# 中华蜜蜂及意大利蜜蜂气味结合蛋白 OBP12 的基因克隆与差异表达分析<sup>\*</sup>

杜亚丽<sup>1\*\*</sup> 冯宇佳<sup>1\*\*</sup> 马卫华<sup>2</sup> 邰苗苗<sup>1</sup> 李新宇<sup>1</sup> 苏文婷<sup>1</sup> 赵慧婷<sup>3</sup> 姜玉锁<sup>1\*\*\*</sup>

(1. 山西农业大学动物科技学院,太谷 030801;2. 山西省农业科学院园艺研究所,太原 030031;3. 山西农业大学生命科学学院,太谷 030801)

摘 要 【目的】 克隆获得中华蜜蜂 Apis cerana cerana (简称中蜂) 和意大利蜜蜂 Apis mellifera ligustica (简称意蜂)的气味结合蛋白基因 OBP12 序列,并对两蜂种的蛋白结构进行预测,明确该基因在两蜂种 不同组织和发育阶段的表达差异。【方法】 分别以中蜂和意蜂的触角 cDNA 为模板,采用 RT-PCR 技术扩 增和克隆获得 OBP12 cDNA 全长序列,并利用生物信息学软件对其编码蛋白的理化特性、结构特征和系 统进化进行分析;采用 qRT-PCR 技术对 OBP12 在中华蜜蜂和意大利蜜蜂不同发育阶段(1、5、10、15、 20、25、30 日龄)各组织(触角、头、胸、腹、足和翅)中 mRNA 的表达情况进行比较分析。【结果】 成 功获得了 AcerOBP12 和 AmelOBP12 的完整开放阅读框 ORF 序列, 全长均为 453 bp, 共编码 150 个氨基 酸,预测分子量分别为 17.76 ku、17.42 ku;N-末端均有一段含 22 个氨基酸的信号肽,无跨膜结构;均含 有 6 个保守的半胱氨酸位点,属于 Classical OBP 亚家族。两蛋白均包含 6 个 α 螺旋,且由 Cys 组成的 3 个二硫键连接在一起。系统进化树分析表明,中华蜜蜂 AcerOBP12 首先与意大利蜜蜂 AmelOBP12 聚在一 起,再与同为膜翅目的回条蜂HlabPBPGp-9-like、印度跳蚁HsalPBPGp-9-like、阿根廷蚁LhumPBPGp-9-like 和小火蚁 WaurPBPGp-9-like 聚为一类。荧光定量 PCR 结果显示, OBP12 在中、意蜂不同发育阶段各组织 中均有表达,且触角中的表达量极显著高于其他组织(P<0.01);其他组织中,翅膀和足的表达量相对较 高,头、胸和腹中呈微量表达。此外,OBP12在意蜂不同发育阶段各组织的表达量均高于中蜂。【结论】 AcerOBP12 和 AmelOBP12 均属于 Classical OBP 亚家族,推测其为信息素气味结合蛋白 PBP。组织表达 谱结果暗示, OBP12 除广泛参与嗅觉相关行为之外, 还可能参与味觉识别过程。

关键词 中华蜜蜂; 意大利蜜蜂; OBP12; 基因克隆; 生物信息学分析; 时空表达

# Cloning and differential expression of the *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica* odorant binding protein gene *OBP*12

DU Ya-Li<sup>1\*\*</sup> FENG Yu-Jia<sup>1\*\*</sup> MA Wei-Hua<sup>2</sup> TAI Miao-Miao<sup>1</sup> LI Xin-Yu<sup>1</sup> SU Wen-Ting<sup>1</sup> ZHAO Hui-Ting<sup>3</sup> JIANG Yu-Suo<sup>1\*\*\*</sup>

College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China;
 Institute of Horticulture, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, China;
 College of Life Science, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

**Abstract** [Objectives] To clone the cDNA sequence of *OBP*12 from *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica*, predict their protein structures and compare differences in gene expression in different tissues and developmental stages between these two species. [Methods] The full-length cDNA sequence of *OBP*12 was amplified and cloned from antennae of

<sup>\*</sup>资助项目 Supported projects:国家自然科学基金项目(31502021, 31272513);现代农业产业技术体系(蜜蜂)建设项目 (CARS-44-KXJ23)

<sup>\*\*</sup>共同第一作者 Co-first authors, E-mail: duyali2000@yeah.net; 18404967705@163.com

<sup>\*\*\*</sup>通讯作者 Corresponding author, E-mail: jiangys-001@163.com

收稿日期 Received: 2018-06-08; 接受日期 Accepted: 2018-10-15

A. c. cerana and A. m. ligustica using RT-PCR. Its physiochemical properties and structural characteristics are described and a phylogenetic tree of the deduced amino acids constructed using bioinformatics software. The expression profiles of AcerOBP12 and AmelOBP12 mRNA in different tissues (antenna, head, thorax, abdomen, legs and wings) at different developmental stages (1, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 d) were detected with real-time PCR and compared. [Results] The entire ORF sequence of AcerOBP12 and AmelOBP12 containing 453 bp was successfully obtained. Both genes encoded a putative protein of 150 amino acids with estimated molecular weights of 17.76 ku and 17.42 ku, respectively. Both deduced proteins had a signal peptide of 22 amino acids at the N-terminal region, no transmembrane structure and contained six conserved cysteine sites, suggesting that they belong to the Classical OBP subfamily. Both genes had 6  $\alpha$ -helices linked by three disulfide bonds. The phylogenetic tree indicates that AcerOBP12 and AmelOBP12 belong to the same group, clustering together with the Hymenopteran genes HlabPBPGp-9-like, HsalPBPGp-9-like, LhumPBPGp-9-like and WaurPBPGp-9-like. Real-time PCR revealed that OBP12 was expressed in various tissues at different developmental stages of A. c. cerana and A. m. ligustica, and that expression profiles in antennae were significantly higher than in other tissues (P<0.01). In other tissues, OBP12 was primarily expressed in the legs and wings and only weakly expressed in the head, thorax and abdomen. Expression levels of OBP12 in different tissues and developmental stages of A. m. ligustica were higher than in the corresponding tissues and developmental stages of A. c. cerana. [Conclusion] AcerOBP12 and AmelOBP12 belong to the classical OBP subfamily and may be pheromone binding proteins (PBPs). Tissue expression profiles suggest that OBP12 may have a gustatory function, and play a role in olfaction.

Key words *Apis cerana cerana; Apis mellifera ligustica; OBP*12; gene cloning; bioinformatics analysis; temporal-spatial expression

昆虫生存与繁殖的相关行为,如寻找食物和 配偶、定位产卵场所、避免敌害和有毒物质、同 伴及配偶之间信息的交流等,在很大程度上都依 赖于自身的嗅觉系统( Carey and Carlson ,2011 )。 昆虫嗅觉识别过程中涉及到多种蛋白,其中气味 结合蛋白 ( odorant binding proteins , OBPs ) 作 为最先对外界环境中挥发性气味分子进行识别 的化学通讯蛋白,是一类呈酸性的水溶性小蛋 白,已在多个物种中鉴定获得,包括蛾类(Gong et al., 2009; Zhang et al., 2011; Glaser et al., 2013 ; Zhang et al., 2013 ; Walker et al., 2016 ; Sun et al., 2017a), 蝇类 (Hekmat-Scafe et al., 2002 ; Meunier et al., 2003 ; Leitch et al., 2015 ). 蚊类(Xu et al., 2003; Zhou et al., 2008; Pelletier and Leal, 2011; He et al., 2016), 蝽类(Gu et al., 2011 ; Ji et al., 2013 ; Hull et al., 2014 ; Yuan et al., 2015; Paula et al., 2016)、蚜虫类(Zhou, 2010; Gu et al., 2013)、蜜蜂类 (Forêt and Maleszka, 2006; Park et al., 2015; Karpe et al., 2016)。6个保守的半胱氨酸形成了3个二硫键, 可以帮助昆虫 OBPs 折叠形成识别气味分子的亲 水性空腔 (Pelosi et al., 2013)。这与脊椎动物

折叠方式完全不同。脊椎动物 OBPs 属于酯质运 载蛋白家族,如视黄醇结合蛋白、β-乳球蛋白和 其他不同功能的蛋白,典型结构为 8 个反平行的 β-折叠和 1 个短的 α-螺旋(紧靠 C 端)(Flower *et al.*, 2000),脊柱动物 OBPs 氨基酸序列中的 半胱氨酸在蛋白稳定性方面并未起到关键作用 (Vincent *et al.*, 2000)。

根据氨基酸序列同源性以及结合不同配基 的特性,可以将 OBPs 分为:信息素结合蛋白 (Pheromone binding proteins, PBPs),普通气味 结合蛋白1(General odorant binding protein 1, GOBP1)和普通气味结合蛋白2(General odorant binding protein 2,GOBP2)、触角结合蛋白 (Antennal binding proteins,ABPx)(张升祥等, 2010)。PBPs 在毛形感器的非神经性辅助细胞 (毛原和膜原细胞)中合成并表达,与性信息素 的结合能力较强,能够显著增强气味受体对性信 息素的专一性和敏感性(Sun et al.,2013;Chang et al.,2015;Liu et al.,2015a)。研究表明,抑 制 PBPs 的表达会严重扰乱雄虫对雌虫所释放性 信息素的反应(Dong et al.,2017)。而 OBPs 的 其他亚家族在识别一般气味和信息素的过程中 是必不可少的(He et al., 2010;Yin et al., 2012),

气味结合蛋白 OBPs 的生理功能是很复杂 的。大量研究表明, OBPs 除在嗅觉器官中表达 之外,还在味觉器官(包括唇瓣、跗节和翅中的 味觉感器)中表达,推测其除行使嗅觉功能之外 还可能参与呈味物质的识别过程。桔小实蝇 Bactrocera dorsalis BdorOBP2 在不同组织中均 有表达,其中头部中的表达量最高(陈玲等, 2013);小地老虎 Agrotis ipsilon AipsPBP1-3 在触 角中的表达量明显高于在其他组织中的表达量, 同时该基因在味觉器官喙和下唇须中也有少量 的表达(谷少华,2013); Ozaki 等(2003) 对黑 花蝇 Phormia regina 唇瓣上的化学感器所进行的 电生理反应研究,发现一种可以转运单萜类物质 的 OBP。黑腹果蝇 Drosophila melanogaster OBP57d 和 OBP57e 在足中的味觉感器中共表 达,有利于辛酸的感知 (Matsuo et al., 2007; Yasukawa et al., 2010); OBP49a 参与黑腹果蝇 对甜味物质的摄食行为 (Jeong et al., 2013)。随 后的 RNAi 实验也证明 OBP 在黑腹果蝇味觉系 统中以组合和性别二态方式来发挥功能(Swarup et al., 2014).

蜜蜂作为大自然生态系统中的一员,以其特 有的生物学本能,参与大自然的生态平衡,在食 物链中起承上启下的作用。在现代化农业生态系 统中,由于规模化、机械化、集约化、化学化的 发展,野生授粉昆虫的数量极度减少,蜜蜂授粉 的重要性日渐凸显(刘光楠,2017)。目前,我国 养蜂生产上使用的主要蜂种是中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* Fabricius(简称中蜂)和意大利蜜 蜂 *Apis mellifera ligustica* Spinola(简称意蜂)。

中蜂是我国特有的蜂种,与意蜂相比,具有嗅觉 灵敏、善于利用零星分散的蜜粉源,抗螨、抗美 幼病及白垩病的能力强等优点,是我国山林地区 不可替代的优良蜂种(苏松坤等,2005;Zhao *et al.*,2014)。

本研究是在前期对中蜂触角(1、10、18和 25日龄)转录组测序的基础上,我们选择其中 一个显著上调表达的基因 *OBP*12,分别从中蜂、 意蜂触角中克隆获得该基因,对其编码蛋白的理 化性质和结构特征进行预测,并利用 quantitative real-time PCR 技术对其在两蜂种不同发育阶段 各组织中的表达差异进行了比较分析,以期为该 蛋白的生理功能及蜜蜂的嗅觉识别机制研究奠 定基础。

# 1 材料与方法

#### 1.1 供试蜜蜂

试验用中华蜜蜂 A. c. cerana 和意大利蜜蜂 A. m. ligustica 均由山西农业大学动物科技学院 实验蜂场提供。选取群势强壮、健康无病、无自 然分蜂倾向的中蜂和意蜂各 1 群,分别从蜂巢中 抽出一张成熟封盖子脾(新蜂将要出房)置于人 工培养箱恒温培养(34),待其羽化出房后用 无味无毒的油漆在背部进行标记(约2500只), 再放回原来的蜂巢,在成蜂1、5、10、15、20、 25、30日龄时进行采样。两蜂种每个日龄各采 集 300只,随机分为3组,按触角、头(去除触 角) 胸(去除足和翅) 腹、足和翅膀6个组织 进行分离。每 100只工蜂各组织的混合样作为一 个生物学重复。所采样品要迅速投入盛有液氮的 研钵中研磨至粉末状,倒入装有 1 mL RNAiso Plus 的 1.5 mL 离心管中, - 80 保存备用。

#### 1.2 主要试剂和仪器

总 RNA 提取试剂盒 RNAiso Plus、反转录试 剂盒 PrimeScript<sup>TM</sup> RT Reagent Kit with gDNA Eraser (perfect real time)、荧光定量试剂盒 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II (Tli RNaseH Plus) 克隆载体 pMD<sup>TM</sup>19-T、DNA Marker DL 1000 和 DNA 凝胶回收试剂盒等购自 TaKaRa 宝生物工 程(大连)有限公司;Amp、IPTG、X-Gal 和 50×TAE Buffer 等购自北京依托华茂生物科技有 限公司;PCR 反应试剂 2×Es Taq MasterMix(含 染料)和感受态细胞 DH5 $\alpha$  购自北京康为世纪生 物科技有限公司;异丙醇、氯仿、无水乙醇等常 规分析纯购自北京索莱宝科技有限公司。

所需仪器主要为: PCR 梯度扩增仪 (ABI,

美国), 实时荧光定量 PCR 仪(ABI,美国), Universal Hood II 紫外凝胶成像分析系统 (BIO-RAD,美国), 5810R 高速冷冻离心机 (Eppendorf,德国), ND-1000核酸蛋白浓度测 定仪(NanoDrop,美国), MCS-3020 全自动高 压灭菌锅(SANYO,日本), DL-CJ-2ND 超净 工作台(东联哈尔,北京), DYY-32B 琼脂糖水 平电泳仪(六一,北京)。

#### 1.3 实验方法

 1.3.1 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成 按照 RNAiso Plus 试剂说明书进行各组织样
 本总 RNA 的提取,经纯度和浓度测定之后,根据 PrimeScript<sup>TM</sup> RT Reagent Kit with gDNA Eraser (perfect real time)试剂盒反转录合成 cDNA 第一链,反应所需 RNA 总量为 1 000 ng。 获得的 cDNA 模板 - 20 保存备用。 **1.3.2** 引物设计 根据前期获得的中华蜜蜂触角 转录组数据中的 Unigene 序列和西方蜜蜂基因组 中 *AmelOBP*12(GenBank 登录号:NM\_001040229) 基因序列,使用 Primer 3.0 plus (http://www. bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus. cgi)软件设计引物用于扩增目的基因的 cDNA 序列。根据克隆获得序列和 *Arp*1 基因(GenBank 登录号:NM\_001185145.1)的开放阅读框 ORF 序列,利用 Primer 5.0 软件设计用于 qRT-PCR 的 特异性引物。所用引物均由北京华大基因科技有 限公司合成,详细信息见表 1。

表1 本研究所用引物 Table 1 Primers used in this study

Table 1 Triffer's used in this study								
基因名称 Gene name	引物序列(5'-3') Primers sequences	产物长度(bp) Product size	退火温度() Annealing temperature	<b>引物用途</b> Use of primers				
AcerOBP12	F: GACACTGCACGAAGGAACAA	736	54	基因克隆 Gene cloning				
AmelOBP12	R: GTCTCGCGTTGAAAGAAAGC F: ATGTTATATAATAACTTAACTT	453	52	C				
AcerORP12	R: TCAGGGATAATTACGCATAGCT	161		带来之量 DCD				
Accrobit 12	R: GCGACGTCACACTTGTCATT	101		Real-time				
AmelOBP12	F: TGGCTGTTTCCTAGCTTGCA	163	62	PCR				
Arp1	R: GTGAACGTCATCTTCGCACG	185						
r	R: GGAAAAGAGCCTCGGGACAA							

1.3.3 OBP12 基因的克隆 分别以保存的中华 蜜蜂、意大利蜜蜂的触角 cDNA 为模板,用表1 中的引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(20 μL) 为 :2×Es Taq MasterMix 10 µL ,cDNA 模板 2 µL , 上、下游引物(10 µmol·L<sup>-1</sup>)各 0.8 µL ,RNase-Free Water 6.4 µL。反应程序:94 预变性 4 min; 94 变性 30 s 54 退火 30 s ,72 延伸30s, 终延伸 8 min。以 DNA Marker 35 个循环;72 DL 1 000 作为参照, PCR 扩增产物经 1.0%的琼 脂糖凝胶电泳后 ,在紫外灯下迅速切下含有目的 DNA 条带的琼脂糖凝胶,并根据 DNA 凝胶回收

试剂盒进行纯化。将纯化产物连接到克隆载体 pMD<sup>TM</sup>19-T 上,转化至 DH5α 感受态细胞,经 蓝白斑筛选鉴定,挑取单一白色菌落至含 Amp (1:1000)的LB液体培养基中扩大培养。经 菌液 PCR 鉴定后,将阳性克隆产物送北京华大 基因科技有限公司进行双向测序。

1.3.4 生物信息学分析 利用在线软件 ORF Finder (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html)查 找序列的开放阅读框,使用 Lasergene 软件中的 EditSeq 工具预测其编码的氨基酸序列。在 NCBI 中用在线工具 Protein BLAST (http://blast.ncbi.

nlm.nih.gov/Blast.cgi)工具进行氨基酸序列的同 源性分析 ;NCBI Conserved Domains( http://www. ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi)分析保 守结构域; ProtParam ( http://web.expasy.org/cgibin/protparam/protparam)预测蛋白的分子量、等 电点等理化性质 ;SignalP 4.1( http://www.cbs.dtu. dk/services/SignalP/)预测信号肽序列;TMHMM-2.0 ( http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/ ) 分析跨膜结构; ProtScale ( http://web.expasy.org/ cgi-bin/protscale/protscale.pl)进行疏水性分析; PSORT II ( http://psort.hgc.jp/form2.html ) 和 LocTree 3 ( https://rostlab.org/services/loctree3/ ) 进行亚细胞定位分析 ;PredictProtein( https://www. predictprotein.org/)预测氨基酸序列中二硫键的 位置; Swiss-Model (http://swissmodel.expasy. org/)分别预测分析蛋白的三级结构。从 GenBank 数据库中下载与其同源性较高的昆虫 OBPs,利 用 ClusalW 软件进行氨基酸的多重序列比对,采 用 MEGA6.0 软件中的邻接法 Neighbor-Joining (Bootrap 为 1 000 次) 构建系统发育树。

**1.3.5** 荧光定量 **PCR** 反应 以各日龄的成蜂 cDNA (反转录之后进行 4 倍稀释)为模板,使 用 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒进行荧光定量 PCR。反应体系为 20  $\mu$ L: SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II (2×)10  $\mu$ L, ROX Reference Dye II (2×)0.4  $\mu$ L,上、下游引物(10  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>)各 0.8  $\mu$ L, cDNA 模板 2  $\mu$ L, 灭菌超 纯水 6  $\mu$ L。反应程序:95 预变性 30 s;95 变性 30 s,62 退火 34 s,共 45 个循环。测定 熔解曲线的反应条件:95 15 s,60 1 min。 每个样品进行 3 次平行重复。

**1.3.6**数据处理与分析 荧光定量结果应用 7500 Real-time PCR System 软件(ABI,美国) 进行分析处理。根据标准曲线及荧光曲线的 Ct 值,采用 2<sup>-Ct</sup> 法进行数据分析,分别采用 SPSS17.0 软件中的单因素方差分析(ANOVA) 和 *t*-检验进行显著性差异分析。所得结果均以平 均数±标准误(Mean±SE)表示,并利用 GraphPad Prism 5.2 软件进行图形分析。

# 2 结果与分析

#### 2.1 OBP12 基因的克隆及鉴定

以中蜂和意蜂触角 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,均得到与预期长度一致的目的片段。回收 片段纯化后与 pMD<sup>TM</sup>19-T 载体连接转化后,经 蓝白斑筛选和菌液 PCR 鉴定,结果显示为阳性 (图1)。获得序列在 NCBI 中进行 BlastN 比对, 与西方蜜蜂 *OBP*12 (GenBank 登录号:NM\_ 001040229.1)核苷酸序列一致性为 91%,确定 克隆得到的序列是正确的。利用 ORF Finder 对所 获得的序列分析表明,*AcerOBP*12 和 *AmelOBP*12 的开放阅读框 (ORF)均为 453 bp,共编码 150 个氨基酸 (图 2)。两蛋白的氨基酸序列中均含 有 6 个保守的半胱氨酸位点,属于 Classical OBP 亚家族。





Marker DL 1000; 12-1 和 12-2 分别为 AcerOBP12 和 AmelOBP12 的菌液扩增产物。

A. *OBP*12 from *Apis cerana cerana*; B. *OBP*12 from *Apis mellifera ligustica*. M: DNA Marker DL 1000; 12-1 and 12-2 are the microbial amplication products of *AcerOBP*12 and *AmelOBP*12, respectively.

### 2.2 AcerOBP12 和 AmelOBP12 蛋白特性比较 分析

**2.2.1** 蛋白基本理化性质分析 运用 ProtParam 在线软件预测 AcerOBP12 和 AmelOBP12 的蛋白 理化性质(表 2)。从表 2 中可以看出,这 2 个 蛋白预测分子量分别为 17.76 ku、17.42 ku,均

>Ace	rOBP	12																			
1	gtct	tcgo	cgti	tgaa	aag	aaaq	gcg	tat	ata	laat	tc	yaa	gc <b>l</b>	ATC	AA	GAA	TTT	ATC	GT	CA.	TTTA
1													-	М	Κ	Ν	L	S	F	I	Y
61	TAT	CTG	GTT	rat(	CCC	CTA	ΓTΤ	TGG	GCI	TCA	AAA	ATT	TAC	CAT	GCA	AGP	AGG	CAT	CAA	TAT	TTT
9	I	W	F	I	Р	Y	F	' G	I	, Ç	) l	V	L	Η	А	R	S	I	Ν	I	F
121	TCAA	AGA	PAT:	rgc <i>i</i>	AGA	GTG	CAT	GGA	TCO	GATC	CAA	ACA	TGI	ACA	ATT	'CA'I	GA	ATT	AAC	GAA	ACT
29	Q	D	I	А	Ε	С	M	I D	F	2 2	5 1	V	М	Т	Ι	Η	Ε	L	Т	K	L
181	TCG:	ГGA	CTC	GTC	GGA	GGCI	٩AG	AAT	AAA	GTI	'AA'	ΓAA	ACO	GAA	GAG	GAA	AG	[TTT	CAG	AAG	CTA
49	R	D	S	S	Ε	А	R	I	k	I I		Ε	Ν	Ε	Ε	Ε	S	F	R	S	Y
241	TGG	CTG	TTT(	CTTA	AGC	TTG	CAT	TTG	GCA	ACA	AA	ГТG	GC	GTG	ATG	'AA	GGG	CTC	CGA	ATT	GAG
69	G	С	F	L	A	С	I	W	Ç	2 Ç	) ]	Ε	G	V	М	Ν	G	S	Ε	L	S
301	CAC	ATA	[AA	CATA	AGC.	AGG	GAT	CAT	CGA	AAA	ACC	GAT	AT(	CAC	GAI	GAC	GA	AGA	ТСТ	TAA	AAC
89	Т	Y	Ν	I	A	G	I	I	E	L K	C E	ર	Y	Н	D	D	Ε	D	L	K	Т
361	ATA	TTT:	rca:	ГААА	AAT	CGC	GTT	AAC	GTO	SCGA	AGA	ΑTG	ACI	ATC	TAC	AGP	AAZ	ATT	TTT	ACA	CGT
109	Y	F	Η	K	Ι	А	L	I I	C	: E	L I	C	D	Ι	Y	R	Κ	F	L	Η	V
421	GAA	FGA	CAA	GTG	ГGА	CGT	CGC	TCT	TAG	TTT	CAA	AAT	TG	rgc	ATG	TTC	SAAZ	AGC	TAT	GCG	TAA
129	Ν	D	K	С	D	V	A	. I	S	5 F	ľ	K	L	С	М	$\mathbb{L}$	Κ	A	М	R	N
481	TTA	rcco	C <b>TG</b>	<b>A</b> at	саа	ittt	ata	att	tta	tct	att	tgo	cac	tto	gtc <sup>.</sup>	tat	tac	cgc	aaa	aaat	tac
149	Y	Ρ	*																		
541	agag	ggat	taa	aaaq	gaa	tati	tc	att	att	ccc	aco	ctt	tta	atc	gct	acc	tti	tct	ccc	taa	tag
601	cgtt	tcaa	aata	agga	act	aata	agc	gac	ata	icga	itaa	aaa	tta	aat	caa	tco	ggaa	aac	gta	gat	ata
661	gatt	tgad	cacq	gcgt	tc	taga	aac	aat	tag	fatt	gca	aca	tto	cgt	cgg	ata	igti	tgc	aat	tgt	tgt
721	tcct	ttc	gtgo	cagt	cgt	С															
> 7 m o	ממה ו	10																			
>Alle	בים בים ב מידע	፲ረ የጥጥል	<u>ጥ አ</u> ጥ	ייע מ	ממ	יጥጥል	אכי	יידי ביי	rCT.	יידי בי ב	ተ አ ጥ	۵Cr	ቦጥል	ͲϹͿ	שרכי	гст	CCA	CTT	יראי	יממו	ቦጥጥል
1	M	T.	v	N	N	л 113 Т.	лю. Т	T	V	T	Т	ло. Т.		T	M	C C	G	V	0	N	T.
61	CGTO		AGAZ	AGCO	TTC.		<u>י</u> תידי	<u>+</u> ידידידי	CAA	GAT	יד אי	L L L L L L	AGZ	ь АСТ	GCG	TGO		CGA	 TCA	AAC	ATG
21	R	A	R	S	V	N	I	F	0	D	I	A	I	ΣΓ	cl	V	D	R	S	N	М
121	ACA	TTT	CAT	GAAT	ΓTG.	AAG	AAA	CTT	CGI	'GAC	TCC	GTC	GGZ	AGG	CAA	GAA		AAA'	TTA	ATA	AAC
41	Т	F	Н	Е	L	K	K	L	R	D	S	S	F	Ξ	A	R	Ι	K	L	Ι	Ν
181	GAG	GAG	GAAZ	AAT	FTC.	AGGI	AAC	TAT	GGC	TGI	TTC	ССТ	AG	CTT	GCA	TT1	GGG	CAA	CAA	ACT	GGC
61	Ε	Е	Е	Ν	F	R	Ν	Y	G	С	F	L	7	Αſ	С	I	W	0	0	Т	G
241	GTGA	ATG	AAT	GGC	rcc	GAA:	ГТG	AGC	ACC	TAC	CAAC	CAT	AG	CAG	GGA	TT	ATCO	GAG	GGA	CAA	TAC
81	V	М	Ν	G	S	Е	L	S	Т	Y	Ν	I	7	A	G	I	I	Е	G	0	Y
301	CACO	GAT	GAC	GAAC	GAT	CTT	AAA	ACG	TTT	TTC	CAT	ΓAA	GA:	ГCG	CGI	TAP	ACG	rgc	GAA	GAT	GAC
101	Н	D	D	Е	D	L	Κ	т	F	F	Н	K	-	Γ	A	L	Т	С	Е	D	D
361	GTT	CAC	AGGZ	AAG	TTT	TTG	CAC	GTG	AAC	GAC	GAG	GTG	TGI	ACG	TCG	CTC	TT	AGC	TTC	AAA	TTG
121	V	Н	R	Κ	F	L	Н	V	Ν	D	Е	C	] I	C	V	A	L	S	F	Κ	L
421	TGCA	ATG	[TG7	AAA	GCT.	ATG	CGT	ААТ	ТАТ	'CCC	TG	A	_								
141	С	M	L	K	A	M	R	N	Y	P	*	-									

图 2 AcerOBP12 和 AmelOBP12 cDNA 核苷酸序列及其推导的氨基酸序列 Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of AcerOBP12 and AmelOBP12 cDNA

小写字母为非编码区,大写字母为开放阅读框 ORF;起始密码子和终止密码子用粗体标识, 信号肽序列用下划线标注,保守半胱氨酸位点用黑色方框标注。

Non-coding region is showed by lowercase letters, ORF is showed by uppercase letters, the start and stop codons are indicated by bold, sequence of signal peptide is underlined, conversed cysteine residues are labeled by box.

为小分子蛋白;理论等电点 pI 分别为 6.19、5.49, 介于 4.8-6.3,为中性蛋白;总平均亲水系数 (GRAVY)为 - 0.175 和 - 0.151,为亲水性蛋白; 不稳定系数分别为 56.19、45.31,均大于 40,为 不稳定蛋白;脂溶系数均大于 90,说明这 2 个 蛋白具有脂溶性。 2.2.2 蛋白基本结构预测 在线 NCBI 结构域分 析结果表明, AcerOBP12 编码产物的第 27-146 位氨基酸之间存在一个昆虫气味结合蛋白家族 的保守结构区域 PBP-GOBP superfamily, 而 AmelOBP12 编码产物的第 26-145 位氨基酸之间 也存在相同的保守结构域。两蛋白的信号肽均位

蛋白特性 Protein chara	cteristics	AcerOBP12	AmelOBP12		
蛋白分子式 Molecular formula		$C_{797}H_{1231}N_{209}O_{227}S_{12}$	$C_{766}H_{1204}N_{210}O_{228}S_{13}$		
原子总数 Total number of atoms		2 476	2 421		
蛋白分子量 Molecular weight		17.76 ku	17.42 ku		
等电点 Isoelectric point		6.19	5.49		
	最高 Maximum	Ile 10.7% (16)	Leu 10.0% (15)		
氨基酸组成 Amino acid constitute	最低 Minimum	Lys 12.9% ( 1 )	Pro 和 Trp 0.7% ( 1 )		
	未出现 Nonentity	Pyl 和 Sec	Pyl 和 Sec		
带正电荷氨基酸残基总数(Arg+L Total number of positively charged r	ys ) esidues	18	16		
带负电荷氨基酸残基总数(Asp+G Total number of negatively charged n	lu ) residues	20	21		
吸光系数 Absorptivity		1.312	0.765		
总平均疏水系数 Grand average of h	nydropathicity	- 0.175	- 0.151		
半衰期 Half-life period		30 h	30 h		
不稳定系数 Instability index		56.19	45.31		
脂溶系数 Aliphatic index		91.73	93.60		

表 2 AcerOBP12 和 AmelOBP12 蛋白的理化性质分析 Table 2 Physical and chemcial properties of characteristics for AcerOBP12 and AmelOBP12

于 1-22 位氨基酸序列,剪切位点位于 22 和 23 位氨基酸之间,无跨膜结构。疏水性分析显示, AcerOBP12 的氨基酸序列中,第 101 位氨基酸 Score 值最低为 - 3.378,第 8 位和第 9 位氨基酸 最高为 2.211; AmelOBP12 的氨基酸序列中,第 101 位氨基酸 Score 值最低为 - 2.878,第 10 位 氨基酸最高为 3.444,这表明它们可能都是脂溶 性气味分子的结合位点,存在多个比较明显的疏 水区域(Score 为正值的区域)。亚细胞定位结果 表明,两个蛋白主要集中在分泌途径上,说明它 们均属于分泌型蛋白。

**2.2.3** 蛋白高级结构预测 以家蚕性信息素气味结合蛋白 BmorPBP(PDB 登录号:1dqe.1.A)为模板分别对 AcerOBP12 和 AmelOBP12 进行3D 结构的预测(图 3)。AcerOBP12 与模板的结构相似度为 20.75%,包含 6 个 α 螺旋:α1(32-37



图 3 中华蜜蜂和意大利蜜蜂 OBP12 蛋白的 3D 结构预测模型 Fig. 3 Three-dimensional prediction structure of OBP12 from Apis cerana and Apis mellifera linnaeus

位 AA ) α2(43-49 位 AA ) α3(67-79 位 AA ) α4(89-98 位 AA ) α5(104-119 位 AA ) α6 (131-148 位 AA ); AmelOBP12 与模板的结构 相似度为 17.43%,也含有 6 个 α螺旋 α1(31-38 ) α2(43-49 ) α3(67-79 ) α4(89-98 ) α5(104-119 ) α6(127-144 )。两个蛋白均含有 3 对二硫键,其 中 Cys34-Cys132 连接着 α1 和 α6 螺旋, Cys70-Cys117 连接着 α3 和 α5, Cys74-Cys141 连接着 α3 和 α6。这些结构可能形成一个与气味 物质结合的空腔。

#### 2.3 蛋白序列比对和系统进化分析

将获得的氨基酸序列在NCBI数据库中进行

Blastp 分析,找到与 AcerOBP12 具有同源性的 昆虫 OBPs 氨基酸序列,主要包括膜翅目和双翅 目,而在其他目类的昆虫中几乎找不到相似序 列。使用 MEGA6.0 软件邻位相连法 Neighborjoining 进行1000次重复计算后构建系统进化树 (图 4)。从图 4 中可以看出,中华蜜蜂 AcerOBP12 首先与西方蜜蜂 AmelOBP12 聚在一 起,之后与同为膜翅目的回条蜂 HlabPBPGp-9-like、印度跳蚁 HsalPBPGp-9-like、阿根廷蚁 LhumPBPGp-9-like 和小火蚁 WaurPBPGp-9-like 聚为一类。说明两蜂种该蛋白在功能上没有大的 分化,该结果符合物种进化规律,同时也说明构 建的系统进化树是可靠的。





#### 2.4 OBP12 mRNA 时空表达分析

以中蜂 10 日龄头部的 *OBP*12 表达量为基 准,通过实时荧光定量 PCR 技术分析 *OBP*12 分 别在 1、5、10、15、20、25、30 日龄中蜂和意 蜂不同组织中 mRNA 的表达情况(图 5)。从图 5 中可以看出,*OBP*12 mRNA 在中蜂、意蜂不同 发育阶段的触角、头、胸、腹、足和翅中均有表 达,但表达程度存在明显差异,其中在各日龄触 角中的表达量最高,均极显著高于其他组织 (*P*<0.01);其他组织中,除刚出蜂房的新生蜂 外,其他日龄工蜂足和翅膀中的表达量相对较 高,头、胸和腹中呈微量表达。比较分析中蜂、 意蜂各组织中 OBP12 mRNA 的表达情况,结果 发现意蜂各组织中 OBP12 mRNA 表达量均高于 相应日龄中蜂各组织中的表达量。

## 3 讨论

嗅觉在蜜蜂的各种生物行为中均起着重要的作用,不仅能提供维持蜂群内聚力的感觉系统,还能识别空气中来源于食物和配偶的各种化学物质(Zhao et al., 2015)。本研究中,我们分别从中华蜜蜂和意大利蜜蜂中成功地克隆获得了 AcerOBP12 和 AmelOBP12 的 ORF 序列全长, 编码 150 个氨基酸,预测分子量介于 17-18 ku



Acer:中华蜜蜂;Amel:意大利蜜蜂。An:触角;H:头(去除触角);T:胸(去除翅膀和足);

Ab:腹;L:足;W:翅膀。1 d-30 d:成年工蜂的日龄。

柱上标有不同大写字母表示成蜂相同日龄不同组织之间的表达量差异极显著(P<0.01), \*\*、\*和 NS 分别表示 同一日龄中、意蜂触角中 OBP12 mRNA 的表达差异极显著(P<0.01), 差异显著(P<0.05)和无显著差异(P>0.05), Acer: Apis cerana cerana; Amel: Apis mellifera linnaeus; An: Antenna; H: Head without antenna; T: Thorax without wings and legs; Ab: Abdomen; L: Legs; W: Wings; 1 d-30 d: Days-old of adult worker bees. Histograms with different uppercase letters indicate extremely significant differences in the expression profiles in different tissues of the same day-old (P<0.01). \*\*, \* and NS indicate that the expression profiles of OBP12 mRNA in the antenna at the same day between Apis cerana cerana and Apis mellifera linnaeus had significant difference at the 0.01 level, significant difference at the 0.05 level and no difference at the 0.05 level, respectively.

之间,N-末端均有一段含 22 个氨基酸的信号肽, 具有小分子蛋白的一般特征;序列中包含 6 个保 守的半胱氨酸位点,均属于 Classical OBP 亚家 族,符合昆虫 OBP 结构通式: $C_1$ - $X_{15-39}$ - $C_2$ - $X_3$ - $C_3$ - $X_{21-44}$ - $C_4$ - $X_{7-12}$ - $C_5$ - $X_8$ - $C_{69}$ (Field *et al.*, 2000)。两 个蛋白均含有 6 个  $\alpha$  螺旋,且由 Cys 组成的二硫 键连接在一起,符合昆虫 OBPs 的典型结构特征。 BlastP 比对结果显示,中蜂和意蜂 AmelOBP12 的氨基酸序列一致性较高,推测他们是直系同源 基因。系统进化树结果表明,AcerOBP12 和 AmelOBP12 与同为膜翅目的回条蜂 HlabPBPGp-9-like、印度跳蚁HsalPBPGp-9-like、 阿根廷蚁 LhumPBPGp-9-like 和小火蚁 WaurPBPGp-9-like 有极高的相似性和同源性,故 而推测OBP12可能是信息素气味结合蛋白PBP, 在信息素识别和转运过程中起着重要的作用。

早期的研究认为昆虫 OBPs 特异地表达于触 角中,特别是信息素结合蛋白 PBPs 主要表达于

雄性昆虫的触角,如多音天蚕蛾 Antheraea polyphemus ApolPBPs (Vogt and Riddiford, 1981)。随后发现斜纹夜蛾 Spodoptera litura SlitGOBP1 (吴仲南等, 2009)、中华按蚊 Anopheles sinensis AsinOBP1 (秦赠等, 2015), 桃蛀螟 Conogethes punctiferalis CpunPBP1( 贾小 俭等 2015) 绿盲蝽 Apolygus lucorum AlucOBP8 (朱晓强等, 2015)、西花蓟马 Frankliniella occidentalis FoccOBP1(张治科等, 2016), 铜绿 丽金龟 Anomala corpulenta AcorOBP1(王超群 等,2017)、光肩星天牛 Anoplophora glabripennis AglaOBP12 (李广伟等, 2017) 和中华蜜蜂 AcerOBP14(杜亚丽等, 2016)也是在触角中特 异性高表达。本研究表明,中蜂、意蜂 OBP12 在工蜂(尤其是采集蜂)触角中相对表达量极显 著高于其他非嗅觉器官 (P<0.01)。作为社会性 昆虫,蜜蜂必须依赖其复杂的嗅觉系统来调节蜂 巢内外的一切活动,如哺育幼虫和蜂王、识别同 伴和寻找蜜粉源植物等。触角是蜜蜂最主要的嗅 觉感受器官,其上分布着大量感器,而 OBP12 在不同日龄工蜂触角的表达量是有变化的,暗示 该基因在蜜蜂的嗅觉调控过程中发挥一定的 作用。

昆虫基因的表达分布在一定程度上可以反 映其生理功能(Hull et al., 2014)。一般来说, 触角中高丰度表达的基因与嗅觉感知功能相关, 而在味觉器官(如喙、跗节和产卵器)中高表达 的基因能够参与味觉识别 (Pelosi et al., 2014; Brito et al., 2016)。如中红侧沟茧蜂 Microplitis mediator MmedOBP19 主要表达于前足跗节的锥 形感器中,参与足部味觉识别过程(杨叶青等, 2017) , 首蓿盲蝽 Adelphocoris lineolatus AlinOBP11 在雌、雄虫的前足中呈高丰度表达 , 参与寄主植 物选择过程中味觉物质的感知(Sun et al., 2017b);棉铃虫 Helicoverpa armigera HarmOBP16 在雌虫翅中的表达水平最高 ,在识别寄主植物的 过程中发挥一定的作用 (李兆群等, 2017); 中 蜂 AcerOBP11 在采集蜂的足和翅膀中均有表达 (张林雅, 2013)。qRT-PCR 结果显示,

AcerOBP12 和 AmelOBP12 在足和翅膀中也有较 高的表达。昆虫的足上常有丰富的味觉感受器, OBP12 在采集蜂足中高表达,推测可能和感知 蜜粉源植物的非挥发性物质有关。此外,昆虫的 翅是由胸部侧背叶发展而来的,与体壁的构造完 全相同,其内有气管、神经和血淋巴,外面有感 觉器和体壁的衍生物。当昆虫落在植物上,其跗 节和唇瓣上的味觉发挥主要作用,该系统能够使 昆虫寻找有利的产卵场所(Romani et al.,2005)。 虽然在甜菜夜蛾 Spodoptera exigua (Liu et al., 2015b)、茶尺蠖 Ectropis obliqua(Ma et al.,2016) 翅上也有感觉器的发现,但没有关于蜜蜂翅具有 化学感受功能的报道。

一般认为,中蜂具有比意蜂更灵敏的嗅觉, 这主要是基于对中蜂采集勤奋、善于利用零星蜜 粉源这一特点得出的。但从本研究所获得的结果 看 , 无论是在不同发育阶段还是不同组织中 , 意 大利蜜蜂 AmelOBP12 mRNA 的表达量均高于中 华蜜蜂。此外,从作为触角中起主要嗅觉作用的 板形感器的数量来看,意蜂工蜂触角鞭节中约有 2 220 个板形感器,而中蜂工蜂触角鞭节中约有 2104个板形感器,两者之间差异不大(宋飞飞, 2011)。因此我们可以推测,中蜂可以采集零星 蜜粉源的原因 ,并不是由于其拥有比意蜂更灵敏 的嗅觉系统 ,而是适应我国山林地区的气候特点 和蜜粉源条件经过长期自然选择逐渐形成的。由 于缺乏中蜂、意蜂触角中的其他气味结合蛋白时 空表达特性的比较研究,有关中蜂较意蜂嗅觉更 灵敏的普遍共识仍有待进一步证实。

#### 参考文献 (References)

- Brito NF, Moreira MF, Melo AC, 2016. A look inside odorant binding proteins in insect chemoreception. J. Insect Physiol., 95: 51–65.
- Carey AF, Carlson JR, 2011. Insect olfaction from model systems to disease control. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 108(32): 12987–12995.
- Chang H, Liu Y, Yang T, Pelosi P, Dong S, Wang G, 2015. Pheromone binding proteins enhance the sensitivity of olfactory receptors to sex pheromones in *Chilo suppressalis. Sci. Rep.*, 5(1): 13093.
- Chen L, Li HL, Zhou YX, Zhao L, Zhang LY, Ni CX, Shang HW, 2013. cDNA cloning, tissue expression and ligand binding

characteristics of odorant-binding protein 2 from the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *Acta Entomologica Sinica*, 56(6): 612–621. [陈玲, 李红亮, 周宇翔, 赵磊, 张林雅, 倪翠侠, 商晗武, 2013. 桔小实蝇气味结合蛋 白 *BdorOBP2* 的 cDNA 克隆、组织表达及配基结合特性. 昆

虫学报,56(6):612-621.]

- Dong K, Sun L, Liu JT, Gu SH, Zhou JJ, Yang RN, Dhiloo KH, Gao XW, Guo YY, Zhang YJ, 2017. RNAi-induced electrophysiological and behavioral changes reveal two pheromone binding proteins of *Helicoverpa armigera* involved in the perception of the main sex pheromone component Z11-16: Ald. J. Chem. Ecol., 43(2): 1–8.
- Du YL, Zhang ZY, Pan JF, Wang SJ, Yang S, Zhao HT, Jiang YS, 2016. Cloning and expression analysis of odorant binding protein gene AcerOBP14 from Apis cerana cerana. Chinese Academy of Agricultural Sciences, 49(19): 3852–3862. [杜亚丽,张中印,潘 建芳, 王树杰,杨爽,赵慧婷,姜玉锁, 2016. 中华蜜蜂气味 结合蛋白基因 AcerOBP14 的克隆及时空表达. 中国农业科学, 49(19): 3852–3862.]
- Field LM, Pickett JA, Wadhams LJ, 2000. Molecular studies in insect olfaction. *Insect Mol. Biol.*, 9(6): 545–551.
- Flower DR, North AC, Sansom CE, 2000. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim. Biophys. Acta*, 1482(1): 9–24.
- Forêt S, Maleszka R, 2006. Function and evolution of a gene family encoding odorant binding-like proteins in a social insect, the honey bee (*Apis mellifera*). *Genome Res.*, 16(11): 1404–1413.
- Glaser N, Gallot A, Legeai F, Montagné N, Poivet E, Harry M, Calatayud PA, Jacquin-Joly E, 2013. Candidate chemosensory genes in the stemborer *Sesamia nonagrioides*. Int. J. Biol. Sci., 9(5): 481–495.
- Gong DP, Zhang HJ, Zhao P, Xia QY, Xiang ZH, 2009. The odorant binding protein gene family from the genome of silkworm, *Bombyx mori. BMC Genomics*, 10: 332.
- Gu SH, 2013. Molecular and cellular basis of sex pheromone communication in the black cutworm moth Agrotis ipsilon. Doctor dissertation. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. [谷少华, 2013. 小地老虎性信息素通讯的分子和细 胞机制. 博士学位论文. 北京: 中国农业科学院.]
- Gu SH, Wang SP, Zhang XY, Wu KM, Guo YY, Zhou JJ, Zhang YJ, 2011. Identification and tissue distribution of odorant binding protein genes in the lucerne plant bug *Adelphocoris lineolatus* (Goeze). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 41(4): 254–263.
- Gu SH, Wu KM, Guo YY, Field LM, Pickett JA, Zhang YJ, Zhou JJ, 2013. Identification and expression profiling of odorant binding proteins and chemosensory proteins between two wingless

morphs and a winged morph of the cotton aphid *Aphis gossypii* glover. *PLoS ONE*, 8(9): e73524.

- He X, He ZB, Zhang YJ, Zhou Y, Xian PJ, Qiao L, Chen B, 2016. Genome-wide identification and characterization of odorantbinding protein (OBP) genes in the malaria vector *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae). *Insect Sci.*, 23(3): 366–376.
- He X, Tzotzos G, Woodcock C, Pickett JA, Hooper T, Field LM, Zhou JJ, 2010. Binding of the general odorant binding protein of *Bombyx mori* BmorGOBP2 to the moth sex pheromone components. J. Chem. Ecol., 36(12): 1293–1305.
- Hekmat-Scafe DS, Scafe CR, McKinney AJ, Tanouye MA, 2002. Genome-wide analysis of the odorant-binding protein gene family in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.*, 12(9): 1357– 1369.
- Hull JJ, Perera OP, Snodgrass GL, 2014. Cloning and expression profiling of odorant-binding proteins in the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris. Insect Mol. Biol.*, 23(1): 78–97.
- Jeong YT, Shim J, Oh SR, Yoon HI, Kim CH, Moon SJ, Montell C, 2013. An odorant-binding protein required for suppression of sweet taste by bitter chemicals. *Neuron*, 79(4): 725–737.
- Ji P, Gu SH, Liu JT, Zhu XQ, Guo YY, Zhou JJ, Zhang YJ, 2013. Identification and expression profile analysis of odorant-binding protein genes in *Apolygus lucorum* (Hemiptera: Miridae). *Appl. Entomol. Zool.*, 48(3): 301–311.
- Jia XJ, Hao SD, Du YL, Zhang MZ, Qin XC, Wang JZ, Wang HX, Ji WR, 2015. cDNA cloning, expression profiling and binding affinity assay of the pheromone binding protein Cpun-PBP1 in the yellow peach moth, *Conogethes punctiferalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Acta Entomologica Sinica*, 58(11): 1167–1176. [贾 小俭, 郝少东, 杜艳丽, 张民照, 覃晓春, 王进忠, 王海香, 冀卫荣, 2015. 桃蛙螟性信息素结合蛋白 Cpun-PBP1 的 cDNA 克隆、表达谱及其与配体化合物的结合特性分析. 昆虫学报, 58(11): 1167–1176.]
- Karpe SD, Jain R, Brockmann A, Sowdhamini R, 2016. Identification of complete repertoire of *Apis florea* odorant receptors reveals complex orthologous relationships with *Apis mellifera*. *Genome Biol. Evol.*, 8(9): 2879–2895.
- Leitch O, Papanicolaou A, Lennard C, Kirkbride KP, Anderson A, 2015. Chemosensory genes identified in the antennal transcriptome of the blowfly *Calliphora stygia. BMC Genomics*, 16: 255.
- Li GW, Chen XL, Shang TC, 2017. cDNA cloning, expression and ligand binding properties of the odorant binding protein AglaOBP12 in the Asian longhorned beetle, *Anoplophora* glabripennis (Coleoptera: Cerambycidae). *Acta Entomologica* Sinica, 60(10): 1141–1154. [李广伟,陈秀琳,尚天翠, 2017. 光肩星天牛气味结合蛋白 AglaOBP12 的基因克隆、表达及配

#### 体结合特征. 昆虫学报, 60(10): 1141-1154.]

- Li ZQ, Zhang S, Zhou SF, Luo JY, Cui JJ, 2017. Tissue expression profiling and ligand-binding properties of HarmOBP16 of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 60(8): 891–899. [李兆群, 张帅, 周 淑芬, 雒珺瑜,崔金杰, 2017. 棉铃虫气味结合蛋白 HarmOBP16 的组织表达谱及配基结合特性分析.昆虫学报, 60(8): 891–899.]
- Liu GN, 2017. Talking about the existence crisis and protective measures of *Apis cerana cerana. Jiangxi Journal of Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, (4): 67–68. [刘光楠, 2017. 浅谈中华蜜蜂的生存危机与保护措施. 江西畜牧兽医杂志, (4): 67–68.]
- Liu NY, Yang F, Yang K, He P, Niu XH, Xu W, Anderson A, Dong SL, 2015a. Two subclasses of odorant-binding proteins in *Spodoptera exigua* display structural conservation and functional divergence. *Insect Mol. Biol.*, 24(2): 167–182.
- Liu NY, Zhang T, Ye ZF, Li F, Dong SL, 2015b. Identification and characterization of candidate chemosensory gene families from *Spodoptera exigua* developmental transcriptomes. *Int. J. Biol. Sci.*, 11(9): 1036–1048.
- Ma L, Li ZQ, Bian L, Cai XM, Luo ZX, Zhang YJ, Chen ZM, 2016. Identification and comparative study of chemosensory genes related to host selection by legs transcriptome analysis in the tea geometrid *Ectropis obliqua*. *PLoS ONE*, 11(3): e0149591.
- Matsuo T, Sugaya S, Yasukawa J, Aigaki T, Fuyama Y, 2007. Odorant-binding proteins OBP57d and OBP57e affect taste perception and host-plant preference in *Drosophila sechellia*. *PLoS Biology* 5(5): e118.
- Meunier N, Marion-Poll F, Rospars JP, Tanimura T, 2003. Peripheral coding of bitter taste in *Drosophila*. J. Neurobiol., 56(2): 139–152.
- Ozaki M, Takahara T, Kawahara Y, Wada-Katsumata A, Seno K, Amakawa T, Yamaoka R, Nakamura T, 2003. Perception of noxious compounds by contact chemoreceptors of the blowfly, *Phormia regina*: Putative role of an odorant-binding protein. *Chem. Senses.*, 28(4): 349–359.
- Park D, Jung JW, Choi BS, Jayakodi M, Lee J, Lim J, Yu Y, Choi YS, Lee MY, Park Y, Choi IY, Yang TJ, Edwards OR, Nah G, Kwon HW, 2015. Uncovering the novel characteristics of Asian honey bee, *Apis cerana*, by whole genome sequencing. *BMC Genomics*, 16(1): 1.
- Paula DP, Togawa RC, Costa MMC, Grynberg P, Martins NF, Andow DA, 2016. Identification and expression profile of odorant-binding proteins in *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae). *Insect Mol. Biol.*, 25(5): 580–594.
- Pelletier J, Leal WS, 2011. Characterization of olfactory genes in the

antennae of the Southern house mosquito, *Culex quinquefasciatus*. J. Insect Physiol., 57(7): 915–929.

- Pelosi P, Iovinella I, Felicioli A, Dani FR, 2014. Soluble proteins of chemical communication: an overview across arthropods. *Front. Physiol.*, 5: 320.
- Pelosi P, Mastrogiacomo R, Iovinella I, Tuccori E, Persaud KC, 2013. Structure and biotechnological applications of odorantbinding proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98(1): 61–70.
- Qin Z, Ran YH, Zhi ZQ, Yan ZT, Zhang YJ, Huang T, He ZB, Chen B, 2014. Cloning and expression analysis of an odorant binding protein gene *AsinOBP1* from *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae). *Acta Entomologica Sinica*, 57(11): 1289–1298. [秦赠, 冉永红,支中婧,闫振天,张玉娟,黄婷,何正波,陈斌, 2014. 中华按蚊气味结合蛋白基因 *AsinOBP1* 的克隆和表达分析. 昆虫学报, 57(11): 1289–1298]
- Romani R, Salerno G, Frati F, ContiE, Isidoro N, Bin F, 2005. Oviposition behaviour in *Lygus rugulipennis*: a morphofunctional study. *Entomol. Exp. Appl.*, 115(1): 17–25.
- Song FF, 2011. Antennal proteome comparison of drone and worker between *Apis mellifera ligustica* and *Apis cerana cerana*. Master dissertation. Zhengzhou: Zhengzhou University. [宋飞飞, 2011. 意大利蜜蜂和中华蜜蜂雄蜂与工蜂触角差异表达蛋白质组分 析. 硕士学位论文. 郑州: 郑州大学.]
- Su SK, Chen SL, Zhong BX, Zheng HQ, Stefan A, 2005. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding mrjp3 of *Apis cerana cerana. Scientia Agricultura Sinica*, 38(3): 612–618. [苏松坤, 陈盛禄, 钟伯雄, 郑火青, Stefan Albert, 2005. 中华蜜蜂 mrjp3 基因 cDNA 的克隆及序列分析. 中国农业科学, 38(3): 612–618.]
- Sun L, Mao TF, Zhang YX, Wu JJ, Bai JH, Zhang YN, Jiang XC, Yin KS, Guo YY, Zhang YJ, Xiao Q, 2017a. Characterization of candidate odorant-binding proteins and chemosensory proteins in the tea geometrid *Ectropis obliqua* Prout (Lepidoptera: Geometridae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 94(4): e21383.
- Sun L, Wang Q, Wang Q, Dong K, Xiao Y, Zhang YJ, 2017b. Identification and characterization of odorant binding protein in the forelegs of *Adelphocoris lineolatus* (Goeze). *Front Physiol.*, 8: 735.
- Sun M, Liu Y, Wang G, 2013. Expression patterns and binding properties of three pheromone binding proteins in the diamondback moth, *Plutella xyllotella*. J. Insect Physiol., 59(1): 46–55.
- Swarup S, Morozova TV, Sridhar S, Nokes M, Anholt RR, 2014. Modulation of feeding behavior by odorant-binding proteins in Drosophila melanogaster. Chem. Senses., 39(2): 125–132.
- Vincent F, Spinelli S, Ramoni R, Grolli S, Pelosi P, Cambillau C, Tegoni M, 2000. Complexes of porcine odorant binding protein with odorant molecules belonging to different chemical classes. J.

Mol. Biol., 300(1): 127-139.

- Vogt RG, Riddiford LM, 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 293(5828): 161–163.
- Walker WB, Gonzalez F, Garczynski SF, Witzgall P, 2016. The chemosensory receptors of codling moth *Cydia pomonella*expression in larvae and adults. *Sci. Rep.*, 6: 23518.
- Wang CQ, Zhao Y, Cao YZ, Wei HS, Li KB, Zhang S, Peng Y, Yin J, 2017. Expression and binding characterization of odorant binding protein 1 (AcorOBP1) in *Anomala corpulenta* (Coleoptera: Scarabaeoidea). *Acta Entomologica Sinica*, 60(4): 363–371. [王 超群,赵莹,曹雅忠,魏红爽,李克斌,张帅,彭宇,尹姣, 2017. 铜绿丽金龟气味结合蛋白 AcorOBP1 的表达和结合特 性分析. 昆虫学报, 60(4): 363–371.]
- Wu ZN, Du YJ, ZhuGe QC, 2009. Expression and localization analysis of general odorant binding protein 1 (GOBP1) gene in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 52(2): 610–616. [吴仲南, 杜永均, 诸葛启钏, 2009. 斜 纹夜蛾普通气味结合蛋白 GOBP1 基因的表达定位分析. 昆虫 学报, 52(2): 610–616.]
- Xu PX, Zwiebel LJ, Smith DP, 2003. Identification of a distinct family of genes encoding atypical odorant-binding proteins in the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae. Insect Mol. Biol.*, 12(6): 549–560.
- Yang YQ, Wang SN, Peng Y, Dan S, Zheng Y, Li RJ, Zhang YJ, Guo YY, 2017. Expression of the odor binding protein MmedOBP19 in the legs of *Microplitis mediator* (Hymenoptera: Braconidae) and its ligand binding characteristics. *Acta Entomologica Sinica*, 60(6): 613–620. [杨叶青,王山宁,彭勇,单双,郑瑶,李瑞军, 张永军,郭予元, 2017. 气味结合蛋白 MmedOBP19 在中红侧 沟茧蜂足部的表达及配体结合特征. 昆虫学报, 60(6): 613– 620.]
- Yasukawa J, Tomioka S, Aigaki T, Matsuo T, 2010. Evolution of expression patterns of two odorant-binding protein genes, Obp57d and Obp57e, in *Drosophila. Gene*, 467(1/2): 25–34.
- Yin J, Feng H, Sun H, Xi J, Cao Y, Li K, 2012. Functional analysis of general odorant binding protein 2 from the meadow moth, *Loxostege sticticalis* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *PLoS ONE*, 7(3): e33589.
- Yuan HB, Ding YX, Gu SH, Sun L, Zhu XQ, Liu HW, Dhiloo KH, Zhang YJ, Guo YY, 2015. Molecular characterization and expression profiling of odorant-binding proteins in *Apolygus lucorum. PLoS ONE*, 10(10): e0140562.
- Zhang LY, 2013. Molecular cloning and functional analysis of two kinds of olfactory related genes in the Chinese honeybee, *Apis*

cerana cerana.. Master dissertation. Hangzhou: China Jiliang University. [张林雅, 2013. 中华蜜蜂两种嗅觉相关蛋白的基因克隆与功能研究. 硕士学位论文. 杭州: 中国计量学院.]

- Zhang SX, Zhang Y, Xu SQ, Wang GX, Hu ZJ, Zhao CX, Cui WZ, 2010. Mapping and expression analysis of GOBP/PBP subfamily gene cluster during pupal and adult stages of the silkworm, *Bombyx mori. Acta Entomologica Sinica*, 53(10): 1069–1076.
  [张升祥,张瑶,徐世清,王更先,胡增娟,赵春晓,崔为正, 2010. 家蚕蛹和成虫期 GOBP/PBP 亚家族基因簇基因定位与表达分析.昆虫学报, 53(10): 1069–1076.]
- Zhang YF, Huang LQ, Ge F, Wang CZ, 2011. Tarsal taste neurons of *Helicoverpa assulta* (Guenée) respond to sugars and amino acids, suggesting a role in feeding and oviposition. *J. Insect. Physiol.*, 57(10): 1332–1340.
- Zhang YN, Jin JY, Jin R, Xia YH, Zhou JJ, Deng JY, Dong SL, 2013. Differential expression patterns in chemosensory and nonchemosensory tissues of putative chemosensory genes identified by transcriptome analysis of insect pest the purple stem borer *sesamia inferens* (walker). *PLoS ONE*, 8(7): e69715.
- Zhang ZK, Wu SY, Lei ZR, 2016. Cloning, sequence analysis and expression profile of an odorant binding protein gene in western flower thrips (*Frankliniella occidentalis*). *Scientia Agricultura Sinica*, 49(6): 1106–1116. [张治科, 吴圣勇, 雷仲仁, 2016. 西 花蓟马气味结合蛋白的 cDNA 克隆、序列分析及时空表达. 中 国农业科学, 49(6): 1106–1116.]
- Zhao HX, Zeng XN, Liang Q, Zhang XF, Huang WZ, Chen HS, Luo YX, 2015. Study of the obp5 gene in *Apis mellifera ligustica* and *Apis cerana cerana. Genet. Mol. Res.*, 14(2): 6482–6494.
- Zhao HT, Zhao WM, Gao PF, Zhang GX, Jiang YS, 2014. Sequence and expression characterization of an OBP1 gene in the Asian honeybee, *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae). *Appl. Entomol. Zool.*, 49(1): 189–196.
- Zhou JJ, 2010. Odorant-binding proteins in insects. *Vitam. Horm.*, 83: 241–272.
- Zhou JJ, He XL, Pickett JA, Field LM, 2008. Identification of odorant-binding proteins of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*: genome annotation and comparative analyses. *Insect Mol. Biol.*, 17(2): 147–163.
- Zhu XQ, Ding YX, Liu HW, Zhou YL, Zhang YJ, Guo YY, 2015. Binding specificity analysis of odorant binding protein AlucOBP8 of *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür). *Chinese Journal of Biological Control*, 31(6): 821–829. [朱晓强,丁玉骁,刘航玮,周延乐, 张永军,郭予元, 2015. 绿盲蝽气味结合蛋白 AlucOBP8 的结 合特性分析. 中国生物防治学报, 31(6): 821–829.]