

doi: 10.3969/j.issn.1674-0858.2016.02.4

# 孟氏隐唇瓢虫气味结合蛋白 ComOBP1 基因的克隆和时空表达

潘 畅<sup>1</sup>, 张宇宏<sup>2</sup>, 谢佳沁<sup>1,3</sup>, 李浩森<sup>1</sup>, 庞 虹<sup>1\*</sup>

- (1. 有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 生物多样性演化与保护广东普通高校重点实验室, 中山大学生命科学院, 广州 510275;
2. 广东省昆虫研究所, 广东省农业害虫综合治理重点实验室, 广东省野生动物保护与利用公共实验室, 广州 510260;
3. 根特大学生物工程学院植物保护系, 比利时根特市 B-9000)

**摘要:** 采用 RT-PCR 和 RACE 技术, 从孟氏隐唇瓢虫 *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant 中成功克隆出气味结合蛋白 (ComOBP1) 基因的全序列 (Genbank 登陆号: KU170686)。ComOBP1 基因全长 922 bp, 包括 5'端长为 40 bp 的非编码区域 (UTR), 及 3'端长为 462 bp 的 UTR, 开放阅读框 ORF 长为 420 bp, 编码 139 个氨基酸, 预测的分子量为 15.516 kDa, 等电点 pI 为 6.57, 存在 AATAAA 加尾信号。N-末端疏水区包含由 20 个氨基酸构成的信号肽, 无跨膜结构, 有 4 个保守的半胱氨酸, 属于 Minus-C OBP, 也是在孟氏隐唇瓢虫中发现的第一个 Minus-C OBP。氨基酸序列中有且仅有一个 N-糖基化位点为 62 NLSA, 并存在 2 个潜在的磷酸化位点。与其它昆虫的 Minus-C OBPs 进行同源性比较并构建系统发育树, 发现与同为鞘翅目 Coleoptera 昆虫的同源性较高。利用 Real-time PCR、RT-PCR 技术对 CmonOBP1 基因在孟氏隐唇瓢虫不同发育阶段, 不同组织, 不同营养条件及不同食性下的表达水平进行了测定, 结果显示, CmonOBP1 基因在整个发育阶段均有表达, 雄性成虫期具有最高表达量, 且多在成虫的头部及翅部表达。当营养条件发生变化时, 表达丰度不会发生变化, 当猎物由天然猎物柑橘粉蚧 *Planococcus citri* Risso 变成碗豆修尾蚜 *Megoura japonica* Matsumura 时, 表达量会明显下降。该结果表明, 孟氏隐唇瓢虫的不同发育阶段、不同组织及猎物种类会影响 CmonOBP1 基因的表达, 从而进一步影响其嗅觉行为。同时, CmonOBP1 基因可能在雄虫相关的信息素感受过程中发挥着重要作用。

**关键词:** 孟氏隐唇瓢虫; 气味结合蛋白; CmonOBP1 基因; 基因克隆; 序列分析; 时空表达

中图分类号: Q963; S476

文献标志码: A

文章编号: 1674-0858 (2016) 02-0249-12

## Cloning and spatio-temporal expression of the odorant binding protein ComOBP1 gene from *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae)

PAN Chang<sup>1</sup>, ZHANG Yu-Hong<sup>2</sup>, XIE Jia-Qin<sup>1,3</sup>, LI Hao-Sen<sup>1</sup>, PANG Hong<sup>1\*</sup> (1. State Key Laboratory of Biocontrol, Key Laboratory of Biodiversity Dynamics and Conservation of Guangdong Higher Education Institute, College of Ecology and Evolution, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China; 2. Laboratory of Integrated Pest Management in Agriculture, Guangdong Public Laboratory of Wild Animal Conservation and Utilization, Guangdong Entomological Institute, Guangzhou 510260, China; 3. Department of Crop Protection, Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University, Coupure links 653, B-9000 Ghent, Belgium)

**Abstract:** The odorant binding protein gene CmonOBP1 (Genbank number: KU170686) from *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant was cloned by technology of RT-PCR and RACE. The full length was

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 项目 (2013CB127600); 国家自然科学基金面上项目 (31171899, 31572052); 国家自然科学基金项目 (31301720)

作者简介: 潘畅, 女, 1989 年生, 硕士, 研究方向为昆虫分子生物学与害虫生物防治, E-mail: dwpanchang@163.com

\* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: Lsshpan@mail.sysu.edu.cn

收稿日期 Received: 2016-01-01; 接受日期 Accepted: 2016-03-04

922 bp, containing a 5' UTR (untranslated region) of 40 bp and a 3' UTR of 462 bp. ORF (Open Reading Frame) was 420 bp which encoded a polypeptide of 139 amino acids with an estimated molecular weight of 15.516 kDa and pI of 6.57. Besides, the sequence had an AATAAA tailing signal. The predicted N-terminal hydrophobic region containing 20 amino residues displayed the characteristic features of a signal peptide, and no transmembrane domain was predicted. Four conservative cysteine residues classified CmonOBP1 as the first Minus-C OBP which was found in *C. montrouzieri*. The amino acid sequence had only one N-glycosylation site 62 NLSA, and two potential phosphorylation sites. Compared with other insect Minus-C OBPs, CmonOBP1 was much identical to the other Coleoptera. By Real-time PCR and RT-PCR methods, we determined the expression pattern of CmonOBP1 in different developmental stages, various adult tissues, different larval food regimes and other food. Spatio-temporal expression result showed that CmonOBP1 expressed in every stage and the male adult had the highest level. In addition, CmonOBP1 had a higher expression level in adult head and wing than that of other adult tissues. When larval diet changed either poor or rich, the expression level wouldn't be influenced markedly, while when the food changed from natural prey *Planococcus citri* Risso to *Megoura japonica* Matsumura, the expression level decreased significantly. The result suggested that the expression level of CmonOBP1 gene was development, tissues and prey type dependent, indicating a distinct sensitivity in olfactory. In addition, CmonOBP1 gene might play an important role in the process of male adult feeling related pheromone.

**Key words:** *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant; odorant binding protein; CmonOBP1 gene; gene cloning; sequence analysis; spatio-temporal expression

孟氏隐唇瓢虫 *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant 原产于澳大利亚, 属鞘翅目 Coleoptera 瓢虫科 Coccinellidae 小毛瓢虫亚科 Scymninae, 1955 年从前苏联引进广东, 1979 年间发现已在广州、福建等地建立了稳定的自然种群 (庞雄飞和李丽英, 1979)。孟氏隐唇瓢虫作为一种有效捕食性天敌瓢虫, 被广泛用来防治半翅目昆虫如粉蚧、蚜、蚜虫、飞虱等 (Jayanthi *et al.*, 2014), 特别是在防治 *Pseudococcus* 属的粉蚧方面取得成功, 在生物防治中具有广阔的应用发展前景。但制约其广泛应用的因素之一是食物的可利用性, 目前, 应用人工饲料喂养该天敌效果都不甚理想, 在室内仍以生活在南瓜果实上的天然猎物柑橘粉蚧 *Planococcus citri* Risso 作为食物进行人工饲养和保种 (蒋瑞鑫等, 2011)。能否实现天敌昆虫的规模化生产, 将直接影响以此为基础的生物防治效果和应用 (张帆等, 2015), 本实验室采用的室内繁育方法 (谢佳沁等, 2015) 能提供稳定的实验种群。

昆虫识别挥发性气味分子的灵敏性和特异性对其生存和繁衍起着重要作用, 对孟氏隐唇瓢虫 Minus-C OBP 的研究对于丰富昆虫中 OBP 的存在方式及防治粉蚧提供了新思路和新途径。目前对孟氏隐唇瓢虫的研究大多集中在分类学、行为学、规模化生产及控害效果评价等宏观水平, 随着酶

工程、二代测序技术、基因组学等技术的快速发展, 以及在孟氏隐唇瓢虫 mRNA、转录组、基因表达等方面的探索为孟氏隐唇瓢虫的研究提供了新思路 (Zhang, 2012; Jayanthi *et al.*, 2014; Xie *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015; 张宇宏, 2015), 而孟氏隐唇瓢虫转录组的测序成功则为气味结合蛋白的研究提供了条件。目前, 昆虫 Minus-C OBPs 的研究涉及鞘翅目中的赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*、黄粉虫 *Tenebrio molitor*、松墨天牛 *Monochamus alternatus*、山松甲虫 *Dendroctonus ponderosae*、水象甲 *Lissorhoptrus oryzophilus*、花绒寄甲 *Dastarcus helophoroides* 等少数种类, 鳞翅目中的夜蛾科 Noctuidae、凤蝶科 Papilionidae、螟蛾科 Pyralidae 少数几科, 以及脉翅目中的草蛉 Chrysopidae, 对捕食性瓢虫 Minus-C OBPs 的研究鲜有报导。根据转录组测序得到的孟氏隐唇瓢虫气味结合蛋白的中间片段, 利用 RT-PCR 及 RACE 技术, 得到孟氏隐唇瓢虫 CmonOBP1, 并用实时荧光定量技术对其时空表达模式进行了研究。克隆孟氏隐唇瓢虫 CmonOBP1 基因, 对其序列进行分析, 了解该基因的编码蛋白特征和时空表达模式, 为进一步研究其分子功能以及气味诱导剂的开发应用奠定分子基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 供试昆虫

孟氏隐唇瓢虫在中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室于  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , 14L:10D, RH = 60%  $\pm$  10% 条件下饲养。

粉蚧组: 用柑橘粉蚧 *Planococcus citri* Risso 饲养孟氏隐唇瓢虫的幼虫及成虫, 食物一直补充, 幼虫笼养, 成虫以雌雄比例 1:1 对养, 获得的孟氏隐唇瓢虫称为粉蚧组 (谢佳沁等, 2015); 蚜虫组: 用碗豆修尾蚜 *Megoura japonica* Matsumura 饲养孟氏隐唇瓢虫的幼虫及成虫, 食物一直补充, 幼虫笼养, 成虫以雌雄比例 1:1 对养, 获得的孟氏隐唇瓢虫称为蚜虫组; 高营养组: 每 10 头孟氏隐唇瓢虫幼虫为一组, 放入单独的培养皿 (90 mm  $\times$  15 mm) 进行饲养, 每组幼虫每天提供 10 头 (直径约为 1.5 mm) 柑橘粉蚧, 并且每天更换食物, 直到成虫羽化; 低营养组: 每 10 头孟氏隐唇瓢虫幼虫为一组, 放入单独的培养皿 (90 mm  $\times$  15 mm) 进行饲养, 每组幼虫每天提供 5 头 (直径约为 1.5 mm) 柑橘粉蚧, 每隔一天更换一次食物, 直到成虫羽化; 改善营养组: 每 10 头孟氏隐唇瓢虫幼虫为一组, 放入单独的培养皿 (90 mm  $\times$  15 mm) 进行饲养, 每组幼虫在前 8 d 和低营养组饲养方式一致, 直到第 9 天开始, 食物供应与高营养组的饲养方式一致, 直至成虫羽化 (Xie *et al.*, 2015)。

取样时间及取样组织器官: 随机取粉蚧组 2 龄幼虫、3 龄幼虫、4 龄幼虫、蛹期幼虫适量 (10–20 头), 羽化初期的雌性成虫, 雄性成虫各 3 头; 粉蚧组雌性成虫及雄性成虫适量 (15–20 头), 分别取其头、胸、腹及翅; 随机取粉蚧组羽化初期的高营养组、低营养组、改善营养组成虫各 3 头; 蚜虫组羽化初期的雌性成虫及雄性成虫各 3 头; 液氮处理后迅速置于  $-80^{\circ}\text{C}$  保存备用。

#### 1.1.2 主要试剂

第一链合成试剂盒 PrimeScript<sup>TM</sup> 1<sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis Kit, SMARTer<sup>®</sup> RACE 5'/3'Kit 琼脂糖凝胶回收试剂盒, DNA 纯化试剂盒购自 Takara 公司, DL2000 Marker, RNA 提取试剂

Trizol, PCR 试剂盒 Golden Easy PCR System, 荧光定量试剂盒 SuperReal PreMix Plus 购自天根生化科技 (北京) 有限公司。PCR 引物由华大科技 (深圳) 公司合成。其它试剂均为国产分析纯。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 总 RNA 的提取及 cDNA 第一条链的合成

按照 Trizol 提取动物组织总 RNA 的方法, 分别提取孟氏隐唇瓢虫在不同龄期、不同组织、不同营养条件及不同食性下的总 RNA。用紫外分光光度计测定其浓度和纯度, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。按照 cDNA 第一链合成试剂盒的要求, 以提取的总 RNA 为模板, 以 Oligo dT 为引物反转录合成 cDNA 第一条链。

#### 1.2.2 CmonOBP1 基因中间片段的获得

本实验室保存的孟氏隐唇瓢虫转录组数据库, 高通量测序后得到 26666668 条成对的 90 bp 长度的短序列 (reads) (Genbank 登录号为 SRR343064), 用 Velvet 和 Oases 对其组装及拼接后得到转录组数据库, 通过 Blast2GO 对转录组基因进行注释, 从中筛选到含有 OBP 片段的序列。通过对筛选到的序列进行手工注释, 并同源性分析, 寻找到 CmonOBP1 基因的保守片段并设计一对特异性 PCR 引物。上下游引物序列分别是:

OBP1-F: 5'-CAGCAGTCGTAATGGGCAATG-3'

OBP1-R: 5'-GCTTCACAACCTCGTCACC-3'

以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 体系为: 在总体积为 50  $\mu\text{L}$  的 PCR 管中依次加入 4  $\mu\text{L}$  dNTP Mixture (2.5 mM), 5  $\mu\text{L}$  10  $\times$  Taq Buffer, DNA Polymerase (2.5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.5–1.0  $\mu\text{L}$ , 上下游引物 (10  $\mu\text{M}$ ) 各 1  $\mu\text{L}$ , 少于 1 ng cDNA 模板, 补足去离子水至 50  $\mu\text{L}$ 。反应条件为:  $94^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min,  $94^{\circ}\text{C}$  30 s,  $50^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  90 s, 30 个循环后  $72^{\circ}\text{C}$  10 min, 扩增完毕后  $4^{\circ}\text{C}$  终止反应。经琼脂糖凝胶电泳检测正确的产物交由华大科技 (深圳) 公司测序。

#### 1.2.3 CmonOBP1 基因 cDNA 末端快速扩增

根据 Clontech 公司的 SMARTer<sup>®</sup> RACE 5'/3' Kit 试剂盒使用方法, 分别构建孟氏隐唇瓢虫 5'和 3'RACE 文库。根据已有 CmonOBP1 基因部分片段设计 5'和 3'RACE 巢式 PCR 特异性引物, 引物序列分别为:

OBP1NGSP1 (5'RACE): 5'-GATTACGCCAAGCTTCAACTCGTCACCAATGCTTTGTCCGT-3'

OBP1NGSP2 (5'RACE): 5'-GATTACGCCAAGCTTTCGTCACCAATGCTTTGTCCGTTACCT-3'

OPB1NGSP1 (3'RACE): 5'-GATTACGCCAAGCTTCTTTTCGGCTACATTCTTTGTTACGCCA-3'

OBP1NGSP2 (3'RACE): 5'-GATTACGCCAAGCTTAACGGACAAAGCATTGCTGACG AG-3'

3'RACE 扩增采用引物 10 × UPM (试剂盒提供) 和 OBP1NGSP1 (3'RACE), 二次 PCR 扩增采用引物 UPS (试剂盒提供) 和 OBP1NGSP2 (3'RACE), 5'RACE 扩增原理相同。采用相同的反应程序: 94℃ 30 s, 72℃ 2 min, 5 个循环; 94℃ 30 s, 70℃ 30 s, 72℃ 2 min, 5 个循环; 94℃ 30 s, 68℃ 30 s, 72℃ 3 min, 15 - 25 个循环。

#### 1.2.4 PCR 产物的克隆与测序

采用 In-Fusion 克隆的方法, 将目的 DNA 定向克隆到 pRACE 载体中, 然后转入 Stellar Competent Cells 感受态细胞中, 挑取单个白斑进行菌落 PCR 验证后, 送华大科技 (深圳) 公司测序验证。

#### 1.2.5 CmonOBP1 基因的时空表达

运用 Real-time PCR、RT-PCR 方法对孟氏隐唇瓢虫 CmonOBP1 基因在不同发育阶段, 不同组织, 不同营养条件及不同食性下的表达情况进行测定。设计特异性引物一对, CmonOBP1F: 5'-CAAAAACGACGACAACACTGCAA-3'; CmonOBP1R: 5'-TCTCTTCCTTTTTTCACACCACACT-3'。内参基因 beta-tubulin (BT) 引物序列: BT-F: 5'-CACGG AAGGTACTTGACTGTTG-3'; BT-R: 5'-GCTGCTGT TCTTGTTTTGATG-3'。20 μL 体系中含有 2 × SuperReal PreMix Plus 10 μL, 上下游引物各 0.3 μM, cDNA 模板少于 100 ng, ROX Reference Dye 终浓度为 1 ×, 用于消除信号本底以及校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。在 Stratagene Mx3000P 荧光定量 PCR 仪上进行反应, 三步法反应体系为: 95℃ 15 min; 95℃ 10 s, 55℃ 30 s, 72℃ 32 s, 40 个循环, 反应结束后先加热到 95℃ 1 min, 然后降至 55℃ 1 min, 记录荧光信号变化, 然后温度每升高 0.5℃ 记录一次荧光信号, 以得出扩增产物的融解曲线。

#### 1.2.6 序列分析及系统学分析

序列分析及同源性分析采用 Dnastar、Dnaman、BioEdit 等软件以及 <http://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl>; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/> 等在线分析软件,

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> 进行氨基酸同源性比对, <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> 预测信号肽结构, SWISS-MODEL: <http://swissmodel.expasy.org/> 进行蛋白质同源建模, <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/> 分析跨膜结构, <http://web.expasy.org/protscale/> 进行氨基酸结构预测, polyadq 在线软件 [http://rulai.cshl.org/tools/polyadq/polyadq\\_form.html](http://rulai.cshl.org/tools/polyadq/polyadq_form.html) 验证 AATAAA 加尾信号, NetPhos 2.0 <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/> 分析潜在的磷酸化位点, <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/> 预测糖基化位点, 用 Swiss-PDBViewer 软件观察蛋白质的三维结构。系统树构建采用 MEGA 5.05 中的最大似然法 (Maximum Likelihood), 以泊松修正 (Poisson Correction) 为模型进行了 1000 次重复构建, cut-off value 为 50%。

#### 1.2.7 数据统计与分析

利用 2 - ΔΔCT 相对定量法, 分析孟氏隐唇瓢虫 CmonOBP1 基因在不同发育阶段, 不同组织, 不同营养条件及不同食性下的表达差异。采用 SPSS 19.0 邓肯氏 (Duncan's multiple range test) 单因素方差 (one-way ANOVA) 进行不同样品之间的差异显著性分析 ( $P < 0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 CmonOBP1 基因的克隆和序列分析

根据 RT-PCR 及测序得到 257 bp 的中间片段, 与预测吻合, 设计 5'RACE 及 3'RACE 扩增引物, 分别得到 450 bp 及 650 bp 左右的清晰条带, 这和回收、连接、转化、验证和测序的结果一致。拼接 3'和 5'RACE 的序列和中间片段, 获得孟氏隐唇瓢虫 CmonOBP1 基因全长, Genbank 登陆号为 KU170686。基因 cDNA 全长为 922 bp, 包括 5'端长为 40 bp 的 UTR, 及 3'端长为 462 bp 的 UTR, 开放阅读框 ORF 长为 420 bp, 编码 139 个氨基酸, 于 704 - 709 位具有终止信号 AATAAA, 序列末端具有 26 个 poly (A) 尾巴结构。对编码区蛋白进行理化性质分析表明, 该蛋白分子量为

15.516 kDa, 理论等电点 pI 为 6.57, 分子式为  $C_{682}H_{1118}N_{182}O_{208}S_{10}$ , 脂肪系数为 105.83, 总平均疏水性为 0.055, 无可预测的跨膜结构。氮位糖基化位点分析表明, ComOBP1 基因氨基酸序列中有仅且有一个 N-糖基化位点 62 NLSA (图 2)。磷酸化位点分析表明, CmonOBP1 氨基酸序列中存在 2 个潜在的磷酸化位点 (图 5), 分别为丝氨酸 (Serine) 1 个和苏氨酸 (Theronine) 1 个。用 Hphob. / Kyte & Doolittle 方法进行亲脂性分析表

明, CmonOBP1 氨基酸序列中有 3 个亲脂性区域 (A, B, C), 尤其是在第 65-75 位的氨基酸残基形成了一个明显的亲脂性口袋, 这可能是与脂溶性气味相结合的位点 (图 4)。

推导的氨基酸编码区中包含 4 个气味结合蛋白基因保守的半胱氨酸 (Cysteine, Cys) 位点, 属于 Minus-C OBP, 预测 N-末端疏水区包含由起始位置开始的 20 个氨基酸组成的信号肽 (图 1)。通过在 GenBank 上进行比对分析, 发现该基因为 PBP/GOBP

```

1          ACATGGGGATAGTTAATAATTTCTAACCACGAACAACAAC
          10      20      30      40      50      60
38  ATGAAGTCGATCACGCTTACCCTTGCATTCATCGTGATATCGTTATCGCGGTGTGATGGGC
1   M K S I T L T L A F I V I S L C G V M G

          70      80      90      100     110     120
101 AATGAACTTCAAGAAATGTTTCTCGAATCCAAACATAACAATGCTGAATGTGGGAAAGAA
21  N E L Q E M F A R I Q T Y N A E C G K E

          130     140     150     160     170     180
161 ATTAATGTGGATTCOGATGTATTATCGAGAGCGAAAAAAGGAGATATCGATGAAAAGAAC
41  I N V D S D V L S R A K K G D I D E K N

          190     200     210     220     230     240
221 GAAAACTTTTCGGCCTACATTCCTTGTGTTAGCCAAAAAAGTAGGTTTGTAAATGATGCT
61  E N L S A Y I L C Y A K K V G F V N D A

          250     260     270     280     290     300
281 GTAGAACTTCAAGADGATGTGATCGCAAGAAAAATGTCACTTCAGGTAACGGACAAGACA
81  V E L Q D D V I A R K M S L Q V T D K A

          310     320     330     340     350     360
341 TTGGTGADGAGAGTTGTGAAGCTTGTGTCATGAGATCAAGAATACGGGTGATAACAACITA
101 L V T R V V K L C H E I K N T G D N N L

          370     380     390     400     410     420
401 TTTTCATCAAGAGTCTTATCATGTTATTATAAAAATCTTCCTGGTGTATCATCATGTAA
121 F S S R V L S C Y Y K N L P G V I I M *

461 AATAGTGGTGATGTAATATTTAAGTTGTTGTTACTAATCAAAGTTCACAAATATTCCTG
521 TAGGAGAAGCATATAACTGAATATTTTTTCGATGCATATTTGATTTGTATGCTTTTCG
581 TCAAAGTTCATATTACATAAATTGAATACTGTGTGATCGATTTGCCTATATCAGAGAAA
641 ATTAATGTTTGTGGAATTCAAAATCDECAGTCGACACTTCCTTTGTAGAAAATCCT
701 ACAAATAAATATACAAAATCAATTGAAGATTTTCCATTCACAGACTACAAAATGAA
761 TCCTTCAACTTATGTAGATACAGTAGCAGTCGAATTCATTCAATTTTATTCTTAACAA
821 TTTTGGGTTTGTGTTCCAAATATAAAATGTTGTTTTCTTTAGAAAATAATATAATAT
881 AAGTAAATATTGTTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 孟氏隐唇瓢虫 CmonOBP1 基因氨基酸序列及信号肽

Fig. 1 The deduced amino acid sequence and signal peptide of CmonOBP1

注: 信号肽序列用下划线标注, \* 代表终止密码子, 方框内表示气味结合蛋白四个保守的半胱氨酸, 粗体字表示加尾信号及 Poly (A) 尾, 左侧序号代表氨基酸和核苷酸的位置。Note: The predicted signal peptide sequence was underlined, stop codons were indicated by asterisk, conserved cysteine residues were boxed, polyadenylation signal domain and Poly (A) tail were bold, the position of the amino acids and nucleotides were listed by the serial numbers on the left.

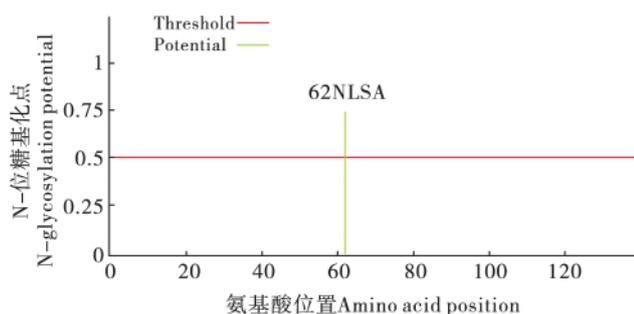
图2 孟氏隐唇瓢虫 *CmonOBP1* 基因的 N-糖基化位点预测图

Fig. 2 Predicted N-glycosylation site in the *Cryptolaemus montrouzieri* CmonOBP1 gene

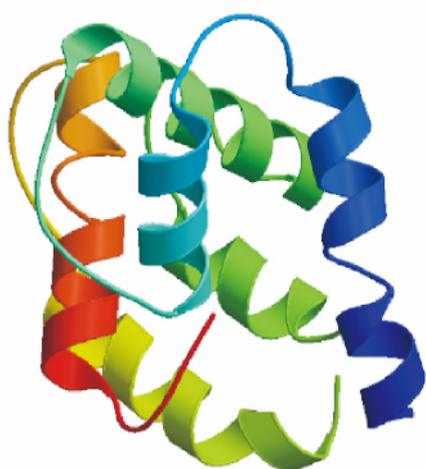
图3 孟氏隐唇瓢虫 *CmonOBP1* 的三维结构模型图

Fig. 3 The predicted 3D image of domains of *Cryptolaemus montrouzieri* CmonOBP1 amino acids

家族的气味结合蛋白基因。二级结构主要由 6 个  $\alpha$  螺旋构成多维二聚体, 4 个保守的半胱氨酸形成 2 个交互的二硫键 (CYS73-CYS69, CYS109-CYS128), 以支撑蛋白质的稳定结构。应用 Swiss-model 同源建模, 以黑腹果蝇的普通气味结合蛋白 (SMTL id: 3b6x.1) 为模板, 得到模拟的孟氏隐唇瓢虫 *CmonOBP1* 蛋白三维结构 (图 3), 其中有 76 个  $\alpha$  螺旋 (Helix), 41 个无规卷曲 (Coils), 无  $\beta$  折叠 (Sheet)。

## 2.2 CmonOBP1 基因氨基酸同源性比对

当前记录中, 对 Minus-C OBPs 有研究的昆虫涉及鞘翅目中的赤拟谷盗、黄粉虫、松墨天牛、山松甲虫、水象甲、花绒寄甲等少数几种, 鳞翅目中的夜蛾科、凤蝶科、螟蛾科少数几科, 以及脉翅目中的草蛉。根据 NCBI 同源比对的结果, 找

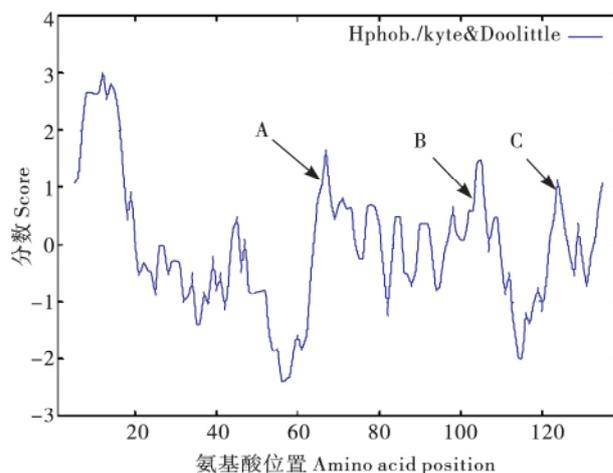
图4 孟氏隐唇瓢虫 *CmonOBP1* 的疏水性分析图

Fig. 4 Predicted hydrophobic profiles for the deduced amino acid sequences of the CmonOBP1

注: 对应氨基酸残基的亲脂指数根据 Kite 和 Doolittle (1982) 的算法得到, 正数代表亲脂性, 负数代表亲水性。Note: Hydrophobicity index values were plotted against the amino acid residues (Kite and Doolittle, 1982), positive values indicated hydrophobicity and negative values indicated hydrophilicity.

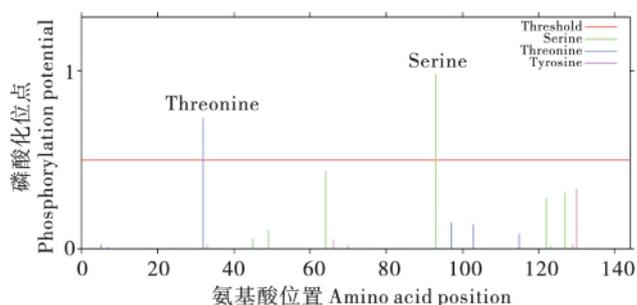
图5 *CmonOBP1* 蛋白潜在的磷酸化位点

Fig. 5 Prediction of phosphorylation sites of CmonOBP1

到与孟氏隐唇瓢虫 *CmonOBP1* 同源性大小各异 (30% - 80%) 的 20 种昆虫 Minus-C OBPs 基因序列, ClustalW2 多重联配结果显示 (图 6), 孟氏隐唇瓢虫 *CmonOBP1* 与其它 20 种不同昆虫的 Minus-C OBPs 均有 4 个保守的半胱氨酸残基, 说明这些氨基酸对昆虫感受外界气味具有重要的作用。孟氏隐唇瓢虫 *CmonOBP1* 与鞘翅目昆虫同源性相对较高, 与花绒寄甲气味结合蛋白同源性为 77.8%, 与赤拟谷盗气味结合蛋白同源性为 72.4%, 与松墨天牛同源性为 51.6%, 与黄粉虫同源性为 47.4%, 与山松甲虫同源性为 42%, 与鳞翅目、脉翅目同源性为 30% - 60%。

```

Cpal-obp      -----MKNFILTGVIAAAF-CIVQNQAKI-TAEQQKTFKQRSEECRTET
Dhou-obp      -----MKTFLIAVCLV-----AVQ--AL-TDEQKEKLNKKHRTKCLAET
Csup-obp      MGTVSTEHYPAHHVINMKAFIVLAVCIV-----AAQ--AL-TDEQKEKLNKKHRTKCLAET
Msex-obp      -----MKALLVLAACLV-----LAQ--AL-TDEQKEKLNKKHRTKCLSET
Slit-obp      -----MKTFLVFAACIL-----LAQ--AL-TDEQKEKLNKKHRTKCLTET
Harm-obp      -----MKTFLVLAACVM-----LVQASGL-TDEQKEKLNKKHRTKCLTET
Hass-obp      -----MKTFLVLAACVM-----LVQASGL-TDEQKEKLNKKHRTKCLTET
Pxyl-obp      -----MIAGCHAHL-TKDQSARVHEYGMECMKKT
Dple-obp      -----MKFLVLCVCAIFISRSNAQNAHL-TSAQKEKLVKQYTAECIRES
Aips-obp      -----MKSFLVLAACVM-----LVQASGL-TDEQKEKLNKKHRTKCLTET
Dkik-obp      -----AYLFLCLVLT-AAGLEAHTIHL-SHTQKDKAHQLTMECMKES
Pmac-obp      -----MNSLLLLCFVLS-FATIEAHTVHL-SHSQKEKAHLYIACCMKES
Ppol-obp      -----MNSLLFLCFVLS-VGGSEAHTVHL-SHAQKEKAHLHTAECMKES
CmonOBP1     -----MKSITLTLAFIVISLCG---VMGNEIQEMFARIQTYNACGKEI
Bhor-obp      -----MKTAF---VFACVVAA---LAAS-LSEEEKQLQEIHDKQADP
Tmol-obp      -----MKSSTFLVLC---FLLG---IQGG-VINNPEDDLRRVKAQCEQS
Malt-obp      -----MNKLT--VLFYITFFAA---VHGL-TEEEKM---AIHEDCFSSQS
Tcas-obp      -----MKA--FIV--LVAVAVC---AQAL-TDEQKEKLNKYNHKECSAVS
Dhel-obp      -----MKSFAFVL--ALTFVVA---VYGL-TEEQKEKLNKYNHKECSASS
Lory-obp      -----MKSFLAAVVIIGALACI---EAQL-TDEQKAKLKEHYTVCVGGT
Dpon-obp      -----MKAMFVTLTVATVVVFA---SADL-TEEQKQKLVANGKAGVAET

Cpal-obp      KVDPQLIENVKKGEAVS-SDDFKAYAIKLTNRLLQLLNDAGDVNMEKALSLLPAGE-DKAA
Dhou-obp      KPDEQLVAKLNKNGDYKTESEPLKKYALCMVMKSELMTKDGKFKKDVALAKVPDAA-DKPM
Csup-obp      KVDEQLVNLKAGDYKSDNEALKKYALCMLIKSELMTKEGKFKKDVALAKVANPA-DKPQ
Msex-obp      KVEEQLVNLKAGDYKAENDNLKKYALCMMMSELMTKEGKFKKDVALSKVFNPA-DKPM
Slit-obp      KVDEQLVNLKAGDYKMDNEALKKYALCMMMSELMTKDGKFKKDVALAKVFNPA-DKPT
Harm-obp      KVDEQLVNLKAGDYKTESEPLKKYALCMMMSELMTKDGKFKKDVALAKVFNAA-DKPT
Hass-obp      KVDEQLVNLKAGDYKTESEPLKRYALCMMMSELMTKDGKFKKDVALAKVFNAA-DKPT
Pxyl-obp      GVNALVAKAKKGEFTD-DEALKKFTLCCFQKGTGILTS DGKLN E VALSKLPAEV-DKAA
Dple-obp      GVKHEVLADAKKGNLNE-DEGLKRFI FCFQKSGI VTADAKLNMEVALSKLPKDI-DKVA
Aips-obp      GVSKEVLA EAKKGIAD-DEGLKKFTLCCFQKAGI VDNNGKLNLETA LAKLPPGV-DKAE
Dkik-obp      NVKPEVIAESKKKGH FADDDD LKFTLCCFQKAGI LSPDAKLNVDTALEKLPKGV-DKAE
Pmac-obp      GVKSEVLAEAKKGVFEE-DEPLKKFTLCCFQKSGI INDEGKLNVAEALAKLPSGV-DKAN
Ppol-obp      GVKSEVLA EAKKGVFED-DEALKKFTLCCFQKSGI ISDEGKLN VSEALAKLPTGV-DKVA
CmonOBP1     NVDSVLSRAKKGDI DEKNE NLSAYI LCFYAKKGVFVNDAVE LQDDVI ARKMSLQVTDKAL
Bhor-obp      ATYVDHELLHNL SANID-NPKVGAHMLCE SKAVGLQKPNGLDLNVI KQKISLTVS DKAK
Tmol-obp      NVNAA SLKNIP LGRFDN-DPNLKEYLLCFVSKMSGYQNEAGYLQSDVI RVKLGAGHYNDDT
Malt-obp      GVSEEMASKVMDGVFVD-DPKLKLVI LCFQKAGI LSPDAKLNVDTALEKLPKGV-DKAE
Tcas-obp      GVSQDVITKARKGEFIE-DPKFKEHLFCFQKAGI LSPDAKLNVDTALEKLPKGV-DKAE
Dhel-obp      GVNQDLITKARKGEFVE-DPKLMEHLFCFQKAGI LSPDAKLNVDTALEKLPKGV-DKAE
Lory-obp      GVDKDVITKARKQGNFVD-DPKLKAFAFCMSKRIGFQNEAGDVQPDVVKAKLSGAINDPAA
Dpon-obp      GADPELIKAARQKGFAD-DAKLLKAFALCMSSKSGFQNEAGEIQSDVVVKQKLGLAIGDEAA

```

\*



斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*、棉铃虫 *Helicoverpa armigera*、烟夜蛾 *Helicoverpa assulta* 几种鳞翅目昆虫 Minus-C OBPs 同聚在另一分支上, 实验中所有鞘翅目 Coleoptera 昆虫 Minus-C OBPs 同聚在又一个分支上, 说明这三大支的 Minus-C OBPs 基因各自

来源于同一个祖先基因, 由于自然选择作用, 最终分化成不同的基因型。孟氏隐唇瓢虫 CmonOBP1 先与云斑天牛 *Batocera horsfieldi* 聚为一支, 然后与山松甲虫 *Dendroctonus ponderosae* 聚为一支, 再与黄粉虫 *Tenebrio molitor* 聚为一支, 最后其它鞘翅目

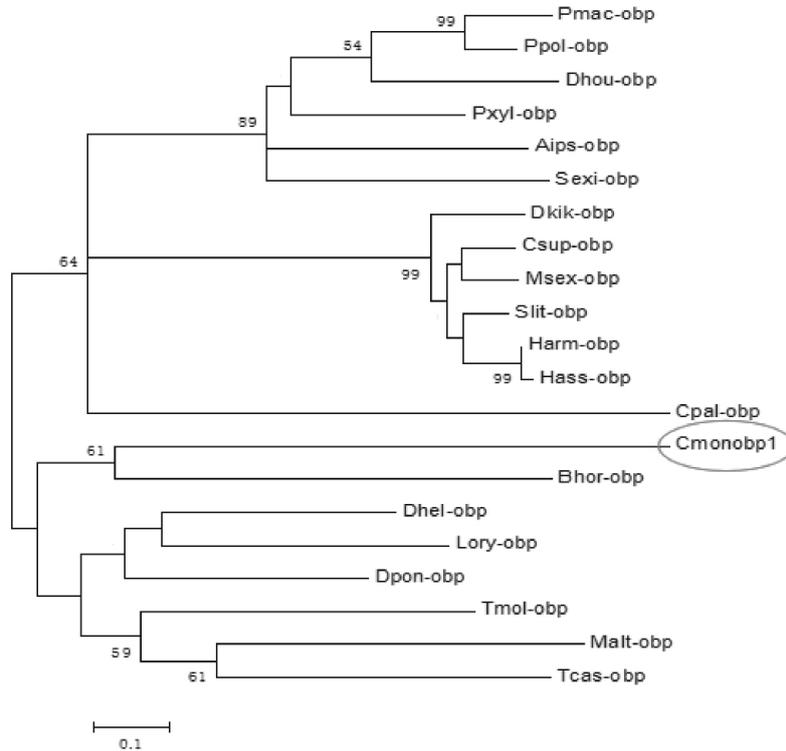


图 7 孟氏隐唇瓢虫气味结合蛋白 CmonOBP1 与其它已知昆虫气味结合蛋白的系统发育树

Fig. 7 Phylogenetic tree of CmonOBP1 and Minus-C OBPs from other different insect species

注: 分支上的数字大小代表不同的亲缘关系, 标尺代表对应分支上单个氨基酸发生变异的估计值。Note: Different numbers on the branches represented different genetic relationship, and the scale bar represented an estimate of variation value corresponding to each amino acid.

昆虫聚类为一大支, 说明 CmonOBP1 与鞘翅目昆虫遗传距离较近, 关系较亲密, 与鳞翅目昆虫及草蛉 (Neuroptera: Chrysopidae) 的遗传距离相对较远。21 种昆虫的 Minus-C OBPs 最终都汇为一支。

2.4 CmonOBP1 基因时空表达模式

标准曲线结果显示, CmonOBP1 和 beta-tubulin 两对定量引物在不同浓度模板下皆能得到平滑而稳定的扩增曲线。CmonOBP1 引物的扩增效率为 115.5%, 相关系数为 0.984, 标准曲线斜率为 -2.999; beta-tubulin 引物的扩增效率为 114.4%, 相关系数为 0.998, 标准曲线斜率为 -3.019。均符合 Real-time PCR 的反应条件, 可以用于后面的分析。

根据 Real-time PCR 结果显示 (图 8),

CmonOBP1 基因在成虫的不同组织中均有表达, 在雄虫中的表达量由高到低依次是翅、头、胸、腹, 且在头、翅部中表达量明显高于在胸、腹部中的表达量 (图 8A), 在雌虫中的表达量由高到低依次是头、翅、胸、腹, 且在头、翅部中表达量明显高于在胸、腹部中的表达量 (图 8B), 在雄虫胸、腹、翅中的表达量分别是雌虫胸、腹、翅中的表达量的 7 倍、7.1 倍、3.4 倍, 而雌虫头部的表达量与雄虫头部表达量无显著性差异 (图 8C)。CmonOBP1 基因在发育的不同阶段表达量不同, 2、3、4 龄幼虫阶段表达量低, 蛹期开始增加, 成虫期则达到顶峰。雌、雄成虫中表达量明显高于幼虫阶段表达量, 且雄性成虫中表达量是雌性成虫中表达量的 3.3 倍 (图 8D)。在幼虫不同营养条件下 CmonOBP1 基因的表达量由高到低依次是高

营养组, 低营养组, 改善营养组, 但统计分析未达到显著水平 (图 8E)。在猎物发生改变时, CmonOBP1 基因的表达量明显改变 (图 8F)。同一性别个体在食物由天然猎物柑橘粉蚧变为碗豆修

尾蚜时, 雌性成虫中表达量下调至粉蚧组雌性个体的 0.423, 雄性个体中表达量下调至粉蚧组雄性个体的 0.371。

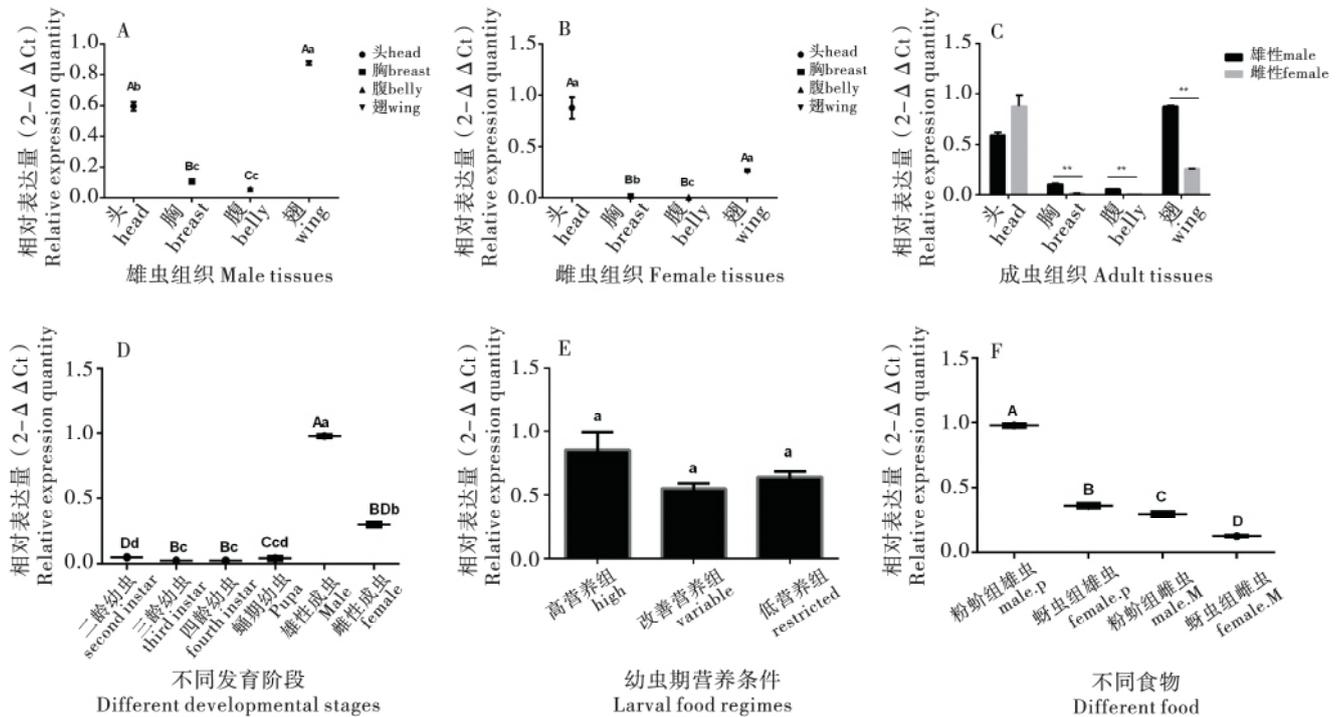


图 8 Real-time PCR 鉴定 CmonOBP1 基因的表达谱分析

Fig. 8 Relative expression level of CmonOBP1 measured by Real-time PCR

注: 误差线代表 1 个标准误差, 用 t 检验法进行分析, 试验组与对照组相比, \*\* 表示差异极显著 ( $P < 0.01$ ), \* 表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 不标者则为差异不显著 ( $P > 0.05$ )。用 Duncan 法进行多重比较, 同一曲线中标有不同大写字母、小写字母者分别表示组间差异极显著 ( $P < 0.01$ ) 和显著 ( $P < 0.05$ ), 标有相同小写字母者表示组间差异不显著 ( $P > 0.05$ )。Note: Error bars represented 1 SE value, analyzed with t test, comparing experimental group with control group, \*\* showed extremely significant difference ( $P < 0.01$ ), \* showed significant difference ( $P < 0.05$ ), no asterisk meant no significant difference ( $P > 0.05$ ). Analyzed with Duncan multiple comparisons, the same curve with different capital letters or lowercase letters respectively meant extremely significant difference ( $P < 0.01$ ) or significant difference ( $P < 0.05$ ), with the same lowercase letters indicated no significant differences between groups ( $P > 0.05$ ).

### 3 结论与讨论

本研究采用 RT-PCR 以及 RACE 技术得到孟氏隐唇瓢虫气味结合蛋白基因 CmonOBP1, 这是在孟氏隐唇瓢虫中发现的第一个 Minus-C OBP, 属于小分子量的酸性分泌蛋白, 具有 4 个保守的半胱氨酸位点, 以及信号肽结构。氨基酸序列一致性分析结果表明, 孟氏隐唇瓢虫 CmonOBP1 与其它昆虫 Minus-C OBPs 同源一致性在 30% - 80% 之间, 说明了 Minus-C OBPs 亚型具有多样性, 而同一目的昆虫 Minus-C OBPs 氨基酸序列更为保守, 这可

能与不同目昆虫结合气味分子的不同组分有关。21 种昆虫氨基酸序列均含有 4 个保守的半胱氨酸残基, 说明这些半胱氨酸残基在昆虫感受外界气味分子过程中有着重要的作用。昆虫的 Minus-C OBPs 蛋白具有相似的三级结构, 表明昆虫 Minus-C OBPs 在进化过程中比较保守, 可能结合相同或者相似的气味分子。进化树分析结果表明, 鞘翅目昆虫的 Minus-C OBPs 最后汇聚为一支, 表明鞘翅目昆虫 Minus-C OBPs 可能在该目昆虫的嗅觉识别过程中起着相似的功能, 而鳞翅目昆虫的 Minus-C OBPs 分化成两亚群, 说明这两类 OBPs 可能在鳞翅目昆虫嗅觉识别中起着不同的作用。21 种昆虫 Minus-C OBPs 最后

汇聚为同一大支,说明这 21 种昆虫的 Minu-C OBPs 来源于共同的祖先基因,而后在不同的选择压力下朝不同的方向进化,反映了趋异进化现象。从单个分析,孟氏隐唇瓢虫 CmonOBP1 最有可能与云斑天牛 Bhor-obp 来自同一祖先基因,但在长期进化过程中对不同环境化学因子刺激的适应和进化使其产生了分化,在不同物种间行使着相同或者某些相似的功能。

蛋白质翻译后修饰在生命活动中具有十分重要的作用,它使蛋白质的结构更为复杂,功能更为完整,调节更为精强,作用更为专一(白海艳等,2011)。作为生物体内最为重要的蛋白质翻译后修饰形式之一,糖基化在细胞免疫、信号传导、蛋白翻译调控、蛋白降解等诸多生物过程中起着重要作用,N-糖基化的位点是我们理解其糖链功能的基础(李军等,2009)。糖基化位点预测显示,CmonOBP1 氨基酸序列中存在一个经典的N-糖基化位点为 62 NLSA。当三联子序列 N 端或 C 端存在半胱氨酸时,二硫键的形成会增加构象的刚性,降低 N-糖链发生的概率(周蕾和顾建新,2011)。蛋白质磷酸化是将外界刺激转换为胞内信号的一个主要机制,在细胞信号转导的过程中起着重要作用(梁前进等,2012)。真核生物中主要通过丝氨酸、苏氨酸及酪氨酸等氨基酸残基的磷酸化,可逆的蛋白质磷酸化更是调节着细胞的大部分功能,如能量储存、形态变化、蛋白合成、基因表达、信号因子释放、肌肉收缩和生化代谢等。本研究中预测到的潜在的磷酸化位点有丝氨酸(Serine) 残基 1 个及苏氨酸(Theronine) 残基 1 个。

昆虫嗅觉系统对感受食物来源、寄主植物、产卵场所、信息交流及异性交配有重要作用,气味结合蛋白与脂溶性的气味物质结合是昆虫专一性识别外界气味物质的第一步生化反应(谷少华等,2010)。本研究采用实时荧光定量技术对气味结合蛋白 CmonOBP1 基因在孟氏隐唇瓢虫不同发育阶段、不同组织、不同营养条件及不同食物条件下的表达谱进行了分析。CmonOBP1 基因在各个组织普遍表达,说明其与孟氏隐唇瓢虫识别普通气味分子过程相关。CmonOBP1 基因的 mRNA 在幼虫阶段表达量普遍偏低,说明孟氏隐唇瓢虫在幼虫阶段接受气味分子的能力可能较弱。雄虫中表达量高于雌虫,原因可能是由于雄性成虫相比雌性成虫有更多的感受普通气味分子的传感器。同时

也说明,CmonOBP1 基因可能在雄虫相关的信息素感受过程中发挥着重要作用,如对雌性信息素的感受。在成虫头部及翅部的高丰度表达,暗示其可能与成虫的嗅觉、味觉及飞翔功能有关。幼虫时期的营养条件常常影响成虫繁殖能力及生理功能,如免疫、新陈代谢或者解毒能力。本实验中,CmonOBP1 基因在幼虫期不同营养条件处理实验中,表达量无明显变化,说明该基因可能并不参与孟氏隐唇瓢虫的解毒、免疫等生理功能。当猎物由柑橘粉蚧变为豌豆修尾蚜后,CmonOBP1 基因在雄性成虫及雌性成虫中表达量分别降至 0.371、0.423 倍,说明了 CmonOBP1 识别气味分子具有特异性,也说明了生活在南瓜果实上的柑橘粉蚧是孟氏隐唇瓢虫的较优食料,这和庞虹等(1996)的研究结果一致。

本实验对研究 CmonOBP1 在孟氏隐唇瓢虫嗅觉识别过程以及其它生命过程中的作用提供了初步结论,为进一步解析孟氏隐唇瓢虫 CmonOBP1 的生化特征和生理功能提供了很好的技术支持,也为深入研究 CmonOBP1 基因与不同组分的结合能力,进而制备相关的气味诱导剂来进行害虫防治奠定了理论基础。

### 参考文献 (References)

- Bai HY, Lv J, Zhang Y, et al. Recognition of protein phosphorylation site [J]. *Journal of Inner Mongolia University of Technology*, 2011, 30 (2): 108 - 115. [白海艳,吕军,张颖,等. 蛋白质磷酸化位点的识别 [J]. 内蒙古工业大学学报(自然科学版),2011,30 (2): 108 - 115]
- Gu SH, Sun Y, Ren LY, et al. Cloning, expression and binding characterization analysis of odorant binding protein AlinOBP3 gene from *Helicoverpa assulta* [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2010, 55 (27 - 28): 2690 - 2701. [谷少华,孙洋,任丽燕,等. 苜蓿盲蝽气味结合蛋白 AlinOBP3 的克隆、表达及结合特性分析 [J]. 科学通报,2010,55 (27 - 28): 2690 - 2701]
- Jiang RX, Zhang YH, Wu HS, et al. The color preference of *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae) on substrates [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2011, 33 (2): 213 - 218. [蒋瑞鑫,张宇宏,吴红胜,等. 孟氏隐唇瓢虫对产卵基质的颜色选择行为研究 [J]. 环境昆虫学报,2011,33 (2): 213 - 218]
- Jayanthi PDK, Rajinikanth R, Ravishankar KV, et al. Influence of cGMP on feeding potential of predatory Coccinellid, *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant and isolation of partial foraging gene [J]. *Journal of Insect Behavior*, 2014, 27 (3): 385 - 394.
- Li J, Du X, Hosseini, et al. The research progress in protein glycosylation modification [J]. *Bulletin of Science and Technology*, 2009, 25 (6): 773 - 778, 783. [李军,杜鑫, Hosseini, 等. 蛋

- 白质糖基化修饰研究进展 [J]. 科技通报, 2009, 25 (6): 773-778, 783]
- Li HS, Jin MJ, Ślipiński A, *et al.* Genetic differentiation in native and introduced populations of *Cryptolaemus montrouzieri* (Coleoptera: Coccinellidae) and its implications for biological control programs [J]. *Journal of Economic Entomology*, 2015, 108 (4): 743-747.
- Li L, Yang WL, Guo XR, *et al.* Cloning, sequence analysis and spatio-temporal expression of a pheromone binding protein 2 (PBP2) gene from *Helicoverpa assulta* (Guenee) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2009, 52 (11): 1199-1205. [李亮, 杨文玲, 郭线茹, 等. 烟夜蛾性信息素结合蛋白 2 (PBP2) 基因的克隆、序列分析与时空表达 [J]. 昆虫学报, 2009, 52 (11): 1199-1205]
- Liang QJ, Wang PC, Bai YR. Summarization on the progress in protein phosphorylation [J]. *Science and Technology Review*, 2012, 30 (31): 73-79. [梁前进, 王鹏程, 白燕荣. 蛋白质磷酸化修饰研究进展 [J]. 科技导报, 2012, 30 (31): 73-79]
- Pang H, Li LY, Tang C. The technique for preservation of *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant adult with the artificial diet [J]. *Natural Enemies of Insects*, 1996, 18 (2): 64-66. [庞虹, 李丽英, 汤才. 孟氏隐唇瓢虫成虫的人工饲料保种技术 [J]. 昆虫天敌, 1996, 18 (2): 64-66]
- Pang XF, Li LY. Studies on the *Cryptolaemus montrouzieri* setting control of mealybug harm in Guangzhou and other places [J]. *Natural Enemies of Insects*, 1979, 1 (3): 50. [庞雄飞, 李丽英. 孟氏隐唇瓢虫在广州等地定居控制石粟粉蚧的危害 [J]. 昆虫天敌, 1979, 1 (3): 50]
- Xie JQ, Wu HS, Zhang YH, *et al.* A way of artificial breeding, storage and reproduction of *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant [P]. Chinese Patent: 201410482952.1, 2015-03-04. [谢佳沁, 吴红胜, 张宇宏, 等. 一种孟氏隐唇瓢虫人工饲养、保种和繁殖生产方法 [P]. 中国专利: 201410482952.1, 2015-03-04]
- Xie JQ, Patrick DC, Pan C, *et al.* Larval nutrition-induced plasticity affects reproduction and gene expression of the ladybeetle, *Cryptolaemus montrouzieri* [J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2015, 15 (1): 1-9.
- Zhang F, Li S, Xiao D, *et al.* Progress in pest management by natural enemies in greenhouse vegetables in China [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2015, 48 (17): 3463-3476. [张帆, 李姝, 肖达, 等. 中国设施蔬菜害虫天敌昆虫应用研究进展 [J]. 中国农业科学, 2015, 48 (17): 3463-3476]
- Zhou L, Gu JX. N-glycosylation sites analysis and nonconsensus N-glycosylated sequences [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2011, 23 (6): 605-611. [周蕾, 顾建新. N-糖基化位点鉴定方法和非经典 N-糖基化序列 [J]. 生命科学, 2011, 23 (6): 605-611]
- Zhang YH, Jiang RX, Wu HS, *et al.* Next-generation sequencing-based transcriptome analysis of *Cryptolaemus montrouzieri* under insecticide stress reveals resistance-relevant genes in ladybirds [J]. *Genomics*, 2012, 100 (1): 35-41.
- Zhang YH. Transcriptome Analysis of *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant under Different Stresses based on High-throughput Sequencing [D]. Sun Yat-sen University PhD Dissertation, 2012, 144. [张宇宏. 基于高通量测序的逆境胁迫下的孟氏隐唇瓢虫转录组分析 [D]. 中山大学博士论文, 2012, 144]
- Zhang YH, Zheng JH, Mao RQ, *et al.* Cloning and characterization analysis of cytochrome P450 CYP9Z401 gene from *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2015, 37 (4): 759-766. [张宇宏, 郑基焕, 毛润乾, 等. 孟氏隐唇瓢虫细胞色素 P450 基因的克隆与序列分析 [J]. 环境昆虫学报, 2015, 37 (4): 759-766]