

家蝇抗菌肽 Attacin-2 基因的克隆、序列分析和诱导表达

柳峰松*, 孙玲玲, 唐 婷, 王丽娜

(河北大学生命科学学院, 河北保定 071002)

摘要: 攻击素 (attacin) 作为昆虫抗菌肽之一, 在昆虫的先天免疫中起着重要作用。本研究通过家蝇 *Musca domestica* EST 序列筛选并结合 RACE 技术克隆了家蝇的 Attacin-2 基因 (*Mdatta2*) cDNA 序列。其全长 819 bp, 包含一个 726 bp 的完整开放阅读框 (open reading frame, ORF), 以及 42 bp 的 5' 末端非翻译区 (5' UTR) 和 51 bp 的 3' 末端非翻译区 (3' UTR), 编码 241 个氨基酸残基, 推导的多肽 N 端 22 个氨基酸残基为信号肽序列。同源性分析表明, 其氨基酸序列与嗜凤梨果蝇 *Drosophila ananassae* 的 Attacin 一致性最高 (46%)。以邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建的系统关系表明, 家蝇的 Attacin-2 与其他双翅目昆虫的 Attacin 起源于共同的祖先, 属于 Attain_C 超家族。应用实时荧光定量 PCR 的方法研究家蝇幼虫在受到外源细菌刺激时 *Mdatta2* 基因的表达, 结果显示, 在大肠杆菌 *Escherichia coli* 和金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 分别刺激后 3 h 和 6 h, 家蝇幼虫 *Mdatta2* 表达量出现显著上调。*Mdatta2* 基因在家蝇幼虫体内呈诱导型表达, 表达水平随诱导时间的不同而变化, 提示 *Mdatta2* 基因可能在家蝇免疫防御过程中起着重要作用。

关键词: 家蝇; 抗菌肽; 攻击素; 基因克隆; 基因表达

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2011)01-0027-07

Cloning, sequence analysis and induced expression of attacin-2 gene in housefly (*Musca domestica*)

LIU Feng-Song*, SUN Ling-Ling, TANG Ting, WANG Li-Na (College of Life Sciences, Hebei University, Baoding, Hebei 071002, China)

Abstract: As a member of the antimicrobial peptide family, attacin plays a key role in insect innate immune system. In this study, a cDNA of 819 bp encoding attacin-2 was cloned from housefly (*Musca domestica*) by RACE based on the EST information, and named *Mdatta2*. The cDNA sequence contains a 726 bp open reading frame (ORF) encoding 241 amino acid residues and is flanked by a 42 bp 5' UTR and a 51 bp 3' UTR. The deduced peptide contains a putative signal peptide of 22 amino acids. The amino acid sequence of *Mdatta2* showed the highest identity (46%) with that of *Drosophila ananassae* by Blastp analysis. The phylogenetic tree indicates that the attacin-2 from housefly and those from other dipterans are descended from a single common ancestor and belong to Attain_C superfamily. The expression of *Mdatta2* transcript was measured by real-time PCR. The results demonstrated that after housefly larvae were challenged with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, respectively, the mRNA level of *Mdatta2* at 3 h and 6 h post-challenge was up-regulated and significantly higher than that of the blank control. The expression of *Mdatta2* is inducible, and its expression level varies with the induction time, suggesting that *Mdatta2* may play an important role in housefly defensive system.

Key words: *Musca domestica*; antibacterial peptide; attacin; gene cloning; gene expression profiling

昆虫能够有效地防御病原微生物的入侵, 一个重要原因是体内含有能防御细菌入侵的抗菌肽 (antibacterial peptide) (Imler and Bulet, 2005;

Tanaka *et al.*, 2009)。抗菌肽是生物体内一些具有抗菌活性的小分子多肽, 是防御病原微生物入侵的天然屏障 (Kamysz and Turecka, 2005)。攻击素

基金项目: 教育部高等学校博士学科点专项科研基金项目 (20101301120005); 河北大学自然科学基金项目 (2010001); 河北省自然科学基金项目 (C2008000596)

作者简介: 柳峰松, 男, 1976 年生, 河北任丘人, 博士, 副教授, 从事无脊椎动物分子免疫学研究

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: liufengsong@hbu.edu.cn

收稿日期 Received: 2010-09-02; 接受日期 Accepted: 2010-12-12

(attacin)最早是从惜古比天蚕蛾 *Hyalophora cecropia* 体内发现并分离得到的一类富含甘氨酸的可诱导型抗菌肽 (Hultmark *et al.*, 1983)。研究证明,在鳞翅目和双翅目昆虫中,攻击素与天蚕素(cecropin)、防御素(defensin)以及溶菌酶(lysozyme)等一起构成了昆虫体液免疫防御系统的主体(Fiołka *et al.*, 2005; 王艳等, 2009)。

家蝇 *Musca domestica* 属于世界性分布的昆虫,隶属于昆虫纲(Insecta)双翅目(Diptera)环裂亚目(Cyclorrhapha)蝇科(Muscidae)蝇属 *Musca*,从幼虫到成虫都生活在极其恶劣的环境中,携带着许多病原体,但家蝇本身不受这些病原的感染,所以家蝇必定具有独特而完善的免疫防御机制。对家蝇体内抗菌物质的生化及分子生物学研究表明,其体内存在具有多种抗菌功能的抗菌肽(王远程等, 1992, 1997; 王继恒和曲传智, 2000; 周义文等, 2008)。目前在家蝇中已经鉴定的抗菌肽主要有 5 种:防御素(王来城等, 2003; 许琴英等, 2004; Wang *et al.*, 2006)、攻击素(耿华等, 2004)、天蚕素(金小宝等, 2004; Liang *et al.*, 2006)、溶菌酶(Ren *et al.*, 2009)、双翅肽(diptericin)(柳峰松等, 2009)。目前国内外对双翅目和鳞翅目的攻击素已经展开了较为广泛的研究,研究表明攻击素具有广谱的抗菌活性,但对其抗菌机制还不是很清楚(Kishimoto *et al.*, 2002; 耿华等, 2004; Kwon *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008, 2010)。本文为了进一步研究攻击素的抗菌机制,通过搜索本实验室测得的家蝇转录组数据库,得到一条家蝇 Attacin 基因 EST,采用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆到一条新的家蝇抗菌肽 Attacin-2 基因,并对其在家蝇免疫应答中的表达变化进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 家蝇 *M. domestica* 种蝇由中国科学院动物研究所何凤琴老师惠赠,幼虫由本实验室饲养,饲养温度 25℃,相对湿度 50%~70%。诱导所用大肠杆菌 *Escherichia coli* 和金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 为本实验室所保存。

1.1.2 主要试剂: RNAiso Plus、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、pMD18-T 载体、SYBR Green 为 TaKaRa 公司产品, M-MLV 反转录酶、Taq DNA 聚合酶以及引物均为南京金斯瑞科技有限公司产品。

1.2 家蝇幼虫攻毒试验

参考柳峰松等(2009)的方法,用微生物刺激家蝇:取若干大小均一、用无菌培养基培养的家蝇 3 龄幼虫,分别经新鲜培养的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌菌液($OD_{600} = 1.8$)浸泡 10 min 后,用无菌针刺家蝇幼虫,刺激后直接转入无菌培养基培养,在针刺后 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48 和 60 h 各取 6 头幼虫分别提取总 RNA。

1.3 总 RNA 提取和反转录

按照使用说明书,用 RNAiso Plus (TaKaRa 公司)提取家蝇幼虫总 RNA,经琼脂糖凝胶电泳检测其完整性后,利用核酸定量仪测定其浓度和纯度,各取 2 μ g 总 RNA,以 AOLP[5'-GGCCACGCGTCTCGA CTAGTACT₁₆(G/A/C)-3']为引物反转录合成 cDNA (Liu *et al.*, 2005)。

1.4 家蝇 attacin-2 cDNA 片段验证

根据本实验室家蝇转录组数据库中的 Attacin-2 EST 序列设计特异正向引物 AttaF1 (5'-ATTCAAACGAAATAAACATCAA-3') 和反向引物 AttaR1 (5'-AACCCCTTAAAAGCATGACTTC-3'),以家蝇 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,PCR 反应条件为:94℃ 预变性 4 min; 94℃ 30 s, 57℃ 40 s, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离、切胶回收后,连接 pMD18-T (TaKaRa 公司)载体,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,PCR 筛选阳性克隆后测序。

1.5 家蝇 Attacin-2 基因 3'末端的克隆

采用 RACE 技术,以家蝇 cDNA 为模板,根据已验证的家蝇 Attacin-2 cDNA 片段设计特异引物 AttaF2 (5'-CCGCAACGAGTTTATGTA-3') 与 cDNA 末端接头引物 AP(5'-GGCCACGCGTCTCGACTAGTAC-3'),进行 PCR 扩增,PCR 反应条件为:94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 30 s, 57℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 80 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用同上方法进行克隆测序。

1.6 家蝇 Attacin-2 基因全长 cDNA 克隆

用序列 5'端特异引物 AttaF1 和 3'端特异引物 AttaR2 (5'-GATCATATATTTCTCAAGCTT-3'),以 cDNA 为模板克隆 Attacin-2 全长 cDNA。反应程序为:94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 30 s, 57℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用同上方法进行克隆测序。

1.7 序列分析

将上述测序结果进行比对拼接,利用 Bioedit

软件搜索开放阅读框, 翻译成氨基酸序列, 在 NCBI 网站上利用 Blastp 程序进行相似性比对。应用 ExPASy Molecular Biology Server 上的 ProtParam 程序对推导的多肽序列进行分析。利用 SignalP 3.0 查找信号肽。用 Bioedit 软件分析其成熟肽氨基酸组成。利用 MEGA 4.0 软件对昆虫 attacin, dipteracin 和 sarcotoxin II 等抗菌肽的多肽序列进行多重比对, 通过 NJ (neighbor-joining) 方法构建分子系统树。

1.8 家蝇 Attacin-2 基因的表达定量

以组成型表达的 β -actin 基因作为内参基因, 设计内参基因引物 ActinF (5'-GAGAAATCCTATGAAC TTCCGACG-3') 和 ActinR (5'-GGATACCGCAAGAT TCCATACCCAA-3') 以及目的基因的特异引物 AttaF2 和 AttaR3 (5'-CAGGGAGTTCTTCCAGTC-3'), 利用实时荧光定量 PCR 检测在外源微生物大肠杆菌和金黄色葡萄球菌分别刺激后, Attacin-2 基因随时间的表达量变化。PCR 反应条件: 95℃ 1 min; 95℃ 20 s, 60℃ 10 s, 60℃ 实时采集荧光, 共 45 个循环。测定溶解曲线的反应条件: 60℃ 到 95℃, 每升高 0.5℃ 停留 5 s, 采集荧光。

1.9 数据统计与分析

处理组样本基因的数量用相对定量 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法来表示, 即先用参照基因 β -actin 进行标准化, 然后和

对照组样本基因进行比较。具体方法: $2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-[\Delta C_T(1) - \Delta C_T(2)]}$, 其中 $\Delta C_T(1) =$ 处理组样本基因 C_T - 处理组参照基因 C_T , $\Delta C_T(2) =$ 对照组样本基因 C_T - 对照组参照基因 C_T 。处理组样本基因相对于对照组样本基因的量通过公式 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算得到, 然后再取均值。用 t 检验 ($n=6$) 来比较处理组和对照组的差异, $P < 0.01$ 为极显著差异, $0.01 < P < 0.05$ 为显著差异, $P > 0.05$ 则为无显著差异。

2 结果

2.1 家蝇 Attacin-2 基因 cDNA 全序列及分析

经过同源 PCR 克隆, 获得家蝇 Attacin-2 基因全长 cDNA 序列 819 bp, 此序列包含 726 bp 完整的开放阅读框 (ORF), 5' 末端非翻译区 42 bp, 3' 末端非翻译区 51 bp, PolyA 尾上游 13 个核苷酸处存在典型的加尾信号 AATAAA (图 1)。在 NCBI 进行 Blastp 同源搜索, 比对结果表明所得 Attacin-2 氨基酸序列与嗜凤梨果蝇 *Drosophila ananassae* attacin 氨基酸序列一致性 (identity) 最高 (46%), 与家蝇 Attacin-1 (GenBank 登录号: AAR23786) 氨基酸序列的一致性为 37%, 故将其命名为家蝇 Attacin-2 基因 (*Mdatta2*), GenBank 登录号为 FJ794603。

```

1  ATTCAAACGAAATAAACATCAATTAATAAAATTATAGCCTGAAATGAAAGTGTATTCTATTGTTG6CAGCTTGTGTTG6CATTTTAGCTTTT
      M K C I L L L A A C Y G I L A F
91  GCATCCGTAAACAGAA6CTCA6CC6CAAC6A6TTTTATGTACAAAAATTG6CCATATTATCCACCTCCCACCC666CACCCTCA6CTCAT6AGA
      A S Y T E A Q P Q R V Y Y V Q K L P Y Y P P P T R A P Q L M R
181  GC6C66C6TTCTCC6ATAGTCC6CCCA6A6TTCTG6CATTCAAATTAAGACCAACTC66T6A6CAGCAACATATTCCA66CCCTCG
      A R R S P D S P P P S S G I Q I K T N S V S S N I F T S P S
271  AACAAATTG6ATG6TACC6T6ACCCAAA6TAAAACCTATTTTCCCAATG6ACAATTTTCA6AATCCTCCTC666TTCTTTG6ACT66AA6
      N K L D G T V T Q S K T Y F P N G Q F S E S S S G S L D W K
361  AACTCCCTG66C6TTG6T66TTG6T66T6G6T6G6CATTACCAC666T6CAC6C6ATTCTTTTACAAAATCGTTG66T6TCAAC6CTCTTC
      N S L G V G G S L S R D I T T G H S D S F T K S L G V N V F
451  AACAAAT6AC6AAAC6GTCTG6ATG6CCATG6TATTCAC6GT6C6CACAAA6ACTGAACAATG6TTTTG6TTTCAATAG6AA66T66CTC6
      N N D R N S L D A M Y S Q S H T K L N N G F G F N R E G G S
541  CT6AAAT66ACCAAC6AA66T66ACATG6TCTG6GT6CTG6T6TAC6C6TTTTGAA66CATT66CAA6C66CCTCTATTG6T66CAAC
      L K W T N E G G H G L S A G V T R F E G I G K Q A S I A G N
631  ACAAATCTCTTTACCTCCAATG6ATG6TAATACTC6CTT66ATG6CCTTTT66TCTG6TAC6AAATG6TTAAATG6TCCATTT6AAAATCAA
      T N L F T S N D G N T R L D A F G S G T K W L N G P F E N Q
721  AGAGAATTCAAATTTG66CTTTG6T66AA6TCA6T6CTTTTAA666TTAAGCTT6A6AAATATATG6ATCTTTTAAAATTA6TAAATAAAAA
      R E F N F G F G G S H A F K G *
811  AAAAAAAAA
  
```

图 1 家蝇 Attacin-2 cDNA 及其推导的氨基酸序列

Fig. 1 The complete nucleotide and deduced amino acid sequences of Attacin-2 from *Musca domestica*

加方框 ATG 和 TAA 分别表示起始密码子和终止密码子, AATAAA 为加尾信号, 下划线表示 N 端信号肽。The boxed ATG and TAA indicate the start codon and the stop codon, respectively, the letters AATAAA indicate the polyadenylation signal, and signal peptides at the N-terminal are underlined.

推导的 Mdata2 多肽序列由 241 个氨基酸残基组成, 由 SignalP 3.0 程序预测 N 端含有 22 个氨基酸残基的信号肽。Mdata2 成熟肽由 219 个氨基酸残基组成, 富含 Gly (12.79%)、Ser (13.70%) 和 Asn (9.13%), 理论分子量为 23.63 kD, 理论等电点为 9.77。

Mdata2 基因编码的蛋白与双翅目其他昆虫的 Attacin 有较高的相似性, 应用 Clustal W 程序对几

种双翅目的 Attacin 进行多序列比对, 结果见图 2。利用 MEGA 4.0 软件对昆虫的 Attacin, Sarcotoxin II 和 Dipteracin 等多肽序列以 NJ 法构建的系统关系表明: 本实验得到的家蝇 Attacin-2 和麻蝇 Sarcotoxin II 形成一支, 进化距离最近, 然后又和双翅目其他昆虫的 Attacin 聚在一起, 表明本实验得到的家蝇 Mdata2 属于 Attacin 家族; 而与 Attacin/Sarcotoxin II 家族密切相关的 Dipteracin 则形成一个独立的分支(图 3)。



图 2 家蝇 Attacin-2 与其他物种 Attacin 的多序列比对

Fig. 2 Multiple alignment of amino acid sequences of Attacin-2 with those of other attacins from several insect species

* : 相同的氨基酸 Identical amino acids; :: 相似的氨基酸 Similar amino acids; - : 空位 The gap. 各物种序列及其 GenBank 登录号 The sequences and their GenBank accession numbers are as follows: 家蝇 *Musca domestica* Attacin-2 (ACO35258); 家蝇 *Musca domestica* Attacin-1 (AAR23786); 黑果蝇 *Drosophila virilis* Attacin (XP_002049765); 拟果蝇 *Drosophila simulans* AttacinC (AAP69835); 嗜凤梨果蝇 *Drosophila ananassae* Attacin (XP_001960756).

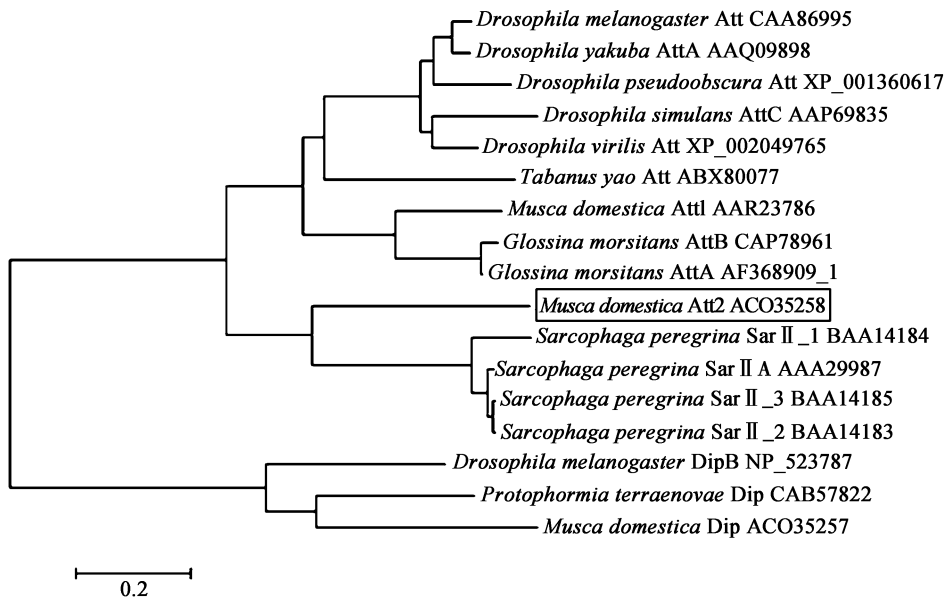


图 3 Attacin_C 超家族抗菌肽系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of the Attacin_C superfamily

物种拉丁名后为序列名及该序列在 GenBank 登录号。Following the species name is the sequence name and its GenBank accession number. Att: Attacin; sar: Sarcotoxin; Dip: Dipteracin.

2.2 Mdatta2 基因的表达

应用实时荧光定量 PCR 技术, 检测家蝇幼虫受大肠杆菌和金黄色葡萄球菌刺激后 Mdatta2 基因的表达, 目的基因和内参 PCR 产物的溶解曲线均为尖锐单峰(图 4), 且各自的溶解温度均一。利用 SPSS 16.0 对实验数据进行分析, Mdatta2 基因的表

达趋势见图 5, 结果表明在未经诱导的家蝇幼虫体内 Mdatta2 基因的表达量极低, 经过菌体刺激后 Mdatta2 基因表达迅速上调, 在 3 h 达到高峰, 6 h 仍有很高的表达, 12 h 逐渐恢复, 60 h 后基本恢复到正常水平。通过 t 检验, Mdatta2 基因表达量在诱导前后具有极显著差异($P < 0.01$)。

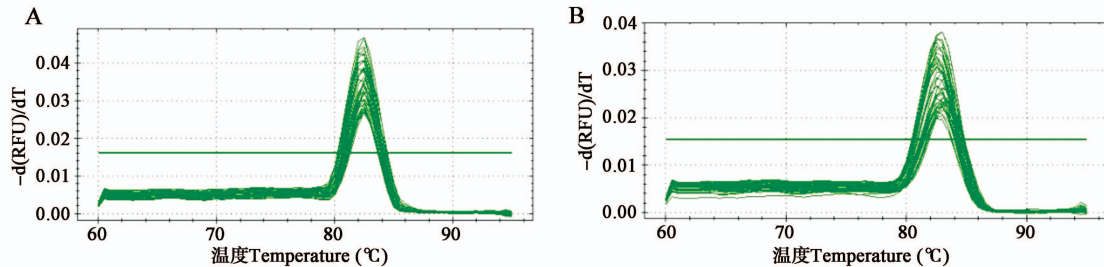


图 4 家蝇 β -actin (A) 和 Mdatta2 (B) 扩增产物溶解曲线

Fig. 4 Melting curve of the PCR products of β -actin (A) and Mdatta2 (B) from *Musca domestica*

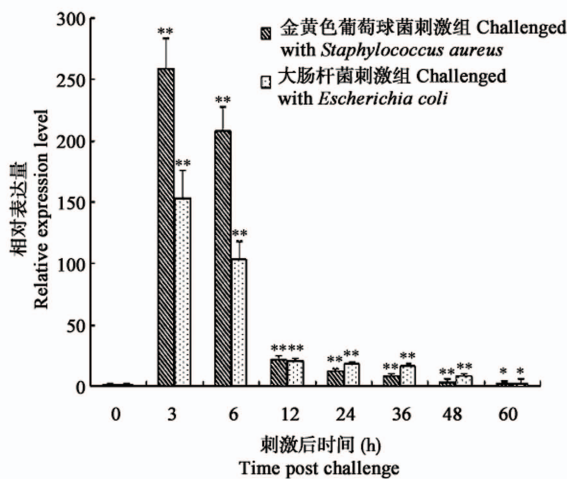


图 5 葡萄球菌和大肠杆菌刺激家蝇幼虫后不同时间 Mdatta2 的表达量分析

Fig. 5 Expression profile of Mdatta2 from *Musca domestica* larvae after challenged with *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*

图中数值为均数 \pm 标准差 The data in the figure are mean \pm SD; ** 与对照差异极显著 (t 检验, $P < 0.01$) Extremely significant difference between the treatment and control (t -test, $P < 0.01$); * 与对照差异显著 (t 检验, $0.01 < P < 0.05$) Significant difference between the treatment and control (t -test, $0.01 < P < 0.05$).

3 讨论

根据氨基酸组成和结构特征, 一般可以把昆虫抗菌肽分为 5 类: 天蚕素类抗菌肽、昆虫防御素类抗菌肽、富含脯氨酸的抗菌肽、富含甘氨酸的抗菌肽、抗真菌肽(宫霞等, 2004)。本研究从家蝇中克

隆了 Mdatta2 基因, 其推导的多肽由 241 个氨基酸组成, 成熟肽含 12.79% 的甘氨酸, 属于富含甘氨酸的抗菌肽家族。分子系统学分析表明 Mdatta2 属于 Attacin_C 超家族。Attacin_C 超家族抗菌肽的 C 端都有一个或两个富含甘氨酸的结构域——G 结构域(G-domain), 因此也被称为富含甘氨酸的一类抗菌肽(glycine-rich antibacterial peptide), 此类抗菌肽被认为主要抗 G^- 菌, 也有抗 G^+ 菌(Brey and Hultmark, 1988)。其杀菌机制可能是: attacin 在脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)的参与下, 抑制细菌一些外膜蛋白基因的转录, 使这些蛋白的合成减少, 从而增加外膜的渗透性, 抑制细菌的生长(Carlsson *et al.*, 1998; Kishimoto *et al.*, 2002)。

家蝇幼虫对不同的细菌刺激有特异性反应, 且经刺激后抗菌蛋白的含量会大量增加(侯利霞等, 2006)。本实验采用实时荧光定量 PCR 的方法, 研究 Mdatta2 基因在诱导不同时间的表达情况, 结果表明, Mdatta2 可受大肠杆菌(G^- 菌)和金黄色葡萄球菌(G^+ 菌)诱导, 在幼虫体内呈显著诱导型表达。这与其他人的研究结果相符合(Xu *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008; 李殿香等, 2010)。在受到大肠杆菌和金黄色葡萄球菌刺激后 3 h 就达到高峰, 这表明 Mdatta2 可能参与了家蝇抗感染免疫过程并在受到病原刺激后能够迅速发挥作用; 不同刺激源诱导结果表明: 大肠杆菌(G^-)和金黄色葡萄球菌(G^+)均可有效诱导虫体 Mdatta2 上调表达, 但金黄色葡萄球菌的诱导作用强于大肠杆菌, 说明本实

验得到的 Mdatta2 可能对革兰氏阳性菌具有更高的特异性。这些结果提示, Mdatta2 是家蝇体液免疫系统中的重要成分并发挥重要作用。对 Mdatta2 基因的克隆和定量的初步研究为今后研究 Mdatta2 蛋白在家蝇的免疫防御体系和生长发育中的作用机理, 以及活性鉴定来确定其应用和开发价值都具有重要意义。

参 考 文 献 (References)

- Brey PT, Hultmark D, 1988. Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects. Chapman & Hall, London. 40 – 66.
- Carlsson A, Nyström T, de Cock H, Bennich H, 1998. Attacinan insect immune protein – binds LPS and triggers the specific inhibition of bacterial outer-membrane protein synthesis. *Microbiology*, 144 (Pt8): 2179 – 2188.
- Fiołka MJ, Ptasińska AA, Czarniawski W, 2005. Antibacterial and antifungal lysozyme-type activity in *Cameraria ohridella* pupae. *J. Invertebr. Pathol.*, 90(1): 1 – 9.
- Geng H, An CJ, Hao YJ, Li DS, Du RQ, 2004. Molecular cloning and expression of attacin from housefly (*Musca domestica*). *Acta Genetica Sinica*, 31(12): 1344 – 1350. [耿华, 安春菊, 郝友进, 李德森, 杜荣寿, 2004. 家蝇攻击素 (Attacin) 基因的克隆与表达. *遗传学报*, 31(12): 1344 – 1350]
- Gong X, Shi YH, Le GW, 2004. Bioactivity and application prospect of insect antibacterial peptides in animal science. *Chinese Journal of Animal Science*, 40(8): 37 – 40. [宫霞, 施用晖, 乐国伟, 2004. 昆虫抗菌肽生物学活性及其应用前景. *中国畜牧杂志*, 40(8): 37 – 40]
- Hou LX, Zhai P, Shi YH, Le GW, 2006. Induced responses on the antibacterial proteins/peptides in the larvae of housefly by different bacteria. *Chinese Bulletin of Entomology*, 43(6): 827 – 831. [侯利霞, 翟培, 施用晖, 乐国伟, 2006. 不同细菌对家蝇幼虫抗菌蛋白/肽的诱导效应. *昆虫知识*, 43(6): 827 – 831]
- Hultmark D, Engström A, Andersson K, Steiner H, Bennich H, Boman HG, 1983. Insect immunity. Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. *EMBO J.*, 2(4): 571 – 576.
- Imler JL, Bulet P, 2005. Antimicrobial peptides in *Drosophila*: structures, activities and gene regulation. *Chem. Immunol. Allergy*, 86: 1 – 21.
- Jin XB, Xu QY, Xu JH, Zhu JY, 2004. Cloning and sequence analysis of the cDNA encoding cecropin an antimicrobial peptide from *Musca domestica* larvae. *China Tropical Medicine*, 4(6): 903 – 907. [金小宝, 许琴英, 徐建华, 朱家勇, 2004. 家蝇幼虫天蚕素基因的克隆与序列分析. *中国热带医学*, 4(6): 903 – 907]
- Kamysz W, Turecka K, 2005. Antimicrobial preservative effectiveness of natural peptide antibiotics. *Acta Pol. Pharm.*, 62(5): 341 – 344.
- Kishimoto K, Fujimoto S, Matsumoto K, Yamano Y, Morishima I, 2002. Protein purification, cDNA cloning and gene expression of attacin, an antibacterial protein, from eri-silkworm, *Samia cynthia ricini*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32(8): 881 – 887.
- Kwon YM, Kim HJ, Kim YI, Kang YJ, Lee IH, Jin BR, Han YS, Cheon HM, Ha NG, Seo SJ, 2008. Comparative analysis of two attacin genes from *Hyphantria cunea*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 151(2): 213 – 220.
- Li DX, Kang CJ, Zhang W, Wang JX, Zhao XF, 2010. Construction of a suppression subtractive hybridization cDNA library to identify differentially expressed genes from *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) larvae. *Acta Entomologica Sinica*, 53(6): 601 – 610. [李殿香, 康翠洁, 张伟, 王金星, 赵小凡, 2010. 家蝇幼虫消减文库的构建及差异表达基因的鉴定. *昆虫学报*, 53(6): 601 – 610]
- Liang Y, Wang JX, Zhao XF, Du XJ, Xue JF, 2006. Molecular cloning and characterization of cecropin from the housefly (*Musca domestica*), and its expression in *Escherichia coli*. *Dev. Comp. Immunol.*, 30(3): 249 – 257.
- Liu F, Liu Y, Li F, Dong B, Xiang J, 2005. Molecular cloning and expression profile of putative antipolysaccharide factor in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Marine Biotechnology*, 7(6): 600 – 608.
- Liu FS, Wang LN, Tang T, Li W, 2009. Cloning and characterisation of the dipterecin gene in *Musca domestica*. *Acta Entomologica Sinica*, 52(10): 1078 – 1082. [柳峰松, 王丽娜, 唐婷, 李伟, 2009. 家蝇抗菌肽 Dipterecin 基因的克隆与分析. *昆虫学报*, 52(10): 1078 – 1082]
- Ren Q, Zhao X, Wang J, 2009. Molecular characterization and expression analysis of a chicken-type lysozyme gene from housefly (*Musca domestica*). *Journal of Genetics and Genomics*, 36(1): 7 – 16.
- Tanaka H, Sagisaka A, Nakajima Y, Fujita K, Imanishi S, Yamakawa M, 2009. Correlation of differential expression of silkworm antimicrobial peptide genes with different amounts of rel family proteins and their gene transcriptional activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73(3): 599 – 606.
- Wang J, Hu C, Wu Y, Stuart A, Amemiya C, Berriman M, Toyoda A, Hattori M, Aksoy S, 2008. Characterization of the antimicrobial peptide attacin loci from *Glossina morsitans*. *Insect Mol. Biol.*, 17(3): 293 – 302.
- Wang JH, Qu CZ, 2000. Progress in insect antimicrobial peptides. *Chinese Journal of Vector Biology and Control*, 11(5): 392 – 395. [王继恒, 曲传智, 2000. 昆虫抗菌肽的研究进展. *中国媒介生物学及控制杂志*, 11(5): 392 – 395]
- Wang JX, Zhao XF, Liang YL, Li L, Zhang W, Ren Q, Wang LC, Wang LY, 2006. Molecular characterization and expression of the antimicrobial peptide defensin from the housefly (*Musca domestica*). *Cell Mol. Life Sci.*, 63(24): 3072 – 3082.
- Wang LC, Wang JX, Wang LY, Zhao XF, 2003. Cloning and sequence analysis of the full-length cDNA encoding defensin, an antimicrobial peptide from the housefly (*Musca domestica*). *Acta Zoologica Sinica*, 49(3): 408 – 413. [王来城, 王金星, 王来元, 赵小凡, 2003. 家蝇防御素基因的 cDNA 克隆及序列分析. *动物学报*, 49(3): 408 – 413]
- Wang LN, Yu B, Han GQ, Chen DW, 2010. Molecular cloning,

- expression in *Escherichia coli* of Attacin A gene from *Drosophila* and detection of biological activity. *Mol. Biol. Rep.*, 37 (5): 2463 - 2469.
- Wang Y, Jin XB, Zhu JY, Zeng AH, Chu FJ, Yang XR, Ma Y, 2009. Expression pattern of antibacterial genes in the *Musca domestica*. *Science in China Series C: Life Sciences*, 39 (7): 685 - 691. [王艳, 金小宝, 朱家勇, 曾爱华, 褚夫江, 杨小蓉, 马艳, 2009. 家蝇抗菌肽基因的表达模式研究. 中国科学 C 辑: 生命科学, 39(7): 685 - 691]
- Wang YC, Liu W, Yang F, Feng GL, 1992. Abstraction of hemolymph of house fly and the inducing of its antibacterial matter. *Acta Microbiologica Sinica*, 32(6): 439 - 444. [王远程, 刘伟, 杨峰, 冯国蕾, 1992. 家蝇血淋巴的提取及抗菌物质的诱导. 微生物学报, 32(6): 439 - 444]
- Wang YC, Zuo XF, Sun DX, Chen JX, Guan ZH, 1997. The assay of composition and physicochemical characteristics of antibacterial matters from housefly larvae. *Acta Microbiologica Sinica*, 37 (2): 148 - 153. [王远程, 左晓峰, 孙东旭, 陈建新, 管致和, 1997. 家蝇幼虫抗菌物质组成及其理化性质. 微生物学报, 37(2): 148 - 153]
- Xu JH, Zhu JY, Jin XB, Xu QY, 2007. Cloning and expression of antibacterial peptide attacin gene isolated from *Musca domestica* larvae and its biological activities. *Journal of Medical Molecular Biology*, 4(1): 20 - 26.
- Xu QY, Jin XB, Xu JH, Zhu JY, 2004. Cloning and sequence analysis of the defensins gene from *Musca domestica* larva. *Journal of Tropical Medicine*, 4(5): 513 - 517. [许琴英, 金小宝, 徐建华, 朱家勇, 2004. 家蝇幼虫抗菌肽 Defensins 基因的克隆与序列分析. 热带医学杂志, 4(5): 513 - 517]
- Zhou YW, Ji SY, Shen P, Tu ZC, Yin YB, Chen H, Meng JP, Wang XZ, Lu L, Chen RS, 2008. Study on immune inducement and antimicrobial activity of *Musca domestica* anti-bacterial peptide. *Chinese Journal of Clinical Laboratory Science*, 26 (1): 24 - 26. [周义文, 姬尚义, 申萍, 涂植光, 尹一兵, 陈辉, 孟江萍, 王小中, 卢亮, 陈如山, 2008. 家蝇抗菌肽的免疫诱导及抗菌活性研究. 临床检验杂志, 26(1): 24 - 26]

(责任编辑: 赵利辉)