

烟实夜蛾触角普通气味结合蛋白 II cDNA 的克隆、序列分析及在大肠杆菌中的表达

巩中军¹, 原国辉^{1*}, 郭线茹¹, 安世恒²

(1. 河南农业大学植物保护学院, 郑州 450002; 2. 浙江大学应用昆虫学研究所, 杭州 310029)

摘要: 利用 RT-PCR 技术扩增了编码烟实夜蛾 *Helicoverpa assulta* 雌、雄虫触角普通气味结合蛋白 II 的 cDNA 片段, 将其克隆至 pGEM-T Easy 载体, 获得了普通气味结合蛋白 II 基因成熟蛋白阅读框序列。将该基因重组到表达型质粒 pET-30a(+) 中, 并转化入原核细胞中表达。序列测定结果表明, 烟实夜蛾触角普通气味结合蛋白 II 基因的成熟蛋白阅读框全长 489 bp, 编码 162 个氨基酸残基, 预测分子量和等电点分别为 18.2 kD 和 5.35。推导的氨基酸序列与已报道的 10 种昆虫普通气味结合蛋白 II 高度同源(73% ~ 98%), 并具有气味结合蛋白的典型特征。SDS-PAGE 和 Western 印迹分析表明, 经 IPTG 诱导, 普通气味结合蛋白 II 基因能在大肠杆菌 BL21(DE3) 中表达, 电泳检测到一条约 23 kD 大小的外源蛋白, 与预测的融合蛋白分子量大小相应。

关键词: 烟实夜蛾; 普通气味结合蛋白; 触角; 基因克隆; 原核表达

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2005)01-0018-06

Cloning and sequencing of cDNA encoding general odorant binding protein II in the antenna of *Helicoverpa assulta* (Guenée) and its expression in *Escherichia coli*

GONG Zhong-Jun¹, YUAN Guo-Hui^{1*}, GUO Xian-Ru¹, AN Shi-Heng² (1. College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. Institute of Applied Entomology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: The cDNA encoding the general odorant binding protein II (named as Hass-GOBP2) was isolated from the male and female antennae of *Helicoverpa assulta* (Guenée) by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The cDNA fragment was further cloned into pGEM-T Easy vector, and then constructed into expression vector pET-30a(+) for overexpression in prokaryotic cells. Structural analysis showed that the full length of mature Hass-GOBP2 open reading frame (ORF) was 489 bp, encoding 162 amino acid residues; the predicted MW and pI were 18.2 kD and 5.35, respectively. The deduced amino acid sequence showed a high identity to the reported sequences of GOBP2 from other insects and shared the typical structural features of odorant binding proteins from other insects. Induced by IPTG, the full length of GOBP2 was expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3). Its molecular weight was found to be about 23 kD by checking with SDS polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting.

Key words: *Helicoverpa assulta*; general odorant binding protein; antenna; gene cloning; prokaryotic expression

烟实夜蛾 *Helicoverpa assulta* (Guenée), 又称烟青虫, 是世界动物区系中的东洋、古北、澳洲、非洲共有种, 我国各省区均有分布。已记录的寄主植物约 70 多种, 栽培植物中的主要寄主是烟草和辣椒。目前过分单一的使用农药不仅易使昆虫产生抗药性, 而且污染环境, 因此有必要发展一种经济有效的防治方法。

研究表明, 昆虫能够感受空气中的挥发性物质, 并依此作为寻偶、觅食和寻找产卵场所的信息(娄永根和程家安, 2001; 王桂荣等, 2001)。而昆虫触角感器中的气味结合蛋白与脂溶性的气味物质的结合, 是昆虫专一性识别外界气味物质的第一步生化反应 (Vogt *et al.*, 1999), 对于昆虫与外界进行信息交流具有重要意义。对此进行研究可以为害虫防治提供

基金项目: 河南省自然科学基金资助项目(0311031700)

作者简介: 巩中军, 男, 1978 年 1 月生, 河南范县人, 硕士研究生, 从事分子生物学和生态学研究, E-mail: gongzj-2@sohu.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: yguohui@hotmail.com; xrguod@sina.com

收稿日期 Received: 2003-11-12; 接受日期 Accepted: 2004-05-20

新的思路与途径,为研制开发无污染、不杀伤天敌、与环境相容性好的高效引诱剂提供理论依据。

昆虫气味结合蛋白(odorant binding protein, OBP)是一类低分子量的水溶性酸性蛋白(Pelosi and Maida, 1995),在昆虫识别外界气味物质中起重要作用(Li and Prestwich, 1997; 王睿等, 1999),多在昆虫嗅觉感器中表达。对于鳞翅目昆虫依据其生理功能将 OBP 分为信息素结合蛋白(pheromone binding protein, PBP)、普通气味结合蛋白 I (general odorant binding protein I, GOBP1)、普通气味结合蛋白 II (GOBP2)和 PBP 相关蛋白(PBP-like protein)(Li and Prestwich, 1997)。

实验证明 PBP 可与特定的信息素结合,它们主要存在于毛形感器中,在信息素识别过程中起关键作用。GOBP2 在雌、雄蛾触角中表达量相同(Vogt *et al.*, 1991; Jacquin-Joly *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2003),在所研究的昆虫中表现出很高的序列同源性。一些实验证明,相对于 PBP 家族间较高的特异性而言,GOBP2 家族有明显的广谱性。GOBP2 除了能结合较广范围的气味分子外,还能结合一些信息素分子(Li and Prestwich, 1997)。但还未找到合适的配体(Li and Prestwich, 1997),也就不能得到一个理想的嗅觉模型(Maibeche-Coisne *et al.*, 1998)。

由于昆虫触角较小,直接分离纯化大量气味结合蛋白用于生物化学和生物物理学研究比较困难。迄今对昆虫 GOBP2 蛋白的结构和功能研究尚少,对功能的研究还限于根据一些生理生化和免疫学实验结果作出的一些推理,没有直接的证据(Li and Prestwich, 1997; Maibeche-Coisne *et al.*, 1998; 王桂荣等, 2002)。随着生物化学和分子生物学技术的快速发展,利用多种原核和真核表达系统表达外源基因,进而对其蛋白结构和功能进行研究已成为可能。本研究旨在利用 RT-PCR 法克隆烟实夜蛾触角 GOBP2 基因,将得到的基因与表达载体相连后,在大肠杆菌中表达,得到目的蛋白,为研究其结构及功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试昆虫: 烟实夜蛾用人工饲料单管饲养,羽化后 3 天内分别剪下雌、雄虫触角,立即放在液氮中冷冻保存备用。

1.1.2 菌种及质粒: pGEM-T Easy 载体购自 Promega

公司,大肠杆菌 DH5 α 和 BL21(DE3)、质粒 pET-30a(+)均为本室保存。

1.1.3 主要试剂及工具酶: T4 DNA 连接酶、硝酸纤维素膜、辣根过氧化物酶底物 DAB 和辣根过氧化物酶标记的二抗购自 Promega 公司, Ex Taq DNA 聚合酶,限制酶 *EcoR* I、*Xho* I 和 *Bam*HI 购自 TaKaRa 公司,鼠抗 His 单抗购自 Novagen 公司, X-gal、IPTG、dNTP、Trizol、丙烯酰胺、N,N'-甲叉双丙烯酰胺试剂由 Sangon 公司生产, DNA 凝胶回收试剂盒由 Vitagene 公司生产, cDNA 合成试剂盒由 MBI 公司生产,蛋白质分子量标准购自中国科学院上海生物化学研究所,其他均为国产或进口分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 触角 RNA 提取及 cDNA 合成: 将保存的烟实夜蛾雌、雄虫触角各 50 对加液氮捣碎组织后,加入 Trizol 按照 Sangon 公司使用说明提取,按照 MBI RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 合成 cDNA 第 1 链。

1.2.2 引物设计: 根据 GenBank 中已登录的其他昆虫的 GOBP2 基因序列(谷实夜蛾 *Helicoverpa zea*、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 和甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* 的 GenBank 登录号分别为 AY017411、AJ278991 和 AF051144)设计并合成引物:正向引物:5'-AGGATCCATGACGTCGAAGAGT-3';反向引物:5'-ACTCGACTCAGTACTTCTCCAT-3'。

为了便于将目的基因克隆到表达载体 pET-30a(+),在正向、反向引物中分别设计了 *Bam*HI、*Xho*I 酶切位点(以下划线标示)。

以上引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2.3 PCR 扩增: 以上合成的 cDNA 第 1 链为模板,反应体系为 cDNA 2 μ L, 10 \times buffer 2.5 μ L, dNTP 0.5 μ L (30 mmol/L), Ex Taq 0.5 μ L, 正向引物和反向引物各 1 μ L (20 μ mol/L),加水至 25 μ L,混匀、离心,然后在液面上加一滴石蜡油,放入 PCR 仪(Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 480)扩增。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 4 min;接着进行 30 个循环,循环条件为 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增电泳完毕后,用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定、纯化,并回收目的片段。

1.2.4 PCR 产物的克隆和鉴定: 按使用说明将回收的 PCR 产物克隆到 pGEM-T Easy 载体,然后转化大肠杆菌 DH5 α ,蓝白斑筛选,随机挑取一白色菌落,培养后提取质粒(质粒提取参照 Sambrook 等的方法),

用 *EcoR* I 酶切方法, 鉴定重组克隆 pGEM/Hass-GOBP2。

1.2.5 序列测定和分析: DNA 的序列测定在上海生工生物工程技术有限公司进行。

1.2.6 重组表达质粒的构建: 将重组克隆 pGEM/Hass-GOBP2 经 *Xho* I 和 *Bam* H I 双酶切后, 回收 500 bp 大小的片段, 与经同样酶切的原核表达载体 pET-30a(+) 连接。二者以 3:1 的摩尔比混合, 在 T4 DNA 连接酶的作用下于 16℃ 连接过夜。首先转化大肠杆菌 DH5 α , 过夜培养后, 碱解法提取质粒 DNA, 用 PCR 扩增和 *Xho* I、*Bam* H I 双酶切鉴定阳性克隆。1.2% 琼脂糖凝胶电泳观察分析。

1.2.7 序列测定: 挑取经初步鉴定了的阳性克隆送由上海生工生物工程技术有限公司进行序列测定。

1.2.8 外源基因的诱导表达: 提取经鉴定了的质粒 pET/Hass-GOBP2, 转化大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞, 挑取单菌落置 2 mL LB 培养基(含 Kan 30 μ g/mL) 中, 37℃ 160 r/min 振荡培养过夜。活化后按 1%(V/V) 接种量转接 10 mL LB 培养基(Kan 30 μ g/mL), 振荡培养至 OD₆₀₀ 达 0.3 左右, 加 IPTG(异丙基-1-硫代- β -D-半乳糖苷) 至终浓度为 1 mmol/L, 28℃ 160 r/min 继续诱导 5~6 h。收集菌液, 8 000 r/min 离心 5 min, 去除上清。用蒸馏水将沉淀重新悬浮, 8 000 r/min 离心 5 min, 收集菌体, 加入 300 μ L SDS 凝胶加样缓冲液(40 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8, 10% 甘油, 2% SDS, 5% 巯基乙醇, 0.1% 溴酚蓝) 后剧烈振荡悬浮, 煮沸 10 min, 离心后取上清, 置 4℃ 备用(张振臣等, 1999, 2000)。

1.2.9 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和 Western 印迹分析: SDS-PAGE 条件参照张振臣等(2000)方法; Western 印迹分析参照 Sambrook 等(1989)方法。具体操作如下: 首先将蛋白从 SDS-PAGE 胶上转移到硝酸纤维素膜上, 然后用封闭液(PBST+5% 脱脂牛奶) 封闭过夜; 接着与鼠抗 His 单抗室温反应 1.5 h, 用洗脱液 PBST 洗膜 3 次; 加入封闭液稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠为二抗, 室温反应 1.5 h, 用洗脱液洗膜 3 次; 最后将硝酸纤维素膜置于含有 DAB 的显色液中显色至条带清晰, 将膜放入蒸馏水中终止显色反应。

2 结果与分析

2.1 GOBP2 基因的扩增和克隆

烟实夜蛾触角 cDNA 为模板扩增的 DNA 产物,

进行琼脂糖凝胶电泳分析, 结果见图 1。由图 1 可以看出, 扩增产物长度约 500 bp, 与报道的其他昆虫 GOBP2 基因大小基本一致。将纯化的扩增片段与 pGEM-T Easy 载体用 T4 DNA 连接酶连接, 用氯化钙法转化大肠杆菌 DH5 α , 并在带有 Ampicillin、X-gal、IPTG 的 LB 平板上根据蓝白斑筛选阳性重组子, 用 *EcoR* I 酶切方法鉴定, 从而获得带有 GOBP2 基因的重组质粒 pGEM/Hass-GOBP2(图 2)。

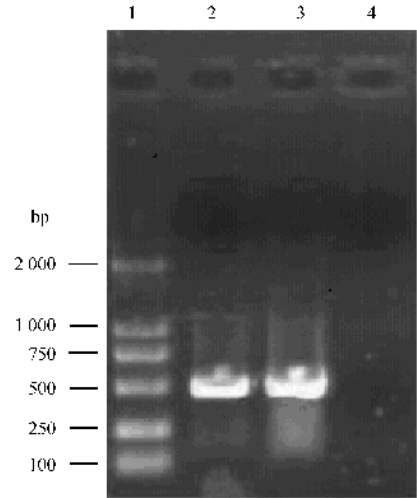


图 1 烟实夜蛾 GOBP2 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of Hass-GOBP2 gene
1. 分子量标准 DNA marker DL2000; 2. cDNA 为模板(雌虫) cDNA as template (female); 3. cDNA 为模板(雄虫) cDNA as template (male); 4. PCR 阴性对照 PCR without template.

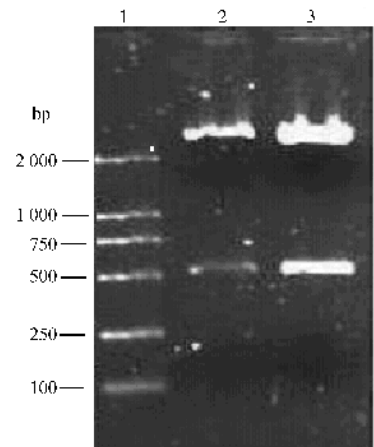


图 2 阳性克隆酶切鉴定

Fig. 2 Identification of positive clones by enzymatic digest
1. 分子量标准 DNA marker DL2000; 2. 重组子 pGEM/Hass-GOBP2 的 *EcoR* I 酶切(雌虫) pGEM/Hass-GOBP2 was digested by *EcoR* I (female); 3. 重组子 pGEM/Hass-GOBP2 的 *EcoR* I 酶切(雄虫) pGEM/Hass-GOBP2 was digested by *EcoR* I (male).

2.2 序列测定和分析

烟实夜蛾 GOBP2 基因的核苷酸序列如图 3 所示, 推定的氨基酸序列位于核苷酸序列之下, 方框内为保守的半胱氨酸位点。该基因已在 GenBank 中登记, 序列号为 AY351670。

序列测定和结果分析表明, 烟实夜蛾 GOBP2 基因阅读框架全长 489 bp, 编码 162 个氨基酸残基, 预测的分子量为 18.2 kD, 等电点为 5.35。在 162 个氨基酸残基中亲脂性的氨基酸残基有 70 个(占 43.2%), 中性氨基酸残基有 51 个(占 31.4%), 亲水性的氨基酸残基有 41 个(占 25.3%)。该蛋白具有气味结合蛋白的典型特征, 序列中有 6 个保守的半胱氨酸位点, 呈酸性, 且雌、雄虫 GOBP2 的核苷酸序

```

1      ATGACGTCGAAGAGTTGTTTGTGCTGGTGGCCATGGCGACGCTCACAGCCTCAGTGATG
1      M T S K S C L L L V A M A T L T A S V M

61     GGCCTGCGGAGCTGATGAGCCATGTCCTGACATTTTGGAAAGGCGCTTGAAGAGTGC
21     G I A E V M S H V T A H F G K A L E E □

121    AGGGAAGAGTCAGGGTTATCAGCGGAAGTGGTGGAGGAGTCCAACACTTCTGGCGCGAG
41     R E E S G L S A E V L E E F Q H F W R E

181    GACTTCGAGGTGGTGCACCGGAGCTGGGCTGCCCATCATCTGCATGTCCAACAAGTTC
61     D F E V V H R E L G □ A I I □ M S N K F

241    TCGCTGCTGCAGGATGACTCCAGGATGCATCATGTCAACATGCATGACTACATCAAGAGC
81     S L L Q D D S R M H H V N M H D Y I K S

301    TTCCCCAATGGTCATGTCTCTCGGAGAAACTGGTGGAGTTGATCCATAACTGTGAAAAG
101    F P N G H V L S E K L V E L I H N □ E K

361    AAGTACGACACGATGACAGACGACTGTGACCGGCTGGTGAAGGTGGCTGCGTGTCTCAAG
121    K Y D T M T D D □ D R V V K V A A □ F K

421    GTGGACGCCAAGGCGCGCCGATCGCTCCCGAGGTGCCCATGATAGAAGCCGTCATGGAG
141    V D A K A A G I A P E V A M T E A V M E

481    AAGTACTGA
161    K Y *

```

图 3 烟实夜蛾 GOBP2 基因的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 3 Nucleotide and amino acid sequence of Hass-GOBP2 gene

从一定程度上表明亲缘关系越近, GOBP2 基因间的核苷酸和氨基酸序列同源性越高。同时 6 个保守的半胱氨酸位点在不同昆虫 GOBP2 氨基酸的位置是一致的, 在序列中高度保守。但分析结果还表明, 棉铃虫与小地老虎的核苷酸及氨基酸同源性为 100%, 这与形态分类的结果差异较大。

2.3 烟实夜蛾 GOBP2 基因原核表达载体的构建

构建过程如图 5, 克隆载体 pGEM/Hass-GOBP2 经 *Xho* I 和 *Bam*H I 双酶切后, 回收 500 bp 大小的片段, 与经同样酶切的原核表达载体 pET-30a(+) 连接。转化大肠杆菌 DH5 α , 过夜培养后, 碱解法提取质粒 DNA, 用 PCR 扩增和 *Xho* I、*Bam*H I 双酶切, 电

泳观察, 均得到 500 bp 大小的目的片段, 因而 pET/Hass-GOBP2 原核表达载体构建成功。

2.4 序列测定

根据测序结果与 GenBank 发表序列(AY351670) 的比较可以看出, 重组载体中插入片段编码序列完整, 读框正确。

2.5 烟实夜蛾 GOBP2 基因在大肠杆菌中的表达

含有 pET/Hass-GOBP2 的 BL21(DE3) 工程菌经 IPTG 诱导后, 可产生 23 kD 左右的特异蛋白质条带, 而经 IPTG 诱导的含有 pET-30a(+) 的 BL21(DE3) 工程菌则没有相应的条带(图 6)。为了进一步检测表达产物是不是含有 His 的融合蛋白, 以鼠抗 His 为第

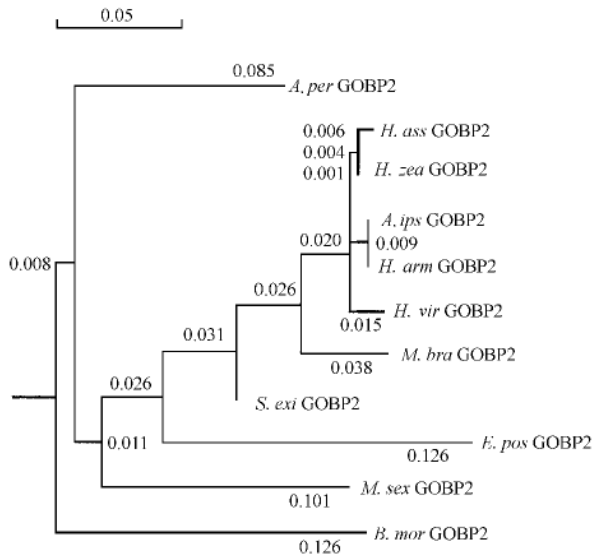


图4 烟实夜蛾 GOBP2 氨基酸与其他已知昆虫 GOBP2 氨基酸的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of reported GOBP2 of insects

- A. per*: *Antheraea pernyi*, GenBank 登录号为 X96772;
H. ass: *Helicoverpa assulta*, GenBank 登录号为 AY351670;
H. zea: *Helicoverpa zea*, GenBank 登录号为 AY017411;
A. ips: *Agratis ipsilon*, GenBank 登录号为 AY301980;
H. arm: *Helicoverpa armigera*, GenBank 登录号为 AJ278991;
H. vir: *Heliothis virescens*, GenBank 登录号为 X96863;
M. bra: *Maneistra brassicae*, GenBank 登录号为 AF051144;
S. exi: *Spodoptera exigua*, GenBank 登录号为 AJ294808;
E. pos: *Epiphyas postvittana*, GenBank 登录号为 AF411460;
M. sex: *Manduca sexta*, GenBank 登录号为 M73798;
B. mor: *Bombyx mori*, GenBank 登录号为 X94989.

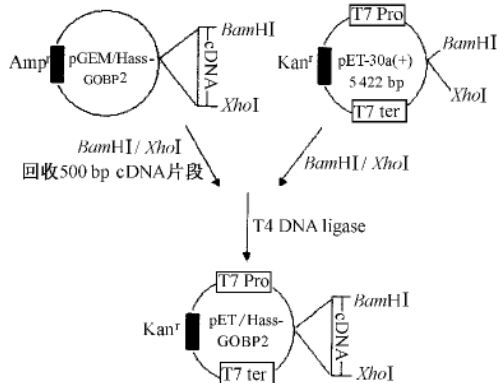


图5 pET/Hass-GOBP2 的构建示意图

Fig. 5 Schematic outline of construction of pET/Hass-GOBP2

一抗体,以辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠为二抗,对表达产物进行 Western 印迹分析,结果表明, pET/Hass-GOBP2 经 IPTG 诱导产生的 23 kD 蛋白条带与抗 His 抗体发生很强的交叉反应,表明融合蛋白得到了表达(图 7)。

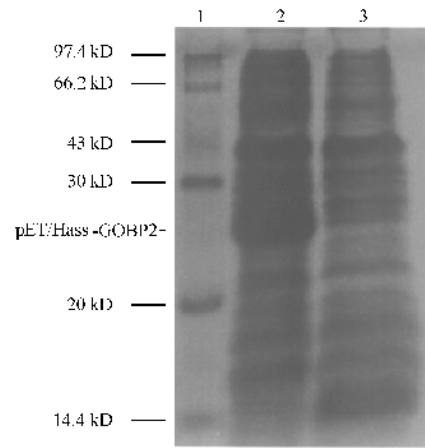


图6 重组质粒 pET/Hass-GOBP2 在大肠杆菌中的表达(17% SDS-PAGE)

Fig. 6 Expression of pET/Hass-GOBP2 in *Escherichia coli* (17% SDS-PAGE)

1. 蛋白质分子量标准 Protein molecular marker; 2. 诱导的 pET/Hass-GOBP2 表达菌全菌体 The total cell of *E. coli* pET/Hass-GOBP2 induced by 1 mmol/L IPTG; 3. pET-30a(+) 表达菌全菌体 The total cell of *E. coli* pET-30a(+) induced by 1 mmol/L IPTG.

图7 GOBP2 与 His 融合蛋白表达产物的 Western 印迹分析

Fig. 7 Western blotting analysis of expressed product for His-GOBP2

3 讨论

利用 RT-PCR 技术从烟实夜蛾触角 RNA 中获得了编码烟实夜蛾 GOBP2 基因的 cDNA 片段,根据测序结果推定的氨基酸序列具有气味结合蛋白的典型特征,属于 GOBP2 亚家族,根据 Krieger (1996)命名法命名为 Hass-GOBP2。

获得烟实夜蛾触角普通气味结合蛋白基因的完整序列,并进一步将其克隆至表达载体 pET-30a(+),转入 *E. coli* BL21 中进行表达。所得重组质粒经测序证明,编码序列完整,读框正确。构建的 pET/Hass-GOBP2 工程菌在 IPTG 诱导下,表达出一个大小约 23 kD 的重组蛋白。经 Western 印迹分析表明,所得蛋白为 His 和 GOBP2 的融合蛋白。

本实验利用双酶切克隆载体 pGEM/Hass-GOBP2 获得目的基因片段,相对而言,比直接双酶切带有酶切位点的 PCR 产物来获得目的基因片段,容易确定酶切的程度,利于连接反应。原核表达载体 pET-30a(+)带有 His-tag 纯化标记,作为融合蛋白一部分的

原核多肽可利用来纯化、检测该融合蛋白。

在目的基因片段与载体 pET-30a(+) 连接后, 首先转化的是大肠杆菌 DH5 α , 对重组子鉴定后, 再提取质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞进行诱导表达, 主要是利用 pET-30a(+) 可以在不同的宿主细胞进行外源基因的克隆和表达的特点, 有利于提高转化效率。

GOBP2 家族有很高的序列同源性, 它们在锥形感器中表达, 对所谓的普通气味敏感, 能广泛结合普通气味物质分子, 目前尚未有 GOBP2 家族特异性结合的证据, 仅有一些对信息素组分 (Maibeche-Coisne *et al.*, 1997) 和植物气味 (Li and Prestwich, 1997) 非特异性结合的报道。最近的研究发现, 甘蓝夜蛾雄虫在交配前特异性地释放 2-苯乙醇, 一般认为, 2-苯乙醇是一种普通植物气味物质。这就提出了问题, 2-苯乙醇是作为普通气味还是特异性气味被识别呢? 看来以前将气味分为特异性气味和普通气味的方法过于简单, 应该考虑种内、种间气味的差异, 同时还应考虑气味浓度和刺激间隔的时间 (Maibeche-Coisne *et al.*, 1998)。

参 考 文 献 (References)

Jacquin-Joly E, Bohbot J, Francois MC, Cain AH, Nagnan-Le Meillour P, 2000. Characterization of the general odorant-binding protein 2 in the molecular coding of odorants in *Mamestra brassicae*. *Eur. J. Biochem.*, 267(22): 6 708 - 6 714.

Krieger J, Nickisch-Rosenegk EV, Mameli M, Pwlosi P, Breer H, 1996. Binding proteins from the antennae of *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 26(): 297 - 307.

Li F, Prestwich GD, 1997. Expression and characterization of a lepidopteran general odorant binding protein. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27(5): 405 - 412.

Lou YG, Cheng JA, 2001. Chemical sensory mechanism of insects. *Chinese Journal of Ecology*, 20(2): 66 - 69. [姜永根, 程家安, 2001. 昆虫的化学感觉机理. 生态学杂志, 20 (2): 66 - 69]

Maibeche-Coisne M, Longhi S, Jacquin-Joly E, Brunel C, Eglouff MP, Gastinel L, Cambillau C, Tegoni M, Nagnan-Le Meillour P, 1998. Molecular cloning and bacterial expression of a general odorant binding protein from the cabbage armyworm *Mamestra brassicae*. *Eur. J. Biochem.*, 258(2): 768 - 774.

Maibeche-Coisne M, Sobrio F, Delaunay T, Lettère M, Dubroca J, Jacquin-Joly E, Nagnan-Le Meillour P, 1997. Pheromone-binding proteins of the moth *Mamestra brassicae*: specificity of ligand binding. *Insect*

Biochem. Mol. Biol., 27: 213 - 221.

Pelosi P, Maida R, 1995. Odorant-binding proteins in insects. *Comp. Biochem. Physiol.*, 111(3): 503 - 514.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Vogt RG, Prestwich GD, Lerner MR, 1991. Odorant binding protein subfamilies associate with distinct classes of olfactory receptor neurons in insects. *J. Neurobiol.*, 22(1): 74 - 84.

Vogt RG, Rogers ME, Dickens JC, Callahan FE, 1999. Odorant binding protein diversity and distribution among the insect orders, as indicated by LAP, an OBP-related protein of the true bug *Lygus lineolaris* (Hemiptera, Heteroptera). *Chem. Senses*, 24(5): 481 - 495.

Wang GR, Guo YY, Wu KM, 2002. Expression and identification of general odorant binding protein II from *Helicoverpa armigera*. *Acta Entomol. Sin.*, 45(3): 285 - 289. [王桂荣, 郭予元, 吴孔明, 2002. 棉铃虫普通气味结合蛋白 II 基因的表达及鉴定. 昆虫学报, 45 (3): 285 - 289]

Wang GR, Guo YY, Xu G, Wu KM, 2001. Cloning and sequencing of a gene encoding GOBP2 in the antenna of *Spodoptera exigua*. *Scientia Agricultura Sinica*, 34(6): 619 - 625. [王桂荣, 郭予元, 徐广, 吴孔明, 2001. 甜菜夜蛾 GOBP2 基因的克隆及序列测定. 中国农业科学, 34 (6): 619 - 625]

Wang GR, Wu KM, Guo YY, 2003. Cloning, expression and immunocytochemical localization of a general odorant-binding protein gene from *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33(1): 115 - 124.

Wang R, Zhang W, Tian Y, Zhang SG, 1999. Identification of odorant binding proteins of *Helicoverpa armigera*. *Entomol. Knowl.*, 36(5): 297 - 298. [王睿, 张薇, 田雨, 张善干, 1999. 棉铃虫触角气味物质结合蛋白的鉴别. 昆虫知识, 36(5): 297 - 298]

Zhang ZC, Li DW, Chen JF, Yu JL, Qiao Q, Jin XL, 2000. Overexpression of sweet potato feathery mottle virus coat protein in *E. coli* and preparation of its specific antiserum. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 8(2): 177 - 179. [张振臣, 李大伟, 陈健夫, 于嘉林, 乔奇, 靳秀兰, 2000. 甘薯羽状斑驳病毒外壳蛋白基因在大肠杆菌中的表达及特异抗血清的制备. 农业生物技术学报, 8 (2): 177 - 179]

Zhang ZC, Li DW, Zhang L, Yu JL, Liu Y, 1999. Expression and purification of movement protein and its two mutants of cucumber mosaic virus. *Acta Phytopathologica Sinica*, 29(2): 132 - 137. [张振臣, 李大伟, 张力, 于嘉林, 刘仪, 1999. 黄瓜花叶病毒运动蛋白基因及其缺失突变体在大肠杆菌中的表达和表达产物的纯化. 植物病理学报, 29(2): 132 - 137]

(责任编辑: 黄玲巧)