



赵慧婷, 彭竹, 黄丽, 郭丽娜, 杜亚丽, 吕建华. 气味结合蛋白 *OBP*s 在意大利蜜蜂头部表达模式的研究 [J]. 环境昆虫学报, 2021, 43 (5): 1229 - 1236.

气味结合蛋白 *OBP*s 在意大利蜜蜂头部表达模式的研究

赵慧婷^{1*}, 彭竹¹, 黄丽¹, 郭丽娜², 杜亚丽², 吕建华¹

(1. 山西农业大学生命科学学院, 山西太谷 030801; 2. 山西农业大学动物科技学院, 山西太谷 030801)

摘要: 昆虫气味结合蛋白 (OBPs) 是脂溶性化学物质的载体, 参与了嗅觉识别和化学传输等生理过程。本研究利用 MEME 在线软件对意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* OBPs 基因家族 21 条氨基酸序列进行 Motif 预测分析; 采用 RT-PCR 初步筛选出在意大利蜜蜂头部表达量较高的 *OBP*s 基因, 然后利用 qPCR 技术对筛选出的基因进一步分析其在不同日龄内勤蜂头部的表达情况。结果表明, 在预测获得的 6 个 motif 中, motif 1 为 21 个 *OBP*s 所共有, 具有极高的保守性, 推测该序列元件可能是意大利蜜蜂 *OBP*s 与底物结合的区域; 表达谱分析结果表明, 13 个 *OBP*s 基因的凝胶电泳条带明显 (即在头部的表达量较高), 且大多数基因在 4 日龄时表达量达到最高值, 推测这类蛋白可能参与了幼虫信息素和糖类物质的识别过程。本研究结果丰富了蜜蜂 *OBP*s 表达特性的研究数据, 同时也为探讨昆虫 *OBP*s 广泛的生理功能奠定了基础。

关键词: 意大利蜜蜂; 气味结合蛋白; motif 预测分析; 荧光定量 PCR; 时序表达分析

中图分类号: Q963; S89

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2021) 05-1229-08

Expression profiles of odorant binding proteins in head of the Western honeybee, *Apis mellifera ligustica*

ZHAO Hui-Ting^{1*}, PENG Zhu¹, HUANG Li¹, GUO Li-Na², DU Ya-Li², LV Jian-Hua¹ (1. College of Life Science, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi Province, China; 2. College of Animal Science and Technology, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi Province, China)

Abstract: Odorant binding proteins (OBPs) are chemical compound carriers, involving in diverse physiological processes including olfactory detection and chemical transportation. In this study, the Motif structure of 21 *OBP*s in *Apis mellifera ligustica* were predicted by the online software MEME. RT-PCR was used to detect the *OBP*s with high expression levels in the head of bees preliminarily, which were then further analyzed for their expression profiles in the head of nurse bees from different days by qPCR. The results showed that among the predicted six motifs, motif 1 was shared by 21 *OBP* genes, which was a highly conservative region. It was speculated that the motif might be the binding region between *OBP*s and their ligands. Expression profile analysis showed that 13 *OBP*s had obvious gel electrophoresis bands, that was these genes expressed relatively high in head of the *A. c. ligustica*, and most of them reached their highest level at 4 days old, which was speculated that these proteins may be involved in the recognition process of larval pheromone and carbohydrate. The results of this study enrich the expression information of honeybee *OBP*s, and lay a foundation for exploring the broad physiological functions of insect *OBP*s.

基金项目: 国家自然科学基金 (31502021); 山西省“省 1331”高校科技创新 (2019L0357)

* 作者简介: 赵慧婷, 女, 博士研究生, 副教授, 研究方向为蜜蜂生物学, E-mail: zhaohuoting@126.com

收稿日期 Received: 2020-06-04; 接受日期 Accepted: 2020-12-21

Key words: *Apis mellifera ligustica*; odorant binding proteins; motif predictive analysis; quantitative real-time PCR; temporal expression analysis

在长期的进化过程中,昆虫与外界环境相互作用,形成了复杂且灵敏的化学感受系统(如嗅觉和味觉系统),在昆虫觅食、饲喂、交配、个体交流及躲避敌害等行为中发挥了重要的作用。在参与昆虫嗅觉识别的多种蛋白中,包含一类小分子量的亲水性转运蛋白——气味结合蛋白(odorant binding proteins, OBPs)。这类蛋白存在于昆虫嗅觉感受器的淋巴液中,其主要功能是结合和运输外界疏水性的气味分子到达嗅觉神经元树突状膜上,激活膜上的气味受体 ORs (odorant receptors, ORs),实现信号转导,最终通过中枢神经系统产生行为反应(Leal *et al.*, 2013; Pelosi *et al.*, 2018)。因此,从嗅觉发生的过程可以看出,OBPs 在识别气味分子和引发生理反应的途径中起到了十分重要的作用(Dani *et al.*, 2011)。

Vogt 等(1981)利用传统的配体结合试验手段,从多音天蚕蛾 *Antheraea polyphemus* 触角中鉴定到昆虫第一个 OBP 蛋白。近年来,高通量技术的兴起加速了昆虫 OBPs 基因的鉴定。而基因的表达特性常常与其功能存在着密切的联系,当基因被鉴定后,其表达谱的研究成为了一项基础性工作。Forêt 和 Maleszka (2006)在西方蜜蜂 *Apis mellifera* 基因组中共鉴定到 21 个 OBPs,其中的 9 个基因在触角中特异性表达,其余基因在各个组织或特异的组织中表达。其后,Iovinella 等(2011)对 21 个 OBPs 在西方蜜蜂不同级型和不同发育期下颚腺中的表达特性及气味分子结合能力进行了研究,推测在下颚腺中高表达的 OBPs 可能参与了化学信息素的溶解与释放过程。

尽管昆虫 OBPs 起初多被证实为具有嗅觉功能,而且这类蛋白大多数表达在昆虫的触角中,然而随着 OBPs 基因家族成员不断被鉴定,越来越多的研究表明,OBPs 除具有嗅觉功能外,还有结合其他配体等更广泛的生理功能,如在昆虫头部和足部表达的 OBPs 可能与味觉识别有关(Pelosi *et al.*, 2014);在黑库蚊 *Culex nigripalpus* 和锥蝽 *Rhodnius prolixus* 的肠道转录组中发现的 OBPs,被认为可能参与了转运营养物质或其它与肠道功能有关的分子(Smartt and Erickson, 2009; Ribeiro *et al.*, 2014)。另外,在昆虫产生信息素的腺体和生殖器官中也发现了 OBP 基因,如棉铃虫

Helicoverpa armigera Hübner *OBP10* (Sun *et al.*, 2012) 和埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 的 *OBP22* (Li *et al.*, 2008),它们可能参与控制化学信息素向环境中释放的过程。

蜜蜂作为一类社会性昆虫具有很高的化学感知和通讯能力。头部是蜜蜂感觉和取食的中心,着生有眼、触角和口器,蜜蜂通过感知蜂群内部的信息素来调节和稳定蜂群高度复杂的社会活动,通过监测外界环境中的气味化合物来定位食物来源(Slessor *et al.*, 2005)。为了进一步挖掘意大利蜜蜂 OBPs 的序列特征及其表达谱数据,在前人研究基础上,本研究分析了 21 个 OBPs 基因在意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 不同日龄内勤蜂头部的表达模式,该试验结果也为研究昆虫 OBPs 更广泛的生理功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验样品的准备

意大利蜜蜂于 2018 年夏季采自山西农业大学实验蜂场。从 3 箱蜂群中分别提取正有新蜂出房的封盖子脾,置于恒温培养箱中。培养条件为:温度 $34^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$,相对湿度 $75\% \pm 5\%$ 。次日,每箱中收集 1 日龄工蜂各 10 头。同时使用标记笔在新蜂胸背部进行标记,一群蜂标记约 100 头,标记后将巢脾带蜂放回原群中。此后,分别于 4、6、8、10、12 和 14 日龄从 3 群蜂中各采集 10 头工蜂,用无菌镊子将工蜂头部分离下来,迅速投入液氮冷冻后研磨,盛入装有 1 mL Trizol 的 EP 管中, -70°C 保存备用。

1.2 RNA 提取及 cDNA 合成

按照 Trizol 试剂盒 (Invitrogen, USA) 说明书提取各样品的总 RNA。经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳和核酸测定仪检测 RNA 的完整性及其纯度和浓度后,使用反转录试剂盒 (TaKaRa, 中国大连) 进行 cDNA 第一链合成。合成过程分两步:①基因组 DNA 的去除。反应总体积为 10 μL : 5 \times gDNA Eraser Buffer 2.0 μL , gDNA Eraser 1.0 μL , 总 RNA 1 μg , RNase Free ddH₂O 补足 10 μL 。42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 min; ②反转录。反应总体积为 10 μL : 5 \times Primer Script Buffer 4.0 μL , PrimeScript RT Enzyme Mix I 1.0 μL , RT Primer Mix 1.0 μL , 步骤①的反

应液 10 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s。

1.3 引物设计

在 NCBI 数据库中搜索意大利蜜蜂 21 个 OBP_s 基因的核苷酸序列, 采用 Primer 5.0 软件设计引物, 用于 RT-PCR 及 qPCR 试验。由于 OBP6 与 OBP8、OBP19 与 OBP20 核苷酸序列相似性很高, 分别为 96% 和 99%, 通过 PCR 扩增难以将其区分开来, 因此这两对基因分别共用一对引物。引物详情见附表 1。

1.4 RT-PCR 检测 OBP_s 在工蜂头部组织的表达

采用 RT-PCR 方法检测 21 个 OBP_s 在 8 日龄工蜂头部组织的表达量。PCR 扩增总体系为 20 μL : 1 \times Taq MasterMix 10 μL , 上、下游引物各 1 μL , cDNA 1.5 μL , ddH₂O 6.5 μL 。PCR 扩增条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 ~ 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 进行 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 8 min。以西方蜜蜂 *Arp1* (GenBank 登录号: XM_623831.6) 为参照基因。

1.5 qPCR 检测部分 OBP_s 在不同日龄工蜂头部的表达量

以意大利蜜蜂 *Arp1* 为内参基因, 在 7500 型实时荧光定量 PCR 仪 (ABI) 中采用 SYBR Green 法进行 qPCR 检测。荧光定量 PCR 总体系为 20 μL : cDNA 各 1.5 μL , SYBR Premix Ex Taq (2 \times) 10 μL , 上、下游引物各 0.8 μL , ROX Reference Dye (50 \times) 0.4 μL , ddH₂O 6.5 μL 。PCR 反应条

件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 接着进行 42 个循环反应, 循环条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s。测定溶解曲线的反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min。每个样品重复 3 次。

1.6 21 个 OBP_s 氨基酸序列的 Motif 分析

利用在线软件 MEME 5.2.0 (<http://meme-suite.org/tools/meme>) 对 21 条完整的 OBP_s 氨基酸序列进行保守基序 Motif 预测分析, 设置的保守 Motif 最大数目为 6。通过 Pfam 33.1 (<http://pfam.xfam.org/>) 在线分析软件对 Motif 进行功能注释。

1.7 数据分析

对于 qPCR 检测数据, 根据扩增曲线获得的 Ct 值, 在 Excel 中采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法进行数据分析。利用 SPSS 25.0 软件进行单因素方差分析, Duncan 法进行多重比较, 并利用 GraphPad Prism 8.0 软件作图。

2 结果与分析

2.1 意大利蜜蜂 OBP_s 基因家族的 Motif 预测结果

对 21 个意大利蜜蜂 OBP_s 基因编码的氨基酸序列进行 Motif 预测分析, 得到 6 个保守的 Motif (图 1)。Pfam 分析结果表明, Motif 1 和 Motif 6 均为 PBP/GOBP family 典型结构, 其余 Motif 均未得到其功能结构的信息。Motif 4 最短, 包含 15 个氨

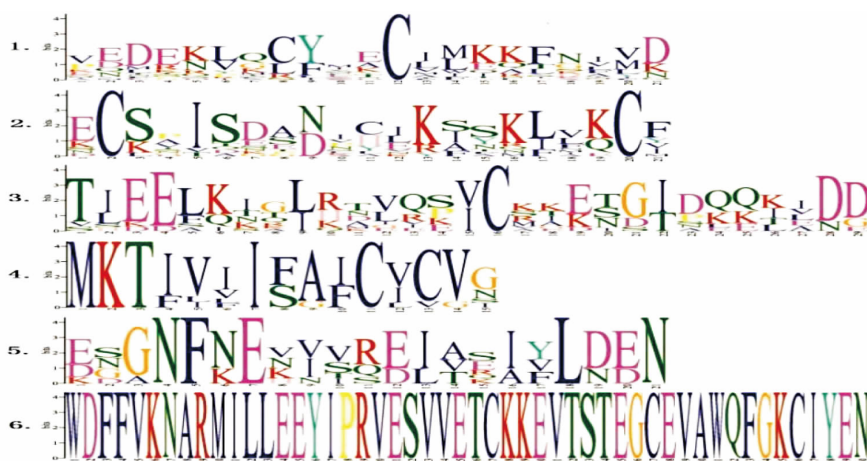


图 1 意大利蜜蜂 OBP_s 的 Motif 结构类型

Fig. 1 Motif structure and type of OBP_s in *Apis mellifera ligustica*

注: 图中不同字母代表不同的氨基酸, 横坐标数字表示该 motif 的长度, 纵坐标数字表示氨基酸字母的高度。字母的大小表示该氨基酸在特定基序中的保守程度, 字母越大表示该氨基酸越保守。Note: Different letters represented different amino acids, the x-axis numbers represented the length of the motif, and the y-axis numbers represented the height of the amino acid letter. The size of the letter represented the degree of conservation of that amino acid in the consensus sequence. The larger the letter, the more conserved the amino acid.

氨酸, Motif 6 最长, 由 50 个氨基酸组成。在所有的 OBP 的氨基酸序列中都存在 Motif 1 (图 2), 可见 Motif 1 是意大利蜜蜂气味结合蛋白家族十分保守的基序, 且该基序中包含一个保守的半胱氨酸残基。另外, 在 13 个 OBP 中含有 Motif 2, 11 个 OBP 中含有 Motif 3, 9 个 OBP 中含有 Motif 4, 7 个 OBP 中含有 Motif 5, 仅有 2 个 OBP 中含有 Motif 6。从 Motif 排布位置来看, Motif 4 和 Motif 5 的位置较为固定, Motif 4 位于第 1~15 位 aa, Motif 5 位于第 75~95 位 aa。

对 Motif 的结构和分布进行对比分析, 可以将 21 个 OBP 分为 4 种类型, OBP15~OBP21 均含有相同的 5 个 Motif (Motif 1~Motif 5), 且 Motif 的排布位置一致, 而 OBP13 和 OBP14 的 Motif 结构与之相似, 因此可以将它们归为一类; OBP6 和 OBP8 的结构相似, 在其氨基酸序列中 Motif 3、Motif 1 和 Motif 6 依次排列; OBP 1、9、10 和 11 均含有两个 Motif (Motif 1 和 Motif 2); OBP 2、3、4、5、7 和 12 仅含有 1 个 Motif (Motif 1)。

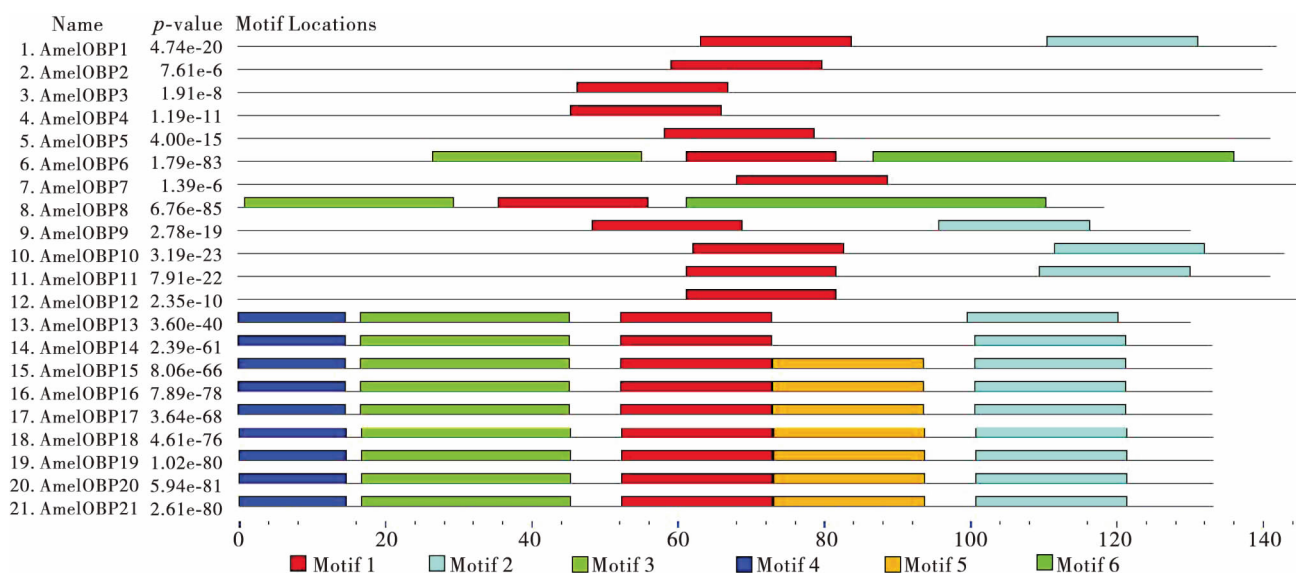


图 2 意大利蜜蜂 OBPs Motif 的组成及排布

Fig. 2 Motif composition and position of OBPs in *Apis mellifera ligustica*

注: 图中彩条的位置为不同的 Motif 在氨基酸序列中所处的位置。彩条高度与序列的保守性成比例。Note: The position of color strips indicated the position of different Motifs in amino acid sequences. Colored strip height was proportional to match to consensus sequence.

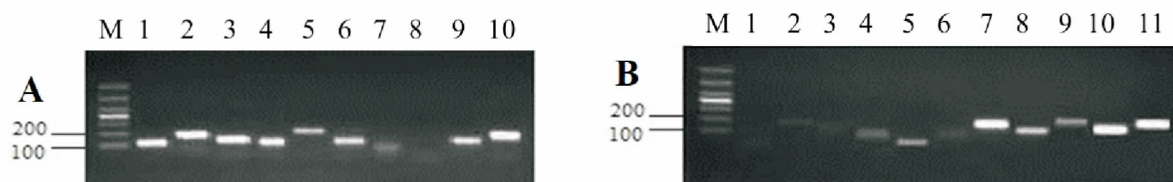


图 3 21 个 OBPs 在工蜂头部组织 RT-PCR 扩增结果

Fig. 3 RT-PCR result of the 21OBP genes derived from worker bees

注: M 泳道为 DNA 分子量标准; A 图 1~10 泳道分别为 OBPs 1、2、3、4、5、6/8、9、10 和 Arp1 的 PCR 产物条带; B 图 1~11 泳道分别为 OBPs 11、12、13、14、15、16、17、18、19/20、21 和 Arp1 的 PCR 产物条带。Note: M represented DNA Marker; 1~10 lanes in figure A were bands of PCR products from OBPs 1, 2, 3, 4, 5, 6/8, 9, 10 and Arp1; 1~11 lanes in figure B were bands of PCR products from OBPs 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19/20, 21 and Arp1.

2.2 *OBPs* 在意大利蜜蜂工蜂头部表达量的定性分析

利用 RT-PCR 检测了各 *OBPs* 在 4 日龄意大利工蜂头部的表达量, RCR 扩增后的凝胶电泳结果见图 3。由图可见, 内参基因 *Arp1* 的扩增条带 (A 图第 10 泳道, B 图第 11 泳道) 清晰, 无拖尾, 说明模板 cDNA 质量良好, 可以通过电泳条带的亮度初步判断目的基因的表达量。图 3 中, *OBPs* 1-5、6/8、10、14、15、17、18、19/20 和 21 的条带较亮, 表明这 13 个基因在意大利蜜蜂工蜂头部均有表达, 而 *OBPs* 7、9、11、12、13 和 16 的条带较弱, 说明这 6 个基因在工蜂头部表达量较低, 因此未参与后续 qPCR 试验。

2.3 部分 *OBPs* 在意大利蜜蜂工蜂头部表达量的定量分析

对 RT-PCR 试验筛选出的 13 个扩增条带较亮, 即在内勤蜂头部表达量较高的 *OBPs* 基因, 进一步利用 qPCR 进行定量检测分析。

首先, 以 *OBP3* 基因 mRNA 表达量为基准, 分析了 13 个 *OBP* 基因在 4 日龄和 8 日龄工蜂头部的相对表达量。从两个表达谱综合分析结果可以看出, *OBPs* 1、2、4、6/8 和 21 在工蜂头部的表达量较高, 而 *OBPs* 5、10 和 19 的表达量相对较低 (如图 4 所示)。qPCR 结果中大部分基因的表达情况与 RT-PCR 的结果相符。

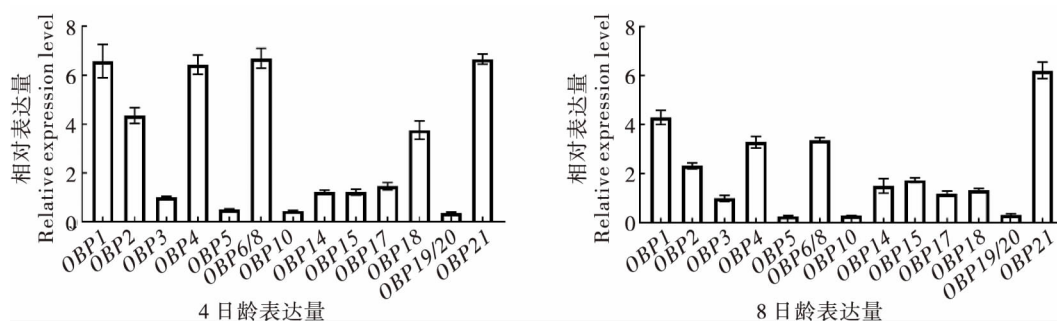


图 4 13 个 *OBPs* 基因在工蜂头部组织的表达量

Fig. 4 Relative expression of 13 *OBPs* in the head of worker bees

其次, 以各基因 8 日龄 mRNA 的表达量为基准, 对 13 个 *OBPs* 在内勤蜂不同发育阶段 (1 ~ 14 日龄) 基因表达量的变化进行了分析 (见图 5)。值得注意的是, 在 13 个 *OBPs* 中, 大多数基因 (11 个 *OBPs*) 均是在 4 日龄时表达量最高。其中, *OBPs* 15、17、18、19/20 和 21 的表达模式相似, 即 1 日龄表达量最低, 4 日龄表达量最高, 6 日龄、8 日龄的表达量依次降低, 10 日龄、12 日龄和 14 日龄表达量再次降低, 但 3 者间差异不显著; *OBPs* 2、3、5 和 *OBP6/8* 的表达模式相似, 即 1 日龄表达量最低, 4 日龄表达量最高, 6 ~ 14 日龄表达量差异不大; *OBP1* 和 *OBP4* 表达模式相似, 即 4 日龄表达量最高, 1 日龄次之, 其余日龄表达量均较低, 14 日龄表达量最低。*OBP10* 和 *OBP14* 的表达情况较为特殊, *OBP10* 在 1 日龄时表达量最高, 随日龄的增加表达量逐渐降低; *OBP14* 在 6 日龄时表达量较高, 10 ~ 12 日龄表达量较低。

3 结论与讨论

蜜蜂同其它社会性昆虫类似, 利用自身复杂的化学通讯系统, 调节不同性别、不同级型和不同群体间的关系, 以及同一群体内不同个体间的分工合作 (Slessor *et al.*, 2005)。另外, 蜜蜂还能够识别与其有亲属的关系的其它个体, 单倍体的雄蜂和病死的个体 (Swanson *et al.*, 2009)。昆虫化学感受过程中涉及许多不同种类的蛋白, 如气味结合蛋白 (*OBPs*)、化学感受蛋白 (*CSPs*)、气味受体 (*ORs*)、神经元膜蛋白 (*SNMPs*) 和气味降解酶 (*ODEs*) 等, 这些蛋白将结合的化学配体的信息传递给中枢神经产生行为反应。研究已证实, 在昆虫触角中高表达的 *OBPs* 主要行使嗅觉功能 (Leal *et al.*, 2013; Qiu *et al.*, 2018), 而目前的一个重要任务是解析在其它组织中广泛表达的 *OBPs* 的非嗅觉功能。

蜜蜂的 *OBPs* 共有 21 个家族成员, 其数量比

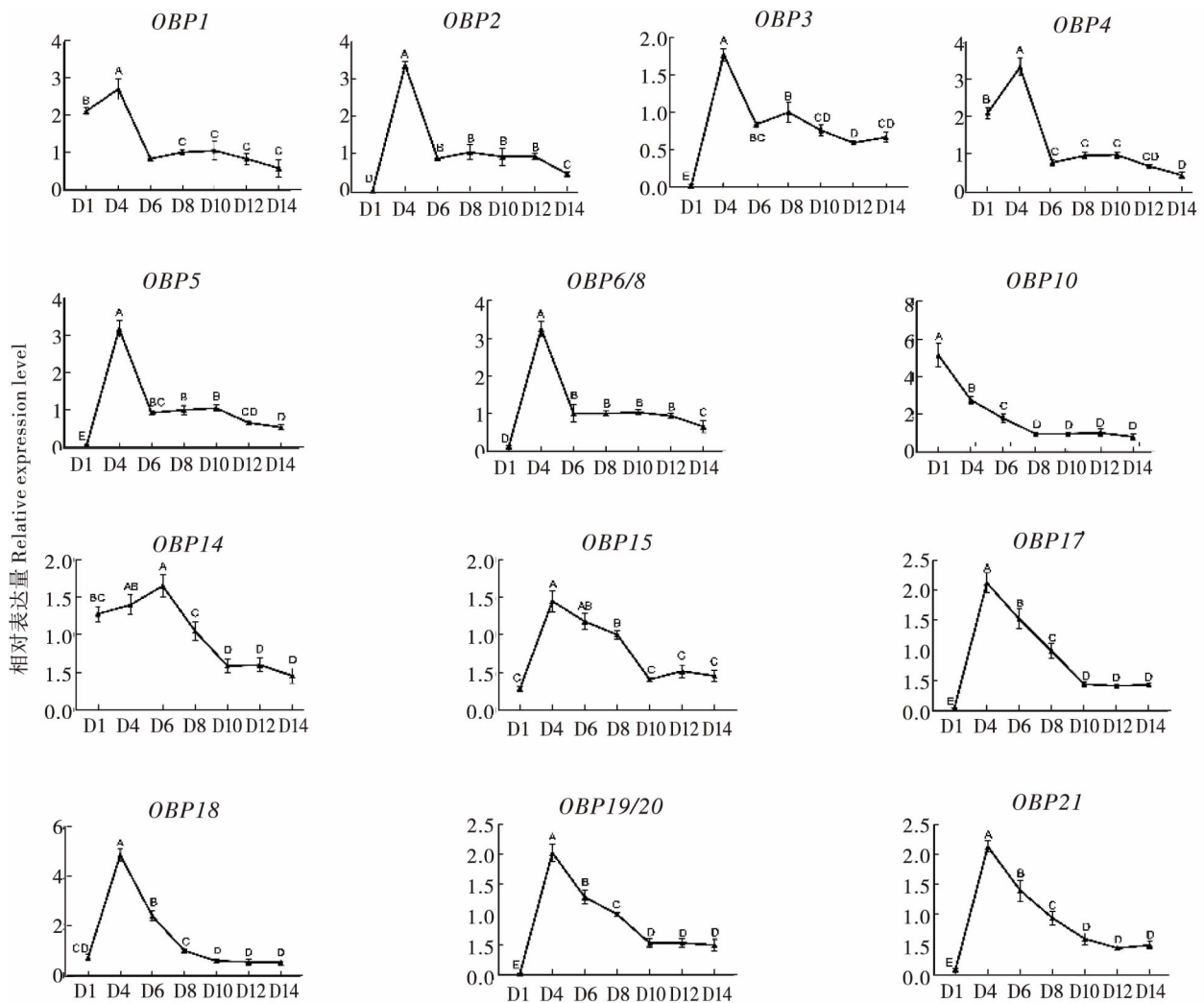


图5 13个OBPs在不同日龄工蜂头部组织的表达模式

Fig. 5 Expression profiles of 13 OBPs in head of the worker bees of different days

黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (52 个)、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* (69 个)、德国小蠊 *Blattella germanica* (109 个) 少很多 (Hekmat-Scafe *et al.*, 2002; Vieira and Rozas, 2011; Robertson *et al.*, 2018), 但与同属于社会性昆虫的火红蚁 *Solenopsis invicta* 的数量 (18 个) 相近 (Gotzek *et al.*, 2011), 属于小型的基因家族, 然而这也为系统地研究这一家族的进化及功能提供了有利的条件。目前, 已开展了对蜜蜂 OBPs 的表达 (Forêt and Maleszka *et al.*, 2006; 杜亚丽等, 2016; 2019)、结构 (Lartigue *et al.*, 2004; Spinelli *et al.*, 2012)、与气味分子的结合能力及结合位点 (Langeswaran *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2018) 等方面的研究。

Motif 通常是一些有序列特异性蛋白的结合位

点的短序列, 与基因的表达调控相关。通过对意大利蜜蜂 21 条 OBPs 氨基酸序列中 6 个 Motif 进行比较分析得出, Motif 1 是 21 个 OBPs 所共有的基序结构, 推测这一 Motif 很可能与底物的结合密切相关。Motif 6 仅在 OBP6 和 OBP8 中存在, 这一基序是否与底物结合的特异性有关还有待进一步研究。另外, 从 21 个 OBPs 的 Motif 组成及排布来看, OBPs 13 ~ 21 的 Motif 结构相似, OBP6 和 OBP8 的结构相似, 这一结果与 Forêt 和 Maleszka (2006) 采用 neighbor-joining 法建立的蜜蜂 OBPs 系统进化树结果类似。但是在进化树中 OBP5 与 OBP6 和 OBP8 被归为一个分支, 与本研究的归类结果不一致, 对其具体功能的分类还需要更进一步的试验支持。

Forêt 和 Maleszka (2006) 利用反向斑点杂交

技术 (Reverse Northern dot blot hybridization) 分析了西方蜜蜂 *OBPs* 在不同级型、不同组织和不同发育阶段 (幼虫、蛹、1 日龄幼蜂和采集蜂) 的表达量, 结果显示, 除 *OBP10* 和 *OBP14* 外, 其余基因在头部表达量均较低。而本研究分析结果表明, 除 *OBPs* 7、9、11、13 和 16 在工蜂头部表达量较弱外, 其余 *OBP* 基因均有表达, 且 *OBPs* 1、2、4、6/8 和 21 表达量较高。造成两研究结果差异的原因可能是由于试验方法不同, 通常 RT-PCR 和 qPCR 检测方法比 Northern 印迹更加灵敏, 因此得到的表达量也不尽相同。

不同发育时期表达谱分析表明, 在意大利内勤蜂头部有表达的 *OBPs* 中, 多数在 4 日龄表达量较高, 6 日龄后表达量均较低, 推测这些 *OBPs* 可能具有类似的功能。在正常的蜂群中, 3~6 日龄的工蜂主要承担调制蜂粮饲喂大幼虫的工作; 6~12 日龄工蜂王浆腺发达, 可分泌大量王浆, 从事饲喂小幼虫、蜂王等工作; 12~18 日龄的工蜂蜡腺发达, 可从事泌蜡造脾、清洁卫生、酿蜜等工作 (曾志将, 2017)。头部是蜜蜂感觉和取食的中心, 在其表面分布着大量的嗅觉和味觉感受器 (Matsuo *et al.*, 2007)。因此本研究推测在 4 日龄工蜂头部表达量较高的 *OBPs* 可能参与了幼虫信息素和糖类物质的识别。

本研究对意大利蜜蜂气味结合蛋白 *OBPs* 基因家族的氨基酸序列进行 Motif 分析, 鉴定到一个十分保守的 Motif 结构, 长度为 21 个氨基酸, 包含一个保守的半胱氨酸残基。21 个 *OBPs* 基因中有 13 个在内勤蜂头部有表达, 其中 *OBPs* 1、2、4、6/8 和 21 表达量相对较高, 且大多数基因在 4 日龄时表达量达到最高, 这些 *OBPs* 可能参与了意大利蜜蜂对巢内蜂粮等甜味物质及幼虫信息素的识别过程。

参考文献 (References)

Brito NF, Moreira MF, Melo AC. A look inside odorant-binding proteins in insect chemoreception [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2016, 95: 51–65.

Dani FR, Michelucci E, Francese S, *et al.* Odorant-binding proteins and chemosensory proteins in pheromone detection and release in the Silkworm *Bombyx mori* [J]. *Chemical Senses*, 2011, 36 (4): 335–344.

Du YL, Feng YJ, Ma WH, *et al.* Cloning and differential expression of the *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica* odorant binding protein gene *OBP12* [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*,

2019, 56 (3): 517–529. [杜亚丽, 冯宇佳, 马卫华, 等. 中华蜜蜂及意大利蜜蜂气味结合蛋白 *OBP12* 的基因克隆与差异表达分析 [J]. *应用昆虫学报*, 2019, 56 (3): 517–529]

Du YL, Zhang ZY, Pan JF, *et al.* Cloning and expression analysis of odorant binding protein gene *AcerOBP14* from *Apis cerana cerana* [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49 (19): 3852–3862. [杜亚丽, 张中印, 潘建芳, 等. 中华蜜蜂气味结合蛋白基因 *AcerOBP14* 的克隆及时空表达 [J]. *中国农业科学*, 2016, 49 (19): 3852–3862]

Forêt S, Maleszka R. Function and evolution of a gene family encoding odorant binding-like proteins in a social insect the honey bee (*Apis mellifera*) [J]. *Genome Research*, 2006, 16 (11): 1404–1413.

Gotzek D, Robertson HM, Wurm Y, *et al.* Odorant binding proteins of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*: An example of the problems facing the analysis of widely divergent proteins [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6 (1): e16289.

Hekmat-Scafe DS, Scafe CR, McKinney AJ, *et al.* Genome-wide analysis of the odorant binding protein gene family in *Drosophila melanogaster* [J]. *Genome Research*, 2002, 12 (9): 1357–1369.

Iovinella I, Dani FR, Niccolini A, *et al.* Differential expression of odorant-binding proteins in the mandibular glands of the honey bee according to caste and age [J]. *Journal of Proteome Research*, 2011, 10 (8): 3439–3449.

Langeswaran K, Jeyaraman J, Mariadasse R, *et al.* Insights from the molecular modeling, docking analysis of illicit drugs and bomb compounds with honey bee odorant binding proteins (OBPs) [J]. *Bioinformatics*, 2018, 14 (5): 219–231.

Lartigue A, Gruetz A, Briand L. Sulfur single-wavelength anomalous diffraction crystal structure of a pheromone-binding protein from the honeybee *Apis mellifera* L [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279 (6): 4459–4464.

Leal WS. Odorant reception in insects: Roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes [J]. *Annual Review of Entomology*, 2013, 58: 373–391.

Matsuo T, Sugaya S, Yasukawa J, *et al.* Odorant-binding proteins *OBP57d* and *OBP57e* affect taste perception and host-plant preference in *Drosophila sechellia* [J]. *PLoS Biology*, 2007, 5 (5): e118.

Pelosi P, Iovinella I, Felicioli A, *et al.* Soluble proteins of chemical communication: An overview across arthropods [J]. *Frontiers in Physiology*, 2014, 5: 320.

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.

Qiu L, Tao S, He H, *et al.* Transcriptomics reveal the molecular underpinnings of chemosensory proteins in *Chlorops oryzae* [J]. *BMC Genomics*, 2018, 19 (1): 890.

Ribeiro JM, Genta FA, Sorgine MH, *et al.* An insight into the transcriptome of the digestive tract of the bloodsucking bug, *Rhodnius prolixus* [J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2014, 8 (1): e2594.

Robertson HM, Baits RL, Walden KKO, *et al.* Enormous expansion of

- the chemosensory gene repertoire in the omnivorous German cockroach *Blattella germanica* [J]. *Journal of Experimental Zoology Part B-molecular and Developmental Evolution*, 2018, 330 (5): 265 – 278.
- Slessor KN, Winston ML, Conte Y. Pheromone communication in the honeybee (*Apis mellifera* L.) [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2005, 31 (11): 2731 – 2745.
- Smartt CT, Erickson JS. Expression of a novel member of the odorant-binding protein gene family in *Culex nigripalpus* (Diptera: Culicidae) [J]. *Journal of Medical Entomology*, 2009, 46 (6): 1376 – 1381.
- Song XM, Zhang LY, Fu XB, *et al.* Various bee pheromones binding affinity, exclusive chemosensillar localization, and key amino acid sites reveal the distinctive characteristics of odorant-binding protein 11 in the Eastern Honey Bee, *Apis cerana* [J]. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 422.
- Spinelli S, Lagarde A, Iovinella I, *et al.* Crystal structure of *Apis mellifera* OBPI4, a C-minus odorant-binding protein, and its complexes with odorant molecules [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2012, 42 (1): 41 – 50.
- Sun YL, Huang LQ, Pelosi P, *et al.* Expression in antennae and reproductive organs suggests a dual role of an odorant-binding protein in two sibling *Helicoverpa* species [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7 (1): e30040.
- Swanson JAI, Torto B, Kells SA, *et al.* Odorants that induce hygienic behavior in honeybees: Identification of volatile compounds in chalkbrood-infected honeybee larvae [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2009, 35 (9): 1108 – 1116.
- Vieira FG, Rozas J. Comparative genomics of the odorant-binding and chemosensory protein gene families across the Arthropoda: Origin and evolutionary history of the chemosensory system [J]. *Genome Biology and Evolution*, 2011, 3: 476 – 90.
- Vogt RG, Riddiford LM. Pheromone binding and inactivation by moth antennae [J]. *Nature*, 1981, 293 (5828): 161 – 163.
- Zeng ZJ. *Apiology* [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2017: 29. [曾志将. 养蜂学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2017: 29]