



昆虫不同类型启动子的研究 及其应用进展*

毕洪论** 连杰涵 任 行 蒋春冉 周树堂***

(河南大学生命科学学院, 棉花生物育种与综合利用全国重点实验室, 开封 475004)

摘 要 启动子是一类受 RNA 聚合酶结合, 调控基因起始转录的一段 DNA 序列, 精确调控基因在生物体内时空维度的表达量。昆虫是已知物种数量最多的生物类群之一, 不同类型的启动子在昆虫中的研究和应用发挥着重要作用。本文对启动子的基本结构、分类和鉴定以及昆虫启动子的研究进行综述, 并总结展望下昆虫启动子在基因编辑和转基因技术中的应用。

关键词 启动子; 鉴定方法; 基因编辑; 转基因; 害虫防治

Research and application progress on different types of promoters in insects

BI Hong-Lun** LIAN Jie-Han REN Hang JIANG Chun-Ran ZHOU Shu-Tang***

(National Key Laboratory of Cotton Bio-Breeding and Integrated Utilization, College of Life Sciences,
Henan University, Kaifeng 475004, China)

Abstract Promoters are DNA sequences that are bound by RNA polymerase to regulate the initial transcription of genes. They play a key role in regulating the expression of genes within the spatial and temporal context of an organism. Insects are the most diverse group of organisms worldwide, with the largest number of identified species. Different types of promoters play an important role in the research and application of insects. In this paper, the basic structure, classification, identification, and current research of insect promoters are reviewed. Additionally, the potential application of insect promoters in genome editing and transgenic technology is discussed.

Key words promoter; identification methods; gene editing; transgene; pest control

利用昆虫遗传转化技术对害虫进行遗传控制是害虫防治研究的重要方向, 该技术具有物种特异性强、防控效率高且对环境友好等特点, 而实现这一目标, 启动子 (Promoter) 作为该系统关键的调控元件发挥着至关重要的作用 (刘桂清等, 2015)。启动子作为基因时空表达调控的重要元件, 与 RNA 聚合酶结合形成转录起始复合体, 控制着基因表达的起始时间和表达水平 (童晓玲等, 2018)。通过对不同类型启动子的

合理应用, 实现对外源基因大量高效或精准特异的表达, 从而进一步应用于基因组编辑、功能基因组研究以及害虫防治等方面 (王亚军等, 2019)。目前启动子已在各类昆虫中成功应用, 如双翅目的黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*, 鳞翅目的家蚕 *Bombyx mori*、草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda*, 棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 和膜翅目的寄生蜂等 (Dorsett, 1999; Tamura *et al.*, 2000; 陈征, 2014; Li *et al.*, 2014;

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金项目 (32202314); 河南省科技攻关项目 (222102110108)

**第一作者 First author, E-mail: honglunbi@henu.edu.cn

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: szhou@henu.edu.cn

收稿日期 Received: 2023-06-02; 接受日期 Accepted: 2024-05-09

Zhao *et al.*, 2020)。

1 启动子的结构和分类

1.1 启动子结构

适当的基因表达量和正确的表达时间对于所有生物的发育和多样性至关重要。基因表达的控制主要发生在转录过程中 (Levine and Tjian, 2003)。在基因转录调控过程中通常将转录起始位点 (Transcription start site, TSS) 定义为+1, TSS 位于基因序列的 5'端, 其上游含有丰富的调控位点结合序列, 被称为“启动子”。启动子调控序列的大小在个体基因组内因物种而异 (Zheng *et al.*, 2011), 大多数启动子的长度在 100-1 000 bp 之间 (Danino *et al.*, 2015)。启动子能活化 RNA 聚合酶, 使之与模板 DNA 准确的结合使得 RNA 的转录起始具有特异性。

由于启动子对细胞功能的重要性, 它们已被深入研究, 许多标准的启动子基序已被特征化。Brázda 等 (2021) 总结了不同生物中启动子的序列特征, 如图 1 所示。在细菌中有 4 个保守性较高的启动子基序和各种其他元件: 围绕转录起始位点 TSS(+1)的核心识别元件 (Core recognition element, CRE)、-10 区富含 AT 的序列、-35 区和各种上游元件, 如增强子 (Enhancer) 和沉默子 (Silencer) (Chen *et al.*, 2021)。与原核生物启动子不同的是, 在古生菌和真核生物中, 启动子结构可被认为是由两个模块化的元件组成: 核心启动子区域和上游激活序列 (Upstream activating

sequence, UAS) (Cazier and Blazeck, 2021), 其中核心启动子区域包含 TATA box、起始子和 B 识别元件 (B recognition element, BRE) (Wenck and Santangelo, 2020)。许多高表达基因的核心启动子中都含有 1 个强 TATA box, 包括管家基因、一些致癌基因和生长因子基因在内的大量基因等。TATA box 最初被认为是位于每个 TSS 上游约 24-30 bp 的通用元件, 由 TATA 结合蛋白 (TATA binding protein, TBP) 识别, 而 TBP 是起始前复合物的核心部分 (Andersson and Sandelin, 2020)。除了这些序列外, 真核转录元件在核心启动子区远端还使用了大量的增强子、沉默子和绝缘子 (Insulator)。例如, 在真核生物中, 通常有 1 个下游启动子元件 (Downstream promoter element, DPE) 和许多其他可被视为启动子序列的区域, 如 CAAT box 和 GC box, 以及其他更远的调控元件 (Roy and Singer, 2015)。

“核心启动子”被定义为指导转录起始的最小 DNA 序列, 通常为 TSS 周围±50 个碱基对 (bp) 区域 (Andersson and Sandelin, 2020)。在设定后生动物基因表达水平中, “核心启动子”起着重要作用, 但它如何精确地“计算”表达仍不清楚。为了分析其功能, Peter Bandilla 等对模式生物果蝇进行了全面的结构-功能分析, 观察到不同突变类型对启动子活性的强烈影响, 包括单个序列、基序和基序组合的敲除、基序强度的变化、核小体定位和侧翼序列等不同类型的启动子序列变化。单个基序特征的线性组合在很大程度上

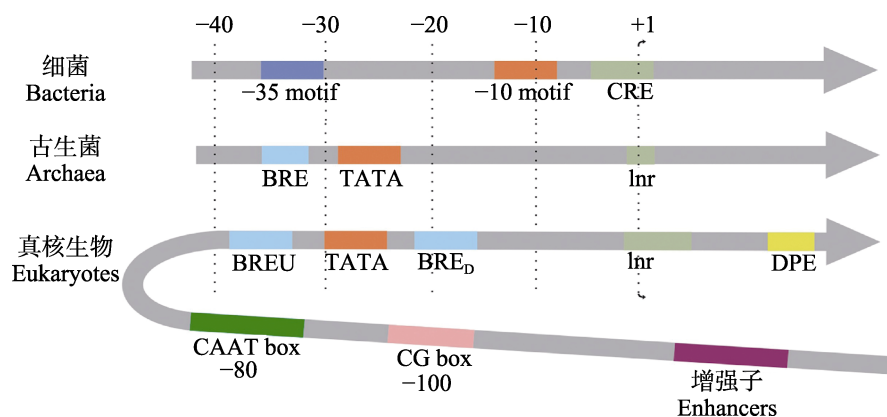


图 1 古生菌、细菌和真核生物启动子元件的示意图 (Brázda *et al.*, 2021)

Fig. 1 Schematic comparison of promoter elements in archaea, bacteria, and eukaryotes (Brázda *et al.*, 2021)

解释了核心启动子活性的组合效应 (Qi *et al.*, 2022)。细菌启动子由称为 -35 和 -10 bp 区域的核心序列基序组成, 其共有序列分别是 TTGACA 和 TATAAT, 这两个序列是从对大肠杆菌的主要研究中鉴定出来的, 在后续研究分析显示了 -35 和 -10 bp 区域的两个最佳基序, 即 TTGNNN 和 TANNN (Kozakai *et al.*, 2020)。一些启动子含有丰富的特定类型碱基, 而另一些则具有更多样、复杂的序列特征, 调控启动子活性的也不仅是碱基序列, 还有表观遗传修饰和 DNA 结构的改变, 所有生物的启动子都包含可以形成链内发夹 (十字形) 或四链结构 (g-四链或 i-基序) 的序列 (Brázda *et al.*, 2021)。通过以上的研究可知, 对启动子调控基因表达的分子机制还有很多需要深入研究的方面。

1.2 启动子分类

根据启动子方向分类, 可分为: 单向启动子、发散启动子和双向启动子。Duttke 等 (2015) 分析了 HeLa 细胞中人类启动子的转录, 并将启动子分为 3 种类型: 单向启动子 (只在 1 个方向有注释基因)、发散启动子 (在正向方向包含 1 个注释基因, 在反向方向没有注释基因) 和双向启动子 (在两个方向都包含注释基因)。令人惊讶的是, 他们发现大约一半的人类活性启动子本质上是单向的。此外, 这些不同的转录本来自于它们自身的反向核心启动子。Danino 等 (2015) 认为, 分化转录不是转录过程的固有属性, 而是

正向和反向启动子存在的结果。

真核生物启动子依据不同的 RNA 聚合酶的结合可以分为 3 类: I 型启动子, 只启动 rRNA 前体基因的表达; II 型启动子: RNA 聚合酶 II (RNA polymerase II, Pol II) 启动子是参与真核生物蛋白编码基因和部分 RNA 基因差异转录调控的关键区域, 涉及众多编码蛋白基因的转录 (Solovyev *et al.*, 2010); III 型启动子, 启动一些小分子 RNA 的转录, 如 tRNA 和 snRNA 启动子 (Putthoff *et al.*, 2003)。

内源性启动子依据转录模式可分为 3 种类型: 组成型启动子、诱导型启动子和组织特异性启动子。组成型启动子保持相对稳定的转录水平, 几乎不受细胞内或细胞外刺激的影响, 如肌动蛋白 (Actin) 和泛素 (Ubiquitin) 等基因的启动子 (Tang *et al.*, 2020)。诱导型启动子可在特定刺激存在或不存在的条件下启动其相应基因的转录水平发生显著变化, 目前主要分离了热诱导表达基因启动子, 如昆虫热休克蛋白 (Heat shock protein 70) 基因 *hsp70* 启动子 (Pelham, 1982)。组织特异性启动子启动基因在特定组织中表达, 具有发育调节的特性, 能使目的基因表达产物在一定组织部位积累, 以达到局部表达量增加, 如果蝇生殖细胞特异的 Nanos 基因启动子 (Ali *et al.*, 2010)。对真核生物常见启动子分类进行总结见表 1。

对在昆虫中已有文献报道的 3 类转录模式启动子进行大致归纳总结, 见表 2。

表 1 真核生物常见启动子分类标准
Table 1 Classification criteria for common promoters in eukaryotes

分类方式 Classification methods	启动子类型 Promoter types	注释 Annotation
生物种类 Species	原核启动子 Prokaryotic promoter	序列较简单, 由 -10 bp 的 TATA box 和 -35 bp 附近的 TTGA 区组成 The sequence is relatively simple, consisting of a -10 bp TATA box and a TTGA region near -35 bp
	真核启动子 Eukaryotic promoter	序列较复杂, 由 -30 bp 左右的 TATA box 和 -80 bp 附近的 CAAT box 以及 -100 bp 左右的 GC box 组成 The sequence is complex, consisting of TATA box around -30 bp, CAAT box attached to -80 bp and GC box around -100 bp
结构特点 Structural features	单项启动子 Single promoter	只在一个方向转录表达基因 Only transcribe and express genes in one direction
	发散启动子 Divergent promoter	只在正向转录表达基因 Only express genes in the forward transcription of the promoter sequence

续表 1 (Table 1 continued)

分类方式 Classification methods	启动子类型 Promoter types	注释 Annotation
结构特点 Structural features	双向启动子 Bidirectional promoter	正向和反向均能表达基因 Both forward and reverse sequences of the promoter can express genes
不同 RNA 聚合酶结合 Binding of different RNA polymerases	I 型启动子 Type I promoter	又称为 rRNA 启动子, 启动 rRNA 前体基因表达 Also known as rRNA promoter, it initiates the expression of rRNA precursor genes
	II 型启动子 Type II promoter	又称为 mRNA 启动子, 参与真核生物蛋白编码基因和部分 RNA 基因差异转录调控的关键区域, 涉及众多编码蛋白基因的转录 Also known as mRNA promoter, it is a key region involved in differential transcriptional regulation of protein coding genes and some RNA genes in eukaryotes, involving the transcription of numerous protein coding genes
	III 型启动子 Type III promoter	又称为 tRNA 启动子, 启动一些小分子 RNA 的转录, 如 snRNA 启动子, U6 启动子等 Also known as tRNA promoter, it initiates the transcription of some small molecule RNAs, such as snRNA promoter, U6 promoter, etc
转录模式 Transcriptional profile	组成型启动子 Constitutive promoter	又称为非特异启动子, 这类启动子调控的基因表达水平大致恒定, 在基因表达调控方面不受时间和空间的限制 Also known as non-specific promoters, these promoters regulate gene expression levels that are roughly constant and are not limited by time and space in gene expression regulation
	组织特异性启动子 Tissue-specific promoter	又称为器官特异型启动子, 这类启动子可以在特定组织或器官中表达, 受组织特异性表达的调控元件、增强子和沉默子的共同调控 Also known as organ specific promoters, these promoters can be expressed in specific tissues or organs and are jointly regulated by tissue-specific regulatory elements, enhancers, and silencers
	诱导型启动子 Inducible promoter	指在诱导物(如环境, 理化因子和微生物等)的刺激下大幅提高所调控基因的转录水平, 如热激蛋白启动子 Refers to the significant increase in transcription levels of regulated genes under the stimulation of inducers such as the environment, physicochemical factors, and microorganisms, such as heat shock protein promoters
启动效率 Promoting efficiency	强启动子 Strong promoter	指能大幅提高该基因表达效率的启动子 Refers to the promoter that can significantly improve the expression efficiency of the gene
	弱启动子 Weak promoter	指能小量表达目的基因的启动子 Refers to the promoter that can express the target gene in small amounts
序列来源 Origin of Sequence	内源性启动子 Endogenous promoter	指启动子序列来源于该物种, 为自身内源鉴定得到应用的启动子 Refers to the promoter sequence derived from the species and applied for endogenous identification
	外源性启动子 Exogenous promoter	指启动子序列来源于其他物种, 但可以在该物种中正常启动基因表达发挥作用, 一般应用于基因工程、转基因和基因编辑等领域 Refers to the promoter sequence originating from other species, but can normally initiate gene expression and play a role in that species, generally applied in fields such as genetic engineering, transgenic, and gene editing

表 2 已报道的昆虫基因启动子分类示例

Table 2 Examples of reported insect gene promoter classification

类别 Category	基因 (文献) Gene (references)	作用范围 Scope	物种 Species
组成型启动子 Constitutive promoter	<i>actin5C</i> (Thummel <i>et al.</i> , 1988)	全身 Whole body	黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>
	<i>Polyubiquitin</i> (Anderson <i>et al.</i> , 2010)	全身 Whole body	埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>
	<i>Am-actin5C</i> (Schulte <i>et al.</i> , 2013)	全身 Whole body	蜜蜂 <i>Apis mellifera</i>
	<i>A3</i> (Fatyol <i>et al.</i> , 1999)	全身 Whole body	家蚕 <i>Bombyx mori</i>

续表 2 (Table 2 continued)

类别 Category	基因 (文献) Gene (references)	作用范围 Scope	物种 Species
组成型启动子 Constitutive promoter	<i>CYP6ab4</i> (Zhao <i>et al.</i> , 2015)	全身 Whole body	家蚕 <i>Bombyx mori</i>
	<i>TcaTub1</i> (Siebert <i>et al.</i> , 2008)	全身 Whole body	赤拟谷盗 <i>Tribolium castaneum</i>
	<i>12 l</i> (Miyata <i>et al.</i> , 2019)	全身 Whole body	范氏多足摇蚊 <i>Polypedilum vanderplanki</i>
组织特异性启动子 Tissue-specific promoter	<i>Twist</i> (Pan <i>et al.</i> , 1991)	腹侧 Ventral side	黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>
	<i>Nanos</i> (Ali <i>et al.</i> , 2010)	生殖细胞 Generative cell	黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>
	<i>Lsp-2</i> (Benes <i>et al.</i> , 1996)	脂肪体 Fat body	黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>
	<i>Yps</i> (Søndergaard <i>et al.</i> , 1995)	雌性卵巢脂肪体 Female ovaries and fat bodies	黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>
	<i>ninaE</i> (Mismer and Rubin, 1987)	感光细胞 Photoreceptor cell	黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>
	<i>MSSP-α2</i> (Christophides <i>et al.</i> , 2000)	雄性脂肪体 Male fat body	地中海实蝇 <i>Ceratitis capitata</i>
	<i>MSSP-β2</i> (Christophides <i>et al.</i> , 2000)	中肠 Midgut	地中海实蝇 <i>Ceratitis capitata</i>
	<i>30K a</i> , <i>30K b</i> (Mathur <i>et al.</i> , 2010)	成虫雌性唾液腺 Adult female salivary gland	埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>
	<i>Ubl40</i> (Anderson <i>et al.</i> , 2010)	早期幼虫和卵巢 Early larvae and ovaries	埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>
	<i>β2 tubulin</i> (Smith <i>et al.</i> , 2007)	精巢 Testis	埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>
	<i>VgR</i> (Cho <i>et al.</i> , 2006)	卵巢 Ovary	埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>
	<i>LCH</i> (Pham and Chavez, 2005)	肠道 Gut	埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>
	<i>HCH</i> (Pham <i>et al.</i> , 2003)	肠道 Gut	埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>
	<i>AeCP; AgCP</i> (Moreira <i>et al.</i> , 2000)	肠道 Gut	埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>
	<i>Vg</i> (Kokoza <i>et al.</i> , 2000)	脂肪体 Fat body	埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>
	<i>AgAper1</i> (Abraham <i>et al.</i> , 2005)	中肠 Midgut	冈比亚按蚊 <i>Anopheles gambiae</i>
	<i>G12</i> (Nolan <i>et al.</i> , 2011)	中肠 Midgut	冈比亚按蚊 <i>Anopheles gambiae</i>
	<i>Vasa</i> (Papathanos <i>et al.</i> , 2009)	生殖细胞 Generative cell	冈比亚按蚊 <i>Anopheles gambiae</i>
	<i>elp2l</i> (Schulte <i>et al.</i> , 2013)	神经元 Neuron	蜜蜂 <i>Apis mellifera</i>
	<i>ser1</i> (Guo <i>et al.</i> , 2005)	丝腺 Silk gland	家蚕 <i>Bombyx mori</i>
	<i>BmR1</i> ; <i>Bmβ4</i> (Xu <i>et al.</i> , 2015)	精巢 Testis	家蚕 <i>Bombyx mori</i>
	<i>Bmintb2</i> ; <i>Bmintb3</i> ; <i>BmCatO</i> (Zhang <i>et al.</i> , 2015)	血细胞 Blood cell	家蚕 <i>Bombyx mori</i>
	<i>Bmlp3</i> (Deng <i>et al.</i> , 2013)	脂肪体 Fat body	家蚕 <i>Bombyx mori</i>
	<i>P2</i> (Jiang <i>et al.</i> , 2013)	中肠 Midgut	家蚕 <i>Bombyx mori</i>
	<i>APN</i> (Chen and Palli, 2023)	中肠 Midgut	家蚕 <i>Bombyx mori</i>
	<i>BmLSP</i> (邓党军等, 2011)	脂肪体 Fat body	家蚕 <i>Bombyx mori</i>
	<i>C1b1</i> (Zhao <i>et al.</i> , 2007)	卵巢 Ovary	家蚕 <i>Bombyx mori</i>
	<i>cathepsin B</i> (Cai <i>et al.</i> , 2014)	脂肪体 Fat body	家蚕 <i>Bombyx mori</i>
	<i>BmCatD</i> (Yu <i>et al.</i> , 2012)	脂肪体 Fat body	家蚕 <i>Bombyx mori</i>
	<i>FABP</i> (Wu <i>et al.</i> , 2002)	飞行肌 Flight muscle	沙漠蝗 <i>Schistocerca gregaria</i>
诱导型启动子 Inducible promoter	<i>hsp70</i> (Pelham, 1982)	温度特异 Temperature specific	黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>
	<i>Am-hsp83</i> ; <i>Am-hsp70</i> (Schulte <i>et al.</i> , 2013)	温度特异 Temperature specific	蜜蜂 <i>Apis mellifera</i>
	<i>SfHsp70D</i> ; <i>SfHsp19.07</i> (Chen <i>et al.</i> , 2020b)	温度特异 Temperature specific	草地贪夜蛾 <i>Spodoptera frugiperda</i>

2 昆虫不同类型启动子的鉴定

2.1 启动子序列的分析与获取

启动子序列是基因表达的主要调控元件。正确识别它们是理解基因表达模式、细胞特异性和发育的基础。启动子序列的基因特异性结构使得对设计预测启动子的方法产生了不同的标准。启动子 5'侧翼区域可能包含数十个短(长 5-10 bp)基序,作为提供转录起始和基因表达特异性调节的蛋白识别位点,提供转录起始和基因表达的特定制控(Solovyev *et al.*, 2010)。

迄今为止,许多数据库提供了关于已知启动子序列的信息。Bucher 和 Trifonov (1986)首次通过实验绘制了转录起始位点及其周围序列的集合,称为真核启动子数据库(Eukaryotic promoter database, EPD, <http://www.epd.isb-sib.ch>)。在 2002 年 10 月发布的第 72 版之前,EPD 是一个人工编制的数据库,完全依赖已发表的实验证据。随着第 73 版的发布,开发者开始利用 5'-全长 cDNA 克隆的表达序列标签(Expressed sequence tag, EST)作为定义启动子的新资源,大约一半的 EPD 条目是基于 5'-EST 序列,EPD 的结构便于动态提取有生物学意义的启动子子集进行比较序列分析。用户可以以不同的格式查看 EPD 的相关信息,根据不同的标准选择和提取启动子序列,浏览相关的数据库。同时还提供了分析 EPD 所定义的 TSS 的序列基序的工具(Schmid *et al.*, 2004)。除此之外 DBTSS 数据库(DataBase of transcriptional start sites)(Suzuki *et al.*, 2004)(<http://dbtss.hgc.jp>)是基于人类基因的一系列实验确定的 TSS 构建的,是涵盖了如老鼠和人类疟疾寄生虫等相关基因的一个中央数据库,该数据库现也用于启动子的比较分析。

Wang 等(2022)开发了一种用于启动子识别的混合深度学习模型(Hybrid model for promoter identification, HMPI),建立额外的判别特征并正确识别启动子,该模型可同时表征启动子的天然序列和启动子的形态轮廓,并将一种名为启动子序列特征网络(Promoter sequence

features network, PSFN)的方法与一种名为深层结构图谱网络(Deep structural profiles network, DSPN)的技术相结合,前者用于表征天然启动子序列并推断序列特征,后者用于根据启动子的结构图谱对其建模并推导其结构属性。

Miyata 等(2019)为了从范氏多足摇蚊 *P. vanderplanki* 中分离出一个强的组成性启动子,首先检索了一个在范氏多足摇蚊幼虫中高效表达的基因,根据范氏多足摇蚊基因组数据库的转录组数据 MidgeBase(<http://bertone.nisesf.affrc.go.jp/midgebase/>),发现位于 scaffold121 上的 *Pv.00443* 基因在范氏多足摇蚊幼虫的脱水和补水过程中均呈现组成性高表达特征,然后从 *Pv.00443* 基因转录起始位点克隆了一个 1 842 bp 的基因组片段,通过实验证实了其在 Pv11 细胞系实验中具有较强的转录活性。然后他们为了确定该片段的最小长度以获得较强的转录活性,构建了 8 个缺失突变体,并用荧光素酶测定系统评估了其启动子活性,最后得到 1 333 bp 片段(-1 333)保留了原始 1 842 bp 片段(-1 842)的最大启动子活性。因此,他们将这个 1 333 bp 的片段命名为“121 启动子”。

Chen 和 Palli (2023)在草地贪夜蛾 *S. frugiperda* 中通过 RNA-Seq 数据分析发现了一组在中肠和其他组织中高表达的 8 个基因和一组仅在中肠特异表达的 16 个基因。然后通过 RT-qPCR 检测各基因的 mRNA 水平,并扩增到了相应基因的启动子序列。

由于一些基因在很多物种中有较高的同源性,如已有文献报道某类启动子在某物种中发挥作用,可以查阅相关文献,在数据库中根据基因序列比对,通过 NCBI 获取扩增基因的序列信息,找到其在基因组中的位置,并标记转录起始位点(TSS),然后向前延伸 1 000-2 000 bp 左右,可以初步获得该基因的上游启动子序列。Anderson 等(2010)利用已知的黑腹果蝇 *D. melanogaster* 泛素单体(76 a.a. ubiquitin)通过 tBLASTn 在埃及伊蚊 *A. aegypti* 基因组中进行检索,分析比较得出埃及伊蚊中与黑腹果蝇同源的泛素基因,进一步扩增得到了泛素基因上游的启动子序列。

Schulte 等 (2013) 利用黑腹果蝇的同源基因的遗传信息来鉴定蜜蜂中的候选启动子, 为了获得神经元中驱动表达的 *elp2l* 启动子 5'UTR 序列, 从基因组 DNA 中扩增 *elp2l* 转录起始位点上游 2 000 bp 的片段, 成功鉴定了该 *elp2l* 启动子, 并利用这种方法成功鉴定了在整个发育过程中普遍表达的 *actin5C* (*act5C*) 基因启动子。Siebert 等 (2008) 使用了黑腹果蝇组成型活性 α -微管蛋白 (α -Tubulin) 84B (α -Tub84B) 的推导氨基酸序列来比对 (tBLASTn) 鉴定赤拟谷盗 *T. castaneum* 基因组中预测的微管蛋白基因, 成功鉴定了该基因的启动子序列。Kou 等 (2023) 以黑腹果蝇同源基因为比对序列, 利用 BLAST 技术从黑水虻 *Hermetia illucens* 基因组数据库中鉴定出 *Hiactin5C* (*Hermetia illucens actin5C*) 和 3 个 *HiU6* (*Hermetia illucens U6*) 基因的保守基因序列, 并利用启动子预测网站 (https://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html): 伯克利果蝇基因组计划 (Berkeley Drosophila genome project, BDGP), 确定了每个基因的上游启动子预测区域。

2.2 启动子的鉴定

一般通过将启动子序列构建到带有筛选标记的载体上, 来进行后续的验证。Thummel 等 (1988) 在研究果蝇基因的调控和功能时, 将载体设计用于生殖细胞系转化和细胞培养转染分析, 这些载体包含几个独特的限制性位点, 用于插入来自 *cat* 或 *lacZ* 报告基因上游的外源启动子。两种 β -半乳糖苷酶编码载体也被插入起始密码子后, 用于翻译报告酶, 以此来研究翻译调节序列 (Thummel *et al.*, 1988)。Anderson 等 (2010) 为了确定预测的泛素基因启动子序列是否可以驱动蚊子细胞中的基因表达, 将荧光素酶开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 准确地放置在泛素翻译正常开始的位置, 在质粒转染白纹伊蚊 *Aedes albopictus* C6/36 或白纹伊蚊 Aag2 细胞系后进行了荧光素酶测定, 并根据荧光素酶活性来鉴定泛素启动子是否发挥作用。为了评估斯氏按蚊 *Anopheles stephensi* *Antryp1* 启动子的活性,

Nolan 等 (2011) 选择的启动子区域跨越起始密码子上游的核苷酸 -1 到 -1 100, 也就 *Antryp1* 上游 1.1 kb 区域 (pAntryp1), 并建立了一个包含荧光素酶基因 (*luciferase*, *luc*) 的报告转录单元, pAntryp1-luc 片段与 Actin5C-EGFP (Enhanced green fluorescent protein) 一起克隆在 minos 转座元件的臂中, 以生成转座质粒 pMinLuc, 并用于后续在活体中检测启动子活性。

构建好相应的表达质粒后, 可进行相应的体外实验和体内实验, 体外实验主要是通过将带有启动子和筛选基因的载体转入相应的细胞系进行试验验证, 通过细胞实验结果来验证启动子是否发挥作用。Kou 等 (2023) 利用 DmU6 (*Drosophila melanogaster U6*) 序列与黑水虻基因组序列进行比对, 发现 BSF 中存在 3 个 U6 基因, 为了评估内源性 U6 启动子的有效性, 在每个 HiU6 snRNA 基因上游扩增了大约 600 bp 的片段, 并测试了它们驱动 *shEGFP* 表达的效率。

体内验证可以将构建的质粒转入昆虫体内, 根据该筛选基因的表达来验证该启动子能否发挥功能, 以及该启动子的表达模式等。Schulte 等 (2013) 为了进一步验证 *elp2l* 启动子序列能否在蜜蜂神经组织中直接表达, 将 *elp2l* 启动子序列克隆到 EGFP 报告基因的前面, 构建了 pIZ/V5-*elp2l*-EGFP 质粒, 通过电穿孔将 pIZ/V5-*elp2l*-EGFP 质粒导入蜜蜂大脑, 电穿孔 3 d 后, 检测到了绿色蛋白 EGFP 的表达, 证实了蜜蜂来源的 *elp2l* 启动子序列可直接在蜜蜂大脑中启动基因表达。Siebert 等 (2008) 通过将赤拟谷盗 *TcaTub2* (*T. castaneum* α -Tubulin2) 启动子置于 EGFP 基因上游来检测其组织特异性, 并使用基于 piggyBac 转座系统的载体来进行种系转化, 通过活体实验检测到了质粒的瞬时表达, 同时该载体还携带了眼睛特异性标记物 3xP3Tcv, 以帮助筛选转化的后代, 建立转化系 (α T-EGFP), 检测了 *TcaTub2* 启动子在胚胎、幼虫和成虫中 EGFP 表达的时空模式。

Tan 等 (2020) 通过分析转基因家蚕中 A4IP-Gal4/UAS-EGFP 的表达来表征近端启动子 *A4IP* (*Actin4 intronic promoter*) 的功能, 证明了

A4IP 驱动 *Gal4* 的表达, 从而激活 *UAS* 连接的 *EGFP* 在转基因家蚕从胚胎第 3 天到成虫中的持续表达, 进一步检测发现 *EGFP* 在气管、脂肪体和中肠等组织中低水平表达, 而在翼盘/翅和内表皮中高水平表达。

Chen 等 (2020b) 从草地贪夜蛾中鉴定了多个热击蛋白 (Heat shock protein, *Hsp*) 基因, 并分析了它们在 *Sf9* 细胞、胚胎和幼虫不同组织中的热诱导表达。将几个高诱导 *Hsp* 基因的潜在启动子克隆到荧光素酶表达载体中, 并评估它们在 *Sf9* 细胞和胚胎中的活性。鉴定出几个在 *Sf9* 细胞和胚胎中具有活性的 *Hsp* 启动子, 这些启动子具有较强的热诱导活性, 可用于蛋白质的表达, 并用于草地贪夜蛾和其他鳞翅目昆虫的转基因和基因编辑方法的开发。

3 昆虫不同类型启动子的应用

由于启动子可被用来介导外源基因在昆虫中的组成型或组织特异性表达的这一特性, 研究人员们将其广泛应用于昆虫的各种遗传操作系统中, 例如转基因系统和基因编辑系统等, 从而进一步介导相关的益虫利用和害虫防治研究工作, 并在各个方面取得成功, 产生良好的经济效益。

3.1 不同类型启动子在转基因方面的应用

传统的杂交育种技术已不能满足家蚕日益增长的产丝需求, 进一步提高蚕丝产量将依赖现代分子育种技术。Yang 等 (2008) 通过将带有 *Actin3* 启动子的 *piggyBac* 转座子随机插入家蚕基因组中, 进行一系列转基因试验, 获得了抗家蚕核型多角体病毒的家蚕品系。Xu 等 (2014) 鉴定了一个家蚕内源性启动子 *BmVgP*, 并结合 *piggyBac* 的转基因分析表明, *BmVgP* 以性别、组织和阶段特异性的方式精确地指导报告基因增强型绿色荧光蛋白 (*EGFP*) 的表达, 为筛选家蚕性别提供元件。Zhang 等 (2017) 报道了在家蚕的后部丝腺 (Posterior silk glands, *PSG*) 中将癌基因 *Yorkie*^{CA} cDNA 连接到 *HR3* 增强子和丝素 *L*-链 (*Fibroin L-chain*, *Fil*) 基因启动子的下

游, 然后插入到 *piggyBac* 载体中进行转基因, 特异性过表达 *Yorkie*^{CA} 使转基因家蚕的产丝量提高。

同时, 利用转基因技术结合不同类型的启动子在害虫防治中发挥关键作用。在埃及伊蚊中分离并鉴定了特定的 *beta2* 微管蛋白基因 (*A. aegypti* *β 2-tubulin*), 该基因仅在精巢中表达, 并进一步鉴定了 *beta2* 微管蛋白启动子, 从而介导转基因在害虫中的性别特异性表达, 使基于性别遗传或通过生殖系传播的转基因控制新策略得以开发并测试实施 (Smith *et al.*, 2007)。为了控制蚊子传播的疾病, 研究人员开发了蚊子遗传操作工具, 包括适当的组织特异性启动子, 如蚊子铁蛋白 *LCH* 基因的启动子可驱动抗致病分子在病原体库的主要位置表达, 如肠道和唾液腺 (Dunkov *et al.*, 2002; Geiser *et al.*, 2003); Moreira 等 (2000) 报告了两种蚊子肠道特异性启动子 *AeCP* 和 *AgCP*, 它们能以血液诱导的方式驱动 mRNA 和蛋白质的稳定表达, 这些特性使得羧肽酶启动子非常适合用于蚊子的基因改造, 有利于对疟疾寄生虫抗性进行相关的研究。基于组织、细胞、性别和阶段特异性基因的特征, 其调控区域可作为蚊子二元 *Gal4/UAS* 系统的驱动因子, 从而利用二元 *Gal4/UAS* 系统研究蚊子的独特生物学特性 (Kokoza and Raikhel, 2011)。蚊子体内的免疫细胞, 即血细胞, 参与对包括疟疾寄生虫在内的病原体的免疫防御。使用 *Gal4/UAS* 系统来表征冈比亚按蚊 *A. gambiae* 成虫体内果蝇血细胞特异性溶血素 (*Hemolysin*) 基因启动子的活性, 揭示了血细胞对免疫反应的特异性贡献以及免疫基因和通路的血细胞特异性功能 (Pondeville *et al.*, 2020)。

随着启动子不断深入的研究, 在多个非模式物种中发挥关键作用。Siebert 等 (2008) 使用内源性启动子 *Tubulin* 驱动转基因表达, 促进了赤拟谷盗和其他昆虫的过表达研究。Chen 和 Palli (2023) 研究了中肠特异性 *CYP321A8* 启动子介导的 *CYP450* 过表达, 使草地贪夜蛾对溴氰菊酯产生抗性, 验证了 *CYP450* 基因在杀虫剂抗性中的作用。Li 等 (2022) 通过直接注射 RNAi

质粒在美国白蛾 *Hyphantria cunea* 体内鉴定了 RNA 聚合酶 III 型 (Pol III) 启动子, 即 *HcU62* 小核 RNA (snRNA) 基因启动子, 随后应用基于 piggyBac 的转基因 RNAi (*HcU62: shHcyellow*, *Ysh2*) 显著降低了 *Hcyellow* 的表达水平, 并构建了 *HcU62* 驱动的靶向 *Hcser2* 基因的转基因 RNAi 品系, 从而获得了显性雄性不育的表型。Chen 等 (2020a) 在草地贪夜蛾中鉴定出了多个强内源性启动子, 其中 *SfHSC70-P1780* 和 *SfPub-P2009* 两个启动子显示出比常用的 HR5/IE1 启动子更高的活性, 并将这些强内源性启动子在草地贪夜蛾和其他鳞翅目昆虫中进行相关应用, 包括蛋白表达、基因编辑和转基因等, 丰富了非模式生物启动子的应用场景。

3.2 不同类型启动子在基因编辑方面的应用

通过对不同类型启动子的探究, 拓宽了基因编辑技术在不同领域的应用。Feng 等 (2021) 将 *Actin5C* 这种组成型启动子在昆虫中广泛应用于 Cas9 和 Gal4 等功能蛋白的表达。Xu 等 (2019) 表征了家蚕 *Nanos* 基因 (*BmNos*) 启动子的活性, 并评估了在转基因 CRISPR/Cas9 系统中 *Nos* 驱动的 Cas9 表达, 鉴定了 *BmNos* 启动子可驱动早期胚胎和性腺特异性表达, 为后续双元转基因 CRISPR/Cas9 敲除系统奠定了基础。Ahmed 等 (2019) 利用斑翅果蝇 *Drosophila suzukii* *U6* 和 *hsp70* 基因的内源性启动子分别驱动 gRNA 和

Cas9 的表达, 提高了基因编辑技术, 并且分离出 *Dsβ2t* (*Drosophila suzukii β-tubulin2*) 基因, 利用其启动子驱动精子中红色荧光蛋白 (DsRed) 的表达, 结合改进的 HDR (Homology directed repair) 基因编辑技术建立了转基因精子标记系统, 精子标记系统将有助于在昆虫不育技术 (Sterile insect technique) 的背景下监测害虫活动, 并为这种入侵性害虫的生殖生物学基础研究提供工具。同样为了提高斑翅果蝇 CRISPR/Cas9 系统的基因编辑效率, Ni 等 (2021) 克隆并测试了 4 个内源性 U6 启动子来驱动白眼基因 (*Drosophila suzukii White*) 的突变, 拓宽了在斑翅果蝇中表达 gRNAs 的启动子范围, 为斑翅果蝇的基础研究和应用研究提供了便利。Ren 等 (2013) 报道了一种在 U6b 启动子的控制下将编码短 sgRNAs 的质粒 DNA 注入 Nanos 启动子表达 Cas9 的转基因果蝇胚胎中, 构建了有效且廉价的黑腹果蝇基因组 DNA 编辑方法。Neville 等 (2021) 通过 CRISPR/Cas9 技术产生一个跨越 *fruitless (fru)* P1 核心启动子区域的缺失, 从而产生了一个新的等位基因 *fruΔP1*, 在该等位基因中无法检测到雄性 *Fru^M* 的表达, 纯合子突变雄性对雌性的求偶行为大大减少, 并且在行为上不育, 还进一步研究了 *fru* P1 启动子缺失对雄性活动及其对求偶歌声刺激的反应能力的影响。在这里对已报道的不同类型启动子的鉴定方法及应用进行归纳总结, 如表 3 所示。

表 3 昆虫不同类型启动子的鉴定方法及应用

Table 3 Identification methods and applications of different types of promoters in insects

类别 Category	基因 (文献) Gene (references)	启动子的鉴定方法及应用 Promoter identification method and application	物种 Species
组成型启动子 Constitutive promoter	<i>actin 5C</i> (Thummel <i>et al.</i> , 1988)	转基因 Transgene	黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>
	<i>Am-actin5C</i> (Schulte <i>et al.</i> , 2013)	瞬时表达 Transient expression; 电穿孔 Electroporation	西方蜜蜂 <i>Apis mellifera</i>
	<i>Polyubiquitin</i> (Anderson <i>et al.</i> , 2010)	转基因 Transgene	埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>
	<i>A3</i> (Fatyol <i>et al.</i> , 1999)	瞬时表达 Transient expression	家蚕 <i>Bombyx mori</i>
	<i>CYP6ab4</i> (Zhao <i>et al.</i> , 2015)	双荧光素酶报告基因系统 Dual-luciferase reporter gene system	家蚕 <i>Bombyx mori</i>

续表 3 (Table 3 continued)

类别 Category	基因 (文献) Gene (references)	启动子的鉴定方法及应用 Promoter identification method and application	物种 Species
组成型启动子 Constitutive promoter	<i>TcaTub1</i> (Siebert <i>et al.</i> , 2008)	瞬时表达 Transient expression; 转基因 Transgene	赤拟谷盗 <i>Tribolium castaneum</i>
	<i>121</i> (Miyata <i>et al.</i> , 2019)	双荧光素酶报告基因系统 Dual-luciferase reporter gene system	范氏多足摇蚊 <i>Polypedilum vanderplanki</i>
组织特异性启动子 Tissue-specific promoter	<i>Twist</i> (Pan <i>et al.</i> , 1991)	转基因 Transgene	黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>
	<i>Nanos</i> (Ali <i>et al.</i> , 2010)	转基因 Transgene; 缺失分析 Deletion assay	黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>
	<i>Lsp-2</i> (Benes <i>et al.</i> , 1996)	转基因 Transgene	黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>
	<i>Yps</i> (Søndergaard <i>et al.</i> , 1995)	转基因 Transgene; 缺失分析 Deletion assay	黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>
	<i>ninaE</i> (Mismer and Rubin, 1987)	转基因 Transgene; 缺失分析 Deletion assay	黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>
	<i>MSSP-α2</i> (Christophides <i>et al.</i> , 2000)	转基因 Transgene	黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>
	<i>MSSP-β2</i> (Christophides <i>et al.</i> , 2000)	转基因 Transgene	黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>
	<i>30Ka</i> ; <i>30Kb</i> (Mathur <i>et al.</i> , 2010)	转基因 Transgene	埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>
	<i>Ubl40</i> (Anderson <i>et al.</i> , 2010)	双荧光素酶报告基因系统 Dual-luciferase reporter gene system, 转基因 Transgene	埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>
	<i>β2 tubulin</i> (Smith <i>et al.</i> , 2007)	转基因 Transgene; 原位杂交 <i>In situ</i> hybridization	埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>
	<i>VgR</i> (Cho <i>et al.</i> , 2006)	转基因 Transgene; 原位杂交 <i>In situ</i> hybridization	埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>
	<i>LCH</i> (Pham and Chavez, 2005)	双荧光素酶报告基因系统 Dual-luciferase reporter gene system; DNase I 足迹 DNase I footprinting	埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>
	<i>HCH</i> (Pham <i>et al.</i> , 2003)	双荧光素酶报告基因系统 Dual-luciferase reporter gene system; DNase I 足迹 DNase I footprinting	埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>
	<i>AeCP</i> ; <i>AgCP</i> (Moreira <i>et al.</i> , 2000)	转基因 Transgene	埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>
	<i>Vg</i> (Kokoza <i>et al.</i> , 2000)	转基因 Transgene	埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>
	<i>AgAper1</i> (Abraham <i>et al.</i> , 2005)	转基因 Transgene	冈比亚蚊 <i>Anopheles gambiae</i>
	<i>G12</i> (Nolan <i>et al.</i> , 2011)	转基因 Transgene	冈比亚蚊 <i>Anopheles gambiae</i>
	<i>Vasa</i> (Papathanos <i>et al.</i> , 2009)	转基因 Transgene	冈比亚蚊 <i>Anopheles gambiae</i>
	<i>elp2l</i> (Schulte <i>et al.</i> , 2013)	转基因 Transgene	蜜蜂 <i>Apis mellifera</i>
	<i>ser1</i> (Guo <i>et al.</i> , 2005)	重组 AcMNPV 表达载体系统 Recombinant AcMNPV expression vector system	家蚕 <i>Bombyx mori</i>

续表 3 (Table 3 continued)

类别 Category	基因 (文献) Gene (references)	启动子的鉴定方法及应用 Promoter identification method and application	物种 Species
组织特异性启动子 Tissue-specific promoter	<i>BmR1</i> ; <i>Bmβ4</i> (Xu <i>et al.</i> , 2015)	转基因 Transgene	家蚕 <i>Bombyx mori</i>
	<i>Bmintb2</i> ; <i>Bmintb3</i> ; <i>BmCatO</i> (Zhang <i>et al.</i> , 2015)	重组 AcMNPV 表达载体系统 Recombinant AcMNPV expression vector system	家蚕 <i>Bombyx mori</i>
	<i>Bmlp3</i> (Deng <i>et al.</i> , 2013)	双荧光素酶报告基因系统 Dual-luciferase reporter gene system; 转基因 Transgene	家蚕 <i>Bombyx mori</i>
	<i>P2</i> (Jiang <i>et al.</i> , 2013)	转基因 Transgene	家蚕 <i>Bombyx mori</i>
	<i>BmNos</i> (Xu <i>et al.</i> , 2019)	转基因 Transgene	家蚕 <i>Bombyx mori</i>
	<i>BmLSP</i> (邓党军等, 2011)	转基因 Transgene	家蚕 <i>Bombyx mori</i>
	<i>Clb1</i> (Zhao <i>et al.</i> , 2007)	瞬时表达 Transient expression; 缺失分析 Deletion assay	家蚕 <i>Bombyx mori</i>
	<i>cathepsin B</i> (Cai <i>et al.</i> , 2014)	重组 AcMNPV 表达载体系统 Recombinant AcMNPV expression vector system; 双荧光素酶报告基因系统 Dual-luciferase reporter gene system	家蚕 <i>Bombyx mori</i>
	<i>BmCatD</i> (Yu <i>et al.</i> , 2012)	重组 AcMNPV 表达载体系统 Recombinant AcMNPV expression vector system, 双荧光素酶报告基因系统 Dual-luciferase reporter gene system	家蚕 <i>Bombyx mori</i>
	<i>FABP</i> (Wu <i>et al.</i> , 2002)	荧光素酶报告基因系统 Luciferase reporter gene assay	沙漠飞蝗 <i>Schistocerca gregaria</i>
诱导型启动子 Inducible promoter	<i>hsp70</i> (Pelham, 1982)	缺失分析 Deletion assay, S1 核酸酶作图 SI mapping; 瞬时表达 Transient expression	黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>
	<i>Am-hsp83</i> ; <i>Am-hsp70</i> (Schulte <i>et al.</i> , 2013)	瞬时表达 Transient expression, 电穿孔 Electroporation	蜜蜂 <i>Apis mellifera</i>

4 展望

基因表达是一个经历多层次调控、受到多因素影响的复杂过程。启动子作为基因的非编码区在之前的研究中获得关注和投入相对较少。随着转基因、基因编辑等基因工程技术的应用不断发展,人们对基因表达调控的认识不断深入、新的研究手段不断更新,启动子作为基因表达调控的关键因子发挥着越来越重要的作用。生物信息学、数据挖掘技术和分子生物学技术的不断进步,各项技术的交叉融合将会促进启动子在更多领域的不断突破,包括对启动子等非编码区功能

进行精细标注、研究启动子与顺式作用元件、反式作用因子和转录调控因子之间的互作调控机制,同时也为启动子在基因工程、生物医药、农业育种和害虫防治领域提供研究基础。

昆虫是世界上最繁盛的动物,已发现 100 多万种。很多种类的昆虫由于繁殖能力强,种群数量得不到有效控制而大面积肆虐,对人类的生产生活造成严重的不良后果,如传播疟疾的埃及伊蚊、斯氏按蚊;毁坏农作物爆发成灾的蝗虫、草地贪夜蛾等。利用不同类型启动子构建昆虫基因编辑或转基因系统正在成为害虫防治的一种环境友好的新型手段,如 Marinotti 等 (2013) 利

用雌性特异性基因启动子开发了一种雌性特有的显性致死转基因斯氏按蚊品系,以帮助控制登革热和疟疾的传播。除此之外,一些产生经济效益的昆虫同样也正在应用启动子介导的转基因或基因编辑技术来增强抗病毒能力或者产生更高的经济效益,Hua等(2016)构建的具有单一κB基序、仅由NF-κB分子诱导的*BmCecA1*短启动子,不仅有助于家蚕免疫信号通路的深入研究,而且有助于建立监测体内免疫反应的工具。

启动子作为昆虫遗传操作的基本元件,存在很多的局限性,尤其在非模式物种中,存在诸多瓶颈。纵观果蝇、蚊子和家蚕等模式物种中,转基因、基因编辑和基因驱动等技术发展较为成熟。由于启动子序列在不同物种中的特异性,需要进行大量的筛选、克隆、鉴定和应用。未来基于不同物种启动子的研究,构建非模式物种的遗传操作系统,逐渐减少与模式物种之间的差异,将有助于解决更多的生物学问题。

综上所述,在未来昆虫领域的研究中,基于启动子来构建各种基因操作系统从而达到对害虫的防治和益虫的利用研究,仍然有很大的应用前景和研究价值。

参考文献 (References)

- Abraham EG, Donnelly-Doman M, Fujioka H, Ghosh A, Moreira L, Jacobs-Lorena M, 2005. Driving midgut-specific expression and secretion of a foreign protein in transgenic mosquitoes with *AgAper1* regulatory elements. *Insect Molecular Biology*, 14(3): 271–279.
- Ahmed HMM, Hildebrand L, Wimmer EA, 2019. Improvement and use of CRISPR/Cas9 to engineer a sperm-marking strain for the invasive fruit pest *Drosophila suzukii*. *BMC Biotechnology*, 19(1): 85.
- Ali I, Rehman MU, Rashid F, Khan S, Iqbal A, Xia LX, Ahmed NUD, Swati AZ, 2010. *Cis*-regulatory elements affecting the *Nanos* gene promoter in the germline stem cells. *Journal of Biotechnology*, 145(4): 323–329.
- Anderson MAE, Gross TL, Myles KM, Adelman ZN, 2010. Validation of novel promoter sequences derived from two endogenous ubiquitin genes in transgenic *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology*, 19(4): 441–449.
- Andersson R, Sandelin A, 2020. Determinants of enhancer and promoter activities of regulatory elements. *Nature Reviews Genetics*, 21(2): 71–87.
- Benes H, Neal KC, Willis RL, Gadde D, Castleberry AB, Korochkina SE, 1996. Overlapping *Lsp-2* gene sequences target expression to both the larval and adult *Drosophila* fat body. *Insect Molecular Biology*, 5(1): 39–49.
- Brázda V, Bartas M, Bowater RP, 2021. Evolution of diverse strategies for promoter regulation. *Trends in Genetics*, 37(8): 730–744.
- Bucher P, Trifonov EN, 1986. Compilation and analysis of eukaryotic POL II promoter sequences. *Nucleic Acids Research*, 14(24): 10009–10026.
- Cai XY, Yu J, Yu HY, Liu YW, Fang Y, Ren ZX, Jia JQ, Zhang GZ, Guo XJ, Jin BR, Gui ZZ, 2014. Core promoter regulates the expression of *cathepsin B* gene in the fat body of *Bombyx mori*. *Gene*, 542(2): 232–239.
- Cazier AP, Blazeck J, 2021. Advances in promoter engineering: Novel applications and predefined transcriptional control. *Biotechnology Journal*, 16(10): e2100239.
- Chen J, Boyaci H, Campbell EA, 2021. Diverse and unified mechanisms of transcription initiation in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 19(2): 95–109.
- Chen XE, Chereddy SCRR, Gurusamy D, Palli SR, 2020a. Identification and characterization of highly active promoters from the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 126: 103455.
- Chen XE, Palli SR, 2023. Midgut-specific expression of CYP321A8 P450 gene increases deltamethrin tolerance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Pest Science*, 96(4): 1611–1623.
- Chen XE, Tan AJ, Palli SR, 2020b. Identification and functional analysis of promoters of heat-shock genes from the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Scientific Reports*, 10(1): 2363.
- Chen Z, 2014. Cloning and sequence analysis of *Ankyrin* and *PTP* genes and identification of a *Ankyrin* promoter. Master dissertation. Hangzhou: Zhejiang University. [陈征, 2014. 菜蛾盘绒茧蜂病毒 *Ankyrin* 和 *PTP* 家族基因克隆, 序列分析和一个 *Ankyrin* 基因启动子序列初步鉴定. 硕士学位论文. 杭州: 浙江大学.]
- Cho KH, Cheon HM, Kokoza V, Raikhel AS, 2006. Regulatory region of the vitellogenin receptor gene sufficient for high-level, germ line cell-specific ovarian expression in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36(4): 273–281.

- Christophides GK, Livadaras I, Savakis C, Komitopoulou K, 2000. Two medfly promoters that have originated by recent gene duplication drive distinct sex, tissue and temporal expression patterns. *Genetics*, 156(1): 173–182.
- Danino YM, Even D, Ideses D, Juven-Gershon T, 2015. The core promoter: At the heart of gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1849(8): 1116–1131.
- Deng DJ, Xu HF, Wang F, Duan XL, Ma SY, Xiang ZH, Xia QY, 2013. The promoter of *Bm1p3* gene can direct fat body-specific expression in the transgenic silkworm, *Bombyx mori*. *Transgenic Research*, 22(5): 1055–1063.
- Deng DJ, Xu HF, Wang F, Ma SY, Xia QY, 2011. Expression analysis of DsRed gene driven by promoter of *BmLSP* gene in transgenic silkworm, *Bombyx mori*. *Science of Sericulture*, 37(2): 200–205. [邓党军, 徐汉福, 王峰, 马三垣, 夏庆友, 2011. *BmLSP* 基因启动子驱动 DsRed 在转基因家蚕中的表达分析. 蚕业科学, 37(2): 200–205.]
- Dorsett D, 1999. Distant liaisons: Long-range enhancer-promoter interactions in *Drosophila*. *Current Opinion in Genetics & Development*, 9(5): 505–514.
- Dunkov BC, Georgieva T, Yoshiga T, Hall M, Law JH, 2002. *Aedes aegypti* ferritin heavy chain homologue: Feeding of iron or blood influences message levels, lengths and subunit abundance. *Journal of Insect Science*, 2: 7.
- Duttke SHC, Lacadie SA, Ibrahim MM, Glass CK, Corcoran DL, Benner C, Heinz S, Kadonaga JT, Ohler U, 2015. Human promoters are intrinsically directional. *Molecular Cell*, 57(4): 674–684.
- Fatyl K, Illes K, Szalay AA, 1999. An alternative intronic promoter of the *Bombyx A3 cytoplasmic actin* gene exhibits a high level of transcriptional activity in mammalian cells. *Molecular & General Genetics*, 261(2): 337–345.
- Feng XC, López Del Amo V, Mameli E, Lee MG, Bishop AL, Perrimon N, Gantz VM, 2021. Optimized CRISPR tools and site-directed transgenesis towards gene drive development in *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *Nature Communications*, 12(1): 2960.
- Geiser DL, Chavez CA, Flores-Munguia R, Winzerling JJ, Pham DQ, 2003. *Aedes aegypti* ferritin. *European Journal of Biochemistry*, 270(18): 3667–3674.
- Guo XY, Guo TQ, Wang SP, Wang JY, Lu CD, 2005. Silk gland specific secretory expression of *egfp* gene in silkworm *Bombyx mori* with rAcMNPV system. *Archives of Virology*, 150(6): 1151–1160.
- Hua XT, Ma XJ, Xue RJ, Cheng TC, Wang F, Xia QY, 2016. Characterization of the *Bombyx mori* Cecropin A1 promoter regulated by IMD pathway. *Insect Science*, 23(2): 297–304.
- Jiang L, Cheng TC, Dang YH, Peng ZW, Zhao P, Liu SP, Jin SK, Lin P, Sun Q, Xia QY, 2013. Identification of a midgut-specific promoter in the silkworm *Bombyx mori*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 433(4): 542–546.
- Kokoza V, Ahmed A, Cho WL, Jasinskiene N, James AA, Raikhel A, 2000. Engineering blood meal-activated systemic immunity in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(16): 9144–9149.
- Kokoza VA, Raikhel AS, 2011. Targeted gene expression in the transgenic *Aedes aegypti* using the binary Gal4-UAS system. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(8): 637–644.
- Kou ZQ, Luo XY, Jiang YG, Chen BH, Song Y, Wang YH, Xu J, Tomberlin JK, Huang Y, 2023. Establishment of highly efficient transgenic system for black soldier fly (*Hermetia illucens*). *Insect Science*, 30(4): 888–900.
- Kozakai T, Izumi A, Horigome A, Odamaki T, Xiao JZ, Nomura I, Suzuki T, 2020. Structure of a core promoter in *Bifidobacterium longum* NCC2705. *Journal of Bacteriology*, 202(7): e00540-19.
- Levine M, Tjian R, 2003. Transcription regulation and animal diversity. *Nature*, 424(6945): 147–151.
- Liu GQ, Yan Y, Wang YS, Zhang GF, Wan FH, 2015. Insect gene promoters used in insect population genetic control. *Journal of Biosafety*, 24(2): 115–125. [刘桂清, 严盈, 王玉生, 张桂芬, 万方浩, 2015. 昆虫种群遗传控制技术中启动子的研究. 生物安全学报, 24(2): 115–125.]
- Li S, Zhang QN, Zhang XT, Zheng XY, Lv YF, Hao ZM, 2014. Cytomegalovirus immediate-early promoter efficiently drives heterogeneous gene expression in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) insect cells. *Cellular and Molecular Biology*, 60(1): 6–11.
- Li XW, Liu Q, Bi HL, Wang YH, Xu X, Sun W, Zhang Z, Huang YP, 2022. piggyBac-based transgenic RNAi of *serine protease 2* results in male sterility in *Hyphantria cunea*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 143: 103726.
- Marinotti O, Jasinskiene N, Fazekas A, Scaife S, Fu GL, Mattingly ST, Chow K, Brown DM, Alphey L, James AA, 2013. Development of a population suppression strain of the human malaria vector mosquito, *Anopheles stephensi*. *Malaria Journal*, 12: 142.
- Mathur G, Sanchez-Vargas I, Alvarez D, Olson KE, Marinotti O, James AA, 2010. Transgene-mediated suppression of dengue viruses in the salivary glands of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology*, 19(6): 753–763.

- Mismer D, Rubin GM, 1987. Analysis of the promoter of the *ninaE* opsin gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 116(4): 565–578.
- Miyata Y, Tokumoto S, Sogame Y, Deviatiiarov R, Okada J, Cornette R, Gusev O, Shagimardanova E, Sakurai M, Kikawada T, 2019. Identification of a novel strong promoter from the anhydrobiotic midge, *Polypedilum vanderplanki*, with conserved function in various insect cell lines. *Scientific Reports*, 9(1): 7004.
- Moreira LA, Edwards MJ, Adhami F, Jasinskiene N, James AA, Jacobs-Lorena M, 2000. Robust gut-specific gene expression in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(20): 10895–10898.
- Neville MC, Eastwood A, Allen AM, de Haan A, Nojima T, Goodwin SF, 2021. Generation and characterization of fruitless P1 promoter mutant in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Neurogenetics*, 35(3): 285–294.
- Ni XY, Lu WJ, Qiao X, Huang J, 2021. Genome editing efficiency of four *Drosophila suzukii* endogenous U6 promoters. *Insect Molecular Biology*, 30(4): 420–426.
- Nolan T, Petris E, Müller HM, Cronin A, Catteruccia F, Crisanti A, 2011. Analysis of two novel midgut-specific promoters driving transgene expression in *Anopheles stephensi* mosquitoes. *PLoS ONE*, 6(2): e16471.
- Pan DJ, Huang JD, Courey AJ, 1991. Functional analysis of the *Drosophila* twist promoter reveals a dorsal-binding ventral activator region. *Genes & Development*, 5(10): 1892–1901.
- Papathanos PA, Windbichler N, Menichelli M, Burt A, Crisanti A, 2009. The Vasa regulatory region mediates germline expression and maternal transmission of proteins in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*: A versatile tool for genetic control strategies. *BMC Molecular Biology*, 10: 65.
- Pelham HR, 1982. A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila hsp 70* heat-shock gene. *Cell*, 30(2): 517–528.
- Pham DQ, Chavez CA, 2005. The ferritin light-chain homologue promoter in *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology*, 14(3): 263–270.
- Pham DQD, Shaffer JJ, Chavez CA, Douglass PL, 2003. Identification and mapping of the promoter for the gene encoding the ferritin heavy-chain homologue of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(1): 51–62.
- Pondeville E, Puchot N, Parvy JP, Carissimo G, Poidevin M, Waterhouse RM, Marois E, Bourgouin C, 2020. Hemocyte-targeted gene expression in the female malaria mosquito using the *hemolentin* promoter from *Drosophila*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 120: 103339.
- Putthoff P, Akyüz N, Kutsche M, Zardi L, Borgmeyer U, Schachner M, 2003. Structure of the murine *tenascin-R* gene and functional characterisation of the promoter. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 308(4): 940–949.
- Qi Z, Jung C, Bandilla P, Ludwig C, Heron M, Sophie Kiesel A, Museridze M, Philippou-Massier J, Nikolov M, Renna Max Schnepf A, Unnerstall U, Ceolin S, Mühlhig B, Gompel N, Soeding J, Gaul U, 2022. Large-scale analysis of *Drosophila* core promoter function using synthetic promoters. *Molecular Systems Biology*, 18(2): e9816.
- Ren X, Sun J, Housden BE, Hu Y, Roesel C, Lin S, Liu LP, Yang Z, Mao D, Sun L, Wu Q, Ji JY, Xi J, Mohr SE, Xu J, Perrimon N, Ni JQ, 2013. Optimized gene editing technology for *Drosophila melanogaster* using germ line-specific Cas9. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(47): 19012–19017.
- Roy AL, Singer DS, 2015. Core promoters in transcription: Old problem, new insights. *Trends in Biochemical Sciences*, 40(3): 165–171.
- Schmid CD, Praz V, Delorenzi M, Périer R, Bucher P, 2004. The Eukaryotic Promoter Database EPD: The impact of in silico primer extension. *Nucleic Acids Research*, 32(Database issue): D82–D85.
- Schulte C, Leboulle G, Otte M, Grünwald B, Gehne N, Beye M, 2013. Honey bee promoter sequences for targeted gene expression. *Insect Molecular Biology*, 22(4): 399–410.
- Siebert KS, Lorenzen MD, Brown SJ, Park Y, Beeman RW, 2008. Tubulin superfamily genes in *Tribolium castaneum* and the use of a *Tubulin* promoter to drive transgene expression. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(8): 749–755.
- Smith RC, Walter MF, Hice RH, O'Brochta DA, Atkinson PW, 2007. Testis-specific expression of the *beta2 tubulin* promoter of *Aedes aegypti* and its application as a genetic sex-separation marker. *Insect Molecular Biology*, 16(1): 61–71.
- Solovyev VV, Shahmuradov IA, Salamov AA, 2010. Identification of promoter regions and regulatory sites. *Methods in Molecular Biology*, 674: 57–83.
- Søndergaard L, Mauchline D, Egetoft P, White N, Wulff P, Bownes M, 1995. Nutritional response in a *Drosophila* yolk protein gene promoter. *Molecular & General Genetics*, 248(1): 25–32.
- Suzuki Y, Yamashita R, Sugano S, Nakai KT, 2004. DBTSS, DataBase of Transcriptional Start Sites: Progress report 2004.

- Nucleic Acids Research*, 32(Database issue): D78–D81.
- Tamura T, Thibert C, Royer C, Kanda T, Abraham E, Kamba M, Komoto N, Thomas JL, Mauchamp B, Chavancy G, Shirk P, Fraser M, Prudhomme JC, Couble P, 2000. Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon-derived vector. *Nature Biotechnology*, 18(1): 81–84.
- Tan TT, Liu RP, Luo Q, Ma JW, Ou Y, Zeng WH, Feng LC, Xu HF, 2020. The intronic promoter of *Actin4* mediates high-level transgene expression mainly in the wing and epidermis of silkworms. *Transgenic Research*, 29(2): 243–251.
- Tang HT, Wu YL, Deng JL, Chen NZ, Zheng ZH, Wei YJ, Luo XZ, Keasling JD, 2020. Promoter architecture and promoter engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolites*, 10(8): 320.
- Thummel CS, Boulet AM, Lipshitz HD, 1988. Vectors for *Drosophila* P-element-mediated transformation and tissue culture transfection. *Gene*, 74(2): 445–456.
- Tong XL, Shi J, Gai TT, Fang CY, Dai FY, 2018. Research and application of insect promoters. *Acta Entomologica Sinica*, 61(3): 360–370. [童晓玲, 石津, 盖婷婷, 方春燕, 代方银, 2018. 昆虫启动子的研究及应用. 昆虫学报, 61(3): 360–370.]
- Wang Y, Peng QK, Mou X, Wang XY, Li HZ, Han T, Sun Z, Wang X, 2022. A successful hybrid deep learning model aiming at promoter identification. *BMC Bioinformatics*, 23(Suppl. 1): 206.
- Wang YJ, Huang YP, Yu HH, Xu XJ, Yang G, Ai QQ, You MS, 2019. Cloning and functional characterization of the *NanosO* gene promoter in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 61(12): 1376–1383. [王亚军, 黄宇萍, 于慧慧, 徐雪娇, 杨广, 艾倩倩, 尤民生, 2019. 小菜蛾 *NanosO* 基因启动子的克隆及功能验证. 昆虫学报, 61(12): 1376–1383.]
- Wenck BR, Santangelo TJ, 2020. Archaeal transcription. *Transcription*, 11(5): 199–210.
- Wu QW, Chang WH, Rickers-Haunerland J, Higo T, Haunerland NH, 2002. Characterization of a new fatty acid response element that controls the expression of the locust muscle *FABP* gene. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 239(1/2): 173–180.
- Xu J, Bi HL, Chen RM, Aslam AF, Li ZQ, Ling L, Zeng BS, Huang YP, Tan AJ, 2015. Transgenic characterization of two testis-specific promoters in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Molecular Biology*, 24(2): 183–190.
- Xu J, Chen RM, Chen SQ, Chen K, Tang LM, Yang DH, Yang X, Zhang Y, Song HS, Huang YP, 2019. Identification of a germline-expression promoter for genome editing in *Bombyx mori*. *Insect Science*, 26(6): 991–999.
- Xu J, Wang YQ, Li ZQ, Ling L, Zeng BS, You L, Chen YZ, Aslam AFM, Huang YP, Tan AJ, 2014. Functional characterization of the vitellogenin promoter in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Molecular Biology*, 23(5): 550–557.
- Yang HJ, Fan W, Wei H, Zhang JW, Zhou ZH, Li JY, Lin JR, Ding N, Zhong BX, 2008. Transgenic breeding of anti-*Bombyx mori* L. nuclear polyhedrosis virus silkworm *Bombyx mori*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 40(10): 873–876.
- Yu J, Wu FY, Zou FM, Jia JQ, Wang SP, Zhang GZ, Guo XJ, Gui ZZ, 2012. Identification of ecdysone response elements (EcREs) in the *Bombyx mori* cathepsin D promoter. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 425(1): 113–118.
- Zhang K, Yu S, Su JJ, Xu M, Tan P, Zhang YJ, Xiang ZH, Cui HJ, 2015. Identification and characterization of three novel hemocyte-specific promoters in silkworm *Bombyx mori*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 461(1): 102–108.
- Zhang PL, Liu SM, Song HS, Zhang GZ, Jia QQ, Li S, 2017. *Yorkie^{CA}* overexpression in the posterior silk gland improves silk yield in *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*, 100: 93–99.
- Zhao GD, Zhang YL, Liu YL, Li B, Chen YH, Xu YX, Xia QY, Shen WD, Wei ZG, 2015. Promoter analysis and RNA interference of *CYP6ab4* in the silkworm *Bombyx mori*. *Molecular Genetics and Genomics*, 290(5): 1943–1953.
- Zhao J, Wei Q, Gu XR, Ren SW, Liu XN, 2020. Alcohol dehydrogenase 5 of *Helicoverpa armigera* interacts with the CYP6B6 promoter in response to 2-tridecanone. *Insect Science*, 27(5): 1053–1066.
- Zhao QL, Shen XJ, Zhu LJ, Yi YZ, Tang SM, Zhang GZ, Guo XJ, 2007. Characterization of *C1b1* gene promoter from silkworm, *Bombyx mori*. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, 62(11/12): 875–880.
- Zheng W, Gianoulis TA, Karczewski KJ, Zhao H, Snyder M, 2011. Regulatory variation within and between species. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 12: 327–346.