

DOI:10.12171/j.1000-1522.20240102

长林小蠹气味降解酶基因的鉴定与分子对接

李相淳 陶静 李心钰 宗世祥

(北京林业大学林学院, 北京 100083)

摘要:【目的】对长林小蠹的气味降解酶相关基因进行筛选、分类与组织表达分析,为后续利用分子生物学手段调控长林小蠹的行为提供理论依据。【方法】在长林小蠹全基因组数据中筛选关键的气味降解酶基因,并进行基因的系统发育分析与成虫的组织表达分析。利用同源建模预测气味降解酶基因的三维结构,对模型结构进行合理性评估后,使用 Autodock1.5.7 软件进行分子对接的模拟。【结果】在长林小蠹全基因组数据中共鉴定出 65 个候选的气味降解酶基因,其中谷胱甘肽-S-转移酶的数量为 11 个,细胞色素 P450 的数量为 46 个,羧酸酯酶的数量为 8 个。系统发育结果显示,长林小蠹的气味降解酶基因相对保守。成虫的组织表达分析结果显示,长林小蠹气味降解酶相关基因主要在触角中表达,且谷胱甘肽-S-转移酶与细胞色素 P450 两类基因家族的表达量较高。分子对接结果显示,长林小蠹气味降解酶和不同气味分子之间的结合能普遍较低且差异较小,形成的分子间作用力较为固定。【结论】在长林小蠹的触角中显著表达的气味降解酶基因类型主要为谷胱甘肽-S-转移酶与细胞色素 P450,分子对接的结果证明长林小蠹的气味降解酶基因具有普遍降解气味分子的能力,且分子间的结合方式相似。

关键词: 长林小蠹; 气味降解酶; 基因鉴定; 同源建模; 分子对接; 害虫防治

中图分类号: S763.38 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-1522(2025)02-0079-16

引文格式: 李相淳, 陶静, 李心钰, 等. 长林小蠹气味降解酶基因的鉴定与分子对接 [J]. 北京林业大学学报, 2025, 47(2): 79-94. Li Xiangchun, Tao Jing, Li Xinyu, et al. Identification and molecular docking of odorant-degrading enzyme genes in *Hylurgus ligniperda* [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2025, 47(2): 79-94.

Identification and molecular docking of odorant-degrading enzyme genes in *Hylurgus ligniperda*

Li Xiangchun Tao Jing Li Xinyu Zong Shixiang

(School of Forestry, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: [Objective] This paper aims to screen, classify, and analyze the tissue expression of odor degradation enzyme-related genes in *Hylurgus ligniperda*. The results of this study will provide a theoretical foundation for utilizing molecular biology techniques to effectively regulate the behavior of *Hylurgus ligniperda*. [Method] Key odor-degrading enzyme genes were screened from the whole-genome data of *Dendroctonus longipennis*. Phylogenetic analysis of the genes and tissue expression analysis of the adults were conducted. Homology modeling was used to predict the three-dimensional structure of the odor-degrading enzyme genes. After the rationality of the model structure was evaluated, molecular docking simulation was performed using Autodock1.5.7 software. [Result] The analysis revealed a total of 65 potential odor degradation enzyme genes within the complete genome data of *Hylurgus ligniperda*. Among them, 11 were identified as glutathione S-transferase genes, 46 as cytochrome P450 genes, and 8 as esterase genes. The phylogenetic analysis displayed a relatively conserved nature of odor degradation enzyme genes

收稿日期: 2024-04-07 修回日期: 2024-05-22

基金项目: 国家重点研发计划(2021YFD1400300)。

第一作者: 李相淳。主要研究方向: 森林保护学。Email: 17600746697@163.com 地址: 100083 北京市海淀区清华东路北京林业大学林学院。

责任作者: 宗世祥, 博士, 教授。主要研究方向: 森林保护学。Email: zongsx@126.com 地址: 同上。

本刊网址: <http://j.bjfu.edu.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

in *Hylurgus ligniperda*. Furthermore, the gene expression distribution in adult beetle tissues indicated that odor degradation enzyme-related genes were predominantly expressed in the antennae, with higher levels of expression observed in the glutathione S-transferase and cytochrome P450 gene families. Notably, the molecular docking results demonstrated that the binding energies between the odor degradation enzymes of *Hylurgus ligniperda* and various odor molecules were consistently low and exhibited minimal differences, indicating a stable intermolecular interaction force. [Conclusion] The significant expression of glutathione S-transferase and cytochrome P450 genes in antennae of *Hylurgus ligniperda* reinforces their vital role in odor degradation. Furthermore, the molecular docking results confirm the universal ability of odor degradation enzyme genes of *Hylurgus ligniperda* in breaking down odor molecules, with similar intermolecular binding modes observed.

Key words: *Hylurgus ligniperda*; odorant-degrading enzymes; gene identification; homologous modeling; molecular docking; pest control

长林小蠹(*Hylurgus ligniperda*)隶属于鞘翅目(Coleoptera),象甲科(Curculionidae),小蠹亚科(Scolytinae),林小蠹属(*Hylurgus*),主要危害松属(*Pinus*)植物,已被列为世界各国进境植物检疫性有害生物的重要林业害虫之一^[1-2]。长林小蠹属于次期性害虫,其寄主范围较广,主要危害新伐树与受损伤的树木,多见于采伐迹地与火灾迹地。该物种原产于欧洲南部、俄罗斯以及非洲北部的地中海沿岸地区,随后逐渐传播并定殖于美洲、澳大利亚、新西兰及亚洲等地区^[3-6]。中国首次发现该物种是在2019年,于山东省泰安市发现并诱捕获得,之后在山东省烟台市、威海市、日照市等地区均有报告。长林小蠹具有较强的适生能力,已在中国及其他亚洲国家传播并定殖。小蠹等钻蛀性害虫的传播与定殖能力,与其复杂的嗅觉机制密切相关。因此,深入研究长林小蠹的嗅觉机制,对于理解其寄主选择行为以及开发有效的信息素监测于防控策略具有重要的意义。在昆虫嗅觉相关蛋白中,气味降解酶(odorant-degrading enzymes, ODEs)作为昆虫嗅觉感受器中参与嗅觉活动的一类蛋白质,在昆虫对外界环境中气味分子的识别过程发挥着重要的作用。当气味分子完成对昆虫气味受体的刺激后,气味降解酶会将多余的气味分子快速降解掉,维持嗅觉感受系统的灵敏性。否则多余的气味分子会对受体保持持续刺激,可能对昆虫的神经系统造成损害^[7-8]。在昆虫触角淋巴液中的气味降解酶主要包括谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione-S-transferase, GSTs)、细胞色素 P450 氧化还原酶(cytochrome P450 reductase, CYPs)、羧酸酯酶(carboxylesterase, CXEs)和醛氧化酶(aldehydeoxidase, AOXs)等。在棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)、甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)等研究中发现,特定的谷胱甘肽-S-转移酶基因能够降解性信息素以及其他挥发性有机化合物,在昆虫嗅觉信号

的消除和嗅觉敏感性的恢复中起到关键作用^[9-10]。近年来研究表明,昆虫体内的细胞色素 P450 能够催化多种底物的氧化反应,这一特性使其在昆虫对环境毒素的适应中发挥重要作用。研究发现,细胞色素 P450 在家蝇(*Musca domestica*)和异发丽金龟(*Phyllopertha diversa*)中也具有降解性信息素的能力^[11-12]。对昆虫气味降解酶的研究,不仅有助于深入揭示昆虫的气味通讯分子机制,而且对于开发基于昆虫嗅觉相关蛋白的林业害虫防治调控技术具有重要的科学价值^[13-14]。

随着计算机生物技术的普及以及生物信息学的发展,分子对接技术从最初的医药领域逐渐拓展到其他领域。分子对接技术通过在蛋白质数据库中筛选与未知蛋白序列相似度高的蛋白模型,经过质量评价分析后,将这些蛋白模型与配体分子进行模拟对接。通过计算结合能,筛选出潜在的对生物行为活动起到调节作用的物质^[15-16]。分子对接还可以探究蛋白与配体分子的结合模式,比较不同蛋白的结合方式,从而提高蛋白与配体的筛选效率。

本研究从长林小蠹全基因组中筛选出所有可能具有气味降解相关功能的基因,并进行系统发育分析与进化树的构建。利用实时荧光定量 PCR 法,分析气味降解酶基因在长林小蠹成虫不同组织中的表达。结合组织表达的结果,最终选择在触角中高度表达的基因进行同源建模,并与寄主黑松(*Pinus thunbergii*)的主要挥发物配体分子进行分子对接,探究气味降解酶与气味分子的结合情况,以期为今后利用化学生态手段调控长林小蠹的嗅觉行为提供理论基础。

1 材料与方法

长林小蠹的成虫样品采集时间为2023年3—6月,采样于山东省烟台市牟平区沿海防护林带。通

过挖取受长林小蠹侵害的寄主松树根部,挑选体态合适、无损伤的成虫,用新鲜树皮装盒饲养。饲养条件为室温 25 °C、无光照,用水浸湿新鲜树皮保证环境的湿润,并保持良好的通风。饲养一周后,将成虫浸泡于 RNA Later 溶液中,并置于-80 °C 冰箱保存,以备后续试验使用。

1.1 长林小蠹气味降解酶基因的筛选与系统发育分析

长林小蠹气味降解酶相关基因的筛选数据,来源于课题组已获得的长林小蠹全基因组数据。将获得的全基因序列在 NR(non-redundant protein sequence database)数据库中筛选比对;进行 GO 分析,搜索 KOG 和 KEGG 数据库以分类长林小蠹基因片段的功能;最终获得全部基因序列的比对目标序列 id、序列比对一致度、符合比对的区域长度、比对区域的错配数对比结果的期望值以及基因注释结果。

在全基因组的基因注释结果中,筛选注释结果为谷胱甘肽-S-转移酶、醛氧化酶、羧酸酯酶、细胞色素 P450 的相关基因,关键词为 GST、CXE、AOX、CYP450。过滤掉序列长度过短(<50 bp),注释内容标注有 fragment、isoform 的序列。再运用 NCBI 的 BLASTX 在线工具进行比对,以 NCBI 数据库中其他昆虫的细胞色素 P450、谷胱甘肽-S-转移酶、羧酸酯酶和醛氧化酶蛋白的可用序列作为查询序列,根据比对的分数确定候选气味降解酶基因,确定相似度最高的基因序列^[17]。将筛选出的基因及序列整理归类,作为气味降解酶的相关基因用于后续研究。

搜索已有研究中其他物种的气味降解酶相关基因,获取基因名称与 Genbank 登录号。从 GenBank 数据库中下载各物种 ODEs 核苷酸序列,使用 Clustal W 软件进行比对,比对结果导入 MEGAX 软件(<http://www.megasoftware.net>),通过最大似然法构建系统发育树。对结果进行 1 000 次分枝支持度的计算^[18],探究长林小蠹气味降解酶相关基因与其他物种之间的亲缘关系。使用 iTOL(<https://itol.embl.de/>)在线网站对进化树进行美化。

1.2 长林小蠹气味降解酶基因的组织表达分析

长林小蠹成虫由于虫体过小,因此使用体式显微镜与微型镊子、微型解剖针等工具。将成虫从-80 °C 冰箱中取出后立即放置于冰上进行解剖,以防 RNA 降解。分别取下长林小蠹的触角、头部、腹部、足 4 部分,提取不同组织的总 RNA。每次提取一次 RNA 所需解剖的长林小蠹成虫数量为腹部 10 头、头部 50 头、足 50 头、触角 120 头。每个组织的 RNA 提取过程均进行了 3 次生物学重复和 3 次技术重复(所用试剂盒为 Aidlab 公司生产的组织 RNA 快速提取试剂盒)。气味降解酶相关基因的组

织表达首先采用半定量 RT-PCR 法进行初步筛选,并验证设计引物的可行性。首先,进行 cDNA 扩增,将长林小蠹各组织提取出的 RNA 溶液作为模板,使用 TAKARA 公司生产的反转录试剂盒 PrimeScript RT reagent Kit with DNA Eraser 进行反转录,合成 cDNA 第一链。接着,通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳法分析 PCR 产物,确定引物的特异性。RT-PCR 反应和实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)反应均需使用基因特异性引物。使用 Primer Premier 6 软件对筛选出的气味降解酶相关基因进行引物的设计。根据半定量 RT-PCR 试验结果,筛选出长林小蠹各组织中相对高度表达的基因。再通过 qRT-PCR 法进行筛选。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算每个基因相对于内参基因的表达水平,并采用单因素方差分析法检测分析基因表达水平的差异^[19]。

1.3 建模模板与配体分子的选择

气味降解酶蛋白的建模模板:根据实时荧光定量 PCR 结果,筛选出在长林小蠹触角中高度表达的 11 个气味降解酶相关基因进行蛋白质三维模型的构建。其中包括 4 条谷胱甘肽-S-转移酶基因与 7 条细胞色素 P450 基因。

配体分子:选择长林小蠹寄主植物黑松的主要挥发物成分作为分子对接的配体。挥发物成分主要有 β -月桂烯、松油烯、十一烷、壬醛、茨烯、3-萜烯、磷酸三丁酯、 α -松油醇、D-柠檬烯、 α -蒎烯、 β -蒎烯。气味分子的配体文件从 Pubchem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)中获取。

气味降解酶相关蛋白的结构建模,利用 swissmodle 在线网站,将对应的氨基酸序列与数据库中的模板进行比对,搜索用于构建模型的最佳模板。所筛选的模板的氨基酸序列应与目标 ODE 氨基酸序列的一致性大于 20%,且模板覆盖率达到 85% 以上^[20]。筛选出最佳模板后使用 Pymol4.6 软件对蛋白结构可视化,用于后续分子对接使用。

为确保从同源建模中获得的模型的质量,使用 SAVES v6.0(<https://saves.mbi.ucla.edu/>)网站对筛选蛋白的三维蛋白模型进行评估。其中,Procheck 法通过评估残基几何参数是否符合高分辨率结构的立体化学标准,检查蛋白质结构的立体化学质量,评价形式以拉氏构象图来显示^[21]。拉式图中超过 90% 的残基位于红色的允许区域和黄色的额外允许区域内,则认为模型合格。VERIFY_3D 是根据结构的原子坐标计算得出正确的蛋白质结构,比较氨基酸的三维结构与一级结构的兼容性。结果中超过 80% 的氨基酸残基得分大于 0.2 分则认为模型是合理的。

使用 AutoDock-1.5.7 软件对蛋白与气味分子进

行对接。首先,对蛋白模型进行前处理,对蛋白结构去水、添加氢原子、进行电荷校正和化学键的修正,并将其保存为 PDBQT 格式的文件。其次,对配体小分子进行了加氢原子生成 3D 结构、加电荷和加 Root 的处理,将其保存为 PDBQT 格式的文件。接下来,设置对接网格的大小和空间位置,网格大小设置为 $x = 126, y = 126, z = 126$ 。格点数、格点距离等参数采用系统默认值。运行 AutoGrid4 程序后,生成 glg 文件与针对不同原子探针的范德华作用力、静电力以及去溶剂化作用力的 map 文件。在 Docking 过程中,选择半柔性对接,并采用拉马克遗传算法作为对接算法,并将其保存为 dpf 文件。dpf 文件中包含了分子对接的参数,默认对接的构象数为 10 个。AutoDock4 程序运行完成后,生成 dlg 文件,其中包含了按照结合能排序的 10 个最佳构象。选择结合能最小的构象进行分析和评价^[16]。最后,使用 Pymol 4.6 软件对分子对接的结果进行图像的可视化和美化。

2 结果与分析

2.1 谷胱甘肽-S-转移酶的鉴定与系统进化发育树

共筛选出 11 条长林小蠹的谷胱甘肽 S 转移酶基因,基因的序列长度在 264 ~ 696 bp 之间,均具有完整的开放阅读框(open reading frame, ORF),编码的蛋白长度在 87~231 个氨基酸残基之间(表 1)。预测的分子质量为 10.1 ~ 27.1 kDa,等电点理论预测值为 4.50 ~ 9.70。BLASTX 比对结果显示,9 个长林小蠹谷胱甘肽-S-转移酶基因与中欧山松大小蠹(*Dendroctonus ponderosae*)的基因具有较高的同源性,均在 60% 以上。*HligGSTe1* 与稻水象甲(*Lissorhoptrus oryzophilus*)的同源性最高(82.2%),

HligGSTe2 与米象(*Sitophilus oryzae*)的同源性最高,为 53.3%。

使用软件 MegaX 构建长林小蠹 HligGSTs 和其他昆虫的谷胱甘肽-S-转移酶系统发育树^[22-24]。结合系统发育进化树构建的结果(图 1),长林小蠹的 11 条谷胱甘肽-S-转移酶基因片段分别位于 GSTs 的 3 个亚家族中。其中,2 条在 Epison 亚家族,6 条在 Sigma 亚家族,3 条在 Tau 亚家族。分析表明,*HligGSTs1* 与华山松大小蠹(*Dendroctonus armandi*)的 DaGSTs4 聚为一支,*HligGSTs3* 与华山松大小蠹的 DaGSTs7 聚为一支,并与 *HligGSTs2* 同属相同的分支;*HligGSTs4* ~ *HligGSTs6* 同属于相同的分支,其中 *HligGSTs6* 与中欧山松大小蠹的 DponGSTs1 聚为一支,说明其遗传距离较近;*HligGSTe1* 与华山松大小蠹的 DaGSTe10 聚为一支,*HligGSTe2* 与华山松大小蠹的 DaGSTe7 聚为一支;*HligGSTu1*、*HligGSTu2*、*HligGSTu3* 均聚在一小枝上,并与华山松大小蠹的 DaGSTt2、DaGSTt3 聚为一支。

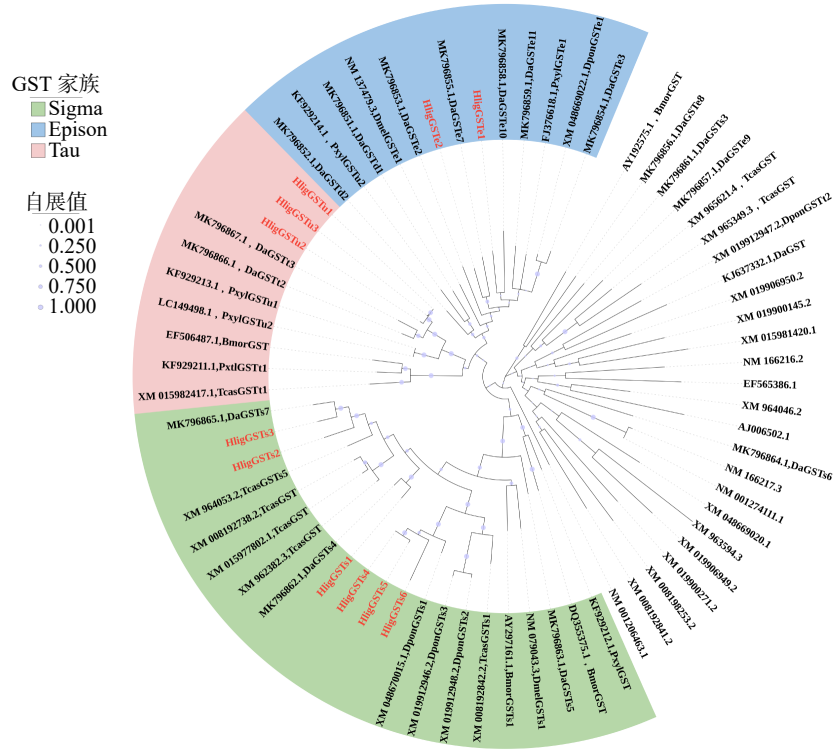
2.2 细胞色素 P450 的鉴定与系统进化发育树

共筛选出 46 条长林小蠹的细胞色素 P450 (*CYP450*)基因,基因的序列长度总体在 1 071 ~ 2 088 bp 之间,均具有完整的 ORF,编码的蛋白长度 356 ~ 695 个氨基酸残基。预测的分子质量为 40.5 ~ 79.0 kDa,等电点理论预测为 5.30 ~ 10.25 (表 2)。BLASTX 比对结果显示,长林小蠹细胞色素 P450 基因中 44 条序列与同属鞘翅目的华山松大小蠹、中欧山松大小蠹高度同源。*HligCYP4b6*、*HligCYPM2* 与米象序列的同源性最高。根据进化树(图 2)可知,长林小蠹的 44 条 *CYP450* 基因分属于

表 1 长林小蠹谷胱甘肽-S-转移酶基因最佳比对结果

Tab. 1 Best comparison results of glutathione-S-transferase genes in *Hylurgus ligniperda*

基因名称	长度/bp	开放阅读框/aa	分子量/kDa	等电点	Blastx最佳比对结果			
					比对物种	得分	期望值	相似度/%
<i>HligGSTu1</i>	696	231	27.1	6.75	中欧山松大小蠹 <i>Dendroctonus ponderosae</i>	382	8.18 ⁻¹³³	76.5
<i>HligGSTu2</i>	489	162	18.8	6.51	中欧山松大小蠹 <i>D. ponderosae</i>	263	5.79 ⁻⁸⁷	80.4
<i>HligGSTu3</i>	507	168	19.9	8.74	中欧山松大小蠹 <i>D. ponderosae</i>	277	1.22 ⁻⁹²	76.2
<i>HligGSTs3</i>	687	228	26.1	9.08	中欧山松大小蠹 <i>D. ponderosae</i>	298	4.27 ⁻¹⁰⁰	69.0
<i>HligGSTs4</i>	624	207	23.5	9.06	中欧山松大小蠹 <i>D. ponderosae</i>	331	1.73 ⁻¹¹³	77.3
<i>HligGSTs5</i>	453	150	17.0	6.61	中欧山松大小蠹 <i>D. ponderosae</i>	243	1.31 ⁻⁷⁹	78.8
<i>HligGSTs6</i>	264	87	10.1	9.70	中欧山松大小蠹 <i>D. ponderosae</i>	117	4.29 ⁻³¹	61.3
<i>HligGSTs1</i>	618	205	23.2	5.43	中欧山松大小蠹 <i>D. ponderosae</i>	360	3.91 ⁻¹²⁵	82.4
<i>HligGSTs2</i>	621	206	23.1	4.92	中欧山松大小蠹 <i>D. ponderosae</i>	236	2.97 ⁻⁷⁶	57.6
<i>HligGSTe1</i>	678	225	25.3	4.57	稻水象甲 <i>Lissorhoptrus oryzophilus</i>	390	3.28 ⁻¹³⁶	82.2
<i>HligGSTe2</i>	672	223	25.6	4.50	米象 <i>Sitophilus oryzae</i>	227	3.78 ⁻⁷²	53.3



GSTs 相关基因标记为红色。Tcas. 赤拟谷盗; Dpon. 中欧山松大小蠹; Da. 华山松大小蠹; Pxyl. 小菜蛾; Bmor. 家蚕; Dmel. 黑腹果蝇

图 1 长林小蠹 HligGSTs 系统发育分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of HligGSTs in *Hylurgus ligniperda*

5 个 CYP 亚家族, 包括 CYP4、CYP6、CYP9、CYP12 和线粒体亚家族。由系统发育树可知, 长林小蠹细胞色素 P450 蛋白多为自成一支, 同其他已鉴定出气味降解功能的物种相比, 多数长林小蠹的细胞色素 P450 蛋白与赤拟谷盗 (*Tribolium castaneum*) 聚为一支, 遗传距离更近。HligCYP6DF1 与 HligCYP6n1 不属于 CYP 亚家族的任何分支, 且遗传距离较其他基因长, 表明这两个蛋白功能不同于其他的细胞色素 P450 蛋白。

2.3 羧酸酯酶的鉴定与系统进化发育树

共筛选出 8 条长林小蠹的羧酸酯酶 (CXEs) 基因, 基因的序列长度 1 296 ~ 2 031 bp, 均具有完整的 ORF, 编码的蛋白长度在 431 ~ 676 个氨基酸残基之间。预测的分子质量为 43.0 ~ 67.1 kDa, 等电点理论预测为 5.93 ~ 9.22 (表 3)。BLASTX 比对结果显示, 7 个长林小蠹羧酸酯酶基因与中欧山松大小蠹的谷胱甘肽-S-转移酶基因具有较高的同源性, 均在 63% 以上。HligCXE8 与米象一致性最强, 为 68.4%。与其他已鉴定出具有气味降解功能的物种构建的系统发育树结果 (图 3) 显示: HligCXE1 ~ HligCXE7 与甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) 的 SexiCXE13 聚在同一枝, 表明其具有相似的功能, 遗传距离更近; HligCXE8 独自为一支, 表明其与其他 7 个羧酸酯酶蛋白功能相似度不高。

2.4 长林小蠹气味降解酶基因的组织表达分析

通过 RT-PCR 反应共筛选出长林小蠹的 23 个基因, 其中包括 19 个细胞色素 P450 基因和 4 个谷胱甘肽-S-转移酶基因。利用 qRT-PCR 技术研究这 23 个基因在长林小蠹成虫的 4 种不同组织 (触角、头部、腹部和腿部) 的表达。将头部的表达量作为对照组, 绘制气味降解酶相关基因的组织表达谱 (图 4)。结果显示: 4 个谷胱甘肽-S-转移酶基因中, HligGSTu1、HligGSTe1、HligGSTs3、HligGSTs6 在触角中的表达量均高于头部, 其中 HligGSTs3 也在腹部和足部表达, HligGSTs6 在腹部有表达, HligGSTu1、HligGSTe1 在腹部和足部表达量较低; 19 个 CYP450 基因中, HligCYP6a8、HligCYP12a4、HligCYP4b1、HligCYP6a6、HligCYP4a5、HligCYP9a2、HligCYP12a6 在触角的表达量高于头部, 其中 HligCYP4a5、HligCYP6a6 与 HligCYP12a6 在的触角表达尤其显著; HligCYP4b3、HligCYP4a7 在腹部的表达显著, HligCYP4a5、HligCYP12a6、HligCYP9a2 在足部的表达显著。相对非嗅觉器官, 长林小蠹的 GST 基因与 CYP450 基因多在嗅觉器官中表达。

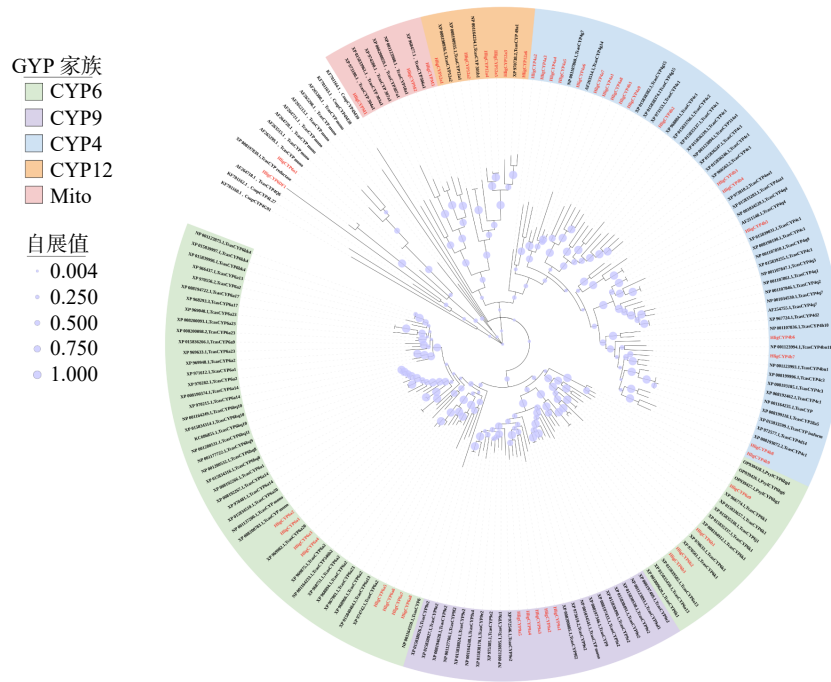
2.5 模型模板的选择

与 HligGSTu1 氨基酸序列一致性最高的模板是中欧山松大小蠹的 GST 蛋白, 模板编号 J3JYS3.1.A, 序列一致性为 77.83%, 模板覆盖率 100%; 与

表2 长林小蠹细胞色素 P450 基因最佳比对结果

Tab. 2 Best comparison results of cytochrome P450 genes in *Hylurgus ligniperda*

基因名称	长度/bp	开放阅读框/aa	分子量/kDa	等电点	Blastx最佳比对结果			
					比对物种	得分	期望值	相似度/%
<i>HligCYP6b3</i>	1 587	528	61.1	9.16	华山松大小蠹 <i>Dendroctonus armandi</i>	881	0	81.7
<i>HligCYP12a1</i>	1 452	483	55.5	8.17	中欧山松大小蠹 <i>D. ponderosae</i>	858	6.55 ⁻³¹³	85.9
<i>HligCYP12a2</i>	1 557	518	58.9	8.34	华山松大小蠹 <i>D. armandi</i>	853	0	86.8
<i>HligCYP12a3</i>	1 578	525	60.5	8.98	华山松大小蠹 <i>D. armandi</i>	962	0	91.4
<i>HligCYP12a4</i>	1 536	511	58.6	8.64	中欧山松大小蠹 <i>D. ponderosae</i>	863	1.77 ⁻³¹³	86.3
<i>HligCYP12a5</i>	1 596	531	61.4	8.58	华山松大小蠹 <i>D. armandi</i>	922	0	84.9
<i>HligCYP12a6</i>	1 761	586	67.4	8.63	中欧山松大小蠹 <i>D. ponderosae</i>	992	0	85.0
<i>HligCYP4a1</i>	1 545	514	58.4	6.30	华山松大小蠹 <i>D. armandi</i>	912	0	88.3
<i>HligCYP4a2</i>	1 182	393	45.3	6.53	中欧山松大小蠹 <i>D. ponderosae</i>	605	2.11 ⁻²¹⁴	77.7
<i>HligCYP4a3</i>	222	73	84.4	10.25	中欧山松大小蠹 <i>D. ponderosae</i>	57	3.07 ⁻⁰⁸	66.7
<i>HligCYP4a4</i>	1 515	504	58.2	8.54	中欧山松大小蠹 <i>D. ponderosae</i>	335	1.07 ⁻¹⁰⁶	36.4
<i>HligCYP4a5</i>	1 314	437	50.1	8.59	中欧山松大小蠹 <i>D. ponderosae</i>	665	3.60 ⁻²³⁷	72.7
<i>HligCYP4a6</i>	1 692	563	64.8	7.02	华山松大小蠹 <i>D. armandi</i>	1 006	0	87.7
<i>HligCYP4a7</i>	1 692	563	64.5	7.64	华山松大小蠹 <i>D. armandi</i>	1 036	0	90.6
<i>HligCYP4a8</i>	1 485	494	57.2	9.04	中欧山松大小蠹 <i>D. ponderosae</i>	743	7.94 ⁻²⁶⁷	74.6
<i>HligCYP4a9</i>	1 491	496	56.8	8.74	华山松大小蠹 <i>D. armandi</i>	701	9.40 ⁻²⁵¹	76.5
<i>HligCYP4b1</i>	1 515	504	58.4	8.48	中欧山松大小蠹 <i>D. ponderosae</i>	795	3.09 ⁻²⁸⁷	78.5
<i>HligCYP4b2</i>	1 548	515	59.2	7.54	中欧山松大小蠹 <i>D. ponderosae</i>	828	6.63 ⁻³⁰⁰	79.0
<i>HligCYP4b3</i>	1 521	506	58.6	8.74	中欧山松大小蠹 <i>D. ponderosae</i>	849	5.20 ⁻³⁰⁸	76.9
<i>HligCYP4b4</i>	1 467	488	56.3	8.70	中欧山松大小蠹 <i>D. ponderosae</i>	730	2.99 ⁻²⁶²	73.0
<i>HligCYP4b5</i>	1 509	502	58.1	9.00	华山松大小蠹 <i>D. armandi</i>	774	4.84 ⁻²⁷⁹	74.1
<i>HligCYP4b6</i>	1 509	502	58.4	6.77	米象 <i>Sitophilus oryzae</i>	500	5.67 ⁻¹⁷¹	52.8
<i>HligCYP4b7</i>	1 491	496	56.8	9.06	中欧山松大小蠹 <i>D. ponderosae</i>	742	1.86 ⁻²⁶⁶	74.6
<i>HligCYP4b8</i>	1 332	443	50.3	6.44	中欧山松大小蠹 <i>D. ponderosae</i>	604	4.50 ⁻²¹³	67.9
<i>HligCYP4b9</i>	1 491	496	57.2	7.62	华山松大小蠹 <i>D. armandi</i>	783	1.42 ⁻²⁸²	78.3
<i>HligCYP6a1</i>	1 551	516	59.7	8.57	中欧山松大小蠹 <i>D. ponderosae</i>	700	3.19 ⁻²⁴⁹	67.5
<i>HligCYP6a2</i>	1 137	378	43.7	7.01	中欧山松大小蠹 <i>D. ponderosae</i>	499	1.85 ⁻¹⁷⁴	67.4
<i>HligCYP6a3</i>	1 518	505	58.6	9.16	华山松大小蠹 <i>D. armandi</i>	889	0	85.7
<i>HligCYP6a4</i>	1 071	356	40.5	8.78	华山松大小蠹 <i>D. armandi</i>	521	2.25 ⁻¹⁸¹	69.6
<i>HligCYP6a5</i>	1 533	510	58.1	9.10	中欧山松大小蠹 <i>D. ponderosae</i>	893	0	85.6
<i>HligCYP6a6</i>	1 452	483	56.4	8.58	中欧山松大小蠹 <i>D. ponderosae</i>	685	2.85 ⁻²⁴⁴	66.5
<i>HligCYP6a7</i>	1 524	507	58.1	9.17	华山松大小蠹 <i>D. armandi</i>	816	1.33 ⁻²⁹⁵	77.7
<i>HligCYP6a8</i>	1 569	522	60.3	9.08	中欧山松大小蠹 <i>D. ponderosae</i>	772	1.45 ⁻²⁷⁷	71.8
<i>HligCYP6D1</i>	1 242	413	46.2	6.79	中欧山松大小蠹 <i>D. ponderosae</i>	732	2.19 ⁻²⁶⁴	88.1
<i>HligCYP6n1</i>	2 088	695	79.0	5.30	华山松大小蠹 <i>D. armandi</i>	1 321	0	93.4
<i>HligCYP6a9</i>	1 503	500	58.3	8.65	中欧山松大小蠹 <i>D. ponderosae</i>	863	2.04 ⁻³¹⁴	81.0
<i>HligCYP6b1</i>	1 491	496	56.9	8.98	中欧山松大小蠹 <i>D. ponderosae</i>	796	8.81 ⁻²⁸⁸	76.3
<i>HligCYP6b2</i>	1 503	500	57.3	9.01	中欧山松大小蠹 <i>D. ponderosae</i>	855	3.23 ⁻³¹¹	81.2
<i>HligCYP6b3</i>	1 086	361	41.4	7.10	华山松大小蠹 <i>D. armandi</i>	602	1.85 ⁻²¹³	80.6
<i>HligCYP6a9</i>	1 611	536	62.4	8.95	中欧山松大小蠹 <i>D. ponderosae</i>	770	1.86 ⁻²⁷⁶	74.2
<i>HligCYP6b1</i>	1 572	523	60.5	8.84	中欧山松大小蠹 <i>D. ponderosae</i>	802	2.74 ⁻²⁸⁹	74.9
<i>HligCYP9a3</i>	1 587	528	61.3	9.04	华山松大小蠹 <i>D. armandi</i>	930	0	83.1
<i>HligCYP9a1</i>	1 437	478	55.7	6.69	华山松大小蠹 <i>D. armandi</i>	689	1.74 ⁻²⁴⁵	74.8
<i>HligCYPM1</i>	1 224	407	47.3	6.67	中欧山松大小蠹 <i>D. ponderosae</i>	560	9.05 ⁻¹⁹⁷	68.5
<i>HligCYPM2</i>	1 584	527	60.3	6.73	米象 <i>Sitophilus oryzae</i>	942	0	86.9
<i>HligCYPM3</i>	1 470	489	55.2	8.79	中欧山松大小蠹 <i>D. ponderosae</i>	738	5.77 ⁻²⁶⁵	72.5



CYPs 相关基因标记为红色。Tcas. 赤拟谷盗; Dpon. 中欧山松大小蠹; Da. 华山松大小蠹; Pxyl. 小菜蛾; Bmor. 家蚕; Dmel. 黑腹果蝇

图 2 长林小蠹 HligCYPs 系统发育分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of HligCYPs in *Hylurgus ligniperda*

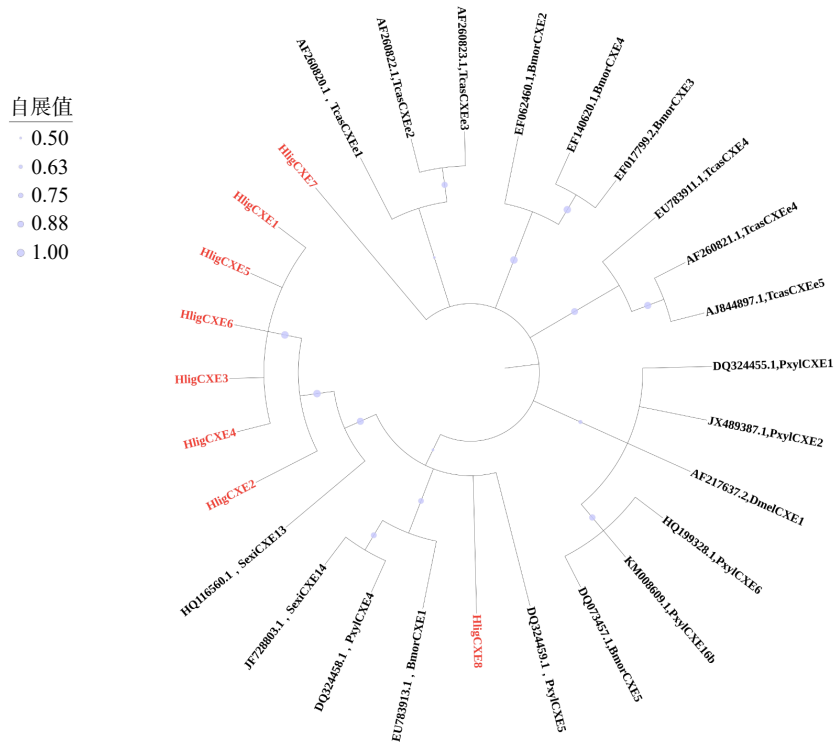
表 3 长林小蠹羧酸酯酶基因最佳比对结果

Tab. 3 Best comparison results of carboxylesterase genes in *Hylurgus ligniperda*

基因名称	长度/bp	开放阅读框/aa	分子量/kDa	等电点	Blastx最佳比对结果			
					对比物种	得分	期望值	相似度/%
HligCXE1	1 707	568	64.5	5.93	中欧山松大小蠹 <i>Dendroctonus ponderosae</i>	864	1.81 ⁻³¹²	72.5
HligCXE2	1 707	568	57.4	6.74	中欧山松大小蠹 <i>D. ponderosae</i>	766	1.57 ⁻²⁷³	65.3
HligCXE3	1 548	515	51.4	6.16	中欧山松大小蠹 <i>D. ponderosae</i>	785	7.15 ⁻²⁸²	74.0
HligCXE4	1 515	504	43.0	8.53	中欧山松大小蠹 <i>D. ponderosae</i>	785	4.65 ⁻²⁸²	74.0
HligCXE5	1 521	506	57.9	5.74	中欧山松大小蠹 <i>D. ponderosae</i>	728	8.04 ⁻²⁶⁰	63.3
HligCXE6	1 296	431	49.1	7.20	中欧山松大小蠹 <i>D. ponderosae</i>	665	2.60 ⁻²³⁶	73.7
HligCXE7	1 698	565	64.6	9.22	中欧山松大小蠹 <i>D. ponderosae</i>	948	0	80.2
HligCXE8	2 031	676	67.1	8.66	米象 <i>Sitophilus oryzae</i>	863	0	68.4

HligGSTs3 氨基酸序列一致性最高的是褐飞虱 (*Nilaparvata lugens*) 的 GSTS2 蛋白, 模板编号 5h5l.1.A, 序列一致性为 48%, 模板覆盖率 88%; 与 HligGSTs6 氨基酸序列一致性最高的是血矛线虫 (*Haemonchus contortus*) 的 GST 蛋白, 模板编号 2ws2.1.A, 序列一致性为 44.74%, 模板覆盖率 87%; 与 HligGSTe1 氨基酸序列一致性最高的是稻水象甲的 GSTe1 蛋白, 模板编号 A0A2R4FXD5.1.A, 序列一致性为 82.22%, 模板覆盖率 100%; 与 HligCYP6a8 氨基酸序列一致性最高的是中欧山松大小蠹的 CYP6BX1 蛋白, 模板编号 I1VJ44.1.A, 序列一致性为 72.66%, 模板覆盖率 98%; 与 HligCYP12a4 氨基酸序列一致性最高的是华山松大小蠹的 CYP450

蛋白, 模板编号 A0A0M4H594.1.A, 序列一致性 83.6%, 模板覆盖率 98%; 与 HligCYP4b1 氨基酸序列一致性最高的是中欧山松大小蠹的 CYP411a1 蛋白, 模板编号 I1VJ30.1.A, 序列一致性为 78.82%, 模板覆盖率 97%; 与 HligCYP6a6 氨基酸序列一致性最高的是人类的 CYP3a4 蛋白, 模板编号 8so1.1.B, 序列一致性为 29.07%, 模板覆盖率 94%; 与 HligCYP4a5 氨基酸序列一致性最高的模板编号为 6c93.1.A, 序列一致性为 21.67%, 模板覆盖率 96%; 与 HligCYP9a2 氨基酸序列一致性最高的是中欧山松大小蠹的 CYP450 蛋白, 模板编号 U4UD90.1.A, 序列一致性为 76.20%, 模板覆盖率 100%; 与 HligCYP12a6 氨基酸序列一致性最高的是中欧山松



CXEs 相关基因标记为红色。Tcas.赤拟谷盗; Pxy1.小菜蛾; Bmor.家蚕; Dmel.黑腹果蝇; Sexi.甜菜夜蛾

图 3 长林小蠹 HligCXEs 系统发育分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of HligCXEs in *Hylurgus ligniperda*

大小蠹的 CYP49a1 蛋白, 模板编号 I1VJ31.1.A, 序列一致性为 88.68%, 模板覆盖率 98%(表 4)。11 个蛋白的结构建模如图 5 所示。

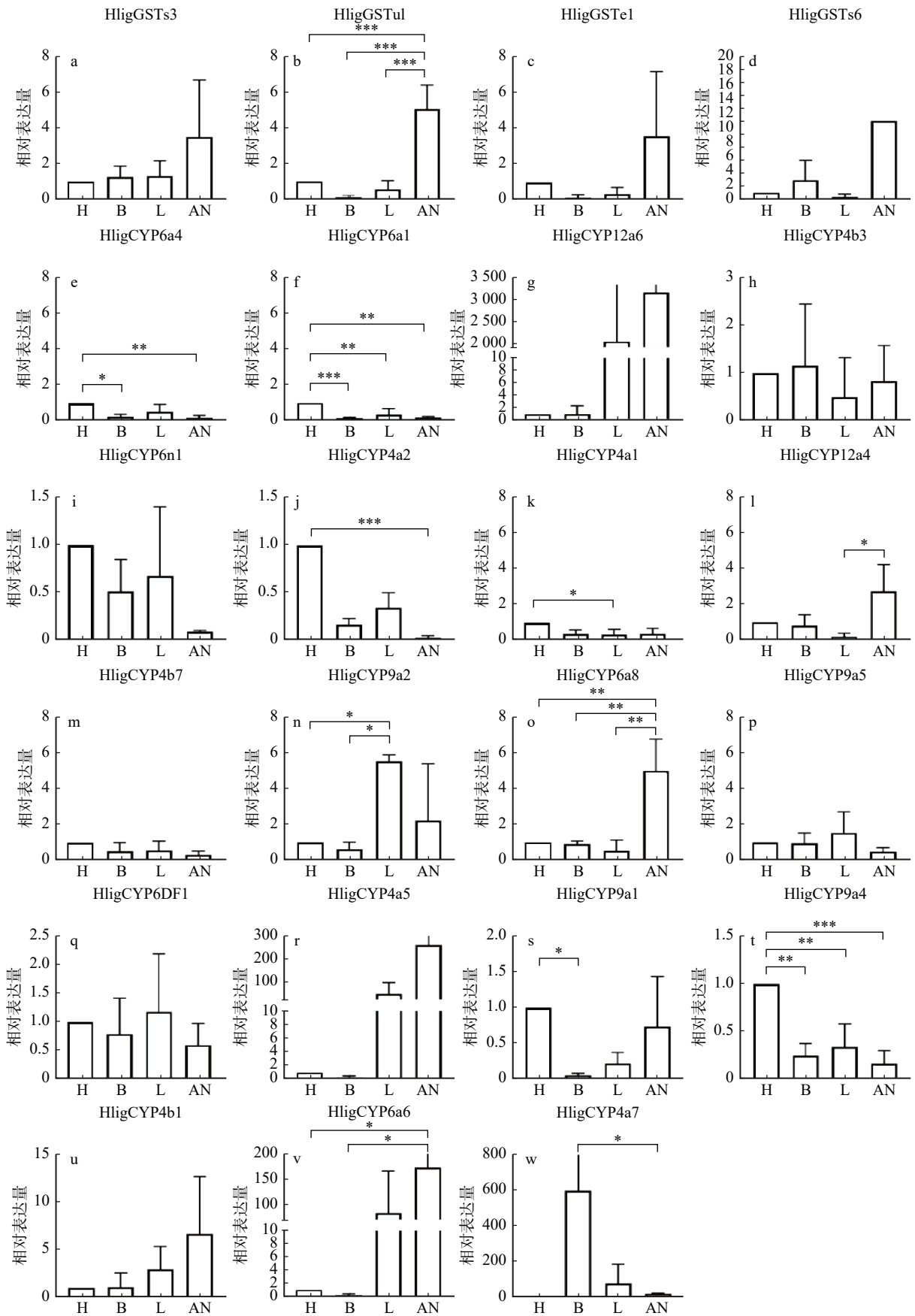
2.6 模型评价结果

对 Procheck 法得到的拉氏构象图(图 6)进行分析发现: HligGSTu1 的氨基酸残基中, 93.8% 位于理想区域, 5.7% 处于较好区域, 0.5% 在允许区域, 没有残基在不允许区域; HligGSTs3 的残基中, 92.6% 位于理想区域, 6.8% 在较好区域, 0.6% 在不允许区域; HligGSTs6 的残基中, 91.9% 位于理想区域, 6.5% 在较好区域, 1.6% 在不允许区域; HligGSTe1 的残基中, 有 94% 位于理想区域, 6% 在较好区域; HligCYP6a8 的残基中, 91.6% 位于理想区域, 7.6% 在较好区域, 0.4% 在允许区域, 0.4% 在不允许区域; HligCYP12a4 的残基中, 89.9% 位于理想区域, 8.3% 在较好区域, 1.1% 在允许区域, 0.7% 在不允许区域; HligCYP4b1 的残基中, 92.4% 位于理想区域, 6.5% 在较好区域, 0.4% 在允许区域, 0.7% 在不允许区域; HligCYP6a6 的残基中, 91% 位于理想区域, 8% 在较好区域, 0.2% 在允许区域, 0.7% 在不允许区域; HligCYP4a5 的残基中, 89.2% 位于理想区域, 8.7% 在较好区域, 0.5% 在允许区域, 1.6% 在不允许区域; HligCYP9a2 的残基中, 90.1% 位于理想区域, 9.5% 在较好区域, 0.2% 在允许区域, 0.2% 在不允许

区域; HligCYP12a6 的残基中, 84.9% 位于理想区域, 12.6% 在较好区域, 1.7% 在允许区域, 0.8% 在不允许区域。综合上述数据, 除了 HligCYP12a4、HligCYP4a5 和 HligCYP12a6 之外, 其他蛋白序列的拉氏构象图均满足理想区域超过 90% 的要求, 这表明构建的蛋白模型结构是合理的。

利用 Verify_3D 法评估蛋白质的三维结构与其氨基酸序列的一致性(图 7)。一般认为超过 80% 的残基拥有大于 0.2 的 3D/1D 值, 则模型的质量合格。4 条 GST 蛋白中, HligGSTu1 大于 0.2 的氨基酸有 79.57%, HligGSTs3 大于 0.2 的氨基酸有 63.98%, HligGSTs6 得分大于 0.2 的氨基酸有 74.34%, HligGSTe1 大于 0.2 的氨基酸有 58.22%。7 条细胞色素 450 蛋白中, HligCYP6a8 大于 0.2 的氨基酸有 85.24%, HligCYP12a4 大于 0.2 的氨基酸有 61.60%; HligCYP4b1、HligCYP6a6、HligCYP4a5、HligCYP9a2 和 HligCYP12a6 大于 0.2 的氨基酸分别有 77.08%、80.54%、73.87%、73.18%、76.24%。综上, HligCYP6a8 与 HligCYP6a6 的氨基酸残基与其一级结构较为符合。

Errat 法通过评估在 0.35 nm 距离内不同原子类型间的非键合相互作用数量, 判断其是否处在合理界限内, 以此计算模型的准确度误差值。一般认为得分大于 85 则表示分子结构较好。结果(图 8)显示, 除 HligCYP6a6 得分略小于 85 外, 其



H.头部; B.身体; L.足; AN.触角

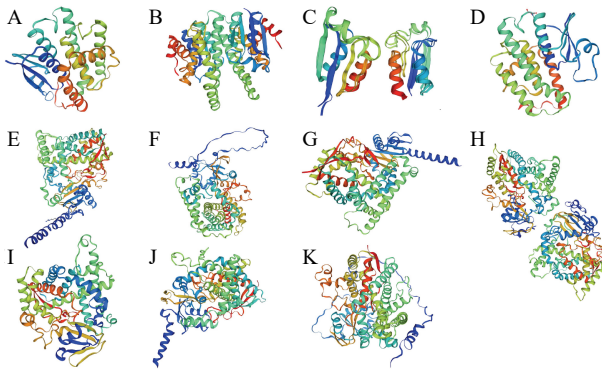
图 4 长林小蠹 HligGSTs(a~d)与 HligCYPs(e~w)在成虫不同组织中的相对表达水平

Fig. 4 Relative expression levels of HligGSTs (a~d) and HligCYPs (e~w) in different tissues of *Hyलगус ligniperda*

表4 长林小蠹气味降解酶基因三维建模信息

Tab. 4 Modeling information of odor degrading enzyme genes in *Hylurgus ligniperda*

基因名称	模版编号	类别	模型质量估计	一致性/%	方法	蛋白状态	质量评估	相似度	覆盖率/%
<i>HligGSTu1</i>	J3JYS3.1.A	Glutathione S-transferase	0.96	77.83	AlphaFold v2	Monomer		0.55	100
<i>HligGSTs3</i>	5h5l.1.A	Glutathione S-transferase S2	0.76	48.00	X-ray, 2.00 Å	Homo-dimer	-0.82	0.44	88
<i>HligGSTs6</i>	2ws2.1.A	Glutathione S-transferase	0.72	44.74	X-ray, 2.01 Å	Homo-dimer	-0.74	0.42	87
<i>HligGSTe1</i>	A0A2R4FXD5.A	Glutathione S-transferase e1	0.93	82.22	AlphaFold v2	Monomer		0.57	100
<i>HligCYP6a8</i>	I1VJ44.1.A	Cytochrome P450 CYP6BX1	0.85	72.66	AlphaFold v2	Monomer		0.53	98
<i>HligCYP12a4</i>	A0A0M4H594.A	Cytochrome P450	0.86	83.60	AlphaFold v2	Monomer		0.56	98
<i>HligCYP4b1</i>	I1VJ30.1.A	Cytochrome P450 CYP411a1	0.89	78.82	AlphaFold v2	Monomer		0.55	97
<i>HligCYP6a6</i>	8so1.1.B	Cytochrome P450 3A4	0.61	29.07	X-ray, 2.05 Å	Homo-dimer	-3.20	0.34	94
<i>HligCYP4a5</i>	6c93.1.A	Cytochrome P450 4B1	0.57	21.67	X-ray, 2.67 Å	Monomer	-3.78	0.32	96
<i>HligCYP9a2</i>	U4UD90.1.A	Cytochrome P450	0.88	76.20	AlphaFold v2	Monomer		0.54	100
<i>HligCYP12a6</i>	I1VJ31.1.A	Cytochrome P450 CYP49a1	0.81	88.68	AlphaFold v2	Monomer		0.58	98



A. *HligGSTu1*; B. *HligGSTs3*; C. *HligGSTs6*; D. *HligGSTe1*; E. *HligCYP6a8*; F. *HligCYP12a4*; G. *HligCYP4b1*; H. *HligCYP6a6*; I. *HligCYP4a5*; J. *HligCYP9a2*; K. *HligCYP12a6*

图5 长林小蠹对接蛋白的三维结构模型

Fig. 5 Three-dimensional structure model of docking protein in *Hylurgus ligniperda*

余10个蛋白均高于85,表明其蛋白建模的非键相互作用是合理的。

2.7 分子对接结果

通过分子对接,分析了长林小蠹11个气味降解酶与寄主植物11种主要挥发物的结合能(表5)。分子对接主要包含了分子之间的空间识别和能量识别两个方面,其中分子之间保持稳定结合的基础是能量匹配。结合能的大小显示了蛋白模型与配体气味分子结合的能力大小,结合能数值越低表明二者的结合能力越强。

11个气味分子中,与长林小蠹气味降解酶结合能较高的为十一烷、磷酸三丁酯、壬醛,表明其结合特性较差。松油烯、 α -蒎烯、 β -蒎烯和茨烯的结合能普遍较低,结合特性较好,其中 *HligGSTs3* 与松油烯的结合能最低,为-6.14 kJ/mol。根据表5中结合能数据,选择 *HligGSTu1* 与 *HligGSTs3* 做进一步的分子对接分析。

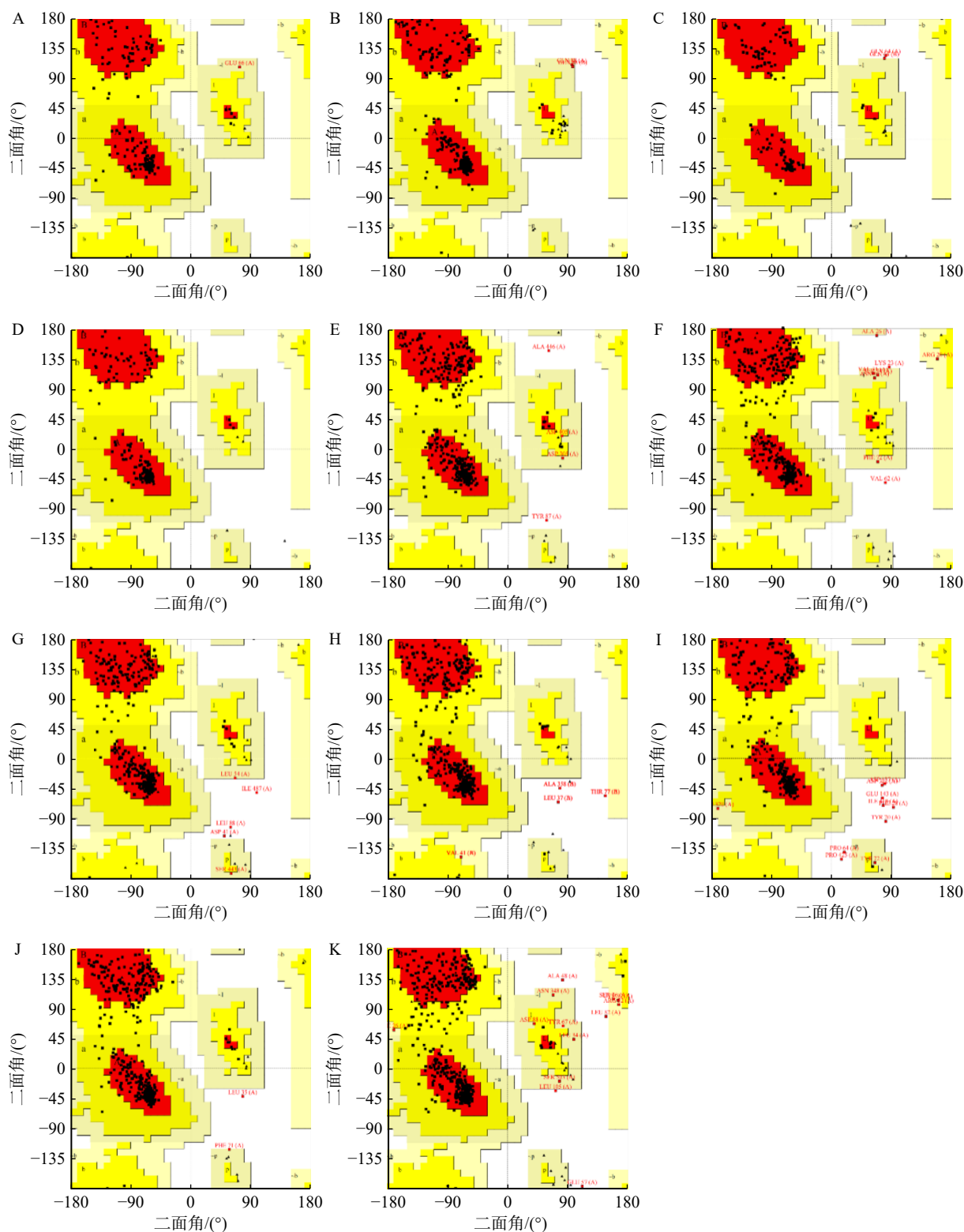
子对接分析。

HligGSTu1 与茨烯和 α -蒎烯的对接结果如图9所示。茨烯位于长林小蠹 *HligGSTu1* 的 α -螺旋形成的结合腔内,二者之间主要形成 Alkyl 键、Pi-Alkyl 键,其作用位点的疏水性氨基酸残基有 LEU(A:143)、LEU(A:182)、TRP(A:186)和 LYS(A:185)。 α -蒎烯位于长林小蠹 *HligGSTu1* 的 β -螺旋形成的结合腔内,二者之间主要形成 Alkyl 键、Pi-Alkyl 键作用,其作用位点的疏水性氨基酸残基有 LEU(A:115)、CYS(A:111)、PRO(A:12)、PHE(A:119)、PHE(A:120)和 ALA(A:10)。

HligGSTs3 与茨烯和 α -蒎烯的对接结果如图10所示。茨烯位于长林小蠹 *HligGSTs3* 的 α -螺旋形成的结合腔内,二者之间主要形成 Alkyl 键、Pi-Alkyl 键,其作用位点的疏水性氨基酸残基有 LEU(B:39)、LEU(B:184)、LEU(B:188)、ARG(B:124)和 PHE(B:127)。 α -蒎烯位于长林小蠹 *HligGSTs3* 的 α -螺旋形成的结合腔内,二者之间主要形成 Alkyl 键、Pi-Alkyl 键作用,其作用位点的疏水性氨基酸残基有 LEU(B:39)、LEU(B:184)、LEU(B:188)、PHE(B:127)和 ARG(B:124)。

3 讨论

昆虫气味降解酶研究领域与其他嗅觉相关蛋白领域(如气味结合蛋白、化学感受蛋白、气味受体等)相比,文章发文量较少,研究者数量也十分有限。已有的研究结果显示,气味降解酶会单独或与其他分子结合完成信号的失活化过程^[25]。本研究在长林小蠹全基因组数据中共鉴定出65个候选的气味降解酶基因,其中 *GSTs* 基因11个, *CYP450* 基因46个, *CXEs* 基因8个。相较于家蚕(*Bombyx mori*)、小菜



A. HligGSTu1; B. HligGSTs3; C. HligGSTs6; D. HligGSTe1; E. HligCYP6a8; F. HligCYP12a4; G. HligCYP4b1; H. HligCYP6a6; I. HligCYP4a5; J. HligCYP9a2; K. HligCYP12a6

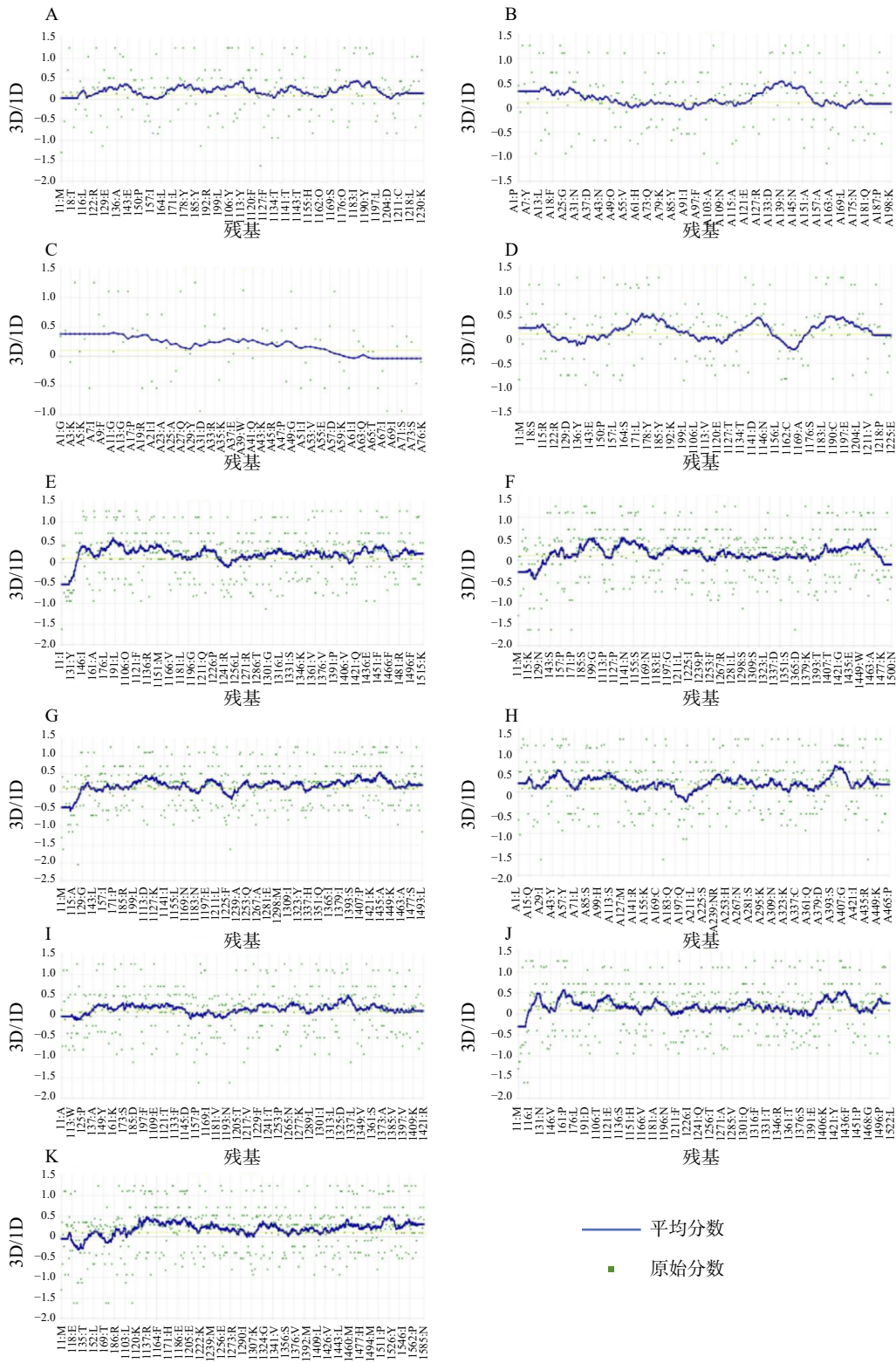
图 6 长林小蠹蛋白模型拉氏构象图

Fig. 6 Ramachandran plots of protein models in *Hylurgus ligniperda*

蛾、赤拟谷盗、中欧山松大小蠹等已鉴定出气味降解相关功能基因的物种^[26-30],长林小蠹的气味降解酶基因数量偏少。原因可能是,基因组数据中长林小蠹序列片段的分析不全,并未将许多 fragment 片段与 isoform 片段包含在基因检测的范围内;此外也可

能与长林小蠹的生存环境和生物学习性相关^[31]。

从长林小蠹与其他物种的系统发育进化树中,发现大多数气味降解酶相关基因在不同物种间聚在同一枝上,基因相对保守。而同一物种内的气味降解酶基因表现出一定的分化,这可能与长林小蠹长



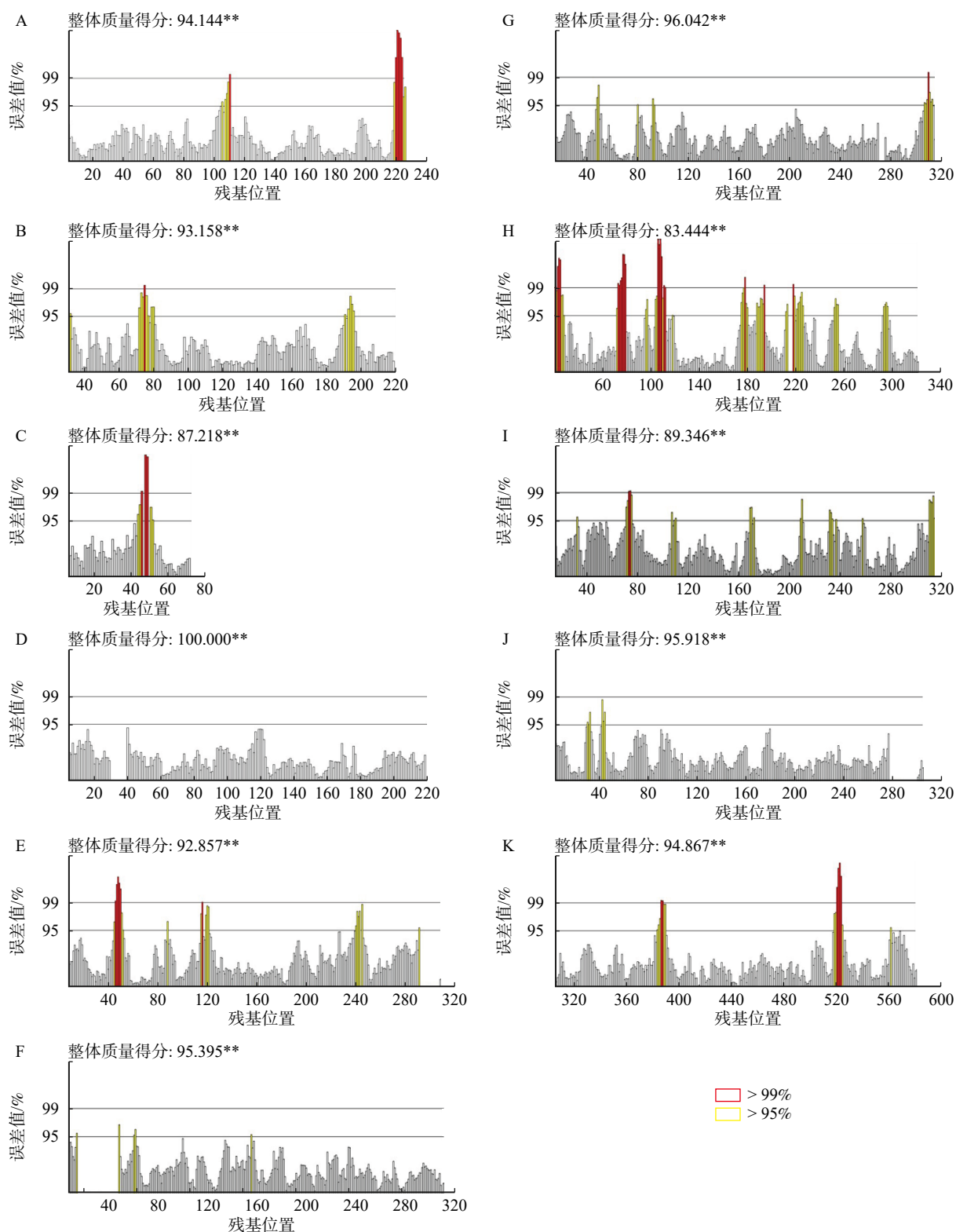
A. HligGSTu1; B. HligGSTs3; C. HligGSTs6; D. HligGSTel1; E. HligCYP6a8; F. HligCYP12a4; G. HligCYP4b1; H. HligCYP6a6; I. HligCYP4a5; J. HligCYP9a2; K. HligCYP12a6. 3D:蛋白质的三维结构,即蛋白质在空间中的实际构象;1D:蛋白质的一维序列,即氨基酸序列。通常用3D/1D值来表示该残基在三维结构中所处的环境与一维序列信息的匹配程度。

图7 长林小蠹蛋白模型 Verify_3D 结果

Fig. 7 Verify_3D results of protein models in *Hylurgus ligniperda*

期的进化过程中基因适应环境的变化而快速功能分化有关^[32-33]。在筛选的3类基因中,GST中Epison亚家族在触角部位展现出较高的扩散能力和适应性,并且与有害物质的代谢过程密切相关。例如:赤

拟谷盗的GST基因在接触到茶这种物质后,其表达水平显著增加,显示出其在有毒物质代谢中的关键作用;TcasGSTd2基因在有杀虫剂的环境中显著上调表达,敲除掉同一家族的TcasGSTd1则表现为生



A. HligGSTu1; B. HligGSTs3; C. HligGSTs6; D. HligGSTe1; E. HligCYP6a8; F. HligCYP12a4; G. HligCYP4b1; H. HligCYP6a6; I. HligCYP4a5; J. HligCYP9a2; K. HligCYP12a6. **表示在 $P < 0.01$ 的显著性水平下拒绝零假设。

图 8 长林小蠹蛋白模型 Errat 评估结果

Fig. 8 Errat assessment results of protein models in *Hylurgus ligniperda*

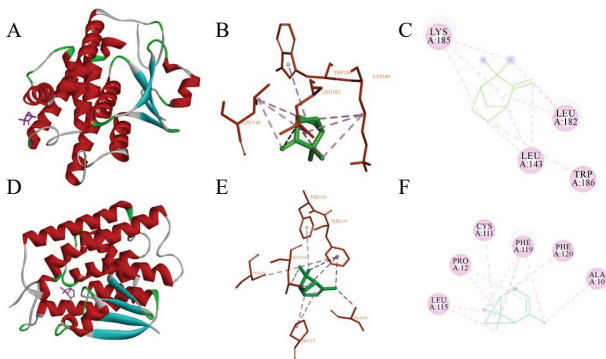
殖能力的丧失与发育上的缺陷。CYP450 参与昆虫的内源化合物的生成降解和外源有毒化学物质的解毒过程，在终止化学信号过程中发挥作用。其中 CYP6 和 CYP9 同属于 CYP3 的分支，主要参与外源

性代谢与解毒的过程^[8]。昆虫 CXE 基因的功能包括性信息素的传递、毒性物质的解毒，已有研究表明斜纹夜蛾 (*Spodoptera litura*) 的 *SlitCXE* 基因在乙酸酯信息素和植物挥发酯的降解中起重要作用^[34-35]。组

表5 长林小蠹气味降解酶与气味化合物对接的结合能

Tab. 5 Binding energy of odor compounds and odorant degrading enzymes in *Hylurgus ligniperda* kJ/mol

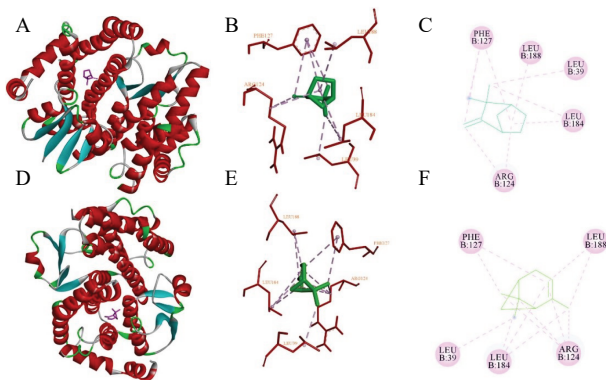
气味化合物	HligGSTu1	HligGSTs3	HligGSTs6	HligGSTe1	HligCYP6a8	HligCYP12a4	HligCYP4b1	HligCYP6a6	HligCYP4a5	HligCYP9a2	HligCYP12a6
β -月桂烯	-4.31	-4.62	-3.45	-3.50	-4.96	-4.89	-4.55	-3.89	-4.12	-4.04	-4.65
松油烯	-5.07	-6.14	-4.23	-4.23	-5.72	-5.85	-5.58	-5.13	-4.9	-4.78	-5.73
十一烷	-3.92	-4.17	-2.85	-3.31	-4.67	-4.50	-4.28	-2.86	-3.33	-3.62	-4.34
壬醛	-3.52	-4.46	-2.86	-3.50	-4.40	-4.54	-4.10	-3.05	-3.44	-3.47	-4.22
莜烯	-5.45	-5.16	-4.42	-4.57	-5.85	-5.86	-5.23	-4.61	-5.84	-4.79	-6.31
3-萜烯	-4.75	-4.19	-3.90	-4.19	-5.22	-5.53	-5.19	-4.39	-4.81	-4.57	-5.47
磷酸三丁酯	-3.86	-3.15	-2.08	-2.88	-4.71	-3.13	-3.85	-2.63	-3.04	-3.91	-3.70
α -松油醇	-5.39	-5.26	-4.54	-4.61	-6.00	-5.67	-5.69	-4.64	-5.13	-5.70	-5.74
D-柠檬烯	-5.10	-5.92	-4.00	-4.48	-5.65	-5.85	-5.54	-4.51	-4.6	-5.31	-5.72
α -蒎烯	-5.13	-5.07	-4.22	-4.45	-4.92	-5.58	-5.11	-5.17	-5.77	-5.96	-5.98
β -蒎烯	-5.07	-4.86	-3.87	-4.17	-4.91	-5.52	-5.12	-5.23	-5.92	-5.05	-6.05



A、D. 结合模式的三维结构显示；B、E. 莜烯和 α -蒎烯与蛋白口袋的详细结合模式；C、F. 蛋白分子间作用力

图9 HligGSTu1 与莜烯(A~C)和 α -蒎烯(D~F)的对接情况

Fig. 9 Docking situation of HligGSTu1 with camphene (A~C) and α -pinene (D~F)



A、D. 结合模式的三维结构显示；B、E. 莜烯和 α -蒎烯与蛋白口袋的详细结合模式；C、F. 蛋白分子间作用力

图10 HligGSTs3 与莜烯(A~C)和 α -蒎烯(D~F)的对接情况

Fig. 10 Docking situation of HligGSTs3 with camphene (A~C) and α -pinene (D~F)

织表达的结果分析发现,长林小蠹气味降解酶相关基因主要在触角中富集表达,且 *GSTs* 与 *CYP450* 两类基因家族的表达量较高,这表明气味降解酶基因的表达多集中于触角的淋巴液中,且类型较为统一^[36]。

选取在触角中显著表达的气味降解酶基因进行三维建模与分子对接,结果显示,气味降解酶和不同气味分子的之间的结合能差异较小,结合能数值在 $-6 \sim -3$ 之间。同一气味分子与不同气味降解酶结合时,结合位点与结合能相似,且气味降解酶对于同一气味分子特异性不高。在 OBP、ORs 和 ODEs 3 种蛋白质类别中,ODEs 可能是特异性最低的,因此是更具针对性的行为抑制蛋白^[37]。本研究选取了触角中表达量较高的 *GST* 基因进行具体的分子对接结合过程,在对候选气味降解酶与配体相互作用的研究中发现,这些酶的专一性相对较弱。不同种类的气味降解酶在与相同气味分子结合时,其结合模式的变化不大,这与其他特异性的嗅觉相关蛋白明显不同。进一步分析表明,气味降解酶与气味结合蛋白在与配体结合的机制上存在本质差异。通过分子对接研究,我们了解到蛋白质内部的结合腔和蛋白质表面形成的结合位点,并不能直接反映其结合的紧密程度;实际上,结合能的大小主要受到化学键的形成和分子构型的影响。就本研究中的气味降解酶而言,结构相似的气味分子与蛋白质结合位点的相互作用主要由 Alkyl 作用力所决定。从气味降解的功能角度来看,ODEs 对气味分子的特异性较低,这表明它们具有广泛降解大部分气味分子的特点。结合能的数值也表明 ODEs 确实对气味分子具有一定的降解能力。

通过本次研究,可以证实气味降解酶具备分解气味分子的有效性,并筛选出了潜在的具有较强气味降解能力的长林小蠹气味降解酶基因,但对 ODE 具体的功能研究还需要进行实际的分子试验与行为试验。在本研究在认知其功能的基础上,应当深入研究气味降解酶基因调控机制,为能开发基于 ODEs 的害虫行为调控技术提供理论支持。

参 考 文 献

- [1] 任利利, 武海卫, 宗世祥, 等. 重大害虫长林小蠹入侵我国的首次发现与侵染特征[J]. 林业科学, 2021, 57(5): 140-150.
Ren L L, Wu H W, Zong S X, et al. The first discovery and infective characteristics of a major invasive pest *Hylurgus ligniperda* (Coleoptera: Scolytidae) in China[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2021, 57(5): 140-150.
- [2] 李承锦, 赵文霞, 淮稳霞, 等. 我国新入侵害虫长林小蠹研究进展[J]. 环境昆虫学报, 2023, 45(4): 850-861.
Li C J, Zhao W X, Huai W X, et al. Research progress on *Hylurgus ligniperda* Fabricius (Coleoptera: Curculionidae), a new invasive species in China[J]. Journal of Environmental Entomology, 2023, 45(4): 850-861.
- [3] Gomez D, Hirigoyen A, Balmelli G, et al. Patterns in flight phenologies of bark beetles (Coleoptera: Scolytinae) in commercial pine tree plantations in Uruguay[J]. Bosque, 2017, 38(1): 47-53.
- [4] Pawson S M, Kerr J L, Somchit C, et al. Flight activity of wood and bark boring insects at New Zealand ports[J]. New Zealand Journal of Forestry Science, 2020, 50: 1-11.
- [5] Huanquilef C, Espinoza J, Mutis A, et al. Antifeedant activities of organic fractions from *Cestrum parqui* leaves on the red-haired bark beetle *Hylurgus ligniperda*[J]. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 2021, 21(1): 13-21.
- [6] Pugh A R, Romo C M, Clare G K, et al. Temperature effects on the survival and development of two pest bark beetles *Hylurgus ligniperda* F. (Coleoptera: Curculionidae) and *Hylastes ater* Paykull (Coleoptera: Curculionidae)[J]. Environmental Entomology, 2023, 52(1): 56-66.
- [7] Baldwin S R, Mohapatra P, Nagalla M, et al. Identification and characterization of CYPs induced in the drosophila antenna by exposure to a plant odorant[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 20530.
- [8] Blomquist G J, Tittiger C, MacLean M, et al. Cytochromes P450: terpene detoxification and pheromone production in bark beetles[J]. Current Opinion in Insect Science, 2021, 43: 97-102.
- [9] Wang G R, Guo Y Y, Wu K M. Cloning of a cDNA fragment of an antenna-specific gene in *Helicoverpa armigera*[J]. Chinese Journal of Agricultural Biotechnology, 2004, 1(1): 37-43.
- [10] Ono H, Ozaki K, Yoshikawa H. Identification of cytochrome P450 and glutathione-S-transferase genes preferentially expressed in chemosensory organs of the swallowtail butterfly *Papilio xuthus* L.[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2005, 35(8): 837-846.
- [11] Snyder M J, Stevens J L, Andersen J F. Expression of cytochrome P450 genes of the CYP4 family in midgut and fat body of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1995, 321(1): 13-20.
- [12] Wojtasek H, Leal W S. Conformational change in the pheromone-binding protein from *Bombyx mori* induced by pH and by interaction with membranes[J]. Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(43): 30950-30956.
- [13] Zhang L, Shen Y, Jiang X, et al. Transcriptomic identification and expression profile analysis of odorant-degrading enzymes from the asian corn borer moth *Ostrinia furnacalis*[J]. Insects, 2022, 13(11): 1027-1045.
- [14] Zhang Y X, Wang W L, Li M Y, et al. Identification of putative carboxylesterase and aldehyde oxidase genes from the antennae of the rice leaf folder, *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Pyralidae)[J]. Journal of Asia-Pacific Entomology, 2017, 20(3): 907-913.
- [15] Sledz P, Caflisch A. Protein structure-based drug design: from docking to molecular dynamics[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2018, 48: 93-102.
- [16] Smach M A, Hafsa J, Abdallah J B, et al. Neuroprotective and anti-amnesic effects of *Laurus nobilis* essential oil against scopolamine-induced memory deficits in mice brain[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2024, 319(Pt1): 117151.
- [17] Ma Y F, Gong L L, Zhang M Q, et al. Two antenna-enriched carboxylesterases mediate olfactory responses and degradation of ester volatiles in the German cockroach *Blattella germanica*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(12): 4789-4801.
- [18] Lam-Tung N, Schmidt H A, von Haeseler A, et al. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies[J]. Molecular Biology and Evolution, 2015, 32(1): 268-274.
- [19] Ishida Y, Leal W S. Cloning of putative odorant-degrading enzyme and integumental esterase cDNAs from the wild silkmoth, *Antheraea polyphemus*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2002, 32(12): 1775-1780.
- [20] Schwede T, Kopp J, Guex N, et al. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server[J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31(13): 3381-3385.
- [21] Hollingsworth S A, Karplus P A. A fresh look at the Ramachandran plot and the occurrence of standard structures in proteins[J]. Biomolecular Concepts, 2010, 1(3-4): 271-283.
- [22] Dai L, Ma J, Ma M, et al. Characterisation of GST genes from the Chinese white pine beetle *Dendroctonus armandi* (Curculionidae: Scolytinae) and their response to host chemical defence[J]. Pest Management Science, 2016, 72(4): 816-827.
- [23] Dai L, Gao H, Chen H. Expression levels of detoxification enzyme genes from *Dendroctonus armandi* (Coleoptera: Curculionidae) fed on a solid diet containing pine phloem and terpenoids[J]. Insects, 2021, 12(10): 1-11.
- [24] Li W, Yang B, Liu N, et al. Identification and characterization of the detoxification genes based on the transcriptome of *Tomicus yunnanensis*[J]. Diversity-Basel, 2022, 14(1): 110431.
- [25] Leal W S. Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes[J]. Annual Review of Entomology, 2013, 58: 373-391.
- [26] Merlin C, Francois M C, Bozzolan F, et al. A new aldehyde oxidase selectively expressed in chemosensory organs of insects [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications,

- 2005, 332(1): 4–10.
- [27] Pelletier J, Bozzolan F, Solvar M, et al. Identification of candidate aldehyde oxidases from the silkworm *Bombyx mori* potentially involved in antennal pheromone degradation[J]. *Gene*, 2007, 404: 31–40.
- [28] Chertemps T, Younus F, Pearce S, et al. Odorant-degrading enzymes in *Drosophila melanogaster*[J]. *Chemical Senses*, 2015, 40(3): 214.
- [29] He P, Zhang Y N, Yang K, et al. An antenna-biased carboxylesterase is specifically active to plant volatiles in *Spodoptera exigua*[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2015, 123: 93–100.
- [30] Sun L, Wang Q, Wang Q, et al. Identification and expression patterns of putative diversified carboxylesterases in the tea geometrid ectropis obliqua prout[J]. *Frontiers in Physiology*, 2017, 8: 1–13.
- [31] Wei H, Tan S, Li Z, et al. Odorant degrading carboxylesterases modulate foraging and mating behaviors of *Grapholita molesta*[J]. *Chemosphere*, 2021, 270: 128647.
- [32] Durand N, Carot-Sans G, Bozzolan F, et al. Degradation of pheromone and plant volatile components by a same odorant-degrading enzyme in the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*[J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e29147.
- [33] Durand N, Chertemps T, Carot-Sans G, et al. In vitro characterization of two antennal odorant-degrading enzymes in the noctuid moth *Spodoptera littoralis*[J]. *Chemical Senses*, 2011, 36(1): E65–E66.
- [34] Chertemps T, Francois A, Durand N, et al. A carboxylesterase, Esterase-6, modulates sensory physiological and behavioral response dynamics to pheromone in *Drosophila*[J/OL]. *BMC Biology*, 2012, 10[2024–02–19]. <http://www.biomedcentral.com/1741-7007/10/56>.
- [35] Steiner C, Bozzolan F, Montagne N, et al. Neofunctionalization of “Juvenile Hormone esterase duplication” in drosophila as an odorant-degrading enzyme towards food odorants[J/OL]. *Scientific Reports*, 2017, 7[2024–02–15]. <https://www.nature.com/articles/s41598-017-13015-w>.
- [36] Shanguan C, Kuang Y, Gao L, et al. Antennae-enriched expression of candidate odorant degrading enzyme genes in the turnip aphid, *Lipaphis erysimi*[J/OL]. *Frontier in Physiology*, 2023, 14: 1228570[2024–02–14]. <https://doi.org/10.1002/arch.22022>.
- [37] Bohbot J, Vogt R G. Antennal expressed genes of the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti* L.) characterization of odorant-binding protein 10 and takeout[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 35(9): 961–979.

(责任编辑 范娟
责任编辑 骆有庆)