

棉铃虫 *BR-C Z2* 基因的克隆、原核表达及其表达谱



胡得琴 罗生慧 张亚林 刘小宁*

(新疆大学生命科学与技术学院, 新疆生物资源基因工程重点实验室, 乌鲁木齐 830046)

摘要: 为明确转录因子广泛锌指复合物(broad complex, BR-C)在棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 生长发育过程中的作用, 基于转录组序列从棉铃虫幼虫中肠克隆获得 *BR-C Z2* 的 cDNA 序列并对其氨基酸序列和蛋白结构进行生物信息学分析, 利用原核表达系统表达其融合蛋白; 用实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, qRT-PCR) 技术分析 *BR-C Z2* 基因在棉铃虫体内的表达规律, 以及 2-十三烷酮(2-tridecanone, 2-TD) 处理后其在棉铃虫 6 龄幼虫中肠内的变化规律。结果显示, 棉铃虫 *BR-C Z2* 基因的开放阅读框为 1 257 bp, 编码 418 个氨基酸, 预测编码蛋白的分子量和理论等电点分别为 46.63 kD 和 6.94, 主要定位于细胞核中。系统进化树结果显示棉铃虫 *BR-C Z2* 与家蚕 *Bombyx mori* 的 *BR-C Z2* 亲缘关系最近。成功表达 His-HaBR-C Z2 融合蛋白。*BR-C Z2* 基因在棉铃虫蛹期和 6 龄幼虫中肠组织中相对表达量最高; 不同浓度 2-TD 处理后, 棉铃虫 *BR-C Z2* 基因相对表达量变化趋势不同, 其中 15 mg/g 浓度处理 12 h 后棉铃虫 *BR-C Z2* 基因相对表达量达到峰值, 是对照的 2.5 倍, 而 20 mg/g 浓度处理 20 h 后棉铃虫 *BR-C Z2* 基因相对表达量降到最低, 为对照的 45.13%。表明 *BR-C Z2* 基因可能参与棉铃虫的生长发育, 并响应 2-TD 的胁迫。

关键词: 棉铃虫; 广泛锌指复合物; 基因; 原核表达; 2-十三烷酮; 生长发育

Cloning, prokaryotic expression and spatio-temporal expression profiling of *BR-C Z2* gene in *Helicoverpa armigera*

Hu Deqin Luo Shenghui Zhang Yalin Liu Xiaoning*

(Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China)

Abstract: To investigate the role of broad complex (BR-C) in the growth and development of *Helicoverpa armigera*, the cDNA sequence of *BR-C Z2* was cloned from the midgut of *H. armigera* larvae based on transcriptome sequence, and its amino acid sequence and protein structure were analyzed by bioinformatics. The fusion protein was expressed by using a prokaryotic expression system; real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the temporal and spatial expression profiles of *BR-C Z2* in *H. armigera*, and its change in the midgut of the 6th instar larvae of *H. armigera* was detected after 2-tridecanone treatment. The results showed that the open reading frame of *BR-C Z2* in *H. armigera* was 1 257 bp in length, encoding 418 amino acids. The predicted molecular weight and isoelectric point of *BR-C Z2* in *H. armigera* were 46.63 kD and 6.94, respectively. Phylogenetic analysis showed that *BR-C Z2* in *H. armigera* was closely related to the *BR-C Z2* of *Bombyx mori*. The fusion protein of His-HaBR-C Z2 was successfully expressed. The relative expression level of *BR-C Z2* in *H. armigera* was the highest at the pupal stage and in the midgut of the 6th instar larvae. After treatment

with different concentrations of 2-TD, the relative expression level of *BR-C Z2* in *H. armigera* first had different changes. The relative expression level of *BR-C Z2* in *H. armigera* reached a peak 20 h after treated with 15 mg/g of 2-TD, which was 2.5 times that of the control group, but it decreased to the lowest 20 h after treated with 20 mg/g of 2-TD, which was 45.13% of the control group. These results suggested that *BR-C Z2* in *H. armigera* might be involved in the growth and development of cotton bollworm, and respond to the 2-TD stimulation.

Key words: *Helicoverpa armigera*; broad-complex (*BR-C*); gene; prokaryotic expression; 2-tridecanone; growth and development

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 属鳞翅目夜蛾科, 是一种具有较强繁殖能力的多食性农业害虫, 主要为害棉花的幼叶和棉铃 (Tabashnik et al., 2009)。草食性昆虫在取食过程中会遇到一系列植物次生物质, 2-十三烷酮 (2-tridecanone, 2-TD) 是存在于茄科植物体内的一种重要次生物质, 在叶片中的浓度高达 0.386%, 且能诱导昆虫中肠和脂肪体内多种解毒酶过量表达 (于彩虹等, 2002), 并提高对溴氰菊酯的耐受性 (高希武等, 1998; 李永强等, 2012; 唐涛等, 2013)。高希武 (1995) 和董钧锋等 (2002) 报道 2-TD 等植物次生物质可以诱导昆虫体内细胞色素 P450 的过表达, 导致昆虫对外界胁迫包括杀虫剂在内的有毒物质产生耐受性, 是昆虫抗药性产生的原因之一。因此, 深入研究 2-TD 对昆虫的作用机理及昆虫对其的响应机制对于绿色防控棉铃虫等害虫至关重要。

广泛锌指复合物基因 (*broad complex*, *BR-C*), 作为蜕皮激素 (20-hydroxyecdysone, 20E) 的早期应答基因参与调控昆虫的多种生长发育过程, 包括胚胎发生 (Erezyilmaz et al., 2009)、翅发育 (Deng et al., 2015)、神经系统发育 (Spokony & Restifo, 2009) 及卵发育 (Yang et al., 2014) 等生物学过程。该基因的转录受 20E 核受体 (ecdysone receptor, EcR) 和超气门蛋白 (ultraspiracle, USP) 的直接调控 (Buszczak & Segraves, 2000; Fang et al., 2005; Piulachs et al., 2010)。Nishita & Takiya (2006) 研究发现家蚕 *Bombyx mori* *BR-C* 基因的启动子区有 2 个转录起始位点, 即远端的启动子和近端的启动子, 但只有远端启动子区有 2 个 20E 应答元件, 能够与 EcR/USP 复合体直接结合, 进而激活 *BR-C* 基因的转录表达 (Nishita, 2014), 实现对蜕皮和变态发育时期昆虫各组织的调控, 如果蝇唾腺经 20E 处理后, 其体内 *BR-C* 基因的过量表达, 进而能显著上调细胞凋亡因子 *Drice* 基因表达 (Kilpatrick et al., 2005)。与 20E 直接诱导 *BR-C* 基因不同, 保幼激素 (juvenile hormone,

JH) 通过启动转录因子 Kr-h1 的表达而抑制 *BR-C* 基因的表达, 进而阻断 20E 信号通路 (Minakuchi et al., 2009; Charles et al., 2011), 如摘除昆虫体内合成 JH 的咽侧体后保幼激素含量降低, 低浓度的保幼激素可以促进 *BR-C* 基因表达, 进而导致幼虫提前进入蛹期; 而利用外源合成的 JH 处理摘除咽侧体的幼虫后, 其体内 *BR-C* 基因的表达明显被抑制, 导致幼虫进入蛹期滞后 (Reza et al., 2004; Muramatsu et al., 2008)。综上所述, *BR-C* 基因介导了昆虫体内蜕皮激素和保幼激素之间的信号交流, 在昆虫的生长发育和变态过程中发挥着重要作用。

本课题组前期研究证实 2-TD 可以诱导棉铃虫中肠组织中 P450 *CYP6B6* 基因的过量表达 (Liu et al., 2006), 通过对 2-TD 处理不同时间后棉铃虫 6 龄幼虫中肠转录组分析, 得到一个能响应 2-TD 诱导的基因, 即棉铃虫 *BR-C Z2* 基因 (赵洁等, 2019)。目前, 关于 *BR-C* 基因的研究主要集中于模式昆虫中, 而关于害虫尤其是棉铃虫 *BR-C Z2* 基因的相关研究较少。为探究 *BR-C Z2* 基因在棉铃虫生长发育过程中的作用, 本研究拟通过克隆获得棉铃虫中肠的 *BR-C Z2* 基因, 利用原核表达系统成功表达其融合蛋白, 并用实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, qRT-PCR) 技术检测 *BR-C Z2* 基因在棉铃虫不同发育阶段、6 龄幼虫不同组织中的表达以及外源植物次生物质 2-TD 处理棉铃虫 6 龄幼虫后其中肠内 *BR-C Z2* 基因表达量的变化, 以期后续基因功能验证和棉铃虫响应 2-TD 诱导的代谢通路提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试昆虫: 棉铃虫为新疆生物资源基因工程重点实验室长期饲养种群 (Liu et al., 2006), 于温度 (26±2)℃、相对湿度 (65±5)%、光周期 16 L: 8 D 的养虫室内用人工饲料饲养, 收集 24 h 内产的卵、生长

状态良好且大小一致的1~6龄幼虫、蛹和成虫供试。

LB(Luria-Bertani)液体培养基:胰蛋白胨10 g、酵母抽提物5 g、NaCl 10 g,蒸馏水定容至1 L,pH 7.0~7.5。

人工饲料:将玉米粉120 g、黄豆粉40 g、琼脂15 g加入到600 mL蒸馏水中,在高压蒸汽灭菌锅121℃下煮沸30 min,即组分1;将山梨酸1 g、对羟基基本甲酸酯2 g、酵母浸粉12 g、肌醇0.2 g、维生素片4 g、纽崔莱1片溶解到20 mL蒸馏水中,即组分2,待组分1降到40℃时加入组分2,搅拌均匀,凝固后备用。

试剂:表达载体pET32a由本课题组前期于-80℃保存;TRIzol Up Plus RNA Kit RNA提取试剂盒、PerfectStart Green qPCR SuperMix Kit荧光定量试剂盒、pEASY-T1 Simple Vector Kit克隆载体、大肠杆菌*Escherichia coli* Trans1-T1、BL21(DE3)感受态细胞、蛋白Marker、一抗(鼠抗His-Tag)、二抗(HRP标记的羊抗鼠IgG)和蛋白纯化镍料,北京全式金生物技术有限公司;DNA Marker、*Bam*H I、*Xho* I限制性核酸内切酶、T4 DNA连接酶和反转录试剂盒,宝生物工程(大连)有限公司;胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒,瑞士OMEGA公司;2-TD,上海拜力生物科技有限公司;辣根过氧化氢酶DAB显色试剂盒,北京中杉金桥生物技术有限公司;纽崔莱和维生素片,美国安利公司;其他化学试剂均为国产分析纯。

仪器:C1000™ Thermal Cycler PCR仪、Quantstudio™ 3 Real-Time PCR仪和Nano Drop 1000微量紫外可见分光光度计,美国Thermo Fisher公司;Gel Doc™ XR with Image Lab™ Software凝胶成像仪和Microfuge 22R® Centrifuge离心机,美国贝克曼库尔特公司;JY92-2D超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;PS 301电泳仪,美国通用电气公司。

1.2 方法

1.2.1 棉铃虫BR-C Z2基因的克隆及序列分析

根据本课题组前期转录组数据所提供的序列(赵洁等,2019),在NCBI数据库预测其开放阅读框,并利用Primer Premier 5.0软件设计该基因开放阅读框区的特异性引物*HaBR-C-F*和(5'-CGCGGATC-CATGGTGGACACACAACACTTC-3')/*HaBR-C-R*(5'-CGCTCGAGCTAAAAAATCGTATTTGATCT-GTC-3'),引物中下划线分别表示*Bam*H I和*Xho* I酶切位点,所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

挑选大小一致、健康良好的棉铃虫6龄幼虫,将

其置于冰上冰冻麻痹,在玻璃皿中倒入预冷的磷酸盐缓冲液,用1只解剖镊固定棉铃虫头部,另1只小心地将幼虫的头部摘掉,轻轻地拉出整个肠道获得中肠样品。按照TRIzol Up Plus RNA Kit试剂盒说明书提取中肠总RNA,用分光光度计检测总RNA的浓度和纯度。取1 μg总RNA按照两步法程序反转合成cDNA,于-80℃保存备用。采用PCR技术扩增棉铃虫BR-C基因序列,20 μL PCR反应体系:cDNA 1 μL、浓度为10 μmol/L的*HaBR-C-F*和*HaBR-C-R*引物各0.5 μL、ddH₂O 14.2 μL、10×*Ex Taq* Buffer 2 μL、dNTP Mix 1.5 μL、*Ex Taq*酶0.3 μL。PCR反应程序:95℃预变性4 min;95℃变性30 s,63℃退火30 s,72℃延伸90 s,35个循环;72℃再延伸10 min。经1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,其余产物切胶回收后与克隆载体pEASY-T1 Simple Vector连接,转化至大肠杆菌Trans-T1感受态细胞,挑取单克隆进行菌液PCR鉴定,PCR反应体系和反应程序同上。将鉴定正确的阳性单克隆送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。为验证克隆得到的棉铃虫BR-C基因序列的可靠性,利用BLAST工具将其与GenBank数据库中的其他物种相关序列进行同源性序列比对。

1.2.2 棉铃虫BR-C Z2蛋白的氨基酸序列分析

采用EXPASy-ProtScale(<https://web.expasy.org/protscale/>)对棉铃虫BR-C Z2进行蛋白质理化性质分析,DNAMAN 6.0软件进行氨基酸的多序列比对分析。在GenBank数据库下载已发表的其他昆虫的BR-C氨基酸序列,使用MEGA 7.0软件采用Clustal X分析和邻接法构建系统发育树,1 000重复检验。用SMART软件(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)分析BR-C Z2功能结构域;根据其氨基酸组成使用PSORTII 3.0软件(<https://www.genscript.com/psort.html>)预测BR-C Z2蛋白质的亚细胞定位;采用SABLE(<http://sable.cchmc.org/>)软件预测棉铃虫BR-C Z2蛋白二级结构的主要分布形式;用SWISS-MODEL(<http://www.expasy.ch/swissmod/swiss-model.html>)软件预测BR-C Z2蛋白的三级结构。

1.2.3 棉铃虫BR-C Z2蛋白的原核表达及纯化

利用限制性核酸内切酶*Bam*H I和*Xho* I酶切克隆质粒*HaBRC-Z2/pEASY-T1*和*pET32a*空载体,分别回收目的片段和酶切片段,用T4 DNA连接酶将目的片段和酶切片段连接,并转化到大肠杆菌Trans1-T1感受态细胞中,采用PCR技术筛选菌液中阳性重组子,反应体系和反应程序同1.2.1。对重组

质粒pET32a-HaBRC-Z2进行双酶切鉴定,将鉴定正确的重组质粒pET32a-HaBRC-Z2转化至大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞中,对菌液进行PCR检测以筛选阳性单克隆,反应体系和反应程序同1.2.1。将阳性克隆接种到LB液体培养基中,于37℃、200 r/min条件下培养,当波长600 nm处的吸光度为0.4~0.6时,取出1 mL作为诱导前的样品,向剩下的样品中加入异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG),使其终浓度为0.5 mmol/L,于37℃下继续培养4~5 h,1 000 r/min下离心10 min收集重组菌体,沉淀用pH 7.0的1×PBS缓冲液重悬,超声破碎至相对透亮,分别获得上清液和沉淀。重组菌体的诱导前、诱导后、超声处理的沉淀和上清液同时用15%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)进行检测。将总蛋白转印至硝酸纤维素膜上,用5%脱脂奶粉封闭液于37℃下封闭2 h,加入含有抗HIS标签的鼠单克隆抗体的封闭液(体积比为1:1 000)室温孵育2 h,吐温磷酸缓冲液洗涤5次,每次5 min;加入含有辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG抗体的封闭液(体积比为1:4 000)室温孵育1.5 h,吐温磷酸缓冲液洗涤5次,每次5 min;最后用DAB试剂盒进行显色,时间为10 min,拍照观察。取1 L重组菌株pET32a-HaBR-C Z2进行诱导和超声,加入8 mol/L尿素在4℃过夜变性,取上清液与Ni-NTA柱结合,分别用浓度为20、20、50、100、100、200和200 mmol/L的咪唑溶液去除杂蛋白,15% SDS-PAGE检测蛋白纯化时的流出液。

1.2.4 棉铃虫BR-C Z2基因的表达模式分析

分别取棉铃虫卵100粒、1龄幼虫30头、2龄幼虫20头、3、4、5和6龄幼虫及蛹各6头、雌成虫3头以及6头6龄幼虫的头部、体壁、脂肪体及中肠组织,提取总RNA及反转录合成cDNA用于qRT-PCR扩增。根据棉铃虫BR-C Z2的开放阅读框序列设计qRT-PCR引物HaBR-C Z2-QF(5'-TGCGGGAAGGTTCTGTGC-3')/HaBR-C Z2-QR(5'-CCTGTCCTCGACTTGTGGTAC-3'),以棉铃虫 β -actin基因(β -actin-QF: 5'-TGCGGGAAGGTTCTGTGC-3'; β -actin-QR: 5'-CCTGTCCTCGACTTGTGGTAC-3')为内参基因进行qRT-PCR。采用PCR检测qRT-PCR引物条带的单一性,20 μ L PCR反应体系:dNTP 1.5 μ L、10×Ex Taq Buffer 2 μ L、浓度为10 μ mol/L的HaBR-C Z2-QF/HaBR-C Z2-QR各0.5 μ L、Ex Taq聚合酶0.2 μ L、模板1 μ L、ddH₂O 14.3 μ L;PCR反应程序:95℃预变

性4 min;95℃变性30 s,58℃退火30 s,72℃延伸30 s,35个循环;72℃再延伸10 min。qRT-PCR 20 μ L反应体系:RNase-free H₂O 8 μ L、2×PerfectStart™ Green qPCR SuperMix 10 μ L、ROX校正液0.4 μ L、浓度为10 μ mol/L的HaBR-C Z2-QF/HaBR-C Z2-QR引物各0.3 μ L、cDNA 1 μ L。qRT-PCR反应程序:95℃预变性2 min;95℃变性30 s,58℃退火30 s,72℃延伸30 s,40个循环。按照2^{- $\Delta\Delta$ CT}方法计算棉铃虫BR-C Z2基因的相对表达量。每个样品设3个生物学重复和2个技术重复。不同发育阶段和不同组织中棉铃虫BR-C Z2基因表达量分别以卵期和中肠中的表达量为参照。

1.2.5 棉铃虫BR-C Z2基因对2-TD响应的测定

称取4 g 2-TD溶于1 mL蒸馏水中,将溶解后的2-TD混入200 g人工饲料中制成浓度为20 mg/g的饲料,用正常饲料依次从高到低稀释,最终配制成浓度分别为5、10、15和20 mg/g的饲料。选取大小一致、健康的1日龄棉铃虫6龄幼虫,饥饿2 h后,将含2-TD不同浓度的人工饲料切成20 mm×10 mm×4 mm的长条用于饲喂棉铃虫,以饲喂不添加2-TD的人工饲料为对照。分别于处理6、12、20、30和48 h时取样,每个时间设3个生物学重复,每个生物学重复取6头棉铃虫中肠,采用qRT-PCR方法检测不同浓度处理后棉铃虫BR-C Z2基因的相对表达量,方法同1.2.4。

1.3 数据分析

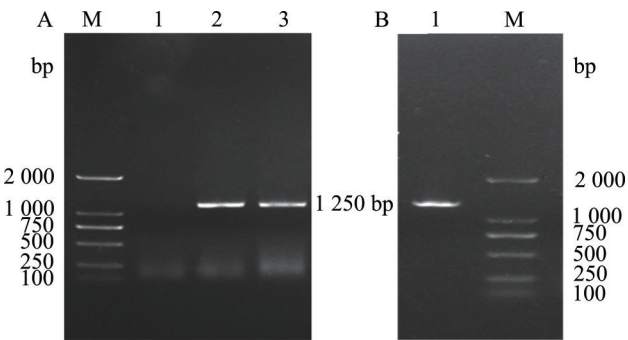
采用SPSS 16.0软件对试验数据进行统计分析,应用Duncan氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 棉铃虫BR-C Z2基因的克隆及序列分析

以棉铃虫6龄幼虫中肠组织cDNA为模板扩增出1 250 bp大小的单一条带(图1-A),胶回收产物与目的条带大小一致(图1-B)。获得的棉铃虫BR-C Z2开放阅读框为1 257 bp,编码418个氨基酸,该蛋白在N端第22~117位氨基酸处具有保守的BTB结构域,C端具有2个C2H2锌指结构域(图2)。在NCBI数据库中进行比对,发现棉铃虫BR-C Z2蛋白的氨基酸序列与棉铃虫基因组中的广泛锌指核心蛋白异构体X3(GenBank登录号为XM_021344097.1)的氨基酸序列完全一致。进化树结果显示,现已发表的所有昆虫BR-C蛋白被聚为2大类,I类包括常见的BR-C Z1~BR-C Z4,II类仅包括棉铃虫BrZ7,棉铃虫BR-C蛋白与其他昆虫的BR-C Z2聚为一

类,且与家蚕BR-C Z2蛋白的亲缘性较高,序列相似性为79.63%(图3)。



M: DNA 分子量标准。图 A 中 1: 阴性对照; 图 A 中 2~3: 退火温度为 63℃ 的 PCR 产物; 图 B 中 1: 切胶回收产物。M: DNA marker; 1 in Fig. A: negative control; 2~3 in Fig. A: PCR products under the annealing temperature 63℃; 1 in Fig. B: product of gel extraction.

图1 棉铃虫 *BR-C Z2* 基因克隆产物 PCR 扩增(A)和切胶回收产物(B)电泳图
Fig. 1 Electrophoresis of amplified PCR fragments (A) and products of gel extraction (B) of *BR-C Z2* gene of *Helicoverpa armigera*

```
1  ATGGTGGACACAACTTCTGCCTCCGGTGGAACTACCAGAGCAGCATACCAGC
1  M V D T Q H F C L R W N N Y Q S S I T S
61  GCCTTCGAGAACCTGCGAGATGATGAGGACTTGTGATGTACCCCTGCGCTGTATGGC
21  A F E N L R D D E D F V D V T L A C D G
121 AAGAGCTTGAAGGCCATAGAGTGGTCTTGTGCGCTTGACGCCGATATTTAGGGAGCTG
41  K S L K A H R V V L S A C S P Y F R E L
181 TTAAGTCAACACCATGCAAGCACCGAGTGTGCTCCAAGACGTGGCGTTTACTGAT
61  L K S T P C K H P V I V L Q D V A F T D
241 CTTACGCGTTGGTGGAGTTCATCTACCATGGAGAGGTGAACGTGCATCAGAGGAGCCG
81  L H A L V E F I Y H G E V N V H Q R S L
301 TCTTCGTTCTCAAGACAGCTGAGGTGCTTCGCGTGTGGGGCTGACGCATAATGATAAT
101 S S F L K T A E V L R V S G L T H N D N
361 GCTCAGGGGCCACTACTGACGCCGATGCGGGCTCCGTCAAGACATCCCGCACACGCCG
121 A Q G P L L Q P M R A P S T T S P H T P
421 CCCACTCAGCCACAGCAGCAGCATCAGCCAGCTCCCTCTACGACGGCTGGAAGAA
141 P H S A H S T H I S H A P S Y D R L E E
481 GGCCTGCTGACGCCACATCTCAAGCGTGCAGAGTCTATGGCGCAACCCCTCTCCCG
161 A L L Q P T S S S V Q Q L M R R T P L P
541 CCGCGCGCCTCAGCGCTCAGCGGACACAGCCAGAGTCAACAGCCCTCTGTAC
181 P R R L S R S A D N S P D V I K R P R H
601 GACAATAACAAGCAACACCCAGATCCATGCTACCGACTTTCCACCAAGAACAATACT
201 D N N N E Q P Q I H A T D F S T K N N T
661 CATAGTCGCATGAGACGGGAAACAATGGGAATGGCATTCCAACAGCAGCTCGTCCCA
221 H S R H E T G N N G N G I S N S S S S P
721 TCTCCTCGGCTGATCGATGAAGTAAAGATGAGCGATTGATATGTGCTCGTCTTGAAC
241 S P R L I D E V K N E P I D M C P S S N
781 CCGGATATTGATAGGAGCAGGATGATACGCCGCTCATCATAGACCACTTGGAGGG
261 P D I D R S T D D T P P H H H R P L G G
841 GGCCCGCGCTCCCGCGGAGCTCGGCGATGCTGAGGAGTGCACGCCGCAACCGCACCG
281 G P P S R G S S A D A E E C T P P P H P
901 CCGCCCTTCATACAGCTCCGGAACCAAGCTCTCAACCGGCGAATACATACAACATT
301 P P F I Q P P E T K L F N P A N T Y N F
961 CCCATGGACGCACTGACGCATCCCTCTTTGACTGGTCTGCAAAGTCCATTGACTCGGAC
321 P M D A L T H P S L T G L Q S P L T P D
1021 GGCATCGCAAGTACTTCCAAGTAAAAAGTATTACGTGCACGTTATGCGGGAAGTT
341 G I A S T S Q G K K V F T C T L C G K V
1081 CTGTGCTCAAAGGCGTGTGAAGCGGCATATCGCTGACAAACATGCCGAGAGACAAGAG
361 L C S K A S L K R H I A D K H A E R Q E
1141 GAGTACGATGAATATATGTGAGAGGTGTACTGCTCCGGAACCTCCGTATGACCCAC
381 E Y R C N I C E R V Y C S R N S L M T H
1201 ATATACACGTACCAAGTGGAGACAGGGAGACAGATCAAAATACGATTTTTTTAG
401 I Y T Y H K S R T G E T D Q I R F F *
```

: 终止密码子; 划线: BTB 结构域; 灰色阴影: 锌指结构域。: Stop codon; underlined: BTB domain; gray shadowed: Zn finger domain.

图2 棉铃虫 *BR-C Z2* 基因的核苷酸序列和氨基酸序列
Fig. 2 Nucleotide and amino acid sequences of *BR-C Z2* gene of *Helicoverpa armigera*



图3 基于蛋白序列采用邻接法构建棉铃虫BR-C Z2氨基酸序列与其他物种BR-C氨基酸序列的系统进化树

Fig. 3 Construction of the phylogenetic tree of BR-C Z2 from *Helicoverpa armigera* and BR-C from other species based on the protein sequences using the neighbor joining method

2.2 棉铃虫BR-C Z2蛋白的结构及氨基酸序列分析

棉铃虫BR-C Z2蛋白分子量为46.63 kD,理论等电点为6.94;其蛋白序列中丝氨酸、脯氨酸和亮氨酸含量较高,分别为11.0%、9.6%和7.9%。不稳定系数为59.81,总平均亲水性为-0.724,该蛋白属于不稳定的亲水性蛋白。二级结构预测显示,该蛋白53.35%的序列为无规则卷曲,延伸链占14.11%, α -螺旋占25.60%, β -转角占6.94%,说明棉铃虫BR-C Z2蛋白质中大部分氨基酸处于一个比较有序的结构中;棉铃虫BR-C Z2蛋白三级结构预测显示,54.00%的序列处于无序状态,第7~118位氨基酸残基处于最佳有利区域,以最匹配模板人的B细胞淋巴瘤6蛋白BCL6建模,发现最佳匹配区域是棉铃虫BR-C Z2蛋白序列的BTB结构域。棉铃虫BR-C Z2蛋白有27个O-糖基化位点和1个N-糖基化位点(235位的NSSS),定位于细胞核的概率最高,达91.3%,其次是细胞质和线粒体中,都是4.3%,说明棉铃虫BR-C Z2蛋白发挥其生物学功能的主要场所是细胞核。

2.3 重组蛋白His-HaBR-C Z2的表达及纯化

将HaBRC-Z2/pEASY-T1和pET32a空载体分别用BamH I和Xho I酶切回收,连接并转化至Trans1-T1感受态细胞,将验证正确的pET32a-HaBR-C Z2质粒转到BL21菌株中,获得重组菌株。SDS-PAGE结果显示表达蛋白大小约为66.6 kD且主要以包涵体的形式存在(图4-A);Western blot结果表明该融合蛋白能与抗His-Tag的单克隆抗体特

异性免疫反应(图4-B),表明融合蛋白His-HaBR-C Z2成功表达。将重组菌大量诱导后用镍柱-咪唑系统对融合蛋白进行纯化,结果显示200 mmol/L咪唑洗涤第2次后出现与目的蛋白大小相符的单一一条带(图4-C)。

2.4 棉铃虫各发育阶段和组织中BR-C Z2基因的表达

棉铃虫体内BR-C Z2基因在整个发育期均有表达,从5龄幼虫期开始其相对表达量逐渐上升,蛹期时其相对表达量达到最高,为卵期相对表达量的28.9倍,但到成虫期时,其表达量又急剧下降,与5龄幼虫期的相当(图5-A)。BR-C Z2基因在棉铃虫6龄幼虫的各组织中均有表达,其中在中肠中其相对表达量最高,为脂肪体中相对表达量的5.1倍,其次是头部和体壁,在脂肪体中的相对表达量最低(图5-B)。

2.5 棉铃虫BR-C Z2基因表达及对2-TD的响应

5、10、15和20 mg/g浓度处理6 h后,棉铃虫中肠内BR-C Z2基因相对表达量均显著低于对照($P < 0.05$),但4者之间差异不显著;处理12、20和30 h后,BR-C Z2基因相对表达量均随2-TD浓度增加呈先上升后下降的趋势,分别当浓度为15、5和5 mg/g时BR-C Z2基因相对表达量最高,分别为对照的2.5倍、1.0倍和1.99倍,且5、10、15和20 mg/g浓度处理12 h和30 h后,BR-C Z2基因相对表达量均高于对照,而20 mg/g浓度处理20 h后,BR-C Z2基因相对表达量最低,为对照的45.13%;5、10、15和20 mg/g浓度处理48 h后,BR-C Z2基因相对表达量均低于对照(图6)。

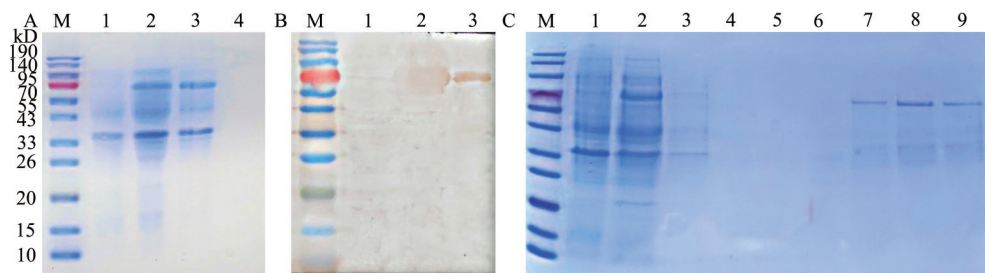


图4 融合蛋白 His-HaBR-C Z2 的诱导表达和纯化
A: SDA-PAGE 检测融合蛋白的表达; B: Western blot 验证; C: SDS-PAGE 检测融合蛋白的纯化。M: 标准蛋白; 图 A 中 1~4: 重组菌体诱导前、诱导后、诱导后沉淀及上清; 图 B 中 1~3: 重组菌体诱导前、诱导后和包涵体; 图 C 中 1~9: 重组菌体诱导前、流出液及用浓度为 20、20、50、50、100、100、200 和 200 mmol/L 咪唑分别洗涤的总蛋白。A: Analysis of expressed fusion proteins by SDS-PAGE; B: Western blot analysis; C: analysis of purified fusion proteins by SDS-PAGE. M: Protein marker; 1~4 in Fig. A: total proteins of BL21(DE3)-pET32a-HaBR-C Z2 strains without and with IPTG induced, induced supernatant, induced precipitation; 1~3 in Fig. B: BL21(DE3)-pET32a-HaBR-C Z2 strains without and with IPTG induced, inclusion bodies; 1~9 in Fig. C: BL21(DE3)-pET32a-HaBR-C Z2 strain without IPTG induced, flow-through liquid, wash of total protein with 20, 20, 50, 50, 100, 100, 200 and 200 mmol/L imidazole.

图4 融合蛋白 His-HaBR-C Z2 的诱导表达和纯化

Fig. 4 Prokaryotic expression and purification of His-HaBR-C Z2

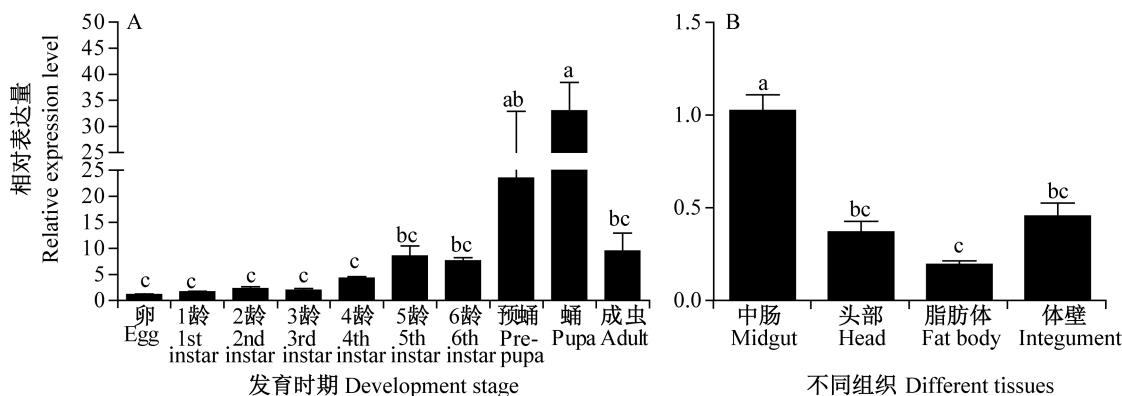


图5 棉铃虫不同发育时期(A)及6龄幼虫不同组织中(B) *BR-C Z2* 基因的相对表达量

Fig. 5 Relative expression levels of *BR-C Z2* gene in different developmental stages (A) and tissues (B) of the 6th instar larvae of *Helicoverpa armigera*

图中数据为平均数±标准差。不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著。Data in the figure are mean±SD. Different lowercase letters indicate significant difference at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

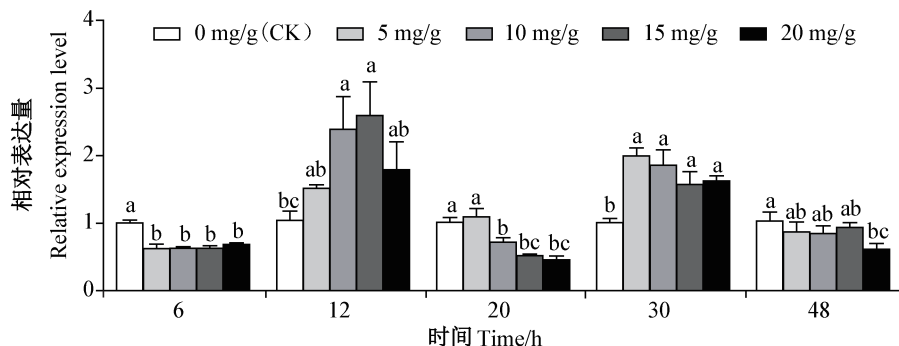


图6 2-十三烷酮不同剂量处理后棉铃虫体内 *BR-C Z2* 基因的相对表达量

Fig. 6 Relative expression levels of *BR-C Z2* gene of *Helicoverpa armigera* under different doses of 2-tridecanone

图中数据为平均数±标准差。不同小写字母表示相同时间不同处理之间经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著。Data in the figure are mean±SD. Different lowercase letters indicate significant difference among different treatments at the same time at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

3 讨论

转录因子BR-C作为20E的早期应答基因,其在昆虫的变态发育中发挥着重要作用(Hitrik et al., 2016)。转录因子BR-C mRNA选择性剪接形式不同,所以不同昆虫的BR-C异构体数量也不同,如在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 鉴定到BR-C Z1、BR-C Z2、BR-C Z3和BR-C Z4四种不同的异构体(Dibello et al., 1991; Bayer et al., 1996);但在家蚕中仅鉴定到BR-C Z1、BR-C Z2和BR-C Z4三种异构体(Ijro et al., 2004);在赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 中BR-C异构体多达5种(Konopova & Jindra, 2008; Suzuki et al., 2008);而在德国小蠊 *Blattella germanica* 中已经鉴定到6种BR-C异构体(Piulachs et al., 2010)。本研究克隆获得了棉铃虫BR-C基因的全长编码序列,与其他鳞翅目昆虫的BR-C蛋白类似,该蛋白具有与蛋白质互作的BTB结构域和转录调控的锌指结构域(Ijro et al., 2004)。本研究结果显示棉铃虫BR-C蛋白定位于细胞核中的可能性最高,具有20个潜在的磷酸化位点,能被蛋白激酶A和蛋白激酶C磷酸化。而家蚕BR-C蛋白有12个磷酸化位点,丝氨酸373位点和苏氨酸406位点的磷酸化修饰可以引导家蚕BR-C蛋白进入细胞核(Cheng et al., 2014)。系统发育树结果显示棉铃虫BR-C蛋白与其他昆虫的BR-C Z2异构体聚为一类,且与家蚕的BR-C Z2聚为一支,表明两者亲缘关系最近,蛋白序列相似度为79.63%。

BR-C基因的每个亚型都有其自身的组织和时间特异性(Riddiford et al., 1994)。果蝇BR-C基因主要在唾液腺、表皮和中枢神经系统中表达,且从幼虫到蛹期均有表达(Zhou & Riddiford, 2002; Spokony & Restifo, 2009)。本研究结果显示BR-C Z2基因在棉铃虫不同发育阶段均有表达,其中在蛹期的相对表达量最高,其次是预蛹期。BR-C基因在家蚕和兰州熊蜂 *Bombus lantschouensis* 蛹期的表达量也明显高于在幼虫期的表达量(Wang et al., 2009; Zhen et al., 2018; Cong et al., 2020)。这可能是因为昆虫的预蛹期是幼虫至蛹的过渡阶段,也是参与变态发育所需相关激素变化较大的时期(Zhao et al., 2006)。同时棉铃虫BR-C Z2基因表达也存在组织差异性,其在棉铃虫6龄幼虫头部、脂肪体、中肠和体壁中均有表达,且在中肠中相对表达量最高。BR-C基因同样在舞毒蛾 *Lymantria dispar* 中肠中高表达,其参与舞毒蛾的蜕皮和组织重构过程(丁楠,

2020)。对于大多数昆虫幼虫来说,中肠组织是消化食物、吸收养分和能量代谢的主要器官,随着幼虫的发育其结构有很大的变化(张翠红等, 2007; 童丹丹等, 2013)。因此,棉铃虫BR-C Z2基因可能也受20E的调控,参与幼虫蜕皮及变态发育时组织重构过程。

在协同进化的过程中,植物和昆虫为了彼此适应保留了复杂而精细的防御机制,植物为了抵御食草性昆虫的取食,不仅具有物理防御机制而且还可以合成一系列有毒化合物,而食草性昆虫则通过体内的解毒系统降低植物次生物质的毒害作用(Zhao et al., 2020)。2-TD作为一种植物次生物质,不仅可以抵抗昆虫取食(于彩虹等, 2002),也可以影响昆虫的激素代谢,如2-TD能刺激草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 体内蜕皮激素20-单加氧酶的活性(Yu, 1995)。本研究结果显示不同浓度2-TD处理后棉铃虫6龄棉铃虫体内BR-C Z2基因作出响应,其表达量随时间的延长呈先降低后升高的趋势。Zhang et al. (2016)研究报道,2-TD可以诱导P450酶系中与20E代谢相关的基因CYP314A1、CYP315A1、CYP18A1、CYP307A1和CYP306A1表达,导致20E浓度降低,影响幼虫体重,阻止幼虫向蛹转化。而BR-C基因位于20E应答的早期,其含量随20E滴度的变化而变化(Ou & King-Jones, 2013)。因此,推测2-TD处理后可能先引起棉铃虫幼虫体内20E的变化,进而通过BR-C Z2基因以转录调控的方式将20E信号传导到靶基因,通过调控中肠和脂肪体内解毒酶的表达来提高其对植物次生物质的解毒能力。

本研究克隆了棉铃虫BR-C Z2基因,明确了其在棉铃虫不同发育阶段和不同组织中的差异表达以及2-TD处理对其转录水平的影响,探讨了BR-C Z2基因在棉铃虫解毒代谢途径和激素代谢途径中的潜在作用。下一步将深入研究棉铃虫BR-C Z2基因的功能及其调控机理,以期有效控制棉铃虫提供新靶标。

参 考 文 献 (References)

- Bayer CA, Holley B, Fristrom JW. 1996. A switch in broad-complex Zinc-finger isoform expression is regulated post transcriptionally during the metamorphosis of *Drosophila* imaginal discs. *Developmental Biology*, 177(1): 1-14
- Buszczak M, Segraves WA. 2000. Insect metamorphosis: out with the old, in with the new. *Current Biology*, 10(22): 830-833
- Charles JP, Iwema T, Epa VC, Takaki K, Rynes J, Jindra M. 2011. Ligand-binding properties of a juvenile hormone receptor, metho-

- prene-tolerant. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108(52): 21128–21133
- Cheng DJ, Qian WL, Wang YH, Meng M, Wei L, Li ZQ, Kang LX, Peng J, Xia QY. 2014. Nuclear import of transcription factor BR-C is mediated by its interaction with RACK1. PLoS ONE, 9(10): e109111
- Cong JS, Tao CC, Zhang X, Zhang H, Cheng TC, Liu C. 2020. Transgenic ectopic overexpression of broad complex (BrC-Z2) in the silk gland inhibits the expression of silk fibroin genes of *Bombyx mori*. Insects, 11(6): 374
- Deng HM, Niu KK, Zhang JL, Feng QL. 2015. *BmBR-C Z4* is an upstream regulatory factor of *BmPOUM2* controlling the pupal specific expression of *BmWCP4* in the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 66: 42–50
- DiBello PR, Withers DA, Bayer CA, Fristrom JW, Guild GM. 1991. The *Drosophila* broad-complex encodes a family of related proteins containing zinc fingers. Genetics, 129(2): 385–397
- Ding N. 2020. Silencing *LdBr-C* impairs larval development and chitin synthesis in *Lymantria dispar* larvae. Master thesis. Harbin: Northeast Forestry University (in Chinese) [丁楠. 2020. *LdBr-C* 基因沉默对舞毒蛾幼虫生长发育及几丁质合成的影响. 硕士学位论文. 哈尔滨: 东北林业大学]
- Dong JF, Zhang JH, Wang CZ. 2002. Effects of plant allelochemicals on nutritional utilization and detoxication enzyme activities in two *Helicoverpa* species. Acta Entomologica Sinica, 45(3): 296–300 (in Chinese) [董钧锋, 张继红, 王琛柱. 2002. 植物次生物质对烟青虫和棉铃虫食物利用及中肠解毒酶活性的影响. 昆虫学报, 45(3): 296–300]
- Erezyilmaz DF, Rynerson MR, Truman JW, Riddiford LM. 2009. The role of the pupal determinant broad during embryonic development of a direct-developing insect. Development Genes and Evolution, 219(11): 535–544
- Fang F, Xu Y, Jones D, Jones G. 2005. Interactions of ultraspiracle with ecdysone receptor in the transduction of ecdysone-and juvenile hormone-signaling. The FEBS Journal, 272(7): 1577–1589
- Gao XW, Zhao Y, Wang X, Dong XL, Zheng BZ. 1998. Induction of carboxylesterase in *Helicoverpa armigera* by insecticides and plant allelochemicals. Acta Entomologica Sinica, 41(S1): 7–13 (in Chinese) [高希武, 赵颖, 王旭, 董向丽, 郑炳宗. 1998. 杀虫药剂和植物次生性物质对棉铃虫羧酸酯酶的诱导作用. 昆虫学报, 41(S1): 7–13]
- Gao XW. 1995. Toxicology and biochemistry of acetylcholinesterase (AChE) in *Helicoverpa armigera*.//Advances in plant protection research. Beijing: Beijing Science and Technology Press, pp. 327–334 (in Chinese) [高希武. 1995. 棉铃虫乙酰胆碱酯酶 (AChE) 的毒理学和生物化学.//植物保护研究进展. 北京: 北京科学技术出版社, pp. 327–334]
- Hitrik A, Popliker M, Gancz D, Mukamel Z, Lifshitz A, Schwartzman O, Tanay A, Gilboa L. 2016. Combap promotes ovarian niche development and chromatin association of EcR-binding regions in BR-C. PLoS Genetics, 12(11): e1006330
- Ijiri T, Urakawa H, Yasukochi Y, Takeda M, Fujiwara Y. 2004. cDNA cloning, gene structure, and expression of broad-complex (BR-C) genes in the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 34(9): 963–969
- Kilpatrick ZE, Cakouros D, Kumar S. 2005. Ecdysone-mediated up-regulation of the effector caspase drice is required for hormone-dependent apoptosis in *Drosophila* cells. Journal of Biological Chemistry, 280(12): 11981–11986
- Konopova B, Jindra M. 2008. Broad-complex acts downstream of met in juvenile hormone signaling to coordinate primitive holometabolite metamorphosis. Development, 135(3): 559–568
- Li YQ, An FQ, Su LD, Feng JT, Zhang X. 2012. Effects of two points mutations of esterases from *Helicoverpa armigera* on metabolic activities of three kinds of insecticides. Journal of Plant Protection, 39(3): 271–276 (in Chinese) [李永强, 安凤秋, 苏立德, 冯俊涛, 张兴. 2012. 棉铃虫酯酶两个位点突变对三种杀虫剂代谢活性的影响. 植物保护学报, 39(3): 271–276]
- Liu XN, Liang P, Gao XW, Shi XY. 2006. Induction of the cytochrome P450 activity by plant allelochemicals in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner). Pesticide Biochemistry and Physiology, 84(2): 127–134
- Piulachs MD, Pagone V, Bellés X. 2010. Key roles of the broad-complex gene in insect embryogenesis. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 40(6): 468–475
- Minakuchi C, Namiki T, Shinoda T. 2009. *Krüppel* homolog 1, an early juvenile hormone-response gene downstream of methoprene-tolerant, mediates its anti-metamorphic action in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. Developmental Biology, 325(2): 341–350
- Muramatsu D, Kinjoh T, Shinoda T, Hiruma K. 2008. The role of 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone in pupal commitment of the epidermis of the silkworm, *Bombyx mori*. Mechanisms of Development, 125(5/6): 411–420
- Nishita Y. 2014. Ecdysone response elements in the distal promoter of the *Bombyx mori* broad-complex gene, *BmBR-C*. Insect Molecular Biology, 23(3): 341–356
- Nishita Y, Takiya S. 2006. Differential usage of two promoters of the broad-complex gene in the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 36(10): 779–788
- Ou QX, King-Jones K. 2013. What goes up must come down: transcription factors have their say in making ecdysone pulses. Current Topics in Developmental Biology, 103: 35–71
- Piulachs MD, Pagone V, Bellés X. 2010. Key roles of the broad-complex gene in insect embryogenesis. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 40(6): 468–475
- Reza AMS, Kanamori Y, Shinoda T, Shimura S, Mita K, Nakahara Y, Kiuchi M, Kamimura M. 2004. Hormonal control of a metamorphosis-specific transcriptional factor broad-complex in silkworm. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 139(4): 753–761
- Riddiford LM, Hewes RS, Truman JW. 1994. Dynamics and metamorphosis of an identifiable peptidergic neuron in an insect. Journal of Neurobiology, 25(7): 819–830

- Spokony RF, Restifo LL. 2009. Broad complex isoforms have unique distributions during central nervous system metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Neurology*, 517(1): 15–36
- Suzuki Y, Truman JW, Riddiford LM. 2008. The role of Broad in the development of *Tribolium castaneum*: implications for the evolution of the holometabolous insect pupa. *Development*, 135(3): 569–577
- Tabashnik BE, van Rensburg JBJ, Carrière Y. 2009. Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory, and data. *Journal of Economic Entomology*, 102(6): 2011–2025
- Tang T, Zhao CQ, Feng XY, Liu XY, Qiu LH. 2013. Effects of RNAi-mediated silencing of several components of cytochrome P450 enzyme on beta cypermethrin toxicity against *Helicoverpa armigera*. *Journal of Plant Protection*, 40(4): 355–362 (in Chinese) [唐涛, 赵春青, 冯晓云, 刘雪源, 邱立红. 2013. RNAi介导的棉铃虫细胞色素P450酶系几种组分基因沉默对高效氯氰菊酯毒力的影响. *植物保护学报*, 40(4): 355–362]
- Tong DD, Wu YL, Zheng GL, Li CY. 2013. Research advances on insect midgut cell culture *in vitro*. *Journal of Environmental Entomology*, 35(3): 390–398 (in Chinese) [童丹丹, 吴艳蕾, 郑桂玲, 李长友. 2013. 昆虫中肠细胞的离体培养. *环境昆虫学报*, 35(3): 390–398]
- Wang HB, Nita M, Iwanaga M, Kawasaki H. 2009. β FTZ-F1 and broad-complex positively regulate the transcription of the wing cuticle protein gene, *BMWCP5*, in wing discs of *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39(9): 624–633
- Yang CW, Lin Y, Liu HL, Shen GW, Luo J, Zhang HY, Peng ZX, Chen EX, Xing RM, Han CS, et al. 2014. The broad complex isoform 2 (BrC-Z2) transcriptional factor plays a critical role in vitellogenin transcription in the silkworm *Bombyx mori*. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, 1840(9): 2674–2684
- Yu CH, Gao XW, Zheng BZ. 2002. Induction of the cytochrome P450 by 2-tridecanone in *Helicoverpa armigera*. *Acta Entomologica Sinica*, 45(1): 1–7 (in Chinese) [于彩虹, 高希武, 郑炳宗. 2002. 2-十三烷酮对棉铃虫细胞色素P450的诱导作用. *昆虫学报*, 45(1): 1–7]
- Yu SJ. 1995. Allelochemical stimulation of ecdysone 20-monooxygenase in fall armyworm larvae. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 28(4): 365–375
- Zhang CH, Cui WZ, Guo YK, Wang YW, Mu ZM. 2007. Ultrastructure changes and function of the midgut and salivary glands in *Bombyx mori* during the pupal-adult metamorphosis. *Acta Entomologica Sinica*, 50(8): 769–774 (in Chinese) [张翠红, 崔为正, 郭延奎, 王彦文, 牟志美. 2007. 家蚕蛹-成虫变态期中肠和涎腺超微结构变化与功能. *昆虫学报*, 50(8): 769–774]
- Zhang L, Lu Y, Xiang M, Shang QL, Gao XW. 2016. The retardant effect of 2-tridecanone, mediated by cytochrome P450, on the development of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *BMC Genomics*, 17(1): 954
- Zhao J, Wei Q, Gu XR, Ren SW, Liu XN. 2020. Alcohol dehydrogenase 5 of *Helicoverpa armigera* interacts with the CYP6B6 promoter in response to 2-tridecanone. *Insect Science*, 27(5): 1053–1066
- Zhao J, Wei Q, Ren SW, Liu XN. 2019. Cloning and expression profiling of the forkhead box protein A-like protein gene *HarmFoxA1* in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 62(6): 672–684 (in Chinese) [赵洁, 魏倩, 任苏伟, 刘小宁. 2019. 棉铃虫叉头框蛋白A类似蛋白基因 *HarmFoxA1* 的克隆及表达谱分析. *昆虫学报*, 62(6): 672–684]
- Zhao XF, He HJ, Dong DJ, Wang JX. 2006. Identification of differentially expressed proteins during larval molting of *Helicoverpa armigera*. *Journal of Proteome Research*, 5(1): 164–169
- Zhen CA, Yang HP, Luo SD, Huang JX, Wu J. 2018. Broad-Complex Z3 contributes to the ecdysone-mediated transcriptional regulation of the vitellogenin gene in *Bombus lantschouensis*. *PLoS ONE*, 13(11): e0207275
- Zhou XF, Riddiford LM. 2002. Broad specifies pupal development and mediates the ‘status quo’ action of juvenile hormone on the pupal-adult transformation in *Drosophila* and *Manduca*. *Development*, 129(9): 2259–2269

(责任编辑:张俊芳)