



cDNA Cloning and Transcriptional Expression of the N-methyl-D-aspartate Receptor in the Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis* 【Research report】

東方果實蠅NMDA受器cDNA選殖及轉錄表現【研究報告】

Ching-Yi Chien, and Mei-Er Chen*

簡靖倚、陳美娥*

*通訊作者E-mail: meirchen@dragon.nchu.edu.tw

Received: 2012/10/29 Accepted: 2012/12/10 Available online: 2012/12/01

Abstract

In this study the *Bactrocera dorsalis* N-methyl-D-aspartate receptor (NMDA receptor) subunit 1 (BdNR1) cDNA was cloned using RT-PCR and RACE. The complete BdNR1 cDNA had a length of 3,643 bp including an open reading frame which is 2,958 bp to encode a 985-amino acid protein. The BLAST analysis revealed a high identity (85%) with the *Drosophila melanogaster* NMDA receptor 1. RT-PCR was applied to detect the transcriptional expression of BdNR1 in different developmental stages. The results showed that BdNR1 was highly expressed in the larvae. In pupae, there was no expression in the early period and only a little in the late period. In adults, BdNR1 was expressed in from 0- to 10-day-old female adults. Further, the highest transcriptional expression was found in the flight muscle in adults. Real-time PCR analysis revealed that BdNR1 was expressed in the flight muscle of 0- to 10-day-old female adults, and the expression level was not different. In conclusion, BdNR1 was expressed in vivacious larvae and adults, and not in immovable pupae. In addition, BdNR1 was highly expressed in the flight muscle. This suggests that BdNR1 may affect muscle contraction. However, blocking the NMDA receptor inhibits the ovarian development in other insects. In this study, the NMDA receptor antagonist, MK-801, was injected into female adults to detect the effect of the NMDA receptor on the ovarian development in *B. dorsalis*. The results showed that the size of the ovaries has no significant difference between the control group and the insects injected with MK-801.

摘要

本研究利用RT-PCR及RACE選殖東方果實蠅 (*Bactrocera dorsalis*) N- methyl-D-aspartate (NMDA) 受器，得到全長 3,643 bp 之 cDNA，含有一個 2,958 bp 之開放讀架，轉譯一個 985 個胺基酸之蛋白。利用 basic local alignment search tool (BLAST) 運算法分析序列，結果與 *Drosophila melanogaster* NMDA receptor 1 類源關係相近 (85% 相同度)，將之命名為 *Bactrocera dorsalis* NMDA receptor subunit 1 (BdNR1)。以 RT-PCR 偵測 BdNR1 於不同發育時期之表現，結果顯示 BdNR1 於幼蟲期大量表現，蛹早期不表現，蛹晚期有少量表現，於 0~10 日齡雌成蟲則皆有表現。進一步測試 BdNR1 表現之組織專一性，結果顯示在成蟲各組織中以在飛行肌肉的表現量最高。以 real-time PCR 偵測 0~10 日齡雌成蟲飛行肌肉 BdNR1 的表現量，發現每個日齡皆有表現且表現量無明顯差異。東方果實蠅 NMDA 受器次單位 1 (BdNR1) 在活動力相對較活躍的幼蟲期及成蟲期有表現，且於雌成蟲主要表現於飛行肌肉，而在不活動的蛹前期則不表現。因此我們推測 BdNR1 可能影響肌肉運動。另外，於其他昆蟲研究結果顯示阻斷 NMDA 受器會抑制卵巢發育。本研究注射 NMDA 受器通道阻斷劑 MK-801 於東方果實蠅雌成蟲，以測試其對卵巢發育之影響。結果顯示注射 MK-801 之實驗組卵巢大小與對照組比較並無差異。

Key words: *Bactrocera dorsalis*, NMDA receptor, flight muscle, muscle contraction

關鍵詞: 東方果實蠅、NMDA 受器、飛行肌肉、肌肉運動。

Full Text: [PDF \(1.88 MB\)](#)

下載其它卷期全文 Browse all articles in archive: <http://entsocjournal.yabee.com.tw>

東方果實蠅 NMDA 受器 cDNA 選殖及轉錄表現

簡靖倚、陳美娥*

國立中興大學昆蟲學系 40227 台中市南區國光路 250 號

摘 要

本研究利用 RT-PCR 及 RACE 選殖東方果實蠅 (*Bactrocera dorsalis*) N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受器，得到全長 3,643 bp 之 cDNA，含有一個 2,958 bp 之開放讀架，轉譯一個 985 個胺基酸之蛋白。利用 basic local alignment search tool (BLAST) 運算法分析序列，結果與 *Drosophila melanogaster* NMDA receptor 1 類源關係相近 (85% 相同度)，將之命名為 *Bactrocera dorsalis* NMDA receptor subunit 1 (*BdNR1*)。以 RT-PCR 偵測 *BdNR1* 於不同發育時期之表現，結果顯示 *BdNR1* 於幼蟲期大量表現，蛹早期不表現，蛹晚期有少量表現，於 0~10 日齡雌成蟲則皆有表現。進一步測試 *BdNR1* 表現之組織專一性，結果顯示在成蟲各組織中以及在飛行肌肉的表現量最高。以 real-time PCR 偵測 0~10 日齡雌成蟲飛行肌肉 *BdNR1* 的表現量，發現每個日齡皆有表現且表現量無明顯差異。東方果實蠅 NMDA 受器次單位 1 (*BdNR1*) 在活動力相對較活躍的幼蟲期及成蟲期有表現，且於雌成蟲主要表現於飛行肌肉，而在不活動的蛹前期則不表現。因此我們推測 *BdNR1* 可能影響肌肉運動。另外，於其他昆蟲研究結果顯示阻斷 NMDA 受器會抑制卵巢發育。本研究注射 NMDA 受器通道阻斷劑 MK-801 於東方果實蠅雌成蟲，以測試其對卵巢發育之影響。結果顯示注射 MK-801 之實驗組卵巢大小與對照組比較並無差異。

關鍵詞：東方果實蠅、NMDA 受器、飛行肌肉、肌肉運動。

前 言

麩胺酸鹽 (glutamate) 在哺乳動物的中央神經系統為重要的刺激性神經傳遞物質

(excitatory neurotransmitter; Weinberg, 1999)，而在昆蟲則為神經肌肉連接處 (neuromuscular junction) 的刺激性神經傳遞物質 (Jan and Jan, 1976)。Glutamate 與

*論文聯繫人
Corresponding email: meirchen@dragon.nchu.edu.tw

各式 glutamate 受器結合，活化下游因子。Glutamate 受器分為促離子通道型 (ionotropic) 及促代謝型 (metabotropic) 兩大類，N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受器即為一種促離子通道型受器。促離子通道型 glutamate 受器於細胞膜形成一陽離子通道，當其與 glutamate 結合後，離子通道就會開啟，離子進入細胞內活化下游的因子。離子型 glutamate 受器其功能與神經發育、運動節律的發生 (generation of rhythms of locomotion)、突觸可塑性、記憶的形成及腦垂體的內分泌有關 (Villalobos *et al.*, 1996; VanDongen, 2008)。

NMDA 受器非競爭性拮抗劑 (antagonist) (+)-5-Methyl-10, 11-dihydro-5H-dibenzo [a,d] cyclohepten-5, 10-imine maleate (MK-801, dizolcipine)，可結合於通道內部，阻擋離子通道，又稱為離子通道阻斷劑，對 NMDA 受器具有高親和力及選擇性 (Wong *et al.*, 1986; Ferrer-Montiel *et al.*, 1995; Kew and Kemp, 2005)。於哺乳動物的研究指出 MK-801 之毒性會造成運動失調 (ataxia) (Nakki *et al.*, 1996)。添加 MK-801 於果蠅幼蟲的食物中，會使得幼蟲活動力下降，造成癱瘓。而以體外培養進行電生理實驗，發現 MK-801 能抑制肌肉的節律活動，由此推論 NMDA 受器可能影響昆蟲的運動 (Cattaert and Birman, 2001)。

另外於脊椎動物的研究中，MK-801 注射於球魚 (*Xiphophorus maculatus*)，使雌魚進入青春期的比率降低，而免疫標定法偵測到 NMDA 受器分佈於腦部的促性腺激素釋放激素 (gonadotropin releasing hormone, GnRH) 分泌細胞，推論 NMDA 受器與配體結合後刺激 GnRH 分泌，進一步刺激促性腺激素 (gonadotropin hormone, GnH) 釋

放，再刺激生殖發育 (Flynn *et al.*, 2002)。在昆蟲，青春激素 (juvenile hormone, JH) 被認為是昆蟲的 GnH，刺激成蟲的生殖發育，(Ramaswamy *et al.*, 1997; De Loof *et al.*, 2001)。而在蜚蠊 (*Diploptera punctata*) 雌成蟲咽喉側腺偵測到 NMDA 受器表現，將其咽喉側腺進行體外培養，當加入 NMDA 後，培養液中的 JH 量上升，顯示 NMDA 受器與 JH 的生合成有關 (Chiang *et al.*, 2002)。綜合上述，NMDA 受器可能經由影響 JH 的生合成，進一步影響生殖。

東方果實蠅 (*Bactrocera dorsalis* Hendel) 為亞洲及太平洋地區之重要果樹害蟲，而其強大的繁殖能力為造成問題的主要原因之一。本研究以 MK-801 對東方果實蠅雌成蟲進行注射試驗探討 NMDA 受器對東方果實蠅生殖之影響，並選殖東方果實蠅 NMDA 受器 cDNA 及探討其表現特性以推論是否具其他生理功能。

材料與方法

一、試驗昆蟲之飼育

本研究所使用的東方果實蠅為實驗室飼養之穩定族群。幼蟲之人工飼料及飼養方法根據 Chiu (1978)，飼養於塑膠盤內，放置於黑暗環境。成蟲飼養於 30 立方公分網箱，以蛋白胨：酵母抽出物：糖 = 1：1：3 之人工飼料餵養，另用海綿吸水放置網箱上。飼養環境為 28°C，光週期 12 小時光亮 12 小時黑暗。

二、MK-801 注射試驗

(一) 第 3 日齡雌成蟲之 MK-801 注射試驗

初羽化的雌成蟲，為了減少卵巢發育的變異度，先以糖及水飼養使卵巢不發育，第一次注射之後則以成蟲飼料飼養，提供卵巢發育所

需的蛋白質。將第 3 日齡 (羽化後 78 小時) 雌成蟲放置冰上約 5 分鐘, 靜止不動後開始進行注射。使用微量注射器 (World Precision Instruments, USA) 及 35G 注射針頭 (35G Beveled Needle, World Precision Instruments, USA), 從胸腹部連接處之節間膜, 針頭由後往前平行胸背板注射至胸部, 每隻注射 1 μ L PBS 其中含有 3 μ g MK-801, 對照組則注射 1 μ L PBS。每隔 24 小時注射一次, 共三次。實驗組與對照組各注射 10 隻, 試驗進行四重覆。於第 6 日齡 (第一次注射 72 小時後), 在解剖顯微鏡下測量單顆卵巢最寬的長度, 並將兩顆卵巢的長度相加, 表示每一隻蟲的卵巢大小。

(二) 第 0 日齡雌成蟲之 MK-801 注射試驗

以第 0 日齡 (羽化後 6 小時) 東方果實蠅雌成蟲進行注射及觀察, 方法同上, 共注射六次。實驗組與對照組各注射 20 隻, 試驗進行三重覆。

三、NMDA 受器 cDNA 選殖及序列分析

萃取第 0 日齡雌成蟲頭部及胸部總量 RNA (total RNA), 使用 SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen, USA) 試劑組將 1 μ g 總量 RNA 合成 cDNA。利用簡併性引子對 (degenerate primers): 5'-YTDGTWATGG KDTCKGTNCAYG-3'; 5'-GCRAAWCCDGC CCADACCATDCC-3' 及上述 cDNA 進行 PCR, 反應過程為第一階段: 94°C 2 分鐘, 第二階段: 94°C 30 秒、50°C 30 秒、72°C 30 秒, 反應 35 循環 (cycle); 第三階段: 72°C 10 分鐘。將 PCR 預計產物 (230 bp) 選殖入 pCR®II-TOPO® 載體 (Invitrogen, USA), 進一步以 ABI3730 系統 (Applied Biosystems) 全自動 DNA 毛細管電泳, 取得序列 (源資國

際生物科技股份有限公司, 台北, 台灣)。

利用試劑組: GeneRacer™ Kit (Invitrogen, USA) 進行 cDNA 末端快速擴增法 (rapid amplification of cDNA ends, RACE)。根據上述 230 bp 序列設計引子 (表一) 擴增 5' 及 3' 端的片段, 所使用 PCR 反應過程為第一階段: 94°C 2 分鐘, 第二階段: 94°C 30 秒、58~60°C 30 秒 (依不同引子對而定, 表一)、72°C 30 秒~4 分鐘 (每 1 kb 產物設定 1 分鐘), 反應 35 循環; 第三階段: 72°C 10 分鐘。將 PCR 產物如上述選殖及定序。

以美國全國生物技術信息中心資料庫 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 之 basic local alignment search tool (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 搜尋比對相似基因; 並以 conserved domain database (CDD) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 進行保守區域分析。利用 CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) 比對胺基酸序列。

四、NMDA 受器 mRNA 表現之偵測

(一) 於不同發育時期之表現

以一齡、二齡、三齡前期、三齡後期幼蟲、第 0~8 日齡蛹及第 0~10 日齡雌成蟲之 cDNA (皆以 1 μ g 總量 RNA 合成) 為模板, 加上專一性引子對 NR1-823F: 5'-CACAGGT TATATTCCGAGACGCTGC-3'、NR1-823R: 5'-CCAATTAGACCGCTCCATTCTTTACG C-3', 進行 RT-PCR, PCR 反應過程為第一階段: 94°C 2 分鐘, 第二階段: 94°C 30 秒、60°C 30 秒、72°C 1 分鐘, 反應 35 循環; 第三階段: 72°C 10 分鐘。

(二) 於不同成蟲組織之表現

表一 RACE PCR 使用引子之序列

Table 1. The sequences of primers used in RACE PCR

Primer name	Primer sequence	T _m (°C)
NR1-230-1F	5'- CTCACCGTTTCGGACGTTTCAAACATC -3'	58
NR1-230-2R	5'- TTCCCTCACCGATGCCACTATTTAAGAGC -3'	58
NR1-230-3F	5'- CGGACGTTTCAAACATCACACACGG -3'	60
NR1-230-4R	5'- ACTATTTAAGAGCACACCCAGGCG -3'	60
NR1-5F	5'- GGCAATACAACGTGGGTCTGAACG -3'	58
NR1-6R	5'- CCACAATCATTTCACGGCGGCAC -3'	58
NR1-7F	5'- CATTAGCTTCGCTGTGGATAAACGTCG -3'	60
NR1-8R	5'- GTAATTCGTCTGTGAGGTGGTCTGG -3'	60

以第 5 日齡雌成蟲的腦、前腸、中腸、後腸、飛行肌肉、馬氏管、脂肪體及卵巢之 cDNA (皆以 1μg 總量 RNA 合成) 作為模板，進行 RT-PCR，方法與上述相同。

(三) 於不同日齡雌成蟲飛行肌肉之表現

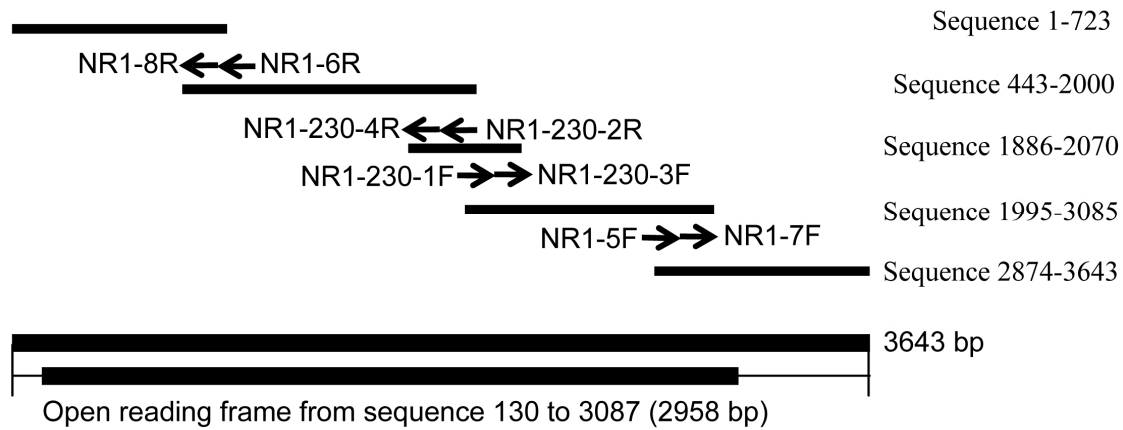
以第 0~10 日齡雌成蟲飛行肌肉 cDNA (皆以 1μg 總量 RNA 合成) 作為模板，加上專一性引子對 NR1-qPCR-1F : 5'- GTATTACCACCAAGCGGATGTCTGGC -3'、NR1-qPCR-2R : 5'- CGTAATTCGTCTGTGAGGTGGTCTGG -3'，及 internal control 18s 引子對 : 5'- GATGACCACTGTACATGCAACCACTG -3'、5'- GGTCAGCTTGCCGTTCAATTCAGG -3'進行即時定量 RT-PCR (Real-time quantitative RT-PCR, qRT-PCR) : 於 Multiplate[®] PCR Plates[™] (Bio-Rad, USA) 加入 12.5 μL SYBR[®] GreenER[™] qPCR SuperMix for iCycler[®] (Bio-Rad, USA)、0.5 μL NR1-qPCR-1F (10 μM)、0.5 μL NR1-qPCR-2R (10 μM)、10.5 μL DEPC 水及 1 μL cDNA，以 Microseal[®] 'B' Film (Bio-Rad, USA) 封口。置 iCycler[™] Thermal Cycler (Bio-Rad, USA)，qPCR 循環設定如下：第一階段：50°C 2 分鐘，第二階段：95°C 8 分鐘 30 秒，第三階段：95°C 15 秒，65°C 1 分鐘，

反應 40 循環。解離曲線分析 (Melting curve analysis) 設定如下：第一階段：95°C 1 分鐘，第二階段：55°C 1 分鐘，第三階段：55°C 10 秒，每循環增加 0.5°C，反應 80 循環。以 iQ[™]5 Optical System Software (Version 2.0) (Bio-Rad, USA) 進行資料分析。

結 果

一、NMDA 受器 cDNA 選殖、定序及結構分析

利用簡併性引子對 (degenerate primers; M230F/M230R) 進行 RT-PCR，結果增幅五個不同長度的片段，其中以 231 bp 的片段訊號最強，且符合預期長度，依此片段序列設計引子對 (表一)，接著進行 RACE : 5' 端 RACE 以 NR1-230-2R 配合試劑組引子進行第一次 PCR，所得產物再以 NR1-230-4R 配合試劑組引子進行巢式 PCR，產物為 1,558 bp 的片段 (圖一)。接著以 NR1-6R 配合試劑組引子進行第一次 PCR，所得產物再以 NR1-8R 配合試劑組引子進行巢式 PCR，產物為 723 bp 的片段 (圖一)。3' 端 RACE 以 NR1-230-1F 配合試劑組引子進行第一次 PCR，所得產物再以 NR1-230-3F 配合試劑組引子進行巢式 PCR，所得產物為 1,131 bp 的



圖一 東方果實蠅 NMDA 受器 cDNA 選殖的片段之組合。五個片段組合出全長 3,643 bp 之 cDNA 包含一長 2,958 bp 之開放讀架。

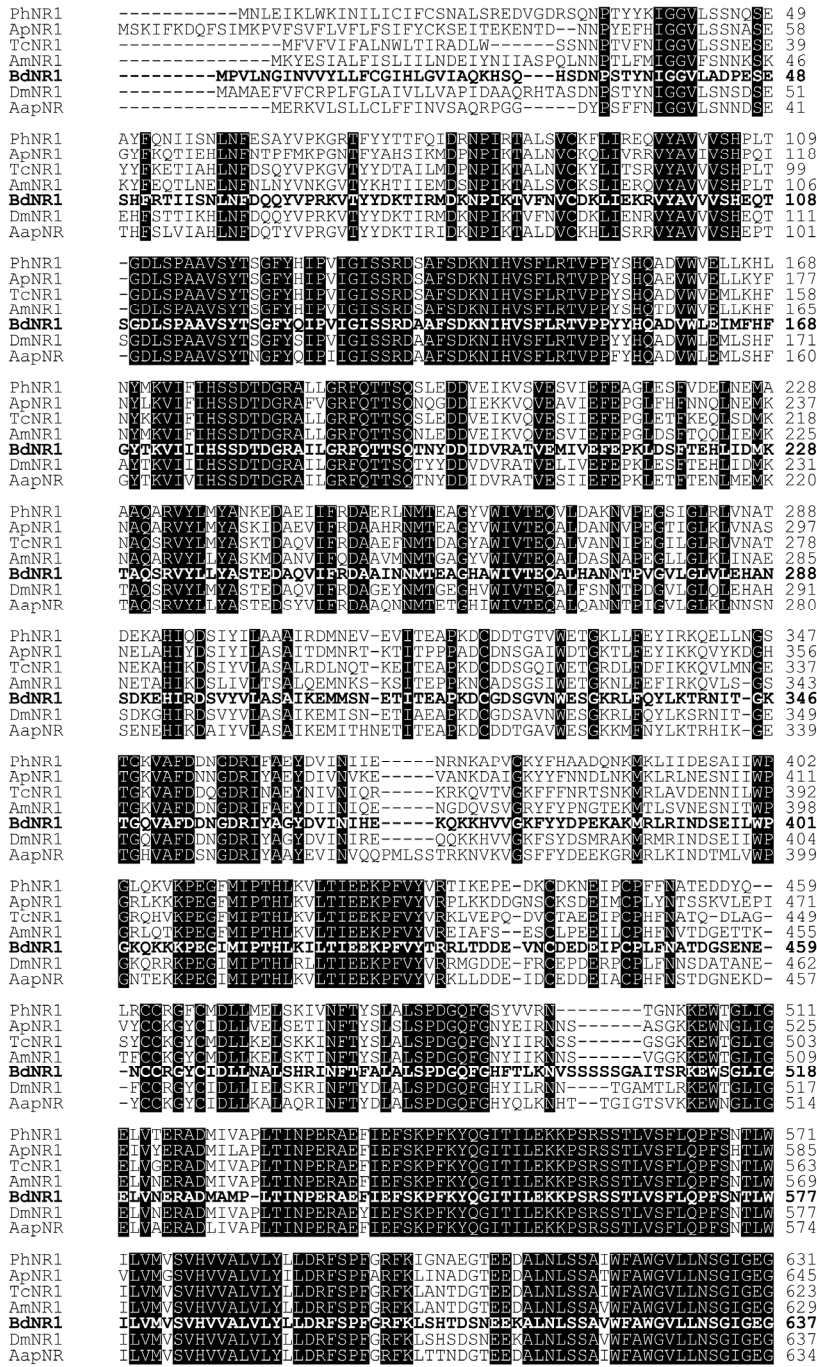
Fig. 1. Assembly of the fragments of the NMDA receptor cDNA cloning in *Bactrocera dorsalis*. The full-length 3,643-bp cDNA sequence revealed an open reading frame of 2,958 bp.

片段 (圖一)。接著以 NR1-5F 配合試劑組引子進行第一次 PCR，所得產物再以 NR1-7F 配合試劑組引子進行巢式 PCR，所得產物為 770 bp 的片段 (圖一)。

以上五個 cDNA 片段，經序列組合 (assembling) 得到全長 3,643 bp 之 cDNA 序列，命名為東方果實蠅 NMDA 受器次單位 1 (*Bactrocera dorsalis* N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1, *BdNR1*) (GenBank accession no. JX987094)。為檢測組合過程中是否發生錯誤，進一步分別於 5' 及 3' 非轉譯區 (untranslated regions, UTR) 設計專一性引子對 *BdNR1*-5'UTR-F (5'-CTTGACTATACACATACGCGCAACAAC-3') 及 *BdNR1*-3'UTR-R (5'-GCCAACAACATGCTTAACA TCAATGC-3') 進行 RT-PCR，得到 3,211 bp 之產物，與上述組合之 cDNA 序列相同，確認序列組合正確。*BdNR1* 含有一個 2,958 bp 之開放讀架 (open reading frame)，轉譯 985 個胺基酸之蛋白。

利用 NCBI 之 BLAST 分析 *BdNR1* 與其他昆蟲 NMDA 受器之同源性，結果顯示與果蠅 NMDA 受器 (*D. melanogaster* NMDA receptor 1; Ultsch *et al.*, 1993; NP_730940) 類源關係最相近，具 85% 的相同度 (identity)，與埃及斑蚊 (*Aedes aegypti*; XP_001653302) 則具 78% 的相同度，而與其他昆蟲：赤擬穀盜 (*Tribolium castaneum*; XP_969654)、體蝨 (*Pediculus humanus corporis*; XP_002424050)、義大利蜂 (*Apis mellifera*; Zannat *et al.*, 2006; NP_001011573) 及豌豆蚜 (*Acyrtosiphon pisum*; XP_001949860) 的相同度則分別為 71、70、67 及 66%。與其他無脊椎動物相同度則較低，與靜水椎實螺 (*Lymnaea stagnalis*; AAT40576) 及海蝸牛 (*Aplysia californica*; NP_001191411) 的相同度分別為 47 及 46%。

將 *BdNR1* 胺基酸序列，與果蠅、埃及斑蚊、赤擬穀盜、體蝨、義大利蜂及豌豆蚜的胺



圖二 七種昆蟲 NMDA 受器胺基酸序列比對及分析。Ph: 體蝨、Ap: 豌豆蚜、Tc: 赤擬穀盜、Am: 義大利蜂、Bd: 東方果實蠅、Dm: 果蠅、Aa: 埃及斑蚊。完全相同之胺基酸以黑底白字表示。

Fig. 2. Alignment of seven insect NMDA receptor amino acid sequences. Ph: *Pediculus humanus corporis*; Ap: *Acyrtosiphon pisum*; Tc: *Tribolium castaneum*; Am: *Apis mellifera*; Bd: *Bactrocera dorsalis*; Dm: *Drosophila melanogaster*; Aa: *Aedes aegypti*. Identical residues are noted as white text on a black background.

```

PhNR1  TPRSFSARVLGMVWAGFAMIIVASYTANLAAFLVLERPKTKLSGINDARLRNTMENLTCA 691
ApNR1  TPRSFSARVLGMVWAGFAMIIVASYTANLAAFLVLERPKTKLSGINDARLRNTMENLTCA 705
TcNR1  TPRSFSARVLGMVWAGFAMIIVASYTANLAAFLVLERPKTKLSGINDARLRNTMENLTCA 683
AmNR1  TPRSFSARVLGMVWAGFAMIIVASYTANLAAFLVLERPKTKLSGINDARLRNTMENLTCA 689
BdNR1  TPRSFSARVLGMVWAGFAMIIVASYTANLAAFLVLERPKTKLSGINDARLRNTMENLTCA 697
DmNR1  TPRSFSARVLGMVWAGFAMIIVASYTANLAAFLVLERPKTKLSGINDARLRNTMENLTCA 697
AapNR  TPRSFSARVLGMVWAGFAMIIVASYTANLAAFLVLERPKTKLSGINDARLRNTMENLTCA 694

PhNR1  TVKGSADVDMYFRROVELSNMYRTMEANNYDTAEPAINDVKNKLMAFIWDSSRLEYEAAQ 751
ApNR1  TVKGSADVDMYFRROVELSNMYRTMEANNYDTAEPAINDVKNKLMAFIWDSSRLEYEAAQ 765
TcNR1  TVKGSADVDMYFRROVELSNMYRTMEANNYDTAEPAINDVKNKLMAFIWDSSRLEYEAAQ 743
AmNR1  TVKGSADVDMYFRROVELSNMYRTMEANNYDTAEPAINDVKNKLMAFIWDSSRLEYEAAQ 749
BdNR1  TVKGSADVDMYFRROVELSNMYRTMEANNYDTAEPAINDVKNKLMAFIWDSSRLEYEASK 757
DmNR1  TVKGSADVDMYFRROVELSNMYRTMEANNYDTAEPAINDVKNKLMAFIWDSSRLEYEASK 757
AapNR  TVKGSADVDMYFRROVELSNMYRTMEANNYDTAEPAINDVKNKLMAFIWDSSRLEYEASK 754

PhNR1  DCELVTAGELFGRSGYGLGLOKGSFWADAVTLAILEDPHESGFMSLLENHILQSGIQH-C 810
ApNR1  DCELVTAGELFGRSGYGLGLOKGSFWSESVPLSLDDEPHESGFMSLLEDDKNIHQGRVQ-C 824
TcNR1  DCELVTAGELFGRSGYGLGLOKGSFWADDLFLALLDDEPHESGFMSLLEDDKNIHQGNVQ-C 802
AmNR1  DCELVTAGELFGRSGYGLGLOKGSFWADAVTLAILEDPHESGFMSLLENHILRSNVQ-C 808
BdNR1  DCELVTAGELFGRSGYGLGLOKGSFWTDAVTLAILEDPHESGFMSLLEDDKNIHQGNAQ-C 816
DmNR1  DCELVTAGELFGRSGYGLGLOKGSFWTDAVTLAILEDPHESGFMSLLEDDKNIHQGHVQ-C 817
AapNR  DCELVTAGELFGRSGYGLGLOKGSFWTDAVTLAILEDPHESGFMSLLEDDKNIHQGNIQ-C 813

PhNR1  EQNEKTPNTLGLKKNMAGVFLVAGIVGCGIGLIIIVMAYKKHQIKKQKRLELARHAAADK 870
ApNR1  EQDEKTPNTLGLKKNMAGVFLVAVGIVVCMVIVIEIGYKHHVVRKNRLOLARFNQGTW 884
TcNR1  EQFEKTPNTLGLKKNMAGVFLVAAIVGCGIGLIIIVMAYKKHQIKKQKRMELARHAAADK 862
AmNR1  EQLEKTPNTLGLKKNMAGVFLVGVGIIIGGIGLIIIVMAYKKHQIKKQKRMELARHAAADK 868
BdNR1  ELFEKTPNTLGLKKNMAGVFLVAAVAGVAGCVGLIIVEVVIYKHHQVKKQKRLDIARHAAADK 876
DmNR1  ELFEKTPNTLGLKKNMAGVFLVGVGIIAGCVGLIIVEVVIYKHHQVKKQKRLDIARHAAADK 877
AapNR  EQFEKTPNTLGLKKNMAGVFLVAGIVGCGIGLIIIVMAYKKHQIKKQKRLELARHAAADK 873

PhNR1  RGAIEKRRKTLRAT-----VAAQRRLKGNAITDESISLSVETLPRCVGAQAN--SPT 919
ApNR1  RAIVQKRKMMRMQGRTSVGVGALSLSVEALPRSVLNIOQSPIRSIETLPRTCRNSP---SPT 941
TcNR1  RGCVEKRRKTLRAS-----ATTQRRIKSNGVNDPATISLAVDKYQR----IG--GPE 907
AmNR1  RGAIEKRRKTLRAS-----IAAQRRIQSNGLNDPTTVSLAVDTVARSNVTPR--SPE 917
BdNR1  RGTIEKRRKTLRAS-----LAMQRQYNVGLNAT--PGTISFAVDKRRYPRMGPR--APE 925
DmNR1  RGTIEKRRKTLRAS-----LAMQRQYNVGLNSTHAPGTISLAVDKRRYPRLGQRL--GPE 929
AapNR  RGTIEKRRKTLRAS-----LAMQRQYNVGLNSVS--KSI SQAVDKNRNPKLNPLSRAPE 924

PhNR1  RILWT----DIRHRKSE-----AEFSSDPLV 940
ApNR1  RAWSG---RQMVHRKSDDIP--L-----RSPIGGPPQL 969
TcNR1  RAWPGD--SDIROPRVEDSSGVQ-----PVPRYLPAYT 938
AmNR1  RAWPGD--SDIROPIPRSDDIR-----LSP---AAAYT 945
BdNR1  QAWKSD-ADILRNRYLDDATKG-----GHS PAVHMPILGKMRPPTNMLPPRYSPAYT 977
DmNR1  RAWPGDAADVLRIRPYELGNPGQSPKVMANQPGMPMPMLGKTRPQQSVLPPRYSPGYT 989
AapNR  RAWPGD-HEIARNRRNNDQTYKP-----PPRYMPTYA 955

PhNR1  -----
ApNR1  HFHNNLM- 976
TcNR1  SDVSHLIV 946
AmNR1  ANVSHLIV 953
BdNR1  SNVSHLIV 985
DmNR1  SDVSHLIV 997
AapNR  TDVSHLIV 963

```

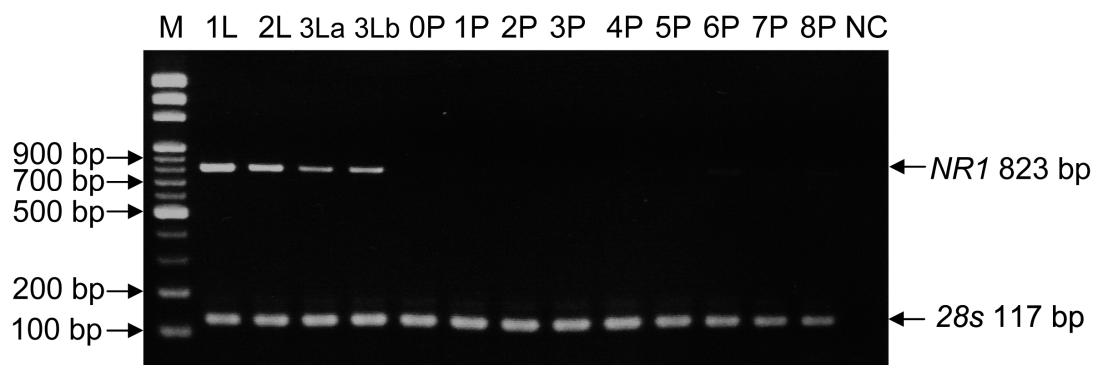
圖二 (續)。
Fig. 2. (continued).

基酸序列進行比對 (alignment)，結果上述昆蟲的 NMDA 受器具有高度的保守性 (圖二)。參考果蠅及義大利蜂 NMDA 受器序列分析 (Ultsch *et al.*, 1993; Zannat *et al.*, 2006)，以及利用 NCBI 保守區資料庫 (conserved domain database, CDD) 進行蛋白質模組分析，其功能區由 N 端至 C 端依序為 N 端區域、第一配體結合區、第一穿膜區、第二穿膜區、第三穿膜區、第二配體結合區、第四穿膜區、C 端區域 (包含攜鈣素 (calmodulin) 結合區)，與現有已知的 NMDA 受器功能區相同，在無脊椎動物與脊

椎動物皆然。

二、NMDA 受器於不同發育時期及成蟲各組織之表現

東方果實蠅幼蟲每齡期皆有 *BdNR1* 的表現，於一齡及二齡有大量表現，三齡前期及後期表現則少於一、二齡 (圖三)，*BdNR1* 在幼蟲的表現量隨齡期呈現遞減的情形。於蛹期從第 0 至 4 日皆無觀察到 *BdNR1* 表現，第 5 至 8 日則有少量的表現 (圖三)，顯示從化蛹後 *BdNR1* 並沒有表現，直到蛹的後期才有少量的表現。*BdNR1* 於東方果實蠅雌成蟲第 0 至



圖三 東方果實蠅幼蟲及蛹 *BdNR1* 之轉錄表現。*BdNR1* 大量表現於幼蟲期，於蛹期前期無表現，蛹期後期則有非常少量的表現。M：100 bp 核酸標記；1L：一齡幼蟲；2L：二齡幼蟲；3La：三齡幼蟲前期；3Lb：三齡幼蟲後期（跳蛹時期）；0P：0 日齡蛹；1P：1 日齡蛹；2P：2 日齡蛹；3P：3 日齡蛹；4P：4 日齡蛹；5P：5 日齡蛹；6P：6 日齡蛹；7P：7 日齡蛹；8P：8 日齡蛹；NC：無模板的對照組。*NR1* 823 bp: *BdNR1*; 28s 117 bp: 28s (internal control)。

Fig. 3. Expression of *BdNR1* transcripts in *B. dorsalis* larvae and pupae. *BdNR1* was highly expressed in larval stage. There is no expression in the early pupal stage, and little in the late pupal stage. M: 100 bp DNA marker; 1L: 1st instar larvae; 2L: 2nd instar larvae; 3La: earlier period of 3rd instar larvae; 3Lb: later period of 3rd instar larvae (wandering stage); 0P: 0-day-old pupae; 1P: 1-day-old pupae; 2P: 2-day-old pupae; 3P: 3-day-old pupae; 4P: 4-day-old pupae; 5P: 5-day-old pupae; 6P: 6-day-old pupae; 7P: 7-day-old pupae; 8P: 8-day-old pupae; NC: control without template. *NR1* 823 bp: *BdNR1*; 28s 117 bp: 28s (internal control).

10 日齡皆有表現 (圖四)。

偵測雌成蟲各組織的表現，結果飛行肌肉的表現量最高，而在脂肪體、卵巢、前腸及中腸只有很少量的表現，在腦、後腸及馬氏管則無表現 (圖五)。而雌成蟲飛行肌肉由 0 至 10 日齡皆有 *BdNR1* 的表現，各日齡之間無顯著差異 (圖六)。

三、NMDA 受器通道阻斷劑 MK-801 對卵巢發育之影響

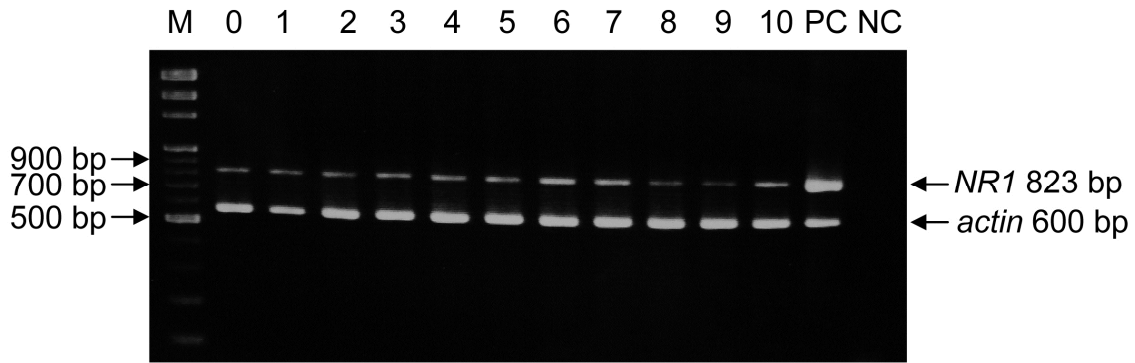
進行 MK-801 注射試驗以觀察其對東方果實蠅卵巢發育之影響。第 3 日齡注射試驗，結果顯示處理組卵巢大小平均為 2.18 ± 0.22 mm，對照組平均則為 2.13 ± 0.15 mm，無顯著差異 (表二)。若將注射時間點提前，於第 0 日齡進行注射，結果處理組卵巢大小平均為 1.90 ± 0.03 mm，對照組平均則為 1.90 ± 0.08

mm，亦無顯著差異 (表二)。兩次注射結果皆顯示，本研究注射 MK-801 於東方果實蠅雌蟲，對卵巢發育並無影響。

討 論

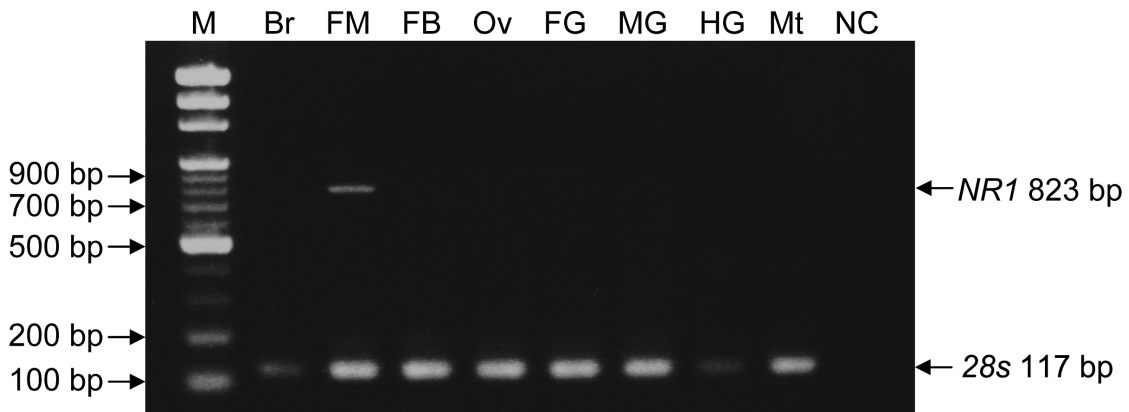
一、NMDA 受器之表現及其功能之探討

東方果實蠅 NMDA 受器大量表現於成蟲飛行肌肉，目前並沒有文獻指出 NMDA 受器表現於昆蟲成蟲的肌肉組織。在果蠅成蟲的頭部有 NMDA 受器次單位 1 (*DmNR1*) 的大量表現 (Ultsch *et al.*, 1993)，而義大利蜂 NMDA 受器次單位 1 (*AmNR1*) 蛋白表現於腦、神經元及神經膠質細胞 (glial cell) (Zannat *et al.*, 2006)。NMDA 受器屬於 glutamate 受器，glutamate 為昆蟲神經肌肉連接處的神經傳遞物質，所以 glutamate



圖四 東方果實蠅雌成蟲羽化後 (0~10 日齡) *BdNR1* 之轉錄表現, *BdNR1* 於各個日齡皆有表現。M: 100 bp 核酸標記; PC: 以包含 *BdNR1* 及 *actin* cDNA 片段之質體為模板; NC: 無模板的對照組。NR1 823 bp: *BdNR1*; *actin* 600 bp: *actin* (internal control)。

Fig. 4. Expression of *BdNR1* transcripts in *B. dorsalis* female adults (days 0-10) after eclosion. *BdNR1* was expressed from 0- to 10-day-old female adults. M: 100 bp DNA marker; PC: *BdNR1* and *actin* plasmid cDNA as positive control; NC: control without template. NR1 823 bp: *BdNR1*; *actin* 600 bp: *actin* (internal control).

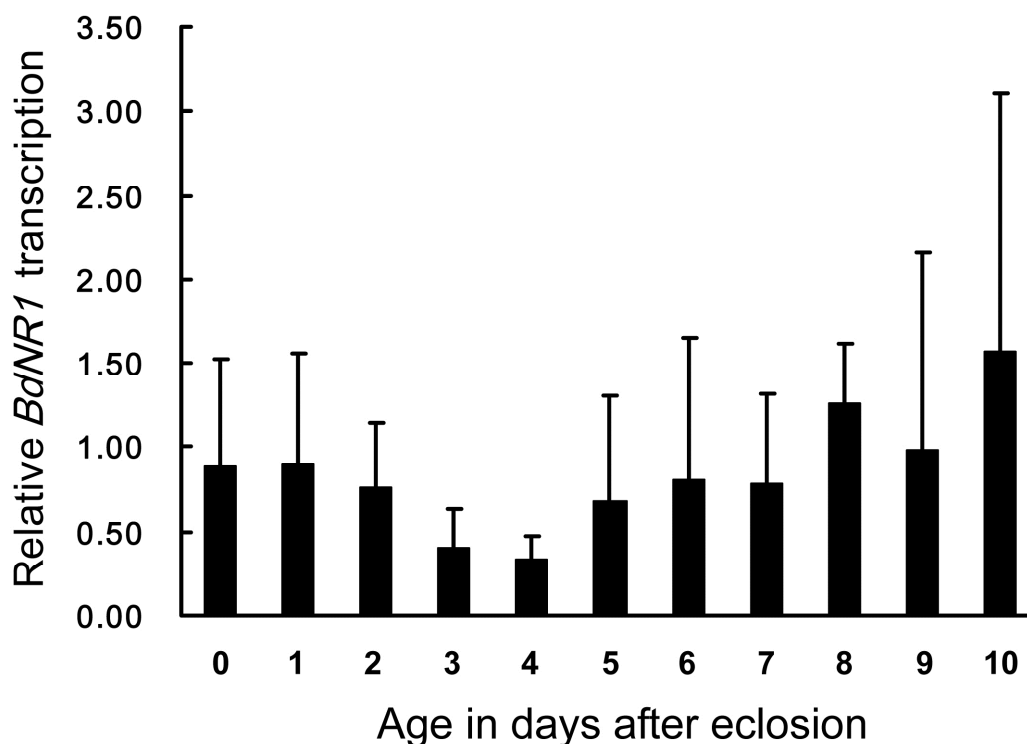


圖五 東方果實蠅 5 日齡雌成蟲 *BdNR1* 轉錄表現的組織專一性, *BdNR1* 主要表現於飛行肌肉。M: 100 bp 核酸標記; Br: 腦; FM: 飛行肌; FB: 脂肪體; Ov: 卵巢; FG: 前腸; MG: 中腸; HG: 後腸; Mt: 馬氏管; NC: 無模板的對照組。NR1 823 bp: *BdNR1*; 28s 117 bp: 28s (internal control)。

Fig. 5. Tissue-specific expression of *BdNR1* transcripts in *B. dorsalis* 5-day-old female adults. *BdNR1* was mainly expressed in flight muscle. M: 100 bp DNA marker; Br: brain; FM: flight muscle; FB: fat body; Ov: ovary; FG: foregut; MG: midgut; HG: hindgut; Mt: Malpighian tubule; NC: control without template. NR1 823 bp: *BdNR1*; 28s 117 bp: 28s (internal control).

受器很可能分布於突觸後的肌肉細胞膜 (Jan and Jan, 1976; Johansen *et al.*, 1989)。推測東方果實蠅 NMDA 受器在飛行肌肉與神經連

接處接收由突觸前釋放的 glutamate 而開啟鈣離子通道, 一旦鈣離子流入飛行肌肉細胞內即可影響飛行肌肉的收縮。



圖六 以即時定量 PCR 偵測東方果實蠅雌成蟲羽化後 (0~10 日齡) 飛行肌肉 *BdNR1* 之轉錄表現。*BdNR1* 於各個日齡之飛行肌肉皆有表現，且表現量無明顯差異。Reference gene: *18s*。

Fig. 6. Expression of *BdNR1* transcripts in the flight muscle of *B. dorsalis* female adults (days 0-10) after eclosion by real-time PCR. *BdNR1* was expressed in the flight muscle from 0- to 10-day-old female adults, and the level of expression was not different. Reference gene: *18s*.

表二 NMDA 受器拮抗劑 MK-801 對東方果實蠅卵巢發育之影響

Table 2. The effect of antagonist (MK-801) of NMDA (N-methyl-D-aspartate) receptor on the development of ovary in *Bactrocera dorsalis*

Treatment	6-day-old female's mean ovary size (mm) (Mean ± SD)	
	Day 0 injected ¹	Day 3 injected ²
MK-801 ³	1.90 ± 0.03	2.18 ± 0.22
PBS	1.91 ± 0.08	2.13 ± 0.15

¹ Day 0 injected: injected at day 0, 1, 2, 3, 4, 5 (n = 40)

² Day 3 injected: injected at day 3, 4, 5 (n = 60)

³ concentration: 3 µg MK-801 /µL; injection volume: 1 µL

東方果實蠅 NMDA 受器次單位 1 (*BdNR1*) 表現在活動力相對較活躍的幼蟲期及成蟲期，在不活動的蛹前期則不表現，此結果支持上述之推論：NMDA 受器可能影響肌肉運動。Ultsch 等人 (1993) 以北方墨點法偵測 NMDA 受器次單位 1 (*DmNR1*) 在果蠅胚胎、幼蟲、蛹及早期成蟲的表現，發現在胚胎晚期、蛹晚期有大量表現，認為這兩個時期分別為幼蟲、成蟲中央神經系統發育的時期，所以 *DmNR1* 大量表現。*DmNR1* 於蛹早期無表現，於早期成蟲有表現 (Ultsch *et al.*, 1993)，與本研究結果相似。而東方果實蠅與

果蠅 *NR1* 表現時期最大的不同處，在於幼蟲期。本研究使用 PCR 技術偵測 *BdNR1* 表現於幼蟲，而 Ultsch 等人 (1993) 利用北方墨點法於果蠅幼蟲並未偵測到 *DmNR1* 之表現。然而餵食果蠅幼蟲 NMDA 受器通道阻斷劑 MK-801 或 phencyclidine (PCP)，皆造成幼蟲運動能力下降，顯示 NMDA 受器可能在幼蟲期表現，並且可能影響神經調控肌肉運動 (Cattaert and Birman, 2001)。

東方果實蠅 NMDA 受器次單位 1 (*BdNR1*) 於雌成蟲的飛行肌肉表現，表示 NMDA 受器在成蟲可能影響肌肉的運動。對東方果實蠅雌成蟲注射 NMDA 受器通道阻斷劑 MK-801，發現處理組相較於對照組活動力較低，行走及飛行皆困難，輕輕敲動飼養杯杯壁，處理組成蟲仍會抖動及短距離行走。處理組在經過 4~8 小時之後恢復至與對照組相同的活動力 (未發表結果)。在果蠅幼蟲有類似的結果，餵食 MK-801 造成幼蟲癱瘓，動作的幅度變小，但對外界刺激仍有反應，且以體外培養進行電生理實驗，發現 MK-801 能抑制肌肉的節律活動 (Cattaert and Birman, 2001)。儘管我們的實驗與前人研究結果指出，無脊椎動物的 NMDA 受器可能與肌肉運動有關 (Brockie *et al.*, 2001; Cattaert and Birman, 2001; Lima *et al.*, 2003)，但值得注意的是利用 MK-801 研究肌肉運動並不適當。於哺乳動物的研究指出 MK-801 之毒性會造成運動失調 (Nakki *et al.*, 1996)，所以 MK-801 注射試驗無法證明是因為 NMDA 受器受到抑制而造成運動功能喪失，還是因為 MK-801 的毒性造成的運動失調。未來可利用 RNA 干擾技術，默化 NMDA 受器之表現以觀察成蟲的活動力及飛行能力。

二、NMDA 受器通道阻斷劑 MK-801 對卵巢發育之影響

選擇性 NMDA 受器通道阻斷劑 MK-801，在脊椎動物的研究中，會使 NMDA 受器失去原有功能，包括注射 MK-801 能抑制生殖發育 (Flynn *et al.*, 2002)。研究推論 NMDA 受器藉由影響 GnRH 的分泌，進一步刺激 GnH 釋放，以調節鼠及球魚的生殖發育 (Gore *et al.*, 1996; Flynn *et al.*, 1999, 2002)。於昆蟲的研究也利用 MK-801 探討昆蟲 NMDA 受器與生殖的關係：注射 MK-801 於肉蠅 (*Neobellieria bullata*)、蚊蝶 (*Bicyclus anynana*)、沙漠飛蝗 (*Schistocerca gregaria*) 及黃斑黑蟋蟀 (*Gryllus bimaculatus*)，造成卵巢發育受到抑制 (Begum *et al.*, 2004; Geister *et al.*, 2008)，推測 MK-801 在昆蟲和脊椎動物的作用類似，也藉由抑制昆蟲 NMDA 受器的功能以影響生殖。而蜚蠊 (*D. punctata*) 的 NMDA 受器次單位 1 即表現於雌成蟲的咽喉側腺，可能影響 JH 的生合成 (Chiang *et al.*, 2002)，進一步可能影響生殖。上述與東方果實蠅同樣為雙翅目的肉蠅以 5 μg MK-801/gbm (per gram body mass) 的劑量注射能明顯抑制卵巢的發育，而以 40 μg MK-801/gbm 的劑量注射能完全抑制卵黃生成 (Begum *et al.*, 2004)。本研究中每隻東方果實蠅注射 3 μg MK-801 (3 μg /隻)，以雌蟲體重 (平均一隻 0.18 g) 換算，相當於每克體重接受 16.67 μg MK-801 的劑量 (16.67 μg MK-801/gbm)，結果處理組卵巢大小與對照組沒有顯著差異。而以 6 μg MK-801/隻，相當於 33.34 μg MK801/gbm 的劑量，則造成 50% 以上的死亡率 (前測試)，此劑量對東方果實蠅造成致死毒性，不適合用於生理研究。在肉蠅以 40 μg MK-801/gbm 的劑量注射並無造成毒性，以 80 μg MK-801/gbm 的劑量注射則造

成 100% 的死亡率 (Begum *et al.*, 2004), 而在沙漠蝗蟲以 400 µg MK-801/gbm 的劑量注射並沒有造成毒性 (Geister *et al.*, 2008)。上述結果顯示 MK-801 對東方果實蠅的毒性高於肉蠅及沙漠蝗蟲, 由此推測注射 MK-801 於體型相對較小的昆蟲, 使用的劑量可能因毒性而受到限制。

引用文獻

- Begum M, Breuer M, Kodrik D, Rahman MM, De Loof A.** 2004. The NMDA receptor antagonist MK-801 inhibits vitellogenesis in the flesh fly *Neobellieria bullata* and in the desert locust *Schistocerca gregaria*. *J Insect Physiol* 50: 927-934.
- Brockie PJ, Mellem JE, Hills T, Madsen DM, Maricq AV.** 2001. The *C. elegans* glutamate receptor subunit NMR-1 is required for slow NMDA-activated currents that regulate reversal frequency during locomotion. *Neuron* 31: 617-630.
- Cattaert D, Birman S.** 2001. Blockade of the central generator of locomotor rhythm by noncompetitive NMDA receptor antagonists in *Drosophila* larvae. *J Neurobiol* 48: 58-73.
- Chiang AS, Lin WY, Liu HP, Pszczolkowski MA, Fu TF, Chiu SL, Holbrook GL.** 2002. Insect NMDA receptors mediate juvenile hormone biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 37-42.
- Chiu HT.** 1978. Studies on the improvement of mass rearing for oriental fruit flies. *Plant Prot Bull* 20: 87-92. (in Chinese)
- De Loof A, Baggerman G, Breuer M, Claeys I, Cerstiaens A, Clynen E, Janssen T, Schoofs L, Vanden Broeck J.** 2001. Gonadotropins in insect: an overview. *Arch Insect Biochem Physiol* 47: 129-138.
- Ferrer-Montiel AV, Sun W, Montal M.** 1995. Molecular design of N-methyl-D-aspartate receptor binding site for phencyclidine and dizolcipine. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 8021-8025.
- Flynn KM, Schreibman MP, Yablonsky-Alter E, Banerjee S.** 1999. Sexually dimorphic development and binding characteristics of NMDA receptors in the brain of the platyfish. *Gen Comp Endocrinol* 115: 282-291.
- Flynn KM, Miller SA, Sower SA, Schribman MP.** 2002. Sexually dimorphic effects of NMDA receptor antagonism on brain-pituitary-gonad axis development in the platyfish. *Comp Biochem Physiol Part C* 131: 9-18.
- Geister TL, Lorenz MW, Hoffmann KH, Fischer K.** 2008. Effects of the NMDA receptor antagonist MK-801 on female reproduction and juvenile hormone biosynthesis in the cricket *Gryllus bimaculatus* and the butterfly *Bicyclus anynana*. *J Exp Biol* 211: 1587-1593.
- Gore AC, Wu TJ, Rosenberg JJ, Roberts JL.** 1996. Gonadotropin-releasing hormone and NMDA receptor gene

- expression and colocalization change during puberty in female rats. *J Neurosci* 16: 5281-5289.
- Jan LY, Jan YN.** 1976. L-glutamate as an excitatory transmitter at the *Drosophila* larval neuromuscular junction. *J Physiol* 262: 215-236.
- Johansen J, Halpern ME, Johansen KM, Keshishian H.** 1989. Stereotypic morphology of glutamatergic synapses on identified muscle cells of *Drosophila* larvae. *J Neurosci* 9: 710-725.
- Kew JNC, Kemp JA.** 2005. Iontropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology* 179: 4-29.
- Lima PA, Nardi G, Brown ER.** 2003. AMPA/kainite and NMDA-like glutamate receptors at the chromatophore neuromuscular junction of the squid: role in synaptic transmission and skin patterning. *Eur J Neurosci* 17: 507-516.
- Nakki R, Sharp FR, Sagar SM.** 1996. FOS expression in the brainstem and cerebellum following phencyclidine and MK801. *J Neurosci Res* 43: 203-212.
- Ramaswamy SB, Shu SQ, Park YI, Zeng FR.** 1997. Dynamics of juvenile hormone-mediated gonadotropism in the lepidoptera. *Arch Insect Biochem Physiol* 35: 539-558.
- Ultsch A, Schuster CM, Laube B, Betz H, Schmitt B.** 1993. Glutamate receptors of *Drosophila melanogaster*: primary structure of a putative NMDA receptor protein expressed in the head of the adult fly. *FEBS Lett* 324: 171-177.
- VanDongen AM.** 2008. Biology of the NMDA receptor. Boca Raton: CRC Press. 342pp.
- Villalobos C, Nunez L, Garcia-Sancho J.** 1996. Functional glutamate receptors in a subpopulation of anterior pituitary cells. *FASEB J* 10: 654-660.
- Weinberg RJ.** 1999. Glutamate: an excitatory neurotransmitter in the mammalian CNS. *Brain Res Bull* 50: 353-354.
- Wong EH, Kemp JA, Priestley T, Knight AR, Woodruff GN, Iversen LL.** 1986. The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 7104-7108.
- Zannat MT, Locatelli F, Rybak J, Menzel R, Leboulle G.** 2006. Identification and localization of the NR1 sub-unit homologue of the NMDA glutamate receptor in the honeybee brain. *Neurosci Lett* 398: 274-279.

收件日期：2012年10月29日

接受日期：2012年12月10日

cDNA Cloning and Transcriptional Expression of the N-methyl-D-aspartate Receptor in the Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis*

Ching-Yi Chien, and Mei-Er Chen *

Department of Entomology, National Chung Hsing University, 250 Kuo-Kuang Rd., Taichung 40227, Taiwan

ABSTRACT

In this study the *Bactrocera dorsalis* N-methyl-D-aspartate receptor (NMDA receptor) subunit 1 (*BdNR1*) cDNA was cloned using RT-PCR and RACE. The complete *BdNR1* cDNA had a length of 3,643 bp including an open reading frame which is 2,958 bp to encode a 985-amino acid protein. The BLAST analysis revealed a high identity (85%) with the *Drosophila melanogaster* NMDA receptor 1. RT-PCR was applied to detect the transcriptional expression of *BdNR1* in different developmental stages. The results showed that *BdNR1* was highly expressed in the larvae. In pupae, there was no expression in the early period and only a little in the late period. In adults, *BdNR1* was expressed in from 0- to 10-day-old female adults. Further, the highest transcriptional expression was found in the flight muscle in adults. Real-time PCR analysis revealed that *BdNR1* was expressed in the flight muscle of 0- to 10-day-old female adults, and the expression level was not different. In conclusion, *BdNR1* was expressed in vivacious larvae and adults, and not in immovable pupae. In addition, *BdNR1* was highly expressed in the flight muscle. This suggests that *BdNR1* may affect muscle contraction. However, blocking the NMDA receptor inhibits the ovarian development in other insects. In this study, the NMDA receptor antagonist, MK-801, was injected into female adults to detect the effect of the NMDA receptor on the ovarian development in *B. dorsalis*. The results showed that the size of the ovaries has no significant difference between the control group and the insects injected with MK-801.

Key words: *Bactrocera dorsalis*, NMDA receptor, flight muscle, muscle contraction