

家蚕 C 类清道夫受体 BmSR-C 的基因克隆、 原核表达及亚细胞定位

申利[#], 许川[#], 张蕾, 张奎, 毛景欣, 潘光照,
李重阳, 胡仁建, 杨丽群^{*}, 崔红娟^{*}

(西南大学, 家蚕基因组生物学国家重点实验室, 重庆 400716)

摘要:【目的】本研究旨在克隆与鉴定家蚕 *Bombyx mori* C 类清道夫受体基因 *BmSR-C*, 为探析其在家蚕免疫中的功能奠定基础。【方法】利用 RACE 技术克隆家蚕 C 类清道夫受体基因全长序列, 并对其生物信息学分析。利用 RT-PCR 和 qPCR 方法对 *BmSR-C* 基因的时空表达情况进行检测。通过原核表达和 Ni⁺亲和层析的方法获得 BmSR-C 重组蛋白, 免疫昆明小鼠制备抗 BmSR-C 多克隆抗体。利用 ELISA 法和 Western blot 分别对鼠抗 BmSR-C 蛋白多克隆抗体的效价和特异性进行检测。构建家蚕 BmSR-C 的真核表达载体, 转染家蚕 BmE 细胞, 分析该蛋白的亚细胞定位情况。【结果】克隆获得家蚕 *BmSR-C* 基因 (GenBank 登录号: BCIBMGA004577), 其开放阅读框 (ORF) 全长为 1 821 bp, 编码 606 个氨基酸残基。BmSR-C 具有典型的 C 类清道夫受体家族结构特征, 主要由 CCP, MAM 和 SO 结构域以及靠近 C 端的单次跨膜结构域组成。进化分析结果显示鳞翅目昆虫 SR-C 单独聚为一支, 家蚕 BmSR-C 与同为鳞翅目昆虫的草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 和大红斑蝶 *Danaus plexippus* 的同源蛋白亲缘关系最为接近。对 *BmSR-C* 基因的时空表达分析表明, *BmSR-C* 在家蚕的马氏管和血细胞中高表达, 而在其他组织中无明显表达; 其在家蚕不同发育时期的血细胞中均有表达, 且在 4 龄眠期的表达量达到峰值。ELISA 检测结果显示, 所制得抗体效价高达 1:128 000; Western blot 检测结果显示, 该抗体可以特异性识别重组蛋白。家蚕 BmE 细胞中的亚细胞定位结果表明 BmSR-C 主要定位于细胞膜。【结论】获得家蚕 C 类清道夫受体基因 *BmSR-C* 的完整 cDNA 序列及其表达特征; 成功制备了 BmSR-C 的多克隆抗体, 利用家蚕 BmE 细胞在细胞水平上分析了 BmSR-C 的亚细胞定位情况, 推测其参与家蚕的生长发育及病原微生物入侵的免疫反应, 为进一步研究 BmSR-C 的生物学功能奠定了基础。

关键词: 家蚕; *BmSR-C*; 表达分析; 原核表达; 亚细胞定位

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2018)10-1132-13

Gene cloning, prokaryotic expression and subcellular localization of a class C scavenger receptor BmSR-C in the silkworm, *Bombyx mori*

SHEN Li[#], XU Chuan[#], ZHANG Lei, ZHANG Kui, MAO Jing-Xin, PAN Guang-Zhao, LI Chong-Yang, HU Ren-Jian, YANG Li-Qun^{*}, CUI Hong-Juan^{*} (State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: 【Aim】 This study aims to clone and identify a class C scavenger receptor gene *BmSR-C* in the

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31672496, 31802142); 中国博士后科学基金 (2017M620408); 重庆自然科学基金项目 (cstc2016jcyjA0425); 重庆高校创新团队建设计划 (CXTDX201601010)

作者简介: 申利, 女, 1992 年 4 月生, 重庆铜梁人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫免疫, E-mail: shenl313@163.com; 许川, 男, 1980 年 2 月生, 四川成都人, 博士, 副教授, 研究方向为细胞生物学, E-mail: xuchuan100@163.com

[#]并列第一作者 Authors with equal contribution

^{*} 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: hongjuan.cui@gmail.com; cysylq@swu.edu.cn

收稿日期 Received: 2018-03-23; 接受日期 Accepted: 2018-06-02

silkworm, *Bombyx mori*, so as to lay a foundation for the further exploration of the function of scavenger receptor class C in the silkworm immunity. 【Methods】 The full-length cDNA of *BmSR-C* was cloned by RACE and analyzed by bioinformatics. The spatial and temporal expression profiles of *BmSR-C* were detected by RT-PCR and qPCR. The BmSR-C recombinant protein was obtained by prokaryotic expression and Ni⁺ affinity chromatography. The antibody was acquired by using the recombinant protein to immunize mice, and its titer and specificity were detected by ELISA and Western blot, respectively. Simultaneously, the subcellular localization of the protein was analyzed after BmSR-C eukaryotic vector was constructed and then transfected into BmE cells of the silkworm. 【Results】 We cloned the full-length cDNA of *BmSR-C* (GenBank accession no. : BGIBMGA004577) from *B. mori*, which contains an ORF of 1 821 bp encoding a putative protein of 606 amino acid residues. BmSR-C has the typical structural features of scavenger receptor class C family, including CCP, MAM and SO domains, as well as a single transmembrane region in the near end of the C-terminus. Evolutionary analysis showed that SR-C proteins from lepidopteran insects clustered alone, and BmSR-C was most closely related to its homologues from *Spodoptera frugiperda* and *Danaus plexippus*. The spatial and temporal expression profiles showed that *BmSR-C* was highly expressed in the Malpighian tubules and hemocytes, but showed no obvious expression in other detected tissues. In addition, *BmSR-C* was expressed in hemocytes during different developmental stages, with the expression peak at the 4th instar larval molting. The titer of the antibody was estimated as high as 1:128 000 dilution ratio through ELISA, and the result of Western blot showed that the antibody could specifically recognize the recombinant protein. The subcellular localization result in BmE cells showed that BmSR-C is mainly located on the cell membrane. 【Conclusion】 *BmSR-C* was cloned and its expression patterns were investigated. The anti-mouse polyclonal antibody was obtained. The subcellular localization of BmSR-C was investigated in BmE cells of the silkworm. It is inferred that BmSR-C may be involved in the growth and development and immune response to the invasion of pathogenic microorganisms in the silkworm. This study provides a foundation for further research of the biological function of BmSR-C in the silkworm.

Key words: *Bombyx mori*; *BmSR-C*; expression profiling; prokaryotic expression; subcellular localization

清道夫受体(scavenger receptor, SR)被定义为可以结合多种配体并有助于去除非己或自身变异靶标的细胞表面受体(PrabhuDas *et al.*, 2017)。基于这一定义,美国国立卫生研究院的15位相关领域的专家讨论研究后提出将这些受体划分为10类,即A-J(PrabhuDas *et al.*, 2017)。清道夫受体在结构上是多种多样的,其生物学功能也非常广泛,它们在生物的内吞、吞噬、粘附和信号传导等过程中发挥重要作用,最终协助免疫细胞消除或降解有害物质(PrabhuDas *et al.*, 2017)。清道夫受体能够识别的配体很广泛,主要包括多聚阴离子,如化学修饰的脂蛋白(如氧化低密度脂蛋白和乙酰化低密度脂蛋白)、多聚鸟嘌呤核苷酸和多聚次黄嘌呤核苷酸、多糖(如硫酸右旋糖酐)、阴离子的磷脂(如丝氨酸磷脂,但卵磷脂不是)和细菌脂多糖(如内毒素)等(Murphy *et al.*, 2005; Plüddemann *et al.*, 2006; González-Lázaro *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2013;

Prabhudas *et al.*, 2014)。清道夫受体广泛的配基识别谱使得其具备多样化的功能,研究显示,清道夫受体与机体的防御、动脉粥样硬化、体内平衡、细胞粘附和癌症进展等都有着不同程度的相关性(Gordon, 2002; Huang *et al.*, 2010; PrabhuDas *et al.*, 2017)。

清道夫受体不仅可以结合乙酰化或氧化的低密度脂蛋白(AcLDL或OxLDL),而且可以识别包括脂磷壁酸(lipoteichoic acid, LTA)、脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)、细菌CpG DNA和酵母 β -葡聚糖等在内的多种病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)(Mukhopadhyay and Gordon, 2004; Sigsgaard *et al.*, 2008)。作为一类重要的模式识别受体(PRRs),清道夫受体通常通过激活内吞作用、吞噬作用或下游信号最终协助对病原微生物的清除(PrabhuDas *et al.*, 2014)。SRA通过结合LTA识别革兰氏阳性菌(Dunne *et al.*, 1994)。在果蝇中,SR-Bs涉及免疫应

答、凋亡细胞的结合与吞噬作用、类胡萝卜素的代谢与运输、信息素的检测与传播以及其他生理过程 (Franc *et al.*, 1999; Kiefer *et al.*, 2002; Philips *et al.*, 2005; Stuart *et al.*, 2005; Agaissé *et al.*, 2005; Voolstra *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007; Benton *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2008)。目前,已经在多种物种中鉴定到 SRC 蛋白,如达氏按蚊 *Anopheles darlingi*、埃及伊蚊 *Aedes aegypti*、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 和库鲁马虾 *Marsupenaeus japonicus* 等 (Misra *et al.*, 2002; Tanaka *et al.*, 2008; Mendes *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2016),然而,关于它们的生物学作用的报道很少。黑腹果蝇 SRC 的 4 种类型中的 dSR-CI 具有介导革兰氏阳性和阴性菌的吞噬作用 (Rämet *et al.*, 2001)。埃及伊蚊 SRC (AaSRC) 可以识别登革热病毒并调节抗菌肽的表达以消除病毒 (Xiao *et al.*, 2014)。库鲁马虾 SRC (MjSRC) 通过增强虾中血细胞对白斑综合征病毒 (WSSV) 的吞噬作用,从而发挥抗病毒作用 (Yang *et al.*, 2016)。此外, MjSRC 通过增强血细胞吞噬作用和抗菌肽的表达而在库鲁马虾的抗菌免疫中发挥重要作用 (Yang *et al.*, 2017)。日本学者 Tanaka 等 (2008) 在全基因组水平对家蚕 *Bombyx mori* 免疫相关基因进行系统鉴定,发现 4 个 A 类清道夫受体基因、13 个 B 类清道夫受体基因和 1 个 C 类清道夫受体基因。家蚕的 A 类清道夫受体 BmSCRASP2 与果蝇、疟原虫 *Plasmodium* 及埃及伊蚊中的 A 类清道夫受体 Corin 结构类似, BmSCRAL1 与果蝇、疟原虫及埃及伊蚊中的 Lox2 结构相似, BmSCRAC1 与果蝇的 CG3921 结构类似,而 BmSCRASP4 则具有独特的结构,但是,它们都含清道夫受体半胱氨酸富集区 (SRCR),因此推测家蚕的 A 类清道夫受体具有与其他物种中 A 类清道夫受体相似的功能,如微生物吞噬性识别和病原体清除作用 (Peiser *et al.*, 2002; Pierini, 2006; Tanaka *et al.*, 2008)。Sakudoh 等 (2010) 鉴定 B 类清道夫受体的另一个成员——家蚕黄茧 C (yellow cocoon, Cameo2) 基因,随后,该课题组又鉴定到一个由 Fresh (F) 基因编码的 SCRB15 (Sakudoh *et al.*, 2013)。董占鹏等通过比较基因组学的方法从家蚕基因组鉴定得到了 14 个家蚕 B 类清道夫受体基因,发现家蚕 B 类清道夫受体具有与哺乳动物 SR-B 相似的 CD36 结构域,其胞外域含有多数 N 端连接糖基化位点、豆蔻酰化位点、磷酸化位点以及簇生半胱氨酸,推测它们可能参与凋亡细胞清除、结合修饰性 LDL、参与免疫防护、脂质代谢及脂类物质的转运及

感觉器官维护等 (董占鹏等, 2010; 董占鹏, 2011; Dong *et al.*, 2015)。2016 年,本实验室赵羽卒等克隆得到了家蚕 B 类清道夫受体的另一个成员的基因 BmSCR8 (赵羽卒等, 2016)。家蚕不仅是一类重要的经济昆虫,同时也是鳞翅目的模式昆虫。然而,家蚕 C 类清道夫受体基因还未被克隆,其相关功能暂无报道。对家蚕 C 类清道夫受体基因的研究将有助于对家蚕以及鳞翅目昆虫的脂类代谢、免疫反应等重要生理机制进行探究,丰富家蚕基因功能研究,同时为其他昆虫特别是鳞翅目昆虫的研究提供理论依据。本研究通过 RACE 技术获得家蚕 C 类清道夫受体 BmSR-C 基因,并对其结构和在家蚕幼虫体内的时空表达特征进行分析,通过原核表达和蛋白纯化获得重组蛋白,制备多克隆抗体,分析 BmSR-C 的亚细胞定位情况,为后续研究奠定坚实的基础。

1 材料与方法

1.1 材料与主要试剂

本实验所用家蚕品种为大造 (P50),由西南大学家蚕基因库提供。蚕卵于室温 (25℃)、相对湿度 60%~80%、光周期 12L:12D 的条件下催青,幼虫在 27℃ 人工气候箱中用新鲜干净的桑叶饲养。BmE 细胞系保存于本实验室。质粒抽提试剂盒购自 Qiagen 公司;pMD19-T Simple、T4 连接酶以及限制性内切酶购自 TaKaRa 公司;HiFi Taq 酶购自北京全式金生物技术有限公司;反转录试剂盒购自 Promega 公司;RACE Kit 与 Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司;X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent 转染试剂购自 Roche 公司。引物均由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。多聚甲醛购自上海生工,抗荧光淬灭剂及 DAPI 购自碧云天生物技术公司。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

取家蚕 5 龄第 3 天幼虫 50 头,解剖获得头、中肠、体壁、丝腺、马氏管、脂肪体、精巢、血细胞和卵巢等组织。收集血液组织时加入苯基硫脲以抵抗黑化反应,直接将 Trizol 加入血细胞中。其他组织均先用液氮研磨后再分别加入 Trizol,按照 Invitrogen 公司的操作指南进行总 RNA 的提取,再用 M-MLV 反转录酶系统按照相关说明书进行反转录得到 cDNA。

1.3 RACE 法扩增 BmSR-C 的 5' 端及 3' 端序列

根据家蚕基因组数据库 SilkDB (<http://www.>

silkdb.org/silkdb/) 提供的目的基因预测序列及 EST 序列, 用 Primer 5.0 软件设计引物(表 1)。收集 4 龄眠期家蚕血细胞, 离心后弃上清, 沉淀加入 1 mL Trizol 裂解液, 按照 TaKaRa 公司的操作指南进行总 RNA 的提取, 再用 M-MLV 反转录酶系统按照相关说明书进行反转录得到 cDNA。PCR 扩增体系: cDNA 模板 0.1 μ g, dNTPs 2 μ L, 上下游引物(20 μ mol/ μ L)各 0.5 μ L, HiFi 酶 0.2 μ L, 10 \times HiFi 缓冲液(2.0 mmol/L)2.5 μ L, 双蒸水补齐至 25 μ L。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 然后 94 $^{\circ}$ C 变性

30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 总共 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 最后 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 扩增获得目的基因部分序列, 经测序验证后, 依照此序列设计特异引物 GSP1, NGSP1, GSP2 和 NGSP2(表 1)。遵照 RACE 试剂盒的说明书分别进行 5'RACE 和 3'RACE 扩增。产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 切胶回收并连接至 pMD19-T Simple 载体上, 经转化、挑斑和菌液电泳验证筛选后送至北京华大基因公司测序, 分析拼接之后获得目的基因 cDNA 全长序列。

表 1 本研究所用引物信息

Table 1 Information of primers used in this study

引物 Primers	引物序列 Primer sequences (5' - 3')	用途 Use
BmSR-C	F: ATGAATTTTATTATATAAGTGTATTT R: ATCGTCCATATGGGCAC	PCR
GSP1	GGAGCCGTACGTGTGATCAAACCA	5'RACE
NGSP1	GGTGGCAATTTAGGGCAGCCTGATTT	5'RACE
GSP2	CGACTCTTGCCTCGGTCGATGCTT	3'RACE
NGSP2	ACCACAACGACGACTACACCCAAA	3'RACE
BmSR-C-Full	F: TTCTGACACCGGAATAGTTAA R: CATATGGGCACTCAGATAGCG	cDNA 全长扩增 Full-length cDNA cloning
BmSR-C-RT	F: ATTCCGAAATGACATGAACG R: GAACAGTTCAATCGTCCATATG	RT-PCR
BmActin3	F: AACACCCCGTCTGCTCACTG R: GGGCGAGACGTGTGATTTCTT	RT-PCR
BmSR-C-qRT	F: ACCACAACGACGACTACACCC R: CTCTGTTTCTGGGATGGGCTA	qPCR
BmGAPDH-qRT	F: CATTCCGCGTCCCTGTTGCTAAT R: GCTGCCTCCTTGACCTTTTGC	qPCR
BmSR-C-PE	F: TTCGCTCTAAGATGTCCTTACC R: CAGTGTTTTTGAGGCTCC	原核表达 Prokaryotic expression

1.4 基因结构及序列特征分析

利用在线网站 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 预测目的基因的 ORF; 从家蚕基因组数据库 SilkDB (<http://www.silkdb.org/silkdb/>) 下载 SR-C 基因组序列, 运用 Splign (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/splign/splign.cgi?textpage=online&level=form>) 对其基因结构进行分析; 利用在线工具 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>), TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 和 Signal 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/>

[services/SignalP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)) 等对其蛋白结构进行预测。

1.5 同源序列比对与进化分析

从 NCBI 数据库下载草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda*、大红斑蝶 *Danaus plexippus*、西方蜜蜂 *Apis mellifera*、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*、埃及伊蚊 *Aedes aegypti*、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 和黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 等物种 C 类清道夫受体蛋白全长序列, 将其与家蚕 SR-C 利用 Clustal X 进行比对分析, 然后用 MEGA6.0 软件构建 NJ 进化树。

1.6 RT-PCR

从家蚕幼虫 4 龄第 3 天到预蛹第 2 天, 每隔 1 d

收集 50 头蚕的血细胞,提取总 RNA 后反转获得 cDNA。以各时期血细胞和 1.2 节合成的家蚕 5 龄第 3 天幼虫各组织的 cDNA 为模板,进行 RT-PCR 扩增,以肌动蛋白 3(Actin3)基因为内参,引物见 1。PCR 反应体系: cDNA 模板 0.1 μg , dNTPs 2 μL , 上下游引物(20 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$)各 0.5 μL , HiFi 酶 0.2 μL , 10 \times HiFi 缓冲液(2.0 mmol/L)2.5 μL , 双蒸水补齐至 25 μL 。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 总共 25 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min;最后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。各取 5 μL 扩增产物,经 1% 琼脂糖凝胶电泳和 EB 染色后用 Bio-Rad 凝胶成像系统进行成像分析。所有检测均重复 3 次。

1.7 qPCR

以 1.6 节合成的血细胞和 1.2 节合成的家蚕 5 龄第 3 天幼虫各组织的 cDNA 为模板,以 BmGAPDH 基因作为内参进行 qPCR 扩增,引物列见表 1。qPCR 在 LightCycler 96 (Roche) 机器上通过 GoTaq qPCR Master Mix (Promega, 美国)根据制造商的说明书进行。PCR 反应体系: cDNA 模板 0.1 μg , 上下游引物(10 mmol/L)各 0.4 μL , 2 \times GoTaq[®] Probe qPCR Master Mix 10 μL 。PCR 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 45 个循环。qPCR 数据以平均值 \pm SE 表示,统计差异使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算,进行 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异显著。

1.8 原核表达载体构建及诱导表达

根据基因比对结果,选取家蚕 SR-C 基因特异性片段,设计分别带有 *Hind*III 和 *Xho*I 两个酶切位点的上下游引物(表 1)进行 PCR 扩增,测序验证后连接至原核表达载体 pET32a(+)上,获得重组质粒 pET32a(+)-*BmSR-C*(图 1)。将该重组质粒转化至感受态细胞 Rosseta 菌株进行蛋白诱导,分别在 16, 25 和 37 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 分别诱导 20, 12 和 6 h 后收集菌体,冰上超声破碎后分别收集上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳。随后利用终浓度分别为 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 和 1.0 mmol/L 的 IPTG 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 6 h, 同样用 SDS-PAGE 电泳检测上清与沉淀中目标蛋白的表达情况。

1.9 蛋白纯化

按照 IPTG 终浓度为 0.1 mmol/L, 37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 6 h 的条件大规模诱导家蚕 SR-C 重组蛋白的表达,收集菌体,超声破碎后 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心,收集沉淀。依次用含

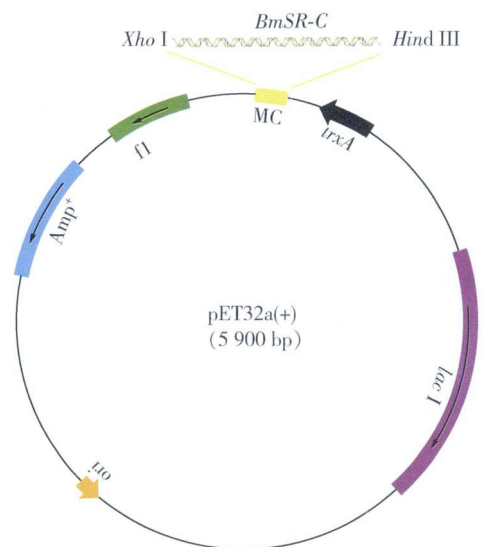


图 1 原核表达载体 pET32a(+)-*BmSR-C* 的结构
Fig. 1 Structure of the prokaryotic expression vector pET32a(+)-*BmSR-C*

有 5% 乙酸和 1% Triron 的洗涤液, 2 mol/L 尿素(含 5 mmol/L EDTA 和 25 mmol/L Tris-HCl), pH 7.0 的含 20 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl 和 50% 乙醇的洗涤液洗涤沉淀,然后用双蒸水洗涤沉淀去盐。用 8 mol/L 的尿素(含 25 mmol/L Tris-HCl 和 0.3 mol/L NaCl, pH 8.0)溶解包涵体,调节 pH 值至 11.5 ~ 12.0,过夜搅拌,4 $^{\circ}\text{C}$ 20 000 r/min 离心,将上清用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤后备用,最终用 Ni^{2+} 柱(Ni-NTA)纯化该重组蛋白(按照 GE 公司所提供的说明书进行操作)。

1.10 抗血清制备

将纯化得到的重组蛋白注射雌性昆明小鼠制备抗血清,每只小鼠进行 5 次蛋白腹腔注射,注射时间点分别为 0, 10, 10, 15 和 21 d。第 1 次注射将蛋白和弗式完全佐剂等体积混合乳化,后 4 次均将蛋白和弗式不完全佐剂等体积混合乳化。最后直接注射纯蛋白,1 周后摘除小鼠的眼球取血。将获取的血液于室温静置 2 h,然后 3 000 r/min 离心 10 min,吸取血清部分,加入体积比为 30% 的甘油后分装保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.11 ELISA 法测定抗体效价

利用间接 ELISA 法检测抗体效价。参照 TMB 底物显色试剂盒说明书,将纯化获得的重组蛋白加入 96 孔酶标板中,每孔 50 μg ,4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜。次日用缓冲液洗涤 3 次,每次 5 min,每孔加入 0.2 mL 0.1% BSA,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭孵育 1 h。PBST 洗涤 3 次,每次 5 min,每孔分别加入按照 1:10 等梯度稀释的

抗体, 4℃ 孵育过夜。用 PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 加入 1:2 000 稀释的羊抗鼠 IgG-HRP, 室温孵育 1 h, 洗涤后加入 TMB 反应 15 min, 然后每孔加入 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 于 450 nm 进行检测, 最后计算出抗体效价。

1.12 Western blot 检测家蚕 SR-C 抗血清特异性

收集家蚕 4 龄眠期家蚕血细胞, 离心弃上清后加入适量 RIPA 蛋白裂解液, 用移液枪轻轻混匀悬浮后于冰上静置 30 min, 4℃ 12 000 r/min 离心 10 min, 轻轻吸取上清液, 即为提取的蛋白, 然后利用 BCA 法测定蛋白浓度, 样品经 SDS-PAGE 电泳和转膜后, 以含 5% BSA 的 TBST [NaCl 8.8 g, 1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 20 mL, 0.5 mL Tween-20, 定容到 1 L] 于室温封闭 2 h, 将小鼠产生的抗血清以 1:5 000 的比例稀释后于 4℃ 孵育过夜, 经 TBST 洗涤后, 将 HRP 标记的小鼠 IgG 以 1:10 000 的比例稀释后在室温孵育 1 h, TBST 洗涤, 用 ECL 显色液显色后再用成像仪曝光。

1.13 家蚕 SR-C 亚细胞定位

用 PCR 扩增 1.3 节获得的家蚕 SR-C 基因全长的 ORF 序列, 把该片段经限制性内切酶 *Hind*III 和 *Xba*I 酶切后连接到载体 pIZ-EGFP-V5His 上, 挑选阳性克隆送到北京华大基因公司测序。将测序正确的质粒命名为 pIZ-EGFP-BmSR-C-V5His。将家蚕胚胎细胞系 BmE 细胞用含 10% FBS 的 Grace 昆虫细胞培养基在 27℃ 培养箱进行培养, 进行转染前先将 BmE 细胞接种于 24 孔板 (1 × 10⁵ 个), 用无抗生素的 Grace 培养基培养细胞, 当细胞生长至密度为 70% ~ 80% 时转染过表达质粒 (依照转染的操作说明进行转染), 6 ~ 8 h 后, 换成加抗生素的 Grace 完

全培养基, 48 h 后用 4% 多聚甲醛在室温下固定 15 min, 然后用细胞膜染料 DiI 于室温染色 30 min, 再用 DAPI 室温染色 10 min 进行细胞核染色, 最后用 Olympus FV1000 共聚焦荧光显微镜进行观察。并且将转染后的细胞收集起来, 一部分细胞用于提取 RNA, 反转录获得 cDNA, 方法同 1.2 节, 然后以此为模板进行 qPCR 检测家蚕 SR-C 基因的表达, 所用引物及扩增反应体系和反应条件同 1.7 节; 另外一部分细胞用于提取蛋白, 进行 Western blot 检测家蚕 SR-C 亚细胞定位情况。

2 结果

2.1 家蚕 C 类清道夫受体基因克隆

PCR 扩增获得约 1 700 bp 的序列 (图 2: A), 在此基础上利用 RACE 技术获得目的基因 5' 端 (399 bp) 和 3' 端 (693 bp) 的 cDNA 序列 (图 2: B, C), 在此基础上设计引物 PCR 扩增得到 cDNA 全长片段为 1 917 bp (图 2: D)。家蚕 C 类清道夫受体基因在家蚕基因组数据库中所对应的基因编号为 BGIBMGA004577-TA, 并且位于 27 号染色体上的 nscaf2800, 其位置是 531 837 - 541 893 bp, 该基因的 cDNA 全长序列为 2 047 bp, 含有一个长为 1 821 bp 的完整开放阅读框 (ORF), 编码 606 个氨基酸残基, 其 5' 和 3' 非翻译区序列 (UTR) 长度分别为 118 bp 和 32 bp, 有 1 个加尾信号序列 AATAAA 在其 3'-UTR 结构区域中 (图 4: A)。将其与基因组序列进行对比, 结果表明, 该基因全长为 14 456 bp, 是多外显子基因, 一共包括 10 个外显子和 9 个内含子 (图 3)。

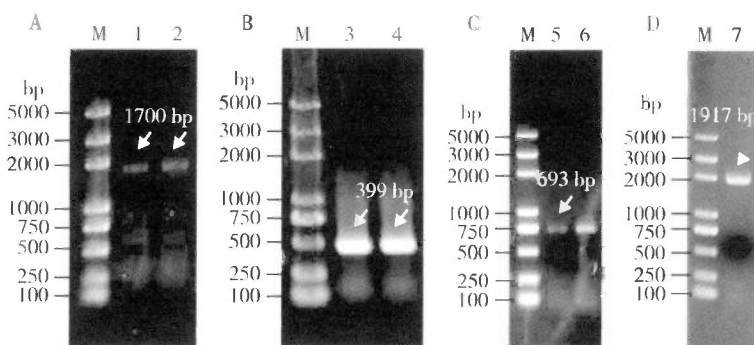


图 2 家蚕 C 类清道夫受体基因 *BmSR-C* 的全长 cDNA 克隆

Fig. 2 Full-length cDNA cloning of *BmSR-C* from *Bombyx mori*

A: *BmSR-C* 中间片段扩增 Amplification of the intermediate fragment of *BmSR-C*; B: 5'RACE; C: 3'RACE; D: cDNA 全长扩增 Amplification of the full-length cDNA. M: DNA 分子量标准 DNA molecular weight marker; 1, 2: 中间片段的 PCR 产物 PCR product of the intermediate fragment; 3, 4: 5'RACE 产物 5'RACE product; 5, 6: 3'RACE 产物 3'RACE product; 7: cDNA 全长扩增产物 Amplification product of full-length cDNA.

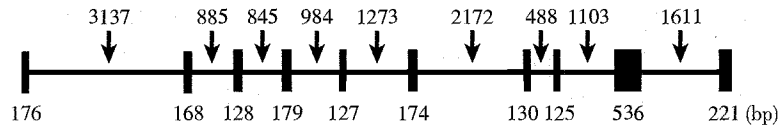


图3 家蚕 BmSR-C 基因外显子及内含子信息

Fig. 3 Analysis of exons and introns in BmSR-C gene of *Bombyx mori*

黑色方块示外显子,箭头所指线条部分为内含子。Black blocks show exons, and the arrow parts refer to the intron.

2.2 家蚕 BmSR-C 结构域分析

蛋白质结构预测发现 BmSR-C 第 25 - 74 和 79 - 125 位氨基酸是补体对照蛋白 (complement control protein, CCP) 区域,第 134 - 315 位氨基酸是 Meprin A5 antigen and RPTP Mu (MAM) 区域,第 327 - 369 位氨基酸是 S 样生长调节素 (somatomedin-

S-like, SO) 区域,在第 553 - 575 位氨基酸位点之间具有典型的跨膜结构域 (图 4: B)。信号肽预测结果显示第 1 - 20 位氨基酸区域是其信号肽区域 (图 4: C),成熟肽从第 21 位氨基酸开始,经预测其分子量为 67.54 kD,等电点 (pI) 为 8.81。该蛋白有 1 个跨膜螺旋区域 (图 4: D)。

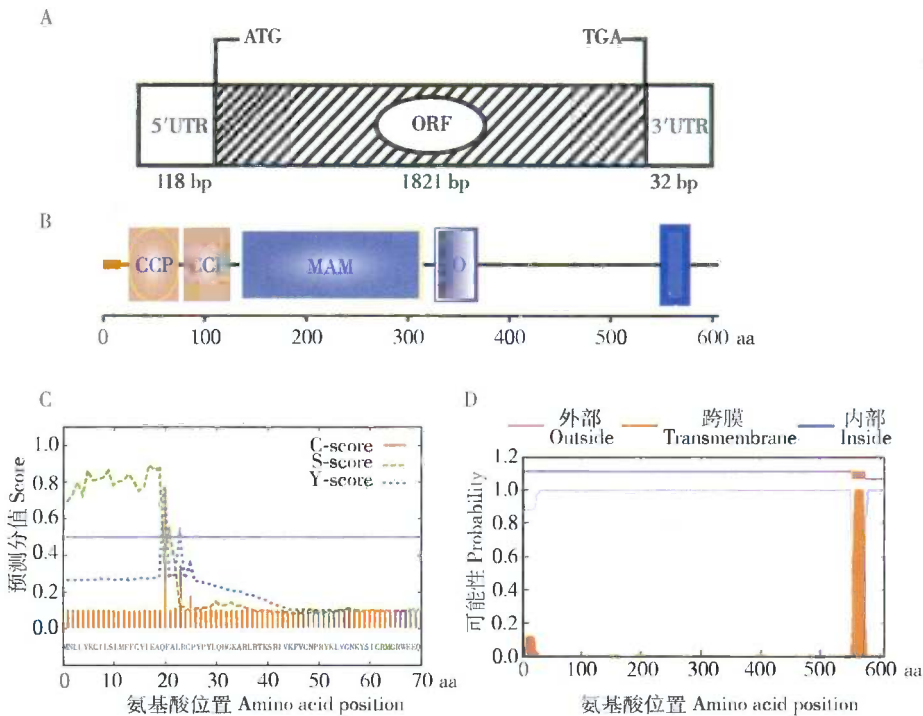


图4 家蚕 BmSR-C 基因结构分析及其蛋白结构域预测

Fig. 4 Structure analysis of the BmSR-C gene of *Bombyx mori* and its protein domain prediction

A: BmSR-C 基因 cDNA 全长序列分析 Full-length cDNA sequence analysis of BmSR-C; B: BmSR-C 蛋白结构预测 Domain prediction of BmSR-C protein; C: BmSR-C 蛋白信号肽预测 Signal peptide prediction of BmSR-C; D: BmSR-C 蛋白跨膜结构域预测 Transmembrane domain prediction of BmSR-C. CCP: 补体对照蛋白 Complement control protein; MAM: Meprin A5 antigen and RPTP Mu; SO: S 样生长调节素 Somatomedin-S-like.

2.3 同源与进化分析

家蚕 C 类清道夫受体是一个在昆虫中比较特异性表达的蛋白。使用 MEGA6.0 软件,对几种经典昆虫的 C 类清道夫受体进行了进化树分析,结果如图 5 所示。从进化树可以看出,家蚕 C 类清道夫受体与草地贪夜蛾和大红斑蝶的 C 类清道夫受体最为接近,其次是与西方蜜蜂和赤拟谷盗的 C 类清

道夫受体。

2.4 BmSR-C 的表达分析

通过 RT-PCR 分析 BmSR-C 在家蚕 5 龄第 3 天幼虫头部、体壁、丝腺、中肠、脂肪体、马氏管、精巢、卵巢和血细胞这 9 个组织内的表达,结果显示,其在马氏管和血细胞中表达量较高,而在其他组织中无明显表达 (图 6: A);在家蚕 4 龄第 3 天到预蛹第 2

天幼虫血细胞中 *BmSR-C* 持续表达,且在 4 龄眠期表达量较高(图 6: B)。定量 PCR 结果显示,*BmSR-C* 在家蚕 5 龄第 3 天的幼虫马氏管中表达水平最

高,其次是血细胞中(图 6: C);各时期血细胞定量结果显示,*BmSR-C* 在 4 龄眠血细胞中的表达水平达到峰值(图 6: D)。

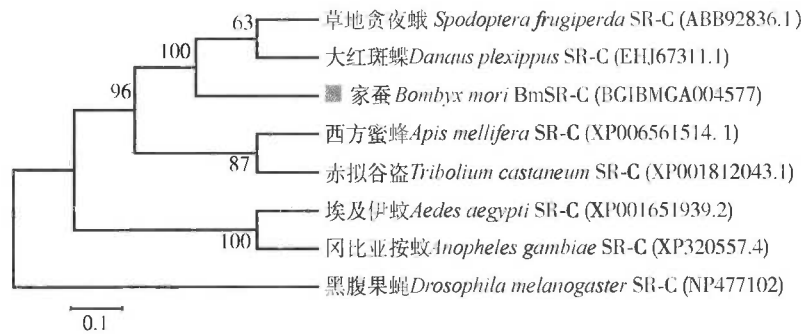


图 5 基于氨基酸序列构建的家蚕 BmSR-C 与其他昆虫的 SR-C 蛋白的进化树(邻接法, 重复 1 000 次)
Fig. 5 Phylogenetic tree based on the amino acid sequences of BmSR-C of *Bombyx mori* and SR-C proteins from other insect species by neighbor-joining method (1 000 replicates)

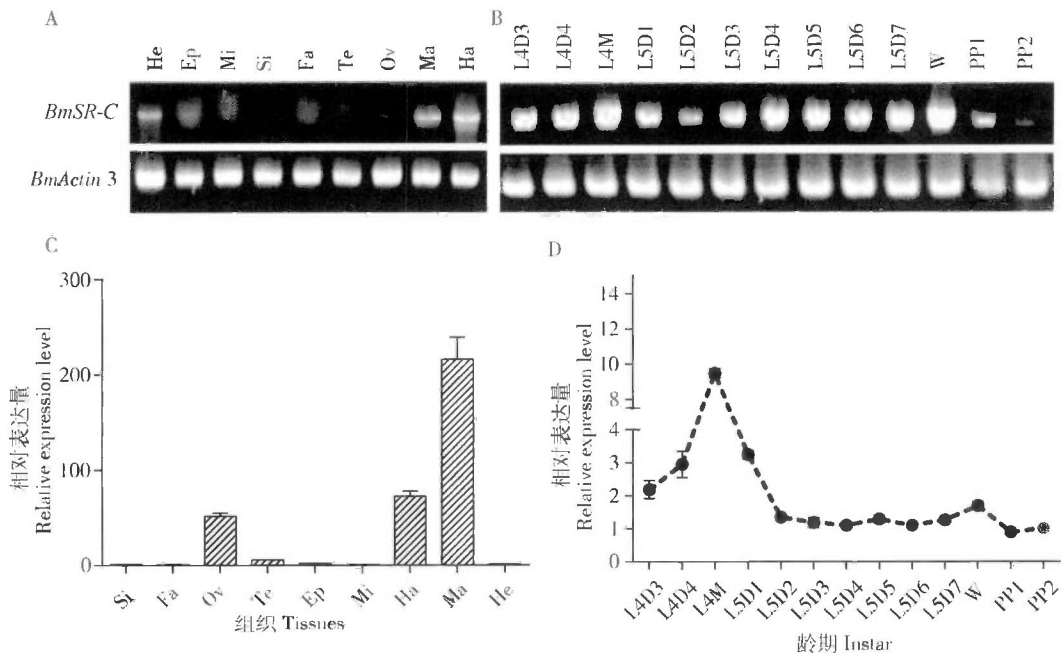


图 6 *BmSR-C* 在家蚕 5 龄第 3 天幼虫不同组织(A, C)及不同发育时期血细胞(B, D)中的表达谱
Fig. 6 Expression profiles of *BmSR-C* in different tissues (A, C) of the day-3 5th instar larvae and hemocytes (B, D) at different developmental stages of *Bombyx mori*

A, B: RT-PCR; C, D: qPCR. He: 头 Head; Ep: 体壁 Epidermis; Mi: 中肠 Midgut; Si: 丝腺 Silk gland; Fa: 脂肪体 Fat body; Te: 精巢 Testis; Ov: 卵巢 Ovary; Ma: 马氏管 Malpighian tubules; Ha: 血细胞 Haemocyte. L4D3-4: 分别为 4 龄第 3 和 4 天的幼虫 Day 3 and 4 4th instar larva, respectively; L4M: 4 龄眠 Molting period of the 4th instar larva; L5D1-7: 分别为 5 龄第 1-7 天的幼虫 Day 1-7 5th instar larva, respectively; W: 上蔟 Wandering stage; PP1-2: 分别为预蛹第 1-2 天 1-2 d-old prepupa, respectively. 图中数据为平均值 \pm SE。Data are mean \pm SE.

2.5 *BmSR-C* 原核表达与蛋白纯化

将扩增得到的 *BmSR-C* 特异部分序列克隆到 pMD19-T 载体上,测序正确后连接到 pET32a(+) 载体上,用 *Hind* III 及 *Xho*I 进行双酶切验证,所得结果与预期的结果一致,这说明原核表达载体

pET32a(+)-*BmSR-C* 已被成功构建。

pET32a(+)-*BmSR-C*/Rosseta 菌液在 IPTG 终浓度为 1 mmol/L 时,分别经 16, 25 和 37℃ 诱导后进行 SDS-PAGE 电泳检测,结果显示 16℃, 25℃ 和 37℃ 处理均能诱导目的蛋白表达,但在 37℃ 诱导后

的蛋白表达量是最高的,并且主要是在包涵体中表达(图 7: A)。pET32a(+)-*BmSR-C*/Rosseta 菌液在终浓度 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 和 1 mmol/L 的 IPTG 中 37°C 分别诱导 6 h 后, SDS-PAGE 结果显示各浓度的 IPTG 均能诱导目的蛋白表达(图 7: B), 于是最终采用了 IPTG 终浓度 0.1 mmol/L 在

37°C 条件下进行 *BmSR-C* 蛋白的大规模诱导, 经 SDS-PAGE 电泳检测, 成功地诱导了目的蛋白的表达(图 7: C)。通过诱导包涵体蛋白大量表达后, 再采用 Ni⁺ 亲和层析法纯化获得了高纯度的 *BmSR-C* 重组蛋白(图 7: C)。

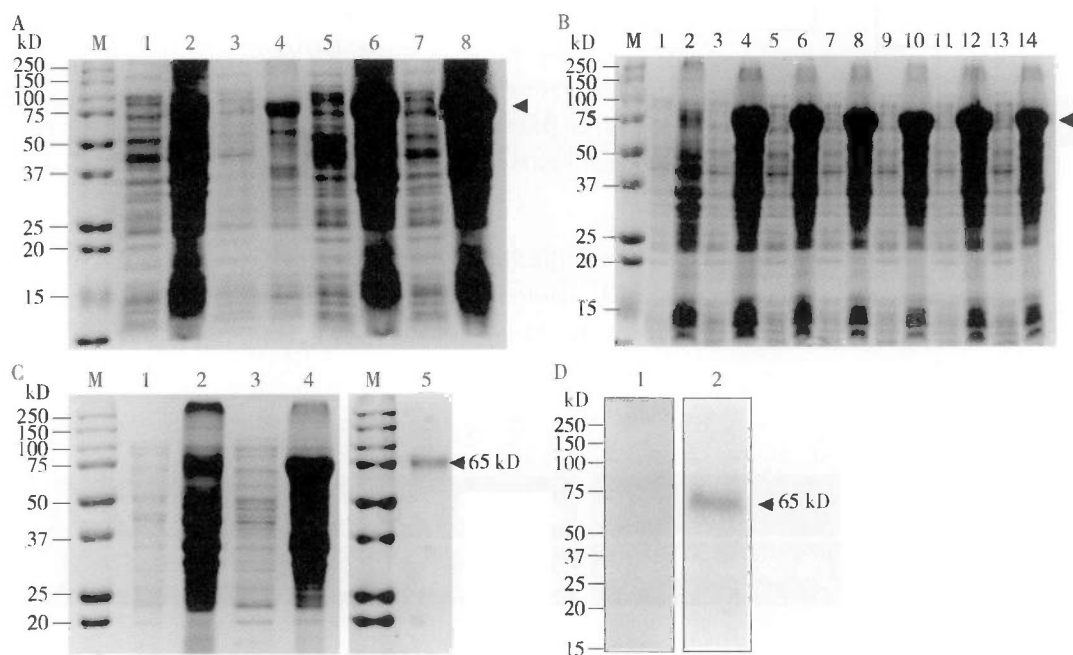


图 7 家蚕 *BmSR-C* 的原核表达及蛋白纯化

Fig. 7 Prokaryotic expression and protein purification of *BmSR-C* of *Bombyx mori*

A: 不同温度下 1 mmol/L 的 IPTG 诱导 *BmSR-C* 重组蛋白表达 Expression of recombinant protein of *BmSR-C* by IPTG (1 mmol/L) induction under different temperatures. M: 蛋白分子量标准 Protein molecular weight marker; 1: 未诱导的上清蛋白 Non-induced supernatant; 2: 未诱导的包涵体蛋白 Non-induced inclusion body protein; 3, 5, 7: 1 mmol/L IPTG 分别于 16, 25 和 37°C 诱导的上清蛋白 Soluble fraction induced by 1 mmol/L IPTG at 16, 25 and 37°C, respectively; 4, 6, 8: 1 mmol/L IPTG 分别于 16, 25 和 37°C 诱导的包涵体蛋白 Inclusion body protein induced by 1 mmol/L IPTG at 16, 25 and 37°C, respectively. B: 37°C 下不同浓度 IPTG 诱导(6 h) *BmSR-C* 重组蛋白表达 Expression of recombinant protein of *BmSR-C* after induction with different concentrations of IPTG for 6 h at 37°C. M: 蛋白分子量标准 Protein molecular weight marker; 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13: 分别为 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 和 1.0 mmol/L IPTG 37°C 诱导的上清蛋白 Soluble fraction induced by 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1.0 mmol/L IPTG at 37°C, respectively; 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14: 分别为 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 和 1.0 mmol/L IPTG 37°C 诱导的包涵体蛋白 Inclusion body protein induced by 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1.0 mmol/L IPTG at 37°C, respectively. C: 0.1 mmol/L IPTG 规模诱导 *BmSR-C* 重组蛋白表达(37°C, 6 h)及纯化 Large-scale induction (37°C, 6 h) of recombinant protein of *BmSR-C* by 0.1 mmol/L IPTG and purification. M: 蛋白分子量标准 Protein molecular weight marker; 1: 未经 IPTG 诱导的上清蛋白 Non-induced supernatant by IPTG; 2: 未经 IPTG 诱导的包涵体蛋白 Non-induced inclusion body protein by IPTG; 3: 0.1 mmol/L IPTG 大规模诱导的上清蛋白 Soluble fraction induced by 0.1 mmol/L IPTG; 4: 0.1 mmol/L IPTG 大规模诱导的包涵体蛋白 Inclusion body protein induced by 0.1 mmol/L IPTG; 5: 纯化得到的 *BmSR-C* 包涵体蛋白 Purified inclusion body protein of *BmSR-C*. D: *BmSR-C* 抗体的 Western blot 检测 Immunological characterization of anti-*BmSR-C* antibody by Western blot. 1: 免疫前血清 Preimmune serum; 2: 抗 *BmSR-C* 血清 Anti-*BmSR-C* serum.

2.6 *BmSR-C* 抗血清检测

用经过纯化得到的 *BmSR-C* 重组蛋白免疫小鼠, 获得鼠抗血清, 经 ELISA 测定 *BmSR-C* 的抗血清效价高达 1:128 000(表 2)。取家蚕 4 龄眠幼虫的血细胞蛋白作为材料, 以家蚕 *BmSR-C* 的抗血清为一抗, Western blot 检测发现在相对分子量约 65 kD

处出现了特异的蛋白条带(图 7: D), 说明所制备的抗体可以与所表达的蛋白特异性结合。

2.7 *BmSR-C* 基因全长过表达载体构建及亚细胞定位

为了研究 *BmSR-C* 的亚细胞定位情况, 我们采用 PCR 技术克隆得到 *BmSR-C* 的 ORF 片段, 将其连

表 2 BmSR-C 抗血清效价 ELISA 分析
Table 2 Titer of the anti-BmSR-C serum by ELISA analysis

稀释比 Dilution ratio	3 次测定的 OD ₄₅₀ 值 OD ₄₅₀ values of three replicates		
	第 1 次 1st	第 2 次 2nd	第 3 次 3rd
1: 500	1.556	1.501	1.553
1: 1 000	1.508	1.489	1.492
1: 2 000	1.478	1.421	1.423
1: 4 000	1.443	1.411	1.462
1: 8 000	1.451	1.389	1.431
1: 16 000	1.441	1.442	1.421
1: 32 000	1.417	1.376	1.387
1: 64 000	1.139	1.121	1.217
1: 128 000	1.116	1.054	1.076
1: 256 000	0.153	0.134	0.123
阴性血清 Negative serum	0.139	0.123	0.142

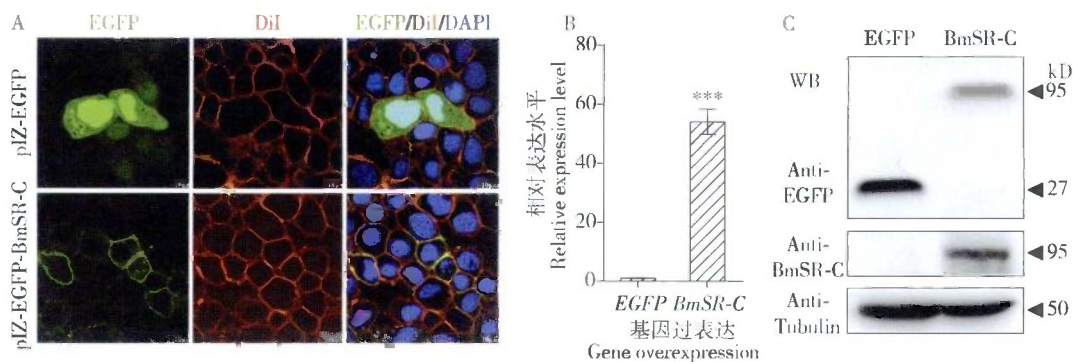


图 8 家蚕 BmSR-C 在 BmE 细胞中的表达和亚细胞定位

Fig. 8 Expression and subcellular localization of BmSR-C in BmE cells of *Bombyx mori*

A: 免疫荧光检测 BmSR-C 在 BmE 细胞中的定位 Subcellular localization of BmSR-C in BmE cells by immunofluorescence assay; pIZ-EGFP-V5his: 对照质粒 Control plasmid; pIZ-EGFP-BmSR-C-V5his: 重组质粒 Recombinant plasmid. EGFP: 增强绿色荧光蛋白在细胞中的定位情况 The intracellular localization of enhanced green fluorescent protein; DiI: 细胞膜红色荧光探针标记细胞膜 Cell membrane red fluorescence probe was used to label the cell membrane; EGFP/DiI/DAPI: 细胞核蓝色荧光染料标记细胞核 Nucleus were stained dark by nuclear blue fluorescent dye. B: qPCR 检测转染 BmE 细胞中 BmSR-C 的表达量 Expression level of BmSR-C in the transfected BmE cells by qPCR; 数据以平均值 \pm SE 表示, 进行 *t* 检验。Data are presented as mean \pm SE, and subjected to *t* test. *** $P < 0.001$. C: 转染 BmE 细胞中 EGFP 和 BmSR-C 表达的 Western blot 检测 Expression analysis of EGFP and BmSR-C proteins in the transfected BmE cells by Western blotting.

3 讨论

无脊椎动物缺乏适应性免疫, 只有由细胞免疫 (cellular immunity) 和体液免疫 (humoral immunity) 组成的先天性免疫系统来抵御病原入侵。在先天免疫过程中, 模式识别受体 (PRR) 通过结合与其相应的配体启动先天免疫应答反应 (Choi *et al.*, 2016)。受体介导的病原体吞噬作用是一个高度保守的生物学过程。巨噬细胞能够识别其摄取的颗粒或微生物不同的表面结构, 并且可以通过像甘露糖受体、其他

接到 pIZ-EGFP-V5his 载体上, 得到 pIZ-EGFP-BmSR-C-V5his 全长过表达载体。在家蚕胚胎细胞系 BmE 细胞中进行转染 48 h 后, 分别用 DiI 和 DAPI 进行细胞膜和细胞核染色, 再在共聚焦荧光显微镜下观察 EGFP 融合蛋白的表达情况。结果显示, 空白对照组的 EGFP 荧光信号在细胞核和细胞质中, 而实验组的 EGFP 荧光信号在细胞膜上 (图 8: A)。对经转染的细胞进行 BmSR-C 的定量 PCR 和 Western blot 检测, 发现过表达 BmSR-C 细胞的 BmSR-C 在 RNA 水平上是显著上升的 (图 8: B), 过表达了空载和 BmSR-C 的细胞蛋白水平检测结果显示, EGFP 抗体分别在 27 和 95 kD 处孵育出了相应的条带, BmSR-C 抗体在 95 kD 处孵育出了相应的条带 (图 8: C)。

凝集素样受体和清道夫受体 (SRs) 等模式识别受体 (PRR) 直接识别微生物 (Janeway, 1989; Krieger, 1997; Stahl and Ezekowitz, 1998; Gough and Gordon, 2000)。已经有研究表明, 果蝇 dSR-CI 是一种细菌 PRR, 占 S2 细胞总细菌结合活性的 20% ~ 30% (Rämet *et al.*, 2001)。

本研究通过 PCR 及 RACE 技术获得家蚕 C 类清道夫受体基因 BmSR-C 的全长序列。在果蝇中, S2 细胞对细菌的吞噬作用是通过 dSR-CI 结合革兰氏阳性和阴性菌来完成的, 并且研究发现 CCP 域与 MAM 结合域在体外能够结合细菌 (Rämet *et al.*,

2001)。BmSR-C 基因编码的蛋白有 2 个 CCP, 1 个 MAM 和 1 个 SO 结构域, 具有典型的跨膜结构域, 暗示 BmSR-C 可能参与细胞对微生物的吞噬过程。BmSR-C 在头、马氏管和血细胞中表达量较高, 尤其是在马氏管和血细胞中。家蚕幼虫的头部内是脑组织, 由一层坚硬的骨质壳包裹在外面, 上面有触角、单眼、口器等重要的器官, 密布着家蚕的各种感觉器官(包括嗅觉、触觉、视觉和味觉), 执行很多重要的生命功能, 因此推测在头部表达的 BmSR-C 不仅参与脂类代谢, 而且在嗅觉、脑神经、视觉和味觉中行使着类似哺乳动物和果蝇中同源基因相似的功能。目前, 很少有关于昆虫清道夫受体在各感觉器官中的功能研究报道, 家蚕头部的 BmSR-C 基因行使何种功能还没有任何文献支持。家蚕属开放式循环系统, 血液在整个体腔之中循环, 体内组织器官浸没在血液当中, 血液有着储藏、调节、传递压力、防御及愈伤等方面的作用(杨丽群等, 2015)。血细胞参与的吞噬、包裹、黑化和结节形成等细胞和体液免疫应答反应在整个免疫系统中具有极其重要的作用(Nappi and Vass, 1993; Strand and Pech, 1995; Hoffmann and Reichhart, 2002; Lavine and Strand, 2002)。马氏管开始发育于昆虫的早期胚胎时期, 因为昆虫代谢活动的最终产物都集中在血液中, 浸没在血液中的马氏管对于昆虫保持其正常的生命活动, 调节血液酸碱变化、组成成分、水分的含量和渗透压有着非常重要的作用, 同时, 也因为它能够产生及分泌抗微生物的蛋白质而具有免疫反应的作用。因此, 推测在家蚕血细胞和马氏管中表达的 BmSR-C 可能在调节血液组分、清除凋亡细胞、转运脂类物质和免疫防护等方面发挥作用。血细胞还参与家蚕变态发育过程中大量旧组织降解和新组织重建等, 在家蚕整个生命周期中具有十分重要的作用(Kim and Kim, 2005; Marmaras and Lampropoulou, 2009)。通过分析 4 龄第 3 天到熟蚕时期的血细胞表达谱发现, BmSR-C 在各时期血细胞中持续表达, 并且在眠期和上簇时期表达量较高。清道夫是一类病原模式识别受体, 除了识别病原外, 还参与血细胞对细胞碎片和凋亡细胞的处理(董占鹏等, 2010; 董占鹏, 2011; Dong *et al.*, 2015), 预蛹时期机体发生大规模的旧组织降解, 血细胞进入相关组织参与处理细胞碎片和凋亡细胞, 游离血细胞减少, 这可能是导致 BmSR-C 在预蛹时期的循环血细胞中表达下调的重要原因, 暗示着 BmSR-C 可能在家蚕的变态发育过程中发挥着重要的功能, 但具体机制仍需进一步的

研究。深入研究 BmSR-C 基因的表达与功能, 对揭示昆虫 SR-C 基因的功能多样性具有重要意义。为了进一步分析 BmSR-C 在亚细胞上的定位, 本研究构建了 pIZ-EGFP-BmSR-C-V5his 的过表达质粒, 转染家蚕胚胎细胞系 BmE 细胞后用共聚焦显微镜观察, 发现转染 pIZ-EGFP-BmSR-C-V5his 的细胞有荧光信号, 并且主要定位于细胞膜上, 因此推测该蛋白可能参与代谢废物、脂类物质的转运和外源物的结合等。为了后续实验的开展, 本研究构建了原核表达载体, 通过优化原核表达和蛋白纯化条件, 获得高纯度 BmSR-C 重组蛋白, 通过免疫小鼠制备了高效特异的多克隆抗体。本研究为进一步探索 BmSR-C 在家蚕免疫方面的功能奠定了基础。

参考文献 (References)

- Agaisse H, Burrack LS, Philips JA, Rubin EJ, Perrimon N, Higgins DE, 2005. Genome-wide RNAi screen for host factors required for intracellular bacterial infection. *Science*, 309(5738): 1248–1251.
- Benton R, Vannice KS, Voshall LB, 2007. An essential role for a CD36-related receptor in pheromone detection in *Drosophila*. *Nature*, 450(7167): 289–293.
- Choi YH, Jin N, Kelly F, Sakhivel SK, Yu T, 2016. Elevation of alanine aminotransferase activity occurs after activation of the cell-death signaling initiated by pattern-recognition receptors but before activation of cytolytic effectors in NK or CD8+ T cells in the liver during acute HCV infection. *PLoS ONE*, 11(10): e0165533.
- Dong ZP, 2011. Cloning, Identification and Study on the Function of Class B Scavenger Receptor Genes in Silkworm, *Bombyx mori*. PhD Dissertation, Southwest University, Chongqing. [董占鹏, 2011. 家蚕 B 型清道夫受体(Class B Scavenger Receptor)基因的克隆鉴定及功能研究. 重庆: 西南大学博士学位论文]
- Dong ZP, Chai CL, Dai FY, Pan MH, Du ZH, Hu H, Lu C, 2010. Identification, phylogenetic and expressional analyses of class B scavenger receptor genes in silkworm, *Bombyx mori*. *Sci. Sericult.*, 36(5): 743–753. [董占鹏, 柴春利, 代方银, 潘敏慧, 杜周和, 胡海, 鲁成, 2010. 家蚕 B 型清道夫受体基因的鉴定及系统发生与表达分析. 蚕业科学, 36(5): 743–753]
- Dong ZP, Chai CL, Dai FY, Pan MH, Huang P, Wang W, Liao PF, Liu M, Lu C, 2015. Expression pattern and tissue localization of the class B scavenger receptor BmSCRBQ4 in *Bombyx mori*. *Insect Sci.*, 22(6): 739–747.
- Dunne DW, Resnick D, Greenberg J, Krieger M, Joiner KA, 1994. The type I macrophage scavenger receptor binds to gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(5): 1863–1867.
- Franc NC, Heitzler P, Ezekowitz RA, White K, 1999. Requirement for croquemort in phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila*. *Science*, 284(5422): 1991–1994.
- González-Lázaro M, Dinglasan RR, Hernández-Hernández FL,

- Rodríguez MH, Laclaustra M, Jacobs-Lorena M, Flores-Romo L, 2009. *Anopheles gambiae* Croquemort SCRBQ2, expression profile in the mosquito and its potential interaction with the malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 39(5-6): 395-402.
- Gordon S, 2002. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell*, 111(7): 927-930.
- Gough PJ, Gordon S, 2000. The role of scavenger receptors in the innate immune system. *Microbes Infect.*, 2(3): 305-311.
- Hoffmann JA, Reichhart JM, 2002. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat. Immunol.*, 3(2): 121-126.
- Huang J, Zheng DL, Qin FS, Cheng N, Chen H, Wan BB, Wang YP, Xiao HS, Han ZG, 2010. Genetic and epigenetic silencing of SCARA5 may contribute to human hepatocellular carcinoma by activating FAK signaling. *J. Clin. Invest.*, 120(1): 223-241.
- Janeway CJ, 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 54(Pt 1): 1-13.
- Jin X, Ha TS, Smith DP, 2008. SNMP is a signaling component required for pheromone sensitivity in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105(31): 10996-11001.
- Jones RS, Minogue AM, Connor TJ, Lynch MA, 2013. Amyloid-beta-induced astrocytic phagocytosis is mediated by CD36, CD47 and RAGE. *J. Neuroimmune Pharmacol.*, 8(1): 301-311.
- Kiefer C, Sumser E, Wernet MF, von Lintig J, 2002. A class B scavenger receptor mediates the cellular uptake of carotenoids in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(16): 10581-10586.
- Kim T, Kim YJ, 2005. Overview of innate immunity in *Drosophila*. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 38(2): 121-127.
- Krieger M, 1997. The other side of scavenger receptors: pattern recognition for host defense. *Curr. Opin. Lipidol.*, 8(5): 275-280.
- Lavine MD, Strand MR, 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 32(10): 1295-1309.
- Marmaras VJ, Lampropoulou M, 2009. Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. *Cell Signal.*, 21(2): 186-195.
- Mendes ND, Freitas AT, Vasconcelos AT, Sagot MF, 2010. Combination of measures distinguishes pre-miRNAs from other stem-loops in the genome of the newly sequenced *Anopheles darlingi*. *BMC Genomics*, 11: 529.
- Misra S, Crosby MA, Mungall CJ, Matthews BB, Campbell KS, Hradecky P, Huang Y, Kaminker JS, Millburn GH, Prochnik SE, Smith CD, Tupy JL, Whitfield EJ, Bayraktaroglu L, Berman BP, Bettencourt BR, Celniker SE, de Grey ADNJ, Drysdale RA, Harris NL, Richter J, Russo S, Schroeder AJ, Shu SQ, Stapleton M, Yamada C, Ashburner M, Gelbart WM, Rubin GM, Lewis SE, 2002. Annotation of the *Drosophila melanogaster* euchromatic genome: a systematic review. *Genome Biol.*, 3(12): research0083. 1-83. 22.
- Mukhopadhyay S, Gordon S, 2004. The role of scavenger receptors in pathogen recognition and innate immunity. *Immunobiology*, 209(1-2): 39-49.
- Murphy JE, Tedbury PR, Homer-Vanniasinkam S, Walker JH, Ponnambalam S, 2005. Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors. *Atherosclerosis*, 182(1): 1-15.
- Nappi AJ, Vass E, 1993. Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune reactions. *Pigment Cell Res.*, 6(3): 117-126.
- Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S, 2002. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 14(1): 123-128.
- Philips JA, Rubin EJ, Perrimon N, 2005. *Drosophila* RNAi screen reveals CD36 family member required for mycobacterial infection. *Science*, 309(5738): 1251-1253.
- Pierini LM, 2006. Uptake of serum-opsonized *Francisella tularensis* by macrophages can be mediated by class A scavenger receptors. *Cell. Microbiol.*, 8(8): 1361-1370.
- Plüddemann A, Mukhopadhyay S, Gordon S, 2006. The interaction of macrophage receptors with bacterial ligands. *Expert Rev. Mol. Med.*, 8(28): 1-25.
- PrabhuDas M, Bowdish D, Drickamer K, Febbraio M, Herz J, Kobzik L, Krieger M, Loike J, Means TK, Moestrup SK, Post S, Sawamura T, Silverstein S, Wang XY, El Khoury J, 2014. Standardizing scavenger receptor nomenclature. *J. Immunol.*, 192(5): 1997-2006.
- PrabhuDas MR, Baldwin CL, Bollyky PL, Bowdish DME, Drickamer K, Febbraio M, Herz J, Kobzik L, Krieger M, Loike J, McVicker B, Means TK, Moestrup SK, Post SR, Sawamura T, Silverstein S, Speth RC, Telfer JC, Thiele GM, Wang XY, Wright SD, El Khoury J, 2017. A consensus definitive classification of scavenger receptors and their roles in health and disease. *J. Immunol.*, 198(10): 3775-3789.
- Rämet M, Pearson A, Manfrulli P, Li X, Koziel H, Gobel V, Chung E, Krieger M, Ezekowitz RA, 2001. *Drosophila* scavenger receptor CI is a pattern recognition receptor for bacteria. *Immunity*, 15(6): 1027-1038.
- Sakudoh T, Iizuka T, Narukawa J, Sezutsu H, Kobayashi I, Kuwazaki S, Banno Y, Kitamura A, Sugiyama H, Takada N, Fujimoto H, Kadono-Okuda K, Mita K, Tamura T, Yamamoto K, Tsuchida K, 2010. A CD36-related transmembrane protein is coordinated with an intracellular lipid-binding protein in selective carotenoid transport for cocoon coloration. *J. Biol. Chem.*, 285(10): 7739-7751.
- Sakudoh T, Kuwazaki S, Iizuka T, Narukawa J, Yamamoto K, Uchino K, Sezutsu H, Banno Y, Tsuchida K, 2013. CD36 homolog divergence is responsible for the selectivity of carotenoid species migration to the silk gland of the silkworm *Bombyx mori*. *J. Lipid Res.*, 54(2): 482-495.
- Stahl PD, Ezekowitz RA, 1998. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr. Opin. Immunol.*, 10(1): 50-55.
- Strand MR, Pech LL, 1995. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. *Annu. Rev. Entomol.*, 40: 31-56.
- Stuart LM, Deng J, Silver JM, Takahashi K, Tseng AA, Hennessy EJ, Ezekowitz RA, Moore KJ, 2005. Response to *Staphylococcus aureus*

- requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain. *J. Cell Biol.*, 170(3): 477–485.
- Tanaka H, Ishibashi J, Fujita K, Nakajima Y, Sagisaka A, Tomimoto K, Suzuki 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. Molec. Biol.*, 38(12): 1087–1110.
- Wang T, Jiao Y, Montell C, 2007. Dissection of the pathway required for generation of vitamin A and for *Drosophila* phototransduction. *J. Cell Biol.*, 177(2): 305–316.
- Xiao X, Liu Y, Zhang X, Wang J, Li Z, Pang X, Wang P, Cheng G, 2014. Complement-related proteins control the flavivirus infection of *Aedes aegypti* by inducing antimicrobial peptides. *PLoS Pathog.*, 10(4): e1004027.
- Yang MC, Shi XZ, Yang HT, Sun JJ, Xu L, Wang XW, Zhao XF, Wang JX, 2016. Scavenger receptor C mediates phagocytosis of white spot syndrome virus and restricts virus proliferation in shrimp. *PLoS Pathog.*, 12(12): e1006127.
- Yang MC, Yang HT, Li J, Sun JJ, Bi WJ, Niu GJ, Zhang Q, Shi XZ, Zhao XF, Wang JX, 2017. Scavenger receptor C promotes bacterial clearance in kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* by enhancing hemocyte phagocytosis and AMP expression. *Fish Shellfish Immunol.*, 67: 254–262.
- Yang LQ, Xu M, Cui HJ, 2015. Research progress in hemocyte of silkworm (*Bombyx mori*). *Sci. Sericul.*, 41(6): 973–978. [杨丽群, 徐曼, 崔红娟, 2015. 家蚕 (*Bombyx mori*) 血细胞研究进展. *蚕业科学*, 41(6): 973–978]
- Zhao YZ, Zhang K, Tang M, Xu M, Li CY, Pan GZ, Shen L, Cui HJ, Yang LQ, 2016. Cloning and expression of scavenger receptor class B *BmSCR8* in silkworm *Bombyx mori*. *Chin. J. Biotech.*, 32(10): 1408–1421. [赵羽卒, 张奎, 唐梅, 徐曼, 李重阳, 潘光照, 申利, 崔红娟, 杨丽群, 2016. 家蚕 B 类清道夫受体 *BmSCR8* 基因的克隆及表达. *生物工程学报*, 32(10): 1408–1421]

(责任编辑: 马丽萍)