

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2022.01.003

苹果蠹蛾气味结合蛋白基因 *CpomOBP20* 的克隆及表达分析

和东风^{1,2+}, 张雪²⁺, 黄聪², 武强², 邢龙生², 刘博², 郭建洋³,
万方浩^{2,3*}, 钱万强^{2*}, 王文凯^{1*}

¹长江大学农学院, 湖北荆州 434025; ²中国农业科学院(深圳)农业基因组研究所, 广东深圳 518120;
³中国农业科学院植物保护研究所植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193

摘要:【目的】通过克隆苹果蠹蛾气味结合蛋白 *CpomOBP20* 基因 cDNA 序列, 分析其序列特征和表达谱, 旨在更好地了解 OBP 基因在苹果蠹蛾生命活动过程中的作用, 为害虫的绿色防控提供理论支撑。【方法】采用 RT-PCR 法扩增苹果蠹蛾气味结合蛋白 *CpomOBP20* 基因 cDNA 序列, 并使用生物信息学软件对其核苷酸和氨基酸序列进行分析; 基于 qPCR 技术分析 *CpomOBP20* 基因在苹果蠹蛾 4 龄幼虫不同组织(头、血淋巴、表皮、脂肪体、中肠、马氏管和唾液腺)以及雌雄成虫不同末端组织(头、触角、下唇须、喙、足和翅)中的表达情况, 利用分子对接研究了 *CpomOBP20* 与 3 种保幼激素的结合能力。【结果】苹果蠹蛾气味结合蛋白 *CpomOBP20* 基因的开放阅读框长 459 bp, 共编码 152 个氨基酸, 等电点为 6.30, 蛋白分子质量为 16.264 ku, N 末端具有 20 个氨基酸组成的信号肽序列, 蛋白质序列中具有 6 个保守的半胱氨酸残基, 属于 Classical OBP。序列分析表明, *CpomOBP20* 的氨基酸序列与小菜蛾 OBP (XP_011557123.1) 的一致性最高, 在亲缘关系上更加接近。qPCR 结果表明, *CpomOBP20* 基因在苹果蠹蛾 4 龄幼虫以及雌雄成虫不同组织中均有表达, 其中在 4 龄幼虫的血淋巴中表达量最高, 在雌雄成虫表达量最高的分别是翅和足, 其次是头部。分子对接结果表明, *CpomOBP20* 与 3 种保幼激素均具有较好的结合能力, 可能参与保幼激素的结合与转运。【结论】本研究明确了 *CpomOBP20* 的核苷酸和氨基酸序列的组成及编码蛋白的理化性质, 并推测 *CpomOBP20* 的作用可能不仅局限于嗅觉识别, 在非嗅觉器官中也可能起着重要的生理作用, 为今后更深入地探究气味结合蛋白在苹果蠹蛾生命活动中的作用机理提供数据支撑。

关键词: 苹果蠹蛾; 气味结合蛋白; 基因克隆; 序列分析; 表达分析



开放科学标识码
(OSID 码)

Cloning and expression analysis of the odorant-binding protein gene *CpomOBP20* in the codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae)

HE Dongfeng^{1,2+}, ZHANG Xue²⁺, HUANG Cong², WU Qiang², XING Longsheng², LIU Bo²,
GUO Jianyang³, WAN Fanghao^{2,3*}, QIAN Wanqiang^{2*}, WANG Wenkai^{1*}

¹College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025, China; ²Agricultural Genomics Institute at Shenzhen, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shenzhen, Guangdong 518120, China; ³State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

Abstract: 【Aim】To better understand the function of odorant-binding proteins (OBPs) in *Cydia pomonella* and provide a theoretical foundation for managing and controlling fruit pests, we analyzed the sequence features and expression profiles of *CpomOBP20*.

收稿日期(Received): 2021-08-18 接受日期(Accepted): 2021-10-14

基金项目: 国家重点研发计划(2021YFD1400100、2021YFD1400102、2021YFD1400101); 中国博士后科学基金(2020M683001); 深圳市孔雀团队项目(KQTD20180411143628272)

作者简介: 和东风, 男, 硕士研究生。研究方向: 入侵生物基因组与化学生态学。E-mail: 19939829810@163.com; 张雪, 女, 硕士研究生。研究方向: 资源利用与植物保护。E-mail: 17854223861@163.com

*同等贡献作者(The two authors contributed equally to this work)

*通信作者(Author for correspondence), 万方浩, E-mail: wanfanghao@caas.cn; 钱万强, E-mail: qianwanqiang@caas.cn; 王文凯, E-mail: wwkw@yangtzeu.edu.cn

【Method】We first amplified the cDNA sequence of *CpomOBP20* using reverse transcription-PCR, and then analyzed the features of its nucleotide and amino acid sequences using bioinformatics software. We also studied the expression profile of *CpomOBP20* in the tissues of 4th instar larvae (including head, hemolymph, integument, fat body, midgut, Malpighian tubules, and salivary glands) and terminal tissues of female and male adults (including head, antenna, labial palps, beak, leg, and wing). We evaluated the binding capacity of *CpomOBP20* to the three juvenile hormones. 【Result】The open reading frame encoded by *CpomOBP20* was 459 base pairs and encoded 152 amino acids. The predicted molecular weight of *CpomOBP20* was 16.264 ku and its isoelectric point 6.30. The first 20 amino acids at the N-terminus are signal peptide sequences. The encoded protein had six conserved cysteines, indicating that it is a classical OBP. Multiple sequence alignments showed that *CpomOBP20* had the highest amino acid sequence identity with the orthologous OBP (XP_011557123.1) in *Plutella xylostella*. Quantitative PCR analysis showed that *CpomOBP20* was expressed in almost all tissues of 4th instar larvae and in adult *C. pomonella* females and males. In 4th instar larvae, *CpomOBP20* showed the highest expression level in the hemolymph. In adults, the gene was highly expressed in the wings and legs, followed by that in the head, and molecular docking showed that *CpomOBP20* can bind to three juvenile hormones, suggesting that it plays an important role in the recognition and translocation of juvenile hormones. 【Conclusion】We determined the physiochemical properties of the nucleotide and amino acid sequences of *CpomOBP20* and further predicted that the function of *CpomOBP20* was not limited to odor recognition but may also have physiological effects in non-olfactory tissues. This study provides supporting data for exploring the physiological functions of OBPs in *C. pomonella*.

Key words: *Cydia pomonella*; odorant binding protein; gene cloning; sequence analysis; expression profiling

苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* (L.), 属鳞翅目 Lepidoptera 卷蛾科 Tortricidae 小卷蛾亚科 Olethreutinae 小卷蛾属 *Cydia* 的钻蛀型入侵害虫, 是全球仁果类水果种植地区最重要的果树害虫之一, 也是我国一类进境检疫性有害生物, 对全球水果种植业造成巨大经济损失(周文等, 2010)。苹果蠹蛾寄主广泛, 包括苹果 *Malus pumila* Mill.、梨 *Pyrus* spp.、沙果 *Malus asiatica* Nakai、海棠 *Malus spectabilis* (Ait.) Borkh 等 30 余种水果(杨雪清, 2014)。该虫起源于欧亚大陆, 现广泛分布于世界六大洲几乎所有的苹果产区(Wan *et al.*, 2019)。苹果蠹蛾在我国于 20 世纪 50 年代在新疆首次被发现(张学祖, 1957), 现已在新疆、甘肃等地区严重发生, 并逐步入侵扩大到 9 个省 181 个县(区、市)(农业农村部, 2020), 已被列为我国十大农作物虫害之一(农业农村部, 2021)。苹果蠹蛾具有隐蔽性, 幼虫孵化后很快蛀入果实内部; 常年大量以及不合理使用化学农药(主要是有机磷)已使苹果蠹蛾抗药性增强, 并造成环境污染和果品安全等问题(段辛乐等, 2015; Wan *et al.*, 2019; Wei *et al.*, 2020), 因此, 亟需发展针对苹果蠹蛾的绿色安全高效的防治方法。

气味结合蛋白(odorant binding proteins, OBPs)是昆虫外周嗅觉系统中重要的一类可溶性小分子蛋白质, 参与结合与转运环境信息化合物分子(杜亚丽等, 2020; 张玉等, 2019), 外界气味分子通过触角感器上的小孔进入淋巴液中, 与水溶性的 OB-

Ps 结合, 形成气味结合蛋白-气味分子复合体, 将气味分子运送至位于嗅觉神经元树突膜上的气味受体(odorant receptors, ORs)并使之激活, 将信号传递至中枢神经系统, 引发昆虫相应的行为反应(杜亚丽等, 2020; 张玉等, 2019)。因此, OBPs 与气味分子的结合是昆虫对环境信息化合物分子的第一步识别, 在昆虫定位寄主或寻找食物过程中发挥重要作用。最近的研究发现, 一些 OBPs 除了在昆虫嗅觉中发挥重要作用之外, 在其他非嗅觉生理活动中也能发挥重要功能, 如: 果蝇 *Drosophila* 的 OBP59a 在湿度感受中(Sun *et al.*, 2018)、三点苜蓿盲蝽 *Adelphocoris fasciaticollis* Reuter 的 AfasOBP11 在味觉中(Li *et al.*, 2019)、斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* Fabricius 的 SIGOBP2 在对化学农药毒死蜱抗性中(Sun *et al.*, 2021)均发挥重要作用。Kim *et al.* (2017)则发现埃及伊蚊 *Aedes aegypti* (L.) 的 mJH-BP 可与保幼激素 JHⅢ结合。

OBPs 的生理功能与其拓扑结构密切相关(张雪等, 2021)。OBPs 等受体与气味小分子等配体的结合, 主要通过氢键作用、疏水作用以及范德华力等结合(Venthur *et al.*, 2014), 因此, 蛋白质的三维结构将影响其与小分子化合物的结合能力(Li *et al.*, 2019a; Pan *et al.*, 2020; Tian *et al.*, 2020), 分子对接是研究受体和配体三维结构上的结合关系, 由于其利用计算的方法能快速获得较为准确的结合潜能, 越来越多地被应用于研究 OBPs 与小分子化

合物结合的生理功能(Li *et al.*, 2021)。此外,OBPs 在不同组织或不同发育阶段的表达量也与其生理功能密切相关(张雪等, 2021);在触角和头部高表达的 OBPs 一般与寄主植物挥发物和性信息素识别相关(Huang *et al.*, 2018; Wei *et al.*, 2021);在外生殖器官中高表达可能与性信息素的释放有关(Li *et al.*, 2020)。鉴于 OBPs 对昆虫识别外界环境信息化合物的重要性,已被发展为害虫防治的重要靶标(Brito *et al.*, 2020; Venthur & Zhou, 2018)。因此,研究 OBPs 的结构、进化和生理功能等有利于基于 OBPs 作为防控靶标的害虫防治技术的成功应用。

目前,国内外关于苹果蠹蛾气味结合蛋白的研究报道相对较少,现有的研究集中在对苹果蠹蛾的 PBP 和 GOBP 的鉴定,并对 PBP1 和 PBP2 进行同源建模、配体竞争性结合实验以及配体预测,而其他气味结合蛋白的序列、结构和功能尚不明确(Garczynski *et al.*, 2013; Tian *et al.*, 2020, 2016; Tian & Zhang, 2016)。因此,研究苹果蠹蛾气味结合蛋白的理化性质与结构对明确其生理功能和作用机制显得尤为重要。Huang *et al.* (2021)从苹果蠹蛾基因组中鉴定获得 *CpomOBP20* 基因,通过转录组分析,发现其不仅在雌雄成虫头部,也在其他非化学感受器官中高表达。因此, *CpomOBP20* 可能在多种生理活动中发挥重要功能,研究其多样性的功能对于发展以 OBPs 为防控靶标的害虫防治技术具有重要意义。基于此,本研究对 *CpomOBP20* 基因进行了克隆,并对其进行生物信息学分析,包括三维结构预测和进化分析,通过实时荧光定量 PCR 方法对其在 4 龄幼虫以及雌雄成虫不同组织中的表达谱进行测定,通过分子对接研究了 *CpomOBP20* 与 3 种保幼激素的结合模式,旨在为进一步研究苹果蠹蛾气味结合蛋白基因的生理功能提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

苹果蠹蛾原始种群于 2013 年 11 月在甘肃省酒泉市果园采集获得,利用人工饲料在室内饲养至第 70 余代。饲养温度(25 ± 1) °C,相对湿度(70±5)%,光周期 16L: 8D。选取 4 龄幼虫以及羽化 1~3 d 的活跃雌雄成虫,在体视显微镜下解剖并分别收集 4 龄幼虫的不同组织(头、血淋巴、表皮、脂肪体、中肠、马氏管和唾液腺)及雌雄成虫的不同末

端组织样品,包括头(5 个)、触角(25 对,50 根)、下唇须(60 对)、喙(60 对)、翅(20 头,40 对)、足(20 头,120 根),每个样品 3 个重复,液氮冷冻并保存于 -80 °C 低温冰箱中备用。

1.2 供试试剂及仪器

试剂:RNA 小量提取试剂盒、微量总 RNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒为北京天漠科技开发有限公司产品;Hifair® III 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (gDNA digester plus)、Hieff® qPCR SYBR® Green Master Mix (Low Rox) 为上海翊圣生物科技有限公司产品;金牌 Mix (green)、pClone007 Versatile Simple Vector Kit、TreliefTM5α Chemically Competent Cell 购自北京擎科生物公司;Trans2K® DNA Marker 为北京全式金生物技术有限公司产品。

仪器:ABI 7500 定量 PCR 仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);超微量紫外分光光度计 Nano Photometer P330 (Implen, Germany)。

1.3 总 RNA 的提取与 cDNA 第 1 链的合成

用 RNA 小量提取试剂盒提取苹果蠹蛾雌雄成虫总 RNA,微量总 RNA 提取试剂盒分别提取 4 龄幼虫不同组织和雌雄成虫不同末端组织的总 RNA。利用 Nano Photometer P330 紫外可见分光光度计检测 RNA 样品的完整性及浓度,并用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的质量。使用 Hifair® III 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (gDNA digester plus) 反转录试剂盒合成 cDNA 第 1 链,于 -20 °C 冰箱保存备用,剩余 RNA 于 -80 °C 低温冰箱保存。

1.4 *CpomOBP20* 基因克隆和生物信息学分析

根据基因组中的 *CpomOBP20* 基因序列,使用 Vector NTI Advance® 11.5 软件设计引物: *CpomOBP20*-F 引物序列 5'-TGATTGTCATTGTGAAGT-GTCGT-3'; *CpomOBP20*-R 引物序列 5'-TTCTGCTG-GTCCATTTTCGGT-3'; *CpomOBP20*-qF 引物序列 5'-TGGACAACCTCAGGAGCACTATCAG-3'; *CpomOBP20*-qR 引物序列 5'-TTTCACCATTCACTTTCTCG-CACTC-3'; EF-1α-F 引物序列 5'-GGTCCCCTC-CAAGCCTCTGT-3'; EF-1α-R 引物序列 5'-CTCG-GCAGCTTTGCTGACCT-3'。送至北京擎科新业生物技术有限公司合成。

以 RNA 小量提取试剂盒提取的雌雄成虫 RNA

样品经反转录得到的 cDNA 作为模板,加入 PCR 引物,扩增目的基因。PCR 反应体系: Mix (green) 22 μL , 正反向引物及 cDNA 模板各 1 μL 。PCR 反应程序: 98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min 后进入 35 个循环(98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s), 之后 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 5 min。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 将胶回收的目的片段连接到 T 载体上, 转化至大肠杆菌 Trelief™ 5 α 感受态细胞, 最后将鉴定的阳性克隆的菌株送至北京擎科生物技术有限公司测序。

利用 ExPASy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线软件预测 *CpomOBP20* 氨基酸序列的蛋白分子质量、等电位点及其他理化特性。利用在线网站 SWISS MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 对 *CpomOBP20* 基因的氨基酸序列进行同源建模以获得其三维结构。将 *CpomOBP20* 的氨基酸序列与其他 16 种鳞翅目昆虫: 脐橙螟蛾 *Amyelois transitella* (Walker)、家蚕 *Bombyx mori* L.、帝王蝶 *Danaus plexippus* (L.)、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner)、诗神袖蝶 *Heliconius melpomene* L.、庆网蛱蝶 *Melitaea cinxia* L.、烟草天蛾 *Manduca sexta* (L.)、黄凤蝶 *Papilio machaon* L.、玉带凤蝶 *Papilio polytes* L.、菜粉蝶 *Pieris rapae* L.、柑橘凤蝶 *Papilio xuthus* L.、小菜蛾 *Plutella xylostella* L.、草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)、斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* (Fab.)、粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* (Hübner) 和黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的基因组蛋白质序列(均从 NCBI 下载获得)进行 Blastp 比对, 参数设置为“-evalue 1e-5”, 鉴定出这些物种中与 *CpomOBP20* 属直系同源基因的氨基酸序列。利用 MAFFT v7 对 *CpomOBP20* 及其直系同源基因氨基酸序列进行多重比对, 比对后的序列利用 MEGA6 软件中的最大似然法(maximum likelihood)构建系统发育树, bootstrap 值设置为 1000。

1.5 *CpomOBP20* 基因在苹果蠹蛾 4 龄幼虫和雌雄成虫组织中的表达谱

根据苹果蠹蛾气味结合蛋白编码基因的全长序列设计 qPCR 引物, 研究 *CpomOBP20* 基因在幼虫及雌雄成虫不同组织中的表达情况, 内参基因选择 EF-1 α 。以 1.3 中合成的苹果蠹蛾 4 龄幼虫和雌雄成虫各组织的 cDNA 第 1 链为模板, qPCR 反应体系(20 μL): Hieff® qPCR SYBR® Green Master Mix (Low Rox) 10 μL , 正反向引物(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)各 0.4 μL ,

cDNA 模板 1 μL , 补充 ddH₂O 到 20 μL 混匀离心[试剂盒为 Hieff® qPCR SYBR® Green Master Mix (Low Rox)]。扩增程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火/延伸 34 s, 共 40 个循环, 每个样品设 3 个生物学重复和 3 个技术重复。

1.6 *CpomOBP20* 与 3 种保幼激素的分子对接

从 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中下载 3 种保幼激素(JH I、JH II 和 JH III)的三维结构文件。利用 AutoDock Vina (Trott and Olson 2010) 对 *CpomOBP20* 和 3 种保幼激素进行分子对接研究它们的结合能力; 利用 PLIP (protein-ligand interaction profiler) (Salentin *et al.*, 2015) 在线服务器分析与 3 种保幼激素结合的关键氨基酸残基; 最后, 利用 Pymol (DeLano, 2002) 可视化 *CpomOBP20* 和 3 种保幼激素的结合模式。

1.7 数据处理与分析

采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 *CpomOBP20* 基因在不同末端组织中的相对表达量, 利用 SPSS 软件中的 LSD 法检验 *CpomOBP20* 在苹果蠹蛾成虫不同组织中表达量的差异显著性, 采用独立样本 *t* 检验(independent samples *t*-test) 检测 *CpomOBP20* 在雌雄成虫同一组织中表达量的差异显著性($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 *CpomOBP20* 基因克隆和序列分析

利用 PCR 扩增得到了 *CpomOBP20* 基因, 该基因片段大小符合预期结果(图 1A)。*CpomOBP20* 基因的全长 cDNA 序列包括一个 459 bp 的开放阅读框(ORF), 共编码 152 个氨基酸, 在线预测到其等电点为 6.30, 蛋白分子质量为 16.264 ku, N 末端具有 20 个氨基酸组成的信号肽序列, 且该蛋白质序列中具有 6 个保守的半胱氨酸残基(C1、C2、C3、C4、C5 和 C6)(图 1B), 属 Classical OBPs 亚家族。

CpomOBP20 的 N 端疏水区包含由起始位置至第 20 位氨基酸组成的信号肽, 符合分泌型蛋白的特征。将 *CpomOBP20* 的氨基酸序列提交至 SWISS MODEL 网站, 匹配到与其序列相似性大于 30% 的模板, 并进行同源建模, 结果表明, *CpomOBP20* 具有 6 个 α -螺旋, 主要结构为 α 螺旋与无规则卷曲结构, 部分 α -螺旋反向平行构成疏水的结合口袋, 具有保守的 6 个半胱氨酸残基且形成 3 个二硫键, 以起到稳定和支撑蛋白三维结构的作用(图 2)。

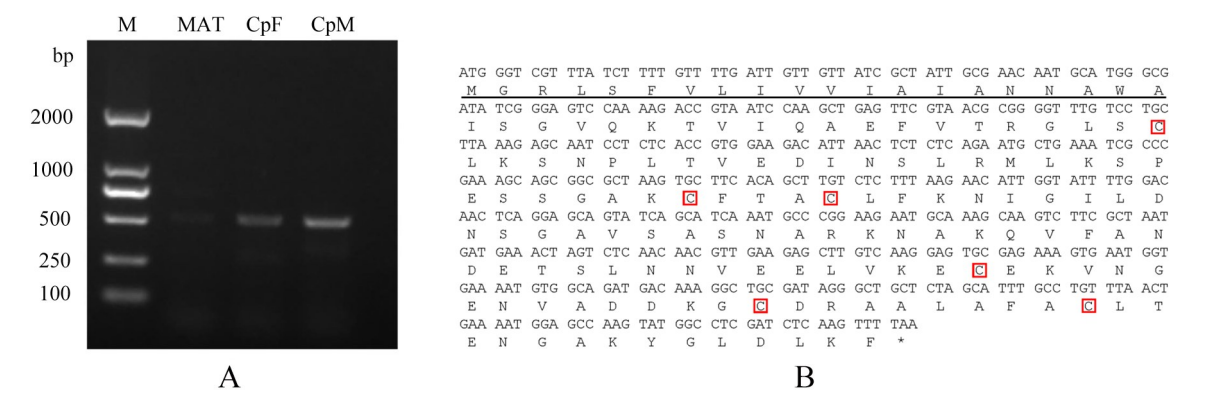


图 1 *CpomOBP20* 基因 cDNA 克隆及序列分析

Fig.1 Cloning and analyzing of the cDNA sequence of the *CpomOBP20* gene
A:PCR 扩增电泳图;B:苹果蠹蛾 *CpomOBP20* 核苷酸序列及其推导氨基酸序列;M:Marker;MAT:雄虫触角;CpF:苹果蠹蛾雌成虫;CpM:苹果蠹蛾雄成虫;保守位点上的半胱氨酸用红色方框表示,信号肽用横线表示。
A: PCR amplification electrophoretogram; B: Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *CpomOBP20* from *C. pomonella*;
M: Marker; MAT: Antenna of male *C. pomonella*; CpF: Female of *C. pomonella*; CpM: Male of *C. pomonella*;
The conserved cysteines are indicated in red box, and the predicted signal peptide is horizontal-line.

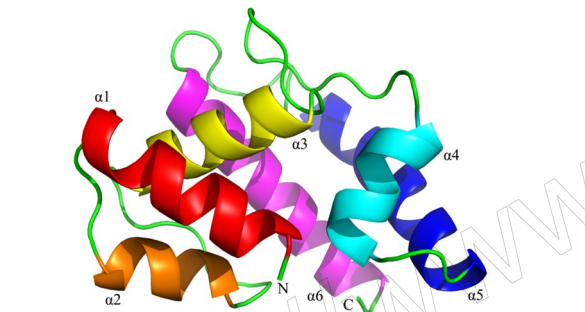


图 2 *CpomOBP20* 的三级结构
Fig.2 Tertiary structure of *CpomOBP20*

2.2 *CpomOBP20* 及其直系同源基因多序列比对和系统发育分析

将 *CpomOBP20* 与其 16 个直系同源基因的氨基酸序列进行多序列比对,并利用在线软件 ESPript 3.0 (<http://esprict.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi>)进行可视化分析,结果如图 3 所示。所有 17 个 OBPs 均属于 Classical OBPs 亚家族,它们的氨基酸序列中均具有 6 个保守的半胱氨酸,且符合 Classical OBPs 亚家族的半胱氨酸残基排列规则: C1-X20-66-C2-X3-C3-X21-43-C4-X8-14-C5-X8-C6, C2 与 C3 之间有 3 个氨基酸残基, C5 与 C6 之间有 8 个氨基酸残基。多序列比对结果表明, *CpomOBP20* 与小菜蛾 XP_011557123.1 的氨基酸序列一致性最高,为 41.73%,表明它们之间在进化关系上更加同源,但与其他直系同源基因的氨基酸序列一致性较低,均小于 40%。

将 *CpomOBP20* 与其 16 个直系同源基因构建系统发育树,以黑腹果蝇的 NP_523505.1 作为外群

(图 4)。结果表明, *CpomOBP20* 基因与小菜蛾 XP_011557123.1 基因聚在一起,说明它们之间的亲缘关系最近。而黑腹果蝇的 NP_523505.1 与其余 16 个鳞翅目昆虫的 OBPs 亲缘关系较远。

2.3 *CpomOBP20* 在苹果蠹蛾 4 龄幼虫不同组织中的表达量

利用 qRT-PCR 检测 *CpomOBP20* 基因在苹果蠹蛾 4 龄幼虫头部、血淋巴、表皮、脂肪体、中肠、马氏管和唾液腺的表达情况(图 5A)。结果表明, *CpomOBP20* 基因在血淋巴中表达量最高,显著高于在其他组织中的表达量,在表皮中表达量最低($P < 0.05$)。

2.4 *CpomOBP20* 在苹果蠹蛾雌雄成虫不同末端组织中的表达量

根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量法,以雄成虫头中的表达量为基准,研究 *CpomOBP20* 基因在苹果蠹蛾成虫不同末端组织中的表达情况(图 5B)。结果显示, *CpomOBP20* 在雌雄成虫头、触角、下唇须、喙、翅和足均有表达,且表达量各异:在雌成虫不同组织中的表达量为翅>头>触角>足>下唇须>喙;在雄成虫各组织中的表达量为足>下唇须>头>翅>触角>喙。 *CpomOBP20* 在雌成虫头部和翅中的表达量显著高于在雄成虫头部和翅中的表达量($P < 0.05$),而在雄成虫足中的表达量显著高于雌成虫足中的表达量($P < 0.05$),雌雄成虫之间在其他组织中的表达量差异不显著($P > 0.05$)。

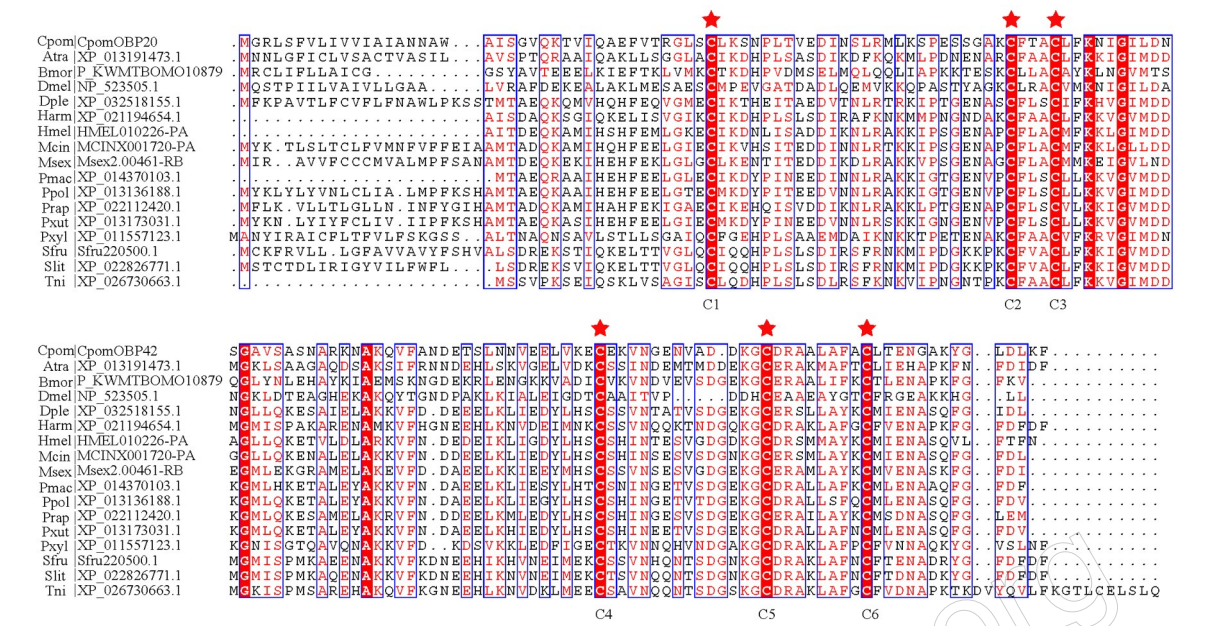


图 3 17 个物种 OBPs 的氨基酸序列的多重序列比对

Fig.3 Multiple sequences alignment of amino acid sequences of OBPs from 17 species

Cpom; 苹果蠹蛾; Atra; 脐橙螟蛾; Bmor; 家蚕; Dmel; 黑腹果蝇; Dple; 帝王蝶; Harm; 棉铃虫; Hmel; 诗神袖蝶; Mcin; 庆网蛱蝶; Msex; 烟草天蛾; Pmac; 黄凤蝶; Ppol; 玉带凤蝶; Prap; 菜粉蝶; Pxut; 柑橘凤蝶; Pxl; 小菜蛾; Sfru; 草地贪夜蛾; Slit; 斜纹夜蛾; Tni; 粉纹夜蛾。

Cpom; *Cydia pomonella*; Atra; *Amyelois transitella*; Bmor; *Bombyx mori*; Dmel; *Drosophila melanogaster*; Dple; *Danaus plexippus*; Harm; *Helicoverpa armigera*; Hmel; *Heliconius melpomene*; Mcin; *Melitaea cinxia*; Msex; *Manduca sexta*; Pmac; *Papilio machaon*; Ppol; *Papilio polytes*; Prap; *Pieris rapae*; Pxut; *Papilio xuthus*; Pxl; *Plutella xylostella*; Sfru; *Spodoptera frugiperda*;

Slit; *Spodoptera litura*; Tni; *Trichoplusia ni*.

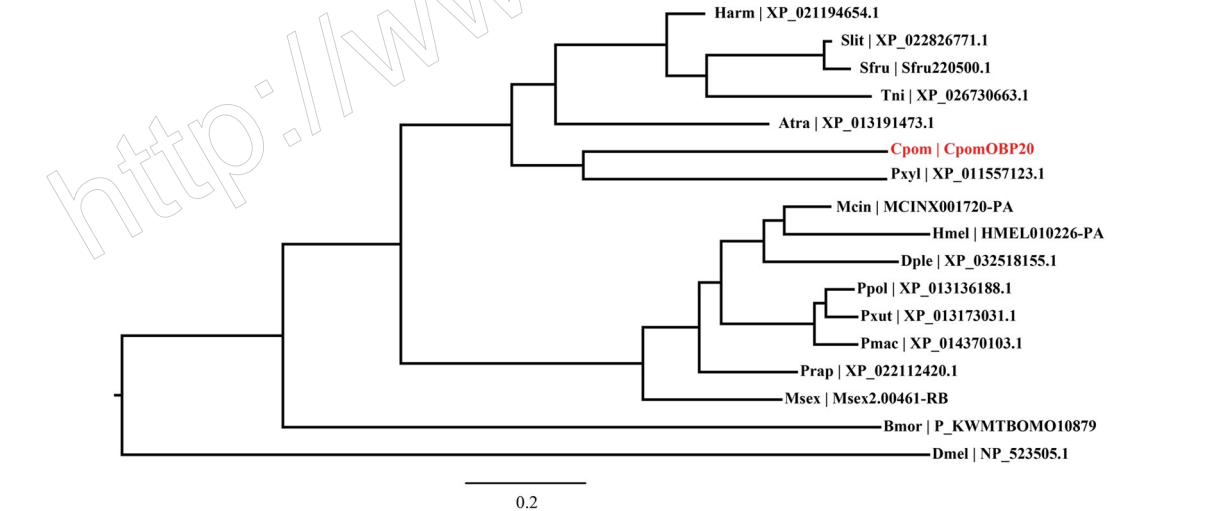


图 4 基于最大似然法的 *CpomOBP20* 与其直系同源基因系统发育分析

Fig.4 The phylogenetic relationship between *CpomOBP20* and its orthologous OBP genes based on maximum likelihood

2.5 *CpomOBP20* 与保幼激素的分子对接

分子对接结果表明, *CpomOBP20* 与 3 种保幼激素均具有较低的结合能, 分别为 -6.6、-6.31 和 -6.5 kcal · mol⁻¹。从 *CpomOBP20* 与 3 种配体结合模式图(图 6)可以看出, 3 种保幼激素均被包围在由疏水性氨基酸组成的结合腔。其中: *CpomOBP20* 与 JH I 结合的关键氨基酸分别是苯丙氨酸 13 (PHE13A)、亮氨酸 34 (LEU34A)、亮氨酸 37

(LEU37A)、苯丙氨酸 53 (PHE53A)、异亮氨酸 58 (ILE58A)、缬氨酸 77 (VAL77A)、苯丙氨酸 116 (PHE116A) 和亮氨酸 119 (LEU119A); 与 JH II 和 JH III 结合最好的关键氨基酸均为苯丙氨酸 13 (PHE13A)、苯丙氨酸 53 (PHE53A)、异亮氨酸 56 (ILE56A)、异亮氨酸 58 (ILE58A)、缬氨酸 77 (VAL77A) 和亮氨酸 119 (LEU119A)。

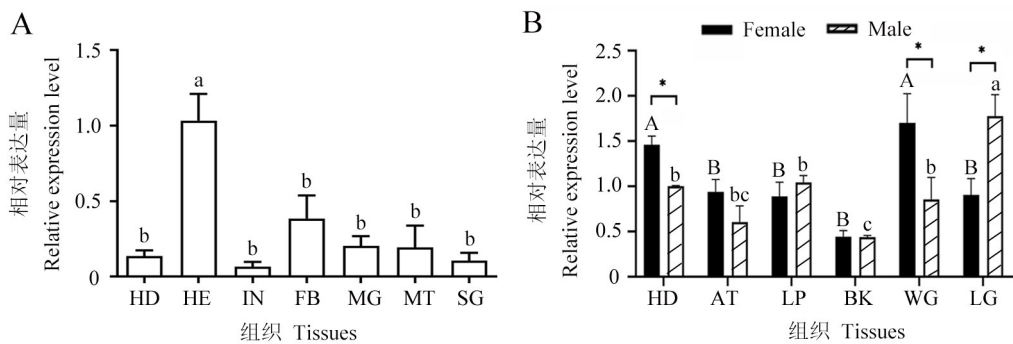


图 5 *CpomOBP20* 在苹果蠹蛾 4 龄幼虫 (A) 和雌雄成虫 (B) 不同组织中的相对表达量

Fig.5 Relative expression level of *CpomOBP20* in different tissues of 4th instar larvae (A) and adults (B) of *C. pomonella*
HD: 头; HE: 血淋巴; IN: 表皮; FB: 脂肪体; MG: 中肠; MT: 马氏管; SG: 唾液腺。AT: 触角; LP: 下唇须; BK: 喙; WG: 翅; LG: 足。
图中数据为平均值±标准误; 不同大写字母和小写字母分别表示不同组织间的表达量差异显著 ($P<0.05$, LSD 检验);
* 表示雌雄成虫同一组织中的表达量差异显著 ($P<0.05$, t 检验)。
HD: Head; HE: Hemolymph; IN: Integument; FB: Fat body; MG: Midgut; MT: Malpighian tubule; SG: Salivary glands; AT: Antennae; LP: Labial palp; BK: Beak; WG: Wing; LG: Leg. Data in the figure are mean $\pm$ SE. Different capital letters and lowercase indicate significantly different gene expression levels among different terminal tissues, respectively ($P<0.05$, LSD-test). * indicates significant difference in the gene expression level in the same tissue between female and male adults ($P<0.05$, t -test).

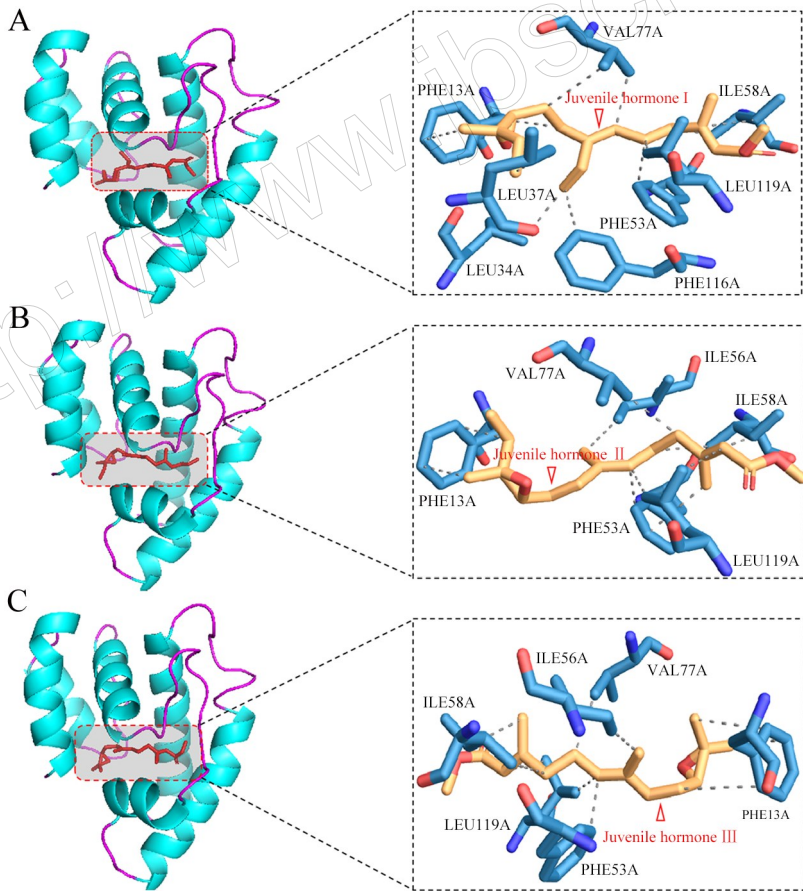


图 6 *CpomOBP20* 与 3 种保幼激素的分子对接模式

Fig.6 Molecular docking mode of *CpomOBP20* with three juvenile hormones (JHs)

3 讨论

本研究从苹果蠹蛾中克隆得到 *CpomOBP20* 基因序列,其开放阅读框长 456 bp,编码 152 个氨基

酸组成的多肽,预测的蛋白分子质量为 16.264 ku,等电点为 6.30。序列比对发现,*CpomOBP20* 属于 OBP 基因家族的 Classical OBP 亚家族,在鳞翅目昆

虫中 Classical OBP 亚家族中基因数目最多,接近 OBP 基因总数的一半 (Vogt *et al.*, 2015)。昆虫的 OBPs 朝着产生更多半胱氨酸残基的方向进化, Classical OBPs 多存在于进化较快的物种中,如鳞翅目和双翅目,而鞘翅目和膜翅目中 Minus-C OBP 亚家族中基因数目较多 (Vieira & Rozas, 2011)。研究表明,大部分 Classical OBPs 主要功能为感受化学信息素 (Dippel *et al.*, 2014), 因此,推测 *CpomOBP20* 参与苹果蠹蛾对环境信息素的识别。

多序列比对结果表明, *CpomOBP20* 与其直系同源基因氨基酸序列中均有 6 个保守的半胱氨酸位点,三维结构表明, *CpomOBP20* 与其他昆虫 Classical OBPs 的三维结构相似,均具有 6 个 α -螺旋,部分 α -螺旋构成疏水的结合口袋,6 个保守的半胱氨酸残基形成 3 个二硫键,以稳定和维持蛋白的三维结构 (Ma *et al.*, 2018; Pan *et al.*, 2020)。本研究将 *CpomOBP20* 与其他 16 种鳞翅目昆虫中的直系同源基因构建了系统发育树,以黑腹果蝇中 *CpomOBP20* 的直系同源基因作为外群,结果表明,与苹果蠹蛾 *CpomOBP20* 亲缘关系最近的是小菜蛾中的直系同源 OBP 基因 (XP_011557123.1),而双翅目的黑腹果蝇 OBP 与之亲缘关系最远,这可能与物种亲缘关系远近相关。

昆虫的 OBPs 基因在虫体组织中的表达谱在一定程度上能够反映其功能 (张雪等, 2021),到目前为止,对昆虫 OBPs 基因的功能研究主要集中在成虫,表达量分析也均针对于成虫组织,鲜有报道 OBPs 基因在幼虫组织中的表达谱,然而昆虫 OBPs 对于幼虫寻找食物等生命活动也具有重要作用,如小菜蛾 *PxylGOBP2* 基因在其幼虫寻找食物中发挥重要作用 (Zhu *et al.*, 2016)。

本研究对 *CpomOBP20* 在苹果蠹蛾 4 龄幼虫不同组织以及雌雄成虫不同末端组织中的相对表达量分别进行了比较分析。结果表明, *CpomOBP20* 在幼虫头部高表达,推测 *CpomOBP20* 可能参与幼虫寻找食物等化学通讯交流,与小菜蛾 *PxylGOBP2* 基因功能类似 (Zhu *et al.*, 2016);然而, *CpomOBP20* 在幼虫血淋巴中也高表达,推测 *CpomOBP20* 除了在幼虫寻找食物中发挥重要作用,可能还具有其他生理功能,如埃及伊蚊 *Aedes aegypti* (L.) 的 OBP 家族成员 mJHBP 在其血淋巴中高表达,具有与保幼激素结合的能力 (Kim *et al.*, 2017)。本研究发现,

CpomOBP20 与 3 种保幼激素均有较好的结合能力,推测 *CpomOBP20* 可能也参与苹果蠹蛾对保幼激素的结合与转运。成虫组织表达谱表明, *CpomOBP20* 基因在雌成虫翅和头部表达量最高,且均显著高于雄成虫,然而, *CpomOBP20* 基因在雄成虫足部的表达量显著高于其他组织和雌成虫,推测 *CpomOBP20* 基因在苹果蠹蛾雌雄成虫中的生理功能可能存在分化。该结果与一些昆虫的 OBPs 基因表达谱类似,如绿盲蝽 *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür) 的 *AlucOBP3*、*AlucOBP9* 和 *AlucOBP10* 3 个基因 (Ji *et al.*, 2013),橘小实蝇 *Bactrocera dorsalis* Hendel 的 *BdorOBP7* 基因 (Zheng *et al.*, 2013) 在足中表达量均显著高于其他组织;绿盲蝽的 *AlucOBP4* 基因在雌成虫翅中的表达量显著高于其他组织 (Hua *et al.*, 2012)。然而,目前对于在足和翅中高表达的 OBPs 基因的功能尚缺乏研究。

综上,本研究结果表明, *CpomOBP20* 基因在苹果蠹蛾生命活动中不仅参与对气味化合物的识别,也可能具有其他重要生理功能,如结合转运保幼激素等,具体功能尚待进一步研究,本文研究结果可为苹果蠹蛾气味结合蛋白的功能研究提供参考。

参考文献

- 杜亚丽, 徐凯, 赵慧婷, 刘玉玲, 牛庆生, 姜玉锁, 2020. 昆虫气味结合蛋白的研究进展. 昆虫学报, 63(3): 365-380.
- 段辛乐, 乔宪凤, 陈茂华, 2015. 苹果蠹蛾抗药性研究进展. 生物安全学报, 24(1): 1-8.
- 杨雪清, 2014. 苹果蠹蛾解毒酶基因的克隆及功能研究. 博士学位论文. 杨凌: 西北农林科技大学.
- 张学祖, 1957. 苹果蠹蛾 (*Carpocapsa pomonella* L.) 在我国的新发现. 昆虫学报, 7(4): 467-472.
- 张雪, 黄聪, 武强, 杨念婉, 钱万强, 万方浩, 2021. 昆虫普通过味结合蛋白研究进展. 生物安全学报, 30(1): 11-19.
- 张玉, 杨斌, 王桂荣, 2019. 昆虫嗅觉相关可溶性蛋白的研究进展. 环境昆虫学报, 41(2): 229-240.
- 农业农村部, 2020. 中华人民共和国农业农村部公告第 333 号. (2020-09-15) [2021-08-15]. http://www.moa.gov.cn/nybg/2020/202010/202011/t20201130_6357326.htm.
- 农业农村部, 2021. 农业农村部办公厅关于印发《全国农业植物检疫性有害生物分布行政区名录》的通知. (2021-04-22) [2021-08-15]. http://www.moa.gov.cn/govpublic/ZZYGLS/202104/t20210422_6366376.htm.
- 周文, 刘万学, 万方浩, 申建茹, 2010. 寄主植物信息化合

- 物对苹果蠹蛾行为的影响及其在防控中的应用. 应用生态学报, 21(9): 2434–2440.
- BRITO N F, OLIVEIRA D S, SANTOS T C, MOREIRA M F, MELO A C A, 2020. Current and potential biotechnological applications of odorant-binding proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(20): 8631–8648.
- DELANO W L, 2002. Pymol: an open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsletter on Protein Crystallography*, 40: 82–92.
- DIPPEL S, OBERHOFER G, KAHNT J, GERISCHER L, OPITZ L, SCHACHTNER J, STANKE M, SCHUTZ S, WIMMER E A, ANGELI S, 2014. Tissue-specific transcriptomics, chromosomal localization, and phylogeny of chemosensory and odorant binding proteins from the red flour beetle *Tribolium castaneum* reveal subgroup specificities for olfaction or more general functions. *BMC Genomics*, 15: 1141.
- GARCZYNSKI S F, COATES B S, UNRUH T R, SCHAEFFER S, JIWAN D, KOEPKE T, DHINGRA A, 2013. Application of *Cydia pomonella* expressed sequence tags: identification and expression of three general odorant binding proteins in codling moth. *Insect Science*, 20(5): 559–574.
- HUA J F, ZHANG S, CUI J J, WANG D J, WANG C Y, LUO J Y, LV L M, 2012. Identification and binding characterization of three odorant binding proteins and one chemosensory protein from *Apolygus lucorum* (Meyer-Dur). *Journal of Chemical Ecology*, 38(9): 1163–1170.
- HUANG C, ZHANG X, HE D F, WU Q, TANG R, XING L S, LIU W X, WANG W K, LIU B, XI Y, YANG N W, WAN F H, QIAN W Q, 2021. Comparative genomics provide insights into function and evolution of odorant binding proteins in *Cydia pomonella*. *Frontiers in Physiology*, 12: 690185.
- HUANG G Z, LIU J T, ZHOU J J, WANG Q, DONG J Z, ZHANG Y J, LI X C, LI J, GU S H, 2018. Expressional and functional comparisons of two general odorant binding proteins in *Agrotis ipsilon*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 98: 34–47.
- J I P, GU S H, LIU J T, ZHU X Q, GUO Y Y, ZHOU J J, ZHANG Y J, 2013. Identification and expression profile analysis of odorant-binding protein genes in *Apolygus lucorum* (Hemiptera: Miridae). *Applied Entomology and Zoology*, 48(3): 301–311.
- KIM I H, PHAM V, JABLONKA W, GOODMAN W G, RIBEIRO J M C, ANDERSEN J F, 2017. A mosquito hemolymph odorant-binding protein family member specifically binds juvenile hormone. *Journal of Biological Chemistry*, 292: 15329–15339.
- LI R T, HUANG L Q, DONG J F, WANG C Z, 2020. A moth odorant receptor highly expressed in the ovipositor is involved in detecting host-plant volatiles. *Elife*, 9: e53706.
- LI T T, LIU W C, ZHU J, YANG Y H, MA C, LU C, ZHANG K X, 2019a. Crystal structure and ligand identification of odorant binding protein 4 in the natural predator *Chrysopa pallens*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 141: 1004–1012.
- LI Z B, WEI Y, SUN L G, AN X K, DHILOO K H, WANG Q, XIAO Y, KHASHAVEH A, GU S H, ZHANG Y J, 2019b. Mouthparts enriched odorant binding protein Afa-sOBP11 plays a role in the gustatory perception of *Adelphocoris fasciaticollis*. *Journal of Insect Physiology*, 117: 103915.
- MA L, LI Z Q, ZHANG W N, CAI X M, LUO Z X, ZHANG Y J, CHEN Z M, 2018. The odorant binding protein 6 expressed in sensilla chaetica displays preferential binding affinity to host plants volatiles in *Ectopis obliqua*. *Frontiers in Physiology*, 9: 534.
- PAN L N, XIANG W F, SUN Z Y, YANG Y X, HAN J Y, WANG Y H, YAN C C, LI M, 2020. CeOBP2 plays a crucial role in 3-carene olfactory response of the parasitoid wasp *Chouioia cunea*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 117: 103286.
- SALENTIN S, SCHREIBER S, HAUPT V J, ADASME M F, SCHROEDER M, 2015. PLIP: fully automated protein-ligand interaction profiler. *Nucleic Acids Research*, 43: 443–447.
- SUN J S, LARTER N K, CHAHDA J S, RIOUX D, GU-MASTE A, CARLSON J R, 2018. Humidity response depends on the small soluble protein Obp59a in *Drosophila*. *Elife*, 7: e39249.
- SUN Z X, WANG R M, DU Y F, GAO B Y, GUI F R, LU K, 2021. Olfactory perception of herbicide butachlor by GOBP2 elicits ecdysone biosynthesis and detoxification enzyme responsible for chlorpyrifos tolerance in *Spodoptera litura*. *Environmental Pollution*, 285: 117409.
- TIAN Z, LI Y, ZHOU T, YE X, LI R, LIU J, 2020. Structure dynamics reveal key residues essential for the sense of 1-dodecanol by *Cydia pomonella* pheromone binding protein 2 (CpomPBP2). *Pest Management Science*, 76(11): 3667–3675.
- TIAN Z, LIU J Y, ZHANG Y L, 2016. Structural insights into *Cydia pomonella* pheromone binding protein 2 mediated prediction of potentially active semiochemicals. *Scientific Reports*, 6: 22336.
- VENTHUR H, MUTIS A, ZHOU J J, QUIROZ A, 2014. Ligand binding and homology modelling of insect odorant-bind-

- ing proteins. *Physiological Entomology*, 39(3): 183–198.
- VENTHUR H, ZHOU J J, 2018. Odorant receptors and odorant-binding proteins as insect pest control targets: a comparative analysis. *Frontiers in Physiology*, 9: 1163.
- VIEIRA F G, ROZAS J, 2011. Comparative genomics of the odorant-binding and chemosensory protein gene families across the Arthropoda: origin and evolutionary history of the chemosensory system. *Genome Biology and Evolution*, 3: 476–490.
- VOGT R G, GROSSE-WILDE E, ZHOU J J, 2015. The Lepidoptera odorant binding protein gene family: gene gain and loss within the GOBP/PBP complex of moths and butterflies. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 62: 142–153.
- WAN F H, YIN C L, TANG R, CHEN M H, WU Q, HUANG C, QIAN W Q, ROTA-STABELLI O, YANG N W, WANG S P, WANG G R, ZHANG G F, GUO J Y, GU L Q, CHEN L F, XING L S, XI Y, LIU F L, LIN K J, GUO M B, LIU W, HE K, TIAN R Z, JACQUIN-JOLY E, FRANCK P, SIEGWART M, OMETTO L, ANFORA G, BLAXTER M, MESLIN C, NGUYEN P, DALIKOVA M, MAREC F, OLIVARES J, MAUGIN S, SHEN J R, LIU J D, GUO J M, LUO J P, LIU B, FAN W, FENG L K, ZHAO X X, PENG X, WANG K, LIU L, ZHAN H X, LIU W X, SHI G L, JIANG C Y, JIN J S, XIAN X Q, LU S, YE M L, LI M Z, YANG M L, XIONG R C, WALTERS J R, LI F, 2019. A chromosome-level genome assembly of *Cydia pomonella* provides insights into chemical ecology and insecticide resistance. *Nature Communications*, 10: 4237.
- WEI H S, QIN J H, CAO Y Z, LI K B, YIN J, 2021. Two classic OBPs modulate the responses of female *Holotrichia oblita* to three major ester host plant volatiles. *Insect Molecular Biology*, 30(4): 390–399.
- WEI Z H, LIU M, HU C, YANG X Q, 2020. Overexpression of glutathione S-transferase genes in field lambda-cyhalothrin-resistant population of *Cydia pomonella*: reference gene selection and expression analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68: 5825–5834.
- ZHENG W, PENG W, ZHU C, ZHANG Q, SACCONI G, ZHANG H, 2013. Identification and expression profile analysis of odorant binding proteins in the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(7): 14936–14949.
- ZHU J, BAN L P, SONG L M, LIU Y, PELOSI P L, WANG G R, 2016. General odorant-binding proteins and sex pheromone guide larvae of *Plutella xylostella* to better food. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 72: 10–19.

(责任编辑:郭莹)