

• 农业生物技术 •

家蚕保幼激素结合蛋白 *Bmtol* 基因的克隆及功能分析

何石宝, 殷娅茹, 郑茜, 郭东东, 辛佳, 朱勇

西南大学 生物技术学院, 重庆 400715

何石宝, 殷娅茹, 郑茜, 等. 家蚕保幼激素结合蛋白 *Bmtol* 基因的克隆及功能分析. 生物工程学报, 2018, 34(1): 78–89.

He SB, Yin YR, Zheng X, et al. Expression and characterization of juvenile hormone binding protein *Bmtol* gene in silkworm, *Bombyx mori*. Chin J Biotech, 2018, 34(1): 78–89.

摘 要: 家蚕头部是一个神经中枢和感受的器官, 其头部含有触角和感觉毛, 感受外界的信号, 并将外界信号传送到大脑进行反应。保幼激素主要是由咽侧体合成和分泌的, 而保幼激素结合蛋白是保幼激素转运和发挥功能的载体, 在昆虫体内具有极其重要的功能。文中通过 SilkDB 和 NCBI 数据库筛选并鉴定到一个新的具有保幼激素结合蛋白家族保守结构的蛋白 BmTOL, 其编码基因编号为 BGIBMGA003404 (GenBank 登录号: KY681053)。利用原核表达系统成功表达了该蛋白, 通过 Ni-NTA 亲和层析的方法获得了 BmTOL 的重组蛋白并制备了多克隆抗体。组织表达分析发现无论是转录水平还是蛋白水平 BmTOL 在头部都是高量表达, 且 *Bmtol* 基因在起蚕时表达量较高, 在 5 龄和蛹期表达量较低, 而在化蛾后表达量又开始上调。免疫组化结果显示 BmTOL 蛋白定位在头部的皮层、触角和脑中, 推测其可能与头部信息传递有关, 为家蚕的生长发育和行为调控提供重要的信息来源。

关键词: 家蚕, 保幼激素结合蛋白, BmTOL, 免疫组化

Expression and characterization of juvenile hormone binding protein *Bmtol* gene in silkworm, *Bombyx mori*

Shibao He, Yaru Yin, Xi Zheng, Dongdong Guo, Jia Xin, and Yong Zhu

College of Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: The head of the silkworm is a nerve center and a sense organ, contains antennae and sensory hair, feels the outside signal, and responds to the external signal delivered to the brain. Juvenile hormone is mainly synthesized and secreted by corpora allata, and it needs to be played with the aid of the hormone binding protein, because the juvenile hormone binding protein is the carrier of juvenile hormone transport and plays a functional *in vivo*, they have an extremely important function in insects. The objective of this study is to screened and identify a novel BmTOL proteins that it has a conserved structure of the juvenile hormone binding protein family by SilkDB and NCBI database. Its coding gene number is BGIBMGA003404 (GenBank Accession No. KY681053). We also expressed the recombinant protein using the prokaryotic expression system, and then successfully purified the recombinant protein by Ni-NTA chromatography column to generate the polyclonal

Received: March 14, 2017; **Accepted:** June 7, 2017

Supported by: National Agricultural Science and Technology Achievements Transformation Foundation (No. 2012GB2F100376).

Corresponding author: Yong Zhu. Tel: +86-23-68251939; E-mail: zhuy@swu.edu.cn

国家农业科技成果转化资金项目 (No. 2012GB2F100376) 资助。

antibodies. The expression patterns analysis in various tissues showed that both in transcriptional and protein levels *Bmtol* was higher expressed in head. Furthermore, the expression level of *Bmtol* gene was higher in newly exuviated silkworm, and expression level of *Bmtol* gene was lower from at 3 days 5th instar to 7 days pupa, began to increase after the moth. Immunohistochemistry showed that BmTOL protein was localized in the cortex, antennae and brain of the head, It may be related to the information transmission of the head, and provides an important source of information for the growth and development of silkworm.

Keywords: *Bombyx mori*, juvenile hormone binding protein, BmTOL, immunohistochemistry

家蚕是一种鳞翅目昆虫的模式生物, 又是一种重要的经济昆虫, 在我国拥有相当长的饲养历史。同时, 家蚕又属于变态发育昆虫, 在整个生活发育史中要经历卵、幼虫、蛹、成虫 4 个阶段, 从幼虫到成虫的生长、发育等过程主要受到保幼激素 (Juvenile hormone, JH) 和蜕皮激素 (20-hydroxyecdysone, 20E) 的调控^[1]。家蚕激素 (保幼激素、蜕皮激素等) 的合成分泌器官、生物合成途径及对生长发育调控等的研究, 是 20 世纪内分泌学和昆虫发育生物学研究的典范^[2]。而保幼激素结合蛋白 (Juvenile hormone binding protein, JHBP) 是 JH 在体内转运和发挥功能的载体, 是 Takeout/JHBP 蛋白家族的一个总称^[3-5]。

Takeout (TO) 蛋白是昆虫独有的一类蛋白家族, 又称保幼激素结合蛋白 (Juvenile hormone binding protein, JHBP)。Sarov-Blat L 等^[6]首先在果蝇 *Drosophila melanogaster* 中被鉴定到该蛋白并命名 DmTO。*to* 基因家族是昆虫在长期进化过程中形成的, 为其独有的一个大的基因家族, 其编码的蛋白为分泌蛋白, 序列长度为 250 个氨基酸左右, 多数成员在 N 端有一段 18–23 个氨基酸残基的信号肽^[6-10]。而且 TO/JHBP 蛋白家族的多数成员在 N 端都有 2 个相当保守的 Cys 残基, 参与二硫键的形成, 且对配体结合能力也非常重要^[6-11], 但配体种类还未有明确报道。Hamiaux 等^[12]利用硫的单波长反常衍射 (Sulfur-single wavelength anomalous diffraction, S-SAD) 技术首次报道了雄性苹浅褐卷蛾 *Epiphyas postvittana* 中 EpTO1 的晶体结构, 该结构包含 4 个 α 螺旋和

5 个 β 折叠, Cys8 和 Cys15 形成一个二硫键, 连接于 N 末端和 $\alpha 1$ 螺旋的第一个弯曲, 并认为该部位是 TO 蛋白与配体结合的核心部位。2013 年, Fujimoto 等^[13]利用硒代蛋氨酸的单波长反常衍射技术对家蚕 JHBP 的结构进行了研究, 并构建了晶体模型, 发现与其他昆虫 TO 蛋白家族的结构极其相似。在物种中 TO 和 Takeout-like (TOL) 都属于 TO/JHBP 蛋白家族成员, 它们之间都有相同保守的结构域。

to 基因在昆虫体内的表达也具有组织特异性, 比如, Sarov-Blat 等^[6]利用原位杂交技术发现 *to* 基因主要在果蝇的前胃和嗦囊中有高量表达, 在脑和触角中也有表达。Dauwalder 等^[8]通过原位杂交发现 *to* 在雌果蝇的头部和脂肪体中没有出现, 只在雄果蝇的头部和脂肪体中分布。Du 等^[9]通过原位杂交发现在烟草天蛾 *Manduca sexta* 5 龄 2 d 幼虫的头部、胸及腹部表皮中表达, 而其他组织中均没有被检测到。Justice 等^[14]在研究冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 时发现 TOL 蛋白主要在触角中表达。Bohbot 和 Vogt 在埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 雄性的触角中分离出 *to* 基因^[15]。Fujikawa 等^[10]通过蛋白印迹发现 TOL 蛋白在黑花蝇 *Phormia regina* 的触角和下唇须中高表达, 而在其他组织中没有检测到。Saito 等^[16]在家蚕中鉴定了几种 *to* 家族基因, 并通过 Northern 杂交发现 *Bman-0128*、*Bman-0147*、*Bman-0921*、*Bmbrp-1649* 和 *Bmbrp-2095* 主要在脂肪体中表达, *Bman-0128*、*Bmbrp-2095* 和 *Bmbrp-1649* 在中肠和丝腺中表达, *Bmbrp-1649* 还在表皮中有表达。Hagai 等^[17]在意

大利蜜蜂 *Apis mellifera* 腹部和头部检测到有 *to* 表达,而在其他组织中没有检测到。Jordan 等^[18]从雄性苹浅褐卷蛾中发现了 4 个 TO 蛋白家族成员。而 Schwinghammer 等^[19]发现 TO 蛋白在美洲散白蚁 *Reticulitermes flavipes* 的工蚁、兵蚁及若虫的多个组织中也均有表达。

目前,TO/JHBP 蛋白在果蝇中的功能研究得比较透彻,其功能研究主要在化学感受器(如触角、下唇须等)和营养组织(如脂肪体、前胃等)。Sarov-Blat 等^[6]在果蝇中发现了一个新 *to* 基因与果蝇取食行为的节律调控有关,随后,So 等^[7]也发现了一个新的果蝇生物钟调控输出基因。Meunier 等^[20]在果蝇中发现, *Dmto* 编码了一种类似于 JHBP 的 TO 蛋白,通过它可以提高果蝇饥饿时味觉系统对糖分的敏感性,从而增加取食量,进而调节果蝇体内的营养平衡。Dauwalder 等^[8]研究中发现 TO/JHBP 蛋白只在雄果蝇的头部和脂肪体表达,却不在雌果蝇的头部和脂肪体中表达,他们还发现,TO 受体细胞性别决定通路中 2 种转录因子的调控,分别为 *fruitless (fru)* 和 *doublesex (dsx)*,调控与性别特异性功能相关的多种调控因子,故 TO/JHBP 蛋白主要通过对性别信号进行加工整合,进而影响雄性的求偶行为。Du 等^[9]发现烟草天蛾的 *to/JHBP* 基因家族可以维持表皮细胞中 JH 的含量,同时也受到 JH 和营养状况的调控。Bohbot 等^[15]在埃及伊蚊的触角中发现 TO 蛋白高量表达,可推测 TO 蛋白对宿主、食物或信息素气味分子有化学感应。在黑花蝇中通过免疫组织化学实验表明 TOL 蛋白主要分布于辅助细胞的细胞膜周围和唇瓣味觉感受器的淋巴液中,这表明了 TOL 蛋白也可能对昆虫的感受系统有调控作用^[10]。Hagai 等^[17]在意大利蜜蜂的研究中发现 TO 蛋白的表达受到发育相关因子 JH 调控。Bauer 等^[21]发现如果 TO 的表达量增多,会延长果蝇的寿命。那么 *Bmtol* 基因在家蚕头部、表皮和精巢中的

表达是否也参与生物节律、取食活动、性别分化和求偶行为等调控? 这些问题都需要回答。

本研究筛选并鉴定得到了一个新的保幼激素结合蛋白 *Bmtol* 基因,并对 *Bmtol* 基因进行原核表达、蛋白纯化和制备抗体,同时对该蛋白进行表达情况分析 & 免疫组化分析,以期为进一步研究在其家蚕头部和精巢中的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验用的家蚕品种大造由西南大学生物技术学院家蚕育种实验室提供。幼虫在 (25±1) °C、相对湿度 70%、自然光照条件下桑叶饲养。分别对供试家蚕从收蚁至化蛾各时期和 5 龄 3 d 各组织进行取材,置于 -80 °C 保存。

取正常生长且健康的 5 龄起蚕 90 头,随机分成 3 组,第 1 组饲喂不作任何处理的新鲜桑叶;第 2 组为实验组添食 0.1 mg/L JHA 浸泡的新鲜桑叶,每天分别添食 1 次,连续处理 3 d,其他为正常桑叶饲喂;第 3 组为对照组添食 0.1 mg/L 丙酮溶液浸泡的新鲜桑叶,每天分别添食 1 次,连续处理 3 d,其他为正常桑叶饲喂;然后在第 5 天开始取材,用 4% 的多聚甲醛进行固定。

BL21 (DE3) 感受态细胞购自北京全式金公司;pMD19-T vector 克隆载体、M-MLV 反转录酶、*Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶等购自 TaKaRa 公司;pET28a 表达载体由本实验室保存;IPTG、Ampicilline、X-Gal、Kanamycin 购自生工生物工程(上海)股份有限公司;Ni-NTA 亲和层析介质和引物购自南京金斯瑞公司;琼脂糖购自 Invitrogen 公司;酵母粉、蛋白胨购自 OXOID 公司;JHA (苯氧威) 购自 Sigma 公司;其他未标明试剂均为国产分析纯。

1.2 *Bmtol* 基因克隆与鉴定

从 SilkDB 和 NCBI 中获取家蚕 *Bmtol* 基因的

芯片数据,找出相对应芯片号与基因之间的对应关系,查找基因并整理基因的表达数据,初步对 *Bmtol* 基因的表达情况进行预测。同时又通过 NCBI 数据库进行在线 BLAST 软件检索找到一条与家蚕数据库相似基因的预测序列,并没有前人报道和克隆该基因的编码序列,故初步判定为新基因。故对编码区设计引物,引物序列见表 1,以大造 5 龄 3 d 整蚕的 RNA 为模板,利用 M-MLV 反转录酶合成 cDNA 的第一条链,并用内参基因 *BmActin3* 进行检测,反应程序:95 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 35 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 40 s, 反应 30 个循环;再在 72 °C 进行终延伸 10 min, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,经染色后观察确认满足后续实验需要。以总 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,反应程序:95 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 50 s, 反应 30 个循环;再在 72 °C 进行终延伸 10 min, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,经染色后观察并进行胶回收。将目的片段连接到 pMD19-T 载体上,转化到 DH5 α 大肠杆菌中,通过菌液 PCR 筛选阳性克隆菌,送至华大基因进行测序验证。

1.3 *Bmtol* 基因的组织 and 时期表达特征分析

将研钵和研棒洗净用 160 °C 高温烘 4–6 h。研磨前用液氮预冷研钵和研棒,分别将 5 龄 3 d 的家蚕各组织和收蚁到化蛾各时期的材料放入研钵

中,并在液氮中研磨成粉末,此过程中要反复添加液氮,避免其完全挥发。利用 Trizol 试剂 (TaKaRa) 提取家蚕各组织和各时期的总 RNA, 并利用 M-MLV 反转录酶,合成 cDNA 第一链。利用表 1 中的内参引物,以家蚕 5 龄 3 d 幼虫各组织器官和各时期的 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增检测,反应程序:95 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 35 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 40 s, 反应 30 个循环;再在 72 °C 进行终延伸 10 min, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,经染色后观察确认满足后续实验需要。对检测后的 cDNA 模板表达特征分析,反应程序:95 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 50 s, 反应 30 个循环;再在 72 °C 进行终延伸 10 min, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,对 PCR 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色观察。

1.4 *Bmtol* 基因的原核表达、蛋白纯化及抗体制备

对 BmTOL 序列进行信号肽和跨膜分析发现,该蛋白含有一段信号肽序列,没有跨膜区,故对非信号肽区域设计原核表达引物,见表 1。以家蚕大造 5 龄 3 d 整蚕 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,扩增条件同 1.2。对 PCR 产物进行扩增和胶回收,克隆到 pMD19-T 载体上(命名为 pMD19-*Bmtol*),转化到 DH5 α 大肠杆菌中,通过菌液 PCR 筛选出阳性克隆菌,送至华大基因进行测序验证。将 pET28a

表 1 本研究所用引物

Table1 Primers used in this study

Gene name	Primers sequences (5'-3')	Using
<i>Bmtol</i>	F: CTGTTTACTACAAGGGAACACG R: TTCATTCGCCTTTAAACATTTT	Cloning
<i>Bmtol</i> - BamH I	F: CGGGATCCAAGAAACAGATCCCCGGCTACATAC	Prokaryotic expression
<i>Bmtol</i> - Xho I	R: CCGCTCGAGTTAAGGTTTGGGCAGTAGTTCGTTG	
<i>BmActin3</i>	F: AACACCCCGTCCTGCTCACTG R: GGGCGAGACGTGTGATTCCT	Reference

Note: the underlined is the restriction site.

质粒载体与 pMD19-Bmtol 重组质粒用 *Bam*H I 和 *Xho* I 限制性内切酶进行双酶切,并回收双酶切产物,构建 pET28a-Bmtol 重组表达载体,转化至 BL21 (DE3) 感受态细胞中,并进行测序验证。同时转化 pET28a 质粒作为原核表达的对照。将重组质粒 pET28a-Bmtol 和空载体 pET28a 转化的表达菌在 IPTG 终浓度为 0.4 mmol/L 的 28 °C 和 37 °C 条件培养,间隔 2 h 取一次样,收集菌体,用 PBS 重悬,经 12% SDS-PAGE 检测。同时又对其在不同 IPTG 终浓度的条件下诱导 8 h,分析蛋白表达情况和对重组蛋白进行可溶性分析,最后综合上述表达条件的优化,确定最佳表达条件为 28 °C、IPTG 终浓度为 0.4 mmol/L、诱导 8 h。并进行大量表达,利用 Ni-NTA 亲和层析进行重组蛋白纯化,用不同溶度的咪唑洗脱重组蛋白,并对重组蛋白进行透析和浓缩,最后送至重庆泽恒生物技术有限公司进行多克隆抗体制备。

1.5 Western blotting 检测和免疫组化

在液氮中研磨家蚕 5 龄 3 d 的头部、表皮、脂肪体、中肠、丝腺、马氏管、血淋巴、精巢和卵巢等组织,研磨后的粉末用蛋白裂解液溶解提取总蛋白,并用 Bradford 法测定总蛋白浓度。将总蛋白进行 SDS-PAGE 分析,以 α -tubulin 为内参,根据蛋白浓度计算上样量。再进行转膜、一抗二抗孵育、显色和曝光处理,步骤如下:

1) 转膜结束后,取出 PVDF 膜正面(朝向凝胶的面为正面)朝上,用 TBST 溶液清洗后,浸泡在封闭液中,室温摇荡 3 h 或 4 °C 恒温封闭过夜;2) 一抗孵育:将 PVDF 膜从封闭液中取出,放入一抗稀释液(α -tubulin 抗体为 1:10 000,一抗以 1:20 000)中,37 °C 孵育 1 h 或 4 °C 孵育过夜,用 TBST 洗膜 3-4 次,10-15 min/次;3) 二抗孵育:BmTOL 为羊抗兔,内参为羊抗鼠,稀释比例为 1:30 000,37 °C 孵育 1 h 后,用 TBST 洗膜 3-4 次,15 min/次;4) ECL 显色:将 ECL 显

色液 A 液和 B 液按等比例(1:1)混匀,注意避光,现配现用;将配好的 ECL 显色液加入到 PVDF 膜上,并保证显色液覆盖整个 PVDF 膜,避光显色 3-5 min;5) 曝光:显色完毕后,在化学发光成像仪上进行曝光处理,曝光时间 30-50 s,观察并保存图片。

选取 5 龄 3 d 的家蚕头部组织用 4% (W/V) 多聚甲醛 4 °C 固定 24 h,然后进行脱水,用石蜡包埋。将石蜡包埋的组织进行切片、摊片和烤片处理。然后进行免疫组化实验,步骤如下:

1) 脱蜡处理:二甲苯 I (10-15 min)→二甲苯 II (10-15 min)→100% 酒精 I (5 min)→100% 酒精 II (5 min)→95% 酒精 I (3 min)→95% 酒精 II (3 min)→90% 酒精 (2 min)→80% 酒精 (2 min)→70% 酒精 (2 min)→ddH₂O (10 min);

2) 灭活:用 3% 去离子水孵育或 10% H₂O₂ 室温/温箱孵育 10-15 min,消除内源性过氧化氢酶的活性,用 PBS 溶液冲洗 5 min×3 次;

3) 抗原修复:0.01 μ L 柠檬酸缓冲液(pH 0.6)连同容器一起放入水浴锅中加热 10 min,期间用温度计测温,待抗原修复液温度达到有效温度(68-70 °C)后,将切片放入持续 40 min,取出恢复至室温,微波修复 10 min,防止缓冲液干涸暴露组织。用 PBS 溶液冲洗 5 min×3 次;

4) 滴加内源性碱性磷酸酶阻断剂,室温孵育 10-15 min,以阻断内源性碱性磷酸酶的活性。用 PBS 溶液冲洗 5 min×3 次;

5) 滴加封闭液,37 °C 孵育 20-30 min 或 4 °C 过夜孵育,甩去多余液体,勿洗;

6) 滴加一抗(1:2 000)覆盖组织,并将切片置于湿盒中,37 °C 温箱孵育 2-3 h 或 4 °C 过夜,次日取出后温箱孵育 1 h。阴性对照组滴加 PBS 缓冲液。用 PBS 溶液冲洗 5 min×3 次;

7) 滴加 AP 标记的二抗 IgG,在 37 °C 温箱孵育 30-60 min。用 PBS 溶液冲洗 5 min×3 次;

8) 滴加 BCIP/NBT 显色剂进行显色, 室温显色 3–30 min, 在显微镜下观察显色情况, 蒸馏水冲洗;

9) 脱水透明: 70%酒精 (2 min)→80%酒精 (2 min)→90%酒精 (2 min)→95%酒精 I (5 min)→95%酒精 II (3 min)→100%酒精 I (5 min)→100%酒精 II (5 min)→二甲苯 I (15 min)→二甲苯 II (15 min);

10) 封片: 用中性树胶封片, 在显微镜下观察并照相。

2 结果与分析

2.1 家蚕保幼激素结合蛋白 *Bmtol* 基因的克隆与鉴定

以大造 5 龄 3 d 家蚕表皮组织的 cDNA 为模板, 用 *Bmtol* 基因的引物对 *Bmtol* 基因进行 PCR 扩增, 利用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测与分析 PCR 产物的片段大小, 电泳结果显示有特异性条带 (图 1)。并对该特异性 PCR 产物进行胶回收, 连接转化, 挑选出阳性克隆菌进行测序, 确定该片段大小。

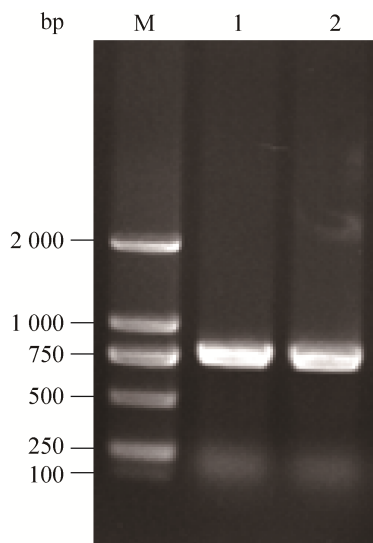


图 1 *Bmtol* 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of *Bmtol* gene. M: DL2000 DNA marker; 1, 2: PCR amplification of *Bmtol* gene.

2.2 家蚕保幼激素结合蛋白 *Bmtol* 基因的序列分析

对 *Bmtol* 基因进行测序发现与 NCBI 上的预测序列基本一致, 得到的 cDNA 序列长度为 810 bp (GenBank 登录号: KY681053), 其中 ORF 为 759 bp, 包含 6 个外显子, 5 个内含子, 编码的氨基酸序列为 252 个氨基酸, 发现该蛋白序列第 1–23 氨基酸为信号肽。利用 protparam 软件对该基因编码的蛋白进行预测分析, 其理论分子量为 27.72 kDa, 等电点为 6.16。

2.3 家蚕保幼激素结合蛋白 BmTOL 多序列比对

从 NCBI 数据库中获得埃及伊蚊、家蚕、果蝇、苹果褐卷蛾、棉铃虫、斑点木蝶、柑橘凤蝶等物种的 TO 的氨基酸序列, 将这些序列与家蚕 BmTOL 蛋白进行多序列比对, 在比对中与这些昆虫的总相似度为 34.54%。家蚕 BmTOL 蛋白是一种 JHBP 蛋白, 是 TO/JHBP 家族的一员, 在序列比对中发现, 在 N 端含有两个保守的 Cys 残基, 这两个 Cys 残基参与二硫键的形成, 连接于 N 末端和 $\alpha 1$ 螺旋的第一个弯曲, 是 TO 蛋白结合配体的核心部位 (图 2)。

2.4 *Bmtol* 基因的组织 and 时期表达特征分析

利用 RT-PCR 对家蚕 5 龄 3 d 各组织 *Bmtol* 基因的表达量进行检测, 发现主要在头部有高量表达, 其次在表皮和精巢表达量也较高, 而其他组织的表达量很低或没有 (图 3)。同时, 对 *Bmtol* 基因在各时期的表达情况进行 RT-PCR 检测, 发现主要在每个时期的起蚕时表达量较高, 从 5 龄 3 d 到化蛹 7 d *Bmtol* 基因表达量都比较低, 到化蛾后又开始上调 (图 4)。

2.5 *Bmtol* 基因的原核表达、蛋白纯化及抗体制备

为了对该蛋白进行深入研究, 我们对非信号肽区域进行克隆, 并送公司测序验证。构建含有该目的片段的原核表达载体, 利用 BL21 (DE3)

Aa_to.seq MKVMVSGTVAVLL NAALATTY. . . . AAQF PAGYTL CPKDD. . . . QKCLFERI GATF AKHAA. G PAI DL	60
Bm_an-0921.seq MALNFI FLFG LI VFG. . . . DAAFVDTL GKCSLKD. . . . EECTKS LI NNALNEI SSTG PELDI	55
Bm_e96h-0303.seq MLVLCFLFACAFVAD. . . . ATDL AKFI TPCRPKD. . . . TACLKS SAQKAVPFLAA. G ADLGI	55
Ep_to.seq	MLLT KYVL VHTWAI VLSCLHLTKADQEVQAVGKI LSQCKKSPHFDS CMKRAFNE LRPF FKR. G PELGV	69
Bm_an-0128.seq MLTFLCLFALVLGV. . . . KSASAPFI TPCKVGD. . . . SACFVASQAAPVI VAA. G PDLGI	53
Bm_brp-1649.seq MHKFVALFLI ATVI PL. . . . KTNANI FGGKCSRODPNVDA CLLR SFNNLV DY LKG. GAPENGI	58
Bm_tol.seq M SVQNFL LPSFLVL CVVSGSGSKKQI PGYI QI CKHDPNTI SECVQKSI EALPKPLAE. G PELDV	65
Ha_to.seq NASLHTFLTSSSFVFFCVI NGG. LFKEI PSYI QVCKRDPATI NDCVKKSI EALRPQI ST. G PELDV	64
Bm_an-0147.seq MYQI LLLFCVI YPSNGAI EI SKHLKVCNRSNLDLNDCI VEAVRDGI EKMAT. G EELDI	58
Bm_brp-2095.seq MVLI ALFLFAAHVFN TADDAYL PPYI EACEFSNENLEQCI KEQI EKSLPEFTK. G PELDV	61
Bm_wdS3-0639.seq MKRKVCFAFFAFSSVSVSI. . . . FGALPD. VQKCNLT D. . . . AVCLKT SAQLMVPQLTD. GL PDLGS	55
Pa_to.seq MWKFLI FLSSVYFVKCDEKSF I NFGGFVCPREDNALGRCLRDALNTYI PQLAT. GVPEYGV	60
Bm_an-0895.seq MMTGLFLVLGLYESV. VGLGLPSYI SSCSRKDPNLNDCKALKSARNSVHQFSL. G DPERGL	58
Bm_ce-0330.seq MHCI ESV. . . . FSVLP. . . . VDKCKLED. . . . SACMI TAFQANMPVFFS. GLPEI GV	44
Dm_takeout.seq MFAT AFAVLCLLVSV. . . . DAKFEPDPKPKYGD. . . . GEICI MKLCNTLFSENSAE G DPLNL	56
Px_to.seq MLRYFCFLALFLNV. . . . KSASAPFI KPCKDGD. . . . NACI LASSQAII PLLAP. G MPSLGV	53
Consensus c c g	
Aa_to.seq	VSLDPLKI QKMDI VQG. GDGPI NI VLNFKNVDLTGLSEAVVKKANGFTGN. PTKMELGI LVPVTSLVGGY	128
Bm_an-0921.seq	PPVDPI ALKNVSVTVLG. . . . LVDI TLLEGOAKGVKTCKFSSLI DLEKEI GAYEFTCDI. . . . DIEGKY	117
Bm_e96h-0303.seq	ETMDPMTVGRVNTVQA. . . . GLHMDFRDITVRGLRNCVVLNLR. . . . RLHDKTLLDLKCSV. . . . TLVGEY	114
Ep_to.seq	APFDPHFARQVQKQRS. . . . FFLGYTLT LIRNYYERQATSTVTNFTTDRDNANI IYSQYFPEK. . . . SLDGQY	135
Bm_an-0128.seq	KPLDPLHI SVI NGNQG. . . . GLELTFKDTI VRGLSGCHVEGVKNDPAKKKQAVTI KCSV. . . . TLTGDY	114
Bm_brp-1649.seq	EEAEPI VI DELSI ALG. . . . AGPDGYRATFKDI HASGASNMTI TNVRS DLETHQFQLTLYGPH. . . . I SARARY	124
Bm_tol.seq	PPLEPFI IPEVVASSK. DRVPLOATG. . . . KNI KVTGAGDFHI NKLN. VDL D. SLI LKAKVNF PKLHFDGLY	130
Ha_to.seq	PSLDPFPI PEI KALTA. DNTPLRATG. . . . HNI KVTGAGSFVI KSLT. VDL D. TLKI KARVRFPKLHFEQGY	129
Bm_an-0147.seq	PPLDPFFQDELKVEYK. . . . NNQI AVKMLI KNI YVEGLKGSTVHDARVRAEDNFYMEVDLSAPSI VLRGDF	126
Bm_brp-2095.seq	PSTD PVHLDDI NI DGN. . . . GLKLTFTKALMHGLKGSHLKEFKLFKFDGDHGNFKLAFI SN. MSLTA EY	124
Bm_wdS3-0639.seq	KVLDPLYVEAI KVDLA. . . . GLKLLATDAEI TGVKDTI I DKLSDVLAKKQI QVI CHVSV. . . . YLKGKY	116
Pa_to.seq	PPCEPLLVPALAVQOS. . . . AGPI SI TSSFS DVTVRGPSRMVVKHVEVESKNHSI VATLHI PE. . . . LRNMKGDY	126
Bm_an-0895.seq	PPLDPLYVENMVVYVP. . . . NRNGFKVVF KDNYFTGLSSLT LQNLKFDMDKKI I AAQALVNL. . . . DVNNTY	122
Bm_ce-0330.seq	EVLDMELDYVEFDLS. . . . GLKFTLSDGRLKGHNATI DDVKVDTEKRRFDVI YHLD S. . . . SIKGHI	105
Dm_takeout.seq	NQLDPLKVDRMI SQGES SSPVGI TLTFTDNL LYG KDQRI VKVKGFGRDL TAKHEVKI VTKTFSLVGPY	126
Px_to.seq	KSLDPLKVPRI TSDQG. . . . SLKLTFTDTMTLGLKGCKI ESI KHDRVKGKQTLVLRCDM. . . . VLDGDI	114
Consensus g	
Aa_to.seq	KI NGKVL I LP. I OGESRSNMTMENNHI QMKWTGKL V. . . . DRNGKQYQLD. . . . KLKATFDTR. FH	186
Bm_an-0921.seq	KVFS E SPLI KNLLGGTT VHGE GNGKVL EKLQI SMKFPVYAQK. RDDGEI YMKCDYSKI KYDYKI LGKTK	186
Bm_e96h-0303.seq	TLGGQL I LP. I EGTGKYRI RI RDI I MKI I LDVEER. . . . I VEGDRYMHVS. . . . DWKHS AEDVSKVE	173
Ep_to.seq	EFGS DMLGES. LERAGWNMTL RDYSQTTRVR. RRGRGAGAGL. . . . DVRVEI DHI GDMD	189
Bm_an-0128.seq	KLSGKL LVL P. I EGECKYNI KI RDI VI KTANDLVTVT. GADGKPHWHI E. . . . SVKHTYEVKTGAH	174
Bm_brp-1649.seq	RSSGVL LVR. ASGGEYMEGHVGKAKVYFRGAPY. . . . ERDGRTYLKLQ. . . . QLKLDFSVKD. I K	182
Bm_tol.seq	KLDTQI LVLP. I KGE NLLADTVNCDAEL VFKGKGY. . . . QKDGLEFI KFN. . . . SLDTKI GI KD. I K	188
Ha_to.seq	KLDGQVLI VP. LKGE NLLADTVNCDAEL VLHTQI V. . . . NKDGVDYVKFK. . . . KI DTDI NI KD. YR	187
Bm_an-0147.seq	KGE GQYNAL K. VKAYGDNFTNSMDLI FTMKLDGVPE. . . . KNGTDTYVRI K. . . . SFYMRPDVGN. MI	184
Bm_brp-2095.seq	EADGKL LI Q. I KKGEDALI NCVNVDVEI ESKLNQVK. DNNGKDHLKL G. . . . TPSYKYKI EK. TT	183
Bm_wdS3-0639.seq	KASGKL LI LP. I TGDGDTTI KLKNLRI QMI YPFLNVK. NSE GKDVI DLS. . . . SYRYSYDVKNDAH	176
Pa_to.seq	NLKGQL LML P. I EGSCKFSAKYGI DATVTI VLGRTPRDNAAADALACK. . . . SLGVKFHI GK. AV	186
Bm_an-0895.seq	DLSGRI LVI P. I KSSGDSFI KLKNTLLNI NFYYEDI E. DADGKVHWKI F. . . . NHDVEYEVEK. AV	181
Bm_ce-0330.seq	TAGGSI LVLP. I TGDGQMKLKLKNVQI HFYI EYDVEK. AEDGKDHI VLK. . . . KYDFDFDVRENH	165
Dm_takeout.seq	NI QGKVL I LP. I SGTGQS NMTMVNRAI VSFSGKPL. . . . VKNGETYL DVT. . . . DLKI TNKPES. SH	184
Px_to.seq	VLDGQL LI LP. VOGKERYKI DI RDI VI KTVTDLTTEQ. GPDGKEHWKI V. . . . KWRDSFQVKTGVK	174
Consensus g	
Aa_to.seq	MHFSNL FNGDKAL GDNMNVFL NE NMQDI LKELKPAI I DAFVKI FQSVI SSVFNKVPYNE LFQ.	248
Bm_an-0921.seq	FYADNL FLGEQE ASKLVTTF LNE NMKFVMDTFGRSFFDKAMDI FYSYTSKFFGTVPKHYLTD DFTSI AK	256
Bm_e96h-0303.seq	YQFQNL FNGNRDL AKTI HDFANS NMREI FQEVAPPNVKAI VSKI I HETFKL FDKVPI KDLALE.	236
Ep_to.seq	LHI GNLLKGKTT LERVLDS LI NASMKPGFVVVRPAI NDLVSTAF TNI VSKSFKKVHI EDDFTD.	252
Bm_an-0128.seq	FQFENL FNGNKVL ATPVEEFVNS NMKDVMQEVAPPI VRSI VSEVVAVDALYKAVPAEELYLQ.	237
Bm_brp-1649.seq	NGVENL DNSNAVLQAALNLFI STNAQELLKEMKPELKRDLADKNSRYLDHI LQHI PYDELVD.	245
Bm_tol.seq	VKFDGL FNNDKVL GDAANDAI NQNGGEFFNTFKPFLAAVSKLLNI SNKVVDLDPF NELLPKP.	252
Ha_to.seq	VKLDGL FNGDKNL GEAANQAI NONRGEI LRATKPHLEKT VSTNL EAAANNVVEGLTL DQLPKP.	251
Bm_an-0147.seq	SHL NNE NPETREL TNLGTSL NQMRVL YRELLPYAQSNWDKI GTNVANKI FSKVPYDQI FPSGT.	249
Bm_brp-2095.seq	FDLKNL FNGNKE LADTTLQFANE NMQQLMDDLAPPAI KQI VKTVVKAI NKFFASVTTQI I KGYS P.	249
Bm_wdS3-0639.seq	FHMTNL FNGNKL GDMVLT FMMQNMKALT QEF GKPLLEI PNEMVYNTVKTYLKSQPLEDI ANL.	239
Pa_to.seq	MELNNL FGGDDDL GNAMNKF LNE NNE NLLVELQSPMEDALRDFL KPLADHAFGTLDADDI LLSK.	250
Bm_an-0895.seq	FRLENL LN. DKNLGEQI NKI LNLGSQI VDEVGPTI CGSLNKAVVENLGI LLEQVSDLELME.	243
Bm_ce-0330.seq	FELS NL FNGNKE LSK I HSFLNE NMKQVTFEGRPI MDATAKKFKNI NI FFEKNSLEDI AI L.	228
Dm_takeout.seq	YHFSNL FNGDKAL GDNMNVFL NE NSEAI YKETAKAI DRSF GKLYLGVVGVFSKLPYAKFFADES.	249
Px_to.seq	FHFDNL FNGNKVL ADPVI EFANTNMVDMQEI APPI VHTI I AAVFKEI ESLYKAVPADELYI P.	237
Consensus	

图2 昆虫 TO 蛋白多序列比对结果

Fig. 2 Multiple sequence slignment results of TO proteins in insects. Aa: *Aedes aegypti*; Bm: *Bombyx mori*; Ep: *Epiphyas postvittana*; Ha: *Helicoverpa armigera*; Pa: *Pararge aegeria*; Dm: *Drosophila melanogaster*; Px: *Papilio xuthus*.

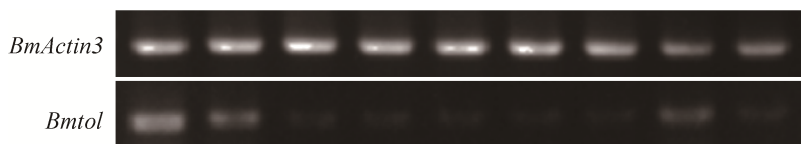


图 3 RT-PCR 分析家蚕 *Bmtol* 基因在 5 龄 3 d 各组织的表达

Fig. 3 RT-PCR analysis of *Bmtol* gene in various tissues of 3 day in 5th instar silkworm larvae. 1: head; 2: epidermis; 3: fat body; 4: midgut; 5: silk gland; 6: malpighian tube; 7: hemolymph; 8: testis; 9: ovary.

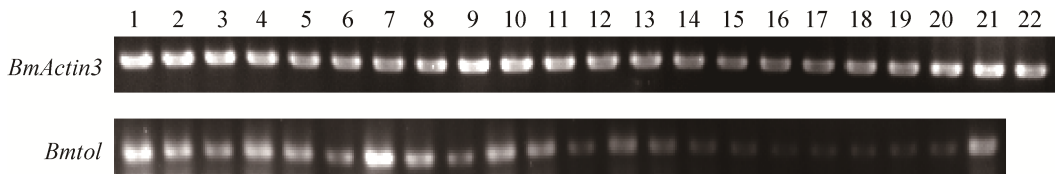


图 4 家蚕 *Bmtol* 基因各时空表达谱

Fig. 4 The expression profile of *Bmtol* gene during whole larvae development. 1: hatching; 2: day-2 1st instar; 3: 1st instar pre-molting; 4: day-1 2nd instar; 5: day-2 2nd instar; 6: 2nd instar pre-molting; 7: day-1 3th instar; 8: day-2 3th instar; 9: 3th instar pre-molting; 10: day-1 4th instar; 11: day-2 4th instar; 12: 4th instar pre-molting; 13: day-1 5th instar; 14: day-3 5th instar; 15: day-5 5th instar; 16: day-7 5th instar; 17: prepupa; 18: day-1 pupa; 19: day-3 pupa; 20: day-5 pupa; 21: day-7 pupa; 22: moth.

大肠杆菌对重组蛋白进行原核表达。由于 pET28a 表达载体上含有 His 标签序列，该标签蛋白的分子量大小约为 4 kDa，去掉信号肽的目的蛋白分子量大小约为 25 kDa。对 28 ℃ 和 37 ℃ 在不同时间的表达情况进行分析，发现重组蛋白在 28 ℃ 和 37 ℃ 的条件下均能表达，在 28 ℃ 条件诱导 8 h 表达量达到最大值，在 37 ℃ 条件下诱导 6 h 表达量达到最大值。又对重组表达菌在 28 ℃ 和 37 ℃ 条件下不同 IPTG 浓度诱导下的表达情况进行分析，图 5 和 6 显示，在 28 ℃ 条件下，IPTG 终浓度为 0.6 mmol/L 时表达量最高；在 37 ℃ 条件下，IPTG 终浓度为 0.4 mmol/L 时表达量最高。为了确定重组蛋白在表达菌中是以什么形式表达的，对上述成功表达的重组蛋白进行可溶性分析，发现在 37 ℃ 和 28 ℃ 诱导条件下，目的蛋白主要以包涵体形式表达，但也有可溶性表达，而且温度越低越有利于可溶性蛋白的形成和表达。根据上述分析，确定一个最佳的表达蛋白的条件 (IPTG 终浓度为 0.6 mmol/L 在 28 ℃ 诱导 8 h) 进行蛋白的大量表达，并对表达的蛋白进行 Ni-NTA 亲和层析

和蛋白纯化 (图 7)。对纯化好的重组蛋白进行透析和浓缩，发现获得了较纯的重组蛋白。最后将重组蛋白送至公司制备多克隆抗体，抗体效价检测大于 500 000，可用于后续实验。

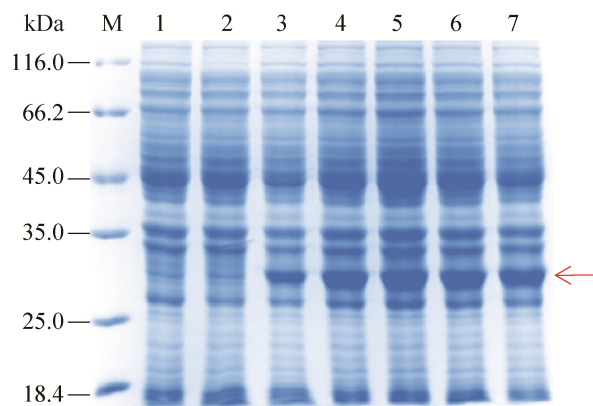


图 5 在 28 ℃ 条件下不同 IPTG 浓度诱导重组蛋白的表达

Fig. 5 The aim protein expression induced at different concentrations of IPTG at 28 ℃. M: protein marker; 1: pET28(a) vector induced; 2-7: recombination expression bacterium respectively induced for 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1.0 mmol/L.

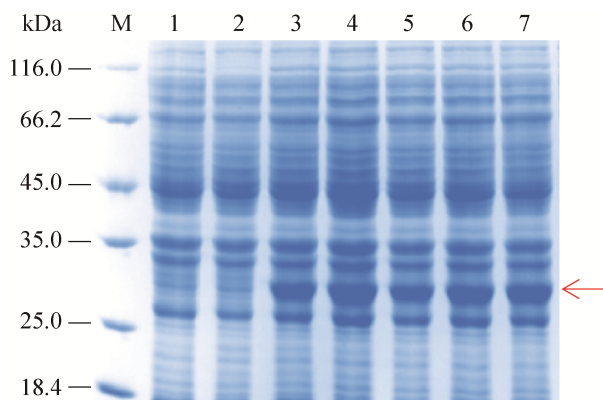


图6 在 37 °C 条件下不同 IPTG 浓度诱导重组蛋白的表达

Fig. 6 The aim protein expression induced at different concentrations of IPTG at 37 °C. M: protein marker; 1: pET28(a) vector induced; 2–7: recombination expression bacterium respectively induced for 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1.0 mmol/L.

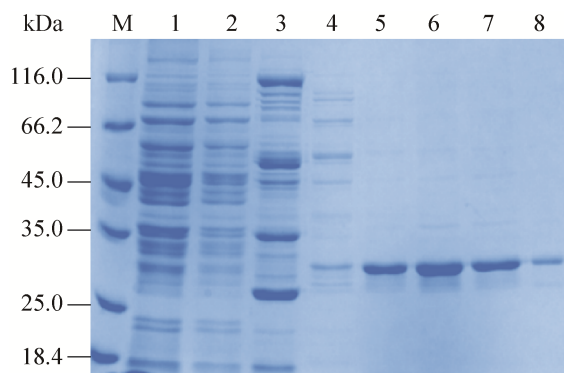


图7 目的蛋白纯化 SDS-PAGE 检测

Fig. 7 Purified proteins detected by SDS-PAGE. M: protein marker; 1: pET28(a) vector induced; 2: outflow liquid; 3: 10 mmol/L; 4: 50 mmol/L; 5: 100 mmol/L; 6: 200 mmol/L; 7: 250 mmol/L; 8: 300 mmol/L.

2.4 Western blotting 检测和免疫组化

为检查纯化的蛋白是否为目的蛋白及抗体是否符合实验要求, 对抗体进行检测, 检测发现抗体满足实验要求, 并显示提取了目的蛋白 (图 8)。通过 Western blotting 在蛋白水平上对家蚕各组织中 BmTOL 的表达情况进行分析, BmTOL 蛋白主要在家蚕的头部、表皮和精巢有表达 (图 9)。为

了确定 *Bmtol* 在家蚕头发挥功能的位置, 我们选择了 5 龄 5 d 的家蚕头部, 通过免疫组化技术对 BmTOL 蛋白在头部组织位置进行定位。实验结果发现 BmTOL 蛋白主要在家蚕头部表皮层和脑中表达, 阴性对照组没有。此外对于添食 JHA 处理组和丙酮对照组中, 发现 BmTOL 蛋白表达量有所上调, 但差异不是很显著 (图 10)。

3 讨论

家蚕作为鳞翅目昆虫的模式生物, 研究其保幼激素结合蛋白在家蚕体内的调控机制, 可以为其他昆虫的研究提供理论依据和参考价值。本研究通过 SilkDB 和 NCBI 数据库筛选并鉴定到了一个新的 *Bmtol* 基因。通过 RT-PCR 和 Western blotting 分别对 5 龄 3 d 的组织 mRNA 和蛋白表达情况进行了分析, 结果发现 *Bmtol* 基因无论在核酸还是蛋白水平上都是在头部高量表达, 其次是表皮和精巢中。并对从收蚁到化蛾的各时期进行了 RT-PCR 检测, 发现在幼虫期的各起蚕时高量表达, 另外在 5 龄至蛹期 *Bmtol* 基因的表达

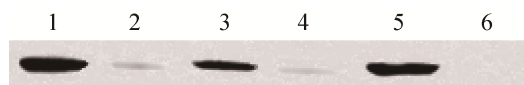


图8 重组蛋白的 Western blotting 检测

Fig. 8 Western blotting analysis of recombinant proteins. 1,3: purified protein of concentrated; 2,4: purified protein of non-concentrated; 5: supernatant protein; 6: pET28(a) vector.

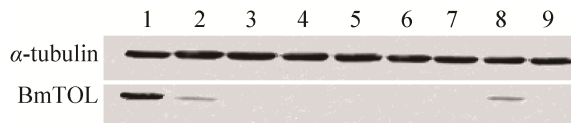


图9 Western blotting 检测分析家蚕 BmTOL 蛋白在各组织的表达

Fig. 9 Western blotting analysis of BmTOL expression in various tissues of the silkworm larvae. 1: head; 2: epidermis; 3: fat body; 4: midgut; 5: silk gland; 6: malpighian tube; 7: hemolymph; 8: testis; 9: ovary.

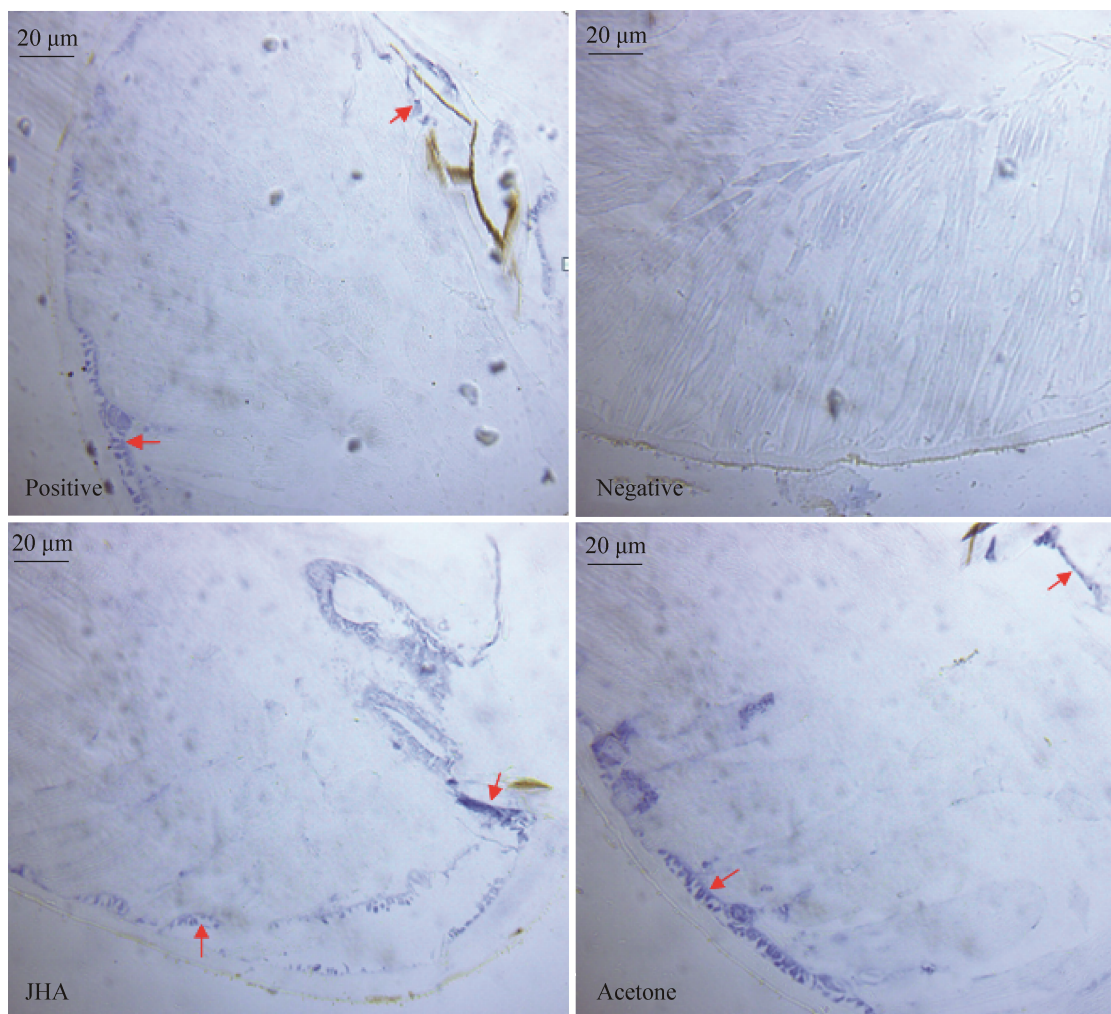


图 10 BmTOL 蛋白在家蚕头部组织的免疫组化结果

Fig. 10 Immunohistochemistry results of BmTOL in silkworm head. The red arrow: BmTOL. Red arrow are the positive results of TO protein.

水平一直都很低,但是化蛾后表达量又突然上调。推测 *Bmtol* 基因可能参与生物节律、摄食活动、发育等方面的调控。此外该基因除了参与幼虫期的发育调控外,可能还在化蛾后参与其他方面的调控(如性信息调控、求偶行为等)。

前人的研究表明,在果蝇中 *to* 基因参与取食行为和生物节律调控^[6-7]。Meunier 等^[20]在果蝇中发现,通过 *Dmto* 编码的 TO 蛋白,可以提高果蝇饥饿时味觉系统对糖分的敏感性,从而增加取食量,进而调节果蝇体内的营养平衡。Dauwalder

等^[8]研究发现 TO/JHBP 蛋白只在雄果蝇的头部和脂肪体表达,却不在雌果蝇的头部和脂肪体中表达。他们还发现,TO 受体细胞性别决定通路中 2 种转录因子的调控,分别为 *fruitless(fru)* 和 *doublesex(dsx)*,调控与性别特异性功能相关的多种调控因子,同时 *to* 基因的表达又能间接调控 Fru 的作用;此外,在求偶和交配过程中,果蝇头部会分泌 TO 蛋白来影响雄性的行为,故 TO/JHBP 蛋白主要通过对性别信号进行加工整合,进而影响雄性的求偶行为。Bauer 等^[21]发现 TO 的表达量

增多会延长果蝇的寿命。*to/JHBP* 基因家族可以维持烟草天蛾表皮细胞中 JH 的含量,同时又受到 JH 和营养状况的调控^[9]。在黑花蝇的研究中发现 TOL 蛋白主要分布于辅助细胞的细胞膜周围和唇瓣味觉感受器的淋巴液中,对昆虫的感受系统有调控作用^[10]。

Saito 等^[16]在家蚕中鉴定了几个 *to* 家族基因,通过 Northern 杂交发现 *Bman-0128*、*Bman-0147*、*Bman-0921*、*Bmbrp-1649* 和 *Bmbrp-2095* 主要在脂肪体中表达, *Bman-0128*、*Bmbrp-2095* 和 *Bmbrp-1649* 在中肠和丝腺中表达, *Bmbrp-1649* 还在表皮中有表达,但并未对其进一步深入探究。本研究结果表明, *Bmtol* 基因主要在家蚕的头部、表皮和精巢中表达,且在头部高量表达,说明该基因主要在头部发挥功能。JH 在昆虫的生长发育过程中起到一个开关的作用,而 *TO/JHBP* 间接调控昆虫的生长发育,在胚胎发育过程中如果有新的 JHBP 合成,那么组织的敏感性也会发生一定的变化,在胚胎期就能决定不同细胞对 JH 的应答类型^[22]。此外,对于 *Bmtol* 基因与家蚕体内该家族其他基因在组织中的表达存在差异,说明该家族的基因并不具有功能一致性,可能该家族基因在不同组织中具有不同的功能,对此需要实验加以证明。

本研究通过 SilkDB 和 NCBI 数据库筛选并鉴定到了一个新的 *Bmtol* 基因,对该蛋白基因进行了克隆、表达并制备了多克隆抗体,通过组织和时期表达分析及免疫组化分析,发现该蛋白只在头部高量表达,其次在表皮和精巢中,其他组织表达量很低或没有。在幼虫期的各起蚕时高量表达,在 5 龄至蛹期 *Bmtol* 基因的表达水平一直都很低,但是化蛾后表达量又突然上调。推测 *Bmtol* 基因可能参与生物节律、摄食活动、发育等方面的调控,还可能在化蛾后参与其他方面的调控(如性信息调控、求偶行为等),但需要后续实验对此推测进行进一步验证。同时通过添食 JHA 处

理,免疫组化分析发现该基因的表达量有所上调,但不是很显著,可能激素处理对其作用效果不是太明显,对此可以再从饥饿诱导、生物节律等方面进行进一步功能探究。此外,由于 *Bmtol* 基因在家蚕的表皮和精巢中也有表达,在家蚕幼虫期和化蛾时高量表达,故也可以从这些方面再进行其功能的研究,以探究其在家蚕体内的分子调控机制,为更好地应用于蚕丝产业的发展提供理论基础。

REFERENCES

- [1] Whisenton LR, Bowen MF, Granger NA, et al. Brain-mediated 20-hydroxyecdysone regulation of juvenile hormone synthesis by the corpora allata of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Gen Comp Endocrinol*, 1985, 58(2): 311–318.
- [2] Qin J, He NJ, Xiang ZH. Advances in silkworm modeling research. *Sci Sericult*, 2010, 36(4): 645–649 (in Chinese).
秦俭, 何宁佳, 向仲怀. 家蚕模式化研究进展. *蚕业科学*, 2010, 36(4): 645–649.
- [3] Orth AP, Lan Q, Goodman WG. Ligand regulation of juvenile hormone binding protein mRNA in mutant *Manduca sexta*. *Mol Cell Endocrinol*, 1999, 149(1/2): 61–69.
- [4] Orth AP, Tauchman SJ, Doll SC, et al. Embryonic expression of juvenile hormone binding protein and its relationship to the toxic effects of juvenile hormone in *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2003, 33(12): 1275–1284.
- [5] He XT, Zhang YN, Li F, et al. Cloning, temporal expression of a juvenile hormone binding protein gene in *Laodelphax striatellus* (Fallén). *J Nanjing Agric Univ*, 2012, 35(2): 59–64 (in Chinese).
贺秀婷, 张亚楠, 李飞, 等. 灰飞虱保幼激素结合蛋白基因的克隆及表达动态. *南京农业大学学报*, 2012, 35(2): 59–64.
- [6] Sarov-Blat L, So WV, Liu L, et al. The *Drosophila takeout* gene is a novel molecular link between circadian rhythms and feeding behavior. *Cell*, 2000, 101(6): 647–656.
- [7] So WV, Sarov-Blat L, Kotarski CK, et al. *takeout*, a

- novel *Drosophila* gene under circadian clock transcriptional regulation. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(18): 6935–6944.
- [8] Dauwalder B, Tsujimoto S, Moss J, et al. The *Drosophila takeout* gene is regulated by the somatic sex-determination pathway and affects male courtship behavior. *Genes Dev*, 2002, 16(22): 2879–2892.
- [9] Du JG, Hiruma K, Riddiford LM. A novel gene in the *takeout* gene family is regulated by hormones and nutrients in *Manduca* larval epidermis. *Insect Biochem Mol Biol*, 2003, 33(8): 803–814.
- [10] Fujikawa K, Seno K, Ozaki M. A novel Takeout-like protein expressed in the taste and olfactory organs of the blowfly, *Phormia regina*. *FEBS J*, 2006, 273(18): 4311–4321.
- [11] Wojtasek H, Prestwich GD. Key disulfide bonds in an insect hormone binding protein: cDNA cloning of a juvenile hormone binding protein of *Heliothis virescens* and ligand binding by native and mutant forms. *Biochemistry*, 1995, 34(15): 5234–5241.
- [12] Hamiaux C, Stanley D, Greenwood DR, et al. Crystal structure of *Epiphyas postvittana takeout 1* with bound ubiquinone supports a role as ligand carriers for takeout proteins in insects. *J Biol Chem*, 2009, 284(6): 3496–3503.
- [13] Fujimoto Z, Suzuki R, Shiotsuki T, et al. Crystal structure of silkworm *Bombyx mori* JHBP in complex with 2-methyl-2,4-pentenediol: plasticity of JH-binding pocket and ligand-induced conformational change of the second cavity in JHBP. *PLoS ONE*, 2013, 8(2): e56261.
- [14] Justice RW, Dimitratos S, Walter MF, et al. Sexual dimorphic expression of putative antennal carrier protein genes in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol*, 2003, 12(6): 581–594.
- [15] Bohbot J, Vogt RG. Antennal expressed genes of the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti* L.); characterization of odorant-binding protein 10 and takeout. *Insect Biochem Mol Biol*, 2005, 35(9): 961–979.
- [16] Saito K, Su ZH, Emi A, et al. Cloning and expression analysis of *takeout/JHBP* family genes of silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol Biol*, 2006, 15(3): 245–251.
- [17] Hagai T, Cohen M, Bloch G. Genes encoding putative takeout/juvenile hormone binding proteins in the honeybee (*Apis mellifera*) and modulation by age and juvenile hormone of the *takeout-like* gene *GB19811*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2007, 37(7): 689–701.
- [18] Jordan MD, Stanley D, Marshall SDG, et al. Expressed sequence tags and proteomics of antennae from the tortricid moth, *Epiphyas postvittana*. *Insect Mol Biol*, 2008, 17(4): 361–373.
- [19] Schwinghammer MA, Zhou XG, Kambhampati S, et al. A novel gene from the *takeout* family involved in termite trail-following behavior. *Gene*, 2011, 474(1/2): 12–21.
- [20] Meunier N, Belgacem YH, Martin JR. Regulation of feeding behaviour and locomotor activity by *takeout* in *Drosophila*. *J Exp Biol*, 2007, 210(Pt8): 1424–1434.
- [21] Bauer J, Antosh M, Chang CY, et al. Comparative transcriptional profiling identifies *takeout* as a gene that regulates life span. *Aging*, 2010, 2(5): 298–310.
- [22] Wang YC. *Insect Biochemistry*. Beijing: China Agriculture Press, 2001 (in Chinese).
王荫长. *昆虫生物化学*. 北京: 中国农业出版社, 2001.

(本文责编 郝丽芳)