

DOI:10.12403/j.1001-1498.20220608

杜仲梦尼夜蛾 CD36 家族同源基因克隆 与组织分布研究

黄星瑞^{1,2}, 杨洁¹, 邹洁^{1,2}, 文玺¹,
胡传豪¹, 张佑祥¹, 黄兴龙^{1,2*}

(1. 吉首大学 生物资源与环境科学学院, 湖南 吉首, 416000; 2. 吉首大学, 杜仲综合利用技术国家地方联合
工程实验室, 湖南 吉首, 416000)

摘要: [目的] 揭示杜仲梦尼夜蛾 CD36 家族同源基因神经膜蛋白 (SNMPs) 和 b 族清道夫受体 (SRb) 的序列特征和组织分布情况。[方法] 设计特异性引物克隆杜仲梦尼夜蛾 SNMPs 和 SRb 基因, 对这些基因编码的蛋白进行同源建模; 通过荧光定量 PCR 分析这些基因在不同组织的表达情况。[结果] 在杜仲梦尼夜蛾中鉴定得到 3 个 CD36 家族同源基因 (*OsonSNMP1*、*OsonSNMP2* 和 *OsonSRb1*); 这些基因编码的蛋白具有 2 个跨膜区域和 1 个细胞外结构域。空间结构预测发现, 这些蛋白的胞外结构域包含 1 个主要由反向平行 β -折叠构成的桶状核心和 1 个富含疏水性氨基酸残基的 α -螺旋; 荧光定量 PCR 结果表明, *OsonSNMP1*、*OsonSNMP2* 和 *OsonSRb1* 均在触角中大量表达; *OsonSNMP1* 在雄虫触角中的表达水平显著高于雌虫触角, *OsonSNMP2* 在雌虫触角的表达水平显著高于其他组织, *OsonSRb1* 在雄虫触角中大量表达外, 还在雌雄虫的口器中大量表达。[结论] 本研究发现 *OsonSNMP1*、*OsonSNMP2* 和 *OsonSRb1* 编码的蛋白具有与脊椎动物 CD36 家族受体类似的空间结构, 与嗅觉器官高度关联的表达模式表明这些基因可能在杜仲梦尼夜蛾嗅觉系统中发挥了功能, 以上结果为探究杜仲梦尼夜蛾 CD36 家族同源基因的嗅觉功能提供了数据。

关键词: 杜仲梦尼夜蛾; 嗅觉; CD36 家族; 神经膜蛋白; 清道夫受体 b 族

中图分类号: S763.42; Q963

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2023)05-0072-11

昆虫通过触角、口器等器官上的嗅觉感受器精准感知外界的化学信号^[1]。这些被感知信号的化学本质是由昆虫同类、寄主植物、天敌生物、有机环境等生物和非生物释放的挥发性化学分子, 因此嗅觉在昆虫同类交流^[2]、寻找寄主^[3-4]、繁殖后代^[5]、栖息越冬^[6]等多种行为中发挥了非常重要的作用。昆虫嗅觉感受器是一类形状多变的特化表皮结构, 常见的有毛形感受器、指形感受器、腔锥形感受器等。这些感受器表面有供分子进入的细微孔道, 基部有 1 个或多个感觉神经元。感觉神经元表面和周围分布的多种蛋白作为嗅觉感受的分子基础, 在昆

虫雌雄识别、寄主定位等活动中发挥了关键作用。

感觉神经膜蛋白 (Sensory neuron membrane proteins, SNMPs) 是一类在昆虫嗅觉器官中大量表达的膜蛋白, 在分子进化上与脊椎动物跨膜转运蛋白白细胞分化抗原 36 (Transmembrane transporter protein cluster of differentiation 36, CD36) 家族受体同源。脊椎动物 CD36 家族受体包含 2 个分别位于氮端和碳端的跨膜区域, 以及 1 个位于跨膜区域之间的细胞外结构域, 在细胞脂脂肪酸转运和代谢中发挥了重要作用^[7]。SNMPs 分

收稿日期: 2022-12-17 修回日期: 2023-01-15

基金项目: 国家自然科学基金 (32001320); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (S202010531001); 吉首大学校级科研项目 (Jdx20031)

* 通讯作者: 黄兴龙, 博士, 副教授。研究方向: 杜仲害虫防治和水生昆虫研究。E-mail: hxl@jsu.edu.cn

为 SNMP1 和 SNMP2 两个亚族, 与脊椎动物 CD36 家族受体类似, 也包含 2 个跨膜区域和 1 个细胞外结构域。在组织分布上, SNMPs 主要在触角、口器等嗅觉器官中表达, 在非嗅觉器官中表达量较低^[8]。原位杂交实验表明, 编码 SNMP1 的 mRNA 出现在昆虫嗅觉神经元中^[9]; 进一步的免疫标记实验发现, SNMP1 蛋白定位于嗅觉神经元细胞膜, 并且与感受雌虫释放性信息素的气味受体高度关联^[10]。基因敲除实验证实, SNMP1 基因是昆虫性信息素感受所必需的^[11]。Pregitzer 等^[12]在昆虫细胞系中共表达了烟芽夜蛾 SNMP1 和性信息素受体 HR13, 发现共表达 SNMP1 和 HR13 的细胞在性信息素刺激下产生的嗅觉电位反应显著高于单独表达 HR13 的细胞, 推测 SNMP1 能够显著提高性信息素受体对性信息素的敏感性。SNMP2 定位于嗅觉感受器支持细胞, 在嗅觉神经元中不表达^[9]。异源表达实验发现, SNMP2 的存在与否并不影响气味受体对气味分子的识别。但是鉴于 SNMP2 与嗅觉功能高度关联的表达模式和细胞定位, 推测该蛋白参与了气味分子被识别后的转移和清除过程^[13]。

B 族清道夫受体 (Class b Scavenger receptors, SRb) 是一类在昆虫和脊椎动物中都广泛存在的两次跨膜蛋白, 与 SNMPs 一样也具有 CD36 家族受体的空间结构特征, 包含 2 个位于细胞内的末端、2 个跨膜区域和 1 个位于跨膜区域之间的细胞外结构域。在脊椎动物中, SRb 主要作为脂类和脂蛋白受体, 参与了脂类、胆固醇、类胡萝卜素等有机化合物的识别和转运^[14]。对小鼠鼻腔黏膜 SRbs 的研究发现, 这些 SRbs 还参与了醛类气味分子的嗅觉识别^[15-16]。目前研究比较深入的昆虫 SRbs 主要来自果蝇、家蚕和蜜蜂; 这些 SRbs 在头部、丝腺、体壁、脂肪体、精巢、卵巢、马氏管等多种组织和器官中分布, 表达时期涵盖卵、幼虫、蛹和成虫, 参与了包括物质转运、细胞免疫、生长发育在内的多种生化进程^[17-20]。

杜仲梦尼夜蛾 (*Orthosia songi* Chen et Zhang) 隶属于鳞翅目 (Lepidoptera) 夜蛾科 (Noctuidae) 行军虫亚科 (Hadeninae)^[21]。该虫为单食性害虫, 只为害我国重要的药用植物杜仲 (*Eucommia ulmoides* Oliver)^[22]。交配后的杜仲梦尼夜蛾雌蛾通常选择杜仲嫩叶进行产卵, 孵化的幼虫直接以杜仲叶片为食。该虫食量大, 扩散蔓延

快, 为害时期长, 已经成为我国杜仲产业最具威胁的虫害之一^[23-25]。对其他夜蛾科昆虫的研究发现, 昆虫行为与嗅觉功能关系密切, 干扰昆虫对异性和寄主的嗅觉识别已发展成为重要的害虫无公害防治手段^[26]。SNMPs、气味受体等嗅觉蛋白在昆虫配偶识别、寄主选择等行为中发挥了重要作用, 探究昆虫嗅觉蛋白的功能和表达规律可以为开发针对昆虫嗅觉的害虫防治手段提供科学依据^[27]。本研究在杜仲梦尼夜蛾中鉴定得到 3 个 CD36 家族受体同源基因 (OsonSNMP1、OsonSNMP2 和 OsonSRb1); 这些基因编码的蛋白具有 2 个位于碳/氮端的跨膜区域和介于跨膜区域之间的胞外结构域; 胞外结构域具有 6~8 个保守的半胱氨酸残基, 并包含一个主要由反向平行 β -折叠构成的桶状核心; 定量 PCR 结果表明 OsonSNMPs 和 OsonSRb1 主要在嗅觉功能相关的器官中表达。本研究为研究杜仲梦尼夜蛾 CD36 家族同源基因的嗅觉功能提供了科学数据。

1 研究方法

1.1 试虫准备

杜仲梦尼夜蛾幼虫采自湖南省张家界市江垭林场, 带回实验室后置于恒温培养箱 (温度 27 ± 1 °C, 相对湿度 $70\% \pm 5\%$, 光周期 16L : 8D), 以新鲜的杜仲叶片饲养至成虫。幼虫化蛹后, 在体视镜下观察腹部生殖节判断雌雄。羽化 1~3 d 的成虫用于解剖获取触角、口器、胸、腹、足和翅, 其中触角、口器、足和翅分别来自 20 头雄虫和 20 头雌虫, 胸和腹分别来自 3 头雄虫和 3 头雌虫; 所有组织在液氮中保存直至 RNA 提取。

1.2 RNA 提取与 cDNA 合成

将杜仲梦尼夜蛾组织研磨成粉末, 使用柱式动物组织总 RNA 抽提纯化试剂盒 (生工, 上海) 进行 RNA 提取, 操作步骤按说明书执行; RNA 浓度和纯度在核酸蛋白测定仪 (Eppendorf, 德国) 测定。使用自带基因组 DNA 移除的 cDNA 合成试剂盒 (全式金, 北京) 进行 cDNA 第一链合成, 按照试剂盒说明书进行加样, 样品在 PCR 仪 (博日科技, 杭州) 中 42 °C 反应 15 min, 85 °C 加热 5 s 终止反应; 合成的 cDNA 在 -20 °C 保存。

1.3 生物信息学分析

从我们前期获得的杜仲梦尼夜蛾转录组数据中

筛选注解为“Sensory neuron membrane protein”和“Class b Scavenger receptor”的基因。使用 Primer Premier 软件将基因翻译成蛋白质序列。使用 NCBI 网站的 BlastP 服务 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行相似蛋白序列搜索。采用 ProtParam tool 在线工具 (<https://web.expasy.org/protparam>) 对蛋白质分子量和理论等电点进行预测; 蛋白跨膜区域采用 DTU Health Tech 网站的跨膜区域预测服务 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>) 进行预测; 疏水性预测采用 expasy 在线工具 (<https://web.expasy.org/protscale/>)。蛋白质胞外结构同源建模使用 Swiss-model 线上服务 (<https://swissmodel.expasy.org/>), 预测的蛋白空间结构使用 Visual

Molecular Dynamics 软件呈现和展示重要氨基酸残基。预测的 SNMP 结构与系统发育分析使用 MEGA5.0 软件, 采用步长法构建邻接树, 重复 1 000 次^[28]。

1.4 基因克隆与实时荧光定量 PCR

使用 Primer Premier 软件设计特异性引物进行基因克隆 (表 1); PCR 反应体系包含 12.5 μL 2xTaq MasterMix (康为世纪, 北京), 上下游引物各 1 μL , cDNA 模板 1 μL , 灭菌水 9.5 μL 。反应程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 然后 35 个循环的 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后送生物公司测序 (生工, 上海)。

表 1 本研究中使用的引物
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer	引物序列 Sequence	备注 Note
OsonSNMP1c-F	ACAACGGACACCTTCAAAGAAAGCGA	基因克隆
OsonSNMP1c-R	CCATACGATCGCCAAGCTCAGGAGT	基因克隆
OsonSNMP2c-F	TAAAAAGTGAAAAAGTAAAGTAAAAAGTGTTC	基因克隆
OsonSNMP2c-R	TTCCATCAATTGCCTTTATTAACCT	基因克隆
OsonSRb1c-F	ATCAAAATGCAAGGTCGTGATAAGTGGTG	基因克隆
OsonSRb1c-R	TTGACGCCTATCCTTACAATTTATCTTCTACT	基因克隆
OsonSNMP1q-F	TGGCAACTGCCCTCCTAAAG	定量分析
OsonSNMP1q-R	GGTCGCTGTCCAGGAAATGA	定量分析
OsonSNMP2q-F	ACGGATGCTTGTTGATGGGT	定量分析
OsonSNMP2q-R	CTCTGTCAGGCTTGATGCCA	定量分析
OsonSRb1q-F	GCCAATACGACTCCCCGATT	定量分析
OsonSRb1q-R	ATCCCCTCGACTTGCTCTCT	定量分析
OsonTUAq-F	AACCTGAACCGTCTCATCGG	定量分析
OsonTUAq-R	CAAGGGGAAGTGGATACGGG	定量分析
OsonNAPDHq-F	CTATTTTCGATGCCGCTGCC	定量分析
OsonNAPDHq-R	TAACGCGTTGGAGTATCCG	定量分析

根据测序结果在 NCBI 网站中的 Primer Blast 服务 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) 中设计实时荧光定量 PCR 引物 (表 1)。实时荧光定量 PCR 在 PikoReal 荧光定量 PCR 仪 (Thermal, 美国) 中进行, 反应体系为 10 mL, 包含 5 μL 2xTaq UltraSYBR Mixture (康为世纪, 北京), 上下游引物各 0.5 μL , cDNA 模板 1 μL ,

灭菌水 3 μL 。反应程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min; 然后 40 个循环的 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s。以 OsonTUA 和 OsonNAPDH 基因作为内参基因, 雌虫腹部为参考组织, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 OsonSNMPs 和 OsonSRb1 基因在不同组织中的相对表达水平; 使用 SPSS 17.0 软件中的 One-way analysis of variance (One-way ANOVA) 方法

对 OsonSNMPs 和 OsonSRb1 在杜仲梦尼夜蛾不同组织中的表达水平进行差异显著性分析。

2 研究结果

2.1 基因鉴定

我们从杜仲梦尼夜蛾中克隆得到 3 个隶属于 CD36 家族的基因 (表 2), 包括 2 个 SNMPs 基因 (OsonSNMP1 和 OsonSNMP2) 和 1 个 SRb 亚族

基因 (OsonSRb1)。OsonSNMP1 开放阅读框长度为 1 575 bp, 推导蛋白包含 524 个氨基酸, 预测的蛋白分子量为 59.08 kDa, 理论等电点 6.31。OsonSNMP2 开放阅读框 1 563 bp, 预测其推导蛋白包含 520 个氨基酸, 分子量 58.58 kDa, 等电点 6.62。OsonSRb1 开放阅读框长度为 1 548 bp, 编码的蛋白包含 515 个氨基酸, 分子量 58.0 kDa, 等电点 5.93。

表 2 OsonSNMPs 和 OsonSRb1 序列特征

Table 2 Characteristics of OsonSNMPs and OsonSRb1 sequence

基因名称 Gene name	开放阅读框 ORF /bp	分子量 Mw /kDa	等电点 pI	长度 Length /aa			
				推导蛋白 Protein	氮端/碳端胞内序列 N-/C-terminus	氮端/碳端跨膜区域 TM	胞外区域 EC
OsonSNMP1	1 575	59.08	6.31	524	8/43	23/23	427
OsonSNMP2	1 563	58.58	6.62	520	6/26	23/23	442
OsonSRb1	1 548	58.0	5.93	515	18/38	23/23	413

2.2 序列一致性和系统发育分析

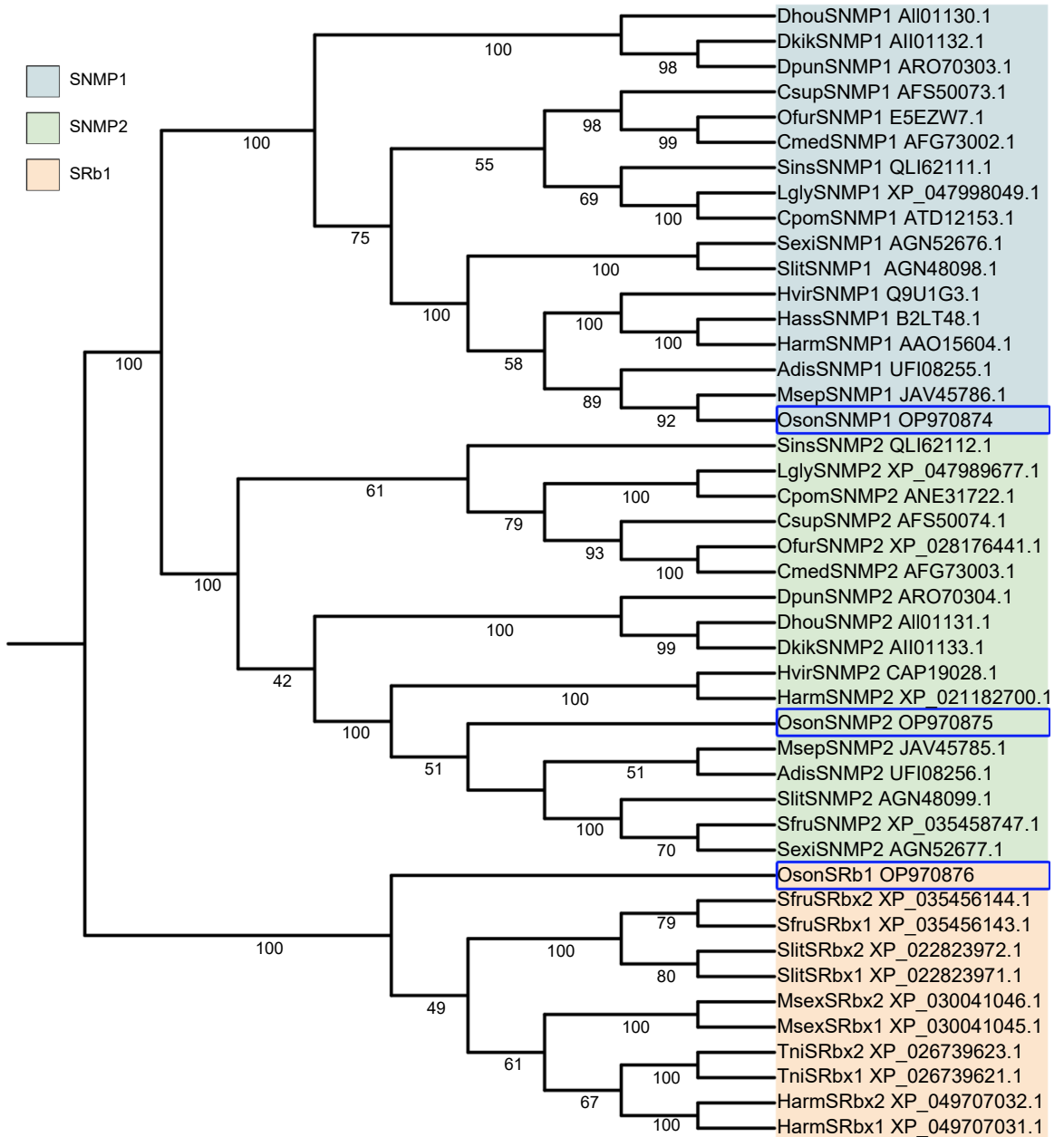
序列一致性分析发现, OsonSNMP1 与甘蓝夜蛾 (*Mamestra brassicae*) 的 MbraSNMP1 序列一致性较高, 达到 93.90%; OsonSNMP2 与甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) 的 SexiSNMP2 序列一致性较高, 达到 89.62%。OsonSRb1s 与其他夜蛾科昆虫的 SRb 家族基因序列一致性较高 (72.18%~94.22%)。OsonSNMP1、OsonSNMP2 和 OsonSRb1 三者之间序列一致性较低; OsonSNMP1 与 OsonSNMP2 的序列一致性为 31.57%, 与 OsonSRb1 的为 26.44%; OsonSNMP2 与 OsonSRb1 的序列一致性为 27.33%。在昆虫 SNMPs 和 SRb1 基因构成的系统发育树中 SNMP1、SNMP2 和 SRb1 各自聚为一支 (图 1), 其中 SNMP1 分支和 SNMP2 分支临近。OsonSNMP1 和 OsonSNMP2 分别位于 SNMP1 分支和 SNMP2 分支, 其中 OsonSNMP1 与 MsepSNMP1 临近, 步长为 92%。OsonSNMP2 与 5 个夜蛾科昆虫的 SNMP2 基因所在分支临近, 步长为 51%。OsonSRb1 位于鳞翅目昆虫的 SRb1 基因分支, 且位于分支的边缘。

2.3 推导蛋白结构预测

OsonSNMP1、OsonSNMP2 和 OsonSRb1 推导蛋白为包含 2 个跨膜区域的膜蛋白; 氮末端和

碳末端位于细胞内, 2 个疏水的跨膜区域分别靠近氮端和碳端, 跨膜区域之间是一个大的细胞外结构 (图 2A)。OsonSNMP1、OsonSNMP2 和 OsonSRb1 氮末端细胞内结构分别包含 8、6 和 18 个氨基酸残基; 碳末端细胞内结构分别为 43、26 和 38 个氨基酸残基; 3 个蛋白氮端、碳端跨膜区域均包含 23 个氨基酸残基; 胞外结构分别为 427、442 和 413 个氨基酸残基 (表 2)。

胞外结构域空间结构预测表明, OsonSRb1 和 OsonSNMP2 具有 1 个由反向平行 β -折叠构成的桶状核心和多个位于该核心外围的 α -螺旋。OsonSRb1 的细胞外结构域上有 6 个保守的半胱氨酸残基 (C1~C6) (图 2A), 空间结构模型显示这些半胱氨酸残基参与了 3 个二硫键键的形成 (C1~C3、C2-C6 和 C4~C5) (图 2B)。OsonSNMP1 和 OsonSNMP2 的胞外结构域上存在 8 个保守的半胱氨酸残基 (C1~C8) (图 2A), 其中 C3~C8 与 OsonSRb1 的 C1~C6 同源, 可能参与了 3 个二硫键键的形成 (C3~C5、C4~C8 和 C6~C7), 另外 OsonSNMP1 和 OsonSNMP2 的 C1 和 C2 在空间上临近, 但当前模型中并未形成二硫键 (图 2C, D)。疏水性分析发现, OsonSNMP1、OsonSNMP2 和 OsonSRb1 包含多个疏水性区域 (图 3A~C), 其中碳/氮端跨膜区域疏水值最高; 在胞外结构域也存在 1 个疏水性区域, 该区域为一



注: OsonSNMPs 和 OsonSRb1 由蓝色方框标注; 蛋白名称后的编号为 Genbank 登录号

Notes: OsonSNMPs and OsonSRb1 are marked with blue boxes; The GenBank accession numbers are added to the end of protein names

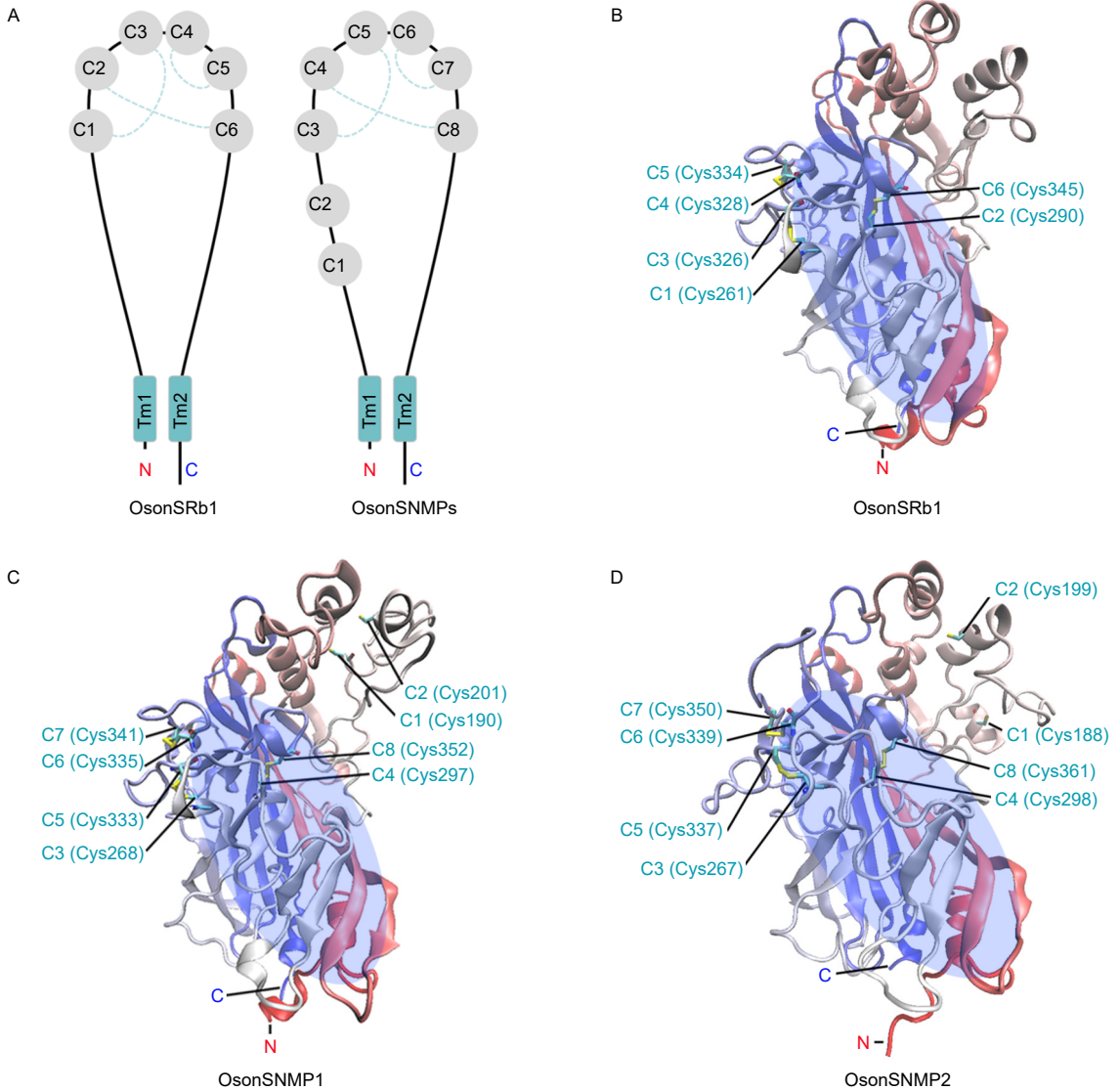
图 1 昆虫 CD36 家族受体同源蛋白的系统发育分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of CD36 homologs in insects

段富含疏水性氨基酸残基的 α -螺旋。OsonSRb1、OsonSNMP1 和 OsonSNMP2 胞外结构富含疏水性氨基酸残基的 α -螺旋位于蛋白的端部 (图 3D~F); 疏水性氨基酸残基占比分别为 55.5%、58.6% 和 58.6%。OsonSNMP1、OsonSNMP2 和 OsonSRb1 胞外结构的 β -折叠核心区域形成了 1 个中空的桶状结构, 该结构与其他二级结构一起形成了一个贯穿整个蛋白的通道, 通道入口靠近蛋白顶端, 出口朝向细胞膜 (图 3D~I)。

2.4 组织分布

通过荧光定量 PCR 实验结果表明, 杜仲梦尼夜蛾 OsonSNMPs 和 OsonSR1 均在触角中大量表达 (图 4)。OsonSNMP1 在雌雄虫的触角、翅和雌虫足中表达水平较高, 且在雄虫触角和雌虫翅中的表达水平显著高于其他组织 (图 4A)。OsonSNMP2 在雌虫触角和足中表达水平较高; 在雌虫足中的表达水平低于雌虫触角, 但显著高于其他组织 (图 4B)。OsonSR1 在雄虫触角和口器, 以及雌虫口器中的



注: A, OsonSRb1 和 OsonSNMPs 结构域; B, OsonSRb1 立体结构; C, OsonSNMP1 立体结构; D, OsonSNMP2 立体结构; Tm, 跨区域; C1~C8, 保守的半胱氨酸残基; N, 氮端; C, 碳端; β -折叠构成的桶状核心由蓝色椭圆标注

Note: A, OsonSRb1 and OsonSNMPs domains; B, Stereo view of OsonSRb1; C, Stereo view of OsonSNMP1; D, Stereo view of OsonSNMP2. Tm, transmembrane domain; C1~C8, conserved cysteine residues; N, N-terminus; C, C-terminus; β -barrel core was marked by ellipse

图 2 OsonSNMPs 和 OsonSRb1 蛋白结构和保守半胱氨酸残基在胞外结构域的空间分布

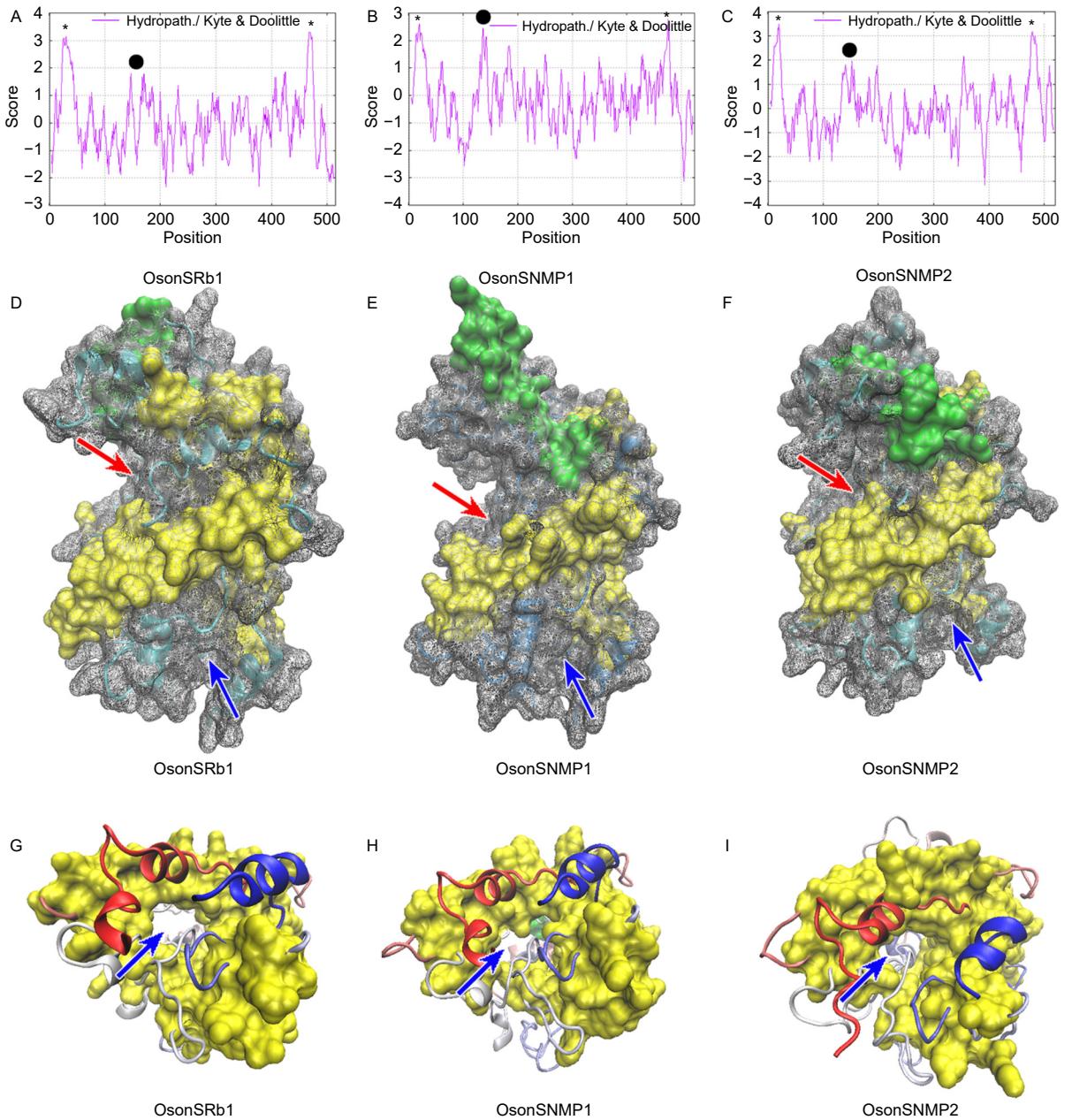
Fig. 2 Protein structure of OsonSRb1 and OsonSNMPs and distribution of conserved cysteine residues in extracellular domain

表达水平显著高于其他组织 (图 4C)。

3 讨论

CD36 家族受体是一类在脂肪细胞、肝细胞、血细胞、嗅觉上皮细胞等多种细胞中广泛表达的受体蛋白^[29], 在脊椎动物免疫、代谢、血管形成和行为中发挥了重要作用^[30]。昆虫 SNMPs 和 SRbs 与脊椎动物 CD36 家族基因同源, 在化学感受和脂类物质转运过程中发挥了重要作用^[8, 14]。本研究在杜

仲单食性害虫杜仲梦尼夜蛾中克隆得到 2 个 SNMPs 基因和 1 个 SRbs 基因。这些基因编码的蛋白具有 CD36 家族受体的典型特征, 包含 2 个分别位于氮端和碳端的跨膜区域和 1 个包含保守半胱氨酸残基的细胞外结构。蛋白结构预测发现, 昆虫 OsonSRb1 和 OsonSNMPs 均包含一个由 β -折叠构成的桶状结构, 6 个保守半胱氨酸残基参与形成了 3 个二硫键。序列一致性分析发现, 这 3 个基因编码的蛋白与各自亚族蛋白序列一致性较高, 但相互之间序列一致性较低: OsonSNMP1 与



注：A~C，OsonSRb1 和 OsonSNMPs 疏水性分析；D~F，胞外结构域空间结构；G~I， β -折叠轮廓；高疏水区由星号和黑色圆标注；富含疏水性氨基酸的 α -螺旋显示为绿色， β -折叠显示为黄色，通道入口由红色箭头指出，通道出口由蓝色箭头指出

Note: A~C, Hydrophobicity analysis of OsonSRb1 and OsonSNMPs; D~F, Stereo view of OsonSRb1 and OsonSNMPs extracellular domain; G~I, β -barrel of OsonSRb1 and OsonSNMPs. The domain with high drophobic value were marked with asterisks and black circle. The α -helix rich in hydrophobic amino acid residues was marked in green. The β -barrel was marked in yellow; Entrance of the tunnel was marked by red arrow. Exit of the tunnel was marked by blue arrow

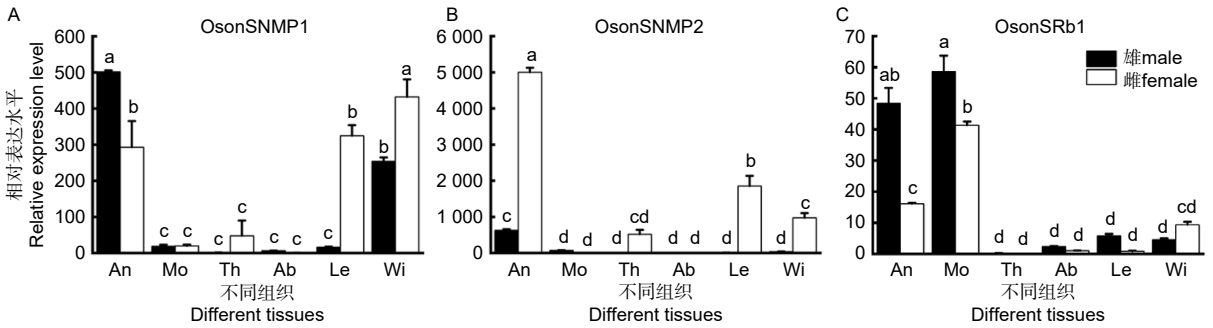
图 3 OsonSNMPs 和 OsonSRb1 疏水性分析和胞外结构域空间结构

Fig. 3 Hydrophobicity analysis and extracellular domain stereo view of OsonSRb1 and OsonSNMPs

OsonSNMP2 为 31.57%，与 OsonSRb1 为 26.44%，OsonSNMP2 与 OsonSRb1 为 27.33%。OsonSNMP1 和 OsonSNMP2 在雌雄蛾的触角中大量表达；OsonSRb1 在雌雄蛾的触角和口器大量表达；此外，这些基因在翅上也有一定表达。我

们的研究表明 OsonSNMP1、OsonSNMP2 和 OsonSRbs 属于 CD36 家族，这些基因可能在杜仲梦尼夜蛾感觉器官中发挥了重要功能。

昆虫 SRbs 蛋白结构域与脊椎动物 CD36 家族受体类似，包含 2 个靠近碳/氮末端的跨膜区域和



注: A, OsonSNMP1 相对表达水平; B, OsonSNMP2 相对表达水平; C, OsonSRb1 相对表达水平; An, 触角; Mo, 口器; Th, 胸; Ab, 腹; Le, 足; Wi, 翅; 柱顶不同的字母表示差异显著 ($P < 0.05$, One-way ANOVA, 生物学重复和技术重复各 3 次)

Notes: A, relative expression level of OsonSNMP1; B, relative expression level of OsonSNMP2; C, relative expression level of OsonSRb1; An, antenna; Mo, mouthpart; Th, thorax; Ab, Abdomen; Le, leg; Wi, wing. The different letters on the column indicate significant differences ($P < 0.05$, One-way ANOVA, biological repeat and technical repeat are both 3 times)

图 4 OsonSNMPs 和 OsonSRb1 在不同组织中的表达

Fig. 4 Expression of OsonSNMPs and OsonSRb1 in different tissues

1 个胞外结构域, 以及位于细胞内的碳/氮末端。CD36 家族受体的胞外结构域在配体结合和转移中起到了重要作用^[7]。人类 CD36 胞外结构域具有 1 个主要由 β -折叠构成的通道和 1 个位于顶端 α -螺旋区域的疏水性区域^[31]。该通道包含 1~2 个靠近蛋白顶端的入口和 1 个朝向细胞膜的出口, 脂溶性化合物到达疏水性区域后沿通道滑向细胞膜^[32]。本研究预测了 OsonSRb1 的蛋白结构, 发现该蛋白符合 CD36 家族受体的结构特征, 位于胞外结构核心区域的 β -折叠形成了一个中空的桶状结构, 与其他二级结构一起形成了一条贯穿蛋白的通道, 此外 OsonSRb1 端部具有 1 个富含疏水性氨基酸残基的 α -螺旋, 我们推测 OsonSRb1 能够捕获细胞外的脂溶性化合物, 并通过蛋白内的通道将这些化合物向下游传递。在脊椎动物中, 血脂主要以脂蛋白的形式进行运输, CD36 家族受体通过胞外结构顶端的丙氨酸残基与脂蛋白结合, 并借助核心区域的通道转运疏水性的长链脂肪酸^[32]。昆虫 CD36 家族受体也能够结合长链脂肪酸等脂溶性物质, 这些膜蛋白在昆虫脂肪酸代谢、免疫、感觉等生理活动中发挥了重要作用。在家蚕中, BmorSRbs 家族受体与脂蛋白相互作用, 促进固醇类化合物的摄入和转运^[33]; BmorSCR8 可以直接与病原关联因子结合, 提高机体对病原的清除效力^[18]。果蝇 SRbs 受体 ninaD 参与了细胞对类胡萝卜素的摄入, 由于类胡萝卜素是视觉发色团合成的重要原料, 缺失 ninaD 基因会导致果蝇失明^[20, 34]。Yang 和 Zhang^[35] 对果蝇嗅觉系统的蛋白互作分析发

现, 果蝇 SRbs 与嗅觉功能高度关联, 这些蛋白可能在嗅觉系统中参与了脂类转运和废弃代谢物清理。

昆虫 SNMPs 结构符合 CD36 家族受体的结构特征, 也具有主要由 β -折叠构成的通道和位于胞外结构顶端的疏水性区域。Gomez-Diaz 等^[36] 以哺乳动物 CD36 家族受体为模板分析果蝇 SNMP1 空间结构, 发现果蝇 SNMP1 的胞外结构也具有 1 个足以容纳性信息素的通道, 氨基酸定点突变阻塞这个通道后会降低果蝇对性信息素的嗅觉电位反应, 而异源表达小鼠 CD36 家族受体能够恢复果蝇 SNMP1 突变体对性信息素的嗅觉电位反应, 表明昆虫 SNMPs 可能具有与脊椎动物 CD36 家族受体类似的功能。本研究预测了 OsonSNMPs 胞外区域的蛋白结构, 位于蛋白核心区域的 β -折叠与其他二级结构一起形成了一条贯穿蛋白的通道, 此外在 OsonSNMP1 和 OsonSNMP2 胞外结构端部均有 1 个富含疏水性氨基酸残基的 α -螺旋, 我们推测 OsonSNMPs 与脊椎动物 CD36 家族受体和其他昆虫 SNMPs 类似, 能够捕获细胞外的疏水性气味化合物分子, 并通过蛋白内的通道将这些化合物向气味受体传递。CD36 家族受体结合的配体包括各种氧化脂蛋白、乙酰化脂蛋白和各种天然脂蛋白, 在 CD36 存在的条件下, 长链脂肪酸从血清蛋白或磷酸双分子层上分离可以发生在毫秒之内^[37]。在果蝇中, SNMP1 能极大提高感觉神经元对性信息素的敏感性, 这一现象可能是由于 SNMP1 能够从气味结合蛋白上卸载了气味分子, 并通过胞外结构的通道将气味分子输送到气味受体进行识别^[11, 36, 38]。

在脊椎动物嗅觉上皮细胞中分布的 CD36 家族受体参与了油酸、醛类的嗅觉感受^[39-41]。昆虫 CD36 家族受体也在嗅觉功能中发挥了重要作用；这些嗅觉蛋白的组织分布主要包括触角、下颚须、下唇须等感觉器官^[42-44]。沙漠蝗 SgreSNMP1 和 SgreSNMP2 在触角中大量表达，组织定位发现 SgreSNMP1 在感觉神经元树突和支持细胞绒毛上分布，SgreSNMP2 只在支持细胞绒毛分布，以上组织分布情况表明 SgreSNMP1 可能参与了气味分子的接收和嗅觉淋巴液内气味分子清除，而 SgreSNMP2 的功能仅限于嗅觉淋巴液内气味分子清除^[45-46]。在果蝇中，SNMP1 被证实定位于触角感受器基部的感觉神经元，并参与了气味受体对性信息素的识别过程^[11, 41]。本研究发现，OsonSNMP1 和 OsonSRb1 在杜仲梦尼夜蛾触角中大量表达，OsonSRb1 在雌雄蛾的触角和口器大量表达；与嗅觉器官高度关联的表达模式和与脊椎动物类似的蛋白结构暗示这些基因在杜仲梦尼夜蛾嗅觉系统中发挥了功能。此外，OsonSNMP1 在运动相关的组织足和翅中也大量表达。但是这些蛋白的具体嗅觉功能还有待进一步细胞定位和蛋白功能实验来验证。

4 结 论

综 上 ， OsonSNMP1、 OsonSNMP2 和 OsonSRb1 具有脊椎动物 CD36 家族受体类似的空间结构，包含 2 个跨膜区域和 1 个细胞外结构域；胞外结构域具有 1 个主要由反向平行 β -折叠构成的桶状核心和 1 个富含疏水性氨基酸残基的 α -螺旋。OsonSNMP1 和 OsonSNMP2 在杜仲梦尼夜蛾触角中大量表达，OsonSRb1 在雌雄蛾的触角和口器大量表达。与嗅觉器官高度关联的表达模式和与脊椎动物类似的蛋白结构表明这些基因可能在杜仲梦尼夜蛾嗅觉系统中发挥了功能。

参 考 文 献：

- [1] HALLEM E A, DAHANUKAR A, CARLSON J R. Insect odor and taste receptors[J]. *Annu Rev Entomol.*, 2006, 51: 113-135.
- [2] TANAKA K, UDA Y, ONO Y, *et al.* Highly selective tuning of a silkworm olfactory receptor to a key mulberry leaf volatile[J]. *Curr Biol.*, 2009, 19(11): 881-90.
- [3] KASANG G. Uptake of the sex pheromone 3H-bombykol and related compounds by male and female *Bombyx antennae*[J]. *J Insect Physiol.*, 1974, 20(12): 2407-2422.
- [4] MATSUMOTO S, HULL J J, OHNISHI A, *et al.* Molecular mechanisms underlying sex pheromone production in the silkworm, *Bombyx mori*: characterization of the molecular components involved in bombykol biosynthesis[J]. *J Insect Physiol.*, 2007, 53(8): 752-729.
- [5] GEGEAR R J. Exploring the role of cognition in the annual fall migration of the monarch butterfly (*Danaus plexippus*) [J]. *Insects*, 2021, 12(8): 760.
- [6] GREENSTEIN L, STEELE C, TAYLOR C M. Host plant specificity of the monarch butterfly *Danaus plexippus*: A systematic review and meta-analysis[J]. *PLoS One*, 2022, 17(6): e0269701.
- [7] PEPINO M Y, KUDA O, SAMOVSKI D, *et al.* Structure-function of CD36 and importance of fatty acid signal transduction in fat metabolism[J]. *Annu Rev Nutr.*, 2014, 34(1): 281-303.
- [8] 宋月芹, 白小军, 陈庆霄, 等. 红脊长蜡感觉神经元膜蛋白基因克隆及组织表达谱分析[J]. *林业科学研究*, 2021, 34 (5): 135-141.
- [9] ZHANG J, LIU Y, WALKER W B, *et al.* Identification and localization of two sensory neuron membrane proteins from *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae)[J]. *Insect Sci.*, 2015, 22(3): 399-408.
- [10] SHAN S, WANG S N, SONG X, *et al.* Molecular characterization and expression of sensory neuron membrane proteins in the parasitoid *Microplitis mediator* (Hymenoptera: Braconidae)[J]. *Insect Sci.*, 2020, 27(3): 425-439.
- [11] BENTON R, VANNICE KS, VOSSHALL LB. An essential role for a CD36-related receptor in pheromone detection in *Drosophila*[J]. *Nature*, 2007, 450(7167): 289-293.
- [12] PREGITZER P, GRESCHISTA M, BREER H, *et al.* The sensory neurone membrane protein SNMP1 contributes to the sensitivity of a pheromone detection system[J]. *Insect Mol Biol.*, 2014, 23(6): 733-742.
- [13] CASSAU S, KRIEGER J. The role of SNMPs in insect olfaction[J]. *Cell Tissue Res.*, 2021, 383(1): 21-33.
- [14] MA B T, JIA J, WANG X B, ZHANG R, *et al.* Differential roles of Scavenger receptor class B type I: A protective molecule and a facilitator of atherosclerosis[J]. *Mol Med Rep.*, 2020, 22(4): 2599-2604.
- [15] LEE S, EGUCHI A, TSUZUKI S, *et al.* Expression of CD36 by olfactory receptor cells and its abundance on the epithelial surface in mice[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0133412.
- [16] TSUZUKI S, KIMOTO Y, LEE S, *et al.* A novel role for scavenger receptor B1 as a contributor to the capture of specific volatile odorants in the nasal cavity[J]. *Biomed Res.*, 2018, 39(3): 117-129.
- [17] HERBOSO L, TALAMILLO A, PÉREZ C, *et al.* Expression of the scavenger receptor class B type I (SR-BI) family in *Drosophila melanogaster*[J]. *Int J Dev Biol.*, 2011, 55(6): 603-611.
- [18] ZHANG K, HU X, ZHAO Y, *et al.* Scavenger receptor B8 im-

- proves survivability by mediating innate immunity in silkworm, *Bombyx mori*[J]. Dev Comp Immunol., 2021, 116: 103917.
- [19] ZHOU LZ, WANG RJ, YAN Y Y, *et al.* Scavenger receptor B1 mediates phagocytosis and the antimicrobial peptide pathway in the endoparasitic wasp *Micropilits mediator*[J]. Dev Comp Immunol., 2021, 119: 104039.
- [20] VOOLSTRA O, KIEFER C, HOEHNE M, *et al.* The *Drosophila* class B scavenger receptor NinaD-I is a cell surface receptor mediating carotenoid transport for visual chromophore synthesis[J]. Biochemistry, 2006, 45(45): 13429-13437.
- [21] 赵 阳, 朱景乐, 李芳东, 等. 杜仲梦尼夜蛾发育后期及取食行为研究[J]. 植物保护, 2015, 41 (2): 75-79.
- [22] 赵 阳, 朱景乐, 李芳东, 等. 杜仲梦尼夜蛾幼虫的空间分布型及抽样技术[J]. 环境昆虫学报, 2014, 36 (4): 629-634.
- [23] 周云龙, 张声堂, 刘湘银, 等. 杜仲梦尼夜蛾生物学特性及防治研究[J]. 西北林学院学报, 1996 (2): 66-70 + 81.
- [24] 孙志强, 赵 阳, 马志刚, 等. 杜仲梦尼夜蛾危害的风险分级[J]. 林业科学, 2016, 52 (7): 78-86.
- [25] 李剑豪, 李东平, 黄祖惠, 等. 杜仲梦尼夜蛾生物学特性初步研究[J]. 森林病虫害通讯, 1997 (4): 19-21.
- [26] 王留洋, 杨超霞, 郭兵博, 等. 昆虫性信息素研究进展与应用前景[J]. 农药学报, 2022, 24 (5): 997-1016.
- [27] CLARK J T, RAY A. Olfactory mechanisms for discovery of odorants to reduce insect-host contact[J]. J Chem Ecol., 2016, 42(9): 919-930.
- [28] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Mol Biol Evol., 2011, 28(10): 2731-2739.
- [29] YANG R, LIU Q, ZHANG M. The past and present lives of the intraocular transmembrane protein CD36[J]. Cells, 2023, 12(1): 171.
- [30] SILVERSTEIN R L, FEBBRAIO M. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior[J]. Sci Signal., 2009, 2(72): re3.
- [31] NECULAI D, SCHWAKE M, RAVICHANDRAN M, *et al.* Structure of LIMP-2 provides functional insights with implications for SR-BI and CD36[J]. Nature, 2013, 504(7478): 172-176.
- [32] HSIEH F L, TURNER L, BOLLA J R, *et al.* The structural basis for CD36 binding by the malaria parasite[J]. Nat Commun., 2016, 7(1): 12837.
- [33] TAKESHIMA M, OGIHARA M H, KATAOKA H. Characterization and functional analysis of BmSR-B1 for phytosterol uptake[J]. Steroids, 2022, 184: 109039.
- [34] KIEFER C, SUMSER E, WERNET M F, *et al.* A class B scavenger receptor mediates the cellular uptake of carotenoids in *Drosophila*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A., 2002, 99(16): 10581-10586.
- [35] YANG S, ZHANG W J. Systematic analysis of olfactory protein-protein interactions network of fruitfly, *Drosophila melanogaster*[J]. Arch Insect Biochem Physiol., 2022, 110(2): e21882.
- [36] GOMEZ-DIAZ C, BARGETON B, ABUIN L, *et al.* A CD36 ectodomain mediates insect pheromone detection via a putative tunnelling mechanism[J]. Nat Commun., 2016, 7: 11866.
- [37] JAY A G, CHEN A N, PAZ M A, *et al.* CD36 binds oxidized low density lipoprotein (LDL) in a mechanism dependent upon fatty acid binding[J]. J Biol Chem., 2015, 290(8): 4590-4603.
- [38] LI Z, NI J D, HUANG J, *et al.* Requirement for *Drosophila* SNMP1 for rapid activation and termination of pheromone-induced activity[J]. PLoS Genet., 2014, 10(9): e1004600.
- [39] OBERLAND S, ACKELS T, GAAB S, *et al.* CD36 is involved in oleic acid detection by the murine olfactory system[J]. Front Cell Neurosci., 2015, 9: 366.
- [40] LEE S, TSUZUKI S, AMITSUKA T, *et al.* CD36 involvement in the olfactory perception of oleic aldehyde, an odour-active volatile compound, in mice[J]. Biomed Res., 2017, 38(3): 207-213.
- [41] TSUZUKI S, KIMOTO Y, MARUI K, *et al.* Application of a novel fluorescence intensity assay: identification of distinct fatty acetates as volatile compounds that bind specifically to amino acid region 149-168 of a transmembrane receptor CD36[J]. Biosci Biotechnol Biochem., 2022, 86(4): 509-518.
- [42] JIN X, HA T S, SMITH D P. SNMP is a signaling component required for pheromone sensitivity in *Drosophila*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A., 2008, 105(31): 10996-11001.
- [43] LEMKE R S, PREGITZER P, EICHHORN A S, *et al.* SNMP1 and odorant receptors are co-expressed in olfactory neurons of the labial and maxillary palps from the desert locust *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae)[J]. Cell Tissue Res., 2020, 379(2): 275-289.
- [44] GUO M, CHEN Q, LIU Y, *et al.* Chemoreception of mouthparts: sensilla morphology and discovery of chemosensory genes in proboscis and labial palps of adult *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)[J]. Front Physiol., 2018, 9: 970.
- [45] JIANG X, PREGITZER P, GROSSE-WILDE E, *et al.* Identification and characterization of two "sensory neuron membrane proteins" (SNMPs) of the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae)[J]. J Insect Sci., 2016, 16(1): 33.
- [46] CASSAU S, SANDER D, KARCHER T, *et al.* The sensilla-specific expression and subcellular localization of SNMP1 and SNMP2 reveal novel insights into their roles in the antenna of the desert locust *Schistocerca gregaria*[J]. Insects, 2022, 13(7): 579.

Cloning and Tissue Distribution of Homologous Genes of CD36 Family in *Orthosia songi* Chen et Zhang (Lepidoptera: Noctuidae)

HUANG Xing-ru^{1,2}, YANG Jie¹, ZOU Jie^{1,2}, WEN Xi¹,
HU Chuan-hao¹, ZHANG You-xiang¹, HUANG Xing-long^{1,2}

(1. Jishou University, College of Biology and Environmental Sciences, Jishou 416000, Hunan, China; 2. Jishou University, National and Local United Engineering Laboratory of Integrative Utilization of *Eucommia ulmoides*, Jishou 416000, Hunan, China)

Abstract: [Objective] To reveal the sequence characteristics and expression profiles of CD36 homolog genes, sensory neuron membrane proteins (SNMPs) and class b scavenger receptors (SRb) in *Orthosia songi* Chen et Zhang. [Method] Specific primers were used to clone the SNMP and SRb genes. The protein encoded by these genes were constructed by homo-modeling, and the gene expression profiles were determined by quantitative fluorescent real-time PCR. [Result] Three CD36 homolog genes (OsonSNMP1, OsonSNMP2 and OsonSRb1) were identified from *O. songi*. The proteins encoded by these genes consisted of two transmembrane domains and an extracellular domain. The extracellular domain contained an antiparallel β -barrel core and a hydrophobic domain near the top. OsonSNMP1 was mainly expressed in the antennae and wings of male and female moth, and the expression level in male antennae was significantly higher than that in other tissues. OsonSNMP2 was discriminatorily expressed in male and female antennae and female wings, and its expression level in female antennae was significantly higher than that in other tissues. OsonSRb1 were specifically expressed in the antennae and mouthparts of male and female. [Conclusion] The proteins encoded by OsonSNMP1, OsonSNMP2 and OsonSRb1 have similar structures with CD36 receptors in vertebrates. Their expression profiles highly associated with olfactory organs indicate the potential roles in olfactory systems. These results provide experimental data for further study on the olfactory function of CD36 homolog genes in *Orthosia songi*.

Keywords: *Orthosia songi*; olfactory; CD36 family; Sensory neuron membrane protein; Class b scavenger receptor

(责任编辑: 崔 贝)