

家蚕小分子热激蛋白 *BmHsp19.1* 基因克隆及在蚕卵中的表达特征

龚竞^{1,2}, 张伟¹, 唐苗¹, 程悦静², 庞家欣²

1. 西南大学 蚕桑纺织与生物质科学学院, 重庆 400715; 2. 资源昆虫高效养殖与利用全国重点实验室, 重庆 400715

摘要: 小分子热激蛋白(small heat shock proteins, sHsps)是细胞抵御压力首先反应的蛋白, 目前家蚕卵滞育相关的 sHsps 研究较少. 为了更好地了解 sHsps 在滞育过程中的作用, 以转录组筛选出的差异表达基因 *BmHsp19.1* 为研究对象, 通过生物信息学分析、基因克隆、PCR 等方法对其进行克隆鉴定及在滞育卵、非滞育卵等蚕卵中的表达特征进行分析. 结果发现: *BmHsp19.1* 基因 ORF 全长 507 bp, 编码 168 个氨基酸, 理论分子量为 19.06 kDa, 有典型的 Hsp20 结构域, 属于 sHsps 家族; qRT-PCR 结果显示该基因在滞育卵 3~7 d 表达量上调, 而在非滞育卵中仅在第 7 d 上调表达, 且滞育卵中表达量显著高于非滞育卵, 暗示 *BmHsp19.1* 基因在蚕卵进入滞育时可能发挥作用, 起到了保护机体免受损伤的抗逆作用. 结果为解析 *BmHsp19.1* 基因功能提供了有用的信息, 也为其他昆虫的 sHsps 研究提供了一些有价值的参考.

关键词: 家蚕; *BmHsp19.1* 基因; 滞育; 基因克隆

中图分类号: S882 **文献标志码:** A

文章编号: 1673-9868(2023)06-0109-07

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Cloning and Expression Analysis of *BmHsp19.1* Gene in Silkworm Eggs

GONG Jing^{1,2}, ZHANG Wei¹, TANG Miao¹,
CHENG Yuejing², PANG Jiaxin²

1. College of Sericulture, Textile and Biomass Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. State Key Laboratory of Resource Insects, Chongqing 400715, China

Abstract: Small heat shock proteins (sHsps) are the first line of cell defense. However, to date, the sHsps of *Bombyx mori* (BmsHsps), which are related to diapause of silkworm eggs, were not well studied. In order to better understand the role of BmsHsps in the process of diapause, the *BmHsp19.1* gene, which is differentially expressed between diapause eggs and nondiapause eggs in the transcriptome, was studied by gene cloning, bioinformatics methods and PCR analysis. The results showed that the ORF of the *BmHsp19.1* gene was 507 bp in length, encoding a total 168 amino acids, and the theoretical molecu-

lar weight of the protein was 19.06 kDa, which had a typical Hsp20 domain and belonged to the sHsps family. The *BmHsp19.1* was up-regulated at day 3 to 7 after oviposition in diapause eggs, while it was up-regulated only at day 7 after oviposition in nondiapause eggs. Moreover, the expression level of *BmHsp19.1* in diapause eggs was significantly higher than that in nondiapause eggs. It is speculated that *BmHsp19.1* gene is involved in silkworm enter diapause, and plays an anti-stress role in protecting the body from injury. The results increased our understanding in the biological functions of *BmHsp19.1*, and may facilitate the sHsps study of other insects.

Key words: *Bombyx mori*; *BmHsp19.1*; diapause; gene cloning

昆虫种类繁多、分布广泛, 受益于昆虫在进化过程中生成的多种适应环境条件的能力, 滞育便是昆虫周期性度过不良生存环境的一种策略. 与休眠不同, 滞育是昆虫经年累月受到特定的刺激(例如光周期、温度等)^[1], 将这些外部信号转化为生物的一种特性, 并遗传给后代. 进入滞育的昆虫, 新陈代谢速率下降、应激耐受能力增强、生长发育停滞^[2].

滞育可以发生在昆虫生长的任一阶段, 按照不同的发育时期, 可分为卵滞育、幼虫滞育、蛹滞育和成虫滞育^[3]. 家蚕(*Bombyx mori*)是典型的卵滞育昆虫, 遗传背景清晰, 有重要的经济价值. 实际生产中, 常使用一些特殊的处理法(如即时浸酸法、冷藏浸酸法)阻断或解除滞育^[4], 使其进入正常的发育状态. 此外, 高浓度氧气处理滞育卵也能有效阻断蚕卵滞育^[5-6]. 由于滞育对家蚕生长繁育的影响与蚕业生产相关, 滞育机制还未完全解析, 因此家蚕滞育研究一直是大家关注的焦点.

热激蛋白(heat stress proteins, Hsps)广泛存在于原核、真核生物中, 最早在果蝇(*Drosophila melanogaster*)中发现^[7]. 当生物遭受外界胁迫(如高温)时, 体内细胞通过诱导合成热激蛋白, 作为分子伴侣促进蛋白质的完整性和细胞稳态, 以抵御胁迫反应^[8]. Hsps 分子量差异较大, 可分为 sHsps(small heat shock proteins), Hsp60, Hsp70 以及 Hsp90^[9]. 热激蛋白的存在反映了生物对环境中存在的某些极端应力的响应机制. 有研究表明, 热激蛋白与昆虫的滞育联系紧密, 在滞育期间热激蛋白基因表达产物通过增加、减少或者维持不变来促进昆虫在逆境中的生存^[8].

在前期研究中, 我们通过对家蚕滞育卵与发育卵转录组的研究分析^[6], 发现了一些差异表达的热激蛋白基因, 在这些基因中筛选出小分子热激蛋白 *BmHsp19.1* 基因, 进行克隆、生物信息分析以及在不同发育状态蚕卵中的表达特征调查, 对该基因的功能进行了初步推导. 该结果为解析 *BmHsp19.1* 功能提供了有价值的信息, 为其他昆虫 sHsps 的研究提供了一些参考.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验昆虫

家蚕二化性品种大造(Dazao)由西南大学蚕桑纺织与生物质科学学院家蚕育种实验室提供. 对母代胚胎进行 25 °C 长光照、15 °C 黑暗催青分别获得滞育卵、非滞育卵, 对其中的滞育卵进行高浓度氧气处理、HCl 处理, 采集以上 4 种蚕卵产后 0~7 d 材料, 用液氮速冻, 保存于-80 °C 冰箱备用.

1.1.2 试剂耗材

RNAiso Plus, 反转录试剂盒, T4 DNA 连接酶和 pMD19-T 载体, Takara; DNA 聚合酶(2×Taq Master Mix), Novoprotein; 胶回收试剂盒(Gel Extraction Kit), 广州美基生物; 氨苄霉素, 上海生工; 宿主菌 BL21 (DE3)和大肠杆菌(*Escherichia coli*) 感受态菌株 Trans1-T1, 上海唯地生物; 引物合成和测序, 上海生工; 纯氧气瓶, 重庆强胜; HCl 溶液, 重庆科试.

1.2 方法

1.2.1 高浓度氧气处理及 HCl 处理

高浓度氧气处理: 滞育卵产后 20 h, 放置于 25 °C 氧气浓度为 70% 的三气培养箱中处理 40 h.

HCl 处理: 滞育卵产后 20 h, 室温 25 ℃ 条件下在比重为 1.100 的 HCl 溶液中浸泡 70 min, 用流水洗净, 晾干.

期间收集两种处理产后 2 d, 3 d, 5 d 和 7 d 的蚕卵材料.

1.2.2 基因克隆鉴定和表达量检测

利用报道过的 *BmHsp19.1* 基因序列在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 以及 SilkBase (<http://silkbases.ab.a.u-tokyo.ac.jp/cgi-bin/>) 中进行检索, 检索之后用引物设计软件 Primer Premier (Version5.0)^[10] 设计 *BmHsp19.1* 荧光定量 PCR (qRT-PCR) 引物、克隆引物和内参引物 sw22671^[11] (表 1).

在 *BmHsp19.1* 载体构建实验中, 以家蚕滞育卵 7 d 的 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增. 循环参数为 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 反应 32 个循环; 72 ℃ 终延伸 10 min. 产物经 1.5% 琼脂糖电泳后检测其大小, 对目的 DNA 片段切胶回收, 再与 pMD19-T 载体连接, 将连接产物转化到感受态细胞中, 通过菌液 PCR 筛选阳性克隆并进行测序鉴定.

以产后 0 h, 20 h, 2 d, 3 d, 5 d, 7 d 家蚕滞育卵、非滞育卵, 产后 2 d, 3 d, 5 d, 7 d 高浓度氧气处理、HCl 处理的滞育卵的 cDNA 为模板开展 qRT-PCR 分析, qRT-PCR 反应程序设定为 94 ℃ 预变性 1 min; 94 ℃ 反应 20 s, 60 ℃ 反应 40 s, 30 个循环. 每个样品 3 个生物学重复, 相对定量 ($2^{-\Delta\Delta CT}$ 法) 计算基因表达量.

表 1 引物序列

引物名称	序列(5'-3')	用途
<i>BmsHsp19.1-F1</i>	ATGTCTCTGCTACCTTACATCTTTGACTAC	克隆
<i>BmsHsp19.1-R1</i>	TCACTTGCTCGGAGTTTCTTCTGTGA	
<i>BmsHsp19.1-F2</i>	ACAAGGACAAGTGGCAGATCAACG	
<i>BmsHsp19.1-R2</i>	GTAACCGTGCTCATCCTGCTTCTC	qRT-PCR
<i>BmActin3-F2</i>	CCGTATGCGAAAGGAAATCA	
<i>BmActin3-R2</i>	TTGGAAGGTAGAGAGGGAGG	

1.2.3 蛋白的生物信息学分析

利用在线网站预测 *BmHsp19.1* 的信号肽区域(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>)和磷酸化位点以及糖基化位点 (<https://prosite.expasy.org/>), 采用在线网站 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测结构域, 采用在线网站 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 预测蛋白跨膜结构域, 利用在线网站 expasy (<https://web.expasy.org/protscale/>) 对蛋白亲疏水性进行预测. 以 *BmHsp19.1* 为检索序列, 采用 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) blast 工具收集部分生物的 sHsps 序列, 在 TBtools 软件中进行建树, 建树方法为最大似然法, 检验 5 000 次. 采用 SilkDB 3.0(<https://silkbdb.bioinfotoolkits.net/main/species-info/-1>) 进行亚细胞定位, 利用在线网站 PSIPRED v3.3 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) 进行二级结构预测, 利用在线网站 Robetta(<https://robetta.bakerlab.org/>) 对蛋白质的三维结构进行预测, 用 PyMOLWin 软件制图并导出.

1.2.4 统计分析

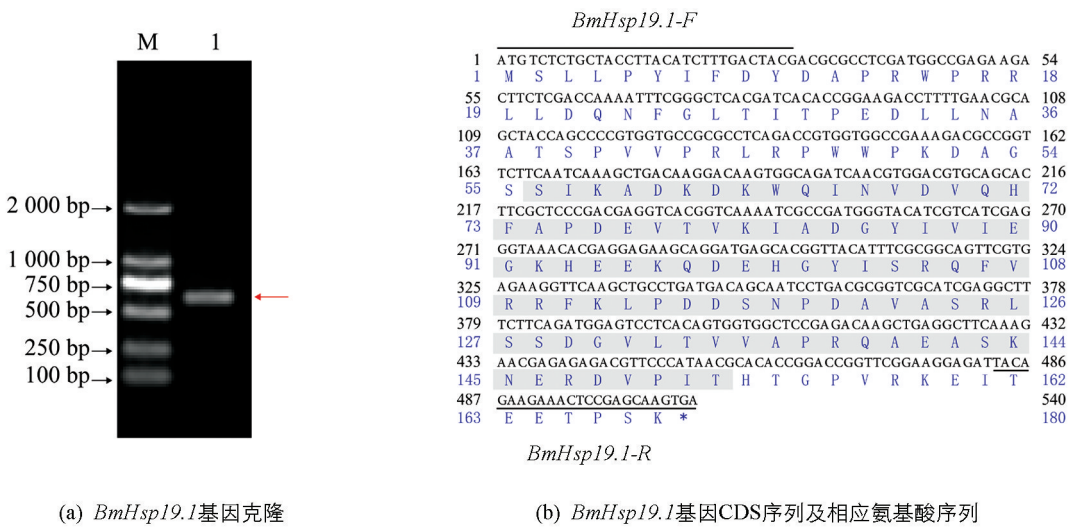
使用 GraphPad Prism 5.0 软件对数据结果进行统计分析, 采用 two-way ANOVA 方法检验比较不同样品的差异显著性 ($p<0.05$).

2 结果与分析

2.1 *BmHsp19.1* 基因克隆与分析

对 *BmHsp19.1* 基因进行克隆, 以家蚕品种大造滞育卵 7 d 的 cDNA 为模板, 用基因的克隆引物进行 PCR 扩增, 产物的大小采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测. 结果显示, 在 500~750 bp 之间有 1 条特异性条带,

与预期片段大小相符(图 1a). 对该 PCR 产物进行切胶回收, 连接转化 pMD19-T 载体, 筛选出阳性克隆进行测序, 得到 CDS 长度为 507 bp 核苷酸序列, 编码 168 个氨基酸, 无信号肽结构, 无跨膜结构域, 在第 56~152 个氨基酸位具备 Hsp20 功能结构域, 属于小分子热激蛋白家族(图 1b). 比对结果表明, *BmHsp19.1* 基因克隆序列和家蚕 SilkDB 数据库预测基因序列一致.



a 图中 M 为 DL2000 Marker, 1 为 PCR 扩增产物; b 图中 Hsp20 功能结构域以灰色显示.

图 1 *BmHsp19.1* 基因

2.2 *BmHsp19.1* 蛋白序列分析

BmHsp19.1 蛋白预测的分子量为 19.06 kDa, 等电点为 5.59, 具有 5 个潜在的磷酸化修饰位点(T-29, S-56, T-79, S-117 和 S-143), 无糖基化位点. 利用 ProtScale 软件进行蛋白亲疏水性分析, 结果显示: *BmHsp19.1* 蛋白亲水性氨基酸在整个肽链中的分布占比较多(图 2a), 疏水性氨基酸相对较少, 分别占总氨基酸的 68.45%和 31.55%. 23~41 区域、81~89 区域、128~138 区域的氨基酸疏水性较强, 其中, 疏水性最强的氨基酸在第 132 位, 分值为 1.422; 亲水性较强的氨基酸集中分布在 9~22 区域、34~35 区域、42~69 区域、71~77 区域、90~122 区域、139~152 区域、154~164 区域, 其中亲水性最强的氨基酸在第 96 位, 分值为-3.522. 通过 PSIPRED v3.3 和 Robetta 在线网站对蛋白的二级(图 2b)、三级结构进行预测(图 2c), 其中, 蛋白结构中无规则卷曲所占比例最大, 为 58.4%, β 折叠占 31.5%, α 螺旋占 10.1%.

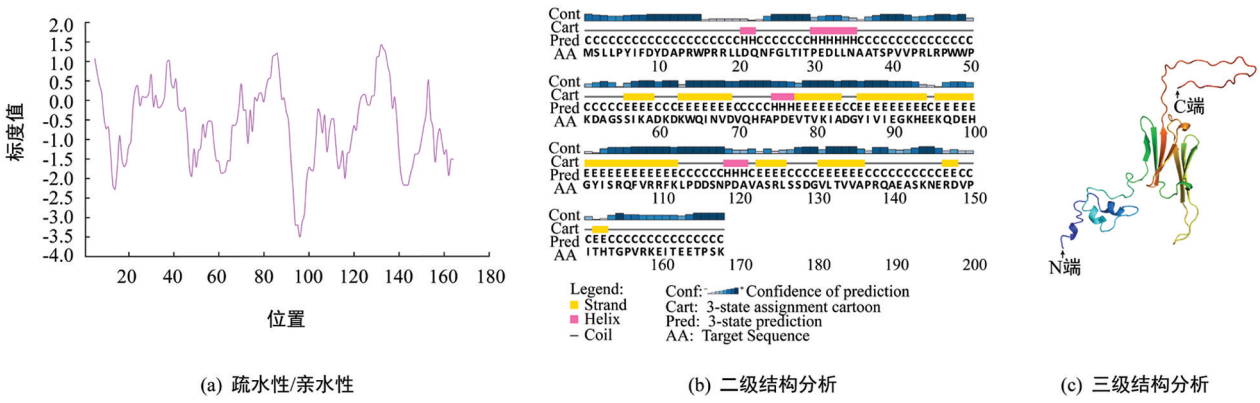


图 2 *BmHsp19.1* 蛋白

2.3 *BmHsp19.1* 进化分析

利用 Mega X 软件对 20 种不同物种的小分子热激蛋白构建系统进化树, 结果显示, 选用的物种形成脊椎动物和无脊椎动物两个大的分支, 其中家蚕和野桑蚕的亲缘关系最近, 然后再与其他鳞翅目昆虫聚在一起(图 3).

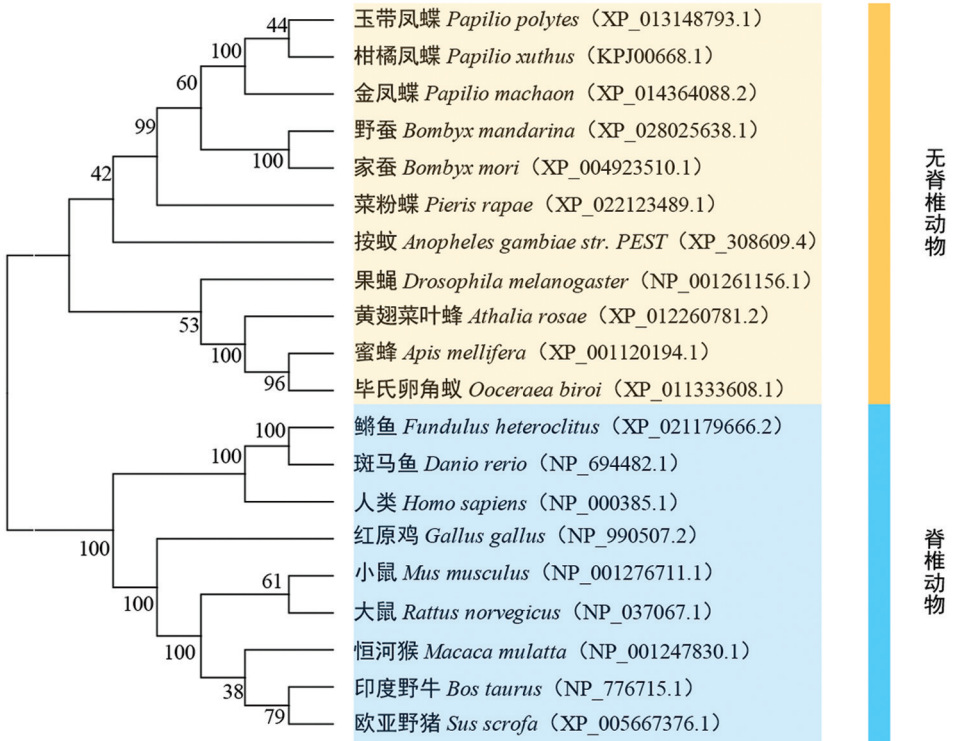
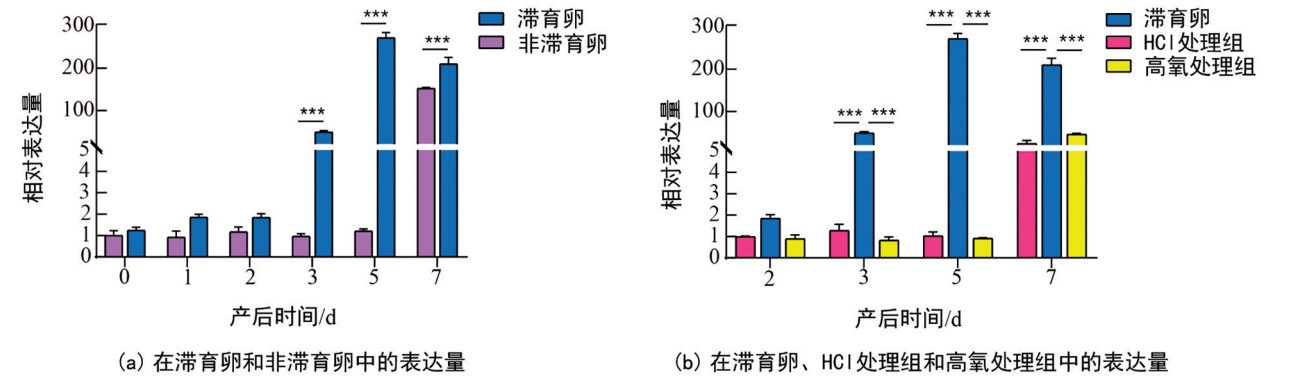


图 3 sHsps 系统发育进化树

2.4 BmHsp19.1 基因在蚕卵中的表达分析

为了调查家蚕 *BmHsp19.1* 基因在滞育卵、非滞育卵、高浓度氧气处理的滞育卵和 HCl 处理的滞育卵中的表达情况, 采用 qRT-PCR 方法对其蚕卵进行分析(图 4). 结果表明: *BmHsp19.1* 基因在滞育卵和非滞育卵产后 0~2 d 的表达量较小, 差异不大; 滞育卵的表达量在产后 3~7 d 上调, 显著高于非滞育卵. 在滞育卵、高氧处理组 and HCl 处理组的比较中, *BmHsp19.1* 基因的表达量也是在滞育卵中产后 3 d 开始上调, 显著高于其余处理组, 并持续到产后 7 d. 说明 *BmHsp19.1* 基因主要在蚕卵进入滞育过程的后期高量表达, 暗示该基因可能在进入滞育过程中起到了很重要的作用.



*** 表示 $p < 0.001$, 差异有统计学意义.

图 4 家蚕 *BmHsp19.1* 基因在不同发育状态蚕卵中的表达量分析

3 讨论

本研究中我们聚焦可能与滞育有关的 Hsps 家族蛋白, 这类蛋白通常在昆虫经历高温、寒冷、缺氧等外界不利条件时产生并发挥作用, 其中 Hsp60, Hsp70 和 Hsp90 的分子量较大, 依赖于 ATP 发挥作用; 而 sHsps 家族蛋白, 其分子量介于 12~43 kDa 之间, 通常在 30 kDa 以下, 蛋白有保守的二级结构和蛋白结

构域,不依赖 ATP 发挥作用^[8,12]。本文中鉴定的 *BmHsp19.1* 基因,其蛋白分子量为 19.06 kDa,具有典型的 Hsp20 功能结构域,属于小分子热激蛋白家族。

滞育是昆虫经历的一个特殊的生理环境,是生命活动由旺盛到几乎停滞的过程^[13]。由于呼吸的减弱生物会进入到一个生理性缺氧的状态,这与外界条件缺氧环境很相似。已有研究发现,蟋蟀(*Allonemobius socius*)在卵滞育时具有代谢减少 64% 的特征,*Hsp20.7* 和 *Hsp90* 的 mRNA 表达量相对于非滞育的卵减少,而 *Hsp70* 的 mRNA 表达量没有变化^[14-15]。苜蓿切叶蜂(*Megachile rotundata*)滞育蛹中 *Hsp70* 的表达量明显上调,但 *Hsc70* 和 *Hsp90* 表达量的变化很小^[16]。有意思的是,果蝇成虫在缺氧过程中会上调至少 4 个 *Hsps* 基因,包括 *Hsp23*, *Hsp67Bc*, *Hsp68* 和 *Hsp40*,其中 *Hsp23* 对缺氧最敏感^[17]。受缺氧影响的肥须麻蝇(*Sarcophaga crassipalpis*)成虫增加了 *Hsps* 基因的表达:*Hsp70* 对缺氧反应最迅速,并且表现出最大的表达,其次是 *sHsps* 基因(*Hsp18*, *Hsp23* 和 *Hsp25*),然后是 *Hsp40* 和 *Hsp60*^[18]。从中可以看出,无论是滞育还是缺氧环境,热激蛋白都做出了压力反应,其中小热激蛋白表现为普遍上调。

家蚕在胚胎早期进入滞育,以滞育卵的形式度过寒冷的冬季。科研工作者通过组学的方法对家蚕中的 *Hsps* 进行了广泛的鉴定^[6,19-20],其中与家蚕滞育相关的 *Hsps* 有 *Hsp60*, *Hsp70*, *DnaJ*, *Hsp83*, *Hsp90*, *sHsps* 有 *Hsp12.2-like*, *Hsp19.1*, *Hsp19.9*, *Hsp20.1*, *Hsp20.4*, *Hsp20.8*, *Hsp23.7*。由于滞育过程中能量代谢被抑制,产生的 ATP 显著下降,此时不依赖于 ATP 的 *sHsps* 在滞育过程中大量积累。有研究表明 *Hsp12.2-like*, *Hsp19.5* 在滞育卵中上调表达^[6,21],本研究中的 *BmHsp19.1* 基因在家蚕滞育进入过程中也呈现出上调表达的趋势。这些 *sHsps* 与细胞中存储的蛋白质结合,可以起到防止蛋白不可逆变性的保护作用,这是细胞在滞育期间抵御压力引起的蛋白质损失的首要反应^[22-23]。*sHsps* 反应迅速还在于其可以通过转录后修饰,如磷酸化等来调节蛋白活性,无需从头合成蛋白。在这方面研究最广泛的例子是人类 *Hsp27*,其 N 末端区域内有 3 个磷酸化位点(Ser-15, Ser-78 和 Ser-82),通过丝裂原活化蛋白激酶级联调控进行修饰^[12,24],而本研究中 *BmHsp19.1* 预测的磷酸化位点多达 5 个(T-29, S-56, T-79, S-117 和 S-143),暗示该蛋白可能通过蛋白修饰活化进而发挥功能。有研究表明 *sHsps* 在正常和应激条件下,细胞内定位是不同的^[25-26],而该蛋白在不同条件下的亚细胞定位,有待进一步实验证实。

综上所述,本研究成功地对 *BmHsp19.1* 基因进行了鉴定和在蚕卵中的表达分析,该结果丰富了家蚕 *Hsps* 基因家族的研究信息,下一步将获取较纯的 *BmHsp19.1* 蛋白,作为研究滞育卵和非滞育卵差异的候选基因,后续可采用 RNAi 干扰或基因编辑的方法对其开展功能研究。

参考文献:

- [1] XU L R, NI X Z, WANG Z Y, et al. Effects of Photoperiod and Temperature on Diapause Induction in *Conogethes punctiferalis* (Lepidoptera: Pyralidae) [J]. Insect Science, 2014, 21(5): 556-563.
- [2] 徐卫华. 昆虫滞育的研究进展 [J]. 昆虫学报, 1999, 42(1): 100-107.
- [3] 郭鄂. 昆虫的激素 [M]. 北京: 科学出版社, 1979.
- [4] 黄君霆, 朱万民, 夏建国. 中国蚕丝大全 [M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1996.
- [5] 龚竞, 尚杉, 张育浩, 等. 高浓度氧处理法阻断蚕卵滞育 [J]. 华南农业大学学报, 2020, 41(1): 61-68.
- [6] GONG J, TIAN S, ZHOU X, et al. Transcriptional Response of Silkworm (*Bombyx mori*) Eggs to O₂ or HCl Treatment [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(12): 1838.
- [7] RINEHART J P, LI A Q, YOCUM G D, et al. Up-Regulation of Heat Shock Proteins is Essential for Cold Survival during Insect Diapause [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(27): 11130-11137.
- [8] KINGA M, MACRAE T H. Insect Heat Shock Proteins during Stress and Diapause [J]. Annual Review of Entomology, 2015, 60: 59-75.
- [9] HASLBECK M, FRANZMANN T, WEINFURTNER D, et al. Some Like it Hot: The Structure and Function of Small Heat-Shock Proteins [J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2005, 12(10): 842-846.
- [10] 方小梅, 罗近瑜, 黄科慧, 等. 甜芥 FePG1 基因克隆及表达分析 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2021, 43(12):

- 49-56.
- [11] WANG G H, XIA Q Y, CHENG D J, et al. Reference Genes Identified in the Silkworm *Bombyx mori* during Metamorphosis Based on Oligonucleotide Microarray and Confirmed by qRT-PCR [J]. *Insect Science*, 2008, 15(5): 405-413.
- [12] HASLBECK M, WEINKAUF S, BUCHNER J. Small Heat Shock Proteins: Simplicity Meets Complexity [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(6): 2121-2132.
- [13] NYLIN S. Induction of Diapause and Seasonal Morphs in Butterflies and other Insects: Knowns, Unknowns and the Challenge of Integration [J]. *Physiological Entomology*, 2013, 38(2): 96-104.
- [14] REYNOLDS J A, HAND S C. Decoupling Development and Energy Flow during Embryonic Diapause in the Cricket, *Allonemobius socius* [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2009, 212(13): 2065-2074.
- [15] REYNOLDS J A, HAND S C. Embryonic Diapause Highlighted by Differential Expression of Mnas for Ecdysteroidogenesis, Transcription and Lipid Sparing in the Cricket *allonemobius socius* [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2009, 212(13): 2075-2084.
- [16] YOCUM G D, KEMP W P, BOSCH J, et al. Temporal Variation in Overwintering Gene Expression and Respiration in the Solitary Bee *Megachile rotundata* [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2005, 51(6): 621-629.
- [17] LIU G W, ROY J, JOHNSON E A. Identification and Function of Hypoxia-Response Genes in *Drosophila Melanogaster* [J]. *Physiological Genomics*, 2006, 25(1): 134-141.
- [18] MICHAUD M R, TEETS N M, PEYTON J T, et al. Heat Shock Response to Hypoxia and Its Attenuation during Recovery in the Flesh Fly, *Sarcophaga crassipalpis* [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2011, 57(1): 203-210.
- [19] FAN L F, LIN J R, ZHONG Y S, et al. Shotgun Proteomic Analysis on the Diapause and Non-Diapause Eggs of Domesticated Silkworm *Bombyx mori* [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e60386.
- [20] LI Z W, LI X, YU Q Y, et al. The Small Heat Shock Protein (sHsp) Genes in the Silkworm, *Bombyx mori*, and Comparative Analysis with other Insect SHSP Genes [J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2009, 9(1): 215.
- [21] 龚竞, 尚杉, 郑茜, 等. 家蚕 *BmHsp19.5* 基因的鉴定及在滞育卵中的表达分析 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2022, 44(1): 57-64.
- [22] KINGA M, MACRAE T H. The Small Heat Shock Protein P26 Aids Development of Encysting Artemia Embryos, Prevents Spontaneous Diapause Termination and Protects Against Stress [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e43723.
- [23] SI F L, HE Z B, CHEN B. Cloning and Expression Profiling of Heat Shock Protein Dahsp23 Gene in the Winter and Summer Diapause Pupae of the Onion Maggot, *Delia antiqua* (Diptera: Anthomyiidae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2016, 59(4): 402-410.
- [24] GUSEV N B, BOGATCHEVA N V, MARSTON S B. Structure and Properties of Small Heat Shock Proteins (sHsp) and Their Interaction with Cytoskeleton Proteins [J]. *Biochemistry*, 2002, 67(5): 511-519.
- [25] ADHIKARI A S, SRIDHAR RAO K, RANGARAJ N, et al. Heat Stress-Induced Localization of Small Heat Shock Proteins in Mouse Myoblasts: Intranuclear Lamin a/C Speckles as Target for AlphaB-Crystallin and Hsp25 [J]. *Experimental Cell Research*, 2004, 299(2): 393-403.
- [26] BRYANTSEV A L, LOKTIONOVA S A, ILYINSKAYA O P, et al. Distribution, Phosphorylation, and Activities of Hsp25 in Heat-Stressed H9c2 Myoblasts: a Functional Link to Cytoprotection [J]. *Cell Stress & Chaperones*, 2002, 7(2): 146-155.

责任编辑 周仁惠