



# 白蜡窄吉丁气味结合蛋白 *AplaOBP3* 的免疫定位及配体结合特性

宋玄<sup>3</sup>, 王泽华<sup>1</sup>, 单双<sup>2</sup>, 张永军<sup>2</sup>, 王山宁<sup>1,\*</sup>

(1. 北京市农林科学院植物保护环境保护研究所, 北京 100097; 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. 中国农业大学植物保护学院, 北京 100193)

**摘要:**【目的】本研究旨在解析白蜡窄吉丁 *Agrilus planipennis* 气味结合蛋白 *AplaOBP3* 在触角中的定位及配体结合特性, 同时比较 *AplaOBP3* 与已报道的 *AplaOBP1* 和 *AplaOBP2* 的功能异同。【方法】原核表达白蜡窄吉丁气味结合蛋白 *AplaOBP3*, 制备多克隆抗体并进行 Western blot 检测; 采用免疫组织化学技术在白蜡窄吉丁触角感器中对 *AplaOBP3* 的表达进行定位; 通过荧光竞争结合实验分析 *AplaOBP3* 重组蛋白与 58 种化合物的结合特性, 并与前期报道的白蜡窄吉丁 *AplaOBP1* 和 *AplaOBP2* 蛋白的配体结合特性进行比较。【结果】原核表达系统中成功表达 *AplaOBP3* 重组蛋白; 免疫定位结果显示 *AplaOBP3* 在白蜡窄吉丁触角的锥形感器类型 I 中表达。荧光竞争结合实验结果表明, 重组 *AplaOBP3* 蛋白与反-2-己烯醛、苯甲醛、4'-乙基苯乙酮、 $\beta$ -紫罗兰酮和罗勒烯具有强的结合能力, 其解离常数  $K_D$  值分别为 6.20, 4.03, 5.24, 1.72 和 4.83  $\mu\text{mol/L}$ 。 *AplaOBP3* 与 *AplaOBP2* 具有相似的表达及配体结合特性。【结论】白蜡窄吉丁气味结合蛋白 *AplaOBP3* 与 *AplaOBP2* 具有相似的表达及配体结合特性, 它们可能共同参与白蜡窄吉丁的嗅觉感受, 在白蜡窄吉丁寄主定位过程中发挥作用。

**关键词:** 白蜡窄吉丁; 气味结合蛋白; 触角感器; 免疫组织化学; 配体结合特性; 嗅觉感受

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2021)01-0010-09

## Immunolocalization and ligand binding characteristics of the odorant binding protein *AplaOBP3* of *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae)

SONG Xuan<sup>3</sup>, WANG Ze-Hua<sup>1</sup>, SHAN Shuang<sup>2</sup>, ZHANG Yong-Jun<sup>2</sup>, WANG Shan-Ning<sup>1,\*</sup>

(1. Institute of Plant and Environment Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, 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. College of Plant Protection, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract:** 【Aim】 The aim of this study is to explore the localization of the odorant binding protein *AplaOBP3* in antennae of *Agrilus planipennis* and its ligand binding characteristics, and to compare the function of *AplaOBP3* with the reported *AplaOBP1* and *AplaOBP2*. 【Methods】 The recombinant *AplaOBP3* of *A. planipennis* was expressed in prokaryotic expression system. The polyclonal antibody against *AplaOBP3* was prepared and detected by Western blot assay. Immunocytochemical technique was used to localize the expression of *AplaOBP3* in antennal sensilla of *A. planipennis*. Its binding characteristics to 58 compounds were determined by fluorescence competitive binding assay, and

基金项目: 北京市自然科学基金项目(6184042); 北京市农林科学院科技创新能力建设专项(KJCX201910)

作者简介: 宋玄, 男, 1992年5月生, 河北张家口人, 博士研究生, 研究方向为昆虫化学生态学, E-mail: songxuansongxuan@163.com

\* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: wangshanning@yeah.net

收稿日期 Received: 2020-06-10; 接受日期 Accepted: 2020-08-04

compared with those of AplaOBP1 and AplaOBP2 previously reported. 【Results】 The recombinant protein AplaOBP3 was successfully expressed in prokaryotic expression system. The immunolocalization results showed that AplaOBP3 was expressed in the antennal sensilla basiconica type I. The results of fluorescence competitive binding assay showed that AplaOBP3 had strong binding capabilities with *trans*-2-hexenal, benzaldehyde, 4'-ethylacetophenone,  $\beta$ -ionone and ocimene, with the dissociation constant  $K_D$  values of 6.20, 4.03, 5.24, 1.72 and 4.83  $\mu\text{mol/L}$ , respectively. AplaOBP3 and AplaOBP2 had similar expression and ligand binding properties. 【Conclusion】 AplaOBP3 and AplaOBP2 have similar expression and ligand binding properties, and both may be involved in olfactory perception together and play a role in host localization in *A. planipennis*.

**Key words:** *Agilus planipennis*; odorant binding protein; antennal sensilla; immunocytochemistry; ligand binding characteristics; olfactory perception

白蜡窄吉丁 *Agilus planipennis*, 又名花曲柳窄吉丁、楞小吉丁, 属鞘翅目 (Coleoptera) 吉丁科 (Buprestidae), 主要为害木犀科 (Oleaceae) 白蜡属 *Fraxinus* 树木 (魏霞等, 2004; 赵同海等, 2005)。该虫原产于东亚, 自 2002 年传入北美, 因其隐蔽性强, 防治极为困难, 迄今已造成北美地区数百万白蜡树死亡, 严重威胁多种白蜡属树木的生存 (Anulewicz *et al.*, 2008; Herms and McCullough, 2014; Wendy *et al.*, 2018)。气味分子介导的该虫寄主识别和种间通讯已经被证实。白蜡叶片挥发物中至少发现 16 种化合物能诱发成虫触角电位反应, 如顺-3-己烯醇、乙酸顺-3-己烯酯、反-2-己烯醛等, 其中顺-3-己烯醇对雄虫有很强的诱集作用 (Rodriguez-Saona *et al.*, 2006)。白蜡树皮挥发物中的 6 种倍半萜, 包括  $\alpha$ -蒎烯、 $\alpha$ -可巴烯、 $\alpha$ -葎草烯等均对成虫具有触角活性, 含有这些化合物的两种植物油 manuka oil 和 phoebe oil 在野外对成虫具有诱捕效果 (Crook *et al.*, 2008b)。白蜡窄吉丁雌虫释放的具有触角活性的化合物 (3Z)-lactone 能够吸引雄性, 被认为是该虫的性信息素组分 (Bartelt *et al.*, 2007)。目前已经根据寄主植物挥发物和性信息素研制开发了白蜡窄吉丁的多种引诱剂 (Crook *et al.*, 2008b; Silk *et al.*, 2015, 2019; Katie *et al.*, 2020)。但是, 人们对该虫的化学通讯分子机制还不太了解。

昆虫感知外界化学信息的过程中, 气味结合蛋白 (odorant binding proteins, OBPs)、化学感受蛋白 (chemosensory proteins, CSPs)、气味受体 (odorant receptors, ORs) 和离子型受体 (ionotropic receptors, IRs) 等多种嗅觉相关蛋白发挥至关重要的作用 (Clyne *et al.*, 1999; Couto *et al.*, 2005; Benton *et al.*, 2009; Leal, 2013; Joseph and Carlson, 2015)。昆虫气味结合蛋白 (OBPs) 是一类小分子的水溶性

蛋白, 此类蛋白广泛分布在昆虫的各类感受器官中 (Pelosi *et al.*, 2018)。在昆虫触角中, OBP 蛋白由位于化学感受器下方的辅助细胞合成, 随后被大量分泌到感器腔的淋巴液中, 参与结合、溶解、运输疏水性气味分子, 在昆虫感受外界环境中的化学信号过程中发挥重要功能 (Vogt and Riddiford, 1981; Angeli *et al.*, 1999; Leal, 2013; Pelosi *et al.*, 2014, 2018)。

昆虫气味结合蛋白广泛存在不同昆虫中, 参与昆虫信息化合物的识别。在鞘翅目昆虫大黑鳃金龟 *Holotrichia oblita* 触角转录组中鉴定出 29 个 OBP 基因, 其中 HobLOBP9 和 HobLOBP13 分别参与大黑鳃金龟雌虫对寄主植物挥发物苯乙醇和反-2-苯烯醇的识别 (Yin *et al.*, 2019)。松墨天牛 *Monochamus alternatus* MaltOBP1, MaltOBP3 和 MaltOBP5 能够与部分寄主植物挥发物结合, 它们可能在松墨天牛的寄主选择过程发挥功能 (Gao and Wang, 2015; Zhang *et al.*, 2020)。苹果小吉丁 *Agilus mali* AmalOBP3 在雌雄触角中高表达, 能够结合醇类和醛类等多种寄主挥发物 (Cui *et al.*, 2018)。本实验室前期对白蜡窄吉丁基因组数据进行分析, 鉴定了 11 个气味结合蛋白, 组织表达谱结果表明 AplaOBP1, AplaOBP2 和 AplaOBP3 在雌雄成虫触角特异表达, 荧光竞争结合实验表明 AplaOBP1 和 AplaOBP2 能够与多种寄主挥发物结合, 它们在白蜡窄吉丁寄主识别中发挥功能 (Wang *et al.*, 2020; 宋玄等, 未发表数据), 推测 AplaOBP3 同样在白蜡窄吉丁嗅觉感受行为中发挥功能。

为深入解析气味结合蛋白在白蜡窄吉丁嗅觉感受中的功能, 本研究进一步对 AplaOBP3 蛋白进行了原核表达, 利用免疫组化技术检测了该蛋白的亚细胞定位, 通过荧光竞争结合实验对 AplaOBP3 重

组蛋白与 58 种化合物的结合特性进行了分析,并对 3 种气味结合蛋白(AplaOBP1-3)的表达及配体结合特性进行比较,以期阐明白蜡窄吉丁气味结合蛋白参与寄主识别的化学感受机制提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试昆虫

于北京郊区白蜡林地,将受害白蜡树截成约 50 cm 的木段带回室内,置于养虫笼罩内待白蜡窄吉丁成虫自然羽化,成虫羽化后转移至养虫盒内,饲喂白蜡树叶片进行饲养,成虫饲养条件为温度  $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ,相对湿度  $60\% \pm 5\%$ ,光周期 16L:8D。

### 1.2 AplaOBP3 重组蛋白的表达与纯化

利用 SignalP 3.0 Server 在线程序(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/>)预测白蜡窄吉丁 AplaOBP3 蛋白(GenBank 登录号:XM\_025977151.1)信号肽序列,去信号肽后的核苷酸序列由南京金斯瑞生物科技有限公司进行化学合成并克隆到原核表达载体 pET30a(+),转化大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3)。将单克隆阳性菌株接种于含 100 mg/mL 卡那霉素的培养基中  $37^\circ\text{C}$  200 r/min 摇床中培养,待  $\text{OD}_{600}$  值为 0.6~0.8 时,加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,在  $18^\circ\text{C}$  160 r/min 摇床中诱导 16 h。超声破碎后分别收集上清及包涵体。参照 Prestwich (1993)的方法,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,经氧化还原处理后获得可溶性蛋白。利用亲和层析镍柱纯化,纯化的重组蛋白经肠激酶  $25^\circ\text{C}$  孵育过夜处理后,再次用亲和层析镍柱纯化,超滤浓缩后得到无 His 标签的 AplaOBP3 重组蛋白。通过 4%~20% SDS-PAGE 电泳检测各阶段目的蛋白的表达及纯化情况。纯化的目的蛋白送北京信诺晶科生物技术有限公司制备多克隆抗体。

### 1.3 Western blot 检测

收集白蜡窄吉丁成虫触角,使用组织蛋白抽提试剂盒(康为世纪生物科技有限公司,北京)提取触角组织粗蛋白。采用 4%~20% SDS-PAGE 电泳对触角组织粗蛋白和纯化的重组蛋白 AplaOBP1, AplaOBP2 和 AplaOBP3 进行分离,其中 AplaOBP1 和 AplaOBP2 重组蛋白由本实验室前期实验获得(Wang *et al.*, 2020; 宋玄等,数据未发表)。采用 One Step Western Kit HRP(Rabbit)(康为世纪生物

科技有限公司,北京)进行 Western blot,检测 AplaOBP3 多克隆抗体的特异性;通过高灵敏度化学发光检测试剂盒(康为世纪生物科技有限公司,北京)进行发光检测;使用化学发光成像分析仪(AI680, GE, 美国)进行曝光及图像采集。

### 1.4 免疫组织化学定位检测

1.3 节收集的白蜡窄吉丁触角样品送至中国农业科学院农产品加工研究所电镜室进行固定、制样包埋、切片、免疫染色及电镜观察。1.2 节制备的 AplaOBP3 多克隆抗体按照 1:5 000 (v/v) 稀释使用,以未免疫的兔血清代替抗体作为阴性对照,详细步骤参照本实验室前期报道(Wang *et al.*, 2020),检测 AplaOBP3 在白蜡窄吉丁触角感器中的表达定位。

### 1.5 荧光竞争结合实验

为了与前期报道的白蜡窄吉丁 AplaOBP1 和 AplaOBP2 蛋白的配体结合特性进行比较,本研究选取了 58 种相同的化合物作为候选配体(表 1),其中 27 种挥发物的选择是来自于白蜡窄吉丁为害的寄主植物。使用 F-380 荧光分光光度计(天津港东科技发展股份有限公司)进行荧光竞争结合实验,激发波长 337 nm,扫描发射波长范围 370~550 nm。采用 N-苯基-1-萘胺(N-phenyl-1-naphthylamine, 1-NPN)作为荧光探针。候选配体和荧光探针用色谱级甲醇溶解,配制成浓度为 1 mmol/L 的工作液。于 PBS 缓冲液(pH 7.4)中加入 AplaOBP3 重组蛋白,终浓度为 2  $\mu\text{mol/L}$ ,再加入 1-NPN,使探针浓度从 2  $\mu\text{mol/L}$  递增至 12  $\mu\text{mol/L}$ ,重复 3 次,测定荧光强度变化,计算 AplaOBP3 与探针的结合能力曲线和解离常数。将 AplaOBP3 加入 PBS 缓冲液(pH 7.4)中,终浓度为 2  $\mu\text{mol/L}$ ,加入相同浓度的 1-NPN,记录荧光强度,随后加入待测配体,浓度从 2  $\mu\text{mol/L}$  开始递增至 20  $\mu\text{mol/L}$ ,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  $\text{IC}_{50}$  值。利用下列公式计算出配体解离常数  $K_D$ :  $K_D = [\text{IC}_{50}] / (1 + [1\text{-NPN}] / K_{1\text{-NPN}})$ , [1-NPN] 是未结合的 1-NPN 的浓度,  $K_{1\text{-NPN}}$  为 AplaOBP3 与 1-NPN 的解离常数(Gu *et al.*, 2011)。

## 2 结果

### 2.1 AplaOBP3 的重组表达

SDS-PAGE 结果表明,气味结合蛋白 AplaOBP3 重组蛋白在包涵体中表达(图 1),对包涵体进行复性,通过亲和层析获得重组蛋白,肠激酶切去 His 标

签后得到分子量约为 14 kD 的目的蛋白,用于抗体制备及竞争性结合实验。

## 2.2 Western blot 检测

Western blot 检测了 AplaOBP3 多克隆抗体与白蜡窄吉丁触角粗蛋白以及纯化的 AplaOBP1, AplaOBP2 和 AplaOBP3 重组蛋白的结合特异性,结果表明,仅在触角粗蛋白和 AplaOBP3 蛋白样品中检测到分子量约 14 kD 特异性条带,表明 AplaOBP3 多克隆抗体仅与 AplaOBP3 蛋白结合,可以满足后续的免疫组织化学检测(图 2)。

## 2.3 AplaOBP3 在触角中的表达定位

免疫组化结果表明,黑色胶体金颗粒标记的 AplaOBP3 蛋白分布在白蜡窄吉丁锥形感器类型 I 的感器腔及感器下方(图 3)。锥形感器类型 I 的感器壁具有明显的微孔,是嗅觉感受器,推测 AplaOBP3 蛋白在白蜡窄吉丁嗅觉感受过程中发挥着重要的作用。

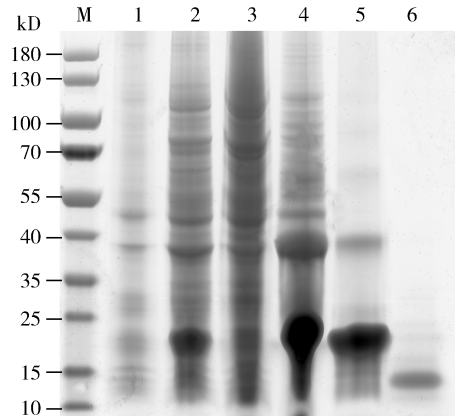


图 1 白蜡窄吉丁重组蛋白 AplaOBP3 的 SDS-PAGE 分析  
Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the recombinant AplaOBP3 of *Agrilus planipennis*

M: 蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker; 1: 未诱导的大肠杆菌菌株 Non-induced *Escherichia coli*; 2: 经 IPTG 诱导 16 h 的大肠杆菌菌株 *E. coli* induced by 1 mmol/L IPTG for 16 h; 3: 上清液 Supernatant; 4: 包涵体蛋白 Inclusion body protein; 5: 带 His 标签重组蛋白 AplaOBP3 Recombinant AplaOBP3 with His-tag; 6: 无 His 标签的重组蛋白 AplaOBP3 Recombinant AplaOBP3 without His-tag.

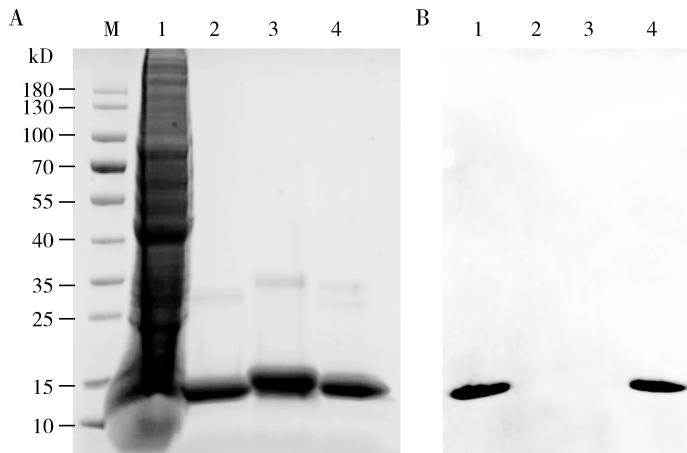


图 2 白蜡窄吉丁 AplaOBP3 多克隆抗体的 SDS-PAGE (A) 和 Western blot (B) 检测

Fig. 2 SDS-PAGE (A) and Western blot (B) analysis of the polyclonal antibody against AplaOBP3 of *Agrilus planipennis*

M: 蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker; 1: 提取自白蜡窄吉丁的触角粗蛋白 Crude protein extracted from antennae of *A. planipennis*; 2: AplaOBP1 重组蛋白 Recombinant AplaOBP1; 3: AplaOBP2 重组蛋白 Recombinant AplaOBP2; 4: AplaOBP3 重组蛋白 Recombinant AplaOBP3.

## 2.4 AplaOBP3 重组蛋白配体结合特征

荧光竞争结合实验结果表明, AplaOBP3 与荧光探针 1-NPN 的解离常数为  $0.4 \mu\text{mol/L}$ , 1-NPN 和重组蛋白 AplaOBP3 的结合曲线及 Scatchard 方程见图 4 (A)。AplaOBP3 与候选配体的结合曲线(图 4: B)和解离常数(表 1)可以看出, 在 58 种气味挥发物中, AplaOBP3 可以特异性结合反-2-己烯醛、苯甲醛、4'-乙基苯乙酮、 $\beta$ -紫罗兰酮和罗勒烯, AplaOBP3 与  $\beta$ -紫罗兰酮结合能力最强, 解离常数为  $1.72 \mu\text{mol/L}$ , 与苯甲醛的结合能力次之, 其解离常数为

$4.03 \mu\text{mol/L}$ , 与反-2-己烯醛的结合能力最弱, 其解离常数为  $6.20 \mu\text{mol/L}$ 。

## 2.5 AplaOBP3 与 AplaOBP1 和 AplaOBP2 的表达及配体结合特性比较

AplaOBP3 与前期报道的白蜡窄吉丁 AplaOBP1 和 AplaOBP2 蛋白的表达及配体结合特性(表 2)进行比较发现, AplaOBP3 与 AplaOBP2 具有相似的表达及配体结合特性, 但与 AplaOBP1 的明显不同。AplaOBP3 和 AplaOBP2 均在触角锥形感器类型 I 表达, 而 AplaOBP1 在锥形感器类型 I 和 III 均表达。在

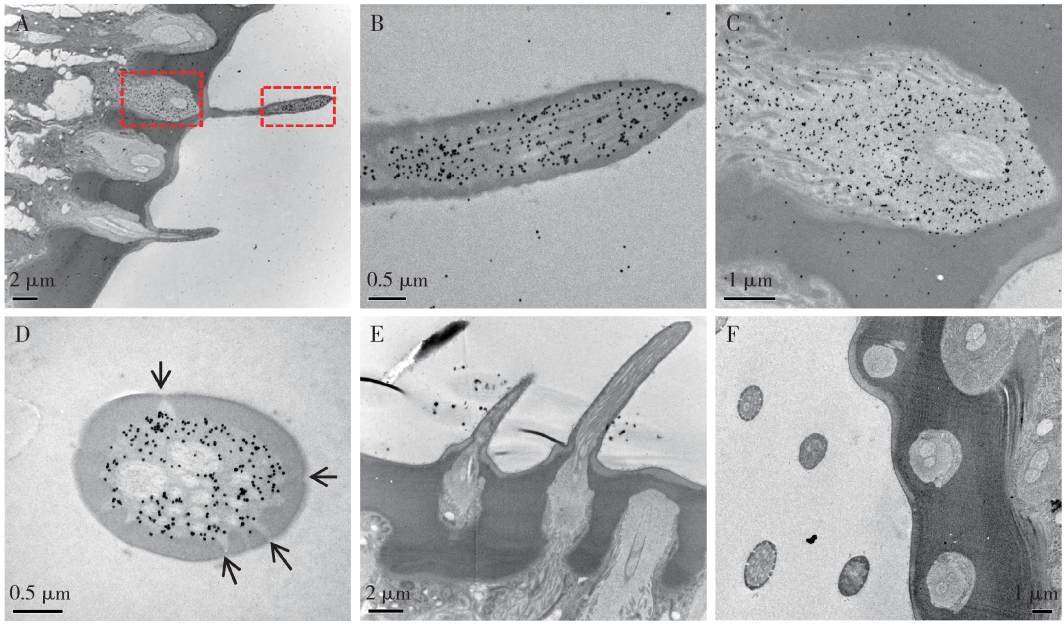


图3 *AplaOBP3* 蛋白在白蜡窄吉丁触角的表达定位

Fig. 3 Expression localization of *AplaOBP3* protein in the antenna of *Agrilus planipennis*

A: 显示黑色颗粒标记的 *AplaOBP3* 蛋白分布在锥形感器类型 I 的感器腔及感器基部的纵切图 Longitudinal section showing that *AplaOBP3* proteins labeled with black spots are distributed in the hair lumen and the base of the sensilla basiconica type I; B: 锥形感器类型 I 的感器腔 Hair lumen of the sensilla basiconica type I; C: 锥形感器类型 I 的感器基部 Base of the sensilla basiconica type I; D: 显示 *AplaOBP3* 蛋白在锥形感器类型 I 的感器腔中表达的横切图, 箭头表示感器上的壁孔 Cross section showing the expression of *AplaOBP3* protein at the hair lumen of sensilla basiconica type I, arrows indicating the wall pores on the sensillum; E: 显示未免疫的兔血清阴性对照未被标记的纵切图 Longitudinal section showing that the negative control of unimmunized rabbit serum was not labeled; F: 显示未免疫的兔血清阴性对照未被标记的横切图 Cross section showing that the negative control of unimmunized rabbit serum was not labeled.

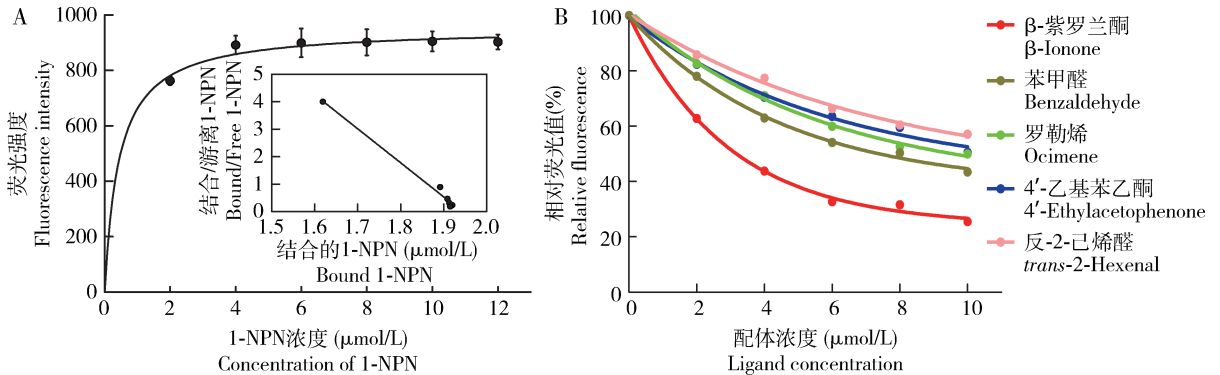


图4 白蜡窄吉丁重组蛋白 *AplaOBP3* 的结合特征

Fig. 4 Binding properties of the recombinant *AplaOBP3* of *Agrilus planipennis*

A: 1-NPN 和 *AplaOBP3* 的结合曲线及 Scatchard 方程 Binding curve and Scatchard plot of 1-NPN to *AplaOBP3*; B: *AplaOBP3* 与候选配体的结合曲线 Binding curves of *AplaOBP3* to candidate ligands.

58 种候选配体中, 共有 15 种化合物至少与一种 *AplaOBP* 重组蛋白结合。与 *AplaOBP3* 结合的 5 种配体中, 其中 4 种 (反-2-己烯醛、苯甲醛、4'-乙基苯乙酮和  $\beta$ -紫罗兰酮) 也与 *AplaOBP2* 结合, 而与 *AplaOBP1* 结合的多数配体与 *AplaOBP3* 和 *AplaOBP2* 不结合, 其中仅罗勒烯与 *AplaOBP3* 结合。

### 3 讨论

白蜡窄吉丁触角上分布有 3 种多孔的锥形感器, 在雌雄成虫感受外界嗅觉刺激信号中发挥着重要的作用 (Crook *et al.*, 2008a)。免疫组化结果表明,

表 1 白蜡窄吉丁重组蛋白 AplaOBP3 与候选配体结合能力

Table 1 Binding capabilities of the recombinant AplaOBP3 of *Agrilus planipennis* to candidate ligands

配体 Ligands	来源 Source	CAS 登记号 CAS number	纯度(%) Purity	IC <sub>50</sub> (μmol/L)	K <sub>D</sub> (μmol/L)
醇类 Alcohols					
1-己醇 1-Hexanol *	TCI	111-27-3	>98.0	-	-
反-2-己烯-1-醇 <i>trans</i> -2-Hexen-1-ol	TCI	928-95-0	>95.0	-	-
顺-2-己烯-1-醇 <i>cis</i> -2-Hexen-1-ol	TCI	928-94-9	>93.0	-	-
反-3-己烯-1-醇 <i>trans</i> -3-Hexen-1-ol	Sigma	928-97-2	97.0	-	-
顺-3-己烯-1-醇 <i>cis</i> -3-Hexen-1-ol *	TCI	928-96-1	>97.0	-	-
反-4-己烯-1-醇 <i>trans</i> -4-Hexen-1-ol	Sigma	928-92-7	≥96.0	-	-
1-辛醇 1-Octanol	TCI	111-87-5	>99.0	-	-
2-苯乙醇 2-Phenylethyl alcohol	TCI	60-12-8	>98.0	-	-
醛类 Aldehydes					
丁醛 Butyraldehyde	TCI	123-72-8	>98.0	-	-
戊醛 Valeraldehyde	TCI	110-62-3	>95.0	-	-
己醛 Hexanal *	TCI	66-25-1	>98.0	-	-
反-2-己烯醛 <i>trans</i> -2-Hexenal *	TCI	6728-26-3	>97.0	12.09 ± 0.25	6.20 ± 0.13
反-2-庚烯醛 <i>trans</i> -2-Heptenal	TCI	18829-55-5	>95.0	-	-
正辛醛 n-Octanal	TCI	124-13-0	>98.0	-	-
壬醛 Nonanal *	TCI	124-19-6	>95.0	-	-
苯甲醛 Benzaldehyde	TCI	100-52-7	>98.0	7.87 ± 0.29	4.03 ± 0.15
烷类 Alkanes					
正辛烷 Octane	TCI	111-65-9	>97.0	-	-
癸烷 Decane *	TCI	124-18-5	>99.0	-	-
十一烷 Undecane	TCI	1120-21-4	>99.0	-	-
十二烷 Dodecane *	TCI	112-40-3	>99.0	-	-
十三烷 Tridecane	TCI	629-50-5	>99.0	-	-
酯类 Esters					
苯乙酸甲酯 Methyl phenylacetate	TCI	101-41-7	>99.0	-	-
水杨酸甲酯 Methyl salicylate *	TCI	119-36-8	>99.0	-	-
丁酸顺式-3-己烯酯 <i>cis</i> -3-Hexenyl butyrate *	Sigma	16491-36-4	≥98.0	-	-
苯甲酸甲酯 Methyl benzoate	TCI	93-58-3	>99.0	-	-
丙烯酸异丁酯 Isobutyl acrylate	TCI	106-63-8	>99.0	-	-
丁酸己酯 Hexyl butyrate	TCI	2639-63-6	>98.0	-	-
乙酸反-2-己烯酯 <i>trans</i> -2-Hexenyl acetate	TCI	2497-18-9	>97.0	-	-
丁酸反-2-己烯基酯 <i>trans</i> -2-Hexenyl butyrate	TCI	53398-83-7	>93.0	-	-
乙酸己酯 Hexyl acetate *	TCI	142-92-7	>99.0	-	-
乙酸顺-3-己烯酯 <i>cis</i> -3-Hexenyl acetate *	TCI	3681-71-8	>97.0	-	-
惕各酸异丁酯 Isobutyl tiglate	TCI	61692-84-0	>96.0	-	-
酮类 Ketones					
2-庚酮 2-Heptanone	TCI	110-43-0	>98.0	-	-
2-辛酮 2-Octanone	TCI	111-13-7	>98.0	-	-
4'-乙基苯乙酮 4'-Ethylacetophenone *	TCI	937-30-4	>97.0	10.22 ± 0.20	5.24 ± 0.10
3',4'-二甲氧基苯乙酮 3',4'-Dimethoxyacetophenone	TCI	1131-62-0	>98.0	-	-
β-紫罗兰酮 β-Ionone	TCI	14901-07-6	>95.0	3.36 ± 0.06	1.72 ± 0.03
萜烯类 Terpenes					
β-蒎烯 β-Pinene *	麦克林	127-91-3	≥95.0	-	-
(1R)-(+) -α-蒎烯 (1R)-(+) -α-Pinene *	TCI	7785-70-8	>97.0	-	-

续表 1 Table 1 continued

配体 Ligands	来源 Source	CAS 登记号 CAS number	纯度 (%) Purity	IC <sub>50</sub> (μmol/L)	K <sub>D</sub> (μmol/L)
月桂烯 Myrcene *	麦克林	123-35-3	≥90.0	-	-
3-蒎烯 3-Carene *	麦克林	13466-78-9	90.0	-	-
(+)-柠檬烯(+)-Limonene *	TCI	5989-27-5	>95.0	-	-
松油醇 Terpineol	Sigma	8000-41-7	≥96.0	-	-
α-松油烯 α-Terpinene	TCI	99-86-5	>90.0	-	-
橙花叔醇 Nerolidol *	TCI	7212-44-4	>97.0	-	-
α-葎草烯 α-Humulene *	TCI	6753-98-6	>93.0	-	-
α-可巴烯 α-Copaene *	化学慧	3856-25-5	>90.0	-	-
香叶醇 Geraniol	TCI	106-24-1	>96.0	-	-
金合欢烯 Farnesene *	Sigma	502-61-4	>90.0	-	-
罗勒烯 Ocimene *	Sigma	13877-91-3	≥90.0	9.43 ± 0.35	4.83 ± 0.18
β-石竹烯 β-Caryophyllene *	TCI	87-44-5	>90.0	-	-
(-)-氧化石竹烯(-)-Caryophyllene oxide *	Sigma	1139-30-6	95.0	-	-
芳樟醇 Linalool *	TCI	78-70-6	>96.0	-	-
1,8-桉树脑 1,8-Cineole *	TCI	470-82-6	>99.0	-	-
柠檬醛 Citral	TCI	5392-40-5	>96.0	-	-
(-)-香茅醛(-)-Citronellal	TCI	5949-05-3	>96.0	-	-
其他 Others					
四氢吡咯 Pyrrolidine	TCI	123-75-1	>98.0	-	-
吲哚 Indole *	TCI	120-72-9	>99.0	-	-

IC<sub>50</sub>: 配体置换 50% 探针 1-NPN 时的浓度 Concentration of ligand displacing 50% 1-NPN; K<sub>D</sub>: 解离常数 Dissociation constant. 当 IC<sub>50</sub> > 20 μmol/L 时, 认定重组蛋白 AplaOBP3 与该配体不结合, 不计算其 K<sub>D</sub> 值。与重组蛋白 AplaOBP3 无结合的配体的 IC<sub>50</sub> 值和 K<sub>D</sub> 值均以负号表示。When IC<sub>50</sub> > 20 μmol/L, the recombinant AplaOBP3 can not bind with the tested ligand, and the K<sub>D</sub> value will not be calculated. The IC<sub>50</sub> and K<sub>D</sub> values of the ligand not binding to the recombinant AplaOBP3 are represented by a minus. \* 寄主植物挥发物 Host plant volatiles (Rigsby *et al.*, 2017).

表 2 3 种 AplaOBP 蛋白表达及配体结合特征比较

Table 2 Comparison of expression and ligand binding characteristics of three AplaOBP proteins

配体 Ligands	AplaOBP1 <sup>a</sup>	AplaOBP2 <sup>b</sup>	AplaOBP3 <sup>b</sup>
辛烷 Octane	√	-	-
丁酸乙酯 Hexyl butyrate	√	-	-
(-)-香茅醛(-)-Citronellal	√	-	-
柠檬醛 Citral	√	-	-
月桂烯 Myrcene	√	-	-
(+)-柠檬烯(+)-Limonene	√	-	-
橙花醇 Nerolidol	√	-	-
α-法尼烯 α-Farnesene	√	-	-
罗勒烯 Ocimene	√	-	√
反-2-己烯醛 <i>trans</i> -2-Hexenal	-	√	√
反-2-庚烯醛 <i>trans</i> -2-Heptenal	-	√	-
苯甲醛 Benzaldehyde	-	√	√
4'-乙基苯乙酮	-	√	√
4'-Ethylacetophenone	-	√	√
3',4'-二甲氧基苯乙酮	-	√	-
3',4'-Dimethoxyacetophenone	-	√	-
β-紫罗兰酮 β-Ionone	-	√	√

<sup>a</sup> 在锥形感器类型 I 和 III 中表达 Expressed in sensilla basiconica type I and III; <sup>b</sup> 在锥形感器类型 I 中表达 Expressed in sensilla basiconica type I. √: 结合 Binding; -: 不结合 Not binding.

AplaOBP3 蛋白在白蜡窄吉丁锥形感器类型 I 中表达, 推测 AplaOBP3 可能与嗅觉感受有关。本研究选择 58 种挥发物作为候选配体, 其中包括 27 种寄主挥发物, AplaOBP3 重组蛋白能与多种挥发物结合, 其中与 AplaOBP3 重组蛋白结合的 5 种配体中, 3 种配体即罗勒烯、反-2-己烯醛和 4'-乙基苯乙酮属于白蜡窄吉丁寄主植物白蜡树的叶片挥发物, 它们可以引起白蜡窄吉丁 EAG 反应, 并且反-2-己烯醛对白蜡窄吉丁具有吸引作用 (Rigsby *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2020; 宋玄等, 未发表数据), 表明 AplaOBP3 可能在白蜡窄吉丁选择寄主植物过程中发挥重要嗅觉感受功能。AplaOBP3 和 AplaOBP2 表现出大致相同的表达及配体结合特征, 它们均可结合反-2-己烯醛、苯甲醛、4'-乙基苯乙酮和 β-紫罗兰酮。Zhong 等 (2018) 的研究发现茶翅蜡 5 种 OBPs 与报警信息素组分反-2-癸烯醛具有强的结合能力。苹果小吉丁 OBP2 和 OBP8 与十二醇、橙花醇、法尼醇和十二烷等多种配体均具有强的结合能力 (Cui *et al.*, 2018)。因此, 昆虫中不同种类的气味结合蛋白能够结合同一种挥发物, 推测可能共同参与某种化合物的识别。

顺-3-己烯醇是白蜡叶片挥发物重要组分,其可以引起白蜡窄吉丁的 EAG 反应,且对白蜡窄吉丁具有诱集活性,已应用于商业化诱饵关键组分 (Rodriguez-Saona *et al.*, 2006; Grant *et al.*, 2010, 2011)。目前,未发现一种 AplaOBP 蛋白能够与顺-3-己烯醇结合。白蜡窄吉丁 11 个 AplaOBPs 中,除触角特异表达的 3 个 AplaOBPs 以外,AplaOBP6 和 AplaOBP7 基因在触角的表达量高于其他组织 (Wang *et al.*, 2020),它们是否能够与顺-3-己烯醇结合还需进一步实验研究。另外,其他水溶性转运蛋白如化学感受蛋白 (CSPs) 也可能参与寄主挥发物的识别。Andersson 等 (2019) 对白蜡窄吉丁基因组进行分析,共注释了 14 个 AplaCSPs 基因。目前,关于 AplaCSPs 在白蜡窄吉丁化学感受中的功能未见报道。我们推测触角特异或高表达的 AplaCSPs 也很有可能参与顺-3-己烯醇等寄主挥发物的识别。

综上,本研究对白蜡窄吉丁 AplaOBP3 蛋白在触角感器中的定位进行了解析,通过体外功能研究的方法证明 AplaOBP3 可能参与白蜡窄吉丁对寄主植物挥发物的识别,同时比较了 AplaOBP3 与已报道的 AplaOBP1 和 AplaOBP2 的配体结合异同,为阐明气味结合蛋白在白蜡窄吉丁寄主识别中的功能奠定了一定基础,也为基于气味结合蛋白的功能筛选白蜡窄吉丁新的信息化合物提供了依据。然而,对于气味结合蛋白在白蜡窄吉丁寄主识别中的具体生理功能还需进一步通过基因干扰或基因编辑进行验证。

## 参考文献 (References)

Andersson MN, Keeling CI, Mitchell RF, 2019. Genomic content of chemosensory genes correlates with host range in wood-boring beetles (*Dendroctonus ponderosae*, *Agrilus planipennis*, and *Anoplophora glabripennis*). *BMC Genomics*, 20(1): 690.

Angeli S, Ceron F, Scaloni A, Monti M, Monteforti G, Minnocci A, Petacchi R, Pelosi P, 1999. Purification, structural characterization, cloning and immunocytochemical localization of chemoreception proteins from *Schistocerca gregaria*. *Eur. J. Biochem.*, 262(3): 745–754.

Anulewicz AC, McCullough DG, Cappaert DL, Poland TM, 2008. Host range of the emerald ash borer (*Agrilus planipennis* Fairmaire) (Coleoptera: Buprestidae) in North America: Results of multiple-choice field experiments. *Environ. Entomol.*, 37(1): 230–241.

Bartelt R, Cossé AA, Zilkowski BW, Fraser I, 2007. Antennally active macrolide from the emerald ash borer *Agrilus planipennis* emitted predominantly by females. *J. Chem. Ecol.*, 33(7): 1299–1302.

Benton R, Vannice KS, Gomez-Diaz C, Vosshall LB, 2009. Variant

ionotropic glutamate receptors as chemosensory receptors in *Drosophila*. *Cell*, 136(1): 149–162.

Clyne PJ, Warr CG, Freeman MR, Lessing D, Kim J, Carlson JR, 1999. A novel family of divergent seven transmembrane proteins: Candidate odorant receptors in *Drosophila*. *Neuron*, 22(2): 327–338.

Couto A, Alenius M, Dickson BJ, 2005. Molecular, anatomical, and functional organization of the *Drosophila* olfactory system. *Curr. Biol.*, 15(17): 1535–1547.

Crook DJ, Kerr LM, Mastro VC, 2008a. Distribution and fine structure of antennal sensilla in emerald ash borer (Coleoptera: Buprestidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 101(6): 1103–1111.

Crook DJ, Khirman A, Francese JA, Fraser I, Poland TM, Sawyer AJ, Mastro VC, 2008b. Development of a host-based semiochemical lure for trapping emerald ash borer *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae). *Environ. Entomol.*, 37(2): 356–365.

Cui XN, Liu DG, Sun KK, He Y, Shi XQ, 2018. Expression profiles and functional characterization of two odorant-binding proteins from the apple buprestid beetle *Agrilus mali* (Coleoptera: Buprestidae). *J. Econ. Entomol.*, 111(3): 1420–1432.

Gao X, Wang MQ, 2015. A cDNA library from the antenna of *Monochamus alternatus* Hope and binding properties of odorant-binding proteins. *J. Appl. Entomol.*, 139(3): 229–236.

Grant GG, Poland TM, Ciaramitaro T, Lyons DB, Jones GC, 2011. Comparison of male and female emerald ash borer (Coleoptera: Buprestidae) responses to phoebe oil and (*Z*)-3-hexenol lures in light green prism traps. *J. Econ. Entomol.*, 104(1): 173–179.

Grant GG, Ryall KL, Lyons DB, Abouzaid MM, 2010. Differential response of male and female emerald ash borers (Col., Buprestidae) to (*Z*)-3-hexenol and manuka oil. *J. Appl. Entomol.*, 134(1): 26–33.

Gu SH, Wang WX, Wang GR, Zhang XY, Guo YY, Zhang ZD, 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.

Hermes DA, McCullough DG, 2014. Emerald ash borer invasion of North America: History, biology, ecology, impacts, and management. *Annu. Rev. Entomol.*, 59: 13–30.

Joseph RM, Carlson JR, 2015. *Drosophila* chemoreceptors: A molecular interface between the chemical world and the brain. *Trends Genet.*, 31(12): 683–695.

Katie P, Krista R, Brian HA, Peter S, 2020. Early detection of *Agrilus planipennis*: Investigations into the attractive range of the sex pheromone (3*Z*)-lactone. *Entomol. Exp. Appl.*, 168(2): 166–173.

Leal WS, 2013. Odorant reception in insects: Roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annu. Rev. Entomol.*, 58: 373–391.

Pelosi P, Iovinella I, Felicioli A, Dani FR, 2014. Soluble proteins of chemical communication: An overview across arthropods. *Front. Physiol.*, 5: 320.



- Pelosi P, Iovinella I, Zhu J, Wang G, Dani FR, 2018. Beyond chemoreception: Diverse tasks of soluble olfactory proteins in insects. *Biol. Rev.*, 93(1): 184–200.
- Prestwich GD, 1993. Bacterial expression and photoaffinity labeling of a pheromone binding protein. *Prot. Sci.*, 2(3): 420–428.
- Rigsby CM, McCartney NB, Herms DA, Tumlinson JH, Cipollini D, 2017. Variation in the volatile profiles of black and Manchurian ash in relation to emerald ash borer oviposition preferences. *J. Chem. Ecol.*, 43(8): 831–842.
- Rodriguez-Saona C, Poland TM, Miller JR, Stelinski LL, Grant GG, de Groot P, Buchan L, MacDonald L, 2006. Behavioral and electrophysiological responses of the emerald ash borer, *Agrilus planipennis*, to induced volatiles of Manchurian ash, *Fraxinus mandshurica*. *Chemoecology*, 16(2): 75–86.
- Silk P, Mayo P, Ryall K, Roscoe L, 2019. Semiochemical and communication ecology of the emerald ash borer, *Agrilus planipennis* (Coleoptera; Buprestidae). *Insects*, 10(10): 323.
- Silk PJ, Ryall K, Mayo P, MaGee DI, Leclair G, Fidgen J, Lavallee R, Price J, McConaghy J, 2015. A biologically active analog of the sex pheromone of the emerald ash borer, *Agrilus planipennis*. *J. Chem. Ecol.*, 41(3): 294–302.
- Vogt RG, Riddiford LM, 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 293(5828): 161–163.
- Wang SN, Shan S, Yu GY, Wang H, Dhiloo KH, Khashaveh A, Zhang F, Zhang YJ, 2020. Identification of odorant-binding proteins and functional analysis of antenna-specific AplaOBPI in the emerald ash borer, *Agrilus planipennis*. *J. Pest Sci.*, 93(2): 853–865.
- Wei X, Reardon D, Wu Y, Sun JH, 2004. Emerald ash borer, *Agrilus planipennis* Fairmaire (Coleoptera; Buprestidae), in China: A review and distribution survey. *Acta Entomol. Sin.*, 47(5): 679–685. [魏霞, Reardon D, 吴云, 孙江华, 2004. 白蜡窄吉丁虫在中国的研究现状与分布调查. 昆虫学报, 47(5): 679–685]
- Wendy SK, Kamal JKG, Lawrence CL, Kayla IP, Kevin BR, Daniel AH, 2018. Ecological impacts of emerald ash borer in forests at the epicenter of the invasion in North America. *Forests*, 9(5): 250.
- Yin J, Wang CQ, Fang CQ, Zhang S, Cao YZ, Li KB, Leal WS, 2019. Functional characterization of odorant-binding proteins from the scarab beetle *Holotrichia oblita* based on semiochemical-induced expression alteration and gene silencing. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 104: 11–19.
- Zhang FM, Merchant A, Zhao ZB, Zhang YH, Zhang J, Zhang QW, Wang QH, Zhou XG, Li XR, 2020. Characterization of MaltOBPI, a minus-C odorant-binding protein, from the Japanese pine sawyer beetle, *Monochamus alternatus* Hope (Coleoptera; Cerambycidae). *Front. Physiol.*, 11: 212.
- Zhao TH, Gao RT, Liu H, Bauer LS, Sun LQ, 2005. Host range of emerald ash borer, *Agrilus planipennis* Fairmaire, its damage and the countermeasures. *Acta Entomol. Sin.*, 48(4): 594–599. [赵同海, 高瑞桐, Liu H, Bauer LS, 孙龙强, 2005. 花曲柳窄吉丁的寄主植物范围、危害和防治对策. 昆虫学报, 48(4): 594–599]
- Zhong YZ, Tang R, Zhang JP, Yang SY, Chen GH, He KL, Wang ZY, Zhang F, 2018. Behavioral evidence and olfactory reception of a single alarm pheromone component in *Halyomorpha halys*. *Front. Physiol.*, 9: 1610.

(责任编辑: 马丽萍)