

家蚕幼虫 5 龄期中肠蛋白质组学

姚慧鹏, 郭爱芹, 何芳青, 鲁兴萌, 吴小锋

浙江大学动物科学学院, 杭州 310029

摘要: 利用双向电泳技术对家蚕幼虫 5 龄期第 2 天、第 5 天和第 7 天的中肠蛋白质进行分离, 并利用 ImageMaster 2D Platinum 对所分离得到的蛋白图谱进行比较, 并对一些蛋白质斑点进行了质谱鉴定。研究发现, 家蚕中肠蛋白质具有区别于家蚕其他组织的明显特征: 蛋白质大多分布在 PI 值 4-8、分子量 20~70 kD 的区域, 且分布不均匀, 主要集中在酸性一侧, 这一特点在家蚕 5 龄期第 7 天的图谱尤为明显。5 龄期家蚕第 2 天的蛋白质斑点数目为 869 个, 而到第 5 天增加到 966 个, 新增蛋白数目 97 个, 进一步观察发现增加的蛋白主要分布在 PI 值 6-9, 分子量 20~40 kD 区间; 随着进入幼虫成熟期, 蛋白质斑点数目明显减少, 第 7 天斑点数为 420 个, 比第 5 天减少了 56.5%。这些结果说明家蚕中肠组织蛋白质组成在 5 龄早、中、晚期经历了较大变化, 暗示这可能与中肠的功能相适应。从 MALDI-TOF-MS 鉴定的斑点发现了构成家蚕中肠组织的一些新的部分结构蛋白和一些可能与消化、吸收相关的蛋白, 还发现一些能够抵御外界微生物入侵的相关蛋白。这些结果为进一步认识家蚕中肠提供了重要的理论基础。

关键词: 家蚕, 中肠, 双向电泳, 质谱

Proteomics of Midgut of Fifth-instar Silkworm Larva

Huipeng Yao, Aiqin Guo, Fangqing He, Xingmeng Lu, and Xiaofeng Wu

College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China

Abstract: We used high resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and ImageMaster 2D platinum techniques to study the total midgut proteins of silkworm, *Bombyx mori* in the 2nd, 5th and 7th day of the fifth instar stage. The characteristics of midgut proteomic differed from other reported silkworm tissues. Most protein spots were unevenly distributed in the area from 20 to 70 kD and PI between 4 and 8. Among them most spots located in acidic area, and this characteristic was observed in the map of midgut in the 7th day. There were 869 spots in the 2D map of midgut in the 2nd day, and 966 in 5th day. During this period, 97 new spots were generated, and mainly located in the area of pI 6-9 with molecular size between 20 and 40 kD. Along with larval maturation, the spots in the map decreased obviously, with 420 in the 7th day, 56.5% less than that of the 5th day. These results indicated that the proteins in the midgut had big change at the early, middle and late 5th stage, implying their adaptation in the larval midgut. Some spots were excised and identified by using MALDI-TOF MS, and they were involved in larval body structure, metabolism and immunity.

Keywords: silkworm, midgut, 2D-electrophoresis, MALDI-TOF MS

Received: March 26, 2007; **Accepted:** April 17, 2007

Supported by: the National Basic Research Program (No. 2005CB121003), the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA10Z159) and the New-Century Training Program Foundation for the Talents (No. NCET-06-0524), Ministry of Education, China.

Corresponding author: Xiaofeng Wu. Tel: +86-571-85971658; Fax: +86-571-86971647; E-mail: wuxiaofeng@zju.edu.cn

国家重大基础研究发展规划项目(No.2005CB121003), 国家高技术研究发展计划项目(863 计划) (No. 2007AA10Z159)和教育部“新世纪人才计划”项目资助。

家蚕(*Bombyx mori*)是我国重要的经济资源昆虫。近年随着家蚕基因组框架图测序工作的完成^[1],作为鳞翅目昆虫的代表物种,家蚕作为模式生物(昆虫)的地位也逐渐被认可,在未来的昆虫生物学和分子生物学研究中将发挥愈来愈重要作用。家蚕中肠是家蚕进行营养物质消化、吸收的重要器官,桑叶中的各种大分子物质如蛋白质、糖类和脂肪类化合物首先在中肠肠液的作用下,消化成小分子化合物而被中肠上皮细胞吸收,通过血液运输到其它组织,参与蚕体各种组织建设和能量代谢。同时中肠也是抵御外来病原微生物的第一道天然屏障。家蚕幼虫期一般分为5个龄期,而5龄期是家蚕大量取食(占整个幼虫期的85%以上)、由幼虫过渡到蛹期的关键时期,家蚕5龄期吸收的营养物质是家蚕一生中营养和能量的最重要来源。因此,分析家蚕5龄期中肠蛋白质的组成和变化不仅有助于阐明家蚕对营养的消化、吸收等机理,而且对进一步认识家蚕的病原防御机制也有重要的参考价值。

家蚕蛋白质组学的研究近年已逐渐展开。沈飞英、颜新培、靳远祥等利用双向电泳对家蚕幼虫的丝腺蛋白质、胚胎和卵黄蛋白分别进行了研究^[2-6],Zhang等利用质谱技术对丝腺组织的总蛋白进行了质谱分析^[7],靳远祥等把双向电泳和质谱结合起来分析和确定了家蚕雌性附腺及其分泌物和Ng突变体之间存在的差异性蛋白^[8,9],而Miao等也利用此技术对5龄家蚕不同时期血液进行了蛋白质组的差异比较^[10]。但关于家蚕中肠蛋白质组学的研究尚没有详细报道。

本文利用双向电泳技术和质谱技术研究分析了家蚕5龄期不同阶段家蚕中肠的蛋白质组成变化,以期为进一步研究家蚕的营养吸收和消化等方面提供基础数据和理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料

家蚕品种:白玉。由浙江大学动物科学学院蚕桑馆提供。孵化后25℃恒温桑叶饲养至成熟结茧。分别解剖5龄第2天、第5天和第7天家蚕幼虫中肠,将中肠组织置于冰冷的0.75%生理盐水,经洗涤后迅速称量后置-80℃保存。

1.2 蛋白质的抽提

准确称取中肠组织220mg,放入离心管并随后加入100 μL的裂解液(8 mol/L的urea,4%的CHAPS,2%的IPG buffer),冰上充分研磨,最后加入400 μL裂解液充分摇匀,放之冰浴30 min,期间每10 min超声处理1 min。然后在15 000 r/min,4℃下离心30 min,小心移除脂肪吸取上清液至另一离心管,并用Bradford法测定蛋白质含量^[11]。然后将样品分装,-80℃冰箱冷冻备用。

1.3 中肠蛋白质的双向电泳分析

取150 μg蛋白质通过clean up试剂进行纯化,然后用150 μL样品溶解液(9 mol/L urea,4% CHAPS,2% IPG buffer,40 mmol/L DTT和40 mmol/L Tris-base)对所得到的纯化样品复溶。然后按照GE公司所示的最新的Ettan IPGphor3等电聚焦系统的方法指南进行第一向固相pH剃度等电聚焦:首先使用24 cm胶条被动水化,时间为12 h(水化液为8 mol/L urea,2% CHAPS,15 mmol/L DTT和0.5% IPG buffer),然后在Ettan IPGphor3上放上样盘,在上样盘中加胶条和覆盖油,放上样杯并且将已经复溶的150 g的样品溶液加入其中,放滤纸和电极,最后设定剃度电压为200 V 1 h,500 V 2 h,1000 V 3 h,1000 V→8000 V 1 h,8000 V 72 000 Vh。聚焦完毕后采用两步平衡法,每步15 min,平衡液为6 mol/L urea,50 mmol/L Tris-HCl,0.07% SDS, and 30% glycerol,1% DTT,第二步平衡时用1.25%碘乙酰胺代替DTT。平衡过后在Ettan DALT six中进行SDS-PAGE电泳,采用的胶浓度均为12.5%,对2-D胶进行银染显色。

1.4 2D图谱分析

蛋白质电泳图谱采用GE公司的ImageScanner2D进行扫描,用Image Master2D platinum分析软件进行图象分析,检测蛋白斑点,预测其分子量、等电点,比较差异蛋白点。

1.5 蛋白点的质谱分析

在得到的双向电泳图谱胶中选取表达量较大的20个蛋白点(9个点在家蚕幼虫的所有时期都出现,8个点只在第2天和第5天出现,1个点在第7天出现,1个点仅在第5天出现,1个点出现在第2天和第7天),手工取点,委托浙江理工大学质谱中心进行质谱测定。每一个蛋白质斑点重复测定3次。质谱仪为ABI公司的4700 Proteomics Analyzer,数据库为当前的

Swissprot 和 NCBIInr 所有动物的数据库(由于家蚕蛋白质数据库中的数据比较少), 搜库软件采用搜库专用软件 GPS Explore™ software, NCBIInr 数据库中 60 分值合格, Swissprot 数据库中 50 分合格。

2 结果与分析

2.1 家蚕 5 龄第 2 天、第 5 天和第 7 天中肠双向凝胶电泳图谱基础分析

图 1、图 2 和图 3 分别是家蚕 5 龄期第 2、5 和 7 天的中肠蛋白质图谱。利用 ImageMaster 2D Platinum 软件对图谱进行分析, 结果表明家蚕中肠蛋白质具有区别于家蚕其他组织的明显特征: 多数蛋白质分布在等电点 4~8、分子量 20~70 kD 的区域之间, 而且分布不均匀, 酸性一侧分布较多, 而在碱性区域分布较少, 另外分子量较大的蛋白质斑点较多, 这在第 7 天的蛋白质图谱中尤为明显。5 龄期家

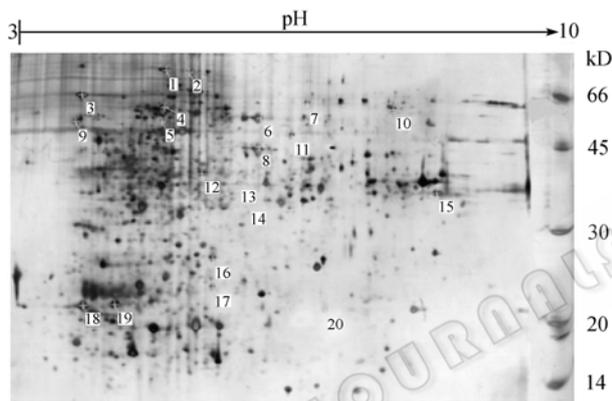


图 1 家蚕 5 龄期第 2 天中肠蛋白双向电泳图谱

Fig. 1 2-D protein map of midgut of silkworm in the 2nd of the fifth instar

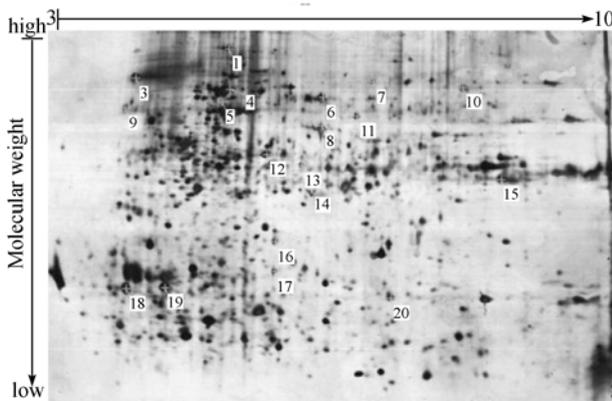


图 2 家蚕 5 龄期第 5 天中肠蛋白双向电泳图谱

Fig. 2 2-D protein map of midgut of silkworm in the 5th of the fifth instar

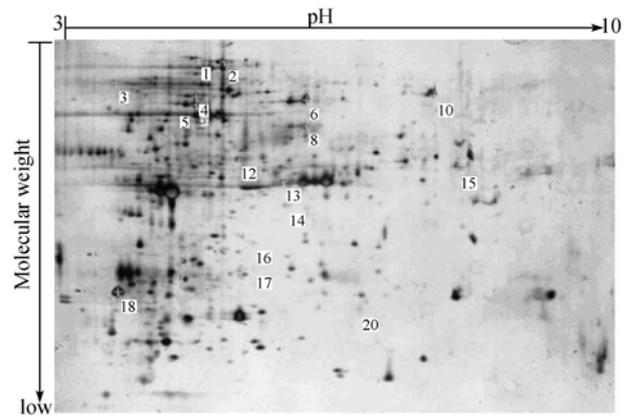


图 3 5 龄期第 7 天家蚕白玉中肠的蛋白双向电泳图谱

Fig. 3 2-D protein map of midgut of silkworm in the 7th of the fifth instar

蚕第 2、5 和第 7 天的蛋白质斑点数目差异较大, 总数目分别为 869 个、966 个和 420 个, 说明家蚕中肠蛋白质组成和代谢在 5 龄早、中、晚期变化较大。

2.2 家蚕 5 龄期的蛋白质斑点的变化情况

家蚕 5 龄第 2 天、第 5 天、第 7 天分别为 5 龄初期、旺食期和成熟期(吐丝前期), 可以说代表了家蚕 5 龄期早、中、晚三个特征时期, 能够较好地反映家蚕 5 龄期及由幼虫过渡到蛹期比较典型的生理生化变化, 尤其是蛋白质的代谢变化情况。

在解剖家蚕中肠的过程中, 我们发现 5 龄期第 2 天和第 5 天的家蚕中肠是比较完整的组织, 而第 7 天的家蚕已进入成熟期, 不再取食桑叶, 中肠在外形和颜色上有了明显变化, 颜色呈现浅黄(说明组织可能开始降解)。对解剖的中肠进行称量, 发现第 2 天和第 5 天平均质量分别是 0.88 g 和 0.89 g, 而在第 7 天平均质量仅为 0.23 g。

以 5 龄第 5 天的中肠蛋白质图谱为参考图谱, 然后把 5 龄期第 2 天和第 7 天的图谱进行比较, 发现大多数共有蛋白质斑点重复性很好, 5 龄期第 2 天和第 5 天图谱重复的蛋白质斑点数为 770 个, 占 5 龄期第 2 天蛋白质斑点总数的 88.6%, 占 5 龄期第 5 天斑点总数的 79.4%, 5 龄期第 7 天和 5 龄期第 5 天的共有斑点为 330 个, 占 5 龄期第 7 天的 78.6%。家蚕从 5 龄期初期到旺食期生长的过程中, 其中肠蛋白质的总数目在逐渐上升, 斑点数目从 869 个升至 966 个, 新增加 97 个斑点, 增加了 11.2%, 而从旺食期后, 家蚕中肠的总蛋白数目迅速下降, 蛋白数目

减少了 546 个, 减少了 56.5%。上述结果表明, 中肠作为家蚕在营养消化、吸收的重要器官, 其蛋白质组成并不是一成不变的, 在 5 龄期前、中、后三个时期蛋白质组成明显不同。这与家蚕 5 龄不同时期中肠的功能变化是一致的。在 5 龄初期和旺食期, 中肠的主要生理功能是对桑叶进行消化并进行吸收, 特别在旺食期, 家蚕大量取食, 代谢旺盛, 消化能力强, 需要大量蛋白质参与。而进入成熟期后, 家蚕摄食减少乃至停止, 中肠的消化和吸收活动也随之减弱直至最后完全丧失。

2.3 MALDI-TOF-MS 质谱分析

从上述图谱挑出 20 个蛋白质斑点进行 MALDI-TOF-MS 分析, 其中成功鉴定了 14 个蛋白质斑点, 分别是蛋白点 2、3、4、5、9、10、11、12、13、14、15、16、17、20(详见图 1-3 和表 1)。从得到的质谱数据可知, 所属蛋白质分别是 HSP7C_DROME(热激 70 kD 蛋白类似物 3)、VATA_MANSE(液泡性 ATP 合成酶催化单位 A)、TBA8_RAT(微管蛋白 α -8 链)、ATPB_DROME(ATP 合成酶 β 亚单位(线粒体))、actin(肌动蛋白)、keratin 1(角蛋白 1)、AGL165Wp、cytoplasmic actin A3a1(胞质型肌动蛋白 A3a1)、arginine kinase(精氨酸激酶)、hemolymph 30k protein (gene 6G1)(血淋巴 30k 蛋白(基因 6G1))、major plasma protein 30K(主要血浆蛋白 30k)、unnamed protein product(未命名蛋白, gi20322)、thiol peroxiredoxin(硫

醇抗氧化蛋白)和 cyclophilin-like protein(类亲和素蛋白)(见表 1)。在这些鉴定的蛋白质质谱的数据结果中, 有 4 个来自于 SwissP rot, 有 10 个来自于 NCBI(见表 1); 三次重复都出现的并且分值比较高的蛋白质质谱数据总共有 9 个(见表 2 到表 10 和图 4), 分别是液泡性 ATP 合成酶催化单位 A、ATP 合成酶 β 亚单位(线粒体)、肌动蛋白、胞质型肌动蛋白 A3a1、精氨酸激酶、血淋巴 30k 蛋白(基因 6G1)、主要血浆蛋白 30k、硫醇抗氧化蛋白、类亲和素蛋白, 占所鉴定蛋白的 45%; 仅有 4 个蛋白质质谱数据来源于家蚕, 分别是血淋巴 30k 蛋白(基因 6G1)、主要血浆蛋白 30k、硫醇抗氧化蛋白和类亲和素蛋白; 除 ATP 合成酶 β 亚单位(线粒体)在家蚕的末期表达量升高外, 其它 13 个蛋白斑点, 肌动蛋白、胞质型肌动蛋白 A3a1、微管蛋白 α -8 链、角蛋白 1、未命名蛋白(gi20322)是中肠蛋白质的骨架蛋白; 热激 70kD 蛋白类似物 3、液泡性 ATP 合成酶催化单位 A、硫醇抗氧化蛋白、AGL165Wp、精氨酸激酶为家蚕的营养提供必要的物质支持和能量来源, 另外血淋巴 30k 蛋白(基因 6G1)、主要血浆蛋白 30k 和类亲和素蛋白可能和家蚕的免疫有关。

3 讨论

家蚕幼虫期是家蚕唯一的取食阶段, 因此研究家蚕幼虫期的消化器官不仅对理解幼虫的消化代谢具有重要的意义, 而且对认识下一阶段的蛹、成虫

表 1 5 龄期家蚕中肠蛋白质斑点鉴定表

Table 1 List of proteins identified from midgut of *Bombyx mori* in the fifth instar

Spot No.	Protein name	Swissprot/NCBI entry	Mr/kD	pI	Protein score	The 2nd day	The 5th day	The 7th day
2	HSP7C_DROME	P29844	72216.5	5.22	68	+	-	+
3	VATA_MANSE	P31400	68122.5	5.14	294	+	+	-
4	TBA8_RAT	Q6AY56	50005.5	4.97	54	+	+	-
5	ATPB_DROME	Q05825	54074.4	5.14	173	-	-	+
9	Actin	Gi156759	41781.7	5.37	136	+	+	-
10	Keratin 1	Gi11935049	66027	8.16	84	+	+	+
11	AGL165Wp	Gi44985702	51093.5	8.77	79	+	+	-
12	Cytoplasmic actin A3a1	Gi19526213	41805.8	5.3	129	+	+	+
13	Arginine kinase	Gi46401516	28915.4	6.39	134	+	+	+
14	Hemolymph 30K protein (gene 6G1)	Gi84791	29642.9	6.33	100	+	+	+
15	Major plasma protein 30K	Gi45685355	27423.7	6.6	157	+	+	+
16	Unnamed protein product	Gi20322	41925.8	5.22	60	+	+	-
17	Thiol peroxiredoxin	Gi38260562	21902.2	6.09	155	+	+	-
20	Cyclophilin-like protein	Gi60592747	17947	7.74	107	-	+	-

“+” indicates high protein expression volume, “-” indicates low protein expression volume or no protein expression

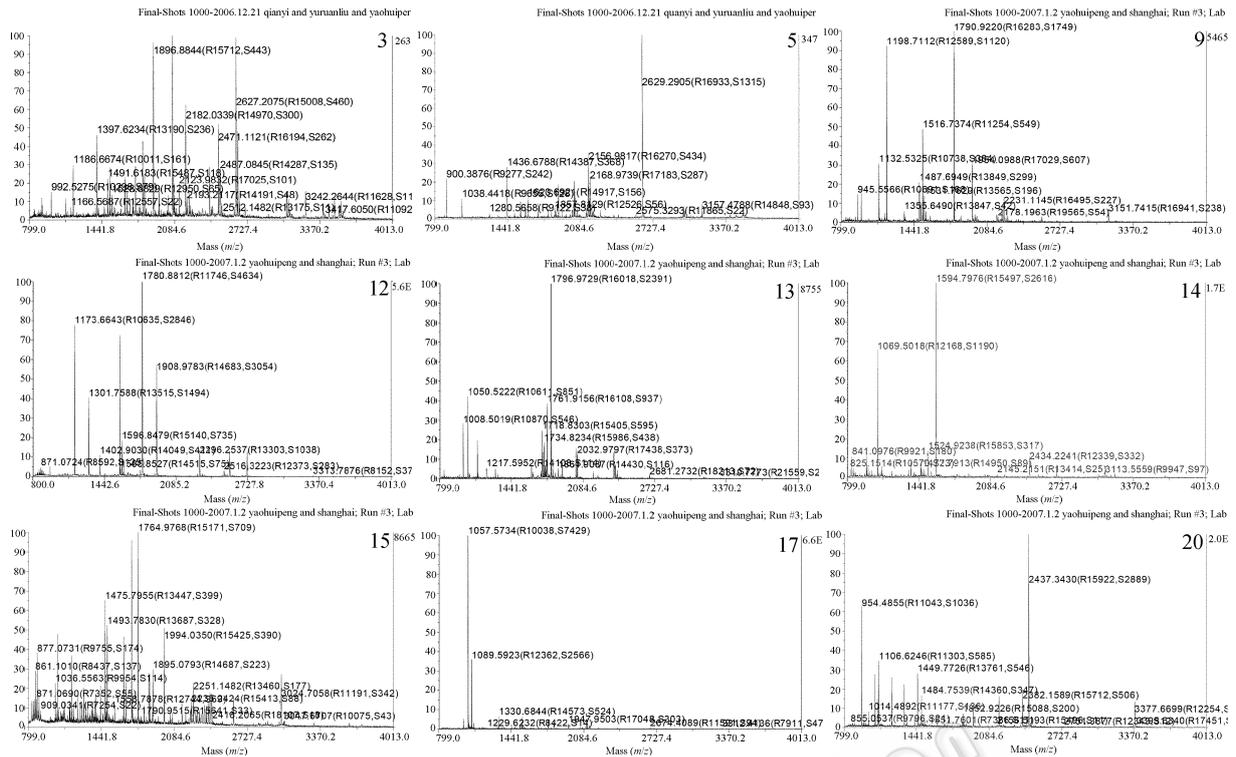


图4 代表性的蛋白点肽质量指纹图谱

Fig. 4 PMF of representative spots

PMF of spot 3, 5, 9, 12, 13, 14, 15, 17 and 20 extracted from 2-DE gel in map

的发育过程中的物质代谢和生命活动也具有参考价值。家蚕幼虫期的消化器官是由口腔到肛门纵贯体腔中的大管道组成,中肠位于食道之后,占消化管道全长的78%,是家蚕消化桑叶的重要器官,5龄期家蚕从前期粗大的长筒形中肠到后期以及蛹期中的完全消失,其组织、功能变化非常明显。除此之外,中肠也是家蚕抵抗病原菌侵染的重要场所,其中的红色荧光蛋白(GFP)是由中肠前部细胞分泌后能够使病毒失活,中肠中某些蛋白质不仅具有消化功能,而且兼之具有某些抗病毒功能,如近年报道的lipase和SP-2蛋白,不仅具有酶的作用而且具有抗病毒功能^[12,13],因此研究家蚕中肠蛋白质组在5龄期的变化对于了解家蚕的营养消化以及其抗病生物学方面具有重要意义。

本研究结果显示,家蚕5龄初期至旺食期,即第2天至第5天,尽管中肠从表观性状,如外形和质量上观察并没有太大的变化,但从本研究的结果可知蛋白质的组成有显著变化,其中在表达量较大的多个特异蛋白质斑点中,质谱测序得到其中一种蛋白质是类亲和素蛋白。虽然在家蚕体内的作用还不

清楚,但在其他动物体内,它是免疫系统中起着免疫作用的一种氧化应激诱导分泌的生长因子,从它在5龄期第2天未能检测到,而在第5天却大量存在,推测它可能与家蚕对外界微生物侵入的防御抵抗上可能发挥重要作用。

家蚕5龄期的初期和旺食期是家蚕中肠发挥其消化作用的主要时期,因此在家蚕5龄期第2天和第5天出现的大多数蛋白点和中肠的消化吸收功能有着紧密的联系,从质谱得到的蛋白可以说明这一点:肌动蛋白、胞质型肌动蛋白A3a1、微管蛋白 α -8链、角蛋白1、未命名蛋白(gi20322)这些蛋白是中肠进行营养、消化食物的骨架蛋白,它们构成了中肠的肌肉层和上皮层的组成成分,而热激70kD蛋白类似物3、液泡性ATP合成酶催化单位A、硫醇抗氧化蛋白、AGL165Wp、精氨酸激酶这些酶或者蛋白的作用是为中肠进行消化和吸收桑叶中的营养物质提供相关能量或者必需的物质和材料(包括相关酶等)。而像血淋巴30k蛋白(基因6G1)和主要血浆蛋白30k这两种蛋白从细胞的功能上看,它们和抑制家蚕细胞的凋亡有着密切的联系,所以似乎和类

亲和素一样, 它们和家蚕对外界的免疫有关。

当家蚕成熟期即吐丝前期到来之时, 对营养消化吸收的生理功能已经完成, 相关这部分的蛋白质表达量自然呈下降的趋势, 推测这是家蚕中肠在第7天的蛋白质斑点数目明显减少的主要原因。因此, 在家蚕5龄期初期和旺食期的许多蛋白表达量在家蚕5龄期末期会下降, 蛋白点的总数目会减少, 像骨架蛋白如肌动蛋白、未命名蛋白(gi20322)在家蚕5龄末期消失, 和中肠消化吸收功能相关的蛋白质像微管蛋白 α -8链、液泡性ATP合成酶催化单位A、AGL165Wp、硫醇抗氧化蛋白也在家蚕5龄末期被降解。这是因为在吐丝结茧前期, 尽可能快地把中肠本身组成的营养物质消化掉是生物进化的本能, 以减少对中肠组织所需物质和能量的消耗和增加对其所含物质和能量的利用。ATP酶是和生物体能量代谢以及细胞功能有重要关系的广泛存在的一类酶, 而ATP合成酶 β 亚单位是定位在线粒体上的ATP酶的催化亚基, 它在可以在 H^+ 的存在条件下把很多的ADP生成ATP。ATP合成酶 β 亚单位在家蚕末期表达量不仅没有降低而且增高, 意味由此生成ATP的增多, 产能的能力增加, 但不是用来像液泡性ATP合成酶催化单位A那样为中肠的消化功能提供能量, 而应该是提供足够的能量, 来降解在家蚕中肠本身的组织蛋白, 从而尽快消化掉已经失去生物功能的家蚕中肠, 而把消化中肠得到的物质和营养供给新生成的组织和器官等。

REFERENCES

- [1] Xia QY, Zhou ZY, Lu Ch, *et al.* A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science*, 2004, **306**(5703): 1937-1940.
- [2] Shen FY, Zhong BX, Lou CF, *et al.* A Comparison of the protein composition of the middle silk gland cell of the fifth instar larvae of silkworm. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, **38**(5): 1053-1058.
沈飞英, 钟伯雄, 楼程富, 等. 家蚕5龄期中部丝腺细胞蛋白质组成分析. *中国农业科学*, 2005, **38**(5): 1053-1058.
- [3] Wu WC, Zhong BX, Meng ZQ, *et al.* Composition analysis of protein from posterior silk gland of silkworm *Bombyx mori* between larvae of 4th molting stage and the 5th instar stage. *Science of Sericulture*, 2005, **31**(3): 273-279.
吴卫成, 钟伯雄, 孟智启, 等. 家蚕4眠期与5龄期后部丝腺细胞蛋白质组成分析. *蚕业科学*, 2005, **31**(3): 273-279.
- [4] Yan XP, Zhong BX, Cao JS, *et al.* Establishment of 2D-PAGE protein patterns of silkworm embryo during incubating stage. *Science of Sericulture*, 2004, **30**(1): 28-30.
颜新培, 钟伯雄, 曹家树, 等. 家蚕催青期胚胎蛋白质图谱的建立. *蚕业科学*, 2004, **30**(1): 28-30.
- [5] Yan XP, Zhong BX, Xu MK, *et al.* Analysis of protein patterns from embryo of silkworm *Bombyx mori* at earlier stage by two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Acta Entomologica Sinica*, 2005, **48**(2): 295-300.
颜新培, 钟伯雄, 徐孟奎, 等. 家蚕催青前期胚胎蛋白质双向电泳图谱分析. *昆虫学报*, 2005, **48**(2): 295-300.
- [6] Jin YX, Xu MK. A Dissertation for Doctor of Philosophy Degree Functional Proteomics Studies on the Colleterial Gland of Silkworm (*Bombyx mori*), 49-50.
靳远祥, 徐孟奎. 博士学位论文(家蚕雌性附腺功能蛋白质组学研究), 49-50.
- [7] Pingbo Zhang, Yoichi Aso, Kohji Yamamoto, *et al.* Proteome analysis of silk gland proteins from the silkworm, *Bombyx mori*. *Proteomics*, 2006, **6**(8): 2586-2599.
- [8] Jin YX, Xu MK, Ch YY, *et al.* Two-dimensional electrophoresis analysis of proteins from the colleterial gland of silkworm(*Bombyx mori* L). *Chinese Journal of Biotechnology*, 2004, **20**(4): 590-593.
靳远祥, 徐孟奎, 陈玉银, 等. 家蚕雌性附腺及其Ng突变体蛋白质组双向电泳图谱分析. *生物工程学报*, 2004, **20**(4): 590-593.
- [9] Jin YX, Xu MK, Ch YY, *et al.* Proteomics analysis of proteins secreted from colleterial gland of silkworm, *Bombyx mori*. *Science of Sericulture*, 2005, **31**(1): 97-99.
靳远祥, 徐孟奎, 陈玉银, 等. 家蚕雌性附腺及其分泌物的蛋白质双向电泳分析. *蚕业科学*, 2005, **31**(1): 97-99.
- [10] Li XH, Wu XF, Yue WF, *et al.* Proteomic analysis of the silkworm (*Bombyx mori* L.) hemolymph during developmental stage. *Proteome Res*, 2006, **5**(10): 2809-2814.
- [11] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248-254.
- [12] Kangayam M.Ponnuvel, Hiroshi Nakazawa. A Lipase isolated from the silkworm shows antiviral activity against NPV. *J.Virol*, 2003, **77**: 10725-10729.
- [13] Nakazawa H, Tsuneishi E. Antiviral activity of a serine protease from the digestive juice of *B.mori* larvae against NPV. *Viol*, 2004, **321**: 154-162.