

文章编号:1001-1498(2016)05-0778-06

## 白蜡虫热激蛋白序列分析

孙涛, 王雪庆, 赵遵岭, 于淑慧, 陈晓鸣, 刘魏魏, 仝倩, 杨璞\*

(中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 国家林业局资源昆虫培育与利用重点实验室, 云南昆明 650224)

**摘要:** [目的] 了解白蜡虫泌蜡高峰期所表达的热激蛋白及其序列特征。 [方法] 从白蜡虫转录组数据库筛选获得 *hsp10*、*hsp20*、*hsp40*、*hsp60*、*hsp70*、*hsp90* 基因序列, 进行序列联配和进化树分析, 并对 *hsp40*、*hsp60*、*hsp90* 基因在不同温度下 mRNA 相对表达量情况进行荧光定量 PCR 检测。 [结果] 从白蜡虫转录组数据库中共筛选出 32 条 *hsp* 基因序列, 序列分析发现它们与目前已报道的序列具有很高一致性, 大部分含有保守区域和特征序列, 能够与同目昆虫基因聚为一支。 *hsp40*、*hsp60*、*hsp90* 基因均能被温度诱导。 [结论] 在白蜡虫泌蜡高峰期共鉴定到 32 个热激蛋白非重复序列基因 (unigene): *hsp10* unigene 3 个, *hsp20* unigene 1 个, *hsp40* unigene 11 个, *hsp60* unigene 1 个, *hsp70* unigene 13 个, *hsp90* unigene 3 个。

**关键词:** 白蜡虫; 热激蛋白; 序列分析; 温度胁迫; 荧光定量 PCR

中图分类号: S899

文献标识码: A

### Sequence Analysis of Heat Shock Protein of *Ericerus pela*

SUN Tao, WANG Xue-qing, ZHAO Zun-ling, YU Shu-hui, CHEN Xiao-ming, LIU Wei-wei, QI Qian, YANG Pu

(Research Institute of Resources Insects, Chinese Academy of Forestry, Key Laboratory of Cultivating and Utilization of Resources Insects of State Forestry Administration, Kunming 650224, Yunnan, China)

**Abstract:** [Objective] The study aims at investigating the heat shock protein (*hsp*) genes and analyze the sequence characterization of *Ericerus pela* during the peak period of wax-secreting. [Method] The sequences of *hsp10*, *hsp20*, *hsp40*, *hsp60*, *hsp70*, and *hsp90* were obtained from the transcriptome database of *E. pela*. The sequence alignment and phylogenetic analysis were performed. And the mRNA expression patterns of *hsp40*, *hsp60*, and *hsp90* under different temperature treatments were carried out by using the quantitative real time PCR (qRT-PCR). [Result] A total of 32 HSPs, which were highly similar with the HSP reported in other species, were identified. Most of them had the conserved regions and characteristic sequences, and they were clustered together with the sequences of the same order insect in the phylogenetic trees. The qRT-PCR results showed that, *hsp40*, *hsp60*, and *hsp90* can be induced by temperature-stress. [Conclusion] In this study, 32 unigenes of HSP of *E. pela* were identified, including 3 *hsp10* unigenes, 1 *hsp20* unigenes, 11 *hsp40* unigenes, 1 *hsp60* unigenes, 13 *hsp70* unigenes, and 3 *hsp90* unigenes.

**Keywords:** *Ericerus pela*; heat shock protein; sequence analysis; temperature-stress; quantitative real time PCR

白蜡虫 (*Ericerus pela* Chavannes) 是一种具有重要经济价值的资源昆虫, 2 龄雄虫所分泌的白蜡

在医药、食品、化工等行业具有重要的应用价值<sup>[1]</sup>。白蜡虫从温带到热带均有分布<sup>[2]</sup>, 在白蜡

收稿日期: 2016-03-06

基金项目: 国家 863 计划 2014AA021801, 林业公益性行业科研专项 201504302、201304808, 云南省应用基础研究重点项目 2013FA052, 国家自然科学基金 31572337

作者简介: 孙涛 (1991—), 男, 硕士研究生, 主要从事昆虫分子生物学研究。

\* 通讯作者: 杨璞

的生产中,主要采用“高山产虫,低山产蜡”的生产模式,利用低山区域高温、高湿度和低光照的环境刺激增加白蜡虫泌蜡量<sup>[3-4]</sup>。因此,研究白蜡虫对极端温度、湿度等不良环境的适应性,对于了解白蜡虫自然种群的分布特点、扩大白蜡产区、提高白蜡产量具有重要意义。

热激蛋白(heat shock protein, HSP),作为一种参与生物体抗逆反应的应激蛋白,能够防止或消除肽链错误折叠、辅助完成正确折叠,保证机体能够进行正常的生理活动,对于生物抵御诸如极端温度、拥挤、干燥、缺氧等不良环境具有重要作用<sup>[5-10]</sup>。前期研究发现,*hsp* 基因的表达与白蜡虫受到低温和高温胁迫以及发育过程密切相关,在温度胁迫和发育过程可能起到重要作用<sup>[11-12]</sup>,但是目前对白蜡虫 HSP 基因家族缺少系统的分析。

HSPs 一般根据分子量大小被划分为 HSP10、HSP20、HSP40、HSP60、HSP70、HSP90 和 HSP100,不同的 HSPs 具有不同的序列特征,有的是组成型,参与生物体的生长发育,有的是诱导型,发挥分子伴侣的功能<sup>[13]</sup>。因此,对白蜡虫所有 HSPs 进行系统的序列分析是了解 HSPs 在白蜡虫中功能的基础。本研究从白蜡虫 2 龄雄虫泌蜡高分期转录组中筛选 *hsp* 基因,对 *hsp* 基因进行序列联配和系统进化分析,并分析部分 *hsp* 基因在不同温度胁迫下的基因表达动态,为 *hsp* 基因功能研究奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

所用白蜡虫采自昆明中国林业科学研究院资源昆虫所人工大棚(102.73°E、25.04°N)内女贞树上。

### 1.2 实验试剂

DEPC 原液购自上海生工公司,异丙醇、三氯甲烷、无水乙醇等分析纯购自天津市风帆化学试剂科技有限公司,Trizol、用于 qRT-PCR 的 M-MLV 第一链合成系统试剂盒购自 Invitrogen 公司(中国),Sso-fastEvaGreenSupermix 试剂盒购自 Bio-Rad 公司(美国)。

### 1.3 *hsp* 基因家族鉴定

转录组数据库(SRA047286)来自 Yang Pu *et al.* (2012)<sup>[14]</sup>,将从 NCBI nr 数据库注释为 *hsp* 的氨基酸序列选出,利用 NCBI 中的 BLASTX 在默认参数下

进一步的比对确认,选择排序靠前且注释为 *hsp* 的序列。

1.3.1 序列联配 从 NCBI 数据库下载已知的昆虫热激蛋白序列,利用 DNAMAN V6 软件多序列比对功能对 BLASTX 筛选过的 HSP10、HSP20、HSP40、HSP60、HSP70、HSP90 氨基酸序列与已知序列联配,在默认参数下进行。

1.3.2 构建进化树 在构建进化树时,将含有同一保守区域的 HSP 氨基酸序列片段进行聚类分析,将这些氨基酸序列与 NCBI 中的已知昆虫 HSPs 氨基酸序列通过 ClustalX1.83 软件进行完全比对并输出 FASTA 格式文件,然后将 FASTA 格式文件载入 MEGA5.1 软件选择 NJ(Neighbor-Joining,邻接法)进行聚类分析,Bootstrap 法 1 000 次重复评估结果可信度。

### 1.4 荧光定量 PCR 检测

对从转录组筛选出的 *hsp40*、*hsp60*、*hsp90* 基因分别随机选取一个基因,并在不同温度下 mRNA 相对表达量情况进行荧光定量检测,RNA 提取、cDNA 合成、引物的设计与合成、qRT-PCR 等具体实验操作参考刘魏魏等(2013)<sup>[11]</sup>,以白蜡虫  $\beta$ -actin 为内参基因,数据分析时,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法进行相对定量分析,采用 DPS 数据处理软件中 LSD 法(least significant difference,最小显著差法)进行差异显著性统计分析,显著检验水平为  $P < 0.01$ 。

## 2 结果

### 2.1 HSPs 序列分析

2.1.1 HSP10 从白蜡虫转录组中得到 3 个 *hsp10*,核苷酸序列长度分别是 186 bp、120 bp 和 108 bp,NCBI Blast 比对 E-value  $\leq 1.0 \times 10^{-5}$ ,与丽蝇蛹集金小蜂(*Nasonia vitripennis* Wa-lker) HSP10 氨基酸序列的一致性分别为 42.86%、58.54% 和 79.49% (表 1 和图 1)。

2.1.2 HSP20 从白蜡虫转录组中得到 1 个 *hsp20*,核苷酸序列长度为 186 bp,NCBI Blast 比对 E-value  $\leq 1.0 \times 10^{-5}$ ,与实验室前期获得的白蜡虫 HSP20 氨基酸序列同区段进行比对,与同源性的 HSP21.5 的一致性为 42.00%,与物种特异性的 HSP21.7 的一致性为 100% (表 1),*hsp20* unigene (1)是属于 *hsp21.7* 的基因片段,因此 ep-HSP20(1)为物种特异性 HSP20。

表1 鉴定获得的基因及其序列信息、比对结果

基因	核苷酸序列长度/bp	利用基本的局部相似性比对搜索工具 (BLAST) 在美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 进行序列比对的期望值 (E-value)	与其它昆虫 HSP 氨基酸序列比对的一致性/%
<i>hsp10</i>	unigene (1)	186	丽蝇蛹集金小蜂 42.86%
	unigene (2)	120	58.54%
	unigene (3)	108	79.49%
<i>hsp20</i>	unigene (1)	186	白蜡虫 21.5 42.00% 白蜡虫 21.7 100.00%
	unigene (2)	1 201	东亚飞蝗 26.42%
<i>hsp40</i>	unigene (1)	1 746	18.66%
	unigene (2)	492	34.30%
	unigene (3)	246	58.21%
	unigene (4)	162	62.22%
	unigene (5)	300	41.59%
	unigene (6)	399	66.85%
	unigene (7)	105	57.50%
	unigene (8)	830	15.93%
	unigene (9)	1 142	24.37%
	unigene (10)	1 791	16.88%
	<i>hsp60</i>	unigene (1)	303
unigene (1)		267	黑腹果蝇 87.50%
unigene (2)		351	71.05%
unigene (3)		501	86.25%
unigene (4)		351	79.46%
unigene (5)		450	83.78%
<i>hsp70</i>	unigene (6)	1 434	66.95%
	unigene (7)	354	54.24%
	unigene (8)	351	83.33%
	unigene (9)	690	81.00%
	unigene (10)	1 131	70.59%
	unigene (11)	831	60.52%
	unigene (12)	213	95.71%
	unigene (13)	(686)	81.02%
<i>hsp90</i>	unigene (1)	270	意大利蜜蜂 91.01%
	unigene (2)	723	50.63%
	unigene (3)	732	45.38%

AP	V V A V G F G A R N Q C . G K F V E I D V N V G D F V L I P E Y G G T A T Q L D D D S Y T I F K E S E I L A K V E	101
GM	V V A V G F G A R N N C T G A H I A F S V K E G D F V L I P E Y G G T K V E L E D K K E Y L L F R E S D I L A K Y E	103
NV	V V A L G P G S R N D K . G E H I P E S I K V G D V V L I P E Y G G T K V E L E E N K E E H I F R E S D I L A K L E	103
ep-HSP10 (1)	K V V A V G F G A L E K K . G N R L E M G V A A G D F V L I P E Y G G S P V K A G E . E E Y Q I F R E S E I L A K I N	61
Consensus	V a g p g g g d v l p g g f s l a k	
AP	. . M A S V A T K E R F I L F D R V L V K H L A V K C S K G G I M I P E S A S K K	39
GM	. . M A A Q A I K K I M F M L D R I L V Q R A E S I L T I T K G G I V I P E A S Q A K	40
NV	M A A A A A V K R L I P I L F D R V L Q R A E A L T K I K G G I V I P E A Q G K	41
ep-HSP10 (2)	. . M A S G V V S R L K E I L F D R V L M K A E Q V T I T K G G I M I P E K A V R K	40
Consensus	p d r l k g g i p e k	
AP	V N V G D R V L L P E Y G G T A T Q L D D D S Y T I F K E S E I L A K V E	101
GM	V V E G D R V L L P E Y G G T K V E L E D K K E Y L L F R E S D I L A K Y E	103
NV	I K V G D V L L P E Y G G T K V E L E E N K E F H I F R E S I I L A K L E	103
ep-HSP10 (3)	L K V G D R V L L P E Y G G T K V E L E E . K E Y H I F R E T E L L A K L D	37
Consensus	g d v l l p e y g g t l f e l a k	

注:白蜡虫与其它昆虫 HSP10 氨基酸序列比对,所分析的 HSP10 来源及 GenBank 登录号如下:AP,豌豆长管蚜 *Acyrtosiphon pisum* Harris (NP\_001119666);GM,萨凡纳采采蝇 *Glossina morsitans morsitans* (ADD19718);NV,丽蝇蛹集金小蜂 (XP\_001599992)。

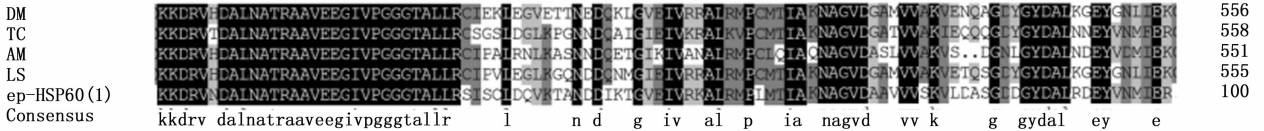
图1 ep-HSP10(1)/(2)/(3)与其它昆虫 HSP10 氨基酸序列比对

2.1.3 HSP40 从白蜡虫转录组比对之后得到 11 条 *hsp40*,它们的核苷酸序列长度在 105 bp 和 1 201

bp 之间,NCBI Blast 比对 E-value  $\leq 1.0 \times 10^{-5}$ ,与东亚飞蝗 (*Locusta migratoria* Meyen) HSP40 氨基酸序

列的一致性从 15.93% 到 66.85%, 这 11 条氨基酸序列都包含 J 结构域, 其中 ep-HSP40(7) 还含有 G/F 结构域(表 1)。进化树结果表明, 白蜡虫 HSP40 与半翅目聚在一起。

2.1.4 HSP60 从白蜡虫转录组比对之后得到 1



注:白蜡虫与其它昆虫 HSP60 氨基酸序列比对,所分析的 HSP60 来源及 GenBank 登录号如下:DM,黑腹果蝇(AAF47999);TC,赤拟谷盗(XP\_971630);AM,意大利蜜蜂 Apis mellifera LigusticaSpinola (XP\_392899);LS,美洲斑潜蝇 Liriomyza sativae Blanchard (AAW49251)。

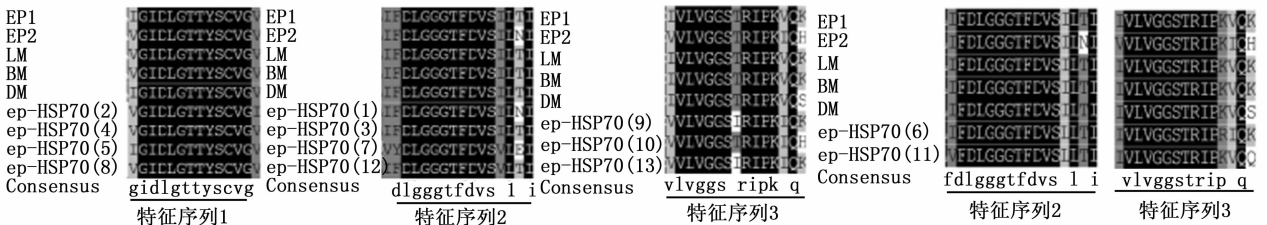
图2 ep-HSP60(1)与其它昆虫 HSP60 氨基酸序列比对

2.1.5 HSP70 从白蜡虫转录组中比对之后得到 13 条 *hsp70*, 核苷酸序列长度在 213 bp 和 1 434 bp 之间, NCBI Blast 比对 E-value  $\leq 1.0 \times 10^{-5}$ , 序列联配发现, 与黑腹果蝇 HSP70 比对的一致性从 45.38% 到 95.71%, ep-HSP70(2)、ep-HSP70(4)、ep-HSP70(5)、ep-HSP70(8) 含有 HSP70 家族的特征序列 IDLGGTTYS; ep-HSP70(1)、ep-HSP70(3)、ep-HSP70(6)、ep-HSP70(7)、ep-HSP70(11)、ep-HSP70(12) 含有 HSP70 家族的特征序列 IFDLGGGTFDV-SIL; ep-HSP70(6)、ep-HSP70(9)、ep-HSP70(10)、ep-HSP70(11)、ep-HSP70(13) 含有 HSP70 家族的特征序列 IVLVGGSTRIPKIQK(表 1 和图 3)。参考本实验室之前研究 HSP70 时构建的进化树对鉴定到的 HSP70 进行系统发育分析<sup>[12]</sup>, 结果表明 ep-

条 *hsp60*, 核苷酸序列长度是 303 bp, NCBI Blast 比对 E-value  $\leq 1.0 \times 10^{-5}$ , 与黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster* Meigen) HSP60 氨基酸序列的一致性为 74.00%(表 1 和图 2)。进化树结果表明, ep-HSP60(1) 与半翅目聚为一支。

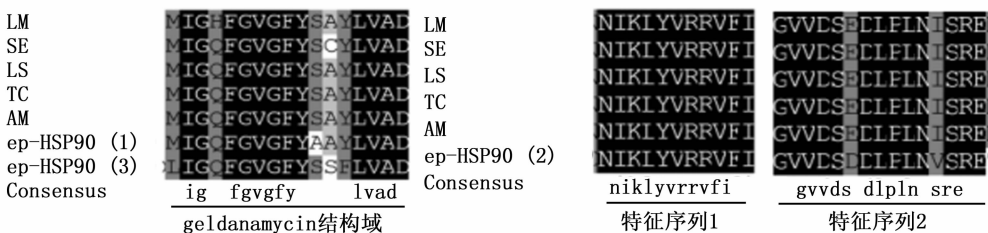
HSP70(3)、ep-HSP70(6)、ep-HSP70(9)、ep-HSP70(12)、ep-HSP70(13) 为细胞质中的 HSP70; ep-HSP70(7) 为内质网中的 HSP70; ep-HSP70(10) 为线粒体中的 HSP70。

2.1.6 HSP90 从白蜡虫转录组比对之后得到 3 条 *hsp90*, 核苷酸序列长度分别是 270 bp、723 bp 和 732 bp, NCBI Blast 比对 E-value  $\leq 1.0 \times 10^{-5}$ , 与意大利蜜蜂 HSP90 氨基酸序列的一致性分别为 91.01%、50.63% 和 45.38%, ep-HSP9(1)、ep-HSP90(3) 包含 geldanamycin 结构域, ep-HSP90(2) 含有 HSP90 家族的特征序列 NNIKLYVRRVFD 和 GVVDSEDLPLNISRE(表 1 和图 4)。进化树的结果表明, ep-HSP90(1) 与半翅目聚为一支(图 5)。



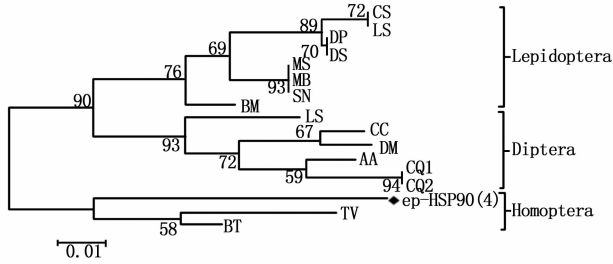
注:白蜡虫与其它昆虫 HSP70 氨基酸序列比对,所分析的 HSP70 来源及 GenBank 登录号如下:EP1,白蜡虫(AGE92596);EP2,白蜡虫(AGE92595);LM,东亚飞蝗(AAP57537);BM,家蚕(BAB92074);DM,黑腹果蝇(NP\_731651)。

图3 基于氨基酸序列构建的昆虫 HSP70 的系统进化树(邻接法)



注:白蜡虫与其它昆虫 HSP90 氨基酸序列比对,所分析的 HSP90 来源及 GenBank 登录号如下:LM,东亚飞蝗(AAS45246.2);SE,甜菜夜蛾 Spodoptera exigua Hiibner (ACL77779);LS,美洲斑潜蝇(AAW49253);TC,赤拟谷盗(XP\_967904);AM,意大利蜜蜂(XP\_623939)。

图4 ep-HSP90 与其它昆虫 HSP90 氨基酸序列比对



注:用于构树的 HSP90 来源及 GenBank 登录号如下:CS, 二化螟 *Chilo suppressalis* Walker (BAE44307.1); LS, 草地螟 *Loxostege sticticalis* Linnaeus (ABW87791.1); DP, 马尾松毛虫 *Dendrolimus punctatus* Walker (ABM90804.1); DS, 落叶松毛虫 *D. superans* Butler (ABM89112.1); MS, 粘虫 *Mythimna separata* Walker (ABY55234.1); MB, 甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* Linnaeus (BAF03554.1); SN, 粉茎螟 *Sesamia nonagrioides* Guenee (ABA54273.2); BM, 家蚕 (NP\_001036876.1); LS, 美洲斑潜蝇 (AAW49253.2); CC, 地中海实蝇 *Ceratitis capitata* Wiedemann (CAJ28987.1); DM, 黑腹果蝇 (NP\_523899.1); AA, 白端按蚊 *Anopheles albimanus* (AAB05639.1); CQ1, 致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* Say (XP\_001865484.1); CQ2, 致乏库蚊 (XP\_001861928.1); TV, 温室白粉虱 *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (ACH85202.1); BT, 烟粉虱 *Bemisia tabaci* Gennadius (ACH85198.1)。

图5 基于氨基酸序列构建的昆虫 HSP90 的系统进化树(邻接法)

## 2.2 hsp 表达分析

荧光定量结果表明, *hsp40*、*hsp60*、*hsp90* mRNA 的相对表达量均能被高温诱导, 其中, *hsp90* mRNA 的相对表达量明显增加, 33℃ 时是对照组的 11.39 倍, *hsp40*、*hsp60* mRNA 的表达量也有明显增加(图6)。

## 3 讨论

本研究从白蜡虫的转录组中共筛选出 32 条 HSPs 片段, 很多序列只包含个别保守区域而没有包含所有保守区域, 因此在构建系统发育树时只选部分片段进行系统发育分析。

通过与实验室前期获得的白蜡虫 HSP20 氨基酸序列同区段进行比对分析, ep-HSP20(1) 为物种特异性的 HSP20, 在其他研究中发现, 大部分昆虫 HSP20 是物种特异性的, 它们在机体受到温度胁迫时发挥重要作用, 如从二化螟中分离鉴定出的物种特异性 HSP20, 在进行高低温刺激后检测发现其表达量均明显增加<sup>[15]</sup>。前期研究中作者发现物种特异性的 HSP20 对温度变化敏感<sup>[12]</sup>, 推测其在白蜡虫 2 龄雄虫对温度耐受性的适应中可能起到重要作用。

HSP40 在不同物种之间存在一定的变异<sup>[16]</sup>, 系统发育分析表明, 白蜡虫 HSP40 与半翅目聚在一

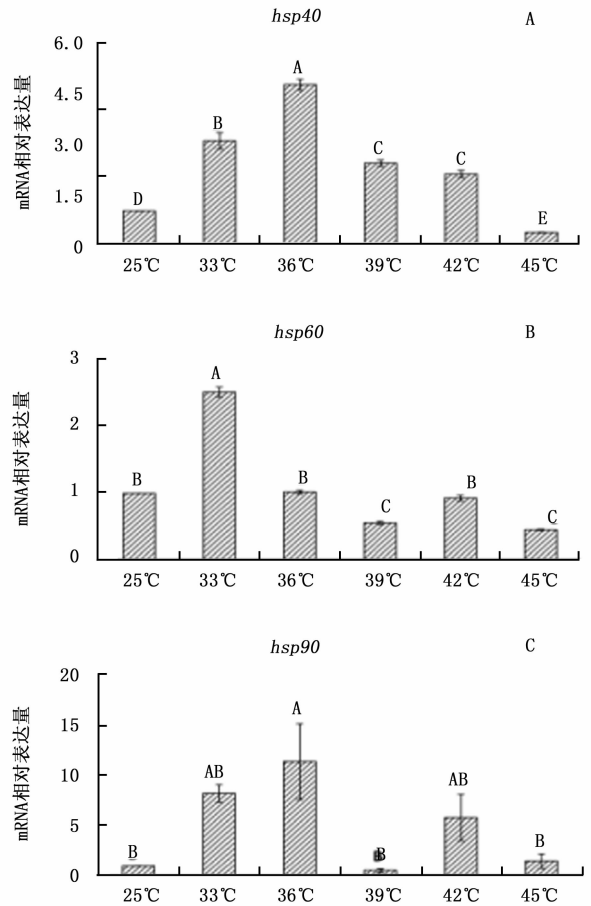


图6 高温胁迫对白蜡虫二龄雄虫 *hsp40*、*hsp60*、*hsp90* 表达的影响, 相同字母表示差异不显著 ( $P < 0.01$ )。

起, 但并没有聚在一支, 外源基因较多, 说明半翅目 HSP40 与其他目差异较大, 半翅目内 HSP40 变异较大。对白蜡虫 2 龄雄虫 *hsp40* 进行高温诱导后发现, 在 33℃、36℃ 时表达量显著增加。在对黑腹果蝇 *hsp40* 的研究中发现它能被低温诱导<sup>[17]</sup>。由此可以推测 HSP40 在白蜡虫 2 龄雄虫抵御温度胁迫时起到一定的作用。

ep-HSP60(1) 与半翅目聚为一支, 双翅目、鞘翅目、膜翅目、半翅目的 HSP60 均能独立成族, 物种特异性较强。HSP60 主要存在于叶绿体、线粒体等细胞器中, 其主要功能是负责蛋白质的再折叠和保护机体免于不良环境条件影响的作用<sup>[18]</sup>。对白蜡虫 2 龄雄虫 *hsp60* 进行高温诱导后发现, 在 33℃ 时表达量显著增加, *hsp60* 在白蜡虫 2 龄雄虫受到温度胁迫时可能起到一定的作用。在受到热刺激时, 二化螟血细胞 *hsp60* 显著增加, 也证实当昆虫受到温度胁迫时 *hsp60* 起到了一定的作用<sup>[19]</sup>。

HSP70 分为诱导型 HSP 和组成型 HSC 两种, 诱导型 *hsp70* 没有内含子, 在维护机体应对高温等不

利环境刺激时起到重要作用;组成型 *hsc70* 通常不能被不良环境刺激诱导,在机体的基础代谢过程中起到一定的作用<sup>[8,20]</sup>。系统发育分析表明,白蜡虫 ep-HSP70(12) 为诱导型 HSP; ep-HSP70(3), ep-HSP70(6), ep-HSP70(9), ep-HSP70(13) 为组成型 HSC,均位于细胞质中。在前期研究中表明,诱导型 HSP70 对温度变化敏感,组成型 HSC70 在白蜡虫受到极端温度胁迫时也显著上调<sup>[12]</sup>,因此 HSP70 在白蜡虫 2 龄雄虫应对温度胁迫时可能起到重要作用。

鳞翅目、双翅目、半翅目的 HSP90 均能独立成族,物种特异性较强。对白蜡虫 2 龄雄虫 *hsp90* 进行高温诱导后发现,在 33℃、36℃ 时表达量显著增加,前期对白蜡虫 2 龄雄虫进行低温处理后发现 *hsp90* 上调量显著<sup>[11]</sup>。很多昆虫 *hsp90* 的研究中,当受到温度胁迫时都有上调表达的现象<sup>[21-23]</sup>,如红尾肉蝇 (*Sarcophaga crassipalpis*) 在受到温度胁迫时,*hsp90* 的表达量显著升高<sup>[21]</sup>。HSP90 在白蜡虫 2 龄雄虫对温度耐受性的适应中可能起到一定作用。

## 4 结论

研究鉴定到 ep-HSP20(1) 为物种特异性 HSP20; ep-HSP40、ep-HSP70、ep-HSP90 氨基酸序列都包含家族的特征序列。共鉴定到 32 个热激蛋白非重复序列基因 (unigene): *hsp10* unigene 3 个, *hsp20* unigene 1 个, *hsp40* unigene 11 个, *hsp60* unigene 1 个, *hsp70* unigene 13 个, *hsp90* unigene 3 个。且 *hsp40*、*hsp60*、*hsp90* mRNA 的相对表达量均能被高温诱导。

## 参考文献:

[1] 陈小平. 白蜡虫的研究进展[J]. 四川林业科技, 2007, 28(1): 50-52.

[2] 张长海. 白蜡虫在我国的地理分布[J]. 林业科学研究, 1991, 4(2): 192-196.

[3] 陈晓鸣, 王自力, 陈勇, 等. 影响白蜡虫泌蜡主要气候因子及白蜡虫生态适应性分析[J]. 昆虫学报, 2007, 50(2): 45-52.

[4] 陈晓鸣, 王自力, 陈勇, 等. 白蜡虫同地产虫产蜡生产模式构建与分析[J]. 林业科学, 2010, 46(12): 106-113.

[5] Rinehart JP, Li A, Yocum GD, et al. Up-regulation of heat shock proteins is essential for cold survival during insect diapause[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007, 104(27): 11130-11137.

[6] King AM and MacRae TH. Insect heat shock proteins during stress and diapause[J]. Annual Review of Entomology, 2015, 60(1): 59-75.

[7] Štětina T, Košťál V and Korbelová J. The Role of Inducible Hsp70, and Other Heat Shock Proteins, in Adaptive Complex of Cold Tolerance of the Fruit Fly (*Drosophila melanogaster*) [J]. PLoS One,

2015, 10(6): 1-22.

[8] Zhu JY, Zhao N and Yang B. Global transcriptome profiling of the pine shoot beetle, *Tomicus yunnanensis* (Coleoptera: Scolytinae) [J]. PLoS One. 2012, 7(2): 1-12.

[9] Wang H, Li K, Zhu JY, et al. Cloning and expression pattern of heat shock protein genes from the endoparasitoid wasp, *Pteromalus puparum* in response to environmental stresses [J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology. 2012, 79(4-5): 247-63.

[10] Tungitwitayakul J, Tatum N, Vajarasathira B, et al. Expression of heat shock protein genes in different developmental stages and after temperature stress in the *Maize weevil* (Coleoptera: Curculionidae) [J]. J Econ Entomol. 2015, 108(3): 1313-1323.

[11] 刘魏魏, 杨璞, 陈晓鸣. 白蜡虫热激蛋白基因在低温胁迫下的表达分析[J]. 林业科学研究, 2013, 26(6): 681-685.

[12] Liu W W, Yang P, Chen X M, et al. Cloning and expression analysis of four heat shock protein genes in *Ericerus pela* (Homoptera: Coccidae) [J]. Journal of Insect Science. 2014, 14(142): 1-9

[13] Wang H S, Wang X H, Zhou C S, et al. cDNA cloning of heat shock proteins and their expression in the two phases of the migratory locust [J]. Insect Molecular Biology. 2007, 16(2): 207-219.

[14] Yang P, Zhu J Y, Gong Z J, et al. Transcriptome analysis of the Chinese white wax scale *Ericerus pela* with focus on genes involved in wax biosynthesis [J]. PLoS One. 2012, 7(4): e35719.

[15] Lu M X, Hua J, Cui Y D, et al. Five small heat shock protein genes from *Chilo suppressalis*: characteristics of gene, genomic organization, structural analysis, and transcription profiles [J]. Cell Stress Chaperones. 2014, 19(1): 91-104.

[16] Qiu X B, Shao Y M, Miao S, et al. The diversity of the Dna J/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones [J]. Cellular and Molecular Life Sciences. 2006, 63(22): 2560-2570.

[17] Colinet H, Lee S F, Hoffmann A. Temporal expression of heat shock genes during cold stress and recovery from chill coma in adult *Drosophila melanogaster* [J]. Febs Journal. 2010, 277(1): 174-185.

[18] Itoh H, Komatsuda A, Ohtani H, et al. Mammalian HSP60 is quickly sorted into the mitochondria under conditions of dehydration [J]. European Journal of Biochemistry. 2002, 269(23): 5931-5938.

[19] Cui Y D, Du Y Z, Lu M X, et al. Cloning of the heat shock protein 60 gene from the stem borer, *Chilo suppressalis*, and analysis of expression characteristics under heat stress [J]. Journal of Insect Science. 2010, 10(100): 100.

[20] Wang H, Lei Z, Li X, et al. Rapid cold hardening and expression of heat shock protein genes in the B-bio type *Bemisia tabaci* [J]. Environmental Entomology. 2011, 40(1): 132-139.

[21] Rinehart J P, Denlinger D L. Heat-shock protein 90 is down-regulated during pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*, but remains responsive to thermal stress [J]. Insect Molecular Biology. 2000, 9(6): 641-645.

[22] Shue G, Kohtz D S. Structural and functional aspects of basic helix-loop-helix protein folding by heat-shock protein 90 [J]. Journal of Biological Chemistry. 1994, 269(4): 2707-2711.

[23] Li Q R, Xiao Y, Wu F Q, et al. Analysis of midgut gene expression profiles from different silkworm varieties after exposure to high temperature [J]. Gene. 2014, 549(1): 85-96.