

• 农业生物技术 •

棉铃虫 *c-Myc* 基因的原核表达纯化、抗体制备、时空表达谱测定与功能分析

索倩^{1,2,3#}, 孙晓燕^{1,2,3#}, 张莹^{1,2,3}, 王育婧^{1,2,3}, 刘凯于^{1,2,3}, 杨红^{1,2,3}, 洪华珠^{1,2,3}, 彭建新^{1,2,3}, 彭蓉^{1,2,3*}

1 华中师范大学生命科学学院, 湖北 武汉 430079

2 华中师范大学昆虫学研究所, 湖北 武汉 430079

3 华中师范大学 遗传调控与整合生物学湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430079

索倩, 孙晓燕, 张莹, 王育婧, 刘凯于, 杨红, 洪华珠, 彭建新, 彭蓉. 棉铃虫 *c-Myc* 基因的原核表达纯化、抗体制备、时空表达谱测定与功能分析[J]. 生物工程学报, 2023, 39(7): 2730-2742.

SUO Qian, SUN Xiaoyan, ZHANG Ying, WANG Yujing, LIU Kaiyu, YANG Hong, HONG Huazhu, PENG Jianxin, PENG Rong. Prokaryotic expression, polyclonal antibody preparation, spatio-temporal expression profile and functional analysis of *c-Myc* of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(7): 2730-2742.

摘要: 细胞致癌基因(cellular-myelocytomatosis viral oncogene, *c-Myc*)编码的 *c-Myc* 蛋白通过 Wnt/ β -catenin 信号通路调节相关基因的表达, 近年来引起了广泛的研究关注。本研究旨在利用原核表达系统体外表达棉铃虫(*Helicoverpa armigera*) *c-Myc* (*Ha-c-Myc*)基因, 制备多克隆抗体, 明确 *Ha-c-Myc* 的时空表达模式, 并探究 *Ha-c-Myc* 在调控棉铃虫胆固醇载体蛋白-2 (sterol carrier protein-2, SCP-2)基因表达中的潜在作用。通过 PCR 扩增 *Ha-c-Myc* 基因并克隆至 pET-32a(+)原核表达载体中, 构建重组表达质粒 pET-32a-*Ha-c-Myc*, 转化大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)细胞, 使用 IPTG 诱导蛋白表达, 并通过 Ni²⁺-NTA 柱纯化重组蛋白, 用重组蛋白免疫新西兰兔制备抗 *Ha-c-Myc* 多克隆抗体。利用实时荧光定量 PCR (real-time quantitative reverse transcription PCR, qRT-PCR)法检测棉铃虫不同发育时期(卵、幼虫、预蛹、蛹和成虫)和预蛹期不同组织(中肠、脂肪体、头部和表皮)中 *Ha-c-Myc* 基因的表达水平。设计合成 *Ha-c-Myc* siRNA 并转染棉铃虫 Ha 细胞, 通过 qRT-PCR 分析 *Ha-c-Myc* 基因的 RNA 干扰后棉铃虫 *Ha-c-Myc* 基因和 *HaSCP-2* 基因 mRNA 表达的情况。结果表明, 本实验构建了 pET-32a-*Ha-c-Myc* 重组质粒, 在大肠杆菌中获得了高效表达的、大小约为 65 kDa

资助项目: 国家自然科学基金(31401762, 31672355); 国家重点研发计划(2017YFD0200400); 武汉市青年科技晨光计划项目(2017050304010320); 遗传调控与整合生物学湖北省重点实验室课题(GRIB202210)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31401762, 31672355), the National Key Research and Development Program of China (2017YFD0200400), the Wuhan Youth Science and Technology Morning Light Program Project (2017050304010320), and the Fund of Hubei Key Laboratory of Genetic Regulation and Integrative Biology (GRIB202210).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: pengrong@mail.ccnu.edu.cn

Received: 2022-09-23; Accepted: 2023-02-13; Published online: 2023-03-02

的可溶性 Ha-c-Myc 蛋白。经纯化得到纯度较高的蛋白, 免疫新西兰兔制备了多克隆抗体, 免疫印迹实验(Western blotting)表明抗体的特异性较好, 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)分析显示抗体具有较高的效价。qRT-PCR 实验发现 *Ha-c-Myc* 基因在棉铃虫各发育阶段均有表达, 在幼龄和大龄幼虫及预蛹中表达量较高, 其中预蛹的表达量最高。组织表达结果显示, *Ha-c-Myc* 基因在预蛹不同组织均有一定表达但存在差异, 在中肠部位具有高表达, 而在表皮和脂肪体表达水平较低。RNA 干扰的结果显示, *Ha-c-Myc* 表达的敲降对 *HaSCP-2* 基因的转录有较大影响, 导致 *HaSCP-2* 基因的相对表达水平显著性降低了 50%。上述研究表明, 利用 pET-32a(+) 原核表达系统可以有效地表达可溶性 Ha-c-Myc 蛋白, 并且制备高质量的抗 Ha-c-Myc 多克隆抗体。RNA 干扰证明在中肠组织高表达的 *Ha-c-Myc* 能促进 *HaSCP-2* 基因的转录表达, 在棉铃虫的脂质代谢中具有重要作用。本实验结果有助于深入研究 *Ha-c-Myc* 在棉铃虫中的潜在功能及其作用机理, 为探究绿色农药的新型作用靶标提供实验数据。

关键词: 棉铃虫; *Ha-c-Myc*; 原核表达; SCP-2; 时空表达谱; RNA 干扰; 脂质代谢

Prokaryotic expression, polyclonal antibody preparation, spatio-temporal expression profile and functional analysis of *c-Myc* of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)

SUO Qian^{1,2,3#}, SUN Xiaoyan^{1,2,3#}, ZHANG Ying^{1,2,3}, WANG Yujing^{1,2,3}, LIU Kaiyu^{1,2,3}, YANG Hong^{1,2,3}, HONG Huazhu^{1,2,3}, PENG Jianxin^{1,2,3}, PENG Rong^{1,2,3*}

1 College of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan 430079, Hubei, China

2 Institute of Entomology, Central China Normal University, Wuhan 430079, Hubei, China

3 Hubei Provincial Key Laboratory of Genetic Regulation and Integrative Biology, Central China Normal University, Wuhan 430079, Hubei, China

Abstract: *c-Myc* protein encoded by *c-Myc* (cellular-myelocytomatosis viral oncogene) gene regulates the related gene expression through the Wnt/ β -catenin signaling pathway, and has received extensive attention in recent years. The purpose of this study was to express *Helicoverpa armigera c-Myc* gene (*Ha-c-Myc*) by using prokaryotic expression system, prepare the polyclonal antibody, examine the spatio-temporal expression profile of *Ha-c-Myc*, and investigate the possible function of Ha-c-Myc in regulating *H. armigera* sterol carrier protein-2 (SCP-2) gene expression. The *Ha-c-Myc* gene was amplified by PCR and cloned into a prokaryotic expression plasmid pET-32a(+). The recombinant plasmid pET-32a-*Ha-c-Myc* was transformed into *Escherichia coli* BL21. IPTG was used to induce the expression of the recombinant protein. Protein was purified by Ni²⁺-NTA column and used to immunize New Zealand rabbits for preparing the polyclonal antibody. The *Ha-c-Myc* expression levels in different developmental stages (egg, larva, prepupa, pupa, and adult) of *H. armigera* and different tissues (midgut, fat body, head, and epidermis) of the prepupa were determined by real-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR). *Ha-c-Myc* siRNA was synthesized

and transfected into *H. armigera* Ha cells. The relative mRNA levels of *Ha-c-Myc* and *HaSCP-2* in Ha cells were detected by qRT-PCR. Results showed that the pET-32a-*Ha-c-Myc* recombinant plasmid was constructed. The soluble Ha-c-Myc protein of about 65 kDa was expressed in *E. coli*. The polyclonal antibody was prepared. Western blotting analysis suggested that the antibody had high specificity. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) showed that the titer of the antibody was high. *Ha-c-Myc* gene expressed at all developmental stages, with high levels in the early and late instars of larva, and the prepupal stage. Tissue expression profiles revealed that *Ha-c-Myc* expressed in various tissues of prepupa, with high expression level in the midgut, but low levels in the epidermis and fat body. RNAi results showed that the knockdown of *Ha-c-Myc* expression significantly affected transcription of *HaSCP-2*, leading to a 50% reduction in *HaSCP-2* mRNA expression level. In conclusion, the *Ha-c-Myc* was expressed through a prokaryotic expression system, and the polyclonal anti-Ha-c-Myc antibody was obtained. Ha-c-Myc may promote the expression of *HaSCP-2* and play an important role in the lipid metabolism of *H. armigera*. These results may facilitate further study on the potential role and function mechanism of *Ha-c-Myc* in *H. armigera* and provide experimental data for exploring new targets of green pesticides.

Keywords: *Helicoverpa armigera*; *Ha-c-Myc*; prokaryotic expression; SCP-2; spatio-temporal expression profile; RNA interference; lipid metabolism

细胞致瘤基因 (cellular-myelocytomatosis viral oncogene, *c-Myc*) 是一种具有转录因子活性的原癌基因, 属于 *Myc* 家族重要成员, *Myc* 家族蛋白作为转录因子, 参与调节细胞的多种生命活动如增殖、分化、凋亡及代谢等^[1-4]。*c-Myc* 蛋白的氨基端含有转录激活结构域 (transcription activation domain, TAD), 羧基端含有碱性区 (basic region, b)、螺旋-环-螺旋 (helix-loop-helix, HLH) 结构和亮氨酸拉链 (leucine zipper, ZIP) 区, 中部含有非特异性 DNA 结合结构域 (non-specific DNA binding domain, NBD) 和核定位信号 (nuclear localization signal, NLS)^[5]。*c-Myc* 通过其羧基端的 b-HLH-ZIP 结构, 特异性结合 DNA 进而发挥转录调控的作用^[6]。HLH 结构由 1 个环状结构和 2 个 α 螺旋组成, ZIP 区在 *c-Myc* 的羧基端形成一个重要的蛋白质互作区, ZIP 结构中每 7 个氨基酸会重复出现亮氨酸, 而且亮氨酸在 α 螺旋的一侧呈线性排列, 从而形成疏水的表面, 有助于形成二聚体^[5-6]。*c-Myc* 转录因子

通常以同源或异源二聚体的形式存在, 研究证明 *c-Myc* 与其分子伴侣 Max 蛋白相结合, 形成异源二聚体, 特异性识别和结合靶标基因启动子的 E-box 顺式作用元件 (CANNTG), 调节靶基因的转录表达^[7-9]。

c-Myc 可以促进细胞增殖, Nikiforov 等^[10] 将小鼠 *c-Myc* 基因敲除, 发现其胚胎在 11 d 后死亡, 表明靶向敲除 *c-Myc* 基因将导致细胞增殖的稳定缺陷, 在生物个体发育过程中, *Myc* 依赖性细胞增殖是不可替代的。同时 *c-Myc* 基因可以抑制细胞分化, Hoffman 等^[11] 研究发现 *c-Myc* 的异常表达能阻断体外造血细胞的分化。此外, 在人急性早幼粒白血病细胞 (HL-60) 中转染重组反义 *c-Myc* 腺病毒, 探究重组反义 *c-Myc* 腺病毒对 HL-60 细胞的诱导分化及其机制, 结果表明重组腺病毒可有效抑制 *c-Myc* 的表达, 并导致分化相关基因 *c-fos* 表达增加, 说明 *c-Myc* 可通过下调分化相关基因的表达抑制细胞的分化^[12]。*c-Myc* 蛋白可以诱导大鼠成纤维细胞发生凋亡,

c-Myc 通过激活天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白水解酶(caspase)依赖的 Fas 死亡受体通路, 导致细胞凋亡^[13]。研究表明 *c-Myc* 还可以激活线粒体通透性, 通过增强控制线粒体膜失稳功能的蛋白的表达, 达到诱导细胞色素 *c* 从线粒体内释放到细胞质中的目的, 诱发细胞凋亡^[14]。研究显示, *c-Myc* 参与细胞周期的调控, *c-Myc* 不仅能调控细胞周期蛋白(cyclin)和细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)的转录, 而且诱导 Cdc25 (cell division cycle 25)磷酸酶和 CDK 活化激酶(CDK activating kinase, CAK)活化 cyclin-CDK 复合物, 促使细胞从 G_1 期步入 S 期^[15-17]。另外, *c-Myc* 可通过阻断 CDK 抑制因子 p21 的转录来调控细胞周期^[18]。目前有关 *c-Myc* 的报道主要是在高等脊椎动物中的研究, 对昆虫 *c-Myc* 的了解还不详。继线虫 (*Caenorhabditis elegans*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、小鼠(*Mus musculus*)和人(*Homo sapiens*)等模式生物之后, 在果蝇中也发现了昆虫 *c-Myc* 同源基因^[19-20]。研究推测 *c-Myc* 通过 Wingless (Wg)/Wnt、Decapentaplegic (Dpp)/BMP/TGF- β 、Hpo、dInr/mTOR 和 EcR 等信号通路参与果蝇细胞生长和个体发育等重要生命活动的调控^[21-22]。在昆虫的滞育生理方面, 有研究报道棉铃虫 *c-Myc* 参与 Wnt/ β -catenin 信号通路, *c-Myc* 与下游靶基因激活增强子结合蛋白(activating enhancer binding protein, AP-4)基因的启动子结合, 促进 AP-4 表达, 激活滞育激素的表达, 影响昆虫蜕皮激素表达和蛹的发育^[23]。在昆虫体内, 胆固醇载体蛋白-2 (sterol carrier protein-2, SCP-2)是吸收、运输胆固醇的重要转运蛋白, 参与了胆固醇和脂肪酸的吸收与代谢等生理过程^[24-30]。本实验室前期研究 *HaSCP-2* 基因的表达调控时发现, *Ha-c-Myc* 可通过 E-box 元件与 *HaSCP-2* 基因启动子结合, 因此推测 *Ha-c-Myc*

在棉铃虫 *HaSCP-2* 基因的转录表达中起一定调控作用。

c-Myc 是一种生物体内功能较为广泛的转录因子, 在昆虫的代谢和生长发育等生命过程中发挥重要的潜在功能。本研究克隆棉铃虫 *Ha-c-Myc* 基因, 构建 pET-32a-*Ha-c-Myc* 原核表达质粒, 成功表达和纯化了 *Ha-c-Myc* 重组蛋白, 并制备了多克隆抗体。采用 qRT-PCR 探究了 *Ha-c-Myc* 基因在棉铃虫体内的时空表达模式。通过 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术, 研究敲降棉铃虫细胞 *Ha-c-Myc* 表达对 *HaSCP-2* 基因转录表达的影响。本研究将有助于深入阐明 *Ha-c-Myc* 在棉铃虫中的潜在功能及其作用机制, 进一步促进新的绿色农药作用靶点的发掘, 为农业的绿色可持续发展提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒载体和所用试剂

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21(DE3)和 DH5 α 和 pET-32a(+)质粒由本实验室保藏; 逆转录试剂盒、限制性核酸内切酶、DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、pGEM-T 测序载体购于 TaKaRa 公司; 转染试剂、TRIzol、质粒提取试剂盒、硝酸纤维素膜和蛋白质分子量标准购于 Thermo Fisher Scientific 公司; Ni-NTA 琼脂糖柱填料为 Qiagen 公司的产品; His-tag 一抗和荧光二抗购于 Sigma 公司。

1.2 本研究所用的动物和细胞

棉铃虫购于河南省科云生物农药有限公司。将棉铃虫饲养于人工智能培养箱中, 饲养温度为 28 °C, 湿度为 70%–80%, 光周期设置为 14 L:10 D。

棉铃虫 QB-Ha-E5 细胞系(Ha 细胞)为胚胎细胞系, 由青岛农业大学李国勋教授惠赠, 保存于

本实验室。将 Ha 细胞培养在 Grace 细胞培养基(含有 10%胎牛血清)中,于 28 °C 静置培养,每隔 2-3 d 对细胞进行更换新鲜培养液或传代培养。

1.3 *Ha-c-Myc* 基因克隆及原核表达载体构建

解剖棉铃虫幼虫并收集中肠组织,用 TRIzol 试剂提取总 RNA,反转录合成 cDNA,以此为模板扩增 *Ha-c-Myc* 基因,PCR 反应体系如下: KOD-Plus-Neo Buffer, 2.5 μ L; 2 mmol/L dNTPs, 2.5 μ L; 25 mmol/L MgSO₄, 1.5 μ L; 100% DMSO, 0.5 μ L; 引物 F, 1.25 μ L; 引物 R, 1.25 μ L; 模板 DNA, 0.5 μ L; KOD 酶, 0.5 μ L; 超纯水, 14.5 μ L。其中特异性引物序列见表 1 (*Ha-c-Myc-F* 和 *Ha-c-Myc-R*)。PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 5 min; 98 °C 变性 10 s, 58 °C 退火 30 s, 68 °C 延伸 1 min, 共 5 个循环; 98 °C 再次变性 10 s, 65 °C 退火 30 s, 68 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 68 °C 延伸 7 min。回收目的片段连接至 pGEM-T 载体,转化大肠杆菌 DH5 α , 挑取阳性克隆进行测序验证。通过 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切,将 *Ha-c-Myc* 基因亚克隆至 pET-32a(+)载体,转化宿主大肠杆菌 BL21(DE3),挑取单菌落进行双酶切鉴定和测序。

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Size (nt)	T_m (°C)
c-Myc-F	ATAGGATCCATGGCGCCACCGTTC	24	66
c-Myc-R	ATCGAATTCGTACGAGCGGTAGCG	24	65
qHaSCP-2-F	GAGAAAGTACGAGGCATCTATGG	23	58
qHaSCP-2-R	ATCGCTGATGGTGAAGGTG	19	55
qHa-c-Myc-F	TTGTATGTGGGCAGGCTCT	19	58
qHa-c-Myc-R	AATGACGGAAGTGTGGTGGT	20	60
q-rpS3A-F	CCTCGTGAGGCCAACAT	17	54
q-rpS3A-R	TGATGGCACGGACCTGAGT	19	57
Ha-c-Myc-siRNA-1-F	CCCUGGAUGAGGAUUCUUTT	21	59
Ha-c-Myc-siRNA-1-R	AAGGAAUCCUCAUCCAGGGTT	21	60
Ha-c-Myc-siRNA-2-F	CCGAAACUCCACCAUCAATT	21	62
Ha-c-Myc-siRNA-2-R	UUGAUGGUGGAGUUCCGGTT	21	59

1.4 重组蛋白的原核表达

将重组菌接种到 5 mL LB 液体培养基(含有 50 μ g/mL Kana)中, 37 °C、200 r/min 振荡培养过夜,活化的细菌按 1:100 的比例接种至 1 L LB 培养基(含有 50 μ g/mL Kana)中, 200 r/min 振荡培养至 OD_{600} 约为 0.6 时,加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG)进行诱导表达。实验中设置了不同的 IPTG 浓度梯度(0.2、0.4、0.8 和 1 mmol/L)、时间梯度(4、12、24 h)和不同温度梯度(16、25、37 °C),摸索出 1 mmol/L IPTG, 25 °C 培养 4 h 为最佳的诱导表达条件。4 °C、5 000 r/min 离心 10 min 收集诱导表达的重组菌,超高压破碎细菌并制备上清样品,进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE),分析重组蛋白的表达情况。

1.5 *Ha-c-Myc* 重组蛋白的纯化

参照何华伟等^[31]方法首先用硫酸镍溶液进行镍柱(Ni²⁺-NTA)再生,将诱导表达重组菌的上清用 0.45 μ m 的滤膜过滤后缓慢加入镍柱中,然后依次用 20、50、100、200 和 300 mmol/L 浓度的咪唑溶液梯度洗脱,纯化产物经 SDS-PAGE 和 Western blotting 实验检测鉴定。

1.6 多克隆抗体的制备和检测

用纯度为 90% 的重组蛋白为抗原注射新西兰兔。免疫时, 将 5 400 μg 重组蛋白与弗氏完全佐剂混匀乳化, 对新西兰兔进行皮下多点注射。每 2 周注射 1 次, 一共注射免疫 4 次, 免疫周期为 2 个月, 结束后采集抗血清, 用 0.5、1、5 和 10 ng *Ha-c-Myc* 与抗体进行 Western blotting 检测, 并通过酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)测定抗血清效价。

1.7 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)测定 *Ha-c-Myc* 基因的时空表达情况

选取不同发育阶段的棉铃虫(卵、1 龄幼虫、2 龄 d-1 幼虫、2 龄 d-2 幼虫、3 龄 d-1 幼虫、3 龄 d-2 幼虫、4 龄 d-1 幼虫、4 龄 d-2 幼虫、5 龄 d-1 幼虫、5 龄 d-2 幼虫、预蛹、d-1 蛹、d-2 蛹和成虫), 每个发育阶段各取 5 头(个), 首先使用 TRIzol 法提取总 RNA, 进行 cDNA 的逆转录合成, 然后采用实时荧光定量 PCR (real-time quantitative reverse transcription PCR, qRT-PCR) 方法测定棉铃虫各发育阶段样品的 *Ha-c-Myc* 的表达量。另外, 解剖 5 头预蛹期的棉铃虫, 分别收集头部、表皮、中肠和脂肪体组织, 通过 qRT-PCR 检测各组织中 *Ha-c-Myc* 的表达水平。在 qRT-PCR 实验中为确保数据的准确性, 每个样品设置 4 个重复, 并进行 3 次独立的生物实验。参照 Fast EvaGreen qPCR 试剂的说明书设置反应, 以 *rpS3A* 基因作为内参, 所用引物序列如表 1 所示。反应体系(共 15 μL): cDNA 25 ng, 引物 F (10 $\mu\text{mol/L}$)和引物 R (10 $\mu\text{mol/L}$)各 1.4 μL , 2 \times Fast EvaGreen qPCR Master mix 7.5 μL , 加入 DEPC H₂O 补至 15 μL 。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 31 s, 共 39 个循环; 65 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 s。

1.8 *Ha-c-Myc* 的 RNA 干扰实验

根据 *Ha-c-Myc* 基因序列设计并合成 2 条

Ha-c-Myc 小干扰 RNA (*Ha-c-Myc*-siRNA-1 和 *Ha-c-Myc*-siRNA-2, 见表 1), 使用 Cellfectin 转染试剂, 在接种有 Ha 细胞的 6 孔培养板中, 按照转染试剂说明书步骤进行细胞转染实验, 将 2 条 *Ha-c-Myc* 小干扰 RNA 混合转染至 Ha 细胞, 同时以未转染 *Ha-c-Myc* siRNA 的 Ha 细胞为对照, 实验重复 3 次。转染 *Ha-c-Myc* siRNA 后, 2 000 r/min 离心收集细胞, 提取总 RNA, 通过 qRT-PCR 方法分别测定 Ha 细胞中 *HaSCP-2* 基因和 *Ha-c-Myc* 基因 mRNA 的相对表达量。qRT-PCR 以 *rpS3A* 基因为内参, 所用引物见表 1。

1.9 数据分析

本实验采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法对基因表达水平的相对变化进行分析。数据通过 GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc.)软件处理, 并进行独立样本的 *T* 检验及单因素方差(one-way analysis of variance, one-way ANOVA) Tukey 氏多重比较。

2 结果与分析

2.1 *Ha-c-Myc* 基因原核表达质粒的构建

扩增棉铃虫 *Ha-c-Myc* 基因, 经与 T-载体连接测序正确后, 酶切克隆至表达载体 pET-32a(+), 构建的 pET-32a-*Ha-c-Myc* 重组质粒经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切鉴定, 电泳得到清晰的 2 条带(图 1, 泳道 2), 分别为 5 900 bp 的 pET-32a(+)载体和 1 100 bp 的 *Ha-c-Myc* 片段, 与预期相符。质粒经测序验证, 序列正确, 表明 pET-32a-*Ha-c-Myc* 原核表达载体成功构建。

2.2 *Ha-c-Myc* 蛋白的诱导表达

将构建成功的重组质粒 pET-32a-*Ha-c-Myc* 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 使用终浓度为 1 mmol/L IPTG 诱导培养 4 h, 表达产物经电泳检测显示, 裂解上清中呈现大小为约 65 kDa (图 2, 泳道 3)的明显蛋白条带, 与预期的结果相一致。

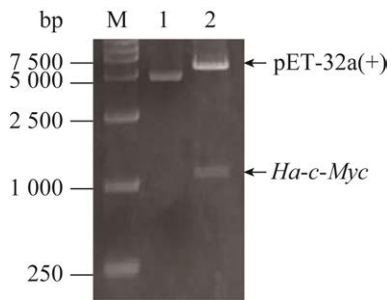


图1 *Ha-c-Myc* 原核表达质粒的构建

Figure 1 Construction of prokaryotic *Ha-c-Myc* expression plasmid. Double enzymatic digestion of pET-32a-*Ha-c-Myc* recombinant plasmid. Lane M: DNA molecular weight standards; Lane 1: pET-32a-*Ha-c-Myc* recombinant plasmid without enzyme digestion; Lane 2: Double enzymatic digestion products of the pET-32a(+) vector (upper arrow) and *Ha-c-Myc* gene (lower arrow).

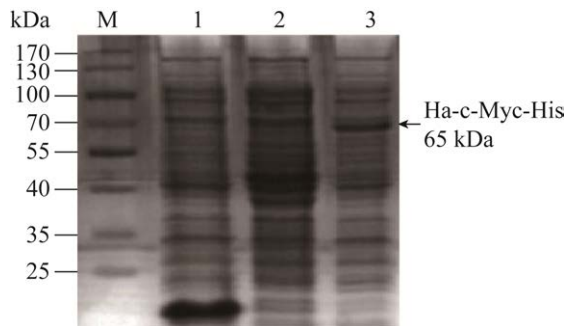


图2 *Ha-c-Myc* 重组蛋白的诱导表达

Figure 2 Inducible expression of recombinant *Ha-c-Myc* protein in *Escherichia coli*. Lane M: Protein molecular weight marker; The total supernatant protein of *E. coli* BL21(DE3) carrying pET-32a vector with IPTG induction (lane 1); The total supernatant protein of *E. coli* BL21(DE3) carrying pET-32a-*Ha-c-Myc* plasmid without (lane 2) or with (lane 3) IPTG induction.

在转空载体(图 2, 泳道 1)和未诱导的对照组上清(图 2, 泳道 2)中没有出现该条带。上述表明, 利用原核表达系统成功实现了棉铃虫 *Ha-c-Myc* 蛋白的体外可溶性表达。

以 Anti-His-Tag 单克隆抗体为一抗, 对表达的 *Ha-c-Myc* 重组蛋白进行 Western blotting 鉴定(图 3), 结果显示重组蛋白与抗体发生结合, 在含重组

质粒的细菌诱导上清的约 65 kDa 处可见清晰的抗体与重组蛋白的特异性杂交条带(图 3, 泳道 3), 在空载(图 3, 泳道 1)中未出现该杂交条带, 在未诱导的细菌上清(图 3, 泳道 2)中出现较浅的条带, 推测是大肠杆菌表达中较为常见的表达产物的渗漏现象, 对本实验后续工作影响较小。如图 3 中泳道 4 显示, 后续经镍离子柱纯化的蛋白也呈现较强的杂交条带。该结果进一步证实, 表达的蛋白是带有 His 标签的 *Ha-c-Myc* 重组蛋白, 该 *Ha-c-Myc* 重组蛋白在诱导上清中具有较强的特异性表达。

2.3 *Ha-c-Myc* 重组蛋白的纯化

采用镍离子金属螯合亲和层析的方法, 将诱导表达的上清分别用不同浓度的咪唑溶液(20、50、100、200、300 mmol/L)进行重组蛋白的梯度洗脱。纯化结果(图 4)表明 300 mmol/L 的咪唑浓度的洗脱结果较好, 本研究用该浓度咪唑对重组蛋白进行大量纯化, 共得到 10 mg *Ha-c-Myc* 重组蛋白。

2.4 抗 *Ha-c-Myc* 多克隆抗体的制备及检测

用纯化的重组蛋白免疫新西兰兔, 制备得到 10 mL 抗血清。为了检测抗体的特异性, 用不同浓度的 *Ha-c-Myc* 重组蛋白与稀释比为 1:2 000 的抗血清进行 Western blotting 检测, 均能检测到杂交条带(图 5)。如图 5 所示, 随着抗原量的

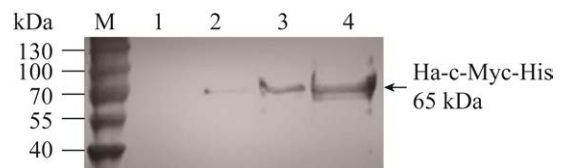


图3 重组蛋白的 Western blotting 鉴定

Figure 3 Western blotting identification of recombinant *Ha-c-Myc* protein. Lane M: Protein molecular weight marker; The total supernatant protein of *E. coli* BL21(DE3) containing pET-32a(+) empty vector with IPTG induction; The total supernatant protein of *E. coli* BL21(DE3) containing pET-32a-*Ha-c-Myc* plasmid without (lane 2) or with (lane 3) IPTG induction; The purified *Ha-c-Myc* recombinant protein (lane 4).

减少, 目的条带逐渐变暗, 并且单一化程度高, 背景无杂带, 表明制备的多克隆抗体的特异性较强, 5 ng 抗原即能与抗血清发生阳性反应, 说明抗体的灵敏度较好。

酶联免疫吸附试验检测结果显示, 空白对照

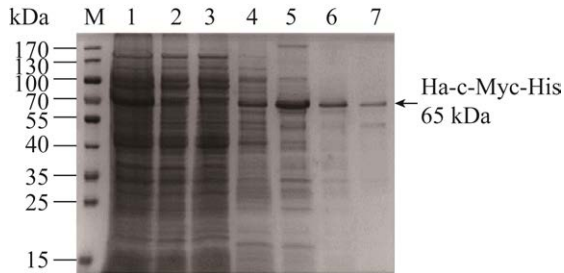


图4 Ha-c-Myc 重组蛋白纯化的SDS-PAGE 电泳检测
Figure 4 SDS-PAGE analysis of the purified recombinant Ha-c-Myc protein. Lane M: Protein molecular weight marker; Lane 1: Unpurified supernatant from induced *E. coli* BL21(DE3) containing pET-32a-*Ha-c-Myc* plasmid; Lane 2: Eluate after supernatant samples were loaded to the column; Lane 3-7: Elution by 20, 50, 100, 200 and 300 mmol/L imidazole washing solution.

(3%脱脂奶粉)和阴性对照(免疫前血清)都无阳性反应, 而抗原与不同稀释比的抗体均有明显阳性反应, 且随着抗体浓度降低, 颜色逐渐减弱, 200 ng 的抗原与 1:512 000 稀释的抗体孵育后吸光值大于 0.1 (图 6A), 仍有明显的阳性反应, 且

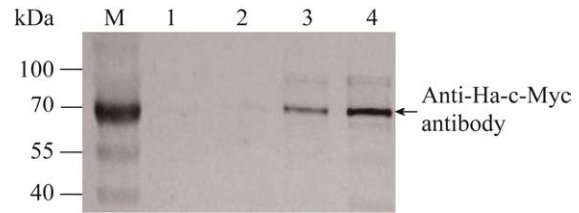


图5 Western blotting 检测多克隆抗体对不同浓度的 Ha-c-Myc 重组蛋白的特异性
Figure 5 Specificity of the anti-Ha-c-Myc polyclonal antibody to the Ha-c-Myc recombinant protein of different concentrations detected by Western blotting. Lane 1: 500 pg antigens; Lane 2: 1 ng antigens; Lane 3: 5 ng antigens; Lane 4: 10 ng antigens; Antiserum dilution ratio is 1:2 000.

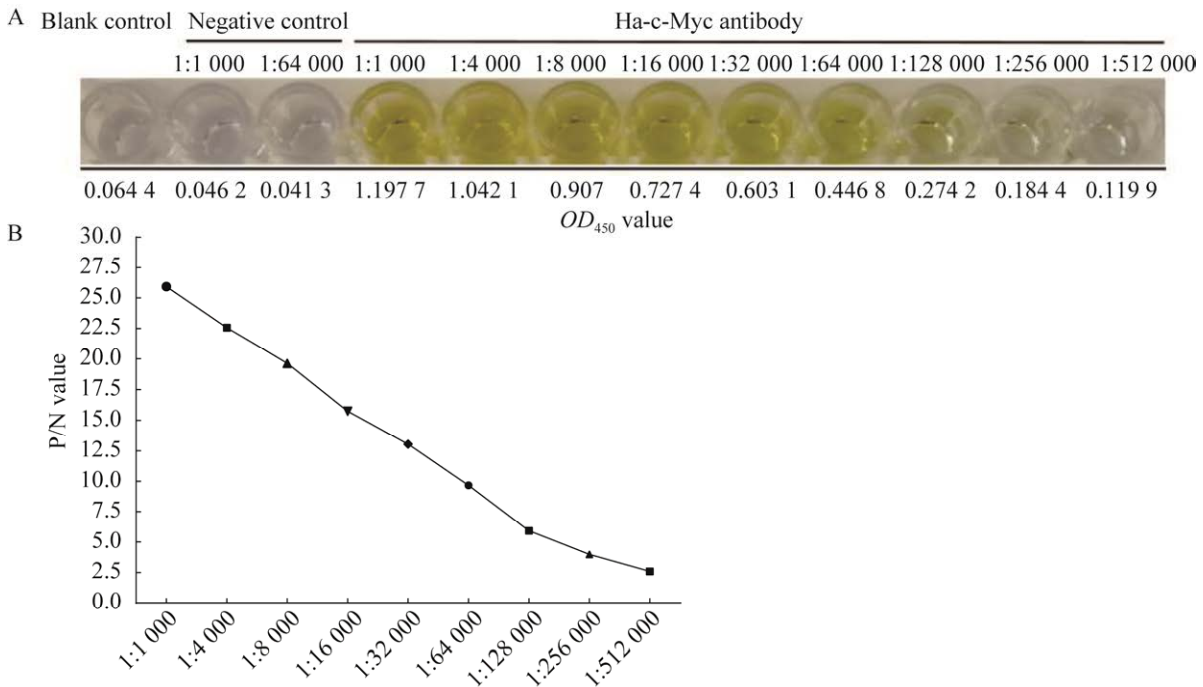


图6 Ha-c-Myc 抗体的ELISA 效价检测

Figure 6 Titer of the Ha-c-Myc antibody detected by ELISA. TBST was used as a blank control, the pre-immune serum was used as a negative control, the Ha-c-Myc antisera diluted at different ratios were incubated with 200 ng/mL antigen to develop color, and 1:1 000 and other numbers indicate the different dilution ratios.

P/N 值(阳性血清与阴性血清吸光度比值)为 2.6, 大于 2.1 (图 6B), 测得抗体效价为 1:512 000, 以上表明制备的 Ha-c-Myc 抗血清效价较高。

2.5 不同发育阶段棉铃虫 *Ha-c-Myc* 的表达分析

如图 7 所示, 不同发育时期棉铃虫体内 *Ha-c-Myc* 的 mRNA 表达水平有较大差异。从整体趋势来看, 从卵、幼虫到预蛹, 随着龄期的增加, *Ha-c-Myc* mRNA 的表达量随之增加, 在预蛹期达到最高峰, 而在随后的蛹期及成虫期均有所下降。在幼虫早期和晚期, *Ha-c-Myc* mRNA 表达量较高, 而在中期其表达水平较低。与卵相比, 1 龄第 1 天幼虫 *Ha-c-Myc* mRNA 的相对表达水平显著增加了 2.95 倍($P<0.001$)。4 龄第 2 天幼虫 *Ha-c-Myc* 表达水平比 3 龄第 1 天和 3 龄第 2 天幼虫显著增加了 5.95 倍和 3.6 倍($P<0.05$)。在 5 龄幼虫末期和预蛹期, *Ha-c-Myc* 基因的表达量显著高于其他的发育阶段。其中, 预蛹的 *Ha-c-Myc* 基因的表达量是 3 龄第 1 天幼虫表达

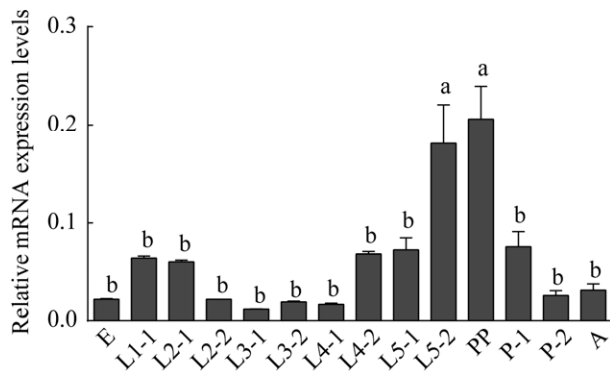


图 7 不同发育阶段棉铃虫 *Ha-c-Myc* mRNA 的表达水平

Figure 7 The expression levels of *Ha-c-Myc* mRNA in *Helicoverpa armigera* at different developmental stages. E: Egg; LX-Y: The Y day of the X instar larva. PP: Prepupa; P-1: 1 day-old pupa; P-2: 2 day-old pupa; A: Adult. Data in the figure are $\bar{x} \pm s$. Different letters above bars indicate significant difference ($P<0.05$, Tukey's HSD multiple test) in the gene expression level between different developmental stages.

量的 18.26 倍($P<0.05$), 5 龄第 2 天幼虫的 *Ha-c-Myc* 表达量是 3 龄第 1 天幼虫的 16.03 倍($P<0.05$)。因此, 后续选取表达量最高的预蛹棉铃虫进行组织差异表达分析。

2.6 棉铃虫不同组织 *Ha-c-Myc* 的表达分析

组织表达分析显示, *Ha-c-Myc* 在预蛹的各种组织均有一定的表达, 但不同组织中表达量差异较大(图 8), 主要表现为该基因在中肠和头中具有较高的表达量, 而在表皮中表达量较低。其中, *Ha-c-Myc* 基因在中肠的表达量最高, 分别是表皮、脂肪体和头的表达量的 10.56 倍、4.12 倍和 2.46 倍($P<0.05$)。该结果说明中肠是棉铃虫 *Ha-c-Myc* 基因表达的富集部位。

2.7 *Ha-c-Myc* 基因干扰对 *HaSCP-2* 表达的影响

为确定 *Ha-c-Myc* 对 *HaSCP-2* 转录的调控作用, 对 *Ha-c-Myc* 基因进行 RNAi 实验。结果如图 9 所示, 棉铃虫 Ha 细胞转染 *Ha-c-Myc* siRNA 后, 细胞 *Ha-c-Myc* 基因的表达受到抑制, *Ha-c-Myc*

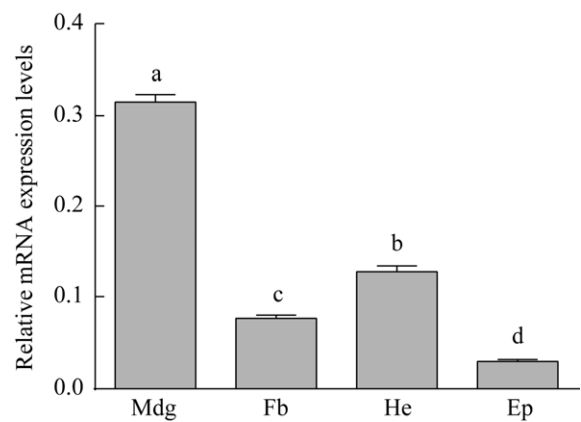


图 8 棉铃虫预蛹不同组织中 *Ha-c-Myc* 的表达分析
Figure 8 Analysis of *Ha-c-Myc* expression in different tissues of *Helicoverpa armigera*. Mdg: Midgut; Fb: Fat body; He: Head; Ep: Epidermis; Data in the figure are mean \pm SE. Different letters above bars indicate significant difference ($P<0.05$, Tukey's HSD multiple test) in the gene expression level between different tissues.

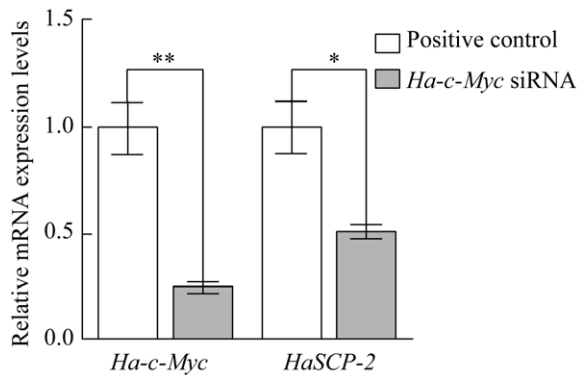


图9 使用 *Ha-c-Myc* siRNA 干扰后棉铃虫 Ha 细胞中 *Ha-c-Myc* 和 *HaSCP-2* 的表达水平

Figure 9 Relative mRNA expression levels of *Ha-c-Myc* and *HaSCP-2* in Ha cell by RNAi. * and **: Significant difference ($P < 0.01$, *t*-test) and extremely significant difference ($P < 0.05$, *t*-test) in the mRNA expression level between the siRNA treated group and the control.

基因 mRNA 的相对表达水平显著降低了约 75% ($P < 0.005$), 表明 siRNA 对 *Ha-c-Myc* 基因的干扰是成功的。与此同时, 转染 *Ha-c-Myc* siRNA 的 Ha 细胞内 *HaSCP-2* 的表达量也显著下调, *HaSCP-2* mRNA 的相对表达水平与未转染的对照组相比, 显著降低了 50% ($P < 0.05$)。由于 *Ha-c-Myc* siRNA 抑制转录因子 *Ha-c-Myc* 基因的表达, 从而下调了 *HaSCP-2* 基因启动子的活性, *HaSCP-2* 的表达量下降, 表明转录因子 *Ha-c-Myc* 能正向调控 *HaSCP-2* 启动子活性, 进而促进 *HaSCP-2* 基因的转录表达。

3 讨论

c-Myc 是近年来备受关注的一类参与细胞增殖调控、细胞分化和凋亡以及个体发育等生命活动的重要转录因子, 其作用广泛, 是调控细胞命运的关键蛋白^[3]。本研究利用原核表达系统, 构建 pET-32a-*Ha-c-Myc* 表达质粒, 成功实现了 *Ha-c-Myc* 蛋白的体外可溶性表达。Chen 等^[23] 从棉铃虫脑中克隆了 *Ha-c-Myc* 基因, 表达了

Ha-c-Myc 蛋白的部分肽段。值得一提的是, 本实验实现了 *Ha-c-Myc* 全部肽段的可溶性表达, 为后续深入阐明棉铃虫 *c-Myc* 的结构和功能奠定了基础。

本研究在探索 *Ha-c-Myc* 体外表达的过程中, 尝试选择了多种诱导表达方案, 通过对 IPTG 诱导浓度、诱导时间和温度的调整优化, 探索出最佳的诱导表达条件为 25 °C, 1 mmol/L IPTG 诱导培养 4 h, 表达的目的蛋白完全溶于重组菌诱导上清, 保持了蛋白质原有的生物活性。在蛋白纯化方面, 通过金属离子亲和层析和咪唑溶液洗脱的方法, 获得了大量纯度较好的重组蛋白, 并确定重组蛋白的最适咪唑洗脱浓度为 300 mmol/L。用纯化的重组蛋白免疫新西兰兔, 制备得到 10 mL 抗血清。通过 ELISA 效价检测及免疫印迹法分析, 表明制备的多克隆抗体效价较高, 且特异性较好。

为了探究 *Ha-c-Myc* 在棉铃虫体内的时间和空间维度的表达规律, 利用实时荧光定量 PCR 法测定了该基因在体内的表达情况。发现在棉铃虫的各个发育阶段, *Ha-c-Myc* 基因转录水平存在较大的差异, 在低龄、大龄幼虫期和预蛹期的表达量较高。*Ha-c-Myc* 在低龄幼虫的高表达, 暗示其可能在昆虫个体早期发育中具有重要功能, 这与果蝇 *c-Myc* 的研究结果相似^[22], 果蝇 *c-Myc* 基因的突变导致幼虫出现严重的生长缺陷, 细胞体积减小及细胞周期进程受阻, 幼虫发育停滞并死亡, 表明 *c-Myc* 通过调控细胞生长与细胞周期影响果蝇幼虫个体发育。而有关 *Ha-c-Myc* 在棉铃虫早期发育中的调控机制还有待研究。*Ha-c-Myc* 基因在预蛹期的高表达, 与已报道的其在棉铃虫蛹发育中的作用较为一致^[23]。在探究 *Ha-c-Myc* 在不同组织中的表达差异时, 确定了 *Ha-c-Myc* 基因的主要表达部位为中肠组织。昆虫由于缺乏合成胆固醇的两种关键

酶——鲨烯合酶和羊毛甾醇合酶,无法自主合成胆固醇,只能通过取食植物源固醇并将其转化为胆固醇,而中肠恰好是昆虫消化食物、吸收外源胆固醇的主要部位^[32]。*Ha-c-Myc* 在中肠组织的高水平表达暗示了 *Ha-c-Myc* 基因表达产物作为转录因子,在棉铃虫中肠吸收、转运胆固醇的过程中发挥重要功能。在本研究检测的 4 种组织中, *Ha-c-Myc* 基因在脑中也有较高的表达,这与有关棉铃虫脑中 *c-Myc* 的研究相一致^[23]。昆虫体内胆固醇呈现动态分布,在神经系统、消化系统和唾液腺中含量较为丰富^[33],因而推测 *Ha-c-Myc* 也可能在棉铃虫脑部神经系统胆固醇的吸收利用中发挥作用。*Ha-c-Myc* 基因的时空表达谱清晰地显示了在棉铃虫体内该基因的组成型表达模式及表达丰度,为开展 *Ha-c-Myc* 基因与蛋白功能的深入研究提供了较为重要的信息。

在研究棉铃虫 *c-Myc* 对 *HaSCP-2* 基因表达的调控作用中,使用 RNA 干扰技术敲降了 *Ha-c-Myc* 基因的表达,导致 *HaSCP-2* 的转录水平显著性降低一半,证明 *Ha-c-Myc* 转录因子对 *HaSCP-2* 基因的启动子具有正向调节作用,可上调脂质转运蛋白基因 *HaSCP-2* 的转录。因此,本文推测该转录因子通过上调 *HaSCP-2* 的表达,促进棉铃虫从外界吸收转运固醇类脂质,进而影响棉铃虫的生长和发育。有研究报道 *c-Myc* 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路,影响蜕皮激素的表达,从而参与调控昆虫蛹的发育^[22]。而有关 *Ha-c-Myc* 转录因子通过何种信号途径、如何在昆虫的脂质代谢与生理调节中发挥调控作用还有待进一步研究。

4 结论

本研究成功构建了棉铃虫 *Ha-c-Myc* 基因的原核表达质粒,实现了该基因的体外高效可溶性

表达,并用纯化的蛋白制备了特异性较好、效价较高的多克隆抗体。时空表达谱分析表明该基因在棉铃虫发育的各个阶段均有表达但存在差异,在幼虫早期和晚期以及预蛹期的表达量较高, *Ha-c-Myc* 在中肠组织中的表达水平最高,显著高于表皮、头和脂肪体组织,暗示该基因在棉铃虫中肠的胆固醇吸收转运中发挥作用。RNAi 实验证实了在中肠部位高表达的 *Ha-c-Myc* 能上调胆固醇载体蛋白 *HaSCP-2* 基因的转录表达,促进棉铃虫对外源脂质的摄取吸收,从而参与个体脂质代谢生理过程。本研究为深入阐明 *c-Myc* 在昆虫中的潜在生物学功能及其关键作用机理奠定了良好的基础,为绿色农药作用新靶点的发掘和利用提供了数据和参考。

REFERENCES

- [1] STONE J, de LANGE T, RAMSAY G, JAKOBOVITS E, BISHOP JM, VARMUS H, LEE W. Definition of regions in human *c-myc* that are involved in transformation and nuclear localization[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1987, 7(5): 1697-1709.
- [2] ZHOU JN, ZHANG B, WANG HY, WANG DX, ZHANG MM, ZHANG M, WANG XK, FAN SY, XU YC, ZENG Q, JIA YL, XI JF, NAN X, HE LJ, ZHOU XB, LI S, ZHONG W, YUE W, PEI XT. A functional screening identifies a new organic selenium compound targeting cancer stem cells: role of *c-Myc* transcription activity inhibition in liver cancer[J]. *Advanced Science*, 2022, 9(22): 2201166.
- [3] DANG CV. MYC on the path to cancer[J]. *Cell*, 2012, 149(1): 22-35.
- [4] PATEL JH, LOBODA AP, SHOWE MK, SHOWE LC, MCMAHON SB. Analysis of genomic targets reveals complex functions of MYC[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2004, 4(7): 562-568.
- [5] KATO GJ, DANG CV. Function of the *c-Myc* oncoprotein[J]. *The FASEB Journal*, 1992, 6(12): 3027-3122.
- [6] BLACKWELL TK, KRETZNER L, BLACKWOOD EM, EISENMAN RN, WEINTRAUB H.

- Sequence-specific DNA binding by the *c-Myc* protein[J]. *Science*, 1990, 250(4984): 1149-1151.
- [7] DANG CV, BARRETT J, VILLA-GARCIA M, RESAR LM, KATO GJ, FEARON ER. Intracellular leucine zipper interactions suggest *c-Myc* hetero-oligomerization[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1991, 11(2): 954-962.
- [8] AMATI B, BROOKS MW, LEVY N, LITTLEWOOD TD, EVAN GI, LAND H. Oncogenic activity of the *c-Myc* protein requires dimerization with Max[J]. *Cell*, 1993, 72(2): 233-245.
- [9] AMATI B, DALTON S, BROOKS MW, LITTLEWOOD TD, EVAN GI, LAND H. Transcriptional activation by the human *c-Myc* oncoprotein in yeast requires interaction with Max[J]. *Nature*, 1992, 359 (6394): 423-426.
- [10] NIKIFOROV MA, KOTENKO I, PETRENKO O, BEAVIS A, VALENICK L, LEMISCHKA I, COLE MD. Complementation of *Myc*-dependent cell proliferation by cDNA expression library screening[J]. *Oncogene*, 2000, 19(42): 4828-4831.
- [11] HOFFMAN B, AMANULLAH A, SHAFARENKO M, LIEBERMANN DA. The pro-oncogene *c-myc* in hematopoietic development and leukemogenesis[J]. *Oncogene*, 2002, 21(21): 3414-3421.
- [12] 陈龙, 陈洁平, 林晨. 重组反义 *c-myc* 腺病毒诱导 HL-60 细胞分化的作用[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(17): 1553-1556.
- CHEN L, CHEN JP, LIN C. Effects of recombinant antisense *c-myc* adenovirus in induction of differentiation of HL-60 cells[J]. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 2004, 26(17): 1553-1556 (in Chinese).
- [13] JÄRVINEN K, HOTTI A, SANTOS L, NUMMELA P, HÖLTTÄ E. Caspase-8, *c-FLIP*, and caspase-9 in *c-Myc*-induced apoptosis of fibroblasts[J]. *Experimental Cell Research*, 2011, 317(18): 2602-2615.
- [14] IACCARINO I, HANCOCK D, EVAN G, DOWNWARD J. *c-Myc* induces cytochrome *c* release in Rat1 fibroblasts by increasing outer mitochondrial membrane permeability in a bid-dependent manner[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2003, 10(5): 599-608.
- [15] MEYER N, PENN LZ. Reflecting on 25 years with MYC[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2008, 8(12): 976-990.
- [16] AMATI B, ALEVIZOPOULOS K, VLACH J. *Myc* and the cell cycle[J]. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 1998, 3(4): 250-268.
- [17] LUTZ W, LEON J, EILERS M. Contributions of *Myc* to tumorigenesis[J]. *Biochimica Biophysica Acta*, 2002, 1602(1): 61-71.
- [18] CLAASSEN GF, HANN SR. A role for transcriptional repression of p21^{CIP1} by *c-Myc* in overcoming transforming growth factor β -induced cell-cycle arrest[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(17): 9498-9503.
- [19] LÜSCHER B, LARSSON LG. The world according to MYC[J]. *EMBO Reports*, 2007, 8(12): 1110-1114.
- [20] GALLANT P, SHIIO Y, CHENG PF, PARKHURST SM, EISENMAN RN. *Myc* and Max homologs in *Drosophila*[J]. *Science*, 1996, 274(5292): 1523-1527.
- [21] de la COVA C, JOHNSTON LA. *Myc* in model organisms: a view from the flyroom[J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2006, 16(4): 303-312.
- [22] GALLANT P. *Myc* function in *Drosophila*[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2013, 3(10): a014324.
- [23] CHEN W, XU WH. Wnt/ β -catenin signaling regulates *Helicoverpa armigera* pupal development by up-regulating *c-Myc* and AP-4[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 53: 44-53.
- [24] KREBS KC, LAN Q. Isolation and expression of a sterol carrier protein-2 gene from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*[J]. *Insect Molecular Biology*, 2003, 12(1): 51-60.
- [25] DYER DH, LOVELL S, THODEN JB, HOLDEN HM, RAYMENT I, LAN Q. The structural determination of an insect sterol carrier protein-2 with a ligand-bound C16 fatty acid at 1.35-Å resolution[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(40): 39085-39091.
- [26] KIM MS, LAN Q. Sterol carrier protein-x gene and effects of sterol carrier protein-2 inhibitors on lipid uptake in *Manduca sexta*[J]. *BMC Physiology*, 2010, 10: 9.
- [27] DU X, MA HH, ZHANG X, LIU KY, PENG JX, LAN Q, HONG HZ. Characterization of the sterol carrier protein-x/sterol carrier protein-2 gene in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*[J]. *Journal of Insect*

- Physiology, 2012, 58(11): 1413-1423.
- [28] PENG R, FU Q, HONG HZ, SCHWAEGLER T, LAN Q. THAP and ATF-2 regulated sterol carrier protein-2 promoter activities in the larval midgut of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*[J]. PLoS One, 2012, 7(10): e46948.
- [29] ZHANG LL, LI D, XU R, ZHENG SC, HE HW, WAN J, FENG QL. Structural and functional analyses of a sterol carrier protein in *Spodoptera litura*[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e81542.
- [30] MA HH, MA YM, LIU XH, DYER DH, XU PY, LIU KY, LAN Q, HONG HZ, PENG JX, PENG R. NMR structure and function of *Helicoverpa armigera* sterol carrier protein-2, an important insecticidal target from the cotton bollworm[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 18186.
- [31] 何华伟, 王叶菁, 赵敏健, 位曙光, 赵朋, 蒋文超, 刘莉娜, 赵萍. 家蚕精氨酸激酶原核表达纯化、结构与活性分析[J]. 生物工程学报, 2017, 33(7): 1109-1123.
- HE HW, WANG YJ, ZHAO MJ, WEI SG, ZHAO P, JIANG WC, LIU LN, ZHAO P. Prokaryotic expression, purification and characterization of arginine kinase of *Bombyx mori*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2017, 33(7): 1109-1123 (in Chinese).
- [32] JOSHI M, AGARWAL HC. Site of cholesterol absorption in some insects[J]. Journal of Insect Physiology, 1977, 23(3): 403-404.
- [33] LASSER NL, CLAYTON RB. The intracellular distribution of sterols in *Eurycotis floridana* and its possible relation to subcellular membrane structures[J]. Journal of Lipid Research, 1966, 7(3): 413-421.

(本文责编 郝丽芳)