

编码棉铃虫化学感受蛋白 cDNA 的克隆及序列分析

王桂荣, 吴孔明, 郭予元

(中国农业科学院植物保护研究所植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100094)

摘要: 从棉铃虫触角中克隆了一条全长 722bp 的 cDNA 序列, 命名为 *CSPHarm*。 *CSPHarm* 阅读框全长 381bp, 编码 127 个氨基酸残基, 推导的氨基酸序列具有昆虫化学感受蛋白的典型特征。 *CSPHarm* 与已报道的其它昆虫的化学感受蛋白的氨基酸序列有很高的同源性, 因此, *CSPHarm* 是一个编码棉铃虫化学感受蛋白的基因。 *CSPHarm* 具有强烈的亲水性, 但是在第 20~30 位的氨基酸组成一个亲脂性的结构, 这可能是结合亲脂性气味物质的区域。 半定量 RT-PCR 研究结果显示, *CSPHarm* 在棉铃虫头、胸、腹、足、翅和触角等组织中表达量都很高, 在不同组织中的表达量没有明显的区别, 在卵、幼虫、蛹和成虫体内也都有表达, 在卵中表达量相对较低, 在成虫体内表达量较高。

关键词: 棉铃虫; 化学感受蛋白; 基因克隆

Cloning and Sequence Analysis of a cDNA Encoding Chemosensory Protein in *Helicoverpa armigera*

WANG Gui-rong, WU Kong-ming, GUO Yu-yuan

(State Key Laboratory for Biology of Plant Disease and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094)

Abstract: A full-length cDNA, *CSPHarm*, was cloned from antennae of *Helicoverpa armigera*. The open reading-fragment of *CSPHarm* was 381bp, encoding 127 amino acid residues. This deduced amino acid sequence shared some common structural features with chemosensory proteins in insects. It also shared high identity with chemosensory proteins from other insects. Therefore, *CSPHarm* was a cDNA encoding chemosensory protein of *H.armigera*. *CSPHarm* displayed a strong hydrophilicity all along the molecular, except for the hydrophobic domain between residues 20-30, which was likely binding domain of hydrophobic compounds. Semi-quantitative RT-PCR analysis showed that *CSPHarm* was highly expressed in head, thorax, abdomen, leg, wing and antenna of *H. armigera*. No obvious difference at expressed level of *CSPHarm* among these tissues. *CSPHarm* was also expressed in egg, larva, pupae and adult and relatively low expressed in egg and highly expressed in adult.

Key words: *Helicoverpa armigera*; Chemosensory protein; Gene cloning

昆虫通过位于感受器内的专一性感觉神经原来识别外界环境中的气味分子和化学刺激, 昆虫所有类型的感受器都具有相似的结构: 具有特殊的表皮结构, 内部有一个或多个双级感觉神经元, 3 个附属细胞以及感受器淋巴液。感受器淋巴液是亲水性的液体, 充满了整个表皮壁以内的空间, 使所有的感觉神经原树突都浸浴于其中。因此外界脂溶性的气味分子或化学刺激不能直接通过水溶性的淋巴液到达感觉神经

原^[1]。目前在化学感受器淋巴液中已经发现两类水溶性蛋白能够作为气味分子和化学刺激物的载体, 一类是气味结合蛋白 (odorant binding proteins, OBPs), 气味结合蛋白序列中有 6 个保守的半胱氨酸残基, 具有相似的水溶性及次级结构, 能够溶解和运输气味分子到达神经受体^[2-5]。根据生理功能的不同, 气味结合蛋白分为性外激素结合蛋白 (pheromone binding proteins, PBPs) 和两类普通气味结合蛋白 (general

收稿日期: 2005-01-24

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(30330410)和国家“973”计划项目(G2000016208)资助

作者简介: 王桂荣(1972-), 男, 安徽宿松人, 博士, 主要从事昆虫生物化学和分子生物学研究。E-mail: wgrsun@163.com。郭予元为通讯作者, Tel: 010- 62894786; yuyanguo@hotmail.com

odorant proteins, GOBPs), 性外激素结合蛋白与性外激素的专一性识别有关, 而普通气味结合蛋白与普通气味分子的识别有关, 这两类蛋白均在昆虫触角中专一性表达^[6-8]。

感受器淋巴液中另一类水溶性蛋白是果蝇 OS-D 类似蛋白^[9,10], 也称作化学感受蛋白 (chemosensory proteins, CSPs)^[11]。这类蛋白与气味结合蛋白同源性质低, 序列中只有 4 个保守的半胱氨酸残基, 在昆虫各种化学感觉器官中表达, 推测可能在感受化学刺激的感受器中起着重要的作用^[12-16]。目前发现 CSPs 广泛存在于鳞翅目^[14,15,17]、膜翅目^[18,19]、蜚蠊目^[20,21]、竹节虫目^[12,16]和直翅目^[11]等昆虫中。本研究克隆了中国重要农业害虫——棉铃虫的一个 CSP 基因, 对棉铃虫不同发育时期和不同组织中 CSP 基因的表达进行了研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料和试剂

棉铃虫为本实验室用人工饲料饲养, 根据本研究需要取不同发育时期和不同组织部位的材料后, 立即放在液氮中冷冻, 然后置-70℃保存备用。T-easy 载体购自 Promega 公司, 限制性内切酶、*ExTaq* DNA 聚合酶和 3'-RACE 试剂盒购自 TaKaRa 公司, 5'-RACE 试剂盒购自 GIBCO BRL 公司。

1.2 棉铃虫不同组织总 RNA 的分离

根据 Wang 等^[7]的方法, 用 Trizol 试剂提取棉铃虫不同组织总 RNA (Life Techniques 公司产品)。

1.3 引物设计和合成

用 DNASIS 软件比较已报道的昆虫化学感受蛋白的氨基酸序列, 根据保守区 YTDKYDN 结合 PCR 引物设计原则设计了一条正向简并引物(CSPS), 用于 3'-RACE 扩增, 再根据 3'-RACE 的结果设计两条特异性引物(CSPa1 和 CSPrt)用于 5'-RACE 扩增。根据 5'-RACE 和 3'-RACE 测序结果设计了一对特异性引物用于扩增棉铃虫化学感受蛋白的全长阅读框, 为了便于将该基因亚克隆到表达载体上进行表达, 在引物上分别引入了 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切位点。引物在北京博亚生物技术有限公司合成。引物序列如下:

CSPS: 5'-TAYACNGAYAARTAYGAYAA-3'

CSPA1: 5'-AGCTCATTCTTGATCAGGTG-3'

CSPRT: 5'-CTTGGCAGCCAGCTC-3'

CSPF: 5'-CGC GGATCC GATGACAAGTACACGG
ACAA-3' *Bam*H I

CSPR: 5'-CGC GAATTC TTATTCGGGGATCTGGA
TGC-3' *Eco*R I

1.4 RACE 反应

RACE 反应参照 Wang 等^[22]稍作修改。3'-RACE 反应条件如下: 首先, 94℃变性 3 min; 接着利用降落 PCR 进行 19 个循环, 循环条件为 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 每个循环下降 0.5℃; 然后在以下条件下重复进行 19 个循环, 循环条件为 94℃ 30 s, 45℃ 30 s, 72℃ 1 min; 最后 72℃保温 10 min。5'-RACE 反应条件为: 94℃变性 3 min; 94℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 30 s; 72℃保温 10 min。扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检查, 回收目的片段。

1.5 RACE 产物的克隆、鉴定及序列测定

RACE 产物经电泳回收纯化后, 连接到 T-easy 载体上(按 Kit 说明进行), 然后转化大肠杆菌 *DH5α*, 挑取白色菌落, 培养后提取少量质粒(质粒提取参照 Sambrook 等^[23]的方法)用 *Eco*RI 酶切鉴定重组阳性克隆。挑选含有目的片段的阳性克隆, 放入含有 Amp100 μg·μl⁻¹ 的 LB 培养液震荡过夜, 碱法提取质粒, 采用 ABI377 全自动测序仪测序。

1.6 半定量 RT-PCR

半定量 RT-PCR 参考王桂荣等^[22], 以 1 μl cDNA 为模板, 加入 10×*ExTaq* 缓冲液 5 μl(含 Mg²⁺), 正向和反向引物各 1 μl(10 μmol·L⁻¹), 内标基因 18S RNA 的扩增引物各 1 μl (18SS: 5'-TTAGTGAGGTCTTCGG ACCG-3'和 18SR: 5'-CTTCCGCAGGTTCCCCTACG-3'), 2.5 mmol·L⁻¹ dNTP 4 μl, *ExTaq* DNA 聚合酶 0.25 μl (5 U·μL⁻¹), 加水至 50 μL。反应条件为: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 55℃ 1 min, 72℃ 3 min, 30 个循环; 72℃ 10 min。PCR 产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

以棉铃虫触角和足的 RNA 为模板, CSPS 和 3SITE 为引物进行 3'-RACE 扩增, 电泳回收 500~700 bp 的片段, 与 T-easy 载体连接, 转化大肠杆菌 *DH5α*, 根据蓝白斑筛选阳性重组子, 用 *Eco*RI 酶切进行鉴定, 确定重组子中含有目的片段, 然后进行测序, 测序结果在 NCBI 上利用 BLAST 进行同源搜寻, 结果表明一条 600 bp 左右的片段与昆虫的 CSP 高度同源。根据测定的这条序列设计了特异性引物进行 5'-RACE 反应, 结果得到了一条 300 bp 左右的特异性条带, 同样将这个片段连到 T-easy 载体上进行测序。

拼接 3'-RACE 和 5'-RACE 反应测序结果, 得到了

编码棉铃虫的 CSP 的 cDNA 序列(图 1), 命名为 *CSPHarm*, 推定的氨基酸序列位于核苷酸序列之下。序列拼接结果显示该序列全长 722 bp, 阅读框长 381 bp, 编码 127 个氨基酸残基, 前 16 个氨基酸是信号肽序列(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>), 预测成熟

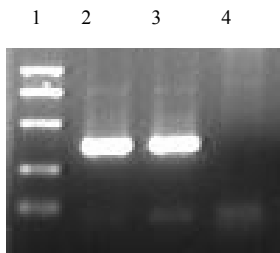
蛋白分子量为 12.96 kD, 等电点为 5.15。为了证明 3'-RACE 和 5'-RACE 片段是来源于同一个基因, 根据拼接的序列设计了一对特异性引物(CSPF 和 CSPR), PCR 扩增得到了一条特异性条带(图 2), 测序结果与拼接序列一致。

-49

5'-TCATTCGCTTCTTTCGATTACTGTTAACTAGACGAGCAAACGTGCATC	0
ATG AAA GTC CTG CTA GTA CTG TGC CTA TTC GCC GCG GCG GCC CTA GCT GAT GAC	54
Met Lys Val Leu Leu Val Leu Cys Leu Phe Ala Ala Ala Ala Leu Ala Asp Asp	
AAG TAC ACG GAC AAA TAT GAC AAT ATC AAC TTG GAC GAA ATC CTG GAA AAC AAA	108
Lys Tyr Thr Asp Lys Tyr Asp Asn Ile Asn Leu Asp Glu Ile Leu Glu Asn Lys	
CGA CTG CTG CTT GCG TAC GTC AAC TGT GTT ATG GAA AGG GGA AAG TGC AGT CCT	162
Arg Leu Leu Leu Ala Tyr Val Asn Cys Val Met Glu Arg Gly Lys Cys Ser Pro	
GAG GGC AAG GAG CTT AAA GAA CAT CTA CAA GAC GCG ATC GAG ACC GGC TGC TCA	216
Glu Gly Lys Glu Leu Lys Glu His Leu Gln Asp Ala Ile Glu Thr Gly Cys Ser	
AAA TGC ACA GAA GCT CAA GAG AAA GGC GCA TAC AAG GTC ATT GAG CAC CTG ATC	270
Lys Cys Thr Glu Ala Gln Glu Lys Gly Ala Tyr Lys Val Ile Glu His Leu Ile	
AAG AAT GAG CTG GAC ATC TGG CGC GAG CTG GCT GCC AAG TAC GAC CCC AAG GGA	324
Lys Asn Glu Leu Asp Ile Trp Arg Glu Leu Ala Ala Lys Tyr Asp Pro Lys Gly	
GAC TGG AGG AAG AAG TAC GAA GAC CGC GCG AGA GCC AAC GGC ATC CAG ATC CCC	378
Asp Trp Arg Lys Lys Tyr Glu Asp Arg Ala Arg Ala Asn Gly Ile Gln Ile Pro	
GAA TAA ACCCACAAATTAACATAAGCTAGCTAGATAGATTTTGATCACGCGATCGTCATTTGATGT	447
Glu -	
CATACGATCAACTTGATCGTTTAGCCAGTCTGTCTGAGCTATCTCAAATGCTCAATTTATCCTACTACTTT	519
TACTCATTATTTTTATTTCGTTGTTATTTCTTTTATTGTAATGCTGCTGAAAATTTGATATACCTTTGTAAT	591
TATTTTGCATGAACCTTATTGTCCTATTGTTTATTGTTTAATAAACCAAGAAATCCGCAAAAAAAAAA	663
AAAAAAAAA-3'	673

图 1 *CSPHarm* 基因的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *CSPHarm* gene



1. 标准分子量 DL2000; 2. 触角 cDNA 作为模板; 3. 足 cDNA 作为模板; 4. 蒸馏水代替 cDNA 作为模板
1. Molecular weight marker DL2000; 2. cDNA from antennae as template; 3. cDNA from leg as template; 4. No template

图 2 *CSPHarm* 基因的 PCR 扩增

Fig.2 PCR amplification of *CSPHarm* gene

利用 Kyte 和 Doolittle 等^[24]的方法对 *CSPHarm* 的氨基酸序列进行亲水性分析, 整个 *CSPHarm* 蛋白序列具有强烈的亲水性, 但是在第 20~30 位的氨基酸组成一个亲脂性的结构, 这一区域具有昆虫 CSPs 的保守结构--RLL--Y--C- (图 3), 这可能是结合亲脂性气味物质的区域(图 4-A)。二级结构预测结果表明, *CSPHarm* 与其它昆虫的 CSP 一样主要形成 α -螺旋, 而且 *CSPHarm* 与大多数昆虫 CSPs 一样, N 端相应位置的保守区(¹⁵-EIL-N-RLL--Y--C----³²)形成明显的 α -螺旋(图 4-B), 这一区域与以上提到的亲脂性区域重叠, 昆虫 CSPs 的这种结构使 CSPs 既能选择性结合亲脂性气味物质, 又能顺利穿过水溶性感受器淋巴液。

CSPHarm	MKVLVLCFLF.....AAAALA.....DDK...YTDK	23
CSP1Hvir	MA.....LA.....RPDGAAYTDK	14
CSP2Hvir	MKFIVAVALLC.....LVAVESWA.....AST...YTDK	25
CSP3HvirTDK	3
CSP1MbraEDK...YTDK	7
CSP1Bmor	MKVLIVLSCV.....LVAVLA.....DDK...YTDK	23
CSP1Msex	MKYLLVLCV.....VAAVVC.....DDK...YTDK	23
CSPAgam	MKLFV.....VVALSLVAVAA.....QDK...YTSK	24
CSPCcac	MMKTSLVLLCC.....LAAVLA.....RPSDT.YTDK	26
CSPLmigE EK...YTTK	7
P10	MKCVAVFVIVA...VVALAEARFRR.....DDK...YTTK	30
OS-DDmel	MGQPGFRRAIGHVSLVVALMCTTCFQVEGLPHPPATSPSPMMERMVEQAYDDK.F.....	54
CSPHarm	YDNINLDEILNKRLLLAYVNCVMERGK..CSPEGKELKEHLQDAIETGCSKCTEAQCEKG	81
CSP1Hvir	YDNVDLDEILSNRRLVLPYVKCILLDQGK..CAPDAKELKEHIIIEALENECGKCTEAQCKG	72
CSP2Hvir	WDNINVDEILESQRLLKAYVDCILDRGR..CTPDGKALKETLPDALENECSKCTEKQKAG	83
CSP3Hvir	YVNINLDEILNKRLLLAYVNCVMERGK..CSPEGKELKEHLQDAIETGCSKCTEAQCEKG	61
CSP1Mbra	YDNINLDEILANKRLLVAYVNCVMERGK..CSPEGKELKEHLQDAIENGCKKCAENQCEKG	65
CSP1Bmor	YDKINLQEILNKRLLESYMDCVLGGK..CTPEGKELKDHLQEALETGCEKCTEAQCEKG	81
CSP1Msex	YDNVNVDEILANERLLKGYVDCVLERGK..CTPEGKELKEHLRDAIETGCKKCTKQCEEG	81
CSPAgam	YDNINVDEILKSDRLFNGNYKCLLDQGR..CTPDGNELKRILPDALQTNCEKCEKQRDG	82
CSPCcac	YDNINIQEILNKRLLEAYVNCVLDKGG..CTPEGKELKEHLQEALETGCEKCTEAQCEKG	84
CSPLmig	YDNVNLDEILANDRLFDKYAQCILEDGESNCTADGKELKKAVPDALSNCAKCKNEKQCEG	67
P10	YDNIDLDEILASDRLLANYHKCLIEEGK..CTPDGEBLKSHVSDALQNDCAKCSDKQRAG	88
OS-DDmel	.DNVDLDEILNQERLLINYYTKCLEGTGP..CTPDAKMLKEILPDALQTDCTKCTEKQRYG	111
CSPHarm	AYKVIEHLIKNELDIWRELAAKYDPKGDWRKKYEDRARANGIQIPE	127
CSP1Hvir	TRRVIGHLNNNEADYWNELTAKFDPEKKYVQKYEKELKEVKA	114
CSP2Hvir	SDKVIRYLVNKRQDLWKELSAKYDPNNIYQDRYKDKIEAVKGQ	126
CSP3Hvir	AYKVIEHLIKNELDIWRELTAKYDPKGDWR..KYEDRARANGIQIPE	106
CSP1Mbra	AYRVIEHLIKNEIETWRELTAKYDPTGNWRKKYEDRAKAAGIVIPEE	112
CSP1Bmor	AETSIDYLIKNELEIWKELTAHFDPDGKWRKKYEDRAKAGIVIPE	127
CSP1Msex	ATKVIDFLIKNKLEVMRELVAKFDPEGKWRKKYEDRARANGIVIPE	127
CSPAgam	AIKVINYLQNRKQDQVLDVQKKBDEPNKYLEKYRQQAQKEGKIKLD	127
CSPCcac	AYTVIEHLIKNEIETWRQLADKFDPERKYRKKYEDRARAKGIEIPE	130
CSPLmig	TKKVLKHLINHKPDVWQKLKAKYDPDGTYSKKYEDREKELHQ	109
P10	ÆKVINFLYNKKKPMWESLQKKYDPENTYVTKYADRLLKELHD	130
OS-DDmel	ÆKVTRHLIDNRPTDWERLEKTYDPEGTYRIKYQEMKSKANEEP	155

星号表示 4 个保守的半胱氨酸残基

The four characteristic cysteines are indicated by asterisks

Heliothis virescens CSPs (CSP1Hvir, CSP2Hvir, CSP3Hvir)^[15], *Mamestra brassicae* CSP (CSP1Mbra)^[25], *B.mori* (CSP1Bmor)^[14], *Maduca sexta* CSP (CSP1Msex)^[26], *Anopheles gambiae* CSP (CSPAgam)^[27], *Cactoblastis cactorum* (CSPCcac)^[13], *Locusta migratoria* (CSPLmig)^[28], *P.americana* p10^[29], *Drosophila* OS-D^[9]

图 3 棉铃虫 CSPHarm 氨基酸序列与 CSP 家族其它蛋白氨基酸序列同源性比较

Fig. 3 Alignment of amino acid sequences of CSPHarm with other proteins of the CSP family

为了明确 *CSPHarm* 在棉铃虫体内的时空表达, 用半定量 RT-PCR (Semi-quantitative RT-PCR) 对棉铃虫不同组织和不同发育时期 *CSPHarm* 的表达量进行了分析, 结果显示, *CSPHarm* 在棉铃虫头、胸、腹、足、翅和触角等组织中表达量都很高, 在不同组织中的表达量没有明显的区别(图 5-A), 在卵、幼虫、蛹和成虫体内也都有表达, 在卵中表达量相对较低, 在成虫体内表达量较高(图 5-B)。

3 讨论

本研究克隆的基因推导的氨基酸序列具有昆虫化学感受蛋白的典型特征, 即序列中有 4 个保守的半胱氨酸残基(图 3), 呈酸性, 分子量在 13kD 左右, 并且 *CSPHarm* 与已报道的其它昆虫的化学感受蛋白的氨基酸序列有很高的同源性(表)。

CSPHarm 在棉铃虫体内的时空表达情况与棉铃虫气味结合蛋白在触角中专一性表达不同, 这可能与它们的功能有关, 因为棉铃虫主要通过触角感受外界的挥发性气味分子, 而对于化学刺激的识别除了触角

表 昆虫 CSP 的氨基酸序列同源性比较

Table The homology of CSP from insects (%)

	CSP Harm	CSP1 Hvir	CSP2 Hvir	CSP3 Hvir	CSP1 Mbra	CSP1 Bmor	CSP1 Msex	CSP Agam	CSP Ccac	CSP Lmig	P10
CSPHarm	-										
CSP1Hvir	55	-									
CSP2Hvir	51	51	-								
CSP3Hvir	98	56	54	-							
CSP1Mbra	86	56	49	86	-						
CSP1Bmor	72	54	43	73	72	-					
CSP1Msex	75	51	48	76	75	70	-				
CSPAgam	48	47	53	47	46	48	51	-			
CSPCcac	72	58	47	77	76	71	64	49	-		
CSPLmig	51	51	50	49	52	46	52	49	45	-	
P10	46	48	44	46	50	42	48	56	40	58	-
OS-Ddmel	43	43	38	46	45	38	43	49	37	46	48

外, 其它的组织如足和喙等, 因此, *CSPHarm* 除了在触角中表达外, 在其它的组织中也有表达。

迄今为止, 已经克隆了来自 5 个目的 10 种昆虫共计 40 多个 CSPs 基因, 很多昆虫中存在多个 CSP 基因, 对于 CSPs 基因的功能主要是通过基因的结构和分布进行的预测, 而能直接证明 CSPs 功能的研究很少^[25], 国内仅对直翅目的蝗虫进行过研究^[28]。本研究已将克隆的棉铃虫 *CSPHarm* 基因亚克隆到表达载体上进行了表达, 为研究该基因编码蛋白的空间结构及生理功能奠定了基础。

4 结论

本研究从棉铃虫触角中克隆了一个编码棉铃虫化学感受蛋白的基因, 虽然该基因推导的氨基酸具有强烈的亲水性, 但是在第 20~30 位的氨基酸组成一个亲脂性的结合结合亲脂性气味物质的区域。该基因在棉铃虫头、胸、腹、足、翅和触角等组织中表达量都很高, 在不同组织中的表达量没有明显的区别, 在卵、幼虫、蛹和成虫体内也都有表达, 在卵中表达量相对较低, 在成虫体内表达量较高。

References

- [1] Vogt R G. Biochemical diversity of odor detection: OBPs, ODEs, SNMPs. In: *Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology*. Edited by Blomquist G and Vogt R. Elsevier Academic Press. 2003: 392-445.
- [2] Vogt R G, Riddiford L M. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 1981, 293: 161-163.
- [3] Pelosi P, Maida R. Odorant-binding proteins in insects. *Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1995, 111(3): 503-514.
- [4] Sandler B H, Nikonova L, Leal W S, Clardy J. Sexual attraction in the silkworm moth: Structure of the pheromone-binding-protein-bombykol complex. *Chemical Biology*, 2000, 7: 143-151.
- [5] 王桂荣, 郭予元, 吴孔明. 昆虫触角气味结合蛋白研究进展. *昆虫学报*, 2002, 45(1), 131-137.
Wang G R, Guo Y Y, Wu K M. Progress in the studies of antenna odorant binding proteins of insects. *Acta Entomologica Sinica*, 2002, 45(1): 131-137. (in Chinese)
- [6] Steinbrecht R A, Laue M, Ziegelberger G. Immunocytochemical of pheromone-binding protein and general odorant-binding protein in olfactory sensilla of the silk moth *Antheraea* and *Bombyx*. *Cell Tissue Research*, 1995, 282: 203-217.
- [7] Wang G R, Wu K M, Guo Y Y. Cloning, expression and immunocytochemical localization of a general odorant-binding protein from *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, (33): 115-124.
- [8] Wang G R, Guo Y Y, Wu K M. Molecular cloning, bacterial expression of pheromone binding protein in the antenna of *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2004, 57(1): 15-27.
- [9] McKenna M P, Hekmat S D S, Gaines P, Carlson J R. Putative *Drosophila* pheromone-binding proteins expressed in a subregion of the olfactory system. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269:16 340-16 347.
- [10] Pikielny C W, Hasan G, Rouyer F, Rosbash M. Members of a family of *Drosophila* putative odorant-binding proteins are expressed in different subsets of olfactory hairs. *Neuron*, 1994, 12: 35-49.

- [11] Angeli S, Ceron F, Scaloni A, Monti M, Monteforti G, Minnocci A, Petacchi R, Pelosi P. Purification, structural characterization, cloning and immunocytochemical localization of chemoreception proteins from *Schistocerca gregaria*. *European Journal of Biochemistry*, 1999, 262: 745-754
- [12] Tuccini A, Maida R, Rovero P, Mazza M, Pelosi P. Putative odorant-binding protein and general odorant-binding protein in antennae and legs of *Carausius morosus* (Insecta, Phasmatodea). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1996, 26: 19-24.
- [13] Maleszka R, Stange G. Molecular cloning, by a novel approach, of a cDNA encoding a putative olfactory protein in the labial palp of the moth *Cactoblasts cactorum*. *Gene*, 1997, 202: 39-43.
- [14] Picimbon J F, Dietrich K, Angeli S, Scaloni A, Kriger J, Breer H, Pelosi P. Purification and molecular cloning of chemosensory proteins from *Bombyx mori*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2000, 44: 120-129.
- [15] Picimbon J F, Dietrich K, Kriger J, Breer H. Identity and expression pattern of chemosensory proteins in *Heliothis virescens* (Lepidoptera, Noctuidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2001, 31: 1173-1181.
- [16] Marchese S, Angeli S, Andolfo A, Scanloni A, Brandazza A, Mazza M, Picimbon J F, Leal W S, Pelosi P. Soluble proteins from chemosensory organs of *Eurycantha calcarata* (Insecta, Phasmatodea). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2000, 30: 1091-1098.
- [17] Nagnan-Le P, Cain A H, Jacquin-Joly E, Francois M C, Ramashadran S, Maida R, Steinbrecht R A. Chemosensory proteins from the proboscis of *Mamestra brassicae*. *Chemical Senses*, 2000, 25: 541-553
- [18] Danty E, Arnold G, Huet J C, Masson C, Pernollet J C. Separation, characterization and sexual heterogeneity of multiple putative odorant-binding proteins in the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidea). *Chemical Sense*, 1998, 23: 83-91.
- [19] Briand L, Swasdipan N, Nespoulous C, Bezirard V, Blon F, Huet J C, Ebert P, Penollet J C. Characterization of a chemosensory protein (ASP3c) from honeybee (*Apis mellifera* L.) as a brood pheromone carrier. *European Journal of Biochemistry*, 2002, 269(18): 4586-4596.
- [20] Kitabayashi A N, Arai T, Kubo T, Natori S. Molecular cloning of Cdna for p10, a novel protein that increase in the regenerating legs of *Periplaneta Americana* (American cockroach). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1998, 28: 785-790.
- [21] Riviere S, Lartigue A, Quennedey B, Campanacci V, Farine J P, Tegoni M, Cambillau C, Brossut R. A pheromone-binding protein from the cockroach *Leucophaea maderae*: cloning, expression and pheromone binding. *The Biochemical Journal*, 2003, 371: 573-579.
- [22] 王桂荣, 吴孔明, 梁革梅, 郭予元. 棉铃虫中肠钙粘蛋白基因的克隆、表达及 Cry1A 结合区定位. *中国科学*, 2004, 34(6): 537-546. Wang G R, Wu K M, Liang G M, Guo Y Y. Gene cloning, expression of cadherin in midgut of *Helicoverpa armigera* and its Cry1A binding region. *Science in China*, 2005, 48(4): 346-356.
- [23] Sambrook K J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nded Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 1989.
- [24] Kyte J, Doolittle R F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 1982, 157:105-132.
- [25] Jacquin-Joly E, Vogt R G, Francois M C, Naganan-Le P M. Functional and expression pattern analysis of chemosensory proteins expressed in antennae and pheromonal gland of *Mamestra brassicae*. *Chemical Senses*, 2001, 26: 833-844.
- [26] Robertson H M, Martos R, Sears C R, Todres E Z, Walden K K, Nardi J B. Diversity of odourant binding proteins revealed by an expressed sequence tag project on male *Manduca sexta* moth antennae. *Insect Molecular Biology*, 1999, 8(4): 501-518.
- [27] Biessmann H, Walter M F, Dimitratos S, Woods D. Isolation of cDNA clones encoding putative odourant binding proteins from the antennae of the malaria-transmitting mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology*, 2002, 11: 123-132.
- [28] Ban L, Scaloni A, Brandazza A, Angeli S, Zhang L, Yan Y, Pelosi P. Chemosensory proteins of *Locusta migratoria*. *Insect Molecular Biology*, 2003, 12(2): 125-134.
- [29] Nomura A, Kawasaki K, Kubo T, Natori S. Purification and localization of p10, a novel protein that increases in nymphal regenerating legs of *Periplaneta Americana* (American cockroach). *International Journal of Developmental Biology*, 1992, 36: 391-398.