

研究报告

Research Reports

九香虫 i 型溶菌酶基因的克隆与细菌诱导表达分析

黄海, 杜娟, 李尚伟*, 龚涛, 齐小浪

(贵州大学昆虫研究所, 贵州省山地农业病虫害重点实验室, 贵阳 550025)

摘要 溶菌酶是一组进化上保守的酶, 在昆虫中主要分为 c 型和 i 型两类。为明确 i 型溶菌酶在九香虫 *Coridius chinensis* 体内的表达模式与功能, 我们对九香虫的两个 i 型溶菌酶基因 *CcLys-i1* 和 *CcLys-i2* 进行了克隆, 这两个基因的编码区分别为 504 bp 和 432 bp, 分别编码 167 和 143 个氨基酸。序列分析显示, *CcLys-i1* 和 *CcLys-i2* 缺乏与催化活性相关的谷氨酸(E)和丝氨酸(S)。同源性和聚类分析显示, *CcLys-i1* 和 *CcLys-i2* 与斯氏珀蝽 *Plautia stali* 的 i 型溶菌酶相似性最高, 分别为 80.36% 和 48.95%。采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 解析 *CcLys-i1* 和 *CcLys-i2* 基因的时空表达谱, 结果表明它们在九香虫不同发育阶段都有表达, *CcLys-i1* 在成虫中表达水平最高, 而 *CcLys-i2* 在 5 龄若虫中表达水平最高; 它们在所检测的成虫不同组织中都有表达, 都在脂肪体中表达水平最高。九香虫被注射细菌后 24 h, *CcLys-i1* 和 *CcLys-i2* 的表达显著上调; 九香虫被饲喂细菌后, 这两种基因的表达水平没有显著变化。九香虫的这两种 i 型溶菌酶基因的表达受到自身免疫机制的调控, 可以被诱导而参与免疫应答, 但不具有参与消化的功能。该研究为进一步明确九香虫 i 型溶菌酶基因的功能奠定基础。

关键词 九香虫; i 型溶菌酶; 时空表达; 先天免疫; 细菌诱导

中图分类号: Q967 文献标识码: A DOI: 10.16688/j.zwbh.2020669

Cloning and induced expression analysis of the i-type lysozyme genes in *Coridius chinensis*

HUANG Hai, DU Juan, LI Shangwei*, GONG Tao, QI Xiaolang

(Guizhou Provincial Key Laboratory for Agricultural Pest Management in Mountainous Regions, Institute of Entomology, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China)

Abstract Lysozymes are a group of evolutionarily conserved enzymes and can be divided into c-type and i-type in insects. In order to clarify the expression pattern and function of the i-type lysozyme in *Coridius chinensis*, we cloned two i-type lysozyme genes *CcLys-i1* and *CcLys-i2*. The coding regions of these two genes were 504 bp and 432 bp, encoding 167 and 143 amino acids, respectively. Sequence analysis showed that *CcLys-i1* and *CcLys-i2* lacked glutamic acid (E) and serine (S) related to catalytic activity. Homology and cluster analyses showed that *CcLys-i1* and *CcLys-i2* shared the similarity of 80.36% and 48.95%, respectively, with the i-type lysozyme from *Plautia stali*. The spatiotemporal expression profiles of *CcLys-i1* and *CcLys-i2* were analyzed by using real-time quantitative PCR (RT-qPCR). The results indicated that these two genes were expressed at various developmental stages of *C. chinensis*, with the highest expression levels for *CcLys-i1* in the adults and for *CcLys-i2* in the fifth-instar nymphs; they were expressed in different tissues of adults and had the highest expression level in the fat bodies. The expression levels of *CcLys-i1* and *CcLys-i2* were significantly upregulated within 24 h post bacterial injection, but there were no significant changes in the expression levels of these two genes post bacterial feeding. The expression of these two i-type lysozyme genes in *C. chinensis* was regulated by its own immune mechanism and could be induced to participate in immune response, but they were not involved in digestion. This study laid a foundation for further elucidating the functions of the i-type lysozyme genes in *C. chinensis*.

Key words *Coridius chinensis*; i-type lysozyme; spatiotemporal expression; innate immunity; bacterial induction

收稿日期: 2020-12-15 修订日期: 2021-02-24

基金项目: 国家自然科学基金(31560610)

* 通信作者 E-mail: swliu@163.com

九香虫 *Coridius chinensis* 隶属于半翅目 Hemiptera 兜蝽科 Dinidoridae, 广泛分布于我国南方地区, 包括云南、四川、贵州、广西等地, 主要以葫芦科植物的汁液为食, 春夏季节常栖息在南瓜等农作物的茎叶上吸食浆液, 造成植株生长缓慢, 为害严重时, 可造成植株枯死。同时, 九香虫也是一种极具开发潜力的昆虫资源, 其虫体内富含蛋白质、多肽、脂肪酸、维生素以及微量元素等^[1-2], 具有很高的食用和药用价值^[3]。研究表明, 九香虫提取物具有抗菌和抗癌活性^[4], 研究发现这些活性主要源于提取物中的一些活性多肽, 例如防御素和溶菌酶等^[5-8]。此外, 九香虫野生资源数量有限, 在自然条件下, 九香虫一年仅发生一代, 加之人们对其进行的破坏性采集及环境污染, 野生虫源逐年减少, 人工繁殖九香虫是解决其供不应求的重要途径^[9]。相较于自然环境中的九香虫, 目前完全人工饲养的九香虫子代常出现畸形、免疫力低下以及细菌感染等严重问题, 给九香虫的饲养和繁殖带来巨大挑战。因此, 提高其子代自身的免疫防御功能和抗病能力也是目前养殖的关键, 加强对九香虫免疫系统和免疫防御反应机理的研究势在必行。

昆虫在长期的生物进化过程中形成了独特的免疫系统, 仅靠先天免疫就能迅速有效地完成对细菌、病毒或药物的免疫^[10-11]。昆虫先天免疫主要由体液免疫和细胞免疫组成。体液免疫包括产生抗菌肽、活性氧或氮的中间产物, 以及调节血淋巴凝固或黑色素化的复杂酶级联反应^[12-15]。细胞免疫是指由血细胞介导的免疫反应, 包括吞噬、结瘤和包埋^[16-17]。作为体液免疫机制的重要组成部分, 抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs)是宿主防御的第一个屏障, 能杀死细菌、真菌、病毒和原生动物等微生物或减缓它们的生长^[18-19]。在各种抗菌活性物质中, 溶菌酶是最常见的, 存在于许多生物中, 如细菌、噬菌体、真菌、植物和动物。

溶菌酶在结构、催化和免疫学特性上存在差异。传统上溶菌酶分为 3 大类型: 鸡型溶菌酶(c 型)、鹅型溶菌酶(g 型)和无脊椎动物型溶菌酶(i 型)^[20-21]。溶菌酶通常具有水解酶活性, 能水解细菌细胞壁肽聚糖聚合物中 N-乙酰胞壁酸和 N-乙酰氨基葡萄糖之间的 β -1,4 糖苷键^[22-23]。因此, 溶菌酶对于不断接触环境中微生物的无脊椎动物尤为重要, 可以帮助它们抵御细菌病原体的入侵^[24-26]。i 型溶菌酶最初是在海星和海洋双壳类动物中发现的, 在昆虫中

普遍存在^[27]。家蝇 *Musca domestica* 和海洋双壳类动物消化器官中溶菌酶的发现还表明了溶菌酶具有参与消化的功能, 这类溶菌酶在肠道中高表达^[28-30]。此外, 据报道 i 型溶菌酶还具有异肽酶和几丁质酶活性^[31-32]。从医用水蛭 *Hirudo medicinalis* 唾液中分离出的一种 i 型溶菌酶最初被描述为一种失稳酶(destabilase), 因为它能够溶解交联纤维蛋白^[33], 该酶后来被证明既具有溶菌酶活性又具有异肽酶活性^[34]。作为一组进化上保守的酶, 许多在昆虫中编码 c 型和 i 型溶菌酶的基因在基因组和转录组分析中被鉴定出来。目前, 研究者已研究了昆虫 c 型溶菌酶在蛋白质水平上的功能特征, 而对于昆虫 i 型溶菌酶只在 DNA 或 mRNA 水平上研究了其特征^[35]。昆虫 i 型溶菌酶可能在进化过程中失去了溶菌酶原有的一些特性, 而获得了新的、尚未确定的功能。

本课题组在前期九香虫转录组测序中共发现了 12 种抗菌活性多肽, 包括 4 种昆虫防御素, 1 种富含甘氨酸的抗菌肽, 1 种富含脯氨酸的抗菌肽以及 6 种溶菌酶。本研究在防御素和 c 型溶菌酶的研究基础上选择 2 个 i 型溶菌酶基因 *CcLys-i1* 和 *CcLys-i2*, 研究它们与其他物种的 i 型溶菌酶之间的进化关系, 并进行了细菌感染诱导下靶基因表达的分析, 初步探索两种 i 型溶菌酶在九香虫生长发育以及先天免疫中的功能。这项研究旨在完善九香虫溶菌酶在免疫防御机制中的作用, 为昆虫中广泛存在的 i 型溶菌酶的研究提供了一定的理论依据与数据支撑。

1 材料与方法

1.1 昆虫与供试菌

九香虫 *Coridius chinensis* 采自贵阳市花溪区, 在人工气候箱中用南瓜叶饲养。饲养温度 $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$, 相对湿度 80%, 光照周期 L//D=14 h//10 h。克隆载体 pMD18-T 和大肠杆菌 *Escherichia coli* 感受态细胞 TOP10 购自生工生物工程(上海)股份有限公司, 保存于一 80°C 冰箱, 大肠杆菌 *E. coli* (ATCC 25922) 和藤黄微球菌 *Micrococcus luteus* (CMCC 28001) 均保存于贵州大学昆虫研究所分子生物学实验室。

1.2 RNA 提取与基因克隆

采用 HP Total RNA Kit (Omega Bio-Tek, GA, USA) 提取九香虫不同发育时期(卵, 1~5 龄若虫, 雌虫和雄虫)以及成虫各个组织(头、脂肪体、血淋巴、中肠、肌肉、体壁、精巢和卵巢)的 RNA, 其

中九香虫血淋巴提取使用双管离心法^[36]。用 Nano-Drop 2000 超微量分光光度计(Thermo Fisher Scientific, MA, USA)测定 RNA 浓度,并用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量。采用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(Thermo Fisher Scientific, MA, USA)将提取的 RNA 反转录为 cDNA,将合成的 cDNA 浓度稀释到 300~500 ng/ μ L, -20℃ 保存。根据转录组序列信息用 Primer Premier 6.0 设计 PCR

引物(表 1),并由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。用 2 $\times$ PCR Master Mix 进行 PCR,反应条件:95℃ 预变性 3 min;95℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 40 s,35 个循环;72℃ 延伸 10 min。对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,并用胶回收试剂盒回收产物连接到 pMD18-T 载体上,转化大肠杆菌感受态细胞 TOP10,送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

表 1 九香虫两种 i 型溶菌酶基因的克隆与表达分析的引物信息

引物名称 Primer name	序列 (5'-3') Sequence	用途 Usage	退火温度/℃ Annealing temperature	扩增片段长度/bp Amplified fragment length
<i>Lys-i1</i> -F	GTCTTCAGAGATGCGTTTCCA	克隆	55	570
<i>Lys-i1</i> -R	TTATTCAGGAGGCTATCGGAGG		55	
<i>Lys-i2</i> -F	CAGACATGCACTTCCACTCAG		55	
<i>Lys-i2</i> -R	AAGGCTTGGATTGTGGCTAG		55	
<i>Actin</i> -F	ACCGCTGAGAGGGAATCG	实时荧光定量 PCR	58	195
<i>Actin</i> -R	CAAGAAGGAAGGCTGGAAGAG		58	
<i>qLys-i1</i> -F	CGACCACCTCAAGCAGAAG		61	150
<i>qLys-i1</i> -R	CGATGGATGGCAGCGTAGTC		61	
<i>qLys-i2</i> -F	GGACGACCGCAGAGCAAACG		61	121
<i>qLys-i2</i> -R	GGTGGATGGCAGCGAAGTCTATG		61	
<i>qLys2</i> -F	CTCTTGAGGACGACGACATCT		60	193
<i>qLys2</i> -R	TGACTGTGGTGTGGACTGTGA		60	

1.3 生物信息学分析

用 NCBI 的开放阅读框(Open reading frame, ORF)搜寻数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)预测 *CcLys-i1* 和 *CcLys-i2* (GenBank 登录号见表 2)的 ORF。在 ExPASy ProtParam tool(<https://web.expasy.org/protparam/>)平台预测两种溶菌酶的分子量和等电点,并用 SignalP 5.0 Server ([https://services.healthtech.dtu.dk/service.php? SignalP-5.0](https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0))分析信号肽及前肽。亚细胞定位使用 TargetP 2.0 ([https://services.healthtech.dtu.dk/service.php? TargetP-2.0](https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TargetP-2.0))。用 NCBI 的 BLAST 进行同源性比较(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>),并用 MEGA-X 软件中的邻接法构建系统进化树,重复运行 1 000 次。用于序列比对和构建进化树的溶菌酶来源物种和 GenBank 登录号见表 2。

1.4 时空表达谱

采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)在 CFX96 Touch Real-Time PCR 仪(Bio-Rad, CA, USA)上检测 *CcLys-i1* 和 *CcLys-i2* 基因在九香虫不同发育阶段和成虫不同组织中的表达水平。利用 Primer Premier 6.0 设计溶菌酶基因 *CcLys-i1* 和 *CcLys-i2*

表 2 用于多序列比对和聚类分析的溶菌酶

Table 2 Lysozymes used for multiple sequence alignment and cluster analysis		
蛋白 Protein	物种 Species	GenBank 登录号 GenBank accession no.
CcLys-i1	九香虫 <i>Coridius chinensis</i>	MW250791
CcLys-i12	九香虫 <i>C. chinensis</i>	MW250792
CcLys-i13	九香虫 <i>C. chinensis</i>	MW250793
CcLys-i4	九香虫 <i>C. chinensis</i>	MW250794
CcLys2	九香虫 <i>C. chinensis</i>	QPB70596
PmLyzil	斑节对虾 <i>Penaeus monodon</i>	ACZ63471
PmLyziz	斑节对虾 <i>P. monodon</i>	ACZ63472
PcLysi1	克氏原螯虾 <i>Procambarus clarkii</i>	AXR98475
PcLysi2	克氏原螯虾 <i>P. clarkii</i>	ACY64750
PcLysi3	克氏原螯虾 <i>P. clarkii</i>	AVK42824
HaLys-i2	异色瓢虫 <i>Harmonia axyridis</i>	ALM25917
DsLys-i	果蝇 <i>Drosophila serrata</i>	XP_020799746
AgLys-i	冈比亚按蚊 <i>Anopheles gambiae</i>	AAT51799
PsLys-i	斯氏珀蝽 <i>Plautia stali</i>	BBE08152
HhLys-i	茶翅蝽 <i>Halyomorpha halys</i>	XP_014272957
TjLys-i	菲律宾帘蛤 <i>Ruditapes philippinarum</i>	2DQA_A
RpLys-i2	菲律宾帘蛤 <i>R. philippinarum</i>	AMS37097
ArLys-i	红海盘车 <i>Asterias rubens</i>	AAR29291
AjLys-i	日本刺参 <i>Apostichopus japonicus</i>	ABK34500
EaLys-i	安德爱胜蚓 <i>Eisenia andrei</i>	ABC68610
HmLys-i	医用水蛭 <i>Hirudo medicinalis</i>	AAA96144
MlLys-i	文蛤 <i>Meretrix lusoria</i>	3AB6_A
CvLys-il	美洲牡蛎 <i>Crassostrea virginica</i>	P83673
CvLys-il	美洲牡蛎 <i>C. virginica</i>	XP_022343938
BmLZ	家蚕 <i>Bombyx mori</i>	NP_001037448

的特异性引物(表 1),引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。RT-qPCR 反应按照 $2\times$ SYBR Select Master Mix (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)说明书进行,反应体系为 $20\ \mu\text{L}$: $1\ \mu\text{L}$ cDNA, $10\ \mu\text{mol/L}$ 上、下游引物各 $1\ \mu\text{L}$, $10\ \mu\text{L}$ $2\times$ SYBR Select Master Mix, $7\ \mu\text{L}$ 无 RNA 酶的无菌去离子水。反应程序: 50°C 2 min; 95°C 预变性 2 min; 95°C 变性 15 s, 61°C 退火 15 s, 72°C 延伸 1 min, 40 个循环, 每个样本重复 3 次, 以九香虫 βactin 基因(GenBank 登录号: MK370101)作内参对照。

1.5 细菌注射

大肠杆菌和藤黄微球菌在自然环境中广泛分布,是动物经常接触到的细菌,通常在动物出现损伤时会引起伤口感染。溶菌酶等抗菌物质是昆虫应对细菌感染的第一道屏障,抑制细菌感染是它们最主要的功能。因此,注射细菌通常可诱导这类抗菌物质的产生。将藤黄微球菌和大肠杆菌分别接种于 $20\ \text{mL}$ LB 培养基中,于 37°C 恒温培养箱, $200\ \text{r/min}$ 振荡培养至 $\text{OD}_{600}=0.5$, $10\ 000\ \text{g}$ 离心 5 min, 收集菌体用 PBS 洗涤,并将两种细菌混合后悬浮于 PBS 中调节 $\text{OD}_{600}=0.01$ ($5\times 10^6\ \text{cfu/mL}$)。随机选取 100 头健康的九香虫成虫,每头腹腔注射 $1\ \mu\text{L}$ 菌液,为排除 PBS 缓冲液和机械损伤的影响,用同样的方法注射无菌的 $1\ \mu\text{L}$ PBS 作为阴性对照。注射后的九香虫饲养在人工气候箱中,温度 $(28\pm 1)^\circ\text{C}$,相对湿度 80%,光照周期 L//D=14 h//10 h,分别在无菌条件下收集 10 头注射细菌后 6、8、12、24、36、48、60 h 和 72 h 时的九香虫,用液氮速冻。RNA 提取和 cDNA 合成方法同上。采用 RT-qPCR 分析注射细菌后 *CcLys-i1* 和 *CcLys-i2* 的表达量,并与九香虫 c 型溶菌酶 *CcLys2* 进行比较分析(GenBank 登录号: MN816376)。

1.6 细菌饲喂

在 $250\ \text{mL}$ LB 培养液中接种藤黄微球菌,于 37°C 摇床, $200\ \text{r/min}$ 振荡过夜培养至 $\text{OD}_{600}=4$, 然后 $10\ 000\ \text{g}$ 离心 5 min, 收集菌体用 PBS 洗涤,再悬浮于 PBS 中调节至 $\text{OD}_{600}=2$ 。将采摘的新鲜南瓜茎叶剪碎与藤黄微球菌悬液($\text{OD}_{600}=2$)混合,放入 $15\ \text{mm}\times 25\ \text{mm}$ 的透明塑料盒子中。将随机选取的 40 头饥饿 12 h 的健康九香虫成虫转入该塑料盒子,用尼龙网封口以保证空气流通并将其放入人工气候箱中继续培养,以未混菌的南瓜茎叶饲养的九香虫

为对照。分别收集喂养 6、12 h 和 24 h 的九香虫成虫中肠,用液氮速冻。总 RNA 提取、cDNA 合成和 RT-qPCR 步骤同上。

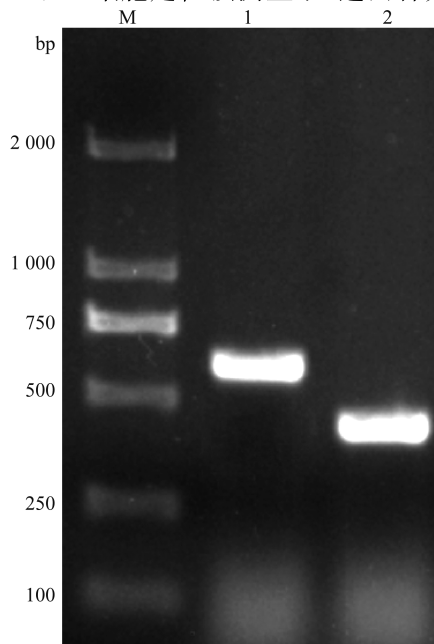
1.7 数据统计与分析

用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算不同发育阶段、不同组织及细菌诱导后 *CcLys-i1* 和 *CcLys-i2* 的表达水平。RT-qPCR 表达量相关数据用 SPSS 22.0 统计软件进行分析,采用单因素方差分析(ANOVA)和邓肯氏新复极差法进行多重检验, $P<0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 序列验证与特征分析

CcLys-i1 和 *CcLys-i2* 基因经 PCR 扩增后,电泳显示在约 570 bp 和 460 bp 位置各出现明亮的扩增带,与预期扩增片段大小一致(图 1),测序结果与来自转录组的序列相同。两种溶菌酶基因在 NCBI 数据库中的 BLAST 结果表明,它们属于无脊椎动物型(i 型)溶菌酶基因。*CcLys-i1* 基因的开放阅读框为 504 bp,编码 167 个氨基酸,预测分子量为 18.04 kDa,理论等电点为 5.28(图 2a)。*CcLys-i2* 基因的开放阅读框长度为 432 bp,编码 143 个氨基酸,预测分子量为 15.74 kDa,理论等电点为 5.12(图 2b)。亚细胞定位预测显示,这两种九香虫 i 型



M: DL2000 DNA 分子量标准; 1: *CcLys-i1* 基因; 2: *CcLys-i2* 基因
M: DL2000 DNA marker; 1: *CcLys-i1* gene; 2: *CcLys-i2* gene

图 1 九香虫两种 i 型溶菌酶基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of two i-type lysozyme genes from *Coridius chinensis*

溶菌酶均为分泌蛋白,都有一个 N-端信号肽,信号肽长度分别为 21 个氨基酸($G_{21} \downarrow Q_{22}$, CcLys-i1)和 24 个氨基酸($G_{24} \downarrow L_{25}$, CcLys-i2)。结构域分析显示

两种溶菌酶均具有典型的 i 型溶菌酶结构域 LYZ_i,且 CcLys-i1 和 CcLys-i2 在糖结合位点上的氨基酸高度一致(图 2)。

AGTCTTCAGAG

ATGCGTTTCCAGTGTGCCGCTCTTCCAGCAGTTGCTGTGCTCTTTGTCGCCTCGGTCTTCGGACAGCTGCCGGAG

M R F Q C A A L P A V A V L F V A S V F G Q L P E

CCAGTGAGCGAGCTGTGCCTGGGCTGCATCTGCGAGGCTGCATCGAACTGCGACCGCACCCTCGGCTGCACCGGC

P V S E L C L G C I C E A A S N C D R T L G C T G

GGCCTCTGCGGGCTCTTCAAGATCACCCAGCCCTACTGGTTAGACGCCAACAAGCCCACCATCCCCCTCGACCAC

G L C G L F K I T Q P Y W L D A N K P T I P L D H

CCTCAAGCAGAAGGAGCTTACCAAAGATGCTCTACTGATCCAGTGTGTGCGGCCGAAACTGTCAAGAACTATATG

P Q A E G A Y Q R C S T D P V C A A E T V K N Y M

GCCAGATTGCTCAGGACTGCAACGGTGACGGCAGAGTGGACTGCGCCGACTACGCTGCCATCCATCGGCTTGTT

A R F A Q D C N G D G R V D C A D Y A A I H R L G

GGCTACGGCTGCCAGGGCCAAATGGACGCCAAGTTCTGGCAGACCTTCAGAGCTTGCCAGTCCCAGATCCAATCC

G Y G C Q G Q M D A K F W Q T F R A C Q S Q I Q S

TTGGCGCCCACTATCGACATCAGGGGAGGAAACAATGCAGAGATCTTCAAGTAACTCCAAGAAACTCCTCAGAAC

L A P T I D I R G G N N A E I F K *

TTATCTTCATATTTATTACCCTCCGATAGCCTCCTGAATAATTAACCTTATTAAATGGTTACATTTTGACCCTTG

TTTTACAACATTTTCTTAAAAATTTAGGTGATTTTCACAAAAATAATATTAAATATTATATAATTGTAATATTA

ATATTATATTATATCCCTGTATAATATAAATTTTTTTTTGTTTTATGTAGTAAAGGTTTTTATTAATAAAAAA

AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

a

ATTCTTCAGAC

ATGCACTTCCACTCAGCAATTCTTCCAGCAGTAGCTGTACTGTTTGTGCGTGAATTTTCGGGTTAGTGGAGGGGCTA

M H F H S A I L P A V A V L F V V T F G L V E G L

GTGAGCGAGGGTTGCATGAAGAGGATCTGCGAGATGGCCTCCAACCTGCAGAGAGAATGCCGGGTGCGACAACGAC

V S E G C M K R I C E M A S N C R E N A G C D N D

GTCTGCGGCCCTTCAAGATCACCGAGGCTTCTGGGTGCGACGCCTTCAGGCCACCATCCCAGGGGACGACCGC

V C G P F K I T E A F W V D A F R P T I P G D D R

AGAGCAAACGGAGCTTTTGAAAGGTGCACTACTGATGCAAAGTGTGCGGAAAAAACTGTACAACCTTATATGGCA

R A N G A F E R C T T D A K C A E K T V Q L Y M A

AGACACGCTAGGACTGCAACGGTGACGGCCAAGTTACTTGCATAGACTTCGCTGCCATCCACCGGTTTGGGCCA

R H A R D C N G D G Q V T C I D F A A I H R F G P

TTTGCTGCCGAGCCAAATAAACGCTGAATTCGAGAATTCATTGATGACTGCTAGCCACAAATCCAAGCCTTG

F G C R S Q I N A E F E N S I D D C *

TTTTTAAATTTTAACATTTTGATCCATATTCACCATTATTGTTTCAAATTTATGTTTATTTAAAAAAAATTAT

TGAACTATTGTAATATTAATATTATATCCTTATCCATTGTTTAAACACAAATACATTGTTTTTAT

b

a: *CcLys-i1* 的核苷酸与氨基酸序列; b: *CcLys-i2* 的核苷酸与氨基酸序列。下划线部分表示信号肽, 灰色阴影部分为推导的糖结合位点。终止密码子用星号表示
a: Nucleotide and amino acid sequences of *CcLys-i1*; b: Nucleotide and amino acid sequences of *CcLys-i2*. The signal peptide is underlined and the deduced sugar-binding site is gray-shaded. Asterisks indicate stop codons

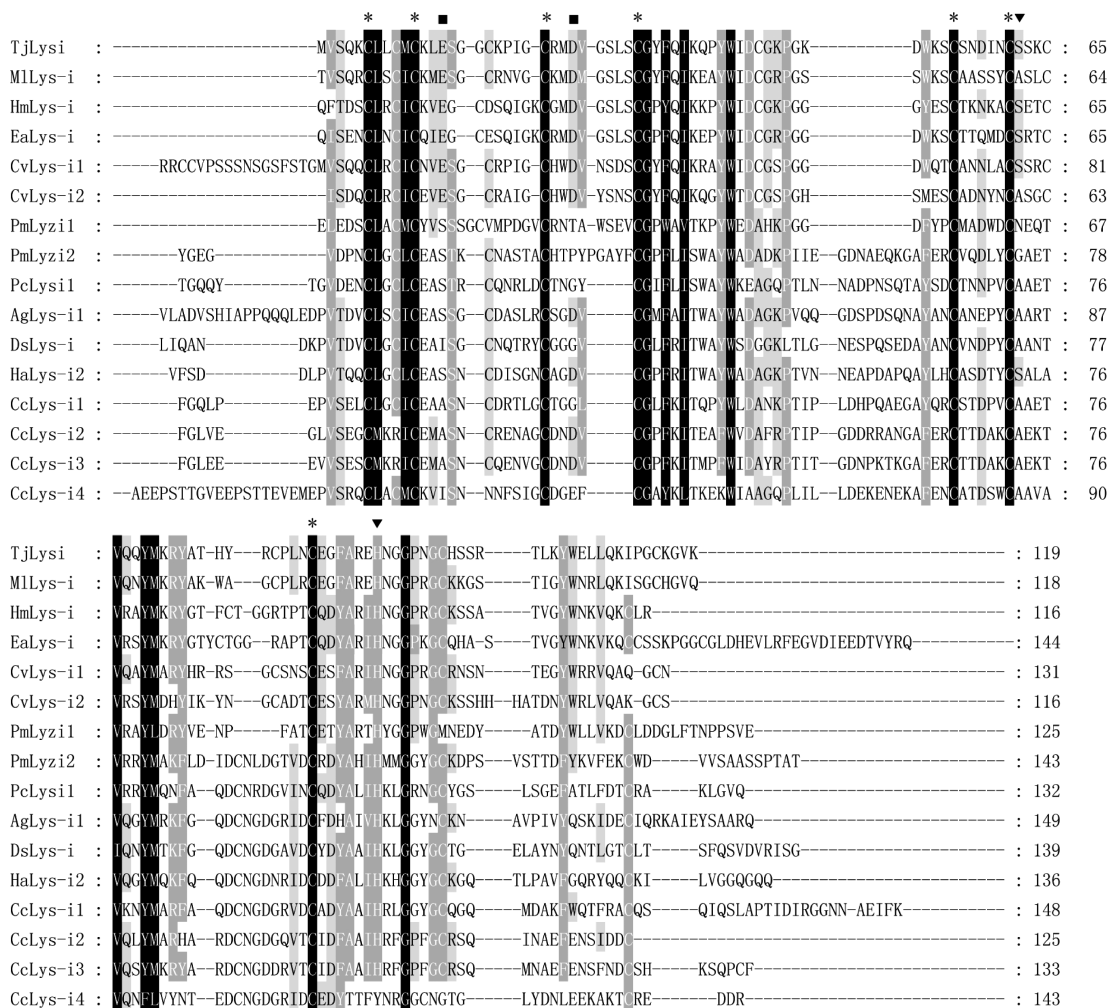
图 2 九香虫两种 i 型溶菌酶的核苷酸与推导的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of two i-type lysozymes from *Coridius chinensis*

2.2 序列比对与系统发育分析

将来自九香虫的 4 种溶菌酶的成熟蛋白氨基酸序列与其他 12 个物种的 i 型溶菌酶氨基酸序列进行比对,这 12 个物种包括 4 种软体动物(美洲牡蛎 *Crassostrea virginica*, 菲律宾帘蛤 *Ruditapes philippinarum* 和文蛤 *Meretrix lusoria*), 2 种环节动物(安德爱胜蛭 *Eisenia andrei* 和医用水蛭 *H. medicinalis*), 6 种节肢动物(果蝇 *Drosophila serrata*, 异色瓢虫 *Harmonia axyridis*, 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*, 斑节对虾 *Penaeus monodon* 和克氏原螯虾 *Procambarus clarkii*)。多序列比对显示了 i 型溶菌酶催化必需的谷氨酸残基 E 和天冬氨酸残基 D, 以及完全保守的 8 个半胱氨酸残基 C

基序。与 c 型溶菌酶一样, 谷氨酸残基 E 和天冬氨酸残基 D 也被认为对 i 型溶菌酶的催化活性至关重要^[37-38]。有趣的是, 来自九香虫的 4 种溶菌酶以及其他节肢动物的 i 型溶菌酶至少缺乏这两种氨基酸残基中的一个, 而环节动物和软体动物的 i 型溶菌酶都具有这两种保守的催化残基(图 3)。此外, 一般认为 i 型溶菌酶还具有异肽酶活性, 并且这种异肽酶活性被认为涉及丝氨酸蛋白酶机制, 需要丝氨酸残基 S62 和组氨酸残基 H92^[39-40]。然而, 在节肢动物中丝氨酸残基 S 并不保守, 除异色瓢虫外, 九香虫的 4 种溶菌酶以及其他节肢动物的 i 型溶菌酶对应位点均没有发现有丝氨酸残基 S 的存在(图 3)。



Cc: 九香虫; Tj: 菲律宾帘蛤; Ml: 文蛤; Hm: 医用水蛭; Ea: 安德爱胜蛭; Cv: 美洲牡蛎; Pm: 斑节对虾; Pc: 克氏原螯虾; Ag: 冈比亚按蚊; Ds: 果蝇; Ha: 异色瓢虫。保守的半胱氨酸用“*”标出; 胞壁质酶活性所需的谷氨酸(E)和天冬氨酸(D)用“■”标注; 异肽酶活性所需丝氨酸(S)和组氨酸(H)残基用倒三角形“▼”表示

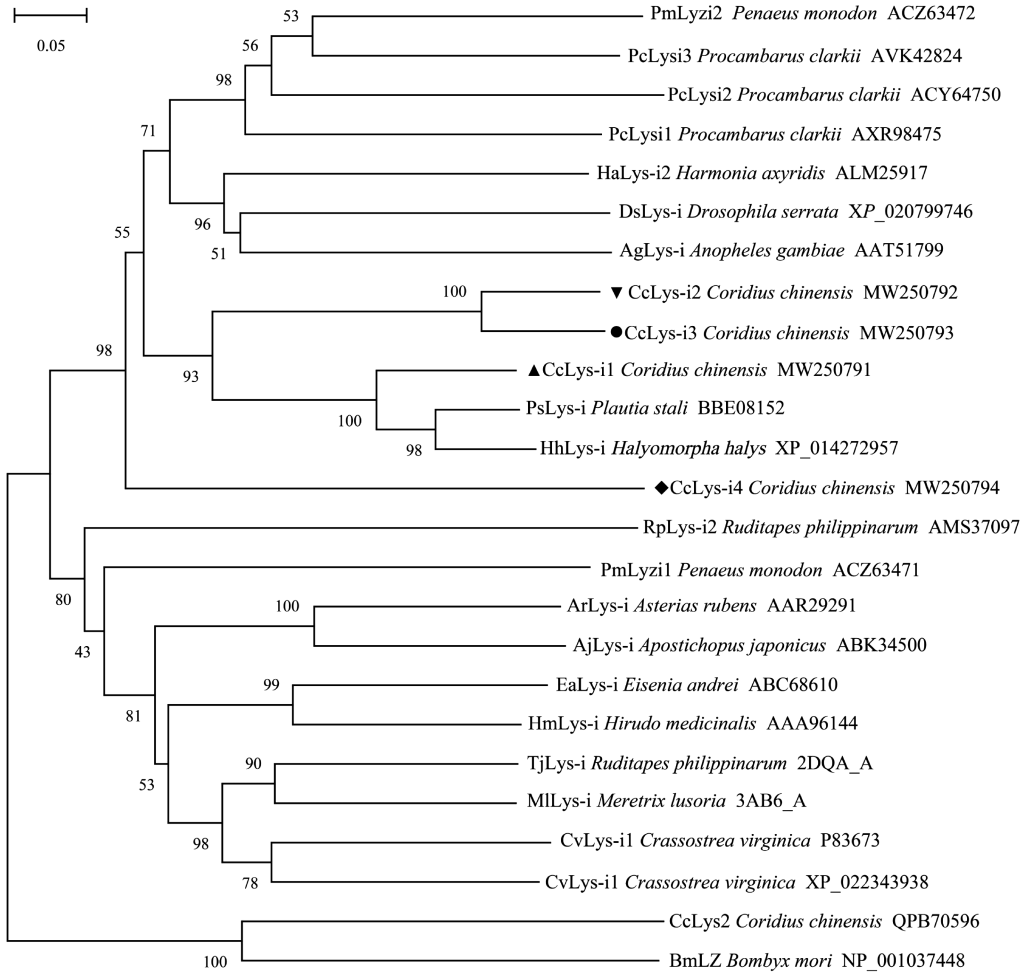
Cc: *C. chinensis*; Tj: *R. philippinarum*; Ml: *M. lusoria*; Hm: *H. medicinalis*; Ea: *E. andrei*; Cv: *C. virginica*; Pm: *P. monodon*; Pc: *P. clarkii*; Ag: *A. gambiae*; Ds: *D. serrata*; Ha: *H. axyridis*. Conserved cysteines are marked with asterisks; the glutamic acid (E) and aspartic acid (D) residues required for muramidase activity are indicated by “■”, and the serine (S) and histidine (H) residues required for isopeptidase activity are indicated by “▼”

图3 九香虫与其他物种 i 型溶菌酶的多重序列比对

Fig. 3 Multiple sequence alignment of i-type lysozymes from *Coridius chinensis* and other species

以九香虫 c 型溶菌酶 *CcLys2* 和家蚕 *B. mori* 的 c 型溶菌酶 *BmLZ* 为外群,用邻接法构建基于成熟蛋白的系统发育树,结果显示来自节肢动物的溶菌酶聚为一支,在另一支中,除了斑节对虾溶菌酶 *PmLyz1* 外,还包括环节动物、软体动物以及棘皮动物的 i 型溶菌酶(图 4)。与其他无脊椎动物 i 型溶菌酶相比,用于系统发育分析的所有节肢动物 i 型溶菌酶几乎都缺失了与胞壁质酶活性相关的特

征催化残基;在 NCBI 蛋白数据中对 i 型溶菌酶的检索表明,i 型溶菌酶中这种推测的催化残基的缺失在昆虫中普遍存在。来自九香虫的 4 种溶菌酶与斯氏珀蝽 *Plautia stali* 和茶翅蝽 *Halyomorpha halys* 的溶菌酶聚为一个亚群,这表明它们具有较近的亲缘关系;而九香虫的这 4 种 i 型溶菌酶在系统发育树上的差异,则表明九香虫 i 型溶菌酶至少有 3 种不同的亚型。



MEGA-X构建i型溶菌酶的邻接树,重复运行1 000次,节点上的数值表示自举检验值
MEGA-X is used to construct the clustering tree based on amino acid sequences of i-type lysozymes using neighbor-joining method (NJ). One thousand replications are performed and bootstrap confidence values are shown at the nodes

图 4 无脊椎动物型溶菌酶的系统发育树
Fig. 4 The phylogenetic tree of i-type lysozymes

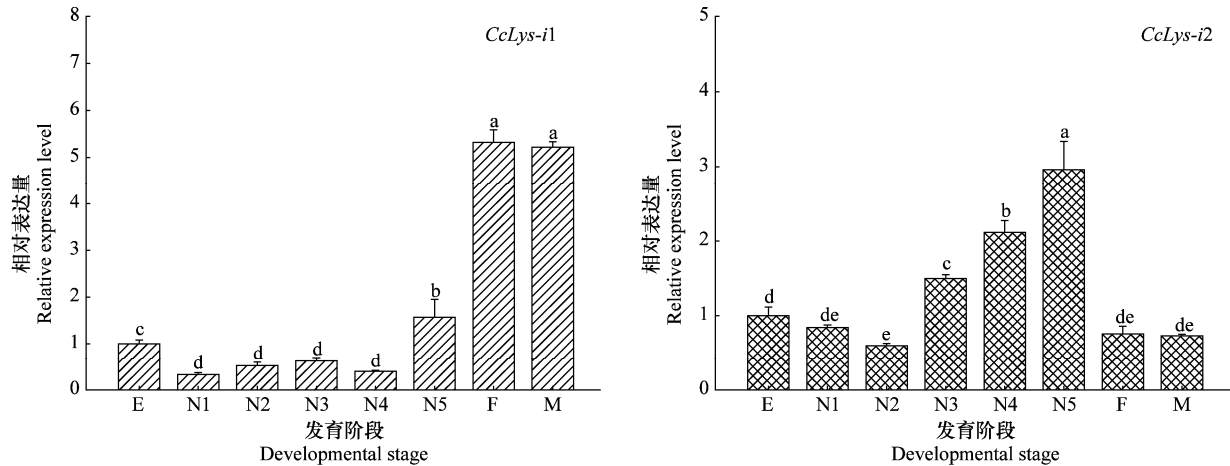
2.3 时空表达谱

九香虫溶菌酶基因 *CcLys-i1* 和 *CcLys-i2* 的时空表达模式见图 5 和图 6, *CcLys-i1* 和 *CcLys-i2* 在九香虫不同发育时期的表达水平有显著差异。 *CcLys-i1* 在成虫期的表达量最高且雌、雄虫之间无显著差异,在 5 龄若虫中的表达量次之。 *CcLys-i1* 在成虫中的表达量约为在卵中的 5 倍,5 龄若虫中

的 3 倍(图 5a)。 *CcLys-i2* 在 5 龄若虫中的表达量最高,在 4 龄若虫中的表达量次之,在成虫中的表达量较低。 *CcLys-i2* 在 5 龄若虫中的表达量约为卵中的 3 倍以及成虫中的 4 倍(图 5b)。在检测的成虫不同组织中, *CcLys-i1* 和 *CcLys-i2* 具有相似的组织分布模式,两种 i 型溶菌酶均在脂肪体有最高的表达量;在其余组织中, *CcLys-i1* 主要在血淋巴、精巢和卵巢

中表达(图 6a),而 *CcLys-i2* 在血淋巴和中肠中有较

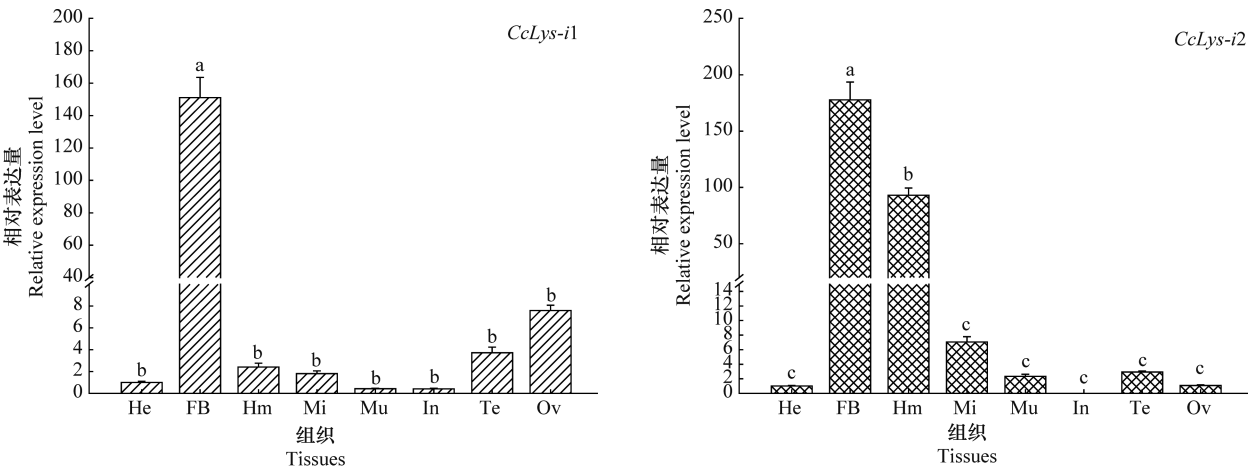
高的表达量(图 6b)。



E: 卵; N1~N5: 1~5龄若虫; F: 雌虫; M: 雄虫。图上的不同字母表示经Duncan氏新复极差法在 $\alpha=0.05$ 水平有显著差异,下同
E: Egg; N1-N5: The 1st-5th instar nymph; F: Female; M: Male. Different letters above the bars indicate significant difference at 0.05 level according to Duncan's new multiple range test. The same applies below

图 5 两种 i 型溶菌酶基因在九香虫不同发育时期的相对表达量

Fig. 5 Relative expression levels of two i-type lysozyme genes at various developmental stages of *Coridius chinensis*



He: 头; FB: 脂肪体; Hm: 血淋巴; Mi: 中肠; Mu: 肌肉; In: 体壁; Te: 精巢; Ov: 卵巢
He: Head; FB: Fat body; Hm: Hemolymph; Mi: Midgut; Mu: Muscle; In: Integument; Te: Testis; Ov: Ovary

图 6 两种 i 型溶菌酶基因在九香虫成虫不同组织中的相对表达量

Fig. 6 Relative expression levels of two i-type lysozyme genes in different tissues of adult *Coridius chinensis*

2.4 细菌注射后溶菌酶基因的表达模式

九香虫被注射细菌后 3 种溶菌酶基因的表达模式见图 7,与未注射细菌的对照组(CK)相比,虽然 *CcLys-i2* 在 36 h 出现波动,但总体上 *CcLys-i1* 和 *CcLys-i2* 以及 c 型溶菌酶 *CcLys2* 的表达水平均显著上调,表达模式基本一致。*CcLys-i1* 和 *CcLys-i2* 的表达量在 24 h 内升高并达到最大值,*CcLys2* 则是在 60 h 内持续保持高丰度并达到最大值;而在注射 PBS 的样本中 *CcLys-i1* 和 *CcLys-i2* 的表达水平基本保持不变或变化很小(图 7d),说明注射 PBS 不能诱导这两种溶菌酶的表达。这些结果表

明 *CcLys-i1* 和 *CcLys-i2* 与九香虫的免疫密切相关。

2.5 细菌饲喂后溶菌酶基因的表达模式

与注射细菌后的表达模式不同,被饲喂细菌的九香虫与用南瓜茎叶正常饲喂的九香虫(CK)相比,仅发现 c 型溶菌酶 *CcLys2* 表达水平在饲喂 6 h 后有显著上调,而两种 i 型溶菌酶基因的表达丰度在 24 h 内与对照组相比变化幅度较小,并未上调(图 8),这说明 *CcLys-i1* 和 *CcLys-i2* 在中肠中不能被饲喂细菌的方式所诱导,并不参与九香虫肠道的消化作用。

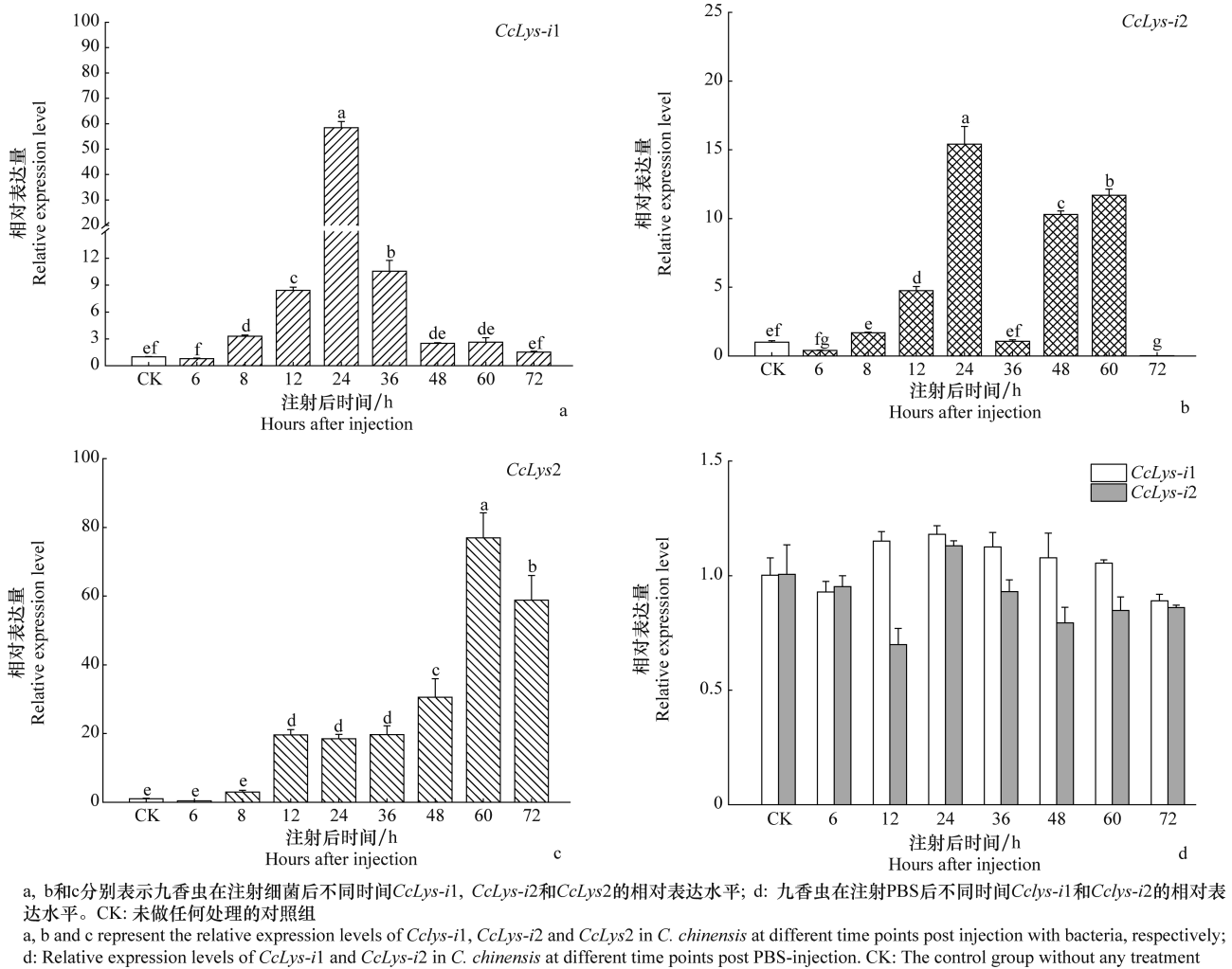


图 7 3 种溶菌酶基因在九香虫注射细菌后不同时间的相对表达量

Fig. 7 Relative expression levels of three lysozyme genes in *Coridius chinensis* at different time points after injection with bacteria

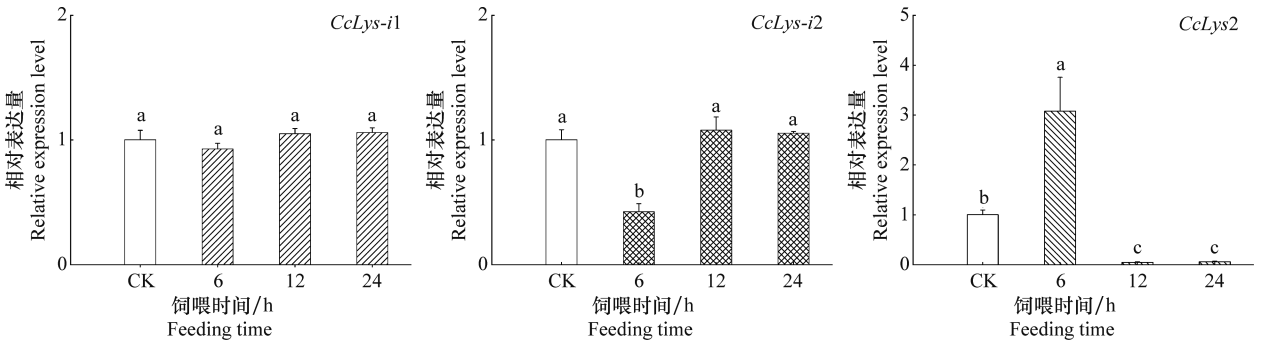


图 8 3 种溶菌酶基因在饲喂细菌九香虫中的相对表达量

Fig. 8 Relative expression levels of three lysozyme genes in *Coridius chinensis* fed with bacteria

3 结论与讨论

溶菌酶作为一种重要的天然免疫因子,广泛分布于脊椎动物和无脊椎动物^[41]。本文报道了来自

九香虫的两种无脊椎动物型(i 型)溶菌酶 *CcLys-i1* 和 *CcLys-i2*,该研究可为其他昆虫 i 型溶菌酶同源物的功能注释提供参考。

先前的研究通过定点诱变方法证实 E18 和 D30

在 i 型溶菌酶 TJL 催化活性中的重要性,它们被认为是 c 型溶菌酶 HEWL 中催化残基 E35 和 D52 的等价物^[37-38, 42]。然而,在节肢动物中 i 型溶菌酶缺乏这两种催化残基的情况并不罕见,尤其是在昆虫的 i 型溶菌酶中。有研究提出昆虫中 c 型溶菌酶的功能冗余导致 i 型溶菌酶失去活性,从而获得新的功能^[43],在苹掌舟蛾 *Phalera flavescens* 中发现的 N-乙酰氨基乳糖特异性凝集素被认为是从昆虫 i 型溶菌酶进化而来^[44]。后续的研究也证明 i 型溶菌酶具有多种功能,如异肽酶活性、几丁质酶活性和非酶抗菌活性等^[45-46]。在本研究中,序列分析显示来自九香虫的 2 种 i 型溶菌酶均没有与胞壁质酶活性相关的谷氨酸残基 E 以及异肽酶活性所需的丝氨酸残基 S,仅 CcLys-i2 在对应活性位点上有天冬氨酸残基 D,因此我们推测 CcLys-i1 和 CcLys-i2 可能既没有胞壁质酶活性也没有异肽酶活性。在异色瓢虫中发现的 5 种 i 型溶菌酶也存在类似的情况,它们均缺乏与胞壁质酶或异肽酶活性相关的催化残基,而在后续的研究中被证实没有相关的酶活性^[35]。

无脊椎动物型(i 型)溶菌酶在生物体内具有多种功能。在克氏原螯虾和斑节对虾中,i 型溶菌酶没有胞壁质酶活性,但仍具有非酶抗菌活性和异肽酶活性^[46-47],其抗菌活性似乎与胞壁质酶之间并没有必然联系。在蚊子中,i 型溶菌酶被认为在吸血或免疫中起作用^[43]。在软体动物中,i 型溶菌酶还被认为具有帮助消化的作用,类似于反刍动物胃中的 c 型溶菌酶^[20, 48-49]。在医用水蛭中,i 型溶菌酶具有异肽酶活性,有分解血凝块中纤维蛋白的功能^[40]。但在目前的研究中,一般认为昆虫 i 型溶菌酶缺乏胞壁质酶活性相关的结构域,而其是否具有异肽酶活性尚不清楚^[50],仅研究了它们在 DNA 或 mRNA 水平上的特征。为了更好地了解 i 型溶菌酶在九香虫中的作用,我们对 CcLys-i1 和 CcLys-i2 的表达水平进行了检测。CcLys-i1 和 CcLys-i2 具有相似的组织分布模式,可以在脂肪体、血淋巴以及精巢和卵巢中检测到。脂肪体和血淋巴在昆虫的天然免疫系统中非常重要,通常昆虫抗菌肽在脂肪体中表达后分泌到血淋巴^[51-52]。因此,CcLys-i1 和 CcLys-i2 可能作为抗菌蛋白参与免疫过程,至于检测到 CcLys-i1 在精巢和卵巢有一定表达水平,则暗示了其可能与九香虫生长发育有某种联系。在人类精子顶体中发现的溶菌酶样蛋白 SLIP1 就被认为在精卵结合中发挥作用^[53]。

有研究表明,异色瓢虫的一种 i 型溶菌酶以及

冈比亚按蚊的两种 i 型溶菌酶并不能被免疫激发所诱导^[35]。然而,在我们的研究中,九香虫的两种 i 型溶菌酶不仅可以被诱导,而且与来自九香虫的 c 型溶菌酶 CcLys2 有着相似的表达模式。九香虫被注射细菌后,CcLys-i1 和 CcLys-i2 在数小时内持续上调,一般昆虫在感染细菌后约 6~12 h 抗菌肽就会出现于被感染昆虫的血淋巴中^[54],而在注射 PBS 的样本中并未检测到 CcLys-i1 和 CcLys-i2 的表达水平的显著变化,这表明它们与九香虫的免疫密切相关。九香虫喂食混有细菌的南瓜茎叶后两种基因的表达并未出现上调,则说明 CcLys-i1 和 CcLys-i2 并不在肠腔分泌,虽然有研究表明 i 型溶菌酶可能有助于消化的作用,但在本研究中没有证据表明两种九香虫 i 型溶菌酶有这样的功能,仅 c 型溶菌酶 CcLys2 可能存在这种功能。现有的研究表明,i 型溶菌酶在不同物种之间具有不同的活性和功能,即使在同一个物种中,不同的 i 型溶菌酶功能也可能有所不同。在九香虫的不同发育阶段,CcLys-i1 与 CcLys-i2 表达模式不同,受到九香虫自身发育的调控。CcLys-i1 在雌雄成虫中高表达,且在精巢和卵巢中表达水平较高,这表明该基因可能与九香虫的生长发育相关,而 CcLys-i2 在若虫期的表达水平高于成虫,推测 i 型溶菌酶可能具有与昆虫蜕皮相关的几丁质酶活性。

本研究从九香虫的转录组中筛选并克隆了两个无脊椎动物型溶菌酶基因 CcLys-i1 和 CcLys-i2,对这两种基因的 mRNA 表达模式进行了解析。研究结果表明,两种溶菌酶在进化上属于典型的昆虫 i 型溶菌酶,受到九香虫自身发育的调控,与九香虫被细菌感染后的免疫应答密切相关。该研究有助于进一步研究 i 型溶菌酶在九香虫生长发育和免疫防御中的作用,从而为九香虫资源的开发提供理论支撑。鉴于 i 型溶菌酶功能的多样性及昆虫 i 型溶菌酶在蛋白水平功能上的不确定性,下一步我们考虑用 RNA 干扰或基因编辑(CRISPR-Cas9)技术对其功能做进一步研究。

参考文献

- [1] 李刚, 李晓飞. 贵州九香虫营养成分分析 [J]. 昆虫知识, 2010, 47(4): 748-751.
- [2] 刘伦沛, 郁建平. 九香虫的营养成分分析与评价 [J]. 食品科学, 2008, 29(2): 406-410.
- [3] 刘庆芳. 九香虫现代临床研究与应用 [J]. 河南大学学报(医学科学版), 2002, 22(4): 66-67.
- [4] 侯晓晖, 孙廷, 李晓飞. 九香虫粗提物对 SGC-7901 和 HepG2 细胞增殖及细胞周期的影响 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(1): 108-109.

- [5] 郭志来. 基于转录组测序和真核重组表达的九香虫(*Aspongopus chinensis* Dallas)来源防御素和溶菌酶研究 [D]. 贵州: 贵州师范大学, 2018.
- [6] 李尚伟, 赵柏松, 杜娟. 九香虫抗菌肽 CcAMP1 的分离纯化和抗菌活性检测 [J]. 昆虫学报, 2015, 58(6): 610–616.
- [7] 吴玛莉, 金道超. 九香虫血淋巴及其纯化蛋白抑菌活性的研究 [J]. 昆虫知识, 2005, 42(3): 315–318.
- [8] 喻廷君, 杜娟, 李尚伟. 九香虫防卫素基因 *CcDef1* 的克隆及特征分析 [J]. 山地农业生物学报, 2019, 38(3): 6–11.
- [9] 吴有芳. 九香虫滞育生理原因初步研究 [D]. 贵州: 贵州大学, 2019.
- [10] CYTRYŃSKA M, WOJDA I, JAKUBOWICZ T. How insects combat infections [M]//BALLARIN L, CAMMARATA M. Lessons in immunity. Amsterdam: Academic Press, 2016: 117–128.
- [11] HOFFMANN J A. Innate immunity of insects [J]. Current Opinion in Immunology, 1995, 7(1): 4–10.
- [12] NAKHLEH J, MOUSSAWI L E, OSTA M A. The melanization response in insect immunity [M]//LIGOXYGAKIS P. Advances in insect physiology. Amsterdam: Academic Press, 2017: 83–109.
- [13] NAPPI A J, CHRISTENSEN B M. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity [J]. Insect Biochemistry & Molecular Biology, 2005, 35(5): 443–459.
- [14] ZUG R, HAMMERSTEIN P. *Wolbachia* and the insect immune system: what reactive oxygen species can tell us about the mechanisms of *Wolbachia*-host interactions [J/OL]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 1201. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01201.
- [15] YI Huiyu, CHOWDHURY M, HUANG Yadong, et al. Insect antimicrobial peptides and their applications [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2014, 98(13): 5807–5822.
- [16] LAVINE M D, STRAND M R. LAVINE M D, et al. Insect hemocytes and their role in immunity [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2002, 32(10): 1295–1309.
- [17] STRAND M R. The insect cellular immune response [J]. Insect Science, 2008, 15(1): 1–14.
- [18] BACHÈRE E. Anti-infectious immune effectors in marine invertebrates: potential tools for disease control in larviculture [J]. Aquaculture, 2003, 227: 427–438.
- [19] BULET P, STÖCKLIN R, MENIN L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates [J]. Immunological Reviews, 2010, 198(1): 169–184.
- [20] BACHALI S, JAGER M, HASSANIN A, et al. Phylogenetic analysis of invertebrate lysozymes and the evolution of lysozyme function [J]. Journal of Molecular Evolution, 2002, 54(5): 652–664.
- [21] SIMPSON R J, BEGG G S, DOROW D S, et al. Complete amino acid sequence of the goose-type lysozyme from the egg white of the black swan [J]. Biochemistry, 1980, 19(9): 1814–1819.
- [22] IMOTO T, JOHNSON L N, NORTH A C T, et al. 21 vertebrate lysozymes [J]. The Enzymes, 1972, 7: 665–868.
- [23] QASBA P K, KUMAR S, BREW K. Molecular divergence of lysozymes and α -lactalbumin [J]. Critical Reviews in Biochemistry, 1997, 32(4): 255–306.
- [24] HIKIMA S, HIKIMA J I, ROJTINNAKORN J, et al. Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species [J]. Gene, 2003, 316(1): 187–195.
- [25] MAI Weijun, HU Chaoqun. Molecular cloning, characterization, expression and antibacterial analysis of a lysozyme homologue from *Fenneropenaeus merguensis* [J]. Molecular Biology Reports, 2009, 36(6): 1587–1595.
- [26] MINAGAWA S, HIKIMA J I, HIRONO I, et al. Expression of Japanese flounder c-type lysozyme cDNA in insect cells [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2001, 25(5/6): 439–445.
- [27] JOLLÈS J, JOLLÈS P. The lysozyme from *Asterias rubens* [J]. FEBS Journal, 1975, 54(1): 19–23.
- [28] CANÇADO F C, VALÉRIO A A, MARANA S R, et al. The crystal structure of a lysozyme c from housefly *Musca domestica*, the first structure of a digestive lysozyme [J]. Journal of Structural Biology, 2007, 160(1): 83–92.
- [29] MARANA S R, CANÇADO F C, VALÉRIO A A, et al. Crystallization, data collection and phasing of two digestive lysozymes from *Musca domestica* [J]. Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications, 2006, 62(Pt 8): 750–752.
- [30] MCHENERY J G, BIRKBECK T H, ALLEN J A. The occurrence of lysozyme in marine bivalves [J]. Comparative Biochemistry & Physiology Part B Comparative Biochemistry, 1979, 63(1): 25–28.
- [31] ITO Y, YOSHIKAWA A, HOTANI T, et al. Amino acid sequences of lysozymes newly purified from invertebrates imply wide distribution of a novel class in the lysozyme family [J]. European Journal of Biochemistry, 1999, 259(1/2): 456–461.
- [32] JOSKOVÁ R, ŠILEROVÁ M, PROCHÁZKOVÁ P, et al. Identification and cloning of an invertebrate-type lysozyme from *Eisenia andrei* [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2009, 33(8): 932–938.
- [33] BASKOVA L P, NIKONOV G I. Destabilase, the novel ϵ -(γ -Glu)-Lys isopeptidase with thrombolytic activity [J]. Blood Coagulation and Fibrinolysis, 1991, 2(1): 167–172.
- [34] ZAVALOVA L L, LAZAREV V N, LEVITSKY S A, et al. Destabilase-lysozyme of medicinal leech. Multifunctionality of recombinant protein [J]. Biochemistry, 2010, 75(9): 1173–1181.
- [35] BECKERT A, WIESNER J, SCHMIDTBERG H, et al. Expression and characterization of a recombinant i-type lysozyme from the harlequin ladybird beetle *Harmonia axyridis* [J]. Insect Molecular Biology, 2016, 25(3): 202–215.
- [36] SU T, MULLA M S. Quantitative determination of free amino acids in the hemolymph of autogenous and anautogenous strains of *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) [J]. Journal of Medical Entomology, 1997, 34(6): 729–734.
- [37] CALLEWAERT L, MICHIELS C W. Lysozymes in the animal kingdom [J]. Journal of Biosciences, 2010, 35: 127–160.
- [38] GOTO T, ABE Y, KAKUTA Y, et al. Crystal structure of *Tapes japonica* lysozyme with substrate analogue: structural basis of the catalytic mechanism and manifestation of its chitinase activity

- accompanied by quaternary structural change [J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(37): 27459 - 27467.
- [39] FRADKOV A, BEREZHNOY S, BARSOVA E, et al. Enzyme from the medicinal leech (*Hirudo medicinalis*) that specifically splits endo-(γ -Glu)-Lys isopeptide bonds: cDNA cloning and protein primary structure [J]. FEBS Letters, 1996, 390(2): 145 - 148.
- [40] ZAVALOVA L, LUKYANOV S, BASKOVA I, et al. Genes from the medicinal leech (*Hirudo medicinalis*) coding for unusual enzymes that specifically cleave endo-epsilon (gamma-Glu)-Lys isopeptide bonds and help to dissolve blood clots [J]. Molecular & General Genetics, 1996, 253(1/2): 20 - 25.
- [41] PRAGER E M, JOLLÈS P J. Animal lysozymes c and g: an overview [J]. EXS, 1996, 75: 9 - 31.
- [42] MALCOLM B A, ROSENBERG S, COREY M J, et al. Site-directed mutagenesis of the catalytic residues Asp-52 and Glu-35 of chicken egg white lysozyme [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1989, 86(1): 133 - 137.
- [43] PASKEWITZ S M, LI B, KAJLA M K. Cloning and molecular characterization of two invertebrate-type lysozymes from *Anopheles gambiae* [J]. Insect Molecular Biology, 2010, 17(3): 217 - 225.
- [44] YOKOYAMA K, SATO M, HANEDA T, et al. An N-acetylglucosamine-specific lectin, PFA, isolated from a moth (*Phalera flavescentis*), structurally resembles an invertebrate-type lysozyme [J]. Insect Biochemistry & Molecular Biology, 2014, 54: 106 - 111.
- [45] BASKOVA I P, ZAVALOVA L L. Polyfunctionality of destabilase, a lysozyme from a medicinal leech [J]. Bioorganicheskaya khimiya, 2008, 34(3): 337 - 343.
- [46] ZHANG Hongwei, SUN Chen, SUN Shanshan, et al. Functional analysis of two invertebrate-type lysozymes from red swamp crayfish, *Procambarus clarkii* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 29(6): 1066 - 1072.
- [47] SUPUNGUL P, RIMPHANITCHAYAKIT V, AOKI T, et al. Molecular characterization and expression analysis of a c-type and two novel muramidase-deficient i-type lysozymes from *Penaeus monodon* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 28(3): 490 - 498.
- [48] DOBSON D E, PRAGER E M, WILSON A C. Stomach lysozymes of ruminants. I. Distribution and catalytic properties [J]. Journal of Biological Chemistry, 1984, 259(18): 11607 - 11616.
- [49] XUE Q G, ITOH N, SCHEY K L, et al. A new lysozyme from the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) indicates adaptive evolution of i-type lysozymes [J]. Cellular & Molecular Life Sciences, 2007, 64(1): 82 - 95.
- [50] HERREWEGHE J M, MICHIELS C W. Invertebrate lysozymes: Diversity and distribution, molecular mechanism and *in vivo* function [J]. Journal of Biosciences, 2012, 37(2): 327 - 348.
- [51] BOMAN. Gene-encoded peptide antibiotics and the concept of innate immunity: an update review [J]. Scandinavian Journal of Immunology, 1998, 48(1): 15 - 25.
- [52] SEUFI A E M, HAFEZ E E, GALAL F H. Identification, phylogenetic analysis and expression profile of an anionic insect defensin gene, with antibacterial activity, from bacterial-challenged cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* [J/OL]. BMC Molecular Biology, 2011, 12(1): 47. DOI: 10.1186/1471-2199-12-47.
- [53] MANDAL A, KLOTZ K L, SHETTY J, et al. SLLP1, a unique, intra-acrosomal, non-bacteriolytic, c lysozyme-like protein of human spermatozoa [J]. Biology of Reproduction, 2003, 68(5): 1525 - 1537.
- [54] KANOST M R, JIANG Haobo, YU Xiaoqiang. Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta* [J]. Immunological Reviews, 2004, 198(1): 97 - 105.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 16 页)

- [107] 赵红艳. 内蒙古地区马铃薯疮痂病生防菌的筛选鉴定及防效研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2018.
- [108] LIU Daqun, ANDERSON N A, KINKEL L L. Field evaluation of antagonistic *Streptomyces* strains on biocontrol of potato scab [J]. 植物病理学报, 2000, 30(3): 237 - 244.
- [109] NEENO-ECKWALL E C, KINKEL L L, SCHOTTEL J L. Competition and antibiosis in the biological control of potato scab [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2001, 47(4): 332 - 340.
- [110] 奚启新, 杜凤英, 王凤山, 等. 调节土壤 pH 值和药剂防治马铃薯疮痂病 [J]. 中国马铃薯, 2000(1): 57 - 58.
- [111] DAVIS J R, MCMASTER G M, GALLIHAN R H. Influence of soil moisture and fungicide treatments on common scab and mineral content of potatoes [J]. Phytopathology, 1976, 66(2): 228 - 233.
- [112] ADAMS M J, LAPWOOD D H. Studies on the lenticel development, surface microflora and infection by common scab (*Streptomyces scabies*) of potato tubers growing in wet and dry soils [J]. Annals of Applied Biology, 2010, 90(3): 335 - 343.
- [113] 赵萍, 岳新丽, 康胜. 采用不同基质防治马铃薯微型薯疮痂病的试验[J]. 中国马铃薯, 2012, 26(1): 43 - 45.
- [114] 周芳, 贾景丽, 刘兆财, 等. 2, 4-D 防治马铃薯疮痂病的效果 [J]. 中国马铃薯, 2018, 32(4): 235 - 239.
- [115] 张笑宇, 胡俊, 安智慧. 几种杀菌剂对马铃薯疮痂病菌的室内毒力[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 2009, 30(4): 47 - 50.
- [116] 王宏虬, 缪福俊, 李彪, 等. 马铃薯疮痂病最适诱抗剂筛选试验[J]. 南方农业学报, 2013, 44(7): 1125 - 1129.
- [117] 徐雪亮, 刘子荣, 曾绍民, 等. 5 种生物药剂防治马铃薯主要病害田间药效试验[J]. 中国农学通报, 2020, 36(9): 122 - 126.
- [118] 石莹莹, 赵盼, 宋双伟, 等. 马铃薯疮痂病拮抗菌 YN-2-2 的分离与鉴定[J]. 微生物学通报, 2020, 47(8): 2425 - 2435.
- [119] 高同国, 姜军坡, 郭晓军, 等. 马铃薯疮痂病高效拮抗菌的筛选及鉴定[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(12): 157 - 159.
- [120] 徐红艳, 王卫, 王彬, 等. 刺五加内生放线菌对马铃薯疮痂病菌拮抗作用初探[J]. 西北农业学报, 2016, 25(11): 1742 - 1748.

(责任编辑: 杨明丽)