

热胁迫下八字地老虎 *hsc70* 基因在不同组织转录表达差异性分析*

王 玲^{1**} 杨 帅² 朱明贺¹ 徐忠新¹ 赵奎军^{1***} 韩岚岚^{1***}

(1. 东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农业科学院植物脱毒苗木研究所, 哈尔滨 150086)

摘 要 【目的】为探讨八字地老虎 *Xestia c-nigrum* (Linnaeus) *Xe-hsc70* 基因表达与高温耐受性之间的关系, 比较热胁迫下 *Xe-hsc70* 基因在不同组织中诱导表达的差异。【方法】本研究以八字地老虎 4 龄幼虫为研究对象, 采用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆获得编码热激同源蛋白 70 (70 ku heat shock cognate, HSC70) 的基因 (命名为 *Xe-hsc70*) cDNA 全序列与基因组 DNA 序列 (Genomic DNA, gDNA), 并利用实时荧光定量 PCR 和 Western blotting 技术, 比较分析不同热胁迫温度及不同热诱导时间下八字地老虎 4 龄幼虫体内马氏管、中肠、体壁、脂肪体与唾腺 5 个组织中 *Xe-hsc70* 基因在 mRNA 转录与蛋白表达两水平上相对表达量的变化。【结果】比较分析克隆得到的 *Xe-hsc70* 基因 cDNA 全序列和 gDNA 序列, 结果表明 *Xe-hsc70* 基因含有 8 个内含子, 最大内含子 (561 bp) 位于 5'端非编码区, 并含有一个类似热激应答原件 HSE 的核心结构序列 (gaatatgCaGAAtgTTCaGaa), 其余内含子 (长度在 86~218 bp 之间不等) 均在编码区内, 本研究首次报道了八字地老虎 *hsc70* 内含子的具体数目及位置。组织差异性分析显示: 在常温 25℃ 条件下, *Xe-HSC70* 在脂肪体中表达量最高, 在唾腺中表达量最低; 经热激诱导后中肠、唾腺与体壁组织中 *Xe-HSC70* 的表达量与对照 (25℃) 相比显著上调, 随着热激时间的延长, 表达量呈现出先升高后恢复至对照水平的变化趋势, 脂肪体和马氏管 *Xe-HSC70* 表达量与对照相比无明显变化。【结论】八字地老虎不同组织在应对热胁迫的过程中, 抗逆机制具有明显的差异。*Xe-HSC70* 的不断积累是八字地老虎对热胁迫不断适应的一个过程, 其组织中 *Xe-hsc70* 基因的高表达在八字地老虎抗热胁迫的过程中起着重要作用, 并为从分子水平上研究八字地老虎的抗逆机理提供依据。

关键词 八字地老虎, 热激同源蛋白 70, 实时荧光定量 PCR, Western blotting

Analysis of transcription differences of the heat shock cognate 70 gene in different tissues in response to heat stress in *Xestia c-nigrum* Linnaeus (Lepidoptera: Noctuidae)

WANG Ling^{1**} YANG Shuai² ZHU Ming-He¹ XU Zhong-Xin¹
ZHAO Kui-Jun^{1***} HAN Lan-Lan^{1***}

(1. College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. Virus-Free Seedling Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

* 资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-04); 公益性行业 (农业) 专项资助 (201103002)

**E-mail: lingling6958@163.com

***通讯作者, E-mail: kjzhao@neau.edu.cn; hanll_neau@yahoo.com.cn

收稿日期: 2013-12-06, 接受日期: 2014-01-02

Abstract **[Objectives]** To investigate the effects of heat on *Xe-hsc70* expression in *Xestia c-nigrum* Linnaeus. **[Methods]** cDNA and gDNA sequences of the heat shock cognate 70 (70 ku heat shock cognate, HSC70) gene (hereafter *Xe-hsc70*) were cloned from fourth instar larvae of *X. c-nigrum* using the RT-PCR and RACE techniques. The relative expression levels of mRNA and protein in different tissues (malpighian tubules, fat body, midgut, epidermis and salivary glands) under a series temperatures and times were determined by real time quantitative PCR and Western blotting. **[Results]** The *Xe-hsc70* gene contains 8 introns, the longest of which lies at 5'-UTR and contains a HSE-like core sequence (gaatatgCaGAAtgTTCaGaa). The other introns (with lengths from 86 to 218 bp) are located in the ORF. *Xe-HSC70* expression was highest in the fat body and lowest in the salivary glands at 25°C. The relative expression levels of *Xe-HSC70* in the midgut, salivary glands and epidermis increased significantly after heat shock, and increased with the duration of heat stress; expression levels first increased and then returned to the control level. There was no significant difference in the mRNA expression levels of *Xe-HSC70* in the fat body and malpighian tubules compared with the control. **[Conclusion]** These findings indicate that different tissues of *X. c-nigrum* respond differently to heat stress. The high expression of the *Xe-hsc70* gene plays an important role in the high temperature tolerance of *X. c-nigrum*, and provides a foundation for further investigation of thermal stress-avoidance mechanisms of *X. c-nigrum* at the molecular level.

Key words *Xestia c-nigrum* Linnaeus, HSC70, Real-time qPCR, western blotting

热激同源蛋白 70 (70 ku heat shock cognate , HSC70) 是一种组成型表达的热休克蛋白 70 (70 ku heat shock proteins , HSP70s) , 存在于所有原核及真核生物细胞中 (Kiang and Tsokos , 1998) 。在正常条件下即有高表达 , 当受到环境胁迫因子 (如高温、重金属、杀虫剂等) 刺激时表达量会进一步提高 (Lindquist and Craig , 1988) 。HSC70 主要参与新生肽链的折叠、组装与蛋白前体转运 , 清除受损蛋白和永久变性蛋白 , 使变性蛋白恢复正常构象 , 对细胞起修复和保护作用 , 从而有效提高机体的耐热性和抗应激能力 (Mads , 2007) 。HSP70s 家族还包括诱导型热休克蛋白 70 (70 ku inducible heat shock protein , HSP70) , 其在正常生理状态下表达量很低 , 只有在受到环境压力 (如热激) 时才显著表达 (Deane and Woo , 2005 ; Daugaard *et al.* , 2007) 。两种蛋白在基因结构上最主要的区别是组成型表达的 *hsc70* 含有内含子 , 而诱导型表达的 *hsp70* 不含有内含子 (Qin *et al.* , 2003 ; Franzellitti and Fabbri , 2005 ; Ming *et al.* , 2010) 。

研究发现 , 烟草天蛾 *Manduca sexta* 在高温环境下 *hsc70* 的高表达可促进幼虫体内各激素的合成与分泌 , 从而提高机体耐热性 (Rybczynski and Gilbert , 2000) ; 二化螟 *Chilo suppressalis* 与棉铃虫 *Heliothis zea* *hsc70* 的表达都与滞育和抗寒性密切相关 (Sonoda *et al.* , 2006) , *hsc70* 在滞育期间高表达可使其顺利度过不良环境 , 并有助于缩短滞育时间 (Zhang and Denlinger , 2010) 。由此可见 , *hsc70* 与生物体的抗逆抗应激能力密切相关 , 同时影响着机体的存活能力和生长速率 (Rohde *et al.* , 2005) 。对于不同胁迫因子诱导 *hsc70* 在昆虫中表达差异性的研究已有报道 , 如 : 步甲 *Merizodus soledadinus*、家蚕 *Bombyx mori*、黄粉虫 *Tenebrio molitor* 等 (Siaussat *et al.* , 2012 ; 王林玲等 , 2012 ; Huang *et al.* , 2013) , 但对热胁迫诱导 *hsc70* 在昆虫中组织表达差异性的研究较少。因此 , 开展热胁迫下昆虫 *hsc70* 的组织表达差异性分析及其内含子的研究显得尤为重要。

八字地老虎 *Xestia c-nigrum* Linnaeus 属鳞

翅目 Lepidoptera 夜蛾科 Noctuidae, 分布在世界各地, 4 龄期危害严重, 主要危害植物茎基部, 使植物整株枯死, 直接影响产量, 可对粮食作物、棉花、烟草、蔬菜、葡萄等造成危害, 属多食性地下害虫。在我国, 早期分布主要集中在东北地区和西南地区, 但近年来, 随着气候变化, 在新疆、西藏等地已经发现并开始大面积危害, 呈现出全国范围内扩张的趋势(赵奎军等, 1996; 张履鸿等, 1993; 席景会等, 2002)。八字地老虎的广泛分布与危害表明它具有极强的温度适应能力和强有力的抵抗外界不利温度的抗逆机制, 目前对八字地老虎耐高温特性的研究, 主要集中在生态学与生理学等方面(郑英荣和王维升, 2010), 从分子水平上对其热胁迫适应机制的研究还未见报道。鉴于 *hsc70* 在其它昆虫抗热胁迫中的重要作用及目前鳞翅目昆虫 *hsc70* 基因研究报道较少的现状, 本研究针对八字地老虎 *Xe-hsc70* 基因, 通过克隆技术获得其 cDNA 全序列与 gDNA 序列, 并结合实时荧光定量 PCR 技术(Real-time fluorescent quantitative PCR, RT-qPCR)与 Western blotting 反应, 比较分析了在不同热胁迫温度及不同热诱导时间下, 在 mRNA 转录水平及蛋白表达水平上, *Xe-hsc70* 在八字地老虎 4 龄幼虫中肠、马氏管、体壁、脂肪体与唾腺组织中相对表达量的差异, 并对 *Xe-hsc70* 内含子的作用进行了讨论。本研究将为探讨八字地老虎 *Xe-hsc70* 表达与高温耐受性之间的关系, 为了解八字地老虎的抗逆机理与广泛分布的生态适应性机制奠定重要分子理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试昆虫: 八字地老虎 4 龄幼虫。利用黑光

灯在田间诱集成虫, 饲以 5% 蜂蜜水使其产卵。幼虫在 RXZ 人工气候箱(温度 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, 相对湿度 $70\% \pm 5\%$, 光周期 L:D=14:10)中以新鲜白菜叶片为饲料饲养至 4 龄阶段备用。

主要试剂与仪器: 总 RNA 提取试剂盒、基因组 DNA 提取试剂盒, 购自 OMEGA 公司; pMD18-T、*Taq* 酶、5'RACE 与 3'RACE 试剂盒, 购自 TaKaRa 公司; 荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR Green I、反转录试剂盒, 购自 ToYoBo 公司; 感受态细胞 DH5 α 、蛋白 Marker, 购自北京全氏金生物技术有限公司; 动物组织蛋白抽提试剂盒购自 Novagen 公司; DAB 辣根过氧化物酶显色试剂盒购自碧云天生物技术研究; 小鼠抗 HSC70 单抗、 β -actin 抗体, 购自 Abcam 公司; 羊抗小鼠 IgG-HRP 酶标二抗购自 Pierce 公司; BCA 蛋白定量试剂盒购自 Thermo 公司。引物合成与测序由上海生工生物工程技术有限公司完成。微量紫外分光光度计 NanoDrop 8000, 美国 Parallax 公司; 实时荧光定量 PCR 仪 Chromo4TM、SDS-PAGE 电泳仪与蛋白质转印系统, Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 *Xe-hsc70* 全长 cDNA 的克隆与序列分析
总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成: 使用 RNA 提取试剂盒提取八字地老虎 4 龄幼虫总 RNA, 利用紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的浓度与纯度并利用反转录试剂盒合成 cDNA 第一条链。

引物设计与保守区克隆: 参照已登录 GenBank 的烟草天蛾 *M. sexta* (AAF09496.1)、二化螟 *C. suppressalis* (BAE44308.1)、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (NP_524356.1) 等 9 种

鳞翅目昆虫 *hsc70* 的核苷酸与氨基酸保守区序列,利用 Primer Premier 5.0 软件设计 1 对保守区简并引物 P1 和 P2 (表 1)。以反转录的 cDNA 第一条链为模板进行 PCR 扩增。反应条件为: 94℃预变性 3 min ;94℃ ,30 s ;58℃ ,30 s ;72℃ ,70 s , 35 个循环 ;72℃延伸 10 min。扩增产物经 1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测后回收目的片段,经连接、转化、蓝白斑筛选后,挑选阳性克隆测序来验证序列的正确性。

RACE 扩增 :根据克隆得到的 *Xe-hsc70* 保守区序列,设计 5'RACE 特异性引物 5'GSP1 和 5'GSP2 与 3'RACE 特异性引物 3'GSP1 和 3'GSP2 (表 1),分别用于 5'RACE 与 3'RACE 扩增,具体步骤参照试剂盒说明书。扩增产物克隆并测

序(步骤同上)。根据测序得到的 3 段序列,设计扩增 *Xe-hsc70* cDNA 全长引物 P3 和 P4 (表 1),克隆并测序(步骤同上)。

序列分析:用 DNASTar 软件拼接 *Xe-hsc70* 全长 cDNA 序列。用 BLAST 软件对序列一致性和同源性进行分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 利用在线工具 Biology WorkBench 获得开放读码框 ORF。用 ProtParam (<http://www.cn.expasy.org/tolls/ProtParam>)对所推测蛋白质的基本物理、化学参数进行分析。利用 ScanProsite (<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>)和 SWISS-MODEL(<http://www.swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>) 对蛋白质的功能区及三维结构进

表 1 实验中所用引物
Table 1 Primers for the experiment in this study

引物类型 Primer type	引物序列 (5'-3') Sequences of primers	引物用途 Use of primers
保守区与全长 RT-PCR 引物 RT-PCR primers for conserved domain and full length sequence		
P1	GAGGGMRTCGACTTCTAYACBTCCATCAC	克隆 <i>Xe-hsc70</i> cDNA 保守区 Cloned the conserved domain of <i>Xe-hsc70</i>
P2	CTTGTA CTCTCTGCNTCYTGBACCAT	
P3	CGTGAAAAGAAGCCGTCAATCG	克隆 <i>Xe-hsc70</i> cDNA 全长及 gDNA 序列 Cloned full-length of <i>Xe-hsc70</i> and gDNA
P4	GAGTTTCAATCATTTATTGGAGAGACTGTAC	
P5	CACCTTTGCTGAGTTACTCTACGAGTTAAG	克隆 <i>Xe-hsp70</i> gDNA 序列 Cloned gDNA of <i>Xe-hsc70</i>
P6	CAATATCAGTAAAAGCTTGCTGTAATGTTG	
5'RACE 与 3'RACE 引物 Primers of 5'RACE and 3'RACE		
5'GSP 1	CGTTACGTTCTCCACTCCCCTTCTTGTC AAGGCCG	克隆 5'端序列 For 5' RACE

5'GSP 2	GTTGGAAGCGAGGTCCTTCTTG	
3'GSP 1	GAACGCTCTGGAATCTTACTGCTTCAACATG	克隆 3'端序列 For 3' RACE
3'GSP 2	GAAGTCTACCAACAAGGAGAACAAG	
实时荧光定量 PCR 引物 Primers of RT-qPCR		
hsc70F	CTTGACGGTGACAAGTCTGAG	扩增目的片段 Amplified fragment
hsc70R	GAATGTCTGGGTTTGCTTGGTG	
β -actinF	CGCGACCTCACAGACTACCTG	扩增内参基因 Reference gene
β -actinR	CGTAGGACTTCTCCAGGGAGC	

行分析 (Gasteiger *et al.* , 2003)。通过在线软件 PSORT II (<http://psort.hgc.jp/form2.html>) 进行核定位信号 (nuclear localization signals , NLS) 预测。

1.2.2 *Xe-hsc70* 基因组 DNA 的克隆 使用基因组 DNA 提取试剂盒提取八字地老虎 4 龄幼虫基因组 DNA。利用引物 P3 和 P4 (表 1) 扩增 *Xe-hsc70* gDNA 序列。根据已知的八字地老虎诱导型 *Xe-hsp70* 基因 cDNA 全序列 (HQ698836.1) , 横跨编码区 ORF 序列设计引物 P5 和 P6 (表 1) , 用于扩增八字地老虎 *Xe-hsp70* gDNA 序列, 步骤同上。利用 Spidey (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/spideywed.cgi>) 对 gDNA 序列的内含子进行分析。

1.2.3 *Xe-hsc70* 组织表达差异性 RT-qPCR 分析 供试八字地老虎的处理: 随机取 15 头 25℃ 饲养的八字地老虎 4 龄幼虫作为一个实验组, 每组 3 次重复, 在 33℃ 与 37℃ 热激条件下, 分别处理 1、2、3、4、5、6、7 和 8 h 后, 室温恢复 2 h, 对照组为 25℃ 下饲养 (未热激) 4 龄幼虫。利用试剂盒分别提取中肠、体壁、唾腺、脂肪体和马氏管 5 种组织的总 RNA, 选取 OD₂₆₀/OD₂₈₀=1.8 ~

2.0 之间的 RNA 样品, 将浓度稀释到 100 ng/ μ L, 反转录成 cDNA 第一条链。

RT-qPCR 分析: 根据获得的 *Xe-hsc70* cDNA 序列与 gDNA 序列, 设计目的基因引物 hsc70F 和 hsc70R (表 1) , 设计原则横跨一个内含子, 以避免模板中 DNA 杂质对扩增结果产生干扰, 扩增 cDNA 片段为 145 bp。根据已知八字地老虎 β -actin 基因 (GenBank 登录号: EU035315) 设计内参基因引物 β -actinF 和 β -actinR (表 1) , 扩增片段为 156 bp。经测序确定扩增序列为目的基因序列与内参基因序列。采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 RT-qPCR 扩增。反应条件: 95℃ 预变性 30 s ; 95℃ 变性 10 s , 56℃ 退火 15 s , 72℃ 延伸 30 s , 40 个循环。每个样品设 3 个重复, 反应结果 Ct 值由软件 Opticon 3 读取。数据分析采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法 (Pfaffl , 2001) , 应用 SPSS16.0 统计软件单因素方差分析 (One-way ANOVA) 和 Duncan's 多重比较来分析所得数据间的差异 ($P < 0.05$ 水平)。

1.2.4 *Xe-hsc70* 组织表达差异性的 Western blotting 分析 八字地老虎 4 龄幼虫 33、37℃ 热

激 2 h 后, 室温 25℃ 恢复 2 h。用 CytoBuster 蛋白抽提试剂盒提取热激处理后与 25℃ 未热激条件下八字地老虎中肠、体壁、唾腺、脂肪体和马氏管 5 种组织的总蛋白, 用 PBS 缓冲液将其稀释到 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 并储存于 -80℃ 备用。进行 SDS-PAGE 电泳, 总蛋白上样量均为 20 μg (10 μL), 每个处理 3 个重复。内参蛋白为 β -actin 蛋白 (分子量 42 ku)。蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳分离后用湿转法转移至硝酸纤维素膜 (PVDF) 上, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后进行一抗、二抗孵育, 最后加 DAB 显色并拍照。用 ImagJ 4.0 软件对条带宽度及灰度进行分析并计算密度值, 以目的蛋白 Xe-HSC70 与内参蛋白 β -actin 的密度比值作为目的蛋白的相对含量。采用 SPSS16.0 软件包中的单因素方差分析 (One-way ANOVA) 对数据进行方差分析与显著性检验 ($P < 0.05$ 水平)。

2 结果与分析

2.1 *Xe-hsc70* cDNA 与 gDNA 的克隆及序列分析

克隆得到 *Xe-hsc70* cDNA 全序列为 2 152 bp (不包括 poly(A) $\dagger$ GenBank 登录号 KC844151.1), 5' 与 3' 端非编码区 101 bp 和 86 bp, 开放读码框 (Open reading frame, ORF) 为 1 965 bp, 编码 654 aa 组成的蛋白质, 分子量约为 71.59 ku, 等

电点为 5.32。推导的氨基酸序列含有 3 个 HSP70s 家族标签: IDLGTTYSCV (9-18aa)、IFDLGGGT FDVSIL (199-212 aa) 和 IVLVGGST RIPKIQK (336-350 aa), 靠近 C 端具有 GGMP (617-628 aa) 四肽重复序列, C 末端为胞质蛋白标志序列 EEVD (651-654 aa), 还含有两个相互重叠的双向核定位信号 (NLS) 标签序列 (图 1)。并预测 Xe-HSC70 蛋白含有 3 个结构域, 即 N 端高度保守的 44 ku 的 ATP 酶结构域 (7-382 aa), 18ku 的底物肽结合结构域 (387-545 aa) 和 10 ku 的 C 端结构域 (539-623 aa)。Xe-*hsc70* gDNA 序列长 3710 bp (GenBank 登录号: KF731994), 与 cDNA 序列比对发现该 gDNA 序列含有 8 个内含子, 其中最大内含子, 即第一个内含子 (561 bp) 位于 5' 非编码区, 并含有一个类似热激应答原件 (Heat shock response element, HSE) 的核心结构序列 (gaatatgCa GAAtgTTCcaGaa), 其余内含子均在编码区内 (图 1), 长度分别为: 157、213、87、86、135、101 和 218 bp, 所有剪接位点符合经典的“GT-AG”法则, 即在内含子的 5' 端为保守碱基 GT, 3' 端为保守碱基 AG。将 gDNA 外显子与 cDNA 序列进行比对, 结果表明两者的碱基序列与编码的氨基酸序列完全一致。

1 GAAATTTTTCGTGAAAGAGGCGCTCAATGCGGCAAGTTTGTCTGAGTTACTCAACGAGTTAAGTCAACGACTGAGATGTTATACAAAAATg
 121 caagtattattcagttattggggagctaaaggogattactaacaactccaaaatttgagctcttgctagtgttaattatgttttaacaaatattgct
 241 ttataaattgcttggctgttagtcagcagcgcattttttacacccctatagaatatgcagaatgttccagaagcagcaggttctcactgcattg
 361 cagcgtagtgttcttcgagggggaggggttctgtttttagctaaagtagctaatatattatattgtctgtaaatgccaggagcttttagaa
 481 ttataaagacgtactgtttttcatctatggogtatgcacatgggatattatataattgtctgtatcctacaogctataattgtctgtatcct
 601 agagatcagttgaacaggtgtccagctgacaggaaaataaaaagattggcccttagTAAAAATGCGACCACTAAAGCAACCGCTGTAGGTATOG
 1 M A A T K A P A V G I D L
 721 TGGGAGTTTTCAGCATGGTAAAGTGGAGATCATOGCAACGACGAGGCAACAGGACGACGCTCATATGTGCGTTTACAGACACCGAGGCTC
 21 G V F Q H G K V E I I A N D Q G N R T T P S Y V A F T D T E R L
 841 AGGTGGCGATGAACCTTAACACAAATTTTGGtatgaagagcattatatttttaattccctgtacacaaattatattgtgtgtgtaaaat
 61 V A M N P N N T I F D
 961 acagtgcagattcattacatttcccaagaaggogtacctcaagtttttcatctttaagatctttacagATGCCAAAGCTTCATCGCGCTTAA
 72 A K R L I G R K
 1081 GACATGAAGCACTGGGCTTTCAGGTAGTTCAGTGAAGTGGCAAGCAAGATCAAGTCTCATACAAGGTGAAGACAAACCTTCTTCCCTGAG
 88 D M K H W P F E V V S D G G K P K I K V S Y K G E D K T F F P E
 1201 AAAATGAAGGAAACGCGGCTTACCTCGCAAGtaagaatcatgaactcaaattttgagatttatttatgtttacattttaaaccattttt
 128 K M K E T A E A Y L G K
 1321 gtgaacaccttattcttagtggaactctgtttgtgtgtttattaaacctttcactaactgttttaactgcccccaattgtttataagaaccaa
 1441 ggccctcagACTGTGCAATGCAATCAAGTTCAGGTTTCAATGACTCAGAGAGACAAGCACAAAAGATGCGGCTACCATCTCTGGC
 140 T V Q N A V I T V P A Y F N D S Q R Q A T K D A G T I S G
 1561 GAACGACTGCTGCTGCGATTGCGTACGGCTTGACAGAAAGgtggcagcaatctgcttgaatacatagcagtagaaaagaaacttgagactga
 177 E P T A A A I A Y G L D K K
 1681 accacttagGGGAGTGGAGAAAGTAAAGTATTGATTTTCGATCTCGCGGCGGTACCTTTCAGCTTTCATCTGACCATGAGGATGTTATCTTT
 191 G S G E R N V L I F D L G G G T F D V S I L T I E D G I F
 1801 ACGCATTTGGGAGGAGGAGTTCGACAAACGAATGGTAAACCACTTTGTGCAAGAGTTCAAGAGGAAATACAAGAGGACCTGCTTCCAACAG
 228 T H L G G E D F D N R M V N H F V Q E F K R K Y K K D L A S N K
 1921 GCTGTGAAGGGGAGAGAACTCTCTCTGTCACCCAGGCTAGCATTTGAAATGACTCTCTGTGAGGGTATTGACTTCTATACCTCCATC
 268 A C E R A K R T L S S S T Q A S I E I D S L F E G I D F Y T S I
 2041 AACGCTGACCTGTTGAGTCCACTATGGAGCTGTGGAGAAGTCCCTTCGTGACGGAAGATGGACAAGTCTCAATCCACGACATCGTACTTGTG
 308 N A D L F R S T M E P V E K S L R D A K M D K S Q I H D I V L V
 2161 GTGCAGAGCTCCTTCAAGACTTCTTAAATGGCAAGGAGCTTAAACAAATCCATCAACCCCTGACGAGGCGGTAGCTTACGGTGttaaataagaacaggtac
 348 V Q K L L Q D F F N G K E L N K S I N P D E A V A Y G A
 2281 gcattttccatggtgatcttcagtcagccacagataaatttccacagCTGCGCTTCAGGCTGOCATCTTGCACGCTGACAAGTCTGAGGAGTGC
 376 A V Q A A I L H G D K S E V Q
 2401 CTCGTTGTGCTGCGTATCGAACTGCGGCGGTGTAATGAACCACTCATCAAGCGCAACACCACTCCCAACCAAGCAAAACCCAGACATTC
 400 P L S L G I E T A G G V M T T L I K R N T T I P T K Q T Q T F T
 2521 GAGTACTTATOCAGgtgagaatgctctggtcaaaaggagacagttaaaagttataagaacctgaagatttaacccagatgacatctataggcta
 440 V L I Q
 2641 tctaattcttaattcattattaagtcacagGTGTTGGAAGTGAAGCGGCAATGAACCAAGGATAACAACTTCTGGAAGTTCGAGCTGACCGCA
 444 V F E G E R A M T K D N N L L G K F E L T G I
 2761 CCCAGATCGAAGTCACTTTGACATTGAAGCAACGCACTTCTTAACTGTGCGCGTTCGGAAGTCAACCAAGGAGAAACAGATCAACATC
 475 Q I E V T F D I D A N G I L N V S A V E K S T N K E N I T I
 2881 atgactttttatacctgtgtatcctactataagacagatagtttccagacatttttaataattttattccttattcattgtctttcagCGGTC
 511 R L
 3001 GGTCAACGAGGCGGAGAAATACAGGACTGAGGATGAGAAGCAAAAGGAGACCATCCAGGCTAAGAAAGCTCTGGAATCTTACTGCTTCAACATGA
 521 V N E A E K Y R T E D E K Q K E T I Q A K N A L E S Y C F N M
 3121 CAAGGACAAAATCTCCGACTCCGACAAACAGACCATCTGGACAAGTGAACGACACCATTAATGGCTAGACTCCAATCAGTGTGCTGACAAAG
 561 K D K I S D S D K Q T I L D K C N D T I K W L D S N Q L A D K
 3241 gggaaaccactgttgagcatccctaaactgataattgatgtgtattcaccctaattgccacattttattgctaataatcataggtcttattttctt
 3361 ttctagtgtattctttaaactttataagcgactgtcttgttaactcttaccacaaagctgctaactcagtttcgttagTACGAGCATAAGCAGA
 594 Y E H K Q
 3481 ATTATACCAAAATGTACAGGAGGAGTGGTATGCGCGGCGGTATGCGCGGAGTATGCGCGGCTTCCCGGCGGCGCTCCCGGCGCGGGTG
 607 P I I T K M Y Q G A G G M P G G M P G G M P G F P G G A P G A
 3601 CCTACCATCGAGGAGGTGAGTAAACATTCACAAATTTATACAGCAAGCTTTTACTGATATTGCAAGTATCACTACAGTACAGTCTCTCAG
 647 G P T I E E V D *
 3721 AA

图 1 八字地老虎 *Xe-hsc70* 基因及其氨基酸序列及内含子分析Fig. 1 Analysis of *hsc70* gene and deduced amino acid sequence and introns of *Xestia c-nigrum*

图中大写字母核酸序列为 *Xe-hsc70* 基因 cDNA 序列, 小写字母表示 *Xe-hsc70* 基因内含子, 核酸序列下面的大写字母表示相应的氨基酸。黑色背景核苷酸表示起始密码子和终止密码子, *代表终止编码氨基酸, 双下划线则表示类似 HSE 核心结构序列; 灰色背景序列为 HSP70s 家族特征序列; 下划线标出的序列为核定位信号标签; 加框的核苷酸表示加

* 资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-04); 公益性行业 (农业) 专项资助 (201103002)

**E-mail: lingling6958@163.com

***通讯作者, E-mail: kjzhao@neau.edu.cn; hanll_neau@yahoo.com.cn

收稿日期: 2013-12-06, 接受日期: 2014-01-02

尾信号; C 末端保守序列 EEVD 用斜体表示。

The cDNA sequence of *Xe-hsc70* gene is shown with nucleotide sequence in uppercase letters, *Xe-hsc70* gene introns is shown in lowercase letters. The capital letters below the nucleotide sequence represent the corresponding amino acids. The start and stop codons are shown with black background, and * represent the end of the coding amino acid, and HSE-like core sequence is double-underlined. The characteristic motifs of HSP70s are represented with grey background amino acid sequences. Nuclear localization signal sequence is underlined. The polyadenylation signal is framed. Consensus sequence EEVD at the C-terminus is indicated in italics.

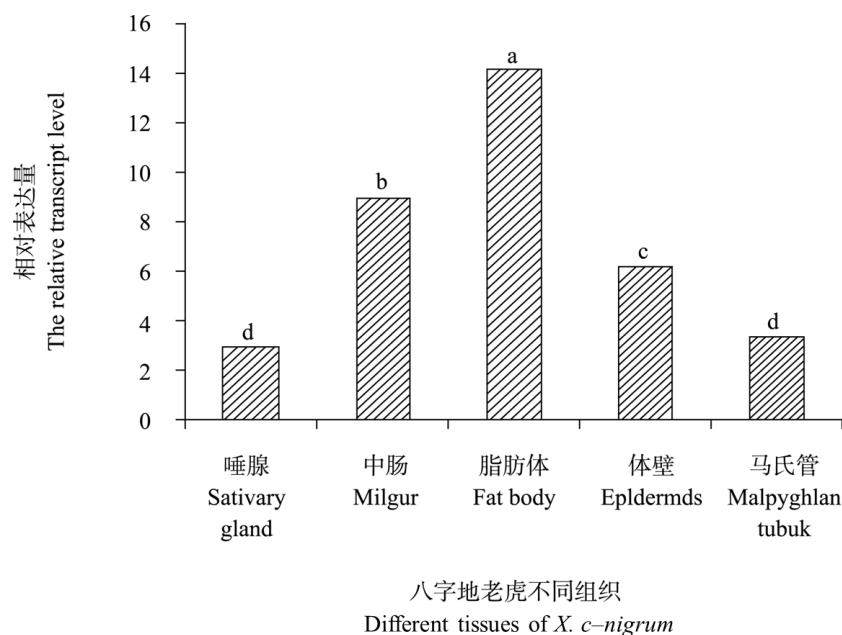
将克隆得到的 *Xe-hsp70* gDNA 序列和已知 *Xe-hsp70* cDNA 序列进行比对,发现诱导型表达的 *Xe-hsp70* 不含内含子,而组成型表达的 *Xe-hsc70* 含有内含子。表明 *Xe-hsc70* 属于组成型表达的 HSC70 亚家族基因。

2.2 *Xe-hsc70* 组织表达差异性分析

RT-qPCR 分析:采用 RT-qPCR 技术从 mRNA 转录表达水平上对不同热激温度及不同热诱导时间下 *Xe-hsc70* 在各组织中的相对表达量进行检测。结果表明:在 25℃ (非热激) 条件下,脂肪体中 *Xe-hsc70* 表达量最高,显著高于其它 4 个组织 ($P<0.05$),表达量从高到低依次是脂肪体、中肠、体壁、马氏管和唾腺,并且中肠与体壁、中肠与马氏管、中肠与唾腺、体壁与马氏管、体壁与唾腺间均存在显著性差异 ($P<0.05$),而马氏管与唾腺间差异不显著 ($P>0.05$)。由此可知,在正常情况下 *Xe-hsc70* 在这 5 个组织中均有表达,其表达具有组织普遍性,表达量之间又存在一定的差异,同时具有一定的组织特异性

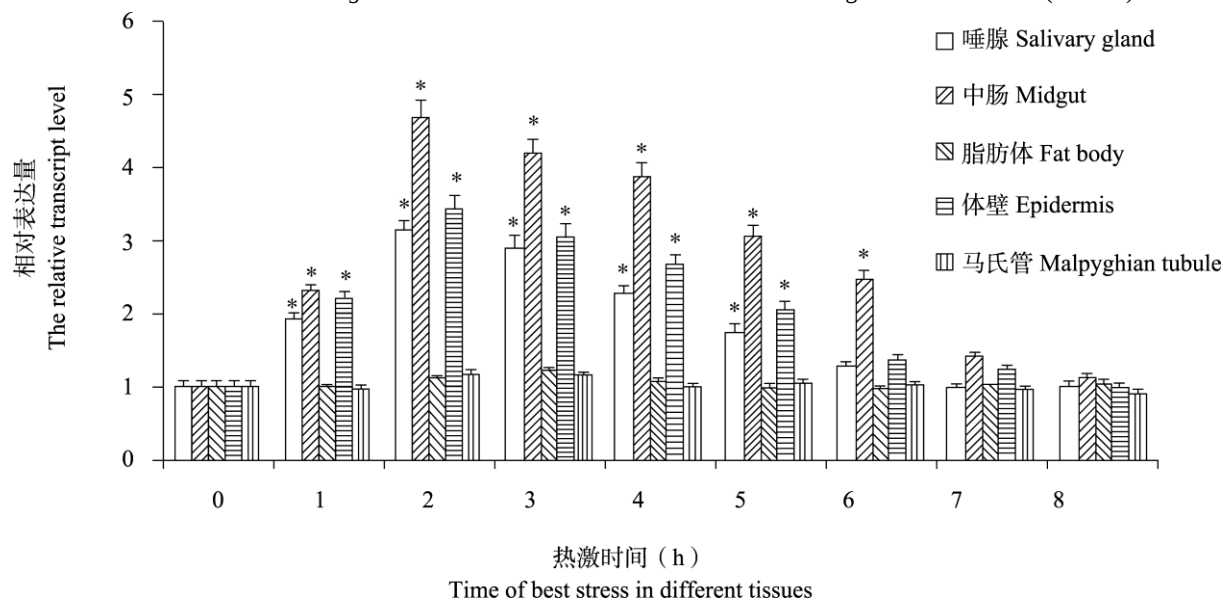
(图 2)。

经 33℃ 与 37℃ 热激处理不同时间后,脂肪体与马氏管中 *Xe-hsc70* 表达量与对照组 (25℃) 相比均无显著差异 ($P>0.05$)。在 33℃ 热激处理 1 h,中肠、体壁与唾腺中 *Xe-hsc70* 表达量显著高于对照组 ($P<0.05$);处理 2 h 后,*Xe-hsc70* 表达量达到峰值,从高到低依次是中肠、体壁与唾腺,分别增加了 4.67 倍、3.47 倍与 3.13 倍;处理 6~7 h,中肠、体壁与唾腺中 *Xe-hsc70* 表达量相继恢复至对照水平,随后在对照水平上下波动 (图 3)。37℃ 热激处理 1 h,中肠、体壁与唾腺中 *Xe-hsc70* 表达量显著高于对照组 ($P<0.05$);处理 2 h,3 种组织 *Xe-hsc70* 表达量达到峰值,从高到低依次是中肠、体壁与唾腺,分别增加了 5.27 倍、4.34 倍与 4.03 倍;处理 8 h,表达量恢复至对照水平 (图 4)。从表达量上看,在相同热激时间下随温度的升高中肠、体壁与唾腺组织中 *Xe-hsc70* 表达量增加;在同一温度热

图 2 25°C 八字地老虎不同组织中 *Xe-hsc70* mRNA 的相对表达量Fig. 2 The relative mRNA expression levels of *hsc70* in different tissues of *Xestia c-nigrum*

不同小写字母表示 25°C 下八字地老虎不同组织中 *Xe-hsc70* mRNA 表达量存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

Histograms with different lowercase letters are the results of multi-comparison of the mRNA expression levels of *Xe-hsc70* in different tissues of *X. c-nigrum* at 25°C which indicate that the means are significant difference ($P < 0.05$).



* 资助项目：现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-04)；公益性行业 (农业) 专项资助 (201103002)

**E-mail: lingling6958@163.com

***通讯作者, E-mail: kjzhao@neau.edu.cn; hanll_neau@yahoo.com.cn

收稿日期：2013-12-06，接受日期：2014-01-02

图 3 33℃热激处理不同时间后, 八字地老虎 4 龄幼虫不同组织中 *Xe-hsc70* 基因 mRNA 的相对表达
Fig. 3 Relative mRNA expression levels of *hsc70* gene in different tissues of fourth larvae of *Xestia c-nigrum* with different duration time at 33℃

*: 与对照组相比差异显著, $P < 0.05$, 图 4 同。

*: Asterisks above bars indicate significant difference compared with the control level, $P < 0.05$. The same with Fig. 4.

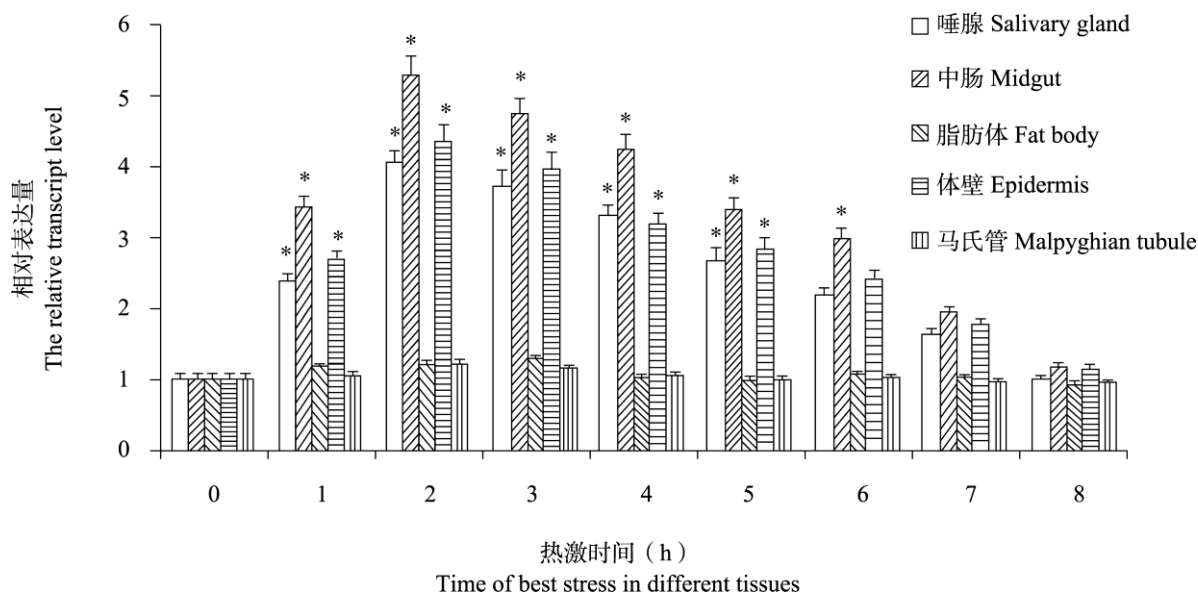


图 4 37℃热激处理不同时间后, 八字地老虎幼虫不同组织中 *Xe-hsc70* 基因 mRNA 的相对表达
Fig. 4 Relative mRNA expression levels of *hsc70* gene in different tissues of *Xestia c-nigrum* larvae with different duration time at 37℃

激处理相同时间, 不同组织 *Xe-hsp70* 的表达量不同, 中肠中表达量最高。从高表达持续时间上看, 随热激温度的升高, 体壁与唾腺中 *Xe-hsc70* 高表达的持续时间增加; 在同一温度处理不同时间后, 中肠、体壁与唾腺中 *Xe-hsc70* 的表达量随着热激时间的延长呈先上升后下降至对照水平的趋势, 具有一定的时间效应。以上结果表明, 高温胁迫对八字地老虎 4 龄幼虫 *Xe-hsc70* 的表达具有明显的诱导作用, 并且 *Xe-hsc70* 的表达具有组织特异性。

Western blotting 分析: 为更好的了解 *Xe-hsc70* 表达的组织的差异性, 运用 Western blotting 分析方法从蛋白水平上对 25、33 与 37℃下

八字地老虎不同组织中 *Xe-HSC70* 表达量的变化进行检测。结果显示, 在 25℃条件下, 各组织均能表达出 *Xe-HSC70* 蛋白, 且表达量之间存在差异, 脂肪体中 *Xe-HSC70* 表达量显著高于其它组织 ($P < 0.05$), 从高到低依次是脂肪体、中肠、体壁、唾腺、马氏管。33℃与 37℃热激实验组中, 各组织间表达量也存在显著性差异, 均为中肠中表达量最高, 马氏管最低。随着热激温度的升高, 中肠、体壁与唾腺中 *Xe-HSC70* 表达量显著升高, 而脂肪体与马氏管中 *Xe-HSC70* 表达量无显著变化 ($P > 0.05$) (图 5)。以上结果与 *Xe-hsc70* 基因在 mRNA 转录表达水平上的结果相一致。

3 讨论

本研究克隆获得的 *Xe-hsc70* gDNA 序列含有 8 个内含子而 *Xe-hsp70* gDNA 序列不含内含子, 表明 *Xe-hsc70* 属于组成型表达的 HSC70 亚

家族基因。*Xe-hsc70* 编码的氨基酸序列具有 Dank 特征基序 (IDLGTT-S-V) 和两个 HSP70s 家族签名序列, C 末端的定位基序为 EEVD, 说明 *Xe-hsc70* 属于 Dank 类型细胞质 HSP70s 家族基因 (Basu *et al.*, 2002; Fu *et al.*, 2009); 含有

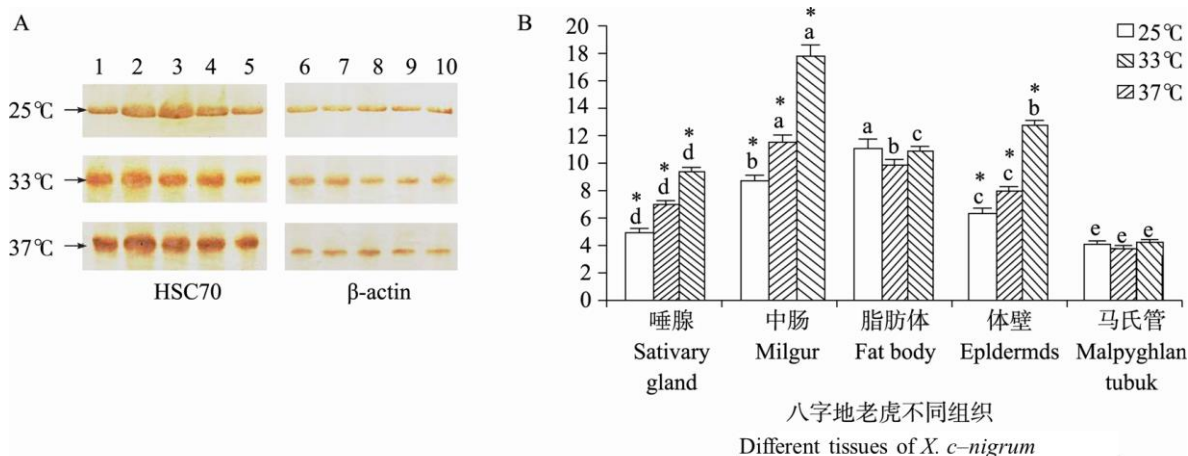


图 5 不同温度下八字地老虎不同组织中 *Xe-HSC70* 蛋白的相对表达分析

Fig. 5 Relative protein expression levels of *Xe-HSC70* gene in different tissues of *Xestia c-nigrum* at different treatments

A. 不同热激温度下八字地老虎不同组织中 *Xe-HSC70* 蛋白的 Western blotting 鉴定。1-5: *Xe-HSC70* 蛋白的 Western blotting 鉴定 (1: 唾腺 Salivary gland; 2: 中肠 Midgut; 3: 脂肪体 Fat body; 4: 体壁 Epidermis; 5: 马氏管 Malpighian tubule); 6-10: 与 1-5 对应的内参蛋白 β -actin 的 Western blotting 鉴定。B. 目的蛋白的相对含量分析。不同小写字母表示同一温度不同组织间的 *Xe-HSC70* 蛋白的表达量存在显著性差异 ($P < 0.05$); 柱上星号表示同一组织不同温度的 *Xe-HSC70* 蛋白的表达量存在显著性差异 (*: $P < 0.05$)。

A. Western blotting identification of *Xe-HSC70* protein in different tissues of *X. c-nigrum* at different treatments. 1-5: Western blotting identification of *Xe-HSC70* protein (1: Salivary gland; 2: Midgut; 3: Fat body; 4: Epidermis; 5: Malpighian tubule); 6-10: Western blotting identification of β -actin (internal control) corresponding to 1-5. B. The relative contents of target protein. The different lowercase letters above the bars are the results of multi-comparison of the expression levels of *Xe-HSC70* protein in different tissues at the same temperature which indicate that the mean are significant difference ($P < 0.05$). Asterisks above bars indicate significant difference of expression levels of *Xe-HSC70* protein in the same tissue at different temperatures (*: $P < 0.05$).

两个双向重叠的核定位信号标签 NSL, 氧化应激时, NSL 能够介导 HSC70 的抗氧化损伤功能, 提高细胞对应激源的耐受性, 增强抗氧化作用 (王慷慨等, 2005); C 末端含有多个 GGMP 四肽重复序列, GGMP 四肽重复功能目前尚不清楚, 相关资料表明, 可能是分子伴侣因子的结合位点 (Demand *et al.*, 1998)。

Xe-hsp70 gDNA 序列含有 8 个内含子且第一个内含子最长出现在 5' 端非编码区, 这与人 *H. sapiens*、鼠 *Mus musculus*、团头鲂 *M. amblycephalus* 等物种的 *hsc70* 内含子数目及位置基本相同 (Dworniczak and Mirault, 1987; Hunt *et al.*, 1999; Ming *et al.*, 2010)。一般认为, 对基因表达具有显著调节功能的内含子通常位

于基因 5'端区域 (Rose , 2002) , 基因第一个内含子对该基因的精确表达具有调控功能 (Kelly *et al.* , 2006) 。在染色体中富含 A、T 的区段对于基因转录表达具有明显的调控作用, 使 gDNA 双链解链变得容易, 更利于其转录表达 (杜启艳等, 2005) 。在 *hsc70* 中热激应答原件 HSE 通过与热激因子 (Heat shock factor , HSF) 特异性结合调控 *hsc70* 基因的转录, 其核心结构序列为 “CnnGAAnnTTCnnG” (Amin *et al.* , 1998) 。*Xe-hsc70* 第一个内含子处于 5'端非编码区, 富含 A、T 碱基, 且存在一个类似 HSE 的核心结构序列 : gaatatgCaGAAtgTTCcaGaa , 因此推测 *Xe-hsc70* 第一个内含子极有可能调控八字地老虎的转录表达。

在正常生理状态下 *Xe-hsc70* 在八字地老虎各组织中稳定且高表达, 热胁迫后表达量显著升高。*Xe-hsc70* 的这种表达模式可能与基因含有内含子有关。有研究表明, HSC70 蛋白的合成主要在转录水平上进行调节, 因此研究内含子对 *hsc70* 转录的调节作用对于研究其热胁迫的分子机制显得尤为重要 (Currie and Tufts , 1997 ; 万文菊等, 2007) 。本研究首次报道了八字地老虎 *hsc70* 的内含子具体数目、位置及 HSE 的核心结构序列, 为其它昆虫 *hsc70* gDNA 序列的获得提供重要的参考依据。

为了明确 *Xe-hsc70* 基因在八字地老虎抗热胁迫中的重要作用, 本研究从 mRNA 转录水平及蛋白表达水平上分别对不同热激温度与不同热激时间下 *Xe-hsc70* 组织表达的差异性进行了分析。两种方法检测结果基本一致, 在非热激和热激条件下, *Xe-hsc70* 基因的表达既具有组织普遍性又具有组织特异性。在非应激条件下脂肪体 *Xe-HSC70* 表达量要明显高于其它组织, 推测在常温下 *Xe-hsc70* 基因对八字地老虎能量储存起

着某种调节作用。热激后, 中肠、体壁与唾腺中 *Xe-HSC70* 表达量显著升高, 推测这 3 个组织对温度变化非常敏感, 热胁迫引起受攻击组织细胞中 *Xe-HSC70* 大量表达以提高其高温耐受性, 维持机体正常生命活动 (刘志刚等, 2012) ; 中肠 *Xe-HSC70* 表达量最高, 高表达持续时间最长, 说明中肠组织对温度变化最敏感, 因此可用于检测八字地老虎的热应激反应状态; 脂肪体中 *Xe-HSC70* 表达量无显著变化, 脂肪体是中间代谢的重要场所 (王林玲等, 2012) , 在高温下八字地老虎的中间代谢可能受到抑制。王林玲等 (2012) 研究发现 25℃ 常温下家蚕 *B. mori hsc70-3* 基因在脂肪体中的表达量最高, 热激后脂肪体中 *hsc70-3* 的表达量与对照相比无显著变化, 但中肠中的表达量与对照相比显著升高, 此结果与本研究结果基本一致。

八字地老虎在遭受热胁迫后, 各组织 (除脂肪体与马氏管) *Xe-HSC70* 在转录水平上的表达量呈现出先升高后降低至对照水平的变化趋势, 表现为明显的时间依赖性。造成这一现象的原因是多方面的: 首先, 可能与 HSC70 在转录水平的反馈调节方式有关, 其基因的内含子中具有热激应答原件 HSE 能与热激因子 HSF 特异性结合对 HSC70 的表达形成转录和转录后的双重调节 (Kroeger *et al.* , 1993 ; Iwama *et al.* , 1998) ; 其次, 也有学者提出组织中特异性的启动子原件可能是造成的不同组织表达差异的原因 (Yaron , 1995 ; 章海滨等, 2013) ; 最后, HSC70 的高表达是昆虫对环境胁迫的应激反应, 是一种短期行为, 如果长时间大量表达, 会消耗机体大量的能量, 从而导致其它功能蛋白或结构蛋白的含量不足, 反而更不利于其生存, 因此在短时间升高后又逐渐恢复到正常水平。

本研究比较分析了 *Xe-hsc70* cDNA 全序列

及 gDNA 序列的内含子有无、位置及功能,并通过 RT-qPCR 技术及 Western blotting 反应对 *Xe-hsc70* 组织表达的差异性进行分析。热胁迫可以诱导 *Xe-hsc70* 在中肠、体壁与唾腺中的高表达,其表达既具有组织普遍性又具有差异性,因此我们推测 *Xe-HSC70* 表达量的增加增强了八字地老虎对高温的耐受能力,这可能是导致其在我国广泛分布的重要原因之一。但是 *Xe-hsc70* 基因抗热胁迫的具体分子作用机制及其各内含子的功能,还有待进一步研究。

参考文献 (References)

- Amin J, Ananthan J, Voellmy R, 1998. Key features of heat shock regulatory elements. *Mol. Cell. Biol.*, 8(9): 3761–3769.
- Basu N, Todgham AE, Ackerman PA, Bibeau MR, Nakano K, Schulte PM, Iwama GK, 2002. Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene*, 295(2): 173–183.
- Currie S, Tufts B, 1997. Synthesis of stress protein 70 (HSP70) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) red blood cells. *J. Exp. Biol.*, 200(3): 607–614.
- Daugaard M, Rohde M, Jäättelä M, 2007. The heat shock protein 70 family: highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett.*, 581(19): 3702–3710.
- Deane EE, Woo NYS, 2005. Cloning and characterization of the hsp70 Multigene family from silver sea bream: modulated gene expression between warm and cold temperature acclimation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 330(3): 776–783.
- Demand J, Luders J, Hohfeld J, 1998. The carboxy-terminal domain of Hsc70 provides binding sites for a distinct set of chaperone cofactors. *Mol. Cell. Biol.*, 18(4): 2023–2028.
- Dworniczak B, Mirault ME, 1987. Structure and expression of a human gene coding for a 71 kD heat shock ‘cognate’ protein. *Nucleic Acids Res.*, 15(13): 5181–5197.
- Franzellitti S, Fabbri E, 2005. Differential HSP70 gene expression in the Mediterranean mussel exposed to various stressors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 336(4): 1157–1163.
- Fu W, Yao J, Wang X, Liu F, Fu G, Duan D, 2009. Molecular cloning and expression analysis of a cytosolic Hsp70 gene from *Laminaria japonica*. *Mar. Biotechnol.*, 11(6): 738–747.
- Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A, 2003. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.*, 31(13): 3784–3788.
- Hunt CR, Parsiana AJ, Goswami PC, Kozak CA, 1999. Characterization and expression of the mouse Hsc 70 gene. *Biochim. Biophys. Acta*, 1444(3): 315–325.
- Huang Q, Hu J, Sun L, Wang Q, 2013. Cloning, sequence analysis and expression profiling of a heat shock protein 70 gene in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Acta Entomologica Sinica*, 56(5): 475–485.
- Iwama GK, Thomas PT, Forsyth RB, Vijayan MM, 1998. Heat-shock protein expression in fish. *Rev. Fish Biol. Fisher.*, 8(1): 35–56.
- Kelly BB, Hedlund E, Kim C, Ishiguro H, Isacson O, Chikaraishi DM, Kim KS, Feng G, 2006. A tyrosine hydroxylase yellow fluorescent protein knock-in reporter system labeling dopaminergic neurons reveals potential regulatory role for the first intron of the rodent tyrosine hydroxylase gene. *Neuroscience*, 142(2): 343–354.
- Kiang JG, Tsokos GC, 1998. Heat shock protein 70kDa molecular biology, biochemistry and physiology. *Pharmacol. Ther.*, 80(2): 183–201.
- Kroeger PE, Sarge KD, Morimoto RI, 1993. Mouse heat shock transcription factors 1 and 2 prefer a trimeric binding site but interact differently with the HSP70 heat shock element. *Mol. Cell. Biol.*, 13(6): 3370–3383.
- Lindquist S, Craig EA, 1988. The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.*, 22(1): 631–677.
- Mads D, 2007. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett.*, 581: 3702–3710.
- Ming JH, Xie J, Xu P, Liu WB, Ge XP, Liu B, He YJ, Cheng YF, Zhou QL, Pan LK, 2010. Molecular cloning and expression of two HSP70 genes in the Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala* Yih). *Fish Shellfish Immunol.*, 28(3): 407–418.
- Pfaffl MW, 2001. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 29(9): e45.
- Qin W, Tyshenko MG, Wu BS, Walker VK, Robertson RM, 2003. Cloning and characterization of a member of the Hsp70 gene family from *Locusta migratoria*, a highly thermotolerant insect. *Cell Stress Chaperones*, 8(2): 144–152.
- Rose AB, 2002. Requirements for intron-mediated enhancement of gene expression in Arabidopsis. *RNA*, 8(11): 1444–1453.
- Rohde M, Daugaard M, Jäättelä M, 2005. Members of the

- heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by mechanisms. *Gene Dev.*, 19(5): 570–582.
- Rybczynski R, Gilbert LI, 2000. cDNA cloning and expression of a hormone-regulated heat shock protein (hsc 70) from the prothoracic gland of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30(7): 579–589.
- Sonoda S, Fukumoto K, Izumi Y, Yoshida H, Tsumuki H, 2006. Cloning of heat shock protein genes (hsp90 and hsc70) and their expression during larval diapause and coldtolerance acquisition in the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 63(1): 36–47.
- Siaussat D, LaparieM, Maria A, Renault D, 2012. Heat shock protein responses to salinity, FOOD deprivation, and temperature in the invasive ground beetle *Merizodus soledadinus* at the Kerguelen Islands. *Polar Biol.*, DOI 10.1007/s00300-012-1252-x.
- Yaron Z, 1995. Endocrine control of game togenesis and spawning induction in the carp. *Aquaculture*, 129(1): 49–73.
- Zhang Q, Denlinger DL, 2010. Molecular characterization of heat shock protein 90, 70 and 70 cognate cDNAs and their expression patterns during thermal stress and pupal diapauses in the corn earworm. *J. Insect Physiol.*, 56(2): 138–150.
- 杜启艳, 常重杰, 陈颖, 2005. 3种鲤科鱼 β 珠蛋白基因的比较研究. *水生生物学报*, 29(1): 86-90. [DU QY, CHANG ZJ, CHEN Y, 2005. Comparision of β globin gene in three fishes of cyprinoid. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 29(1): 86-90.]
- 刘志刚, 张其中, 张占会, 崔淼, 2012. 近江牡蛎 HSC70 基因对溶藻弧菌感染的反应. *中国水产科学*, 19(3): 500-508. [LIU ZG, ZHANG QZ, ZHANG ZH, CUI M, 2012. mRNA expression of heat-shock cognate protein 70 gene (HSC70) in the oyster (*Crassostrea hongkongensis*) in response to *Vibrio alginolyticus* challenge. *Journal of Fishery Sciences of China*, 19(3): 500-508.]
- 王慷慨, 鄂顺梅, 蒋磊, 张华莉, 刘同, 张玲莉, 肖献忠, 2005. 核定位信号在热休克蛋白 70 抑制氧化应激所致细胞核仁分离中的作用. *生物化学与生物物理进展*, 32(5): 456-462. [WANG KK, E SM, JIANG L, ZHANG HL, LIU K, ZHANG LL, XIAO XZ, 2005. Roles of nuclear localization signal (NLS) in inhibitory effect of HSP70 on nucleolar segregation induced by oxidative stress. *Pyog. Biochem. Biophys.*, 32(5): 456-462.]
- 王林玲, 林海静, 王钰, 李治, 周泽杨, 2012. 家蚕热休克蛋白 70 家族基因的染色体定位及表达特征. *蚕业科学*, 38(4): 617-623. [WANG LL, LIN HJ, WANG Y, LI Z, ZHOU ZY, 2012. Chromosomal localization and expressional profile of heat shock protein 70 family genes in silkworm, *Bombys mori*. *Science of Sericulture*, 38(4): 617-623.]
- 万文菊, 王纪亨, 石存斌, 吴淑勤, 2007. 溶藻弧菌感染对剑尾鱼 HSP70 基因表达的影响. *大连水产学院学报*, 22(5): 330-334. [WAN WJ, WANG JT, SHI CB, WU SQ, 2007. Gene expression of HSP70 in green swordtail *Xiphophorus helleri* exposed to *Vibrio alginolyticus*. *Journal of Dalian Fisheries University*, 22(5): 330-334.]
- 席景会, 潘洪玉, 陈玉江, 郭永来, 2002. 四种食料植物对八字地老虎生长发育和繁殖的影响. *昆虫知识*, 39(6): 428-429. [XI JH, PAN HY, CHEN YJ, GUO YL, 2002. Influence of four food plants on development and fecundity of the spotted cutworm, *Agrotis c-igrum*. *Entomological Knowledge*, 39(6): 428-429.]
- 章海滨, 张修月, 宋昭彬, 2013. 岩原鲤 HSC70 基因的克隆、序列分析及其组织表达研究. *四川动物*, 32(3): 325-329. [ZHANG HB, ZHANG XY, SONG ZB, 2013. Cloning, sequence analysis and gene expression of cDNA for HSC70 gene in *Procypris rabaudi*. *Sichuan Journal of Zoology*, 32(3): 325-329.]
- 赵奎军, 许少甫, 徐艳丽, 1996. 经济作物害虫识别与防治 (第一版). 北京:中国农业科学出版社. 101-119. [ZHAO KJ, XU SP, XU YL, 1996. Economic crop pest identification and control (The first edition). Beijing: China Agriculture Science Press. 101-119.]
- 张履鸿, 李国勋, 赵奎军, 1993. 农业经济昆虫学. 哈尔滨:哈尔滨船舶学院出版社. 231. [ZHANG LH, LIN GX, ZHAO KJ, 1993. Agricultural economic entomology. Harbin Engineering University Press. 231.]
- 郑英荣, 王维升, 2010. 八字地老虎在北方地区生物特性观察. *吉林农业*, (12): 109. [ZHENG YR, WANG WS, 2010. Biological characteristics of *Agrotis c-igrum* were observed in the north of China. *Ji Lin Agricultural*, (12): 109.]