应用昆虫学报 *Chinese Journal of Applied Entomology* 2017, 54(5): 791–802. DOI: 10.7679/j.issn.2095–1353.2017.095

家蚕 C 型凝集素 S11 的克隆、表达及功能研究*

詹明月** 杨佩瑾 饶相君***

（安徽农业大学植物保护学院，合肥 230036）

摘 要 **【目的】** C 型凝集素（C-type lectin, CTL）广泛存在于植物和动物中，参与免疫防御反应、发育及细胞信号传导。鳞翅目昆虫中的 C 型凝集素依据长度和特征功能域可以分成 S 型、IML 型和 X 型，目前对 S 型凝集素的功能了解非常有限。本研究对家蚕 *Bombyx mori* L. C 型凝集素 S11 进行了克隆、蛋白表达纯化和初步功能分析。**【方法】** 基于先前对家蚕基因组中所有 C 型凝集素序列的生物信息学分析，通过 PCR 克隆了 *CTL-S11* 基因的全长 cDNA；利用相关软件对核酸和蛋白质序列进行了比对和分析；通过大肠杆菌原核系统表达纯化重组蛋白；通过 RT-PCR 和荧光定量 PCR 研究了该基因的组织表达分布和诱导表达；通过凝集实验检测了重组蛋白对细菌的凝集作用。**【结果】** 获得了长度为 519 bp 的 *CTL-S11* 全长 cDNA 序列，编码 173 个氨基酸，纯化得到分子量约为 18 ku，带有组氨酸标签的重组蛋白。RT-PCR 表明该基因在中肠、脂肪体、血细胞和表皮都有表达。荧光定量 PCR 结果表明，细菌喂食或注射家蚕幼虫后，*CTL-S11* 的表达水平在某些时间点有显著上调。凝集实验显示，在钙离子存在的条件下重组蛋白对大肠杆菌和金黄葡萄球菌有明显的凝集作用。**【结论】** *CTL-S11* 的表达可以被细菌显著诱导，重组蛋白可以引起细菌的凝集，因此其有可能作为免疫受体参与家蚕对病原微生物的识别。

关键词 家蚕，先天免疫，C 型凝集素，免疫受体，凝集

Cloning, expression and analysis of the silkworm C-type lectin S11

ZHAN Ming-Yue** YANG Pei-Jin RAO Xiang-Jun***

(School of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract [Objectives] C-type lectins are common in plants and animals and are involved in immune defense responses, development and signal transductions. Lepidopteran C-type lectins can be divided into three types (S, IML and X) based on their lengths and conserved domains. Little is known about the functions of S-type CTLs. We cloned the *Bombyx mori* L. C-type lectin S11, quantified its expression, and conducted a preliminary analysis of its function. **[Methods]** Based on bioinformatic analysis of all C-type lectin sequences in the silkworm genome, we cloned the full-length cDNA of *CTL-S11* with PCR. The nucleic acid and amino acid sequences were compared and analyzed *in silico*. The recombinant protein was expressed and purified from *E. coli*. RT-PCR and real-time PCR was used to analyze the tissue profile and inductions. Bacterial agglutination using a recombinant protein was also examined. **[Results]** The full-length cDNA of *CTL-S11* is 519 bp and encodes 173 amino acids. The corresponding recombinant protein with the HisTag is about 18 ku. RT-PCR indicated that *CTL-S11* is expressed in the midgut, fat body, hemocytes and epidermis. Realtime PCR showed that, after feeding, or injecting larvae with bacteria, *CTL-S11* was significantly induced at certain time points. The agglutination experiment showed that the recombinant protein induced bacterial agglutination in the presence of Ca^{2+}. **[Conclusion]** The expression of *CTL-S11* was significantly induced by bacteria and a recombinant *CTL-S11* protein could induce bacterial agglutination. Therefore, *CTL-S11* may function as an immune receptor involved in pathogen recognition in the silkworm.

Key words silkworm, innate immunity, C-type lectin, immune receptor, agglutination

---

*资助项目 Supported projects：国家自然科学基金青年基金项目(31402017)

**第一作者 First author，E-mail：zmyahnydx@163.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：rxjxyz@163.com

收稿日期 Received：2016-02-21，接受日期 Accepted：2017-04-05

昆虫作为地球上种类和数量最庞大的动物群体，进化形成了复杂高效的先天免疫防御系统，用于抵御病原微生物的感染和寄生（Meister *et al.*，2000；Iwanaga and Lee，2005）。类似于高等动物的先天免疫，昆虫的免疫系统依靠模式识别受体（Pattern-recognition receptors）识别特异的病原分子特征（Pathogen-associated molecular patterns）（Janeway，1989；Janeway and Medzhitov，2002；Bi *et al.*，2015；Zhu *et al.*，2016）。昆虫的免疫反应分为两种类型：体液免疫和细胞免疫（Jiravanichpaisal *et al.*，2006；初源等，2013）。体液免疫可以诱导产生抗菌肽（Antimicrobial peptide，AMP）以及激活酚氧化酶（Phenoloxidase）引起黑化 （Lu *et al.*，2014）。抗菌肽对细菌、病毒、癌细胞等具有独特的抑制作用，其作用机制不同于传统的抗生素，不易产生耐药性（Yi *et al.*，2014）。细胞免疫主要包括血细胞介导的包被和吞噬作用等（Smith，2010）。

C 型凝集素是模式识别受体的一个庞大家族，广泛存在与植物和动物体内，具有一个或多个糖识别域（Carbohydrate recognition domain，CRD），可以在钙离子介导下识别并结合不同的糖基分子（Dambuza and Brown，2015）。我们先前的研究显示依据分子量大小和 CRD 的数目等特征，鳞翅目昆虫家蚕和烟草天蛾中的 C 型凝集素可以分为 3 种类型：S 型 CTL 序列较短且只含有一个 CRD；IML 型 CTL 含有两个串联排列的 CRD；X 型 CTL 序列较长，除了 CRD 外还含有其它的保守结构域 （Rao *et al.*，2015a，2015b）。研究显示昆虫 IML，即免疫凝集素广泛参与微生物的识别，酚氧化酶的激活和异源物的包被（Yu *et al.*，1999，2005，2006；Yu and Kanost，2000）。S 型凝集素的功能似乎更加多样，有可能与昆虫的发育和免疫都有关系。一个 CTL-S 蛋白瞬时出现在再生的蟑螂腿部表皮组织（Kubo *et al.*，1993）。埃及伊蚊的一种 CTL-S 蛋白可以与西尼罗河病毒相互作用，加速病毒的感染（Cheng *et al.*，2010）。家蚕 *CTL-S3* 可以加速血淋巴中细菌的清除（Zhan *et al.*，2016）。家蚕基因组至少编码 12 种 CTL-S，其中绝大部分功能还不明确。

鳞翅目是仅次于鞘翅目的昆虫纲第二大目，包括许多资源昆虫和严重危害农业生产的害虫。我国有 5000 年养蚕缫丝的历史，目前天然蚕丝纤维在医药、生物材料和化妆品等领域的创新性应用研究不断深入，因此蚕的研究具有重大的经济意义。此外蚕作为鳞翅目代表性的模式生物（Model organism）已经被广泛应用于生命科学的研究。蚕的生活周期短、基因突变系材料多、繁殖容易、个体大小适中，是遗传学和分子生物学良好的实验材料（陈克平，2009）。

本研究在先前对家蚕基因组中所有 C 型凝集素进行了整体分析的基础上，克隆了 S11 的基因，分析了它的序列特征和进化关系，并通过 RT-PCR 和 Realtime PCR 研究了该基因的组织分布和诱导表达。原核表达的重组蛋白对细菌具有凝集效应。为进一步研究该基因在家蚕免疫系统中的功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫、材料和试剂

大造品系家蚕从安徽农业大学生命科学院获得并在 25℃室温用新鲜桑叶进行饲养。克隆用菌株大肠杆菌 DH5α，表达用菌株大肠杆菌 BL21（DE3），表达载体 Pet-30a（+）由本实验室保存。总 RNA 抽提试剂 RNAiso plus、DNA 胶回收试剂盒、Western blot 显色试剂盒、反转录试剂盒等购自生工生物工程（上海）公司。PCR 回收纯化试剂盒及质粒抽提试剂盒购自康宁生命科学（吴江）公司。Realtime PCR 使用的“雷鸟”定量 PCR 试剂盒购自 TOYOBO CO.，LTD（Osaka，Japan）。相关引物合成和测序由生工生物工程公司完成。Western blot 所用的兔多抗组氨酸标签（HisTag）抗体购自 Affinity Biosciences，二抗辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 购自 Santa Cruz Biotech。

1.2 *CTL-S11* 的克隆、表达和蛋白纯化

CTL-S11 的核酸（NM_001046670.1）和蛋白质（NP_001040135.1）序列从 GenBank 获取，

利用 Primer Premier 软件设计引物 CTL-S11-NdeI 和 CTL-S11-XhoI（表 1）。以家蚕幼虫的 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增，扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测分离，相应片段经凝胶回收和酶切后，连接到同样酶切纯化的表达载体 Pet-30a (+) 片段上。连接产物转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞，挑取克隆并测序验证。用测序正确的重组质粒转化大肠杆菌 BL21（DE3）感受态细胞，挑取单克隆接种到 2 mL 的新鲜 LB 培养基中，37℃ 200 r/min 振荡培养过夜。将过夜菌按照 1∶100 的比例加入新鲜的 LB 中，37℃ 200 r/min 振荡培养至 OD_{600}≈0.6，再加入 IPTG（至终浓度 1 m mol·L^{-1}）诱导 6 h，低温离心收集菌体，PBS 重悬后超声破碎，离心分别收集上清和包涵体进行 Western blot 检测。将包涵体用 8 mol·L^{-1} 尿素溶解，用 Ni-NTA 纯化 C 端带有组氨酸标签的重组蛋白。纯化的蛋白经过 6、4、2、0 mol·L^{-1} 的尿素透析液逐级透析得到复性的蛋白。

表 1　本研究所用引物
Table 1　Sequences of primers in this study

引物用途 Use of primers	引物名称 Primer name	引物序列（5′–3′）Primer sequences
克隆	CTL-S11-NdeI	GGAATTCCATATGCAGCCAACTGATGGTTACGTGC
Cloning	CTL-S11-XhoI	CCGCTCGAGAACTGGATTGACGGTCTTTTGGC
荧光定量 PCR	CTL-S11-RTF	CAAACTTATCGCTTGGCTGG
Realtime PCR	CTL-S11-RTR	AGGCTCTGCTGGGTCATCA
	Moricin-RTF	TGTGGCAATGTCTCTGGTG
	Moricin-RTR	GCTCTTAGACCTTTACCGACTG
	Glo1-RTF	CCAACAGCATTATCAAAGC
	Glo1-RTR	GGAAATTACAGAACGCAGA
	CecA-RTF	TCTAAACAGCATAAGGCATTTC
	CecA-RTR	TGCACTCGGTCACTCTGAG
	ActinA3-RTF	CAACACCGTATTGTCCGGTGGTA
	ActinA3-RTR	GGGGGAGCGATGATCTTAATCTTCAT

限制性内切酶位点用下划线标注。
Restriction endonuclease sites are underlined.

1.3　生物信息学分析

使用 DNAMAN6.0 分析 S11 的开放阅读框和氨基酸序列，预测分子量和等电点；使用 S11 的蛋白质序列进行 Blast（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/）序列比对得到同源的序列；用 MEGA 6 软件进行蛋白质序列的对比和进化树构建（Tamura *et al.*，1994）。使用 SMART（http://smart.embl-heidelberg.de/）进行蛋白的结构域分析。使用 SignalP 4.1（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/）预测蛋白的信号肽。

1.4　组织收集、总 RNA 的提取及荧光定量 PCR

5 龄家蚕喂食或注射细菌后，在不同时间点取家蚕经冷冻麻醉后解剖收集组织，使用 RNAiso plus 提取组织总 RNA（全虫、中肠、血细胞、脂肪体和表皮）。总 RNA 经琼脂凝胶电泳检测其完整性后，利用紫外分光光度计测定浓度，以 1 μg 总 RNA 为模板，用反转录试剂盒将其反转录合成 cDNA。最后以 cDNA 为模版，在伯乐 CFX96 荧光定量 PCR 仪上进行分析。基因相对表达水平用 $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ 法进行计算，$\Delta\Delta CT=(CT_{目标}-CT_{内参})_{实验组}-(CT_{目标}-CT_{内参})_{对照组}$。

1.5　*CTL-S11* 的组织分布和诱导表达分析

为了分析 S11 的组织表达分布，取 5 龄家蚕分别解剖收集血细胞、中肠、脂肪体、表皮，提取总 RNA，反转录合成 cDNA。用 cDNA 作为模板，用定量引物 CTL-S11-RTF 和 CTL-S11-

RTR 以及内参引物 ActinA3-RTF 和 ActinA3-RTR（表 1）进行 RT-PCR 扩增，扩增产物用 1%琼脂凝胶电泳分析。

为了分析 S11 全虫水平的诱导表达，取 2 龄的家蚕，分别喂食 PBS、大肠杆菌和枯草芽孢杆菌浸润的新鲜桑叶，3 h 和 6 h 后分别取全虫研磨，提取总 RNA，反转录合成 cDNA。用定量引物 CTL-S11-RTF 和 CTL-S11-RTR 以及内参引物 ActinA3-RTF 和 ActinA3-RTR（表 1）进行 Realtime PCR 检测，以抗菌肽基因作为对照。

为了分析 S11 的组织诱导表达，选取 5 龄家蚕，分别注射和喂食细菌（大肠杆菌和金黄葡萄球菌），分析基因表达变化。在 3、6、12、24 h 后提取组织，其中注射细菌的虫体收集血细胞和脂肪体，喂食细菌的虫体收集中肠。提取总 RNA，反转录合成 cDNA。用定量引物 CTL-S11-RTF 和 CTL-S11-RTR 以及内参引物 ActinA3-RTF 和 ActinA3-RTR 进行检测，以抗菌肽基因作为对照。

1.6 凝集实验

将大肠杆菌和金黄葡萄球菌用 PBS（含有 1 mmol·L^{-1} 的 $CaCl_2$）重悬。将 *CTL-S11* 重组蛋白与细菌共同孵育（以加入 BSA 或 EDTA 组作为对照）。混匀后分别加 10 μL 至玻片上，室温避光保湿放置 2 h，用 Nikon Eclipse 倒置显微镜观察并拍照。

1.7 数据分析

采用 Graphpad Prism5.0 软件进行双因素方差分析和 Tukey's 多重比较。各基因的表达水平的显著差异用*表示（*: P <0.05，**: P <0.01，***: P <0.001，****: P <0.0001）。

2 结果与分析

2.1 序列和进化树分析

将获得的家蚕 *CTL-S11* 的编码序列用 DNAMAN 软件进行分析，该 ORF 包括了 519 bp，编码一个含有 173 个氨基酸的蛋白。该蛋白的 N 端具有一个 24 个氨基酸长度的信号肽序列，另外有一个由 142 个氨基酸组成的保守 CRD 功能结构域，没有跨膜区（图 1）。全长蛋白的预测分子量为 19.761 ku，等电点为 7.54；切除信号肽后的成熟蛋白的预测分子量为 16.894 ku，等电点为 6.67。靠近 C 端的 QDN 位点可能是决定该蛋白结合糖基特异性的关键位点。

经过 Blast 搜索在 GenBank 中获得家蚕 *CTL-S11* 同源的 16 条蛋白的序列，将 17 条序列进行比对分析并构建了 NJ 进化树。结果显示 S11 的同源蛋白存在于其它目的昆虫以及节肢动物、鱼类和脊椎动物中，包括膜翅目（Hymenoptera）、蜚蠊目（Blattodea）、文昌鱼目（Amphioxiformes）、鳞翅目（Lepidoptera）、鲤目（Cypriniformes）、鲶形目（Siluriformes）、海胆目（Echinoida）、鲤齿科（Cyprinodontidae）、蜘蛛目（Araneae）和有鳞目（Squamata）。S11 与膜翅目的金小蜂 *Nasonia vitripennis* 和佛罗里达弓背蚁 *Camponotus floridanus* 的同源蛋白的相似度分别为 96%和 99%，同文昌鱼 *Branchiostoma floridae* 同源蛋白的相似性最低，仅为 17%（图 2）。

2.2 基因克隆，蛋白表达与纯化

CTL-S11 的 PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测为单一的 500 bp 左右的亮带，与预测的大小相符（图 3：A，1~2 泳道）；Pet-30a（+）的酶切产物为单一大小 5 000 bp 左右的亮带（图 3：A，3~4 泳道）。将 PCR 扩增片段酶切后与酶切的载体片段用 T4 DNA 连接酶连接，测序正确，转入 BL21（DE3）进一步进行蛋白的表达纯化。

在加入 IPTG 诱导前，取 1 mL 菌液标记为未诱导留待检测，诱导结束后取 1 mL 菌液标记为诱导，与未诱导的菌液一并离心，用 SDS 上样缓冲液煮沸，分别做考马氏亮蓝染色和 Western blot 检测（图 3：B，C）。未加 IPTG 诱导的菌液在相应位置没有条带（图 3：B，泳道 5；图 3：C，泳道 7），IPTG 诱导的菌液则出现明显的条带（图 3：B，泳道 6；图 3：C，泳道 8），大小约为 18 ku，与成熟蛋白的预测分子量相符。

```
1    ATGTGGTTTACAACAAAAATGAGACTGTTAGCTATTTCCTTCTTTTTCATAGCTATCGCA
1     M  W  F  T  T  K  M  R  L  L  A  I  S  F  F  F  I  A  I  A

61   TATGTGCAGTCGCAGCCAACTGATGGTTACGTGCTAGAAAAGGATGTGGGTATAGCCTAC
21    Y  V  Q  S  Q  P  T  D  G  Y  V  L  E  K  D  V  G  I  A  Y

121  AAACTGGTGTATCAAGCACAAAACGGGACTAAAGCTAAGGAATATGGTGAACAAGAAGGC
41    K  L  V  Y  Q  A  Q  N  G  T  K  A  K  E  Y  G  E  Q  E  G

181  GCTAAATTAGCTGTACCTAAATCTGAGGAAGAATACGCTTTAATACAAAAAATAGTTCGA
61    A  K  L  A  V  P  K  S  E  E  E  Y  A  L  I  Q  K  I  V  R

241  CACATGCACTTTCCCAGTGTGGTTAACGCCGAAATCAAACTTATCGCTTGGCTGGGCATC
81    H  M  H  F  P  S  V  V  N  A  E  I  K  L  I  A  W  L  G  I

301  AACAACCTGAAAAATTACAAAGTCTGGAAGAATATCGATGGTCAAAACATTGAAGACACC
101   N  N  L  K  N  Y  K  V  W  K  N  I  D  G  Q  N  I  E  D  T

361  GGATTCCACACTTGGACGGGTCAAGATAACGGTCGCGGCTACAGTGATGACCCAGCAGAG
121   G  F  H  T  W  T  G  Q  D  N  G  R  G  Y  S  D  D  P  A  E

421  CCTCACTGCGCCGGCGTCGATGCCATCAACCCTGGACTAAGAGACTGGTGGTGCCACCGA
141   P  H  C  A  G  V  D  A  I  N  P  G  L  R  D  W  W  C  H  R

481  CGACAACCTTACGTATGCCAAAAGACCGTCAATCCAGTTTAG
161   R  Q  P  Y  V  C  Q  K  T  V  N  P  V  *
```

图 1　*CTL-S11* 的核酸和蛋白质序列

Fig. 1　Nucleic acid and protein sequence of *CTL-S11*

信号肽序列用下划线标出，糖识别域用阴影标出。

The signal peptide is underlined，the CRD region is shaded grey.

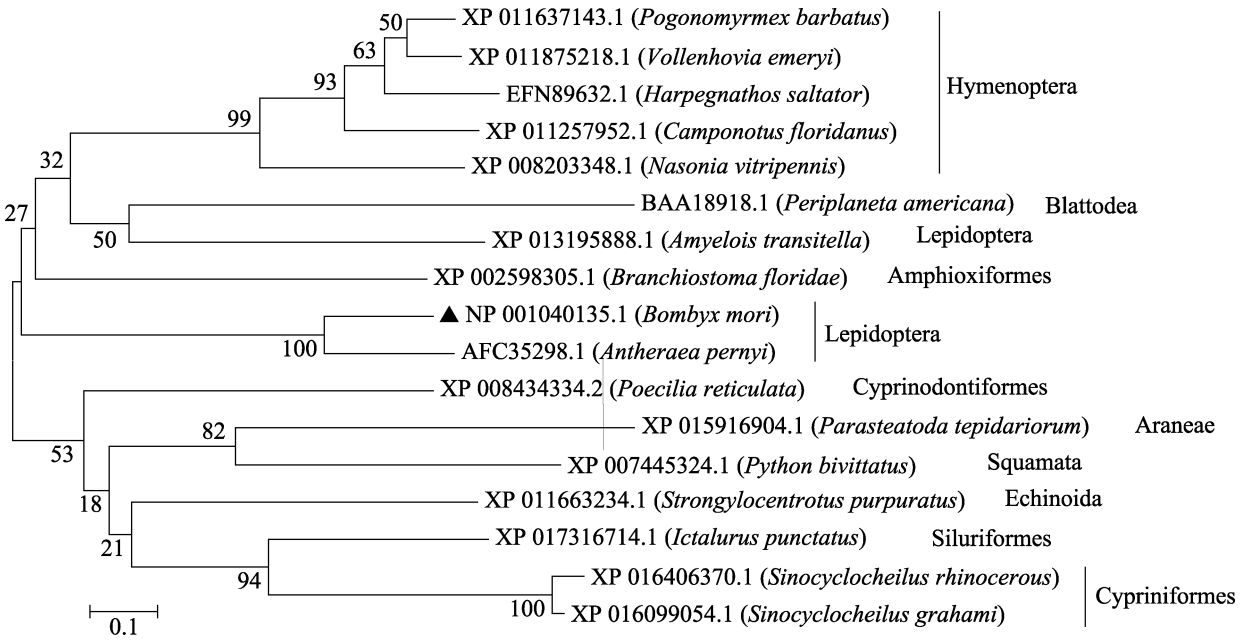

图 2　*CTL-S11* 进化树

Fig. 2　The phylogenetic tree of *CTL-S11*

每个同源物蛋白的 GenBank 登录号在图中标注，括号里为相应的种名，右侧标注了该生物所属的分类。

The GenBank accession number of each homolog is marked, the genus names are annotated in brackets, the taxonomic categories are marked to the right.

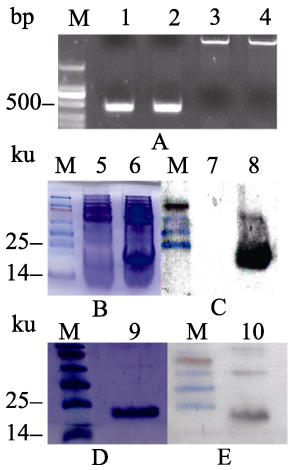

图 3 基因克隆、蛋白表达和纯化

Fig. 3 Gene cloning, protein expression and purification

A. PCR 产物和载体酶切片段的检测，M：分子量标准；1~2：*CTL-S11* PCR 扩增产物；3~4：酶切后的载体；B. 诱导前后菌液的考马氏亮蓝染色检测，M：分子量标准；5：诱导前；6：诱导后；C. 诱导前后菌液的 Western blot 检测，M：分子量标准；7：诱导前；8：诱导后；D. 复性后的蛋白检测，M：分子量标准；9：考马氏亮蓝染色；E. 复性后的蛋白检测 M：分子量标准；10：组氨酸标签抗体的 Western blot。

A. The PCR product and digested vector fragment, M: Marker; 1-2: PCR product of S11; 3-4: Digested vector fragment; B. Coomassie blue staining of bacteria before/after induction, M: Marker; 5: Before; 6: After; C. Western blot of bacteria before/after induction, M: Marker; 7: Before; 8: After; D. Analysis of the refolded protein, M: Marker; 9: Coomassie blue staining; E. Analysis of the refolded protein, M: Marker; 10: Western blot using the HisTag antibody.

包涵体经尿素溶解，镍离子亲和层析法分离后得到较纯的重组蛋白，再经过逐级透析后得到复性的可溶性重组蛋白。纯化的蛋白进行考马氏亮蓝染色和 Western Blot 检测（图 3：D，E）。染色和 Western blot 的结果都显示在 18 ku 位置有明显的蛋白条带且纯度较高。

2.3 组织分布和诱导表达分析

为了分析 *CTL-S11* 的组织表达分布，从 4 个主要的免疫器官提取总 RNA 以制备 cDNA，并用相关引物进行 RT-PCR 扩增（表 1），扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测。结果显示 *CTL-S11* 在家蚕的血细胞、中肠、脂肪体和表皮中均有表达（图 4）。

为了分析 *CTL-S11* 在全虫水平的诱导表达变化，用沾有大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的桑叶喂食 2 龄幼虫 3~6 h，提取全虫的 RNA，制备 cDNA，进行 Realtime PCR 扩增。喂食沾有 PBS 的桑叶作为对照组，计算基因的相对表达水平。结果显示喂食大肠杆菌 3 h 后，S11 的表达水平达到对照组的 1.5 倍，而 6 h 时有一定程度的降低；抗菌肽 *CecA* 在 3 h 和 6 h 均引起显著上调，分别达到对照组的 2.5 倍和 4 倍；抗菌肽 *Moricin* 在 3 h 时为对照组的 1.5 倍，到 6 h 上调更显著，为对照组的 4 倍；抗菌肽 *Glo1* 在 3 h 没有明显变化，6 h 上调约 20 倍（图 5：A，C，E，G）。在喂食枯草芽孢杆菌后，*CTL-S11* 在 3 h 时表达水平略微下调，6 h 时上调，为对照组的 1.3 倍；抗菌肽 *CecA* 在 3 h 和 6 h 均显著上调，为对照组的 1.5 倍和 2 倍；抗菌肽 *Glo1* 在喂食后的 3 h 时下调，6 h 时显著上调，达到 6 倍；抗菌肽 *Moricin* 在 3 h 时引起显著下调至 0.5 倍，6 h 时没有显著变化（图 5：B，D，F，H）。

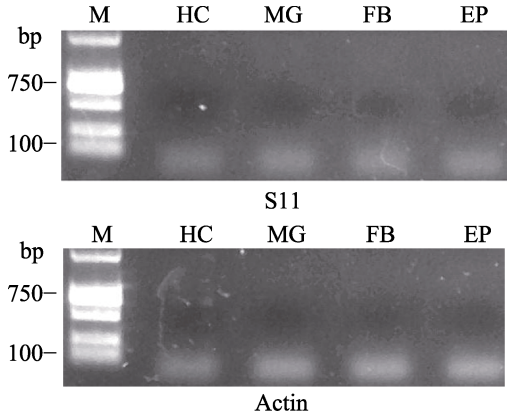

图 4 S11 的组织表达

Fig. 4 Tissue profile of S11

M：DNA 分子量标记；HC：血细胞；MG：中肠；FB：脂肪体；EP：表皮。

M: DNA Marker; HC: Hemocytes; MG: Midgut; FB: Fat body; EP: epidermis.

为了进一步分析各组织的基因表达变化，收集喂食大肠杆菌或金黄葡萄球菌的幼虫中肠进行 Realtime PCR 分析。结果显示在中肠内，喂食大肠杆菌 12 h 后 *CTL-S11* 的表达量达到最高值，为对照组的 10 倍左右，至 24 h 回归正常（图 6：A）；*CecA* 在 3 h 和 12 h 均引起显著上调，在 6 h 和 24 h 没有显著变化（图 6：C）。而喂食了金

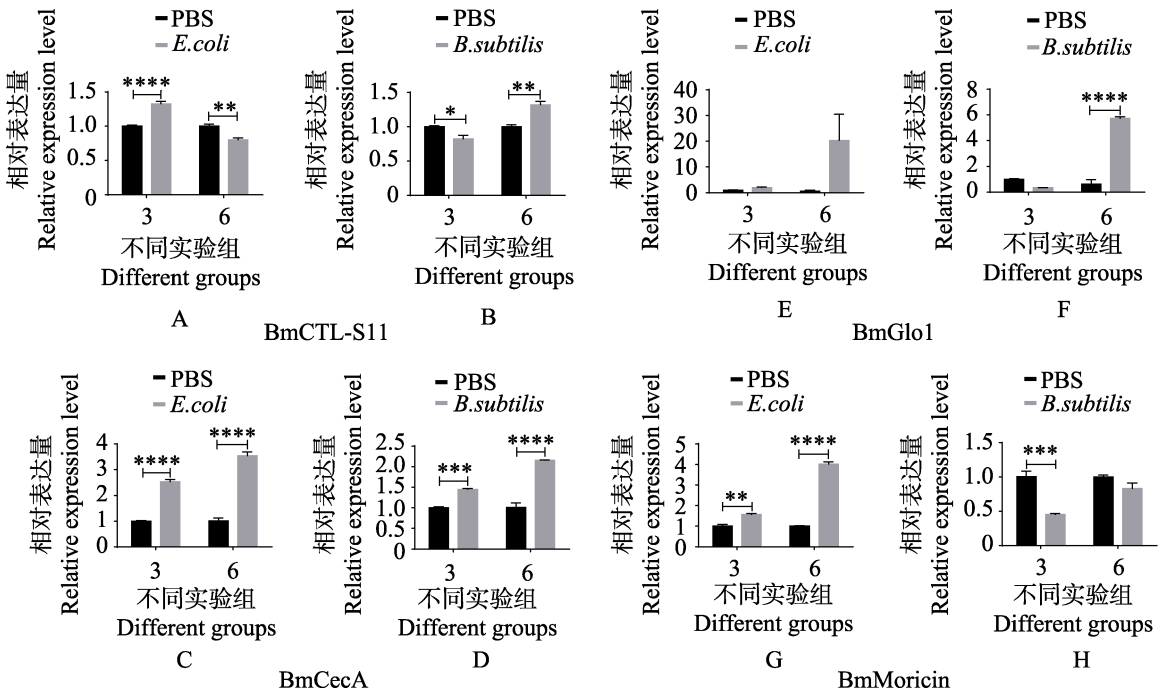

图 5　全虫水平的基因表达变化

Fig. 5　Changes of gene expression of whole larvae

A，C，E，G. 喂食大肠杆菌；B，D，F，H. 喂食枯草芽孢杆菌。

A, C, E, G. Feed *E. coli*; B, D, F, H. Feed *B. subtilis*.

柱上标有*表示 $P<0.05$，**表示 $P<0.01$，***表示 $P<0.001$，****表示 $P<0.0001$。下图同。

Histograms with * indicate $P<0.05$，** indicate $P<0.01$，*** indicate $P<0.001$，****indicate $P<0.0001$. The same below.

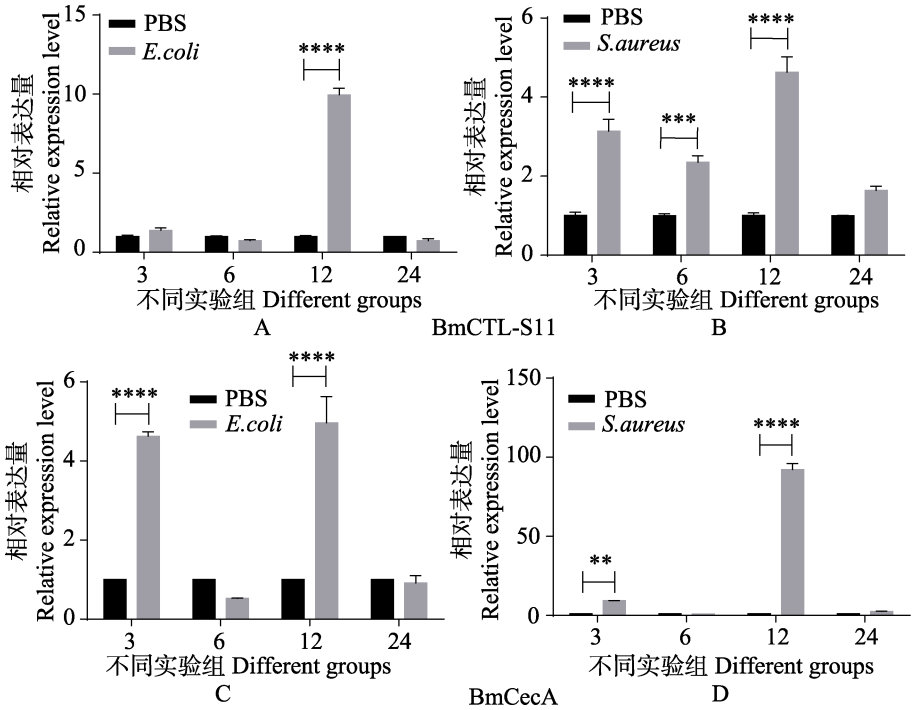

图 6　中肠基因表达变化

Fig. 6　Changes of gene expression in the midgut

A，C. 喂食大肠杆菌；B，D. 喂食金黄葡萄球菌。

A, C. Feed *E. coli*; B, D. Feed *S. aureus*.

黄葡萄球菌的幼虫中肠，*CTL-S11* 在 3、6、12、24 h 表达水平均上调，12 h 上调最为显著（图 6：B）；*CecA* 在 3 h 和 12 h 时均上调，且 12 h 上调尤为显著，为对照组的近 100 倍，而 6 h 和 24 h 几乎没有变化（图 6：D）。

蚕的体腔中含有血细胞和脂肪体，是引发体液免疫和细胞免疫的重要器官。因此我们将细菌注射到 5 龄家蚕的体腔中，检查脂肪体和血细胞中各基因表达变化。对于脂肪体，注射大肠杆菌后，*CTL-S11* 在 3、6、24 h 上调，其中在 6 h 上调最为显著；*Glo1* 在 12 h 显著上调，3、6、24 h 显著下调；*CecA* 在 24 h 引起上调尤为显著，为对照组的约 17 倍（图 7：A，C，E）。注射金黄葡萄球菌后，脂肪体中 *CTL-S11* 在 6 h 显著上调；抗菌肽 *Glo1* 在 6 h 和 12 h 显著上调，其中 6 h 时上调尤为明显，为对照组的 8.5 倍；抗菌肽 *CecA* 在 6 h 和 24 h 时显著上调，6 h 时上调最为显著（图 7：B，D，F）。对于血细胞，注射大肠杆菌后 *CTL-S11* 在 3 h 和 12 h 非常显著的上调，其中 3 h 时上调超过 150 倍；抗菌肽 *Glo1* 在 3 h 显著上调，约为对照组的 110 倍，而 12 h 时几乎没有变化；*CecA* 在 3 h 和 12 h 时均无上调（图 8：A，C，E）。注射金黄葡萄球菌后，血细胞中 *CTL-S11*，*CecA* 和 *Glo1* 在 3 h 和 12 h 这两个时间点均下调。*CecA* 和 *Glo1* 的相对表达也呈现下降趋势（图 8：B，D，F）。

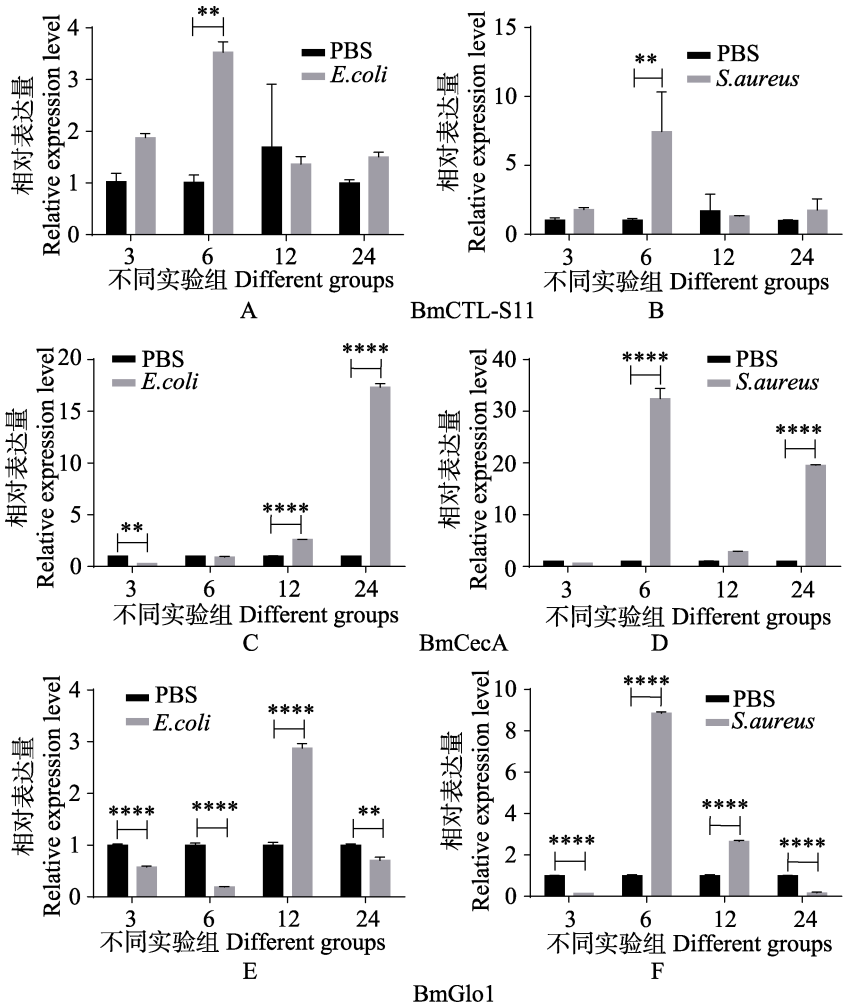

图 7 脂肪体基因表达变化

Fig. 7 Changes of gene expression in the fat body

A，C，E. 注射大肠杆菌；B，D，F. 注射金黄葡萄球菌。

A, C, E. Inject *E. coli*; B, D, F. Inject *S. aureus*.

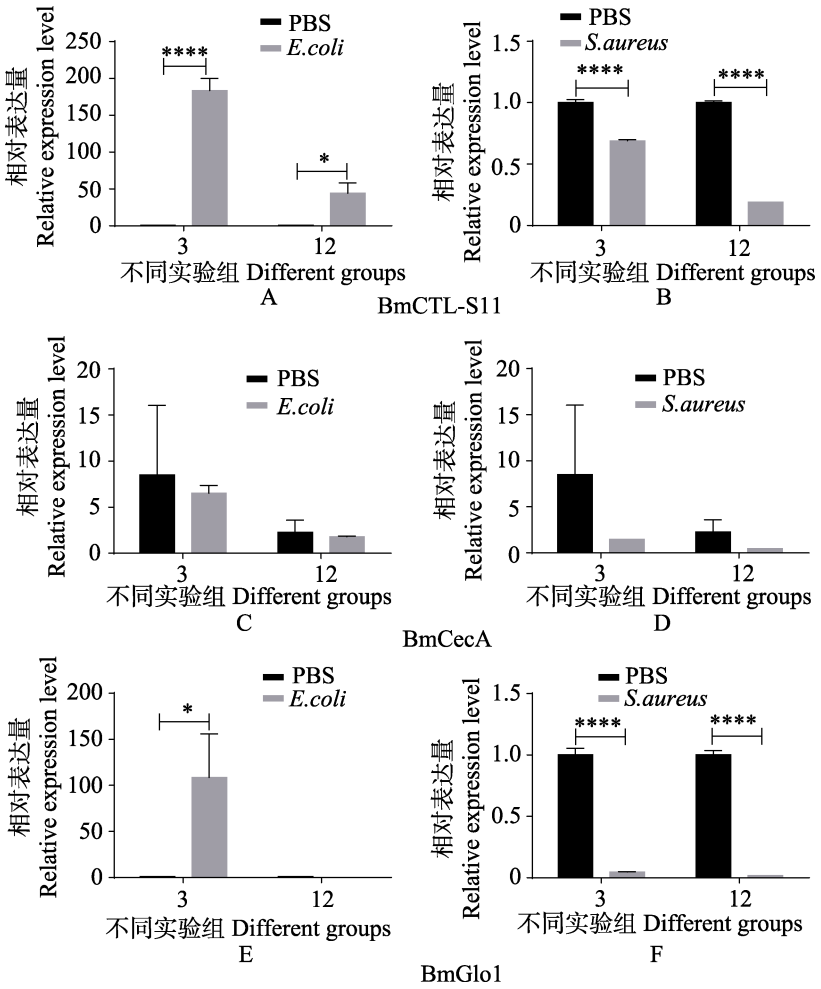

图 8　血细胞基因表达变化

Fig. 8　Changes of gene expression in hemocytes

A，C，E. 注射大肠杆菌；B，D，F. 注射金黄葡萄球菌。

A, C, E. Inject *E. coli*; B, D, F. Inject *S. aureus*.

2.4　凝集实验

C 型凝集素可以识别细菌表面的糖分子结构，有可能引起细菌的凝集。因此我们将 S11 的重组蛋白在添加钙离子的情况下分别和大肠杆菌及金黄葡萄球菌共同孵育，检测有无凝集现象。结果显示重组 S11 对大肠杆菌和金黄葡萄球菌均有明显的凝集作用。而对照 BSA 中基本没有凝集出现。此外加了 EDTA 后，S11 引起的凝集基本消失。说明 S11 的凝集作用需要钙离子参与，与 C 型凝集素的作用机理一致（图 9）。

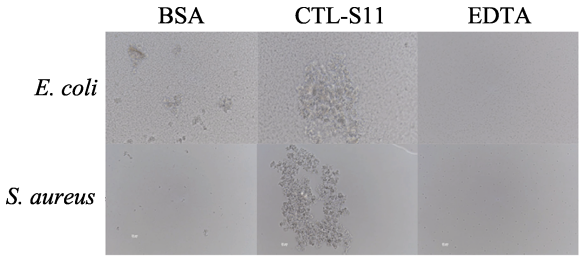

图 9　细菌凝集实验（20×）

Fig. 9　Bacterial aggregation experiment (20×)

3　讨论

微生物表面具有很多独特的分子结构，例如脂多糖（LPS）、肽聚糖（PGN）、脂磷壁酸（LTA）、葡聚糖（Glucan）等，是免疫系统识别微生物的重要靶标分子，模式识别受体正确识别这些病原分子特征对于无脊椎动物的免疫系统的功能至关重要（Pal and Wu，2009；Thompson *et al.*，

2011）。这些病原特征分子一般是由糖基和脂质或氨基酸组成的大分子，因此识别其中的糖基是免疫识别的重要机制之一 （Boscher *et al.*，2011）。凝集素作为专门识别糖基的一大类蛋白质，参与了许多重要的生理过程，例如免疫反应、发育、癌症发生 （Boscher *et al.*，2011；Arthur *et al.*，2015；Dambuza and Brown，2015）。C 型凝集素作为其中的一个亚类，其特征是具有一个或多个保守的 CRD。C 型凝集素的 CRD 在结构上由 alpha 螺旋，beta 折叠和环组成，不同 CTL 的 CRD 总体三维结构类似，个别的氨基酸位点决定了识别糖基的种类差异 （Kastrup *et al.*，1998；Zelensky and Gready，2005）。*CTL-S11* 具有一个保守的 CRD，和其它 C 型凝集素的 CRD 具有高度相似性。然而 *CTL-S11* 的 CRD 并没有 EPN 或 QPD 特征序列，它的 QDN 位点可能是决定其识别特性的关键位点，需要进一步的实验证实（图 1）。

我们先前分析了家蚕和烟草天蛾中所有具有 CTL 特征 CRD 的蛋白，并根据 CRD 的数目等特征将它们分为 S 型，IML 型和 X 型（Rao *et al.*，2015a，2015b）。家蚕有 6 个 IML，烟草天蛾有 19 个，多数与病原微生物的识别有关。烟草天蛾 IML-1 可以被免疫诱导并激活酚氧化酶 （Yu *et al.*，1999）；IML-2 激活血细胞介导的包被和黑化 （Yu and Kanost，2000；Yu and Kanost，2004）；IML-3 可以从血清转移到血细胞内部 （Yu *et al.*，2005）；IML-4 可以结合脂多糖和脂磷壁酸（Yu *et al.*，2006）。家蚕的脂多糖结合蛋白（Lipopolysaccharide-binding protein，BmLBP）与血清中的细菌清除有关 （Koizumi *et al.*，1997；Koizumi *et al.*，1999a，1999b）。相比之下，CTL-S 的功能似乎更为广泛，除了参与免疫识别外，还与昆虫的发育相关 （Kubo *et al.*，1993）。我们报道过家蚕的 *CTL-S3* 可以促进血清中细菌的清除 （Zhan *et al.*，2016）。一种小龙虾的 CTL-S 可以增强对鳗弧菌（*V. anguillarum*）的包被和清除 （Zhang *et al.*，2011）。中国白虾的 *FcLec4* 的 N 端序列（非 CRD 区）能够与血细胞表面的整合素（Integrin）相互作用，促进血细胞对微生物的吞噬（Wang *et al.*，2014）。冈比亚按蚊的两种 CTL-S（*CTL4* 和 *CTLMA2*）共同抵御革兰氏阴性菌，同时协助伯氏疟原虫的侵染 （Osta *et al.*，2004；Schnitger *et al.*，2009）。埃及伊蚊的一种 CTL-S（*GCTL-1*）可以与西尼罗河病毒（West Nile virus）相互作用，协助病毒的侵染（Cheng *et al.*，2010）。因此 C 型凝集素既可以作为宿主的免疫受体协助抵御病原微生物，又有可能通过协同进化被病原加以利用，成为加速侵染的帮凶 （Van *et al.*，2012）。我们发现 *CTL-S11* 可以引起大肠杆菌和金黄葡萄球菌的凝集，这与先前报道的凝集素的典型功能一致，我们计划未来进一步的研究 *CTL-S11* 是不是能引起酚氧化酶的激活，或者促进血细胞对微生物的吞噬（沈东旭等，2015）。

C 型凝集素的免疫诱导特性已经有不少报道。罗氏沼虾的 C 型凝集素 *MrCTL* 主要在胰肝腺中表达，在副溶血性弧菌（*Vibrio parahaemolyticus*）或对虾白斑综合征病毒（White spot syndrome virus，WSSV）刺激后，该基因在胰肝腺中的表达水平显著上调 （Huang *et al.*，2015）。本实验中家蚕注射了大肠杆菌后，*CTL-S11* 在血细胞中的表达于 3 h 达到最高点，12 h 也显著上调，说明该基因可能参与了对革兰氏阴性菌的初期识别和清除，在抑制细菌增殖过程中可能发挥作用；在注射金黄葡萄球菌后，*CTL-S11* 在 3 h 和 12 h 这两个时间点均显著下调，说明基因可能不参与对革兰氏阳性菌的初期识别。本实验中注射大肠杆菌后，*CTL-S11* 在脂肪体中在 6 h 时上调最显著，12 h 开始下调，说明基因可能对抑制细菌增殖有作用；在注射金黄葡萄球菌后，*CTL-S11* 在脂肪体中 6 h 上调显著。虽然 *CTL-S11* 在某些组织的某些时间点可以被细菌上调或下调，但是我们注意到它的总体变化水平和抗菌肽相比较低，可能的原因是凝集素作为一种免疫受体，其表达调控的机制和抗菌肽有所不同 （Tanji *et al.*，2008；Rao and Yu，2010；Rao *et al.*，2011）。

近年来，宿主-病原互作与免疫的关系是研究的热点，研究病原如何规避宿主免疫系统的攻

击在植物保护和病虫害防治领域具有主要意义（陈亚峰，2014）。零星的报道显示 CTL 在其中可能扮演着复杂的角色。因此我们获得了一种家蚕 S 型 CTL 的序列信息，克隆并表达纯化了蛋白，并研究了该基因的组织分布和诱导表达情况，以及用重组蛋白初步开展了功能研究。然而对于 *CTL-S11* 的详细功能未来还需要进一步的深入研究。

参考文献 (References)

Arthur CM, Baruffi MD, Cummings RD, Stowell SR, 2015. Evolving mechanistic insights into galectin functions. *Methods Mol. Biol.,* 1207: 1–35.

Bi WJ, Li DX, Xu YH, Xu S, Li J, Zhao XF, Wang JX, 2015. Scavenger receptor B protects *shrimp* from bacteria by enhancing phagocytosis and regulating expression of antimicrobial peptides. *Dev. Comp. Immunol.,* 51(1): 10–21.

Boscher C, Dennis JW, Nabi IR, 2011. Glycosylation, galectins and cellular signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.,* 23(4): 383–392.

Chen KP, Huang J, Yao Q, 2014. Model Organism *Bombyx mori*. Jiangsu: Jiangsu Science and Technology Press. 4–7. [陈克平, 2014. 模式生物家蚕. 江苏: 江苏科技出版社. 4–7.]

Chen YF, 2009. A study on developmental and immunological interactions between parasitoids and their nonpermissive host. Doctor dissertation. Hangzhou: Zhejiang University. [陈亚锋, 2009. 寄生蜂与非适应性寄主之间的发育和免疫互作研究. 博士学位论文. 杭州: 浙江大学.]

Cheng G, Cox J, Wang P, Krishnan MN, Dai J, Qian F, Anderson JF, Fikrig E, 2010. A C-type lectin collaborates with a CD45 phosphatase homolog to facilitate West Nile virus infection of *mosquitoes*. *Cell,* 142(5): 714–725.

Chu Y, Zhou F, Zhang MM, An CJ, 2013. Insect natural immune response research front. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50(2): 311–320. [初源, 周帆, 张明明, 安春菊, 2013. 昆虫天然免疫反应研究前沿. 应用昆虫学报, 50(2): 311–320.]

Dambuza IM, Brown GD, 2015. C-type lectins in immunity: recent developments. *Curr. Opin. Immunol.,* 32(32): 21–27.

Huang X, Huang Y, Shi YR, Ren Q, Wang W, 2015. Function of a novel C-type lectin with two CRD domains from Macrobrachium rosenbergii in innate immunity. *Dev. Comp. Immunol*., 49(1): 121–126.

Iwanaga S, Lee BL, 2005. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J. Biochem. Mol. Biol*., 38(2): 128–150.

Janeway CA, 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp. Quant. Biol*., 54(9): 1–13.

Janeway CA, Jr., Medzhitov R, 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.,* 20(1): 197–216.

Jiravanichpaisal P, Lee BL, Soderhall K, 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*, 211(4): 213–236.

Kastrup JS, Nielsen BB, Rasmussen H, Holtet TL, Graversen JH, Etzerodt M, Thøgersen HC, Larsen IK, 1998. Structure of the C-type lectin carbohydrate recognition domain of human tetranectin. *Acta Crystallogr D Biol. Crystallogr*, 54(5): 757–766.

Koizumi N, Imai Y, Morozumi A, Imamura M, Kadotani T, Yaoi K, Iwahana H, Sato R, 1999a. Lipopolysaccharide-binding protein of *Bombyx mori* participates in a hemocyte-mediated defense reaction against gram-negative bacteria. *J. Insect Physiol.,* 45(9): 853–859.

Koizumi N, Imamura M, Kadotani T, Yaoi K, Iwahana H, Sato R, 1999b. The lipopolysaccharide-binding protein participating in hemocyte nodule formation in the *silkworm Bombyx mori* is a novel member of the C-type lectin superfamily with two different tandem carbohydrate-recognition domains. *FEBS Lett.,* 443(2): 139–143.

Koizumi N, Morozumi A, Imamura M, Tanaka E, Iwahana H, Sato R, 1997. Lipopolysaccharide-binding proteins and their involvement in the bacterial clearance from the hemolymph of the *Silkworm Bombyx mori*. *Eur. J. Biochem*., 248(1): 217–224.

Kubo T, Kawasaki K, Natori S, 1993. Transient appearance and localization of a 26-kDa lectin, a novel member of the *Periplaneta* lectin family, in regenerating cockroach leg. *Developmental Biology*, 156(2): 381–390.

Lu A, Zhang Q, Zhang J, Yang B, Wu K, Xie W, Luan YX, Ling E, 2014. Insect prophenoloxidase: the view beyond immunity. *Front Physiol.,* 5: 252.

Meister M, Hetru C, Hoffmann JA, 2000. The antimicrobial host defense of *Drosophila*. *Curr. Top Microbiol. Immunol*., 248(4): 17–36.

Osta MA, Christophides GK, Kafatos FC, 2004. Effects of *mosquito* genes on *Plasmodium* development. *Science*, 303(5666): 2030–2032.

Pal S, Wu LP, 2009. Pattern recognition receptors in the fly: lessons we can learn from the *Drosophila melanogaster* immune system. *Fly (Austin)*, 3(2): 121–129.

Rao XJ, Cao X, He Y, Hu Y, Zhang X, Chen YR, Blissard G, Kanost MR, Yu XQ, Jiang H, 2015a. Structural features, evolutionary

relationships, and transcriptional regulation of C-type lectin-domain proteins in *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.,* 62: 75–85.

Rao XJ, Shahzad T, Liu S, Wu P, He YT, Sun WJ, Fan XY, Yang YF, Shi Q, Yu XQ, 2015b. Identification of C-type lectin-domain proteins (CTLDPs) in *silkworm Bombyx mori*. *Dev. Comp. Immunol.,* 53(2): 328–338.

Rao XJ, Xu XX, Yu XQ, 2011. *Manduca sexta* moricin promoter elements can increase promoter activities of *Drosophila melanogaster* antimicrobial peptide genes. *Insect Biochem. Mol. Biol.,* 41(12): 982–992.

Rao XJ, Yu XQ, 2010. Lipoteichoic acid and lipopolysaccharide can activate antimicrobial peptide expression in the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Dev. Comp. Immunol.,* 34(10): 1119–1128.

Schnitger AK, Yassine H, Kafatos FC, Osta MA, 2009. Two C-type lectins cooperate to defend *Anopheles gambiae* against Gram-negative bacteria. *J. Biol. Chem.,* 284(26): 17616–17624.

Shen DX, Chu Y, Hong F, Liu Y, Wang GR, An CJ, 2015. Asian corn borer c-type lectin CTL6 cloning and functional analysis. *Acta Entomlogica Sinica*, 58(11): 1177–1185. [沈东旭, 初源, 洪芳, 刘杨,王桂荣, 安春菊, 2015. 亚洲玉米螟 C 型凝集素 CTL6 的克隆和功能分析. 昆虫学报, 58(11): 1177–1185.]

Smith VJ, 2010. Immunology of Invertebrates: Cellular. eLS. New York : John Wiley & Sons, Ltd. 15–20.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S, 1994. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6. 0. *Mol. Biol. Evol*., 30(2): 2725–2729.

Tanji T, Shiraishi H, Natori S, Ohashi-Kobayashi A, 2008. Differential activation of the lectin and antimicrobial peptide genes in *Sarcophaga peregrina* (the flesh fly). *Arch. Insect Biochem. Physiol.,* 69(69): 189–198.

Thompson MR, Kaminski JJ, Kurt-Jones EA, Fitzgerald KA, 2011. Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Viruses*, 3(6): 920–940.

Van den Berg LM, Gringhuis SI, Geijtenbeek TB, 2012. An evolutionary perspective on C-type lectins in infection and immunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.,* 1253(1): 149–158.

Wang XW, Zhao XF, Wang JX, 2014. C-type lectin binds to beta-integrin to promote hemocytic phagocytosis in an invertebrate. *J. Biol. Chem.,* 289(4): 2405–2414.

Yi HY, Chowdhury M, Huang YD, Yu XQ, 2014. Insect antimicrobial peptides and their applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* 98(13): 5807–5822.

Yu XQ, Gan H, Kanost MR, 1999. Immulectin, an inducible C-type lectin from an insect, *Manduca sexta*, stimulates activation of plasma prophenol oxidase. *Insect Biochem. Mol. Biol.,* 29(7): 585–597.

Yu XQ, Kanost MR, 2000. Immulectin-2, a lipopolysaccharide-specific lectin from an insect, *Manduca sexta*, is induced in response to gram-negative bacteria. *J. Biol. Chem.,* 275(48): 37373–37381.

Yu XQ, Kanost MR, 2004. Immulectin-2, a pattern recognition receptor that stimulates hemocyte encapsulation and melanization in the *tobacco hornworm*, *Manduca sexta*. *Dev. Comp. Immunol*., 28(9): 891–900.

Yu XQ, Ling E, Tracy ME, Zhu Y, 2006. Immulectin-4 from the *tobacco hornworm Manduca sexta* binds to lipopolysaccharide and lipoteichoic acid. *Insect Mol. Biol.,* 15(2): 119–128.

Yu XQ, Tracy ME, Ling E, Scholz FR, Trenczek T, 2005. A novel C-type immulectin-3 from *Manduca sexta* is translocated from hemolymph into the cytoplasm of hemocytes. *Insect Biochem. Mol. Biol.,* 35(4): 285–295.

Zelensky AN, Gready JE, 2005. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J.,* 272(24): 6179–6217.

Zhan MY, Shahzad T, Yang PJ, Liu S, Yu XQ, Rao XJ, 2016. A Single-CRD C-type lectin is important for bacterial clearance in the *silkworm*. *Dev. Comp. Immunol*., 65: 330–339.

Zhang XW, Wang XW, Sun C, Zhao XF, Wang JX, 2011. C-type lectin from red swamp crayfish *Procambarus clarkii* participates in cellular immune response. *Arch. Insect Biochem. Physiol.,* 76(3): 168–184.

Zhu YT, Zhang X, Wang SC, Li WW, Wang Q, 2016. Antimicrobial functions of EsLecH, a C-type lectin, via JNK pathway in the Chinese *mitten crab*, *Eriocheir sinensis*. *Dev. Comp. Immunol*., 61: 225–235.