

中华蜜蜂化学感受蛋白基因 *Acer-CSP1* 克隆与表达特征分析

李红亮^{1,2}, 倪翠侠^{1,2}, 姚 瑞¹, 高其康³, 商晗武^{1,2,*}

(1. 中国计量学院生命科学院, 杭州 310018; 2. 浙江省生物计量及检验检疫技术重点实验室, 杭州 310018;

3. 浙江大学昆虫科学研究所, 杭州 310029)

摘要: 化学感受蛋白 (chemosensory proteins, CSPs) 是昆虫化学感受系统中重要的组成部分之一。本研究克隆了中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 化学感受蛋白基因 *Acer-CSP1*, 其核苷酸全长 351 bp (GenBank 登录号为 FJ157352), 编码 116 个氨基酸残基, 预测蛋白分子量为 13.85 kD, 等电点为 4.89, 且含有 4 个保守的半胱氨酸残基, 均符合昆虫 CSPs 的一般特征, 且与意蜂 CSP1 基因具有 99.1% 的相似性, 与其他昆虫也有 45.3%~68.0% 的相似性。利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法及绝对定量法的 real-time PCR 技术对 *Acer-CSP1* 在中蜂不同器官表达特征进行了研究, 得出的一致结论为 *Acer-CSP1* 显著水平地高丰度表达于中华蜜蜂触角, 其次大量表达于头部。由于触角为中华蜜蜂最主要的嗅觉器官, 而头部则具有发达的感觉神经系统和味觉系统, 这也提示 *Acer-CSP1* 极有可能参与中华蜜蜂的嗅觉以及其他化学感受功能。

关键词: 中华蜜蜂; 化学感受蛋白; 克隆; DNA 序列分析; 表达谱

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2010)09-0962-07

Molecular cloning, characterization, and expression pattern of chemosensory protein 1 gene (*Acer-CSP1*) in the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae)

LI Hong-Liang^{1,2}, NI Cui-Xia^{1,2}, YAO Rui¹, GAO Qi-Kang³, SHANG Han-Wu^{1,2,*} (1. College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China; 2. Key Laboratory of Biometrology and Inspection & Quarantine of Zhejiang Province, Hangzhou 310018, China; 3. Institute of Insect Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: Chemosensory proteins (CSPs) are a class of the most important proteins involved in chemical communications and perception in insects. In this study, one CSP gene from the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana*, was cloned and characterized, which was named *Acer-CSP1* (GenBank accession no.: FJ157352). The *Acer-CSP1* cDNA was 351 bp in length, encoding 116 amino acid residues with the predicated molecular mass of approximately 13.85 kD and pI of 4.89, of which four conservative cysteines are included. With the general characteristics of the CSP gene family in insects, *Acer-CSP1* showed high similarity (99.1%) with the CSP1 gene of *A. mellifera* and moderate similarity (45.3%–68.0%) with the CSP genes of other ten insects analyzed with the deduced amino acid sequences. The expression of the *Acer-CSP1* in different sensory organs of *A. cerana cerana* was compared using both relative ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) and absolute quantitative analyses of real-time PCR. The results indicated that the *Acer-CSP1* was primarily expressed in the antennae, followed by the head, but least expressed in other organs (wings, legs, thorax, and abdomen). Since the antennae are the major olfactory organs and the head is the major sensory and gustatory organ of the honeybee, the results suggest that the *Acer-CSP1* gene is most likely involved in the olfaction, gestation and other chemosensory functions of the insect.

Key words: *Apis cerana cerana*; chemosensory proteins; molecular cloning; DNA sequence analysis; expression profile

化学感受 (chemoreception) 机制在昆虫的行为 生理过程中发挥至关重要的作用, 如通过嗅觉来获

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30900163); 浙江省自然科学基金项目 (Y307597)

作者简介: 李红亮, 男, 1981 年生, 河南新乡人, 博士, 副教授, 研究方向为昆虫分子生物学与化学生态学, E-mail: hlli@cjl.edu.cn

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: hwsang@cjl.edu.cn

收稿日期 Received: 2010-03-09; 接受日期 Accepted: 2010-06-18

悉食物、配偶乃至天敌所释放的挥发性信息物质, 而通过味觉来进一步甄别其中的刺激物从而引起取食和交配等行为 (Sanchez-Gracia *et al.*, 2009)。在这种化学感受机制中, 主要有两大类分子发挥作用: 一类主要在昆虫感受器外围发挥作用, 主要由气味结合蛋白 (odorant-binding proteins, OBPs) 和化学感受蛋白 (chemosensory proteins, CSPs) 组成; 另外一类为化学受体, 主要由嗅觉受体 (olfactory receptor, OR) 和味觉受体 (gustatory receptor, GR) 组成。各种分子形成一个有机整体, 共同在昆虫化学感受系统中发挥作用。

昆虫化学感受蛋白 (CSPs) 是一类生化上呈弱酸性的小分子蛋白, 1994 年首次在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 触角中发现, 当时描述为可溶性嗅觉特异蛋白 (olfactory specific-D, OS-D) (McKenna *et al.*, 1994) 和 A-10 (Pikielny *et al.*, 1994), 以有别于功能相对明确的气味结合蛋白 OBPs, 目前已经在鳞翅目、双翅目、膜翅目等 6 目 14 科 20 多种昆虫中发现 CSPs 的存在 (Wanner *et al.*, 2004), 且国内学者也对其逐渐关注 (王桂荣等, 2005; 蒋金炜等, 2006; 张志春等, 2009; 张帅等, 2009)。由于 CSPs 在分子结构、表达模式以及功能上均与 OBPs 存在较大的差异, 而有关 CSPs 的生理功能、作用机制等还有着众多疑问之处, 所以 CSPs 已成为昆虫学界目前的研究热点之一。

中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* (简称中蜂) 为原产中国的本土蜜蜂, 它较意大利蜜蜂 *Apis mellifera* L. (简称意蜂) 具有更灵敏的嗅觉、敏锐准确的鉴别能力和强烈的排异性, 能有效地利用零星蜜源, 并且作为意蜂主要寄生螨——狄斯瓦螨 *Varroa destructor* (Anderson and Trueman, 2000) 的原始寄主, 具有非常强的适应抗性。中蜂的这种排异行为以及抗螨过程均与其化学感受行为紧密相关, 故其化学感受蛋白 CSPs 也有可能参与了这一独特生理行为。目前已经在中蜂工蜂触角中成功克隆鉴定了一种化学感受蛋白 Acer-ASP3, 并且证明其不参与搜索蜜粉源等嗅觉活动, 但可能参与蜂巢内个体信息识别以及触角的机械运动 (Li *et al.*, 2007); 另外也对其时空表达进行了研究 (Li *et al.*, 2009)。本实验在上述研究的基础上, 利用 RT-PCR 技术成功地克隆了一个编码中华蜜蜂化学感受蛋白 CSP1 的基因, 并利用两种定量策略的 real-time PCR 技术对其在中蜂不同部位表达谱特征进行了综合鉴定和分析, 对研

究化学感受蛋白在中蜂排异及抗螨过程奠定了一定的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

中蜂工蜂 50 头取自浙江大学蜂场; pGEM-T Easy 载体购自 Promega 公司, 大肠杆菌 *Escherichia coli* Top10 为本室保存。主要试剂及工具酶: 总 RNA 提取试剂盒 TRIzol、Super-Script™ II 反转录酶购自 Invitrogen 公司, Super® Premix Ex Taq™ II 及 DNA marker DL2000 均购自 TaKaRa 公司, 质粒微量抽提与凝胶回收试剂盒购自 U-gene 公司, dNTP、T4 DNA 连接酶、X-gal、IPTG、氨苄青霉素等购自上海生工生物工程技术有限公司, 其他均为国产或进口分析纯试剂。

1.2 总 RNA 提取及 cDNA 第一链的合成

通过 Trizol 试剂提取和分离 50 头中蜂不同部位 (触角、头、胸、腹、足、翅) 的总 RNA, 按各部位 1 μg 并利用 Super-Script™ II 反转录获得 cDNA 第一链。

1.3 中蜂 CSP1 引物设计

根据 GenBank 中意蜂化学感受蛋白 CSP1 基因 (*Amel-CSP1*) 序列 (GenBank 登录号: DQ855482), 利用 Primer Premier 5.0 软件, 设计引物 CSP1 (表 1)。为方便以后将目的片段亚克隆至其他载体上, 在正反向引物上设计 BamH I、Hind III 双酶切位点。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.4 中蜂 CSP1 cDNA 的扩增、克隆和测序

以触角的 cDNA 第一链为模板, 用引物 CSP1 对其进行 PCR 扩增。降落 PCR 反应条件: 94℃ 预变性 3 min 后, 94℃ 变性 45 s, 65℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 1 min, 共进行 15 个循环, 每循环一次退火温度降低 1℃ 直至 50℃, 然后 94℃ 45 s, 50℃ 45 s, 72℃ 1 min 共进行 20 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。将 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳并割胶纯化, 克隆至 pGEM-T Easy 载体内后, 转化 Top10 感受态细胞, 最后将鉴定的阳性克隆菌送至上海英骏生物技术有限公司进行测序。

1.5 荧光定量 PCR 引物的设计

根据 1.4 中测序结果设计中蜂 CSP1 基因特异性引物 qCSP1 (表 1), 用来进行不同部位表达的定量分析; 根据 GenBank 中意蜂 β -actin 序列 (XM_623378) 设计内参引物 Be-Ac。

表 1 本研究所用中蜂 CSP1 基因引物列表

Table 1 Oligonucleotide primers used for the isolation and expression of the CSP1 gene in *Apis cerana cerana*

引物功能 Primer function	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence	退火温度(℃) Annealing temperature
基因克隆 Molecular cloning	CSP1-F	GCGGATCCATGCGCCATAATTAT	50
	CSP1-R	GGTAAGCTTTTATGCGCCTTCGTC	
	qCSP1-F	GCCCTTGTTTAACTCC	50
荧光定量 PCR Real-time PCR	qCSP1-R	CTTTATCATTATTTCCACGA	
	Be-Ac-F	TCCTGCTATGTATG TCGC2	53
	Be-Ac-R	AGTTGCCATTTCTCTGTTTC	

1.6 质粒标准品的制备

将 1.4 中阳性克隆接种于 LB 培养基中(含氨苄青霉素 50 mg/mL), 37℃ 过夜培养, 提取阳性克隆质粒, 紫外分光光度计对质粒 DNA 浓度进行分析, 根据质粒碱基长度计算得出单位浓度质粒所含目的基因拷贝数, 并倍比稀释 6 个浓度梯度(拷贝数分别为 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , $10^2/\mu\text{L}$), 进行绝对定量中标准曲线的制作。

1.7 中蜂 CSP1 基因的 real-time PCR 定量表达

利用 1.5 中设计的引物及 1.6 中制备的中蜂 CSP1 基因质粒标准品, 以 1.2 中提取的各部位 cDNA 为模板, 于 iQ5 real-time PCR 检测系统(Bio-Rad)上进行操作, 每一样品重复 3 次。PCR 扩增程序为 95℃ 预变性 3 min, 94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 40 s, 45 个循环, 72℃ 5 min; 最后以每 10 s 上升 0.5℃ 的速度从 50℃ 到 95℃ 记录熔解曲线。

1.8 数据统计与分析

分别根据相对定量和绝对定量的策略对于 CSP1 基因在中蜂各部位的表达谱进行分析。其中相对定量则依据各样品与其对应的 $\beta\text{-actin}$ 所得的 Ct 值, 利用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法(Livak and Schmittgen, 2001)进行分析, 而

绝对定量依据制作的标准曲线来计算出未知样本的精确拷贝数, 不同样本之间的差异显著性分析采用 ANOVA 方法进行($P\leq 0.05$, LSD 多重比较)。

2 结果与分析

2.1 中蜂化学感受蛋白 CSP1 基因 cDNA 扩增与克隆

以中蜂触角 cDNA 第一链为模板, 根据意蜂化学感受蛋白基因序列设计的 CSP1 引物进行 PCR 扩增后, 得到约 350 bp 的特异性 PCR 条带。将目的片段与 T 载体用 T4 DNA 连接酶进行连接后, 转化大肠杆菌 Top10, PCR 鉴定结果显示目的片段克隆成功, 最后送样测序。

2.2 序列测序结果与分析

中蜂 CSP1 cDNA 全长核苷酸序列如图 1 所示(推测的氨基酸序列位于核苷酸序列之下)。该目的基因全长为 351 bp(GenBank 登录号:FJ157352), 编码 116 个氨基酸残基, 其中 N 端 22 个氨基酸为信号肽序列, 预测蛋白分子量为 13.85 kD, 等电点为 4.89。且成熟肽序列中含有 4 个保守的半胱氨酸位点(图 1 圆圈所示), 以上特征均符合昆虫化学感受蛋白的一般特点。经 BlastX 分析显示, 其与意

ATGCGCCATAATTATATTGTAATATTAATATTATCTTTATTAACGTGGACATATGCTGAGGAACCTTATTCT
M R H N Y I V I L I L S L L T W T Y A E E L Y S
GATAAATATGATTATGTGAATATTGACGAAATTTAGCAAATGATCGTCTACGAAATCAATATTATGATTGT
D K Y D Y V N I D E I L A N D R L R N Q Y Y D
TTCATCGATGCAGGCCCTTGTTAACTCCGATTTCAGTATTCTTTAAAGTCACATAACAGAAGCGTTTCAA
F I D A G P L T P D S V F F K S H I T E A F Q
ACACAATGTAAAAATGACTGAAATTCAAAAACAACTTGGACAAATTAGCAGAATGGTTTACTACAAAT
T Q K K T E I Q K Q N L D K L A E W F T T N
GAACCAGAAAAATGGAATCATTTCTGTTGAAATAATGATAAAGAAAAAGACGAAGGCGCATAA
E P E K W N H F V E I M I K K K D E G A *

图 1 中蜂 CSP1(Acer-CSP1)核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequence of CSP1 gene from *Apis cerana cerana* (Acer-CSP1)

单下划线为预测的信号肽序列, 双下划线为终止密码子, 圆圈所示 4 个保守的半胱氨酸。The predicted signal peptide sequence is labeled by single underline, terminate codon is labeled by double underline, and 4 conservative Cys are labeled by circles.

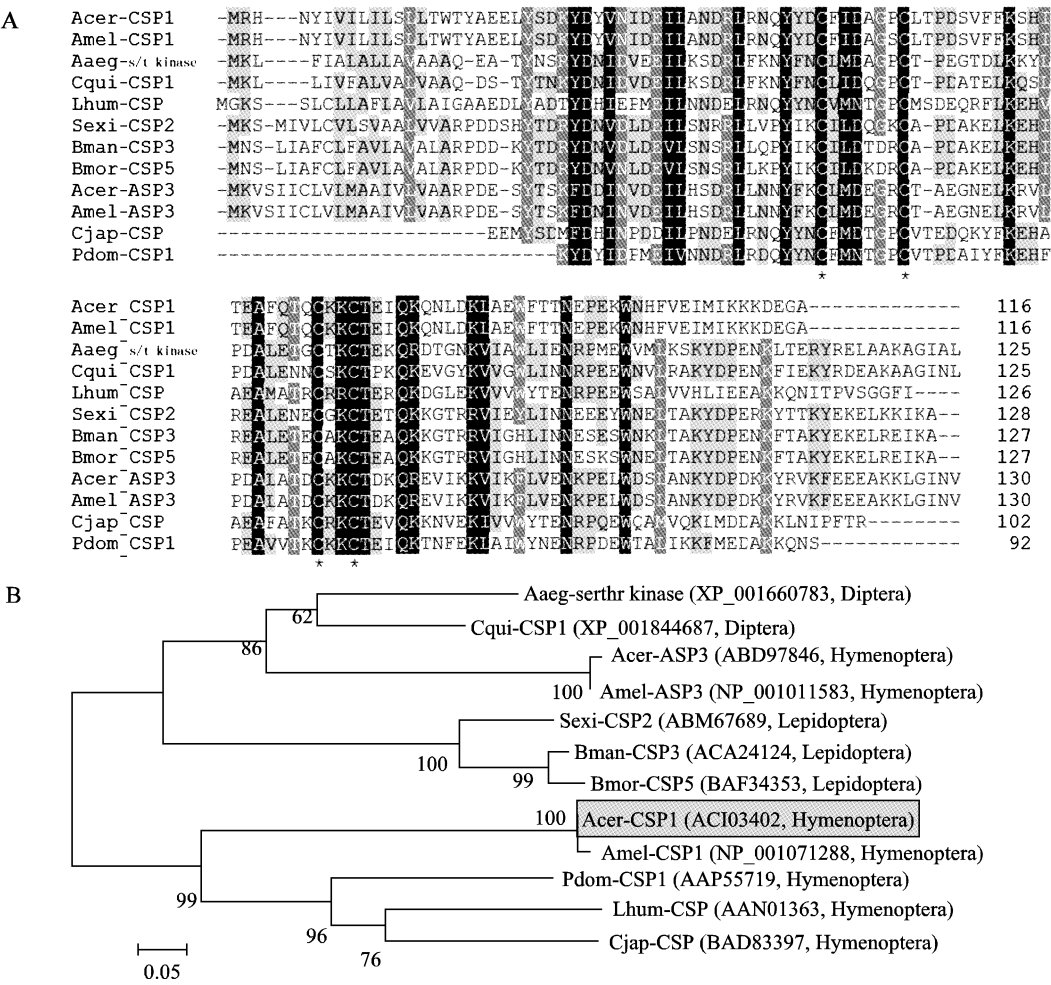


图 2 中蜂 CSP1 多序列联配 (A) 及系统发育树分析 (B)

Fig. 2 Alignment of the deduced amino acid sequence of CSP1 from *Apis cerana cerana* with homologous proteins from other insect species (GenBank BLASTP) (A) and the neighbor-joining (NJ) tree of their sequences (B)

Acer: 中华蜜蜂 *Apis cerana cerana*; Amel: 意大利蜜蜂 *Apis mellifera*; Aaeg: 埃及伊蚊 *Aedes aegypti*; Cqui: 致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus*; Lhum: 阿根廷蚂蚁 *Linepithema humile*; Sexi: 甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*; Bman: 野桑蚕 *Bombyx mandarina*; Bmor: 家蚕 *Bombyx mori*; Cjap: 日本弓背蚁 *Camponotus japonicus*; Pdom: 马蜂 *Polistes dominulus*.

蜂 CSP1 基因具有 99.1% 的相似性, 表明同源性较高, 故命名其为 *Acer-CSP1* 基因, 与其他昆虫也有 45.3% ~ 68.0% 的相似性。通过 ClustalW 进行多序列比对, 利用 N-J 法对 *Acer-CSP1* 及其相似序列进行进化树分析, 结果如图 2 所示, 与中蜂 CSP1 相似性较高的序列绝大多数为化学感受蛋白, 且均具有 4 个保守的半胱氨酸的典型 CSP 标志。另外中蜂 CSP1 与埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 的一种丝氨酸/苏氨酸激酶具有 37.8% 的相似性, 且该激酶亦具有 4 个保守的半胱氨酸的典型的 CSPs 结构 (图 2)。

2.3 基于 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法的 *Acer-CSP1* 的表达特征

利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法相对定量的策略, 对 *Acer-CSP1* 在中蜂不同器官内的表达进行定量分析, 结果表明, *Acer-CSP1* 和 β -actin 扩增产物为非常单一的两

个单峰, 表明扩增条件较好 (图 3), 数据分析表明, *Acer-CSP1* 在中蜂触角中的表达量最高, 其次在头部, 在其他部位似乎不表达 (图 4)。

2.4 基于绝对定量法的 *Acer-CSP1* 的表达特征

采用绝对定量策略进一步明确 *Acer-CSP1* 在中蜂各组织内部的具体拷贝数, 熔解曲线显示 *Acer-CSP1* 扩增情况良好 (图 5), 利用 6 个浓度梯度 (10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , $10^2/\mu\text{L}$) 制作标准线的相关系数为 0.986, 斜率为 -3.199, 表明线性程度较好, 符合绝对定量的要求 (图 6)。经计算和 ANOVA 方差分析 ($P \leq 0.05$, LSD 多重比较), *Acer-CSP1* 在中蜂不同器官的表达丰度如下: 触角表达量显著高于腹部和头部, 而后者则显著高于翅、胸和足 (图 7, 表 2)。

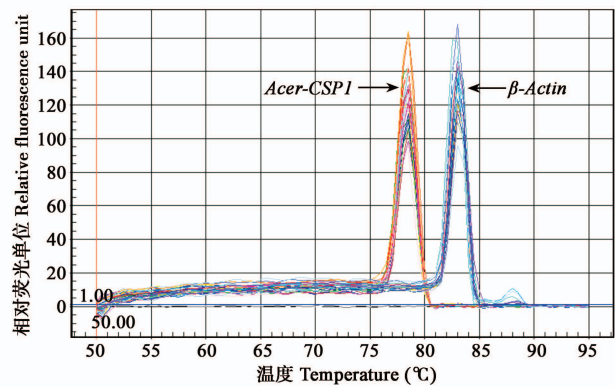


图3 *Acer-CSPI* 熔解曲线($2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法)

Fig. 3 Melting curve graph of real-time PCR of *Acer-CSPI* (method of $2^{-\Delta\Delta C_t}$)

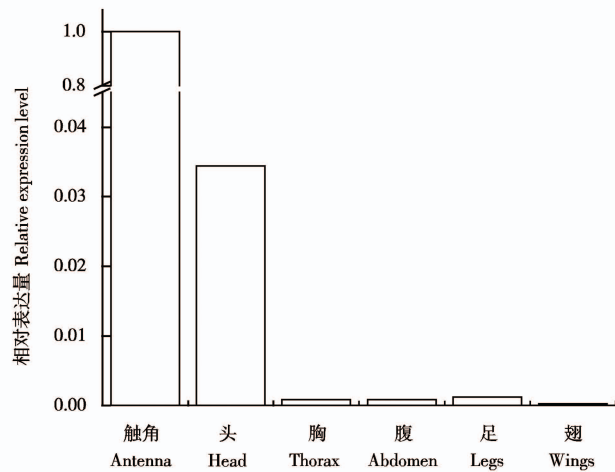


图4 *Acer-CSPI* 在不同器官的表达情况 (相对定量法)

Fig. 4 Transcription profiles of *Acer-CSPI* in various organs of *Apis cerana cerana* (method of relative quantitative analysis)

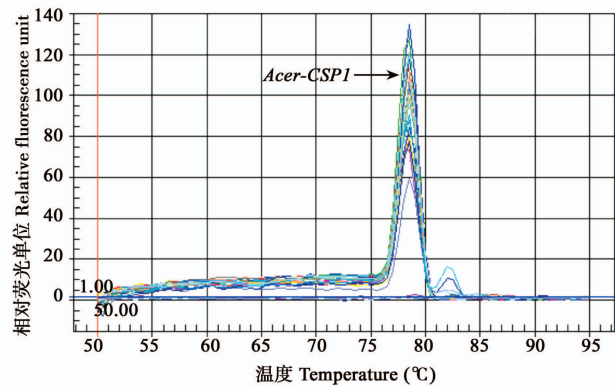


图5 *Acer-CSPI* 熔解曲线 (绝对定量法)

Fig. 5 Melting curve graph of real-time PCR of *Acer-CSPI* (method of absolute quantitative analysis)

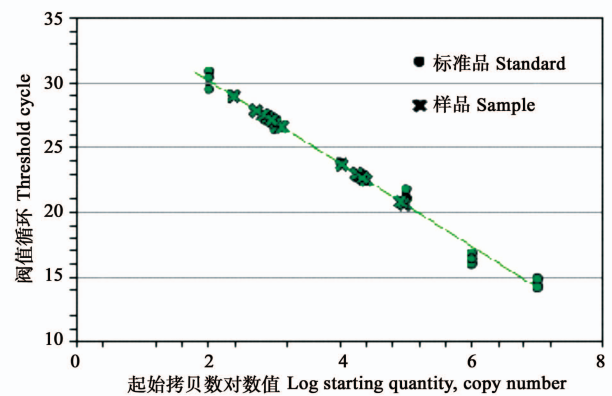


图6 *Acer-CSPI* 标准曲线 (绝对定量法)

Fig. 6 Standard curve of real-time PCR of *Acer-CSPI* (method of absolute quantitative analysis)

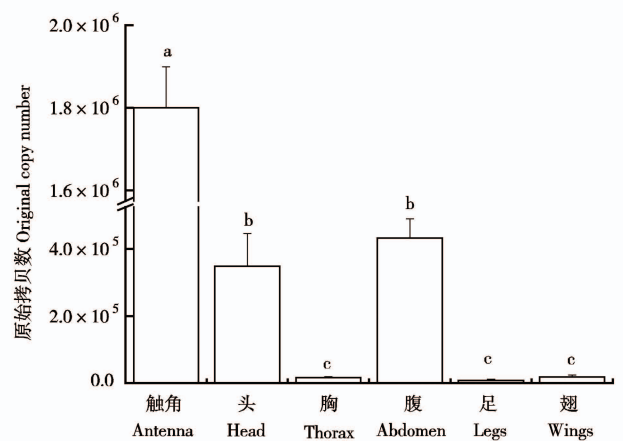


图7 *Acer-CSPI* 在不同器官的表达情况 (绝对定量法)

Fig. 7 Transcription profiles of *Acer-CSPI* in various organs of *Apis cerana cerana* (method of absolute quantitative analysis)

表2 *Acer-CSPI* 在不同器官的原始拷贝数

Table 2 Original copy number of *Acer-CSPI* in various organs of *Apis cerana cerana*

器官 Organ	拷贝数 Copy number (copies/ μ g)
触角 Antenna	$1.80 \times 10^6 \pm 9.89 \times 10^4$ a
头 Head	$3.48 \times 10^5 \pm 9.75 \times 10^4$ b
胸 Thorax	$1.70 \times 10^4 \pm 2.45 \times 10^3$ c
腹 Abdomen	$4.32 \times 10^5 \pm 5.72 \times 10^4$ b
足 Legs	$7.68 \times 10^3 \pm 4.05 \times 10^3$ c
翅 Wings	$1.82 \times 10^4 \pm 6.29 \times 10^3$ c

表中数据为平均值 $\pm$ 标准差, 数据后不同字母表示不同器官中基因拷贝数在 0.05 水平上差异显著 (LSD 多重比较)。Data are mean $\pm$ SD, and those followed by different lowercase letters indicate significant difference in gene copies among different organs at the 0.05 level (LSD test).

3 讨论

本研究通过 RT-PCR 技术对中华蜜蜂化学感受蛋白 CSP1 基因进行了全长克隆。基因全长为 351 bp, GenBank 登录号为 FJ157352, 且预测蛋白分子量为 13.85 kD, 等电点为 4.89, 并且含有 4 个保守的半胱氨酸位点(图 3), 以上特征均符合昆虫 CSPs 的一般特征, 且与意蜂 CSP1 基因具有 99.1% 的相似性, 与其他昆虫也有 45.3% ~ 68.0% 的相似性。进一步分析发现该蛋白与 *A. aegypti* 中参与信号转导的一种丝氨酸/苏氨酸激酶有一定的同源性(图 2: B), 提示 *Acer-CSP1* 有可能是从昆虫化学通讯中受体信号传递分子进化而来。

本研究采用了相对和绝对两种策略的 real-time PCR 技术, 以全面了解 *Acer-CSP1* 在中蜂不同器官的表达特征。其中 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法相对定量的策略表明, *Acer-CSP1* 在中蜂触角中的表达量最高, 其次在头部, 在其他部位似乎不表达; 绝对定量的结果表明, *Acer-CSP1* 在中蜂触角中表达量要显著高于腹部和头部, 且后者显著高于翅、胸和足(图 7, 表 2)。这两种策略虽然具体方法不同, 但得出的一致结论为 *Acer-CSP1* 丰度高且显著表达于中蜂触角, 大量表达于头部, 由于触角为中蜂最主要的嗅觉器官, 而头部则具有发达的感觉神经系统和味觉系统, 这也提示 *Acer-CSP1* 极有可能参与中蜂的嗅觉以及其他化学感受功能。另外两种方法均确定 *Acer-CSP1* 在工蜂胸、足和翅中表达丰度极低, 而对于腹部的表达特征上两种方法的迥然不同, 我们认为可能是由于腹部 β -actin 内参表达丰度较高而造成了相对定量上显示出来的低丰度效果。

从意蜂全基因组中已经发现了 6 个 CSPs, 其中半定量结果显示仅有 CSP1 与 CSP3 在触角中表达量较高(Forêt *et al.*, 2007), 采集蜂触角的蛋白质组学分析也验证了这一点(Dani *et al.*, 2010), 触角中的高丰度表达表明 CSP1 与 CSP3 极有可能参与意蜂的嗅觉反应。但在中蜂的 CSPs 中, *Acer-CSP1* 与另外一个中蜂化学感受蛋白 *Acer-ASP3* (与意蜂 CSP3 同源)的表达谱也存在一定差异, 如 *Acer-ASP3* 不仅高丰度地表达于中蜂触角, 更倾向于高丰度表达于中蜂的翅及胸腹部(李红亮等, 2009); 进一步研究表明, *Acer-ASP3* 在中蜂的嗅觉感器上不表达, 而却表达于触角上的机械感器(Li *et al.*, 2007), 以上也显示了中蜂不同化学感受蛋白功能

上的多样性。所以有这样一种假设, 即 CSPs 与编码不同类型气味结合蛋白的基因可能来源于同一前体, 而这类蛋白最早感知的气味范围较广, 以后这些气味识别蛋白通过进化, 被专业化性更高的 OBP 和 PBP 所代替(龚亮等, 2009)。但是该假设对于某些功能特殊的 CSPs 无法解释, 如意蜂 CSP5 仅特异性地表达于卵巢, 且参与了卵巢的发育(Maleszka *et al.*, 2007), 与气味识别根本无关。所以作者认为 CSPs 很可能作为一种信号传导通路中的一类分子, 才会经常表达于昆虫全身各部位, 导致功能复杂多样, 因为所在器官组织不同, 而似乎表现为一种功能的具体化。如本研究中的 *Acer-CSP1*, 其丰度高且显著表达于中蜂触角, 似乎作为气味识别分子参与了类似 OBP 的嗅觉分子运载功能, 但经同源性分析, 又有可能作为信号传递通路中的一类受体分子参与中蜂化学信息配体的嗅觉识别机理。所以本研究不仅丰富了昆虫化学感受蛋白功能的研究内容, 也为进一步研究中蜂独特化学感受生理学功能提供了新的思路。

参考文献 (References)

- Anderson DL, Trueman JWH, 2000. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Exp. Appl. Acarol.*, 24(3): 165–189.
- Dani FR, Iovinella I, Felicioli A, Niccolini A, Calvello MA, Carucci MG, Qiao H, Pieraccini G, Turillazzi S, Moneti G, Pelosi P, 2010. Mapping the expression of soluble olfactory proteins in the honeybee. *J. Proteome Res.*, 9(4): 1822–1833.
- Forêt S, Wanner KW, Maleszka R, 2007. Chemosensory proteins in the honey bee: insights from the annotated genome, comparative analyses and expressional profiling. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37(1): 19–28.
- Gong L, Chen Y, Cheng G, Zhong GH, 2009. Insect chemosensory proteins. *Chinese Bulletin of Entomology*, 46(4): 646–652. [龚亮, 陈永, 程功, 钟国华, 2009. 昆虫化学感受蛋白. 昆虫知识, 46(4): 646–652]
- Jiang JW, Gao SX, An SH, Wang CZ, 2006. Cloning and sequencing of cDNA encoding a chemosensory protein in the antenna of *Helicoverpa assulta* and its expression in *Escherichia coli*. *Acta Entomologica Sinica*, 49(5): 740–746. [蒋金炜, 高素霞, 安世恒, 王琛柱, 2006. 烟实夜蛾触角化学感受蛋白 cDNA 的克隆、序列分析及在大肠杆菌中的表达. 昆虫学报, 49(5): 740–746]
- Li HL, Lou BG, Cheng JA, Gao QK, 2007. The chemosensory protein of Chinese honeybee, *Apis cerana cerana*: molecular cloning of cDNA, immunocytochemical localization and expression. *Chinese Science Bulletin*, 52(10): 1355–1364.
- Li HL, Wang HY, Gao QK, Cheng JA, 2009. Spatio-temporal expressed analysis of two kinds of chemical communication related proteins in

- working bee of *Apis cerana cerana*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 17(1): 73–77. [李红亮, 王海燕, 高其康, 程家安, 2009. 中华蜜蜂两种化学通讯相关蛋白基因时空表达分析. 农业生物技术学报, 17(1): 73–77]
- Li HL, Zhang YL, Wang HY, Gao QK, Cheng JA, 2009. Spatio-temporal expression analysis of two kinds of chemical communication-related proteins in the worker bee *Apis cerana cerana* Fabricius (Hymenoptera: Apidae). *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology*, 6(2): 147–152.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Maleszka J, Forêt S, Saint R, Maleszka R, 2007. RNAi-induced phenotypes suggest a novel role for a chemosensory protein CSP5 in the development of embryonic integument in the honeybee (*Apis mellifera*). *Dev. Genes Evol.*, 217(3): 189–196.
- McKenna MP, Hekmat-Scafe DS, Gaines P, Carlson JR, 1994. Putative *Drosophila* pheromone-binding proteins expressed in a subregion of the olfactory system. *J. Biol. Chem.*, 269(23): 16340–16347.
- Pikielny CW, Hasan G, Rouyer F, Rosbash M, 1994. Members of a family of *Drosophila* putative odorant-binding proteins are expressed in different subsets of olfactory hairs. *Neuron*, 12(1): 35–49.
- Sanchez-Gracia A, Vieira FG, Rozas J, 2009. Molecular evolution of the major chemosensory gene families in insects. *Heredity*, 103(3): 208–216.
- Wang GR, Wu KM, Guo YY, 2005. Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding chemosensory protein in *Helicoverpa armigera*. *Scientia Agricultura Sinica*, 38(11): 2233–2239. [王桂荣, 吴孔明, 郭予元, 2005. 编码棉铃虫化学感受蛋白 cDNA 的克隆及序列分析. 中国农业科学, 38(11): 2233–2239]
- Wanner KW, Willis LG, Theilmann DA, Isman MB, Feng Q, Plettner E, 2004. Analysis of the insect os-d-like gene family. *J. Chem. Ecol.*, 30(5): 889–911.
- Zhang S, Zhang YJ, Su HH, Gao XW, Guo YY, 2009. Binding characterization of chemosensory protein MmedCSP1 in *Microplitis mediator* (Hymenoptera: Braconidae). *Acta Entomologica Sinica*, 52(8): 838–844. [张帅, 张永军, 苏宏华, 高希武, 郭予元, 2009. 中红侧沟茧蜂化学感受蛋白 MmedCSP1 的结合特征. 昆虫学报, 52(8): 838–844]
- Zhang ZC, Wang MQ, Zhang GA, 2009. Molecular cloning and expression characterization of a chemosensory protein gene *PxylCSP1* from the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Acta Entomologica Sinica*, 52(2): 140–146. [张志春, 王满囤, 张国安, 2009. 小菜蛾化学感受蛋白基因 *PxylCSP1* 的克隆和表达. 昆虫学报, 52(2): 140–146]

(责任编辑: 赵利辉)