

蜜蜂专栏

东方蜜蜂气味受体基因 *Or1* 和 *Or2* 的克隆与序列分析^{*}

赵慧婷^{1**} 高鹏飞¹ 张桂贤¹ 张春香¹ 马卫华^{1,2} 姜玉锁^{1***}

(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)

摘 要 本研究采用自行设计的引物对东方蜜蜂 *Apis cerana* Fabricius 气味受体 (odorant receptors) *Or1*、*Or2* 的部分基因组序列 (GenBank 登录号为: JN544932, JN544931) 进行了克隆、测序和分析, 以探寻传统气味受体 (*AcOr1*) 和非典型气味受体 (*AcOr2*) 基因在近缘种昆虫间的进化差异。试验所得的东方蜜蜂气味受体基因 *Or1*、*Or2* 的序列长度分别为 1 247 bp 和 1 138 bp, 各包含 4 个和 2 个内含子, 编码区序列长度分别为 682、686 bp。经序列比对发现, 两气味受体 DNA 序列在东、西方蜜蜂及熊蜂间差异较大, 最低相似性仅为 56% (*AcOr1*—*BtOr82a-like*), 差异的主要来源为内含子长度及其碱基的变异, 而编码区氨基酸序列相似性较高, 均达 85% 以上; 从整体分析来看, 在膜翅目昆虫中, 非典型气味受体 *AcOr2* 较传统气味受体 *AcOr1* 是相对保守的气味受体基因。

关键词 东方蜜蜂, 气味受体, 序列对比, 进化分析

Gene cloning and sequence analysis of *Or1* and *Or2* in *Apis cerana*

ZHAO Hui-Ting^{1**} GAO Peng-Fei¹ ZHANG Gui-Xian¹ ZHANG Chun-Xiang¹
MA Wei-Hua^{1,2} JIANG Yu-Suo^{1***}

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China;

2. Institute of Horticulture, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, China)

Abstract Two odorant receptors, the partial DNA sequences *AcOr1*, *AcOr2* (Genbank accession number: JN544932, JN544931) of *Apis cerana* Fabricius were cloned using PCR. The aim was to explore the evolutionary diversity of conventional and atypical odorant receptors among related species. The cloned fragments of *AcOr1* and *AcOr2* were 1 247 bp and 1 138 bp in length, and contained 4 and 2 introns respectively. The coding region lengths were 682 bp and 686 bp respectively. Sequence alignment showed that genome sequences were highly divergent in different insects of *A. cerana*, *A. mellifera* and *Bombus terrestris* with minimum identity of 56% (*AcOr1*—*BtOr82a-like*). These differences were primarily due to variation in nucleotides and intron length, although amino acid sequences shared high identity ($\geq 85\%$). Compared with *AcOr1*, *AcOr2* appears to be a relatively conservative odorant receptor in Hymenopteran insects.

Key words *Apis cerana*, odorant receptors, sequence alignment, evolution analysis

昆虫具有特殊的嗅觉系统, 用来感知外界环境中的气味信号, 当气味分子与嗅觉神经元上的受体结合后产生一系列的化学信号, 并将其传递到被激活的大脑中枢神经元中, 从而对气味做出判断, 并进一步调节昆虫相应的行为, 如觅食、交

配、产卵、同族识别及躲避敌害等 (Robertson *et al.*, 2003; Field *et al.*, 2009)。昆虫气味受体分为两类: 一类是传统气味受体, 另一类是 Or83b 受体家族, 亦称为非典型气味受体。传统气味受体的氨基酸序列在不同昆虫中同源性很低, 而

* 资助项目: 国家自然科学基金项目 (31040078)。

**E-mail: zhaoting@yahoo.com.cn

***通讯作者, E-mail: jiangys-001@163.com

收稿日期: 2012-02-07, 接受日期: 2012-03-28

Or83b 受体家族较为特殊,其氨基酸序列和功能在不同昆虫中都是高度保守的。Or83b 本身并无感受气味的功能,在大多数的嗅觉神经元中它必须与传统气味受体形成异质二聚体复合物,来共同完成感受气味分子的功能(Krieger *et al.*, 2003; Larsson *et al.*, 2004; Hallem *et al.*, 2006)。

昆虫的气味受体具有与线虫和脊椎动物截然相反的拓扑结构,其受体蛋白的 N 末端位于细胞膜内,而 C 末端位于细胞膜胞外(Benton *et al.*, 2006; Wistrand *et al.*, 2006),这使得昆虫的气味识别机制成为研究的热点。到目前为止,在气味受体的鉴定(Clyne *et al.*, 1999; Robertson *et al.*, 2006, 2010)、结构特征(Benton *et al.*, 2006; Wistrand *et al.*, 2006)、组织特异性表达(Robertson and Wanner, 2006; Patch *et al.*, 2009; 张帅等,2009)、功能(Wanner *et al.*, 2007; Nichols *et al.*, 2010; Marshall *et al.*, 2011)及信号转导机制方面(Sato *et al.*, 2008; Wicher *et al.*, 2008; Nichols and Luetje, 2010)已做了大量研究。

蜜蜂是对人类有益的昆虫,随着人们对蜜蜂生物学特点认识和研究的深入,蜜蜂从经济昆虫走向模式生物的研究已逐渐兴起。Krieger 等(2003)利用 Or83b 家族保守性,扩增出了西方蜜蜂的 *Apis mellifera* L. 第一个气味受体基因 *AmelR2*。在西方蜜蜂全基因组测序的完成后(Weinstock *et al.*, 2006),Robertson 等(2006)利用生物信息学方法,从其基因组中共鉴定到了 170 个 *Or* 基因,通过聚类分析也找到了西方蜜蜂的 Or83b 家族成员,定名为 *AmOr2*。东方蜜蜂 *Apis*

cerana Fabricius 是西方蜜蜂的近缘种,因其具有善于采集零星蜜源、耗蜜量低、抵抗胡蜂及有节制的产卵等优点受到广大养蜂者的欢迎(杨冠煌, 2001; 曾志将, 2002),而有关东方蜜蜂气味受体方面的文章还未见报道,本文以东方蜜蜂为研究对象,克隆和分析了东方蜜蜂两类不同气味受体 *Or1* 和 *Or2* 的基因组序列,为进一步研究昆虫气味受体的起源及进化规律提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 供试样本与试剂

东方蜜蜂取自山西农业大学动物科技学院实验中蜂场,每群随机抓取数只工蜂,采用常规的酚-氯仿抽提法从工蜂的胸部肌肉中提取基因组 DNA,用核酸测定仪(ND1000)测定其浓度及纯度,选取其中质量最好的个体 DNA 进行后续扩增试验。

Taq DNA 聚合酶、pGM-T 克隆试剂盒为天根生化公司产品;普通琼脂糖凝胶回收试剂盒,质粒小提试剂盒为 Omega 公司产品;内切酶 *EcoRI* 为 Takara 公司产品;其它试剂为国产或进口分析纯试剂。

1.2 引物设计

根据 GenBank 中已发表的近缘种西方蜜蜂 *AmOr1*、*AmOr2* 序列(登录号分别为: NC_007071.3, NC_007070.3),分别设计了 2 对扩增序列有重叠区域的引物用于扩增东方蜜蜂相应基因组序列(*AcOr1*、*AcOr2*),引物序列如表 1 所示。

表 1 用于扩增 *AcOr1* 和 *AcOr2* 的特异性引物
Table 1 Specific primers used for amplification *AcOr1* and *AcOr2*

目的基因 Objective gene	扩增用引物 Primer	扩增产物长度 Size of product
<i>AcOr1</i>	F1:5′ - CAAGGAGGACAACACGACTCA -3′	656 bp
	R1:5′ - TGCTCAGTGATTCTCCAACCC -3′	
	F2:5′ - TGAACGATGTCGATAACACG -3′	996 bp
	R2:5′ - GTAGGCTGCCGAAGTTTT -3′	
<i>AcOr2</i>	F1:5′ - TCACCATGCTCTTCTTCACG -3′	767 bp
	R1:5′ - CGCTGAATTCCATCAAAGGC -3′	
	F2:5′ - TGCTCGTGGCTCCTGTTTCGC -3′	447 bp
	R2:5′ - AGCAGTTGGCCGAAGGTGG -3′	

1.3 *AcOr1* 和 *AcOr2* 基因组 DNA 的扩增、克隆与测序

以提取的工蜂基因组 DNA 为模版, 用上述引物分别进行 PCR 扩增, PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 30 s, 52 ~ 58℃ 30 s, 72℃ 1 min, 32 个循环; 72℃ 延伸 8 min。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后进行割胶回收, 将回收产物连接到 pGM-T 载体上, 然后转化到 DH5 α 感受态细胞中, 挑取白色单克隆菌斑, 摇菌培养后提取质粒, 最后经 *EcoR* I 双酶切位点鉴定后选取阳性质粒送北京华大基因研究中心进行测序。

1.4 序列分析

测序结果首先在 NCBI 中经 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 搜索比对检查序列的正确性, 然后采用 DNAMAN 软件进行序列拼接, 拼接结果及各同源序列经 Clustal W 软件

进行比对分析, 最后利用 Mega4.0 中 Neighbor-Joining (NJ) 法构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 序列测定

通过对东方蜜蜂 DNA PCR 扩增产物的克隆、测序及序列拼接, 获得了 2 条气味受体部分基因组序列, 根据对应的西方蜜蜂气味受体序列, 分别命名为 *AcOr1* 和 *AcOr2* (GeneBank 登录号分别为: JN544931, JN544932)。*AcOr1* 序列长度为 1 247 bp, 包含 5 段外显子和 4 个内含子 (为全序列完整的内含子区), A + T 含量为 70.3%, G + C 含量为 29.8%; *AcOr2* 序列长度为 1 138 bp, 包含 3 段外显子和 2 个内含子, A + T 含量为 58.9%, G + C 含量为 41.1%。2 条序列的基因结构模式如图 1 所示。

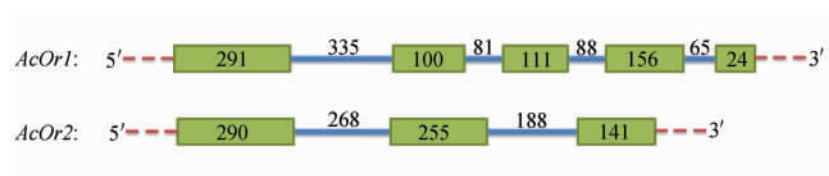


图 1 *AcOr1* 和 *AcOr2* 的基因结构模式图

Fig. 1 The ideograph of *AcOr1* and *AcOr2* gene structure

代表外显子, 代表内含子, 数字表示所得片段的长度。

represent exon region, represent intron region, numeral represent the length of exons or introns.

2.2 同源性比对

2.2.1 核苷酸序列分析 测序结果经 BLAST 搜索, 分别找到 2 条与 *AcOr1*、*AcOr2* 同源的序列进行多序列比对 (图 2, 3)。从图 2, 3 中可以看出, 两气味受体 DNA 序列长度在 3 个昆虫中差异较大, 但外显子区长度是较为保守的 (仅熊蜂 *Or2* 序列比东、西方蜜蜂 *Or2* 多出 3 个碱基)。通过序列比对分析得到: *AcOr1* 与 *AmOr1* 相似性为 84%, 与 *BtOr82a-like* 相似性为 56%, 其中内含子区相似性分别为 71% 和 28%。*AcOr2* 与 *AmOr2* 相似性为 80%, 与 *BtOr2* 相似性为 73%, 其中内含子区相似性分别为 64% 和 63%。

2.2.2 编码区氨基酸序列分析 对 *AcOr1*、*AcOr2* 外显子区分别进行拼接、翻译得出, *AcOr1*、*AcOr2* 外显子区分别编码 226 和 228 个氨基酸。经 BLAST 搜索后, 在结果中分别找出 6 条和 13 条与

其同源的膜翅目昆虫氨基酸序列 (图 4, 5)。序列比对结果表明, *AcOr2* 与 *AmOr2* 相似性最高, 达到 100%, 与 *CsOr2* 相似性最低, 为 66%; *AcOr1* 与 *AmOr1*, *AmOr3* 的相似性分别为 99%, 81%, 与 *NvOr9* 仅有 34% 的相似性。

2.3 聚类分析

根据 *AcOr1*、*AcOr2* 氨基酸同源性比对结果, 采用 Mega4.0 软件中的 NJ 法分别构建东方蜜蜂与其它膜翅目昆虫气味受体系统进化树 (图 6, 7)。从图 6 可以看出, 东方蜜蜂 *Or1* 与西方蜜蜂 *Or1* 及 *Or3* 之间, 丽蝇蛹集金小蜂 *Or2* 与 *Or9* 之间亲缘关系较近。而 *Or83b* 受体家族聚类树 (图 7) 能较好地反映昆虫间的进化关系, 从图 6, 7 中可以看出, 蜜蜂科昆虫与蚁科亲缘关系最近, 而与蜚蠊科及小蜂总科亲缘关系相对较远。

AcOr1	CAGGAGGAC	AACACGACTC	AGATACATT	GCCTTATTC	AGCGACTACG	TTTTCTCGT	AATCGAGAT	TGCGCGATT	ACGAGATGAC	TTTCCTATTC	CAATATTCA	TCAGCAGTAT	[120]
AmOr1	G..A..CT..T	..T..C.....	T.....	T..T..C.....	T..T..C.....	C.....A.....	C.....C.....	C.....C.....	G..T..CG..C.....	..G..G..G.....	TT..C.....		[120]
BiOr													[120]
AcOr1	TATTTTGTCT	ACGAATTGTG	GGACTTACAG	CTTGATCGCA	TCTATAACGA	TGCACGTGTTG	CGGCTGTTC	GAGGTTACCA	ATAGAAAGAT	CGAGACGCTT	TGCAGTGGG	ATAATCGGGA	[240]
AmOr1	C.....	C.....	A.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	[240]
BiOr	C..AA..A..	A..	A..T...T..	T..T.....	T..C.....	T.....	A.....	GA..	A.....	C..T..T..G.....	A..A..		[240]
AcOr1	TTTGCATCAT	CGTGTTATTC	ACATCGTTC	ATCTCATCTG	AAGCAATCC	AGTAAGTATA	TATTAT	-----	-----	-----	A-CAT--TAT	-----	[360]
AmOr1	A..C.....	CA..GC.....	T.....	A.....	A.....	GTTC	TACATAATAT	TTGATTAAAA	AAATATATAT	TATCAGTTAT	-----	-----	[360]
BiOr													[360]
AcOr1	GTTGTACATA	ATATTGACT	AAAAAATGT	AATTGTTAGT	TTATGTTTAT	TGCTTAAATA	GAGTCATATA	ATTGTCATAT	TGGCTGTTG	TTTAATTTTA	TGTAATACCA	TTTTTTTAAA	[480]
AmOr1	T.....	A..C.....	A..C.....	T..C.....	A..C.....	A..C.....	A..C.....	A..C.....	A..C.....	A..C.....	A..C.....	A..C.....	[480]
BiOr	..AA.....	T...G..C..TA	TT..TT..TGTG	T..AC..A--	..T..C..G..	..ATA..GT..AG	..TT..GTAC	..AAGAT..GCA	G..TT..A..AA	CCC..G	CAG..GGTCGT	GG..CC..A..	[480]
AcOr1	ATTTAATTTT	TTTATAAATA	CTCTTTTAT	AAATACCTAT	CGTTTTTACG	TTTATACATG	ATCTCTCTGT	TTTTTAT--	-----GT	CATCAGGACT	CTGCTTTTTT	ACTTATGTGT	[600]
AmOr1													[600]
BiOr													[600]
AcOr1	GTGATAGATT	ATTT--GTGGA	TTGCGATTGGC	TATTGATTTT	TATAGTATAT	GTTTTATTTT	CGTGA--	-----	-----	-----	-----	-----	[720]
AmOr1	A.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	[720]
BiOr	AAT..G..T..CA	T...ATCGTT	A..TA..AAT..T	C..AAT..C..A	..ACA.....	..A..AACAAA	T..AT..ATAT	ATATACTCTG	AAGTATACGA	ATATCTTACA	TCCACAGTAA	TAAACGAAT	[720]
AcOr1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[840]
AmOr1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[840]
BiOr	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[840]
AcOr1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[960]
AmOr1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[960]
BiOr	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[960]
AcOr1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[1080]
AmOr1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[1080]
BiOr	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[1080]
AcOr1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[1200]
AmOr1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[1200]
BiOr	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[1200]
AcOr1	ATGCTTTGCT	CGGTATCATC	CATCATCGCT	ACCATCGTCA	AGGTATTCGA	TGCAATATTT	TGTCGATAGC	AATATGACCT	CGACCATACA	CCTAGTTAAT	TTTCACATAA	TATCTATTTA	[1320]
AmOr1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[1320]
BiOr	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[1320]
AcOr1	AAATGCTTGG	TTGCGCATCC	ATAATATCTT	TCTTCAATTT	TGCTCTATTC	ATGCTATACG	AAAAAT--AGT	ATTAGTTTAA	AAATTT--A	CAAAAAAACA	A--ATAAATG	ATAAATAA	[1440]
AmOr1	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	[1440]
BiOr	..G...A..	..C..T.....	..G.....C..	..C.....	..C..G..T	..G...G..T..A..	..A..C.....	..C..C..G--	..A..G..TT..	..C.....	..G..T..T..	..G..T..T..	[1440]
AcOr1	ATTAAAAATA	TTTTTAGGAA	TTGGAAGATC	ATAAACAATT	GAGCACAATA	ACGTATTTTG	TTTAAATGAC	GTCAATTTTC	GTAATGTGT	TCATATATTC	GTTATTTGGT	GACCGTCTCA	[1560]
AmOr1	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	[1560]
BiOr	..CC..GT..	G.....	G.....	C.....	C.....	A.....	A.....	A.....	C.....	T.....	C.....	T.....	[1560]
AcOr1	AACAGAGGCT	AT-----AT	TTTCTAA--TA	--CATTTATC	T-----TGT	CTCGAATAAA	TT-----T--G	TTAATTTTAA	TTTTTCTCGA	-----AATATC	GTTCATATA	TTAAAAAGAG	[1680]
AmOr1	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	[1680]
BiOr													[1680]
AcOr1	TCAGCAATA	AGAGAAACAT	CATATTTCAT	ACCATGTCAC	GATTTTCCAA	CGGAAGTGGC	AAAAAATATA	AAGCAATCA	TACTTAGAGC	CAGTCAGCCA	TCAGTCTGT	CTGGGCCCCA	[1800]
AmOr1	C.....	G..C..TC..	G.....	GT	T..A..C..AA..	T..G..G..G..	G.....	A.....	T..ATT..	G..T.....	T.....	T.....	[1800]
BiOr													[1800]
AcOr1	CATATTAGAT	CTTTCTCTTC	AAGCATTTTG	CGATGTAAAT	CTTAATATAT	ATGTTTATAT	ATTTTTCATT	TATTCTGTGA	AAAT-----	-----CAAAA	AA--TTATT	GTAGGTTTGC	[1920]
AmOr1	G..G.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	[1920]
BiOr													[1920]
AcOr1	AAACCTTCGG	CAGCCTAC	[1938]	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[1938]
AmOr1	-----	-----	[1938]	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[1938]
BiOr	-----	-----	[1938]	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[1938]

图2 *AcOr1* 核苷酸序列与其它昆虫相应序列的比对Fig.2 Nucleotide sequences alignment of *AcOr1* with that of other insects

—代表相同的碱基; - - - 代表缺少的碱基;下划线部分是外显子区。

—represent the same base; - - - represent the missing base; sequences above the underline are exon.

AcOr1: *Apis cerana* Or1 (JN544932); *AmOr1*: *Apis mellifera* Or1 (NC_007071.2);*BiOr*: *Bombus terrestris* Or82a-like (NC_015763.1).

3 讨论

昆虫的气味受体和味觉受体在氨基酸序列上是高度分化的,基因的重复和缺失,以及在特定神经元中的低表达特点,使得对它们的鉴定高度地依赖基因组测序工作(Clyne *et al.*, 1999; Vosshall and Stocker, 2007)。目前已有10余种昆虫的气味受体得到了全面的鉴定,这为它们近缘种昆虫相应受体的鉴定奠定了基础。本试验试图以东方蜜蜂的近缘种西方蜜蜂气味受体 *Or1* 及 *Or2* 序列为参照,在外显子区设计引物对东方蜜蜂相应基

因的DNA序列进行扩增,结果发现,东、西方蜜蜂两气味受体在序列长度上存在较大差异,东方蜜蜂与西方蜜蜂 *Or1* DNA长度分别为1 247 bp、1 286 bp, *Or2* DNA长度分别为1 138 bp、1 833 bp。西方蜜蜂两气味受体的基因组长度均长于东方蜜蜂的基因组长度。

从生物进化的角度来看,内含子的进化速率很快,保守程度远低于外显子,对内含子序列的比较研究,可以为我们研究近缘种的进化提供线索。从试验结果可以看出,同属的东方蜜蜂和西方蜜蜂气味受体基因 *Or1*、*Or2* 的外显子区同源性能达

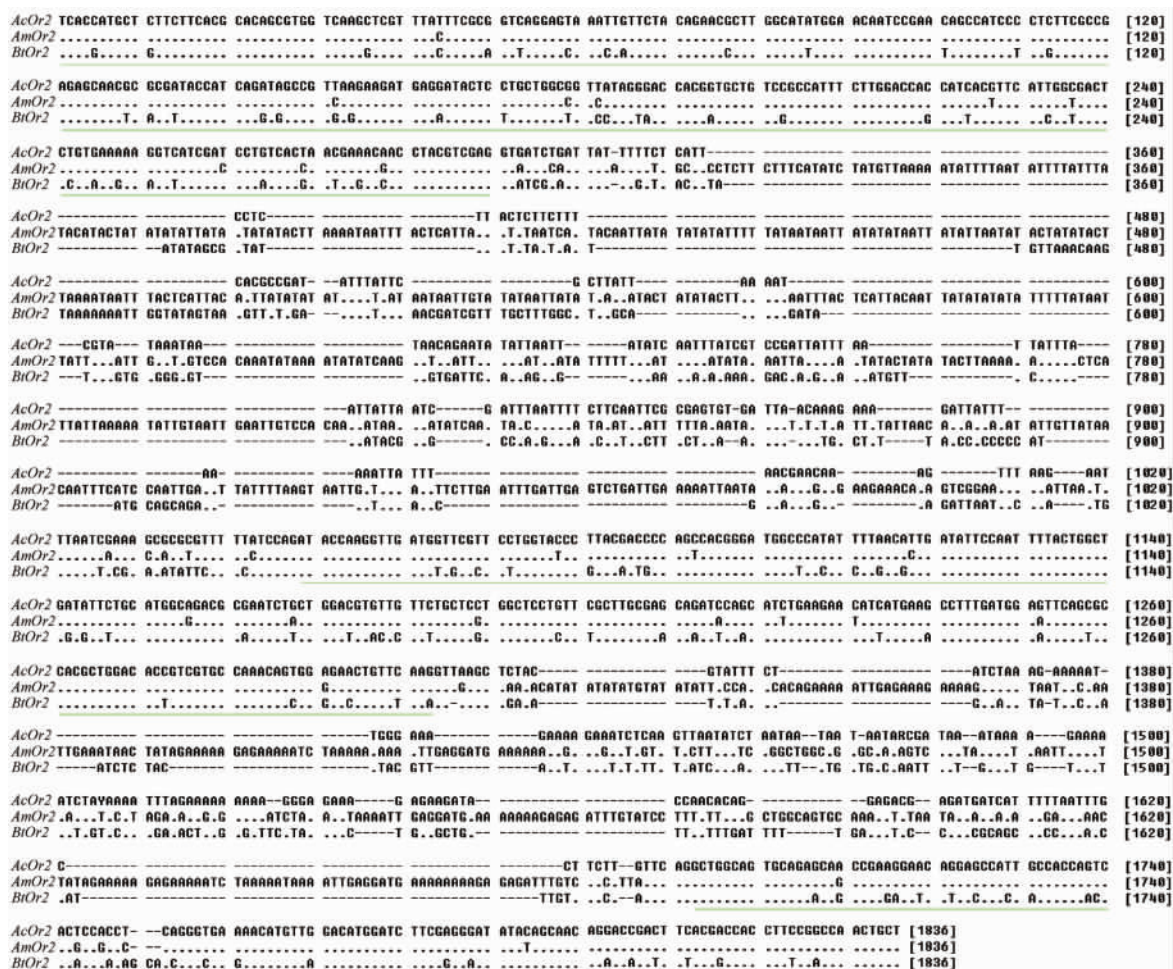


图3 *AcOr2* 核苷酸序列与其它昆虫相应序列的比对

Fig.3 Nucleotide sequences alignment of *AcOr2* with that of other insects

——代表相同的碱基; - - - -代表缺少的碱基;下划线部分是外显子区。

——represent the same base; - - - - represent the missing base; sequences above the underline are exon.

AcOr2: *Apis cerana* Or2 (JN544931); *AmOr2*: *Apis mellifera* Or2 (NC_007070);

BtOr2: *Bombus terrestris* Or2 (NW_003566036).

到99%以上,而内含子区同源性较低,仅为71%和64%,这与王妮娜(2008)研究的2个榕小蜂近缘种 *Or83b-like* 基因同源性的结果相似。从核苷酸序列比对图可以看出, *AcOr1*、*AcOr2* 与西方蜜蜂和熊蜂相应基因在序列长度上存在较大差异,而这种差异绝大部分存在于内含子中,且亲缘关系的远近与内含子的差异存在相关关系,亲缘关系越远,内含子的差异就越大。

氨基酸序列比对结果显示, *AcOr2* 与其它膜翅目昆虫 *Or83b* 类基因具有较高的同源性,证明 *AcOr2* 属于 *Or83b* 家族。另外,经比对搜索可以看出, *Or83b* 受体家族与其它气味受体间没有同源

性,而传统气味受体间却可能存在同源现象,如 *AmOr1* 与 *AmOr3* 之间, *NvOr2* 与 *NvOr9* 之间有相似区域,且从其基因定位图中可以看到,这些基因均位于同一染色体上,表明这些气味受体可能是由同一基因分化而来的。

参考文献 (References)

- Benton R, Sachse S, Michnick SW, Vosshall LB, 2006. A typical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors in vivo. *PLoS Biol.*, 4 (2): 240—257.
- Clyne PJ, Warr CG, Freeman MR, Lessing D, Kim J, Carlson

AcOr1	KEDNTTQIPL	PYLSDYVFFV	IEDSPIYEMT	FVLQIFISSI	ILSTNCGTYS	LIASITHMCC	GLFEVTNRKI	ETLCKWNNRD
AmOr1								K.....
BtOr82a-like	.A.....	...N.I..T	V.N.....I.		I..		S.R.	...H...KC.
BiOr82a-like	.A.....	I..T	V.N.....I.		I..		S.R.	...H...KC.
AmOr3	.A..S.....	T..I.	..V.M.T.FL	.M.L.Y.I..			R.	..IL.---
NvOr2	RS...M...	..P.E...I	V...L..IV	..T..L...	T.V..	...CVV...	C....SNRA	.K.LRGHKY.
NvOr9	MRG.VSLR..	A.P.YF...N	PQIR..WDYV	..THCMGLV	RY.VT..V..	TAILCI..I.	SQITI.SSML	DR.VENFDNM
AcOr1	-----LHD	RVIDIVQSHL	KAIEYSARVG	ESLSIVFLSE	MLGCTIICF	LEFGVIMELE	DHKTLSTVTY	FVLMTSIFVN
AmOr1	-----							
BtOr82a-like	-----	..V...Y..	E..G...LI.	K.....	.V.....		L..	
BiOr82a-like	-----	..V...Y..	E..G...LI.	K.....	.V.....	W.	L..	
AmOr3	-----RG	.IA..I....	L..	K.....		V.W.	...F.M...	...V..M...
NvOr2	KSKISPE.GK	KLSELIDF.V	...Q.AETHE	NA.N..M...	.G.....	..Y.ILQD..	..REY.GM...	IM.....
NvOr9	-----LLGK..TQ..	RFLKFASKLE	DLFNQIC.V.	V..S.C....	.GYL.T.Y.	QREPIA....	.L.LC.FVF.	
AcOr1	VFIISFIGDR	LKQESERIRE	TSYFIPWYDF	PTE-VAKNIK	TIILRASRPS	SLSGAKILDL	SLQAFCDVCK	TSAA
AmOr1								E.
BtOr82a-like		G.	...L....	.VD-....N	..M..T.L..	C...N..E.		
BiOr82a-like		G.	...L....	.VD-....N	..M..TRL..	C...N..EI		
AmOr3	L.....	GQ	...L...E.	..-I....R	I.....	M...	..RV....F.	
NvOr2	...L.YV..K	V.EQ..A.GF	SA.SMQ.V.L	.N.FIM.DL.	FMHA..NQ.T	R.TAG.LF..	...G....A.	..M.
NvOr9	I..LCY..EI	.TEQC.S.GT	.A.M.R..HL	SGK-E.R.VV	L..ASTQ..V	VMTAG.MVN.	...S.TN.I.	A..S

图4 AcOr1 氨基酸序列与其它膜翅目昆虫相应序列比对图

Fig. 4 Amino acid sequences alignment of AcOr1 with that of other insects in Hymenoptera

——代表相同的氨基酸。

——resperant same amino acid.

AcOr1: *Apis cerana* (Or1 JN544932); AmOr1: *Apis mellifera* (OR1 XP_001121080); Bt Or82a-like: *Bombus terrestris* (XP_003393987); Bi Or82a-like: *Or82a-like Bombus impatiens* (XP_003484569); AmOr3: *Apis mellifera* Or3 (XP_003250769); NvOr2: *Nasonia vitripennis* Or2 (NP_001177429); NvOr9: *Nasonia vitripennis* Or9 (NP_001177435).

- JR, 1999. A novel family of divergent seven-transmembrane proteins: candidate odorant receptors in *Drosophila*. *Neuron*, 22 (2): 327—338.
- Field LM, Pickett JA, Wadhams LJ, 2009. Molecular studies in insect olfaction. *Insect Mol. Biol.*, 9 (6): 545—551.
- Hallem EA, Dahanukar A, Carlson JR, 2006. Insect odor and taste receptors. *Annu. Rev. Entomol.*, 51: 113—135.
- Krieger J, Klink O, Mohl C, Raming K, Breer H, 2003. A candidate olfactory receptor subtype highly conserved across different insect orders. *J. Comp. Physiol. A*, 189 (7): 519—526.
- Larsson MC, Domingos AI, Jones WD, Chiappe ME, Amrein H, Vosshall LB, 2004. *Or83b* encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron*, 43 (5): 703—714.
- Marshall B, Warr CG, Bruyne M, 2010. Detection of volatile indicators of illicit substances by the olfactory receptors of *Drosophila melanogaster*. *Chem. Senses*, 35: 613—625.
- Nichols AS, Chen S, Luetje CW, 2011. Subunit Contributions to insect olfactory receptor function: Channel block and odorant recognition. *Chem. Senses*, 36 (9): 781—790.
- Nichols AS, Luetje CW, 2010. Transmembrane segment 3 of *Drosophila melanogaster* odorant receptor subunit 85b contributes to ligand-receptor interactions. *J. Biol. Chem.*, 16 (285): 11854—11862.
- Patch HM, Velarde RA, Walden KK, Robertson HM, 2009. A candidate pheromone receptor and two odorant receptors of the hawkmoth *Manduca sexta*. *Chem. Senses*, 34 (4): 305—316.
- Robertson HM, Gadau J, Wanner KW, 2010. The insect chemoreceptor superfamily of the parasitoid jewel wasp *Nasonia vitripennis*. *Insect Mol. Biol.*, 19 (Suppl. 1): 121—136.
- Robertson HM, Wanner KW, 2006. The chemoreceptor superfamily in the honeybee *Apis mellifera*: expansion of the odorant, but not gustatory, receptor family. *Genome Res.*, 16 (11): 1395—1403.
- Robertson HM, Warr CG, Carlson JR, 2003. Molecular evolution of the insect chemoreceptor superfamily in *Drosophila melanogaster*. *PNAS*, 100 (Suppl. 2): 14537—14542.
- Sato K, Pellegrino M, Nakagawa T, Vosshall LB, Touhara K, 2008. Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. *Nature*, 452 (7190): 1002—1006.
- Vosshall LB, Stocker RE, 2007. Molecular architecture of

AcOr2	TMLFFTHSVV	KLVIYFAVRK	LFYRTLGIWN	NPNSHPLFAE	SNARYHQIAV	KKMRILLAV	IGTTVLSAIS	WTTITFIGDS
AmOr2	I	.V.....			V	R.....	LA..M.....	..S.....
BiOr7	I	.V.....			V	R.....	LV..M.....	..S.....
BtOr7	I	.V.....			V	R.....	LV..M.....	..S.....
SiOr	.L.....I	.V.....I	Y...WA...		A..L	...L..FL	G....A..LA	...L..FEHP
MmOr1	.I...L.TLI	.I...A...	Y...A...		S..L	T.V.R..FC	GAA..ATT..	...L..FE.P
AeOr7	.L.....I	.V.....I	Y...WA...		A..L	...L..FL	GV...T.VA	...L..FEHP
NvOr1	L.PI.	.MI..P...	I..K..A...		...F.AL.I	T...R..FC	A.A..IF.V..	..G...VDE.
CsOr2	V.P..	.VI..PI...	M..K..A...		...SL.I	T...R..FC	AAA..F.V..	..G...MDE.
CfOr7	.L.....I	.V.....I	Y...WA...		A..L	...L..FL	GA...T..A	..VL..FEHP
PpOr2	L.PI.	.II..L...	I..K..A...		...L.AL.	T...R..FC	A.A..IF.V..	..G...ADE.
HsOr7	.L.....I	.II.....	Y...WA...		A..L	...L..FL	GA.....A	..VL..FEHP
AbOr2	L.PI.	.MI..P...	I..K..A...		...F.AL.I	T...R..FC	A.A..IF.V..	..G...E..
PsOr2	L.PI.	.MI..L...	I..K..A...		...F.AL.	T...R..FC	A.A..IF.V..	..G...VDE.
AcOr2	VKKVIDPVTN	ETTYVEIPRL	MVRSWYPYDP	SHGMAHILTL	IFQFYWLIFC	NADANLLDVL	FCSWLLFACE	QIQHLKNIMR
AmOr2								
BiOr7	I..		.L.....NA		V..			
BtOr7	I..		.L.....NA		V..			
SiOr	.R.IV..I..	..EVIQL.Q.	L...F..F.A	.K.VT.V.V.	.Y...VL.H	LIN..S...		..L...Q...
MmOr1	HVERLNKE..	..YIE....	L...F..F.A	R..V...GH.	.Y.I...FI.	TV...SI..		..L...A...
AeOr7	IR.LV..I..	..IIQL.Q.	L...F..F.A	R.IT...I.	.Y...VF.H	LVN..S...		..L...Q...
NvOr1	..RIV..E..	..IIP....	.I.TF..FNA	MS.AG.VFA.	.Y...Y..IS	..IS.S...		..L...A...
CsOr2	..RI...E..	..ITP....	.I.TF..UNA	MS.AG.VFS.	FY...Y.AIV	..IS.S...		..L...A...
CfOr7	IR.LV...E..	..II.L.Q.	L...F..F.A	R.IK...V.	.Y...VL.H	LIN..S...		..L...Q...
PpOr2	..RI...AE..	..VIP....	.I.TF..FNA	MS.AG.VFA.	.Y...Y..IS	..VS.S...		..L...A...
HsOr7	IR.LV...E..	..II.L.Q.	LL..Y..F.A	.K.IM.VIV.	.Y...VL.H	LI...S...		..L...Q...
AbOr2	..RIT..E..	..IIP....	.I.TF..FNA	MS.AG.VFA.	.Y...Y.VIS	..VS.S...		..L...A...
PsOr2	..RI...AE..	..IIP....	.I.TF..FNA	MS.AG.VFA.	.Y...Y..IS	..VS.S...		..L...A...
AcOr2	PLMEFSATLD	TVVPNSGELF	KAGSAEQPKE	Q---EPLPP	VTPPQ-GENM	LDHDLRGIYS	NRTDFTTTFR	PT
AmOr2				-----				
BiOr7			.S.....RD	H---D....	T..TAP...		..A...	..
BtOr7			.S.....RD	H---D....	T..TAP...		..A...	..
SiOr	L.....	S...	DHLR.	S-ENNQ.P.	---ND...	..L...N...	..Q...A...	..
MmOr1	L.....	S...	DHLR.	N---DGV.A	-E.AMN.D..		..Q...A...	..
AeOr7	L.....	S...	DHLR.	SNENNQ.P.	SAAA-.D..	..L...N...	..Q...A...	..
NvOr1	L.....	S...	DHLR.	S---QGV--	-Q.SGN.D.V	..V.....	..Q...A...	..
CsOr2	L.....	S...	DHLR.	T---QGV--	-Q.SGN.D.I	V.V.V....	..Q...A...	..
CfOr7	L.....	S...	DHLR.	S-ENNQSOL.	-A...-DS.	..L...N...	..Q...A...	..
PpOr2	L.....	S...	DHLR.	S---QGI--	-Q.SGN.D.V	..V.....	..Q...A...	..
HsOr7	L.....	S...	DHLR.	S-EN-Q.P.	-V...-DS.	..L...N...	..Q...A...	..
AbOr2	L.....	S...	DHLR.	S---QGV--	-Q.SGN.D.V	..V.....	..Q...A...	..
PsOr2	L.....	S...	DHLR.	S---QGI--	-Q.SGN.D.V	..V.....	..Q...A...	..

图5 AcOr2 氨基酸序列与其它膜翅目昆虫相应序列比对图

Fig.5 Amino acid sequences alignment of AcOr2 with that of other insects in Hymenoptera

—代表相同的氨基酸; - - - 代表缺少的氨基酸。

—resperant the same amino acid; - - - resperant the missing amino acid.

AcOr2: *Apis cerana* Or2 (JN544931); AmOr2: *Apis mellifera* Or2 (NP_001128415); BiOr7: *Bombus impatiens* Or7 (XP_003494153); BtOr7: *Bombus terrestris* Or7 (XP_003402775); SiOr: *Solenopsis invicta* Or (EFZ15266); MmOr1: *Microplitis mediator* Or1 (ABM05966); AeOr7: *Acromyrmex echinator* Or7 (EGI63650); NvOr1: *Nasonia vitripennis* Or1 (NP_001164465); CsOr2: *Ceratosolen solmsi marchali* Or2 (ABY51614); CfOr7: *Camponotus floridanus* Or7 (EFN70194); PpOr2: *Philotrypes pilosa* Or2 (ABY51616); HsOr7: *Harpegnathos saltator* Or7 (EFN84180); AbOr2: *Apocrypta bakeri* Or2 (ABY51615); PsOr2: *Philotrypes* sp. Or2 (ABY51617).

smell and taste in *Drosophila*. *Annu. Rev. Neurosci.*, 30: 505—533.

Wanner KW, Nichols AS, Walden KK, Brockmann A, Luetje CW, 2007. A honeybee odorant receptor for the queen substance 9-oxo-2-decenoic acid. *PNAS*, 104 (36): 14383—14388.

Weinstock GM, Robinson GE, Gibbs RA, Worley KC, Evans JD, Maleszka R, 2006. Insights into social insects from the

genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, 443 (7114): 931—949.

Wicher D, Schfer R, Bauernfeind R, Stensmyr MC, Heller R, Heinemann SH, Hansson BS, 2008. *Drosophila* odorant receptors are both ligand-gated and cyclic-nucleotide-activated cation channels. *Nature*, 452(7190): 1007—1011.

Wistrand M, Kall L, Sonnhammer EL, 2006. A general

model of G protein-coupled receptor sequences and its application to detect remote homologs. *Protein Sci.*, 15 (3):509—521.

曾志将, 2002. 养蜂学. 北京: 中国农业出版社. 12.

王妮娜, 2008. 昆虫嗅觉受体 *Or83b-like* 基因内含子的进化研究. 硕士学位论文. 泰安: 山东农业大学.

杨冠煌, 2001. 中华蜜蜂. 北京: 中国农业科技出版社. 1—281.

张帅, 张永军, 苏宏华, 高希武, 郭予元, 2009. 棉铃虫气味受体的克隆与组织特异性表达. *昆虫学报*, 52 (7): 728—735.

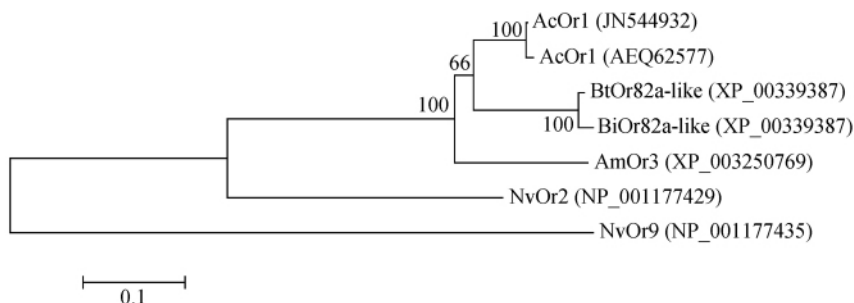


图 6 AcOr1 与其同源序列的系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree of AcOr1 with its homology genes of other insects

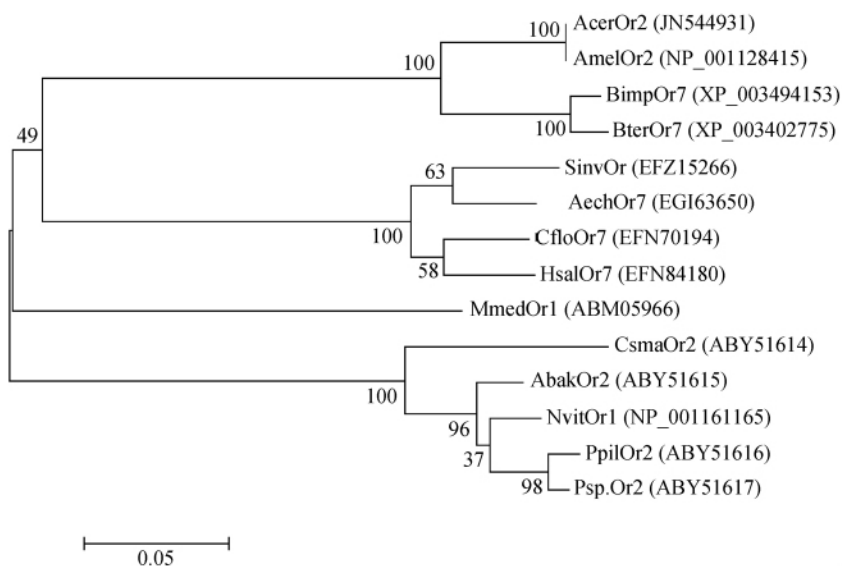


图 7 AcOr2 与其同源序列的系统进化树

Fig. 7 Phylogenetic tree of AcOr2 with its homology genes of other insects