

橡胶材小蠹 5 个化学感受蛋白与信息化化合物的分子对接

张 凯, 郭技星*, 王 倩, 邬 祺, 许哲源, 邓礼楠, 周 祥**

海南大学热带农林学院/热带农林生物灾害绿色防控教育部重点实验室, 海南儋州 571737

摘 要: 橡胶材小蠹 (*Xyleborus affinis*) 是橡胶树的主要害虫之一, 利用信息化化合物对其进行监测或诱集防控已成为橡胶害虫防治的关键手段。在昆虫识别信息化化合物的过程中, 化学感受蛋白 (chemosensory proteins, CSPs) 发挥着重要作用。为了探究化学感受蛋白在橡胶材小蠹识别信息化化合物中的作用, 本研究克隆并鉴定了 5 个橡胶材小蠹化学感受蛋白 *XaffCSP1~XaffCSP5* 基因。利用生物信息学方法分析了 *XaffCSPs* 核酸及氨基酸序列特征, 利用分子对接技术解析了 *XaffCSPs* 与橡胶材小蠹 15 种信息化化合物的结合能力及结合模式, 其中包括 14 种寄主植物挥发物和 1 种聚集信息素。结果表明: 橡胶材小蠹 5 个 *XaffCSPs* 基因开放阅读框 (open reading frame, ORF) 长度为 366~417 bp, 编码 121~138 个氨基酸, 预测蛋白质分子量为 13.95~16.08 kDa, 氨基端含有 17~20 个氨基酸残基组成的信号肽, 蛋白质结构二级结构均以 α -螺旋为主, 并且 5 个 *XaffCSPs* 均具有 4 个保守的半胱氨酸位点, 符合昆虫化学感受蛋白的典型特征。系统发育树结果显示, 除 *XaffCSP5* 单独聚为一支外, *XaffCSP1~XaffCSP4* 分别与其他小蠹不同 CSPs 聚为一支。利用 trRosetta 平台对 *XaffCSPs* 进行模型构建, 5 个 *XaffCSPs* 的三维模型均由 6 个 α -螺旋组成, 模型评估结果表明模型质量良好。分子对接结果显示 5 个 *XaffCSPs* 对 α -古巴烯和长叶烯均表现出很强的结合能力; 此外, *XaffCSP4* 对萜品油烯和柠檬烯结合较强, 而 *XaffCSP5* 对莰烯、 α -蒎烯和 β -蒎烯有较强结合; 5 个 *XaffCSPs* 与顺式-马鞭草烯醇结合能力相对较弱。研究表明 5 个 *XaffCSPs* 与寄主植物挥发物有较好的亲和力, 可能参与橡胶材小蠹对寄主植物挥发物的识别, 研究结果为阐明橡胶材小蠹识别信息化化合物的分子机制奠定理论基础, 对橡胶材小蠹的防控具有重要意义。

关键词: 橡胶材小蠹; 化学感受蛋白; 序列分析; 信息化化合物; 分子对接

中图分类号: S763.7

文献标志码: A

Molecular Docking of Five Chemosensory Proteins in *Xyleborus affinis* with Semiochemicals

ZHANG Kai, GUO Jixing*, WANG Qian, WU Qi, XU Zheyuan, DENG Linan, ZHOU Xiang**

School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University / Key Laboratory of Green Prevention and Control of Tropical Plant Diseases and Pests, Ministry of Education, Danzhou, Hainan 571737, China

Abstract: *Xyleborus affinis*, a main pest of rubber trees, is effectively monitored and controlled using semiochemicals, a key method in rubber pest management. Chemosensory proteins (CSPs) are believed to play an important role in the process of binding and transporting odorants in insect. To elucidate the role of chemosensory proteins in semiochemicals recognizing by *X. affinis*, the *XaffCSP1~XaffCSP5* genes were cloned and identified in this study. The characteristics of nucleotide and deduced amino acid sequences of the genes were analyzed using bioinformatics methods. The binding mode and ability with 15 different ligands (14 host plant volatiles and 1 aggregation pheromone) was analyzed using molecular docking technology. Results revealed that the length of the open reading frame (ORF) of the five *XaffCSPs* genes was 366–417 bp, encoding 121–138 amino acids. The predicted protein molecular weight was 13.95–16.08 kDa

收稿日期 2024-05-17; 修回日期 2024-05-22

基金项目 国家自然科学基金地区基金项目 (No. 32060644); 海南省自然科学基金项目 (No. 322MS012); 海南省科技人才创新项目 (No. KJRC2023D01)。

作者简介 张 凯 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 农业昆虫与害虫防治; *同等贡献作者: 郭技星 (1989—), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 农业昆虫与害虫防治。**通信作者 (Corresponding author): 周 祥 (ZHOU Xiang), E-mail: 991017@hainanu.edu.cn。

and all five XaffCSPs contained signal peptide composed of 17–20 amino acid residues at N-terminal. The secondary structure of the proteins was mainly composed of α -helix. All five XaffCSPs possessed four conserved cysteine residues, conforming to the typical characteristics of insect chemosensory proteins. Phylogenetic tree analysis indicated that except for XaffCSP5, XaffCSP1 to XaffCSP4 were clustered with CSPs of other bark beetle species. The three-dimensional models of the five XaffCSPs were with good model quality according to model assessment results, and the models of the five XaffCSPs were composed of six α -helices. Molecular docking results demonstrated all five XaffCSPs had a strong binding affinity with (-)- α -copaene and (+)-longifolene. Additionally, XaffCSP4 showed strong binding to terpinolene and limonene, while XaffCSP5 showed strong binding to camphene, α -pinene, and β -pinene. The binding ability of the five XaffCSPs to (S)-cis-verbenol was relatively weak. The results demonstrated that the five XaffCSPs had good affinity with host volatiles and may be participated in the process of recognizing host plant volatiles by *X. affinis*. This study would provide a theoretical basis for elucidating the molecular mechanism of *X. affinis* in recognizing semiochemicals and is of great significance for the control of *X. affinis*.

Keywords: *Xyleborus affinis*; chemosensory proteins; sequence analysis; semiochemicals; molecular docking

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.11.016

橡胶材小蠹 (*Xyleborus affinis*) 属鞘翅目 (Coleoptera) 象甲科 (Curculionidae) 小蠹亚科 (Scolytinae), 原产于美洲, 现已广泛分布于全球热带和亚热带地区, 且寄主范围广, 是多种重要经济作物的害虫^[1]。橡胶材小蠹是我国橡胶树害虫的优势种之一^[2-3], 通常在极端天气或人为割胶导致树势衰弱后入侵树体, 在木质部中构筑坑道为害^[4-5]。橡胶材小蠹目前主要以农业防治和化学防治为主, 但由于该害虫主要以蛀干为害, 隐蔽性强、适应性广, 且具有较强的繁殖能力, 化学防治效果较差^[3, 6]。利用信息化化合物对害虫进行监测或诱集防控, 因其绿色、高效等特点而被广泛关注。已有研究利用乙醇及其与 α -蒎烯的混合物成功诱集到橡胶材小蠹^[7]; 干威^[8]利用月桂烯、S-(-)-柠檬烯、顺式-马鞭草烯醇和蒎烯在橡胶林中成功诱集到橡胶材小蠹; 徐凡丁等^[9]鉴定了橡胶树韧皮部挥发物成分, 并通过室内行为测定试验筛选到长叶烯、十四烷、2-苯基-2-丙醇 3 种化合物对橡胶材小蠹具有行为活性。ROMERO 等^[1]测定了橡胶材小蠹对 3 种寄主植物挥发物的触角电生理反应, 发现裂榄 (*Bursera simaruba*) 树皮挥发物能引起橡胶材小蠹较强的触角电位反应, 其主要成分包括 3-蒎烯、蒎烯、 α -蒎烯、 β -蒎烯、桉烯、伞花烃、柠檬烯、 α -古巴烯、萜品油烯等。

昆虫识别外界信息化合物需要多种蛋白质相互协作, 其中化学感受蛋白 (chemosensory proteins, CSPs) 是嗅觉识别过程最早参与的蛋白质之一。CSPs 由 100~120 个氨基酸组成, 其典型特征为含有 4 个保守的半胱氨酸 (cysteine, Cys), 分别由 2 个二硫键 (S-S 键) 连接^[10-11]。该类蛋白

质三维空间结构通常小而紧凑, 其 6 个 α -螺旋形成一个“疏水结合口袋”, 用于结合信息化合物^[12-13]。CSPs 主要存在于化学感受器淋巴液中, 负责结合气味或信息素分子, 并传递给气味受体 (odorant receptors, ORs), 因此, CSPs 在识别和运输气味分子中发挥着重要作用^[14]。

昆虫化学感受研究中, 同源建模和分子对接技术被广泛应用于 CSPs、气味结合蛋白 (odorant binding proteins, OBPs) 及 ORs 的功能预测, 这些技术可以方便快捷地研究蛋白质与小分子物质的结合模式及其结合力大小, 从而了解它们之间的相互作用^[15-17]。本研究从橡胶材小蠹转录组中鉴定到 5 个橡胶材小蠹化学感受蛋白 XaffCSPs, 通过构建 XaffCSPs 三维模型, 利用分子对接技术解析 XaffCSPs 与信息化化合物的结合能力及结合方式, 为阐明橡胶材小蠹识别信息化化合物的分子机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试虫源: 橡胶材小蠹采集于海南省儋州市海南大学农科基地, 使用锯木断收集和诱捕法 2 种方法采集。

1.2 方法

1.2.1 XaffCSPs 基因的克隆 从前期橡胶材小蠹转录组中筛选鉴定化学感受蛋白基因 XaffCSPs 序列^[18], 使用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物, 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成 (表 1)。

以橡胶材小蠹 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,

表 1 本研究所用引物
Tab. 1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')
XaffCSP1-F	ATGAAAAATCTAATCGCTGCC
XaffCSP1-R	GTTGCCTAGAACTGCCTA
XaffCSP2-F	ATGTGGAAGTTGACCCTACTT
XaffCSP2-R	CTGAGCATCGACAGGCTTC
XaffCSP3-F	ATGGTTTTGTTACTTTCGTTACT
XaffCSP3-R	CTTATCTACAAGTATTTTACTC
XaffCSP4-F	ATGAAGCTTTTGGTAATCGC
XaffCSP4-R	CAGATTGATTCCATCCTTCTTC
XaffCSP5-F	ATGAGAAGCATAGTGGTTGT
XaffCSP5-R	AATGTCATACTCTGCCTTCC

反应体系如下：Phanta[®] Max Super-Fidelity DNA Polymerase 0.4 μL、2×Phanta[®] Max Buffer 10 μL、dNTP Mix 0.4 μL、引物对各 0.8 μL、cDNA 模板 0.2 μL、ddH₂O 7.4 μL，总体积为 20 μL。反应条件：95℃预变性 3 min；95℃变性 15 s，58℃退火 15 s，72℃延伸 30 s，反应 35 个循环；72℃延伸 10 min。用 1%琼脂糖凝胶电泳检测获得 PCR 产物，利用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒[天根生化科技（北京）有限公司]纯化回收目的条带，将纯化产物与 pMD18-T 载体连接，并转化至感受态细胞 DH5α 中。挑取单克隆菌落进行 PCR 验证，筛选阳性克隆提取质粒，送至生工生物工程（上海）股份有限公司进行测序。

1.2.2 XaffCSPs 的序列分析 利用 NCBI ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 预测 XaffCSPs 基因的开放阅读框 (open reading frame, ORF)；使用 SignalP 4.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>) 预测 XaffCSPs 的信号肽位置；通过 Expasy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam>) 预测 XaffCSPs 的分子量和等电点。利用 SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 对 XaffCSPs 氨基酸序列二级结构进行预测；使用 NCBI BLASTx (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 分析 XaffCSPs 与其他鞘翅目昆虫化学感受蛋白序列的相似性；利用 DNAMAN 软件进行氨基酸序列比对。利用 MEGA 11 软件采用邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建 XaffCSPs 与其他昆虫 CSPs 的系统发育树，bootstrap 为 1000 次。使用 MEME (<https://meme-suite.org/meme/index.html>) 设置最大 Motif 数量为 5，对 XaffCSPs 的

保守基序进行评估。

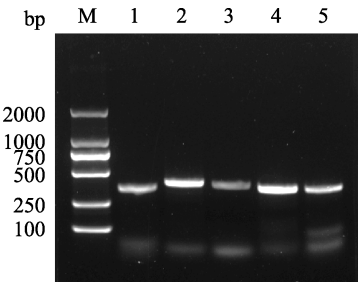
1.2.3 XaffCSPs 的三维建模与模型评价 利用 trRosetta 平台^[19]对蛋白质的三级结构进行预测。使用 SAVES 6.0 (<https://saves.mbi.ucla.edu/>) 的 ERRAT 和 ProCheck 对 XaffCSPs 三维模型进行评价。

1.2.4 分子对接 以 15 种对橡胶材小蠹有行为或电生理活性的化合物作为配体，从 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中下载配体 PDB 文件，通过 AutoDock Tool 1.5.6 对 XaffCSPs 蛋白质与配体的三维模型进行能量优化，并赋予原子电荷及力场。通过 POCASA1.1 (<https://g6altair.sci.hokudai.ac.jp/g6/service/pocasa/>) 预测蛋白质结合口袋的位置，设置受体与配体的结合搜寻空间 Grid Box，进行半柔性对接^[20]。自由结合能越低且位点构象合理的物质，即为 XaffCSPs 的潜在结合物质。结合能越小，认为配体与受体的结合越好。

2 结果与分析

2.1 5 个 XaffCSPs 的序列分析

从前期转录组数据中鉴定到 5 个注释为化学感受蛋白的 Unigene 序列，分别命名为 XaffCSP1~XaffCSP5。以橡胶材小蠹 cDNA 为模版对 ORF 进行 PCR 扩增，电泳结果显示 5 个 XaffCSPs 基因扩增条带均位于 300~500 bp 之间，条带大小与预期一致（图 1）。获得测序结果后对转录组原始序列进行校正。



M: DL2000 DNA marker; 1~5: XaffCSP1~XaffCSP5 PCR 产物。
M: DL2000 DNA marker; 1-5: PCR product of XaffCSP1-XaffCSP5.

图 1 XaffCSPs 基因 ORF 的 PCR 扩增
Fig. 1 PCR amplification of XaffCSPs ORF

5 个 XaffCSPs 基因均包含完整 ORF，长度为 366~417 bp，编码 121~138 个氨基酸，预测的蛋白质分子量为 13.95~16.08 kDa，氨基端含有 17~20 个氨基酸残基组成的信号肽（表 2）。二级

结构预测结果表明，5 个 XaffCSPs 蛋白质结构均以 α -螺旋为主，其次为无规则卷曲（表 3）。对 XaffCSPs 进行基序预测分析，5 个 XaffCSPs 序列中发现 5 个保守基序（图 2）。

表 2 XaffCSPs 蛋白的理化性质
Tab. 2 Physicochemical properties of putative XaffCSPs protein

蛋白名称 Protein name	全长 Full length/bp	开放阅读框 ORF size/bp	氨基酸数量 Number of amino acids	信号肽 Signal peptide	分子量 Molecular weight/kDa	等电点 pI
XaffCSP1	574	366	121	1~18	13.95	9.36
XaffCSP2	847	417	138	1~20	16.08	5.45
XaffCSP3	1604	405	134	1~18	15.41	9.05
XaffCSP4	1539	384	127	1~17	14.63	8.79
XaffCSP5	979	390	129	1~20	15.30	5.07

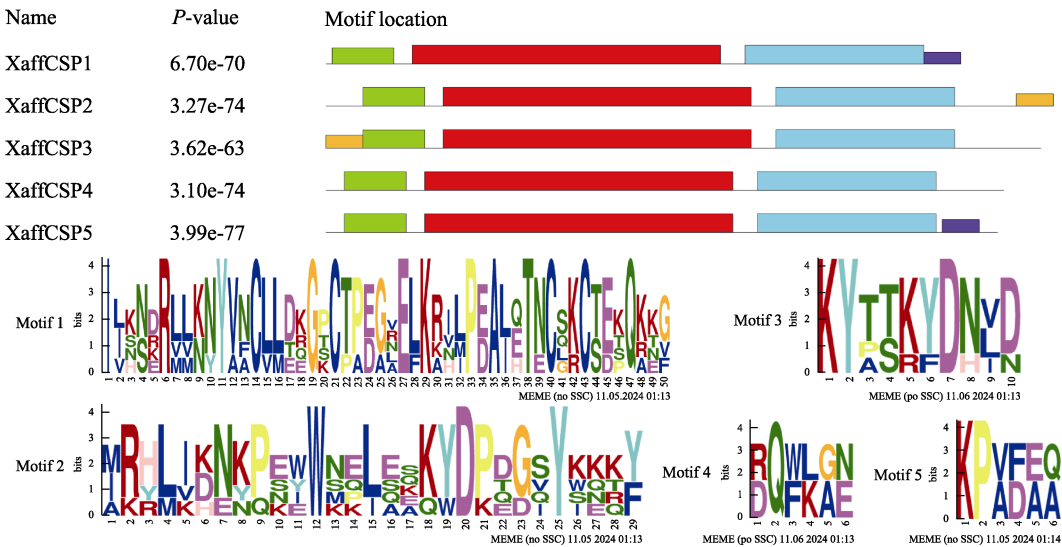


图 2 XaffCSPs 蛋白的保守基序分析
Fig. 2 Conserved motifs prediction of XaffCSPs protein

表 3 XaffCSPs 蛋白二级结构预测
Tab. 3 XaffCSPs protein secondary structure prediction %

蛋白名称 Protein name	α -螺旋 α -helix	β -转角 β -turn	延伸链 Extended strand	无规则卷曲 Random coil
XaffCSP1	62.81	4.96	3.31	28.93
XaffCSP2	52.90	5.80	6.52	34.78
XaffCSP3	64.18	6.72	2.99	26.12
XaffCSP4	61.42	8.66	4.72	25.20
XaffCSP5	65.89	4.65	1.55	27.91

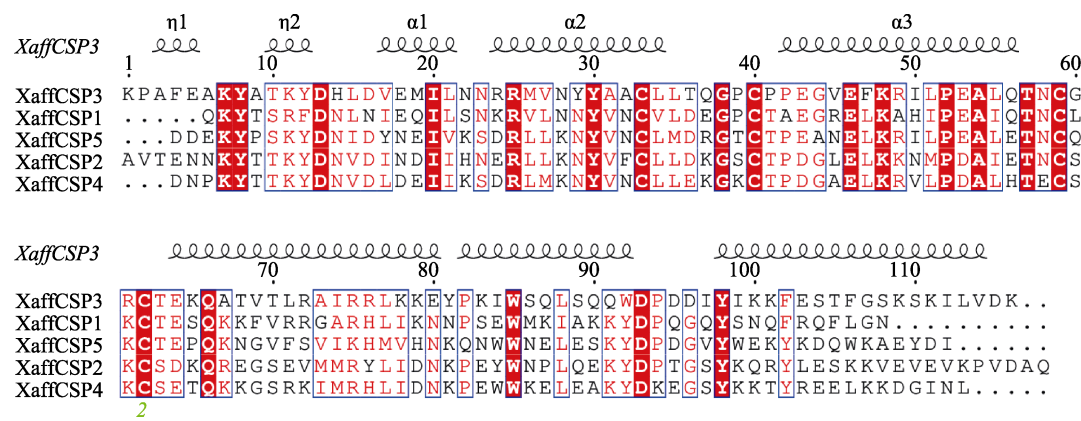
表 4 XaffCSPs 基因的同源性分析
Tab. 4 Homology analysis of XaffCSPs gene

基因 Gene	物种名称 Species name	同源基因 Homologous gene	登录号 Accession No.	相似度 Identity/%
XaffCSP1	华山松大小蠹	CSP2	AXF53965.1	68.07
XaffCSP2	云南切梢小蠹	CSP1	AMP19496.1	79.03
XaffCSP3	枣飞象	CSP9	WJJ63294.1	76.98
XaffCSP4	星天牛	CSP	AUF72999.1	88.04
XaffCSP5	黄粉虫	CSP9	AJO62215.1	60.95

2.2 XaffCSPs 的序列比对与系统发育分析

对 XaffCSPs 进行 Blast 比对分析表明，在 NCBI 数据库中与 XaffCSP1~XaffCSP5 相似性最高的分别是华山松大小蠹（*Dendroctonus armandi*）CSP2、云南切梢小蠹（*Tomicus yunnanensis*）CSP1、枣飞象（*Pachyrhinus yasumatsui*）CSP9、星天牛（*Anoplophora chinensis*）CSP 和黄粉虫（*Tenebrio molitor*）CSP9 基因（表 4）。序列

比对结果表明，XaffCSP1~XaffCSP5 均具有 4 个保守半胱氨酸位点，符合 C₁-X₆-C₂-X₁₈-C₃-X₂-C₄ 的排列模式（图 3）。构建 XaffCSPs 与其他 5 种小蠹 CSPs 的系统发育树，除 XaffCSP5 单独聚为一支外，XaffCSP1~XaffCSP4 分散在不同的分支（图 4），XaffCSP1 与华山松大小蠹 DarmCSP2、中欧山松大小蠹（*D. ponderosae*）DponCSP2 和松圆头小蠹（*D. adjunctus*）DadjCSP2 聚为一支，亲



红色背景为保守氨基酸，蓝色框为相同或相似的氨基酸，绿色数字为半胱氨酸形成的二硫键。
The red background represents conserved amino acids, the blue box represents identical or similar amino acids, and the green numbers represent disulfide bonds formed by cysteine.

图 3 XaffCSPs 的序列比对
Fig. 3 Sequence alignment of XaffCSPs

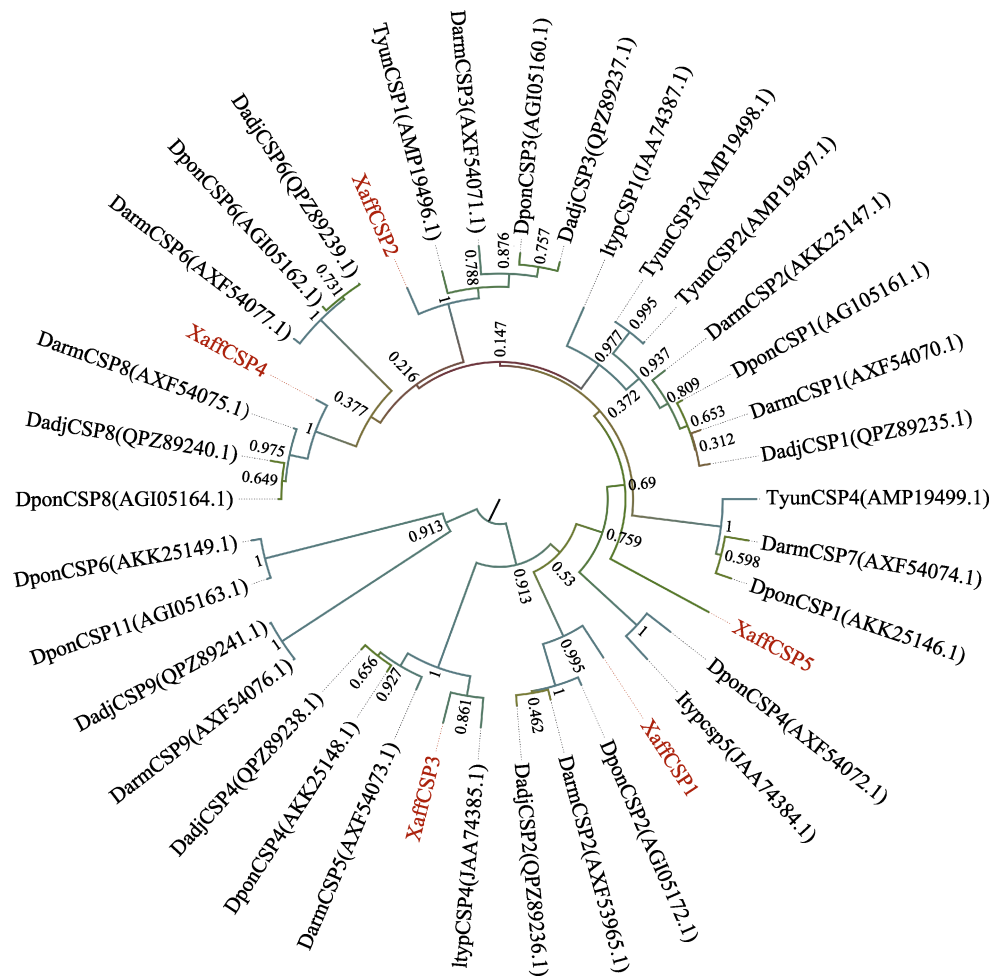


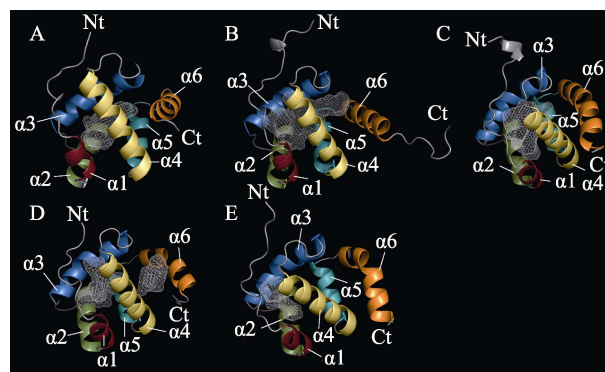
图 4 XaffCSPs 与其他小蠹虫 CSPs 的系统发育树
Fig. 4 Phylogenetic analysis of amino acid sequence of XaffCSPs and bark beetles CSPs

缘关系近；XaffCSP2 与华山松大小蠹、中欧山松大小蠹、松圆头小蠹的 CSP3 及云南切梢小蠹 TyunCSP1 聚为一支；XaffCSP3 与中欧山松大小蠹、松圆头小蠹及云杉八齿小蠹 (*Ips typographus*) 的 CSP4 及华山松大小蠹 DarmCSP5 聚为一支；XaffCSP4 与华山松大小蠹、中欧山松大小蠹及松

圆头小蠹的 CSP8 聚为一支。

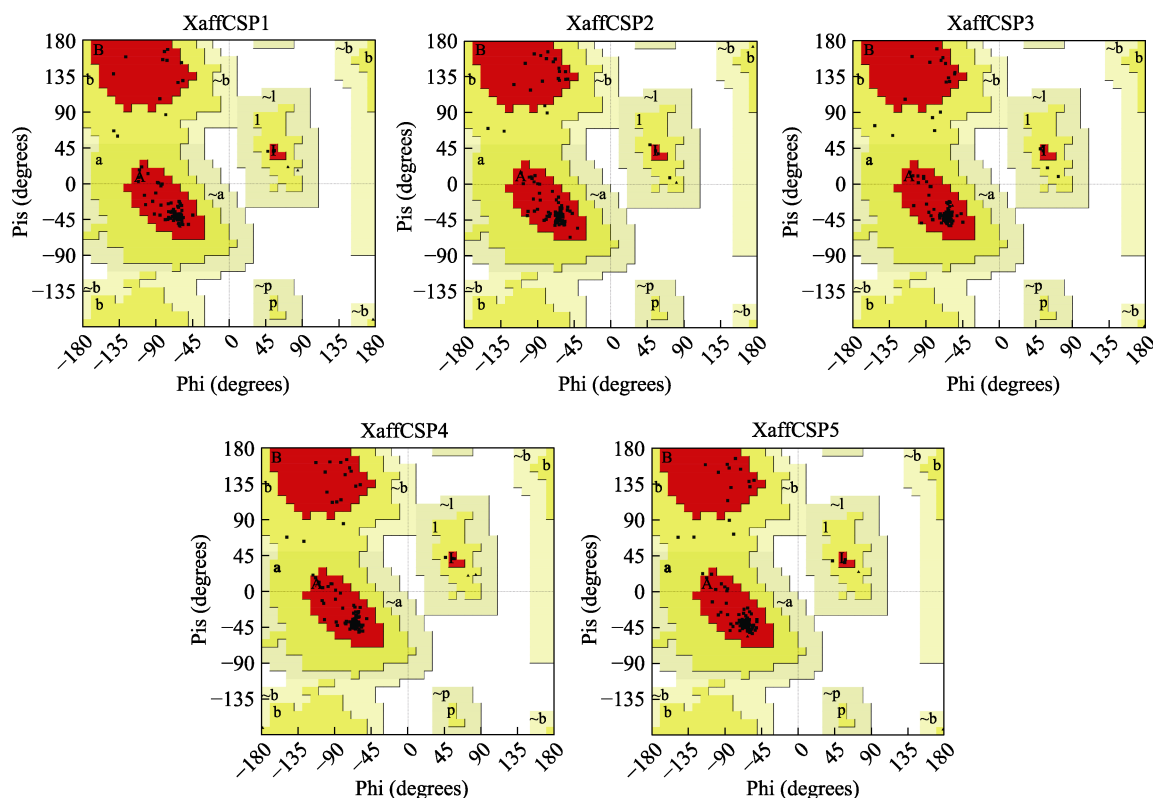
2.3 XaffCSPs 的三维建模构建及质量评估

通过 trRosetta 平台构建 XaffCSPs 的蛋白质模型, XaffCSP1~XaffCSP5 的三维模型均由 6 个 α -螺旋组成 (图 5)。XaffCSP1~XaffCSP5 三维模型的 ERRAT 值分别为 100%、98.14%、100%、100% 和 100%, 均大于 50%, 表明非共价键相互作用合理。利用 ProCheck 程序对蛋白质三维结构进行评估, 拉氏构象图表明 XaffCSP1~XaffCSP15 三维模型分别有 95.70%、94.30%、94.20%、94.90% 和 93.90% 的氨基酸残基位于最佳区域, 分别有 4.30%、5.70%、5.80%、5.10% 和 6.10% 的氨基酸位于较合适区域, 无氨基酸位于勉强许可区和不合理区域, 表明通过 trRosetta 构建的 XaffCSP1~XaffCSP15 三维模型构象合理 (图 6)。



A~E 为 XaffCSP1~XaffCSP5 的三维结构; Nt 和 Ct 分别代表蛋白质的氨基端和羧基端; α 表示蛋白质的 α -螺旋。
A~E are 3D structures of XaffCSP1~XaffCSP5; Nt and Ct represent the amino terminal and the carboxyl terminal of the protein, respectively; α indicates α -helix of the protein.

图 5 XaffCSPs 的三维模型
Fig. 5 3D model of XaffCSPs



红色: 最佳区域, 包括 A、B、L 区域; 黄色: 许可区域, 包括 a、b、l、p 区域; 浅黄色: 较合理区域, 包括~a、~b、~l、~p 区域; 白色: 不合理区域。
Red: Most favored regions, including A, B and L areas; Yellow: Additional allowed regions, including a, b, l, p areas; Pale yellow: Generously allowed regions, including ~a, ~b, ~l, ~p areas; White: Disallowed regions.

图 6 XaffCSPs 模型的拉氏构象图

Fig. 6 Ramachandran plots of homologous models of XaffCSPs

2.4 XaffCSPs 与信息化化合物的分子对接

将 5 个 XaffCSPs 与 15 种信息化化合物进行分子对接, 结果表明, XaffCSP1~XaffCSP5 对 α -古巴烯均表现出很强的结合能力, 结合能分别为

-7.71、-7.26、-7.46、-7.85、-7.59 kJ/mol; 其次为长叶烯, XaffCSP2、XaffCSP3、XaffCSP4 和 XaffCSP5 与该化合物的结合能分别为 -6.27、-7.31、-6.33、-7.24 kJ/mol, XaffCSP1 与长叶烯

的结合能力相对较弱。此外, XaffCSP4 对萜品油烯和柠檬烯也表现出较强的结合能力, 结合能分别为-6.32、-6.21 kJ/mol, 而 XaffCSP5 对茨烯、 α -蒎烯和 β -蒎烯表现出较强的结合能力, 结合能分别为-6.25、-6.22、-6.17 kJ/mol。15 个化合物

中, 5 个 XaffCSPs 对十四烷和月桂烯均表现出较弱的结合能力。在与聚集信息素顺式马鞭草醇的结合中, 与其他 XaffCSPs 相比, XaffCSP5 表现出较强的结合能力, 其结合能为-5.81 kJ/mol (表 5)。

表 5 XaffCSPs 与 15 种配体的分子对接
Tab. 5 Molecular docking of XaffCSPs with 15 ligands

编号 No.	配体物质 Ligand substance	CAS 号 CAS No.	分子式 Formula	形状 (环状/链状) Shape (cyclic/chain)	结合能/(kJ·mol ⁻¹)				
					CSP1	CSP2	CSP3	CSP4	CSP5
1	棕榈酸甲酯 methyl palmitate	112-39-0	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	链状	-4.95	-5.01	-4.82	-5.80	-4.78
2	月桂烯 myrcene	123-35-3	C ₁₀ H ₁₆	链状	-4.36	-4.35	-4.46	-5.18	-4.85
3	3-蒎烯 3-carene	13466-78-9	C ₁₀ H ₁₆	环状	-5.24	-5.21	-5.20	-5.51	-5.66
4	β -蒎烯(-)-beta-pinene	18172-67-3	C ₁₀ H ₁₆	环状	-5.54	-5.79	-5.52	-5.79	-6.17
5	顺式-马鞭草烯醇(S)-cis-verbenol	18881-04-4	C ₁₀ H ₁₆ O	环状	-5.56	-5.80	-5.42	-5.61	-5.81
6	桉烯 sabinen	3387-41-5	C ₁₀ H ₁₆	环状	-5.17	-5.30	-5.19	-5.73	-5.60
7	α -古巴烯(-)-alpha-copaene	3856-25-5	C ₁₅ H ₂₄	环状	-7.71	-7.26	-7.46	-7.85	-7.59
8	长叶烯(+)-longifolene	475-20-7	C ₁₅ H ₂₄	环状	-5.36	-6.27	-7.31	-6.33	-7.24
9	间伞花烃 m-cymene	535-77-3	C ₁₀ H ₁₄	环状	-5.40	-5.11	-4.97	-5.78	-5.29
10	萜品油烯 terpinolene	586-62-9	C ₁₀ H ₁₆	环状	-5.57	-5.57	-5.51	-6.32	-5.83
11	柠檬烯(-)-limonene	5989-54-8	C ₁₀ H ₁₆	环状	-5.45	-5.43	-5.53	-6.21	-5.61
12	2-苯基-2-丙醇 2-phenyl-2-propanol	617-94-7	C ₉ H ₁₂ O	环状	-4.48	-5.01	-4.51	-5.53	-4.82
13	十四烷 tetradecane	629-59-4	C ₁₄ H ₃₀	链状	-4.83	-4.47	-4.42	-5.86	-4.83
14	茨烯 camphene	79-92-5	C ₁₀ H ₁₆	环状	-5.60	-5.69	-5.42	-5.72	-6.25
15	α -蒎烯 alpha-piene	80-56-8	C ₁₀ H ₁₆	环状	-4.42	-5.70	-5.51	-5.76	-6.22

XaffCSP1 主要通过范德华力和疏水作用与 α -古巴烯结合, 其中氨基酸残基 Ile15、Leu22、Tyr25、Val26、Val29、Leu42、Phe64、Val65、Leu72 形成疏水作用, 氨基酸残基 Ile12、Leu16、Gly39、Ile46、Gly68、Ala69、Trp80、Ile83 形成范德华力。在与其他化合物的对接结果中, 氨基酸残基 Ile46、Val65、Ala69、Ile83 参与了多数化合物的结合 (图 7A)。XaffCSP2 与 α -古巴烯的结合中, 形成疏水作用的氨基酸残基包括 Val15、Ile17、Ile20、Tyr30、Leu47、Lys65, 形成范德华力的氨基酸残基有 Tyr12、Asp13、Asn14、Asp43、Gln66、Gly69、Ser70; 而在与长叶烯的结合中, 氨基酸残基 Leu34、Met51、Ile55、Met74、Leu77、Leu88、Tyr98 主要形成疏水作用, Leu47、Ala54、Ser70、Met73、Trp85、Gln89 形成范德华力 (图 7B)。 α -古巴烯与长叶烯的结合位置均位于 XaffCSP2 的疏水性结合腔内, 但位置略有差异, 2 个氨基酸残基 Leu47 和 Ser70 在 2 种配体结合中均发挥作用。

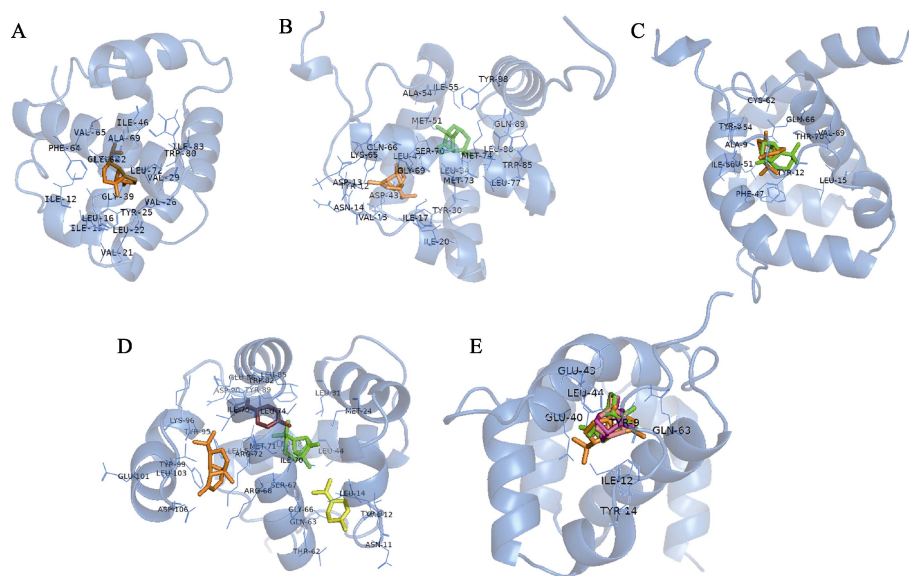
根据 XaffCSP3 与配体的对接结果, α -古巴烯和长叶烯位于 XaffCSP3 疏水性结合腔内相同的

位置 (图 7C)。形成疏水作用的氨基酸残基 Tyr8、Phe47、Ile50 和形成范德华力的氨基酸残基 Gln66 和 Thr70 均在 XaffCSP3 与这 2 种信息化化合物的结合中均发挥作用。

XaffCSP4 主要通过范德华力和疏水作用与 α -古巴烯、长叶烯、萜品油烯和柠檬烯结合, 这 4 种配体位于 XaffCSP4 疏水性结合腔的不同位置 (图 7D)。在与 α -古巴烯的结合中, XaffCSP4 的氨基酸残基 Arg68、Met71、Arg72、Ile75、Trp82、Tyr95、Tyr99、Leu103 形成疏水性作用力, 氨基酸残基 Lys96、Glu102、Asp106 形成范德华力。在与长叶烯的结合中, Leu31、Leu44、Leu48、Leu52、Ile70、Met71、Leu74、Leu85 形成疏水作用, Met24、Tyr82、Ser67 形成范德华力。Tyr9、Val12、Leu14、Leu44、Ile70 通过疏水作用作用于萜品油烯, Asp10、Thr62、Gln63、Gly66、Ser67 通过范德华力与萜品油烯相互作用。与柠檬烯的结合中, Leu31、Leu48、Leu52、Leu74、Trp82、Leu85、Trp82 形成疏水作用, Met71、Glu86、Tyr89、Asp90 通过范德华力发挥作用。

XaffCSP5 与 α -古巴烯、长叶烯、茨烯、 α -蒎烯和 β -蒎烯的结合主要通过范德华力和疏水作用 (图 7E)。形成疏水作用的氨基酸残基 Tyr9、Ile12、Tyr14、Leu44 与形成范德华力的氨基酸残基 Glu40、Glu43、Gln63 在 XaffCSP5 与以上 5 种信息化化合物的结合中发挥作用。XaffCSP5 通过

范德华力、疏水作用和氢键与顺式-马鞭草烯醇结合, 其氨基酸残基 Ile12、Tyr14、Leu44、Ile47、Val67 通过疏水作用与顺式-马鞭草烯醇互作, 氨基酸残基 Asp10、Glu40、Glu43、Gln63 通过范德华力与聚集信息素互作, Tyr9 与顺式-马鞭草烯醇形成氢键。



A: XaffCSP1; B: XaffCSP2; C: XaffCSP3; D: XaffCSP4; E: XaffCSP5。相同颜色代表同一配体。
A: XaffCSP1; B: XaffCSP2; C: XaffCSP3; D: XaffCSP4; E: XaffCSP5。The same color represents the same ligand.

图 7 XaffCSPs 的分子对接图

Fig. 7 Molecular docking diagram of XaffCSPs

3 讨论

随着基因组与转录组学技术在昆虫化学感受研究领域的应用, 许多昆虫的化学感受基因已经被鉴定, 其中包括多种小蠹虫的 CSPs 基因。例如在中欧山松大小蠹 *D. ponderosae* 中, 鉴定得到 11 个 CSPs 基因, 在华山松大小蠹 (*D. armandi*) 的转录组中发现 9 个 CSPs, 在云南切梢小蠹 (*T. yunnanensis*) 头部转录组中得到 8 个 CSPs, 红脂大小蠹 (*D. valens*) 和云杉八齿小蠹 (*I. typographus*) 触角转录组中各发现 6 个 CSPs^[21-24]。本研究利用橡胶材小蠹转录组数据鉴定到 5 个 XaffCSPs, 其序列分析表明这些 XaffCSPs 的结构具有高度保守性, 均包含 4 个半胱氨酸位点, 其排列模式为 C-X₆-C-X₁₈-C-X₂-C, 符合鞘翅目昆虫 CSPs 的普遍结构^[25]。

鞘翅目昆虫中, CSPs 在识别信息化化合物过程中发挥着重要作用。一些 CSPs 能与寄主植物的多种挥发物紧密结合。如绿豆象 (*Callosobruchus chinensis*) 的 CchiCSP1 可以与绿豆的 4 种挥发物

紧密结合^[26]。在甘薯小象甲 (*Cylas formicarius*) 中发现有 3 个 CSPs 对 17 种植物挥发物具有较高的结合能力, 通过 RNAi 干扰 *CforCSP1*、*CforCSP5* 和 *CforCSP6* 的表达后, 甘薯小象甲丧失了对部分植物挥发物的嗅觉反应^[27]。CSPs 也参与了鞘翅目昆虫信息素的识别, 如华山松大小蠹的 DarmCSP2 可能是多种信息素和寄主植物挥发物的载体^[23]。本研究通过分子对接技术分析了 5 个 XaffCSPs 与橡胶材小蠹信息化化合物的结合能力, 发现 XaffCSPs 与 α -古巴烯和长叶烯有较强的结合能力, 而对聚集信息素结合能力相对较弱。因此, XaffCSPs 可能在橡胶材小蠹识别寄主植物挥发物的过程中发挥重要作用。XaffCSPs 与植物挥发物的结合主要是通过范德华力和疏水作用进行结合, 在这些配体中, 棕榈酸甲酯、十四烷和月桂烯的分子结构呈链状, 而其余配体的分子结构为环状。根据分子对接的结果, 发现 5 个 XaffCSPs 对环状配体的结合能力普遍强于对链状配体的结合能力。结合腔的形状及其与配体分子形状的契合度可能是影

响 CSPs 结合能的重要因素, 如果配基与结合腔能够进行较好的契合, 配体与形成结合腔的不同氨基酸充分接触, 通过更牢固作用力将配基固定在结合腔内^[28], 也有研究表明配体的弹性及碳链长度也会影响其与蛋白质的结合^[29-30]。

综上所述, 本研究克隆并分析了 5 个橡胶材小蠹化学感受蛋白 *XaffCSPs* 基因, 并利用分子对接技术分析了其与 15 种橡胶材小蠹信息化合物的结合模式, 结果表明这 5 个 *XaffCSPs* 与 α -古巴烯和长叶烯结合能力较强。本研究为阐明橡胶材小蠹识别信息化合物的分子机制提供了理论基础。由于昆虫的生活环境及生理状态具有复杂性和多样性, 尽管分子对接技术可以模拟 CSPs 与配体的结合过程, 但仍存在一定的局限性, 还需通过荧光竞争结合试验和定点突变等技术验证蛋白质与配体的结合能力及关键氨基酸残基的作用, 以及通过 RNAi 试验验证 CSPs 在橡胶材小蠹识别信息化合物中的作用。

参考文献

- [1] ROMERO P, IBARRA-JUÁREZ L A, CARRILLO D, GUERRERO-ANALCO J A, KENDRA P E, KIEL-MARTÍNEZ A L, GUILLÉN L. Electroantennographic responses of wild and laboratory-reared females of *Xyleborus affinis* Eichhoff and *Xyleborus ferrugineus* (Fabricius) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) to ethanol and bark volatiles of three host-plant species[J]. *Insects*, 2022, 13(7): 655.
- [2] 张虎雄. 橡胶树小蠹虫的特征特性及其防治措施[J]. *现代农业科技*, 2014(11): 125-126.
ZHANG H X. Characteristics of rubber tree bark beetle and its control measures[J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2014(11): 125-126. (in Chinese)
- [3] 周祥, 郭技星, 殷涛, 干威, 白春秀, 徐凡丁, 杨松灵. 中国植胶区橡胶小蠹虫及其诱捕防控技术研究进展[J]. *热带作物学报*, 2021, 42(11): 3049-3054.
ZHOU X, GUO J X, YIN T, GAN W, BAI C X, XU F D, YANG S L. Research progress on rubber bark beetles and trapping control technology in China[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2021, 42(11): 3049-3054. (in Chinese)
- [4] 张虎雄, 赵能丽, 曹彪. 橡胶树小蠹虫的危害及防治研究[J]. *乡村科技*, 2017(30): 65-66.
ZHANG H X, ZHAO N L, CAO B. Research on the harm and control of rubber tree beetle[J]. *Rural Technology*, 2017(30): 65-66. (in Chinese)
- [5] 李守贞. 小蠹虫的特征特性及防治措施[J]. *现代农业科技*, 2019(7): 98, 102.
- LI S Z. The characteristics and control measures of the bark beetle[J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2019(7): 98, 102. (in Chinese)
- [6] 李四有. 海南橡胶树病虫害的防治对策[J]. *农业科技通讯*, 2018(11): 321-323.
- LI S Y. Prevention and control strategies for diseases and pests of rubber trees in Hainan[J]. *Bulletin of Agricultural Science and Technology*, 2018(11): 321-323. (in Chinese)
- [7] MILLER D R, RABAHIA R J. Ethanol and (-)- α -pinene: attractant kairomones for bark and ambrosia beetles in the southeastern US[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2009, 35(4): 435-448.
- [8] 干威. 橡胶小蠹虫粘捕防控技术初探[D]. 海口: 海南大学, 2020.
GAN W. A preliminary study on the integration of adhesive trapping control technology for rubber bark beetles[D]. Hainan University, 2020. (in Chinese)
- [9] 徐凡丁, 周祥, 宋灿灿. 橡胶树挥发性成分对橡胶材小蠹的行为影响[J]. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39(9): 4145-4153.
- XU F D, ZHOU X, SONG C C. Effects of volatile components in rubber tree on behavior of *Xyleborus affinis*[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2020, 39(9): 4145-4153. (in Chinese)
- [10] TEGONI M, CAMPANACCI V, CAMBILLAU C. Structural aspects of sexual attraction and chemical communication in insects[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2004, 29(5): 257-264.
- [11] 刘孝贺, 孙丽娜, 张怀江, 仇贵生. 昆虫化学感受蛋白研究进展[J]. *农学学报*, 2020, 10(6): 22-26.
- LIU X H, SUN L N, ZHANG H J, QIU G S. Research progress on chemosensory proteins of insects[J]. *Journal of Agriculture*, 2020, 10(6): 22-26. (in Chinese)
- [12] PELOSI P, ZHOU J J, BAN L P, CALVELLO M. Soluble proteins in insect chemical communication[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2006, 63(14): 1658-1676.
- [13] PELOSI P, IOVINELLA I, ZHU J, WANG G R, DANI F R. Beyond chemoreception: diverse tasks of soluble olfactory proteins in insects[J]. *Biological Reviews*, 2018, 93(1): 184-200.
- [14] 周巧玲, 滑金锋, 李宗芸. 昆虫化学感受蛋白及其功能研究进展[J]. *黑龙江农业科学*, 2021(12): 114-123.
ZHOU Q L, HUA J F, LI Z Y. Research progress of chemosensory protein and its functions in insects[J]. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, 2021(12): 114-123. (in Chinese)
- [15] ŚLEDŹ P, CAFLISCH A. Protein structure-based drug design: from docking to molecular dynamics[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2018, 48: 93-102.
- [16] 李敏, 郭美琪, 相伟芳, 杨艺新, 王永辉, 朱耿平, 潘丽娜.

- 分子对接技术在昆虫化学感受研究中的应用进展[J]. 植物保护, 2019, 45(5): 121-127.
- LI M, GUO M Q, XIANG W F, YANG Y X, WANG Y H, ZHU G P, PAN L N. Research progress in molecular dock in insect chemosense[J]. Plant Protection, 2019, 45(5): 121-127. (in Chinese)
- [17] 付淑慧, 张鹤, 赵婉清, 梁志刚. 小菜蛾气味结合蛋白 PxyIOBP33 与其相关信息化学物质的分子对接[J]. 环境昆虫学报, 2023, 45(5): 1291-1305.
- FU S H, ZHANG H, ZHAO W Q, LIANG Z G. Molecular docking of *Plutella xylostella* odorant binding protein PxyIOBP33 with its related semiochemicals[J]. Journal of Environmental Entomology, 2023, 45(5): 1291-1305. (in Chinese)
- [18] 崔广超. 橡胶材小蠹气味结合蛋白的鉴定与结合特性分析[D]. 海口, 海南大学, 2023.
- CUI G C. Identification and binding properties of odorant-binding proteins of *Xyleborus affinis*[D]. Haikou: Hainan University, 2023. (in Chinese)
- [19] DU Z Y, SU H, WANG W K, YE L S, WEI H, PENG Z L, ANISHCHENKO I, BAKER D, YANG J Y. The trRosetta server for fast and accurate protein structure prediction[J]. Nature Protocols, 2021, 16(12): 5634-5651.
- [20] 段爱霞, 陈晶, 刘宏德, 刘秀辉, 卢小泉. 分子对接方法的应用与发展[J]. 分析科学学报, 2009, 25(4): 473-477.
- DUAN A X, CHEN J, LIU H D, LIU X H, LU X Q. Applications and developments of molecular docking method[J]. Journal of Analytical Science, 2009, 25(4): 473-477. (in Chinese)
- [21] ZHU J Y, ZHAO N, YANG B. Global transcriptional analysis of olfactory genes in the head of pine shoot beetle, *Tomicus yunnanensis*[J]. International Journal of Genomics, 2012, 2012: 491748.
- [22] GU X C, ZHANG Y N, KANG K, DONG S L, ZHANG L W. Antennal transcriptome analysis of odorant reception genes in the red turpentine beetle (RTB), *Dendroctonus valens*[J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0125159.
- [23] LI Z M, DAI L L, CHU H L, FU D Y, SUN Y Y, CHEN Y Y. Identification, expression patterns, and functional characterization of chemosensory proteins in *Dendroctonus armandi* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae)[J]. Frontiers in Physiology, 2018, 9: 291.
- [24] ANDERSSON M N, KEELING C I, MITCHELL R F. Genomic content of chemosensory genes correlates with host range in wood-boring beetles (*Dendroctonus ponderosae*, *Agilus planipennis* and *Anoplophora glabripennis*)[J]. BMC Genomics, 2019, 20(1): 1-18.
- [25] WANNER K W, WILLIS L G, THEILMANN D A, ISMAN M B, FENG Q L, PLETTNER E. Analysis of the insect os-d-like gene family[J]. Journal of Chemical Ecology, 2004, 30(5): 889-911.
- [26] LIU Q, YIN M Z, MA S, GU N, QIAN L F, ZHANG Y N. Ligand-binding properties of chemosensory protein 1 in *Callosobruchus chinensis* to mung bean volatiles[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2023, 192: 105394.
- [27] HUA J F, FU Y J, ZHOU Q L, HUANG Y M, LI H F, CHEN T Y, MA D F, LI Z Y. Three chemosensory proteins from the sweet potato weevil, *Cylas formicarius*, are involved in the perception of host plant volatiles[J]. Pest Management Science, 2021, 77(10): 4497-4509.
- [28] LI D Z, YU G Q, YI S C, ZHANG Y N, KONG D X, WANG M Q. Structure-based analysis of the ligand-binding mechanism for DhelOBP21, a C-minus odorant binding protein, from *Dastarcus helophoroides* (Fairmaire; Coleoptera: Bothriidae)[J]. International Journal of Biological Sciences, 2015, 11(11): 1281-1295.
- [29] TIAN Z, LIU J Y, ZHANG Y L. Structural insights into *Cydia pomonella* pheromone binding protein 2 mediated prediction of potentially active semiochemicals[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 22336.
- [30] ZHENG Z C, LI D Z, ZHOU A M, YI S C, LIU H, WANG M Q. Predicted structure of a Minus-C OBP from *Batocera horsfieldi* (Hope) suggests an intermediate structure in evolution of OBPs[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 33981.