

麦蛾气味受体 OrCo 基因的克隆及其表达模式分析

应益益¹ 马 敏¹ 陆 艳¹ 刘 灿¹ 李雪刚² 杨凤连¹

1. 华中农业大学植物科技学院/昆虫资源利用与害虫可持续治理湖北省重点实验室, 武汉 430070;
2. 华中农业大学理学院, 武汉 430070

摘要 采用 RT-PCR 和 RACE 技术, 克隆了麦蛾 *OrCo* 基因全长序列, 并将该基因命名为 *ScerOrCo*。序列分析结果显示, *ScerOrCo* 全长为 1 876 bp, 开放阅读框长 1 422 bp, 编码 473 个氨基酸, 序列中有 7 个跨膜区。*ScerOrCo* 基因的氨基酸序列与粘虫 *Mythimna separate* 嗅觉受体的同源性高达 87%。qRT-PCR 检测结果表明 *ScerOrCo* 只在麦蛾触角中特异性表达, 且雌雄虫间表达量无显著差异。

关键词 麦蛾; 气味受体; 基因克隆; 序列分析; 表达模式

中图分类号 Q 78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)01-0046-06

昆虫对外界环境因子的刺激反应主要依赖于昆虫灵敏的嗅觉系统, 其在昆虫很多行为反应中均起着极其重要的作用, 包括交配、产卵、寻找寄主和躲避天敌等^[1]。昆虫触角上的嗅觉感受器是昆虫与外界环境进行化学信息交流的最基本的结构单元, 通常受两个或多个嗅觉受体神经元(olfactory receptor neurons, ORNs)支配^[2]。每个嗅觉受体神经元可表达 1~3 个配体结合受体, 即传统的气味受体(odorant receptors, ORs), 并同时表达 1 个保守的共受体(olfactory receptor coreceptor, OrCo)^[3-5]。OrCo 在不同昆虫间均较保守, 属于非典型的气味受体, 尽管它并不感受气味分子, 但是在传统气味受体的合成、运输、定位及稳定存在等方面具有重要的作用, 且还能提高传统气味受体对气味分子的反应能力^[6-8]。

麦蛾 *Sitotroga cerealella* Olivier 是一种世界性的储粮害虫, 并被列为我国三大重要储粮害虫(麦蛾、玉米象 *Sitophilus zeamais*、谷蠹 *Rhizopertha dominica*)榜首。据报道, 麦蛾全年可发生多次危害, 尤其在热带地区可达到 12 代之多, 在受害严重的地区, 其所造成的粮食损失量可占总储粮量的 40% 以上^[9-10]。另外, 化学药剂的长期连续单一使用及施用方法不合理使得麦蛾的抗药性正在逐日提高^[11]。因此, 寻求一种安全有效的“绿色谷物保护剂”势在必行。近年来, 伴随着人类环保意识的增强以及生态文明的发展, 越来越多的研究工作者致力于利用害虫行为调节机制研究开发“昆虫行为调节剂”, 这已成为害虫治理研究的重要方向^[12]。麦蛾在寻求配偶和产卵场所等生殖行为中均需要与外界的信息交流, 而嗅觉传导在这些行为中则扮演着非常重要的角色^[13]。因此, 探索麦蛾的嗅觉机制有助于寻找切实可行的麦蛾防治方法。笔者采用 RT-PCR 技术和 RACE 技术, 成功获得了麦蛾非典型气味受体基因 *ScerOrCo*, 并分析了该基因的序列和表达模式, 以期为后期深入研究麦蛾的嗅觉识别机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

供试麦蛾均为华中农业大学资源昆虫研究所所长期饲养的品系。麦蛾种群均在养虫笼(长宽高: 30 cm×30 cm×30 cm)内饲养, 并且在其底部装约 3 cm 厚的小麦作为食物。养虫室的温度控制在 (28±1) °C, 相对湿度控制在 75%±5%, 光周期设置为 L:D=14:10。

1.2 主要试剂

RNA 提取试剂盒(产品货号: RN07)由北京艾德莱生物科技有限公司提供; LA Taq 酶、pMD18-T

收稿日期: 2017-07-31
基金项目: 中央高校基本科研业务费专项(2662015JC008; 2662017JC032)
应益益, 硕士研究生。研究方向: 昆虫生理及分子生物学。E-mail: 357435794@qq.com
通信作者: 杨凤连, 博士, 副教授。研究方向: 植物与昆虫互作机制。E-mail: yangfenglian@mail.hzau.edu.cn

vector、5'-Full RACE Kit、3'-Full RACE Core Set Ver.2.0、反转录试剂盒 (PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser) 和 SYBR Premix Ex *Taq* II 由宝生物工程(大连)有限公司提供; Trans 5 α 感受态细胞由北京全式金生物技术有限公司提供; 凝胶回收试剂盒 (Axygen DNA) 由爱思进生物技术(杭州)有限公司提供; 所有引物均由上海生工生物工程有限公司合成; 由华大基因生物技术公司提供测序服务工作。

1.3 引物设计与合成

比较已报道的鳞翅目昆虫气味受体 *OrCo* 基因的氨基酸序列, 首先在保守区设计了 1 对简并引物, 用于克隆 *OrCo* 基因的 cDNA 片段。再根据已获得的片段设计 3' 和 5' 端的引物。qRT-PCR 的引物由 Beacon Designer 7 软件设计。本研究中所使用的引物见表 1。

表 1 麦蛾 *OrCo* 基因克隆和表达引物

Table 1 Primers used in cloning and expression of <i>ScerOrCo</i>	
引物名称 Primer names	引物序列(5'-3') Primer sequences (5'-3')
Degenerate PCR	
OrCo-F1	AARGTNAARGCNGARGGNYT
OrCo-R1	ATYTTNGTNGCYTGRTANGC
Nested PCR	
5'OrCo Outer Primer	ACCGAAGCGAACAAATCCAG
5'OrCo Inner Primer	ATGGACGATACCAATCTCACAA
3'OrCo Outer Primer	ACCATCACCTTGACTCTGCTTGC
3'OrCo inner Primer	TCCCTGGATTTGTTTCGCTTCG
Quantitative real-time PCR	
OrCo-F2	GGCTCCTATTCTCAATGATGCTCGC
OrCo-R2	GAAGTCCTGCTGCGTGGAGTAGATG
GAPDH-F	CCATCAAGCAAAAGGTAAGGGAGG
GAPDH-R	TTGATGAGTGCGTGTCACCGAT

注: 表中简并引物的字母分别表示: Y = C/T; R = A/G; N = A/T/G/C。Note: DNA letter codes: Y = C/T; R = A/G; N = A/T/G/C.

1.4 麦蛾触角总 RNA 的提取

为了提高麦蛾触角总 RNA 的提取效率, 减少在试验过程中因触角细小而造成的损失, 本试验采用 RNA 小量提取试剂盒 RN07 进行提取。取 50~100 头初羽化的麦蛾, 在 -20℃ 条件下冷冻处理 5~10 min, 在冰上分别取麦蛾雌雄成虫的触角、头(去触角)、躯干、翅和足, 立即放入盛有液氮的离心管中(卵和幼虫直接放入离心管并在液氮中速冻), 待收集完全后用研磨棒进行研磨, 然后根据试剂盒说明书提取总 RNA。

1.5 反转录

以 1 μ g 麦蛾触角的总 RNA 为模板, 按反转录

试剂盒说明书合成 cDNA 第一链。此试剂盒中包含 gDNA 酶, 可以去除 gDNA 的干扰。

1.6 PCR 扩增和 RACE 反应

以本文“1.5”中合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应程序和具体步骤详见文献[14], 略有改动。50 μ L 的 PCR 反应体系: cDNA 为 2 μ L, 上/下游引物(10 μ mol/L)各为 2 μ L, 10 $\times$ LA PCR Buffer II (Mg²⁺ Free) 为 5 μ L, MgCl₂ 为 5 μ L, dNTPs (各 2.5 mmol/L) 为 8 μ L, LA *Taq* 酶(5 U/ μ L) 为 0.5 μ L, 再加双蒸水定容至 50 μ L。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 54℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 设置 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。

试验中的 5' 和 3' 端序列克隆分别参照宝生物工程(大连)有限公司的 5'-Full RACE Kit 和 3'-Full RACE Core Set Ver.2.0 试剂盒说明书。采用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 再利用爱思进生物技术(杭州)有限公司的胶回收试剂盒纯化回收目的片段。

1.7 PCR 产物克隆及测序

将回收的 PCR 产物连接至 pMD18-T 载体, 再转化到大肠杆菌 Trans 5 α 感受态细胞中, 经蓝白斑筛选并挑取阳性克隆子后交由华大基因公司测序。

1.8 序列分析

将获得的序列与 GenBank 中已有的序列进行 BLAST 比对分析, 最后通过序列拼接获得麦蛾 *OrCo* (*ScerOrCo*) 的基因全长。等电点和分子质量预测利用 ExPASyProtParam tool (<http://www.expasy.org>) 进行; 疏水性分析利用 ExPASyProtScale tool (<http://web.expasy.org/protscale/>) 进行, 并由 SignalP 4.1Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽; 最后利用 TM-HMM Server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 完成跨膜区域的预测。

1.9 qRT-PCR

20 μ L 的荧光定量 PCR 检测体系: cDNA 为 2 μ L, 上/下游引物(10 μ mol/L)各为 0.8 μ L, SYBR Premix Ex *Taq* II (2 $\times$) 为 10 μ L, 加双蒸水定容至 20 μ L。采用两步法 PCR 反应程序: 95℃ 预变性 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 30 s, 设置 40 个循环。熔解曲线条件为: 55℃ 30 s, 再以每个循环增加 0.5℃ 上升到 95℃。相对表达量采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算^[15]。采用甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因(glyceraldehyde-3-phos-

phate dehydrogenase, GenBank: KF513153) 作为内参基因进行标准化。利用统计分析软件 (SPSS 17.0) 对麦蛾不同组织间该基因的相对表达量进行单因素方差统计分析 (ANOVA), 并采用图基 (Tukey) 进行差异显著性分析 ($P < 0.05$)。

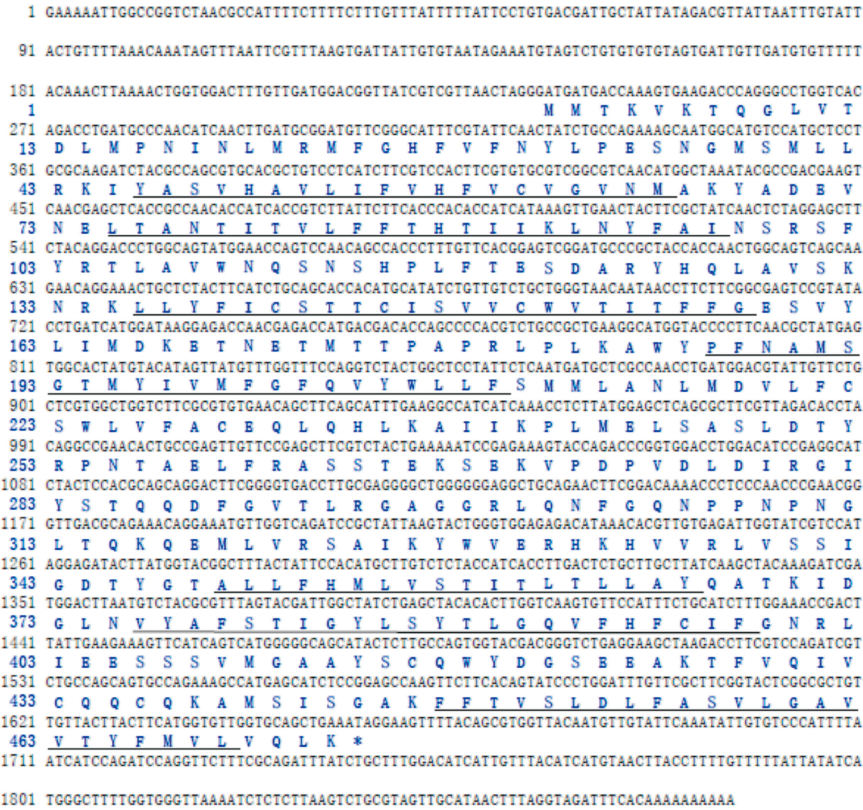
2 结果与分析

2.1 ScerOrCo 基因克隆

试验以麦蛾触角的 cDNA 为模板, 设计简并引

物进行 RT-PCR 扩增, 结果获得了 1 条 430 bp 左右的特异性条带。将获得的序列在 NCBI 上进行 BLAST 比对分析, 结果表明该片段与鳞翅目的非典型气味受体基因具有高度的相似性。

根据已获得的保守区序列分别设计 3' 和 5' 端的特异性引物, 进行 3' 和 5' RACE 反应, 测序后得到了长度分别为 291 bp 和 1 260 bp 的序列。通过序列拼接后最终获得了 ScerOrCo 全长序列 (GenBank 登录号: KF513149) (图 1)。



下划线表示预测的 7 个跨膜区; * 表示终止密码子。The predicted transmembrane regions are underlined; the asterisk marks the translation-termination codon.

图 1 ScerOrCo 核苷酸序列和推导的氨基酸序列

Fig.1 ScerOrCo sequences of nucleotide and inferred amino acid

2.2 序列分析

ScerOrCo 全长为 1 876 bp, 开放阅读框 1 422 bp, 编码 473 个氨基酸 (图 1)。预测的分子质量为 53.6 ku, 等电点为 8.54。信号肽预测分析表明 ScerOrCo 的 N-端没有信号肽、非分泌蛋白 (图 2)。ScerOrCo 总疏水性平均系数 GRAVY (Grand average of hydropathicity) 为 0.257, 表明该蛋白为疏水性蛋白 (图 3)。跨膜结构分析结果显示 ScerOrCo 有 7 个跨膜区, 分别是 C46-C65、C75-C97、C136-C158、C187-C209、C349-C366、C376-C398 和 C447-

C469 (图 4)。将推导的 ScerOrCo 氨基酸序列进行 BLAST 比对, 发现 ScerOrCo 与粘虫 *Mythimna separate* 嗅觉受体同源性最高, 同源性达 87%; 其次是棉铃虫 *Helicoverpa armigera*, 同源性达 86%。

2.3 ScerOrCo 的组织分布

qRT-PCR 结果显示 ScerOrCo 主要在麦蛾触角中表达, 在成虫其他组织中如不包括触角的头部、翅、足等的表达量非常少或不表达 (图 5), 而在其他生长发育阶段, 如卵和幼虫中有极微量的表达; 另

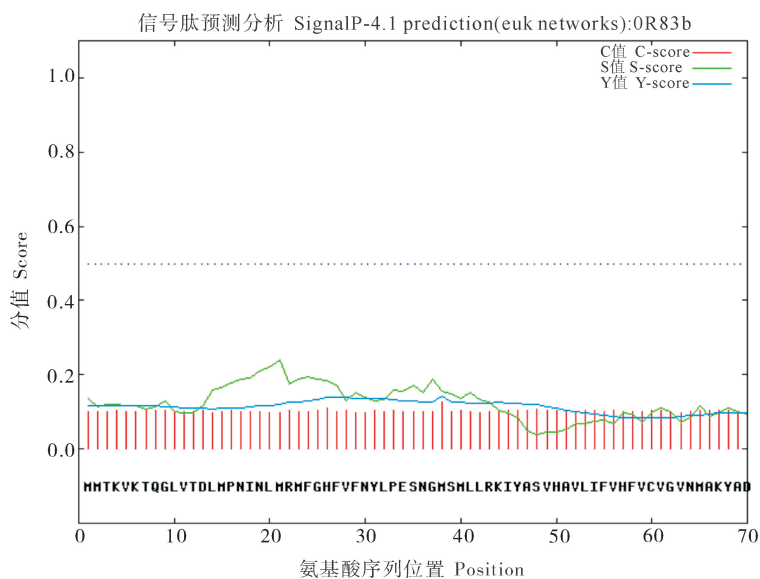


图 2 ScerOrCo 信号肽分析

Fig.2 The prediction of signal peptide of ScerOrCo

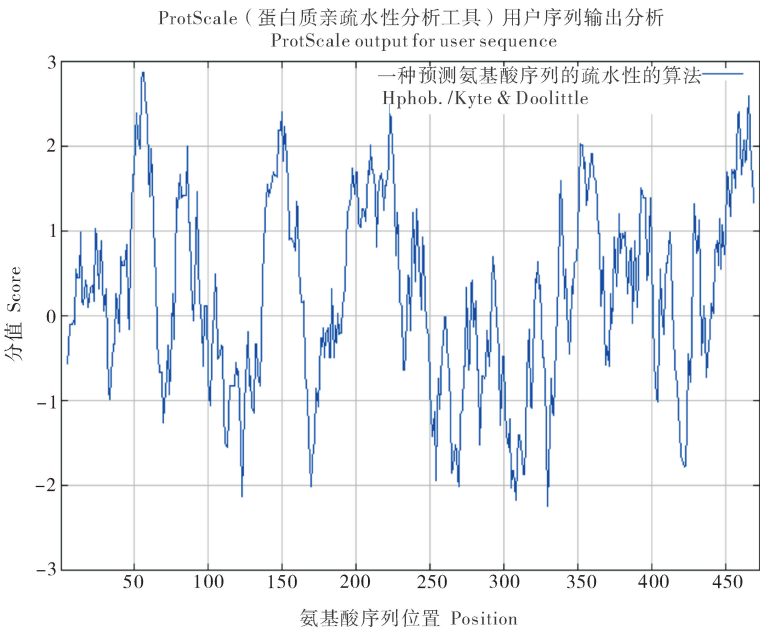


图 3 ScerOrCo 疏水性分析

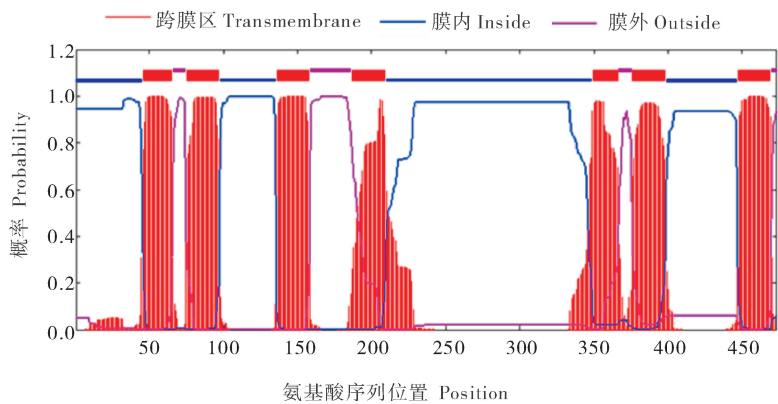
Fig.3 Analysis of the hydrophobicity of ScerOrCo

外, *ScerOrCo* 在雌蛾和雄蛾触角中的表达量相当, 差异不显著 ($P>0.05$)。

3 讨论

本文利用基因克隆技术获得了 *ScerOrCo* 基因全长, 并对其进行了序列分析。 *ScerOrCo* 与粘虫嗅觉受体的同源性高达 87%, 与棉铃虫嗅觉受体的同源性达 86%。 尽管经历了数百万年的进化分离, *OrCo* 基因在不同昆虫体内仍表现出高度的保守

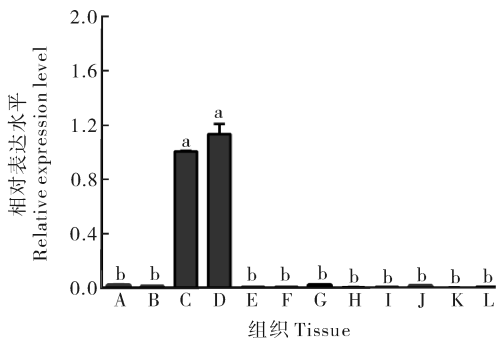
性^[16]。 *ScerOrCo* 具有 7 个跨膜区, 与其他文献报道结果一致^[17]。 虽然 *OrCo* 是一类有 7 个跨膜区的跨膜蛋白, 但是它并不是严格意义上的 G 蛋白偶联受体, *OrCo* 的 N-端在胞内, 而 C-端在胞外, 这一特征已在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 和冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 中得到证实^[18-19]。 *ScerOrCo* 主要在麦蛾成虫触角中特异性表达, 在卵和幼虫中表达量极少。 然而, *OrCo* 被发现可在豆荚草盲蝽 *Lygus hesperus* 和丝光绿蝇 *Lucilia sericata*



跨膜区 1(46~65); 跨膜区 2(75~97); 跨膜区 3(136~158); 跨膜区 4(187~209); 跨膜区 5(349~366); 跨膜区 6(376~398); 跨膜区 7(447~469)。Transmembrane region 1(46-65); transmembrane region 2(75-97); transmembrane region 3(136-158); transmembrane region 4(187-209); transmembrane region 5(349-366); transmembrane region 6(376-398); transmembrane region 7(447-469)。

图 4 ScerOrCo 跨膜区分析

Fig.4 Analysis of the transmembrane regions of ScerOrCo



图中误差线表示标准偏差;相同字母表示表达水平差异不显著($P>0.05$)。Error bars in the figure mean standard deviation; same letters indicate that the expression level was not significantly different ($P>0.05$). A:卵 Eggs; B:幼虫 Larvae; C:雌蛾触角 Female antennae; D:雄蛾触角 Male antennae; E:雌蛾头部 Female heads; F:雄蛾头部 Male heads; G:雌蛾翅 Female wings; H:雄蛾翅 Male wings; I:雌蛾足 Female legs; J:雄蛾足 Male legs; K:雌蛾虫体其余部分 Female remaining body; L:雄蛾虫体其余部分 Male remaining body.

图 5 qRT-PCR 分析麦蛾 *OrCo* 基因的表达模式

Fig.5 *ScerOrCo* expression level by qRT-PCR

的卵中表达^[16, 20]。另外, *ScerOrCo* 在雌雄虫中表达量无显著差异,类似的结果在豆莢草盲蝽 *Lygus hesperus* 中已见报道^[16]。

通过对麦蛾序列相似性、跨膜结构和表达模式进行分析,我们发现麦蛾的 *ScerOrCo* 受体与其他昆虫 *OrCo* 具有高度的保守性,这说明了该受体对于昆虫的正常生存具有非常重要的作用^[8]。麦蛾 *ScerOrCo* 受体的克隆和分析,为深入研究麦蛾气味

受体的功能,以及揭秘麦蛾的产卵和求偶的分子机制奠定了基础。从应用角度出发,这类在不同昆虫中高度保守的气味受体 *OrCo* 的发现无疑给“害虫行为调节剂”的开发和应用带来了新的机遇,若能成功干扰或者破坏 *OrCo* 的功能,势必能同时影响昆虫多个嗅觉受体正常功能的调控作用,并且这种技术一旦获得成功并能应用于生产实践中,即可同时防控多种近缘害虫,将具有广阔的应用前景。

参 考 文 献

[1] BRUYNE M, BAKERT C. Odor detection in insects; volatile codes [J]. Journal of chemical ecology, 2008, 34(7): 882-897.

[2] ALTNER H, PRILLINGER L. Ultrastructure of invertebrate chemo-, thermo-, and hygroreceptors and its functional significance [J]. International review of cytology, 1980, 67: 69-139.

[3] CLYNE P J, WARR C G, FREEMAN M R, et al. A novel family of divergent seven-transmembrane proteins; candidate odorant receptors in *Drosophila* [J]. Neuron, 1999, 22(2): 327-338.

[4] GROSSE-WILDE E, STIEBER R, FORSTNER M, et al. Sex-specific odorant receptors of the tobacco hornworm *Manduca sexta* [J]. Frontiers in cellular neuroscience, 2010, 4: 22.

[5] GROSSE-WILDE E, KUEBLER L S, BUCKS S, et al. Antennal transcriptome of *Manduca sexta* [J]. Proceedings of the national academy of sciences, 2011, 108(18): 7449-7454.

[6] LARSSON M C, DOMINGOS A I, JONESW D, et al. Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction [J]. Neuron, 2004, 43(5): 703-714.

[7] GE H, KRISHNAN P, LIU L, et al. A *Drosophila* nonvisual arrestin is required for the maintenance of olfactory sensitivity [J]. Chemical senses, 2006, 31(1): 49-62.

[8] GOLDMAN A L,VAN NATERS W V G,LESSING D,et al. Coexpression of two functional odor receptors in one neuron [J].*Neuron*,2005,45(5):661-666.

[9] 李正凡.怎样防治麦蛾 [J].*四川农业科技*,1982(6):28-29.

[10] YANG F L,ZHU F,LEI C L.Insecticidal activities of garlic substances against adults of grain moth, *Sitotroga cerealella* (Lepidoptera: Gelechiidae) [J]. *Insect science*, 2012, 19 (2): 205-212.

[11] BOSHRA S A.Effect of high-temperature pre-irradiation on reproduction and mating competitiveness of male *Sitotroga cerealella* (Olivier) and their F1 progeny [J].*Journal of stored products research*,2007,43(1):73-78.

[12] 陆宴辉,张永军,吴孔明.植食性昆虫的寄主选择机理及行为调控策略[J].*生态学报*,2008,28 (10):5113-5122.

[13] 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.

[14] 马敏.大蒜精油活性物质干扰麦蛾交配的分子机理研究[D].武汉:华中农业大学,2016.

[15] 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.

[16] HULL J J,HOFFMANN E J,PERERA O P,et al.Identification of the western tarnished plant bug (*Lygus hesperus*) olfactory co-receptor Orco; expression profile and confirmation of atypical membrane topology [J].*Archives of insect biochemistry and physiology*,2012,81(4):179-198.

[17] BENTON R.On the origin of smell:odorant receptors in insects [J].*Cellular and molecular life sciences*, 2006, 63 (14): 1579-1585.

[18] BENTON R,SACHSE S,MICHNICK S W,et al. Atypical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors *in vivo* [J].*PLoS biology*,2006,4(2):e20.

[19] TSITOURA P,ANDRONOPOULOU E,TSIKOUD,et al.Expression and membrane topology of *Anopheles gambiae* odorant receptors in lepidopteran insect cells [J].*PLoS ONE*,2010, 5(11):e15428.

[20] WANG X,ZHONG M,WEN J,et al.Molecular characterization and expression pattern of an odorant receptor from the myiasis-causing blowfly, *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) [J]. *Parasitology research*,2012,110(2):843-851.

Cloning and expression profile analysis of odorant receptor gene in *Sitotroga cerealella*

YING Yiyi¹ MA Min¹ LU Yan¹ LIU Can¹ LI Xuegang² YANG Fenglian¹

1.Hubei Insect Resources Utilization and Sustainable Pest Management Key Laboratory/
College of Plant and Science Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China ;
2.College of Science, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract In the present study, the full-length cDNA of the odorant receptor co-receptor gene was cloned from the antennae of *Sitotroga cerealella* (named *ScerOrCo*) by using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE). Sequence analysis revealed that the transcript consisted of 1 876 nucleotides and the open reading frame was 1 422 bp, encoding a peptide of 437 amino acids with 7 putative transmembrane domains. The deduced amino acid sequence of *ScerOrCo* shared the highest similarity with the olfactory receptor of *Mythimna separate* (87%). The results of quantitative real time RT-PCR showed that the *ScerOrCo* mRNA was expressed specifically in adult antennae and had no difference between female and male ($P>0.05$).

Keywords *Sitotroga cerealella*; odorant receptor; gene cloning; sequence analysis; expression patterns

(责任编辑:边书京)