

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2021.005.016

红脊长蝽感觉神经元膜蛋白基因克隆及组织表达谱分析

宋月芹¹, 白小军², 陈庆霄¹, 吕琪卉¹, 孙会忠^{1*}

(1. 河南科技大学林学院, 河南 洛阳 471000; 2. 宜阳县林业技术指导站, 河南 洛阳 471600)

摘要: [目的] 感觉神经元膜蛋白 (SNMP) 是至关重要的次要嗅觉蛋白, 能够作为信息素识别的标记, 而红脊长蝽 (*Tropidothorax elegans*) 作为一个重要的农林害虫, 这方面的研究还很少。[方法] 利用 PCR 方法对红脊长蝽 SNMP 基因进行克隆, 并通过荧光定量 PCR 对该基因的表达情况进行分析。[结果] 首次克隆和鉴定了红脊长蝽的 2 个 SNMPs 基因, 并命名为 *TeleSNMP1* 和 *TeleSNMP2*。序列分析表明, *TeleSNMP1* 编码区开放阅读框长 1 497 bp, 编码 498 aa; 而 *TeleSNMP2* 编码区开放阅读框长 1 686 bp, 编码 561 aa, 这 2 个基因的等电点分别为 8.26 和 7.05。同源性分析发现, 同目昆虫同类 SNMP 序列一致性较高, 不同目昆虫不同类 SNMP 序列一致性较低。*TeleSNMP1* 和 *TeleSNMP2* 之间的序列一致性极低。进化树结果也表现同目昆虫同类 SNMP 基因进化关系最近。定量 PCR 结果显示, *TeleSNMP1* 主要在雌雄触角中表达, 而 *TeleSNMP2* 在非触角组织中也有表达。[结论] 该结果为今后对红脊长蝽 SNMPs 基因功能的研究提供了有用的参考。

关键词: 红脊长蝽; 感觉神经元膜蛋白; 克隆; 序列分析; 表达谱

中图分类号: Q966

文献标志码: A

文章编号: 1001-1498(2021)05-0135-07

昆虫的化学感受系统在其生存和繁殖过程中起着极其重要的作用^[1-3]。在过去 10 多年的时间里, 研究者对昆虫触角嗅觉信号传导的分子机制研究有了突出的进步。在昆虫嗅觉识别时, 气味分子从触角感器孔渗入, 然后被气味结合蛋白 (odorant binding proteins, OBPs) 或化学感受蛋白 (chemosensory proteins, CSPs) 识别和转移, 最后激活位于嗅觉感觉神经元 (olfactory sensory neurons, OSNs) 树突膜上的嗅觉受体 (odorant receptors, ORs) 或离子型受体 (ionotropic receptors, IRs), 产生电位, 指导昆虫做出相应的行为反应^[4-8]。此外, 还有一些蛋白如感觉神经元膜蛋白 (sensory neuron membrane proteins, SNMPs) 在昆虫气味识别过程中也扮演着至关重要的作用^[5]。

昆虫 SNMPs 也是一种膜蛋白, 与脊椎动物

CD36 家族为同源基因, 具有 2 个跨膜区域, 其功能主要是识别和转运亲脂性气味分子如脂肪酸和脂类化合物等^[9-14]。昆虫第一个 SNMP 基因在多音天蚕 (*Antheraea polyphemus* Cramer) 中被鉴定, 并命名为 *ApolSNMP1*^[9]。随后在烟草天蛾 (*Manduca sexta* L.) 中发现 SNMP 的第二个亚类型, 即命名为 *MsexSNMP2*^[10, 15]。紧接着 SNMP 的同源基因在鳞翅目 Lepidoptera^[10, 15-16]、双翅目 Diptera^[17]、鞘翅目 Coleoptera^[18]、直翅目 Orthoptera^[13] 和膜翅目 Hymenoptera^[19] 等昆虫中都有发现。一直以来被认为 SNMP 基因家族就 2 个成员, 即 SNMP1 和 SNMP2。最近昆虫 SNMP 家族的第三个成员 SNMP3 在鳞翅目中被鉴定^[20-21], 但认为该基因的主要功能与昆虫的免疫反应有关, 这还需要进一步的去证明。

红脊长蝽 (*Tropidothorax elegans* Distant) 属

收稿日期: 2020-01-07 修回日期: 2020-01-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31701788); 河南省科技攻关计划 (农业领域) 项目 (202102110069)

* 通讯作者: 孙会忠, 男, 副教授, 主要研究方向: 昆虫生物与分子生物学, E-mail: huizhong66@163.com

半翅目 (Hemiptera) 长蝽科 (Lygaeidae), 主要为害刺槐 (*Robinia pseudoacacia* L.)、辣椒 (*Capsicum annuum* L.)、葫芦 (*Lagenaria siceraria* Molina)、油菜 (*Brassica napus* L.)、大白菜 (*Brassica pekinensis* Lour.) 和小麦 (*Triticum aestivum* L.) 等多种植物, 食性较杂。关于红脊长蝽的嗅觉基因研究较少, 本研究通过前期红脊长蝽触角转录组测序结果^[22], 鉴定了红脊长蝽的 2 个 SNMP 基因, 即 *TeleSNMP1* 和 *TeleSNMP2*, 并通过荧光定量 PCR 技术对红脊长蝽 *TeleSNMP1* 和 *TeleSNMP2* 在不同组织中的表达情况进行分析, 为进一步探索红脊长蝽 SNMPs 的化学通讯功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试虫的准备

红脊长蝽来自河南科技大学林学院昆虫实验室, 该群体为自 2014 年 7 月在洛阳周边 (112°26'E, 34°43'N) 蔬菜地采集的成虫, 然后在温室内继代饲养至今。温室条件为: 温度 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 相对湿度 $60\% \pm 5\%$, 光周期 14L : 10D。

1.2 总 RNA 的提取与第一链 cDNA 的合成

选取红脊长蝽羽化后第 3 d 的雌雄成虫, 收集触角各 100 头、头部各 30 头、胸部各 20 头、腹部各 5 头、足各 50 头、翅各 50 头, 每个样品收集材料重复 3 次。将红脊长蝽各部分组织解剖后立即放入浸在液氮中的 1.5 mL 离心管内, 然后保存于 -80°C 中。

总 RNA 的提取采用 RNAiso Plus Kit (TaKaRa, 北京) 试剂盒进行, 并使用 RNase-free DNase I (TaKaRa, 北京) 对提取的 RNA 进行除 DNA 处理。采用 1% 的琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 2000c 分光光度计 (Thermo Scientific) 进行质量检测。采用 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa, 北京) 试剂盒对 RNA 进行反转录。

1.3 红脊长蝽 SNMPs 基因的克隆

从本实验室前期对红脊长蝽触角转录组测序注释结果中^[21] 搜索到 2 个 SNMP 基因。根据该序列设计特异性引物, *TeleSNMP1*-F: 5'-ATGGCTG CACCACTGAGG-3', *TeleSNMP1*-R: 5'-CTAGTA CTTTGCCGGGGGTG-3'; *TeleSNMP2*-F: 5'-ATG ACGAAGGTGCTGTTCCC-3', *TeleSNMP2*-R: 5'-T

TAGCTTGTGAGAGTCCTTTTGA-3', 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 20 μL : 雌蛾触角 cDNA 模板 1 μL , 上下游引物各 1.5 μL ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), dNTPs 混合液 1.6 μL ($2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), Ex Taq DNA 聚合酶 0.2 μL (TaKaRa, 大连), $10 \times$ Ex Taq buffer 2 μL , ddH₂O 为 12.2 μL 。PCR 反应条件为: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 30 s, 35 个循环; 最后 72°C 10 min。胶回收目的片段, 将目的片段克隆到 pMD™19-T 载体上, 转化 DH5 α 感受态细胞, 挑取阳性克隆培养过夜, 送去测序。

1.4 红脊长蝽 SNMPs 基因的序列分析

核酸序列采用在线工具 (<http://www.bio-software.net/sms/>) 翻译; 采用 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) 在线工具进行跨膜区域预测; 利用在线工具 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 对蛋白序列特性进行分析; 蛋白亲疏水性采用在线工具 (<https://web.expasy.org/protscale/>) 分析; 序列比对采用线下 DNAMAN 进行多重序列比较; 进化树采用线下 MEGA 6.0 构建。

1.5 实时定量 PCR

通过荧光定量 PCR 检测红脊长蝽 SNMPs 基因在不同组织中的表达情况。根据红脊长蝽 SNMPs 基因的开放阅读框和荧光定量引物设计原则设计特异性引物, *TeleSNMP1*-F: TCACCATCCCTCATC CA, *TeleSNMP1*-R: TCTTCGCCGTCTTTCAT, *TeleSNMP2*-F: TGTGGGAACGGAAGTCT, *TeleSNMP2*-R: GCACCTTGGCACTTTG。内参基因为红脊长蝽 Actin 基因 (基因登陆号为 MG322127), 引物为: *TeleActin*-F: CAAGGACGAAACAATCA; *TeleActin*-R: GAGAATACACTCCCAGAAC。

荧光定量 PCR 被执行在 ABI 7500 PCR 仪 (ABI, Carlsbad, CA, USA) 上进行, 每个反应体积 20 μL , 包括 10 μL 的 $2 \times$ SYBR Green PCR Master Mix (TaKaRa, 大连)、0.8 μL 的正反向引物 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、2 μL 的 cDNA 模板 (200 ng) 和 6.4 μL 的 DEPC 水。PCR 循环遵循 95°C 30 s, 然后 95°C 5 s, 53°C 31 s, 共循环 40 个周期。试验重复 3 次。

1.6 数据分析

红脊长蝽 SNMPs 基因在不同组织中的相对表达量采用公式 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ ^[23] 计算。利用 SPSS 17.0 软件中的 ANOVA 方法对 *TeleSNMPs* 在红脊长蝽不同

组织中的表达量进行显著性差异比较(新复极差法检验, $P \leq 0.05$)。

2 结果与分析

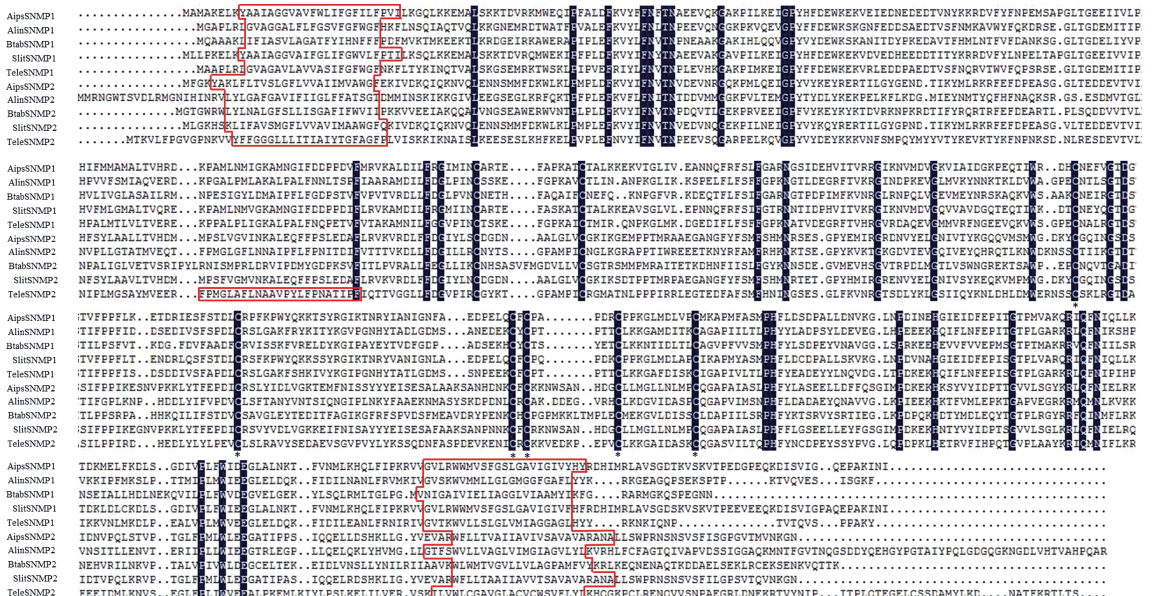
2.1 红脊长蜡 SNMPs 基因克隆及序列分析

将测序结果在 NCBI 上进行同源性搜索, 结果表明所测序列与多种昆虫的 SNMP 基因序列高度同源, 证明这 2 个基因就是红脊长蜡的 SNMP 基因, 并分别命名为 *TeleSNMP1* 和 *TeleSNMP2*, 在 NCBI 基因登陆号分别为 MW442946 和 MW442947。

这 2 个 SNMPs 基因都具有全长的开放阅读

框, *TeleSNMP1* 长度为 1 497 bp, 编码 498 个氨基酸(图 1); 而 *TeleSNMP2* 长度为 1 686 bp, 编码 561 个氨基酸。这 2 个基因都是酸性, *TeleSNMP1* 的等电点是 8.26, 蛋白分子量是 55.59 kD; *TeleSNMP2* 的等电点是 7.05, 蛋白分子量是 63.37 kD。

TeleSNMP1 和 *TeleSNMP2* 在氨基酸序列的 N-端和 C-端各有一个跨膜区域, 其中 *TeleSNMP2* 在氨基酸第 158 和 180 之间还有一个跨膜区域。在膜外区域 6 个保守的半胱氨酸残基位点被预测(图 1), 这 6 个保守的半胱氨酸位点与 CD36 基因家族相似。



注: 方块内为跨膜区域; 6 个保守的半胱氨酸位点用小星星表示; 缩写的种名分别是: Tele, 红脊长蜡; Aips, 小地老虎; Alin, 苜蓿盲蝽; Slit, 斜纹夜蛾; Btab, 烟草粉虱。

Note: the transmembrane domains are boxed; the six conserved cysteines are marked with an asterisk; Abbreviated species names: Tele, *Tropidotherax elegans*; Aips, *Agrotis ipsilon*; Alin, *Adelphocoris lineolatus*; Slit, *Spodoptera litura*; Btab, *Bemisia tabaci*.

图 1 红脊长蜡 *TeleSNMP1* 和 *TeleSNMP2* 与其他昆虫 SNMPs 的序列比对

Fig. 1 Alignment of *Tropidotherax elegans* SNMP1 and SNMP2 with SNMPs from other insects

2.2 红脊长蜡 SNMPs 与其他昆虫 SNMP 基因的同源性及进化树分析

将红脊长蜡 *TeleSNMP* 基因与已报道的其他昆虫 SNMP 基因的氨基酸序列在 NCBI 中的 Blastp 在线搜索工具进行同源性分析, 发现 *TeleSNMP1* 基因与不同种类昆虫 SNMP 基因一致性差别较大。与同目昆虫 SNMP 基因一致性较高, 如 *TeleSNMP1* 与茶翅蛾 (*Halyomorpha halys* Stal) *HhalSNMP1* 序列一致性在 81.33%; 与苜蓿盲蝽 (*Adelphocoris lineolatus* Goeze) *AlinSNMP1* 序列一致性在 68.54%; 与不同目昆虫 SNMP 基因一致性较低, 如

TeleSNMP1 与斑痣悬茧蜂 (*Meteorus pulchricornis* Wesmali) *MpulSNMP1* 序列一致性在 43.44%。但 *TeleSNMP2* 与所有昆虫 SNMP 基因一致性都不高, 如与茶翅蛾 *HhalSNMP2* 序列一致性在 48.68%; 与苜蓿盲蝽 *AlinSNMP2* 序列一致性在 41.18%; 与德国小蠊 (*Blattella germanica* Linnaeus) *BgerSNMP1* 序列一致性在 46.22%。*TeleSNMP2* 与玉带凤蝶 (*Papilio polytes* L.) *PpolSNMP2* 序列一致性在 30.94%; 与亚洲小车蝗 (*Oedaleus asiaticus* Bei-Bienko) *OasiSNMP2* 序列一致性在 34.76%。红脊长蜡 *TeleSNMP1* 和 *TeleSNMP2* 之间序列一致性

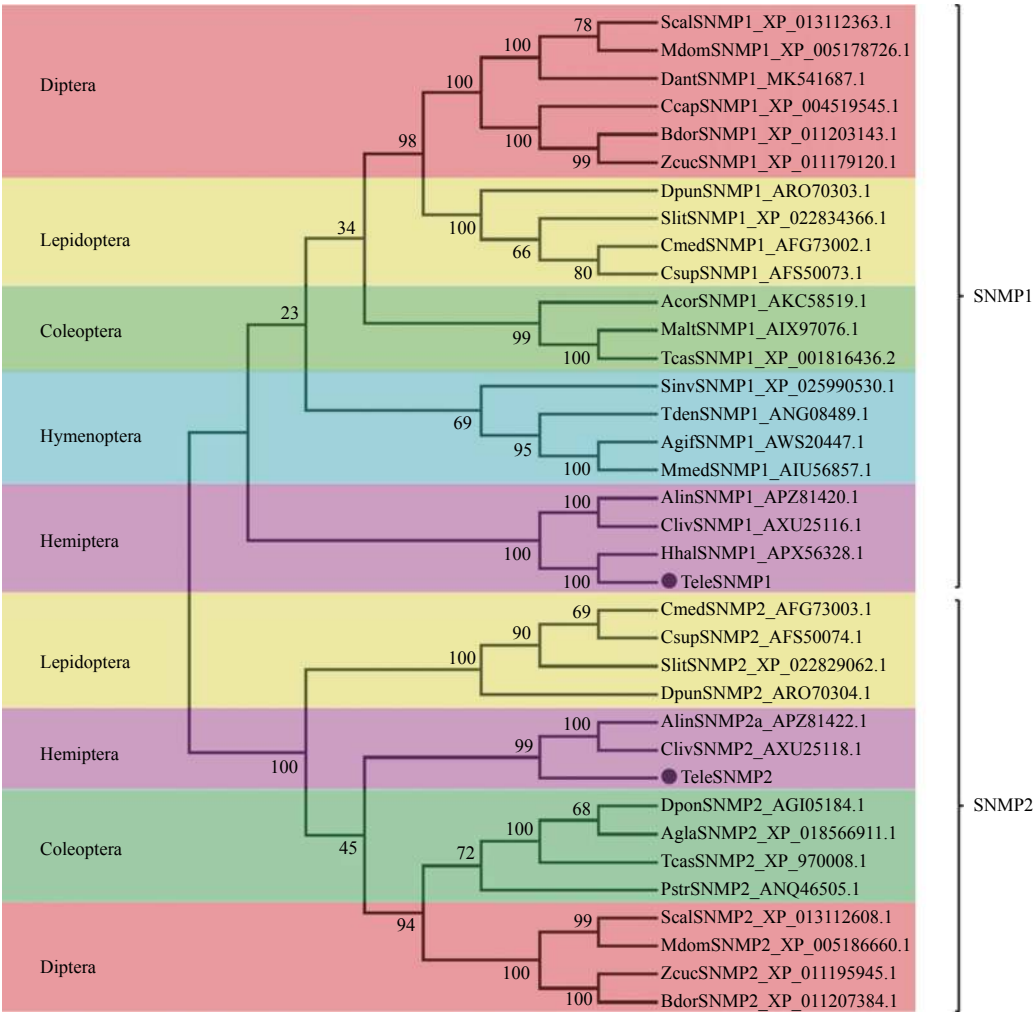


图 2 红脊长蝽 SNMPs 与其他昆虫 SNMPs 氨基酸序列的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of the SNMPs of *Tropidothorax elegans* and other insects based on amino acid sequences by using neighbor-joining method

仅有 29.66%。

使用 MEGA6.0 对 9 个目的 36 种昆虫 SNMP 同源基因进行进化树比较。SNMPs 基因被分成 2 个亚组，即 SNMP1 和 SNMP2（图 2），每亚组中同目昆虫 SNMP 基因同源性最高。红脊长蝽的 *TeleSNMP1* 和 *TeleSNMP2* 基因分别被集聚到这 2 个亚组，并且与同为半翅目昆虫的苜蓿盲蝽、茶翅蝽和黑肩绿盲蝽 SNMP 基因进化关系最近，与其他目昆虫 SNMP 关系较远。

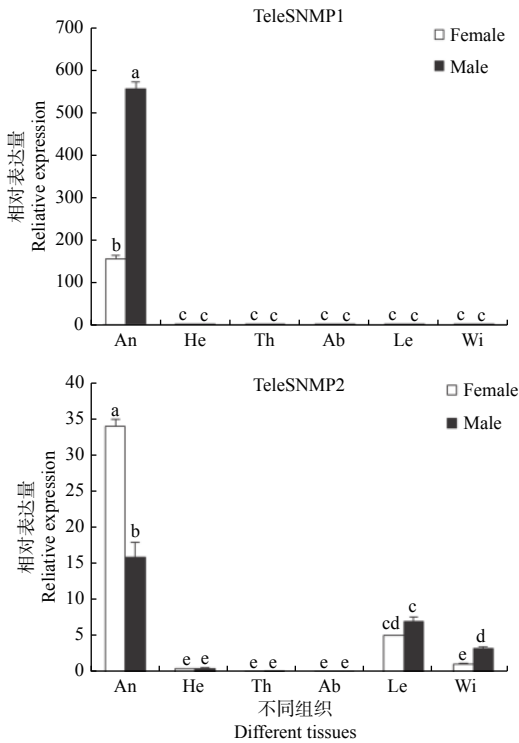
2.3 红脊长蝽 SNMPs 基因表达谱分析

使用荧光定量 PCR 对红脊长蝽 *TeleSNMP1* 和 *TeleSNMP2* 在不同组织中的表达情况进行分析，结果发现：*TeleSNMP1* 和 *TeleSNMP2* 在雌雄蛾触角中高度表达，*TeleSNMP1* 在雄蛾触角中的表达量明显高于雌蛾，*TeleSNMP2* 的表达情况刚好相反，

即 *TeleSNMP2* 在雌蛾触角中的表达量明显高于雄蛾。除触角外，*TeleSNMP1* 几乎不在其他组织中表达或表达量甚微。*TeleSNMP2* 除在触角中表达量丰富外，在足和翅中也有少量表达（图 3）。

3 讨论

本研究根据前期红脊长蝽触角转录组的数据，通过 BLASTX 在线搜索和同源性比较鉴定出 2 个 SNMPs 基因，即 *TeleSNMP1* 和 *TeleSNMP2*。这 2 个基因与其他昆虫 SNMPs 具有类似的特征，如在氨基酸序列 N 端和 C 端附近有 2 个保守的跨膜区域，并且由 6 个保守的半胱氨酸残基形成二硫键组成一个大的胞外环，此结构也与 CD36 基因家族极其相似^[24-26]。根据对这 2 个跨膜蛋白结构投影预测，这部分的功能是转运和结合脂类分子^[27-28]，我



注: An, 触角; He, 头; Th, 胸; Ab, 腹; Le, 足; Wi, 翅; 柱上不同字母表示不同组织间基因表达存在显著差异 ($P < 0.05$).

Note: An, antennae; He, heads; Th, thoraxes; Ab, abdomen; Le, legs; Wi, wings; The different letters above bars indicate there is a significant difference between different tissues ($P < 0.05$).

图 3 红脊长蝽 SNMPs 在不同组织中的相对表达量

Fig. 3 Expression level of SNMPs in different tissues of *Tropidothorax elegans*

们可推测红脊长蝽 SNMPs 的 2 个跨膜区具有同样的功能。但红脊长蝽 *TeleSNMP2* 在氨基酸序列第 158 和 180 之间多了 1 个跨膜区域, 目前关于 SNMPs 基因具有 3 个跨膜区域的报道还没有, 可能是鉴定的 SNMPs 数量还不够庞大, 也可能长期进化形成的。

红脊长蝽 *TeleSNMP* 基因同源性搜索发现 *TeleSNMP* 基因与不同种类昆虫 SNMP 基因一致性差别较大。与同目昆虫 SNMP 基因一致性较高, 与不同目昆虫 SNMP 基因一致性较低。红脊长蝽 *TeleSNMP1* 和 *TeleSNMP2* 之间分歧也比较大。进化树结果也显示, 红脊长蝽 *TeleSNMP1* 和 *TeleSNMP2* 分别被集聚到 SNMP1 和 SNMP2 两个亚组, 在同一组内同目昆虫的 SNMP 基因进化关系最近, 与其他目昆虫 SNMP 关系较远。此结果与大多数昆虫 SNMP 基因特性相同^[26,29-30]。在鳞翅目中曾经鉴定出 SNMP3 亚家族基因^[20], 而在红脊长蝽触角转录组数据中没有发现该基因, 可能是这个基因在幼

虫肠中高度表达的原因。

组织特异性表达可以为功能预测提供可靠性的参考。我们研究发现红脊长蝽 *SNMP1* 主要表达在雌雄蛾的触角中, 此结果与多音蚕蛾^[9]、脐橙螟 (*Amyelois transitella* Walker)^[31]、甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua* Htibner)^[32] 和中红侧沟茧蜂 (*Microplitis mediator* Haliday)^[33] 等多种昆虫 *SNMP1* 的表达模式相同。Benton 等^[34] 在果腹黑蝇 (*Drosophila melanogaster* wDm) 中发现, *DmelSNMP1* 能够识别集合信息素 cVA, 激活受体 HR13。Pregitzer 等^[28] 在烟芽夜蛾 (*Heliothis virescens* Fabricius) 中也发现, HvirSNMP1 能明显增强 HR13 对信息素 Z11-16:Ald 的结合力。以上研究都暗示昆虫 SNMP1 的功能是调节信息素的识别和通过 SNMP-OR 互作转运信息素。相对于 *TeleSNMP1*, *TeleSNMP2* 的表达相对广泛, 除嗅觉感器触角外, 在非嗅觉感器足中也有少量表达, 此结果与小菜蛾 (*Plutella xylostella* L.)^[35]、二化螟 (*Chilo suppressalis* Walker)^[36]、稻纵卷叶螟 (*Cnaphalocrocis medinalis* G.)^[37]、甜菜夜蛾^[31] 和中红侧沟茧蜂^[32] 一致。昆虫身体上分布有大量的味觉感器^[38], 而 CD36 蛋白的主要功能是转运脂类化合物, 因此可推测 *TeleSNMP2* 和 GRs 在这些组织中共同表达, 识别脂类分子完成味觉过程。

4 结论

本研究首次克隆和鉴定了红脊长蝽的 2 个 SNMPs 基因, 即 *TeleSNMP1* 和 *TeleSNMP2*。同目昆虫同类 SNMP 同源序列一致性较高, 反之, 不同目昆虫不同类 SNMP 同源序列一致性较低。同样, *TeleSNMP1* 和 *TeleSNMP2* 之间的序列一致性也极低。*TeleSNMP1* 主要在雌雄触角中特异性表达, 而 *TeleSNMP2* 除触角外, 在非触角组织中也有表达。

参考文献:

[1] Kaupp U B. Olfactory signalling in vertebrates and insects: differences and commonalities[J]. Nature Reviews Neuroscience, 2010, 11(3): 188-200.

[2] Sun L, Xiao H J, Gu S H, et al. Perception of potential sex pheromones and host-associated volatiles in the cotton plant bug, *Adelphocoris fasciaticollis* (Hemiptera: Miridae): morphology and electrophysiology[J]. Applied Entomology and Zoology, 2014, 49(1):

- 43-57.
- [3] Zhang J, Walker W B, Wang G. Pheromone reception in moths: from molecules to behaviors[J]. Progress in Molecular Biology and Translational Science, 2015, 130: 109-128.
 - [4] Benton R, Vannice K S, Gomez-Diaz C, *et al.* Variant ionotropic glutamate receptors as chemosensory receptors in *Drosophila*[J]. Cell, 2009, 136(1): 149-162.
 - [5] Leal W S. Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes[J]. Annual Review of Entomology, 2013, 58: 373-391.
 - [6] Brito N F, Moreira M F, Melo A C A. A look inside odorant-binding proteins in insect chemoreception[J]. Journal of Insect Physiology, 2016, 95: 51-65.
 - [7] de Fouchier A, Walker W B III, Montagné N, *et al.* Functional evolution of Lepidoptera olfactory receptors revealed by deorphanization of a moth repertoire[J]. Nature Communications, 2017, 8: 15709.
 - [8] Yang K, Huang L Q, Ning C, *et al.* Two single-point mutations shift the ligand selectivity of a pheromone receptor between two closely related moth species[J]. eLife, 2017, 6: e29100.
 - [9] Rogers M E, Sun M, Lerner M R, *et al.* Snmp-1, a novel membrane protein of olfactory neurons of the silk moth *Antheraea polyphemus* with homology to the CD36 family of membrane proteins[J]. Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(23): 14792-14799.
 - [10] Rogers M E, Krieger J, Vogt R G. Antennal SNMPs (sensory neuron membrane proteins) of lepidoptera define a unique family of invertebrate CD36-like proteins[J]. Journal of Neurobiology, 2001, 49(1): 47-61.
 - [11] Febbraio M, Silverstein R L. CD36: implications in cardiovascular disease[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2007, 39(11): 2012-2030.
 - [12] Levy E, Spahis S, Sinnett D, *et al.* Intestinal cholesterol transport proteins: an update and beyond[J]. Current Opinion in Lipidology, 2007, 18(3): 310-318.
 - [13] Vogt R G, Miller N E, Litvack R, *et al.* The insect SNMP gene family[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2009, 39(7): 448-456.
 - [14] Martin C, Chevrot M, Poirier H, *et al.* CD36 as a lipid sensor[J]. Physiology & Behavior, 2011, 105: 36-42.
 - [15] Rogers M E, Steinbrecht R A, Vogt R G. Expression of SNMP-1 in olfactory neurons and sensilla of male and female antennae of the silkworm *Antheraea polyphemus*[J]. Cell and Tissue Research, 2001b, 303(3): 433-446.
 - [16] Forstner M, Gohl T, Gondesén I, *et al.* Differential expression of SNMP-1 and SNMP-2 proteins in pheromone sensitive hairs of moths[J]. Chemical Senses, 2008, 33(3): 291-299.
 - [17] Jin X, Ha T S, Smith D P. SNMP is a signaling component required for pheromone sensitivity in *Drosophila*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(31): 10996-11001.
 - [18] Nichols Z, Vogt R G. The SNMP/CD36 gene family in Diptera, Hymenoptera and Coleoptera: *Drosophila melanogaster*, *D. pseudoobscura*, *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti*, *Apis mellifera*, and *Tribolium castaneum*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2008, 38(4): 398-415.
 - [19] Hu Y Y, Xu S F, Wubie A J, *et al.* Molecular characterization and tissue localization of sensory neuron membrane protein from Chinese honey bee, *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae)[J]. Applied Entomology and Zoology, 2013, 48(4): 533-545.
 - [20] Zhang H J, Xu W, Sun L N, *et al.* Functional characterization of sensory neuron membrane proteins (SNMPs)[J]. BioRxiv. 2018, Available at: <https://doi.org/10.1101/262154>.
 - [21] Zhang H J, Xu W, Chen Q M, *et al.* A phylogenomics approach to characterizing sensory neuron membrane proteins (SNMPs) in Lepidoptera[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2020, 118: 103313.
 - [22] Song Y Q, Sun H Z, Du J. Identification and tissue distribution of chemosensory protein and odorant binding protein genes in *Tropidotherax elegans* Distant (Hemiptera: Lygaeidae)[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 7803.
 - [23] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
 - [24] Huang X L, Liu L, Fang Y Q, *et al.* Expression of a sensory neuron membrane protein SNMP2 in Olfactory Sensilla of codling moth *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae)[J]. Journal of Economic Entomology, 2016, 4(109): 1907-1913.
 - [25] Sun L, Wang Q, Zhang Y, *et al.* Expression patterns and colocalization of two sensory neurone membrane proteins in *Ectropis oblique* Prout, a geometrid moth pest that uses Type-II sex pheromones[J]. Insect Molecular Biology, 2019, 28(3): 342-354.
 - [26] Yang H Y, Ning S Y, Sun X, *et al.* Identification and characterization of two sensory neuron membrane proteins from *Onion Maggot* (Diptera: Anthomyiidae)[J]. Journal of Economic Entomology, 2020, 113(1): 418-426.
 - [27] Herboso L, Talamillo A, Pérez C, *et al.* Expression of the scavenger receptor class B type I (SR-BI) family in *Drosophila melanogaster*[J]. International Journal of Developmental Biology, 2011, 55(6): 603-611.
 - [28] Pregitzer P, Greschista M, Breer H, *et al.* The sensory neuron membrane protein SNMP1 contributes to the sensitivity of a pheromone detection system[J]. Insect Molecular Biology, 2014, 23(6): 733-742.
 - [29] Gu S H, Yang R N, Guo M B, *et al.* Molecular identification and differential expression of sensory neuron membrane proteins in the antennae of the black cutworm moth *Agrotis ipsilon*[J]. Journal of Insect Physiology, 2013, 59: 430-443.
 - [30] 胡颖颖, 徐书法, 李 微, 等. 中华蜜蜂感觉神经元膜蛋白基因克隆、组织表达分析及原核表达[J]. 昆虫学报, 2013, 56(1): 9-

17.

[31] Leal W S, Ishida Y, Pelletier J, *et al.* Olfactory proteins mediating chemical communication in the navel orangeworm moth, *Amyelois transitella*[J]. PLoS One, 2009, 4(9): e7235.

[32] Liu C, Zhang J, Liu Y, *et al.* Expression of SNMP1 and SNMP2 genes in antennal sensilla of *Spodoptera exigua* (Hübner)[J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2014, 85(2): 114-126.

[33] 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 Science, 2020, 27: 425-439.

[34] Benton R, Vannice K S, Vosshall L B. An essential role for a CD36-related receptor in pheromone detection in *Drosophila*[J]. Nature, 2007, 450(7167): 289-293.

[35] Li P Y, Qin Y C. Molecular cloning and characterization of sensory neuron membrane protein and expression pattern analysis in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae)[J]. Applied Entomology and Zoology, 2011, 46(497): 497-504.

[36] Liu S, Qiao F, Liang Q M, *et al.* Molecular characterization of two sensory neuron membrane proteins from *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae)[J]. Annals of the Entomological Society of America, 2013, 106(3): 378-384.

[37] Liu S, Zhang Y R, Zhou W W, *et al.* Identification and characterization of two sensory neuron membrane proteins from *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Pyralidae)[J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2013, 82(1): 29-42.

[38] Montell C. A taste of the *Drosophila* gustatory receptors[J]. Current Opinion in Neurobiology, 2009, 19(4): 345-353.

Cloning and Expression Pattern of Sensory Neuron Membrane Protein Genes of *Tropidothorax elegans*

SONG Yue-qin¹, BAI Xiao-jun², CHEN Qing-xiao¹, LÜ Qi-hui¹, Sun Hui-zhong¹

(1. Forestry College, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, He'nan, China;
2. Yiyang Forestry Technical Guidance Station, Luoyang 471600, He'nan, China)

Abstract: [Objective] To study the sensory neuron membrane proteins (SNMPs) in *Tropidothorax elegans*. [Method] The SNMP genes were cloned by PCR, and the expression of these genes were analyzed by fluorescence quantitative PCR. [Result] Two SNMPs genes of *T. elegans*, named as *TeleSNMP1* and *TeleSNMP2*, were cloned and identified for the first time by RT-PCR. Sequence analysis showed that the *TeleSNMP1* encoding area was 1 497 bp in length, encoding 498 aa. The *TeleSNMP2* encoding area was 1 686 bp in length, encoding 561 aa. The isoelectric points of these two genes were 8.26 and 7.05, respectively. Homology analysis showed that the consistency of SNMPs genes in insects of the same order was high, while the consistency of different order was low, and the sequence consistency between *TeleSNMP1* and *TeleSNMP2* was extremely low. The evolutionary tree results also showed that the evolutionary relationship of SNMPs genes in insects of the same order was rather close. Quantitative real-time PCR showed that *TeleSNMP1* was antennae-biased, whereas *TeleSNMP2* was expressed in female and male antennae but was also expressed in nonantennal tissues. [Conclusion] The results provide a useful reference for future studies on the function of the *T. elegans* SNMPs gene.

Keywords: *Tropidothorax elegans*; sensory neuron membrane proteins; cloning; sequence analysis; expression profile

(责任编辑: 崔 贝)