

棉铃虫蜕皮调节转录因子在大肠杆菌中的重组表达及其包涵体纯化

赵小凡, 蒋晓娟, 徐筠婷, 刘延荷, 王金星

(山东大学生命科学院, 济南 250100)

摘要: 蜕皮调节转录因子(hormone receptor 3, HR3)在昆虫蜕皮过程中启动蜕皮相关早期基因簇表达, 并抑制蜕皮相关晚期基因簇表达, 对昆虫蜕皮级联反应起着关键的调控作用。利用合成的特异性引物通过 RT-PCR 扩增了棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 蜕皮调节转录因子(HHR3), 并与 pGEX-4T-1 载体连接, 在大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 内进行扩增, 经过 PCR 筛选获得了 HHR3-pGEX-4T-1 重组质粒。用该质粒转化大肠杆菌表达菌株 BL21 并进行诱导表达, 获得了与谷胱甘肽-S 转移酶(GST)融合表达的 HHR3 包涵体, 分子量在 94 kD 左右, 通过无离子去垢剂 CAPS(3-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonic acid)变性、复性后获得了可溶性 GST-HHR3 融合蛋白, 经凝血酶裂解和 SDS-PAGE 分离得到纯化的 HHR3, 经蛋白质 N-端测序确认表达正确。用重组表达的 HHR3 免疫家兔, 制备了兔抗 HHR3 多克隆抗体, 免疫印迹检测显示该抗体对 HHR3 有特异性识别能力, 可以用于 HHR3 功能与调控等下游研究。免疫印迹检测结果还表明, HHR3 在 5 龄向 6 龄蜕皮的幼虫脂肪体中高表达, 在进入 6 龄 24 h 的幼虫脂肪体中含量明显下降, 在 6 龄 72 h 的幼虫中肠中没有检测到 HHR3 表达; 成虫卵巢中有 HHR3 表达。

关键词: 棉铃虫; 蜕皮调节转录因子; 重组表达; 包涵体纯化; 抗体制备

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2004)03-0281-06

Recombinant expression and purification of inclusion bodies of the molt-regulating transcription factor HHR3 from *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)

ZHAO Xiao-Fan, JIANG Xiao-Juan, XU Yun-Ping, LIU Yan-He, WANG Jin-Xing (School of Life Sciences, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract: Molt-regulating transcription factor 3 (hormone receptor 3, HR3) plays important roles in regulating expression of tissue-specific genes involved in insect molting and metamorphosis, which initiates expression of chitinase and proteases but represses expression of larval cuticular protein and eclosion hormone during molting. The cDNA encoding the molt-regulating transcription factor 3 was cloned with RT-PCR using gene specific primers from *Helicoverpa armigera*. A recombinant expression plasmid, HHR3-pGEX-4T-1, was constructed and the protein was expressed in BL21 strain of *Escherichia coli*. However, the expressed target protein formed complete inclusion bodies of the molecular size 94 kD. The inclusion bodies were solubilized by being denatured with CAPS(3-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonic acid) and refolded through dialysis against Tris-HCl buffer. After cleavage with thrombin, the target protein was separated by SDS-PAGE and confirmed with N-terminal amino acid sequencing. This recombinant HHR3 was used as an antigen for preparation of rabbit polyclonal antibody. The immunoblotting results indicated that the antibody was specific to HHR3 from *H. armigera* and can be used for further research on the function and regulation of HHR3. Moreover, HHR3 showed high expression in the fat bodies of 5th toward 6th instar molting larvae and declined at 24 h post molting. HHR3 was also detected from ovaries of the adult *H. armigera*, but not detectable from midguts the 6th instar larvae of *H. armigera* at 72 h after molting.

Key words: *Helicoverpa armigera*; molt-regulating transcription factor; recombinant expression; purification; antibody production

基金项目: 国家自然科学基金项目(39870095, 30080002 和 30330070); 国家高技术研究发展计划“863”项目(2001AA214031-1-2)

作者简介: 赵小凡, 女, 1957年生, 四川人, 博士, 教授, 主要从事昆虫分子生物学研究, E-mail: xfzhao@sdu.edu.cn

收稿日期 Received: 2003-10-30; 接受日期 Accepted: 2004-02-02

昆虫要经过多次蜕皮才能化蛹和成熟,这种生长与蜕皮交替的生理过程是由保幼激素和蜕皮激素调控的。蜕皮时,蜕皮激素滴度升高,幼虫停食少动,发生皮层溶离,旧表皮脱落,完成蜕皮过程;随之,蜕皮激素滴度下降,保幼激素滴度升高,幼虫进入取食生长期(Riddiford, 1993; Riddiford *et al.*, 1999)。昆虫蜕皮过程是由一个调控元调控的一系列基因组成的级联反应(Huet *et al.*, 1995),包括蜕皮早期基因族,如蜕皮调节转录因子基因、蛋白酶基因、几丁质酶基因等;晚期基因族,如蜕壳激素基因,多巴脱羧酶基因等;还有间期基因族,如表皮蛋白基因等。蜕皮激素与蜕皮激素接受子(ecdysteroid receptor, EcR)和过剩气门蛋白(ultraspiracle, USP)的复合物结合成为三聚体,然后结合在 DNA 上,诱导产生蜕皮调节转录因子(molt-regulating transcription factor, 也称为激素接受子 hormone receptor 3, HR3),由蜕皮调节转录因子再调控蜕皮级联反应的相关基因族表达(Yao *et al.*, 1992)。蜕皮调节转录因子(HR3)有多种功能,它结合于 DNA,启动蜕皮早期必需的蛋白酶和几丁质酶类表达,使旧表皮中的蛋白质和几丁质被分解吸收,同时阻遏幼虫表皮蛋白表达。蜕皮调节转录因子又通过结合蜕皮激素使蜕皮激素水平下降,从而反馈调控其自身表达,解除对表皮蛋白表达的抑制,开始形成新的表皮。同时,在蜕皮激素下降后,蜕壳激素(eclosion hormone)释放,使旧表皮脱落,多巴脱羧酶也在蜕皮激素下降后出现,合成表皮硬化必需的前体物多巴胺,使表皮完成鞣化和硬化,因此蜕皮调节转录因子是蜕皮级联反应中的关键因子,也可以作为昆虫进入蜕皮状态的分子标记(Palli *et al.*, 1996)。蜕皮调节转录因子可以被蜕皮激素或非甾醇类蜕皮激素竞争物诱导产生(Palli *et al.*, 1992; Retnakaran *et al.*, 1997)。目前已经从多种昆虫中克隆到了蜕皮调节转录因子,如果蝇的 DHR3(Koelle *et al.*, 1992)、大蜡螟的 GHR3、柞色卷蛾的 CHR3(Palli *et al.*, 1996)、烟草天蛾的 MHR3(Palli *et al.*, 1992)等。

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner)属于鳞翅目夜蛾科,危害棉花、玉米、小麦等数十种农作物,是我国和世界农业的重大害虫,在我国华北地区每年发生 4~5 代,每代幼虫有 6 个龄期,20 世纪 90 年代大暴发,至今造成很大危害。据报道,1995 年中国花费在棉铃虫防治上的费用达每公顷 110 美元,每年达 5 亿美元(Huang *et al.*, 2002)。目前害虫防治中使用的多数化学农药对环境和人类健康有害,迫

切需要发展环境安全农药及生物农药,探索害虫防治新途径。本实验室克隆了棉铃虫蜕皮调节转录因子基因,并对该基因在棉铃虫体内的表达模式进行了研究,证明该基因仅在蜕皮时表达,非甾醇类蜕皮激素类似物(RH-化合物)可以诱导棉铃虫蜕皮调节转录因子表达(待发表资料)和致死性提前蜕皮(Zhao *et al.*, 2003)。我们选择与昆虫蜕皮相关的蜕皮调节转录因子进行重组表达,对重组蛋白 N-端测序证明表达的棉铃虫蜕皮调节转录因子(*Helicoverpa* hormone receptor 3, HHR3)是正确的,并用该重组蛋白制备了抗血清,对棉铃虫蜕皮调节转录因子在体内的表达进行了检测,证明该抗血清对 HHR3 具有特异性,可用于该因子体内表达和功能研究。

1 材料与方法

1.1 材料

Taq DNA 聚合酶和限制性内切酶为 Takara Biotechnology 公司(中国,大连)产品;DNA 胶回收试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒和 T_4 DNA 连接酶为 Sangon 公司(中国,上海)产品;pGEX-4T-1 表达系统、Glutathione Sepharose 4B 及标准蛋白质为 Amersham Biosciences 公司(英国, Buckinghamshire)产品。辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 购于北京中山生物技术公司(中国,北京);硝酸纤维素膜由浙江省四甲生化塑料厂生产;福氏完全佐剂、凝血酶和无离子去垢剂 CAPS (3-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonic acid)为 Sigma 公司(美国, St Louis)产品。

1.2 HHR3 基因克隆

用一步法(Chomczynski and Sacchi, 1987)提取棉铃虫成虫卵巢总 RNA,逆转录 cDNA 作模板,用自行设计合成的 HHR3 基因特异性引物(HHR3 EXPF: 5'-AGCGCAATTCATGAACAACAACCAG-3'; HHR3 EXPR: 5'-AGATCTCGAGCTAACCGTGGGTG TAG-3')进行 RT-PCR 扩增,条件为:94℃ 2 min, 94℃ 30 s, 53℃ 45 s, 72℃ 45 s, 34 个循环, 72℃ 10 min, 产物经测序确认。

1.3 HHR3-pGEX-4T-1 重组表达载体构建

将纯化后的 HHR3 的 PCR 产物和 pGEX-4T-1 载体分别用 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切, DNA 纯化后进行连接,转化大肠杆菌 DH5 α , 并通过 PCR 筛选和限制性内切酶验证, PCR 测序确认重组质粒的融合表达开放阅读框正确。

1.4 HHR3 诱导表达

将 HHR3-pGEX-4T-1 重组质粒转入大肠杆菌 BL21 菌株, 在 LB/Amp(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 培养基中生长至 $\text{OD}_{600} = 0.7$, 用 1 mmol/L 的异丙基- β -硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导 HHR3 表达, 37 $^{\circ}\text{C}$, 3 ~ 5 h。

1.5 包涵体变性、复性及目的蛋白分离

包涵体变性与复性参照 Novagen 公司蛋白质复性试剂盒 (Protein Refolding Kit) 的方法进行, 收集诱导表达的 BL21 细胞, 将细胞悬浮在 1 $\times$ IB 缓冲液 [20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 10 mmol/L 乙二胺四乙酸 (EDTA), 1% Triton X-100] 中, 每升培养细胞悬浮于 50 mL 缓冲液中, 在冰浴中经超声波破碎细胞 (按仪器说明书使用), 至细胞悬浮液不粘稠为止。在 10 000 $\times$ g 离心 10 min, 去上清液, 用 0.1 培养体积的 1 $\times$ IB 缓冲液洗涤沉淀 3 次, 将沉淀溶解在变性液 (50 mmol/L CAPS (pH 11), 0.3% N-lauroylsarcosine) 中, 10 ~ 20 mg/mL, 室温下搅拌至包涵体溶解。样品在 50 倍体积复性液 [20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.5), 0.1 mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT)] 中透析复性 2 次, 3 h/次, 4 $^{\circ}\text{C}$; 再在 50 倍体积无 DTT 的缓冲液中透析 2 次, 3 h/次, 4 $^{\circ}\text{C}$ 。10 000 $\times$ g 离心 10 min, 上清液经过 10 体积 1 $\times$ 磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 透析, 使 pH 成为 7.3, 再用 Glutathione Sepharose 4B 亲和层析, 方法参照产品说明书。

1.6 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

参照 Laemmli (1970) 方法进行。

1.7 蛋白质测序

将重组 HHR3 进行 SDS-PAGE (12.5%) 后用电转仪转移到 PVDF 膜上, 用 Edman 降解法在蛋白质测序仪 (Applied Biosystem Model 470) 上测序。

1.8 多克隆抗体制备

用凝血酶将纯化后的 GST-HHR3 裂解, 10 U/mg 蛋白质, 23 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 ~ 3 h, 经 SDS-PAGE 分离 GST (glutathione S-transferase, 谷胱甘肽-S 转移酶) 和 HHR3, 将 HHR3 从胶上切下, 用于免疫家兔。用含有 200 μg HHR3 的凝胶与福氏完全佐剂充分研磨乳化, 皮下分点注射家兔, 每周 1 次, 3 周后用从凝胶中电泳洗出的蛋白质从耳缘静脉加强免疫 3 次, 抗体出现后收集抗血清, 分装存放于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.9 免疫印迹

将待检测的蛋白质样品进行 SDS-PAGE 后用电转仪转移到硝酸纤维素膜上, 将膜在 2% 脱脂奶粉 (TBS) 中封闭, 加入 1:100 稀释于封闭液中的兔抗

HHR3 血清, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, TBS 洗膜 3 次, 每次 15 min, 加入 1:10 000 稀释于封闭液中的 HRP 标记的羊抗兔 IgG, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h, TBS 洗膜 3 次, 每次 15 min, 加入发色液 (0.06% 4-Cl-1-萘酚, 10% 甲醇, 6 μL 过氧化氢, 10 mL TBS) 黑暗中发色。标准蛋白质与样品一同进行 SDS-PAGE, 转膜后切下, 用氨基黑染色。

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增 HHR3

通过 RT-PCR 方法, 用基因特异性引物从棉铃虫卵巢 cDNA 中扩增出一个分子量为 1 700 bp 左右的产物 (图 1), 与目的基因大小相符, 经过克隆、测序及与基因库中的同源序列比较, 与果蝇的相似性为 69%, 与蜡螟的相似性达 94%, 确认产物为蜕皮调节转录因子, 命名为 HHR3 (*Helicoverpa hormone receptor 3*, GenBank 登录号: AF337637), 开放阅读框为 1 668 bp, 编码 556 个氨基酸, 含 13 个半胱氨酸残基。经过 <http://www.expasy.ch> 中的软件分析, 编码的蛋白质分子量为 62 kD, 等电点 pI 为 6.52, 没有信号肽、过膜螺旋或 N-糖基化位点, 但在第 107 至 133 氨基酸为一个保守的核激素接受子结合 DNA 的特征序列。

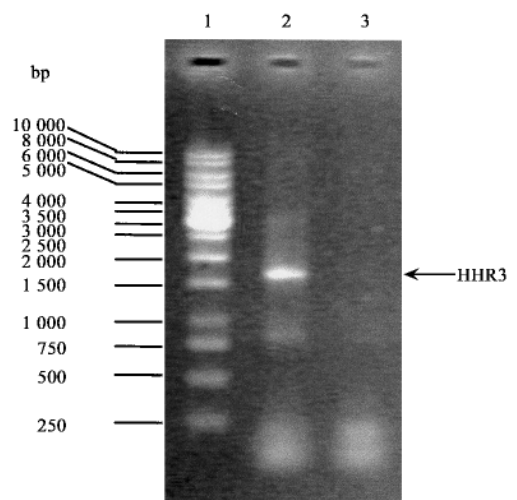


图 1 RT-PCR 扩增 HHR3 的结果 (1% 琼脂糖电泳)

Fig. 1 Amplification of HHR3 with RT-PCR (1% agarose)

1. DNA 梯 DNA ladder; 2. PCR 产物 PCR product;

3. 阴性对照 Negative control.

2.2 HHR3/pGEX-4T-1/BL21 诱导表达

将 PCR 扩增的 HHR3 插入 pGEX-4T-1, 构建重组表达质粒, 转化大肠杆菌 BL21 菌株, 经过诱导表

达,获得一条高表达的蛋白带,经过 SDS-PAGE 分析该蛋白质的分子量约为 94 kD,与预期的融和蛋白质分子量接近,其中 GST 为 27 kD, HHR3 的理论计算值为 62 kD(图 2)。

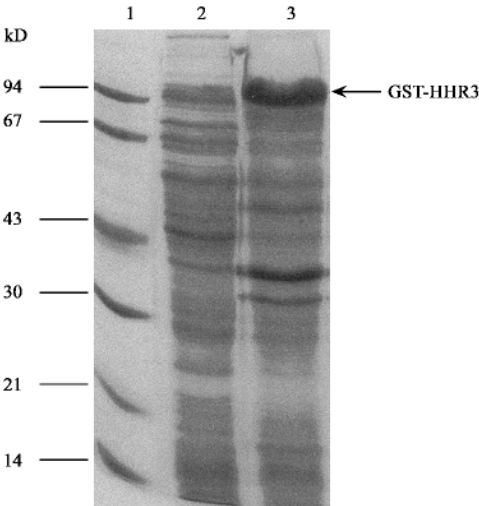


图 2 HHR3 诱导表达的 SDS-PAGE 结果
Fig. 2 SDS-PAGE showing the induced expression of HHR3
1. 标准蛋白质 Standard proteins; 2. 诱导前细胞 Not induced;
3. 诱导后细胞 Induced. 每泳道加样量约 100 μ g,
12.5%胶 100 μ g per lane, 12.5% gel.

2.3 包涵体变性、复性及 HHR3 纯化

电泳检测显示目的蛋白在超声波破碎的沉淀中,而上清液中没有目的蛋白。经过 Glutathione Sepharose 4B 吸附也没有在上清液中检测到目的蛋白,说明该融合蛋白形成了完全的包涵体。大肠杆菌表达的包涵体经 CAPS 变性,再经 Tris-HCl 缓冲液

复性,获得了可溶性的 GST-HHR3 融合蛋白,分子量为 94 kD。通过 Glutathione Sepharose 4B 亲和层析,将 GST-HHR3 结合在柱上,充分洗涤后用凝血酶在柱上裂解后洗脱,得到 27 kD 的 GST 和分子量为 67 kD 左右的 HHR3(图 3)。经过蛋白质测序,重组 HHR3 的 N-端氨基酸序列为: GSPEFMNNNQFHDLF,前面 5 个氨基酸为 GST 的部分,后面 10 个氨基酸是 HHR3 的 N-端序列,说明表达产物为棉铃虫蜕皮调节转录因子。

从每升培养液获得的包涵体中可以纯化到 20 mg GST-HHR3 融合蛋白,得率为 0.5%(表 1)。

表 1 表达产物纯化得率(1 L 培养液,诱导表达 5 h)
Table 1 Purification of HHR3 at steps(1 L culture solution, induced for 5 hours)

纯化步骤 Steps	总蛋白质 Total protein (mg)	得率* Yield* (%)
超声波破碎后上清液 Supernatant of sonication	250	0
包涵体及沉淀 Pellet and inclusion bodies	3 600	100
复性后上清 Supernatant after refolding	70	1.9
亲和纯化 GST-HHR3 Affinity purification of GST-HHR3	20	0.5

* 得率 = 每步总蛋白/包涵体及沉淀蛋白。超声波破碎后上清液中没有检测到 HHR3,不用于得率计算。
* Yield = Total protein in every step/Protein in pellet and inclusion bodies. The supernatant of sonication was not calculated because there was no HHR3 detected.

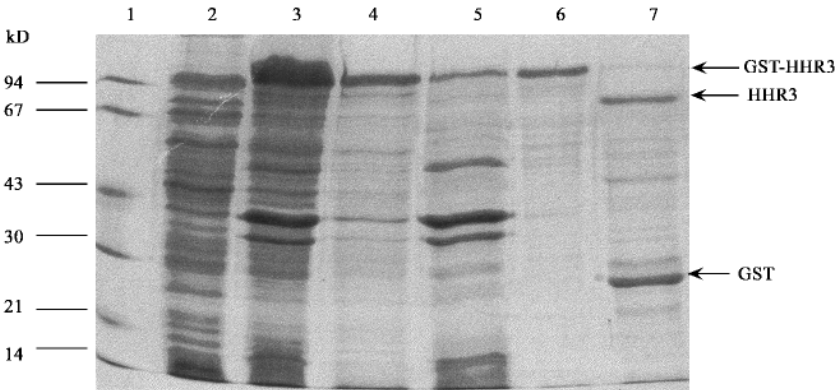


图 3 HHR3 变性、复性及纯化的 SDS-PAGE 结果
Fig. 3 SDS-PAGE showing the denature, refolding and purification of recombinant HHR3
1. 标准蛋白质 Standard proteins; 2. 诱导前细胞 Not induced; 3. 诱导后细胞 Induced; 4. 复性后的包涵体 Refolding;
5. 复性后沉淀 Precipitate after refolding; 6. 亲和层析的 GST-HHR3 Affinity purification of GST-HHR3; 7. 凝血酶裂解后的 HHR3
和 GST HHR3 and GST cleaved by thrombin. 12.5%胶浓度,每泳道加样约 100 μ g 蛋白质 12.5% gel, 100 μ g protein per lane.

2.4 HHR3 抗血清制备及鉴定

通过 SDS-PAGE 分离纯化 HHR3, 免疫家兔, 获得多克隆抗体。免疫印迹结果显示, 该抗血清可以识别在大肠杆菌中表达的 HHR3 和棉铃虫体内的 HHR3。可以看出, HHR3 在 5 龄向 6 龄蜕皮的幼虫脂肪体中高表达, 在进入 6 龄 24 h 的幼虫脂肪体中含量明显下降, 在 6 龄 72 h 的幼虫中肠中没有检测到 HHR3 表达。成虫卵巢中有 HHR3 表达(图 4)。

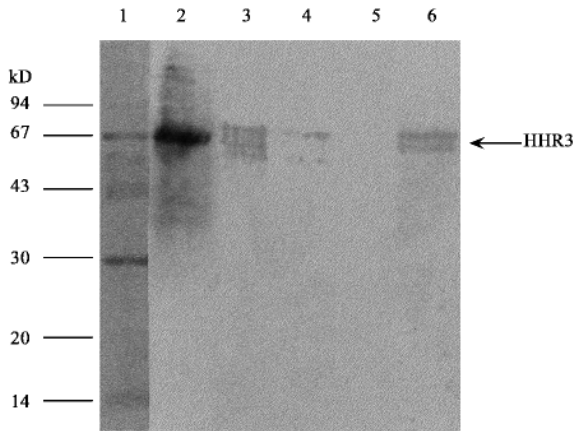


图 4 免疫印迹检测抗体特异性

Fig. 4 Immunoblotting to show the specificity of the antibody against HHR3

1. 标准蛋白质(转膜后切下氨基黑染色)Standard proteins; 2. 大肠杆菌中表达的 HHR3 (凝血酶裂解后) Recombinant HHR3 from *Escherichia coli* (cleaved by thrombin); 3. 5 龄进入 6 龄蜕皮幼虫脂肪体 Fat bodies from 5th toward 6th instar molting larvae; 4. 进入 6 龄后 24 h 幼虫脂肪体 Fat bodies from 6th instar feeding larvae (24 h post molting); 5. 进入 6 龄后 72 h 中肠 Midguts from 6th instar feeding larvae (72 h post molting); 6. 卵巢 Ovaries from *Helicoverpa armigera*. 12.5% 胶, 每泳道蛋白质加样量 20 μ g 12.5% gel, 20 μ g per lane.

3 讨论

棉铃虫蜕皮调节转录因子具有核激素接受子结合 DNA 的基本特征, 与已知的 MHR3、DHR3、CHR3 等具有较高的相似性。Langelan 等(2000)对烟草天蛾幼虫表皮细胞中的 MHR3 的表达模式进行了研究, 表明蜕皮调节转录因子的表达具有严格的时间模式, 在表皮形成前 8 h 出现在细胞核中, 上表皮形成后消失, 头壳爆裂前 8~9 h 出现 mRNA, 头壳爆裂后 2~5 h 下降。因此提取 RNA 的组织和时间要合适, 才能获得 HHR3 的 mRNA。本课题前期 Northern 分析结果显示, HHR3 仅在蜕皮变态时短暂表达, 幼虫脂肪体和中肠、成虫卵巢等组织中均有 HHR3 表达(另文发表), 可以作为提取 HHR3 mRNA 的材料。

由于 HHR3 分子量较大, 且含有 13 个半胱氨

酸, 可能有多对二硫键, 在原核生物体内表达有一定难度。pGEX-4T-1 融合表达系统已经广泛用于异源蛋白表达, 具有很好地表达真核生物基因的能力, 因此我们选择使用该表达系统, 结果表明 HHR3 在该系统得到了高表达, 但不足之处是形成了完全的包涵体。虽然包涵体可以比较容易地与其他蛋白质分离, 但包涵体的变性条件通常比较剧烈, 如需要用高浓度的脲或盐酸胍才能使包涵体变性溶解; 且多数蛋白质在变性后失活, 在复性过程中大多数蛋白质又重新形成不可溶的聚合物, 仅少数蛋白质可以通过一定的条件得到复性, 因此从包涵体中纯化有活性的目的蛋白非常困难; 特别是不同的蛋白质有不同的变性和复性条件; 因此, 包涵体蛋白质的纯化至今是大肠杆菌表达系统没有解决的根本问题(Ausubel *et al.*, 1995)。我们选择了无离子去垢剂 CAPS 作为包涵体变性剂, 变性条件较尿素和盐酸胍温和, 复性时蛋白质浓度可以达到 20 mg/mL, 较脲变性复性的浓度高 10 倍, 但较高的 pH 对蛋白质活性也可能会有影响。变性的完全程度对复性有重要影响, 变性不完全会导致蛋白质不能复性, 造成目的蛋白不能结合到 Glutathione Sepharose 4B 上, 使复性的重复性不稳定。复性条件是在 pH 8.5 进行的, 在亲和层析前要通过 PBS 缓冲液透析, 将 pH 降到 7.3 才能使蛋白质吸附在 Glutathione Sepharose 4B 柱上。

由于抗体制备是用 SDS-PAGE 纯化的大肠杆菌中重组表达的 HHR3, 切割凝胶做抗原时有可能带入了与该蛋白质位置相同或相近的大肠杆菌的蛋白质, 因此, 免疫印迹中抗体会识别某些大肠杆菌的蛋白质, 造成一些非特异性着色, 此可以通过降低抗血清用量和缩短发色时间来减少非特异性产生。但用该抗血清对棉铃虫体内 HHR3 进行检测时, 没有发现非特异性着色, 说明该抗体对棉铃虫来源的 HHR3 具有特异性, 这是因为棉铃虫体内不含大肠杆菌蛋白, 因此用重组蛋白经过 SDS-PAGE 制备的抗体可以用于棉铃虫体内 HHR3 时空表达等下游研究。免疫印迹显示棉铃虫体内的 HHR3 呈现 2~3 条带, 说明该蛋白可能有多种形态存在。

由于 HHR3 的功能是结合特定序列的 DNA, 调控蜕皮级联反应, 重组表达的 HHR3 必须进入细胞内才能发生作用, 目前对 HHR3 没有成熟的功能鉴定方法, 因此重组表达的 HHR3 功能检测是后续研究的难点, 但本研究获得的可溶性重组蛋白可以用于研究该转录因子结合的 DNA 及其辅助因子和报告基因。

参考文献 (References)

- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, 1995. Short Protocols in Molecular Biology. 3rd ed. John Wiley and Sons, Inc., USA.
- Chomczynski P, Sacchi N, 1987. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analyt. Biochem.*, 162: 156 – 159.
- Huang J, Rozelle S, Pray C, Wang Q, 2002. Plant biotechnology in China. *Science*, 295: 674 – 677.
- Huet F, Ruiz C, Richards G, 1995. Sequential gene activation by ecdysone in *Drosophila melanogaster*: The hierarchical equivalence of early and early late genes. *Development*, 121: 195 – 1 204.
- Koelle MR, Segraves WA, Hogness DS, 1992. DHR3: a new *Drosophila* steroid receptor homolog. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 6 167 – 6 171.
- Laemmli UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 227: 680 – 685.
- Langelan RE, Fisher JE, Hiruma K, Palli SR, Riddiford LM, 2000. Patterns of MHR3 expression in the epidermis during a larval molt of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Devel. Biol.*, 227: 481 – 494.
- Palli SR, Hiruma K, Riddiford LM, 1992. An ecdysteroid inducible *Manduca* gene similar to the *Drosophila* DHR3 gene: a member of the steroid hormone receptor superfamily. *Devel. Biol.*, 150: 306 – 318.
- Palli SR, Ladd TR, Sohi SS, Cook BJ, Retnakaran A, 1996. Cloning and developmental expression of *Choristoneura* hormone receptor 3, an ecdysone-inducible gene and a member of the steroid hormone receptor superfamily. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 26: 485 – 499.
- Retnakaran A, Smith LFR, Tomkins WL, Primavera M, Palli SR, Payne N, Jobin L, 1997. Effect of RH-5992, a non-steroidal ecdysone agonist, on the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae): Laboratory, greenhouse, and ground spray trials. *Can. Entomol.*, 129: 871 – 885.
- Riddiford LM, 1993. Hormone receptors and the regulation of insect metamorphosis. *Receptor*, 3: 203 – 209.
- Riddiford LM, Hiruma K, Lan Q, Zhou B, 1999. Regulation and role of nuclear receptors during larval molting and metamorphosis of Lepidoptera. *Am. Zool.*, 39: 736 – 746.
- Yao TP, Segraves WA, Oro AE, McKeown M, Evans RM, 1992. *Drosophila* ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell*, 71: 63 – 72.
- Zhao XF, Li ZM, Wang JX, Wang JB, Wang SL, Blankespoor HD, 2003. Efficacy of RH-2485, a new non-steroidal ecdysone agonist, against the cotton boll worm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in the laboratory and field. *Crop. Prot.*, 22: 959 – 965.

(责任编辑: 黄玲巧)