



小地老虎化学感受蛋白 AipsCSP8 的表达及配体结合特性分析

苏旭^{1,2}, 张永军², 耿亭³, 李静^{1,*}, 谷少华^{4,*}

(1. 河北农业大学植物保护学院, 河北保定 071000; 2. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193; 3. 农业部廊坊作物有害生物科学观测实验站, 河北廊坊 065000; 4. 中国农业大学昆虫学系, 北京 100193)

摘要:【目的】本研究旨在解析小地老虎 *Agrotis ipsilon* 化学感受蛋白 AipsCSP8 的表达谱及配体结合特征。【方法】利用 qRT-PCR 方法测定了 AipsCSP8 在小地老虎成虫头、胸、腹、足、翅、性腺(附腺)、触角、喙和下唇须以及雌雄虫羽化前后触角中的表达水平。体外重组表达 AipsCSP8 蛋白, 通过荧光竞争结合实验测定重组蛋白 AipsCSP8 对 24 种性信息素、22 种植物挥发物和 10 种化学农药的结合特性。【结果】qRT-PCR 检测结果显示, AipsCSP8 在小地老虎雄成虫的足和下唇须中表达量最高, 在附腺和触角中的表达量次之; 在雌成虫的触角中表达量最高, 在足、性腺、下唇须中的表达量次之。另外, 雄、雌虫触角中 AipsCSP8 表达量分别在成虫羽化前 1 d 和羽化当天达到顶峰。荧光竞争结合实验结果表明, 重组蛋白 AipsCSP8 对植物挥发物邻苯二甲酸二丁酯(解离常数 $K_i = 14.6 \mu\text{mol/L}$)、苯乙醛($K_i = 17.2 \mu\text{mol/L}$)以及化学农药阿维菌素($K_i = 12.9 \mu\text{mol/L}$)均有较强的结合能力。【结论】化学感受蛋白 AipsCSP8 可能参与小地老虎嗅觉行为及味觉识别, 并可能在小地老虎感受化学农药的过程中发挥作用。

关键词: 小地老虎; 化学感受蛋白; 时空表达谱; 原核表达; 气味结合特征; 化学感受

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2019)12-1369-10

Expression and ligand binding characteristics of chemosensory protein AipsCSP8 of *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae)

SU Xu^{1,2}, ZHANG Yong-Jun², GENG Ting³, LI Jing^{1,*}, GU Shao-Hua^{4,*} (1. College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071000, China; 2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 3. Langfang Experimental Station of Crop Pests Science, Ministry of Agriculture, Langfang, Hebei 065000, China; 4. Department of Entomology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: 【Aim】The aim of this study is to explore the gene expression profiles and ligand binding characteristics of the chemosensory protein AipsCSP8 of *Agrotis ipsilon*. 【Methods】The expression levels of AipsCSP8 in the head, thorax, abdomen, leg, wing, pheromone gland (accessory gland), antenna, proboscis and labial palp of adults of *A. ipsilon* and the antennae of adults before and after emergence were determined by qRT-PCR. The recombinant protein AipsCSP8 was harvested by *in vitro* prokaryotic expression system, and its binding characteristics to 24 sex pheromones, 22 plant volatiles and 10 chemical pesticides were determined by fluorescence binding assay. 【Results】The qRT-PCR results

基金项目: 国家自然科学基金项目(31772164, 31772176, 31621064)

作者简介: 苏旭, 男, 1995年1月生, 河北沧州人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫化学生态学, E-mail: suxulalala@163.com

* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: lijing1976416514@163.com; gushaohua@cau.edu.cn

收稿日期 Received: 2019-07-22; 接受日期 Accepted: 2019-09-25

indicated that the expression level of *AipsCSP8* was the highest in the leg and labial palp of male adults, followed by in the accessory gland and the antenna of male adults. While in female adults, the expression level of *AipsCSP8* was the highest in the antenna, followed by in the leg, pheromone gland and labial palp. In addition, the expression levels of *AipsCSP8* in the antennae of males and females reached the peak on the 1st day before emergence and on the day of emergence, respectively. The results of fluorescence competitive binding assay showed that *AipsCSP8* had strong binding capabilities with dibutyl phthalate, phenylacetaldehyde and avermectin, with the dissociation constant K_i values of 14.6, 17.2 and 12.9 $\mu\text{mol/L}$, respectively. 【Conclusion】 *AipsCSP8* may be involved in the olfactory behavior and taste recognition of *A. ipsilon* and play a role in the perception of chemical pesticides.

Key words: *Agrotis ipsilon*; chemosensory protein; spatio-temporal expression profile; prokaryotic expression; odor binding characteristics; chemoreception

小地老虎 *Agrotis ipsilon* 属鳞翅目 (Lepidoptera) 夜蛾科 (Noctuidae), 别名土蚕、切根虫等 (张行国等, 2017), 是一种广泛分布、为害严重的地下害虫 (丁蕙淑, 1992; 曹雅忠和李克斌, 2017), 在亚洲、非洲、欧洲、北美和南美洲以及澳大利亚均有分布 (Clement *et al.*, 1982), 可为害多种农作物的幼苗和根部 (李永禧, 1964; 何发林等, 2019), 对农作物产量造成严重威胁。长期以来, 防治小地老虎以化学防治为主, 但小地老虎迁徙能力强, 抗药性发展速度快, 在我国的为害程度日趋严重 (向玉勇和杨茂发, 2008; 向玉勇等, 2010; 何发林等, 2018)。

昆虫依靠其发达、灵敏的嗅觉系统识别外界环境中的化学信号, 以定位栖息地及食物源、识别交配对象、躲避天敌等危险因素。在昆虫感知外界化学信号的过程中, 化学感受蛋白 (chemosensory proteins, CSPs)、气味结合蛋白 (odorant binding proteins, OBPs)、气味受体 (odorant receptors, ORs) 等嗅觉相关蛋白发挥至关重要的作用。昆虫化学感受蛋白又称为 OS-D 相关蛋白 (olfactory specific-D-like proteins) 或者感觉附属蛋白 (sensory appendage proteins, SAPs), 是一类小分子的可溶性蛋白, 一般只有 10 ~ 15 kD (Picimbon *et al.*, 2000)。昆虫化学感受蛋白的典型特征是含有 4 个保守的半胱氨酸, 能够形成 2 对二硫键位点 (Wanner *et al.*, 2004)。此类蛋白在昆虫的各类感受器官当中均有表达, 并且具有感受外界环境中化学刺激的功能 (张天涛等, 2011)。

通过转录组测序已经在棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 触角中鉴定了 12 个 CSP 基因 (Liu *et al.*, 2012), 在甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* 触角中鉴定了 19 个 CSP 基因 (Grosse-Wilde *et al.*, 2011)。Jacquin-Joly 等 (2001) 发现甘蓝夜蛾化学感受蛋白 CSPMbraA 和 CSPMbraB 能够与其性信息素组分结

合。在半翅目昆虫苜蓿盲蝽 *Adelphocoris lineolatus* 触角中鉴定了 8 个 CSP 基因 (Gu *et al.*, 2010), 同时发现苜蓿盲蝽中的 CSP1, CSP2 和 CSP3 具有与 GOBP 类似的功能, 能够同寄主挥发物顺-3-乙醇醇、反-2-己烯醛及戊醛结合 (Gu *et al.*, 2012)。本实验室前期在小地老虎触角中鉴定了 12 个 CSP 基因, 半定量 RT-PCR 和荧光定量 qRT-PCR 发现 *AipsCSP8* 基因在雌、雄触角中的表达量明显高于身体 (头、胸、腹、足和翅的混合物) 中的表达量 (谷少华, 2013), 推测其可能在小地老虎化学感受行为中发挥重要功能。

为深入解析 *AipsCSP8* 的结合特性及功能, 本研究对 *AipsCSP8* 基因进行了克隆, 利用 qRT-PCR 技术测定了该基因的时空表达谱, 原核表达并纯化获得 *AipsCSP8* 重组蛋白, 并通过荧光竞争结合实验对重组蛋白与 24 种性信息素、22 种植物挥发物和 10 种化学农药的结合特性进行了初步探究, 以期阐明小地老虎化学感受蛋白参与化学感受机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

小地老虎成虫采自农业部廊坊作物有害生物科学观测实验站, 在实验室内建立种群, 养虫室内饲养条件为 $24 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 相对湿度为 $75\% \pm 5\%$, 光周期为 16L:8D。小地老虎幼虫使用人工饲料饲养, 饲料主要成分为小麦胚、酪蛋白和蔗糖等。羽化后的成虫使用 20% 的蜂蜜水饲喂。

1.2 *AipsCSP8* 基因序列分析

从本实验室前期小地老虎转录组数据注释中获得 *AipsCSP8* 基因全长序列 (GenBank 登录号:

JX863703.1)。蛋白分子量及等电点预测使用 ExPASy 平台中的 Compute pI/Mw 程序 (http://expasy.org/tools/pi_tool.html), 信号肽预测使用 ExPASy 平台中的 SignalP 3.0 Serve 程序 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Bendtsen *et al.*, 2004)。

1.3 总 RNA 提取及 cDNA 第 1 链合成

收集小地老虎羽化后第 4 天雌、雄成虫的头、胸、腹、足、翅、性腺(雌虫为附腺)、触角、喙和下唇须组织,以及羽化前 5, 3 和 1 d(蛹期)和羽化后 0, 1, 2, 3, 4, 5 和 6 d 的成虫触角组织置于无 RNA 酶的 1.5 mL 离心管中,液氮处理后 -80°C 保存。每个样品来自 30 头试虫个体。利用 Trizol 试剂提取各组织的总 RNA,通过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳和 NanoPhotometer N60 Touch(德国)检测总 RNA 的质量。采用 FastQuant cDNA 第 1 链合成试剂盒(天根生化科技有限公司,北京)以提取的总 RNA 为模板反转录得到 cDNA 第 1 链。

1.4 *AipsCSP8* 基因表达谱测定

利用 qRT-PCR 测定小地老虎化学感受蛋白基因 *AipsCSP8* 在小地老虎雌、雄成虫不同组织以及羽化前后雌、雄虫触角中的相对表达量,以肌动蛋白基因 β -actin (GenBank 登录号: JQ822245) 作为内参

基因(谷少华, 2013)(引物序列见表 1)。qRT-PCR 在 ABI 7500 Fast Real-Time PCR System(美国)上进行。反应体系(20 μL): $2 \times$ SuperReal PreMix Plus 10 μL , 正反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.6 μL , cDNA 模板(200 $\text{ng}/\mu\text{L}$)1 μL , $50 \times$ ROX Reference Dye 0.4 μL , ddH₂O 补足至 20 μL 。采用两步法反应程序进行扩增: 95°C 预变性 15 min; 95°C 变性 10 s, 60°C 退火并延伸 30 s,共 40 个循环。熔解曲线测定: 95°C 15 s,冷却至 60°C 1 min, 95°C 30 s,冷却至 60°C 15 s。每种样品设 3 个生物学重复,每样品重复测定 3 次。

利用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 相对定量法进行数据处理和计算目的基因在不同组织间的表达量差异(Livak and Schmittgen, 2001)。其中: $\Delta C_T = \text{Ave. 目的基因 } C_T - \text{Ave. 内参基因 } C_T$; $\Delta\Delta C_T = \text{Ave. } \Delta C_{T,X} - \text{Ave. } \Delta C_{T,Y}$, Ave 表示平均值, X 代表不同的组织, Y 代表组织表达谱中的成虫腹部或时空表达谱中的羽化后 4 d 的成虫触角。目的基因在不同的组织之间的差异显著性分析采用单因素方差分析(one-way analysis of variance, ANOVA),然后采用 Tukey's Honestly Significance Difference (HSD)法进行多重比较,所有数据均采用 SPSS Statistics 18.0(美国)软件进行统计分析。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

基因 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequences	引物用途 Primer use
<i>CSP8</i>	F: <u>G</u> TcatatgGAAACTTACACAGATAGGTACGACCAC	基因克隆 Gene cloning
	R: CTgaattcTTAATCATCAGCGGCCAGG	
<i>CSP8</i>	F: AAGATGTACTCTGAAGG	qRT-PCR
	R: TGATGTGCTTGACTACTT	
β -actin	F: GATGTTGACATTCGTAAG	
	R: ATCTTGATCTTCATTGTG	

下划线为限制性核酸内切酶切位点。The restriction enzyme sites are underlined.

1.5 *AipsCSP8* 重组蛋白表达与纯化

根据 *AipsCSP8* 基因序列设计特异性引物(表 1),以小地老虎触角 cDNA 为模板,扩增其完整编码序列。PCR 反应体系(25 μL): $1 \times$ Taq MasterMix 20 μL , 正反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL , cDNA 模板 2 μL , ddH₂O 2 μL 。扩增程序: 95°C 预变性 2 min; 94°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 45 s, 共 36 个循环;最后 72°C 延伸 10 min。通过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物并切胶进行回收,克隆

至 pEASY-T3 载体上,转入 TRANS1-T1 感受态细胞,测序获得正确序列质粒。将正确序列质粒和 pET-30a(+)空载体同时进行双酶切,利用 1.0% 琼脂糖凝胶进行检测并切胶进行回收,使用 T4 连接酶将目的序列连接到 pET-30a(+)表达载体上,转化 BL21(DE3)。将单克隆菌株接种于含有 100 mg/mL 卡那霉素的培养基中,于 37°C 200 r/min 摇床中震荡培养至 OD 值为 0.6~0.8,加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L ,于 37°C 200 r/min 摇床中诱导 10 h。离

心收集诱导成功的菌体,超声破碎后分别收集上清及包涵体通过 15% SDS-PAGE 电泳检测。采用氧化还原法进行包涵体的复性和重折叠,即用含 0.2% Triton X-100 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 6.8) 冲洗包涵体,随后将包涵体溶解在 6 mol/L 的盐酸胍中 (Prestwich, 1993)。利用阴离子交换和分子筛色谱柱对目的蛋白进行纯化,脱盐和浓缩处理,详细步骤参照本实验室前期报道 (Gu *et al.*, 2013)。

1.6 荧光竞争结合实验

选择 24 种性信息素、22 种植物挥发物和 10 种化学农药作为候选配体 (表 2), 其中 10 种药剂的选择是来自于小地老虎主要为害的寄主植物田间经常施用的药剂以及用来防治小地老虎的药剂。荧光竞争结合实验在 F-380 荧光分光光度计 (天津) 上进行, 设置激发波长 337 nm, 扫描发射波长范围 370 ~ 550 nm。使用 N-苯基-1-萘胺 (N-phenyl-1-naphthylamine, 1-NPN) 作为荧光探针并溶于色谱级甲醇中, 使用浓度为 1 mmol/L。于 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4) 中加入 AipsCSP8 重组蛋白, 使其终浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$, 再加入 1-NPN, 探针浓

度从 2 $\mu\text{mol/L}$ 递增至 20 $\mu\text{mol/L}$, 重复 3 次, 测定荧光强度变化并测定、计算出 AipsCSP8 与探针的结合能力曲线和解离常数。将 AipsCSP8 加入 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4) 中, 使其终浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$, 加入 1-NPN, 使其终浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$, 加入溶于色谱级甲醇中的待测配体, 浓度从 2 $\mu\text{mol/L}$ 开始递增至 30 $\mu\text{mol/L}$, 记录荧光强度变化, 重复 3 次。计算得出使荧光强度降低一半时的配体浓度, 即 IC_{50} 值。利用下列公式计算出配体解离常数 (K_i): $K_i = [IC_{50}] / (1 + [1-NPN] / K_{1-NPN})$, 其中 $[1-NPN]$ 为未结合的 1-NPN 浓度, K_{1-NPN} 为 AipsCSP8 与 1-NPN 的解离常数 (Gu *et al.*, 2011)。

2 结果

2.1 AipsCSP8 序列分析

AipsCSP8 基因开放阅读框 (open reading frame, ORF) 长度为 372 bp, 编码 123 个氨基酸残基, 其中在 N 末端有 18 个氨基酸组成的信号肽, 预测成熟 AipsCSP8 蛋白分子量大小为 12.4 kD, 等电点为 7.07, 序列中有 4 个保守的半胱氨酸位点 (图 1)。

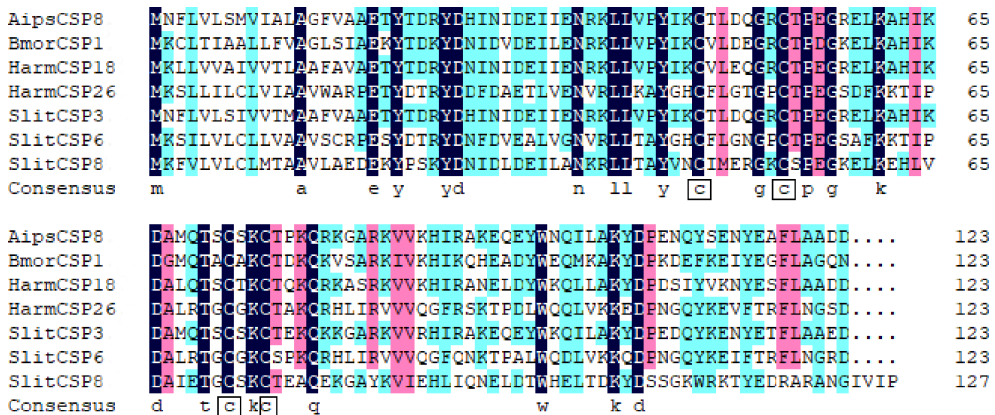


图 1 小地老虎 AipsCSP8 与其他种类昆虫 CSPs 序列比对

Fig. 1 Multiple alignment of AipsCSP8 from *Agrotis ipsilon* and CSPs from other insect species

CSP 蛋白来源物种及 GenBank 登录号 Origin species of CSP proteins and their GenBank accession numbers: AipsCSP8: 小地老虎 *Agrotis ipsilon* (JX863703.1); BmorCSP1: 家蚕 *Bombyx mori* (NM_001043600.1); HarmCSP18: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (KM236060.1); HarmCSP26: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (KY815027.1); SlitCSP3: 斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* (KT261674.1); SlitCSP6: 斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* (KT261677.1); SlitCSP8: 斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* (KT261679.1). 半胱氨酸由方框标注。Cysteine is boxed.

2.2 AipsCSP8 的时空表达谱

AipsCSP8 基因与内参基因 β -actin 的扩增效率均在 90% ~ 100% 之间, 扩增效率近似。AipsCSP8 基因在小地老虎成虫各个组织中的表达量有差异, 对于雄成虫来说, AipsCSP8 在足和下唇须中表达量较高, 在翅、附腺和触角中次之, 在其他部位表达量

较低。对于雌成虫来说, AipsCSP8 在触角中表达量最高, 足、性腺和下唇须中表达量次之, 其他部位中表达量较低 (图 2)。

AipsCSP8 基因在小地老虎雌、雄虫触角中不同发育阶段的表达结果表明, AipsCSP8 在小地老虎羽化前后触角当中的表达量有差异, 对于雄虫来说,

AipsCSP8 在羽化前(蛹期)表达量持续增加,羽化前 1 d 表达量最高,羽化后则开始下降;对于雌虫来说,

该基因在羽化前表达量持续增加,至羽化当天表达量最高,之后开始下降,但并无显著差异(图 3)。

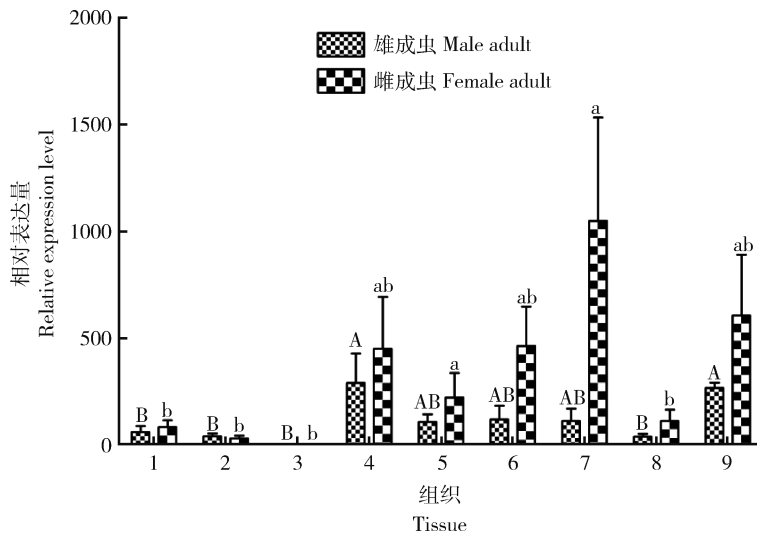


图 2 *AipsCSP8* 在小地老虎雌雄成虫不同组织中的表达量

Fig. 2 Expression level of *AipsCSP8* in different tissues of female and male adults of *Agrotis ipsilon*

1: 头 Head; 2: 胸 Thorax; 3: 腹 Abdomen; 4: 足 Leg; 5: 翅 Wing; 6: 性腺(附腺)Pheromone gland (Accessory gland); 7: 触角 Antenna; 8: 喙 Proboscis; 9: 下唇须 Labial palp. 采用 β -actin 基因作为内参基因。柱上不同小写和大写字母分别表示雌成虫和雄成虫不同组织间的 *AipsCSP8* 相对表达量差异显著 ($P < 0.05$, Tukey 氏 HSD 法)。 β -actin gene was used as the reference gene. Different lowercase and capital letters above bars indicate significant difference in relative expression level of *AipsCSP8* in different tissues of female and male adults, respectively ($P < 0.05$, Tukey's HSD test).

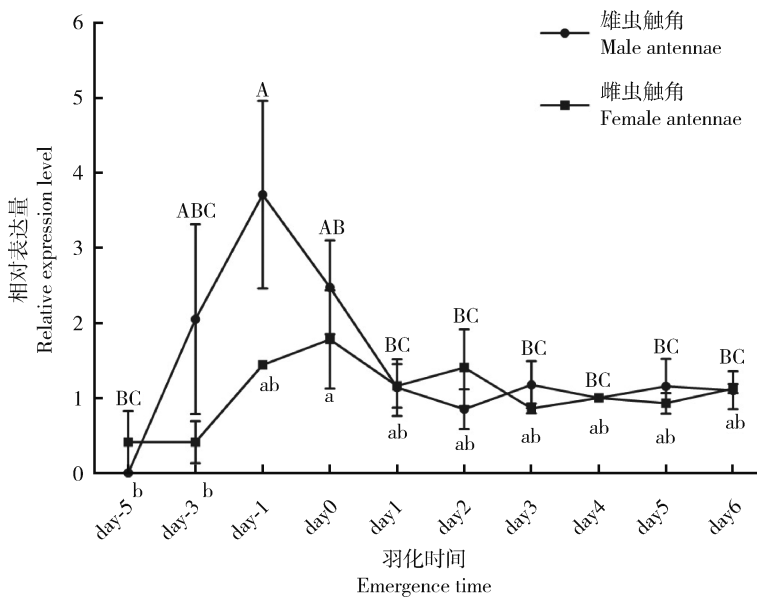


图 3 *AipsCSP8* 在小地老虎羽化前后不同时期触角中的表达量

Fig. 3 Expression level of *AipsCSP8* in the antenna of different stages of *Agrotis ipsilon* before and after emergence

Day-5, day-3, day-1: 分别为羽化前 5, 3 和 1 d (5, 3 and 1 d before emergence, respectively); day 0: 羽化当天 The day of emergence; day 1-6: 分别表示羽化后第 1-6 天 1st-6th day after emergence, respectively. 采用 β -actin 基因作为内参基因。不同小写和大写字母分别表示雌虫和雄虫不同时期触角中的相对表达量差异显著 ($P < 0.05$, Tukey 氏 HSD 法)。 β -actin gene was used as the reference gene. Different lowercase and capital letters indicate significant difference in relative expression level of *AipsCSP8* in the antenna of different stages of females and males, respectively ($P < 0.05$, Tukey's HSD test).

2.3 AipsCSP8 的重组表达

SDS-PAGE 结果表明,重组蛋白 AipsCSP8 主要

在包涵体中表达,纯化后蛋白经浓缩、透析处理后,在接近 15 kD 处显示出单一条带,与目的蛋白大小

一致(图 4)。

2.4 重组 AipsCSP8 气味配体结合特征

荧光竞争结合实验结果表明, AipsCSP8 重组蛋白与 1-NPN 的解离常数 (K_i) 为 $3.03 \mu\text{mol/L}$, 1-NPN 的结合曲线及 Scatchard 方程见图 5。AipsCSP8 重组蛋白与植物挥发物邻苯二甲酸二丁酯和苯乙醛以及化学农药阿维菌素有较强的结合能力。由结合曲线(图 6)和解离常数(表 2)可以看出, AipsCSP8 重组蛋白与阿维菌素结合能力最强, 其解离常数为 $12.9 \mu\text{mol/L}$; 与邻苯二甲酸二丁酯的结合能力次之, 其解离常数为 $14.6 \mu\text{mol/L}$; 与苯乙醛的结合能力最弱, 其解离常数为 $17.2 \mu\text{mol/L}$ 。

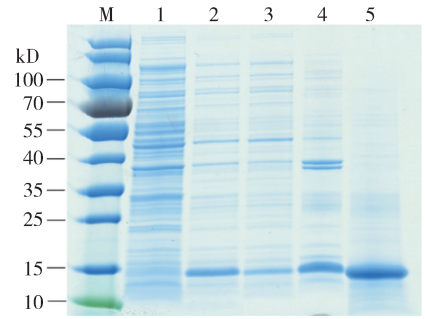


图 4 AipsCSP8 重组蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the recombinant protein AipsCSP8 M: 蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker; 1: 未加 IPTG 诱导 Induced without IPTG; 2: 加入 IPTG 诱导 Induced with IPTG; 3: 上清液 Supernatant; 4: 包涵体 Inclusion body; 5: AipsCSP8 纯化蛋白 Purified AipsCSP8.

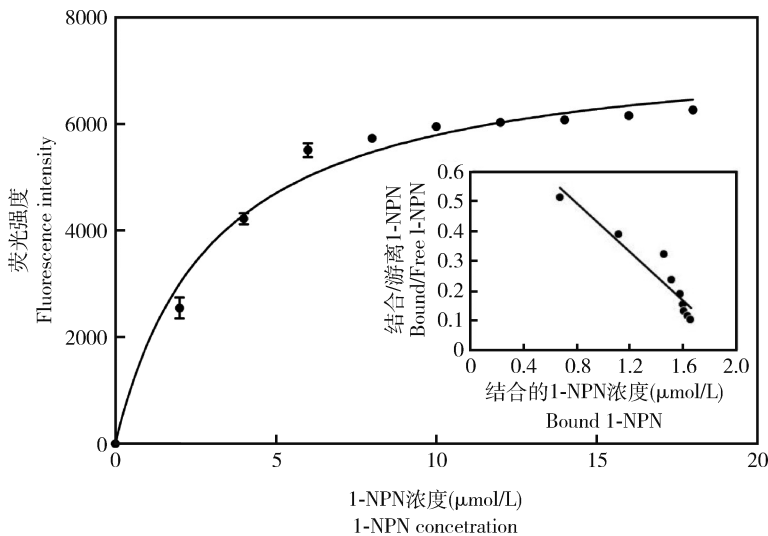


图 5 AipsCSP8 重组蛋白与 1-NPN 的结合曲线及 Scatchard 方程

Fig. 5 Binding curve and Scatchard plot of the recombinant AipsCSP8 to 1-NPN

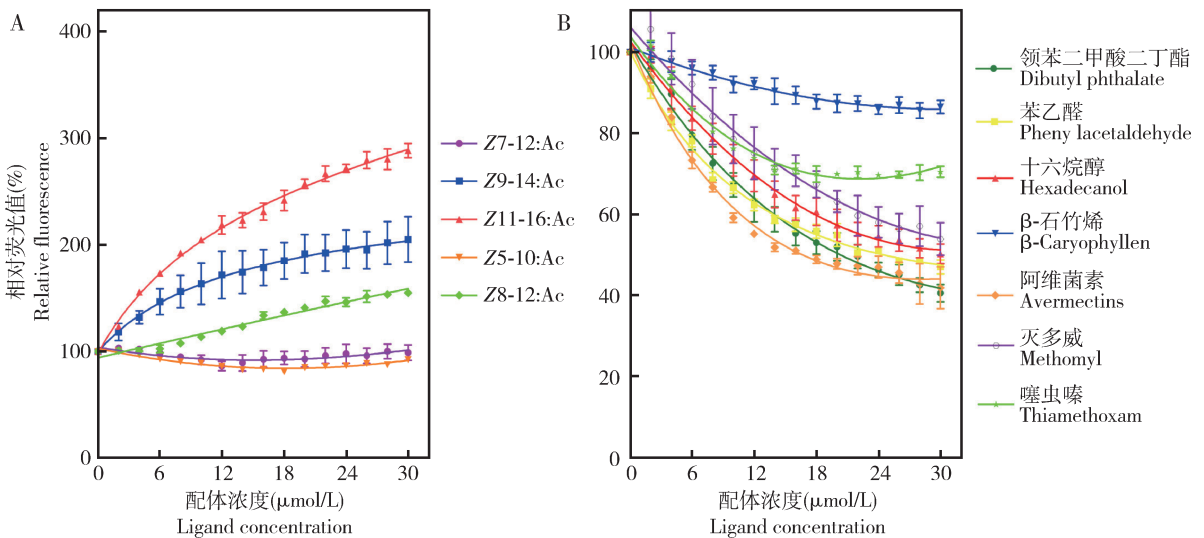


图 6 重组蛋白 AipsCSP8 与候选配体的结合曲线

Fig. 6 Binding curves of the recombinant AipsCSP8 to candidate ligands

A: 性信息素 Sex pheromones; B: 植物挥发物和化学农药 Plant volatile components and chemical pesticides.

表 2 重组蛋白 AipsCSP8 与候选配体的结合能力
Table 2 Binding capabilities of the recombinant AipsCSP8 with candidate ligands

配体 Ligands	IC ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$)	K _i ($\mu\text{mol/L}$)	CAS 号 CAS no.	配体 Ligands	IC ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$)	K _i ($\mu\text{mol/L}$)	CAS 号 CAS no.
小地老虎性信息素 <i>Agrotis ipsilon</i> sex pheromones				虫酰肼 Tebufenozide	-	-	112410-23-8
顺-7-十二碳乙酸酯 Z7-12:Ac	-	-	14959-86-5	啮虫脒 Acetamiprid	-	-	135410-20-7
顺-9-十四碳乙酸酯 Z9-14:Ac	-	-	16725-53-4	噻虫嗪 Thiamethoxam	>30	-	153719-23-4
顺-11-十六碳乙酸酯 Z11-16:Ac	-	-	34010-21-4	溴虫腈 Chlorfenapyr	>30	-	122453-73-0
顺-5-十碳乙酸酯 Z5-10:Ac	-	-	67446-07-5	联苯菊酯 Bifenthrin	-	-	83322-02-5
顺-8-十二碳乙酸酯 Z8-12:Ac	-	-	28079-04-1	高效氯氰菊酯 β -Cypermethrin	-	-	65731-84-2
醛类性信息素 Aldehyde sex pheromones				溴氰菊酯 Deltamethrin	-	-	52918-63-5
顺-11-十六碳醛 Z11-16:Ald	-	-	53939-28-9	灭多威 Methomyl	>30	-	16752-77-5
顺-9-十四碳烯醛 Z9-14:Ald	-	-	53939-27-8	植物挥发物 Plant volatiles			
顺-11-十四碳烯醛 Z11-14:Ald	>30	-	35237-64-0	顺-3-己烯醇 <i>cis</i> -3-Hexen-1-ol	-	-	928-96-1
顺-7-十六碳醛 Z7-16:Ald	>30	-	56797-40-1	顺-3-己烯酯 <i>cis</i> -3-Hexenyl acetate	-	-	3681-71-8
顺-9-十六碳醛 Z9-16:Ald	-	-	56219-04-6	油酸 Oleic acid	-	-	112-80-1
十六醛 16:Ald	-	-	629-80-1	苯甲醛 Benzaldehyde	-	-	100-52-7
醇类性信息素 Alcohol sex pheromones				水杨酸甲酯 Methyl salicylate	>30	-	8024-54-2
顺-11-十六烯-1-醇 Z11-16:OH	-	-	56683-54-6	正庚醛 Heptanal	>30	-	111-71-7
十四烷醇 Tetradecanol	-	-	103-20-8	苯乙醛 Phenylacetaldehyde	24.7	17.2	122-78-1
顺-5-癸烯-1-醇 Z5-10:OH	>30	-	51652-47-2	2-甲基环己酮 2-Methylcyclohexanone	-	-	583-60-8
顺-7-十二烯-1-醇 Z7-12:OH	-	-	20056-92-2	邻苯二甲酸二丁酯 Dibutyl phthalate	21.0	14.6	84-74-2
十六烷醇 Hexadecanol	>30	-	36653-82-4	月桂烯 Myrcene	>30	-	123-35-3
反-5-癸烯-1-醇 E5-10:OH	-	-	56578-18-8	十四醛三聚物 Tetradecanal	-	-	124-25-4
酯类性信息素 Ester sex pheromones				β -石竹烯 β -Caryophyllen	-	-	87-44-5
顺 9, 反 11-十四碳二烯乙酸酯 (Z9,E11)-Tetradecadienyl acetate	-	-	30562-09-5	反-2-己烯醛 (<i>E</i>)-2-Hexenal	-	-	6728-26-3
顺 9, 反 12-十四碳二烯乙酸酯 (Z9,E12)-Tetradecadienyl acetate	-	-	31654-77-0	苯甲醇 Benzyl alcohol	>30	-	100-51-6
顺 5-十二碳烯-1-醇乙酸酯 Z5-Dodecenyl acetate	-	-	35153-13-0	正庚酸 Heptanoic acid	>30	-	111-14-8
顺 9-十二碳烯-1-醇乙酸酯 Z9-Dodecenyl acetate	-	-	16974-11-1	丁香酚 Eugenol	-	-	97-53-0
乙酸 (<i>Z</i>)-5-十二烯醇酯 Z5-Dodecen-1-yl acetate	-	-	16676-96-3	水杨酸 Salicylic acid	-	-	69-72-7
醋酸 (<i>E</i>)-11-十四烯酯 E11-Tetradecenyl acetate	-	-	33189-72-9	正己醇 Hexanol	-	-	111-27-3
醋酸 (<i>Z</i>)-11-十四烯酯 E11-Tetradecenyl acetate	-	-	20711-10-8	癸烷 Decane	-	-	124-18-5
化学杀虫剂 Chemical pesticides				十二烷 Dodecane	-	-	112-40-3
阿维菌素 Avermectins	18.5	12.9	71751-41-2	正十四烷 Tetradecane	-	-	629-59-4
吡虫啉 Imidacloprid	>30	-	138261-41-3	正十六烷 Hexadecane	-	-	544-76-3

IC₅₀: 重组蛋白 AipsCSP8 结合 50% 1-NPN 时的配体浓度 Concentration of ligand when the recombinant AipsCSP8 combines with 50% 1-NPN; K_i: 解离常数 Dissociation constant. 当 IC₅₀ > 30 $\mu\text{mol/L}$ 时, 认定重组蛋白 AipsCSP8 与该配体不结合, 不计算其 K_i 值。与重组蛋白 AipsCSP8 无结合的配体的 IC₅₀ 值和 K_i 值均以减号表示。When the IC₅₀ value is over 30 $\mu\text{mol/L}$, the recombinant AipsCSP8 can not bind with the tested ligand, and the K_i value will not to be calculated. The IC₅₀ and K_i values of the ligand not binding to the recombinant AipsCSP8 are represented by minuses.

3 讨论

本研究解析了小地老虎 *AipsCSP8* 基因的时空表达特性,利用体外原核表达和荧光竞争结合实验明确了 *AipsCSP8* 重组蛋白对不同种类配体的结合特点。qRT-PCR 结果表明, *AipsCSP8* 基因在小地老虎雌雄成虫各组织当中均有表达,但表达量有所差异。该基因在雌、雄成虫的性腺(附腺)和触角当中均有相对较高的表达量,推测 *AipsCSP8* 可能与嗅觉感受行为有关。该基因在雄成虫的足以及雌、雄成虫的下唇须中有着较高的表达量,推断该蛋白在参与嗅觉感受的同时,还可能与识别毒素等味觉功能相关(Tsuchihara *et al.*, 2005; Harada *et al.*, 2008; Yasukawa *et al.*, 2010)。 *AipsCSP8* 在雌、雄虫触角当中的时间表达谱显示该基因在羽化时表达量达到顶峰,暗示其可能与嗅觉系统的成熟相关,参与其羽化后寻找寄主和产卵等生理活动。

荧光定量检测结果还显示 *AipsCSP8* 基因在化学感受器官和性腺中具有较高的表达量,推测其可能参与对环境中的化学信息物质如性信息素等的识别。同时随着小地老虎抗药性的演化,其外周的化学感受系统也可能适应性地识别某些杀虫剂成分,因此本研究选择 24 种性信息素、22 种植物挥发物、10 种化学农药等作为候选配体,评价 *AipsCSP8* 重组蛋白是否结合识别这些化合物。结果表明, *AipsCSP8* 重组蛋白与邻苯二甲酸二丁酯、苯乙醛和化学农药阿维菌素能够结合。

邻苯二甲酸二丁酯是黑杨 *Populus nigra* 叶片挥发物组分,其可以引起分月扇舟蛾 *Clostera anastomosis* 的 EAG 反应,且对小地老虎有较强的诱集活性(郭线茹等, 2001; 凌娜等, 2014)。有报道指出茶尺蠖 *Ectropis obliqua* 的嗅觉结合蛋白 EoblGOBP2 与邻苯二甲酸二丁酯有较强的结合能力(赵磊等, 2014; Zhang *et al.*, 2018)。此外, Huang 等(2018)的研究发现小地老虎 *AipsGOBP1* 和 *AipsGOBP2* 重组蛋白与邻苯二甲酸二丁酯有不同程度的结合能力。可见,小地老虎中不同种类的可溶性气味转运蛋白都能够识别同一种寄主植物挥发物——邻苯二甲酸二丁酯。同时 *AipsCSP8* 重组蛋白还可结合另一种寄主植物挥发物——苯乙醛,该挥发物对斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 和小地老虎均具有电生理和行为活性,对斜纹夜蛾有明显的引诱作用,同时将苯乙醛与性诱芯混用,可以增强性信息

素对斜纹夜蛾的引诱效果(沈幼莲等, 2009)。另外,苯乙醛可以引起小地老虎较强的 EAG 反应且对其有引诱作用(李石力, 2013)。 *AipsCSP8* 重组蛋白对以上两种植物挥发物的特异结合,表明其可能在小地老虎搜寻寄主植物过程中发挥重要化学感受作用。

近年来的研究表明,一些杀虫剂对 CSP 基因的表达有促进或抑制作用(Liu *et al.*, 2016),但关于杀虫剂与化学感受蛋白的结合特性报道较少。本研究发现, *AipsCSP8* 与杀虫剂阿维菌素有结合特性,且结合能力大于与其他两种寄主植物挥发物的结合能力。斜纹夜蛾触角当中高表达的 *SlituCSP6*, *SlituCSP8*, *SlituCSP9* 和 *SlituCSP18* 等化学感受蛋白分别与毒死蜱、甲维盐以及氟虫清有不同程度的结合能力(Lin *et al.*, 2018)。东方蜜蜂 *Apis cerana* 和茶尺蠖等昆虫的 OBPs 和 CSPs 可以和杀虫剂吡虫啉产生较强的作用,且吡虫啉能影响 OBPs 和 CSPs 与天然配体的结合(Li *et al.*, 2015, 2017a, 2017b)。由此,我们认为 *AipsCSP8* 可能参与小地老虎对化学农药的识别。 *AipsCSP8* 能够同时识别植物挥发物和化学农药的特性表明,在长期化学防治小地老虎的过程中,小地老虎的化学感受也有可能增加了对化学农药气味的识别,而不仅仅限于对性信息素及植物挥发物的识别,进而有利于其躲避有害栖境,寻找安全产卵场所等。对此我们需要进一步从行为学水平进行验证。

综上,本研究对小地老虎 *AipsCSP8* 基因的表达特性进行了解析,同时也通过体外功能研究的方法证明 *AipsCSP8* 可能参与小地老虎对植物挥发物和化学农药的识别。当然,对于 *AipsCSP8* 的活体功能还需通过基因干扰或基因编辑进一步研究,从而为设计以调控小地老虎化学通讯为基础的害虫防治策略提供理论依据。

参考文献 (References)

- Bendtsen JD, Nielsen H, Heijne GV, Brunak S, 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.*, 340(4): 783 – 795.
- Cao YZ, Li KB, 2017. Illustrated Handbook of Common Underground Pests in China. China Agricultural Science and Technology Press, Beijing. 203. [曹雅忠, 李克斌, 2017. 中国常见地下害虫图鉴. 北京: 中国农业科学技术出版社. 203]
- Clement SL, Show ED, Way MO, 1982. Black cutworm pheromone trapping in strawberries. *Calif. Agric.*, 36(7): 20 – 21.
- Ding HS, 1992. Patterns of outbreak and migratory flight of *Agrotis ipsilon*

- in Wenshan Prefecture, Yunnan Province. *Entomol. Knowl.*, 29(1): 10–13. [丁蕙淑, 1992. 文山州小地老虎发生及迁飞规律研究. 昆虫知识, 29(1): 10–13]
- Grosse-Wilde E, Kuebler LS, Bucks S, Vogel H, Wicher D, Hansson BS, 2011. Antennal transcriptome of *Manduca sexta*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(18): 7449–7454.
- Gu SH, 2013. Molecular and Cellular Basis of Sex Pheromone Communication in the Black Cutworm Moth *Agrotis ipsilon*. PhD Dissertation, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing. [谷少华, 2013. 小地老虎性信息素通讯的分子和细胞机制. 北京: 中国农业科学院博士学位论文]
- 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(34): 3911–3921.
- Gu SH, Wang WX, Wang GR, Zhang XY, Guo YY, Zhang Z, Zhou JJ, Zhang YJ, 2011. Functional characterization and immunolocalization of odorant binding protein 1 in the lucerne plant bug, *Adelphocoris lineolatus* (Goeze). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 77(2): 81–99.
- Gu SH, Wang SY, Zhang XY, Ji P, Liu JT, Wang GR, Wu KM, Guo YY, Zhou JJ, Zhang YJ, 2012. Functional characterizations of chemosensory proteins of the alfalfa plant bug *Adelphocoris lineolatus* indicate their involvement in host recognition. *PLoS ONE*, 7(8): e42871.
- Gu SH, Zhou JJ, Wang GR, Zhang YJ, Guo YY, 2013. Sex pheromone recognition and immunolocalization of three pheromone binding proteins in the black cutworm moth *Agrotis ipsilon*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 43(3): 237–251.
- Guo XR, Yuan GH, Zheng QW, Fan CL, Ma JS, 2001. Attraction of the adults (Lepidoptera) to volatiles from withered leaves of black poplar. *Acta Agric. Bor.-Sin.*, (4): 104–108. [郭线茹, 原国辉, 郑启伟, 范彩玲, 马继盛, 2001. 黑杨萎蔫叶片萃取物对蛾类成虫诱集活性的研究. 华北农学报, 16(4): 104–108]
- Harada E, Haba D, Aigaki T, Matsuo T, 2008. Behavioral analyses of mutants for two odorant-binding protein genes, *Obp57d* and *Obp57e*, in *Drosophila melanogaster*. *Genes Genet. Syst.*, 83(3): 257–264.
- He FL, Jiang XY, Shang DL, Yao CT, Tan HL, Li XD, Zhang JW, 2019. Induction of the protective and detoxification enzymes by cyantraniliprole in *Agrotis ipsilon*. *Plant Prot.*, 45(2): 90–96. [何发林, 姜兴印, 尚佃龙, 姚晨涛, 谭海丽, 李向东, 张吉旺, 2019. 溴氰虫酰胺胁迫对小地老虎保护酶和解毒酶活性的诱导效应. 植物保护, 45(2): 90–96]
- He FL, Jiang XY, Yao CT, Shang DL, Li XD, 2018. Co-toxicity of chlorantraniliprole with six insecticides against *Agrotis ipsilon*. *Plant Prot.*, 44(6): 236–241. [何发林, 姜兴印, 姚晨涛, 尚佃龙, 李向东, 2018. 氯虫苯甲酰胺与 6 种药剂复配对小地老虎的联合毒力. 植物保护, 44(6): 236–241]
- Huang GZ, Liu JT, Zhou JJ, Wang Q, Dong JZ, Zhang YJ, Li XC, Li J, Gu SH, 2018. Expressional and functional comparisons of two general odorant binding proteins in *Agrotis ipsilon*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 98: 34–47.
- Jacquin-Joly E, Vogt RG, François MC, Nagnan-Le Meillour P, 2001. Functional and expression pattern analysis of chemosensory proteins expressed in antennae and pheromonal gland of *Mamestra brassicae*. *Chem. Senses*, 26(7): 833–844.
- Li HL, Tan J, Song XM, Wu F, Tang MZ, Hua QY, Zheng HQ, Hu FL, 2017a. Sublethal doses of neonicotinoid imidacloprid can interact with honey bee chemosensory protein 1 (CSP1) and inhibit its function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 486(2): 391–397.
- Li HL, Wu F, Zhao L, Tan J, Jiang HT, Hu FL, 2015. Neonicotinoid insecticide interact with honeybee odorant-binding protein: implication for olfactory dysfunction. *Int. J. Biol. Macromol.*, 81: 624–630.
- Li HL, Zhao L, Fu XB, Song XM, Wu F, Tang MZ, Cui HC, Yu JZ, 2017b. Physicochemical evidence on sublethal neonicotinoid imidacloprid interacting with an odorant-binding protein from the tea geometrid moth, *Ectropis obliqua*. *J. Agric. Food Chem.*, 65(16): 3276–3284.
- Ling N, Tang JG, Yin YS, Zhang F, An YL, 2014. Electroantennogram responses of *Clostera anastomosis* adults to plant volatile of *Populus nigra*. *Jiangsu J. Agric. Sci.*, 30(3): 514–519. [凌娜, 唐进根, 殷玉生, 张帆, 安榆林, 2014. 分月扇舟蛾成虫对黑杨挥发物的触角电位反应. 江苏农业学报, 30(3): 514–519]
- Lin X, Mao Y, Zhang L, 2018. Binding properties of four antennae-expressed chemosensory proteins (CSPs) with insecticides indicates the adaption of *Spodoptera litura* to environment. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 146: 43–51.
- Li SL, 2013. The Joint Synergism Attracting Effect of Tobacco Volatiles and Sex Pheromone on *Agrotis ipsilon*. MSc Thesis, Southwest University, Chongqing. [李石力, 2013. 烟草挥发物与性信息素引诱小地老虎的协同增效作用研究. 重庆: 西南大学硕士学位论文]
- Liu GX, Ma HM, Xie HY, Xuan N, Guo X, Fan ZX, Rajashekar B, Arnaud P, Offmann B, Picimbon JF, 2016. Biotype characterization, developmental profiling, insecticide response and binding property of *Bemisia tabaci* chemosensory proteins: role of CSP in insect defense. *PLoS ONE*, 11(5): e154706.
- Liu Y, Gu SH, Zhang YJ, Guo YY, Wang GR, 2012. Candidate olfaction genes identified within the *Helicoverpa armigera* antennal transcriptome. *PLoS ONE*, 7(10): e48260.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Li YX, 1964. The life habits and prevention of black cutworm. *Entomol. Knowl.*, 8(1): 1–5. [李永禧, 1964. 小地老虎生活习性及其防治. 昆虫知识, 8(1): 1–5]
- Picimbon JF, Dietrich K, Breer H, Krieger J, 2000. Chemosensory proteins of *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae). *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 30(3): 233–241.
- Prestwich GD, 1993. Bacterial expression and photoaffinity labeling of a pheromone binding protein. *Protein Sci.*, 2(3): 420–428.
- Shen YL, Gao Y, Du YJ, 2009. The synergism of plant volatile

- compounds and sex pheromones of the tobacco cutworm moth, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomol. Sin.*, 52(12): 1290–1297. [沈幼莲, 高扬, 杜永均, 2009. 植物气味化合物与斜纹夜蛾性信息素的协同作用. 昆虫学报, 52(12): 1290–1297]
- Tsuchihara K, Fujikawa K, Ishiguro M, Yamada T, Tada C, Ozaki K, Ozaki M, 2005. An odorant-binding protein facilitates odorant transfer from air to hydrophilic surroundings in the blowfly. *Chem. Senses*, 30(7): 559–564.
- Wanner KW, Willis LG, Theilmann DA, Isman MB, Feng QL, Plettner E, 2004. Analysis of the insect *os-d*-like gene family. *J. Chem. Ecol.*, 30(5): 889–911.
- Xiang YY, Yang MF, 2008. Study on the occurrence, damage and control techniques of black cutworm in China. *J. Anhui Agric. Sci.*, 36(33): 14636–14639. [向玉勇, 杨茂发, 2008. 小地老虎在我国的发生危害及防治技术研究. 安徽农业科学, 36(33): 14636–14639]
- Xiang YY, Yang MF, Li ZZ, 2010. Observations on the pupation rate, eclosion rate and sex ratio of 12 generations of the black cutworm reared continuously in the laboratory. *J. Huangshan Univ.*, 12(5): 67–69. [向玉勇, 杨茂发, 李子忠, 2010. 小地老虎室内连续饲养 12 代的化蛹率、羽化率和性比观察. 黄山学院学报, 12(5): 67–69]
- Yasukawa J, Tomioka S, Aigaki T, Matsuo T, 2010. Evolution of expression patterns of two odorant-binding protein genes, *Obp57d* and *Obp57e*, in *Drosophila*. *Gene*, 467(1): 25–34.
- Zhang TT, Zou LY, Li KM, Feng JN, Zhang YJ, Guo YY, 2011. Expression profiling and binding characterization of dimeric chemosensory protein 6 (HarmCSP6) in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomol. Sin.*, 54(6): 615–622. [张天涛, 邹朗云, 李科明, 冯纪年, 张永军, 郭予元, 2011. 棉铃虫化学感受蛋白 HarmCSP6 二聚体的组织表达分析及气味结合特征. 昆虫学报, 54(6): 615–622]
- Zhang YL, Fu XB, Cui HC, Zhao L, Yu JZ, Li HL, 2018. Functional characteristics, electrophysiological and antennal immunolocalization of general odorant-binding protein 2 in tea geometrid, *Ectropis obliqua*. *Int. J. Mol. Sci.*, 19(3): E875.
- Zhang XG, Jia YF, Wen Y, Zhang YF, Wan GJ, Chen FJ, 2017. Behavioral rhythms of three lepidopteran pests; *Mythimna separata*, *Agrotis ipsilon* and *Helicoverpa armigera*. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 54(2): 190–197. [张行国, 贾艺凡, 温洋, 张逸飞, 万贵钧, 陈法军, 2017. 粘虫、小地老虎和棉铃虫三种鳞翅目害虫上灯行为节律研究. 应用昆虫学报, 54(2): 190–197]
- Zhao L, Cui HC, Zhang LY, Chen L, Yu JZ, Li HL, 2014. Molecular binding characterization with tea plant volatiles of a general odorant-binding protein EoblGOBP2 in the tea geometrid, *Ectropis obliqua* Prout (Lepidoptera: Geometridae). *J. Tea Sci.*, 34(2): 165–171. [赵磊, 崔宏春, 张林雅, 陈玲, 余继忠, 李红亮, 2014. 茶尺蠖普通气味结合蛋白 EoblGOBP2 与茶树挥发物的结合功能研究. 茶叶科学, 34(2): 165–171]

(责任编辑: 马丽萍)