

文章编号: 1674-7054(2020)03-0281-07

天维菌素处理埃及伊蚊幼虫的转录组学分析

王子贺, 兰坚强, 廖承红, 韩 谦

(海南大学 生命科学与药学院 热带动物医学与病媒生物学实验室, 海口 570228)

摘要: 为探索新型大环内酯类杀虫剂天维菌素对蚊虫防控的应用前景, 进一步了解天维菌素对蚊虫的作用机制, 本研究利用转录组测序技术研究埃及伊蚊幼虫参与药物代谢及靶标等生物学过程的基因。利用高通量测序获取给药前后埃及伊蚊的差异表达基因, 进一步进行 Gene Ontology(GO)及 KEGG 富集分析, 并利用 Real-time Quantitative PCR(rt-qPCR)验证目标基因表达情况。结果显示, 与对照组相比, 天维菌素处理后埃及伊蚊幼虫中有 2 647 个基因差异显著表达, 其中上调基因有 697 个, 下调表达的基因有 1 950 个。Gene Ontology 分析显示, 测序基因主要注释到细胞过程、代谢过程、膜、结合和催化活性等功能类。KEGG 通路主要富集在药物代谢、免疫应答、生物合成以及消化与吸收等过程。选取 GST-1, EST2 等 6 个目标基因进行 rt-qPCR 验证, 表达水平与测序结果一致。

关键词: 天维菌素; 埃及伊蚊; RNA-Seq

中图分类号: Q 786 ; R 384.1

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2020.03.004

埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*) 是虫媒病的主要传播媒介之一, 雌蚊通过吸血传播登革热病毒、基孔肯亚病毒、寨卡病毒和黄热病病毒等多种病毒^[1-2], 严重危害人类的健康。2015 年 CDC 报告指出, 蚊虫在全球范围内造成了近一亿虫媒病病例, 有效的蚊虫防控有利于公共卫生与健康。目前蚊虫防控主要包括环境防控、物理防控、化学防控和生物防控等方法, 其中又主要依赖化学防控^[3]。化学防控具有高效、简单、广谱等优点, 常见的有拟除虫菊酯类、氨基甲酸酯类、有机磷、有机氯^[4]、伊维菌素^[5]和多杀菌素^[6-7]等, 但随着杀虫剂的大量及不合理使用, 导致蚊虫对杀虫剂产生严重的抗性^[8-11], 探索新型杀虫剂对蚊虫防控具有重要意义。天维菌素(Tenvermectin, TVM)是一种新型十六元大环内酯类杀虫剂, 是从基因工程菌链霉菌 MHJ1011 的发酵液中分离纯化的代谢产物。通过对阿维菌素产生菌(*S. avermitilis*)与米尔贝霉素(*S. hygroscopicus*)产生菌进行基因工程改造, 从其代谢物中分离得到 TVM A 和 TVM B 两种有效成分^[12]。有研究表明, 天维菌素对小菜蛾(*Plutella xylostella*)、粘棉铃虫(*Plutella xylostella*)、松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus*)、朱砂叶螨(*Tetranychus cinnabarinus*)、柑橘红蜘蛛(*Panonychus citri*)和二斑叶螨(*Tetranychus urticae*)均有较高的杀虫活性^[13-14]。本实验室的研究结果证明了大环内酯类抗寄生虫药伊维菌素、多杀菌素等对埃及伊蚊有非常好的杀灭作用^[15]; 本实验室的前期实验结果表明, 天维菌素对埃及伊蚊也具有一定的杀灭作用, 但尚不清楚其作用机制。本研究以埃及伊蚊敏感株为实验材料, 使用天维菌素处理埃及伊蚊幼虫, 利用转录组测序并结合生物信息学分析, 在转录组水平上比较埃及伊蚊幼虫在给药前后的基因表达差异, 并利用 Real-time Quantitative PCR(rt-qPCR)对差异表达基因进行验证。本研究在转录组水平上探究天维菌素对埃及伊蚊幼虫的作用机制, 旨在为深入研究埃及伊蚊对天维菌素的抗性机制奠定基础。

收稿日期: 2020-03-12

修回日期: 2020-04-03

基金项目: 国家自然科学基金(31472186, 31860702); 海南省重点研发计划项目(DZYF2019073)

第一作者: 王子贺(1993-), 男, 海南大学生命科学与药学院 2017 级硕士研究生. E-mail: 1005839621@qq.com

通信作者: 韩谦(1963-), 男, 教授. 研究方向: 热带兽医学与媒介生物学. E-mail: qianhan@hainu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 埃及伊蚊幼虫的药物处理实验 供试埃及伊蚊幼虫由海南大学生命科学与药学院热带动物医学与媒介生物学实验室提供。将 $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 天维菌素用二甲基亚砜(DMSO)梯度稀释为 $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 稀释液,然后将 1 mL 天维菌素稀释液加入至 99 mL 的过夜去氯水里使天维菌素处理液的终浓度为 $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (T),同时在对照组(Control)中加入 1 mL 二甲基亚砜,每处理组设 3 次重复。将 20 只 3 龄末 4 龄初的埃及伊蚊幼虫放入盛有天维菌素处理液或对照组处理液的杯中,处理 24 h 后统计并移除死亡幼虫,收集存活蚊虫用于下游转录组分析。

1.2 埃及伊蚊幼虫总 RNA 的提取 采用 Trizol 法^[6]提取药物处理组和对照组幼虫的总 RNA,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,并用微量核酸检测仪测 RNA 浓度和纯度。利用 Nanodrop 及 Bioanalyzer 进行 RNA 质量验证。

1.3 埃及伊蚊幼虫转录组测序及分析 用带有 Oligo(dT) 的磁珠富集有 polyA 尾巴的 mRNA,然后用 DNA 探针杂交 rRNA,去除 rRNA 纯化后即得到所需 RNA。以获得的片段化 RNA 为模板,用随机的 N6 引物进行反转录得到 cDNA,将 cDNA 末端补平,5'端磷酸化,3'段连接接头后进行 PCR,PCR 产物热变性成单链,再用一段桥式引物将单链 DNA 环化得到单链环状 DNA 文库,测序由华大基因有限公司完成。获得的转录组数据利用生物信息学方法进行数据过滤,基因组比对,差异表达分析及基因注释等。

1.4 差异表达基因的实时荧光定量 PCR 验证 选取 6 个差异表达基因(Cuticle protein 19, Tetraspanin-11-like, Glycine-rich cell wall structural, Cuticle protein, Glutathione S-transferase-1, Carboxylesterase 2),利用 Primer 5 软件设计定量 PCR 引物(表 1),以 RPS17 为内参基因,每个样品设 3 个重复,利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因表达量。

表 1 荧光定量 PCR 引物

Tab. 1 Primers for fluorescence quantitative PCR

基因Gene	正向引物Forward primer	反向引物Reverse primer
<i>Cuticle protein 19</i>	GGGGATGTCGTTAAGGGAG	TTGTGGTGGTCGGATTG
<i>Tetraspanin-11-like</i>	TGGACCGTAGTGGATAAGAA	GTCGCAATCAGCACATAGA
<i>Glycine-rich cell wall structural</i>	CGATAGGTGGACAGGGAC	AAACTGTGGACCGAAAGG
<i>Cuticle protein</i>	TCTTGAGCTGCTCCACTCA	TTCCTGCTGGGACTTCTG
<i>Glutathione S-transferase-1</i>	AAGCCGAAGAGCACAAGA	GACTCCACCAGGTAGACCA
<i>Carboxylesterase 2</i>	GCAAAGCGATGAACATAA	TACTGGTTGAACGGGACT
<i>Ribosomal protein S17</i>	AAGAAGTGCCATCATTCCA	GGTCTCCGGGTCGACTTC

2 结果与分析

2.1 埃及伊蚊幼虫转录组测序分析 对埃及伊蚊幼虫对照组(Control 1-3)和处理组(T1-3)的 RNA 样本进行转录组测序,样品比对基因组的平均比率为 90.89%,比对基因集的平均比率为 87.88%;样品比对基因组和比对基因集分别得到 14 748, 14 679, 14 667 个 Unigene 和 14 354, 14 402, 14 356 个 Unigene,这表明埃及伊蚊幼虫表达的基因数量大约为 14 500 个左右。从各个样品基因表达分布图(图 1)可见,对照组和处理组的极低表达水平和中高表达水平基因数均接近,较低表达水平基因数则偏高,且处理组和对照组的组内 3 个重复之间的重复度较好。

2.2 埃及伊蚊幼虫差异表达基因的筛选 比较药物处理组与对照组的基因表达量,当基因差异倍数(Fold Change)为 2 倍及以上并且 $P \leq 0.05$ 时,即 $\log_2(\text{FoldChange}) \leq -1$ 或 $\log_2(\text{FoldChange}) \geq 1$ 的基因,筛选为显著差异表达基因。通过差异表达基因数量的分析共筛选出 2 647 个表达差异显著的基因,其中上调表达的基因有 697 个,下调表达的基因有 1 950 个(图 2-A)。差异基因表达量的火山图(图 2-B)表明,在差异表达的基因中,上调表达的基因 93.54% 主要分布在 $\log_2(\text{FoldChange})$ 绝对值 1 ~ 5 之间;下调表达的基因 98.31% 分布在 $\log_2(\text{FoldChange})$ 绝对值 1 ~ 10 之间,极少部分(1.69%)分布在 $\log_2(\text{Fold}$

Change) 绝对值大于 10 倍的范围。差异基因表达量聚类热图(图 2-C)可见, 药物处理组与对照组基因总的表达趋势或表达变化趋势存在差异, 但是药物处理组的组内 3 个样品表达趋势或表达变化趋势相似, 对照组的组内 3 个样品表达趋势或表达变化趋势相似, 表明组内样本的重复性好, 数据的可信度较高。

2.3 埃及伊蚊幼虫差异表达基因的 GO 功能富集分析 对差异表达基因进行 GO(Gene Ontology) 富集分析, 共得到 40 个显著富集的 GO 功能条目, 分为分子功能(Molecular function)、细胞组分(Cellular component)和生物过程(Biological process)三大功能类(图 3)。在分子功能类别里, 有 686 个差异表达基因, 其中结合(Binding)、催化活性(Catalytic activity)、结构分子活性(Structural molecule activity)和转运活性(Transporter activity)

中包含的差异基因最多; 细胞组分类别中, 差异表达基因数量为 463 个, 主要富集在细胞(Cell)、膜(Membrane)、细胞器(Organelle); 富集到生物过程中的差异表达基因有 323 个, 其中细胞过程(Cellular process)、生物调节(Biological regulation)和代谢过程(Metabolic process)富集水平最高。

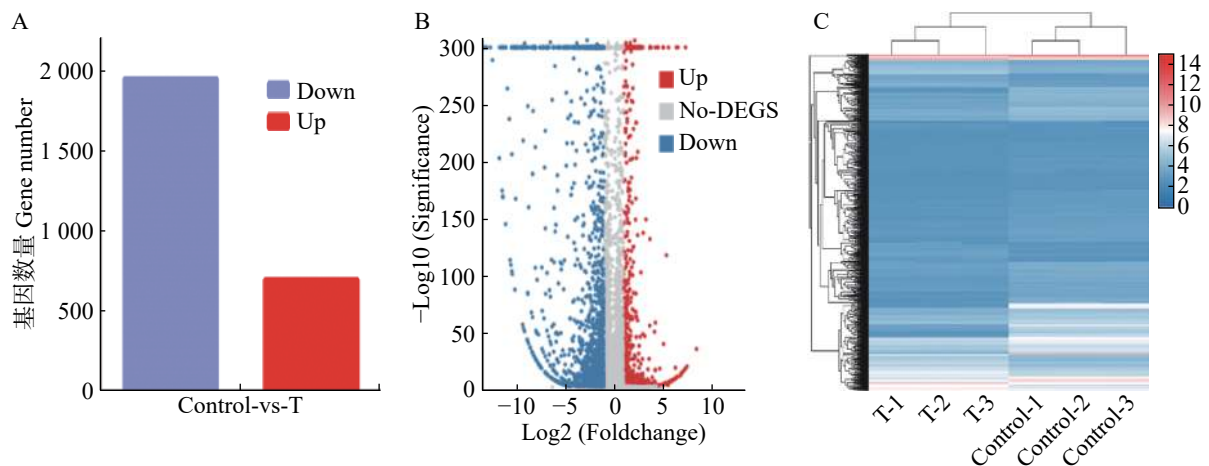


图 2 埃及伊蚊幼虫差异表达基因数量的分析

A 为差异基因表达量的统计图; B 为差异基因表达量的火山图; C 为差异基因表达量的聚类热图, 横坐标轴表示样本的 $\log_2(\text{FPKM}+1)$, 纵坐标轴表示基因。

Fig. 2 Analysis of the quantity of differentially expressed genes

A. The statistical map of differential gene expression; B. The volcano map of differential gene expression; C. The clustering heat map of differential gene expression. The horizontal axis represents the $\log_2(\text{FPKM} + 1)$ of the sample, and the vertical axis represents the gene.

2.4 埃及伊蚊幼虫差异表达基因 KEGG pathway 富集分析 对埃及伊蚊幼虫差异基因进行 KEGG pathway 生物通路注释分类及富集分析, 将基因参与的 KEGG 代谢通路分为 6 个分支: 细胞过程(Cellular Processes)、环境信息处理(Environmental Information Processing)、遗传信息处理(Genetic Information Processing)、人类疾病(Human Disease)(仅限动物)、代谢(Metabolism)、有机系统(Organismal Systems)。根据 KEGG pathway 注释分类, 对数据进行富集分析, 由差异基因 KEGG Pathway 富集气泡图(图 4)可见, 差异基因主要富集在嘧啶代谢(Pyrimidine metabolism)、嘌呤代谢(Purine metabolism)、蛋白

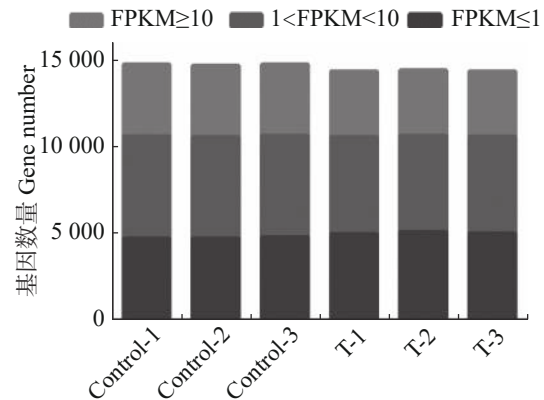


图 1 埃及伊蚊幼虫各样品基因表达量分布

FPKM ≤ 1 的为极低表达水平的基因, $1 < \text{FPKM} < 10$ 的为较低表达水平的基因, FPKM ≥ 10 的为中高表达水平的基因。

Fig. 1 Distribution of gene expression in each sample

The genes with FPKM ≤ 1 are very low in expression, the genes with $1 < \text{FPKM} < 10$ are relatively low in expression, and the genes with FPKM ≥ 10 are moderately high in expression.

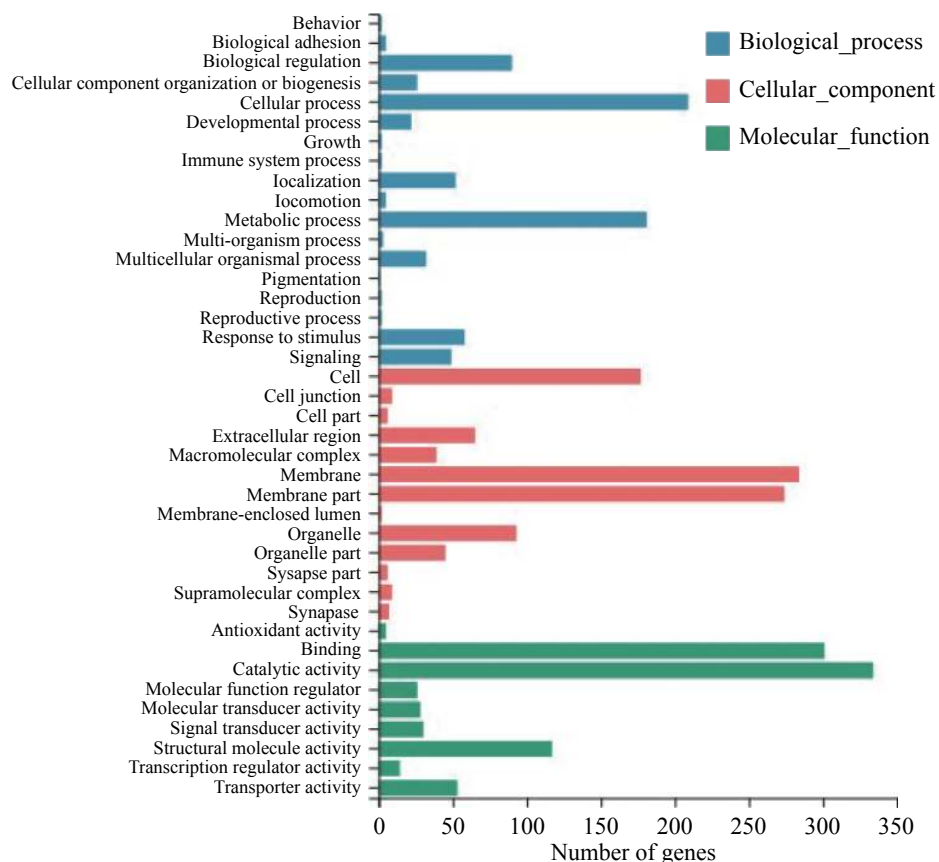


图 3 埃及伊蚊幼虫差异表达基因 GO 功能富集分析

Fig. 3 GO enrichment results of differentially expressed genes of *Aedes aegypti* treated with tenvermectin

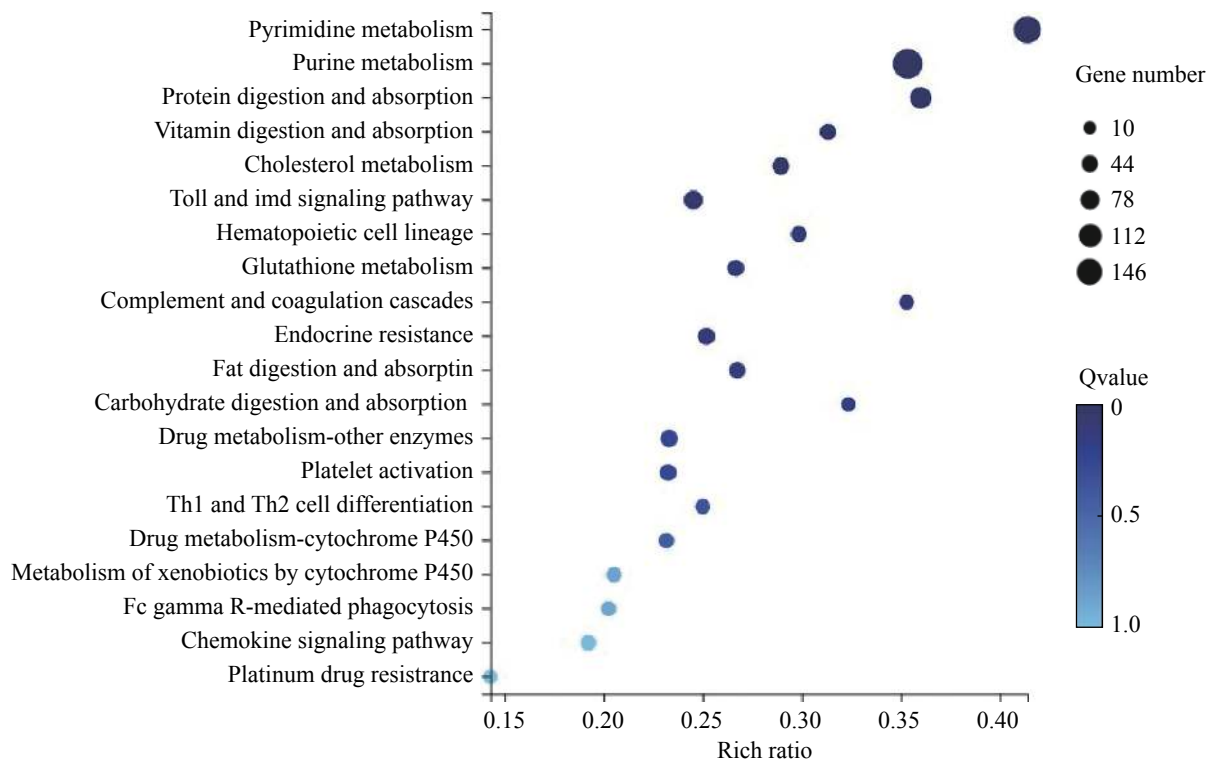


图 4 差异表达基因 KEGG pathway 富集分析

Fig. 4 KEGG enrichment results of differentially expressed genes of *Aedes aegypti* treated with tenvermectin

质的消化与吸收(Protein digestion and absorption)、Toll 和 Imd 信号通路(Toll and Imd signaling pathway)、细胞色素 P450 对异生物素的代谢(Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450)、谷胱甘肽代谢(Glutathione metabolism)、药物代谢-其他酶(Drug metabolism-other enzymes)等通路, 主要富集在代谢、免疫应答、生物合成以及消化与吸收等过程。

2.5 埃及伊蚊幼虫差异表达基因的实时荧光定量 PCR 验证 为验证 RNA-Seq 数据的准确性, 从表达差异基因中随机挑选 6 个基因, 其中 3 个是表达上调基因 *GST-1*, *TS11* 和 *CarE2*, 另外 3 个是表达下调基因 *CP*, *CP19* 和 *GCW*。结果(图 5)表明, 6 个基因的相对表达量与转录组测序结果变化趋势一样。

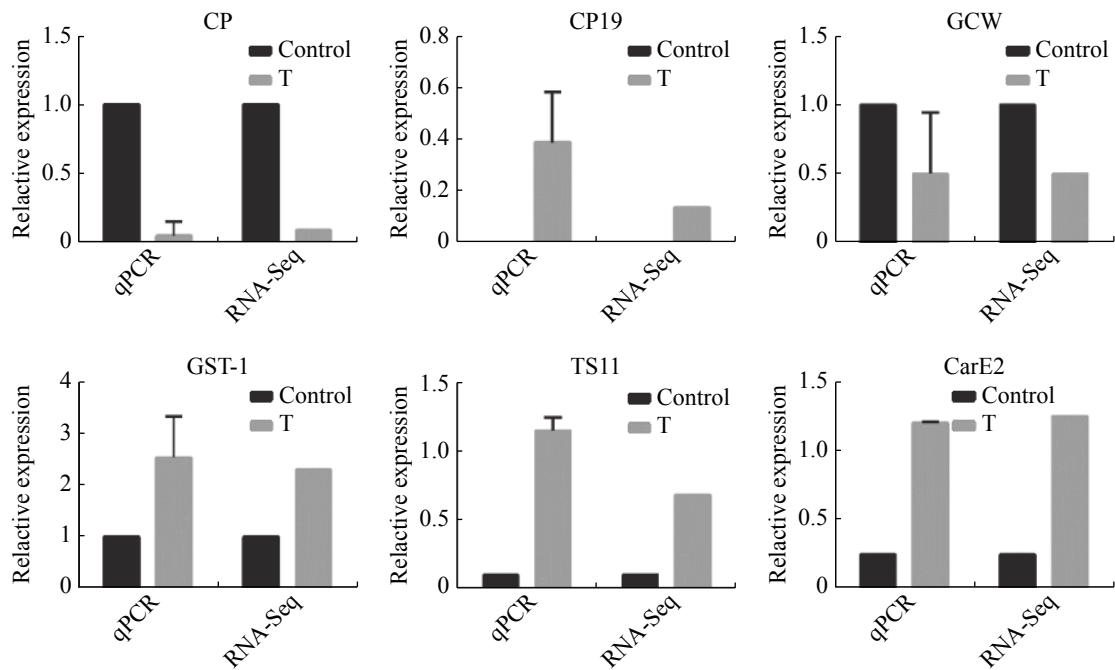


图 5 埃及伊蚊幼虫差异表达基因的 RNA-Seq 和 RT-PCR 的比较分析

Fig. 5 Comparison of differentially expression genes in *Aedes aegypti* larvae between RNA-Seq and qPCR analysis

3 讨论

RNA 测序(RNA-Seq)是一种高通量测序技术, 已成为全转录组基因表达分析的首选工具, RNA-Seq 最典型的应用是比较组之间差异表达基因的鉴定, 此技术目前被广泛应用于生命科学领域^[17-20]。本研究通过埃及伊蚊幼虫药物处理前后的比较转录组测序分析, 从测序结果中筛选出 2 647 个显著性差异表达的基因, 并对这些异基因进行 GO 功能富集分析和 KEGG pathway 富集分析。GO 功能富集分析表明, 分子功能、细胞组分和生物过程中的差异表达基因数均较多, 且主要集中在代谢过程、结合、催化活性、膜, 这些功能又与药物的吸收、运输、代谢有关。结果表明, 埃及伊蚊幼虫机体受到药物处理作出一系列反应, 推测其可能与药物代谢抗性有关, 这在后续实验中还有待进一步探究。

通过对差异基因 KEGG 通路分析, 信号通路主要集中于嘌呤嘧啶代谢、谷胱甘肽代谢、细胞色素 P450 对异生物素的代谢等。细胞色素 P450 对于外源性和内源性成分的解毒或激活作用至关重要^[21], 在其必需的电子供体 NADPH 细胞色素 P450 还原酶或细胞色素 b5 的作用下氧化。P450 基因转录上调, 导致 P450 蛋白水平和 P450 活性升高, 可增强昆虫体内杀虫剂的代谢解毒作用, 导致抗药性的发展^[22]。谷胱甘肽转移酶(glutathione S-transferase, GST)是一个大型多功能酶家族, 主要参与内源性和外源性化合物的解毒^[23]。GST 抗药性的主要机制是谷胱甘肽偶联反应, GST 催化还原谷胱甘肽与外源化合物结合, 增加了它的水溶性, 促进了它从细胞中排泄^[24-25]。本研究发现 GST 和细胞色素 P450 基因表达量在处理前后差异显著, 且 KEGG 分析, 注释到细胞色素 P450 对异生物素的代谢和谷胱甘肽代谢, 表明埃及伊蚊幼

虫对天维菌素的代谢得到加强。本研究通过 RNA-Seq, 筛选出埃及伊蚊经天维菌素处理前后表达差异的基因, 为进一步探究埃及伊蚊中天维菌素的毒理机制以及埃及伊蚊潜在的抗药性相关基因奠定了基础。

参考文献:

- [1] 廖承红, 兰坚强, 张磊, 等. 寨卡病毒——人兽健康新威胁[J]. *中国兽医杂志*, 2016, 52(4): 74 – 76.
- [2] MARTINEZ J D, GARZA J A C, CUELLAR-BARBOZA A. Going Viral 2019: Zika, Chikungunya, and Dengue [J]. *Dermatologic Clinics*, 2019, 37(1): 95 – 105.
- [3] 艾丽云, 侯娟, 陈恩富. 传染病重要传播媒介伊蚊控制技术进展[J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2017, 28(5): 508 – 511.
- [4] 刘玉娥. 蚊虫防治研究进展[J]. *农技服务*, 2011, 28(7): 1008 – 1009.
- [5] ŌMURA S, CRUMP A. Ivermectin and malaria control [J]. *Malaria Journal*, 2017, 16(1): 172.
- [6] DOS SANTOS DIAS L, MACORIS M L, ANDRIGHETTI M T, et al. Toxicity of spinosad to temephos-resistant *Aedes aegypti* populations in Brazil [J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): 1 – 15.
- [7] 张晓越, 孟凤霞, 刘起勇, 等. 多杀菌素 Natular G30 对海南省不同生境致倦库蚊的控制效果比较研究[J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2014, 25(2): 105 – 108, 112.
- [8] SENANAYAKE N, JOHNSON M K. Acute polyneuropathy after poisoning by a new organophosphate insecticide [J]. *New England Journal of Medicine*, 1982, 306(3): 155 – 157.
- [9] HECKEL D G. Ecology. Insecticide resistance after silent spring [J]. *Science*, 2012, 337(6102): 1612 – 1614.
- [10] MARCOMBE S, MATHIEU R B, POCQUET N, et al. Insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* from Martinique: distribution, mechanisms and relations with environmental factors [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): 1 – 11.
- [11] SU T, CHENG M-L. Resistance development in *Culex quinquefasciatus* to spinosad: a preliminary report [J]. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 2012, 28(3): 263 – 267.
- [12] HUANG J, CHEN A-L, ZHANG H, et al. Gene replacement for the generation of designed novel avermectin derivatives with enhanced acaricidal and nematocidal activities [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(16): 5326 – 5334.
- [13] 张绍勇, 杨波, 陈振, 等. 大环内酯类新化合物天维菌素杀螨活性及田间防治效果[J]. *植物保护学报*, 2017, 44(2): 318 – 323.
- [14] 杨波, 张绍勇, 陈振, 等. 新化合物天维菌素的杀虫杀螨活性[J]. *农药学学报*, 2016, 18(1): 124 – 129.
- [15] 兰坚强, 任晓露, 廖承红, 等. 伊维菌素和乙基多杀菌素对埃及伊蚊作用研究[J]. *中国兽医杂志*, 2016, 52(12): 7 – 9, 13, 49.
- [16] 陈静, 张磊, 卢浩然, 等. 埃及伊蚊表皮结构基因 AaCPR100A 序列特征和表达特性分析[J]. *寄生虫与医学昆虫学报*, 2018, 25(1): 18 – 22.
- [17] GARBER M, GRABHERR M G, GUTTMAN M, et al. Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq [J]. *Nature methods*, 2011, 8(6): 469 – 477.
- [18] WANG Z, GERSTEIN M, SNYDER M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2009, 10(1): 57 – 63.
- [19] POPLAWSKI A, MARINI F, HESS M, et al. Systematically evaluating interfaces for RNA-seq analysis from a life scientist perspective [J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2016, 17(2): 213 – 223.
- [20] ZHANG H, HE L, CAI L. Transcriptome Sequencing: RNA-Seq[M]. New York: Humana Press, 2018: 15 – 27.
- [21] IGA M, KATAOKA H. Recent studies on insect hormone metabolic pathways mediated by cytochrome P450 enzymes [J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2012, 35(6): 838 – 843.
- [22] GONG Y, LI T, FENG Y, et al. The function of two P450s, CYP9M10 and CYP6AA7, in the permethrin resistance of *Culex quinquefasciatus* [J/OL]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 587 [2020-03-10]. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00486-0>.
- [23] CHE-MENDOZA A, PENILLA NAVARRO R, RODRIGUEZ D. Insecticide resistance and glutathione S-transferases in mosquitoes: A review [J]. *Afr J Biotechnol*, 2008, 8(8): 503 – 513.
- [24] NDO C, KOPYA E, IRVING H, et al. Exploring the impact of glutathione S-transferase (GST)-based metabolic resistance to insecticide on vector competence of *Anopheles funestus* for *Plasmodium falciparum* [M]. London: Wellcome Open Res, 2019.
- [25] PAVLIDI N, VONTAS J, VAN LEEUWEN T. The role of glutathione S-transferases (GSTs) in insecticide resistance in crop pests and disease vectors [J]. *Current Opinion in Insect Science*, 2018, 27: 97 – 102.

Transcriptome Analysis of *Aedes aegypti* Larvae before and after Treatment with Tenvermectin

WANG Zihe, LAN Jianqiang, LIAO Chenghong, HAN Qian

(Laboratory of Tropical Veterinary Medicine and Vector Biology, School of Life and Pharmaceutical Sciences, Hainan University, Haikou, Hianan 570228, China)

Abstract: Transcriptomes of *Aedes aegypti* larvae before and after administration of tenvermectin were sequenced with RNA-Seq to investigate the gene expression differences of *A. aegypti* at the transcriptome level before and after the treatment. The gene expression differences of *A. aegypti* before and after the treatment were then analyzed, and verified by real-time quantitative PCR. The results showed that, compared with the control group, there were 2 647 genes that were significantly different in expression in the larvae of *A. aegypti* treated with tenvermectin, of which 697 were up-regulated and 1 950 down-regulated. Gene ontology analysis showed that the sequenced genes were mainly annotated into such functional groups as cellular process, metabolic process, membrane, and binding and catalytic activity. The differential gene KEGG pathway is mainly enriched in medicine metabolism, immune response, biosynthesis, digestion and absorption. Six genes including three upregulated genes GST-1, TS11 and CarE2 and three downregulated genes CP, CP19 and GCW were randomly selected from the genes of the larvae treated, and verified by using real-time quantitative PCR, and the results were consistent with the RNA Seq results. RNA Seq was used to screen out the genes that had different expression of *A. aegypti* before and after treatment with tenvermectin, which provides insight into understanding of the toxicological mechanism of tenvermectin in *A. aegypti* and finding of the medicine resistance related genes from *A. aegypti*.

Keywords: tenvermectin; *Aedes aegypti*; RNA-Seq

(责任编辑:叶静)