



胡亚, 罗嫚, 魏川川, 修江帆, 吴建伟. 家蝇 3 种丝氨酸蛋白酶抑制剂 (*Serpin*) 基因在感染白色念珠菌后的表达 [J]. 环境昆虫学报, 2020, 42 (5): 1191–1200.

## 家蝇 3 种丝氨酸蛋白酶抑制剂 (*Serpin*) 基因在感染白色念珠菌后的表达

胡亚<sup>1</sup>, 罗嫚<sup>3</sup>, 魏川川<sup>4</sup>, 修江帆<sup>2</sup>, 吴建伟<sup>2\*</sup>

(1. 毕节市第一人民医院, 贵州毕节 551700; 2. 贵州医科大学基础医学院, 贵阳 550004;

3. 毕节市中医院, 贵州毕节 551700; 4. 贵州省疾病预防控制中心, 贵阳 550004)

**摘要:** 研究家蝇丝氨酸蛋白酶抑制剂 (*Serpin*) 基因 *Sp2*、*Sp13*、*Sp16* 在感染白色念珠菌后的表达模式。利用白色念珠菌刺激家蝇幼虫, 对收集的标本进行逆转录, 以 *GAPDH* 为内参基因, 通过 qPCR 技术检测 3 条 *Serpin* 基因在家蝇感染后不同时间点及不同组织中的表达特征, 统计分析结果。结果表明, 不同时间点感染组和对照组比较, *Sp2* mRNA 在 3 h、6 h 和 48 h 的表达量比对照组高; *Sp13* mRNA 在 6 h 的表达量比对照组高, 在 3 h 和 24 h 时的表达量比对照组低; *Sp16* mRNA 在 6 h、24 h 和 48 h 时的表达量比对照组高, 在 36 h 时的表达量比对照组低。不同组织中感染组和对照组比较, *Sp2* mRNA 在 3 h 时, 在血淋巴和脂肪体中的表达量比对照组高, 在马氏管、气管和肠道的表达量比对照组低; 12 h 时, 在血淋巴中的表达量比对照组高, 在马氏管和唾液腺中的表达量比对照组低; 24 h 时, 在脂肪体中的表达量比对照组低; 48 h 时, 在血淋巴中呈高表达, 在唾液腺中的表达量比对照组低。*Sp13* mRNA 在 3 h 时, 在唾液腺和脂肪体中的表达量比对照组高, 在马氏管、体壁、血淋巴和气管中的表达量比对照组低; 12 h 时, 在血淋巴中呈高表达, 在体壁和脂肪体中的表达量比对照组低; 24 h 时, 在血淋巴、气管和唾液腺中的表达量比对照组高, 在脂肪体中的表达量比对照组低; 48 h 时, 在马氏管、血淋巴、气管和脂肪体中的表达量比对照组高, 在体壁和唾液腺中的表达量比对照组低。*Sp16* mRNA 在 3 h 时, 在马氏管和气管中的表达量比对照组低; 12 h 时, 在马氏管和脂肪体中其表达量比对照组低; 24 h 时, 其表达量在马氏管中比对照组高, 在脂肪体中比对照组低; 48 h 时, 在血淋巴中呈高表达, 而在马氏管中的表达量比对照组低。家蝇 3 种 *Serpin* 基因在白色念珠菌感染后均呈现出差异性表达, 推测 *Serpin* 基因在家蝇免疫调节中具有协同调节作用。

**关键词:** 丝氨酸蛋白酶抑制剂; 家蝇; 感染; 时空表达; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: Q963; S433

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2020) 05-1191-10

### Expression pattern of three serine protease inhibitor (*Serpin*) genes after the fungal infection in *Musca domestica*

HU Ya<sup>1</sup>, LUO Man<sup>3</sup>, WEI Chuan-Chuan<sup>4</sup>, XIU Jiang-Fan<sup>2</sup>, WU Jian-Wei<sup>2\*</sup> (1. Bijie First Municipal People's Hospital, Bijie 551700, Guizhou Province, China; 2. Basic Medical College, Medical University of Guizhou, Guiyang 550004, Guizhou Province, China; 3. Bijie Hospital of Traditional Chinese Medicine, Bijie 551700, Guizhou Province, China; 4. Guizhou Provincial Center for Disease Control and Prevention, Guiyang 550004, Guizhou Province, China)

**Abstract:** To research the expression patterns of *serine protease inhibitors* (*Serpin*) genes *Sp2*, *Sp13* and

基金项目: 国家自然科学基金 (81360254); 贵州省科技厅省校合作项目 (黔科合 LH 字 [2014] 7076 号); 贵州省卫生计生委科学技术项目 (gzwj2014-2-100)

作者简介: 胡亚, 女, 1991 年生, 贵州遵义人, 硕士研究生, 检验主管技师, 研究方向为医学昆虫免疫及应用, E-mail: hooyaa@126.com

\* 通讯作者 Author for correspondence: 吴建伟, 男, 博士, 教授, 主要研究方向为医学昆虫免疫及应用, E-mail: wjw@gmc.edu.cn

收稿日期 Received: 2019-10-12; 接受日期 Accepted: 2020-02-24

*Sp16* in *Musca domestica* larvae after infection of *Canidia Albicans*. *M. domestica* larvae infection *Canidia albicans* and collect specimens, total RNA was extracted from these samples and reverse transcription for cDNA, the expressions of three *Serpin* genes were detected by qPCR. *GAPDH* as internal reference gene. Laboratory data were then analysed statistically. Different time points after infection, the results indicated that the expression of *Sp2* mRNA in infection group increased obviously in 3 h, 6 h and 48 h compared with control group; The expression of *Sp13* in 6 h was higher than the control group, but lower at 3 h and 24 h; The expression of *Sp16* in 6 h, 24 h and 48 h was higher than the control group, and the expression of *Sp16* in 36 h was lower than the control group. Infection group different tissue compared with control group, The *Sp2* mRNA express in the hemolymph and fat body significantly increased in 3 h, but lower expression in the malpighian tubes, trachea and intestinal; Higher expression in the haemolymph, but lower expression in the salivary glands and the malpighian tubes in 12 h; lower expression in the fat body in 24 h; Expressed in the hemolymph quantity higher, but low expression of salivary glands amount than those of the control group in 48 h. The *Sp13* mRNA express in the salivary glands and fat body volume significantly increased in 3 h, but lower expression in the malpighian tubes, epidermis, hemolymph and trachea than the control group; Higher expression in the haemolymph, but lower expression in the epidermis and fat body in 12 h; Higher expression in the haemolymph, trachea and the salivary glands, but lower expression in the fat body than the control group in 24 h; Higher expression in the malpighian tubes, haemolymph, trachea and the fat body, but lower expression in the epidermis and salivary glands in 48 h. The *Sp16* mRNA is lower expression in the malpighian tubes and trachea than the control group in 3 h; lower expression in the malpighian tubes and fat body in 12 h; Higher expression in the malpighian tubes, but lower expression in the fat body in 24 h; Higher expression in the haemolymph, but lower expression in the malpighian tubes in 48 h. Three *Serpin* genes of *M. domestica* showed differential expression after infection with *C. albicans*. It is speculated that *Serpin* gene has synergistic regulation in the immune regulation of *M. domestica*.

**Key words:** Serine protease inhibitor; *Musca domestica*; infection; spatiotemporal expression patterns; real-time fluorescent quantitative PCR

昆虫的免疫系统主要依赖于黑化作用 (李殿香等, 2013)、体液免疫及细胞免疫三者相互作用的免疫应答反应。当机体受病原体感染后, 昆虫体液免疫启动脂肪体细胞合成抗菌肽 (裴志花等, 2014; Osama 等, 2014) 并分泌到血淋巴中杀死入侵的病原体, 不同的病原体通过激活 Toll 信号通路 (Wang *et al.*, 2013; Qian *et al.*, 2014) 和 IMD 信号通路 (Lemaitre and Hoffmann, 2007) 来控制各类抗菌肽分子的产生, 但昆虫先天免疫系统的抗菌肽表达等免疫应答反应, 如果过度产生将会对宿主自身造成极大的损伤。因此对激活免疫应答的上游信号进行精确调节至关重要, 而许多昆虫的免疫应答都是由丝氨酸蛋白酶 (Serine Protease, SP) 级联介导 (Steven and Peter, 2011)。

丝氨酸蛋白酶抑制剂 (*Serpin*) 蛋白家族是一个成员众多、分布广泛的蛋白酶抑制剂家族

(Singh and Jairajpuri, 2014), *Serpin* 主要是通过使用自杀底物原理特异性地与靶酶形成稳定的共价复合物, 导致靶酶失活, 终止过度免疫应答反应, 对宿主本身起着免受损伤的作用。其广泛存在于动物、植物和微生物中 (Hibbetts *et al.*, 1999), 迄今已发现 1 500 多种 *Serpins* (Law *et al.*, 2006), 根据其功能的相似性与序列拓扑结构至少可将其分为 20 个家族, 大多数是糖蛋白, 具有免疫调节活性 (黄薇和吴坤陆, 2010; 杨伟克等, 2014)。它们能折叠成保守的空间结构, 且具有特异的类自杀性底物抑制机制 (Irving *et al.*, 2000; Ruby *et al.*, 2006; 魏川川等, 2016)。在动物体中, *Serpin* 是维持体内环境稳定的重要因素, 一旦基因平衡失调即会导致多种疾病, 任何影响其活性的因素也会造成严重的病理性疾病 (满初日嘎等, 2009; 张兵等, 2014; 李冰等, 2016)。*Serpin* 可作为调节因子参与生理反应, 可调节血液中的多种

蛋白酶, 调节酚氧化酶原活化反应, 还参与调节机体多种非特异性免疫应答 (Krowarsch *et al.*, 2003; 张云, 2006; 韦双双等, 2012; Gatto *et al.*, 2013)。鉴于 *Serp* 重要的免疫调节和生理功能, 其功能研究一直倍受关注。

家蝇 *Musca domestica* 是重要的媒介昆虫, 并且分布广泛, 隶属于昆虫纲双翅目 Diptera 蝇科 Muscidae 家蝇属 *Musca*, 具有强大的先天免疫系统及生长代谢调节功能 (修江帆等, 2014; 彭传林等, 2015; 王宇等, 2015; 胡亚等, 2016), 已日益成为研究者们关注的焦点, 为深入研究家蝇的先天性免疫防御机制, 本研究通过白色念珠菌 *Canidia albicans* 刺激家蝇 3 龄幼虫, 对家蝇中具有潜在免疫调节功能的 3 种 *Serp* 基因的时空表达模式进行研究, 旨在为今后研究 *Serp* 基因的生物学功能提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物材料与菌种

家蝇由贵州医科大学-基础医学院-病原生物学教研室保种, 传代繁殖, 饲养温度控制在 25~28℃, 保持相对湿度在 70%~80%, 光照周期为 12 L:12 D; 白色念珠菌由贵州医科大学-基础医学院-病原生物学教研室保存。

1.1.2 主要试剂与仪器

PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit 试剂盒、DEPC 水、SYBR Premix Ex Taq™ II (Perfect Real Time) 试剂盒、总 RNA 提取试剂 TRIzol Reagent 均购自 Takara 公司; 氯仿和异丙醇购自西陇科学; 去 RNA 酶 EP 管 (美国 Axygen 公司); PCR 扩增仪 (德国 Eppendorf 公司)、微量加样器 (德国 Eppendorf 公司)、冷冻高速离心机 (德国 Eppendorf 公司)、Milli-Q 超纯水仪 (法国 Millipore Pharmacia 公司)、核酸定量分析仪 (GeneQuant 公司)、ABI PRISM 7300 Fast real time PCR System (美国)、显微超微量注射仪 (美国)。所用引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

根据 NCBI 公布的 *GAPDH* (内参基因) 基因序列和家蝇 *Sp2*、*Sp13*、*Sp16* 基因预测序列, 运用 Primer 5.0 软件设计引物。交由生工生物工程 (上

海) 股份有限公司合成, 其序列如下 (表 1):

表 1 实验引物  
Table 1 Primers

| 引物 Primer      | 序列 Sequence                |
|----------------|----------------------------|
| <i>Sp2</i> F   | 5'-CCAAATCAGGCAGTAAATG-3'  |
| <i>Sp2</i> R   | 5'-CTCAGCAGGTATGGGTAAT-3'  |
| <i>Sp13</i> F  | 5'-GCTCTATTGTGCTGCCTAT-3'  |
| <i>Sp13</i> R  | 5'-ATCCGATGTCATTTTGG-3'    |
| <i>Sp16</i> F  | 5'-TCAACAACCTGGGTGGAGG-3'  |
| <i>Sp16</i> R  | 5'-CAAGACTTTGGCATCGTAT-3'  |
| <i>GAPDH</i> F | 5'-CAGGAGGCATTGCTGATGAT-3' |
| <i>GAPDH</i> R | 5'-GAAGGCTGGGGCTCATT-3'    |

1.2.2 标本制备

以浓度为  $1 \times 10^{10}$  CFU/mL 的白色念珠菌作为感染源, 利用显微超微量注射仪注射家蝇 3 龄幼虫, 每头注射 210 nL, 设置为感染组, 同时以等体积的 PBS 缓冲液设为对照组, 收集感染后不同时间点 (3、6、12、24、36、48 h) 和 3、12、24、48 h 各时间点的家蝇幼虫组织 (马氏管、体壁、血淋巴、气管、唾液腺、脂肪体、中肠) 标本, 存于 -80℃ 备用。

1.2.3 提取总 RNA 及合成 cDNA

对所有感染标本, 利用 TRIzol 提取总 RNA, 电泳检测, 运用 GeneQuant 公司核酸定量分析仪测定  $A_{260/280}$  ( $1.8 \leq A_{260/280} \leq 2.1$ ) 及浓度, 以 1 μg 总 RNA 为模板合成 cDNA 第一链, 置于 -80℃ 待用。

1.2.4 荧光定量 PCR

取上述家蝇 3 龄幼虫感染后不同时间点 (3、6、12、24、36、48 h) 及 3、12、24、48 h 各时间点的家蝇幼虫组织 (马氏管、体壁、血淋巴、气管、唾液腺、脂肪体、中肠) (感染组及对照组) cDNA (1:10 稀释) 为模板, 设 *GAPDH* 为内参基因, 按照 Takara SYBR Premix Ex Taq™ II (Perfect Real Time) 试剂盒使用说明, 利用 ABI PRISM 7300 (USA) 进行 qPCR, 每个样品重复 3×3 次。反应体系为: 2×SYBR premix EX Taq II 10 μL、上游引物 (10 μmol/L) 0.8 μL、下游引物 (10 μmol/L) 0.8 μL、ROX Reference Dye (50×) 0.4 μL、cDNA 1.0 μL, RNase Free dH<sub>2</sub>O 补足至 20 μL。反应条件为: 95℃ 预变性 30 s;

95℃ 5 s; 60℃ 34 s; 40 个循环。反应结束确认 qPCR 的扩增曲线和溶解曲线。

### 1.2.5 数据处理及分析

利用 *GAPDH* 作为内参照, 其拷贝数作为校正基数, 感染组样本中 *Serpin* 的  $\Delta Ct$  值等于各样本中 *Serpin* 的  $Ct$  值减去同样本中 *GAPDH* 的  $Ct$  值; 以对照组中  $\Delta Ct$  值作为校正, 得出  $\Delta\Delta Ct$  (感染组  $\Delta Ct$  - 对照组  $\Delta Ct$ ) 值 (胡亚等, 2016), 按目的基因表达量 =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算各感染样本中 *Sp2*、*Sp13*、*Sp16* mRNA 的相对表达量。采用 Graphpad prism 6 进行统计分析并绘图, 通过方差分析进行组间比较,  $P < 0.05$  时具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 qPCR 产物分析

根据 qPCR 原理,  $Ct$  值 (Cycle threshold) 表示每个反应管内的荧光信号达到设定阈值时所经历的循环数, 每个模板的  $Ct$  值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系, 以  $Ct$  值来反映目的基因 cDNA 起始含量, 起始拷贝数越多,  $Ct$  值越小

(胡亚等, 2016)。结果显示, 所有样本中 *Sp2*、*Sp13*、*Sp16* cDNA 显示指数增长, 其扩增曲线为典型的 S 型曲线并达到平台期,  $Ct$  值线性范围为 15 ~ 30 (图 1, 图 2, 图 3)。在熔解曲线中均可见单一的峰, 产物特异性好 (图 4, 图 5, 图 6)。

### 2.2 感染组与对照组 *Sp2*、*Sp13*、*Sp16* mRNA 水平

#### 2.2.1 感染后不同时间点

白色念珠菌感染后, 家蝇 *Sp2*、*Sp13*、*Sp16* 基因在不同时间点均显现出差异表达。家蝇 *Sp2* 基因在感染后 3 h 时表达量最高, 其次为 48 h 和 6 h, 均具有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 而在感染后 12 h、24 h、36 h 表达量差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 家蝇 *Sp13* 基因在感染后 6 h 时表达量最高, 而 3 h 和 24 h 时其表达量较对照组低, 均具有显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 在感染后 12 h、36 h、48 h 表达量差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 家蝇 *Sp16* 基因在感染后 48 h 时表达量最高, 其次为 24 h 和 6 h, 而在感染后 36 h 时其表达量较对照组低, 均具有显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 在感染后 3 h 和 12 h 表达量差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (图 7)。

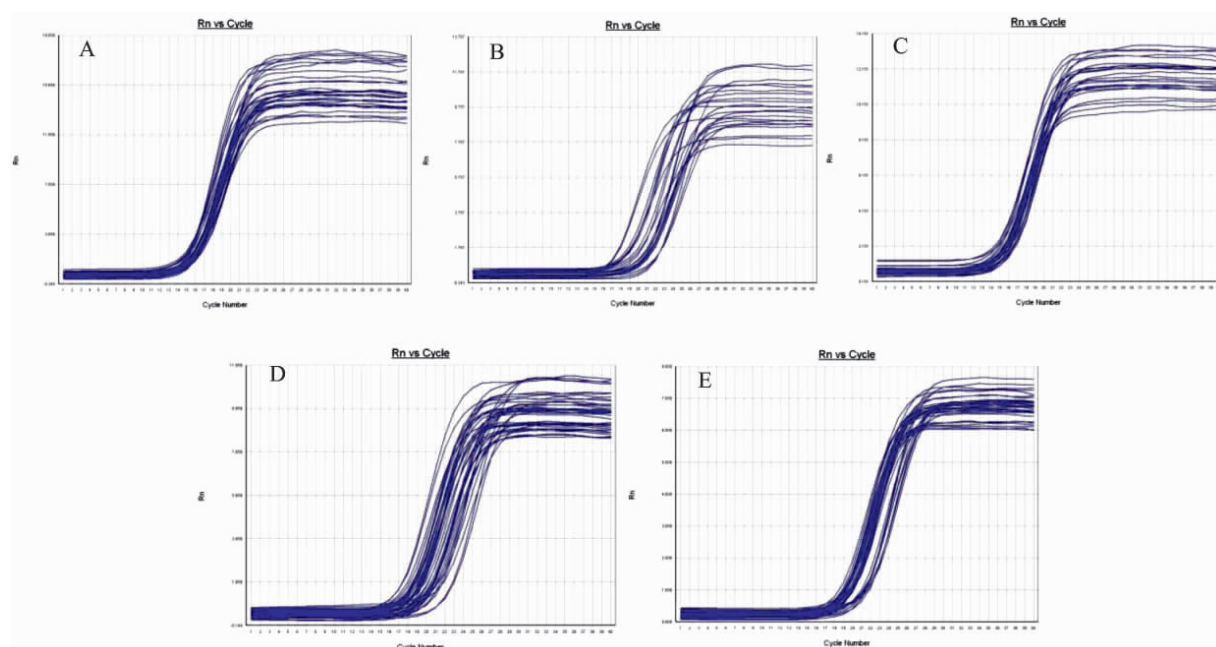


图 1 *Sp2* 扩增曲线

Fig. 1 Amplification of *Sp2*

注: A, 感染后不同时间点; B, 感染后 3 h 不同组织; C, 感染后 12 h 不同组织; D, 感染后 24 h 不同组织; E, 感染后 48 h 不同组织。图 2 - 图 6 同。Note: A, Time post infection; B, Different tissues at 3 h postinfection; C, Different tissues at 12 h postinfection; D, Different tissues at 24 h postinfection; E, Different tissues at 48 h postinfection. Same to Fig. 2 - 6.

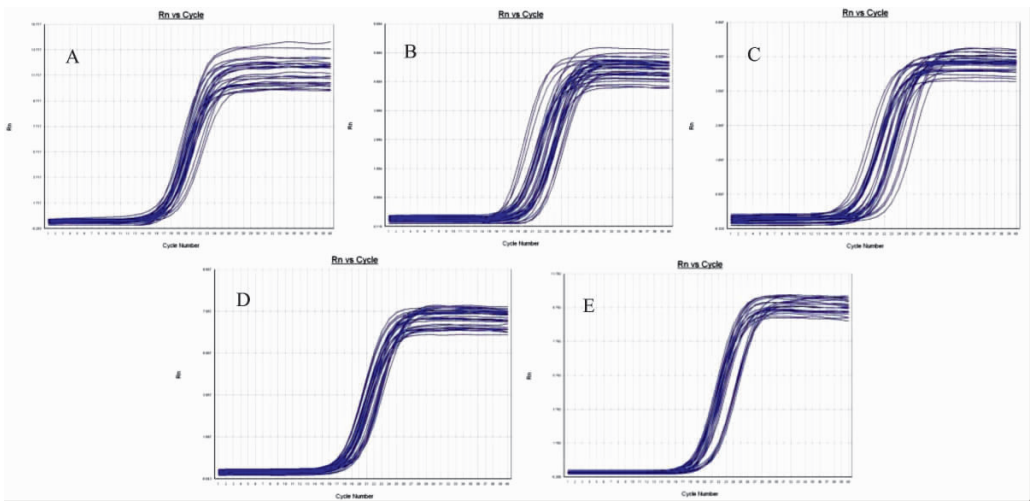


图 2 *Sp13* 扩增曲线  
Fig. 2 Amplification of *Sp13*

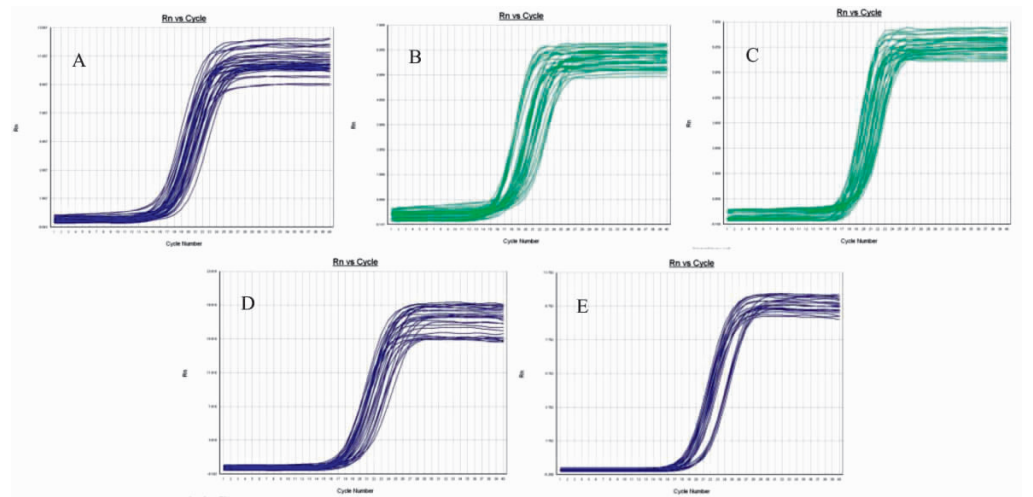


图 3 *Sp16* 扩增曲线  
Fig. 3 Amplification of *Sp16*

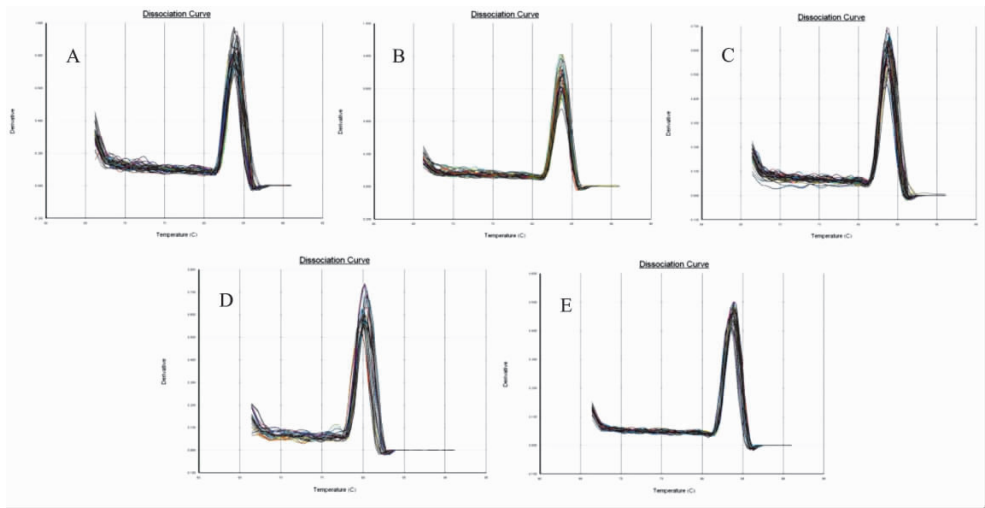


图 4 *Sp2* 溶解曲线  
Fig. 4 Melting curve of *Sp2*

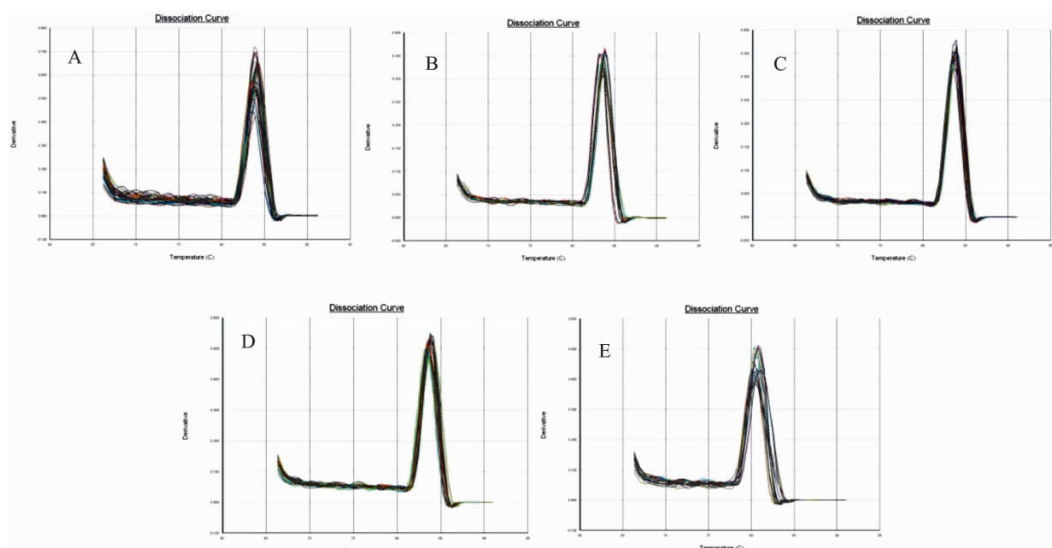


图5 *Sp13* 溶解曲线  
Fig. 5 Melting curve of *Sp13*

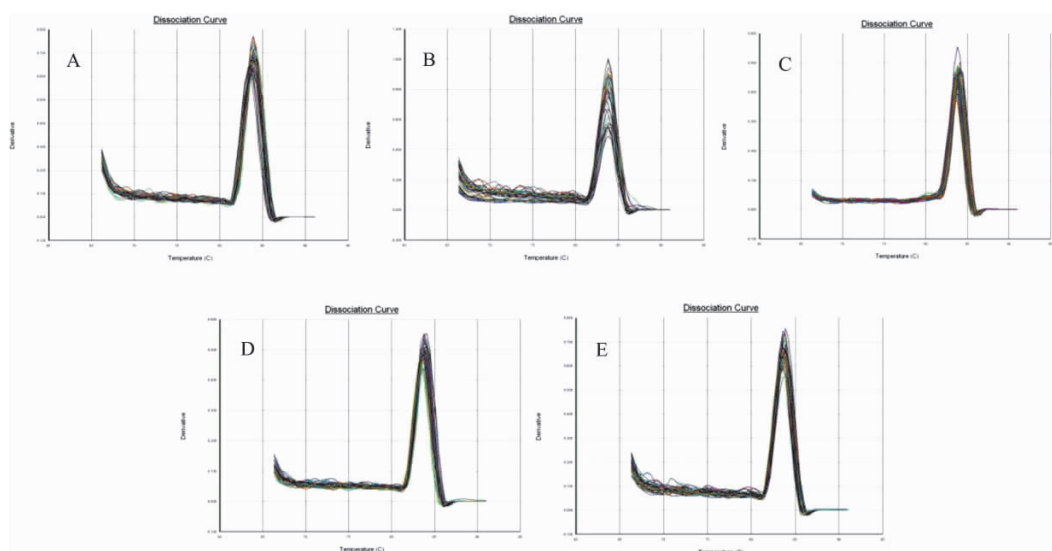


图6 *Sp16* 溶解曲线  
Fig. 6 Melting curve of *Sp16*

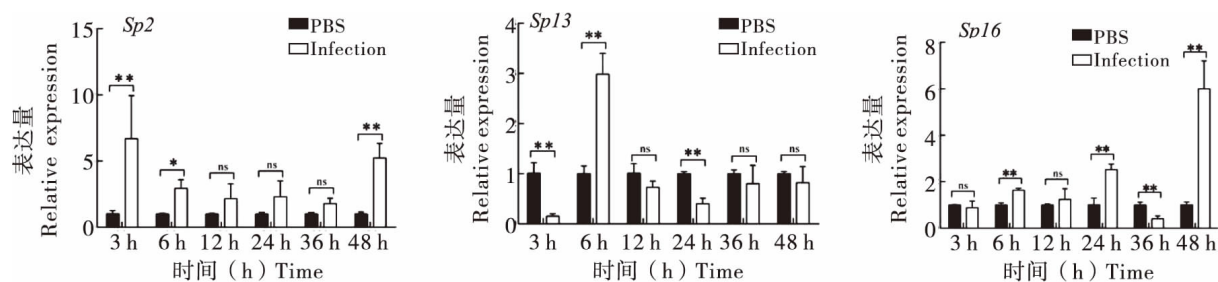


图7 家蝇3种 *Serpin* 基因在感染后不同时间点的表达

Fig. 7 Expression of three *Serpin* gene in different time after *Canidia albicans* infection of *Musca domestica*

注: \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.0001$

### 2.2.2 感染后不同组织

通过白色念珠菌刺激家蝇幼虫, 选择感染后 3 h、12 h、24 h、48 h 时间点, 分析 *Sp2*、*Sp13*、*Sp16* 基因在各组织 (马氏管、体壁、血淋巴、气管、唾液腺、脂肪体、中肠) 中的表达情况。家蝇 *Sp2* 基因在感染后 3 h 时, 在血淋巴中的表达量最高, 其次是在脂肪体中, 均具有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 在马氏管、气管和肠道中其表达量比对照组低, 差异具有显著性 ( $P < 0.05$ ); 12 h 时, 在血淋巴中的表达量比对照组高, 而在马氏管和唾液腺中其表达量比对照组低, 均具有显著性差异 ( $P < 0.01$ ); 24 h 时, 在脂肪体中的表达量比对照组低, 差异具有显著性 ( $P < 0.01$ ); 48 h 时, 在血淋巴中呈高表达, 在唾液腺中的表达比对照组低, 均具有显著性差异 ( $P < 0.01$ ) (图 8)。家蝇 *Sp13* 基因在感染后 3 h 时, 在唾液腺和脂肪体中的表达量比对照组高, 而在马氏管、体壁、血淋巴和气管中的表达量比对照组低, 均具有显著

性差异 ( $P < 0.05$ ); 12 h 时, 在血淋巴中呈高表达, 而在体壁和脂肪体中表达量比对照组低, 均具有显著性差异 ( $P < 0.05$ ); 24 h 时, 在血淋巴、气管和唾液腺中其表达量比对照组高, 在脂肪体中其表达量比对照组低, 差异均具有显著性 ( $P < 0.05$ ); 48 h 时, 在马氏管、血淋巴、气管和脂肪体中其表达量比对照组高, 而在体壁和唾液腺中其表达量比对照组低, 均具有显著性差异 ( $P < 0.05$ ) (图 9)。家蝇 *Sp16* 基因在感染后 3 h 时, 在马氏管和气管中的表达量比对照组低, 差异具有显著性 ( $P < 0.01$ ); 12 h 时, 在马氏管和脂肪体中其表达量比对照组低, 差异具有显著性 ( $P < 0.01$ ); 24 h 时, 其表达量在马氏管中比对照组高, 在脂肪体中比对照组低, 均具有显著性差异 ( $P < 0.01$ ); 48 h 时, 在血淋巴中呈高表达, 而在马氏管中其表达量比对照组低, 均具有显著性差异 ( $P < 0.01$ ) (图 10)。

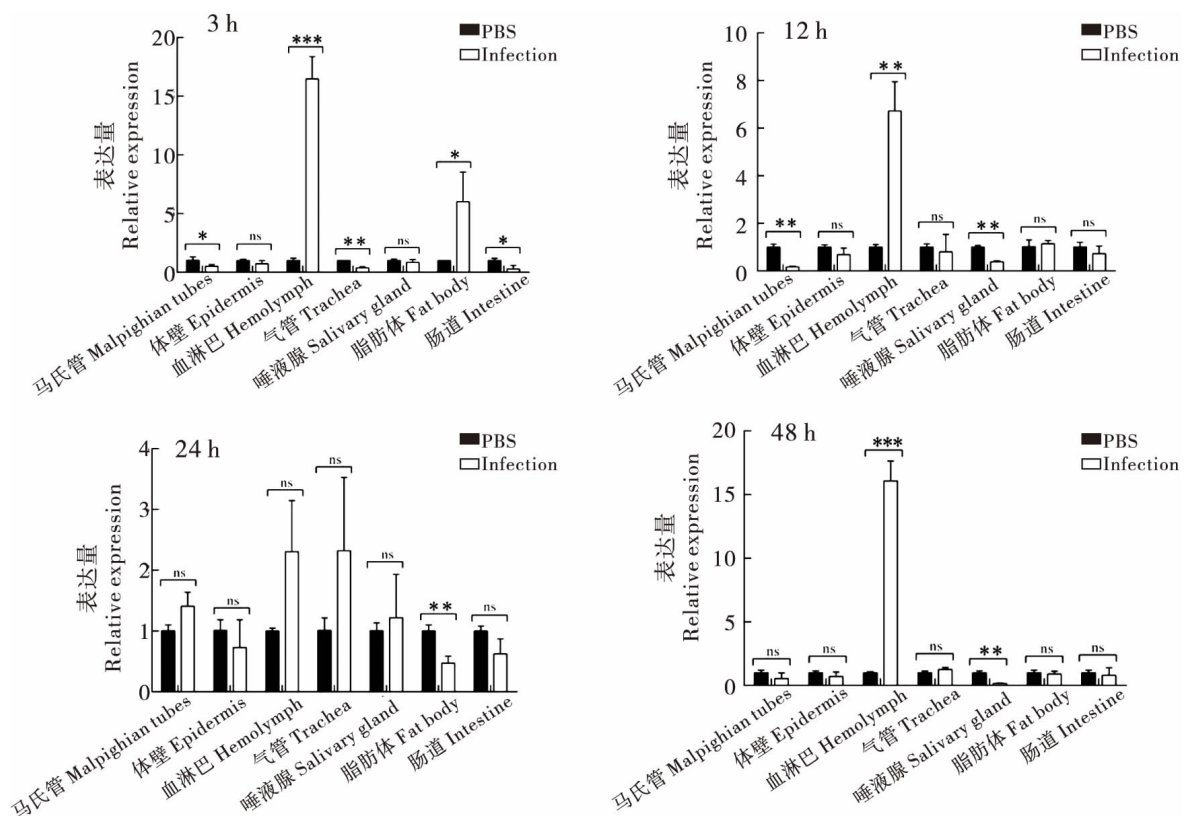
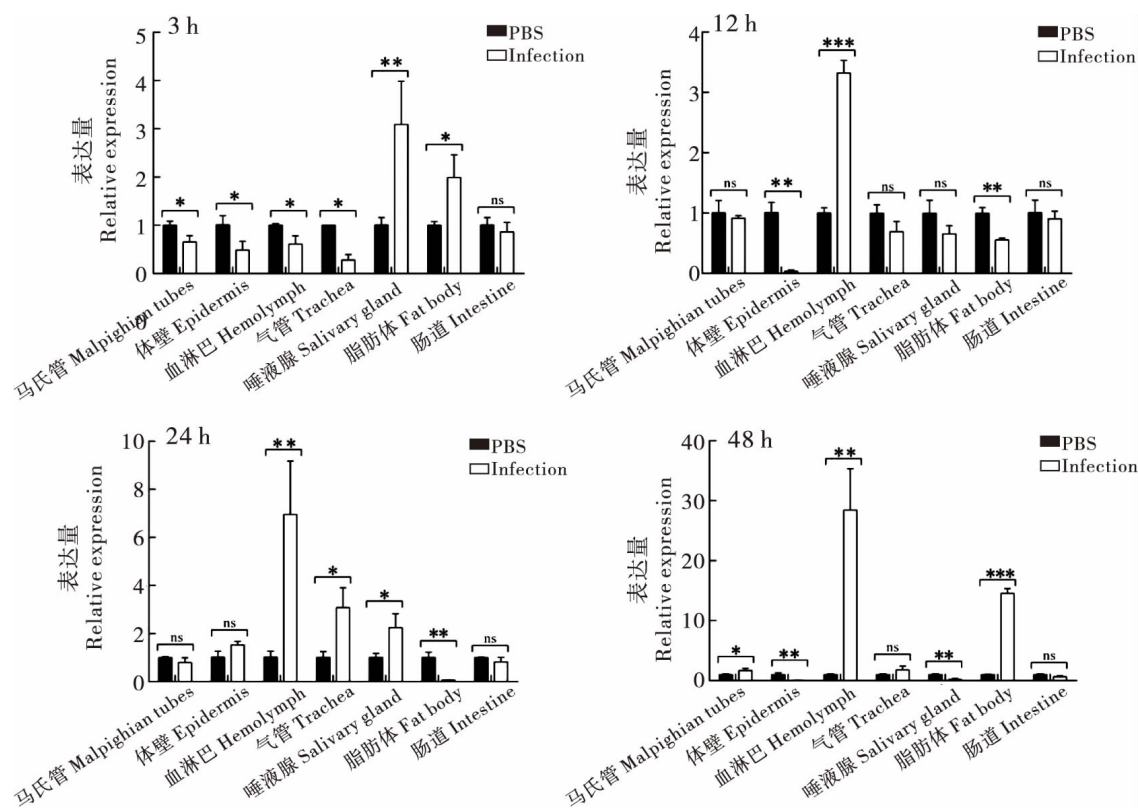
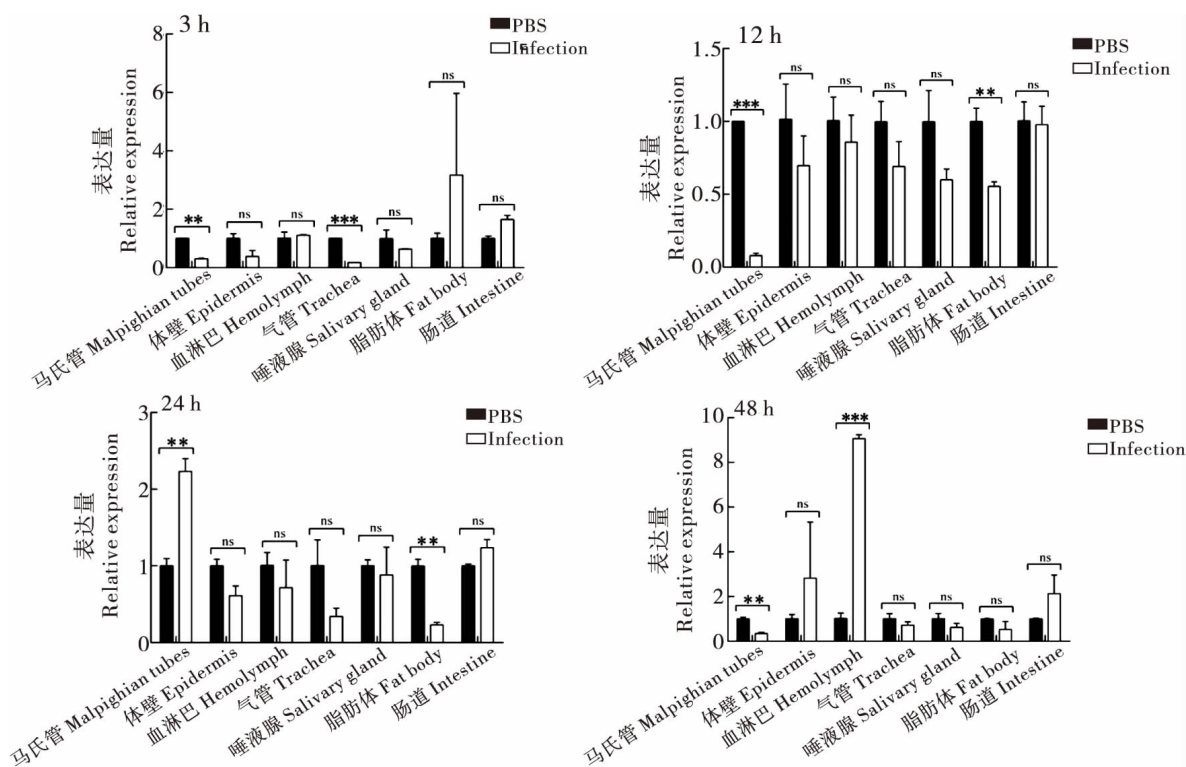


图 8 *Sp2* 在感染后不同组织中的表达

Fig. 8 Expression of *Sp2* in different tissues after *Candida albicans* infection

注: \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.0001$

图9 *Sp13* 在感染后不同组织中的表达Fig. 9 Expression of *Sp13* in different tissues after *Canidia albicans* infection注: \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.0001$ 图10 *Sp16* 在感染后不同组织中的表达Fig. 10 Expression of *Sp16* in different tissues after *Canidia albicans* infection注: \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.0001$

### 3 结论与讨论

家蝇孳生环境复杂,是重要的媒介昆虫,其很少感染病原微生物,这和它自身强大的先天性免疫系统有关(胡亚等,2016)。而大量研究表明 *Serp* 作为重要的免疫调控因子在先天性免疫调控作用中发挥重要作用,如烟草天蛾 *Manduca sexta* *Serp*6 参与了酚氧化酶原的激活(Zou and Jiang, 2005),家蚕 *Bombyx mori* 的 *Serp* 家族中有 5 个基因已被证实具有免疫调节功能(郑青亮等,2010;李游山等,2012),且课题组前期构建系统发育树分析家蝇 *Serp* 基因结果表明(魏川川等,2016),果蝇 *Drosophila* *Serp* 43Ac 基因在机体发生过度免疫时,可通过抑制作用阻断 Toll 信号通路的信号传递,抑制抗菌肽 *Drosomycin* (Jean – Marc and Reichhart, 2005) 的表达,进而终止过度的免疫反应,在机体抵抗外界微生物感染中起到非常重要的作用(Green *et al.*, 2000),它与家蝇 *Sp*13 和 *Sp*16 基因的亲缘关系最接近。家蝇 *Sp*2 与黄粉虫 *Tenebrio molitor* *Serp* N48 和 *Serp* N40 亲缘关系最近,而 *Serp* N48 和 *Serp* N40 已被证实为黄粉虫天然免疫的重要负调控因子(Jiang *et al.*, 2009; 魏川川等,2016),这为今后研究家蝇 *Sp*2、*Sp*13 和 *Sp*16 基因的生物学功能奠定了基础。

本研究利用白色念珠菌刺激家蝇幼虫,采用 qPCR 技术成功检测了家蝇 3 种 *Serp* mRNA 在家蝇幼虫感染后不同时间点及不同组织中的表达情况。结果表明,家蝇 3 种 *Serp* 基因在不同时间点呈现差异表达,家蝇 *Sp*2 基因在感染后 3 h 时表达量最高,其次是 48 h 和 6 h, *Sp*13 基因在感染后 6 h 表达量最高,而在 3 h 和 24 h 时其表达量比对照组低, *Sp*16 基因在感染后 48 h 时表达量最高,其次是 24 h 和 6 h,而 36 h 时其表达量比对照组低。以上结果分析表明,家蝇 3 龄幼虫时期是家蝇整个生长发育过程中生长最快和最活跃的阶段,当受到病原微生物刺激时,家蝇幼虫却能正常生长,推测 *Serp* 基因可能参与了家蝇的个体生长发育,在抵抗外来微生物免疫防御过程中发挥着重要的作用,但 3 种 *Serp* 基因在各时间点的表达各有差异,推测各 *Serp* 基因之间能够协同调控对外来微生物的免疫反应。

家蝇 *Sp*2、*Sp*13 和 *Sp*16 基因在家蝇幼虫不同组织(马氏管、体壁、血淋巴、气管、唾液腺、脂肪体、中肠)中均有不同程度的表达,感染后

*Sp*2 和 *Sp*13 mRNA 的表达量在血淋巴和脂肪体中普遍比对照组高, *Sp*13 mRNA 在 3 h 和 24 h 时在唾液腺中的表达量比对照组高, *Sp*16 mRNA 在 24 h 时,其表达量在脂肪体中比对照组低;48 h 时,在血淋巴中呈高表达。有研究表明脂肪体和血淋巴是昆虫的主要免疫器官,参与昆虫的先天性免疫应答反应,唾液腺是昆虫主要的消化器官,能够分泌多种消化酶,在昆虫的免疫防御系统中扮演着重要的角色。病原微生物感染家蝇时,通过信号通路调节抗菌肽的产生,当抗菌肽过度表达时,各免疫器官在相应时间高表达 *Serp*,通过其特异的类自杀性底物抑制机制终止过度免疫应答反应,使宿主内环境保持平衡,使得家蝇在感染病原体后能够安然地生长繁殖,说明 *Sp*2、*Sp*13、*Sp*16 可能在家蝇的免疫防御系统中起着重要作用,同时 3 种 *Serp* 基因在各组织中不同感染时间呈现出差异性表达,说明 3 种 *Serp* 基因之间在家蝇免疫防御过程中有协同调节的可能。

通过 qPCR 结果分析,推测家蝇 *Sp*2、*Sp*13、*Sp*16 基因在免疫防御过程中担当着重要角色,3 种 *Serp* 基因在各时间点不同组织中的表达各有差异,推测各 *Serp* 基因之间具有协同调节作用,这为今后研究 *Serp* 的生物学与免疫学功能打下坚实的基础。

### 参考文献 (References)

- Green C, Levashina E, McKimmie C, *et al.* The necrotic gene in *drosophila* corresponds to one of a cluster of three serpin transcripts mapping at 43Ac [J]. *Genetics*, 2000, 156 ( 3 ): 1117 – 1127.
- Hibbets K, Hines B, Williams D. An overview of proteinase inhibitors [J]. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 1999, 13: 302 – 308.
- Huang W, Wu KL. The roles of serpins subfamily in immunomodulation [J]. *Chemistry of Life*, 2010, 3: 417 – 420. [黄薇, 吴坤陆. 丝氨酸蛋白酶抑制剂亚家族在免疫调节中的作用 [J]. 生命的化学, 2010, 3: 417 – 420]
- Hu Y, Luo M, Wang Y, *et al.* Cloning and expression pattern of GGBP3 gene under the fungal infection in *Musca domestica* [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2016, 39 ( 6 ): 596 – 604. [胡亚, 罗嫚, 王宇, 等. 家蝇 GGBP3 基因克隆及感染白色念珠菌后的表达 [J]. 环境昆虫学报, 2016, 39 ( 6 ): 596 – 604]
- Irving JA, Pike RN, Lesk AM, *et al.* Phylogeny of the serpin superfamily: Implications of patterns of amino acid conservation for structure and function [J]. *Genome Research*, 2000, 10 ( 12 ): 1845 – 1864.
- Jean – Marc, Reichhart. Tip of another iceberg: *drosophila* serpins [J]. *Trends in Cell Biology*, 2005, 15 ( 12 ): 659 – 665.
- Jiang R, Kim EH, Gong JH, *et al.* Three pairs of protease – serpin complexes cooperatively regulate the insect innate immune responses

- [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284 ( 51 ): 35652 – 35658.
- Krowarsch D, Cierpicki T, Jelen F, *et al.* Canonical protein inhibitors of serine proteases [J]. *Cellular & Molecular Life Sciences Cmls*, 2003, 60: 2427 – 2444.
- Law RH, Zhang QW, McGomanS, *et al.* An overview of the serpin superfamily [J]. *Genome Biology*, 2006, 7 ( 5 ): 216.1 – 216.10.
- Lemaître B, Hoffmann J. The host defense of *Drosophila melanogaster* [J]. *Annual Review of Immunology*, 2007, 25: 697 – 743.
- Li YS, Zhao P, Dong ZM, *et al.* Cloning, expression and microbial – induction analysis of *Bombyx mori* serine protease inhibitor BmSPI37 [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45 ( 23 ): 4898 – 4908. [李游山, 赵萍, 董照明, 等. 家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂 BmSPI37 的克隆、表达及微生物诱导分析 [J]. 中国农业科学, 2012, 45 ( 23 ): 4898 – 4908]
- Li DX, Liu H, Wang J, *et al.* Study on melanization response of *Musca domestica* while confronting with the invading of different pathogens [J]. *Chinese Journal of Hygienic Insecticides & Equipments*, 2013, 19 ( 3 ): 196 – 199. [李殿香, 刘晖, 王军, 等. 家蝇对病原入侵黑化反应的研究 [J]. 中华卫生杀虫药械, 2013, 19 ( 3 ): 196 – 199]
- Li B, Ye CJ, Meng Y, *et al.* Bmserpin6 and its regulation on prophenoloxidase activity and antimicrobial peptide expression [J]. *Science of Sericulture*, 2016, 42 ( 2 ): 237 – 242. [李冰, 叶崇军, 孟艳, 等. 家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂 Bmserpin6 的原核表达及对酚氧化酶原活性和抗菌肽表达的调控作用 [J]. 蚕业科学, 2016, 42 ( 2 ): 237 – 242]
- Man CRG, Zhang YX. Purification of albumin from *Bufo melanostictus* skin and inhibitory activity of its trypsin [J]. *Journal of Anhui Agri. Sci.*, 2009, 37 ( 12 ): 5526 – 5528. [满初日嘎, 张英霞. 黑眶蟾蜍皮肤白蛋白的纯化及胰蛋白酶抑制活性 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37 ( 12 ): 5526 – 5528]
- Osama AO Elhag, Song Q, Zheng LY, *et al.* Research advance on action mode and application of antimicrobial peptides from insects [J]. *Chemistry and Bioengineering*, 2014, 31 ( 3 ): 1 – 4. [Osama AO Elhag, 宋旗, 郑龙玉, 等. 昆虫抗菌肽的作用机制与应用研究进展 [J]. 化学与生物工程, 2014, 31 ( 3 ): 1 – 4]
- Pei ZH, Sun XN, Wang K, *et al.* The research progress of antibacterial peptides in many applications [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2014, 50 ( 11 ): 99 – 101. [裴志花, 孙小宁, 王开, 等. 抗菌肽在多领域应用的研究进展 [J]. 中国兽医杂志, 2014, 50 ( 11 ): 99 – 101]
- Peng CL, Wang Y, Wu JW, *et al.* Cloning expression and sequence analysis of heat shock protein20 of *musca domestica* [J]. *Chinese Journal of Public Health*, 2015, 31 ( 3 ): 330 – 333. [彭传林, 王宇, 吴建伟, 等. 家蝇热休克蛋白 HSP20 基因克隆、表达和序列分析 [J]. 中国公共卫生, 2015, 31 ( 3 ): 330 – 333]
- Qian R, Jiang F, Xue Z, *et al.* A novel Toll like receptor with two TIR domains ( HcToll – 2 ) is involved in regulation of antimicrobial peptide gene expression of *Hyriopsis cumingii* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2014, 45 ( 1 ): 198 – 208.
- Ruby HL, Zhang QW, Gary AS, *et al.* An overview of the serpin superfamily [J]. *Genome Biology*, 2006, 7 ( 5 ): 1 – 11.
- Steven T, Peter GW. Regulation of proteases by protein inhibitors of the serpin superfamily [J]. *Molecular Biology and Translational Science*, 2011, 99: 185 – 240.
- Singh P, Jairajpuri MA. Structure function analysis of serpin superfamily: A computational approach [J]. *Protein and Peptide Letters*, 2014, 21 ( 8 ): 714 – 721.
- Wei SS, Guan H, Zheng JP, *et al.* Molecular cloning and comparison of serpin from *Bufo melanostictus* Skin [J]. *Journal of Anhui Agri. Sci.*, 2012, 40 ( 7 ): 4017 – 4019. [韦双双, 关怀, 郑继平, 等. 黑眶蟾蜍皮肤丝氨酸蛋白酶抑制剂基因的克隆与序列分析 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40 ( 7 ): 4017 – 4019]
- Wang SA, Meng Q, Liu ZY. Fundamental properties of volume – capacity ratio of a private toll road in general networks [J]. *Transportation Research Part B*, 2013, 47: 77 – 86.
- Wang Y, Wu GJ, Luo M, *et al.* Cloning and prokaryotic expression of *Musca domestica* Thymosin gene [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2015, 31 ( 2 ): 143 – 147. [王宇, 吴高吉, 罗曼, 等. 家蝇 Thymosin ( THY ) 基因的克隆及原核表达 [J]. 生物技术通报, 2015, 31 ( 2 ): 143 – 147]
- Wei CC, Xiu JF, Hu Y, *et al.* Cloning sequence analysis and expression pattern of three serine protease inhibitor ( Serpin ) in *Musca domestica* [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2016, 39 ( 6 ): 1334 – 1341. [魏川川, 修江帆, 胡亚, 等. 家蝇 3 种丝氨酸蛋白酶抑制剂 Serpin 基因克隆、序列分析及表达模式 [J]. 环境昆虫学报, 2016, 39 ( 6 ): 1334 – 1341]
- Xiu JF, Wei CC, Chen MM, *et al.* Expression analysis of immune genes at different induction conditions of third instar larvae of *Musca domestica* [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2014, 6: 120 – 127. [修江帆, 魏川川, 陈明明, 吴建伟. 不同诱导条件下家蝇 *Musca domestica* 三龄幼虫免疫相关基因的表达研究 [J]. 生物技术通报, 2014, 6: 120 – 127]
- Yang WK, Dong ZP, Chen AL, *et al.* Roles of insect protease inhibitors in immunomodulation [J]. *Modern Agricultural Sciences*, 2014, 8: 245 – 250. [杨伟克, 董占鹏, 陈安利, 等. 昆虫丝氨酸蛋白酶抑制剂在免疫调节中的作用 [J]. 现代农业科技, 2014, 8: 245 – 250]
- Zou Z, Jiang HB. *Manduca sexta* serpin6 regulates immune serine proteinases PAP3 and HP8 cDNA cloning, protein expression, inhibition kinetics and function elucidation [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280 ( 14 ): 14341 – 14348.
- Zhang Y. Amphibian skin secretions and bio – adaptive significance – implications from *Bombina maxima* skin secretion proteome [J]. *Zoological Research*, 2006, 27 ( 1 ): 101 – 112. [张云. 两栖类动物皮肤分泌物及其生物学适应意义 – 大蹼铃蟾皮肤分泌物蛋白质多肽组的启示 [J]. 动物学研究, 2006, 27 ( 1 ): 101 – 112]
- Zheng QL, Xu SJ, Zhou FP, *et al.* Molecular cloning and expression profile of a Kazal – type serine protease inhibitor gene ( *BmSPI3* ) from *Bombyx mori* [J]. *Science of Sericulture*, 2010, 36 ( 3 ): 496 – 502. [郑青亮, 须苏菊, 周方平, 等. 家蚕 Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 *BmSPI3* 的克隆与表达特征分析 [J]. 蚕业科学, 2010, 36 ( 3 ): 496 – 502]
- Zhang B, Zhao MY, Zhang R. The progress of serine protease inhibitor [J]. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University*, 2014, 31 ( 10 ): 836 – 842. [张兵, 赵明沂, 张嵘. 丝氨酸蛋白酶抑制剂的研究进展 [J]. 沈阳药科大学学报, 2014, 31 ( 10 ): 836 – 842]