

网络出版时间:2018-01-10 16:16

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2018.04.003

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20180110.1614.006.html>

拟黑多刺蚁 5-HT_{2A} 受体基因 cDNA 的克隆及表达

杨 森^{1,2}, 谭 娥¹, 奚耕思¹

(1 陕西师范大学 生命科学学院, 陕西 西安 710119; 2 咸阳师范学院 体育学院, 陕西 咸阳 712000)

[摘 要] **【目的】**克隆拟黑多刺蚁(*Polyrhachis vicina* Roger) 5-HT_{2A} 受体基因的 cDNA 序列, 并对其核苷酸序列和系统进化进行分析, 检测其在拟黑多刺蚁不同发育阶段幼虫和不同品级成虫 mRNA 的表达情况, 为探究 5-HT_{2A} 受体基因对拟黑多刺蚁生长发育的调控规律提供证据。**【方法】**从拟黑多刺蚁中提取总 RNA, RT-PCR 扩增并克隆 Pv5-HT_{2A} 受体基因; 用 ProtParam 预测蛋白质序列, Blast 比较蛋白质序列同源性, 用 Clustal X 进行核酸和氨基酸序列比对, MEGA 6.0 比邻法生成系统进化树。利用荧光实时定量 PCR 检测 Pv5-HT_{2A} 受体基因在拟黑多刺蚁不同发育阶段幼虫及不同品级成虫 mRNA 的表达水平。**【结果】**克隆得到 Pv5-HT_{2A} 受体基因的 cDNA 序列, 全长 2 965 bp, 开放阅读框长 1 926 bp, 编码 641 个氨基酸。疏水性分析显示, Pv5-HT_{2A} 受体氨基酸具有 7 个跨膜疏水区, 属于典型的 G 蛋白偶联受体类型。系统发育分析表明, 拟黑多刺蚁与红收获蚁的亲缘关系最近, 相似度达 69%。荧光实时定量 PCR 结果显示, 拟黑多刺蚁 5-HT_{2A} mRNA 在不同发育阶段和不同品级成虫中均有表达, 其中卵、3 龄幼虫及蛹期的表达量较高; 成虫中, 雄蚁表达量最高, 雌蚁的表达量最低。**【结论】**拟黑多刺蚁与其他昆虫的 5-HT_{2A} 受体基因存在相关性, 推测 5-HT_{2A} 受体基因对拟黑多刺蚁的生长发育具有一定调节作用。

[关键词] 拟黑多刺蚁; 5-HT_{2A} 受体基因; 克隆; 发育调控

[中图分类号] Q963

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2018)04-0020-08

Cloning and expression analysis of 5-HT_{2A} gene in *Polyrhachis vicina* Roger (Hymenoptera: Formicidae)

YANG Sen^{1,2}, TAN E¹, XI Gengsi¹

(1 College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710119, China;

2 College of Physical Education, Xianyang Normal University, Xianyang, Shaanxi 712000, China)

Abstract: **【Objective】** *Polyrhachis vicina* Roger Pv5-HT_{2A} gene was cloned, its nucleotide sequence and system evolution were analyzed, and its expressions in different developmental stages were investigated in this paper to provide evidence for the participation of Pv5-HT_{2A} receptor in modulation of *P. vicina* development and further exploration of Pv5-HT_{2A} functions. **【Method】** The total RNA was extracted from *P. vicina*, the Pv5-HT_{2A} receptor gene was amplified and cloned, and the protein sequence was predicted by ProtParam. The homology was compared by Blast, nucleic acids and amino acid sequence alignment were conducted by Clustal X and phylogenetic tree was generated by MEGA 6.0 nearest neighbor method. The Pv5-HT_{2A} receptor mRNA expressions were detected in different developmental stages and castes using real-time PCR. **【Result】** The obtained full length cDNA of Pv5-HT_{2A} receptor gene was 2 965 bp. The

[收稿日期] 2017-02-17

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31571276, 31171195)

[作者简介] 杨 森(1981—), 男, 陕西西安人, 讲师, 在读博士, 主要从事动物生殖与发育研究。E-mail: yszb2008@163.com

[通信作者] 奚耕思(1956—), 女, 上海浦东人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物生殖与发育研究。E-mail: xigengsi@snnu.edu.cn

open reading frame (ORF) of 1 926 bp encoded 641 amino acids. Hydrophobic analysis showed that the Pv5-HT₂A receptor had seven transmembrane hydrophobic regions. The phylogenetic tree analysis revealed that *P. vicina* had close relationship with *Pogonomyrmex barbatus*. The real-time PCR results showed that Pv5-HT₂A mRNA was detected at all tested development stages. Pv5-HT₂A mRNA was expressed highly in embryo, 3rd larvae and pupae. The Pv5-HT₂A expression level in male was higher than in female. 【Conclusion】 The 5-HT₂A receptor of *P. vicina* was cloned successfully and it had correlation with the genes of other insects. It is speculated that 5-HT₂A receptor gene plays certain role in growth and development of *P. vicina*.

Key words: *Polyrhachis vicina* Roger; 5-HT₂A receptor gene; clone; development regulation

5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)是一种单氨类的神经递质,又名血清素,能调节脊椎动物和无脊椎动物的多种生理功能及行为^[1]。在动物及人的中枢神经系统中,5-HT 参与调节睡眠、体温、痛觉、情绪和学习记忆等过程。当人体内的 5-HT 功能失调时,会引发多种精神疾病,如焦虑症、抑郁症、自闭症等^[2-3]。5-HT 对昆虫的取食、昼夜节律、好斗、记忆、群居和散居等行为也具有调节作用^[4]。

5-HT 通过受体实现对动物和人类生理功能的调节作用。目前已从脊椎动物体内克隆得到 14 个 5-HT 受体亚型,分为 7 类,即 5-HT_{1R}~5-HT_{7R},除 5-HT_{3R} 属于配体门控离子通道受体外,其他的均属于 G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCR)。目前,从昆虫体内克隆得到的 5-HT 受体基因主要属于 5-HT₁、5-HT₂、5-HT₇ 受体基因。从黑腹果蝇体内克隆得到的 5-HT_{1A}、5-HT_{1B}、5-HT_{2A}、5-HT_{2B}、5-HT₇ 受体基因分别与哺乳类的 5-HT_{1A}、5-HT_{1B}、5-HT_{2A}、5-HT_{2B}、5-HT₇ 受体基因同源^[5]。哺乳动物的 5-HT_{2A} 受体属于 5-HT₂ 受体家族成员之一,这个家族成员中除 5-HT_{2A} 受体亚型外,还包括 5-HT_{2B} 和 5-HT_{2C} 受体亚型,这 3 个受体亚型在分子结构、药理学及信号转导路径方面很相似^[6]。人体的 5-HT_{2A} 受体定位于 13 号染色体的 q14~21 区,编码 471 个氨基酸^[7],与大鼠的 5-HT_{2A} 受体同源率为 87%^[6]。通常情况下,5-HT_{2A} 受体与 Gq/11 偶联,从而激活磷脂酶 C,使三磷酸肌醇含量增加,而细胞质中三磷酸肌醇可以作为第二信使,调节内质网 Ca²⁺ 的释放^[7]。哺乳类的 5-HT_{2A} 受体较多分布于中枢神经系统的前脑区,特别是皮质区、尾状核、伏核、嗅球及海马^[8-10],其与平滑肌收缩、血小板聚集、激素调控、神经递质释放、性行为控制、睡眠、运动行为、精神疾病发生密切相关^[7]。

第一个 5-HT_{2A} 受体是从大鼠的脑部克隆得

到的^[11],迄今为止 5-HT_{2A} 受体已经从人类^[12-13]、小鼠^[14]、仓鼠^[15]、猪^[12,16]和猕猴^[12,16]体内克隆得到。5-HT_{2A} 受体已在昆虫黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)、意大利蜜蜂(*Apis mellifera*)、黄斑黑蟋蟀(*Gryllus bimaculatus*)体内克隆得到^[4]。研究发现,5-HT_{2A} 受体主要分布在昆虫的中枢神经系统、咽下腺、唾液腺、中肠,对于调控昆虫的进攻行为、表皮形成、昼夜节律及提高胞内 Ca²⁺ 浓度具有重要作用^[4]。

拟黑多刺蚁(*Polyrhachis vicina* Roger)属于节肢动物门昆虫纲膜翅目蚁科多刺蚁属,是一类营群居的杂食性社会昆虫,广泛分布于我国东南部。拟黑多刺蚁属于完全变态性昆虫,生命周期为卵、幼虫、蛹、成虫,其中成虫分为雌蚁、雄蚁和工蚁 3 个品级,各品级有明确分工,雌蚁在群体中个体最大,负责生育后代,雄蚁主要作用是与雌蚁交配,工蚁主要负责觅食、饲养幼虫、建造和清理蚁穴,在雌蚁短缺时可恢复生殖能力,替代雌蚁行使繁育后代的功能^[17]。拟黑多刺蚁是一种优良的食药两用蚂蚁,是卫生部目前唯一允许使用的无毒无害蚂蚁,也是研究社会性昆虫生长发育、生理生化的优良材料。但目前关于拟黑多刺蚁 5-HT_{2A} 基因的研究尚未见报道。鉴于此,本研究以拟黑多刺蚁为材料,克隆了拟黑多刺蚁 5-HT_{2A} 受体基因,并以其推测出的氨基酸序列构建系统进化树;采用荧光实时定量 PCR 技术,对拟黑多刺蚁不同龄期幼虫和不同品级成虫的 5-HT_{2A} 受体 mRNA 表达进行检测,探索 5-HT_{2A} 受体基因对拟黑多刺蚁发育调控的影响作用,为深入了解 5-HT_{2A} 受体基因在转录水平对拟黑多刺蚁生长发育调控的机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试动物 拟黑多刺蚁购于浙江瑞丰蚂蚁

工坊,3 窝蚂蚁,每窝 300~500 只,雌蚁体长 9~9.8 mm,雄蚁体长 6.5~8 mm,工蚁体长 6.5~7.5 mm,饲养于实验室恒温培养箱中,饲养温度为 $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$,相对湿度为 60%~70%。每天饲喂蚂蚁冰糖和蜂蜜,水放于纸盘中供蚂蚁自由取食。

1.1.2 主要试剂 RNA 提取试剂 Trizol(TaKaRa)、RNA 反转录试剂盒(RevertAidFirst Strand cDNA SynthesisKit,MBI)、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(北京百泰克)、SYBRPremix Ex TaqKit(TaKaRa)、 $2\times$ PCR Mix(TaKaRa)、 $6\times$ DNA loading buffer(TaKaRa)、DNA Marker(TIANGEN)、琼脂粉(华大)、溴化乙锭(Sigma)。

1.2 方法

1.2.1 拟黑多刺蚁总 RNA 的提取及第一链 cDNA 的合成 取 25 只工蚁头部于含有液氮的研钵中研磨,加入适量 Trizol 试剂提取总 RNA。取 $2\ \mu\text{L}$ RNA 样品、 $1\ \mu\text{L}$ $6\times$ DNA loading buffer 电泳检测总 RNA 的完整性。取 $2\ \mu\text{L}$ RNA 样品稀释 25 倍,在核酸蛋白分析仪上以 260 nm 处的吸光值确定 RNA 浓度,以 OD_{260}/OD_{280} 进行纯度检测,纯度较好的 RNA OD_{260}/OD_{280} 应在 1.7~2.0。经完整性和纯度检测合格的 RNA 进行 cDNA 第一链的合成。cDNA 第一链的合成使用 MBI 的 RNA 反转录试剂盒进行,产物可直接进行 PCR 反应或置于 -80°C 保存,用于后续试验。

1.2.2 全长 cDNA 的克隆 依据意大利蜜蜂(*Apis mellifera*)、冈比亚按蚊(*Anopheles gambiae*)和黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)5-HT2A 基因的保守序列设计简并引物,引物序列见表 1,均由金斯瑞公司合成。利用巢式 PCR 克隆拟黑多刺蚁 5-HT2A 基因。第一轮 PCR 反应使用引物 DF1 和 DR1,反应体系:cDNA 模板 $1\ \mu\text{L}$,上、下游引物($20\ \mu\text{mol/L}$)各 $1\ \mu\text{L}$,dNTP($2.5\ \text{mmol/L}$) $2\ \mu\text{L}$, $10\times$ ExPCR 缓冲液(含 Mg^{2+}) $2\ \mu\text{L}$,RNase Free ddH₂O 补足 $20\ \mu\text{L}$ 。反应条件: 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 45 s, 56°C 退火 55 s, 72°C 延伸 1 min,35 个循环;最后 72°C 延伸 10 min。第二轮 PCR 反应使用稀释 10 倍的第一轮 PCR 产物为模板,引物 DF2 和 DR2,在与第一轮相同的 PCR 反应条件下扩增。PCR 产物经 1.8% 琼脂糖凝胶电泳检测,再用 Bioteke 胶回收试剂盒纯化回收目的基因片段,连接到 pMD-18T 质粒载体上,转化到大肠杆菌感受态细胞中, 37°C 条件下培养过夜,并进行蓝白斑筛选,阳性克隆菌落再进行 PCR 鉴定后送上海生工公司

测序。

根据扩增获得的中间片断序列设计特异性引物(表 1),采用 5'RACE 和 3'RACE 试剂盒扩增 5'RACE 和 3'RACE 端。5'RACE PCR 进行两轮,第一轮加 $2\ \mu\text{L}$ 反转录混合物, $8\ \mu\text{L}$ $1\times$ cDNA 稀释缓冲液 II, $4\ \mu\text{L}$ $10\times$ LA PCR 缓冲液 II(无 Mg^{2+}), $3\ \mu\text{L}$ MgCl_2 ($25\ \text{mmol/L}$), $0.25\ \mu\text{L}$ LA Taq ($5\ \text{U}/\mu\text{L}$),外围特异性引物($10\ \mu\text{mol/L}$)(5R1)和 5'RACE 外围引物($10\ \mu\text{mol/L}$)(5R outer)到总体积 $50\ \mu\text{L}$ 。外围 PCR 反应条件: 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 3 min,20 个循环;最后 72°C 延伸 10 min。内围 PCR 以 $1\ \mu\text{L}$ 外围 PCR 混合物为模板, $5\ \mu\text{L}$ $10\times$ LA PCR 缓冲液 II(无 Mg^{2+}), $5\ \mu\text{L}$ MgCl_2 ($25\ \text{mmol/L}$), $8\ \mu\text{L}$ dNTP 混合物($2.5\ \text{mmol/L}$), $0.5\ \mu\text{L}$ Takara LA Taq ($5\ \text{U}/\mu\text{L}$),内围特异性引物($10\ \mu\text{mol/L}$)(5R2)和 5'RACE 内围引物($10\ \mu\text{mol/L}$)(5R inner)以及 $26.5\ \mu\text{L}$ 无菌水。内围 PCR 反应条件: 94°C 变性 3 min; 94°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 3 min,25 个循环;最后 72°C 延伸 10 min。3'RACE 反应的试剂和条件与 5'RACE 相似。PCR 产物用 1.8% 琼脂糖凝胶电泳检测并纯化回收。扩增出的片段与质粒载体连接并转化到大肠杆菌,再进行测序。

1.2.3 序列分析 用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)预测蛋白质序列的分子量和等电点,Blast 比较蛋白质序列的同源性,PROSITE (<http://prosite.expasy.org/>)分析氨基酸序列的功能位点,NetNGlyc 分析糖基化位点,TMHMM 分析跨膜域,Signal P 4.1 分析信号肽。

1.2.4 系统进化树 用 Clustal X 进行核酸和氨基酸序列的多重比对,MEGA 6.0 比邻法生成系统进化树。进行 1 000 次多重比对,计算聚集重复比率。

1.2.5 Pv5-HT2A 实时定量表达 取卵、1~4 龄幼虫(L1~L4)、蛹、雌蚁、雄蚁、工蚁作为测试样本用于实时定量表达。用 RNAiso 试剂盒提取 8~10 只蚂蚁总 RNA,取 $1\ \mu\text{g}$ RNA 样品合成第一条 cDNA。基因特异性引物扩增的 112 bp 片段用于基因表达的研究,内参基因合成 250 bp 片段。SYBR Green 实时定量 PCR 反应在 Biorad 上进行,反应体系($25\ \mu\text{L}$): $12.5\ \mu\text{L}$ SYBR Premix Ex Taq II, $1\ \mu\text{L}$ PCR 上游引物($10\ \mu\text{mol/L}$), $1\ \mu\text{L}$ PCR 下游引物($10\ \mu\text{mol/L}$), $1\ \mu\text{L}$ DNA 模板和 $9.5\ \mu\text{L}$ 无菌水;反应程序: 95°C 预变性 30 s; 95°C 变性 5 s, 60°C 退火 30 s,40 个循环。每个样品重复 3 次,以 β actin 为

内参基因。反应结束后,观察荧光值变化曲线和熔解曲线,熔解曲线(65~90 ℃,每 15 s 升高 0.5 ℃)保证只有一种 PCR 产物被扩增和检测。

表 1 试验所用引物序列
Table 1 Primers used in this study

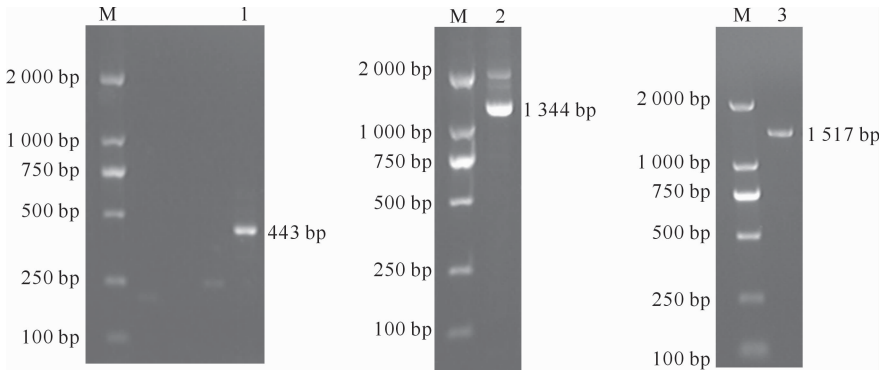
引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	片段大小/bp Expected size
DF1	TTTCTVTTTCGTHGYBGTRTTTAT	
DR1	CATGAYSAYCATGGGKATGT	
DF2	GGAGGVCTGGGVAACATMCT	443
DR2	RAASGCYCKRTTGTTGAT	
5R outer	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA	
5R inner	CGCGGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCGATG	
5R1	CCCACCACCCGTTTCGTAGA	1 344
5R2	GTGTCCTGAGCGGATTACGG	
3R outer	TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT	
3R inner	CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCACTATAGG	
3R1	GCGTGTTTCGGCGAGCATAAT	1 517
3R2	CTCCAACATCATGCCTCGTCC	
5-HT2A-F	TGTTTCGTGGCGGTCTTCATAG	112
5-HT2A-R	CCAGCGACAACAGGAAGTAGT	
β-actin-F	CTCTCTTCCAACCCTCGTTC	250
β-actin-R	CCACCGATCCATACGGAGTA	

2 结果与分析

2.1 Pv5-HT2A 受体 cDNA 克隆及序列分析

利用简并引物扩增出长 443 bp 的片段,再根据该片段设计 5'RACE 和 3'RACE 的特异性外围和

内围引物,分别扩增出 1 344 bp 的 5'RACE 端和 1 517 bp 的 3'RACE 端,对扩增产物进行测序,将测序结果于 NCBI 数据库中进行 BLAST 分析,结果表明成功获得 Pv5-HT2A 受体的中间片段、5'RACE 片段及 3'RACE 片段序列(图 1)。



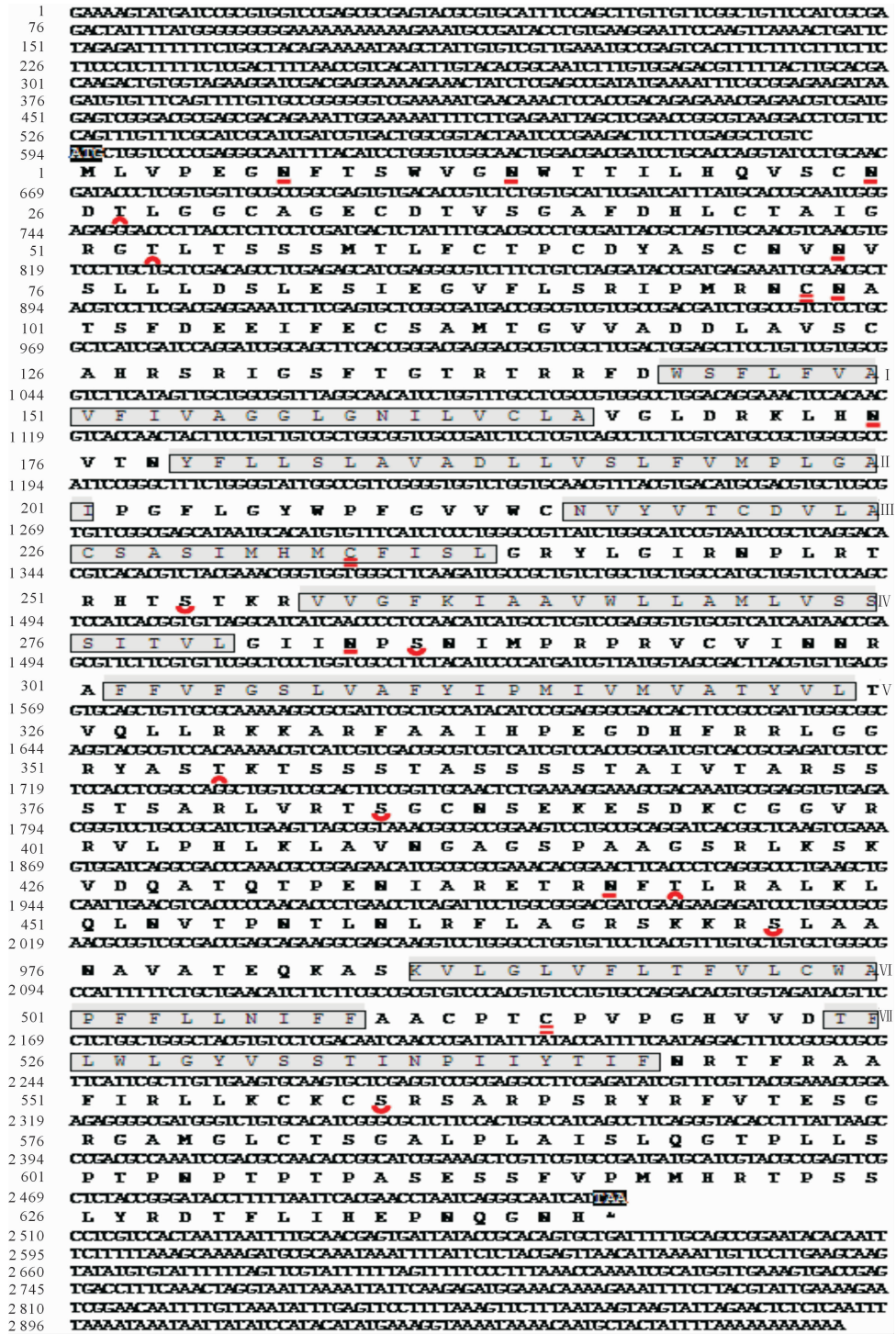
M, DL2000 DNA Marker; 1. 中间序列; 2. 5'RACE 产物; 3. 3'RACE 产物
M, DL2000 DNA Marker; 1. Intermediate sequence; 2. 5'RACE product; 3. 3'RACE product

图 1 拟黑多刺蚁 5-HT2A 基因全长 cDNA 序列的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification of full-length cDNA sequence of *P. vicina*

Pv5-HT2A 受体 cDNA (NCBI GenBank 登录号:KJ666537.2)全长 2 965 bp,开放阅读框(ORF)长 1 926 bp,编码 641 个氨基酸,5'和 3'非编码区(UTR)分别包含 593 和 446 个核苷酸。Pv5-HT2A

氨基酸序列的分子量为 69.68 ku,等电点为 9.60。Pv5-HT2A 氨基酸序列有 8 个 N-糖基化位点、5 个蛋白激酶 A 磷酸化位点、4 个蛋白激酶 C 磷酸化位点和 3 个酰基化位点(图 2)。



预测的 Pv5-HT2A 受体氨基酸序列在图中以单个密码子表示。起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA)用黑色背景显示。

星号(*)代表终止密码子, N-糖基化位点用下划线表示, 蛋白激酶 A 磷酸化位点用下弧线表示, 蛋白激酶 C 磷酸化位点用上弧

线表示, 酰基化位点用双下划线表示。跨膜结构域 I—Ⅶ用灰色背景和黑色边框显示

The deduced amino acid sequence of the Pv5-HT2A receptor is shown in a single letter under the respective codon. The initiation condon (ATG) and termination codon (TAA) are highlighted in black. The asterisk represents the terminator codon, potential N-glycosylation sites are highlighted in single underline, putative protein kinase A phosphorylation sites are highlighted in downward arc underline, putative protein kianse C phosphorylation sites are highlighted in double upward arc underline, putative palmitoylation sites are highlighted in double underline. The transmembrane domains I—Ⅶ determined are shaded and boxed in black

图 2 拟黑多刺蚁 5-HT2A 受体的核苷酸序列和预测的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequence of full-length 5-HT2A receptor of *P. vicina*

2.2 Pv5-HT2A 受体的系统进化树

由 NCBI 网站获取 5-HT2A 氨基酸序列,用 Clustal X 进行多重比对,Pv5-HT2A 与其他物种 5-HT2A 受体蛋白的进化关系如图 3 所示。由图 3 可以看出,5-HT2A 氨基酸序列分为脊椎动物和无脊

椎动物两个组,拟黑多刺蚁 Pv5-HT2A 受体蛋白与红收获蚁的亲缘关系最近,相似度为 69%,与阿根廷蚁的亲缘关系次之,相似度为 58%,与意大利蜜蜂的亲缘关系较远,相似度为 48%。

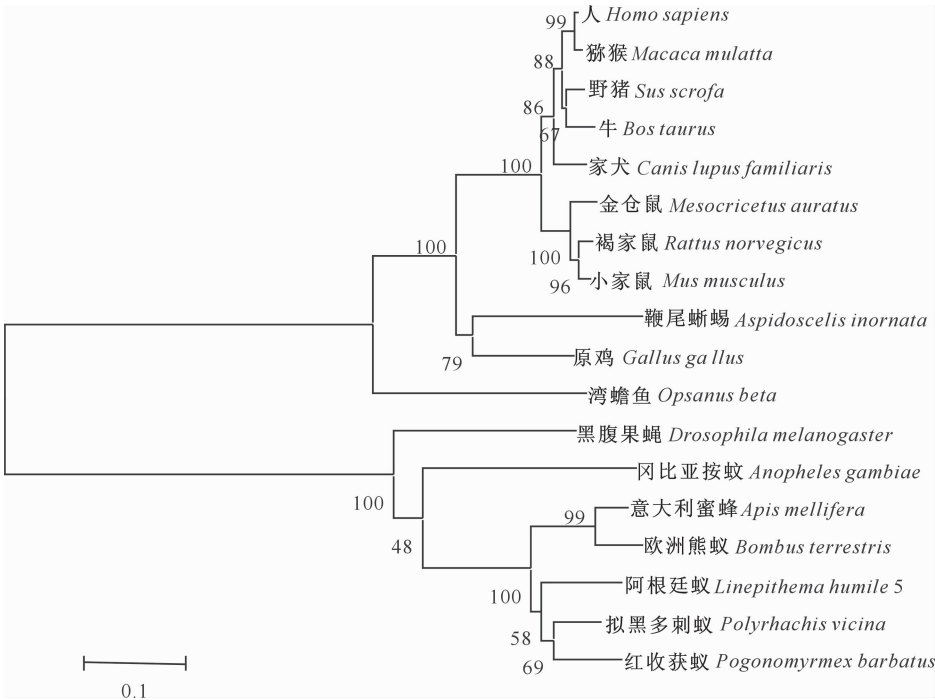


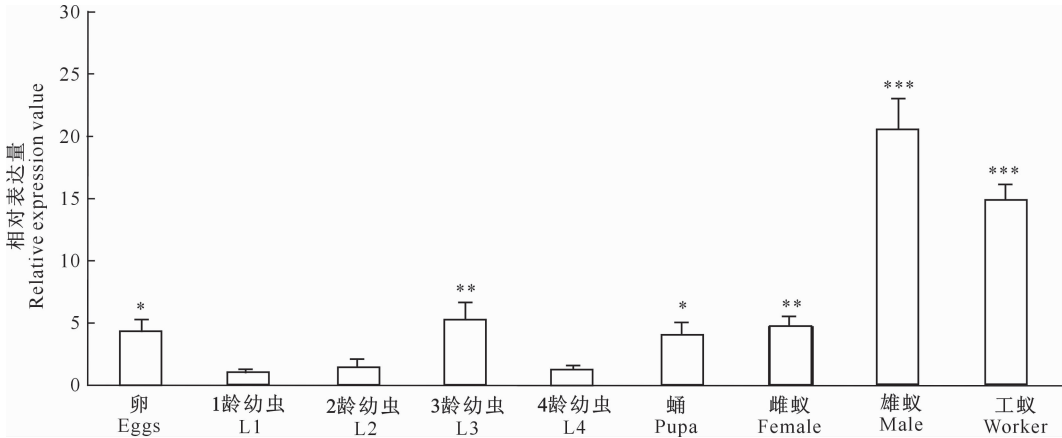
图 3 拟黑多刺蚁受体与其他物种 5-HT2A 受体蛋白的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic analysis of 5-HT2A receptors of *P. vicina* and other animals

2.3 Pv5-HT2A 受体 mRNA 的表达

采用实时定量 PCR 检测 Pv5-HT2A mRNA 在拟黑多刺蚁不同发育阶段和不同品级成虫中的表达情况,结果如图 4 所示。由图 4 可知,Pv5-HT2A mRNA 在拟黑多刺蚁不同发育阶段和不同品级成

虫中均有表达,其中卵、3 龄幼虫及蛹期的表达量较高,1,2,4 龄幼虫的表达量相对较低;成虫中,雄蚁表达量最高,工蚁次之,雌蚁的表达量最低,且工蚁的表达量显著高于雌蚁。



* 表示 $P<0.1$ 时差异显著, * * 表示 $P<0.05$ 时差异显著, * * * 表示 $P<0.01$ 时差异显著

* means significant at $P<0.1$, * * means significant at $P<0.05$, * * * means significant at $P<0.01$

图 4 拟黑多刺蚁 5-HT2A 受体基因 mRNA 在拟黑多刺蚁不同发育阶段的相对表达量

Fig. 4 Relative expressions of 5-HT2A receptor mRNA in different developmental stages in whole body of *P. vicina*

3 讨 论

本研究成功克隆了拟黑多刺蚁 Pv5-HT2A 受体的 cDNA 序列,其全长为 2 965 bp,开放阅读框(ORF)大小为 1 926 bp,编码 641 个氨基酸,5'和 3'非编码区(UTR)分别包含 593 和 446 个核苷酸。通过对 Pv5-HT2A 氨基酸序列分析发现,它具有 7 个跨膜结构域,属于典型的 G 蛋白偶联受体类型^[13]。Pv5-HT2A 受体的典型特征是具有糖基化位点、磷酸化位点及酰基化位点^[6],这些特征实际是氨基酸序列翻译后的修饰,以提高受体的稳定性,便于与细胞膜结合^[18]。本研究发现,Pv5-HT2A 氨基酸序列有 8 个 N-糖基化位点、5 个蛋白激酶 A 磷酸化位点、4 个蛋白激酶 C 磷酸化位点和 3 个酰基化位点。

将不同动物的 5-HT2A 氨基酸序列与拟黑多刺蚁 Pv5-HT2A 受体进行比对,发现拟黑多刺蚁 Pv5-HT2A 与其他物种 5-HT2A 受体具有高度的同源性,从而进一步证实所克隆基因属于拟黑多刺蚁 Pv5-HT2A 受体基因,同时也证实了 5-HT2A 受体基因保守性的特点^[13]。拟黑多刺蚁 5-HT2A 受体蛋白与红收获蚁的亲缘关系最近,相似度为 69%。

荧光实时定量 PCR 检测结果表明,Pv5-HT2A 受体 mRNA 在拟黑多刺蚁不同发育阶段和不同品级成虫中均有表达,且表达量有显著差异性。说明 5-HT2A 对拟黑多刺蚁的发育存在调控的阶段特异性,与 Markus 等^[19]的研究结果相吻合。Markus 等^[19]发现,5-HT2A 受体在意大利蜜蜂不同发育阶段的脑部均有表达,且不同阶段的表达量不均匀,这与脑部 5-HT2A 含量对其不同发育阶段产生的影响有关。本研究发现,Pv5-HT2A 受体 mRNA 在拟黑多刺蚁的卵、3 龄幼虫、蛹期的表达量较高;成虫中,雄蚁的表达量最高,工蚁次之。有研究表明,5-HT2A 受体在黑腹果蝇的胚胎发育期有表达^[20],其表达对于维持胚胎正常发育和存活率很有必要^[21],黑腹果蝇 Dm5-HT2A 受体可调节胚胎发育中胚带延长和角质层形成^[22-23],由此推测拟黑多刺蚁在胚胎期及蛹期的高表达可能与调节胚胎发育及蛹期的角质层增厚有关。5-HT 可以促进蜜蜂寻找食物及提高运动能力^[24],5-HT2 还与雄性果蝇的攻击行为有关^[25-26],由此推测拟黑多刺蚁雄蚁中 5-HT2A 受体 mRNA 的高表达可能与其运动能力和攻击行为有关,具体有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Schlenstedt J, Balfanz S, Baumann A, et al. Am5-HT7: molecular and pharmacological characterization of the first serotonin receptor of the honeybee (*Apis mellifera*) [J]. J Neurochem, 2006, 98(6): 1985-1998.
- [2] Weiger W A. Serotonergic modulation of behaviour: a phylogenetic overview [J]. Biol Rev Camb Philos Soc, 1997, 72(1): 61-95.
- [3] Jones B J, Blackburn T P. The medical benefit of 5-HT research [J]. Pharmacol Biochem Behav, 2002, 71(4): 555-568.
- [4] 齐易香, 吴顺凡, 黄佳, 等. 昆虫 5-羟色胺及其受体的研究进展 [J]. 昆虫学报, 2014, 57(7): 844-859.
Qi Y X, Wu S F, Huang J, et al. Advances in 5-hydroxytryptamine and its receptors in insects [J]. Acta Entomologica Sinica, 2014, 57(7): 844-859.
- [5] Blenau W, Thamm M. Distribution of serotonin (5-HT) and its receptors in the insect brain with focus on the mushroom bodies: lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera* [J]. Arthropod Structure and Development, 2011, 40(5): 381-394.
- [6] Nicholas M B, Trevor S. A review of central 5-HT receptors and their function [J]. Neuropharmacology, 1999, 38(8): 1083-1152.
- [7] Jason H, Daniel H. Molecular biology of 5-HT receptors [J]. Behavioral Brain Research, 2008, 195(1): 198-213.
- [8] Pazos A, Cortés R, Palacios J M. Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain: II. serotonin-2 receptors [J]. Brain Res, 1985, 346(2): 231-249.
- [9] Pazos A, Probst A, Palacios J M. Serotonin receptors in the human brain: IV. autoradiographic mapping of serotonin-2 receptors [J]. Neuroscience, 1987, 21(1): 123-139.
- [10] López-Giménez J F, Mengod G, Palacios J M, et al. Selective visualization of rat brain 5-HT2A receptors by autoradiography with [³H]MDL 100,907 [J]. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 1997, 356(4): 446-454.
- [11] Pritchett D B, Bach A W, Wozny M O, et al. Structure and functional expression of cloned rat serotonin 5HT-2 receptor [J]. EMBO Journal, 1988, 7(13): 4135-4140.
- [12] Saltzman A G, Morse B, Whitman M M, et al. Cloning of the human serotonin 5-HT2 and 5-HT1C receptor subtypes [J]. Biochem & Biophys Res Comm, 1992, 181(3): 1469-1478.
- [13] Gerhardt C C, Van Heerikhuizen H. Functional characteristics of heterologously expressed 5-HT receptors [J]. European Journal of Pharmacology, 1997, 334(1): 1-23.
- [14] Foguet M, Daniel H, Luis A P, et al. Cloning and functional characterization of the rat stomach fundus receptor [J]. EMBO Journal, 1992, 11(9): 3481-3487.
- [15] Chambard J C, Van Obberghen S E, Haslam R J. Chinese hamster serotonin 5-HT type 2 receptor cDNA sequence [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(17): 52-82.
- [16] Johnson M P, Baez M, Kursar J D, et al. Species differences in 5-HT2A receptors: cloned pig and rhesus monkey 5-HT2A

- receptors reveal conserved transmembrane homology to the human rather than rat sequence [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1995, 1236(1): 201-206.
- [17] 王彦男, 奚耕思, 杨栋梁. 拟黑多刺蚁生活史研究及幼虫龄期划分 [J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2016, 44(3): 167-172.
- Wang Y N, Xi G S, Yang D L. Life cycle and larval instar differentiation of *Polyrhachis vicina* Roger [J]. *Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed)*, 2016, 44(3): 167-172.
- [18] Clagett D M, Schoenleber R, Chung C, et al. Preparation of an affinity chromatography matrix for the selective purification of the dopamine D₂ receptor from bovine striatal membranes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1989, 986(2): 271-280.
- [19] Markus T, Danie R, Nadine J, et al. Function and distribution of 5-HT₂ receptors in the honeybee (*Apis mellifera*) [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e82407.
- [20] Colas J F, Launay J M, Kellermann O, et al. *Drosophila* 5-HT₂ serotonin receptor: coexpression with fushi-tarazu during segmentation [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92(12): 5441-5445.
- [21] Sykes P A, Condron B G. Development and sensitivity to serotonin of *Drosophila serotonergic* varicosities in the central nervous system [J]. *Developmental Biology*, 2005, 286(1): 207-216.
- [22] Colas J F, Launay J M, Vonesch J L, Maroteaux L. Serotonin synchronizes convergent extension of ectoderm with morphogenetic gastrulation movements in *Drosophila* [J]. *Mech Dev*, 1999, 87(1/2): 77-91.
- [23] Schaerlinger B, Launay J M, Vonesch J L, et al. Gain of affinity point mutation in the serotonin receptor gene 5-HT_{2D} accelerates germband extension movements during *Drosophila* gastrulation [J]. *Dev Dyn*, 2007, 236(4): 991-999.
- [24] Alice S F, Kerry L S, Daniel R, et al. The role of serotonin in feeding and gut contractions in the honeybee [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2013, 61(100): 8-15.
- [25] Johnson O, Becnel J, Nichols C D. Serotonin 5-HT₂ and 5-HT_{1A}-like receptors differentially modulate aggressive behaviors in *Drosophila melanogaster* [J]. *Neuroscience*, 2009, 158: 1292-1300.
- [26] Dierick H A, Greenspan R J. Serotonin and neuropeptide F have opposite modulatory effects on fly aggression [J]. *Nat Genet*, 2007, 39: 678-682.

(上接第 19 页)

- [18] Turnbull P C, Ramos S V, MacPherson R E, et al. Characterization of lipolytic inhibitor G(0)/G(1) switch gene-2 protein (G0S2) expression in male Sprague-Dawley rat skeletal muscle compared to relative content of adipose triglyceride lipase (ATGL) and comparative gene identification-58 (CGI-58) [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0120136.
- [19] Long M D, Smiraglia D J, Campbell M J. The genomic impact of DNA CpG methylation on gene expression: relationships in prostate cancer [J]. *Biomolecules*, 2017, 7(1): 15.
- [20] Šmardová J, Nemajerová A, Navrátilová J, et al. CBP sensitizes v-myb-transformed monoblasts to differentiation inducers [J]. *Differentiation*, 2005, 73(5): 222-232.
- [21] Yamauchi T, Oike Y, Kamon J, et al. Increased insulin sensitivity despite lipodystrophy in Crebbp heterozygous mice [J]. *Nature Genetics*, 2002, 30(2): 221-226.
- [22] Lord C C, Ferguson D, Thomas G, et al. Regulation of hepatic triacylglycerol metabolism by CGI-58 does not require ATGL co-activation [J]. *Cell Reports*, 2016, 16(4): 939-949.
- [23] Zechner R, Zimmermann R, Eichmann T O, et al. FAT SIGNALS-lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling [J]. *Cell Metabolism*, 2012, 15(3): 279-291.
- [24] Greenberg A S, Coleman R A, Kraemer F B, et al. The role of lipid droplets in metabolic disease in rodents and humans [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2011, 121(6): 2102-2110.
- [25] Brown J M, Betters J L, Lord C, et al. CGI-58 knockdown in mice causes hepatic steatosis but prevents diet-induced obesity and glucose intolerance [J]. *Journal of Lipid Research*, 2010, 51(11): 3306-3315.
- [26] Yang D, Chen H, Zeng X, et al. Macrophage CGI-58 attenuates inflammatory responsiveness via promotion of PPAR γ signaling [J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2016, 38(2): 696-713.