

棉铃虫烟碱类乙酰胆碱受体 $\alpha 7$ 亚基基因的鉴定及功能分析

刘少凯^{1,2} 谢丙堂¹ 魏纪珍² 梁革梅^{1*}

(1. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193;

2. 河南农业大学植物保护学院, 郑州 450002)

摘要: 为探究和挖掘更多杀虫剂靶标受体, 采用PCR方法结合RACE技术克隆了棉铃虫烟碱类乙酰胆碱受体(nicotinic acetylcholine receptor, nAChR)的 $\alpha 7$ 亚基(*nAChR- $\alpha 7$*)基因, 通过荧光定量PCR技术进行时空表达分析, 并采用电生理检测以及RNAi技术研究该基因对棉铃虫生长发育的调控作用。结果表明, 棉铃虫*nAChR- $\alpha 7$* 基因(GenBank 登录号: KM884875)全长3 632 bp, 包含编码496个氨基酸的1 491 bp开放阅读框。该基因具有nAChR典型结构, 与其他鳞翅目昆虫*nAChR- $\alpha 7$* 基因同源性较高, 且包括胞外N端配体结合区、半胱氨酸环、Loop A~Loop F、跨膜区(TM1~TM4)和1个短的C端胞外尾。*nAChR- $\alpha 7$* 基因在棉铃虫幼虫头部及成虫期高表达; 通过将*nAChR- $\alpha 7$* 基因在非洲爪蟾*Xenopus oocytes*卵母细胞中表达, 并检测电生理信号, 确定该基因是nAChR受体基因, 但不能持续响应ACh信号。干扰试验结果显示*nAChR- $\alpha 7$* 基因对棉铃虫幼虫生长发育无显著影响。推测该基因可能不是主要的*nAChR*基因, 而是与其他亚基基因共同起作用。

关键词: 棉铃虫; 烟碱型乙酰胆碱受体; 时空表达; 功能; 电生理学

Identification and functional studies of nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit in cotton bollworm *Helicoverpa armigera*

Liu Shaokai^{1,2} Xie Bingtang¹ Wei Jizhen² Liang Gemei^{1*}

(1. State key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan Province, China)

Abstract: In order to explore more targets for insecticides, the full-length cDNA sequence of nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) $\alpha 7$ subunit (*nAChR- $\alpha 7$*) gene was cloned from cotton bollworm *Helicoverpa armigera* by PCR and RACE (rapid amplification of cDNA ends) technologies in this study. Meanwhile, the expression patterns of *nAChR- $\alpha 7$* gene were also assayed by qRT-PCR. The function of nAChR $\alpha 7$ subunit as a nicotinic acetylcholine receptor was confirmed by being heterologously expressed in *Xenopus oocytes* to record the changing currents using the two-microelectrode voltage-clamp technique. In addition, the regulatory function of *nAChR- $\alpha 7$* gene in the development of cotton bollworm was investigated by using RNAi technology. The results showed that the full-length cDNA sequence of *nAChR- $\alpha 7$* gene (GenBank accession no. KM884875) was 3 632 bp in length, which contained an open reading frame of 1 491 bp encoding 496 amino acids. It had the common characters of the cysteine ring receptor family: N- and C-terminal ex-cytosolic tail, Loop A–Loop F, the four transmembrane

domains TM1, TM2, TM3 and TM4, and the big cytosolic ring. The relatively high expression of *nAChR- $\alpha 7$* was detected in larval heads and adults. The pharmacological property analysis by constructing the *X. oocytes* cell expression confirmed that it was a typical nicotinic acetylcholine receptor, though the electrophysiological experiment showed that the current did not sustain as the doses of Ach increased. The down-regulation of *nAChR- $\alpha 7$* gene had no significant effect on the development of *H. armigera*. The results indicated that *nAChR- $\alpha 7$* gene was not an important nicotinic acetylcholine receptor and might serve a function with other nAChRs.

Key words: *Helicoverpa armigera*; nicotinic acetylcholine receptors (nAChR); spatio-temporal expression; function; electrophysiology

烟碱型乙酰胆碱受体(nicotinic acetylcholine receptor, nAChR)是神经递质门控离子通道蛋白,属于半胱氨酸环受体家族(Thompson et al., 2010),位于昆虫中枢神经系统,其与高等动物 nAChR 结构一样,都是五聚体蛋白复合物,由5个亚基构成,进一步细分为 α 型和非 α 型(Changeux & Edelstein, 2006; Sine & Engel, 2006)。昆虫基因组中 nAChR 有10到16个亚基基因型(Grauso et al., 2002; Thany et al., 2007),每个亚单位具有相似蛋白质结构。 α 亚基有1个大的N端胞外区,Loop C是细胞外N端结构域的6个Loop(A~F)中的1个,在Loop C中有1对相邻的半胱氨酸,组成了位于相邻亚基界面上的乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)结合位点。同时, α 亚基还包含4个跨膜域(TM1~TM4),同时TM3和TM4之间还有1个大的胞内环(Changeux & Edelstein, 2006)。

nAChR负责神经系统突触间兴奋性递质快速传递,并在昆虫和哺乳动物学习、记忆和逃逸行为中起重要作用(Levin & Simon, 1998; Bicker, 1999; Fayyazuddin et al., 2006)。因此以昆虫 nAChR 为重要分子靶标开发出的多杀菌素和新烟碱类杀虫剂在世界范围内被广泛应用(Brown et al., 2006; Millar & Denholm, 2007)。吡虫啉是第一个商业化应用的新烟碱类化合物(Bai et al., 1991; Kagabu, 2011),此后啉虫脒、噻虫胺、烯啶虫胺、噻虫嗪等也被开发出来(Ihara et al., 2018);此外,氟吡呋喃酮、氟啶虫胺胍及最近被开发的三氟苯嘧啶等都能作用于 nAChR (Watson et al., 2011; Nauen et al., 2015; Cordova et al., 2016)。然而这些杀虫剂的长期使用,也迫使昆虫相应的 nAChR 受体突变导致昆虫对这些药剂产生了抗性。例如黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的 *nAChR-Da6* 基因突变,使其不能形成有功能的蛋白,而对多杀菌素产生了1 181倍的抗性(Perry et al., 2007)。多杀菌素类杀虫剂的主要作用靶标也是

nAChR (Salgado, 1998; Watson, 2001)。近些年来多杀菌素类杀虫剂的长期大量使用导致如迟眼蕈蚊 *Bradysia odoriphaga* 和桃蚜 *Myzus persicae* 等昆虫对其产生了抗性(Chen et al., 2017; Charaabi et al., 2018; Huseth et al., 2018),因此迫切需要加深对昆虫 nAChR 的相关研究。

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 属鳞翅目夜蛾科,是一种世界性重要农业害虫,其食性复杂,为害棉花、玉米、蔬菜等200多种作物(Wu & Guo, 2005; Wu, 2007)。以 nAChR 为靶标的杀虫剂,具有作用机理新颖和环境友好、低毒、无残留的特性,在棉铃虫的应急防控中被广泛应用,但目前已有报道田间棉铃虫对以 nAChR 为靶标的杀虫剂产生了抗性(Sene et al., 2020; Wang et al., 2021),因此,深入研究此类杀虫剂的作用机制,对更好地利用这些杀虫剂,并延缓其抗性具有重要意义。本研究通过 RACE 和 PCR 技术克隆棉铃虫 nAChR 的 $\alpha 7$ 亚基(*nAChR- $\alpha 7$*)基因,通过荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)技术分析其在棉铃虫各发育阶段和组织中的表达谱,同时利用异源表达与电生理检测进一步分析其在神经信号传递中的作用,并通过 RNAi 技术在幼虫中干扰其表达,以探明 nAChR $\alpha 7$ 亚基对棉铃虫幼虫生长发育的调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料

供试昆虫:供试敏感品系棉铃虫为96S品系,于1996年采自河南省新乡县棉田,长期在室内使用人工饲料进行饲养(梁革梅等,1999)。饲养条件为温度(27 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度(75 ± 10)%、光周期16 L:8 D。

试剂及仪器:RNA提取试剂 Trizol,美国 Invitrogen 公司;cDNA 合成试剂盒 HiScript[®] III 1st Strand cDNA Synthesis Kit(+gDNA wiper),南京诺唯赞生

物科技股份有限公司;PCR产物回收试剂盒,美国Axygen公司;5',3'Race试剂盒,美国Clontech公司;SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit,日本TaKaRa公司;大肠杆菌*Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞、pEasy-T3载体,北京全式金生物技术有限公司;pGH19-nAChR β 2载体,南京农业大学刘泽文教授课题组提供;雌性非洲爪蟾*Xenopus oocytes*,中国农业科学院植物保护研究所昆虫功能基因研究组提供;1xRinger缓冲液,上海创赛科技有限公司;其他试剂为国产分析纯。Mastercycle Pro S型PCR仪,德国Eppendorf公司;ABI 7500 Fast实时荧光定量PCR仪,美国ABI公司;Centrifuge5417R型台式离心机,德国Eppendorf公司;GelDoc XR凝胶成像仪,美国Bio-Rad公司;ND-2000型紫外分光光度计,美国Thermo公司;DYY-6C型电泳仪,北京六一仪器厂;PLI-100 Pico-Injector注射仪,美国Harvard Apparatus公司;MP-255型显微操作仪,美国Sutter公司,OC-725C型双电极电压钳系统,美国Warner Instruments公司。

1.2 方法

1.2.1 不同样品制备以及总RNA提取、cDNA合成

不同发育时期样品制备:收集棉铃虫96S品系卵100粒,1龄幼虫20头,2~4龄幼虫分别10头,5龄幼虫3头,蛹3头及成虫3头。不同组织样品制备:由于药剂通常对低龄期幼虫效果更佳,且考虑试验操作的精确性,选择3龄棉铃虫幼虫8头,分别取头、胸、腹3个部位的组织。样品完成获取后,立即放入适量RNA提取试剂Trizol进行总RNA的提取。以上各样品均设3次生物学重复。按照SMARTTM

RACE cDNA Amplification Kit操作说明书合成RACE扩增所用的cDNA模板,样品为棉铃虫3龄幼虫的头部组织。qRT-PCR所用cDNA模板是按照HiScript[®] III 1st Strand cDNA Synthesis Kit(+gDNA wiper)说明书合成的。

1.2.2 棉铃虫*nAChRs- α 7*基因的克隆

根据前期得到的棉铃虫转录组数据(张丽丽, 2014),获得*nAChRs- α 7*基因部分序列,利用软件Primer Premier 5.0分别设计特异性5' RACE和3' RACE引物(表1),引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。以棉铃虫cDNA为模板,分别扩增其5'端和3'端序列。50 μ L PCR反应体系:cDNA 3 μ L、10 $\times$ LA *Taq* 5 μ L、2.5 mmol/L dNTP Mixture 6 μ L、上下游引物各1 μ L、UPM 5 μ L、LA *Taq* DNA polymerase 0.5 μ L、无菌水30.5 μ L。PCR反应程序:94 $^{\circ}$ C预变性30 s;94 $^{\circ}$ C变性30 s,72 $^{\circ}$ C延伸3 min,循环5次;94 $^{\circ}$ C变性30 s,70 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸3 min,循环5次;94 $^{\circ}$ C变性30 s,68 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸3 min,循环35次;72 $^{\circ}$ C保温10 min。1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,切割目的条带,送北京博迈德基因技术有限公司进行序列测定。

测序成功后拼接序列,设计特异性引物 α 7-ORF-F和 α 7-ORF-R(表1),以棉铃虫3龄幼虫头部cDNA为模板,扩增其开放阅读框,25 μ L PCR反应体系为:cDNA 1 μ L、上下游引物各0.5 μ L、dNTP 1 μ L、10 $\times$ Easy*Taq* Buffer 2.5 μ L、Easy*Taq* E 0.25 μ L、无菌水19.25 μ L。PCR反应程序同上。反应结束后,参考上述方法进行检测。

表1 本试验设计的引物

Table 1 Primers designed for this study

引物用途 Purpose	引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')	产物大小 Size/bp	扩增效率 Amplification efficiency/%
实时荧光定量 qRT-PCR	α 7-RT-F	GGATGGCGAATGGGAGTT	198	99.8
	α 7-RT-R	GGAGTCTGGAGGCAAGGT		
	18S-RT-F	GCATCTTTCAAATGTCTG	144	97.0
	18S-RT-R	TACTCATTCCGATTACGAG		
	beta-Actin-RT-F	CCTGGTATTGCTGACCGTATGC	144	107.5
	beta-Actin-RT-R	CTGTTGGAAGGTGGAGAGGGAA		
RACE扩增	5' RACE	GCCGAAATCCGAAGTGTTCACCTCAAGTT	3 632	/
RACE amplification	3' RACE	AATTGGTACAGTTGTGATATGCCTCGTTGTG		
开放阅读框验证	α 7-ORF-F	CGTCGCGGCGCTGACATG	1 497	/
ORF verification	α 7-ORF-R	TCGCTACGACACCATGATGTGT		
异源表达	Haa7-BamH I	CGGGATCCGTCGCGGCGCTGACATG	1 514	/
Heterologous expression	Haa7-Hind III	CCCAAGCTTTCGCTACGACACCATGATGTGT		

1.2.3 序列分析和系统发育树构建

在NCBI(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)网站上进行序列同源性比对分析,使用Mega 7.0软件和DNAMAN软件分析棉铃虫*nAChR- $\alpha 7$* 基因核苷酸序列,并翻译为氨基酸,再进行多重序列比对和一致性分析,采用Mega 7.0软件及iTOL v5在线工具(<https://itol.embl.de/>)基于最大似然法和Jones-Taylor-Thornton model模型构建系统进化树。利用ExPASy(https://web.expasy.org/compute_pi/)在线工具程序计算其等电点和分子量;运用NCBI CDD分析棉铃虫*nAChR- $\alpha 7$* 基因保守性结构域(Marchler-Bauer et al., 2011)。

1.2.4 荧光定量PCR检测

采用双内参法进行qRT-PCR检测,内参基因分别为棉铃虫*beta-Actin*基因(GenBank 登录号: EU527017.1)和棉铃虫*18S*基因(GenBank 登录号: AB620126.1)(Zhang et al., 2014),引物序列如表1所示(Zhang et al., 2015; Wei et al., 2021)。*nAChR- $\alpha 7$* 的引物见表1,通过电泳验证条带单一,并测定其扩增效率为99.8%(表1)。使用荧光定量试剂盒ChamQ™ Universal SYBR® qPCR Master Mix进行qRT-PCR。20 μ L qRT-PCR反应体系: 10 μ mol/L正反向引物 0.5 μ L、2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μ L、cDNA 1 μ L、无菌水 8 μ L。反应程序: 95℃预变性 2 min; 95℃变性 15 s, 58℃退火/延伸 30 s, 72℃延伸 30 s, 循环40次, 3次技术重复。该基因在各生长发育阶段及组织中的表达量计算参考Liu et al.(2015)方法。

1.2.5 载体构建

将1.2.2中的PCR产物回收后,通过pEasy-T3载体和Trans1-T1感受态细胞进行连接转化,挑选阳性克隆且PCR电泳结果正确的菌样,送生工生物工程(上海)股份有限公司测序,并对测序结果正确的菌样进行质粒提取。利用含有*Bam*H I和*Hand* III酶切位点的特异性引物Haa7-*Bam*H I和Haa7-*Hind* III(表1),以构建好且测序正确的棉铃虫*nAChR- $\alpha 7$* 质粒为模板,进行PCR扩增。20 μ L PCR反应体系: 2×*Taq* Master Mix 10 μ L、无菌水 8 μ L、cDNA 1 μ L、上下游引物各 0.5 μ L。反应程序: 94℃预变性 3 min; 94℃变性 1 min, 58℃退火 20 s, 72℃延伸 90 s, 循环35次; 72℃保温 10 min。将PCR产物与pGH19-*nAChR $\beta 2$* 载体同时用*Bam*H I和*Hand* III限制性内切酶双酶切,用T4连接酶连接,构建重组质粒并送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.2.6 异源表达与电生理检测

对测序正确的质粒,通过限制性内切酶*Not* I酶切后线性化,利用T7启动子体外转录后,获得cRNA。解剖V至VI期成熟非洲爪蟾卵母细胞,并充分处理后,置于18℃温箱中培养24 h。然后对其进行显微注射,浓度为1 μ g/ μ L,体积为0.027 6 μ L。使用拉针仪拉制玻璃微电极,尖端直径1~3 μ m,电阻0.5~2 m Ω 。2根玻璃微电极内充满3 mol/L的KCl溶液,接到电压钳仪器探头上,调整好电极位置。调节放大器面板上的电流(mA)电压(mV)调节旋钮至零,检测电极电阻是否符合要求。向浴槽中灌入1×Ringer缓冲液(含Ca²⁺),将卵母细胞放入细胞槽中。调节探头上的旋钮使2个电极刺入卵母细胞,钳制电压为-80 mV,选择采样模式Episodic stimulation,采样频率为Slow100 Hz,根据试验要求设定其他参数。

1.2.7 RNA干扰

委托广州睿博生物科技有限公司合成siRNA和阴性对照(unrelated-siRNA), siRNA正义链序列为siRNA1: 5'-GCUGGACUUAUGAUGGUUA dT-dT-3'。干扰试验采用注射法,在进行显微注射前,将棉铃虫3龄幼虫置于冰上麻醉15 min,然后使用显微镜注射仪将0.02 μ L浓度为0.02 mol/L的siRNA注射进入虫体内。每个处理注射48头,并用正常饲料饲养,在24、48、72 h进行取样,每个时间点取6头,通过qRT-PCR技术进行内参基因和*nAChR- $\alpha 7$* 基因表达量分析,方法同1.2.4。并于第1、2、5和7天后统计死亡率并称重,重复4次。

1.3 数据分析

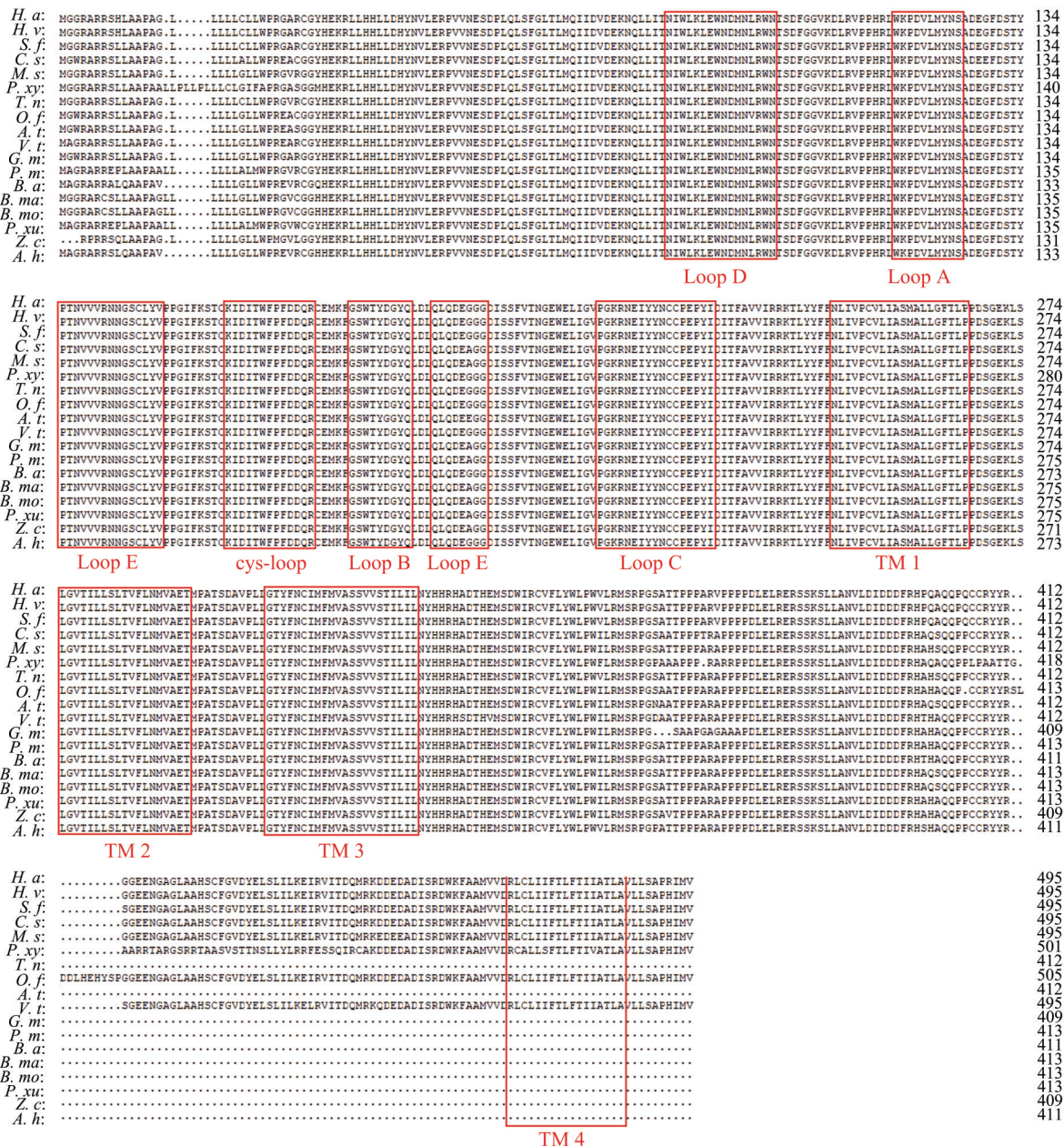
试验数据采用DPS 9.50软件进行统计分析,使用LSD法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 棉铃虫*nAChRs- $\alpha 7$* 基因序列及进化分析

从棉铃虫中扩增到了1条大小为3 632 bp的*nAChR- $\alpha 7$* 基因序列,并提交到NCBI数据库,其GenBank登录号为KM884875。经生物信息学分析,该*nAChR- $\alpha 7$* 基因包含1 491 bp的开放阅读框,编码496个氨基酸(图1),预测分子量为56.4 kD,等电点为5.50。对棉铃虫*nAChR- $\alpha 7$* 基因结构域进行预测,结果表明*nAChR- $\alpha 7$* 基因有1个大的N端胞外结构域,其上有间隔13个氨基酸的2个半胱氨酸环,是典型的*nAChR- α* 基因。同时该基因有6个环Loop A~Loop F, 4个跨膜区TM1~TM4, TM3和TM4之间

有1个胞内环,1个短的C端胞外尾(图1)。



H. a.: 棉铃虫; *H. v.*: 烟芽夜蛾; *S. f.*: 草地贪夜蛾; *T. n.*: 粉斑夜蛾; *P. xy.*: 小菜蛾; *O. f.*: 亚洲玉米螟; *B. mo.*: 家蚕; *B. ma.*: 野蚕; *A. t.*: 脐橙蛾; *B. a.*: 重瞳黛眼蝶; *C. s.*: 二化螟; *G. m.*: 大蜡螟; *M. s.*: 烟草天蛾; *P. m.*: 金凤蝶; *P. xu.*: 柑橘凤蝶; *V. t.*: 特美红蛱蝶; *Z. c.*: 菊黄花粉蝶。 *H. a.*: *Helicoverpa armigera*; *H. v.*: *Heliothis virescens*; *S. f.*: *Spodoptera frugiperda*; *T. n.*: *Trichoplusia ni*; *P. xy.*: *Plutella xylostella*; *O. f.*: *Ostrinia furnacalis*; *B. mo.*: *Bombyx mori*; *B. ma.*: *Bombyx mandarina*; *A. t.*: *Amyelois transitella*; *B. a.*: *Bicyclus anynana*; *C. s.*: *Chilo suppressalis*; *G. m.*: *Galleria mellonella*; *M. s.*: *Manduca sexta*; *P. m.*: *Papilio machaon*; *P. xu.*: *Papilio xuthus*; *V. t.*: *Vanessa tameamea*; *Z. c.*: *Zerene cesonia*.

图1 棉铃虫 *nAchR-α7* 与其他物种 *nAchR-α7* 的序列比对

Fig.1 Multiple alignment of *nAchR-α7* sequences from *Helicoverpa armigera* and other species

将棉铃虫与其他17种昆虫 *nAchR-α7* 基因氨基酸序列进行比对,不同昆虫 *nAchR-α7* 同源性都较高,尤其是胞外N端配体结合区,C端亲水区,半胱氨酸环,Loop A~Loop F及跨膜区(TM1~TM3)都非

常保守,唯有位于TM3和TM4之间的胞内环差异很大(图1),其与烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 氨基酸序列相似性为100%(图1~2),且系统进化树分析结果显示与其他鳞翅目昆虫同源性都较高(图2)。

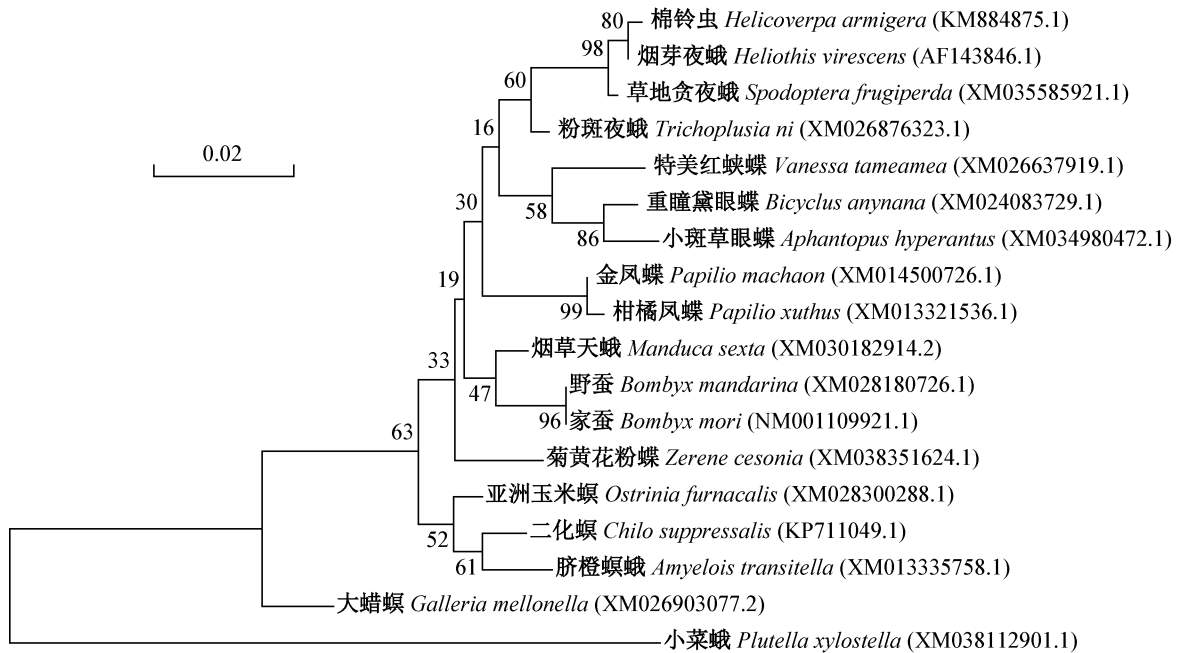


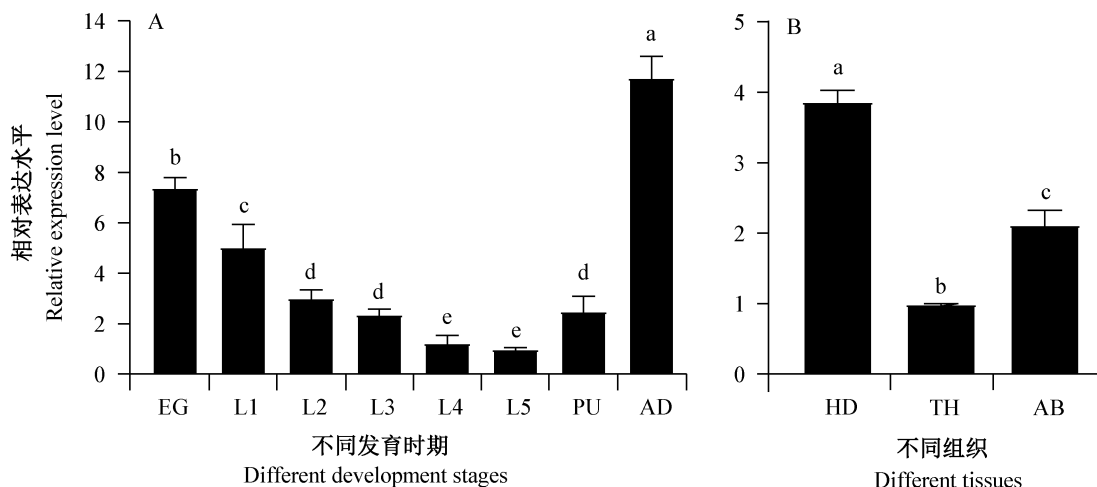
图2 基于 *nAChR-α7* 序列采用最大似然法构建棉铃虫与其他类似昆虫的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *nAChR-α7* from *Helicoverpa armigera* and other insects based on amino acid sequences by using neighbor-joining method

2.2 棉铃虫 *nAChR-α7* 基因时空表达分析

nAChR-α7 基因在棉铃虫整个发育历期都有表达,且各个发育阶段表达量差异显著,其中成虫期表达量最高,并显著高于其他发育阶段 ($P < 0.001$),其次是卵中的表达量较高。*nAChR-α7* 基因在整个幼

虫期表达量随龄期增长而降低(图 3-A)。在蛹期的表达量与 2 龄和 3 龄幼虫期的表达量相当。分析该基因在幼虫不同组织中的表达,发现他在幼虫头部转录水平极显著高于其他部位 ($P < 0.001$),表达水平由高到低依次是头部、腹部和胸部(图 3-B)。



EG: 卵期; L1~L6: 1 龄~6 龄幼虫; PU: 蛹期; AD: 成虫期; HD: 头部; TH: 胸部; AB: 腹部。EG: Egg; L1-L6: 1st-6th instar larvae; PU: pupa; AD: adult; HD: head; TH: thorax; AB: abdomen.

图3 棉铃虫 *nAChR-α7* 基因在不同发育阶段(A)和不同组织(B)中的表达

Fig. 3 The expression levels of *nAChR-α7* in different developmental stages (A) and different tissues (B) in *H. armigera*
图中数据为平均数±标准误。不同小写字母表示经 LSD 法检验在 $P < 0.001$ 水平差异显著。Data are mean±SE. Different letters indicate significant difference at $P < 0.001$ level by LSD test.

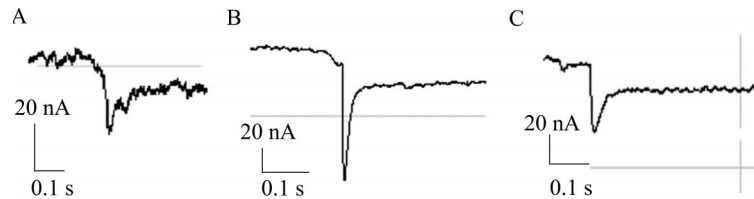
2.3 棉铃虫 *nAChR-α7* 基因电生理学特性

nAChR-α7 基因在非洲爪蟾卵母细胞中成功表

达,双电极电压钳记录结果表明,表达 *nAChR-α7* 的细胞在受到 10^{-6} mmol/L Ach 刺激时,检测到 38.6 nA

微弱电流(图4-A),但随着ACh浓度升高,未能检测到电流变化。在非洲爪蟾卵母细胞中共表达*nAChR- α 7*基因与*nAChR β 2*基因,且受到 10^{-6} mmol/L ACh刺激时,检测到了153.5 nA 轻微的电流(图4-

B),再用 10^{-5} mmol/L ACh进行刺激,检测到67.1 nA 电流(图4-C)。将ACh浓度再升高为 10^{-4} mmol/L 则未能检测到电流变化。



A: 使用 10^{-6} mmol/L ACh刺激时,在非洲爪蟾卵母细胞中表达*nAChR- α 7*基因; B: 使用 10^{-6} mmol/L ACh刺激在爪蟾卵母细胞中共表达*nAChR- α 7*基因与*nAChR β 2*基因; C: 使用 10^{-5} mmol/L ACh刺激在非洲爪蟾卵母细胞中共表达*nAChR- α 7*基因与*nAChR β 2*基因。 A: The current in *nAChR- α 7*-expressed *Xenopus oocytes* under the stimulation with 10^{-6} mmol/L ACh; B: the current in *nAChR- α 7*- and *β 2* subunit-expressed *X. oocytes* under the stimulation with 10^{-6} mmol/L ACh; C: the current in *nAChR- α 7*- and *β 2* subunit-expressed *X. oocytes* under the stimulation with 10^{-5} mmol/L ACh.

图4 非洲爪蟾细胞对乙酰胆碱的电流反应

Fig. 4 Current responses of cells of *Xenopus oocytes* elicited by acetylcholine

2.4 棉铃虫*nAChR- α 7*基因的功能

为了验证*nAChR- α 7*基因对棉铃虫幼虫生长发育和生命活动的影响,本试验将棉铃虫3龄幼虫进行了*nAChR- α 7*基因干扰,结果表明,注射siRNA 24 h

后,*nAChR- α 7*基因的转录水平显著降低,在48 h和72 h时持续显著降低($P<0.001$,图5-A)。同时于第1、2、5和7天观察幼虫存活状况,均未发现幼虫死亡,也未发现体重存在显著差异(图5-B)。

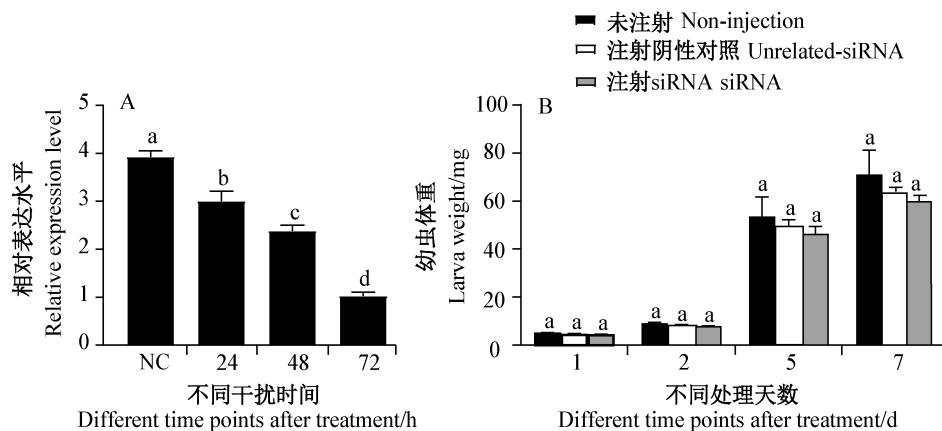


图5 棉铃虫*nAChR- α 7*基因干扰后的转录分析(A)及体重(B)

Fig. 5 Transcriptional expression of *nAChR- α 7* subunit in *Helicoverpa armigera* and the change in the body weights of larvae after RNA interference

NC: 阴性对照。图中数据为平均数 $\pm$ 标准误。不同小写字母表示经LSD法检验在 $P<0.001$ 水平差异显著。NC: Negative control. Data are mean $\pm$ SE. Different letters indicate significant difference at $P<0.001$ level by LSD test.

3 讨论

nAChR 是杀虫剂的重要靶标,迄今为止人们对昆虫*nAChR*亚基进行了较为广泛的研究。其中,在黑腹果蝇、西方蜜蜂*Apis mellifera*和冈比亚按蚊*Anopheles gambiae*、棉铃虫、小菜蛾(Baxter et al., 2010; Wang et al., 2016; 2020a)、西花蓟马*Frankliniella occidentalis*(Wan et al., 2018)、橘小实蝇*Bactro-*

cera dorsalis(Hsu et al., 2012)、地中海实蝇*Ceratitis capitata*(Ureña et al., 2019)等昆虫中*nAChR- α 6*基因已被克隆到。此外,棉铃虫和美洲大蠊*Periplaneta americana*的*nAChR- α 7*基因(Cartereau et al., 2020; Wang et al., 2020b)、马铃薯甲虫*Leptinotarsa decemlineata*的*nAChRs- α 4*、*nAChRs- α 5*、*nAChRs- α 7*和*nAChRs- α 9*基因等(李晨歌等, 2014; 解林杰等, 2018)以及美国白蛾*Hyphantria cunea*的12种

nAChR 基因等(武建业等, 2019)也被鉴定到。本研究鉴定到的棉铃虫 *nAChR- $\alpha 7$* 基因, 具有 nAChR 基本结构, 每个 nAChR 亚基均由胞外 N 端配体结合区、半胱氨酸环、Loop A~Loop F 及跨膜区(TM1~TM4)(其中 TM2 排列在离子通道上)和 1 个短的 C 端胞外尾(Wang et al., 2020b)。进化分析发现棉铃虫 *nAChR- $\alpha 7$* 基因和其他鳞翅目昆虫如草地贪夜蛾、烟芽夜蛾、粉斑夜蛾等 *nAChR- $\alpha 7$* 基因的同源性极高, 且与烟芽夜蛾 *nAChR- $\alpha 7$* 基因氨基酸序列相似性为 100%, 推测该基因在鳞翅目害虫中可能具有相似功能。

昆虫的中枢神经系统遍布各个体节, 是其生命活动的控制中心, 一切都在神经网络中传递和反馈, 不但支配昆虫的行为和运动, 而且直接或间接影响内分泌系统, 调控昆虫生长发育和变态等。本研究结果显示棉铃虫 *nAChR- $\alpha 7$* 基因在棉铃虫头部高表达, 而且在成虫期的表达量显著高于其他发育时期, 产生上述现象可能与昆虫头部神经系统最发达, 含有丰富的突触结构有关; 鳞翅目成虫比幼虫、蛹等更活跃, 其需要进行飞行、觅食、求偶、交配、产卵等复杂行为, 因此需要更强大的神经系统。这与其他研究结果类似, 如马铃薯甲虫 *nAChRs- $\alpha 4$* 基因在成虫期表达量最高(李晨歌等, 2014); 小菜蛾 *nAChRs- $\alpha 8$* 基因也在成虫期表达量最高(赵宇等, 2009); 果蝇中 *nAChR- $\alpha 7$* 基因在果蝇逃避行为中具有重要作用(Fayyazuddin et al., 2006)。但不同昆虫的 nAChR 亚基在不同阶段的表达量存在较大差异, 如马铃薯甲虫 *nAChRs- $\alpha 4$* 基因在成虫期表达量最高, 而 *nAChRs- $\alpha 7$* 和 *nAChRs- $\alpha 9$* 基因的表达量分别在 3 龄幼虫期和蛹期最高(李晨歌等, 2014)。这可能是由于不同 nAChR 亚基在不同阶段发挥不同功能, 其具体功能还需要进一步验证。

在非洲爪蟾卵母细胞中异源表达 *nAChR- $\alpha 7$* 基因后, 通过电生理学检测, 发现棉铃虫 *nAChR- $\alpha 7$* 基因单独表达可对乙酰胆碱刺激产生响应; 与鼠 *nAChR $r\beta 2$* 基因以 1:1 共同表达, 也能检测到明显的电流变化, 表明其与蟑螂 *nAChR- $\alpha 7$* 基因功能类似, 都能响应乙酰胆碱信号(Cartereau et al., 2020); 同时该基因在头部特异性表达, 结合电生理结果表明该基因是一个乙酰胆碱受体, 在神经信号传导中有一定作用。然而不同剂量乙酰胆碱刺激却没有在同一个细胞中产生连续的刺激反应。同时, 棉铃虫 *nAChR- $\alpha 7$* 基因对棉铃虫生长发育未产生明显影响,

这与 Wang et al. (2020b) 的结果一致, 即在棉铃虫中通过 CRISPR-cas9 技术敲除 *nAChR- $\alpha 7$* 基因后, 棉铃虫生长发育无显著变化, 表明该基因不参与棉铃虫生长发育调控, 而且敲除该受体基因后, 多杀菌素、乙基多杀菌素、苯甲酸酯、高效氯氰菊酯、氯虫腈和茚虫威对棉铃虫的毒力也无显著影响。与此同时, 一些学者认为多杀菌素类杀虫剂的作用靶标是 $\alpha 6$ 亚基, 昆虫对其抗性的产生也是由靶标不敏感引起。在小菜蛾、西花蓟马中也有 $\alpha 6$ 亚基基因突变介导其抗性的相关报道(Baxter et al., 2010; Puinean et al., 2013)。此外, 基于 CRISPR-cas9 技术也证实敲除 *nAChRs- $\alpha 6$* 基因会使多种鳞翅目昆虫对多杀菌素类杀虫剂产生很高抗性(Wang et al., 2020a, b; Zuo et al., 2020), 这些研究也排除了棉铃虫 *nAChR- $\alpha 7$* 基因作为多杀菌素杀虫靶点的可能(Wang et al., 2020b)。然而, 不同亚型的 *nAChR* 基因可以共同形成功能性受体(Lansdell et al., 2012)。因此, 推测该基因不是主要的乙酰胆碱受体基因亚型, 而是和其他 *nAChR* 基因亚型共同发挥作用, 以调控信号传递或生理反应, 其具体功能还有待进一步研究。

参 考 文 献 (References)

- Bai DL, Lummis SCR, Leicht W, Breer H, Sattelle DB. 1991. Actions of imidacloprid and a related nitromethylene on cholinergic receptors of an identified insect motor-neuron. *Pesticide Science*, 33(2): 197-204
- Baxter SW, Chen M, Dawson A, Zhao JZ, Vogel H, Shelton AM, Heckel DG, Jiggins CD. 2010. Misspliced transcripts of nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 6$ are associated with field evolved spinosad resistance in *Plutella xylostella* (L.). *PLoS Genetics*, 6(1): e1000802
- Bicker G. 1999. Histochemistry of classical neurotransmitters in antennal lobes and mushroom bodies of the honeybee. *Microscopy Research and Technique*, 45(3): 174-183
- Brown LA, Ihara M, Buckingham SD, Matsuda K, Sattelle DB. 2006. Neonicotinoid insecticides display partial and super agonist actions on native insect nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Neurochemistry*, 99(2): 608-615
- Cartereau A, Taillebois E, Selvam B, Martin C, Graton J, Le Questel JY, Thany SH. 2020. Cloning and expression of cockroach $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor subunit. *Frontiers in Physiology*, 11: 418
- Changeux JP, Edelstein SJ. 2006. Allosteric receptors after 30 years. *Rendiconti Lincei*, 17(1): 59-96
- Charaabi K, Boukhris-Bouhachem S, Makni M, Denholm I. 2018. Occurrence of target-site resistance to neonicotinoids in the aphid *Myzus persicae* in Tunisia, and its status on different host plants.

- Pest Management Science, 74(6): 1297–1301
- Chen CY, Shi XY, Desneux N, Han P, Gao XW. 2017. Detection of insecticide resistance in *Bradysia odoriphaga* Yang et Zhang (Diptera: Sciaridae) in China. *Ecotoxicology*, 26: 868–875
- Cordova D, Benner EA, Schroeder ME, Holyoke CW Jr., Zhang WM, Pahutski TF, Leighty RM, Vincent DR, Hamm JC. 2016. Mode of action of triflumezopyrim: a novel mesoionic insecticide which inhibits the nicotinic acetylcholine receptor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 74: 32–41
- Fayyazuddin A, Zaheer MA, Hiesinger PR, Bellen HJ. 2006. The nicotinic acetylcholine receptor *Dα7* is required for an escape behavior in *Drosophila*. *PLoS Biology*, 4(3): e63
- Grauso M, Reenan RA, Culetto E, Sattelle DB. 2002. Novel putative nicotinic acetylcholine receptor subunit genes, *Dα5*, *Dα6* and *Dα7*, in *Drosophila melanogaster* identify a new and highly conserved target of adenosine deaminase acting on RNA-mediated A-to-I pre-mRNA editing. *Genetics*, 160(4): 1519–1533
- Hsu JC, Feng HT, Wu WJ, Geib SM, Mao CH, Vontas J. 2012. Truncated transcripts of nicotinic acetylcholine subunit gene *Bda6* are associated with spinosad resistance in *Bactrocera dorsalis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42(10): 806–815
- Huseth AS, Chappell TM, Chitturi A, Jacobson AL, Kennedy GG. 2018. Insecticide resistance signals negative consequences of widespread neonicotinoid use on multiple field crops in the U.S. cotton belt. *Environmental Science & Technology*, 52(4): 2314
- Ihara M, Hikida M, Matsushita H, Yamanaka K, Kishimoto Y, Kubo K, Watanabe S, Sakamoto M, Matsui K, Yamaguchi A, et al. 2018. Loops D, E and G in the *Drosophila* *Dα1* subunit contribute to high neonicotinoid sensitivity of *Dα1* chicken $\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor. *British Journal of Pharmacology*, 175(11): 1999–2012
- Kagabu S. 2011. Discovery of imidacloprid and further developments from strategic molecular designs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(7): 2887–2896
- Lansdell SJ, Collins T, Goodchild J, Millar NS. 2012. The *Drosophila* nicotinic acetylcholine receptor subunits *Dα5* and *Dα7* form functional homomeric and heteromeric ion channels. *BMC Neuroscience*, 13: 73
- Levin ED, Simon BB. 1998. Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals. *Psychopharmacology*, 138: 217–230
- Li CG, Ju Y, Han ZJ, Jiang WH. 2014. Cloning and expression analysis of three genes encoding nicotinic acetylcholine receptor subunit in *Leptinotarsa decemlineata*. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 37(3): 65–71 (in Chinese) [李晨歌, 琚阳, 韩召军, 姜卫华. 2014. 马铃薯甲虫 3 个烟碱型乙酰胆碱受体 α 亚基基因的克隆及表达分析. 南京农业大学学报, 37(3): 65–71]
- Liang GM, Tan JW, Guo YY. 1999. An improvement in the technique of artificial rearing cotton bollworm. *Plant Protection*, 25(2): 15–17 (in Chinese) [梁革梅, 谭维嘉, 郭予元. 1999. 人工饲养棉铃虫技术的改进. 植物保护, 25(2): 15–17]
- Liu SS, Wang M, Li XC. 2015. Overexpression of Tyrosine hydroxylase and Dopa decarboxylase associated with pupal melanization in *Spodoptera exigua*. *Science Reports*, 5: 11273
- Marchler-Bauer A, Lu SN, Anderson JB, Chitsaz F, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, Fong JH, Geer LY, Geer RC, Gonzales NR, et al. 2011. CDD: a conserved domain database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Research*, 39(Database): 225–229
- Millar NS, Denholm I. 2007. Nicotinic acetylcholine receptors: targets for commercially important insecticides. *Invertebrate Neuroscience*, 7(1): 53–66
- Nauen R, Jeschke P, Velten R, Beck ME, Ebbinghaus-Kintscher U, Thielert W, Wölfel K, Haas M, Kunz K, Raupach G. 2015. Flupyradifurone: a brief profile of a new butenolide insecticide. *Pest Management Science*, 71(6): 850–862
- Perry T, McKenzie JA, Batterham P. 2007. A *Dα6* knockout strain of *Drosophila melanogaster* confers a high level of resistance to spinosad. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(2): 184–188
- Puinean AM, Lansdell SJ, Collins T, Bielza P, Millar NS. 2013. A nicotinic acetylcholine receptor transmembrane point mutation (G275E) associated with resistance to spinosad in *Frankliniella occidentalis*. *Neurochemistry*, 124(5): 590–601
- Salgado VL. 1998. Studies on the mode of action of spinosad: insect symptoms and physiological correlates. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 60(2): 91–102
- Sene SQ, Tendeng E, Diatte M, Sylla ES, Labou B, Diallo AW, Diarra K. 2020. Insecticide resistance in field populations of the tomato fruitworm, *Helicoverpa armigera*, from Senegal. *Journal of Biological Chemistry Science*, 14(1): 181–191
- Sine SM, Engel AG. 2006. Recent advances in Cys-loop receptor structure and function. *Nature*, 440(7083): 448–455
- Thany SH, Lenaers G, Raymond-Delpech V, Sattelle DB, Lapied B. 2007. Exploring the pharmacological properties of insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 28(1): 14–22
- Thompson AJ, Lester HA, Lummis SCR. 2010. The structural basis of function in Cys-loop receptors. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 43(4): 449–499
- Ureña E, Guillem-Amat A, Couso-Ferrer F, Beroiz B, Perera N, López-Errasquín E, Castañera P, Ortego F, Hernández-Crespo P. 2019. Multiple mutations in the nicotinic acetylcholine receptor *Cca6* gene associated with resistance to spinosad in medfly. *Scientific Reports*, 9: 2961
- Wan YR, Yuan GD, He BQ, Xu BY, Xie W, Wang SL, Zhang YJ, Wu QJ, Zhou XG. 2018. Focca6, a truncated nAChR subunit, positively correlates with spinosad resistance in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 99: 1–10
- Wang J, Ma HH, Zuo YY, Yang YH, Wu YD. 2020b. CRISPR-mediated

- ed gene knockout reveals nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subunit $\alpha 6$ as a target of spinosyns in *Helicoverpa armigera*. *Pest Management Science*, 76(9): 2925–2931
- Wang J, Wang XL, Lansdell SJ, Zhang JH, Millar NS, Wu YD. 2016. A three amino acid deletion in the transmembrane domain of the nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 6$ subunit confers high-level resistance to spinosad in *Plutella xylostella*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 71: 29–36
- Wang QQ, Rui CH, Wang L, Nahiyoona SA, Huang WL, Zhu JS, Ji XJ, Yang QJ, Yuan HZ, Cui L. 2021. Field-evolved resistance to 11 insecticides and the mechanisms involved in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Management Science*, <https://doi.org/10.1002/ps.6548>
- Wang XL, Ma YM, Wang FL, Yang YH, Wu SW, Wu YD. 2020a. Disruption of nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 6$ mediated by CRISPR/Cas9 confers resistance to spinosyns in *Plutella xylostella*. *Pest Management Science*, 76(5): 1618–1625
- Watson GB. 2001. Action of insecticidal spinosyns on gaminbutyric acid responses from small-diameter cockroach neurons. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 71(1): 20–28
- Watson GB, Loso MR, Babcock JM, Hasler JM, Letherer TJ, Young CD, Zhu YM, Casida JE, Sparks TC. 2011. Novel nicotinic action of the sulfoximine insecticide sulfoxaflor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(7): 432–439
- Wei JZ, Yao X, Yang SY, Liu SK, Zhou S, Cen J, Liu XG, Du MF, Tang QB, An SH. 2021. Suppression of calcineurin enhances the toxicity of Cry1Ac to *Helicoverpa armigera*. *Front Microbiology*, 12: 634619
- Wu JY, Hao XL, Li JX, Zhou YX, Wang YL. Screening and identification of nicotinic acetylcholine receptors in *Hyphantria cunea*. *Journal of Northeast Forestry University*, 47(12): 95–99 (in Chinese) [武建业, 郝锡联, 李嘉新, 周宇鑫, 王寅亮. 2019. 美国白蛾乙酰胆碱受体基因的筛选与鉴定. 东北林业大学学报, 47(12): 95–99]
- Wu KM. 2007. Monitoring and management strategy for *Helicoverpa armigera* resistance to Bt cotton in China. *Journal of Invertebrate Pathology*, 95(3): 220–223
- Wu KM, Guo YY. 2005. The evolution of cotton pest management practices in China. *Annual Review of Entomology*, 50(1): 31–52
- Xie LJ, Li S, Jiang WH. 2018. Cloning and expression profile of nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 5$ subunit gene from *Leptinotarsa decemlineata*. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 41(2): 293–301 (in Chinese) [解林杰, 李莎, 姜卫华. 2018. 马铃薯甲虫烟碱型乙酰胆碱受体 $\alpha 5$ 亚基基因的克隆及其表达模式分析. 南京农业大学学报, 41(2): 293–301]
- Zhang LL. 2014. The stress effects of spinetoram on *Helicoverpa armigera* and its influence on natural enemies. Ph. D thesis. Beijing: China Agricultural University (in Chinese) [张丽丽. 2014. 乙基多杀菌素对棉铃虫的胁迫效应及对天敌影响研究. 博士学位论文. 北京: 中国农业大学]
- Zhang SD, An SH, Li Z, Wu FM, Yang QP, Liu YC, Cao JJ, Zhang HJ, Zhang QW, Liu XX. 2015. Identification and validation of reference genes for normalization of gene expression analysis using qRT-PCR in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Gene*, 555(2): 393–402
- Zhang SD, An SH, Zhen L, Wu FM, Yang QP, Liu YC, Gao JJ, Zhang HJ, Zhang QW, Liu XX. 2014. Identification and validation of reference genes for normalization of gene expression analysis using qRT-PCR in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Gene*, 555(2): 393–402
- Zhao Y, Yang YH, Wu SW, Wu YD. 2009. Cloning, sequence analysis and developmental expression of a cDNA encoding nicotinic acetylcholine receptor α subunit from *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). *Acta Entomologica Sinica*, 52(1): 17–26 (in Chinese) [赵宇, 杨亦桦, 武淑文, 吴益东. 2009. 小菜蛾烟碱型乙酰胆碱受体 α 亚基cDNA的克隆、序列分析与不同发育阶段表达分析. 昆虫学报, 52(1): 17–26]
- Zuo YY, Xue YX, Lu WJ, Ma HH, Chen MH, Wu YD, Yang YH, Hu ZN. 2020. Functional validation of nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) $\alpha 6$ as a target of spinosyns in *Spodoptera exigua* utilizing the CRISPR/Cas9 system. *Pest Management Science*, 76(7): 2415–2422

(责任编辑:王璇)