

# 不同启动子对禽流感病毒 H5HA 基因 在马铃薯体中表达的影响

黄翠香<sup>1 2</sup> 季 勤<sup>2</sup> 张云峰<sup>2</sup> 徐 春<sup>2</sup> 窦秉德<sup>2</sup>

(1. 南京师范大学生命科学学院生物多样性与生物技术江苏省重点实验室, 江苏 南京 210046)

(2. 淮阴师范学院生命科学学院江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室, 江苏 淮安 223300)

**[摘要]** 将编码禽流感病毒 H5N1 亚型的血凝素基因 H5HA 的 cDNA 片段分别与马铃薯 GBSS I 和甘薯 SpoA 基因启动子序列融合, 通过农杆菌介导法将重组基因转入马铃薯, 分别用 PCR、Western(印迹杂交和斑点杂交)方法对重组基因在马铃薯中的表达情况进行了分析, 并将其结果与融合 CaMV35S 启动子的 H5HA 重组基因在马铃薯体内的表达情况进行比较。分析结果表明 3 个重组的 H5HA 基因在马铃薯薯块中均获得了表达, 其表达量最高的是融合 GBSS I 启动子的 H5HA 重组基因, 最低的是融合 SpoA 启动子的 H5HA 重组基因。

**[关键词]** H5HA 基因, 转基因马铃薯, 启动子

**[中图分类号]** Q786 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2012)01-0075-05

## Effect of Promoters on Expression of H5HA Avian Influenza Virus Gene in Potato Plant

Huang Cuixiang<sup>1 2</sup> , Ji Qin<sup>2</sup> , Zhang Yunfeng<sup>2</sup> , Xu Chun<sup>2</sup> , Dou Bingde<sup>2</sup>

(1. Jiangsu Key Laboratory for Biodiversity and Biotechnology, School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

(2. Jiangsu Key Laboratory for Eco-Agricultural and Biotechnology Around Hongze Lake, School of Life Sciences, Huaiyin Normal University, Huaian 223300, China)

**Abstract:** The H5HA-encoding cDNA fragment of the avian influenza virus subtype H5N1 gene was, respectively, fused to the promoter fragments of potato granule-bound starch synthase I (GBSSI) and sweet potato Sporamin A (SpoA). The recombinant genes were transferred into a potato cultivar (cv. Desiree) by using Agrobacterium-mediated transformation. The transgenic plants were obtained and analyzed by PCR, Western blotting and Western dot blotting. The results were compared with the expression of the CaMV35S-H5HA recombinant gene in potato. The results showed that three recombinant proteins can be accumulated in potato tubers. The highest level of expression was the H5HA fused to GBSS I promoter, and the lowest one was the gene fused with the SpoA promoter.

**Key words:** H5HA gene, transgenic potato, promoter

禽流感(Avian influenza, AI)是由正黏病毒科 A 型流感病毒引起的一种人、畜、禽共患的急性烈性传染病<sup>[1]</sup>。它的流行不但会给家禽养殖业造成重大经济损失,同时也严重威胁着人类健康<sup>[2]</sup>。

依据禽流感病毒囊膜表面血凝素(HA)和神经氨酸酶(N)蛋白抗原性的不同,可分为 15 个 H 亚型(H1~H15)和 9 个 N 亚型(N1~N9)。其中 H5N1 是引起高致病性流感流行,同时也是由病禽直接感染人群的主要毒株之一<sup>[3]</sup>。目前,病毒疫苗免疫是控制禽流感的关键环节和主要措施。研究发现, H5 亚型的 HA 的一级结构包括 N-端信号肽、HA1 和 HA2 3 个部分<sup>[4]</sup>。H5HA 所有中和表位都位于 HA1 区域,因此体外表达 HA1 蛋白能够涵盖所有的 HA 空间中和表位<sup>[5]</sup>。由于 H5 亚型的血凝素具有的这一特点,使得研制血凝素基因工程疫苗成为研究禽流感病毒疫苗的热点。如齐岩等<sup>[5]</sup>已经在昆虫细胞 Sf9 中成功表达了 H5N1 亚型禽流感病毒(HIV)的 HA1 基因。

收稿日期: 2011-11-07.

基金项目: 淮阴师范学院教授基金(06HSJS025)、江苏省“青蓝工程”。

通讯联系人: 季 勤, 博士, 教授, 研究方向: 分子生物学。E-mail: jiqin@hytc.edu.cn

在前期的研究中,我们首次报道了利用马铃薯作为生物反应器表达 H5N1 亚型的血凝素 H5HA( HA1 编码片段) 重组基因的研究<sup>[6]</sup>. 由于 CaMV35S 是一个组成性启动子,它驱使的 H5HA 基因可以在马铃薯植株的不同部位表达. 而如果选用马铃薯薯块特异性表达的启动子构建 H5HA 重组基因,是否可以提高重组蛋白在马铃薯薯块中的表达水平? 为此,在本研究中,我们选用了马铃薯淀粉粒结合型淀粉合酶 I ( Granule-bound starch synthase I, GBSS I) 基因的启动子和甘薯贮藏蛋白 A 基因( SpoA) 的启动子与 H5HA 基因编码序列融合,通过农杆菌介导法将重组基因转入马铃薯体内,以研究不同启动子对 H5HA 重组基因在马铃薯体内表达水平的影响,并将其分析结果与 CaMV35S-H5HA 基因在马铃薯体内的表达情况进行比较,为利用马铃薯作为生物反应器生产口服疫苗提供依据.

## 1 材料

### 1.1 植物材料

马铃薯品种 Desiree 组培苗由南京农业大学生命科学学院杨清教授提供.

### 1.2 菌株与质粒

大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、农杆菌 EHA105、Pcambia1301 和 pBIN19/H5HA 质粒由江苏省环洪泽湖生态农业重点实验室保存.

### 1.3 主要试剂

Taq DNA 聚合酶和 DNA Marker 购自南京天为生物公司,各种限制性内切酶和 T<sub>4</sub> DNA 连接酶购自 Fermentas 公司,PCR 扩增引物由上海生工合成,DNA 凝胶回收试剂盒购自上海生工,DNA 测序由南京金思特生物公司完成,Anti-H5HA 抗体购自美国 Genscript Corporation 公司,兔抗羊 IgG-HRP 抗体购自南京 Key GEN 公司.

## 2 方法

### 2.1 植物表达载体的构建

本研究构建了两个二元植物表达载体 pBIN19/Gp-H5HA 和 pBIN19/Sp-H5HA,分别用于 H5HA 基因在 GBSS I 和 SpoA 启动子驱使下在马铃薯薯块中的表达. 植物表达载体的构建是从 pBIN19/35Sp-H5HA 质粒<sup>[6]</sup>开始,该质粒携带有 CaMV35S 启动子片段( *Hind* III 和 *Sal* I)、H5HA 基因的编码序列( *Sal* I-*Bam*HI) 和胭脂碱合成酶( *Nos*) 基因的终止子( *Sac* I-*Eco*R I).

#### 2.1.1 pBIN19/Gp-H5HA 表达载体的构建

马铃薯 GBSS I 基因启动子片段扩增依据 pBIN9/SBD 质粒<sup>[7]</sup>中的 GBSS I 启动子序列,利用 Primer 5.0 软件设计一对特异性引物 Gp-F( 5'-CGTGAATACGCCAAGCTTACTACTA-3') 和 Gp-R( 5'-CTTGTCTGACTGATGTGTGTC TAC-3') 在 Gp-F 引物中引入 *Hind* III 位点( 划线部分) 在 Gp-R 引物中引入 *Sal* I 位点( 划线部分). 以 pBIN19/SBD 质粒中的 GBSS I 启动子序列为模板,利用 Taq 聚合酶进行启动子的 PCR 扩增. PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 1 min, 52℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 29 个循环, 72℃ 10 min. 用 *Sal* I 和 *Hind* III 核酸内切酶分别消化 pBIN19/35Sp-H5HA 质粒 DNA 和 GBSS I 启动子的 PCR 扩增产物,质粒 DNA 和 GBSS I 启动子条带回收连接后,得到植物表达载体 pBIN19/Gp-H5HA.

#### 2.1.2 pBIN19/Sp-H5HA 表达载体的构建

甘薯贮藏蛋白 A 基因( SpoA) 启动子片段扩增依据 SpoA 基因启动子的两端序列设计一对特异性引物,正向引物为 Sp-F( 5'-CTATAGAAGCTTTCATTGGACACTTGGACGG-3') 和反向引物为 Sp-R( 5'-TGTAT-AGTCGACCATGCTGGCAGATGAGAT-3'),分别在正向和反向引物中引入 *Hind* III 和 *Sal* I 位点( 划线部分). SpoA 启动子片段的扩增是以甘薯基因组 DNA 为模板进行的,扩增反应条件为: 94℃ 预变性 4 min, 94℃ 变性 30 s, 50℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 29 个循环, 72℃ 10 min. 用 *Sal* I 和 *Hind* III 核酸内切酶消化 SpoA 启动子的 PCR 扩增产物,回收的 SpoA 启动子条带与 2.1.1 中得到的质粒 DNA 条带连接,得到 pBIN19/Sp-H5HA 质粒载体. 重组植物表达载体经酶切鉴定后进一步进行核苷酸序列分析.

### 2.2 农杆菌转化

取 5  $\mu$ L 质粒 DNA,加至 100  $\mu$ L 农杆菌 EHA105 感受态细胞中,小心混匀,在冰浴中放置 10 min 后,将

混合物转入  $-20^{\circ}\text{C}$  预冷电击杯中, 然后置于电穿孔仪( Bio-Rad ,Micro Pulser ,美国) 上进行电击转化操作, 电击条件: 电压 2.2 kV、电击 2 s.

### 2.3 外植体的准备

用生长 4 wks 左右的马铃薯无菌苗, 切取长 0.8 cm 左右不带腋芽的茎段, 接种于  $\text{R}_3\text{B}$ ( MS + 2.0 mg/L NAA( 萘乙酸) + 1.0 mg/L 6-BA( 6-氨基嘌呤) ) + 2 mL PACM( MS + 2.0 g/L 水解酪蛋白 + 1.0 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L KT ( 激动素) ) 的培养基上预培养 23 d 培养条件:  $28^{\circ}\text{C}$  光照时间 16 h/d 光照强度 2 000 lx.

### 2.4 农杆菌菌液制备

在新鲜平板上分别挑取带有 pBIN19/Gp-H5HA 和 pBIN19/Sp-H5HA 质粒的农杆菌单菌落, 接种于含 100.0 mg/L Rif ( 利福平) 和 50.0 mg/L Kan ( 卡那霉素) 的 30 mL LB 培养基中, 在  $28^{\circ}\text{C}$  黑暗条件下振荡培养至  $A_{600}$  值为 0.6 ~ 0.8 后, 将菌液转移至离心管中, 离心( 5 000 r/min  $4^{\circ}\text{C}$  ,10 min) 收集菌体, 然后加 75 mL 的 LB 液体培养基在原三角瓶中重新悬浮菌体, 并分加到 3 个培养皿中( 每皿加 25 mL) .

### 2.5 马铃薯遗传转化及植株再生

取经过预培养的马铃薯茎段, 在农杆菌菌液中浸染 10 min, 将茎段转移到无菌滤纸上, 吸去多余的菌液后, 再将茎段转至原先的预培养基上暗培养 23 d, 随后将这些茎段转至 ZCVK 培养基( MS + 1.0 mg/L ( ZT) 玉米素 + 300.0 mg/L Cefo( 头孢霉素) + 200.0 mg/L Vanco( 万古霉素) + 100.0 mg/L Kan) 上进行愈伤诱导和芽分化的培养, 培养条件:  $22^{\circ}\text{C}$  光照时间 14 h/d 光照强度 2 000 lx 待芽长至 1.0 cm ~ 1.5 cm 高时, 转至生根培养基( MS + 300.0 mg/L Cefo + 50.0 mg/L Kan) 上培养, 培养条件同上.

### 2.6 转基因马铃薯检测

#### 2.6.1 PCR 检测

分别以转基因和对照马铃薯叶片为材料, 用 CTAB 法<sup>[8]</sup> 提取基因组 DNA, 根据 Pcambia1301/H5HA 质粒中 H5HA 基因序列设计一对特异性引物 H5HA-F (  $5^{\prime}$ -GCTCCTCGGAAACCTATGTGTGAC- $3^{\prime}$ ) 和 H5HA-R (  $5^{\prime}$ -CCTGCCATCCTCCCTCTATAAAACCT- $3^{\prime}$ ) , 以提取的基因 DNA 为模板, 利用 Taq DNA 聚合酶进行 PCR 扩增, PCR 反应条件为:  $94^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min  $94^{\circ}\text{C}$  变性 1 min、 $59^{\circ}\text{C}$  退火 30 s、 $72^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min、29 个循环,  $72^{\circ}\text{C}$  10 min. 扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测.

#### 2.6.2 H5HA 重组基因的表达分析

采用 TCA 沉淀法<sup>[9]</sup> 提取薯块总蛋白, 用 SDS-PAGE 和 Western 杂交技术对禽流感病毒 H5HA 重组蛋白在转基因马铃薯薯块中的表达进行分析.

##### 2.6.2.1 表达产物 SDS-PAGE 分析

将蛋白样品与  $2 \times \text{SDS}$  样品缓冲液( 250.0 mmol/L Tris-HCl、pH6.8 30% 甘油 8% SDS 200.0 mmol/L 二硫苏糖醇( DTT) 0.05% 溴酚蓝) 混合, 并在  $100^{\circ}\text{C}$  的水浴中加热 5 min. 在冷却到室温后, 取 10  $\mu\text{L}$  的蛋白质样液, 在 BIO-RAD 垂直电泳仪( Bio-Rad ,Mini Protean Tetra System ,美国) 上, 以 12.5% SDS-PAGE 电泳分离, 染色和脱色操作参照文献<sup>[10]</sup> 方法.

##### 2.6.2.2 Western 印迹杂交分析

用于 Western 印迹杂交分析的 SDS-PAGE 胶板在蛋白质电泳分离后, 在电转移系统( Bio-Rad ,Mini Trans-Blot System ,美国) 中进行印迹转移, 转移条件为: 200 mA、 $4^{\circ}\text{C}$ 、120 min, 转印后的硝酸纤维素滤膜( CN ,Millipore 公司 ,美国) 置于 8 mL 封闭液( 8 mL TBST 缓冲液( TBS + 0.05% Tween20) + 5% 脱脂奶粉 + 0.1% BSA) 室温下过夜封闭. 次日, 用 10 mL TBST 缓冲液洗膜 4 次, 每次 10 min. 随后加入 1:500 的 TBS ( 50 mmol/L Tris + 0.15 M NaCl pH7.5) 缓冲液稀释的一抗 Anti-H5N1( Gen Script Corporation ,美国) , 室温下温育 2 h. 用 TBST 缓冲液洗膜 3 次, 每次 5 min, 加入 1:500 的 TBS 缓冲液稀释的二抗兔抗羊 IgG-HRP ( Key GEN ,南京) , 室温下温育 2 h. 再用 TBST 缓冲液清洗 3 次, 每次 5 min. 最后将膜转入显色液( 10 mL 0.05 mol/L Tris-HCl、pH 7.6 + 0.01 mL 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  + 6 mg 3,3'-二氨基联苯胺四盐酸) 中显色 2 min ~ 3 min.

##### 2.6.2.3 Western 斑点杂交分析

在 Western 印迹杂交分析确定所表达的重组蛋白质相对分子质量正确后, 采用 Western 斑点杂交法对重组蛋白在马铃薯薯块中的表达水平进行分析. 取 10  $\mu\text{L}$  经 SDS 样品缓冲液处理后的蛋白质样液, 直接上样至 NC 膜上, 待样液干燥后, 后续操作参照 Western 印迹杂交分析.

### 3 结果与分析

#### 3.1 植物表达质粒构建及马铃薯转化

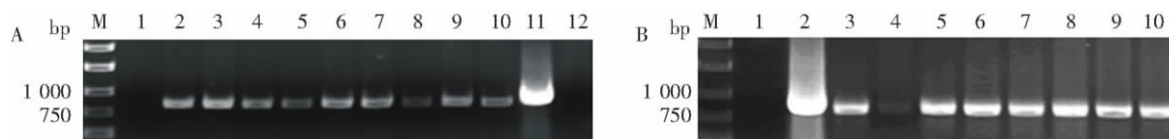
本研究中,将马铃薯 GBSS I 基因和甘薯 SpoA 基因的启动子分别和 H5HA 基因的编码序列融合,然后将重组基因插入带有胭脂碱合成酶(Nos)基因的终止子的 pBIN19 质粒载体中,得到 pBIN19/Gp-H5HA 和 pBIN19/Sp-H5HA 两个二元植物表达质粒(图1),质粒的测序结果表明,H5HA 重组基因序列以及读码框架都与预期的完全一致,所表达的重组蛋白质相对分子质量的理论计算值为 42 000。

将质粒 pBIN19/Gp-H5HA 和 pBIN19/Sp-H5HA 分别转入马铃薯品种 Desiree 后,经 NPT II 抗性筛选得到了 Gp-H5HA 和 Sp-H5HA 两个转基因系列。Gp-H5HA 系列的株系被命名为 GpHxx,其中的 Gp 代表 GBSS I 启动子,H 代表 H5HA 基因,xx 代表该转基因系列中的株系号;Sp-H5HA 系列的株系被命名为 SpHxx,其中的 Sp 代表 SpoA 启动子,Hxx 的含义和前一个序列相同。为了比较,我们将前期研究中得到的 35S-H5HA 系列中的转基因株系命名为 35S-Hxx,其中的 35S 代表 CaMV35S 启动子,Hxx 的含义和上两个序列相同。

将 Gp-H5HA、Sp-H5HA 和 35S-H5HA 3 个转基因系列中的每个株系同时扩繁 5 株后,移入温室继续生长,以非转基因植株为对照。3 个转基因系列植株在整个生长期其表现型与对照相似。

#### 3.2 转基因马铃薯的 PCR 检测

用 PCR 扩增技术对 H5HA 在马铃薯基因组中整合的情况进行了分析。图2是 Gp-H5HA 和 Sp-H5HA 两个系列的 PCR 图谱。从图中可以看出,Gp-H5HA 系列中株系 GpH21、Sp-H5HA 系列的所有株系中扩增到一条与阳性对照同样大小(857 bp)的条带。而阴性对照植株未扩增出相应的片段,实验结果表明,H5HA 基因已经整合到这些转基因马铃薯基因组 DNA 中。



A: M. DNA Marker; 1~10. 转基因马铃薯株系 GpH1-10; 11. 阳性对照 pBIN19/Gp-H5HA; 12. 阴性对照非转基因马铃薯植株;  
B: 泳道 M. DNA Marker; 1. 阴性对照非转基因马铃薯植株; 2. 阳性对照 pBIN19/Sp-H5HA; 3~10. 转基因马铃薯株系 SpH1-8

图2 转基因马铃薯的 PCR 分析

Fig. 2 PCR analysis of transgenic potatoes

#### 3.3 重组蛋白的表达分析

##### 3.3.1 SDS-PAGE 分析

为了调查 H5HA 重组蛋白在马铃薯薯块中的表达情况,我们从 3 个转基因系列中分别选择了一个株系,首先进行 SDS-PAGE 电泳鉴定(图3A)。SDS-PAGE 全蛋白电泳图谱显示,所选择的 3 个株系在相对分子质量约 42 000 处均有一条表达条带,与预期的 H5HA 蛋白的相对分子质量大小一致,而该条带对照泳道没有。这一结果初步表明,该条带即为 H5HA 蛋白的表达条带。

##### 3.3.2 Western 印迹杂交分析

为了进一步验证 3.3.1 中的结果,在 SDS-PAGE 电泳分离、印迹转移后用 Anti-H5N1 抗体进行 Western 印迹杂交分析(图3B)。印迹杂交图谱显示,只有转基因株系的泳道中,在相对分子质量约 42 000 处出现了杂交条,而对照泳道中没有。这一结果与 SDS-PAGE 电泳鉴定结果一致,表明 H5HA 蛋白质在马铃薯

薯块中得到了正确的表达。

### 3.3.3 Western 斑点杂交分析

对 H5HA 重组蛋白在转基因马铃薯薯块中表达水平用 Anti-H5N1 抗体进行 Western 斑点杂交分析. 重组蛋白的积累量是通过将 NC 膜上蛋白显色斑点的深浅与标样点相比较得出的, 根据重组蛋白在薯块中积累量的高低, 将每一个转基因系列分为 0 +、1 +、2 + 和 3 + 4 个组. 0 +、1 +、2 + 和 3 + 分别代表无表达、低、中和高表达水平(见图 4A). 每一个转基因系列在各组的发布情况在图 4B 中给出, 从图 4B 中可以清楚地看出, H5HA 重组蛋白在 3 个转基因系列中的表达水平存在明显差异, Gp-H5HA 系列的最高表达水平是 3 +, 而其余两个系列的最高表达水平均为 2 +; 除此之外, 表达水平为 2 + 的株系, 在 Gp-H5HA 系列中所占比例最高为 44.4%, 35Sp-H5HA 系列为 33.3%, 而 Sp-H5HA 系列中仅有 16.7%. 由此可知, H5HA 重组蛋白在 Gp-H5HA 转基因系列中表达水平最高, 其次是 35Sp-H5HA 系列, 表达水平最低的是 Sp-H5HA 系列.

## 4 讨论

在本研究中, 我们将禽流感 H5N1 亚型的血凝素 H5HA 的编码序列分别与马铃薯 GBSS I 和甘薯 SpoA

启动子融合. 通过农杆菌介导将重组基因转入马铃薯中进行表达, 探讨了不同启动子对 H5HA 重组基因在马铃薯薯块中表达的影响. 我们的实验结果表明, 融合 GBSS I 启动子的 H5HA 重组蛋白的表达水平最高, 其次是 35S 启动子, 表达水平最低是融合甘薯 SpoA 基因启动子, 这说明与 H5HA 融合的启动子对重组基因在马铃薯薯块中的表达水平有一定的影响, 其影响的大小与启动子的性质有关. 本研究中所选用的 GBSS I 启动子本身就是马铃薯薯块特异性表达的启动子, 与其他两种启动子相比, 它驱使的 H5HA 基因在薯块中的表达水平最高; 而 SpoA 启动子则是一个甘薯块根特异性表达的启动子, 虽然 H5HA 基因在它的驱使下可以在马铃薯块茎中表达, 但在三者之间它的表达水平最低; CaMV35S 是一个组成性的启动子, 和它融合基因可以在马铃薯中各个部位表达, H5HA 重组蛋白在薯块中的表达水平介于上述两者之间. 由此我们认为利用马铃薯薯块生产 H5N1 禽流感病毒疫苗, 选用马铃薯薯块特异性表达的启动子构建重组基因较为合适.

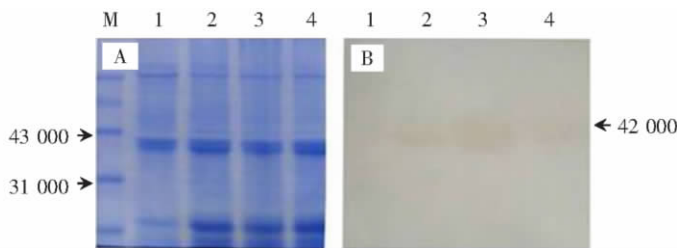


图 3 H5HA 重组蛋白在转基因马铃薯薯块中表达的分析  
Fig.3 Analysis of H5HA proteins expression in transgenic potato tubers  
A: H5HA 表达的 SDS-PAGE 分析图谱, M. Protein MW Marker; 1. 非转基因马铃薯; 2. 35Sp-H5HA 转基因马铃薯; 3. Gp-H5HA 转基因马铃薯; 4. Sp-H5HA 转基因马铃薯. B: H5HA 表达的 Western 印迹杂交分析图谱. 图中 1~4 的排列顺序和图 A 中相同

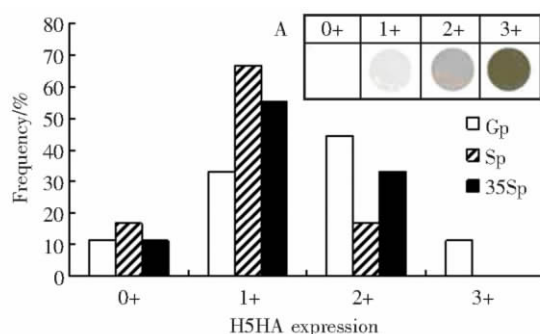


图 4 H5HA 重组蛋白在转基因马铃薯薯块中积累量的分析  
Fig.4 Analysis for the distribution of the individual transformants over the four groups for three transgenic potato series

## 【参考文献】

- [1] Chen H, Smith G J, Zhang S Y, et al. Avian Flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl[J]. Nature, 2005, 436(7048): 191-192.
- [2] 姜三杰, 吴燕民. 转禽流感血凝素基因百脉根植株的获得及筛选[D]. 北京: 中国农业科学院, 2010: 87.
- [3] 韦小琼. 人禽流感研究进展及其应用策略[J]. 右江民族医学院学报, 2006, 28(5): 860-862.
- [4] 颜渊清. 蛋白结构模拟预测 H5 型禽流感病毒保守中和表位及其抗病毒多肽的初步设计[D]. 厦门: 厦门大学生命科学学院, 2007: 88.

(下转第 83 页)

- obscurus* [J]. General and Comparative Endocrinology ,1972 ,18( 3) : 454-462.
- [2] Jerry H H , Paul W A. Influence of ecdysterone on molting in Palaemonetes [J]. General and Comparative Endocrinology , 1972 ,18( 3) : 435-438.
- [3] Gilgan M W , Farquharson T E , Burns B G. The effect of  $\alpha$ -ecdysone , ecdysterone and inokosterone treatment , separately or in combinations , on premolt development and molting in adult male lobsters( *Homarus americanus*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology , 1977 ,56( 1) : 43-49.
- [4] Armstrong P W , Stevenson J R. The effect of ecdysterone on  $^{14}$ C-N-acetylglucosamine incorporation into chitin in the crayfish *Orconectes obscurus* during the molt cycle [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry , 1979 ,63 ( 1) : 63-65.
- [5] Conaugh J R , Costlow J D. Ecdysone regulation of larval crustacean molting [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology , 1981 ,68( 1) : 91-93.
- [6] Muramoto A. Effects of eyestalk extracts and ecdysterone on water intake through the anus of the crayfish [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology , 1981 ,69( 2) : 197-203.
- [7] 魏定义,郭郭. 外源蜕皮激素对蓖麻蚕蛹发育的效应 [J]. 昆虫学报 ,1985 ,28( 4) : 357-361.
- [8] 黄全龙,张剑韵. 植源性蜕皮激素对家蚕结扎蛹卵巢发育的诱导 [J]. 蚕业科学 ,1992 ,18( 1) : 25-29.
- [9] 叶恭银,胡萃,龚和. 保幼激素和蜕皮激素对天蚕卵巢发育的影响 [J]. 浙江农业大学学报: 农业与生命科学版 ,1999 ,25( 3) : 276-250.
- [10] 罗日祥,王玉英.  $\beta$ -蜕皮激素和水龙骨素 B 的混对促进对虾蜕皮生长的作用 [J]. 海洋学报 ,1990 ,12( 3) : 355-358.
- [11] 王宁珠,弘端. 植物蜕皮激素对罗氏沼虾的影响 [J]. 饲料研究 ,1991 ,10: 8-9.
- [12] 康现江,王所安,秦树臻. 外源类固醇激素对中国对虾幼体蜕皮和生长影响的初步研究 [J]. 河北大学学报: 自然科学版 ,1995 ,15( 3) : 44-47.

[责任编辑:黄 敏]

( 上接第 79 页)

- [5] 齐岩,孙凌霜,王彬. H5 亚型禽流感病毒 HA1 基因在 Sf9 昆虫细胞中的表达及其抗原性检测 [J]. 中国兽医科学 , 2006 ,36( 5) : 352-356.
- [6] 谭甜,季勤,奚秉德,等. 禽流感病毒 H5HA 基因在马铃薯中的表达 [J]. 南京师大学报: 自然科学版 ,2009 ,32( 3) : 104-108.
- [7] Ji Q , Vincken J P , Suurs C J M , et al. Microbial starch-binding domains as a tool for targeting proteins to granules during starch biosynthesis [J]. Plant Mol Biol , 2003 ,51( 5) : 789-801.
- [8] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔著 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 北京: 科学出版社 ,2002: 238.
- [9] 陈晶瑜,郭宝峰,何付丽,等. 适合双向电泳的植物全蛋白提取方法比较 [J]. 中国农学通报 ,2010 ,26( 23) : 97-100.
- [10] 张晓薇. SDS-PAGE 对不同产地及质量枸杞的鉴别 [J]. 研究光明中医 ,2011 ,26( 5) : 917-918.

[责任编辑:黄 敏]