

瓜实蝇普通气味结合蛋白基因的克隆及原核表达

申建梅 胡黎明 宾淑英 廖泓之 林进添

仲恺农业工程学院植物保护系, 广州 510225

摘要 利用 RT-PCR 和 RACE 方法克隆获得瓜实蝇 *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) 普通气味结合蛋白 (general odorant binding protein, GOBP) 基因的 cDNA 全长序列, 命名为 *BcucOBP*。测序结果表明, *BcucOBP* 开放阅读框全长 447 bp, 编码 149 个氨基酸。氨基酸序列比对及三维结构同源建模表明, 此序列具有 OBPs 的典型特征, 序列中具有 6 个保守的半胱氨酸和 6 个 α 螺旋区域。构建了重组表达载体 pET28a (+)-*BcucOBP*, 并转化大肠杆菌 BL21(DE3) 中。SDS-PAGE 及 Western blotting 分析表明, 在 IPTG 进行诱导下目标蛋白以 His-标签融合蛋白的形式在宿主菌中得到稳定表达。荧光定量 PCR 分析表明, *BcucOBP* mRNA 在除雌虫腹节外的各个组织中都有表达, 但在触角中的表达量最高。另外, *BcucOBP* mRNA 在昆虫前足和生殖节中具有明显的性别差异表达特征, 推测其不仅具有普通气味蛋白的功能, 还可能参与了信息素的运输过程, 在瓜实蝇交配行为中发挥重要作用。

关键词 瓜实蝇; 气味结合蛋白; 基因克隆; 组织表达特征; 原核表达

中图分类号 Q 966 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)04-0455-06

昆虫气味结合蛋白是一类表面亲水、内部疏水的小分子(15~20 ku)酸性蛋白, 它广泛分布于昆虫的多种化学感受器淋巴液中^[1]。在昆虫感受外界化学信号过程中, 气味结合蛋白(odorant binding proteins, OBPs)作为载体蛋白, 结合并运输外界疏水性的气味分子到达嗅觉神经树突膜上的感觉受体(离子通道), 并最终传导到神经中枢, 引起昆虫的行为反应^[2-3]。根据识别的气味分子不同, 气味结合蛋白分为两大类: 一类是信息素结合蛋白(pheromone binding protein, PBP), 与昆虫感受性信息素有关^[4]; 另一类是普通气味结合蛋白(general odorant binding protein, GOBP)。昆虫的嗅觉系统在昆虫寻找寄主、交配产卵过程中发挥着重要的作用^[5-6], 因此对昆虫的嗅觉识别行为进行有效干扰是防治害虫的途径^[7]。

瓜实蝇 *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) 隶属双翅目实蝇科, 是热带农作物的重要害虫之一, 其危害寄主种类达 81 种, 对农作物造成重大损失^[8]。目前, 瓜实蝇的防治主要采用化学防治, 但防治效果较差且已产生抗药性。通过调控的行为进行害虫综合治理是当前害虫防治的重要手段^[9]。笔者采用 RT-

PCR 结合 RACE 技术克隆获得瓜实蝇 OBP 基因, 并进行了原核表达, 同时采用荧光定量 PCR 技术分析了该基因在不同组织中的表达。

1 材料与方法

1.1 供试材料和主要试剂

瓜实蝇由笔者所在实验室用人工饲料饲养得到^[10]。分别收集瓜实蝇成虫的触角、头(去除触角)、胸、翅、前足、中足、后足、腹部和生殖节等 9 个不同组织, 并将样品迅速放入液氮冷冻后保存于 -70 °C 冰箱备用。

感受态细胞 BL21(DE3) 为 Tiangen 公司产品, 载体 pMD20-T 和 pET28a (+) 分别购自 TaKaRa 公司和 Novagen 公司; RNA 提取试剂盒购自 Omega 公司; 3'-RACE 和 5'-RACE 试剂盒购自 Invitrogen 公司; 反转录系统、ExTaq DNA 聚合酶、核酸分子量标准、蛋白分子质量标准及 SYBR Premix ExTaq 荧光试剂均购自 TaKaRa 公司; 核酸琼脂糖凝胶回收试剂盒、Anti-His Antibody、羊抗鼠 IgG-HRP、HRP-DAB 底物显色试剂盒购自 Tiangen 公司。

收稿日期: 2011-01-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(30971923)

申建梅, 博士, 讲师, 研究方向: 昆虫分子生物学, E-mail: jmshe@eyou.com

通讯作者: 林进添, 博士, 教授, 研究方向: 昆虫分子生物学, E-mail: linjiantian@163.com

1.2 总 RNA 的提取和反转录

参照 RNA 抽提试剂盒(Omega 公司)使用说明提取上述瓜实蝇不同组织材料的总 RNA。经琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测后,按照反转录系统说明书以 Oligo-dT(表 1)为引物进行反转录得到 cDNA,并以此为模板进行 PCR 扩增。

1.3 引物设计与合成

根据 GenBank 中双翅目昆虫的 OBP 序列设计简并引物 BcuOBP31,结合 Oligo-dT,用于扩增瓜实蝇的 OBP 基因。根据 3' RACE 获得的序列设计 2 对特异引物 BcuOBP51 和 BcuOBP52,分别与试剂盒中的 GeneRacer 5'Primer 和 GeneRacer 5'Nested Primer 搭配,用于 5' RACE 的 2 轮扩增。将 5' RACE和 3' RACE 序列拼接后得到基因的全长。本研究设计了 1 对特异引物 OBPF 和 OBPR,用于扩增瓜实蝇 OBP 阅读框,以保证 3'-RACE 和 5'-RACE片段是来源于同一个基因。

所有引物由广州英骏生物技术有限公司合成,引物序列如表 1。

表 1 试验中所用引物
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5'-3')
Oligo-dT	GGCCGGCCTTTT
BcuOBP31	AANACGGGNGTNACAGAYGARGC
BcuOBP51	CACACAATACATGTAACACTTC
BcuOBP52	TGAACATCCCCATCGCTGAAGTC
GeneRacer 5'Primer	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA
GeneRacer 5'NestedPrimer	GGAACTGACATGGAGTGAAGGAGA
OBPF	ATGCACTCCCGAAAGACTCTCCTG
OBPR	TTAGATCAAGAAATAATGCTTCGG
EcoR I	CGGAATTCCAAAAGAGCTGAGACGT-GATG
Xho I	CCGCTCGAG TTAGATCAAGAAATAAT-GC
BcuQF	ACTCTCCTGGGCACATTACTG
BcuQR	ACTTCAACAGCTCGTCTTCGT
BactF	CGTTTCCGTTGCCAGAAATTC
BactR	TCAGCAATACCTGGGTACATG

1.4 PCR 反应及序列测定

以合成的 cDNA 为模板,加入 10 × ExTaq DNA 聚合酶反应缓冲液 5 μL (含 Mg²⁺),正向和反向引物各 1 μL (10 mol/L),2.5 mmol/L dNTP 4 μL,ExTaq DNA 聚合酶 0.25 μL (5 U/μL),加水至 50 μL,混匀离心后放入 PCR 仪扩增。PCR 反应程序:94 ℃变性 3 min;接着进行 35 个循环,循

环条件为 94 ℃ 30 s,66 ℃ 45 s,72 ℃ 1 min;循环完毕后 72 ℃保温 10 min。

RACE 反应参照试剂盒说明书。扩增产物用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测,回收目的片段。胶回收试剂盒进行 DNA 回收,将回收的 DNA 片段与 pMD20-T 克隆载体连接,进行 TA 克隆和酶切鉴定,阳性克隆送往上海英骏生物技术有限公司进行测序。

1.5 三维结构建模

通过 SWISS-MODEL 进行同源建模用 SWISS-PDB Viewer 软件观察蛋白三维结构,采用原子间经验平均力势能(atomic empirical mean force potential, Anolea)评价同源建模结果^[11]。

1.6 基因的组织表达特征

荧光定量 PCR 采用 25 μL 体系,各反应成分的含量为 12.5 μL SYBR 预混液,10 μmol/L 的上、下游引物各 0.5 μL,cDNA 模板 1 μL,灭菌超纯水 10.5 μL,混匀,离心,放入 PCR 仪扩增。PCR 反应条件:94 ℃ 预变性 30 s,以后每个循环为 95 ℃ 5 s,65 ℃ 30 s,共 40 个循环。荧光定量所用引物序列如表 1。本试验设置 3 组重复,每组取 5 头虫或其组织用于提取 RNA。反应中以水为阴性对照。反应结束后收集 Ct 值,并采用 2^{-ΔΔCt} 法进行数据分析^[12]。

1.7 原核表达及 Western blotting 检测

用引物 EcoRI(含 EcoR I 酶切位点)和 Xho I (含 EcoR I 酶切位点)(引物序列见表 1),以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增产物插入 pET28a(+)载体,构建重组表达质粒 pET28a (+)-BcucOBP。重组质粒转化感受态细胞 BL21 (DE3)后,涂板挑单克隆检测。将阳性克隆在 LB/Amp 培养基中于 37 ℃培养至 D₆₀₀ 为 0.6~1.0 时,加入 IPTG 至 1 mmol/L 进行诱导表达。抽提菌体蛋白后,用 15% SDS-PAGE 电泳检测。将分离后的蛋白转印 PVDF 膜 2 h,封闭液封闭 4 h,TBST 洗膜后,加入 Anti-His Antibody,37 ℃孵育 4 h,洗膜,加入羊抗鼠 IgG-HRP 二抗,37 ℃孵育 4 h,充分洗涤后,用 HRP-DAB 底物显色试剂盒显色鉴定表达产物。

2 结果与分析

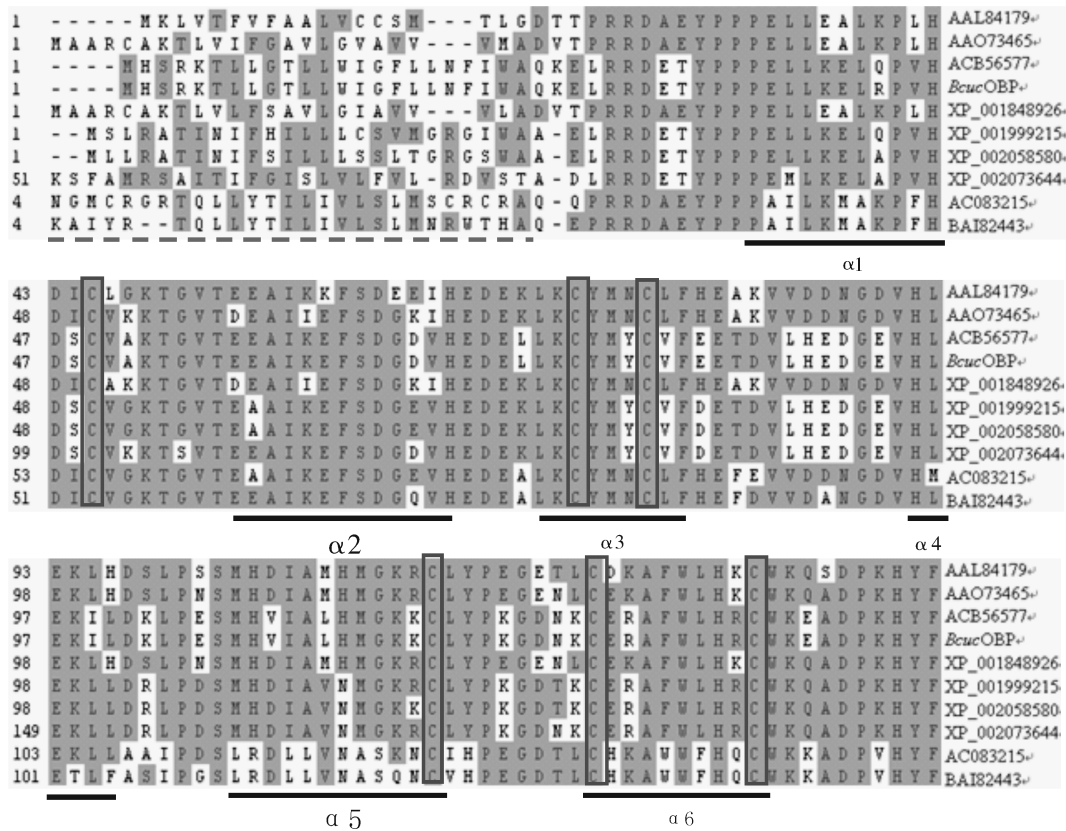
2.1 基因克隆及序列分析

以瓜实蝇的触角 cDNA 为模板,以简并引物 BcuOBP31 与 Oligo-dT 配对使用,扩增后得到大小

约 500 bp 左右的特异条带,测序结果表明该序列与多种昆虫的气味结合蛋白具有较高的相似性,初步推测所获得的片段是瓜实蝇 OBP 基因序列。根据所得的序列信息设计 2 对特异引物(BcuOBP51 和 BcuOBP52)用于基因的 5' 端 cDNA 序列扩增。将 3'-RACE 和 5'-RACE 所得序列拼接后得到瓜实蝇 OBP 基因的 cDNA 全长序列。

用特异性引物(OBPF 和 OBPR)扩增后获得 1 条 447 bp 的特异条带,测序结果与拼接序列一致,

获得了瓜实蝇 OBP cDNA 的完整序列,该基因命名为 *BcucOBP*,编码 149 个氨基酸,分子质量约 17.46 ku。N 端 23 个氨基酸为蛋白信号肽区,成熟肽含 126 个氨基酸。利用 Megalign 软件对瓜实蝇与其他双翅目昆虫 OBP 的氨基酸序列同源性进行比对(图 1),结果表明瓜实蝇 OBP 和其他昆虫 OBP 蛋白一样,都具有 6 个保守的半胱氨酸残基和 6 个 α -螺旋结构域,证明克隆获得的 *BcucOBP* 为昆虫 OBP 蛋白家族。



阴影表示 OBP 蛋白的保守区域;虚线表示 OBP 蛋白的信号肽序列; $\alpha 1$ - $\alpha 6$ 分别表示 6 个 α -螺旋;方框表示 6 个保守的半胱氨酸。Conserved regions of OBP proteins were shaded in gray; signal peptide of OBP was marked with broken line; six predicted alpha-helices were marked with $\alpha 1$ - $\alpha 6$; the six conserved cysteine residues were marked with the boxes. AAL84179:冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*; AAO73465:环喙库蚊 *Culex tarsalis*; ACB56577:桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis*; *BcucOBP*:瓜实蝇 *Bactrocera cucurbitae*; XP_001848926:致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus*; XP_001999215:拟黄果蝇 *Drosophila mojavensis*; XP_002058580:黑果蝇 *Drosophila virilis*; XP_002073644:南美热带果蝇 *Drosophila willistoni*; ACO83215:厩螫蝇 *Stomoxys calcitrans*; BAI82443:葱蝇 *Delia antiqua*。

图 1 *BcucOBP* 氨基酸序列与其他双翅目昆虫 OBP 的同源性比对

Fig.1 Amino acid sequence alignment of *BcucOBP* with the known OBPs from other dipterans insects

2.2 *BcucOBP* 三维结构建模

利用 SWISS-MODEL 进行同源建模,以库蚊 *Culex quinquefasciatus* 的 OBP 基因为模板,获得的瓜实蝇 *BcucOBP* 理论三维结构(图 2),结果表明其蛋白三维结构由 6 个 α 螺旋($\alpha 1$ - $\alpha 6$)组成,且折

叠形成一个非常紧密而稳定的球状结构。利用 Anolea 程序对同源建模的蛋白结构进行了评价,结果显示:绿色的区域为与模板拟合的空间结构,红色的区域为拟合程度不高的空间结构,可见只有少数几个氨基酸残基的空间结构拟合程度不高(图 3)。

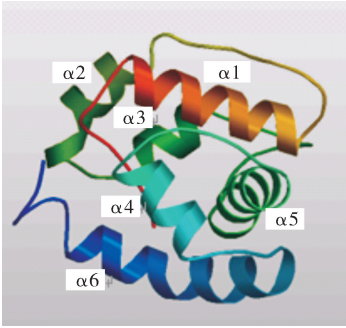


图 2 *BcucOBP* 蛋白的理论三维结构
Fig. 2 Theoretical three dimensional structure of *BcucOBP*

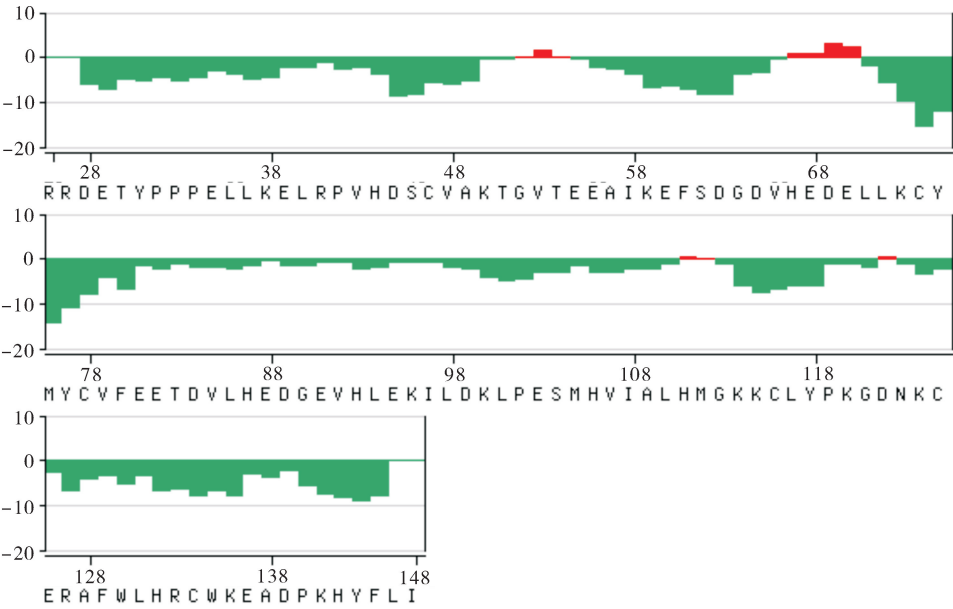


图 3 原子间经验平均力势能评价分析
Fig. 3 Analysis of the atomic empirical mean force potential (anolea)

2.4 原核表达及 Western blotting 检测

抽提重组菌及质粒菌株的蛋白在 15% SDS-PAGE 电泳(图 4),结果发现重组菌在 20 ku 左右有明显的特异条带产生,而未插入目的基因的空质粒在相应位置未出现特异性条带。经过 His 标签抗体的免疫印迹分析,结果表明在 20 ku 左右有 1 条特异的免疫条带出现,与目标蛋白分子质量大小一致,表明目的蛋白以 His 标签融合的形式存在。

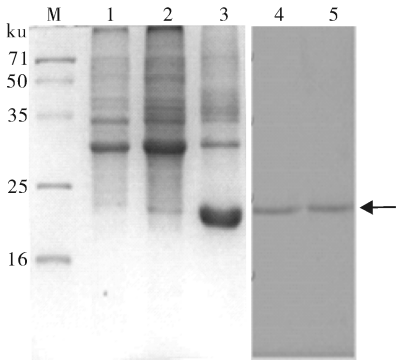
3 讨 论

昆虫气味结合蛋白识别和结合外界气味分子是昆虫感受外界气味分子的第一步生化反应,对昆虫与外界进行信息交流具有重要意义。本试验利用

2.3 *BcucOBP* 基因表达谱

以瓜实蝇雄虫前足中的 *BcucOBP* mRNA 含量作为基准含量,采用荧光定量 PCR 技术对 *BcucOBP* mRNA 在瓜实蝇不同组织中的相对表达量进行分析。*BcucOBP* mRNA 在瓜实蝇触角中的含量最高,雌雄虫触角中的表达量大约是雄虫前足的 10 000 倍,其次是雌虫前足中的表达量在昆虫的前足和生殖节 2 个不同组织中,*BcucOBP* mRNA 表现出明显的性别差异表达特征:雌虫前足表达量约为雄虫前足的 120 倍;雄虫生殖节中的表达量约为雌虫生殖节的 10 倍。在雌虫的腹节中未检测到 *BcucOBP* 的表达。

RT-PCR 技术扩增得到了瓜实蝇普通气味结合蛋白 *BcucOBP* 基因的 cDNA 片段。根据序列和结构分析表明,瓜实蝇 *BcucOBP* 蛋白呈酸性,分子质量约为 17.46 ku,序列中有 6 个保守的半胱氨酸位点,与报道的昆虫气味结合蛋白特征一致^[13-17],具有气味结合蛋白的典型特征,表明本试验克隆的瓜实蝇 *BcucOBP* 属于昆虫 OBP 亚家族。本试验对 36 个 OBPs 序列的结构域分析表明,这些 OBPs 中半胱氨酸保守位置的特点符合 C₁-X26-C₂-X3-C₃-X37-C₄-X8-C₅-X8-C₆的特点,该结果与 Zhou 等提出的气味结合蛋白半胱氨酸保守位置的基本特点(C₁-X15-39-C₂-X3-C₃-X21-44-C₄-X7-12-C₅-X8-C₆)一致,表明 OBP 在不同昆虫间具有高度保守的结构



M: 蛋白分子质量 Protein molecular standard marker;
1: 在 IPTG 诱导下 pET28a(+) 的表达 Expression of pET28a(+) after induction with IPTG; 2: 没有 IPTG 诱导条件下 pET28a(+)-BcucOBP 的表达 Expression of pET28a(+)-BcucOBP without IPTG; 3: 在 IPTG 诱导下 pET28a(+)-BcucOBP 的表达 Expression of pET28a(+)-BcucOBP after induction with IPTG; 4, 5: 免疫印迹 Western blotting.

图 4 *BcucOBP* 融合蛋白的 SDS-PAGE 电泳及免疫印迹分析
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of *BcucOBP* expressed in *Escherichia coli* and Western blotting

域,也证明昆虫 OBP 保守的 6 个半胱氨酸必定对蛋白的结构和功能起着至关重要的作用^[6,14,18-20]。笔者比对分析发现库蚊 OBP 蛋白(3OGN)与瓜实蝇 *BcucOBP* 蛋白的氨基酸同源率为 68.6%,因此以库蚊 OBP 最为模板蛋白同源模建瓜实蝇 *BcucOBP* 蛋白的三维结构是合理的。通过对瓜实蝇 *BcucOBP* 蛋白三维结构分析发现其蛋白结构非常保守,与库蚊 OBP 蛋白三维结构几乎完全相同,都是有 6 个 α 螺旋折叠形成一个球状结构。

Reyes 等^[21]研究表明,6 个组氨酸的 His 标签在生理条件下不带电荷,基本不影响蛋白的结构及功能。因此,本试验原核表达选用由 T7 启动子启动的高效融合表达载体 pET28a(+),将 *BcucOBP* 亚克隆到 pET28a(+),构建了 N 端融合 6 个组氨酸标签的重组表达质粒,并转入大肠杆菌 BL21(DE3)中进行诱导表达,目的是后续可利用该标签检测、纯化该融合蛋白。通过抗 His 单抗与诱导蛋白作 Western-blot 分析,结果呈阳性,表明所得蛋白的确为 His 标签与 *BcucOBP* 的融合蛋白。

昆虫 OBPs 不仅能在触角中表达,而且在喙、足、下唇须及性腺等部位都有表达^[22]。笔者通过荧光定量 PCR 的方法,证实 *BcucOBP* mRNA 主要表达于瓜实蝇的触角中,且雌雄虫触角表达量相当。

BcucOBP mRNA 在雄虫生殖节中也有较高的表达量,约为雌虫生殖节的 10 倍,这种表达模式与 *AaegOBP22* 的十分相似,推测 *BcucOBP* 具有 *AaegOBP22* 相似的功能,可能参与了信息素的运输过程,在瓜实蝇交配行为中发挥重要作用^[23]。*BcucOBP* 基因不仅在瓜实蝇触角等嗅觉组织中有特异表达,而且在胸、足、翅、生殖节等非嗅觉组织中也能表达。由此推测,瓜实蝇 *BcucOBP* 可能不仅起着嗅觉作用,还可能具有其他功能,这与前人的研究结果一致^[24]。

参 考 文 献

[1] PELOSI P, MAIDA R. Odorant-binding proteins in insects[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 1995, 111 (3): 503-514.
[2] VOGT R G, RYBCZYNSKI R, LERNER M R. Molecular cloning of general odorant-binding proteins GOBP1 and GOBP2 from the tobacco hawk moth *Manduca sexta*: comparisons with other insect OBPs and their signal peptides [J]. Journal of Neuroscience, 1991, 11: 2972-2984.
[3] PELOSI P. Odorant-binding proteins[J]. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 1994, 29(3): 199-228.
[4] VOGT R G, RIDDIFORD L M. Pheromone binding and inactivation by moth antennae[J]. Nature, 1981, 293: 161-163.
[5] SLESSOR K N, KAMINSKI L A, KING G G S, et al. Semiochemical basis of the retinue response to queen honey bees[J]. Nature, 1988, 332: 354-356.
[6] PILPEL Y, LANCET D. Olfaction: good reception in fruit fly antennae[J]. Nature, 1999, 398: 285-287.
[7] 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.
[8] SIDERHURST M S, JANG E B, CUCUMBE R. Volatile blend attractive to female melon fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett)[J]. Journal of Chemical Ecology, 2010, 36(7): 699-708.
[9] DHILLON M K, SINGH R, NARESH J S, et al. The melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae*: a review of its biology and management[J]. Journal of Insect Science, 2005, 5: 1-16.
[10] 吕凤鸣. 瓜实蝇产卵之偏好性; 洋香瓜果实主成份之萃取与分析[J]. 台湾昆虫, 2002, 22: 163-170.
[11] ARNOLD K, BORDOLI L, KOPP J, et al. The SWISS-MODEL Workspace: a web-based environment for protein structure homology modeling[J]. Bioinformatics, 2006, 22: 195-201.
[12] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
[13] KRIEGER J, NICKISCH-ROSENECK E, MAMELI M, et al. Binding proteins from the antennae of *Bombyx mori*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1996, 26: 297-307.

- [14] STEINBRECHT R A. Are odorant-binding proteins involved in odorant discrimination? [J]. *Chemical Senses*, 1996, 21(6): 719-727.
- [15] EMMANUELLE J, JONATHAN B, MARIE-CHRISTINE F, et al. Characterization of the general odorant-binding protein 2 in the molecular coding of odorants in *Manetea brassicae* [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2000, 267: 6708-6714.
- [16] WANG G R, WU K M, GUO Y Y. Cloning, expression and immunocytochemical localization of a general odorant-binding protein gene from *Helicoverpa armigera* (Hubner) [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 33: 115-124.
- [17] DAMBERGER F F, ISHIDA Y, LEAL W S, et al. Structural basis of ligand binding and release in insect pheromone-binding proteins: NMR structure of *antheraea polyphemus* PBP1 at pH 4.5 [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 373(4): 811-819.
- [18] ZHOU J J, HE X L, PICKETT J A, et al. Identification of odorant-binding proteins of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*: genome annotation and comparative analyses [J]. *Insect Molecular Biology*, 2008, 17(2): 147-163.
- [19] LEAL W S, NIKONOVA L, PENG G. Disulfide structure of the pheromone binding protein from the silkworm moth, *Bombyx mori* [J]. *FEBS Letter*, 1999, 464(1): 85-90.
- [20] BRIAND L, NESPOULOUS C, HUET J C, et al. Disulfide pairing and secondary structure of ASP1, an olfactory-binding protein from honeybee (*Apis mellifera* L.) [J]. *Journal of Peptide Research*, 2001, 58(6): 540-545.
- [21] REYES L F, SOMMER C A, BELTRAMINI N L, et al. Expression, purification and structural analysis of UBE2G [J]. *Protein Expression and Purification*, 2006, 45(3): 324-328.
- [22] 李正西, ZHOU J J. 冈比亚按蚊嗅觉结合蛋白候选基因 cDNA 的克隆、鉴定及其表达型分析 [J]. *昆虫学报*, 2004, 47(4): 417-423.
- [23] LI S, PICIMBON J F, JI S D, et al. Multiple functions of an odorant-binding protein in the mosquito *Aedes aegypti* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 372(3): 464-468.
- [24] KIM M S, SMITH D P. LUSH odorant-binding protein mediates chemosensory responses to alcohols in *Drosophila melanogaster* [J]. *Genetics*, 1998, 150: 711-721.

Cloning and prokaryotic expression of cDNA encoding general odorant binding protein from *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett)

SHEN Jian-mei HU Li-ming BIN Shu-ying LIAO Hong-zhi LIN Jin-tian

Department of Plant Protection, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China

Abstract In this study, OBP from *Bactrocera cucurbitae* was cloned and named as *BcucOBP*. The full-length of open reading frame(ORF) is 447 bp, encoding 149 amino acid residues. Amino acid sequence alignment and 3D-Homology Modeling analysis showed that *BcucOBP* shared the typical structural feature of OBP with other insects, including 6 conservative Cys residues and 6 α -helices in the sequence. A recombinant plasmid pET28a (+)-*BcucOBP* was constructed and transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3). Western blotting indicated that the His-tagged *BcucOBP* stably expressed in DE3 induced by IPTG. Real-time PCR analysis shows that *BcucOBP* mRNA is expressed nearly in all tissues except for female visceral segment. The relative concentration of *BcucOBP* mRNA is the highest in antenna of *B. cucurbitae* compared with other tissues. *BcucOBP* mRNA shows clear gender-differential expression pattern in general section and the foreleg. The special expression pattern suggested that *BcucOBP* not only acted as a general odor protein but also was involved in the transport of pheromone in the mating behavior of *B. cucurbitae*.

Key words *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett); general odorant binding protein; gene clone; tissue expression pattern; prokaryotic expression