



李强, 刘芳, 赵红霞, 赵俊星. 中华蜜蜂气味结合蛋白基因 *OBP4* 的分子特性及时空表达 [J]. 环境昆虫学报, 2023, 45 (2): 480–485.

中华蜜蜂气味结合蛋白基因 *OBP4* 的分子特性及时空表达

李强¹, 刘芳², 赵红霞^{2*}, 赵俊星^{1*}

(1. 山西农业大学动物科学学院, 山西太谷 030801; 2. 广东省科学院动物研究所, 广东省动物保护与资源利用重点实验室, 广东省野生动物保护与利用公共实验室, 广州 510260)

摘要: 气味结合蛋白 OBPs 在蜜蜂识别气味分子和生理反应的过程中起到了十分重要的作用。本研究通过利用生物信息学软件预测分析中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 气味结合蛋白基因 *OBP4* (*AcerOBP4*) 编码的蛋白理化特性和结构特征; 采用 MEGA 5.2 软件中的邻位相连法 (Neighbor-joining, NJ) 构建 *AcerOBP4* 及其它昆虫 OBPs 的系统发育树; 通过 qRT-PCR 技术分析 *AcerOBP4* 在中华蜜蜂的哺育蜂、采集蜂和 1 日龄工蜂各组织的表达情况。结果表明, 中华蜜蜂和意大利蜜蜂 *Apis mellifera* *OBP4* (*AmelOBP4*) 氨基酸同源性为 78%, *AcerOBP4* 在中华蜜蜂的触角表达量最高, 其次是足和头部组织表明该基因与蜜蜂的嗅觉行为密切相关。此外, *AcerOBP4* 在蜜蜂脑部有一定的表达, 但是在腹部组织表达量很低。该研究结果丰富了蜜蜂 OBPs 表达特性的研究数据, 同时也为继续深入研究 *OBP4* 在中华蜜蜂中是否影响嗅觉行为提供了基础。

关键词: 中华蜜蜂; 气味结合蛋白; 时空表达

中图分类号: Q963; S89

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2023) 02-0480-07

Molecular characteristics and spatiotemporal expression of odorant binding protein gene *OBP4* of *Apis cerana cerana*

LI Qiang¹, LIU Fang², ZHAO Hong-Xia², ZHAO Jun-Xing^{1*} (1. College of Animal Science, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi Province, China; 2. Guangdong Key Laboratory of Animal Conservation and Resource Utilization, Guangdong Public Laboratory of Wild Animal Conservation and Utilization, Institute of Zoology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510260, China)

Abstract: Odorant binding proteins (OBPs) play an important role in recognition of odor molecules and physiological responses in honeybees. In this study, bioinformatics software was performed to predict and analyze the physicochemical and structural characteristics of odorant binding proteins *OBP4* of *Apis cerana cerana* (*AcerOBP4*). The phylogenetic trees of *AcerOBP4* and other insect OBPs were constructed by neighbor-joining (NJ) using MEGA 5.2. The mRNA expression of *AcerOBP4* in different tissues from nurses, foragers and 1-day-old worker bees of *A. cerana cerana* was analyzed by qRT-PCR. The results showed that the homology of *OBP4* amino acid between *A. cerana cerana* and *A. mellifera* was 78%, and the expression of *AcerOBP4* had significantly higher expression in the antennae of *A. cerana cerana* than other part of bees, suggesting that it may be associated with the olfactory behavior of *A. cerana cerana*. Our study enriched the data of OBPs expression characteristics in honeybee, and also provided a basis for

基金项目: 国家蜂产业技术体系 (CARS-44); 广东省基础与应用基础研究项目 (2021A1515010630, 2023A1515030072); 广州市科技计划项目 (202003000009)

作者简介: 李强, 男, 硕士研究生, 研究方向为蜜蜂分子生物学, E-mail: liqiang@giz.gd.cn

* 共同通讯作者 Author for correspondence: 赵俊星, 博士, 教授, 研究方向为动物脂肪发育调控机制研究, E-mail: junzh@163.com;

赵红霞, 女, 博士, 副研究员, 研究方向为蜂产品与蜜蜂害虫防控, E-mail: hxzh110@giabr.gd.cn

收稿日期 Received: 2022-02-17; 接受日期 Accepted: 2022-07-27

further research on mechanism of *OBP4* in regulating olfactory behavior of *A. cerana cerana*.

Key words: *Apis cerana cerana*; odorant binding protein; temporal-spatial expression

昆虫是地球上物种最丰富的动物类群之一, 与人类关系十分密切。在长期的进化过程中, 昆虫与外界环境相互作用, 形成了复杂且灵敏的化学感受系统(如嗅觉和味觉系统)。在参与昆虫嗅觉行为的多种蛋白中, 有一类小分子量的亲水性转运蛋白—气味结合蛋白(Odorant binding proteins, OBPs)。这类蛋白存在于昆虫嗅觉感受器的淋巴液中, 能够将外界疏水性的气味分子运输到嗅觉神经元树突状膜上, 然后激活神经元树突状膜上的气味受体 ORs (odorant receptors, ORs) 实现信号转导, 最终通过中枢神经系统产生行为反应 (Leal *et al.*, 2013; Pelosi *et al.*, 2018)。因此, 从嗅觉发生的过程可以看出, OBPs 在识别气味分子和引发昆虫生理反应的过程中起到了极其重要的作用 (赵慧婷等, 2020)。

自昆虫第一个 OBP 蛋白被 Vogt 等 (1981) 从多音天蚕蛾 *Antheraea polyphemus* 触角中鉴定得到以来, 已在鳞翅目 (Sun *et al.*, 2017a)、鞘翅目 (Li *et al.*, 2017)、双翅目 (Zhao *et al.*, 2018)、膜翅目 (Zhao *et al.*, 2016)、直翅目 (Jiang *et al.*, 2018) 和半翅目 (Sun *et al.*, 2017b) 等多类昆虫中鉴定获得了 OBPs。Forêt 和 Maleszka (2006) 在意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 基因组中共鉴定到 21 个 OBPs, 其中的 9 个基因在触角中特异性表达, 其余基因在各个组织或特异的组织中表达。随后赵慧婷 (2021) 对 21 个 OBPs 在意大利蜂头部表达模式进行研究, 13 个 OBPs 在头部高表达, 且大多数 OBPs 在 4 日龄表达量最高。目前在中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 基因组中共鉴定到 17 个 OBPs (Zhao *et al.*, 2016)。其中 Weng (2015) 发现 *AcerOBP1* 容易与蜂王信息素结合。Li (2020) 发现 *AcerOBP2* 更容易与一般气味结合。除此之外, *AcerOBP11* 还能与蜜蜂信息素和一些植物挥发物结合 (Song *et al.*, 2018)。最近研究表明, *AcerOBP10* 参与氧化应激防御 (Guo *et al.*, 2021)。

中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 作为中国特有的蜜蜂品种, 具有嗅觉灵敏、采集力强、善于利用零星蜜源植物、抗逆抗病能力强等突出的优点, 适合在中国的山林地区饲养 (杜亚丽等, 2016)。对中华蜜蜂 OBPs 的研究, 不仅可以明确中华蜜蜂的嗅觉识别机制, 还能够为科学饲养管理提供理论

指导。目前对中华蜜蜂 *OBP4* 的研究报道较少, 因此本研究通过分析 *AcerOBP4* 基因在中华蜜蜂不同发育阶段和不同组织中的表达模式及分子特性, 为研究蜜蜂 *OBP4* 蛋白更广泛的生理功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 中华蜜蜂采集

供试蜜蜂均采自广东省科学院动物研究所广州综合试验站蜂场。从幼虫脾上采集正在哺育小幼虫的蜜蜂作为哺育蜂, 只有将头伸进幼虫巢房至少 10 s 的蜜蜂才被认为是哺育蜂。在蜂巢门口采集后足携带花粉的蜜蜂作为采集蜂。最后从成熟的封盖子脾中采集刚出房的 1 日龄成年工蜂。蜜蜂的采样均来自 3 个蜂群, 每个蜂群采集 15 头蜂。

解剖 1 日龄工蜂、哺育蜂和采集蜂, 不同组织部位包括头、胸、腹、足、触角、脑。保存在 -80°C 。

1.2 RNA 提取和 cDNA 合成

按照 Trizol 试剂盒 (Invitrogen, USA) 说明书提取各样品的总 RNA。经核酸测定仪检测 RNA 的浓度后, 使用反转录试剂盒 (AG, 中国大连) 进行 cDNA 合成。合成过程: ①基因组 DNA 的去除。反应总体积为 $10\ \mu\text{L}$: $5\times\ \text{gDNA Eraser Buffer}$ $2.0\ \mu\text{L}$, 总 RNA $500\ \text{ng}$, RNase Free ddH₂O 补足 $10\ \mu\text{L}$ 。反应程序: 42°C 孵育 2 min; ②反转录。反应总体积为 $20\ \mu\text{L}$: $5\times\ \text{Evo M-MLV RT Reaction Mix}$ $4.0\ \mu\text{L}$, RNase Free ddH₂O $6\ \mu\text{L}$ 步骤①的反应液 $10\ \mu\text{L}$ 。反应程序: 37°C 15 min, 85°C 5 s, 4°C , 2 min。

1.3 引物设计

在 NCBI 数据库中搜索中华蜜蜂 *OBP4* (序列号: AKQ98505) 基因的核苷酸序列, 采用 Primer 5.0 软件设计引物, 用 qRT-PCR 实验。

1.4 *AcerOBP4* 的生物信息学分析

在 NCBI 中用 Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 工具进行氨基酸序列的同源性分析; ProtParam (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>) 预测蛋白的分子量、等电点等理化性质; ProtScale (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl>) 进行疏水性分析;

PSORT II (<http://psort.hgc.jp/form2.html>) 和 LocTree 3 (<https://roslab.org/services/loctree3/>) 进行亚细胞定位; 将去除信号肽的氨基酸序列导入在线软件 Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>) 三级结构的预测。利用 DNAMAN 软件进行氨基酸的多序列比对, 采用 MEGA 5.2 软件中的邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建系统发育树, Bootstrap 为 1 000 次。

1.5 荧光定量 PCR 反应

以各样品的 cDNA (反转录之后进行 4 倍稀释) 为模板, 使用 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒进行荧光定量 PCR。反应体系 (20 μ L): SYBR Premix Ex Taq[™] II 10 μ L 上下游引物 (Acerobp4F: 5'-TCGAAGCCTGCGTATTCCAA3'; Acerobp4R: 5'-GCAGCTTCGCTAATACA CTGC 3') 各 0.8 μ L, cDNA 模板 3 μ L, DEPC 水 5.4 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 接着进行 40 个循环: 95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s。测定熔解曲线的反应条件: 以 0.5 $^{\circ}$ C 的升温速度从 60 $^{\circ}$ C 升至 95 $^{\circ}$ C。以 β -actin 为内参, 每个样品进行 2 个技术重复。

1.6 数据处理

对于 qPCR 检测数据, 根据扩增曲线获得的 Ct 值, 采用 $2^{-\Delta CT}$ 法进行数据分析。利用 SPSS 25.0 软件进行单因素方差分析, Duncan 法进行多重比较, 并利用 GraphPad Prism 9.1 软件作图。

2 结果与分析

2.1 AcerOBP4 的分子特性

AcerOBP4 蛋白分子式为 $C_{697}H_{1099}N_{177}O_{219}S_{11}$, 预测分子量为 15.81 kDa, 理论等电点为 4.57。在组成 AcerOBP4 蛋白的 18 种氨基酸中, 谷氨酸 (Glu) 所占的比例最高, 达到 10.9%; 带正电荷氨基酸总数 (Arg + Lys) 为 15, 带负电荷氨基酸总数 (Asp + Glu) 为 16, 表明该蛋白带负电荷; 总平均疏水系数 (GRAVY) 为 -0.167, 不稳定系数为 38.29, 脂溶系数为 91.88, 说明该蛋白比较稳定。AcerOBP4 的氨基酸序列中含有 5 个保守的半胱氨酸位点, 属于 Minus-e OBP 亚家族。

2.2 AcerOBP4 的结构预测

NCBI 在线结构域分析结果表明, AcerOBP4 编码产物的第 51 - 116 位氨基酸之间存在一个昆虫气味结合蛋白家族的保守结构区域 PBP-GOBP superfamily (图 1)。疏水性分析显示, AcerOBP4 的氨基酸序列中, 第 48 位氨基酸 Score 值最低为 -2.733, 第 7、8 位氨基酸最高为 3.289; 存在多个比较明显的疏水区域 (Score 为正值区域), 它们可能是脂溶性气味分子的结合位点。亚细胞定位结果表明, AcerOBP4 蛋白可能存在于内质网 (55.6%)、细胞核 (11.1%)、高尔基体 (11.1%)、线粒体 (11.1%) 和细胞质 (11.1%) 中, 主要集



图 1 AcerOBP4 的保守结构区域预测

Fig. 1 Prediction of AcerOBP4's conservative structure

中在分泌途径上, 说明该蛋白属于分泌型蛋白。以东方蜜蜂 OBP4 为模板对其三维结构进行预测 (图 2), 结构相似性为 24.5%, 无跨膜螺旋 (number of predicted TMHs = 0)。

2.3 AcerOBP4 的氨基酸序列比对和系统进化分析

在 NCBI 核酸数据库将 AcerOBP4 进行 BlastX 分析, 找到与目的基因有同源性的其他昆虫的氨基酸序列。序列比对结果显示。中华蜜蜂 AcerOBP4 与意大利蜜蜂 AmelOBP4 的氨基酸序列一致性最高 (图 3), 达到 78%。使用 MEGA 5.2 软件邻位相连法进行 1 000 次重复计算后构建系统

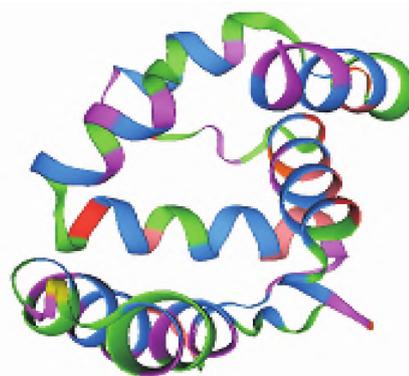


图 2 AcerOBP4 的蛋白质三维结构预测模型

Fig. 2 Three-dimensional prediction structure of AcerOBP4 established by Swiss-Model

进化树。所有选用的昆虫 OBPs 形成两个大的分支 (图 4): 中华蜜蜂 *AcerOBP4*、西方蜜蜂 *AmelOBP4*、松树蜂 *Sirex noctilio* Fabricius *OBP12*、三叶蜂 *Trissolcus japonicus* *OBP3*、胡蜂 *Diachasma alloeum* *OBP69a*、桑蝗聚瘤姬蜂 *Gregopimpla*

kuwanae *OBP7*、布氏游蚁 *Eciton burchelli* *OBP7* 聚为一个分支, 其中 *AcerOBP4* 与 *AmelOBP4* 亲缘关系最近; 角壁蜂 *Osmia cornuta* *OBP1* 和草履蚱 *Drosicha corpulenta* (Kuwana) *OBP15* 聚为另一分支。

	5	15	25	35	45	55	65	75
<i>AmeOBP4</i>	MKITIVSLLC	VIYCAL-VHA	DTVAIL----	-----C	SOKAGFDLSD	LKSMYESNSE	EQMKKLGCFE	ACVFQKLHFM
<i>AcerOBP4</i>	MKITVVFLLC	IYCALDVRA	DAIALL----	-----C	SOKAGFNLDP	LKSIYEDKSE	EQMKKLGCFE	ACVFQKINLM
<i>OcorOBP1</i>	MKFIVAVTCL	LAATTAVRGL	DQDAVIAKYM	EYLMPNVVKP	ADEFHMTEDQ	AKNIQQAADG	MDLKQLGCLK	GVCMKRMGML
<i>DcorOBP15</i>	MNFFVYSVLA	INLLIVSIDD	VLSQDAKYVY	DAETECMVTF	PSITREFMEA	IKQERK-LPD	KPTQDFKCFL	SCVGGKLEAI
<i>EburOBP7</i>	MKTI-LI-AV	LAVLAFVATL	DGFKLTDEQR	SKLKSYSKES	IAETGIDPSV	IDDAKHGQFH	ENDEKLGCFV	TCLMKKIGIM
<i>SnocOBP12</i>	MKLV--AVL	VFVVVISIEN	VESMTRAQIE	NGMKIMRKVC	QPKFGVSNDI	LDAAME-GHF	PADRALQCYQ	KCVLGLMKVL
<i>TjapOBP3</i>	MRFY-GVVTL	LTTVFLINV	ECKLSVPPQLK	GMIAKLKGSC	LKKTGASEEF	LASAHE-GNF	IDDQNFACFQ	KCVFQMMNVL
<i>GkuwOBP7</i>	MKSF----AI	VLAVCFISA-	-AYALTDAQK	AKLKEHRDAG	ITETGVDTAK	VSNAKEGNYD	DADEKLAQFS	ACLLKKIGIM
<i>DalGOBP679a</i>	MNTS-A--TV	LVFCALAVTL	---VLGHHPK	PMFAAAAEK	IEKTGVLDLA	LKTLHETGGV	NADEKLGCFG	AGIMKGLGVM

	85	95	105	115	125	135	145	155
<i>AmeOBP4</i>	-DGNTLNVEK	LESGTRELT-	-PDDFTEDVH	EIIEQVSKA	ADE-DEGMVA	RKYIDCALEK	MKFLDDELEK	IAGN---
<i>AcerOBP4</i>	-DGNTFNVEE	LESRIRELT-	-PDSFTEDVH	EIIEQVISEA	ADE-DEGVVA	RKYTDGALKQ	MKFLDSEWNN	LSYKH---
<i>OcorOBP1</i>	TGNNEFHLEP	VYTMIESVHT	GNDAEIQDVK	KIAEEIISII	QGEPDECNIG	TKYSDCYIQK	LF--N----	-----
<i>DcorOBP15</i>	-VGMELLLDM	LKSIADFDT	GGEFTDEEAH	EAINDIRKA	VTP-DECELS	WEFVDCIVDD	IKKFKLHHTF	CPTCKKHD
<i>EburOBP7</i>	DADGNVDWEV	ARSKLPPDV-	-SQDDF---D	HVFDRCKDIA	-G--DGCKKA	ANLLCALEG	SS--PSHKL	LSDES---
<i>SnocOBP12</i>	-KNDRIQLES	LLKEIGKIL-	-PSDMIERSK	EVSIEVCPKA	TSE-DACEAA	WQFVKCYEET	DK---TMYIF	A-----
<i>TjapOBP3</i>	-KNDRIQEAV	LTKHINTMI-	-EPDIAPILK	DMVHEIAEA	SDE-DDCMAA	LHFVRCYWHK	N---PEMYIF	P-----
<i>GkuwOBP7</i>	NADGTFNEEA	TRAKIPPGI-	-DAAKA---N	EVINKCTET	-GA-TDCETG	RKLYCYLQN	KS--FS---	VLD----
<i>DalGOBP679a</i>	AEDGTVDEVA	AKELVPS---	-DVPDRDKIV	AVIEAHHK	-GA-NECETA	HAIGCMHKN	HM--NDMON-	-----

图 3 中华蜜蜂 *AcerOBP4* 与其他昆虫气味结合蛋白氨基酸序列比对

Fig. 3 Amino acid sequence alignments of *AcerOBP4* with the known OBPs from other insects

注: 保守半胱氨酸位点用黄色方框标注 Conserved cysteine residues were boxed in yellow. OBP 蛋白来源及 GenBank 登录号 Origin of OBP proteins and their GenBank accession numbers: *AmelOBP4*, 意大利蜂 *Apis mellifera* (NP_001011589.1); *AcerOBP4*, 中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* (AAR83081); *OcorOBP1*, 角壁蜂 *Osmia cornuta* (AGI05200); *DcorOBP15*, 草履蚱 *Drosicha corpulenta* (ALV87608); *EburOBP7*, 布氏游蚁 *Eciton burchellii* (KAH0950003); *SnocOBP12*, 松树蜂 *Sirex noctilio* (QHN69053); *TjapOBP3*, 三叶蜂 *Trissolcus japonicus* (QNC49768); *GkuwOBP7*, 柔蝗聚瘤姬蜂 *Gregopimpla kuwanae* (UEN71172); *DalOBP69a*, 胡蜂 *Diachasma alloeum* (XP_015125081)。

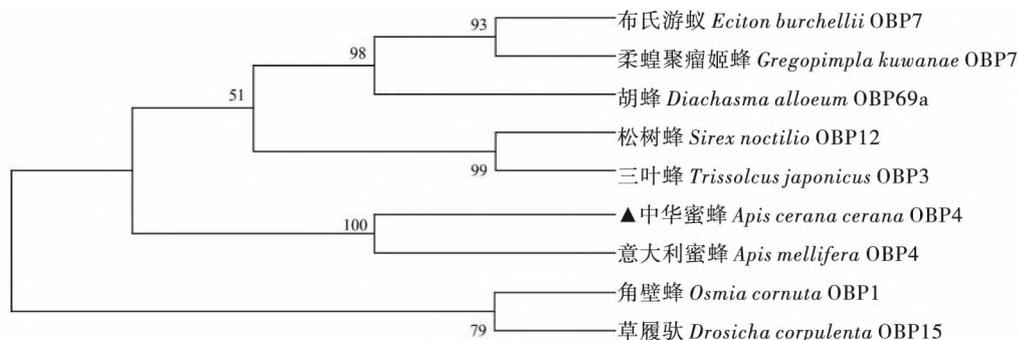


图 4 基于氨基酸序列构建的 OBPs 系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of OBPs based on amino acid sequence

2.4 *AcerOBP4* mRNA 时空表达分析

通过实时荧光定量 PCR 技术分析 *AcerOBP4* mRNA 在 1 日龄工蜂、采集蜂、哺育蜂不同组织中 mRNA 的表达差异, 研究结果发现, *AcerOBP4* 在中华蜜蜂不同发育期的触角、头、胸、腹、足中均有表达, 但其表达程度有差异 (图 5 ~ 图 7)。1 日龄工蜂触角和足的表达量, 均极显著高于其他组织 ($P < 0.01$), 而头、胸、腹、脑的表达量没有差异 ($P > 0.05$)。哺育蜂触角中的表达量极显著高于其他组织 ($P < 0.01$), 而足中表达量极显著高于头、胸、腹、脑部 ($P < 0.01$)。采集蜂触

角中的表达量极显著高于其他组织 ($P < 0.01$), 足中的表达量也显著高于触角之外的其他组织 ($P < 0.01$), 胸部表达量最低。

3 结论与讨论

本研究通过生物信息学分析了中华蜜蜂 *AcerOBP4* 基因序列, 该基因编码 138 个氨基酸, 分子量为 15.81 kDa, 序列中含有保守的半胱氨酸位点, *AcerOBP4* 只有 5 个保守的 Cys 位点, 属于 Minus-C OBP 亚家族。氨基酸同源序列和系统进化

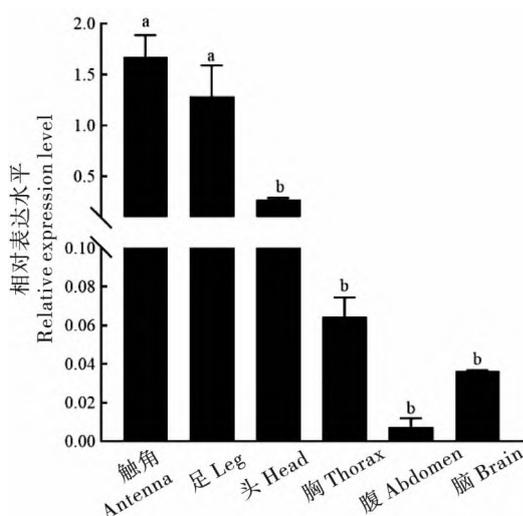


图5 *AcerOBP4* 在 1 日龄中华蜜蜂不同组织中的表达量

Fig. 5 Expression profiles of *AcerOBP4* in different tissues from one-day bees of *Apis cerana cerana*

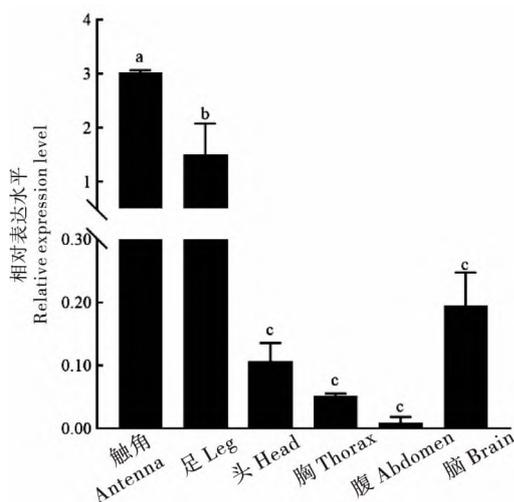


图6 *AcerOBP4* 在中华蜜蜂哺育蜂不同组织中的表达量

Fig. 6 Expression profiles of *AcerOBP4* in different tissues of nurse *Apis cerana cerana*

树分析表明, *AcerOBP4* 与意大利蜜蜂 *AmelOBP14* 同源性较高, 推测它们是直系同源基因。通过对 *AcerOBP4* mRNA 的时空表达分析, 本研究发现在 1 日龄工蜂、哺育蜂、采集蜂 3 个发育阶段, 触角中 *OBP4* 的表达量在任一发育阶段都显著高于其他组织, 此外, 足中的 *OBP4* 是除了触角之外表达量最高的。

有研究已证实, 在昆虫触角中高表达的 OBPs 主要行使嗅觉功能 (Leal *et al.*, 2013; Qiu *et al.*, 2018), 如多音天蚕蛾 *Antheraea polyphemus* ApolPBPs (Vogt and Riddiford, 1981)。斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* SliitGOBP (吴仲南等, 2009)、中华按蚊 *Anopheles sinensis* AsinOBP1 (秦赠等,

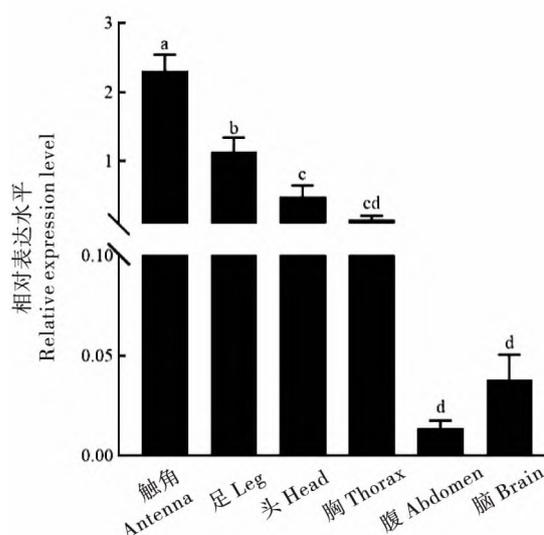


图7 *AcerOBP4* 在中华蜜蜂采集蜂不同组织中的表达量

Fig. 7 Expression profiles of *AcerOBP4* in different tissues of forager *Apis cerana cerana*

2015)、桃蛀螟 *Conogethes punctiferalis* CpunPBP1 (贾小俭等, 2015) 也是在触角中特异性高表达。本研究发现 *AcerOBP4* 在中华蜜蜂各组织中均有表达, 但在触角中表达量相对较高, 作为社会性昆虫, 蜜蜂必须依赖其复杂的嗅觉系统来调节蜂巢内外的一切活动, 如哺育幼虫和蜂王、识别同伴和寻找蜜源植物等。触角是蜜蜂最主要的嗅觉感受器官, 其上分布着大量感器, 而 *OBP4* 在不同日龄工蜂触角的表达量是有变化的, 暗示该基因在蜜蜂的嗅觉调控过程中发挥一定的作用。Forêt (2006) 分析了西方蜜蜂 OBPs 在幼虫、蛹、1 日龄幼蜂和采集蜂的表达量, 结果显示采集蜂, 工蜂和蜂王的触角中 *AmelOBP4* 都存在高表达, 并且在新出房蜜蜂的足中也有表达, 与本研究发现相同, 推测中华蜜蜂的足也参与了蜜蜂的嗅觉行为。

本研究结果表明 *AcerOBP4* 主要在触角中表达, 并且在足中也有表达, 推测 *AcerOBP4* 主要参与中华蜜蜂的嗅觉行为, 为了进一步研究 *AcerOBP4* 的作用, 需要继续对其生物学功能进行深入研究。最后 *AcerOBP4* 在足中的表达量仅次于在触角中的表达量, 表明足可能也参与了中华蜜蜂的嗅觉行为, 这需要进一步研究。

参考文献 (References)

- Du YL, Feng YJ, Ma WH, *et al.* Cloning and differential expression of the *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica* odorant binding protein gene *OBP12* [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2019, 56 (3): 517 - 529. [杜亚丽, 冯宇佳, 马卫华, 等. 中华蜜蜂及意大利蜜蜂气味结合蛋白 *OBP12* 的基因克隆与差异表达分析 [J]. 应用昆虫学报, 2019, 56 (3): 517 - 529]

- Du YL, Zhang ZY, Pan JF, *et al.* Cloning and expression analysis of odorant binding protein gene *AcerOBP14* from *Apis cerana cerana* [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49 (19): 3852–3862. [杜亚丽, 张中印, 潘建芳, 等. 中华蜜蜂气味结合蛋白基因 *AcerOBP14* 的克隆及时空表达 [J]. 中国农业科学, 2016, 49 (19): 3852–3862]
- Dani FR, Iovinella I, Felicioli A, *et al.* Mapping the expression of soluble olfactory proteins in the honeybee [J]. *Proteome Res.*, 2010, 9 (4): 1822–1833.
- Forêt S, Maleszka R, *et al.* Function and evolution of a gene family encoding odorant binding-like proteins in a social insect the honey bee (*Apis mellifera*) [J]. *Genome Research*, 2006, 16 (11): 1404–1413.
- Forêt S, Wanner KW, Maleszka R, *et al.* Chemosensory proteins in the honey bee: Insights from the annotated genome, comparative analyses and expression profiling [J]. *Insect Biochem.*, 2007, 37: 19–28.
- Guo DZ, Hao CH, Cui XP, *et al.* Molecular and functional characterization of the novel odorant-binding protein gene *AcerOBP10* from *Apis cerana cerana* [J]. *Biochem.*, 2021, 169: 215–225.
- Gonzalez D, Rihani K, Neiers F, *et al.* The *Drosophila* odorant-binding protein 28a is involved in the detection of the floral odour β -ionone [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2020, 77 (13): 2565–2577.
- He XJ, Zhang XC, Jiang WJ, *et al.* Starving honey bee (*Apis mellifera*) larvae signal pheromonally to worker bees [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 22359.
- Hu H, Bienefeld K, Wegener J, *et al.* Proteome analysis of the hemolymph, mushroom body, and antenna provides novel insight into honeybee resistance against *Varroa* infestation [J]. *Journal of Proteome Research*, 2016, 15 (8): 2841–2854.
- Ji T, Shen F, Liang Q, *et al.* Cloning, prokaryotic expression and tissue expression profiling of an *OBP3* gene in the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2014, 57 (8): 897–904.
- Jiang X, Ryl M, Krieger J, *et al.* Odorant binding proteins of the desert locust *Schistocerca gregaria* (Orthoptera, Acrididae): Topographic expression patterns in the antennae [J]. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 417–428.
- Jia XJ, Hao SD, Du YL, *et al.* CDNA cloning, expression profiling and binding affinity assay of the pheromone binding protein *Cpun-PBP1* in the yellow peach moth, *Conogethes punctiferalis* (Lepidoptera: Crambidae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2015, 58 (11): 1167–1176. [贾小俭, 郝少东, 杜艳丽, 等. 桃蛀螟性信息素结合蛋白 *Cpun-PBP1* 的 cDNA 克隆、表达谱及其与配体化合物的结合特性分析 [J]. 昆虫学报, 2015, 58 (11): 1167–1176]
- Li HL, Song XM, Wu F, *et al.* Chemical structure of semiochemicals and key binding sites together determine the olfactory functional modes of odorant-binding protein 2 in Eastern honeybee, *Apis cerana* [J]. *Biol. Macromol.*, 2020, 14: 876–884.
- Leal WS. Odorant reception in insects: Roles of receptors, binding proteins and degrading enzymes [J]. *Annual Review of Entomology*, 2013, 58: 373–391.
- Li TT, Liu WC, Zhu J, *et al.* Crystal structure and ligand identification of odorant binding protein 4 in the natural predator *Chrysopa pallens* [J]. *Biol. Macromol.*, 2019, 141: 1004–1012.
- Pelosi P, Iovinella I, Felicioli A, *et al.* Soluble proteins of chemical communication: An overview across arthropods [J]. *Frontiers in Physiology*, 2014, 5: 320.
- Qiu L, Tao S, He H, *et al.* Transcriptomics reveal the molecular underpinnings of chemosensory proteins in *Chlorops oryzae* [J]. *BMC Genomics*, 2018, 19 (1): 890.
- Qin Z, Ran YH, Zhi ZQ, *et al.* Cloning and expression analysis of an odorant binding protein gene *AsinOBP1* from *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2014, 57 (11): 1289–1298. [秦贻, 冉永红, 支中婧, 等. 中华按蚊气味结合蛋白基因 *AsinOBP1* 的克隆和表达分析 [J]. 昆虫学报, 2014, 57 (11): 1289–1298]
- Song XM, Zhang LY, Fu X, *et al.* Various bee pheromones binding affinity, exclusive chemosensillar localization, and key amino acid sites reveal the distinctive characteristics of odorant-binding protein 11 in the eastern honeybee, *Apis cerana* [J]. *Front. Physiol.*, 2018, 9: 422.
- Sun YL, Huang LQ, Pelosi P, *et al.* Expression in antennae and reproductive organs suggests a dual role of an odorant-binding protein in two sibling *Helicoverpa* species [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7 (1): e30040.
- Spinelli S, Lagarde A, Legrand P, *et al.* Crystal structure of *Apis mellifera* *OBP14*, a C-minus odorant-binding protein, and its complexes with odorant molecules [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2012, 42 (1): 41–50.
- Smartt CT, Erickson JS. Expression of a novel member of the odorant binding protein gene family in *Culex nigripalpus* (Diptera: Culicidae) [J]. *Journal of Medical Entomology*, 2009, 46 (6): 1376–1381.
- Vogt RG, Riddiford LM. Pheromone binding and inactivation by moth antennae [J]. *Nature*, 1981, 293 (5828): 161–163.
- Weng C, Fu Y, Jiang H, *et al.* Binding interaction between a queen pheromone component HOB and pheromone binding protein *ASPI1* of *Apis cerana* [J]. *Biol. Macromol.*, 2015, 72: 430–436.
- Wu F, Ma C, Han B, *et al.* Behavioural, physiological and molecular changes in alloparental caregivers may be responsible for selection response for female reproductive investment in honey bees [J]. *Mol. Ecol.*, 2019, 28 (18): 4212–4227.
- Wu ZN, Du YJ, ZhuGe QC. Expression and localization analysis of general odorant binding protein I (*GOBP1*) gene in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2009, 52 (2): 610–616. [吴仲南, 杜永均, 诸葛启钊. 斜纹夜蛾普通气味结合蛋白 *GOBP1* 基因的表达定位分析 [J]. 昆虫学报, 2009, 52 (2): 610–616]
- Zhao H, Du Y, Gao P, *et al.* Antennal transcriptome and differential expression analysis of five chemosensory gene families from the Asian honeybee *Apis cerana cerana* [J]. *PLoS ONE*, 2016, 11: e0165374.
- Zhao Y, Ding J, Zhang Z, *et al.* Sex- and tissue-specific expression profiles of odorant binding protein and chemosensory protein genes in *Bradysia odoriphaga* (Diptera: Sciaridae) [J]. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9 (4): 107–123.
- Zhao HT, Peng Z, Huang L, *et al.* Expression profiles of odorant binding proteins in head of the Western honeybee, *Apis mellifera ligustica* [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2021, 43 (5): 1229–1236. [赵慧婷, 彭竹, 黄丽, 等. 气味结合蛋白 *OBPs* 在意大利蜜蜂头部表达模式的研究 [J]. 环境昆虫学报, 2021, 43 (5): 1229–1236]