研究论文

家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂 20 的表达特征分析*

张学义** 于 皓 张小娟 朱保建 魏国清
钱 岑 刘朝良 王 磊***
（安徽农业大学生命科学学院，合肥 230036）

摘 要 【目的】 原核表达家蚕 *Bombyx mori* 丝氨酸蛋白酶抑制剂 20（Serine proteinase inhibitor 20，BmSerpin-20），分析 BmSerpin-20 基因和蛋白组织表达分布特点，以及不同外源病原物刺激家蚕后 *BmSerpin-20* 基因的表达模式。**【方法】** 利用 pET-28a 表达载体在大肠杆菌 Transetta(DE3)中融合表达 BmSerpin-20 蛋白，利用纯化的重组蛋白作为抗原免疫新西兰大白兔制备多克隆抗体，利用实时定量 PCR 技术及 Western blot 方法分别分析 BmSerpin-20 基因和蛋白的组织表达水平，以及病原物免疫刺激后的表达模式。**【结果】** 在大肠杆菌中正确表达和纯化了融合 BmSerpin-20 蛋白，并制备了多克隆抗体；BmSerpin-20 基因和蛋白在脂肪体、中肠、血细胞、马氏管、表皮、睾丸、卵巢中均有表达，且在表皮中表达量最高；家蚕 5 龄幼虫经核型多角体病毒（Nuclear polyhedrosis viruses）、藤黄微球菌 *Micrococcus luteus*、大肠杆菌 *Escherichia coli*、白僵菌 *Beauveria bassiana* 处理后，*BmSerpin-20* 基因表达量先下调而后上调，但不同病原物在不同时间的影响不尽相同。**【结论】** 研究了 BmSerpin-20 基因和蛋白的表达模式，为下一步研究其在家蚕免疫系统中的作用奠定了基础。

关键词 家蚕，丝氨酸蛋白酶抑制剂，诱导表达，表达分析

Expression of serine protease inhibitor 20 in the silkworm, *Bombyx mori*

ZHANG Xue-Yi** YU Hao ZHANG Xiao-Juan ZHU Bao-Jian WEI Guo-Qing
QIAN Cen LIU Chao-Liang WANG Lei***
(School of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract [Objectives] To examine the expression of the *Bombyx mori* serine proteinase inhibitor 20 gene (BmSerpin-20) in *Escherichia coli*; and more specifically, to analyze its mRNA and protein expression levels in tissues, and its mRNA expression patterns in fat bodies after exogenous microorganism injection. **[Methods]** The *BmSerpin-20* gene was inserted into the pET-28a vector. Recombinant plasmids were transfected into *E. coli* Transetta (DE3), and expression of the BmSerpin-20 protein induced with IPTG. The recombinant BmSerpin-20 protein was employed as an antigen to immunize New Zealand rabbits and to prepare a polyclonal antibody serum. The expression patterns of BmSerpin-20 were analyzed using real-time quantitative PCR and the Western blot technique. **[Results]** The BmSerpin-20 protein was successfully expressed in *E. coli* cells, purified and a polyclonal antibody against BmSerpin-20 prepared. The BmSerpin-20 gene and protein were expressed in the fat body, midgut, hemocyte, malpighian, integument, testis, ovary, with the highest expression in the integument. After treatment of *B. mori* larvae with nuclear polyhedrosis viruses, *Micrococcus luteus*, *E. coli* or *Beauveria bassiana*, the expression patterns of the *BmSerpin-20* gene in the fat body was first down-regulated and then up-regulated. The

* 资助项目 Supported projects：现代农业产业技术体系建设专项基金 (CARS-22-SYZ10)；安徽省自然科学基金项目(1308085QC60)；安徽农业大学引进和稳定人才项目(YJ2013-8)

**第一作者 First author，E-mail：zhangxueyiniu@126.com
***通讯作者 Corresponding author，E-mail：wanglei20041225@163.com

收稿日期 Received：2014-11-06，接受日期 Accepted：2015-03-19

expression level of *BmSerpin-20* differed depending on the microorganism injected and injection time. **[Conclusion]** The expression pattern of *BmSerpin-20* was successfully studied and may lay a foundation for further research on the function of this gene in the immune system of *B. mori*.

Key words *Bombyx mori*, serine protease inhibitor, induced expression, expression analysis

根据氨基酸序列及蛋白结构不同，蛋白酶抑制剂一般被分为 4 类：丝氨酸蛋白酶抑制剂（Serine proteinase inhibitor）、半胱氨酸类蛋白酶抑制剂、天冬氨酸类蛋白酶抑制剂和金属蛋白酶抑制剂（Izaguirre *et al.*，2009），其中丝氨酸蛋白酶抑制剂研究最为广泛。丝氨酸蛋白酶抑制剂由古代抑制剂趋性进化 5 亿年衍变而来（张梅等，1996），大约有 1 500 种，广泛存在于动物、植物、细菌、病毒、真菌等生物体中，参与调节生物体内蛋白质折叠、细胞迁移、补体激活、细胞组织重建与肿瘤抑制等多种重要生命过程（Irving *et al.*，2002；Law *et al.*，2006）。

丝氨酸蛋白酶抑制剂根据序列相似性及结构的特点，可以分为 Kunitz 型、Kazal 型、Bowman-Birk 及 Serpin 型等 10 多个家族。其中，Serpin 型丝氨酸蛋白酶抑制剂研究的比较多。Serpin 是一类单肽链球状蛋白质，是一族结构、序列同源的蛋白酶抑制剂，分子量一般为 40~50 ku，由 350~500 个氨基酸残基组成，各种 Serpin 间有一段 370~390 个氨基酸的保守区，在羧基末端有一段 30~40 个氨基酸的可变区。Serpin 有一高度保守的三维结构，由 8~9 个 α 螺旋和 3 个 β 折叠构成，在 β 折叠端有一个一般由 17 个氨基酸残基构成的活性螺旋中心（Reactive center loop，RCL），RCL 位于 p1 和 p1′之间，呈一种展开，暴露构象，是蛋白质结合和裂解位点（Molnar *et al.*，2001；Silverman *et al.*，2001；Diana *et al.*，2003；Izuhar *et al.*，2008）。

在昆虫烟草天蛾 *Manduca sexta* 中，几种 *serpins* 基因证实参与了体内的先天性免疫反应。幼虫在微生物刺激后，血淋巴中 *serpin-3* 表达量显著上调，它能够抑制 PAPs 从而阻止 proPO 的激活而发挥免疫作用（Zhu *et al.*，2003）。血淋巴中 *MsSerpin-4* 和 *MsSerpin-5* 在脂多糖（Lipopolysaccharide，LPS）刺激后其表达量都显著上调，其表达产物与丝氨酸蛋白酶 HP1 和 HP6 形成共价复合物阻止了蛋白酶的级联反应，抑制黑化反应从而发挥免疫效应（Tong *et al.*，2005）。

对家蚕 *Bombyx mori serpins* 基因的研究主要涉及到 *serpin-2*、*serpin-4*、*serpin-5*、*serpin-6*、*serpin-16* 等基因。Pan 等（2009）研究家蚕 *serpin-2* 基因在家蚕 5 龄幼虫各组织中均有表达，在家蚕的先天性免疫中发挥重要作用。查宏贤等（2011）利用基因重组技术构建了 *serpin-4* 原核表达载体，获得了原核表达重组融合蛋白。李国胜等（2013）发现家蚕 *serpin-5* 基因在家蚕 5 龄幼虫精巢、卵巢中表达量较高，在中肠、丝腺、马氏管、脂肪体中表达量较低。刘衬丽等（2009）检测家蚕 *serpin-6* 基因在家蚕幼虫的头部和生殖腺中转录水平较高，在中肠、丝腺等组织中转录水平较低，还发现家蚕幼虫经脂多糖（Lipopolysaccharide，LPS）刺激后，*serpin-6* 基因在脂肪体的转录水平显著上调。董照明等（2010）发现家蚕 *serpin-16* 基因在幼虫 4~5 龄的丝腺中特异表达显著，推测其能够维持机体泌丝环境的稳定。Tanaka 等（2008）发现家蚕 *serpins* 基因经不同种类的外源细菌刺激后基因调控存在差异，表明家蚕具有针对不同细菌种类的高度选择性的基因调控机制。家蚕缺少后天性免疫系统，但有一种复杂的先天性免疫系统用于抵抗外界微生物的入侵，这些先天性免疫系统包括体液和细胞免疫反应、抗菌肽、酚氧化酶、吞噬作用、黑化反应等（Wan *et al.*，2013）。

家蚕是重要的经济昆虫，是鳞翅目昆虫的模式生物，也是完成全基因组测序的少数鳞翅目昆虫之一，但目前对于家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂基因的研究尤其是对其功能研究还不多。本研究通过对 *BmSerpin-20* 基因进行克隆、双酶切、构建原核表达载体，诱导表达和纯化 BmSerpin-20 蛋白，制备多克隆抗体，分析 BmSerpin-20 组织表达水平，并检测经过不同微生物感染家蚕幼虫

后脂肪体 *BmSerpin-20* 基因表达水平，以期为深入研究家蚕 *BmSerpin-20* 基因的生物学功能奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料与主要试剂

试验家蚕品种为安徽农业大学蚕学教研室保存的滞育多化性品种大造（P50）。

AxyPrep™ Plasmid Miniprep Kit 和 AxyPrep™ DNA Gel Extraction Kit 购自康宁生命科学（吴江）有限公司；PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit，Trizol Reagent，RT-PCR Kit，pMD-19T，*BamH* I 和 *Xho* I，SYBR® Premix Ex *Taq*™试剂盒等购自大连宝生物公司（TaKaRa）；PVDF 膜购自上海玉博生物科技有限公司；Trans1-T1、Transetta（DE3）、Anti-His 抗体购自全式金生物技术（北京）公司；DAB 显色试剂盒、SDS、Glycine、IPTG、考马斯亮蓝、Tris 等购自生工生物工程（上海）股份有限公司。其他生化试剂均为国产分析纯。所有引物合成及 DNA 序列测定由生工生物工程股份有限公司完成。

1.2　总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

取 0.2 g 家蚕脂肪体用 RNase free dH_2O 清洗后，加入液氮充分研磨，采用 TRizol RNAiso Plus 试剂盒法提取 RNA。分别用琼脂糖凝胶电泳和分光光度计检测提取的脂肪体总 RNA，－80℃保存备用。提取的总 RNA 经过 DNase I 消化后，按照 TaKaRa Prime Script™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒操作要求进行第 1 链 cDNA 的合成，制备的第 1 链 cDNA 用于 PCR 克隆。

1.3　*BmSerpin-20* 基因原核表达载体的构建

根据 NCBI 文库中的 *BmSerpin-20* 基因序列（GenBank 登录号：EU935621），利用 Primer Premier 5.0 软件设计 PCR 引物，用以扩增 *BmSerpin-20* 基因的开放阅读框片段（Open reading frame，ORF），其中开放阅读框已去掉信号肽片段。引物序列为 F（5′-CGGGATCCACAGACAACCAAACACTACGAGAAT-3′）和 R（5′-CCGCTCGAGCTAGGACTGCACAGCCATG-3′），下划线部分分别为限制酶 *BamH* I 和 *Xho* I 酶切位点。PCR 反应体系（25 μL）为：模板 cDNA 1 μL，上下游引物各 1 μL，10×PCR buffer 2.5 μL，dNTP 1 μL，Taq 聚合酶 0.3 μL，ddH_2O 18.2 μL。PCR 扩增程序为：94℃预变性 5 min；94℃变性 30 s，60℃退火 30 s，72℃延伸 60 s，共 35 个循环；最后 72℃延伸 10 min。PCR 产物经凝胶电泳检测后，利用胶回收试剂盒回收，测序鉴定。

PCR 扩增产物与 pMT-19T 载体连接，转化 *E. coli* Trans1-T1，筛选阳性克隆进行扩大培养并抽提质粒，质粒经限制酶 *BamH* I and *Xho* I 双酶切并鉴定后与 pET-28a（+）载体连接构建重组质粒，并由琼脂糖凝胶电泳和测序鉴定。

1.4　重组 *BmSerpin-20* 基因的原核表达

将重组质粒 pET-Serpin-20 转化 *E. coli* Transetta（DE3），挑选阳性克隆，37℃扩大培养至 OD_{600}=0.5，第一组菌液不加 IPTG 作为对照，第二组菌液分别加入终浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mmol/L 的 IPTG。37℃振荡培养 4 h 后离心收集菌体，用 12%分离胶进行 SDS-PAGE 电泳检测蛋白表达情况。

1.5　重组 BmSerpin-20 蛋白的 Western blot 检测

用 12%分离胶进行 SDS-PAGE 电泳分离诱导表达产物后，负极至正极依次放置滤纸-凝胶-PVDF 膜-滤纸，在转移缓冲液中 200 mA、2 h 转膜，PVDF 膜在封闭液（TBST 溶液+5%脱脂奶粉）中 37℃摇床孵育 2 h，TBST 溶液洗膜 4 次，每次 5 min，用稀释后（稀释比例 1∶2 000）的鼠抗 Anti-His 抗体 37℃摇床中孵育 2 h，TBST 溶液洗膜 4 次，每次 5 min，再用 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体（稀释比例 1∶1 000）37℃摇床中孵育 2 h，TBST 溶液洗膜 4 次，每次 5 min。使用

超敏型辣根过氧化氢酶 DAB 显色试剂盒进行显色。

1.6 重组 BmSerpin-20 蛋白的纯化与多克隆抗体的制备

离心收集大量诱导的菌体，用 Equilibration Bufer（50 mmol/L sodium phosphate，300 mmol/L NaCl，20 mmol/L imidazole；pH 7.4）重悬，经超声波细胞破碎仪破碎后离心收集沉淀和上清。检测目的蛋白在包涵体和上清中的表达。沉淀用 Equilibration buffer（50 mmol/L sodium phosphate，300 mmol/L NaCl，8 mol/L urea；20 mmol/L imidazole；pH 7.4）再次重悬，离心后上清加入亲和柱 His60 Ni，用 Washing buffer（50 mmol/L sodium phosphate，8 mol/L urea，300 mmol/L NaCl，40 mmol/L imidazole；pH 7.4）清洗杂蛋白，最后用 Elution buffer（50 mmol/L sodium phosphate，8 mol/L urea，300 mmol/L NaCl，300 mmol/L imidazole；pH 7.4）洗脱蛋白，用 12% 分离胶进行 SDS-PAGE 电泳检测纯化的蛋白。

将纯化的蛋白送至杭州华安生物技术公司，由华安生物技术公司进行兔多克隆抗体制备与血清抗体滴度检测工作。

1.7 BmSerpin-20 基因和蛋白组织表达分析

在 DEPC 水中解剖家蚕 5 龄第 3 天幼虫，分别取家蚕脂肪体、表皮、血细胞、中肠、马氏管、卵巢、睾丸组织，分别按照方法 1.2 反转录成 cDNA。按照方法 1.3 和 Real-time PCR 引物设计要求设计引物 QF（5′-TTTTCACGAGCAGCAAAGTG-3′）和 QR（5′- TTCCCTTGGTCTATGGCTTG-3′），并以家蚕 *Actin 3* 基因（GenBank 登录号：U49854）作为内参基因，设计内参引物 AF（5′-CCATCTACGAGGGATACGC-3′）和 AR（5′-TCGGCAGTGGTAGTGAACG-3′）。采用 SYBR® Premix Ex Taq™试剂盒测定目的基因表达的 *Ct* 值，数据分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值法（纪东和辛绍杰，2009），利用 SPSS Statistics 17.0 软件进行显著性分析，其中多重比较采用 Tukey 法，并用 Excel 软件绘图。实时荧光定量 PCR 反应体系（20 μL）：SYBR premix 10 μL，模板 cDNA 1 μL，上、下游引物各 1 μL，RNase free dH_2O 7.4 μL。反应程序为 94℃ 30 s；94℃ 10 s，60℃ 30 s，72℃ 30 s，共 39 个循环；94℃ 5 s，60℃ 30 s；50℃ 30 s。每个样品做 3 个重复。荧光定量 PCR 仪器为 BIO-RAD 公司 CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System。

分别取家蚕脂肪体、表皮、血细胞、中肠、马氏管、卵巢、睾丸组织，研磨提取总蛋白，利用 SDS-PAGE 和 Western blot 方法检测 BmSerpin-20 蛋白在各组织的表达情况。实验组用制备的 BmSerpin-20 多克隆抗体作为一抗（稀释比例 1∶500），羊抗兔 IgG 抗体作为二抗（稀释比例 1∶1 000）。内参照蛋白选取微管蛋白，一抗为鼠 β-Tubulin 单克隆抗体（稀释比例 1∶3 000），二抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体（稀释比例 1∶1 000），并按照方法 1.5 进行组织 Western blot 分析。

1.8 不同微生物诱导家蚕幼虫 *BmSerpin-20* 基因的表达研究

取家蚕 5 龄第 3 天幼虫 120 头，随机分成 5 等组，依次注射经过灭活处理的核型多角体病毒（注射 10 μL，终浓度 10^6 个病毒/幼虫）、白僵菌（注射 10 μL，终浓度 10^6 个菌体/幼虫）、藤黄微球菌（注射 10 μL，终浓度 10^6 个菌体/幼虫）、大肠杆菌（注射 10 μL，终浓度 10^6 个菌体/幼虫），以注射 10 μL PBS 组作为内参对照，用无菌微量注射器从家蚕第 1 腹节处注射，室温孵育。在注射后 1、4、8、12 h 分别取其脂肪体。按照方法 1.2 提取总 RNA，反转录第 1 链 cDNA，并按照方法 1.7 中设计的引物、反应体系和仪器进行实时荧光定量 PCR，并利用 SPSS Statistics 17.0 软件进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 *BmSerpin-20* 基因克隆及重组表达载体的鉴定

通过 PCR 扩增获得大小约 1 100 bp 的片

段（图 1：A），与理论片段（1 149 bp）大小一致。

重组质粒转入 *E. coli* Transetta（DE3），挑选的阳性克隆命名为 pET-BmSerpin-20。重组质粒经限制酶 *BamH* I 和 *Xho* I 双酶切后得到两个片段：pET-28a (+)与目的基因（图 1：B），证明成功构建了重组质粒。

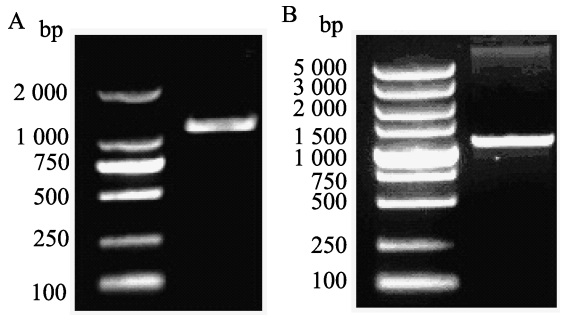

图 1　*BmSerpin-20* 基因 PCR 扩增结果（A）与重组质粒 pET-BmSerpin-20 的双酶切鉴定（B）

Fig. 1　PCR product of *BmSerpin-20* gene (A) and restriction enzyme digestion of recombinant plasmid pET-BmSerpin-20 (B)

2.2　重组 BmSerpin-20 蛋白的诱导表达

将重组质粒 pET-BmSerpin-20 转化 *E. coli* Transetta（DE3），菌液中加入不同浓度的 IPTG 诱导蛋白的表达，以未诱导菌体和空载菌体作为对照，各样品用 12%分离胶进行 SDS-PAGE 电泳，检测结果如图 2 所示，重组蛋白分子量约为 47 ku，IPTG 浓度对蛋白表达影响不显著。

采用 His-tag 单克隆抗体对表达的重组蛋白进行 Western blot 检测（图 2），能够检测到诱导的菌体产生了约 47 ku 的目的蛋白条带，可见 BmSerpin-20 蛋白在大肠杆菌中成功表达。

2.3　重组 BmSerpin-20 蛋白的纯化

蛋白纯化检测结果显示在大小约为 47 ku 处有单一且清晰的条带（图 3），说明纯化的蛋白纯度和浓度均较高。

2.4　*BmSerpin-20* 基因的组织表达分析

实时荧光定量结果表明 *BmSerpin-20* 基因在 5 龄第 3 天幼虫睾丸、卵巢、表皮、血细胞、脂

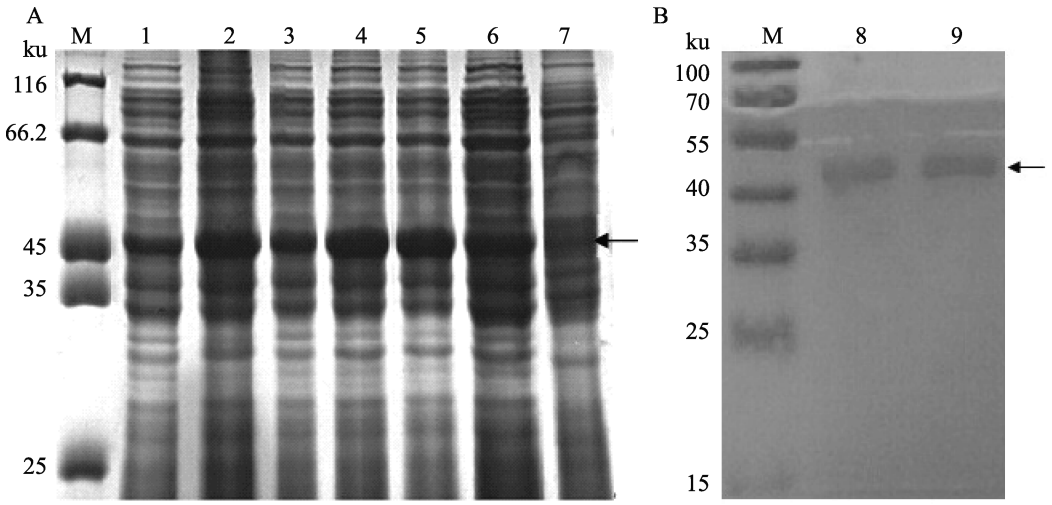

图 2　重组 BmSerpin-20 蛋白表达的 SDS-PAGE（A）与 Western blot（B）检测

Fig. 2　SDS-PAGE (A) and western blot (B) analysis of recombinant BmSerpin-20 protein

M：标准蛋白分子质量；1：未诱导的重组蛋白；2~6：IPTG 终浓度分别为 0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mmol/L 诱导的重组蛋白；7：空载体 pET-28a(+)转化 *E. coli* Transetta（DE3）；8：未经 IPTG 诱导的蛋白样品；9：IPTG 诱导的蛋白样品。

M: Standard protein molecular weight; 1: Recombinant protein un-induced by IPTG; 2-6: Recombinant protein after induction with 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1.0 mmol/L IPTG, respectively; 7: *E. coli* Transetta (DE3) transformed with empty vector pET-28a(+); 8: Sample protein un-induced by IPTG; 9: Sample protein induced by IPTG.

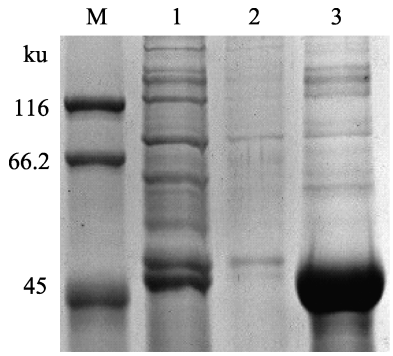

图 3 重组 BmSerpin-20 蛋白的纯化
Fig. 3 Purification of recombinant BmSerpin-20 protein

M：标准蛋白分子质量；1：Equilibration buffer 洗脱蛋白；2：Washing buffer 洗脱蛋白；3：Elution buffer 洗脱蛋白。

M: Protein molecular weight marker; 1: Proteins eluted with equilibration buffer; 2: Proteins eluted with washing buffer; 3: Proteins eluted with elution buffer.

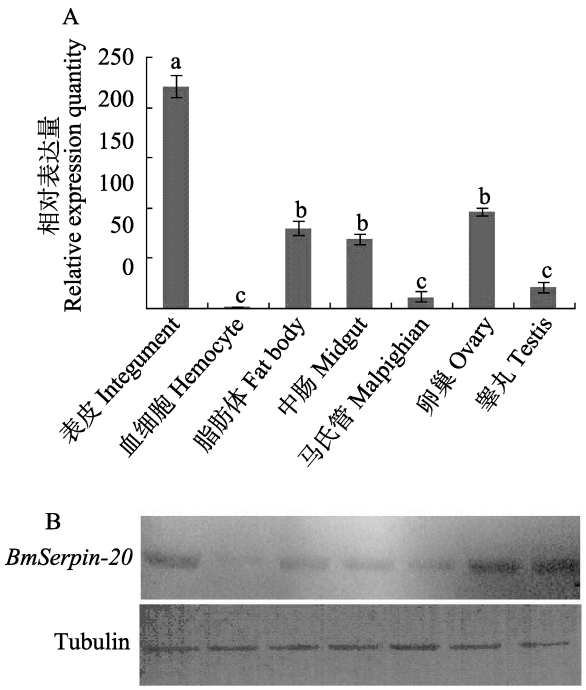

图 4 *BmSerpin-20* 基因在不同组织中的表达
Fig. 4 Expression of *BmSerpin-20* gene in different tissues

柱上标有不同字母表示差异显著（$P<0.05$），采用 Tukey 多重比较检验法比较。图 5 同。

Histograms with different letters indicate significant different at 0.05 level ($P<0.05$) by Tukey's multiple-range test. The same in Fig. 5.

肪体、中肠和马氏管中均有表达，在表皮中表达量最高，其次是卵巢、脂肪体和中肠，在睾丸、马氏管和血细胞中表达量最低（图 4：A）。Western blot 结果表明 BmSerpin-20 蛋白在组织中的分布与基因分布基本一致（图 4：B）。BmSerpin-20 在表皮和卵巢中表达量高，可能参与了表皮的防护功能以及昆虫生殖系统。

2.5 不同微生物诱导家蚕幼虫脂肪体 *BmSerpin-20* 基因的表达分析

家蚕幼虫经核型多角体病毒、藤黄微球菌、大肠杆菌、白僵菌处理后脂肪体中 *BmSerpin-20* 基因的表达量均先下调而后上调，与对照相比下调均不显著，上调的时间不同（图 5）。核型多角体病毒在注射后 8 h，*BmSerpin-20* 基因表达量显著上升，12 h 后又降低（图 5：A）；藤黄微球菌处理 12 h 后，*BmSerpin-20* 基因表达量显著上升（图 5：B）；大肠杆菌处理 8 h 后，*BmSerpin-20* 基因表达量显著上升，12 h 又下降（图 5：C）、白僵菌处理 4 h 后 *BmSerpin-20* 基因的表达上调，到 8 h 后显著升高，后又降低（图 5：D）。不同病原物在不同时间对脂肪体 *BmSerpin-20* 基因的表达影响不同，但都能诱导 *BmSerpin-20* 基因的表达，推测 *BmSerpin-20* 基因可能参与了对外源病原物的免疫反应。

3 讨论

本研究利用荧光定量 PCR 表明 *BmSerpin-20* 基因在 5 龄幼虫的表皮、卵巢中表达量最高，其次是脂肪体。王彦云等（2013）发现家蚕 *serpin*-6 mRNA 在 4 龄家蚕幼虫表皮的转录水平最高，推测其与黑化反应有关。昆虫的丝氨酸蛋白酶抑制剂能够介导和调节 PPO 系统与其他有关防御的蛋白酶水解级联，参与 PPO 级联的负调节机制，在时间和空间上严格控制 PPO 的活化，调节昆虫黑色素合成，使昆虫黑色素合成处于平衡状态，既有利于消灭入侵物，又能防止血细胞过度自溶，发挥重要而特殊的先天免疫防御机制（徐亚玲和李文楚, 2010）。Barbour 等（2012）发现

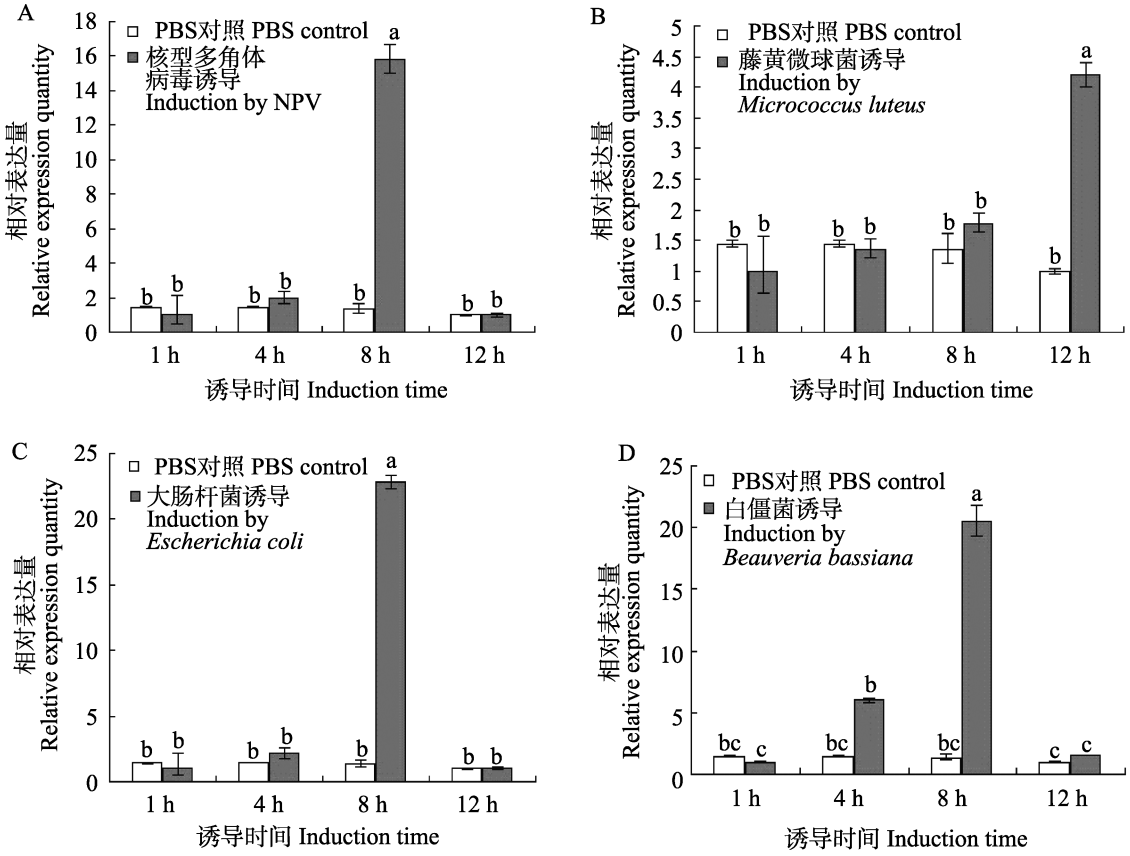

图 5　不同微生物诱导家蚕幼虫脂肪体 ***BmSerpin-20*** 基因的表达分析

Fig. 5　Expression analysis of *BmSerpin-20* gene in fat body induced by different microbes

雄性果蝇辅助性腺中的丝氨酸蛋白酶抑制剂 *Acp76A* 基因，具有调节辅助性蛋白的水解和防止精液凝集的重要功能。

目前关于家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂的表达调控，基因功能及其昆虫免疫的研究集中在以脂多糖或者细菌作为诱导物的昆虫免疫反应，而对利用病毒及真菌诱导昆虫免疫反应的研究较少。本研究通过给家蚕幼虫注射核型多角体病毒、藤黄微球菌、大肠杆菌及白僵菌，检测分析家蚕幼虫脂肪体中 *BmSerpin-20* 基因的表达变化。荧光定量 PCR 分析表明核型多角体病毒、白僵菌及大肠杆菌处理家蚕后 *BmSerpin-20* 基因表达量均先下调，这可能是因为注射的外源病源物短暂的抑制了家蚕的免疫效应，但 *BmSerpin-20* 基因表达量随之上调，可能其表达产物参与一系列化学反应消灭外源物，在后期表达量下调，可能是因为外源物的减少或者被消灭，*BmSerpin-20* 基因表达量随之降低。Zhao 等（2012）发现家蚕 *serpin-6*、*serpin-11*、*serpin-28*、*serpin-37*、*serpin-39*、*serpin-45*、*serpin-46*、*serpin-47* 基因经 *E. coli* 诱导后 24 h 基因表达量显著上调，家蚕 *serpin-16*、*serpin-55*、*serpin-70* 经 NPV 诱导后 6 h 基因表达量在内显著上调，而家蚕 *serpin-37*、*serpin-39*、*serpin-45*、*serpin-46*、*serpin-48*、*serpin-49* 基因经 NPV 处理后 3~12 h 基因表达量显著下调。此外，家蚕幼虫经革兰氏阴性菌的藤黄微球菌的诱导组脂肪体中该 *BmSerpin-20* 基因表达上调幅度整体小于经革兰氏阳性菌的大肠杆菌诱导组。刘建涛等（2006）发现天蚕素类抗菌谱对革兰氏阴性菌抗菌活性比对革兰氏阳性菌较强。荧光定量 PCR 分析结果还发现家蚕幼虫经真菌类的白僵菌诱导后脂肪体中 *BmSerpin-20* 基因表达上调显著，但持续时间较短，而细菌类的藤黄微球菌导后的该基因

表达上调不显著，反应持续时间也较长。但到目前为止，关于抗真菌肽的作用机制，抗真菌机制与抗细菌机制的异同，以及这两种机制是否存在相关性还有待于进一步研究。

参考文献 (References)

Barbour KW, Goodwin RL, Guillonneau F, Wang Y, Baumann H, Berger FG, 2012. Functional diversification during evolution of the routine alphal-proteinase inhibitor family: role of the hypervariable reactive center loop. *Mol. Biol. Evol.*, 19(5): 718–727.

Diana VG, Paul S, Kevin M, Noor K, 2003. Serpin: structure, function and molecular evolution. *Biochem. Cell Biol.*, 35(11): 1536–1547.

Dong ZM, Zhao P, Wang LY, Li YS, Zhang Y, Xia QY, 2010. Expression pattern in vitro recombination and expression of *Bombyx mori* serine protease inhibitor gene serpin16. *Acta Sericologica Sinica*, 36(2): 236–242. [董照明, 赵萍, 王凌燕, 李游山, 张艳, 夏庆友, 2010. 家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 *serpin*16 的表达规律及体外重组表达. 蚕业科学, 36(2): 236–242.]

Irving JA, Steenbakkers PJ, Lesk AM, Opdencamp HJM, Pike RN, Whisstock JC, 2002. Serpins in prokaryotes. *Mol. Biol. Evol.*, 19(11): 1881–1890.

Izaguirre G, Rezaie AR, Olson ST, 2009. Engineering functional antithrombin exosites in alpha(1)-Proteinase inhibitor that specificallypromote the inhibition of factor Xa and factor IXa. *J. Biol. Chem.*, 284(3): 1550–1558.

Izuhar K, Ohta S, Kanaji S, Apima K, 2008. Recent progress in understanding the diversity of the human ov-Serpin/cladeB Serpin family. *Cell Mol. Life Sci.*, 65(16): 2541–2553.

Ji D, Xin SJ, 2009. Development and data analysis of real-time fluorescent quantitative PCR. *Letters in Biotechnology*, 20(4): 598–600. [纪东, 辛绍杰, 2009. 实时荧光定量 PCR 的发展和数据分析. 生物技术通讯, 20(4): 598–600.]

Law RH, Zhang QW, Mcgowan S, Buckle AM, Silverman GA, Wong W, Rosado C, Langendorf CG, Pike RN, Bird PI, Whisstock JC, 2006. An overview of the *serpin* super family. *Genome Biol.*, 7(5): 216–220.

Li GS, Wang YY, Wang MH, Xu KZ, Chen YH, Shen WD, 2013. Preparation of polyclonal antibody and tissues expression analysis of *Bombyx mori* serine protease inhibitor 5. *Acta Sericologica Sinica*, 39(2): 261–265. [李国胜, 王彦云, 王明慧, 徐开遵, 陈玉华, 沈卫德, 许雅香, 2013. 家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂 5 的多抗体制备及组织表达分析. 蚕业科学, 39(2): 261–265.]

Liu CL, Wang D, Li B, Guan JM, Yu YF, Zha HX, Xu YX, Shen WD, 2009. Molecular cloning sequence analysis and tissue expression of serpin-6 gene in *Bombyx mori*. *Acta Entomol. Sin.*, 52(1): 1–9. [刘衬丽, 王东, 李兵, 管京敏, 俞燕芳, 查宏贤, 许雅香, 沈卫德, 2009. 家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 *serpin*-6 的克隆、序列分析和组织表达. 昆虫学报, 52(1): 1–9.]

Liu JT, Su ZJ, Wang FH, Li GH, Song SY, 2006. Progresses on insect antimicrobial peptides. *Natural Enemies of Insects*, 28(1): 36–43. [刘建涛, 苏志坚, 王方海, 李广宏, 宋少云, 2006. 昆虫抗菌肽的研究进展. 昆虫天敌, 28(1): 36–43.]

Molnar K, Holderith BN, Csikos G, Sass M, 2001. Distribution of *serpin* in the tissues of the tobacco hornworm (*Manduca sexta*) larvae: existence of new *serpin* possibly encoded by a gene distinct from the *serpin*-1 gene. *J. Insect Physiol.*, 47(7): 675–687.

Pan Y, Xia HC, Lü P, Chen K, Yao Q, Chen H, Gao L, He Y, Wang L, 2009. Molecular cloning, expression and characterization of *Bmserpin*-2 gene from *Bombyx mori*. *Acta Biochim. Pol.*, 56(4): 671–677.

Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettins PG, Irving JA, Lomas DA, Luke CJ, Moyer RW, Pemberton PA, Remold OE, Salvesen GS, Travis J, Whisstock JC, 2001. The serpins are an expanding super family of structurally similar but functionally diverse proteins. *J. Biol. Chem.*, 276(36): 33293–33296.

Tanaka H, Ishibashi J, Fujita K, Nakajima Y, Sagisaka A, Tomimoto K, Suzuiki N, Yoshiyama M, Kaneko Y, Iwasaki T, Sunagawa T, Yamaji K, Asaoka A, Mita K, Yamakawa M, 2008. A genome-wide analysis of genes and gene families involved in innate immunity of *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38(12): 1087–1110.

Tong Y, Jiang H, Kanost MR, 2005. Identification of plasma proteases inhibited by *Manduca sexta serpin*-4 and *serpin*-5 and their association with components of the prophenol oxidase activation pathway. *J. Biol. Chem.*, 280(15): 14932–14942.

Wan J, Zhou XY, Zhou XJ, 2013. A review of innate immunity of

silkworm, *Bombyx mori*. *Afr. J. Agr. Res*., 8(20): 2319–2325.

Wang YY, He JM, Li GS, Wang HM, Shen WD, Xu YX, 2013. An analysis on specific expression of *Bombyx mori* serine protease inhibitor gene *Bmserpin-6*. *Acta Sericologica Sinica*, 39(2): 257–260. [王彦云, 何渐鸣, 李国胜, 王明慧, 沈卫德, 许雅香, 2013. 家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 *Bmserpin*-6 的特异性表达分析. 蚕业科学, 39(2): 257–260.]

Xu YL, Li WC, 2010. Research progress in activation mechanism of phenoloxidse in insects. *J. Anhui Agric. Sci*., 38(27): 14844–14846. [徐亚玲, 李文楚, 2010. 昆虫酚氧化酶作用机制的研究进展. 安徽农业科学, 38(27): 14844–14846.]

Zha HX, Liu G, Zhang C, Wang YY, Wei ZG, Li B, Chen YH, Xu YX, Shen WD, 2011. Cloning, prokaryotic expression of polyclonal antibody of serine protease inhibitor 4 (serpin-4) from *Bombyx mori*. *Acta Entomol. Sin.*, 54(6): 642–647. [查宏贤, 刘罡, 张晨, 王彦云, 卫正国, 李兵, 陈玉华, 许雅香, 沈卫德, 2011. 家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂 4(*serpin*-4)的基因克隆、原核表达和多抗体制备. 昆虫学报, 54(6): 642–647.]

Zhang M, Zhu ZM, 1996. Study and application of serine proteinase inhibitor. *Prog. Biochem. Biophys.*, 23(3): 240–244. [张梅, 朱柞铭, 1996. 丝氨酸蛋白酶抑制剂的研究及应用. 生物化学与生物物理进展, 23(3): 240–244.]

Zhao P, Dong ZM, Duan J, Wang GH, Wang LY, Li YS, Xiang ZH, Xia QY, 2012. Genome-wide identification and immune response analysis of serine protease inhibitor gene in the silkworm, *Bombyx mori*. *PLoS ONE*, 7(2): e31168.

Zhu Y, Wang Y, Gorman MJ, Jiang H, Kanost MR, 2003. *Manduca sexta serpin-3* regulates prophenoloxidase activation in response to infection by inhibiting prophenoloxidase-activating proteinases. *J. Biol. Chem.*, 278(47): 46556–46564.