北京林业大学学报
JOURNAL OF BEIJING FORESTRY UNIVERSITY

桉蝙蛾气味结合蛋白EsigOBP8与桉树挥发物的结合特性

张森哲 刘佳欣 付恒飞 邱峙嵩 杨振德 胡平

Binding characteristics of odor binding protein EsigOBP8 from *Endoclita signifier* and volatile compounds from *Eucalyptus* spp.

Zhang Senzhe, Liu Jiaxin, Fu Hengfei, Qiu Zhisong, Yang Zhende, Hu Ping

引用本文:
张森哲, 刘佳欣, 付恒飞, 邱峙嵩, 杨振德, 胡平. 桉蝙蛾气味结合蛋白EsigOBP8与桉树挥发物的结合特性[J]. 北京林业大学学报, 2025, 47(8):1–9. doi: 10.12171/j.1000–1522.20240206
Zhang Senzhe, Liu Jiaxin, Fu Hengfei, Qiu Zhisong, Yang Zhende, Hu Ping. Binding characteristics of odor binding protein EsigOBP8 from *Endoclita signifier* and volatile compounds from *Eucalyptus* spp.[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2025, 47(8):1–9. doi: 10.12171/j.1000–1522.20240206

在线阅读 View online: https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20240206

您可能感兴趣的其他文章
Articles you may be interested in

松针鞘瘿蚊气味结合蛋白TjapOBP1的同源模建及活性气味分子的筛选
Homology modeling of the odorant binding protein TjapOBP1 of *Thecodiplosis japonensis* and screening of active odorant molecules
北京林业大学学报, 2021, 43(9): 77–86. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20210188

桉蝙蛾幼虫触角及胸腹体表感器形态及分布特征
Morphology and distribution of sensillum on antennal, thoracic and abdominal tegument of *Endoclita signifier* larva
北京林业大学学报, 2021, 43(9): 111–120. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20210145

饰面刨花板VVOC及气味释放分析
Analysis of very volatile organic compounds (VVOC) and odor emission from decorative particleboard
北京林业大学学报, 2021, 43(8): 117–126. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20210152

三聚氰胺浸渍纸贴面中纤板气味释放分析
Odor emission analysis of melamine faced MDF
北京林业大学学报, 2018, 40(12): 117–123. https://doi.org/10.13332/j.1000–1522.20180272

GST–pull down技术筛选毛白杨天冬氨酸蛋白酶PtoAED3互作蛋白
Identification of aspartic acid protease PtoAED3–interacting proteins through GST pull–down assays in *Populus tomentosa*
北京林业大学学报, 2021, 43(5): 64–74. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20200365

榛子正常发育与败育子房差异蛋白谱对比分析
Comparative studies on differently expressed proteomes of developing and abortive ovary in hazelnut
北京林业大学学报, 2018, 40(3): 13–25. https://doi.org/10.13332/j.1000–1522.20170352

DOI:10.12171/j.1000−1522.20240206

桉蝙蛾气味结合蛋白 EsigOBP8 与桉树挥发物的结合特性

张森哲　刘佳欣　付恒飞　邱峙嵩　杨振德　胡　平
（广西大学林学院，广西 南宁 530004）

摘要:【目的】桉蝙蛾是近年来在广西、广东地区危害桉树最严重的蛀干害虫之一。为了研发高效的防控技术，本研究从桉蝙蛾嗅觉识别机制入手，分析桉扁蛾关键嗅觉基因 *EsigOBP*8 的结构特征和结合特性，为基于嗅觉识别干扰的新型防控策略提供理论依据。**【方法】**基于转录组筛选，采用 RACE 技术获得 *EsigOBP*8 全长序列，采用 SWISS-MODEL 构建其三维结构，利用 Procheck 等评估软件评估其质量。随后，借助 AutoDock Tools 软件对 EsigOBP8 与 64 种桉树主要挥发物进行分子对接分析。**【结果】***EsigOBP*8 基因的 mRNA 全长 805 bp，ORF 区全长 549 bp，编码 182 个氨基酸。其中 5′非编码区 108 bp，具有真核生物帽子结构（m7GPPPN 结构），3′非编码区 148 bp，具有 ployA 尾结构。序列对比显示，EsigOBP8 与冈比亚按蚊 OBP47（NT_078265.2）的相似性为 33%。分子对接结果表明，EsigOBP8 与葙酮的结合能力最强，其次依次为罗汉柏烯、(+)-香橙烯、左旋樟脑（−）和桉叶油醇。5 种桉树挥发物的关键结合点位为 ALA-126、ILE-25 和 PHE-129 残基，关键作用力均为疏水作用。**【结论】**桉叶油醇作为桉树主要挥发物，为主要配体与气味结合蛋白 EsigOBP8 结合，可诱导桉蝙蛾幼虫产生电生理反应，该嗅觉识别在桉蝙蛾 3 龄幼虫的寄主识别中发挥重要作用。此外，左旋樟脑（−）、(+)-香橙烯和罗汉柏烯虽为桉树受害树干中的微量挥发物，但其通常对昆虫具有引诱活性，也可能参与了桉蝙蛾幼虫嗅觉识别过程。综上，EsigOBP8 可能是桉蝙蛾 3 龄幼虫识别寄主（尤其是寄主中桉叶油醇）的关键嗅觉蛋白。

关键词：桉蝙蛾；同源建模；分子对接；气味结合蛋白
中图分类号：S763.42　**文献标志码：**A　**文章编号：**1000−1522(2025)08−0001−09
引文格式：张森哲，刘佳欣，付恒飞，等. 桉蝙蛾气味结合蛋白 EsigOBP8 与桉树挥发物的结合特性［J］. 北京林业大学学报，2025，47(8)：1−9. Zhang Senzhe, Liu Jiaxin, Fu Hengfei, et al. Binding characteristics of odor binding protein EsigOBP8 from *Endoclita signifier* and volatile compounds from *Eucalyptus* spp.［J］. Journal of Beijing Forestry University, 2025, 47(8): 1−9.

Binding characteristics of odor binding protein EsigOBP8 from *Endoclita signifier* and volatile compounds from *Eucalyptus* spp.

Zhang Senzhe　Liu Jiaxin　Fu Hengfei　Qiu Zhisong　Yang Zhende　Hu Ping
(College of Forestry, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi, China)

Abstract:［**Objective**］*Endoclita signifier* is one of the most serious borer pests that has been found in Guangxi and Guangdong regions of southern China in recent years, causing damage to eucalyptus. To develop efficient prevention and control techniques, this paper aims to find key olfactory recognition genes of *E. signifier* and analyze the structural features and binding characteristics the key olfactory gene of *EsigOBP*8 providing theoretical support for developing new prevention and control strategies.［**Method**］*EsigOBP*8 sequence based on transcriptome screening was obtained using RACE. Its three-dimensional structure was constructed using SWISS-MODEL, and its quality was evaluated using evaluation

收稿日期: 2024−06−21　**修回日期:** 2024−09−24
基金项目: 国家自然科学基金项目（3237140510）。
第一作者: 张森哲，博士生。主要研究方向：森林保护。Email：1561548485@qq.com　地址：530004 广西壮族自治区南宁市大学东路 100 号广西大学林学院。
责任作者: 胡平，副教授。主要研究方向：森林保护。Email：hupingcs@163.com　地址：同上。
本刊网址: http://j.bjfu.edu.cn；http://journal.bjfu.edu.cn

software such as Procheck. Molecular docking experiments between EsigOBP8 and 64 main volatiles of eucalyptus were conducted using AutoDock Tools software. [**Result**] The full length of *EsigOBP*8 mRNA was 805 bp, full length of ORF was 549 bp, encoding 182 amino acids, 5′ non-coding region 108 bp, with eukaryotic cap structure (m7GPPPN), 3′ non-coding region 148 bp, with ployA tail structure. The similarity between EsigOBP8 and *Anopheles gambiae* OBP47 (NT_078266.2) was 33%. The results of molecular docking showed that EsigOBP8 had the strongest binding ability with (−)-fenchone, followed by thujopsene, (+)-aromadendrene, (−)-camphor and eucalyptol. The key binding sites for 5 eucalyptus volatiles were identified as ALA-126, ILE-25, and PHE-129 residues, with hydrophobic interactions serving as the predominant binding force. [**Conclusion**] As the predominant volatile compoundin eucalyptus, eucalyptol serves as the primary ligand that binds to the odorant-binding protein EsigOBP8. This interaction can induce electrophysiological responses in *E. signifer* larvae, and such olfactory recognition plays a crucial role in host location by 3rd instar *E. signifer* larvae. Additionally, although (−)-camphor, (+)-aromadendrene and thujopsene are trace volatiles in the affected trunks of eucalyptus trees, they are usually attractant to insects and may also be involved in olfactory recognition process of larvae of *E. signifier*. In conclusion, it is suggested that EsigOBP8 is a key protein involved in host recognition of the 3rd instar larvae, especially in recognition of eucalyptol.

Key words: *Endoclita signifer*; homology modeling; molecular docking; odorant binding proteins

桉蝙蛾(*Endoclita signifer*)隶属于鳞翅目(Lepidoptera),蝙蝠蛾科(Hepialidae),是近年来在广东、广西等地危害桉树(*Eucalyptus* spp.)最为严重的钻蛀性害虫之一。其幼虫蛀食树干,造成木质部受损,阻碍林木生长,严重时可引发风折,给桉树人工林的健康与生产力带来威胁[1]。该虫于 2005 年首次被报道为桉树害虫,2011 年于永辉等[2]在论述中国桉树蛀干害虫现状时,对其生物学特征进行了初步描述。桉蝙蛾在亚洲主要分布于日本、朝鲜和东南亚地区,在我国则主要见于贵州和广西等地[3]。自 2011 年起,本课题组对广西桉蝙蛾的寄主范围、分布规律及危害特性等开展了系统研究[4],为制定有效的防控策略提供了基础数据支持。研究发现,桉扁蛾幼虫的生活史呈现明显的阶段性:1 ~ 2 龄幼虫主要生活在桉树林下的朽木或落叶层(地栖阶段),3 龄幼虫开始向树干转移(树栖阶段)。值得注意的是,即使在混交林环境中,3 龄幼虫仍能准确地选择和危害桉树个体,提示其可能通过嗅觉识别植物挥发物实现精准定位。类似现象见于其他植食性昆虫,如玉米根叶甲(*Diabrotica virgifera*)幼虫通过玉米挥发物中的 6-甲氧基-2-苯并恶唑啉酮定位寄主[5],草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)幼虫识别并利用豇豆(*Vigna unguiculata*)幼苗挥发的 4,8-二甲基-1,3,7-壬三烯作为其寄主定位的化学物质[6]。因此,深入解析桉蝙蛾幼虫的嗅觉识别机制以及植物挥发物与植食性昆虫寄主定位的影响,对开发高效绿色的防治手段具有重要意义。

昆虫在长期进化过程中形成了高度灵敏的化学感受系统[7],以应对复杂的生存环境挑战。其中,嗅觉系统通过识别环境中的挥发性有机物,引导昆虫进行寄主定位、食物选择、求偶、栖息地选择和躲避天敌等行为[8]。这一过程依赖多种嗅觉相关蛋白的协同作用,其中识别外界气味环境的第一道媒介则是气味结合蛋白(odorant binding proteins,OBPs)。它能够携带疏水性的气味分子穿过亲水性淋巴液到达气味受体,引导昆虫对气味产生生物化学反应[9]。OBPs 是一类分子量在 10 ~ 30 kDa 之间的小分子可溶性蛋白质,一般由 6 个 α-螺旋结构域组成[10]。这 6 个 α-螺旋之间形成 3 个连锁的二硫键,这样的排列方式有助于维持蛋白质三维结构的稳定性,并形成非常紧密的疏水性结合腔[9]。研究表明,大多数昆虫 OBPs 可特异性识别寄主植物挥发物及信息素[11]:如白蜡窄吉丁(*Agrilus planipennis*)体内的 AplaOBP1 与 5 种寄主植物挥发物表现出高亲和力[12],多异瓢虫(*Hippodamia variegata*)气味结合蛋白 HvarOBP2 通过结合多种植物挥发物参与寄主识别[13],蜜蜂(*Apis mellifera*)则利用 OBPs 识别挥发性信息素与同类进行交流[14]。除嗅觉功能外,OBPs 还参与昆虫的其他行为及生命活动。黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)触角中高度表达的气味结合蛋白 OBP28a 在基因敲除后发现并未影响黑腹果蝇的嗅觉反应,后证实该蛋白在触角主要起缓冲作用[15];在草地贪夜蛾非感觉器官中高度表达的 *SfruOBP*27,敲除后明显对雄性成虫的幼虫发育和交配过程产生影响[16]。因此为了更深入研究桉蝙蛾 3 龄幼虫嗅觉识别机制,了解其嗅觉相关蛋白的结构、功能及其与

气味分子的结合特性和互作模式至关重要[17]。

验证 OBPs 与配体结合能力最常用的方法是荧光竞争结合试验，但此方法要求重组蛋白保持稳定的活性，且需要高纯度配体化合物，成本较高。相比于传统方法，同源建模（homology modeling）和分子对接（molecular docking）技术能够高效、便捷地分析蛋白质结构和分子间相互作用，已成为研究蛋白结构和功能的新手段。相似的基因序列通常意味着相似的蛋白结构，通常序列相似性高于 30% 被视为是同源序列[18]。同源建模是通过已知结构的同源蛋白构建目标蛋白质的三维立体结构，并与挥发物小分子进行分子对接，可快速识别与 OBPs 结合的化学物质，并筛选出结合能力较强的特定识别对象[19]。因此，可以利用同源建模的技术基础，配制特异的桉蝙蛾性引诱剂。目前，基于昆虫与植物挥发物的嗅觉识别机制，开发干扰其嗅觉识别的防控新方法已成为研究热点。

本研究以桉蝙蛾 *EsigOBP*8 全长基因序列为基础，利用同源建模构建 EsigOBP8 蛋白三维蛋白结构，通过 Procheck 等程序对三维结构进行评估并利用分子对接将 EsigOBP8 模板与 64 种桉树气味挥发物进行对接模拟，分析 EsigOBP8 蛋白结构以及与挥发物的结合能力、结合位点、结合腔等，以期找到关键的嗅觉识别位点和配体，为开发基于嗅觉干扰的防控新方法提供理论支撑。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫与气味化合物

分别选取活体 3 龄、5 龄、9 龄和 12 龄的桉蝙蛾幼虫各 3 头。解剖步骤如下：将头部直接剪下，用解剖剪沿腹部中线剪开幼虫胸腹部表皮，用镊子去除肠道及脂肪，再用剪刀将胸部和腹部分开，后用 RNase-free H_2O 清洗。最终得到桉蝙蛾幼虫头部、胸部和腹部 3 个体段的样品，每个龄期和体段的样品均设置 3 个生物学重复。

基于课题组前期研究[20]，以 3 龄幼虫上树危害时期采集的健康和受害桉树树干及浅层土壤中鉴定的所有 64 种挥发物为候选气味化合物。

1.2　RACE 克隆

*EsigOBP*8 基因来源于课题组构建的桉蝙蛾转录组数据库[21]。表达谱分析显示，该基因在 3 龄幼虫头部的表达量显著高于其他龄期和体段（$p < 0.05$），推测其可能在 3 龄幼虫寄主选择行为中起关键作用[21]。初步序列分析表明，该基因的开放阅读框（ORF）不完整。因此，利用 RACE 技术扩增出了 *EsigOBP*8 5′端和 3′端缺失的序列，拼接后获得具有帽子结构和 polyA 尾结构的全长序列[22]。

1.2.1　RACE-ready cDNA 的合成

以桉蝙蛾幼虫 3 龄幼虫头部和胸部的总 RNA 为模板，使用 SMARTer® RACE 5′/3′ Kit 试剂盒合成 Ready cDNA，用于 3′端和 5′端的克隆。配置用于 cDNA 合成的 Buffer Mix，体系为 5X First-Strand Buffer 4.0 μL，DTT（100 mmol/L）0.5 μL，dNTPs（20 mmol/L）1.0 μL 备用。3′端反应体系为 RNA 1.0 ~ 11.0 μL，3′-CDS Prime A 1.0 μL，Sterile H_2O 0 ~ 10 μL，PCR 反应条件为 72 ℃ 3 min，42 ℃ 2 min，后加入 Buffer Mix 5.5 μL，核糖核酸酶抑制剂（40 U/μL）0.5 μL，SMARTScribe Transcriptase（100 U）2.0 μL；5′端反应体系为 RNA 1.0 ~ 10.0 μL，5′-CDS Prime A 1.0 μL，Sterile H_2O 0 ~ 9 μL，PCR 反应条件为 72 ℃ 3 min，42 ℃ 2 min，后再加入 SMARTerII A OIigonucleotide 1.0 μL，Buffer Mix 5.5 μL，核糖核酸酶抑制剂（40 U/μL）0.5 μL，SMARTScribe Transcriptase（100 U）2.0 μL。两体系进行 42 ℃ 孵育 90 min 后升温至 70 ℃ 再加热 10 min。最后加入 90 μL 的缓冲溶液稀释 3′-RACE-ready cDNA 和 5′-RACE-ready cDNA，保存于−20 ℃。

1.2.2　RACE 引物设计

根据 *EsigOBP*8 的转录组测序得到的中间序列采用 Primer Primer5.0 设计 3′和 5′特异性引物。具体为 OBP8-5′GSP（5′-CCATCGGCTCAACTCCACATTCGTCC-3′），OBP8-3′GSP（5′-GCTCATGCTGGACGACGAGAAGCTA-3′），RACE-long primer（5′-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3′），RACE-short primer（5′-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3′）。

1.2.3　PCR 扩增 5′与 3′末端

采用巢式 PCR 方法进行 5′和 3′末端克隆。反应体系为 5′-RACE-Ready cDNA/3′-RACE-Ready cDNA 1 μL，特异性引物 5′GSP/3′GSP 2 μL，RACE-long primer 0.5 μL，RACE-short primer 1.5 μL，1.1 × T3 Super PCR Mix 45 μL。反应条件为 94 ℃ 5 min，5 个循环的 94 ℃ 30 s、68 ℃ 30 s、72 ℃ 90 s，30 个循环的 94 ℃ 30 s、68 ℃ 30 s、72 ℃ 60 s，72 ℃ 7 min。4 ℃ 保存，产物切胶回收，纯化 PCR 产物，再使用 pEAST®-T1 Cloning Kit 克隆试剂盒进行基因克隆。阳性克隆检测成功的菌液送至擎科生物科技有限公司双向测序，后用 BioXM 软件进行测序序列与中间片段序列的拼接获得 *EsigOBP*8 序列全长。

1.3　同源建模

通过 SignalP-4.1 在线程序（https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-4.1/）预测桉蝙蛾

EsigOBP8 氨基酸序列的信号肽(signal peptide)，删除信号肽后的序列用于后续分析。将处理好的序列上传至 ExPASy 服务器中的 SWISS-MODEL 在线软件(https://swissmodel.expasy.org/interactive)搜索蛋白数据库 PDB 中与之相匹配的模板蛋白，筛选出氨基酸序列相似性大于 30% 且已有晶体结构的作为同源建模的模板，基于此模板进行 EsigOBP8 蛋白三维结构的构建[23]。

1.4 模型评估

UCLA 网站(http://services.mbi.ucla.edu/)中的 Procheck 程序是通过拉式构象图(Ramachandran)显示评估结果[24]，根据氨基酸分布情况来评价蛋白模型的立体化学特性[25]；ERRAT 程序是通过统计三维结构中不同原子间的非键作用与高分辨率晶体结构间的差异情况来评判模板整体性能的高低[26]；ModFOLD8 在线软件(https://www.reading.ac.uk/bioinf/ModFOLD/)通过对比氨基酸残基与天然结构中等效氨基酸残基的距离来预测模型与原生蛋白质结构的相似程度[27]；PROSA 程序(https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php)通过蛋白质天然结构范围与模型结构比较[28−29]。

1.5 分子对接

根据作为备选对接配体共 64 个化合物的 CAS 号，从 NCBI 上的 Pubchem 数据库(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)获取配体分子的 3D 模型(SDF 文件格式)。通过 Open Babel GUI 软件将文件格式转化成 PDB 文件格式用于分子对接。利用 AutoDock Tools 对接软件将桉蝙蛾 EsigOBP8 建模模型与桉树挥发物配体小分子进行分子对接，通过 Discovery studio 软件和 CASTp 3.0(http://sts.bioe.uic.edu/castp/)分析其相互作用力和结合腔。对分子对接结果进行分析，蛋白模型与配体对接的结合能均为负值，且数值越小，代表蛋白的结合能力越强。

2 结果与分析

2.1 *EsigOBP8* 的序列特征

EsigOBP8(NCBI 登录号为:PX101962)的 mRNA 全长为 805 bp，ORF 全长 549 bp，编码 182 个氨基酸。其中 5′非编码区长度为 108 bp，具有真核生物帽子结构；3′非编码区长度为 148 bp，末端含 ployA 尾结构。系统发育树(图 1)表明，桉蝙蛾的 OBPs 并没有聚集到同一支，提示其功能分化可能较为复杂。值得注意的是，*EsigOBP8* 与 *EbolOBP10*、*LbotOBP35*、*MsexGOBP67* 和 *GpylOBP7a* 聚集到了一起。

2.2 EsigOBP8 模型构建与评价

通过 AlphaFold3 预测 EsigOBP8 的蛋白质结构，其中 ipTM 评分为 0.80，表明建模结构较好。EsigOBP8 蛋白分子量为 20.61 kDa，EsigOBP8 中的 6 个 α 螺旋和连接它们的回折构成了其三维结构(图 2a)。EsigOBP8 的 6 个 α 螺旋分别是 Lys17-Asp32(α_1)、Asp43-Lys51(α_2)、Leu63-Ile70(α_3)、Trp80-Cys105(α_4)、Ile110-Ser120(α_5)、Ile131-Met140(α_6)，其中 5 个 α 螺旋(α_1、α_2、α_3、α_5、α_6)反向平行形成了疏水结合腔(图 2b)。

2.3 分子对接的结合能

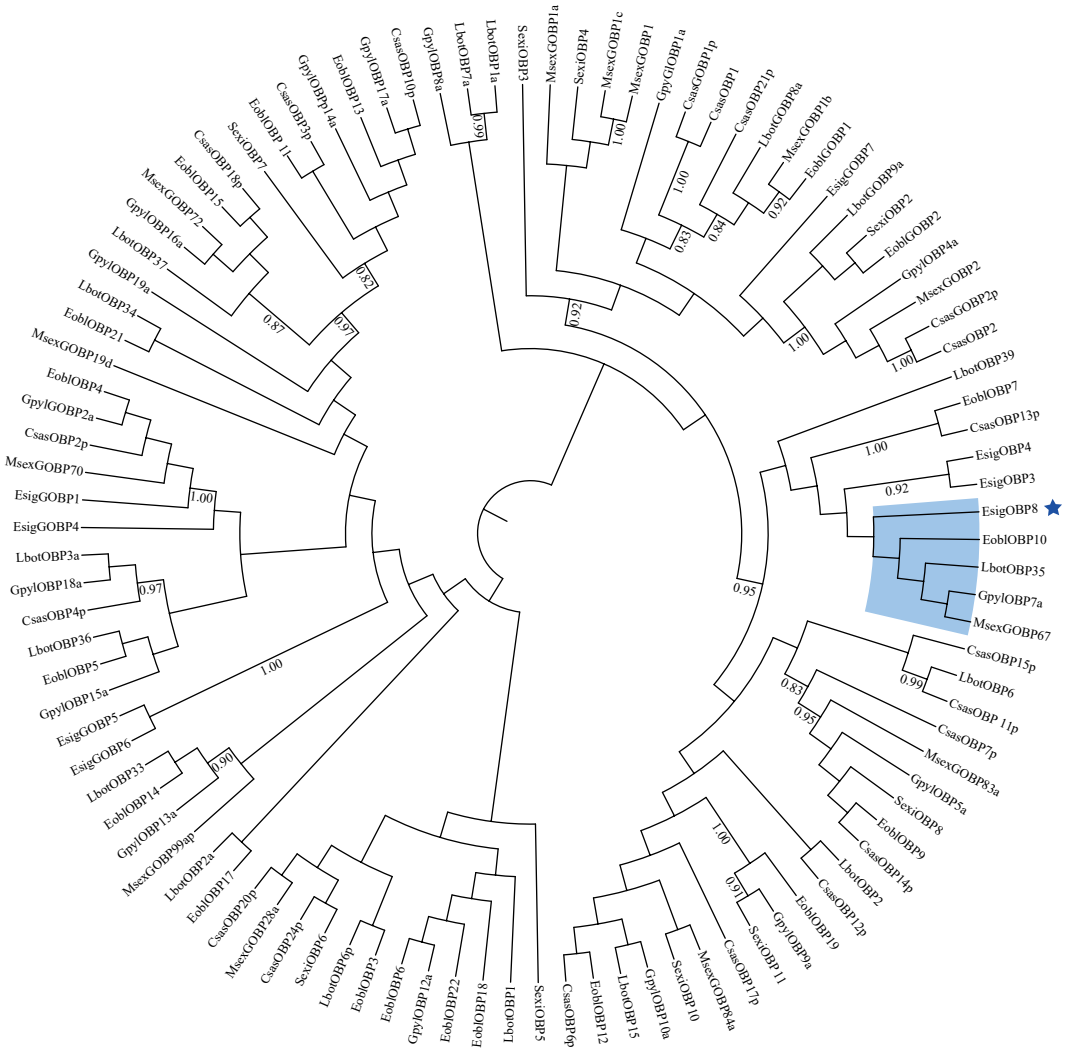
基于 AutoDockt Tools 软件模拟分子对接得到桉蝙蛾 EsigOBP8 蛋白模型与挥发物的结合能[30]，数值越小代表结合能力越强，结合能最小的配体分子理论上为该蛋白质的最佳配体。共与 64 个挥发物分子配体进行对接，其中筛选出前 5 种结合能最低的化合物(表 1)。葑酮与 EsigOBP8的结合能最低，为 −6.91，是最有可能与蛋白模型结合的气味分子；其次依次是罗汉柏烯(−6.84)；(+)−香橙烯(−6.65)；左旋樟脑(−)(−6.63)；桉叶油醇(−6.51)。

前 5 种桉树挥发物与桉蝙蛾 EsigOBP8 进行结合位点表明所有挥发物分子与蛋白结合位点均位于疏水结合腔内，形成典型的口袋结合模式(图 3)。结合能最低的 5 种化合物与 EsigOBP8 的结合模式与位点比较接近，结合位点都位于 EsigOBP8 的 α-螺旋形成的结合空腔内，主要通过疏水作用与蛋白质结合。在 5 个对接模型中，葑酮、左旋樟脑(−)、桉叶油醇与 EsigOBP8 结合的关键作用力均为疏水作用，其中 ALA-126、ILE-25 和 PHE-129 为 EsigOBP8 与葑酮、左旋樟脑(−)、罗汉柏烯、(+)-香橙烯和桉叶油醇的关键结合位点。

3 讨论与结论

随着蛋白质结构研究的快速发展，通过蛋白质构象研究蛋白质的功能已经成为热点[31]。基于此，本研究通过 PDB 数据库中冈比亚按蚊 OBP47 作为模板，利用 SWISS-MODEL 构建桉蝙蛾 EsigOBP8 的三维结构。结果表明 EsigOBP8 由 6 个 α-螺旋构成其三维结构，符合通常昆虫 OBP 的结构特征。通过 Procheck、ModFOLD8、ERRAT 和 PROSA 对 EsigOBP8 的三维结构进行评估，结果表明该蛋白模型达到高质量建模标准，有很高的可靠性[24]。

利用 AutoDock Tools 软件将选取的 64 种桉树树干主要气味挥发物与 EsigOBP8 进行分子对接实验，结果显示挥发物分子与 EsigOBP8 的结合位点均位于疏水结合腔内，二者之间通过氢键、范德华力和疏水作用相结合。范德华力是构成复合物三维结构的主要作用力；疏水作用对蛋白分子的折叠和整体



蓝色五角星表示桉蝙蛾 EsigOBPs；蓝色框表示 EsigOBP8 所在分支；Csas.桃小食心虫 *Carposina sasakii*；Eobl.茶尺蠖 *Ectropis obliqua*；Gpyl.桑螟 *Glyphodes pyloalis*；Lbot.葡萄花翅小卷蛾 *Lobesia botrana*；Msex.烟草天蛾 *Manduca sexta*；Sexi.甜菜夜蛾 *S. exigua*

图 1　EsigOBP8 系统发育树

Fig. 1　EsigOBP8 phylogenetic tree

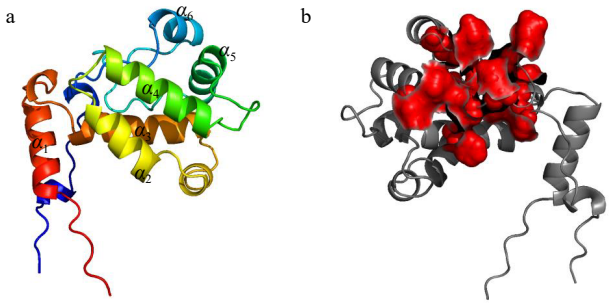


图 a 中 α_1 ~ α_6 表示 6 个 α 螺旋的位置。图 b 中红色部分表示结合腔位置。

图 2　桉蝙蛾 EsigOBP8 三维模型与结合腔

Fig. 2　3D model and binding cavity of EsigOBP8 of *E. signifier*

稳定性起着重要作用；氢键作用力强于范德华力和疏水作用，通过氢键相连接的结构更稳定，这些分子间作用力对复合物的稳定十分重要[32]。其中 21 种挥发物与 EsigOBP8 以氢键结合，其他 43 种物质以疏水作用和范德华力同 EsigOBP8 结合。与冈比亚按蚊的 AgamOBP1 与配体 PEG 以及致卷库蚊（*Culex quinquefasciatus*）的 *CquiOBP*1 和配体 MOP 的结合方式类似，符合 OBPs 作为转运蛋白的特性，以非共价相互作用力与配体分子结合，通过蛋白质构象的改变，结合和释放配体分子[33]。

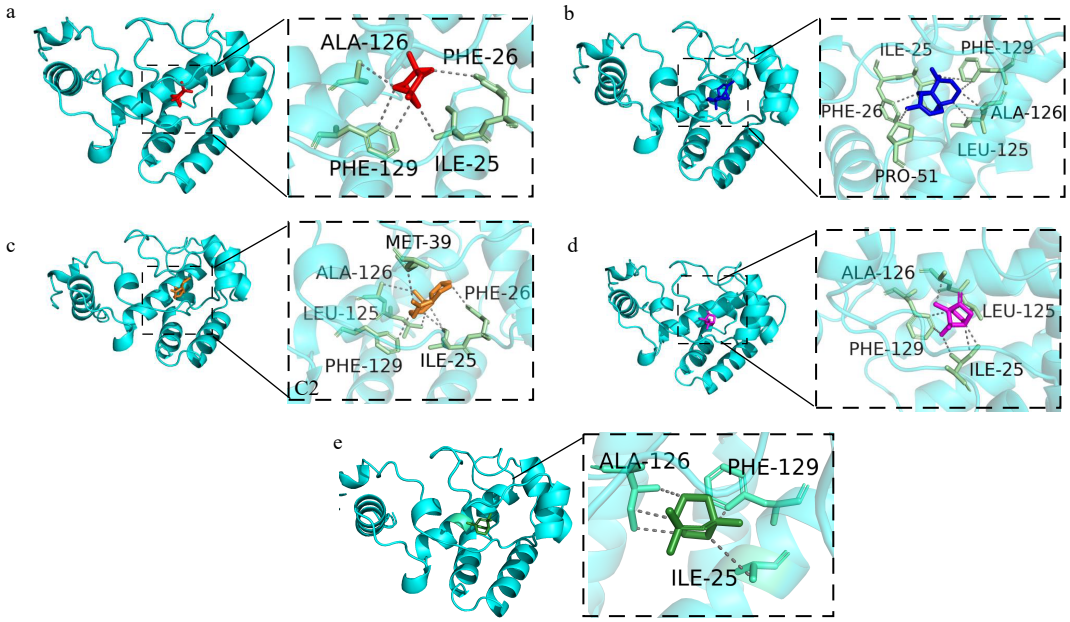
结合能结果显示，EsigOBP8 与葑酮的结合能力最强，其次为罗汉柏烯、(+)-香橙烯、左旋樟脑(−)、桉叶油醇。对这 5 种挥发物分子与 EsigOBP8 结合位点 3D 图进行分析，ALA-126、ILE-25 和 PHE-129 均参与了蛋白与罗汉柏烯、(+)-香橙烯、葑酮、左旋樟脑(−)的结合，并与葑酮、左旋樟脑(−)形成了作用力较强的疏水作用，说明这 3 个氨基酸残基为 EsigOBP8 与配体分子结合的位点，且配体分子在此位置结合时，结合能较低，结合能力较强。桉叶油醇作为 EsigOBP8 结合能力最强的几个配体之一，是桉树挥发物中一种主要成分。根据课题组前期的研究[20]显示，桉叶油醇在桉树树干及 1 年生桉树树叶上的

表 1 分子对接的结合能

Tab. 1 Binding energy of molecular docking

序号	化合物名称	分子式	CAS号	结合能
1	葑酮(−)	$C_{10}H_{16}O$	7787-20-4	−6.91
2	罗汉柏烯	$C_{15}H_{24}$	470-40-6	−6.84
3	(+)−香橙烯	$C_{15}H_{24}$	489-39-4	−6.65
4	左旋樟脑(−)	$C_{10}H_{16}O$	464-48-2	−6.63
5	桉叶油醇	$C_{10}H_{18}O$	470-82-6	−6.51
6	对乙基苯乙酮	$C_{10}H_{12}O$	937-30-4	−6.46
7	香芹酚	$C_{10}H_{14}O$	499-75-2	−6.44
8	樟脑	$C_{10}H_{16}O$	464-49-3	−6.43
9	4-羟基-3-甲基苯乙酮	$C_9H_{10}O_2$	876-02-8	−6.41
10	苯乙酮	C_8H_8O	98-86-2	−6.22
11	α-萜品烯	$C_{10}H_{16}$	99-86-5	−6.21
12	(R)-氧化柠檬烯	$C_{10}H_{16}O$	1195-92-2	−6.20
13	芳樟醇	$C_{10}H_{18}O$	78-70-6	−6.09

注：表中仅保留结合能小于−6.0的挥发物。



a. EsigOBP8 与葑酮对接；b. OEsigOBP8 与罗汉柏烯对接；c. EsigOBP8 与(+)−香橙烯对接；d. EsigOBP8 与左旋樟脑对接；e.EsigOBP8 与桉叶油醇对接。黑色虚线方框内部分表示分子对接相互作用细节，关键残基名已标出，灰色虚线表示疏水作用。

图 3 EsigOBP8 与配体的结合情况

Fig. 3 Binding status of EsigOBP8 with its ligands

含量较高，表明桉叶油醇是桉树一种主要挥发物成分。同时 GC-EAD 测定结果显示，桉蝙蛾幼虫对桉叶油醇存在电生理反应，表明桉蝙蛾幼虫能够识别桉叶油醇[34]。而桉叶油醇对其他昆虫同样具有引诱活性，对核桃缘吉丁(*Meliboeus ohbayashii*)、黄地老虎(*Agrotis segetum*)、光材小蠹(*Xyleborus glabratus*)具有显著吸引作用[35−37]，对马铃薯块茎蛾(*Phthorimaea operculella*)的产卵行为也具有引诱作用[38]；中华蜜蜂(*A. cerana*)的 AcerOBP7 与桉叶油醇通过荧光竞争结合试验表明，二者具有较强的结合活性，且通过 RNAi 干扰 AcerOBP7 表达后，其触角与桉叶油醇的 GC-EAD 活性明显下降[39]；桉叶油醇对棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)具有较高的 GC-EAD 反应，且相对于空气棉铃虫更喜欢挥发物混合液[40]。结合本次试验结果，可初步推断出桉叶油醇作为桉树挥发物的一种主要成分对桉蝙蛾幼虫具有引诱活性，是与气味结合蛋白 EsigOBP8 结合的一个关键配体分子。综上分析推断桉叶油醇在桉蝙蛾幼虫嗅觉识

别过程中发挥重要作用。

罗汉柏烯、(+)−香橙烯和左旋樟脑也是与 EsigOBP8 结合能力最强的几个配体分子，但这些化合物只在受害树干上测得微小含量。武晓颖等[41]研究发现，罗汉柏烯和雪松醇按一定比例混合可引起双条杉天牛(*Semanotus bifasciatus*)的明显触角电位反应。杨雪云等[42]的研究表明，罗汉柏烯可能是侧柏(*Platycladus orientalis*)衰弱树中引诱柏肤小蠹(*Phloeosinus aubei*)雌雄成虫的重要活性成分。涂蓉[43]研究发现，香橙烯会引起切割潜蝇茧蜂(*Psytallia incise*)的触角电位反应，同时对长尾潜蝇茧蜂(*Diachasmimorpha longicaudata*)具有引诱作用。王广利等[44]研究表明二化螟(*Chilo suppressalis*)雌蛾对樟脑有强烈的触角电位反应，同样陈聪[45]研究发现其对香樟齿喙象(*Pagiophloeus tsushimanus*)有引诱活性。葑酮与 EsigOBP8 同样具有较强的结合能力，研究发现衰弱松树释放的葑酮对松褐天牛和其天敌花绒寄甲都具有引诱活性，使之产生三级营养关系互作[46]。但在测定桉树挥发物成分时只在林下腐殖质中检测到少量葑酮成分，所以葑酮对桉蝙蛾幼虫嗅觉识别的具体功能还需深入研究。因此推测这 3 种微量挥发物也可能参与了桉蝙蛾幼虫嗅觉识别的过程。

综上，EsigOBP8 与桉叶油醇以及微量挥发物罗汉柏烯、(+)−香橙烯和左旋樟脑有较强的结合能力，结合触角电位反应测定结果，初步推断 EsigOBP8 可能参与了桉蝙蛾幼虫识别过程。桉蝙蛾 3 龄幼虫是其由土壤转移到树干中的关键时期，且 EsigOBP8 在 3 龄幼虫头部的表达量显著高于其他龄期和体段，推测 EsigOBP8 是桉蝙蛾 3 龄幼虫寄主识别的关键基因。但此次试验只是通过分子模拟手段对 EsigOBP8 进行结合特性分析，缺少荧光竞争结合试验对此分析结果的验证，以及缺少基因沉默或基因敲除等基因编辑技术来明确该蛋白功能特点。后期将继续通过氨基酸定点突变技术和荧光竞争结合试验，进一步确定 EsigOBP8 与关键气味挥发物之间的结合能力和关键位点，为开发桉蝙蛾高效引诱剂提供理论基础。

参　考　文　献

[1] 杨秀好, 罗基同, 吴耀军, 等. 林木重大钻蛀性害虫桉蝙蛾分布与危害 [J]. 中国森林病虫, 2021, 40(4): 34−40.
Yang X H, Luo J T, Wu Y J, et al. Distribution and damage of major wood pest, *Endoclyta signifer* Walker[J]. Forest Pest and Disease, 2021, 40(4): 34−40.

[2] 庞正轰. 中国桉树有害生物的发生现状和发生趋势预测 [J]. 广西科学院学报, 2013, 29(3): 192−206.
Pang Z H. Current situation and development in trend of eucalyptus pest in China[J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences, 2013, 29(3): 192−206.

[3] 王缉健, 杨秀好, 罗基同, 等. 桉蝙蛾生物学研究 [J]. 中国森林病虫, 2015, 34(1): 9−13.
Wang J J, Yang X H, Luo J T, et al. Bionomics of *Endoclyta signifier*[J]. Forest Pest and Disease, 2015, 34(1): 9−13.

[4] 于永辉, 杨振德, 庞正轰, 等. 中国桉树蛀干害虫研究现状 [J]. 中国森林病虫, 2011, 30(3): 25−28.
Yu Y H, Yang Z D, Pang Z H, et al. Research status of eucalyptus stem borers in China[J]. Forest Pest and Disease, 2011, 30(3): 25−28.

[5] Bjostad L B, Hibbard B E. 6-Methoxy-2-benzoxazolinone: a semiochemical for host location by western corn rootworm larvae[J]. Journal of Chemical Ecology, 1992, 18(7): 931−944.

[6] Carroll M J, Schmelz E A, Teal P E A. The attraction of *Spodoptera frugiperda* neonates to cowpea seedlings is mediated by volatiles induced by conspecific herbivory and the elicitor inception[J]. Journal of Chemical Ecology, 2008, 34(3): 291−300.

[7] Hansson B S, Stensmyr M C. Evolution of insect olfaction[J]. Neuron, 2011, 72(5): 698−711.

[8] 常延斌, 王桂瑶, 奚家勤, 等. 烟草甲气味结合蛋白与驱避配体的分子对接 [J]. 南京农业大学学报, 2023, 46(4): 688−697.
Chang Y B, Wang G Y, Xi J Q, et al. Molecular docking of odorant-binding proteins of *Lasioderma serricorne* with repellent ligands[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2023, 46(4): 688−697.

[9] 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.

[10] 杜亚丽, 徐凯, 赵慧婷, 等. 昆虫气味结合蛋白的研究进展 [J]. 昆虫学报, 2020, 63(3): 365−380.
Du Y L, Xu K, Zhao H T, et al. Research progress in odorant binding proteins of insects[J]. Acta Entomologica Sinica, 2020, 63(3): 365−380.

[11] 王冰, 李慧敏, 操海群, 等. 挥发性化合物介导的植物-植食性昆虫-天敌三级营养级互作机制及应用 [J]. 中国农业科学, 2021, 54(8): 1653−1672.
Wang B, Li H M, Cao H Q, et al. Mechanisms and applications of plant-herbivore-natural enemytritrophic interactions mediated by volatile organic compounds[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2021, 54(8): 1653−1672.

[12] Wang L, Bi Y D, Liu M, et al. Identification and expression profiles analysis of odorant-binding proteins in soybean aphid, *Aphis glycines* (Hemiptera: Aphididae)[J]. Insect Science, 2019, 27(5): 1019−1030.

[13] 唐浩宇, 刘靖涛, 谢佼昕, 等. 多异瓢虫气味结合蛋白 HvarOBP2 的基因克隆及配体结合特性分析 [J]. 昆虫学报, 2022, 65(8): 977−985.
Tang H Y, Liu J T, Xie J X, et al. Gene cloning and ligand binding characterization of the odorant-binding protein HvarOBP2 in *Hippodamia variegata* (Coleoptera:

Coccinellidae)[J]. Acta Entomologica Sinica, 2022, 65(8): 977−985.

[14] Wu F, Feng Y L, Han B, et al. Mechanistic insight into binding interaction between chemosensory protein 4 and volatile larval pheromones in honeybees (*Apis mellifera*)[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 141(C): 553−563.

[15] Larter N K, Sun S J, Carlson J R. Organization and function of drosophila odorant binding proteins[J]. eLife, 2016, 5: e20242.

[16] Han W K, Tang F X, Yu N, et al. A nonsensory odorant-binding protein plays an important role in the larval development and adult mating of *Spodoptera frugiperda*[J]. Insect Science, 2023, 30(5): 1325−1336.

[17] Pelosi P, Mastrogiacomo R, Iovinella I, et al. Structure and biotechnological applications of odorant-binding proteins[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98: 61−70.

[18] Zheng W M. Proteins: from sequence to structure[J]. Chinese Physics B, 2014, 23(7): 078705.

[19] John B, Sali A. Comparative protein structure modeling by iterative alignment, model building and model assessment[J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31(14): 3982−3992.

[20] 许原, 张玉静, 熊运凡, 等. 桉蝙蛾幼虫对桉树树干及其林下浅层土壤挥发物的嗅觉行为反应 [J]. 南方农业学报, 2022, 53(7): 1953−1962.
Xu Y, Zhang Y J, Xiong Y F, et al. Olfactory responses of *Endoclita signifer* Walker larvae to volatiles of eucalyptus trunks and shallow soil under eucalyptus forest[J]. Journal of Southern Agriculture, 2022, 53(7): 1953−1962.

[21] 邱峙嵩, 陈晓, 马洪轩, 等. 桉蝙蛾 3 龄幼虫嗅觉结合蛋白的高表达量与其寄主选择时期的一致性 [J]. 环境昆虫学报, 2023, 45(3): 711−718.
Qiu Z S, Chen X, Ma H X, et al. High expression of binding proteins in 3rd larvae of *Endoclita signifier* consistent with its host selection behavior[J]. Journal of Environmental Entomology, 2023, 45(3): 711−718.

[22] 郭莉. 花椒窄吉丁气味结合蛋白的结合特性分析 [D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2021.
Guo L. Binding characters analysis of odorant binding proteins from *Agrilus zanthoxylumi*[D]. Xianyang: Northwest A&F University, 2021.

[23] Zheng Z C, Li D Z, Zhou A, et al. Predicted structure of a Minus-C OBP from *Batocera horsfieldi* (Hope) suggests an intermediate structure in evolution of OBPs[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 33981.

[24] Laskowski R A, Rullmann J A C, MacAethur M W, et al. AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR[J]. Journal of Biomolecular NMR, 1996, 8: 477−486.

[25] Laskowski R A, Macarthur M W, Moss D S, et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures[J]. Journal of Applied Crystallography, 1993, 26(2): 283−291.

[26] 汪宇, 孙浩, 朱家颖, 等. 云南切梢小蠹气味结合蛋白的同源模建 [J]. 应用昆虫学报, 2015, 52(5): 1223−1228.
Wang Y, Sun H, Zhu J Y, et al. Homology modeling of the odorant binding protein of the pine shoot beetle, *Tomicus yunnanensis*[J]. Chinese Journal of Applied Entomology, 2015, 52(5): 1223−1228.

[27] McGuffin L J, Aldowsari F M F, Alharbi S M A, et al. ModFOLD8: accurate global and local quality estimates for 3D protein models[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(W1): W425−W430.

[28] Wiederstein M, Sippl M J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins[J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35 (Web Server issue): W407−W410.

[29] Sippl M J. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins[J]. Proteins, 1993, 17(4): 355−362.

[30] Lengauer T, Rarey M. Computational methods for biomolecular docking[J]. Current Opinion in Structural Biology, 1996, 6(3): 402−406.

[31] Leal W S, Chen A M, Ishida Y, et al. Kinetics and molecular properties of pheromone binding and release[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(15): 5386−5391.

[32] 马宏玉. 飞蝗嗅觉受体 OR35 异源表达与化学感受蛋白 CSP91 结构与功能的初步探索 [D]. 保定: 河北大学, 2022.
Ma H Y. Preliminary exploration of heterologous expression of olfactory receptor OR35 and the structure-function relationship of CSP91 from migratory locusts[D]. Baoding: Hebei University, 2022.

[33] 王帆. 长足大竹象性信息素结合蛋白 CbuqPBP1 与 CbuqPBP2 互作机制研究 [D]. 成都: 四川农业大学, 2022.
Wang F. Mechanism analysis of interaction between pheromone binding protein CbuqPBP1 and CbuqPBP2 in *Cyrtotrachelus buqueti*[D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2022.

[34] Xu Y, Qiu Z S, Zhang Y J, et al. Volatiles from eucalyptus trunks and forest floor humus influence the habitat transfer, host selection, and aggregation of *Endoclita signifer* larvae[J]. Forests, 2022, 13(12): 2058.

[35] 崔亚琴, 宗世祥. 核桃缘吉丁成虫的取食选择行为及机制 [J]. 北京林业大学学报, 2021, 43(9): 121−130.
Cui Y Q, Zong S X. Feeding choice behavior and mechanism of adults *Meliboeus ohbayashii primoriensis*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2021, 43(9): 121−130.

[36] Kuhns E H, Martini X, Tribuiani Y, et al. Eucalyptol is an attractant of the redbay ambrosia beetle, *Xyleborus glabratus*[J]. Journal of Chemical Ecology, 2014, 40(4): 355−362.

[37] 李琳, 修春丽, 路伟, 等. 黄地老虎成虫对 15 种植物挥发物的电生理和行为反应 [J]. 新疆农业科学, 2020, 57(11): 2020−2027.
Li L, Xiu C L, Lu W, et al. Electrophysiological and behavioral responses of adults of *Agrotis segetum* (Denis et Schiffermüller) to 15 plant volatiles[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2020, 57(11): 2020−2027.

[38] 刘燕, 谢冬生, 熊焰, 等. 庚醛与桉叶油醇组合对马铃薯块茎蛾

产卵选择的影响 [J]. 植物保护, 2016, 42(3): 99−103.
Liu Y, Xie D S, Xiong Y, et al. Effects of combination of cineole with heptanal on oviposition choices of the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella*[J]. Plant Protection, 2016, 42(3): 99−103.

[39] 赵慧婷, 彭竹, 姜玉锁, 等. 中华蜜蜂气味结合蛋白 AcerOBP7 的表达及结合特性 [J]. 中国农业科学, 2022, 55(3): 613−624.
Zhao H T, Peng Z, Jiang Y S, et al. Expression and binding properties of odorant binding protein AcerOBP7 in *Apis cerana cerana*[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2022, 55(3): 613−624.

[40] Liu H N, Xiu C L, Zhang T, et al. Odor perception in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*, exposed to *Juglans regia*, a marginal host plant[J]. Journal of Chemical Ecology, 2022, 48(7−8): 618−627.

[41] 武晓颖, 王骏, 刘寰, 等. 侧柏树干的超临界 CO_2 萃取物组分分析及双条杉天牛的 EAG 反应 [J]. 昆虫知识, 2007(5): 671−675.
Wu X Y, Wang J, Liu H, et al. Chemical analysis and electroantennogram responses in *Semanotus bifasciatus* adults to *Platycladus orientalis* volatiles extracted by SFE[J]. Chinese Bulletin of Entomology, 2007(5): 671−675.

[42] 杨雪云, 赵博光, 周振义, 等. 侧柏衰弱树中引诱柏肤小蠹的活性成分测定 [J]. 东北林业大学学报, 2006, 34(5): 10−12.
Yang X Y, Zhao B G, Zhou Z Y, et al. Determination of active components from stressed *Platycladus orientalis* as potential aggregation pheromones *Phloeosinus aubei* Perris[J]. Journal of Northeast Forestry University, 2006, 34(5): 10−12.

[43] 涂蓉. 桔小实蝇及其幼虫寄生蜂的嗅觉行为研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2012.
Tu R. Study on behavior responses of *Bactrocera dorsalis* (Hendel) and its larval parasitoids to their host volatiles[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2012.

[44] 王广利, 付小刚, 韩晓霞, 等. 二化螟雌蛾对香根草挥发物的 EAG 和行为反应 [J]. 应用昆虫学报, 2016, 53(1): 148−156.
Wang G L, Fu X G, Han X X, et al. EAG and behavioral responses of *Chilo suppressalis* females to plant volatiles from *Vetiveria zizanioides*[J]. Chinese Journal of Applied Entomology, 2016, 53(1): 148−156.

[45] 陈聪. 香樟齿喙象信息化学物质的活性组分鉴定及其关键气味结合蛋白的功能分析 [D]. 南京: 南京林业大学, 2021.
Chen C. Identification of active components of semiochemicals and functional analysis of key odorant-binding proteins in *Pagiophloeus tsushimanus*[D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2021.

[46] 杨瑞楠. 松褐天牛与其天敌花绒寄甲进化保守 OBPs 的嗅觉功能及转录调控分析 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2023.
Yang R N. Olfactory function and transcriptional regulation of evolutionally-conserved OBPs in *Monochamus alternatus* and its natural enemy *Dastarcus helophoroides*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2023.

（责任编辑　范　娟
责任编委　骆有庆）