

斜纹夜蛾普通气味结合蛋白基因 *SlitGOBP1* 的 克隆及序列分析

钟国华, 李苗孟, 胡美英, 罗倩, 马金亮

(华南农业大学 昆虫毒理研究室, 广东 广州 510642)

摘要:通过 PCR 扩增结合 RACE 技术克隆获得斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 普通气味结合蛋白 1 (GOBP1) 基因 (*SlitGOBP1*) 全序列。序列测定和结构分析表明, *SlitGOBP1* 阅读框全长为 495 bp, 编码 164 个氨基酸残基, 预测相对分子质量和等电点分别为 19 270 和 5.29, 与已报道的 10 种鳞翅目昆虫 GOBP1 相似性为 90% ~ 41%。cDNA 序列 GenBank 登录号为 EF159978。SlitGOBP1 序列中有 6 个保守的半胱氨酸位点, 具有 GOBP1 的典型特征。SlitGOBP1 编码的蛋白呈酸性, 整个分子呈亲水性, 在第 40 ~ 60 位和 100 位以后的氨基酸表现亲脂性, 蛋白质二级结构主要由 α 螺旋构成。氨基酸序列系统进化树分析表明, 昆虫间 GOBP1 分子具有明显的保守性, SlitGOBP1 与夜蛾科的烟青虫 *Helicoverpa assulta*、烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 和棉铃虫 *Helicoverpa armigera* GOBP1 属于一个分支, 相似性分别为 78.1%、87.6% 和 79.9%。这些结果为进一步了解斜纹夜蛾感受环境信息分子机制, 研制昆虫行为调节剂提供了基础。

关键词:斜纹夜蛾; 普通气味结合蛋白 1; 基因克隆; 序列分析

中图分类号: S433.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2008)02-0038-06

Cloning and Sequence Analysis of *SlitGOBP1* Encoding a General Odorant Binding Protein 1 from *Spodoptera litura*

ZHONG Guo-hua, LI Miao-meng, HU Mei-ying, LUO Qian, MA Jin-liang

(Laboratory of Insect Toxicology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: By using the total RNA isolated from the antenna of *Spodoptera litura*, the full-length sequence of gene encoding a general odorant binding protein 1 (named *SlitGOBP1*, see GenBank EF159978) was cloned by the method of reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid amplification cDNA ends (RACE). The sequence analysis showed that *SlitGOBP1* encodes 164 amino acid residues and its open reading frame was 495 bp. Deduced SlitGOBP1 protein ($M_r = 19\ 270$; $pI = 5.29$) had six conserved cysteines. The deduced amino acid sequence showed 90% ~ 41% similarity to the sequence of GOBP1 from 10 species of the moth and shared several common structural features. The protein was acidic and hydrophilic, while the amino acids in 40-60 loci and the loci after 100 were hydrophobic. The protein secondary structure mainly consists of α helices. The phylogenetic tree was created from the alignments of the amino acid sequences, and the analysis revealed that GOBP1 possessed distinct conservation in evolution and SlitGOBP1 were 78.1%, 87.6% and 79.9% identical to GOBP1 of *Helicoverpa assulta*, *Heliothis virescens* and *Helicoverpa armigera*, respectively. The results in this study would be the basis to explore the molecular mechanism of insect receiving the message from environment.

Key words: *Spodoptera litura*; general odorant binding protein 1 (GOBP1); gene cloning; sequence analysis

收稿日期: 2008-01-04

作者简介: 钟国华 (1973—), 男, 副教授, 博士; 通讯作者: 胡美英 (1954—), 女, 教授, E-mail: humy@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (30671387 和 30770291); 农药与化学生物学教育部重点实验室开放基金

昆虫感受外界环境中的信号物质及种群的信息交换依赖于体内感受器中各种蛋白质的介导,这些蛋白质包括气味结合蛋白、化学感受蛋白、气味受体、气味降解酶以及感觉神经元膜蛋白等,其中昆虫气味结合蛋白(odorant binding proteins, OBPs)被认为是运输气味分子至嗅觉的受体,是昆虫专一性识别外界气味物质的第1步生化反应,对于昆虫感受空气中的挥发性化合物,寻找交配对象、食物和生殖场所具有特殊的意义^[1]。目前一般将昆虫 OBPs 分为性外激素结合蛋白(pheromone binding protein, PBP)和普通气味结合蛋白(general odorant binding protein, GOBP),后者又可分为 GOBP1 和 GOBP2^[2-4]。深入研究 OBPs 不仅具有重要理论意义,而且在实践中可以为害虫监测防治和益虫利用提供新途径、新方法,所以近年来国内外 OBPs 研究颇受关注,在生态进化意义、分布表达部位、生化特性、分子结构、生理功能等方面均取得了一系列重要进展,鳞翅目、双翅目、膜翅目、直翅目等多种昆虫 OBPs 已在 GenBank 等中报道。斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 是农作物的主要害虫之一,食性杂,为害重,属间歇暴发性害虫^[5],其 OBPs、嗅觉识别分子机制国内外鲜见报道,深入研究其与环境信息交流机制的分子基础,将为其综合防治新技术研究提供科学依据。本文克隆了斜纹夜蛾触角 GOBP1 基因(*SluGOBP1*),进行了序列分析,为进一步研究斜纹夜蛾感受化学刺激,特别是感受挥发性产卵忌避活性物质作用打下了基础。

1 材料与方法

1.1 供试虫源和试剂

斜纹夜蛾成虫购于中山大学生命科学院昆虫所,取羽化3 d内的成虫,剪下触角后立即置液氮中冷冻,然后-80℃冰箱保存备用。基因工程菌 DH5 α 由本研究室保存,pGEM-T Easy 克隆载体和 AMV 反转录酶为 Promega 公司产品。凝胶 DNA 回收试剂盒、Pyrobest DNA 聚合酶(5 U/ μ L)均为 TaKaRa 产品。

1.2 雌成虫触角总 RNA 和 DNA 的提取

参考文献[6-7]方法,提取斜纹夜蛾雌成虫触角 RNA,直接用于 RT-PCR 或-80℃保存,提取雌成虫 DNA,-20℃冰箱保存备用。

1.3 cDNA 第1链的合成

参照 Promega 的 AMV 反转录酶使用说明合成 cDNA 第1链,用于 PCR 扩增或-20℃保存。

1.4 引物设计及合成

参照 GenBank 公布的亲缘关系较近的昆虫

GOBP1 的 cDNA 序列,根据保守序列设计简并引物 3G1F,结合 Oligo (dT)₂₀,用于 3'-RACE 扩增。根据 3'-RACE 获得的序列,设计2条特异引物(5'G1R、5'G1nest),配合 GeneRacer Kit 提供的正向引物进行 5'-RACE 巢式扩增。根据已获得的斜纹夜蛾 GOBP1 的 cDNA 全长序列,设计特异性引物 G1gF 和 G1gR,用于扩增 GOBP1 基因的全长阅读框,上游引物 G1gF 带有起始密码子 ATG,下游引物 G1gR 带有终止子 TAA。引物序列如下:

3G1F:5'-CNAAYGGNGARGTNYTNGCNMGNCA-3';

5'G1R:5'-GTTAGTTGTTGCCGAGGGGTGACT-3';

5' G1Rnest: 5'-CCTCCTCGTGCTCGTGCTGCT-TCTC-3';

G1gF:5'-ATGTTGCTGTTGTTGCGCGCGCTGC-3';

G1gR:5'-TTAGCGCGCCTCAGCCTCCATGATG-3'。

1.5 RACE 反应及产物的克隆

通过简并引物 3G1F 和 Oligo (dT)₂₀ 组合进行 PCR 扩增。反应程序为:94℃变性2 min;接着进行30个循环,循环条件为94℃1 min,55℃1 min,72℃1 min;最后72℃延伸10 min。5'-RACE 按照 In-vitrogen GeneRacer™ 步骤说明进行2轮扩增。第1轮反应程序为:94℃变性2 min;然后以条件94℃30 s,72℃1 min进行5个循环,94℃30 s,70℃1 min进行5个循环,94℃30 s,66℃30 s,70℃1 min进行25个循环;最后在70℃保存10 min。将第1轮 PCR 产物用于第2轮 PCR 扩增,反应条件为:94℃变性2 min;然后以条件94℃30 s,68℃45 s,72℃1 min进行30个循环;72℃保存7 min。反应结束后,用10 g/L琼脂糖凝胶电泳检测。RACE 产物均经过 TaKaRa 凝胶 DNA 回收试剂盒纯化回收,参照 T-easy 载体说明书连接到 T-easy 载体。然后转化大肠杆菌 DH5 α ,挑取白色菌落,培养后提取质粒(质粒提取参照 Sambrook 等^[8]方法),用 EcoR I 酶切和 PCR 扩增2种方法鉴定重组克隆。

1.6 内含子的鉴定

以总 DNA 为模板,以引物 G1gF 和 G1gR 进行扩增,程序为94℃预变性2 min;然后进行35个循环,循环条件为94℃30 s,68℃45 s,72℃1 min;最后在72℃保存10 min。采用1.5方法克隆、鉴定测序。

1.7 序列测定及推导氨基酸序列的分析

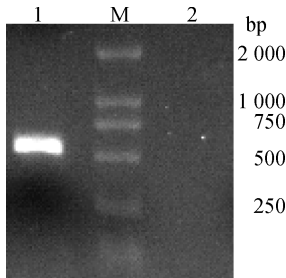
选择经 PCR 鉴定为阳性的重组质粒与斜纹夜蛾 GOBP1 基因组 DNA 的 PCR 扩增产物送上海英骏生物技术有限公司进行序列测定。采用 NCBI 的 Blast 程序,对所测 GOBP1 基因核苷酸序列及其推导氨基酸序列与 GenBank 公布的序列进行比较分析,采用 DNASTar 软件以及网站(www.expasy.org)提供的软

件分析序列.

2 结果与分析

2.1 3'-RACE 获得编码 GOBP1 的 cDNA 下游序列

以斜纹夜蛾触角 cDNA 为模板,3G1F 和 Oligo (dT)₂₀ 组合进行 PCR 反应后,在 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,可见到约为 600 bp 的电泳条带 (图 1),回收纯化后,插入 pGEM-T Easy 载体的克隆位点,构建重组质粒. 挑取转化大肠杆菌 DH5α 后的白色单菌落进行培养,抽提质粒,以质粒为模板进行 PCR 鉴定,测序结果在 NCBI 上利用 BLAST 进行同源搜寻,结果表明,1 条 600 bp 左右的片段与昆虫 GOBP1 基因高度同源. 根据测定的这条序列设计了特异性引物进行 5'-RACE 反应.



1: 触角 cDNA 作为模板;M: DNA marker DL2 000;2: ddH₂O 作为模板
1: The cDNA of antenna as template;M: DNA marker DL2000;2: No template (ddH₂O as template)

图 1 3'-RACE PCR 产物电泳

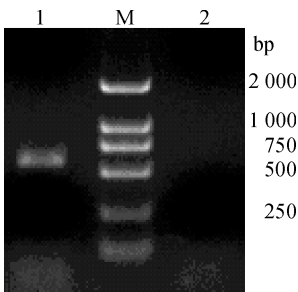
Fig. 1 Analysis of 3'-RACE products in agarose gel

2.2 5'-RACE 获得编码 GOBP1 的 cDNA 上游序列

根据已测序的 cDNA 3'端序列设计引物 5'G1R 和 5'G1Rnest,用 5'G1R 和 GeneRacer Kit 中 GeneRacer Primer 对 GOBP1 基因的 5'-RACE 进行第 1 轮扩增,用 5'G1Rnest 和 GeneRacer 5'Nested Primer 进行第 2 轮扩增,第 2 轮 PCR 产物于 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳时,得到约 600 bp 电泳条带 (图 2),将其回收纯化,插入 pGEM-T Easy 载体,转化大肠杆菌 DH5α 后,挑取白色单菌落进行培养,抽提质粒,以质粒为模板进行 PCR 鉴定. 选取鉴定后正确的 GOBP1 基因的 5'-RACE 产物克隆送样测序,得到基因片段,序列分析后发现,去除重叠片段后,剩余基因片段中发现有起始密码子 (ATG) 的存在,起始密码子前面有 17 bp 的非编码区. 从序列分析结果可以证实得到了编码斜纹夜蛾 GOBP1 的 cDNA 5'端完整序列.

2.3 编码斜纹夜蛾 GOBP1 的 cDNA 全长序列及推测的氨基酸序列

将 cDNA 的 3'末端序列和 5'末端序列进行分析,去除序列中的重复区域,获得了斜纹夜蛾 GOBP1 的 cDNA 完整序列,命名为 *SlitGOBP1*,全长为 925



1: 触角 cDNA 作为模板;M: DNA marker DL2000;2: ddH₂O 作为模板
1: the cDNA of antenna as template;M: DNA marker DL2000;2: No template (ddH₂O as template)

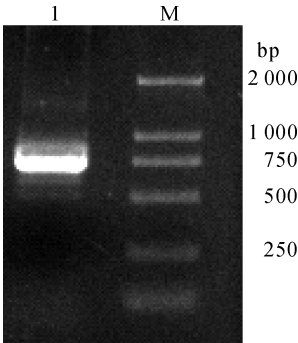
图 2 5'-RACE 第 2 轮 PCR 产物电泳

Fig. 2 Analysis of 5'-RACE products in agarose gel

bp,编码 164 个氨基酸残基,*SlitGOBP1* 编码区开始的 19 个氨基酸具有分泌蛋白信号肽的典型特征,成熟蛋白实际上只有 145 个氨基酸. 详细序列已登录于 GenBank,cDNA 序列号为 EF159978,氨基酸序列号为 ABM54823. 将 *SlitGOBP1* 序列在 NCBI 进行 Blastx 搜索,发现其编码的氨基酸序列与多种昆虫 GOBP1 相似性为 90% ~ 41%,其中,与烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 的 HvirGOBP1 和黄地老虎 *Agrotis segmentum* 的 AsegGOBP1 相似性高达 90%,与苹淡褐卷蛾 *Epiphyas postvittana* 的 EposGOBP1 相似性为 41%.

2.4 SlitGOBP1 内含子的确定

为了明确 *SlitGOBP1* 是否存在内含子,以斜纹夜蛾成虫总 DNA 为模板,进行 PCR 扩增 (图 3). 从图 3 中可看出,扩增产物约为 600 bp,预测含有内含子. 将 PCR 产物直接送到上海英骏生物技术有限公司测序. 测序结果表明,*SlitGOBP1* 基因组 DNA 大小为 659 bp,发现含 1 个内含子,起始于编码区第 123 个碱基之后,共 164 bp,两端具有典型 GT-AG 结构,符合 GT-AG 规则 (GT-AG rule),即在内含子和外显子交界处有 2 个相当短的保守序列:5'端为 GT,3'端为 AG,这是最常见的内含子 (图 4).



1: 成虫总 DNA 作为模板;M: DNA marker DL2000
1: total DNA of adult as template ; M: DNA marker DL2000

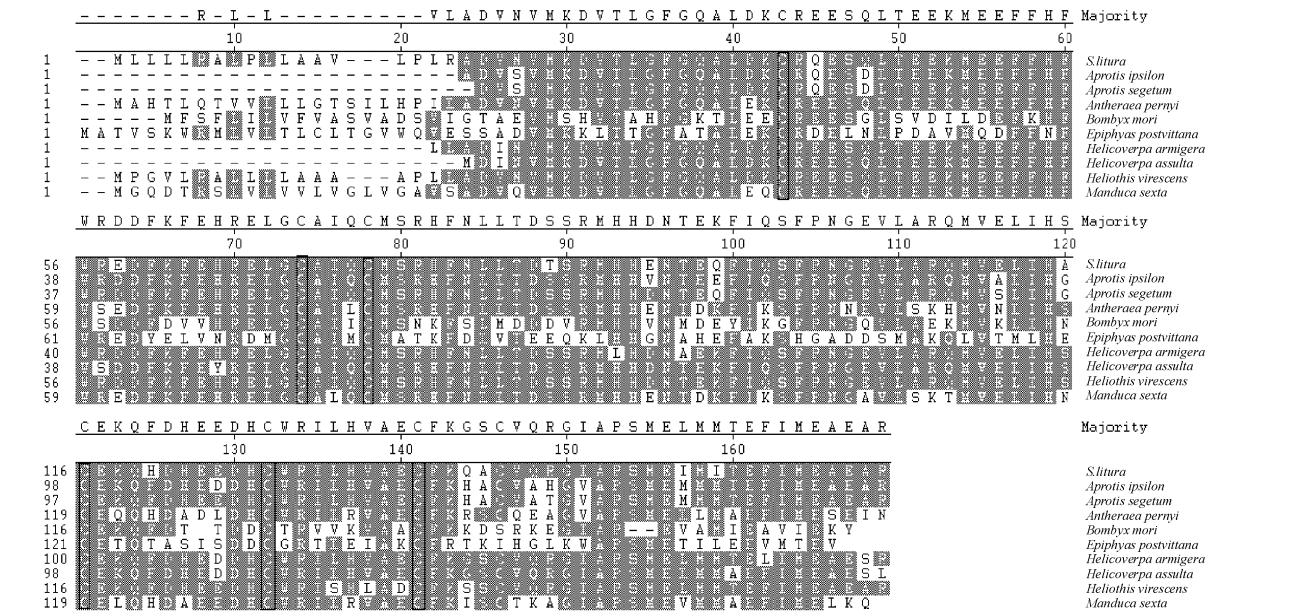
图 3 基因组 DNA 的 PCR 扩增

Fig. 3 Identification of positive clones of genome DNA of *SlitGOBP1* by PCR amplification

ATGTTGCTGTTGTTGCGCGCTGCCACTGCTCGCCC
CCGTGCTGCCGCTGCGCGCTGACGTCAATGTCATGA
AAGACGTCACCTCGGCTTCGGACAAGCGTTGGACA
AGTGTGCCAGGAG **GTACTGTTCTCACATTGCT**
GTCCACGCCAAACTCAAATATACTAGTGCA
CTGGTCCAAACATTGTTCTTGTACATGAAC
CTCTACCTAGAAAGATCACAAAGTAGCCACAAA
AACCGTGTAACGGGCGATGATGGGAAAGAA
ATAAAAATAATCTCTTTTCAG AGTCAACTGACGG
AGGAGAAGATGGAAGAGTTTTTCCATTTCTGGCGTG
AAGACTTCAAGTTTCGAGCACCGCGAGTTGGGCTGCC
CCATCCAGTGCATGAGCCGGCACTTTAACCTGCTGAC
CGACACCAGCCGCATGCACCACGAGAACACCGAGCA
GTTTCATCCAATCCTTCCCCAACGGCGAGGTGCTGGC
GCGGCAGATGGTGGAGCTGATTCATGCATGCCAGAA
GCAGCACGACCACGAGGAGGACCACTGCTGGCGCAT
CCTGCACGTGGCAGAGTGCTTCAAGCAGGCGTGCGT
GCAGCGCAGCATCGCGCCCTCCATGGAGATAATGAT
TACCGAGTTCATCATGGAGGCTGAGGCGCGCTGA

图 4 *SlitGOBP1* 编码区内的内含子(黑体部分)
Fig. 4 The introns in *SlitGOBP1* gene encoding sections (the black part in DNA sequences)

2.5 *SlitGOBP1* 推测的氨基酸序列分析
2.5.1 氨基酸序列保守区域分析 应用 Clustal W 多重序列比较程序分析(图 5)发现,*SlitGOBP1* 推测的氨基酸序列与 GenBank 登录的其他昆虫 GOBP1 相似性较高,在所报道的 GOBP1 中都具有 6 个完全保守的半胱氨酸位点,*SlitGOBP1* 编码的成熟肽氨基酸序列中,在图标的第 43、74、78、121、132 和 141 位具有 6 个保守的半胱氨酸残基,表现出进化过程的高度保守性。
2.5.2 氨基酸序列信号肽分析 根据程序 Signal P 3.0 分析斜纹夜蛾普通气味结合蛋白(*SlitGOBP1*)氨基酸序列信号肽剪切位点(图 6),蛋白信号肽最有可能的剪切位点分别位于第 19 位到第 20 位之间。蛋白质切割信号肽后,经过简单的加工过程而成为成熟肽,*SlitGOBP1* 成熟蛋白含有氨基酸 145 个,与昆虫 GOBP1 多肽链的长度相符。
2.5.3 蛋白质氨基酸组成 使用 DNA Star 软件计算蛋白质 *SlitGOBP1* 由 164 个氨基酸组成,其中酸性氨基酸为 Asp 和 Glu,碱性氨基酸为 Lys 和 Arg,极性氨基酸为 Asn、Cys、Gln、Ser、Thr 和 Tyr,疏水氨基酸为 Ala、Ile、Leu、Phe、Trp 和 Val,分别占蛋白质相对分子质量的 17.58%、12.91%、18.18% 和 34.52% ,



以 *SlitGOBP1* 的 ORF 编码的氨基酸序列为标准进行分析 Analysis standard by amino acid sequences of *SlitGOBP1* ORF encoding;
图中所列昆虫的学名和蛋白登录号依次为 The insect scientific names and the GeneBank accession numbers of proteins as following:斜纹夜蛾 *Spo-*
doptera litura ABM54823、小地老虎 *Agrotis ipsilon* ABI24160、黄地老虎 *Agrotis segetum* ABI24159、柞蚕 *Antheraea pernyi* P87508、家蚕 *Bombyx mori*
P34170、苎荻褐卷蛾 *Epiphyas postvittana* Q95VP3、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* AAL09821、烟青虫 *Helicoverpa assulta* AAW65076、烟芽夜蛾 *Heliothis*
virescens Q27226 和烟草天蛾 *Manduca sexta* AAA29315;
方框内为 6 个保守的半胱氨酸位点 Six conservative cysteines were marked in the box

图 5 昆虫 GOBP1 保守氨基酸分析
Fig. 5 Analysis of conserved amino acid of GOBP1 from insects

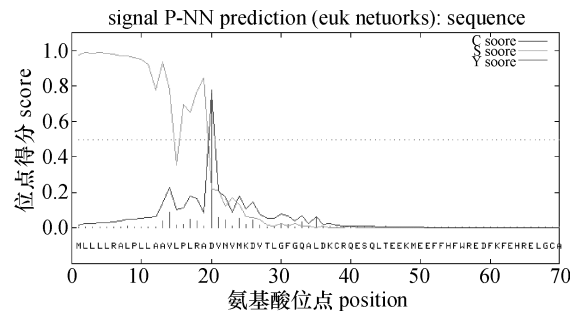


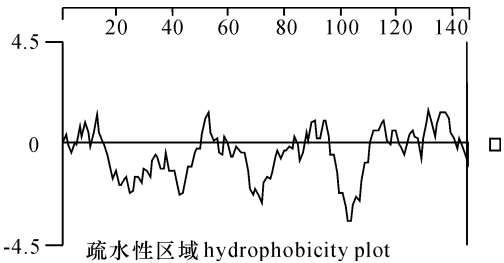
图6 *SlitGOBP1* 推导的氨基酸序列信号肽分析

Fig.6 Analysis of signal peptide of deduced amino acid sequences of *SlitGOBP1*

利用频率分别为 16.47%、10.37%、19.52% 和 36.00%。各种氨基酸在蛋白质 *SlitGOBP1* 的组成中利用次数不一样,利用最多的是 Glu 和 Leu,分别为 20 和 18 次,最少的是 Trp,仅 2 次。

2.5.4 蛋白质相对分子质量、等电点、亲脂性分析和二级结构预测 将编码蛋白氨基酸序列以及成熟蛋白用 ExPASy 中的 M_r 、 pI 、Titration curve 程序预测其相对分子质量和等电点,表明*SlitGOBP1*编码蛋白

氨基酸序列的相对分子质量为 19 270,成熟蛋白相对分子质量为 17 200,等电点为 5.29。利用 Kyte-Doolittle 氨基酸亲水性分析标准可知,*SlitGOBP1* 整个分子呈亲水性,部分区域显示为亲脂性(图7),这与已报道的其他昆虫 *GOBP1* 相似^[9-13]。成熟蛋白氨基酸序列用 Garnier-Robson 法进行结构预测可知,*SlitGOBP1* 由 5 个 α -螺旋组成(图8)。



正值代表亲脂性,负值代表亲水性 Hydrophaty plots indicate hydrophobicity by positive values and hydrophilicity by negative values

图7 *SlitGOBP1* 成熟蛋白氨基酸亲脂性分析

Fig.7 Predicted hydrophaty profiles of deduced mature *SlitGOBP1* protein

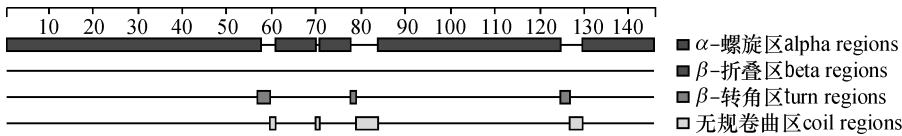


图8 Garnier-Robson 方法预测 *SlitGOBP1* 蛋白二级结构

Fig.8 Predicted secondary structures of *SlitGOBP1* by Garnier-Robson method

2.5.5 昆虫 *GOBP1* 氨基酸序列同源性及系统进化树分析 从搜索结果中选择 GenBank 登录的鳞翅目昆虫 *GOBP1* 基因推测的氨基酸序列,应用 DNASTar 软件中 Clustal W 多重序列比较程序分析氨基酸序列相似性,结果表明,从氨基酸全序列比较,*SlitGOBP1* 与其他鳞翅目昆虫 *GOBP1* 相似性为 87.6% ~ 36.1%,与烟芽夜蛾 *HvirGOBP1* 相似性最高,为 87.6%,亲缘关系最近,与苹淡褐卷蛾 *EposGOBP1* 相似性最低,为

36.1%,亲缘关系最远,与家蚕 *BmorGOBP1* 相似性为 45.5%。应用 Phylogenetic Tree 程序建立系统进化树(图9),分析表明,昆虫 *GOBP1* 分子进化具有明显的保守性,相同目不同科之间同源性较高。斜纹夜蛾与夜蛾科的烟青虫 *Helicoverpa assulta*、烟芽夜蛾和棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 的 *GOBP1* 氨基酸序列属于一个分支,一致性分别为 78.1%、87.6% 和 79.9%。

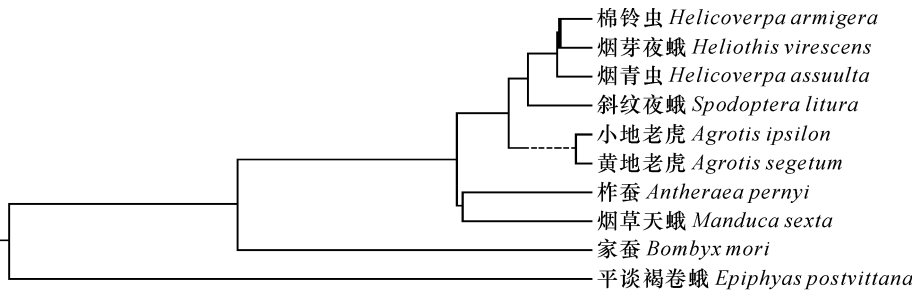


图9 昆虫 *GOBP1* 氨基酸序列系统进化树

Fig.9 Phylogenetic trees of amino acid sequences of *GOBP1* from insect

3 讨论

本文通过 PCR 扩增结合 RACE 技术首次克隆获得了斜纹夜蛾普通气味结合蛋白 1 基因 *SlitGOBP1*, 为深入研究其表达、蛋白与信息物质结合、神经生理等提供了基础, 亦为今后探索斜纹夜蛾感受环境信息机制, 研究产卵忌避剂、拒食剂等昆虫行为调节剂提供了分子基础。目前已报道的 *GOBPs* 编码的氨基酸都有 6 个保守的半胱氨酸位点, 通过 3 个二硫桥相连^[9], 且具有相似的水溶性及次级结构^[10], 这些都是昆虫 *GOBP1* 的典型特征。本文所克隆的 *SlitGOBP1* 编码的氨基酸同样有 6 个保守的半胱氨酸位点, 符合这个特点; 推导蛋白中半胱氨酸残基位置相对固定, 表现出进化过程中的高度保守性, 由此似乎可推测这种蛋白可能不只一种稳定的三级结构, 随着二硫键的不同, 存在不同的异构形式, 因此, *GOBP1* 就有可能起着运载气味分子刺激受体和使其失活的双重作用, 生物化学研究的结果为这种观点提供了支持^[11]。亲脂性预测表明, *SlitGOBP1* 整个分子呈现亲水性, 在成熟蛋白序列中大约第 40 ~ 60 位的氨基酸形成一个明显的亲脂性口袋^[12], 这些位点可能是其结合亲脂性化合物的位点, 这或许可以解释为什么亲水性的 *GOBP1* 还能与部分疏水性的气味分子结合。蛋白结构预测表明, *SlitGOBP1* 二级结构主要是 α -螺旋, 与烟草天蛾 *GOBP1* 的二级结构相似^[13], 而在脊椎动物鼻黏液中的 *OBPs* 主要为 β -折叠^[14-15], 因此昆虫 *GOBP* 与哺乳动物 *GOBP* 起源可能不同, 它们具有共同的生理功能很可能是一种趋同进化现象。

昆虫 *GOBPs* 在表现保守的同时, 也体现了其进化性。比如 *SlitGOBP1* 与夜蛾科昆虫 *GOBP1* 就不属于同一个小分支。从进化树中可以看出, *SlitGOBP1* 与烟青虫亲缘关系最近(图 9), 但它们的氨基酸相似性只达到 78.1%, 仅高于与之亲缘关系较远的烟草天蛾(相似性 73.8%)(数据未列出)。所以, 昆虫 *GOBPs* 氨基酸的相似程度与它们的亲缘关系并不完全一致, 其进化性和保守性说明, 昆虫 *GOBPs* 具有特异性和多样性共存的特点, 这种特点可能是斜纹夜蛾适应多种复杂环境, 接受复杂刺激信息的进化结果, 具体原因有待于进一步深入探讨。

参考文献:

- [1] 刘金香, 钟国华, 谢建军, 等. 昆虫化学感受蛋白研究进展[J]. 昆虫学报, 2005, 48(3): 418-426.
- [2] PING W, RICHARD F H, SVETLANA A S, et al. Asso-

ciation of polymorphisms in odorant-binding protein genes with variation in olfactory response to benzaldehyde in *Drosophila*[J]. Genetics, 2007, 177 (3): 1655-1665.

- [3] KONSTANTOPOULOU M A, PRATSINIS H, KLETSAS D, et al. Pheromone-binding protein and general odorant-binding protein of *Sesamia nonagrioides*: Sex- and diel-dependent expression[J]. Entomol Exp et Appl, 2006, 119 (2): 129-136.
- [4] KRIEGER J, BREER H. Olfactory reception in invertebrates[J]. Science, 1999, 286 (5440): 720-723.
- [5] 周晓梅, 黄炳球. 斜纹夜蛾抗药性及其防治对策的研究进展[J]. 昆虫知识, 2002, 39(2): 98-102.
- [6] 李苗孟. 斜纹夜蛾普通气味结合蛋白的基因克隆和原核表达[D]. 广州: 华南农业大学资源环境学院, 2007.
- [7] 田英芳, 黄刚, 郑哲民, 等. 一种简易的昆虫基因组 DNA 提取方法[J]. 陕西师范大学学报: 自然科学版, 1999, 27 (4): 82-84.
- [8] SAMBROOK J, RITSCH E F, ANIATIS T. Molecular cloning: A laboratory manual [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [9] SCALONI A, MONTI M, ANGELI S. Structural analysis and disulfide bridge pairing of two odorant binding proteins from *Bombyx mori*[J]. Biochemistry Physiology Research Communication, 1999, 266: 386-391.
- [10] PELOSI P, MAIDA R. Odorant-binding proteins in insects [J]. Comp Biochem Physiol Biochem Mol Biol, 1995, 111 (3): 503-514.
- [11] VOGT R G, CALLAHAN F E, ROGERS M E et al. Odorant binding protein diversity and distribution among the insect orders, as indicated by LAP, an OBP-related protein of the true bug *Lygus lineolaris* (Hemiptera, Heteroptera) [J]. Chem Senses, 1999, 24 (5): 481-495.
- [12] DU Ge-hua, NG C S, PRESTWICH G D. Odorant binding by a pheromone binding protein: active site mapping by photoaffinity labeling [J]. Biochemistry, 1994, 33: 4812-4819.
- [13] LI Feng, PRESTWICH G D. Expression and characterization of a lepidopteran general odorant binding protein[J]. Insect Biochem Mol Biol, 1997, 27 (5): 405-412.
- [14] MARIA S, SABATO D A, ANTONIO V, et al. Stability and dynamics of the porcine odorant-binding protein[J]. Biochemistry, 2007, 46 (39): 11120-11127.
- [15] SABATO D A, MARIA S, ANTONIO V, et al. The odorant-binding protein from *Canis familiaris*: Purification, characterization and new perspectives in biohazard assessment[J]. Protein and Peptide Letters, 2006, 13 (4): 349-352.

【责任编辑 李晓卉】