

桃小食心虫 *CsasCSP14* 的基因克隆及分子对接*

刘孝贺^{1,2**} 孙丽娜¹ 佟兆国³ 张怀江¹ 闫文涛¹ 岳强¹ 仇贵生^{1***}

(1. 中国农业科学院果树研究所, 兴城 125100; 2. 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100193;
3. 西昌学院农业科学学院, 西昌 615013)

摘要 【目的】本研究旨在获得桃小食心虫 *Carpocapsa sasakii* Matsumura *CsasCSP14* 基因序列, 分析其在雌雄不同组织中的表达差异, 并与寄主挥发物进行分子对接, 为该基因的功能研究提供参考。

【方法】以桃小食心虫全组织 cDNA 为模板, 通过 PCR 技术扩增克隆获得 *CsasCSP14* cDNA 序列全长; 利用生信分析软件分析其编码蛋白的理化性质和结构特征; 通过荧光定量 PCR 技术分析 *CsasCSP14* 在桃小食心虫雌雄成虫不同组织 (触角、头、胸、腹、足和翅) 中的表达情况; 使用 Modeller (version 9.19) 构建 *CsasCSP14* 蛋白的三维结构模型; 运用 Autodock 4.2 将 *CsasCSP14* 与 32 种苹果挥发物和 2 种性信息素分子进行分子对接。【结果】克隆获得了桃小食心虫化学感受蛋白基因 *CsasCSP14* 的 cDNA 序列, 其开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 长度为 369 bp, 编码 122 个氨基酸, 预测其蛋白分子量为 14.13 ku, 理论等电点为 5.20, 有 17 个氨基酸残基组成的信号肽序列, 且 18-122 位氨基酸之间存在昆虫化学感受蛋白家族保守结构域; 含有 4 个保守的半胱氨酸位点。*CsasCSP14* 具有 6 个 α 螺旋; 氨基酸同源比对结果显示, *CsasCSP14* 与玉米螟 *Pyrausta nubilalis* OfurCSP5 的氨基酸序列一致性最高, 达到 79.01%。荧光定量 PCR 结果显示, *CsasCSP14* 在雌雄成虫的触角、头、胸、腹、足和翅中均有表达, 但是其表达丰度有差异, 在雌雄成虫触角中的表达量最高。通过 Modeller 软件搜索 *CsasCSP14* 三维结构的模板, 得到与沙漠蝗 *Schistocerca gregaria* CSPsg4 序列相似性为 65.7%。因此以 CSPsg4 为模板成功构建 *CsasCSP14* 三维结构。分子对接结果表明 *CsasCSP14* 与 2-己烯醛、桃醛、醋酸丁酯、庚醛、异戊醛和法尼烯气味分子结合能比较低, 并且 Leu-22、Phe-29、Phe-42 和 Ile-46 4 个疏水性氨基酸残基在结合过程中发挥了关键作用。

【结论】本研究为进一步了解桃小食心虫 *CsasCSP14* 基因功能和利用化学生态的方法防控该虫提供了前期理论基础。

关键词 桃小食心虫; *CsasCSP14*; 基因克隆; 分子对接; 荧光定量

Cloning and molecular docking of the *Carpocapsa sasakii* chemosensory protein gene, *CsasCSP14*

LIU Xiao-He^{1,2**} SUN Li-Na¹ TONG Zhao-Guo³ ZHANG Huai-Jiang¹
YAN Wen-Tao¹ YUE Qiang¹ QIU Gui-Sheng^{1***}

(1. Research Institute of Pomology, Chinese Academy of Agricultural Science, Xingcheng 125100, China;
2. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;
3. School of Agriculture Science, Xichang University, Xichang 615013, China)

Abstract 【Objectives】To clone the cDNA sequence of the *Carpocapsa sasakii* CSP14 gene, *CsasCSP14*, determine its expression profiles in different tissues of both sexes, and its molecular docking with host volatiles, and thereby lay a foundation for the future study of the physiological function of this gene. 【Methods】The full-length cDNA sequence of *CsasCSP14* was cloned from body tissues of *C. sasakii* by PCR. The expression levels of *CsasCSP14* mRNA in different tissues (antennae, head, thorax, abdomen, legs and wings) were detected by real-time PCR. Modeller software (version-9.19)

*资助项目 Supported projects: 国家重点研发计划 (2017YFD0201000); 国家自然科学基金 (31601643)

**第一作者 First author, E-mail: liuxiaoheaye@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: guoshu2008@163.com

收稿日期 Received: 2020-05-08; 接受日期 Accepted: 2021-02-02

was used to build a three-dimensional model of *CsasCSP14* and Autodock 4.2 was then used to dock this model to 32 apple plant volatiles and 2 sex pheromones. **[Results]** The open reading frame (ORF) of the full-length cDNA sequence of *CsasCSP14* obtained using real-time PCR was 369 bp long, encoding a protein of 122 aa with an estimated molecular weight 14.13 ku and a pI of 5.20. The encoded protein has a signal peptide, no transmembrane structure, a CSP superfamily domain between residues 18-122 and contains four conserved cysteins and 6 α -helixes. The results of amino acid sequence alignment indicate that *CsasCSP14* is homologous to *OfurCSP13* with 86% amino acid sequence identify. Furthermore, the results of real-time PCR show that *CsasCSP14* transcripts are differentially expressed in the antennae, head, thorax, abdomen, legs and wings of male and female adults. The highest expression of *CsasCSP14* was in the antennae of adult males and females. Modeller was used to compare the sequence of *CsasCSP14* with those of previously characterized proteins in the Protein Data Bank (PDB). *CsasCSP14* shares 65.03% similarity with *S. gregaria* CSPsg4; the 3D structure of CSPsg4 was used as the template for the 3D structure of *CsasCSP14*. **[Conclusion]** The results of molecular docking simulation indicate that 2-Hexenal, Undecanolactone, Butyl-acetate, Heptanal, 3-Methylbutanal and Farnesene have relatively low binding energies with *CsasCSP14*. However, the hydrophobic amino acid residues Leu-22, Phe-29, Phe-42 and Ile-46, interact with all *CsasCSP14* ligands. These results provide a theoretical basis for further research on the binding of *CsasCSP14* to host plant volatiles, and thereby facilitate the development of new methods of controlling *C. sasakii*.

Key words *Carposina sasakii*; *CsasCSP14*; gene cloning; molecular docking; real-time qPCR

桃小食心虫 *Carposina sasakii* Matsumura 是我国北方果树生产中的重要害虫 (孙丽娜等, 2015)。雌虫将卵产于未成熟的桃、苹果、冬枣、山楂等果实的表面, 幼虫孵化后蛀入果实内部纵横串食, 导致大量“豆沙馅”似的虫果, 给果农造成严重的经济损失 (刘波等, 2016)。目前, 对桃小食心虫的防治主要以化学农药为主, 这种防治方法不仅会导致昆虫“3R”(农药残留 Residue, 抗药性 Resistance, 再猖獗 Resurgence) 问题日益严峻, 而且还会造成大量天敌被误杀 (王付平等, 2019)。基于昆虫灵敏的嗅觉分子机制, 开发性诱剂和趋避剂对害虫开展“Push-Pull”策略的行为调控已成为研究的热点。

灵敏的嗅觉对于桃小食心虫处理复杂的生命活动至关重要, 例如寻找食物、交配产卵、避免天敌等行为都需要嗅觉系统的参与 (Sánchez-Gracia *et al.*, 2009)。触角是主要的嗅觉器官, 内部充满亲水性的淋巴液, 并含有 2 类水溶性蛋白: 化学感受蛋白 (Chemosensory proteins, CSPs) 和气味结合蛋白 (Odorant binding proteins, OBPs) (倪翠侠等, 2013)。其中 CSPs 是一类由 100-120 个氨基酸残基组成的可溶性蛋白, 一般有 6 个 α -螺旋组成一个疏水性的口袋, 在 N 末端有前 20 个左右的氨基酸残基组成的信号肽序列, CSPs 典型特征是含有 4 个保守的半胱氨酸

(Cys) 位点, 两两配对组成 2 对二硫键, 用来保持 CSPs 蛋白结构的紧凑、稳定。

自黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中发现第一个昆虫化学感受蛋白以来, 已在多种昆虫中鉴定并克隆得到 CSPs 基因, 如红火蚁 *Solenopsis invicta*、蚜虫 *Aphid oidea*、蜜蜂 *Solenopsis invicta*、埃及伊蚊 *Aedes aegypti*、美洲大蠊 *Periplaneta americana*、东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* 和大多数蛾类昆虫 (McKenna *et al.*, 1994; Calvo *et al.*, 2006; Pelosi *et al.*, 2018)。已有研究表明 CSPs 在昆虫体内广泛分布于触角、性腺、翅和足部 (Jacquin-Joly *et al.*, 2001; Picimbon *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2008; Xue *et al.*, 2016)。CSPs 在非化学感器组织中表达说明它们还具有其它的作用, 例如参与螳螂肢体再生, 蜜蜂的胚胎发育, 斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 的繁殖和蝗虫行为改变等 (Pelosi *et al.*, 2018)。在触角中高表达或特异性表达的化学感受蛋白具有化学信号接收的功能 (He *et al.*, 2017)。例如, 在麦长管蚜 *Sitobion avenae* 触角中 *SaveCSP1* 的特异表达, 在其寻找寄主植物中发挥关键作用 (Xue *et al.*, 2016)。相似的, *SinfCSP19* 在水稻大螟 *Sesamia inferen* 触角中表达并可识别水稻挥发物 (Zhang *et al.*, 2014)。另外, 荧光竞争结合实验表明 CSPs 与多种化学物质结合, 如昆

虫信息素、植物挥发物、碳氢化合物和脂质 (Li *et al.*, 2015)。

目前, 关于桃小食心虫嗅觉相关研究主要集中在 OBP 上, 但有关 CSPs 的表达及功能尚无报道。在作者课题组对桃小食心虫全虫转录组 (GFQL000000000) 和触角转录组 (GGMY000000000) 测序的基础上, 克隆得到一个桃小食心虫 CSP 基因 (*CsasCSP14*) 并对该基因结构特征进行预测, 利用 qPCR 技术对 *CsasCSP14* 在不同组织和性别间表达情况进行分析, 使用分子对接技术筛选与 *CsasCSP14* 蛋白有亲和性的寄主挥发物和性信息素分子, 以期为该蛋白的深入研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

供试种群于 2018 年 7 月采自中国农业科学院果树研究所试验园 (40.61° N, 120.73° E), 采集被桃小食心虫幼虫蛀入后带有“泪滴”危害状的金冠苹果, 于温度 (25±1) °C, 相对湿度 70%±5%、光周期为 15 L : 9 D 的条件下饲养 (Quan *et al.*, 2016)。

1.2 主要试剂和仪器

TRIzol、反转录试剂盒 (cat#6210A)、DNA 胶回收试剂盒 (cat#9762)、荧光定量试剂盒 (cat#9765)、DNA Marker 1000、DH5 α 感受态细胞、pMD-19T 载体均购于 TAKARA 公司。IPTG、Ampicillin、X-gal 等购自上海索莱宝。异丙醇、无水乙醇和氯仿等分析纯购自天津永晟精细化工有限公司。

1.3 总 RNA 提取及 cDNA 第一链合成

分别取桃小食心虫雌雄成虫全虫以及触角 (100 对)、头部 (去触角, 20 头)、胸部 (10 个)、腹部 (10 个)、足 (20 虫×6 对)、翅 (20 对) 组织, 按照 TRIzol 试剂盒说明书提取总 RNA, 用 RNase-free 水溶解, 在检测其浓度和纯度后, 根据反转录试剂盒合成 cDNA 第一链, 置于 -20 °C 的条件下保存, 或直接进行

CsasCSP14 的基因克隆试验。

1.4 引物设计

以笔者所在团队测序获得的桃小食心虫触角转录组 (登录号: GFQL000000000) 和全虫转录组 (登录号: GGMY000000000) 的测序结果为基础 (孙丽娜等, 2018; Tian *et al.*, 2018), 以 “chemosensory protein” 为关键词检索本地 BLAST NCBI 数据库, 将检索到的序列构建成 query 序列库, 使用 query 序列分别对上述两个转录组数据库进行 BLASTN, 将得到的序列使用 CAP3 进行拼接, 然后使用 Transdecoder 软件得到桃小食心虫化学感受蛋白的 mRNA、CDS 和蛋白序列。将得到的蛋白序列再与 NCBI 中 nr 数据库进行本地 BLASTP, 验证是否属于化学感受蛋白 (Huang and Madan, 1999; Haas *et al.*, 2013)。使用 Primer Premier 5.0 软件在目的基因前端 100 bp 和后端 100 bp 区域设计引物扩增 *CsasCSP14* 的开放阅读框 (Open reading frame, ORF), 并在 ORF 区域设计特异性引物用于荧光定量 PCR。试验所用引物见表 1。

1.5 *CsasCSP14* 的 cDNA 克隆

以桃小食心虫全组织 cDNA 为模板进行扩增。PCR 反应体系: cDNA 模板 500 ng, TakaRa ExTaq 10 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol·L⁻¹) 各 0.5 μ L, 加 RNase-Free H₂O 至总体积为 20 μ L。反应条件: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 循环; 72 °C 终延伸 8 min。PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 切胶纯化后与 pMD19-T 克隆载体连接, 转化至 DH5 α 感受态细胞后涂布含氨苄青霉素的 LB 固体培养基上, 37 °C 培养 12 h, 经蓝白斑筛选鉴定挑取单一白色菌落。菌液经 PCR 鉴定, 将阳性克隆产物送北京六合华大基因科技有限公司进行双向测序。

1.6 *CsasCSP14* 荧光定量 PCR 反应

取样方法同 1.3, 以桃小食心虫不同部位的 cDNA 为模板, 试验在 CFX96 Real-Time System PCR 仪 (BioRad) 中进行, 其反应体系包含 10 μ L

SYBR Master Mix、1 μL cDNA 模板、0.5 μL 正向引物、0.5 μL 反向引物和 8 μL DEPC 水。反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 40 个循环。以 *Actin* 基因和 *elongation factors 1 α* 基因为内参基因计算相对表达量, 其中 $\Delta\Delta C_t = (C_{t\text{目的}} - C_{t\text{内参}})_{\text{实验}} - (C_{t\text{目的}} - C_{t\text{内参}})_{\text{对照}}$ 。数据分析使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析 (Livak and Schmittgen, 2001)。每次 Real-time PCR 需要 3 次技术重复, 并且每个器官样本进行 3 个生物学重复。

1.7 CsaCSP14 序列的生物信息学分析

使用在线程序 Expasy (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html) 预测 CsaCSP14 蛋白的等电点和分子量。运用 SignalP4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.0/>) 预测 CsaCSP14 蛋白信号肽序列。使用 PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) 分析 CsaCSP14 蛋白的二级结构。使用 NCBI 中 BLASTp (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 寻找 CsaCSP14 与其他昆虫的同源序列, 下载相似性大于 60% 的蛋白序列, 然后再用 Clustal W (Kumar *et al.*, 2018) 进行多序列比对。采用 MEGA X 软件中的邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建系统发育树, Bootstrap 为 1 000 次 (杜丽亚等, 2016; Kumar *et al.*, 2018)。

表 1 克隆与定量 PCR 引物
Table 1 Primers used in clone and qPCR

基因名称 Gene name	引物序列 Primers sequence (5'-3')	引物用途 Use of primers
<i>CSP14</i>	F: ACTACCTGAAAGTTGACTTAAGTCC R: CATTGTCAACGCAAAATGGTAC	基因克隆 Gene cloning
<i>CSP14</i>	F: ATTTCTACAGTAGCAAGTATG R: GTATCACTTTCCTAAAATCCT	荧光定量 PCR Real-time quantitative PCR
<i>β-actin</i>	F: GTGTTATGGTGTCTAGTTGGT R: GATGTTTCAGTTCTGTCTGGTAT	
<i>elongation factors 1 α</i>	F: GTATTCTCAAGCCTGGTA R: GCATCTCAACAGACTTAAC	

1.8 CsaCSP14 三维模型构建

使用 Modeller (version-9.19) 构建 CsaCSP14 的三维结构模型, 选择 CsaCSP14 的氨基酸序列作为探针在 PDB 蛋白数据库中进行搜索, 根据晶体结构的 R-因子、序列连续性和结构相似性选择最佳模板 (Martí-Renom *et al.*, 2000)。使用 Align2D 软件比对 CsaCSP14 与模板序列。Modeller 中的自动建模程序生成 100 个构象, 首先用共轭梯度法 (Conjugate gradient, CG) 优化每个构象。其次使用 DOPE (Discrete optimized protein energy) 值来衡量 CsaCSP14 构象的稳定性, 并使用 Procheck 生成拉氏图评价三维模型的合理性, 最后将最优构象与模板进行叠合, 并查看 RMSD 值 (Younas *et al.*, 2018)。

1.9 CsaCSP14 蛋白质与气味分子对接

1.9.1 气味分子获得 寄主挥发物分子的三维结构从 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 网站下载 (表 2)。

1.9.2 CsaCSP14 与气味分子对接 运用 openbabel (<https://sourceforge.net/projects/openbabel/>) 工具将气味分子转换为 pdbqt 格式, 并使用 Autodock tools 对气味分子去水加氢, 然后再运用 Autodock4.2 进行 CsaCSP14 蛋白与气味分子半柔性对接, 将 CsaCSP14 设置为刚性, 配体气味分子设为柔性, 并设置配体内能旋转的键为任意旋转 (Morris *et al.*, 2009)。设定网格参数为 40 点 $\times$ 40 点 $\times$ 40 点, 格点间距为 0.037 5 nm, 通过局部能量搜索和拉马克遗传算法寻找对接构

表 2 寄主挥发物配体信息
Table 2 Host volatiles ligand information

种类 Species	寄主挥发物 Host volatiles	登录号 Accession number	分子式 Molecular formula	分子量 Molecular weight	氢键供体 Donor	氢键受体 Acceptor
醇类 Alcohols	2-乙基-1-己醇 2-Ethyl-1-hexanol	CID_7720	C ₈ H ₁₈ O	130.23	1	1
	芳樟醇 Linalool	CID_6549	C ₁₀ H ₁₈ O	154.25	1	1
	癸醇 Decanol	CID_8174	C ₁₀ H ₂₂ O	158.28	1	1
	十二醇 Dodecanol	CID_8193	C ₁₂ H ₂₆ O	186.34	1	1
	十四醇 Tetradecanol	CID_8290	C ₁₄ H ₃₀ O	214.39	0	4
	橙花叔醇 Nerolidol	CID_5284507	C ₁₅ H ₂₆ O	222.37	1	1
	法呢醇 Farnesol	CID_445070	C ₁₅ H ₂₆ O	222.37	1	1
醛类 Aldehydes	异戊醛 3-Methylbutanal	CID_11552	C ₅ H ₁₀ O	86.13	0	1
	苯甲醛 Benzaldehyde	CID_240	C ₇ H ₆ O	106.12	0	1
	辛醛 Octanal	CID_454	C ₈ H ₁₆ O	128.21	0	1
	壬醛 Nonanal	CID_31289	C ₉ H ₁₈ O	142.24	0	1
	桃醛 γ -Undecanolactone	CID_61204	C ₁₁ H ₂₀ O ₂	184.28	0	2
	癸醛 Decanal	CID_8175	C ₁₀ H ₂₀ O	156.26	0	1
	2-己烯醛 2-Hexenal	CID_5281168	C ₆ H ₁₀ O	98.14	0	1
	庚醛 Heptanal	CID_8130	C ₇ H ₁₄ O	114.19	0	1
酯类 Esters	乙酸顺-3-己烯酯 (Z)-3-Hexenyl acetate	CID_5363388	C ₈ H ₁₄ O ₂	142.20	0	2
	乙酸己酯 Hexyl acetate	CID_8908	C ₈ H ₁₆ O ₂	144.21	0	2
	丙酸叶醇酯 (Z)-3-Hexenyl propionate	CID_5365049	C ₉ H ₁₆ O ₂	156.22	0	2
	乙酸辛酯 Octyl acetate	CID_8164	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	172.26	0	2
	己酸丁酯 Butyl hexanoate	CID_12294	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	172.27	0	2
	醋酸丁酯 Butyl-acetate	CID_31272	C ₆ H ₁₂ O	116.16	0	2
萜类 Terpenoids	(4E,6Z)-2,6-二甲基-2,4,6-辛三烯 (4E,6Z)-2,6-Dimethyl-2,4,6-octatriene	CID_5371125	C ₁₀ H ₁₆	136.23	0	0
	(Z)- α -罗勒烯 (Z)- α -Ocimene	CID_5320250	C ₁₀ H ₁₆	136.23	0	0
	α -蒎烯 α -Pinene	CID_440967	C ₁₀ H ₁₆	136.23	0	0
	莰烯 Camphene	CID_6616	C ₁₀ H ₁₆	136.23	0	0
	十二烷 Dodecane	CID_8182	C ₁₂ H ₂₆	170.34	0	0
烷烃 Alkanes	十三烷 Tridecane	CID_12388	C ₁₃ H ₂₈	184.36	0	0
	十四烷 Tetradecane	CID_12389	C ₁₄ H ₃₀	198.39	0	0
性信息素分子 Sex pheromone	Z-7-二十烯-11-酮 Z-7-eicosen-11-one	CID_10870139	C ₂₀ H ₃₈ O	294.50	0	1
	Z-7-十九烯-11-酮 Z-7-Nonadecen-11-one	CID_11076852	C ₁₉ H ₃₆ O	280.50	0	1
其他物质 Others	苯乙烯 Styrene	CID_7501	C ₈ H ₈	104.15	0	0
	十四烯 Tetradecene	CID_14260	C ₁₄ H ₂₈	196.37	0	0
	苯甲腈 Benzonitrile	CID_7505	C ₇ H ₅ N	103.12	0	1
	法尼烯 Farnesene	CID_5362889	C ₁₅ H ₂₄	204.35	0	0

象,当进行 100 次对接计算后,将结果进行聚类,选取结合自由能和抑制常数 (K_i) 最小的构象进行分析,使用 PyMOL-2.3.0 (<http://www.pymol.org/>) 显示对接结果。

1.10 数据分析

根据各样品和内参基因的 C_t 值,参照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量法进行数据处理。目的基因在不同组织间的差异采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验 ($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 *CsasCSP14* 克隆与序列分析

测序结果发现,桃小食心虫 *CsasCSP14* 开放阅读框 ORF 长 369 bp,共编码 122 个氨基酸 (图 1)。*CsasCSP14* 蛋白分子式为 $C_{635}H_{989}N_{161}O_{188}S_8$,预测的分子量 14.13 ku,理论等电点为 5.20。在组成 *CsasCSP14* 蛋白的 20 种氨基酸中,赖氨酸 (Lys) 所占比例最高,达到 10.7%;带正电荷氨基酸总数 (Arg+Lys) 为 18,带负电荷氨基酸总数 (Asp+Glu) 为 21;总平均疏水系数 (CRAVY) 为 -0.500,不稳定系数为 35.05,脂溶系数为 75.25,说明该蛋白比较

稳定。*CsasCSP14* 的氨基酸序列中含有 4 个保守的半胱氨酸位点,符合 CSPs 蛋白家族的特征。

将克隆得到的核酸序列在 NCBI 蛋白数据库中进行 Blast X 分析,找到与目的基因同源性高的其他鳞翅目昆虫的氨基酸序列。结果显示,桃小食心虫 *CsasCSP14* 与 11 种鳞翅目昆虫 CSPs 的氨基酸序列一致性大于 60% (图 2)。桃小食心虫 *CsasCSP14* 与玉米螟 *O. n. n.* *CSP5* 的氨基酸序列一致性最高,达到 72.95%,其次是黄野螟 *H. vi.* *CSP5*,一致性为 70.94%。使用 MEGA X 软件构建系统进化树表明 (图 3),*CsasCSP14* 与玉米螟 *O. n. n.* *CSP13* 亲缘关系最近。

2.2 *CsasCSP14* mRNA 不同组织表达分析

以刚羽化的雌性全虫 *CsasCSP14* 表达量为基准,通过实时荧光定量 PCR 技术分析 *CsasCSP14* 分别在交配后雌雄不同组织部位的触角、头部 (去触角)、胸部、腹部、足、翅中的表达情况。荧光定量 PCR 结果分析表明:*CsasCSP14* 在桃小食心虫的各个组织中都有表达,桃小食心虫的雌雄成虫触角中 *CsasCSP14* 的表达量最高,翅部的表达量次之,腹部的表达量最低,且触角中的表达量显著高于其他组织。对于雄成虫来说,*CsasCSP14* 在触角中的表达量比在翅中的表达量高 5.58 倍。对于雌成虫来说,

```

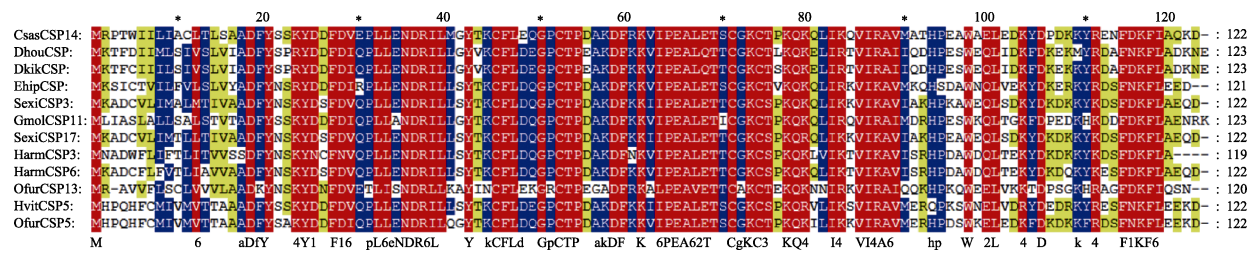
1  ATGCGGCCAACGTGGATAATCCTCATAGCCTGCCTGACCCTAAGCGCAGCAGATTTCTAC
   M R P T W I I L I A C L T L S A A D F Y
61  AGTAGCAAGTATGACGACTTTGATGTGGAGCCACTGCTGGAGAACGACAGGATCCTGATG
   S S K Y D D F D V E P L L E N D R I L M
121 GGCTACACCAAGTGCTTTCTAGAGCAGGGACCTTGACGCGCGGATGCCAAGGATTTTAGG
   G Y T K (C) F L E Q G P (C) T P D A K D F R
181 AAAGTGATACCAGAAGCACTAGAAACATCTTGCGAAATGCACTCCAAACAGAAGCAG
   K V I P E A L E T S (C) G K (C) T P K Q K Q
241 TTGATAAAGCAGGTCATCAGAGCCGTGATGGCAACGCACCCTGAGGCTTGGGCGGAGCTG
   L I K Q V I R A V M A T H P E A W A E L
301 GAAGACAAGTACGATCCTGACAAGAAGTACAGGAGAACTTTGATAAGTTATTGCGCAG
   E D K Y D P D K K Y R E N F D K F I A Q |
361 AAAGATTAA
   K D *

```

图 1 *CsasCSP14* cDNA 核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequence of *CsasCSP14* cDNA

信号肽序列用下划线标注,保守的半胱氨酸残基用圆圈标注,终止密码子用星号表示。
Signal peptide is marked with underlined, conserved residues are marked with cycle and the asterisk indicates stop codons.

图 2 *CsasCSP14* 与鳞翅目其他昆虫化学感受蛋白氨基酸序列比对Fig. 2 Amino acid sequence alignments of *CsasCSP14* with other 11 CSPs from Lepidoptera insects

红色、蓝色和黄色分别代表 100%、80% 和 60% 的序列相似性。DhouCSP: 云南松毛虫 (AII01020.1); DkikCSP: 思茅松毛虫 (AII01036); EhipCSP: 沙棘木匠蛾 (AOG12902.1); SexiCSP3: 甜菜夜蛾 (AKF42442.1); GmolCSP11: 梨小食心虫 (ALC79597.1); SexiCSP17: 甜菜夜蛾 (AVC68636.1); HarmCSP3: 棉铃虫 (AEX07266.1); HarmCSP6: 棉铃虫 (AEX07267.1); CsupCSP: 二化螟 (AHC05673.1); HvitCSP5: 黄野螟 (AZB49397.1); OfurCSP5: 亚洲玉米螟 (BAV56817.1)。下图同。

The red, blue, and yellow color represent 100%, 80% and 60% sequence similarity. DhouCSP: *Dendrolimus houi* (AII01020.1); DkikCSP, *Dendrolimus kikuchii* (AII01036); EhipCSP: *Eogystia hippophaecolus* (AOG12902.1); SexiCSP3: *Spodoptera exigua* (AKF42442.1); GmolCSP11: *Grapholita molesta* (ALC79597.1); SexiCSP17: *Spodoptera exigua* (AVC68636.1); HarmCSP3: *Helicoverpa armiger* (AEX07266.1); HarmCSP6: *Helicoverpa armigera* (AEX07267.1); CsupCSP: *Chilo suppressalis* (AHC05673.1); HvitCSP5: *Heortia vitessoides* (AZB49397.1); OfurCSP5: *Ostrinia furnacalis* (BAV56817.1). The same below.

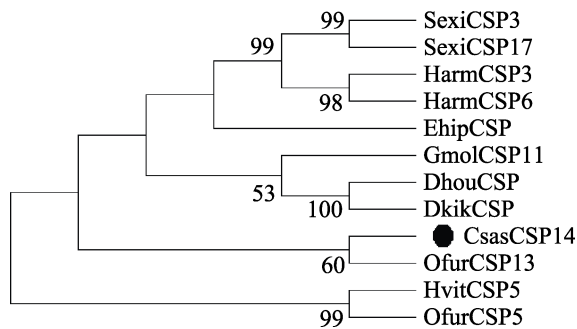


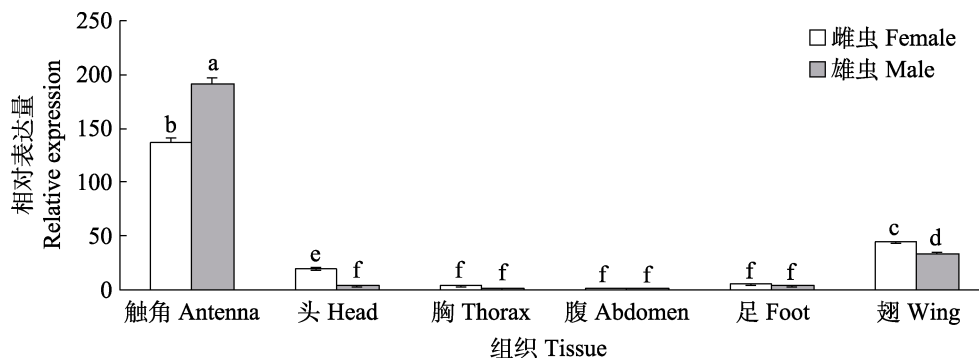
图 3 基于氨基酸序列构建的膜翅目昆虫 CSPs 的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of CSPs reconstructed from Lepidoptera insects based on amino acid sequence

CsasCSP14 在触角中的表达量比在翅中的表达量高 3.09 倍。并且, *CsasCSP14* 在雄虫触角中表达量是在雌虫触角中表达量 1.39 倍 (图 4)。*CsasCSP14* 基因在桃小食心虫触角感器中高表达, 可能参与桃小食心虫寄主定位的生命活动。

2.3 *CsasCSP14* 蛋白的三维模型构建

桃小食心虫 *CsasCSP14* 在 PDB (<http://www.rcsb.org/>) 库中搜索同源蛋白, 结果表明与沙漠蝗的化学感受蛋白 CSPsg4 的序列相似性高达 65.7% (图 5: A), 因此使用 CSPsg4 (图 5: D)

图 4 桃小食心虫 *CsasCSP14* 在不同组织中的表达量Fig. 4 Expression profiles of *CsasCSP14* in different tissues of *Carposina sasakii*

柱上标有不同小写字母表示不同雌成虫和雄成虫不同组织间的 *CsasCSP14* 显著性差异水平 ($P < 0.05$)。

Histograms with different lowercase letters indicate significant difference in relative expression level of *CsasCSP14* in different tissues of female and male adults, respectively ($P < 0.05$).

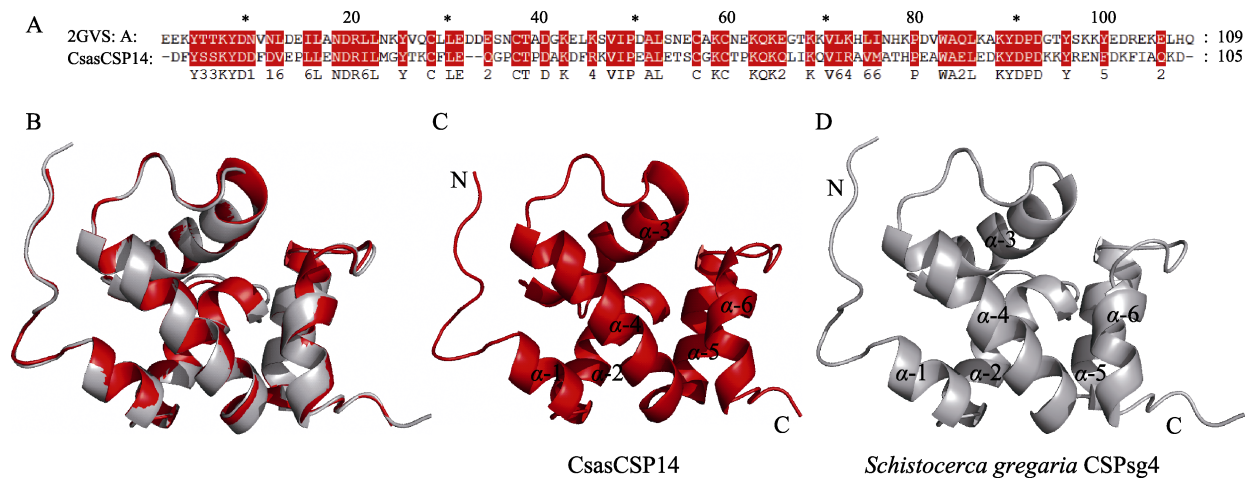


图 5 CsasCSP14 的三维模型

Fig. 5 Three-dimensional (3D) structures of CsasCSP14

A. CsasCSP14 与 CSPsg4 序列比对; B. CsasCSP14 与 CSPsg4 的三维模型比对;

C. CsasCSP14 三维结构; D. 被用作模板的 CSPsg4 的三维模型图。

A. Alignment of CsasCSP14 and CSPsg4 sequence; B. Superimposed structure of CsasCSP14 and the template CSPsg4;

C. 3D structure of CSPsg4 used as a template; D. 3D structure of CsasCSP14.

作为构建 CsasCSP14 的三维模型 (图 5: C)。通过 Procheck 评估 CsasCSP14 模型, 拉氏图中 99.1% 的残基落在最佳区域, 达到高质量建模的标准 (>90%), 使用 Verify_3D 对建模蛋白的三维结构与一级结构的构效关系进行评价, Verify Score 为 37.75, 远远大于要求的最低分值 21.32。CsasCSP14 三维模型符合要求, 适合接下来的分析。预测 CsasCSP14 二维结构表明, CsasCSP14 是由 α -1 (Val12-Leu16)、 α -2 (Asp19-Glu31)、 α -3 (Pro37-Thr52)、 α -4 (Pro59-Thr75)、 α -5 (Pro79-Yyr87) 和 α -6 (Lys92-Ala102) 6 个 α 螺旋组成的球状蛋白。这个结构包含几个疏水结构域, 可能是为了与配体结合。CsasCSP14 与 CSP4sg 三维模型比对, 均方根位移 (Root Mean Square Deviation, RMSD) 值为 0.257Å, 这表明 CsasCSP14 与模板结构有正确的叠合 (图 5: B)。

2.4 CsasCSP14 与气味分子对接

桃小食心虫 CsasCSP14 与 32 种苹果挥发物和 2 种信息素分子对接, Autodock 4.2 计算了与不同配体结合产生的结合能值 (表 3), 桃醛、庚醛和法尼烯与 CsasCSP14 结合有较低的结合自由能, 分别为 -6.36、-4.09 和 -7.2 kJ/mol; 2-己烯醛、醋酸丁酯和异戊醛的结合自由能分别

为 -3.85、-3.78 和 -3.33 kJ/mol, 这 3 类物质与 CsasCSP14 结合的自由能值较高。与性信息素分子 Z-7-二十烯-11-酮和 Z-7-十九烯-11-酮对接的结合自由能值为 129.2 kJ/mol 和 75.79 kJ/mol, 说明 CsasCSP14 与桃小食心虫的信息素不结合。本研究中的对接模型表明, 气味分子都结合在 CsasCSP14 的疏水腔中 (图 6), 并且靠近许多疏水性的氨基酸残基 (图 7), 并且 Leu-22、Phe-29、Phe-42 和 Ile-46 4 个疏水性的氨基酸残基与所有配体相互作用 (表 3), 上述结果表明 Leu-22、Phe-29、Phe-42 和 Ile-46 可能是 CsasCSP14 与气味分子结合的关键氨基酸残基。

3 讨论

化学感受蛋白在昆虫识别外界气味分子的生化反应中具有重要意义。在昆虫嗅觉感器中, 化学感受蛋白结合疏水性的气味分子, 穿过亲水性的淋巴液, 传递给嗅觉神经元, 将化学信号转化为电信号。本研究解析了桃小食心虫 CsasCSP14 基因的时空表达特性, 利用三维建模和分子对接技术明确了 CsasCSP14 蛋白对不同种类配体的结合特点。荧光定量 PCR 结果表明, CsasCSP14 基因在桃小食心虫雌雄成虫各组织中均有表达,

表 3 *CsasCSP14* 与气味分子的结合能
Table 3 The binding energy between *CsasCSP14* and volatiles

寄主挥发物 Host volatiles	结合自由能 (kJ/mol) Binding energy (kJ/mol)	抑制常数 ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) Inhibition constant ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	氢键 Hydrogen bond	范德华力 Van der Waals	疏水作用力 Hydrophobic interactions
2-己烯醛 2-Hexenal	- 3.85	1.50	-	Cys-28 Ile-46 Phe-29 Arg-43 Phe-42 Ala-39 Tyr-25 Thr-26	Val-72 Leu-22 His-76
桃醛 Undecanolactone	- 6.36	21.60	Thr-26	Tyr-25 Leu-22 His-76 Leu-30 Trp-80 Ile-69 Ile-46	Arg-43 Phe-29 Ala-79 Val-72 Leu-83 Phe-42
醋酸丁酯 Butyl-acetate	- 3.78	1.70	Arg-43 Thr-26	Ala-39 Tyr-25 Leu-22 Ile-69 Phe-29	Leu-83 Ile-46 Phe-42 Val-72
庚醛 Heptanal	- 4.09	1.01	Ile-69	Ile-46 Val-68 Val-72 Trp-80 Leu-83 Leu-22 Thr-26 Tyr-25	Phe-42 Arg-43 Phe-29
异戊醛 3-Methylbutanal	- 3.33	3.62	-	Tyr-25 leu-83 Arg-43 Ala-39 Thr-26	Ile-46 Phe-42 Phe-29 Val-72 Leu-22
法尼烯 Farnesene	- 7.20	5.28	-	Cys-28 Leu-15 Thr-26 Arg-94	Tyr-25 Arg-43 Ala-39 Ile-46 Phe-42 Leu-83 Val-68 Ile-69 Trp-80 Val-72 His-76 Leu-22 Phe-29

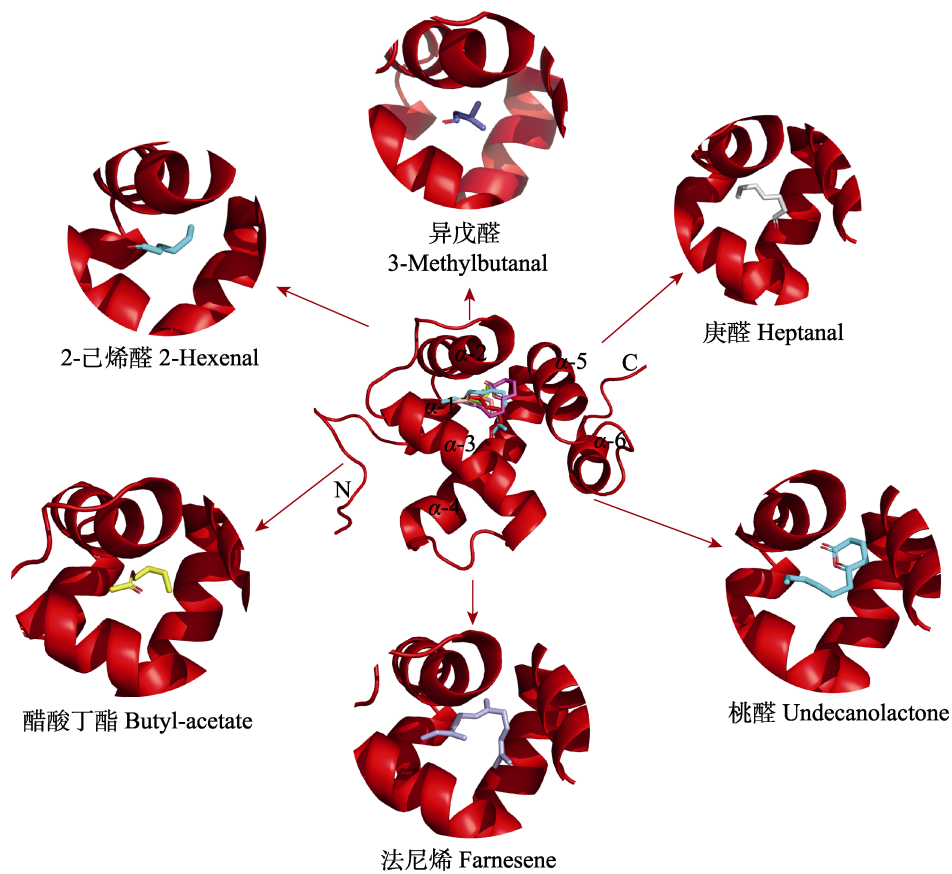


图 6 *CsasCSP14* 与配体的结合模式
Fig. 6 Binding modes of *CsasCSP14* and different ligands

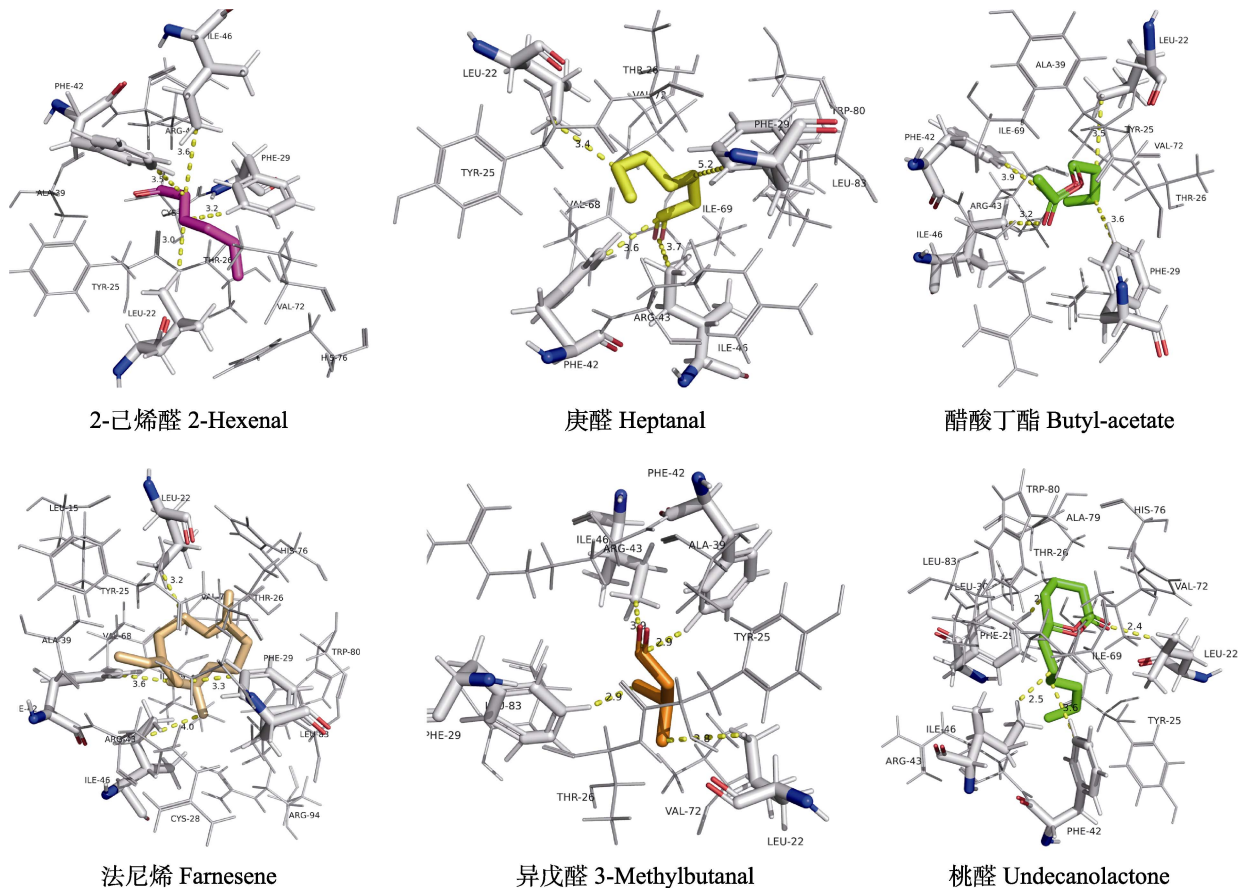


图 7 CsasCSP14 与不同配体相互作用的关键氨基酸残基

Fig. 7 The key residues of the different ligands with CsasCSP14

CsasCSP14 与配体气味分子相互作用的关键氨基酸残基以球棍模型显示，其他相互作用的氨基酸残基以线状模型显示。
The key residues that CsasCSP14 interact with ligand are shown as sticks, and other interacting residues are shown in lines.

但表达量有所不同。*CsasCSP14* 在雌雄成虫触角和翅中的表达量较高，暗示 *CsasCSP14* 可能与桃小食心虫定位寄主的嗅觉行为有关。如在苜蓿盲蝽 *Adelphocoris lineolatus*、烟粉虱 *Bemisia tabaci* 和西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* 中，CSPs 在嗅觉感器中高表达，并参与不同寄主植物挥发物和信息素的识别（Gu *et al.*, 2012；吴帆等，2015；Zhang and Lei, 2015）。

与常规化学生态相比，反向化学生态策略是一种快速且低成本的方法，用来筛选具有潜在吸引或趋避活性的气味分子，该方法的发展是基于了解昆虫嗅觉系统的分子机制和嗅觉蛋白与行为活性化合物的结合能力（Jayantihi *et al.*, 2014）。最近，反向化学生态策略在农业害虫管理中受到越来越多的关注（Leal, 2017）。根据局部能量搜索和拉马克遗传算法，蛋白与配体之

间的结合能越低，说明蛋白与配体的结合亲和性越高（Morris *et al.*, 2009）。Chen 等（2018）研究白背飞虱 *Sogatella furcifera* SfurCSP5 与寄主水稻挥发物的结合实验表明，SfurCSP5 与 2-十三酮、2-十五烷酮和 β -紫罗兰酮有较高的亲和性，同样，SfurCSP5 与 3 种物质的分子对接分值也最低。本研究中 *CsasCSP14* 蛋白与 32 种寄主挥发物进行分子对接发现，2-己烯醛、桃醛、醋酸丁酯、庚醛、异戊醛和法尼烯 6 种小分子化学物质结合能较低，而与桃小食心虫性信息素分子结合能较高。有研究表明，醛类物质是苹果、桃等果树挥发物的主要组成部分，而法尼烯是由植物分泌的具有趋避作用的一类气味挥发物，也是蚜虫报警信息素的主要成分（Sun *et al.*, 2012；Zhang and Lei, 2015）。因此，*CsasCSP14* 可能与桃小食心虫识别寄主植物有关。

分析 *CsasCSP14* 与 6 种小分子化学物质的相互作用力以及预测关键的氨基酸结合位点, 可进一步探明蛋白与配体结合的分子机制。本研究结果表明 *CsasCSP14* 氨基酸残基贡献的作用力类型主要为疏水性作用力和范德华力 (表 3), 且 *CsasCSP14* 分别与桃醛、庚醛和醋酸丁酯形成氢键。已有研究认为, 氢键在蛋白与配体特异性识别中具有关键作用 (Sandler *et al.*, 2000)。在上述 6 种蛋白气味分子复合物中, Leu-22、Phe-29、Phe-42 和 Ile46 疏水性氨基酸残基都参与了与气味分子的结合过程。可见, 疏水性的氨基酸残基在蛋白与配体的结合过程种发挥着重要作用, 而且, 亮氨酸 (Leu) 和异亮氨酸 (Ile) 是 *CSPMbraA6* 与气味分子结合的关键氨基酸残基, 表明这 4 个疏水性氨基酸残基可能是 *CsasCSP14* 与气味分子结合的关键氨基酸位点 (Jansen *et al.*, 2007; Campanacci *et al.*, 2003)。

综上, 本研究对桃小食心虫 *CsasCSP14* 基因的表达特性进行了解析, 同时也通过分子对接的研究方法筛选出 6 种潜在的气味分子, 并找到 4 个关键的氨基酸结合位点。为接下来通过荧光竞争结合试验和基因编辑技术验证 *CsasCSP14* 活体功能, 从而为设计以调控桃小食心虫化学通讯为基础的害虫防治策略提供理论依据。

参考文献 (References)

- Calvo E, Mans BJ, Andersen JF, Ribeiro JMC, 2006. Function and evolution of a mosquito salivary protein family. *Journal of Biological Chemistry*, 281: 1935–1942.
- Campanacci V, Lartigue A, Hällberg BM, Jones TA, Giudici-orticoni MT, Tegoni M, Cambillau C, 2003. Moth chemosensory protein exhibits drastic conformational changes and cooperativity on ligand binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(9): 5069–5074.
- Chen GL, Pan YF, Ma YF, Wang J, He M, He P, 2018. Binding affinity characterization of an antennae-enriched chemosensory protein from the white-backed planthopper, *Sogatella furcifera* (Horvath), with host plant volatiles. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 152: 1–7.
- 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*. *Scientia Agricultura Sinica*, 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.]
- Marti-Renom MA, Stuart AC, Fiser A, Sánchez R, Melo F, Šali A, 2000. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 29: 291–325.
- Gu SH, Wang SY, Zhang XY, Ji P, Liu JT, Wang GR, Wu KM, Guo YY, Zhou JJ, Zhang YJ, 2012. Functional characterizations of chemosensory proteins of the alfalfa plant bug *Adelphocoris lineolatus* indicate their involvement in host recognition. *PLoS ONE*, 7(8): e42871.
- Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M, Grabherr M, Blood PD, Bowden J, Couger MB, Eccles D, Li B, Lieber M, Lieber M, Macmanes MD, Ott M, Orvis J, Pochet N, Strozzi F, Weeks N, Westerman R, William T, Dewey CN, Henschel R, Leduc RD, Friedman N, Regev A, 2013. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols*, 8: 1494–1512.
- He P, Li ZQ, Zhang YF, Chen L, Wang J, Xu L, Zhang YN, He M, 2017. Identification of odorant-binding and chemosensory protein genes and the ligand affinity of two of the encoded proteins suggest a complex olfactory perception system in *Periplaneta americana*. *Insect Molecular Biology*, 26(6): 687–701.
- Huang XQ, Madan A, 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research*, 9: 868–877.
- Jacquin-Joly E, Vogt RG, Francois MC, Nagnan-le MP, 2001. Functional and expression pattern analysis of chemosensory proteins expressed in antennae and pheromonal gland of *Mamestra brassicae*. *Chemical Senses*, 26(7): 833–844.
- Jansen S, Chmelik J, Zidek L, Padrt P, Novak P, Zdrahal Z, Picimbon JF, Lofstedt C, Sklenar V, 2007. Structure of *Bombyx mori* chemosensory protein 1 in solution. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 66(3): 135–145.
- Jayanthi KP, Kempraj V, Aurade RM, Roy TK, Shivashankara KS, Verghese A, 2014. Computational reverse chemical ecology: Virtual screening and predicting behaviorally active semiochemicals for *Bactrocera dorsalis*. *BMC Genomics*, 15: 209.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K, 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6): 1547–1549.
- Leal WS, 2017. Reverse chemical ecology at the service of conservation biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114: 12094–12096.
- Liu B, Zhan GP, Ren LL, Li BS, Niu M, Wang YJ, 2016. Toxicity of pure phosphine to *Carposina sasakii* Matsumura (Lepidoptera: Carposinidae). *Plant Protection*, 42(6): 191–196. [刘波, 詹国平, 任荔荔, 李柏树, 牛墨, 王跃进, 2016. 纯磷化氢熏蒸对桃小

- 食心虫的毒力作用. 植物保护, 42(6): 191–196.]
- Li ZQ, Zhang S, Luo JY, Zhu J, Cui JJ, Dong SL, 2015. Expression analysis and binding assays in the chemosensory protein gene family indicate multiple roles in *Helicoverpa armigera*. *Journal of Chemical Ecology*, 41(5): 473–485.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- McKenna MP, Hekmat-Scafe DS, Gaines P, Carlson JR, 1994. Putative *Drosophila* pheromone-binding proteins expressed in a subregion of the olfactory system. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(23): 16340–16347.
- Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ, 2009. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16): 2785–2791.
- Ni CX, Zhang LY, Li HL, Shang HW, 2013. Molecular cloning and expression profiles analysis of chemosensory protein genes family in the Chinese honeybee (*Apis cerana cerana*). *Scientia Agricultura Sinica*, 46(8): 1706–1715. [倪翠侠, 张林雅, 李红亮, 商晗武, 2013. 中华蜜蜂化学感受蛋白基因家族克隆及表达特征分析. 中国农业科学, 46(8): 1706–1715.]
- Pelosi P, Iovinella I, Zhu J, Wang G, Dani FR, 2018. Beyond chemoreception: Diverse tasks of soluble olfactory proteins in insects. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical*, 93(1): 184–200.
- Picimbon JF, Dietrich K, Krieger J, Breer H, 2001. Identity and expression pattern of chemosensory proteins in *Heliothis virescens* (Lepidoptera, Noctuidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31(12): 1173–1181.
- Quan LF, Qiu GS, Zhang HJ, Sun LN, Li YY, Yan WT, 2016. Sublethal concentration of beta-cypermethrin influences fecundity and mating behavior of *Carposina sasakii* (Lepidoptera: Carposinidae) adults. *Journal of Economic Entomology*, 109(5): 2196–2204.
- Sandler BH, Nikonova L, Leal WS, Clardy J, 2000. Sexual attraction in the silkworm moth: Structure of the pheromone-binding-protein-bombykol complex. *Chemistry & Biology*, 7: 143–151.
- Sánchez-Gracia A, Vieira FG, Rozas J, 2009. Molecular evolution of the major chemosensory gene families in insects. *Heredity*, 103: 208–216.
- Sun LN, Zhang HJ, Yan WT, Ma CS, Qiu GS, 2015. Molecular cloning and expression profiling of a ryanodine receptor gene in the peach fruit moth (*Carposina sasakii*). *Scientia Agricultura Sinica*, 48(10): 1971–1981. [孙丽娜, 张怀江, 闫文涛, 马春森, 仇贵生, 2015. 桃小食心虫鱼尼丁受体基因克隆及表达模式分析. 中国农业科学, 48(10): 1971–1981.]
- Sun LN, Tian ZQ, Zhang HJ, Li YY, Yan WT, Yue Q, Qiu GS, 2018. Transcriptome analysis of disruption of mating in the peach fruit moth (*Carposina sasakii*) by chlorantraniliprole. *Scientia Agricultura Sinica*, 51(15): 2925–2936. [孙丽娜, 田志强, 张怀江, 李艳艳, 闫文涛, 岳强, 仇贵生, 2018. 氯虫苯甲酰胺干扰桃小食心虫交配的转录组分析. 中国农业科学, 51(15): 2925–2936.]
- Sun YF, De Biasio F, Qiao HL, Iovinella I, Yang SX, Ling Y, Riviello L, Battaglia D, Falabella P, Yang XL, 2012. Two odorant-binding proteins mediate the behavioural response of aphids to the alarm pheromone(E)-ss-farnesene and structural analogues. *PLoS ONE*, 7(3): e32759.
- Tian ZQ, Sun LN, Li YY, Quan LF, Zhang HJ, Yan WT, Yue Q, Qiu GS, 2018. Antennal transcriptome analysis of the chemosensory gene families in *Carposina sasakii* (Lepidoptera: Carposinidae). *BMC Genomics*, 19: 544.
- Wang FP, Zhang L, Li YH, Cui ZJ, Luo Y, Su YL, 2019. Advances on research and application on mating disruption of *Grapholitha molesta*. *China Fruits*, (5): 12–15. [王付平, 张丽, 李拥虎, 崔章静, 罗尧, 苏延乐, 2019. 梨小食心虫迷向技术研究及应用进展. 中国果树, (5): 12–15.]
- Wu F, Zhang XM, Zhao L, Cui XH, Li HL, Luo C, 2015. Binding characterization of chemosensory protein CSP1 in the *Bemisia tabaci* biotype Q with plant volatiles. *Scientia Agricultura Sinica*, 48(10): 1955–1961. [吴帆, 张晓曼, 赵磊, 崔旭红, 李红亮, 罗晨, 2015. Q型烟粉虱化学感受蛋白 CSP1 与植物挥发物的结合特征. 中国农业科学, 48(10): 1955–1961.]
- Xue W, Fan J, Zhang Y, Xu Q, Han Z, Sun J, Chen J, 2016. Identification and expression analysis of candidate odorant-binding protein and chemosensory protein genes by antennal transcriptome of *Sitobion avenae*. *PLoS ONE*, 11(8): e0161839–e0161839.
- Younas A, Waris MI, Tahir U, Qamar M, Shaaban M, Pragers M, 2018. Functional analysis of the chemosensory protein MsepCSP8 from the oriental armyworm *Mythimna separata*. *Frontiers in Physiology*, 9: 872.
- Zhang YN, Ye ZF, Yang K, Dong SL, 2014. Antenna-predominant and male-biased CSP19 of *Sesamia inferens* is able to bind the female sex pheromones and host plant volatiles. *Gene*, 536(2): 279–286.
- Zhang ZK, Lei ZR, 2015. Identification, expression profiling and fluorescence-based binding assays of a chemosensory protein gene from the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *PLoS ONE*, 10(1): e0117726–e0117726.
- Zhou SH, Zhang J, Zhang SG, Zhang L, 2008. Expression of chemosensory proteins in hairs on wings of *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae). *Journal of Applied Entomology*, 132(6): 439–450.