河南农业科学,2020,49(11):153-158
Journal of Henan Agricultural Sciences
doi:10.15933/j.cnki.1004-3268.2020.11.020

昆虫激素对家蚕 ALP 活性及其基因表达水平的影响

唐芬芬[1],杨伟克[2]
(1.红河学院 生命科学与技术学院,云南 蒙自 661101;
2.云南省农业科学院 蚕桑蜜蜂研究所,云南 蒙自 661101)

摘要:为了探究昆虫激素对家蚕碱性磷酸酶(ALP)活性及其基因表达水平的影响,以五龄第 3 天家蚕(大造)幼虫为试验材料,注射外源蜕皮激素 20E 和保幼激素 JH,分析检测家蚕血淋巴和中肠 *ALP* 基因及 ALP 酶活性的变化情况。结果显示,20E 或 JH 处理后 6 h、12 h 和 24 h,家蚕血淋巴 *ALP* 均明显上调表达,而中肠 *ALP* 仅在 12 h 和 24 h 上调表达。其中 20E 处理组,血淋巴 *ALP* 在 6 h 的相对表达量最高,为对照组的 2.3 倍;中肠 *ALP* 在 12 h 表达量最高,为对照组的 2.8 倍。JH 处理组,血淋巴和中场 *ALP* 均是在 24 h 的相对表达量最高,分别是对照组的 3.7 倍和 4.7 倍。另外,20E 和 JH 均能显著激活家蚕血淋巴和中肠的 ALP 酶活性。20E 处理组,血淋巴 ALP 酶活性在 20E 处理 6 h、12 h 和 24 h 显著高于对照组;在 12 h 活性最高,为 33.34 U/mg。中肠 ALP 酶活性是在 12 h 和 24 h 极显著高于对照组,其活性分别为 37.68 U/mg 和 40.95 U/mg。JH 处理组,血淋巴和中肠 ALP 酶活性在 6 h,12 h 和 24 h 显著高于对照组,其中血淋巴的 ALP 酶活性在 6 h 出现最高值(42.29 U/mg),而中肠 ALP 酶活性在 12 h 升至最高值(46.84 U/mg)。上述结果表明,家蚕 *ALP* 基因受激素 20E 和 JH 的调控,且激素对 *ALP* 基因表达水平的影响与 ALP 酶活性变化规律一致。

关键词:昆虫激素;家蚕;碱性磷酸酶;酶活性;基因表达水平;蜕皮激素;保幼激素
中图分类号:S881.2;Q78　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:1004-3268(2020)11-0153-06

Effects of Insect Hormone on ALP Activity and Its Gene Expression Level in *Bombyx mori*

TANG Fenfen[1],YANG Weike[2]
(1.College of Life Science and Technology,Honghe University,Mengzi 661101,China;
2.Sericulture and Apiculture Research Institute,Yunnan Academy of Agricultural Sciences,Mengzi 661101,China)

Abstract: In order to explore the effects of insect hormones on the alkaline phosphatase(ALP) activity and its gene expression level in *Bombyx mori*, using the 3rd day of the fifth instar silkworm(Dazao) as test materials, the *ALP* gene expression level and enzyme activity were detected in the hemolymph and the midgut at different time after injecting 20E and JH. The results showed that the *ALP* expression level was significantly up-regulated at 6 h, 12 h and 24 h after 20E or JH treatment in the hemolymph of *Bombyx mori*, but it was up-regulated only at 12 h and 24 h in the midgut. In the 20E treatment group, the *ALP* relative expression level was the highest at 6 h in the hemolymph, which was 2.3 times of the control group; but it was the highest at 12 h in the midgut, which was 2.8 times of the control group. After JH treatment, the *ALP* expression level in the hemolymph and midgut were the highest at 24 h, which were

收稿日期:2020-03-12
基金项目:国家自然科学基金项目(31760638);云南省农业科学院应用基础研究专项(YJM201710)
作者简介:唐芬芬(1985-),女,云南耿马人,副研究员,博士,主要从事家蚕病理与分子生物学研究。
E-mail:tfflove1985@163.com
通信作者:杨伟克(1985-),男,河南许昌人,助理研究员,博士,主要从事家蚕遗传育种与分子生物学研究。
E-mail:cfyjs_tg@163.com

3.7 times and 4.7 times of the control group respectively. In addition, the ALP enzyme activities were significantly activated in the hemolymph and midgut by 20E and JH. The hemolymph ALP enzyme activity was significantly higher than the control group at 6 h, 12 h and 24 h after 20E treatment, and the highest activity at 12 h was 33.34 U/mg; While the activity of ALP in the midgut were significantly higher than the control group only at 12 h and 24 h, their activities were 37.68 U/mg and 40.95 U/mg respectively. Meanwhile, the ALP activity were also significantly higher in the hemolymph and midgut at 6 h, 12 h and 24 h after JH treatment, among them, the ALP activity in the hemolymph had the highest value of 42.29 U/mg at 6 h, while the enzyme activity was rosed to the highest value of 46.84 U/mg at 12 h in the midgut. The above results indicated that the *ALP* expression level was regulated by 20E and JH in *Bombyx mori*, and the effects of hormones on the gene expression level were consistent with the change rule of enzyme activity.

Key words: Insect hormone; *Bombyx mori*; Alkaline phosphatase; Enzymatic activity; Gene expression level; 20-hydroxyecdysone; Juvenile hormone

碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP)是一类广泛存在于生物体且相对保守的非特异性磷酸水解酶,它在碱性条件下不仅能催化磷酸酯的水解,生成无机磷及相应产物,而且参与了磷酸基团的转移和代谢[1-2]。ALP 不仅在昆虫的生长发育、神经传导、物质代谢和滞育等过程发挥了重要作用,而且与昆虫的抗性密切相关[3]。有机磷处理云杉色卷蛾,其 *ALP* 基因表达量及酶活性会显著增加,虫体的抗性增强[4]。用菊酯类杀虫剂处理赤拟谷盗,ALP 酶活性在处理 24 h 后显著增加[5-6]。棉铃虫 ALP 酶活性大小能够影响其对含有机磷农药的水解[7]。另外对除虫菊酯类杀虫剂具有抗性的棉铃虫品系,其 ALP 酶活性显著高于敏感品系[8]。

蜕皮激素 20E 能诱导昆虫发生蜕皮,保幼激素 JH 通过抑制蜕皮激素的作用以维持昆虫的生长状态[9-10]。两类激素的滴度在幼虫生长发育过程中交替上调,协同调控了昆虫的蜕皮与变态[11-12]。在对甜菜夜蛾的研究中发现,蜕皮激素 20E 能够激活马氏管 ALP 酶活性,而 JH 可以促进中肠和盲肠的 ALP 酶活性[13-14]。用 JH 处理雌性果蝇会降低 ALP 酶活性及多巴胺 DA 的含量,而 20E 处理能显著增加 ALP 酶活性及 DA 的含量[15]。

家蚕(*Bombyx mori*)作为一种重要的特种经济昆虫,饲育简单,蚕桑产业已成为我国农民提高经济收入的重要来源[16]。研究发现,质型多角体病毒(*Cytoplasmic polyhedrosis virus*, CPV)和苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)感染家蚕早期,ALP 酶活性会增强,而感染后期,由于中肠组织受到一定程度的损伤,其 ALP 酶活性急剧降低,暗示 ALP 可能参与了家蚕的免疫防御过程[17-18]。ALP 酶活性是衡量家蚕生理状况和经济价值的一项重要生化指数,激活 ALP 酶活性不仅能增强蚕体的抗逆性,而且有助于提高蚕丝产量和质量[19]。家蚕机体的 ALP 酶活性在每个龄期饷食后逐渐升高,盛食期最高,入眠时急剧降低[20]。食桑阶段,蚕体 20E 含量维持在一个较低的水平,而 JH 含量会逐渐增加;进入眠期,20E 含量逐渐增加,JH 含量降低,这暗示两类激素的变化规律与蚕体 ALP 酶活性变化规律存在一定的关联,而关于昆虫激素 20E 和 JH 对家蚕 ALP 酶活性的影响及其编码基因表达调控的研究相对较少。鉴于此,以鳞翅目模式昆虫家蚕为研究对象,探析昆虫激素对家蚕 *ALP* 基因的表达调控作用及对其 ALP 酶活性的影响,旨在为筛选和培育强健性多丝量家蚕新品种提供新思路。

1 材料和方法

1.1 材料

供试家蚕品种为大造,饲育条件:恒温培养箱 26 ℃,相对湿度(75±5)%,光照周期(12 h 光照和 12 h 黑暗),新鲜桑叶饲育。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 主要仪器 恒温培养箱购自广州深华生物技术有限公司;Tana 1220 成像系统购自上海天能科技有限公司;普通 PCR 扩增仪和荧光定量 PCR 仪均购自美国 ABI 公司;Bio Tek Synergy 多功能酶标仪购自美国伯腾仪器有限公司。

1.2.2 主要试剂 动物组织总 RNA 抽提试剂盒(北京全式金生物技术有限公司);反转录试剂盒(TaKaRa 公司);荧光定量试剂 SYBR Green Master Mix(上海翊圣生物科技有限公司);蜕皮激素 20E 和保幼激素 JH(Sigma 公司);BCA 蛋白质测定试剂盒(Beyotime 公司);ALP 酶活性测定试剂盒(南京建成生物有限公司)。

1.3　方法

1.3.1　激素处理试验及样品采集　参考胡启豪等[21]的方法，用二甲基亚砜（DMSO）分别溶解保幼激素 JH（质量浓度 0.5 g/L）和蜕皮激素 20E（质量浓度 1.0 g/L）。选取家蚕五龄第 3 天发育良好的幼虫，用微量注射器在每头家蚕幼虫腹部分别注射 4 μL 的 JH 和 20E，以注射等量的 0.1% DMSO 为对照组。在注射 3 h、6 h、12 h、24 h 和 48 h 后，冰上解剖家蚕幼虫，取血淋巴和中肠组织，每次取样均设 4 次重复，每个重复取 6 头蚕，样品收集后置于 −80 ℃保存备用。

1.3.2　酶活性测定　取适量家蚕血淋巴，在 4 ℃条件下 4 500 r/min 离心 15 min，收集上清液，即为待测酶液。家蚕中肠组织，用生理盐水清洗干净，置于玻璃匀浆器中匀浆 5 min，4 ℃条件下 3 500 r/min 离心 10 min，上清液即为待测酶液。按照 BCA 蛋白质测定试剂盒和 ALP 酶活性测定试剂盒说明书，分别测定蛋白质含量和酶活性。

1.3.3　总 RNA 的提取及反转录　根据动物组织总 RNA 抽提试剂盒操作说明，提取家蚕中肠和血淋巴总 RNA，用分光光度计测定 OD_{260}/OD_{280} 的值，计算 RNA 样品浓度。取 OD_{260}/OD_{280} 在 1.9~2.0 的样品，按照反转录试剂盒操作将 RNA 反转录为 cDNA，用于实时荧光定量 PCR 检测。

1.3.4　实时荧光定量 PCR 检测　以真核翻译起始因子 4A 基因（家蚕芯片探针 ID：*Sw*22934）为荧光定量内参基因，家蚕 *ALP* 基因（NCBI 登录号：NM_001044071）为靶标基因，利用 Primer Premier 5.0 引物设计软件设计定量引物。由生工生物工程（上海）股份有限公司合成引物，序列见表 1。

参照荧光定量试剂 SYBR Green Master Mix 操作说明进行实时荧光定量 PCR。反应体系 20 μL，扩增程序：95 ℃ 5 min；95 ℃ 10 s，60 ℃ 30 s，40 个循环；65 ℃ 5 s，（然后每次加 0.5 ℃，直到 95 ℃，5 s）。采用 ABI 公司 StepOne 荧光定量 PCR 扩增仪记录试验结果，每个样品均设 4 次重复，根据公式 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算基因的相对表达量。

表 1　实时荧光定量 PCR 引物

Tab. 1　Primers used in quantitative real-time PCR

基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequence
ALP	F：5′-AGGAACTGGGAGAATGATAACG-3′
	R：5′-TCACTTTCTGCGACTCCTTATC-3′
Sw22934	F：5′-TTCGTACTGGCTCTTCTCGT-3′
	R：5′-CAAAGTTGATAGCAATTCCCTC-3′

1.4　数据处理及统计分析　采用 Excel 2016 进行数据处理及作图，数据均为平均值±标准差，利用 SPSS 21.0 进行统计学分析。

2　结果与分析

2.1　20E 和 JH 对家蚕血淋巴和中肠 *ALP* 基因表达量的影响

实时荧光定量 PCR 检测了 20E 和 JH 处理后家蚕中肠和血淋巴 *ALP* 基因的相对表达量，将对照组 *ALP* 基因的相对表达量设定为 1，处理组基因的相对表达量若大于 1，表明该基因上调表达，若小于 1 则该基因下调表达，结果见图 1。图 1A 结果表明，家蚕血淋巴的 *ALP* 基因在 20E 处理 6 h、12 h 和 24 h 均明显上调表达，其中在处理 6 h 表达量最高，约为处理组的 2.3 倍，而在处理 3 h 和 48 h 基因的相对表达量无明显变化，其相对值都是约等于 1。中肠组织的 *ALP* 基因在 3 h 和 6 h 的相对表达量无变化，而在 12 h 和 24 h 显著上调表达，相对表达量分别为对照组的 2.8 倍和 2.2 倍，在 48 h 基因表达量减弱至对照组水平。图 1B 结果显示，JH 处理家蚕后，血淋巴和中肠的 *ALP* 基因均呈现先逐渐上调表达，随着时间的延长，表达量增至最高值，随后急剧减弱至对照组水平。其中血淋巴的 *ALP* 基因在 6~24 h 持续上调表达，24 h 表达量最高，约为对照组的 3.7 倍；而中肠的 *ALP* 基因从 12 h 才开始上调表达，在 24 h 相对表达量最高，约为对照组的 4.7 倍。

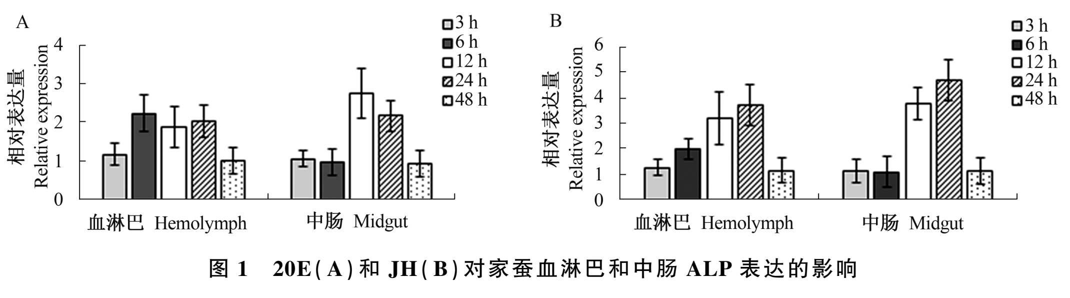
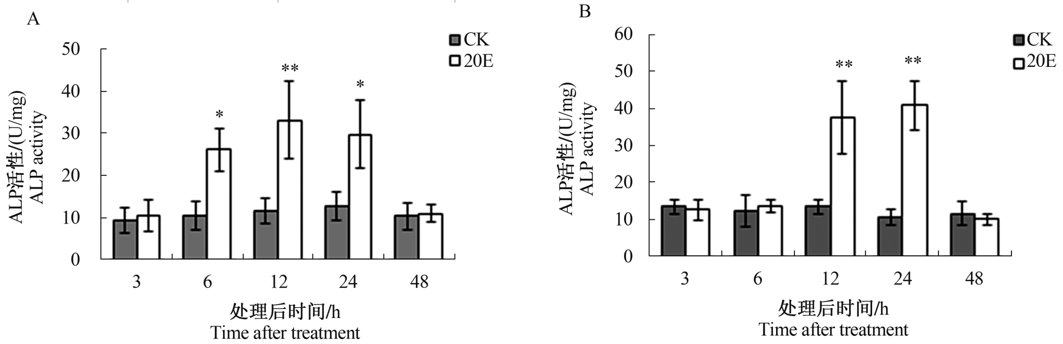


图 1　20E（A）和 JH（B）对家蚕血淋巴和中肠 ALP 表达的影响

Fig. 1　Effects of 20E and JH on ALP expression in the hemolymph and midgut of *Bombyx mori*

2.2 20E 处理对家蚕血淋巴和中肠 ALP 酶活性影响

用蜕皮激素 20E 处理五龄第 3 天家蚕幼虫，随着处理时间的推移，血淋巴和中肠的 ALP 酶活性变化趋势如图 2 所示。图 2A 结果显示，血淋巴的 ALP 酶活性在 20E 处理后的 6 h、12 h 和 24 h 均显著高于对照组，其中在 12 h 活性最高（为 33.34 U/mg），与对照组相比，达到极显著差异水平（$P<0.01$）。而中肠 ALP 酶活性仅在 12 h 和 24 h 极显著高于对照组（$P<0.01$），其活性分别为 37.68 U/mg 和 40.95 U/mg（图 2B）。这表明 20E 对家蚕血淋巴和中肠 ALP 酶活性具有一定的促进作用。



与对照组相比，* 表示差异显著（$P<0.05$），** 表示差异极显著（$P<0.01$），下同

Compared with the control group, * indicates significantly different ($P<0.05$) and ** indicates extremely significant ($P<0.01$), the same below

图 2 20E 处理后不同时间家蚕血淋巴（A）和中肠（B）ALP 酶活性的变化

Fig. 2 Changes of ALP enzyme activity in hemolymph（A） and midgut（B） of *Bombyx mori* at different time after 20E treatment

2.3 JH 处理对家蚕血淋巴和中肠 ALP 酶活性影响

由图 3 结果可知，保幼激素 JH 处理家蚕幼虫，其血淋巴和中肠的 ALP 酶活性均是在 6~24 h 持续高于对照组，并且差异达到显著水平，整体呈现出先升高后减弱的趋势。其中血淋巴的 ALP 酶活性在 6 h 急剧增至最高值（42.29 U/mg），随后开始逐渐减弱，在 48 h 酶活性接近对照组（图 3A）。而中肠 ALP 酶活性从 6 h 开始逐渐增加，在 12 h 酶活性升至最高，为 46.84 U/mg，在 24 h 酶活性开始有所降低，但仍极显著高于对照组（图 3B）。

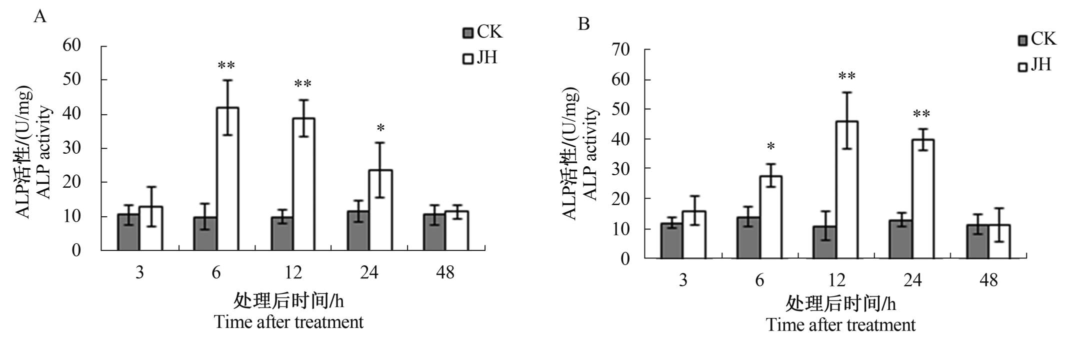


图 3 JH 处理后不同时间家蚕血淋巴（A）和中肠（B）ALP 酶活性的变化

Fig. 3 Changes of ALP enzyme activities in the hemolymph（A） and midgut（B） of *Bombyx mori* at different time after JH treatment

3 结论与讨论

ALP 作为昆虫机体一类极其重要的水解酶，在对内源或外源化合物的解毒代谢和对杀虫剂的抗性形成中起着重要作用[22]。昆虫 ALP 随着机体发育时期及组织分布的不同，其活性大小也不相同[3]。家蚕血淋巴和中肠 ALP 酶活性在四龄盛食期活性较高，入眠时急剧降低，五龄起蚕酶活性逐渐升高，到盛食期活性出现峰值，此后开始减弱，熟蚕期维持一个相对较低的活性水平[20]。ALP 参与蚕体营养物质的代谢吸收，影响蚕丝蛋白的合成及机体的抗性[19]。蜕皮激素 20E 和保幼激素 JH 是昆虫机体最为重要的两类激素，协同调控了昆虫的蜕皮变态及生长发育[23]。20E 和 JH 对昆虫不同组织部位碱性

磷酸活性的影响并不一致，20E 仅能激活甜菜夜蛾马氏管的 ALP 酶活性，而 JH 对其中肠、盲肠和马氏管等组织均有激活作用[13-14]。

本研究结果显示，昆虫激素 20E 和 JH 均能诱导家蚕血淋巴和中肠 *ALP* 基因在一定的时间范围内出现上调表达，并且 ALP 的酶活性也显著高于对照组。血淋巴和中肠的 *ALP* 基因对 20E 和 JH 响应的时间存在一定的差异，其中血淋巴的 *ALP* 基因是在 2 种激素处理 6 h 开始上调表达，而中肠组织是在 12 h 出现上调表达。通过微量注射器在家蚕幼虫腹部注射 20E 或 JH，激素最先进入血淋巴，并随着血淋巴的循环流动，被运送至蚕体其他部位，所以血淋巴 *ALP* 基因对激素的响应略早于中肠。另外，在激素注射的 6~24 h，ALP 及其编码基因受到外源激素的调控，而随着时间的延长，激素逐渐被消耗代谢，基因的表达及其酶活不再受其影响，逐渐恢复到对照组水平。JH 和 20E 对家蚕 ALP 编码基因表达水平的影响与其对 ALP 酶活性的影响表现一致，提示 ALP 在家蚕蜕皮变态过程发挥了重要作用。20E 或 JH 可通过作用于基因启动子区域相应的调控元件，进而调控相关基因的表达[24]，而 *ALP* 基因上游调控序列是否存在激素应答原件有待进一步深入探究。

参考文献：

[1] 严盈，彭露，刘万学，等. 昆虫碱性磷酸酶的研究进展[J]. 昆虫学报，2009，52(1)：95-105.
YAN Y，PENG L，LIU W X，*et al*. Research progress in insect alkaline phosphatases[J]. Acta Entomologica Sinica，2009，52(1)：95-105.

[2] 宁清，刘迪，靳翔，等. 磷矿区高效解磷菌的分离鉴定及其碱性磷酸酶的克隆表达[J]. 山西农业科学，2019，47(11)：1974-1979.
NING Q，LIU D，JIN X，*et al*. Isolation and identification of high-efficient phosphate-solubilizing bacteria and cloning and expression of alkaline phosphatase in phosphate mines[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences，2019，47(11)：1974-1979.

[3] SILVA G D，RAMOS L F C，SECKLER H D S，*et al*. Biochemical characterization of digestive membrane-associated alkaline phosphatase from the velvet bean caterpillar *Anticarsia gemmatalis*[J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology，2019，102(11)：1-14.

[4] LECLAIR G，WILLIAMS M，SILK P，*et al*. *Spruce budworm* (Lepidoptera：Tortricidae) oral secretions Ⅱ：Chemistry[J]. Environmental Entomology，2015，44(6)：1531-1543.

[5] HASEEB J，MUHAMMAD N A，ZUNNU R A，*et al*. Insecticidal toxicity upto third trophic level：A case study of cypermethrin and bifenthrin[J]. International Journal of Entomology Research，2017，2(4)：25-30.

[6] AHMED S，SALEEM M，SHAHZAD R K. Effect of cypermethrin(10ec) and bifenthrin(10ec) on levels of acid and alkaline phosphatases in a strain of *Tribolium castaneum*(Herbst)(Coleoptera：Tenebrionidae)[J]. Pak Entomol，2004，26(1)：47-52.

[7] EPIS S，PORRETTA D，MASTRANTONIO V，*et al*. ABC transporters are involved in defense against permethrin insecticide in the malaria vector *Anopheles stephensi*[J]. Parasites & Vectors，2014，7(1)：349-355.

[8] YANG Y H，LI Y P，WU Y D. Current status of insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* after 15 years of Bt cotton planting in China[J]. Journal of Economic Entomology，2013，106(1)：375-381.

[9] 何倩毓，张原熙，裴泽华，等. 保幼激素对昆虫变态发育调控的分子机制[J]. 昆虫学报，2017，60(5)：594-603.
HE Q Y，ZHANG Y X，PEI Z H，*et al*. Molecular mechanisms of juvenile hormone in insect metamorphosis[J]. Acta Entomologica Sinica，2017，60(5)：594-603.

[10] ZHANG T，SONG W，LI Z，*et al*. Krüppel homolog 1 represses insect ecdysone biosynthesis by directly inhibiting the transcription of steroidogenic enzymes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences，2018，115(15)：3960-3965.

[11] 刘素宁，任充华，李胜. 昆虫变态发育的激素和营养调控研究进展与展望[J]. 应用昆虫学报，2019，56(4)：639-651.
LIU S N，REN C H，LI S. Progress in research on hormonal and nutritional regulation in insect metamorphosis[J]. Chinese Journal of Applied Entomology，2019，56(4)：639-651.

[12] 张丽丽，武怡琼，杨正飞，等. 斜纹夜蛾保幼激素环氧水解酶基因的克隆和原核表达[J]. 河南农业科学，2018，47(12)：84-89.
ZHANG L L，WU Y Q，YANG Z F，*et al*. Cloning and prokaryotic expression of *JHEH* gene from *Spodoptera litura*[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences，2018，47(12)：84-89.

[13] 袁向东，张万娜，赵曼，等. 甜菜夜蛾中肠碱性磷酸酶 *alp2* 基因的克隆、表达及功能分析[J]. 植物保护学报，2017，44(1)：8-15.
YUAN X D，ZHANG W N，ZHAO M，*et al*. Cloning，expression and functional analysis of alkaline phosphatase 2(*alp2*) in the midgut of beet armyworm *Spodoptera ex-*

igua[J]. Journal of Plant Protection, 2017, 44(1): 8-15.

[14] 李倩,任相亮,胡红岩,等. 辛硫磷与 Cry1Ca 的协同增效及对甜菜夜蛾 *SeALP* mRNA 转录水平的影响[J]. 环境昆虫学报,2018,40(6):1413-1421.

LI Q, REN X L, HU H Y, *et al*. Synergism of phoxim with Cry1Ca and its influence on the transcription level of *SeALP* mRNA in *Spodoptera exigua*[J]. Journal of Environmental Entomology,2018,40(6):1413-1421.

[15] RAUSCHENBACH I Y, KARPOVA E K, BURDINA E V, *et al*. Insulin-like peptide DILP6 regulates juvenile hormone and dopamine metabolism in *Drosophila* females [J]. General and Comparative Endocrinology,2017,243(1):1-9.

[16] 杨伟克,刘增虎,钟健,等. 家蚕眠期血淋巴酚氧化酶活性变化及其基因表达分析[J]. 南方农业学报,2019,50(2):391-396.

YANG W K, LIU Z H, ZHONG J, *et al*. Variation of activity of phenoloxidase and its gene expression in the hemolymph of *Bombyx mori* larvae during molting stage [J]. Journal of Southern Agriculture, 2019, 50(2): 391-396.

[17] MIAO Y G. Studies on the activity of the alkaline phosphatase in the midgut of infected silkworm, *Bombyx mori* [J]. Journal of Applied Entomology,2002,126(1):138-142.

[18] 李文楚. 软化病感染家蚕的碱性磷酸酶活力测定及病理学研究[J]. 华南农业大学学报,2004,25(4):120-122.

LI W C. Studies on the activities of alkaline phosphatase and pathology of *Bombyx mori* infected with flacherie [J]. Journal of South China Agricultural University, 2004,25(4):120-122.

[19] 何华伟,王叶菁,侯丽,等. 家蚕碱性磷酸酶原核表达纯化、结构与活性分析[J]. 中国农业科学,2017,50(14):2837-2850.

HE H W, WANG Y J, HOU L, *et al*. Expression, purification, structure and activity analysis of alkaline phosphatase of *Bombyx mori*[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2017,50(14):2837-2850.

[20] GOWDA M K, PETER A, NAIKA M B, *et al*. Identification of *in vitro* red fluorescent protein with antipathogenic activity from the midgut of the silkworm (*Bombyx mori* L) [J]. Protein & Peptide Letters, 2018, 25(3): 302-313.

[21] 胡启豪,刘学术,马琼,等. 保幼激素和蜕皮激素对家蚕翅原基生长分化的影响[J]. 华南师范大学学报(自然科学版),2017,49(4):62-67.

HU Q H, LIU X S, MA Q, *et al*. Effects of javenile hormone and ecdystuoids on the develop-ment of wing disc in silkworm, *Bombyx mori*[J]. Journal of South China Normal University(Natural Science Edition), 2017, 49(4):62-67.

[22] NGUYEN H C, WU S P, SU C H, *et al*. Biochemical, biophysical and thermal properties of alkaline phosphatase from thermophile *Thermus* sp. NTU-237[J]. Biotechnology,2017,21(2):117-126.

[23] 王菁菁,胡琼波. 昆虫蜕皮激素受体研究进展[J]. 环境昆虫学报,2017,39(3):721-729.

WANG J J, HU Q B. A review of ecdysone receptor[J]. Journal of Environmental Entomology,2017,39(3):721-729.

[24] 洪芳,宋赫,安春菊. 昆虫变态发育类型与调控机制[J]. 应用昆虫学报,2016,53(1):1-8.

HONG F, SONG H, AN C J. The types and regulatory mechanisms of insect metamorphosis and development [J]. Chinese Journal of Applied Entomology, 2016, 53(1):1-8.