

# 中华按蚊气味结合蛋白 AsinOBP1 与避蚊胺 (DEET) 的结合特性分析

史宗畔, 冉永红, 张晶晶, 张 静, 闫振天, 陈 斌, 何正波\*

(重庆师范大学昆虫与分子生物学研究所, 媒介昆虫重庆市重点实验室, 重庆 401331)

**摘要:**【目的】研究中华按蚊 *Anopheles sinensis* 气味结合蛋白 1 (AsinOBP1) 与避蚊胺 (N, N-diethyl-*m*-toluamide, DEET) 的结合特性, 并与埃及伊蚊 *Aedes aegypti* AaegOBP1、致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* CquiOBP1 进行比较, 分析与 DEET 互作的关键氨基酸残基。【方法】利用原核表达载体进行目的蛋白 AsinOBP1 的原核表达及纯化。以 N-苯基-1-萘胺 (N-phenyl-1-naphthylamine, 1-NPN) 作为荧光探针, 通过荧光竞争结合实验对 AsinOBP1 与 DEET 的结合特性进行分析, 并比较 AsinOBP1, AaegOBP1 和 CquiOBP1 与 DEET 的结合能力, 通过分子对接鉴定其与 DEET 互作的氨基酸残基。【结果】AsinOBP1 能与 DEET 结合, 解离常数为 29.55  $\mu\text{mol/L}$ 。在相同实验条件下, CquiOBP1 和 AaegOBP1 都能结合 DEET, 解离常数分别为 17.15 和 12.81  $\mu\text{mol/L}$ 。与 AaegOBP1 和 CquiOBP1 相比, AsinOBP1 结合 DEET 的能力最弱, AaegOBP1 最强。分子对接显示, DEET 分子结合在 AsinOBP1 二聚体靠近交界面的结合口袋边缘, 结合口袋由  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  和  $\alpha 6$  上的氨基酸残基 Leu-92, Leu-95, His-96, Leu-99, Ala-107, Met-108, Met-110, Gly-110, Cys-114, Leu-115, Trp-133, Met-108', Lys-112' 和 Leu-115' 组成。比较分析发现 3 个蛋白中与 DEET 甲基基团形成疏水性作用的氨基酸残基、与 DEET 羰基氧形成氢键的氨基酸残基是相同的, 但与 DEET 二乙基侧链形成疏水性作用的氨基酸残基中, 有一个位置存在差异, AaegOBP1 是 Leu, 而 AsinOBP1 和 CquiOBP1 是 Met 残基。Leu 的疏水性强于 Met, 可能是 AaegOBP1 与 DEET 的结合能力较强的原因之一。【结论】AsinOBP1 能够结合 DEET, 不同蚊虫气味结合蛋白 1 与 DEET 的亲合力存在差异, 进一步探索这些差异形成的原因对于阐明气味结合蛋白与 DEET 互作的模式具有重要的参考价值。

**关键词:** 中华按蚊; 气味结合蛋白; 避蚊胺; 荧光竞争结合实验; 分子对接

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2018)01-0139-10

## Binding characteristics of the odorant binding protein AsinOBP1 of *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) with the mosquito repellent DEET

SHI Zong-Pan, RAN Yong-Hong, ZHANG Jing-Jing, ZHANG Jing, YAN Zhen-Tian, CHEN Bin, HE Zheng-Bo\* (Chongqing Key Laboratory of Vector Insects, Institute of Entomology and Molecular Biology, Chongqing Normal University, Chongqing 400047, China)

**Abstract:** 【Aim】 To study the binding characteristics of the odorant binding protein AsinOBP1 from *Anopheles sinensis* with the mosquito repellent N, N-diethyl-*m*-toluamide (DEET) in comparison with *Aedes aegypti* OBP1 (AaegOBP1) and *Culex quinquefasciatus* OBP1 (CquiOBP1), and to identify the key residues responsible for the binding to DEET by OBPs from different mosquito species. 【Methods】

基金项目: 国家自然科学基金项目(31572332); 重庆市教委科学技术研究项目(KJ1400507); 重庆市优秀人才支持计划; “两江学者”计划专项经费资助项目

作者简介: 史宗畔, 女, 1993年生, 重庆奉节人, 硕士研究生, 研究方向为生化与分子生物学, E-mail: 793604725@qq.com

\* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhengbohe@cqnu.edu.cn

收稿日期 Received: 2017-05-15; 接受日期 Accepted: 2017-08-03

The recombinant protein AsinOBP1 was expressed using a prokaryotic expression system and then purified. The DEET binding properties of AsinOBP1 were evaluated by fluorescence competitive binding assays using N-phenyl-1-naphthylamine (1-NPN) as the fluorescence probe. The binding affinities of AsinOBP1, AaegOBP1 and CquiOBP1 to DEET were compared, and the key residues responsible for this binding were identified using molecular docking. 【Results】 AsinOBP1 was able to bind to DEET, with a dissociation constant of 29.55  $\mu\text{mol/L}$ . Under the same experimental conditions, CquiOBP1 and AaegOBP1 were also able to bind to DEET, with their dissociation constants of 17.15 and 12.81  $\mu\text{mol/L}$ , respectively. It was shown that AaegOBP1 had the strongest binding affinity to DEET, followed by CquiOBP1 and AsinOBP1. The molecular docking of AsinOBP1 revealed that one DEET molecule is bound to each subunit at a site located near the interface between the two monomers of AsinOBP1. The DEET binding pocket is formed by residues belonging to helices  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$  and  $\alpha_6$  (Leu-92, Leu-95, His-96, Leu-99, Ala-107, Met-108, Met-110, Gly-110, Cys-114, Leu-115, Trp-133, Met-108', Lys-112' and Leu-115'). The residues interacting with the tolyl group and ketonic oxygen of DEET are identical in the three recombinant proteins. However, among the five key residues interacting with the diethyl group of DEET, one residue is different: in AaegOBP1 the residue is Leu, whereas in CquiOBP1 and AsinOBP1 it is Met. Given that the residue Leu is more hydrophobic than Met, it was speculated that this might contribute to a higher affinity of AaegOBP1 to DEET. 【Conclusion】 AsinOBP1, AaegOBP1 and CquiOBP1 are all able to bind to DEET, but differ in affinity. Further study should be focused on the causes of their difference in affinity so as to better understand the mechanisms by which OBPs bind to DEET.

**Key words:** *Anopheles sinensis*; odorant binding protein; DEET; fluorescence competitive binding assay; molecular docking

蚊虫是一类对人类威胁最大的媒介昆虫,不仅叮咬骚扰人类,而且传播多种传染性疾病,危害人类健康,如疟疾、黄热病、登革热、乙型脑炎、西尼罗病毒病、丝虫病等。其中由按蚊传播的疟疾对人类健康威胁最大,全世界约有半数人口处于罹患疟疾的危险之中,如2015年就有2.12亿人口感染疟疾,导致42.9万人死亡,其中不满5岁的儿童就占70.63% (WHO, 2016)。由于缺乏有效的疟疾疫苗,抗击疟疾主要依赖于杀虫剂和驱避剂,减少蚊虫与人类宿主之间的接触,以切断疟疾传播途径 (WHO, 2005)。拟除虫菊酯类杀虫剂因其高效、低毒的特点,是WHO批准用于蚊虫等卫生害虫防治、市场占有率最高的一类农药 (WHO, 2005)。而应用最广泛的驱避剂是1946年美国农业部开发的避蚊胺(N,N-二乙基间甲基苯甲酰胺, DEET)。DEET对蚊虫不仅具有驱避作用,还具有一定的杀虫活性 (Xue *et al.*, 2003; DeGennaro, 2015)。

早期研究发现,DEET能抑制蚊虫对乳酸、1-辛烯-3-醇等人体汗液主要成分的电生理反应,掩盖或封闭蚊虫的嗅觉系统 (Dogan *et al.*, 1999; Ditzen *et al.*, 2008)。但后来的研究发现DEET直接作用于

蚊虫的嗅觉神经元,产生驱避作用,并不抑制蚊虫对乳酸、CO<sub>2</sub>和1-辛烯-3-醇等化学物质的感知 (Syed and Leal, 2008)。蚊虫的嗅觉系统包含多种与嗅觉相关的功能蛋白,如气味结合蛋白 (odorant binding proteins, OBPs)、化学感受蛋白 (chemosensory proteins, CSPs)、嗅觉受体 (olfactory receptors, ORs)、亲离子受体 (ionotropic receptors, IRs)、感觉神经元膜蛋白 (sensory neuron membrane proteins, SNMPs) 和气味分子降解酶 (odorant degrading enzymes, ODEs) 等 (Liu *et al.*, 2012; Leal, 2013)。

OBP与化学分子的结合是昆虫专一性识别外界化学物质的第一步生化反应 (Vogt and Riddiford, 1981; Engsontia *et al.*, 2014),选择性地结合化学分子,运送穿过亲水性淋巴液,传递给嗅觉神经元膜上的OR,引起OR构象变化,进而引起离子通道开放形成动作电位 (Carey *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; Leal, 2013)。冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* OBP1 (AgamOBP1) 和埃及伊蚊 *Aedes aegypti* OBP1 (AaegOBP1) 能够结合DEET (Tsitsanou *et al.*, 2012; Leal and Leal, 2014)。通过解析AgamOBP1与DEET复合体的晶体结构,发现结合DEET的疏

水性口袋由第 4, 5 和 6 个  $\alpha$  螺旋上的 Leu73, Leu76, His77, Leu80, Ala88, Met89, Met91, Gly92, Gly93, Arg94, Leu96 和 Trp114 等氨基酸残基组成 (Tsitsanou *et al.*, 2012)。除此之外, AgamOBP1 还能与 6-甲基-5-庚烯-2-酮 (6-methyl-5-hepten-2-one, 6-MH) 和 Icaridin [butan-2-yl 2-(2-hydroxyethyl) piperidine-1-carboxylate] 等驱避剂结合 (Murphy *et al.*, 2013; Drakou *et al.*, 2017)。进一步研究发现, 蚊虫特异性的 OR 和 OR 共受体 (OR co-receptor, Orco) 形成的异源二聚体是 DEET 作用的靶标 (Ditzen *et al.*, 2008; Pellegrino *et al.*, 2011; DeGennaro *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2014)。

中华按蚊是我国最重要的间日疟原虫 *Plasmodium vivax* 的传播媒介 (Ree, 2005; Zhou *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2013)。通过基因组筛选鉴定, 共得到 64 个中华按蚊气味结合蛋白基因 (He *et al.*, 2016)。其中, AsinOBP1 在嗅觉器官中特异性表达, 且在吸食血液后表达水平显著下降, 推测其在中华按蚊嗅觉系统中起着重要作用 (秦赠等, 2014)。AsinOBP1, AaegOBP1 和 AgamOBP1 是直系同源基因, 而且 AsinOBP1 和 AgamOBP1 的三维结构极为相似 (秦赠等, 2014)。推测 AsinOBP1 也能结合 DEET, 但尚需实验支持。本研究通过原核表达和结合特性分析, 研究了 AsinOBP1 与 DEET 的结合能力; 并通过结合能力测定和分子对接, 比较分析了 AsinOBP1, AaegOBP1 和致倦库蚊 OBP1 (CquiOBP1) 结合能力的差异及其差异产生的分子基础。研究结果有助于深入理解 DEET 作用的机制, 为以 OBP 结构为基础的新型驱避剂筛选提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

Gel Extraction Kit (100) 购于 OMEGA, Ex Taq 酶, pMD-19T Vector 试剂盒, 内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 购于大连宝生物, pET28a-SUMO 载体为本实验室保存, 荧光探针 N-苯基-1-萘胺 (N-phenyl-1-naphthylamine, 1-NPN)、避蚊胺 (N, N-diethyl-*m*-toluamide, DEET) 购于 Sigma-Aldrich 公司, 其他均为国产分析纯试剂。

### 1.2 原核表达载体的构建

中华按蚊气味结合蛋白 AsinOBP1 序列 (GenBank 登录号: AIR09579) 为本实验室鉴定克隆

(秦赠等, 2014; He *et al.*, 2016)。根据基因的序列, 去除信号肽编码序列后, 在 5' 端和 3' 端添加 *Bam*H I 和 *Hind* III 限制性内切酶位点。设计好的基因序列委托苏州省心生物技术有限公司进行全基因合成。将合成的基因克隆到 pMD-19T 载体, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 测序验证。

提取克隆有 *AsinOBP1* 基因的质粒, 用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后切胶回收, 将该酶切片段与经过同样双酶切后的表达载体 pET28a-SUMO 连接。将连接产物转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞后, 提取质粒进行酶切鉴定阳性克隆, 将阳性克隆转化到 Rosetta 感受态细胞中, 测序验证。将序列正确的表达菌株保存于  $-80^{\circ}\text{C}$ 。

埃及伊蚊 *AaegOBP1* (GenBank 登录号: AY189223) 和致倦库蚊 *CquiOBP1* (GenBank 登录号: XP\_001848926) 基因序列从 NCBI 下载。*AaegOBP1* 和 *CquiOBP1* 原核表达载体的构建方法同 *AsinOBP1* 基因。

### 1.3 重组蛋白的诱导表达和纯化

将 *AsinOBP1* 表达菌株接入含有卡拉霉素的 3 mL LB 培养基中,  $37^{\circ}\text{C}$  200 r/min 过夜培养。取 30  $\mu\text{L}$  过夜培养的菌液加入到含有卡拉霉素的 5 mL LB 培养基中,  $37^{\circ}\text{C}$  200 r/min 培养过夜, 次日按 1:100 (v/v) 的比例转接到新鲜的液体 LB 培养基中,  $37^{\circ}\text{C}$  200 r/min 培养至 OD 值为 0.6, 加入 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L,  $37^{\circ}\text{C}$  200 r/min 培养 3 h。

诱导表达完成后, 合并菌液, 于 6 000 g 离心 10 min 收集菌体。用 60 mL 预冷的 NTA-0 缓冲液重悬菌体, 超声波破碎菌体, 控制功率为 300 W, 超声 4 s, 暂停 4 s, 超声 99 次。20 000 g  $4^{\circ}\text{C}$  离心 30 min, 分别收集上清和沉淀, 用 40  $\mu\text{L}$  1  $\times$  SDS-PAGE 上样缓冲液重悬, 沸水浴 5 min 后, 取 10  $\mu\text{L}$  进行蛋白电泳检测, 确定目标蛋白的表达形式, 若以包涵体形式表达, 则进行包涵体的洗涤、变性及复性处理。

将 Ni-NTA 树脂装入层析柱, 用 10 倍柱床体积的 NTA-0 Buffer 冲洗。将上清液加到层析柱中, 流速 0.5 mL/min, 收集穿柱部分。层析柱用 10 倍柱床体积的 NTA-0 Buffer 冲洗, 流速 1 mL/min。冲洗后, 用 10 倍柱床体积的 NTA-20, NTA-60, NTA-200 和 NTA-500 Buffer 洗脱, 流速 1 mL/min, 收集各洗脱峰, SDS-PAGE 电泳检测。根据电泳结果, 将 NTA-200 和 NTA-500 洗脱液混合, 按比例加 SUMO 酶柱外酶切, PBS 透析后, 重新上柱, 穿柱液即为目的蛋白, 用脱盐柱后再用超滤管浓缩, 浓缩后测定浓

度,并分装保存。

重组 AaegOBP1 和 CquiOBP1 蛋白的纯化方法同上。

#### 1.4 1-NPN 蓝移现象的观察

1-NPN 蓝移现象的观察参照谷少华等 (2010) 方法并稍加改进。用 1 cm 的四通石英玻璃比色皿在 F-2500 荧光分光光度计 (日本日立) 上进行,狭缝宽度为 10 nm。将切除蛋白标签的重组蛋白浓度调整为 1 mg/mL,荧光探针 1-NPN 溶于甲醇,终浓度为 1 mmol/L。在石英杯中加入 50 mmol/L Tris 缓冲液 (pH 7.4),激发光波长为 337 nm,于 390 ~ 530 nm 处扫描并记录荧光强度值;加入 1-NPN,使其终浓度为 5  $\mu$ mol/L,扫描并记录 1-NPN 产生的荧光强度值;然后在上述相同条件下加入 AsinOBP1,使其终浓度也为 5  $\mu$ mol/L,再次扫描并记录荧光强度值。按照相同的方法分别测定 1-NPN 与 AaegOBP1 和 CquiOBP1 蛋白的蓝移现象。

#### 1.5 内荧光及荧光共振能量转移效应的测定

由于 AsinOBP1, AaegOBP1 和 CquiOBP1 蛋白各有两个色氨酸,会产生内荧光。参数设置同 1.4 节。在石英杯中加入 50 mmol/L Tris 缓冲液 (pH 7.4),再加入纯化的 AsinOBP1 蛋白至终浓度为 2  $\mu$ mol/L,激发光波长设为 295 nm,在 310 ~ 455 nm 处记录 AsinOBP1 蛋白产生的内荧光。在上述条件下加入荧光探针 1-NPN 至终浓度为 10, 20, 30, 50 和 70  $\mu$ mol/L,分别记录此时蛋白内荧光的猝灭及荧光共振能量转移效应情况。按照相同的方法分别测定 AaegOBP1 和 CquiOBP1 蛋白的内荧光及其荧光共振能量转移效应。

#### 1.6 重组蛋白与 DEET 的结合实验

采用荧光竞争结合试验研究 OBP1 与 DEET 的结合能力。参数设置同 1.4 节。选取 1-NPN 作为 OBP1 结合特性研究时的竞争性荧光探针。用甲醇将 1-NPN 配制成终浓度为 1 mmol/L 的溶液。测定 1-NPN 和目的蛋白的结合常数时,在比色皿中加入 50 mmol/L Tris 缓冲液 (pH 7.4),然后加入目的蛋白,使其终浓度为 2  $\mu$ mol/L,激发光波长为 337 nm,待荧光稳定后,于 390 ~ 590 nm 处扫描并记录 1-NPN 产生的最大荧光强度值。然后顺序向比色皿中加入溶于甲醇的荧光探针 1-NPN,使加入的 1-NPN 浓度从 2  $\mu$ mol/L 递增到 16  $\mu$ mol/L。每次加入 1-NPN 后,混匀反应 2 min,于 390 ~ 590 nm 处扫描并记录 1-NPN 产生的最大荧光强度值。重复 3 次。

测定 AsinOBP1, AaegOBP1 和 CquiOBP1 与

DEET 的结合能力时,设置荧光分光光度计激发波长为 337 nm,扫描发射波长为 390 ~ 530 nm。荧光比色皿中加入 50 mmol/L Tris 缓冲液 (pH 7.4),再加入 1-NPN 和目的蛋白,终浓度均为 2  $\mu$ mol/L,静置 2min 使其充分反应,测定荧光强度,然后将溶于甲醇的 DEET 样品 (1 mmol/L) 逐次加入到荧光比色皿中,浓度从 5 (100  $\mu$ mol/L 递增,记录荧光强度的变化情况。重复 3 次。

假设目的蛋白的活性为 100% 且为饱和状态,与气味分子的结合比为 1:1,根据  $IC_{50}$  值 (为竞争配基能替换 50% 的 1-NPN 时的浓度),计算配基气味分子和目的蛋白的结合常数。公式如下:  $K_i = [IC_{50}] / (1 + [1-NPN] / K_{1-NPN})$ ,其中  $[1-NPN]$  为未结合的 1-NPN 的浓度,  $K_{1-NPN}$  为目的蛋白/1-NPN 复合物的结合常数。

#### 1.7 同源建模与模型分析

AsinOBP1 与 AgamOBP1 的氨基酸序列一致性为 93%,根据 AgamOBP1 (PDB: 3N7H) 已知的三维结构,使用在线同源建模服务器 Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>) 对 AsinOBP1 进行同源建模 (Biasini *et al.*, 2014)。验证所建模型立体化学性质的合理性用 Procheck 程序 (Laskowski *et al.*, 1993);对所建的结构中的氨基酸序列的相容性评估用 Verify-3D 程序;三维构象的显示和分析用 PDBview 程序。AaegOBP1 (PDB: 3K1E) 和 CquiOBP1 (PDB: 30GN) 的三维结构从 Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) 下载得到。

#### 1.8 分子对接

利用 ChemBioDraw Ultra 12.0 绘制化合物 DEET 的结构,然后用 ChemBio3D Ultra 12.0 转化为三维结构,并使用 MMFF94 力场进行优化。蛋白和 DEET 均使用 AutodockTools 1.5.6 转化为 PDBQT 格式 (Sanner, 1999; Trott and Olson, 2010)。采用 Autodock vina 1.1.2 进行分子对接研究 (Morris *et al.*, 2009)。AsinOBP1, AaegOBP1 和 CquiOBP1 蛋白的 1A 的坐标设置为:center\_x = 16.055, center\_y = 33.976, center\_z = 20.859; size\_x = 8, size\_y = 8, size\_z = 8; 2A 位点的坐标设置为:center\_x = 11.459, center\_y = 43.825, center\_z = 22.465; size\_x = 8, size\_y = 8, size\_z = 8; 1B 位点的坐标设置为:center\_x = 20.179, center\_y = 25.813, center\_z = 18.422; size\_x = 8, size\_y = 8, size\_z = 8; 2B 位点的坐标设置为:center\_x = 25.234, center\_y = 16.859, center\_z = 14.237; size\_x = 8, size\_y = 8, size\_z = 8。为了增加

计算的准确度,将参数 exhaustiveness 设置为 20。除了特别说明,其他参数均采用默认值。最后,选取分值最高的构象用 PyMol 1.7.6 (<http://www.pymol.org/>) 进行结果分析。

## 2 结果

### 2.1 AsinOBP1 蛋白的表达与纯化

用 IPTG 诱导表达后,收集菌体进行超声波破碎,SDS-PAGE 电泳分析表达产物,检测到特异性条带,与预期一致,但未诱导的菌体在相应位置没有表达。而且 SDS-PAGE 电泳显示重组 AsinOBP1 蛋白主要在上清中表达(图 1)。因此,使用 Ni-NTA 亲和层析柱纯化上清中的重组蛋白,并用 SUMO 酶切除重组蛋白 5' 端的  $6 \times \text{His}$  标签和 SUMO 标签。脱盐和浓缩后,测定重组 AsinOBP1 蛋白的浓度,用 50 mmol/L Tris 缓冲液 (pH7.4) 将浓度调整为 1.0 mg/mL,分装后低温保存用于结合特性实验。AaegOBP1 和 CquiOBP1 的原核表达载体构建、诱导表达条件优化和纯化与 AsinOBP1 一样。电泳检测显示 AaegOBP1 和 CquiOBP1 也主要是在上清中表达,纯化并切除标签后得到单一的条带(数据未提供)。

### 2.2 AsinOBP1, AaegOBP1 和 CquiOBP1 蛋白与 1-NPN 的结合特性

Tris 缓冲溶液在 337 nm 处激发时,无荧光产生,而 1-NPN 在 464 nm 处产生微弱的荧光值,当加入 AsinOBP1, AaegOBP1 和 CquiOBP1 蛋白后,1-NPN 均在 412 nm 处产生最大荧光值,荧光值的强度分别增加了 4.25, 7.82 和 7.21 倍(图 2: A-C)。证实 1-NPN 与 AsinOBP1, AaegOBP1 和 CquiOBP1 蛋白结合发生了蓝移现象。

### 2.3 内荧光的淬灭与荧光共振能量转移效应的产生

AsinOBP1 蛋白的第 6 个  $\alpha$  螺旋上有 2 个色氨酸,位于第 128 和 133 位。在无 1-NPN 的情况下,AsinOBP1 蛋白在 295 nm 处激发时,于 338 nm 处产生最大内荧光值(图 2: D)。加入 1-NPN 后,338 nm 处的内荧光发生淬灭,但在 410 nm 处形成一个新的发射峰,产生了荧光共振能量转移效应;随着 1-NPN 浓度增加,内荧光强度减弱,410 nm 处的发射峰值不断增强。说明 AsinOBP1 蛋白中的这两个色氨酸或其中一个位于结合口袋的核心区域。

AaegOBP1 和 CquiOBP1 蛋白的第 6 个  $\alpha$  螺旋上也各有 2 个色氨酸,分别位于第 127 和 132 位及第 133 和 138 位。在相同测定条件下,AaegOBP1 和 CquiOBP1 蛋白于 338 nm 处产生最大内荧光值(图 2: E, F)。与 AsinOBP1 蛋白一样,加入 1-NPN 后,AaegOBP1 和 CquiOBP1 蛋白的内荧光减弱,在 410 nm 处形成一个新的发射峰。说明 AaegOBP1 和 CquiOBP1 蛋白中的色氨酸也位于结合口袋的核心区域。

### 2.4 AsinOBP1, AaegOBP1 和 CquiOBP1 蛋白与 DEET 的结合

AsinOBP1 蛋白与 1-NPN 的结合曲线见图 3 (A)。由图可见,随着 1-NPN 浓度的增加,荧光强度逐渐加强,当 1-NPN 的浓度达到 14 ~ 16  $\mu\text{mol/L}$  时,荧光值不再增加,表明 1-NPN 和目的蛋白结合达到饱和。AsinOBP1 蛋白与 1-NPN 结合的相关系数为 0.9940,通过 Scatchard 方程计算出 AsinOBP1/1-NPN 复合物的解离常数为 2.124  $\mu\text{mol/L}$ 。采用荧光竞争结合实验测定了 AsinOBP1 与 DEET 的结合能力。结果显示,DEET 能将目的蛋白与 1-NPN 的相对荧光值竞争至 50% 以下,说明 AsinOBP1 蛋白能够结合 DEET。随着 DEET 浓度的增加,荧光强度逐渐减弱,当 DEET 的浓度超过 40  $\mu\text{mol/L}$  时,荧光值开始下降趋缓,表明目的蛋白和 DEET 结合逐渐达到饱和(图 3: D)。AsinOBP/DEET 的解离常数

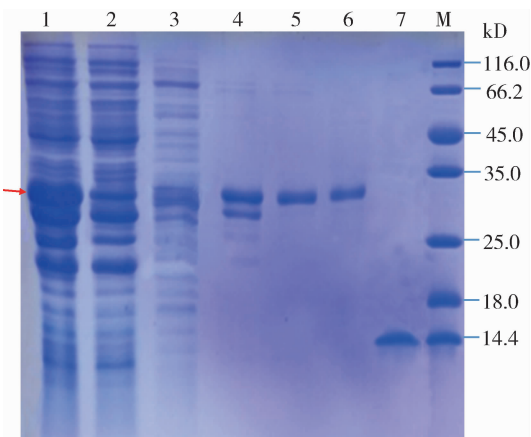


图 1 重组 AsinOBP1 蛋白的诱导表达和纯化

Fig. 1 Induced expression and purification of the recombinant AsinOBP1

M: 蛋白分子量标准 Protein molecular weight marker; 1: 上清中表达的重组 AsinOBP1 蛋白 Recombinant protein of AsinOBP1 in supernatant; 2: 包涵体中的重组 AsinOBP1 蛋白 Recombinant protein of AsinOBP1 in inclusion body; 3: 穿柱液 Flow-through fraction; 4: 用 NTA-60 缓冲溶液洗脱的重组 AsinOBP1 蛋白 Recombinant AsinOBP1 eluted by NTA-60 buffer; 5: 用 NTA-200 缓冲溶液洗脱的重组 AsinOBP1 蛋白 Recombinant AsinOBP1 eluted by NTA-200 buffer; 6: 用 NTA-500 缓冲溶液洗脱的重组 AsinOBP1 蛋白 Recombinant AsinOBP1 eluted by NTA-500 buffer; 7: 用 SUMO 酶切除 SUMO 标签后的 AsinOBP1 目标蛋白 The target protein AsinOBP1 with the SUMO tag removed. 箭头示目标蛋白 Arrow indicates the target protein.

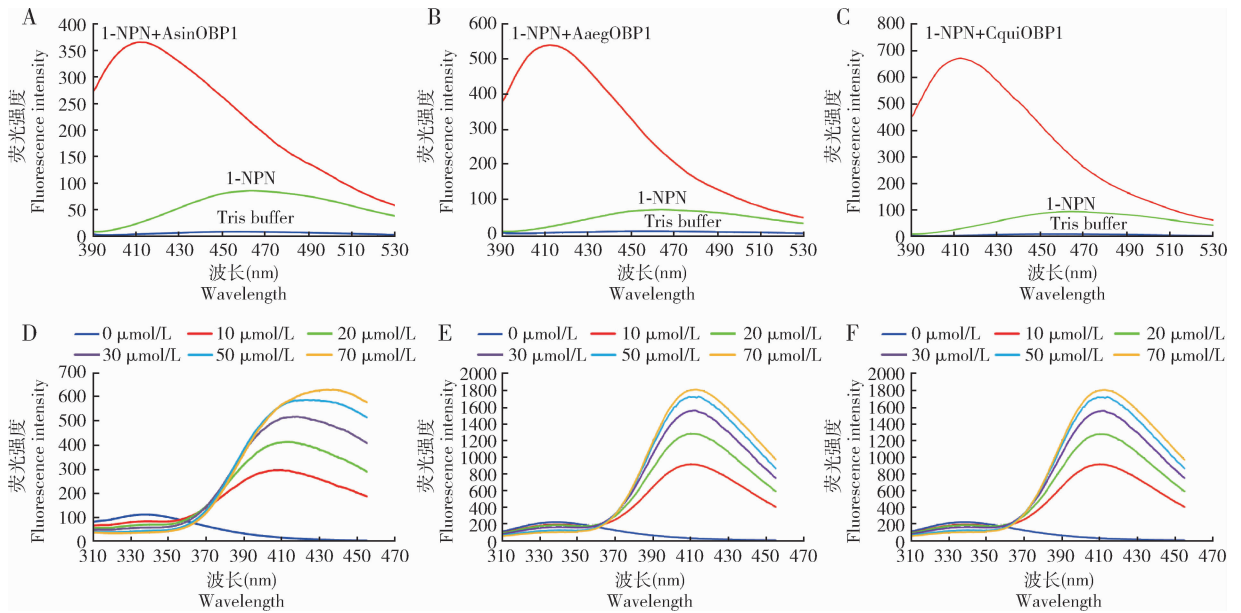


图2 AsinOBP1, AaegOBP1 和 CquiOBP1 蛋白与 1-NPN 的结合特性

Fig. 2 Binding characteristics of 1-NPN with recombinant AsinOBP1, AaegOBP1 and CquiOBP1 proteins

A: 1-NPN 结合 AsinOBP1 后蓝移现象及荧光强度的增加 Blue shift occurred and fluorescence intensity increased after the binding of 1-NPN with AsinOBP1 protein; B: 1-NPN 结合 AaegOBP1 后蓝移现象及荧光强度的增加 Blue shift occurred and fluorescence intensity increased after the binding of 1-NPN with AaegOBP1 protein; C: 1-NPN 结合 CquiOBP1 后蓝移现象及荧光强度的增加 Blue shift occurred and fluorescence intensity increased after the binding of 1-NPN with CquiOBP1 protein; D: AsinOBP1 内荧光的测定及淬灭 Measurement and quenching of intrinsic fluorescence of AsinOBP1; E: AaegOBP1 的测定及淬灭 Measurement and quenching of intrinsic fluorescence of AaegOBP1; F: CquiOBP1 的测定及淬灭 Measurement and quenching of intrinsic fluorescence of CquiOBP1.

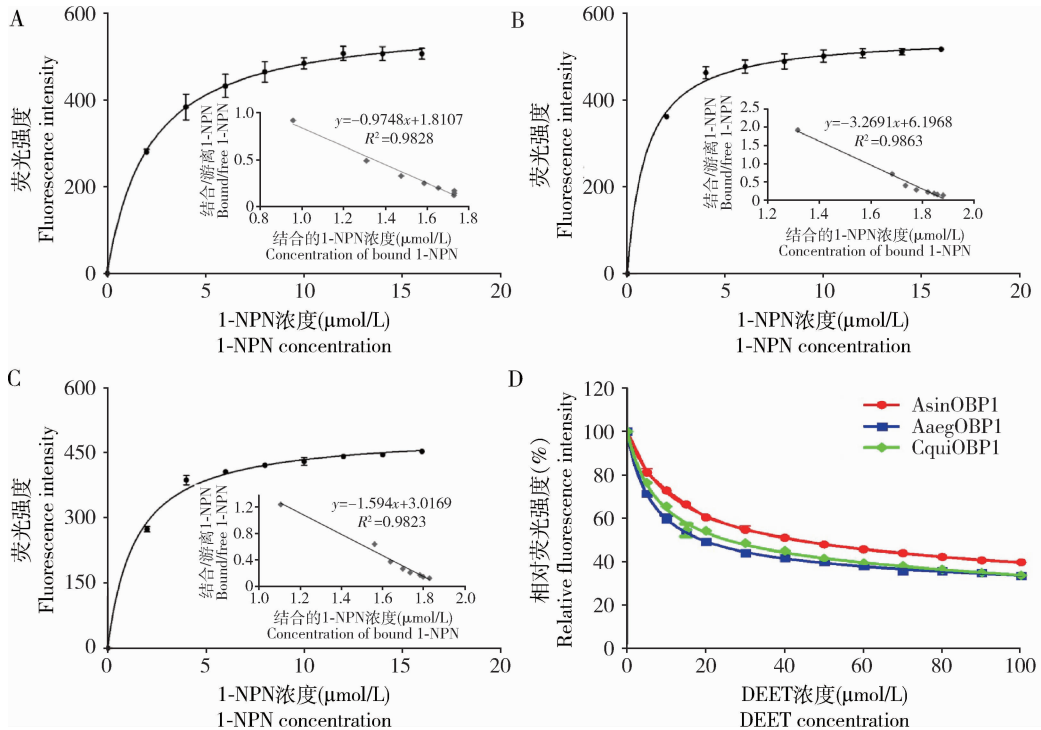


图3 AsinOBP1, AaegOBP1 和 CquiOBP1 蛋白与 1-NPN 和 DEET 结合曲线

Fig. 3 Binding curves of 1-NPN with AsinOBP1, AaegOBP1 and CquiOBP1 proteins

A: 1-NPN 和 AsinOBP1 蛋白的结合曲线及 Scatchard 方程 The binding curve of 1-NPN with AsinOBP1 and the Scatchard plot of 1-NPN with AsinOBP1; B: 1-NPN 和 AaegOBP1 蛋白的结合曲线及 Scatchard 方程 The binding curve of 1-NPN with AaegOBP1 and the Scatchard plot of 1-NPN with AaegOBP1; C: 1-NPN 和 CquiOBP1 蛋白的结合曲线及 Scatchard 方程 The binding curve of 1-NPN with CquiOBP1 and the Scatchard plot of 1-NPN with CquiOBP1; D: DEET 与重组 AsinOBP1, AaegOBP1 和 CquiOBP1 蛋白的竞争性结合曲线 Competitive binding curves of DEET with the complex of 1-NPN and AsinOBP1, AaegOBP1 and CquiOBP1 proteins.



为 29.55  $\mu\text{mol/L}$ 。

AeagOBP1 和 CquiOBP1 蛋白与 1-NPN 的结合曲线见图 3(B,C)。AeagOBP1 和 CquiOBP1 与 1-NPN 结合的相关系数分别为 0.9855 和 0.9927, AeagOBP1/1-NPN 和 CquiOBP1/1-NPN 复合物的解离常数分别为 0.948 和 1.423  $\mu\text{mol/L}$ 。通过竞争结合实验测定证实 AeagOBP1 和 CquiOBP1 蛋白也与 DEET 结合(图 3: D), 解离常数分别为 12.81 和 17.15  $\mu\text{mol/L}$ 。与 AeagOBP1 和 CquiOBP1 相比, AsinOBP1 结合 DEET 的能力最弱, AeagOBP1 最强。

## 2.5 AsinOBP1 与 DEET 的分子对接

AsinOBP1 与 AgamOBP1, AeagOBP1 和 CquiOBP1 的氨基酸序列一致性分别为 93%, 80% 和 86%, 具有昆虫普通气味结合蛋白的典型结构特点, 包括 6 个  $\alpha$  螺旋和 6 个保守的半胱氨酸。根据 AgamOBP1 · DEET 复合体的三维结构 (PDB: 3N7H), 对 AsinOBP1 进行同源建模, 得到 AsinOBP1 的二聚体三维结构模型(图 4: A)。将 DEET 对接

至 AsinOBP1, DEET 以形状高度互补的方式结合在靠近二聚体交界面的结合口袋边缘, 二聚体的两个结合位点(1A 和 1B)呈现出相同的结合模式(图 4: B)。DEET 的结合口袋由  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  和  $\alpha 6$  上的氨基酸残基 Leu-92, Leu-95, His-96, Leu-99, Ala-107, Met-108, Met-110, Gly-110, Cys-114, Leu-115, Trp-133, Met-108', Lys-112' 和 Leu-115' 组成(上撇号指这些氨基酸残基来自二聚体中的另一个单体)(图 4: A, B)。在 1A 位点, DEET 的甲苯基团处于由  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  和  $\alpha 6$  上的氨基酸残基 Leu-92, Leu-95, Leu-99, Ala-107, Met-110 和 Trp-133 所组成的疏水性区域中, DEET 的二乙基侧链则朝向二聚体的交界面, 与氨基酸 Leu-115, Met-108, Met-108', Lys-112' 和 Leu-115' 形成稳定的疏水性相互作用; DEET 的羰基氧与一个保守的结构水分子形成氢键, 并进一步与氨基酸 Gly-111, Cys-114 和 Trp-133 形成三重氢键网络(图 4: B)。DEET 与 AsinOBP1 在疏水作用和氢键等的相互作用下形成稳定的复合物。

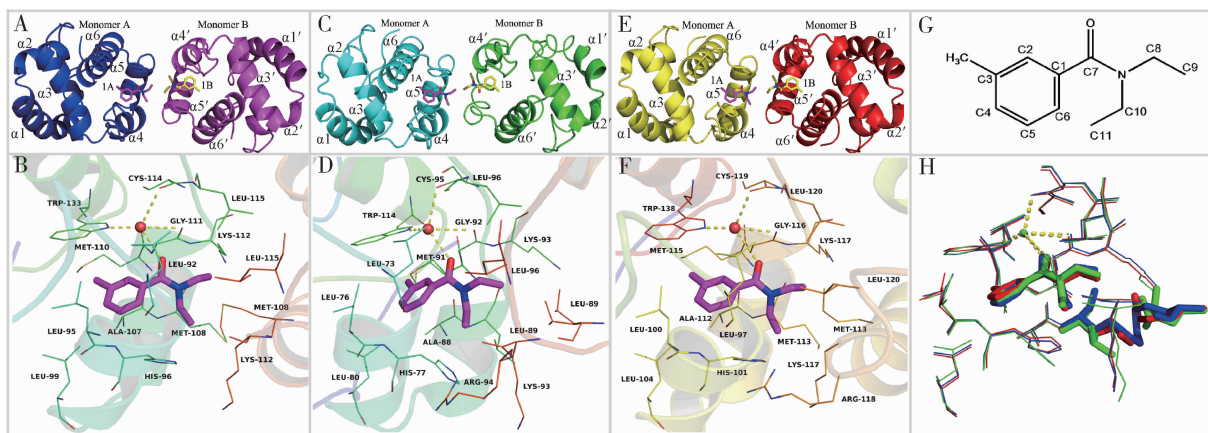


图 4 AsinOBP1, AeagOBP1 和 CquiOBP1 蛋白与 DEET 的分子对接模型

Fig. 4 Molecular docking of AsinOBP1, AeagOBP1 and CquiOBP1 dimers with DEET

A: DEET 对接至 AsinOBP1 的结合口袋 DEET was docked into the binding pocket of AsinOBP1; B: DEET 对接至 AsinOBP1 的 1A 位点 DEET was docked into the 1A binding pocket of AsinOBP1; C: DEET 对接至 AeagOBP1 的活性口袋 DEET was docked into the binding pocket of AeagOBP1; D: DEET 对接至 AeagOBP1 的 1A 位点 DEET was docked into the 1A binding pocket of AeagOBP1; E: DEET 对接至 CquiOBP1 的活性口袋 DEET was docked into the binding pocket of CquiOBP1; F: DEET 对接至 CquiOBP1 的 1A 位点 DEET was docked into the 1A binding pocket of CquiOBP1; G: DEET 的化学结构 The chemical structure of N,N-diethyl-m-toluamide (DEET); H: DEET 在 AsinOBP1 (蓝色)、AeagOBP1 (绿色) 和 CquiOBP1 (红色) 1A 位点的叠合图 The overlay map of DEET docked into the 1A binding pocket of AeagOBP1 (green), CquiOBP1 (red) and AsinOBP1 (blue). 红色球表示水分子, 虚线表示氢键 Red ball represents the water molecular, and hydrogen bonds are shown as dashed lines.

## 2.6 AsinOBP1, AeagOBP1 和 CquiOBP1 蛋白与 DEET 结合的比较分析

根据 AgamOBP1 · DEET 复合体的三维结构 (PDB: 3N7H), 对 AeagOBP1 和 CquiOBP1 进行同源建模, 得到 AeagOBP1 和 CquiOBP1 的二聚体三维结构模型(图 4: C, E)。将 DEET 对接到 AeagOBP1

和 CquiOBP1 的结合口袋。结果发现, DEET 与 AeagOBP1 和 CquiOBP1 的结合模式与 AsinOBP1 一样。3 个蛋白的空间结构及与 DEET 结合的模式呈现出高度的保守性(图 4: H)。比较分析发现, DEET 的甲苯基团、羰基氧与 AsinOBP1, AeagOBP1 和 CquiOBP1 互作的氨基酸残基完全相同, 但 DEET

的二乙基侧链与 AsinOBP1, AegOBP1 和 CquiOBP1 互作的氨基酸残基呈现差异, AegOBP1 结合 DEET 二乙基侧链的疏水性口袋是由 Leu-96, Leu-89, Met-91', Lys-93' 和 Leu-96' 组成, 而蛋白 CquiOBP1 相对应的位点则为 Leu-120, Met-113, Met-113', Lys-117' 和 Leu-120', AsinOBP1 为 Leu-115, Met-108, Met-108', Lys-112' 和 Leu-115' (图 4: B, D, F)。与 DEET 二乙基侧链形成疏水性作用的氨基酸残基中, 有一个位置存在差异, AegOBP1 是 Leu-89, 而 AsinOBP1 对应位置是 Met-108, CquiOBP1 是 Met-113。计算结果显示, DEET 与 AegOBP1, CquiOBP1 和 AsinOBP1 蛋白的结合能分别为  $-6.5$ ,  $-6.1$  和  $-5.8$  kcal/mol。与荧光竞争性结合能力测定的结果一致。

### 3 讨论

中华按蚊、微小按蚊 *Anopheles minimus*, 雷氏按蚊 *Anopheles lesteri* 和大劣按蚊 *Anopheles dirus* 是我国疟疾传播的主要媒介, 其中中华按蚊分布面积广、种群大, 是我国最重要的间日疟原虫 *P. vivax* 传播媒介 (Ree, 2005; Zhou *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2014)。DEET 是应用最为广泛的蚊虫驱避剂, 能够作用于蚊虫的嗅觉系统而产生驱避作用 (Syed and Leal, 2008)。冈比亚按蚊 AgamOBP1 和埃及伊蚊 AegOBP1 能够结合 DEET (Tsitsanou *et al.*, 2012; Leal and Leal, 2014), 并将 DEET 传递给下游特异的 OR/Orco 异源二聚体, 进而引起嗅觉反应 (Ditzen *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2014)。中华按蚊 AsinOBP1 与 AgamOBP1、AegOBP1 等不同蚊虫的 OBP1 比较分析, 不仅具有较高的同源性, 还具有相似的三维结构 (秦贻等, 2014), 推测 AsinOBP1 也能结合 DEET。我们通过原核表达、纯化和荧光竞争结合实验, 证实 AsinOBP1 确实能够结合 DEET (图 3: D), 说明 DEET 也能作用于中华按蚊的嗅觉系统。在相同的实验条件下, 我们还测定了 AegOBP1 和 CquiOBP1 与 DEET 的结合特性, 发现 AegOBP1 和 CquiOBP1 都能够结合 DEET (图 3: D), 说明 DEET 作用于不同蚊虫嗅觉系统的机制是相同的。

在测定的 3 个蛋白中, AsinOBP1 和 CquiOBP1 均为首次实验证实能够结合 DEET。3 个蛋白的原核表达方式和荧光竞争结合实验的条件完全一样, 使得研究结果具有可比性。AsinOBP1, AegOBP1

和 CquiOBP1 与 DEET 的解离常数分别为 29.55, 12.81 和 17.15  $\mu\text{mol/L}$ , 说明 AsinOBP1, CquiOBP1 和 AegOBP1 与 DEET 的亲合力不一样, AegOBP1 的结合能力最强, AsinOBP1 最弱。AgamOBP1 与 DEET 的解离常数为 31.3  $\mu\text{mol/L}$  (Tsitsanou *et al.*, 2012), 与 AsinOBP1 的解离常数非常接近, 说明两者与 DEET 的结合模式相似。Leal 和 Leal (2014) 测定了 1.5 ~ 10  $\mu\text{mol/L}$  DEET 对 AegOBP1/1-NPN 复合物荧光的淬灭作用, 发现 DEET 对荧光强度的降低作用不明显, 认为 AegOBP1 能够结合 DEET, 但结合能力太低以至于不能准确测定其解离常数。我们测定了 5 ~ 100  $\mu\text{mol/L}$  DEET 对 AegOBP1/1-NPN 复合物荧光的淬灭作用, 发现 20  $\mu\text{mol/L}$  DEET 即可将荧光强度降低到 50% 以下, 证实 AegOBP1 能有效结合 DEET, 解离常数为 12.81  $\mu\text{mol/L}$ 。

通过分子对接计算得到 AegOBP1, CquiOBP1 和 AsinOBP1 与 DEET 结合能分别为  $-6.5$ ,  $-6.1$  和  $-5.8$  kcal/mol, 进一步证实 3 个蛋白与 DEET 的亲合力不一样, 与荧光竞争结合实验测定的结果一致。亲和力的不同反映了氨基酸组成和空间结构的差异, 探索这些差异可以为深入分析这些蛋白与 DEET 互作的模式提供重要的参考价值。通过分子对接, 发现 DEET 的甲苯基团、羰基氧与 AsinOBP1, AegOBP1 和 CquiOBP1 互作的关键氨基酸残基完全一样 (图 4: B, D, F)。但是, AsinOBP1, AegOBP1 和 CquiOBP1 蛋白与 DEET 二乙基侧链互作的 5 个氨基酸残基中, 有一个氨基酸存在差异, AegOBP1 是 Leu, 而 AsinOBP1 和 CquiOBP1 相应位置是 Met (图 4: B, D, E)。Leu 的疏水性强于 Met, 可能是 AegOBP1 与 DEET 的结合能力最强的原因, 后续可以通过定点突变、原核表达和结合特性分析进一步研究和确证。然而, DEET 的甲苯基团、羰基氧和二乙基侧链与 AsinOBP1 和 CquiOBP1 结合的氨基酸残基完全相同, 但 AsinOBP1 和 CquiOBP1 与 DEET 结合的解离常数却相差较大, 说明仍然存在结合的差异未被认识, 有待进一步研究。

色氨酸在特定波长激发下能发射荧光。苜蓿盲蝽 AlinOBP3、家蚕 BmorGOBP2 和草地螟 LstiGOBP1 等气味结合蛋白的氨基酸序列中各有一个色氨酸, 在 16 ~ 20  $\mu\text{mol/L}$  的 1-NPN 终浓度下即可使其内荧光发生很好的淬灭效应, 说明色氨酸位于气味结合蛋白结合口袋的核心区域 (Zhou *et al.*, 2009; 谷少华等, 2010; 孙红岩等, 2011)。AsinOBP1, CquiOBP1 和 AegOBP1 蛋白分别有 2 个



色氨酸, 均位于第 6 个  $\alpha$  螺旋上, 50  $\mu\text{mol/L}$  的 1-NPN 才能使内荧光强度淬灭到 50% 以下, 说明 AsinOBP1, CquiOBP1 和 AaegOBP1 蛋白中的这两个色氨酸或其中一个位于结合口袋的核心区域。分子对接分析也证实 AsinOBP1 的 Trp-133, AaegOBP1 的 Trp-114 和 CquiOBP1 的 Trp-138 均位于 DEET 结合口袋中, 与 DEET 的甲苯基团形成疏水性作用, 并与 DEET 的羰基氧形成氢键(图 4)。但是本研究得到的分子对接数据和 AgamOBP1 · DEET 晶体结构解析(Tsitsanou *et al.*, 2012) 都未能证实另外一个色氨酸与 DEET 有互作。

昆虫能够检测的气味物质数量远远大于 OBP 的数量, 因此每个 OBP 能够特异性的识别一类结构相似的气味分子, 或者能够区分具有不同化学结构的化学信息素(Tsitsanou *et al.*, 2012)。AgamOBP1 不仅能结合 DEET, 还能结合 6-MH 和 Icaridin 等驱避剂(Tsitsanou *et al.*, 2012; Murphy *et al.*, 2013; Drakou *et al.*, 2017)。AaegOBP1 能结合 DEET 和蚊虫产卵信息素 MOP(mosquito oviposition pheromone)(Leal and Leal, 2014)。CquiOBP1 除能结合 DEET 和 MOP 外, 还能结合人体气味物质壬醛、驱避剂 picardin(Xu *et al.*, 2009; Mao *et al.*, 2010; Yin *et al.*, 2015)。AsinOBP1 与 AgamOBP1, AaegOBP1 和 CquiOBP1 具有较高序列相似性和三维结构, 推测 AsinOBP1 也有可能结合 6-MH, Icaridin 和 MOP 等多种气味物质, 也进一步说明 OBP1 是筛选新型驱避剂的理想靶标。

## 参考文献 (References)

- Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T, Kiefer F, Cassarino TG, Bertoni M, Bordoli L, Schwede T, 2014. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res.*, 42(W1): W252 – W258.
- Carey AF, Wang G, Su CY, Zwiebel LJ, Carlson JR, 2010. Odorant reception in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Nature*, 464(7285): 66 – 71.
- DeGennaro M, 2015. The mysterious multi-modal repellency of DEET. *Fly (Austin)*, 9(1): 45 – 51.
- DeGennaro M, McBride CS, Seeholzer L, Nakagawa T, Dennis EJ, Goldman C, Jasinskiene N, James AA, Vosshall LB, 2013. *orco* mutant mosquitoes lose strong preference for humans and are not repelled by volatile DEET. *Nature*, 498(7455): 487 – 491.
- Ditzen M, Pellegrino M, Vosshall LB, 2008. Insect odorant receptors are molecular targets of the insect repellent DEET. *Science*, 319(5871): 1838 – 1842.
- Dogan EB, Ayres JW, Rossignol PA, 1999. Behavioural mode of action of DEET: inhibition of lactic acid attraction. *Med. Vet. Entomol.*, 13(1): 97 – 100.
- Drakou CE, Tsitsanou KE, Potamitis C, Fessas D, Zervou M, Zographos SE, 2017. The crystal structure of the AgamOBP1 · Icaridin complex reveals alternative binding modes and stereo-selective repellent recognition. *Cell. Mol. Life Sci.*, 74(2): 319 – 338.
- Engsontia P, Sangket U, Chotigeat W, Satasook C, 2014. Molecular evolution of the odorant and gustatory receptor genes in lepidopteran insects: implications for their adaptation and speciation. *J. Mol. Evol.*, 79: 21e39.
- Gu SH, Sun Y, Ren LY, Zhang XY, Zhang YJ, Wu KM, Guo YY, 2010. Cloning, expression and binding specificity analysis of odorant binding protein 3 of the lucerne plant bug, *Adelphocoris lineolatus* (Goeze). *Chin. Sci. Bull.*, 55(27–28): 2690 – 2701. [谷少华, 孙洋, 任丽燕, 张雪莹, 张永军, 吴孔明, 郭予元, 2010. 苜蓿盲蝽气味结合蛋白 AlinOBP3 的克隆、表达及结合特性分析. 科学通报, 55(27–28): 2690 – 2701]
- He X, He ZB, Zhang YJ, Zhou Y, Xian PJ, Qiao L, Chen B, 2016. Genome-wide identification and characterization of odorant-binding protein (OBP) genes in the malaria vector *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae). *Insect Sci.*, 23(3): 366 – 376.
- Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM, 1993. PROCHECK – a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.*, 26: 283 – 291.
- Leal GM, Leal WS, 2014. Binding of a fluorescence reporter and a ligand to an odorant-binding protein of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Fl1000Res.*, 3: 305.
- Leal WS, 2013. Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annu. Rev. Entomol.*, 58: 373 – 391.
- Liu Y, Gu S, Zhang Y, Guo Y, Wang G, 2012. Candidate olfaction genes identified within the *Helicoverpa armigera* antennal transcriptome. *PLoS ONE*, 7(10): e48260.
- Mao Y, Xu XZ, Xu W, Ishida Y, Leal WS, Ames JB, Clardy J, 2010. Crystal and solution structures of an odorant-binding protein from the southern house mosquito complexed with an oviposition pheromone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(44): 19102 – 19107.
- Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ, 2009. AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.*, 30(16): 2785 – 2791.
- Murphy EJ, Booth JC, Davrazou F, Port AM, Jones DN, 2013. Interactions of *Anopheles gambiae* odorant-binding proteins with a human-derived repellent: implications for the mode of action of *N*, *N*-diethyl-3-methylbenzamide (DEET). *J. Biol. Chem.*, 288(6): 4475 – 4485.
- Pellegrino M, Steinbach N, Stensmyr MC, Hansson BS, Vosshall LB, 2011. A natural polymorphism alters odour and DEET sensitivity in an insect odorant receptor. *Nature*, 478(7370): 511 – 514.
- Qin Z, Ran YH, Zhi ZJ, Yan ZT, Zhang YJ, Huang T, He ZB, Chen B, 2014. Cloning and expression analysis of an odorant binding

- protein gene *AsinOBP1* from *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae). *Acta Entomol. Sin.*, 57 (11): 1289 – 1298. [秦赠, 冉永红, 支中婧, 闫振天, 张玉娟, 黄婷, 何正波, 陈斌, 2014. 中华按蚊气味结合蛋白基因 *AsinOBP1* 的克隆和表达分析. 昆虫学报, 57 (11): 1289 – 1298]
- Ree HI, 2005. Studies on *Anopheles sinensis*, the vector species of vivax malaria in Korea. *Korean J. Parasitol.*, 43(3): 75 – 92.
- Sanner MF, 1999. Python: a programming language for software integration and development. *J. Mol. Graph. Model.*, 17(1): 57 – 61.
- Sun HY, Yin J, Feng HL, Li KB, Xi JH, Cao YZ, 2011. Expression, purification and binding characteristics of general odorant binding protein I (GOBPI) from the meadow moth, *Loxostege sticticalia* (Linnaeus) (Lepidoptera: Pyralidae). *Acta Entomol. Sin.*, 54 (4): 381 – 389. [孙红岩, 尹姣, 冯红林, 李克斌, 席景会, 曹雅忠, 2011. 草地螟普通气味结合蛋白 I (Lsti-GOBPI) 蛋白表达纯化及结合特性分析. 昆虫学报, 54(4): 381 – 389]
- Syed Z, Leal WS, 2008. Mosquitoes smell and avoid the insect repellent DEET. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105(36): 13598 – 13603.
- Trott O, Olson AJ, 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.*, 31(2): 455 – 461.
- Tsitsanou KE, Thireou T, Drakou CE, Koussis K, Keramioti MV, Leonidas DD, Eliopoulos E, Iatrou K, Zographos SE, 2012. *Anopheles gambiae* odorant binding protein crystal complex with the synthetic repellent DEET: implications for structure-based design of novel mosquito repellents. *Cell. Mol. Life Sci.*, 69(2): 283 – 297.
- Vogt RG, Riddiford LM, 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 293(5828): 161 – 163.
- Wang G, Carey AF, Carlson JR, Zwiebel LJ, 2010. Molecular basis of odor coding in the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(9): 4418 – 4423.
- WHO, 2005. Malaria control today: current WHO recommendations. Working Document March, World Health Organization, Geneva.
- WHO, 2016. World Malaria Report 2016. World Health Organization, Geneva.
- Xu P, Choo YM, De La Rosa A, Leal WS, 2014. Mosquito odorant receptor for DEET and methyl jasmonate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111(46): 16592 – 16597.
- Xu X, Xu W, Ishida Y, Li Y, Leal WS, Ames JB, 2009. (1)H, (15)N, and (13)C chemical shift assignments of the mosquito odorant binding protein-1 (CquiOBP1) bound to the mosquito oviposition pheromone. *Biomol. NMR Assign.*, 3(2): 195 – 197.
- Xue RD, Ali A, Barnard DR, 2003. Laboratory evaluation of toxicity of 16 insect repellents in aerosol sprays to adult mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 19(3): 271 – 274.
- Yin J, Choo YM, Duan H, Leal WS, 2015. Selectivity of odorant-binding proteins from the southern house mosquito tested against physiologically relevant ligands. *Front. Physiol.*, 6: 56.
- Zhou D, Zhang D, Ding G, Shi L, Hou Q, Ye Y, Xu Y, Zhou H, Xiong C, Li S, Yu J, Hong S, Yu X, Zou P, Chen C, Chang X, Wang W, Lv Y, Sun Y, Ma L, Shen BI, Zhu C, 2014. Genome sequence of *Anopheles sinensis* provides insight into genetics basis of mosquito competence for malaria parasites. *BMC Genomics*, 15(1): 42.
- Zhou JJ, Robertson G, He X, Dufour S, Hooper AM, Pickett JA, Keep NH, Field LM, 2009. Characterisation of *Bombyx mori* odorant-binding proteins reveals that a general odorant-binding protein discriminates between sex pheromone components. *J. Mol. Biol.*, 389(3): 529 – 545.
- Zhou SS, Huang F, Wang JJ, Zhang SS, Su YP, Tang LH, 2010. Geographical, meteorological and vectorial factors related to malaria re-emergence in Huang-Huai River of central China. *Malar. J.*, 9: 337.
- Zhu G, Xia H, Zhou H, Li J, Lu F, Liu Y, Cao J, Gao Q, Sattabongkot J, 2013. Susceptibility of *Anopheles sinensis* to *Plasmodium vivax* in malarial outbreak areas of central China. *Parasit. Vector.*, 6(1): 176.

(责任编辑: 赵利辉)