



## 家蚕天然 Hemolin 蛋白原核表达

杨琳, 耿明星, 江乾森, 刘影, 舒建洪

(浙江理工大学生命科学与医药学院, 杭州 310018)

**摘要:** Hemolin 蛋白是一种类免疫球蛋白, 属于昆虫的一种重要的先天性免疫球蛋白, 家蚕 (*Bombyx mori*) Hemolin 蛋白与其他昆虫的序列具有高度的同源性, 为了进一步分析家蚕 Hemolin 蛋白的功能, 以杆状病毒感染的家蚕蚕蛹为原料, 通过抗体亲和层析获得高纯度的天然 Hemolin 蛋白。结果表明: 重组表达菌株 pET-32a-hemolin 经终浓度为 0.1 mmol/L IPTG 低温诱导后可在大肠杆菌 BL21 中成功表达; 通过镍离子金属螯合亲和层析并经 200 mmol/L 咪唑洗脱可以获得较纯的重组 Hemolin 蛋白; 免疫新西兰大白兔产生特异性多克隆抗体通过蛋白 A 亲和层析柱纯化后可获得高纯度的 Hemolin 抗体, 并经抗体亲和层析获得的天然 Hemolin 蛋白纯度高, 可用于对 Hemolin 蛋白功能的进一步研究。文章提供的分离纯化高纯度家蚕天然 Hemolin 蛋白的方法能够推进天然免疫蛋白的纯化, 为进一步研究家蚕天然 Hemolin 蛋白的晶体结构、蛋白质抑菌功能以及抗病毒活性奠定基础。

**关键词:** 家蚕; Hemolin 蛋白; 克隆; 表达

中图分类号: Q71

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851 (2020) 05-0664-07

## Prokaryotic expression of natural Hemolin protein from *Bombyx mori*

YANG Lin, GENG Mingxing, JIANG Qiansen, LIU Ying, SHU Jianhong

(College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** Hemolin is an immunoglobulin-like protein (immunoglobulin, Ig), which belongs to an important innate immunoglobulin of insects. Hemolin in *Bombyx mori* has high homology with the sequences of other insects. In order to further analyze the function of Hemolin protein in *Bombyx mori*, in this study, baculovirus-infected pupae of *Bombyx mori* were used as raw materials, and high-purity natural Hemolin protein was obtained by antibody affinity chromatography. The results show that the recombinant expression strain pET-32a-hemolin can be successfully expressed in *E. coli* BL21 after low temperature induction by IPTG with a final concentration of 0.1 mmol/L. Relatively pure recombinant Hemolin protein can be obtained through nickel ion metal chelating affinity chromatography and elution with 200 mmol/L imidazole. High-purity Hemolin antibody can be obtained after specific polyclonal antibodies from immunizing New Zealand white rabbits are purified by Protein A affinity chromatography column, and natural Hemolin protein obtained by antibody affinity chromatography has high purity, which can be used for further research on the function of Hemolin protein. The method to separate and purify natural Hemolin protein in this paper can promote purification of natural immunoprotein and lays a foundation for further studying crystal structure, bacteria inhibition function and antiviral activity of natural Hemolin protein in *Bombyx mori*.

**Key words:** *Bombyx mori*; hemolin protein; cloning; expression

收稿日期: 2020-06-08 网络出版日期: 2020-07-09

基金项目: 浙江省重点研发计划项目 (2019C02043)

作者简介: 杨琳 (1994-), 女, 江苏盐城人, 硕士研究生, 主要从事动物疫病防控研究。

通信作者: 舒建洪 E-mail: shujianhong@zstu.edu.cn

## 0 引言

Hemolin 是一种类免疫球蛋白,属于免疫球蛋白超家族<sup>[1-2]</sup>,在昆虫的先天性免疫中起重要作用<sup>[3-4]</sup>,Hemolin 蛋白也参与家蚕的先天性免疫<sup>[5]</sup>。Hemolin 蛋白的马蹄状结构由4个结构域组成,并参与多种细胞相互作用<sup>[6-7]</sup>。Hemolin 类似于一些细胞黏附蛋白<sup>[8-9]</sup>,是一种在免疫中具有潜在作用的昆虫蛋白<sup>[10]</sup>。hemolin 基因转录发生在滞育期<sup>[11]</sup>,主要存在于幼虫的脂肪体中,但在各种昆虫的胚胎和肠中也会发生适量的转录<sup>[12-14]</sup>。Hemolin 可通过碳水化合物和  $\text{Ca}^{2+}$  介导的细胞粘附促进病原体的吞噬作用,Ig 分子参与该过程<sup>[15-16]</sup>。越来越多的证据表明,Hemolin 可被细菌和病毒感染激活表达,从而在抗菌免疫中发挥重要作用<sup>[17-18]</sup>。通过免疫信息学工具分析发现,具有高抗原性的来自家蚕的 Hemolin 蛋白可以作为载体蛋白的候选<sup>[19]</sup>。

家蚕(*Bombyx mori*)是一种以桑叶为食料的鳞翅目丝足昆虫,属无脊椎动物,节肢动物门,蚕蛾科,蚕蛾属桑蚕种<sup>[20]</sup>。家蚕是中国农业经济上重要的昆虫,可被多种病原体感染,尤其是病毒。在惜古比天蚕(*Hyatophora cecropia*)<sup>[21]</sup>、烟草天蛾(*Munduca sexta*)<sup>[22]</sup>、美国白灯蛾(*Hyphantria cunea*)<sup>[23]</sup>、舞毒蛾(*Lymantria dispar*)<sup>[13]</sup>和其他昆虫中的 hemolin 的结构和功能已被广泛研究,但关于家蚕 Hemolin 蛋白的功能研究很少报道。

为了进一步研究 Hemolin 蛋白的功能,需要对天然 Hemolin 蛋白进行大量纯化。Superdex 75 法可用于 Hemolin 的制备,但其获得的 Hemolin 蛋白量太少,不足以满足对 Hemolin 的进一步研究<sup>[24]</sup>。因此,本文克隆并表达家蚕 Hemolin,利用免疫制备的抗体通过抗体亲和层析分离纯化高纯度的天然 Hemolin 蛋白,为后续深入研究该蛋白抗菌和抗病毒活性奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和试剂

新西兰大白兔从杭州师范大学实验动物中心购买,大肠杆菌 TG1、BL21(DE3)和载体 pET-32a(+)由本实验室提供,家蚕(菁松×皓月)购自浙江蚕农基地(中国金华)、KOD-Plus-Neo 高保真 PCR 酶购自 TOYOBO 公司(日本),FastDigest BamHI, XhoI, Ligation High 购自 Thermo Scientific 公司(美国),镍离子螯合琼脂糖凝胶, AminoLink Plus

固定化和 Protein A 富集试剂盒购自 GE 医疗公司(UK),抗 His-Tag 鼠多克隆抗体,HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 购自天津三箭生物科技有限公司,氰基硼氢化物溶液(5 mol/L  $\text{NaN}_3$  和 1 mol/L NaOH),猝灭缓冲液(1 mol/L Tris, pH 7.4),偶联缓冲液(0.1 mol/L 磷酸钠, 0.15 mol/L NaCl, pH 7.2),结合/洗涤缓冲液(0.15 mol/L PBS, pH 7.4),洗脱缓冲液(0.1~0.2 mol/L 甘氨酸, pH 2.5~3.0),洗涤溶液(1 mol/L NaCl)和中和缓冲液(1 mol/L Tris, pH 8.5~9.0)。文中所有溶液自配。

### 1.2 Hemolin 基因的克隆及重组质粒的构建

用 Trizol 试剂(Invitrogen)提取家蚕总 RNA,并用逆转录试剂盒(Thermo Scientific)进行逆转录获得 cDNA。采用以下引物通过 PCR 扩增 hemolin 基因(GenBank 登录号:LOC692643),正向引物:5'-ATCGGATCCATGCAGCCCGTTAATTCGG-3',反向引物:5'-CTGCTCGAGTTAAGCGACTTGAAG-3'。PCR 扩增体系(50  $\mu\text{L}$ )包括:10×PCR Buffer 5  $\mu\text{L}$ , 2 mmol/L dNTPs 5  $\mu\text{L}$ , 25 mmol/L  $\text{MgSO}_4$  3  $\mu\text{L}$ , 正向引物(10  $\mu\text{mol/L}$ ) 3  $\mu\text{L}$ , 反向引物(10  $\mu\text{mol/L}$ ) 3  $\mu\text{L}$ , cDNA 5  $\mu\text{L}$  (100 ng), KOD-Plus-Neo (1 U/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , 加 ddH<sub>2</sub>O 使总体积为 50  $\mu\text{L}$ 。PCR 扩增程序为:预变性,94  $^{\circ}\text{C}$ , 4 min;变性,94  $^{\circ}\text{C}$ , 45 s;退火,56  $^{\circ}\text{C}$ , 45 s;延伸,72  $^{\circ}\text{C}$ , 4 min,共 30 个循环;延伸,72  $^{\circ}\text{C}$ , 4 min。通过琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物条带大小是否符合预期。

PCR 产物经 BamHI 和 XhoI 酶切后克隆到 pET-32a(+)中。经过挑斑筛选和鉴定后获得重组质粒 pET-32a-hemolin。重组质粒进行双酶切鉴定。通过双酶切鉴定的 pET-32a-hemolin 重组质粒送测序公司测序,并用 BioEdit 软件对测序结果进行序列比对,证实重组质粒序列的正确性。将重组质粒转化到大肠杆菌 BL21 中。含有 pET-32a-hemolin 质粒的菌株用 50%甘油保存,并在-80  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.3 重组 Hemolin 的表达与鉴定

在大肠杆菌 BL21(DE3)中诱导表达融合有6×His 标签的 Hemolin 蛋白,诱导表达方法如下:先将表达菌在 10 mL LB 液体培养基中培养过夜以活化菌种,按体积比 1:100 接种到 1 L LB 液体培养基中(1:1000 添加氨苄抗生素母液)37  $^{\circ}\text{C}$  培养 4 h,再添加终浓度为 0.1 mmol/L 的异丙基硫代半乳糖苷(IPTG),于 16  $^{\circ}\text{C}$  诱导表达 12 h。利用 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定蛋白的表达。SDS-PAGE

后,电转印,封闭液(1 g 脱脂奶粉加入到 20 mL 的 TBST 中)封闭 2 h,一抗(抗 His-Tag 鼠多克隆抗体,以 1:3000 比例稀释)孵育过夜,孵育 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG(1:5000 稀释),采用 BeyoECL Plus (P0018) ECL 试剂检测蛋白。

#### 1.4 重组 Hemolin 的纯化

通过镍离子金属螯合亲和层析(His60 Ni Superflow Resin, TaKaRa, China)和凝胶过滤层析(Superdex200, GE Healthcare, USA)纯化 Hemolin 蛋白<sup>[25-26]</sup>,其中镍离子金属螯合亲和层析使用的洗脱液为 His Buffer B(50 mmol/L Tris-HCl, 150 mM NaCl, 300 mmol/L 咪唑,调 pH 值为 8.0 后用 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤,4  $^{\circ}$ C 保存备用),凝胶过滤层析的平衡液和洗脱液一致(200 mmol/L NaCl, 20 mmol/L PB, pH 7.0)。通过 SDS-PAGE 确定目的蛋白的纯度和表达量。

#### 1.5 Hemolin 多克隆抗体的制备和纯化

根据《中华人民共和国动物伦理程序和指南》的规定,经浙江理工大学动物伦理委员会的批准,免疫注射新西兰大白兔并采集血样。纯化的 Hemolin 蛋白在 Montanide ISA 206 佐剂(Seppic, France)中充分乳化,然后免疫新西兰大白兔产生特异性多克隆抗体,每只皮下注射 Hemolin 蛋白 450  $\mu$ g,免疫间隔为 14 d,每只免疫 3 次。第 3 次免疫后,心脏取血采集血清。通过 ELISA 测定 hemolin 多克隆抗体的效价,用 Protein A 柱(GE Healthcare)纯化多克隆抗体。将兔血清与结合缓冲液(NaCl, 0.5 mol/L;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 20 mmol/L; pH 8.0)1:1 混合,用 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤除杂后,用 5 倍体积的结合缓冲液过 Protein A 柱,将准备好的血清样品上样,用结合缓冲液冲洗柱子,直至结合液中不含蛋白,用洗脱液过柱,同时收集漏出液,直至漏出液中不含蛋白。测定各收集管中的蛋白含量,合并蛋白管。在收集的蛋白样品中按照 1:1 体积加入甘油至终浓度为 50%于 -20  $^{\circ}$ C 保存备用。

#### 1.6 抗体亲和层析柱的制备

取空的重力柱,将 2 mL 氨基偶联填料加入每个色谱柱中,用 6 mL 偶联缓冲液平衡。然后将上述纯化的兔多克隆抗体,80  $\mu$ L 终浓度为 100 mmol/L 氰基硼氢化物溶液加入到平衡好的重力柱中,4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,具体方法参考文献<sup>[27]</sup>。

#### 1.7 天然 Hemolin 蛋白的纯化

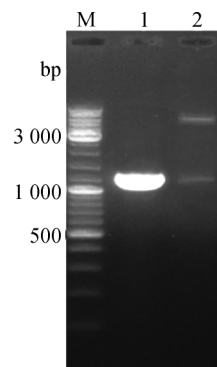
用微量注射器注射杆状病毒( $1 \times 10^5$  个/只)于 5 龄蚕体内,待其结茧成蛹后,将杆状病毒感染的蚕

蛹碾碎。称量样品,并加入 PBS(1:3),将样品冰浴混合 30 min,4  $^{\circ}$ C,12000 r/min 离心 30 min,并通过 4 层纱布过滤两次。收集待纯化的 Hemolin 蛋白缓慢加入上述色谱柱中,将溶液温育 1 h 并用洗涤缓冲液洗涤 5 次,加入 2 mL 洗脱缓冲液,将溶液温育 15 min,用 1 mL 中和缓冲液中和洗脱液,得到纯化的目的蛋白。

## 2 结果与分析

### 2.1 Hemolin 基因的克隆及重组质粒的构建

以 cDNA 为模板 PCR 扩增得约 1.2 kb 的目的 DNA 片段,并通过限制性核酸内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 对目的片段进行双酶切,将酶切过后的特异性片段克隆到同样双酶切的 pET-32a(+)中。用限制性核酸内切酶鉴定重组质粒 pET-32a(+)-hemolin(图 1)。将阳性菌株送至上海生工(中国)进行 DNA 测序,获得的 hemolin 序列通过 NCBI 数据库进行 blast 比对。本文获得的序列与已知的 hemolin 序列(GenBank 登录号:LOC 692643)之间的相似性为 99.7%,证实克隆的序列为 hemolin 基因。

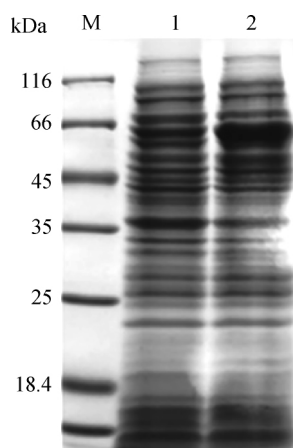


M: DNA Marker; 1: hemolin 的 PCR 产物; 2: *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切 pET-32a-hemolin 的产物

图 1 重组质粒 pET-32a-hemolin 的鉴定

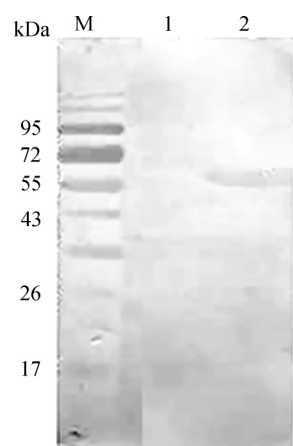
### 2.2 6 $\times$ His 标签的 Hemolin 的表达和纯化

将正确构建的 pET-32a-hemolin 转化到表达菌株大肠杆菌 BL21(DE3)中。在含有抗生素的 Luria-Bertani 培养基中,于 37  $^{\circ}$ C, 220 r/min 的培养条件下培养 4 h 后,添加终浓度为 0.1 mmol/L IPTG 于 16  $^{\circ}$ C 诱导表达过夜,同时制备未诱导的对照组。Hemolin 蛋白本身大小为 44.8 kDa,因 pET-32a 上边有 Trx 标签以及 His 标签,使得最后表达的 Hemolin 蛋白多 18.3 kDa,重组 Hemolin 蛋白的理论值大小应为 63.1 kDa。图 2 是表达的 Hemolin 的 SDS-PAGE 图,图 3 为表达的 Hemolin 的 Western 印迹杂交图,在图 3 中的第二泳道 63.0 kDa 附近有一蛋白印迹条带,其值符合重组蛋白的理论值大小。



M: 蛋白分子量标准; 1: 未诱导含有表达载体 pET-32a-hemolin 的大肠杆菌 BL21; 2: 经 IPTG 诱导的含有表达载体 pET-32a-hemolin 的大肠杆菌 BL21

图 2 SDS-PAGE 检测 Hemolin 在大肠杆菌中的表达



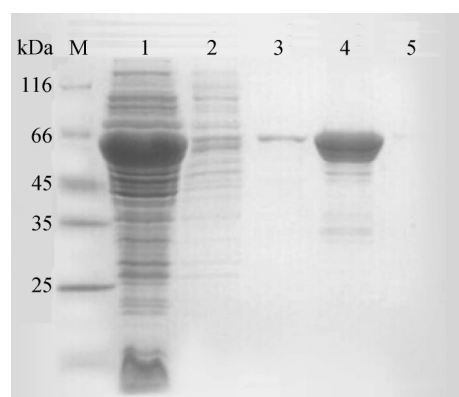
M: 预染蛋白分子量标准; 1: 未诱导含有表达载体 pET-32a-hemolin 的大肠杆菌 BL21; 2: 经 IPTG 诱导的含有表达载体 pET-32a-hemolin 的大肠杆菌 BL21

图 3 Hemolin 的 Western blot 检测

6×His 标签的 Hemolin 通过镍离子金属螯合亲和和层析和凝胶过滤层析纯化, 通过 SDS-PAGE 检测, 结果如图 4 和图 5 所示。图 4 和图 5 显示, 当用 200 mmol/L 咪唑洗脱时, 可以获得较纯的 Hemolin, 在图 5 的泳道 7 中出现一条清晰的大小符合理论值的蛋白条带, 浓度高且纯度好, 说明纯度较高的融合 Hemolin 蛋白出现在第二个峰中。

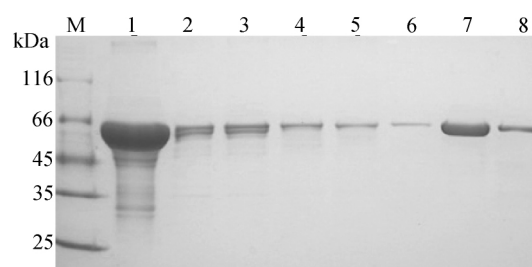
### 2.3 Hemolin 多克隆抗体的制备和纯化

Hemolin 多克隆抗体先通过蛋白 A 柱进一步纯化, 再用蛋白 A 亲和和层析柱进一步纯化 Hemolin 多克隆抗体, SDS-PAGE 检测结果如图 6 所示。由图 6 可知, 在 55 kDa 以及 23 kDa 附近有两条清晰的条带, 分别是 Hemolin 抗体的重链和轻链, 且没有其他杂带, 因此本文纯化的 Hemolin 抗体纯度高, 符合后续实验要求。



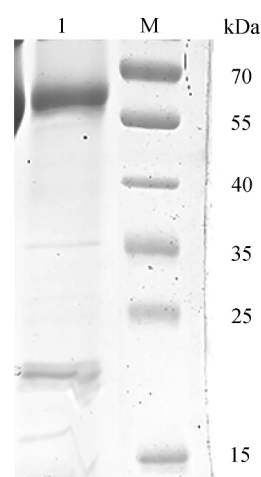
M: 蛋白分子量标准; 1: 预纯化蛋白; 2: 20 mmol/L 咪唑洗脱; 3: 用 50 mmol/L 咪唑洗脱; 4: 用 200 mmol/L 咪唑洗脱; 5: 用 500 mmol/L 咪唑洗脱

图 4 重组 Hemolin 蛋白的纯化



M: 蛋白分子量标准; 1: 未经分离样品; 2-8: Superdex200 收集管中样品

图 5 Superdex200 纯化融合有 6×His 标签的 Hemolin 蛋白的 SDS-PAGE 分析

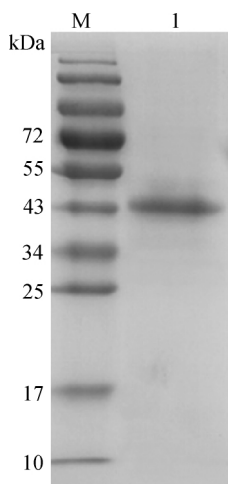


M: 蛋白分子量标准; 1: 第二次纯化后的抗体

图 6 Hemolin 蛋白 pAb 的进一步纯化和鉴定

### 2.4 用抗体亲和柱富集天然 Hemolin

通过抗体色谱柱纯化来自杆状病毒感染的家蚕蛹的天然 Hemolin 蛋白, 并进行 SDS-PAGE 分析。天然 Hemolin 蛋白的理论值大小应为 45 kDa, 在图 7 中的 1 泳道的 44.8 kDa 附近存在清晰的蛋白条带, 且没有杂带, 纯化的蛋白与天然 Hemolin 蛋白的理论值大小一致, 分离的天然 Hemolin 蛋白纯度高。



M: 蛋白分子量标准; 1: 纯化的天然 Hemolin 蛋白

图7 天然 hemolin 的免疫亲和层析纯化

### 3 讨论

Hemolin 是一种与先天性免疫功能相关的蛋白质,最早在罗宾蛾中被发现<sup>[28-30]</sup>。已有大量实验证实 hemolin 在外源微生物入侵时发挥重要作用,在受到病原菌的刺激后识别并结合病菌,通过 hemolin 之间的同嗜性黏着使病原菌与血淋巴细胞结合,血淋巴细胞发生聚集,凝结成块从而延缓病原菌的入侵,在惜古比天蚕蛹中注射细菌后 hemolin 的表达量提高了 18 倍<sup>[31]</sup>,而烟草天蛾幼虫中提高 30~45 倍。Hirai 等<sup>[32]</sup>也证明细菌可以在柞蚕体内诱导 hemolin 的表达。目前研究发现,从家蚕克隆的 hemolin 基因与其他几种昆虫物种同源基因具有高度同源性,表明来自家蚕的 Hemolin 蛋白与其他物种的 Hemolin 具有相似的抗菌活性和抗病毒活性<sup>[33]</sup>。为了达到进一步研究所需的 Hemolin 蛋白的量,需要对天然 Hemolin 蛋白进行制备和纯化。

不同的表达系统具有不同的优缺点,原核表达系统方法简单,能够短时间内获得基因表达产物,而且所需的成本相对比较低廉,本研究通过克隆 hemolin 基因、构建 pET-32a-hemolin 载体,经 SDS-PAGE 以及 Western blotting 验证发现,重组表达菌株 pET-32a-hemolin 经终浓度为 0.1 mmol/L IPTG 低温诱导后可在大肠杆菌 BL21 成功表达。

镍离子金属螯合亲和层析吸附量大,分离条件温和,被广泛应用于分离纯化生物工程蛋白质<sup>[34]</sup>。Ueda 等<sup>[35]</sup>利用镍离子金属螯合亲和层析技术分离了纯度达到 99.5% 的大肠杆菌表达的人催乳素。影响蛋白纯化效果的主要因素是洗脱条件,本研究中分别设置 20、50、200 mmol/L 咪唑以及 500 mmol/L 咪唑

的洗脱条件,经 SDS-PAGE 检测发现,200 mmol/L 咪唑洗脱可以分离纯化较纯的重组 Hemolin 蛋白。

由于对蛋白纯度要求较高且确保纯化的蛋白不失活,所以制备的难度较一般产品较高<sup>[36]</sup>。制备型高效液相色谱法(High performance liquid chromatography, HPLC)可用于产物的最后一步纯化,但是其存在价格昂贵、纯化的量有限、有毒试剂居多等缺点<sup>[37-38]</sup>。抗体亲和层析是利用抗原、抗体之间高度特异性的亲和力进行分离的方法,具有高效、快速、简便的特点,本研究通过纯化的重组 Hemolin 蛋白免疫新西兰大白兔产生特异性多克隆抗体,并通过蛋白 A 亲和层析柱将初步得到的 Hemolin 多克隆抗体进一步纯化,最后通过抗体亲和层析法获得天然 Hemolin 蛋白。通过 SDS-PAGE 分析发现,45 kDa 附近存在清晰的蛋白条带,且与天然 Hemolin 蛋白的理论值一致,该方法获得的天然 Hemolin 蛋白量较多,纯度较高,符合进一步对天然 Hemolin 的研究的要求。

### 4 结论

通过原核表达家蚕 hemolin 蛋白,并通过镍离子金属螯合亲和层析、抗体亲和层析对天然 Hemolin 蛋白纯化,获得以下主要结论:

a) 逆转录家蚕总 RNA 得到 cDNA,PCR 扩增后酶切连接构建重组质粒 pET-32a-hemolin,经测序比对,与已知的 hemolin 序列(GenBank 登录号: LOC 692643)之间的相似性为 99.7%。

b) 重组表达菌株 pET-32a-hemolin 经终浓度为 0.1 mmol/L IPTG 低温诱导后可在大肠杆菌 BL21 中表达大小为 63.1 kDa 的重组 Hemolin 蛋白,重组 Hemolin 蛋白可通过镍离子金属螯合亲和层析进行分离纯化。

c) 将纯化的重组 Hemolin 蛋白以每次 450  $\mu$ g 剂量免疫新西兰大白兔,心脏取血获得的血清可通过蛋白 A 亲和层析柱纯化后获得高纯度的 Hemolin 多克隆抗体。

d) 以感染了杆状病毒( $1 \times 10^5$  个/只)的家蚕蚕蛹为原料,可通过抗体亲和层析获得大小为 44.8 kDa 的高纯度天然 Hemolin 蛋白。

### 参考文献:

- [1] Wang Q, Ren M, Liu X, et al. Peptidoglycan recognition proteins in insect immunity[J]. Mol Immunol, 2019, 106 (45): 69-76.
- [2] Ferrandon D, Imler J L, Hetru C, et al. The Drosophila

- systemic immune response: Sensing and signalling during bacterial and fungal infections [J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(11): 862-874.
- [3] Levitin A, Whiteway M. Drosophila innate immunity and response to fungal infections [J]. *Cell Microbiol*, 2008, 10(5): 1021-1026.
- [4] Su X D, Gastinel L N, Vaughn D E, et al. Crystal structure of hemolin: A horseshoe shape with implications for homophilic adhesion [J]. *Science*, 1998, 281(5379): 991-995.
- [5] Qian C, Wang F, Zhu B, et al. Identification of a hemolin protein from actias selene mediates immune response to pathogens [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 42(1): 74-80.
- [6] Sun Y, Wang L, Qian C, et al. Molecular cloning and expression analysis of a hemolin-like molecule from *Antheraea pernyi* [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 26(1): 65-71.
- [7] Schmidt O, Soderhall K, Theopold U, et al. Role of adhesion in arthropod immune recognition [J]. *Annu Rev Entomol*, 2010, 55(55): 485-504.
- [8] Li W, Terenius O, Hirai M, et al. Cloning, expression and phylogenetic analysis of hemolin, from the chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi* [J]. *Dev Comp Immunol*, 2005, 29(10): 853-864.
- [9] Yu X Q, Kanost M R. Developmental expression of *Manduca sexta* hemolin [J]. *Arch Insect Biochem*, 1999, 42(3): 198-212.
- [10] Terenius O. Hemolin-A lepidopteran anti-viral defense factor? [J]. *Dev Comp Immunol*, 2008, 32(4): 311-316.
- [11] Bettencourt R, Assefaw-redda Y, Faye I. The insect immune protein hemolin is expressed during oogenesis and embryogenesis [J]. *Mech Develop*, 2000, 95(1): 301-304.
- [12] Aye T T, Shim J K, Rhee I K, et al. Upregulation of the immune protein gene hemolin in the epidermis during the wandering larval stage of the Indian meal moth, *Plodia interpunctella* [J]. *J Insect Physiol*, 2008, 54(8): 1301-1305.
- [13] Lee K Y, Horodyski F M, Valaitis A P, et al. Molecular characterization of the insect immune protein hemolin and its high induction during embryonic diapause in the gypsy moth, *Lymantria dispar* [J]. *Insect Biochem Molec*, 2002, 32(11): 1457-1467.
- [14] Sun S C, Lindstrom I, Boman H G, et al. Hemolin: an insect-immune protein belonging to the immunoglobulin superfamily [J]. *Science*, 1990, 250(4988): 1729-1732.
- [15] Bettencourt R, Gunne H, Gastinel L, et al. Implications of hemolin glycosylation and  $Ca^{2+}$ -binding on homophilic and cellular interactions [J]. *Eur J Biochem*, 1999, 266(3): 964-976.
- [16] Lindstrom-dinnetz I, Sun S C, Faye I. Structure and expression of Hemolin, an insect member of the immunoglobulin gene superfamily [J]. *Eur J Biochem*, 1995, 230(3): 920-925.
- [17] Bosch R V, Alvarez-flores M P, Maria D A, et al. Hemolin triggers cell survival on fibroblasts in response to serum deprivation by inhibition of apoptosis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 82(10): 537-546.
- [18] Orozco-flores A A, Valadez-lira J A, Oppert B, et al. Regulation by gut bacteria of immune response, *Bacillus thuringiensis* susceptibility and hemolin expression in *Plodia interpunctella* [J]. *J Insect Physiol*, 2017, 98(3): 275-283.
- [19] Aathmanathan V S, Jothi N, Prajapati V K, et al. Investigation of immunogenic properties of hemolin from silkworm, *Bombyx mori* as carrier protein: An immunoinformatic approach [J]. *Sci Rep-Uk*, 2018, 8(1): 6957.
- [20] 许平震, 张美蓉, 理加伟, 等. 家蚕幼虫消化管的结构和功能及先天免疫研究进展 [J]. *蚕业科学*, 2019, 45(6): 897-901.
- [21] Wang Y, Willott E, Kanost M R. Organization and expression of the hemolin gene, a member of the immunoglobulin superfamily in an insect, *Manduca sexta* [J]. *Insect Mol Biol*, 1995, 4(2): 113-123.
- [22] Dunn P E, Bohnert T J, Russell V. Regulation of antibacterial protein synthesis following infection and during metamorphosis of *Manduca sexta* [J]. *Ann NY Acad Sci*, 1994, 712(15): 117-130.
- [23] Sang W S, Park S S, Park D S, et al. Isolation and characterization of immune-related genes from the fall webworm, *Hyphantria cunea*, using PCR-based differential display and subtractive cloning [J]. *Insect Biochem Molec*, 1998, 28(11): 827-837.
- [24] 杜瑶瑶, 刘玲玲, 王鉴, 等. 用 KTA explorer 10 蛋白纯化系统分离纯化家蚕类免疫球蛋白 [J]. *蚕业科学*, 2013, 39(04): 732-738.
- [25] 杨小猛, 王俊轶, 陈涛, 等. 尘螨肠道微生物蛋白核苷二磷酸激酶的克隆、表达及纯化 [J]. *江西师范大学学报(自然科学版)*, 2014, 38(05): 485-488.
- [26] 钱磊, 张业尼, 陈雪, 等. 大球盖菇漆酶的分离纯化及酶学性质研究 [J]. *生物技术通报*, 2018, 34(4): 127-132.

- [27] B. vijayalakshmi A, Sushrut A, Caroline M, et al. Affinity chromatography as a tool for antibody purification[J]. *Methods*, 2012, 56(2):116-129.
- [28] Chen Y T, Scanlan M J, Sahin U, et al. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening[J]. *P Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(5): 1914-1918.
- [29] Atanackovic D, Altorki N K, Cao Y, et al. Booster vaccination of cancer patients with MAGE-A3 protein reveals long-term immunological memory or tolerance depending on priming[J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(5): 1650-1655.
- [30] Burckstummer T, Bennett K L, Preradovic A, et al. An efficient tandem affinity purification procedure for interaction proteomics in mammalian cells [J]. *Nat Methods*, 2006, 3(12): 1013-1017.
- [31] Lanz-mendoza H, Bettencourt R, Fabbri M, et al. Regulation of the insect immune response; The effect of hemolin on cellular immune mechanisms [J]. *Cell Immunol*, 1996, 168: 47-54.
- [32] Hirai M, Terenius o, Li W, et al. Baculovirus and dsRNA induce Hemolin, but noantibacterial activity, in *Antheraea pernyi* [J]. *Insect Molecular Biology*, 2004, 13(4): 399-405.
- [33] Yamaguchi J, Mizoguchi T, Fujiwara H. siRNAs induce efficient RNAi response in *Bombyx mori* embryos[J]. *Plos One*, 2011, 6(9): e25469.
- [34] 宋超, 吉爱国, 梁浩. 金属螯合亲和层析的应用研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2008(6): 1178-1180.
- [35] Ueda E K, Gout P W, Morganti L. Ni (II)-based immobilized metalion affinity chromatography of recombinant human prolactin from *Periplasmic escheriehia coli*extraets [J]. *J Chromatogr A*, 2001, 922(1-2): 165-175.
- [36] 刘彤, 耿信笃. 基因工程中的液相色谱 [J]. *色谱*, 2000, 18(1): 30-34.
- [37] Nilsson J, Jonasson P, Samuelsson E, et al. Integrated production of human insulin and its C-peptide [J]. *J Biotechnol*, 1996, 48 (3): 241-250.
- [38] Goldman J, Baldwin D, Pugh W, et al. Equilibrium binding assay and kinetic characterization of insulin antibodies[J]. *Diabetes*, 1978, 27(6):653-660.

(责任编辑:唐志荣)