

姚琼, 全林发, 聂晶, 等. 荔枝蒂蛀虫卵 5 个化学感受蛋白的基因克隆及除虫脲对其表达的影响 [J]. 华南农业大学学报, 2021, 42(5): 60-68.
YAO Qiong, QUAN Linfa, NIE Jing, et al. Molecular cloning of five chemosensory proteins from *Conopomorpha sinensis* eggs and gene expression after diflubenzuron treatment[J]. Journal of South China Agricultural University, 2021, 42(5): 60-68.

荔枝蒂蛀虫卵 5 个化学感受蛋白的基因克隆及除虫脲对其表达的影响

姚 琼, 全林发, 聂 晶, 徐 淑, 李文景, 董易之, 陈炳旭
(广东省农业科学院 植物保护研究所/广东省植物保护新技术重点实验室, 广东 广州 510640)

摘要:【目的】获得荔枝蒂蛀虫 *Conopomorpha sinensis* 5 个化学感受蛋白 (Chemosensory proteins, CSPs) 基因 *CsinCSPs* 的全长序列, 并解析除虫脲对其表达的影响。【方法】提取荔枝蒂蛀虫卵总 RNA, 利用转录组测序结果和 cDNA 末端快速扩增技术 (Rapid amplification of cDNA ends, RACE) 获得 5 个 *CsinCSPs* 基因的全长序列; 对序列进行生物信息学分析, 用 Phyre² 在线软件进行同源建模, 用 AutoDock 软件对蛋白与农药分子进行分子对接预测; 用荧光定量 PCR 方法分析在除虫脲处理荔枝蒂蛀虫卵后这 5 个基因的表达情况。【结果】从荔枝蒂蛀虫卵中克隆了 5 个 *CsinCSPs* 基因的全长序列, 序列分析结果表明, 这 5 个基因的编码蛋白具有昆虫化学结合蛋白的典型特征, 其保守半胱氨酸位点排布模式均为 C1-X₆-C2-X₁₈-C3-X₂-C4, 并分为了包含 5 个 α -螺旋和 6 个 α -螺旋的 2 个类群。软件模板分析表明, 5 个 *CsinCSPs* 蛋白的三维结构均由 α -螺旋、 β -折叠和卷曲环组成, 且与甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* CSP2 的三维结构相似度最高。分子对接数据表明, 5 个 *CsinCSPs* 与 2 个菊酯类药剂分子结合亲和力最强, 与除虫脲的结合力最弱。亚致死剂量除虫脲处理荔枝蒂蛀虫卵后, *CsinCSP3* 和 *CsinCSP5* 分别在处理后 6、24 h 表达上调超过 40 余倍, 48 h 则表达下降。【结论】化学感受蛋白 *CsinCSPs* 可能参与农药胁迫下荔枝蒂蛀虫卵的解毒过程。

关键词: 荔枝蒂蛀虫; 化学结合蛋白; 基因克隆; 序列分析; 分子对接; 除虫脲
中图分类号: S186 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2021)05-0060-09

Molecular cloning of five chemosensory proteins from *Conopomorpha sinensis* eggs and gene expression after diflubenzuron treatment

YAO Qiong, QUAN Linfa, NIE Jing, XU Shu, LI Wenjing, DONG Yizhi, CHEN Bingxu
(Plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences/Guangdong Provincial Key Laboratory of New High Technology for Plant Protection, Guangzhou 510640, China)

Abstract: 【Objective】To obtain the full-length sequences of *CsinCSPs* genes of five chemosensory proteins (CSP) from *Conopomorpha sinensis*, and analyze the effect of diflubenzuron on *CsinCSP* gene expression. 【Method】Total RNA was extracted from *C. sinensis* eggs. The full-length cDNA of five *CsinCSP* genes were cloned by transcriptome sequencing results and rapid amplification of cDNA ends(RACE). The putative amino

收稿日期: 2020-12-31 网络首发时间: 2021-06-25 09:09:09
网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20210624.1658.002.html>
作者简介: 姚 琼 (1984—), 女, 副研究员, 博士, E-mail: joanyao_0603@163.com; 通信作者: 陈炳旭 (1963—), 男, 研究员, 博士, E-mail: gzchenbx@163.com
基金项目: 国家自然科学基金 (31801800); 广东省自然科学基金 (2020A151501960); 广东省农业科学院科技创新战略专项 (R2019PY-QY001); 国家现代农业 (荔枝龙眼) 产业技术体系建设专项 (CARS-32-12)

acid sequences of CsinCSPs were analyzed by bioinformatics software. The three-dimensional (3D) structure of CsinCSPs were predicted using the Phyre² online software. The binding capacities of CsinCSPs to pesticides were studied by AutoDock software. The changes of CsinCSP gene expressions after treating the *C. sinensis* eggs with diflubenzuron were analyzed by qRT-PCR. 【Result】 Full-length sequences of five CsinCSP genes were cloned from *C. sinensis* eggs. Sequence analysis results indicated these five genes encode proteins with typical characteristics of insect chemosensory proteins. The putative cysteines pattern of five CsinCSPs was C1-X₆-C2-X₁₈-C3-X₂-C4. The five CsinCSPs could be classified to clades with five α -helix and six α -helix. Based on analysis of model template, the 3D structures of five CsinCSPs were found to consist of α -helix, β -strand and loop, and were most similar to the 3D structure of *Mamestra brassicae* CSP2. The molecular docking results revealed that the five CsinCSPs had the highest binding affinities with two pyrethroids, while the lowest binding affinity with diflubenzuron. The expressions of CsinCSP3 and CsinCSP5 were up-regulated by more than 40 times at 6 and 24 h after diflubenzuron treatment at sublethal dose to *C. sinensis* eggs, and decreased at 48 h after treatment. 【Conclusion】 The chemosensory protein CsinCSPs may be involved in the detoxification process after pesticide treatment in *C. sinensis* eggs.

Key words: *Conopomorpha sinensis*; chemosensory protein; gene cloning; sequence analysis; molecular docking; diflubenzuron

荔枝、龙眼是我国南方优势名贵水果, 主要分布于广东、广西、福建、海南、四川及云南等省区, 被誉为“南国四大果品”之首。2019 年全国荔枝、龙眼栽培面积分别高达 54.1 万和 27.6 万 hm², 在农业经济中占有重要地位^[1]。荔枝蒂蛀虫 *Conopomorpha sinensis* Bradley (Lepidoptera: Gracillariidae) 是荔枝、龙眼栽培中频发的暴发性鳞翅目害虫, 也是荔枝、龙眼果树害虫防控中的难点。首先, 荔枝蒂蛀虫的初孵幼虫咬破卵壳后, 钻入果实、花穗、嫩梢或叶肉等组织内为害, 整个幼虫期都潜伏于寄主植物组织内部, 无法防治; 其次, 该虫在果园世代重叠, 蛹期参差不齐, 成虫期长且高峰期不明显, 唯有反复大量施用化学药剂才能保证成虫防控效果^[2-3]。近年来, 由杀卵剂介导的害虫卵期防控成为了荔枝蒂蛀虫防控的有效突破口。

昆虫依靠发达灵敏的感觉系统识别外界环境中的各种信息, 进而完成取食、交配、生殖、躲避天敌、产卵等行为反应。气味结合蛋白 (Odorant binding proteins, OBPs) 和化学感受蛋白 (Chemosensory proteins, CSPs) 在昆虫感知外界化学信息过程中发挥着重要作用, 其大量存在于化学感受器的淋巴液中, 是昆虫化学信息感知的 2 类关键载体蛋白^[4-5]。其中, CSPs 是一类可溶性的小分子球状蛋白, 典型特征是含有 4 个保守的半胱氨酸, 能两两配对形成 2 个二硫键, 用以保持 CSPs 蛋白结构的稳定性。CSPs 在昆虫体内的许多部位都有表达, 例如触角、性腺、翅膀、足、精卵巢等^[6-7]。CSPs 以广泛的分布及

高度保守性被认为在昆虫对化学刺激的行为反应及多种生理生化过程中扮演着重要的角色。

有关昆虫 CSPs 研究绝大多数集中于成虫期。国家荔枝龙眼产业体系—虫害防控岗位科学家研究团队前期在荔枝蒂蛀虫卵转录组数据中鉴定了 5 个 CSPs 基因, 为深入解析其结合特征及功能, 本研究对荔枝蒂蛀虫卵 5 个 *CsinCSPs* 基因进行克隆, 对其序列特征进行生物信息学分析, 通过分子对接模拟预测荔枝、龙眼果园常用的几种杀虫剂与 5 个 CsinCSPs 的结合特征, 利用 qRT-PCR 技术测定了 5 个 *CsinCSPs* 基因在除虫脲处理后的表达变化, 以期阐明荔枝蒂蛀虫卵期 CSPs 功能研究提供线索。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

荔枝蒂蛀虫成虫采集自广东省农业科学院白云基地荔枝园, 在温度 (25±1)℃, 湿度为 (75±1)%, 光周期为 14 h 光:10 h 暗的养虫室中, 以 φ 为 10% 的蜂蜜水作为营养补充饲养, 每天定时收集并更换产有荔枝蒂蛀虫卵的白色卫生卷纸, 于养虫室内存放备用, 方法参照文献 [8]。

1.2 总 RNA 的提取与反转录

收集孵化 1、2 和 3 d 荔枝蒂蛀虫卵各 200 粒, 分别用液氮研磨后, 利用 Trizol 试剂提取总 RNA, 通过 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整

性。采用 PrimeScript RT Reagent 试剂盒 (Takara, Tokyo, Japan) 以提取的总 RNA 为模板反转录得到 cDNA 第 1 链, -20 ℃ 保存备用。

1.3 序列克隆与分析

以荔枝蒂蛀虫卵转录组 (数据待发表) 测序结果为基础, 从成功注释的 unigene 中搜索 CSPs 基因序列, 将其对应的蛋白序列与 NCBI 中的 nr 数据库进行 BLASTP, 验证是否属于化学感受蛋白。使用 Primer Premier 3.0 软件根据目的基因片段设计用

于 5 个 *CsinCSPs* 基因全长序列扩增和表达分析的引物 (表 1)。分别以 2 对特异性嵌套引物进行 5'和 3'RACE 扩增。5'RACE 反应程序为: 94 ℃ 3 min; 94 ℃ 30 s, 65 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 33 个循环; 72 ℃ 10 min; 4 ℃ 保存。3'RACE 反应程序为: 94 ℃ 3 min; 94 ℃ 30 s, 58 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 33 个循环; 72 ℃ 10 min; 4 ℃ 保存。最后用 DNASTar 软件将所得序列片段拼接为完整的序列。

表 1 *CsinCSPs* 克隆及实时荧光定量 PCR 所需引物
Table 1 Primers for *CsinCSPs* cloning and qRT-PCR

基因 Gene	巢式PCR引物(5'→ 3') Nested gene-specific primers		实时荧光定量PCR (5'→ 3') qRT-PCR
	5'扩增引物	3'扩增引物	
	Primers for 5'RACE	Primers for 3'RACE	
<i>CsinCSP1</i>	CAATATGGTCTGCTACTTGGTAG AGACTACTGCAATTCGTGA	AAAGAGTGGAAACAGCTTCT AACAGCTTCTTGACAAATGG	CCGAAGGAGCTGAACCTTAGAA TCTCTGGAGTCTGTCAACTACT
<i>CsinCSP2</i>	AGCACACGTTTGAAGTTCT TTGTAGTAAGCGAGAAGAAC	AGCTGGTGGTCAGGAAAC AAGAGCGAGCCCAGATTCTC	CCTCATTACAACCGCTACGATAA GAAGTTCTTCCCGTCCTTAGTG
<i>CsinCSP3</i>	GCAACATCTCCTCGAAGT CACATCGTATATGGTCAGGT	TCAAGCACAACACTCGATTG AGTACGACCCTGAGGGTAAC	CACCACACACTGAGCCATTC GACGGCATCGAGGAACAATC
<i>CsinCSP4</i>	GCACTTGATCTGTCTTTGG GTTGTTGTTGTTGTTGCG	GTGTCCGCAATGCACACCAC CGTACTCTATCCTACGTGC	TGGTGGCGTGCTGTCAT TTGTCATTGAGAGCGTCGTC
<i>CsinCSP5</i>	CGCTCCATGTAGTACAAGT CACAGCGATACAGGACAG	ACTTGTACTIONCATGGAGCG AGTGGGCCAAGATTGTACG	GGAACGGACTCTGGCTGAT GACACGCTCCATGTAGTACAAG
<i>β-Actin</i>			AGATCTGGCACCACACCTACGAT ACCGGTGGTACGAC

蛋白相对分子质量及等电点预测使用 ExPASy 平台中的 Compute pI/Mw (http://expasy.org/tools/pi_tool.html), 信号肽预测使用 ExPASy 平台中的 SignalP 4.1 (<http://www.Cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), 亚细胞定位预测使用 LocTree2 软件 (<https://roslab.org/services/loctree3/>)。将去除信号肽的氨基酸序列导入在线软件 PSIPRED(<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) 构建蛋白二级结构。采用 MEGA 4.1 软件中的邻位相连法 (Neighbor-joining, NJ) 构建系统进化树, Bootstrap 为 1000 次。

1.4 3D 结构预测及分子对接模拟

使用 Phyre² 软件构建蛋白三维结构 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>)。选取荔枝、龙眼果园最常用的除虫脲、吡虫啉、辛硫磷、毒死蜱、三唑磷、氯虫苯甲酰胺、高效氯氟氰菊酯和高效氯氰菊酯作为配体分子, 从 NCBI 的 Pubchem Compound 数据库得到 8 种药剂的三维结构。使用 AutoDock

半柔性配体整体分子自动对接程序, 将模建蛋白及配体分子进行分子对接, 根据结合能大小讨论其相互作用。

1.5 药剂处理

前期以孵化后 1 d 的荔枝蒂蛀虫卵开展除虫脲毒力测定, 其毒力方程为 $y=-0.49+1.32x$, LC₅₀ 为 2.37 mg/L^[9]。处理组: 将荔枝蒂蛀虫卵纸置于 2.37 mg/L 除虫脲 (以丙酮为介质稀释) 中浸泡处理 10 s; 对照组: 将荔枝蒂蛀虫卵纸置于丙酮中浸泡处理 10 s。然后分别于处理后 6、24 和 48 h 随机收集处理组和对照组虫卵各 200 粒, 液氮处理后 -80 ℃ 保存备用。样品总 RNA 的提取与反转录方法同 “1.2”。

1.6 实时荧光定量 PCR

根据 5 个 *CsinCSPs* 基因序列, 用 Primer Premier 3.0 软件设计 qRT-PCR 特异性引物。利用 GoTaq qPCR Master Mix 试剂盒 (Promega, 麦迪逊, 美国) 进行 qRT-PCR。反应体系包括: 10 μL GoTaq

qPCR Master Mix, 1 μ L cDNA 模板, 0.5 μ L 正向引物, 0.5 μ L 反向引物, 8 μ L DEPC 水。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s; 60 $^{\circ}$ C 退火 60 s; 40 个循环。以 β -actin (GenBank accession No. KF598848) 基因为内参基因计算相对表达量, 数据分析使用比较 Ct 值方法分析 (Schmittgen and Livak, 2008)。每次 qRT-PCR 需要 3 次技术重复, 并且每个样本进行 3 次生物学重复。

2 结果与分析

2.1 荔枝蒂蛀虫卵 5 个 *CsinCSPs* 基因的克隆与序列分析

以荔枝蒂蛀虫卵 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 得到 *CsinCSP1*~5 的基因开放阅读框 (Open

reading frame, ORF) 长度分别为 438、378、360、336 和 318 bp, 分别编码 145、125、119、111 和 105 个氨基酸 (表 2)。CsinCSP1~5 蛋白相对分子质量分别为 16 400、14 100、13 200、12 600 和 11 900, 其中, CsinCSP3 等电点为 5.04, 偏酸性, 其余 4 个 CsinCSPs 等电点均大于 9, 偏碱性。CsinCSP1~5 的 N 端分别包含由起始位置开始的 16~22 个信号肽序列, 无跨膜结构。蛋白二级结构预测表明, 5 个 CsinCSPs 的保守半胱氨酸位点排布模式均为 C1-X₆-C2-X₁₈-C3-X₂-C4。 α -螺旋是所有 CsinCSPs 的主要二级结构, 其中 CsinCSP1、CsinCSP2 和 CsinCSP3 均含有 6 个 α -螺旋, 而 CsinCSP4 和 CsinCSP5 仅含有 5 个 α -螺旋 (图 1)。亚细胞定位分析表明 CsinCSP1~5 均为非膜蛋白。

表 2 荔枝蒂蛀虫卵的 *CsinCSPs* 蛋白信息
Table 2 Information of *CsinCSPs* in *Conopomorpha sinensis* eggs

基因 Gene	开放阅读框长度/ bp Length of open reading frame	氨基酸数量 No. of amino acid	相对分子质量 Relative molecular weight	等电点 Isoionic point	亲水系数 Hydrophilic coefficient	信号肽数量 No. of signal peptide
<i>CsinCSP1</i>	438	145	16 400	9.06	-0.417	22
<i>CsinCSP2</i>	378	125	14 100	9.28	-0.240	19
<i>CsinCSP3</i>	360	119	13 200	5.04	-0.024	16
<i>CsinCSP4</i>	336	111	12 600	9.41	-0.523	16
<i>CsinCSP5</i>	318	105	11 900	9.58	-0.011	19

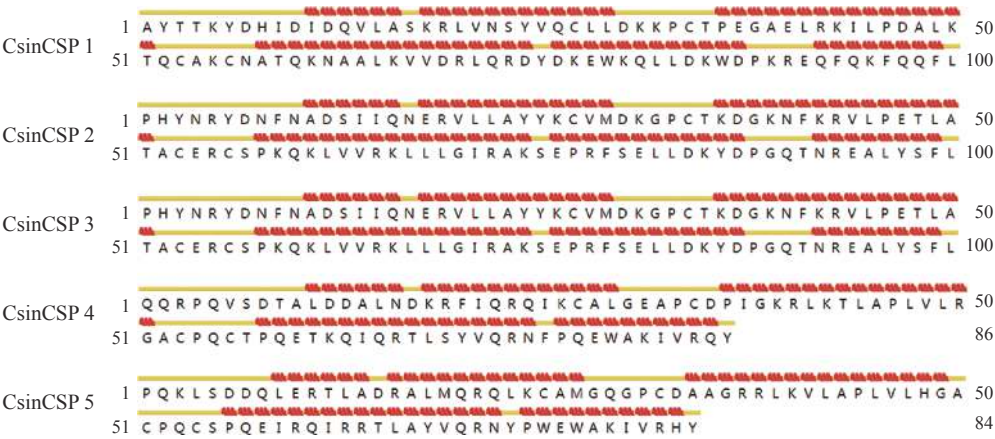


图 1 荔枝蒂蛀虫卵 5 个 *CsinCSPs* 的二级结构分析
Fig. 1 Secondary structure analysis of five *CsinCSPs* from *Conopomorpha sinensis* eggs

2.2 基于荔枝蒂蛀虫卵 5 个 *CsinCSPs* 氨基酸序列进化树的构建与同源性分析

通过与其他昆虫 CSPs 氨基酸序列进行对比, 结果 (图 2) 显示, 与 CsinCSP1~5 相似性最高的同类蛋白分别为蚜科棉蚜 *Aphis gossypii* CSP1、螟蛾科稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis*

CSP1、螟蛾科二化螟 *Chilo suppressalis* CSP2、凤蝶科柑橘凤蝶 *Papilio xuthus* CSP2 和枯叶蛾科云南松毛虫 *Dendrolimus houi* CSP2。使用 MEGA 4.1 软件邻接法进行 1 000 次重复计算后构建进化树 (图 2)。由图 2 可以看出, 所有选中的昆虫 CSPs 形成 2 个明显的分支, CsinCSP1~3 属于 6 个 α -螺

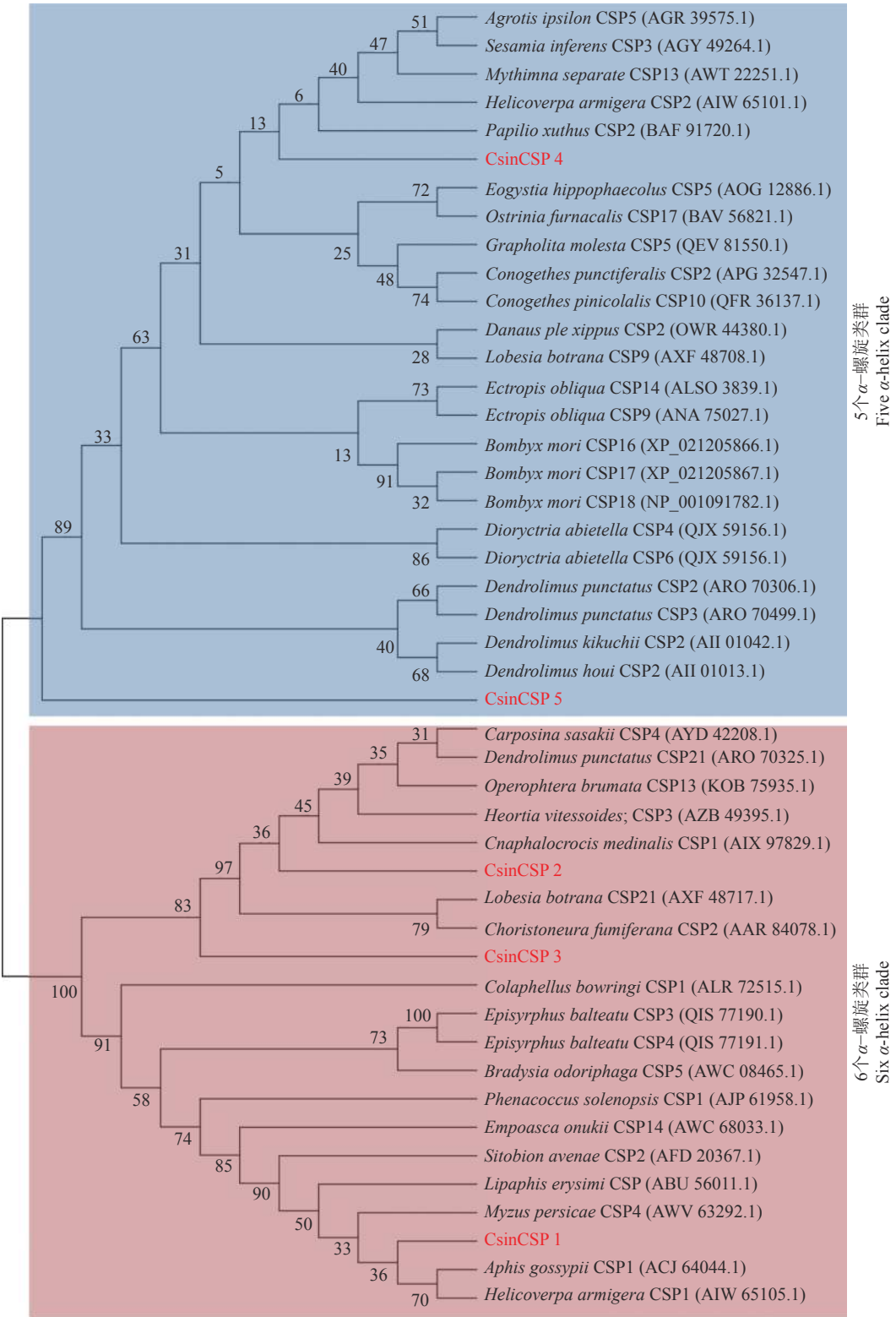


图 2 CsinCSP1~5 与其他昆虫 CSPs 的系统进化树分析
Fig. 2 Phylogenetic analysis of CsinCSP1~5 and CSPs in other insects

旋的类群，而 CsinCSP4 和 CsinCSP5 属于 5 个 α -螺旋的类群。借助 WebLogo 软件对所有选中昆虫的保守区域进行 motif 可视化分析，结果表明 4 个半胱氨酸位点非常保守，其次第 2 个和第 3 个半胱氨酸位点中间的甘氨酸、脯氨酸和亮氨

酸也有较高保守性 (图 3)。

2.3 荔枝蒂蛀虫卵 5 个 CsinCSPs 同源建模和结合功能预测

荔枝蒂蛀虫卵 CsinCSP1~5 蛋白的三维结构预测分析中，软件数据库比对建模筛选出的

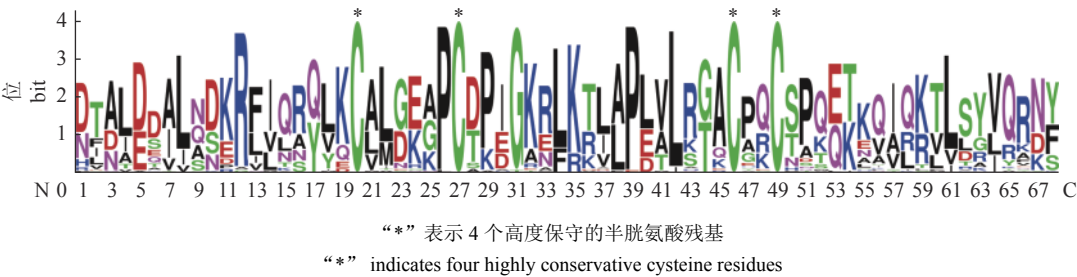


图 3 CsinCSP1~5 与其他昆虫 CSPs 的 WebLogo 比对分析

Fig. 3 The WebLogo alignment of CsinCSP1-5 and CSPs in other insects

CsinCSP1~5 结构模板为甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* CSP2 的三维结构 (PDB: d1n8va)。与其他昆虫的 CSP 一样, 其编码蛋白主要由 α -螺旋 (α -helix)、 β -折叠 (β -strand) 和卷曲环 (loop) 组成,

这些结构形成一个与配体结合的空腔, 空腔内部的氨基酸大部分为疏水性氨基酸, 使得其内部可容纳疏水性的配体分子 (图 4)。

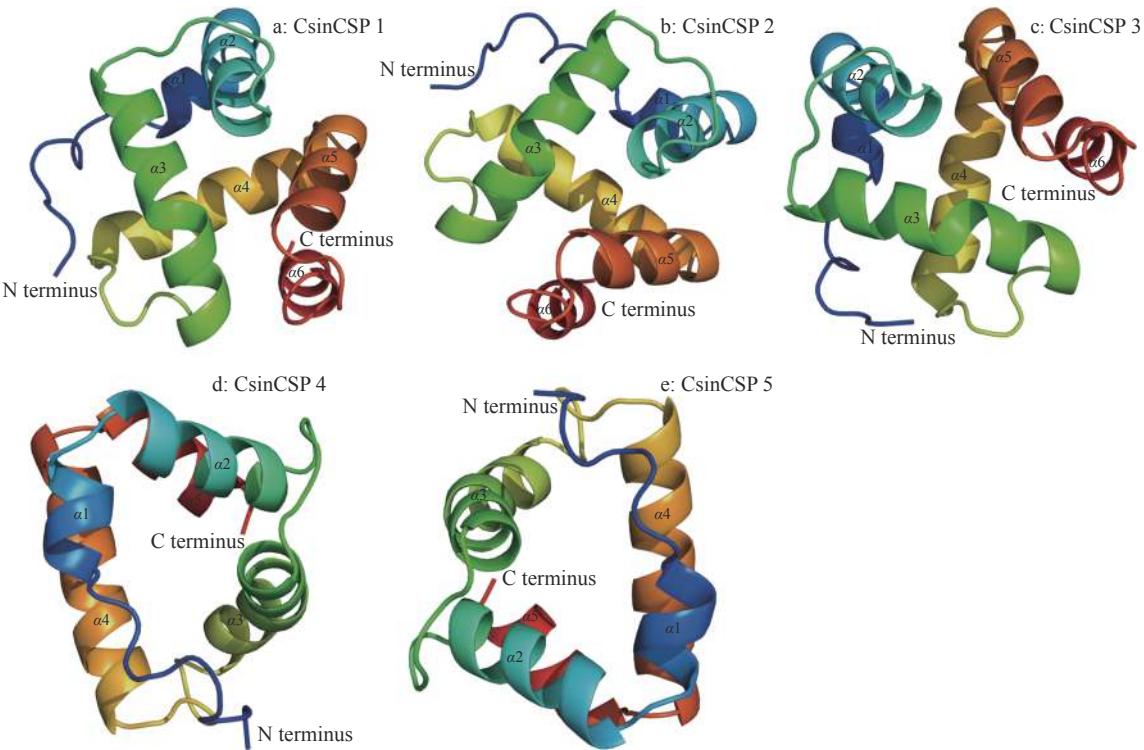


图 4 CsinCSP1~5 的 3D 结构预测模型

Fig. 4 The 3D structure prediction of CsinCSP1-5

从 NCBI 的 Pubchem Compound 数据库得到荔枝、龙眼果园最常用的 8 种化学药剂的三维结构, 然后利用 AutoDock 软件执行自动计算对接, 以获得荔枝蒂蛀虫卵 CsinCSPs 与化学药剂分子的结合能。分子对接数据表明, 5 个 CsinCSPs 与所有配体对接相互作用能量值均为负值。其中, 配体分子高效氯氟菊酯、高效氯氰菊酯与 5 个 CsinCSPs 结合能均为最小, 结合亲和力最强; 5 个 CsinCSPs 与除虫脲、吡虫啉相互作用结合能均高于其他药剂的, 表明 CsinCSPs 与除虫脲和吡虫啉的结合力最

弱 (表 3)。

2.4 除虫脲处理对荔枝蒂蛀虫卵 5 个 *CsinCSPs* 基因表达量的影响

以亚致死剂量除虫脲处理荔枝蒂蛀虫 1 日龄卵, 利用 qRT-PCR 检测虫卵 5 个 *CsinCSPs* 基因在处理 3 个时间点的表达量, 结果 (图 5) 表明: 与空白对照组相比, 除虫脲处理后 6、24、48 h, *CsinCSP1*、*CsinCSP2* 和 *CsinCSP4* 的相对表达量变化不大。但是 *CsinCSP3* 在处理 24 h 表达显著上升 49.4 倍, *CsinCSP5* 在处理 6 h 表达上升

表 3 农药与荔枝蒂蛀虫卵 CsinCSPs 对接的结合能

Table 3 The binding capacities of insecticides and CsinCSPs of *Conopomorpha sinensis* eggs

kJ·mol⁻¹

配体分子 Ligand	CSP1	CSP2	CSP3	CSP4	CSP5
除虫脲 Diflubenzuron	-8.07	-9.00	-8.45	-7.66	-7.83
吡虫啉 Imidacloprid	-7.62	-8.57	-7.92	-8.22	-8.03
辛硫磷 Phoxim	-8.41	-9.70	-9.43	-8.66	-8.45
毒死蜱 Chlorpyrifos	-8.44	-9.32	-9.14	-8.36	-8.46
三唑磷 Triazophos	-9.00	-9.84	-9.77	-8.57	-8.62
氯虫苯甲酰胺 Chlorantraniliprole	-10.44	-10.86	-11.16	-9.95	-9.84
高效氯氟氰菊酯 λ-cyhalothrin	-11.65	-12.59	-11.03	-10.99	-10.42
高效氯氟菊酯 β-cypermethrin	-11.01	-11.57	-11.39	-10.18	-11.01

57.8 倍, 随后二者在处理 48 h 表达则分别下降 36.2 和 23.4 倍, 说明除虫脲能影响荔枝蒂蛀虫卵 CsinCSP3 和 CsinCSP5 的表达, 但对其他 3 个 CsinCSPs 的表达无明显影响 (图 5)。

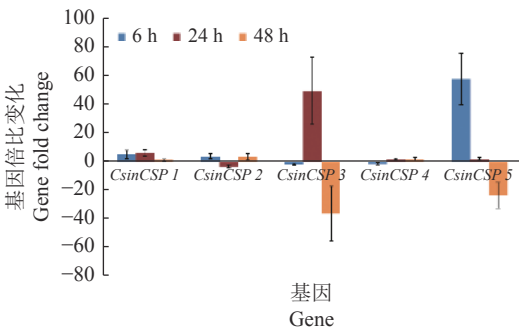


图 5 亚致死剂量的除虫脲对荔枝蒂蛀虫卵 5 个 CsinCSPs 基因表达量的影响

Fig. 5 Effects of diflubenzuron on expression of five CsinCSPs genes in *Conopomorpha sinensis* eggs at sublethal dose

3 讨论与结论

化学感受蛋白在昆虫感知外界信号分子的生化反应过程中具有重要生理学意义。本研究利用转录组测序和 RACE-PCR 的方法, 从荔枝蒂蛀虫卵中克隆出 5 个 CsinCSPs 基因的全长序列, 为首次从鳞翅目害虫卵中克隆同类蛋白序列。其中 ORF 最短和最长的 CsinCSP 分别为 CsinCSP5 和 CsinCSP1, 分别为 318 和 438 bp, 分别编码 105 和 145 个氨基酸, 预测蛋白相对分子质量分别为 11 900 和 16 400。普遍认为昆虫 CSPs 是一类相对分子质量约为 10 000~12 000 的酸性可溶性蛋白, 编码 100~115 个氨基酸分子^[10-11]。昆虫 CSPs 在进化上十分保守, 在 N 端有高度保守区域, 其序列多样性表现在蛋白序列的 C 端, 有些 CSPs 则会在

C 端翻译提前终止而序列较短、相对分子质量更小, 有些 CSPs 的 C 端有延伸而序列较长、相对分子质量更大, 例如棉铃虫 *Helicoverpa armigera* HarmiCSP12、HarmiCSP 14 和 HarmiCSP 25^[12]; 食蚜蝇 *Episyrphus balteatus* EbalCSP3、EbalCSP 4 和 EbalCSP6^[13]; 柑橘木虱 *Diaphorina citri* DcitCSP12^[14] 和褐飞虱 *Nilaparvata lugens* NlugCSP3^[15] 等。本研究中 CsinCSP1、CsinCSP2 和 CsinCSP3 则属于 C 端有延伸的昆虫 CSP 类群。此外, 在 5 个 CsinCSPs 的 N 端具有长度为 16~22 个氨基酸的信号肽序列, 说明 CsinCSPs 具备分泌蛋白特征。亚细胞定位软件 LocTree2 预测结果显示, 本研究中 5 个 CsinCSPs 主要为非膜蛋白, 与上述推断一致。

5 个荔枝蒂蛀虫卵 CsinCSPs 有保守的半胱氨酸位点, 其位点排布模式均为 C1-X₆-C2-X₁₈-C3-X₂-C4, 在 C2 和 C3 位点之间有多个高度保守的其他氨基酸位点, 说明 5 个 CsinCSPs 基序的高度保守性。5 个 CsinCSPs 在二级结构上相邻的半胱氨酸顺次连接形成 2 个二硫键, 与报道的昆虫 CSPs 基本特征一致。在二级结构上 CsinCSP1~3 包括 6 个 α-螺旋, 而 CsinCSP4 和 CsinCSP5 有 5 个 α-螺旋, 在系统进化分析中证实了 5 个 CsinCSPs 属于不同 CSP 类群, 利用在线软件预测 CsinCSPs 蛋白的三维结构也验证了 5 个 CsinCSPs 的 α-螺旋数目不同这点。对功能蛋白而言, 保守的基序和稳定的结构对其功能是非常重要的, 因此由 5 个 CsinCSPs 二维及三维结构的区别可预测其生理功能的区别。与昆虫 OBP 相比, CSPs 在进化上更为保守, 不同物种间序列相似度可高达 40%~50%。昆虫 CSPs 序列进化的保守性也可能与其特征有关, 比如它们对常见环境挥发性物质有较低结合力, 而

与通信有关的信号化学物质则有强结合力^[6]。昆虫 CSPs 在三维结构上有 5 或 6 个 α -螺旋, 因其序列长度范围较广, 三维结构多变, 而被认为可结合更多种类的配体分子^[7, 11]。在解析荔枝蒂蛀虫 5 个 CsinCSPs 三维结构基础上, 本研究以荔枝、龙眼果园 8 种最常用药剂为配体, 利用基于“锁-钥学说”的分子对接技术简单快速地模拟出配体与 CsinCSPs 蛋白之间的相互作用^[16]。分子对接数据表明 5 个 CsinCSPs 与 2 个菊酯类杀虫剂分子的结合能力最强, 其次为辛硫磷、毒死蜱、三唑磷和氯虫苯甲酰胺, 与除虫脲和吡虫啉结合能力最弱。在实际生产应用中, 除虫脲和吡虫啉可作为杀卵剂应用于防治荔枝蒂蛀虫^[9, 17]。因此我们推测, 荔枝蒂蛀虫卵 CsinCSPs 可能参与其他药剂的运输和降解, 而无法包裹除虫脲和吡虫啉分子, 最终导致除虫脲和吡虫啉对荔枝蒂蛀虫卵起到灭杀效果。但分子对接结果仅为模拟预测数据, 后续需通过荧光竞争结合试验获得解离常数进一步确定其结合效力。

除了在昆虫嗅觉识别过程中发挥重要作用, CSPs 还可能参与调节昆虫的生长发育、取食、感受机械刺激、免疫、信号传导等生理功能^[11]。近年来研究发现, 昆虫 CSP 与抗药性相关。对 Bt 抗性种群和 Bt 敏感种群的美洲条螟 *Diatraea saccharalis* 幼虫进行基因表达水平检测发现, 2 个种群中的某些 CSPs 表达不同, 表明这些 CSPs 可能参与了条螟的抗性反应^[18]。亚致死剂量阿维菌素处理家蚕 *Bombyx mori* 成虫后, 会导致 BmorCSP3、BmorCSP 6 和 BmorCSP 7 等多个 CSP 蛋白在多个组织中表达上调^[19]。用闹羊花毒素 III 或茛菪碱处理小菜蛾 *Plutella xylostella* 成虫^[20-21]、毒死蜱处理斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 幼虫^[22]、噻虫嗪处理烟粉虱 *Bemisia tabaci* 成虫^[23]、吡虫啉处理蜜蜂 *Apis cerana* 和 *Apis mellifera* 成虫^[24-25] 均得到同样的结果。此外, 通过 RNAi 方法, 以禾谷缢蚜 *Rhopalosiphum padi* 成虫为材料证实 RpadCSP10 与其对吡虫啉的抗性直接相关^[26]; 以赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 若虫为材料^[27], 证明 TcasCSP10 与靶标害虫对敌敌畏和克百威的抗性相关。有学者推测: 杀虫剂处理后昆虫 CSPs 表达变化, 可能原因是成虫腹部表达的 CSP 蛋白可包裹有毒的杀虫剂分子, 让其随粪便排出体外, 对杀虫剂效力起到缓冲作用^[9, 13]。但是同类研究在多种昆虫的幼虫期或成虫期均有所开展, 在害虫卵期却鲜见文献报道。本研究利用害虫卵开展相关研究, 结果显示亚致死剂量除虫脲处理荔枝蒂蛀虫卵后, CsinCSP3 和 CsinCSP5

在处理 6 和 24 h 的表达均上升 40 倍以上, 随后二者在处理 48 h 表达则下降 20 余倍, 而另外 3 个 CsinCSPs 则变化不大, 说明 CsinCSP3 和 CsinCSP5 可能参与荔枝蒂蛀虫卵对除虫脲的解毒过程。但是在分子对接分析中, CsinCSP2 和 CsinCSP3 与除虫脲结合能力更强, CsinCSP5 却与除虫脲结合能力较弱, 说明分子对接结果不能完全预测 CsinCSPs 在昆虫化学药剂胁迫下解毒过程中的生理功能。

本研究以害虫卵为研究对象, 对荔枝蒂蛀虫 5 个 CsinCSPs 基因进行了克隆及序列分析, 并且在分子建模及分子对接的基础上, 对除虫脲作用后虫卵中 CsinCSPs 基因表达情况进行了解析, 结果证明在 CsinCSPs 可能参与荔枝蒂蛀虫卵在杀虫剂胁迫下的解毒过程, 后续可通过 RNAi 或 CRISPR 基因编辑等技术在活体水平确定该类蛋白在害虫抗药性中的作用机制以及在昆虫卵期的相关功能。

参考文献:

[1] 陈厚彬. 中国荔枝龙眼产业现状[C]// 国家荔枝龙眼产业技术体系年度工作总结报告大会. 广州, 2019: 1-2.

[2] 陈炳旭. 荔枝龙眼害虫识别与防治图册[M]. 北京: 中国农业出版社, 2017: 31-41.

[3] 李文景, 董易之, 姚琼, 等. 荔枝蒂蛀虫研究进展[J]. 昆虫学报, 2018, 61(6): 721-732.

[4] KAUPP B. Olfactory signalling in vertebrates and insects: Differences and commonalities[J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2010, 11(3): 188-200.

[5] IHARA S, YOSHIKAWA K, TOUHARA K. Chemosensory signals and their receptors in the olfactory neural system[J]. *Neuroscience*, 2013, 254(7): 45-60.

[6] PELOSI P, IOVINELLA I, ZHU J, et al. Beyond chemoreception: Diverse tasks of soluble olfactory proteins in insects[J]. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 2018, 93(1): 184-200.

[7] LIU G, XUAN N, RAJASHEKAR B, et al. Comprehensive history of CSP genes: evolution, phylogenetic distribution and functions[J]. *Genes*, 2011, 11(4): 413. doi:10.3390/genes11040413.

[8] 董易之, 姚琼, 陈炳旭, 等. 荔枝蒂蛀虫的产卵选择性研究[J]. 果树学报, 2018, 35(2): 204-211.

[9] YAO Q, QUAN L F, XU S, et al. Effect of diflubenzuron on the chitin biosynthesis pathway in *Conopomorpha sinensis* eggs[J]. *Insect Science*, 2020. <https://doi.org/10.1111/1744.7917.12848>.

[10] 徐浩智, 游银伟, 张龙. 昆虫化学感受蛋白及其功能研究进展[J]. *农业生物技术学报*, 2015, 23(1): 118-125.

[11] 刘孝贺, 孙丽娜, 张怀江, 等. 昆虫化学感受蛋白研究进展[J]. *农学学报*, 2020, 10(6): 22-26.

[12] LI Z Q, ZHANG S, LUO J Y, et al. Expression analysis and binding assays in the chemosensory protein gene

- family indicate multiple roles in *Helicoverpa armigera*[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2015, 41(5): 473-485.
- [13] JIA H R, NIU L L, SUN Y F, et al Odorant binding proteins and chemosensory proteins in *Episyrphus balteatus* (Diptera: Syrphidae): Molecular cloning, expression profiling, and gene evolution[J]. *Journal of Insect Science*, 2020, 20 (4). doi:10.1093/jisesa/ieaa065.
- [14] ZHANG H, CHEN J L, LIN J H, et al. Odorant-binding proteins and chemosensory proteins potentially involved in host plant recognition in the Asian citrus psyllid, *Dialephorina citri*[J]. *Pest Management Science*, 2020, 76(8): 2609-2618.
- [15] WARIS M I, YOUNAS A, AMEEN A, et al. Expression profiles and biochemical analysis of chemosensory protein 3 from *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae)[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2020, 46(4): 363-377.
- [16] 汪宇, 孙浩, 朱家颖, 等. 云南切梢小蠹气味结合蛋白的分子对接[J]. *江苏农业科学*, 2015, 43(5): 132-134.
- [17] 陈炳旭, 董易之, 李文景, 等. 荔枝主要害虫防治技术研究进展与综合治理体系构建[J]. *广东农业科学*, 2020, 47(11): 103-113.
- [18] GUO Z, CHENG Z Y, HUANG F, et al. Microarray analysis of global gene regulation in the Cry1Ab-resistant and Cry1Ab-susceptible strains of *Diatraea saccharalis*[J]. *Pest Management Science*, 2012, 68(5): 718-730.
- [19] XUAN N, GUO X, XIE H Y, et al. Increased expression of CSP and CYP genes in adult silkworm females exposed to avermectins[J]. *Insect Science*, 2015, 22(2): 203-219.
- [20] DONG X L, ZHAI Y F, HU M Y, et al. Proteomic and properties analysis of botanical insecticide rhodojaponin III-induced response of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.)[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e67723. doi:10.1371/journal.pone.0067723.
- [21] BAUTISTA M A, BHANDARY B, WIJERATNE A J, et al. Evidence for trade-offs in detoxification and chemosensation gene signatures in *Plutella xylostella*[J]. *Pest Management Science*, 2015, 71(3): 423-432.
- [22] LIN X, JIANG Y, ZHANG L, et al. Effects of insecticides chlorpyrifos, emamectin benzoate and fipronil on *Spodoptera litura* might be mediated by OBPs and CSPs[J]. *Bull Entomology Research*, 2018, 108(5): 658-666.
- [23] LIU G X, XUAN N, CHU D, et al. Biotype expression and insecticide response of *Bemisia tabaci* chemosensory protein-1[J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2014, 85(3): 137-151.
- [24] LI H, TAN J, SONG X, et al. Sublethal doses of neonicotinoid imidacloprid can interact with honey bee chemosensory protein 1 (CSP1) and inhibit its function[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017, 486(2): 391-397.
- [25] LI Z, YU T, CHEN Y, HEERMAN M, et al. Brain transcriptome of honey bees (*Apis mellifera*) exhibiting impaired olfactory learning induced by a sublethal dose of imidacloprid[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2019, 156(56): 36-43.
- [26] PENG X, QU M J, WANG S J, et al. Chemosensory proteins participates in insecticide susceptibility in *Rhopalosiphum padi*, a serious pest on wheat crops[J]. *Insect Molecular Biology*, 2020. doi:10.1111/IMB.12683.
- [27] XIONG W, GAO S, LU Y, et al. Latrophilin participates in insecticide susceptibility through positively regulating CSP10 and partially compensated by OBPC01 in *Tribolium castaneum*[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2019, 159(4): 107-117.

【责任编辑 霍 欢】