



红火蚁 *SiMLs* 免疫响应不同病原物的 表达模式分析

康泽泓，朱展鹏，蔺良杰，吴洪鑫，李 昂，陆永跃，金丰良，许小霞*

(华南农业大学，绿色农药全国重点实验室，“一带一路”农业有害生物绿色防控科技产业创新院，广州 510642)

摘要：相关脂质识别蛋白由一类具有 ML (Myeloid differentiation factor-2 related lipid recognition protein) 单结构域的蛋白质组成，在脂类识别和天然免疫信号传导途径中起重要作用。ML 蛋白家族成员在节肢动物中众多，功能复杂，ML 蛋白研究聚焦于宿主与病毒之间的互动，但是对于 ML 蛋白在入侵昆虫中的功能研究未见报道。本团队以入侵昆虫红火蚁 *Solenopsis invicta* 为研究对象，基于红火蚁基因组和转录组数据，筛选鉴定获得 5 个 ML 基因 (*SiML1*~*5*)，生物信息学分析表明 *SiMLs* 家族包含一个信号肽和一个典型 ML 结构域，其中 ML 结构域几乎覆盖了 *SiML1* (25~151 aa)、*SiML2* (23~150 aa)、*SiML3* (24~145 aa)、*SiML4* (21~150 aa) 和 *SiML5* (58~175 aa) 蛋白的整个编码区，并含有 6 个保守的半胱氨酸残基。系统进化分析显示红火蚁 *SiML1*，*SiML2*，*SiML3* 和 *SiML4* 在同一个分支，与紫苑叶蝉 *Macrosteles quadrilineatus* (MqML) 亲缘关系较近；而红火蚁 *SiML5* 与中红侧沟茧蜂 *Microplitis mediator* (MmML3) 在同一个分支上。荧光定量 PCR 检测显示红火蚁 *SiMLs* 家族基因在红火蚁 6 个组织中均有转录，在脂肪体中表达量最高；*SiMLs* 家族基因在整个发育历期都有表达，在卵、幼虫、蛹和成虫变态期间均有差异表达，主要是上调表达，表明 ML 蛋白可能参与红火蚁的变态发育过程。用细菌和真菌病原菌通过喷洒或浸泡红火蚁大型工蚁进行免疫诱导，RT-qPCR 结果显示火蚁大型工蚁 *SiMLs* 家族成员在大肠杆菌诱导 3~48 h 后均显著上调表达，在金龟子绿僵菌和白僵菌诱导后，早期 (3~12 h) *SiMLs* 家族成员表达升高，后期 (24~48h) 表达受到抑制。本研究表明红火蚁 *SiMLs* 能够响应病原菌的入侵，且针对不同病原物有不同的表达模式，这些发现为 *SiMLs* 蛋白的功能研究奠定了基础。

关键词：ML 家族成员；红火蚁；病原物；表达模式；免疫反应

中图分类号：Q963

文献标识码：A

Analysis of expression patterns of *SiMLs* in *Solenopsis invicta* in immune response to different pathogens

KANG Ze-Hong, ZHU Zhan-Peng, LIN Liang-Jie, WU Hong-Xin, LI Ang, LU Yong-Yue, JIN Feng-Liang, XU Xiao-Xia* (National Key Laboratory of Green Pesticide, "Belt and Road Initiative" Technology Industry and

基金项目：国家自然科学基金 (32172498, 31972345)；国家重点研发计划 (2021YFD1000500)

作者简介：康泽泓，男，硕士研究生，研究方向为资源利用与植物保护；E-mail: kzhscou@stu.scou.edu.cn

*通讯作者 Author for correspondence: 许小霞，女，博士，教授，研究方向为生物防治，E-mail: xuxiaoxia111@scou.edu.cn

收稿日期 Received: 2024-02-08；修回日期 Revision received: 2024-10-09；接受日期 Accepted: 2024-10-12

Innovation Institute for Biological Control of Agricultural Pests, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstracts: Related lipid recognition proteins, which compose a class of proteins featuring a single ML domain, play a crucial role in lipid recognition and innate immune signaling pathways. Numerous ML protein family members exist in arthropods, exhibiting complex functions. These ML proteins primarily focus on the interactions between hosts and viruses. However, studies investigating the interaction mechanisms of ML proteins in invasive insects and pathogens remain scarce. Specifically, the function of ML protein in invasive insects have not been documented. Five ML genes (*SiML1*~5) were identified based on the genome of *S. invicta* and laboratory transcriptome data. Bioinformatics analyses were conducted on the *S. invicta* ML family, which includes a signal peptide and a typical ML domain. The ML domain encompasses nearly the entire coding region of *SiML1* (25~151 aa), *SiML2* (23~150 aa), *SiML3* (24~145 aa), *SiML4* (21~150 aa) and *SiML5* (58~175 aa), and contains six conserved cysteine residues. Phylogenetic analysis revealed that *SiML1*, *SiML2*, *SiML3* and *SiML4* were grouped in the same clade, showing close relation to *Macrosteles quadrilineatus* (MqML). The relationship between *SiML5* and *Microplitis mediator* (MmML3) was found to be close. Results from fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) indicated that *SiMLs* family genes were transcribed in six tissues of *S. invicta*, with particularly high expression in the fat body. These genes were expressed throughout the developmental stages and exhibited differential expression during metamorphosis, suggesting that ML proteins play a role in the metamorphic development of *S. invicta*. Immunological responses to bacterial and fungal pathogens were elicited by spraying or soaking the major worker ants. RT-qPCR results demonstrated that the expression of ML family members in major worker ants was significantly up-regulated 3 to 48 h after induction by *Escherichia coli* ($P < 0.05$). Following induction by *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*, the expression of ML family members was induced in the early stage (3 to 12 h) but inhibited in the later stage (24 to 48 h). These results indicate that the *SiMLs* family in major worker ants can respond to pathogenic bacterial infections, with distinct immune response modes observed among different pathogens. Furthermore, the findings suggest that *S. invicta* *SiMLs* can effectively respond to pathogen invasion, exhibiting varied expression patterns in response to different pathogens. This study lays the groundwork for future functional investigations of *SiMLs* proteins.

Key words: ML family members; *Solenopsis invicta*; pathogens; expression profile; immune responses

髓样分化蛋白 2 脂质识别 (Myeloid differentiation factor-2 related lipid recognition protein, ML) 是一类由 ML 结构域组成的蛋白质。ML 结构域大约有 150 个氨基酸残基, 含有 2 对或以上保守的半胱氨酸。ML 蛋白家族广泛分布在植物、动物和真菌中, 只有在哺乳动物中有明确的分类, ML 蛋白由 NPC2、MD-2、GM2A 和螨变应原 Derp2 等组成。最典型代表是 MD-2 和 NPC2 家族, 功能研究比较清楚, 二者分别在先天免疫信号传导和胆固醇代谢中起重要作用 (Dziarski *et al.*, 2000; Zamyatina *et al.*, 2020)。目前, ML 蛋白调控无脊椎动物和脊椎动物的免疫信号途径鲜有相关报道。在脊椎动物中, MD-2 是 LPS-TLR4 信号通路中不可缺少的配体。MD-2 作为一个中间结合蛋白能够与细菌细胞壁组分脂多糖 (LPS

Lipopolysaccharides) 直接结合, 在 Toll 免疫信号通路中发挥作用。MD-2 具有 β -杯形折叠结构, 形成一个大的疏水口袋, LPS 的 6 个酰基链中有 5 个插入到 MD-2 的疏水结合口袋中, MD-2 协助 TLR4 识别细菌 LPS, 在脊椎动物的天然免疫中发挥关键作用 (Dziarski *et al.*, 2001; Kennedy *et al.*, 2004; Ao *et al.*, 2008; Zamyatina *et al.*, 2020)。人类中 NPC2 是一种胆固醇转运载体的分泌蛋白, NPC2 具有很强结合胆固醇能力, 快速地将胆固醇转运至膜受体, 进而调节细胞内的脂质平衡 (Zamyatina *et al.*, 2020)。

在无脊椎动物中, ML 家族成员 MD-2 或 NPC2 已在多种昆虫模式物种中鉴定。如在果蝇中, 有 8 个 NPC2 样基因被鉴定 (Huang *et al.*, 2007); 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 中有 13 个 MD-2 样基因 (Dong *et al.*, 2006); 埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 中有 15 个 NPC2 样基因被鉴定 (Thambi *et al.*, 2024); 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 中有 8 个 MD-2 样基因被鉴定 (Zou *et al.*, 2007), 家蚕 *Bombyx mori* 中则有 4 个 NPC2 样基因被鉴定 (Zhang *et al.*, 2021)。昆虫的 MD-2 或 NPC2 是否跟哺乳动物 MD-2 一样参与免疫调控引起人们广泛的关注。目前只有部分昆虫 ML 家族在免疫调控功能研究被开展, 如黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中 NPC2e 和 NPC2a 可以激活天然免疫 Imd (Immune deficiency) 信号途径 (Shi *et al.*, 2012)。在家蚕中, BmToll9 在 BmMLs 辅助下直接识别脂多糖 LPS 引发家蚕先天免疫的研究, 其识别方式与哺乳动物 TLR4 相似 (Adachi *et al.*, 2014, 张若男, 2019; Zhang *et al.*, 2021)。本实验猜测入侵昆虫中 ML 家族同样具有识别病原体或者 PAMPs 激活红火蚁的先天免疫系统的功能。

红火蚁原发生于南美洲, 是一种具有扩散快、攻击性强、繁殖力强和竞争力强的外来入侵害虫。红火蚁不仅威胁农业生产安全, 还会捕食昆虫等无脊椎动物, 因此对入侵地区造成巨大的生态危害 (曾玲等, 2005; 陆永跃等, 2019; 王偲等, 2024)。目前, 红火蚁的防治过度依赖大量的化学农药, 不仅导致红火蚁抗药性逐渐增强, 还造成环境污染, 威胁人畜安全。因此, 开展红火蚁的绿色防控, 是保障人类与自然可持续发展及提高农产品产量和品质的重要前提 (李庆国等, 2023)。不同来源的微生物杀虫剂为红火蚁绿色防控提供了最有潜力的资源 (吴慧敏等, 2024)。但是红火蚁高效精密的先天性免疫系统, 强烈限制微生物杀虫剂的规模化应用。基于此, 本研究利用生物信息学筛选鉴定红火蚁 *SiMLs* 家族, 并利用 RT-qPCR 检测了 *SiMLs* 家族免疫响应病原物的表达水平, 为开发以 *SiMLs* 基因为靶点的微生物杀虫剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫和菌株

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 、粘质沙雷氏菌 *Serratia marcescens*、苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis*、金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 和白僵菌 *Beauveria bassiana* 保存于绿色农药全国重点实验室。金龟子绿僵菌和白僵菌分别在 PDA 培养基上, 培养 15 d, 培养条件: 温度: 25 $^{\circ}$ C, 湿度: 70%。供试红火蚁采集于广东省广州市天河区华南农业大学农场, 野外采集的红火蚁巢带回实验室后, 实验室红火蚁的处理和饲养参照许亚婷的进行 (许亚婷等, 2022)。

1.2 红火蚁 *SiMLs* 家族基因的鉴定

红火蚁 *SiMLs* 家族基因的鉴定方法参考 Mei 和本实验室成员吴洪鑫等人的方法进行 (Mei *et al.*, 2022; 吴洪鑫等, 2022)。红火蚁 *SiMLs* 家族成员氨基酸数量、分子量大小、等电点和不稳定系数等理化性质分析采用在线软件 ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>) 进行。

1.3 红火蚁 *SiMLs* 家族基因的多序列比对

从 GenBank 中下载的蛋白序列, 包括人类 *Homo sapiens* MD-1 AAC98152 (HsMD1), 人类 *H. sapiens* MD-2 BAA78717 (HsMD2), 小鼠 *M. musculus* MD-1 BAA32399 (MmMD1), 小鼠 *M. musculus* MD-2 BAA93619 (MmMD2), *M. musculus* NPC2 AAH07190 (MmNPC2), 日本对虾 *Marsupenaeus japonicus* ML-1 QDX01882.1 (MjML1), 日本对虾 *M. japonicus* ML-2 QDX01883.1 (MjML2), 日本对虾 *M. japonicus* ML-4 QDX01885.1 (MjML3), 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* NPC2 NP_608637.1 (DmNPC2) 蛋白序。利用 ClusterX 进行蛋白序列比对, Genedoc 对蛋白序列做图。

1.4 红火蚁 *SiMLs* 家族基因的系统进化关系

从 UniProt 蛋白质数据库中下载紫苑叶蝉 *Macrosteles quadrilineatus* (Mq), 红火蚁 *Solenopsis invicta* (Si), 丛林斜眼褐蝶 *Bicyclus anynana* (Ba), 黑脉金斑蝶 *Danaus plexippus* (Dp), 大蜡螟 *Galleria mellonella* (Gm), 柑橘凤蝶 *Papilio xuthus* (Px), 草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* (Sf), 棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Ha), 红铃虫 *Pectinophora gossypiella* (Pg), 麦红吸浆虫 *Sitodiplosis mosellana* (Sm), 麦无网长管蚜 *Metopolophium dirhodum* (Md), 根瘤蚜 *Daktulosphaira vitifoliae* (Dv), 中红侧沟茧蜂 *Microplitis mediator* (Mm), 一类熊蜂 *Bombus huntii* (Bh), 锈斑大黄蜂 *Bombus affinis* (Ba), 按蚊 *Anopheles funestus* (Af), 一类沙漠蝗虫 *Schistocerca cancellata* (Sc), 一类沙漠蝗虫 *Schistocerca serialis cubense* (Ssc), 亮沙漠蝗 *Schistocerca nitens* (Sn), 沙漠蝗 *Schistocerca gregaria* (Sg) 蛋白序列。系统进化树的构建参照 Subramanian *et al.* (2019) 和吴洪鑫等人 (2022) 方法进行。

1.5 红火蚁 *SiMLs* 基因的生物信息学分析

参照吴洪鑫等人方法进行 (Bailey *et al.*, 2006; 吴洪鑫等, 2022)。将红火蚁 *SiMLs* 基因进行染色体定位和共线性分析, 进一步对红火蚁 *SiMLs* 家族基因的保守结构与保守基序进行分析; 利用 IBS 软件绘制红火蚁 *SiMLs* 家族基因结构图 (Wang *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2015; 吴洪鑫等, 2022)。

1.6 红火蚁的时空表达模式

挑选发育良好和行动能力旺盛的红火蚁进行实验。参照 Chen 等 (2023) 的方法进行, 将红火蚁工蚁区分为大型工蚁、中型工蚁和小型工蚁 3 个亚品级; 收集红火蚁不同阶段/品级 (卵, 幼虫, 蛹, 雌蚁、雄蚁、大型工蚁、中型工蚁、小型工蚁) 10 头; 将大型工蚁放在冰上解剖, 取其脂肪体、血细胞、中肠、头部、胸部和腹部 6 个组织。根据 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA (Invitrogen, 美国)。根据 PrimeScript™ RT Master Mix 说明书的操作进行 cDNA 的合成 (Perfect Real Time) (TaKaRa, 日本)。根据红火蚁 *SiMLs* 家族基因的序列分别设计各自 RT-qPCR 的引物序列, 引物见表 1。反应体系: 上游引物 (10 mM) 1.0 μ L,

下游引物 (10 mM) 1.0 μ L, cDNA 模板 1.0 μ L、TB Green Premix Ex Taq II 12.5 μ L、水补齐至总体积为 25 μ L, 反应程序: 94°C 变性 30 s, 94°C 5 s、60°C 30 s 进行 40 个循环, 以红火蚁 *RP37* 基因作为内参基因, 进行同样的 cDNA 扩增。根据溶解曲线分析用来判断扩增产物是否相对专一。*SiMLs* 基因的相对表达量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 为实验组/对照组的比值, 其中 $\Delta\Delta Ct = (Ct_{目的} - Ct_{内参})_{实验} - (Ct_{目的} - Ct_{内参})_{对照}$ 。由于每组中目的基因和内参基因加入的模板量是一致的, 所以可以对每个样本 $\Delta Ct = (Ct_{目的} - Ct_{内参})$ 值。每个模板 cDNA 样品设置 3 次重复, 每个实验进行 3 次生物学重复。

1.7 红火蚁 *SiMLs* 家族基因对病原微生物的免疫响应

分别将粘质沙雷氏菌、苏云金芽孢杆菌和大肠杆菌接种至新鲜的 LB 培养基; 绿僵菌和白僵菌接种到新鲜的 PDA 培养基, 37°C 240 r/min 振荡培养至对数生长期, 10 000 g 离心 10 min, 去掉上清收集菌体, PBS 洗两次, 用 PBS 稀释至 1×10^7 (CFU/mL) 备用, 将新鲜 LB/PDA 液体培养基作为各自的阴性对照。

细菌对红火蚁的侵染采用喷洒法。将 5 mL 粘质沙雷氏菌 (1×10^7 CFU/mL)、苏云金芽孢杆菌 (1×10^7 CFU/mL) 和大肠杆菌菌液 (1×10^7 CFU/mL) 分别加入喷壶中, 摇匀后喷洒于大型工蚁。将侵染后的红火蚁置于 25°C、70%湿度的恒温培养箱饲养, 并于侵染后 3 h、6 h、12 h、24 h 和 48 h 收集时虫体, 每次收集 10 头大型工蚁, 并在冰上解剖, 取其脂肪体。真菌金龟子绿僵菌和白僵菌参照许亚婷等人的方法进行 (许亚婷等, 2022)。将挑选好的红火蚁大型工蚁采用浸渍法侵染, 侵染后的红火蚁, 置于 25°C、70%湿度的恒温培养箱饲养, 分别在 3 h、6 h、12 h、24 h 和 48 h 时收集样品, 每个样品随机取整虫 10 头, 在冰上解剖, 取其脂肪体。总 RNA 的提取, cDNA 的合成, 定量程序的设计和 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算参照前面的方法。每个实验设置 3 个重复, 每个重复处理 200 头。3 个不同巢穴的红火蚁大型工蚁作为 3 个生物学重复。

表1 实验所用的引物

Table 1 Primers used in the experiment

基因名称 Gene name	引物名称 Primer name	序列 (5'-----3') Primer sequences (5'-----3')
<i>SiML1</i>	<i>SiML1F</i>	CAAATTCACAGAAGTGTCGG
	<i>SiML1R</i>	AGGACAATTAATTCCAGCGT
<i>SiML2</i>	<i>SiML2F</i>	CCGATATGACTGCTGAGAAA
	<i>SiML2R</i>	ATAGGCACTTCCATCATCAC
<i>SiML3</i>	<i>SiML3F</i>	CCTGACTATTGAGTTTGCT
	<i>SiML3R</i>	ATCGTGAGACGAGATCCTAT
<i>SiML4</i>	<i>SiML4F</i>	ATCAAACCTCCTGCCTAACAG
	<i>SiML4R</i>	CTTCGATGGAACCTCAAAGC
<i>SiML5</i>	<i>SiML5F</i>	ACGTGTTGATCCATGTAGAG
	<i>SiML5R</i>	GAATGATTGCCTTTGACCAG
<i>RP37</i>	<i>RP37F</i>	GTGAAGGCAAAGAGGAGGAAGA
	<i>RP37R</i>	TCTTGAATTTGCGGCGTACA

1.8 数据统计与分析

利用软件 GraphPad Prism 8.01 作图和 IBM SPSS Statistic 25.0 分析实验数据。采用单因素方差分析红火蚁 *SiMLs* 基因在发育历期/不同品级、不同组织和病原物诱导后的表达差异, 差异显著性水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 红火蚁 *SiMLs* 家族基因的鉴定与分析

通过 BLAST 和 NCBI-CDD 数据库筛选和分析终鉴定获得红火蚁 *SiMLs* 家族基因。根据 *SiMLs* 基因在染色体中的位置将其命名为 *SiML1*、*SiML2*、*SiML3*、*SiML4* 和 *SiML5* (表 2), *SiMLs* 基因的理化性质进行预测与分析 (表 2)。红火蚁 *SiMLs* 基因长度位于 1 681~5 407 bp (base pair) 之间, CDS 序列长度位于 453~540 bp 之间, *SiML3* 编码蛋白最短, 只有 109 aa, *SiML5* 最长, 有 179 aa; *SiMLs* 分子量大小范围为 16.88~20.25 kDa; 等电点范围为 4.07~8.13, *SiML1* 和 *SiML5* 为碱性蛋白; *SiML2*、*SiML3* 和 *SiML4* 为酸性蛋白, 只有 *SiML1* 和 *SiML3* 为稳定蛋白。红火蚁 *SiML* 家族基因蛋白理化性质差异很大, 暗示红火蚁 *SiMLs* 蛋白功能的多样性。进一步对红火蚁 *SiMLs* 家族成员蛋白的氨基酸序列进行多重比对 (图 1)。红火蚁 *SiMLs* 家族蛋白都含有保守的 6 个半胱氨酸残基与果蝇的 DmNPC2 有相同的半胱氨酸残基, 是昆虫 ML 蛋白典型的半胱氨酸残基个数。

表2 红火蚁*SiMLs*家族成员基因特点

Table 2 Sequence characteristics of the *SiMLs* family members in *Solenopsis invicta*

基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	基因长度 (bp) Gene length	CDS 长度 (bp) CDS length	氨基酸 Amino acid	分子量 (kDa) Molecular weight	等电点 Isoelectric point	不稳定系数 Instability index
<i>SiML1</i>	LOC105197296	5 407	465	154	17.16	8.13	38.74
<i>SiML2</i>	LOC105197297	4 946	534	153	17.04	4.80	43.16
<i>SiML3</i>	LOC105195649	1 681	453	109	16.69	4.07	38.42
<i>SiML4</i>	LOC105203615	4 645	466	134	16.88	4.90	40.27
<i>SiML5</i>	LOC105193603	4 692	540	179	20.25	7.36	58.27

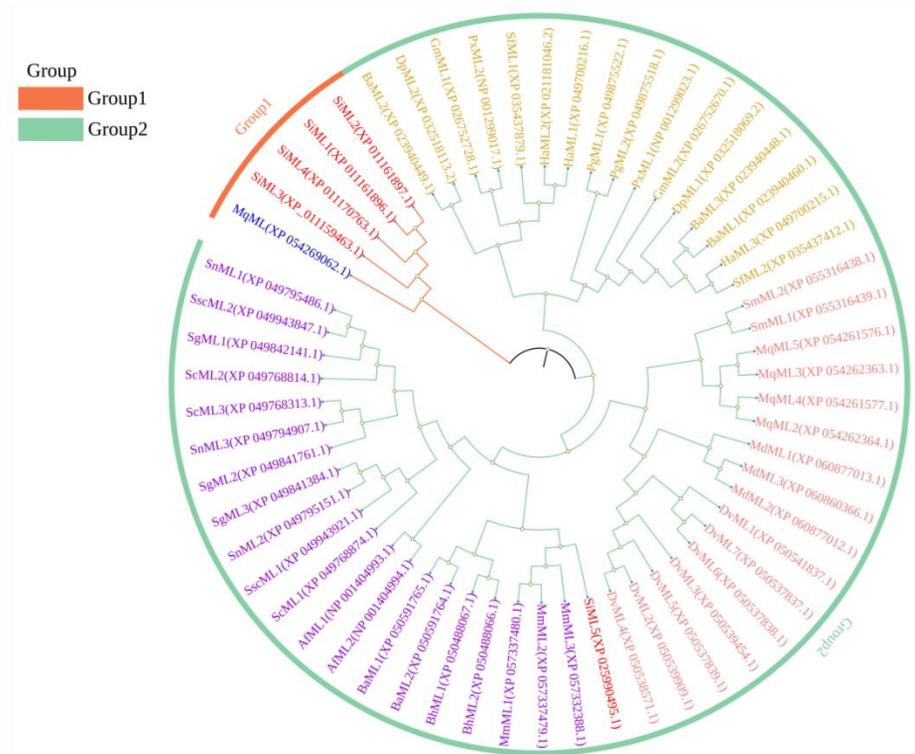


图 2 红火蚁 ML 蛋白系统进化树分析

Fig. 2 Phylogenetic tree analysis of ML proteins from *Solenopsis invicta*

2.3 红火蚁 *SiMLs* 家族基因的鉴定

将红火蚁 *SiMLs* 家族基因的 5 个成员进行染色体定位(图 3)。染色体定位结果显示红火蚁 5 个 *SiMLs* 基因分布在 4 条染色体上, 红火蚁 *SiML1* 和 *SiML2* 基因, 紧密相连, 并分布在 10 号染色体上; *SiML3* 基因在 4 号染色体上, *SiML4* 基因在 16 号染色体上, *SiML5* 基因在 9 号染色体上。

运用软件 MCscanX 探究 *SiMLs* 家族成员在红火蚁、斯氏林蚁 *Formica selysi* 和东方蜜蜂 *Apis cerana* 中的共线性情况。共线性分析结果显示红火蚁与斯氏林蚁具有 4 对共线性基因, 分别为 *SiML1*、*SiML3*、*SiML4*、*SiML5* (图 4)。红火蚁与东方蜜蜂有 3 个共线性基因, 分别是 *SiML1*、*SiML3* 和 *SiML5* 进行线性分析。结果显示红火蚁 *SiML1*、*SiML3* 和 *SiML5* 基因与蜜蜂科与蚁科有共同祖先, 在他们分化之前就存在, 也进一步暗示 *SiML1*、*SiML3* 和 *SiML5* 基因进化上属于保守基因。

根据红火蚁基因组基因结构注释文件, 获得红火蚁 *SiMLs* 家族成员结构图。基因结构图显示红火蚁 *SiMLs* 家族成员结构简单, 由 2~4 个外显子组成, 均含有内含子 (图 5)。*SiML1*、*SiML2* 和 *SiML5* 基因含有 4 个外显子, 而 *SiML3* 和 *SiML4* 基因含有 2 个外显子; *SiMLs* 家族中, 4 个 *SiML* 基因长度在 5 000 bp 左右; 只有 *SiML2* 长度特短, 只有 1 680 bp; 红火蚁 *SiMLs* 家族成员都定位在染色体的正链上 (图 5)。

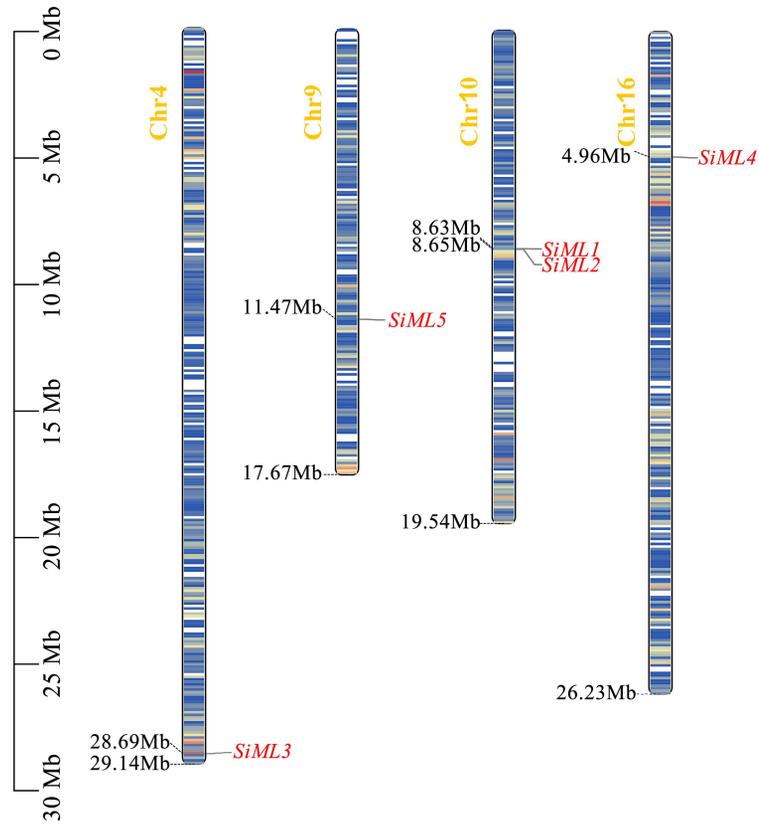


图 3 红火蚁*SiMLs*家族成员的染色体定位

Fig. 3 Chromosome mapping of members of *SiMLs* family in *Solenopsis invicta*

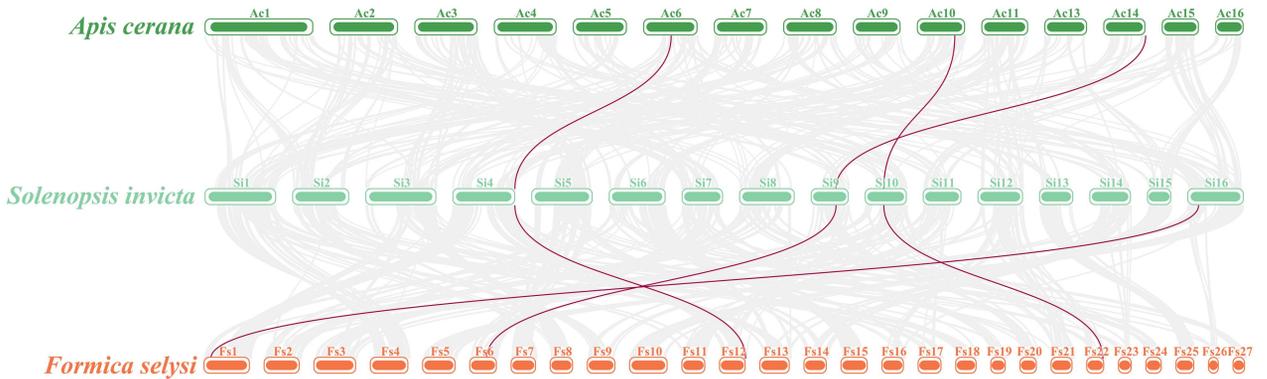


图4 红火蚁*SiMLs*家族成员共线性分析

Fig. 4 Collinearity analysis of *SiMLs* families genes in *Solenopsis invicta*

注：红火蚁与斯氏林蚁、东方蜜蜂ML基因共线性分析。Note: Collinearity analysis *Solenopsis invicta*, *Formica selysi* and *Apis cerana*.

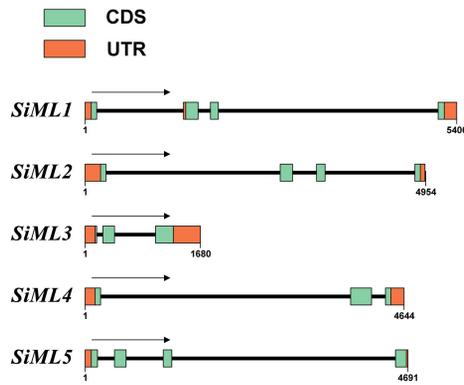


图5 红火蚁 *SiMLs* 家族成员的结构

Fig. 5 *SiMLs* gene family gene structure of *Solenopsis invicta*

注：图中箭头表示转录方向，箭头向右代表染色体在正链上。Note: Arrows in the figure indicated the transcriptional direction, the arrows to the right indicated that the gene was on the forward strand of the chromosome.

2.4 红火蚁 *SiMLs* 家族成员保守结构域与 Motif 分析

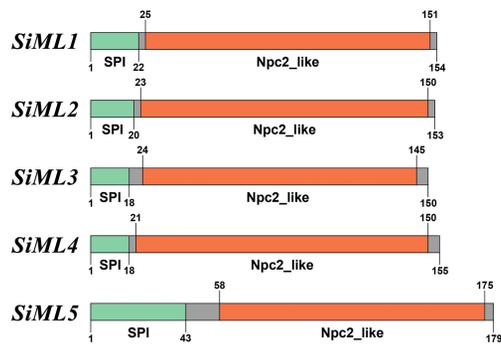


图6 红火蚁 *SiMLs* 家族成员的保守结构域

Fig. 6 *SiMLs* family Conserved Domains of *Solenopsis invicta*

对红火蚁 *SiMLs* 家族成员蛋白的保守结构域进行分析,发现 *SiMLs* 家族蛋白含有信号肽和NPC2-like2 结构域,即典型的 MD-2 相关脂质识别 (ML) 结构域。NPC2-like2 结构域的长度不一样,推测 *SiMLs* 蛋白功能上存在差异 (图 6)。 *SiMLs* 家族蛋白中 ML 结构域几乎覆盖了 *SiML1* (25~151 aa)、 *SiML2* (23~150 aa)、 *SiML3* (24~145 aa)、 *SiML4* (21~150 aa) 和 *SiML5* (58~175 aa) 蛋白的整个编码区。在 *SiMLs* 蛋白中搜索 motif,发现红火蚁 *SiMLs* 蛋白包含 4 个 motif 中,其中 motif1 和 motif2 在 *SiMLs* 蛋白中保守存在,暗示这 2 个 motif 可能是 *SiMLs* 蛋白发挥功能所必需的 (图 7)。此外,不同的 *SiMLs* 蛋白的 motif 组成是多样化的,这些多样化的 motif 暗示了红火蚁 *SiMLs* 蛋白功能上的多样性。

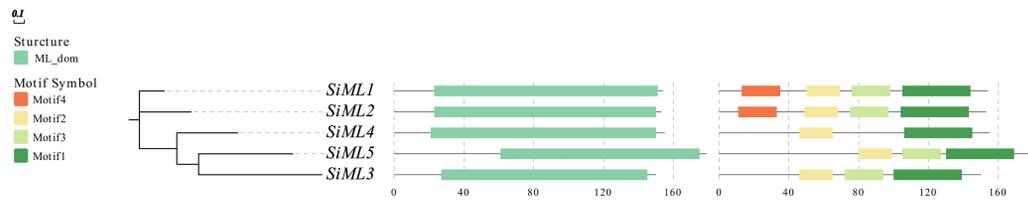


图7 红火蚁*SiMLs*家族成员的保守基序分析

Fig. 7 *SiMLs* family protein motif of *Solenopsis invicta*

2.5 红火蚁 *SiMLs* 家族成员的时空表达模式

利用 RT-qPCR 对红火蚁的发育历期/不同品级、大型工蚁不同组织的 *SiMLs* 家族成员进行 mRNA 水平检测 (图 8)。 *SiMLs* 家族成员在红火蚁发育历期中的 mRNA 表达水平达到差异显著 ($P<0.05$)；大型工蚁表达水平偏高，且 *SiML3* 在幼虫中表达最高，其次，*SiML4* 在幼虫及大型工蚁中表达也较高，而中型工蚁表达量差异很大，尤其在 *SiML4* 没有检测到表达，在 *SiML1* 的表达量也很低；*SiML2* 在卵、幼虫和蛹期的表达量最低 (图 8-A)；红火蚁 *SiMLs* 家族成员在红火蚁雄性生殖蚁和雌性生殖蚁中的表达差异较大，达到显著水平 ($P<0.05$)。 *SiML1* 和 *SiML2* 基因的表达水平在雌性生殖蚁中显著高于雄性生殖蚁，而在 *SiML3*、*SiML4* 和 *SiML5* 中，两者之间的表达水平则反之 ($P<0.05$)，说明红火蚁 *SiMLs* 家族成员表达水平与性别可能相关，但是 *SiML* 所起的功能需进一步的鉴定。利用 RT-qPCR 进一步检测 *SiML* 家族成员在大型工蚁不同部位的表达水平 (图 8-B)。红火蚁 *SiML1*、*SiML2*、*SiML3*、*SiML4* 和 *SiML5* 基因在头部、胸部和腹部中的表达达到差异显著水平 ($P<0.05$)；红火蚁 *SiMLs* 基因均在头部高表达，只有 *SiML3* 在腹部表达量显著高于胸部 (图 8-B)，暗示红火蚁 *SiMLs* 蛋白在头部起着重要的作用。利用 RT-qPCR 检测 *SiMLs* 家族成员在大型工蚁主要免疫器官 (脂肪体、血细胞和中肠) 中的表达水平 (图 8-C)。RT-qPCR 结果显示红火蚁 *SiMLs* 家族成员在脂肪体中高表达，其表达量显著高于血细胞和中肠 ($P<0.05$) 说明脂肪体是红火蚁的一个重要免疫器官。红火蚁 *SiML1* 和 *SiML4* 在血细胞中有较高水平的表达，*SiML2*、*SiML3* 和 *SiML5* 在血细胞中低表达，*SiML3* 和 *SiML5* 在中肠中有较高的表达水平 (图 8-C)。暗示红火蚁 *SiMLs* 蛋白在不同的免疫器官所起的作用不同。

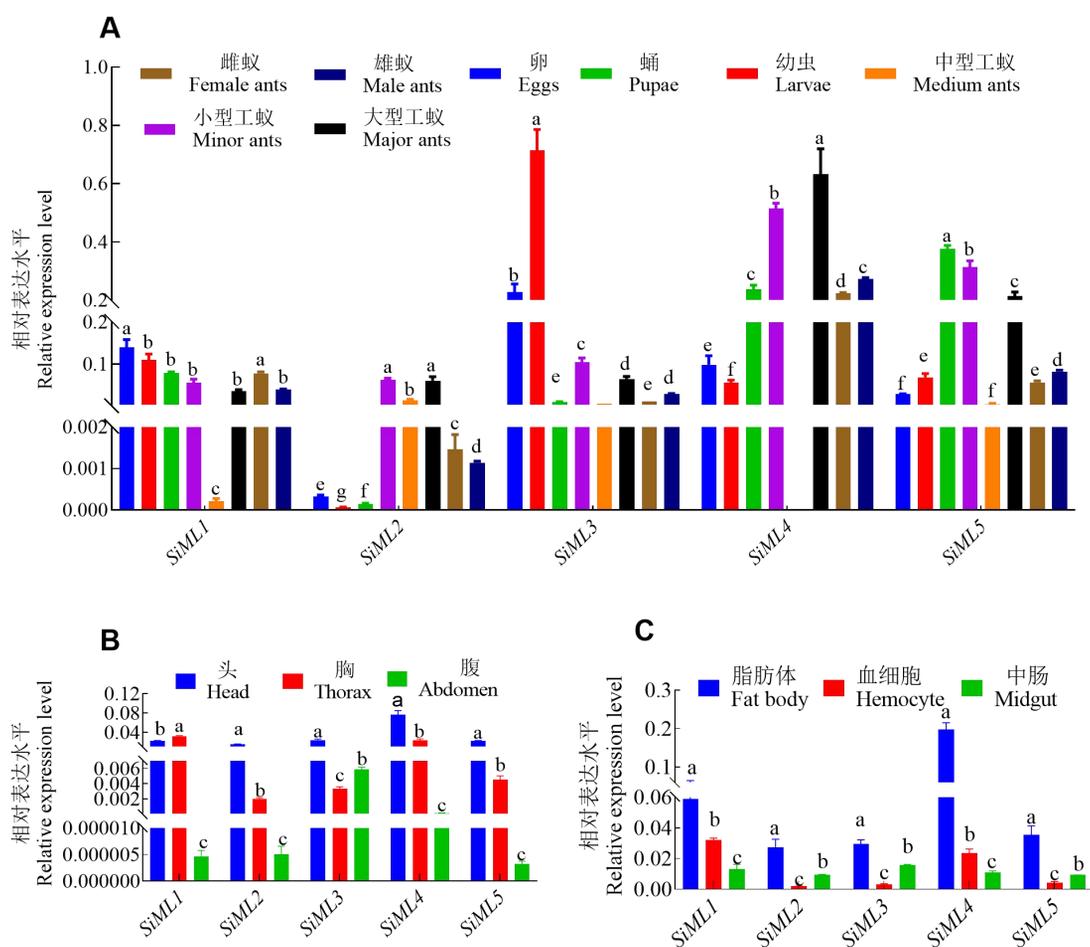


图 8 红火蚁 *SiMLs* 家族成员的发育历期/品级和组织的表达量

Fig. 8 Expression level of *SiMLs* family genes at life stages/castes and tissues of *Solenopsis invicta*

注：图中数值为平均值±标准误 (n=3)；柱上不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$ ，单因素方差分析，Duncan 氏新复极差检验法)。Note: Data in the figure were mean±SE (n=3). Different small letters above bars indicated significant difference ($P<0.05$, one-way ANOVA, Duncan's new multiple range test).

2.6 不同病原物诱导红火蚁 *SiMLs* 家族成员的表达水平

为了研究红火蚁 *SiMLs* 家族成员在不同病原物感染大型工蚁后的表达模式。所有病原物浓度均为 1×10^7 (CFU/mL)。大肠杆菌、粘质沙雷氏菌和苏云金芽孢杆菌饲喂给红火蚁大型工蚁；金龟子绿僵菌和白僵菌浸泡红火蚁大型工蚁 3~5 s，处理后 3 h、6 h、12 h、24 h 和 48 h 收集样品，解剖获得脂肪体。利用 RT-qPCR 检测红火蚁工蚁 *SiMLs* 家族成员的诱导表达模式 (图 9)。RT-qPCR 结果表明 *SiMLs* 家族成员 mRNA 表达水平差异显著 (图 9-A~E)，在金龟子绿僵菌感染 3 h 后，*SiML1*、*SiML2*、*SiML3*、*SiML4*、*SiML5* 基因显著被诱导，且 *SiMLs* 存在显著差异，*SiML1*、*SiML3* 和 *SiML5* 表达高峰期在诱导后 3 h，而 *SiML2* 和 *SiML4* 表达高峰期在诱导后 6 h (图 9)；白僵菌诱导红火蚁大型工蚁后，*SiML1*、*SiML3* 和 *SiML5* 表达高峰期在诱导后 3 h，*SiML2* 和 *SiML4* 表达高峰期在诱导后 6 h (图 9)；大肠杆菌诱导大型工蚁后，

SiML1、*SiML2*、*SiML3* 表达高峰期在 48 h，*SiML4* 表达高峰期在 6 h，*SiML5* 表达高峰期在 24 h（图 9）；粘质沙雷氏菌诱导红火蚁大型工蚁后，*SiML1*、*SiML2* 和 *SiML5* 对粘质沙雷氏菌的诱导最为敏感，*SiML1*、*SiML4* 和 *SiML5* 表达高峰期在 12 h，*SiML3* 在表达高峰期在 24 h，*SiML2* 表达高峰期在 48 h，*SiML5* 对粘质沙雷氏菌的诱导最为敏感（图 9）；苏云金芽孢杆菌诱导红火蚁大型工蚁后，*SiML5* 表达高峰期在 12 h，*SiML2* 和 *SiML4* 在表达高峰期在 24 h，*SiML1* 和 *SiML3* 表达高峰期在 48 h（图 9）；相比较而言，金龟子绿僵菌对 *SiMLs* 家族成员的诱导效果比白僵菌效果明显，达到差异显著水平；所选的 3 种细菌中，大肠杆菌诱导大型工蚁效果最好，诱导结果表明红火蚁 *SiMLs* 家族成员可以免疫响应病原微生物的侵染，对红火蚁起到保护作用。

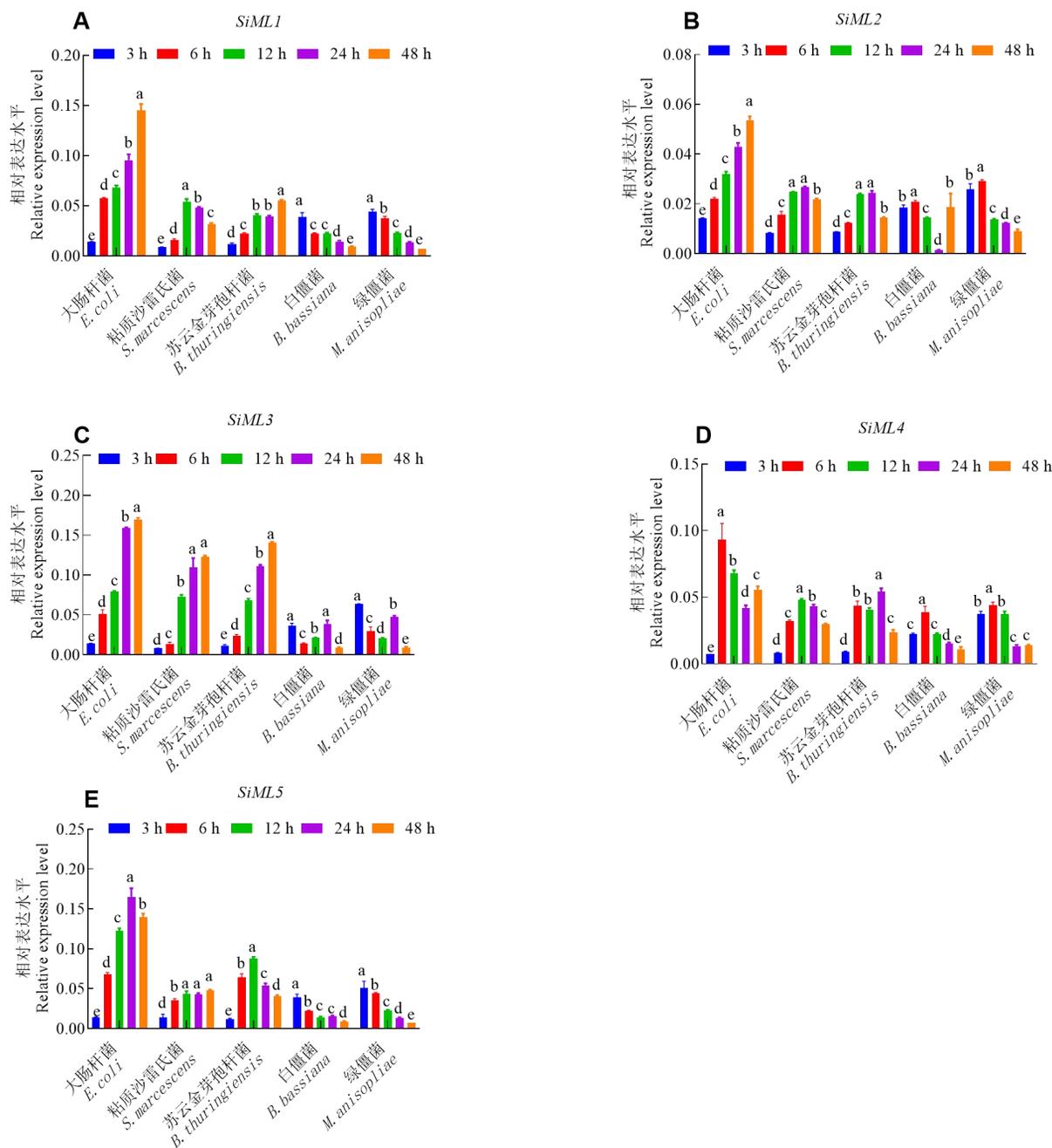


图9 不同病原物侵染后红火蚁大型工蚁 *SiMLs* 家族成员的 mRNA 表达水平的 RT-qPCR 分析

Fig. 9 RT-qPCR analysis mRNA level of *SiMLs* family member in major worker ants of *Solenopsis invicta* against different pathogens

注：红火蚁工蚁 *SiMLs* 家族成员在不同病原物诱导后的表达模式分析；图中数值为平均值±标准误（n=3），不同小写字母表示大型工蚁中以同种病原物在不同时间点的表达量差异（ $P < 0.05$, 单因素方差分析 LSD 检验）。Note: Analysis of *SiMLs* family member expression pattern in major worker ant of *Solenopsis invicta*; Values in the figure were average± standard error (n=3). Different lowercase letters indicated significant differences in the relative gene expression levels of major worker ants at the different time point ($P < 0.05$, one way ANOVA, LSD test).

3 结论与讨论

研究表明人类 *Homo sapiens*、老鼠 *Mus musculus*、蠕虫 *Caenorhabditis elegans* 和酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 的基因组中只有单个 MD-2 和 NPC2 基因，并且在哺乳动物中，ML 蛋白家族有明确的分类和功能 (Kirchhoff *et al.*, 1990; Naureckiene *et al.*, 2000; Visintin *et al.*, 2001)。而昆虫中，ML 蛋白家族成员多、复杂、功能多元化。在本研究中，生物信息学鉴定出红火蚁中有 5 个 *SiMLs* 家族成员，他们具有相似核苷酸长度的 ML 结构域基因，ML 结构域几乎覆盖了 *SiML1* (25~151 aa)、*SiML2* (23~150 aa)、*SiML3* (24~145 aa)、*SiML4* (21~150 aa) 和 *SiML5* (58~175 aa) 蛋白的整个编码区。尽管 5 个红火蚁 *SiMLs* 蛋白中都具有典型的 ML 结构域，但它们氨基酸序列相似度很低，在 11%~20% 之间。红火蚁 *SiML1*、*SiML2*、*SiML3*、*SiML4* 和 *SiML5* 蛋白预测 N 端有一个信号肽，表明他们为分泌蛋白 (图 6)。脊椎动物中，MD-2 蛋白有 6 个高度保守的半胱氨酸残基，它们可以形成分子内二硫键，或在分子间形成二聚体、寡聚体、多聚体等等。且单个 MD-2 结合 TLR4 更强，促进 TLR4 对脂多糖的识别，暗示半胱氨酸残基个数对 ML 蛋白激活先天性免疫起着至关重要的作用 (Visintin *et al.*, 2001)。本研究中，红火蚁 *SiMLs* 蛋白质序列都有 6 个保守的半胱氨酸残基，所在位置与人类和小鼠一致 (图 1)，暗示红火蚁 *SiMLs* 蛋白质与人类功能相似，能激活红火蚁先天性免疫系统。在人类中，ML 蛋白按照 1~6、2~3 和 4~5 的模式连接形成二硫键，在激活天然免疫功能中发挥重要作用 (Abreu *et al.*, 2002; Vanier *et al.*, 2004)。系统发育树分析表明红火蚁 *SiML* 存在分化的进化关系，红火蚁 *SiML1*、*SiML2*、*SiML3* 和 *SiML4* 与紫苑叶蝉 *MqML* 亲缘关系较近，红火蚁 *SiML5* 与中红侧沟茧蜂 *MmML3* 蛋白亲缘关系较近，暗示它们各自的功能相似。

串联重复和片段重复是家族基因扩张的两种主要方式，是基因组进化过程中最重要的动力 (Wang *et al.*, 2012)。为了进一步探究红火蚁 *SiMLs* 基因在蜜蜂科与蚁科间的共线性关系，本研究选取了红火蚁、斯氏林蚁和东方蜜蜂进行共线性分析 (图 4)。发现红火蚁与斯氏林蚁具有 4 对共线性基因；红火蚁与东方蜜蜂有共线性关系的基因有 3 对。这表明 *SiMLs* 中 3 个基因在蜜蜂科与蚁科有共同祖先，进化上较为保守，此结果与吴洪鑫的结果相似 (吴洪鑫等, 2022)。

昆虫免疫器官主要包括脂肪体、血细胞和中肠，它们具有多种重要的生理功能。如血细胞具有储存能量和免疫防御外界病原物入侵等重要生理功能 (宋阳等, 2023)；昆虫的脂肪体相当于哺乳动物的肝脏，在天然免疫中有着举足轻重的作用，除外，在生殖、发育、变态也起着重要的作用 (Gross *et al.*, 2001)；中肠中含有围食膜，能够隔绝病原微生物进入肠道上皮细胞，为宿主提供了物理防御作用，在先天免疫中也发挥着重要作用 (宋阳等, 2023)。研究报道，烟草天蛾 *MsML-1* 蛋白与 LPS 体外结合，激活先天性免疫信号途径 (Ao *et al.*, 2008)。家蚕 *BmML* 基因在脂肪体中高表达，且 *BmML* 蛋白能够识别 LPS，激活先天性免疫中的体液免疫 (梅雄娥等, 2019)。本研究中，利用 RT-qPCR 检测了红火蚁大型工蚁 3 个主要免疫器官。RT-qPCR 结果表明红火蚁 *SiMLs* 家族基因在脂肪体中都高表达，血细胞和中肠次之，说明红火蚁的脂肪体为其主要的免疫器官 (图 8-C)。且 *SiML1* 和 *SiML4* 基因在血细胞中也有较高的表达水平，而 *SiML2*、*SiML3* 和 *SiML5* 基因在中肠中有较高表达水平，说明红火蚁中不同的 *SiMLs* 有不同

的功能(图 8-C)。这一结果与在哺乳动物、虾类和其他昆虫中获得的 ML 同源物的表达模式一致(Vanier *et al.*, 2004; Liao *et al.*, 2011; Surinlert *et al.*, 2020; Maung *et al.*, 2021)。在本研究中,进一步利用 RT-qPCR 检测了红火蚁 *SiMLs* 基因在大型工蚁头、胸、腹的表达水平。发现所有红火蚁 *SiMLs* 基因在头部高表达,这暗示它们在外出觅食过程中发挥作用(图 8-B);在检测不同发育历期或者品级时,出乎意料的是,红火蚁 *SiML3* 转录本在卵中被检测到高水平表达(图 8-A),这暗示它可能在胚胎发育过程中有功能性作用。红火蚁 *SiML1* 和 *SiML4* 在中型工蚁中低表达,而在小型工蚁和大型工蚁中高表达,暗示这两个 *SiMLs* 基因在工蚁中所起的生理功能上有所不同(图 8-A)。相比之下,红火蚁 *SiML1*、*SiML2*、*SiML3*、*SiML4* 和 *SiML5* 基因在雄蚁和雌蚁中表达存在显著差异,这表明红火蚁 *SiMLs* 基因在生殖上的功能有所不同(图 8-A)。

日本囊对虾 ML 蛋白能够识别对虾白斑综合征病毒(WSSV),激活先天免疫系统,发挥抗病毒的作用(徐伊桦等,2015)。凡纳滨对虾 ML(*LvML*)基因在注射 LPS 后,*LvML* 基因上调表达强烈;*LvML* 蛋白具有抗病毒的作用,重组蛋白 *LvML* 能与 LPS 结合,激活日本囊对虾的先天免疫(Liao *et al.*, 2011; Xiao *et al.*, 2021)。中华绒螯蟹 *EsML3* 识别多种 PAMPs 和微生物,对入侵微生物进行凝集,促进血细胞清除细菌和吞噬作用来介导细胞免疫反应,同时参与了下游抗菌肽的表达调控(宋玉,2022)。利用不同病原物侵染家蚕 5 龄幼虫后,家蚕 *BmNPC2a*、*BmNPC2b*、*BmML-1*、*BmML-2* 和 *BmEr-16* 基因的转录和表达都显著上调,且不同病原物诱导 ML 家族的表达水平不同,推测 ML 家族成员可能参与到宿主对入侵病原物的免疫过程(张若男,2019)。在黑腹果蝇中,*DmNPC2* 不仅能识别肽聚糖 PGN、脂多糖 LPS 等细胞壁成分,还调控 Imd 途径在先天免疫中发挥作用(Shi *et al.*, 2012)。以上研究表明 ML 家族在无脊椎动物生理过程中的复杂性和重要性。本研究中,将不同病原菌大肠杆菌、粘质沙雷氏菌、苏云金芽孢杆菌、金龟子绿僵菌和白僵菌侵染红火蚁大型工蚁,RT-qPCR 检测表明火蚁 *SiMLs* 家族能够免疫响应不同病原菌的诱导,且 *SiMLs* 基因强烈上调表达,推测红火蚁 *SiMLs* 家族参与对入侵微生物的免疫识别(图 9)。研究结果与梅雄娥结果相似,她注射或添食病原菌侵染家蚕 5 龄幼虫后,所有病原物强烈刺激 *SiMLs* 的表达(梅雄娥等,2019)。红火蚁 *SiMLs* 基因在细菌诱导 3~48 h 后均显著上调表达($P<0.05$),而在真菌诱导后,在诱导早期(3~12 h),*SiML* 家族成员显著上调表达,诱导后期(24~48 h)抑制 *SiML* 家族成员的表达,暗示红火蚁 *SiMLs* 家族成员响应真菌时,在不同诱导时间所起的作用不同,且 *SiML* 家族成员对不同病原物的诱导响应不同,暗示 *SiMLs* 家族成员在不同病原菌诱导中所起生物学功能不同(图 9)。真菌研究结果与梅雄娥利用球孢白僵菌诱导家蚕免疫诱导结果不一致,说明真菌诱导不同物种有一定的特异性(梅雄娥等,2019)。家蚕中 *BmNPC2* 能被细菌脂多糖和肽聚糖刺激后显著上调表达,*BmNPC2* 能直接与 β 葡聚糖结合,且 *BmNPC2* 能促进家蚕 *BmNPV* 在细胞中增殖,也暗示 *BmNPC2* 响应病毒的识别。本研究结果与家蚕 *BmNPC2* 的免疫诱导结果一致(张若男,2019; Minkner *et al.*, 2020)。总而言之,本研究中,红火蚁的 *SiML* 家族 5 个基因在病原物诱导后,RT-qPCR 检测 *SiMLs* 家族成员发现都有不同程度的表达差异,且在不同病原体之间存在不同的免疫响应模式,暗示红火蚁的 *SiMLs* 家族

成员蛋白参与抵御病原微生物的入侵，对红火蚁具有保护作用。研究结果可为后续红火蚁 *SiMLs* 家族蛋白功能的研究提供参考信息，并为微生物杀虫剂的开发提供标靶。

参考文献 (References)

- Abreu MT, Arnold ET, Thomas LS, *et al.* TLR4 and MD-2 expression is regulated by immune-mediated signals in human intestinal epithelial cells [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277 (23): 20431-20437.
- Adachi T, Ishii K, Matsumoto Y, *et al.* Niemann-Pick disease type C2 protein induces triglyceride accumulation in silkworm and mammalian cell lines [J]. *Biochemical Journal*, 2014, 459 (1): 137-147.
- Ao J, Ling E, Rao X, *et al.* A novel ML protein from *Manduca sexta* may function as a key accessory protein for lipopolysaccharide signaling [J]. *Molecular Immunology*, 2008, 45 (10): 2772-2781.
- Bailey TL, Williams N, Misleh C, *et al.* MEME: Discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs [J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34 (suppl_2): W369-W373.
- Chen C, Chen H, Zhang Y, *et al.* TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. *Molecular Plant*, 2020, 13 (8): 1194-1202.
- Dong Y, Aguilar R, Xi Z, *et al.* *Anopheles gambiae* immune responses to human and rodent *Plasmodium* parasite species [J]. *PLoS Pathogens*, 2006, 2 (6): e52.
- Dziarski R, Gupta D. Role of MD-2 in TLR2- and TLR4-mediated recognition of Gram-negative and Gram-positive bacteria and activation of chemokine genes [J]. *Journal of Endotoxin Research*, 2000, 6 (5): 401-405.
- Dziarski R, Wang Q, Miyake K, *et al.* MD-2 enables Toll-like receptor 2 (TLR2)-mediated responses to lipopolysaccharide and enhances TLR2-mediated responses to Gram-positive and Gram-negative bacteria and their cell wall components [J]. *The Journal of Immunology*, 2001, 166 (3): 1938-1944.
- Gross PS, Bartlett TC, Browdy CL, *et al.* Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus* [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2001, 25 (7): 565-577.
- Huang X, Warren JT, Buchanan JA, *et al.* *Drosophila* Niemann-Pick type C-2 genes control sterol homeostasis and steroid biosynthesis: A model of human neurodegenerative disease [J]. 2007, 134 (20): 3733-3742.
- Kennedy MN, Mullen GED, Leifer CA, *et al.* A complex of soluble MD-2 and lipopolysaccharide serves as an activating ligand for Toll-like receptor 4 [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279 (33): 34698-34704.
- Kirchoff C, Osterhoff C, Habben I, *et al.* Cloning and analysis of mRNAs expressed specifically in the human epididymis [J]. *International Journal of Andrology*, 1990, 13 (2): 155-167.
- Li GQ, Biyahong TLBT, Yang DS. Field efficacy of seven biopesticides against grassland locusts in Xinjiang [J]. *World Pesticide*, 2023, 45 (11): 46-49
[李庆国, 托伦巴特·毕亚洪, 杨德松, 等. 7种生物杀虫剂对新疆草原蝗虫的野外防治效果评价 [J]. *世界农药*, 2023, 45 (11): 46-49]
- Liao JX, Yin ZX, Huang XD, *et al.* Cloning and characterization of a shrimp ML superfamily protein [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30 (2): 713-719.
- Liu W, Xie Y, Ma J, *et al.* IBS: An illustrator for the presentation and visualization of biological sequences [J]. *Bioinformatics*, 2015, 31 (20): 3359-3361.
- Lu YY, Zeng L, Xu YJ, *et al.* Research progress of invasion biology and management of red imported fire ant [J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2019, 40 (5): 149-160. [陆永跃, 曾玲, 许益铸, 等. 外来物种红火蚁入侵生物学与防控研究进展 [J]. *华南农业大学学报*, 2019, 40 (5):

149-160]

- Maung KL, Jing D, Zhang T, *et al.* Molecular identification and functional analysis of Niemann-Pick type C2 protein in *Macrocentrus cingulum* Brischke (Hymenoptera: Braconidae) [J]. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 2021, 24 (1): 7-14.
- Mei XE, Li ZH, Yu B, *et al.* Identification of ML family genes in *Bombyx mori* and their expression characteristics induced by pathogen [J]. *Acta Sericologica Sinica*, 2019, 45 (1): 32-39. [梅雄娥, 李致宏, 于滨, 等. 家蚕ML家族基因的鉴定及病原诱导表达特征 [J]. 蚕业科学, 2019, 45 (1): 32-39]
- Mei Y, Jing D, Tang S, *et al.* InsectBase 2.0: A comprehensive gene resource for insects [J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50 (D1): D1040-D1045.
- Minkner R, Xu J, Zagst H, *et al.* A systematic and methodical approach for the efficient purification of recombinant protein from silkworm larval hemolymph [J]. *Journal of Chromatography B*, 2020, 1138: 121964.
- Naureckiene S, Sleat DE, Lackland H, *et al.* Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease [J]. *Science*, 2000, 290 (5500): 2298-2301.
- Shi XZ, Zhong X, Yu XQ. *Drosophila melanogaster* NPC2 proteins bind bacterial cell wall components and may function in immune signal pathways [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2012, 42 (8): 545-556.
- Song Y. The Antibacterial Immune Mechanism Research of Myeloid Differentiation Factor-2-related Lipid Recognition (ML) Protein in *Eriocheir Sinensis* [D]. East China Normal University, 2022. [宋玉. 中华绒螯蟹髓样分化因子-2相关脂质识别 (ML) 蛋白的抗菌免疫机制研究 [D]. 华东师范大学, 2022]
- Song Y, FAN LL, Shentu XP, *et al.* Regulatory mechanism of intestinal microbial homeostasis in insects [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2023, 66 (10): 1404-1414. [宋阳, 范琳琳, 申屠旭萍, 等. 昆虫肠道微生物稳态的调控机制 [J]. 昆虫学报, 2023, 66 (10): 1404-1414]
- Subramanian B, Gao S, Lercher MJ, *et al.* Evolview v3: A webserver for visualization, annotation, and management of phylogenetic trees [J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47 (W1): W270-W275.
- Surinlert P, Sukonset C, Khongkha T, *et al.* Existence and distribution of Niemann-Pick type 2C (NPC2) in prawn reproductive tract and its putative role as a cholesterol modulator during sperm transit in the vas deferens [J]. *Cell and Tissue Research*, 2020, 382 (2): 381-390.
- Thambi PJ, Modahl CM, Kini RM. Niemann-Pick Type C2 Proteins in *Aedes aegypti*: Molecular modelling and prediction of their structure-function relationships [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25 (3): 1684.
- Vanier MT, Millat G. Structure and function of the NPC2 protein [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2004, 1685 (1-3): 14-21.
- Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JH, *et al.* Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells [J]. *Journal of Immunology*, 2001, 166 (1): 249-255.
- Wang C, Zhu T, Yang XY. Advances in red imported fire ant impacts on vertebrates [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2024, 44 (9): 3575-3585. [王偲, 朱婷, 杨欣亚, 等. 入侵红火蚁对脊椎动物影响研究进展 [J]. 生态学报, 2024; 44 (9): 3575-3585]
- Wang Y, Tang H, Debarry JD, *et al.* MCSan X: A toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity [J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40 (7): e49.
- Wu HM, Bai WH, Deng JF, *et al.* Study on the toxicity of *Metarhizium anisopliae* CQMa421 and *Beauveria bassiana* ZJU435 to red imported fire ants *Solenopsis invicta* and synergistic effects of polysiloxane on the two strains [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2024, 46 (2): 377-388. [吴慧敏, 白卫辉, 邓杰夫, 等. 金龟子绿僵菌CQMa421和球孢白僵菌ZJU435对红火蚁毒力及聚硅氧烷的增效作用研究 [J]. 环境昆虫学报, 2024, 46 (2):

377-388]

- Wu HX, Xu YT, Kang ZH, *et al.* Genome-wide identification of Serpin gene family in *Solenopsis invicta* and expression analysis in response to *Metarhizium anisopliae* [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2022, 44 (6): 1541-1552. [吴洪鑫, 许亚婷, 康泽泓, 等. 红火蚁 Serpin 家族基因鉴定及其在绿僵菌侵染下的表达模式分析 [J]. 环境昆虫学报, 2022, 44 (6): 1541-1552]
- Xiao B, Liao X, Wang H, *et al.* BigPEN, an antimicrobial peptide of penaeidin family from shrimp *Litopenaeus vannamei* with membrane permeable and DNA binding activity [J]. *Fish and Shellfish Immunology Reports*, 2021, 2: 100034.
- Xu YH, Su YQ, Mao Y, *et al.* Cloning and expression of a ML superfamily protein in *Marsupenaeus japonicas* [J]. *Journal of Tropical Biology*, 2015, 6 (4): 365-373. [徐伊桦, 苏永全, 毛勇, 等. 日本囊对虾 ML 基因的克隆与表达分析 [J]. 热带生物学报, 2015, 6 (4): 365-373]
- Xu YT, Yang RR, Wu HX, *et al.* Study on expression pattern of Toll receptor family of *Solenopsis invicta* Buren in response to *Metarhizium anisopliae* [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2022, 44 (6): 1528-1540. [许亚婷, 杨荣蓉, 吴洪鑫, 等. 红火蚁 Toll 受体家族免疫响应绿僵菌表达模式的研究 [J]. 环境昆虫学报, 2022, 44 (6): 1528-1540]
- Zamyatina A, Heine H. Lipopolysaccharide recognition in the crossroads of TLR4 and Caspase-4/11 mediated inflammatory pathways [J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 585146.
- Zeng L, Lu YY, He XF, *et al.* Identification of red imported fire ant *Solenopsis invicta* to invade mainland China and infestation in Wuchuan, Guangdong [J]. *Chinese Bulletin of Entomology*, 2005, 42 (2): 144-148. [曾玲, 陆永跃, 何晓芳, 等. 入侵中国大陆的红火蚁的鉴定及发生为害调查 [J]. 昆虫知识, 2005, 42 (2): 144-148]
- Zhang R, Bi TT, Liu N, *et al.* Evaluation on field control effects of 4 pesticides against *Solenopsis invicta* Buren [J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2022, 10: 65-67. [张睿, 毕婷婷, 刘娜, 等. 4种药剂防治红火蚁田间效果评价 [J]. 现代农业科技, 2022, 10: 65-67]
- Zhang R, Li X, Zhang J, *et al.* Toll9 from *Bombyx mori* functions as a pattern recognition receptor that shares features with Toll-like receptor 4 from mammals [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2021, 118 (19): e2103021118.
- Zhang RN. BmMLs-assisted BmToll9 Directly Recognizes Lipopolysaccharide-induced Innate Immunity of *Bombyx mori* Larvae [D]. South China Agricultural University, 2019. [张若男. BmMLs辅助BmToll9直接识别脂多糖LPS引发家蚕先天免疫的研究 [D]. 华南农业大学, 2019]
- Zou Z, Xu Y, Ma B, *et al.* BmECM25, from the silkworm *Bombyx mori*, is an extracellular matrix protein [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2015, 65: 68-74.
- Zou Z, Evans JD, Lu Z, *et al.* Comparative genomic analysis of the *Tribolium* immune system [J]. *Genome Biology*, 2007, 8: 1-16.