

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

杜亚丽^{1**} 冯宇佳^{1**} 马卫华² 邵苗苗¹ 李新宇¹
苏文婷¹ 赵慧婷³ 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;
3. 山西农业大学生命科技学院, 太谷 030801)

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

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

Cloning and differential expression of the *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica* odorant binding protein gene *OBP12*

DU Ya-Li^{1**} FENG Yu-Jia^{1**} MA Wei-Hua² TAI Miao-Miao¹ LI Xin-Yu¹
SU Wen-Ting¹ ZHAO Hui-Ting³ 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;

3. College of Life Science, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract [Objectives] To clone the cDNA sequence of *OBP12* from *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica*, predict their protein structures and compare differences in gene expression in different tissues and developmental stages between these two species. [Methods] The full-length cDNA sequence of *OBP12* was amplified and cloned from antennae of

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

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

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: jiangys-001@163.com

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

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

Key words *Apis cerana cerana*; *Apis mellifera ligustica*; *OBP12*; gene cloning; bioinformatics analysis; temporal-spatial expression

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

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

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

是必不可少的(He *et al.*, 2010; Yin *et al.*, 2012)。

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

蜜蜂作为大自然生态系统中的一员, 以其特有的生物学本能, 参与大自然的生态平衡, 在食物链中起承上启下的作用。在现代化农业生态系统中, 由于规模化、机械化、集约化、化学化的发展, 野生授粉昆虫的数量极度减少, 蜜蜂授粉的重要性日渐凸显(刘光楠, 2017)。目前, 我国养蜂生产上使用的主要蜂种是中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* Fabricius (简称中蜂) 和意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* Spinola (简称意蜂)。中蜂是我国特有的蜂种, 与意蜂相比, 具有嗅觉灵敏、善于利用零星分散的蜜粉源, 抗螨、抗美幼病及白垩病的能力强等优点, 是我国山林地区不可替代的优良蜂种(苏松坤等, 2005; Zhao *et al.*, 2014)。

本研究是在前期对中蜂触角(1、10、18 和 25 日龄)转录组测序的基础上, 我们选择其中一个显著上调表达的基因 OBP12, 分别从中蜂、

意蜂触角中克隆获得该基因, 对其编码蛋白的理化性质和结构特征进行预测, 并利用 quantitative real-time PCR 技术对其在两蜂种不同发育阶段各组织中的表达差异进行了比较分析, 以期为该蛋白的生理功能及蜜蜂的嗅觉识别机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试蜜蜂

试验用中华蜜蜂 *A. c. cerana* 和意大利蜜蜂 *A. m. ligustica* 均由山西农业大学动物科技学院实验蜂场提供。选取群势强壮、健康无病、无自然分蜂倾向的中蜂和意蜂各 1 群, 分别从蜂巢中抽出一张成熟封盖子脾(新蜂将要出房)置于人工培养箱恒温培养(34℃), 待其羽化出房后用无味无毒的油漆在背部进行标记(约 2 500 只), 再放回原来的蜂巢, 在成蜂 1、5、10、15、20、25、30 日龄时进行采样。两蜂种每个日龄各采集 300 只, 随机分为 3 组, 按触角、头(去除触角)、胸(去除足和翅)、腹、足和翅膀 6 个组织进行分离。每 100 只工蜂各组织的混合样作为一个生物学重复。所采样品要迅速投入盛有液氮的研钵中研磨至粉末状, 倒入装有 1 mL RNAiso Plus 的 1.5 mL 离心管中, -80℃ 保存备用。

1.2 主要试剂和仪器

总 RNA 提取试剂盒 RNAiso Plus、反转录试剂盒 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser (perfect real time)、荧光定量试剂盒 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)、克隆载体 pMD™19-T、DNA Marker DL 1000 和 DNA 凝胶回收试剂盒等购自 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司; Amp、IPTG、X-Gal 和 50×TAE Buffer 等购自北京依托华茂生物科技有限公司; PCR 反应试剂 2×Es Taq MasterMix (含染料)和感受态细胞 DH5α 购自北京康为世纪生物科技有限公司; 异丙醇、氯仿、无水乙醇等常规分析纯购自北京索莱宝科技有限公司。

所需仪器主要为: PCR 梯度扩增仪 (ABI,

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

1.3 实验方法

1.3.1 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

按照 RNAiso Plus 试剂说明书进行各组织样本总 RNA 的提取, 经纯度和浓度测定之后, 根据 PrimeScriptTM RT Reagent Kit with gDNA

Eraser (perfect real time) 试剂盒反转录合成 cDNA 第一链, 反应所需 RNA 总量为 1 000 ng。获得的 cDNA 模板 -20℃ 保存备用。

1.3.2 引物设计 根据前期获得的中华蜜蜂触角转录组数据中的 Unigene 序列和西方蜜蜂基因组中 *AmelOBP12* (GenBank 登录号: NM_001040229) 基因序列, 使用 Primer 3.0 plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) 软件设计引物用于扩增目的基因的 cDNA 序列。根据克隆获得序列和 *Arp1* 基因 (GenBank 登录号: NM_001185145.1) 的开放阅读框 ORF 序列, 利用 Primer 5.0 软件设计用于 qRT-PCR 的特异性引物。所用引物均由北京华大基因科技有限公司合成, 详细信息见表 1。

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

基因名称 Gene name	引物序列 (5'-3') Primers sequences	产物长度 (bp) Product size	退火温度 (°C) Annealing temperature	引物用途 Use of primers
<i>AcerOBP12</i>	F: GACACTGCACGAAGGAACAA R: GTCTCGCGTTGAAAGAAAGC	736	54	基因克隆 Gene cloning
<i>AmelOBP12</i>	F: ATGTTATATAATAACTTAACCTT R: TCAGGGATAATTACGCATAGCT	453	52	
<i>AcerOBP12</i>	F: ATGAATGGCTCCGAATTGAG R: GCGACGTCACACTTGTTCATT	161		荧光定量 PCR Real-time quantitative PCR
<i>AmelOBP12</i>	F: TGGCTGTTTCCTAGCTTGCA R: GTGAACGTCATCTTCGCACG	163	62	
<i>Arp1</i>	F: ACTACGGCCGAACGTGAAAT R: GGAAAAGAGCCTCGGGACAA	185		

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

试剂盒进行纯化。将纯化产物连接到克隆载体 pMDTM19-T 上, 转化至 DH5α 感受态细胞, 经蓝白斑筛选鉴定, 挑取单一白色菌落至含 Amp (1:1 000) 的 LB 液体培养基中扩大培养。经菌液 PCR 鉴定后, 将阳性克隆产物送北京华大基因科技有限公司进行双向测序。

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

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

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

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

2 结果与分析

2.1 OBP12 基因的克隆及鉴定

以中蜂和意蜂触角 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 均得到与预期长度一致的目的片段。回收片段纯化后与 pMD[™]19-T 载体连接转化后, 经蓝白斑筛选和菌液 PCR 鉴定, 结果显示为阳性 (图 1)。获得序列在 NCBI 中进行 BlastN 比对, 与西方蜜蜂 OBP12 (GenBank 登录号: NM_001040229.1) 核苷酸序列一致性为 91%, 确定克隆得到的序列是正确的。利用 ORF Finder 对所获得的序列分析表明, *AcerOBP12* 和 *AmelOBP12* 的开放阅读框 (ORF) 均为 453 bp, 共编码 150 个氨基酸 (图 2)。两蛋白的氨基酸序列中均含有 6 个保守的半胱氨酸位点, 属于 Classical OBP 亚家族。

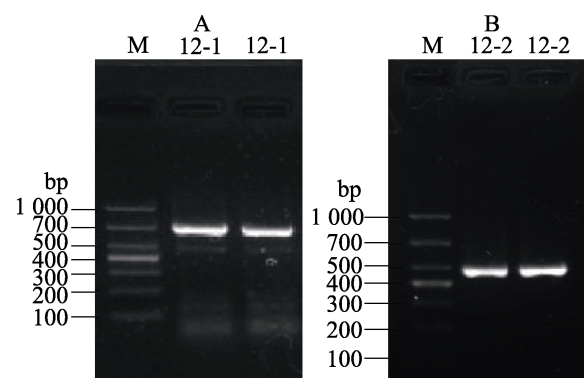


图 1 菌液 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of microbial PCR amplification products

A. 中华蜜蜂 OBP12; B. 意大利蜜蜂 OBP12。M 为 DNA Marker DL 1000; 12-1 和 12-2 分别为 *AcerOBP12* 和 *AmelOBP12* 的菌液扩增产物。

A. OBP12 from *Apis cerana cerana*; B. OBP12 from *Apis mellifera ligustica*. M: DNA Marker DL 1000; 12-1 and 12-2 are the microbial amplification products of *AcerOBP12* and *AmelOBP12*, respectively.

2.2 *AcerOBP12* 和 *AmelOBP12* 蛋白特性比较分析

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

```

>AcerOBP12
1  gtctcgcggttgaaagaaagcgtatataaattcgaagcATGAAAGAATTTATCGTTCATTTA
1  M K N L S F I Y
61  TATCTGGTTTATCCCCTATTTTGGGCTTCAAAATTTACATGCAAGAAGCATCAATATTTT
9  I W F I P Y F G L Q N L H A R S I N I F
121 TCAAGATATTGCAGAGTGCATGGATCGATCAAACATGACAATTCATGAATTAACGAAACT
29  Q D I A E C M D R S N M T I H E L T K L
181 TCGTGACTCGTCCGAGGCAAGAATAAAGTTAATAAACGAAGAGGAAAGTTTCAGAAGCTA
49  R D S S E A R I K L I N E E E S F R S Y
241 TGGCTGTTTCTTAGCTTGCATTTGGCAACAAATTGGCGTGATGAATGGCTCCGAATTGAG
69  G C F L A C I W Q Q I G V M N G S E L S
301 CACATATAACATAGCAGGGATCATCGAAAAACGATATCACGATGACGAAGATCTTAAAC
89  T Y N I A G I I E K R Y H D D E D L K T
361 ATATTTTCATAAAATCGCGTTAACGTGCGAAGATGACATCTACAGAAAATTTTACACGT
109 Y F H K I A L T C E D D I Y R K F L H V
421 GAATGACAAGTGTGACGTCGCTCTTAGTTTCAAATTTGTGCATGTTGAAAGCTATGCGTAA
129 N D K C D V A L S F K L C M L K A M R N
481 TTATCCCTGAatcaatttatattttatctatttgcacttgtctattaccgcaaaaattac
149 Y P *
541 agaggattaaaagaatattttcattattcccaccttttatcgctaccttttctccctaataag
601 cgttcaaataggactaatagcgacatacgataaaattaatcaatcggaacgtagatata
661 gattgacacgcggttctagaacaatttagattgcacattcgtcggatagttgcaattgttgt
721 tccttcgtgcagtgtc

>AmelOBP12
1  ATGTTATATAATAACTTAACCTATTGTAATTATACTTATCATGTGTGGAGTTCAAAATTTA
1  M L Y N N L T I V I I L I M C G V Q N L
61  CGTGCAAGAAGCGTCAATATTTTCAAGATATTGCAGACTGCGTGGATCGATCAAACATG
21  R A R S V N I F Q D I A D C V D R S N M
121 ACATTTTCATGAATTGAAGAACTTCGTGACTCGTCCGAGGCAAGAATAAAATTAATAAAC
41  T F H E L K K L R D S S E A R I K L I N
181 GAGGAGGAAAATTTTCAAGAACTATGGCTGTTTCTTAGCTTGCATTTGGCAACAACTGGC
61  E E E N F R N Y G C F L A C I W Q Q T G
241 GTGATGAATGGCTCCGAATTGAGCACGTACAACATAGCAGGATTATCGAGGACAATAC
81  V M N G S E L S T Y N I A G I I E G Q Y
301 CACGATGACGAAGATCTTAAACGTTTTTCCATAAGATCGCGTTAACGTGCGAAGATGAC
101 H D D E D L K T F F H K I A L T C E D D
361 GTTCACAGGAAGTTTTTGCACGTGAACGACGAGTGTGACGTCGCTCTTAGCTTCAAATTG
121 V H R K F L H V N D E C D V A L S F K L
421 TGCATGTTGAAAGCTATGCGTAATTATCCCTTGA
141 C M L K A M R N Y P *

```

图2 *AcerOBP12* 和 *AmelOBP12* cDNA 核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *AcerOBP12* and *AmelOBP12* cDNA

小写字母为非编码区，大写字母为开放阅读框 ORF；起始密码子和终止密码子用粗体标识，

信号肽序列用下划线标注，保守半胱氨酸位点用黑色方框标注。

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

为小分子蛋白；理论等电点 pI 分别为 6.19、5.49，介于 4.8-6.3，为中性蛋白；总平均亲水系数 (GRAVY) 为 -0.175 和 -0.151，为亲水性蛋白；不稳定系数分别为 56.19、45.31，均大于 40，为不稳定蛋白；脂溶系数均大于 90，说明这 2 个蛋白具有脂溶性。

2.2.2 蛋白基本结构预测 在线 NCBI 结构域分析结果表明，*AcerOBP12* 编码产物的第 27-146 位氨基酸之间存在一个昆虫气味结合蛋白家族的保守结构区域 PBP-GOBP superfamily，而 *AmelOBP12* 编码产物的第 26-145 位氨基酸之间也存在相同的保守结构域。两蛋白的信号肽均位

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

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

于 1-22 位氨基酸序列,剪切位点位于 22 和 23 位氨基酸之间,无跨膜结构。疏水性分析显示,AcerOBP12 的氨基酸序列中,第 101 位氨基酸 Score 值最低为 - 3.378,第 8 位和第 9 位氨基酸最高为 2.211;AmelOBP12 的氨基酸序列中,第 101 位氨基酸 Score 值最低为 - 2.878,第 10 位氨基酸最高为 3.444,这表明它们可能都是脂溶性气味分子的结合位点,存在多个比较明显的疏

水区域(Score 为正值区域)。亚细胞定位结果表明,两个蛋白主要集中在分泌途径上,说明它们均属于分泌型蛋白。

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

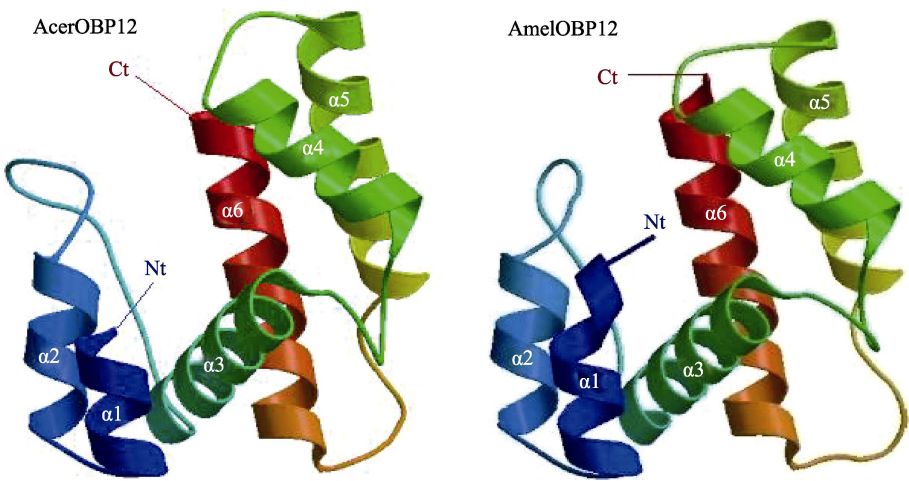


图 3 中华蜜蜂和意大利蜜蜂 OBP12 蛋白的 3D 结构预测模型
Fig. 3 Three-dimensional prediction structure of OBP12 from *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera linnaeus*

位 AA) $\alpha 2$ (43-49 位 AA) $\alpha 3$ (67-79 位 AA) $\alpha 4$ (89-98 位 AA) $\alpha 5$ (104-119 位 AA) $\alpha 6$ (131-148 位 AA); AmelOBP12 与模板的结构相似度为 17.43%, 也含有 6 个 α 螺旋 $\alpha 1$ (31-38) $\alpha 2$ (43-49) $\alpha 3$ (67-79) $\alpha 4$ (89-98) $\alpha 5$ (104-119) $\alpha 6$ (127-144)。两个蛋白均含有 3 对二硫键, 其中 Cys34-Cys132 连接着 $\alpha 1$ 和 $\alpha 6$ 螺旋, Cys70-Cys117 连接着 $\alpha 3$ 和 $\alpha 5$, Cys74-Cys141 连接着 $\alpha 3$ 和 $\alpha 6$ 。这些结构可能形成一个与气味物质结合的空腔。

2.3 蛋白序列比对和系统进化分析

将获得的氨基酸序列在 NCBI 数据库中进行

Blastp 分析, 找到与 AcerOBP12 具有同源性的昆虫 OBPs 氨基酸序列, 主要包括膜翅目和双翅目, 而在其他目类的昆虫中几乎找不到相似序列。使用 MEGA6.0 软件邻位相连法 Neighbor-joining 进行 1 000 次重复计算后构建系统进化树 (图 4)。从图 4 中可以看出, 中华蜜蜂 AcerOBP12 首先与西方蜜蜂 AmelOBP12 聚在一起, 之后与同为膜翅目的回条蜂 HlabPBPg-9-like、印度跳蚁 HsalPBPg-9-like、阿根廷蚁 LhumPBPg-9-like 和小火蚁 WaurPBPg-9-like 聚为一类。说明两蜂种该蛋白在功能上没有大的分化, 该结果符合物种进化规律, 同时也说明构建的系统进化树是可靠的。

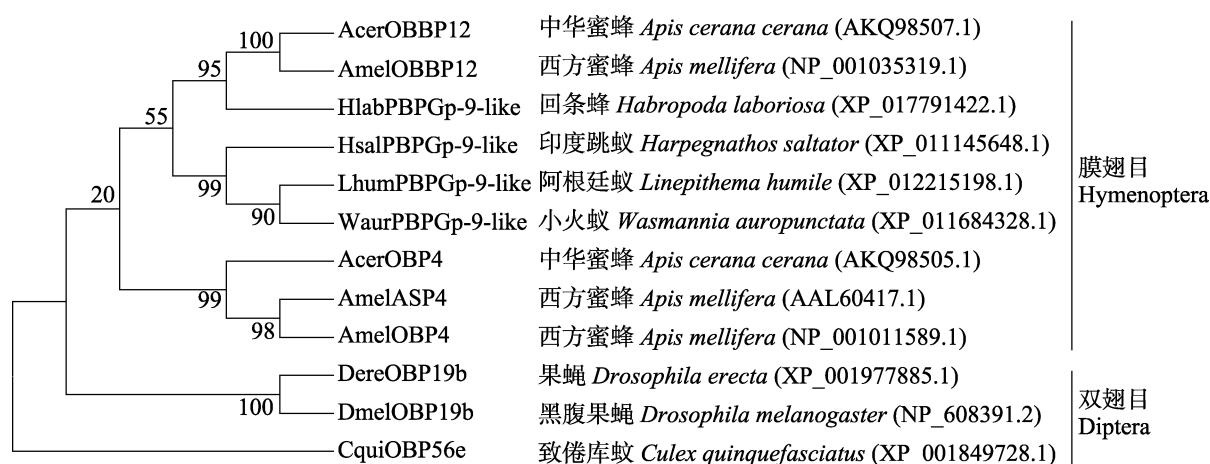


图 4 基于氨基酸序列构建的昆虫 OBPs 的系统进化树 (邻接法)
Fig. 4 Phylogenetic tree of OBPs reconstructed from insects based on amino acid sequence with Neighbor-joining method

2.4 OBP12 mRNA 时空表达分析

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

意蜂各组织中 OBP12 mRNA 的表达情况, 结果发现意蜂各组织中 OBP12 mRNA 表达量均高于相应日龄中蜂各组织中的表达量。

3 讨论

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

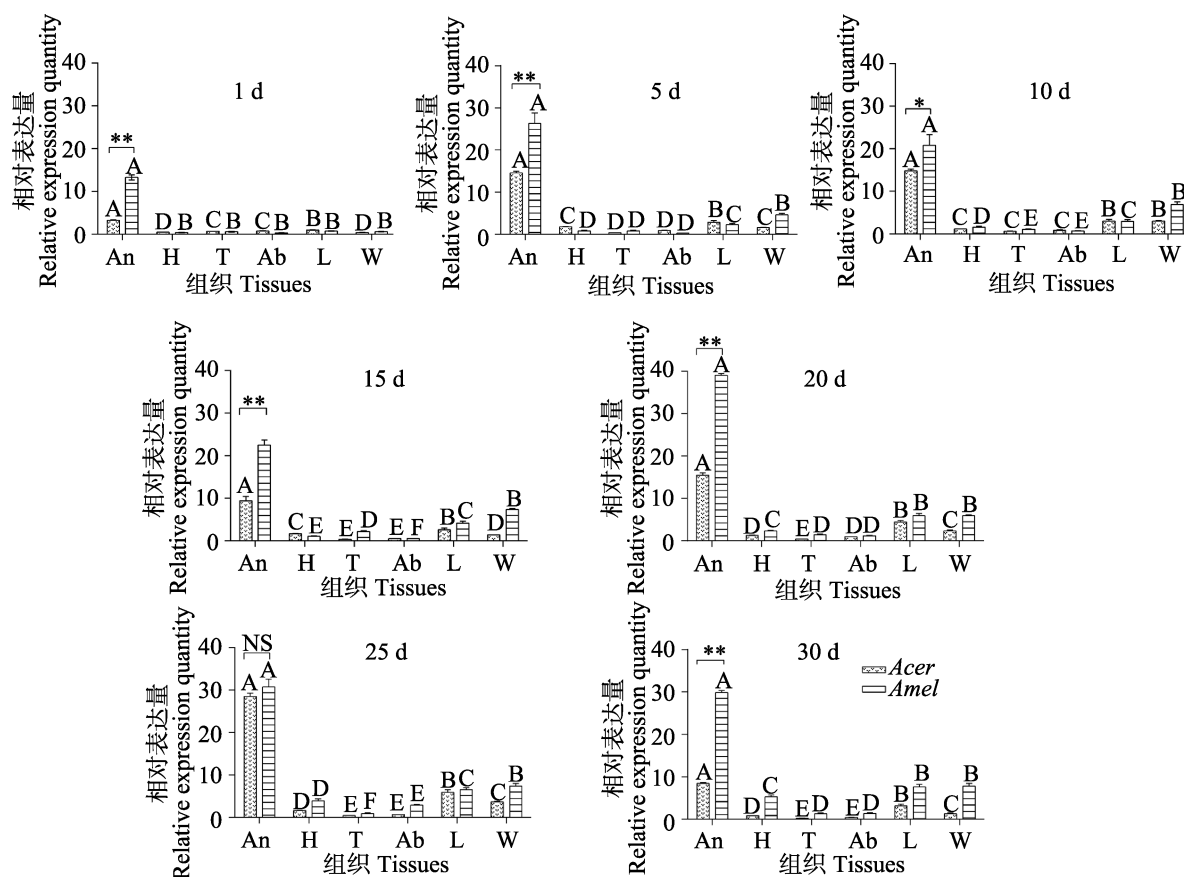


图 5 OBP12 在中蜂、意蜂不同发育阶段、不同组织中的相对表达

Fig. 5 Relative expression of OBP12 in different developmental stages and different tissues of *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera linnaeus*

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

Ab: 腹; L: 足; W: 翅膀。1 d-30 d: 成年工蜂的日龄。

柱上标有不同大写字母表示成蜂相同日龄不同组织之间的表达量差异极显著 ($P < 0.01$), **, * 和 NS 分别表示同一日龄中、意蜂触角中 OBP12 mRNA 的表达差异极显著 ($P < 0.01$)、差异显著 ($P < 0.05$) 和无显著差异 ($P > 0.05$)。Acer: *Apis cerana cerana*; Amel: *Apis mellifera linnaeus*; An: Antenna; H: Head without antenna; T: Thorax without wings and legs; Ab: Abdomen; L: Legs; W: Wings; 1 d-30 d: Days-old of adult worker bees. Histograms with different uppercase letters indicate extremely significant differences in the expression profiles in different tissues of the same day-old ($P < 0.01$).

**, * and NS indicate that the expression profiles of OBP12 mRNA in the antenna at the same day between *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera linnaeus* had significant difference at the 0.01 level, significant difference at the 0.05 level and no difference at the 0.05 level, respectively.

之间, N-末端均有一段含 22 个氨基酸的信号肽, 具有小分子蛋白的一般特征; 序列中包含 6 个保守的半胱氨酸位点, 均属于 Classical OBP 亚家族, 符合昆虫 OBP 结构通式: $C_1-X_{15-39}-C_2-X_3-C_3-X_{21-44}-C_4-X_{7-12}-C_5-X_8-C_{69}$ (Field *et al.*, 2000)。两个蛋白均含有 6 个 α 螺旋, 且由 Cys 组成的二硫键连接在一起, 符合昆虫 OBPs 的典型结构特征。BlastP 比对结果显示, 中蜂和意蜂 AmelOBP12 的氨基酸序列一致性较高, 推测他们是直系同源

基因。系统进化树结果表明, AcerOBP12 和 AmelOBP12 与同为膜翅目的回条蜂 HlabPBPgP-9-like、印度跳蚁 HsalPBPgP-9-like、阿根廷蚁 LhumPBPgP-9-like 和小火蚁 WaurPBPgP-9-like 有极高的相似性和同源性, 故而推测 OBP12 可能是信息素气味结合蛋白 PBP, 在信息素识别和转运过程中起着重要的作用。

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

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

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

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

一般认为, 中蜂具有比意蜂更灵敏的嗅觉, 这主要是基于对中蜂采集勤奋、善于利用零星蜜粉源这一特点得出的。但从本研究所获得的结果看, 无论是在不同发育阶段还是不同组织中, 意大利蜜蜂 *AmelOBP12* mRNA 的表达量均高于中华蜜蜂。此外, 从作为触角中起主要嗅觉作用的板形感器的数量来看, 意蜂工蜂触角鞭节中约有 2 220 个板形感器, 而中蜂工蜂触角鞭节中约有 2 104 个板形感器, 两者之间差异不大 (宋飞飞, 2011)。因此我们可以推测, 中蜂可以采集零星蜜粉源的原因, 并不是由于其拥有比意蜂更灵敏的嗅觉系统, 而是适应我国山林地区的气候特点和蜜粉源条件经过长期自然选择逐渐形成的。由于缺乏中蜂、意蜂触角中的其他气味结合蛋白时空表达特性的比较研究, 有关中蜂较意蜂嗅觉更灵敏的普遍共识仍有待进一步证实。

参考文献 (References)

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

- characteristics of odorant-binding protein 2 from the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *Acta Entomologica Sinica*, 56(6): 612–621. [陈玲, 李红亮, 周宇翔, 赵磊, 张林雅, 倪翠侠, 商晗武, 2013. 桔小实蝇气味结合蛋白 *BdorOBP2* 的 cDNA 克隆、组织表达及配基结合特性. 昆虫学报, 56(6): 612–621.]
- Dong K, Sun L, Liu JT, Gu SH, Zhou JJ, Yang RN, Dhillon KH, Gao XW, Guo YY, Zhang YJ, 2017. RNAi-induced electrophysiological and behavioral changes reveal two pheromone binding proteins of *Helicoverpa armigera* involved in the perception of the main sex pheromone component Z11-16: Ald. *J. Chem. Ecol.*, 43(2): 1–8.
- Du YL, Zhang ZY, Pan JF, Wang SJ, Yang S, Zhao HT, Jiang YS, 2016. Cloning and expression analysis of odorant binding protein gene *AcerOBP14* from *Apis cerana cerana*. *Chinese Academy of Agricultural Sciences*, 49(19): 3852–3862. [杜亚丽, 张中印, 潘建芳, 王树杰, 杨爽, 赵慧婷, 姜玉锁, 2016. 中华蜜蜂气味结合蛋白基因 *AcerOBP14* 的克隆及时空表达. 中国农业科学, 49(19): 3852–3862.]
- Field LM, Pickett JA, Wadhams LJ, 2000. Molecular studies in insect olfaction. *Insect Mol. Biol.*, 9(6): 545–551.
- Flower DR, North AC, Sansom CE, 2000. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim. Biophys. Acta*, 1482(1): 9–24.
- Forêt S, Maleszka R, 2006. Function and evolution of a gene family encoding odorant binding-like proteins in a social insect, the honey bee (*Apis mellifera*). *Genome Res.*, 16(11): 1404–1413.
- Glaser N, Gallot A, Legeai F, Montagné N, Poivet E, Harry M, Calatayud PA, Jacquin-Joly E, 2013. Candidate chemosensory genes in the stemborer *Sesamia nonagrioides*. *Int. J. Biol. Sci.*, 9(5): 481–495.
- Gong DP, Zhang HJ, Zhao P, Xia QY, Xiang ZH, 2009. The odorant binding protein gene family from the genome of silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics*, 10: 332.
- Gu SH, 2013. Molecular and cellular basis of sex pheromone communication in the black cutworm moth *Agrotis ipsilon*. Doctor dissertation. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. [谷少华, 2013. 小地老虎性信息素通讯的分子和细胞机制. 博士学位论文. 北京: 中国农业科学院.]
- Gu SH, Wang SP, Zhang XY, Wu KM, Guo YY, Zhou JJ, Zhang YJ, 2011. Identification and tissue distribution of odorant binding protein genes in the lucerne plant bug *Adelphocoris lineolatus* (Goeze). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 41(4): 254–263.
- Gu SH, Wu KM, Guo YY, Field LM, Pickett JA, Zhang YJ, Zhou JJ, 2013. Identification and expression profiling of odorant binding proteins and chemosensory proteins between two wingless morphs and a winged morph of the cotton aphid *Aphis gossypii* glover. *PLoS ONE*, 8(9): e73524.
- He X, He ZB, Zhang YJ, Zhou Y, Xian PJ, Qiao L, Chen B, 2016. Genome-wide identification and characterization of odorant-binding protein (OBP) genes in the malaria vector *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae). *Insect Sci.*, 23(3): 366–376.
- He X, Tzotzos G, Woodcock C, Pickett JA, Hooper T, Field LM, Zhou JJ, 2010. Binding of the general odorant binding protein of *Bombyx mori* BmorGOBP2 to the moth sex pheromone components. *J. Chem. Ecol.*, 36(12): 1293–1305.
- Hekmat-Scafe DS, Scafe CR, McKinney AJ, Tanouye MA, 2002. Genome-wide analysis of the odorant-binding protein gene family in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.*, 12(9): 1357–1369.
- Hull JJ, Perera OP, Snodgrass GL, 2014. Cloning and expression profiling of odorant-binding proteins in the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris*. *Insect Mol. Biol.*, 23(1): 78–97.
- Jeong YT, Shim J, Oh SR, Yoon HI, Kim CH, Moon SJ, Montell C, 2013. An odorant-binding protein required for suppression of sweet taste by bitter chemicals. *Neuron*, 79(4): 725–737.
- Ji P, Gu SH, Liu JT, Zhu XQ, Guo YY, Zhou JJ, Zhang YJ, 2013. Identification and expression profile analysis of odorant-binding protein genes in *Apolygus lucorum* (Hemiptera: Miridae). *Appl. Entomol. Zool.*, 48(3): 301–311.
- Jia XJ, Hao SD, Du YL, Zhang MZ, Qin XC, Wang JZ, Wang HX, Ji WR, 2015. cDNA cloning, expression profiling and binding affinity assay of the pheromone binding protein Cpun-PBP1 in the yellow peach moth, *Conogethes punctiferalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Acta Entomologica Sinica*, 58(11): 1167–1176. [贾小俭, 郝少东, 杜艳丽, 张民照, 覃晓春, 王进忠, 王海香, 冀卫荣, 2015. 桃蛀螟性信息素结合蛋白 Cpun-PBP1 的 cDNA 克隆、表达谱及其与配体化合物的结合特性分析. 昆虫学报, 58(11): 1167–1176.]
- Karpe SD, Jain R, Brockmann A, Sowdhamini R, 2016. Identification of complete repertoire of *Apis florea* odorant receptors reveals complex orthologous relationships with *Apis mellifera*. *Genome Biol. Evol.*, 8(9): 2879–2895.
- Leitch O, Papanicolaou A, Lennard C, Kirkbride KP, Anderson A, 2015. Chemosensory genes identified in the antennal transcriptome of the blowfly *Calliphora stygia*. *BMC Genomics*, 16: 255.
- Li GW, Chen XL, Shang TC, 2017. cDNA cloning, expression and ligand binding properties of the odorant binding protein AglaOBP12 in the Asian longhorned beetle, *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae). *Acta Entomologica Sinica*, 60(10): 1141–1154. [李广伟, 陈秀琳, 尚天翠, 2017. 光肩星天牛气味结合蛋白 AglaOBP12 的基因克隆、表达及配

- 体结合特征. 昆虫学报, 60(10): 1141–1154.]
- Li ZQ, Zhang S, Zhou SF, Luo JY, Cui JJ, 2017. Tissue expression profiling and ligand-binding properties of HarmOBP16 of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 60(8): 891–899. [李兆群, 张帅, 周淑芬, 雒珺瑜, 崔金杰, 2017. 棉铃虫气味结合蛋白 HarmOBP16 的组织表达谱及配基结合特性分析. 昆虫学报, 60(8): 891–899.]
- Liu GN, 2017. Talking about the existence crisis and protective measures of *Apis cerana cerana*. *Jiangxi Journal of Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, (4): 67–68. [刘光楠, 2017. 浅谈中华蜜蜂的生存危机与保护措施. 江西畜牧兽医杂志, (4): 67–68.]
- Liu NY, Yang F, Yang K, He P, Niu XH, Xu W, Anderson A, Dong SL, 2015a. Two subclasses of odorant-binding proteins in *Spodoptera exigua* display structural conservation and functional divergence. *Insect Mol. Biol.*, 24(2): 167–182.
- Liu NY, Zhang T, Ye ZF, Li F, Dong SL, 2015b. Identification and characterization of candidate chemosensory gene families from *Spodoptera exigua* developmental transcriptomes. *Int. J. Biol. Sci.*, 11(9): 1036–1048.
- Ma L, Li ZQ, Bian L, Cai XM, Luo ZX, Zhang YJ, Chen ZM, 2016. Identification and comparative study of chemosensory genes related to host selection by legs transcriptome analysis in the tea geometrid *Ectropis obliqua*. *PLoS ONE*, 11(3): e0149591 .
- Matsuo T, Sugaya S, Yasukawa J, Aigaki T, Fuyama Y, 2007. Odorant-binding proteins OBP57d and OBP57e affect taste perception and host-plant preference in *Drosophila sechellia*. *PLoS Biology* 5(5): e118.
- Meunier N, Marion-Poll F, Rospars JP, Tanimura T, 2003. Peripheral coding of bitter taste in *Drosophila*. *J. Neurobiol.*, 56(2): 139–152.
- Ozaki M, Takahara T, Kawahara Y, Wada-Katsumata A, Seno K, Amakawa T, Yamaoka R, Nakamura T, 2003. Perception of noxious compounds by contact chemoreceptors of the blowfly, *Phormia regina*: Putative role of an odorant-binding protein. *Chem. Senses.*, 28(4): 349–359.
- Park D, Jung JW, Choi BS, Jayakodi M, Lee J, Lim J, Yu Y, Choi YS, Lee MY, Park Y, Choi IY, Yang TJ, Edwards OR, Nah G, Kwon HW, 2015. Uncovering the novel characteristics of Asian honey bee, *Apis cerana*, by whole genome sequencing. *BMC Genomics*, 16(1): 1.
- Paula DP, Togawa RC, Costa MMC, Grynberg P, Martins NF, Andow DA, 2016. Identification and expression profile of odorant-binding proteins in *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae). *Insect Mol. Biol.*, 25(5): 580–594.
- Pelletier J, Leal WS, 2011. Characterization of olfactory genes in the antennae of the Southern house mosquito, *Culex quinquefasciatus*. *J. Insect Physiol.*, 57(7): 915–929.
- Pelosi P, Iovinella I, Felicioli A, Dani FR, 2014. Soluble proteins of chemical communication: an overview across arthropods. *Front. Physiol.*, 5: 320.
- Pelosi P, Mastrogiacomo R, Iovinella I, Tuccori E, Persaud KC, 2013. Structure and biotechnological applications of odorant-binding proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98(1): 61–70.
- Qin Z, Ran YH, Zhi ZQ, Yan ZT, Zhang YJ, Huang T, He ZB, Chen B, 2014. Cloning and expression analysis of an odorant binding protein gene *AsinOBP1* from *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae). *Acta Entomologica Sinica*, 57(11): 1289–1298. [秦贻, 冉永红, 支中婧, 闫振天, 张玉娟, 黄婷, 何正波, 陈斌, 2014. 中华按蚊气味结合蛋白基因 *AsinOBP1* 的克隆和表达分析. 昆虫学报, 57(11): 1289–1298]
- Romani R, Salerno G, Frati F, ContiE, Isidoro N, Bin F, 2005. Oviposition behaviour in *Lygus rugulipennis*: a morpho-functional study. *Entomol. Exp. Appl.*, 115(1): 17–25.
- Song FF, 2011. Antennal proteome comparison of drone and worker between *Apis mellifera ligustica* and *Apis cerana cerana*. Master dissertation. Zhengzhou: Zhengzhou University. [宋飞飞, 2011. 意大利蜜蜂和中华蜜蜂雄蜂与工蜂触角差异表达蛋白质组分析. 硕士学位论文. 郑州: 郑州大学.]
- Su SK, Chen SL, Zhong BX, Zheng HQ, Stefan A, 2005. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding mrjp3 of *Apis cerana cerana*. *Scientia Agricultura Sinica*, 38(3): 612–618. [苏松坤, 陈盛禄, 钟伯雄, 郑火青, Stefan Albert, 2005. 中华蜜蜂 mrjp3 基因cDNA的克隆及序列分析. 中国农业科学, 38(3): 612–618.]
- Sun L, Mao TF, Zhang YX, Wu JJ, Bai JH, Zhang YN, Jiang XC, Yin KS, Guo YY, Zhang YJ, Xiao Q, 2017a. Characterization of candidate odorant-binding proteins and chemosensory proteins in the tea geometrid *Ectropis obliqua* Prout (Lepidoptera: Geometridae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 94(4): e21383.
- Sun L, Wang Q, Wang Q, Dong K, Xiao Y, Zhang YJ, 2017b. Identification and characterization of odorant binding protein in the forelegs of *Adelphocoris lineolatus* (Goeze). *Front Physiol.*, 8: 735.
- Sun M, Liu Y, Wang G, 2013. Expression patterns and binding properties of three pheromone binding proteins in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *J. Insect Physiol.*, 59(1): 46–55.
- Swarup S, Morozova TV, Sridhar S, Nokes M, Anholt RR, 2014. Modulation of feeding behavior by odorant-binding proteins in *Drosophila melanogaster*. *Chem. Senses.*, 39(2): 125–132.
- Vincent F, Spinelli S, Ramoni R, Grolli S, Pelosi P, Cambillau C, Tegoni M, 2000. Complexes of porcine odorant binding protein with odorant molecules belonging to different chemical classes. *J.*

- Mol. Biol.*, 300(1): 127–139.
- Vogt RG, Riddiford LM, 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 293(5828): 161–163.
- Walker WB, Gonzalez F, Garczynski SF, Witzgall P, 2016. The chemosensory receptors of codling moth *Cydia pomonella*-expression in larvae and adults. *Sci. Rep.*, 6: 23518.
- Wang CQ, Zhao Y, Cao YZ, Wei HS, Li KB, Zhang S, Peng Y, Yin J, 2017. Expression and binding characterization of odorant binding protein 1 (AcorOBP1) in *Anomala corpulenta* (Coleoptera: Scarabaeoidea). *Acta Entomologica Sinica*, 60(4): 363–371. [王超群, 赵莹, 曹雅忠, 魏红爽, 李克斌, 张帅, 彭宇, 尹皎, 2017. 铜绿丽金龟气味结合蛋白 AcorOBP1 的表达和结合特性分析. 昆虫学报, 60(4): 363–371.]
- Wu ZN, Du YJ, ZhuGe QC, 2009. Expression and localization analysis of general odorant binding protein 1 (GOBP1) gene in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 52(2): 610–616. [吴仲南, 杜永均, 诸葛启钊, 2009. 斜纹夜蛾普通气味结合蛋白 GOBP1 基因的表达定位分析. 昆虫学报, 52(2): 610–616.]
- Xu PX, Zwiebel LJ, Smith DP, 2003. Identification of a distinct family of genes encoding atypical odorant-binding proteins in the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol.*, 12(6): 549–560.
- Yang YQ, Wang SN, Peng Y, Dan S, Zheng Y, Li RJ, Zhang YJ, Guo YY, 2017. Expression of the odor binding protein MmedOBP19 in the legs of *Microplitis mediator* (Hymenoptera: Braconidae) and its ligand binding characteristics. *Acta Entomologica Sinica*, 60(6): 613–620. [杨叶青, 王山宁, 彭勇, 单双, 郑瑶, 李瑞军, 张永军, 郭予元, 2017. 气味结合蛋白 MmedOBP19 在中红侧沟茧蜂足部的表达及配体结合特征. 昆虫学报, 60(6): 613–620.]
- Yasukawa J, Tomioka S, Aigaki T, Matsuo T, 2010. Evolution of expression patterns of two odorant-binding protein genes, Obp57d and Obp57e, in *Drosophila*. *Gene*, 467(1/2): 25–34.
- Yin J, Feng H, Sun H, Xi J, Cao Y, Li K, 2012. Functional analysis of general odorant binding protein 2 from the meadow moth, *Loxostege sticticalis* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *PLoS ONE*, 7(3): e33589.
- Yuan HB, Ding YX, Gu SH, Sun L, Zhu XQ, Liu HW, Dhillon KH, Zhang YJ, Guo YY, 2015. Molecular characterization and expression profiling of odorant-binding proteins in *Apolygus lucorum*. *PLoS ONE*, 10(10): e0140562.
- Zhang LY, 2013. Molecular cloning and functional analysis of two kinds of olfactory related genes in the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana*. Master dissertation. Hangzhou: China Jiliang University. [张林雅, 2013. 中华蜜蜂两种嗅觉相关蛋白的基因克隆与功能研究. 硕士学位论文. 杭州: 中国计量学院.]
- Zhang SX, Zhang Y, Xu SQ, Wang GX, Hu ZJ, Zhao CX, Cui WZ, 2010. Mapping and expression analysis of GOBP/PBP subfamily gene cluster during pupal and adult stages of the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomologica Sinica*, 53(10): 1069–1076. [张升祥, 张瑶, 徐世清, 王更先, 胡增娟, 赵春晓, 崔为正, 2010. 家蚕蛹和成虫期 GOBP/PBP 亚家族基因簇基因定位与表达分析. 昆虫学报, 53(10): 1069–1076.]
- Zhang YF, Huang LQ, Ge F, Wang CZ, 2011. Tarsal taste neurons of *Helicoverpa assulta* (Guenée) respond to sugars and amino acids, suggesting a role in feeding and oviposition. *J. Insect. Physiol.*, 57(10): 1332–1340.
- Zhang YN, Jin JY, Jin R, Xia YH, Zhou JJ, Deng JY, Dong SL, 2013. Differential expression patterns in chemosensory and non-chemosensory tissues of putative chemosensory genes identified by transcriptome analysis of insect pest the purple stem borer *sesamia inferens* (walker). *PLoS ONE*, 8(7): e69715.
- Zhang ZK, Wu SY, Lei ZR, 2016. Cloning, sequence analysis and expression profile of an odorant binding protein gene in western flower thrips (*Frankliniella occidentalis*). *Scientia Agricultura Sinica*, 49(6): 1106–1116. [张治科, 吴圣勇, 雷仲仁, 2016. 西花蓟马气味结合蛋白的 cDNA 克隆、序列分析及时空表达. 中国农业科学, 49(6): 1106–1116.]
- Zhao HX, Zeng XN, Liang Q, Zhang XF, Huang WZ, Chen HS, Luo YX, 2015. Study of the obp5 gene in *Apis mellifera ligustica* and *Apis cerana cerana*. *Genet. Mol. Res.*, 14(2): 6482–6494.
- Zhao HT, Zhao WM, Gao PF, Zhang GX, Jiang YS, 2014. Sequence and expression characterization of an OBP1 gene in the Asian honeybee, *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae). *Appl. Entomol. Zool.*, 49(1): 189–196.
- Zhou JJ, 2010. Odorant-binding proteins in insects. *Vitam. Horm.*, 83: 241–272.
- Zhou JJ, He XL, Pickett JA, Field LM, 2008. Identification of odorant-binding proteins of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*: genome annotation and comparative analyses. *Insect Mol. Biol.*, 17(2): 147–163.
- Zhu XQ, Ding YX, Liu HW, Zhou YL, Zhang YJ, Guo YY, 2015. Binding specificity analysis of odorant binding protein AlucOBP8 of *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür). *Chinese Journal of Biological Control*, 31(6): 821–829. [朱晓强, 丁玉晓, 刘航玮, 周延乐, 张永军, 郭予元, 2015. 绿盲蝽气味结合蛋白 AlucOBP8 的结合特性分析. 中国生物防治学报, 31(6): 821–829.]