

研究报告

Research Reports

灭字脊虎天牛 CSP 基因的鉴定、 表达谱及 *XquaCSP7* 基因的功能研究

庄翔麟¹, 吉帅帅^{1,2}, 赵昱杰¹, 尹宁娜¹, 刘乃勇^{1*}

(1. 西南林业大学云南省森林灾害预警与控制重点实验室, 昆明 650224; 2. 大熊猫国家公园德阳管理分局, 德阳 618000)

摘要 基于已发表的灭字脊虎天牛 *Xylotrechus quadripes* 的触角转录组数据, 采用 BLAST 同源搜索的方法从转录组中一共鉴定到 14 个 CSP 基因, 所有 CSP 均具有全长序列、信号肽序列和 4 个保守的半胱氨酸。序列比对结果表明, 灭字脊虎天牛 CSP 间氨基酸一致性差异较大 (12%~73%), 平均值为 34%; 具有 C1-X₆-C2-X₁₈-C3-X₂-C4 的半胱氨酸保守模式。进化分析表明, 除 *XquaCSP8* 和 *XquaCSP12* 外, 其余 *XquaCSPs* 聚类到不同分支。表达谱分析表明, *XquaCSP7* 基因在触角特异表达; *XquaCSP4*、*CSP5*、*CSP12* 和 *CSP14* 基因在触角高表达; *XquaCSP13* 基因在足特异表达; 其余 *XquaCSPs* 基因在多个组织中有表达。结合测定结果发现, *XquaCSP7* 与测试的 21 种寄主气味结合能力均较弱, 荧光取代率在 4.5%~13.5% 之间, 其中与苯乙酮的结合能力最强, 荧光取代率为 13.5%。研究结果可为后续灭字脊虎天牛 CSP 基因的功能研究奠定基础。

关键词 灭字脊虎天牛; 化学感受蛋白; 基因鉴定; 表达谱; 荧光竞争性结合测定

中图分类号: S 433.5 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2019123

Identification and expression pattern of chemosensory protein genes from *Xylotrechus quadripes* Chevrolat (Coleoptera: Cerambycidae) and functional studies of *XquaCSP7* gene

ZHUANG Xianglin¹, JI Shuaishuai^{1,2}, ZHAO Yujie¹, YIN Ningna¹, LIU Naiyong^{1*}

(1. Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control of Yunnan Province, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China; 2. Deyang Administration Branch of Giant Panda National Park, Deyang 618000, China)

Abstract In this study, we identified 14 chemosensory protein genes from the antennal transcriptome of *Xylotrechus quadripes* by using a BLAST homology-based approach. All identified *XquaCSPs* had full-length sequences with signal peptides and four conserved cysteines. Sequence alignment results showed a varied amino acid identities with a range of 12%–73% (mean: 34%) among *XquaCSPs*. A conserved cysteine pattern of C1-X₆-C2-X₁₈-C3-X₂-C4 was presented among *XquaCSPs*. Phylogenetic analysis indicated that *XquaCSP8* and *XquaCSP12* were grouped into a small clade and others were classified into different clades. Expression pattern analysis revealed that *XquaCSP7* showed an antennae-specific expression, while *XquaCSP4*, *CSP5*, *CSP12* and *CSP14* were highly expressed in the antennae; *XquaCSP13* expression was limited to legs. The remaining *XquaCSP* genes had a broad expression in various tissues. Binding assays showed that *XquaCSP7* exhibited weak binding affinities to 21 odorants derived from host plants, with a range of fluorescent displacements of 4.5%–13.5%. Among these, acetophenone was the best ligand with a fluorescent displacement of 13.5%. The results laid a foundation for future functional studies of *XquaCSP* genes in this species.

Key words *Xylotrechus quadripes*; chemosensory protein; gene identification; expression pattern; fluorescence competitive binding assay

收稿日期: 2019-03-13 修订日期: 2019-04-25

基金项目: 云南省科技厅青年项目(2017FD101)

* 通信作者 E-mail: naiyong_2013@163.com

云南省是我国小粒咖啡 *Coffea arabica* Linn. 的主产区,种植面积和产量均居全国之首^[1]。长期以来,灭字脊虎天牛 *Xylotrechus quadripes* 严重威胁和制约云南省小粒咖啡产业的发展,有学者对定植 5 年的小粒咖啡调查发现灭字脊虎天牛为害率高达 80.6%^[2]。该虫隶属于鞘翅目 Coleoptera,天牛科 Cerambycidae,天牛亚科 Cerambycinae,主要以幼虫蛀食小粒咖啡树干,为害较为隐蔽,目前主要采取人工捕杀幼虫、成虫和喷洒化学农药等方法进行防治,成本高昂且防治效果不理想,亟待研发新型的绿色防治技术^[3]。

触角是天牛等昆虫的重要嗅觉感受器官,其表面着生有不同类型的感器,感器内部的淋巴液中有两种参与识别和运输气味分子的嗅觉蛋白:气味结合蛋白(odorant binding proteins, OBP)和化学感受蛋白(chemosensory proteins, CSPs)^[4-6]。昆虫 CSP 是一类小分子可溶性蛋白,分子质量约为 15~17 kDa,一般多肽链全长 100~120 个氨基酸,具有 4 个保守的半胱氨酸残基(cysteine, Cys),能够形成两对二硫键,起稳定蛋白三级结构的作用^[5,7-8]。1994 年,在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 触角中分别发现 OS-D (olfactory specific-D) 和 A-10 两个 CSP 基因,这也是在昆虫触角中最早发现的 CSP 基因^[9-10]。近年来,随着分子生物学技术的不断发展以及转录组和基因组测序技术的不断更新,大量昆虫的 CSP 基因已被鉴定,如在鞘翅目昆虫云斑天牛 *Batocera horsfieldi*^[11]、红脂大小蠹 *Dendroctonus valens*^[12]、松褐天牛 *Monochamus alternatus*^[13]、光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis*^[14]、星天牛 *A. chinensis*^[15] 和赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*^[16] 中分别鉴定到 3、6、12、12、16 和 20 个 CSP 基因;在非鞘翅目昆虫家蚕 *Bombyx mori*^[8,17]、棉铃虫 *Helicoverpa armigera*^[18]、黑腹果蝇和意大利蜜蜂 *Apis mellifera*^[8] 中分别鉴定到 22、29、4 和 6 个 CSP 基因。另外,研究发现昆虫的 CSP 基因在触角、头、胸、腹、足、翅、下唇须等多个组织中均有表达,说明其功能具有多样性^[6,14-17,19]。目前,一般认为昆虫的 CSP 具有嗅觉感受、运输气味分子、发育和免疫调节等功能^[20-21],如日本弓背蚁 *Camponotus japonicus* 的 CjapCSP 能够特异性识别非同种巢穴蚂蚁表皮的烃类物质^[22];2007 年, Maleszka 等人利用 RNAi 技术证明意大利蜜蜂的 *AmelCSP5* 基因参与了胚胎覆盖膜

的形成^[23]。

在昆虫体外,荧光竞争性结合测定技术被广泛用于研究 CSP 和气味分子的结合能力,如华山松大小蠹 *Dendroctonus armandi* 的 DarmCSP2 与月桂烯和 3-萜烯具有较强的结合能力^[24]。苜蓿盲蝽 *Adelphocoris lineolatus* 的 AlinCSP1-3 与顺-3-己烯-1-醇、2-己烯醛和戊二醛具有较强的结合能力^[25]。据此研究 CSP 与气味分子(植物挥发物和性信息素)的结合能力,结合电生理测定、室内行为学研究和田间诱捕试验,在筛选到害虫防治潜在分子靶标的同时,还可进一步研发基于植物挥发物或性信息素的行为引诱剂或驱避剂。

国内外学者在灭字脊虎天牛的虫情调查、种群动态和发生规律等方面已做了大量的研究^[2-3,26-28],但是在分子生物学尤其是嗅觉方面的研究较少。先前,我们采用转录组测序、生物信息学和分子生物学等技术研究了灭字脊虎天牛的 5 类化感基因家族: OBP、气味受体(odorant receptors, ORs)、味觉受体(gustatory receptors, GRs)、离子型受体(ionotropic receptors, IRs)和化学感受神经膜蛋白(sensory neuron membrane proteins, SNMPs)^[29-30]。基于已测序的转录组数据,本文进一步鉴定了该天牛的 CSP 基因家族,并采用 PCR 研究了这些 CSP 基因的组织表达特征;在此基础上选取触角特异表达的 *XquaCSP7* 基因进行原核表达和纯化,研究了 *XquaCSP7* 与不同寄主气味的结合特性。研究结果不仅丰富了灭字脊虎天牛的化感基因家族,还可为后续该种害虫基于寄主挥发物的行为调控剂的研发奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验昆虫

灭字脊虎天牛采自云南省德宏热带农业科学研究所咖啡种植园,纬度 24°1'32"N,经度 97°51'18"E,海拔 767 m。田间采集受害的咖啡树干,带回室内后将其用纱网套住,每天不定时观察,将羽化当天的灭字脊虎天牛雌雄成虫分开饲养,并提供咖啡枝叶和蜂蜜水作为食物。然后,分别收集 3~5 日龄成虫触角、头(去除触角)、胸、腹、足、翅等组织。将雌雄成虫同一组织按 1:1 的比例混合,以便后续 RT-PCR 试验中同一组织雌雄虫 cDNA 模板浓度相等。收集好

的组织立即用液氮速冻,保存于-80℃冰箱。

1.1.2 试验试剂

TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司;反转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit、DNA rTaq 酶、dNTP Mixture、10×PCR Buffer (Mg²⁺) 和 6×Loading buffer 购自 TaKaRa 宝生物工程有限公司; SuperRed/GelRed 核酸染料购自 BioSharp 公司。

1.2 基因的鉴定

基于已发表的灭字脊虎天牛触角转录组(SRA 登录号:SRP143591),采用 BLAST 同源搜索的方法鉴定灭字脊虎天牛的 CSP 基因。首先,从 NCBI(National Center for Biotechnology Information)数据库中下载松褐天牛、星天牛、光肩星天牛、赤拟谷盗、大猿叶虫 *Colaphellus bowringi* 的 CSP 作为目标序列,在 BioEdit 中采用本地 BLAST 鉴定候选的 CSP 基因。然后,将鉴定的所有 CSP 基因再次在 NCBI nr 蛋白序列(NCBI non-redundant protein sequence database)数据库中进行比对,确定候选的 CSP 基因。最后,根据鞘翅目昆虫 CSP 氨基酸序列中 4 个保守 Cys 及其位置(C1-X₆-C2-X₁₈-C3-X₂-C4),进一步确定候选的 CSP 基因^[8, 16, 31-32]。

1.3 序列分析

利用 NCBI 上的 open reading frame finder (ORF finder) 预测开放阅读框(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)。利用在线软件 SingalP 4.1

Sever(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SingalP>) 预测信号肽^[33]。CSP 氨基酸序列间的一致性采用 GeneDoc 进行计算;序列比对采用 Clustal X 1.83。在进化树分析中,选取了天牛科昆虫松褐天牛、云斑天牛、光肩星天牛和星天牛共 42 条 CSP 序列,利用 MEGA 7.0 软件邻位相连法(neighbour-joining)构建进化树,对结果进行 1 000 次 bootstrap 验证^[34]。

1.4 基因的表达谱分析

根据 TRIzol 试剂盒使用说明书,分别提取灭字脊虎天牛各组织总 RNA;然后,采用 NanoDrop 1000 测定其浓度。利用 DNase I 去除各组织中的基因组 DNA,之后采用反转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit 合成 cDNA。选取灭字脊虎天牛肌动蛋白 *actin* 基因作为内参基因^[32],以检测各组织 cDNA 模板质量及完整性。采用 RT-PCR 研究 CSP 基因在以上各组织的表达情况。PCR 引物采用 Primer Premier 5 软件设计,引物序列送昆明奥基生物科技有限公司进行合成(表 1)。PCR 反应条件为:94℃预变性 3 min;94℃变性 30 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 40 s,35 个循环;72℃延伸 5 min。PCR 扩增产物用 1.2% 的琼脂糖胶进行电泳分析,最后根据目的条带的有无及亮度判断 CSP 基因在不同组织中的表达情况。

表 1 灭字脊虎天牛 CSP 基因表达谱及原核表达所用引物¹⁾

Table 1 Primers used for expression pattern analysis and prokaryotic expression of CSP genes from <i>Xylotrechus quadripes</i>			
基因 Gene	上游引物(5'-3') Forward primer	下游引物(5'-3') Reverse primer	产物大小/bp Product size
表达谱分析 Expression pattern analysis			
CSP1	AGATAGTTTTTTTCGCTTATATCGC	CCCGAATACTGCTTCAGCACT	331
CSP2	ATGAGGAGCGCGTGGCT	TTGGTCCATACTTCTTTATCAGTGA	295
CSP3	ATGGCATAATTTGATTGGCTTCTCT	CTCTCTCTGTACTTCTCCTCGGGGT	344
CSP4	GTGGCGGTGGTATTTATTCTTGC	TCTTTCTGTAAC TGCTTCTGGATC	331
CSP5	GTTGTGCGAACAACAATACACTAAT	TCACTTTGTATTAGATCGGCGTACT	321
CSP6	CTTGTATTTGTCGTTTGTTCGATCG	CCTTTGTCGTATTTGTCTTCGAGTT	317
CSP7	GTGTTAGTGCTATTTTGGCTTCTG	TCCATTTCGTCTTCGTATTGTTTTCT	343
CSP8	ATGAAAGTGCTCTTATTTATTTTCGC	TTGGTTCTGTATTTGTTTCTCGGAT	341
CSP9	ATGGCGAAAATGATCATTCCAT	TCTCCTGTAAAGGCGTCCAATATT	331
CSP10	ACTGTATTTGTGAGTGAAGACCGGT	CCAGGTCCTGATAATCATCCTCAT	391
CSP11	ATGAAGTCTGTAAGCGTAATCCTTC	GTAGGTACCATCTGGATCGTACATG	342
CSP12	GAAAGTGTTGGTACTAGCAGCATTC	CTCTGTCTGTAAGTACCTTGGAAT	339
CSP13	GAAATTCGCGATAGTTTTTTTCG	TTAGATGGTAATCCCTTCCTTTTTTC	394
CSP14	TGATACGGTTTCTAATTTTGTGCG	CTTCCTTTTTTCGCTATTTCTGCATA	363
<i>actin</i>	ATGTGTGACGACGATGTAGCG	GTGTTGAAGGTTTCAAACATGATCT	389
原核表达 Prokaryotic expression			
CSP7	CGC CATATGATGAACAATATACAATAATATGAC	GC TCTAGACTATTTCTCAGGCAATCCTTCTT	333

1) 限制性内切酶 *Nde* I 和 *Xba* I 序列用下划线标记。
Restriction enzyme sites of *Nde* I and *Xba* I are underlined.

1.5 重组蛋白 XquaCSP7 的表达和纯化

1.5.1 原核表达载体的构建

根据 XquaCSP7 基因的开放阅读框序列(去除信号肽)设计原核表达引物,并在正向和反向引物中分别加入 *Nde* I 和 *Xba* I 酶切位点(表 1),从而将目的基因更好地连入载体 pCzn1 中。用相应的限制性内切酶(*Nde* I 和 *Xba* I)酶切表达载体 pCzn1,然后与 PCR 扩增获得的 XquaCSP7 基因进行连接,获得重组质粒 pCzn1-XquaCSP7。重组质粒阳性克隆进一步通过测序进行验证,以确定序列及插入方向的正确性。

1.5.2 重组蛋白的表达和纯化

将测序正确的重组质粒 pCzn1-XquaCSP7 转入大肠杆菌感受态细胞 Arctic-Express 中,离心后全部涂于含 50 μg/mL 氨苄青霉素(ampicillin, Amp⁺)的 LB 平板上,挑取单克隆接种于 3 mL LB 液体培养基(50 μg/mL Amp⁺)中,37℃,220 r/min 振荡过夜。次日,按 1:100 的比例接种于 1 L LB 液体培养基(50 μg/mL Amp⁺)中,37℃,220 r/min 培养至菌体 OD₆₀₀ 值为 0.6~0.8 时,向培养液中加入终浓度为 0.5 mmol/L 的异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl β-D-thiogalactoside, IPTG);然后,在 37℃,220 r/min 继续振荡培养 4 h 进行诱导表达。

4℃离心后弃上清;然后用磷酸盐缓冲液重悬菌体,超声波破碎后分别取上清和沉淀进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析,以确定重组蛋白的可溶性。采用镍离子亲和层析柱对目的蛋白进行纯化,纯化后的目的蛋白液采用超滤管对其进行浓缩。

1.6 荧光竞争性结合测定

在荧光竞争性结合测定中, *N*-苯基-1-萘胺(*N*-phenyl-1-naphthylamine, 1-NPN)和所有化合物均购自 Sigma Aldrich 有限公司,纯度大于或等于 90%(表 2)。以色谱级甲醇为溶剂,分别配制浓度为 10 mmol/L 的荧光探针 1-NPN 和 21 种气味配基的母液,−20℃冰箱保存备用。使用时再用色谱级甲醇将探针和气味配基母液稀释为 1 mmol/L 的工作液。

首先,在 96 Micro Well TM 微孔板(Nunc)加入 2 μmol/L 的蛋白和 2 μmol/L 的 1-NPN,判断 XquaCSP7 与探针是否能够结合;然后,在 2 μmol/L 蛋白液中加入终浓度为 2、4、6、8、12、16 μmol/L 和 20 μmol/L 的 1-NPN,计算 XquaCSP7 与 1-NPN 的

结合常数(K_d);最后,在 2 μmol/L 蛋白和 2 μmol/L 1-NPN 的混合液中分别加入不同浓度的气味配基,用多功能酶标仪(VARIOSKAN FLASH)进行结合测定。测定参数为:激发波长为 337 nm,发射波长为 370~550 nm,激发和发射狭缝均为 5 nm。

表 2 荧光结合试验所用化合物

Table 2 The compounds used for fluorescence competitive binding experiments

序号 No.	气味配体 Odorant ligand	分子量 Molecular weight	纯度/% Purity
醛类 Aldehydes			
1	苯乙醛 Phenylacetaldehyde	120.15	90.0
2	正己醛 Hexanal	100.16	98.0
3	2-己烯醛 2-hexenal	98.14	98.0
酮类 Ketones			
4	苯乙酮 Acetophenone	120.15	99.5
5	环己酮 Cyclohexanone	98.14	99.5
醇类 Alcohols			
6	苯乙醇 Phenylethyl alcohol	122.16	99.0
7	环己醇 Cyclohexanol	100.16	98.0
8	香叶醇 Geraniol	154.25	97.0
9	芳樟醇 Linalool	154.25	97.0
10	正己醇 Hexanol	102.17	98.0
11	顺式-3-己烯醇(Z)-3-hexenol	100.16	98.0
烯类 Alkenes			
12	α-蒎烯 α-pinene	136.23	98.0
13	月桂烯 Myrcene	136.23	90.0
14	罗勒烯 Ocimene	136.23	90.0
酯类 Esters			
15	乙酸甲酯 Methyl acetate	74.08	99.9
16	乙酸乙酯 Ethyl acetate	88.11	99.9
17	乙酸丙酯 Propyl acetate	102.13	99.7
18	乙酸丁酯 Butyl acetate	116.16	99.7
19	乙酸戊酯 Amyl acetate	130.18	97.0
20	乙酸己酯 Hexyl acetate	144.21	99.7
21	顺-3-己烯基乙酸酯(Z)-3-hexenyl acetate	142.20	98.0
荧光探针 Fluorescent probe			
22	<i>N</i> -苯基-1-萘胺 <i>N</i> -phenyl-1-naphthylamine	219.28	98.0

2 结果与分析

2.1 灭字脊虎天牛 CSP 基因的鉴定

利用 BLAST 同源性搜索的方法,从灭字脊虎天牛触角转录组中共鉴定到 14 个 CSP 基因。所有 CSP 基因均具有完整的开放阅读框,编码 101~148 个氨基酸,且在 N 端均具有信号肽序列(16~26 个氨基酸)。NCBI BLAST 比对结果表明,所有 CSP 均比对到鞘翅目其他昆虫的 CSP,其中 XquaCSP6 与松褐天牛的 MaltCSP2 具有最高的氨基酸一致性,为

87%;而 XquaCSP14 与中欧山松大小蠹的 DponCSP1 的氨基酸一致性最低,仅为 50%(表 3)。

表 3 灭字脊虎天牛 CSP 基因的信息¹⁾

Table 3 Information for CSP genes in *Xylotrechus quadripes*

基因 Gene	开放阅读框 ORF (aa)	信号肽 SP (aa)	全长 FL	最佳比对结果(登录号/基因/物种) Best BLAST match (accession number/name/species)	E 值 E value	一致性/% Identity
CSP1	117	23	是	AIX97041.1/chemosensory protein 1/ <i>Monochamus alternatus</i>	4e-61	80
CSP2	101	21	是	AKK25149.1/chemosensory protein 6/ <i>Dendroctonus ponderosae</i>	5e-36	78
CSP3	124	19	是	AIX97085.1/chemosensory protein 10/ <i>Monochamus alternatus</i>	4e-50	60
CSP4	126	16	是	NP_001039279.1/chemosensory protein 11 precursor/ <i>Tribolium castaneum</i>	3e-42	58
CSP5	127	19	是	NP_001039280.1/chemosensory protein 12 precursor/ <i>Tribolium castaneum</i>	2e-42	59
CSP6	129	17	是	AIX97042.1/chemosensory protein 2/ <i>Monochamus alternatus</i>	4e-59	87
CSP7	127	16	是	AIX97043.1/chemosensory protein 3/ <i>Monochamus alternatus</i>	2e-48	67
CSP8	127	18	是	AIX97086.1/chemosensory protein 11/ <i>Monochamus alternatus</i>	3e-65	67
CSP9	139	20	是	AIX97040.1/chemosensory protein 8/ <i>Monochamus alternatus</i>	3e-81	82
CSP10	148	26	是	AIX97087.1/chemosensory protein 12/ <i>Monochamus alternatus</i>	8e-64	67
CSP11	125	18	是	AJO62215.1/chemosensory protein CSP9/ <i>Tenebrio molitor</i>	4e-43	60
CSP12	127	18	是	AIX97043.1/chemosensory protein 3/ <i>Monochamus alternatus</i>	2e-56	74
CSP13	132	17	是	AEC04842.1/chemosensory protein/ <i>Batocera horsfieldi</i>	1e-45	72
CSP14	129	19	是	AGI05161.1/chemosensory protein 1/ <i>Dendroctonus ponderosae</i>	2e-32	50

1) aa 代表氨基酸;FL 代表全长;ORF 代表开放阅读框;SP 代表信号肽。
aa, FL, ORF and SP represent amino acid, full length, open reading frame and signal peptide, respectively.

2.2 灭字脊虎天牛 CSP 的序列及进化分析

的氨基酸序列进行比对,结果表明所有 CSP 均具有 4

利用 Clustal X 1.83 对灭字脊虎天牛 14 个 CSP 个保守的 Cys,模式为 C1-X₆-C2-X₁₈-C3-X₂-C4(图 1)。

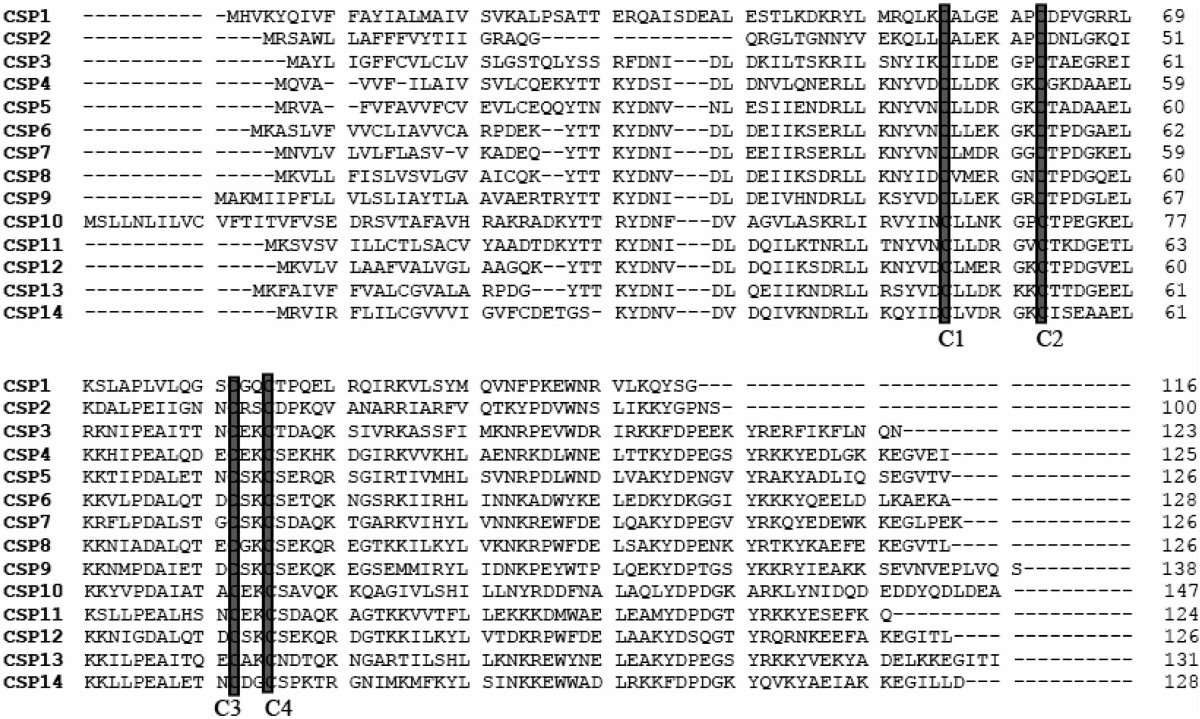


图 1 灭字脊虎天牛 CSP 的序列比对

Fig. 1 Sequence alignment of *Xylotrechus quadripes* CSPs

序列一致性分析结果表明,14 个 CSP 间氨基酸一致性为 12%~73%,平均值为 34%。其中 XquaCSP8 和 XquaCSP12 的氨基酸一致性最高,为

73%;其次是 XquaCSP4 和 XquaCSP5,氨基酸一致性为 57%;XquaCSP2 和 XquaCSP8 的氨基酸一致性最低,仅为 12%(表 4)。

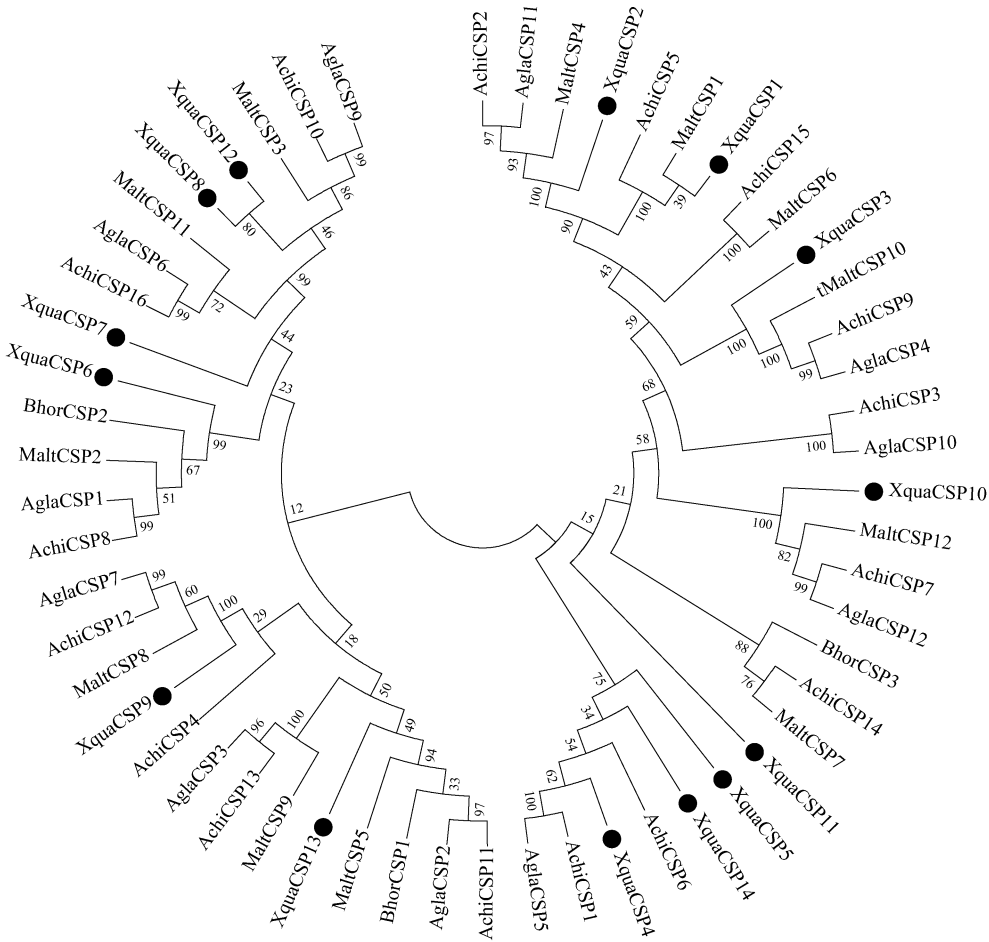
表 4 灭字脊虎天牛 CSP 序列的一致性分析

Table 4 Sequence identity analysis of *Xylotrechus quadripes* CSPs

	CSP1	CSP2	CSP3	CSP4	CSP5	CSP6	CSP7	CSP8	CSP9	CSP10	CSP11	CSP12	CSP13
CSP2	20												
CSP3	20	20											
CSP4	17	16	30										
CSP5	17	17	30	57									
CSP6	17	15	30	44	46								
CSP7	18	14	32	49	48	54							
CSP8	17	12	32	45	47	50	55						
CSP9	16	17	28	39	39	51	45	44					
CSP10	16	15	27	32	28	33	34	29	29				
CSP11	18	20	34	45	38	47	49	43	38	31			
CSP12	16	14	29	44	46	52	58	73	44	27	45		
CSP13	15	16	31	44	41	56	47	44	45	31	42	41	
CSP14	16	14	30	43	45	36	37	44	37	23	37	42	36

为了明确灭字脊虎天牛 14 个 CSP 与鞘翅目其他昆虫 CSP 的进化关系,我们构建了星天牛、光肩星天牛、云斑天牛、松褐天牛和灭字脊虎天牛 CSP

的进化树。结果表明,除 *XquaCSP8* 和 *XquaCSP12* 聚类到同一个小分支外,其余 *XquaCSPs* 聚类到不同的分支(图 2)。



黑色圆圈表示灭字脊虎天牛的新发现CSP。Bhor: 云斑天牛; Malt: 松褐天牛; Agla: 光肩星天牛; Achi: 星天牛
The black circle represents newly identified CSPs in *Xylotrechus quadripes*. Bhor: *Batocera horsfieldi*; Malt: *Monochamus alternatus*; Agla: *Anoplophora glabripennis* and Achi: *Anoplophora chinensis*

图 2 灭字脊虎天牛和其他 4 种天牛 CSP 的邻近树

Fig. 2 Neighbor-joining tree of CSPs from *Xylotrechus quadripes* and four other long-horned beetles

2.3 灭字脊虎天牛 CSP 基因的表达谱分析

为了明确 CSP 基因的可能功能,利用 RT-PCR 技术研究了 14 个 CSP 基因在触角、头(去除触角)、胸、腹、足和翅等组织的表达情况。结果表明,除 *XquaCSP13* 基因外,其他 *XquaCSPs* 基因在触角中均有表达。其中 *XquaCSP7* 基因在触角特异表达;*XquaCSP4*、*CSP5*、*CSP12* 和 *CSP14* 基因在触角高表达;*XquaCSP13* 基因在足特异表达;其余 *XquaCSPs* 基因在除触角以外的多个组织中有表达(图 3)。

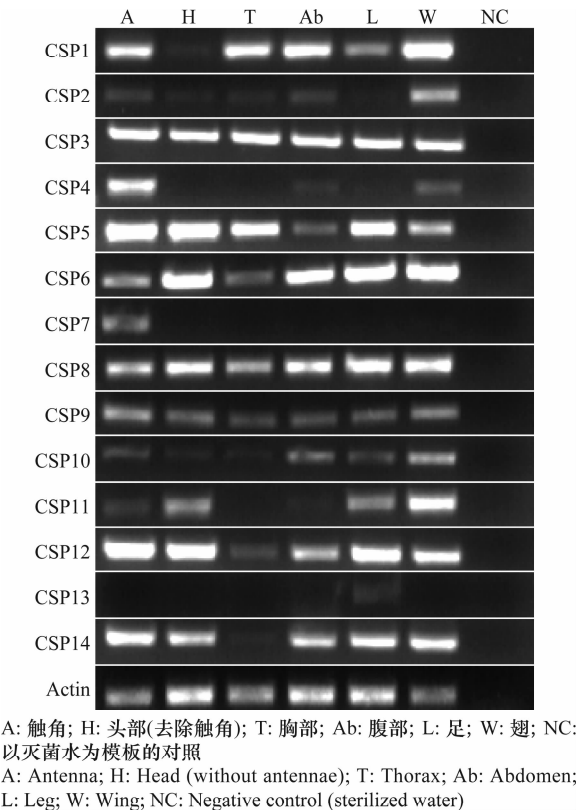


图 3 灭字脊虎天牛 CSP 基因在不同组织中的表达谱

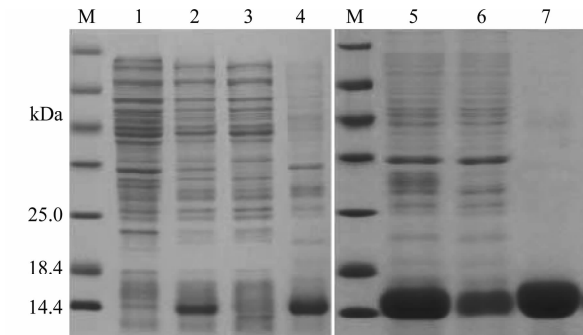
Fig. 3 Expression pattern of CSP genes in different tissues of *Xylotrechus quadripes*

2.4 灭字脊虎天牛 XquaCSP7 的表达及纯化

首先,检测了重组蛋白 pCzn1-XquaCSP7 在大肠杆菌的可溶性表达形式,超声波破碎后分别取上清液和沉淀进行 SDS-PAGE 分析。结果表明,pCzn1-XquaCSP7 主要以包涵体的形式存在,因此采用包涵体变性和复性的方法进行纯化。将处理好的蛋白混合液过柱,纯化后得到约 14 kDa 的高纯度单一目的蛋白(图 4)。

2.5 灭字脊虎天牛 XquaCSP7 与不同配基的结合能力测定

采用荧光竞争性结合测定方法,研究了 *XquaCSP7* 与 21 种寄主气味的结合能力。首先,测定了 *XquaCSP7* 与 1-NPN 的结合能力。结果表明,该蛋白与 1-NPN 探针具有好的结合能力,结合常数 K_d 为 $6.50 \mu\text{mol/L}$ (图 5)。结合测定结果表明,*XquaCSP7* 与 21 种气味配基的结合能力均较弱,1-NPN 的荧光取代率在 4.5%~13.5%之间。在测试的所有化合物中,*XquaCSP7* 与苯乙酮的结合能力最强,荧光取代率为 13.5%;*XquaCSP7* 与顺-3-己烯乙酸酯的结合能力最弱,荧光取代率仅为 4.5%(图 6)。



泳道1: 未经IPTG诱导的pCzn1-XquaCSP7; 泳道2: 经IPTG诱导的pCzn1-XquaCSP7; 泳道3和泳道4: 诱导后超声波破碎上清和沉淀; 泳道5: 过柱样品; 泳道6: 样品流出液; 泳道7: 纯化的XquaCSP7; M: 蛋白分子量标准
Lane 1: pCzn1-XquaCSP7 without IPTG induction; Lane 2: pCzn1-XquaCSP7 with IPTG induction; Lane 3 and 4: pCzn1-XquaCSP7 supernatant and pellet after sonication, respectively; Lane 5: pCzn1-XquaCSP7 extracts; Lane 6: Flow-through sample; Lane 7: Purified XquaCSP7. M: Protein molecular weight marker

图 4 重组蛋白 pCzn1-XquaCSP7 的表达和纯化

Fig. 4 Expression and purification of recombinant pCzn1-XquaCSP7

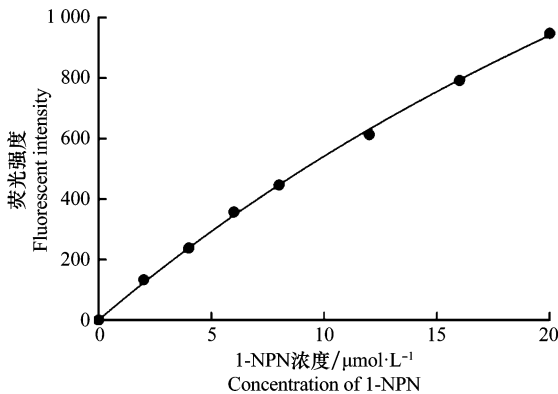


图 5 XquaCSP7 和 1-NPN 的结合曲线

Fig. 5 The binding curve of XquaCSP7 and 1-NPN

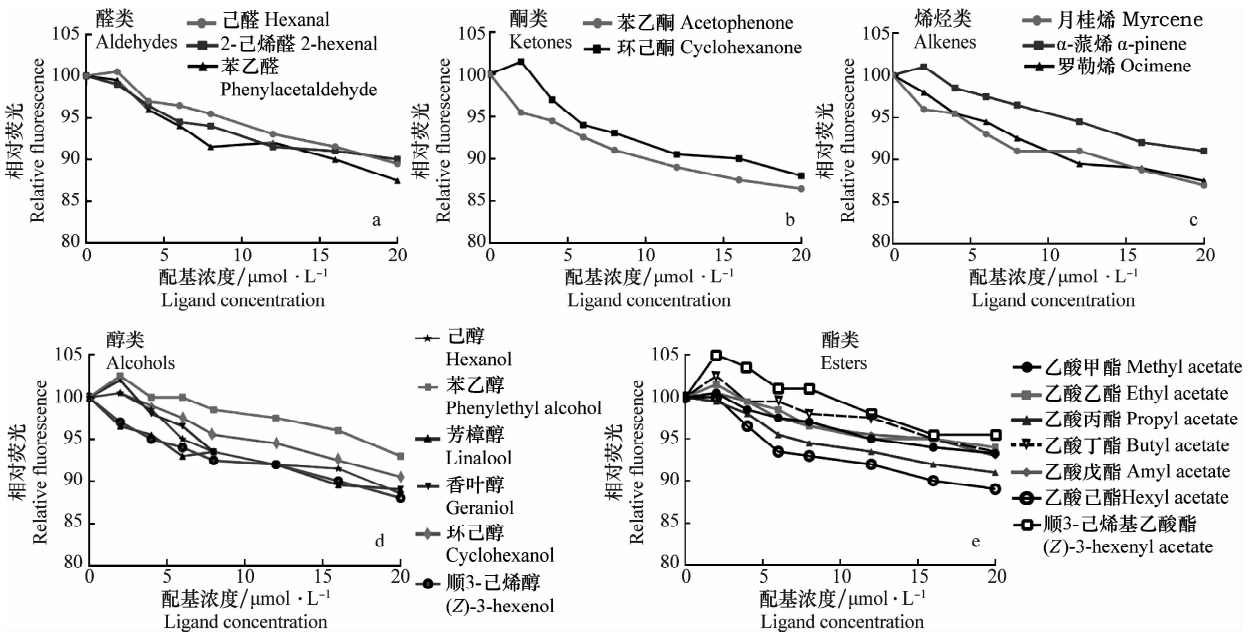


图6 XquaCSP7 与不同气味的竞争性结合曲线

Fig. 6 Competitive binding curves of XquaCSP7 with different odorants

3 讨论

灭字脊虎天牛是小粒咖啡上为害较为严重的蛀干害虫之一,嗅觉在其寄主定位中起着重要作用。与其他大部分昆虫的触角功能类似,天牛的触角能够感受同种性信息素和普通植物气味,在其种群繁衍和生存中必不可少^[35-37]。近年,转录组测序已成为基因鉴定的主要手段,基于触角转录组可鉴定到嗅觉相关的基因及害虫防治的潜在分子靶标,然后采用反向化学生态学技术可筛选到用于害虫防治的行为调控剂。从灭字脊虎天牛的触角转录组中我们已鉴定了该种害虫的5类化感基因家族:ORs、GRs、IRs、SNMPs和OBPs,并研究了它们各自的进化关系及组织表达特征^[29-30]。为了进一步完善该天牛的化感基因家族,本文研究了参与嗅觉感受的另一类重要化感蛋白基因:CSPs。研究结果极大地丰富了灭字脊虎天牛的化感基因家族,并为后续化感基因的功能研究奠定基础。

从灭字脊虎天牛的触角转录组中,一共鉴定到14个CSP基因,其数量多于铜绿异丽金龟 *Anomala corpulenta* (5个)^[37]、云杉八齿小蠹 *Ips typographus* (6个)^[31]、红脂大小蠹(6个)^[12]、华山松大小蠹(9个)^[24]、中欧山松大小蠹 *Dendroctonus ponderosae* (11个)^[31]、大猿叶虫(12个)^[38]、松褐天牛(12个)^[13]、光肩星天牛(12个)^[14]和红棕象甲 *Rhynchophorus ferrugineus* (12个)^[39],考虑到以上鞘翅

目昆虫的CSP基因均来自于成虫触角转录组,因此推测灭字脊虎天牛有更多的CSP基因参与嗅觉感受;此外,也有可能是由于不同昆虫触角转录组测序深度和组装技术的差异导致。但是少于星天牛(16个)^[15]和赤拟谷盗(20个)^[16],其中与赤拟谷盗CSP基因的数量差异较大,原因很可能是赤拟谷盗的CSP基因来源于基因组,而灭字脊虎天牛的CSP基因仅从触角转录组中获得,在其他组织特异或高表达的CSP基因并未被鉴定。

在灭字脊虎天牛中,所有CSP均具有4个保守的Cys,其保守模式“C1-X₆-C2-X₁₈-C3-X₂-C4”与鞘翅目其他昆虫的CSP类似^[8,16,31-31],这种保守的Cys模式极大地帮助了鞘翅目昆虫CSP基因的鉴定。此外,研究发现不同物种同源的CSP间氨基酸一致性较高,如云南切梢小蠹 *Tomicus yunnanensis* 的CSP与鞘翅目其他昆虫的CSP一致性大于45%^[32];星天牛^[15]和光肩星天牛^[14]的CSP与鞘翅目其他昆虫的CSP一致性均大于50%;类似的结果在灭字脊虎天牛中也有发现。然而,同一物种不同CSP间氨基酸一致性差异较大,如光肩星天牛CSP间的一致性为8.9%~71.8%^[14];家蚕CSP间的一致性为20%~60%^[17]。与其他昆虫的CSP类似,灭字脊虎天牛的14个CSP间氨基酸一致性变化较大(12%~73%),其中XquaCSP8和XquaCSP12一致性最高,在进化树中聚类到同一个小分支,且它们具有相似的组织表达特征,说明它们很可能具有相似的功能。

昆虫的 CSP 基因具有多样性的组织表达特征,说明其在嗅觉和非嗅觉感受中均具有重要功能。在鞘翅目中,光肩星天牛的 CSP 基因在触角、足、下颚须、下唇须等组织中均有表达^[14],类似的结果在星天牛^[15]、铜绿异丽金龟^[37]、赤拟谷盗^[16]、黄曲条跳甲 *Phyllotreta striolata*^[40]、榆紫叶甲 *Ambrostoma quadriimpressum*^[41] 等昆虫中也有发现。在灭字脊虎天牛中,除 *XquaCSP7* 和 *XquaCSP13* 基因外,其余 *XquaCSPs* 基因在除触角以外的多个组织中有表达,说明这些 CSP 基因具有多种功能。其中, *XquaCSP7* 基因呈现触角特异表达的特点,很可能参与性信息素或是寄主气味的感受; *XquaCSP13* 基因在足特异表达,与光肩星天牛^[14] 和赤拟谷盗^[16] 的部分 CSP 基因表达特征类似。在美洲大蠊 *Periplaneta americana* 中, *PameCSP10(p10)* 基因在再生足中表达,很可能与足的再生有关^[42],灭字脊虎天牛的 *XquaCSP13* 基因是否与足的发育有关仍需进一步的功能验证。在功能研究中,选取触角特异表达的 *XquaCSP7* 基因,主要考虑到触角是灭字脊虎天牛主要的嗅觉器官,在其寄主定位中具有重要作用。此外,在结合测定中主要选取了寄主植物的气味。虽然 *XquaCSP7* 能够很好地与荧光探针 1-NPN 结合($K_d=6.50 \mu\text{mol/L}$),但是在测试的 21 种气味物质中, *XquaCSP7* 与所有气味配基的结合能力均较弱,没有一种配基的相对荧光值下降到 50% 以下。据此分析认为 *XquaCSP7* 可能是一个非广谱的结合蛋白,即结合谱较窄,仅对一种或几种气味具有结合能力;而在结合测定中,由于测试的配基数量有限,因此没能够筛选到 *XquaCSP7* 亲和力和较好的配基。

参考文献

- [1] WALLER J M, BIGGER M, HILLOCKS R J. 咖啡病虫害防治[M]. 刘杰, 申科, 李福荣, 译. 北京: 中国农业出版社, 2016: 1-2.
- [2] 舒梅, 成文章, 李忠恒, 等. 思茅咖啡灭字脊虎天牛发生与危害调查[J]. 热带农业科学, 2016, 36(5): 81-84.
- [3] 周又生, 赵忠喜, 李松林, 等. 咖啡灭字虎天牛生物学及发生危害规律和治理研究[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2002, 24(1): 1-4.
- [4] LEAL W S. Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes [J]. Annual Review of Entomology, 2013, 58(1): 373-391.
- [5] PELOSI P, IOVINELLA I, FELICOLI A, et al. Soluble proteins of chemical communication: an overview across arthropods [J/OL]. Frontiers in Physiology, 2014, 5: 320. DOI:10.3389/fphys.2014.00320. eCollection. 2014.
- [6] PELOSI P, IOVINELLA I, ZHU Jiao, 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] PELOSI P, CALVELLO M, BAN Liping. Diversity of odorant-binding proteins and chemosensory proteins in insects [J]. Chemical Senses, 2005, 30(S1): i291-i292.
- [8] VIEIRA F G, 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: 476-490.
- [9] MCKENNA M P, HEKMATSCAFE D S, GAINES P, et al. Putative *Drosophila* pheromone-binding proteins expressed in a subregion of the olfactory system [J]. Journal of Biological Chemistry, 1994, 269(23): 16340-16347.
- [10] PIKIELNY C W, HASAN G, ROUYER F, et al. Members of a family of *Drosophila* putative odorant-binding proteins are expressed in different subsets of olfactory hairs [J]. Neuron, 1994, 12(1): 35-49.
- [11] LI Hui, ZHANG Guoan, WANG Manqun. Chemosensory protein genes of *Batocera horsfieldi* (Hope): identification and expression pattern [J]. Journal of Applied Entomology, 2012, 136(10): 781-792.
- [12] GU Xiaocui, ZHANG Yanan, KANG Ke, et al. Antennal transcriptome analysis of odorant reception genes in the red turpentine beetle (RTB), *Dendroctonus valens* [J/OL]. PLoS ONE, 2015, 10(5): e0125159.
- [13] WANG Juan, LI Dongzhen, MIN Shuifa, et al. Analysis of chemosensory gene families in the beetle *Monochamus alternatus* and its parasitoid *Dastarcus helophoroides* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part D-Genomics and Proteomics, 2014, 11(9): 1-8.
- [14] HU Ping, WANG Jingzhen, CUI Mingming, et al. Antennal transcriptome analysis of the Asian longhorned beetle *Anoplophora glabripennis* [J/OL]. Scientific Reports, 2016, 6: 26652. DOI:10.1038/srep26652.
- [15] WANG Jingzhen, HU Ping, GAO Peng, et al. Antennal transcriptome analysis and expression profiles of olfactory genes in *Anoplophora chinensis* [J/OL]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 15470. DOI:10.1038/s41598-017-15425-2.
- [16] DIPPEL S, OBERHOFER G, KAHNT J, et al. Tissue-specific transcriptomics, chromosomal localization, and phylogeny of chemosensory and odorant binding proteins from the red flour beetle *Tribolium castaneum* reveal subgroup specificities for olfaction or more general functions [J/OL]. BMC Genomics, 2014, 15: 1141. DOI:10.1186/1471-2164-15-1141.
- [17] GONG Daping, ZHANG Huijie, ZHAO Ping, et al. Identification and expression pattern of the chemosensory protein gene family in the silkworm, *Bombyx mori* [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2007, 37(3): 266-277.
- [18] PEARCE S L, CLARKE D F, EAST P D, et al. Genomic innovations, transcriptional plasticity and gene loss underlying the evolution and divergence of two highly polyphagous and invasive *Helio-*

- coverpa pest species [J/OL]. BMC Biology, 2017, 15: 69. DOI: 10.1186/s12915-017-0402-6.
- [19] LI Zhaoqun, ZHANG Shuai, LUO Junyu, 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.
- [20] LARTIGUE A, CAMPANACCI V, ROUSSEL A, et al. X-ray structure and ligand binding study of a moth chemosensory protein [J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(35): 32094-32098.
- [21] PICIMBON J F, DIETRICH K, ANGELI S, et al. Purification and molecular cloning of chemosensory proteins from *Bombyx mori* [J]. Archives of Insect Biochemistry & Physiology, 2000, 44(3): 120-129.
- [22] OZAKI M, WADA-KATSUMATA A, FUJIKAWA K, et al. Ant nestmate and non-nestmate discrimination by a chemosensory sensillum [J]. Science, 2005, 309(5732): 311-314.
- [23] MALESZKA J, FORÉT S, SAINT R, et al. RNAi-induced phenotypes suggest a novel role for a chemosensory protein CSP5 in the development of embryonic integument in the honeybee (*Apis mellifera*) [J]. Development Genes & Evolution, 2007, 217(3): 189-196.
- [24] LI Zhumei, DAI Lulu, CHU Honglong, et al. Identification, expression patterns, and functional characterization of chemosensory proteins in *Dendroctonus armandi* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) [J/OL]. Frontiers in Physiology, 2018, 9: 291. https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00291.
- [25] GU Shaohua, WANG Songying, ZHANG Xueying, et al. Functional characterizations of chemosensory proteins of the alfalfa plant bug *Adelphocoris lineolatus* indicate their involvement in host recognition [J/OL]. PLoS ONE, 2012, 7(8): e42871. DOI: 10.1371/journal.pone.0042871.
- [26] VENKATESHA M G AND DINESH A S. The coffee white stemborer *Xylotrechus quadripes* (Coleoptera: Cerambycidae): bioecology, status and management [J]. International Journal of Tropical Insect Science, 2012, 32(4): 177-188.
- [27] SHU Mei, CHENG Wenzhang, LI Zhongheng, et al. Survey of occurrence and damage of *Xylotrechus quadripes* Chevrolat on Simao coffee in Pu'er city [J]. Plant Diseases and Pests, 2016, 7(5/6): 5-7.
- [28] THAPA S, LANTINGA E A. Growing coffee in the shade: a strategy to minimize the prevalence of coffee white stem borer, *Xylotrechus quadripes* [J]. Southwestern Entomologist, 2017, 42(2): 357-362.
- [29] 吉帅帅, 庄翔麟, 刘乃勇. 灭字脊虎天牛触角转录组中气味结合蛋白基因的鉴定及表达谱分析[J]. 四川农业大学学报, 2018, 36(2): 193-202.
- [30] PANG Jixin, ZENG Xin, ZHU Jiayin, et al. Chemosensory transmembrane protein families in the coffee white stemborer, *Xylotrechus quadripes* (Coleoptera: Cerambycidae) [J]. Environmental Entomology, 2018, 47(4): 969-981.
- [31] ANDERSSON M N, GROSSEWILDE E, KEELING C I, et al. Antennal transcriptome analysis of the chemosensory gene families in the tree killing bark beetles, *Ips typographus* and *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) [J/OL]. BMC Genomics, 2013, 14(1): 198. http://www.biomedcentral.com/1471-2164/14/198.
- [32] LIU Naiyong, LI Zongbo, ZHAO Ning, et al. Identification and characterization of chemosensory gene families in the bark beetle, *Tomicus yunnanensis* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part D-Genomics and Proteomics, 2018, 25: 73-85.
- [33] PETERSEN T N, BRUNAK S, VON H G, et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions [J]. Nature Methods, 2011, 8(10): 785-786.
- [34] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. Molecular Biology & Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [35] ALLISON D J, BORDEN H J, SEYBOLD J S. A review of the chemical ecology of the Cerambycidae (Coleoptera) [J]. Chemoecology, 2004, 14: 123-150.
- [36] GINZEL M D, HANKS L M. Role of host plant volatiles in mate location for three species of longhorned beetles [J]. Journal of Chemical Ecology, 2005, 31: 213-217.
- [37] LI Xiao, JU Qian, JIE Wencai, et al. Chemosensory gene families in adult antennae of *Anomala corpulenta* Motschulsky (Coleoptera: Scarabaeidae: Rutelinae) [J/OL]. PLoS ONE, 2015, 10(4): e0121504. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121504.
- [38] LI Xiaoming, ZHU Xiuyun, WANG Zhiqiang, et al. Candidate chemosensory genes identified in *Colaphellus bowringi* by antennal transcriptome analysis [J/OL]. BMC Genomics, 2015, 16: 1028. DOI: 10.1186/s12864-015-2236-3.
- [39] ANTONY B, SOFFAN A, JAKŠE J, et al. Identification of the genes involved in odorant reception and detection in the palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus*, an important quarantine pest, by antennal transcriptome analysis [J/OL]. BMC Genomics, 2016, 17(1): 69. DOI: 10.1186/s12864-016-2362-6.
- [40] WU Zhongzhen, BIN Shuying, HE Hualiang, et al. Differential expression analysis of chemoreception genes in the striped flea beetle *Phyllotreta striolata* using a transcriptomic approach [J/OL]. PLoS ONE, 2016, 11(4): e0153067. DOI: 10.1371/journal.pone.0153067.
- [41] WANG Yinliang, CHEN Qi, ZHAO Hanbo, et al. Identification and comparison of candidate olfactory genes in the olfactory and non-olfactory organs of elm pest *Ambrostoma quadrimpressum* (Coleoptera: Chrysomelidae) based on transcriptome analysis [J/OL]. PLoS ONE, 2016, 11(1): e0147144. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147144.
- [42] KITABAYASHI A N, ARAI T, KUBO T, et al. Molecular cloning of cDNA for p10, a novel protein that increases in the regenerating legs of *Periplaneta americana* (American cockroach) [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1998, 28(10): 785-790.