

小菜蛾化学感受蛋白基因 *PxylCSP5* 克隆及表达分析*

李方圆** 付淑慧 张博晨 吕治荣 王海绮 郝 赤*** 闫喜中***

(山西农业大学植物保护学院, 太谷 030801)

摘 要 【目的】通过对小菜蛾 *Plutella xylostella* 化学感受蛋白基因 *PxylCSP5* 进行基因克隆、生物信息学分析、时空表达谱分析和体外原核表达, 推测 *PxylCSP5* 基因在小菜蛾体内的功能, 为探究小菜蛾化学感受蛋白基因的功能奠定基础。【方法】采用 RT-PCR 法克隆了小菜蛾化学感受蛋白基因 *PxylCSP5*, 对该序列进行生物信息学分析。利用 RT-qPCR 对 *PxylCSP5* 基因在小菜蛾不同发育时期和成虫不同组织中的表达量进行分析。构建了小菜蛾 *PxylCSP5* 原核表达载体, 并在大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中诱导表达该蛋白。【结果】小菜蛾化学感受蛋白基因 *PxylCSP5* 完整的开放阅读框为 393 bp, 编码了 130 个氨基酸残基, 预测氨基酸序列的末端含有 18 个氨基酸长度的信号肽序列, 同时含有 4 个保守的半胱氨酸位点。氨基酸同源比对结果显示, *PxylCSP5* 与谷实夜蛾 *Helicoverpa zea* *HzeaCSP* 的氨基酸序列一致性最高, 达到 67.91%。RT-qPCR 结果表明 *PxylCSP5* 在不同发育时期中成虫期表达量最高, 与其它发育时期相比较, 具有显著差异性 ($P < 0.05$); 成虫期不同组织中腿的表达量最高, 与其它组织比较具有显著差异性 ($P < 0.05$)。成功构建了 *PxylCSP5* 的原核表达载体 pET28a-*PxylCSP5* 并在体外诱导表达。【结论】小菜蛾 *PxylCSP5* 基因在成虫足中高表达, 初步推测可能该基因功能与寄主定位有关。

关键词 小菜蛾; 化学感受蛋白; RT-qPCR; 原核表达

Molecular cloning and expression of the chemosensory *Plutella xylostella* protein gene, *PxylCSP5*

LI Fang-Yuan** FU Shu-Hui ZHANG Bo-Chen LV Zhi-Shen
WANG Hai-Qi YAN Xi-Zhong*** HAO Chi***

(College of Plant Protection, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract 【Objectives】To investigate the function of the chemosensory protein *PxylCSP5* in *Plutella xylostella*. 【Methods】The *PxylCSP5* gene was cloned using RT-PCR, and its sequence analyzed using bioinformatics methods. RT-qPCR was used to analyze the expression of the *PxylCSP5* gene in different developmental stages and tissues of adult moths. A prokaryotic expression vector for *PxylCSP5* was constructed in BL21(DE3) 【Results】The complete open reading frame of *PxylCSP5* is 393 bp, encodes 130 amino acid residues, contains a signal peptide sequence of 18 amino acids at the N-terminal and has four conserved cysteines. The results of amino acid sequence alignment indicate that *PxylCSP5* was homologous to *Helicoverpa zea* *HzeaCSP* with 67.91% amino acid sequence identity. RT-qPCR results show that *PxylCSP5* was more highly expressed in adults, and within adult tissues, in the legs. A prokaryotic expression vector for *PxylCSP5* was successfully constructed allowing *PxylCSP5* to be expressed *in vitro*. 【Conclusion】The *PxylCSP5* gene is highly expressed in the legs of adults, which suggests that its function may be related to host location.

Key words *Plutella xylostella*; chemosensory protein; gene cloning; spatio-temporal expression; prokaryotic expression

*资助项目 Supported projects: 山西省自然科学基金项目 (20210302123387 和 201901D111231); 山西农业大学科研专项 (2020xshf11)

**第一作者 First author, E-mail: 18404980692@163.com

***共同通讯作者 Co-corresponding authors, E-mail: sxauhc@163.com; yanxizhong80@163.com

收稿日期 Received: 2021-08-19; 接受日期 Accepted: 2021-12-01

经过长期的进化,昆虫的化学感官系统在其生长发育、交配产卵躲避天敌等生命活动中起重要作用,其中嗅觉系统的主要功能为识别和传导自然环境中的化合物(Hansson, 2011)。昆虫嗅觉识别化合物的过程中起主要作用的蛋白有化学感受蛋白(Chemosensory proteins, CSPs)、气味结合蛋白(Odorant binding proteins, OBPs)、气味受体(Olfactory receptors, ORs)、离子型受体(Ionotropic receptors, IRs)、气味降解酶(Odorant degrading enzymes, ODEs)和感觉神经元膜蛋白(Sensory neuron membrane proteins, SNMPs)(Pelosi *et al.*, 2006)。昆虫的CSPs是低分子量的可溶性蛋白,蛋白的相对分子质量大小为12-14 ku,氨基酸序列的全长约为100-115个氨基酸。CSPs的结构特点是含有4个高度保守的半胱氨酸(Cys)位点,每两个Cys可以形成1个二硫键。(龚亮等, 2009)。目前,CSPs已经在鳞翅目(Picimbon *et al.*, 2000)、双翅目(Liu *et al.*, 2012)及半翅目(Gu *et al.*, 2015)等多种昆虫目中被广泛报道。

小菜蛾 *Plutella xylostella* L.属鳞翅目菜蛾科,是一种世界性的迁飞害虫,主要危害十字花科蔬菜,其中以白菜、萝卜和油菜等危害最为严重,全球每年因小菜蛾为害造成的经济损失高达40-50亿美元(Furlong *et al.*, 2013)。小菜蛾作为一种寡食性昆虫,通过敏锐的嗅觉来选择和识别寄主植物以及产卵场所等。化学感受蛋白作为一类嗅觉蛋白,参与了小菜蛾的嗅觉识别过程。2017年从小菜蛾触角转录组中鉴定出15个CSP基因(Yang *et al.*, 2017),其中Pxy1CSP1基因能够识别该昆虫的产卵抑制剂闹羊花素Ⅲ(Rhodojaponin-Ⅲ)(Liu *et al.*, 2010),Pxy1CSP11基因不仅能够结合识别寄主挥发物,还能够识别小菜蛾的一种性信息素:顺-11-十六碳烯酯(Z11-16:Ac)(Fu *et al.*, 2020)。但有关小菜蛾化学感受蛋白的其它基因的具体功能有待进一步研究。

本文通过克隆小菜蛾化学感受蛋白基因Pxy1CSP5,并对该基因在不同组织和不同发育时期的表达进行分析,通过原核表达得到了目的蛋白并分析其表达情况,该研究结果不仅丰富了对

小菜蛾化学感受蛋白的认识,而且为探究小菜蛾化学感受蛋白的功能及在嗅觉识别机制中的作用提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫饲养

小菜蛾人工饲养于山西农业大学昆虫神经行为与感官生物学实验室内,饲养温度为(25±1)℃,相对湿度为60%-75%,光周期为16 L:8 D。幼虫饲养于预先放有新鲜甘蓝叶片的圆形塑料盆,每隔1-3 d更换一次新鲜甘蓝叶片,直至羽化,成虫提供15%蜂蜜水。

1.2 样品制备

选取卵(200粒)、1龄幼虫(100只)、2龄幼虫(30只)、3龄幼虫(30只)、4龄幼虫(10只)、蛹(20只)、雌性成虫(15只)及雄性成虫(15只)在1.5 mL无酶离心管中液氮速冻,用于提取不同时期的RNA。用超微量核酸蛋白测定仪检测提取的RNA的浓度、A₂₆₀、A₂₈₀和A₂₃₀值,通过A_{260/280}和A_{260/230}比值评估RNA的纯度,并用1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性。合格的RNA样品置于-80℃冰箱保存;新鲜蛹分装在玻璃指形管中,待羽化后选取健康活跃的雌雄成虫各100只,剪下触角(100只)、头(50只)、胸(50只)、腹(50只)、足(100只)和翅(100只)分别置于1.5 mL无酶离心管中液氮速冻,用于提取不同组织的RNA,检测各组织RNA的纯度和完整性,合格的RNA样品置于-80℃冰箱保存。

1.3 供试试剂和仪器

RNA抽提试剂盒、M-MuLV第一链cDNA合成试剂盒、SanPrep柱式DNA胶回收试剂盒、SGExcel FastSYBR Master预混液(含ROX)、4S Red Plus核酸染色剂及琼脂糖购于上海生物工程技术有限公司。TransStart® FastPfu DNA Polymerase、pEASY-Blunt simple、pEASY-Blunt 3 cloning vector和DH5α大肠杆菌感受态细胞购于北京全式金生物技术有限公司。

pET-28a (+)表达载体和 BL21(DE3)大肠杆菌购自 Novagen。

试验仪器: T100TMThermal Cyclers PCR 仪 (Bio-rad, 美国); 实时荧光定量 PCR 仪 (AppliedBiosystems, 美国); 超微量核酸蛋白测定仪 (BioDrop, 英国); MultilimageTM Light Cabinet 凝胶成像仪 (Alpha Innotech, 美国)。

1.4 方法

1.4.1 *PxyICSP5* 基因的克隆与测序 按照 RNA 抽提试剂盒说明书提取小菜蛾触角 RNA, 采用超微量核酸蛋白测定仪检测 RNA 的浓度、A₂₆₀、A₂₈₀ 和 A₂₃₀ 的数值。根据 M-MuLV 第一链 cDNA 合成试剂盒说明书反转合成 cDNA。PCR 扩增特异性引物参照表 1, 扩增体系 (50 μL): cDNA: 2 μL, 5×TransStar® FassPfu Buffer: 10 μL, 2.5 mmol·L⁻¹ dNTPs: 4 μL, 引物 F: 1 μL, 引物 R: 1 μL, TransStar® FassPfu DNA Polymerase: 1 μL, ddH₂O 补足至 50 μLPCR 扩增的条件为先 95 °C 预变性时间 1 min, 其次是 95 °C 变性 30 s, 之后是 54.6 °C 退火 30 s, 最后是 72 °C 延伸时间 1 min, 扩增程序设置为 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。经过 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 的扩增产物。使用胶回收纯化 PCR 扩增产物后与平末端 pEASY-Blunt simple 克隆载体相连接, 将连接产物转化到大肠杆菌 DH5α 的感受态细胞后

经蓝白斑筛选原理进行筛选, 挑取阳性菌落白色斑点进行液体培养, 进行菌液 PCR, 将验证正确的菌液送去上海生工进行阳性菌液测序分析。

1.4.2 *PxyICSP5* 基因的生物信息学分析 利用 DNAMAN 软件对 *PxyICSP5* 完整的开放阅读框进行氨基酸序列的比对。利用 ExPASy- ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>)在线网站预测 *PxyICSP5* 的理化性质。利用 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>)在线网站预测 *PxyICSP5* 是否存在信号肽序列以及信号肽的氨基酸个数。利用在线网站 NPS@:GOR4 secondary structure prediction (<https://prabi.ibcp.fr/html/site/web/home>)预测 *PxyICSP5* 二级结构类型及占比。利用在线网站 Swiss-model (<https://swissmodel.expasy.org/>)对 *PxyICSP5* 进行同源建模。利用 MAGE 5.0 进行系统发育树的构建。

1.4.3 *PxyICSP5* 的基因表达分析 收集不同发育时期的小菜蛾提取 RNA; 收集雌雄成虫的不同组织提取 RNA。将提取的 RNA 经过检测后进行反转录合成 cDNA, 分别以小菜蛾不同发育时期 (卵、1 龄、2 龄、3 龄、4 龄、蛹、雌性成虫和雄性成虫) 及雌雄成虫不同组织 (触角、头、胸、腹、足和翅) 的 cDNA 为模板; 以 RPS4 为内参基因, 使用实时荧光定量 PCR 仪进行 RT-qPCR; 反应体系 (20 μL): cDNA: 2 μL, SGExcel FastSYBR qPCR 预混液 (含 ROX):

表 1 *PxyICSP5* 引物序列
Table 1 Primers of *PxyICSP5*

名称 Name	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	用途 Use
<i>PxyICSP5</i> F	ATGACATCTCTAAAACCTCCTTGC	PCR 扩增
<i>PxyICSP5</i> R	TCACTCGTCGGGGATGAC	
<i>PxyICSP5</i> F	AAGTACGACAACATCAACCT	实时荧光定量
<i>PxyICSP5</i> R	CTTCTCCAGCACACAGTT	
<i>PxyIRPS4</i> F	ATGGATGTTGTGTCGATTGAAAAGA	
<i>PxyIRPS4</i> R	GGGGTTGCCAGGTCAGAT	
<i>PxyICSP5</i> F	CGCGGATCCGACGACACGTACACGG	原核表达
<i>PxyICSP5</i> R	CCGCTCGAGACTCGTCGGGGATGA	

下划线分别为 *BamH* I 和 *Xho* I 酶切位点。
The restriction sites of *BamH* I and *Xho* I are underlined, respectively.

10 μL , 引物和引物 R 各 0.4 μL , ddH₂O 补足至 20 μL 。反应的扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 扩增程序设置为 40 个循环。待测的每个样品进行 3 次技术重复。试验结束后导出数据使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法分别计算 *PxyICSP5* 的相对表达量 (Livak and Schmittgen, 2001)。

1.4.4 *PxyICSP5* 基因原核表达 *PxyICSP5* 与 pEASY-Blunt 3 cloning vector 连接后转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑选阳性菌落进行液体培养, 检测正确的阳性菌液使用 1.5 mL 离心管分装后送往上海生工进行菌液测序; 测序正确菌液提取质粒, 与 pET28a(+) 质粒用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切; 回收酶切产物后连接得到重组载体 pET28a-*PxyICSP5*; 将重组载体转入 BL21(DE3) 大肠杆菌感受态细胞后送去生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序; 测序正确菌液按照 1:100 的比例转至新鲜的 LB 培养液中 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 h ($\text{OD}_{600}=0.4-0.6$) 分别加入异丙基硫代半乳糖苷 (Isopropyl- β -D- Thiogalactoside, IPTG), 使其终浓度为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 30 $^{\circ}\text{C}$ 4 h 诱导培养; 诱导的菌液进行 SDS-PAGE 电泳分析重组蛋白表达情况; 剩余菌液离心取沉淀, 溶于 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl ($\text{pH}=7.4$) 中, 超声波破碎后菌液 12 000 r/min 低温离心机离心 10 min, 离心结束后分别取样品的上清和沉淀处理后进行表达产物 SDS-PAGE 分析, 分析 pET28a-*PxyICSP5* 的表达形式。

1.5 数据分析

用 SPSS Statistics 19 (IBM) 软件对数据进行统计分析; 小菜蛾不同发育时期、不同组织中 *PxyICSP5* 基因的相对表达量均采用单因素方差分析; 用 Tukey 法进行差异显著性检验; 数据结果使用 GraphPad Prism 7.0 软件进行作图。

2 结果与分析

2.1 *PxyICSP5* 基因的序列和结构分析

触角 RNA 浓度为 0.531 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, $A_{260/230}$ 为 2.103, $A_{260/280}$ 为 2.097。 *PxyICSP5* 的 PCR 扩增

结果如图 1, 扩增结果与预期一致。测序比对后得到小菜蛾化学感受蛋白基因的序列如图 2, 其开放阅读框为 393 bp, 编码 130 个氨基酸残基, 氨基酸序列有 4 个 Cys, 符合昆虫 CSPs 的结构特征。对该基因进行理化性质分析得到: 蛋白分子量为 14.76 ku, 理论等电点为 5.25, 亲水指数为 -0.560, 负电荷残基总数为 23, 正电荷残基总数为 18, 亲水系数为 -0.506。使用 SignalP 4.1 预测结果显示, *PxyICSP5* 的 N-端含有 18 个氨基酸长度的信号肽。

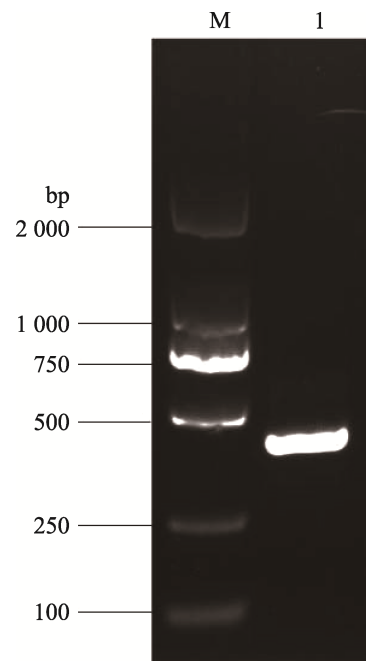


图 1 小菜蛾 *PxyICSP5* 基因 PCR 扩增结果
Fig. 1 PCR amplification results of *PxyICSP5* gene in *Plutella xylostella*

M: DL2000 DNA marker; 1: *PxyICSP5* 基因 PCR 扩增产物。

M: DL2000 DNA marker; 1: PCR amplification product of *PxyICSP5* gene.

利用 NPS@:GOR4 secondary structure prediction 预测 *PxyICSP5* 基因的二级结构, 含有 6 个 α -螺旋, 含量为 56.15%, 其余的二级结构为 β -折叠和无规则卷曲, 含量分别为 12.31%和 31.54%; 利用 Swiss Model 网站进行同源建模 (图 3), 结果表明甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* 触角化学感受蛋白 A6 与 *PxyICSP5* 的序列一致性为 71.34%, 满足同源建模的基本要求, 因此以甘蓝夜蛾触角化学感受蛋白 A6 为模板构建 *PxyICSP5*

```

1 ATGACATCTCAAACTCTTGGCTGGCTGCGTGATGGCGGCGGCACTGGCTGACGACA
1 M T S L K L L A L A C V M A A A L A D D
61 CGTACACGGACAAGTACGACAACATCAACCTGCAGGAGATCTGGACAACAAGCGCTGC
21 T Y T D K Y D N I N L Q E I L D N K R L
121 TCATGAACCTACGTAACCTGTGTGCTGGAGAAGGGCAAGTCAACGCTGAGGGGAAGGAGC
41 L M N Y V N C V L E K G K C N A E G K E
181 TGAAAGACCATTTAGAAAGCGCTCCAGACGGCTGCGCAAAATGCACGGAAGCTCAGA
61 L K D H L E E A L Q T G C A K C T E A Q
241 AGAAGGGCGCGCAGACGGTGATCGAGCACCTGATCAAGAATGAGCTGGAGCTGTGGAGGG
81 K K G A Q T V I E H L I K N E L E L W R
301 AGCTGGCCAAAGTACGACCCCGAGGCGACCTTCAGGAAGAAGTACGAGGACCGAGCCA
101 E L A N K Y D P Q G T F R K K Y E D Q A
361 AGGAACACGGCATCGTATCCCGACGAGTGA
121 K E H G I V I P D E

```

图2 小菜蛾 *PxylCSP5* 基因核苷酸序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 2 *PxylCSP5* gene nucleotide sequence and its encoded amino acid sequence

红色直线为信号肽序列, 红色圆圈为4个保守的半胱氨酸位点。

The signal peptide sequence is marked with the red line, and the 4 conserved cysteine sites are marked with the red circles.

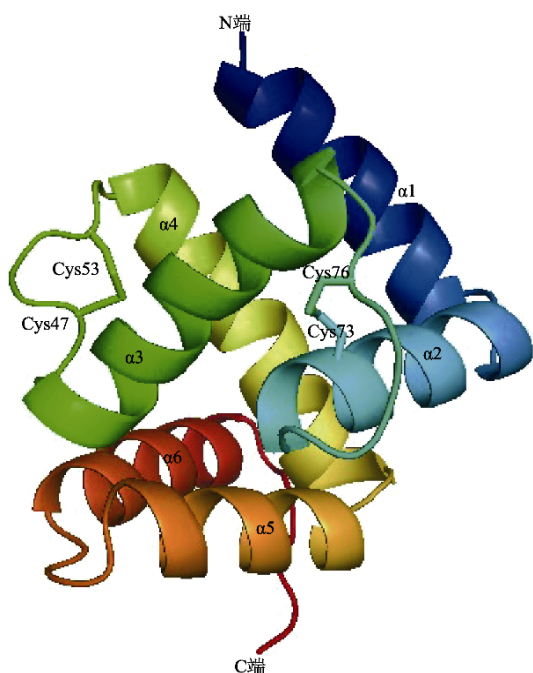


图3 *PxylCSP5* 三维结构图

Fig. 3 3D structure of *PxylCSP5*

的三维结构, 通过 Ramachandran 图评估 *PxylCSP5* 模型的质量如图4所示, 氨基酸残基都在允许区域中, 表明预测的结构是合理可靠的。 *PxylCSP5* 的三维结构是由6个 α 螺旋组成:

$\alpha 1$ (Thr23-Leu31)、 $\alpha 2$ (Lys38-Val48)、 $\alpha 3$ (Ala56-Gln70)、 $\alpha 4$ (Glu78-Asn94)、 $\alpha 5$ (Leu96-Tyr106) 和 $\alpha 6$ (Thr111-Glu122); 存在两对二硫键: Cys47-Cys54 和 Cys73-Cys76。

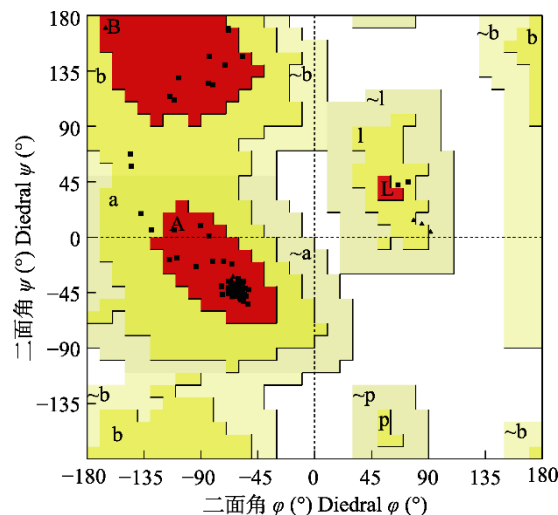


图4 *PxylCSP5* 三维结构的评估结果图

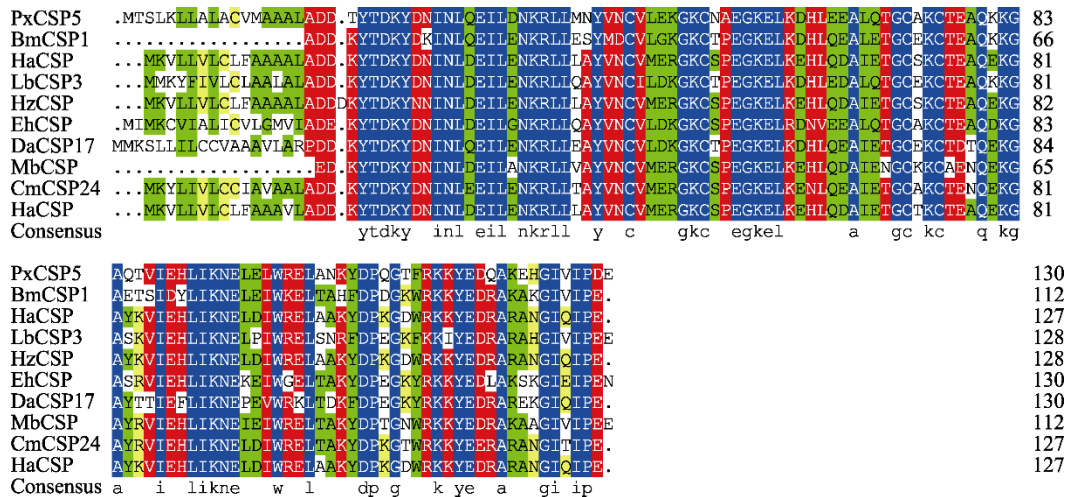
Fig. 4 Assessment results of *PxylCSP5* 3D structure

红色: 最佳区域, 包括 A、B 和 L 区域; 黄色: 许可区域, 包括 a、b、l 和 p 区域; 浅黄色: 较合理区域, 包括 ~a、~b、~l 和 ~p 区域; 白色: 不合理区域。

Red: The most favoured regions, including A, B and L areas; yellow: The additional allowed regions, including a, b, and p areas; pale yellow: The generously allowed regions, including ~a, ~b, ~l and ~p areas; white: The disallowed regions.

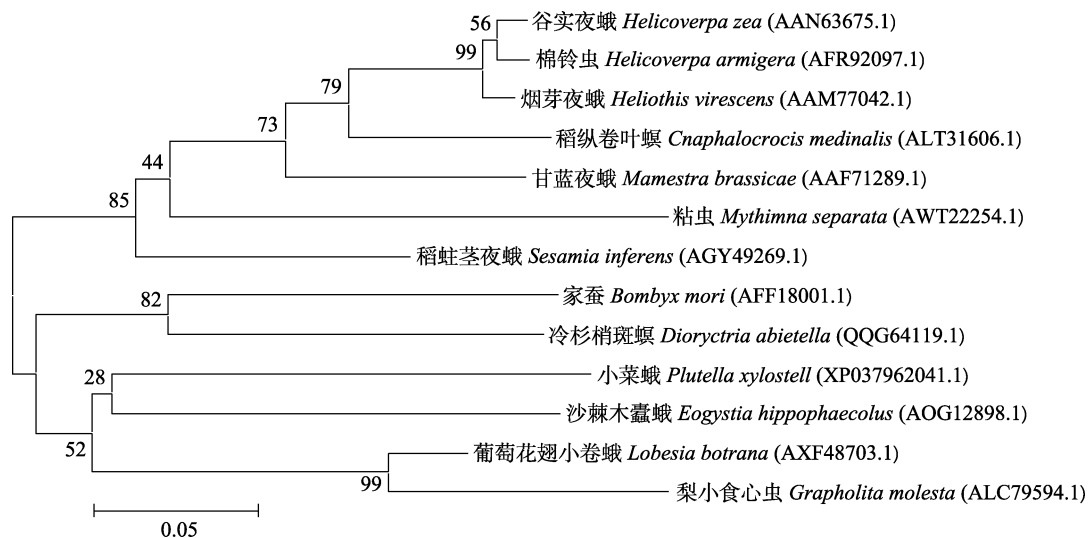
2.2 *PxylCSP5* 基因多序列比对和系统发育分析

利用 DNAMAN 软件将 *PxylCSP5* 基因与鳞翅目不同昆虫 CSPs 基因进行同源性分析(图5), 结果发现 *PxylCSP5* 基因与家蚕 *Bombyx mori*、棉铃虫 *Helicoverpa armigera*、葡萄花翅小卷蛾 *Lobesia botrana*、谷实夜蛾 *Helicoverpa zea*、沙棘木蠹蛾 *Eogystia hippophaecolus*、冷杉梢斑螟 *Dioryctria abietella*、甘蓝夜蛾、稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis* 和烟叶蛾 *Helicoverpa assulta* 的同源性分别为 61.19%、65.67%、67.91%、64.93%、67.16%、66.42%、58.96%、64.18%和 66.42%。利用 MEGA5.0 构建系统发育树, 结果显示小菜蛾 *PxylCSP5* 与沙棘木蠹蛾、葡萄花翅小卷蛾及梨小食心虫 *Grapholita molesta* 的 CSP 聚为一支(图6)。

图5 小菜蛾 *Pxy/CSP5* 与其他昆虫 CSP 氨基酸序列的序列比对Fig. 5 Amino acid sequence alignment of *Pxy/CSP5* and other insect CSPs

蓝色代表 100% 的序列一致性, 红色代表 $\geq 75\%$ 的序列一致性, 绿色代表 $\geq 50\%$ 的序列一致性, 黄色代表 $\geq 33\%$ 的序列一致性。

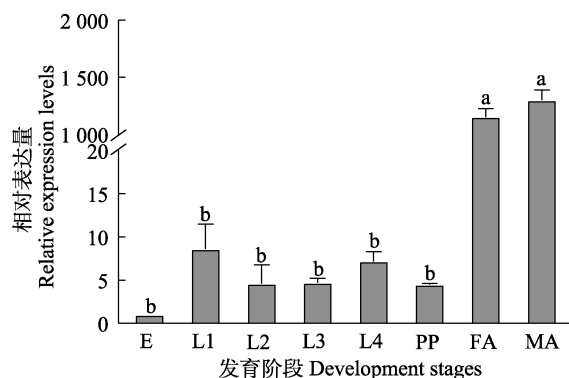
Blue represents 100% identity; red represents $\geq 75\%$ identity; green represents $\geq 50\%$ identity and yellow represents $\geq 33\%$ identity. BmCSP1: 家蚕 *B. mori* (AFF18007.1); HaCSP: 棉铃虫 *H. armigera* (AAK53762.1); LbCSP3: 葡萄花翅小卷蛾 *L. botrana* (AXF48703.1); HzCSP: 谷实夜蛾 *H. zea* (AAN63675.1); EhCSP: 沙棘木蠹蛾 *E. hippophaecolus* (AOG12898.1); DaCSP17: 冷杉梢斑螟 *D. abietella* (QQG64119.1); MbCSP: 甘蓝夜蛾 *M. brassicae* (AAF19647.1); CmCSP24: 稻纵卷叶螟 *C. medinalis* (ALT31606.1); HaCSP: 烟叶蛾 *H. assulta* (ABB91378.1).

图6 小菜蛾 *Pxy/CSP5* 与鳞翅目其它昆虫 CSPs 氨基酸序列的系统发育树Fig. 6 Phylogenetic tree based on the amino acid sequence of *Pxy/CSP5* and lepidoptera other insect CSPs

2.3 *Pxy/CSP5* 基因表达分析

Pxy/CSP5 在不同发育时期和成虫不同组织中有不同程度的表达。*Pxy/CSP5* 基因在小菜蛾的整个生长发育阶段中的表达如图 7。*Pxy/CSP5* 在雌性成虫、雄性成虫中的表达量最高, 显著高

于其它发育阶段 ($F=186.585$; $df=7, 16$; $P=0.000$), 然而雌性成虫、雄性成虫之间的表达量无显著性差异 ($P>0.05$); *Pxy/CSP5* 基因在 1 龄、2 龄、3 龄和 4 龄幼虫期和蛹的表达量相近, 且无显著性差异 ($P>0.05$), 其中 *Pxy/CSP5* 在卵的表达量最低。

图 7 不同发育时期 *PxylCSP5* 基因的表达量Fig. 7 *PxylCSP5* gene expression in different developmental stages

柱上标有不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。图 8 同。
E: 卵; L1: 1 龄幼虫; L2: 2 龄幼虫; L3: 3 龄幼虫;
L4: 4 龄幼虫; PP: 蛹; FA: 雌性成虫;
MA: 雄性成虫。

Histograms with difference lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$). The same as Fig. 8.
E: Egg; L1: 1st instar larva; L2: 2nd instar larva; L3: 3rd instar larva; L4: 4th instar larva; PP: Pupa; FA: Female adult; MA: Male adult.

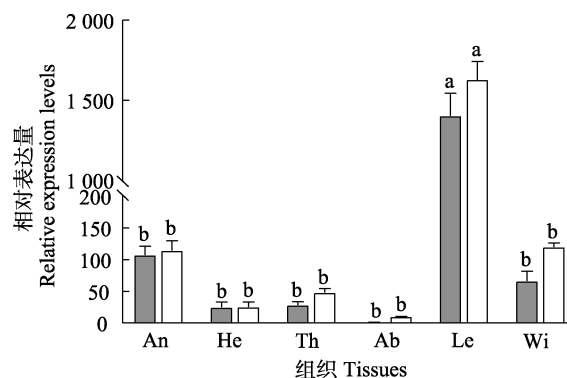
成虫不同组织 RT-qPCR 结果如图 8 所示, *PxylCSP5* 基因在成虫不同组织中均有分布, 但表达量不同; *PxylCSP5* 基因在雌虫足、雄虫足中的表达量最高, 显著高于其它组织 ($F=115.996$; $df=11, 24$; $P=0.000$); 雌虫足和雄虫足之间的表达量无显著性差异 ($P > 0.05$); *PxylCSP5* 基因也在成虫触角、头、胸、腹和翅各个组织中均有表达, 表达量均无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.4 *PxylCSP5* 基因原核表达

构建 *PxylCSP5* 的原核表达载体 pET28a-*PxylCSP5* 后转入 BL21(DE3) 大肠杆菌感受态中, 不同浓度 IPTG 诱导表达后进行 SDS-PAGE 分析, 结果显示重组蛋白 *PxylCSP5* 能够被不同浓度的 IPTG 诱导表达 (图 9)。由于重组蛋白表达形式不同, 其纯化方式不同, 所以分析了诱导的重组蛋白的表达形式, 结果表明重组蛋白 *PxylCSP5* 在上清和沉淀中均表达。

3 讨论

本研究克隆了小菜蛾化学感受蛋白基因

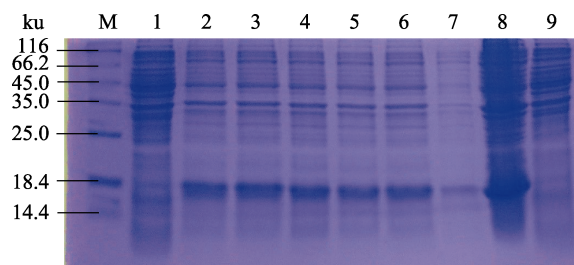
图 8 不同组织 *PxylCSP5* 基因的表达量Fig. 8 *PxylCSP5* gene expression in different tissues

An: 触角; He: 头; Th: 胸;

Ab: 腹; Le: 足; Wi: 翅。

An: Antennae; He: Heads; Th: Thoraxes;

Ab: Abdomens; Le: Legs; Wi: Wings.

图 9 *PxylCSP5* 重组表达蛋白的表达形式分析Fig. 9 Expression type analysis for *PxylCSP5* recombinant protein

M: 蛋白分子量标准; 1: pET28a-*PxylCSP5* 未诱导; 2-6: 0.2、0.4、0.6、0.8 和 1 mmol·L⁻¹ IPTG 诱导产物; 7: 上清液; 8: 沉淀; 9: pET28a(+)空载体未诱导。

M: Protein molecular weight standard; 1: pET28a-*PxylCSP5* was not induced; 2-6: The products were induced by 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1.0 mmol·L⁻¹ IPTG; 7: Supernatant; 8: Precipitation; 9: pET28a (+) vector was not induced.

PxylCSP5, 并对该基因编码的氨基酸序列进行了生物信息学分析, *PxylCSP5* 基因与其它昆虫化学感受蛋白基因的氨基酸序列进行比对, 发现均含有 4 个 Cys, 并两两顺次连接形成 2 对二硫键, 符合昆虫化学感受蛋白的典型特征 (Ban *et al.*, 2002)。对 *PxylCSP5* 基因的结构进行分析, 二级结构和三级结构均显示 *PxylCSP5* 具有 6 个 α 螺旋, 这与已报道的甘蓝夜蛾 CSP6 (Lartigue *et al.*, 2002)、家蚕 CSP1 (Jansen *et al.*, 2007) 和沙漠

蝗 *Schistocera gregaria* CSP4 (Tomaselli et al., 2006) 的主要结构和组成相吻合。

昆虫生长发育过程中,通常伴随着蛋白种类的变化以及表达量的差异。本文采用 RT-qPCR 技术分析了 *PxylCSP5* 基因在小菜蛾不同发育时期的表达量。结果显示, *PxylCSP5* 基因在成虫中的表达量最高,显著高于其它发育阶段,这与悬铃木方翅网蝽 *Corythucha ciliate* CSP1 (付宁宁等, 2017)、棉花粉蚧 *Phenacoccus solenopsis* CSP10 (赵洁等, 2016)、沙葱萤叶甲 *Galeruca daurica* CSP10 (Li et al., 2018a)、褐飞虱 *Nilaparvata lugens* CSP1 (Yang et al., 2014)、华山松大小蠹 *Dendroctonus armandi* CSP1 (Li et al., 2018b) 不同发育时期在成虫中表达量最高的结果相似。小菜蛾 *PxylCSP5* 基因在成虫期的表达量显著上调,可能与寻找食物、定位配偶以及寻找产卵场所等生理活动有关,这一推论有待于进一步进行试验探究。CSPs 在昆虫体内分布范围广泛,研究发现不仅分布在昆虫的嗅觉重要部位——触角,而且还能在身体其他部位,如喙、足、下唇须及性腺等各部分的化学感受器中表达(龚亮等, 2009)。如在美洲大蠊 *Periplaneta americana* 的足中分离出化学感受蛋白 (p-10) (Kitabayashi et al., 1998), 在甘蓝夜蛾的性腺中也有化学感受蛋白表达 (Jacquin-Joly et al., 2001)。因此,组织表达多样性暗示其功能多样化。在苜蓿盲蝽 *Adelphocoris lineolatus* 中, CSP1、CSP2 和 CSP3 能够结合寄主挥发物成分,可能具有嗅觉识别的功能 (Gu et al., 2012)。在家蚕中, CSP1、CSP2、CSP6、CSP8、CSP9、CSP11 和 CSP15 在性信息素腺体中表达,可以协助腺体中的信息素释放 (Dani et al., 2011)。在意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 的卵巢和卵中, CSP5 表现为特异性表达,与胚胎的正常发育密切相关 (Forêt et al., 2007)。除此之外, CSPs 还参与了昆虫的组织修复、生理节律调节以及昆虫的抗药性等,该蛋白的功能也与昆虫的性别以及不同的发育阶段密切相关 (刘金香等, 2005)。本研究结果表明 *PxylCSP5* 基因在成虫足中的表达量最高,与其它昆虫的化学感受蛋白在足中高表达结

果相同,如棉蚜 *Aphis gossypii* CSP2 (李娜等, 2014)、灭字脊虎天牛 *Xylotrechus quadripes* CSP13 (庄翔麟等, 2020)、茶尺蠖 *Ectropis oblique* CSP11 (马龙, 2016)、韭菜迟眼蕈蚊 *Bradysia odoriphaga* CSP1 (Zhao et al., 2018)、绿盲蝽 *Apolygus lucorum* CSP2 (李仔博, 2020)。

目前,在足中高表达的 CSPs 的具体功能尚未明确。然而,足是昆虫主要的感觉器官,具有嗅觉和味觉等功能。刺桐姬小蜂 *Quadrastichus erythrinae* 足上的毛形和刺形感器主要用于觅食,寻找寄主产卵场所 (张振飞等, 2007); 中红侧沟茧蜂 *Microplitis mediator* 足部具有化学感受功能,参与中红侧沟茧蜂足部味觉识别过程 (杨叶青等, 2017)。昆虫足部的化学感受相关的蛋白为其化学感受功能提供了分子基础。魏丹等 (2013) 的研究表明,二化螟 *Chilo suppressalis* 足中高表达的 OBP 对寄主植物具有定向的作用;小菜蛾 *PxylOBP2* 在足中高表达,可能与小菜蛾雄虫寻求配偶有关 (程小娟等, 2016)。棉蚜 *Aphis gossypii* 的 CSP1 在足中表达量显著上调,可能具有寄主定向的作用 (李娜, 2014)。通常来说,基因的功能与其表达的位置和表达量息息相关, *PxylCSP5* 基因在足部高表达且雌雄无显著差异,是否与寄主定向有关,还需要对其功能进一步的探究。

本研究仅对小菜蛾 *PxylCSP5* 基因进行了初步分析,主要在成虫足中高表达,其小菜蛾体内中具体扮演了什么样的角色仍需要后续荧光竞争结合和 RNA 干扰等实验来进一步研究与验证。本研究结果为更进一步探究小菜蛾化学感受蛋白基因的功能和利用化学感受蛋白开发针对小菜蛾的新型防治技术奠定基础。

参考文献 (References)

- Ban LP, Zhang L, Yan YH, Pelosi P, 2002. Binding properties of a locust's chemosensory protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 293(1): 50–54.
- Cheng XJ, Cai LJ, Zheng LS, Qin JM, Huang YP, You MS, 2016. Cloning, expression profiling and binding characterization of the OBP2 gene in the diamondback moth, *Plutella xylostella*

- (Lepidoptera: Plutellidae). *Acta Entomologica Sinica*, 59(4): 365–376. [程小娟, 蔡立君, 郑丽双, 覃江梅, 黄宇萍, 尤民生, 2016. 小菜蛾气味结合蛋白 OBP2 基因的克隆、表达谱及其结合特性分析. *昆虫学报*, 59(4): 365–376.]
- Dani FR, Michelucci E, Francese S, Mastrobuoni G, Cappellozza S, Marca GL, Niccolini A, Felicioli A, Moneti G, Pelosi P, 2011. Odorant-binding proteins and chemosensory proteins in pheromone detection and release in the silkworm *Bombyx mori*. *Chemical Senses*, 36(4): 335–344.
- Forêt S, Wanner KW, Maleszka R, 2007. Chemosensory proteins in the honey bee: Insights from the annotated genome, comparative analyses and expressional profiling. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(1): 19–28.
- Fu NN, Liu J, Qu C, Wang R, Xu YH, Luo C, Li FQ, 2017. Analysis of *Corythucha ciliata* CcICSP1 structure and prediction of its binding to host-plant volatiles. *Scientia Silvae Sinicae*, 53(10): 109–117. [付宁宁, 刘佳, 渠成, 王然, 许奕华, 罗晨, 李峰奇, 2017. 悬铃木方翅网蝽化学感受蛋白 CcICSP1 的结构及其结合寄主挥发物的预测分析. *林业科学*, 53(10): 109–117.]
- Fu SH, Li FY, Yan XZ, Chi H, 2020. Expression profiles and binding properties of the chemosensory protein pxyICSP11 from the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Insect Science*, 20(5): 1–11.
- Furlong MJ, Wright DJ, Dossdall LM, 2013. Diamondback moth ecology and management: Problems, progress, and prospects. *Annual Review of Entomology*, 58: 517–541.
- Gong L, Chen Y, Cheng G, Zhong GH, 2009. Insect chemosensory proteins. *Chinese Bulletin of Entomology*, 46(4): 646–652. [龚亮, 陈永, 程功, 钟国华, 2009. 昆虫化学感受蛋白. *昆虫知识*, 46(4): 646–652.]
- Gu XC, Zhang YN, Kang K, Dong SL, Zhang LW, 2015. Antennal transcriptome analysis of odorant reception genes in the red turpentine beetle (RTB), *Dendroctonus valens*. *PLoS ONE*, 10(5): e0125159.
- Gu SH, Wang SY, Zhang XY, Ji P, Liu JT, Wang GR, Wu KM, Guo YY, Zhou JJ, Zhang YJ, 2012. Functional characterizations of chemosensory proteins of the alfalfa plant bug *Adelphocoris lineolatus* indicate their involvement in host recognition. *PLoS ONE*, 7(8): e42871.
- Hansson BS, Stensmyr MC, 2011. Evolution of insect olfaction. *Neuron*, 72(5): 698–711.
- Jacquin-Joly E, Vogt RG, Franois MC, Meillour NL, 2001. Functional and expression pattern analysis of chemosensory proteins expressed in antennae and pheromonal gland of *Mamestra brassicae*. *Chemical Senses*, 26(7): 833–844.
- Jansen S, Chmelik J, Zidek L, Padrt P, Novák P, Zdráhal Z, Picimbon JF, Löfstedt C, Sklenár V, 2007. Structure of *Bombyx mori* chemosensory protein 1 in solution. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 66(3): 135–145.
- Kitabayashi AN, Arai T, Kubo T, Natori SJ, 1998. Molecular cloning of cDNA for p10, a novel protein that increases in the regenerating legs of *Periplaneta americana* (American cockroach). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 28(10): 785–790.
- Lartigue A, Campanacci V, Roussel A, Larsson AM, Jones TA, Tegoni M, Cambillau C, 2002. X-ray structure and ligand binding study of a moth chemosensory protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(35): 32094–32098.
- Li L, Zhou YT, Tan Y, Zhou XR, Pang BP, 2018a. Identification and expression profiling of chemosensory protein genes in *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Acta Entomologica Sinica*, 61(6): 646–656.
- Li N, Zhang S, Luo JY, Lv LM, Cui JJ, Li GQ, 2014. Gene cloning, temporal expression analysis and binding characteristics of chemosensory protein AgosCSP2 in *Aphis gossypii* (Glover). *Cotton Science*, 26(3): 228–236. [李娜, 张帅, 崔珺瑜, 吕丽敏, 崔金杰, 李国清, 2014. 棉蚜化学感受蛋白 AgosCSP2 的基因克隆、时空表达动态及气味结合特征分析. *棉花学报*, 26(3): 228–236.]
- Li N, 2014. Cloning, temporal expression and binding characteristics of chemosensory-related genes in *Aphis gossypii* (Glover). Doctoral dissertation. Jiangsu: Nanjing Agricultural University. [李娜, 2014. 棉蚜化学感受蛋白的基因克隆、动态时空表达及结合特征分析. 博士学位论文. 江苏: 南京农业大学.]
- Li ZB, 2020. Functional study on close range recognition of the chemosensory related proteins in legs of the *Apolygus lucorum* (Hemiptera: Miridae). Doctoral dissertation. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. [李仟博, 2020. 绿盲蝽足部化学感受相关蛋白在近距离识别中的功能研究. 博士学位论文. 北京: 中国农业科学院.]
- Li ZM, Dai LL, Chu HL, Fu DY, Sun YY, Chen H, 2018b. Identification, expression patterns, and functional characterization of chemosensory proteins in *Dendroctonus arandi* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Frontiers in Physiology*, 9: 291.
- Liu JX, Zhong GH, Xie JJ, Guan S, Hu MY, 2005. Recent advances in chemosensory proteins of insects. *Acta Entomologica Sinica*, 48(3): 418–426. [刘金香, 钟国华, 谢建军, 官珊, 胡美英, 2005. 昆虫化学感受蛋白研究进展. *昆虫学报*, 48(3): 418–426.]
- Liu R, He X, Lehane S, Lehane M, Hertz-Fowler C, Berriman M, Field LM, Zhou JJ, 2012. Expression of chemosensory proteins in the tsetse fly *Glossina morsitans* is related to female host-seeking behaviour. *Insect Molecular Biology*, 21(1): 41–48.
- Liu XL, Luo Q, Zhong GH, Rizwan-ul-Haq M, Hu MY, 2010.

- Molecular characterization and expression pattern of four chemosensory proteins from diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Biochemistry*, 148(2): 189–200.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Ma L, 2016. Molecular and functional characterization of chemosensory genes in *Ectopis obliqua*. Doctoral dissertation. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. [马龙, 2016. 茶尺蠖化学感受相关基因的克隆与功能研究. 博士毕业论文. 北京: 中国农业科学院.]
- Pelosi P, Zhou JJ, Ban LP, Calvillo M, 2006. Soluble proteins in insect chemical communication. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(14): 1658–1676.
- Picimbon JF, Dietrich K, Angeli S, Scaloni A, Krieger J, Breer H, Pelosi P, 2000. Purification and molecular cloning of chemosensory proteins from *Bombyx mori*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 44(3): 120–129.
- Tomaselli S, Crescenzi O, Sanfelice D, Ab E, Wechselberger R, Angeli S, Scaloni A, Boelens R, Tancredi T, Pelosi P, Picone D, 2006. Solution structure of a chemosensory protein from the desert locust *Schistocerca gregaria*. *Biochemistry*, 45(35): 10606–10613.
- Wei D, Ye ZF, Gao JQ, Dong SL, 2013. Molecular cloning and functional identification of a minus-codant binding protein from the rice striped stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Acta Entomologica Sinica*, 56(7): 754–764. [魏丹, 叶占峰, 高建清, 董双林, 2013. 二化螟 Minus-C 气味结合蛋白的分子克隆及功能鉴定. 昆虫学报, 56(7): 754–764.]
- Yang K, He P, Dong SL, 2014. Different expression profiles suggest functional differentiation among chemosensory proteins in *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). *Journal of Insect Science*, 14: 270.
- Yang SY, Cao DP, Wang GR, Liu Y, 2017. Identification of genes involved in chemoreception in *Plutella xylostella* by antennal transcriptome analysis. *Scientific Reports*, 7(1): 11941.
- Yang YQ, Wang SN, Peng Y, Shan 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.]
- Zhang ZF, Liang QC, Wu WJ, Huang J, 2007. Ultrastructural studies on sensilla of *Quadrastichus erythrinae* (Hymenoptera: Eulophidae) adult. *Journal of South China Agricultural University*, 28(2): 52–55. [张振飞, 梁琼超, 吴伟坚, 黄箭, 2007. 刺桐姬小蜂成虫感器超微结构的研究. 华南农业大学学报, 28(2): 52–55.]
- Zhao J, Cheng DF, Lu YY, 2016. Molecular cloning and expression analysis of chemosensory protein gene PsCSP10 in *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae). *Journal of Environmental Entomology*, 38(4): 728–735. [赵洁, 程代凤, 陆永跃, 2016. 棉花粉蚧化学感受蛋白基因 PsCSP10 的克隆及表达谱分析. 环境昆虫学报, 38(4): 728–735.]
- Zhao YH, Ding JF, Zhang ZQ, Liu F, Zhou CG, Mu W, 2018. Sex- and tissue-specific expression profiles of odorant binding protein and chemosensory protein genes in *Bradysia odoriphaga* (Diptera: Sciaridae). *Frontiers in Physiology*, 9: 107.
- Zhuang XL, Ji SS, Zhao YJ, Yin NN, Liu NY, 2020. Identification and expression pattern of chemosensory protein genes from *Xylotrechus quadripes* (Coleoptera: Cerambycidae) and functional studies of XquaCSP7 gene. *Plant Protection*, 46(3): 30–39. [庄翔麟, 吉帅帅, 赵昱杰, 尹宁娜, 刘乃勇, 2020. 灭字脊虎天牛 CSP 基因的鉴定、表达谱及 XquaCSP7 基因的功能研究. 植物保护, 46(3): 30–39.]