

桔小实蝇非典型气味受体 Orco 基因的克隆与表达谱分析

赵海明 易欣 胡美英 安国栋 王会冬 黄林

华南农业大学昆虫毒理研究室/天然农药与化学生物学教育部重点实验室, 广州 510642

摘要 为探讨非典型气味受体基因 *Orco* 的功能, 采用 RT-PCR 和 RACE 方法克隆获得桔小实蝇 *Bactocera dorsalis* (Hendel) *Orco* 受体的全长 cDNA 序列, 命名为 *Bdor/Orco* (GenBank 登录号为 EU621792)。测序结果表明 *Bdor/Orco* 开放阅读框全长 1 422 bp, 编码 473 个氨基酸残基。对其组成成分、疏水/亲水区域、信号肽、蛋白质二级结构, 以及分子进化关系等进行了预测与推断, 分析结果表明 *Bdor/Orco* 与其他昆虫的 *Orco* 具有较高的氨基酸序列一致性, 特别是 C 末端。对该基因在桔小实蝇成虫不同组织和发育时期表达量的荧光定量 PCR 分析, 结果表明 *Bdor/Orco* 主要是在桔小实蝇成虫触角中表达, 头部(去除触角)、雌虫前足和翅中也有较高的表达; 桔小实蝇在各个发育时期的表达水平不同, 在刚羽化雌成虫中的表达量最高。

关键词 桔小实蝇; 气味受体; *Orco* 基因; 克隆; 表达谱

中图分类号 Q 966; Q 969.512.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)01-0040-08

嗅觉在昆虫的生存和种群繁衍过程中发挥重要作用^[1]。对昆虫嗅觉机制的深入研究和嗅觉信号传导途径的完整阐述, 是探索农业害虫专一性防治的基础。气味分子与嗅觉神经元树突上气味受体结合, 参与昆虫嗅觉识别的初始过程^[2-3]。自 1999 年报道鉴定出果蝇 *Drosophila melanogaster* 的第一个气味受体以来^[4], 科学家们利用生物化学、分子生物学和生物信息学等多种技术手段寻找到了多种昆虫气味受体基因^[1,5-9]。但是, 绝大部分受体的氨基酸序列在不同昆虫物种中只有约 20% 的相似性^[10]。近年来, 在多种昆虫中发现了一个高度保守的气味受体基因家族, 其氨基酸序列的一致性接近 50%。这种气味受体基因首先在果蝇基因组内发现并命名为 *Dmel/Orco*。该类基因在不同昆虫间保守性非常高, 编码的受体统称为 *Orco* 家族受体 (*Orco family receptors*), 是一类非典型的气味受体 (*atypical odorant receptors*)。正是由于这种高度保守的特性, 才使得以同源为基础 (*homology-based*) 的传统方法鉴定其他昆虫 *Orco* 类嗅觉受体的基因变为可能。

桔小实蝇 *Bactocera dorsalis* (Hendel) 是果蔬上的一种毁灭性检疫害虫, 其化学防治效果较差且易产生抗药性, 因此, 采用行为调控已成为综合治理

的重要手段^[11]。昆虫的嗅觉系统在昆虫寻找寄主、交配产卵过程中发挥重要作用, 所以, 对昆虫的嗅觉识别进行有效干扰是防治害虫的新途径^[12]。鉴于此类非典型性气味受体的重要作用, 笔者采用 RT-PCR 结合 RACE 技术, 克隆得到桔小实蝇的 *Bdor/Orco* 嗅觉受体基因, 并与其他昆虫 *Orco* 嗅觉受体基因的同源性进行比较与分析, 观察其在不同组织不同发育阶段的表达量, 旨在进一步探讨 *Orco* 在昆虫嗅觉识别过程中的作用, 为研究桔小实蝇寄主选择行为机制和开展行为调控提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

桔小实蝇由笔者所在实验室人工饲养所得。饲养条件: 温度 (26±1) °C, 相对湿度 50%~70%, 光周期 L/D=16/8 h。待桔小实蝇发育到性成熟时期, 分别收集触角、头(去除触角)、胸、前足、中足、后足、翅、腹节和生殖节 9 个不同组织, 并收集卵、幼虫 (1 龄, 2 龄, 3 龄)、蛹 (第 1 天, 第 4 天, 第 7 天, 第 10 天)、羽化 5 min 内的雌成虫和雄成虫。将收集的样品迅速放入液氮冷冻后保存于 -80 °C 冰箱备用。

总 RNA 抽提 Trizol 试剂盒购自 Omega 公司;

收稿日期: 2012-06-27

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31071713) 和教育部博士学科点科研基金项目 (20094404110019)

赵海明, 硕士研究生, 研究方向: 昆虫生理毒理。E-mail: 240031566@qq.com

通讯作者: 胡美英, 教授, 研究方向: 天然源农药、农药残留与环境保护和昆虫生理毒理。E-mail: humy@scau.edu.cn

3'-RACE 和 5'-RACE 试剂盒 SMARTM RACE cDNA amplification Kit 购自 Clontech 公司；琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒购自 Tiangen 公司；*Taq* DNA 聚合酶、DL 2000 DNA Marker、AMV 反转录酶、pMD19-T 载体、大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 均购自 TaKaRa 公司；实时荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR[®] Green qPCR Kit 购自 Thermo 公司。所用引物均由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.2 RNA 的抽提与 cDNA 第一链的合成

参照 Omega 公司总 RNA 抽提 Trizol 试剂盒使用说明,取桔小实蝇不同组织不同发育时期的样品用液氮研磨后进行总 RNA 提取,经琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测后,参照 TaKaRa 公司的 AMV 反转录酶使用说明书合成 cDNA 第一链,并保存于-20 ℃备用。

1.3 引物设计与合成

利用昆虫气味受体 *Orco* 基因的高度保守性,根据 GenBank 中登录昆虫 *Orco* 的氨基酸保守序列设计合成 1 对特异性引物,利用该简并引物扩增出 *Orco* 基因 cDNA 片段,进而设计 3'-RACE 和 5'-RACE 引物,扩增其 3' 及 5' 端序列,序列拼接后根据其非编码区设计全长验证引物。另外,根据全长序列设计定量引物(表 1)。其中引物均使用 primer premier 5. 0 软件辅助设计。

表 1 试验所用的引物

Table 1 Primers used in this experiment

名称 Name	序列 Sequences (5'-3')
O-F	ACTCATCCGTACACTTGGTGCTGG
O-R	AGCAGATAGTAGCACT-GAAAAGCGAAGC
O-5'-outer	GCACCAAGTGTTACGGATGAGTAAATCT-TCT
O-5'-inner	ATAAATAAGCCCGAATATTTTCATA-AGACGAAT
Long univer-sal primer	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAG-CAGTGGTATCAACGCAGAGT
Short univer-sal primer	CTAATACGACTCACTATAGGGC
O-3'-outer	CAATGGCATGAACGGTACAAATC-CGAATGG
O-3'-inner	GCTTTCACAACCATCGGCTACTTGGGC-TAT
Full-F	ATGCAGCCCAGCAAATATGTGGGCCT-TG
Full-O	CTACTTCAATTGCACCAGCACCATGAAG
Oq F	TTCGCATCCATTGTTCGCCG
Oq R	CGCCAAAGAAGGTGATGGTGGT
Act F	CGTTTCCGTTGCCAGAATTCC
Act R	TCAGCAATACCTGGGTACATG

1.4 PCR 扩增与 RACE 反应

取合成的 cDNA 2 μ L 为模板,加入 10 \times

Ex*Taq* DNA 聚合酶反应缓冲液 6 μ L(含 Mg²⁺), 10 mol/L 的正、反向引物各 1 μ L, 2. 5 mmol/L dNTP 6 μ L, 5 U/ μ L Ex*Taq* DNA 聚合酶 0. 5 μ L, 最后补充 ddH₂O 至 50 μ L,混匀离心(3 000 r/min)后,放入 PCR 仪扩增。PCR 反应程序: 94 ℃变性 4 min; 94 ℃ 30 s, 56 ℃ 45 s, 72 ℃ 45 s, 35 个循环; 循环完毕后,最后 72 ℃延伸 10 min。RACE 反应参照试剂盒说明书进行。扩增产物用 1. 2% 琼脂糖凝胶电泳检测并回收目的片段。

1.5 PCR 和 RACE 产物克隆与序列测定

RACE 产物经电泳回收纯化后,将 PCR 及 RACE 产物经回收纯化后与 pMD-19-T 克隆载体连接,然后将连接产物转化到感受态大肠杆菌 DH5 α 中,进行蓝白斑和氨苄青霉素筛选,重组质粒并经扩大培养,提取质粒 DNA 送交广州英骏生物技术有限公司测序。

1.6 数据库和分析软件

生物信息学分析主要应用的数据库为美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)GeneBank 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>)。蛋白质基本性质分析工具 ExPASy 数据库中的 ProtParam Tool(<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>),疏水性分析软件 ProtSca l 程序(<http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>),蛋白质信号肽预测工具 SignalP 3. 0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>),蛋白质磷酸化位点分析工具(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)。

1.7 序列分析与系统进化树构建

利用 Blast 在 NCBI 网站进行序列相似性比对分析,采用 Megalign 程序中的 Clustal W 多重序列比较程进行序列进化关系分析,并利用 MEGA 5. 0 软件中的 Neighbor-Joining 方法构建系统进化树^[13],系统发生树进行 1 000 次重复构建。

1.8 实时荧光定量 PCR

1)引物设计。在桔小实蝇 *Orco* 基因阅读框区设计多对特异性引物用于实时荧光定量 PCR 反应,根据 Livak 等^[14]的方法,对设计的特异性荧光定量引物进行筛选,获得符合要求的特异性引物 Oq F 和 Oq R,用于后续的实时荧光定量 PCR 反应。试验以 *Actin* 基因为内参基因,引物为 Act F、Act R。引物 Oq F、Oq R、Act F、Act R 序列见表 1。

2)实时荧光定量 PCR 反应。采用比较 Ct 值法的相对定量法,分析 *Orco* 在桔小实蝇不同发育阶段和不同组织中的表达量。PCR 反应在 TaKaRa TP900 型(日本 TaKaRa 公司产品)实时荧光定量 PCR 仪中进行。荧光定量 PCR 反应体系为 25 μ L,其中 cDNA 模板 1 μ L,SYBR mGreen Realtime PCR Master Mix 12.5 μ L,10 μ mol/L 上游和下游引物各 0.5 μ L,灭菌超纯水 10.5 μ L,混匀和离心(3 000 r/min)5 s 后放入 PCR 仪进行扩增。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,62 $^{\circ}$ C 退火 45 s,共 40 个循环。反应中以灭菌超纯水为阴性对照组,每个样本重复 3 次。利用 TaKaRa Thermal Cyclor Dice™ Real Time System Software (Version 4.01)进行数据记录分析,产生溶解曲线,收集循环数阈值,其中阈值线由软件自动设定。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行数据分析。

1.9 数据统计与分析

对实时荧光定量分析数据,采用邓肯氏新复极差检验法(DMRT)进行分析,比较各阶段相对表达量的差异。

2 结果与分析

2.1 *Orco* 基因的克隆与序列分析

依据昆虫非典型气味受体 *Orco* 基因的高度同源性特征,以桔小实蝇成虫的触角 cDNA 为模板,以 O-F 和 O-R 为上下游引物对 *Orco* 基因进行 PCR 扩增,鉴定得到 1 条约 487 bp 的特异条带,通过胶回收后连接到 pMD19-T 载体上并进行测序。将所得序列在 NCBI 核酸库中进行 Blast 分析,结果发现该序列与其他昆虫 *Orco* 气味受体的相似性很高,推测所获得的片段是桔小实蝇 *Orco* 基因 cDNA 片段的一部分。根据所得的 cDNA 部分片段设计 2 对特异引物 O-5'-outer 和 O-5'-inner、O-3'-outer 和 O-3'-inner 分别进行基因 5'端和 3'端序列的扩增,测序拼接后得到 *Orco* 基因的 cDNA 全长序列。为验证以上 PCR、3'-RACE 和 5'-RACE 片段是来源于同一个基因,设计了 1 对特异性引物 Full-F 和 Full-R,PCR 扩增得到了 1 条 1 422 bp 的特异性条带,测序结果与拼接序列一致,根据昆虫气味受体统一命名法命名为 *Bdor/Orco* (图 1)。桔小实蝇 *Bdor/Orco* 基因的 GenBank 登录号为 EU621792。

2.2 *Bdor/Orco* 基因序列的结构分析

桔小实蝇 *Bdor/Orco* 基因编码 473 个氨基酸,

ATG CAGC CCAG CAAA TATG TGGG CCTT GTGG CCGA CTT GATGC CCAA TATT CGT CTTAT G 60
M Q P S K Y V G L V A D L M P N I R L M 20
AAA TATT CGGG CTTA TTTA TGCA CAAT TTTA CCGG CGG TTCAG GCGT CTT C AAG AAGAT T 120
K Y S G L F M H N F T G G S G L F K K I 40
TAC TCAT CCGT ACAC TTGG TGCT GGGT CTGG TGCA ATT TCTGT TGAT ACTG GTG AATT T G 180
S S V H L V L V L V Q F L L I L V N L 60
GCG TTGA ATGC GGAG GAGG TGAA TGAG TTGT CCGG CAA CAGCA TTAC GGTG CTC TTCT C 240
A L N A E E V N E L S G N T I T V L F F 80
ACA CATA GCAT AACG AAAT TCAT CTAT CTGG CCGT GAG TCAGA AGAA CTC TAC AGAAC A 300
T H S I T K F I Y L A V S Q K N F Y R T 100
TTG AATA TCTG GAAT CAGG TAAA TTGC CATC CATT GTT CGCG GAGTC GGAC GCA CGCTAC 360
L N I W N Q V N S H P L F A E S D A R Y 120
CAT GCGA TCGC CCTC GCCA AGAT GCGC AAAC TATT CAC CTTGG TGAT GCTG ACG ACCGT C 420
H A I A L A K M R K L F T L V M L T I V 140
GCC TCGG CTGT GGCT TGGA CCAC CATC ACCT TCTT TGG CGAGA GTGT GAAG TTT GCIT T 180
A S A V A W T T I T F F G E S V K F A F 460
GAG AAGG AGAC CAAT TGCA CCAT CACC GTGG AAAT CCC GCGT T TGCC CATC AAG TCGT T C 540
E K E T N S T I T V E I P R L P I K S F 180
TAT CCAT GGAA TGCC GCGG CCGG CATG TTTT ATAT TAT AAGCT TCGC TTTT CAG TGCTAC 600
Y P W N A G A G M F Y I I S F A F Q C Y 200
TAT CTGC TTTT CTCG ATGG TGCA TCGG AACT TGTG CGA TGAT TTTT TTGC TCA TGCTG 660
Y L L F S M V H A N L C D V L F C S W L 220
ATT TTG CCGT CGAA CAGC TGCA ACAT CTGA AAGG CAT TATGA AGCC ATTA ATG GAGCT G 720
I F A C E Q L Q H L K G I M K P L M E L 240
TCA GCCT CGCT GGAC ACCT ATGC GCCA AAT TCGG GGC CCTCT TTGC TTCA TTA TCGCC C 780
S A S L D T Y R P N S A A L F R S L S A 260
AAC TCGA AGTC GGAA TTA TCAA CAAT GAGG AGAA AGA ACCCA CTGA TCTG GAC ATCAG C 840
N S K S E L I N N E E K E P T D L D I S 280
GGC GTCT ATAG CTCG AAAG CCGA TTGG GCGC CACA ATT TCGT GCCC ATGC ACT CTGCAA 900
G V Y S S K A D W G A Q F R A P S T L Q 300
ACC TTCA ATGG CATG AACG GTAC AAAT CCGA ATGG TTT GACCA GAAA ACAG GAA ATGAT G 960
T F N G M N G T N P N G L T R K Q E M M 320
GTG CGCA GCGC TATA AAAT ACTG GGTC GAGC GGCA TAA GCACG TGGT TCGA TTA GTGGC A 1 020
V R S A I K Y W V E R H K H V V R L V A 340
GCA ATTG GTGA CACT TAGC GCGG CGCT TTGT TGTG GCA CATGT TTGC ATGC ACC ATTAT G 1 080
A I G D T Y G G A L L L H M L T S T I M 360
CTG ACGT TGTT GGCA TATC AGGC CACC AAAA TCAC CGG CGTGA ATGC GTAC GCT TTCAC A 1 140
L T L L A Y Q A T K I T G V N A Y A F T 380
ACC ATGC GCTA CTGG GGCT ATGC CTGG GCGC AGGT ATT TCAT TCTG CATA TTT GGCAAC 1 200
T I G Y L G Y A L A Q V F H F C I F G N 400
CGG CTCA TTGA AGAG AGCT CATC TGTC ATGG AGGC AGC CTTAT CCGT CCAC TGG TATGA T 1 260
R L I E E S S S V M E A A Y S C H W Y D 420
GGC TCGG AGGA GGCC AAGA CTTT TGTG CAGA TCGT TTG CCAGC AGTG CCAA AAG GCGAT G 1 320
G S E E A K T F V Q I V C Q Q C K A M 440
TCC ATAT CCGG AGCG AAGT TCTT CACT GTCT CGCT GGA CTGTG TTGC ATCG GTT CTGGC 1 380
S I S G A K F F T V S L D L F A S V L G 460
GCT GTTG TCAC CTAC TTCA TGGT GCTG GTGC AAT GAA GTAG 1 422
A V V T Y F M V L V Q L K * 473

* 表示终止密码子,阴影部分表示预测的 14 个磷酸化位点。The stop codon is indicated with an asterisk, the shaded areas show the sites of phosphorylation.

图 1 桔小实蝇 *Bdor/Orco* 基因序列及其推导的氨基酸序列
Fig. 1 Nucleotide sequence and deduced amino sequences of *Bdor/Orco*

预测蛋白分子质量为 53.068 ku,等电点为 8.72。分子式为 C₂₄₃₆ H₃₇₅₇ N₆₀₇ O₆₆₈ S₂₆,其中碱性氨基酸(Arg+Lys)37 个,酸性氨基酸(Asp+Glu)31 个。利用 ExPASy 数据库中的 ProtScal 程序分析桔小

实蝇 *Bdor/Orco* 的疏水性图谱(图 2)。疏水性最大值为 3.044,最小值为-2.211。采用蛋白质信号肽预测工具 SignalP 3.0 Server,可知该基因不存在信号肽。利用 NetPhos 2.0 Server 磷酸化位点分析,结果表明分值 $Bdor/Orco > 0.5$ 的磷酸化位点有:丝氨酸(Ser)磷酸化位点 10 个,苏氨酸(Thr)磷酸化位点 2 个,酪氨酸(Tyr)磷酸化位点 2 个,共计有 14 个磷酸化位点,这些位点均匀分布于整个多肽链

中(图 1,图 3)。蛋白质的高级结构决定其生物学功能,而高级结构则由一级结构即氨基酸顺序决定。氨基酸的多肽链通过折叠和卷曲形成稳定的空间结构,从而形成特有的生物学活性及理化性质,据此笔者利用 GOR 在线工具完成蛋白质的二级结构预测。预测结果表明: α 螺旋占 52.85%,它们是 *Bdor/Orco* 最大量的结构元件;延伸链占 34.67%,散布在整个蛋白质;随机卷曲占 7.61%。

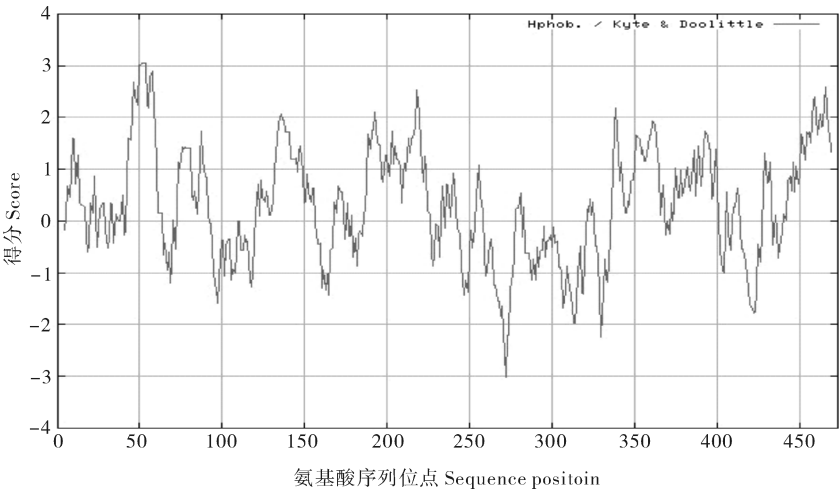


图 2 桔小实蝇 *Bdor/Orco* 基因氨基酸序列的疏水性分析

Fig.2 Hydrophobic character predication of the amino acid sequence of *Bdor/Orco*

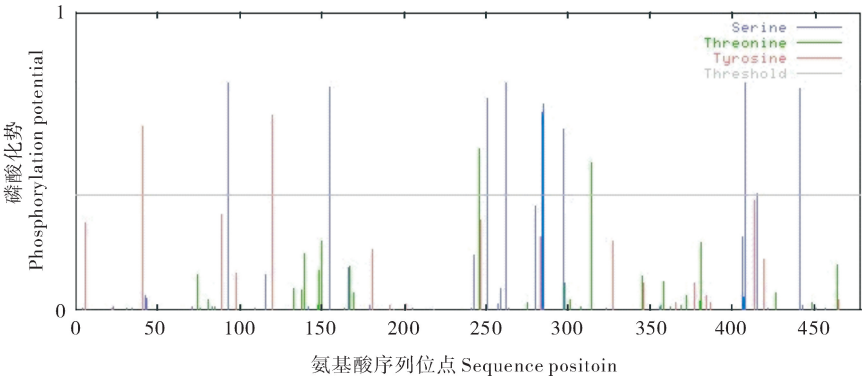


图 3 *Bdor/Orco* 氨基酸序列的磷酸化位点分析

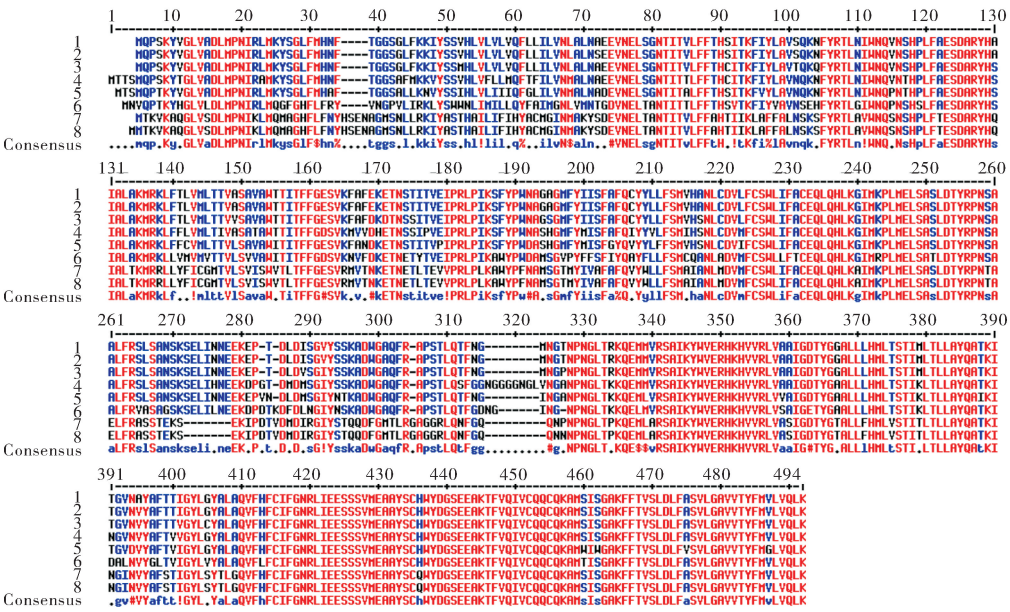
Fig.3 Phosphorylation site predication of the amino acid sequence of *Bdor/Orco*

2.3 *Bdor/Orco* 多序列比对与进化树分析

多序列比对分析表明昆虫种间 *Orco* 基因具有高度保守性。将 *Bdor/Orco* 氨基酸序列与已经报道的其他近缘昆虫的 *Orco* 氨基酸序列进行同源性比较,选取近缘种瓜实蝇 *Bactrocera cucurbitae* 和地中海实蝇 *Ceratitis capitata*、双翅目具有代表性的黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 和埃及伊蚊 *A.aegypti* 以及角蝇 *Haematobia irritans*、鳞翅目

的美洲棉铃虫 *Helicoverpa zea* 和烟蚜夜蛾 *H.viriplaca* 进行比对,结果显示这 8 种昆虫的 *Orco* 受体的 C 端序列在不同昆虫种间具有高度的保守性(图 4)。

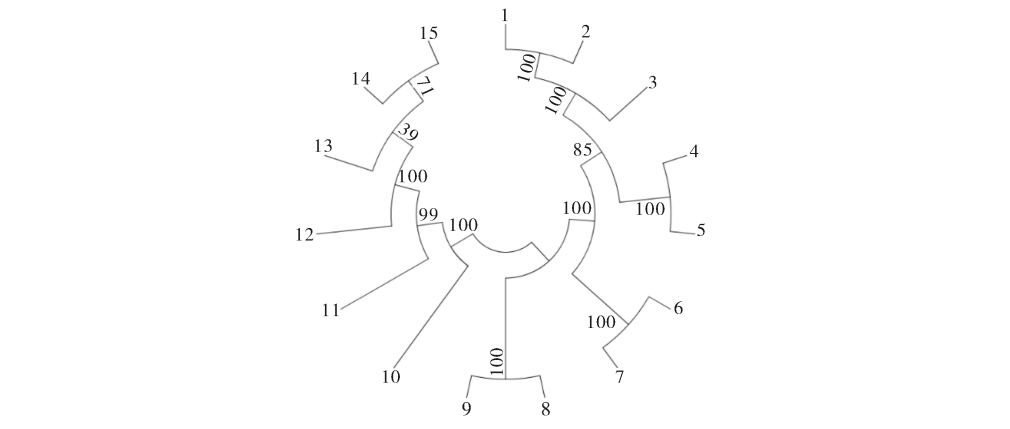
为研究 *Orco* 基因与其他物种之间的进化关系,采用 MEGA 5.0 软件中的邻位相连法构建系统进化树,对系统发生树进行 1 000 次重复构建(图 5)。由图 5 可知:不同物种之间的氨基酸序列差异较大;



1: 桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* (EU621792); 2: 瓜实蝇 *Bactrocera cucurbitae* (ADK97803); 3: 地中海实蝇 *Ceratitis capitata* (AAX14775); 4: 果蝇 *Drosophila melanogaster* (NP524235); 5: 角蝇 *Haematobia irritans* (ACF21678); 6: 埃及伊蚊 *Aedes aegypti* (XP001651426); 7: 美洲棉铃虫 *Helicoverpa zea* (AAX14773); 8: 烟蚜夜蛾 *Heliothis virescens* (CAD31851).

图 4 *Bdor/Orco* 与其他已知昆虫 *Orco* 氨基酸序列比对

Fig. 4 Amino acid sequence alignment of the *Bdor/Orco* with known *Orco* of insects



1: 桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* (EU621792); 2: 地中海实蝇 *Ceratitis capitata* (AAX14775); 3: 瓜实蝇 *Bactrocera cucurbitae* (ADK97803); 4: 果蝇 *Drosophila melanogaster* (NP524235); 5: 拟暗果蝇 *Drosophila pseudoobscura* (XP_001359364); 6: 角蝇 *Haematobia irritans* (ACF21678); 7: 厩螫蝇 *Stomoxys calcitrans* (ACF21677); 8: 埃及伊蚊 *Aedes aegypti* (XP001651426); 9: 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* (XP312379); 10: 小菜蛾 *Plutella xylostella* (ACX54944); 11: 灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis* (ABQ82137); 12: 烟蚜夜蛾 *Heliothis virescens* (CAD31851); 13: 美洲棉铃虫 *Helicoverpa zea* (AAX14773); 14: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (ADQ13177); 15: 烟实夜蛾 *Helicoverpa assulta* (ADQ13178).

图 5 桔小实蝇与其他物种基于 *Orco* 同源基因编码氨基酸序列的系统发育树

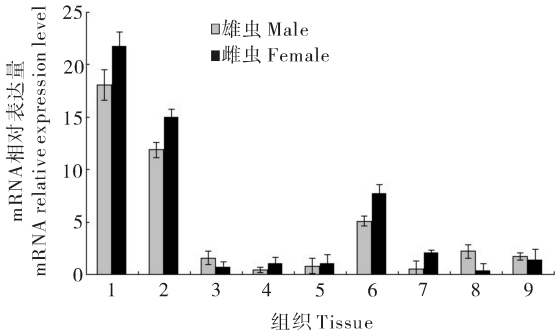
Fig. 5 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of *Orco* from *B. dorsalis* and other species

相同物种同一目昆虫之间的差异较小,其中 *Bdor/Orco* 与双翅目的地中海实蝇和瓜实蝇差异最小,与鳞翅目的烟实夜蛾差异最大。该进化树较好地反映了不同目昆虫之间的进化关系。

2.4 *Bdor/Orco* 表达谱分析

以桔小实蝇雌虫后足中的 *Bdor/Orco* mRNA 含量为基准含量,对不同组织中的 mRNA 含量进行分析(图 6)。由图 6 可知: *Bdor/Orco* mRNA 在

触角中的含量最高,在头部(去除触角)、雌虫前足和翅中也有较高的表达;在触角、头、翅、腹节、生殖节等 5 个不同组织中,*Bdor/Orco* mRNA 的含量表现出明显的性别差异特征,雌虫在头、触角、翅、腹节等组织的表达量均比雄虫高。



图中数据(平均值±SD)以雌虫后足表达量为基准含量,所示为 0.1 倍触角中的相对含量。Data (mean±SD) are normalized to the calibrator female hind leg, and one-tenth expression level in antenna is shown in this figure. 1:触角 Antenna; 2:头(去除触角)Head (with antennae removed); 3:胸 Thorax; 4:前足 Fore legs; 5:中足 Middle legs; 6:后足 Hind legs; 7:翅 Wings; 8:腹节(去掉生殖节)Abdominal segments (with genital segments removed); 9:生殖节 Genital segments.

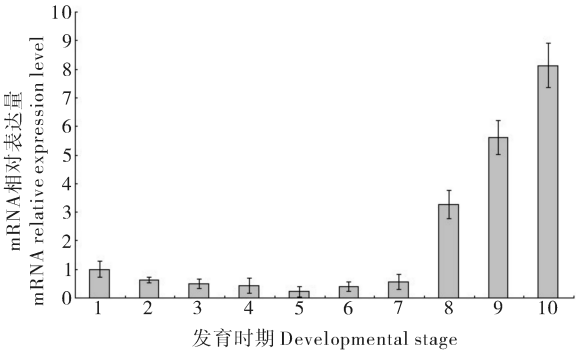
图 6 桔小实蝇成虫不同组织中 *Bdor/Orco* mRNA 的相对表达量

Fig. 6 Relative expression level of *Bdor/Orco* mRNA in different tissues of *B. dorsalis* adults

同时,以桔小实蝇卵的 *Bdor/Orco* 基因的 mRNA 含量为基准,对 *Bdor/Orco* mRNA 的表达量随不同发育时期的变化进行分析(图 7)。由图 7 可知:*Bdor/Orco* 在昆虫各发育阶段均有表达,但在卵、幼虫、蛹发育前期的表达量都较低;在第 10 天的蛹中,即羽化前其表达量出现大幅度增加,这与昆虫发育的生理规律基本一致;刚羽化的雌成虫的表达量高于雄成虫。

3 讨论

昆虫对成千上万种结构各异的气味分子的识别主要依赖于气味受体介导的气味分子与嗅觉神经的专一性结合^[15]。因此,研究气味受体的特性、变异及专一性对于阐明嗅觉识别的分子机制是非常重要的。从最初发现昆虫的气味受体开始,在了解受体家族的功能方面取得了很大进步,而且逐步发现了其嗅觉信号传递的功能。昆虫气味受体分为 2 类:



1:卵 Egg; 2:1 龄幼虫 1-instar larva; 3:2 龄幼虫 2-instar larva; 4:3 龄幼虫 3-instar larva; 5:1 d 的蛹 1 d-old pupa; 6:4 d 的蛹 4 d-old pupa; 7:7 d 的蛹 7 d-old pupa; 8:10 d 的蛹 10 d-old pupa; 9:新羽化雄虫 Newly-emerged male adult; 10:新羽化雌虫 Newly-emerged female adult.

图 7 桔小实蝇不同发育时期 *Bdor/Orco* mRNA 的相对表达量(以卵中的含量为基准)

Fig. 7 Relative expression level of *Bdor/Orco* mRNA in different development stages of *B. dorsalis* (normalized to the value in egg)

一类是普通气味受体,基因之间同源性很低,通过设计简并引物的方法很难获得成功,通过构建冈比亚按蚊触角 cDNA 文库进行筛选气味受体也未获得成功^[16];另一类为 *Orco* 蛋白,是一类非典型的气味受体,在不同昆虫嗅觉感觉神经元中普遍表达,并具有高度的保守性^[3]。本试验通过 RT-PCR 和 RACE 技术,成功地克隆并获得桔小实蝇 *Orco* 基因的全长,并分析了 *Bdor/Orco* 基因及其编码蛋白的基本结构特征和表达特点,研究结果可为今后进一步研究其生理功能和开发基于作用靶标的新型、高效、安全的昆虫行为调节剂等第 4 代杀虫剂提供理论依据。

蛋白是生命功能的体现者。在物种进化过程中,担负某一功能的蛋白在其一级结构及空间结构上会发生种属性分化。笔者利用日益完善的生物信息学技术对已测得的 *Bdor/Orco* 的核苷酸与蛋白质序列进行分析,以期研究实蝇蛋白质结构与功能的关系、发现类似功能基因、揭示基因起源与分子进化规律等提供理论依据。从该蛋白的多项分析结果可知,桔小实蝇与其他昆虫同类蛋白的相对分子质量、理论等电点、酸性与碱性氨基酸比例、极性与疏水氨基酸比例基本一致^[17-18],说明了昆虫 *Orco* 受体蛋白在分子进化过程中具有明显的保守性。另

外,从进化树中也可以看出,桔小实蝇与瓜实蝇和地中海实蝇的气味受体进化关系很近,而与已知的烟实夜蛾气味受体进化关系很远,这与它们在分类地位上的亲缘关系远近是一致的。同时,本试验结果还进一步说明 *Orco* 受体的氨基酸序列在 *Orco* C 末端具有高度保守的区域,这与 Miller 等^[19]的相关研究结果一致。由进化树可以看出,鳞翅目和双翅目昆虫的 *Orco* 受体分属于 2 个不同的大类,双翅目昆虫中实蝇科的 *Orco* 受体聚为一个亚类,与同一科的进化关系较近,也与果蝇科味觉受体有较大的同源性。但与其他鳞翅目的昆虫彼此聚类关系较远,表明高度保守的 *Orco* 受体随着物种的进化发生了一定的序列变异,这与张帅等^[17]和申建梅等^[20]的研究结果一致。

因不同细胞、不同组织在生物的生命活动中起到不同的作用,故对某一基因在细胞水平或组织水平的表达分布特征以及在整个生命周期中表达时序性特征的研究,能够为基因的功能分析提供参考依据。*Orco* 类受体主要表达于昆虫的触角、喙等嗅觉感受器较为丰富的器官中^[19],如棉铃虫、冈比亚按蚊、果蝇、烟蚜夜蛾等,这类非典型气味受体主要在其触角和喙等嗅觉器官中表达^[20-23]。桔小实蝇与瓜实蝇的非典型气味受体有很高的同源性,而且其表达谱也有很大的相似性^[22]。同时,通过实时荧光定量试验也得出与 Zheng 等^[24]相似的研究结果,证实了桔小实蝇的 *Orco* 主要表达在成虫的触角中。本试验还发现 *Orco* 在雌虫中的表达量要高于雄虫,推测这种雌雄差异表达的模式与雌虫的化学感受有某种联系^[13],这种差异还需要在对其功能进行研究后才能证实。*Orco* 不仅表达于桔小实蝇的触角、头部、前足组织中,而且在翅中也有较大量的表达,推测该基因编码的蛋白可能也参与了化学感受以外的其他生理活动过程。另外,在桔小实蝇的整个发育时期都能检测到 *Orco* 的表达,推测 *Orco* 可能参与昆虫的整个发育过程,具有嗅觉感受以外的其他功能,对这些功能的研究有助于全面了解其在桔小实蝇生命活动中的重要作用^[25]。

鉴于气味受体蛋白在昆虫嗅觉系统中识别化学信号分子的重要作用,昆虫非典型嗅觉受体已逐渐成为国内外研究的热点。本试验结果可为深入研究这类基因的进化与功能,以及应用于害虫的嗅觉干扰和行为调控奠定基础。相信随着研究的深入,通过气味受体功能与行为学研究结果的结合,能较完

整地解释昆虫取食、产卵、驱避和求偶的生化 and 分子机制,阐明害虫行为反应的本质原因,进而开发研制以 *Orco* 为药物靶标的新型害虫行为调控剂,为切断害虫的嗅觉识别途径、科学治理害虫提供新途径。

参 考 文 献

- [1] KRIEGER J, RAMING K, DEWER Y M, et al. A divergent gene family candidate olfactory receptors of the moth *Heliothis virescens* [J]. *European Journal of Neuroscience*, 2002, 16(4): 619-628.
- [2] SATO K, TOUHARA K. Insect olfaction: receptors, signal transduction, and behavior [J]. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 2009, 47: 121-138.
- [3] LARSSON M C, DOMINGOS A I, JONES W D, et al. Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction [J]. *Neuron*, 2004, 43(5): 703-714.
- [4] ENNISI E. Fruit fly odor receptors found [J]. *Science*, 1999, 283(5406): 12-39.
- [5] JONES W D, NGUYEN T T, KLOSS B, et al. Functional conservation of an insect odorant receptor gene across 250 million years of evolution [J]. *Current Biology*, 2005, 15(4): 811-812.
- [6] BOHBOT J, PITTS R J, KWON H W, et al. Molecular characterization of the *Aedes aegypti* odorant receptor gene family [J]. *Insect Molecular Biology*, 2007, 16: 525-537.
- [7] HILL C A, FOX A N, PITTS R J, et al. G protein coupled receptors in *Anopheles gambiae* [J]. *Science*, 2002, 298(5591): 176-178.
- [8] ROBERTSON H M, WANNER K W. The chemoreceptor superfamily in the honey bee, *Apis mellifera*: expansion of the odorant, but not gustatory, receptor family [J]. *Genome Research*, 2006, 16(11): 1395-1403.
- [9] SAKURAI T, NAKAGAWA T, MITSUNO H, et al. Identification and functional characterization of a sex pheromone receptor in the silkworm *Bombyx mori* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, 101(47): 16653-16658.
- [10] VOSSHALL L B, STOCKER R F. Molecular architecture of smell and taste in *Drosophila* [J]. *Annual Review of Neuroscience*, 2007, 30: 505-533.
- [11] 胡黎明, 申建梅, 胡美英, 等. 桔小实蝇二硫键异构酶基因的克隆及其发育表达[J]. *华中农业大学学报*, 2012, 31(4): 457-462.
- [12] 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.
- [13] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software Version 4.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24: 1596-1599.
- [14] 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: 402-408.

[15] BUCK L B, AXEL R. A novel multigene family may encode odorant receptor: a molecular basis for odor recognition [J]. Cell, 1991, 65: 175-187.

[16] BIESSMANN H, WALTER M F, DIMITRATOS S, et al. Isolation of cDNA clones encoding putative odourant-binding proteins from the antennae of the malarial transmitting mosquito *Anopheles gambiae* [J]. Insect Molecular Biology, 2002, 11 (2): 123-132.

[17] 张帅, 张永军, 苏宏华, 等. 中红侧沟茧蜂非典型气味受体的克隆及组织特异性表达[J]. 中国农业科学, 2009, 42(5): 1639-1645.

[18] 张帅, 张永军, 苏宏华, 等. 棉铃虫气味受体的克隆与组织特异性表达[J]. 昆虫学报, 2009, 52(7): 728-735.

[19] MILLER R, TU Z J. Odorant receptor C-terminal motifs in divergent insect species [J]. Insect Science, 2008(8): 1-10.

[20] 申建梅, 胡黎明, 宾淑英, 等. 瓜实蝇嗅觉受体基因的克隆及表达谱分析[J]. 昆虫学报, 2011, 54(3): 265-271.

[21] VOSSHALL L B, WONG A M, AXEL R. An olfactory sensory map in the fly brain [J]. Cell, 2000, 102: 147-159.

[22] 王桂荣, 吴孔明, 苏宏华, 等. 棉铃虫嗅觉受体基因的克隆及组织特异性表达[J]. 昆虫学报, 2005, 48(6): 823-828.

[23] VOSSHALL L B, AMREIN H, MOROZOW P S, et al. A spatial map of olfactory receptor expression in the drosophila antenna [J]. Cell, 2004, 96: 725-736.

[24] ZHENG W W, ZHU C P, PENG T, et al. Odorant receptor co-receptor *Orco* is upregulated by methyl eugenol in male *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) [J]. Journal of Insect Physiology, 2012, 58: 1122-1127.

[25] 胡黎明. 桔小实蝇气味结合蛋白基因的克隆及功能分析[D]. 广州: 华南农业大学资源环境学院, 2008.

Gene cloning and expression profiling of atypical odorant receptors
Orco gene in *Bactrocera dorsalis* (Hendel)

ZHAO Hai-ming YI Xin HU Mei-ying AN Guo-dong WANG Hui-dong HUANG Lin
Laboratory of Insect Toxicology, South China Agricultural University/Key Laboratory of Natural Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Guangzhou 510642, China

Abstract In order to explore the functions of *Orco*, the gene encoding *Orco* from *Bactrocera dorsalis* (Hendel) was cloned and named as *Bdor/Orco* (GenBank accession No. EU621792) by RT-PCR and RACE. The sequencing results showed that the open reading frame of *Bdor/Orco* was 1 422 bp in length, encoding 473 amino acid residues. The *Bdor/Orco* was analyzed and predicted by the tools of bioinformatics in the following aspects: the composition, hydrophobicity or hydrophilicity, the signal peptide, protein secondary structure, the composition of homologous protein and the phylogenetic relationship. The results showed *Bdor/Orco* had the characteristics of *Orco*, with special conserved C domains. Tissue expression pattern revealed that *Bdor/Orco* transcript was observed clearly in the antenna of *B. dorsalis*, and highly expressed in the head (with antennae removed), female foreleg and wing. The temporal expression pattern further indicated that *Bdor/Orco* was also expressed in different developmental stages at different expression levels with the highest level in newly emerged female adult.

Key words *Bactrocera dorsalis* (Hendel); odorant receptor; *Orco* gene; cloning; expression pattern

(责任编辑: 陈红叶)