



马秀梅, 杜亚丽, 刘晋佳, 姚慧敏, 张宇昊, 马卫华, 姜玉锁. 中华蜜蜂 *OBP19* 的克隆与时空表达分析 [J]. 环境昆虫学报, 2022, 44 (2): 391–401.

## 中华蜜蜂 *OBP19* 的克隆与时空表达分析

马秀梅<sup>1</sup>, 杜亚丽<sup>1</sup>, 刘晋佳<sup>1</sup>, 姚慧敏<sup>1</sup>, 张宇昊<sup>1</sup>, 马卫华<sup>2</sup>, 姜玉锁<sup>1\*</sup>

(1. 山西农业大学动物科学学院, 山西太谷 030801; 2. 山西省农业科学院园艺研究所, 太原 030031)

**摘要:** 本研究克隆获得了中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* (简称中蜂) 的气味结合蛋白 (odor-binding proteins, OBPs) 基因 *AcerOBP19* 的 cDNA 序列, 预测其蛋白结构, 明确该基因在不同发育时期各组织的表达水平。PCR 扩增 *AcerOBP19* 基因的开放阅读框序列, 应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; 用 qRT-PCR 技术对 *AcerOBP19* 在中蜂不同发育时期 (1、5、10、15、20、25 日龄) 各组织 (触角、足、口器、毒腺和中肠) 中 mRNA 的表达情况进行分析。获得了 *AcerOBP19* 的完整 ORF 序列, 序列长为 420 bp, 共编码 139 个氨基酸; 含有 4 个保守的半胱氨酸位点, 属于 Mins-C OBP 亚家族; N-末端有一段含 16 个氨基酸的信号肽, 无跨膜结构。该蛋白包含 6 个  $\alpha$  螺旋和 2 个二硫键。系统进化树分析表明, *AcerOBP19* 与大蜜蜂 *Apis dorsata* OBPs、小蜜蜂 *Apis florea* OBPs 和西方蜜蜂 *Apis mellifera* OBPs 的氨基酸序列一致性较高, 表明它们之间在进化关系上更加同源, 且 *AcerOBP19* 具有 PBP-GOBP superfamily 家族的保守结构域, 是一种分泌蛋白。qRT-PCR 结果表明 *AcerOBP19* 在中蜂不同发育时期的各组织中均有表达, 其中, 15 日龄触角中的表达量极显著高于其它组织 ( $P < 0.01$ ), 在其它日龄中足的表达量极显著高于其它组织 ( $P < 0.01$ ); 在各个时期中口器和毒腺中有较高表达, 中肠中呈微量表达。通过 *AcerOBP19* 组织表达谱结果, 推测 *AcerOBP19* 不仅参与嗅觉识别机制, 在味觉识别过程中也可能发挥作用。

**关键词:** 中华蜜蜂; *AcerOBP19*; 基因克隆; 生物信息学; 时空表达

中图分类号: Q965; S89

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2022) 02-0391-11

## Cloning and spatiotemporal expression analysis of *OBP19* from *Apis cerana cerana*

MA Xiu-Mei<sup>1</sup>, DU Ya-Li<sup>1</sup>, LUI Jin-Jia<sup>1</sup>, YAO Hui-Min<sup>1</sup>, ZHANG Yu-Hao<sup>1</sup>, MA Wei-Hua<sup>2</sup>, JIANG Yu-Suo<sup>1\*</sup> (1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi Province, China; 2. Horticulture Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030800, China)

**Abstract:** The odor-binding protein (OBP) gene *AcerOBP19* sequence of *Apis cerana cerana* (abbreviated as Chinese bee) was cloned, and its protein structure was predicted, then, the expression level of the gene in various tissues at different developmental stages was clarified. The open reading frame (ORF) sequence of *AcerOBP19* gene was amplified by PCR with specific primers. The physicochemical properties, structural characteristics and phylogenetic tree of *AcerOBP19* were analyzed by bioinformatics software; The mRNA expression of *AcerOBP19* in various tissues (antennae, legs, mouthparts, poison gland and midgut) of *A. cerana cerana* at different developmental stages (1, 5, 10, 15, 20, 25 d) was analyzed by

基金项目: 现代农业产业技术体系 (蜜蜂) 建设专项资金 (CARS-44-KXJ23)

作者简介: 马秀梅, 女, 1996 年生, 甘肃和政人, 硕士研究生, 主要研究方向为蜜蜂生物学, E-mail: 2998355594@qq.com

通讯作者 Author for correspondence: 姜玉锁, 男, 博士, 教授, 主要研究方向为蜜蜂生物学, E-mail: jiangys-001@163.com

收稿日期 Received: 2021-07-05; 接受日期 Accepted: 2021-08-08

qRT-PCR. The ORF sequence of *AcerOBP19* was successfully obtained, with a total length of 420 bp, encoding 139 amino acids; There was a signal peptide containing 16 amino acids at the N-terminal without transmembrane structure; It contained four conserved cysteine sites and belongs to the Mins-C OBP subfamily. The protein contained 6  $\alpha$ -helices and two disulfide bonds. The phylogenetic tree showed that *AcerOBP19* had high amino acid sequence consistency with the *Apis dorsata* OBPs, *Apis florea* OBPs and *Apis mellifera* OBPs, suggesting a more homology in their evolutionary relationship and that *AcerOBP19* had a conserved domain of the PBP-GOBP superfamily, it was a secretory protein. Real-time PCR revealed that *AcerOBP19* was expressed in all tissues of different developmental stages of *A. cerana cerana*. The expression level of *AcerOBP19* in antennae of 15 days old was significantly higher than other tissues ( $P < 0.01$ ), and the expression level of *AcerOBP19* in legs was significantly higher than other tissues in other stages ( $P < 0.01$ ). In other tissues, the expression level of mouthparts and poison glands was relatively high, and the expression level of midgut was low. The results of tissue expression profile suggested that *AcerOBP19* participates in olfactory recognition, but in gustatory function.

**Key words:** *Apis cerana cerana*; *AcerOBP19*; gene cloning; bioinformatics analysis; spatiotemporal expression

蜜蜂作为自然界主要的授粉者,是人类不可或缺或优良生物资源(陈瑜和马春森,2010),它作为一种重要的社会性昆虫,主要依赖其灵敏的嗅觉系统来识别并区分外界环境中的各种化学信号(杜亚丽等,2019)。通过嗅觉感知外界环境中的花香物质、信息素和其它气味挥发物等各种气味物质来搜寻食物来源、躲避敌害、产卵和交配等一系列生命活动(Fan *et al.*, 2011)。气味分子与受体蛋白特异性结合,并将气味复合物转运到相应受体使昆虫的嗅觉受体精确识别并区分不同气味复合物完成整个嗅觉过程均离不开气味结合蛋白家族的参与(陈艺杰等,2020)。

OBPs是一类低分子量可溶性蛋白(Pelosi, 1994),一般由130~150个氨基酸组成,呈酸性,承担外界环境与气味受体(olfactory receptors, ORs)之间互相连接的任务(Zhou, 2010; Liu *et al.*, 2018)。当昆虫触角表面的感器微孔中有气味分子渗入,这些气味分子就会被OBPs结合,形成气味结合蛋白-气味分子复合物,然后这些复合体会通过感器淋巴液,激活感器树突膜上的ORs,引起嗅觉神经元的兴奋(Brito *et al.*, 2016)。OBPs还可以通过结合疏水性化学信息素作为载体,将其传递给嗅觉受体或感觉神经元膜蛋白发挥作用(March *et al.*, 2014; Gong *et al.*, 2015)。

蜜蜂OBPs的种类可分为触角特异性结合蛋白、普通气味结合蛋白和信息素结合蛋白(张升祥等,2010)。也有根据保守半胱氨酸Cys的模式

将OBPs分为Classical OBPs、Minus-C OBPs、Plus-C OBPs、Dimer OBPs和Atypical OBPs。通过半胱氨酸位点的数量大致把OBPs氨基酸序列中含有6个保守Cys位点,有3个二硫键的归为Classical OBPs。把含有4或5个保守Cys位点,仅含有2个二硫键的归为Minus-C OBPs。含有至少2~3个额外的Cys,并且在第6个Cys之后有存在1个保守的脯氨酸位点的归为Plus-C OBPs(Liu *et al.*, 2017)。将具有由2个典型的Cys基序聚合在一起特征的归为Dimer OBPs(Campanini *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2019)。OBPs有较为典型的N端区域,而C端区域较长且特征不明显的归为Atypical OBPs(Malini *et al.*, 2013; 杜亚丽等,2020)。大量研究表明,OBPs的主要功能包括:选择性结合气味分子及信号转导;协助气味分子的运送;降解和清除气味分子及有毒物质;以及使受到气味分子刺激后的受体迅速失活,避免嗅觉神经元因持续的刺激而过度兴奋(Yang *et al.*, 2018; 杜亚丽等,2019)。

研究表明OBPs除了在昆虫的气味感知和传递中起着重要作用,很可能还发挥其他生理功能(Guo *et al.*, 2020)。研究发现OBPs不仅在触角等嗅觉器官中表达,还在口器、足和翅等味觉器官中表达,这说明OBPs在行使嗅觉功能的同时也可能参与对呈味物质的识别过程(谷少华,2013; 杨叶青等,2017),如中华蜜蜂足中特异性高表达的*AcerOBP15*在采集花蜜和花粉时参与味觉识别过程(Du *et al.*, 2021)。也有相关研究发现OBPs在中

肠和腺体等其它非嗅觉器官中广泛表达, 推测它们不仅只参与嗅觉感知功能, 还有可能参与其他生理功能 (Picimbon *et al.*, 2001; Gong *et al.*, 2007; Dani *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2014)。

中华蜜蜂 (*Apis cerana cerana*, 简称中蜂) 作为我国的独有蜂种, 广泛活动在我国山林地区, 因其嗅觉灵敏、抗病抗逆能力强、采集性优良及善于利用零星分散蜜粉源等优点, 在这些地区发挥着不可替代的作用 (苏松坤等, 2005; 王凤鹤等, 2007; Zhao *et al.*, 2014; 陈艺杰等, 2020)。目前有关中华蜜蜂 OBPs 的研究相对匮乏, 鉴于 OBPs 在中蜂生理功能上具有重要意义, 本研究通过克隆获得中蜂的 *AcerOBP19* 的 ORF 序列, 对该蛋白进行生物信息学分析并预测其蛋白结构, 明确在不同发育阶段该基因在触角、足、口器、毒腺和中肠的表达水平, 以期对蜜蜂的嗅觉识别机制的研究及气味结合蛋白在味觉功能上的深入探究提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验样本

试验用样本由山西农业大学动物科技学院实验蜂场提供, 所有样品采集时间为 2020 年 6–7 月。

样本的采集: 从健康无疾病、无自然分蜂倾向、群势强的中蜂巢中取出两张整齐的封盖子脾放于人工培养箱恒温培养 (培养温度  $35 \pm 0.2^\circ\text{C}$ , 相对湿度 50% ~ 70%), 当蜜蜂出房后在其背部用无味无毒的油漆进行标记, 待油漆干后放回原蜂巢, 采样时期为成蜂 1、5、10、15、20、25 日龄, 组织为触角、足、口器、中肠和毒腺。100 头工蜂的组织混合样作为一个生物学重复。克隆样本的采集: 随机抓取一日龄工蜂 3 头。当样品采集后放入研钵中研磨, 随后将粉末倒入装有 1 mL TRIzol 的离心管中, 震荡混匀后  $-80^\circ\text{C}$  保存备用。

#### 1.1.2 主要试剂

TRIzol RNA 分离试剂购自赛默飞世尔科技有限公司 (中国); 荧光定量试剂盒 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (Tli RNaseH Plus)、反转录试剂盒 PrimeScript<sup>™</sup> RT Reagent Kit with gDNA Eraser (perfect real time)、Trans5 $\alpha$  和克隆载体 pMD<sup>™</sup>19-T 等购自 TaKaRa 宝生物工程有限公司 (大连); 2  $\times$  M5 HiPer plus HiFi PCR mix (with bye dye) 购自聚

合美生物科技有限公司 (北京); D2000 DNA Ladder、50  $\times$  TAE Buffer、固相 RNase 清除剂、DNase/RNase-free water、异丙醇、氯仿和购自索莱宝科技有限公司 (北京); DNA Gel/PCR Purification Miniprep Kit 凝胶回收试剂盒购自杭州倍沃医学科技有限公司。

#### 1.1.3 供试仪器

HWS0358 人工智能气候培养箱 (江南仪器厂, 中国宁波), DYCP-31DN 琼脂糖水平电泳仪 (六一, 中国北京), Forma 700 超低温冰箱 (Thermo, 美国), SIM-F124 制冰机 (Sanyo, 日本), 5430R 台式高速离心机 (Eppendorf, 德国), ND-1000 核酸蛋白仪 (NanoDrop, 美国), 荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad, 美国)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

根据 TRIzol 试剂说明书提取 1.1.1 中收集的不同发育时期成蜂各组织的总 RNA, 用核酸浓度测定仪测定浓度。用 1  $\mu\text{g}$  总 RNA 为模板进行反转录, 将合成的 cDNA 测定浓度后置于  $-20^\circ\text{C}$  保存。

#### 1.2.2 引物设计

通过课题组前期所获得的序列, 设计扩增目的基因 cDNA 序列的引物。用克隆获得的序列和内参基因 *Arp1* (GenBank 登录号: NM\_001185145.1) 的 ORF 序列, 设计用于 qRT-PCR 的特异性引物。引物由生工生物工程股份有限公司 (上海) 合成, 引物信息见表 1。

#### 1.2.3 *OBP19* 基因的克隆

以 1.2.1 保存的中蜂 cDNA 为模板对 *AcerOBP19* 基因进行 PCR 扩增, 反应体系 (10  $\mu\text{L}$ ) 如下: 2  $\times$  M5 HiPer plus Taq HiFi PCR mix (with blue dye) 5  $\mu\text{L}$ , 上游引物 (10  $\mu\text{M}$ )、下游引物 (10  $\mu\text{M}$ ), 各 0.3  $\mu\text{L}$ , cDNA 模板 1.0  $\mu\text{L}$  ( $<1 \mu\text{g}$ ), RNase Free dH<sub>2</sub>O 3.4  $\mu\text{L}$ 。最优反应程序为:  $95^\circ\text{C}$  预变性 4 min; 35 个循环:  $95^\circ\text{C}$  变性 26 s,  $58^\circ\text{C}$  退火 26 s,  $72^\circ\text{C}$  延伸 16 s;  $72^\circ\text{C}$  终延伸 5 min;  $4^\circ\text{C}$   $\infty$ 。以 Marker DL 2000 作为参照, 将 PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后, 在紫外凝胶成像系统中检测目的条带。检测后将扩增产物回收纯化, 连接至 pMD<sup>™</sup>19-T 载体, 将载体转化到 Trans5 $\alpha$  感受态细胞, 通过蓝白斑筛选, 挑出单一饱满的白色菌落放入 LB 液体培养基中进行扩大培养。菌液 PCR 鉴定后, 把阳性克隆产物送华大基因科技有限公司 (北京) 进行测序。

表 1 试验所用引物  
Table 1 Primers used in this study

| 基因名称       |    | 引物序列 (5′-3′)                            | 产物长度<br>( bp) | 退火温度 ( °C)            | 引物用途           |              |
|------------|----|-----------------------------------------|---------------|-----------------------|----------------|--------------|
| Gene name  |    | Primers sequences                       | Product size  | Annealing temperature | Use of primers |              |
| Acer OBP19 | F: | ATGAAAACTATCGTGGTTATTTTGC               | 420           | 58                    | 基因克隆           |              |
|            | R: | TTAGAAATTTAATATTCTTTCATTGTTTATATTTCTCAA |               |                       | Gene cloning   |              |
|            | F: | CAGGAAGCTTGCAAGGCAGA                    | 85            |                       | 荧光定量 PCR       |              |
|            | R: | CATCTTCTACATCAAAGTCGACTTCAC             |               |                       |                | Real-time    |
| ArpI       | F: | TGCTGCACTCGTAGTTGACAATGG                | 112           |                       |                | quantitative |
|            | R: | ACCCTGGTGGCGTGGTCTTC                    |               |                       |                | PCR          |

#### 1.2.4 *OBP19* 基因的序列分析

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, 用 EditSeq 预测其编码的氨基酸序列。氨基酸序列的同源性通过 NCBI 中的 Protein BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 工具进行分析; 从 GenBank 数据库中下载与其同源性较高的昆虫 OBPs 序列, 使用 MEGA-X 软件构建系统发育树, 选择邻接法 Neighbor-Joining (Bootstrap 为 1 000 次)。蛋白生物信息学分析参考杜亚丽等 (2016)。

#### 1.2.5 荧光定量 PCR 检测

以各日龄的组织 cDNA (浓度稀释到 200 ng/ $\mu$ L) 为模板, 使用 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒进行荧光定量 PCR, 每个样品进行 3 次技术重复。反应体系为 10  $\mu$ L: SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II 5  $\mu$ L, 上游引物 0.4  $\mu$ L, 下游引物 0.4  $\mu$ L, cDNA 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 3.2  $\mu$ L; 反应程序: 95°C 预变性 30 s, 接着进行 45 个循环: 95°C 30 s, 60°C 34 s。测定溶解曲线的反应条件为: 以 0.5°C 的温度从 60°C 到 95°C。

#### 1.2.6 数据处理与分析

以 15 日龄中蜂触角的表达量为基准, 根据荧光曲线的 Ct 值, 用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法进行数据分析, 显著性差异用 SPSS 22.0 软件中的单因素方差分析 (ANOVA)。结果以平均数  $\pm$  标准误 (Mean  $\pm$  SE) 表示, 通过 GraphPad Prism 9.0 软件进行图形分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因的克隆与测序

根据设计的特异性引物, 以中蜂 cDNA 为模板对 *AcerOBP19* 基因进行 PCR 扩增, 电泳图显示扩增的目的片段和预测的长度 (420 bp) 一致 (图 1)。

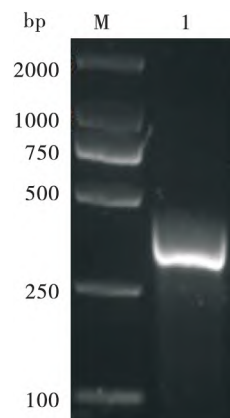


图 1 *AcerOBP19* 基因 PCR 产物电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of the PCR products of *AcerOBP19* gene. Note: M, DNA molecular Marker; 1, PCR product.

### 2.2 基因的序列分析

在 NCBI 中将测序所得序列进行 Blastn 比对, 结果显示与西方蜜蜂 *AmelOBP19* (GenBank 登录号: NM\_001040209) 的核苷酸序列相似性为 83.58%。*AcerOBP19* 基因的 ORF 序列长为 420 bp, 编码 139 个氨基酸, 其序列 (图 2) 中含有 4 个保守的半胱氨酸位点, 属于 Mins-C 亚家族。

```
>AcerOBP19
1  ATGAAAACTATCGTGGTTATTTTGCCTTTTGCATTGCGTTAATGCAATGACAATTGAA
1  M K T I V V I F A F C I C V N A M T I E

61  GAATTAAAACTAAATTATATGATGAGCAGGAAGCTTGCAAGGCAGAATCTGGCATTGAT
21  E L K T K L Y D E Q E A [C] K A E S G I D

121  GAACAAAAAGCAGATAATGTTAATAGTGAAGTCGACTTTGATGTAGAAGATGAGAAAGTT
41  E Q K A D N V N S E V D F D V E D E K V

181  CAATTGTATTCTAAATGTTTAATAAGAAAATTCAATTCGGTTGATGAAAATGGAAACTTT
61  Q L Y S K [C] L I R K F N S V D E N G N F

241  AATGAAAATGTAATTGAGAACTAACGAGTCTATATTTAGACGAAAATGAAGTTAATCAA
81  N E N V I R E L T S L Y L D E N E V N Q

301  TTAGTCACCGAATGTTTCATCGTATTTTAATACCTCTGATGACGATATAAATTTAAATTT
101  L V T E [C] S S Y F N T S D D D I N L K F

361  AGTAAACTAATGAAGTGTTTGGAGAAATATAAAACAATGAAAGGAATATTAAATTTCTAA
121  S K L M K [C] F E K Y K T M K G I L N F *
```

图2 *AcerOBP19* 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 *AcerOBP19* cDNA

注: 大写字母为开放阅读框 ORF; 起始密码子和终止密码子用斜体标识, 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。Note: ORF was described by uppercase letters; Initiation codon was indicated by italic , sequence of signal peptide was underlined , conserved cysteine sites were labeled by black box.

2.3 生物信息学分析

2.3.1 蛋白的基本理化性质

使用在线软件 ProtParam 预测 *AcerOBP19* 理化性质 (表2)。该蛋白分子量为 16.11 kDa , 为小分子蛋白; 理论等电点 pI 为 4.47 , 为酸性蛋白; 不稳定系数为 23.02 ( <40 ) , 较稳定; 总平均系数为 - 0.375 , 为亲水性蛋白; 脂溶系数为 82.66 ( <90 ) , 为水溶性蛋白。

表2 *AcerOBP19* 蛋白的理化性质

Table 2 Physical and chemcial properties of characteristics for *AcerOBP19*

| 蛋白特性 Protein characteristics                            | <i>AcerOBP19</i>                                                                     |
|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 蛋白分子式 Molecular formula                                 | C <sub>707</sub> H <sub>1110</sub> N <sub>176</sub> O <sub>232</sub> S <sub>10</sub> |
| 原子总数 Total number of atoms                              | 2235                                                                                 |
| 蛋白分子量 Molecular weight                                  | 16108.23                                                                             |
| 等电点 Isoelectric point                                   | 4.47                                                                                 |
| 最高 Maximum                                              | Glu 11.5% (16)                                                                       |
| 氨基酸组成 Amino acid constitute                             | -                                                                                    |
| 最低 Minimum                                              | Arg 1.4% (2)                                                                         |
| 带正电荷氨基酸残基总数 Total number of positively charged residues | 27                                                                                   |
| 带负电荷氨基酸残基总数 Total number of negatively charged residues | 16                                                                                   |
| 总平均亲水性 Total mean hydrophilicity                        | - 0.375                                                                              |
| 半衰期 Half-life period                                    | 30 h                                                                                 |
| 不稳定系数 Instability index                                 | 23.02                                                                                |
| 脂溶系数 Aliphatic index                                    | 82.66                                                                                |

### 2.3.2 信号肽预测

信号肽位于分泌蛋白的 N 端,一般将其作为判断蛋白质是否为分泌蛋白的一个主要依据。将本试验所得到的 AcerOBP19 的氨基酸序列用 SignalP-4.1 进行信号肽的预测,结果表明(图3)该蛋白的第1~16位氨基酸为其信号肽序列,其剪切位点在第16和第17位氨基酸之间,故推测 AcerOBP19 为分泌蛋白。

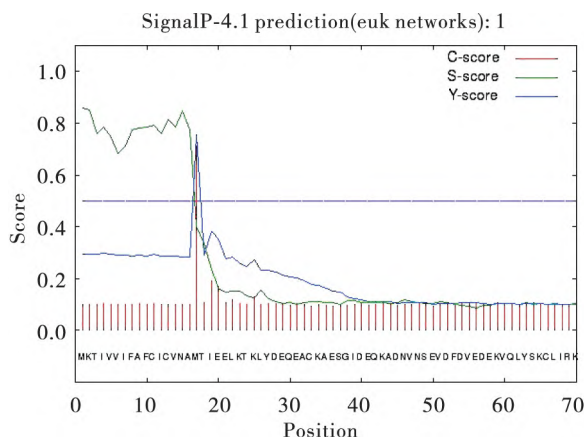


图3 AcerOBP19 信号肽的预测

Fig. 3 Predicted results for singal peptide in AcerOBP19

### 2.3.3 跨膜结构预测

在 TMHMM-2.0 软件上对 AcerOBP19 进行跨膜结构的预测,预测的期望跨膜螺旋数为0,表明该蛋白不是跨膜蛋白(图4)。

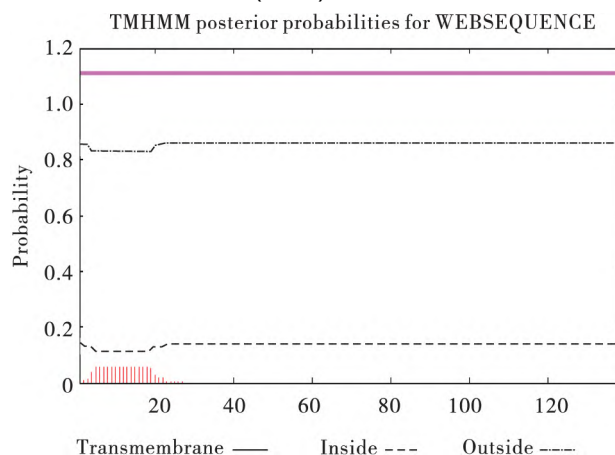


图4 AcerOBP19 跨膜结构预测

Fig. 4 Prediction of transmembrane structure of AcerOBP19

### 2.3.4 保守结构区域与功能结构域的分析

使用 NCBI Conserved Domains 对 AcerOBP19 的保守结构域进行分析,它具有 PBP-GOBP superfamily 家族的保守结构域,其保守结构区域位

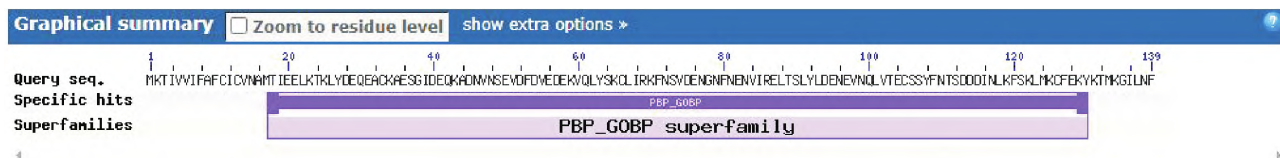


图5 AcerOBP19 保守结构域

Fig. 5 Functional structure domain of AcerOBP19

于第17~130位氨基酸之间, E-value 为  $2.73e^{-48}$ 。AcerOBP19 存在一个 PhBP 功能结构域,位于第132~139位氨基酸之间, E-value 为 0.00598 (图5)。

### 2.3.5 疏水性分析

AcerOBP19 氨基酸序列的疏水性通过 Hphob. / Kyte & Doolittle 方法进行分析(图6),该序列中,最高 Score 值在第8位氨基酸为 3.533,第79位最低为 -2.456,总平均亲水性为 -0.375。这说明 AcerOBP19 为亲水性蛋白。

### 2.3.6 亚细胞定位分析

AcerOBP19 蛋白亚细胞定位在 PSORT II 分析,结果表明(表3)该蛋白主要出现在分泌途径上,结合 LOCTREE 2.0 分析的结果,该蛋白主要分布在胞外区(GO: 0005576),说明该蛋白属于分泌型蛋白。

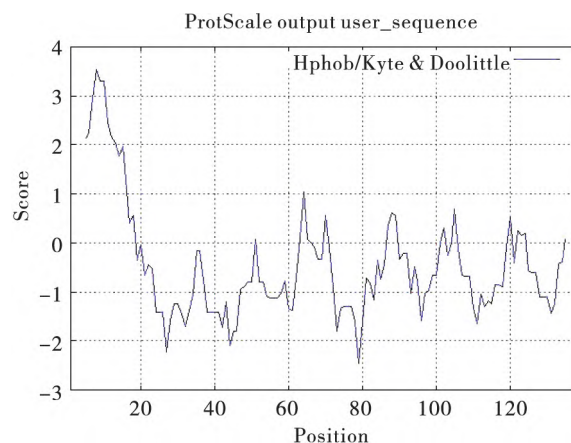


图6 AcerOBP19 的氨基酸序列疏水性分析

Fig. 6 Predicted hydrophobicity profiles for amino acid sequences of AcerOBP19

表 3 *AcerOBP19* 的亚细胞定位分析

Table 3 Subcellular localization prediction of *AcerOBP19*

| 预测位置 Predicted location               | <i>AcerOBP19</i> |
|---------------------------------------|------------------|
| 胞外 Extracellular, including cell wall | 55.6%            |
| 液泡 Vacuolar                           | 11.1%            |
| 内质网 Endoplasmic reticulum             | 11.1%            |
| 高尔基体 Golgi                            | —                |
| 线粒体 Mitochondrial                     | —                |
| 细胞质 Cytoplasmic                       | 22.2%            |
| 细胞核 Nuclear                           | —                |

2.3.7 高级结构预测

以西方蜜蜂气味结合蛋白 *Apis mellifera* OBP14 (PDB 登录号: 3s0g.1.A) 为模板对 *AcerOBP19* 进行 3D 结构的预测 (图 7), 结果表明该蛋白与 *AmelOBP14* 的结构相似度达 49.58%, 含有 6 个  $\alpha$  螺旋和 2 对二硫键, 二硫键分别是 Cys33-Cys66 和 Cys105-Cys126。

2.3.8 系统进化树分析

在 NCBI 数据库中将获得的氨基酸序列进行 Blastp 分析, 选取与 *AcerOBP19* 同源性高的昆虫 OBPs 氨基酸序列在 MEGA-X 软件上构建系统进化

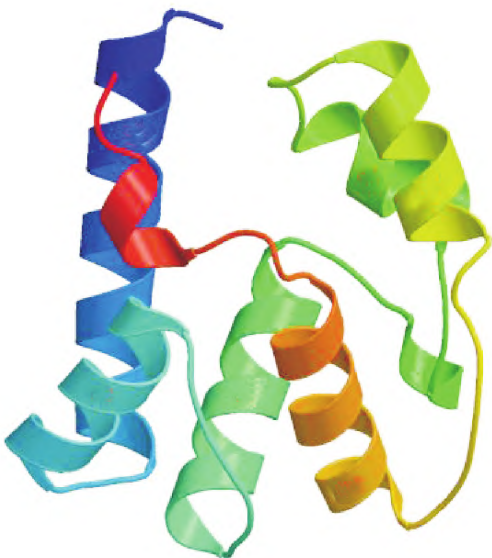


图 7 *AcerOBP19* 的 3D 结构预测模型

Fig. 7 Three-dimensional prediction structure of *AcerOBP19*

树 (图 8), 采用邻位法 Neighborjoining 进行 1 000 次重复。从图中可以看出, *AcerOBP19* 与大蜜蜂 *Apis dorsata* OBPs、小蜜蜂 *Apis florea* OBPs 和西方蜜蜂 *Apis mellifera* OBPs 的氨基酸序列一致性较高, 表明它们之间在进化关系上更加同源。

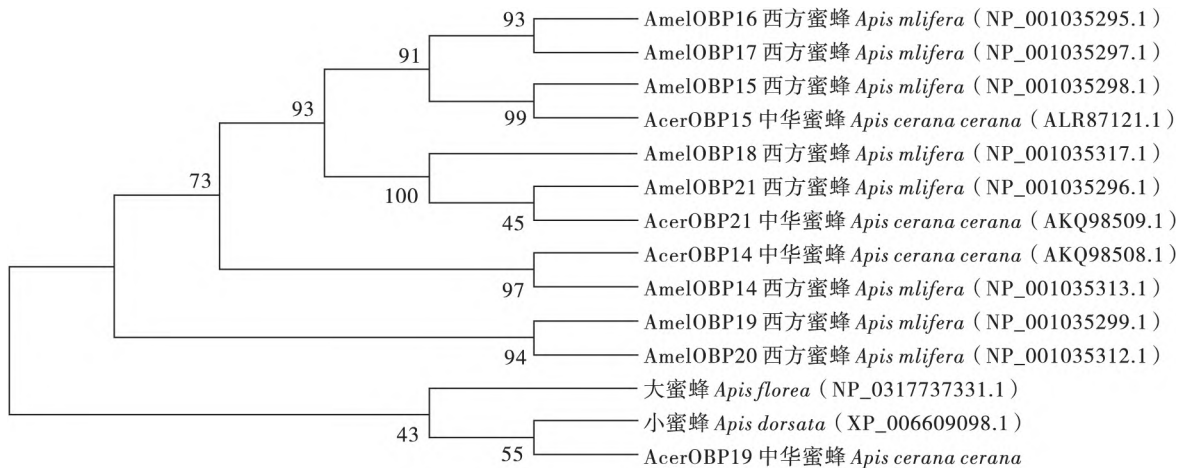


图 8 基于昆虫 OBPs 与 *AcerOBP19* 的氨基酸序列构建的系统进化树 (邻接法)

Fig. 8 Phylogenetic tree of the amino acid sequences of insect OBPs and *AcerOBP19* based on amino acid sequence with Neighbor-joining method

2.4 *AcerOBP19* 基因 mRNA 水平表达分析

以 15 日龄工蜂触角的 *AcerOBP19* 基因表达量为基准, 通过 qRT-PCR 技术分析 *AcerOBP19* 在中蜂不同时期各组织中 mRNA 的表达水平, 结果发现。 *AcerOBP19* 在中蜂不同发育时期的触角、口

器、足、毒腺中均有不同程度的表达, 在中肠中呈微量表达 (图 9)。

*AcerOBP19* 在 1、5、10、20 和 25 日龄中华蜜蜂足中的表达量极显著高于其它组织 ( $P < 0.01$ ), 15 日龄中华蜜蜂触角中的表达量极显著高于其它

组织 ( $P < 0.01$ )。在不同的发育阶段,在足中 1 日龄时相对表达量最高,5 日龄时呈下降趋势,10 日龄时又呈上升趋势,15 日龄时又下降为最低相对表达量,整体呈先减后增“波浪”式趋势;在口器中 1、5 和 10 日龄的相对表达量呈缓慢下降趋势,15 日龄时骤增,20 日龄和 25 日龄时又呈下

降趋势,整体呈先降,中间增,后又趋于下降模式;在触角中 1 至 5 日龄时的相对表达量呈下降趋势,5 至 15 日龄时呈上升趋势,20 日龄时呈下降趋势,25 日龄时又缓慢上升;在毒腺中相对表达量整体呈先降后升的“波浪”式趋势,10 日龄时相对表达量最高,25 日龄时最低。

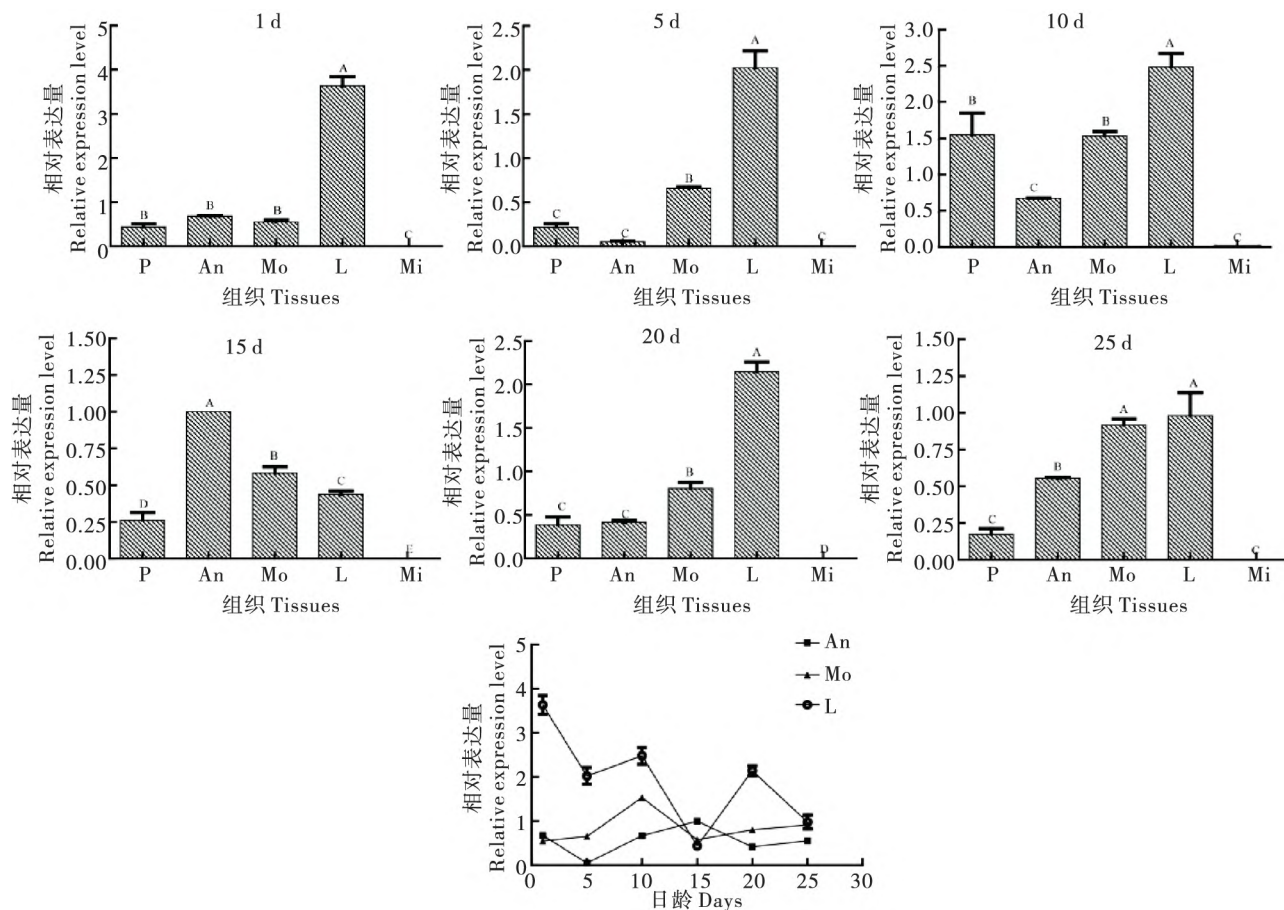


图9 *AcerOBP19* 在中蜂不同发育时期各组织中的相对表达量

Fig. 9 Expression of *AcerOBP19* in different developmental stages and tissues of *Apis cerana cerana*

注: An, 触角; P, 毒腺; Mo, 口器; L, 足; Mi, 中肠; 1 d ~ 25 d: 成年工蜂的日龄。不同大写字母表示成蜂相同时期不同组织之间的表达量差异极显著 ( $P < 0.01$ )。Note: An, Antenna; P, Poison gland; Mo, Mouthparts; L, Legs; Mi, Midgut; 1 d ~ 25 d: Days-old of adult worker bees. Different uppercase letters showed extremely significant differences in the expression in different tissues of the same stage ( $P < 0.01$ ).

### 3 结论与讨论

蜜蜂嗅觉系统及其灵敏,不仅对蜜蜂的各种生物行为发挥作用,还对维持蜂群内部稳定起着重要作用 (Carey and Carlson, 2011; Zhao *et al.*, 2015)。本试验克隆获得了 *AcerOBP19* 的完整 ORF 序列,其长 420 bp,编码 139 个氨基酸,预测分子量介于 13 ~ 17 kDa,含有 4 个保守的半胱氨酸位

点,属于 Mins-C 亚家族,与之前研究一致 (吴少英等, 2005)。信号肽是位于分泌蛋白的 N 端,且 N 端部位具有具有 15 ~ 35 个氨基酸的短肽链,一般将其作为判断蛋白质是否为分泌蛋白的一个主要依据 (彭佳师等, 2011)。AcerOBP19 蛋白的第 1 ~ 16 位氨基酸为其信号肽序列,其剪切位点在第 16 和 17 位氨基酸之间,亚细胞定位也主要在分泌途径上,因此说明 AcerOBP19 蛋白为分泌型蛋白。进化树结果显示 AcerOBP19 与大蜜蜂 OBPs、小蜜

蜂 OBP<sub>s</sub> 和西方蜜蜂 OBP<sub>s</sub> 的氨基酸序列一致性较高, 表明它们之间在进化关系上更加同源, 且 *AcerOBP19* 具有 PBP-GOBP superfamily 家族的保守结构域, 说明 *AcerOBP19* 符合气味结合蛋白家族的特征, 可能在嗅觉系统中承担着气味的识别和转运的任务。

昆虫 OBP<sub>s</sub> 广泛存在于其各个组织中, 这与它复杂的生物学功能密切联系 (Hull *et al.*, 2014)。起初有研究表明昆虫 OBP<sub>s</sub> 在触角中特异性地表达, 如家蚕 *Bombyx mori* 的 Bmor OBP<sub>s</sub>、亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 的 Ofur PBP3、小菜蛾 *Plutella xylostella* 的 Pxyl PBP1、水稻二化螟 *Chilo suppressalis* 的 Csup OBP2 (张治科等, 2017)。随后, 越来越多的研究发现, 一些 OBP<sub>s</sub> 也在昆虫的头、胸、腹、足、翅、下颚须、喙、口器、性腺、精囊、气门等其它组织部位中表达 (Li *et al.*, 2008; Vogel *et al.*, 2010; Hua *et al.*, 2012; 陈玲等, 2013; 魏丹等, 2013; Zhu *et al.*, 2013; 吉挺等, 2014; 秦赠等, 2014; 宋月芹等, 2014; 赵雪等, 2014)。组织表达谱分析发现, *AcerOBP19* 在中蜂的触角、足、口器、毒腺和中肠中都有表达, 这与上述研究相符。昆虫的足上分布着许多与味觉相关的感受器, 而气味结合蛋白在味觉器官中高表达, 可能与昆虫摄食和营养吸收等功能有关 (Sanchez-Gracia *et al.*, 2009)。在本次试验中除 15 日龄外, *AcerOBP19* 在其它日龄时足中的相对表达量极显著于其它组织, 由此可以推测, *AcerOBP19* 除了在中蜂嗅觉调控机制中发挥作用, 也与感知蜜粉源植物的非挥发性物质等味觉功能相关联, 如在采集花粉花蜜时参与味觉识别过程, 与 *AcerOBP15* 一致 (Du *et al.*, 2021)。在 15 日龄时, *AcerOBP19* 在触角中的表达量极显著高于其它组织, 与杜亚丽等人研究结果相同 (Du *et al.*, 2019)。通过比较分析 *AcerOBP19* 在触角、足和口器中的相对表达量可知, *AcerOBP19* 在足中的表达量 1 日龄时达到峰值, 远远高于在触角中的表达, 这可能是由于作为新生蜂其嗅觉系统尚未完全发育成熟, 推测 *AcerOBP19* 在味觉器官中的高表达可能与新生蜂在巢中哺育幼虫酿制蜂蜜等味觉及其它功能相联系。*AcerOBP19* 在触角中的表达量在 15 日龄时达到峰值, 此时 *AcerOBP19* 在足与口器中的表达量都低于触角, 这可能是 15 日龄为中华蜜蜂从内勤蜂向外勤蜂转变的过渡阶段而发生了改变, 详细原因还需进一步论证。*AcerOBP19* 在口器中的

表达量在 10 日龄时达到峰值, 众所周知, 蜜蜂的味觉器与味觉神经相连, 对糖浆等物质的浓度有很高的识别能力, 结合在足中的表达模式, 对此现象可以做出推测, *AcerOBP19* 基因在糖浆和花蜜浓度的识别过程中有可能发挥了一定的作用, 可能参与了中蜂的采集过程。

虽然许多 OBP<sub>s</sub> 是化学感觉特异性的, 但有些 OBP<sub>s</sub> 可能具有更一般的生理作用 (Gong *et al.*, 2009)。为了验证在此结果上的推测, 本课题组将会继续进行表达纯化其蛋白, 通过荧光竞争结合等实验明确该气味结合蛋白的结合谱, 在蛋白水平上进一步检测该基因在嗅觉与味觉器官中的表达与定位情况等后续试验。

### 参考文献 (References)

- Brito NF, Moreira MF, Melo A. A look inside odorant-binding proteins in insect chemoreception [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2016, 95: 51–65.
- Campanini EB, Brito R. Molecular evolution of odorant-binding proteins gene family in two closely related *Anastrepha* fruit flies [J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2016, 16 (1): 198.
- Carey AF, Carlson JR. Insect olfaction from model systems to disease control [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108 (32): 12987–12995.
- Chen L, Li HL, Zhou YX, *et al.* cDNA cloning, tissue expression and ligand binding characteristics of odorant binding protein 2 from the oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2013, 56 (6): 612–621. [陈玲, 李红亮, 周宇翔, 等. 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 [J]. 昆虫学报, 2013, 56 (6): 612–621]
- Chen Y, Ma CS. Research progress on the effects of climate warming on insects [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30 (8): 2159–2172. [陈瑜, 马春森. 气候变暖对昆虫影响研究进展 [J]. 生态学报, 2010, 30 (8): 2159–2172]
- Chen YJ, Li YJ, Zhang J, *et al.* Cloning and sequence analysis of the odor-binding protein gene *AcerOBP7* of Chinese honeybee [J]. *Biotechnology*, 2020, 4: 313–317. [陈艺杰, 李英娇, 张瑾, 等. 中华蜜蜂气味结合蛋白基因 *AcerOBP7* 的克隆及序列分析 [J]. 生物技术, 2020, 4: 313–317]
- Dani FR, Michelucci E, Francese S, *et al.* Odorant-binding proteins and chemosensory proteins in pheromone detection and release in the Silkworm *Bombyx mori* [J]. *Chemical Senses*, 2011, 36 (4): 335–344.
- Du YL, Xu K, Zhao HT, *et al.* Identification and functional characterization of *AcerOBP15* from *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae) [J]. *Apidologie*, 2021, 52: 668–683.
- Du YL, Feng YJ, Ma WH, *et al.* Gene cloning and differential expression analysis of the odor-binding protein *OBP12* of Chinese

- honeybee and Italian honeybee [J]. *Journal of Applied Entomology*, 2019, 56 (3): 159–171. [杜亚丽, 冯玉军, 马伟华, 等. 中华蜜蜂和意大利蜜蜂气味结合蛋白基因 *OBP12* 的克隆及差异表达 [J]. 应用昆虫学报, 2019, 56 (3): 159–171]
- Du YL, Xu K, Ma WH, *et al.* Contact chemosensory genes identified in leg transcriptome of *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae) [J]. *Journal of Economic Entomology*, 2019, 112 (5): 2015–2029.
- Du YL, Xu K, Zhao HT, *et al.* Research progress on insect odor-binding proteins [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2020, 63 (3): 123–138. [杜亚丽, 徐凯, 赵慧婷, 等. 昆虫气味结合蛋白的研究进展 [J]. 昆虫学报, 2020, 63 (3): 123–138]
- Du YL. Cloning and Expression Analysis of Four Odor-binding Protein Genes *AcerOBPs* from Chinese Honeybees [D]. Taiyuan: Shanxi Agricultural University Master Thesis, 2016. [杜亚丽. 中华蜜蜂 4 个气味结合蛋白基因 *AcerOBPs* 的克隆与表达分析 [D]. 太谷: 山西农业大学硕士论文, 2016]
- Fan J, Francis F, Liu Y, *et al.* Review: An overview of odorant-binding protein functions in insect peripheral olfactory reception [J]. *Genetics & Molecular Research Gmr.*, 2011, 10 (4): 3056–69.
- Gong DP, Zhang HJ, Zhao P, *et al.* Identification and expression pattern of the chemosensory protein gene family in the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 37 (3): 266–277.
- Gong DP, Zhang HJ, Zhao P, *et al.* The odorant binding protein gene family from the genome of silkworm, *Bombyx mori* [J]. *BMC Genomics*, 2009, 10 (1): 332.
- Gong Z, Su L, Jiang Y, *et al.* Construction and analysis of antennal cDNA library from rice striped stem borer, *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae), and expression profiles of putative odorant-binding protein and chemosensory protein genes [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2015, 89 (1): 35–53.
- Gu SH. The Molecular and Cellular Mechanisms of Sex Pheromone Communication in Cutworms [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences Doctor Thesis, 2013. [谷少华. 小地老虎性信息素通讯的分子和细胞机制 [D]. 北京: 中国农业科学院博士论文, 2013]
- Guo DZ, Hao CH, Cui XP, *et al.* Molecular and functional characterization of the novel odorant-binding protein gene *AccOBP10* from *Apis cerana cerana* [J]. *The Journal of Biochemistry*, 2021, 169 (2): 215–225.
- Hua JF, Zhang S, Cui JJ, *et al.* Identification and binding characterization of three odorant binding proteins and one chemosensory protein from *Apolygus lucorum* (Meyer-Dur) [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2012, 38 (9): 1163–1170.
- Hull JJ, Perera, *et al.* Cloning and expression profiling of odorant-binding proteins in the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* [J]. *Insect Mol. Biol.*, 2014, 23 (1): 78–97.
- Ji T, Shen F, Liang Q, *et al.* Cloning, prokaryotic expression and tissue expression profile of *OBP3* gene of Chinese honeybee [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2014, 57 (8): 897–904. [吉挺, 沈芳, 梁勤, 等. 中华蜜蜂 *OBP3* 基因的克隆、原核表达及组织表达谱 [J]. 昆虫学报, 2014, 57 (8): 897–904]
- Jiao Y, Feng H, Sun H, *et al.* Functional analysis of general odorant binding protein 2 from the Meadow Moth, *Loxostege sticticalis* L. (Lepidoptera: Pyralidae) [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7 (3): e33589.
- Liu NY, Li ZB, Zhao N, *et al.* Identification and characterization of chemosensory gene families in the bark beetle, *Tomicus yunnanensis* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2017, 25: 73–85.
- Liu W, Jiang XC, Yang B, *et al.* Functional studies of sex pheromone receptors in Asian corn borer *Ostrinia furnacalis* [J]. *Front Physiol.*, 2018, 9: 591.
- Liu YL, Guo H, Huang LQ, *et al.* Unique function of a chemosensory protein in the proboscis of two *Helicoverpa* species [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2014, 217 (10): 1821–6.
- Malini M, Matthieu N, Aurore V, *et al.* Comparative genomics of odorant binding proteins in *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti*, and *Culex quinquefasciatus* [J]. *Genome Biology and Evolution*, 2013, 5 (1): 163–180.
- March CD, Golebiowski J. A computational microscope focused on the sense of smell [J]. *Biochimie*, 2014, 107: 3–10.
- Pelosi, Paolo. Odorant-binding proteins [J]. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 1994, 29 (3): 199–228.
- Peng JS, Gong JM. Signal peptide and protein sorting and transportation [J]. *Chinese Journal of Plant Physiology*, 2011, 1: 13–21. [彭佳师, 龚继明. 信号肽与蛋白质的分选转运 [J]. 植物生理学报, 2011, 1: 13–21]
- Picimbon JF, Dietrich K, Krieger J, *et al.* Identity and expression pattern of chemosensory proteins in *Heliothis virescens* (Lepidoptera, Noctuidae) [J]. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 2001, 31 (12): 1173–1181.
- Qin Z, Ran YH, Zhi ZJ, *et al.* Cloning and expression analysis of *Anopheles sinensis* odorant binding protein gene *AsinOBP1* [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2014, 57 (11): 1289–1298. [秦赠, 冉永红, 支中婧, 等. 中华按蚊气味结合蛋白基因 *AsinOBP1* 的克隆和表达分析 [J]. 昆虫学报, 2014, 57 (11): 1289–1298]
- Sanchez-Gracia A, Vieira FG, Rozas J. Molecular evolution of the major chemosensory gene families in insects [J]. *Heredity*, 2009, 103 (3): 208–16.
- Sha L, Picimbon JF, Ji S, *et al.* Multiple functions of an odorant-binding protein in the mosquito *Aedes aegypti* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 372 (3): 464–468.
- Song YQ, Xie XC, Dong JF, *et al.* cDNA cloning, expression profile and binding characteristics analysis of the odor binding protein GmoOBP3 of Pear heartworm [J]. *Acta Entomologica Sinica*,

- 2014, 57 (3): 274–285. [宋月芹, 解幸承, 董钧锋, 等. 梨小食心虫气味结合蛋白 GmolOBP3 的 cDNA 克隆、表达谱及结合特性分析 [J]. 昆虫学报, 2014, 57 (3): 274–285]
- Su SK, Chen SL, Zhong BX, et al. Cloning and sequence analysis of *mrjp3* gene cDNA of *Apis chinensis* [J]. *Chinese Agricultural Sciences*, 2005, 38 (3): 612–618. [苏松坤, 陈盛禄, 钟伯雄, 等. 中华蜜蜂 *mrjp3* 基因 cDNA 的克隆及序列分析 [J]. 中国农业科学, 2005, 38 (3): 612–618]
- Vogel H, Heidel AJ, Heckel DG, et al. Transcriptome analysis of the sex pheromone gland of the noctuid moth *Heliothis virescens* [J]. *BMC Genomics*, 2010, 11: 29.
- Wang FH, Yang F, Geng JH, et al. Protection and utilization of Chinese honeybees in Beijing [J]. *Acta Applied Entomology*, 2007, 44 (6): 923–927. [王凤鹤, 杨甫, 耿金虎, 等. 北京中华蜜蜂的保护与利用 [J]. 应用昆虫学报, 2007, 44 (6): 923–927]
- Wei D, Ye ZF, Gao JQ, et al. Molecular cloning and functional identification of *Chilo suppressalis* Minus – C odor binding protein [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2013, 56 (7): 754–764. [魏丹, 叶占峰, 高建清, 等. 二化螟 Minus – C 气味结合蛋白的分子克隆及功能鉴定 [J]. 昆虫学报, 2013, 56 (7): 754–764]
- Wu SY, Wang GR, Wu KM, et al. Cloning and sequence analysis of the odor binding protein gene of *Helicoverpa armigera* [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38 (9): 1817–1824. [吴少英, 王桂荣, 吴孔明, 等. 烟青虫气味结合蛋白基因的克隆与序列分析 [J]. 中国农业科学, 2005, 38 (9): 1817–1824]
- Yang A, Guo L, Jiang JX, et al. Overview on characteristics and function of odorant binding proteins in insects [J]. *Journal of Changjiang Vegetables*, 2018, 2: 36–41. [杨安, 郭玲, 蒋杰贤, 等. 昆虫气味结合蛋白特性与功能研究概述 [J]. 长江蔬菜, 2018, 2: 36–41]
- Yang YQ, Wang SN, Peng Y, et al. Expression and ligand binding characteristics of the odorant binding protein MmedOBP19 in the foot of *Bracon striata* [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2017, 60 (6): 613–620. [杨叶青, 王山宁, 彭勇, 等. 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 [J]. 昆虫学报, 2017, 60 (6): 613–620]
- Yang Z, Yu TY, Wu QJ, et al. Genome – wide analysis of odorant – binding proteins and chemosensory proteins in the sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci* [J]. *Insect Sci.*, 2019, 4: 620–634.
- Zhang SX, Zhang Y, Xu SQ, et al. Mapping and expression analysis of GOBP/PBP subfamily gene cluster during pupal and adult stages of the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2010, 53 (10): 1069–1076. [张升祥, 张瑶, 徐世清, 等. 家蚕蛹和成虫期 GOBP/PBP 亚家族基因簇基因定位与表达分析 [J]. 昆虫学报, 2010, 53 (10): 1069–1076]
- Zhang ZK, Zhang Y, Wu SY, et al. Research progress in insect odorant binding proteins [J]. *Acta Environmental Entomology*, 2017, 39 (3): 713–720. [张治科, 张烨, 吴圣勇, 等. 昆虫气味结合蛋白研究进展 [J]. 环境昆虫学报, 2017, 39 (3): 713–720]
- Zhao H, Zhao W, Gao P, et al. Sequence and expression characterization of an OBP1 gene in the Asian honeybee, *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae) [J]. *Applied Entomology & Zoology*, 2014, 49 (1): 189–196.
- Zhao HX, Zeng XN, Liang Q, et al. Study of the obp5 gene in *Apis mellifera ligustica* and *Apis cerana cerana* [J]. *Genetics & Molecular Research Gmr*, 2015, 14 (2): 6482–94.
- Zhao X, Han LL, Wang L, et al. Sequence characteristics and expression profile analysis of the odor – binding protein OBP7 of *Acyrtosiphon solani*, the odor – binding protein OBP7 [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2014, 5: 639–646. [赵雪, 韩岚岚, 王玲, 等. 茄无网蚜 *Acyrtosiphon solani* 气味结合蛋白 OBP7 的序列特点及表达谱分析 [J]. 中国生物防治学报, 2014, 5: 639–646]
- Zhou JJ. Odorant – binding proteins in insects [J]. *Vitamins & Hormones*, 2010, 83: 241–272.
- Zhu JY, Zhang LF, Ze SZ, et al. Identification and tissue distribution of odorant binding protein genes in the beet armyworm, *Spodoptera exigua* [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2013, 59 (7): 722–728.