

褐飞虱和桃蚜粗提液中酚氧化酶原激活系统的激活特点

陈 娇, 徐均焕*, 冯明光

(浙江大学生命科学院微生物研究所 杭州 310029)

摘要: 采用研磨法制备褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stål) 和桃蚜 *Myzus persicae* (Sulzer) 粗提液, 用于研究几种化学因子对粗提液中酚氧化酶原激活系统 (proPO-AS) 的激活特点。结果表明, 在 0.1 ~ 100 mmol/L 的 Ca^{2+} 浓度范围内, 虱液和蚜液的酚氧化酶 (PO) 活性随 Ca^{2+} 浓度升高而增强, 并在 30 mmol/L 处 PO 活性达到最高, 在此限之上 PO 活性反而下降。当昆布多糖浓度从 10^{-4} mg/mL 升至 10 mg/mL 时, 虱液和蚜液的 PO 活性也随之升高, 但再提高昆布多糖浓度却未见 PO 活性的峰顶出现。在 6 种葡聚糖对 PO 的激活作用中, 昆布多糖和酵母聚糖能显著增强 PO 活性, 但 curdlan 对虱液和蚜液的 PO 无明显激活作用, 而甘露聚糖、右旋糖苷和纤维素则降低 PO 活性。这些结果显示 β -1, 3-葡聚糖能有效激活 proPO-AS。 Ca^{2+} 和丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF 加样顺序的不同也会影响 PO 活性。

关键词: 褐飞虱; 桃蚜; 酚氧化酶原激活系统; 酚氧化酶; 昆虫免疫

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2006)02-0194-06

Features of the prophenoloxidase-activating system in crude extracts of *Nilaparvata lugens* and *Myzus persicae*

CHEN Jiao, XU Jun-Huan*, FENG Ming-Guang (Institute of Microbiology, College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: The prophenoloxidase (proPO) activating system (proPO-AS) involved in crude extracts of rice planthopper *Nilaparvata lugens* (Stål) and green peach aphid *Myzus persicae* (Sulzer) was investigated in relation to potentially influential agents. The results showed that as Ca^{2+} concentration increased from 0.1 mmol/L to 100 mmol/L, the activities of phenoloxidase (PO) in the crude extracts of *N. lugens* and *M. persicae* were concentration dependent. The activation of the proPO peaked at 30 mmol/L of the Ca^{2+} concentration. However, a further increase of the Ca^{2+} to 100 mmol/L resulted in a decrease in proPO activation. Incubation of the extracts in conjunction with different concentrations of laminarin (from 10^{-4} mg/mL to 10 mg/mL) witnessed the levels of proPO activation entirely depending on the laminarin concentrations. When different glucans were used as activating agents, laminarin and zysoman significantly enhanced the PO activities whereas the effect of curdlan was not significant compared to a blank control. In contrast, the PO activities were reduced when mannan, dextran or cellulose was added. These results indicated that the β -1, 3-glucan effectively activated the proPO present in the extracts of the two insect species with the proPO-AS selectively responding to different glucans. The sequence of adding Ca^{2+} and phenylmethyl sulfonyl fluorid (a serine protease inhibitor) in the extracts also affected the PO activities.

Key words: *Nilaparvata lugens*; *Myzus persicae*; prophenoloxidase-activating system; prophenoloxidase; insect immunity

酚氧化酶原激活系统 (prophenoloxidase-activating system, proPO-AS) 是昆虫最重要的体液免疫系统之

一, 在抵御异源物入侵、表皮硬化、伤口愈合等重要的生理反应中起作用 (Ashida and Brey, 1998)。该系

基金项目: 国家科技部项目 (G2000016208-04); 国家自然科学基金项目 (30470063); 浙江省自然科学基金项目 (302016)

作者简介: 陈娇, 女, 1980年生, 硕士研究生, 从事昆虫病理学研究, E-mail: chj33@126.com

* 通讯作者 Author for correspondences, Tel.: 0571-86434359; E-mail: xujh@zju.edu.cn

收稿日期 Received: 2005-07-12; 接受日期 Accepted: 2005-11-25

统能被细菌细胞壁上的肽聚糖和脂多糖及真菌细胞壁上的 β -1,3-葡聚糖等微生物所共有而不存在于昆虫体内的分子所激活,产生酚氧化酶(phenoloxidase, PO)。PO 是该系统最重要的功能组分,以无活性的酶原即酚氧化酶原(prophenoloxidase, proPO)的形式存在,经丝氨酸蛋白酶级联反应限制性水解成 PO。PO 为复合功能氧化酶,具有单酚氧化酶(EC 1.14.18.1 单酚:氧化还原酶)和 *o*-双酚氧化酶(EC 1.10.3.1 *o*-双酚:氧化还原酶)活性,能催化酪氨酸转化成多巴再氧化成多巴醌,多巴醌经非酶促转化产生多巴色素,在多巴色素异构酶作用下产生 5,6-二羟吲哚,进而氧化产生黑色素。目前,对 proPO-AS 的研究多集中于较大型昆虫,而较少涉及小型昆虫,因为体型较大的昆虫有丰富的血淋巴和血细胞,便于取血检测,而小型昆虫却难以用常规方法获得大量血淋巴。

虫霉是一类重要的昆虫病原真菌,常引发害虫流行病,具有主动弹射孢子、入侵速度快、侵染力强等特点,是害虫微生物防治的研究热点(冯明光和李增智,1997)。褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stål) 和桃蚜 *Myzus persicae* (Sulzer) 是我国重要的农业害虫,具有个体小、繁殖快、周期短、迁飞扩散能力强等特点,是一些常见虫霉的主要寄主。由于对这些小型昆虫的生理生化和免疫机制缺乏了解,限制了人们对虫霉侵染生物学的深层次认识。本实验以褐飞虱和桃蚜为研究对象,通过研磨法获取昆虫粗提液,研究多种化学因子对粗提液中 proPO-AS 的激活特点,初步建立小型昆虫 proPO-AS 的研究方法,为进一步研究虫霉-小型昆虫免疫互作体系奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 供试虫源

供试用褐飞虱在光照培养箱中($27 \pm 1^\circ\text{C}$, 12L:12D)饲养于无土栽培水稻苗上,桃蚜在温室中($22 \pm 1^\circ\text{C}$, 12L:12D)饲养于网罩盆栽京丰 1 号甘蓝植株上。大量收集成虫,冷藏于 -20°C 冰箱中备用。

1.2 褐飞虱和桃蚜粗提液的制备

取 1 g 冷藏褐飞虱,加入 5 mL 预冷抗凝固缓冲液(62 mmol/L NaCl, 100 mmol/L 葡萄糖, 10 mmol/L EDTA, 30 mmol/L 柠檬酸三钠, 26 mmol/L 柠檬酸, pH 4.6)(Leonard *et al.*, 1985),于玻璃匀浆器中研磨。所得研磨液在 $7\ 370 \sim 14\ 300 \times g$ 下多次离心 15 min,最终所得澄清液即为褐飞虱粗提液,简称虱液。

按同样方法制得澄清桃蚜粗提液,简称蚜液。以上步骤均在 $0 \sim 4^\circ\text{C}$ 下进行。

1.3 PO 活性的测定

PO 的活性以反应底物 L-多巴(L-3,4-dihydroxyphenylalanine, L-DOPA, Sigma)氧化成多巴色素时 490 nm 处的光吸收值表示。取虱液或蚜液 200 μL ,加入 200 μL 水溶液(含 Ca^{2+} 、葡聚糖等化学因子),混合物在 30°C 反应 1 h,再加入 2 mmol/L 多巴溶液 200 μL ,继续反应 10 min,用紫外分光光度计测定 OD_{490} 。一个酶活单位(U)定义为每分钟每毫克蛋白的 OD_{490} 改变 0.001(Söderhäll and Unestam, 1979)。

1.4 Ca^{2+} 浓度对 PO 活性的影响

在 200 μL 粗提液中加入 CaCl_2 溶液,使 Ca^{2+} 浓度分别达到 0.1, 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 和 100 mmol/L,再加入 10 mmol/L 昆布多糖溶液 20 μL , 30°C 反应 1 h 后加入多巴继续反应 10 min,测定 OD_{490} 。以不加 Ca^{2+} 的体系为对照。

1.5 昆布多糖浓度对 PO 活性的影响

在 200 μL 粗提液中加入 100 mmol/L CaCl_2 溶液 50 μL 后,加入不同量的昆布多糖溶液,使其浓度分别达到 10^{-4} 、 10^{-3} 、 10^{-2} 、 10^{-1} 、1 和 10 mg/mL, 30°C 反应 1 h 后加入多巴继续反应 10 min,测定 OD_{490} 。以不加昆布多糖的体系为对照。

1.6 不同葡聚糖对 PO 活性的影响

在 200 μL 粗提液中加入 100 mmol/L CaCl_2 溶液 50 μL 后,分别加入 6 种 10 mmol/L 葡聚糖溶液,即昆布多糖(laminarin)、甘露聚糖(mannan)、右旋糖苷(dextran)、纤维素(cellulose)、curdlan 和酵母聚糖(zymosan)(Sigma),各 20 μL , 30°C 反应 1 h 后加入多巴继续反应 10 min,测定 OD_{490} 。以不加葡聚糖的体系为对照。

1.7 PMSF 对 PO 活性的影响

取 200 μL 粗提液,加 100 mmol/L CaCl_2 溶液 50 μL 后再加入 10 mmol/L PMSF(phenylmethyl sulfonyl fluoride, Sigma)丝氨酸蛋白酶抑制剂溶液 10 μL ,或者先加入 PMSF 再加入 CaCl_2 溶液,冰上反应 5 min 后加入 10 mmol/L 昆布多糖溶液 20 μL , 30°C 反应 1 h 后加入多巴继续反应 10 min,测定 OD_{490} 。以不加 PMSF 的体系为对照。

1.8 蛋白质浓度的测定

蛋白质浓度按考马斯亮蓝染色法测定 OD_{595} 值(Bradford, 1976)。

2 结果与分析

2.1 Ca^{2+} 浓度对 PO 活性的影响

在 0.1 ~ 100 mmol/L 的 Ca^{2+} 浓度范围内, 虱液和蚜液 PO 活性的总体趋势是一致的(图 1): 随着 Ca^{2+} 浓度升高, PO 活性迅速增强, 在 30 mmol/L Ca^{2+} 浓度处达到最高值; 当 Ca^{2+} 浓度进一步增加时, PO 活性反而下降, 但 PO 活性并没有降到 0, 而是维持在较高水平。总体而言, 在相同 Ca^{2+} 浓度下, 蚜液的 PO 活性高于虱液, 如在 30 mmol/L 时, 蚜液的 PO 活性约为虱液的 2 倍。

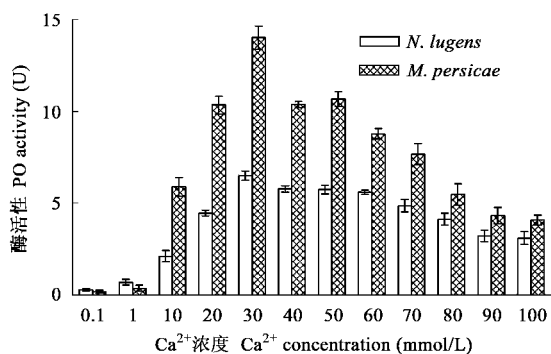


图 1 Ca^{2+} 浓度对虱液及蚜液中酚氧化酶活性的影响

Fig. 1 The effect of different Ca^{2+} concentrations on the phenoloxidase (PO) activities in crude extracts from *Nilaparvata lugens* and *Myzus persicae*

2.2 昆布多糖浓度对 PO 活性的影响

单独的昆布多糖对虱液和蚜液 proPO 没有激活作用, 而单独的 Ca^{2+} 可强烈激活 PO 活性, 当昆布多糖和 Ca^{2+} 共同作用时则激活力更强, 并显著高于 Ca^{2+} 单独激活的 PO 活性(虱液: $F_{3,8} = 234.9$, $P < 0.01$; 蚜液: $F_{3,8} = 256.5$, $P < 0.01$) 表明 Ca^{2+} 为昆布多糖激活 proPO 的必需因子(图 2)。

当 Ca^{2+} 存在时, 随着昆布多糖的浓度从 10^{-4} mg/mL 升高到 10 mg/mL, 虱液和蚜液的 PO 活性也随之升高(图 3)。在 10^{-4} ~ 1 mg/mL 的浓度范围内, 虱液和蚜液的 PO 活性缓慢升高, 且蚜液 PO 活性高于虱液。当昆布多糖浓度升高到 10 mg/mL 时, 虱液 PO 活性迅速升高, 其活性水平高于蚜液, 约为后者的 2 倍。但是进一步提高昆布多糖浓度也未见 PO 活性的峰顶出现(数据省略)。

2.3 不同葡聚糖对 PO 活性的影响

不同葡聚糖对虱液及蚜液的 proPO 激活作用差

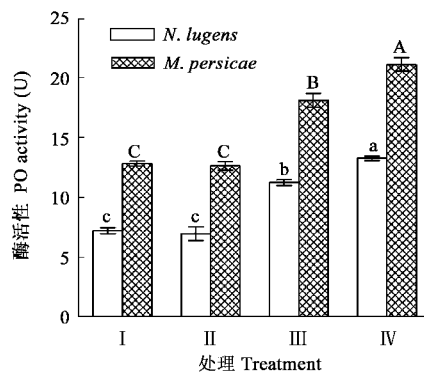


图 2 Ca^{2+} 和昆布多糖对虱液及蚜液中酚氧化酶活性的影响

Fig. 2 The effect of Ca^{2+} and laminarin on the phenoloxidase (PO) activities in crude extracts from

Nilaparvata lugens and *Myzus persicae*

栅顶大小写字母表示各型栅高差异的显著性 Different lower and uppercase letters on the white or shading bars denote significance of the differences among the treatments ($P < 0.05$); 图 4 和图 5 同 The same for Fig. 4 and Fig. 5; I: 双蒸水 ddH₂O; II: 昆布多糖 Laminarin; III: Ca^{2+} ; IV: Ca^{2+} 和昆布多糖混合物 Ca^{2+} - laminarin mixture.

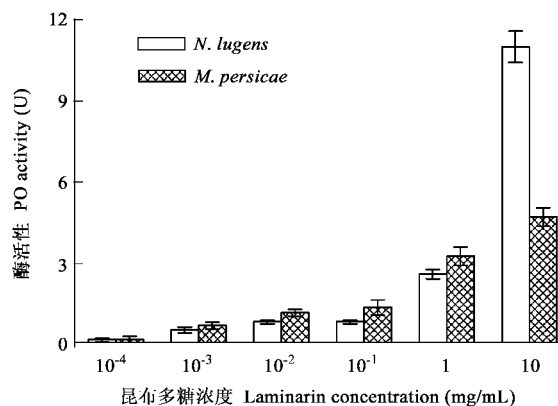


图 3 昆布多糖浓度对虱液及蚜液中酚氧化酶活性的影响

Fig. 3 The effect of different laminarin concentrations on the phenoloxidase (PO) activities in crude extracts from *Nilaparvata lugens* and *Myzus persicae*

异显著(虱液: $F_{6,14} = 93.0$, $P < 0.01$; 蚜液: $F_{6,14} = 41.2$, $P < 0.01$)。其中, 昆布多糖对 proPO 的激活作用最强, 其次为酵母聚糖, 两者的激活作用均显著强于其他葡聚糖。昆布多糖对虱液 proPO 的激活作用显著强于酵母聚糖, 而对蚜液 proPO 的激活作用中, 两者间没有显著差异。与对照相比, Curdlan 对虱液和蚜液都无明显激活作用。甘露聚糖、右旋糖苷和纤维素作用下的虱液及蚜液的 PO 活性处于同

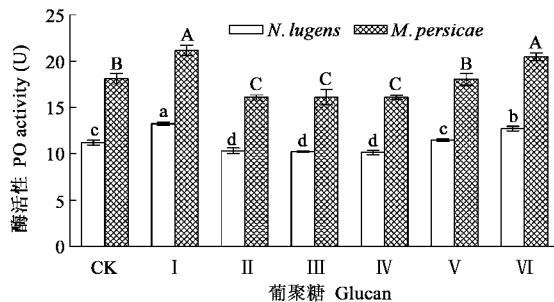


图 4 不同类型的葡聚糖对虱液及蚜液中酚氧化酶活性的影响

Fig. 4 The effect of different types of glucan on the phenoloxidase (PO) activities in crude

extracts from *Nilaparvata lugens* and *Myzus persicae*

CK:对照; I:昆布多糖 Laminarin; II:甘露聚糖 Mannan; III:右旋糖苷 Dextran; IV:纤维素 Cellulose; V:Curdlan; VI:酵母聚糖 Zymosan.

一水平,显著低于对照(图 4)。

2.4 PMSF 对 PO 活性的影响

丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF 和 Ca^{2+} 加样顺序的不同会产生不同的 PO 活性(虱液: $F_{2,6} = 77.3$, $P < 0.01$; 蚜液: $F_{2,6} = 31.4$, $P < 0.01$)。虱液中先加 Ca^{2+} 后加 PMSF,可明显抑制 PO 活性,其活性水平显著低于对照,而先加 PMSF 后加 Ca^{2+} 则不表现上述抑制作用。在蚜液中先加 Ca^{2+} 再加 PMSF 不能抑制 PO 活性,其活性水平与对照相近;而先加 PMSF 再加 Ca^{2+} 的 PO 活性却显著高于对照(图 5)。

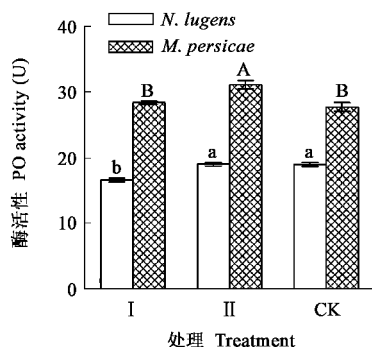


图 5 Ca^{2+} 和丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF 加样顺序对虱液及蚜液中酚氧化酶活性的影响

Fig. 5 The effect of Ca^{2+} and PMSF interaction

on the phenoloxidase (PO) activities in crude extracts

from *Nilaparvata lugens* and *Myzus persicae*

CK:对照; I:先加 Ca^{2+} 后加 PMSF (Ca^{2+} was added to the reaction earlier than PMSF); II:先加 PMSF 后加 Ca^{2+} (PMSF was added to the reaction earlier than Ca^{2+}).

3 讨论

对于 Ca^{2+} 是否为激活 proPO-AS 的必需因子,目前存在两个截然相反的结论。在烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*、埃及伊蚊 *Aedes aegypti*、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 的研究中, Ca^{2+} 并非是激活 proPO-AS 必需的因子(Lockey and Ourth, 1992; Nayar and Bradley, 1994; Hung and Boucias, 1996);而在家蚕 *Bombyx mori*、东亚飞蝗 *Locusta migratoria*、大头折翅蠖 *Blaberus craniifer* 同一系统的激活被证明需要 Ca^{2+} (Ashida et al., 1983; Leonard et al., 1985; Brehélin et al., 1989)。本实验结果显然支持后者。这些矛盾的结果可能与 proPO-AS 制备的来源、提取方式或其他性质有关。此外,对于需要 Ca^{2+} 的激活反应,最高 PO 活性一般在低 Ca^{2+} 浓度下表现,而高 Ca^{2+} 浓度则抑制激活,而且不同昆虫种类的最适 Ca^{2+} 浓度有所不同,如意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 为 $5 \mu\text{mol/L}$ (Zufelato et al., 2004),大蜡螟为 $10 \sim 20 \text{ mmol/L}$ (Dunphy, 1991),灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis* 为 30 mmol/L (Lee and Anstee, 1995)。目前,对于 Ca^{2+} 在 proPO-AS 中的确切功能和作用机制并不很清楚。近年的一些研究表明, Ca^{2+} 可能为丝氨酸蛋白酶级联中某些酶原的转化所需要的,而并不是直接作用于 proPO 的转化(Jiang et al., 1998, 2003a, 2003b; Lee et al., 1998, 2002; Satoh et al., 1999; Kim et al., 2002)。

昆布多糖对虱液和蚜液 proPO-AS 的激活作用依赖于 Ca^{2+} ,而昆布多糖和 Ca^{2+} 共同作用激活的 PO 活性显著高于单独 Ca^{2+} 激活的活性,显示 Ca^{2+} 及其与昆布多糖的互作在 PO 激活方面具有重要作用。这在加州对虾 *Penaeus californiensis* 和黄粉甲 *Tenebrio molitor* 中也有相似报道(Gollas-Galván et al., 1997; Lee et al., 2002; Zhang et al., 2003)。在 Ca^{2+} 存在时,虱液和蚜液的 PO 活性都随着昆布多糖浓度的增加而升高,甚至在昆布多糖浓度高达 50 mmol/L 时,PO 继续升高,而 50 mmol/L 已远高于其他昆虫中所检测的昆布多糖浓度,因此未能找出最高 PO 活性。这不同于其他昆虫中昆布多糖对 proPO-AS 的激活作用,它们都可以找到一个最适昆布多糖浓度,如大头折翅蠖中浓度为 $100 \mu\text{g/mL}$ 时激发最大 PO 活性(Leonard et al., 1985)。从理论上讲,任何免疫系统处理异源物的能力都有个限度,因为宿主不可能无限供应相关的蛋白和辅因子,而且

过度免疫反应造成的伤害可能比异源物造成的损坏更严重,所以存在调控因子来调节免疫反应。由此推测,虱液和蚜液中可能破坏或损失了某些 proPO-AS 的调节因子而使 proPO 不受限制地活化。借鉴他人实验中所用的昆布多糖浓度,本实验采用 1 mg/mL。当昆布多糖在低至 1 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度下仍能有效激活虱液和蚜液 proPO-AS,而大头折翅蠨蛛中有激活作用的昆布多糖浓度甚至低至 10 ng/mL (Leonard *et al.*, 1985)。显然,proPO-AS 是一个非常有效的非自我识别体系,即使对极微量的异源物也能做出免疫反应。

在 6 种葡聚糖中,昆布多糖、酵母聚糖和 curdlan 均为 β -1,3-葡聚糖,甘露聚糖和右旋糖苷为 α -1,6-葡聚糖,纤维素为 β -1,4-葡聚糖。昆布多糖和酵母聚糖能显著增强 PO 活性,curdlan 不能激活 proPO,而甘露聚糖、右旋糖苷和纤维素产生的 PO 活性均显著低于对照。这些结果表明不同类型的葡聚糖对 proPO-AS 具有不同的激活作用; β -1,3-葡聚糖能有效激活 proPO,而其他葡聚糖则不能引发 PO 活性。这与真菌细胞壁中主要由 β -1,3-葡聚糖激活 proPO-AS 的结论是一致的,也表明 proPO-AS 对不同类型葡聚糖的反应是选择性的,如在家蚕中的选择性反应尤为明显(Ashida *et al.*, 1983; Tsuchiya *et al.*, 1996)。

在许多昆虫中,异源物对 proPO 的激活作用可被丝氨酸蛋白酶抑制剂抑制。本研究检测了丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF 对 proPO 激活作用的影响。有趣的是, Ca^{2+} 和 PMSF 加样顺序的不同会产生不同的 PO 活性,其原因目前并不清楚,也未见相关报道,进一步研究揭示 Ca^{2+} 在 proPO-AS 中的作用机制将有助于这一认识的深化。在他人实验中,一般是先加 Ca^{2+} 后加抑制剂,而且在不同动物中不同抑制剂对 proPO-AS 的抑制效果有完全抑制、部分抑制及不抑制之分,有的甚至增强 PO 活性(Arizza *et al.*, 1995; Brivio *et al.*, 1996; Zufelato *et al.*, 2004)。

本研究中检测的并非单纯的血淋巴或血浆或血细胞裂解液中的 proPO,而是整个虫体的研磨液,可能包含了血浆、血细胞、表皮或者组织中的 proPO,因此检测的是总 PO 活性。至于 proPO 在褐飞虱和桃蚜中存在的确切部位有待于进一步研究揭示。综上所述,采用研磨法制取的昆虫粗提液可以应用于 proPO-AS 的研究。

参考文献 (References)

Arizza V, Cammarata M, Tomasino MC, Parrinello N, 1995. Phenoloxidase

characterization in vacuolar hemocytes from the solitary ascidian *Styela plicata*. *J. Invertebr. Pathol.*, 66(3): 297–302.

Ashida M, Ishizaki Y, Iwahana H, 1983. Activation of prophenoloxidase by bacterial cell walls or β -1,3-glucans in plasma of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 113(2): 562–568.

Ashida M, Brey PT, 1998. Recent advances on the research of the insect prophenoloxidase cascade. In: Brey PT, Hultmark D eds. *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects*. New York: Chapman & Hall. 135–172.

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72(1/2): 248–254.

Brehélin M, Drif L, Baud L, Boemare N, 1989. Insect haemolymph: cooperation between humoral and cellular factors in *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.*, 19(3): 301–307.

Brivio MF, Mazzei C, Scari G, 1996. proPO system of *Allogamus auricollis* (Insecta): Effects of various compounds on phenoloxidase activity. *Comp. Biochem. Physiol.*, 113(2): 281–287.

Dunphy GB, 1991. Phenoloxidase activity in the serum of two species of insects, the gypsy moth, *Lymantria dispar* (Lymanthriidae) and the greater wax moth, *Galleria mellonella* (Pyrilidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, 98(4): 535–538.

Feng MG, Li ZZ, 1997. Entomophthorales-caused epizootics: Importance for natural control of insect pests and utilization. In: Fan MZ ed. *Study and Application of Entomogenous Fungi in China*, vol. 4. Beijing: China Agricultural Sciencetech Press. 6–17. [冯明光,李增智,1997. 虫霉流行病及其对害虫种群的天然控制与利用. 见:樊美珍主编. 中国虫生真菌研究与应用. 第4卷. 北京:中国农业科技出版社. 6–17]

Gollas-Galván T, Hernández-López J, Vargas-Albores F, 1997. Effect of calcium on the prophenoloxidase system activation of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comp. Biochem. Physiol.*, 117(3): 419–425.

Hung SH, Boucias DG, 1996. Phenoloxidase activity in hemolymph of naive and *Beauveria bassiana*-infected *Spodoptera exigua* larvae. *J. Invertebr. Pathol.*, 67(1): 35–40.

Jiang HB, Wang Y, Kanost MR, 1998. Pro-phenol oxidase activating proteinase from an insect *Manduca sexta*: A bacteria-inducible protein similar to *Drosophila easter*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(21): 12 220–12 225.

Jiang HB, Wang Y, Yu XQ, Kanost MR, 2003a. Prophenoloxidase activating proteinase-2 (PAP-2) from hemolymph of *Manduca sexta*: A bacteria-inducible serine proteinase containing two clip domains. *J. Biol. Chem.*, 278(6): 3 552–3 561.

Jiang HB, Wang Y, Yu XQ, Zhu YF, Kanost MR, 2003b. Prophenoloxidase-activating proteinase-3 (PAP-3) from *Manduca sexta* hemolymph: A clip-domain serine proteinase regulated by serpin-IJ and serine proteinase homologs. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33(10): 1 049–1 060.

Kim MS, Baek MJ, Lee MH, Park JW, Lee SY, Söderhäll K, Lee BL, 2002. A new easter-type serine protease cleaves a masquerade-like protein during prophenoloxidase activation in *Holotrichia diomphalia*

- larvae. *J. Biol. Chem.*, 277(42): 39 999 – 40 004.
- Lee MJ, Anstee JH, 1995. Phenoloxidase and its zymogen from the haemolymph of larvae of the lepidopteran *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, 110B(2): 379 – 384.
- Lee SY, Kwon TH, Hyun JH, Choi JS, Kawabata S, Iwanaga S, Lee BL, 1998. *In vitro* activation of prophenol-oxidase by two kinds of prophenoloxidase-activating factors isolated from hemolymph of coleopteran, *Holotrichia diomphalia* larvae. *Eur. J. Biochem.*, 254(1): 50 – 57.
- Lee KY, Zhang R, Kim MS, Park JW, Park HY, Kawabata SI, Lee BL, 2002. A zymogen form of masquerade-like serine proteinase homologue is cleaved during pro-phenoloxidase activation by Ca^{2+} in coleopteran and *Tenebrio molitor* larvae. *Eur. J. Biochem.*, 269(17): 4 375 – 4 383.
- Leonard C, Söderhäll K, Ratcliffe NA, 1985. Studies on prophenoloxidase and protease activity of *Blaberus craniifer* haemocytes. *Insect Biochem.*, 15(6): 803 – 810.
- Lockey TD, Ourth DD, 1992. Phenoloxidase activity independent of calmodulin and calcium in hemolymph of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *J. Econ. Entomol.*, 85(4): 1 069 – 1 071.
- Nayar JK, Bradley TJ, 1994. Comparative study of hemolymph phenoloxidase activity in *Aedes aegypti* and *Anopheles quadrimaculatus* and its role in encapsulation of *Brugia malayi* microfilariae. *Comp. Biochem. Physiol.*, 109A(4): 929 – 938.
- Satoh D, Horii A, Ochiai M, Ashida M, 1999. Prophenoloxidase-activating enzyme of the silkworm, *Bombyx mori*: purification, characterization and cDNA cloning. *J. Biol. Chem.*, 274(11): 7 441 – 7 453.
- Söderhäll K, Unestam T, 1979. Activation of serum prophenoloxidase in arthropod immunity: The specificity of cell wall glucan activation and activation by purified fungal glycoproteins of crayfish phenoloxidase. *Can. J. Microbiol.*, 25(3): 406 – 414.
- Tsuchiya M, Asahi NA, Suzuoki F, Ashida M, Matsuura S, 1996. Detection of peptidoglycan and β -glucan with silkworm larvae plasma test. *FEMS Immu. Med. Microbiol.*, 15(2–3): 129 – 134.
- Zhang R, Cho HY, Kim HS, Ma YG, Osaki T, Kawabata SI, Söderhäll K, Lee BL, 2003. Characterization and properties of a 1,3- β -D-glucan pattern recognition protein of *Tenebrio molitor* larvae that is specifically degraded by serine protease during prophenoloxidase activation. *J. Biol. Chem.*, 278(43): 42 072 – 42 079.
- Zufelato MS, Lourenco AP, Simões ZLP, Jorge JA, Bitondi MMG, 2004. Phenoloxidase activity in *Apis mellifera* honey bee pupae, and ecdysteroid-dependent expression of the prophenoloxidase mRNA. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34(12): 1 257 – 1 268.

(责任编辑:黄玲巧)