

· 植物保护 ·

DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20230140



主持人: 缪卫国

## 意大利蜜蜂 $\alpha 1$ 亚型烟碱型乙酰胆碱受体功能表达和分析

耿俊杰<sup>1,2</sup>, 王昱权<sup>1,2</sup>, 张坤<sup>1,2</sup>, 吴少英<sup>1,2</sup>

(1. 海南大学 南繁研究院(三亚南繁研究院), 海南 三亚 572025; 2. 海南大学 热带农林学院, 海口 570228)

**摘要:** 尽管作用于昆虫烟碱型乙酰胆碱受体 (nicotinic acetylcholine receptors, nAChRs) 的新烟碱类杀虫剂是农作物害虫防治的常用工具, 但它们对意大利蜜蜂等传粉昆虫产生严重的负面影响。本研究克隆意大利蜜蜂 nAChR  $\alpha 1$  亚基基因, 对其进行系统发育分析, 并利用双电极电压钳技术研究  $\alpha 1$  亚型 nAChR 与新烟碱类杀虫剂 (吡虫啉、噻虫胺和呋虫胺) 的相互作用机制。序列比对和系统进化树分析显示, 意大利蜜蜂 nAChR  $\alpha 1$  亚基具有典型的 nAChRs 亚基家族基因结构域特征, 与半翅目昆虫的  $\alpha 1$  亚基关系最远, 与同属膜翅目蜜蜂的  $\alpha 1$  亚基关系最近。将意大利蜜蜂 nAChR  $\alpha 1$  亚基与小鼠 nAChR  $\beta 2$  亚基在非洲爪蟾卵母细胞中共表达, 电生理结果显示吡虫啉对 Am $\alpha 1/\beta 2$  nAChR 的激动效率最高, 噻虫胺最低, 而 Am $\alpha 1/\beta 2$  nAChR 对呋虫胺的激动亲和力最高, 对吡虫啉最低。这表明意大利蜜蜂 nAChR  $\alpha 1$  亚基是新烟碱类杀虫剂的作用靶标之一, 并且 Am $\alpha 1/\beta 2$  nAChR 对不同新烟碱类杀虫剂敏感性存在差异。本研究结果对于开发作用于害虫的新型高选择性杀虫剂具有重要理论指导意义。

**关键词:** 意大利蜜蜂; 烟碱型乙酰胆碱受体;  $\alpha 1$  亚基; 功能表达

中图分类号: Q966 文献标志码: A 文章编号: 1674-7054 (2024) 05-0623-09

耿俊杰, 王昱权, 张坤, 等. 意大利蜜蜂  $\alpha 1$  亚型烟碱型乙酰胆碱受体功能表达和分析 [J]. 热带生物学报, 2024, 15 (5): 637-645. doi: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20230140

意大利蜜蜂 (*Apis mellifera*) 是自然生物群落中不可或缺的重要成员, 具有巨大的经济效益、社会效益和生态效益<sup>[1]</sup>。在全球重要的农作物中, 大部分通过意大利蜜蜂进行授粉<sup>[2]</sup>。意大利蜜蜂每年对全球的经济贡献超过 1 000 亿英镑<sup>[3]</sup>。然而, 自 21 世纪以来, 美国和欧洲的意大利蜜蜂种群逐渐减少<sup>[4-6]</sup>。这种现象被科学家称为蜂群崩溃综合征, 即蜂巢中存在蜂王、幼虫和食物, 但工蜂数量减少, 并且在蜂巢周围没有发现工蜂残骸<sup>[7]</sup>。该现象的发生通常是由病毒、螨虫类寄生虫、农药和环境压力等多种因素共同作用导致的<sup>[8-12]</sup>。在以上风险因素中, 化学合成农药中的新烟碱类杀虫剂被证明是主要影响因素之一<sup>[13]</sup>。

新烟碱类杀虫剂对蜜蜂的影响与其接触剂量

和时间有关, 不同接触剂量和时间会对蜜蜂的生长发育、行为 (觅食、运动、学习、记忆)、寿命等产生不同影响<sup>[14]</sup>。有研究表明, 当中华蜜蜂短期接触 20  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  吡虫啉时, 会导致工蜂的味觉学习行为减弱, 长期接触剂量 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 会缩短工蜂的寿命<sup>[15]</sup>。对意大利蜜蜂进行噻虫胺处理时, 长期接触亚致死剂量会严重损害蜜蜂的运动行为, 从而对蜜蜂的健康产生影响<sup>[16]</sup>。另外, 长期接触亚致死剂量的呋虫胺也会缩短意大利蜜蜂的寿命<sup>[17]</sup>。

新烟碱类杀虫剂通过与烟碱型乙酰胆碱受体 (nAChRs) 结合影响蜜蜂的神经系统信息传递<sup>[18]</sup>。nAChRs 位于突触后膜, 属于半胱氨酸环受体超家族, 是由 5 个亚基组成的五聚体通道蛋白<sup>[19]</sup>。五聚

收稿日期: 2023-12-13

修回日期: 2024-02-07

基金项目: 海南省重大科技计划项目 (ZDKJ2021007); 国家自然科学基金地区科学基金项目 (32360663, 32260666)

第一作者: 耿俊杰 (1998-), 男, 海南大学热带农林学院 2021 级硕士研究生。E-mail: gengjunjie666@163.com

通信作者: 张坤 (1993-), 男, 博士, 讲师。研究方向: 昆虫毒理学。E-mail: kunzhang996164@hainanu.edu.cn

吴少英 (1980-), 女, 博士, 教授。研究方向: 昆虫分子毒理及生理生化。E-mail: wswy6000@hainanu.edu.cn

通道蛋白包括5个相同亚基的同源五聚体或5个不同亚基的异源五聚体。nAChRs的每个亚基包括1个N端亲水区、1个C端疏水区和4个跨膜结构域(TM1-TM4)。N端的亲水区包含6个Loop环(LoopA-LoopF),这些环参与构建配体结合腔,而跨膜区域TM2参与形成配体门控离子通道<sup>[20]</sup>。在脊椎动物中,nAChRs的亚基类型有4种,分别为 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 和 $\delta$ 亚基<sup>[21]</sup>,而昆虫nAChRs仅有 $\alpha$ 和 $\beta$ 亚基<sup>[22]</sup>。目前,将昆虫nAChR  $\alpha$ 亚基与脊椎动物nAChR  $\beta$ 亚基共同表达是体外研究nAChRs功能的主要方法之一,已经成功地在非洲爪蟾卵母细胞中表达出多种昆虫的具有活性的nAChRs,如桃蚜(*Myzus persicae*)<sup>[23]</sup>、褐飞虱(*Nilaparvata lugens*)<sup>[24]</sup>、黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)<sup>[20]</sup>、猫栉首蚤(*Ctenocephalides felis*)<sup>[25]</sup>和马铃薯叶甲(*Leptinotarsa decemlineata*)<sup>[26]</sup>等。

nAChRs在昆虫的中枢神经系统中广泛表达,参与调控学习和记忆行为<sup>[27]</sup>。新烟碱类杀虫剂通过与nAChRs结合,从而影响蜜蜂神经冲动传导,导致蜂群数量急剧下降<sup>[28]</sup>。因此,迫切需要从分子水平上阐明新烟碱类杀虫剂与意大利蜜蜂nAChRs的相互作用机制。本研究克隆意大利蜜蜂nAChR  $\alpha 1$ 亚基基因,并与脊椎动物大鼠nAChR  $\beta 2$ 亚基基因在非洲爪蟾卵母细胞中进行共表达,利用双电极电压钳技术明确了新烟碱类杀虫剂(吡虫啉、噻虫胺和呋虫胺)与Am $\alpha 1/\beta 2$  nAChR的相互作用机制,旨在为研发针对靶标害虫的高选择性杀虫剂提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验材料:雌性非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)购自于云南昆明动物研究所,并饲养于18℃恒温环境;意大利蜜蜂购自于海南省海口市当地养蜂户;脊椎动物nAChR  $\beta 2$ 亚基基因是大鼠(*Rattus norvegicus*)nAChR  $\beta 2$ 亚基基因(GenBank编号:AY574258),由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

试剂:乙酰胆碱(98%)购自上海源叶生物科技有限公司;阿托品(98.0%)、吡虫啉(99.0%)、噻虫胺(99.1%)和呋虫胺(98.1%)购自北京百灵威科技有限公司;提取RNA的试剂Trizol购自美国Ambion公司;合成cDNA的试剂PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit购自日本TaKaRa公

司;PCR产物纯化回收试剂盒Cycle-Pure Kit购自美国OMEGA公司;大肠杆菌Stbl-2感受态细胞购自上海唯地生物技术有限公司;质粒提取试剂盒Plasmid DNA Mini Kit购自美国OMEGA公司;体外合成cRNA试剂盒mMESSAGE mMACHINE™ T7购自美国Thermo Fisher公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 意大利蜜蜂nAChR  $\alpha 1$ 亚基的基因克隆** 液氮冷冻单头意大利蜜蜂成虫,取头部组织备用。利用试剂Trizol提取RNA,根据试剂PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit说明书反转录合成cDNA。从美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)下载意大利蜜蜂nAChR  $\alpha 1$ 亚基的基因序列(GenBank编号:XM\_026442626.1)并设计引物,上游引物为:TTGGCAGATCAATTCCCCGGGGATGCTTAGGGATGCTTGGTGGAAC,下游引物为:AGTGTAACCAGATCAAGCTTCTAGTCCTCCTCGGGACCCATG,引物均由北京擎科生物科技股份有限公司合成。基因扩增程序如下,PCR反应体系:2×Phanta Max Buffer 25.0  $\mu$ L, dNTP Mix 1.0  $\mu$ L, Forward primer 2.0  $\mu$ L, Reverse primer 2.0  $\mu$ L, cDNA 1.0  $\mu$ L, Phanta Max Super-Fidelity DNA polymerase 1.0  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 18.0  $\mu$ L;PCR反应程序:95℃预变性3 min,95℃变性15 s,55℃15 s,72℃延伸2 min,共计30个循环,72℃反应后延伸5 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳验证后储存于-20℃冰箱备用。

**1.2.2 载体构建** 根据Cycle-Pure Kit说明书对以上PCR产物进行纯化回收。首先,使用Hind III-HF和Xma I-HF限制性内切酶对表达载体PGH19进行酶切处理,处理后再次纯化和回收产物。然后,使用Enase II酶将经纯化回收后的PGH19和意大利蜜蜂nAChR  $\alpha 1$ 亚基连接起来,随后将连接产物转入Stbl-2感受态细胞并涂板<sup>[29]</sup>。最后将培养板倒置在30℃的恒温培养箱中隔夜培养,次日挑选单克隆菌落摇菌。在48 h后,根据Plasmid DNA Mini Kit说明书提取质粒,并取10  $\mu$ L质粒送至北京擎科生物科技股份有限公司进行测序。

**1.2.3 序列分析和系统发育树构建** 测序后的意大利蜜蜂nAChR  $\alpha 1$ 亚基在NCBI网站上进行序列同源性比对,下载其他43种昆虫nAChR  $\alpha 1$ 亚基基因序列信息(表1),通过MEGA 7.0软件中的邻接法

表 1 44 种昆虫 nAChR  $\alpha 1$  亚基基因的 NCBI 序列号  
 Tab. 1 NCBI sequence number of nAChR  $\alpha 1$  subunit gene in 44 insects

拉丁文名 Latin name	NCBI 序列号 NCBI sequence number	拉丁文名 Latin name	NCBI 序列号 NCBI sequence number
意大利蜜蜂 <i>Apis mellifera</i>	XP_026298411	家蝇 <i>Musca domestica</i>	XP_019893127
中华蜜蜂 <i>Apis cerana</i>	XP_028519935	黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	NP_524481
大蜜蜂 <i>Apis dorsata</i>	XP_031365742	冈比亚按蚊 <i>Anopheles gambiae</i>	AAU12503
小蜜蜂 <i>Apis florea</i>	XP_031775144	家蚕 <i>Bombyx mori</i>	ABV45511
黑大蜜蜂 <i>Apis laboriosa</i>	XP_043789690	草地贪夜蛾 <i>Spodoptera frugiperda</i>	XP_050562625
<i>Bombus affinis</i>	XP_050586095	棉铃虫 <i>Helicoverpa zea</i>	XP_047028973
<i>Bombus bifarius</i>	XP_033312403	赤拟谷盗 <i>Tribolium castaneum</i>	ABS86902
<i>Bombus huntii</i>	XP_050474877	米象 <i>Sitophilus oryzae</i>	XP_030752575
<i>Bombus pascuorum</i>	XP_060814639	七星瓢虫 <i>Coccinella septempunctata</i>	XP_044757148
火红熊蜂 <i>Bombus pyrosoma</i>	XP_043588786	猫栉首蚤 <i>Ctenocephalides felis</i>	XP_026465568
欧洲熊蜂 <i>Bombus terrestris</i>	XP_003397561	禾谷缢管蚜 <i>Rhopalosiphum padi</i>	ALB27745
<i>Bombus vosnesenskii</i>	XP_033359155	高粱蚜 <i>Melanaphis sacchari</i>	XP_025203039
<i>Dufourea novaeangliae</i>	XP_015439554	棉蚜 <i>Aphis gossypii</i>	XP_027844765
<i>Frieseomelitta varia</i>	XP_043529091	美洲大蠊 <i>Periplaneta americana</i>	AKV94620
<i>Habropoda laboriosa</i>	XP_017787385	小火蚁 <i>Wasmannia auropunctata</i>	XP_011693111
<i>Hylaeus volcanicus</i>	XP_053973889	西班牙箭蚁 <i>Cataglyphis hispanica</i>	XP_050456110
<i>Megalopta genalis</i>	XP_033338174	阿根廷蚁 <i>Linepithema humile</i>	XP_012232337
<i>Nomia melanderi</i>	XP_031846677	<i>Trachymyrmex septentrionalis</i>	XP_018352400
<i>Osmia lignaria</i>	XP_034184537	<i>Acromyrmex echinator</i>	XP_011050467
西花蓟马 <i>Frankliniella occidentalis</i>	AOT81837	<i>Atta cephalotes</i>	XP_012054740
棕榈蓟马 <i>Thrips palmi</i>	XP_034239543	<i>Atta colombica</i>	XP_018051500
辣椒果实蝇 <i>Bactrocera latifrons</i>	XP_018799038	<i>Trachymyrmex cornetzi</i>	XP_018365497

构建系统发育树, bootstrap 值为 1 000。最后通过以下网站对克隆基因进行生物信息学分析: 蛋白分子量和等电点 (<https://novopro.cn/tools/>)、N 末端信号

肽 (<https://services.healthtec-h.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>)、跨膜结构域 (<https://dtu.biolib.com/Deep-TMHMM>)、功能化位点 (<https://prosite.expasy.org/>)。



**1.2.4 cRNA 合成与注射** 选用 *Not* I 限制性内切酶对意大利蜜蜂 nAChR  $\alpha$ 1 亚基质粒和大鼠 nAChR  $\beta$ 2 亚基质粒进行酶切处理。处理完成后,根据 mMESSAGE mMACHINE™ T7 说明书合成 cRNA,并将其储存于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱备用。然后,解剖成熟雌性非洲爪蟾,获取处于 V ~ VI 期的卵母细胞。第一步,使用 5 号镊子将成堆的细胞撕成 5 ~ 8 个细胞成簇的细胞团;第二步,使用胶原酶 I 型(Collagenase Type I Lyophilized)对细胞团进行酶消处理;第三步,待卵母细胞表层的滤泡膜脱落后,挑选黑白色分明的细胞备用。接下来,将意大利蜜蜂 nAChR  $\alpha$ 1 亚基与大鼠 nAChR  $\beta$ 2 亚基的 cRNA 按照 5:1 的比例混合,并按每个卵母细胞注射 35 nL cRNA 的程序进行显微注射。注射后的卵母细胞放置在  $18^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱培养 4 ~ 7 d,以备后续的检测。

**1.2.5 电生理检测** 乙酰胆碱用 A-SOS 溶液 ( $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Atropine,  $1.0 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $1.8 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $2.0 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  KCl,  $10.0 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  HEPES,  $96.0 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl, pH=7.5) 溶解。待检测的标准品药剂(吡虫啉、噻虫胺和呋虫胺)先用 DMSO 溶解,再用 A-SOS 稀释至药剂中 DMSO 的最终浓度小于 0.1%,确保 DMSO 不会对 nAChRs 的检测产生影响。

使用双电极电压钳系统(Amplifier OC-725D 放大器, Digital-to-analogue converter Axon Digital

1550B 数模转换器)检测  $\text{Am}\alpha$ 1/ $\text{r}\beta$ 2 nAChR 的电流表达。检测前,依次设置钳制电位为  $-70 \text{mV}$ ,采样模式为 Episodic stimulation,采样频率为 Slow 100 Hz。检测程序:每个循环灌流 3 min,其中前 5 s 灌流药剂,后 175 s 灌流 A-SOS 溶液,每个浓度重复 3 次,共计 3 个循环,并使用 Clampex 11.2 软件记录数据。

**1.2.6 数据分析** 从 Clampfit 11.2 软件导出的数据用平均值  $\pm$  标准误差 (SEM) 表示,用 GraphPad Prism 8 软件对数据间的差异进行显著性分析,针对不同药剂激活  $\text{Am}\alpha$ 1/ $\text{r}\beta$ 2 nAChR 的数据差异选用单因素方差分析法进行处理 (Tukey 检验,  $P < 0.05$ )。

根据公式  $Y = \frac{I_{\text{max}}}{1 + 10^{(\log EC_{50} - \log X)^n}}$ ,用 GraphPad Prism 8 软件将数据进行非线性拟合,其中 Y 表示响应率,  $I_{\text{max}}$  表示最大响应率,  $EC_{50}$  表示诱发 50% 受体响应所需要的激动剂浓度, X 表示测试药剂的浓度,  $n_H$  表示希尔系数。

**2 结果与分析**

**2.1 意大利蜜蜂 nAChR  $\alpha$ 1 亚基基因克隆和序列分析** 经克隆获得的意大利蜜蜂 nAChR  $\alpha$ 1 亚基基因的开放阅读框长度为 1 884 bp,编码 627 个氨基酸。其中,核苷酸 A、T、C 和 G 的含量依次为 21.71%、19.90%、27.34% 和 31.05%(图 1)。通过生

A	Amex1	ATGCTTAGGGATGCTTGGCGAAGCAGCGTGGGAAAGGCTGGTGGGATGGTGTCTAGTGTGGCGGATTCGCTGGCGATGGGCGCGCCATTTCCGCGT	120
	Amex1	GCCTCGGCCAATTCGGAACCGAAGCGTCTCTAGCAGCACTGCTGTCGAACACTACAACCGCCTATCGCGCCCGTTGGCAACAACAGCGATCGCCTCACTTC	240
	Amex1	TCCCAGCTCATCGACGTTAACTCTAAGAACAGATCATGACGACCAAGCTTTGGGTGGAACAAGAGTGAAGCATTACAAGCTGAAGTGAACCCGGATG	360
	Amex1	CTCCACGTGCCGTCGGAGCATAFATGTTGCGGACATTTCTTTACAACAACCGCGATGGCAACTACGAGGTACCAATATGACCAAGCAATTTGACCATAC	480
	Amex1	TGGAAACCGCCCGCCATCATAAATCATTTTGGCAGATCGACCTGGAGTACTTCCCGTTTGACGAGCAGACTGTCTTATGAAGTTTGGTTCGGACTAC	600
	Amex1	TTGGCAGCCTTCCGACAGCCGAAGACTCGAAGCAGATCGAGGTGGGATCGACCTGACCGCACTACTACATTCGCTGAGTGGGACATCATAAAGTG	720
	Amex1	TTCTACATATGCTGGAGGAGCCCTACCCGATATCGTGTCAATATACCCCTACGCGGCAAGACCCCTTCTTACAGGGTGAACCTGATACATCCG	840
	Amex1	CTGCTGGTGTCTACCTGCGGAGGGACAGCGGGGAGAAGGTCTCGCTCTGATCTCGATCTCTGCTGCTGCTGACGGTGTCTTCTGCTACTGCT	960
	Amex1	ACGGTGCCGTGCTGGCAAGTACTACTGTTCACCATGCTGCTGGTCCCGTTTCCGTTGGTGTGACAGTAGCCGTGCTGAACCTGAACCTTCGATCG	1 080
	Amex1	AGTGGGTGAGGGTGGTTCATACAGCTGTTCGCCGTTCTCTCTCTATGAGAGCGCAAGAGGACGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG	1 200
	Amex1	GGGGTGGCGCGATGAACCCCAACCGGGAGGGGCTGGCGAGGTGGCAGGAGGACGACGAGCGGGGACGACGAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC	1 320
	Amex1	GGCATGCTACCGATGCTTCCATGTACAAGACTGACAAGACTGACAGCCTACTACCGCAACAGCTTACGCGGGAGTAGGAGATACCTGCCACCGTCT	1 440
	Amex1	TACGACCTTGGCGCGTGGCCACCGCTGGCCAGCAGCCCTAACGCCCTGCTTGGAGAGCCCTACCTCGCTCCCACTGCCGGGGCTGACGACGACCT	1 560
	Amex1	TACGTTACGAGGAGCCTGACCGCCACATTCGAGAAGCCCTGGTTCGCGAGATGCGAAGACCATCGACGATGCGAGGTTTATCGCTCAGCAGCCGA	1 680
	Amex1	GTGGAGGAGGACTGGAATACTGGCGATGCTGCTGACCGGATCTCTCTGTGGATATTCACCGTGGCCTGCTGCTGCGGACCGGTGTGATCATTT	1 800
	Amex1	ACCACGAAGCCGATCGACATCAAGTACAGCAAGATCGCGAAGAAGAGGATGCTGATGAACATGCGGTCGGGTCGGGACGAGGAGGACTAG	1 884
B	Amex1	MLRDASNDDGKGVWRWWSRLGGLLAMATAISCLVAPFFGASANSEAKRVLDDLSNYSNLRIRPVGNNSDRLETVKMGRLRSQLDVLNKNQIMTINV	120
	Amex1	LHVPSSEHILWLPDIVLNNADGNIEYTIMTKAILHHTCKVWVKPAIYKSFCEIDVEYFPFDEQTCFMKFGSWTYDGYTVDLRHLAQTEDSNQIEVG	240
	Amex1	FYICCEEYPIVFNITLRRKTLFYTVNLHPCVGSIFLSVLVFFYLPDSGKESVLSISILLSLTVFLLLAHIEPPTSLTVPLLGKYLFTMVLVTL	360
	Amex1	RWVRVFIQVLPFRLLIERPKKDEDEEEEEEVVVGRNAGVGMNANGANGVEDEDDDDDDDDDDVEAANGKPAEGLMDFVHVQETDKDYAYGNR	480
	Amex1	YDLGAVATYVTTVPCFEFPLSLPLPGADDDLFGPASPAYVHEDVSPTEFKPLVREIEKTIDARFIAQHAKNKDFESVEEDWKYVAMVLDRIFLW	600
	Amex1	TTKPIDIKYSKIAKRRMLMNMGPED	627

图 1 意大利蜜蜂 nAChR  $\alpha$ 1 亚基基因序列

A 意大利蜜蜂 nAChR  $\alpha$ 1 亚基核苷酸序列; B 意大利蜜蜂 nAChR  $\alpha$ 1 亚基氨基酸序列

Fig. 1 Sequence of nAChR  $\alpha$ 1 subunit gene of *A. mellifera*

A: The nucleotide sequence of nAChR  $\alpha$ 1 subunit of *A. mellifera*; B: The amino acid sequence of nAChR  $\alpha$ 1 subunit of *A. mellifera*

物信息学分析发现,该基因预测的蛋白分子量为 70.83 kDa,等电点为 4.418。此外,根据氨基酸结构域预测结果,发现该基因具有 nAChRs 亚基家族基因典型结构域特征,包括神经递质门控离子通道特征-间隔 13 个氨基酸残基的半胱氨酸环(171-185 位氨基酸)、N 端信号肽(1-43 位氨基酸)、4 个跨膜区 TM1-4(263-287、294-316、328-349、575-595 位氨基酸)、6 个 Loop 环 Loop A-F(129-136、192-199、236-251、98-103、148-161、204-216 位氨基酸),其中 Loop C 环上 2 个相邻的半胱氨酸残基(“CC”结构)是将该亚基划分为  $\alpha$  亚基的关键依据(图 1-B)。根据功能化位点的预测结果显示,该基因有 2 个 N 端糖基化位点(67-70、255-258 位氨基酸),5 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点(169-172、479-482、541-544、560-563、597-600 位氨基酸),7 个蛋白激酶 C 磷酸化位点(69-71、73-75、156-158、257-259、356-358、452-454、601-603 位氨基酸)和 10 个 N 端豆蔻酰化位点(22-27、40-45、77-82、116-121、216-221、399-404、403-408、460-465、473-478、484-489 位氨基酸)。

**2.2 意大利蜜蜂 nAChR  $\alpha 1$  亚基基因系统发育分析**

通过将 NCBI 数据库下载的 43 种昆虫 nAChR  $\alpha 1$  亚基基因和意大利蜜蜂 nAChR  $\alpha 1$  亚基基因的氨基酸序列构建系统发育树,结果(图 2)显示,包含意大利蜜蜂在内 44 种昆虫的 nAChR  $\alpha 1$  亚基基因间均具有一定同源性,膜翅目昆虫  $\alpha 1$  亚基与半翅目昆虫  $\alpha 1$  亚基的亲缘关系最远。而在膜翅目中,意大利蜜蜂的  $\alpha 1$  亚基与同为蜜蜂属的其他蜜蜂的  $\alpha 1$  亚基聚为一支,却与芭切叶蚁属昆虫的  $\alpha 1$  亚基亲缘关系最远。

**2.3 意大利蜜蜂 nAChR  $\alpha 1$  亚基基因在非洲爪蟾卵母细胞中的功能表达**

在 cRNA 混合物注射后的第 4 天,Am $\alpha 1$ /r $\beta 2$  nAChR 在非洲爪蟾卵母细胞中成功表达电流。电生理结果显示,  $1 \times 10^{-3} \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  乙酰胆碱就能激活 Am $\alpha 1$ /r $\beta 2$  nAChR,诱导产生微弱响应电流。随着乙酰胆碱浓度的增加,响应电流值逐渐增大(图 3-A)。当乙酰胆碱浓度为  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,其激动活性最强,诱导产生峰值电流,当乙酰胆碱浓度为  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,Am $\alpha 1$ /r $\beta 2$  nAChR 出现靶标脱敏现象,乙酰胆碱诱导电流值减小(图 3-A)。由图 3-B 乙酰胆碱的剂量反应曲线可知,乙酰胆碱的  $\text{pEC}_{50}$  值为  $5.786 \pm 0.145$ (表 2)。

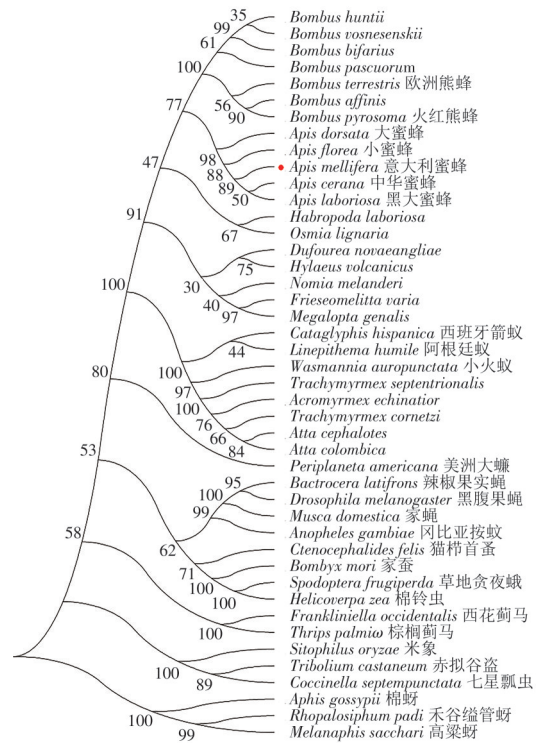


图 2 44 种昆虫 nAChR  $\alpha 1$  亚基基因系统发育树分析  
Fig. 2 Phylogenetic tree analysis of nAChR  $\alpha 1$  subunit genes of 44 insect species

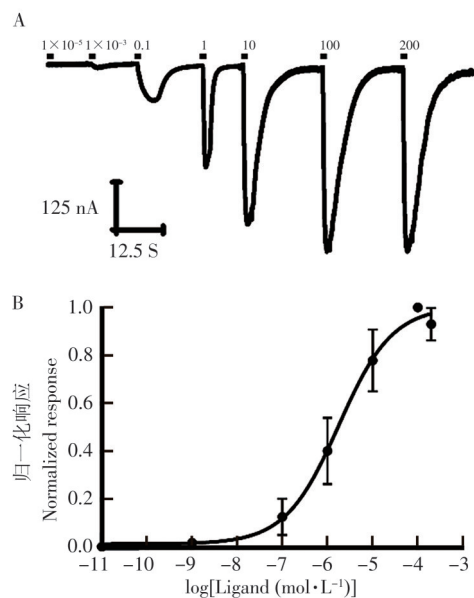


图 3 乙酰胆碱诱导 Am $\alpha 1$ /r $\beta 2$  nAChR 的电流响应  
A: Am $\alpha 1$ /r $\beta 2$  nAChR 随着乙酰胆碱( $1 \times 10^{-5} \sim 200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 浓度增加表现出的电生理学现象; B: 乙酰胆碱的剂量反应曲线。  
Fig. 3 Current response of Am $\alpha 1$ /r $\beta 2$  nAChR induced by acetylcholine

A: Am $\alpha 1$ /r $\beta 2$  nAChR showed electrophysiological phenomena with the increase of acetylcholine ( $1 \times 10^{-5} \sim 200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) concentration; B: Dose response curve of acetylcholine.

表2 4种化合物对Am $\alpha$ 1/r $\beta$ 2 nAChR的激动作用  
Tab. 2 Agonistic actions of four compounds on Am $\alpha$ 1/r $\beta$ 2 nAChR

nAChR 亚型 nAChR subtype	激动剂 Agonist	激动效率 $I_{\max}$	激动亲和力 $pEC_{50}$	细胞数 Oocyte number
Am $\alpha$ 1/r $\beta$ 2	乙酰胆碱 Acetylcholine	1.000 <sup>a</sup>	$5.786 \pm 0.145^b$	5
	吡虫啉 Imidacloprid	$0.075 \pm 0.005^b$	$8.637 \pm 0.241^a$	5
	噻虫胺 Clothianidin	$0.012 \pm 0.001^d$	$9.007 \pm 0.451^a$	5
	呋虫胺 Dinotefuran	$0.044 \pm 0.003^c$	$9.958 \pm 0.523^a$	5

注: 归一化最大响应电流用  $I_{\max}$  表示。  $pEC_{50}$  由公式  $-\log EC_{50} (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$  计算所得。不同字母表示不同激动剂对 Am $\alpha$ 1/r $\beta$ 2 nAChR 的  $I_{\max}$  或  $pEC_{50}$  值有显著性差异(单因素方差分析, Tukey 检验,  $P < 0.05$ )。

Note: The normalized maximum response current is expressed as  $I_{\max}$ . The  $pEC_{50}$  value is calculated by the formula  $-\log EC_{50} (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ . Different letters indicate that different agonists have significant differences in the  $I_{\max}$  or  $pEC_{50}$  values of Am $\alpha$ 1/r $\beta$ 2 nAChR (one-way ANOVA, Tukey test,  $P < 0.05$ ).

通过电生理实验发现, 3种新烟碱类杀虫剂(吡虫啉、噻虫胺和呋虫胺)均可诱导 Am $\alpha$ 1/r $\beta$ 2 nAChR 产生响应电流(图4)。以乙酰胆碱诱导的峰值电流值为分母, 测试新烟碱药剂诱导的峰值电流值为分子, 进行归一化处理获得测试药剂激动效率的评价指标  $I_{\max}$ 。结果显示, 吡虫啉的激动效率最高( $0.075 \pm 0.005$ ), 其次为呋虫胺( $0.012 \pm 0.001$ ), 最低的是噻虫胺( $0.044 \pm 0.003$ ), 三者之间存在显著性差异。根据  $pEC_{50}$  值可知, Am $\alpha$ 1/r $\beta$ 2 nAChR 对呋虫胺( $9.958 \pm 0.523$ )的亲和力最高, 噻虫胺( $9.007 \pm 0.451$ )次之, 对吡虫啉( $8.637 \pm 0.241$ )的亲和力最低(表2)。

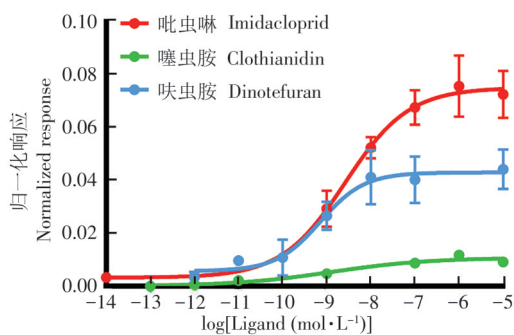


图4 三种新烟碱类杀虫剂的剂量反应曲线

Fig. 4 Dose-response curves of three neonicotinoid insecticides

### 3 讨论

迄今为止, 科学家已经在多种昆虫中研究了 nAChR  $\alpha$ 1 亚基, 包括桃蚜<sup>[23]</sup>、棉蚜 (*Aphis gossypii*)<sup>[30]</sup>、褐飞虱<sup>[24]</sup>、铜绿蝇 (*Lucilia cuprina*)<sup>[31]</sup>、黑腹

果蝇<sup>[20]</sup>、猫栉首蚤<sup>[25]</sup>、甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*)<sup>[32]</sup>、马铃薯叶甲<sup>[26]</sup>、韭菜迟眼蕈蚊 (*Bradysia odoriphaga*)<sup>[33]</sup>、血红扇头蜉 (*Rhipicephalus sanguineus*)<sup>[34]</sup>等。Shan 等<sup>[33]</sup>通过比对韭菜迟眼蕈蚊的吡虫啉敏感品系 nAChR  $\alpha$ 1 亚基基因的表达水平发现, 随着吡虫啉抗性倍数增加,  $\alpha$ 1 亚基基因的转录水平逐渐下调。同时, 他们还利用 RNAi 技术干扰  $\alpha$ 1 亚基基因, 并进行吡虫啉毒力测定, 结果发现处理组种群的死亡率下降。Qu 等<sup>[35]</sup>通过 RNAi 技术干扰马铃薯叶甲 nAChR  $\alpha$ 1 亚基基因表达, 进一步毒力测定结果表明处理组种群对吡虫啉和噻虫啉的敏感性显著降低。Wang 等<sup>[32]</sup>利用 CRISPR/Cas9 技术敲除甜菜夜蛾 nAChR  $\alpha$ 1 亚基基因, 并对敲除品系进行毒力测定, 结果显示其对呋虫胺的抗性增加。Lu 等<sup>[36]</sup>敲除黑腹果蝇 nAChR  $\alpha$ 1 亚基基因后显示  $\alpha$ 1 亚基敲除品系对包括吡虫啉、噻虫啉、啉虫脒、噻虫啉、噻虫胺、呋虫胺、烯啶虫胺和氟啶虫胺脒在内的 8 种常用杀虫剂的抗性水平均出现不同程度的上升。上述研究结果表明, 昆虫 nAChR  $\alpha$ 1 亚基在种群对新烟碱类杀虫剂产生抗性过程中起到了重要的调控作用。

此外, 相关研究结果显示, 不同昆虫的  $\alpha$ 1 亚型 nAChR 对常用杀虫剂的敏感性也存在差异, 例如: 褐飞虱  $\alpha$ 1 亚型 nAChR 对包括啉虫脒、吡虫啉、烯啶虫胺、噻虫啉、噻虫胺、噻虫啉和呋虫胺在内的 7 种杀虫剂的敏感性存在差异, 其对噻虫啉最敏感, 对呋虫胺最不敏感<sup>[24]</sup>; 马铃薯叶甲  $\alpha$ 1 亚型 nAChR 对吡虫啉的敏感性最高, 呋虫胺次之, 对噻虫啉敏感性最低<sup>[26]</sup>; 棉蚜  $\alpha$ 1 亚型 nAChR 对氟啶虫



胺腈最敏感, 噻虫啉次之, 对呋虫胺敏感性最低<sup>[37]</sup>; 黑腹果蝇 $\alpha 1$ 亚型nAChR对吡虫啉最敏感, 噻虫胺次之, 对呋虫胺敏感性最低<sup>[25]</sup>。上述研究结果表明, 不同类型的昆虫 $\alpha 1$ 亚型nAChR对多种新烟碱类杀虫剂的敏感性存在差异。与此类似, 意大利蜜蜂 $\alpha 1$ 亚型nAChR对不同种新烟碱类杀虫剂也存在敏感性差异。

本研究获得意大利蜜蜂nAChR $\alpha 1$ 亚基基因, 生物信息学分析显示该亚基具有nAChRs亚基家族基因典型结构域特征, 与其聚在一支的大蜜蜂 $\alpha 1$ 亚基基因序列的同源性高达100%, 但与半翅目昆虫nAChR $\alpha 1$ 亚基基因的亲缘关系较远, 这说明不同物种 $\alpha 1$ 亚基基因间存在序列差异性。Ihara等<sup>[20]</sup>通过比对黑腹果蝇和脊椎动物的nAChR亚基基因序列发现保守区域Loop G环上存在差异性氨基酸残基, 黑腹果蝇 $\alpha 1$ 亚基中是精氨酸(R), 在脊椎动物 $\alpha$ 亚基相对应位置是丝氨酸(S), 将黑腹果蝇 $\alpha 1$ 亚基中精氨酸突变为丝氨酸后, Dm $\alpha 1^{R57S}$ /chicken $\beta 2$ nAChR对噻虫啉的敏感性下降。Lees等<sup>[34]</sup>发现血红扇头蜉 $\alpha 1$ 亚型nAChR对尼古丁和胆碱敏感, 但对吡虫啉不敏感, 而Dederer等<sup>[25]</sup>却发现同为吸血害虫的猫栉首蚤 $\alpha 1$ 亚型nAChR对吡虫啉最敏感, 这表明不同物种nAChR $\alpha 1$ 亚基在位点上存在差异, 这可能导致不同物种 $\alpha 1$ 亚型nAChR对同一种新烟碱类杀虫剂出现敏感性差异。未来可以筛选蜜蜂和多种农业害虫的 $\alpha 1$ 亚型nAChR与药剂结合的差异位点, 从而设计出对蜜蜂低毒的新型高选择性杀虫剂。

## 参考文献:

- [1] LIU S, LIU Y, HE F, et al. Enantioselective olfactory effects of the neonicotinoid dinotefuran on honey bees (*Apis mellifera* L.) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(43): 12105–12116.
- [2] KLEIN A M, VAISSIÈRE B E, CANE J H, et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops [J]. Proceedings Biological Sciences, 2007, 274(1608): 303–313.
- [3] GALLAI N, SALLES J M, SETTELE J, et al. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline [J]. Ecological Economics, 2009, 68(3): 810–821.
- [4] VANENGELSDORP D, UNDERWOOD R, CARON D, et al. Estimate of managed colony losses in the winter of 2006–2007: A report commissioned by the apiary inspectors of America [J]. American Bee Journal, 2007, 147: 599–603.
- [5] AURELL D, BRUCKNER S, WILSON M, et al. A national survey of managed honey bee colony losses in the USA: results from the bee informed partnership for 2020–21 and 2021–22 [J]. Journal of Apicultural Research, 2024, 63(1): 1–14.
- [6] WILLIAMS G R, TARPY D R, VANENGELSDORP D, et al. Colony collapse disorder in context [J]. BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology, 2010, 32(10): 845–846.
- [7] VANENGELSDORP D, EVANS J D, SAEGERMAN C, et al. Colony collapse disorder: a descriptive study [J]. PLoS One, 2009, 4(8): e6481.
- [8] CHEN Y P, PETTIS J S, CORONA M, et al. Israeli acute paralysis virus: epidemiology, pathogenesis and implications for honey bee health [J]. PLoS Pathogens, 2014, 10(7): e1004261.
- [9] MARTIN S J, HIGHFIELD A C, BRETTELL L, et al. Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite [J]. Science, 2012, 336(6086): 1304–1306.
- [10] MESNAGE R, ANTONIOU M N. Ignoring adjuvant toxicity falsifies the safety profile of commercial pesticides [J]. Frontiers in Public Health, 2018, 5: 361.
- [11] LI G, ZHAO H, LIU Z, et al. The wisdom of honeybee defenses against environmental stresses [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 722.
- [12] STRAUB L, WILLIAMS G R, VIDONDO B, et al. Neonicotinoids and ectoparasitic mites synergistically impact honeybees [J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 8159.
- [13] FORFERT N, TROXLER A, RETSCHNIG G, et al. Neonicotinoid pesticides can reduce honeybee colony genetic diversity [J]. PLoS One, 2017, 12(10): e0186109.
- [14] 张伟, 齐素贞, 薛晓锋, 等. 农药对蜜蜂的影响及毒理学机制研究进展 [J]. 农药学报, 2022, 24(5): 1125–1138.
- [15] LIU J, LI Y, ZHANG Z, et al. Low concentration of quercetin reduces the lethal and sublethal effects of imidacloprid on *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae) [J]. Journal of Economic Entomology, 2021, 114(3): 1053–1064.
- [16] TOSI S, NIEH J C. A common neonicotinoid pesticide, thiamethoxam, alters honey bee activity, motor functions, and movement to light [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 15132.
- [17] TSVETKOV N, SAMSON-ROBERT O, SOOD K, et al. Chronic exposure to neonicotinoids reduces honey bee health near corn crops [J]. Science, 2017, 356(6345): 1395–1397.
- [18] IHARA M, MATSUDA K. Neonicotinoids: molecular mechanisms of action, insights into resistance and impact on pollinators [J]. Current Opinion in Insect Science, 2018, 30: 86–92.

- [19] CHANGEUX J P. The nicotinic acetylcholine receptor: the founding father of the pentameric ligand-gated ion channel superfamily [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(48): 40207–40215.
- [20] IHARA M, HIKIDA M, MATSUSHITA H, et al. Loops D, E and G in the *Drosophila* D $\alpha$ 1 subunit contribute to high neonicotinoid sensitivity of D $\alpha$ 1-chicken  $\beta$ 2 nicotinic acetylcholine receptor [J]. *British Journal of Pharmacology*, 2018, 175(11): 1999–2012.
- [21] 李旭扬, 陈舒苗, 于津鹏, 等.  $\alpha$ 6/ $\alpha$ 3 $\beta$ 4 烟碱型乙酰胆碱受体  $\beta$ 4 亚基双点突变体的制备及其功能研究 [J]. *热带生物学报*, 2021, 12(4): 403–411.
- [22] 马倩芸, 江涛, 于日磊. 烟碱乙酰胆碱受体结构的研究进展 [J]. *中国海洋药物*, 2018, 37(2): 97–102.
- [23] ZHOU Y, HAN Q, FENG K, et al. New binding sites of nicotinic acetylcholine receptors from *Myzus persicae* [J]. *Entomologia Generalis*, 2023, 43(2): 461–470.
- [24] LIU Z, WILLIAMSON M S, LANSDELL S J, et al. A nicotinic acetylcholine receptor mutation (Y151S) causes reduced agonist potency to a range of neonicotinoid insecticides [J]. *Journal of Neurochemistry*, 2006, 99(4): 1273–1281.
- [25] DEDERER H, WERR M, ILG T. Differential sensitivity of *Ctenocephalides felis* and *Drosophila melanogaster* nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 2 subunits in recombinant hybrid receptors to nicotinoids and neonicotinoid insecticides [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 41(1): 51–61.
- [26] WANG Z M, LI S, SHI C C, et al. The actions of neonicotinoid insecticides on nicotinic acetylcholine subunits Ld $\alpha$ 1 and Ld $\alpha$ 8 of *Leptinotarsa decemlineata* and assembled receptors [J]. *Insect Science*, 2022, 29(5): 1387–1400.
- [27] GAUTHIER M. State of the art on insect nicotinic acetylcholine receptor function in learning and memory [J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2010, 683: 97–115.
- [28] FAROOQUI T. A potential link among biogenic amines-based pesticides, learning and memory, and colony collapse disorder: a unique hypothesis [J]. *Neurochemistry International*, 2013, 62(1): 122–136.
- [29] 潘雪莲, 杨磊, 袁琳琳, 等. 豆大蓟马钠离子通道基因克隆及分析 [J]. *热带生物学报*, 2022, 13(3): 249–258.
- [30] HIRATA K, JOURAKU A, KUWAZAKI S, et al. The R81T mutation in the nicotinic acetylcholine receptor of *Aphis gossypii* is associated with neonicotinoid insecticide resistance with differential effects for cyano- and nitro-substituted neonicotinoids [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2017, 143: 57–65.
- [31] DEDERER H, BERGER M, MEYER T, et al. Structure-activity relationships of acetylcholine derivatives with *Lucilia cuprina* nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 2 subunits in chicken  $\beta$ 2 subunit hybrid receptors in comparison with chicken nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha$ 4/ $\beta$ 2 [J]. *Insect Molecular Biology*, 2013, 22(2): 183–198.
- [32] WANG Z, ZHANG R, PEI Y, et al. The knockout of the nicotinic acetylcholine receptor subunit gene  $\alpha$ 1 (nAChR  $\alpha$ 1) through CRISPR/Cas9 technology exposes its involvement in the resistance of *Spodoptera exigua* to insecticides [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2023, 196: 105616.
- [33] SHAN T, ZHANG H, CHEN C, et al. Low expression levels of nicotinic acetylcholine receptor subunits Bo $\alpha$ 1 and Bo $\beta$ 1 are associated with imidacloprid resistance in *Bradysia odoriphaga* [J]. *Pest Management Science*, 2020, 76(9): 3038–3045.
- [34] LEES K, JONES A K, MATSUDA K, et al. Functional characterisation of a nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha$  subunit from the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* [J]. *International Journal for Parasitology*, 2014, 44(1): 75–81.
- [35] QU Y, CHEN J, LI C, et al. The subunit gene Ld $\alpha$ 1 of nicotinic acetylcholine receptors plays important roles in the toxicity of imidacloprid and thiamethoxam against *Leptinotarsa decemlineata* [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2016, 127: 51–58.
- [36] LU W, LIU Z, FAN X, et al. Nicotinic acetylcholine receptor modulator insecticides act on diverse receptor subtypes with distinct subunit compositions [J]. *PLoS Genetics*, 2022, 18(1): e1009920.
- [37] 姚香梅. 新烟碱类杀虫剂对靶标和非靶标昆虫乙酰胆碱受体毒理学特性研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2015.



# Functional expression and analysis of *Apis mellifera* $\alpha 1$ nicotinic acetylcholine receptor

GENG Junjie<sup>1,2</sup>, WANG Yuquan<sup>1,2</sup>, ZHANG Kun<sup>1,2</sup>, WU Shaoying<sup>1,2</sup>

(1. School of Breeding and Multiplication (Sanya Institute of Breeding and Multiplication), Hainan University, Sanya, Hainan 572025, China; 2. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

**Abstract:** Neonicotinoids that act on insect nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) are common tools for crop pest control, but they have serious negative effects on pollinators such as *Apis mellifera*. In this study, the nAChR  $\alpha 1$  subunit gene was cloned from *A. mellifera* and systematically analyzed. The interaction mechanism between the nAChR  $\alpha 1$  subtype and neonicotinoids (imidacloprid, clothianidin, and dinotefuran) was investigated by using the two-electrode voltage clamp technique. Sequence alignment and phylogenetic tree analysis showed that the nAChR  $\alpha 1$  subunit of *A. mellifera* had typical domain characteristics in the nAChR subunit family genes, and was most distantly related to the  $\alpha 1$  subunit of Hemiptera insects and most closely related to the  $\alpha 1$  subunit of bees from Hymenoptera. The combination of *A. mellifera* nAChR  $\alpha 1$  subunit and *Rattus norvegicus* nAChR  $\beta 2$  subunit was co-expressed in *Xenopus laevis* oocytes. Electrophysiological results showed that imidacloprid had the highest agonistic efficiency and lowest agonistic affinity, that clothianidin had the lowest agonistic efficiency and that dinotefuran had the highest agonistic affinity for Am $\alpha 1/r\beta 2$  nAChR, indicating that the  $\alpha 1$  subunit of *A. mellifera* nAChRs is one of the targets of neonicotinoids and the sensitivity of Am $\alpha 1/r\beta 2$  nAChR to different neonicotinoids is different. All these results have important theoretical significance for the development of novel highly selective insecticides for target insects.

**Keywords:** *Apis mellifera*; nicotinic acetylcholine receptor;  $\alpha 1$  subunit; functional expression

(责任编辑:叶 静)