管氏肿腿蜂毒液抗凝血酶III基因的克隆与表达分析*

韩开健[1**] 樊晓红[1] 吴朝妍[1] 朱家颖[1, 2***]

（1. 西南林业大学云南省森林灾害预警与重点实验室，昆明 650224；
2. 西南林业大学西南山地资源保育与利用教育部重点实验室，昆明 650224）

摘 要 **【目的】** 克隆和表达管氏肿腿蜂 *Scleroderma guani* 毒液抗凝血酶III（Antithrombin Ⅲ）基因 *SgAT-Ⅲ*，为深入研究该毒液基因的生理功能奠定基础。**【方法】** 利用逆转录 PCR 技术克隆 *SgAT-Ⅲ*基因开放阅读框（Open reading frame，ORF）序列，使用生物信息学软件分析其基因序列结构特征，通过 qPCR 技术分析其在雌成虫不同组织中的表达模式，采用载体 pCzn1 对其进行原核表达。**【结果】** 克隆得到 *SgAT-Ⅲ*基因的 ORF，长 1 338 bp，编码 446 个氨基酸，其中第 1-19 位氨基端为信号肽，理论分子量 49.49 ku，等电点 6.23。多序列比对分析表明，SgAT-Ⅲ与蚂蚁 AT-Ⅲ具有较高的氨基酸一致性（>64%），C 末端具有 serpin 蛋白家族典型反应中心环区，含有供靶标蛋白识别的活性裂解位点。系统发育分析表明，SgAT-Ⅲ与膜翅目其他昆虫的 AT-Ⅲ亲缘关系较近，且与蚂蚁的 AT-Ⅲ聚为一支。qPCR 分析表明，*SgAT-Ⅲ*基因在毒液器官中高表达。SDS-PAGE 电泳检测发现，成功表达 SgAT-Ⅲ重组蛋白，纯化得到高纯度的重组蛋白。**【结论】**克隆得到 *SgAT-Ⅲ*基因，其在毒液器官中高表达，纯化得到 SgAT-Ⅲ重组蛋白，为进一步研究该毒液基因的生理功能奠定了基础。

关键词 管氏肿腿蜂；抗凝血酶III；基因克隆；表达特征；原核表达

Cloning and expression of the venom antithrombin Ⅲ gene in *Scleroderma guani* (Hymenoptera: Bethylidae)

HAN Kai-Jian[1**] FAN Xiao-Hong[1] WU Chao-Yan[1] ZHU Jia-Ying[1, 2***]

(1. Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control of Yunnan Province, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China; 2. Key Laboratory for Forest Resources Conservation and Utilization in the Southwest Mountains of China, Ministry of Education, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

Abstract **[Objectives]** The aim of this study was to clone and express the venom antithrombin Ⅲ gene of *Scleroderma guani* (*SgAT-Ⅲ*) and thereby provide a basis for characterizing the physiological function of this gene. **[Methods]** The open reading frame (ORF) sequence of the *SgAT-Ⅲ* gene was cloned by reverse transcription PCR technology and its sequence structure analyzed with bioinformatic software. The gene expression profiles of SgAT-Ⅲ in different developmental stages and tissues of female adults were detected with qPCR. The gene was expressed using the prokaryotic vector pCzn1. **[Results]** The ORF of the *SgAT-Ⅲ* gene was successfully cloned and found to be 1 338 bp in length, encoding 446 amino acids with a signal peptide comprised of amino acids 1-20, a predicted molecular weight of 49.49 ku and an isoelectric point (pI) of 6.23. The results of multiple sequence alignment revealed that SgAT-Ⅲ shares high amino acid identity (>64%) with SgAT-Ⅲs of other members of the Formicidae. Its C-terminal sequence has a typical, reactive, center loop region of the serpin protein family, and contains an active cleavage site that can be recognized by target protease. Phylogenetic analysis indicates that

*资助项目 Supported projects：国家自然科学基金项目（32060126）；云南省高层次人才培养支持计划“青年拔尖人才”专项（YNWR-QNBJ-2018-393）；中国科学院“西部之光”人才培养计划“西部青年学者”项目

**第一作者 First author，E-mail：597183457@qq.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：jyzhu@swfu.edu.cn

收稿日期 Received：2020-12-21；接受日期 Accepted：2021-08-06

SgAT-Ⅲ is closely related to AT-Ⅲs of other hymenopteran insects, particularly those of ants. qPCR analysis revealed that the *SgAT-Ⅲ* gene was abundantly expressed in the venom apparatus. SDS-PAGE electrophoresis detection revealed that the recombinant SgAT-Ⅲ was successfully expressed, and that high-purity recombinant SgAT-Ⅲ was obtained. **[Conclusion]** The SgAT-Ⅲ gene was successfully cloned and found to be abundantly expressed in the venom apparatus. Obtaining this purified, recombinant protein lays a foundation for further investigation of the physiological function of SgAT-Ⅲ.

Key words *Scleroderma guani*; antithrombin Ⅲ; gene cloning; expression profile; prokaryotic expression

丝氨酸蛋白酶抑制剂普遍存在于生物体内，参与调控诸多重要的蛋白质水解级联反应，包括哺乳动物的凝血途径和节肢动物的免疫应答、激素分泌、生长发育等（Meekins *et al.*，2017；Sachetto and Mackman，2019）。抗凝血酶Ⅲ（Antithrombin Ⅲ，AT-Ⅲ）隶属于丝氨酸蛋白酶抑制剂的 serpin 家族，与其它丝氨酸蛋白酶抑制剂在氨基酸序列上具有 30%左右的一致性，其分子量在 50 ku 左右，N 端具有 serpin 的特殊结构域，C 末端具有 3 个 β-折叠，8-9 个 α-螺旋结构和 1 个反应中心环（Reactive center loop，RCL）区的保守三级结构（Gettins，2002）。现有研究发现，脊椎动物 AT-Ⅲ与其它 serpin 抑制的作用原理相同，以不可逆的自杀性机制抑制靶标蛋白酶活性，从而实现对蛋白水解级联反应的调控，主要起抑制血栓形成、抗炎和抗血管生成作用（Huntington *et al.*，2000；Huntington，2013）。鉴于 AT-Ⅲ对抑制血栓形成具有重要作用，国内外学者对 AT-Ⅲ及其同源物的作用机制开展了大量研究，发现其通过调节凝血级联反应中的凝血酶及凝血因子而发挥作用（Koh and Kini，2009；Huntington，2014）。如，吸血动物（虱、蚊、蝇、蚤、寄生线虫和蝙蝠）唾液中的 AT-Ⅲ能与凝血酶及凝血因子互作，进而成功抑制哺乳动物血液凝固（Sachetto and Mackman，2019）。

AT-Ⅲ作为动物毒液的重要成分，与高等哺乳动物 AT-Ⅲ的同源性很高。如，巴西具窍蝮蛇 *Bothrops jararaca* 毒液 AT-Ⅲ和人 *Homo sapiens* AT-Ⅲ之间的氨基酸高度一致（de Morais *et al.*，2009）。此外，现有研究表明，动物毒液 AT-Ⅲ与脊椎动物 AT-Ⅲ的生理功能相似，具有抗凝血功能（如，黄绿原矛头蝮 *Protobothrops flavoviridis* 和巴西具窍蝮蛇毒液 AT-Ⅲ能抑制血栓形成），并具有抗炎作用（Kini，2011；Morais-Zani *et al.*，2015）。鉴于毒液 AT-Ⅲ的医药应用价值，国内外学者对其开展了大量研究，并已将来源于蛇毒的 AT-Ⅲ研发为抗血栓药物进行使用（Kini，2011）。

尽管毒液 AT-Ⅲ具有较好的应用价值，但目前有关动物毒液 AT-Ⅲ的研究主要集中在蛇中（Slagboom *et al.*，2017；Khan *et al.*，2018）。昆虫作为世界上最大的有毒动物类群，研究发现蜜蜂毒液中存在高丰度的 AT-Ⅲ（Danneels *et al.*，2015），且昆虫毒液中鉴定到的 AT-Ⅲ与蛇毒中的 AT-Ⅲ同源性较高（de Oliveira *et al.*，2015），但其功能和作用机制尚不清楚。就昆虫毒液 AT-Ⅲ的研究而言，除在蜜蜂中有研究报道外，迄今仅有 AT-Ⅲ存在于双斑镶颚姬蜂 *Hyposoter didymator* 和管氏肿腿蜂 *Scleroderma guani* 毒液中的报道，但未见其编码基因的表达特征以及功能方面的研究（Dorémus *et al.*，2013；Zhu，2016）。

有鉴于此，本论文以天牛、小蠹等重要蛀干害虫幼虫和蛹期外寄生蜂——管氏肿腿蜂为研究对象，在前期研究发现该蜂毒液富含 AT-Ⅲ的基础上（Zhu，2016），为今后深入研究该蜂毒液 AT-Ⅲ基因（*SgAT-Ⅲ*）的功能，克隆了 *SgAT-Ⅲ* 基因的开放阅读框（Open reading frame，ORF）序列，分析了其在雌成虫不同组织中的表达特征，对该毒液基因进行了原核表达，纯化了其重组蛋白。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

黄粉甲 *Tenebrio molitor* 为实验室繁育多代的种群，利用麦麸作为饲料进行饲养（Zhu *et al.*，2013）。利用刚化蛹的黄粉甲作为寄主饲养管氏

肿腿蜂，用蘸透 20%蜂蜜水的脱脂棉球作为成蜂营养源（Zhu *et al.*，2013）。

1.2　RNA 的提取及 cDNA 合成

取羽化 1-5 d 内的管氏肿腿蜂雌蜂，放入无 RNase 的离心管中，加入液氮后置于冰上研磨后，用 Trizol 试剂（Invitrogen）提取雌成虫总 RNA。采用分光光度仪和 1%琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的含量和完整性后，取 5 μg 总 RNA，利用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit（Thermo Scientific）反转录试剂盒，按照使用说明书合成 cDNA 模板，并于 - 20 ℃保存备用。

1.3　*SgAT-III*基因的克隆及测序

基于实验室前期管氏肿腿蜂毒液器官转录组测序获得的 *SgAT-III*基因序列（Zhu，2016），设计 PCR 正反向引物（5′-ATGAATTCAATA-GCACTCTTCGTGGCCCT-3′和 5′-TTATACATA-TTCCTGTACAGAGAGACCT-3′）扩增其 ORF 序列。PCR 反应体系为 25 μL：cDNA 1 μL, 正反向引物各 1 μL, dNTP Mixture 12.5 μL, 超纯水 9.5 μL。PCR 反应条件为：94 ℃预变性 3 min；94 ℃变性 30 s，65 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 1 min 30 s，35 个循环；72 ℃ 10 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后，送铂尚生物技术（上海）有限公司进行测序。

1.4　*SgAT-III*基因的序列分析

使用 DNASTAR7.1（Burland，2000）对测序获得的 *SgAT-III*基因序列进行分析，序列同源比对搜索采用 BlastP（https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi），理化性质分析用 ProtParam 软件(https://web.expasy.org/protparam/)，多序列比对采用 ClustalX1.83（Thompson *et al.*，1997），结构域预测使用 Smart server（http://smart.embl-heidelberg.de/），信号肽预测用 SignalP 4.0（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/），进化树构建用 MegaX 中的最大似然法（Maximum Likelihood，ML）（Bootstrap 设置为 1 000 次重复）(Kumar *et al.*，2018)，序列一级结构绘制采用 IBS1.03 绘制（Liu *et al.*，2015）。

1.5　*SgAT-III*基因的表达特征分析

分别收集管氏肿腿蜂雌成虫不同组织（头部、胸部、去除毒液器官的腹部和毒液器官）样品于 1.5 mL 离心管中，加入液氮后研磨后，再加入 Trizol（Invitrogen）试剂混匀，于 - 80 ℃保存备用，每个样品共设 3 个生物学重复。参照 1.2 的方法提取各样品总 RNA，使用 DNAase 去除基因组 DNA 后，合成相应的 cDNA 模板。根据克隆获得的 *SgAT-III*基因 ORF 序列，设计引物（5′-ACCACAAAGGGTCAAATCCA-3′和 5′-AATCTGCTCTGCCAGAAACC-3′），以 *18S RNA* 基因作为内参基因，采用实时荧光定量 PCR（Real time fluorescence quantitative PCR，qPCR）对 *SgAT-III*基因在不同发育阶段和雌蜂不同组织中的表达特征进行分析。qPCR 反应体系为：Bestar® qPCR mastermix 荧光定量试剂盒（DBIR Bioscience, Germany）10 μL，正反向引物（10 μmol·L^{-1}）各 1 μL，cDNA 1 μL，ddH_2O_2 8 μL。qPCR 反应程序为：95 ℃预变性 2 min，95 ℃ 10 s，58 ℃ 31 s，72 ℃ 30 s，40 个循环。

1.6　*SgAT-III*基因的原核表达

运用 PAS（PCR-based accurate synthesis）方法合成含有 *Nde*I 和 *Xba*I 酶切位点的 S*gAT-III*基因，经测序验证序列正确和酶切后，将其链接到表达载体 pCzn1，转化大肠杆菌克隆菌株 DH5α。菌落 PCR 及测序验证表达载体构建成功后，用质粒提取试剂盒提取质粒，并转入大肠杆菌表达菌株 BL21（DE3）感受态细胞中，进行原核表达。将验证正确的表达菌株菌液和空载体菌液按照 1∶100 接种于 30 mL LB（Lysogeny broth）培养液中，37 ℃ 220 r·min^{-1} 振摇培养至菌液 OD_{600} 为 0.6，加入终浓度为 0.5 mmol·L^{-1} 的异丙基 -β-D- 硫代半乳糖苷（Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside，IPTG），诱导培养 4 h。取出 1 mL 培养物，10 000 g 室温离心 2 min，去培养基，磷酸盐缓冲液（Phosphate-buffered saline，PBS）重悬菌液，离心取上清。然后，再加入 PBS 至沉淀中，超声波破碎后离心，取上清。利用 Ni-IDA-Sepharose CL-6B 亲和层析柱对重组表

达蛋白进行纯化，纯化重组蛋白在 PBS 中透析过夜后，加入 PBS 进行溶解。对获得的菌液上清、沉淀中的蛋白以及纯化后的蛋白，利用 12% SDS-PAGE（Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis）电泳检测，考马斯亮蓝 R-250 染色过夜，脱色液脱色处理后，对凝胶进行拍照分析。

1.7 数据分析

qPCR 数据采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法分析（Livak and Schmittgen，2001）。利用 SPSS 17.0 软件中的 Fisher's least significant difference（LSD）法分析不同样品中 *SgAT-Ⅲ*基因的相对表达量差异显著性（P<0.05）。采用 GraphPad Prism 8 软件（GraphPad Software Inc.）作图。

2 结果与分析

2.1 *SgAT-Ⅲ*基因的克隆和序列分析

克隆获得 *SgAT-Ⅲ*基因的 ORF 序列，长 1 338 bp，编码 446 个氨基酸，理论分子量为 49.9 ku，等电点 5.61。信号肽预测结果显示，SgAT-Ⅲ蛋白质序列 N 端包含长为 19 个氨基酸的信号肽序列。SMART 预测结果显示，SgAT-Ⅲ氨基酸序列的第 48-437 位氨基酸残基之间含有 1 个 serpin 家族特有的保守结构域（图 1：A）。利用 BlastP 同源比对方法在 NCBI 中的搜索结果显示，SgAT-Ⅲ与长脊切胸蚁 *Temnothorax*

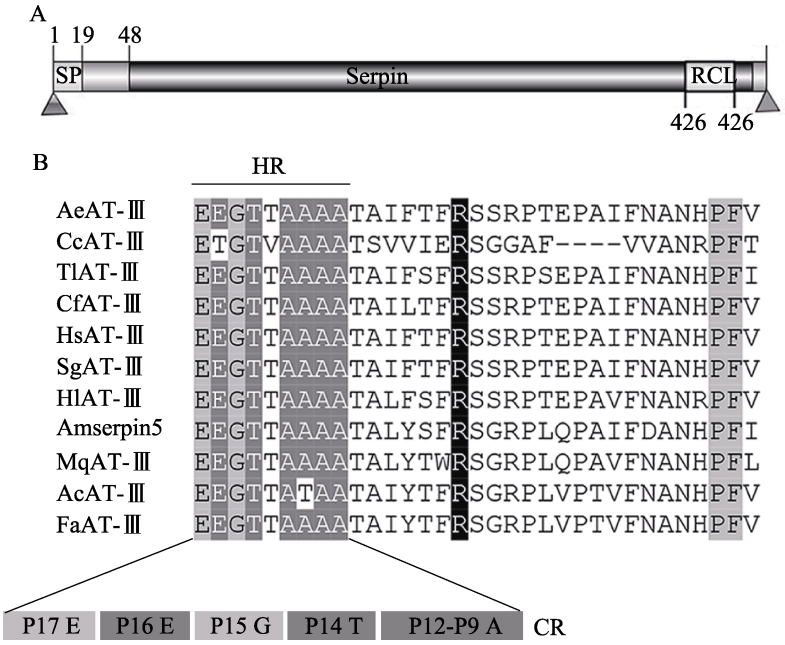

图 1 *SgAT-Ⅲ* 基因编码的氨基酸序列结构分析

Fig. 1 Amino acid sequence structure analysis of the *SgAT-Ⅲ* gene

A. SgAT-Ⅲ氨基酸序列结构；B. 昆虫 AT-Ⅲ RCL 区多序列比对。A. Amino acid sequence structure of the SgAT-Ⅲ; B. Multiple sequences alignment of the RCL of insect's AT-IIIs.

三角形为起始密码子和终止密码子。SP：信号肽；Serpin：丝氨酸蛋白酶抑制剂结构域；RCL：反应中心环；HR：铰链区；CR：保守残基。预测的 P1 残基以黑色标记，其他保守氨基酸残基以不同颜色标记。Ae：多次顶蚁；Ac：中华蜜蜂；Am：意大利蜜蜂；Cc：纵脊驼背蚁；Cf：佛罗里达弓背蚁；Fa：山潜蝇茧蜂；Hl：蓝莓蜂；Hs：跳镰猛蚁；Mq，四条麦蜂；Sg：管氏肿腿蜂；Tl，长脊切胸蚁。

The initiation and termination codon were indicated by triangles. SP: Signal peptide; Serpin: Domain of the serine proteinase inhibitor; RCL: Reactive center loop; HR, Hinge region; CR, Conserved residues. The predicted P1 residues were marked in black, and other conserved amino acid residues were marked in gray. Ae: *Acromyrmex echinatior*; Ac: *Apis cerana*; Am: *A. mellifer*; Am: *Apis mellifera*; Cc: *Cyphomyrmex costatus*; Cf: *Camponotus floridanus*; Fa: *Fopius arisanus*;Hl: *Habropoda laboriosa*; Hs: *Harpegnathos saltator*; Mq: *Melipona quadrifasciata*; Sg: *Scleroderma guani*; Tl: *Temnothorax longispinosus*.

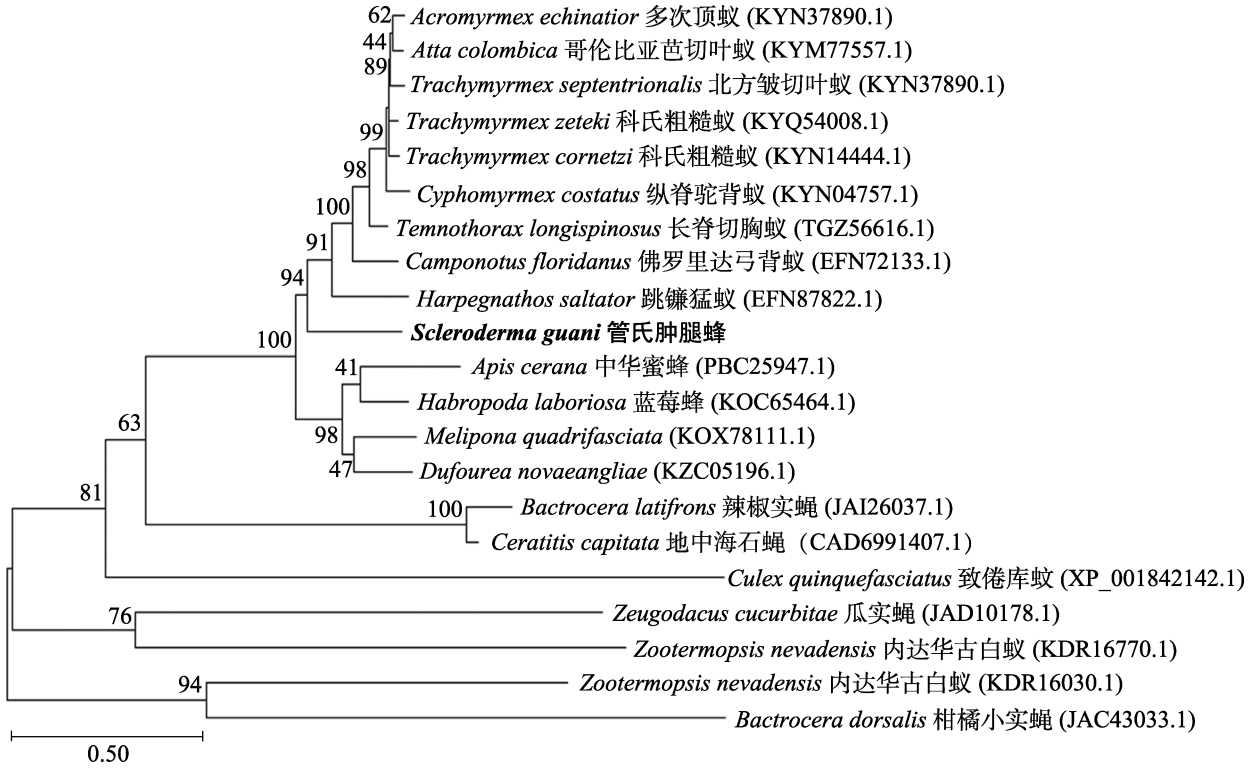

图 2　昆虫 AT-Ⅲ系统发育树

Fig. 2　Phylogenetic tree of AT-Ⅲs in insects

longispinosus 和北方皱切叶蚁 *Trachymyrmex septentrionali* AT-Ⅲ的氨基酸序列一致性最高，分别为 68.09%和 64.91%。多序列比对结果表明，SgAT-Ⅲ与其它昆虫 AT-Ⅲ相似，C 端有保守的 RCL 区，RCL 区中的活性裂解中心氨基酸位点为 Arg（R），P17E、P16E、P15G、P14T、P12-P9A 为铰链区共有的保守氨基酸残基（图 1：B）。系统进化树分析结果显示，SgAT-Ⅲ和蚂蚁 AT-Ⅲ聚为一支（图 2）。

2.2　*SgAT-Ⅲ*基因的表达特征分析

在雌成虫不同组织中，*SgAT-Ⅲ*基因在毒液器官中高度表达，其表达量显著高于头、胸和腹部残体中的表达量（F=17.464，df=3，P<0.05）（图 3）。

2.3　*SgAT-Ⅲ*基因的原核表达

将去除信号肽的 Sg*AT-Ⅲ*基因 ORF 序列插入到 pCzn1 原核载体中，转化大肠杆菌后诱导表达，利用 Ni 亲和柱对表达产物进行纯化。

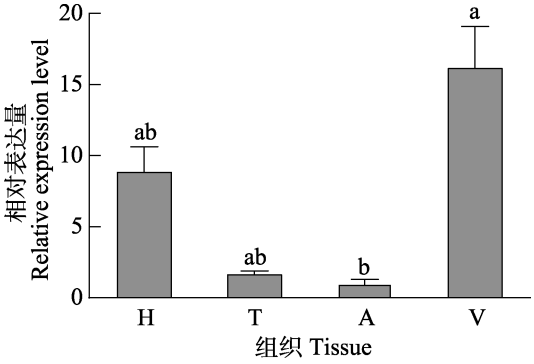

图 3　*SgAT-Ⅲ* 基因在不同组织中的表达量

Fig. 3　Expression levels of *SgAT-Ⅲ* gene in different tissues

H：头；T：胸；A：腹部（去除毒液器官）；V：毒液器官。

数据为平均值±标准差，柱上标有不同字母表示不同组织中的基因相对表达量存在显著差异（P<0.05，LSD 检验）。

H: Head; T: Thorax; A: Abdomen without venom apparatus; V: Venom apparatus.

Data in the figure are mean ± SD. Histograms with different letters indicate significant difference gene expression levels among different tissues (P<0.05, LSD test).

SDS-PAGE 电泳检测结果显示，重组的 SgAT-Ⅲ融合蛋白在大肠杆菌成功表达，以可溶性蛋白形式存在于上清中，SgAT-Ⅲ重组蛋白的分子量约 50 ku，与理论分子量相符，且纯化得到的 SgAT-Ⅲ重组蛋白纯度高（图 4）。

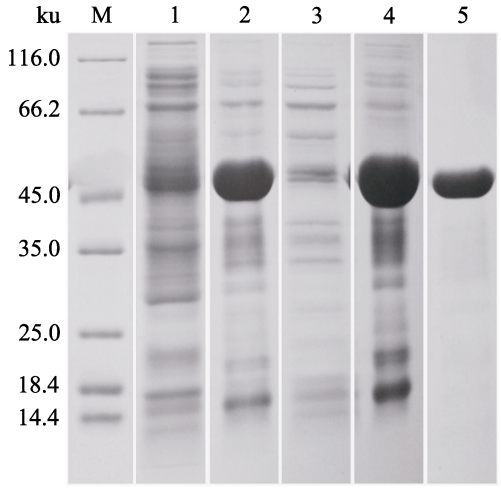

图 4　SgAT-Ⅲ重组蛋白原核表达

Fig. 4　Prokaryotic expression of SgAT-Ⅲ recombinant protein

M：标准蛋白；1：未诱导表达的蛋白；2：诱导后表达的蛋白；3：诱导表达的沉淀蛋白；4：诱导表达的上清蛋白；5：纯化蛋白。

M: Protein marker; 1: Protein of uninduction; 2: Protein after induction; 3: Precipitate protein after induction; 4: Supernatant protein after induction; 5: Purified protein.

3　讨论

在前期发现 AT-Ⅲ为管氏肿腿蜂毒液高丰度成分的基础上（Zhu，2016），采用逆转录 PCR 方法成功克隆获得了 *SgAT-Ⅲ*基因 ORF 序列。氨基酸序列分析表明，SgAT-Ⅲ具有保守的 serpin 结构域，是 serpin 超家族成员（Kumar *et al.*，2013）。现有研究表明，已报道的毒液 AT-Ⅲ同源物作为节肢动物毒液组分是分泌型蛋白，其 N 端具有信号肽序列（de Graaf *et al.*，2010）。SignalP 预测结果显示，SgAT-Ⅲ的 N 端也存在信号肽序列，表明该毒液蛋白也是分泌蛋白。氨基酸序列分析表明，SgAT-Ⅲ的氨基酸序列中具有保守的 serpin 结构域，是 serpin 超家族成员（Kumar *et al.*，2013）。与 serpin 相似，SgAT-Ⅲ拥有丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族具有的典型 RCL 区，且含有能被靶标蛋白酶识别的活性裂解位点 P1。有研究证实，P1 位置的氨基酸残基决定丝氨酸蛋白酶抑制剂的特异性，P1 位置具有 Arg（R）或 Lys（K）残基的丝氨酸蛋白酶抑制剂可以抑制胰凝乳蛋白酶活性（Lin *et al.*，2017；Yang *et al.*，2017）。SgAT-Ⅲ的 P1 位置是 R 残基，表明其可能具有抑制胰凝乳蛋白酶的功能。系统发育树结果表明，SgAT-Ⅲ与蚂蚁以及其他膜翅目昆虫 AT-Ⅲ聚为一支，表明 AT-Ⅲ在膜翅目昆虫中具有相对保守的进化特性，且它们之间应该具有相似的生理功能。

前期蛋白质谱分析结果证实，SgAT-Ⅲ为管氏肿腿蜂的高丰度毒液蛋白组分（Zhu，2016）。与该结果相吻合，基因表达特征分析结果表明，*SgAT-Ⅲ*基因在管氏肿腿蜂毒液器官中高表达，但在毒液器官中高表达的调控机制值得后续深入研究。与在 SgAT-Ⅲ的研究结果不同，Dorémus 等（2013）研究发现双斑镶颚姬蜂毒液中 AT-Ⅲ含量较低。这表明 AT-Ⅲ作为毒液蛋白，其含量在不同类群的寄生蜂间存在差异。而且，尽管已有多种寄生蜂的毒液蛋白组分被揭示，但未见 AT-Ⅲ作为毒液蛋白组分在除管氏肿腿蜂和双斑镶颚姬蜂之外的其他寄生蜂中被报道（Poirié *et al.*，2014；Zhu，2016），据此认为 AT-Ⅲ不是寄生蜂毒液中普遍存在的成分。另外，尽管仅有极少数的研究报道了 AT-Ⅲ是蜜蜂主要毒液成分，但是因管氏肿腿蜂隶属于青蜂总科 Chrysidoidea，与蚁总科 Formicoidea 具有很近的亲缘关系，且它们与社会性蜂类之间具有一些相似的社会习性（Peters *et al.*，2017）。为此，结合膜翅目昆虫的进化历史推测认为，在膜翅目中，AT-Ⅲ作为毒液蛋白应存在有趣的起源进化现象，不仅与膜翅目昆虫的习性进化相关联，而且可能先在隶属于姬蜂总科 Ichneumonoidea、金小蜂总科 Chalcidoidea、瘿蜂总科 Cynipoidea 等的某些寄生蜂中起源后，再在隶属于青蜂总科、蚁总科、胡蜂总科 Vespoidea、蛛蜂总科 Pompiloidea 等的蜂类中进化成为主要毒液蛋白成分，并在其他社会性蜂类毒液中以高丰度蛋白

存在。

本研究不仅克隆得到了管氏肿腿蜂 *SgAT-III* 基因序列，而且成功利用原核表达载体 pCzn1 对其进行了表达。表达产物的 SDS-PAGE 电泳结果显示，该毒液基因的重组表达蛋白主要存在于上清中，表明应该具有生理功能。而且，分析结果还显示，纯化得到的 SgAT-III重组蛋白纯度高。一直以来，AT-III生理功能的研究较为有限，且主要集中于脊椎动物中。就 AT-III作为毒液蛋白的生理功能研究而言，迄今仅探明蛇毒液 AT-III具有抗凝血和抗炎功能，尚乏其它动物毒液 AT-III的功能研究（Morais-Zani *et al.*，2015）。高纯度 SgAT-III重组蛋白的获得，为后期制备其特异性抗体以及研究其生理功能奠定了基础。

参考文献 (References)

Burland TG, 2000. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. *Methods Molecular Biology*, 132: 71–91.

de Graaf DC, Aerts M, Brunain M, Desjardins CA, Jacobs FJ, Werren JH, Devreese B, 2010. Insights into the venom composition of the ectoparasitoid wasp *Nasonia vitripennis* from bioinformatic and proteomic studies. *Insect Molecular Biology*, 19 (Suppl.1): 11–26.

de Morais KB, Vieira CO, Hirata IY, Tanaka-Azevedo AM, 2009. *Bothrops jararaca* antithrombin: Isolation, characterization and comparison with other animal antithrombins. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 152(2): 171–176.

de Oliveira UC, Candido DM, Dorce VA, Junqueira-de-Azevedo Ide L, 2015. The transcriptome recipe for the venom cocktail of *Tityus bahiensis* scorpion. *Toxicon*, 95: 52–61.

Dorémus T, Urbach S, Jouan V, Cousserans F, Ravallec M, Demettre E, Wajnberg E, Poulain J, Azéma-Dossat C, Darboux I, Escoubas JM, Colinet D, Gatti JL, Poirié M, Volkoff AN, 2013. Venom gland extract is not required for successful parasitism in the polydnavirus-associated endoparasitoid *Hyposoter didymator* (Hym. Ichneumonidae) despite the presence of numerous novel and conserved venom proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43(3): 292–307.

Danneels EL, Vaerenbergh MV, Debyser G, Devreese B, de Graaf DC, 2015. Honeybee venom proteome profile of queens and winter bees as determined by a mass spectrometric approach. *Toxins*, 7(11): 4468–4483.

Gettins PG, 2002. Serpin structure, mechanism, and function. *Chemical Reviews*, 102(12): 4751–4804.

Huntington JA, Read RJ, Carrell RW, 2000. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature*, 407(6806): 923–926.

Huntington JA, 2013. Thrombin inhibition by the serpins. *Thrombosis and Haemostasis*, 11(Suppl.1): 254–264.

Huntington JA, 2014. Natural inhibitors of thrombin. *Thrombosis and Haemostasis*, 111(4): 583–589.

Khan S, Gul A, Noreen R, Ahmed S, Ashraf M, Awan MSB, Niazi ZR, Khan N, 2018. Potential applications of venom peptides as anti-thrombotic agents for management of arterial and deep-vein thrombosis. *Protein and Peptide Letters*, 25(7): 677–687.

Kini RM, 2011. Toxins in thrombosis and haemostasis: Potential beyond imagination. *Thrombosis and Haemostasis*, 9(Suppl.1): 195–208.

Koh CY, Kini RM, 2009. Molecular diversity of anticoagulants from haematophagous animals. *Thrombosis and Haemostasis*, 102(3): 437–453.

Kumar A, Bhandair A, Sarde SJ, Goswami C, 2013. Sequence, phylogenetic and variant analyses of antithrombin III. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 440(4): 714–724.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K, 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology Evolution*, 35(6): 1547–1549.

Lin HL, Lin XJ, Zhu JW, Yu XQ, Xia XF, Yao F, Yang G, You MS, 2017. Characterization and expression profiling of serine protease inhibitors in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *BMC Genomics*, 18(1): 162.

Liu W, Xie Y, Ma J, Luo X, Nie P, Zuo Z, Lahrmann U, Zhao Q, Zheng Y, Zhao Y, Xue Y, Ren J, 2015. IBS: An illustrator for the presentation and visualization of biological sequences. *Bioinformatics*, 31(20): 3359–3361.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$. *Methods*, 25(4): 402–408.

Meekins DA, Kanost MR, Michel K, 2017. Serpins in arthropod biology. *Seminars in Cell Developmental Biology*, 62: 105–119.

Morais-Zani KD, Grego KF, Torquato RJS, Silva CS, Tanaka AS, Tanaka-Azevedo AM, 2015. Cloning, characterization and anti-inflammatory properties of *Bothrops jararaca* snake antithrombin. *Protein and Peptide Letters*, 22(5): 410–418.

Peters RS, Krogmann L, Mayer C, Donath A, Gunkel S, Meusemann K, Kozlov A, Podsiadlowski L, Petersen M, Lanfear R, Diez PA, Heraty J, Kjer KM, Klopfstein S, Meier R, Polidori C, Schmitt T,

Liu S, Zhou X, Wappler T, Rust J, Misof B, Niehuis O, 2017. Evolutionary history of the Hymenoptera. *Current Biology*, 27(7): 1013–1018.

Poirié M, Colinet D, Gatti JL, 2014. Insights into function and evolution of parasitoid wasp venoms. *Current Opinion in Insect Science*, 6: 52–60.

Sachetto ATA, Mackman N, 2019. Modulation of the mammalian coagulation system by venoms and other proteins from snakes, arthropods, nematodes and insects. *Thrombosis Research*, 178: 145–154.

Slagboom J, Kool J, Harrison R A, Casewell NR, 2017. Haemotoxic snake venoms: Their functional activity, impact on snakebite victims and pharmaceutical promise. *British Journal of Haematology*, 177(6): 947–959.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG, 1997. The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24): 4876–4882.

Zhu JY, 2016, Deciphering the main venom components of the ectoparasitic ant-like bethylid wasp, *Scleroderma guani*. *Toxicon*, 113: 32–40.

Zhu JY, Yang P, Zhang Z, Wu GX, Yang B, 2013. Transcriptomic immune response of *Tenebrio molitor* pupae to parasitization by *Scleroderma guani*. *PLoS ONE*, 8(1): e54411.

Yang L, Mei Y, Fang Q, Wang J, Yan Z, Song Q, Lin Z, Ye G, 2017. Identification and characterization of serine protease inhibitors in a parasitic wasp, *Pteromalus puparum*. *Scientific Reports*, 7(1): 15755.

****

封面介绍

平行绿蟹蛛 *Oxytate parallela* (Simon)

蜘蛛是节肢动物门 Arthropoda 蛛形纲 Arachnida 蜘蛛目 Araneae)种的通称。《应用昆虫学报》不仅发表昆虫（节肢动物门的昆虫纲 Insecta）的各类研究成果，同时也从广义角度关注蜘蛛等相关研究成果的报道，同时很多蜘蛛是昆虫的天敌。本期封面照片为平行绿蟹蛛 *Oxytate parallela* (Simon)（蟹蛛科 Thomisidae，李枢强鉴定物种名称，张润志拍摄照片），2020 年 8 月 16 日拍摄于北京延庆四海。平行绿蟹蛛分布于北京、河北、浙江、陕西等地。雌蛛长 7-11 mm，身体绿色。眼区黄色，眼有眼丘，前侧眼>后侧眼>前中眼>后中眼。

（张润志，中国科学院动物研究所）