

烟实夜蛾信息素结合蛋白 3 cDNA 的克隆、 序列分析与原核表达

刘晓光, 安世恒, 罗梅浩*, 郭线茹, 原国辉

(河南农业大学植物保护学院, 郑州 450002)

摘要: 利用 RT-PCR 技术从烟实夜蛾 *Helicoverpa assulta* (Hass) 雄虫触角中扩增得到了信息素结合蛋白 3 (Hass PBP3)。克隆和测序结果表明, 该基因核苷酸序列全长 495 bp, 编码 164 个氨基酸残基, 预测分子量 18.5 kD。并预测 N-末端疏水区包含由 22 个氨基酸组成的信号肽。因此, 成熟蛋白应包括 142 个氨基酸, 预测分子量为 16.1 kD, 等电点为 5.44。经氨基酸序列同源性分析发现, 此序列与已知昆虫 PBP3 有较高的同源性, 而且具有气味结合蛋白的典型特征。将该基因重组到表达载体 pGEX-4T-2 中进行原核表达。经 IPTG 诱导、SDS-PAGE 分析和 Western 印迹检测, 结果表明烟实夜蛾 PBP3 基因能在大肠杆菌 BL21 中表达, 电泳检测到一条大约 42 kD 的外源蛋白, 与预测的融合蛋白分子量相符。

关键词: 烟实夜蛾; 信息素结合蛋白; 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(2006)05-0733-07

Cloning and sequencing of cDNA encoding pheromone binding protein 3 from the *Helicoverpa assulta* (Guenée) and its expression in *Escherichia coli*

LIU Xiao-Guang, AN Shi-Heng, LUO Mei-Hao*, GUO Xian-Ru, YUAN Guo-Hui (College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: A cDNA clone encoding a pheromone binding protein 3 from antenna of *Helicoverpa assulta* (named HassPBP3) was isolated by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The cloning and sequencing results showed that the full length of HassPBP3 open reading frame (ORF) was 495 bp, encoding 164 amino acid residues, and the predicted molecular weight (MW) was 18.5 kD. The N-terminus hydrophobic region predicted containing of 22 amino acid residues within the HassPBP3 displayed the characteristic features of a signal peptide. Thus, the mature protein should consist of 142 amino acids with a calculated molecular weight (MW) of 16.1 kD and isoelectric point (IP) of 5.44. The gene was then constructed into expression vector pGEX-4T-2 for over expression in prokaryotic cells. The SDS-PAGE and Western blot analysis showed that induced by IPTG, the PBP3 proteins in *H. assulta* was expressed in *Escherichia coli* BL21, and its MW was found to be about 42 kD by checking with SDS-PAGE, nearly equal to the predicted.

Key words: *Helicoverpa assulta*; pheromone binding protein; gene clone; prokaryotic expression

昆虫在长期进化过程中, 能够利用挥发性化学信息物质来寻求食物、配偶和产卵场所等(王桂荣等 2001, 2002; Larsson *et al.*, 2004)。这一系列行为是通过特异性嗅觉受体神经元(olfactory receptor neurons, ORN)来实现的, 这种神经元位于具有不同

类型的触角感受器中。而空气中的疏水性气味分子是依靠气味结合蛋白从感受器淋巴液被运输到纤毛神经受体上的(Kaissling, 1986; van den Berg and Ziegelberger, 1991), 这是昆虫嗅觉感受发生的第一步生化反应。气味结合蛋白在这个复杂的过程中充

基金项目: 科技部农业科技成果转化基金项目(2003410050122)

作者简介: 刘晓光, 男, 1981年4月生, 河南舞阳人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫分子生态学, E-mail: xiaoguangliu1981@hotmail.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: mhluo@eyou.com

收稿日期 Received: 2006-01-24; 接受日期 Accepted: 2006-05-30

当了运送和卸载信息化合物的重要作用。

在鳞翅目昆虫中,有 3 类气味结合蛋白已经被定名,即信息素结合蛋白(pheromone binding protein, PBP) (Vogt and Riddiford, 1981; Maida *et al.*, 1993)、普通气味结合蛋白 1 (general odorant binding protein 1, GOBP1) 和普通气味结合蛋白 2 (general odorant binding protein 2, GOBP2)。其中 PBP 包含有极为相似的不同种类,目前已经发现并命名的主要有 PBP、PBP1、PBP2、PBP3,它们主要存在于雄虫触角中,在部分昆虫雌虫触角中也有不同量的表达 (Vogt and Riddiford, 1981; Vogt *et al.*, 1989; Krieger *et al.*, 1991; Nagnan-Le Meillour *et al.*, 1996; Abraham *et al.*, 2005)。Vogt 和 Riddiford (1981) 用标记信息素的方法,首次在多音大蚕蛾 *Antheraea polyphemus* (*Apol*) 雄蛾触角中分离出 PBP,迄今为止已从近 30 种昆虫中克隆出 40 多种 PBP 基因,分别分布于鳞翅目、鞘翅目和脉翅目 (修伟明等, 2005)。研究发现, PBP 存在于对信息素敏感的毛状触角感受器中 (Steinbrecht *et al.*, 1995; 王桂荣等, 2001, 2002), 它可以特异性地结合信息素化合物 (Vogt and Riddiford, 1981; Maida *et al.*, 1993; Maibeche-Coisne *et al.*, 1997)。昆虫气味结合蛋白对微量挥发性化合物的识别和反馈能力,已经成为研究其嗅觉系统的重要模型 (Newcomb *et al.*, 2002; 王桂荣等, 2004)。

烟实夜蛾 *Helicoverpa assulta* (Guenée) (Hass) 是烟草、辣椒等经济作物的主要害虫,目前对此仍主要采用化学防治。由于使用化学农药引起的环境污染以及害虫抗药性等问题日益突出,随着分子生物学和蛋白质组学的飞速发展和不断前进,人们正在探索利用昆虫与外界的信息交流行为以达到控制害虫的目的 (王桂荣等, 2002)。本文利用 RT-PCR 技术,首次从烟实夜蛾雄虫触角中扩增得到了 PBP3 基因,并进行了序列分析及在大肠杆菌中成功表达,以期获得大量 Hass PBP3 重组蛋白,为进一步研究烟实夜蛾信息素分子通讯机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试昆虫:烟实夜蛾为河南农业大学昆虫实验室饲养,温度为 26℃,光周期 16 L:8 D。蛹期分雌雄,成虫羽化后第 3 天将雄蛾触角剪下立即提取 RNA。

1.1.2 菌种及质粒:pGEM-T Easy vector 购自 Promega 公司,大肠杆菌 JM109 和 BL21 (DE3) 质粒 pGEX-4T-2 均为本实验室保存。

1.1.3 主要试剂及工具酶:总 RNA 抽提试剂 RNAiso Reagent、用于 RT-PCR 的 One Step RNA PCR Kit、质粒小样快速抽提试剂盒、T4 DNA 连接酶、限制性酶 *Bam*H I、*Xho* I 和蛋白质分子量标准购自 TaKaRa 公司;辣根过氧化物酶底物 DAB 以及鼠抗 GST 单抗购自 BBI 公司;辣根过氧化物酶标记的二抗购自华美生物工程公司;硝酸纤维素膜 (NC) 购自 Promega 公司;X-gal、IPTG、丙烯酰胺和 N,N'-甲叉双丙烯酰胺试剂由 Sangon 公司生产;溶菌酶 (lysozyme) 由 Amresco 公司生产;其它均为国产或进口分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 触角总 RNA 的提取:取立即剪掉的烟实夜蛾雄虫触角 30 对,放入无 RNAase 的 1.5 mL 离心管中进行充分研磨,匀浆后加入 1.0 mL 的 Trizol 试剂,按照 TaKaRa 公司的使用说明提取总 RNA。RNA 沉淀溶解于 50 μ L RNAase 的去离子水中, -20℃ 保存。

1.2.2 引物设计:根据棉铃虫 PBP3 (*Harm*PBP3, GenBank 登录号为 AF527054) 核苷酸序列设计并合成引物。

上游引物:5'-AGGATCCATGGGATCGAGACACG TCT-3'

下游引物:5'-ACTCGAGTTATATCTCAGTGAGC ACCT-3'

为了便于将目的基因克隆到表达载体上,在上游、下游引物中分别设计了 *Bam*H I、*Xho* I 酶切位点(以下划线表示),以上引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2.3 RT-PCR 反应:PCR 反应体系为 50 μ L,总 RNA 样品 3 μ L,上游引物和下游引物各 2 μ L,10 \times Buffer 5 μ L, dNTP mixture 5 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 10 μ L, RNase Inhibitor 1 μ L, AMV RTase XL 1 μ L, AMV-Optimized Taq 1 μ L, RNase Free dH₂O 20 μ L,放入 PCR 仪扩增。PCR 反应条件为 50℃ RT 反应 30 min, 94℃ 变性 2 min 后,接着进行 30 个循环,循环条件为 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min,最后 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保持。

1.2.4 PCR 产物的检测、克隆和鉴定:PCR 扩增完毕后,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。接着将 PCR 产物克隆到 pGEM-T Easy 载体上,然后转化大肠杆菌 JM109,并进行蓝白斑筛选,随机挑选一白色菌斑

过夜培养,提取质粒(参照 TaKaRa 公司质粒提取试剂盒方法),用 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切鉴定重组克隆 pGEM/*Hass*PBP3。

1.2.5 序列测定和基因的预测分析:经酶切鉴定成功的阳性克隆样品送 TaKaRa 公司进行 DNA 序列测定。将获得的基因翻译成氨基酸,利用生物信息学在线工具进行预测分析。信号肽分析网站: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>;蛋白质的分子量、等电点预测网站: <http://www.expasy.ch/>。

1.2.6 重组表达载体的构建:将重组 pGEM/*Hass*PBP3 经 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切,回收到 500 bp 的目的片段,与经同样双酶切的原核表达载体 pGEX-4T-2 连接,二者以 3:1 的摩尔比混合,加入 T4 连接酶于 14℃ 条件下连接过夜。转化大肠杆菌 JM109,过夜培养后提取质粒 DNA,用 *Xho* I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定阳性克隆,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,获得烟实夜蛾 PBP3 与 GST 蛋白融合表达载体 pGEX/*Hass*PBP3。

1.2.7 外源基因的诱导表达:提取经初步鉴定的质粒,转入大肠杆菌 BL21 感受态细胞中,然后涂平板过夜培养。挑取单菌落于 10 mL 含有氨苄的 LB 培养基中,7 次重复,振荡培养至 OD₆₀₀ 值达 0.3 左右,分别加入不同浓度的 isopropylthio-β-D-galactoside (IPTG, 异丙基-1-硫代-β-D-半乳糖苷),28℃,140 r/min 诱导过夜。收集菌液,每个离心管中倒入 1.5 mL 诱导过的菌液,离心弃上清,重复操作一次(为了增加蛋白量),在每管沉淀中加入 150 μL PBS、少量的上样 buffer β-mercaptoethanol (β-巯基乙醇 2 滴)后混匀,沸水中煮 10 min,离心 2 min, -20℃ 保存备用。

1.2.8 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和 Western 印迹分析:参照张传溪(2001)的方法进行 SDS-PAGE 和 Western 印迹分析,先将蛋白从 SDS-PAGE 胶上转移到 NC 膜上,然后用封闭液(PBST + 5% 脱脂牛奶)封闭过夜;接着与鼠抗 GST 单抗室温反应 1.5 h,用洗脱液 PBST 洗膜 3 次;加入使用 PBST 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗,室温反应 1.5 h,用洗脱液洗膜 3 次;最后将 NC 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。

1.2.9 融合蛋白可溶性检测:取大肠杆菌诱导培养的菌液,4℃ 12 000 r/min 离心 5 min 收集细胞。每 300 μL 培养物细胞沉淀悬于 150 μL PBS。加入溶菌酶至终浓度 1 mg/mL,冰上放置 30 min。用针筒将

30 μL 0.2% 的 Triton X-100 注入粘的细胞裂解物中,剧烈振荡数次混匀。4℃ 振荡温育 15 min。5 000 r/min 离心 20 min,去除不溶性细胞碎片。将上清和沉淀分别处理后进行 SDS-PAGE 检测。

2 结果与分析

2.1 PBP3 基因的扩增和克隆

以烟实夜蛾雄虫触角 RNA 进行 RT-PCR 一步反应,扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示(图 1),目的片段的长度约为 500 bp。将目的片段与 pGEM-T Easy 载体用 T4 DNA 连接酶连接,用氯化钙法转化大肠杆菌 JM109,并在带有氨苄青霉素(ampicillin) X-gal、IPTG 的 LB 平板上根据蓝白斑筛选阳性重组子,然后用酶切方法鉴定克隆结果。

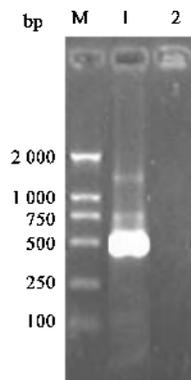


图 1 烟实夜蛾 PBP3 基因 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR product of *Hass*PBP3 gene

2.2 序列测定和分析

烟实夜蛾 PBP3 基因序列测定结果表明,烟实夜蛾 PBP3 基因阅读框架全长 495 bp,编码 164 个氨基酸残基,预测分子量为 18.5 kD。该基因已在 GenBank 中登录,登录号为 DQ286414。预测 N-末端疏水区包含由起始位置开始的 22 个氨基酸组成的信号肽。因此,成熟蛋白应包 142 个氨基酸,预测分子量为 16.1 kD,等电点为 5.44。该蛋白质具有气味结合蛋白的一些特征,都是小分子可溶性呈酸性蛋白,序列中都含 6 个高度保守的半胱氨酸位点。

使用 NCBI 中的 BLAST 将烟实夜蛾 PBP3 cDNA 推导的氨基酸序列与已知其它鳞翅目昆虫 PBP 进行同源性比较,然后用 EBI 中的 ClustalW 进行序列多重联配(图 2)、进化树的构建(图 3)和同源性分析(表 1),结果表明,PBP3 和其它 PBP 氨基酸一样,具有相同的 6 个保守的半胱氨酸位点(用 + 标注),能够分别交叉形成 3 个二硫键(C1-C3、C2-C5、C4-C6),

在信息素蛋白的三级结构中起支撑作用。同时,从图 4 中还可以看出, PBP3 家族有一个从起始位置开

始的含有 22 个氨基酸的信号肽(signal peptides),这也是同一类型气味结合蛋白共有的特征。

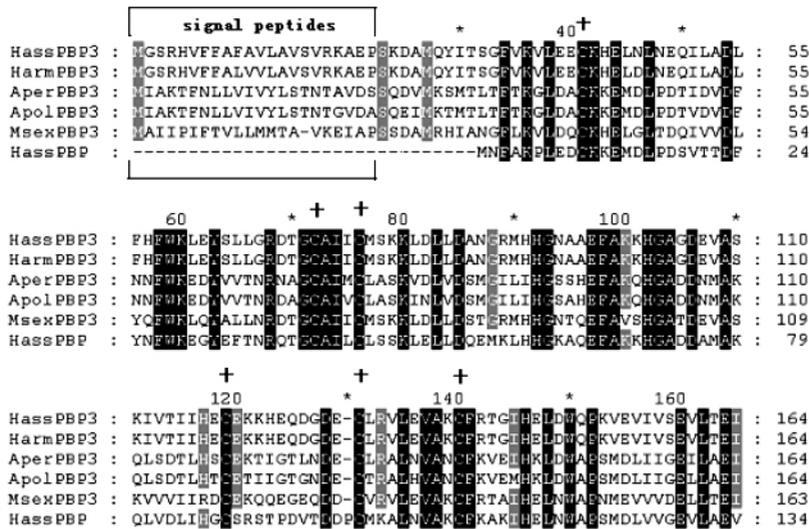


图 2 烟实夜蛾信息素结合蛋白 (PBP3) 与其他已知信息素结合蛋白的多重联配

Fig. 2 Aligned amino acid sequences of reported PBP3s from other insects

黑色阴影表示氨基酸 100% 同源, 灰色表示 80% 同源, 白色表示 80% 以下同源。Amino acids 100% identical are in black box, 80% identical in grey box and identical below 80% in white box. HassPBP3: 烟实夜蛾 *Helicoverpa assulta* PBP3 (GenBank 登录号 GenBank accession no. DQ286414); HarmPBP3: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera* PBP3 (AF527054); AperPBP3: 柞蚕 *Antheraea pernyi* (AJ277265); ApolPBP3: 多声大蚕 *Antheraea polyphemus* PBP3 (AJ277267); MsexPBP3: 烟草天蛾 *Manduca sexta* PBP3 (AAF16703); HassPBP: 烟实夜蛾 *Helicoverpa assulta* PBP (AY864775). 下同 The same below.

表 1 昆虫 PBP 氨基酸序列同源性

Table 1 Homology matrix of PBP3s from insects

	HassPBP3	HarmPBP3	MsexPBP3	AperPBP3	HassPBP	ApolPBP3
HassPBP3	100%					
HarmPBP3	98%	100%				
MsexPBP3	62%	62%	100%			
AperPBP3	40%	40%	39%	100%		
HassPBP	38%	38%	40%	47%	100%	
ApolPBP3	37%	38%	37%	88%	47%	100%

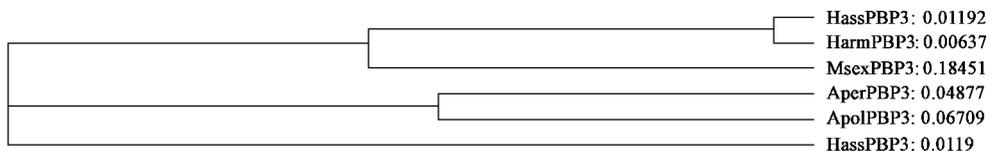


图 3 烟实夜蛾 PBP3 氨基酸与其他昆虫 PBP 氨基酸的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of reported PBP3s of insects

从表 1 可以看出, 烟实夜蛾 PBP3 与其它几种昆虫的 PBP 基因有较高的同源性, 其中与 Harm PBP3 的序列同源性最高, 达 98%, 其次是与 Msex PBP3, 同源性为 61%。与 AperPBP3 和 ApolPBP3 同源性较低, 分别为 40% 和 37%。以上结果从一定程度上表明, 昆虫的亲缘关系越近, PBP3 基因间的氨基酸序列同源性越高。

从系统发育树中可以看出(图 3), HassPBP3 和 HarmPBP3 聚在一起, AperPBP3 和 ApolPBP3 聚在一起, HassPBP 单独分为一支, 这也在一定程度上表明了这几种 PBP 在遗传上的亲缘关系。

2.3 烟实夜蛾 PBP3 基因原核表达载体的构建与表达

克隆载体 pGEM/HassPBP3 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 pGEX-4T-2 连接。转化大肠杆菌 JM109 过夜培养后,转化重组表达载体,提取质粒 DNA,双酶切后电泳检测。含有 pGEX-4T-2/*Hass*PBP3 的 BL21 工程菌经不同浓度的 IPTG 诱导后,其中表达载体 pGEX-4T-2 (阳性对照)产生 26 kD 大小的蛋白条带,表达蛋白为目的蛋白(分子量约 16 kD)和 GST 的融合体(分子量约 26 kD),电泳检测到一条大约 42 kD 的外源蛋白,与预测的融合蛋白分子量相符。而 BL21 工程菌(阴性对照)则无相应的条带(图 4)。为了进一步检测表达产物是否为含有 GST 的融合蛋白,以鼠抗 GST 为一抗,以辣根过氧化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,pGEX/*Hass*PBP3 经 IPTG 诱导产生约 42 kD 的蛋白条带与 GST 抗体发生很强的交叉反应,表明融合蛋白得到了表达(图 5)。

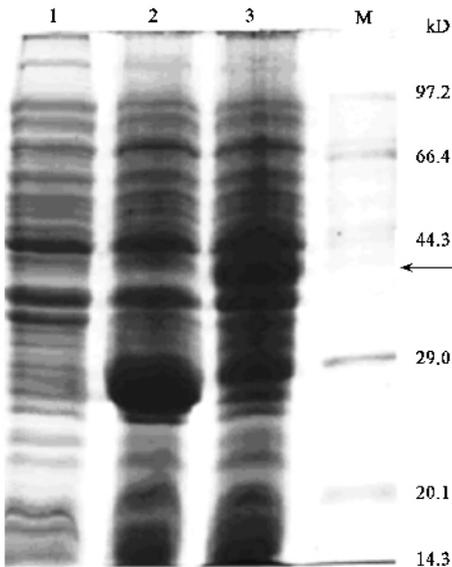


图 4 *Hass*PBP3 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 12% SDS-PAGE analysis of expressed product for pGEX/*Hass*PBP3

M: 标准分子量 DL2000 Molecular weight marker DL2000; 1: BL21 对照 *E. coli* BL21; 2: pGEX-4T-2 转化 BL21 的表达产物 Expressed product of pGEX-4T-2; 3: pGEX/*Hass*PBP3 表达产物 Expressed product of pGEX/*Hass*PBP3.

2.4 表达蛋白的可溶性检测

对大肠杆菌诱导产物上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析,发现约 42 kD 的融合蛋白是以包涵体形式存在的,成为不溶性沉淀,存在于经溶菌酶处理后的沉淀中,上清液中没有目的蛋白(图 6)。

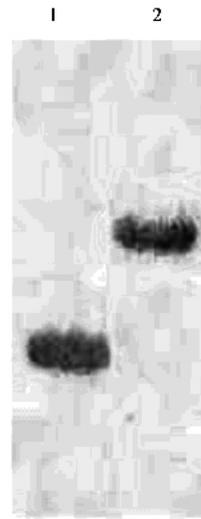


图 5 Western 印迹杂交鉴定

Fig. 5 Western blot analysis

1: pGEX-4T-2 转化 BL21 的表达产物 Expressed product of pGEX-4T-2; 2: pGEX/*Hass*PBP3 表达产物 Expressed product of pGEX/*Hass*PBP3.

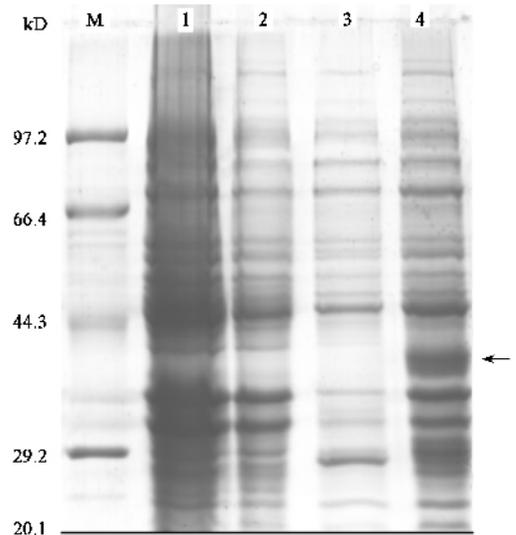


图 6 表达蛋白的可溶性检测

Fig. 6 10% SDS-PAGE analysis of the distribution of the expressed product for pGEX/*Hass*PBP3 protein after treatment with lysozyme

M: 标准分子量 Molecular weight marker; 1: BL21 对照 *E. coli* BL21; 2: 含有 pGEX/*Hass*PBP3 菌体未经 IPTG 诱导 None-induced cells transformed by pGEX/*Hass*PBP3; 3: 经溶菌酶处理过上清 Soluble protein after treatment with lysozyme; 4: 经溶菌酶处理过沉淀 Insoluble protein after treatment with lysozyme.

3 讨论

利用 RT-PCR 技术从烟实夜蛾雄蛾触角中获得了编码 PBP3 基因的 cDNA 片段,进一步克隆至表达

载体 pGEX-4T-2, 然后转入大肠杆菌 BL21 进行表达。构建所得 pGEX/HassPBP3 工程菌在 IPTG 诱导下表达出一条约 42 kD 的重组蛋白, 经 Western 印迹分析证明, 所得蛋白为 GST 和 PBP3 的融合蛋白, 此融合蛋白经 SDS-PAGE 检测为不溶性的包涵体。

PBP 多数为二聚体, 其翻译后修饰 (Paolini *et al.*, 1998) 特性有利于应用在原核生物中大量表达。从我们的实验结果看, 烟实夜蛾 PBP3 基因在大肠杆菌中的表达量还是很大的, 这为以后 HassPBP3 重组蛋白的大量诱导和纯化, 进一步制备多克隆抗体和研究其功能奠定了基础。

序列比较发现, 不同 PBP (HassPBP3, HarmPBP3, AperPBP3, ApolPBP3, MsexPBP3) 氨基酸序列同源性从 37% 到 98% 不等, 一定程度上显示了信息素结合蛋白家族的多样性。结果还发现, 作为近缘种的烟实夜蛾与棉铃虫 PBP3 则具有很高的同源性 (98%)。类似现象也有发生, Abraham 等 (2005) 研究了地小老虎 *Agrotis ipsilon* 和黄地老虎 *A. segetum* 的 4 个 PBP (AipsPBP1, AipsPBP2, AsegPBP1, AsegPBP2) 基因, 发现它们都有 3 个外显子和 2 个内含子, 并且 2 个内含子具有完全相同的插入位点 (第 1 个内含子起始于编码 Glu22 位点, 第 2 个内含子起始于编码 Ala82 位点); 具有保守的外显子-内含子交界区, 富含 A-T 碱基。这些共同特点表明, 同属的 2 种地老虎不同 PBP 源于同一基因家族, 它们的形成可能由于基因发生复制造成, 随后内含子内开始发生突变并且大量积累。其它如烟草天蛾 PBP2 和 PBP3, 产生于基因复制晚期, 榨蚕 PBP3 和多声大蚕蛾 PBP3 则产生于大蚕蛾科分化之前。这些基因复制现象表明, PBP 是一类典型的基因进化活跃型家族, 这也可能是 PBP 多样性存在的一个关键因子。随着更多尤其是夜蛾科 PBP 基因的发现与鉴定, 通过内含子功能结构的逐步阐明, 不仅能够确定种内或种间 PBP 是否具有不同的遗传性, 而且可以证明是否存在功能的差异 (Abraham *et al.*, 2005)。

研究发现, 至少有 4 种蛾类 PBP 中都存在包含性信息素的复合成分, 表明在不同昆虫成虫中都存在多种类型的 PBP, 并且分别特异性地结合信息素复合物中的不同成分 (Vogt *et al.*, 1991; Du and Prestwich, 1995; Prestwich *et al.*, 1995)。Maida 等 (2000) 从榨蚕、多声大蚕蛾触角中分别分离出了 3 种不同类型的 PBP, 它们均能结合 3 种相同的信息素复合物 E6, Z11-16 AC, E4, Z9-14AC 和 E6,

Z11-16ALD, 但是结合速率并不相同。实验结果表明, ApolPBP1, ApolPBP3 对 E6, Z11-16 AC, E4, Z9-14AC 2 种乙酸盐复合物特异, 而 AperPBP2 对含乙醛成分的复合物特异。Leal 等 (2005) 利用荧光标记 (fluorescence) 和圆二色性 (circular dichroism, CD) 光谱实验研究了 Apol PBP1 在不同条件下对 3 种信息素复合物的反应, 高 PH 值条件下, 表现出较高的亲和性, 低 PH 值条件下亲和力和明显降低; 在非竞争性实验中, ApolPBP1 对 3 种信息素的结合无明显差异, 但是随着 PH 值的降低结合能力也明显下降; 竞争性实验中, ApolPBP1 对 E6, Z11-16 AC 的亲和力显著高于其它两种成分。这与 Horst 等 (2001) 研究家蚕 *Bombyx mori* PBP 对信息素的结合与释放实验结果一致, 即酸性 (pH4.5) 条件下, PBP C-末端的第 7 个 α -螺旋 (α_7) 位于信息素结合位点, 取代了信息素分子的位置, 因此在低 PH 值下降低了对信息素复合物亲和性, 从而把信息素释放出去。

一般认为雌蛾不感受自身释放的信息素, 早期用 N 末端测序方法仅在雄虫中检测到 PBP。随着研究的进一步深入, 发现 PBP 也存在于雌虫触角中, 可能它们在雌雄虫触角中表达量有所不同, 其功能也不甚清楚。起初认为 PBP 是作为识别信息素物质而存在的 (Vogt and Riddiford, 1981), 而后逐步认为雌虫触角中的 PBP 也能够识别自身的信息素, 或者至少能够识别自身信息素复合物的某些成份 (Callahan *et al.*, 2000)。本实验是从烟实夜蛾雄虫触角中提取 RNA 并进行 RT-PCR 扩增的, 而雌虫触角中是否存在 PBP3, 表达量是否同雄虫相当还需要进一步实验证明。

参考文献 (References)

- Abraham D, Löfstedt C, Picimbon JF, 2005. Molecular characterization and evolution of pheromone binding protein genes in *Agrotis* moths. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35(10): 1100–1111.
- Du G, Prestwich GD, 1995. Protein structure encodes the ligand binding specificity in pheromone binding proteins. *Biochem.*, 34(27): 8726–8732.
- Callahan FE, Vogt RG, Tucker ML, Dickens JC, Mattoo AK, 2000. High level expression of male specific pheromone binding proteins (PBPs) in the antennae of female noctuid moths. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30(6): 507–514.
- Horst R, Damberger F, Luginbühl P, Güntert P, Peng G, Nikonova L, Leal WS, Wüthrich K, 2001. NMR structure reveals intramolecular regulation mechanism for pheromone binding and release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(25): 14374–14379.
- Kaissling KE, 1986. Chemo-electrical transduction in insect olfactory

- receptors. *Annu. Rev. Neurosci.*, 9:121-145.
- Krieger J, Raming K, Breer H, 1991. Cloning of genomic and complementary DNA encoding insect pheromone binding proteins: evidence for microdiversity. *Biochem. Biophys. Acta*, 1088(2):277-284.
- Larsson MC, Domingos AI, Jones WD, Chiappe ME, Amrein H, Vosshall LB, 2004. Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron*, 43(5):703-714.
- Leal WS, Chen AM, Erickson ML, 2005. Selective and pH-dependent binding of a moth pheromone to a pheromone-binding protein. *J. Chem. Ecol.*, 31(10):2493-2499.
- 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(3):213-221.
- Maida R, Krieger J, Gebauer T, Lange U, Ziegelberger G, 2000. Three pheromone-binding proteins in olfactory sensilla of the two silkmoth species *Antheraea polyphemus* and *Antheraea pernyi*. *Eur. J. Biochem.*, 267(10):2899-2908.
- Maida R, Steinbrecht RA, Ziegelberger G, Pelosi P, 1993. The pheromone binding protein of *Bombyx mori*: purification, characterization and immunocytochemical localization. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 23(2):243-253.
- Nagnan-Le Meillour P, Huet JC, Maibeche M, Pernollet JC, Descoins C, 1996. Purification and characterization of multiple forms of odorant/pheromone binding proteins in the antennae of *Mamestra brassicae* (Noctuidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 26(1):59-67.
- Newcomb RD, Sirey TM, Rassam M, Greenwood DR, 2002. Pheromone binding proteins of *Epiphyas postvittana* (Lepidoptera: Tortricidae) are encoded at a single locus. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32(11):1543-1554.
- Paolini S, Scaloni A, Amoresano A, Marchese S, Napolitano E, Pelosi P, 1998. Amino acid sequence, post-translational modifications, binding and labelling of porcine odorant-binding protein. *Chem. Senses*, 23(6):689-698.
- Prestwich GD, Du G, LaForest S, 1995. How is pheromone specificity encoded in proteins? *Chem. Senses*, 20(4):461-469.
- Steinbrecht RA, Laue M, Ziegelberger G, 1995. Immunolocalization of pheromone-binding protein and general odorant-binding protein in olfactory sensilla of the silk moths *Antheraea* and *Bombyx*. *Cell Tissue Res.*, 282:203-217.
- Van den Berg MJ, Ziegelberger G, 1991. On the function of the pheromone-binding protein in the olfactory hairs of *Antheraea polyphemus*. *J. Insect Physiol.*, 37:79-85.
- Vogt RG, Köhne AC, Dubnau JT, Prestwich GD, 1989. Expression of pheromone binding proteins during antennal development in the Gypsy moth *Lymantria dispar*. *J. Neurosci.*, 9(9):3332-3346.
- Vogt RG, Prestwich GD, Lerner MR, 1991. Odorant binding protein subfamilies associate with distinct classes of olfactory receptor neurons in insects. *J. Neurosci.*, 11(1):74-84.
- Vogt RG, Riddiford LM, 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 293(5827):161-163.
- Wang GR, Wu KM, Guo YY, 2001. Partial cloning and characterization of the cDNA of general odorant binding protein 1 gene in the antenna of *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Entomol. Sin.*, 8(4):289-297. [王桂荣, 吴孔明, 郭予元, 2001. 棉铃虫触角普通气味结合蛋白 1 基因 cDNA 的部分克隆和定性分析. 中国昆虫科学, 8(4):289-297]
- Wang GR, Wu KM, Guo YY, 2002. Progress in the studies of antenna odorant binding proteins of insect. *Acta Entomol. Sin.*, 45(1):131-137. [王桂荣, 郭予元, 吴孔明, 2002. 昆虫触角气味结合蛋白的研究进展. 昆虫学报, 45(1):131-137]
- Wang GR, Wu KM, Guo YY, 2004. Research advance on molecular mechanism of odors perception in insects. *J. Agric. Biotechnol.*, 12(6):720-726. [王桂荣, 吴孔明, 郭予元, 2004. 昆虫感受气味物质的分子机制研究进展. 农业生物技术学报, 12(6):720-726]
- Xiu WM, Dong SL, Wang YC, 2005. Pheromone binding proteins in insects with emphasis on their molecular transport and physiological functions. *Acta Entomol. Sin.*, 48(5):778-784. [修伟明, 董双林, 王荫长, 2005. 昆虫信息素结合蛋白及其分子运输机制和生理功能研究进展. 昆虫学报, 48(5):778-784]
- Zhang CX, 2001. Analysis of Baculovirus Polyhedrin Gene and Protein Kinase, and Expression of Human Erythropoietin Gene in Baculovirus-insect System. Beijing: Higher Education Press. 87-103. [张传溪, 2001. 昆虫杆状病毒 *ph*、*pk* 基因分析和人 *EPO* 基因在杆状病毒-昆虫系统中的表达. 北京: 高等教育出版社. 87-103]

(责任编辑:袁德成)