昆虫学的基本科学问题及分子生物学技术

赵小凡

(山东大学生命科学院, 济南 250100)

摘要: 昆虫与人类生产及生活关系密切,昆虫学研究具有重要的理论意义和实践价值。昆虫容易大量饲养,是研究生物学基本科学问题的良好材料。分子生物学技术与方法的快速发展,极大地推动了昆虫学研究进程。转录组测序的普及以及基因编辑(gene editing)技术的成功已经打破了模式生物与非模式生物的界限,为研究各种重要的农业害虫提供了技术。我们应当根据生产实践的需要和现有理论凝练重要的创新性科学问题,灵活运用各种研究方法和技术,推动昆虫学研究进展,阐明昆虫学领域的特殊科学问题及大生物学领域的共同科学问题。

关键词: 昆虫; 科学问题; 方法与技术; 转录组; 基因编辑

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2016)08-0896-10

Basic scientific questions and molecular biology techniques in entomology

ZHAO Xiao-Fan (School of Life Sciences, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract: Insects are closely associated with human production and life, and therefore entomological research has important theoretical significance and practical value. Insects are good materials to study biological questions because they are easily bred in a large number. The rapid development of molecular biology techniques has greatly promoted the process of entomological research. The success of the transcriptome sequencing and gene editing technologies has broken the boundary of the model species and the non-model species, providing techniques for the study of various important agricultural pests. We need to consider the important scientific questions according to the needs of production practice and the existing theories, promote entomological research progress by using various research methods and techniques, and clarify special scientific questions in the field of entomology and common scientific questions in the field of biology as well.

Key words: Insect; scientific questions; methods and techniques; transcriptome; gene editing

昆虫种类繁多、数量巨大,与人类关系密切,因此,昆虫学研究历来受到学术界广泛关注。各种现代生物学研究技术与方法的蓬勃发展,使昆虫学研究进入到了一个全新的时代。目前科学家已经对很多昆虫进行了基因组测序,在美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_euk/all/)可以检索到60余种注释的昆虫基因组,包括果蝇 *Drosophila*、家蚕 *Bombyx mori*、蜜蜂 *Apis*、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*、帝王蝶 *Danaus plexippus*、小菜蛾 *Plutella xylostella* 和佛罗

里达弓背蚁 *Camponotus floridanus* 等。转录组测序在基因组未知的昆虫中广泛应用,开启了非模式昆虫基因研究的方便之门。蛋白质组学为研究不同条件下蛋白表达差异提供了技术。飞速发展的基因编辑(gene editing)技术使非模式昆虫的基因编辑成为现实。经典的分子生物学研究方法和技术使基因功能及机制研究得到深入。在基因组时代直至后基因组时代,这些现代生物学研究技术与方法推动着昆虫学研究进入到了分子水平,使阐释昆虫学的各种科学问题及分子机理成为可能。本文拟分析昆虫学基本科学问题,基因组学、转录组学、蛋白质组学和

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(31230067); 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)项目(2012CB114101)

作者简介: 赵小凡,女,1957年11月生,河北邢台人,博士,教授,研究方向为昆虫发育, E-mail: xfzhao@sdu.edu.cn

收稿日期 Received: 2016-06-17; 接受日期 Accepted: 2016-07-03

蛋白质结构研究,以及基因敲除、沉默和编辑技术及常规分子生物学方法在昆虫学研究中的应用。

1 昆虫学的基本科学问题

昆虫学研究大致可以分为应用研究和基础研究。应用研究包括农业害虫防治的新方法和新策略 (Badran *et al.*, 2016)、昆虫生长调节剂 (Hincapie *et al.*, 2011)、转基因作物 (Lu *et al.*, 2012)、转基因作物与害虫控制 (Dovrat and Aharoni, 2016)、有益昆虫利用 (Garibaldi *et al.*, 2016)、性别控制 (Tan *et al.*, 2013)、以及许多农业害虫、卫生害虫、森林害虫、贮粮害虫等相关的诸多应用研究。基础研究包括昆虫生理、生殖、发育、滞育、免疫、抗性、神经、嗅觉、行为、激素,昆虫与植物的关系,昆虫与疾病传播,以及分类和系统演化等。由于昆虫材料的处理不受伦理约束,而生物进化又具有保守性,因此,用昆虫材料既可以研究昆虫学特有的科学问题,也可以研究大生物学领域普遍关注的科学问题,包括激素信号转导途径 (Liu *et al.*, 2014)、细胞自噬与凋亡 (Xie *et al.*, 2016)、干细胞增殖与分化 (Ding *et al.*, 2016)、先天免疫的分子机理 (Gold and Bruckner, 2015)、生物演化 (Zinner *et al.*, 2002) 等。在飞蝗散居型和群居型分子机理研究中发现,神经可塑性调控基因的差异表达是两型转变和聚群的重要分子机制 (Wang and Kang, 2014)。在褐飞虱中发现,胰岛素受体 1 (insulin receptor, InR1) 通过 PI(3)K-Akt 途径决定长翅,而胰岛素受体 2 (InR2) 抑制 InR1-PI(3)K-Akt 途径的功能而导致形成短翅,揭示了昆虫翅型控制的关键基因 (Xu *et al.*, 2015)。激素调控昆虫发育是昆虫学领域的基本科学问题之一,经过几十年的研究,取得了大量研究成果,目前昆虫激素的研究前沿是激素之间的相互作用机制及信号转导途径,如蜕皮激素 (20E) 与保幼激素 (JH) 间的相互作用,以及 20E 与胰岛素间的相互作用。在棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 中研究发现,20E 通过上调磷酸酶 PTEN 表达,抑制胰岛素途径,促进转录因子 FoxO 入核启动 20E 途径基因转录 (Cai *et al.*, 2016)。在家蚕中发现,低浓度 20E 促进家蚕翅盘发育 (Moriyama *et al.*, 2016),JH 通过促进转录因子 Krüppel homolog 1 表达维持幼虫状态 (Kayukawa *et al.*, 2016)。除了已经阐明的 20E 核受体途径外,现在研究发现 20E 还存在细胞膜受体介导的信号转导途径,已经在棉铃虫中鉴定到两种 7 次跨膜的 G

蛋白偶联受体 (G-protein-coupled receptor, GPCR) 参与 20E 信号转导途径 (Cai *et al.*, 2014a; Wang *et al.*, 2015a)。果蝇中研究证明,多巴胺受体 (dopamine receptor, DR) 可以结合 20E 类似物,命名为 *Drosophila melanogaster* dopamine/ecdyseroid receptor (DmDopEcR) (Srivastava *et al.*, 2005)。近年的研究鉴定了 JH 的细胞内受体 (Charles *et al.*, 2011),极大地推动了 JH 的研究进展。最近还有研究表明,JH 也可能存在细胞膜受体,可能是单次跨膜的受体酪氨酸激酶 (receptor tyrosine kinase, RTK) (Liu *et al.*, 2015b),但还不知道是哪种 RTK 介导了 JH 的细胞膜信号途径。国内外在昆虫学研究中大量基础研究和应用研究的文章发表,由于篇幅限制,在此不能一一详述。

昆虫学的基本科学问题存在于昆虫学的不同领域中。2016 年即将召开的第 XXV 届国际昆虫学大会的内容包括 30 个主题 (topics), 285 个专题 (symposia), 涵盖农业和森林昆虫,蜜蜂与家蚕,昆虫生物防治,昆虫种群生态,昆虫化学生态,昆虫免疫,昆虫生理生化,储粮害虫以及城市昆虫等 (<http://ice2016orlando.org/>)。通过上网浏览这些专题,可以大概了解昆虫学的基本科学问题、研究前沿、研究热点及研究水平。还可以通过 NCBI-PubMed 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) 查阅昆虫学及生物学研究进展和成果,及时了解各研究领域的研究前沿和热点科学问题,为创新型研究提供思路,避免重复研究。

2 基因组学

基因组学是研究生物的基因组的科学 (Allendorf *et al.*, 2010)。基因组是指单倍体细胞中包括编码序列和非编码序列在内的全部 DNA 分子 (Roach, 2000)。基因组测序可以获得某一物种的全部 DNA 信息,包括外显子和内含子。基因的外显子提供编码基因的开放阅读框 (ORF) 的序列。ORF 编码完整的多肽链,对研究基因功能提供了生物信息基础。对于基因组已知的昆虫,可以从 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) 的基因库中根据基因名、物种名或基因编号检索到基因的 ORF。基因的内含子则可以提供调控基因表达的各种 DNA 序列,包括基因的 5' 和 3' 非翻译区、启动子、增强子、绝缘子、特殊转录因子结合元件等。其中,特殊转录因子结合元件是研究转录因子调控基因表

达的主要靶标,是阐释基因转录调控机理的重要依据。基因的3'非翻译区有小RNA(miRNA)结合序列,是蛋白质翻译的重要调控区。内含子序列是研究基因表达调控机理的基础。对于已经有全基因组测序的昆虫,可以通过NCBI网站获得基因的全部信息,有助于开展基因调控研究;而对于基因组未知的昆虫,只能通过DNA步移法(设计引物做PCR扩增)获得基因的非编码序列,因此,要找到特殊转录因子结合元件比较困难。

对基因的ORF可以进行基本的生物信息学分析。例如,在NCBI中运用局部序列比对基本检索工具(basic local alignment search tool, BLAST)进行同源基因比对,用DNA软件分析不同物种中基因的系统演化关系(<http://www.megasoftware.net/>)。可以用各种蛋白质分析软件将ORF翻译成蛋白质,预测蛋白质结构与功能、亚细胞定位、翻译后修饰、信号肽和等电点及分子量等(<http://www.expasy.org/>)。还可以运用一个简单的模块化体系结构研究工具(Simple Modular Architecture Research Tool, SMART)分析蛋白质功能域(<http://smart.embl-heidelberg.de/>),蛋白质功能域在不同生物中具有结构和功能的保守性。

昆虫基因组测序可以推动昆虫功能基因组学研究,如:小菜蛾*P. xylostella*基因组测序(Tang *et al.*, 2014)后鉴定到149免疫相关基因(Xia *et al.*, 2015),推动了基因组范围的丝氨酸蛋白酶基因(Lin *et al.*, 2015)、谷胱甘肽-S-转移酶(You *et al.*, 2015)以及P-450基因(Yu *et al.*, 2015)的研究;帝王蝶*D. plexippus*基因组测序阐明了长距离迁飞的遗传和分子机制(Zhan *et al.*, 2011);东亚飞蝗*Locusta migratoria*基因组测序阐释了群居与长距离迁飞的机制(Wang *et al.*, 2014)及特殊的嗅觉系统(Wang *et al.*, 2015b)。从NCBI-PubMed网站以查阅到大量昆虫基因组研究方面的文章。国内有很多公司可以完成测序及分析工作。但基因组测序花费的资金较多,所获得的数据也很多,虽然可以提供大数据,但却难以从中确定某一信号途径的关键基因及调控的分子机制。

3 转录组学

转录组学是研究细胞中基因转录及转录调控规律的科学(Wang *et al.*, 2009)。转录组是细胞内所有基因转录产物的集合,包括mRNA和非编码

RNA。转录组测序已经替代了芯片技术,广泛应用于基因表达谱分析(McGettigan, 2013)。相对于基因组测序的昂贵费用,转录组测序的费用大多数实验室可以承受。对于基因组未知的物种,可以通过测定转录组获得RNA序列。新一代高通量测序能够全面快速地获得某一物种特定组织或器官在某一状态下的转录本序列信息。获得的RNA序列可以用于各种生物信息学分析及蛋白质表达及功能研究,预测蛋白质结构及互作(<http://swissmodel.expasy.org/>)。转录组测序的不足之处是不能获得基因的内含子序列,因此,要研究基因的各种调控元件,必须通过基因组步移技术(genome walking),即设计引物,以基因组DNA(gDNA)为模板,扩增5'或3'非翻译区,再分析启动子、内含子、转录因子结合元件、miRNA结合序列等。虽然转录组不能提供内含子序列,转录组测序仍然可以为基因组未知的物种提供足够的基因表达信息,开展各种功能研究。随着转录组测序技术成熟及费用的下降,现在可以通过转录组测序获得某种生物的比较完整的ORF序列及差异表达的基因,通过重复测序可以统计分析差异表达的RNA(Wu *et al.*, 2016)。目前,转录组测序技术已经替代了过去的差异显示技术(differential display-PCR, DD-PCR)(Liang and Pardee, 1992)和抑制性消减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)技术(Diatchenko *et al.*, 1996)。转录组测序虽然可以获得大量的差异表达基因,分析各种信号通路,但与基因组测序一样,存在数据众多,而对机制阐释不足的缺点,难以从众多差异表达的基因中确认上游关键基因及作用机制。

4 蛋白质组学

蛋白质组学是大规模研究蛋白质的表达水平、翻译后修饰及相互作用的科学。蛋白质组是指由基因组表达的所有蛋白质。蛋白质是实现各种生命活动的物质基础(Anderson and Anderson, 1998)。不同的组织、细胞、生理或病理条件下蛋白质表达是不同的,因此可以通过研究特定条件下蛋白质的表达水平,以发现某种蛋白质或某信号途径中的蛋白质的功能。在棉铃虫中,通过蛋白质组学研究昆虫蜕皮与变态的差异基因,在5龄蜕皮时期的棉铃虫幼虫表皮、血淋巴、脂肪体和肠中鉴定到数十个差异表达的蛋白质,为后续研究昆虫蜕皮提供了一系列

靶标蛋白(Zhao *et al.*, 2006)。蛋白质组学研究技术包括双向电泳、质谱技术等,需要经过长时间专门训练才能掌握。目前国内已经可以通过公司提供的技术服务完成蛋白质组学研究,大大节省了时间和提高了成功率。

因为蛋白质存在翻译后修饰,如磷酸化、糖基化、乙酰化、甲基化等,这些翻译后修饰对蛋白质功能具有决定作用,因此蛋白质组学是研究蛋白质翻译后修饰(如蛋白质磷酸化)比较好的技术。在棉铃虫中,通过双向电泳和 Pro-Q 染色从棉铃虫表皮鉴定到 61 种变态时期差异磷酸化的蛋白质点,通过 RT-PCR 验证了 8 种蛋白质在 mRNA 水平高表达,通过 Western blot 证明其中的储存蛋白(hexamerin)和肌动蛋白结合蛋白(calponin)存在蛋白质磷酸化(Fu *et al.*, 2009)。进一步研究表明,calponin 通过磷酸化参与 20E 途径基因转录,而非磷酸化形式与转录因子 USP 结合,参与 JH 途径基因转录(Liu *et al.*, 2011)。通过先分离磷酸化蛋白质再进行质谱鉴定的方法,在棉铃虫表皮细胞系 HaEpi(Shao *et al.*, 2008)中鉴定到 30 余种受 20E 调控的蛋白,包括 20E 核受体 EcR、异源二聚体蛋白 USP 及 G 蛋白 α 等 20E 途径的关键蛋白(Ren *et al.*, 2014),并在后续工作中证明了 USP 蛋白受 20E 调控磷酸化(Liu *et al.*, 2014)。

与转录组一样,蛋白质组学研究虽然可以获得大量的差异表达蛋白,但检测到的是在某一条件下蛋白质总体表达的结果,虽然也可以分析各种通路,但难以从众多蛋白质中确认上游关键蛋白并阐释作用机理。对蛋白质组学中鉴定到的蛋白质功能及作用机制需要后续深入研究。对于基因组未知的昆虫,只能根据亲缘关系最近的物种的蛋白质库鉴定蛋白质。例如,棉铃虫蛋白质质谱得到的氨基酸序列要用家蚕的蛋白质库进行比对,才能鉴定是何种蛋白,因为鳞翅目昆虫与果蝇的蛋白质差异较大,与人的蛋白质差异更大。因此,对于基因组未知的昆虫,蛋白质质谱鉴定难度很大,有些差异表达的蛋白质因为保守性不高而不能被鉴定到是何种蛋白质。

5 蛋白质结构研究

蛋白质三维结构是发挥功能的基础。Brian Kobilka 长期研究 GPCR,解析了 GPCR 与 G 蛋白结合瞬间传导信号的结构,获得 2012 年诺贝尔化学奖(Rasmussen *et al.*, 2011)。蛋白质结构解析需要先

结晶蛋白质,然后通过 X 射线晶体衍射。近年来快速发展的冷冻电镜技术免除了蛋白质结晶的困扰,但对小的蛋白质解析度低(Bai *et al.*, 2015)。核磁共振成像(nuclear magnetic resonance, NMR)可以在溶液状态下观察蛋白质结构(Ma *et al.*, 2015)。X 射线衍射、冷冻电镜及核磁共振均需要昂贵的设备及研究经验,在必要时可以通过与有关实验室合作的方式开展研究。一般观察到的蛋白质结构为静态结构,对蛋白质发挥功能的动态结构研究难度很大,因此,仅研究蛋白质结构对阐明蛋白质的功能有一定的局限性。目前已经解析了很多蛋白质的结构,因为蛋白质的功能域从低等生物到高等生物具有保守性,因此可以运用同源建模软件(<http://swissmodel.expasy.org/>),根据已知结构分析同类蛋白质的三维结构。蛋白质结构需要与蛋白质功能研究相结合才能证明结构与功能的关系。

无论哪种蛋白质结构研究技术都需要大规模可溶表达和纯化蛋白质。常用的蛋白质表达系统有大肠杆菌 *Escherichia coli*、毕赤酵母菌 *Pichia pastoris*、昆虫杆状病毒 *Baculovirus* 等表达系统。大肠杆菌表达系统操作简便,成本低廉,是表达蛋白质的首选表达系统。但大肠杆菌缺乏翻译后修饰及二硫键形成相关的蛋白,有的蛋白质可以表达成可溶性并有功能的蛋白,但大多数真核生物的蛋白质容易在大肠杆菌中形成包涵体。虽然包涵体可以通过变性和复性处理获得可溶性蛋白,但多数复性后的蛋白质结构和活性与天然蛋白还是存在差异,因此大肠杆菌表达系统难以可溶性表达许多真核生物的蛋白质,特别是跨膜蛋白。毕赤酵母属于真核表达系统,可以高浓度表达真核生物蛋白质,可溶性较好,但糖基化修饰与真核生物存在差异。昆虫病毒表达系统不需要 CO₂ 培养箱,基因重组病毒可以在细胞系中或通过感染途径引入昆虫体内大量表达目的蛋白。哺乳动物表达系统需要 CO₂ 培养箱,成本较高,主要用于表达某些翻译后修饰与哺乳动物蛋白严格相同的蛋白质,如某些临床使用的基因工程药物。蛋白质纯化可以通过传统的柱层析,包括离子交换、分子筛等方法进行。如果目的蛋白融合有标签则可以通过亲和纯化获得目的蛋白,如组氨酸标签(His-Tag)可以用镍离子亲和纯化柱纯化蛋白质,必要时进一步采用离子交换及分子筛等技术获得纯化的蛋白质。

6 基因敲除、基因沉默及基因编辑技术

基因敲除是通过 DNA 同源重组去除或破坏基

因的 DNA 序列,在模式生物中广泛应用。基本过程包括构建基因敲除载体、注射胚胎或胚胎干细胞、选择纯合体 (Skarnes *et al.*, 2011)。模式生物有基因组序列信息支持基因敲除同源位点的确定及载体构建,但在基因组未知的生物中则难以应用基因敲除技术,没有基因组序列信息一直是困扰非模式生物基因功能研究的瓶颈。

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 或转录后基因沉默 (post-transcriptional gene silencing) 是由内源或外源的双链 RNA (dsRNA) 诱发的 mRNA 特异性降解的现象,普遍存在于线虫、果蝇、植物、动物中。dsRNA 与沉默复合体结合,分解成单链并结合到靶标 mRNA 上,指导沉默复合体中的核酸酶 Argonaute 2 水解目的 mRNA,被切割后的 mRNA 随即被降解,导致蛋白质不能翻译,基因功能丧失 (Gregory *et al.*, 2005)。Andrew Fire 和 Craig C. Mello 阐明了 dsRNA 导致基因沉默的机制 (Fire *et al.*, 1998), 获得 2006 年度诺贝尔生理学或医学奖。

利用 RNAi 原理发展的基因沉默技术,为在不能进行基因敲除的非模式生物中开展基因功能研究提供了可能。与哺乳动物不同,在昆虫中可以用长片段 (50 ~ 500 bp) 双链 RNA (dsRNA) 进行 RNA 干扰,长片段的 dsRNA 可以被体内的 RNA 酶 (Dicer) 水解成短的 dsRNA。昆虫中存在系统性 RNA 干扰,即在一种组织中注射 dsRNA,可以在多种组织中检测到干扰效果。在棉铃虫中可以通过饲喂表达 dsRNA 的大肠杆菌进行 RNA 干扰 (Liu *et al.*, 2011; Dong *et al.*, 2012), 大肠杆菌菌株和 dsRNA 表达质粒可以通过公司购买 (<https://www.addgene.org>), 将目的基因片段插入到表达质粒中并转化到大肠杆菌即可获得表达 dsRNA 的大肠杆菌。在棉铃虫中也可以通过血淋巴注射体外合成的 dsRNA 进行 RNA 干扰 (Liu *et al.*, 2013a)。体外合成 dsRNA 需要根据基因开读框设计带有 T₇ RNA 聚合酶结合序列的引物,通过 PCR 扩增模板,用 dsRNA 合成试剂盒或 T₇ RNA 聚合酶及核苷酸底物在体外合成。用 RNA 转染试剂将 dsRNA 转染到昆虫细胞内,也可以通过构建表达小发夹结构的 RNA (shRNA) 的质粒在细胞内产生 shRNA 进行 RNAi,但直接注射 dsRNA 到虫体或转染 dsRNA 到细胞可以减少质粒在体内表达 shRNA 的步骤。与基因敲除技术不同, RNAi 只是在细胞质中暂时降低 mRNA 水平,不能在细胞核中敲除基因或长时间沉默基因。

RNAi 技术的应用极大地推动了非模式生物基

因功能研究,是研究非模式生物基因功能的重要技术。RNA 干扰已经在很多昆虫中获得成功,包括双翅目、鳞翅目、鞘翅目、直翅目、同翅目和蜚蠊目等 (Yu *et al.*, 2013)。对于不同的基因干扰效率有所不同,有的基因比较容易干扰成功,有的较难干扰成功,机制尚不清楚。有的 RNA 被干扰后 mRNA 水平有所下降,但蛋白质水平下降不显著,需要延长干扰时间,待蛋白质水平下降后再检测基因的功能。蛋白质是发挥生物学功能的分子,在进行 RNA 干扰的实验中,宜采用 Western blot 检查蛋白质水平下降来确认干扰效果,特别是对某些降解较慢的蛋白尤其重要。在昆虫细胞系中进行 RNA 干扰较虫体容易成功,与 dsRNA 较组织中容易进入细胞有关。RNAi 干扰技术难度不大,一般的实验室都能进行该实验,在大多数昆虫中干扰效果比较好,目前仍然在各种真核生物基因功能研究中广泛应用 (Unniyampurath *et al.*, 2016)。

CRISPR/Cas9 基因编辑是通过 RNA 介导的 DNA 编辑技术。CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein 9) 是细菌在进化中形成的一种免疫防御系统。细菌将入侵的噬菌体和质粒的 DNA 片段整合到自己的 DNA 中形成成簇的、规律间隔的短回文重复序列 (CRISPR), 根据 CRISPR 转录 RNA (crRNA), crRNA 与核酸酶 Cas9 结合,将 Cas9 靶向到噬菌体和质粒的 DNA, Cas9 剪切噬菌体和质粒的双链 DNA,从而干扰或降解噬菌体和质粒的 DNA。根据该原理发展的 CRISPR/Cas9 DNA 编辑技术,根据要编辑的靶标 DNA 序列,在体外合成指导 RNA (guide RNA, gRNA), gRNA 结合 Cas9 并将 Cas9 靶向到靶标 DNA 并剪切靶标 DNA,在生物体内修复 DNA 缺口的过程中产生基因突变,破坏基因开读框,从而实现基因编辑。也可以利用该技术在切割的位点插入基因,形成转基因生物。基因敲入是在 DNA 剪切后在该位置利用同源片段插入一个新的基因片段,因此,插入效率较低。CRISPR-Cas9 系统可以作为简单灵活的基因组编辑工具 (Jinek *et al.*, 2012)。CRISPR/Cas9 已经广泛用于哺乳动物 (Wang *et al.*, 2013a)、植物 (Luo *et al.*, 2016) 及家蚕的基因组编辑 (Wang *et al.*, 2013b; Zeng *et al.*, 2016), 为各种生物的基因编辑提供了新的方法。

应用 CRISPR/Cas9 技术在受精卵中进行 DNA 编辑时,根据靶标 DNA 在体外合成物种序列特异的 gRNA 和不同物种通用的 Cas9 RNA,共同注射到早

期受精卵。在细胞系中进行 DNA 编辑时,通过构建带有合适启动子的表达 gRNA 的质粒和 Cas9-质粒,共同转染细胞,实现基因编辑。在细胞中表达 gRNA 的质粒一般用 U6 启动子,在相近的物种中可以通用,质粒上有结合 Cas9 的 RNA 骨架结构,没有物种特异性。在细胞中表达 Cas9 的质粒需要相近物种的启动子。需要注意的是,选择 gRNA 时要避开内含子才能使基因编辑后的开读框被破坏,达到基因编辑的目的。对基因组未知的生物需要用 DNA 模板通过 PCR 确认 gRNA 的序列位于外显子中。Cas9 需要识别目标 DNA 中 3'端附近的前间区序列邻近基序 (protospacer-adjacent motif, PAM) 5'-NGG-3'才能切割 DNA 双链,因此,gRNA 应注意选在 5'-NGG-3'前面。与传统的基因敲除技术相比,CRISPR/Cas9 技术易于操作,但与 RNAi 技术相比,CRISPR/Cas9 相对复杂一些,特别是在昆虫细胞系中后期进行单细胞克隆有一定的难度,昆虫细胞系中染色体数量增加也导致了编辑的难度。在昆虫受精卵注射中还需要克服卵壳的硬度及某些昆虫分散产卵的问题。另外,Cas9 的 ORF 比较大,在体外合成 Cas9 的 mRNA 有一定难度。

NgAgo-gDNA 编辑技术是韩春雨等新近建立的一种通过 DNA 介导的 DNA 编辑技术 (Gao *et al.*, 2016)。从格氏嗜盐碱杆菌 *Natronobacterium gregoryi* 中克隆到的内切核酸酶 Argonaute (NgAgo) 可以在 37°C 的生理温度下切割双链 DNA。在 NgAgo 蛋白的氨基端加上核定位信号后,NgAgo 可以进入细胞核,与人工合成的 24 核苷酸大小的 5'-磷酸化单链 DNA (5'-P-ssDNA),即指导 DNA (guide DNA, gDNA) 结合,gDNA 准确结合到靶标 DNA 单链,介导 NgAgo 在靶标 DNA 处水解目的 DNA 双链。24 核苷酸大小的 5'-P-ssDNA 在真核生物中几乎不存在,因此该方法可以用于真核生物的基因编辑,也可以在 DNA 切断处通过同源重组插入外源基因。研究表明该技术导致的脱靶效应很低,如果有 3 个碱基错配,NgAgo 就不能切断 DNA,而 CRISPR/Cas9 可以容忍 5 个碱基错配 (Hsu *et al.*, 2014)。NgAgo 切割 DNA 不需要特殊的 PAM 序列,NgAgo 分子量仅有 Cas9 的 2/3,比较容易表达。该技术较 CRISPR/Cas9 操作简单,效率高,特异性好。5'-磷酸化的 24 碱基可以在公司合成,转染到细胞中的剂量可控。但 NgAgo 表达后容易失活,在哺乳动物细胞中需要通过表达质粒新翻译的 NgAgo 才能结合 5'-P-ssDNA。NgAgo-gDNA 技术可能广泛应用到各

种生物的基因编辑中。

无论基因敲除、RNAi 或基因编辑技术都有可能存在脱靶效应,可以通过多位点的干扰或编辑进行验证。

7 常规分子生物学方法

常规分子生物学研究方法包括实时定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR),蛋白质印记 (Western blot),免疫共沉淀 (co-immunoprecipitation, CoIP),荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET),免疫组织化学及免疫细胞化学,蛋白质过表达及功能与结构域分析,染色质免疫共沉淀 (chromatin immunoprecipitation, ChIP),以及凝胶迁移实验 (electrophoretic mobility shift assay, EMSA) 等,可根据不同的研究目的灵活运用。

qRT-PCR 方法是检测 mRNA 表达水平的方法 (Pfaffl *et al.*, 2002)。qRT-PCR 方法的普及为测定特定条件下 mRNA 的表达水平提供了非常方便的技术,基本上替代了过去的 Northern blot 实验,被各种分子生物学研究广泛应用。由于 mRNA 是蛋白质翻译的模板,因此从理论上讲大多数 mRNA 的表达水平代表了蛋白质表达水平。在没有获得抗体检测蛋白质的情况下可以 qRT-PCR 方法检测基因表达水平。

Western blot (Towbin *et al.*, 1979) 是检测蛋白质的技术。蛋白质是发挥生物学功能的分子,可能存在翻译后修饰。通过提取不同条件下的蛋白质,用 Western blot 方法不仅可以看到蛋白质表达量的变化,而且可以看到蛋白质翻译后修饰导致的分子量变化,如某些蛋白质活化后可能出现的片段化、磷酸化、糖基化及乙酰化等。蛋白质发生修饰后会导致分子量的轻微变化,可以通过改变蛋白质电泳的凝胶浓度检测蛋白质修饰后的分子量变化,也可以用特殊的抗体检测蛋白质修饰。我们运用 Western blot 检测到 20E 调控棉铃虫钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II 的磷酸化导致的分子量增加,通过磷酸酶水解证明分子量增加是磷酸化修饰的结果,利用乙酰化抗体检测到 USP 乙酰化修饰 (Jing *et al.*, 2015)。通过 Akt 磷酸化抗体检测到 20E 抑制 Akt 磷酸化,进而抑制转录因子 FoxO 磷酸化,促进 FoxO 入核启动 20E 途径基因转录 (Cai *et al.*, 2016)。蛋白质翻译后修饰可能导致蛋白质构象变化,由此引发蛋白质互作变化以及亚细胞定位的变化,这些都是蛋白质

发挥功能的基础。因此,检测蛋白质翻译后修饰是阐释蛋白质作用机制的必要实验。Western blot 需要有特异性的抗体,可以从公司购买,也可以自己重组表达蛋白质,免疫兔子,制备多克隆抗体。

蛋白质过表达是用载体在细胞系中表达蛋白质的技术。蛋白质过表达可以在细胞中提高某种蛋白质的含量,检查蛋白质在细胞中的功能,与 RNA 干扰降低蛋白质水平的实验形成双向验证,在研究蛋白质功能中普遍应用。蛋白质过表达为研究蛋白质关键结构域或位点提供了很好的技术,例如,通过缺失突变或点突变基因序列,表达突变的蛋白质,与野生型蛋白比较功能差异,从而确定蛋白质关键结构或位点。通过与绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 或红色荧光蛋白 (red fluorescent protein, RFP) 融合表达目的蛋白,在荧光显微镜下可以实时监测蛋白质的亚细胞定位和移位,建立研究模型,通过 RNAi 分析上游调控因子及途径以及下游产出效应,免去了抗体缺失的困扰。也可以通过 GFP 抗体或 RFP 抗体用免疫共沉淀技术检测蛋白质相互作用。在蛋白质末端加上组氨酸标签 (His-Tag), 可以用 His 抗体检查蛋白质及与其他蛋白的互作。在棉铃虫中通过与荧光蛋白融合表达,证明棉铃虫 G-蛋白偶联受体 2 (ErGPCR-2) 定位在细胞膜上并可以在 20E 调控下进入细胞质,通过突变鉴定了 ErGPCR-2 的磷酸化位点及其在进入细胞质中的作用 (Wang *et al.*, 2015a)。荧光蛋白为活体和细胞中实时观察蛋白质提供了可能,各种突变体荧光蛋白可以产生不同的荧光颜色,应用范围非常广泛,不仅在细胞中,而且在个体中均可标记并观察蛋白质 (Tsien, 1998), 该技术获得 2008 诺贝尔化学奖。商业化的昆虫细胞系主要有果蝇胚胎细胞系 S2 (Schneider, 1972), 草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 卵巢细胞系 Sf9 和 Sf21 (Vaughn *et al.*, 1977)。也可以自己建立昆虫的细胞系,如棉铃虫表皮细胞系 (Shao *et al.*, 2008)。相近物种的细胞系可以应用到相近物种研究中。

CoIP 主要用于研究蛋白质相互作用。先用一种特定的抗体沉淀目标蛋白,同时共沉淀其他结合在一起的蛋白,再进行 Western blot,用不同的特异性抗体分别检测免疫共沉淀中的蛋白质。因此,CoIP 中检测不同蛋白质的抗体必须具备特异性,不能交叉识别免疫共沉淀中不同的蛋白质。在棉铃虫研究中应用 CoIP 检测到 20E 调控热休克蛋白 90 (Hsp90) 与转录因子 USP 互作,而 JH 调控 Hsp90 与

JH 的胞内受体 Met 互作 (Liu *et al.*, 2013b)。免疫共沉淀蛋白质时应该注意避开蛋白质等电点,还要注意避开免疫球蛋白 IgG 重链和轻链与目的蛋白分子量的重叠。免疫共沉淀是检测蛋白质互作的常用方法。

FRET 技术也是检测蛋白质相互作用的方法。FRET 是距离很近的两个荧光分子间产生的一种能量转移现象。将供体蛋白青色荧光蛋白 (cyan fluorescent protein, CFG) 和受体蛋白黄色荧光蛋白 (yellow fluorescent protein, YFG) 分别与两种目的蛋白融合表达。当两个蛋白质分子互作时的距离在 10 nm 范围以内时,高能量供体分子 CFP 就会将能量转移给低能分子受体 YFP,使得供体的荧光强度比它单独存在时要低的多 (荧光猝灭),而能量受体分子发射的荧光却大大增强 (敏化荧光) (Nguyen and Daugherty, 2005)。该方法要求用荧光共振能量转移显微镜或共聚焦显微镜观察结果,一般实验室不具备该设备。

免疫组织化学及免疫细胞化学可用于研究蛋白质组织分布和亚细胞定位,在各种生物学科学问题研究中是不可或缺的技术,在棉铃虫研究中也广泛应用 (Liu *et al.*, 2015a)。免疫组织化学及免疫细胞化学需要用特异性抗体和荧光标记的二抗检测目的蛋白。免疫组织化学的样品制备可以采用石蜡包埋切片或冷冻切片,石蜡包埋切片比较薄,可以在荧光显微镜下观察,而冷冻切片比较厚,需要通过激光共聚焦显微镜提高成像的分辨率。免疫细胞化学经过细胞固定即可进行后续工作。免疫组织化学及免疫细胞化学要尽量用激光共聚焦显微镜成像以得到高清晰度图像。

ChIP (Collas, 2010) 和 EMSA (Garner and Revzin, 1981) 是研究转录因子及 DNA 结合元件的必需方法。ChIP 实验是通过抗体沉淀目的蛋白并共沉淀目的蛋白质结合的 DNA,通过 qRT-PCR 即可以测定蛋白质结合的 DNA 的量,与对照比较,可以显示转录因子结合 DNA 的异同。EMSA 是根据蛋白质结合 DNA 后可以改变 DNA 在凝胶中的迁移率的原理进行的实验。需要合成一段 DNA 并标记上地高辛或生物素作探针,与蛋白质孵育后,通过聚丙烯酰胺凝胶电泳和转膜,用地高辛或生物素抗体检测标记的 DNA 的迁移率变化,即可显示转录因子是否结合 DNA。可以结合基因突变及过表达技术,分析转录因子结合 DNA 的关键功能域或位点、上游调控因子及途径以及下游产出效应。在研究 20E 或 JH 调控基因转录中有较多应用 (Cai *et al.*, 2014b)。

8 展望

科学研究的技术进步极大地推动了科学研究水平的提高,近年来的诺贝尔生理或化学奖多数颁发给了创造各种新技术的发明者,因此发明和创造新的生物技术仍然是今后生物学包括昆虫学研究的重要内容。而根据生产实践的需要及现有理论凝练的各种基本科学问题也是今后生物学包括昆虫学研究的重要内容。不同昆虫目之间可能存在特殊的适应性基因及机制,可以作为昆虫学小领域的科学问题开展研究,而不同昆虫以及不同生物间存在进化保守性,其中的共同科学问题,可以作为昆虫学及生物学大领域的科学问题开展研究。原创性研究课题可以来自于生产实践的需要或研究过程中的意外发现,也可以来自于现有理论假设和推导。凝练原始创新性科学问题是获得创新性成果的基础。在昆虫学科学问题凝练中注意选择大生物学领域共同感兴趣的科学问题,有助于将成果发表到综合性杂志,提高成果的影响力。经典的昆虫学基本问题已经有了多年研究积累,但一些关键的科学问题并没有得到阐释,还有待利用新的技术和方法开展深入研究。在一些研究较少的新兴领域中开展研究,例如神经、行为、生物节律等,可能会有较好的发展空间。转录组测序的普及、基因编辑技术的成功已经打破了模式生物与非模式生物的界限,为研究各种重要的农业害虫提供了技术条件。根据不同的科学问题,综合运用先进的研究方法和技术,开展深入的研究工作,可以推动昆虫学研究进展和提高研究水平。

参考文献 (References)

Allendorf FW, Hohenlohe PA, Luikart G, 2010. Genomics and the future of conservation genetics. *Nat. Rev. Genet.*, 11 (10): 697 - 709.

Anderson NL, Anderson NG, 1998. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*, 19 (11): 1853 - 1861.

Badran AH, Guzov VM, Huai Q, Kemp MM, Vishwanath P, Kain W, Nance AM, Evdokimov A, Moshiri F, Turner KH, Wang P, Malvar T, Liu DR, 2016. Continuous evolution of *Bacillus thuringiensis* toxins overcomes insect resistance. *Nature*, 533(7601): 58 - 63.

Bai XC, McMullan G, Scheres SHW, 2015. How cryo-EM is revolutionizing structural biology. *Trends Biochem. Sci.*, 40(1): 49 - 57.

Cai MJ, Dong DJ, Wang Y, Liu PC, Liu W, Wang JX, Zhao XF, 2014a. G-protein-coupled receptor participates in 20-hydroxyecdysone signaling on the plasma membrane. *Cell Commun.*

Signal., 12: 9.

Cai MJ, Liu W, Pei XY, Li XR, He HJ, Wang JX, Zhao XF, 2014b. Juvenile hormone prevents 20-hydroxyecdysone-induced metamorphosis by regulating the phosphorylation of a newly identified broad protein. *J. Biol. Chem.*, 289(38): 26630 - 26641.

Cai MJ, Zhao WL, Jing YP, Song Q, Zhang XQ, Wang JX, Zhao XF, 2016. 20-Hydroxyecdysone activates Forkhead box O to promote proteolysis during *Helicoverpa armigera* molting. *Development*, 143 (6): 1005 - 1015.

Charles JP, Iwema T, Epa VC, Takaki K, Rynes J, Jindra M, 2011. Ligand-binding properties of a juvenile hormone receptor, Methoprene-tolerant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108 (52): 21128 - 21133.

Collas P, 2010. The current state of chromatin immunoprecipitation. *Mol. Biotechnol.*, 45(1): 87 - 100.

Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD, 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(12): 6025 - 6030.

Ding R, Weynans K, Bossing T, Barros CS, Berger C, 2016. The Hippo signalling pathway maintains quiescence in *Drosophila* neural stem cells. *Nat. Commun.*, 7: 10510.

Dong DJ, Liu PC, Wang JX, Zhao XF, 2012. The knockdown of Ha-GRIM-19 by RNA interference induced programmed cell death. *Amino Acids*, 42(4): 1297 - 1307.

Dovrat D, Aharoni A, 2016. Bioengineering: evolved to overcome *Bt*-toxin resistance. *Nature*, 533(7601): 39 - 40.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC, 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669): 806 - 811.

Fu Q, Liu PC, Wang JX, Song QS, Zhao XF, 2009. Proteomic identification of differentially expressed and phosphorylated proteins in epidermis involved in larval-pupal metamorphosis of *Helicoverpa armigera*. *BMC Genomics*, 10: 600.

Gao F, Shen XZ, Jiang F, Wu Y, Han C, 2016. DNA-guided genome editing using the *Natronobacterium gregoryi* Argonaute. *Nat. Biotechnol.*, 34: 768 - 773.

Garibaldi LA, Carvalheiro LG, Vaissiere BE, Gemmill-Herren B, Hipolito J, Freitas BM, Ngo HT, Azzu N, Saez A, Astrom J, An J, Blochtein B, Buchori D, Chamorro Garcia FJ, Oliveira da Silva F, Devkota K, Ribeiro Mde F, Freitas L, Gaglianone MC, Goss M, Irshad M, Kasina M, Pacheco Filho AJ, Kiill LH, Kwamong P, Parra GN, Pires C, Pires V, Rawal RS, Rizali A, Saraiva AM, Veldtman R, Viana BF, Witter S, Zhang H, 2016. Mutually beneficial pollinator diversity and crop yield outcomes in small and large farms. *Science*, 351(6271): 388 - 391.

Garner MM, Revzin A, 1981. A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res.*, 9(13): 3047 - 3060.

Gold KS, Bruckner K, 2015. Macrophages and cellular immunity in

- Drosophila melanogaster*. *Semin. Immunol.*, 27(6): 357–368.
- Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R, 2005. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 123(4): 631–640.
- Hincapie CA, Monsalve Z, Parada K, Lamilla C, Alarcon J, Cespedes CL, Seigler D, 2011. Insect growth regulatory activity of *Blechnum chilense*. *Nat. Prod. Commun.*, 6(8): 1085–1088.
- Hsu PD, Lander ES, Zhang F, 2014. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157(6): 1262–1278.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E, 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096): 816–821.
- Jing YP, Liu W, Wang JX, Zhao XF, 2015. The steroid hormone 20-hydroxyecdysone via nongenomic pathway activates Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II to regulate gene expression. *J. Biol. Chem.*, 290(13): 8469–8481.
- Kayukawa T, Nagamine K, Ito Y, Nishita Y, Ishikawa Y, Shinoda T, 2016. Kruppel homolog 1 inhibits insect metamorphosis via direct transcriptional repression of Broad-complex, a pupal specifier gene. *J. Biol. Chem.*, 291(4): 1751–1762.
- Liang P, Pardee AB, 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 257(5072): 967–971.
- Lin H, Xia X, Yu L, Vasseur L, Gurr GM, Yao F, Yang G, You M, 2015. Genome-wide identification and expression profiling of serine proteases and homologs in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *BMC Genomics*, 16: 1054.
- Liu CY, Liu W, Zhao WL, Wang JX, Zhao XF, 2013a. Upregulation of the expression of prodeath serine/threonine protein kinase for programmed cell death by steroid hormone 20-hydroxyecdysone. *Apoptosis*, 18(2): 171–187.
- Liu CY, Zhao WL, Wang JX, Zhao XF, 2015a. Cyclin-dependent kinase regulatory subunit 1 promotes cell proliferation by insulin regulation. *Cell Cycle*, 14(19): 3045–3057.
- Liu P, Peng HJ, Zhu J, 2015b. Juvenile hormone-activated phospholipase C pathway enhances transcriptional activation by the methoprene-tolerant protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 112(15): E1871–E1879.
- Liu PC, Wang JX, Song QS, Zhao XF, 2011. The participation of calponin in the cross talk between 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone signaling pathways by phosphorylation variation. *PLoS ONE*, 6(5): e19776.
- Liu W, Cai MJ, Zheng CC, Wang JX, Zhao XF, 2014. Phospholipase cgamma1 connects the cell membrane pathway to the nuclear receptor pathway in insect steroid hormone signaling. *J. Biol. Chem.*, 289(19): 13026–13041.
- Liu W, Zhang FX, Cai MJ, Zhao WL, Li XR, Wang JX, Zhao XF, 2013b. The hormone-dependent function of Hsp90 in the crosstalk between 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone signaling pathways in insects is determined by differential phosphorylation and protein interactions. *Biochim. Biophys. Acta*, 1830(11): 5184–5192.
- Lu Y, Wu K, Jiang Y, Guo Y, Desneux N, 2012. Widespread adoption of Bt cotton and insecticide decrease promotes biocontrol services. *Nature*, 487(7407): 362–365.
- Luo M, Gilbert B, Ayliffe M, 2016. Applications of CRISPR/Cas9 technology for targeted mutagenesis, gene replacement and stacking of genes in higher plants. *Plant Cell Rep.*, 35(7): 1439–1450.
- Ma H, Ma Y, Liu X, Dyer DH, Xu P, Liu K, Lan Q, Hong H, Peng J, Peng R, 2015. NMR structure and function of *Helicoverpa armigera* sterol carrier protein-2, an important insecticidal target from the cotton bollworm. *Sci. Rep.*, 5: 18186.
- McGettigan PA, 2013. Transcriptomics in the RNA-seq era. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 17(1): 4–11.
- Moriyama M, Osanai K, Ohyoshi T, Wang HB, Iwanaga M, Kawasaki H, 2016. Ecdysteroid promotes cell cycle progression in the *Bombyx* wing disc through activation of c-Myc. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 70: 1–9.
- Nguyen AW, Daugherty PS, 2005. Evolutionary optimization of fluorescent proteins for intracellular FRET. *Nat. Biotechnol.*, 23(3): 355–360.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L, 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.*, 30(9): e36.
- Rasmussen SG, DeVree BT, Zou Y, Kruse AC, Chung KY, Kobilka TS, Thian FS, Chae PS, Pardon E, Calinski D, Mathiesen JM, Shah ST, Lyons JA, Caffrey M, Gellman SH, Steyaert J, Skiniotis G, Weis WI, Sunahara RK, Kobilka BK, 2011. Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature*, 477(7366): 549–555.
- Ren J, Li XR, Liu PC, Cai MJ, Liu W, Wang JX, Zhao XF, 2014. G-protein alphaq participates in the steroid hormone 20-hydroxyecdysone nongenomic signal transduction. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 144 Pt B: 313–323.
- Roach JS, 2000. What's in a genome? *Anal. Chem.*, 72(17): 609A–611A.
- Schneider I, 1972. Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 27(2): 353–365.
- Shao HL, Zheng WW, Liu PC, Wang Q, Wang JX, Zhao XF, 2008. Establishment of a new cell line from lepidopteran epidermis and hormonal regulation on the genes. *PLoS ONE*, 3(9): e3127.
- Skarnes WC, Rosen B, West AP, Koutsourakis M, Bushell W, Iyer V, Mujica AO, Thomas M, Harrow J, Cox T, Jackson D, Severin J, Biggs P, Fu J, Nefedov M, de Jong PJ, Stewart AF, Bradley A, 2011. A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature*, 474(7351): 337–342.
- Srivastava DP, Yu EJ, Kennedy K, Chatwin H, Reale V, Hamon M, Smith T, Evans PD, 2005. Rapid, nongenomic responses to ecdysteroids and catecholamines mediated by a novel *Drosophila* G-protein-coupled receptor. *J. Neurosci.*, 25(26): 6145–6155.
- Tan A, Fu G, Jin L, Guo Q, Li Z, Niu B, Meng Z, Morrison NI, Alphey L, Huang Y, 2013. Transgene-based, female-specific

- lethality system for genetic sexing of the silkworm, *Bombyx mori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110(17): 6766–6770.
- Tang W, Yu L, He W, Yang G, Ke F, Baxter SW, You S, Douglas CJ, You M, 2014. DBM-DB: the diamondback moth genome database. *Database*, 2014: bat087.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J, 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76(9): 4350–4354.
- Tsien RY, 1998. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.*, 67: 509–544.
- Unniyampurath U, Pilankatta R, Krishnan MN, 2016. RNA interference in the age of CRISPR: will CRISPR interfere with RNAi? *Int. J. Mol. Sci.*, 17(3): 291.
- Vaughn JL, Goodwin RH, Tompkins GJ, McCawley P, 1977. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro*, 13(4): 213–217.
- Wang D, Zhao WL, Cai MJ, Wang JX, Zhao XF, 2015a. G-protein-coupled receptor controls steroid hormone signaling in cell membrane. *Sci. Rep.*, 5: 8675.
- Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R. 2013a. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 153(4): 910–918.
- Wang X, Fang X, Yang P, Jiang X, Jiang F, Zhao D, Li B, Cui F, Wei J, Ma C, Wang Y, He J, Luo Y, Wang Z, Guo X, Guo W, Zhang Y, Yang M, Hao S, Chen B, Ma Z, Yu D, Xiong Z, Zhu Y, Fan D, Han L, Wang B, Chen Y, Wang J, Yang L, Zhao W, Feng Y, Chen G, Lian J, Li Q, Huang Z, Yao X, Lv N, Zhang G, Li Y, Zhu B, Kang L, 2014. The locust genome provides insight into swarm formation and long-distance flight. *Nat. Commun.*, 5: 2957.
- Wang X, Kang L, 2014. Molecular mechanisms of phase change in locusts. *Annu. Rev. Entomol.*, 59(1): 225–244.
- Wang Y, Li Z, Xu J, Zeng B, Ling L, You L, Chen Y, Huang Y, Tan A, 2013b. The CRISPR/Cas system mediates efficient genome engineering in *Bombyx mori*. *Cell Res.*, 23(12): 1414–1416.
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M, 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.*, 10(1): 57–63.
- Wang Z, Yang P, Chen D, Jiang F, Li Y, Wang X, Kang L, 2015b. Identification and functional analysis of olfactory receptor family reveal unusual characteristics of the olfactory system in the migratory locust. *Cell Mol. Life Sci.*, 72(22): 4429–4443.
- Wu S, Tong X, Peng C, Xiong G, Lu K, Hu H, Tan D, Li C, Han M, Lu C, Dai F, 2016. Comparative analysis of the integument transcriptomes of the black dilute mutant and the wild-type silkworm *Bombyx mori*. *Sci. Rep.*, 6: 26114.
- Xia X, Yu L, Xue M, Yu X, Vasseur L, Gurr GM, Baxter SW, Lin H, Lin J, You M, 2015. Genome-wide characterization and expression profiling of immune genes in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Sci. Rep.*, 5: 9877.
- Xie K, Tian L, Guo X, Li K, Li J, Deng X, Li Q, Xia Q, Zhong Y, Huang Z, Liu J, Li S, Yang W, Cao Y, 2016. BmATG5 and BmATG6 mediate apoptosis following autophagy induced by 20-hydroxyecdysone or starvation. *Autophagy*, 12(2): 381–396.
- Xu HJ, Xue J, Lu B, Zhang XC, Zhuo JC, He SF, Ma XF, Jiang YQ, Fan HW, Xu JY, Ye YX, Pan PL, Li Q, Bao YY, Nijhout HF, Zhang CX, 2015. Two insulin receptors determine alternative wing morphs in planthoppers. *Nature*, 519(7544): 464–467.
- You Y, Xie M, Ren N, Cheng X, Li J, Ma X, Zou M, Vasseur L, Gurr GM, You M, 2015. Characterization and expression profiling of glutathione S-transferases in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *BMC Genomics*, 16: 152.
- Yu L, Tang W, He W, Ma X, Vasseur L, Baxter SW, Yang G, Huang S, Song F, You M, 2015. Characterization and expression of the cytochrome P450 gene family in diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Sci. Rep.*, 5: 8952.
- Yu N, Christiaens O, Liu JS, Niu JZ, Cappelle K, Caccia S, Huvenne H, Smagghe G, 2013. Delivery of dsRNA for RNAi in insects: an overview and future directions. *Insect Sci.*, 20(1): 4–14.
- Zeng B, Zhan S, Wang Y, Huang Y, Xu J, Liu Q, Li Z, Tan A, 2016. Expansion of CRISPR targeting sites in *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 72: 31–40.
- Zhan S, Merlin C, Boore JL, Reppert SM, 2011. The monarch butterfly genome yields insights into long-distance migration. *Cell*, 147(5): 1171–1185.
- Zhao XF, He HJ, Dong DJ, Wang JX, 2006. Identification of differentially expressed proteins during larval molting of *Helicoverpa armigera*. *J. Proteome Res.*, 5(1): 164–169.
- Zinner D, Alberts SC, Nunn CL, Altmann J, 2002. Evolutionary biology: significance of primate sexual swellings. *Nature*, 420(6912): 142–143.

(责任编辑: 赵利辉)