



研究论文

大蜡螟中类肽聚糖识别蛋白 Gm21 的鉴定、 基因克隆及序列分析*

石怀兴** 曾洪梅 邱德文***

(中国农业科学院植物保护研究所 农业部有害生物综合治理重点实验室 北京 100081)

摘要 为了调查毒素蛋白免疫下大蜡螟 *Galleria mellonella* L. 产生的免疫相关蛋白, 采用双向电泳的方法, 从大蜡螟血淋巴中鉴定得到一种昆虫肽聚糖识别蛋白 Gm21, 通过 RT-PCR、cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术克隆得到其全长基因, 该基因全长 cDNA 具有完整的编码框, 编码 211 个氨基酸, 序列分析表明该蛋白是一种具有潜在酰胺酶活性的 S 型肽聚糖识别蛋白。本研究中 Gm21 蛋白在免疫压力下的上调表达及其 cDNA 序列的克隆, 对进一步深入研究昆虫肽聚糖识别蛋白的功能具有重要的意义。

关键词 大蜡螟, 肽聚糖识别蛋白, 免疫

Identification, cDNA cloning and sequence analysis of a peptidoglycan-recognition-like protein Gm21 in *Galleria mellonella*

SHI Huai-Xing** ZENG Hong-Mei QIU De-Wen***

(Key Laboratory of Integrated Pest Management in Crops, Ministry of Agriculture, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract An investigation was made of the immune protein in *Galleria mellonella* L. that had been immune-challenged with toxic protein. A peptidoglycan-recognition protein, Gm21, in hemolymph of *G. mellonella* was identified by two dimensional (2-D) electrophoresis, and the encoding gene was cloned by RT-PCR and RACE. The full length cDNA has the complete open reading frame and encodes a protein of 211 amino acids. Sequence analysis indicated that the protein is a peptidoglycan-recognition protein (PGRP) -S-like protein with potential amidase activity. The increased expression of Gm21 protein in immune-challenged *G. mellonella* and molecular cloning of the Gm21 gene are important techniques for further study of peptidoglycan-recognition proteins.

Key words *Galleria mellonella*, peptidoglycan-recognition protein, immune

昆虫不像脊椎动物一样具有高度专一的获得性免疫系统, 先天性免疫系统是昆虫对侵入的病原体快速做出免疫应答的重要防线, 这也就意味着先天性免疫系统必须具有高效性。昆虫的先天性免疫反应由细胞免疫和体液免疫组成, 包括由血细胞介导的吞噬、包被反应, 多酚氧化酶的级联反应和抗菌肽 (AMPs) 的合成, 其中 AMP 的合成

与昆虫的 2 个信号途径 Toll/IMD 密切相关 (Tsakas and Marmaras, 2010)。

昆虫的脂肪体和血细胞能够分泌许多具有抗菌活性或者间接作用于免疫反应的血淋巴蛋白 (Kanost *et al.*, 2004), 在病原体 (质) 进入昆虫体内以后, 一些蛋白表达量明显增加, 比如包括肽聚糖识别蛋白 (peptidoglycan-recognition protein,

* 资助项目: 国家自然科学基金 (31071741)。

** E-mail: shx.344@163.com

*** 通讯作者, E-mail: dewenqiu@hotmail.com

收稿日期: 2012-02-28, 接受日期: 2012-07-07

PGRP)在内的模式识别蛋白(Zhu *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2006; Altincicek *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010)、抗菌肽(Verleyen *et al.*, 2006; Brown *et al.*, 2009)、铁代谢相关蛋白(Levy *et al.*, 2004; Altincicek *et al.*, 2007)、解毒酶(Bergin *et al.*, 2006; Altincicek *et al.*, 2007)等,这些蛋白的发现对深入了解昆虫的免疫反应有着至关重要的作用。

致病杆菌(*Xenorhabdus* spp.)是一种共生于昆虫病原斯氏线虫(*Steinernema* spp.)肠道内的革兰氏阴性菌,侵染期的线虫进入昆虫血腔以后,释放其肠道内携带的共生菌,共生菌在宿主血淋巴中快速繁殖并产生各种毒素蛋白和免疫抑制因子干扰甚至破坏昆虫的免疫系统,最终将其杀死(Goodrich-Blair, 2007)。我们从一株 *Xenorhabdus ehlersii* 致病杆菌中分离得到一种具有血腔毒性的蛋白 XeGroEL(Shi *et al.*, 2012),为了研究该蛋白引发的昆虫免疫反应,我们从 XeGroEL 免疫后的大蜡螟血淋巴中鉴定得到一个与免疫相关的类肽聚糖识别蛋白(PGRP),并克隆得到其编码基因,初步分析其序列特征,为研究其免疫功能奠定了坚实的基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

大蜡螟 *Galleria mellonella* L. 幼虫(~30 mg)为作者实验室饲养。

1.2 试剂

pH 3~10 NL 13 cm IPG 干胶条和两性电解质购自 GE 公司;TRIZol 购自 Invitrogen 公司;M-MLV 逆转录酶购自 Promega 公司;Anchored Oligo(dT) 18 Primer, dNTP, Ribonuclease Inhibitor, High Fidelity(HiFi)PCR SuperMix 均购自北京全式金公司;柱式 DNA 清除剂购自北京天恩泽公司;5'-FULL RACE Kit 购自 TaKaRa 公司;PCR 相关试剂及大肠杆菌感受态购自北京全式金公司;PMD 18-T Simple 克隆载体购自 TaKaRa 公司;DNA 凝胶回收及质粒提取试剂盒购自 Omega 公司;其他生化试剂均购自 Sigma 公司。

1.3 血淋巴蛋白样品的制备

大蜡螟用 75% 酒精消毒后,分别注入 5 μ L XeGroEL 蛋白和等量的 BSA,12 h 后剪开腹足,收

集血淋巴,每个样品至少取 5 头虫子,每个处理准备 3 个样品。收集的血淋巴双倍稀释于预冷的 PBS 中,轻轻混匀,短暂离心(1 000 $\times$ g, 2 min)后,将上清溶于 4 倍体积的水化上样液中,血淋巴总蛋白浓度用 2-D quant kit 测定。

1.4 蛋白质组及质谱分析

第一向等点聚焦和第二向 SDS-PAGE 分别在 Ettan IPGphor 3 等点聚焦电泳系统和 PROTEAN II xi cell 中进行。第一向等点聚焦,将 800 μ g 的血淋巴蛋白溶于适量水化上样液(7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 4% (w/v) CHAPS, 40 mmol/L DTT, 2% (v/v) IPG buffer, 痕量溴酚蓝)中至 250 μ L, 然后上样于等点聚焦槽中,放入 pH 3~10 NL 13 cm IPG 干胶条,覆盖矿物油,按如下条件完成等点聚焦:50 V, 12 h;500 V, 1 h;1 000 V, 1 h;8 000 V 至总功率为 20 kWh。第二向 SDS-PAGE(12%)电泳,于 30 mA/胶条电泳 4 h。银染染色后,用 Image Scanner III 扫胶成像, ImageMaster 2D Platinum 6.0 自动探测蛋白点并进行表达量差异分析(LSD 检验, $P < 0.05$)。

蛋白点的鉴定按文献(Qi *et al.*, 2010)的方法进行。将双向凝胶的蛋白点取下,胶内酶切消化后,经液相分离,在 Bruker REFLEX III MALDI-TOF-MS 质谱仪上进行肽指纹图谱分析,所得数据用 Mascot 程序在 NCBI 全动物基因组数据库中进行检索。

1.5 大蜡螟幼虫总 RNA 的提取

用液氮将已高温灭菌除 RNA 酶的研钵充分预冷,然后将 2 头大蜡螟幼虫放入液氮速冻并迅速研磨至粉末状,待液氮未挥发完全时加入 2 mL Trizol,继续研磨至粉末状,室温静置直至融化,然后将其转入离心管中,按 Trizol 使用说明书进行 RNA 的提取。按说明书用柱式 DNA 清除剂去除总 RNA 中残留的基因组 DNA,1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,Eppendorf biophotometer plus 核酸蛋白测定仪检测 RNA 的浓度及质量。

1.6 cDNA 第一链合成

按如下操作进行反转录合成 cDNA 第一链:RNA 4 μ L, Anchored Oligo(dT) 18 Primer 1 μ L, RNase-free 水 10 μ L,混匀后在 70 $^{\circ}$ C 水浴中保持 5 min 然后冰浴冷却,然后加入 M-MLV 5 $\times$ Reaction Buffer 5 μ L, dNTP 5 μ L, Ribonuclease Inhibitor 1

μL, M-MLV 反转录酶 200 units, 最后用 RNase-free 水加至 25 μL, 在 42℃ 孵育 60 min 完成反转录。-80℃ 保存备用。

1.7 5'RACE

按照 5'RACE 试剂盒的操作说明, 依次对大蜡螟的总 RNA 进行去磷酸化、去“帽子”、加接头和反转录反应。

根据 GenBank 中大蜡螟 PGRP (登录号: AM392402) 的 mRNA 3' 序列设计特异引物 pgrp-gsp1 和 pgrp-gsp2 (表 1) 用于 5'RACE 的 PCR 反应。

5'Outer PCR 反应: 取 RT 产物 3 μL, pgrp-gsp1 1 μL 等组分按比例配制 25 μL 反应体系, PCR 条件为 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min 进行 20 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

5' Inner PCR 反应: 取 5'Outer PCR 反应产物 1 μL, pgrp-gsp2 1 μL 等组分按比例配制 25 μL 反应体系, 设置 3 个不同的退火温度进行 PCR, 扩增条件为 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, (53.1, 55 和 57.7℃) 30 s, 72℃ 1 min 进行 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 回收目的条带, 连接 PMD 18-T 载体, 转化大肠杆菌 DH5α 感受态, 涂氨苄平板, 37℃ 过夜培养, 挑取单菌落并检测阳性克隆, 测序。

表 1 用于 5'RACE 和全长 PCR 反应的引物序列

Table 1 Primers for 5'RACE and full-length PCR

引物 Primers	引物序列 (5' - 3') Sequence (5' - 3')
pgrp-gsp1	CGGTGCTCGTACGTATGATGAATG
pgrp-gsp1	GAGCGTTATCAGTGGCCTCACATCT
pgrp-F	GATTGCAGCATAAACTGACGAAGTG
pgrp-R	CTATTGTGAGTTTTCCTCAAGGGC

1.8 Gm21 全长的克隆

根据 5'RACE 的结果, 拼接全长 cDNA 序列并设计上下游引物 pgrp-F 和 pgrp-R (Table 1) 进行全长基因的 PCR 克隆。

取 1.6 的反转录产物 1 μL, pgrp-F 1 μL, pgrp-R 1 μL, HIFI supermix 10 μL 配置 20 μL 体系, 设置 4 个不同的退火温度进行 PCR 反应。PCR 条件为 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, (59.8, 57.7, 55 和

51.8℃) 45 s, 72℃ 1 min 进行 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 回收目的条带, 连接 PMD 18-T 载体, 转化大肠杆菌 DH5α 感受态, 涂氨苄平板, 37℃ 过夜培养, 挑取单菌落并检测阳性克隆, 测序验证。

1.9 生物信息学分析

Plotorf 工具进行开放阅读框的预测, 根据 ORF 序列翻译出氨基酸序列, 用 SignalP 4.0 进行信号肽的预测, Tmap 工具进行跨膜区域的预测, 在 NCBI 网站进行 BLAST, 下载同源序列, DNAMAN 比对分析, 并用 MEGA 建立进化发育树。

2 结果与分析

2.1 双向电泳及质谱分析

用 BSA 或 XeGroEL 处理的大蜡螟血淋巴经双向电泳分离后, 扫描成像 (图 1: A, B), 用 ImageMaster 软件分析不同蛋白点在处理前后的表达量, 结果显示注射 XeGroEL 后 (图 1: B), 点 1 表达量上调至对照 (图 1: A) 的 6.16 倍。

挖取该点然后对其进行 PMF 一级质谱分析, 数据处理后进行 Mascot 检索, 结果显示质谱产生的 14 个肽段离子能够与已报道的大蜡螟 PGRP (GenBank 登录号: AM392402) 蛋白 C 端肽段匹配 (图 2)。

2.2 大蜡螟幼虫总 RNA 的提取

提取的大蜡螟幼虫总 RNA 经 DNase 处理后, 电泳检测显示 RNA 较为完整, A260/A280 为 1.916, 可以满足后续的反转录及 RACE 反应。

2.3 5'RACE PCR 反应

用外侧 pgrp-gsp1 引物进行第 1 次 PCR, 电泳检测没有出带, 接着我们用第一次的 PCR 产物和内侧 pgrp-gsp2 引物进行了第 2 次 PCR, 并设置了不同的退火温度, 电泳检测显示 3 个退火温度下出现了大小不同的 3 个条带 (图 2), 将 3 个条带分别回收连接载体, 测序结果显示只有 ~250 bp 的条带序列吻合。

2.4 Gm21 全长的克隆

我们根据拼接得到的 cDNA 全长设计了一对引物, PCR 未得到阳性结果。于是, 我们根据测序得到 5'UTR 序列设计了上游引物, 分别在 59.8, 57.7, 55 和 51.8℃ 退火, 其中在 57.7℃ 和 55℃ 退

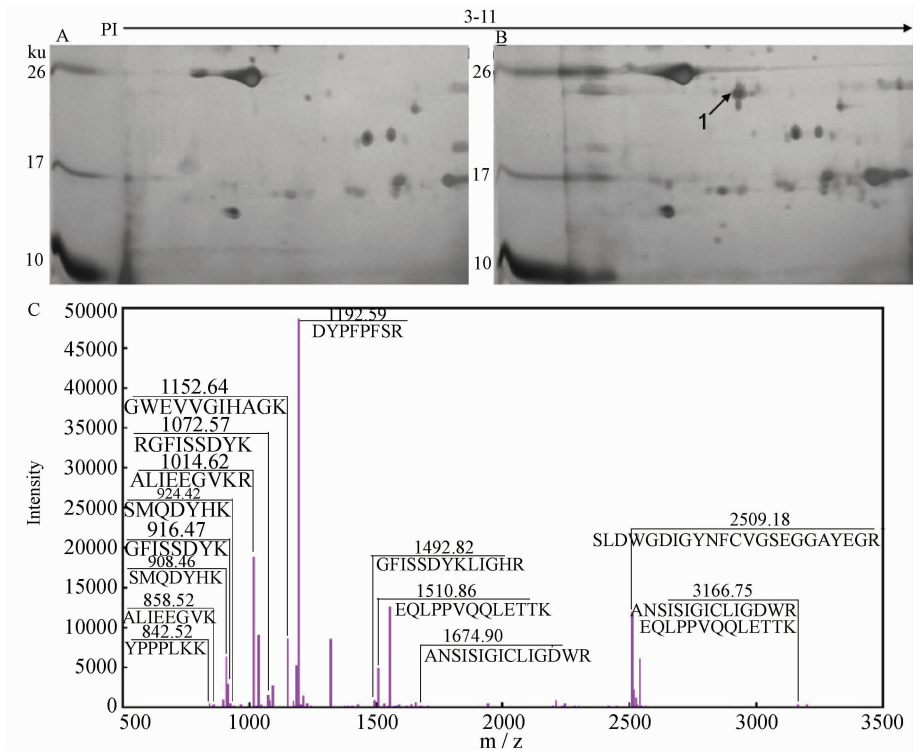


图 1 大蜡螟血淋巴的双向电泳分析和差异点的质谱鉴定

Fig.1 2-D PAGE analysis of proteins in cell-free hemolymph and spot identified by MALDI-TOF-MS

A:注射 BSA 的大蜡螟血淋巴总蛋白的双向电泳图;B:注射 XegroEL 的大蜡螟血淋巴总蛋白的双向电泳图;
C:表达上调蛋白点 1 的肽指纹图谱(PMF)分析。

A:2-D PAGE analysis of proteins in cell-free hemolymph from BSA-injected larva; B: 2-D PAGE analysis of proteins in cell-free hemolymph from XegroEL-injected larva; C: PMF of expression-increased spot 1.

火得到了 700 bp 左右的条带(图 3),回收目的条带,连接载体,测序结果显示为一段 672 bp 长的片段,测序结果与预期结果相符。

2.5 Gm21 基因的生物信息学分析

对克隆得到 Gm21 cDNA 全长进行拼接和开放阅读框分析得知,该序列具有 138 bp 的 5' UTR 序列,开放阅读框全长 636 bp,编码 211 个氨基酸,SignalP 4.0 预测前 23 个氨基酸为信号肽,Tmap 预测无跨膜区域,是一种分泌蛋白,成熟的 Gm21 蛋白共含有 188 个氨基酸,理论分子量为 21.15 ku,理论等电点为 6.29。该序列已上传至 GenBank(登录号:JQ687224)。

2.6 同源序列比对

NCBI 在线 BLAST 结果显示,Gm21 与其他鳞翅目昆虫的肽聚糖识别蛋白(PGRP)有 49% ~ 62% 的一致度,与鳞翅目外的昆虫肽聚糖识别蛋白的一致度≤51%。由于鳞翅目昆虫肽聚糖识别

蛋白的功能研究很少,所以我们从 BLAST 结果中选取已知功能的其他昆虫肽聚糖识别蛋白进行了序列的初步比对,分析发现,Gm21 与具有酰胺酶活性的 PGRP 相似度较高。为了进一步分析 Gm21 的序列特征,我们将 BLAST 结果中相似度较高且具有酰胺酶活性的 PGRP 与 4 种不具酰胺酶活性的 PGRP 一同进行了比对并建立了系统发育树,比对结果显示,Gm21 与 9 种具酰胺酶活性肽聚糖识别蛋白有 23 个一致的氨基酸残基,其中 5 个位点为酰胺酶活性所必须,其他 4 种不具有酰胺酶活性的 PGRP 不同时具有这 5 个氨基酸(图 4: A)。此外,系统发育树的结果显示,Gm21 与具有酰胺酶活性的 PGRP 处于同一分支的 Bootstrap 值要远高于不具酰胺酶活性的 Bootstrap 值(图 4: B)。

信号肽和跨膜区域预测发现,与 Gm21 处于同一分支的 PGRP 蛋白中,S 型蛋白具信号肽无跨膜区域,与 Gm21 相吻合,但 LB 型蛋白既无信号肽

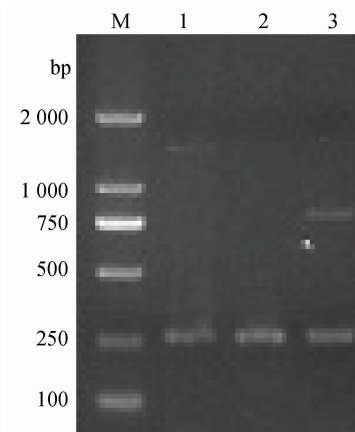


图 2 5'RACE inner PCR 扩增产物

Fig.2 PCR products of 5'RACE inner PCR with agarose gel electrophoresis analysis

M:DNA marker;1;53.1℃退火得到的 PCR 产物;2;55℃退火得到的 PCR 产物;3;57.7℃退火得到的 PCR 产物。

M: DNA marker;1:PCR products reannealed at 53.1℃; 2: PCR products reannealed at 55℃;3: PCR products reannealed at 57.7℃.

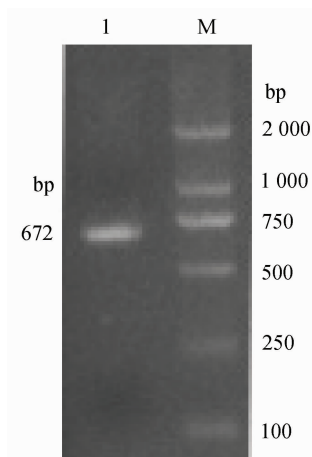


图 3 PGRP-LB full-length PCR 扩增产物

Fig.3 PCR products of PGRP-LB full-length PCR with agarose gel electrophoresis analysis

M:DNA marker;1;在 57.7 和 55℃退火所得目的条带回收后的 PCR 产物。

M:DNA marker; 1:DNA fragment extracted from PCR products reannealed at 57.7 and 55℃.

3 讨论

微生物表面存在一些与其生命活动有关的保守结构,称之为病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns,PAMPs),微生物侵入昆虫体内以后,昆虫的先天性免疫系统通过体内的受体对 PAMPs 进行识别来引发免疫反应 (Girardin and Philpott, 2004; Levin *et al.*, 2005; Guan and Mariuzza,2007)。

肽聚糖(PGN)作为所有细菌细胞壁的主要成分,是昆虫免疫系统重要的靶标分子 (Dziarski, 2004)。在昆虫体内,肽聚糖主要被肽聚糖识别蛋白(PGRPs)所识别,PGRPs 主要分为两类:PGRP-S (short)和 PGRP-L(long),不同的 PGRPs 具有不同的免疫活性。在果蝇中,PGRP-SA 和 PGRP-SD 能够识别细菌尤其革兰氏阳性菌的 PGN 并激活 Toll 途径,产生免疫因子和抗菌肽 (Michel *et al.*, 2001; Bischoff *et al.*, 2004);PGRP-LC 和 PGRP-LE 识别革兰氏阴性菌的 PGN,激活 IMD 途径 (Choe *et al.*, 2002; Takehana *et al.*, 2004; Kaneko *et al.*, 2006);PGRP-LB,PGRP-SC1 和 PGRP-SC2 具有酰胺酶活性的 PGRP 可以分解 PGN,对革兰氏阴性菌引发的 IMD 途径进行负向调控 (Bischoff *et al.*, 2006;Zaidman-Rémy *et al.*, 2006)。

本研究中,将来自于致病杆菌 *X. ehlersii* 的 XeGroEL 蛋白注射入大蜡螟血腔后,发现血淋巴中一个类 PGRP 蛋白(Gm21)表达量上调 6.16 倍,我们克隆得到其编码序列,经分析发现其具有信号肽,无跨膜区域,与已知的 PGRP-S 蛋白很相似 (Dziarski,2004);此外,活性位点分析表明 Gm21 具有潜在的酰胺酶活性 (Kim *et al.*, 2003),因此,我们推测 Gm21 是一种具有酰胺酶活性的 PGRP-S 蛋白。已知的具有酰胺酶活性的 PGRP 蛋白,在对昆虫 IMD 途径进行负调控的过程中起着重要的作用,大蜡螟在 XeGroEL 蛋白的免疫压力下可能引发 IMD 途径,Gm21 的上调削弱了这种免疫反应。目前在鳞翅目昆虫的肽聚糖识别蛋白中未见关于酰胺酶活性的描述。

我们尝试在大肠杆菌中表达 Gm21,未获成功;更换表达载体、改善诱导条件和突变某些碱基延长稀有密码子间的距离等策略均未得到重组蛋白。初步分析认为,表达产物可能对大肠杆菌细胞壁产生伤害不利于表达,也有可能转录本

亦无跨膜区域(数据未显示),由此我们推测 Gm21 是一种具有酰胺酶活性的 S 型肽聚糖识别蛋白。

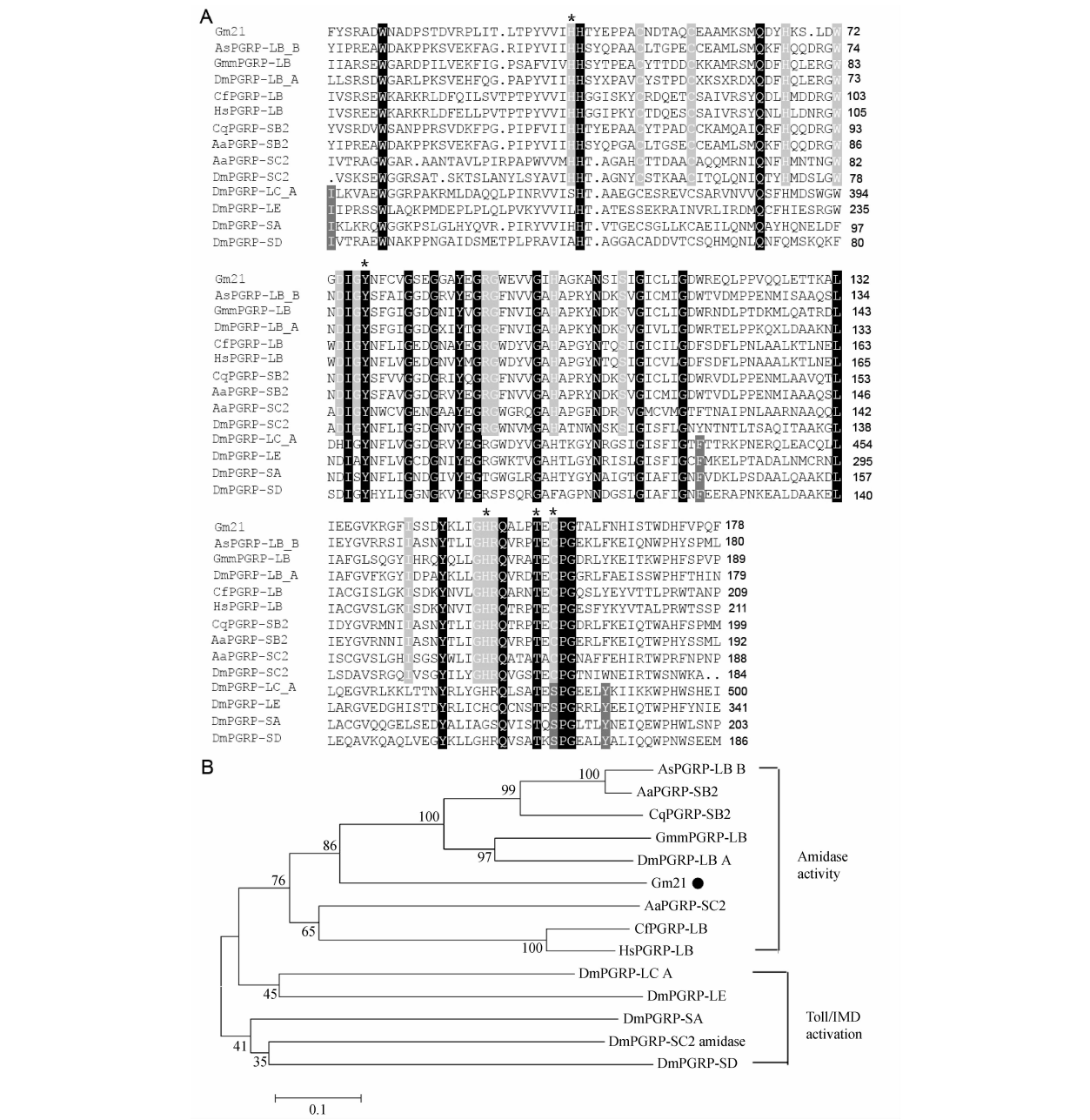


图 4 肽聚糖识别蛋白的序列比对 (A) 及系统发育树分析 (B)

Fig.4 Sequence alignment (A) and phylogenetic tree construction (B) of PGRPs

Gm:大蜡螟;As:骚扰阿蚊;Aa:埃及伊蚊;Cq:致倦库蚊;Dm:黑腹果蝇;Gmm:刺舌蝇;Cf:佛罗里达弓背蚊;Hs:印度跳蚊。A:PGRP 的序列比对。所有 14 个 PGRP 高度保守的氨基酸残基用黑色阴影标示,酰胺酶活性的 PGRP 保守残基用浅灰阴影标示,仅具识别功能的 PGRP 保守残基用深灰阴影标示,酰胺酶活性所必须的残基用星号标示。B:邻接法构建的 PGRPs 系统发育树,节点数值代表置信值。

Gm, *Galleria mellonella*; As, *Armigeres subalbatus*; Aa, *Aedes aegypti*; Cq, *Culex quinquefasciatus*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Gmm, *Glossina morsitans morsitans*; Cf, *Camponotus floridanus*; Hs, *Harpegnathos saltator*; A: sequence alignment of PGRP. The highly conserved residues among all PGRP proteins are shown in black, conserved residues present in the catalytic PGRPs and recognition PGRPs are shown in light gray and dark gray shadow, respectively. Residues required for amidase activity are indicated by a star. B: phylogenetic tree construction of PGRPs by Neighbor-Joining (NJ) method. Numbers at nodes indicate bootstrap values.

mRNA 存在复杂的二级结构导致不能表达,进一步的优化还在进行中。PGRP 蛋白在昆虫对病原微生物的免疫应答中起着非常重要的作用,对大蜡螟 PGRP 蛋白功能的深入研究将有助于进一步了解鳞翅目昆虫的免疫系统。

参考文献 (References)

- Altincicek B, Linder M, Linder D, Preissner KT, Vilcinskas A, 2007. Microbial metalloproteinases mediate sensing of invading pathogens and activate innate immune responses in the Lepidopteran model host *Galleria mellonella*. *Infect. Immun.*, 75(1):175–183.
- Bergin D, Murphy L, Keenan J, Clynes M, Kavanagh K, 2006. Pre-exposure to yeast protects larvae of *Galleria mellonella* from a subsequent lethal infection by *Candida albicans* and is mediated by the increased expression of antimicrobial peptides. *Microbes infect.*, 8(8):2105–2112.
- Bischoff V, Vignal C, Boneca IG, Michel T, Hoffmann JA, Royet J, 2004. Function of the *Drosophila* pattern-recognition receptor PGRP-SD in the detection of Gram-positive bacteria. *Nat. Immunol.*, 5(11):1175–1180.
- Bischoff V, Vignal C, Duvic B, Boneca IG, Hoffmann JA, Royet J, 2006. Downregulation of the *Drosophila* immune response by peptidoglycan-recognition proteins SC1 and SC2. *PLoS Pathog.*, 2(2):e14.
- Brown SE, Howard A, Kasprzak AB, Gordon KH, East PD, 2009. A peptidomics study reveals the impressive antimicrobial peptide arsenal of the wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39(11):792–800.
- Choe KM, Werner T, Stven S, Hultmark D, Anderson KV, 2002. Requirement for a peptidoglycan recognition protein (PGRP) in Relish activation and antibacterial immune responses in *Drosophila*. *Science*, 296(5566):359.
- Dziarski R, 2004. Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Mol. Immunol.*, 40(2):877–886.
- Girardin SE, Philpott DJ, 2004. The role of peptidoglycan recognition in innate immunity. *Eur. J. Immunol.*, 34(7):1777–1782.
- Goodrich-Blair H, 2007. They've got a ticket to ride: *Xenorhabdus nematophila*-*Steinernema carpocapsae* symbiosis. *Curr. Opin. Microbiol.*, 10(3):225–230.
- Guan R, Mariuzza RA, 2007. Peptidoglycan recognition proteins of the innate immune system. *Trends Microbiol.*, 15(3):127–134.
- Kaneko T, Yano T, Aggarwal K, Lim JH, Ueda K, Oshima Y, Peach C, Erturk-Hasdemir D, Goldman WE, Oh BH, 2006. PGRP-LC and PGRP-LE have essential yet distinct functions in the *Drosophila* immune response to monomeric DAP-type peptidoglycan. *Nat. Immunol.*, 7(7):715–723.
- Kanost MR, Jiang H, Yu XQ, 2004. Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *Immunol. Rev.*, 198(1):97–105.
- Kim MS, Byun M, Oh BH, 2003. Crystal structure of peptidoglycan recognition protein LB from *Drosophila melanogaster*. *Nat. Immunol.*, 4(8):787–793.
- Levin DM, Breuer LN, Zhuang S, Anderson SA, Nardi JB, Kanost MR, 2005. Ahemocyte-specific integrin required for hemocytic encapsulation in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35(5):369–380.
- Levy F, Bulet P, Ehret-Sabatier L, 2004. Proteomic analysis of the systemic immune response of *Drosophila*. *Mol. Cell. Proteomics*, 3(2):156–166.
- Michel T, Reichhart JM, Hoffmann JA, Royet J, 2001. *Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature*, 414(6865):756–759.
- Qi J, He P, Chen W, Wang H, Wang X, Zhang M, 2010. Comparative proteome study of apoptosis induced by As₄S₄ in retinoid acid resistant human acute promyelocytic leukemia NB4-R1 cells. *Leukemia Res.*, 34(11):1506–1516.
- Shi HX, Zeng HM, Yang XF, Zhao J, Chen MJ, Qiu DW, 2012. An insecticidal protein from *Xenorhabdus ehlersii* triggers prophenoloxidase activation and hemocyte decrease in *Galleria mellonella*. *Curr. Microbiol.*, 6(64):604–610.
- Song KH, Jung SJ, Seo YR, Kang SW, Han SS, 2006. Identification of up-regulated proteins in the hemolymph of immunized *Bombyx mori* larvae. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics*, 1(2):260–266.
- Takehana A, Yano T, Mita S, Kotani A, Oshima Y, Kurata S, 2004. Peptidoglycan recognition protein (PGRP)-LE and PGRP-LC act synergistically in *Drosophila* immunity. *EMBO J.*, 23(23):4690–4700.
- Tsakas S, Marmaras V, 2010. Insect immunity and its signalling: an overview. *Invertebrate Surv. J.*, 7:228–238.
- Verleyen P, Baggerman G, D'Hertog W, Vierstraete E, Husson SJ, Schoofs L, 2006. Identification of new immune induced molecules in the haemolymph of *Drosophila melanogaster* by 2D-nanoLC MS/MS. *J. Insect Physiol.*,

52(4):379–388.

Wang Q, Liu Y, He HJ, Zhao XF, Wang JX, 2010. Immune responses of *Helicoverpa armigera* to different kinds of pathogens. *BMC Immunol.*, 11(1):9.

Zaidman-Rémy A, Hervé M, Poidevin M, Pili-Floury S, Kim MS, Blanot D, Oh BH, Ueda R, Mengin-Lecreulx D, Lemaitre B, 2006. The *Drosophila* amidase PGRP-LB modulates the immune response to bacterial infection. *Immunity*, 24(4):463–473.

Zhu Y, Johnson T, Kanost M, 2003. Identification of differentially expressed genes in the immune response of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33:541–559.