

草地贪夜蛾 PP2A 的克隆、序列分析及在大肠杆菌中的表达^{*}

郝少东^{**} 杨宝东 王进忠^{***} 张志勇^{***} 张民照 郑林青 孙淑玲

(农业应用新技术北京市重点实验室 北京农学院植物科学技术学院 北京 102206)

摘要 为建立斑蝥素等 PP2A 抑制剂的体外活性测定方法,用于以杀虫剂为目的的药物快速活性评价,本研究首次同源克隆了鳞翅目昆虫草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) 的 PP2A 催化亚基 cDNA 全长序列,探索了该基因在大肠杆菌中的表达。结果显示, *S. frugiperda* 的 PP2A 编码一条 309 个氨基酸的肽链,预测其蛋白质分子量为 35.46 ku,等电点 5.37。分析蛋白质氨基酸序列,没有发现信号肽和跨膜结构,推测该 PP2A 主要存在于胞质中。多重比对分析 *S. frugiperda* 及其它昆虫的 PP2A,表明 PP2A 的保守性较高,可以用 *S. frugiperda* PP2A 作为研究斑蝥素等抑制剂的药物筛选靶标酶,用于杀虫剂的筛选。利用该基因构建 pET30a-PP2A 原核表达载体转化至 *E. coli* BL21 (DE3) 中,在 16~30℃, 0.2~0.8 mmol/L 的 IPTG 下均能成功诱导 PP2A-His 表达,经 Ni-琼脂糖柱纯化后可以得到 SDS-PAGE 呈现单一条带的纯化蛋白,电泳纯度大于 90%,为进一步活性测定奠定了基础。

关键词 草地贪夜蛾,蛋白磷酸酶 2A,分子克隆,原核表达

Molecular cloning, sequence analysis and expression in *Escherichia coli* of the *Spodoptera frugiperda* protein phosphatase 2A

HAO Shao-Dong^{**} YANG Bao-Dong WANG Jin-Zhong^{***}

ZHANG Zhi-Yong^{***} ZHANG Min-Zhao ZHENG Lin-Qing SUN Shu-Ling

(Beijing Key Laboratory of New Technology in Agricultural Application, College of Plant Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Abstract This study is aimed at establishing a method of PP2A activity assay for evaluating potential new pesticides *in vitro*. A Ser/Thr protein phosphatase 2A catalytic subunit gene was cloned from *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) Sf-9 cell culture and expressed in *Escherichia coli*. The full-length cDNA sequence was 1 303 bp, encoding 309 amino acids with a predicted molecular weight of 35.46 ku and an isoelectric point of 5.37. This PP2A may mainly occur in cytoplasm without signal peptides and transmembrane structure. Multiple comparison analysis of *S. frugiperda* and other insects' PP2A indicate that PP2A is highly conserved. PP2A of *S. frugiperda*, the target enzyme for selection of inhibitors, can be used for screening insecticides in activity assays. A prokaryotic expression vector pET30a-PP2A was constructed and transfected into the *E. coli* BL21 (DE3) strain, establishing a prokaryotic expression system. This expression system expressed PP2A well at conditions of 16–30℃ with a 0.2–0.8 mol/L IPTG inducer. We dissolved the inclusion in urea solution and purified it using a Ni-agarose column, obtaining purified PP2A which presented a single band after SDS-PAGE, showing the purity was over 90%. These results lay a foundation for research into PP2A activity assay.

Key words *Spodoptera frugiperda*, PP2A, molecular cloning, prokaryotic expression

^{*} 资助项目:国家自然科学基金项目(30971938,31272099);北京市教委科技创新平台项目(PXM2008_014207_055164);北京市高校人才强教计划项目(PHR-201107135);国家科技支撑计划-果蔬重大病虫害防控技术与示范(2012BAD19B06)。

^{**} E-mail: haosd@bua.edu.cn

^{***} 通讯作者, E-mail: jinzhw9276@163.com; zhangzy16@aliyun.com

收稿日期:2013-04-17,接受日期:2013-05-30

蛋白质的磷酸化和去磷酸化是真核生物生命活动分子调节的重要手段。蛋白磷酸酶催化蛋白的去磷酸化,参与调节细胞周期、细胞生长发育中的多种信号转导、细胞骨架动态调节及细胞凋亡等(Hunter, 1995; Cohen, 2000)。蛋白磷酸酶 2A (PP2A)属于丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶中的 PPP (phosphoprotein phosphatase)家族一员。PP2A 是异源三聚体,由结构亚基 A、调节亚基 B 和催化亚基 C 组成,其中 C 亚基与 A 亚基组成的整体被称之为 PP2A 核心酶。B 亚基具有多个亚基家族,决定 PP2A 作用的底物特异性和功能(Janssens and Goris,2001)。

一些 PP2A 天然抑制剂如斑蝥素 (cantharidin)、冈田酸(okadaic acid)、微囊藻素-LR (microcystin-LR)、变构霉素 (tautomycin)、节球藻素 (nodularin)和福司曲星 (fostriccin)等可以通过结合 C 亚基抑制 PP2A 活性(Honkanen, 1993; Maynes *et al.*, 2004; Xing *et al.*, 2006; Kelker *et al.*, 2009;Pereira *et al.*, 2011),在药物研究中具有不同的应用价值,如冈田酸作为一种重要的分子工具常被用来研究分子内信号传导途径,变构霉素具有突出的抗真菌作用(Chen *et al.*, 2011);斑蝥素具有抗菌和杀虫作用(张志勇和袁锋, 1998;曹微丹等,2008;陈利平等,2011),可显著抑制 Sf9 细胞增殖并诱导其凋亡(张来喜等,2011;周晗颖等,2012),已被开发为杀虫剂得到应用(刁绍东,2003)。虽然已发现斑蝥素是哺乳动物细胞

PP2A 的抑制剂,但对昆虫 PP2A 作用机制研究还很有限。Sf9 是从草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) 卵巢中分离而建立的离体培养昆虫细胞系,是深入研究活性物质作用机制和建立新型高效快速筛选体系的理想实验材料。在研究斑蝥素对鳞翅目昆虫毒理作用过程中,我们首次克隆了地贪夜蛾 PP2A 催化亚基 C 的 cDNA 序列,在大肠杆菌中得以表达,现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 简并引物扩增 PP2A 片段

按照 RNAeasy Plus Mini Kit (Qiagen, 德国) 操作步骤,提取 Sf9 细胞(10^6 个)总 RNA,使用 500 ng 总 RNA 在 oligo (dT) 引物及 M-MLV 反转录酶 (Promega, 美国) 下获得 cDNA。基于 PPP 保守区的多重比对,由 Primer Premier 5.0 设计简并引物(表 1)。用于扩增 PP2A 片段的 50 μ L PCR 体系包含 3U LA-*Taq* DNA 聚合酶(Takara, 大连), 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 50 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl₂, 200 μ mol/L dNTP, 200 pmol 引物; PCR 反应条件:第 1 个循环前预变性 94 $^{\circ}$ C, 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 2 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min, 30 个循环。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳纯化,克隆至 pMD-18T 载体(Takara, 大连)。阳性克隆质粒由 TIANprep Mini Plasmid Kit(天根, 北京)提取,送北京中科希林生物技术公司由 ABI377 系统测序。

表 1 引物序列及用途
Table 1 Primers and its application

引物名称 Primers	序列(5'→3') Primer sequences (5'→3')	用途 Application	扩增区域 Fragment of PCR
F1	GTCCACGGTCRGTTTCRC	CDS 扩增	CDS 区 172-623
R	CCRGCCACCTCTNTCATC		
GSP195	GATGGAGCTGTTCCGTATCGG	3'RACE	CDS 区 195-3'末端
GSP371	CTCAGGTGTACGGTTTCTACGA	3'RACE	CDS 区 371-3'末端
GSP1	CCCTGGAGACGAGTGTCAGCCCGTT	5' RACE	5'末端-CDS 区 772
GSP2	ATGTACGTGTTTAATGAGGTCCAATCG	5' RACE	5'末端-CDS 区 1168
FB	TCGGATCCATGGAGGACAAGCGCTCGTT	构建表达载体	CDS 区
RH	GCAAGCTTCTACATGAAGTAATCTGGCG		

1.2 PP2A 的 cDNA 末端序列扩增(RACE)

简并引物 PCR 仅获得 PP2A 全长的部分序列,3'及 5'RACE 用来补充获得序列的未知 3'及 5'端。3'-RACE 按照 3'-Full RACE Core Set Ver 2.0 Kit(Takara,大连)操作完成,用试剂盒中的接头引物反转录得到 cDNA 第一链。巢式 PCR 中第一轮 PCR 引物对为 GSP371 和试剂盒中的 UPM,模板为 cDNA 第一链;第二轮 PCR 引物对为 GSP371 和试剂盒中的 UPM,模板为第一轮 PCR 产物。PCR 反应程序为:95℃ 预变性 3 min,95℃ 变性 30 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,30 个循环;72℃ 延伸 10 min。5'RACE 按照 SMARTer RACE cDNA Amplification Kit(Clontech,美国)的操作完成,反转录后合成的 cDNA5'端具有接头引物序列,利用试剂盒中的接头引物与基因特异性引物进行巢式 PCR,用两步法 PCR 程序:95℃ 预变性 3 min,95℃ 变性 30 s,68℃ 退火及延伸 2 min,30 个循环。3'及 5'RACE 中的基因特异性引物见表 1。

1.3 PP2A 的 cDNA 全长序列分析

用 DNAsar 软件寻找 PP2A 核酸序列的 ORF 区,将其翻译为氨基酸序列,利用 BLAST 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)寻找并下载 PP2A 同源序列。在 DNAMAN 6.0 中进行多重序列比。同源进化树利用邻近法,自展支持率评估设置为 1 000 次,由 MEGA 5.0(Tamura *et al.*, 2007)完成。蛋白质分子量、等电点预测在 Expsasy 服务器(http://web.expasy.org/compute_pi/)分析。iPSORT 工具(<http://ipsort.hgc.jp/>)用于分析蛋白质信号肽。TMHMM 工具(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)用于分析跨膜区域。蛋白质三级结构预测在 Swiss model server(<http://swissmodel.expasy.org/>)完成,所有参数选择默认值。

1.4 PP2A 在 *E. coli* 中的表达

PP2A 经由带酶切位点的引物 FB/RH(表 1)扩增后,连入 pMD18T-simple 克隆载体,经 *Bam* HI/*Hind* III 双酶切后,经琼脂糖凝胶电泳纯化后连入同样经过此双酶切并纯化的 pET-30a 表达载体中(Novagen,美国)转化至 Trans5 α 化学感受态细胞(全式金,北京),由 TIANprep Mini Plasmid Kit(天根,北京)提取质粒,测序验证后转化至 *E. coli* BL21(DE3)菌株中。pET-30a 表达载体具有 N 末

端 His-标签/凝血酶/T7 结构,在 IPTG 诱导剂下,可以高效表达含 His 标签的目的蛋白。诱导表达后的菌体经超声波裂解,SDS-PAGE 进行分析。包涵体由 Ni-Agarose His 标签蛋白纯化试剂盒(CWBIO,北京)纯化。

2 结果与分析

2.1 基因克隆和序列分析

简并引物 PCR 得到 452 bp 的 PP2A 同源片段(图 1),在此基础上设计基因特异性引物,在 3'RACE,5'RACE 中分别获得 742 bp,889 bp 的两个片段(图 1),通过序列拼接,得到 1 303 bp 的 PP2AcDNA 全长,提交至 GeneBank(accession: KC429039),该序列包含 930 bp 的编码区,171 bp 的 3'端非编码区及 205 bp 的 5'非编码区。编码肽链包含 309 个氨基酸,预测其分子量为 35.46 ku,等电点 5.37。多重比对 *S. frugiperda* 与其它昆虫的 PP2A,证实 PP2A 的保守性较高,具有与 PP2A 活性位点及金属原子结合的结构域(图 2)。进化树分析 *S. frugiperda* 与君主斑蝶 *Danaus plexippus* 最先聚成一类,亲缘关系最近(图 3)。iPSORT 分析表明 PP2A 无信号肽及线粒体转运肽,TMHMM 工具分析显示,PP2A 无跨膜结构域,与人 PP2A 主要存在于胞质中一致。SWISS-MODEL 预测 *S.*

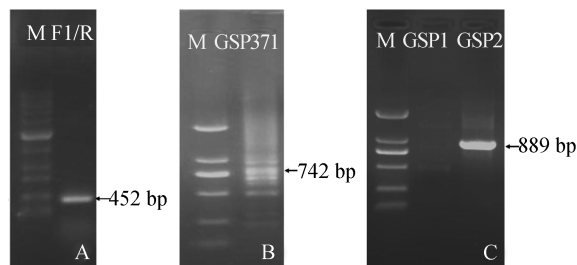


图 1 草地贪夜蛾 PP2A 的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR production of PP2A of *Spodoptera frugiperda*

A. 利用简并引物扩增的 PP2A 片段(F1/R);B. 3'RACE 第二轮 PCR 产物(GSP371);C. 5'RACE 第一轮 PCR(GSP1)及第二轮 PCR(GSP2);M:DNA 分子量标准。

A. amplification of the PP2A fragment with degenerate primers;B. first and nest PCR production in 3'RACE of PP2A of *S. frugiperda*;C. first (GSP1) and nest PCR (GSP2) production in 5' RACE of PP2A of *S. frugiperda*. M: DNA marker.

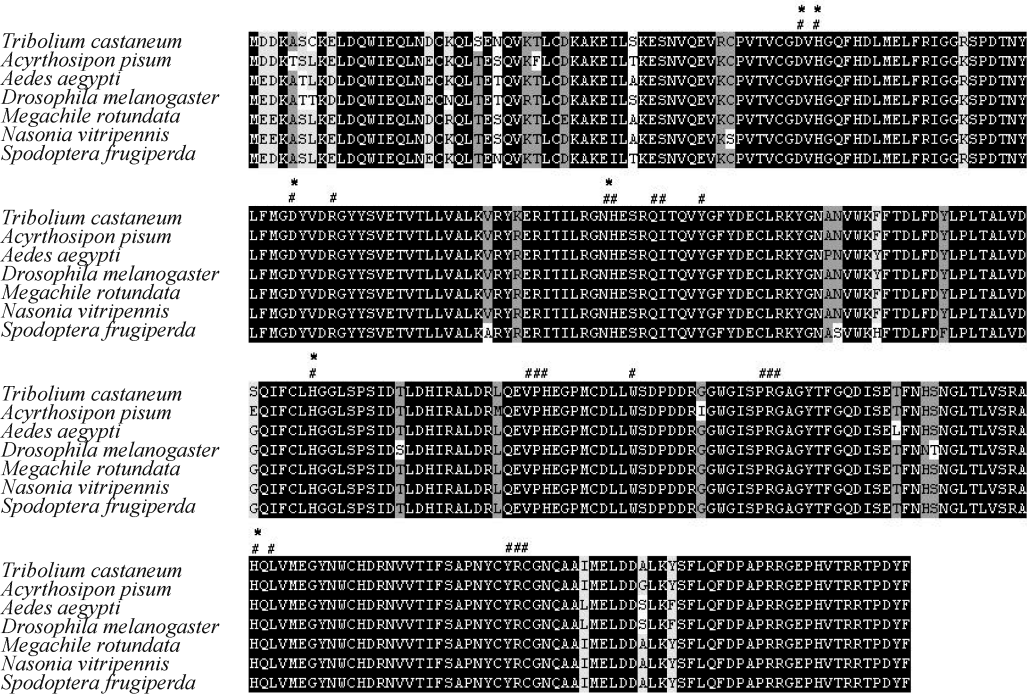


图 2 草地贪夜蛾与其它昆虫 PP2A 氨基酸序列的同源性比较

Fig. 2 Alignment of PP2A of insect

黑色表示氨基酸序列同源性为 100%,灰色表示 50% ~ 99%;#示与 PP2A 活性位点相关的氨基酸;
* 示与金属原子结合位点的氨基酸。

Black and gray indicate the amino acid sequence homology was 100% and 50% ~ 99% respectively, pound sign (#) for residues involved in active site, asterisk (*) for residues involved in metal binding.

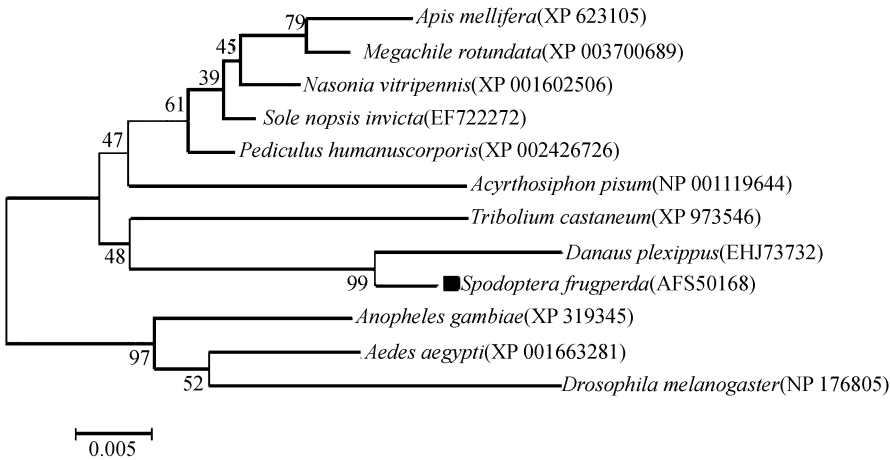


图 3 昆虫 PP2A 催化亚基的系统发育树

Fig. 3 Phylogeny tree of insect PP2A catalytic subunit

frugiperda PP2A结构见图 4,活性部位结合有 2 个金属原子。

2.2 草地贪夜蛾 PP2A 在 E. coli 中的表达

pET30a-PP2A 重组质粒经测序表明,插入片段与克隆序列完全一致,目的基因的阅读框与原

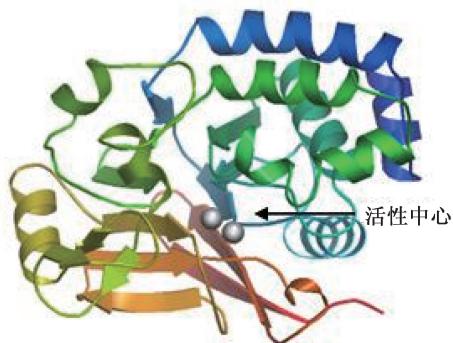


图4 SWISS-MODEL 预测草地贪夜蛾 PP2A 结构

Fig.4 Predictive 3D structure of the *Spodoptera frugiperda* PP2A

核表达载体上的 His-Tag 阅读框正确融合。将其转染至 *E. coli* BL21 (DE3) 株系中后,筛选的表达工程菌在 16℃,0.2 ~ 0.8 mmol/L 的 IPTG 诱导剂下均能成功表达 PP2A,SDS-PAGE 电泳(图 5)显示,在分子量分别为 49.3 ku 和 29.0 ku 的位置间存在 1 条融合蛋白诱导表达条带,与目的蛋白的分子量理论值相符,而未诱导的转化菌则未出现目的蛋白带。为了获得正确折叠的可溶性蛋白,选择在较低浓度 IPTG (0.2 mmol/L) 下诱导目的蛋白,考察不同温度对目的蛋白表达的影响,16 ~ 30℃ 之间 PP2A-His 表达顺利,温度低至 10℃ 时,目的蛋白表达量极少(图 5)。将菌体裂解液溶解于 7 mol/L 尿素溶液后,PP2A-His 经 Ni-琼脂糖柱纯化,在 SDS-PAGE 上只呈现单一条带的纯化蛋白(图 6),电泳纯度大于 90%。

3 讨论

PP2A 作为磷酸化丝氨酸/苏氨酸残基蛋白磷酸酶家族中的重要一员,参与了细胞代谢、DNA 复制、基因表达、信号转导、细胞周期、细胞分化及凋亡等细胞活动过程 (Janssens and Goris, 2001; Lechward *et al.*, 2001),一些天然 PP2A 抑制剂除具有抗癌作用 (Deng *et al.*, 2013) 外,在农业生产中还具有作为除草剂或杀虫剂的潜能 (Matsuzawa *et al.*, 1987; 张志勇和袁锋, Bajsa *et al.*, 2012; 1998),近些年来得到了一定的开发和应用。然而除果蝇外,对其它昆虫 PP2A 的研究鲜见报道。本文对草地贪夜蛾及其它昆虫的 PP2A 多重比对分析证实 PP2A 的保守性较高,PP2A 是一个含 Mn^{2+} 的金属酶 (Xing *et al.*, 2008),催化亚基 C 在进化

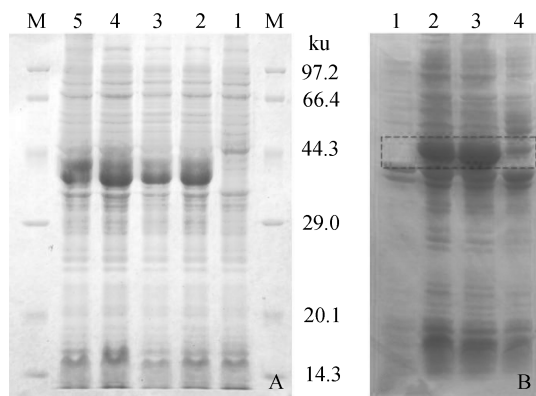


图5 草地贪夜蛾的 PP2A 在 *E. coli* 中的表达

Fig.5 Expression of *Spodoptera frugiperda* PP2A in *E. coli*

A. 不同 IPTG 浓度在 16℃ 下诱导 pET30a-SfPP2Ac 12 h 后 PP2A 的表达:1: 无诱导剂的对照, 2: 0.2 mmol/L, 3: 0.4 mmol/L, 4: 0.6 mmol/L, 5: 0.8 mmol/L; B. 0.2 mmol/L IPTG 在不同温度下诱导 pET30a-SfPP2Ac 6 h 后 PP2A 的表达:1: 无诱导剂的对照, 2: 30℃ 下诱导表达, 3: 24℃ 下诱导表达, 4: 10℃ 下诱导表达; 虚框指示的 His-PP2A 的位置。

A. induced expression of recombinant protein His-PP2A in *E. coli* BL21 (DE3) cells after induced for 12 h under 16℃. M: protein molecular weight standard, 1: control without IPTG, 2: 0.2 mmol/L IPTG, 3: 0.4 mmol/L IPTG, 4: 0.6 mmol/L IPTG, 5: 0.8 mmol/L IPTG; B. induced expression of recombinant protein His-PP2A in *E. coli* BL21 (DE3) cells after induced for 6 h under different temperature a of recombinant protein. 1, 5: control, 2, 6: 30℃, 3, 7: 24℃, 4, 8: 10℃. Dotted box indicates location of His-PP2A.

过程中保持高度的稳定,可能是已知酶中最保守的 (Cohen *et al.*, 1990),其 C 端的 6 个氨基酸残基 (TPDYFL) 增强 C 亚基与结构亚基的结合 (Tolstykh *et al.*, 2000; Xing *et al.*, 2006),图 2 示与 PP2A 活性位点相关及与金属原子结合位点的氨基酸。我们认为可以将草地贪夜蛾 PP2A 作为研究斑蝥素等抑制剂的药物筛选靶标酶,用于杀虫剂的活性测定。选用这一靶标作用模型的优势在于,草地贪夜蛾具有已建立的无限细胞系 Sf9,获得的酶活性测定数据可以进一步与细胞毒性分析结果加以验证,从而建立一套完整的 PP2A 抑制剂的昆虫毒理学研究模式,对 PP2A 抑制剂进行活性

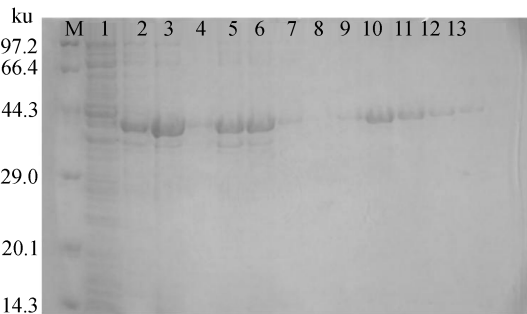


图 6 Ni-琼脂糖柱纯化溶解于尿素中的 PP2A-His
Fig. 6 Purification of PP2A-His dissolved in urea solution using Ni-agarose column

1: 裂解液上清;2,3:包涵体全蛋白;4,5:流穿液第 1、2 mL;6,7: 结合缓冲液第 1、2 mL;8: 20 mmol/L 咪唑漂洗液第 1 mL;9,13: 300 mmol/L 咪唑洗脱液第 1、2、3、4、5 mL;M: 蛋白质 marker。
1: supernatant of lysis solution;2,3: inclusion body protein; 4,5: flow binding buffer 1st mL, 2nd mL; 6, 7: native binding buffer 1st mL, 2nd mL;8: wash buffer (20 mmol/L imidazole) 1st mL;9 – 13: eluting buffer (300 mmol/L imidazole) 1st mL, 2nd mL, 3rd mL, 4th mL, 5th mL; M: marker.

评价,促进这一类药物结构优化与分子毒性评价、细胞毒性评价和生物测定等,如现有研究表明斑蝥素引起 S9 细胞膜显著去极化(汪丽等,2013)。

外源基因能否在大肠杆菌中正确表达,受到目的基因是否需要其它蛋白作进行分子修饰以及合适的诱导温度和时间等影响。在哺乳动物体内,PP2A 受到许多其它蛋白质的调节作用(Janssens and Goris,2001),如亮氨酸羧基甲基转移酶(leucine carboxyl methyltransferase, LCMT)可以甲基化修饰 C 端亮氨酸,参与调节 PP2A 核心酶与 B 亚基结合形成全酶(Kloeker *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2001)。修饰 C 端后可以实现 PP2A 的超表达(Wadzinski *et al.*, 1992),而直接转基因 PP2A 则无法实现高表达(Green *et al.*, 1987),PP2A 的表达严格受到翻译水平的调控(Baharians and Sch6nthal,1998)。草地贪夜蛾 PP2A 催化亚基的 C 端不具有亮氨酸,不受亮氨酸羧基甲基转移酶的调节作用,可能利于 PP2A 的表达。本研究首次探索了鳞翅目昆虫 PP2A 在大肠杆菌中的表达及纯化,但表达条件的研究尚有限,需要在今后研究中予以完善。在 *E. coli* 中表达的 PP2A 包涵体经 Ni-琼脂糖柱纯化后可以作为抗原获取 PP2A 抗血

清,为进一步研究昆虫 PP2A 基因的组织表达及亚细胞定位具有重要意义。

参考文献 (References)

Baharians Z, Sch6nthal AH, 1998. Autoregulation of protein phosphatase type 2A expression. *J. Biol. Chem.*, 273 (30):19019 – 19024.

Bajsa J, Pan Z, Dayan FE, Owens DK, Duke SO, 2012. Validation of serine/threonine protein phosphatase as the herbicide target site of endothall. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 102(1):38 – 44.

Chen X, Zhu X, Ding Y, Shen Y, 2011. Antifungal activity of tautomycin and related compounds against *Sclerotinia sclerotiorum*. *J. Antibiot.*, 64(8):563 – 569.

Cohen P, 2000. The regulation of protein function by multisite phosphorylation-a 25 year update. *Trends Biochem. Sci.*, 25(12):596 – 601.

Cohen PT, Brewis ND, Hughes V, Mann DJ, 1990. Protein serine/threonine phosphatases ; an expanding family. *FEBS Lett.*, 268: 355 – 359.

Deng LP, Dong J, Cai H, Wang W, 2013. Cantharidin as an antitumor agent: A retrospective review. *Curr. Med. Chem.*, 20(2):159 – 166.

Green DD, Yang SI, Mumby MC, 1987. Molecular cloning and sequence analysis of the catalytic subunit of bovine type 2A protein phosphatase. *PNAS*, 84(14):4880 – 4884.

Honkanen RE, 1993. Cantharidin, another natural toxin that inhibits the activity of serine/threonine protein phosphatases types 1 and 2A. *FEBS Lett.*, 330(3):283 – 286.

Hunter T, 1995. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*, 80 (2):225 – 236.

Janssens V, Goris J, 2001. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem. J.*, 353(Pt3):417 – 439.

Kelker, MS, Page R, Peti W, 2009. Crystal structures of protein phosphatase-1 bound to nodularin-R and tautomycin: a novel scaffold for structure-based drug design of serine/threonine phosphatase inhibitors. *J. Mol. Biol.*, 385(1):11 – 21.

Kloeker S, Bryant JC, Strack S, Colbran RJ, Wadzinski BE, 1997. Carboxymethylation of nuclear protein serine/threonine phosphatase X. *Biochem. J.*, 327(Pt2):481 – 486.

Lechward K, Awotunde OS, Swiatek W, Muszynska G,

2001. Protein phosphatase 2A: variety of forms and diversity of functions. *Acta Biochim. Polon.*, 48(4): 921–934.
- Matsuzawa M, Graziano MJ, Casida JE, 1987. Endothal and cantharidin analogs: relation of structure to herbicidal activity and mammalian toxicity. *J. Agricult. Food Chem.*, 35(5): 823–829.
- Maynes JT, Perreault KR, Cherney MM, Luu HA, James MN, Holmes CF, 2004. Crystal structure and mutagenesis of a protein phosphatase-1: calcineurin hybrid elucidate the role of the $\beta 12$ - $\beta 13$ loop in inhibitor binding. *J. Biol. Chem.*, 279(41): 43198–43206.
- Pereira SR, Vasconcelos VM, Antunes A, 2011. The phosphoprotein phosphatase family of Ser/Thr phosphatases as principal targets of naturally occurring toxins. *Crit. Rev. Toxicol.*, 41(2): 83–110.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28(10): 2731–2739.
- Tolstykh T, Lee J, Vafai S, Stock JB, 2000. Carboxyl methylation regulates phosphoprotein phosphatase 2A by controlling the association of regulatory B subunits. *EMBO J.*, 19(21): 5682–5691.
- Wadzinski BE, Eisfelder BJ, Peruski LF, Mumby MC, Johnson GL, 1992. NH₂-terminal modification of the phosphatase 2A catalytic subunit allows functional expression in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, 267(24): 16883–16888.
- Xing Y, Xu Y, Chen Y, Jeffrey PD, Chao Y, Lin Z, Strack S, Stock JB, Shi Y, 2006. Structure of protein phosphatase 2A core enzyme bound to tumor-inducing toxins. *Cell*, 127(2): 341–353.
- Xing Y, Li Z, Chen Y, Stock JB, Jeffrey PD, Shi Y, 2008. Structural mechanism of demethylation and inactivation of protein phosphatase 2A. *Cell*, 133(1): 154–163.
- Yu XX, Du X, Moreno CS, Green RE, Ogris E, Feng Q, Chou L, McQuoid MJ, Pallas DC, 2001. Methylation of the protein phosphatase 2A catalytic subunit is essential for association of Balph α regulatory subunit but not SG2NA, striatin, or polyomavirus middle tumor antigen. *Mol. Biol. Cell*, 12(1): 185–199.
- 曹微丹, 张志勇, 杨宝东, 张民照, 孙淑玲, 2008. 斑蝥素及去甲斑蝥素对七种植物病原真菌的抑制作用. 植物保护学报, 35(1): 63–68.
- 陈利平, 杨宝东, 张志勇, 张爱环, 张民照, 张来喜, 孙淑玲, 2011. 斑蝥素对小菜蛾体壁组织结构的影响. 应用昆虫学报, 48(6): 1779–1785.
- 刁绍东, 王菁, 顾明洁, 姜红霞, 周生久, 2003. 天然源农药 0.1% 斑蝥素水溶剂的应用技术. 农药, 42(8): 36–37.
- 汪丽, 张来喜, 张志勇, 杨宝东, 王进忠, 张爱环, 张民照, 2013. 斑蝥素对草地贪夜蛾 S9 细胞膜完整性和膜电位的影响. 昆虫学报, 56(5): 512–520.
- 张来喜, 杨宝东, 张民照, 王进忠, 张爱环, 张志勇, 2011. 斑蝥素诱导草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 卵巢细胞系 S9 凋亡的临界条件. 北京农学院学报, 24(2): 14–17.
- 张志勇, 袁锋, 1998. 斑蝥素对菜蛾的毒杀作用研究初报. 植物保护学报, 25(2): 166–170.
- 周晗颖, 杨宝东, 张民照, 王进忠, 张爱环, 张志勇, 2012. 斑蝥素与去甲斑蝥素对昆虫细胞 S9 抑制作用比较. 环境昆虫学报, 34(2): 154–160.