

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2024.10.008

张艳, 董照明, 夏建华, 等. 家蚕 30K 蛋白 BmLP1 的表达模式及其在胚胎中的作用 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2024, 46(10): 99-106.

家蚕 30K 蛋白 BmLP1 的表达模式及其在胚胎中的作用

张艳, 董照明, 夏建华, 令狐青青, 万娜,
张仁义, 卢忠燕, 林英, 赵萍

西南大学 西部(重庆)科学城种质创制大科学中心/前沿交叉学科研究院生物学研究中心, 重庆 400715

摘要: 家蚕 30K 蛋白是家蚕血液和卵中的高丰度蛋白, 参与营养、免疫、抑制细胞凋亡等功能. 探究 30K 蛋白在家蚕体内的表达模式有助于更清楚地了解 30K 蛋白的功能. 利用生物信息学方法发现 4 种 30K 蛋白基因 *Bmlp1*, *Bmlp2*, *Bmlp3* 和 *Bmlp7* 都含有信号肽. 其中, *Bmlp1* 与其他 30K 蛋白的序列相似性小于 50%. 半定量 RT-PCR 结果表明, *Bmlp1* 从 5 龄第 3 d 到化蛹第 1 d 在脂肪体中表达量都比较高, 之后表达量降低. Western blotting 结果表明, BmLP1 从 5 龄第 5 d 到化蛹第 4 d 在血淋巴中的含量都比较高, 之后含量降低. 与血淋巴中的变化趋势不同, 卵巢中的 BmLP1 在上簇第 2 d 被检测到, 之后含量一直增加, 化蛾时含量达到最高. 这是由于上簇第 2 d 卵巢管迅速长大, 血液中的 BmLP1 等营养蛋白逐渐转运至卵巢管的未受精卵并开始积累. 免疫组织化学定位结果表明, 在胚胎发育前期, BmLP1 分布于蚕卵的卵黄颗粒中, 在孵化前期, BmLP1 被吞入胚胎的肠道内. 体外孵育结果表明, 蚁蚕粗提物可以降解 BmLP1, 暗示蚁蚕肠道内可能存在某种蛋白酶可以将大部分 BmLP1 水解, 最终为蚁蚕的孵化提供能量或者氨基酸. 系统分析了 BmLP1 在不同发育时期脂肪体、血液、卵巢和胚胎中的表达特征, 揭示了其在胚胎发育过程中的重要作用.

关键词: 家蚕; 30K 蛋白; BmLP1; 胚胎发育; 血淋巴

中图分类号: S881.2

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2024)10-0099-08

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Expression Pattern of Silkworm 30K Protein BmLP1 and Its Role in Embryonic Development

ZHANG Yan, DONG Zhaoming, XIA Jianhua,
LINGHU Qingqing, WAN Na, ZHANG Renyi,
LU Zhongyan, LIN Ying, ZHAO Ping

收稿日期: 2023-09-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(32202750); 重庆市基础与前沿研究计划项目(cstc2021jcyj-msxmX0582); 重庆市创新群体项目(cstc2020jcyj-cxtt).

作者简介: 张艳, 博士, 副教授, 主要从事家蚕蛋白质组及基因功能研究.

Integrative Science Center of Germplasm Creation in Western China (Chongqing) Science City, Southwest University/
Biological Science Research Center, Academy for Advanced Interdisciplinary, Chongqing 400715, China

Abstract: 30K proteins are abundant in silkworm hemolymph and egg. They are involved in nutrition, immunity, inhibition of apoptosis and other functions. We studied the expression of 30K proteins to better understand their functions. In this research, bioinformatic analysis showed that all the Bmlp1, Bmlp2, Bmlp3 and Bmlp7 genes have signal peptides. The sequence similarity between Bmlp1 and other 30K protein genes is less than 50%. The result of semi-quantitative RT-PCR showed that Bmlp1 was highly expressed from day 3 of fifth instar larvae to day 1 of pupae, and then decreased. By Western blotting assay, we found that the BmLP1 antibody could only bind with BmLP1 protein, not BmLP2, BmLP3 and BmLP7 proteins, suggesting that the antibody has good specificity. The Western blotting result showed that BmLP1 was abundant from day 5 of fifth instar larvae to day 4 of pupae, and then decreased, whereas BmLP1 was firstly observed after day 2 of wandering, then increased gradually, and reached a maximum level in the moth. This is because that ovary tubes grew quickly from day 2 of wandering, and BmLP1 and other nutrients-storage proteins were transported into the ovary tubes and accumulated in the unfertilized eggs. Immunohistochemistry result showed that BmLP1 was located in the yolk granules on day 6 of egg and in the gut before the hatching. We incubated BmLP1 with the new hatched larvae extract in vitro, and found that the extract could degraded the majority of BmLP1, indicating that there may be one protease in the gut responsible for the degradation of BmLP1. BmLP1 could provide the energy and amino acid resources for the hatching of baby silkworm larvae. This study explored the changing pattern of silkworm 30K protein BmLP1 in the fat body, hemolymph, ovary and egg at different developmental stage, laying the foundation for understanding the function of BmLP1 in the silkworm embryonic development.

Key words: silkworm (*Bombyx mori*); 30K protein; BmLP1; embryonic development; hemolymph

家蚕是我国的重要经济昆虫,已经有 5 000 年的驯化历史.近年来,家蚕成为了典型的鳞翅目模式昆虫,对家蚕的基础研究可为研究其他鳞翅目昆虫提供重要的理论支撑.家蚕具有开放式血淋巴循环系统,组织器官浸润于血淋巴中.血淋巴在营养物质转运、废物运输等方面发挥着至关重要的作用.家蚕血淋巴中有几百种蛋白质,这些蛋白质主要分为 2 大类:营养储存蛋白和免疫相关蛋白^[1].营养储存蛋白主要包括载脂蛋白、贮藏蛋白、卵黄原蛋白和 30K 蛋白.30K 蛋白是序列高度同源且分子量在 30K 左右的一群蛋白,在家蚕血液和胚胎中含量非常高^[2-6].家蚕 30K 蛋白的功能研究将有助于我们理解 30K 蛋白在血液和胚胎中的作用.

2007 年, SUN 等^[7]利用家蚕的 EST 数据对 30K 蛋白基因进行了鉴定,共鉴定到 10 个基因.2012 年, ZHANG 等^[8]利用家蚕基因组精细图序列数据,确定家蚕中共有 46 个基因编码 30K 蛋白.根据进化分析和结构域分析,可以将 30K 蛋白分为 3 个家族: ENF 肽结合蛋白、富含丝氨酸和苏氨酸的 30K 蛋白和典型 30K 蛋白.典型 30K 蛋白分子量约为 30 kDa,共有 24 个成员.对 4 龄和 5 龄家蚕血液进行蛋白质组学分析,结果表明典型 30K 蛋白在 5 龄家蚕血液中高量存在,尤其是 BmLP1 和 BmLP2^[1].已有研究表明, BmLP1 有多种生物学功能,在胚胎的正常发育中具有重要作用^[9]. BmLP1 可以与糖结合,如甘露糖、葡萄糖、N-乙酰葡萄糖胺^[10]和葡聚糖,葡聚糖是病原体表面携带的重要糖分子, BmLP1 可以结合葡聚糖,暗示其可能参与了昆虫的免疫^[11-12]; YE 等^[13]证实 BmLP1 可以与血细胞膜结合,通过促进血细胞包囊及黑化反应参与家蚕免疫; BmLP1 可以结合 EcR-B1,从而抑制蜕皮激素诱导的细胞凋亡^[14]. ZHANG 等^[9]对 BmLP7 进行了详细研究,发现 BmLP7 主要由 5 龄家蚕的脂肪体合成,然后分泌进入血液中,再转运进入卵巢中,最终在胚胎发育过程中被胚胎肠腔内的酶降解,为胚胎发育提供能量和氨基酸.近期有研究表明,

BmVgR(家蚕卵黄原蛋白受体)可以与 BmLP1 结合, 将 BmLP1 转运进入卵巢. 2016 年, WANG 等^[15]从 5 龄家蚕消化液中纯化获得碱性丝氨酸蛋白酶 P-IIc, 该酶在胚胎后期表达, 将该蛋白酶与不同 30K 蛋白孵育后, 发现其具有强烈水解 30K 蛋白的功能.

30K 蛋白成员众多, 且在生物学功能上呈现出丰富的多样性. 前期研究了 30K 蛋白 BmLP7 的表达模式与功能, 为了系统地比较与分析不同 30K 蛋白的功能差异, 有必要对 BmLP1 等其他 30K 蛋白进行研究. 本研究利用半定量 RT-PCR, Western blotting, 免疫组化等技术, 对家蚕 30K 蛋白 BmLP1 在不同组织器官中的表达模式进行调查和分析, 旨在揭示家蚕 BmLP1 蛋白的合成、转运与利用情况, 阐明家蚕 30K 蛋白在胚胎发育中的功能.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

家蚕大造为本研究的实验材料, 由西南大学提供. 大造采用常规饲喂方法饲养, 饲喂的相对温度为 25 °C, 相对湿度为 60%.

Trizol 试剂购于 Invitrogen 公司; dNTPs, Oligo (dT), M-MLV 反转录酶购于 Promega 公司; 羊抗兔二抗购于 Sigma 公司; Tubulin 抗体、FITC 染色液和抗荧光淬灭封闭液购于碧云天; DAB 显色试剂盒购于北京中杉金桥; PVDF 膜购于 Roche; 苯基硫脲、考马斯亮蓝、甘氨酸等试剂购于上海生工; 松油醇、二甲苯、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、甲醇及冰醋酸等试剂购于重庆化学试剂厂.

1.2 氨基酸多序列比对分析

在 Silkdb 数据库(<http://silkworm.swu.edu.cn/silkdb/>)下载 30K 蛋白 BmLP1, BmLP2, BmLP3 和 BmLP7 的氨基酸序列^[16], 利用 ClustalX 1.83 软件进行多序列比对分析^[17], 并利用 GeneDoc 软件进行手动校正.

1.3 30K 蛋白基因的 RT-PCR 检测

收集不同发育时期的家蚕脂肪体材料放于 -80 °C 冰箱中保存备用. 家蚕的发育阶段共 8 个, 分别为: 5 龄第 3 d, 5 龄第 5 d, 5 龄第 7 d, 上簇第 2 d, 化蛹第 1 d, 化蛹第 4 d, 化蛹第 7 d 和化蛾第 1 d. 利用 Trizol 试剂提取脂肪体的总 RNA, 反转录为 cDNA. 利用 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增所用引物见表 1, 扩增条件为: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 40 s; 54 °C 退火 40 s; 72 °C 延伸 40 s; 循环 28 次; 72 °C 再延伸 10 min; 最后置于 12 °C 保存.

表 1 扩增所用引物

基因名	引物序列	产物大小/bp	退火温度/°C	循环次数
<i>Bmlp1</i>	F-AGACTGACTTTGTTTGCCTTCG R-GCTTTATTCGGTAATTTGGTT	827	53	28
<i>Bmlp3</i>	F-CAATGATGTTCAAGGCGACG R-GCTCAACCGTCCTCGACAGT	323	60	28
<i>Bmlp7</i>	F-AAGCCCGTCATAGTTATT R-GTCTTTGTCTGTTTAGCG	618	59	28

1.4 30K 蛋白的 SDS-PAGE 及 Western blotting 分析

家蚕发育至 5 龄第 1 d 时, 鉴定性别, 取雌性家蚕作为实验材料. 在 5 龄期和上簇期, 先用解剖针扎家蚕腹足, 收集血液, 并加入少量的苯基硫脲防止血液黑化, 再取家蚕的卵巢组织存放于 -80 °C 冰箱中. 在蛹期和蛾期, 将家蚕固定于蜡盘上, 用 20 μL 枪头吸取血液置于离心管中保存, 再取其卵巢组织

保存于一80℃冰箱中。血液样品用0.1 mol/L PBS溶液稀释5倍待用。卵巢样品采用液氮研磨的方法研磨成粉末状,加入适量的0.1 mol/L PBS溶液溶解。

利用Brandford法对血液样品和卵巢样品进行定量分析,并以牛血清白蛋白(BSA)绘制标准曲线。根据定量结果,取2 μg蛋白质样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析,凝胶浓度为12.5%。将血液和卵巢样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳后,通过湿转法将蛋白转移至PVDF膜上,转膜条件为200 V,转膜时间为30 min。待转膜完成后,将膜放置在培养皿中,用5%的脱脂奶粉封闭1 h后,倒掉封闭液,加入一抗溶液孵育2 h,用TBST溶液清洗4次,再加入二抗溶液孵育2 h,再用TBST溶液清洗4次。最后将PVDF膜浸泡在显色液中,避光反应5 min,放入曝光仪中曝光。

1.5 免疫组织化学定位分析

当蚕卵发育至第6 d和第10 d时,取适量的卵放入10% KOH溶液中软化,然后置于Smith固定液中24 h,接着用乙醇梯度脱水,用松油醇处理,使之变得透明。最后,将处理好的蚕卵包埋进石蜡中,用石蜡切片机进行切片,切片厚度设置为5 μm。石蜡切片经过脱蜡、乙醇复水、去除内源性过氧化物酶、抗原修复、封闭、一抗孵育和二抗孵育等处理后,用DAPI和DAB显色液进行显色,在显微镜下观察并拍照。

1.6 蚁蚕粗提物对BmLP1的降解

蚁蚕粗提物对BmLP1降解实验的反应体系如下: BmLP1的对照组中只加入了BmLP1蛋白,最终体积用缓冲液补足;蚁蚕粗提物组中只加入了蚁蚕粗提物,最终体积用缓冲液补足;BmLP1与蚁蚕粗提物孵育的实验组中加入了蚁蚕粗提物与BmLP1,其质量比为3:1。缓冲液为100 mmol/L的Tris-HCl, pH值为8.8。对照组与实验组都在37℃下孵育2 h,保证蚁蚕粗提物中的酶与BmLP1充分反应。反应结束后,取相同体积的量进行SDS-PAGE电泳检测降解效果。

2 结果与分析

2.1 BmLP1与其他30K蛋白的相似性分析

已有研究表明,家蚕的典型30K蛋白在进化树上可以分为4群: I, II, III和IV^[8]。其中, III群和IV群在5龄家蚕血液中含有非常高。BmLP1与BmLP2属于典型30K蛋白III群,而BmLP3和BmLP7属于典型30K蛋白IV群。从silkDB网站下载的BmLP1, BmLP2, BmLP3和BmLP7的氨基酸序列可以看出,它们都有信号肽,因而都属于分泌性蛋白。将其序列进行比对,发现BmLP3和BmLP7的序列相似性超过90%, BmLP1与另外3个30K蛋白的序列同源性不到50%(图1)。

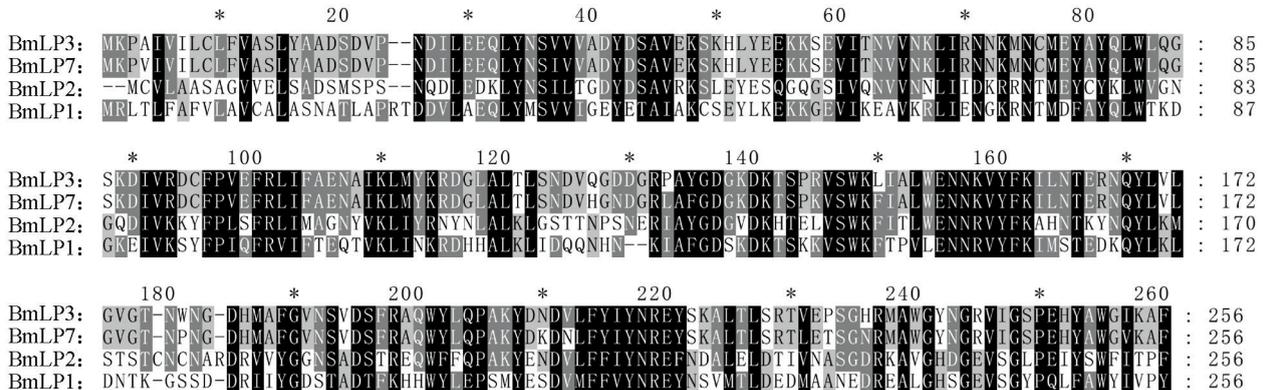


图1 4个30K蛋白的多序列比对图

2.2 BmLP1在脂肪体中的表达特征分析

已有的研究揭示了典型30K蛋白基因是在脂肪体中合成的^[8-9],为了检测BmLP1基因在脂肪体中的表达趋势,提取了不同阶段的脂肪体RNA,将其反转录为cDNA,作为后续检测的模板。半定量RT-PCR结

果表明, *Bmactin3* 在各时期的脂肪体中表达量相当, 可以用于下一步目的基因的检测. *Bmlp1* 在家蚕 5 龄期和蛹前期表达量较高, 在蛹后期时, 表达量开始降低, 这与 *Bmlp3* 和 *Bmlp7* 的表达特征相似(图 2).

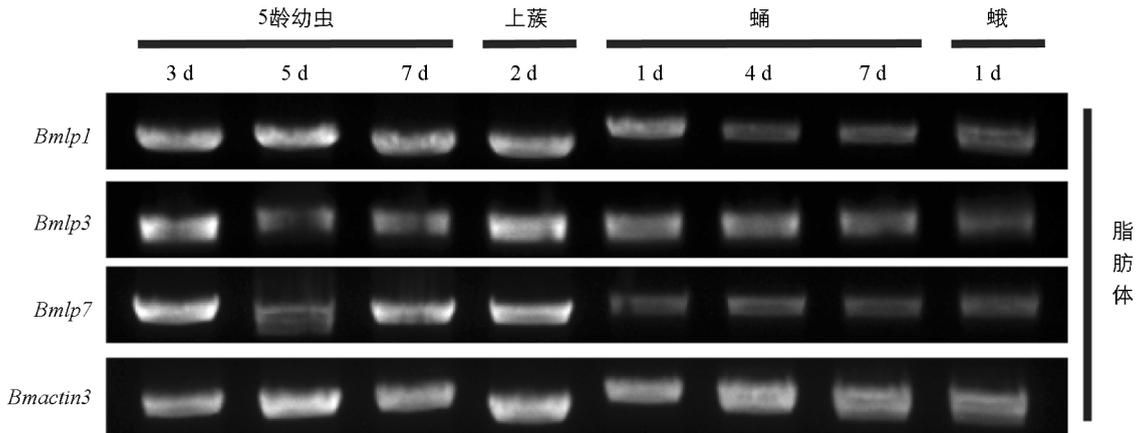
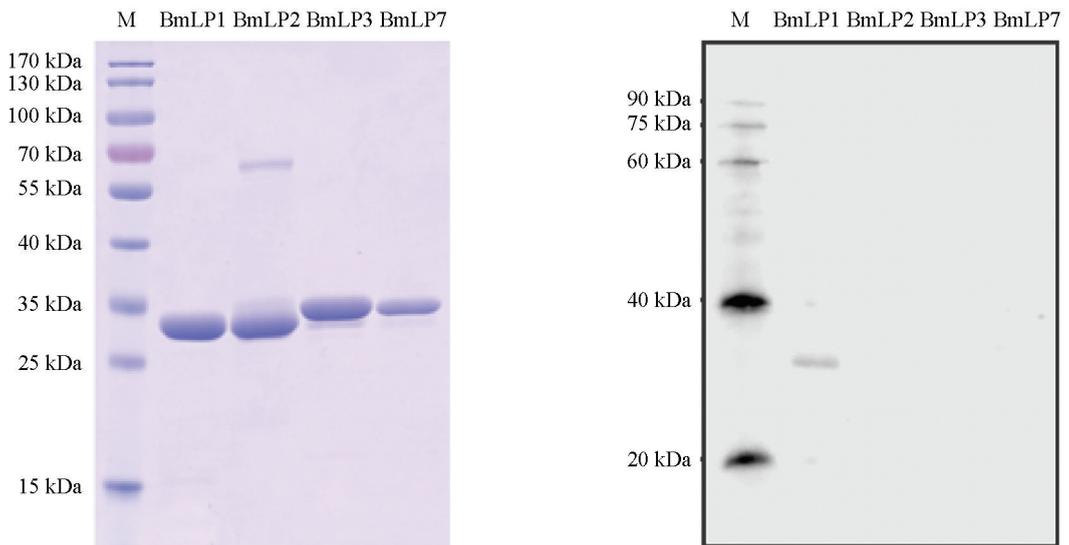


图 2 3 个 30K 蛋白基因在脂肪体中的表达模式图

2.3 BmLP1 抗体的特异性检测

为了在蛋白水平上检测 BmLP1 的含量表达情况, 利用制备的 BmLP1 抗体进行后续实验. 30K 蛋白是一群序列结构非常相似的家族, 为了检测 BmLP1 抗体的特异性, 用已获得的原核表达蛋白进行检测. 如图 3a 所示, 对 BmLP1, BmLP2, BmLP3 和 BmLP7 的重组蛋白进行凝胶电泳, 发现 BmLP1 和 BmLP2 的分子量比 BmLP3 和 BmLP7 略小. 利用 BmLP1 抗体与这 4 种蛋白进行孵育, 发现 BmLP1 抗体只能识别 BmLP1 蛋白, 表明 BmLP1 抗体特异性较好.



a. 4 个蛋白的 SDS-PAGE 检测

b. 4 个蛋白的 Western blotting 检测

图 3 BmLP1 抗体特异地识别 BmLP1 蛋白

2.4 BmLP1 在血液和卵巢中的表达情况

由于脂肪体合成的分泌性蛋白会进入到血淋巴中, 为了探究 BmLP1 蛋白在不同时期血淋巴中的变化情况, 利用 BmLP1 抗体进行了检测, 结果如图 4 所示. 由图 4 可知, BmLP1 蛋白在 5 龄期和蛹前期的家蚕血液中高量存在, 而在蛾期血液中含量较少, 这与脂肪体中的 mRNA 合成情况相似, 表明 BmLP1 是由脂肪体合成后分泌入血液中的. 蛹后期血淋巴中的 BmLP1 逐渐减少, 而卵巢中的 BmLP1 却逐渐增多, 在蛾期的卵巢中含量达到最高. 而 30K 蛋白基因在蛹后期和蛾期的卵巢中根本不表达, 这表明卵巢中的 30K 蛋白并非卵巢本身合成, 而是由血液转运而来^[9].

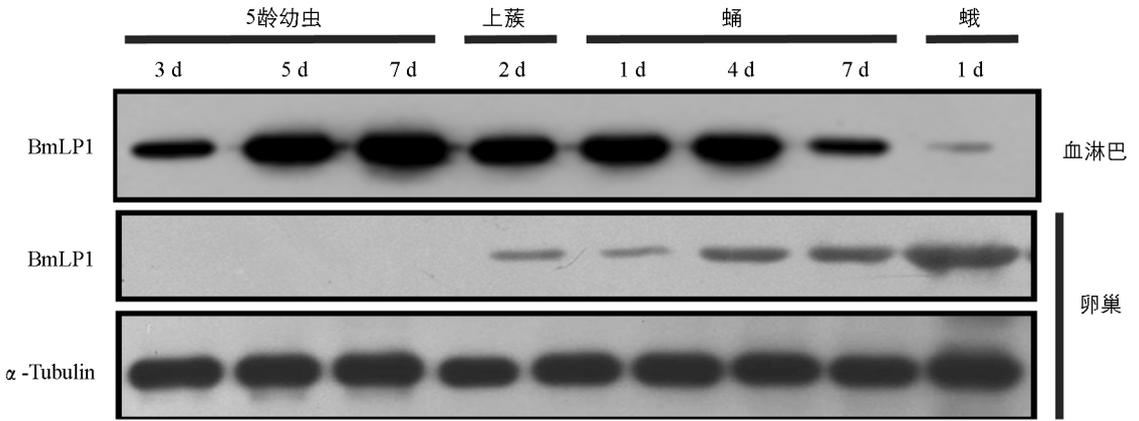


图 4 BmLP1 在血淋巴和卵巢中的变化趋势图

2.5 BmLP1 在胚胎时期的定位分析

BmLP1 蛋白从血液转运进卵巢后, 一直储存在卵巢的未受精卵中, 当家蚕产下卵时, BmLP1 仍然存在于卵中. 为了了解 BmLP1 蛋白在胚胎发育过程中的变化情况, 我们对第 6 d 和第 10 d 的受精卵进行了免疫组织化学定位分析, 结果如图 5 所示. 在卵第 6 d 时, 胚子的雏形可见, 发现 BmLP1 定位于胚子外边的卵黄颗粒中. 当胚胎发育至第 10 d, 即快孵化时, 能明显地看到胚子的形态, 此时, BmLP1 定位于胚子的肠道内. 这表明, BmLP1 最开始定位于胚外的卵黄颗粒中, 但快孵化时, BmLP1 被胚子吞入进了肠道内, 为胚胎的孵化提供氨基酸或能量.

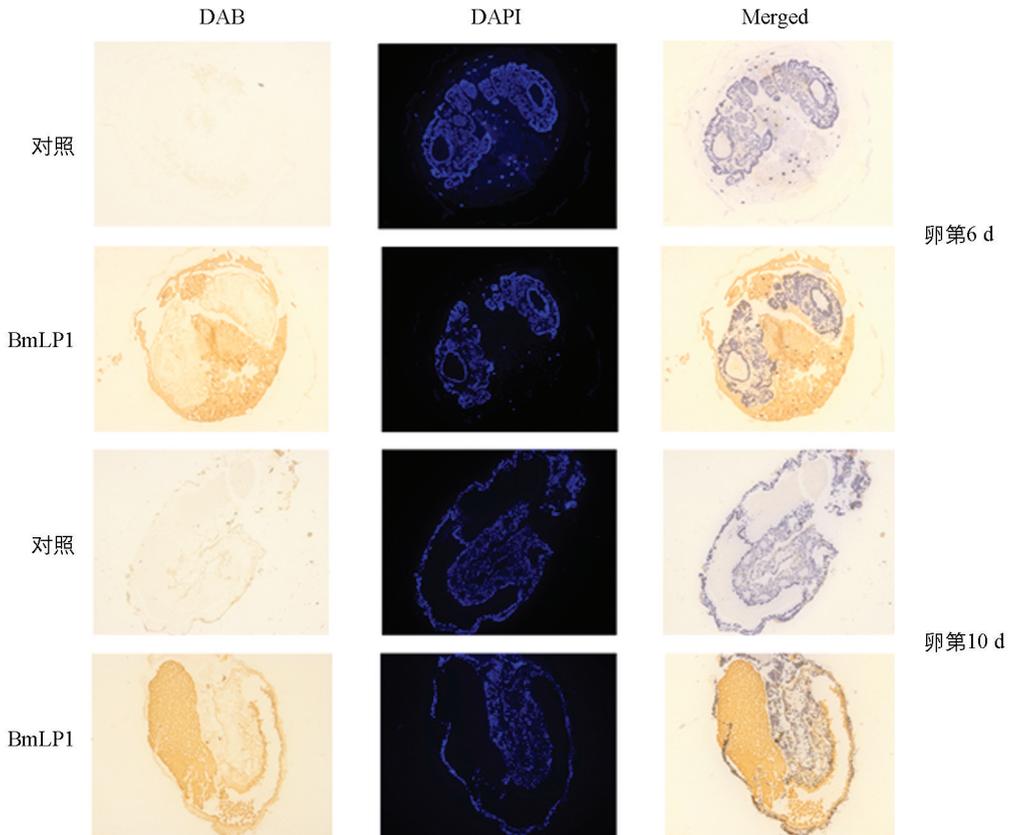


图 5 BmLP1 在不同发育时期卵中的定位

2.6 BmLP1 可以被蚁蚕粗提物降解

在胚胎发育后期, BmLP1 被吞入肠腔内, 猜测肠腔内有蛋白酶可以降解 BmLP1, 最终降解的 BmLP1 可以为胚胎发育提供能量或氨基酸. 为了验证这一猜测, 提取蚁蚕的粗提物, 将蚁蚕粗提物与 BmLP1 进行

孵育, 结果如图 6 所示, 蚁蚕粗提物可以将 BmLP1 水解。

3 讨论与结论

3.1 讨论

在家蚕的末龄幼虫中, 血液重量一般占体质量的 $1/4$ ^[18]. 在 5 龄期幼虫的血液中, 30K 蛋白是含量最大的一群蛋白质之一^[4-5, 9]. 在其他鳞翅目昆虫, 如烟草原天蛾、蓖麻蚕、琥珀蚕和印度柞蚕中也鉴定到了 30K 蛋白的同源基因^[8], 但这些物种的血液中 30K 蛋白的表达量并不高。

本研究选取了在家蚕 5 龄第 7 d 血液中含量最高的典型 30K 蛋白 BmLP1 进行研究, 发现 BmLP1 基因在脂肪体中高量表达, 表明 BmLP1 和其他典型 30K 蛋白均在脂肪体中合成^[19]. 由于 BmLP1 编码的蛋白质具有信号肽, 是一种可分泌蛋白, 在脂肪体中表达的 BmLP1 基因分泌进入血液中, 因此, 在 5 龄期和蛹前期, 血液中 BmLP1 蛋白含量都较高. 但在蛹后期和蛾期, BmLP1 蛋白逐渐减少, 与此同时, 卵巢中的 BmLP1 却开始增加. 卵巢从蛹期开始急剧生长, 卵巢管冲破卵巢膜, 游离于体腔中. 卵在卵巢管中形成, 并从血液中摄取营养以支持其在蛹期的快速生长. BmLP1 被卵巢从血液中吸收并积累到卵中, 作为重要的营养物质.

这些转运进卵巢的 BmLP1 在胚胎发育过程中一直不被利用, 直到胚胎后期才开始减少. XU 等^[21]的研究表明 BmLP1 是通过 BmVgR 转运进卵巢的. 免疫组织化学定位分析结果表明, BmLP1 蛋白一直储存在卵黄颗粒中, 当胚子发育成熟后, 胚子将含有 BmLP1 的卵黄颗粒吞入肠道内. 蚁蚕粗提物孵育实验结果表明, 蚁蚕肠道内存在可以降解 BmLP1 的蛋白酶, 最终将 BmLP1 降解为氨基酸. 这些结果与之前报道的 BmLP3 和 BmLP7 的结果相似^[8], 暗示了典型 30K 蛋白的共同特性: 合成于脂肪体, 分泌入血液, 转运进卵巢, 贮存在卵中, 在蚁蚕孵化前被降解掉.

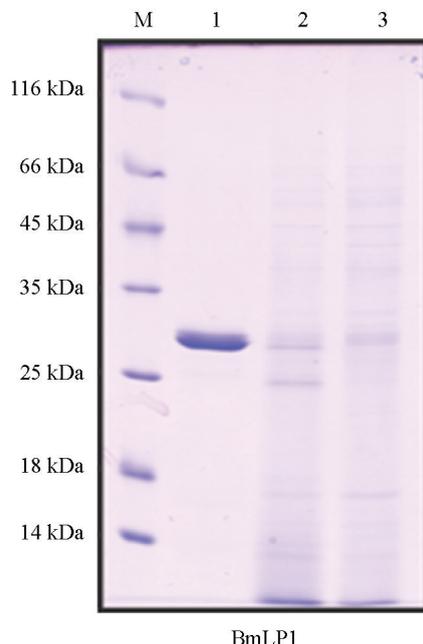
孵育实验结果表明, 蚁蚕粗提物可以将大部分 BmLP1 水解. 2016 年, WANG 等^[15]从家蚕的 5 龄幼虫肠液中纯化到一种碱性丝氨酸蛋白酶 P-IIc, 该蛋白酶最适 pH 值为 11, 最适温度为 25 °C. 碱性丝氨酸蛋白酶 P-IIc 是一个广谱性蛋白酶, 可以水解大部分桑叶蛋白质. 另外, 该蛋白酶在胚胎后期具有很高的表达量, 可以水解卵黄磷蛋白、ESP 蛋白和 30K 蛋白. 值得注意的是, 该蛋白酶可以水解大部分 BmLP1 蛋白, 只能部分水解 BmLP2、BmLP3、BmLP7 和 BmLP8^[15], 表明其对不同底物的活性不同. 因此, 认为家蚕胚胎后期, 肠中的丝氨酸蛋白酶 P-IIc 是导致 30K 蛋白 BmLP1 降解的主要水解酶.

3.2 结论

本研究发现 30K 蛋白 BmLP1 基因在 5 龄幼虫和蛹期的脂肪体中高量表达, 分泌进入血液中. 随着蛹期卵巢管的萌发, BmLP1 逐渐从血液转运进卵巢. BmLP1 蛋白一直储存在卵巢管的卵中, 最终定位于卵黄颗粒中储存. 当胚子发育成熟后, 胚子将含有 BmLP1 的卵黄颗粒吞入肠道内. 肠道内存在可以降解 BmLP1 的蛋白酶, 最终将 BmLP1 降解为氨基酸, 为胚胎的发育提供营养.

参考文献:

- [1] ZHANG Y, DONG Z M, WANG D D, et al. Proteomics of Larval Hemolymph in *Bombyx mori* Reveals Various Nutrient-Storage and Immunity-Related Proteins [J]. *Amino Acids*, 2014, 46(4): 1021-1031.
- [2] KAWOYU J K, OSIR E O, LAW J H. Physical and Chemical Properties of Microvitellogenin. A Protein from the Egg of the Tobacco Hornworm Moth, *Manduca sexta* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1986, 261(23): 10844-10849.



图中 1 表示 BmLP1; 2 表示 BmLP1+ 蚁蚕粗提物; 3 表示 蚁蚕粗提物。

图 6 蚁蚕粗提物可以降解 30K 蛋白 BmLP1

- [3] KAWOOYA J K, LAW J H. Purification and Properties of Microvitellogenin of Manduca sexta Role of Juvenile Hormone in Appearance and Uptake [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1983, 117(2): 643-650.
- [4] HOU Y, ZOU Y, WANG F, et al. Comparative Analysis of Proteome Maps of Silkworm Hemolymph during Different Developmental Stages [J]. Proteome Science, 2010, 8: 45.
- [5] HOU Y, ZHANG Y, GONG J, et al. Comparative Proteomics Analysis of Silkworm Hemolymph during the Stages of Metamorphosis via Liquid Chromatography and Mass Spectrometry [J]. Proteomics, 2016, 16(9): 1421-1431.
- [6] FAN L F, LIN J R, ZHONG Y S, et al. Shotgun Proteomic Analysis on the Diapause and Non-Diapause Eggs of Domesticated Silkworm *Bombyx mori* [J]. PLoS One, 2013, 8(4): e60386.
- [7] SUN Q, ZHAO P, LIN Y, et al. Analysis of the Structure and Expression of the 30K Protein Genes in Silkworm, *Bombyx mori* [J]. Insect Science, 2007, 14(1): 5-14.
- [8] ZHANG Y, DONG Z M, LIU S P, et al. Identification of Novel Members Reveals the Structural and Functional Divergence of Lepidopteran-Specific Lipoprotein_11 Family [J]. Functional & Integrative Genomics, 2012, 12(4): 705-715.
- [9] ZHANG Y, ZHAO P, LIU H L, et al. The Synthesis, Transportation and Degradation of BmLP3 and BmLP7, Two Highly Homologous *Bombyx mori* 30K Proteins [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2012, 42(11): 827-834.
- [10] SAWADA H, YAMAHAMA Y, MASE K, et al. Molecular Properties and Tissue Distribution of 30K Proteins as Ommatium-Binding Proteins from Diapause Eggs of the Silkworm, *Bombyx mori* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2007, 146(2): 172-179.
- [11] UJITA M, KIMURA A, NISHINO D, et al. Specific Binding of Silkworm *Bombyx mori* 30-kDa Lipoproteins to Carbohydrates Containing Glucose [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2002, 66(10): 2264-2266.
- [12] UJITA M, KATSUNO Y, KAWACHI I, et al. Glucan-Binding Activity of Silkworm 30-kDa Apolipoprotein and Its Involvement in Defense Against Fungal Infection [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2005, 69(6): 1178-1185.
- [13] YE L, ZHANG Y, DONG Z M, et al. Five Silkworm 30K Proteins are Involved in the Cellular Immunity Against Fungi [J]. Insects, 2021, 12(2): 107.
- [14] KIM M Y, SONG H Y, KIM J H, et al. Silkworm 30K Protein Inhibits Ecdysone-Induced Apoptosis by Blocking the Binding of Ultraspiracle to Ecdysone Receptor-B1 in Cultured Bm5 Cells [J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2012, 81(3): 136-147.
- [15] WANG D D, ZHANG Y, DONG Z M, et al. Serine Protease P-IIc is Responsible for the Digestion of Yolk Proteins at the Late Stage of Silkworm Embryogenesis [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2016, 74: 42-49.
- [16] DUAN J, LI R Q, CHENG D J, et al. SilkDB v2.0: A Platform for Silkworm (*Bombyx mori*) Genome Biology [J]. Nucleic Acids Research, 2010, 38(suppl_1): D453-D456.
- [17] THOMPSON J. The CLUSTAL_X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [18] 向仲怀. 蚕丝生物学 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2005.
- [19] IZUMI S, FUJIE J, YAMADA S, et al. Molecular Properties and Biosynthesis of Major Plasma Proteins in *Bombyx mori* [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure, 1981, 670(2): 222-229.
- [20] 浙江农业大学. 蚕体解剖生理学 [M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [21] XU Y Y, SHEN G W, WU J X, et al. Vitellogenin Receptor Transports the 30K Protein LP1 without Cell-Penetrating Peptide, into the Oocytes of the Silkworm, *Bombyx mori* [J]. Frontiers in Physiology, 2023, 14: 1117505.

责任编辑 孙文静

崔玉洁