

分类号: Q965; Q966

单位代码: 10335

学 号: 21216110

浙江大学

硕士学位论文



黑腹果蝇孤儿受体 CG12796 和 CG13579 的 信号转导和药理学研究

Signaling and pharmacology of orphan receptors CG12796 and CG13579 in *Drosophila melanogaster*

申请人姓名: 夏仁英

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: 昆虫神经生物学与毒理学

所在学院: 农业与生物技术学院

论文提交日期 二〇一五年四月

黑腹果蝇孤儿受体 CG12796 和 CG13579 的

信号转导和药理学研究



论文作者签名: 夏仁英

指导教师签名: 黄仁

论文评阅人: 双向隐名评阅

答辩委员会主席: 俞晓平 研究员 中国计量学院

委员: 沈志成 教授 浙江大学

吕仲贤 研究员 浙江省农业科学院

傅强 研究员 中国水稻研究所

郑永利 高级农艺师 浙江省植物检疫局

答辩日期: 二〇一五年六月六日

**Signaling and pharmacology of orphan receptors CG12796
and CG13579 in *Drosophila melanogaster***



Author signature: Xia Renying

Supervisor signature: Huang Jia

Ye Gongyin

Thesis reviewer: Anonymous

Chair: Prof. Xiaoping Yu, Chinese Jiliang University

Committeeman: Prof. Zhicheng Shen, Zhejiang University

Prof. Zhongxian Lv, Zhejiang Academy of
Agricultural Sciences

Prof. Qiang Fu, China National Rice Research
Institute

Senior Agronomist Yongli Zheng, Plant Quarantine
Bureau of Zhejiang Province

Date of Oral Defence: 6 June, 2015

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：夏仁英

签字日期：2015 年 6 月 30 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：夏仁英

导师签名：葛伟

签字日期：2015 年 6 月 30 日

签字日期：2015 年 6 月 30 日

本研究承蒙

国家高技术研究发展计划（863 计划）项目
(2011AA10A204-2)

国家重点基础研究发展计划（“973”）项目 (973
Program, 2013CB127600)

国家自然科学基金创新群体项目(31321063)

资助

目录

致谢	I
摘要	III
Abstract.....	V
第一章 昆虫体内的毒蕈型乙酰胆碱及其受体	1
1 引言	1
2 合成与分解.....	2
3 储存、释放与再吸收.....	2
4 分布.....	3
5 生理功能.....	4
6 毒蕈型乙酰胆碱受体.....	5
6.1 信号转导途径.....	5
6.2 药理学性质.....	7
6.3 受体的生理功能.....	8
7 展望.....	9
第二章 昆虫体内的多巴胺及其受体	10
1 引言	10
2 合成与分解.....	11
3 储存、释放与再吸收.....	12
4 分布.....	14
5 生理功能.....	14
6 多巴胺受体.....	16
6.1 信号转导途径.....	16
6.2 药理学性质.....	17
6.3 受体的生理功能.....	18
7 展望.....	18
第三章 CG12796 的信号通路和药理学研究	20
1 引言.....	20
2 材料与方法.....	21
2.1 供试昆虫.....	21
2.2 RNA 抽提	21
2.3 CG12796 cDNA 的克隆.....	22
2.3.1 RT-PCR	22
2.3.2 CG12796 cDNA 序列的获得.....	23
2.4 PCR 产物的纯化	24
2.5 目的片段与克隆载体连接.....	25
2.6 连接产物的转化、鉴定和测序.....	25
2.6.1 连接产物的转化.....	25
2.6.2 转化子的鉴定和测序.....	25
2.7 质粒 DNA 的抽提	26
2.8 pcDNA3-CG12796 融合质粒的构建.....	27
2.9 多重序列比对和进化树分析.....	28
2.10 定量 PCR	29

2.11 细胞培养及转染.....30

2.12 Western blotting31

2.13 免疫细胞化学.....32

2.14 Ca²⁺测定32

2.15 cAMP 测定33

3 结果与分析.....34

3.1 CG12796 cDNA 的克隆及序列分析34

3.2 CG12796 的定量 PCR.....39

3.3 免疫细胞化学.....40

3.4 CG12796 在 CHO-K1 细胞上的表达.....40

4 讨论.....44

第四章 CG13579 的信号通路和药理学研究46

1 引言.....46

2 材料与方法.....46

2.1 供试昆虫.....46

2.2 RNA 抽提46

2.3 克隆 CG13579 cDNA 序列全长.....47

2.4 PCR 产物纯化、目的片段与克隆载体的连接及连接产物的转化、鉴定和测序
.....47

2.5 pcDNA3-CG13579 融合质粒的构建.....47

2.6 定量 PCR.....48

2.7 细胞培养及转染.....48

2.8 Ca²⁺测定48

2.9 cAMP 测定48

3 结果与分析.....49

3.1 CG13579 cDNA 的克隆及序列分析49

3.2 CG13579 的定量 PCR.....54

3.3 CG13579 在 HEK-293 细胞上的表达.....55

4 讨论.....57

总结58

1 本研究的创新之处.....58

2 本研究存在的问题.....58

3 今后的研究方向.....58

参考文献.....59

作者简历.....71

致谢

岁月如梭，光阴似箭，在浙江大学三年的求学生涯也即将结束。虽然短暂，但却充实满足，三年来，我学到的不仅是科学知识，更重要的是为人处事的道理，我的硕士论文能够顺利完成，与老师、同学、朋友、家人的帮助与鼓励分不开，在这里，想所有关心、帮助、鼓励、支持我的老师、同学和家人表示最诚挚的谢意。

本论文的工作是在我的导师黄佳副教授和叶恭银教授的悉心指导和关怀之下完成的。黄老师求真务实、积极进取、学识渊博并且工作勤恳，在留学期间虽身负教学科研重任，仍经常询问我的研究进程，为我指点迷津，帮助我开拓研究思路，精心点拨，热忱鼓励，回国之后更是在我的实验技能、实验方案及论文撰写上给予了极大的帮助。叶老师一丝不苟的作风，严谨求实的态度，踏踏实实的精神，让我受益终身，叶老师不仅是我们的老师更是我们的朋友，不仅在学术上敦敦教诲，更在生活上教导我们，帮助我们树立正确的人生观价值观。黄老师深厚的理论素养和求是创新的精神、叶老师严谨的治学态度和科学的工作方法都给予了我极大的帮助和影响。同时，也特别感谢姚洪渭老师和方琦老师的对我的教诲和栽培。在此，由衷感谢三年来你们对我的关心和指导，郑重地说声谢谢！

在硕士论文完成期间，我也得到了多方的支持与帮助。首先，要特别感谢齐易香师姐从科研实验到文章写作各个方面都给予了我无私的帮助。此外，还要特别感谢昆虫生理生化实验室各位师兄师姐师弟师妹在实验上和生活中给予我的帮助和关怀，包括已经毕业了师兄师姐吴顺凡、卢增斌、姚尧、程璐、常雪、钱岑、祖风、蒋鹏凌、刘玉娥，在读的博士生王飞、徐刚、汪芳、严智超、朱宇、王前进、滕子文、贾文茜、杨蕾、肖山、阿力，硕士生韩乃顺、巨青松、刘洋、武亚苏、杜玉萍、宁铎、陈利鹏、李萌琪、党聪、王蓓蓓、陈晓昂表示衷心的感谢。同时，还要向我的同级及同窗涂彬彬、李乔、曹婷婷、张琼、张燕、沈嫚俐等人表示衷心的感谢。另外，也要感谢华中农业大学实习生王之清给我提供了很多帮助。感谢昆虫所全体师生对我的关心和鼓励。

除了科研和学习，在生活中我也得到了许多亲朋好友的支持和关爱，感谢父亲和母亲对我的养育之恩和无比巨大的关怀、支持和鼓励，感谢弟弟和妹妹对我的关爱、理解和帮助，感谢男朋友对我照顾、包容和关怀。

最后，谨向所有关心、支持、帮助和照顾我的老师、亲朋好友表示我最诚挚的谢意！同时向参加本论文评阅和答辩委员会的专家和教授们致以最崇高的敬意！

夏仁英

2015 年 3 月 30 日于浙江大学紫金港

摘要

在昆虫的神经系统中,乙酰胆碱和多巴胺是一种重要的神经递质和神经调质,在昆虫体内发挥不同的神经调控作用,调节昆虫的多种行为和生理功能。在昆虫体内,它们主要通过结合各自特异性的离子通道或 G 蛋白偶联受体来发挥作用。目前大部分杀虫剂是以神经受体为靶标的毒性化合物,而 G 蛋白偶联受体一直被视为杀虫剂开发的潜在靶标,对其药理学性质和生理学功能研究也日益受到关注。本研究以模式昆虫黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (双翅目: Diptera; 果蝇科: Drosophilidae) 为研究对象,采用分子生物学等研究方法对其体内的新型毒蕈型乙酰胆碱受体(CG12796)和多巴胺受体(CG13579)的信号传导及药理学做了系统研究。

1 果蝇新型毒蕈型乙酰胆碱受体 CG12796 的信号转导和药理学研究

从果蝇体内克隆到 CG12796 的 cDNA 全长,生物信息学分析表明其可能属于毒蕈型乙酰胆碱受体。CG12796 的 mRNA 表达于各个发育阶段及组织部分,包括幼虫、蛹、成虫及成虫的头、胸、腹,而其在雄性果蝇和雌性果蝇的头部表达量最高,且雄性果蝇头部表达量是雌性果蝇头部表达量的 4 倍,由此可知 CG12796 的表达主要在果蝇的头部。将构建的 pcDNA3-CG12796 真核表达质粒转染于 CHO-K1 细胞中,对其信号通路和药理学性质做了系统研究。实验表明,乙酰胆碱对胞内 cAMP 含量没有影响,即不能促进 cAMP 含量的升高,也不能降低由 forskolin 诱导的 cAMP 含量,结果表明,CG12796 既不偶联 G_s 蛋白也不偶联 G_i 蛋白。在测试的激动剂中,CG12796 能被乙酰胆碱和氧化震颤素所激活。乙酰胆碱引起 Ca^{2+} 反应的浓度范围为 1 nM 到 10 μ M (最大反应),其 EC_{50} 值为 73.02 nM,另一激动剂氧化震颤素引起 Ca^{2+} 反应的 EC_{50} 值为 48.23 nM。传统的乙酰胆碱受体拮抗剂 100 μ M 阿托品和 100 μ M 莨菪碱能完全阻断 100 nM ACh 引起的 Ca^{2+} 反应。所以,我们命名 CG12796 为 C 型毒蕈型乙酰胆碱受体(C-type mAChR),区别与已报道的 A 型和 B 型受体。

2 果蝇新型多巴胺受体 CG13579 的信号转导和药理学研究

从果蝇体内克隆得到 *CG13579* 的 cDNA 全长, 生物信息学分析表明其与果蝇体内蜕皮激素兼多巴胺受体 *DmDopEcR* (即 *CG18314* 基因) 的序列相似, 表明其可能属于新型蜕皮激素受体或多巴胺受体。*CG13579* mRNA 表达于各个发育阶段及组织部分, 包括幼虫、蛹、成虫及成虫的头、胸、腹, 而其在雄性果蝇的头部和雌性果蝇的头部表达量最高, 且雄性果蝇头部表达量是雌性果蝇头部表达量的 3 倍, 由此可知 *CG13579* 的表达主要在果蝇的头部。该基因有个转录本 *CG13579*, 在 *CG13579* 的第 651 个氨基酸处是一个终止密码子, 且前面的 650 个氨基酸即为 *CG13579* 的蛋白序列。为了研究其配体信息, 偶联的下游信号通路以及药理学性质, 我们分别将这种转录本真核表达于 HEK-293 细胞中。实验表明, *CG13579* 不能引起胞内 Ca^{2+} 上升, 却能够显著的升高 forskolin 诱导的 cAMP 含量。所以, *CG13579* 可能是一种新型多巴胺受体。

关键词: 果蝇, G 蛋白偶联受体, 毒蕈型乙酰胆碱受体, 多巴胺受体, 信号通路药理学, 激动剂, 拮抗剂

Abstract

In the nervous system of insects, acetylcholine and dopamine is a major neurotransmitter and neuromodulator. They regulate a wide variety of behaviors and physiological processes. All of them are independent neurotransmitters, exert their effects by binding to specific ion channel or G-protein-coupled receptors. Most currently used insecticides are neurotoxic chemicals that target a limited number of sites. G-protein-coupled receptors have been recognized as very suitable and specific insecticide targets, especially the studies about their receptors, have been paid more attentions in recent years. In the study, we chose model insect fruit fly, *D. melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). Using modern molecular biology methods, we investigated signaling and pharmacology of muscarinic acetylcholine receptors and dopamine receptors in fruit fly.

1. Signaling and pharmacology of a novel muscarinic acetylcholine receptor (CG12796) in the fruit fly, *D. melanogaster*

A full-length cDNA of *CG12796* has been obtained from fruit fly, *D. melanogaster*. The mRNA of *CG12796* is present in the developmental stages and various tissues, including larvae, pupae, adult fly and different body parts of adult male and female, head, thorax, abdomen. The highest expression level of *CG12796* was in the head of adult fly male and female. We generated a CHO-K1 cell line that stably expresses pcDNA3-*CG12796* in order to examine signaling and pharmacological properties of this receptor. The result show that none of the amines and acetylcholine were found to increase intracellular cAMP levels or decrease the forskolin-stimulated intracellular cAMP levels. The results show *CG12796* neither coupling G_s nor G_i . Agonists acetylcholine chloride and oxotremorine M can increase intracellular Ca^{2+} level in a dose-dependent way. The EC_{50} values respectively are 73.02 nM, 48.23 nM. In addition, the classical antagonists 100 μ M atropine and 100 μ M scopolamine can inhibit 100 nM acetylcholine-induced intracellular Ca^{2+}

increases. So we named CG12796 as the C-type mAChR which is different from the A-type and B-type mAChRs.

2. Signaling and pharmacology of a novel dopamine receptor

CG13579 in the fruit fly, *D. melanogaster*

We identified a full-length cDNA of putative dopamine receptor *CG13579* from fruit fly, *D. melanogaster*. *CG13579* was predicted as sequence similarity of previously characterized dopamine/ecdysteroid receptor (CG18314) in the fruit fly *D. melanogaster*. The mRNA of *CG13579* is present in the developmental stages and various tissues. The highest expression level of *CG13579* was in the head of adult fly male and female. *CG13579* encode one transcript. We generated HEK-293 cell line stably transfected with cloned cDNA for examining the second messenger coupling and pharmacological properties of *CG13579*. *CG13579* can not increase of intracellular Ca^{2+} concentration in response to high concentrations of dopamine. But they can increase the forskolin-stimulated intracellular cAMP levels. To our knowledge, *CG13579* may be a new family of insect dopamine receptors.

Key words: *D. melanogaster*, G-protein-coupled receptors, muscarinic acetylcholine receptors, dopamine receptors, signaling, pharmacology, agonist, antagonist.

第一章 昆虫体内的毒蕈型乙酰胆碱及其受体

1 引言

目前大部分使用的杀虫剂是以一些特定的位点为靶标的神经毒性化合物,昆虫的胆碱能神经传递是主要的靶标。有机磷和氨基甲酸甲酯是乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)的抑制剂,能引起异常的乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)的积累。根据其神经生物学功能,可将其分为两类:烟碱型乙酰胆碱和毒蕈型乙酰胆碱(Millar and Baylis, 1995)。新烟碱作为烟碱型乙酰胆碱受体(nicotinic acetylcholine receptors, nAChRs)的激动剂,属于配体阳离子通道。潜在发展的杀虫剂目标毒蕈型乙酰胆碱受体(muscarinic acetylcholine receptors, mAChRs),属于代谢型 G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs) (Collin *et al.*, 2013; Wess *et al.*, 2007)。昆虫体内有 A 类、B 类 mAChRs, 五种哺乳类 mAChRs 与昆虫体内的 A 类相近。目前,我们已经从黑腹果蝇体内分离出了一个新基因 CG12796 的 cDNA 序列全长。

在昆虫的神经系统中乙酰胆碱是一种主要的神经递质。乙酰胆碱通过结合不同的 G 蛋白受体,即不同药物类型的乙酰胆碱受体(acetylcholine receptors, AChs)发挥生理作用。mAChRs 与质膜上的 K^+ 或 Ca^{2+} 离子通道相关,属于视紫红质类、有七跨膜区域(seven transmembrane segments, TMI-TMVII)和单糖蛋白的受体的总科,由胞内环和胞外环连接。mACh 通过与不同的 GPCRs 的相互作用发挥生理作用(Karakiulakis and Roth, 2012)。在哺乳动物中,目前已经有五种 mAChRs 亚型被鉴定出来,按鉴定出的先后顺序分别是 M1、M2、M3、M4、M5,且它们的命名法是由 Caulfield and Birdsall 提议的(Caulfield and Birdsall, 1998)。

二十多年前, Takeshi Onai 等人(Onai *et al.*, 1989)首次从黑腹果蝇 *D. melanogaster* 体内克隆并验证了昆虫的 mAChR, 其对阿托品(atropine)很敏感(Shapiro *et al.*, 1989)。然而,在最近的研究工作中,天然配体乙酰胆碱的激活效应没有得到验证,而且,阿托品也只能部分的抑制受体的特异性。目前,昆虫体内 mAChRs 分为两大类:the A-type mAChR 和 the B-type mAChR, 其中 the A-type mAChRs 和哺乳动物体内的 M1-M5 mAChRs 神经生物学功能相似,对传统的拮

抗剂阿托品、莨菪碱(scopolamine N-butylbromide)和 3-奎宁环苄(3-Quinuclidinyl-benzylate, QNB)很敏感;而 the B-type mAChRs 不同于 the A-type mAChRs 和哺乳动物体内的 M1-M5 mAChRs, 对传统的拮抗剂阿托品、莨菪碱和 3-奎宁环苄不敏感, 但两类受体对传统激动剂乙酰胆碱和毒蕈碱(muscarinic)都有明显的激活效应(Collin *et al.*, 2013)。在黑腹果蝇 *D. melanogaster*、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*、可能所有其他昆虫和节肢动物中都存在 the A-type mAChRs 和 the B-type mAChRs。

目前对昆虫体内 mAChRs 的研究还比较少。本文主要对 mAChRs 的生物合成、神经组织中的分布、生理作用以及其受体的信号转导、药理学和生理功能等方面进行综述。对昆虫 mAChRs 的药理学研究将有助于使其成为可能的作用靶标用于从而开发更多新型的特异性杀虫剂用于害虫防治。

2 合成与分解

乙酰胆碱作为一种传统的神经递质主要存在于中枢神经和外周神经系统中, 主要在胆碱能神经末梢合成, 少量在包体内合成, 以胆碱(choline)和乙酰辅酶 A (acetyl coenzyme A, Acetyl-CoA) 为前体, 在胆碱乙酰转移酶(choline acetyltransferase, ChAT)的催化作用下生成。Stanislav Tuček 发现了另一种酶肉毒碱乙酰转移酶(carnitine acetyltransferase)也能合成乙酰胆碱, 其是一种线粒体酶主要参与脂肪酸的代谢, 与突触的传递不相关。ChAT 在神经元核周体合成, 并通过轴突运输机制运输到神经元。ChAT 在轴突和树突中都存在。乙酰胆碱能在所有的胆碱能神经元中合成, 其产物主要在突触前神经元, 与释放乙酰胆碱的位置临近(Tucek, 1985)。

存在于神经突触间隙的乙酰胆碱在乙酰胆碱酯酶的作用下分解成乙酸和胆碱, 乙酸继续降解, 胆碱被重新吸收利用。

3 储存、释放与再吸收

在神经末梢, 大多数(如果不是全部的话) ChAT 存在于胞浆中, 因此乙酰胆碱在胞浆中合成(Fonnum, 1968)。乙酰胆碱合成后通过质子反向运输至囊泡(vesicle), 在囊泡乙酰胆碱转运体(vesicular acetylcholine transporter, VAChT)的作

用下,从胞浆中转运到突触囊泡内与 ATP 和囊泡相关膜蛋白(vesicle-associated membrane proteins, VAMP)共存。乙酰胆碱被储存在这些囊泡内,通过动作电位作用将囊泡与突触神经膜融合,囊泡与突触神经膜的相互作用可能只有在细胞内 Ca^{2+} 水平变化时才会发生。

Ca^{2+} 分子的吸收通过突触结合蛋白亚基 C2A 和 C2B 的相互作用,从而在突触内膜形成一个复杂的突触小体结合蛋白 25 (SNAP-25),而内膜上的另一个分子突触融合蛋白和可溶性的乙酰马来酰亚胺融合因子蛋白受体(soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion factor attachment protein receptors, SNARE)的相互作用是乙酰胆碱与膜融合的必要条件。乙酰胆碱通过囊泡和细胞膜的融合释放,结合并刺激位于突触后的 AChR (Pohanka, 2012)。ACh 能自发的或者通过神经脉冲从神经末梢释放出来,其释放的速度会不断变化。

乙酰胆碱化学性质稳定属于胆碱季胺原子的一部分,被释放到神经突触间隙(neurosynaptic cleft)时要持续很长一段时间,其自然消除很慢,而神经突触间隙的 AChE 能很快的终止乙酰胆碱的信号传递。乙酰胆碱在 AChE 作用下分解成乙酸和胆碱,乙酸继续降解,而胆碱通过高亲和性胆碱转运体(choline transporter, ChT)从神经突触间隙运回神经元轴突细胞质进行再吸收(Pohanka, 2012; Sarter and Parikh, 2005)。

4 分布

哺乳动物中烟碱胆碱能受体分布于自主神经节、中枢、电鳗的电器官等的细胞膜中,毒蕈胆碱能受体存在于副交感神经、平滑肌等组织中。M1 大量表达与皮质、海马状突起和纹状体,也分布于外周神经(Wess, 2003); M2 主要分布于脑干、丘脑等区域的胆碱能神经元突触末梢,也存在于心脏和平滑肌,调节心肌收缩力; M3 主要分布于腺体和平滑肌,少量表达于中枢神经系统; M4 出现在脑部各区域,但主要表达于纹状体内,其在节前神经末梢、肺等外周组织上也有表达; M5 是唯一表达于黑质的 mAChRs,其在外周少量表达于虹膜、食道、淋巴细胞。

mAChRs 在昆虫中枢神经系统(central nervous system, CNS)和外周神经系统(peripheral nervous system, PNS)中都有分布。研究 mAChRs 在昆虫体内的分布主

要是通过原位杂交技术和免疫组织化学法。mAChRs 在黑腹果蝇 *D. melanogaster* 的脑和胸神经节(Blake *et al.*, 1993), 家蚕 *Bombyx mori* 脑的神经分泌细胞(Aizono *et al.*, 1997), 西方蜜蜂 *Apis mellifera* 的触角叶纤维球(antennal lobes glomeruli, ALG), 烟草天蛾 *Manduca sexta* 的触角(antenna) (Clark *et al.*, 2005), 拟黑多刺蚁 *Polyrhachis vicina* 的脑部蘑菇体(mushroom body, MB)、触角叶(antennal lobes, AL)、中央复合体(central complex)、光叶(optic lobes, OL)和光叶中的神经纤维(nerve fibers)及肯扬细胞(Kenyon cells)中均有分布(Lu *et al.*, 2011)。昆虫神经系统中存在的 mAChRs 控制着昆虫的多种行为, 如触角中的 mAChRs 对控制果蝇嗅觉和飞行运动有一定的作用, 拟黑多刺蚁 CNS 分布很多, 影响其取食、学习和记忆、感觉、和发声等行为(Lu *et al.*, 2011)。

5 生理功能

哺乳动物中, M1 通过影响皮质和海马之间的交互活动发挥调节记忆、学习等功能, 但 M1 对于记忆的形成并非必要条件(Wess, 2003), 外周 M1 与迷走神经诱导的支气管收拾和胃酸分泌有关。M2 主要与中枢 ACh 的释放有关, 也能调节心肌收缩力。M3 主要调节平滑肌收缩和腺体分泌, 大多数平滑肌组织以 4:1 的比例表达 M2 和 M3, 二者协同调节肌肉收缩; 表达于中枢神经系统的 M3 的生理功能尚不明确, 但有研究报道其可能参与食欲调控。M4 在纹状体内与多巴胺受体(dopamine receptor, DAR)共存, 抑制纹状体内多巴胺(dopamine)释放, 调控 ACh 介导的运动能力, 在外周神经系统表达的 M4 主要抑制交感和副交感神经信号传递。存在于黑质中的 M5 呈离散型分布, 有研究表明中枢神经中 M5 的分布和功能与 DA 系统密切相关, 而在外周神经系统中少量表达的 M5 生理功能仍有待研究。另外, 有研究表明各类 mACh 除了单独或联合调控胆碱能作用外, 还可协同 DA 系统调节中枢活动, 如 M1 可调节前脑 DA 水平; M2 与 DA 信号转导关联; 激活纹状体内 M4 可抑制 DA 释放; 而激活该区域的 M5 则促进 DA 释放。这为中枢神经系统治疗疾病提供新的靶标和策略, 如激活尾状壳核内 M2 治疗精神分裂症。

在昆虫体内, 自 1989 年首次从果蝇体内克隆获得第一个 mAChR 基因序列(Onai *et al.*, 1989), 通过免疫组织化学方法和虫体药理学研究发现 mAChR 参与

昆虫表皮的形成、神经元轴突的延伸(Clark *et al.*, 2005), 调节昆虫的迁飞(Oliveira *et al.*, 2010), 求偶、鸣声(Heck *et al.*, 2009; Hoffmann *et al.*, 2007), 及学习记忆等行为(Guez *et al.*, 2010; Ismail *et al.*, 2006)。mAChR 具有很大的开发和应用价值, 是农药开发的潜在靶标(Honda *et al.*, 2007)。

6 毒蕈型乙酰胆碱受体

mAChRs 属于视紫红质类 G 蛋白偶联受体, 具有七个跨膜螺旋结构, 其中七个跨膜区由三个胞外环(extracellular loop, E1-E3)和三个胞内环(intracellular loop, I1-I3)连接而成, 其氨基端位于细胞外侧, 羧基端位于细胞内侧。mAChRs 被激活后通过与其偶联的 G 蛋白转导后续信号, 引起细胞内多种生理生化作用。mAChRs 在外周可调节平滑肌收缩、腺体分泌、心率等, 在中枢参与学习、记忆等高级认知功能与运动控制。

6.1 信号转导途径

mAChRs 属于 GPCR 受体, 而 GPCR 信号转导过程的共同特点是 GPCR 被激活后会引引起细胞内第二信使浓度的改变。mAChRs 被激活后, 根据其偶联的 G 蛋白的不同, 会使细胞内环腺苷酸 cAMP (intracellular cyclic adenosine monophosphate, $[cAMP]_i$)或 Ca^{2+} (intracellular Ca^{2+} , $[Ca^{2+}]_i$)浓度的改变, 从而引起不同的信号转导途径。

一种途径会使 $[Ca^{2+}]_i$ 改变。在脊椎动物中, M1、M3、M5 优先偶联 $G_{q/11}$, 结合并激活磷脂酶 C (phospholipase C, PLC), PLC 能启动三磷酸肌醇级联反应, 水解一种膜结合底物—磷脂酰肌醇二磷酸(phosphatidylinositol 4, 5 -bisphosphate, PIP2), 产生两种第二信使, 即三磷酸肌醇(inositol trisphosphate, IP3)和二酰基甘油(diacylglycerol, DAG)。二者作为胞内第二信使, 分别激活 $IP3/Ca^{2+}$ 和 DG/PKC 两个信号途径, 前一个是 IP3 自由扩散并结合内质网膜上特定的 IP3 受体, 使 Ca^{2+} 通道打开, 使 Ca^{2+} 从内质网流向细胞质, 也可开放细胞膜 Ca^{2+} 通道, 使细胞外 Ca^{2+} 流入细胞内。DAG 激活膜上的蛋白激酶(protein kinase C, PKC) (Berstein *et al.*, 1992; Falkenburger *et al.*, 2010)。PKC 能够将很多蛋白的丝氨酸和苏氨酸残基磷酸化, 从而改变这些蛋白的功能, 产生生物学效应。

另一种途径会使 $[cAMP]_i$ 改变。受体亚型 M2 and M4 可偶联 $G_{i/o}$ ，抑制腺苷酸环化酶(adenylyl cyclase, AC)的活性，引起胞内 cAMP 含量的下降，蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA)活性降低，产生抑制性效应。同时还能引起非 Ca^{2+} 依赖性 K^+ 和 Cl^- 通道的开放，使细胞膜反应性降低(Eglen *et al.*, 2001; Honda *et al.*, 2007; Mohr and Tränkle, 2013; Wess *et al.*, 2007)。

目前，与脊椎动物相比，昆虫体内的 mAChRs 研究相对较少，分为两大类：the A-type mAChR 和 the B-type mAChR，这两类受体的信号传导途径与脊椎动物的受体亚型 M1、M3、M5 一样，偶联 $G_{q/11}$ ，激活 PLC，PLC 能启动肌醇三磷酸级联反应，导致胞内 Ca^{2+} 离子转移并激活 PKC。而 the B-type mAChR 同时也能偶联 $G_{i/o}$ ，抑制腺苷酸环化酶(adenylyl cyclase, AC)的活性，引起胞内 cAMP 含量的下降(Ren *et al.*, 2015)。总之，GPCR 被激活后，依靠第二信使产生细胞内信号级联反应，不同胞内信号通道可能在同一个细胞中同时激活，这种共激活反应的产生可能导致细胞反应的放大或减小(Blenau and Baumann, 2001)。

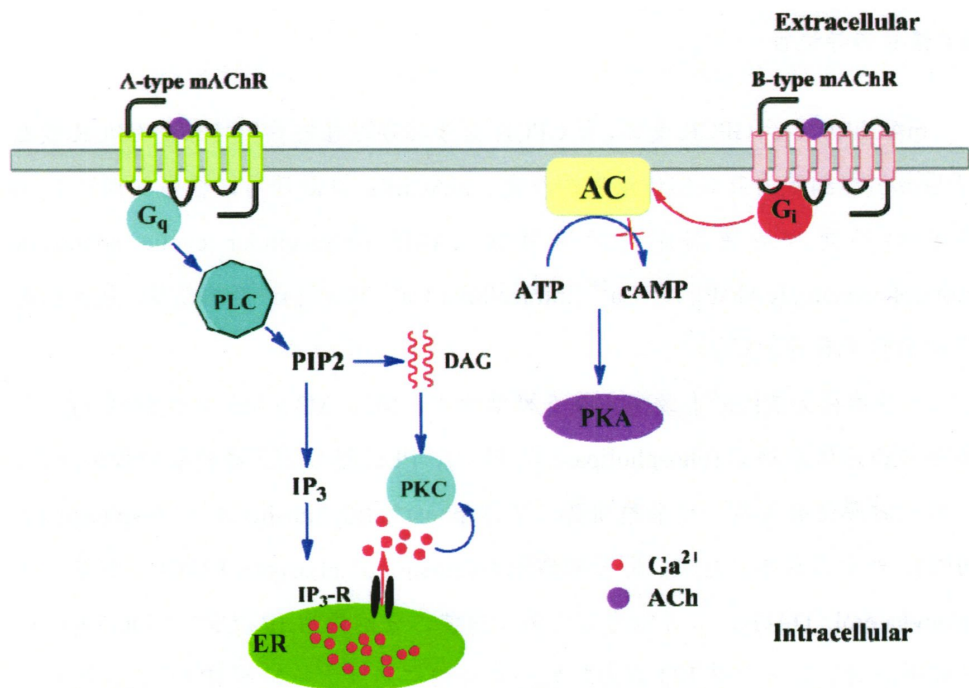


图 1.1 昆虫体内 mAChRs 所偶联的信号转导途径

Fig 1.1 Insect mAChRs coupled to different Signaling pathways

PLC: 磷脂酶 C Phospholipase C; PIP2: 磷脂酰肌醇二磷酸 phosphatidylinositol 4, 5 -bisphosphate; IP3: 肌醇三磷酸 Inositol trisphosphate; DAG: 二酰基甘油 Diacylglycerol; PKC:

蛋白激酶 C Protein kinase C; AC: 腺苷酸环化酶 Adenylate cyclase; PKA: 蛋白激酶 A Protein kinase A; ER: 内质网 Endoplasmic reticulum.

6.2 药理学性质

mAChRs 药理学研究主要集中在对其激动剂和拮抗剂的研究中。哺乳动物体内 mAChRs 分为 M1、M2、M3、M4、M5。LY2033298 对 M4 受体的变构位点有很高的选择性，其确定为高选择性的 M4 受体激动剂，有研究表明，LY2033298 有抗精神失常的作用，被认为是治疗神经分裂症最具前景的新药（李慧等，2014）。已有多多种 mAChR 激动剂，如阿托品、莨菪碱、槟榔碱(arecoline)、毛果云香碱(pilocarpine)、沙考美林(sabcomeline)、占诺美林(xanomeline)等，目前被批准用于治疗 AD 临床药物的均是乙酰胆碱酯酶抑制剂，其通过提高乙酰胆碱水平发挥治疗作用（史一鸣，2009）。哌仑西平(pirenzepine)是选择性的 M1 受体拮抗剂，在外周主要用于治疗胃溃疡；选择性 M2 亚型拮抗剂 SCH57790 可以增强认知能力和记忆力；而托特罗定(tolterodine)是较成功的 M3 受体拮抗剂，用于治疗膀胱过度活动症，且无口干等不良反应；拮抗剂噻托溴铵(tiotropium)被认为是治疗慢性阻塞性肺病的首选药。1,5-苯并二氧杂环类化合物是一类新型、对 M1-M3 亚型具有高亲和力的拮抗剂，其中 1,5-benzodioxepin 衍生物 A 已成为有潜力的候选药物（史一鸣，2009）。由于对 M5 亚型的功能研究还不完善，因此针对 M5 药物的研发较少。

昆虫体内药理学研究主要有两个方面，一是细胞药理学研究，二是虫体药理学研究（姜鸣，2014）。目前只有果蝇 *D. melanogaster* 和赤拟谷盗 *T. castaneum* 的细胞药理学研究报道。mAChRs 根据其药理学性质分为两大类：the A-type mAChR 和 the B-type mAChR，其中 the A-type mAChRs 和哺乳动物体内的 M1-M5 mAChRs 神经生物学功能相似，可被乙酰胆碱、毒蕈碱激动剂所激活，对传统的拮抗剂阿托品、莨菪碱和 3-奎宁环苄很敏感；而 the B-type mAChRs 不同于 the A-type mAChRs 和哺乳动物体内的 M1-M5 mAChRs，对乙酰胆碱有明显的激活效应，但对毒蕈碱敏感性要比乙酰胆碱低 1000 倍，而对传统的拮抗剂阿托品、莨菪碱和 3-奎宁环苄不敏感(Collin *et al.*, 2013)。有关 B 类亚型药理学研究还需进一步开展。对蜜蜂虫体药理学研究发现，给蜜蜂食用 mAChRs 激动剂毒蕈碱

和毛果云香碱会导致脑部神经纤维网体积增大,该效果可被拮抗剂莨菪碱所抵消, mAChRs 的激活与蜜蜂脑部的可塑性有关,且能影响蜜蜂依赖性的学习记忆行为 (Guez *et al.*, 2010; Ismail *et al.*, 2006)。在雄性蝗虫脑部中央复合区注射激动剂毒蕈碱,会导致蝗虫的鸣声更尖锐持续时间更长,而该效果可被 AC 的抑制剂 neomycin、U-73122 所抑制,而注射 AC、3-isobutyl-1-methylxanthine 和 PKA 催化剂 forskolin 时,也能引起鸣声,说明 mAChRs 可以调节蝗虫的鸣声 (Heinrich *et al.*, 2001; Hoffmann *et al.*, 2007; Wenzel *et al.*, 2002)。

6.3 受体的生理功能

哺乳动物中, mAChRs 在外围副交感神经系统和中枢神经系统中起重要作用。mAChRs 调控了多种生理反应和行为过程,如刺激肠道平滑肌的收缩,温度、心率、注意力的调节,学习和记忆,疼痛 (Bubser *et al.*, 2012; Caulfield and Birdsall, 1998; Hasselmo, 2006; Wess *et al.*, 2007)。哺乳动物里这五种 mAChRs 都能被传统的激动剂毒蕈碱和乙酰胆碱激活,也能被传统的 mAChRs 拮抗剂阿托品、莨菪碱和 3-奎宁环苄拮抗 (Harvey, 2012; Tobin *et al.*, 2009)。mAChRs 可以作为很多疾病的药物作用靶点,包括口干、失禁、慢性阻塞性肺病、阿耳茨海默氏病、帕金森病、精神分裂症、青光眼、止痛、沮丧、心律失常、肠道蠕动的失调、晕动病、消化性溃疡、干燥综合征、肥胖症和糖尿病 (Caulfield and Birdsall, 1998; Wess *et al.*, 2007)。mAChRs 在结构、功能特征和医药发展的研究上取得了很大的突破 (Ishii and Kurachi, 2006)。

在昆虫体内,目前的研究相对较少,根据药理学性质分为 the A-type mAChR 和 the B-type mAChR,其中 the A-type mAChR 主要存在于神经系统,主要功能是参与神经生理活动,是杀虫剂的潜在靶标。the B-type mAChR 由 Collin 等人于 2013 年发现,对其功能研究较少。对果蝇 DM1 研究发现,果蝇 DM1 受体主要在神经系统中的触角叶表达量最高,说明果蝇 DM1 与嗅觉信息的神经传递有关 (Blake *et al.*, 1993)。对烟草天蛾 *M. sexta* 触角中 mAChRs 的研究表明,神经元和神经胶质细胞间胆碱的通讯可能调节轴突的延伸,而即将分化的上皮细胞上则存在的胆碱能系统可能与表皮的形成相关 (Clark *et al.*, 2005)。对家蚕 *B. mori* 脑部 the A-type mAChRs 研究发现,其在家蚕脑部神经系统广泛表达,且与促前胸腺

激素(prothoracicotropic hormone, PTTH)在分泌细胞及神经纤维中呈共表达模式,由此推测其可能调节 PTTH 激素的释放(Aizono *et al.*, 1997)。拟黑多刺蚁 *P. vicina* mAChR mRNA 广泛存在于 CNS 中,且在其卵期、幼虫及成虫的整个发育阶段都有表达,表明 mAChRs 可能参与了昆虫的发育行为,且其 mRNA 在蚂蚁脑部广泛表达,在脑部嗅叶、蕈形体和视叶的阳性反应最强,由此推测 mAChRs 可能参与视觉和嗅觉信息的获取和整合(Lu *et al.*, 2011)。mAChRs 调节多种神经生理活动,但其具体的调节机制还需深入研究,目前在昆虫基因功能研究中 RNAi 技术已经相当成熟,未来结合 RNAi 技术进一步研究昆虫 mAChRs 功能将是重要方向。

7 展望

目前对于昆虫体内 mAChRs 的研究相对薄弱,主要集中在生理学功能和药理学性质两个方面的研究。生理功能的研究认为 mAChRs 在昆虫体内调节昆虫的多种行为活动,但其作用机理及信号转导途径还需进一步研究,而对其药理学研究表明部分激动剂与拮抗剂可以明显影响家蚕和果蝇的行为,并提出以 mAChRs 为靶标的杀虫剂可以避免已有杀虫剂所带来的交叉抗药性(Honda *et al.*, 2007)。目前从分子方面已验证昆虫存在 the A-type mAChR 和 the B-type mAChR,对于 the B-type mAChR 其研究甚少。因此,加强对昆虫 mAChRs 的研究,有助于深入了解昆虫胆碱神经的传递机制,特别是对 the B-type mAChR,其功能研究可能为发现新的杀虫作用靶标,研发新的杀虫剂提供新思路。

第二章 昆虫体内的多巴胺及其受体

1 引言

多巴胺(dopamine, DA)是一种广泛存在于脊椎动物和无脊椎动物体内生物胺(biogenic amine)。在生物体内, DA 是去肾上腺素(norepinephrine, NE)和肾上腺素(epinephrine, AE)的合成前体, 参与调控动物多种生理反应和行为过程, 如: 运动, 情感, 学习记忆和神经内分泌等(Beaulieu and Gainetdinov, 2011; Missale *et al.*, 1998)。目前, 在哺乳动物体内对 DA 的研究主要集中在理解和治疗有关 DA 参与影响的各种神经性疾病上, 如帕金森综合征(Parkinson' s disease)、焦躁症(bipolar disorder)、药物成瘾(drug addiction)以及精神分裂症(schizophrenia)等(Beaulieu and Gainetdinov, 2011; Sillitoe and Vogel, 2008)。在昆虫体内, DA 调控昆虫的学习和记忆(learning and memory) (Agarwal *et al.*, 2011)、抉择(decision-making) (Zhang *et al.*, 2007)、运动(motor behavior) (Draper *et al.*, 2007)以及飞蝗从散居到群居型的型变(phase change) (Yuan *et al.*, 2011)。

1910 年, DA 首次由 George Barger 和 James Ewens 通过左旋多巴(L-DOPA)合成(Fahn, 2006), 直到 1957 年 Arvid Carlsson 等(1957)才发现其独立于去肾上腺素和肾上腺素, 作为神经递质在动物体内扮演重要角色。

DA 主要通过激活特异性的多巴胺受体(dopamine receptors, DARs)发挥作用, DARs 属于视紫红质类 G 蛋白偶联受体家族(rhodopsin-like subfamily of GPCRs)。在哺乳动物体内, 根据其信号传导、生理功能及药理学性质可将 DARs 分为两类: D1-like DARs 和 D2-like DARs。D1-like DARs 包括 D1 (Sunahara *et al.*, 1990)和 D5 (Sunahara *et al.*, 1991)受体, 其偶联 G_s 蛋白, 激活 AC, 引起胞内 cAMP 含量的升高; D2-like DARs 包括 D2 (Grandy *et al.*, 1989)、D3 (Sokoloff *et al.*, 1990)和 D4 (Van Tol *et al.*, 1991)受体, 其被激活后偶联 G_i 蛋白, 抑制 AC 活性, 引起胞内 cAMP 含量的下降。在昆虫体内, 目前主要三种亚型 DARs 被克隆到, 可分为两类: D1-like DARs 和 D2-like DARs, D1-like 包括 DOP1 和 DOP2, D2-like 仅有一种亚型即 DOP3。近年来, DA 在昆虫体内所扮演的生理作用及对昆虫行为的调控, 昆虫体内各种 DARs 的药理学及生理学功能的研究日益受到科研工作

者们的重视,尤其是一些模式昆虫,如黑腹果蝇 *D. melanogaster* (Han *et al.*, 1996; Hearn *et al.*, 2002),家蚕 *B. mori* (Mitsumasu *et al.*, 2008; Ohta *et al.*, 2009)和西方蜜蜂 *A. mellifera* (Blenau *et al.*, 1998; Humphries *et al.*, 2003)等。本文主要从昆虫体内 DA 的合成分解、分布、生理作用以及 DARs 的信号转导、药理学及生理功能等方面进行阐述。

2 合成与分解

昆虫体内 DA 的合成与脊椎动物一样,以氨基酸酪氨酸(tyrosine, Tyr)为合成前体,在酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)的作用下生成多巴(3, 4-dihydroxy-L-phenyl-alanine, L-DOPA),然后在多巴脱羧酶(dopa decarboxylase, DDC)的作用下生成 DA (Restifo and White, 1990) (图 2.1)。TH 是 DA 合成过程中的限速酶(Blenau and Baumann, 2001),目前,TH 和 DDC 这两种酶已经在多种昆虫体内被克隆到,并被发现参与了昆虫的体色形成(Gorman and Arakane, 2010),黑化反应(Gorman *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2005)以及发育和行为(Hodgetts and O'Keefe, 2006)等。

在已研究的后生动物,包括哺乳动物、昆虫和软体动物体内,DA 的分解途径各不相同。昆虫体内,DA 主要在 β -丙酰化, γ -谷酰化, *N*-乙酰化,硫酸化和氧化脱氨基等酶解作用下分解。在果蝇体内,DA 在 *ebony* 基因的催化作用下生成 *N*- β -丙酰多巴胺(*N*- β -alanyl dopamine, NBAD),且反应过程可逆,一些 NBAD 又能在 *tan* 基因编码的 NBAD 水解酶作用下生成 DA, NBAD 可参与到果蝇黄色骨化的形成。DA 也可在芳香烷基胺-*N*-乙酰基转移酶(arylalkylamine-*N*-acetyl transferases, aaNATs)作用下生成 *N*-乙酰多巴胺(*N*-acetyl dopamine, NADA), NADA 是无色骨化形成的前体物质(Wittkopp *et al.*, 2003)。在昆虫体内 DA 的具体代谢过程见图 2.1。在哺乳动物体内 DA 的失活主要包括单胺氧化酶(monoamine oxidase, MAO)和儿茶酚-氧位-甲基转移酶(catechol-O-methyltransferase, COMT)的作用。MAO 有两种亚型:MAO-A 和 MAO-B, DA 在 MAO 的作用下脱氧生成醛,进一步转化为酸和醇;在 COMT 作用下,DA 的氧位甲基化,进一步在 MAO 的作用下生成高香草酸(homovanillic acid)。虽已在多种软体动物体内克隆到了 MAO 基因,如长牡蛎 *Crassostrea gigas*

(Boutet *et al.*, 2004)和栉孔扇贝 *Chlamys farreri* (Zhou *et al.*, 2011)。但是目前在昆虫体内还没有克隆到 MAO 基因, 昆虫体内是否存在 MAO 这条代谢途径还存在争议, 因此现在认为, 在昆虫的神经组织内极少或没有 MAO 活性(Sloley, 2004)。

3 储存、释放与再吸收

DA 在囊泡单胺转运体(vesicular monoamine transporter, VMAT)的作用下, 从细胞质转运到突触囊泡内(Chang *et al.*, 2005)。DA 储存在这些囊泡内, 随后囊泡与细胞膜融合然后通过胞吐作用将 DA 泵出到神经突触(synapses)间隙(Greer *et al.*, 2005)。被释放到突触间隙的 DA 便会结合位于突触后的 DARs, 引起信号从突触前传播到突触后的神经元中。DA 也能结合位于突触前的 DARs, 来刺激或抑制突触前的神经元, 而具有抑制性功能的突触前受体被称为自受体(autoceptors), 自受体具有负调控作用, 能够抑制突触前神经元内神经递质的合成和释放, 它们的作用是当 DA 的释放被突然破坏导致 DA 浓度过高或过低时, 能够保持正常的 DA 含量(Simon *et al.*, 2009)。

DA 在昆虫体内引起突触后细胞发生反应并产生相关信号, 需要通过多巴胺转运体(dopamine transporter, DAT)将 DA 重吸收进入突触前结构中(Donly and Caveney, 2005; Gallant *et al.*, 2003; Horn, 1990)。DAT 属于 Na^+/Cl^- 依赖性的神经递质转运体家族, 属于一种膜蛋白, 有 12 个跨膜结构域, 其氮端和碳端均在胞质内。DAT 存在于多巴胺能神经末梢的突触前膜上, 用于将释放的 DA 转运到突触前细胞胞质内, 药理学家认为它可以作为良好的药物作用靶标, 阻断其对 DA 的再摄取可达到害虫防治的目的。目前, 已经在多种无脊椎动物体内克隆得到了 DAT, 包括黑腹果蝇 *D. melanogaster* (Pörzgen *et al.*, 2001)、家蚕 *B. mori*、秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* (Jayanthi *et al.*, 1998)和可卡因毒蛾 *Eloria noyesi* 等(Chen *et al.*, 2006)。此外, 突触间隙(synaptic cleft)的 DA 被转运到突触前胞质后, 会被 VMAT 转运到囊泡中重复利用。

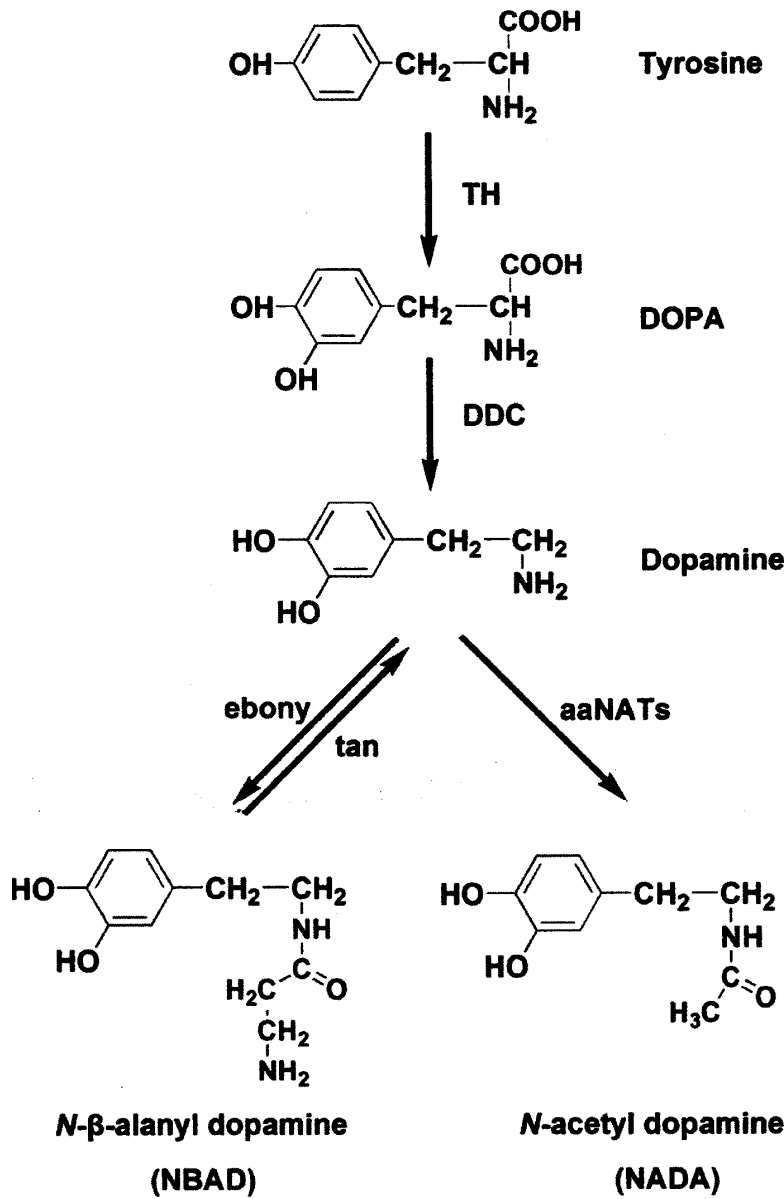


图 2.1 昆虫体内 DA 的合成和分解代谢简图

Fig 2.1 Biosynthesis and metabolism of dopamine in insects

Tyrosine: 酪氨酸; DOPA: 多巴; Dopamine: 多巴胺; TH: 酪氨酸羟化酶 Tyrosine hydroxylase; DDC: 多巴脱羧酶 Dopa decarboxylase; tan: a gene *Drosophila* which encodes NBAD hydrolase; ebony: a gene of *Drosophila* which encodes NBAD synthetase; NBAD: N-β-丙酰多巴胺 N-β-alanyl dopamine; aaNATs: arylalkylamine-N-acetyl transferases; NADA: N-乙酰多巴胺 N-acetyl dopamine (吴顺凡, 2013) .

4 分布

DA 在昆虫中枢神经系统(central nervous system, CNS)和外周神经系统(peripheral nervous system, PNS)中都有分布。对果蝇 DA 的分布研究比较深入,其在果蝇的咽下神经节(suboesophageal ganglion, SOG)、蘑菇体(mushroom body, MB)和脑部的中央复合体(central complex)中均有存在(Zhang *et al.*, 2007)。MB 中的 DA 神经元与果蝇的学习、记忆密切相关(Bang *et al.*, 2011), 如对惩罚和奖励的调控(Riemensperger *et al.*, 2005)等。中央复合体内存在的大量 DA 及其受体,控制着果蝇的运动行为(Kahsai *et al.*, 2012)。以果蝇为研究材料研究的帕金森综合症也备受关注(Feany and Bender, 2000)。DA 在蝗虫的前脑(Protocerebrum), 中大脑(Deutocerebrum), 后脑(Tritocerebrum)以及视叶(Optic lobes)中均有分布(Vieillemaringe *et al.*, 1984), 在蝗虫的神经系统及两型转变中扮演重要角色。此外, 外周神经中存在的 DA 可能释放到血淋巴系统中进行循环(Bräunig, 1991; Bräunig and Pflüger, 2001)。不同种类的昆虫其体内的 DA 含量不同, 且受到外界条件的影响较大(Hamasaka and Nässel, 2006)。Sasaki 等研究发现, 刚出房的雄蜂脑部的 DA 含量最少, 七、八日龄时 DA 含量达到最高, 然后逐渐下降(Harano *et al.*, 2008; Sasaki *et al.*, 2012)。蜜蜂的幼虫、蛹和成虫的脑部都有 DA, 主要分布在前脑, 其代谢产物 N-乙酰多巴胺在视叶和前脑均有分布(Sasaki and Nagao, 2001)。

5 生理功能

在昆虫体内, DA 可作为神经递质、神经调质或者神经激素发挥重要的生理功能, 调控主要的行为活动。DA 会影响昆虫的学习与记忆、生长、发育和代谢等多种行为(表 2.1)。例如, 提高 DA 含量能够大幅度提高雄性果蝇同性间求偶的倾向, 但并没有影响到对异性求偶的行为(Neckameyer and Weinstein, 2005); 对果蝇研究发现 DDC 基因影响其寿命的长短, 而该基因是 DA 生成所需要的(De Luca *et al.*, 2003); 此外 DA 也参与了果蝇对厌恶气味嗅觉记忆的形成(Riemensperger *et al.*, 2005; Schultz, 2005), 而且 DA 在 MB 内的神经回路对果蝇的选择行为有重要影响(Zhang *et al.*, 2007)。DA 是一种重要的多功能分子, 作为

神经传递物质参与调控了果蝇的运动、求偶及寿命等各种生命活动(Liu *et al.*, 2008)。DA 对昆虫的交配能力的影响在调节蜜蜂 *A. mellifera* 生殖上也得到了充分的体现(Sasaki and Nagao, 2002)。DA 也能影响两型昆虫的相变行为, 研究发现与东亚飞蝗 *Locusta migratoria* 的相变行为有关的重要靶基因参与了多巴胺的合成和突触释放,RNAi 和药物干预实验证实,提高 DA 含量或注射 DARs 激动剂, 能引起飞蝗的群居行为(Yuan *et al.*, 2011)。在昆虫体内 DA 与保幼激素(Juvenile hormone, JH)、蜕皮激素(20-hydroxyecdysone, 20E)的含量有一定关系, DA 和 OA 能够提高果蝇体内的 20E 合成和降低 JH 的降解(Rauschenbach *et al.*, 2007)。Angela B. Lange 和 Kenny Chan 研究发现多巴胺调控着东亚飞蝗 *Locusta migratoria* 前肠的收缩(Lange and Chan, 2008)。DA 还与昆虫唾液腺的分泌有关, 有研究发现 DA 能够诱导离体的美洲大蠊 *Periplaneta americana* 唾液腺分泌无蛋白的唾液(Just and Walz, 1996), 并能引起导管细胞内钙离子浓度缓慢的增加(Lang and Walz, 1999)。

表 2.1 多巴胺在昆虫体内所参与的功能

Table 2.1 Functions regulated by dopamine in insects

功能 Functions	昆虫种类 Insect species	参考文献 References
学习和记忆 Learning and memory	西方蜜蜂 <i>A. mellifera</i>	(Agarwal <i>et al.</i> , 2011a; Mizunami <i>et al.</i> , 2009)
	蟋蟀 <i>Gryllus texensis</i>	
交配行为 Mating behavior	黑腹果蝇 <i>D. melanogaster</i>	(Liu <i>et al.</i> , 2008; Neckameyer, 1998)
寿命 Longevity	黑腹果蝇 <i>D. melanogaster</i>	(De Luca <i>et al.</i> , 2003)
嗅觉 Olfactory	黑腹果蝇 <i>D. melanogaster</i> ;	(Dacks <i>et al.</i> , 2012)
	西方蜜蜂 <i>A. mellifera</i> ;	
	烟草天蛾 <i>M. sexta</i>	
型变 Phase change	东亚飞蝗 <i>L. migratoria</i>	(Yuan <i>et al.</i> , 2011)
奖赏 Reward	黑腹果蝇 <i>D. melanogaster</i>	(Liu <i>et al.</i> , 2012a)
调控保幼激素和蜕皮激素含量 Regulates JH and ecdysteroid titer	黑腹果蝇 <i>D. melanogaster</i>	(Rauschenbach <i>et al.</i> , 2007)
睡眠和觉醒 Sleep and arousal	黑腹果蝇 <i>D. melanogaster</i>	(Kumar <i>et al.</i> , 2012; Liu <i>et al.</i> , 2012b; Ueno <i>et al.</i> , 2012)
运动 Locomotion	黑腹果蝇 <i>D. melanogaster</i> ;	(Akasaka <i>et al.</i> , 2010; Draper <i>et al.</i> , 2007)
	西方蜜蜂 <i>A. mellifera</i>	

6 多巴胺受体

DA 在昆虫体内发挥不同的生理作用，很多都是通过其受体实现的。目前，昆虫体内鉴定出来的 DA 受体都是 G 蛋白偶联受体，有 7 个跨膜区域，1 个胞外的氨基端和胞内的羧基端，以及 3 个胞内和胞外环(Rosenbaum *et al.*, 2009)。

6.1 信号转导途径

G 蛋白偶联受体信号转导过程中的共同特点是 GPCR 被激活后会引引起细胞内第二信使浓度的改变。DA 受体被激活后，根据其偶联的 G 蛋白的不同，会使细胞内 cAMP 或 Ca^{2+} 浓度的改变，从而引起不同的信号转导途径。由 DARs 激活的信号转导途径很广泛，主要为对 AC 的激活、抑制和钙信号的调控。

D1-like DARs和D2-like DARs中的个体其跨膜结构域具有高水平的同源性并且有不同的药理学性质。一种是使 $[\text{cAMP}]_i$ 浓度改变。D1-like的多巴胺受体通过AC激活G蛋白的 G_s 家族从而刺激cAMP的产生，并且唯有在突触后的多巴胺受体细胞中才能发现。D1受体结合到 G_s 蛋白上，被激活的 G_s 亚基会跟质膜上的AC发生反应，导致该环化酶的活性提高，使ATP转化为AMP，AMP浓度的升高会激活依赖cAMP的PKA的活性。PKA能够将底物分子中的丝氨酸和苏氨酸磷酸化，这些底物包括细胞溶质蛋白、配体门控或电压门控的离子通道以及一些转录因子如CREB, CREM和ATF-1 (De Cesare *et al.*, 1999)。DA受体也能抑制AC的活性，主要是D2-like的多巴胺受体与抑制性G蛋白的 G_i 家族偶联，诱导AC抑制效应。与D1-like的多巴胺受体对比，D2-like DARs不论在突触后的多巴胺靶细胞还是突触前的多巴胺能神经元细胞中都能表达(Beaulieu and Gainetdinov, 2011)。

另一个途径使 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 浓度的改变。受体结合到 G_q 家族类蛋白上，结合并激活 PLC 的活性(Rhee and Bae, 1997)。PLC 能够水解一种膜结合底物—PIP2，产生两种第二信使即三磷酸肌醇 IP3 和 DAG。IP3 结合内质网膜上特定的 IP3 受体，它们是一些 Ca^{2+} 通道。结合后能使 Ca^{2+} 通道打开， Ca^{2+} 释放到细胞质中。 Ca^{2+} 通过直接控制酶或离子通道的活性在细胞很多功能中起了重要的作用。另外， Ca^{2+} 也能与许多蛋白结合，如钙调蛋白、钙结合蛋白、钙网膜蛋白等，这些蛋白通过蛋白互作调控昆虫很多蛋白效应器的活化。PLC 也导致了 DAG 的产生，DAG

是质膜上的第二信使，能结合 Ga^{2+} 激活 PKC 的活性，PKC 跟 PKA 一样，PKC 能够使很多蛋白的丝氨酸和苏氨酸残基磷酸化，从而改变这些蛋白的功能 (Blenau and Baumann, 2001)。总之，GPCR 激活后，细胞内各级信号浓度发生变化，不同的细胞内信号通道可能在同一个细胞中同时激活，这将导致细胞反应的放大或减小从而达到信号传导的功能。

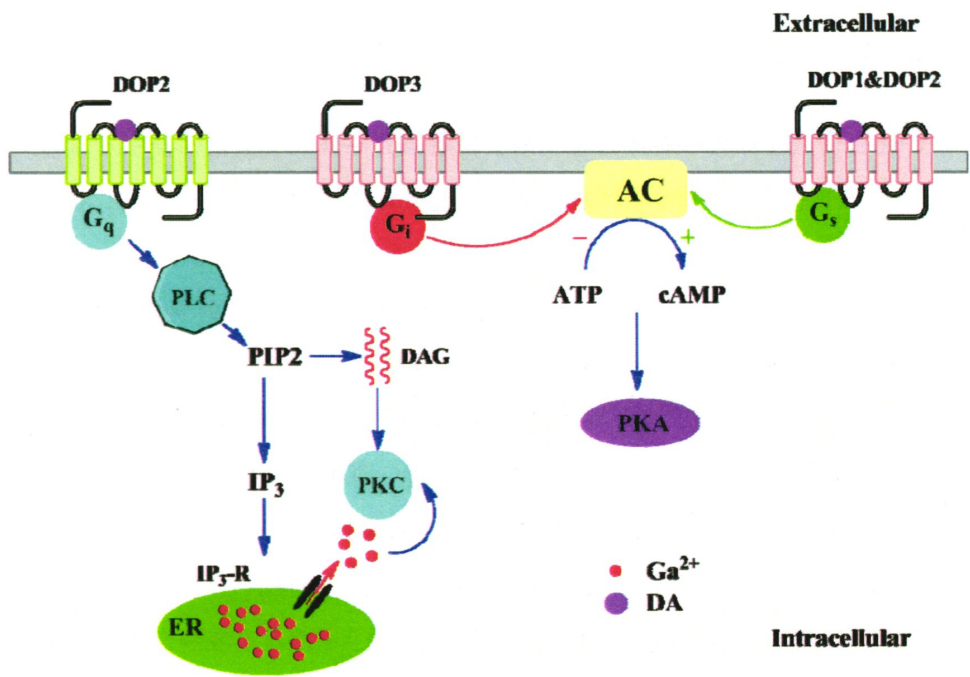


图 2.2 昆虫体内 DARs 所偶联的信号转导途径

Fig 2.2 Insect DARs coupled to different Signaling pathways

PLC: 磷脂酶 C Phospholipase C; PIP2: 磷脂酰肌醇二磷酸 phosphatidylinositol 4, 5 -bisphosphate; IP3: 肌醇三磷酸 Inositol trisphosphate; DAG: 二酰基甘油 Diacylglycerol; PKC: 蛋白激酶 C Protein kinase C; AC: 腺苷酸环化酶 Adenylate cyclase; PKA: 蛋白激酶 A Protein kinase A; ER: 内质网 Endoplasmic reticulum.

6.2 药理学性质

昆虫体内 DA 受体虽在结构和信号转导上与哺乳动物相似，但药理学性质却不尽相同。DA 受体亚型的药理学进展主要集中在激动剂和拮抗物的研究中。例如，激动剂中 6、7-ADTN 对昆虫 D1-like 受体有激动效果，而另三种激动剂：溴麦角环肽(Bromocriptine)、阿扑吗啡(Apomorphine)和 SKF-38393 对家蚕的

D1-like 受体均无反应(Ohta *et al.*, 2009)。SKF38393 对果蝇的 DmDOP1 反应微弱(Gotzes and Baumann, 1996), 对蜜蜂的 AmDOP1 则具有激动作用(Beggs *et al.*, 2011)。在哺乳动物中, Bromocriptine 是 D2-like DARs 的激动剂, Apomorphine 对所有的 DARs 都具有非选择性激活效果, SKF-38393 是 D1-like DARs 的激动剂。拮抗剂中, 哺乳动物 D1 拮抗剂 SCH23390, 可特异性的拮抗昆虫 D1-like DARs, 其对 D2-like DARs 拮抗效果则未见报道(Beggs *et al.*, 2011; Ohta *et al.*, 2009)。Flupentixol、butaclamol 和 spiperone 对家蚕的 D1-like DARs 有明显的拮抗效果, 而 flupentixol 对蜜蜂的 AmDOP1 无拮抗作用, 对 AmDOP2 有拮抗作用。常见的拮抗剂 Flupentixol、spiperone、mianserin 和 epinastine 均对蜜蜂的 AmDOP3 和果蝇的 DmDOP3 无明显的拮抗效果(Beggs *et al.*, 2011; Hearn *et al.*, 2002)。不同类型 DA 受体的特异性激动剂或拮抗剂可作为选择性杀虫剂的生物合成前体。

6.3 受体的生理功能

DA 的生理功能主要是通过结合其相应的受体实现。有研究表明果蝇的 DmDOP1 和 DmDOP2 (DAMB) 基因在其脑部的蘑菇体中的表达参与了果蝇记忆的形成(Han *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2003), 果蝇对食欲的控制(Inagaki *et al.*, 2012) 以及对嗅觉的记忆(Liu *et al.*, 2012a)。激活 DA 神经元能引起果蝇睡眠的减少, 然而若失去 DmDOP1 受体的表达, 这种效应便被阻断, 若恢复该受体的表达, DA 引起的睡眠减少则会再次显现。果蝇的 DmDOP3 被报道参与了对果蝇爬行行为的调控(Draper *et al.*, 2007), 且还参与对果蝇体内保幼激素和蜕皮激素水平的调控。有研究报道蜜蜂的 AmDOP2 参与其运动行为(Mustard *et al.*, 2010)。蜜蜂的 AmDOP3 能被蜂王信息素(queen mandibular pheromone, QMP)的主要成分 HVA (homovanillyl alcohol) 激活, 并影响脑部 cAMP 变化, 引起记忆的产生(Beggs and Mercer, 2009)。

7 展望

DA 是昆虫和哺乳动物中枢神经系统中一种重要的神经递质、神经调质和神经激素。尽管对于 DA 信号调节系统和 DARs 分子特征和功能特征的研究相对深入, 但关于 DA 和 DARs 如何参与调控昆虫各种生理功能的还有很多新途径, 包

括对免疫的调控、对行为的控制以及参与学习与记忆等。目前,已经在多种昆虫体内克隆到 DARs,包括果蝇(Gotzes *et al.*, 1994; Han *et al.*, 1996),家蚕(Mitsumasu *et al.*, 2008)和蜜蜂(Blenau *et al.*, 1998)等。随着昆虫基因组测序和 RNAi 技术的发展,未来会致力于发掘更多新的 DARs 以及寻找不同昆虫特异性的 DARs,对昆虫体内 DA 及 DARs 生理和药理学研究的另一个意义在于开发高效杀虫剂,传统的杀虫剂有一些不可避免的问题如害虫的抗药性,因此,开发新作用方式的杀虫剂非常必要。

第三章 CG12796 的信号通路和药理学研究

1 引言

在昆虫的神经系统中乙酰胆碱是主要的神经递质，它结合不同药物类型的乙酰胆碱受体。根据其神经生物学功能，可将其分为两类：烟碱型乙酰胆碱和毒蕈型乙酰胆碱(Millar and Baylis, 1995)。在哺乳动物中，乙酰胆碱能激活烟碱型乙酰胆碱受体，属于配体离子通道受体；也能激活毒蕈型乙酰胆碱受体，属于 G 蛋白偶联受体。

在哺乳动物中，毒蕈型乙酰胆碱已经有五种受体亚型被鉴定出来，分别是 M1、M2、M3、M4、M5，其中 M1、M3、M5 优先偶联 $G_{q/11}$ ，激活 PLC，磷脂酶 C 能启动三磷酸肌醇级联反应，导致胞内 Ca^{2+} 离子转移并激活 PKC。另一方面，受体亚型 M2 and M4 偶联 $G_{i/o}$ ，抑制 AC 的活性，同时还能激活 G 蛋白封闭的钾离子通道，在不同的兴奋细胞中导致细胞质膜的超极化。在外围副交感神经系统和中枢神经系统中起重要作用，例如：刺激肠道平滑、肌肉收缩和降低心率(Bubser *et al.*, 2013; Harvey, 2012; Tobin *et al.*, 2009)。mAChRs 可以作为很多疾病的药物作用靶点，包括口干、失禁、慢性阻塞性肺病。mAChRs 在结构、功能特征和医药发展的研究上取得了很大的突破(Ishii and Kurachi, 2006)。

二十多年前，从黑腹果蝇 *D. melanogaster* 体内克隆并验证了昆虫的 mAChR，对阿托品很敏感(Shapiro *et al.*, 1989)。目前，昆虫体内 mAChRs 分为两大类：the A-type mAChR（即 DmCG4356）和 the B-type mAChR（即 DmCG7918），其中 the A-type mAChRs 和哺乳动物体内的 M1-M5 mAChRs 神经生物学功能相似，对传统的拮抗剂阿托品、莨菪碱和 3-奎宁环苄很敏感；而 the B-type mAChRs 对传统的拮抗剂阿托品、莨菪碱和 3-奎宁环苄不敏感，但两类受体对传统激动剂乙酰胆碱和毒蕈碱都有明显的激活效应(Collin *et al.*, 2013)。在黑腹果蝇 *D. melanogaster*、赤拟谷盗 *T. castaneum*、可能所有其他昆虫和节肢动物中都存在 the A-type mAChRs 和 the B-type mAChRs。

本研究中，从果蝇体内克隆到 CG12796 cDNA 的全长。已确定为新的毒蕈型乙酰胆碱受体，暂命名为 C 型乙酰胆碱受体(the C-type mAChR)。将其表达于仓

鼠卵巢细胞(Chinese hamster ovary, CHO-K1)细胞中, 对其药理学特性和所偶联的信号通路做了系统研究。

2 材料与方法

2.1 供试昆虫

本实验所用野生型的黑腹果蝇 *D. melanogaster* 来自本实验室世代培养。果蝇饲养于人工培养箱 (温度控制在 25℃, 湿度在 70%, 光周期为 L:D=12h:12h) 内。所用饲料为标准的玉米粉培养基, 其组分为 7.3%的玉米粉、1%的黄豆粉、0.5%的琼脂、1.7%的酵母粉、7%的白糖和 0.25%的尼泊金甲酯。每周一次将羽化的成虫换至装有饲料的新试管中。本实验所用试剂均购自 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)。

果蝇饲料配方如下:

成分	重量
水	1L
玉米粉	73g
黄豆粉	10g
琼 脂	5g
酵 母	17g
白 糖	70g
尼泊金甲酯	2.5g

2.2 RNA 抽提

分别收集果蝇的不同虫态, 如卵、幼虫、蛹、成虫以及雄虫和雌虫的不同组织如头胸腹, 用 TRIzol 法(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)提取样品的总 RNA, 具体操作步骤及过程如下:

- (1) 在收集到的各组织样品中加入 1 ml TRIzol, 加入不锈钢珠用组织研磨仪 TissueLyser II 匀浆 1 min, 室温静置 5 min;
- (2) 离心机 4℃, 12000 g 离心 10 min, 抽取上层液体至新的 1.5 ml 离心管;

- (3)加入 200 μl 氯仿剧烈振荡 15 sec, 室温静置 5min, 4°C, 12000 g 离心 15 min;
- (4) 取上清于新的 1.5 ml 离心管中, 加入 500 μl 异丙醇, 室温静置 10 min 后, 4°C, 12000 g 离心 10 min;
- (5) 去除上清, 加入 1 ml 75%的乙醇, 混匀, 4°C, 7500 g 离心 5 min;
- (6) 弃去上清, 室温干燥 5-10 min 后, 将提取的 RNA 样品溶解在 DEPC 水中;
- (7)总 RNA 提取后,RNA 完整性的检测采用 1.5%的甲醛变性琼脂糖凝胶电泳, RNA 纯度及定量的测定则采用 NanoDrop 分光光度计(Thermo Scientific)。根据需要进行适当稀释, 用于下一步实验或者保存于-70°C。

2.3 CG12796 cDNA 的克隆

取 50 头成虫果蝇的头部组织, 采用 TRIzol 试剂法(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)获取总 RNA。

2.3.1 RT-PCR

以 1.0 μg 总 RNA 为模板, 采用反转录试剂盒 ReverTra Ace-kit (Toyobo, Osaka, Japan)进行反转录合成第一链 cDNA。

用 RQ1 DNase (Promega)进行 DNA 消化, 具体操作如下:

(1) 消化反应体系:

溶于水中的 RNA	1 μL
RQ1 RNase-Free DNase 10X Reaction Buffer	1 μL
RQ1 RNase-Free DNase (1 μg/μL)	1 μL
Nuclease-Free water	up to 10 μL

- (2) 37°C 孵育 30 min;
- (3) 加 1 μL RQ1 DNase Stop Solution 终止反应;
- (4) 65°C 孵育 10 min 失活, 立即置于冰上。

按照反转录试剂盒 ReverTra Ace-kit (Toyobo)说明书进行反转录, 具体操作如下:

(1) RNA 热变性:

消化体系中的 RNA	11 μL
------------	-------

Oligo (dT) (10 pmol/μL)	0.5 μL
Random Primer (25 pmol/μL)	0.5 μL
65°C, 5 min 后, 立即置于冰上。	
(2) 反应液配置:	
(1) 中变性后的 RNA 溶液	12 μL
5×RT Buffer	4 μL
dNTP Mixture (各 10 mM)	2 μL
RNase Inhibitor (各 10 U/μL)	1 μL
ReverTra Ace	1 μL
(3) 逆转录反应	
30 °C, 10 min;	
42 °C, 60 min;	
99 °C, 5 min;	
4 °C, 10 min;	
反应完毕, 瞬间离心。	

2.3.2 CG12796 cDNA 序列的获得

根据 CG12796 发布在(<http://www.flybase.org>)上的序列数据, 用 Primer 5.0 软件设计引物。克隆基因片段所用引物见表 3.1。获得编码基因 CG12796 全长序列的 cDNA 片段的 20 μL 的 PCR 反应体系如下:

cDNA 模板	1 μL
5×Phusion GC Buffer	4 μL
10 mM dNTPs	0.7 μL
上游引物(10 μmol/L)	0.6 μL
下游引物(10 μmol/L)	0.6 μL
Phusion DNA 聚合酶	1 μL
灭菌 ddH ₂ O	12.8 μL

PCR 反应程序: 94°C 2 min; 94°C 15 sec, 60°C 30 sec, 72°C 2 min, 38 个循环; 72°C 10 min; 4°C forever. PCR 扩增产物用 1%的琼脂糖凝胶进行电泳鉴定。

表 3.1 PCR 扩增 CG12796 cDNA 序列所用引物

Table 3.1 Primers for cloning the gene *CG12796* cDNA

引物名称	引物序列(5'-3')
Primer name	Primer sequence(5'-3')
<i>CG12796-compF</i>	CTCATGGCATTACCAGCAGCTCAT
<i>CG12796-compR</i>	TTCTACCAAGTTAAAGCGTTGGGTT

2.4 PCR 产物的纯化

PCR 产物通过 1.0%的琼脂糖凝胶电泳分开得到，采用 Axygen Gel Extraction Kit 凝胶回收试剂盒进行回收纯化，具体操作步骤如下：

- (1) 在紫外灯下观察并切下含有目的 DNA 的琼脂糖凝胶；
- (2) 将凝胶放入 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 6-8 min。至凝胶完全融化，期间每 2-3 min 振荡离心管混匀；
- (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，当分离的 DNA 片段小于 400 bp 时，需再加入 1 个凝胶体积的异丙醇，提高回收效率；
- (4) 吸取步骤 3 中的混合液，转移至 DNA 制备管，并装在干净的 2 mL 收集管内，室温 12000 g 离心 1 min；
- (5) 弃滤液，在柱中加入 500 μL Buffer W1，室温 12000 g 离心 1 min；
- (6) 弃滤液，在柱中加入 700 μL Buffer W2(加乙醇)，室温 12000 g 离心 30 sec；
- (7) 重复步骤 (6) 一次；
- (8) 弃流出液，把空柱放回收集管中，室温 12000 g 离心 1 min，去尽柱中残液；
- (9) 将回收柱放入 1.5 mL 离心管中，加入 25 μL 65℃ 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，弃纯化柱，洗脱液即为回收的目的 DNA；
- (10) 取适量纯化液采用 NanoDrop 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 pGEM®-T Easy Vector System I (Promega, Madison, WI, USA)载体中, 对其进行测序鉴定, 使用 3730 XL DNA 分析仪 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), 获得编码 CG12796 的全长序列。连接反应体系如下:

目的 DNA	3 μL
T4 DNA Ligase	1 μL
pGEM®- T Easy Vector	1 μL
2×Rapid Ligation Buffer	5 μL

轻轻混匀后, 4℃ 反应连接过夜。

2.6 连接产物的转化、鉴定和测序

经 Axygen 凝胶回收试剂盒回收后, 产物与 pGEM®-T Easy 载体连接, 转化至 TransT1 感受态细胞, 接种于含 Amp、X-gal 和 IPTG 的 LB 固体培养基培养, 经蓝白斑筛选后挑取白色单菌落, 进行菌落 PCR 验证, 选取含有正确插入片段的菌液测序。

2.6.1 连接产物的转化

将连接后的产物进行转化, 具体操作方法如下:

- (1) 在刚解冻的 50 μL 全式金公司生产的 TransT1 感受态细胞中加入 5 μL 连接的产物, 轻轻混匀, 冰上静置 20 min;
- (2) 42℃ 热激 45 sec 后, 立即置于冰上 2 min;
- (3) 每管加入 800 μL LB 液体培养基, 37℃, 200 rpm 振荡孵育 1 h;
- (4) 在含 Amp (100 μg/mL)抗性的 LB 固体培养基平板上加入 40 μL 20 mg/mL X-gal 和 8 μL 100 mg/mL IPTG 溶液, 用涂布器将其轻轻涂匀;
- (5) 取 200 μL 培养的菌液于上述平板, 用涂布器将菌液轻轻涂匀;
- (6) 平板正放于 37℃ 至菌液完全吸收, 倒置平板继续培养 10-16 h。

2.6.2 转化子的鉴定和测序

- (1) 用灭菌的 10 μL 枪头在 LB 平板上挑取 5 个白色单菌落，分别接种于 1 mL 含 Amp (100 $\mu\text{g/mL}$) 抗性的 LB 液体培养基中，37 $^{\circ}\text{C}$ ，200 rpm 振荡培养；
- (2) 以培养的菌液为模板，T7/SP6 为引物，进行菌落 PCR 验证，PCR 反应体系为 20 μL ，如下：

ddH ₂ O	15.3 μL
10 $\times$ Easy Taq Buffer	2 μL
dNTP	1 μL
T7 引物(10 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$)	0.5 μL
SP6 引物(10 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$)	0.5 μL
模板	0.5 μL
Easy Taq	0.2 μL

PCR 反应条件为：94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 sec, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 sec, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ forever。

- (3) 经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后将含有目的片段的菌液送铂尚生物技术有限公司测序。

2.7 质粒 DNA 的抽提

- (1) 质粒 DNA 的抽提采用 Axygen Plasmid Kit，具体操作方法如下：
- (2) 取 1-5 mL 在 LB 培养基中培养过夜的菌液，室温 12000 g 离心 1 min 沉淀菌种，弃尽上清；
- (3) 加入 250 μL 含有 RNase A 的 Buffer S1 悬浮沉淀，漩涡振荡使其悬浮均匀；
- (4) 加入 250 μL Buffer S2，温和并充分地上下翻转 4-6 次混合均匀使菌体充分裂解，直至形成透亮的溶液。
- (5) 往上述混合液中加入 350 μL Buffer S3，温和并充分地上下翻转数次，至形成白色絮状沉淀，室温离心 12000 g 离心 10 min；
- (6) 吸取步骤 5 中的离心上清并转移至制备管(置于 2 mL 离心管中)，室温 12000 g 离心 1 min, 弃滤液。
- (7) 将制备管放回 2 mL 离心管，加 500 μL Buffer W1，室温 12000 g 离心 1 min，弃滤液；

- (8) 将制备管放回 2 mL 离心管，加 700 μ L Buffer W2（加乙醇），室温 12000 g 离心 1 min，弃滤液；以同样的方法再用 700 μ L Buffer W2 洗涤一次，弃滤液；
- (9) 将制备管放回 2 mL 离心管，室温 12000 g 离心 1 min；
- (10) 将制备管移至新的 1.5 mL 离心管中，在制备管膜中央加 50 μ L 65 $^{\circ}$ C 预热的灭菌 ddH₂O，室温静置 1 min，12000 g 离心 1 min，洗脱出柱膜上的质粒 DNA，弃纯化柱；
- (11) 新抽提的质粒用 NanoDrop2000 微量紫外分光光度计检测 DNA 含量。

2.8 pcDNA3-CG12796 融合质粒的构建

用 Primer 5.0 软件设计 CG12796 的酶切引物，通过 PCR 扩增得到含酶切位点的 CG12796 全长序列，并将 Kozak 序列(Kozak, 1987)和 CG12796 基因的 ORF 相融合，采用 *KpnI* 和 *XhoI* 分别对所得序列和 pcDNA3 (Invitrogen)质粒进行酶切处理。然后将消化后的 PCR 产物经 T4 DNA 连接酶连接至 5 端具有 HA 标签的 pcDNA3 载体上产生 pcDNA3-CG12796 融合质粒，通过测序验证插入序列的正确性。此过程中所用的酶切引物见表 3.2。具体操作方法如下：

- (1) 分别在 CG12796 的 5'端和 3'端通过 PCR 连上酶切位点 *KpnI* 和 *XhoI*，切胶回收 PCR 产物，准备双酶切。CG12796 连上酶切位点的 50 μ L PCR 体系如下：

灭菌的 ddH ₂ O	29 μ L
5 $\times$ Transstart Fast Pfu Fly Buffer	10 μ L
2.5 mM dNTPs	5 μ L
<i>KpnI</i> -F	2 μ L
<i>XhoI</i> -R	2 μ L
cDNA	1 μ L
Transstart FastPfu Fly DNA Polymerase	1 μ L

PCR 反应条件为：95 $^{\circ}$ C 2 min；95 $^{\circ}$ C 10 sec，55 $^{\circ}$ C 20 sec，72 $^{\circ}$ C 1 min，38 个循环；72 $^{\circ}$ C 5 min；4 $^{\circ}$ C forever。

- (2)对带有 *KpnI*、*XhoI* 粘性末端的 CG12796 和载体 pcDNA3 分别进行双酶切，100 μ L 双酶切体系如下：

<i>KpnI</i>	4 μ L
-------------	-----------

<i>XhoI</i>	4 μL
10×M Buffer	10 μL
pcDNA3+H ₂ O	82 μL

在 37℃ 条件下，酶切 3 h 后，对双酶切载体和目的片段进行 1%琼脂糖凝胶电泳，回收产物，测定浓度。

(3) 连接双酶切后的目的基因 *CG12796* 和载体 pcDNA3，10 μL 的连接体系如下：

10×T4 DNA Ligase Buffer	1 μL
目的片段 <i>CG12796</i>	6 μL
PcDNA3	2 μL
T4 DNA Ligase	1 μL

目的基因的摩尔数应控制在载体 PcDNA3 摩尔数的 3-10 倍，16℃ 连接过夜，将过夜产物取 5 μL 转入 TransT1 感受态细胞中，挑取培养的单菌落摇菌测序，并用 T7 和目的基因的反向引物 *XhoI* 进行菌落 PCR 验证，并测序验证目的基因正确插入 pcDNA3，抽提质粒。

表 3.2 双酶切引物

Table 3.2 Primers for restriction enzyme digestion	
引物名称	引物序列(5'- 3')
Primer name	Primer sequence(5'- 3')
<i>CG12796-KpnI-F</i>	TTGGTACCACCATGGCATTACCAGCAG
<i>CG12796-XhoI-R</i>	CCCTCGAGTCACTGAGTGGCCTTC

2.9 多重序列比对和进化树分析

获得了编码 *CG12796* 的全长 cDNA 序列。利用 NCBI 网站的 GenBank 数据库(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)对其进行 BLASTX 同源序列比对分析。采用 ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)对完整的氨基酸序列进行多序列比对，用 TMHMM 2.0 对 *CG12796* 的跨膜结构域和拓扑结构进行预测(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)，并利用 MEGA 5.05 软件，采用邻位相连法(neighbor-joining)进行系统发育和分子进化分析。

2.10 定量 PCR

CG12796 mRNA 在果蝇不同的发育阶段和组织中的相对表达量是通过定量 PCR (quantitative PCR, qPCR)利用美国应用生物系统公司的 7500 定量 PCR 系统 (Applied Biosystems)测定。(1) 收集黑腹果蝇 *D. melanogaster* 不同发育阶段的虫体, 定量分析 *CG12796* 动态发育的表达量, 分别有胚胎(20-24h), 幼虫 (1d、2d、3d、4d、5d), 蛹 (雄蛹: 2d、3d; 雌蛹: 2d、3d), 成虫 (整头雄虫和雌虫); (2) 收集不同组织的样品, 定量分析 *CG12796* 组织发育的表达量, 分别有雄虫的头、胸、腹, 雌虫的头、胸、腹, 整头雄虫、整头雌虫; (3) 取出的样品分别放置在含有 RNA 酶抑制剂的 PBS (Tris-buffered saline, 25 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl and 3 mM KCl, pH 7.0)里清洗干净, 以上各组织 RNA 的提取均采用 TRIzol(Invitrogen, CA)试剂法按照说明书进行; (4) 提取好总 RNA 后, 采用 DNase (RQ1 RNase-Free DNase, Promega)消化以去除基因组 DNA 的污染, 定量 1 μ g 采用试剂盒 the ReverTra Ace qPCR kit 反转录成 cDNA, 逆转录条件为: 37°C, 15 min 逆转录反应; 98°C, 5 min 酶失活反应。反应结束后将其保存在-20°C 条件下。

用于 qPCR 分析的特异性引物见表 3.3。以内参引物 RpL11 cDNA 片段(Collin *et al.*, 2013)为标准运用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法(Livak and Schmittgen, 2001)计算果蝇动态发育和组织分布的相对表达量。

表 3.3 定量 PCR 引物

Table 3.3 Primers for real-time quantitative	
引物名称	引物序列(5'- 3')
Primer name	Primer sequence(5'- 3')
q <i>CG12796</i> -S	TGTGGTCTTCATCATGGGCT
q <i>CG12796</i> -A	AAGCCAGAGTTCTTCCACGA
RpL11-S	CGATCCCTCCATCGGTATCT
RpL11-A	AACCACTTCATGGCATCCTC

2.11 细胞培养及转染

CHO-K1 细胞在 Dulbecco's modified Eagle medium F-12 (1:1) (DMEM/F-12) 培养基(Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)中培养, 培养基内增补 10%热灭火的 FBS (Gibco BRL)和 1%的抗生素(青霉素和链霉素), 细胞置于恒温 37°C 和 5% CO₂ 含量的二氧化碳培养箱中培养。

细胞培养基的置换操作: 将慢慢变黄的培养基吸走, 用 1 mL PBS (Tris-buffered saline, 25 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl and 3 mM KCl, pH 7.0)轻轻清洗, 加入 5 mL 新培养基。

细胞传代的操作方法如下:

- (1) 细胞长满后进行传代, 将旧的培养基吸走, 用 1 mL PBS 轻轻清洗;
- (2) 加 200 μ L 胰酶消化 30 sec, 使几乎所有细胞都接触到胰酶减小细胞壁的张力, 消化 30 sec 后吸走胰酶;
- (3) 将培养皿放置培养箱中 1 min, 准备一个新的培养皿, 写好标签, 拿出培养箱中的旧培养皿, 加 1 mL 新培养基, 用实验枪轻轻吹打下细胞, 混匀;
- (4) 用 100 μ L 于新培养基中, 加入 5 mL 新培养基, 混匀细胞, 即可放入培养箱中培养, 旧的细胞及皿扔掉, 细胞传代完成。

细胞的转染的操作方法如下:

- (1) 将 250 μ L 转染液 OPTI-MEM®I (1X) (Gibco BRL)分别轻轻混合 10 μ L 脂质体 2000 (Invitrogen)和 4 μ g pcDNA3-CG12796 载体, 室温静置 5 分钟;
- (2) 轻轻混合含脂质体 2000 和 pcDNA3-CG12796 载体的转染液, 室温静置 20 min, 利用脂质体 2000 (Invitrogen)将 4 μ g pcDNA3-CG12796 载体转入呈指数期生长的 CHO-K1 细胞中(直径 3.5 cm 细胞培养皿, $\sim 4 \times 10^5$ 个细胞);
- (3) 将 500 μ L 混合液加入长满细胞的培养皿中, 加入 2 mL 转染液 OPTI-MEM®I (1X) (Gibco BRL)放入培养箱中即完成转染;
- (4) 转染 6 h 后换上普通培养液 2.5 mL, 转染 24 h 后传代 100 μ L 至新培养皿, 传代第二天细胞用 20 μ L G418 (0.8 mg/ml)筛选, 后期可多加至 30 μ L 或 40 μ L;
- (5) 筛选两周以获取稳定转染的细胞系, 用 RT-PCR、Western blotting 和免疫细胞化学检测细胞转染效率。

2.12 Western blotting

Western blotting 用来检测细胞转染效率。分别收集经筛选形成稳定转染的细胞系和未转染质粒的空白 CHO-K1 细胞。

分别提取转染和未转染细胞的膜蛋白和可溶性蛋白。其具体操作方法为：

- (1) 将收集好的细胞，4℃，800×g 离心 10 min，弃掉上层培养液；
- (2) 加入 Bugmaster，在冰上超声破碎 5 次，以确保细胞的充分裂解；
- (3) 以 1:1000 的比例加入蛋白酶抑制剂，测蛋白浓度，加入蛋白 loading buffer；
- (4) 煮沸 10 min，在冰上冷却后，4℃，10,000 × g 离心 20 min，上清为可溶性蛋白，吸取上清到新的 1.5 mL 离心管中，离心后所得的沉淀物为膜蛋白。

可溶性蛋白与等体积的 2×上样缓冲液混匀煮样后，对混合样品进行 12% SDS-PAGE。Western blotting 的具体操作方法如下：

- (1) SDS-PAGE 电泳结束后用去离子水将凝胶冲洗干净，剪取相同大小的硝酸纤维素膜 (PVDF 膜, 0.45 μm, Millipore)，剪取相同大小的 8 张滤纸，4 张一份，将蛋白胶和 PVDF 膜同时放入半干转膜缓冲液平衡 15 min；
- (2) 在半干转印仪上一次放上 4 层滤纸、PVDF 膜、蛋白胶和另外 4 层滤纸，用干净玻璃棒轻柔并均匀的碾压驱赶气泡，采用 Bio-Rad 公司的半干电转膜系统转膜，条件为恒压 16 V 转移 16 min，将凝胶上的蛋白转印到硝酸纤维素膜上(0.45 μm) (Millipore)。
- (3) 转膜后将 PVDF 膜放入平皿中，加入 50 mL TBST(TBS with 0.05% Tween-20)洗膜两次，每次 5min；
- (4) PVDF 膜采用 5%脱脂奶粉在 4℃封闭过夜或室温封闭 1 h；
- (5) 60 mL TBST 洗膜 3 次，每次 5 min，加入用 5%脱脂奶粉 1: 1000 稀释的 HA-taq 多克隆抗体，室温放置 1-2 h；
- (6) TBST 洗膜 5 次，每次 5 min 后，加入用 5%脱脂奶粉 1: 3000 稀释的 HRP 标记的羊抗兔二抗(Sigma)，室温放置 1 h；
- (7) TBST 洗膜 4 次，每次 5 min，最后一次用 TBS 洗膜 5 min；
- (8) 用 3',3',5',5'-四甲基联苯胺(TMB) (Promega)显色，室温避光反应 1-2 min，去离子水终止显色，在 GS-800(Bio-rad)上拍照并保存结果。

2.13 免疫细胞化学

免疫荧光检测细胞转染效率, 实验步骤为:

- (1) 分别收集经筛选形成稳定转染的细胞系和未转染质粒的空白 CHO-K1 细胞。
- (2) 分别取 10 μL 至 8 孔的腔室盖玻片(Lab-Tek Chambered Coverglass System, Nunc, Thermo Scientific)中, 置于恒温 37°C 和 5% CO_2 含量的二氧化碳培养箱中培养;
- (3) 一两天后待细胞长至 70%, 去除培养基, 用 PBS 缓慢清洗细胞 2 次, 用 4% 的多聚甲醛固定液固定 20 min;
- (4) 去除固定液, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min, 采用 1% BSA(溶于 PBS)对转染及对照组未转染的细胞进行封闭, 室温下封闭 1 h;
- (5) 封闭后采用 PBS 对血细胞再次进行漂洗, 共 3 遍, 每遍 5 min;
- (6) 用含 1% BSA 的 PBS 以 1:200 的比例稀释带有 HA 标签的 HA-Tag 多克隆抗体, 室温下孵育 1 h。PBS 漂洗细胞 3 次, 每次 5 min;
- (7) 用含 1% BSA 的 PBS 以 1:500 的比例稀释用 FITC 标记的羊抗兔二抗(Sigma), 室温下共孵育 30 min;
- (8) 二抗孵育后, 采用 PBS 对细胞进行漂洗 4 遍, 每次 5 分钟;
- (9) 细胞核采用 DAPI (0.5 $\mu\text{g/mL}$)染色 5 min, 在 LSM510 型激光共聚焦显微镜 (Zeiss, NY)对 CG12796 蛋白进行免疫荧光观察。

2.14 Ca^{2+} 测定

细胞内 Ca^{2+} 浓度测定采用 Easy Ratio Pro 钙成像分析(PTI, Birmingham, NJ)系统完成。CHO-K1 细胞系 Ca^{2+} 成像流程为:

- (1) 将转染有 pcDNA3-CG12796/CHO-K1 细胞种在 12 mm 玻片(Thermo Scientific)上;
- (2) 次日取出预培养的细胞, 除去培养基, 使用 PBS 洗涤细胞 2 次后, 加入用 PBS 稀释的浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 的 Fura 2-AM (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)溶液, 溶液量以覆盖细胞为准;
- (3) 37°C 避光孵育 30 min, 除去 Fura 2-AM 工作液, 用 PBS 缓慢清洗细胞 2 次, 以充分去除残留的 Fura 2-AM 工作液;

(4)加入 PBS 溶液覆盖细胞,在 37℃ 培养箱内孵育 20-30 min,以确保 Fura 2-AM 在细胞内的完全去酯化作用;

(5)最后用 Easy Ratio Pro 钙成像分析仪检测细胞,激发波长 380 nm (Fura 2) 和 340 nm(Ca^{2+} -Fura 2),发射波长 510 nm。

2.15 cAMP 测定

cAMP 提取的具体操作方法如下:

(1) 将 pcDNA3-CG12796/CHO-K1 细胞传代至 12 孔板(Nunc)上,放在 37℃ 5% CO_2 的二氧化碳培养箱中培养,至次日细胞长满(约 1×10^6 /孔);

(2) 去除细胞培养基,用 PBS 洗涤细胞 2 次,每孔中加入 450 μL PBS 配置的浓度为 100 μM 的 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, Sigma-Aldrich)以抑制磷酸二酯酶水解 cAMP 的活性,在室温下孵育 20 min;

(3) 加入 50 μL PBS 溶解的各供试浓度药剂,混匀后继续在室温下孵育 20 min;

(4) 去除上层药液,加入 250 μL 细胞裂解液($1 \times$ cell lysis buffer),吸取上清继续做 cAMP 测定或冻存于 -80℃ 冰箱中。

cAMP 浓度的测定参照 cAMP Parameter Assay Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; Catalog # KGE002B)操作手册进行,具体操作方法如下:

(1) 96 孔板除了两个 NSB 孔,每个孔加 50 μL Primary antibody solution,注意不要有气泡,放在水平振荡仪 (MixMate, eppendorf) 550 rpm 孵育 1 h;

(2) 配置标样 cAMP standard,加入 1 mL 灭菌 ddH₂O 配成 2400 pmol/mL,后面浓度的稀释使用 $1 \times$ cell lysis buffer,用灭菌 ddH₂O 稀释 $25 \times$ Wash buffer 为 $1 \times$;

(3) 细胞裂解液在 -80℃ 冰箱内反复冻融两次,使细胞充分裂解,吸取裂解液到 1.5 ml 离心管中,4℃, $12,000 \times g$ 离心 10 min;

(4) 弃孵育后的 Primary antibody solution, $1 \times$ Wash buffer 清洗 4 次,每次 400 μL ,洗完后拍干;

(5) 加入 cAMP conjugate,每孔 50 μL ,加入 100 μL 准备的标样、细胞裂解液,放在水平振荡仪 (MixMate, eppendorf) 550 rpm 孵育 2 h;

(6) 弃孵育后的样品, $1 \times$ Wash buffer 清洗 4 次,每次 400 μL ,拍干;

(7) 每孔加入 200 μ L Substrate solution (Color reagents A 和 B 等体积混合), 避光室温放置 30 min;

(8) 每孔加入 100 μ L Stop solution, 使用水平振荡仪 (MixMate, eppendorf) 测定。

3 结果与分析

3.1 CG12796 cDNA 的克隆及序列分析

通过 PCR 手段, 从果蝇头部克隆得到编码 CG12796 cDNA 序列的全长 (见图 3.1), 在 GenBank 上的登录号为: NM_132130。序列分析结果表明, 编码 CG12796 的 ORF 大小为 1116 bp, 共编码 371 个氨基酸, 预测分子量大小为 41.90 kDa, 等电点为 8.47。通过 TMHMM 和 TMpred 预测发现其编码一个 α 螺旋的 7 跨膜受体, 属于典型的 G 蛋白偶联受体家族 (见图 3.2)。在跨膜 3 (TM3) 后胞内 2 区 (ICL2) 上存在有典型的 DRY (Asp 147-Arg 148-Tyr 149) 结构域 (Moro *et al.*, 1993), 在 TM7 上存在有 NPXXY 结构域, 这两个特性都在视紫红质类 G 蛋白偶联受体高度保守。克隆到 CG12796 的 ORF 与发布在 (<http://www.flybase.org>) 上的 CG12796 基因有 13 个不同的碱基, 3 个不同的氨基酸, 分别由 Arg 29、Val 255、Ala 333 代替了 (<http://www.flybase.org>) 上的 His 29、Met 255、Val 333 (见图 3.3)。

对昆虫体内已知的 mAChRs 基因的氨基酸序列进行多重序列比对。几乎在所有的 mAChRs 中 TM2 中的 Leu 93、TM3 中的 Leu 141 和 TM6 中的 Ile 273 (见图 3.3 中黑色圆点标记) 是完全保守; 在 TM3 氮端的 Cys 123 和 ECL2 中的 Cys 197 之间存在一个二硫键, 是 mAChRs 的共同特征 (如图 3.3 所示)。五角星标注的六个位点很可能是激动剂乙酰胆碱的结合位点 (Haga *et al.*, 2012), 三角形标注的 N31 可能是一个糖基化位点 (N-x-[S/T]), PKC ([S/T]-x-[R/K]) 磷酸化作用的四个位点分别存在于第一个胞内环、第二个胞内环、TM7 的氮端和第四个胞外环 (T₇₇, T₁₆₃, S₃₂₂, T₃₄₀)。

对人类和昆虫的 mAChRs 基因构建系统发育进化树, 以临近法 (neighbor-joining) 重复 1000 次, 并以 DmFR 为外源基因, 分析结果表明 CG12796 与目前已知的 mAChRs 家族在不同的进化枝上, 所以预测 CG12796 为新的毒蕈

型乙酰胆碱受体家族, 并命名为 C 型毒覃型乙酰胆碱受体。C-type mAChR 与在冈比亚按蚊(*Anopheles gambiae*, XP_310742), 家蚕(*B. mori*, XP_004924179), 毕氏粗角蚁(*Cerapachys biroi*, EZA62475), 赤拟谷盗(*T. castaneum*, EFA01319)同源基因的氨基酸相似度分别为 71%, 61%, 57%, 56%(图 3.4)。

```

1      ATGGCATTTACAGCAGCTCATCGCCGGCTTGGGATTATCGAAGCTCCCGGAAGCGTTG
1      M A F T S S S S P A W D Y R S S ? E A L
61     GGTGTCGTCCGTTCTGTGGCAGCACCAGAACGCCAGGAAACGCCAAGGAAATAACC
21     G V V P F L W Q R Q N A T E T P T E I T
12:    CTCCAGCGCAGCAGTTTCGGTCCCGCATCTGCTGTGGCTAGCCAATCAATGCTTCTGTG
41     L Q A T S F G A G H L L W L A I N A F L
18:    TTITGCTTATCCTGGCGGCAATATTCGACCAATTGTGGCGGTGGCGACCTGCCGCCAC
61     F V L I L G G N I L T I V A V R T C R H
24:    CTGGCATCGGTCACTCCAACTGTTCATCTGTGCTGGCGGTCTCCGACTTCTGTGTG
81     L R S V I S N L F I L S L A V S D F C Y
30:    GGACTGGCAGTCCCTATCACTGTATTTTACATGGGCTGGGACAATGGCGCATGAGA
10:    G L A L P Y H L V F Y W G S D I G A W R
36:    GGTCCTGTGCTGCTGCTGCTTCTTCTGCTCATCTGCGCTGCTGCGTGCATGTTGACT
12:    G P C L L R F F L L I C A C C V S M L T
42:    CTGATCTCGATTCCGGTGGATCGGTATATAGCAGTCTGTATGCTCGCACTATAGAAGA
14:    L I S I A V D R Y I A V V Y A L H Y R R
48:    TACATGACCCGTGAGTGGCATATAGCATCATATTCATTTGGTGTGCTGGGTGCATTG
16:    Y M T R R V A Y S I I I F N W C L G A L
54:    GTGGCTCTGCTGCCAGTGTCTGCAATCGATGCCCGGATGCACAGCGGTGGGAATTGCAC
18:    V A L L P V F W N R W P D A Q A C E F D
60:    GAAGTTCTCGCGCTGTGTTACATTGCCGAGTGATAACGCCGGGTCTGTGATCATCTGG
20:    E V L A P G Y I A G V I T P G F V I I W
66:    ATCTGTATGTTCTGCTTCTACTGCGCATCATGCGCGAGGCATGCAAGCAGCGCTCGGA
22:    I C M F L V Y W R I M R E A S K Q A L R
72:    TTGGCAGTCCGGTGGTCTACAACAAGGAGGAGGCCACCACCATGCGAAATCTGCTGCTC
24:    L R Q S V V Y N T D E A T T V R N L L L
78:    CATCCAGACTGGAAGACGTCAGATTGTGGTCTTCATCATGGGCTGCTTCAAGCTCTGT
26:    H P D W K S V Q I V V F I M G C F T L C
84:    TGGCTAOCGTACTTCTGTGTGGCCATTGCCAGCTATTTAGCATCTGCCAGAGCAGCTGG
28:    W L P Y F C V A I A Q L F S I C Q S S S
90:    ATGATCTACAAGACGAGTCTCTCTGCGCATTGCCAACTCTGCTCTCAATCGATTATC
30:    M I Y K T T F S L A I A N S A L N P I I
96:    TACTGTGGAAGAACTCTGGCTTTCCGGCAGCCTTTGTCCAACATATGCTGCCGAACG
32:    Y S W K N S G F R R A F A Q T L C C R T
102:  GCGAGGCAGTCCGAGGATCAATTGCCGGGAGCAGCAAGCAACCGCAATGGAGGCCACATCC
34:    A R Q C E D Q L P A D S K H R M E A T S
108:  TCATCTCAGGAGATCAACCGAAGCCCACTCAGTGA
36:    S S Q E I K P K A T Q *

```

图 3.1 CG12796 的核苷酸和氨基酸序列

Fig 3.1 Nucleotide and amino-acid sequences of CG12796

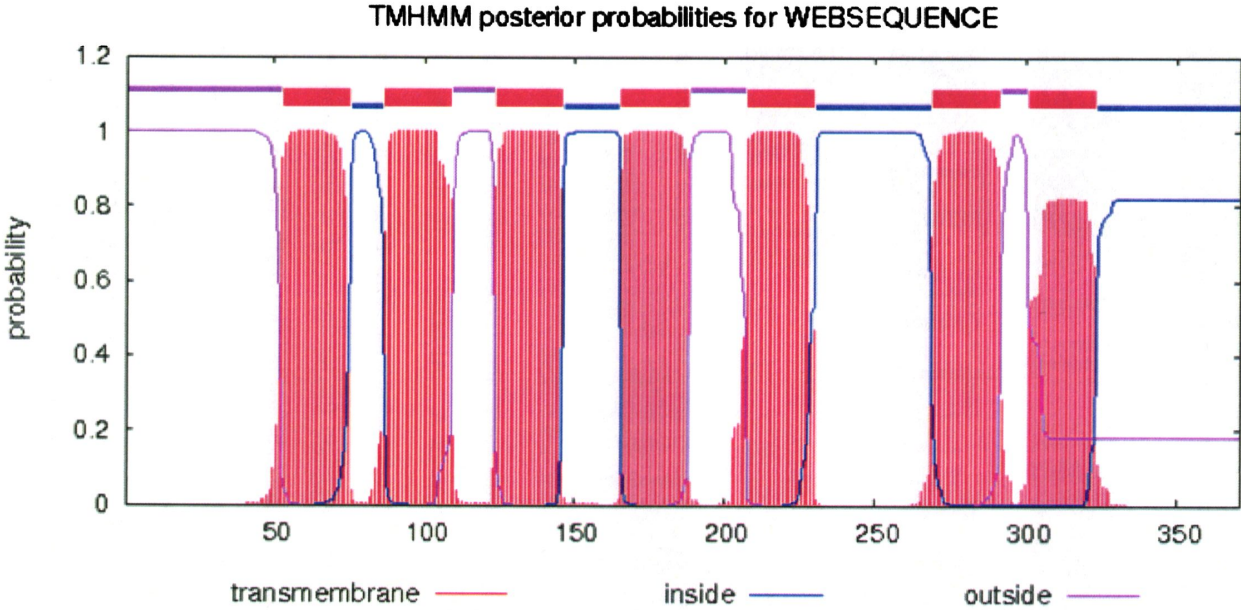


图 3.2 CG12796 的七跨膜结构域

Fig 3.2 Seven hydrophobic transmembrane domains of CG12796

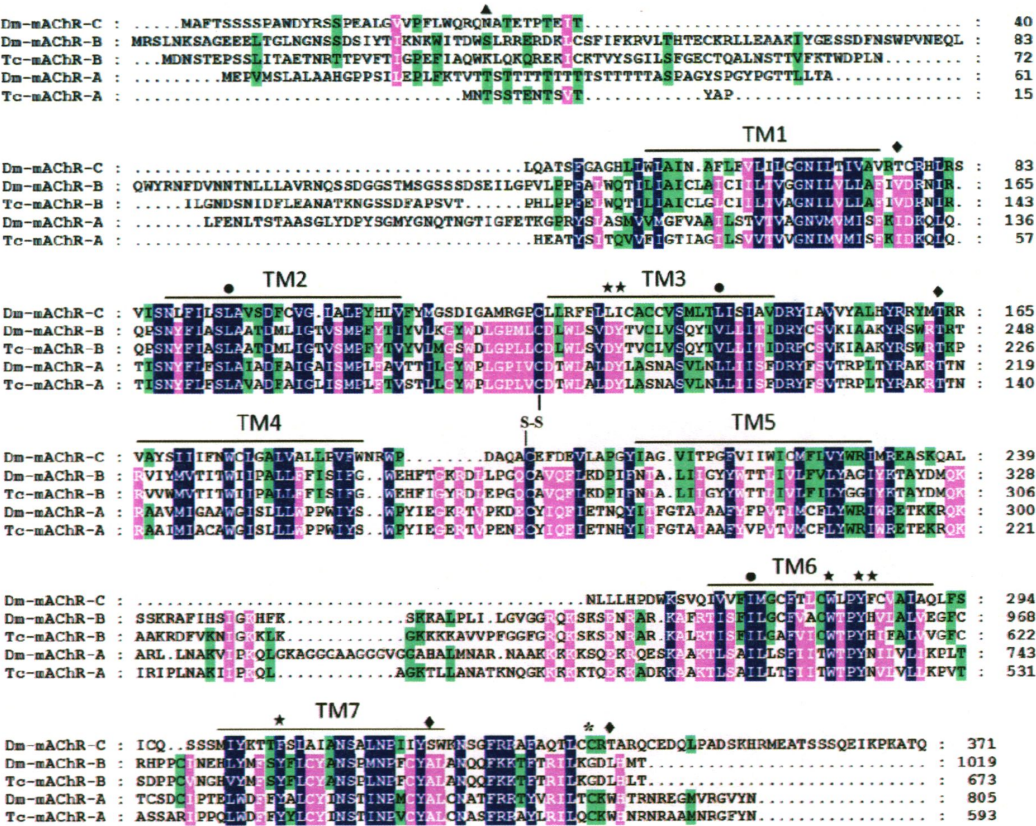


图 3.3 CG12796 氨基酸序列与赤拟谷盗和果蝇中同源基因的多重序列比对分析

Fig 3.3 Sequence alignments of *D. melanogaster* and *T. castaneum* mAChRs. Accession No.: Dm-mAChR-C, AAF46208; Dm-mAChR-A, AFJ23965; Tc-mAChR-A, AGG09676; Dm-mAChR-B, AGE13748; Tc-mAChR-B, AFJ23968. The alignment was performed by ClustalX, and the shaded sequences highlight the identity level of amino acids between the receptors. The transmembrane helices are indicated by TM1-TM7. The six residues marked by asterisks are the proposed acetylcholine binding sites (Haga *et al.*, 2012). Cystine bridges are indicated by "S-S". The one marked by triangle is N-linked glycosylation (N-x-[S/T]) site. The four marked by diamond are phosphorylation by protein kinase C (PKC) ([S/T]-x-[R/K]) sites. The three residues with solid black markers are absolutely conserved among all mAChRs. The snowflakes symbol is palmitoylation of a cysteine residue site.

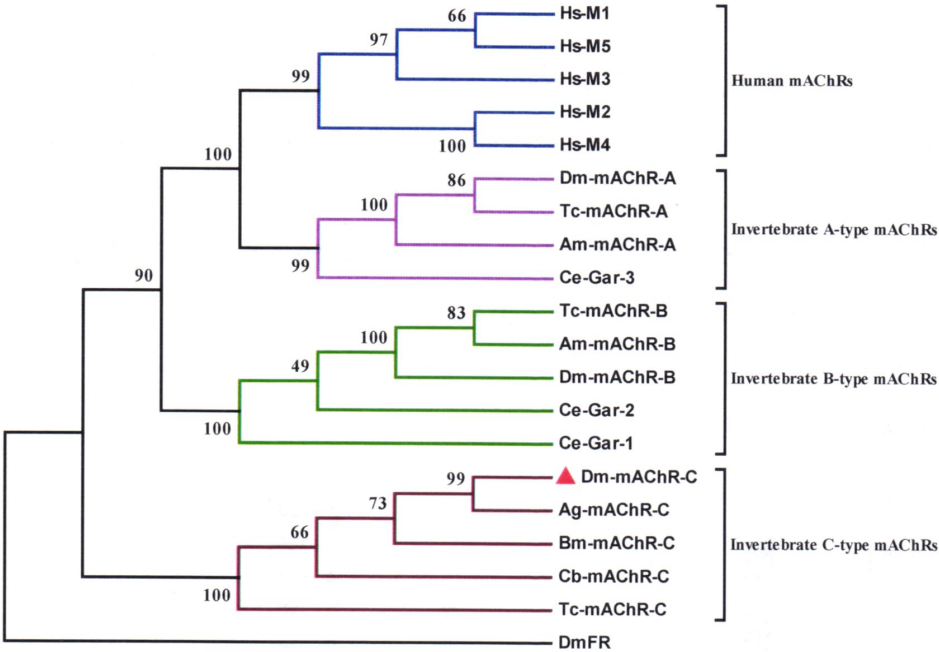


图 3.4 CG12796 和其它乙酰胆碱受体的进化树分析

Fig 3.4 Phylogenetic analysis of Dm-mAChR-C and various mAChRs. Neighbor-joining trees were constructed in ClustalW2 using 1000-fold bootstrap re-sampling, and the resulting tree was displayed graphically by MEGA 5. The numbers at the nodes of the branches represent the level of bootstrap support for each branch. DmFR was used as an outgroup. Abbreviations: Hs, *Homo sapiens*; Am, *Apis mellifera*. Ce, *Caenorhabditis elegans*. Ag, *Anopheles gambiae*; Bm, *Bombyx mori*; Cb, *Cerapachys biroi*. Accession No.: Hs-M1, AAM18938; Hs-M2, AAM18939; Hs-M3, AAM18940; Hs-M4, AAM18941; Hs-M5, AAM18942; Tc-mAChR-C, EFA01319; Am-mAChR-A, XP_395760; Am-mAChR-B, XP_006558421; Ce-Gar-1, NP_001204403; Ce-Gar-2, NP_001022596; Ce-Gar-3, NP_001024236; Ag-mAChR-C, XP_310742; Bm-mAChR-C, XP_004924179; Cb-mAChR-C, EZA62475; DmFR, AAF47700.

3.2 CG12796 的定量 PCR

CG12796 mRNA 在果蝇不同的发育阶段和组织中的相对表达量是通过定量 PCR 利用美国应用生物系统公司的 7500 定量 PCR 系统(Applied Biosystems)测定。测定结果表明果蝇体内不同发育阶段的 CG12796 在第三天的幼虫相对表达量最高，其次是雄虫（图 3.5 A）。组织分布中 CG12796 在雄性果蝇头部相对表达量最高，其次是雌性果蝇的头部（图 3.5 B）。由此可知，CG12796 的表达主要在果蝇的头部。

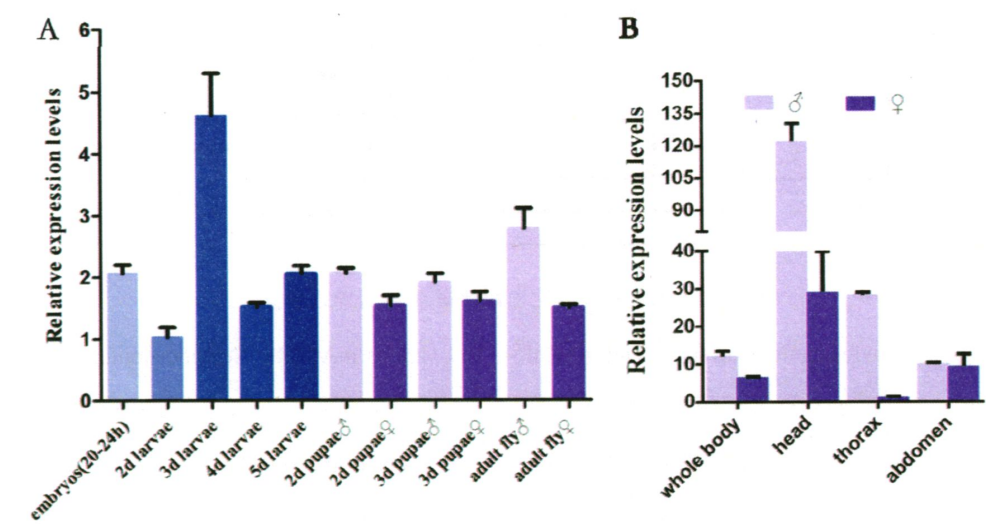


图 3.5 CG12796 的动态发育和组织分布的相对表达量

Fig 3.5 Relative expression levels of CG12796 in different developmental stages and different various tissues analysed by qPCR. (A) In different developmental stages of embryos (20-24h), larvae (2 days, 3 days, 4 days, 5 days), pupae (2 days male, 2 days female, 3 days male, 3 days female), adult flies (male and female). (B) In different body parts of adult male and female: whole body, head, thorax, abdomen. Enough body parts were pooled for each mRNA isolation. These pools are the same for each part. Data represent means $\pm$ SEM with $n=3$. Note that the receptor gene is strongly expressed in the 3 days larvae and adult fly heads, especially in adult fly male head.

3.3 免疫细胞化学

为了验证 CG12796 是否为新的毒蕈型乙酰胆碱受体家族成员，我们将其克隆至 pcDNA3 载体上，并转染进 CHO-K1 细胞系中，通过 G418 筛选获得了稳定转染的细胞系。然后通过免疫荧光检测细胞转染成功（图 3.6）。

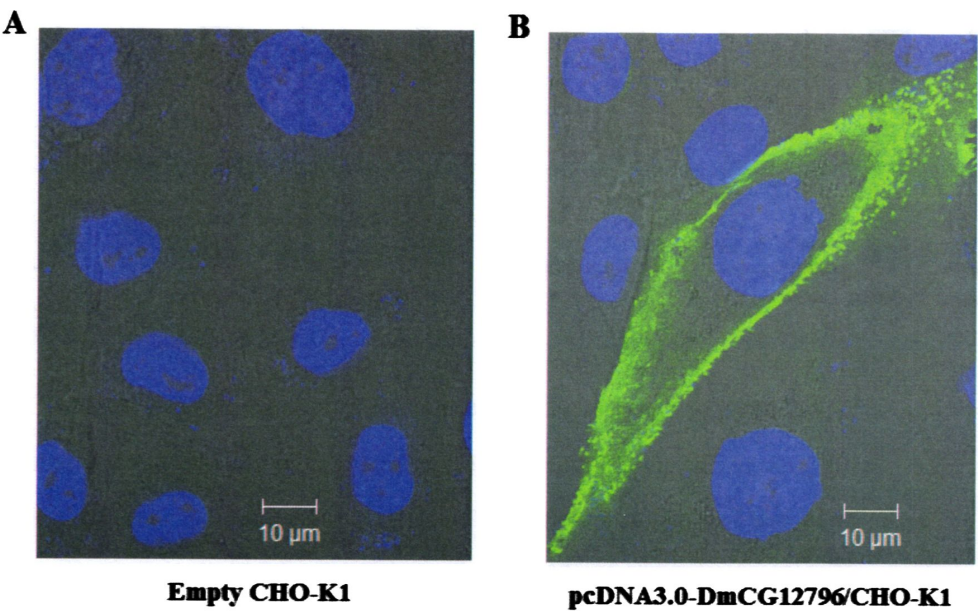


图 3.6 细胞的免疫化学反应

Fig 3.6 Cells of the immune reaction. (A) blank control: the immunohistochemistry of empty CHO-K1. (B) the immune reaction of pcDNA3-CG12796 in CHO-K1 cells.

3.4 CG12796 在 CHO-K1 细胞上的表达

在表达有 CG12796 的细胞系中，10 μM 的乙酰胆碱、酪胺、章鱼胺和多巴胺对胞内 cAMP 含量均没有影响（图 3.7）。

10 μM 的 5-羟色胺、酪胺、章鱼胺和多巴胺对胞内 Ca^{2+} 反应没有影响，10 nM 乙酰胆碱能引起胞内 Ca^{2+} 反应且低于 1 μM 乙酰胆碱所引起的反应（图 3.8 A）。乙酰胆碱引起 Ca^{2+} 反应的浓度范围为 1 nM 到 10 μM（最大反应），其 EC_{50} 值为 73.02 nM，另一激动剂氧化震颤素(oxotremorine M)引起 Ca^{2+} 反应的 EC_{50} 值为 48.23 nM（图 3.8）。

传统的乙酰胆碱受体拮抗剂 100 μM 阿托品和 100 μM 莨菪碱(scopolamine N-butylbromide)能完全拮抗 100 nM ACh 引起的 Ca^{2+} 反应 (图 3.9)。

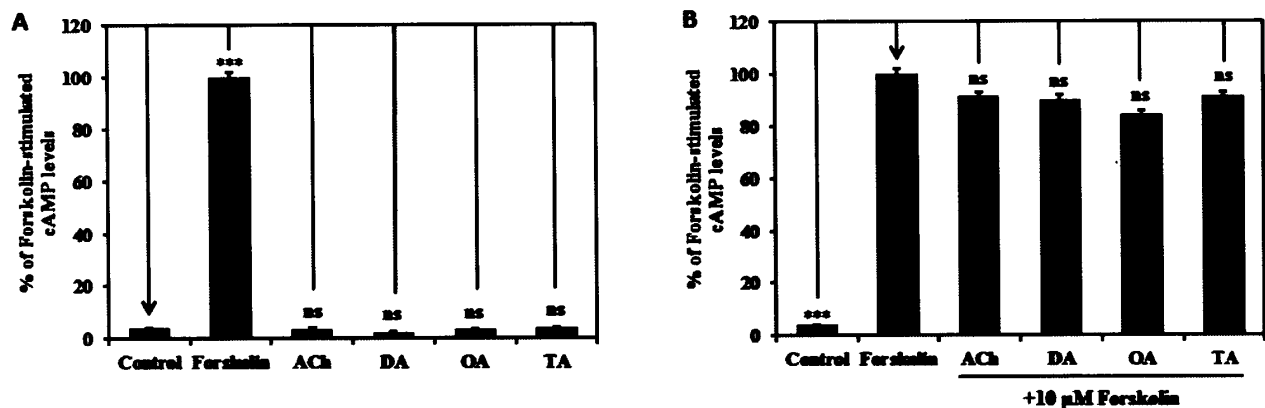


图 3.7 乙酰胆碱对 pcDNA3-CG12796/CHO-K1 胞内 cAMP 含量的影响

Fig 3.7 [cAMP]_i modulation in CHO-K1 cells stably expressing CG12796. (A) Effects of various biogenic amines and forskolin on [cAMP]_i in CHO-K1 cells. (B) Effects of various biogenic amines on [cAMP]_i stimulated by 10 μM forskolin in CHO-K1 cells. The data are represented as means $\pm$ SEM with $n=6$. Asterisks indicate values significantly different from the control value using one-way ANOVA with the Tukey-Kramer multiple comparisons test (*** $P<0.001$), and ns means no significant difference

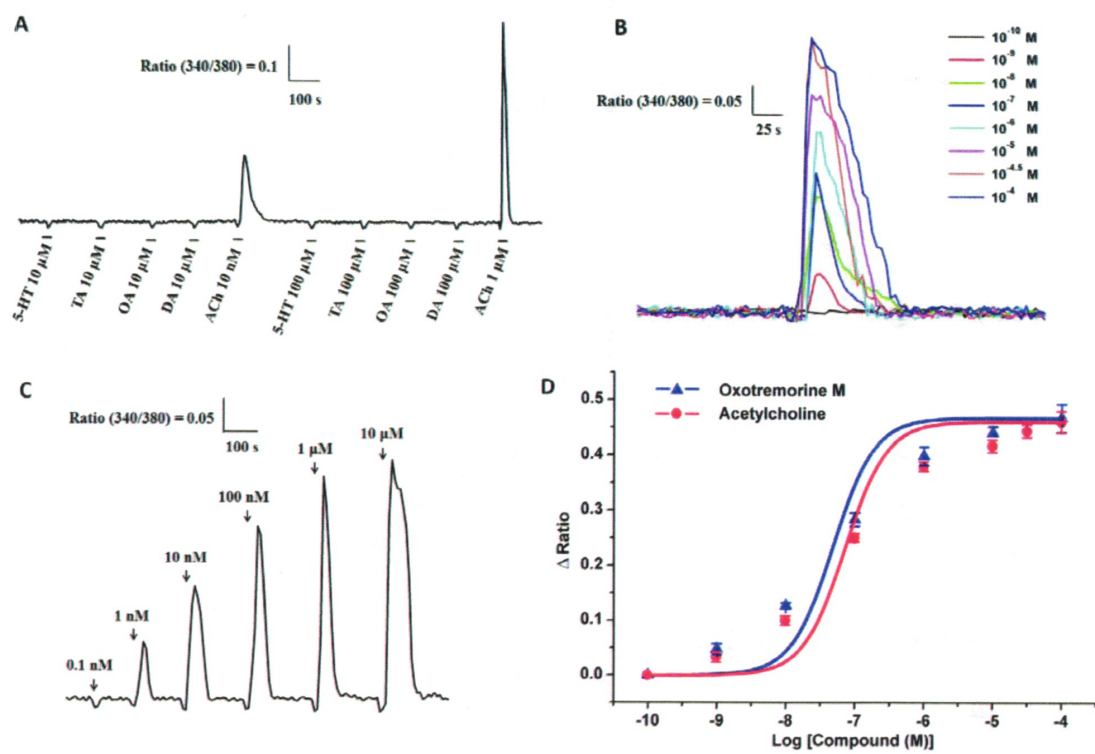


图 3.8 不同生物胺和激动剂对 pcDNA3-CG12796/CHO-K1 的 $[Ca^{2+}]_i$ 反应

Fig. 3.8 Representative $[Ca^{2+}]_i$ responses and dose-response profiles in CHO-K1 cells expressing CG12796. (A) Effects of ACh and the biogenic amines 5-HT, TA, OA and DA on $[Ca^{2+}]_i$ in a representative single CHO-K1 cell. (B) Increasing concentrations of ACh dose-dependently induced changes in the fluorescence ratio. $[Ca^{2+}]_i$ was determined by the ratio of the emission at 510 nm from individual Fura 2-loaded cells upon excitation at 340 and 380 nm (F_{340}/F_{380}). (C) Dose-response of oxotremorine M on $[Ca^{2+}]_i$ in a representative single CHO-K1 cell. (D) Dose-response curve for ACh and oxotremorine M, as obtained from Ca^{2+} assays. The presented data are the means $\pm$ SEM of at least four separate experiments with each point representatively selected 30 to 50 cells.

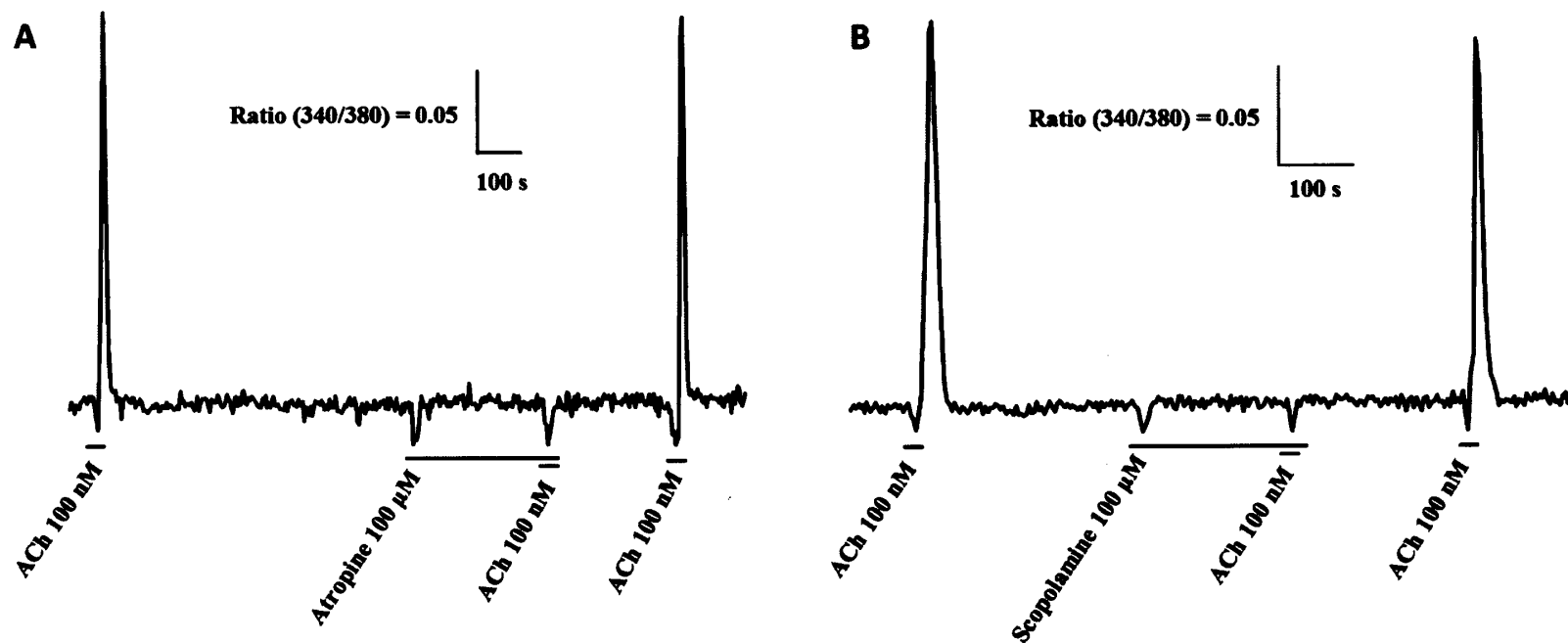


图 3.9 拮抗剂对 pcDNA3-CG12796/CHO-K1 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 反应

Fig.3.9 Effects of 100 μM atropine(A) and scopolamine(B) on 100 nM ACh-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase. The CHO-K1 cells which stably expressed CG12796 were stimulated with 100 nM ACh at first, then incubated with various antagonists for 2 min ahead of the second application of 100 nM ACh.

4 讨论

本研究中,我们从果蝇体内克隆到一种新的 mAChR,将其命名为 C 类亚型受体(the C-type mAChR)。对其药理学性质做了研究,也表明其属于 mAChRs 家族成员。C 类亚型受体的氨基酸序列与其他在哺乳动物和昆虫中已被报道的 mAChRs 的相似度较低。

我们将 the C-type mAChR 稳定表达于 CHO-K1 细胞中,药理学实验表明 the C-type mAChR 与其他 mAChRs 药理学性质不尽相同。The C-type mAChR 能被激动剂乙酰胆碱和氧化震颤素所激活,所引起的 EC_{50} 值大约都在 10^{-7} 到 10^{-8} mol l^{-1} ,也能被传统的拮抗剂阿托品和莨菪碱所拮抗。而果蝇体内 B-type mAChR (Collin *et al.*, 2013)和秀丽隐杆线虫 *Caenorabditis elegans* GAR-1 and GAR-2 (Lee *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000)能够被低浓度的乙酰胆碱激活,但毒蕈碱的敏感性要比乙酰胆碱低 1000 倍,而乙酰胆碱引起的激动效果也不能被同浓度传统的拮抗剂阿托品、莨菪碱、二苯乙醇酸-3-奎宁环酯所拮抗。然而, the C-type mAChR 的药理学性质不同于 A-type 和哺乳动物体内的 M1-M5 mAChR。A-type 和 M1-M5 能够被毒蕈碱激活且能被上述传统的拮抗剂所拮抗。另外,低浓度(1 nM)的乙酰胆碱能引起细胞的 Ca^{2+} 反应,而高浓度(100 nM)的多巴胺、酪胺、章鱼胺和五羟色胺都不能引起反应。另一方面,进化树分析也证实了这一结果,哺乳动物体内的 M1-M5 和 A-type 紧密地聚集在一起,而 B-type 和 C-type 都来自不同的分枝 (Fig. 2)。因此, C-type mAChR 可选择性的偶联 G_q 蛋白,结合激动剂结合位点刺激 PLC,合成肌醇磷酸盐,引起 Ca^{2+} 反应。

[cAMP]_i 水平的测定是用来检测 C-type mAChR 下游信号通路。我们实验发现章鱼胺、多巴胺、酪胺等不同种类的生物胺和乙酰胆碱都不能引起促进 cAMP 的合成或抑制由 forskolin 诱导的 cAMP 水平 (Fig. 6)。由此可知, C-type mAChR 既不偶联 G_s 蛋白也不偶联 G_i 蛋白。The C-type mAChR 在果蝇第三天的幼虫和雄虫头部的相对表达量最高 (Fig. 4A 和 4B),雄性果蝇头部的表达量是雌性头部表达量的 4 倍左右,是其他部位的 10 倍左右,说明 C-type mAChR 主要在果蝇的脑部表达量最高。

在哺乳动物的 mAChRs 不仅存在在中枢神经系统中,也可能存在于感觉神经、

神经胶质和表皮细胞中，表皮细胞中的 mAChRs 与细胞增殖、移动、粘附和分化有关(Torkkeli *et al.*, 2004)。M1 mAChR 主要与认知过程有关，是治疗阿耳茨海默氏病药物作用靶点(Eglen, 2005; Wess *et al.*, 2007)。M2 mAChR 主要调节心率。M3 mAChR 主要与平滑肌收缩和腺体的分泌有关(Caulfield, 1993; Caulfield and Birdsall, 1998)。M4 mAChR 能降低人患精神分裂症的机率(Scarr *et al.*, 2007)。M5 mAChR 与大脑血管的扩张有关(Yamada *et al.*, 2001)。目前 mAChRs 调控了多种生理反应和行为过程。由此可以推测，昆虫体内的 C-type mAChR 在调节昆虫的行为过程中可能扮演重要角色。加强对昆虫 M 型受体的研究，有助于深入了解昆虫胆碱神经的传递机制，并作为一个潜在的目标开发更新奇和高效选择性杀虫剂。

第四章 CG13579 的信号通路和药理学研究

1 引言

DA 是昆虫体内一种重要的生物胺, 参与调控昆虫的多种生理反应和行为过程。DA 通过结合特异性的 G 蛋白偶联受体, 即 DARs 在昆虫体内发挥不同的神经调控作用, 调节昆虫主要的行为活动, 比如学习与记忆、认知、交配、发育、嗅觉、抉择、运动等。在人体内, D1-like DARs 包括 D1 (Sunahara *et al.*, 1990) 和 D5 (Sunahara *et al.*, 1991) 受体, 其偶联 G_s 蛋白, 激活 AC, 引起胞内 cAMP 含量的升高; D2-like DARs 包括 D2 (Grandy *et al.*, 1989)、D3 (Sokoloff *et al.*, 1990) 和 D4 (Van Tol *et al.*, 1991) 受体, 其被激活后偶联 $G_{i/o}$ 蛋白, 抑制 AC 活性, 引起胞内 cAMP 含量的下降。在昆虫体内, 目前主要三种亚型 DARs 被克隆到。参照脊椎动物体内的分类方法, DARs 可分为两类: D1-like DARs 和 D2-like DARs。D1-like DARs 又包含 2 种亚型, 分别为 DOP1 和 DOP2。DOP1 仅能引起胞内 cAMP 的上升, 而 DOP2 既能引起胞内 cAMP 的上升, 又能偶联胞内 Ca^{2+} 的释放。D2-like DARs 仅包含一种亚型 DOP3, 能引起胞内 cAMP 的降低。

本研究中, 从果蝇体内克隆到一个新基因 CG13579 的 cDNA 序列全长, 预测为新的 DARs 家族。将其分别表达于人胚胎肾细胞 (human embryonic kidney, HEK-293), 对其药理学特性和所偶联的信号通路做系统研究, 并预测两者偶联的第二信使和药理学性质基本一致。

2 材料与方法

2.1 供试昆虫

野生型的黑腹果蝇 *D. melanogaster*, 饲养同第三章 2.1。本实验所用试剂均购自 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)。

2.2 RNA 提取

RNA 提取使用 TRIzol 法, 具体操作方法参见第三章 2.2。

2.3 克隆 *CG13579* cDNA 序列全长

CG13579 cDNA 序列的获得方法同第三章 2.3，克隆基因引物见表 4.1。

表 4.1 PCR 扩增 *CG13579* cDNA 序列所用引物

Table 4.1 Primers for cloning the gene *CG13579* cDNA

引物名称	引物序列(5'-3')
Primer name	Primer sequence(5'-3')
<i>CG13579</i> -compF	AAGTGAACAGATTGGGCGTGTGATG
<i>CG13579</i> -compR	CTTGATCCCAGTGCCCTCTGTGATC

2.4 PCR 产物纯化、目的片段与克隆载体的连接及连接产物的转化、鉴定和测序

PCR 产物纯化的具体操作方法同第三章 2.3；目的片段与克隆载体连接同第三章 2.4；连接产物的转化、鉴定和测序的具体操作方法同第三章 2.5。

2.5 pcDNA3-*CG13579* 融合质粒的构建

用 Primer 5.0 软件设计 *CG13579* 的酶切引物，通过 PCR 扩增得到含酶切位点的 *CG13579* 全长序列，并将 Kozak 序列(Kozak, 1987)和 *CG13579* 的 ORF 相融合，采用 *KpnI* 和 *EcoRI* 分别对所得序列和 pcDNA3 (Invitrogen)质粒进行酶切处理。然后将消化后的 PCR 产物经 T4 DNA 连接酶连接至 5 端具有 HA 标签的 pcDNA3 载体上产生 pcDNA3-*CG13579* 融合质粒，通过测序验证插入序列的正确性。此过程中所用的酶切引物见表 4.2，具体操作方法同第三章 2.8。

表 4.2 双酶切引物

Table 4.2 Primers for restriction enzyme digestion

引物名称	引物序列(5'-3')
Primer name	Primer sequence(5'-3')
<i>CG13579</i> -Short- <i>KpnI</i> -F	TTGGTACCACCATGGATCTAAAGACTGGC
<i>CG13579</i> -Short- <i>EcoRI</i> -R	CGGAATTCCTAGATGTCCGGAATGCT
<i>CG13579</i> -Long- <i>KpnI</i> -F	TTGGTACCACCATGGATCTAAAGACTGGC
<i>CG13579</i> -Long- <i>EcoRI</i> -R	CGGAATTCCTACTTGCGATACTCGGC

2.6 定量 PCR

CG13579 mRNA 在果蝇不同的发育阶段和组织中的相对表达量通过定量 PCR 利用美国应用生物系统公司的 7500 定量 PCR 系统(Applied Biosystems)测定。用于 qPCR 分析的特异性引物见表 4.3。以内参引物 RpL11 cDNA 片段(Collin *et al.*, 2013)为标准运用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法(Livak and Schmittgen, 2001)计算果蝇动态发育和组织分布的相对表达量。定量 PCR 具体操作方法参见第三章 2.10。

表 4.3 定量 PCR 引物

Table 4.3 Primers for real-time quantitative	
引物名称	引物序列(5'- 3')
Primer name	Primer sequence(5'- 3')
qCG13579-S	TACACCAACAGCCCCGTTAT
qCG13579-A	TGCTGGAGTGCTGGTAGTAG
RpL11-S	CGATCCCTCCATCGGTATCT
RpL11-A	AACCACTTCATGGCATCCTC

2.7 细胞培养及转染

HEK-293 细胞在 D-MEM 培养基(Gibco BRL, Gaithersburg, MD)中培养,培养基内增补 10% 热灭火的 FBS (Gibco BRL),细胞置于恒温 37℃, 5% CO₂ 含量的二氧化碳培养箱中培养。用脂质体 2000 (Invitrogen)将 4 μg pcDNA3-CG13579 载体转入呈指数期生长的 HEK-293 细胞中(3.5 cm 细胞培养皿, ~ 4 × 10⁵ 个细胞),转染后的细胞用 G418 (0.8 mg/ml)筛选以获取稳定转染的细胞系,用 Western blotting 和免疫细胞化学检测细胞转染效率。具体操作方法同第三章 2.11。

2.8 Ca²⁺测定

参见第三章 2.14。

2.9 cAMP 测定

参见第三章 2.15。

3 结果与分析

3.1 CG13579 cDNA 的克隆及序列分析

通过 PCR 从果蝇头部克隆得到编码 CG13579 cDNA 的序列全长(见图 4.1), 在 GenBank 上的登录号为: NM_001274240。序列分析结果表明, 编码 CG13579 的 ORF 大小为 1953 bp, 共编码 650 个氨基酸, 预测分子量大小为 71 kDa, 等电点为 8.60。在 CG13579 第 651 个氨基酸处是一个终止密码子, 且其前面的 650 个氨基酸即为 CG13579 的氨基酸序列。通过 TMHMM 和 TMPred 预测发现这两个剪切体具有相同的七跨膜结构, 编码一个同 α 螺旋的七跨膜受体, 属于典型的 G 蛋白偶联受体家族, 且具有超长的第三胞内环是生物胺受体的共同特征(见图 4.2)。在三跨膜结构(TM3)的碳端后存在典型的 DRY (Asp 147-Arg 148-Tyr 149) 结构域, 在七跨膜结构(TM7)上存在 NPXXY 结构域, 这两个结构域在视紫红质类 G 蛋白偶联受体内高度保守。克隆的 CG13579 cDNA 与公布在 (<http://www.flybase.org>)上的 CG13579 有 3 个不同的碱基, 但其氨基酸序列完全相同。

对 CG13579-Long 和昆虫体内 CG13579-like 型基因的氨基酸序列进行多重序列比对(见图 4.3)。黑体三角形标注的 N16, N184, N338 可能是 N 端糖基化位点(N- x- [S/T]), 而六个星星标注的位置可能是蛋白激酶 C (PKC) ([S/T]- x- [R/K]) 磷酸化位点, 两个位于第二个胞内环, 一个位于 TM5 的氮端, 三个位于第三个胞内环(S₁₅₂, S₁₅₃, S₁₉₉, T₃₂₄, T₃₂₈, T₃₄₃)。在 TM3 和 TM5 前分别有一个半胱氨酸残基, 其可能参与了配体的结合。

对人类和昆虫的多巴胺受体基因构建系统发育进化树, 以临近法(neighbor-joining)重复 1000 次, 以 DmFR 为外源基因, 分析结果表明 CG13579 与目前已知的多巴胺受体家族在不同的进化枝上, 而与蜕皮激素兼多巴胺受体 DmDopEcR 聚在同一进化枝上, 所以 CG13579 可能为新的多巴胺受体家族(见图 4.4)。

1 ATGGATCTAAGACTGGCTCTCTCTGGTAGCAGCCGGCTGAAGAACTCAGCTGCTGTCATCGGCTACTCGGCGACAATTTCATC
1 M D L K T G S L L V A P A V K N S S C S H P R Y S G H N F I
91 GCGCAGATAGGATTGGGGAGACCATAGAGCGGGTGTCTCATCTGGTCTCAGACTGGGGGTTCATCGGGGCAACTGCTGCTCATCTTC
31 A H I G I A E T I E A V L L L V L T L G V I G A N C L V I F
181 GTCATCAACAGCGCGCTATGGGCTACATACACCAAGCGCGGTTATCTGCTCACTCGCTGGCGCTGAATGACCTGACAATTGGT
61 V I N N R R Y A A Y I H Q Q P R Y L L L T S L A L N D L T I G
271 CTGCTAATTACACCATGGGCTAATGGCGGCAATGTTCCACTGCTGGCCATACGGAGAGATCTTCTGTCAGATACAGGCGCTGCTCGGA
91 L L I T P E G L M P A L F H C W P Y G E I F C Q I Q A L L R
361 GGGCGCTTTCCACAGAGCGCGCTCATCTGGTTTGCATGGCAGTGCATAGATACATGTGTGCCCTGCATCGGCGCGCTACTACCG
121 G A L S Q Q S A V I L L V C M A Y D R Y M C A L H P R R Y Y Q
451 CACTCCAGCAAGAGCGCTGCTGCGCATCTGAGCTTAACCTGGATTATCAGCTGAGCGTGTTCGCTTCTGGTGTGCTGCCAAAGGT
151 H S S K K G G V A I L S L T W I I S L T V F G F L V L P K G
541 TACTACTTCAACAACTAGCGGTCTAATGGCTGGAGCGCTTCTACAGCAAGCATCTACAGGATACTGTCCAGCTGCCCGCTTACTTT
181 Y Y F N N T G L M A C E P F Y S K P S Y R I L S T C A L Y F
631 CCGCAGACGATGGTCTGATGTACTGCTACGGCTCCAGCTTCCACATGAGCGCTTCCGGCTAAAGCATCCGACCATGCCCTCACGGCG
211 P T T M V L M Y C Y G S S F H M S R F R L N D F T M P L T A
721 GCGCGCCACCGCCCATCGCGCCACCATCCACCGCGCGCCAGCAGTCCAGATGCACGACGACGACCAATCACCAGCAGGCGGGA
241 A A H H P H P H P H T A A Q Q L Q M H Q H Q Q H H Q Q A G
811 ATGCACTGCCACTCTACCGCGGCACTGGCATGCGCGGCGCCACCGCAGTCCACCAAGCAGCCCAAGCAGCGCGCGCGCGCGCGCAT
271 M H S H L Y H G H S H H P S H P S H P N H P N H H G H P H H
901 CATGCGCGCGGCTTATGGCGCATCTCAGCATGGCATGAGCATGGGACTGGCGGCGATGCGCAATCAGCAACAGATTACAAAAAG
301 H G P P V M G H L S M A M S M G L A G M P N M I T K K
991 ATTGTTCCATCCAGCAAGCAACTCCAGCGATCCACTCGCGCTGCATGCGCGCGCATTTCACTGGCTTCATAGTGATGTCAGTCCG
331 I V P I Q E K N S S G S S R S M A A I S L G F I V M V I P
1081 TCGGCGATTGAGGAATAGTCACTGCTCCAGCGGATCCAGCTGCGCGCTGCTGCTGATTTCTGGTTCAGCTGCAAGCGCGCTGAGCAAT
361 W T I Q E I V T A C T G S K L P P F L D F L V I W T A L S A
1171 AGTCTGTGCAACGCTTCACTACTGCTGCTGAATCCGATTTCCGCGCATGAGTCCGCACTGATCCGCAACAAATGCTTCCCGCAC
391 S L W N P F M Y W L L N S D F R R M S R Q L M F N K C F P H
1261 GAGGATACCGCGAGCACAAATCAGGCTGTGTCAATCAATGCTAAGGATTTCGAATCAGCAAGCTTCCGATTTCCCGCGAGCGGCA
421 E D T P E H K S G C C H N A N D F E I T T L F I P P E P P
1351 TCATCGCTCCACCGCGCGGAGCAGGAGGAGCTGAGGTCATCCAGTGGAGTCCAGGCTTCCGCGCGGAGTGGCGAGTTCATT
451 S S R P P G G A G G G G G G P S S G G P S S G G G V A S S I
1441 GCGGCTCGGCTCTGAACTGCGCGCGCTCGCGCACAAACAGCTCAGCGCGAGCGCTCCAGTACATCCGAGGCAATGGCGGA
481 G G S V L G I C G R S R N S L S R S A S Q Y I R G T M G G
1531 GGAGTCCCAATCAACAGGCGACGGAAGCTTCTCCACCGAGGCGCTACATTGAGGCGCTCTCCGAGAACTACTGGCGGAGATCTG
511 G V H N H Q A T E A F S T R P D I E G L S E K Y W G E I L
1621 GAGAGAACGTCAGCTCGGCAACTGAATGCCATGCAGAAACCTGCGCGCGCACTGCGCTAGCGCGCAGCACTGGTCCACAGATC
541 E R T V S S G N L N A M Q K H L P P H L P Y A H H L V H Q I
1711 CACCAAGCGGAGCAGCACCAACCAACAGCAGACCACTCTTCAAGCAAGCCAGGATCTGCAGCTGAACCTGAACCTCAGCGCAAGCAGC
571 H Q P Q Q H H Q Q Q T T S F S K A S D L Q L N L S Q A A
1801 ACGGCTCGCGAGCTGGCAAGTTCTCCAACCTCGGAGCGGAGCTGTGCGAGCACCTCTTTCAAGAGTGAAGCTGGCGCAAGCAGCGCG
601 T A A E L G K F S N S E P K L C E H L F H D V N C A K S K A
1891 GCGAAGCGGAGTGGGAGTCTCGCGCAAGCTGGCTGCGGTGCGAGCATTCGAGACATCTAGTACGCGCGAGGAGTGATCTGGCGAAG
631 A N G D G E S S G K L A C G R S I P D I * Y A E D V I L A K
1981 AACCAACTGCTGGCGAGCGGCGCAAGTCTCGCACCACTCGGCTGCGAGCAGCGCGCAAGAGCGCTCTCCATTCCACAGCGCGAGCTG
661 N Q L L A R Q A K C S H B P L H Q Q A K T R L H S H T G S L
2071 CGCTTCAGCGGATTCGCGCTGCTGCCACAGTCCGCGCGGAGAGTCCGCTTTCCAAATGGCGAGTATCGCAAGTAG
691 R F S R I R A A C H S P P P E K S A F P M A E Y R K *

图 4.1 CG13579 的核苷酸和氨基酸序列

Fig 4.1 Nucleotide and amino-acid sequences of CG13579

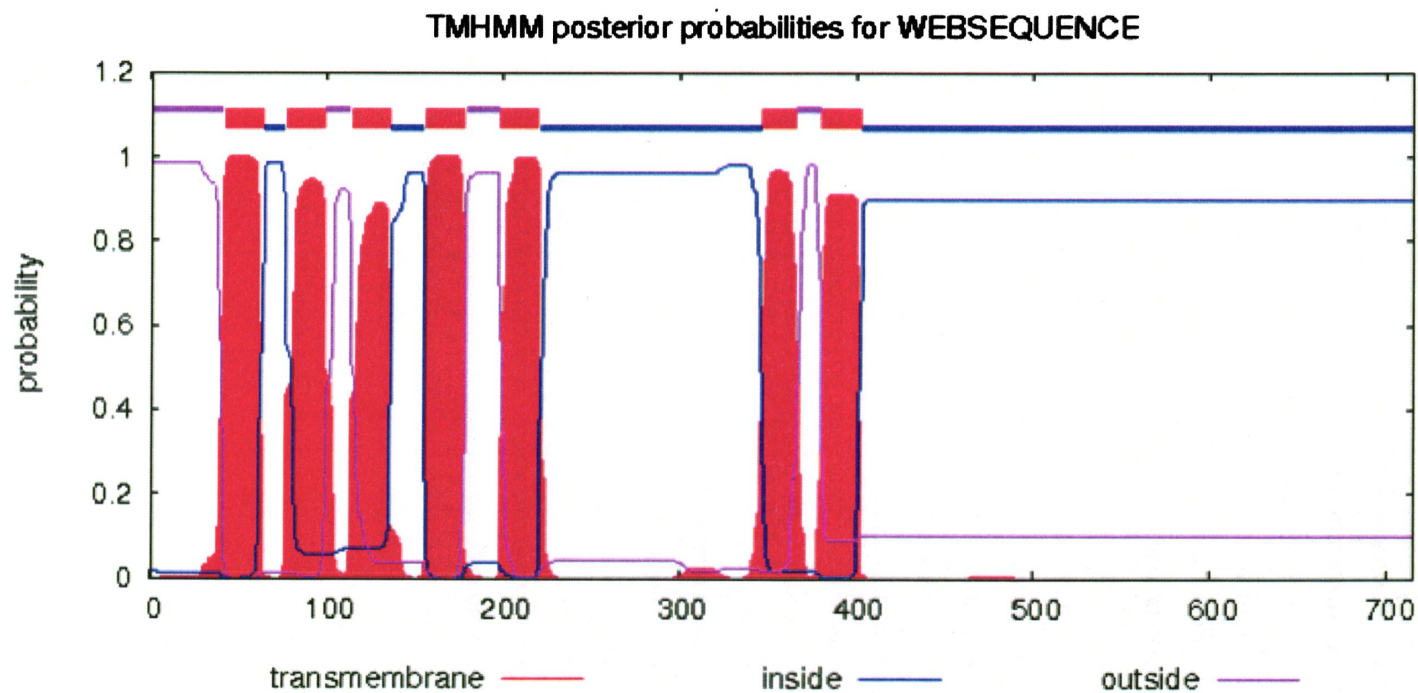


图 4.2 CG13579 的七跨膜结构域

Fig 4.2 Seven hydrophobic transmembrane domains of CG13579

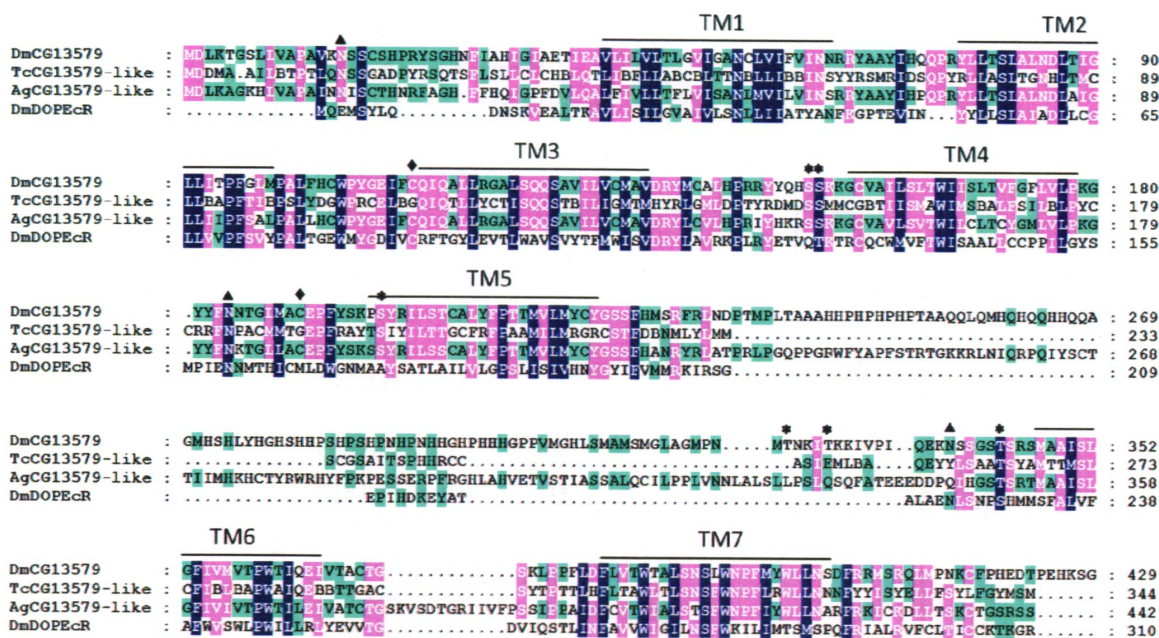


图 4.3 CG13579 氨基酸序列与其他昆虫同源基因的多重序列比对分析

Fig 4.3 Alignments of amino acid sequences between CG13579 and the other insects orthologues. Abbreviations: Dm, *Drosophila melanogaster*; Tc, *Tribolium castaneum*; Ag, *Anopheles gambiae*. Accession Nos. : CG13579, NP_001261169; DmDopEcR, NP_647897; TcCG13579-like, NP_001280536; AgCG13579-like, XP_564170. The alignment was performed by ClustalX, and the shaded sequences highlight the identity level of amino acid between the receptors. The transmembrane helices are indicated by TM1- TM7. The three marked by triangle is protential N-glycosylation sites. Five protential phosphorylation sites for protein kinase C are marked by snowflakes symbol. The two cysteine residue sites labeled by diamond are predicted to be involved in agonist binding.

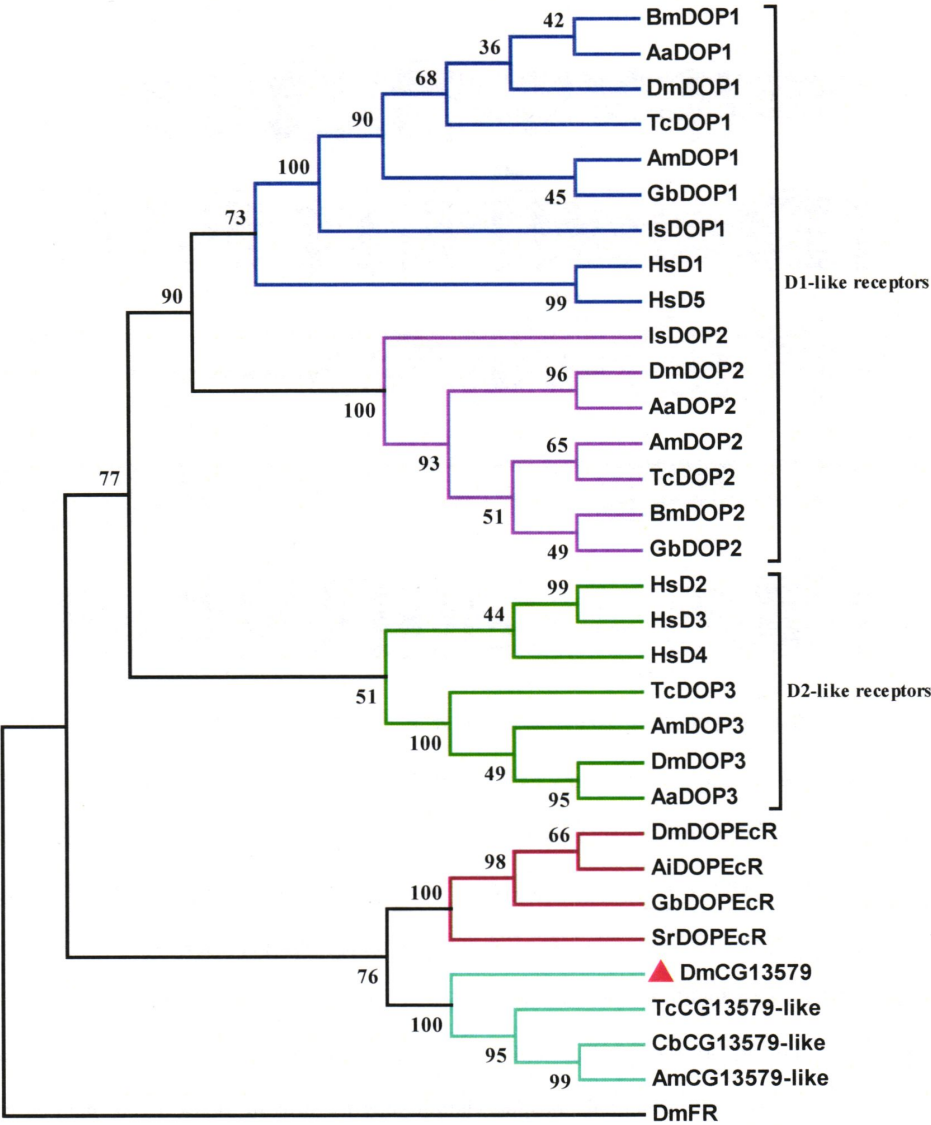


图 4.4 CG13579 和其它多巴胺受体的进化树分析

Fig 4.4 Phylogenetic analysis of CG13579 and various DARs. Neighbor-joining trees were constructed in ClustalW2 using 1000-fold bootstrap re-sampling, and the resulting tree was displayed graphically by MEGA 5.05. The numbers at the nodes of the branches represent the level of bootstrap support for each branch. DmFR was used as an outgroup. Abbreviations: Hs, *Homo sapiens*; Am, *Apis mellifera*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Tc, *Tribolium castaneum*; Bm, *Bombyx mori*; Aa, *Aedes aegypti*; Ai, *Agrotis ipsilon*; Cb, *Cerapachys biroi*; Sr, *Strongyloides ratti*; Gb, *Gryllus bimaculatus*; Is, *Ixodes scapularis*. Accession Nos.: HsD1, NP_000785; HsD2,

NP_057658; HsD3, NP_001277738; HsD4, NP_000788; HsD5, NP_AAA52329; DmDOP1, NP_001247092; DmDOP2, NP_733299; DmDOP3, AAN15955; DmDOPEcR, NP_647897; CG13579, NP_001261169; AmDOP1, NP_001011595; AmDOP2, NP_001011567; AmDOP3, NP_001014983; AmCG13579-like, XP_003251787; TcDOP1, NP_001280543; TcDOP2, NP_001280503; TcDOP3, NP_001280515; TcCG13579-like, NP_001280536; BmDOP1, NP_001108459; BmDOP2, NP_001108338; AaDOP1, AFB73766; AaDOP2, AFB73767; AaDOP3, XP_001648623; GbDOP1, BAM15634; GbDOP2, BAM15635; GbDOPEcR, BAM15638; IsDOP1, XP_002409287; IsDOP2, XP_002399655; AiDOPEcR, AGN74919; SrDOPEcR, CEF70555; CbCG13579-like, XP_011347246; DmFR, AAF47700.

3.2 CG13579 的定量 PCR

CG13579 mRNA 在果蝇不同的发育阶段和组织中的相对表达量是通过定量 PCR 利用美国应用生物系统公司的 7500 定量 PCR 系统(Applied Biosystems)测定。测定结果表明果蝇体内不同发育阶段的 *CG13579* 在雄性果蝇第三天的蛹中相对表达量最高(图 4.4 A)。组织分布中 *CG13579* 在雄性果蝇头部相对表达量最高, 其次是雌性果蝇的头部(图 4.4 B)。由此可知, *CG13579* 的表达主要在果蝇的头部, 即在脑部表达量最高。

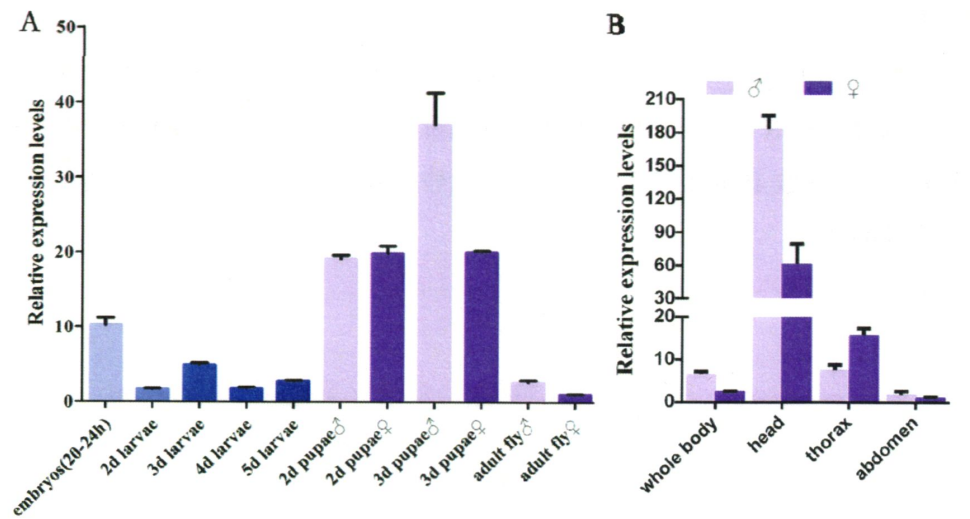


图 4.5 *CG13579* 的动态发育和组织分布的相对表达量

Fig 4.5 Relative expression levels of *CG12796* in different developmental stages and different various tissues analysed by qPCR. (A) In different developmental stages of embryos (20-24h), larvae (2 days, 3 days, 4 days, 5 days), pupae (2 days male, 2 days female, 3 days male, 3 days female), adult flies (male and female). (B) In different body parts of adult male and female: whole body, head, thorax, abdomen. Enough body parts were pooled for each mRNA isolation. These pools are the same for each part. Data represent means $\pm$ SEM with $n=3$. Note that the receptor gene is strongly expressed in the 3 days larvae and adult fly heads, especially in adult fly male head.

3.3 CG13579 在 HEK-293 细胞上的表达

为了研究 CG13579 偶联的信号通路及药理学性质，将融合质粒 pcDNA3-*CG13579* 转染于 HEK-293 细胞中，通过筛选获得了稳定表达有该受体的细胞系。研究发现 10 μM 的多巴胺、酪胺、章鱼胺和 5-羟色胺对胞内 Ca^{2+} 反应都没有影响，说明 CG13579 不能偶联 G_q 蛋白。

在转染了 pcDNA3-*CG13579* 的 HEK-293 细胞中加 10 μM 的酪胺、章鱼胺和 5-羟色胺对胞内 cAMP 水平没有影响，而 10 μM 浓度的多巴胺能够引起胞内 cAMP 的上升，其可能是多巴胺激活了 HEK-293 细胞上自身的 DARs 的原因（见图 4.6 A）。

研究被 10 μM forskolin 诱导后的 pcDNA3-*CG13579*/HEK-293 细胞发现，在被 10 μM 的酪胺、章鱼胺和 5-羟色胺刺激后均不能引起胞内 cAMP 水平的升高或降低，而在被 10 μM 多巴胺刺激后却能够引起胞内 cAMP 含量的大幅度升高（见图 4.6 B）。

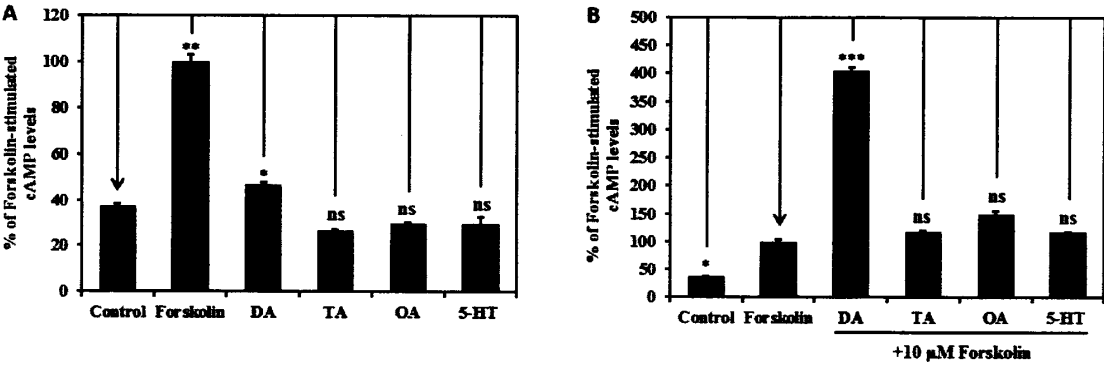


图 4.6 DA 对 pcDNA3-CG13579/HEK-293 胞内 cAMP 含量的影响

Fig 4.6 [cAMP]_i modulation in HEK-293 cells stably expressing CG13579. (A) Effects of various biogenic amines and forskolin on [cAMP]_i in HEK-293 cells. (B) Effects of various biogenic amines on [cAMP]_i stimulated by 10 μM forskolin in HEK-293 cells. The data are represented as means ± SEM with *n*=6. Asterisks indicate values significantly different from the control value using one-way ANOVA with the Tukey-Kramer multiple comparisons test (**P*<0.01, ***P*<0.005, ****P*<0.001), and ns means no significant difference.

4 讨论

本研究中,我们从果蝇体内克隆到 *CG13579* cDNA 序列全长,具有七跨膜结构域,且胞内 3 环区域(intracellular loop 3, ICL3)较长,是典型的 G 蛋白偶联受体家族。通过对其药理学性质的初步研究,表明其可能属于 DARs,此受体与其他在哺乳动物和昆虫中已被报道的 DARs 相似度较低,所以预测其为新型 DAR。

我们将 *CG13579* 稳定表达于 HEK-293 细胞中,药理学实验表明 *CG13579* 与其他 DARs 的药理学性质不尽相同。*CG13579* 不能引起胞内 Ca^{2+} 浓度的变化,表明其不偶联 G_q 蛋白。 $[\text{cAMP}]_i$ 水平的测定用来检测 *CG13579* 下游信号通路,实验发现 DA 能够大大促进被 forskolin 诱导的 cAMP 水平(图 4.6),由此可知,*CG13579* 偶联 G_s 蛋白,也表明 *CG13579* 可能属于 DAR。DA 是昆虫体内一种重要的生物胺,参与调控昆虫的多种生理反应和行为过程。多巴胺通过结合特异性的 G 蛋白偶联受体,在昆虫体内发挥不同的神经调控作用,调节昆虫主要的行为活动,比如学习与记忆、认知、交配、发育、嗅觉、抉择、运动等。昆虫体内 DA 受体主要分为两类: D1-like DARs 和 D2-like DARs。D1-like DARs 又包含 2 种亚型,分别为 DOP1 和 DOP2。DOP1 偶联 G_s 蛋白,直接刺激胞内 cAMP 水平的上升,而 DOP2 既能引起胞内 cAMP 的上升,又能偶联胞内 Ca^{2+} 的释放。D2-like DARs 仅包含一种亚型 DOP3,偶联 G_i 蛋白,降低由 forskolin 升高的胞内 cAMP 水平。

由于时间的原因本论文对 *CG13579* 只对其做了初步的研究,其药理学实验数据比较少,需要进一步的研究才能为开发针对昆虫体内多巴胺受体的高效杀虫剂提供更多参考信息。

总结

1 本研究的创新之处

- 1) 克隆得到果蝇 CG12796 cDNA 全长, 明确其在脑部高表达, 并完成体外真核表达, 通过 Ca^{2+} 和 cAMP 功能性试验的测定对其偶联的信号通路和药理学性质做了研究, 已确定其为新型毒蕈型乙酰胆碱受体;
- 2) 克隆得到果蝇 CG13579 这个转录本 cDNA 的全长, 明确其在脑部高表达, 并完成体外真核表达, 通过 Ca^{2+} 和 cAMP 功能性试验的测定对其偶联的信号通路和药理学性质做了初步研究, 预测其可能为新型多巴胺受体。

2 本研究存在的问题

- 1) 虽发现新的 C 型毒蕈型乙酰胆碱受体, 但对其生理功能并未做深入了解;
- 2) 虽对 CG13579 做了初步药理学分析, 但并未完全确定其为多巴胺受体; 对其药理学性质和生理学功能未能展开进一步的研究。

3 今后的研究方向

- 1) 明确基因 CG13579 的这个转录本是否为新型多巴胺受体;
- 2) 利用 RNAi 或敲除突变等实验技术研究新型毒蕈型乙酰胆碱受体和多巴胺受体在果蝇体内的生理作用;
- 3) 利用克隆到的新型毒蕈型乙酰胆碱受体和多巴胺受体, 研究其作为杀虫剂靶标的可能性。

参考文献

- 姜鸣, 张雅林, 吕淑敏. (2014). 昆虫毒蕈碱型乙酰胆碱受体的分子进化、功能及药理学研究. *环境昆虫学报*, 36: 814-819.
- 李慧, 李鹏, 陈磊, 黄新洁, 瞿海峰. (2014). 伏隔核的 M1 和 M4 型毒蕈碱乙酰胆碱受体参与吗啡奖赏记忆的表达. *中国药物依赖性杂志*, 23: 93-98.
- 史一鸣, 钮因尧, 陆阳. (2009). M 受体及相关选择性药物研究进展. *国际药学研究杂志*, 36: 355-361.
- 吴顺凡, 徐刚, 齐易香, 夏仁英. (2013). 昆虫多巴胺及其受体的研究进展. *昆虫学报*, 56: 1342-1358.
- Agarwal, M., Giannoni Guzmán, M., Morales-Matos, C., Del Valle Diaz, R. A., Abramson, C. I. and Giray, T. (2011). Dopamine and octopamine influence avoidance learning of honey bees in a place preference assay. *PLoS ONE* 6, e25371.
- Aizono, Y., Endo, Y., Sattelle, D. B. and Shirai, Y. (1997). Prothoracicotropic hormone-producing neurosecretory cells in the silkworm, *Bombyx mori*, express a muscarinic acetylcholine receptor. *Brain Research*, 763, 131-136.
- Akasaka, S., Sasaki, K., Harano, K. and Nagao, T. (2010). Dopamine enhances locomotor activity for mating in male honeybees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*, 56, 1160-1166.
- Bang, S., Hyun, S., Hong S. T., Kang J., Jeong K., Park J.J., Choe J. and Chung J. (2011). Dopamine signalling in mushroom bodies regulates temperature-preference behaviour in *Drosophila*. *PLoS Genetics*, 7, e1001346.
- Beaulieu, J. M. and Gainetdinov, R. R. (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacological Reviews*, 63, 182-217.
- Beggs, K. T. and Mercer, A. R. (2009). Dopamine receptor activation by honey bee queen pheromone. *Current Biology*, 19, 1206-1209.
- Beggs, K. T., Tyndall, J. D. A. and Mercer, A. R. (2011). Honey bee dopamine and octopamine receptors linked to intracellular calcium signaling have a close phylogenetic and pharmacological relationship. *PLoS ONE*, 6, e26809.

- Berstein, G., Blank, J. L., Smrcka, A. V., Higashijima, T., Sternweis, P. C., Exton, J. H., Ross, E. M.** (1992). Reconstitution of agonist-stimulated phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate hydrolysis using purified M1 muscarinic receptor, $G_{q/11}$, and phospholipase C- β 1. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 8081-8088.
- Blake, A. D., Anthony, N. M. and Chen, H. H.** (1993). *Drosophila* nervous system muscarinic acetylcholine receptor: transient functional expression and localization by immunocytochemistry. *Molecular Pharmacology*, 44, 716-724.
- Blenau, W. and Baumann, A.** (2001). Molecular and pharmacological properties of insect biogenic amine receptors: lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 48, 13-38.
- Blenau, W., Erber, J. and Baumann, A.** (1998). Characterization of a dopamine D1 receptor from *Apis mellifera*: cloning, functional expression, pharmacology, and mRNA localization in the brain. *Journal of Neurochemistry*, 70, 15-23.
- Boutet, L., Tanguy, A. and Moraga, D.** (2004). Molecular identification and expression of two non-P450 enzymes, monoamine oxidase A and flavin-containing monooxygenase 2, involved in phase I of xenobiotic biotransformation in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1679, 29-36.
- Bräunig, P.** (1991). Suboesophageal DUM neurons innervate the principal neuropiles of the locust brain. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 332, 221-240.
- Bräunig, P. and Pflüger, H. J.** (2001). The unpaired median neurons of insects. *Advances in Insect Physiology*, 28, 185-266, IN181-IN182.
- Bubser, M., Byun, N., Wood, M. R. and Jones, C. K.** (2012). Muscarinic receptor pharmacology and circuitry for the modulation of cognition. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 208, 121-166.
- Caulfield, M. P.** (1993). Muscarinic receptors-characterization, coupling and function. *Pharmacology & Therapeutics*, 58, 319-379.
- Caulfield, M. P. and Birdsall, N. J. M.** (1998). International union of pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacological Reviews*, 50, 279-290.
- Chang, H. Y., Grygoruk A., Brooks E. S., Ackerson L. C., Maidment N. T., Bainton R. J. and**

- Krantz D. E.** (2005). Overexpression of the *Drosophila* vesicular monoamine transporter increases motor activity and courtship but decreases the behavioral response to cocaine. *Molecular Psychiatry*, 11, 99-113.
- Chen, R., Wu, X., Wei, H., Han, D. D. and Gu, H. H.** (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.
- Clark, J., Meisner, S. and Torkkeli, P.** (2005). Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase and muscarinic ACh receptors in the antenna during development of the sphinx moth *Manduca sexta*. *Cell and Tissue Research*, 320, 163-173.
- Collin, C., Hauser, F., Gonzalez de Valdivia, E., Li, S., Reisenberger, J., Carlsen, E. M., Khan, Z., Hansen, N. O., Puhm, F., Søndergaard, L., Niemiec, J., Heninger, M., Ren, G. R. and Grimmelikhuijzen, C. J.** (2013). Two types of muscarinic acetylcholine receptors in *Drosophila* and other arthropods. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70, 3231-3242.
- Dacks, A. M., Riffell, J. A., Martin, J. P., Gage, S. L. and Nighorn, A. J.** (2012). Olfactory modulation by dopamine in the context of aversive learning. *Journal of Neurophysiology*, 108, 539-550.
- De Cesare, D., Fimia, G. M. and Sassone-Corsi, P.** (1999). Signaling routes to CREM and CREB: plasticity in transcriptional activation. *Trends in Biochemical Sciences*, 24, 281-285.
- De Luca, M., Roshina, N. V., Geiger-Thornsberry, G. L., Lyman, R. F., Pasyukova, E. G. and Mackay, T. F. C.** (2003). Dopa decarboxylase (Ddc) affects variation in *Drosophila* longevity. *Nature Genetics*, 34, 429-433.
- Donly, B. C. and Caveney, S.** (2005). A transporter for phenolamine uptake in the arthropod CNS. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 59, 172-183.
- Draper, I., Kurshan, P. T., McBride, E., Jackson, F. R. and Kopin, A. S.** (2007). Locomotor activity is regulated by D2-like receptors in *Drosophila*: an anatomic and functional analysis. *Developmental Neurobiology*, 67, 378-393.
- Eglen, R. M.** (2005). Muscarinic receptor subtype pharmacology and physiology. In F. D. King and G. Lawton (Eds.) *Progress in Medicinal Chemistry* (pp. 105-136): Elsevier.
- Eglen, R. M., Choppin, A. and Watson, N.** (2001). Therapeutic opportunities from muscarinic receptor research. *Trends Pharmacological Science*, 22, 409-414.

- Fahn, S.** (2006). The history of levodopa as it pertains to parkinson's disease, movement disorder society's 10th international congress of parkinson's disease and movement disorders. Movement Disorder, Kyoto, Japan.
- Falkenburger, B. H., Jensen, J. B. and Hille, B.** (2010). Kinetics of M1 muscarinic receptor and G protein signaling to phospholipase C in living cells. *Journal of General Physiology*, 135, 81-97.
- Feany, M. B. and Bender, W. W.** (2000). A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature*, 404, 394-398.
- Fonnum, F.** (1968). Choline acetyltransferase binding to and release from membranes. *Biochemistry Journal*, 109, 389-398.
- Gallant, P., Malutan, T., McLean, H., Verellen, L., Caveney, S. and Donly, C.** (2003). Functionally distinct dopamine and octopamine transporters in the CNS of the cabbage looper moth. *European Journal of Biochemistry*, 270, 664-674.
- Gorman, M. J., An, C. and Kanost, M. R.** (2007). Characterization of tyrosine hydroxylase from *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37, 1327-1337.
- Gorman, M. J. and Arakane, Y.** (2010). Tyrosine hydroxylase is required for cuticle sclerotization and pigmentation in *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40, 267-273.
- Gotzes, F., Balfanz, S. and Baumann, A.** (1994). Primary structure and functional characterization of a *Drosophila* dopamine receptor with high homology to human D1/5 receptors. *Receptors Channels*, 2, 131-141.
- Gotzes, F. and Baumann, A.** (1996). Functional properties of *Drosophila* dopamine D1-receptors are not altered by the size of the N-terminus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 222, 121-126.
- Grandy, D. K., Marchionni, M. A., Makam, H., Stofko, R. E., Alfano, M., Frothingham, L., Fischer, J. B., Burke-Howie, K. J., Bunzow, J. R. and Server, A. C.** (1989). Cloning of the cDNA and gene for a human D2 dopamine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 9762-9766.
- Greer, C. L., Grygoruk, A., Patton, D. E., Ley, B., Romero-Calderon, R., Chang, H. Y., Houshyar, R., Bainton, R. J., Diantonio, A. and Krantz, D. E.** (2005). A splice variant of

- the *Drosophila* vesicular monoamine transporter contains a conserved trafficking domain and functions in the storage of dopamine, serotonin, and octopamine. *Journal of Neurobiology*, 64, 239-258.
- Guez, D., Zhu, H., Zhang, S. W. and Srinivasan, M. V. (2010). Enhanced cholinergic transmission promotes recall in honeybees. *Journal of Insect Physiology*, 56, 1341-1348.
- Haga, K., Kruse, A. C., Asada, H., Yurugi-Kobayashi, T., Shiroishi, M., Zhang, C., Weis, W. I., Okada, T., Kobilka, B. K., Haga, T. and Kobayashi, T. (2012). Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. *Nature*, 482, 547-551.
- Hamasaka, Y. and Nässel, D. R. (2006). Mapping of serotonin, dopamine, and histamine in relation to different clock neurons in the brain of *Drosophila*. *Journal of Comparative Neurology*, 494, 314-330.
- Han, K. A., Millar, N. S., Grotewiel, M. S. and Davis, R. L. (1996). DAMB, a novel dopamine receptor expressed specifically in *Drosophila* mushroom bodies. *Neuron*, 16, 1127-1135.
- Harano, K. i., Sasaki, K., Nagao, T. and Sasaki, M. (2008). Influence of age and juvenile hormone on brain dopamine level in male honeybee (*Apis mellifera*): Association with reproductive maturation. *Journal of Insect Physiology*, 54, 848-853.
- Harvey, R. D. (2012). Muscarinic receptor agonists and antagonists effects on cardiovascular function. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 208, 299-316.
- Hasselmo, M. E. (2006). The role of acetylcholine in learning and memory. *Current Opinion in Neurobiology*, 16, 710-715.
- Hearn, M. G., Ren, Y., McBride, E. W., Reveillaud, I., Beinborn, M. and Kopin, A. S. (2002). A *Drosophila* dopamine 2-like receptor: Molecular characterization and identification of multiple alternatively spliced variants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 14554-14559.
- Heck, C., Kunst, M., Hartel, K., Hulsmann, S. and Heinrich, R. (2009). *In vivo* labeling and *in vitro* characterisation of central complex neurons involved in the control of sound production. *Journal of Neuroscience Methods*, 183, 202-212.
- Heinrich, R., Wenzel, B. and Elsner, N. (2001). A role for muscarinic excitation: control of specific singing behavior by activation of the adenylate cyclase pathway in the brain of grasshoppers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

- America*, 98, 9919-9923.
- Hodgetts, R. B. and O'Keefe, S. L.** (2006). Dopa decarboxylase: A model gene-enzyme system for studying development, behavior, and systematics. *Annual Review of Entomology*, 51, 259-284.
- Hoffmann, K., Wirmer, A., Kunst, M., Gocht, D. and Heinrich, R.** (2007). Muscarinic excitation in grasshopper song control circuits is limited by acetylcholinesterase activity. *Zoological Science*, 24, 1028-1035.
- Honda, H., Tomizawa, M. and Casida, J., E.** (2007). Insect muscarinic acetylcholine receptor: pharmacological and toxicological profiles of antagonists and agonists. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 2276-2281.
- Horn, A. S.** (1990). Dopamine uptake: a review of progress in the last decade. *Progress in Neurobiology*, 34, 387-400.
- Huang, C. Y., Chou, S. Y., Bartholomay, L. C., Christensen, B. M. and Chen, C. C.** (2005). The use of gene silencing to study the role of dopa decarboxylase in mosquito melanization reactions. *Insect Molecular Biology*, 14, 237-244.
- Humphries, M. A., Mustard, J. A., Hunter, S. J., Mercer, A., Ward, V. and Ebert, P. R.** (2003). Invertebrate D2 type dopamine receptor exhibits age-based plasticity of expression in the mushroom bodies of the honeybee brain. *Journal of Neurobiology*, 55, 315-330.
- Inagaki, H. K., Ben-Tabou de-Leon, S., Wong, A. M., Jagadish, S., Ishimoto, H., Barnea, G., Kitamoto, T., Axel, R. and Anderson, D. J.** (2012). Visualizing neuromodulation in vivo: TANGO-mapping of dopamine signaling reveals appetite control of sugar sensing. *Cell*, 148, 583-595.
- Ishii, M. and Kurachi, Y.** (2006). Muscarinic acetylcholine receptors. *Current Pharmaceutical Design*, 12, 3573-3581.
- Ismail, N., Robinson, G. E. and Fahrbach, S. E.** (2006). Stimulation of muscarinic receptors mimics experience-dependent plasticity in the honey bee brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 207-211.
- Jayanthi, L. D., Apparsundaram, S., Malone, M. D., Ward, E., Miller, D. M., Eppler, M. and Blakely, R. D.** (1998). The *Caenorhabditis elegans* gene T23G5.5 encodes an antidepressant- and cocaine-sensitive dopamine transporter. *Molecular Pharmacology*, 54, 601-609.

- Just, F. and Walz, B.** (1996). The effects of serotonin and dopamine on salivary secretion by isolated cockroach salivary glands. *Journal of Experimental Biology*, 199, 407-413.
- Kahsai, L., Carlsson, M. A., Winther, Å. M. E. and Nässel, D. R.** (2012). Distribution of metabotropic receptors of serotonin, dopamine, GABA, glutamate, and short neuropeptide F in the central complex of *Drosophila*. *Neuroscience*, 208, 11-26.
- Karakiulakis, G. and Roth, M.** (2012). Muscarinic receptors and their antagonists in COPD: anti-inflammatory and antiremodeling effects. *Mediators of Inflammation*, 2012, 409580.
- Kim, Y. C., Lee, H. G., Seong, C. S. and Han, K. A.** (2003). Expression of a D1 dopamine receptor dDA1/DmDOP1 in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Gene Expression Patterns*, 3, 237-245.
- Kozak, M.** (1987). At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *Journal of Molecular Biology*, 196, 947-950.
- Kumar, S., Chen, D. and Sehgal, A.** (2012). Dopamine acts through Cryptochrome to promote acute arousal in *Drosophila*. *Genes & Development*, 26, 1224-1234.
- Lang, I. and Walz, B.** (1999). Dopamine stimulates salivary duct cells in the cockroach *Periplaneta americana*. *Journal of Experimental Biology*, 202, 729-738.
- Lange, A. B. and Chan, K.** (2008). Dopaminergic control of foregut contractions in *Locusta migratoria*. *Journal of Insect Physiology*, 54, 222-230.
- Lee, Y. S., Park, Y. S., Chang, D. J., Hwang, J. M., Min, C. K., Kaang, B. K. and Cho, N. J.** (1999). Cloning and expression of a G protein-linked acetylcholine receptor from *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Neurochemistry*, 72, 58-65.
- Lee, Y. S., Park, Y. S., Nam, S., Suh, S. J., Lee, J., Kaang, B. K. and Cho, N. J.** (2000). Characterization of GAR-2, a novel G protein-linked acetylcholine receptor from *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Neurochemistry*, 75, 1800-1809.
- Liu, C., Plaçais, P.Y., Yamagata, N., Pfeiffer, B. D., Aso, Y., Friedrich, A. B., Siwanowicz, I., Rubin, G. M., Preat, T. and Tanimoto, H.** (2012a). A subset of dopamine neurons signals reward for odour memory in *Drosophila*. *Nature*, 488, 512-516.
- Liu, Q., Liu, S., Kodama, L., Driscoll, M. R. and Wu, M. N.** (2012b). Two dopaminergic neurons signal to the dorsal fan-shaped body to promote wakefulness in *Drosophila*. *Current Biology*, 22, 2114-2123.

- Liu, T., Dartevielle, L., Yuan, C., Wei, H., Wang, Y., Ferveur, J. F. and Guo, A. (2008).** Increased dopamine level enhances male-male courtship in *Drosophila*. *Journal of Neuroscience*, 28, 5539-5546.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001).** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-408.
- Lu, S. M., Zhao, Z., Li, K., Zhang, Y. L. and Xi, G. S. (2011).** Cloning and expression analysis of a muscarinic cholinergic receptor from the brain of ant, *Polyrhachis vicina*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 78, 46-60.
- Millar, N. S. and Baylis, H. A. (1995).** Functional expression of a cloned *Drosophila* muscarinic acetylcholine receptor in a stable *Drosophila* cell line. *Journal of Experimental Biology*, 198, 1843-1850.
- Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. w., Jaber, M. and Caron, M. G. (1998).** Dopamine receptors from structure to function. *Physiological Reviews*, 78, 189-225.
- Mitsumasu, K., Ohta, H., Tsuchihara, K., Asaoka, K., Ozoe, Y., Niimi, T., Yamashita, O. and Yaginuma, T. (2008).** Molecular cloning and characterization of cDNAs encoding dopamine receptor-1 and -2 from brain-suboesophageal ganglion of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Molecular Biology*, 17, 185-195.
- Mizunami, M., Unoki, S., Mori, Y., Hirashima, D., Hatano, A. and Matsumoto, Y. (2009).** Roles of octopaminergic and dopaminergic neurons in appetitive and aversive memory recall in an insect. *BMC Biology*, 7, 46.
- Mohr, M. and Tränkle, C. (2013).** A muscarinic view on G_q *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 386, 935-936.
- Moro, O., Lameh, J., Högger, P. and Sadee, W. (1993).** Hydrophobic amino acid in the i2 loop plays a key role in receptor-G protein coupling. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 22273-22276.
- Mustard, J. A., Pham, P. M. and Smith, B. H. (2010).** Modulation of motor behavior by dopamine and the D1-like dopamine receptor AmDOP2 in the honey bee. *Journal of Insect Physiology*, 56, 422-430.
- Neckameyer, W. S. (1998).** Dopamine and mushroom bodies in *Drosophila*: experience-dependent and -independent aspects of sexual behavior. *Learning & Memory*, 5,

157-165.

- Neckameyer, W. S. and Weinstein, J. S. (2005). Stress affects dopaminergic signaling pathways in *Drosophila melanogaster*. *Stress: The International Journal on the Biology of Stress*, 8, 117-131.
- Ohta, H., Tsuchihara, K., Mitsumasu, K., Yaginuma, T., Ozoe, Y. and Asaoka, K. (2009). Comparative pharmacology of two D1-like dopamine receptors cloned from the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39, 342-347.
- Oliveira, E. E., Pippow, A., Salgado, V. L., Buschges, A., Schmidt, J. and Kloppenburg, P. (2010). Cholinergic currents in leg motoneurons of *Carausius morosus*. *Journal of Neurophysiology*, 103, 2770-2782.
- Onai, T., FitzGerald, M. G., Arakawa, S. and Gocayne, J. D. (1989). Cloning, sequence analysis and chromosome localization of a *Drosophila* muscarinic acetylcholine receptor. *FEBS Letters*, 255, 219-225.
- Pörzgen, P., Park, S. K., Hirsh, J., Sonders, M. S. and Amara, S. G. (2001). The antidepressant-sensitive dopamine transporter in *Drosophila melanogaster*: A primordial carrier for catecholamines. *Molecular Pharmacology*, 59, 83-95.
- Pohanka, M. (2012). $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor is a target in pharmacology and toxicology. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 2219-2238.
- Rauschenbach, I. Y., Chentsova, N. A., Alekseev, A. A., Gruntenko, N. E., Adonyeva, N. V., Karpova, E. K., Komarova, T. N., Vasiliev, V. G. and Bownes, M. (2007). Dopamine and octopamine regulate 20-hydroxyecdysone level *in vivo* in *Drosophila*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 65, 95-102.
- Ren, G. R., Folke, J., Hauser, F., Li, S., Grimmelikhuijzen, C. J. (2015). The A- and B-type muscarinic acetylcholine receptors from *Drosophila melanogaster* couple to different second messenger pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, online.
- Restifo, L. L. and White, K. (1990). Molecular and genetic approaches to neurotransmitter and neuromodulator systems in *Drosophila*. In P. D. Evans and V. B. Wigglesworth (Eds.) *Advances in Insect Physiology* (pp. 115-219) : Academic Press.
- Rhee, S. G. and Bae, Y. S. (1997). Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 15045-15048.

- Riemensperger, T., Völler, T., Stock, P., Buchner, E. and Fiala, A. (2005). Punishment prediction by dopaminergic neurons in *Drosophila*. *Current Biology*, 15, 1953-1960.
- Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G. F. and Kobilka, B. K. (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 459, 356-363.
- Sarter, M. and Parikh, V. (2005). Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. *Nature Reviews Neuroscience*, 6, 48-56.
- Sasaki, K., Matsuyama, S., Harano, K. i. and Nagao, T. (2012). Caste differences in dopamine-related substances and dopamine supply in the brains of honeybees (*Apis mellifera* L.). *General and Comparative Endocrinology*, 178, 46-53.
- Sasaki, K. and Nagao, T. (2001). Distribution and levels of dopamine and its metabolites in brains of reproductive workers in honeybees. *Journal of Insect Physiology*, 47, 1205-1216.
- Sasaki, K. and Nagao, T. (2002). Brain tyramine and reproductive states of workers in honeybees. *Journal of Insect Physiology*, 48, 1075-1085.
- Scarr, E., Sundram, S., Keriakous, D. and Dean, B. (2007). Altered hippocampal muscarinic M4, but not M1, receptor expression from subjects with schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 61, 1161-1170.
- Schultz, W. (2005). Behavioral theories and the neurophysiology of reward. *Annual Review of Entomology*, 57, 87-115.
- Shapiro, R. A., Wakimoto, B. T., Subers, E. M. and Nathanson, N. M. (1989). Characterization and functional expression in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 9039-9043.
- Sillitoe, R. V. and Vogel, M. W. (2008). Desire, disease, and the origins of the dopaminergic system. *Schizophr Bulletin*, 34, 212-219.
- Simon, A. F., Daniels, R., Romero-Calderón, R., Grygoruk, A., Chang, H. Y., Najibi, R., Shamouelian, D., Salazar, E., Solomon, M., Ackerson, L. C., Maidment, N. T., Diantonio, A. and Krantz, D. E. (2009). *Drosophila* vesicular monoamine transporter mutants can adapt to reduced or eliminated vesicular stores of dopamine and serotonin. *Genetics*, 181, 525-541.
- Sloley, B. D. (2004). Metabolism of monoamines in invertebrates: the relative importance of monoamine oxidase in different phyla. *Neurotoxicology*, 25, 175-183.

- Sokoloff, P., Giros, B., Martres, M. P., Bouthenet, M. L. and Schwartz, J. C. (1990). Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature*, 347, 146-151.
- Srivastava, D. P., Yu, E. J., Kennedy, K., Chatwin, H., Reale, V., Hamon, M., Smith, T. and Evans, P. D. (2005). Rapid, nongenomic responses to ecdysteroids and catecholamines mediated by a novel *Drosophila* G-protein-coupled receptor. *Journal of Neuroscience*, 25, 6145-6155.
- Sunahara, R. K., Guan, H. C., O'Dowd, B. F., Seeman, P., Laurier, L. G., Nq, G., George, S. R., Torchia, J., Van Tol, H. H. and Niznik, H. B. (1991). Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. *Nature*, 350, 614-619.
- Sunahara, R. K., Niznik, H. B., Weiner, D. M., Stormann, T. M., Brann, M. R., Kennedy, J. L., Gelernter, J. E., Rozmahel, R., Yang, Y. L. and Israel, Y. (1990). Human dopamine D1 receptor encoded by an intronless gene on chromosome 5. *Nature*, 347, 80-83.
- Tobin, G., Giglio, D. and Lundgren, O. (2009). Muscarinic receptor subtypes in the alimentary tract. *Journal of Physiological Pharmacology*, 60, 3-21.
- Torkkeli, P. H., Widmer, A. and Meisner, S. (2004). Expression of muscarinic acetylcholine receptors and choline acetyltransferase enzyme in cultured antennal sensory neurons and non-neural cells of the developing moth *Manduca sexta*. *Journal of Neurobiology*, 62, 316-329.
- Tucek, S. (1985). Regulation of acetylcholine synthesis in the brain. *Journal of Neurochemistry*, 44, 11-24.
- Ueno, T., Tomita, J., Tanimoto, H., Endo, K., Ito, K., Kume, S. and Kume, K. (2012). Identification of a dopamine pathway that regulates sleep and arousal in *Drosophila*. *Nature Neuroscience*, 15, 1516-1523.
- Van Tol, H. H. M., Bunzow, J. R., Guan, H. C., Sunahara, R. K., Seeman, P., Niznik, H. B. and Civelli, O. (1991). Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature*, 350, 610-614.
- Vieillemaringe, J., Duris, P., Geffard, M., Le Moal, M., Delaage, M., Bensch, C. and Girardie, J. (1984). Immunohistochemical localization of dopamine in the brain of the insect *Locusta migratoria migratorioides* in comparison with the catecholamine distribution determined by

- the histofluorescence technique. *Cell and Tissue Research*, 237, 391-394.
- Wenzel, B., Elsner, N. and Heinrich, R. (2002). mAChRs in the grasshopper brain mediate excitation by activation of the AC PKA and the PLC second-messenger pathways. *Journal of Neurophysiology*, 87, 876-888.
- Wess, J. (2003). Novel insights into muscarinic acetylcholine receptor function using gene targeting technology. *Trends in Pharmacological Sciences*, 24, 414-420.
- Wess, J., Eglen, R. M. and Gautam, D. (2007). Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6, 721-733.
- Wittkopp, P. J., Carroll, S. B. and Kopp, A. (2003). Evolution in black and white: genetic control of pigment patterns in *Drosophila*. *Trends in Genetics*, 19, 495-504.
- Yamada, M., Lamping, K. G., Duttaroy, A., Zhang, W., Cui, Y., Bymaster, F. P., McKinzie, D. L., Felder, C. C., Deng, C. X., Faraci, F. M. and Wess, J. (2001). Cholinergic dilation of cerebral blood vessels is abolished in M_5 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 14096-14101.
- Yuan, M. Z., Wei, G., Jiao, G. X., Hui, W. X. and Le, K. (2011). Modulation of behavioral phase changes of the migratory locust by the catecholamine metabolic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 3882-3887.
- Zhang, K., Guo, J. Z., Peng, Y., Xi, W. and Guo, A. (2007). Dopamine-mushroom body circuit regulates saliency-based decision-making in *Drosophila*. *Science*, 316, 1901-1904.
- Zhou, Z., Wang, L., Gao, Y., Wang, M., Zhang, H., Wang, L., Qiu, L. and Song, L. (2011). A monoamine oxidase from scallop *Chlamys farreri* serving as an immunomodulator in response against bacterial challenge. *Developmental and Comparative Immunology*, 35, 799-807.

作者简历

教育经历:

2012 年 9 月-2015 年 6 月	浙江大学植物保护专业	硕士学位
2010 年 2 月-2012 年 1 月	武汉大学会计学专业	第二学位
2008 年 9 月-2012 年 6 月	华中农业大学植物保护专业	学士学位

硕士期间发表的学术论文:

1. Yi-Xiang Qi, **Ren-Ying Xia**, Ya-Su Wu, David Stanley, Jia Huang and Gong-Yin Ye. Larvae of the small white butterfly, *Pieris rapae*, express a novel serotonin receptor. **Journal of Neurochemistry**. 131 (6): 767-777, 2014.
2. Shun-Fan Wu, Gang Xu, Yi-Xiang Qi, **Ren-Ying Xia**, Jia Huang and Gong-Yin Ye. Two splicing variants of a novel family of octopamine receptors with different signaling properties. **Journal of Neurochemistry**. 129 (1): 37-47, 2014.
3. 吴顺凡, 徐刚, 齐易香, **夏仁英**, 黄佳, 叶恭银. 昆虫多巴胺及其受体的研究进展. **昆虫学报** 56 (11): 1342-1358, 2013.

硕士期间参与的学术会议:

1. **Ren-Ying Xia**, Yi-Xiang Qi, Ya-Su Wu, Gong-Yin Ye and Jia Huang. *Drosophila* CG12796 encodes a novel muscarinic acetylcholine receptor. The 62th Annual Meeting of the Entomological Society of America, Portland, Oregon, November 16-19, 2014.

硕士期间获奖经历:

1. 2013-2014 年获“硕士研究生国家奖学金”;
2. 2013-2014 年获浙江大学“三好研究生”和“优秀研究生”荣誉称号;
3. 2012-2013 年获浙江大学“朋辈心理辅导员资格证书”。