

家蚕化学感受蛋白 BmCSP4 表达谱及结合特性分析

邓培渊^{1,2}, 乔惠丽², 李丹丹², 鲁云凤², 李生才^{1,*}, 阚云超^{2,*}

(1. 山西农业大学农学院, 山西太谷 030801; 2. 南阳师范学院中英南阳洛桑昆虫生物学联合实验室, 河南南阳 473061)

摘要: 化学感受蛋白 (chemosensory proteins, CSPs) 是昆虫体内存在的一类主要识别和运载非挥发性的气味分子和化学刺激物的可溶性蛋白。本研究运用半定量 RT-PCR 方法分析了 *BmCSP4* 的时空及组织表达谱。结果表明: *BmCSP4* 在家蚕 *Bombyx mori* 各发育阶段均表达, 但表达量从 4 龄到蛹期逐渐减少, 且在雌成虫头部、胸部和腹部表达量较少。用 1-NPN 作为荧光探针, 测定了 15 种外源配基与 BmCSP4 蛋白的结合特性, 结果显示: 仅芳香醛类和芳香酮类化合物在浓度 10 $\mu\text{mol/L}$ 能将 1-NPN 从 BmCSP4 中替换 50%, 苯甲醛解离常数为 3.20 $\mu\text{mol/L}$, 对甲氧基苯甲醛解离常数为 2.24 $\mu\text{mol/L}$, 2-戊基-3-苯丙基-烯醛解离常数为 2.88 $\mu\text{mol/L}$, 1-苯基-1-丁酮解离常数为 2.04 $\mu\text{mol/L}$, 苯乙酮解离常数为 2.52 $\mu\text{mol/L}$ 。据此推测, BmCSP4 在不同的发育阶段执行不同的生理功能, 并可能参与对芳香醛、芳香酮类气味识别过程。

关键词: 家蚕; 化学感受蛋白; 半定量 RT-PCR; 1-NPN; 荧光结合

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2011)08-0869-08

Expression pattern and binding specificity of chemosensory protein BmCSP4 in the silkworm, *Bombyx mori*

DENG Pei-Yuan^{1,2}, QIAO Hui-Li², LI Dan-Dan², LU Yun-Feng², LI Sheng-Cai^{1,*}, KAN Yun-Chao^{2,*}

(1. College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China; 2. China-UK NYNU-RRes Joint Laboratory of Insect Biology, Nanyang, Henan 473061, China)

Abstract: Chemosensory proteins (CSPs) are a class of small soluble proteins in insects, which are supposed to recognize and transport non-volatility odour molecules and chemical stimuli. In this study, we investigated the expression pattern of *BmCSP4* using semi-quantitative RT-PCR. The results showed that *BmCSP4* was expressed across various developmental stages, with gradual decrease from 4th larva to pupa. The tissue expression profile in males and females at adult stage was further studied, and the results showed that the expression level of *BmCSP4* was lower in female head (with antennae removed), thorax and abdomen than in other female tissues. The binding specificity of BmCSP4 to 15 compounds was tested using N-phenyl-1-naphthylamine (1-NPN) as fluorescent probe, and the results showed that only benzaldehyde, *p*-methoxy benzaldehy, 2-pentyl-3-phenylpropenoic, 1-phenyl-1-butanol and acetophenone at the concentration of 10 $\mu\text{mol/L}$ replaced 1-NPN from BmCSP4 by 50%, with the dissociation constants of 3.20, 2.24, 2.88, 2.04 and 2.52 $\mu\text{mol/L}$, respectively. These results suggest that BmCSP4 may have diverse physiological function in different developmental stages, and may be involved in the process of discriminating aromatic aldehyde and aromatic ketone compounds.

Key words: *Bombyx mori*; chemosensory protein; semi-quantitative PCR; N-phenyl-1-naphthylamine; fluorescence binding assay

气味分子和化学刺激物从外界环境到达昆虫体内神经膜上相应受体之前的所有过程及与受体的相互作用都发生在嗅觉神经末端的外周水溶性淋巴液内 (Pelosi, 1996; 龚亮等, 2009), 气味分子

和化学刺激物一般为亲脂性分子, 不能直接通过亲水性的淋巴液到达嗅觉神经树突末梢, 因此, 树突周围存在一类可以可逆结合外界化学信号刺激, 转运这些亲脂性信号分子通过亲水性淋巴液的载体

基金项目: 国家自然科学基金项目(30700070)

作者简介: 邓培渊, 男, 1981年2月生, 河南登封人, 博士, 讲师, 主要从事昆虫分子生物学研究, Tel.: 0377-6325087; E-mail: zhzd201@sohu.com

* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: yekan1974@nynu.edu.cn; sxaulsc@126.com

收稿日期 Received: 2011-03-09; 接受日期 Accepted: 2011-05-29

蛋白。目前在昆虫感受器淋巴液中已经发现两类水溶性蛋白能够作为气味分子和化学刺激物的载体,一类是气味结合蛋白(odorant binding proteins, OBPs),另一类是化学感受蛋白。气味结合蛋白主要结合和运载挥发性的气味分子和化学刺激物,化学感受蛋白主要结合和运载非挥发性的气味分子和化学刺激物(Pikielny *et al.*, 1994; Steinbrecht *et al.*, 1995; Ban *et al.*, 2002)。

CSPs 分子量约 13 kD,有 100~115 个氨基酸残基,4 个保守的半胱氨酸位点,形成 2 个二硫键(Angeli *et al.*, 1999); CSPs 的保守性强,同种昆虫不同 CSP 以及不同目、科昆虫间都有较高的同源性; CSPs 不仅在触角、下唇须、下颚须、跗节等化学感受器官中表达,而且在其他非感受器官如胸、腹、喙、翅、眼、头部等部位也有表达(Nagnan-Le Meillour *et al.*, 2000; Picimbon *et al.*, 2000a; Kim *et al.*, 2003; Gong *et al.*, 2007); Gong 等(2007)通过 microarray 法分析家蚕 *Bombyx mori* 5 龄幼虫不同时期(3 h-9 d) CSPs 的表达差异性,发现不同的 *BmCSP* 在 5 龄各时期表达的差异较大;意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 不同 *AmelCSP* 基因在各个发育阶段和组织有不同的表达谱,如 *AmelCSP3* 在触角、头、足、胸部和幼虫 4 龄、5 龄及蛹晚期都有很高的表达量,但 *AmelCSP4* 仅在触角中大量表达,在幼虫期和蛹期不表达(Forêt *et al.*, 2007); Zhou 等(2006)发现 *BmorEST3*, *BmorEST5*, *BmorEST6*, *BmorEST7* 和 *BmorEST8* 在家蚕复眼中有表达,并推测这 5 个基因具有除嗅觉之外的其他生理功能,本文中 *BmCSP4* 与 *BmorEST6* 是同一基因,具有相同的 CDS 区序列。

CSPs 与信息素或其他气味化学物质的结合实验是研究其生理功能的重要途径,该实验方法运用蛋白中的色氨酸和外源荧光配基结合产生的荧光来检测气味分子的特征,但该色氨酸必须位于蛋白的结合腔内,且和气味分子的相互作用影响其荧光的变化,通过蛋白结合腔内色氨酸与外源荧光配基结合生成荧光的淬灭效应检测蛋白对不同的气味分子结合能力。常用的外源荧光配基有 1-aminoanthracene (1-AMA), N-phenyl-1-naphthylamine (1-NPN), 以及异构体 2-aminoanthracene (2-AMA) 和 N-phenyl-2-naphthylamine (2-NPN) (Pelosi *et al.*, 2006), 1-NPN 是 CSPs 常用荧光配基,以此为荧光探针研究了 CSPlm-II-10, recCSP-sg4, SgreCSP-III 等多种 CSP 的结合特性(Ban *et al.*,

2002, 2003; Jin *et al.*, 2005), 但未见对家蚕 CSP 结合特性的研究。

家蚕是我国重要的经济昆虫,也是国际鳞翅目基因组协会确定的鳞翅目昆虫生化与分子遗传及基因组研究的模式生物。本研究运用半定量 RT-PCR 检测了 *BmCSP4* 基因在不同时间(1-5 龄、蛹期、成虫期),不同组织(触角、头、足、翅、胸、腹)以及成虫不同性别(雌、雄)中的表达情况。鉴于 CSP 结合气味分子种类的多样性,参照 Li 等(2008)研究 OBP 功能方法,本实验以常见类型(酚、醚、醇、酯、酮、醛)化合物(共 15 种)为外源竞争配基,以 1-NPN 为外源荧光配基,检测纯化的重组 *BmCSP4* 蛋白与 15 种气味分子的结合特性,从而掌握此蛋白识别的气味分子种类,为阐明昆虫与外界环境信息联系本质,开发利用益虫和防治害虫新途径提供重要理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

本实验所用的家蚕品系为大造 P₅₀, 蚕卵由西南大学惠赠,卵保存在 4℃,相对湿度 75%~85%,自然光照条件催青,孵化后幼虫在恒温 25℃,自然光周期条件,以新鲜桑叶饲养。

1.2 主要实验材料、试剂和仪器

Trizol 提取试剂盒购自 Gibco 公司, cDNA 反转录试剂盒购自 Promega 公司,限制性内切酶购自 NEB 公司, pfu DNA 聚合酶、T4 ligase 酶和 PageRuler Prestained Protein Ladder 购自 Ferments 公司, 1-NPN 和外源气味分子标准品购自 Sigma 公司,表达载体 pET-30b(+),菌株 DH10B、菌株 BL21(DE3)为本实验室保存,完全弗氏佐剂和不完全弗氏佐剂购自 Thermo 公司,阴离子交换树脂 DE-52 柱材料为 Whatman 产品, Superose-12 预装柱和 AKTA 蛋白纯化系统为 GE 公司产品,荧光分光光度计为 Jasco FP-750,其他常规试剂均购自 TaKaRa 公司。

1.3 半定量 RT-PCR

1.3.1 引物的设计与合成:从 GenBank 检索并下载家蚕 *BmCSP4* (GenBank 登录号: NM_001043587) 基因 CDS 区序列,运用在线软件 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> 预测其信号肽序列,依据蛋白成熟编码区设计引物,以家蚕 Actin3 基因为内参。

BmCSP4-Forward:

5'-CGCATATGGATGATAAGTACACTGACA-3'

BmCSP4-Reverse:

5'-GCCAATTC TTATTCAGGGATGACGATGC-3'

BmorActin3-Forward:

5'-ATGTGCGACGAAGAAGTTGCC-3'

BmorActin3-Reverse:

5'-AGTGAGCAGGACGGGGTGT-3'

引物序列下划线部分为酶切位点 (*Nde* I 和 *EcoR* I), 酶切位点前为保护碱基, 引物由北京奥科鼎盛生物技术有限公司合成。

1.3.2 总 RNA 提取及第一条链 cDNA 的合成: 分别取 1-5 龄(解剖后用 DEPC 水冲洗肠道)和蛹期第 2 天整虫及羽化后第 2 天雌、雄成虫不同组织(触角、头、足、翅、胸、腹)各约 10 mg, Trizol 法提取总 RNA, DNase I 消化除去残留的基因组 DNA, 按照 Sigma cDNA 反转录试剂盒说明书合成第一条链 cDNA。

1.3.3 半定量 RT-PCR 法分析 BmCSP4 时空及组织表达谱: 以 1.3.2 中合成的 cDNA(约 80 ng)为模板, 加入 10 × PCR Buffer 2 μL, 正、反向引物(10 μmol/L)各 1 μL, 1.6 μL dNTP (2 mmol/L), rtaq DNA 聚合酶 1.5 U (TaKaRa), ddH₂O 补至 20 μL。反应条件: 94℃ 预变性 4 min, 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 25 个循环, 72℃ 终延伸 10 min, 以 ddH₂O 替代 cDNA 模板设空白对照。每个样品重复 3 次。

1.4 *BmCSP4* 基因的克隆与表达

以雄虫触角 cDNA 为模板扩增 *BmCSP4* 基因, PCR 产物纯化后用 *Nde* I / *EcoR* I 双酶切, 割胶回收后与经同样双酶切的表达载体 pET-30b(+) 连接, 连接产物转化 DH10B 感受态细胞, 挑单菌落培养后经菌液 PCR 及双酶切检测后送北京奥科鼎盛生物技术有限公司测序验证; 将测序验证正确的重组表达载体 pET/30b-*BmCSP4* 转化 BL21 (DE3) 感受态细胞, 挑单克隆于 5 mL LB 培养基(卡那霉素浓度: 10 μg/mL)过夜培养, 次日以 1:100 (v:v) 加入新培养基(卡那霉素浓度: 10 μg/mL)中 37℃ 培养, OD₆₀₀ 值约为 0.6 时加入 IPTG (终浓度为 0.4 mmol/L) 诱导 3 h, SDS-PAGE 电泳检测蛋白的表达。

1.5 重组 BmCSP4 蛋白的纯化

1 000 mL LB 培养基大量表达目的蛋白, 诱导后离心收集菌体, 用 15 mL 50 mmol/L Tris-HCl

(pH 7.4) 悬浮, 超声破碎后离心取上清, 保存沉淀, SDS-PAGE 电泳检测目的蛋白表达形式。

含有重组目的蛋白的溶液经阴离子交换树脂 DE-52 [0 ~ 0.5 mol/L NaCl + 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4)] 和 Superose-12 两个步骤纯化。

1.6 Western 免疫印迹检测

1.6.1 多克隆抗体的制备: 将纯化的重组 BmCSP4 蛋白(约 300 μg)与弗氏完全佐剂按 1:1 的体积比充分乳化后, 背部皮下多点注射新西兰大白兔, 之后每 7 d 用弗氏不完全佐剂替代弗氏完全佐剂加强免疫 1 次, 共 4 次, 末次免疫后一周耳部静脉取血, 分离血清, 加 0.02% NaN₃, -70℃ 保存。

1.6.2 Western 免疫印迹检测: 将家蚕雄成虫触角的粗提总蛋白从 SDS-PAGE 胶上电转到硝酸纤维素膜上, 用 PBST + 5% 脱脂牛奶封闭 1 h; 加入 BmCSP4 抗血清孵育 1 h (稀释度 1:1 000), PBST 洗膜 3 次; 加入 AP (碱性磷酸酶) 标记的羊抗兔 IgG (稀释度 1:2 500), 室温孵育 1.5 h, PBST 洗膜 3 次; 最后将膜置于 BCIP/NBT 显色液中至条带显色清晰, ddH₂O 终止显色。

1.7 重组蛋白 BmCSP4 的荧光特征

在 25℃ 用 Jasco FP-750 荧光分光光度计记录荧光发射光谱。外源荧光配基 1-NPN 溶于甲醇 (1 mmol/L), 用 295 nm 激发光激发 4 μmol/L 重组蛋白, 记录 300 ~ 400 nm 光谱处色氨酸的荧光强度, 在 4 μmol/L 重组蛋白中加入 1-NPN, 记录 1-NPN 浓度为 0 ~ 20 μmol/L 时色氨酸荧光的淬灭情况; 用 337 nm 激发光激发 2 μmol/L 1-NPN 甲醇溶液, 记录 350 ~ 500 nm 波长之间的荧光发射光谱, 在 2 μmol/L 1-NPN 甲醇溶液加入重组蛋白至浓度为 4 μmol/L, 记录 350 ~ 500 nm 波长之间峰值的蓝移及强度变化, 并记录 1-NPN 浓度为 4, 6, 10 和 15 μmol/L 时峰值的蓝移及强度变化, 以蓝移的峰值为纵坐标、自由 1-NPN 浓度为横坐标作图, Schatchard Plot 法线性化该曲线, 并计算 *BmCSP4*/1-NPN 复合物的解离浓度 $K_{[1-NPN]}$ 。以上检测所得数据均为 3 次重复的平均值。

1.8 竞争结合实验

用 1-NPN 作荧光报告子, 以最大发射光谱处荧光强度和配基浓度作图, 以测定 15 种外源气味分子(表 1)配基的结合强度, 外源配基的浓度为 0 ~ 10 μmol/L, 蛋白浓度为 4 μmol/L, 1-NPN 浓度为 4 μmol/L。荧光强度值均为 3 次重复的平均值。

1.9 数据统计与分析

以在理想状态下蛋白活性为 100%，饱和状态时蛋白和配基结合比例为 1:1 为前提，通过荧光强度的变化估计被结合外源气味分子配基浓度。根据 IC_{50} 值计算竞争外源气味分子配基的解离浓度。公式： $K_D = [IC_{50}] / (1 + [1-NPN]) / K_{[1-NPN]}$ ，其中 IC_{50} 是外源气味分子配基能替换 50% 1-NPN 时浓度， $[1-NPN]$ 为未结合 1-NPN 浓度， $K_{[1-NPN]}$ 为 BmCSP4/1-NPN 复合物的解离浓度。

表 1 本研究所用 15 种配基化合物

Table 1 15 ligand compounds used in this study

编号 Code	配基 Ligands
C1	苯甲醛 Benzaldehyde
C2	辛醛 Octanal
C3	对甲氧基苯甲醛 <i>p</i> -Methoxy benzaldehyde
C4	2-戊基-3-苯丙基-烯醛 2-Pentyl-3-phenylpropenoic aldehyde
C5	对甲基苯酚 <i>p</i> -Hydroxytoluene
C6	1-苯基-1-丁酮 1-Phenyl-1-butanol
C7	4-烯丙基-2-甲氧基苯酚 2-Methoxy-4-allyl phenol
C8	苯乙酮 Acetophenone
C9	2-甲基丙酸乙酯 Ethyl-2-methylpropanoate
C10	对甲基苯甲醚 <i>p</i> -Methyl anisole
C11	4-戊基- δ -戊内酯 4-Pentyl- δ -valerolactone
C12	十六酸甲酯 Methyl palmitate
C13	3-苯丙醇 3-Phenylpropanol
C14	对甲醛苯酚 <i>p</i> -Formylphenol
C15	5-甲基十一烷醇 5-Methylhendecanol

2 结果与分析

2.1 BmCSP4 基因的表达谱分析

运用半定量 RT-PCR 技术分析 BmCSP4 基因在不同龄期、成虫不同组织的表达差异性。结果如图 1 和图 2 所示，BmCSP4 基因在家蚕幼虫各个龄期均有表达，3 龄后随龄期增加表达量逐渐减少(图 1)；在雌虫各组织中均表达，但在头部、胸部和腹部表达量较低，触角、足、翅中表达量较高(图 2: A)；在雄虫各组织均表达，且无明显差异性(图 2: B)。

2.2 BmCSP4 基因的克隆、酶切鉴定

以雄成虫触角第一条链 cDNA 为模板克隆 BmCSP4 基因，构建 pET/30b-BmCSP4 重组表达载体，菌落 PCR 扩增出条带大小与目的基因大小一致，双酶切切出的片段大小也与目的基因一致；测序结果表明扩增出的 BmCSP4 基因序列与 GenBank 公布的序列完全一致，且与 pET-30b(+) 正确连接。

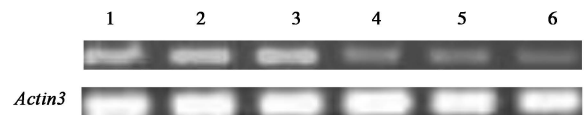


图 1 家蚕不同发育阶段 BmCSP4 基因的表达谱

Fig. 1 Expression pattern of BmCSP4 gene in different developmental stages of Bombyx mori

1: 1 龄幼虫 1st instar larva; 2: 2 龄幼虫 2nd instar larva; 3: 3 龄幼虫 3rd instar larva; 4: 4 龄幼虫 4th instar larva; 5: 5 龄幼虫 5th instar larva; 6: 蛹期 Pupa.

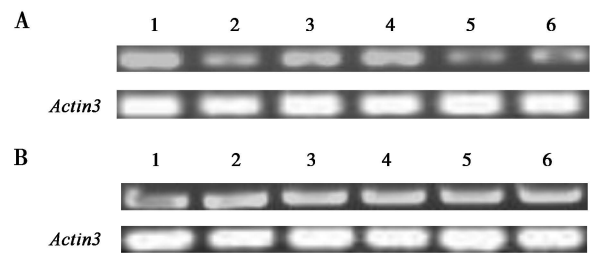


图 2 家蚕雌性(A)和雄性(B)成虫组织中 BmCSP4 基因表达谱

Fig. 2 Expression pattern of BmCSP4 gene in female (A) and male (B) adult tissues of Bombyx mori

1: 触角 Antennae; 2: 头部(去触角) Head (with antennae removed); 3: 翅 Wings; 4: 足 Legs; 5: 胸部 Thorax; 6: 腹部 Abdomen.

2.3 BmCSP4 基因表达及蛋白纯化

含有 pET/30b-BmCSP4 的 BL21 (DE3) 菌株经 IPTG 诱导后产生一条 13 kD 左右的特异性蛋白条带，而未经诱导的 pET/30b-BmCSP4 和经同样条件诱导的 pET-30b(+) 则无此条带(图 3)。

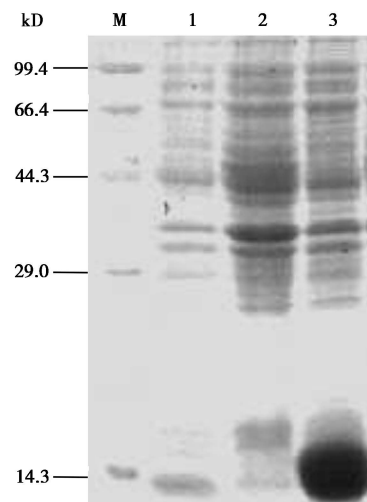


图 3 重组 BmCSP4 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expressed recombinant BmCSP4 M: 蛋白分子量标准 Protein molecular weight marker; 1: 诱导后 pET-30b(+) [Induced pET-30b(+)]; 2: 未诱导的 pET/30b-BmCSP4 (Non-induced pET/30b-BmCSP4); 3: 诱导后的 pET/30b-BmCSP4 (Induced pET/30b-BmCSP4).

蛋白大量表达后超声破碎并离心, SDS-PAGE 电泳检测其上清液和沉淀, 结果如图 4 所示:

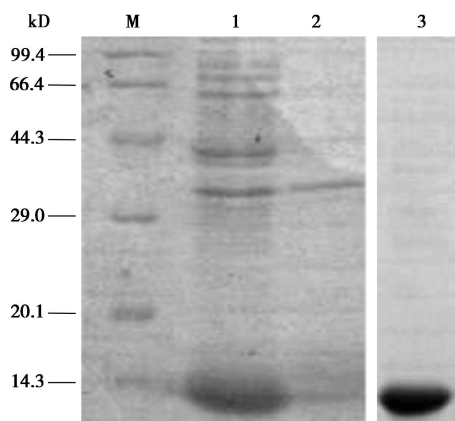


图 4 重组 BmCSP4 蛋白表达形式及纯化产物 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the expressed form and purified protein of the recombinant BmCSP4

M: 蛋白分子量标准 Protein molecular weight marker; 1: 超声破碎后离心上清液 Supernatant after sonication; 2: 超声破碎后离心沉淀 Pellet after sonication; 3: 纯化后的 BmCSP4 蛋白 Purified BmCSP4 protein.

目的蛋白存在于上清液中, 沉淀中无目的蛋白, 可见此重组蛋白为可溶性蛋白。表达的重组蛋白经 DE-52 和 Superose-12 纯化后得到高纯度 BmCSP4 蛋白。

2.4 BmCSP4 的 Western 印迹检测

以制备的 BmCSP4 抗血清为一抗, 碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG 为二抗, 对粗提雄成虫触角总蛋白(设清水对照)进行 Western 印迹分析, 结果如图 5 所示: 在约 13 kD 处 BmCSP4 抗体与粗提的雄成虫触角总蛋白发生很强的交叉反应, 清水对照无印迹显示。

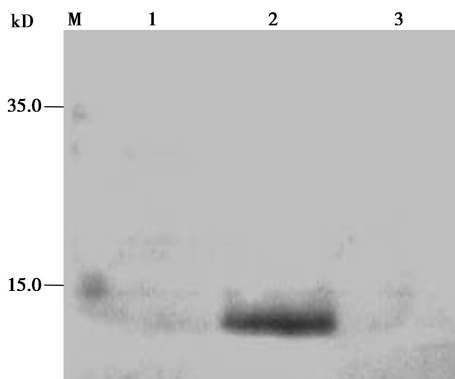


图 5 BmCSP4 的 Western 印迹分析

Fig. 5 Western blotting analysis of BmCSP4

M: 蛋白分子量标准 PageRular Prestained Protein Ladder; 1: 清水 H₂O; 2: 雄虫触角总蛋白 Total protein from male antenna; 3: 清水 H₂O.

2.5 重组 BmCSP4 蛋白的荧光特征

重组 BmCSP4 蛋白中含有色氨酸, 在 295 nm 激发光下在 340 nm 处产生内源荧光, 说明其色氨酸位于蛋白结合口袋的核心区域并且处于一个相对疏水的环境中; 随着 1-NPN 量增加, 色氨酸荧光强度逐渐降低, 当 1-NPN 浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 时 BmCSP4 蛋白中色氨酸荧光值降为初始值的 60% (图 6), 表明荧光探针 1-NPN 和 BmCSP4 蛋白在疏水结合口袋内部结合。

2.6 配基结合实验

用 337nm 波长激发光激发 1-NPN, 扫描 290 ~ 380 nm 波长范围, 仅在 475 nm 处产生微弱峰值; 加入 BmCSP4 蛋白后在 410 nm 处产生新的荧光峰值, 发生蓝移现象, 且强度也明显增加。

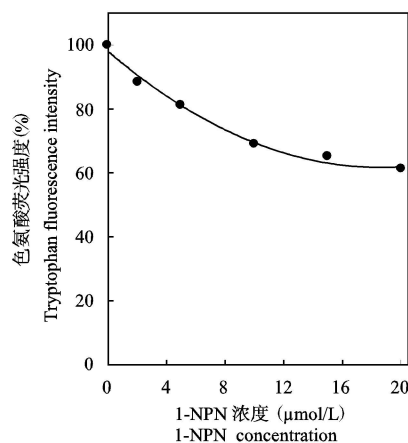


图 6 BmCSP4 蛋白内源荧光的猝灭曲线

Fig. 6 The quenching curve of BmCSP4 intrinsic fluorescence

当在 4 $\mu\text{mol/L}$ BmCSP4 蛋白中加入 0 ~ 15 $\mu\text{mol/L}$ 1-NPN 时, 1-NPN 荧光强度逐渐增加(图 7: A); 通过 Scatchard 方程计算出 BmCSP4/1-NPN 复合物解离常数 4.8 $\mu\text{mol/L}$ (图 7: B), 通过荧光竞争结合实验测定了 15 种外源化合物(4 种醛、3 种酚、2 种酮、3 种酯、2 种醇、1 种醚)与 BmCSP4 蛋白结合能力, 结果显示仅与芳香醛类和芳香酮类有较好结合能力(图 7: C 和 D), 其他化合物即使浓度达到 15 $\mu\text{mol/L}$, 1-NPN 荧光强度基本上不降低, 甚至升高; 苯甲醛解离常数为 3.20 $\mu\text{mol/L}$, 对甲氧基苯甲醛解离常数为 2.24 $\mu\text{mol/L}$, 2-戊基-3-苯丙基-烯醛解离常数为 2.88 $\mu\text{mol/L}$, 1-苯基-1-丁酮解离常数为 2.04 $\mu\text{mol/L}$, 苯乙酮为 2.52 $\mu\text{mol/L}$ (表 2)。

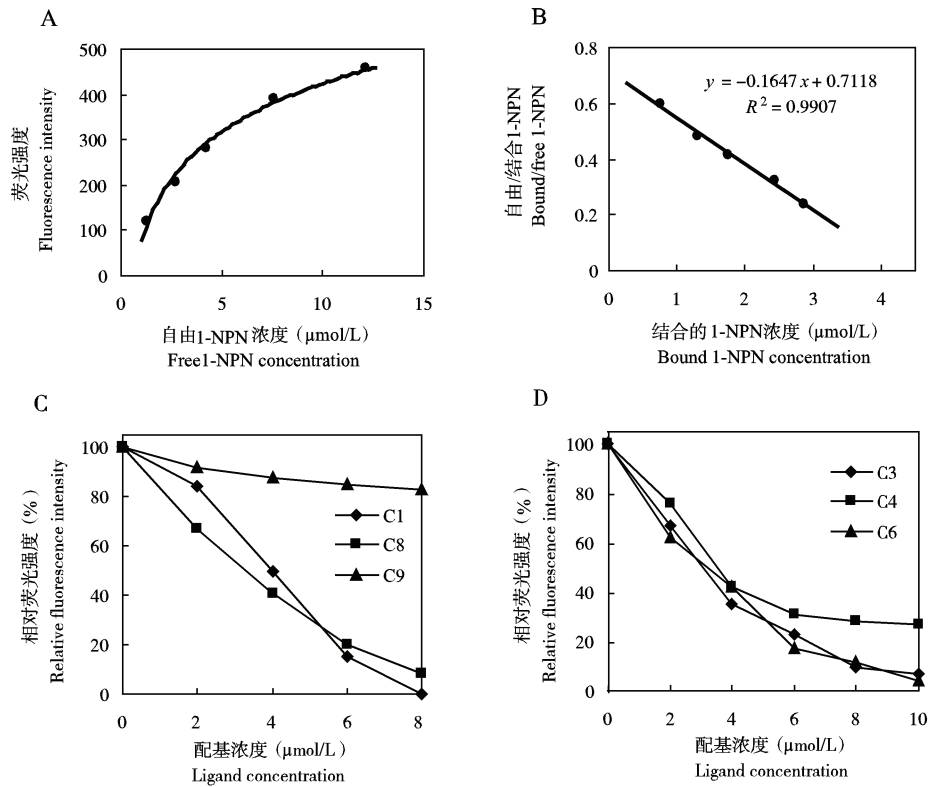


图7 1-NPN 与 BmCSP4 的结合及结合 1-NPN 的 BmCSP4 与配基的竞争结合

Fig. 7 Binding of 1-NPN to BmCSP4 and competitive binding of 1-NPN in BmCSP4 with ligands

A: 1-NPN 与 BmCSP4 蛋白的结合曲线 Binding curve of 1-NPN to BmCSP4; B: 1-NPN 与 BmCSP4 蛋白结合的 Scatchard 方程 Scatchard plot of 1-NPN binding to BmCSP4; C, D: 外源配基与 BmCSP4 蛋白的竞争结合曲线 Competitive binding curve of 1-NPN in BmCSP4 with external ligands. 配基化合物 C1 ~ C9 如表 1 所示。Ligand compounds C1 - C9 as shown in Table 1.

表 2 不同配基对 BmCSP4 蛋白的 IC_{50} 值和解离常数 (K_D)
Table 2 IC_{50} and dissociation constants of ligands to BmCSP4

外源配基 Ligands	IC_{50} ($\mu\text{mol/L}$)	K_D ($\mu\text{mol/L}$)
苯甲醛 Benzaldehyde	4.00	3.20
对甲氧基苯甲醛 <i>p</i> -Methoxy benzaldehyde	2.80	2.24
2-戊基-3-苯丙基-烯醛 2-Pentyl-3-phenylpropenoic aldehyde	3.60	2.88
1-苯基-1-丁酮 1-Phenyl-1-butanol	2.55	2.04
苯乙酮 Acetophenone	3.15	2.52
2-甲基丙酸乙酯 Ethyl-2-methylpropanoate	-	-

-: 外源配基浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时, 仍不能替换 50% 1-NPN, IC_{50} 和 K_D 值无法计算。10 $\mu\text{mol/L}$ external ligands could not replace 50% 1-NPN from BmCSP4, so it is impossible to calculate IC_{50} and K_D .

3 讨论

OBP 基因一般在成虫期表达, 在羽化前开始合成, 如舞毒蛾 *Lymantria dispar* 的 PBP 和 GOBP 的合成始于约羽化前 3 d (Krieger *et al.*, 1996)。张瑶 (2008) 运用半定量 RT-PCR 方法检测了家蚕 7 个

OBP 在幼虫期 (4 龄眠期、5 龄取食期、熟蚕期) 的表达谱, 发现只有 ABP 和 ABPX 两种 OBP 表达, 其余 5 种 OBP 的 mRNA 转录水平没有检测到表达; Picimbon 等 (2001) 用 Northern 印迹法检测到 HvirCSP1 在羽化前 3 d 表达量达到和成虫阶段相当的水平; Jin 等 (2005) 发现飞蝗 *Locusta migratoria* CSP III 在 1 - 5 龄幼虫期均表达; Wanner 等 (2005)

发现云杉色卷蛾 *Chroistoneura fumiferana* 的 CSP 基因 *CfumAY426538* 在 1-5 龄幼虫期和蛹期均表达; 本实验中发现 *BmCSP4* 广泛分布于家蚕幼虫各个龄期包括 1, 2, 3, 4 和 5 龄以及蛹期, 且表达量有差异, 但从 4 龄开始, *BmCSP4* 基因表达量明显减少, 蛹期最少可能是由于蛹期家蚕与外界的信息交流减少, 可见 CSPs 比 OBPs 出现得更早, 分布更为广泛, 因此功能也可能比 OBPs 更复杂和多样化。

CSPs 在昆虫接触性器官中表达量较高, Picimbon 等(2000a, 2000b)运用 Northern blot 法分析 BmCSP1, BmCSP2 和 LmisOS-Ds 在各组织中的表达差异, 结果发现在触角和足中表达量最高, 但雌雄间差异不显著; 烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 的 HvirCSP1, HvirCSP2, HvirCSP3 在雌、雄成虫足部有较高的表达量(Picimbon *et al.*, 2001); 本实验发现 BmCSP4 在雌虫接触性器官(触角、足和翅)中表达量高于非接触性器官(头、胸和腹), 但在雄虫各组织则无显著差异。这种性别间的基因表达差异性表明, 在成虫阶段, 除作为嗅觉产生的一个成分, BmCSP4 可能在别的途径中参与或决定了家蚕雌虫和雄虫发育或者行为的差异。值得注意的是, 与家蚕 BmCSP4 同源性很高的意大利蜜蜂的 AmelCSP4 在幼虫和蛹期都不表达, 其主要在嗅觉器官触角中表达, 在其他组织表达量很低或者不表达(Forêt *et al.*, 2007), 可见 CSP4 虽在种间高度保守, 但其表达谱差异较大, 所以推测其在不同物种中的功能也可能存在一定差异。

BmCSP4 编码蛋白的氨基酸中有两个色氨酸(Trp81, Trp94), 在 340 nm 处的内源荧光的猝灭可能是两个色氨酸共同作用结果, 也可能是单个色氨酸作用结果, Bette 等(2002)对多音大蚕 *Antheraea polyphemus* PBP1 内源色氨酸(Trp37, Trp127)荧光的研究表明突变了 Trp37 位色氨酸后 E6, Z11-Ald 对 PBP1 蛋白内源荧光没有猝灭效应, 而突变了 Trp127 位色氨酸后 E6, Z11-Ald 对 PBP1 蛋白内源荧光与突变前一样有明显的猝灭效应, Trp37 氨基酸在气味结合蛋白中保守性强, 所以推测在化学感受蛋白中相对保守 Trp81 位点可能位于 BmCSP4 疏水性的结合腔内, 但 Trp94 是否参与外源配基的结合需通过定点突变后测定内源荧光的猝灭来确定。

CSPs 可分为 3 类亚型: CSP1s, CSP2s 和 CSP3s, 每种类型都可能都有其结合特性; CSP1s 主要结合长烷基链的脂肪酸, 如 CSPmbraA6(Lartigue *et al.*, 2002), CSP2s 主要结合芳香族化合物, 如 CSP-

sg4(Ban *et al.*, 2002); Ban 等(2003)研究发现 12, 14, 18 个碳的醇、酸及其己酯在高浓度条件都不能将 1-NPN 从 1-NPN/recCSP-sg4 上有效地替代下来; 本实验研究发现长链的酯类和醇类如 2-甲基丙酸乙酯、4-戊基- δ -戊内酯、十六酸甲酯、5-甲基十一烷醇也不与 BmCSP4 蛋白结合, 但芳香醛类和芳香酮类与 BmCSP4 结合能力较强, 由此推断 BmCSP4 可能都属于 CSP2s 亚型; 辛醛在寄生蜂寻找寄主的过程中起一定作用, 能吸引苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* (L.) 的寄生蜂 *Hyssopus pallidus* (Rott *et al.*, 2005), 其可能是一种昆虫信息素, 所以不与 CSPs 结合(张帅等, 2009); BmCSP4 不结合酚类可能是由于酚类碱性强而导致亲水性强, 配基不能进入结合位点内部与蛋白结合; Jiang 等(2009)认为配基的 C 原子数与其与嗅觉蛋白的结合能力是相关的, 但本实验发现配基所携带的官能团性质对其结合特性的影响更大; 苯甲醛、对甲氧基苯甲醛、2-戊基-3-苯丙基-烯醛、1-苯基-1-丁酮、苯乙酮的结构与碳原子数都差别较大, 但解离常数的差异性不大, 可能是由于这两类化合物与 BmCSP4 蛋白的相互作用模式是相同的; 芳香醛类具有花果香型气味, 芳香酮类多具有特定的清香味道, 所以推测 BmCSP4 可能与昆虫传粉和危害果实类害虫寻找寄主有关, 但需更多的配基和直接的生理证据进一步验证。

通过实验证明和 BmCSP4 结合能力很强的苯甲醛、对甲氧基苯甲醛、2-戊基-3-苯丙基-烯醛、1-苯基-1-丁酮、苯乙酮, 虽不能作为 BmCSP4 蛋白生理功能直接证据, 但鉴于 CSPs 蛋白在种间的保守性, 通过大田实验和相关的行为学研究后可作为昆虫人工引诱剂的有效成分。

参 考 文 献 (References)

- Angeli S, Ceron F, Scaloni A, Monti M, Minnocci A, Petacchi R, Pelosi P, 1999. Purification, structural characterization, cloning and immunocytochemical localization of chemoreception proteins from *Schistocerca gregaria*. *European Journal of Biochemistry*, 262: 745-754.
- Ban LP, Scaloni A, D'Ambrosio C, Zhang L, Yan YH, Pelosi P, 2003. Biochemical characterization and bacterial expression of an odorant-binding protein from *Locusts migratoria*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60: 390-400.
- Ban LP, Zhang L, Yan YH, Pelosi P, 2002. Binding properties of a locust's chemosensory protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 293: 50-54.
- Bette S, Breer H, Krieger J, 2002. Probing a pheromone binding protein

- of the silkworm *Antheraea polyphemus* by endogenous tryptophan fluorescence. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 241 – 246.
- Forêt S, Wanner KW, Maleszka R, 2007. Chemosensory proteins in the honey bee: Insights from the annotated genome, comparative analyses and expressional profiling. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37: 19 – 28.
- Gong DP, Zhang HJ, Zhao P, Lin Y, Xia QY, Xiang ZH, 2007. Identification and expression pattern of the chemosensory protein gene family in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37: 266 – 277.
- Gong L, Chen Y, Cheng G, Zhong GH, 2009. Insect chemosensory proteins. *Chinese Bulletin of Entomology*, 46(4): 646 – 652. [龚亮, 陈永, 程功, 钟国华, 2009. 昆虫化学感受蛋白. 昆虫知识, 46(4): 646 – 652]
- Jiang QY, Wang WX, Zhang ZD, Zhang L, 2009. Binding specificity of locust odorant binding protein and its key binding site for initial recognition of alcohols. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39: 440 – 447.
- Jin X, Brandazza A, Navarrini A, Ban L, Zhang S, Steinbrecht RA, Zhang L, Pelosi P, 2005. Expression and immunolocalisation of odorant-binding and chemosensory proteins in locusts. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62: 1156 – 1166.
- Kim I, Lee KS, Ryu KS, Kim JW, Ahn MY, Lee HS, Sohn HD, Jin BR, 2003. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding putative chemosensory protein from the mole cricket, *Gryllotalpa orientalis*. *International Journal of Industrial Entomology*, 6(1): 87 – 92.
- Krieger J, von Nickisch-Rosenegk E, Mameli M, Pelosi P, Breer H, 1996. Binding proteins from the antennae of *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 26: 297 – 307.
- Lartigue A, Campanacci V, Roussel A, Larsson AM, Jones TA, Tegoni M, Cambillau C, 2002. X-ray structure and ligand binding study of a moth chemosensory protein. *Journal of Biological Chemistry*, 277(35): 32094 – 32098.
- Li S, Picimbon JF, Ji SD, Kan YC, Qiao CL, Zhou JJ, Pelosi P, 2008. Multiple functions of an odorant-binding protein in the mosquito *Aedes aegypti*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 372: 464 – 468.
- Nagnan-Le Meillour P, Cain AH, Jacquin-Joly E, François MC, Ramachandran S, Maida R, Steinbrecht RA, 2000. Chemosensory proteins from the proboscis of *Mamestra brassicae*. *Chemical Senses*, 25(5): 541 – 553.
- Pelosi P, 1996. Perireceptor events in olfaction. *Journal of Neurobiology*, 30(1): 3 – 19.
- Pelosi P, Zhou JJ, Ban LP, Calvello M, 2006. Soluble proteins in insect chemical communication. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63: 1658 – 1676.
- Picimbon JF, Dietrich K, Angeli S, Scaloni A, Krieger J, Breer H, Pelosi P, 2000a. Purification and molecular cloning of chemosensory proteins from *Bombyx mori*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 44(3): 120 – 129.
- Picimbon JF, Dietrich K, Breer H, Krieger J, 2000b. Chemosensory proteins of *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30: 233 – 241.
- Picimbon JF, Dietrich K, Krieger J, Breer H, 2001. Identity and expression pattern of chemosensory proteins in *Heliothis virescens* (Lepidoptera, Noctuidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31: 1173 – 1181.
- Pikielny CW, Hasan G, Rouyer F, Rosbash M, 1994. Members of a family of *Drosophila* putative odorant-binding proteins are expressed in different subsets of olfactory hairs. *Neuron*, 12: 35 – 49.
- Rott AS, Häckermann J, Brand N, Vallat A, Dorn S, 2005. Parasitoid exploitation of the seasonal variation in host plant volatile emission for herbivore locanon. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 115(1): 199 – 205.
- 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 and Tissue Research*, 282: 203 – 217.
- Wanner KW, Isman MB, Feng Q, Plettner E, Theilmann DA, 2005. Developmental expression patterns of four chemosensory protein genes from the Eastern spruce budworm, *Chroistoneura fumiferana*. *Insect Molecular Biology*, 14(3): 289 – 300.
- Zhang S, Zhang YJ, Su HH, Gao XW, Guo YY, 2009. Binding characterization of chemosensory protein MmedCSP1 in *Microplitis mediator* (Hymenoptera: Braconidae). *Acta Entomologica Sinica*, 52(8): 838 – 844. [张帅, 张永军, 苏宏华, 高希武, 郭予元, 2009. 中红侧沟茧蜂化学感受蛋白 MmedCSP1 的结合特征. 昆虫学报, 52(8): 838 – 844]
- Zhang Y, 2008. Temporal-spatial Expression Study on Odorant-binding Protein Gene in Silkworm, *Bombyx mori*. MSc Thesis, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong. [张瑶, 2008. 家蚕气味结合蛋白基因时空表达的研究. 山东泰安: 山东农业大学硕士学位论文]
- Zhou JJ, Kan Y, Antoniw J, Pickett JA, Field LM, 2006. Genome and EST analyses and expression of a gene family with putative functions in insect chemoreception. *Chemical Senses*, 31(5): 453 – 465.

(责任编辑: 赵利辉)