



大蜡螟触角感觉神经元膜蛋白 SNMPs 的克隆及组织表达分析*

谢佼昕^{1,2**} 张惠满¹ 孙乐乐¹ 张宇¹ 郭媛^{3***}

(1. 山西农业大学动物科学学院, 太谷 030801; 2. 畜禽遗传资源发掘与精准育种山西省重点实验室, 太谷 030801;
3. 山西农业大学园艺学院, 太原 030031)

摘要 【目的】鉴定并克隆大蜡螟 *Galleria mellonella* 触角感觉神经元膜蛋白基因 *GmelSNMP1* 和 *GmelSNMP2*, 明确 *GmelSNMP1* 和 *GmelSNMP2* 在大蜡螟成虫不同组织的表达谱, 为进一步研究其功能提供理论基础。【方法】基于大蜡螟成虫触角转录组测序数据, 通过 PCR 克隆具有完整 ORF 的 *GmelSNMP1* 和 *GmelSNMP2* cDNA 序列; 利用系统发育进化分析和序列分析研究 *GmelSNMP1* 和 *GmelSNMP2* 的分类及序列结构特征; 采用荧光定量 PCR 检测该基因在大蜡螟成虫不同组织中的表达水平。【结果】克隆得到大蜡螟 *GmelSNMP1* 和 *GmelSNMP2* (GenBank 登录号: PQ824699 和 PQ824700) 的 cDNA 全长序列; *GmelSNMP1* 基因 ORF 含有 1 578 个核苷酸, 编码 525 个氨基酸; *GmelSNMP2* 基因 ORF 含有 1 566 个核苷酸, 编码 521 个氨基酸。*GmelSNMP1* 和 *GmelSNMP2* 蛋白 N 端位于胞内的 2 个跨膜域和 1 个大的胞外环状结构域, 与脊椎动物 CD36 蛋白家族具有相似的结构特点。*GmelSNMP1* 主要在雌雄触角中表达, 且雌虫触角表达量显著高于雄虫触角 ($P=0.002$); 而 *GmelSNMP2* 在触角和其他组织中均有表达。【结论】该研究结果为进一步探索大蜡螟 SNMPs 在检测性信息素和一般气味分子中的功能提供了理论基础。

关键词 大蜡螟; 感觉神经元膜蛋白; 克隆; 序列分析; 组织表达

Cloning and expression pattern of sensory neuron membrane protein genes of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae)

XIE Jiao-Xin^{1,2**} ZHANG Hui-Man¹ SUN Le-Le¹ ZHANG Yu¹ GUO Yuan^{3***}

(1. College of Animal Science, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China; 2. Shanxi Key Laboratory of Animal Genetics Resource Utilization and Breeding, Taigu 030801, China; 3. College of Horticulture, Shanxi Agricultural University, Taiyuan 030031, China)

Abstract [Aim] To clone the sensory neuron membrane protein (SNMP) genes, *GmelSNMP1* and *GmelSNMP2*, in the antennae of the wax moth, *Galleria mellonella*, and clarify the expression profiles of these genes in different adult tissues, and thereby provide a foundation for further research on their function. [Methods] Based on adult antennal transcriptome sequencing data and the identification of *G. mellonella* SNMPs, the cDNA sequence of *GmelSNMP1* and *GmelSNMP2*, including a complete ORF, was cloned using PCR. Phylogenetic and sequence analysis were used to determine the classification and sequence structure of these genes, and fluorescent, quantitative PCR was used to detect their expression in different adult tissues. [Results] Full-length cDNA sequences of *GmelSNMP1* and *GmelSNMP2* (GenBank accession no.: PQ824699 and PQ824700) were successfully cloned. The ORF of the *GmelSNMP1* gene contains 1 578 nucleotides, encoding 525 amino acids; The ORF of the *GmelSNMP2* gene contains 1 566 nucleotides, encoding 521 amino acids. The N-terminus of *GmelSNMP1* and *GmelSNMP2* proteins are in two transmembrane domains and a large extracellular circular domain within the

*资助项目 Supported projects: 山西省基础研究计划青年科学研究项目 (202303021212086); 山西农业大学引进人才科研启动工程项目 (2023BQ07); 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系资助 (CARS-44-KXJ2)

**第一作者 First author, E-mail: xiejiaoxin18@126.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: yysgy3@163.com

收稿日期 Received: 2025-01-06; 接受日期 Accepted: 2025-02-12

cell, sharing similar structural characteristics with the vertebrate CD36 protein family. *GmelSNMP1* was predominantly expressed in the antennae, and its expression in the antennae of adult females was significantly higher than in males ($P=0.002$). *GmelSNMP2* was expressed in the antennae of both females and males, as well as in non-antennal tissues. **[Conclusion]** These results lay a foundation for further exploring the function of large wax moth SNMPs in detecting sex pheromones and other odor molecules.

Key words *Galleria mellonella*; sensory neuron membrane protein; cloning; sequence analysis; expression pattern

昆虫依靠其化学感觉系统来感知和辨别环境中的各类化学物质,包括寄主挥发物、种内信息素和种间信息素等。昆虫化学感受系统包括两部分:外周神经系统与中枢神经系统。外周神经系统主要用于对周围气味物质的接收及传递,而中枢神经系统则是对传进来的信号进行整合并输出调控行为的指令,从而完成对刺激信号的响应。在昆虫主要的化学感受器官触角中,气味结合蛋白(Odorant-binding proteins, OBPs)、化学感受蛋白(Chemosensory proteins, CSPs)、感觉神经元膜蛋白(Sensory neuron membrane proteins, SNMPs)、气味受体(Odorant receptor, ORs)和离子型受体(Ionotropic receptor, IRs)等化学感受相关蛋白在外周神经系统的化学信号识别过程中发挥关键作用(Leal, 2013; Joseph and Carlson, 2015)。

感觉神经元膜蛋白 SNMP 是昆虫中一类重要的化学感受相关蛋白,其与脊椎动物中参与脂肪酸、脂蛋白复合物等疏水性分子转运的 CD36 蛋白家族同源(Benton *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2008; Cassau and Krieger, 2021)。随着测序技术和生物信息学工具的快速发展,极大地促进了昆虫 SNMPs 的鉴定。在过去的几十年中,利用现有的 SNMPs 对基因组和转录组进行 BLAST 分析,在鳞翅目、鞘翅目、膜翅目、双翅目、半翅目和直翅目等昆虫中都鉴定到了候选 SNMPs 蛋白(Nichols and Vogt, 2008; Jiang *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2020)。在昆虫中,SNMP 家族主要包括 2 个亚家族:SNMP1 和 SNMP2。不同昆虫 SNMP 的数量也不同,范围从黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的 2 个 SNMPs 到蛱蝶 *Onthophagus taurus* 的 16 个(Zhao *et al.*, 2020)。在一个物种内,相同 SNMP 类型可能存在不同数量的旁系同源基因,如赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 有 4 个 SNMP1s, 3 个 SNMP2s 和 2 个 SNMP3s (Zhao

et al., 2020)。

分析昆虫的各种 SNMP 基因的组织特异性表达谱是解析不同 SNMPs 功能的关键。在鳞翅目、膜翅目、双翅目、鞘翅目、半翅目和直翅目昆虫中,SNMP1 特异或高表达于触角,在其他化学感受器官,如足、下唇须和喙管等也有一定量的表达,表明其在嗅觉功能中发挥了重要的作用。与 SNMP1 类似,在触角中发现至少一种 SNMP2,但是与 SNMP1 相比,SNMP2 在昆虫体内的分布更为广泛,在口器、足、翅膀、胸部、腹部和中肠等部位均有表达(Gu *et al.*, 2013; Shan *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2024)。这些更广泛的表达模式表明,SNMP2 除了参与嗅觉过程外,还可能在昆虫体组织中发挥非嗅觉功能。对于 SNMP1 和 SNMP2 基因的功能,基于目前的研究结果研究者们普遍认为,OBP 与外界的气味分子结合形成 OBP/信息素复合物向表达 OR 的嗅觉感受神经元扩散,而细胞膜中的 SNMP1 可能介导气味分子的卸载,并协助气味分子与 OR 结合(Vogt, 2003; Gomez-Diaz *et al.*, 2016);而 SNMP2 在触角的各种感器类型的支持细胞中表现出广泛的表达,结合哺乳动物 CD36 蛋白的功能推测(Raheel *et al.*, 2019),SNMP2s 作为脂质及脂质蛋白复合物的转运体和受体,有助于消除从感觉淋巴产生的各种亲脂性废物,如信息素和气味的分解产物或无意中从空气中进入感受器的气味分子,从而确保感受器内环境的平衡和嗅觉单元的功能(Vogt, 2003; Leal, 2013)。到目前为止,SNMP3 的组织表达谱只有在少数蛾类昆虫中得到研究,如在甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 的各种化学感受和非化学感受组织中均发现了 SNMP3 (Liu *et al.*, 2015),而家蚕 *Bombyx mori* 和棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 的 SNMP3 仅在成虫和幼虫肠道中检测到(Jiang *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2021),但在消化系统中的具体作用尚不清

楚。对于鞘翅目特异性扩张的 *SNMP4* 的组织分布仍有待分析 (Zhao *et al.*, 2020)。

大蜡螟 *Galleria mellonella* 属鳞翅目 Lepidoptera 螟蛾科 Pyralidae, 是一种对世界各地蜜蜂具有毁灭性危害的昆虫, 其幼虫又称巢虫, 取食蜜蜂的巢脾, 危害蜂群封盖子, 造成大量的“白头蛹”, 严重时扰乱蜜蜂蜂群的正常活动, 给养蜂业造成严重的经济损失 (Ellis *et al.*, 2013; 杨爽等, 2016)。与其它鳞翅目昆虫相比, 大蜡螟的性信息素释放和识别系统是不寻常的, 它是由雄蛾分泌并发出求偶行为, 引诱雌性靠近并进行交配, 为性信息素感知提供了一个独特的嗅觉模型 (Leyrer and Monro, 1973; 马涛等, 2013)。为了更好地理解大蜡螟的嗅觉识别机制, 多位研究者已使用高通量测序对其成虫的触角进行了转录组分析, 并注释了可能参与化学感受的基因家族 (Zhao *et al.*, 2019; 蒋秀云, 2021; Yang *et al.*, 2021)。本研究通过前期大蜡螟触角转录组测序结果, 克隆了大蜡螟的 2 个 *SNMPs* 基因, 即 *GmelSNMP1* 和 *GmelSNMP2*, 并进一步对其序列特征展开分析, 然后利用荧光定量 PCR 技术对大蜡螟 *GmelSNMP1* 和 *GmelSNMP2* 在不同组织中的表达情况进行分析, 为进一步探索大蜡螟 SNMPs 的化学通讯功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫与组织收集

在山西农业大学养蜂学实验室通过人工饲养获得大蜡螟 (刘位芬等, 2016)。将刚交配后的雌性大蜡螟装入 1.5 mL 的离心管中 (顶端开孔), 等待其产卵。产卵后, 将同一批卵转移到已经准备好的人工饲料中, 并将其置于恒温恒湿箱 (宁波江南仪器厂, HWS-0358) 中, 温度 (28±2) °C, 湿度 65%±5%, 待其羽化。分别取 40 头羽化后 2-3 d 的大蜡螟雌雄成虫触角、头 (去除触角)、胸、腹、足和翅, 并分别置于 1.5 mL 离心管中, 在液氮中处理后置于 -80 °C 冰箱保存。

1.2 RNA 提取与 cDNA 的合成

采用 TRIzol 法对收集的各组织的总 RNA 进

行提取, 用组织匀浆器在液氮中充分研磨组织至粉末, 参照 TRIzol (Invitrogen, 美国) 试剂盒说明书提取 RNA。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 用分光光度计 (NanoDrop, Wilmington, DE, USA) 测定 RNA 的浓度及 OD260/280 和 OD260/230, 保存于 -80 °C。采用试剂盒 FastQuant RT Kit (TianGen 天根生化科技, 北京) 将 RNA 反转录成 cDNA, 保存于 -20 °C。

1.3 *GmelSNMP1* 和 *GmelSNMP2* 的克隆

从本实验室前期对大蜡螟触角转录组测序注释结果中鉴定到 2 个 *SNMP* 基因。使用 Primer Express 5.0 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) 设计特异引物, 用于 *GmelSNMP1* 和 *GmelSNMP2* 开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 序列的扩增 (表 1)。PCR 反应体系: 2× Phanta mix (Vazyme, 南京) 25 μL, cDNA 4 μL, 正反向引物 (10 μmol/L) 各 2 μL, 加无菌水至 50 μL。将反应液混合后离心 30 s, 放入 PCR 仪中进行扩增。反应程序: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 59 °C 退火 60 s, 72 °C 延伸 60 s, 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并将条带进行胶回收。将回收后的 PCR 产物连接到 pCloneEZ-Blunt TOPO 克隆载体 (Clone Smarter, 美国) 上, 然后转入大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 感受态细胞 (擎科生物技术有限公司, 北京) 中, 送中美泰和生物技术 (北京) 有限公司进行测序。

1.4 *GmelSNMP1* 和 *GmelSNMP2* 的序列分析

选取 32 个不同昆虫 SNMPs 氨基酸序列采用最大似然法构建进化树, 所用软件为 IQ-tree (Bootstrap: 1 000)。通过 TMHMM 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 对 *GmelSNMP1* 和 *GmelSNMP2* 进行跨膜结构域预测, 并利用 Protter (<https://wlab.ethz.ch/protter/>) 对结果进行可视化分析。利用 NCBI 的 Conserved Domains 预测保守结构域 (Batch CD-search)。使用 TBtools (v. 1.121) Protein pairwise similarity matrix 计算并可视化不同昆虫 SNMP1 和 SNMP2 蛋白序列两两相似度矩阵 (Chen *et al.*, 2020)。

表 1 引物信息
Table 1 Primer information

引物 Primer	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	用途 Use
GmelSNMP1-clone-F	ATGAAGATACCAGGTCACATCAAAC	基因克隆 Gene cloning
GmelSNMP1-clone-R	TTACATGTCAACTTTGGCGGC	
GmelSNMP2-clone-F	ATGTTGGGTAAACGTTTCGAGAATG	荧光定量 PCR qRT-PCR
GmelSNMP2-clone-R	CTATCCTTTATTGAGATCTATTCCATTAAC	
GmelSNMP1-Q-F	ATATGGTTGTCAAAGCCGTCA	
GmelSNMP1-Q-R	TTGGTGCAAACCTCTGTTCTAGC	
GmelSNMP2-Q-F	TTCATACATGGCGGCCTTAA	
GmelSNMP2-Q-R	CAACCCATATTGCGAGTACATCT	
EF1 α -F	CCGTGGTTATGTTGCTGGTG	
EF1 α -R	TGTGGCAATCGAGTACAGGTG	
GAPDH-F	GTCATTCCCGCACTTAATGG	
GAPDH-R	CAGCTTCCTTGACCTTCTGC	

1.5 荧光定量 PCR

使用 ABI Prism 7500 Fast (Applied biosystems, Carlsbad, CA, USA) 检测系统及 SYBY Green 法对 *GmelSNMPs* 的组织表达特征进行实时荧光定量 qRT-PCR 分析。以 *EF1 α* 和 *GAPDH* 为内参基因用于校正样本间差异及计算靶基因的相对表达水平 (Zhao *et al.*, 2019; 蒋秀云, 2021)。使用 Beacon Designer 7.0 (PREMIER Biosoft International, Palo Alto, CA, USA) 软件设计靶基因及内参基因引物 (表 1)。每个 PCR 的反应体系为 20 μ L, 包括 SuperReal PreMix Plus 10 μ L, 上、下游引物各 0.6 μ L, Rox Reference Dye 0.4 μ L, cDNA 模板为 500 ng, ddH₂O 补充至 20 μ L。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 15 min; 接着进行 40 个循环: 95 $^{\circ}$ C 10 s, 57 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s。溶解曲线阶段程序为: 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 15 s。在每次实验中都设置无模板的阴性对照。每个样本都进行 3 次技术重复及 3 次生物学重复。

1.6 数据分析

使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析每个组织样本中 *GmelSNMPs* 的相对表达水平。数据分析软件为 IBM SPSS Statistics 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), *GmelSNMPs* 在不同组织之间的表达量差异用 LSD 检验进行比较, *GmelSNMPs* 在雌

雄组织之间的表达量差异使用 *T* 检验方法进行分析。

2 结果与分析

2.1 *GmelSNMPs* 基因的克隆及序列分析

在大蜡螟触角转录组数据库中成功鉴定到了 2 个 *SNMPs* 全长转录本, *GmelSNMP1* (GenBank 登录号: PQ824699) 和 *GmelSNMP2* (GenBank 登录号: PQ824700)。 *GmelSNMP1* 基因 ORF 含有 1 578 个核苷酸, 编码 525 个氨基酸, 分子量为 59.94 kD, 等电点为 7.93; *GmelSNMP2* 基因 ORF 含有 1 566 个核苷酸, 编码 521 个氨基酸, 分子量为 58.90 kD, 等电点为 7.52。 *GmelSNMP1* 和 *GmelSNMP2* 蛋白与脊椎动物 CD36 蛋白家族具有相似的结构特点: N 端位于胞内的两个跨膜域和一个大的胞外环状结构域 (图 1: A, B), *GmelSNMP1* 跨膜区分别位于第 9-31 和第 459-481 位氨基酸之间; *GmelSNMP2* 跨膜区分别位于第 7-29 和第 474-496 位氨基酸之间。利用 NCBI 的 Conserved Domains 预测其保守结构域, 结果显示, *GmelSNMP1* 和 *GmelSNMP2* 分别位于第 11-480 和第 11-491 位氨基酸, 与脊椎动物 CD36 superfamily 的保守结构域一致, *E*-value 分别为 1.90×10^{-152} 和 4.03×10^{-135} (图 2)。

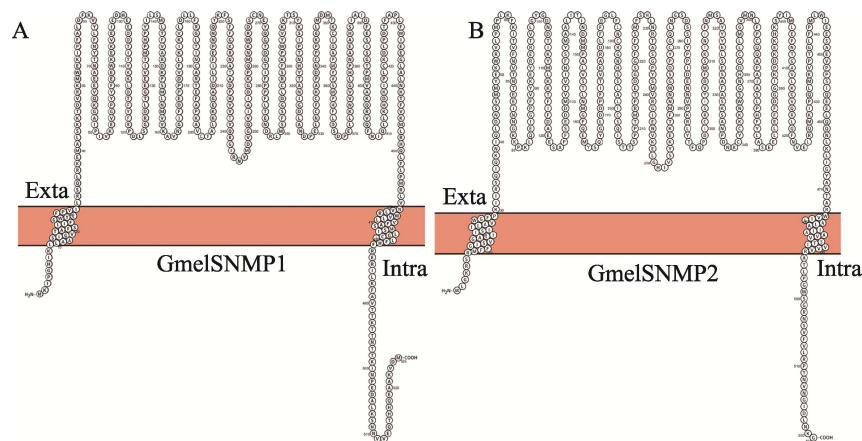


图 1 GmelSNMP1 (A) 和 GmelSNMP2 (B) 的跨膜域和拓扑结构预测
Fig. 1 Transmembrane domains and topological structures of GmelSNMP1 (A) and GmelSNMP2 (B)

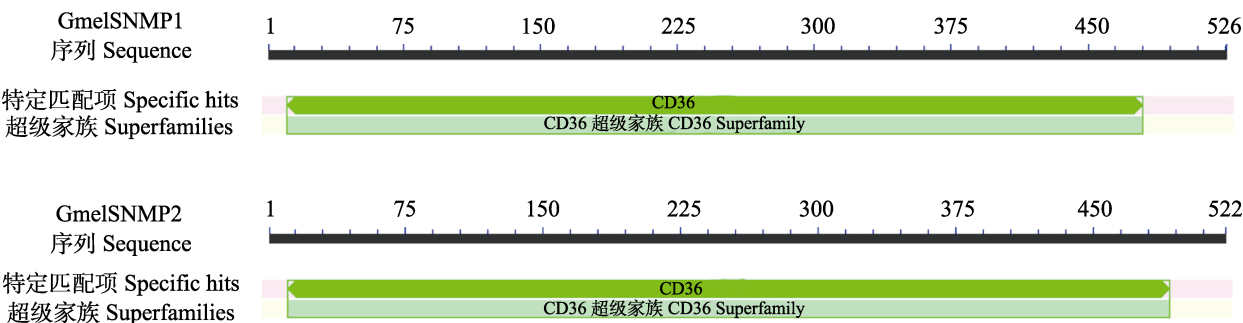


图 2 GmelSNMP1 和 GmelSNMP2 的保守结构域
Fig. 2 Conserved domains of GmelSNMP1 and GmelSNMP2

2.2 GmelSNMPs 的系统进化分析

进化分析结果表明,大蜡螟 SNMPs 与选择的其它昆虫 SNMPs 分属于 2 个大的亚家族:SNMP1 和 SNMP2。GmelSNMP1 与其它昆虫 SNMP1 位于同一分枝,而 GmelSNMP2 与其它昆虫 SNMP2 位于同一分枝,其中,大蜡螟 SNMP1 和 SNMP2 与鳞翅目昆虫的 SNMP1 和 SNMP2 进化关系更近并聚在同一分枝(图 3)。此外,蛋白序列两两相似性矩阵结果表明,鳞翅目昆虫 SNMPs 具有较高的序列相似性,SNMP1 亚家族序列相似性达到 80.46%(图 4: A),SNMP2 亚家族序列相似性达到 69.70%(图 4: B),其中 GmelSNMP1 与欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis* OnubSNMP1 序列相似性最高,为 80.72%(图 4: A),GmelSNMP2 与亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* OfurSNMP2 序列相似性最高,为 80.87%(图 4: B)。序列比对结果表明,GmelSNMP1 和

GmelSNMP2 序列相似性较低,仅为 24.44%。

2.3 GmelSNMPs 基因组织表达谱分析

利用 qRT-PCR 对大蜡螟 *GmelSNMP1* 和 *GmelSNMP2* 在不同组织中的表达谱进行分析,结果发现,在雌雄成虫中,*GmelSNMP1* 和 *GmelSNMP2* 在触角中的表达量显著高于头、胸、腹、足和翅(图 5),例如,*GmelSNMP1* 在雌虫触角中的表达量是头部的 107.1 倍,在雄虫触角中的表达量是头部的 362.1 倍(图 5: A);而与 *GmelSNMP1* 相比,*GmelSNMP2* 在雌虫触角中的表达量仅是头部的 6.5 倍,在雄虫触角中的表达量是头部的 5.2 倍(图 5: B)。此外,在雌雄成虫之间,*GmelSNMP1* 在雌虫触角中的表达量是雄虫触角的 2.3 倍(图 5: A);而 *GmelSNMP2* 在雌虫触角与雄虫触角中的表达量没有显著差异 ($P=0.90$),*GmelSNMP2* 在雄虫翅膀中的表达量是雌虫翅膀中的 2 倍(图 5: B)。

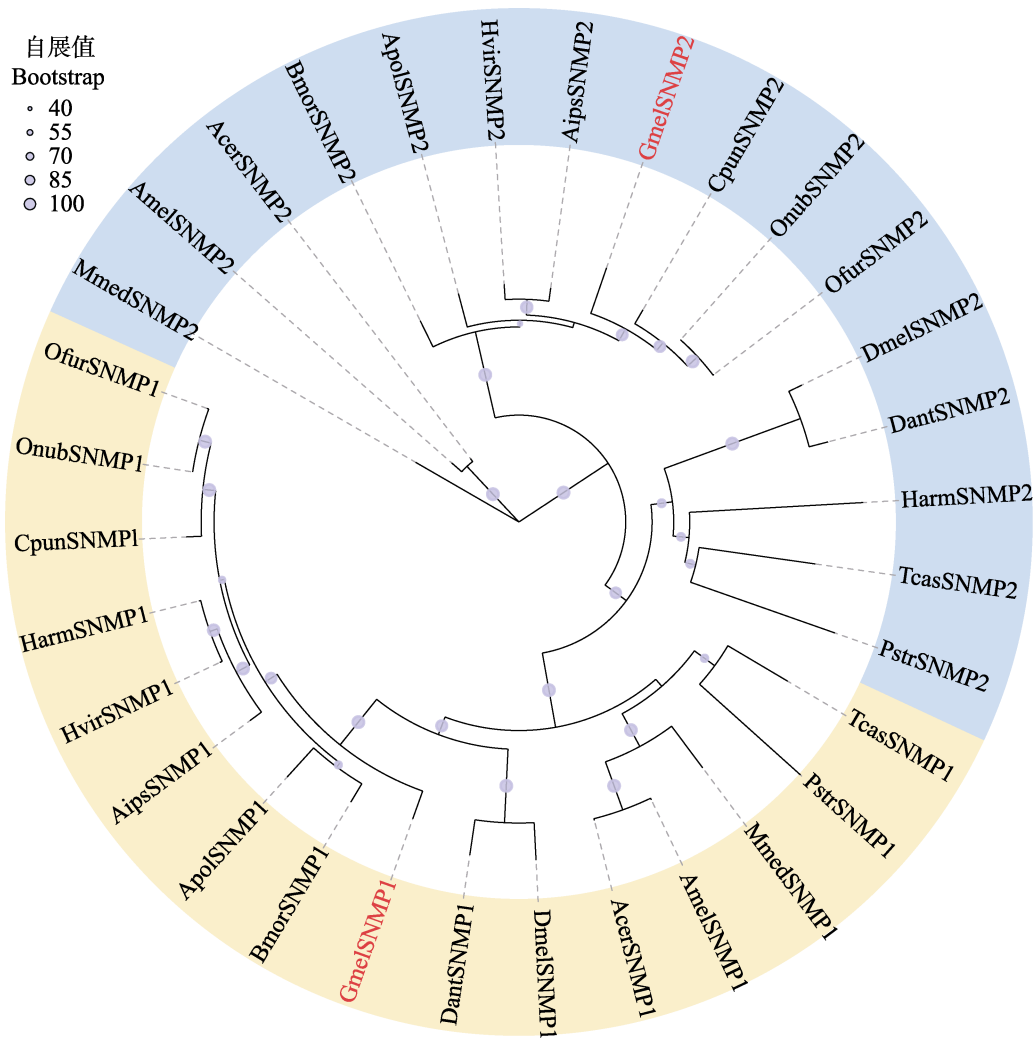


图 3 不同目昆虫感觉神经元膜蛋白 SNMPs 家族进化分析
Fig. 3 Phylogenetic analysis of sensory neuron membrane proteins (SNMPs) from different insect orders

进化树使用 IQ-tree 的最大似然法 (Maximum-likelihood method) 构建, Bootstrap support values 是通过 1 000 次重复得到。This maximum-likelihood phylogenetic tree is constructed using IQ-tree and pairwise by resampling amino acid position 1 000 times.

蛋白来源物种和 GenBank 登录号 Protein origin species GenBank accession no.: DantSNMP1, DantSNMP2:

葱蝇 *Delia antiqua*, MK541687.1, QEO32906.1; DmelSNMP1, DmelSNMP2: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*, NP_001262803, ABW70129.1; PstrSNMP1, PstrSNMP2: 黄曲条跳甲 *Phyllotreta striolata*, ANQ46504.1, ANQ46505.1; TcasSNMP1, TcasSNMP2: 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*, XP_001816436.2, XP_970008.1; AcerSNMP1, AcerSNMP2: 中华蜜蜂 *Apis cerana cerana*, AGC91908.1, XP_061929472.1; AmelSNMP1, AmelSNMP2: 意大利蜜蜂 *Apis mellifera*, XP_006562933.1, XP_026295811.1; MmedSNMP1, MmedSNMP2: 中红侧沟茧蜂 *Microplitis mediator*, KM245938.1, MH229861; CpunSNMP1, CpunSNMP2: 桃蛀螟 *Conogethes punctiferalis*, APG32554.1, APG32553.1; HarmSNMP1, HarmSNMP2: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*, AAO15604, XP_049696491.2; BmorSNMP1, BmorSNMP2: 家蚕 *Bombyx mori*, CAB65730, XP_062527683.1; ApolSNMP1, ApolSNMP2: 多音天蚕 *Antheraea polyphemus*, AAC47540, CAP19029; AipsSNMP1, AipsSNMP2: 小地老虎 *Agrotis ipsilon*, KC182740, KC182741; OfurSNMP1, OfurSNMP2: 亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis*, ADQ73894, ADQ73891; OnubSNMP1, OnubSNMP2: 欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis*, ADQ73892, ADQ73890; HvirSNMP1, HvirSNMP2: 烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*, CAB65739, CAP19028. 图 4 同。The same for Fig. 4.

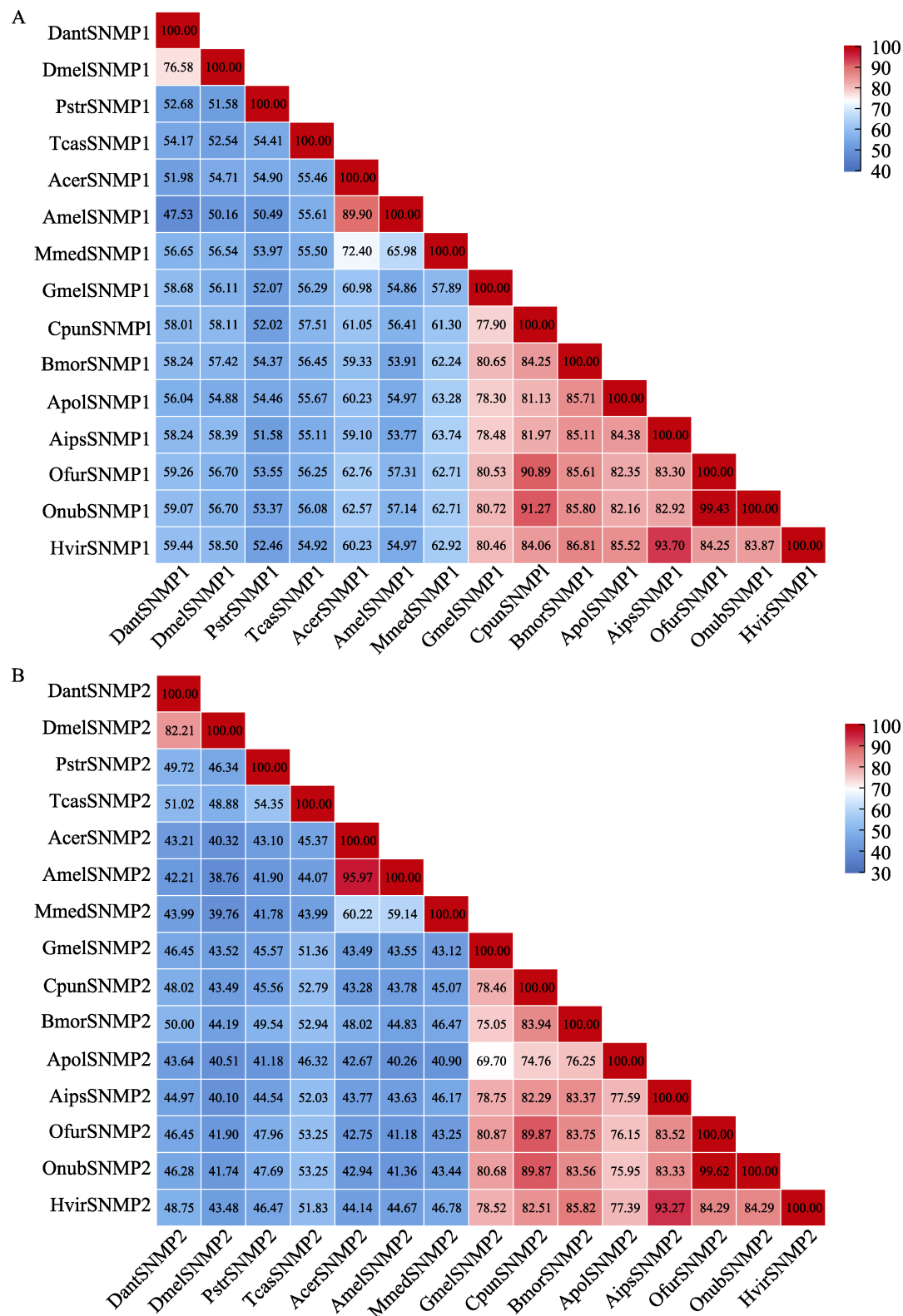


图 4 用于系统发育分析的昆虫 SNMP1s (A) 和 SNMP2s (B) 蛋白序列两两相似性矩阵

Fig. 4 Protein pairwise similarity matrix of the insect SNMP1s (A) and SNMP2s (B) selected for phylogenetic analysis

图中数值表示蛋白序列相似性百分比。

The values in the figure represent the percentage similarity of the protein sequences.

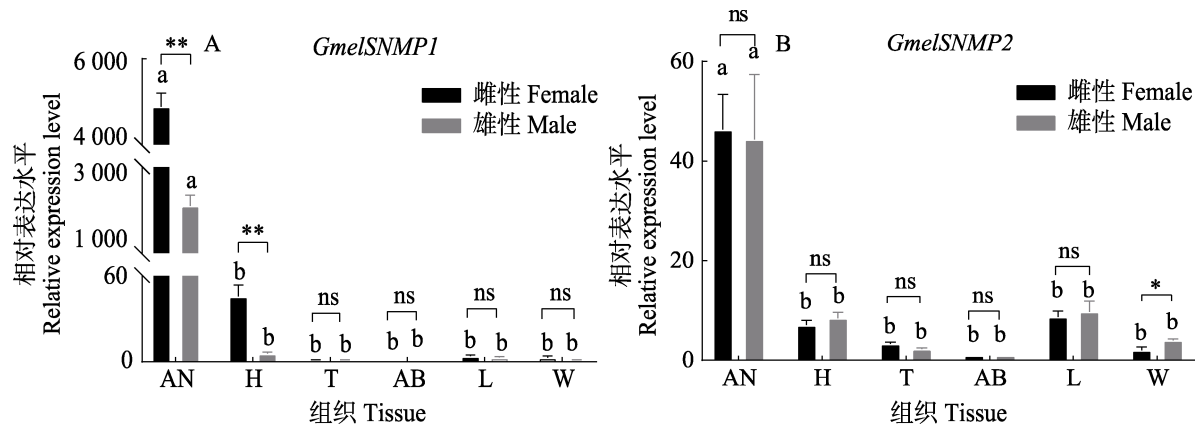


图5 *GmelSNMP1* (A) 和 *GmelSNMP2* (B) 在大蜡螟不同组织中的表达谱

Fig. 5 Expression profiles of *GmelSNMP1* (A) and *GmelSNMP2* (B) in different tissues of *Galleria mellonella*

AN: 触角; H: 头; T: 胸; AB: 腹; L: 足; W: 翅。所有相对表达量的计算都以腹部组织的表达量为基准。图中柱上不同小写字母代表 *GmelSNMPs* 在同一性别不同组织中的表达差异 ($P < 0.05$, LSD 检验), 星号代表 *GmelSNMPs* 在相同组织不同性别之间的表达差异 ($* 0.01 < P < 0.05$, $** 0.001 < P < 0.01$, T 检验)。ns: 无显著差异 (T 检验)。

AN: Antennae; H: Heads; T: Thoraxes; AB: Abdomens; L: Legs; W: Wings. The fold changes are relative to the transcript levels in the abdomens of both sexes. The different small letters above bars indicate significant difference in *GmelSNMPs* transcript levels of different tissues ($P < 0.05$, LSD test). Asterisk represents significant difference in expression levels of *GmelSNMPs* between males and females ($* 0.01 < P < 0.05$, $** 0.001 < P < 0.01$, T -test). ns: No significant difference (T -test).

3 讨论

本研究从大蜡螟触角转录组中共鉴定到了 2 个 *SNMP* 基因, *GmelSNMP1* 和 *GmelSNMP2*。拓扑结构表明, 两个蛋白具有两个跨膜域和一个胞外环状结构域, 这一结构特点与脊椎动物 CD36 蛋白家族类似 (Gruarin *et al.*, 2000)。最近有研究在鳞翅目和鞘翅目物种中确定了另外 2 个 *SNMP* 基因分枝 (*SNMP3* 和 *SNMP4*) (Zhang *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2020), 而在大蜡螟成虫触角转录组中并未鉴定到 *SNMP3*, 推测该基因可能在其他组织或发育阶段中表达, 在昆虫进化过程中某些物种 *SNMP* 基因数量的扩展意味着这些物种的潜在功能分化 (Cassau and Krieger, 2021)。进化分析显示, *GmelSNMP1* 和 *GmelSNMP2* 与其它昆虫物种的 *SNMP1* 和 *SNMP2* 分属于两个大的进化分枝。此外, 不同鳞翅目物种中每个 *SNMP* 亚家族成员之间的氨基酸序列高度同源, 而与其他目昆虫的 *SNMP* 序列相似性较低, 暗示了其在这些物种中可能具有保守的功能。

通过荧光定量 PCR 研究 *GmelSNMP1* 和 *GmelSNMP2* 在大蜡螟成虫不同组织中的表达水平是预测其功能的重要参考。结果表明, *GmelSNMP1*

主要表达于大蜡螟成虫触角中, 相似的, 在中红侧沟茧蜂 *Microplitis mediator*、小地老虎 *Agrotis ipsilon*、红脊长蜡 *Tropidothorax elegans* 和绿盲蝽 *Apolygus lucorum* 等多种昆虫中, *SNMP1* 在触角中的表达量显著高于其他组织。已有多个研究表明, *SNMP1s* 与信息素受体共表达。果蝇中, *SNMP1* 与信息素受体 OR67d 共表达参与性信息素识别 (Benton *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2008)。在烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 中, *SNMP1* 分别与信息素受体 HR13 及 HR6 共表达, 可能参与检测相应的信息素组分 (Grosse-Wilde *et al.*, 2007; Pregitzer *et al.*, 2014)。家蚕 *BmorOrco*, *BmorSNMP1* 和 *BmorOR1* 可能形成异聚体共同参与识别性信息素 (Zhang *et al.*, 2020)。特别的是 *GmelSNMP1* 在雌虫触角中的表达量显著高于雄虫, 这一现象表明 *SNMP1* 可能在雌虫特异的化学感受过程中发挥重要作用。多数昆虫的 *SNMP1* 在雄虫触角中的表达量显著高于雌虫 (Benton *et al.*, 2007; Gu *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2024), 可能是由于大蜡螟性信息素是由雄蛾分泌并发出求偶行为, 引诱雌性靠近并进行交配 (Ellis *et al.*, 2013; 杨爽等, 2016), 而大多数鳞翅目昆虫的雌性会释放性信息素, 这

些信息素刺激雄性对雌性的吸引, 只有雄性通过其触角上的特殊神经元检测到雌性信息素 (Rizvi *et al.*, 2021)。

与 *GmelSNMP1* 相比, *GmelSNMP2* 广泛的表达于成虫各组织中, 且在触角中的表达量显著高于其它组织, 但相对表达量倍数显著低于 *GmelSNMP1*。类似地, 在苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* (Huang *et al.*, 2016)、甜菜夜蛾 (Liu *et al.*, 2015)、小地老虎 (Gu *et al.*, 2013)、双委夜蛾 *Athetis dissimilis* (宋智煜等, 2021) 和红脊长蜡 (宋月芹等, 2021) 中, *SNMP2* 广泛地表达于各组织中, 相对高表达于雌雄成虫触角。*SNMP1* 与 *SNMP2* 表达特性的差异表明两者在昆虫化学感受中可能执行不同的功能。我们推测, 在大蜡螟和其它昆虫中, *SNMP2* 在化学感受外可能还具有更多样的功能。

综上, 本研究首次克隆和鉴定了大蜡螟的 2 个 *SNMPs* 基因, 即 *GmelSNMP1* 和 *GmelSNMP2*。同一目昆虫同一亚家族 *SNMP* 同源序列一致性较高, 而不同目昆虫不同类 *SNMP* 同源序列一致性较低。*GmelSNMP1* 主要在雌雄触角中特异性表达, 且在雌虫触角中表达量显著高于雄虫触角; 而 *GmelSNMP2* 除触角外, 在非触角组织中也有表达。该研究结果为进一步探索大蜡螟 *SNMPs* 在识别性信息素和其他化学感受功能中提供了理论基础。

参考文献 (References)

- Benton R, Vannice KS, Vossall LB, 2007. An essential role for a CD36-related receptor in pheromone detection in *Drosophila*. *Nature*, 450(7167): 289–293.
- Cassau S, Krieger J, 2021. The role of SNMPs in insect olfaction. *Cell and Tissue Research*, 383(1): 21–33.
- Chen CJ, Chen H, Zhang Y, Thomas HR, Frank MH, He YH, Xia R, 2020. TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Molecular Plant*, 13(8): 1194–1202.
- Ellis JD, Graham JR, Mortensen A, 2013. Standard methods for wax moth research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1): 1–17.
- Gomez-Diaz C, Bargeton B, Abuin L, Bukar N, Reina JH, Bartoi T, Graf M, Ong H, Ulbrich MH, Masson JF, Benton R, 2016. A CD36 ectodomain mediates insect pheromone detection via a putative tunnelling mechanism. *Nature Communications*, 7: 11866.
- Grosse-Wilde E, Gohl T, Bouché E, Breer H, Krieger J, 2007. Candidate pheromone receptors provide the basis for the response of distinct antennal neurons to pheromonal compounds. *European Journal of Neuroscience*, 25(8): 2364–2373.
- Gruarin P, Thorne RF, Dorahy DJ, Burns GF, Sitia R, Alessio M, 2000. CD36 is a ditopic glycoprotein with the N-terminal domain implicated in intracellular transport. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 275(2): 446–454.
- Gu SH, Yang RN, Guo MB, Wang GR, Wu KM, Guo YY, Zhou JJ, Zhang YJ, 2013. Molecular identification and differential expression of sensory neuron membrane proteins in the antennae of the black cutworm moth *Agrotis ipsilon*. *Journal of Insect Physiology*, 59(4): 430–443.
- Huang XL, Liu L, Fang YQ, Feng JN, 2016. Expression of a sensory neuron membrane protein SNMP2 in olfactory sensilla of codling moth *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Economic Entomology*, 109(4): 1907–1913.
- Jin X, Ha TS, Smith DP, 2008. SNMP is a signaling component required for pheromone sensitivity in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(31): 10996–11001.
- Jiang XC, Pregitzer P, Grosse-Wilde E, Breer H, Krieger J, 2016. Identification and characterization of two “sensory neuron membrane proteins” (SNMPs) of the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae). *Journal of Insect Science*, 16(1): 33.
- Jiang XY, 2021. Identification, sequence characteristics, and expression pattern analysis of olfactory-related genes from *Galleria mellonella*. Master dissertation. Hefei: Anhui Agricultural University. [蒋秀云, 2021. 大蜡螟嗅觉相关基因鉴定、序列特征与表达模式分析. 硕士学位论文. 合肥: 安徽农业大学.]
- Joseph RM, Carlson JR, 2015. *Drosophila* chemoreceptors: A molecular interface between the chemical world and the brain. *Trends in Genetics*, 31(12): 683–695.
- Leal WS, 2013. Odorant reception in insects: Roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annual Review of Entomology*, 58: 373–391.
- Leyrer RL, Monroe RE, 1973. Isolation and identification of the scent of the moth, *Galleria mellonella*, and a revaluation of its sex pheromone. *Journal of Insect Physiology*, 19(11): 2267–2271.
- Li Y, An XK, Shan S, Pang XQ, Liu XH, Sun Y, Khashaveh A, Zhang YJ, 2024. Functional characterization of sensory neuron

- membrane protein 1a involved in sex pheromone detection of *Apolygus lucorum* (Hemiptera: Miridae). *Journal of Integrative Agriculture*, 23(12): 4120–4135.
- Liu NY, Zhang T, Ye ZF, Li F, Dong SL, 2015. Identification and characterization of candidate chemosensory gene families from *Spodoptera exigua* developmental transcriptomes. *International Journal of Biological Sciences*, 11(9): 1036–1048.
- Liu WF, Liang C, Song WF, Miao CH, Zhang XW, Yang S, 2016. A method for the easy large-scale laboratory propagation of the greater wax moth (*Galleria mellonella*). *Apiculture of China*, 67(6): 34–35. [刘位芬, 梁铨, 宋文菲, 苗春辉, 张学文, 杨爽, 2016. 一种易于实验室批量繁殖大蜡螟的方法. 中国蜂业, 67(6): 34–35.]
- Ma T, Zhang M, Zhu XJ, Yang XC, Li YZ, Wen XJ, 2013. Active components and structural features of insect sex pheromones in Pyraloidea. *Chinese Journal of Ecology*, 32(12): 3378–3384. [马涛, 张蒙, 朱雪姣, 杨兴翠, 李奕震, 温秀军, 2013. 螟蛾总科昆虫性信息素活性组分及结构特征. 生态学杂志, 32(12): 3378–3384.]
- Nichols Z, Vogt RG, 2008. The SNMP/CD36 gene family in Diptera, Hymenoptera and Coleoptera: *Drosophila melanogaster*, *D. pseudoobscura*, *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti*, *Apis mellifera*, and *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(4): 398–415.
- Pregitzer P, Greschista M, Breer H, Krieger J, 2014. The sensory neurone membrane protein SNMP1 contributes to the sensitivity of a pheromone detection system. *Insect Molecular Biology*, 23(6): 733–742.
- Raheel H, Ghaffari S, Khosraviani N, Mintsopoulos V, Auyeung D, Wang CS, Kim YH, Mullen B, Sung HK, Ho M, Fairn G, Neculai D, Febbraio M, Heit B, Lee WL, 2019. CD36 mediates albumin transcytosis by dermal but not lung microvascular endothelial cells: Role in fatty acid delivery. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 316(5): L740–L750.
- Rizvi SAH, George J, Reddy GVP, Zeng XN, Guerrero A, 2021. Latest developments in insect sex pheromone research and its application in agricultural pest management. *Insects*, 12(6): 484.
- Song YQ, Bai XJ, Chen QX, Lü QH, Sun HZ, 2021. Cloning and expression pattern of sensory neuron membrane protein genes of *Tropidotherax elegans*. *Forest Research*, 34(5): 135–141. [宋月芹, 白小军, 陈庆霄, 吕琪卉, 孙会忠, 2021. 红脊长蜡感觉神经元膜蛋白基因克隆及组织表达谱分析. 林业科学研究, 34(5): 135–141.]
- Song ZY, Chen SC, Bai XJ, Dong JF, Song YQ, 2021. Cloning and expression pattern of the sensory neuron membrane protein-encoding genes of *Athetis dissimilis*. *Sichuan Journal of Zoology*, 40(2): 121–129. [宋智煜, 陈双臣, 白小军, 董钧锋, 宋月芹, 2021. 双委夜蛾感觉神经元膜蛋白编码基因鉴定及组织表达谱分析. 四川动物, 40(2): 121–129.]
- Shan S, Wang SN, Song X, Khashaveh A, Lu ZY, Dhilloo KH, Li RJ, Gao XW, Zhang YJ, 2020. Molecular characterization and expression of sensory neuron membrane proteins in the parasitoid *Microplitis mediator* (Hymenoptera: Braconidae). *Insect Science*, 27(3): 425–439.
- Vogt RG, 2003. Biochemical diversity of odor detection: OBPs, ODEs and SNMPs// Blomquist GJ, Vogt RG (eds.). *Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier Academic Press: 391–445.
- Xu W, Zhang HJ, Liao YL, Papanicolaou A, 2021. Characterization of sensory neuron membrane proteins (SNMPs) in cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Science*, 28(3): 769–779.
- Yang S, Zhang XW, Song WF, Miao CH, Zhao HT, Jiang YS, 2016. Review of the biological and control methods on *Galleria mellonella* L. *Apiculture of China*, 67(3): 33–37. [杨爽, 张学文, 宋文菲, 苗春辉, 赵慧婷, 姜玉锁, 2016. 大蜡螟生物学特性及其防治研究概述. 中国蜂业, 67(3): 33–37.]
- Yang S, Zhao HT, Zhang XW, Xu K, Guo LN, Du YL, Jiang YS, 2021. Identification and expression patterns of chemosensory genes in male and female wax moths, *Galleria mellonella*. *Pakistan Journal of Zoology*, 53(5): 1767.
- Zhang HJ, Xu W, Chen QM, Sun LN, Anderson A, Xia QY, Papanicolaou A, 2020. A phylogenomics approach to characterizing sensory neuron membrane proteins (SNMPs) in Lepidoptera. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 118: 103313.
- Zhao HX, Xiao WY, Ji CH, Ren Q, Xia XS, Zhang XF, Huang WZ, 2019. Candidate chemosensory genes identified from the greater wax moth, *Galleria mellonella*, through a transcriptomic analysis. *Scientific Reports*, 9(1): 10032.
- Zhao YJ, Li GC, Zhu JY, Liu NY, 2020. Genome-based analysis reveals a novel SNMP group of the Coleoptera and chemosensory receptors in *Rhaphuma horsfieldi*. *Genomics*, 112(4): 2713–2728.