



杨乐, 曾志将, 张丽珍. 中华蜜蜂气味受体基因 *AcOr170* 的克隆与序列分析 [J]. 环境昆虫学报, 2017, 39 (1): 48 - 54.

# 中华蜜蜂气味受体基因 *AcOr170* 的克隆与序列分析

杨 乐, 曾志将, 张丽珍\*

(江西农业大学蜜蜂研究所, 南昌 330045)

**摘要:** 本研究采用自行设计的引物对中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 雄蜂触角中气味受体基因 (Odorant receptors 170) *AcOr170* 的 cDNA 序列进行了克隆和序列分析, 以探寻中华蜜蜂雄蜂气味受体 *AcOr170* 基因在近缘种昆虫间的进化差异。结果表明: 中华蜜蜂雄蜂气味受体基因 *AcOr170* 的 cDNA 序列总长度为 1356 bp, 编码区序列长度为 1188 bp, 共编码 396 个氨基酸, 其分子量为 46.272 kDa, 等电点 8.96, Genbank 登录号: KX264359。结构域的分析结果显示, 该蛋白具有 7tm-6 一个保守结构域。经序列比对后发现, *Or170* 的序列在中华蜜蜂、西方蜜蜂和大蜜蜂间的亲缘性很近。

**关键词:** 中华蜜蜂; 气味受体; *Or170*; 基因比对; 序列分析

中图分类号: Q963; S89

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2017) 01-0048-07

## Cloning and sequencing analysis of *Odour receptor 170* in honeybees, *Apis cerana cerana*

YANG Le, ZENG Zhi-Jiang, ZHANG Li-Zhen\* (Honeybee Research Institute, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

**Abstract:** A primer for the gene *Odour receptor 170* of *Apis cerana cerana* (*AcOr170*) was designed to clone its cDNA sequence in drones. The aim was to compare evolutionary differences between the *Apis cerana cerana* and other honeybee species. The experimental results showed that the overall sequence of *AcOr170* was 1356 bp in length. The coding region length was 1188 bp, encoding 396 amino acids. Its molecular weight was 46.272 kDa, isoelectric point was 8.96, and the accession ID of Genbank was KX264359. Structural domain analysis indicated that the encoded protein contained a highly conserved structure of 7tm-6. Sequence alignment showed that genome sequences were highly similar among *A. cerana cerana*, *A. mellifera* Linnaeus and *A. dorsata*.

**Key words:** *Apis cerana cerana*; odorant receptors; *Or170*; sequence alignment; evolution analysis

昆虫通过特殊嗅觉系统感知外界环境中的化学气味, 来维持其正常的觅食、求偶、繁殖和避害等生理行为 (赵慧婷等, 2012)。研究表明, 在昆虫触角感受器中气味受体蛋白 (odorant receptors, OBs)、气味结合蛋白 (odorant-binding protein, OBPs)、化学感受蛋白 (chemosensory

proteins, CSPs)、神经元膜蛋白 (sensory neuron membrane protein, SNMPs) 和气味降解酶 (odordegrading enzyme, ODEs) 等蛋白均参与了接收气味这一过程 (Vosshall *et al.*, 1999; Hallem *et al.*, 2004; Vogt *et al.*, 2009)。昆虫的气味受体基因包括编码传统气味受体 (conventional

基金项目: 国家自然科学基金 (31572469, 31602015); 国家蜂产业技术体系资助项目 (No. CARS-45-kxj12)

作者简介: 杨乐, 男, 1992年生, 硕士研究生, 主要从事蜜蜂生物学研究工作, E-mail: 18735431277@163.com

\* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: lzeg@126.com

收稿日期 Received: 2016-10-09; 接受日期 Accepted: 2016-11-23

receptors) 的基因和编码非典型气味受体 Or83b 家族的基因。哺乳动物的嗅觉受体结构包含 7 个跨膜区, 并与 G 蛋白偶联。由于昆虫的气味受体也含有 7 个  $\alpha$  螺旋跨膜区, 所以昆虫的气味受体被普遍认为也与 G 蛋白相偶联, 但有一些试验证据并不支持此观点 (王妮娜, 2005)。

气味受体的研究对于认识昆虫化学信号的分子识别机制有重要意义 (巩中军等, 2008)。目前已有许多学者对昆虫气味受体基因进行了大量的研究。第一个昆虫气味受体基因被 Pennisi (1999) 从黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中鉴定出来。Robertson 等 (2006) 对西方蜜蜂 *Apis mellifera* 基因组分析发现: 西方蜜蜂基因组中有 163 个气味受体基因。另外, Wanner 等 (2007) 发现 Or10、Or11、Or18 和 Or170 在雄蜂触角中高度表达。目前, 10 多种昆虫的气味受体已经得到了全面鉴定, 这对于它们近缘种昆虫的相应受体鉴定有重要意义 (赵慧婷等, 2012)。

中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 是我国特有的蜂种, 简称中蜂。与西方蜜蜂相比, 中蜂更加温顺, 具有较强的抗疾病和抗螨虫能力且善于搜索零星蜜粉源 (Abrol, 2012)。最近, 有研究发现中蜂对于气味的感知能力更强 (陈盛禄, 2001; 曾志将, 2009)。因此中蜂是研究昆虫嗅觉机制的良好实验材料。另外, 中蜂正常处女王交尾行为受到了西方蜜蜂雄蜂的严重干扰 (王启发等, 2003), 因此有必要对中蜂雄蜂的气味受体基因进行研究。

本研究以中蜂雄蜂为实验材料, 通过 RT-PCR 技术克隆了中蜂雄蜂触角 *AcOr170* 基因, 并对其序列进行了分析。以期为进一步研究该基因的生物学功能提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 试验材料

实验蜜蜂取自江西农业大学蜜蜂研究所饲养的中华蜜蜂, 蜂群健康且群势较强。从蜂群的巢房内随机取中蜂雄蜂 70 头, 用镊子小心将蜜蜂放入 EP 管中, 然后立即放入液氮中速冻, 最后  $-80^{\circ}\text{C}$  保存, 用于提取 RNA。

### 1.1.2 试验试剂

总 RNA 提取试剂 TRIzol, pEasy-T3 载体, Transl-T1 感受态细胞, X-gal, IPTG, 氨苄青霉素, RNA 酶抑制剂等购自全式金公司; M-MLV 反转录酶、DNA marker DL2000, PCR 反应试剂购自 Takara 公司, 质粒微量抽提试剂盒与凝胶回收试剂盒购自上海生工。其他均为国产或进口分析纯试剂。

### 1.1.3 实验仪器

移液枪 (eppendorf)、小型冷冻离心机 (eppendorf)、RT-PCR 仪 (eppendorf)、SHP-250 型生化培养箱 (扬州三发电子有限公司)、电热恒温干燥箱 (上海跃进医疗器械厂)、凝胶成像系统 (Tanon)、RT-PCR 仪 (eppendorf) 等。

## 1.2 方法

### 1.2.1 总 RNA 的提取

RNA 提取: 用镊子取 70 头中蜂雄蜂的完整触角, 再用液氮研磨, 并参照 Trizol 试剂盒说明书的步骤提取总 RNA。

### 1.2.2 反转录合成 cDNA

按照 Promega (公司) M-MLV 反转录试剂盒操作说明合成单链 cDNA。反转录条件: 将反应体系 ( $5 \times$  MLV Buffer  $10 \mu\text{L}$ ; dNTP Mixture  $8 \mu\text{L}$ ; RNase 抑制剂  $1.5 \mu\text{L}$ ; M-MLV 反转录酶  $1.5 \mu\text{L}$ ; DEPC 水  $18 \mu\text{L}$ ) 混匀, 于  $42^{\circ}\text{C}$  温育 60 min, 随后  $70^{\circ}\text{C}$  温育 15 min, 最后向合成的 cDNA 中加入灭菌超纯水稀释, 置于  $-80^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.2.3 PCR 扩增引物的设计与合成

根据 GenBank 中已发表的近缘种西方蜜蜂 *AmOr170* 序列 (登录号为: NM\_001242993.1), 设计了 2 对扩增序列有重叠区域的引物用于扩增中华蜜蜂相应基因组序列 (*AcOr170*), 引物序列如表 1 所示。

### 1.2.4 PCR 扩增反应, 胶回收

以触角的 cDNA 第一链为模板, 用引物对其进行巢式 PCR 扩增。PCR 反应条件:  $94^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min 后;  $94^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,  $58^{\circ}\text{C}$  退火 45 s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 90 s, 共进行 30 个循环; 最后  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min, 得到的 PCR 产物保存于  $4^{\circ}\text{C}$ 。将 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测, 在紫外灯下用消毒干净的刀片切下含目的条带的胶条, 使用胶回收试剂盒回收目的片段。

表 1 用于扩增 *AcOr170* 的特异性引物Table 1 Specific primers used for amplification *AcOr170*

目的基因 Object gene	扩增引物 Primer	退火温度 Tm
<i>AcOr170-F1</i>	5'-AAGATACATAACAATTTTCCTTGCA-3'	53.2
<i>AcOr170-F2</i>	5'-GAATTTTTCTCCTTTCATTTCATCA-3'	53.2
<i>AcOr170-R1</i>	5'-GAACTTTTAATCATAAATATCACATG-3'	50.0

### 1.2.5 克隆和测序

将胶回收产物与 P-Easy T3 载体混匀后于 25℃ 连接 20 min, 将连接产物转化到 Transl-T1 感受态细胞中, 然后涂布在 LB 平板上, 37℃ 倒置培养 14 h. 用质粒微量提取试剂盒抽提质粒 DNA, 将得到的质粒 DNA 进行阳性鉴定。最后将鉴定的阳性克隆菌送至上海生工进行测序。

### 1.2.6 生物信息学分析

本实验用 DNASTAR 软件将 *AcOr170* 正反向测序后的序列拼接获得 *AcOr170* 基因的 cDNA 序列; 其氨基酸序列通过 Bioedit 软件按照六读框翻译而成。*AcOr170* 基因首先在 NCBI 中经 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 搜索比对检查序列的正确性, 通过 Clustal X 的多重序列比较分析 *AcOr170* 与其它物种的同源性; 采用 MEGA 6.0 软件对已报道物种的 Or170 氨基酸序列构建邻位相

连法 (Neighbor-joining) 系统进化树。

## 2 结果与分析

### 2.1 中蜂 *AcOr170* 基因的克隆及序列分析

通过对中蜂 *AcOr170* 的克隆、测序以及序列拼接, 获得了 1 条气味受体基因序列, 命名为 *AcOr170* (登录号为: KX264359)。如图 1 所示 *AcOr170* 的 cDNA 序列全长为 1356 bp, 包含一个长 1188 bp, 编码 396 个氨基酸的开放阅读框 (ORF, 起始于第 90 个碱基, 终止于第 1280 个碱基)。其分子量为 46.272 kDa, 等电点 8.96。通过 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 数据库分析 *AcOr170* 的氨基酸序列, 得到 28-54 bp 的一个高度保守的结构功能域 7tm-6。

```

1 GGATCGCCCTTGAATTTTTCTCCTTTCATTTCATCAAAAATTATTATTTTTCTATCCATAAAAAATTACAAGAAGATTAAGTAAGGAAGGAAA 90
M 1
91 TGAATTTTTCAAAAATTGAATCGTTTTGAACGCCCTTCGCAAAACATGATTTTCGGGAACTTTTTACCGATGAACAATATAAATGAGAAATTAT 180
N F Q N L N R L N A F A N M I S G N F L P M N N I N E K L S 31
181 CCATAATTTTGA AAAATCAATTTTCGTCATCGCTTGGATAATAGAACTGATATACGTGACCGCCTCTTTTCTCGGACTTTTCAAATGTGTCGG 270
I I L K I N F V I A W I I E L I Y V T A S F L G L F N V S G 61
271 GGGAAAAAGCCTTAAAGGATGGAACAGTGAACATAGCCATTCGTTTGAAGTATAATCTTCAACATATCTACTACACAGTCGTAAAAAGT 360
E K A L K D G T V N I A I S F E V I I F N I Y L H S R K K L 91
361 TGTTATATAAATTAATCGGAAAGTTGAATCATCTTCTGATTACAGAAGACGAAATATTTTCGAAGCGTGATAATTGATACGGTGAACCCGT 450
L Y K L I G K L N H L L I T E D E I F R S V I I D T V K P L 121
451 TAGAGATGCCCTTAAAAATTTATGTAATGCCAGTTGCTTTCGCTTATGATATGGATATTATCTCCGTTGATCAAAATGTTTCAAAAAGA 540
E M P L K I Y V I A S V A S L M I W I L S P L I K L F Q K N 151
541 ATGAGTTTTTATACGAGGATTTATAATGCCAGCCGTTTTTCCAAAACAACCTTCTCAAACGATATTTTTATTGTGGCAITTTTCTTC 630
E F Y Y E E D F I M P A V F F S K Q P F S N D I F I C G I F L Q 181
631 AATTGCTTGGCGGTGAAGATACGATAAATPAGAAAAATTAGTCTAGATATCTATACCATATACTTGTGCCTTTTAAACGGCACAATACA 720
L L G G E D T I I R K I S L D I Y T I Y L C L L I T A Q Y K 211
721 AATATCTTAGAATCAAAATTTGCGAATTATACTTAAAGAGAAACATCAAAATAACGAAAGATCTATATAAGAATATTATTGGCAAAAACGACA 810
Y L R I K F A I I L K E K H Q I T F K D L Y K N I I W Q N D N 241
811 ATGTCAGACAGGAAATGAAGCTGTTAACCCGCCATTTTGAACCTGTAATCGAGACGACTACTATATTGAAAAAATTAATTTCTCCCAATA 900
V R Q E M K L L T R H F E T V I E T T T I L K K L I S P N I 271
901 TTGGATTTCTTACTTAAGCTACGTTTTCCGGTCTGCTTCTGAGTTTTATGTTTGAATGACTTCGGCCAAAGTATTTTGA AAAATGTT 990
G F L Y L S Y V F R F C F L S F M F A M T Y K N I I W Q N D N 301
991 TACTTGCATCGTATACAATCGGTGCCTAATAACAATTTTATATATTATGTTATTGTATTCAACGTTTTATTGAAAGCGAGTTCGTCTATAG 1080
L A S Y T I G A L I Q F Y I L C Y C I Q R L F E A S S I A 331
1081 CAGATGATGGTGTATGAAAAATGGTACTCTTACGACATAACGCTTTCAACGTGTAATCTTATGATAAGTTTGGCTAACGAATTAAGT 1170
D D V Y Y E K W Y S Y D I R F Q R V I L M I S L A N E L K C 361
1171 GTAAAAATATCAAAATTTCAAAAATATTGATTTAACTTTACCATCTTTTATGTGCGATTCTAAATCAAGCATATTCGGTATGTTTATTATTT 1260
K I S N F Q N I D L T L P S F M S I L N Q A Y S V C L L F L 391
1261 TGAAGCAAGACAAGATTGAATCAAATTAATGTAATATCTTGTATTAAATCAATAGTACATGTGATATTATGATTA AAAAGTTTCAAGGGC 1350
K A R Q D 396
1351 GATCCC 1356

```

图 1 *AcOr170* 基因核苷酸序列及推导的氨基酸序列Fig. 1 Nucleotide and amino acid sequence of *AcOr170*

注: 横线标注部分为 7tm-6 一个高度保守结构域。Note: The part marked in lines means a high conserved structure of 7tm-6.

## 2.2 同源性比对

### 2.2.1 核苷酸序列分析

所得测序结果通过 BLAST 比对, 找到了 2 条与 *AcOr170* 同源的序列, 通过 Clustal X 的多重序列比较分析与其它物种的同源性 (图 2)。从图 2 中能发现, 两气味受体的 DNA 序列长度在中华蜜蜂

*Or170* (*AcOr170*)、大蜜蜂 *Or22c-like* (*AdOr22c-like*)、西方蜜蜂 *Or170* (*AmOr170*) 中有一定差异, 但外显子区长度是较为保守的。通过序列比对分析发现: *AcOr170* 与 *AdOr22c-like*、*AmOr170* 一致性分别为 90.57%, 87.47%。

<i>AdOr22c-like</i>	1	-----
<i>AcOr170</i>	1	-----
<i>AmOr170</i>	1	AGATGAAGAATGGAATGACAAGCAACAATTGTATCCAACACTTCGAATTGATAGAGATAC
<i>AdOr22c-like</i>	1	-----ACTAAATTATCATA---TA
<i>AcOr170</i>	1	-----
<i>AmOr170</i>	61	TCGTAAGCTTTTAGTGACTTGTATATCATTTTTTAGTGCTACTAAATTTATCATAATATA
<i>AdOr22c-like</i>	18	ATAATTATCCAAAGTTTATTCTACTTGAATATTTTTTAATTCGAAACTCAAGATTCT
<i>AcOr170</i>	1	-----
<i>AmOr170</i>	121	ATAATTATCCAAAGTTTATCTACTTGAATATTTTTTAATTTTC-----CAAGATTCT
<i>AdOr22c-like</i>	78	TATGAATCAAATTTAT-----AAAAGATACATAACAATTTTCCTTCAGAATT---TTTCTC
<i>AcOr170</i>	1	-----GATCGCCTT---GAATT---TTTCTC
<i>AmOr170</i>	175	TATGAATCAAATTTATCAAAAAGATACATAACAATTTTCCTTCAGAATTATTTTCTC
<i>AdOr22c-like</i>	133	GTTTCATTCAT-----CAAAATTATATTTTTCT---ATTCATAAAAATTACAAGAAGATTAAGT
<i>AcOr170</i>	23	GTTTCATTCAT-----CAAAATTATATTTTTCT---ATCCATAAAAATTACAAGAAGATTAAGT
<i>AmOr170</i>	235	GTTTCATTCATCAAAATTATATATTTCTCCATCCATGAAAG---AAGATTAAGTAGT
<i>AdOr22c-like</i>	190	AAGGGAGGAAATGAATTTTCAAAATTTGAATCGTTTGAACGCCCTCGCAAACATGATTTCC
<i>AcOr170</i>	80	AAGGGAGGAAATGAATTTTCAAAATTTGAATCGTTTGAACGCCCTCGCAAACATGATTTCC
<i>AmOr170</i>	291	AAGGGAGGAAATGAATTTTCAAAATTTGAATCGTTTGAACGCCCTTCGCAAACATGATTTCC
<i>AdOr22c-like</i>	250	GGGAAACTTTTTACCGATGAACAATATAAATGAGAAATATCCATAATTTTGAAAATCTA
<i>AcOr170</i>	140	GGGAAACTTTTTACCGATGAACAATATAAATGAGAAATATCCATAATTTTGAAAATCTA
<i>AmOr170</i>	351	GGGAAACTTTTTACCGATGACAAATATAAATGAGAAATTTCTGCAATTTTGAAAATCTA
<i>AdOr22c-like</i>	310	TTTCATCATCGCTTGATAATAGAAGTATACGTGACCGCCTTTTTCTCGGACTTTT
<i>AcOr170</i>	200	TTTCATCATCGCTTGATAATAGAAGTATACGTGACCGCCTTTTTCTCGGACTTTT
<i>AmOr170</i>	411	TTTCATCATCGCTTGATAATAGAAGTATACGTGACCGCCTTTTTCTCGGACTTTT
<i>AdOr22c-like</i>	370	CAATGTATCGGGGAAAAGCGTTAAAGGATGGTACAGTGAACATAGCCATCTCGTTTGA
<i>AcOr170</i>	260	CAATGTATCGGGGAAAAGCGTTAAAGGATGGTACAGTGAACATAGCCATCTCGTTTGA
<i>AmOr170</i>	471	CAATGTATCGGGGAAAAGCGTTAAAGGATGGTACAGTGAACATAGCCATCTCGTTTGA
<i>AdOr22c-like</i>	430	AGTGATCATTTTCAACATATATTTACACAGTCGTAAAAAGTTGTTATATAAATTAATTGG
<i>AcOr170</i>	320	AGTGATAATCTTCAACATATATTTACACAGTCGTAAAAAGTTGTTATATAAATTAATTGG
<i>AmOr170</i>	531	AGTGATGCTTCAACATATATTTACACAGTCGTAAAAAGTTGTTATATAAATTAATTGG
<i>AdOr22c-like</i>	490	AAAGTTGAATCATCTTCTGATTACAGAAGACGAAATATTTCAAGCGTGATAATTGATAC
<i>AcOr170</i>	380	AAAGTTGAATCATCTTCTGATTACAGAAGACGAAATATTTCAAGCGTGATAATTGATAC
<i>AmOr170</i>	591	AAAGTTGAATCATCTTCTGATTACAGAAGACGAAATATTTCAAGCGTGATAATTGATAC
<i>AdOr22c-like</i>	550	GGTGAAACCGTTAGAGATGCCTTTAAAAATTTATTAATTGCAAGTGTCTGCTCGCTTAT
<i>AcOr170</i>	440	GGTGAAACCGTTAGAGATGCCTTTAAAAATTTATTAATTGCAAGTGTCTGCTCGCTTAT
<i>AmOr170</i>	651	GGTGAAACCGTTAGAGATGCCTTTAAAAATTTATTAATTGCAAGTGTCTGCTCGCTTAT
<i>AdOr22c-like</i>	610	GATATGGATATTATCCGTTGATCAAATTTGTTTCAAAAATAATGATTTTATTACGAGGA
<i>AcOr170</i>	500	GATATGGATATTATCCGTTGATCAAATTTGTTTCAAAAATAATGATTTTATTACGAGGA
<i>AmOr170</i>	711	GATATGGATATTATCCGTTGATCAAATTTGTTTCAAAAATAATGATTTTATTACGAGGA
<i>AdOr22c-like</i>	670	TTTTATAATTCAGCCGTTTTTCCAAACAAC---CTTTCTCAAACGATATTTTTATTG
<i>AcOr170</i>	560	TTTTATAATTCAGCCGTTTTTCCAAACAAC---CTTTCTCAAACGATATTTTTATTG
<i>AmOr170</i>	771	TTTTATAATTCAGCCGTTTTTCCAAACAACAACCTTTCTCAAACGATATTTTTATTG
<i>AdOr22c-like</i>	727	TGGTATTTTTCTTCAATTGCTTGGCGGTGAAGATACGATAATTAGAAAAATTAGTCTAGA
<i>AcOr170</i>	617	TGGTATTTTTCTTCAATTGCTTGGCGGTGAAGATACGATAATTAGAAAAATTAGTCTAGA
<i>AmOr170</i>	831	TGGTATTTTTCTTCAATTGCTTGGCGGTGAAGATACGATAATTAGAAAAATTAGTCTAGA
<i>AdOr22c-like</i>	787	TATCTATACCATATACTTGTGCCTTTTAATAACGGCTCAATACAAATACCTTAGAATCAA
<i>AcOr170</i>	677	TATCTATACCATATACTTGTGCCTTTTAATAACGGCTCAATACAAATATCTTAGAATCAA
<i>AmOr170</i>	891	TATCTATACCATATACTTGTGCCTTTTAATAACGGCTCAATACAAATATCTTAGAATCAA

接上图

<i>AdOr22c-like</i>	847	ATTTGCGGTCAATACTTGAAGAGAAACGTGAAATAACGAAAGATCTTTACAAGAATATTAT
<i>AcOr170</i>	737	ATTTGCGATTATACTTAAAGAGAAACATCAATAACGAAAGATCTATAAAGAATATTAT
<i>AmOr170</i>	951	ATTTGCGATTATACTTAAAGAGAGCGTGAGATAACGAAAGATCAATTACAAGAATATTAT
<i>AdOr22c-like</i>	907	TTGGCAAAACGAAATGTGACAGCGGAAATGAAGTTGTTGACCCGCCATTTGAAACTGT
<i>AcOr170</i>	797	TTGGCAAAACGACAATGTGACAGCAGGAAATGAAGCTGTTAACCCGCCATTTGAAACTGT
<i>AmOr170</i>	1011	TTGGCAAAACGACAATGTGACAGCAGGAAATGAAGTTGCTAACCCGCCATTTGAAACTGT
<i>AdOr22c-like</i>	967	AATCGAGACGACTACTATATTGAAAAAATTGATTTCTCCAATATTGGATTTCTTTACTT
<i>AcOr170</i>	857	AATCGAGACGACTACTATATTGAAAAAATTAATTTCTCCAATATTGGATTTCTTTACTT
<i>AmOr170</i>	1071	AATCGAGACGACTACTATATTGAAAAAATTAATTTCTCCAATATTGGATTTCTTTACTT
<i>AdOr22c-like</i>	1027	AAGCTACGTTTTCCGTTCTGCTTTCTGAGTTTTATGTTTGCAATGACTACGGCCAACTA
<i>AcOr170</i>	917	AAGCTACGTTTTCCGTTCTGCTTTCTGAGTTTTATGTTTGCAATGACTACGGCCAAGTA
<i>AmOr170</i>	1131	AAGCTACGTTTTCCGTTCTGCTTTCTGAGTTTTATGTTTGCAATGACTACGGCCAAGTA
<i>AdOr22c-like</i>	1087	TTTTGAAAAATGTTTACTTTCATCGTATACAATCGGTGCATTAATACAATTTTATATATT
<i>AcOr170</i>	977	TTTTGAAAAATGTTTACTTTCATCGTATACAATCGGTGCATTAATACAATTTTATATATT
<i>AmOr170</i>	1191	TTTTGAAAAATGTTTCTCGCATCGTATACGATCGGTGCATTAATACAATTTTATATATT
<i>AdOr22c-like</i>	1147	ATGTTATTGTATTCAACATTTATTTGAAGCGAGTTCATCTGTAGGAGATGATGTGATATA
<i>AcOr170</i>	1037	ATGTTATTGTATTCAACGTTTATTTGAAGCGAGTTCCTATAGCAGATGATGTGGTGTAT
<i>AmOr170</i>	1251	ATGTTATTGTATTCAACGTTTATTTGAAGCGAGTTCATCTATAGCGATGATGTGGTGTAT
<i>AdOr22c-like</i>	1207	TGAAAAATGGTATTCTTACGATGTACGCTTTCAACGTGTAATTCCTATGATAAATTTGGC
<i>AcOr170</i>	1097	TGAAAAATGGTATCTTACGATGTACGCTTTCAACGTGTAATTCCTATGATAAGTTTGGC
<i>AmOr170</i>	1311	TGAAAAATGGTATTATTACGACGTACGCTTTCAACGTGTAATTCCTATGATAAGTTTGTCT
<i>AdOr22c-like</i>	1267	TAACGAATTAATAATGTAAAATATCCAACCTTCAAATATTGATTTAACCTTACCATCTTT
<i>AcOr170</i>	1157	TAACGAATTAAGTGTAAAATATCCAATTTCAAATATTGATTTAACCTTACCATCTTT
<i>AmOr170</i>	1371	TAACGAATTAAGTGTAAAATATCCAACCTTCAAATATTGATTTAACCTTACCACCTTT
<i>AdOr22c-like</i>	1327	TATGTCGATTCTAAATCAAGCATATTCGGTATGTTTATTATTTTTAAATCAAGACAAGA
<i>AcOr170</i>	1217	TATGTCGATTCTAAATCAAGCATATTCGGTATGTTTATTATTTTTGAAAGCAAGACAAGA
<i>AmOr170</i>	1431	TATGTCGATTCTAAATCAAGCATATTCGGTATGTTTATTATTTTTGAAAGCAAGACAAGA
<i>AdOr22c-like</i>	1387	TTGAATCAAATATTGTAATATCTGTATTAATCAATAGTATATATGATACTTATGATTA
<i>AcOr170</i>	1277	TTGAATCAAATATTGTAATATCTGTATTAATCAATAGTACATGTGATAATTATGATTA
<i>AmOr170</i>	1491	TTGAATCAAATATTGTAATATCTGTATTAATCAATAGTACATGTGATACTTATGATTA
<i>AdOr22c-like</i>	1447	AAA-GTTTCTCATATTA-----
<i>AcOr170</i>	1337	AAA-GTTTCAAGGCGATCCC---
<i>AmOr170</i>	1551	AAA-GTTTCTCATATTATAATAT

图2 *AcOr170* 核苷酸序列与其它昆虫相应序列的比对

Fig. 2 Nucleotide sequences alignment of *AcOr170* with that of other insects

注: ---代表缺少的碱基。*AcOr170*, 中华蜜蜂气味受体基因 *Or170*; *AmOr170*, 意大利蜜蜂气味受体基因 *Or170*; *AdOr22c-like*, 大蜜蜂气味受体基因 *Or22c-like*。Note: --- represent the missing base. *AcOr170*, *Apis cerana cerana Or170* (JN544932); *AmOr170*, *Apis mellifera Or170* (NM\_001242993.1); *AdOr22c-like*, *Apis dorsata Or22c-like* (XM\_006619001.1).

### 2.2.2 编码区氨基酸序列分析

将 *AcOr170* 核苷酸序列通过 Bioedit 软件按照六读框翻译得出, *AcOr170* 外显子区编码 396 个氨基酸。经 BLAST 比对, 在结果中找出 4 条与其同源的膜翅目昆虫氨基酸序列 (图 3)。序列比对结果表明, *AcOr170* 与大蜜蜂 *Or22c-like* (*AdOr22c-like*) 一致性为 93.94%, 相似性为 97.98%; 与西方蜜蜂 *Or170* (*AmOr170*) 一致性为 94.46%, 相似性为 97.98%; 与小蜜蜂 *Or67a-like* (*AfOr67a-like*) 一致性为 74.94%, 相似性为 85.21%; 与西方蜜蜂 *Or22c-like* (*AmOr22c-like*) 一致性为 73.05%,

相似性为 83.63%。

### 2.3 聚类分析

根据 *AcOr170* 氨基酸同源性的比对结果, 采用 Mega 6.0 软件中的 NJ 法构建中华蜜蜂 *Or170* 与其它四种蜜蜂气味受体系统进化树 (图 4)。从图 4 可以看出, 中华蜜蜂 *Or170* 与西方蜜蜂 *Or170* 及大蜜蜂 *Or22c-like* 可以聚成一支, 他们的亲缘性较近; 小蜜蜂 *Or67a-like* 与西方蜜蜂 *Or22c-like* 聚成一支, 他们两个亲缘关系较近, 而与中华蜜蜂 *Or170* 亲缘性较远。

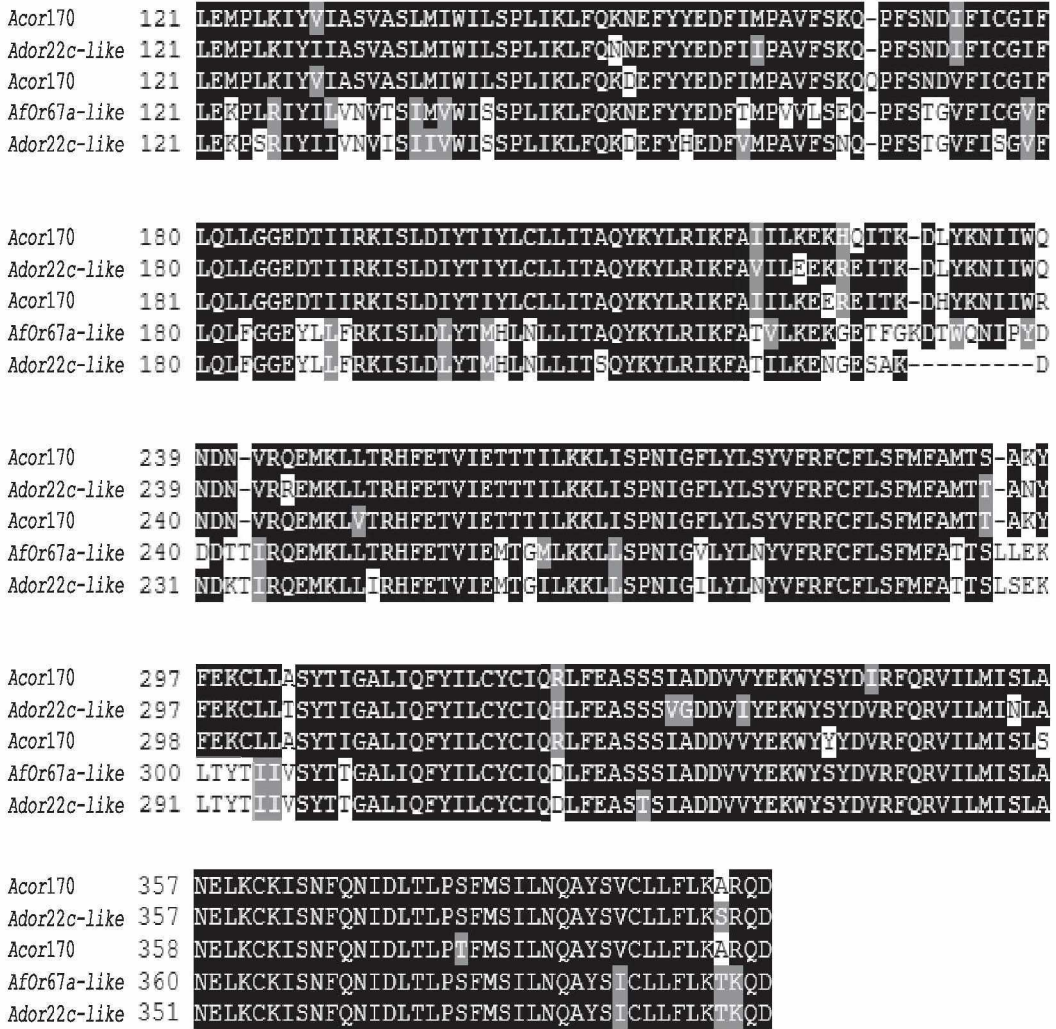


图 3 *AcOr170* 氨基酸序列与其它膜翅目昆虫相应序列比对图

Fig. 3 Amino acid sequences alignment of *AcOr170* with that of other insects in Hymenoptera

注：---代表缺少的氨基酸。*AcOr170*，中华蜜蜂气味受体基因 *Or170*；*AdOr22c-like*，大蜜蜂气味受体基因 *Or22c-like*；*AmOr170*，意大利蜜蜂气味受体基因 *Or170*；*Afor67a-like*，小蜜蜂气味受体基因 *Or67a-like*；*AmOr22c-like*，意大利蜜蜂气味受体基因 *Or22c-like*。Note：---resperant the missing amino acid. *AcOr170*, *Apis cerana cerana Or170* (JN544932); *AdOr22c-like*, *Apis dorsata Or22c-like* (XM\_006619001.1); *AmOr170*, *Apis mellifera Or170* (NM\_001242993.1); *Afor67a-like*, *Apis florea Or67a-like* (XP\_003692912.1); *AmOr22c-like*, *Apis mellifera Or22c-like* (XP\_006564342.1).

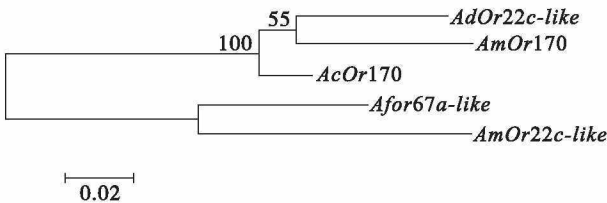


图 4 *AcOr170* 与其同源序列的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of *AcOr170* with its homology genes of other insects

### 3 讨论与结论

本实验结果表明 *AcOr170* 序列长度为 1356 bp，A + T 占 68.81%，G + C 占 31.19%。*AcOr170* 的蛋白质由 396 个氨基酸残基组成，分子量为 46.272 kDa，理论等电点为 8.57 的疏水性蛋白。*AcOr170* 蛋白第 28 - 54 位是个高度保守的结构功能域—7tm-6。该结构具有感知和传输气味的功能，所有已知的这一组成员均是 7 个跨膜结构域的受

体蛋白, 这些蛋白是果蝇受体基因的候选蛋白。这与高一龙等 (2010) 对于气味受体基因分子的特征研究相一致。

前人研究表明 Or170 是西方蜜蜂雄蜂接受蜂王信息素的主要气味受体之一, 在婚飞过程中起十分重要的作用 (Wanne *et al.*, 2007)。而 Plettner 等 (2007) 发现中华蜜蜂和意大利蜜蜂的蜂王上颚腺信息素在成分种类以及各成分含量均有差异。有趣的是, 本研究发现 *AcOr170*、*AmOr170* 在基因序列与长度上同样存在一定差异。这可能是中意蜂雄蜂的 *Or170* 受体基因对感知各自蜂种的蜂王信息素具有一定的专一性。

氨基酸序列比对结果显示, 中华蜜蜂 *Or170* (*AcOr170*) 与大蜜蜂 *Or22c-like* (*AdOr22c-like*) 以及西方蜜蜂 *Or170* (*AmOr170*) 相似性很高分别为 97.98% 和 97.98%; 与小蜜蜂 *Or67a-like* (*AfOr67a-like*) 以及西方蜜蜂 *Or22c-like* (*AmOr22c-like*) 相似性较低, 分别为 85.21% 和 83.63%。经进化树发现 *AcOr170* 与 *AdOr22c-like* 和 *AmOr170* 聚为一支, 表明三者的亲缘关系很近, 三者可能由同一个基因分化而来。另外, BLAST 比对并未找到与其他目类下昆虫同源的序列。这再一次验证在不同种类的昆虫中, 气味受体基因是高度变异的, 这可能是昆虫对信息素感知具有专一性的重要原因之一 (Touhara & Vosshall, 2009)。

### 参考文献 (References)

Abrol DP. Asiatic Honeybee *Apis cerana* [M]. Berlin: Springer Netherlands, 2013.

Chen SL. The Apicultural Science in China [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2001. [陈盛禄. 中国蜜蜂学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001]

Gao YL, Miu Q, Zhang HD, *et al.* Advances on olfactory receptor gene [J]. *Hereditas*, 2010, 32 (1): 17-24. [高一龙, 缪勤, 张汇东, 等. 嗅觉受体基因的研究进展 [J]. 遗传, 2010, 32 (1): 17-24]

Gong ZJ, Zhou WW, Zhu ZR, *et al.* Advances in the studies of insect olfactory receptors [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2008, 51 (7): 761-768. [巩中军, 周文武, 祝增荣, 等. 昆虫嗅觉受体的研究进展 [J]. 昆虫学报, 2008, 51 (7): 761-768]

Hallem EA, Nicole FA, Zwiebel LJ, *et al.* Olfaction: Mosquito receptor for human-sweat odorant [J]. *Nature*, 2004, 427 (6971): 212-213.

Pennisi E. Fruit fly odor receptors found [J]. *Science*, 1999, 283 (5406): 1239-1239.

Plettner E, Otis GW, Wimalaratne PDC, *et al.* Species- and caste-determined mandibular gland signals in honeybees (*Apis*) [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 1997, 23 (2): 363-377.

Robertson HM, Wanner KW. The chemoreceptor superfamily in the honeybee, *Apis mellifera*: Expansion of the odorant, but not gustatory, receptor family [J]. *Genome Research*, 2006, 16 (11): 1395-1403.

Touhara K, Vosshall LB. Sensing odors and pheromones with chemosensory receptors [J]. *Annual Review of Physiology*, 2009, 71 (1): 307-32.

Vogt RG, Miller NE, Litvack R, *et al.* The insect SNMP gene family [J]. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 2009.

Vosshall LB, Amrein H, Morozov PS, *et al.* A spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila*, antenna [J]. *Cell*, 1999, 96 (5): 725-36.

Wang NN. The Intro Evolution of Entomic Olfactory Receptor Gene, *Or83b-like* Gene [D]. Shandong Agricultural University, 2008. [王妮娜. 昆虫嗅觉受体 *Or83b-like* 基因内含子的进化研究 [D]. 山东农业大学, 2008]

Wanner KW, Nichols AS, Walden KK, *et al.* A honey bee odorant receptor for the queen substance 9-oxo-2-decenoic acid [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104 (36): 14383-8.

Wang QF, Li WS, Zhang QM, *et al.* The natural mating interference between *Apis cerana* and *A. mellifera* [J]. *Entomological Knowledge*, 2003, 40 (2): 164-167. [王启发, 李位三, 张启明, 等. 中、西蜂间自然交尾干扰问题的观察 [J]. 应用昆虫学报, 2003, 40 (2): 164-167]

Zeng ZJ. Apiculture [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2009. [曾志将. 养蜂学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2009]

Zhao HT, Gao PF, Zhang GX, *et al.* Advances in research on honeybee olfactory proteins [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2012, 49 (5): 1366-1371. [赵慧婷, 高鹏飞, 张桂贤, 等. 蜜蜂嗅觉相关蛋白的研究进展 [J]. 应用昆虫学报, 2012, 49 (5): 1366-1371]

Zhao HT, Gao PF, Zhang GX, *et al.* Gene cloning and sequence analysis of *Or1* and *Or2* in *Apis cerana* [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2012, 49 (5): 1117-1124. [赵慧婷, 高鹏飞, 张桂贤, 等. 东方蜜蜂气味受体基因 *Or1* 和 *Or2* 的克隆与序列分析 [J]. 应用昆虫学报, 2012, 49 (5): 1117-1124]