

光肩星天牛性信息素结合蛋白 AglaPBP1 和 AglaPBP2 基因鉴定和表达分析*

王菁桢** 胡 平 骆有庆 陶 静***

(北京林业大学林木有害生物防治北京市重点实验室, 北京 100083)

摘 要 【目的】为了鉴定光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis* (Motsch.) 的性信息素结合蛋白 PBP 基因并明确其在雌雄成虫不同部位的表达差异。【方法】本文基于光肩星天牛触角转录组测序数据, 通过 blast 比对得到 2 条 PBP 基因片段, 克隆测序得到 2 条 PBP 基因的全序列, 并进行生物信息学分析。采用 Real-time PCR 方法分析了 2 条 PBP 基因在光肩星天牛雌雄成虫间的表达差异。【结果】克隆得到性信息素结合蛋白基因, 命名为 AglaPBP1 (GenBank 登录号: KX272639) 和 AglaPBP2 (GenBank 登录号: KX272640)。AglaPBP1 开放阅读框长为 411 bp, 编码 136 个氨基酸, 预测分子量为 15.02 ku, 等电点为 4.22, AglaPBP2 开放阅读框长为 408 bp, 编码 135 个氨基酸, 预测分子量为 15.00 ku, 等电点为 5.16。AglaPBP1 和 AglaPBP2 都有完整的信号肽, 分别位于 1-21 位氨基酸和 1-19 位氨基酸。AglaPBP1 和 AglaPBP2 氨基酸序列中均有 6 个保守的半胱氨酸残基, 与云斑天牛 *Batocera horsfieldi* (Hope) BhorPBP1 和 BhorPBP2 的同源性分别为 74% 和 49%。qPCR 结果显示: AglaPBP1 在雌雄虫触角、下颚须, 以及雌虫足中均有表达, 且雌虫触角表达量高于雄虫。AglaPBP2 仅在雄虫触角中显著表达, 在雌雄虫的下颚须中也有少量表达。【结论】克隆获得了 AglaPBP1 和 AglaPBP2 基因序列, 并明确了这两个基因在成虫不同部位的表达情况, 为进一步研究其功能, 从而为更好地了解 PBP 在光肩星天牛嗅觉识别过程中的作用奠定了基础。

关键词 光肩星天牛, 性信息素结合蛋白, 克隆, 表达谱分析

Identification and expression patterns of the pheromone binding protein genes AglaPBP1 and AglaPBP2 in *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae)

WANG Jing-Zhen** HU Ping LUO You-Qing TAO Jing***

(Beijing Key Laboratory for Forest Pest Control, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract 【Objectives】To identify pheromone binding protein (PBP) genes in *Anoplophora glabripennis* (Motsch.) and detect their differential expression in different organs in males and females of this species. 【Methods】Two PBP gene fragments were obtained by blast based on a previously established antennal transcriptome. Complete sequences were obtained by cloning and sequencing, after which bioinformatic methods were employed. Real-time PCR was used to detect the expression patterns of PBP genes in different sexes. 【Results】Two PBP genes were obtained from *A. glabripennis*; AglaPBP1 (GenBank accession no. KX272639) and AglaPBP2 (GenBank accession no. KX272640). The open reading frame of AglaPBP1 is 411 bp, encoding 136 amino acid residues with a predicted molecular weight and isoelectric point of 15.02 ku and 4.22, respectively. The open reading frame of AglaPBP2 is 408 bp, encoding 135 amino acid residues with a predicted molecular weight and isoelectric point of 15.007 ku and 5.16, respectively. AglaPBP1 and AglaPBP2 both have signal peptides at 1-21 and 1-19. Both AglaPBP1 and AglaPBP2 are characterized by six conservative cysteine (Cys) residues. The two genes

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金 (31300546)

**第一作者 First author, E-mail: wjz0707@bjfu.edu.cn

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: taojing1029@hotmail.com

收稿日期 Received: 2016-05-23, 接受日期 Accepted: 2016-07-08

have about 74% and 49% similarity with the PBP genes of *Batocera horsfieldi* (Hope). qPCR analysis indicated that AglaPBP1 was expressed in the antennae, maxillary palps and legs, and that expression in female antennae was higher than in male antennae. AglaPBP2 was almost specifically expressed in male antennae. **[Conclusion]** Clarifying AglaPBP1 and AglaPBP2 expression in different organs lays a foundation for further study of the function of these genes and the molecular mechanisms underlying insect olfaction in general.

Key words *Anoplophora glabripennis*, pheromone binding proteins, cloning, expression analysis

在大多数昆虫中,性信息素是由同种个体所分泌的,被其异性个体所感知,并引起该异性发生相应的行为反应的微量化学物质(朱彬彬, 2005)。利用昆虫依靠性信息素寻找配偶这一特点,人工合成性诱剂已用于害虫的诱捕和交配干扰,并取得了良好的效果(杜娟等, 2013)。昆虫的嗅觉感器淋巴液内大量分布着性信息素结合蛋白(Pheromone binding proteins, PBPs),在昆虫感受信息素的嗅觉反应中,信息素结合蛋白发挥了重要的作用(朱彬彬, 2005)。性信息素结合蛋白首次被发现是在多音天蚕蛾 *Antheraea polyphemus* 雄蛾触角中(Vogt and Riddiford, 1981),属于气味结合蛋白(Odorant-binding protein, OBPs)的一个亚类(修伟明等, 2005)。关于昆虫的性信息素感受机制,目前普遍认为,PBPs能感受雌虫发出的性信息素与其特异性的结合,并携带脂溶性的性信息素进入感器淋巴液中到达嗅觉神经元树突膜上激活性信息素受体(Pheromone receptors, PRs),然后产生一系列脉冲信号传输至中枢神经,进而指导昆虫做出一系列的行为反应,如完成交配繁衍后代(谷少华, 2013; Kaissling, 2013)。

昆虫 OBPs 主要包括信息素结合蛋白(Pheromone-binding proteins, PBPs),普通气味结合蛋白(General odorant-binding proteins, GOBPs)以及触角结合蛋白(Antennal-binding proteins, ABPs)(李慧等, 2010)。同一种昆虫体内可以存在多种性信息素结合蛋白 PBPs (Vogt *et al.*, 1981)和多种普通气味结合蛋白 GOBPs (Vogt *et al.*, 1991)。性信息素结合蛋白作为 OBPs 的一类,包含气味结合蛋白的典型特征,是一种水溶性球状蛋白,分子量为 15~17 ku, 包含有 120~150 个氨基酸。OBPs 蛋白质为酸性,等电点多

在 4.4~5.2 之间,在 N 末端有一个信号肽切割位点,(李慧等, 2010)。PBPs 中 6 个半胱氨酸残基组成二硫键支持 6 个螺旋形成结合位点(Briand *et al.*, 2001)。相关研究表明,昆虫 PBPs 序列保守性在 32%~92% 之间,同源性较高(Mohanty *et al.*, 2008)。一般认为 PBPs 主要在雄虫的触角中大量表达,特别是存在于对雌性性激素敏感的感器中,如毛形感受器(Trichoidsensilla)等(Pelosi *et al.*, 2006)。目前,多种昆虫的 PBPs 基因已经克隆得到,其中部分昆虫 PBPs 在不同组织的表达情况也进行了分析,如家蚕 *Bombyx mori* BmPBP2 和 BmPBP3 在成虫触角中特异表达,且雌雄表达水平相当(龚达平等, 2006);甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (Hübner) SexigPBP1 和 SexigPBP2 雌雄虫触角内均有表达,在其他组织不表达(修伟明等, 2005);小地老虎 *Agrotis ypsilon* Rottemberg PBP1-3 基因主要在雄性触角中表达,同时在喙和下唇须中也有少量的表达(Gu *et al.*, 2013)。PBPs 的生理功能主要为结合并运输特异的性信息素(Gu *et al.*, 2013),同时也具有信息素去活化的功能,以便受体恢复敏感性(Kaissling, 2013)。

光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis* (Motsch.) 属于鞘翅目(Coleoptera),天牛科(Cerambycidae),星天牛属 *Anoplophora*。该虫是我国重要的林木蛀干害虫,严重危害杨树、柳树、槭树、榆树等阔叶树种。目前昆虫的性信息素方面的研究多集中于鳞翅目昆虫,鞘翅目昆虫性信息素研究相对较少。已有研究表明,光肩星天牛的性信息素由雌虫释放,属于接触性信息素,挥发性较低,化学成分为:(Z)-9-二十三碳烯,(Z)-9-二十五碳烯,(Z)-7-二十五碳烯,(Z)-9-二十七碳烯,(Z)-7-二十七碳烯,比例为 1:2:2:8:1

(Zhang *et al.*, 2003)。在寄主植物的挥发物中, α -蒎烯、 β -蒎烯、月桂烯、苧烯和 β -水芹烯等单萜类物质可能对光肩星天牛成虫取食起着定向作用(罗亚平, 2013)。目前已开发出了光肩星天牛的植物源和性信息素引诱剂, 用于林间种群的监测和防治, 并取得了良好效果(Hansen *et al.*, 2015)。然而, 光肩星天牛识别性信息素以及植物挥发物的分子机制等问题尚未得到解决。此前, 仅有少量的光肩星天牛气味结合蛋白 Agla-OBP1、Agla-OBP2 基因和化学感受蛋白 Agla-CSP1 基因得到了克隆(王伟, 2010)。本文基于本实验室光肩星天牛的触角转录组测序数据(Hu *et al.*, 2016), 克隆得到了两个光肩星天牛性信息素结合蛋白基因 AglaPBP1 和 AglaPBP2, 利用生物信息学方法进行序列分析, 并使用 qPCR 方法检测了这两个 PBP 基因的组织表达情况。本研究为进一步研究其功能, 明确昆虫气味识别的分子机制奠定了基础, 同时, 对于开辟有效的行为调控技术进行防治, 例如研制对昆虫两性均有吸引力的高效引诱剂和阻断昆虫识别性信息素的信息素嗅觉抑制剂, 都具有非常重要的应用价值。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

从北京市大兴区采回光肩星天牛幼虫危害的柳树枝条, 置于养虫笼中室温条件下饲养。待其羽化, 用解剖手术刀切取实验所需雌雄成虫触角、足、下颚须(下唇须), 立即放入 RNAlater, 然后置于 -80°C 保存备用。

1.2 实验方法

1.2.1 光肩星天牛各组织总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成 取光肩星天牛雌雄成虫触角、足、下颚须(下唇须)各 50 mg, 按照 Trizol 试剂说明书进行总 RNA 提取, RNA 置于 -80°C 保存。用 TAKARA 公司反转录试剂盒 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (perfect Real Time) 合成 cDNA 第一条链, 置于 -20°C 冰箱保存备用。

1.2.2 光肩星天牛 PBP 基因的克隆 通过 AglaPBPs 基因序列(图 1), 运用在线软件 primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) 设计特异性引物(表 1)。将目的基因 AglaPBP1、AglaPBP2 的 PCR 扩增, 反应体系为 15 μL : cDNA 2 μL , Mix 5 μL , 上下游引物各 1 μL , ddH₂O 补足至 15 μL 。反应条件为: 95°C 预变性 2 min, 95°C 30 s, 55°C 1 min, 72°C 1 min, 34 个循环, 72°C 延伸 10 min。将产物回收、纯化, 然后与 pGM-T 载体连接, 再转化到感受态大肠杆菌 TOP-10 菌株中(天根 DNA 克隆试剂盒)。筛选阳性克隆, 随机挑选 5 个克隆, 委托北京擎科生物技术有限公司进行双向测序。

1.2.3 光肩星天牛 PBP 基因的生物信息学分析 将克隆得到的序列进行生物信息学分析, 与 NCBI 库中的基因序列进 Blast 比对, 在线软件 ORF Finder 确定 AglaPBP1 和 AglaPBP2 的开放阅读框(Open reading frame, ORF), 根据获得的 AglaPBPs 全长的基因利用 DNAMAN 翻译成氨基酸序列, 运用 ExPASy 对蛋白质分子量、等电点、疏水性进行预测。信号肽预测使用在线软件 SignalP4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), 蛋白二级结构预测工具 PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) 预测分析 α -螺旋(α -helice)的数目。从 GenBank 上下载其它鞘翅目昆虫的 OBPs, 应用 Clustalx 软件进行氨基酸序列比对。利用 MEGA 5.1 软件邻位相连法(Neighbour-Joining)构建 AglaPBPs 与其他昆虫 PBP 的系统进化树, 并对结果进行 1 000 次 Bootstrap 统计学验证。

1.2.4 光肩星天牛 PBP 基因实时荧光定量 PCR TakaRa 公司的 SYBR Premix Ex TaqTM II 定量分析 PBP 在光肩星天牛雌雄成虫不同组织间的表达水平。以本实验室转录组测序结果中比对到 Actin 基因为内参基因, 以此研究中 AglaPBPs 的测序结果设计荧光定量引物(表 1), 上述保存的 cDNA 为模板, 无菌水为阴性对照, 在定量 PCR (CFX96 Real-Time System (BioRad)) 仪器中进行荧光定量 PCR 扩增。每个样品做 3 个重复, 反应体系为 25 μL : SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2 $\times$) 12.5 μL ,

正反向各引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , cDNA 2 μL , ddH₂O 8.5 μL 。反应程序: 95°C变性 30 s, 95°C变性 5 s, 60°C退火 30 s, 72°C延伸 20 s, 共 40 个循环。反应结束后, 收集 AglaPBPs 基因及内参基因 Actin 的 Ct 值, 利用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 相对定量法计算 AglaPBPs 基因在不同组织的表达量差异。

2 结果与分析

2.1 光肩星天牛 AglaPBP 基因的克隆与序列分析

第一链 cDNA 为模板, 通过 AglaPBPs 基因序列, 设计特异性引物 (表 1)。PCR 扩增克隆测序结果得知, AglaPBP1 和 AglaPBP2 的序列长度分别为 822 bp 和 607 bp, AglaPBPs 蛋白质氨基酸序列。AglaPBP1 开放阅读框全长 411 bp, 编码 136 个氨基酸残基, 预测分子量和等电点分别为 15.029 ku 和 4.22; AglaPBP2 开放阅读框全长 408 bp, 编码 135 个氨基酸残基, 预测分子量 15.007 ku, 等电点 5.16 (表 2), 以上特点都符合昆虫性信息素结合蛋白 PBPs 的特征且与预期结果一致。各种碱基含量为: AglaPBP1: 219 T (26.6%)、162 C (19.7%)、251 A (30.5%)、190 G (23.1%)。获得序列 A+T 的含量为 57.1%, A+T 含量明显高于 G+C 含量 (42.9%); AglaPBP2: 195 T (32.1%)、93 C (15.3%)、190 A

(31.3%)、129 G (21.3%)。获得序列 A+T 的含量为 63.4%, A+T 含量明显高于 G+C 含量 (36.6%), 与其他昆虫相似。根据光肩星天牛性信息素结合蛋白基因的核苷酸推测出其氨基酸序列, 两个 AglaPBPs 信号肽预测结果显示, AglaPBP1 和 AglaPBP2 基因 N-端都有信号肽, AglaPBP1 的信号肽位于 1-21 位氨基酸; AglaPBP2 的信号肽位于 1-19 位氨基酸。将得到的 2 个光肩星天牛 PBPs 分别在 NCBI 数据库中进行 Blast 比对, 发现 AglaPBP1 和 AglaPBP2 分别与云斑天牛 *Batocera horsfieldi* BhorPBP1 和 BhorPBP2 相似性较高, 分别达到 74%和 49% (表 2)

2.2 光肩星天牛性信息素结合蛋白亲脂性分析

用 BioEdit 软件对光肩星天牛性信息素结合蛋白亲水性进行分析, 结果显示两个 AglaPBPs 都有较明显的疏水区域 (Score 为正值的区域) (图 2, 图 3)。

2.3 光肩星天牛性信息素结合蛋白二级结构分析

将 AglaPBP1 和 AglaPBP 氨基酸序列输入 PSIPRED 进行二级结构分析, 结果显示, 光肩星天牛 AglaPBP1 结构包含 105 个 α -螺旋, 91 个 β -折叠, 16 个转角; 和 AglaPBP2 结构包含 117 个 α -螺旋, 63 个 β -折叠, 15 个转角 (图 4)。

表 1 扩增 AglaPBPs 基因的引物
Table 1 The primers for AglaPBPs genes amplification

引物名称 Name	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
AglaPBP1	TGGTGGACATGCTTCACAAT	ATGGTCGCCTCCACATCTAC
AglaPBP2	GCTTAGCCAGCACTGGAGTC	CAGGCGGTGTACATACATC
Actin	ACATCAAGGAGAACTCTGCTACG	CTTCATGATGGAGTTGTAGGTGGT

表 2 AglaPBPs 的序列分析结果
Table 2 Sequence analysis of AglaPBPs

名称 Name	氨基酸 AA lenth	分子量 MW (ku)	等电点 PI	Blast 结果			
				登录号 Accession number	Score	E-value	Identity (%)
AglaPBP1	136	15.02	4.22	AIV43008.1	200	8e-60	74
AglaPBP2	135	15.00	5.16	AIV43009.1	109	2e-27	49

W: 相对分子量 Molecular weight; PI: 理论等电点 Isoelectric point.

>AglaPBP1
 CCTGCGTATCGTTAGCGTTAGTTTTCGGATTGCGTGCATACAAGGAAACAAACCTTCGTGCTCCCGTTAATCAAACCAA
 TTCCCCAGGAGATGTAGGACCCAGTTGCATAATCCCCAATTACCCCGACAGCCGGTTTCGGTCTACGTTAATTGCTGTGG
 AGACAACGCAGCTTCCTGCTAATTAATCTGGCATTAAATGAAACGGTTTATCGGAGTTATAAAACCCGATATCGCCCC

250 260 270 280 290 300
 241 GGGAGGTGTCAGTCGCGTGCAGGTTAACGAGAGACGTTAAAAAACAATGCTGATAAGA
 1 M L I R
 310 320 330 340 350 360
 301 TTAGGTGCCGCGTGCAGGCTGTGTCCTTTTAGTTCTTCTCTAGTTCTTAGCATAAAGTGAA
 5 L G A A C G C V L L V L P L V L S I S E
 370 380 390 400 410 420
 361 GAACCTTCAAGAGCTGGTGGACATGCTTCACAATACATGCGTAGGAGAGACGGGGACATCA
 25 E L Q E L V D M L H N T C V G E T G T S
 430 440 450 460 470 480
 421 GAAGAGGCTATAGAGAACGCCAAGAAGGGAGATTTTGCTGACGATGAAAAATTTAAATGC
 45 E E A I E N A K K G D F A D D E K F K C
 490 500 510 520 530 540
 481 TACTTGATGTGTATTATGGTCCAAATGGCTTGATAGACGAAGACGGAATAGTAGATGTG
 65 Y L M C I M V Q M A C I D E D G I V D V
 550 560 570 580 590 600
 541 GAGGCGACCATAGCGGTCATTCCAGAGGAATTCAGGACCTCGCAGCTCCGATTATTAGA
 85 E A T I A V I P E E F Q D L A A P I I R
 610 620 630 640 650 660
 601 AAATGCGATACGCAAAAAGGGATCCACCCCTTGTAAGTGCTTGGCTGACGCACAAGTGC
 105 K C D T Q K G S T P C E S A W L T H K C
 670 680 690 700 710 720
 661 TACTACAACGAAATCCAGATGCTTACTTCTTAGTATAAAACCTGATCCTGCGCGAATAT
 1 2 5 Y Y N E N P D A Y F L V
 TTACTTTAATTGCATTGAAAATTACTGTTCAATATGTACAAGTAGGTATAATTTAAACATATTTAGGTTGCA
 ATAAATGTTGTTACAAAAA

>AglaPBP2
 TATGAGTTAATGCGTAGCATTTCATTTAGTAGTACATATAAAGTGAGTATATTTAATTAA

70 80 90 100 110 120
 61 TATTTCCAGTTTTTCGATTGTGTCAATAAGTGAAGCCATGAATCTAAGTGTAACCTTTGTTA
 1 M N L S V T L L
 130 140 150 160 170 180
 121 TATCTTCTACTTTGTCTCACCTCGATTAAGGGTCTATCTGAAAGTAAATTTATAGCAGCT
 9 Y L L L C L T S I K G L S E S K F I A A
 190 200 210 220 230 240
 181 AAAGCTGAAGCTCGCGCTGCTTGCTTAGCCAGCACTGGAGTCTCAGAAGATTTGGTTATG
 29 K A E A R A A C L A S T G V S E D L V M
 250 260 270 280 290 300
 241 GATATTAATAGAGACGGCAAGTTTGCTGATGACGAGAATTTGAAATGCTACGTAAAAATGT
 49 D I N R D G K F A D D E N L K C Y V K C
 310 320 330 340 350 360
 301 GTTCACGAATATCTTGGATTGATGGCTGAAGATGGTACTATGGATTATGAAAAGCTTATC
 69 V H E Y L G L M A E D G T M D Y E K L I
 370 380 390 400 410 420
 361 GTGAACATACCTGAAGAGTTTCGAATCAAGTATGCTTCGAGAATTCGAGCCTGTGGAAC
 89 V N I P E E F R I K Y A S R I R A C G T
 430 440 450 460 470 480
 421 ATATATGGGTCGGATGTATGTGACACCGCCTGGTTGACCATCAAATGTTACGGCGAAAAAT
 109 I Y G S D V C D T A W L T I K C Y G E N
 490 500 510 520 530 540
 481 ATTCCCAAGTTGCCCCATCCGTAATAAGAACAGGTTCAACCAAGTACAGTATATATATTA
 129 I P K L P H P
 CCAGTGAAATATAGAATTAGAAGCAATGCTGAATACTGTTTATTTTCTATTTGAAGAAAGACGG

图 1 AglaPBPs 基因核酸序列及其推导氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of AglaPBPs

下划线部分代表 AglaPBPs 序列信号肽预测结果, AglaPBP1 的信号肽位于 1-21 位氨基酸;

AglaPBP2 的信号肽位于 1-19 位氨基酸。

The underlines represent the predicted result of signal peptide of AglaPBPs,

AglaPBP1 and AglaPBP2 all have signal peptide in 1-21 and 1-19.

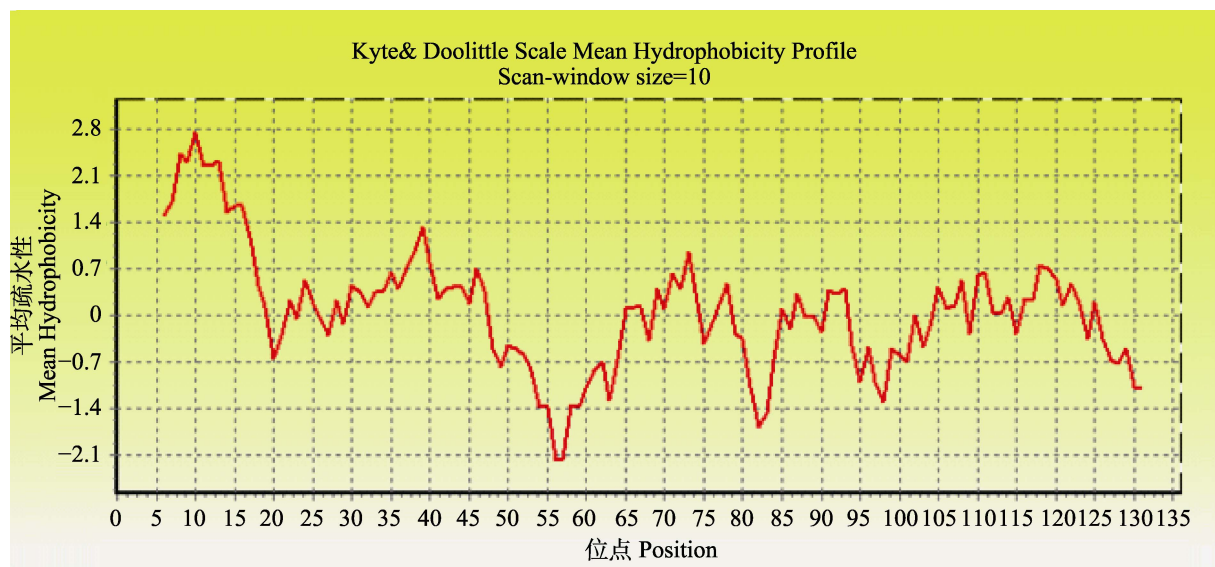


图 2 AglaPBP1 的氨基酸亲水性分析

Fig. 2 Predicted hydropathy profiles for the acid sequences of the AglaPBP1

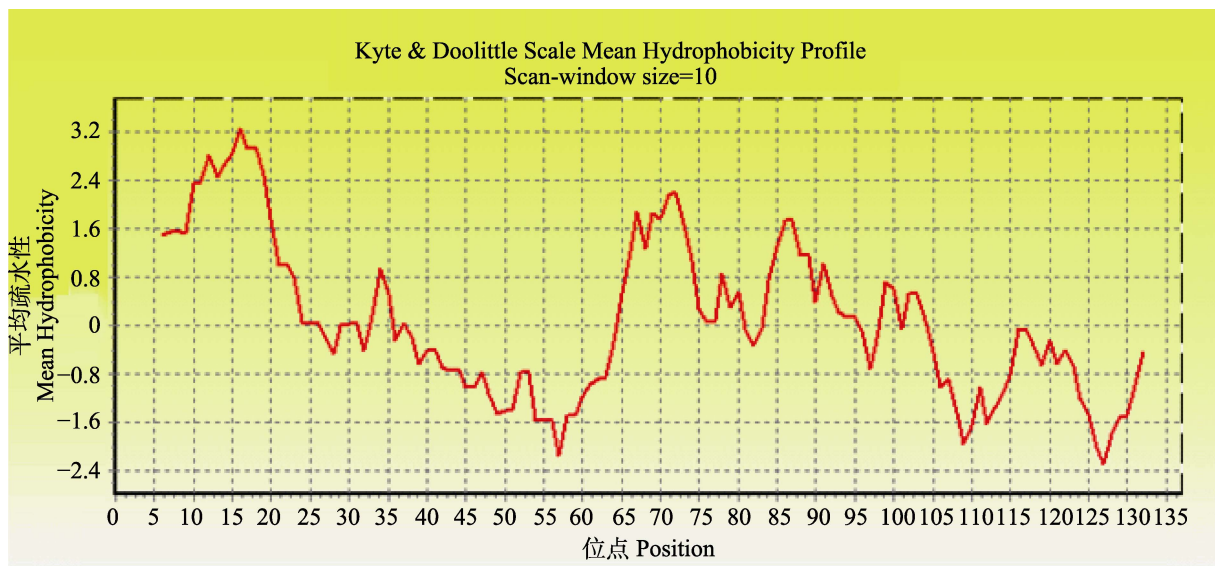


图 3 AglaPBP2 的氨基酸亲水性分析

Fig. 3 Predicted hydropathy profiles for the acid sequences of the AglaPBP2

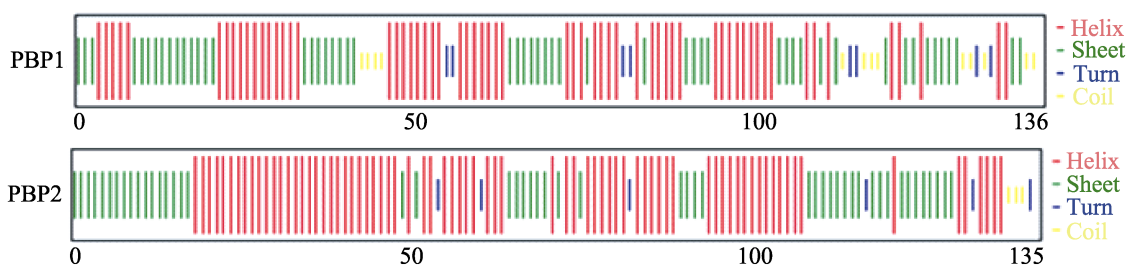


图 4 AglaPBPs 的二级结构预测图

Fig. 4 Predicted secondary structure of the AglaPBPs

红色 (Helix) 代表 α -螺旋；绿色(Sheet)代表 β -折叠；蓝色(Turn)代表转角；黄色(Coil)代表卷曲螺旋。

The red represents alpha helix, the green represents β pleated sheet, the blue represents turn and the yellow represents coil

2.4 光肩星天牛性信息素结合蛋白与其它已知昆虫 OBP 基因序列比对及系统进化分析

Blast 比对显示, AglaPBP1 和 AglaPBP2 与其它鞘翅目昆虫 OBP 具有较高的同源性,

Clustalx 软件对 AglaPBP1 和 AglaPBP2 与鞘翅目昆虫 OBP 进行多重序列比对, 结果表明, AglaPBP1 和 AglaPBP2 均有 6 个保守的半胱氨酸残基 (图 5)。

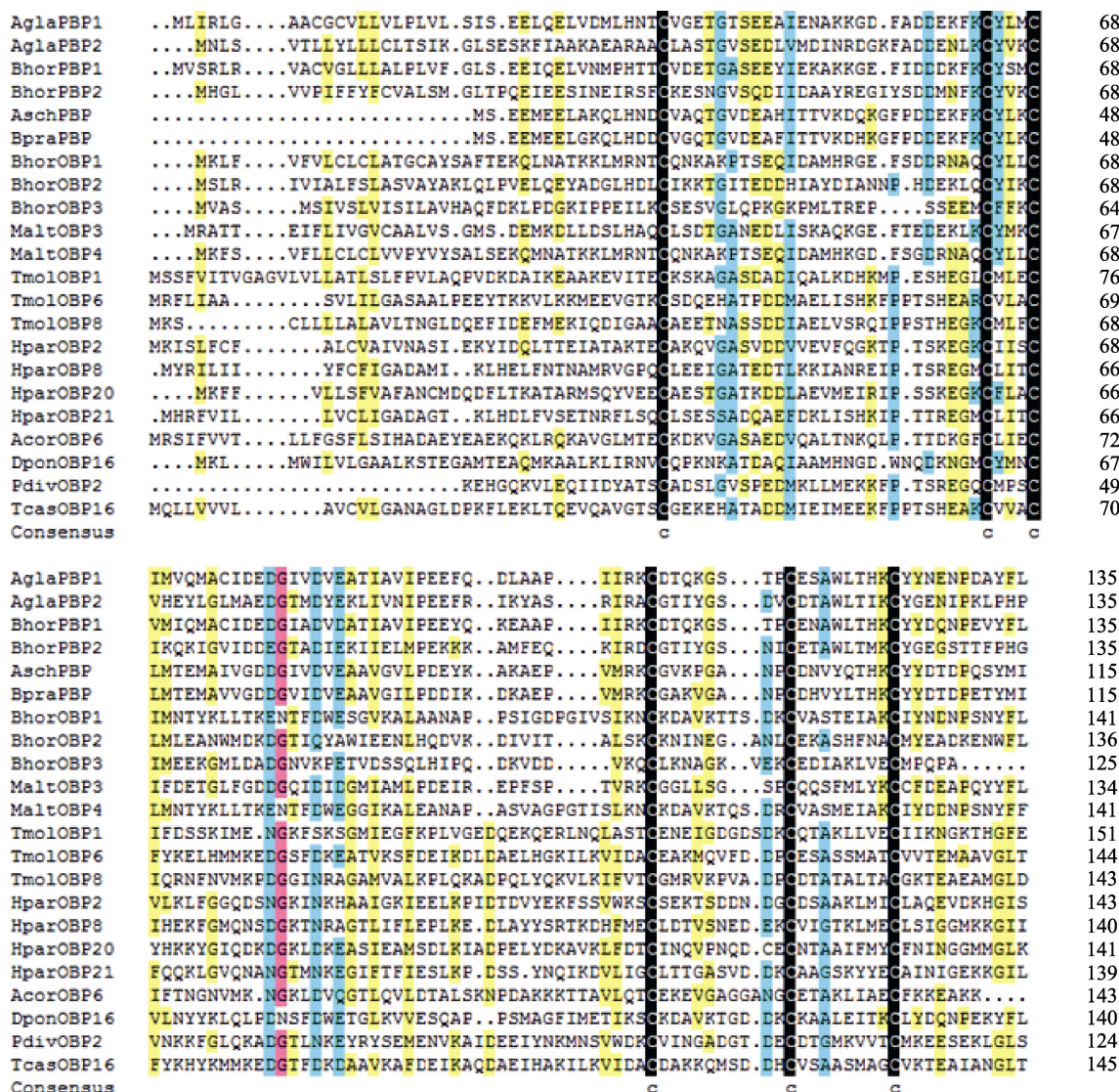


图 5 AglaPBPs 与其它 13 种昆虫 PBPs 氨基酸序列同源性比较
Fig. 5 Alignment of amino acid sequences of AglaPBPs with those of other insect

C 表示保守位点上的半胱氨酸, 蛋白质来源及 GenBank 登录号 Origin species of proteins and their GenBank accession and numbers. AschPBP: *Anomala schonfeldti* 丽金龟属 (BAF79599.1); BpraPBP: *Brachysternus prasinus* 丽金龟属 (AGG37860.1); 云斑天牛 *Batocera horsfieldi* (BhorOBP1, AHA33382.1; BhorOBP2, AHA33380.1; BhorOBP3, AHA33381.1; BhoPBP1, AIV43008.1; BhoPBP2, AIV43009.1); 松墨天牛 *Monochamus alternatus* (MaltOBP3, AHA39268.1; MaltOBP4, AHA39269.1); 黄粉虫 *Tenebrio molitor* (Tmol OBP1, AJM71475.1; Tmol OBP6, AJM71480.1; TmolOBP8, AJM71482.1); 暗黑腮金龟 *Holotrichia parallela* (HparOBP2, AKI84360.1; HparOBP8, AKI84366.1; HparOBP20, AKI84378.1; HparOBP21, AKI84379.1); 铜绿丽金龟 *Anomala corpulenta* (AcorOBP6, AKC58527.1); 分异发丽金龟 *Phyllopertha diversa* (PdivOBP2, BAA88062); 中欧山松大小蠹 *Dendroctonus ponderosae* (Dpon OBP16, AKK25140.1); 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (TcasOBP16, EFA02853.1; TcasOBP28a, XP_008200270.1)。

运用 Neighbor-Joining 法, 1 000 次重复, 进行 AglaPBP1 和 AglaPBP2 系统进化关系分析, 光肩星天牛和其他昆虫 OBPs 相关蛋白序列所构建的进化树有很强的 bootstrap 支持 OBP 相关蛋白这个大家族分成 3 大类, 分别为性信息素结合蛋白 PBPs, 普通气味结合蛋白 GOBPs 以及触角结合蛋白 ABPXs。AglaPBP1 和 AglaPBP2 所在的 PBP 这个亚家族构成一个单系群, AglaPBP1 和 AglaPBP2 分别与云斑天牛 *B. horsfieldi* 的 BhorPBP1 和 BhorPBP2 具有明显的同源性, 两个 AglaPBPs 基因同源性较低 (图 6)。

2.5 光肩星天牛性信息素结合蛋白表达谱分析

以光肩星天牛 Actin 为内参基因, 用 qPCR 技术测定 AglaPBP1 和 AglaPBP2 基因在光肩星天牛雌雄成虫触角、足以及下颚须的相对表达量。结果显示 AglaPBP1 雌雄虫触角下颚须, 以及雌虫足中都有的表达, 且雌虫触角表达量高于雄虫。AglaPBP2 雄虫触角中显著表达, 在下颚须中也有微量的表达 (图 7)。

3 讨论

本实验以实验室已获得的光肩星天牛触角转录组测序数据为基础 (Hu *et al.*, 2016), 通过 Blast 筛选出两条性信息素结合蛋白。设计引物从光肩星天牛成虫触角中克隆得到了 AglaPBP1 和 AglaPBP2 的完整序列。预测的信号肽、分子量和等电点表明, AglaPBP1 和 AglaPBP2 基因具有昆虫 PBPs 的典型特征, 即为含有 20 个左右的信号肽, 分子量约 15 ku 的酸性蛋白, 符合昆虫气味结合蛋白是一种亲水性的小分子蛋白这一特点。AglaPBP1 和 AglaPBP2 有较明显的疏水区域, 可能与结合亲脂性的气味分子有关 (徐素平, 2014)。昆虫的 OBPs 二级结构主要是 α 螺旋 (赵骁, 2012), 普遍具有 6 个保守的半胱氨酸位点, 基本结构模型为 Cys-X (20-66)-Cys-X (3)-Cys-X (21-43)-Cys-X (8-14)-Cys-X (8)-Cys, X 代表每个半胱氨酸之间间隔的氨基酸残基数, 其中第 2 个半胱氨酸与第 3 个半胱氨酸之间总是间

隔 3 个氨基酸残基, 第 5 个半胱氨酸与第 6 个半胱氨酸之间总是间隔 8 个氨基酸残基 (赵莹, 2014)。根据光肩星天牛 PBPs 的半胱氨酸位点的数量和位置, 可知这个蛋白的氨基酸序列属于经典模型 OBPs。

研究发现, 昆虫的 OBP 家族变化很大, 这暗示着这些蛋白可能有着结合不同气味的功能。在系统发育分析中, 光肩星天牛性信息素结合蛋白与其他昆虫信息素结合蛋白 PBPs 聚类。目前鞘翅目昆虫的嗅觉相关基因研究较少, 天牛科昆虫目前在 GenBank 上仅有 4 条云斑天牛的气味结合蛋白序列信息登录, 而且气味结合蛋白同源性都很低。而对 AglaPBP1 和 AglaPBP2 和其它昆虫 PBPs 进行系统进化分析, AglaPBP1 和 AglaPBP2 都与同目的云斑天牛 *B. horsfieldi* 的 BhorPBP1 和 BhorPBP2 同源性最高, 说明 AglaPBPs 和 BhorPBPs 的进化地位最接近, 这也与物种间的同源关系相吻合。AglaPBP1 和 AglaPBP2 同源性较低, 符合同一类型的 PBPs 的氨基酸序列更为保守这一特点 (李亮等, 2009), AglaPBP1 和 AglaPBP2 位于不同的进化树分支上说明这两个 PBP 蛋白可能有着不同的空间三维结构, 识别与运输不同组分的信息素 (修伟明等, 2005)。

PBPs 主要分布于昆虫触角嗅觉传感器的淋巴液内, 作用是与雌虫释放的性信息素发生结合携带信息素通过血淋巴, 到达感觉神经元树突膜, 并激活位于膜上的气味受体 (李文海, 2015)。PBPs 的功能研究已在研究性信息素分子时展开 (Vogt *et al.*, 1985, 1999)。光肩星天牛是由雌性释放性信息素, 雄性受到引诱前来交配 (罗亚平, 2013), AglaPBP2 在雄虫触角中显著表达, 我们推测与雄虫感受空气中的性信息素, 寻找雌虫有关。然而, PBPs 同 OBPs 相比具有多样性, 存在于特殊的感觉神经元, 不同种类的昆虫 PBPs 多样且大部分是雄虫的特性, 但在不同的环境条件下也会改变 (Vogt *et al.*, 1991)。事实上, 雌虫自动检测性信息素在鳞翅目几个物种中已被证明 (曹馨月, 2014), 雌虫可能通过检测

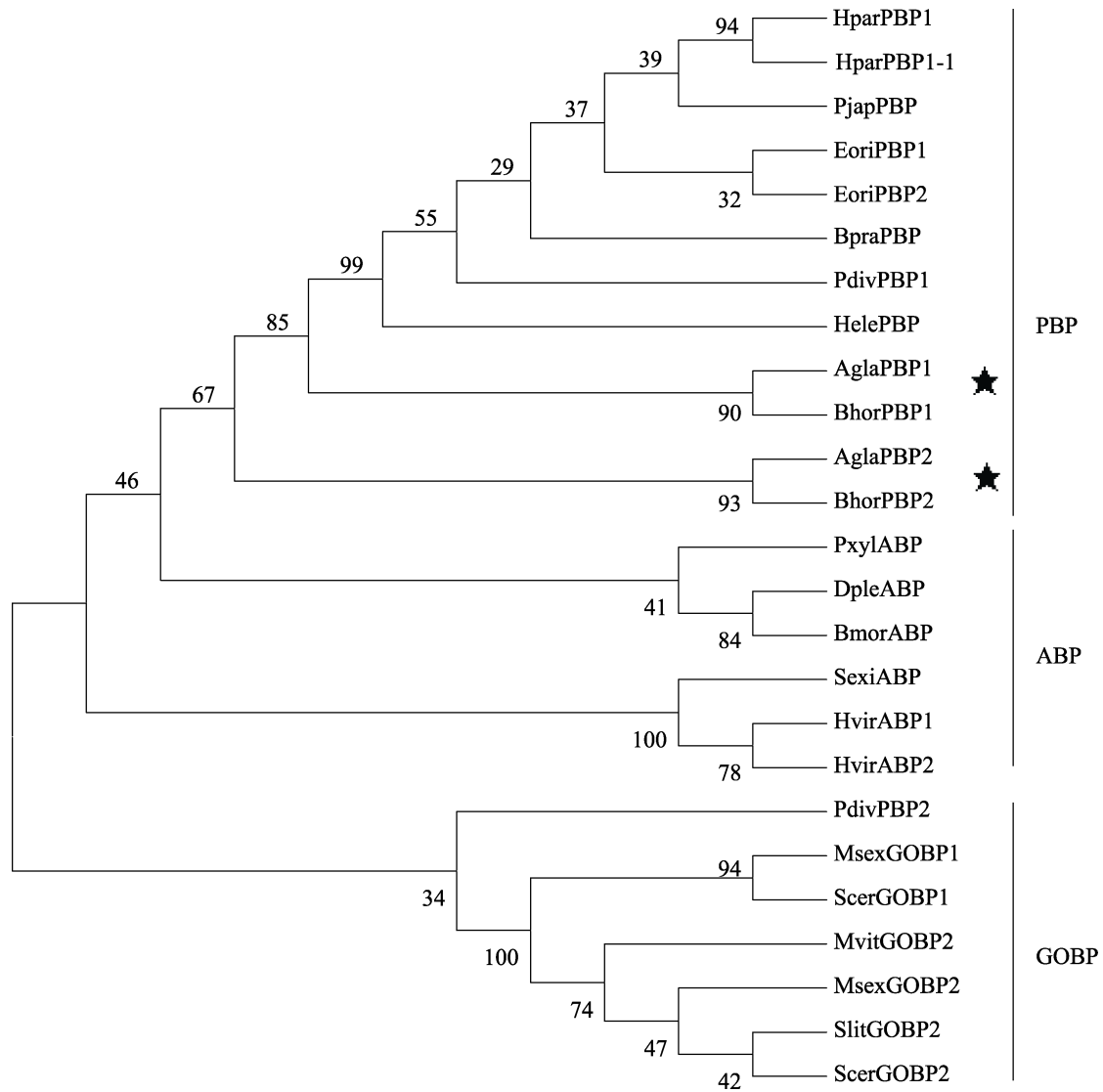
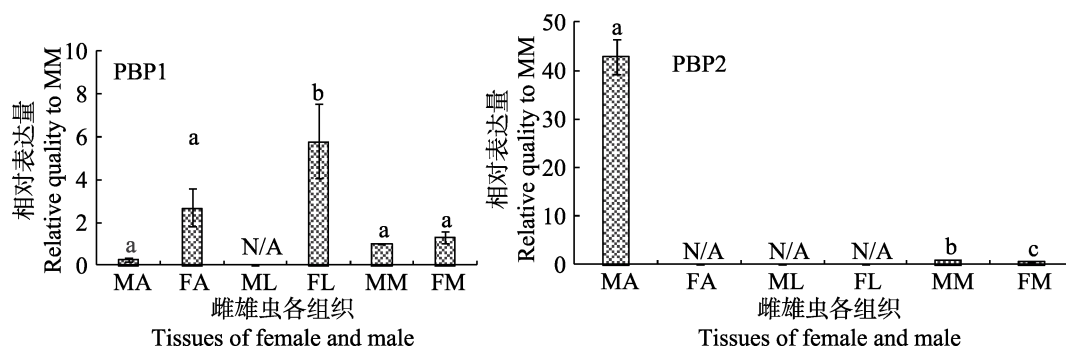


图 6 昆虫 OBP 相关蛋白的系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree of the family of insect OBPs and related proteins

星号标注的是光肩星天牛(*A.glabripennis*)AglaPBP1, AglaPBP2。其他昆虫 OBP 相关蛋白序列在 GenBank 中的登录号

如下。Asterisk is the PBP1 and PBP2 of *A.glabripennis*, the accession numbers of other insect OBP sequences are as follows: MsexGOBP2 (烟草天蛾 *Manduca sexta*, GOBP2) AAA29316.1; MvitGOBP2 (豆荚螟 *Maruca vitrata*, GOBP2) AIN41151.1; SlitGOBP2 (斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*, GOBP2) AIS72932.1; ScerGOBP2 (麦蛾 *Sitotroga cerealella*, GOBP2) AII15785.1; MsexGOBP1 (烟草天蛾 *Manduca sexta*, GOBP1) AAA29315.1; ScerGOBP1 (麦蛾 *Sitotroga cerealella*, GOBP1) AII15787.1; PdivGOBP2 (分异发丽金龟 *Phyllopertha diversa*, GOBP2) BAC66784.1; HvirABP (烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*, ABP) CAC33574.1; HvirABP (烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*, ABP) ACX53810.1; SexiABP (甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*, ABP) ADY17881.1; DpleABP (主斑蝶 *Danaus plexippus*, ABP) EHJ66992.1; BmorABP (家蚕 *Bombyx mori*, ABP) ABD36353.1; PxylABP (小菜蛾 *Plutella xylostella*, ABP) BAD52263.1; BhorPBP2 (云斑天牛 *Batocera horsfieldi*, PBP2) AIV43009.1; BhorPBP1 (云斑天牛 *Batocera horsfieldi*, PBP1) AIV43008.1; HelePBP (*Hylamorphia elegans*, PBP) AGM37951.1; BpraPBP (*Brachysternus prasinus*, PBP) AGG37860.1; EoriPBP (东方异丽金龟 *Exomala orientalis*, PBP) BAB70711.1; EoriPBP (东方异丽金龟 *Exomala orientalis*, PBP) BAB70713.1; Pdiv PBP1(分异发丽金龟 *Phyllopertha diversa*, PBP) BAC66783.1; PjapPBP (日本金龟子 *Popillia japonica*, PBP) AAC63436.1; HparPBP1 (暗黑鳃金龟 *Holotrichia parallela*, PBP1) ADF87392.1; HparPBP1 (暗黑鳃金龟 *Holotrichia parallela*, PBP1) ADF87391.1.

图7 qPCR 鉴定 *AglaPBPs* 在雌雄成虫各个组织间的表达谱Fig. 7 PBPs gene relative quality in different tissues of *Anoplophora glabripennis* investigated by qPCR

MA: 雄虫触角; FA: 雌虫触角; ML: 雄虫足; FL: 雌虫足; MM: 雄虫下颚须; FM: 雌虫下颚须。

MA: Male antenn; FA: Female antenna; ML: Male leg; FL: Female leg;

MM: Male maxillary palp; FM: Female maxillary palp.

自身释放的性信息素的浓度, 来决定是否继续释放信息素或者通过检测环境中性信息素的浓度, *AglaPBP1* 在雌虫触角中的表达量显著高于雄虫, 雌虫触角嗅觉感器存在大量 PBPs, 可能与雌虫通过检测环境中的性信息素浓度, 来判断周围是否存在其他的同种同性个体, 从而避免同种个体间的竞争有关。同时, PBPs 是 OBPs 的一个明显分支, 多次被证明与性信息素感受器有特定关系 (Vogt *et al.*, 1989; Rogers *et al.*, 1999)。一般认为, 锥形感受器表达的是普通气味结合蛋白 GOBPs, 能够识别普通气味如植物挥发物 (谷少华, 2013)。例如, 小地老虎 *Agrotis ypsilon* Rottemberg Aips PBP1-3 蛋白除分布于毛形感器中, 也在对普通气味敏感的锥形感器中表达 (Gu *et al.*, 2013)。光肩星天牛触角上存在 5 类感受器, 锥形感受器是数量最多的感器之一, 且雌虫数量大于雄虫 (闫雄飞等, 2010), *AglaPBP1* 在雌虫触角表达高于雄虫可能与感器结合比例有关。有研究也表明昆虫的 PBP 蛋白液同时能够检测普通气味分子 (Lautenschlager *et al.*, 2007; He *et al.*, 2010), *AglaPBP1* 是否除了可以感受性信息素之外, 同时感受普通气味还需要我们进一步验证。下颚须也是用来感知外界信息物质的器官, *AglaPBP1* 和 *AglaPBP2* 都有在下颚须微量表达。PBP 可能存在尚未发现的其他功能, 有待进一步实验研究。

根据性信息素设计性引诱剂从而诱杀或干

扰害虫交配已成为害虫管理和防治的一个重要发展方向。近年来随着生物技术的不断发展, 从分子水平上研究昆虫嗅觉相关蛋白的功能与调控机制已经成为可能, 基于本研究结果可以通过荧光竞争结合实验对这两个蛋白与配基的结合特性进行分析, 为进一步研究光肩星天牛性信息素的结合机制以及进一步阐明性信息素结合蛋白功能和行为反应的本质原因奠定基础, 进而为利用基因工程的方法治理害虫提供理论依据。

参考文献 (References)

- Briand L, Nespoulous C, Huet JC, Pernollet JC, 2001. Disulfide pairing and secondary structure of ASP1, an olfactory-binding protein from honey bee (*Apis mellifera* L.). *J. Pep. Res.*, 58(6): 540–545.
- Cao XY, 2013. Cloning and prokaryotic expression of *Cydia pomonella* pheromone binding protein II gene (CpomPBP2). Master dissertation. Yangling: Northwest A & F University. [曹馨月, 2014. 苹果蠹蛾性信息素结合蛋白基因 II (CpomPBP2) 组织特异性表达谱研究. 硕士学位论文. 杨凌: 西北农林科技大学.]
- Du J, Liu YF, Tan SQ, Wu JX, 2013. Control index based on number of adults of *Grapholita molesta* captured by sex pheromone traps. *Acta Phytophylacica Sinica*, 40(2): 140–144. [杜娟, 刘彦飞, 谭树乾, 仵均祥, 2013. 基于性诱剂监测的梨小食心虫防治指标. 植物保护学报, 40(2): 140–144.]
- Gong DP, Zhao P, Lin Y, Xia QY, Xiang ZH, 2006. Identification and expression pattern of two pheromone binding proteins in silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomologica Sinica*, 49(3): 355–362. [龚达平, 赵萍, 林英, 张辉洁, 夏庆友, 向仲怀, 2006. 家蚕信息素结合蛋白 BmPBP2 和 BmPBP3 基因的初步鉴定及表达分析. 昆虫学报, 49(3): 355–362.]
- 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, Zhou JJ, Wang GR, Zhang YJ, Guo YY, 2013. Sex pheromone recognition and immunolocalization of three pheromone binding proteins in the black cutworm moth *Agrotis ipsilon*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43(3): 237–251.
- Hansen L, Xu T, Wickham J, Chen Y, Hao D, Lawrence M, 2015. Identification of a male-produced pheromone component of the citrus longhorned beetle, *Anoplophora chinensis*. *PLoS ONE*, 34(3): 321–323.
- Hu P, Wang JZ, Cui MM, Tao J, Luo YQ, 2016. Antennal transcriptome analysis of the Asian longhorned beetle *Anoplophora glabripennis*. *Science Repor*, 6: 26652.
- Kaissling KE, 2013. Kinetics of olfactory responses might largely depend on the odorant-receptor interaction and the odorant, deactivation postulated for flux detectors. *Journal of Comparative Physiology A*, 199(11): 879–96.
- Li H, Wang MQ, Zhang GA, 2010. Odors perception mechanism of insects. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 47(1): 29–38. [李慧, 王满园, 张国安, 2010. 昆虫对气味分子的感受机制. 应用昆虫学报, 47(1): 29–38.]
- Li L, Yang WL, Guo XR, Luo MH, Yuan GH, Qiao J, Fu XW, 2009. Cloning sequence analysis and spatio-temporal expression of a pheromone binding protein 2(PBP 2) gene from *Helicoverpa assulta* (Guen é e) (Lepidoptera:Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 52(11): 1199–1205. [李亮, 杨文玲, 郭线茹, 罗梅浩, 原国辉, 乔奇, 付晓伟, 2009. 烟夜蛾性信息素结合蛋白 2(PBP2)基因的克隆、序列分析与时空表达. 昆虫学报, 52(11): 1199–1205.]
- Li WH, Huang XL, Wang D, Feng JN, 2015. Molecular cloning and immunofluorescence localization of sex pheromone binding protein 2 from *Atrijuglans hetaohei* (Lepidoptera: Heliodinidae). *Acta Entomologica Sinica*, 58(10): 1054–1062. [李文海, 黄兴龙, 王敦, 冯纪年, 2015. 核桃举肢蛾性信息素结合蛋白 2 的分子克隆和免疫荧光定位. 昆虫学报, 58(10): 1054–1062.]
- Luo YP, 2013. The host choice behavior of *Anoplophora glabripenn* and the research of lure from host. Master dissertation. Hangzhou: Zhejiang A&F University. [罗亚萍, 2013. 光肩星天牛的寄主选择行为和植物源引诱剂研究. 硕士学位论文. 杭州: 浙江农林大学.]
- Mohanty S, Ring JR, Prusti RK, 2008. Chemical Communication: A Visit with Insects. *Current Chemical Biology*, 2(1): 83–96.
- Pelosi P, Zhou J, Ban L, Calvello M, 2006. Soluble proteins in insect chemical communication. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(14): 1658–1676.
- Steinbrecht RA, Laue M, Ziegelberger G, 1995. Immunolocalization of pheromone-binding protein and general odorant-binding protein in olfactory sensilla of the silk moths *antheraea* and *bombyx*. *Cell and Tissue Research*, 282(2): 203–217.
- Vogt RG, Riddiford LM, 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 293(5828): 161–163.
- Vogt RG, Prestwich GD, Lerner MR, 1991. Odorant-binding-protein subfamilies associate with distinct classes of olfactory receptor neurons in insects. *Developmental Neurobiology*, 22(1): 74–84.
- Vogt RG, Riddiford LM, Prestwich GD, 1985. Kinetic properties of a sex pheromone-degrading enzyme: the sensillar esterase of *Antheraea polyphemus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(24): 8827–8831.
- Vogt RG, Callahan FE, Rogers ME, Dickens JC, 1999. Odorant binding protein diversity and distribution among the insect orders, as indicated by lap, an obp-related protein of the true bug *Lygus lineolaris* (Hemiptera, Heteroptera). *Chemical Senses*, 24(5): 481–495.
- Wang W, 2010. Identification and cloning of antennal olfactory related genes of *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: cerambycidae). Master dissertation. Yangling: Northwest A&F University. [王伟, 2010. 光肩星天牛触角嗅觉相关蛋白基因的鉴别与克隆. 硕士学位论文. 杨凌: 西北农林科技大学.]
- Xiu WM, Dong SL, Wang YC, 2005. Pheromone binding proteins in insects with emphasis on their molecular transport and physiological functions. *Acta Entomologica Sinica*, 48(5): 778–784. [修伟明, 董双林, 王荫长, 2005. 昆虫性信息素结合蛋白及其分子运输机制和生理功能研究进展. 昆虫学报, 48(5): 778–784.]
- Xu SP, 2014. Cloning and expression analysis of odorant binding proteins in *Aphis gossypii* Glover. Master dissertation. Wuhan: Huazhong Agricultural University. [徐素平, 2014. 棉蚜气味结合蛋白基因克隆和表达分析. 硕士学位论文. 武汉: 华中农业大学.]
- Yan XF, Sun XQ, Liu YH, Li XJ, Luo YQ, 2010. Environmental Scanning electron microscopic observations of sensilla on the antennae of *Anoplophora glabripennis*. *Science Silvae Sinicae*, 46(11): 104–109. [阎雄飞, 孙月琴, 刘永华, 李晓娟, 骆有庆, 2010. 光肩星天牛触角感受器的环境扫描电镜观察. 林业科学, 46(11): 104–109.]
- Zhang A, Oliver JE, Chuanhan K, Zhao BG, Xia LQ, Xu ZC, 2003. Evidence for contact sex recognition pheromone of the Asian longhorned beetle, *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae). *Naturwissenschaften*, 90(9): 410–413.
- Zhao X, 2012. Ultrastructural observations on anult antennal seneilla and cloing, sequence analysis of a pheromone binding protein gene of the codling moth, *Cydia pomonella* (L). Master dissertation. Yangling: Northwest A&F University. [赵晓, 2012. 苹果蠹蛾成虫触角感器超微结构及信息素结合蛋白基因的克隆与序列分析. 硕士学位论文杨凌: 西北农林科技大学.]
- Zhao Y, 2014. Function analysis of odorant binding proteins in *Anomala corpulenta* motschulsky. Master dissertation. Yangling: Northwest A&F University. [赵莹, 2014. 铜绿丽金龟气味结合蛋白功能分析. 硕士学位论文. 杨凌: 西北农林科技大学.]
- Zhu BB, Jiang Y, Lei ZL, 2005. Pheromone binding proteins in insects. *Chinese Bulletin of Entomology*, 42(3): 240–243. [朱彬彬, 姜勇, 雷朝亮, 2005. 昆虫信息素结合蛋白的研究概况. 昆虫知识, 42(3): 240–243.]