

飞蝗储存蛋白家族基因的表达与免疫功能分析

张 早, 焦丽丽, 何 康, 印 红*

(河北大学生命科学学院, 河北省动物系统学与应用重点实验室, 河北 保定 071002)

摘 要:储存蛋白是一种重要的功能蛋白,在昆虫的生长发育和机体免疫应答反应中发挥重要作用。为了进一步分析飞蝗储存蛋白家族基因的免疫功能,通过 qPCR 对飞蝗储存蛋白家族基因的 4 个成员 (*L.m.Hx1*、*L.m.Hx2*、*L.m.Hx3* 和 *L.m.Hx4*) 在成虫不同组织的表达进行定量分析,并选取表达量较高的表皮和脂肪体为实验材料对飞蝗成虫进行大肠杆菌刺激实验。结果显示:菌刺激后,*L.m.Hx1* 和 *L.m.Hx2* 的相对表达量均呈现先下降后上调的趋势,*L.m.Hx3* 和 *L.m.Hx4* 则呈现先上调后下降的趋势,表明飞蝗储存蛋白家族基因均具有一定的免疫功能,*L.m.Hx1* 和 *L.m.Hx2* 负向调控飞蝗的免疫过程,而 *L.m.Hx3* 和 *L.m.Hx4* 则正向调控飞蝗的免疫过程,因此家族成员之间可能存在相互补偿效应。为进一步探讨飞蝗储存蛋白家族基因的免疫功能、相互作用机制及制定害虫防治的策略提供参考。

关键词:飞蝗; 昆虫储存蛋白; 基因表达; 实时荧光定量 PCR; 免疫

doi:10.13304/j.nykjdb.2018.0230

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:1008-0864(2018)12-0045-07

Expression and Immune Functional Analysis of Hexamerin Gene Family in *Locusta migratoria* (Acridoidea: Oedipodidae)

ZHANG Zao, JIAO Lili, HE Kang, YIN Hong*

(Key Laboratory of Zoological Systematics and Application, College of Life Sciences, Hebei University, Hebei Baoding 071002, China)

Abstract: Hexamerin is a key functional protein and plays an important role in the growth and development of insects and the immune response. To further analyze the immune function of the hexamerin gene family in *Locusta migratoria*, qPCR method was adopted to quantitatively analyze the expression of 4 members (*L.m.Hx1*, *L.m.Hx2*, *L.m.Hx3* and *L.m.Hx4*) of the hexamerin gene family in different tissues of the adult stages in this paper, and the cuticle and fat body with higher expression levels were selected as materials to conduct *E.coli* stimulation experiments on adult *Locusta migratoria*. The results showed that after the bacteria stimulated, the relative expression levels of *L.m.Hx1* and *L.m.Hx2* showed trends from declining to rising, while the relative expression levels of *L.m.Hx3* and *L.m.Hx4* showed trends from rising to declining, which indicated that the genes of the hexamerins family had immune function. *L.m.Hx1* and *L.m.Hx2* showed negative regulation of immune response, *L.m.Hx3* and *L.m.Hx4* showed positive regulation of immune response, and hexamerin gene family members manifest functional compensation. Above results provided basis for further studying the immune function and mechanism of hexamerin gene family in *Locusta migratoria*, as well as reference for pest control.

Key words: *Locusta migratoria*; hexamerin; gene expression; qPCR; immunity

昆虫储存蛋白是一种特异性的血淋巴蛋白,对昆虫的生长发育和新陈代谢有着重要的作用。1969 年, Munn 等^[1]首次 在丽蝇 (*Calliphora*

erythrocephala) 中发现昆虫储存蛋白,随着对昆虫储存蛋白研究的深入,发现昆虫储存蛋白在昆虫体内普遍存在,涉及双翅目、鳞翅目、蜚蠊目、直翅

收稿日期:2018-04-11; 接受日期:2018-06-28

基金项目:国家自然科学基金项目(31272293);河北省自然科学基金项目(C2018201082)资助。

作者简介:张 早,硕士研究生,主要从事昆虫分子生物学研究。E-mail:732637707@qq.com。* 通信作者:印 红,教授,博士,主要从事昆虫分子生物学研究。E-mail:yinhong@hbu.edu.cn

目、半翅目等多种昆虫^[2]。昆虫储存蛋白的结构是一种球状六聚体,通常由六个相同或相似的亚基聚合而成,其由昆虫幼虫或若虫的脂肪体合成和分泌,释放到血淋巴中,并在其中大量积累,羽化时又由脂肪体选择性重吸收,以致密的蛋白质颗粒形式出现于脂肪体细胞中,当成虫阶段各器官发育和新组织形成时,作为蛋白质和氨基酸的来源重新进入到血淋巴中,参与昆虫表皮形成、激素转运、能量代谢等生命活动^[3~6]。

在昆虫不同的种类和性别中,其体内所含储存蛋白的种类和功能也不尽相同,昆虫储存蛋白除了参与昆虫的生长发育和新陈代谢,也存在于血淋巴中参与昆虫机体免疫^[3]。Poopathi 等^[7]发现当用细菌侵染库蚊(*Culex quinquefasciatus*)和棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)时,其体内可产生具有储存蛋白的抗性个体;Pan 等^[8]用苏云金杆菌处理烟蚜夜蛾(*Heliothis virescens*)幼虫,发现储存蛋白的表达会使幼虫体内 Cry 毒素(苏云金杆菌分泌的毒素)的毒力降低;Ujita 等^[9]发现家蚕储存蛋白可以干扰蚕蛹体内真菌菌丝的生长,这表明家蚕储存蛋白可能参与了家蚕免疫。另外,研究还发现,当外源物质入侵一些昆虫时,昆虫储存蛋白的表达量显著下降,这可能是因为在面对微生物的侵染时需要付出高昂的代价,利用内源性物质通过抑制生殖、代谢、营养储存等生物过程中的相关基因的表达,作为免疫基因表达的代价,最终在免疫和代谢之间形成一个平衡,以使机体达到自身平衡^[10,11]。总之,昆虫储存蛋白是昆虫体内普遍存在的一类蛋白质,是昆虫基因调控、蛋白质合成和免疫调节等方面的重要模式分子。

飞蝗(*Locusta migratoria*)隶属于昆虫纲(Insecta)、直翅目(Orthoptera)、蝗总科(Acridoidea)、斑翅蝗科(Oedipodidae)、飞蝗属(*Locusta*),分布极为广泛,属于典型的多食性、植食性昆虫,是重要的农业害虫^[12,13]。目前对飞蝗储存蛋白家族基因研究主要集中在生长发育和系统进化方面^[14~16],而对飞蝗储存蛋白家族基因免疫机制的研究未见报道,本研究通过荧光定量 PCR 技术分析储存蛋白家族基因的表达和菌刺激反应,并对其免疫功能进行了分析,以期为进一步研究飞蝗储存蛋白家族基因的免疫功能、家族基因之间的相互关系及寻求害虫防治方法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试昆虫 飞蝗虫卵购自河北省沧州市飞蝗养殖基地,在人工气候箱中对其进行孵化,温度为 $(30\pm 2)^{\circ}\text{C}$,相对湿度为 40%~60%,光照 L:D=14 h:10 h。

1.1.2 主要试剂 RNase-free Water、PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)、RNAiso Plus 试剂盒、SYBR Premix Ex TaqTM II 均购于 TaKaRa 公司。

1.1.3 菌种 大肠杆菌 *Escherichia coli* ATCC25922 由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 大肠杆菌悬液的制备与飞蝗的侵染 将保藏的大肠杆菌接种于 LB 培养基中,37℃ 220 r/min 于摇床中培养过夜进行活化,次日待菌液 OD₆₀₀ 为 1.0 后,4 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,然后用生理盐水洗涤菌体 3 次,重悬,待测得 OD₆₀₀ 为 1.0 后将菌液稀释 1 000 倍,配制成 10⁶ cell/mL 的菌悬液。

1.2.2 飞蝗的菌刺激实验 取飞蝗成虫 8~10 只置于冰上 20 min,用微量进样器吸取 5 μL 已制备的菌悬液,将其注射于飞蝗体侧的第 2~3 腹节间,注射后各种饲养参数均保持不变。

1.2.3 飞蝗不同组织部位的解剖 选取发育正常的成虫及注射后 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 的飞蝗,解剖获得肠、表皮、精巢、卵巢、血淋巴和脂肪体 6 个组织部位,并将每个组织部位设 4 组生物学重复,将解剖好的组织迅速冻存于液氮中。

1.2.4 总 RNA 提取和 cDNA 第一链合成 利用 RNA 提取试剂盒 RNAiso Plus,按照说明书提取解剖好的各组织总 RNA,并使用反转录试剂盒 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 将 RNA 反转录合成 cDNA。-20℃ 保存备用。

1.2.5 飞蝗储存蛋白家族基因片段的引物设计

根据本课题组早期的研究结果发现飞蝗的储存蛋白家族基因共有 4 个基因组成^[17],分别是 *L.m. Hx1*、*L.m. Hx2*、*L.m. Hx3* 与 *L.m. Hx4* (NCBI

GenBank: FJ609738.1、FJ609740.1、FJ609741.1 与 FJ609742.1), 根据序列设计引物, 以 β -actin (NCBI GenBank: KX276642.1) 作为内参基因, 引物信息见表 1, 由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

1.2.6 飞蝗储存蛋白家族基因的表达 采用 qPCR 方法分析飞蝗储存蛋白基因在肠、表皮、精巢、卵巢、血淋巴、脂肪体以及在菌刺激下的各组织中表达情况。反应体系为: cDNA 4 μ L, 上下游

引物 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, SYBR Premix Ex Taq™ II 5 μ L。扩增程序为: 95℃ 预变性 3 min; 95℃ 变性 10 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 20 s, 共 40 个循环; 在 MX3000P 荧光定量 PCR 仪上进行, 然后进行溶解曲线分析。将实验数据用 WPS 表格进行整理, 利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[18] 进行数据处理和 SPSS16.0 软件的 t 检验法对所得数据进行显著性分析, 分析飞蝗成虫储存蛋白家族基因在不同组织及在菌刺激情况下各组织中的相对表达量。

表 1 飞蝗昆虫储存蛋白家族基因的表达引物
Table 1 Expression primers of *Locusta migratoria* hexamerin genes.

基因 Gene	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	片段长度(bp) Product size (bp)
β -actin	β -actin-RtF1	CGAAGCACAGTCAAAGAGAGGTA	156
	β -actin-RtR1	GCTTCAGTCAAGAGAACAGGATG	
<i>L.m.Hx1</i>	<i>L.m.Hx1</i> -RtF1	GAAGAAGAACCCTCAGAACTGG	84
	<i>L.m.Hx1</i> -RtR1	CACCGAAATACGCTTCACAA	
<i>L.m.Hx3</i>	<i>L.m.Hx3</i> -RtF1	CTCAAAGTGAAGAGCGAGAAGGA	136
	<i>L.m.Hx3</i> -RtR1	TGTAGTTGAAGGTGTCCAGCAGA	
<i>L.m.Hx4</i>	<i>L.m.Hx4</i> -RtF1	TCCCTCAGGCAGATGTTTCGC	141
	<i>L.m.Hx4</i> -RtR1	GGACATTCGGATGCCGTTTT	
<i>L.m.Hx5</i>	<i>L.m.Hx5</i> -RtF1	CTACAAGAACAGTTTGTTGCCG	101
	<i>L.m.Hx5</i> -RtR1	CGTCGAAAAATGTCGTAAGCC	

2 结果与分析

2.1 飞蝗储存蛋白家族基因在不同组织中的表达

飞蝗成虫储存蛋白家族基因在不同组织(肠、表皮、精巢、卵巢、血淋巴和脂肪体)中的表达特性分析结果(图 1)表明: 飞蝗储存蛋白家族基因 *L.m.Hx1*、*L.m.Hx2*、*L.m.Hx3*、*L.m.Hx4* 在飞蝗 6 个组织部位中均有不同程度的表达, 且其相对表达量呈现一致性。储存蛋白家族基因在飞蝗表皮和脂肪体中的表达明显高于其他组织, 其次是性腺(卵巢和精巢), 在肠和血淋巴中的表达很少。通过分析发现, *L.m.Hx1* 基因在表皮和脂肪体中的表达量是肠和血淋巴中的 45 倍左右; *L.m.Hx2* 基因在表皮和脂肪体中的表达量是肠和血淋巴中的 480 倍左右; *L.m.Hx3* 基因在表皮和脂肪体中的表达量是肠和血淋巴中的 730 倍左右; *L.m.Hx4* 基因在表皮和脂肪体中的表达量是肠和血淋巴中的 260 倍左右。飞蝗储存蛋白家族

的 4 个基因在脂肪体和表皮中均高表达, 说明飞蝗储存蛋白作为能量储存蛋白, 在飞蝗新陈代谢和表皮的形成中发挥作用。

2.2 菌刺激后储存蛋白家族基因在表皮中的表达

为了研究飞蝗储存蛋白家族基因的免疫机制特性, 选取组织表达水平最高的表皮和脂肪体为实验材料, 对飞蝗进行大肠杆菌注射, 以 β -actin 为内参基因, 分析储存蛋白家族基因在表皮和脂肪体中的表达变化。结果(图 2)显示, 大肠杆菌刺激 3 h 后, *L.m.Hx1* 基因的表达发生明显的下调, 在 12 h 时表达量最低, 是未侵染蝗虫的 0.044 倍, 而后开始慢慢上升, 72 h 时, 虽然表达量已经开始上升, 但是仍低于正常水平; *L.m.Hx2* 基因的表达发生下调, 在 48 h 时表达量达到最低, 是未侵染蝗虫的 0.290 倍, 随后上升, 到 72 h 时已基本恢复初始状态; *L.m.Hx3* 基因的表达显著上调, 12 h 时上调最为显著, 是未侵染蝗虫的 14.79 倍, 随后开始下降, 但仍处于上调状态; *L.m.Hx4* 基因的表达同样上调, 在 48 h 时上调最为显著, 是未侵

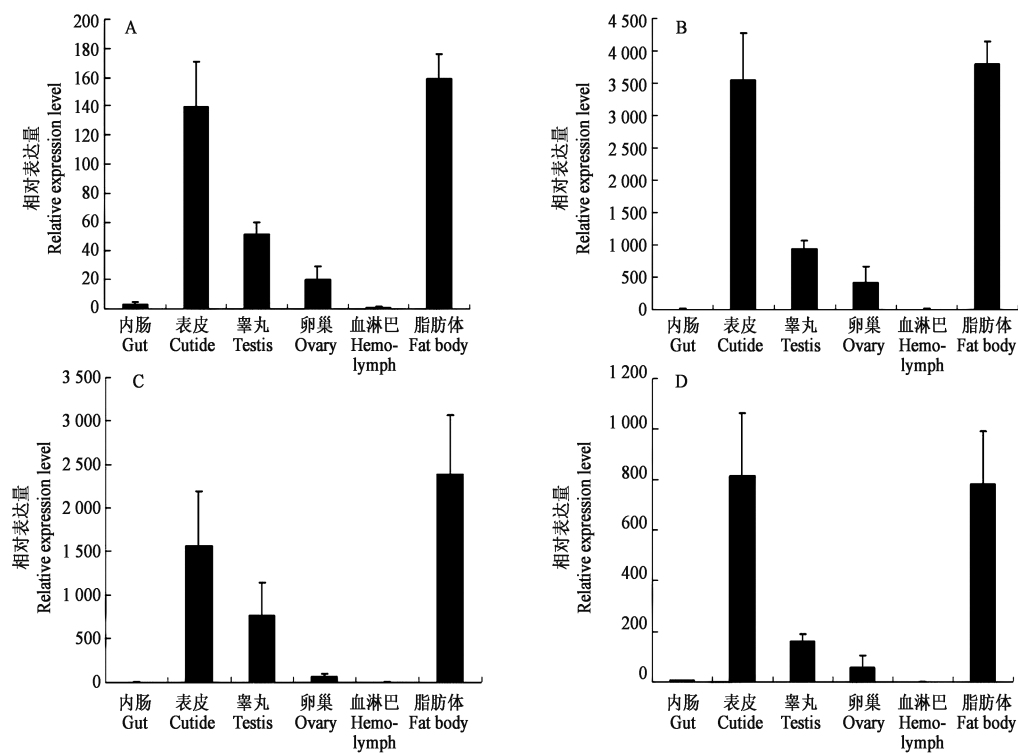


图 1 飞蝗储存蛋白家族基因在不同组织中的相对表达量

Fig.1 Relative expression level of gene in different tissues of *L. migratoria*.

A: *L.m.Hx1*; B: *L.m.Hx2*; C: *L.m.Hx3*; D: *L.m.Hx4*.

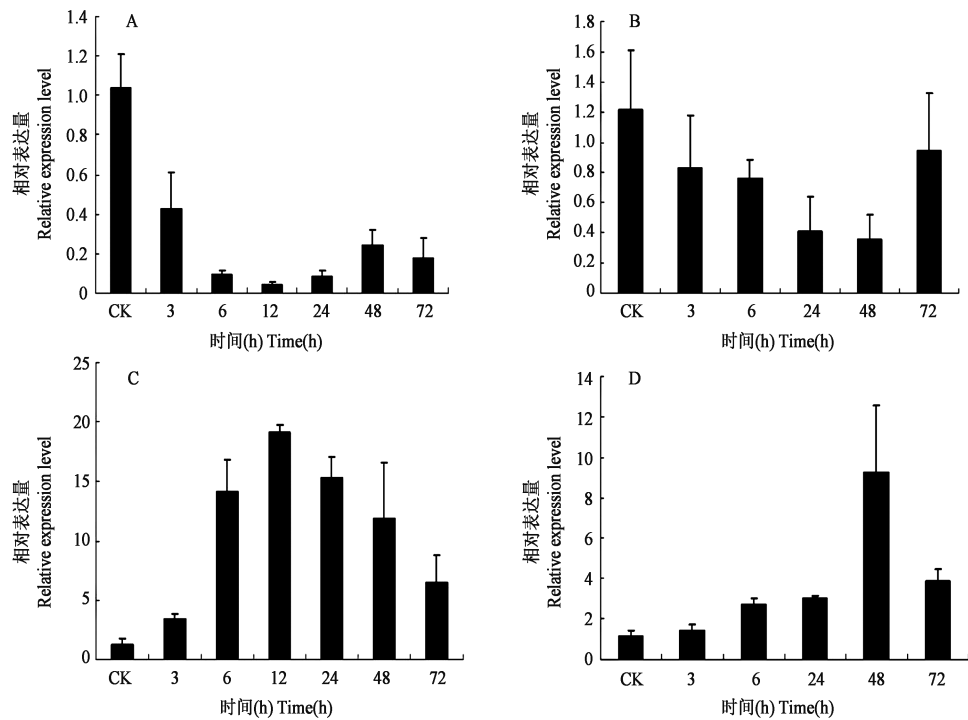


图 2 大肠杆菌刺激下基因在表皮中的相对表达量

Fig.2 Relative expression level of gene in cuticle after *E. coli* challenged.

A: *L.m.Hx1*; B: *L.m.Hx2*; C: *L.m.Hx3*; D: *L.m.Hx4*

染蝗虫的 8.266 倍,随后呈现下降趋势。大肠杆菌刺激后,在飞蝗表皮中 *L. m. Hx1* 和 *L. m. Hx2* 的相对表达量均呈现显著下降的趋势,表明 *L. m. Hx1* 和 *L. m. Hx2* 负向调控飞蝗的免疫调控过程;而 *L. m. Hx3* 和 *L. m. Hx4* 的相对表达量均呈现显著上升的趋势,表明 *L. m. Hx3* 和 *L. m. Hx4* 正向调控飞蝗的免疫调控过程,表明飞蝗储存蛋白家族基因之间有一定的相互作用。

2.3 菌刺激后储存蛋白家族基因在脂肪体中的表达

通过菌刺激后对飞蝗脂肪体的表达分析发现, *L. m. Hx1* 在菌刺激 3 h 后,表达量显著下调,在 12 h 时表达量最低,是未感染蝗虫的 0.008 倍,随

后表达量开始升高,至 72 h 时,表达量已恢复正常水平; *L. m. Hx2* 的表达量下调,6 h 时达到最低水平,是正常水平的 0.44 倍,随后表达量开始升高,在 48 h 时已高于正常水平; *L. m. Hx3* 和 *L. m. Hx4* 的表达呈现一致性,均显著上调,48 h 时上调最为显著,分别为对照组的 23.24 倍和 25.06 倍,到 72 h 时表达量虽有下降,但仍高于正常水平(图 3)。大肠杆菌刺激后,在飞蝗脂肪体中 *L. m. Hx1* 和 *L. m. Hx2* 的相对表达量均呈现显著下降的趋势,而 *L. m. Hx3* 和 *L. m. Hx4* 的相对表达量均呈现显著上升的趋势,这与菌刺激后表皮中的表达分析结果相一致,这也充分说明飞蝗昆虫储存蛋白家族各成员之间具有一定相互关系。

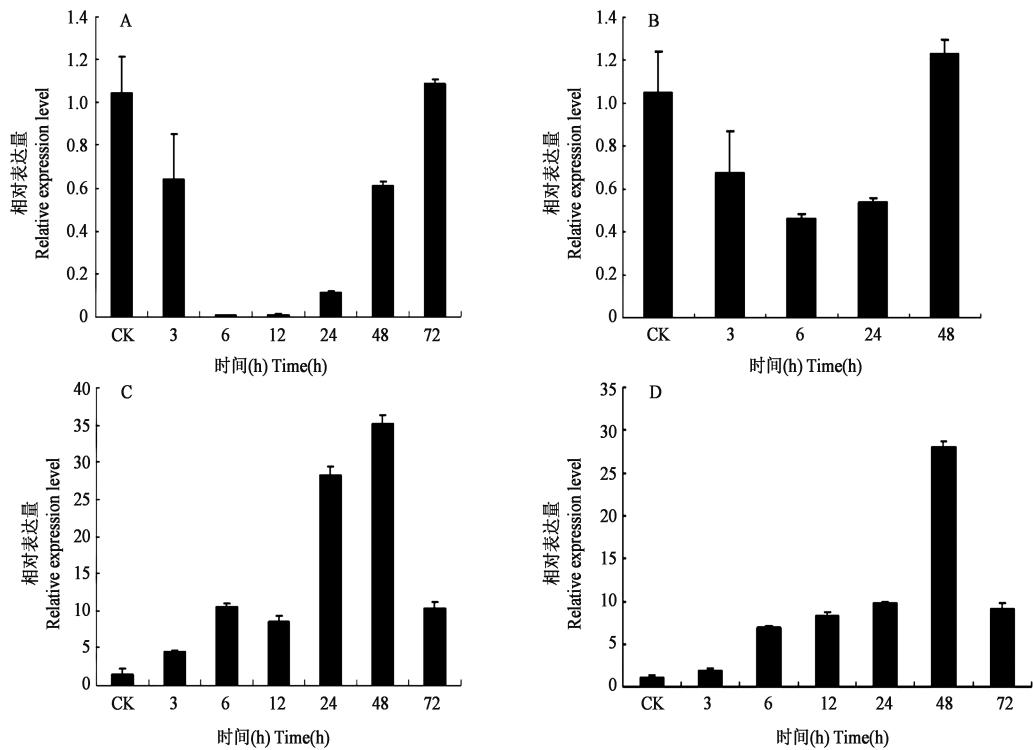


图 3 大肠杆菌刺激下基因在脂肪体中的相对表达量

Fig.3 The relative expression level of gene in fat body after *E. coli* challenged.

A: *L. m. Hx1*; B: *L. m. Hx2*; C: *L. m. Hx3*; D: *L. m. Hx4*

3 讨论

在昆虫的发育过程中,昆虫储存蛋白扮演了十分重要的角色,是昆虫生长发育过程中一种关键的功能性蛋白^[19,20]。本研究根据飞蝗储存蛋白家族基因的序列信息,运用荧光定量 PCR 技术

分析了飞蝗储存蛋白家族基因在不同部位的表达,发现储存蛋白家族基因在飞蝗 6 个组织部位中均有表达,其中在表皮和脂肪体中均为高表达;储存蛋白家族基因在表皮中大量表达,表明其可能与飞蝗表皮的部分功能有关;而在脂肪体中大量存在,也表明储存蛋白作为主要能量蛋白,为飞蝗的生长发育和新陈代谢提供能量,这也与其他

昆虫的研究结果一致^[14,21]。

为了分析飞蝗储存蛋白家族基因的免疫功能,选择高表达的脂肪体和表皮为实验材料,菌刺激后发现 *L.m.Hx3* 和 *L.m.Hx4* 的相对表达量出现显著上升的趋势;Elautout 等^[22]发现当螺原体感染叶蝉 *Cicadellidae* 时,编码储存蛋白的基因表达上调;John 等^[23]发现当用较高浓度的真菌孢子 (10^5 cell/ μ L) 高感染大蜡蛾 *Galleria mellonella* 时,其芳香基储存蛋白的表达量明显增高,说明昆虫储存蛋白参与了昆虫的免疫应答反应。而当菌刺激后 *L.m.Hx1* 和 *L.m.Hx2* 基因在表皮和脂肪体中的相对表达量均呈现显著下降的趋势,表明 *L.m.Hx1* 和 *L.m.Hx2* 可能负向调控飞蝗的免疫应答反应,而 *L.m.Hx3* 和 *L.m.Hx4* 可能正向调控飞蝗的免疫过程,因此推测在飞蝗免疫信号通路中, *L.m.Hx1* 和 *L.m.Hx2* 可能在 *L.m.Hx3* 和 *L.m.Hx4* 的上游,菌刺激后,在信号通路中激活的上游相关蛋白抑制了 *L.m.Hx1* 和 *L.m.Hx2* 的表达,而家族中另外 2 位成员 *L.m.Hx3* 和 *L.m.Hx4* 则表现为功能代偿性的大量表达,表明飞蝗储存蛋白家族基因之间可能存在着相互补偿效应,共同参与飞蝗的免疫应答反应。

近年来,宿主-病原互作与免疫的关系是研究的一大热点,研究病原是如何规避宿主免疫系统的攻击在昆虫病虫害防治领域具有十分重要的意义。本研究分析了飞蝗储存蛋白家族基因在菌刺激下的表达特性,说明昆虫储存蛋白参与了飞蝗的免疫应答过程,为进一步研究飞蝗的免疫机制提供了分子依据。

参 考 文 献

- [1] Munn E A, Greville G D. The soluble proteins of developing: *Calliphora erythrocephala*, particularly calliphorin, and similar proteins in other insects [J]. J. Insect Physiol., 1969, 15 (10): 1935-1950.
- [2] Hunt J H, Buck N A, Wheeler D E. Storage proteins in vespidae wasps: Characterization, developmental pattern, and occurrence in adults [J]. J. Insect Physiol., 2003, 49(8): 785-794.
- [3] Hahn D A, James L N, Milne K R, et al.. Life history plasticity after attaining a dietary threshold for reproduction is associated with protein storage in flesh flies [J]. Funct. Ecol., 2008, 22(6): 1081-1090.
- [4] Scheller K, Zimmerman H P, Sekeris C E. Calliphorin, a protein involved in the cuticle formation of the blowfly, *Calliphora vicina* [J]. Zeitschrift Für Naturforschung C, 1980, 35(5-6): 387-389.
- [5] Haunerland N H, Bowers W S. Binding of insecticides to lipophorin and arylphorin, two hemolymph proteins of *Heliothis zea* [J]. Archives Insect Biochem. Physiol., 1986, 3 (1): 87-96.
- [6] Telfer W H, Kunkel J G. The function and evolution of insect storage hexamers [J]. Annu. Rev. Entomol., 1991, 36 (1): 205-228.
- [7] Poopathi S, Thirugnanasambantham K, Mani C, et al.. Hexamerin a novel protein associated with *Bacillus sphaericus* resistance in *Culex quinquefasciatus* [J]. Appl. Biochem. Biotechnol., 2014, 172 (5): 2299-2307.
- [8] Pan M L, Telfer W H. Storage hexamer utilization in two lepidopterans: Differences correlated with the timing of egg formation [J]. J. Insect Sci., 2001, 1 (2): 1-9.
- [9] Ujita M, Katsuno Y, Kawachi I, et al.. Glucanbinding activity of silkworm 30-kDa apolipoprotein and its involvement in defense against fungal infection [J]. Biosci. Biotechnol. Biochem., 2005, 69 (4): 1178-1185.
- [10] Johnston P R, Makarov O, Rolff J. Inducible defenses stay up late: Temporal patterns of immune gene expression in *Tenebrio molitor* [J]. Genetics Immun., 2014, 4 (6): 947-955.
- [11] Louren O A P, Martins J R, Bitondi M M G, et al.. Tradeoff between immune stimulation and expression of storage protein genes arch [J]. Insect Biochem. Physiol., 2009, 71 (2): 70-87.
- [12] 印象初, 夏凯龄. 中国动物志 [M]. 北京: 科学出版社, 2003, 210-219.
- [13] 李毅平, 龚和. 昆虫幼虫储存蛋白 [J]. 生物学通报, 1998, 33 (1): 4-5.
- [14] Li Y P, Gong H. The study of larval storage protein [J]. Bull. Biol., 1998, 33(1): 4-5.
- [15] 董丽君, 张晓红, 李艳丽, 等. 中华剑角蝗储存蛋白基因的克隆及表达分析 [J]. 中国农业科技导报, 2015, 17(4): 78-84.
- [16] Dong L J, Zhang X H, Li Y L, et al.. Cloning and expression analysis of a hexamerin gene from *Acrida cinerea* (Acridoidea: Acrididae) [J]. J. Agric. Sci. Technol., 2015, 17 (4): 78-84.
- [17] 李艳丽, 郝金凤, 赵学乾, 等. 东亚飞蝗储存蛋白基因 *LmiHex-2* 的克隆与表达分析 [J]. 中国农业科技导报, 2016, 18 (06): 65-71.
- [18] Li Y L, Hao J F, Zhao X Q, et al.. Cloning and expression analysis of a Hexamerin gene *LmiHex-2* from *Locusta migratoria manilensis* (Acridoidea: Oedipodidae) [J]. J. Agric. Sci. Technol., 2016, 18 (6): 65-71.
- [19] 王 嶝, 张 早, 王张平, 等. 意大利蝗血蓝蛋白亚基 I 基因的克隆与原核表达 [J]. 生物技术进展, 2017, 7 (4): 353-354.
- [20] Wang D, Zhang Z, Wang Z P, et al.. Cloning and prokaryotic expression of the Hemocyanin subunit type I from *Calliptanus italicus* [J]. Curr. Biotechnol., 2017, 7 (4): 353-354.
- [21] Li Y, Zhang Z, Feng L, et al.. Gene and expression analysis

- of the hexamerin family proteins from the grasshopper, *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acridoidea) [J]. Biotechnol. Biotechnol. Equipment, 2017, 31(10):1-9.
- [18] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [19] Scharf M E, Buckspan C E, Grzymala T L, et al.. Regulation of polyphenic caste differentiation in the termite *Reticulitermes flavipes* by interaction of intrinsic and extrinsic factors [J]. J. Exp. Biol., 2007, 210 (24): 4390-4398.
- [20] Burmester T. Origin and evolution of arthropod hemocyanins and related proteins [J]. J. Comparative Physiol. B, 2002, 172 (2): 95-107.
- [21] Zhang X H, Li Y L, Zhang K J, et al.. Cloning and expression analysis of the hexamerin subunit type 2 (Hex2) gene from the grasshopper *Calliptamus italicus* (Orthoptera: Catantopidae) [J]. Acta Entomol. Sin., 2016, 59(2):156-163.
- [22] Eliautout R, Marie P D, CaroleV M, et al.. Immune response and survival of *Circulifer haematocephalus* to *Spiroplasma citri* infection requires expression of the gene hexamerin [J]. Dev. Comparative Immun., 2015, 54(1): 7-19.
- [23] John P F, Niamh T, Kevin K. Pre-exposure of *Galleria mellonella* larvae to different doses of *Aspergillus fumigatus conidia* causes differential activation of cellular and humoral immune responses [J]. Virulence, 2011, 2 (5): 413-421.

(责任编辑:温小杰)