

文章编号: 1674-7054(2021)03-0347-09



伊蚊 5-HT 受体家族生物信息学 分析和时空表达谱的构建

李妙珍, 李奕勋, 陈静, 张磊, 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 570028)

摘要: 5-羟色胺(5-HT)可通过多个受体介导来调控昆虫的生长发育和运动等生理活动,也是新型杀虫剂潜在的靶点。本研究对埃及伊蚊的 5-羟色胺受体家族进行系统分析,即利用生物信息学方法、进化分析 5-HT 受体在物种间的同源性,构建系统进化树;使用同源建模的方法以人类 5-羟色胺受体结构为模板,构建埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)5-HT 受体的三维结构模型;通过实时荧光定量 PCR 方法研究受体在埃及伊蚊幼虫期、蛹期和成蚊,未吸血雌蚊的头、胸、腹及附肢的表达情况。从 NCBI 和 VectorBase 数据库中得到埃及伊蚊的 6 个 5-HT 受体基因,生物信息学分析发现 6 个受体结构均具有 7 次跨膜区,其中在受体蛋白的二级结构中 α -螺旋占有较高的比重。进化分析结果表明,埃及伊蚊 5-HT 受体基因分别位于 3 个不同的分支,各分支均与黑腹果蝇 5-HT 相应受体具有较高的同源性。表达谱构建结果表明,相比各龄幼虫和雌蚊,5-HT 受体均在雄蚊中的表达量最高,且在雌蚊各组织中呈现明显的差异。*5-HTR_{1B}*、*5-HTR_{2B}*、*5-HTR_{7B}* 在头、胸、腹和附肢 4 种组织中均有表达;*5-HTR_{1A}* 在头、胸、腹中均有表达;*5-HTR_{1D}* 在胸腔中高表达,但在头部和附肢中不表达;*5-HTR_{7A}* 在附肢中表达丰度最高,而在头部无表达;该结果预示不同受体介导 5-HT 的功能可能不同。本研究明确了埃及伊蚊 5-HT 受体家族蛋白的序列特征、进化关系及组织表达特征,为埃及伊蚊 5-HT 受体功能的进一步研究奠定了基础。

关键词: 5-羟色胺;埃及伊蚊;生物信息分析;时空表达谱

中图分类号: R 384.1 **文献标志码:** A

引用格式: 李妙珍,李奕勋,陈静,等.伊蚊 5-HT 受体家族生物信息学分析和时空表达谱的构建[J].热带生物学报,2021,12(3):347-355. DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2021.03.011

5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)又称血清素,是广泛分布于脊椎动物和无脊椎动物的中枢神经系统和外周神经组织中的一种重要的神经递质^[1]。5-HT 通过与 5-HT 受体(5-hydroxytryptamine receptor, 5-HTR)结合调控许多重要的生理和行为过程,如运动^[2]、繁殖^[3]、性活动、进食^[4]、情绪和感情^[5]、睡眠^[6]、食欲等^[7]。5-HT 受体分型复杂,至少有 7 大类 14 种亚型在人类基因组中被发现,除 5-HT₃ 受体是配体门控离子通道外,其余 5-HT 受体都是 G 蛋白偶联受体。根据保守的氨基酸序列和第二信使激活系统,昆虫的 5-HT 受体可分为 5-HTR₁、5-HTR₂ 和 5-HTR₇3 种^[1]。

5-HT 和 5-HTR 在昆虫的免疫系统中发挥关键的调节作用,研究发现菜青虫中的(*Pieris rapae*)5-HTR_{1B} 和 5-HTR_{2B} 能介导 5-HT 引起的血细胞吞噬作用^[8],该研究在分子水平上证实了昆虫也与哺乳动物一样,可以通过 5-HT 来调节神经系统与免疫系统的相互作用,为利用 5-HT 类药物特异性干扰昆虫免疫系统,增强生物杀虫剂效力提供了可能性。研究还发现通过激活神经元释放出的大量的 5-HT,会抑制黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)的进食和交配行为^[4]。同样,在蜜蜂(*Apis mellifera*)大脑中注射 5-HT,其进

收稿日期: 2021-01-07 修回日期:2021-05-19

基金项目: 国家自然科学基金(31960703, 31860702)

第一作者: 李妙珍(1995-),女,海南大学生命科学与药学院 2018 级硕士研究生. E-mail: limiaozhen4956@163.com

通信作者: 廖承红(1977-),女,教授.研究方向:病媒生物学. E-mail: liaochh@hainanu.edu.cn; 韩谦(1963-),男,教授.研究方向:病媒生物学. Email: qianhan@hainanu.edu.cn

食行为受到抑制,但是在肠道中注射 5-HT 则会刺激肠道肌肉的收缩^[9]。在埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)中,使用 CRISPR-Cas9 技术敲除 5-HTR_{2B} 会导致埃及伊蚊的生长抑制,并且减少成蚊的脂质积累^[10]。目前,研究人员还对 5-HTR_{1A} 的激动剂衍生物进行设计、合成和生测,发现其能够影响昆虫的生长和幼虫的活性^[11],此结果更加表明了 5-HT 受体可作为有害昆虫的药物靶标。随着全球杀虫剂的滥用,传统小分子杀虫剂的耐药性成为控制节肢动物传播传染病的一个难题,需要具有新的作用方式和对抗性害虫种群活性的杀虫剂化学制剂作为替代。破坏节肢动物 G 蛋白偶联受体(GPCR)靶标的小分子杀虫剂逐渐成为人们关注的重点,将用于开发下一代杀虫剂^[12-13]。

埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)是基孔肯雅热、黄热病和登革热等急性传染病的主要传播媒介,每年会造成数亿人感染病毒^[14],严重威胁人类健康。已有研究报道,埃及伊蚊吸血行为与 5-HT 的浓度有关^[10]。目前,有关埃及伊蚊 5-HT 受体家族的功能与结构尚未分析透彻。本研究首先对文献已报道的昆虫 5-HT 受体蛋白进行生物信息学分析,然后采用多序列比对和系统进化树构建法对 5-HT 受体基因进行进化分析,最后对每个受体进行不同发育时期的表达谱分析,为埃及伊蚊 5-HT 受体蛋白的功能研究提供基础,进而为新型杀虫剂寻找靶标。

1 材料与方法

1.1 蚊虫来源 埃及伊蚊(Rockefeller 株)来自军事科学院军事医学研究院微生物流行病学研究所。

1.2 埃及伊蚊 5-HT 受体基因家生物信息学分析 通过比对 NCBI 和 VectorBase 2 个数据库序列,获取埃及伊蚊 5-HT 受体序列,并下载 5-HT 受体蛋白的氨基酸序列。利用 TMHMM Server v2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)程序在线对蛋白序列进行跨膜结构预测;利用在线工具 SOPMA(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)对埃及伊蚊 5-HT 受体蛋白的二级结构进行预测;使用 Signal P 5.0 在线软件预测埃及伊蚊 5-HT 受体的信号肽;使用在线软件 Clustal Omega 对不同昆虫的 5-HT 受体氨基酸序列进行多序列比对,用邻接法(Neighbor-Joining)对氨基酸序列构建进化树。Bootstrap 设为 1000,其余参数采用默认设置,分析不同昆虫的 5-HT 受体的进化关系。

比较 Protein Data Base 数据库中已知 5-HT 受体蛋白的晶体结构,采用 GeneDoc 计算数据库序列相似性分析,发现埃及伊蚊 5-HTR_{7B} 与已知人类 5-HTR_{1B} 的序列相似性最高,为 38.61%。利用 SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/interactive>),以 Hsap5-HTR_{1B} 蛋白的晶体结构^[15](PDB: V)为模板,构建埃及伊蚊 5-HTR_{7B} 三级同源模型。

1.3 埃及伊蚊 5-HT 受体基因家族的表达谱构建 (1)埃及伊蚊总 RNA 的提取。分别收集 50 只 1 龄幼虫,50 只 2 龄幼虫,30 只 3 龄幼虫,10 只 4 龄幼虫,4 只白色雌蛹,4 只白色雄蛹,4 只黑色雌蛹、4 只黑色雄蛹,2 只雄蚊,2 只未吸血的雌蚊,实验重复 3 次;解剖 20 只未吸血雌蚊,分别收集其头、胸、腹、附肢 4 个部位,实验重复 3 次。采用 Trizol 法^[16]提取埃及伊蚊不同样品的总 RNA,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,用微量核酸检测仪检测 RNA 浓度和纯度。(2)cDNA 模板的合成。使用 TAKARA 逆转录试剂盒合成 cDNA: gDNA Eraser Buffer 2.0 μL , gDNA Eraser 1.0 μL , Total RNA 1.0 μL , RNase Free dH₂O 6.0 μL , 混匀后,42 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2 min,转移至冰上,再加入 PrimeScript RT Enzyme Mix 10.0 μL , RT Primer Mix 1.0 μL , 5 \times PrimeScript Buffer 2 (for Real Time) 4.0 μL , RNase Free dH₂O 4.0 μL , 混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min,85 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 s,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。(3)荧光定量 PCR 检测不同发育时期和不同组织中的表达量。采用荧光定量试剂盒(ROCHE)对各个基因进行 qRT-PCR 分析。反应体系为:实时荧光定量 PCR 预混液 5 μL ,上、下游引物各 0.5 μL (10 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$),模板 cDNA 1 μL , ddH₂O 3 μL 。使用 Roche 公司的 LightCycler96 进行实时扩增检测。反应采用两步法 PCR 扩增标准程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,共 40 个循环。以 RPS17 为内参基因^[16],每个样品设置 3 次重复,实验所用引物见表 1。

1.4 统计学分析 根据定量检测结果,以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法^[17]计算样品间基因表达量的差异倍数,用 Graphpad Prism 6.0 软件 T 检验法进行数据的统计分析,用 LSD 法进行多重比较检验,显著性检验水平 $P < 0.05$ 。

表 1 荧光定量 PCR 引物

Tab. 1 Primers for fluorescence quantitative PCR

基因名称 Gene	引物序列 Sequence of primer(5'-3')	
	上游引物 F	下游引物 R
5-HTR _{1B}	TACTGGCGACGGTTATAGG	CGACAATATCAGGTGGTTGG
5-HTR _{1A}	CCCACGAGCAATAATACCC	CCTTGCGTTTGGAGACC
5-HTR _{1D}	GTTCTACAGTAAATCGTCCTACC	CCCGTAGCAATACATCAGC
5-HTR _{2B}	CGAATCTAATTGCTCCTCTCC	CTGGACACTTCTGCTATTCC
5-HTR _{7A}	ACGAAACCGCTAGAATACG	GTGGCAGCGATATACAGG
5-HTR _{7B}	TTCCTAGAGTACCTCCTAACC	GAGTAGAGAGCTTGTGACG
RPS17	AAGAAGTGGCCATCATTCCA	GGTCTCCGGGTCGACTTC

2 结果与分析

2.1 5-HT 受体氨基酸序列分析及三级结构建模 根据数据库数据分析,发现埃及伊蚊有 5-HTR_{1A}、5-HTR_{1B}、5-HTR_{1D}、5-HTR_{2B}、5-HTR_{7A}、5-HTR_{7B} 共 3 个 5-HT 受体家族 6 个亚基, TMHMM 数据跨膜螺旋结构分析结果表明,它们均有 7 个跨膜区,属于典型的 G 蛋白偶联受体;利用 SignalP 5.0 在线软件预测埃及伊蚊 5-HT 受体蛋白的氨基酸序列^[18],发现除 5-HTR_{7B} 有可能存在 SP 信号肽外,其他亚基均不存在信号肽。表 2 结果表明,埃及伊蚊 5-HT 受体蛋白主要由 α 螺旋、延伸链以及无规则卷曲构成,并且还有少量的 β -转角,其中 α 螺旋的比例非常高,约占二级结构组成原件的 28.09%~47.64%, 5-HTR_{7B} 的 α 螺旋比例最高,为 47.64%; 5-HTR_{1D} 的 α 螺旋比例最低。每种受体蛋白都含有无规则卷曲,其中 5-HTR_{1A} 的无规则卷曲比例为 49.14%,是 6 种受体中比例最高的; 5-HTR_{7B} 的无规则卷曲比例最少。在埃及伊蚊 5-HT 受体家族的二级结构中, β -转角的含量相对较少,其中 5-HTR_{1B} 的 β -转角比例最少, 5-HTR_{1D} 的 β -转角比例最高,为 6.71%。

表 2 埃及伊蚊 5-HT 受体蛋白二级结构的主要元件比例
Tab. 2 The proportion of major secondary protein structure of 5-HT receptor protein in *A. aegypti*.

受体名称 Receptor	α -螺旋/% α -helix (%)	延伸链/% Extended strand (%)	β -转角/% Beta turn (%)	无规卷曲/% Random coil (%)
Aae5-HTR _{1B}	40.38	12.74	1.92	44.95
Aae5-HTR _{1A}	32.07	15.52	3.28	49.14
Aae5-HTR _{2B}	37.41	19.17	4.96	36.46
Aae5-HTR _{1D}	28.096	21.73	6.71	43.46
Aae5-HTR _{7A}	47.67	13.56	2.97	35.81
Aae5-HTR _{7B}	47.64	17.67	3.23	31.47

用 Proteindatabase 中已知 Hsap5-HTR_{1B}(图 1-A)的晶体结构做为模板,根据 SWISS-MODEL 同源建模软件构建埃及伊蚊 5-HTR_{7B}(图 1-B)的三级结构。其 GMQE 值为 0.4, QMEAN 值为-3.93,均在合理范围之内^[19-20]。拉氏图是用来描述蛋白质结构中氨基酸残基二面角 ψ 和 ϕ 是否在合理区域的一种可视化方法,可以反映出蛋白质构象是否合理^[21]。结果表明,埃及伊蚊 5-HTR_{7B} 所有氨基酸都存在在绿色和浅绿色的允许区域,无氨基酸在白色不允许区域(图 1-C),证明这些氨基酸残基具有较好的构象空间^[22]。结合 GMQE 值、QMEAN 值和拉氏图可知,所建模型合理^[23-27]。同源建模结果显示, Aae5-HTR_{7B} 具有 7 个 α 螺旋,是典型的 7 次跨膜 G 蛋白偶联受体。与 Hsap5-HTR_{1B} 相比,在 $\alpha 4 \sim \alpha 7$ 间的 loop 差别较大。应用 Clustal Omega 软件^[28]对埃及伊蚊 5-HT 受体基因家族成员完整 ORF 进行同源性和保守域比对,结果表明,埃及伊蚊 5-HT 受体基因家族之间相似性较低,其保守域的同源性约为 40%(图 2),主要集中在跨膜区。

2.2 埃及伊蚊 5-HT 受体的系统进化分析 利用 MEGA7 的邻接法对 6 个受体基因构建系统进化树

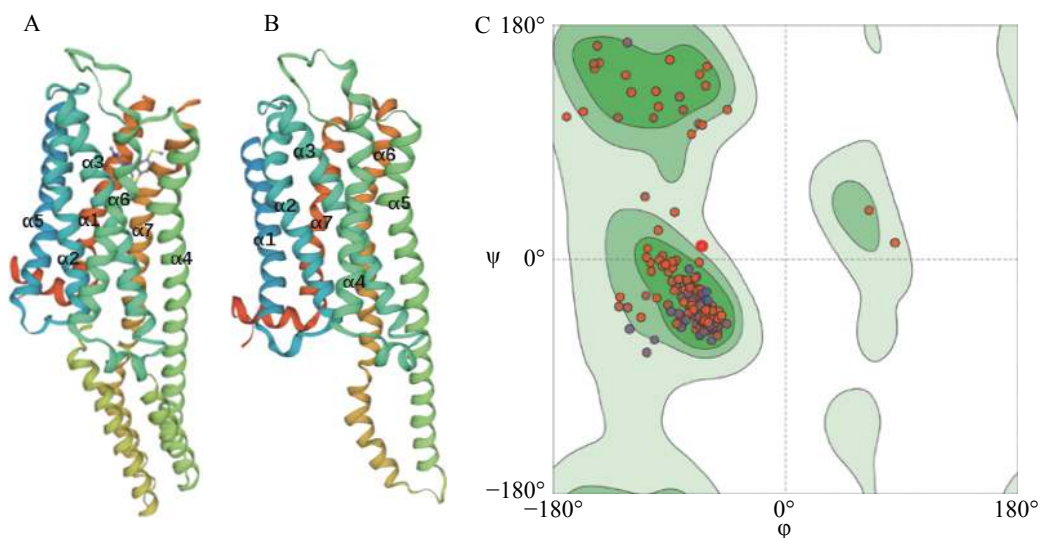


图 1 埃及伊蚊 5-HT 受体蛋白的三级结构建模

A. Hsap5-HTR_{1B} 的三级结构; B. 埃及伊蚊 5-HTR_{7B} 的三级结构; C. 拉氏图。

Fig. 1 Tertiary structure modeling of 5-HT receptor protein in *A. aegypti*

A. Tertiary structure of Hsap5-HTR_{1B}; B. Tertiary structure of Aae5-HTR_{7B}; C. Ramachandran Plot of Aae5-HTR_{7B}.

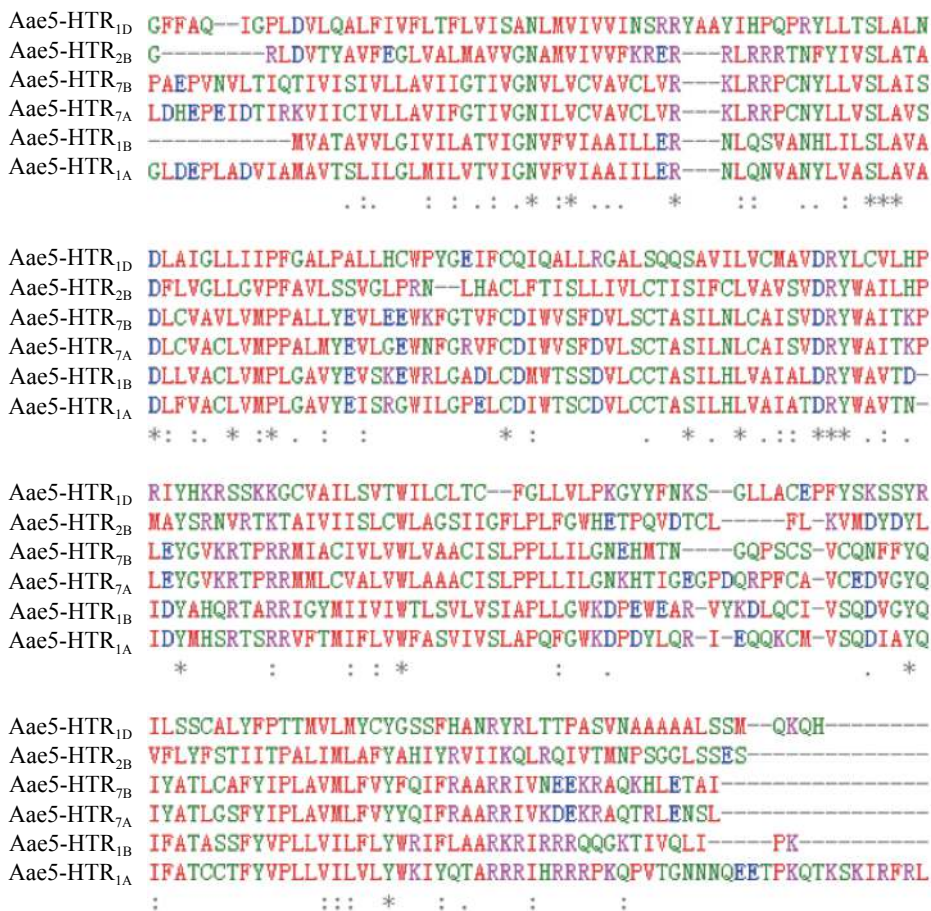


图 2 埃及伊蚊 5-HTR 家族保守结构域序列比对

使用 Clustal Omega 对氨基酸进行多序列比对。“*”为 100% 同源，“:”为 90% 同源，“.”为 80% 同源。

Fig. 2 Alignment of conserved domains of 5-HT proteins family in *A. aegypti*

Multiple sequence alignments of amino acids were performed using Clustal Omega. “*” indicates 100% homology; “:” indicates 90% homology; “.” indicates 80% homology.

(图 3)。高粱蚜虫(*Melanaphis sacchari*)作为半翅目昆虫^[29],与埃及伊蚊亲缘关系较远,因此,可以其作为外群构建系统进化树。结果表明,该进化树分为 3 个分支,*Aae5-HTR_{1D}*与淡色按蚊的 *5-HTR_{1D}* 在同一分支;*Aae5-HTR_{1A}*与黑腹果蝇 *5-HTR_{1A}* 为同一分支,其和致倦库蚊 *5-HTR₂* 同源性较高;*Aae 5-HTR_{2B}* 从黑腹果蝇 *5-HTR_{2B}* 分支上演化而来,并且与 *Aae5-HTR_{1D}* 更接近;*Aae5-HTR_{7A}*、*5-HTR_{7B}* 受体与黑腹果蝇 *5-HTR₇* 聚类为一支。

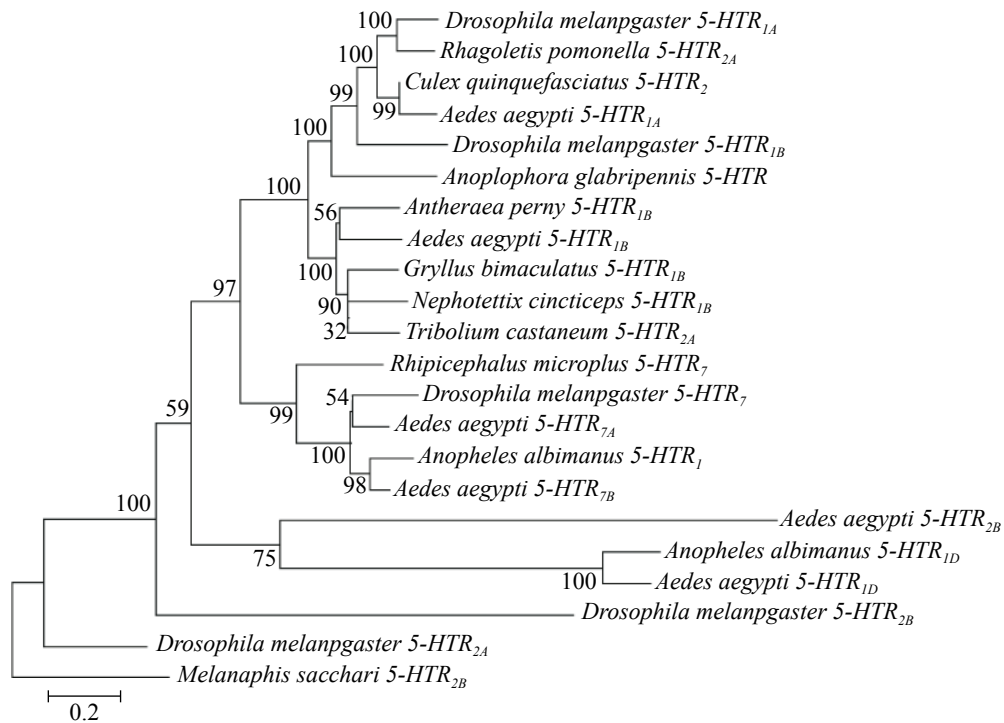


图 3 埃及伊蚊 5-HT 受体蛋白系统进化树(Bootstrap 值为 1000)

Drosophila melanogaster: 黑腹果蝇; *Rhagoletis pomonella*: 苹果实蝇; *Gryllus bimaculatus*: 双斑蟋; *Rhipicephalus microplus*: 微小扇头蜱; *Nephrotettix cincticeps*: 黑尾叶蝉; *Antheraea pernyi*: 柞蚕; *Tribolium castaneum*: 赤拟谷盗; *Anoplophora glabripennis*: 光肩星天牛; *Culex quinquefasciatus*: 致倦库蚊; *Melanaphis sacchari*: 高粱蚜; *Anopheles albimanus*: 淡色按蚊; *Aedes aegypti*: 埃及伊蚊。

Fig. 3 Phylogenetic tree of 5-HT receptor proteins in *A. aegypti*

2.3 埃及伊蚊 5-HT 受体基因发育表达模式 5-HT 受体基因在各发育时期均有表达,如图 4-A—4-E 结果所示, *5-HTR_{1A}*、*5-HTR_{1B}*、*5-HTR_{1D}*、*5-HTR_{2B}*、*5-HTR_{7A}* 5 个受体基因在 1 龄到 4 龄幼虫中表达水平较低,到蛹期有显著增加($P < 0.05$),而 *5-HTR_{7B}* 基因在 1 ~ 4 龄阶段,表达量与蛹期水平相近,随幼虫发育到成虫,表达量逐渐增高(图 4-F)。结果同时表明,显示 6 个受体基因的表达在雌雄成体中具有明显的性别差异,所有的雄性成体的表达量均高于雌性成体(图 5-A—5-F),这与家蚕的表达模式不同^[30]。

2.4 埃及伊蚊 5-HT 受体基因组织表达模式 6 个亚基在不同组织中的表达模式差异较大。*Aae5-HTR_{1A}* 在蚊虫头部的表达量最高,其次是胸腔,在腹部也有较少的表达量,但其在腿部并无表达(图 5-A); *Aae 5-HTR_{1B}* 在头部有较高的表达丰度,但是在胸腔、腹部和附肢中表达量较少(图 5-B); *Aae5-HTR_{1D}* 在各个组织中的表达量相比于其他受体是最低的,并且它是唯一一只在胸腔和腹部表达的 5-HT 受体,其表达丰度最高的组织是胸腔,在腹部也有较少的表达量(图 5-C); *Aae5-HTR_{2B}* 在头、胸、腹和附肢中均存在表达丰度,其中头部的表达量最高,腹部的表达量最少(图 5-D); *Aae5-HTR_{7A}* 是唯一在附肢中具有高表达的受体,但其在头部中没有表达丰度,在腹部中存在较少的表达(图 5-E); *Aae5-HTR_{7B}* 与 *Aae5-HTR_{2BD}* 的组织表达丰度相似。

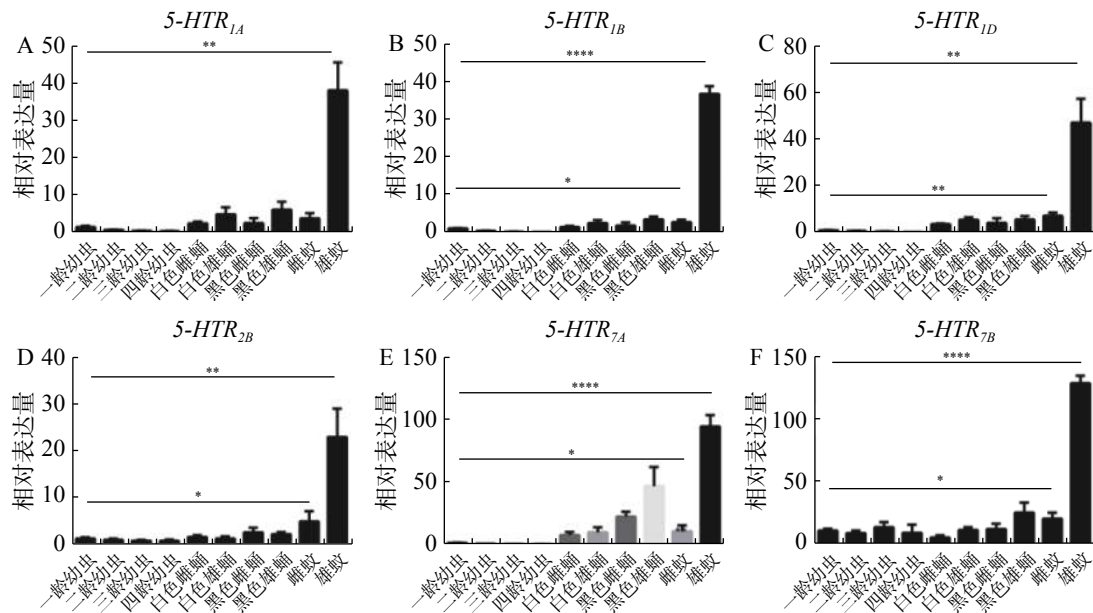


图4 埃及伊蚊 5-HT 受体不同发育时期表达谱

A ~ F: 分别代表 5-HT 受体 6 个亚基在不同发育时期的相对表达水平 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$)。

Fig. 4 Expression profile of 5-HT receptor in *A. aegypti* at different developmental stages

A-F represent the relative expression levels of the 6 subunits of 5-HT receptor at different developmental stages (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$).

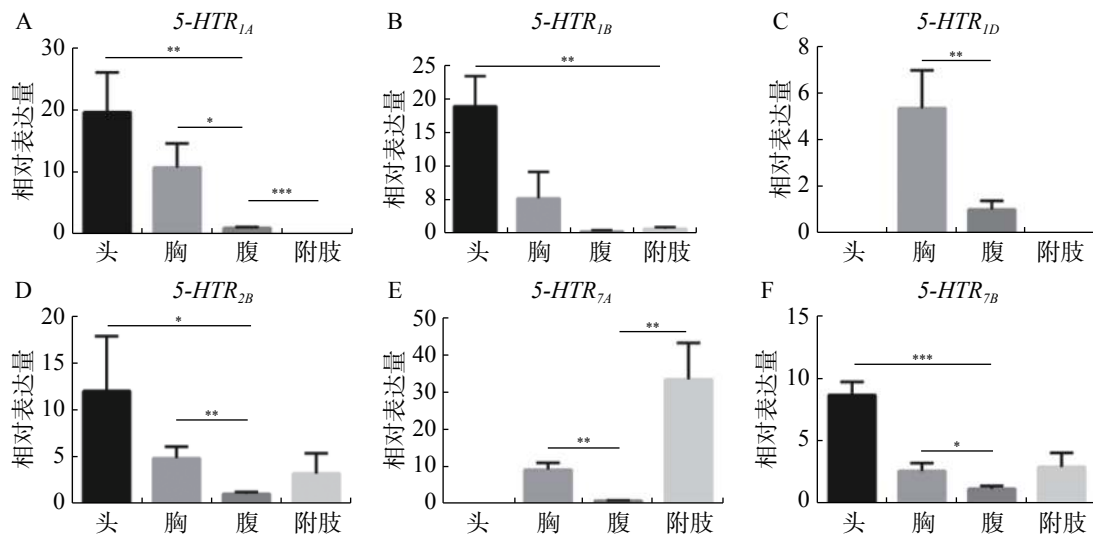


图5 埃及伊蚊 5-HT 受体不同组织表达谱

A ~ F: 分别代表 5-HT 受体 6 个亚基的在雌性成蚊不同组织中的相对表达水平 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)。

Fig. 5 Expression profile of 5-HT receptor in *A. aegypti* at different tissues

A-F: Relative expression levels of the 6 subunits of the 5-HT receptors in different tissues of female adult mosquitoes (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

3 讨论

本研究通过生物信息学方法分析了埃及伊蚊 5-HT 受体的结构, 通过同源建模确定 5-HT 受体具有 7 个跨膜区, 是典型的 G 蛋白偶联受体, 并且跨膜区结构保守。该结果与果蝇、家蚕等昆虫的受体家族结构一致^[30-31]。

不同的 5-HT 受体在昆虫体内分布不同, 与 5-HT 结合在昆虫体内发挥的生理功能也不同^[1]。有研究

表明, *Dm5-HTR_{1A}*、*Dm5-HTR_{2A}* 和 *Dm5-HTR₇* 在头部表达, 主要参与果蝇的短期学习和记忆^[32]; 黑腹果蝇 *Dm5HT_{1A}* 受体、*Dm5HT_{1B}* 受体和 *Dm5HT₇* 受体在幼虫嗅觉选择行为及食欲和厌恶联想嗅觉学习和记忆中具调节性^[33]。当黑腹果蝇 5-HT 受体缺失或表达下调的情况下, 果蝇由于血细胞吞噬能力的降低从而在被病原菌感染后更容易死亡。本研究发现 *Aae5-HTR_{1A}*、*Aae5-HTR_{1B}*、*Aae5-HTR_{1D}*、*Aae5-HTR_{7B}* 在头部特异性高表达, 而蚊虫头部具有很多气味性受体, 因此, 这 4 个受体可能与蚊虫的吸血、交配、寻找宿主等行为有关, 但后续仍需对此进行验证。有研究报道 *Aae5-HTR_{2B}* 基因被敲除后埃及伊蚊的生长和繁殖受到影响^[10]。本研究还发现 *Aae5-HTR_{1D}* 在头部和四肢中并无表达, 但是在胸腔中具有显著性高表达, 暗示其可能与胸腹部消化功能相关。而 *Aae5-HTR_{7A}* 在头部没有表达, 是唯一在四肢中特异性高表达的 5-HT 受体, 蚊虫附肢中存在丰富的感受器, 能感受外界环境的气味以及环境的温湿度/盐度, 因此, 推测该受体可能参与外界温湿度或者气味的感知^[34]。通过构建埃及伊蚊 5-HT 受体基因家族时空表达谱还发现, 埃及伊蚊 5-HT 受体在蚊虫的各个时期都有表达, 说明 5-HT 受体在埃及伊蚊的整个生活中均发挥作用, 可能是蚊虫基本生理活动必需的。其中, *Aae5-HTR_{1D}*、*Aae5-HTR_{1B}*、*Aae5-HTR_{7A}* 在幼虫阶段的表达较低, 但是在蛹期和成蚊期表达量高, 暗示这些受体可能主要与蚊虫的幼虫后期发育及成体的生理功能有关。

目前研究认为, 在昆虫体内 5-HT 作为重要的神经递质, 对昆虫的生长发育以及行为活动等方面都具有许多重要作用, 而其发挥作用主要通过分布在体内不同位置的受体介导。因此, 通过对埃及伊蚊 5-HT 受体家族的序列分析和表达谱构建, 进而进一步研究其功能, 将对探索控制蚊虫及传播病原寻找新型药物提供新的思路。

参考文献:

- [1] RUT V., HELEEN V, JOZEF VANDEN B Serotonin, serotonin receptors and their actions in insects [J]. *Neurotransmitter*, 2015, 2(1): e314.
- [2] SAWIN E R, RANGANATHAN R, HORVITZ H R. *Caenorhabditis elegans* locomotory rate is modulated by the environment through a dopaminergic pathway and by experience through a serotonergic pathway [J]. *Neuron*, 2000, 26(3): 619 – 631.
- [3] PRASAD P, OGAWA S, PARHAR IS. Role of serotonin in fish reproduction [J]. *Front Neurosci*, 2015(9): 195.
- [4] LIU Y, LUO J, CARLSSON M A, et al. Serotonin and insulin-like peptides modulate leucokinin-producing neurons that affect feeding and water homeostasis in *Drosophila* [J]. *J Comp Neurol*, 2015, 523(12): 1840 – 1863.
- [5] DONALDSON Z R, NAUTIYAL K M, AHMARI S E, et al. Genetic approaches for understanding the role of serotonin receptors in mood and behavior [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2013, 23(3): 399 – 406.
- [6] SOOD S, MORRISON JL, LIU H, et al. Role of endogenous serotonin in modulating genioglossus muscle activity in awake and sleeping rats [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005, 172(10): 1338 – 1347.
- [7] HALFORD J C, HARROLD J A, LAWTON C L, et al. Serotonin (5-HT) drugs: effects on appetite expression and use for the treatment of obesity [J]. *Curr Drug Targets*, 2005, 6(2): 201 – 213.
- [8] QI Y X, HUANG J, LI M Q, et al. Serotonin modulates insect hemocyte phagocytosis via two different serotonin receptors [J]. *Elife*, 2016(5): e12241.
- [9] FRENCH A S, SIMCOCK K L, ROLKE D, et al. The role of serotonin in feeding and gut contractions in the honeybee [J]. *J Insect Physiol*, 2014, 61: 8 – 15.
- [10] LING L, RAIKHEL A S. Serotonin signaling regulates insulin-like peptides for growth, reproduction, and metabolism in the disease vector *Aedes aegypti* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(42): E9822 – E9831.
- [11] CAI M, LI Z, FAN F, et al. Design and synthesis of novel insecticides based on the serotonergic ligand 1-[(4-Aminophenyl)ethyl]-4-[3-(trifluoromethyl)phenyl]piperazine (PAPP) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(5): 2624 – 2629.
- [12] SHARAN S, HILL C A. Advances in agrochemicals: ion channels and G Protein-Coupled Receptors (GPCRs) as targets for pest control [M]. America: American Chemical Society, 2017: 55 – 84.
- [13] LAN J, WANG Z, CHEN Z, et al. Identification of the *Aedes aegypti* AChR gene family and molecular target of Spinosad

- [J]. *Pest Management Science*, 2021, 77(4): 1633 – 1641.
- [14] BHATT S, GETHING P W, BRADY O J, et al. The global distribution and burden of dengue [J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 504 – 507.
- [15] YIN W, ZHOU X E, YANG D, et al. Crystal structure of the human 5-HT_{1B} serotonin receptor bound to an inverse agonist [J]. *Cell Discovery*, 2018, 4(1): 12.
- [16] 王子贺, 兰坚强, 廖承红, 等. 天维菌素处理埃及伊蚊幼虫的转录组学分析 [J]. *热带生物学报*, 2020, 11(3): 281 – 287.
- [17] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402 – 408.
- [18] ALMAGRO ARMENTEROS J J, TSIRIGOS K D, SØNDERBY C K, et al. Signal P 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks [J]. *Nature Biotechnology*, 2019(37): 420 – 423.
- [19] BERMAN H M, BATTISTUZ T F, BHAT T N, et al. The protein data Bank [J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(1): 235 – 242.
- [20] BERMAN H, HENRICK K F, NAKAMURA H, et al. The worldwide Protein Data Bank (wwPDB): ensuring a single, uniform archive of PDB data [J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(1): D301 – D303.
- [21] LASKOWSKI R A MMW, MOSS D S, THORNTON J M. PROCHECK - a program to check the stereochemical quality of protein structures [J]. *J App Cryst*, 1993, 26: 283 – 291.
- [22] MORRIS A L, MACARTHUR M W, HUTCHINSON E G, et al. Stereochemical quality of protein structure coordinates [J]. *Proteins*, 1992, 12(4): 345 – 364.
- [23] WATERHOUSE A, BERTONI M, BIENERT S, et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes [J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(W1): W296 – W303.
- [24] BIENERT S, WATERHOUSE A, DE BEER TJAART A P, et al. The SWISS-MODEL Repository—new features and functionality [J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(D1): D313 – D319.
- [25] STUDER G, REMPFER C, WATERHOUSE A M, et al. QMEANDisCo—distance constraints applied on model quality estimation [J]. *Bioinformatics*, 2020, 36(6): 1765 – 1771.
- [26] BENKERT P, BIASINI M, SCHWEDE T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models [J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(3): 343 – 350.
- [27] BERTONI M, KIEFER F, BIASINI M, et al. Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 10480.
- [28] MADEIRA F, PARK Y M, LEE J, et al. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019 [J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(W1): W636 – W641.
- [29] 陈世骧. 昆虫的变态类型与分类体系 [J]. *昆虫学报*, 1962(1): 1 – 15.
- [30] 李海银, 李艳, 陈曦, 等. 家蚕 5-羟色胺受体基因的克隆及表达分析 [J]. *中国农业科学*, 2015, 48(5): 987 – 1001.
- [31] BORYCZ J, BORYCZ JA, KUBOW A, et al. *Drosophila* ABC transporter mutants white, brown and scarlet have altered contents and distribution of biogenic amines in the brain [J]. *J Exp Biol*, 2008, 211(Pt 21): 3454 – 3466.
- [32] JOHNSON O, BECNEL J, NICHOLS C D. Serotonin receptor activity is necessary for olfactory learning and memory in *Drosophila melanogaster* [J]. *Neuroscience*, 2011(192): 372 – 381.
- [33] HUSER A, ESCHMENT M, GÜLLÜ N, et al. Anatomy and behavioral function of serotonin receptors in *Drosophila melanogaster* larvae [J]. *PLOS ONE*, 2017, 12(8): e0181865.
- [34] MATTHEWS B J, YOUNGER M A, VOSSHALL L B. The ion channel ppk301 controls freshwater egg-laying in the mosquito *Aedes aegypti* [J]. *Elife*, 2019(8): e43963.

Bioinformatics Analysis and Construction of Spatiotemporal Expression Profile of the Serotonin Receptor Protein Family in *Aedes aegypti*

LI Miaozen, LI Yixun, CHEN Jing, ZHANG Lei, LIAO Chenghong, HAN Qian

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

Abstract: Serotonin (5-HT) plays a vital role in many physiological processes of insects, regulating physiological activities, such as growth and movement through multiple 5-HT receptors. It is also a potential target of new insecticides. A systematic analysis of the serotonin receptor family of *Aedes aegypti* provides a theoretical basis for the study of its functions. The 5-HT receptor 3D structure of *A. aegypti* was constructed through the homology modeling based on the human 5-HT receptor template, and a phylogenetic tree was established with bioinformatics for evolutionary analysis. The expressions of 5-HT receptors in different tissues (head, thorax, abdomen, appendages) at various stages (larvae, pupal, adult) were analyzed by using RT-qPCR. Six 5-HT receptor genes of *A. aegypti* were obtained from NCBI and VectorBase. Bioinformatics analysis showed that all the receptor structures had seven transmembrane regions, among which α -helix accounted for a high proportion in the secondary structure of the receptors. The evolutionary analysis showed that *A. aegypti* 5-HT receptors were located in three different branches, each of which had a high homology with the 5-HT receptors of *Drosophila melanogaster*. The expression profile showed that the expressions of 5-HT receptors were the highest in males as compared with all the larvae and females. There were significant differences in the expression of 5-HT receptors among the tissues of the female. The 5-HT1B, 5-HT2B, and 5-HT7B receptors were all expressed in the head, thorax, abdomen, and appendages. However, the expression abundance of the 5-HT7A receptor was the highest in the appendages as against other tissues. The 5-HT1A receptor was expressed in all tissues except appendages. This analysis clarified the sequence properties, evolutionary relationship, and tissue expression characteristics of the 5-HT receptor family protein of *A. aegypti*, which lay a foundation for further research on the function of the 5-HT receptors.

Keywords: serotonin; *Aedes aegypti*; bioinformatics analysis; spatiotemporal expression profile

(责任编辑:张莉莉 责任编辑:钟云芳)