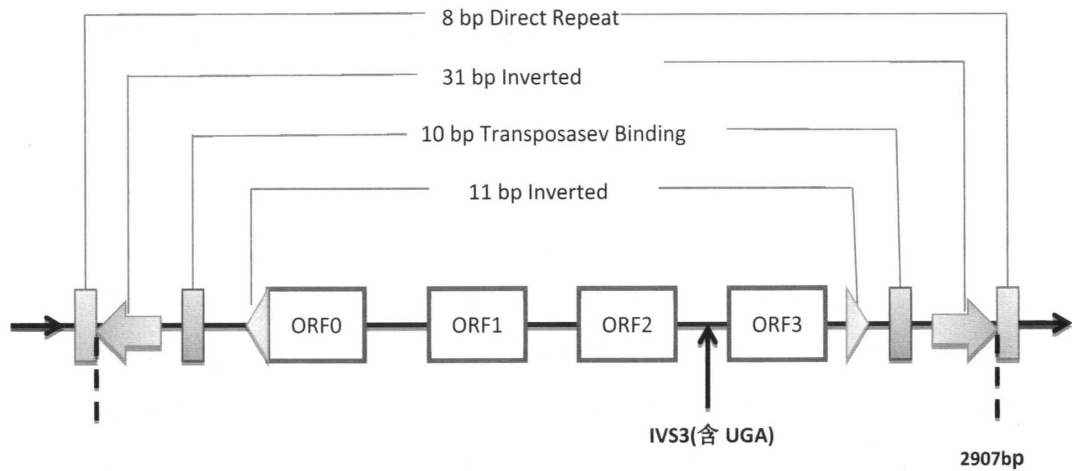


图 1.4 *P* 因子的结构示意图

Fig.1.4 Structure schematic diagram of *P* element

虚线部分是完整的 *P* 因子，长度为 2907bp，包括用来编码转座酶或转座抑制物 4 个 ORF，31bp 反向重复，10bp 结合位点和 11bp 反向重复。*P* 因子的插入会在靶位点处形成 8bp 顺向重复。IVS3 与转座的组织特异性有关。

P 因子主要在以下几个方面广泛应用：首先，可以以 *P* 因子为转基因的载体，将目的基因转到果蝇体内，这是 *P* 因子应用最广泛的一面；其次，利用 *P* 转座因子将具有特殊结构和功能的 DNA 片段（如 *FRT*）导入果蝇体内，用以研究纯

合致死突变(Xu and Rubin, 1993)或者异常染色体分裂时期的行为等(Ahmad and Golic, 1998); 另外, 通过结合 *P* 因子和酵母中半乳糖操纵子构建的 Gal4/UAS 果蝇品系, 可以使 UAS 下游的目的基因于果蝇的特定组织表达。除上述实际应用价值外, *P* 因子还有很大的理论研究价值值得我们深入研究。

转基因果蝇技术需通过显微注射等方法, 将外源基因导入果蝇胚胎, 并成功整合到果蝇的基因组中。显微注射的 DNA 由两部分组成: 一是重组质粒, 由 *P* 因子中的反向重复序列和靶基因构建而成; 二是辅助质粒, 它含有缺陷型 *P* 因子, 本身不能移动, 但能够产生转座酶, 帮助 *P* 因子转化。辅助载体不存在情况下, *P* 因子不可以转座整合到果蝇的基因组中; 辅助载体存在时, 它产生的转座酶可帮助 *P* 因子转座, 目的基因则和 *P* 因子一起被整合到果蝇基因组上, 产生具有稳定遗传性状的转基因果蝇。转基因果蝇是否构建成功可通过 *P* 因子序列中的标记基因 *mini-white* (眼色基因) 来检测和鉴定(Kellum and Schedl, 1992; Zwiebel *et al.*, 1995)。

3.3.1 转座载体的构建

我们可以根据自身实验需要从果蝇的转座载体中选择合适的表达系统, 一般采用的是连有一个合适启动子的标准转座载体。人们根据表达部位的不同将启动子划分为: 广泛表达的和特异组织中进行表达的启动子。广泛表达的启动子指目的基因在生物体各个组织各个时期都有表达, 后者则指目的基因只在果蝇的特定组织中才可以表达, 如眼细胞中特异表达的 *sevenless* 启动子(Tomlinson *et al.*, 1987), 神经中特异表达的 *Elav-Gal4* 启动子(Robinow and White, 1991)等。另外, 还有条件表达的启动子, 如热休克启动子, 30℃条件下对果蝇进行短时间热处理即可诱导热休克启动子开启(Ritossa, 1962; Tissieres *et al.*, 1974)。特异组织中表达的启动子和条件启动子能让目的基因在我们期望的任何时空进行表达。

3.3.2 果蝇胚胎的显微注射

将含有目的基因的重组 *P* 转座子载体和 *P* 因子辅助质粒一起注入果蝇胚胎, 经注射的胚胎发育为成蝇后与野生型果蝇交配, 即产生携带转基因的后代。操作方法见图 1.5。

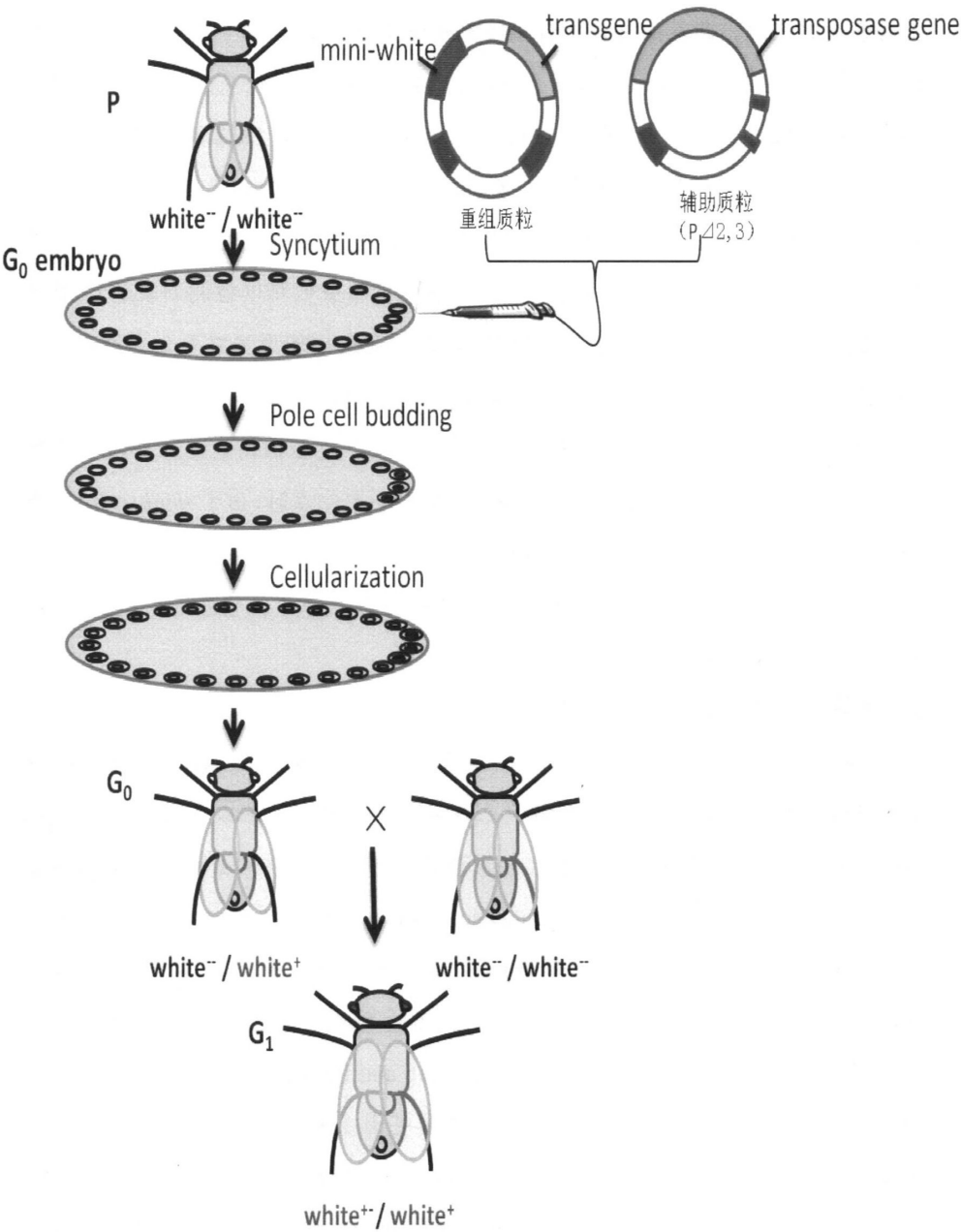


图 1.5 果蝇胚胎显微注射示意图

Fig.1.5 *Drosophila melanogaster* embryo microinjection schematic diagram (modified from Koen J. T. Venken)

3.3.3 转基因果蝇的筛选

转基因果蝇可以通过细胞水平和个体水平进行筛选。细胞水平的筛选是基于报告基因的表达。传统的许多报告基因的构建是基于 *lacZ* 基因的表达, 即 β -半乳糖苷酶的生成作用(Shapiro *et al.*, 1969), 也有的是通过绿色荧光蛋白基因(*GFP*)的表达(Prasher *et al.*, 1992; Niedz *et al.*, 1995; Brand, 1995)。*LacZ* 报告基因的产物 β -半乳糖苷酶可以由 X-gal 检测到, X-gal 是 β -半乳糖苷酶的底物, 水解后呈蓝色。对于 *GFP* 报告基因, 其蛋白产物能在活细胞中观察到。当细胞用 4% 的甲醛固定后能维持 *GFP* 荧光性, 并且通过荧光着色方法我们可以检测到表达 *GFP* 多克隆抗体的绿色荧光蛋白。于是, 带有 *GFP* 的靶基因能用来对单个活细胞监控 GAL4 不同时期表达模式(Fernandez-Abalos *et al.*, 1998)。

转基因果蝇个体水平上的筛选一般通过果蝇眼色基因的表达来实现。携带 *mini-white* 的 *P* 因子转座插入白眼果蝇 DNA 的不同位点时, 由于 *mini-white* 的表达, 后代将出现不同眼色的果蝇。*mini-white* 表达越强烈, 后代果蝇的眼色较深。通过对果蝇眼色变化的观察, 我们就能筛选到插有 *P* 因子的转基因果蝇(Zwiebel *et al.*, 1995; Horn *et al.*, 2002)。

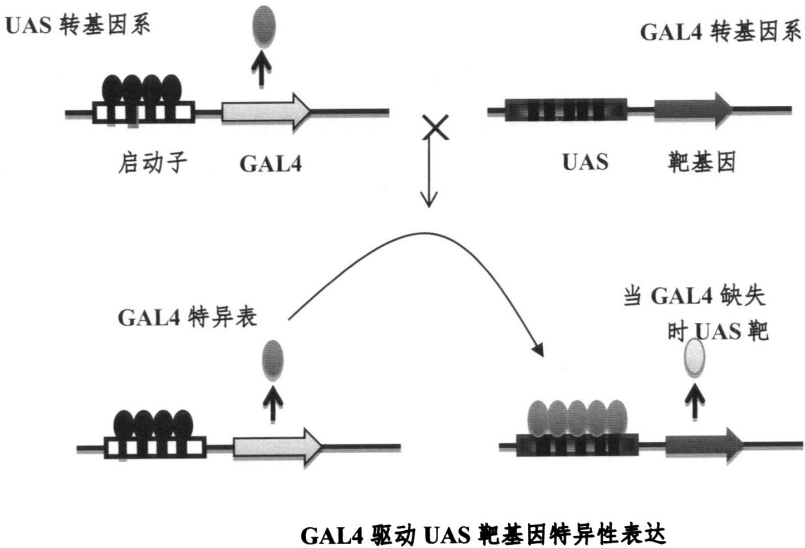
3.4 果蝇 GAL4/UAS 异位表达系统

GAL4/UAS 系统是一种转基因技术体系, GAL4 (Galactose-regulated upstream promoter element, GAL), 半乳糖调节上游启动子元件, 是在酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 体内发现的类似于原核生物乳糖操纵子的一个转录激活子(Laughon *et al.*, 1984)。*UAS* (upstream active sequence, *UAS*), 上游激活序列, 是酵母中另一种类似高等真核生物增强子的序列(Brand and Perrimon, 1993)。通过将 GAL4 与 *UAS* 结合, 可以调节和半乳糖代谢相关的基因的表达。1993 年 Brand 和 Perrimon 在果蝇中建立起 GAL4/UAS 转基因系统(Brand and Perrimon, 1993), 在研究基因的过量表达及异位表达时很方便, 可以使克隆基因在果蝇组织类型和特异的细胞类型中有选择性地表达(Duffy, 2002, Traven *et al.*, 2006)。因此该系统一经建立, 就被广泛应用于研究果蝇发育中基因的功能和调控机理, 类似的 GAL4 系统也已经应用于其它模式生物中。

GAL4/UAS 系统是将 GAL4 与组织特异性的启动子或增强子相连接, 建立起 GAL4 转基因系, 以此方式控制 GAL4 的表达。*UAS* 则与目的基因融合, 建立带

有 *UAS*-目的基因的转基因系(Brand and Perrimon, 1993; Duffy, 2002; Campbell *et al.*, 2008; Fischer *et al.*, 1988)。该技术体系中, *GAL4* 和 *UAS*-目的基因存在于两个不同的转基因系中, 只有将两个转基因品系杂交, 才能产生表达目的基因的后代。因此我们可以建立一个 *GAL4* 转基因系的库, 包含不同时间或部位表达 *GAL4* 的转基因果蝇系。将 *UAS* 转基因系和 *GAL4* 转基因系库里的果蝇杂交, 即得到在不同时间或不同部位表达靶基因的后代。目前在果蝇上, 已经建立起 *GAL4* 转基因系的库, 使得 *GAL4* 在特定的组织如神经(*elav-GAL4*) (Robinow and White, 1991), 复眼(*gmr-GAL4*) (Freeman, 1996; Song *et al.*, 2000)及肌肉组织(*24B-GAL4*) (Brand and Perrimon, 1993; Michelson, 1994)等特定组织中表达。

有多种方法可以对 *GAL4/UAS* 系统杂交子代目的基因的表达进行检测。首先, 可以利用目的基因的抗体或原位杂交技术确定目的基因表达部位, 再对其表达产生的生物学效应做深入的研究。另外, 可以利用报告基因建立 *UAS*-报告基因-目的基因系, 使目的基因产物更易识别。常用的报告基因有 *lacZ* (Shapiro *et al.*, 1969)、*GFP* (Brand, 1995)等, 果蝇还可以用 *UAS-yellow* (Calleja *et al.*, 1996)或 *UAS-mini-white* 进行检测(Zwiebel *et al.*, 1995)。*mini-white* 是编码果蝇眼色的基因, *mini-white*⁺的果蝇表现为红眼。当把含有 *UAS-mini-white* 的载体注射入野生白眼(*mini-white*⁻)果蝇胚胎时, 后代即可通过筛选红眼果蝇的方法得到转基因果蝇。



因为 GAL4 不存在时, *UAS* 转基因系里的目的基因不表达, 所以即使目的基因的表达是致死的, 该品系的果蝇依然能够存活。因此, 利用 GAL4/*UAS* 系统可以构建带有致死基因的转基因果蝇。但 GAL4/*UAS* 系统也有缺点, 如为表达转基因必须进行果蝇杂交, 而且不能根据需求在果蝇发育的任一时间高量表达靶基因等。根据以上缺陷, 2003 年 Giot 等建立起一套新的转基因表达调控系统即果蝇 TARGET 系统(Giot *et al.*, 2003)。它的分子机制是把果蝇 GAL4/*UAS* 系统与 GAL4 的等位基因 GAL80ts 分子(温度敏感型分子)一起应用。温度在 19℃ 时, GAL80ts 能抑制 GAL4 的转录活性, 进而使得 *UAS* 不能被激活, 目的基因沉默。30℃ 热激条件下, GAL80ts 不能发挥作用, 所以 GAL4 可发挥活性, 激活 *UAS*, 使靶基因得以表达。这个系统可以让研究人员在任何时空中过量表达靶基因(Marrone *et al.*, 2011)。

3.5 展望

1982 年, Rubin 等构建出含有控制果蝇眼睛颜色基因的转座载体 *ry1*, 并通过显微注射的方式将其导入白眼果蝇的胚胎, 后代果蝇眼睛为红色, 标志着转入的基因可以在生物体内稳定的表达(Rubin and Spradling, 1982)。伴随第一只转基因果蝇的产生, P 因子逐渐发展为转基因的重要工具, 也作为果蝇遗传学研究的重要依托工具被广泛应用。理论上, 通过 P 因子转座系统我们可以将任何基因插入到果蝇的基因组中, 转基因果蝇技术也成了探索基因功能和许多生命现象的重要手段。1988 年, 随着 Fischer 发现 GAL4 能以组织特异性的方式激活和 *UAS* 相连的下游基因的转录后(Fischer *et al.*, 1988), GAL4/*UAS* 系统被广泛应用于多种生物转基因载体的建立, 成为研究基因功能特别是对胚胎发育、神经发育过程中效应基因功能的有效技术。随着转基因技术和 GAL4/*UAS* 系统的不断改进, 利用 GAL4/*UAS* 系统的转基因技术将在生命科学研究的各个领域发挥重要作用。

第二章 CG18208 的信号通路和药理学研究

1 引言

无脊椎动物体内,章鱼胺(Octopamine, OA)作为神经递质,发挥着重要的生理作用,它通过结合不同的 G 蛋白偶联受体来调控昆虫的好斗(Zhou *et al.*, 2008),产卵(Monastirioti, 2003; Monastirioti *et al.*, 1996),睡眠(Crocker and Sehgal, 2008)和运动(Koon *et al.*, 2011)等行为。迄今为止,已有多种昆虫的 OA 受体被克隆得到(Maqueira *et al.*, 2005; Verlinden *et al.*, 2010),由于它们的氨基酸序列和所偶联的信号通路都和脊椎动物体内的去肾上腺素相似,OA 受体被分为两大类: α -adrenergic-like 型 OA 受体和 β -adrenergic-like 型 OA 受体(Farooqui, 2012)。科学家们首先从果蝇的蘑菇体(Mushroom body)内克隆得到一类 OA 受体,并将其称为 DmOAMB,即果蝇的 OA1 受体,被认为参与了果蝇的学习和记忆(Han *et al.*, 1998)。此类受体的激活剂主要是能引起胞内 Ca^{2+} 的上升,高浓度 OA 刺激时也可以引起胞内 cAMP 含量的升高(Huang *et al.*, 2010)。果蝇体内的 OA2 受体家族可以分为 DmOAB1、DmOAB2、DmOAB3,这类受体对果蝇的产卵是至关重要的(Li *et al.*, 2015),当受到 OA 刺激时能引起胞内 cAMP 含量的增加。近年来,由于分子克隆技术的发展,已从多种无脊椎动物体内克隆得到 OA 受体,包括果蝇(Maqueira *et al.*, 2005),蜜蜂(Blenau *et al.*, 2000),家蚕(Chen *et al.*, 2010)等。2014 年,本实验室从二化螟 *Chilo suppressalis* 体内克隆得到一类新型受体 CsOA3,它有两个剪切体 CsOA3L 和 CsOA3S。CsOA3L 可偶联 G_q 蛋白,引起胞内 Ca^{2+} 浓度升高,而 CsOA3S 即可偶联 G_i 又可偶联 G_q 蛋白,引起胞内 cAMP 水平的降低和 Ca^{2+} 浓度的升高(Wu *et al.*, 2014)。

二化螟 CsOA3 受体基因在果蝇体内的同源基因为 CG18208。本研究中,我们从果蝇体内克隆得到了 CG18208 的 cDNA 全长,并将其命名为 DmOA3。将 CG18208 表达于 HEK-293 细胞中,对其偶联的下游信号通路和药理学性质做了研究。

2 材料与方法

2.1 供试昆虫

本实验所用的野生型黑腹果蝇 *D. melanogaster* 由本实验室世代培养,饲养

于人工培养箱(25±1℃, RH=70%, L:D=12:12 h)内。果蝇食物为标准的玉米粉培养基, 组分为 7.3%的玉米粉、1%的大豆粉、1.7%的酵母粉、0.5%的琼脂、7%的白糖以及 0.25%的尼泊金甲酯。本实验所用试剂购自 Sigma-Aldrich(St Louis, MO, USA)。

果蝇食物配方如下:

成分	重量
水	1 L
玉米粉	73 g
大豆粉	10 g
酵母粉	17 g
琼脂	5 g
白糖	70 g
尼泊金甲酯	2.5 g

2.2 RNA 抽提

收集果蝇的不同虫态, 包括卵、幼虫、蛹和成虫及雌雄果蝇的不同组织, 如头部, 胸部和腹部。利用 TRizol 法(Invitrogen, Carlsbad, CA. USA)分别提取各供试样品的总 RNA, 具体方法如下:

- (1) 在收集到的上述各组织样品中加入 1 ml TRizol 并加入不锈钢珠, 用组织裂解仪 TissueLyser II 处理 1 min, 室温静置约 5 min;
- (2) 离心机温度调至 4℃, 12000 g 离心 10 min; 将上层液体转移至新的 1.5 ml 离心管;
- (3) 加入 200 μL 氯仿剧烈振荡 15 sec, 室温静置 5 min, 4℃, 12000 g 离心 15 min;
- (4) 转移上清于新的 1.5 ml 离心管中, 加入 500 μL 异丙醇, 室温静置 10 min 后, 4℃, 12000 g 离心 10 min;
- (5) 除去上清, 加入 1 ml 75%的乙醇, 混匀, 4℃, 7500 g 离心 5 min;
- (6) 弃上清, 室温干燥 5-10 min 后, 用 DEPC 水溶解 RNA 样品;
- (7) 采用 1.5%的甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 采用 NanoDrop 2000 分光光度计(Thermo Scientific)检测 RNA 纯度及定量。根据需要

进行适当稀释，用于以后的实验或保存于-70℃冰箱。

2.3 克隆 CG18208 cDNA 序列全长

取 50 头果蝇成虫的头部，获取总 RNA 后，以 1.0 μg 总 RNA 为模板，用全式金公司反转录试剂盒(TransScript All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for PCR, AT321-01)合成 cDNA。克隆 CG18208 cDNA 序列的引物见表 2.1。

克隆目的基因片段的 50 μL PCR 反应体系如下：

5×Q5 Reaction Buffer	10 μl
10 mM dNTPs	1 μl
10 μM Forward Primer	2.5 μl
10 μM Reverse Primer	2.5 μl
cDNA	0.5 μl
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	0.5 μl
灭菌的 ddH ₂ O	33 μl

PCR 反应程序：98℃ 30 sec；98℃ 10 sec；55℃ 30 sec；72℃ 30 sec；37 个循环；72℃ 2 min； 4℃ 保存。

表 2.1 PCR 扩增 CG18208 cDNA 序列所用引物

Table 2.1 Primers for cloning CG18208 cDNA	
引物名称	引物序列 (5'-3')
Primer name	Primer sequence (5'-3')
CG18208-compF	ATGGATTATAGCCGACTGAA
CG18208-compR	CATGGATTATAGCCGACTGAA

2.4 PCR 产物的纯化

PCR 产物经 1.0%的琼脂糖凝胶电泳后，用 Axygen Gel Extraction Kit 凝胶回收试剂盒进行回收纯化，操作步骤如下：

- (1) 紫外灯下观察并切下含有目的基因的琼脂糖凝胶；
- (2) 将切下的凝胶块放入 1.5 mL 离心管中，加入 3 倍凝胶体积的溶胶缓冲液 DE-A，混合后置于 75℃金属浴中温育至凝胶完全融化，约 6~8 min，间歇性振荡离心管以便凝胶更快融化；

- (3) 在上述融化的凝胶中加入 1.5 倍凝胶体积的结合液 DE-B, 混合均匀;
- (4) 将步骤 3 中的混合液转移至 DNA 制备管, 将制备管放置在干净的 2 mL 收集管内, 室温 12000 g 离心 1 min;
- (5) 弃滤液, 在柱中加入 500 μ l Buffer W1, 室温 12000 g 离心 1 min;
- (6) 弃滤液, 在柱中加入 700 μ l Buffer W2 (所用 W2 已加过乙醇), 室温 12000 g 离心 30 sec;
- (7) 将步骤 (6) 重复一次;
- (8) 弃滤液, 把空柱放回收集管中, 室温 12000 g 离心 1 min, 保证残液已全部去除;
- (9) 将回收柱置于 1.5 mL 离心管中, 加入 20 μ l 65 $^{\circ}$ C 预热的灭菌 ddH₂O, 室温静置 1 min, 12000 g 离心 1 min, 洗脱柱膜上的 DNA, 洗脱液即为回收的目的 DNA;
- (10) 取 1 μ l 纯化液用 NanoDrop 2000 微量紫外分光光度计(Thermo Scientific)进行纯度测定。

2.5 目的片段与克隆载体连接

将纯化后的 PCR 片段克隆到 *pEASY*[®]-Blunt Zero Cloning Vector (Beijing TransGen Biotech, Co., Ltd.) 载体中, 连接反应体系如下:

目的 DNA	4 μ l
<i>pEASY</i> [®] -Blunt Zero Cloning Vector	1 μ l

轻轻混匀, 25 $^{\circ}$ C 反应 5 min, 反应结束后, 将离心管置于冰上 10 min。然后进行连接产物的转化。

2.6 连接产物的转化

- (1) 将连接产物加入 50 μ l *Trans*1-T1 感受态细胞中, 轻弹混匀, 冰浴 20~30 min;
- (2) 42 $^{\circ}$ C 热激 30 sec, 立即置于冰上 2 min;
- (3) 加 250 μ l 平衡至室温的 LB 培养基, 200 rpm, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;
- (4) 取 200 μ l 菌液涂板 (为得到较多克隆, 4000 rpm 离心 1 min, 弃掉部分上清, 保留 100~200 μ l, 轻弹悬浮菌液, 取全部菌液涂板);

(5) 将平板倒置，放置于 37℃ 培养箱，过夜培养。

2.7 转化子的鉴定和测序

(1) 用灭菌的 10 μl 枪头从 LB 平板上挑取 10 个白色单菌落，分别接种于 1 mL 含 Amp (100 μg/mL) 抗性的 LB 液体培养基中，37℃，300 rpm 振荡培养 3 h；

(2) 以培养的菌液为模板，M13F/M13R 为引物，进行菌落 PCR(2×EasyTaq PCR SuperMix, TransGen As111)，反应体系为 20 mL，如下：

2×EasyTaq PCR SuperMix	10 μl
M13F	1 μl
M13R	1 μl
灭菌的 ddH ₂ O	6.5 μl
菌液	1.5 μl

PCR 反应条件为：94℃ 10 min；94℃ 30 sec；55℃ 30 sec；72℃ 60 sec；35 个循环；72℃ 10 min；4℃ 保存。

(3) 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后将疑似含有目的片段的菌液送往铂尚生物技术有限公司测序。

2.8 质粒抽提

采用 Axygen Plasmid Kit 试剂盒抽提质粒 DNA，抽提产物用 NanoDrop 2000 微量紫外分光光度计检测浓度。具体操作方法参见试剂盒说明书。

2.9 pcDNA3-*CG18208* 融合质粒的构建

用 Primer 5.0 设计 *CG18208* 的酶切引物，通过 PCR 扩增得到含酶切位点的 *CG18208* 全长序列。对所得序列和 pcDNA3 质粒分别用 *Hind*III 和 *Xho* I 进行酶切处理。消化后的 PCR 产物用 T4 DNA 连接酶连接到 5'端有 HA 标签的 pcDNA3 载体上，产生 pcDNA3-*CG18208* 融合质粒，用测序的方法验证序列是否成功插入。过程中所用的酶切引物见表 2.2。

操作方法如下：

(1) 在 *CG18208* 的 5'端和 3'端用 PCR 的方法连接上 *Hind*III 和 *Xho* I 酶切位点，切胶回收 PCR 产物，用以双酶切。*CG18208* 加双酶切位点的 PCR 反应体系如下所示，

灭菌的 ddH ₂ O	29 μl
------------------------	-------

5xTransstart Fast Pfu Fly Buffer	10 μl
2.5 mM dNTPs	5 μl
HindIII	2 μl
Xho I	2 μl
cDNA	1 μl
Transstart Fast Pfu Fly DNA Polymerase	1 μl

PCR 反应条件：95℃ 2 min； 95℃ 10 sec； 56℃ 30 sec； 72℃ 60 sec； 37个循环； 72℃ 10 min； 4℃保存。

(2) 对带有 *HindIII* 和 *Xho* I 粘性末端的 *CG18208* 和 pcDNA3 载体分别用 *HindIII* 和 *Xho* I 进行双酶切，双酶切体系为 100 μl，

<i>HindIII</i>	4 μl
<i>Xho</i> I	4 μl
10 M Buffer	10 μl
pcDNA3+H ₂ O	82 μl

37℃条件下，酶切 3 h，然后对酶切产物进行 1.0%琼脂糖凝胶电泳，回收电泳产物并测定浓度。

(3) 对双酶切的 *CG18208* 和 pcDNA3 进行连接，10 μl 连接体系，

10×T4 DNA Ligase Buffer	1 μl
目的片段 <i>CG18208</i>	6 μl
pcDNA3	2 μl
T4 DNA Ligase	1 μl

16℃条件下，连接过夜。取 5 μl 连接产物转入 TransT1 感受态细胞，摇菌涂板培养后，挑取单菌落摇菌，通过菌落 PCR 验证条带，将有条带的菌液送测序验证目的基因是否成功插入 pcDNA3 质粒。

表 2.2 双酶切所用引物
Table 2.2 Primers for restriction enzyme digestion

引物名称	引物序列 (5'-3')
Primer name	Primer sequence (5'-3')
<i>CG18208-HindIII-F</i>	CCCAAGCTTACCATGGATTATAGCCGACT
<i>CG18208-Xho I-R</i>	CCGCTCGAGTCACTTGAACAGGATGCGC

2.10 细胞培养及转染

HEK-293 细胞用 D-MEM 培养基(Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)培养, 在培养基内增补 10%热灭火的 FBS (Gibco BRL)。将细胞放置于 37℃, 5%CO₂ 含量的二氧化碳培养箱中培养。

置换细胞培养基的操作方法: 将变黄的培养基吸走, 用 1 ml PBS (Tris-buffered saline, 25 mM Tris-HCl, 3 mM KCl and 137 mM NaCl, pH=7.0) 清洗, 并加入 5 mL 的新培养基。

细胞传代的具体操作方法:

(1) 细胞长满培养皿后进行传代, 把原有的培养基吸走, 用 1 mL 的 PBS 清洗;

(1) 往培养基内加入 200 μ l 胰酶, 减小细胞壁的张力, 消化 30 sec, 吸走胰酶;

(2) 把培养皿置于培养箱中 1 min 后拿出, 加 1 mL 的新培养基, 用移液枪轻轻吹打混匀;

(3) 用移液枪移取上一步中的 100 μ l 液体, 放置于新的培养皿中, 加 5 mL 新的培养基, 混匀, 放入培养箱中继续培养。将旧的培养皿扔掉。

细胞转染的具体操作方法:

(1) 将 10 μ l 脂质体 2000 (Invitrogen), 4 μ g pcDNA3-CG18208 质粒分别和 250 μ l 转染液 OPTI-MEM®I (1 $\times$) (Gibco BRL) 混合, 室温条件下静置 5 min;

(2) 将含脂质体 2000 和 pcDNA3-CG18208 载体的转染液轻轻混合, 室温条件下静置 20 min, 利用脂质体 2000 (Invitrogen) 将 4 μ g pcDNA3-CG18208 转入呈指数生长的 HEK-293 细胞中;

(3) 将 500 μ l 的混合液加入长满细胞的培养皿内, 另外加入 2 mL 的转染液 OPTI-MEM®I (1 $\times$) (Gibco BRL), 将培养皿置于培养箱中, 完成转染;

(4) 6 h 后换成 2.5 mL 普通培养液, 24 h 后传代至新的培养皿。传代第二天的时候用 20 μ l G418 (0.8 mg/ml) 筛选细胞;

(5) 连续筛选两周以获得稳定转染的细胞系。

2.11 cAMP 测定

提取 cAMP 的具体方法如下:

(1) 将 pcDNA3-CG18208/HEK-293 细胞传代至 12 孔板 (Thermo

nunc,Thermo Fisher Scientific) 上, 置于 37°C 5%CO₂ 含量的二氧化碳培养箱中培养, 第二天细胞长满 (约 1×10^6 /孔);

(2) 除去细胞的培养基, 用 PBS 洗涤 2 次, 每孔加入用 450 μ l PBS 配置的浓度为 100 μ M 的 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, Sigma-Aldrich), 用来抑制磷酸二酯酶水解 cAMP, 室温孵育 20 min;

(3) 加入用 50 μ l PBS 溶解的供试浓度药剂, 混匀, 室温孵育 20 min;

(4) 除去上层药液, 加入 250 μ l 的细胞裂解液 (1 $\times$ cell lysis buffer), 吸取上清用于接下来的 cAMP 测定或暂时冻存于 -80°C 冰箱;

cAMP 浓度的测定方法按照 cAMP Parameter Assay Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; Catalog # KGE002B) 操作指南进行, 具体如下:

(1) 除两个 NSB 孔外, 96 孔板 (Thermo nunc,Thermo Fisher Scientific) 每孔加 50 μ l Primary antibody solution, 过程中不要有气泡, 将其放在水平振荡仪 (MixMate, eppendorf) 上 550 rpm 孵育 1 h;

(2) 配置标样 cAMP standard, 加 1 ml 灭菌的 ddH₂O 配制成 2400 pmol/mL, 用 1 $\times$ cell lysis buffer 稀释, 将 25 $\times$ Wash buffer 用灭菌的 ddH₂O 稀释为 1 $\times$;

(3) 将细胞裂解液在 -80°C 冰箱内反复冻融两次, 以使细胞充分裂解, 将裂解液转移到 1.5 ml 离心管中, 4°C, 12000 g 离心 10 min;

(4) 弃掉孵育后的 Primary antibody solution, 用 400 μ l 1 $\times$ Wash buffer 清洗 4 次, 洗后拍干;

(5) 每孔加入 50 μ l 的 cAMP conjugate 和 100 μ l 准备的标样、细胞裂解液, 置于水平振荡仪 (MixMate, eppendorf) 上 550 rpm 孵育 2 h;

(6) 弃去孵育后的样品, 用 400 μ l 1 $\times$ Wash buffer 清洗 4 次, 洗后拍干;

(7) 每孔加 200 μ l 的 Substrate solution (Color reagents A、B 等体积混合), 避光室温条件下放置 30 min;

(8) 每孔加 100 μ l 的 Stop solution, 用 Thermo Scientific Varioskan Flash 测定结果。

3 结果与分析

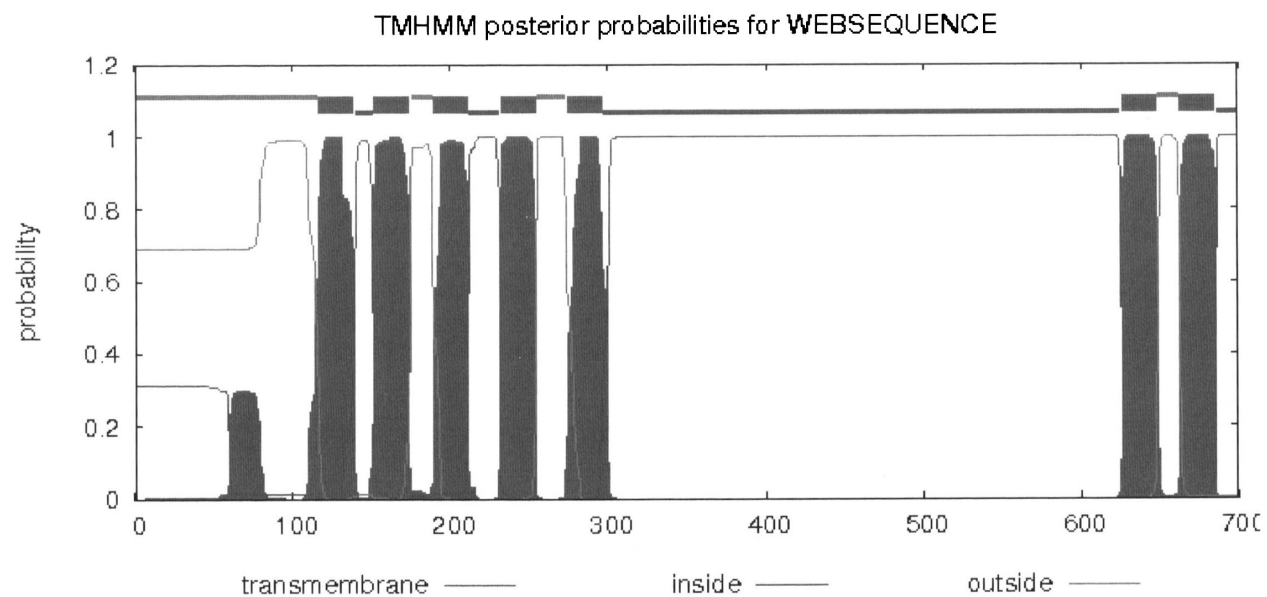
3.1 *DmOA3* cDNA 序列分析

通过 PCR 获得 *DmOA3L* cDNA 的序列全长, GenBank 上的登录号为

NM_142497.5。编码 *DmOA3L* 的 ORF 全长为 2100 bp，共编码 699 个氨基酸，通过 TMHMM 和 TMpred 预测 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)，发现该基因编码一个 α 螺旋的 7 跨膜受体，说明其属于 GPCRs，且有超长的第三胞内环，是生物胺受体的共有特征(图 2.1)。克隆到的序列与(<http://www.flybase.org>)上已公布的序列相比，有 1 个碱基的不同，也只有 1 个不同的氨基酸，即 Arg549 代替了 Gln549。该基因有一个剪切体 *DmOA3S*，*DmOA3S* 比 *DmOA3L* 少编码 29 个氨基酸(图 2.2)。该受体基因胞内二环上有典型的 DRY 结构域(Asp 212-Arg 213-Tyr 214)，它在 G 蛋白偶联受体家族中高度保守，并被认为在受体的激活方面发挥作用(Rovati *et al.*, 2007)。在第六跨膜结构(TM6)上存在 F₆₃₆-X-X-X-W-X-P 结构域，后面跟有两个苯丙氨酸残基(F₆₄₃, F₆₄₄)，该结构域在视紫红质类 G 蛋白偶联受体内也高度保守(图 2.3)。

对 *DmOA3L*、*DmOA3S* 和昆虫体内 *CG18208-like* 型基因的氨基酸序列进行多重序列比对(图 2.3)。黑圆点标注的 N₁₄, N₃₁, N₆₄, N₆₉, N₈₀, N₉₁, N₉₆ 可能是 N 端糖基化位点(N-X-[S/T])。黑色三角形标注的可能是蛋白激酶 C ([S/T]-X-[R/K]) 磷酸化位点(T₁₄₂, T₃₂₆, S₄₂₇)，一个位于第一个胞内环，两个位于第三个胞内环。

对果蝇和其它昆虫的章鱼胺受体基因构建系统进化树，以邻近法(neighbor-joining)重复 1000 次，*DmRh1* 为外源基因，结果显示，*DmOA3* 与二化螟的 *CsOA3* 和赤拟谷盗体内 *CG18208* 的同源基因聚在一起，说明有较近的亲缘关系(图 2.4)。

图 2.1 *CG18208* 的七跨膜区域Fig. 2.1 Seven hydrophobic transmembrane domains of *CG18208*

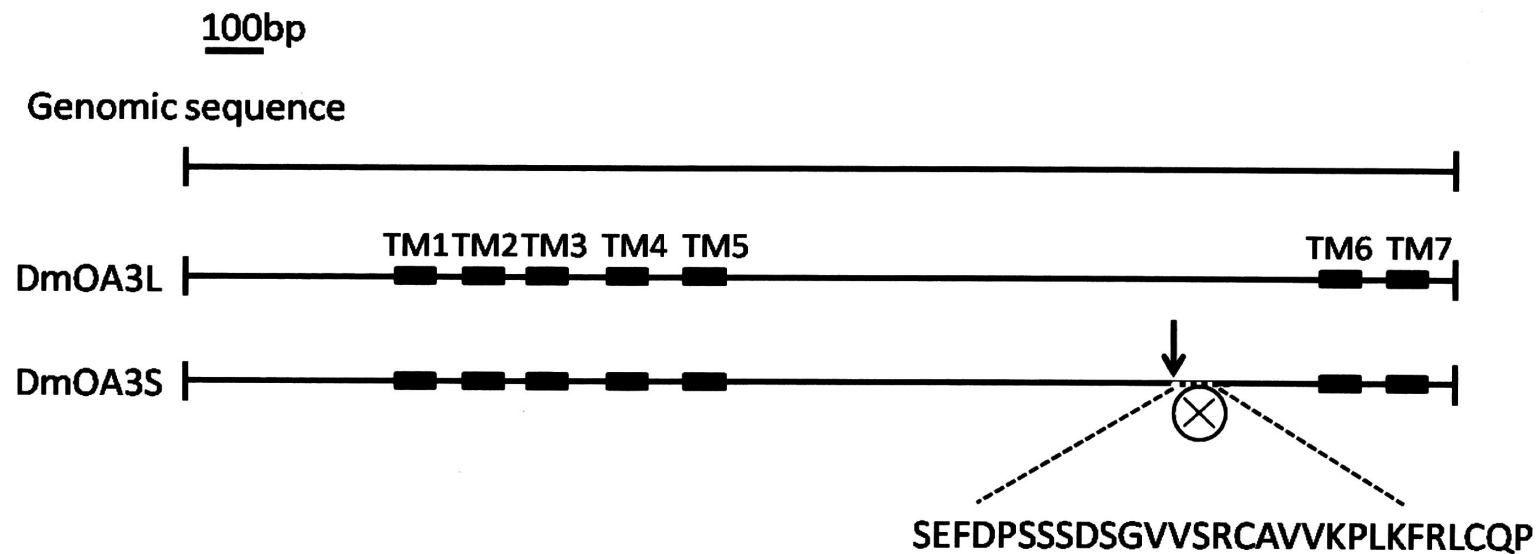


图 2.2 DmOA3 的基因结构图

Fig. 2.2 Schematic representation of the DmOA3 receptor genomic and the two molecular mRNA isoforms. The top lines represent the original genomic sequences. The transmembrane regions are indicated as TM1-7. The DmOA3S lacked 29 amino acids were shown in the last line.

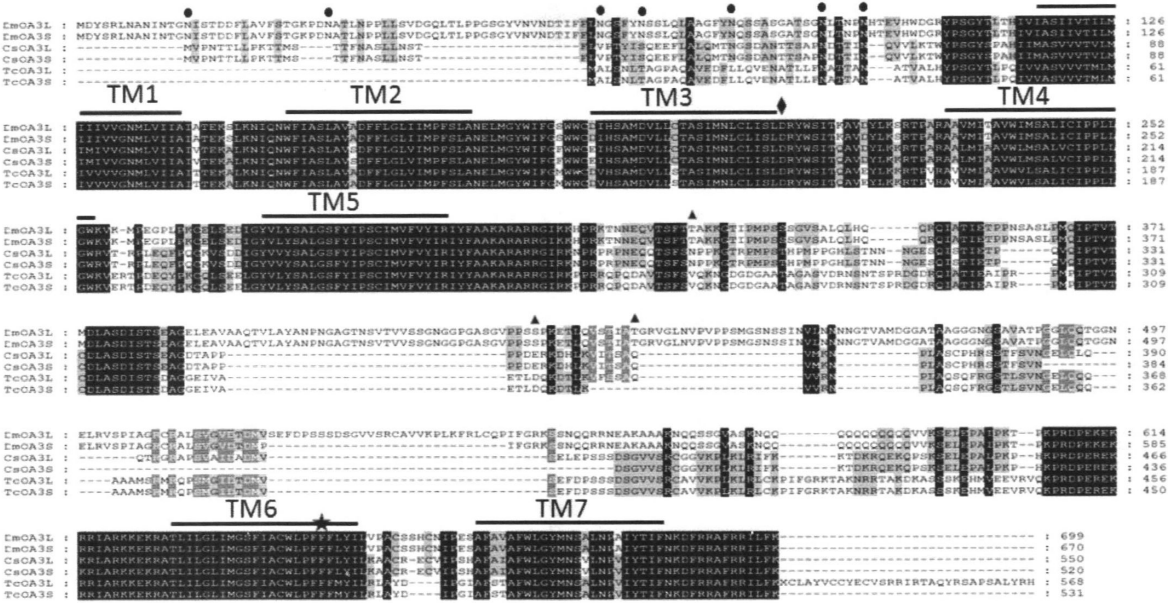


图 2.3 DmOA3L 氨基酸序列与二化螟和赤拟谷盗中同源基因的多序列比对分析

Fig. 2.3 Amino acid sequence alignment of DmOA3L and orthologous receptor from *Chilo suppressalis* and *Tribolium castaneum*. The amino acid position is indicated on the right. The transmembrane helices are indicated by TM1-7. The alignment was performed by ClustalX and the identity level of amino acids between the receptors were highlight by the shaded sequences. Potential N-glycosylation are labeled by filled circles. Potential phosphorylation sites are labeled by filled triangle. The second phenylalanine after the FXXXWXP motif in TM6 is labeled by pentacles, which is a unique feature of aminergic receptors. The DRY site is labeled by diamond, which is highly conservative in GPCRs family.

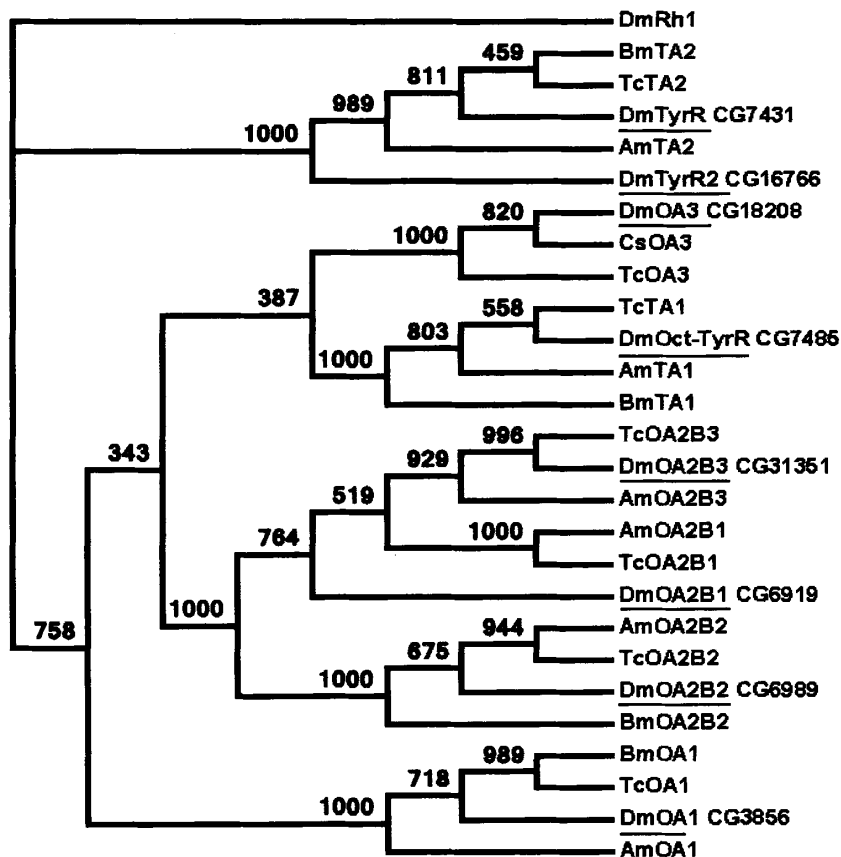


图 2.4 *CG18208* 和其它章鱼胺受体的进化树分析

Fig. 2.4 Phylogenetic analysis of *CG18208* and various OA receptors. Neighbor-joining trees were constructed in Clustal W2 using 1000-fold bootstrap re-sampling, and the resulting tree was displayed graphically by MEGA5.05. The numbers at the nodes of the branches represent the level of bootstrap support for each branch. *DmRh1* was used as an outgroup. Abbreviations: Dm, *Drosophila melanogaster*; Bm, *Bombyx mori*; Am, *Apis mellifera*; Tc, *Tribolium castaneum*; Accession No.: *DmRh1*, NM_079683.3; *BmTA2*, BAI52937.11; *TcTA2*, XP_001811970.1; *DmTyrR*, NP_650652; *AmTA2*, NP_001032395.1; *DmTyrR2*, NP_650651.1; *DmOA3*, NM_142497.5; *CsOA3*, KF460458.1; *TcOA3*, XP_969656.2; *TcTA1*, NP_001164311.1; *DmOct-TyrR*, NM_079695; *AmTA1*, NP_001011594.1; *BmTA1*, BAD11157.1; *TcOA2B3*, XP_974238.2; *DmOA2B3*, NP_001034043.1; *AmOA2B3*, XP_397077.3; *AmOA2B1*, XP_397139.2; *AmOA2B2*, XP_396348.4; *TcOA2B2*, XP_974214.1; *DmOA2B2*, NP_001034049.1; *BmOA2B2*, BAJ06526.11; *BmOA1*, NP_001091748.1; *AmOA1*, NP_001011565.1; *DmOA1*, NP_732541.1; *TcOA1*, XP_970007.2.

3.2 *DmOA3* (*CG18208*) 偶联胞内 cAMP 测定结果

为了研究 *DmOA3* 偶联的信号通路以及药理学性质, 将融合质粒 pcDNA3-*CG18208* 转染于 HEK-293 细胞中, 通过筛选获得了稳定的表达该受体的细胞系。研究发现 10 μM 的章鱼胺和酪胺均能引起胞内 cAMP 水平降低, 说明 *DmOA3* 在胞内偶联 G_i 蛋白。剂量效应实验显示, 章鱼胺 OA 和酪胺 TA 均呈现出显著的剂量反应 (图 2.5 A)。章鱼胺的浓度在 10^{-10} M 时就可造成 cAMP 下降 40%, 而酪胺在浓度达到 10^{-8} M 时才可起到同样的效果 (图 2.5 B)。说明章鱼胺的抑制效率高于酪胺, 二者的 EC_{50} 值分别为 8.20×10^{-11} M 和 4.37×10^{-9} M。

我们测定了双甲脒和杀虫脒对表达 *DmOA3* 细胞的影响, 结果显示, 双甲脒 (AMZ) 和杀虫脒 (CDM) 浓度在 10^{-8} M 能引起胞内 cAMP 的显著下降 (图 2.6), 二者的 EC_{50} 值分别为双甲脒 2.74×10^{-8} M, 杀虫脒 2.31×10^{-8} M。吴顺凡测定的双甲脒和杀虫脒对表达二化螟同源基因 *CsOA3* 细胞的影响, 结果显示双甲脒和杀虫脒浓度在 10^{-11} M 时即能引起胞内 cAMP 的显著下降 (图 2.8), 二者的 EC_{50} 值分别是 8.39×10^{-11} M 和 2.15×10^{-11} M (引自吴顺凡未发表数据), 可以看出二化螟体内的 *CsOA3* 受体比果蝇体内的 *DmOA3* 受体对双甲脒和杀虫脒敏感近 1000 倍。

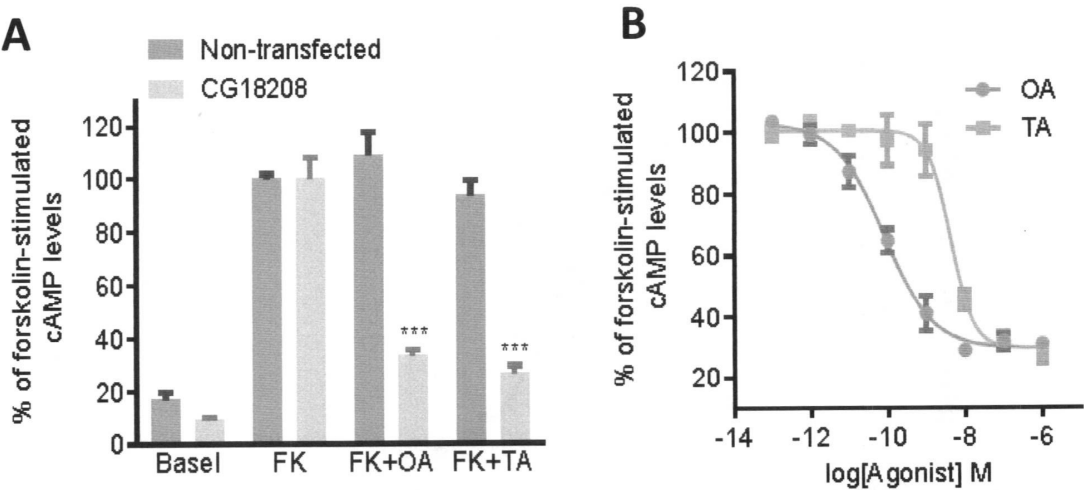


图 2.5 OA 和 TA 对 pcDNA3-*CG18208*/HEK-293 胞内 cAMP 含量的影响

Fig. 2.5 [cAMP]_i modulation in HEK-293 cells stably expressing *CG18208*. The amount of cAMP is given as the percentage of the value obtained with 10 μ M forskolin (=100). The data are represented as means $\pm$ SEM with $n=4$. Asterisks indicate values significantly different from the control value using two-way ANOVA with the Tukey-Kramer multiple comparisons test (** $P<0.001$). (A) Effects of forskolin and OA, TA on cAMP levels in non-transfected HEK-293 cells and in pcDNA3-*CG18208*/HEK-293 cells. Biogenic amine (10 μ M) with 10 μ M forskolin was added to cells. Asterisks indicate statistically significant differences for the treatments versus 10 μ M of forskolin respectively. (B) Dose-response curve of OA and TA in attenuating forskolin-stimulated intracellular cAMP levels in pcDNA3-*CG18208*/HEK-293 cells. OA and TA at 10^{-13} - 10^{-6} M was added to cells.

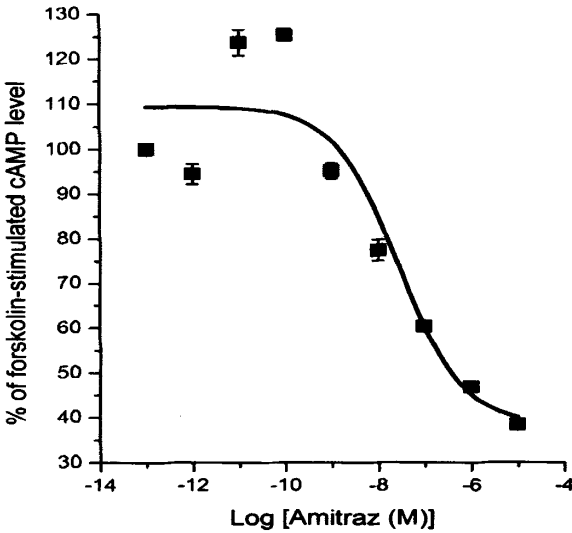


图 2.6 双甲脒对 pcDNA3-*CG18208*/HEK-293 细胞的剂量效应

Fig. 2.6 Dose-dependent effects of amitraz in attenuating forskolin-stimulated intracellular cAMP levels in pcDNA3-*CG18208*/HEK-293 cells. Amitraz at 10^{-13} - 10^{-5} M was added to cells.

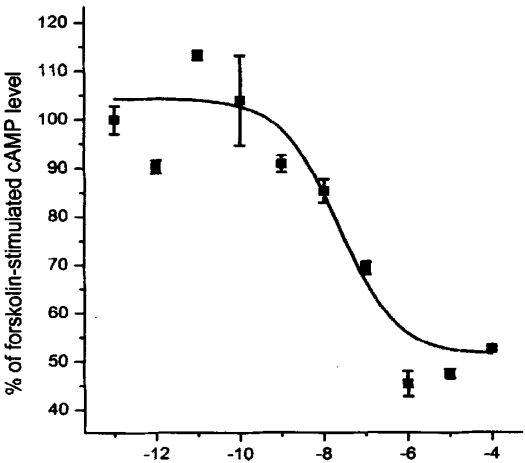


图 2.7 杀虫脒对 pcDNA3-*CG18208*/HEK-293 细胞的剂量效应

Fig. 2.7 Dose-dependent effects of CDM in attenuating forskolin-stimulated intracellular cAMP levels in pcDNA3-*CG18208*/HEK-293 cells. CDM at 10^{-13} - 10^{-4} M was added to cells.

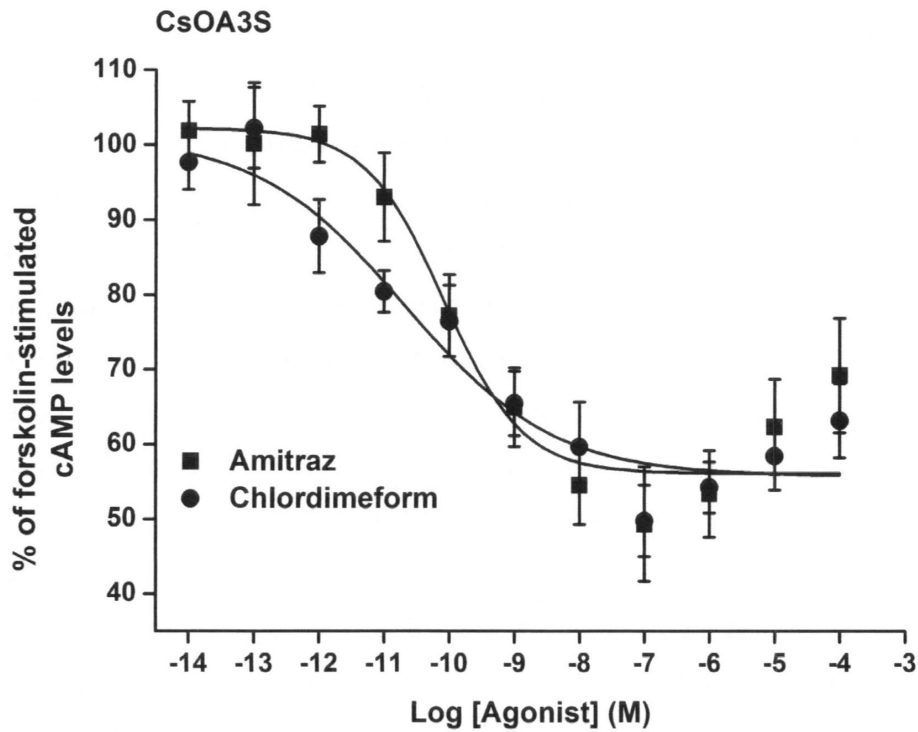


图 2.8 双甲脒和杀虫脒对 pcDNA3-*CsOA3*/HEK-293 细胞的剂量效应 (引自吴顺凡)

Fig. 2.8 Dose-dependent effects of AMZ and CDM in attenuating forskolin-stimulated intracellular cAMP levels in pcDNA3-*CsOA3*/HEK-293 cells. AMZ and CDM at 10⁻¹⁴-10⁻⁴ M was added to cells.

4 讨论

因为二化螟对双甲脒敏感,而果蝇对双甲脒不敏感,我们猜测这种差异效应可能是靶标药理学差异引起的。吴顺凡对二化螟的 *CsOA3* 的药理学实验,表明双甲脒和杀虫脒在浓度很低 (10^{-11} M) 的情况下即可特异的激活 *CsOA3* 受体。本章研究中,我们从果蝇体内克隆得到 *CG18208* 的 ORF 全长,并将其命名为 *DmOA3*,它在二化螟体内的同源基因为 *CsOA3*。将 *CG18208* 稳定表达于 HEK-293 细胞中,双甲脒和杀虫脒对 pcDNA3-*CG18208*/HEK-293 细胞的剂量效应实验表明,它们在 10^{-8} M 时均能引起胞内 cAMP 水平的降低,即特异的激活 *DmOA3* 受体。二化螟 *CsOA3* 对双甲脒和杀虫脒的敏感性比对果蝇的 *DmOA3* 高 1000 倍,这解释了生测实验中,二化螟和果蝇对双甲脒表现出不同的敏感性的原因。

吴顺凡 (2013) 通过对二化螟体内章鱼胺受体的药理学研究,认为 *CsOA3* 受体 (α_2 -adrenergic-like receptor) 很可能是甲脒类杀虫剂的作用靶标。本研究中通过对果蝇体内 *DmOA3* 受体药理学性质的研究,认为在神经组织表达的 *OA3* 型受体可能是双甲脒和杀虫脒在果蝇体内的作用靶标,具体结果还需要通过生测实验的方法来进行验证。

早在 1983 年,Downer 发现 demethylchloridimeform (DMCDM) 和双甲脒 (AMZ) 能够模拟 OA 激活蟑螂神经组织内的腺苷酸环化酶 cAMP 活性,从而初步确定甲脒类杀虫剂的作用靶标是 OA 受体(Gole *et al.*, 1983)。甲脒类杀虫剂与 OA 受体作用后对害虫引起的症状,主要表现为极度兴奋,行为异常,致残进而死亡(Dudai *et al.*, 1987)。Roeder 认为只有在神经上表达的 OA 受体似乎才是甲脒类杀虫剂的作用靶标,因为靶标生物的行为变化不可能是来自非神经组织的 OA 受体作用产生的(Roeder, 1995)。

第三章 转二化螟章鱼胺受体基因果蝇的构建及验证

1 引言

通过对野生果蝇 *Drosophila melanogaster* 和二化螟 *Chilo suppressalis* 进行生测实验,发现双甲脒对果蝇的毒性很低,对二化螟毒性较高。为此我们克隆得到二化螟体内的章鱼胺受体基因 *CsOA1*, *CsOA2B2* 和 *CsOA3*,并将其构建到 pUAST 载体中,得到 UAS-*CsOA1*、UAS-*CsOA2B2* 和 UAS-*CsOA3*。将上述重组质粒通过显微注射的方法导入野生果蝇的胚胎,得到转二化螟章鱼胺受体基因的转基因果蝇品系,用果蝇的 *mini-white* 眼色基因进行标记,转基因果蝇的子代即可通过复眼的颜色进行筛选。将得到的转基因果蝇用双平衡子果蝇进行平衡定位,将平衡定位的转基因果蝇品系 UAS-*CsOA* 分别与 *Elav-Gal4* 和 *24B-Gal4* 果蝇品系杂交,其中 *Elav-Gal4* 驱动 *CsOA* 在果蝇的神经系统中表达, *24B-Gal4* 驱动 *CsOA* 在果蝇的肌肉组织中表达。

2 材料和方法

2.1 供试昆虫

本实验所用二化螟采自浙江省杭州市富阳水稻研究所试验农场。田间采来的是越冬的老熟幼虫,化蛹羽化后,将成虫放置在 40 cm×50 cm×24 cm 产卵箱中,并在箱底放少量湿沙土,保持相对湿度在 90%以上,温度在 25±1℃。产卵箱内放入几丛稻苗供其产卵,隔日收集卵时换新苗,并将已黑头的卵块用 75%酒精和 1%甲醛对卵面进行消毒,接着将其接入盛有人工饲料(Han *et al.*, 2012)的培养瓶中,孵化后的幼虫用人工饲料饲养,过程中及时更换饲料,直至幼虫化蛹,二化螟继代饲养在人工气候室(25±1℃, RH=75%, L:D=14:10 h)内。

本实验所用的野生型黑腹果蝇 *D. melanogaster* 由本实验室世代培养,果蝇双平衡体系 *B1/Cyo*; *TM2/TM6B* 由上海生命科学研究院生化与细胞生物研究所提供, *Elav-Gal4* 和 *24B-Gal4* 果蝇品系由浙江大学生命科学院遗传研究所杨小杭老师提供。饲养方法同第二章 2.1。

2.2 RNA 抽提

分别收集二化螟不同虫态,包括卵,幼虫,蛹和成虫及二化螟幼虫期的不同组织,如血细胞、脂肪体、马氏管、中肠和神经组织,分离后的样品用液氮研磨

后冻存于-70℃冰箱中。利用 TRizol 法（Invitrogen, Carlsbad, CA. USA）分别提取各供试样品的总 RNA，具体方法见第二章 2.2。

2.3 基因克隆

取 20 头 5 龄幼虫的血细胞，获取总 RNA 后，以 1.0 μg 总 RNA 为模板，用 全式金公司反转录试剂盒(TransScript All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for PCR, AT321-01)合成 cDNA。根据 *CsOA1*, *CsOA2B2*, *CsOA3* 发布在（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>）上的序列数据（吴顺凡，2013），用 EditSeq 找到序列的 ORF 后，用 Primer5.0 软件设计引物，见表 3.1。

克隆目的基因片段的 50μL PCR 反应体系如下：

5×Q5 Reaction Buffer	10 μl
10 mM dNTPs	1 μl
10 μM Forward Primer	2.5 μl
10 μM Reverse Primer	2.5 μl
cDNA	0.5 μl
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	0.5 μl
灭菌的 ddH ₂ O	33 μl

PCR 反应程序：98℃ 30 sec；98℃ 10 sec；55℃ 30 sec；72℃ 60 sec；37 个循环；72℃ 2 min； 4℃保存。

表 3.1 PCR 扩增 *CsOA1*、*CsOA2B2*、*CsOA3* cDNAs 序列所用的引物
Table 3.1 Primers for cloning the genes *CsOA1*、*CsOA2B2*、*CsOA3* cDNAs

引物名称	引物序列（5'-3'）
Primer name	Primer sequence（5'-3'）
<i>CsOA1</i> -compF	ATGCGCTCGCTGAACGAG
<i>CsOA1</i> -compR	TTACCTGAAATCTTTGGAGAACAGC
<i>CsOA2B2</i> -compF	ATGGATCCCATAAACGGATCC
<i>CsOA2B2</i> -compR	TCAAAGCGACGCCAAATCCGATGCT
<i>CsOA3</i> -compF	ATGGTACCGAATACGACATTGCT
<i>CsOA3</i> -compR	TCACTTAAACAGTATCCTTCTGAAG

2.4 PCR 产物的纯化、目的片段与克隆载体连接及连接产物的转化

具体操作过程和方法参见第二章 2.4-2.6。

2.5 转化子的鉴定和测序

操作方法参见第二章 2.7。

2.6 质粒抽提

采用 Axygen Plasmid Kit 试剂盒抽提质粒 DNA，操作方法见试剂盒说明书。

2.7 pUAST-CsOA 表达载体的构建

2.7.1 pUAST 载体的线性化

利用双酶切的方法将 pUAST 载体线性化，所用的限制性内切酶是 *EcoR* I 和 *Kpn* I，反应体系为 60 μ l，具体操作如下：

<i>EcoR</i> I	4 μ l
<i>Kpn</i> I	4 μ l
Green Buffer	6 μ l
pUAST	6 μ l
灭菌的 ddH ₂ O	40 μ l

37℃酶切两小时后，将酶切体系放至 85℃条件下 10 min，灭活内切酶，得到线性化的 pUAST 载体。

2.7.2 为目的片段 *CsOA1*，*CsOA2B2*，*CsOA3* 加酶切位点

ClonExpressTMII 插入片段引物设计原则：通过在引物 5'端引入线性化克隆载体末端同源重组序列，使得插入片段扩增产物 5'端和 3'端最末端分别带有和线性化克隆载体两末端对应的完全一致的序列（15 bp）。根据该原则设计的引物如表 3.2 所示，通过 PCR 扩增得到含酶切位点的 *CsOA1*、*CsOA2B2*、*CsOA3* 插入片段。PCR 反应体系为 50 μ l，具体操作如下：

灭菌的 ddH ₂ O	10 μ l
2×PCR buffer for KOD-FX	25 μ l
2 mM dNTPs	10 μ l
Forward primer	1.5 μ l
Reverse primer	1.5 μ l
KOD-FX	1 μ l
cDNA	1 μ l

PCR 反应条件为：94℃ 5 min；98℃ 10 sec；58℃45 sec；68℃ 2 min；35 个循环；68℃ 10 min；4℃ 保存。

表 3.2 PCR 为 *CsOA1*, *CsOA2B2*, *CsOA3* 加酶切位点所用的引物

Table 3.2 Primers for adding restriction enzyme cutting sites for *CsOA1*, *CsOA2B2*, *CsOA3*

引物名称	引物序列(5'-3')
Primer name	Primer sequence(5'-3')
<i>CsOA1</i> -compF	TGAATAGGGAATTGGGAATTCATGCGCTCGCTGAACGAG
<i>CsOA1</i> -compR	CAAAGATCCTCTAGAGGTACCTTACCTGAAATCTTTGGAGAACAGC
<i>CsOA2B2</i> -compF	TGAATAGGGAATTGGGAATTC ATGGATCCCATAAACGGATCC
<i>CsOA2B2</i> -compR	CAAAGATCCTCTAGAGGTACCTCAAAGCGACGCCAAATCCGATGCT
<i>CsOA3</i> -compF	TGAATAGGGAATTGGGAATTCATGGTACCGAATACGACATTGCT
<i>CsOA3</i> -compR	CAAAGATCCTCTAGAGGTACCTCACTTAAACAGTATCCTTCTGAAG

2.7.3 同源重组反应

于冰水浴中配制如下反应体系

灭菌的 ddH ₂ O	10 μl
5×CE TM II Buffer	4 μl
线性化表达载体	3 μl
插入片段	1 μl
Exnase TM	2 μl

体系配制完成后，用移液器上下轻轻吹打几次混匀各组分，为避免产生气泡（不要剧烈震荡或涡旋混匀）。置于 37℃ 反应 30 min。反应完成后，立即将反应管置于冰水浴中冷却 5 min。之后，反应产物可直接进行转化，也可冻存于 -20℃，待需要时解冻转化。

2.8 反应产物转化、涂板

取 20 μl 冷却反应液，加入到 200 μl 感受态细胞中，轻弹管壁数下混匀，在冰上放置 30 min，42℃ 热激 45 sec，立即拿出放于冰上 2 min。加 900 μl 的 LB 培养基，37℃ 孵育 10 min 充分复苏，37℃ 摇菌 1 h。取 100 μl 菌液均匀涂布在含有 Amp 抗性的平板上，将平板倒置，于 37℃ 过夜培养。

2.9 克隆鉴定和测序

过夜培养后，从重组反应转化平板上每个平板挑取 20 个单菌落，以表 2.2 中的序列为引物，通过菌落 PCR 的方法，具体方法参见第二章 2.7，对重组结果进行鉴定。经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后，将疑似含有目的片段的菌液送往铂尚生物技术有限公司测序。

2.10 质粒抽提

根据测序结果, 从正确发生同源重组的菌液中吸取 3 ml 转移到 50 ml 试剂管中, 管内装有 25 ml 左右含 Amp 抗性的 LB 培养液。将管子放置在摇床上 37℃, 300 rpm 摇过夜。将摇浑浊的菌液进行质粒抽提, 具体方法参见试剂盒 (Plasmid Midi Kit, QIAGEN) 说明书。

2.11 果蝇胚胎的显微注射

2.11.1 显微注射用 DNA 的制备

- (1) 吸取 25 μg pUAST-*CsOA* 重组质粒 (浓度 $>0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), 5 μg 辅助质粒 (p Δ 2-3) 和 0.1 体积 3 M 醋酸钠, 3 体积 95% 的乙醇混合;
- (2) -70℃ 放置 30 min;
- (3) 4℃ 12000 rpm 离心 20 min, 除去乙醇;
- (4) 用 70% 乙醇漂洗沉淀物, 4℃ 12000 rpm 离心 5 min, 除去乙醇;
- (5) 室温干燥沉淀物 10 min;
- (6) 沉淀物溶于 50 μl 注射缓冲液, 缓冲液组成为 5 mM KCl, 0.1 mM NaH_2PO_4 (pH=6.8);
- (7) 用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测产物。

2.11.2 果蝇胚胎的准备

(1) 果蝇的扩繁

w¹¹¹⁸ 果蝇繁殖力强, 在扩繁的过程中, 需要注意: 第一, 及时清瓶, 瓶中幼虫发育到 2 龄时就要把老的果蝇清空, 否则瓶中因果蝇产卵太多导致环境过湿, 果蝇翅膀很容易被粘住而降低活力; 第二, 3 龄幼虫爬上瓶壁后可往瓶中加入纸, 一般每瓶加 2~3 张。这样做不仅可以使瓶内保存干燥的环境, 还可以增加每瓶果蝇的产量; 第三, 瓶内新的果蝇孵出后要及时收集, 否则瓶内会因果蝇太多而粘湿。

(2) 产卵碟的制作

称取 7.8 g 蔗糖, 溶解于 75 ml 苹果汁。称取 8.4 g 琼脂, 溶于 240 ml 水中, 微波炉内加热全溶后, 将果汁溶液和琼脂混合后, 倒入培养皿内, 待其冷却即可。产卵碟做好后可置于 4℃ 冰箱备用。使用时, 在板上涂上新鲜的酵母膏, 以刺激果蝇产卵。

(3) 果蝇胚胎的收集

为了在转基因注射时得到足够数量的胚胎,需要对果蝇进行预产。显微注射前一天,将果蝇放入胚胎收集器,25℃避光条件下,使其在涂有新配酵母膏的果汁板上产卵。每隔1 h换一次板。这样能调整果蝇的昼夜节律,让它们适应在白天产卵。如果预产时胚胎数量足够多,就可以准备做显微注射了。中午将预产过的果蝇放入胚胎收集器内,每隔1 h收一次卵。

(4) 胚胎的处理

果蝇的卵外层有较坚硬的壳,注射前,需对卵进行去壳处理。将产卵板上的卵用清水冲洗,去除较大杂质后,用毛刷辅助,收集到网兜中,用水将杂质冲洗干净,放在50%的漂白剂中去壳2 min,然后用自来水冲洗2 min。

(5) 排卵

低温能延缓果蝇胚胎的发育速度,所以在18℃条件下进行排卵。在载玻片上涂上薄薄的一层胶(将适量双面胶放入正庚烷中,摇床摇30 min得到的胶溶液),待胶干后,将卵用毛刷扫到双面胶的下方,吸干多余的水。显微镜下用排卵笔进行胚胎排列时,胚胎的前端向内,后端向外。排列成线形。排好后,放入硅胶干燥剂中干燥。干燥时间的长短因环境湿度等原因而调整,一般5~10 min。对胚胎湿度的控制关系到胚胎的显微注射能否成功。胚胎过湿,注射时,容易爆破;胚胎过干,注射时不易戳进且直接影响胚胎的成活率。

2.11.3 显微注射针的准备

所用拉针仪为Flaming/Brown Micropipette Puller Model P-97,设置的参数为:HEAT=680, PULL=75, VEL=80, TIME=200。

所用的毛细管为7"Drummond #3-000-203-G/XL (Made in U.S.A. by DRUMMOND SCIENTIFIC COMPANY)。

拉好的针经过碰针后,装入准备好的DNA样品,安装于显微注射仪上。

2.11.4 显微注射

本研究中利用日本NARISHIGE公司型号为MODEL MN-153, SERIAL NO.07018的显微注射仪器,注射所用的倒置显微镜为日本Nikon ECLIPSE TS 100。

胚胎干燥后,在其上方覆上一层halocarbon oil保湿。显微镜下通过注射针把质粒DNA注射到果蝇胚胎尾端的极细胞处。

2.12 注射后的培养

将注射好的卵连同载玻片一起放在涂有酵母的产卵碟上，上面加润湿的脱脂棉防止胚胎脱水死亡，置于 25℃培养箱培养，待幼虫孵出后转移至含有玉米粉的果蝇管内，置于 25℃培养箱继续培养。

2.13 转基因果蝇的筛选、平衡、定位

(1) 当注射的果蝇胚胎羽化后，收集处女蝇，将收集的雌雄蝇（F₀）分别与 *w¹¹¹⁸* 回交，收集羽化的后代（F₁）。

(2) 由于 pUAST 质粒上含有果蝇的 *mini-white* 眼色基因，可以使果蝇眼色从白色变为红色，挑选红眼果蝇即为含有转基因序列的果蝇。

(3) 将 F₁ 代红眼果蝇和双平衡果蝇 DB(Double Banlance)*Bl/Cyo; TM2/TM6B* (*Bl*=背部短毛，*Cyo*=卷翅，*Bl/Cyo* 位于 2 号染色体，*TM2*=大平衡棒，*TM6B*=肩部多毛且短茧，*TM2/TM6B* 位于 3 号染色体) 杂交，按图 3.1 的策略对转基因果蝇进行平衡定位。（*代表转入的基因）：

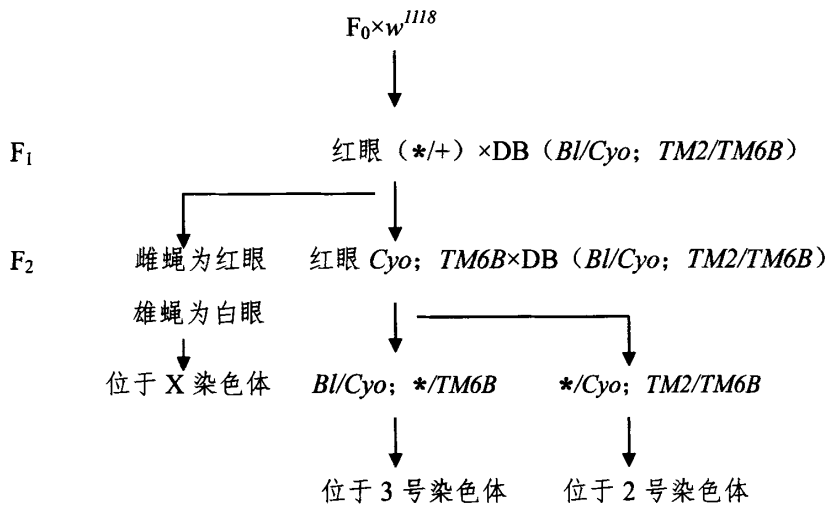


图 3.1 转基因果蝇筛选、平衡及定位

Fig. 3.1 The screening, balancing and locating of transgenic flies

2.14 转基因果蝇的纯合

从转基因果蝇（*UAS-CsOA/Cyo; TM2/TM6B*）管中挑红眼卷翅的处女蝇与红眼卷翅的雄蝇交配，杂交后代中挑选红眼直翅的果蝇即得到 2 号染色体纯合的转基因果蝇。从转基因果蝇（*Bl/Cyo; UAS-CsOA/ TM6B*）中挑选红眼短茧，肩

部多毛的处女蝇与红眼短茧肩部多毛的雄蝇交配，杂交后代中挑选红眼长茧肩部正常毛的果蝇即得到 3 号染色体纯合的转基因果蝇。

2.15 果蝇品系的杂交

(1) 为杂交收集处女蝇

果蝇遗传杂交过程，是从收集处女蝇开始的。25℃条件下，新羽化的雌雄果蝇在羽化的 8 h 内不会交配，如果将要收集处女蝇的果蝇瓶内成虫清光后，管内任何 7~8 h 内羽化的雌蝇都是处女蝇。在 18℃条件下，由于果蝇发育速度显著减慢，新羽化的雌蝇在 16 h 内都可被认为是处女蝇。因此可以将果蝇瓶白天放在 25℃培养箱每 8 h 收集一次处女蝇，晚上放在 18℃培养箱，第二天早上（16 h 内）收集出来的果蝇，一般处女蝇体色苍白，体型较大，透明的腹部有黑点。为了确保收到的果蝇都是处女蝇，可以将收集的果蝇在管内养 2~3 d，如果没有产卵，说明管内雌蝇均为处女蝇。一般杂交所用的果蝇为羽化后 3~7 d 的处女蝇和雄蝇交配，果蝇太老交配能力和产卵能力都会下降。

(2) 杂交方案

将 2.13 中得到的 2 号染色体纯合的转二化螟章鱼胺受体基因（CsOA）的果蝇品系分别和 *Elav-Gal4*、*24B-Gal4* 果蝇品系杂交，其中 *Elav-Gal4* 将驱动 *CsOA* 在果蝇神经系统中进行表达，*24B-Gal4* 则驱动 *CsOA* 在果蝇的肌肉组织中进行表达。杂交的具体方法为：收集 *Elav-Gal4*、*24B-Gal4* 果蝇品系的处女蝇各约 60 只，2 号染色体纯合的 *UAS-CsOA1*，*UAS-CsOA2B2*，*UAS-CsOA3* 转基因果蝇雄蝇各 20 只，将 *Gal4* 的处女蝇（20 只）和 *UAS* 的雄蝇（10 只）放在一个果蝇管内，让其产卵，为了得到更多管的 F₁ 代果蝇，每 3 天将杂交的亲本倒一次管子，共倒 6 次。

表 3.3 转基因果蝇杂交方案
Table 3.3 The hybrid scheme of transgenic flies

Male	Female	
	<i>Elav-Gal4</i>	<i>24B-Gal4</i>
<i>UAS-CsOA1</i>	<i>Elav-Gal4>UAS-CsOA1</i>	<i>24B-Gal4>UAS-CsOA1</i>
<i>UAS-CsOA2B2</i>	<i>Elav-Gal4>UAS-CsOA2B2</i>	<i>24B-Gal4>UAS-CsOA2B2</i>
<i>UAS-CsOA3</i>	<i>Elav-Gal4>UAS-CsOA3</i>	<i>24B-Gal4>UAS-CsOA3</i>

2.16 PCR 验证

2.16.1 杂交果蝇基因组 DNA 的提取

将 2.13 中得到的 2 号染色体纯合的转基因果蝇管中的果蝇用二氧化碳麻醉

装置麻醉后,倒在飞行板上,每个品系随机挑选 5 头果蝇,将果蝇单头放入 1.5 ml 的离心管内,盖子上写明品系名称。将离心管放置在-80℃冰箱 10 min 左右,保证果蝇死亡。

配制提取果蝇基因组 DNA 的缓冲液 (Squash buffer),操作方法为:称取一定量的 Tris、EDTA 和 NaCl 固体,用双蒸水稀释,并用浓盐酸调节 Tris 的 pH=8.0,将 100 μ l 1M Tris (pH=8.0), 20 μ l 0.5M EDTA 和 50 μ l 5M NaCl 加入 15 ml 离心管内,并加入 9.8 ml 双蒸水,充分震荡混匀,配成体积为 10 ml 的提取基因组 DNA 的缓冲液。

单头果蝇基因组 DNA 提取,具体操作方法如下:

- (1) 将冻死的果蝇从冰箱取出后,每个离心管加入 50 μ l 的提取缓冲液(缓冲液使用前,每 50 μ l 需加入 1 μ l 10 mg/ml 的蛋白酶 K);
- (2) 将研磨棒伸入管底,把果蝇在缓冲液中研碎;
- (3) 涡旋震荡离心管,使形成匀浆;
- (4) 将上述匀浆转移入 PCR 管,放置在 PCR 仪内,程序为 37℃ 30 min, 95℃ 2 min, 4℃ 保存;
- (5) 将 PCR 产物 14000 rpm 离心 7 min;
- (6) 将上清即基因组 DNA 转入新的 PCR 管,置于 4℃ 冰箱保存。

2.16.2 PCR 反应

基因组 PCR 验证引物见表 3.4,其中 *CsOA1* 引物拉取的片段长度为 184 bp, *CsOA2B2* 的引物拉取片段长度为 254 bp, *CsOA3* 引物片段长度为 278 bp。*CG7485* 为果蝇基因组中随机选取的一个基因,作为对照以验证模板的质量。

PCR 体系如下:

灭菌的 ddH ₂ O	10 μ l
2×PCR buffer for KOD-FX	25 μ l
2 mM dNTPs	10 μ l
compF	1.5 μ l
compR	1.5 μ l
KOD FX	1 μ l
基因组 DNA	0.5 μ l

PCR 反应条件为：94℃ 10 min；94℃ 30 sec；55℃ 30 sec；72℃ 30 sec；35 个循环；72℃ 10 min；4℃ 保存。

表 3.4 基因组 PCR 验证引物
Table 3.4 Primers for genome PCR

引物名称	引物序列(5'-3')
Primer name	Prime sequence(5'-3')
CsOA1-compF	GCGTCTATCCTGAACCTTTGC
CsOA1-compR	GCTTCTTCGGGCTTTTATCC
CsOA2B2-compF	TTATGCCCTTCAACTTCAGCG
CsOA2B2- compR	ACTGCGTAAGGTTTGTTCAC
CsOA3-compF	GATGGGTIATTGGATTTTCGG
CsOA3-compR	TCGGACACCTTGCACTGTGGG
CG7485-compF	GCTGACCATCATCGGGAACAT
CG7485-compR	CGATCAACGGCGGACTACTTA

2.17 RT-PCR 验证

2.17.1 杂交果蝇 RNA 的提取

分别从杂交果蝇 24B-Gal4>UAS-CsOA1, 24B-Gal4>UAS-CsOA2B2, 24B-Gal4>UAS-CsOA3, F1 代果蝇管中随机挑取果蝇麻醉后单头放入 2 ml 离心管中，做好标记。加入 1 ml TRIzol 并加入不锈钢珠用组织裂解仪 TissueLyser II 处理 1 min，室温静置约 5 min，提取果蝇的 RNA，对野生果蝇品系进行相同的操作，作为对照。具体操作方法见第二章 2.2。对 RNA 逆转录得到 cDNA。

2.17.2 RT-PCR 反应

PCR 反应体系为

灭菌的 ddH ₂ O	10 μl
Buffer	25 μl
dNTPs	10 μl
Forward primer	1.5 μl
Reverse primer	1.5 μl
KOD	1 μl
cDNA	0.5 μl

PCR 反应条件为：94℃ 10 min；94℃ 30 sec；58℃ 30 sec；72℃ 60 sec；35 个循环；72℃ 10 min；4℃ 保存。

表 3.5 RT-PCR 引物
Table 3.5 Primers for RT-PCR

引物名称	引物序列(5'-3')
Primer name	Prime sequence(5'-3')
24B-Gal4>UAS-CsOA1F	ATGCGCTCGCTGAACGAG
24B-Gal4>UAS-CsOA1R	TTACCTGAAATCTTTGGAGAACAGC
24B-Gal4>UAS-CsOA2B2F	ATGGATCCCATAAACGGATCC
24B-Gal4>UAS-CsOA2B2R	TCAAAGCGACGCCAAATCCGATGCT
24B-Gal4>UAS-CsOA3F	ATGGTACCGAATACGACATTGCT
24B-Gal4>UAS-CsOA3R	TCACTTAAACAGTATCCTTCTGAAG

3 结果和分析

3.1 二化螟章鱼胺受体基因的分析

通过 Genebank 查询到二化螟的 *CsOA1*, *CsOA2B2*, *CsOA3* 基因 (吴顺凡, 2013)。*CsOA1* 在 GeneBank 上的登录号是: JN641302, ORF 全长为 1362 bp, 编码 453 个氨基酸。其中, 编码一个 α 螺旋 7 跨膜受体, 说明 *CsOA1* 是典型的 G 蛋白偶联受体。通过基因表达谱分析 *CsOA1* 在二化螟幼虫的各组中都有表达, 在血细胞, 脂肪体和神经组织中分布较多, 血细胞中的含量最高。推测 *CsOA1* 可能在二化螟的免疫系统和神经系统中扮演重要角色(Wu *et al.*, 2013)。*CsOA2B2* 在 GenBank 上的登录号为: JN620367, 完整的 ORF 大小为 1188 bp, 共编码 395 个氨基酸。序列分析表明它编码的蛋白具有典型的 7 跨膜结构域, 和 β -adrenergic-like 型 OA 受体有很高的序列相似性。*CsOA2B2* 在二化螟幼虫神经组织中的表达量最高, 说明它在神经系统中扮演着很重要的作用它在表皮, 血细胞, 中肠, 马氏管和脂肪体也都有表达(Wu *et al.*, 2013)。

CsOA3 有两个不同的剪切体: *CsOA3S* 和 *CsOA3L*。其中 *CsOA3L* 的 ORF 全长为 1653 bp, 共编码 550 个氨基酸, 比 *CsOA3S* 多了 30 个氨基酸。*CsOA* 受体与其它昆虫基因相似性高。在二化螟幼虫体内, 该基因在马氏管和神经组织中表达量较高, 血细胞, 脂肪体, 中肠和表皮中也有表达(Wu *et al.*, 2013)。

3.2 质粒构建的结果与分析

CsOA1、*CsOA2B2*、*CsOA3* 片段加上酶切位点后, 经过 1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测。结果如图 3.2 所示, 其中 A、B、C 图分别为 *CsOA1*、*CsOA2B2*、*CsOA3* 加酶切位点后的电泳图。

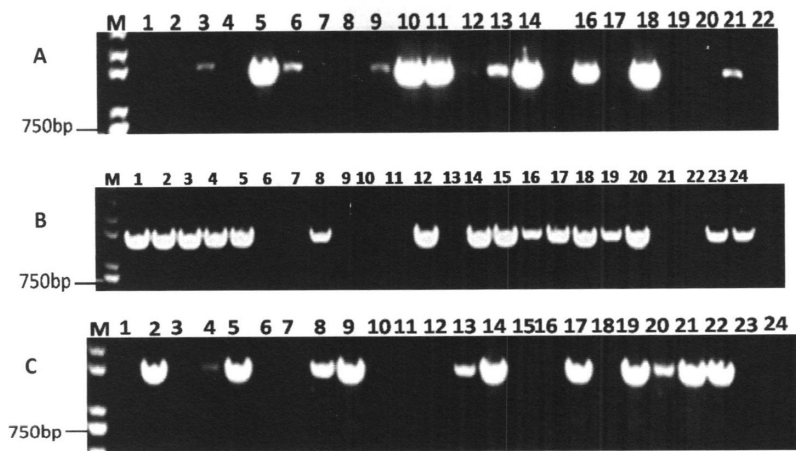


图 3.2 *CsOA1*, *CsOA2B2*, *CsOA3* 加酶切位点后 PCR 反应结果

Fig. 3.2 PCR results of adding restriction enzyme cutting sites for *CsOA1*, *CsOA2B2*, *CsOA3*

将含有酶切位点的片段构建到 pUAST 载体,通过菌落 PCR 的方法对结果进行检测。从 3.3 图中挑选有条带的菌液送测序,返还的结果显示目标条带已构建到载体中。

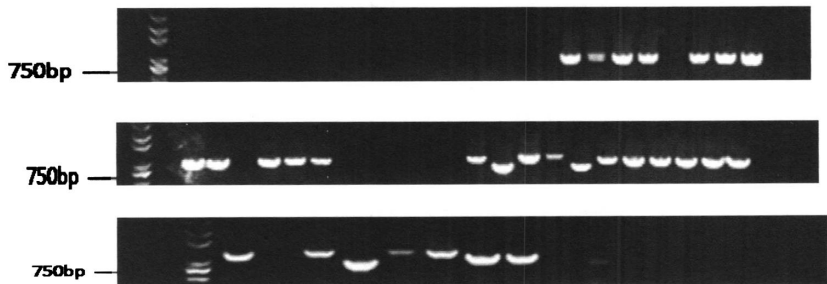


图 3.3 菌落 PCR 验证载体构建结果

Fig. 3.3 Colony PCR verify the vector construction results

3.3 显微注射结果

每品系各显微注射了 200 只 *w¹¹¹⁸* 果蝇(白眼直翅)的胚胎,最后都约有 55% 的胚胎发育成幼虫,因为注射的重组质粒中含有 *mini-white* 眼色基因,只需挑选复眼颜色为红色的后代,将红眼雌雄蝇分别与 DB 杂交两代,得到平衡定位的转基因果蝇。

3.4 杂交果蝇的 PCR 验证结果及分析

图 3.4 第一个图中 1~5 泳道为 *24B-Gal4>UAS-CsOA1* 果蝇品系 PCR 结果, 片段长度为 184 bp; 6~10 泳道为 *24B-Gal4>UAS-CsOA2B2* 果蝇品系 PCR 结果, 片段长度为 254 bp; 11~14 泳道为 *Elav-Gal4>UAS-CsOA2B2* 果蝇品系 PCR 结果, 片段长度为 254 bp; 15~18 泳道为 *24B-Gal4>UAS-CsOA3* 果蝇 PCR 结果, 片段长度为 278 bp; 19~23 泳道为 *Elav-Gal4>UAS-CsOA3* 果蝇品系 PCR 结果, 片段长度为 278 bp。第二个图中 1~4 泳道为 *Elav-Gal4>UAS-CsOA3* 果蝇品系 PCR 结果, 片段长度为 184 bp; 5~22 分别为六个果蝇杂交品系体内的 *CG7485* 基因的一段, 每个品系跑三个样品, 作为对照以验证模板的质量。

图 3.4 表明在基因组水平上, 二化螟的 *CsOA1*、*CsOA2B2*、*CsOA3* 基因已经转入果蝇体内, 并随杂交遗传给了后代。

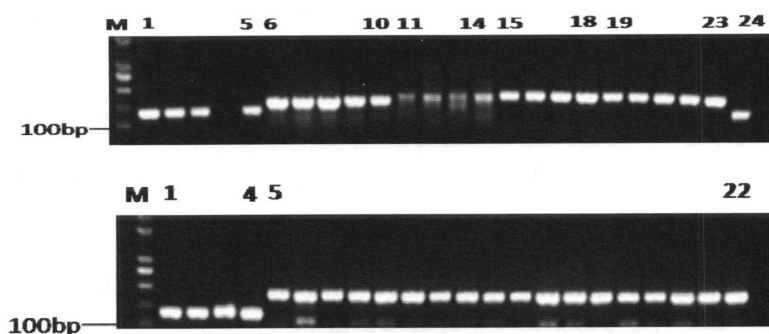


图 3.4 PCR 验证杂交果蝇的结果

Fig 3.4 PCR verify the hybridization of *Drosophila melanogaster* results

3.5 果蝇品系杂交后的 RT-PCR 结果及分析

图 3.5 中第 1、2、3 泳道分别是 *24B-Gal4>UAS-CsOA1*、*24B-Gal4>UAS-CsOA3*、*24B-Gal4>UAS-CsOA2B2* 杂交果蝇品系 RT-PCR 结果, 4、5、6 泳道为野生型果蝇品系作为对照。从 RT-PCR 结果表明二化螟的 *CsOA1*、*CsOA2B2*、*CsOA3* 基因成功转入果蝇体内并能稳定遗传给后代。

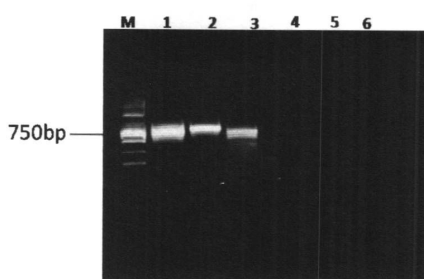


图 3.5 RT-PCR 验证杂交果蝇的结果

Fig.3.5 RT-PCR verify the hybridization of *Drosophila melanogaste* results

4 讨论

果蝇突变体有 *OAMB*, *Octβ1R* 和 *Octβ2R* 品系, 想要通过生测的方法, 测定双甲脒对突变体果蝇的毒力, 从而确定双甲脒作用受体。但以野生型果蝇做预实验时, 发现双甲脒对果蝇的毒力很低, 所以不能直接通过果蝇的突变体得到双甲脒对突变体果蝇的 LC_{50} 值。但我们已知二化螟对双甲脒很敏感, 由于二化螟血淋巴中含有很多的核酸酶, 很难通过 RNAi 的方式研究甲脒类杀虫剂具体作用于二化螟的哪一类章鱼胺 (OA) 受体, 于是我们通过转二化螟章鱼胺受体基因果蝇的方法研究双甲脒的作用靶标。

二化螟体内有三种不同的章鱼胺受体, 分别是 *CsOA1*, *CsOA2B2*, *CsOA3*。2013 年由 Wu 首次克隆得到, 他通过进化树比对分析发现, *CsOA1* 和 *DmOA1*, *BmOA1* 基因相似性很高, 亲缘关系较近, 同属于 α_1 -adrenergic-like 类 OA 受体, 和人类的 α_1 -adrenergic 受体具有较近的同源关系。*CsOA2B2* 和 *BmOA2B2*, *DmOA2B2* 同属 β -adrenergic-like 类 OA 受体, 有较近的亲缘关系, 并和人类的 β -adrenergic 受体有较近的同源关系。*CsOA3* 有两个剪切体, *CsOA3S* 和 *CsOA3L*, 和 *AmOA3*, *TcOA3*, *DmOA3* 能聚在一起, 同属于 α_2 -adrenergic-like 类 OA 受体, 和人类的 α_2 -adrenergic 受体具有近的亲缘关系 (Wu *et al.*, 2013)。

本章研究我们通过克隆得到二化螟的三类 OA 受体, 并将其构建到 pUAST 表达载体, 通过显微注射的方法将其导入果蝇胚胎, 得到转 UAS-*CsOA* 的果蝇品系。将 UAS 果蝇品系和 *Elav-Gal4* 和 *24B-Gal4* 果蝇品系进行杂交, 得到可以稳定表达 *CsOA* 的果蝇后代, 并通过分子的方法验证结果, 得到的杂交 F_1 代作为后续的实验材料。

第四章 双甲脒对转二化螟章鱼胺受体基因果蝇毒力的测定

1 引言

双甲脒是一种新型的甲脒类杀虫杀螨剂,中文别名为螨克、双虫脒等,学名 N-甲基-双(2, 4-二甲苯亚胺甲基)胺,英文名称是 Amitraz,商品名称有 Mitac, Tacti 和犷二力岁卜等,它的化学名称为 1,5-双(2, 4-二甲苯基)-3-甲基-1,3,5-三氮杂戊-1,4-二烯,分子式 $C_{19}H_{23}N_3$,分子量为 293.23, CAS 号: 33089-61-1。原药为白色或浅黄色针状结晶,有碳胺的味道,密度 1.128 g/cm^3 (20°C),熔点 $86^\circ\text{C}\sim 88^\circ\text{C}$,需储存在 $0\sim 6^\circ\text{C}$ 条件下。常温下在水中溶解度很低,约为 1 ppm,可溶于二甲苯、甲醇、丙酮和甲苯等多种有机溶剂。

双甲脒系广谱杀螨剂,具有多种毒杀机制,剂型一般为 20%双甲脒乳油。作用机制包括触杀、拒食、驱避,也有一定的胃毒、内吸和熏蒸作用(Hollingworth, 1976)。适用于柑橘、棉花等作物上的螨类,对木虱类也有良好的防治效果,兼治蚧、蚜及鳞翅目类幼虫等(Hollingworth, 1976; 徐振元, 1983b)。与有机磷类、阿维菌素和菊酯类杀虫剂混用时,有增效作用,并能有效扩大杀虫谱。

研究者已初步确认甲脒类杀虫剂的作用靶标是章鱼胺(OA)受体(Roeder, 2005; Hollingworth and Murdock, 1980),但是如前所述,昆虫体内有三类不同的 OA 受体,且它们各自的下游通过和药理学性质也不尽相同(Roeder, 1992),具体是哪一种或哪几种 OA 受体在起作用,还存在争议(Dudai *et al.*, 1987; Gole *et al.*, 1983)。本章实验中通过生测实验的方法,研究双甲脒对转二化螟章鱼胺受体基因的果蝇的毒力,并测得双甲脒对转基因果蝇品系的 LC_{50} 值,进一步探索了双甲脒具体的分子靶标。

2 材料和方法

2.1 实验材料

2.1.1 供试昆虫

实验用的果蝇为第三章 2.15 步骤中通过杂交得到的 F_1 代果蝇,可表示为: $24B-Gal4>UAS-CsOA1$, $24B-Gal4>UAS-CsOA2B2$, $24B-Gal4>UAS-CsOA3$ 和 $Elav-Gal4>UAS-CsOA1$, $Elav-Gal4>UAS-CsOA2B2$, $Elav-Gal4>UAS-CsOA3$; 2 号染色体纯合的转基因果蝇,表示为 $UAS-CsOA1$, $UAS-CsOA2B2$, $UAS-CsOA3$;

纯合的 *Elav-Gal4*, *24B-Gal4* 品系。

2.1.2 供试药品

双甲脒原药，产品编号 16202，购自 SIGMA。

2.2 实验方法

2.2.1 双甲脒的稀释

称取 99.7%双甲脒原药 0.025 g，加 10 ml 丙酮溶解配制成 2.5 mg/ml 母液，在预实验的基础上将双甲脒用丙酮逐渐稀释，最终的浓度梯度为 2.0 mg/ml，1.5 mg/ml，1.0 mg/ml，0.8 mg/ml，0.5 mg/ml，丙酮作为空白对照。

序号	浓度设置 (mg/ml)
1	2.0
2	1.5
3	1.0
4	0.8
5	0.5
6	丙酮

2.2.2 毒力作用测定

电动微量点滴仪（Auto Microapplicator PDE0006，Burkard，England）是一种低电压自动滴定仪。当使用的是 Burkard 1 ml 全玻璃滴定管时，点滴量分为从 0.1~1 μ l 十个等级；当使用 10 ml 点滴器和适配器时滴定则分为 1.0~10 μ l 十个等级。通过调节仪器前部的控制杆即可选择所需的剂量。该仪器可以使用脚动，圆环式或指动开关，每踏一次或挤压一次指环，玻璃滴定管前端释放的液体量即是所调节好的剂量。

将供试昆虫用二氧化碳麻醉装置麻醉后倒在飞行板上，为避免实验中果蝇醒来，可以多麻醉一会，约 5~8 min。用毛刷将试虫扫入塑料的培养皿内，每次 10 头。电动微量点滴仪内装入稀释后的双甲脒，按浓度从低到高的顺序进行试验，丙酮作为空白对照。

供试的果蝇品系包括转基因果蝇品系 *24B-Gal4>UAS-CsOA1*，*24B-Gal4>UAS-CsOA2B2*，*24B-Gal4>UAS-CsOA3*，*Elav-Gal4>UAS-CsOA1*，*Elav-Gal4>UAS-CsOA2B2*，*Elav-Gal4>UAS-CsOA3*，以及它们的背景果蝇品系

UAS-CsOA1, *UAS-CsOA2B2*, *UAS-CsOA3* 和纯合的 *Elav-Gal4*, *24B-Gal4*, 以排除背景果蝇对结果的影响 (表 4.1)。

表 4.1 生物测定所用转基因果蝇品系
Table 4.1 Transgenic fruit fly lines for biological assessment

序号	试虫种类
1	<i>24B-Gal4>UAS-CsOA1</i>
2	<i>24B-Gal4>UAS-CsOA2B2</i>
3	<i>24B-Gal4>UAS-CsOA3</i>
4	<i>Elav-Gal4>UAS-CsOA1</i>
5	<i>Elav-Gal4>UAS- CsOA2B2</i>
6	<i>Elav-Gal4>UAS-CsOA3</i>
7	<i>UAS-CsOA1</i>
8	<i>UAS-CsOA2B2</i>
9	<i>UAS-CsOA3</i>
10	<i>24B-Gal4</i>
11	<i>Elav-Gal4</i>

具体操作步骤如下:

- (1) 室温条件下, 将麻醉后的果蝇挑入培养皿, 每次 10 头;
- (2) 将电动微量点滴仪的剂量调整到 1 μ l 处, 并通过挤压指环排除玻璃管前端的空气;
- (3) 对培养皿内的果蝇逐头点滴, 将药物滴在果蝇的前胸背板处, 2 μ l/头;
- (4) 不同品种果蝇平行进行实验, 重复 3 次;
- (5) 将点滴完的果蝇用毛刷轻轻扫入含有食物的指状管中, 为免果蝇被食物粘死, 将管子水平放置, 让果蝇呆在管壁或塞子上;
- (6) 在果蝇管壁上标记所使用双甲脒的浓度, 供试果蝇的品系和实验日期;
- (7) 待果蝇逐渐苏醒后, 将果蝇管竖直放置于果蝇篮内, 置于温度为 25℃, 湿度为 70% 的培养箱中培养;
- (8) 24 h 后观察记录管中的果蝇死亡情况;

2.2.3 数据处理

点滴 24 h 后记录每管中果蝇的死亡情况, 并记录, 利用 Abbott(Abbott, 1987)

公式，计算校正死亡率。并用 SPSS 软件计算双甲脒对转基因果蝇的 LC₅₀ 值。

3 结果与分析

施药 24 小时后,对果蝇死亡情况进行统计,并采用 Abbott 校正死亡率公式：
校正死亡率（%）=（处理组死亡率-对照组死亡率）/（1-对照组死亡率），计算
每品系每浓度的果蝇校正死亡率（表 4.2）。将实验数据用 SPSS 软件分析后得到
双甲脒对果蝇的毒力 LC₅₀ 值（表 4.3）。

表 4.2 双甲脒对果蝇毒力测定的校正死亡率（%）

试虫品系	浓度(mg/ml)				
	0.5	0.8	1.0	1.5	2.0
24B-Gal4>UAS-CsOA1	16.7	20	46.7	63.3	73.3
24B-Gal4>UAS-CsOA2B2	23	30	30	46.7	76.7
24B-Gal4>UAS-CsOA3	6	16.7	43.3	60	83.3
Elav-Gal4>UAS- CsOA1	33.3	53.3	70	80	83.3
Elav-Gal4>UAS- CsOA2B2	20	16.7	36.7	53.3	60
Elav-Gal4>UAS- CsOA3	52.5	52.5	72.5	80	85
UAS-CsOA1	10	20	6.7	10	13.3
UAS-CsOA2B2	16.7	10	13.3	23.3	16.7
UAS-CsOA3	23.3	16.7	33.3	10	13.3
24B-Gal4	20	33.3	23.3	26.7	23.3
Elav-Gal4	23.3	40	20	16.7	30

表 4.3 双甲脒对转基因果蝇成虫的室内毒力测定

Table 4.3 Toxicity of amitraz to adults of transgene *Drosophila melanogaster*

试虫品系	回归方程	LC ₅₀ (mg/ml)	95%置信区间
24B-Gal4>UAS-CsOA1	y=2.919x- 0.229	1.198	1.009~1.470
24B-Gal4>UAS-CsOA2B2	y=1.193x- 0.436	2.320	1.4802~40.188
24B-Gal4>UAS-CsOA3	y=3.351x- 0.692	1.609	1.392~1.990
Elav-Gal4>UAS-CsOA1	y=2.486x+0.344	0.727	0.520~0.891
Elav-Gal4>UAS-CsOA2B2	y=2.538x- 0.349	1.372	1.130~1.835
Elav-Gal4> UAS-CsOA3	y=1.217x+0.435	0.439	0.050~0.682

从结果可以看出，转入二化螟章鱼胺受体后，果蝇对双甲脒的敏感性都有所

提高。双甲脒对 *Elav-Gal4>UAS-CsOA* 果蝇品系的 LC_{50} 值分别为 0.727、1.372、0.439, 对 *24B-Gal4>UAS-CsOA* 果蝇品系的 LC_{50} 值分别为 1.198、2.320、1.609, 从上述结果我们推测 *Elav-Gal4>UAS-CsOA* 比 *24B-Gal4>UAS-CsOA* 对双甲脒更敏感。如前所述, *Elav-Gal4* 在果蝇的神经组织中特异的表达而 *24B-Gal4* 在果蝇肌肉组织中特异的表达, 于是我们认为神经组织表达的受体对双甲脒可能更敏感。不同的 CsOA 受体, 发现双甲脒对 *Elav-Gal4>UAS-CsOA3* 果蝇品系的 LC_{50} 值为 0.439, 说明该品系对双甲脒有较高的敏感性, 于是我们推测双甲脒最可能主要作用于 OA3 受体。综合分析认为, 双甲脒的分子靶标有可能是主要在神经中进行表达的 OA3 受体。

4 讨论

脊椎动物体内, 双甲脒的最主要作用机制被认为是对 α_2 -adrenergic 受体的激活作用。Chen 和 Hsu 假设双甲脒及其代谢物是通过降低胞内 cAMP 的水平来激活 α_2 -adrenergic 受体的(Chen and Hsu, 1994), 他们通过体外实验对这个假设进行验证, 双甲脒及其代谢物 BTS-27271 能抑制由 forskolin 激活的胰岛素的释放, 从而降低了胞内 cAMP 的水平(Chen and Hsu, 1994)。Benezet 等证实了甲脒类杀虫剂对大鼠离体脑组织中 MAO 可逆的、竞争性的抑制作用(Benezet and Knowles, 1976)。Viqinia 等利用不同固定强化程序的操作性条件反射方法, 证实了双甲脒和杀虫脒的神经行为毒性(Moser *et al.*, 1987; Boyes and Moser, 1987)。Johnson 等首先提出杀虫脒可以干扰单胺递质的释放及摄取, 认为这一作用与杀虫脒引起的大鼠兴奋状态有关(Johnson and Knowles, 1983)。

昆虫体内, 1983 年, Downer 发现 demethylchloridimeform (DMCDM) 和双甲脒(amitraz) 能够模拟 OA 激活蟑螂神经组织内的腺苷酸环化酶活性, 从而初步确定甲脒类杀虫剂的作用靶标是 OA 受体(Gole *et al.*, 1983)。甲脒类杀虫剂与 OA 受体作用后对害虫引起的症状, 主要表现为极度兴奋, 行为异常, 致残进而死亡(Dudai *et al.*, 1987)。Roeder 认为只有在神经上高表达的 OA 受体似乎才是甲脒类杀虫剂的作用靶标, 因为靶标生物的行为变化不可能是来自非神经组织的 OA 受体作用产生的(Roeder, 1995)。吴顺凡通过对二化螟体内章鱼胺受体的药理学研究, 认为 CsOA3 受体很可能是甲脒类杀虫剂的作用靶标(吴顺凡, 2013)。

前人大都基于昆虫的某一组织进行体外的生理学和药理学的研究, 本研究中,

通过将二化螟的章鱼胺受体转入果蝇体内并让其在果蝇的神经系统和肌肉组织中分别表达。通过生物测试实验,研究双甲脒对转基因果蝇的 LC_{50} 值。由于果蝇本身对双甲脒不敏感,而二化螟对双甲脒敏感,通过转基因的方法让果蝇获得对双甲脒敏感的特性,这种“功能获得型”的体内测试更能证明具体是哪类受体在发挥作用。

本章体内生物测试实验结果显示,在神经组织中表达章鱼胺受体的果蝇品系对双甲脒更敏感,且三类不同的 CsOA 受体中,表达 *CsOA3* 受体基因的果蝇品系对双甲脒最敏感,于是我们推测双甲脒可能主要作用于昆虫的 OA3 受体。昆虫体内 OA3 受体属于 α_2 -adrenergic-like 型 OA 受体,是一类新发现的 OA 受体,具体的生理功能还有待研究(Wu *et al.*, 2014)。

总 结

本研究从果蝇体内克隆得到一类新的章鱼胺 (OA) 受体, 并将其命名为 DmOA3。通过 cAMP 测定实验表明其在胞内偶联 G_i 。药理学实验发现, 果蝇体内的该类受体可以被双甲脒和杀虫脒特异的激活, 但 EC_{50} 值明显低于二化螟, 于是我们猜测甲脒类杀虫剂对二化螟和果蝇毒力的差异是由靶标生物的药理学差异引起的。

构建转二化螟 OA 受体的果蝇品系, 用生物测试的方法研究不同品系的转基因果蝇对双甲脒的敏感性。通过比较发现, 双甲脒对 $Elav-Gal4>UAS-CsOA3$ 果蝇品系的 LC_{50} 值最低, 说明该品系对双甲脒有较高的敏感性, 于是我们推测双甲脒可能主要作用于二化螟的 OA3 受体。

1 本研究的创新之处

(1) 克隆得到果蝇的 CG18208 cDNA 全长, 并将其命名为 DmOA3, 通过 cAMP 测试表明该类受体偶联 G_i 。

(2) 生测实验结果显示, 甲脒类杀虫剂对二化螟毒力高, 而对果蝇毒力却很低。通过研究其药理学性质, 推测这种差异效应可能是靶标本身的药理学差异引起的。

(3) 把二化螟的章鱼胺受体基因分别克隆到 UAS 载体, 以显微注射的方法导入果蝇体内, 通过 $Gal4/UAS$ 系统控制基因在果蝇的神经和肌肉中特异的表达。并以生物测试的方法研究双甲脒对转基因果蝇的 LC_{50} 值, 根据测试结果预测双甲脒的作用靶标可能是 OA3 受体。

2 本研究存在的问题

(1) $UAS-CsOA$ 果蝇品系 2 号染色体是纯合的靶基因, 但 3 号染色体上可能携带平衡子, 可能会对生测实验结果产生影响。

(2) 通过生物测定实验和离体的药理学实验, 预测甲脒类杀虫剂在昆虫体内的作用靶标是 OA3 受体, 但仍需进一步实验验证。

3 今后的研究方向

- (1) 明确甲脒类杀虫剂对不同昆虫的选择毒力作用机制。
- (2) 通过 RNAi 的手段进一步明确甲脒类杀虫剂的作用靶标。

参考文献

- 李秀玲. 2006. 双甲脒对寄生于意蜂大蜂螨的药效试验报告. 蜜蜂杂志, 26(3): 17.
- 吴顺凡. 2013. 二化螟体内生物胺受体的药理学与生理学研究. 浙江大学博士学位论文: 1-183
- 吴顺凡, 郭建洋, 黄佳 & 叶恭银. 2010. 昆虫体内章鱼胺和酪胺的研究进展. 昆虫学报, 53(10): 1157-1166.
- 徐振元. 1983a. 杀虫杀螨剂双甲脒的研究. 农药(3): 9-11.
- 徐振元. 1983b. 双甲脒的杀虫和杀螨活性. 植物保护(1): 32.
- Abbott, W. S. 1987. A method of computing the effectiveness of an insecticide. 1925. J Am Mosq Control Assoc, 3: 302-303.
- Adamo, S. A. 2010. Why should an immune response activate the stress response? Insights from the insects (the cricket *Gryllus texensis*). Brain Behav Immun, 24: 194-200.
- Adams, M. D., S. E. Celniker, R. A. Holt, C. A. Evans, J. D. Gocayne, P. G. Amanatides, et al. 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. Science, 287: 2185-2195.
- Ahmad, K. & K. G. Golic. 1998. The transmission of fragmented chromosomes in *Drosophila melanogaster*. Genetics, 148: 775-792.
- Alkema, M. J., M. Hunter-Ensor, N. Ringstad & H. R. Horvitz. 2005. Tyramine functions independently of octopamine in the *Caenorhabditis elegans* Nervous System. Neuron, 46: 247-260.
- Ananiev, E. V., L. Z. Faizullin & V. A. Gvozdev. 1974. The role of genetic balance in control of transcription rate in the X-chromosomes of *Drosophila melanogaster*. Chromosoma, 45: 193-201.
- Axelrod, J. & J. M. Saavedra. 1977. Octopamine. Nature, 265: 501-504.
- Aziz, S. A. & C. O. Knowles. 1973. Inhibition of monoamine oxidase by the pesticide chlordimeform and related compounds. Nature, 242: 417-418.
- Barron, A. B., R. Maleszka, M. R. Vander & G. E. Robinson. 2007. Octopamine modulates honey bee dance behavior. Proc Natl Acad Sci U S A, 104: 1703-1707.
- Baxter, G. D. & S. C. Barker. 1999. Isolation of a cDNA for an octopamine-like, G-protein

- coupled receptor from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochem Mol Biol*, 29: 461-467.
- Benezet, H. J. & C. O. Knowles.** 1976. Inhibition of rat brain monoamine oxidase by formamidines and related compounds. *Neuropharmacology*, 15: 369-373.
- Blenau, W. & A. Baumann.** 2001. Molecular and pharmacological properties of insect biogenic amine receptors: lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*. *Arch Insect Biochem Physiol*, 48: 13-38.
- Boyes, W. K. & V. C. Moser.** 1987. Investigations of amitraz neurotoxicity in rats. II. effects on visual evoked potentials. *Fundam Appl Toxicol*, 9: 140-153.
- Brand, A. H. & N. Perrimon.** 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 118: 401-415.
- Brand, A.** 1995. GFP in *Drosophila*. *Trends Genet*, 11: 324-325.
- Busch, S., M. Selcho, K. Ito & H. Tanimoto.** 2009. A map of octopaminergic neurons in the *Drosophila* brain. *J Comp Neurol*, 513: 643-667.
- Calleja, M., E. Moreno, S. Pelaz & G. Morata.** 1996. Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*. *Science*, 274: 252-255.
- Campbell, R. N., M. K. Leverentz, L. A. Ryan & R. J. Reece.** 2008. Metabolic control of transcription: paradigms and lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J*, 414: 177-187.
- Cazzamali, G., D. A. Klaerke & C. J. Grimmlikhuijzen.** 2005. A new family of insect tyramine receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, 338: 1189-1196.
- Chang, K. M. & C. O. Knowles.** 1977. Formamidine acaricides. toxicity and metabolism studies with twospotted spider mites, *Tetranychus urticae* Koch. *J Agric Food Chem*, 25: 493-501.
- Chen, A. C., H. He & R. B. Davey.** 2007. Mutations in a putative octopamine receptor gene in amitraz-resistant cattle ticks. *Vet Parasitol*, 148: 379-383.
- Chen, R., X. Wu, H. Wei, D. D. Han & H. H. Gu.** 2006. Molecular cloning and functional characterization of the dopamine transporter from *Eloria noyesi*, a caterpillar pest of cocaine-rich coca plants. *Gene*, 366: 152-160.
- Chen, T. H., and W. H. Hsu.** 1994. Inhibition of insulin release by a formamidine pesticide

- amitraz and its metabolites in a rat beta-cell line: an action mediated by alpha-2 adrenoceptors, a GTP-binding protein and a decrease in cyclic AMP. *J Pharmacol Exp Ther*, 271: 1240-1245.
- Chen, X., H. Ohta, F. Ozoe, K. Miyazawa, J. Huang & Y. Ozoe.** 2010. Functional and pharmacological characterization of a beta-adrenergic-like octopamine receptor from the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol*, 40: 476-486.
- Cole, S. H., G. E. Carney, C. A. McClung, S. S. Willard, B. J. Taylor & J. Hirsh.** 2005. Two functional but noncomplementing *Drosophila* tyrosine decarboxylase genes: distinct roles for neural tyramine and octopamine in female fertility. *J Biol Chem*, 280: 14948-14955.
- Corey, J. L., M. W. Quick, N. Davidson, H. A. Lester & J. Guastella.** 1994. A cocaine-sensitive *Drosophila* serotonin transporter: cloning, expression, and electrophysiological characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 1188-1192.
- Costa, L. G. & S. D. Murphy.** 1987. Interaction of the pesticide chlordimeform with adrenergic receptors in mouse brain: an in vitro study. *Arch Toxicol*, 59: 323-327.
- Crocker, A. & A. Sehgal.** 2008. Octopamine regulates sleep in *Drosophila* through protein kinase A-dependent mechanisms. *J Neurosci*, 28: 9377-9385.
- Crocker, A., M. Shahidullah, I. B. Levitan & A. Sehgal.** 2010. Identification of a neural circuit that underlies the effects of octopamine on sleep: Wake Behavior. *Neuron*, 65: 670-681.
- Da, S. R. & A. B. Lange.** 2008. Tyramine as a possible neurotransmitter/neuromodulator at the spermatheca of the African migratory locust, *Locusta migratoria*. *J Insect Physiol*, 54: 1306-1313.
- Del Pino, J., P. V. Moyano-Cires, M. J. Anadon, M. J. Díaz, M. Lobo, M. A. Capo & M. T. Frejo.** 2015. Molecular mechanisms of amitraz mammalian toxicity: a comprehensive review of existing data. *Chem Res Toxicol*, 28: 1073-1094.
- Donly, B. C. & S. Caveney.** 2005. A transporter for phenolamine uptake in the arthropod CNS. *arch insect biochem Physiol*, 59: 172-183.
- Donly, C., L. Verellen, W. Cladman & S. Caveney.** 2007. Functional comparison of full-length and N-terminal-truncated octopamine transporters from lepidoptera. *Insect Biochem Mol Biol*, 37: 933-940.
- Dudai, Y., J. Buxbaum, G. Corfas & M. Ofarim.** 1987. Formamidines interact with *Drosophila*

- octopamine receptors, alter the flies' behavior and reduce their learning ability. *Journal of Comparative Physiology A*, 161: 739-746.
- Duffy, J. B. 2002. GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's swiss army knife. *Genesis*, 34: 1-15.
- Erspamer, V. & G. Boretti. 1951. Identification and characterization, by paper chromatography, of enteramine, octopamine, tyramine, histamine and allied substances in extracts of posterior salivary glands of octopoda and in other tissue extracts of vertebrates and invertebrates. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 88: 296-332.
- Evans, P. D. 1981. Multiple receptor types for octopamine in the locust. *J Physiol*, 318: 99-122.
- Evans, P. D. & B. Maqueira. 2005. Insect octopamine receptors: a new classification scheme based on studies of cloned *Drosophila* G-protein coupled receptors. *Invert Neurosci*, 5: 111-118.
- Evans, P. D. & S. Robb. 1993. Octopamine receptor subtypes and their modes of action. *Neurochem Res*, 18: 869-874.
- Farooqui, T. 2012. Review of octopamine in insect nervous systems. *Open Access Insect Physiology*(4): 1-17.
- Farooqui, T., K. Robinson, H. Vaessin & B. H. Smith. 2003. Modulation of early olfactory processing by an octopaminergic reinforcement pathway in the honeybee. *J Neurosci*, 23: 5370-5380.
- Fernandez-Abalos, J. M., H. Fox, C. Pitt, B. Wells & J. H. Doonan. 1998. Plant-adapted green fluorescent protein is a versatile vital reporter for gene expression, protein localization and mitosis in the filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*, 27: 121-130
- Fischer, J. A., E. Giniger, T. Maniatis & M. Ptashne. 1988. GAL4 activates transcription in *Drosophila*. *Nature*, 332: 853-856.
- Flecke, C. & M. Stengl. 2009. Octopamine and tyramine modulate pheromone-sensitive olfactory sensilla of the hawkmoth *Manduca sexta* in a time-dependent manner. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*, 195: 529-545.
- Freeman, M. 1996. Reiterative use of the EGF receptor triggers differentiation of all cell types in the *Drosophila* Eye. *Cell*, 87: 651-660.
- Giot, L., J. S. Bader, C. Brouwer, A. Chaudhuri, B. Kuang, Y. Li, Y. L. Hao, et al. 2003. A

- protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 302: 1727-1736.
- Giros, B., M. S. El, N. Godinot, K. Zheng, H. Han, T. Yang-Feng & M. G. Caron.** 1992. Cloning, pharmacological characterization, and chromosome assignment of the human dopamine transporter. *Mol Pharmacol*, 42: 383-390.
- Gole, J. W., G. L. Orr & R. G. Downer.** 1983. Interaction of formamidines with octopamine-sensitive adenylate cyclase receptor in the nerve cord of *Periplaneta Americana* L. *Life Sci*, 32: 2939-2947.
- Gowen, J. W.** 1931. On chromosome balance as a factor in duration of life. *J Gen Physiol*, 14: 447-461.
- Grohmann, L., W. Blenau, J. Erber, P. R. Ebert, T. Strunker & A. Baumann.** 2003. Molecular and functional characterization of an octopamine receptor from honeybee (*Apis mellifera*) brain. *J Neurochem*, 86: 725-735.
- Grunstein, M. & D. S. Hogness.** 1975. Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72: 3961-3965.
- Guillen, A., A. Haro & A. M. Municio.** 1989. A possible new class of octopamine receptors coupled to adenylate cyclase in the brain of the dipterous *Ceratitis capitata*. Pharmacological characterization and regulation of 3H-octopamine binding. *Life Sci*, 45: 655-662.
- Hagstrom, K., M. Muller & P. Schedl.** 1996. Fab-7 functions as a chromatin domain boundary to ensure proper segment specification by the *Drosophila* bithorax complex. *Genes Dev*, 10: 3202-3215.
- Hammer, M. & R. Menzel.** 1995. Learning and memory in the honeybee. *J Neurosci*, 15: 1617-1630.
- Hammer, M. & R. Menzel.** 1998. Multiple sites of associative odor learning as revealed by local brain microinjections of octopamine in honeybees. *Learn Mem*, 5: 146-156.
- Han, K. A., N. S. Millar & R. L. Davis.** 1998. A novel octopamine receptor with preferential expression in *Drosophila* mushroom bodies. *J Neurosci*, 18: 3650-3658.
- Han, L., S. Li, P. Liu, Y. Peng & M. Hou.** 2012. New artificial diet for continuous rearing of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Ann Entomol Soc Am*, 105: 253-258.
- Handler, A. M., S. P. Gomez & D. A. O'Brochta.** 1993. A functional analysis of the P-element

- gene-transfer vector in insects. *Arch Insect Biochem Physiol*, 22: 373-384.
- Harmar, A. J. & A. S. Horn.** 1977. Octopamine-sensitive adenylate cyclase in cockroach Brain: effects of agonists, antagonists, and guanylyl nucleotides. *Mol Pharmacol*, 13: 512-520.
- Harris-Warrick, R. M. & E. A. Kravitz.** 1984. Cellular mechanisms for modulation of posture by octopamine and serotonin in the lobster. *J Neurosci*, 4: 1976-1993.
- Hill, C. A., A. N. Fox, R. J. Pitts, L. B. Kent, P. L. Tan, M. A. Chrystal, et al.** 2002. G protein-coupled receptors in *Anopheles gambiae*. *Science*, 298: 176-178.
- Hiripi, L., S. Juhos & R. G. Downer.** 1994. Characterization of tyramine and octopamine receptors in the insect (*Locusta migratoria migratorioides*) Brain. *Brain Res*, 633: 119-126.
- Hollingsworth, R. M.** 1976. Chemistry, biological activity, and uses of formamidine pesticides. *Environ Health Perspect*, 14: 57-69.
- Hollingsworth, R. M. & L. L. Murdock.** 1980. Formamidine pesticides: octopamine-like actions in a firefly. *Science*, 208: 74-76.
- Horn, C., B. G. Schmid, F. S. Pogoda & E. A. Wimmer.** 2002. Fluorescent transformation markers for insect transgenesis. *Insect Biochem Mol Biol*, 32: 1221-1235.
- Horvitz, H. R., M. Chalfie, C. Trent, J. E. Sulston & P. D. Evans.** 1982. Serotonin and octopamine in the *Nematode caenorhabditis elegans*. *Science*, 216: 1012-1014.
- Hoyer, S. C., A. Eckart, A. Herrel, T. Zars, S. A. Fischer, S. L. Hardie & M. Heisenberg.** 2008. Octopamine in male aggression of *Drosophila*. *Curr Biol*, 18: 159-167.
- Huang, J., S. Wu, X. Li, S. A. Adamo & G. Ye.** 2012. The characterization of a concentration-sensitive α -adrenergic-like octopamine receptor found on insect immune cells and its possible role in mediating stress hormone effects on immune function. *Brain, Behavior, and Immunity*, 26: 942-950.
- Huang, J., T. Hamasaki & Y. Ozoe.** 2010. Pharmacological characterization of a *Bombyx mori* alpha-adrenergic-Like octopamine receptor stably expressed in a mammalian cell line. *Arch Insect Biochem Physiol*, 73: 74-86.
- Johnson, T. L. & C. O. Knowles.** 1983. Influence of formamidines on biogenic amine levels in rat brain and plasma. *Gen Pharmacol*, 14: 591-596.
- Jonsson, N. N. & M. Hope.** 2007. Progress in the epidemiology and diagnosis of amitraz

- resistance in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol*, 146: 193-198.
- Jorens, P. G., E. Zandijk, L. Belmans, P. J. Schepens & L. L. Bossaert.** 1997. An unusual poisoning with the unusual pesticide amitraz. *Hum Exp Toxicol*, 16: 600-601.
- Kellum, R. & P. Schedl.** 1992. A group of scs elements function as domain boundaries in an enhancer-blocking assay. *Mol Cell Biol*, 12: 2424-2431.
- Kim, G. S. & Y. Kim.** 2010. Up-regulation of circulating hemocyte population in response to bacterial challenge is mediated by octopamine and 5-hydroxytryptamine via rac1 signal in *Spodoptera exigua*. *J Insect Physiol*, 56: 559-566.
- Kim, G. S., M. Nalini, Y. Kim & D. W. Lee.** 2009. Octopamine and 5-hydroxytryptamine mediate hemocytic phagocytosis and nodule formation via eicosanoids in the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Arch Insect Biochem Physiol*, 70: 162-176.
- Kim, Y. C., H. G. Lee, J. Lim & K. A. Han.** 2013. Appetitive learning requires the alpha1-like octopamine receptor OAMB in the *Drosophila* mushroom body neurons. *J Neurosci*, 33: 1672-1677.
- Konopka, R. J. & S. Benzer.** 1971. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68: 2112-2116.
- Koon, A. C., J. Ashley, R. Barria, S. DasGupta, R. Brain, S. Waddell, M. J. Alkema & V. Budnik.** 2011. Autoregulatory and paracrine control of synaptic and behavioral plasticity by octopaminergic signaling. *Nat Neurosci*, 14: 190-199.
- Lange, A. B.** 2009. Tyramine: from octopamine precursor to neuroactive chemical in insects. *Gen Comp Endocrinol*, 162: 18-26.
- Laughon, A., R. Driscoll, N. Wills & R. F. Gesteland.** 1984. Identification of two proteins encoded by the *saccharomyces cerevisiae* GAL4 gene. *Mol Cell Biol*, 4: 268-275.
- Lehman, H. K., C. M. Murguic & J. G. Hildebrand.** 2000. Characterization and developmental regulation of tyramine-beta-hydroxylase in the CNS of the moth, *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol*, 30: 377-386.
- Lehman, H. K., D. J. Schulz, A. B. Barron, L. Wraight, C. Hardison, S. Whitney, H. Takeuchi, R. K. Paul & G. E. Robinson.** 2006. Division of labor in the honey bee (*Apis mellifera*): The role of tyramine beta-hydroxylase. *J Exp Biol*, 209: 2774-2784.
- Lewis, E. B.** 1978. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature*, 276: 565-70.

- Li, Y., C. Fink, S. El-Kholy & T. Roeder.** 2015. The octopamine receptor oct β 2R is essential for ovulation and fertilization in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Arch Insect Biochem Physiol*, 88: 168-178.
- Lim, J., P. R. Sabandal, A. Fernandez, J. M. Sabandal, H. Lee, P. Evans & K. Han.** 2014. The octopamine receptor oct β 2R regulates ovulation in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE*, 9: e104441.
- Malutan, T., H. McLean, S. Caveney & C. Donly.** 2002. A high-affinity octopamine transporter cloned from the central nervous system of cabbage looper *Trichoplusia Ni*. *Insect Biochem Mol Biol*, 32: 343-357.
- Maqueira, B., H. Chatwin & P. D. Evans.** 2005. Identification and characterization of a novel family of *Drosophila* beta-adrenergic-like octopamine G-protein coupled receptors. *J Neurochem*, 94: 547-560.
- Marrone, A. K., M. M. Kucherenko, R. Wiek, M. C. Gopfert & H. R. Shcherbata.** 2011. Hyperthermic seizures and aberrant cellular homeostasis in *Drosophila* dystrophic muscles. *Sci Rep*(1): 646-648.
- Massry, S. G., R. M. Schaefer, M. Teschner, M. Roeder, J. F. Zull & A. Heidland.** 1989. Effect of parathyroid hormone on elastase release from human polymorphonuclear leucocytes. *Kidney Int*, 36: 883-890.
- Meng, A., J. R. Jessen & S. Lin.** 1999. Transgenesis. *Methods Cell Biol*, 60: 133-148.
- Michelson, A. M.** 1994. Muscle pattern diversification in *Drosophila* is determined by the autonomous function of homeotic genes in the embryonic mesoderm. *Development*, 120: 755-768.
- Mitsialis, S. A. & F. C. Kafatos.** 1985. Regulatory elements controlling chorion gene expression are conserved between flies and moths. *Nature*, 317: 453-456.
- Mizunami, M., S. Unoki, Y. Mori, D. Hirashima, A. Hatano & Y. Matsumoto.** 2009. Roles of octopaminergic and dopaminergic neurons in appetitive and aversive memory recall in an insect. *BMC Biol*, 7(1): 1-16.
- Monastirioti, M.** 2003. Distinct octopamine cell population residing in the CNS abdominal ganglion controls ovulation in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol*, 264: 38-49.
- Monastirioti, M., C. J. Linn & K. White.** 1996. Characterization of *Drosophila* tyramine

- beta-hydroxylase gene and isolation of mutant flies lacking octopamine. *J Neurosci*, 16: 3900-3911.
- Moser, V. C., W. K. Boyes & R. C. MacPhail.** 1987. Investigations of amitraz neurotoxicity in rats. I. Effects On Operant Performance. *Fundam Appl Toxicol*, 9: 131-139.
- Muller, H. J.** 1918. Genetic variability, twin hybrids and constant hybrids, in a case of balanced lethal factors. *Genetics*, 3: 422-499.
- Muller, H. J.** 1925. The regionally differential effect of X rays on crossing over in autosomes of *Drosophila*. *Genetics*, 10: 470-507.
- Muller, H. J.** 1927. Artificial transmutation of the gene. *Science*, 66: 84-87.
- Muller, H. J. & J. M. Jacobs-Muller.** 1925. The standard errors of chromosome distances and coincidence. *Genetics*, 10: 509-524.
- Nathanson, J. A.** 1979. Octopamine receptors, adenosine 3',5'-monophosphate, and neural control of firefly flashing. *Science*, 203: 65-68.
- Nathanson, J. A. & P. Greengard.** 1973. Octopamine-sensitive adenylate cyclase: evidence for a biological role of octopamine in nervous tissue. *Science*, 180: 308-310.
- Nusslein-Volhard, C., M. Lohs-Schardin, K. Sander & C. Cremer.** 1980. A dorso-ventral shift of embryonic primordia in a new maternal-effect mutant of *Drosophila*. *Nature*, 283: 474-476.
- Ohtani, A., Y. Arai, F. Ozoe, H. Ohta, K. Narusuye, J. Huang, K. Enomoto, H. Kataoka, A. Hirota & Y. Ozoe.** 2006. Molecular cloning and heterologous expression of an alpha-adrenergic-like octopamine receptor from the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Mol Biol*, 15: 763-772.
- Orchard, I. & A. B. Lange.** 1985. Evidence for octopaminergic modulation of an insect visceral muscle. *J Neurobiol*, 16: 171-181.
- Orchard, I., J. A. Carlisle, B. G. Loughton, J. W. Gole & R. G. Downer.** 1982. In vitro studies on the effects of octopamine on locust fat body. *Gen Comp Endocrinol*, 48: 7-13.
- Painter, T. S.** 1933. A new method for the study of chromosome rearrangements and the plotting of chromosome maps. *Science*, 78: 585-586.
- Pass, M. A. & T. D. Mogg.** 1991. Effect of amitraz and its metabolites on intestinal motility. *Comp Biochem Physiol C*, 99: 169-172.

- Patterson, J. T., W. Stone & S. Bedichek.** 1937. Further studies on X chromosome balance in *Drosophila*. *Genetics*, 22: 407-426.
- Pekmezci, D., G. Z. Pekmezci, M. Guzel, S. Cenesiz, A. T. Gurler & G. Gokalp.** 2014. Efficacy of amitraz plus inactivated parapoxvirus ovis in the treatment of canine generalised demodicosis. *Vet Rec*, 174: 556.
- Riffell, J. A., H. Lei, L. Abrell & J. G. Hildebrand.** 2013. Neural basis of a pollinator's buffet: olfactory specialization and learning in *Manduca sexta*. *Science*, 339: 200-204.
- Ritossa, P.** 1962. Problems of prophylactic vaccinations of infants. *Riv Ist Sieroter Ital*, 37: 79-108.
- Robinow, S. & K. White.** 1991. Characterization and spatial distribution of the elav protein during *Drosophila melanogaster* development. *J Neurobiol*, 22: 443-461.
- Roeder, T.** 1992. A new octopamine receptor class in locust nervous tissue, the octopamine 3 (OA3) Receptor. *Life Sci*, 50: 21-28.
- Roeder, T.** 1995. Pharmacology of the octopamine receptor from locust central nervous tissue (OAR3). *Br J Pharmacol*, 114: 210-216.
- Roeder, T.** 1999. Octopamine in invertebrates. *Prog Neurobiol*, 59: 533-561.
- Roeder, T.** 2005. Tyramine and octopamine: ruling behavior and metabolism. *Annu Rev Entomol*, 50: 447-477.
- Roeder, T., M. Seifert, C. Kahler & M. Gewecke.** 2003. Tyramine and octopamine: antagonistic modulators of behavior and metabolism. *Arch Insect Biochem Physiol*, 54: 1-13.
- Rogers, S. M., T. Matheson, K. Sasaki, K. Kendrick, S. J. Simpson & M. Burrows.** 2004. Substantial changes in central nervous system neurotransmitters and neuromodulators accompany phase change in the locust. *J Exp Biol*, 207: 3603-3617.
- Roseman, R. R., V. Pirrotta & P. K. Geyer.** 1993. The su(Hw) protein insulates expression of the *Drosophila melanogaster* white gene from chromosomal position-effects. *Embo J*, 12: 435-442.
- Rotte, C., C. Krach, S. Balfanz, A. Baumann, B. Walz & W. Blenau.** 2009. Molecular characterization and localization of the first tyramine receptor of the american cockroach (*Periplaneta Americana*). *Neuroscience*, 162: 1120-1133.
- Rubin, G. M. & A. C. Spradling.** 1982. Genetic transformation of *Drosophila* with transposable

- element vectors. *Science*, 218: 348-353.
- Rubin, G. M. & E. B. Lewis.** 2000. A brief history of *Drosophila*'s contributions to genome research. *Science*, 287: 2216-2218.
- Rubin, G. M., M. G. Kidwell & P. M. Bingham.** 1982. The molecular basis of P-M hybrid dysgenesis: The Nature of Induced Mutations. *Cell*, 29: 987-994.
- Rovati, G. E., V. Capra & R. R. Neubig.** 2007. The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state. *Mol Pharmacol*, 71: 959-964.
- Saavedra, J. M., M. J. Brownstein, D. O. Carpenter & J. Axelrod.** 1974. Octopamine: presence in single neurons of aplysia suggests neurotransmitter function. *Science*, 185: 364-365.
- Saudou, F., N. Amlaiky, J. L. Plassat, E. Borrelli & R. Hen.** 1990. Cloning and characterization of a *Drosophila* tyramine receptor. *Embo J*, 9: 3611-3617.
- Schwaerzel, M., M. Monastirioti, H. Scholz, F. Friggi-Grelin, S. Birman & M. Heisenberg.** 2003. Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in *Drosophila*. *J Neurosci*, 23: 10495-10502.
- Seyfarth, E. A., K. Hammer, U. Sporhase-Eichmann, M. Horner & H. G. Vullings.** 1993. Octopamine immunoreactive neurons in the fused central nervous system of spiders. *Brain Res*, 611: 197-206.
- Shafqat, S., M. Velaz-Faircloth, A. Guadano-Ferraz & R. J. Freneau.** 1993. Molecular characterization of neurotransmitter transporters. *Mol Endocrinol*, 7: 1517-1529.
- Shapiro, J., L. Machattie, L. Eron, G. Ihler, K. Ippen & J. Beckwith.** 1969. Isolation of pure lac operon DNA. *Nature*, 224: 768-774.
- Shih, J. C., K. Chen & M. J. Ridd.** 1999. Monoamine oxidase: from genes to behavior. *Annu Rev Neurosci*, 22: 197-217.
- Singh, N. K., I. S. Gelot, Jyoti, V. Singh & S. S. Rath.** 2015. Detection of amitraz resistance in *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus from north gujarat, India. *J Parasit Dis*, 39: 49-52.
- Song, Z., B. Guan, A. Bergman, D. W. Nicholson, N. A. Thornberry, E. P. Peterson & H. Steller.** 2000. Biochemical and genetic interactions between *Drosophila* caspases and the proapoptotic genes *rpr*, *hid*, and *grim*. *Mol Cell Biol*, 20: 2907-2914.
- Stern, M.** 1999. Octopamine in the locust brain: cellular distribution and functional significance

- in an arousal mechanism. *Microsc Res Tech*, 45: 135-141.
- Stevenson, P. A. & U. Sporhase-Eichmann.** 1995. Localization of octopaminergic neurones in insects. *Comp Biochem Physiol A Physiol*, 110: 203-215.
- Sun, W., E. McConnell, J. F. Pare, Q. Xu, M. Chen, W. Peng, D. Lovatt, X. Han, Y. Smith & M. Nedergaard.** 2013. Glutamate-dependent neuroglial calcium signaling differs between young and adult brain. *Science*, 339: 197-200.
- Swart, P., E. P. De Villiers, A. C. Swart, K. J. van der Merwe & P. C. Todres.** 1993. The interaction of biogenic amines with adrenal cytochrome P450-dependent enzymes. *Biochem Soc Trans*, 21: 413.
- Tissieres, A., H. K. Mitchell & U. M. Tracy.** 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol*, 84: 389-398.
- Tomlinson, A., D. D. Bowtell, E. Hafen & G. M. Rubin.** 1987. Localization of the sevenless protein, a putative receptor for positional information, in the eye imaginal disc of *Drosophila*. *Cell*, 51: 143-150.
- Traven, A., B. Jelicic & M. Sopta.** 2006. Yeast Gal4: A transcriptional paradigm revisited. *Embo Rep*, 7: 496-499.
- Verlinden, H., R. Vleugels, E. Marchal, L. Badisco, H. J. Pfluger, W. Blenau & J. V. Broeck.** 2010. The role of octopamine in locusts and other arthropods. *J Insect Physiol*, 56: 854-867.
- Wensink, P. C., D. J. Finnegan, J. E. Donelson & D. S. Hogness.** 1974. A system for mapping DNA sequences in the chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Cell*, 3: 315-325.
- Wu, S. F., J. Huang & G. Y. Ye.** 2013. Molecular cloning and pharmacological characterisation of a tyramine receptor from the rice stem borer, *Chilo suppressalis* (walker). *Pest Manag Sci*, 69: 126-134.
- Wu, S. F., G. Xu, Y. X. Qi, R. Y. Xia, J. Huang & G. Y. Ye.** 2014. Two splicing variants of a novel family of octopamine receptors with different signaling properties. *J Neurochem*, 129: 37-47.
- Wu, S. F., Y. Yao, J. Huang & G. Y. Ye.** 2012. Characterization of a beta-adrenergic-like octopamine receptor from the rice stem borer (*Chilo suppressalis*). *J Exp Biol*, 215: 2646-2652.

- Xu, T. & G. M. Rubin.** 1993. Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development*, 117: 1223-1237.
- Zhou, C., Y. Rao & Y. Rao.** 2008. A subset of octopaminergic neurons are important for *Drosophila* aggression. *Nat Neurosci*, 11: 1059-1067.
- Zwiebel, L. J., G. Saccone, A. Zacharopoulou, N. J. Besansky, G. Favia, F. H. Collins, C. Louis & F. C. Kafatos.** 1995. The white gene of *ceratitis capitata*: a phenotypic marker for germline transformation. *Science*, 270: 2005-2008.

作者简历

教育经历:

2009 年 9 月—2013 年 6 月 山东农业大学植物保护专业 学士学位
2013 年 9 月—2016 年 6 月 浙江大学植物保护专业 硕士学位

攻读硕士学位阶段发表的学术论文:

Qi YX, Xia RY, **Wu YS**, Stanley D, Huang J, Ye GY. Larvae of the small white butterfly, *Pieris rapae*, express a novel serotonin receptor. *Journal of Neurochemistry* 2014, 131(6): 767-777.

Qi YX, Huang J, Li MQ, **Wu YS**, Xia RY, Ye GY. Serotonin modulates insect hemocyte phagocytosis via two different serotonin receptors. *eLife* 2016, DOI: <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.12241>

Gang Xu, Shunfan Wu, **Yasu Wu**, GuixiangGu, Qi Fang, Gongyin Ye*. De novo assembly and characterization of central nervous system transcriptome reveals neurotransmitter signaling systems in the rice striped stem borer, *Chilosuppressalis*. *BMC Genomics*, 2015, 16: 525.

硕士期间所获荣誉:

2013-2014 学年, 获浙江大学 “三好研究生” 荣誉称号
2013-2014 学年, 获浙江大学 “优秀研究生” 荣誉称号
2014-2015 学年, 获浙江大学 “三好研究生” 荣誉称号
2014-2015 学年, 获浙江大学 “优秀研究生” 荣誉称号