

拟黑多刺蚁 *mAChR* 基因发育表达的 荧光实时定量 RT-PCR 检测

吕淑敏^{1,2}, 姜 鸣¹, 卜翠萍³, 奚耕思²

(1 西北农林科技大学 植保资源与病虫害治理教育部重点实验室, 陕西 杨凌 712100;

2 陕西师范大学 生命科学学院, 陕西 西安 710062; 3 中国科学院 动物研究所, 北京 100101)

[摘 要] **【目的】**研究毒蕈碱型乙酰胆碱受体(Muscarinic cholinergic receptor, mAChR)在拟黑多刺蚁个体发育中的表达情况,探讨其是否参与拟黑多刺蚁的个体发育行为。**【方法】**采用 SYBR Green I 实时定量 RT-PCR 方法,检测拟黑多刺蚁卵、幼虫、蛹和成虫个体发育阶段 *mAChR* 基因 mRNA 的相对表达量。**【结果】***mAChR* 基因在拟黑多刺蚁整个发育过程及各个品级成虫中均有表达。在卵期 *mAChR* mRNA 的表达量较幼虫期和蛹期高,而成虫期的表达量最高,可达卵期的 3 倍以上。3 个成虫品级之间,工蚁的表达量最高,雄蚁和雌蚁的表达量在统计学上差异不显著。**【结论】***mAChR* 基因参与了拟黑多刺蚁的发育行为,而其主要功能可能是在调节成虫更为复杂的行为中起作用。

[关键词] 拟黑多刺蚁;毒蕈碱型乙酰胆碱受体;实时定量 RT-PCR;发育表达

[中图分类号] Q965

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2010)12-0161-06

Real-time quantitative RT-PCR detection for developmental expression of a muscarinic cholinergic receptor gene in the ant *Polyrhachis vicina*

LÜ Shu-min^{1,2}, JIANG Ming¹, BU Cui-ping³, XI Geng-si²

(1 Key Laboratory of Plant Protection Resources and Pest Management, National Ministry Education, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710062, China;

3 China Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: **【Objective】**To determine whether insect mAChR was involved in its development, the expression levels of mAChR mRNA during developmental stages of the ant *Polyrhachis vicina* were studied. **【Method】**The relative expression of mAChR mRNA during the development of *P. vicina* was investigated by real-time quantitative RT-PCR method. **【Result】**The results revealed that mAChR mRNA was expressed in all samples tested at different levels. The expression of mAChR was higher in eggs than in larval and pupal stages, and the highest level was found in the adults of three castes. Among the adults, the mAChR expressed highest in workers, and there was no significant difference between the male and female ants. **【Conclusion】**Our study indicated that mAChR is also involved in ant development, but the main physiological functions of mAChR are involved in regulating the behaviors or other physiological activities in adults.

Key words: *Polyrhachis vicina*; muscarinic cholinergic receptor (mAChR); real-time quantitative RT-

* [收稿日期] 2010-04-28

[基金项目] 西北农林科技大学人才基金项目(01140411);教育部博士点新教师基金项目(20090204120004);中国博士后科学基金项目(20090451405)

[作者简介] 吕淑敏(1980—),女,安徽黄山人,讲师,博士,主要从事昆虫生理生化研究。E-mail: shuminlv@nwsuaf.edu.cn

PCR;developmental expression

毒蕈碱型乙酰胆碱受体(Muscarinic acetylcholine recptor,mAChR)是昆虫神经系统中一种十分重要的神经递质受体,属于 G 蛋白偶联受体超家族成员。mAChR 与配体结合后通过激活胞内信号转导途径调节昆虫取食、迁飞、发声、学习记忆等行为^[1-3]。Onai 等^[4]首次从果蝇(*D. melanogaster*)体内克隆获得昆虫的第一个 mAChR 基因序列。此后,利用果蝇 mAChR 制备多克隆抗体,分别对果蝇^[1]、意大利蜜蜂(*Apis mellifera*)^[5]、烟草天蛾(*Manduca sexta*)^[6]、家蚕(*Bombyx mori*)^[7]等昆虫的神经系统进行了免疫组织化学定位研究,发现 mAChR 蛋白广泛存在于昆虫神经系统,不仅在神经元中表达,而且在神经胶质细胞和上皮细胞中也有表达,参与神经元轴突的延伸和表皮的形成,并且调节学习记忆等行为。通过药理学研究还发现,mAChR 与昆虫的发声机制相关^[8],介导蜜蜂脑部蕈形体的可塑性^[9]。从有限的昆虫 mAChR 相关资料可知,mAChR 广泛存在于昆虫体内,可能参与多种生理功能。

在哺乳动物的研究中发现,胎儿体内有大量的 mAChR 表达,其介导的信号转导途径在调节胎儿发育及行为方面起着重要作用^[10-12]。对于在进化上相对比较保守的 mAChR 来说,其是否也表达于昆虫胚胎或幼虫期并参与昆虫的发育,目前国内外尚未见相关报道。拟黑多刺蚁(*Polyrhachis vicina*)是典型的社会性昆虫,具有品级分化、行为复杂、分工明确等特征,是研究昆虫发育及行为调控机制的良好材料。鉴于此,本研究以拟黑多刺蚁为材料,基于前期研究克隆获得的拟黑多刺蚁 mAChR 基因全长 cDNA 序列(GenBank 号:EU573239)设计特异性引物,采用荧光实时定量 RT-PCR 技术,对拟黑多刺蚁不同发育阶段、不同品级蚂蚁体内 mAChR 基因 mRNA 水平的表达量进行相对定量研究,旨在了解 mAChR 基因在昆虫发育过程中的表达规律,并探讨其表达与社会性昆虫行为的相关性。

1 材料与方法

1.1 试验材料

拟黑多刺蚁购自广西横县宏发食用蚂蚁研究中心,于实验室传代饲养,室温控制在(28±3)℃,空气湿度 40%,并以梨、苹果、鱼饵、蜂蜜等食物饲养繁殖。拟黑多刺蚁幼虫龄期的划分方法主要参考日本

弓背蚁龄期划分方法和戴氏定律^[13],将幼虫划分为 4 个龄期。取卵、不同发育阶段幼虫、蛹及不同品级成虫(工蚁、雌蚁和雄蚁)于液氮速冻后,-80℃低温冰箱冻存备用。

1.2 试剂与仪器

Total RNA 提取试剂盒(RNAiso Reagent, #D312)、SYBR Green I 实时定量 PCR 试剂盒(SYBR® Premix Ex Taq™ II, # DRR081A)和 DNase I (RNase Free, # D2215)购自宝生物工程(大连)有限公司,反转录试剂盒(RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit, # K1621)购自加拿大 MBI Fermentas 公司。实时定量 PCR 仪器为 iQ™5 apparatus PCR 仪(Bio-Rad,美国)。

1.3 总 RNA 的提取与第一链 cDNA 的合成

随机选取拟黑多刺蚁成虫阶段 3 个品级蚂蚁各 10 头,幼虫阶段各 15 头,采用 Total RNA 提取试剂盒提取不同发育阶段及不同品级成虫的总 RNA,经 DNase I 处理后用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性。通过质量鉴定的总 RNA,采用 MBI 反转录试剂盒合成第一链 cDNA。反转录反应时,总 RNA 用量为 4 μg,反转录引物为 Oligo(dT),反转录产物保存于-80℃备用。

1.4 荧光实时定量 RT-PCR 检测

1.4.1 内参基因的选择及引物的设计与合成 荧光实时定量 RT-PCR 试验中,为了去除不同样本在 RNA 质量以及反转录效率等方面可能存在的差别,对目的基因进行准确定量,通常要选择一定的内参基因进行校正和标准化。本研究选择在昆虫基因表达实时定量 RT-PCR 研究中广泛使用的 β -actin^[14-15]作为内参基因, β -actin 引物 S2/A2 参照文献^[16]设计。采用 Primer 5.0 及 Oligo 软件,在已克隆得到的拟黑多刺蚁 mAChR (GenBank 号:EU573239)基因编码区设计特异性引物 S1/A1。试验引物的相关信息见表 1。引物由北京奥科公司合成。

1.4.2 目的基因和内参基因引物的专一性检测 以工蚁 cDNA 为模板,对 mAChR 和 β -actin 基因引物进行专一性检测,反应体系为:模板 2 μL、上下游引物各 0.4 μL(10 μmol/L)、2×PCR Mix 12.5 μL、ddH₂O 9.7 μL。PCR 反应程序:94℃ 3 min;94℃ 45 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,30 个循环;72℃ 10 min。PCR 产物经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。

表 1 荧光实时定量 RT-PCR 引物及其相关参数

Table 1 The reference of oligonucleotide primers used for real-time quantitative RT-PCR

基因 Gene	引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence	退火温度/℃ Annealing temperature	产物长度/bp Expected size
<i>mAchR</i>	S1	GCCGCGTTTTATGTTCTCTGT	62	80
	A1	TCCTTCTGCCGTTTCTTGGT		
<i>β-actin</i>	S2	CCCTCTTCCAGCCATCGTTC	60	250
	A2	CCACCGATCCAGACGGAGTA		

1.4.3 SYBR Green I 荧光实时定量 PCR 检测
选用工蚁 cDNA 模板做标准曲线,模板的稀释倍数为 $1\times, 10^1\times, 10^2\times, 10^3\times, 10^4\times$ 。实时定量 PCR 反应体系为 25 μL ,反应组分及浓度见表 2。反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 60 s; 60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s。将 PCR 产物的温度从 60 $^{\circ}\text{C}$ 增到 95 $^{\circ}\text{C}$,每上升 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 测 1 次荧光值,最后

由熔解曲线分析程序生成熔解曲线,根据熔解曲线确定反应产物的单一性。每个样品做 3 次重复,结果取平均值,每次反应中目的基因和内参基因分别做一管不加模板的空白对照。采用以上方法,分别对拟黑多刺蚁不同发育阶段、不同品级成虫的 *mAchR* 基因 mRNA 的相对表达量进行荧光实时定量分析。

表 2 实时定量 RT-PCR 反应体系及各反应组分浓度

Table 2 The reagents and concentration in real-time quantitative RT-PCR

反应组分 Content	反应体积/ μL Volume	反应组分 Content	反应体积/ μL Volume
SYBR Premix Ex <i>Taq</i> TM (2 $\times$)	12.5	10 ng/ μL 模板 Template	2.0
10 $\mu\text{mol/L}$ 上游引物 Sense primer	0.4	双蒸水 ddH ₂ O	9.7
10 $\mu\text{mol/L}$ 下游引物 Antisense primer	0.4		

1.5 数据分析

选用卵 cDNA 样品作为参照组,并人为规定参照组目的基因的相对表达量为 1,其他样品的表达量均是相对于参照组的表达量。目的基因的相对表达量(*F*)采用下式^[17]计算: $F = 10^{\Delta C_t, t / \Delta t - \Delta C_t, r / \Delta r}$ 。式中: ΔC_t , *t* 表示待测组与参照组目的基因循环阈值(*Ct*)之差; ΔC_t , *r* 为待测组与参照组内参基因 *Ct* 值之差; Δt 表示目的基因的标准曲线斜率; Δr 表示内参基因的标准曲线斜率。将所得数据输入 Excel 软件,计算每个样品、每个重复 *mAchR* 的相对表达量,即 *F* 值。对所得数据采用 SPSS13.0 软件的 One-Way ANOVA 方法进行单因素方差分析,并进行 Dunnett's multiple comparison 检验,根据“平均值±标准误”绘制统计图。

2 结果与分析

2.1 引物的特异性检测

按照 SYBR Green I 荧光实时定量 PCR 技术的要求,所扩增的目的基因和内参基因长度原则上不应超过 300 bp,本试验所设计的 *mAchR* 和 *β-actin* 基因特异性引物扩增产物长度分别为 80 和 250 bp,符合上述要求。为了确保目的基因定量的准确性,在普通 PCR 仪上对 PCR 的特异性扩增条件进行了摸索,结果表明,在反应体系为 25 μL 、上下游引物各 0.4 μL 、退火温度 60 $^{\circ}\text{C}$ 、循环数为 35~40

的条件下,PCR 扩增效果较好,凝胶电泳检测呈现单一的特异性条带,没有引物二聚体和非特异性条带产生(图 1)。

定量分析软件所形成的熔解曲线仅有单一峰, *mAchR* 和 *β-actin* 基因 PCR 产物的熔解曲线峰值分别在约 80 $^{\circ}\text{C}$ 和 85 $^{\circ}\text{C}$,且熔解温度均一(图 2),说明产物特异性较高。以上结果说明,本试验设计的实时定量引物合理,能够用于荧光实时定量 PCR 分析目的基因的相对表达量。

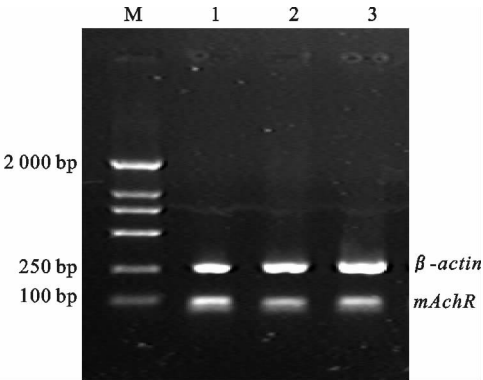


图 1 *β-actin* 和 *mAchR* 基因荧光实时定量引物的特异性检测

M. DNA Marker; 1. 工蚁; 2. 雌蚁; 3. 雄蚁

Fig. 1 The specification of primers of *β-actin* and *mAchR* for real-time RT-PCR

M. DNA Marker; 1. Workers; 2. Female ants; 3. Male ants

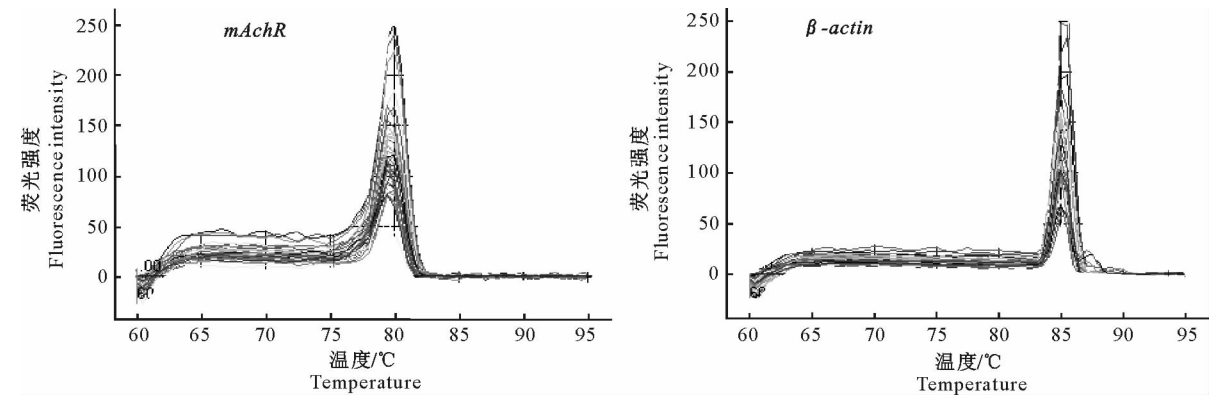


图 2 拟黑多刺蚁 *mAchR* 和 *β-actin* 基因的熔解曲线

Fig. 2 Melt curve peak chart of *mAchR* and *βactin* gene in *polyrhachis vicina*

2.2 拟黑多刺蚁 *mAchR* mRNA 发育表达的检测

对拟黑多刺蚁卵、4 个龄期幼虫、蛹和不同品级成虫共 9 个样本 *mAchR* 基因的 mRNA 相对表达水平进行实时定量检测。以工蚁 cDNA 为模板,进行 $1\times, 10^1\times, 10^2\times, 10^3\times, 10^4\times$ 倍稀释后,获得目的基因(*mAchR*)和内参基因(*βactin*)的标准曲线如图 3 所示,曲线的横坐标和纵坐标分别表示基因扩增

产物起始模板拷贝数的常用对数与其对应 *Ct* 值。由图 3 可见,2 个标准曲线的相关系数 R^2 均接近于 1,说明标准曲线的线性关系较好,能用于目的基因的准确定量。*mAchR* 和 *β-actin* 基因标准曲线的斜率分别为 -2.579 和 -3.113 ,通过公式 $F = 10^{\Delta Ct, t / \Delta Ct, r / \Delta Ct, r / \Delta Ct, r}$ 计算获得各样本目的基因的相对表达量,结果如图 4 所示。

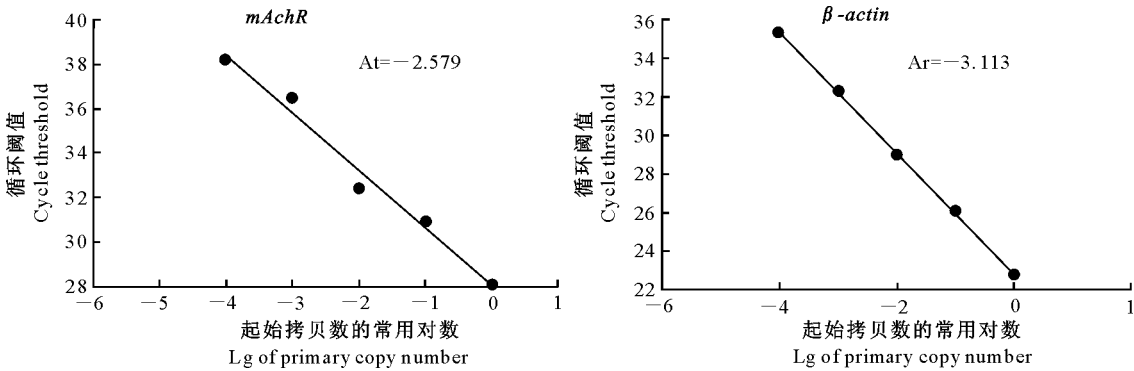


图 3 拟黑多刺蚁 *mAchR* 和 *β-actin* 基因发育分析的标准曲线

Fig. 3 The standard curves of *mAchR* and *βactin* genes in *polyhachis vicina* in analysis of developmental stages

由图 4 可知,*mAchR* mRNA 在拟黑多刺蚁整个发育过程及各个品级中均有表达,卵期的相对表达量较幼虫期和蛹期高,而 3 个品级成虫中的表达量最高。1 龄幼虫的表达量较卵显著降低,2 和 3 龄幼虫的表达量有上升趋势,但这 3 个龄期之间的表达量差异不显著;4 龄幼虫的表达量最低;蛹期表达量有回升现象,但仍低于卵期的表达量;3 个品级成虫之间,工蚁的表达量最高,雄蚁和雌蚁的表达量在统计学上差异不显著。将卵期 *mAchR* 的相对表达量作为标准设定为 1,则幼虫期及蛹期的表达量仅为卵期的 26%~52%,而成虫期的表达量是卵期的 3.31~3.53 倍。由以上结果可知,虽然 *mAchR* mRNA 在整个发育阶段表达量均较低,但各阶段之

间仍以较小的趋势变化。

3 讨论

荧光实时定量 RT-PCR 技术能够实时检测记录 PCR 扩增产物的量,克服了终法定量 PCR 产物的不足,使准确定量 RNA 成为现实。目前,荧光实时 RT-PCR 定量基因表达常采用 2 种方法,即绝对定量和相对定量。相对定量通常以表达恒定的管家基因为参照,来获得目的基因相对于内参基因的表达指数。传统的相对定量方法是 $2^{-\Delta \Delta Ct}$ 方法,该法操作简单,但前提是须将 PCR 扩增效率设定为 1,而 PCR 的实际扩增效率很难达到 1;而且由于引物、模板等因素的影响,目的基因和内参基因的扩增

效率也不一定相同,因此这种算法的定量误差较大^[18]。张弛宇等^[17]通过试验验证发现,通过公式 $F=10^{\Delta C_t, t/At-\Delta C_t, r/Ar}$ 计算即可获得目的基因的相对表达量。该方法基于绝对定量方法,定量结果只与试验样品的 *Ct* 值和标准曲线斜率有关,被认为是一种简便、准确和高效的定量基因表达方法,本研究选择该方法以使定量误差尽可能最小。

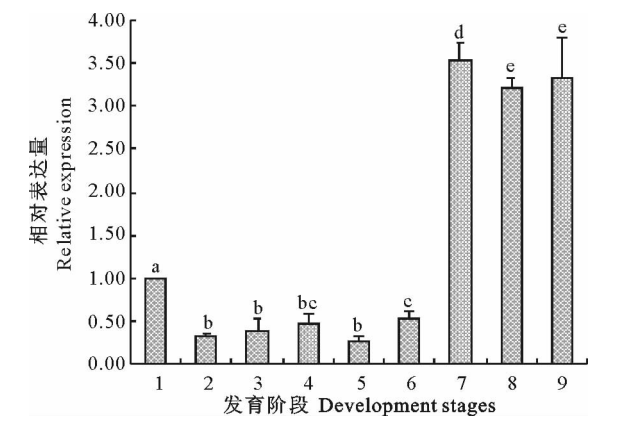


图 4 不同发育阶段和不同品级拟黑多刺蚁 *mAChR* mRNA 的相对表达量
1. 卵期;2. 1 龄幼虫;3. 2 龄幼虫;4. 3 龄幼虫;5. 4 龄幼虫;
6. 蛹期;7. 工蚁;8. 雄蚁;9. 雌蚁;柱形图上标不同小写字母者表示差异显著 ($P<0.05$)

Fig. 4 The relative expression profiles of *mAChR* mRNA in the different developmental stages and in different castes
1. Egg;2. First instar;3. Second instar;4. Fourth instar;5. Pupa
6. Worker;7. Male;8. Female;Different lowercase letters means significantly different ($P<0.05$)

本研究发现, *mAChR* mRNA 不仅在昆虫卵期就有表达,而且在整个发育阶段持续表达。前人对哺乳动物的研究表明,大鼠胚胎的心肌细胞存在 *mAChR*,且可以抑制 L 型钙离子电流^[12],牛胎儿消化道平滑肌上存在大量的 *mAChR*^[10],胎儿逼尿肌的自主性和非自主性收缩受 *mAChR* 的调控^[19],这些研究表明哺乳动物胎儿体内表达的 *mAChR* 在调节胎儿发育及行为方面起着重要作用。由此可以推测,拟黑多刺蚁卵期和幼虫期所表达的 *mAChR* 可能在调节蚂蚁发育行为中起一定作用。前人利用单克隆抗体对蛾子触角发育过程中 *mAChR* 受体进行了组织学定位研究,结果发现在触角发育的不同阶段, *mAChR* 的细胞分布类型及量具有差异性,并认为 *mAChR* 的通讯可能调节着轴突的延伸,并且参与触角表皮的形成^[6]。在蛾子嗅觉神经系统形成过程中,神经胶质细胞的迁移受胆碱能神经系统的调控^[20]。上述研究表明,昆虫 *mAChR* 在其神经系统发育中起着重要作用。而在完全变态昆虫中,成

虫的中枢神经系统在蛹期形成,主要包括神经元细胞的增殖和幼虫神经回路的重建^[21]。此外,在蛹期整个虫体的外形及内部构造都要发生剧烈改变。结合以上研究结果推测认为,拟黑多刺蚁 4 龄幼虫向蛹期转变过程中 *mAChR* 表达量的增加可能与蛹期虫体内部神经系统的重建及其他发育行为有关,但还需要进一步的试验验证。

大量研究已证实,胆碱能神经系统与昆虫的行为密切相关。本研究发现, *mAChR* 在 3 个品级的成虫中表达量普遍较高,其中工蚁的表达量最高,雌蚁和雄蚁的表达量差异不显著。就社会性昆虫蚂蚁而言,其工蚁的行为在 3 个品级中是最复杂的,如觅食、抚育幼蚁、清洁蚁巢、对蚁巢位置的记忆等。蚂蚁在执行这些行为时需要具备一定的空间定位、对蚁巢位置的记忆、气味信息的获取、食源的识别及与同伴之间的信息交流等能力^[22],而这些能力的获得主要靠神经系统协助完成。前人对脊椎动物的研究认为, *mAChR* 参与认知功能的各个环节^[23-25];有关昆虫的研究亦表明, M 型受体与蝗虫的发声机制有关^[26],参与蜜蜂蕈形体的可塑性^[9]。由此推测, *mAChR* 在工蚁体内较高的表达水平可能与其在蚁群中的众多复杂行为有关。

本研究发现, *mAChR* 在昆虫卵期及幼虫期就有表达,说明与脊椎动物类似,昆虫 *mAChR* 亦参与了其发育行为;而高表达出现在 3 个品级的成虫期,推测其主要功能可能是在调节成虫更为复杂的行为中起重要作用。 *mAChR* 调节昆虫行为的机制将是下一步研究的重点。

[参考文献]

[1] Blake A D, Anthony N M, Chen H H, et al. Drosophila nervous system muscarinic acetylcholine receptor: transient functional expression and localization by immunocytochemistry [J]. Mol Pharmacol, 1993, 44(4): 716-724.
[2] Reaper C M, Fanelli F, Buckingham S D, et al. Antagonist profile and molecular dynamic simulation of a *Drosophila melanogaster* muscarinic acetylcholine receptor [J]. Recept Channels, 1998, 5(6): 331-345.
[3] Hoffmann K, Wirmer A, Kunst M, et al. Muscarinic excitation in grasshopper song control circuits is limited by acetylcholinesterase activity [J]. Zoolog Sci, 2007, 24(10): 1028-1035.
[4] Onai T, Fitzgerald M G, Arakawas S, et al. Cloning, sequence and chromosomal localization of a *Drosophila* muscarinic acetylcholine receptor [J]. FEBS Lett, 1989, 255(2): 219-225.
[5] Harrison J B, Sattelle D B, Schaffer S, et al. Immunocytochemical localization of muscarinic acetylcholine receptors in antennal lobe glomeruli of *Drosophila* and *Apis mellifera* [J]. J Physi-

- ol,1995,485:31.
- [6] Clark J, Meisner S, Torkkeli P H. Immunocytochemical localization of cholineacetyl transferase and muscarinic ach receptors in the antenna during development of the Sphinx moth *Manduca sexta* [J]. Cell Tissue Res,2005,320(1):163-173.
- [7] Aizono Y, Endo Y, Sattelle D B, et al. Prothoracicotropic hormone-producing neurosecretory cells in the silkworm, *Bombyx mori*, express a muscarinic acetylcholine receptor [J]. Brain Res,1997,763(1):131-136.
- [8] Wenzel B, Elsner N, Heinrich R. mAChRs in the grasshopper brain mediate excitation by activation of the AC/PKA and the PLC second-messenger pathways [J]. J Neurophysiol,2002,87(2):876-888.
- [9] Ismail N, Robinson G E, Fahrback S E. Stimulation of muscarinic receptors mimics experience-dependent plasticity in the honey bee brain [J]. Proc Natl Acad Sci USA,2006,103(1):207-211.
- [10] Lee J G, Macarak E, Coplen D, et al. Distribution and function of the adrenergic and cholinergic receptors in the fetal calf bladder during mid-gestational age [J]. NeuroUrol Urodyn,1993,12(6):599-607.
- [11] Berger-Sweeney J. The cholinergic basal forebrain system during development and its influence on cognitive processes: important questions and potential answers [J]. Neurosci Biobehav Rev,2003,27(4):401-411.
- [12] Liang H M, Tang M, Liu C J, et al. Muscarinic cholinergic regulation of L-type calcium channel in heart of embryonic mice at different developmental stages [J]. Acta Pharmacol Sin,2004,25(11):1450-1457.
- [13] Ishii Y, Kubota K, Hara K. Postembryonic development of the mushroom bodies in the ant, *Camponotus japonicus* [J]. Zoolog Sci,2005,22(7):743-753.
- [14] Claeys I, Simonet G, Van-Loy T, et al. cDNA cloning and transcript distribution of two novel members of the neuroparsin family in the desert locust, *Schistocerca gregaria* [J]. Insect Mol Biol,2003,12:473-481.
- [15] Simonet G, Claeys I, Breugelmans B, et al. Transcript profiling of pacifastin-like peptide precursors in crowd and isolated-reared desert locusts [J]. Biochem Biophys Res Commun,2004,317:565-569.
- [16] Lü S M, Xi G S, Wang X H. Molecular cloning, characterization, and expression analysis of a QM homologue in the ant *Polyrhachis vicina* (Hymenoptera:Formicidae) [J]. Can Entomol,2008,140(3):312-323.
- [17] 张驰宇,徐顺高,黄新祥. 一种新颖简便的荧光实时 RT-PCR 相对定量方法的建立 [J]. 生物化学与生物物理学进展,2005,32(9):883-888.
Zhang C Y, Xu S G, Huang X X. A novel and convenient relative quantitative method of fluorescence real-time RT-PCR assay based on slope of standard curve [J]. Prog Biochem Biophys,2005,32(9):883-888. (in Chinese)
- [18] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} [J]. Method Methods,2001,25(4):402-408.
- [19] Jimenez-Cidre M A. Urinary incontinence: anticholinergic treatment [J]. Rev Med Univ Navarra,2004,48:37-42.
- [20] Heil J E, Oland L A, Lohr C. Acetylcholine-mediated axon-glia signaling in the developing insect olfactory system [J]. Eur J Neurosci,2007,26(5):1227-1241.
- [21] Truman J W. Steroid receptors and nervous system metamorphosis in insects [J]. Dev Neurosci,1996,18:87-101.
- [22] Hölldobler B, Wilson E O. The ants [M]. Cambridge: The Belknap Press of Harvard University Press,1990:732.
- [23] Platt C E, Wickens D D. The effects of anticholinesterase agents upon animal behavior: the effects of a subcutaneous injection of disopropyl fluorophosphates on the retention of a maze habit by the albino rat [J]. Am Psychol,1950,5:254-258.
- [24] Power A E, Vazdarjanova A, Mcgaugh J L. Muscarinic cholinergic influences in memory consolidation [J]. Neurobiol Learn Mem,2003,80:178-193.
- [25] Liu Q, Wu J, Wang X M, et al. Changes in muscarinic acetylcholine receptor expression in form deprivation myopia in guinea pigs [J]. Mol Vis,2007,13:1234-1244.
- [26] Heinrich R, Wenzel B, Elsner N. A role for muscarinic excitation: control of specific singing behavior by activation of the adenylate cyclase pathway in the brain of grasshoppers [J]. PNAS,2001,17:9919-9923.