

家蚕脂肪体蛋白质组学研究

Proteomics Analysis of Fat Body from Silkworm (*Bombyx mori*)

侯 勇 赵 萍 刘鸿丽 邹 勇 官 建 夏庆友*

HOU Yong, ZHAO Ping, LIU Hong-Li, ZOU Yong, GUAN Jian and XIA Qing-You*

西南大学农业部蚕桑学重点开放实验室 重庆 400716

The Key Sericultural Laboratory of Agricultural Ministry, Southwest University, Chongqing 400716, China

摘 要 通过高精度的双向电泳技术对家蚕末龄幼虫的脂肪体组织进行了研究,采用基质辅助质量飞行时间质谱对其中一些表达量较高的蛋白点进行了鉴定,并利用 GPMW 软件结合家蚕基因组预测的蛋白质数据库构建了本地的肽质量指纹图谱数据库,对所得到的肽质量指纹图谱进行了分析。研究发现,经过双向凝胶电泳及其图象分析技术,银染可以分离出 722 个清晰蛋白点,这些蛋白质主要集中在分子量 15~90 kD 区域,等电点 pH 4~8 之间。MALDI-TOF-MS 鉴定的 41 个蛋白点中都有较强的肽质量指纹信号峰,其中 34 个蛋白点得到了成功鉴定,其中包括了大量参与代谢的酶类、不同分子量的热激蛋白、重要的血液蛋白 30K,Actin3 等,这一结果对人们进一步认识家蚕脂肪体提供了有利的帮助。

关键词 家蚕 脂肪体 双向电泳 MALDI-TOF MS

中图分类号 Q51.5881.2 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)05-0867-06

Abstract High resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, followed by computer-assisted analysis, was applied to investigate the fat body of silkworm, *Bombyx mori*. 722 spots were obtained by silver stain from 18cm pH 3~10 gel. Most of them were distributed in the area from 15 kD to 90 kD with pH 4~8. The matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry were applied for identifying the major spots of the 2D map. A total of 41 spots were excised to identify by a combination of MALDI-TOF MS after digested with trypsin. The result showed among the 34 proteins identified, plenty of them were involved in metabolism and immunity. Additionally, Heat shock proteins, 30K proteins and Actin were also detected in the fat body of silkworm. The result will provide a useful tool for understanding the role of fat body in silkworm.

Key words silkworm, fat body, 2D-electrophoresis, MALDI-TOF MS

家蚕作为鳞翅目昆虫的代表,不仅具有极为重要的经济学价值,而且为人们研究昆虫生理生化和分子生物学提供了良好的材料。家蚕脂肪体是家蚕的重要组织器官,它既是营养物质的贮存场所,又是家蚕体内各种物质代谢的重要器官。它与家蚕体内

循环的血液有着密切的物质交换,为家蚕的生命活动贮存了能量。

家蚕基因组框架图的完成为人们家蚕的研究提供了大量的信息^[1],在此基础上,本实验室对家蚕的脂肪体进行过较为深入的调查研究。程道军曾对

Received: January 1, 2007; Accepted: February 8, 2007.

This work was supported by the grants from the National Basic Research Program of China (No. 2005CB121000), the National Natural Science Foundation (No. 30471313), and the Key Project of Chongqing Science and Technology Commission (No. 2004-8571).

* Corresponding author. Tel: +86-23-68250099; Fax: +86-23-68251128; E-mail: xiaqy@swu.cq.cn

国家重大基础研究发展规划(973 计划)项目(No. 2005CB121000),国家自然科学基金(No. 30471313),重庆市科委重点项目(No. 2004-8571),
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

家蚕不同时期的脂肪体 EST 数据进行过整体分析, 比较了幼虫、蛹、成虫的脂肪体的基因表达差异^[2]。沈以红等人也对五龄 3 天的脂肪体的 EST 进行过拼接和整理^[3]。程廷才等人利用细菌感染后的脂肪体研究了抗菌肽基因表达情况^[4]。他们的研究结果都表明, 脂肪体作为家蚕的重要器官, 参与了许多重要的生命活动。

但是, 仅在信息分析和 cDNA 水平上的研究是难以全面了解到整个生命过程, 很多重要的生物学反应, 如磷酸化、糖基化修饰都是发生在基因的翻译产物—蛋白质的水平上, 因此, 蛋白质组学研究逐渐成为后基因组时代研究的热点。目前, 有关家蚕蛋白质组学方面的研究已有相关报道, 如钟伯雄等对家蚕丝腺进行了蛋白质组学的研究^[5,6]。靳远祥等对家蚕雌性附腺及其分泌物以及 Ng 突变体进行了蛋白质组学研究^[7,8]。颜新培等对家蚕胚胎进行了蛋白质组学研究^[9,10]。2005 年张平波等将家蚕丝腺分为六个部分进行蛋白质组学研究, 鉴定了其中 93 个蛋白点^[11]。同年, 缪云根等对 5 龄家蚕不同时期血液进行了蛋白质组的差异研究^[12]。但是有关家蚕脂肪体的蛋白质组学在国内外的相关报道比较少, 因此, 为了进一步了解家蚕脂肪体的重要生理功能, 本研究利用高精度的双向电泳和质量时间飞行质谱技术对家蚕脂肪体做了初步的研究调查, 发现了大量与代谢和免疫相关的蛋白, 这将为人们在蛋白质水平认识家蚕脂肪体提供有利的参考。

1 材料与方法

1.1 材料

家蚕大造 (P50) 品种, 由西南大学家蚕基因库提供。以桑叶添食饲养到五龄第 5 天取材。

1.2 取材

解剖五龄 5 天幼虫, 将脂肪体组织置于冰冷的 0.75% 生理盐水中洗涤, 迅速放置于离心管中, -80℃ 保存。

1.3 蛋白质的抽提

取出 -80℃ 低温保存的脂肪体组织, 称取约 0.1 g 于研钵中, 加入液氮, 迅速研磨至粉状, 使脂肪体细胞充分被破碎。待组织溶解加入裂解缓冲液 (8 mol/L Urea, 4% CHAPS, 20 mmol/L Tris base, 30 mmol/L DTT, 2% IPG buffer, 0.1% PMSF) 使其充分裂解, 然后在 4℃ 下 40000 g 离心 1 h, 吸取上清并用 Bradford 法定量蛋白^[13], 然后分装至离心管 -80℃ 保存备用。

1.4 脂肪体组织双向电泳分析

按照 IPG phor™ 等电聚焦系统的方法指南进行第一向固相 pH 梯度等电聚焦。采用 7cm 胶条时, 上样量为 60 μg, 聚焦总电压时间为 13 000 (V·h)。使用 18cm 胶条时, 上样量为 150 μg, 选用梯度升压的方法: 50 V 水化 12 h, 100 V 2 h, 200 V 1 h, 500 V 30 min, 1000 V 20 min, 3000 V 20 min, 8000 V 40000 V·h。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。平衡后进行 SDS-PAGE 电泳, 采用的胶浓度均为 12.5% 2-D 胶染色方法为银染。

1.5 2D 图谱分析

蛋白质电泳图谱采用 Amersham 公司的 ImageScanner2D 进行扫描, 用 Image Master2D 分析软件进行图象分析, 检测蛋白斑点, 并预测其分子量、等电点等。

1.6 蛋白点的胶内消化

在 18 cm 双向电泳图谱胶中选取较明显的 41 个蛋白点, 手工取点。分别放置于预先用 milli-Q 和甲醇润洗过的离心管中, 然后加入 50% ACN/NH₄HCO₃ pH8.0 溶液 100~150 μL 洗涤脱色 3 次, 至银的褐色完全褪去后, 加入适量 100% ACN 浸泡, 进行脱水处理, 直到胶呈现乳白色为止。去掉 ACN, 晾干后加入 15 μL 胰蛋白酶 (10 μg/mL, sigma), 37℃ 消化 16~24h。用 25 μL 的 50% ACN/5% TFA 溶液处理消化产物 30 min, 终止酶切反应, 重复 1 次, 合并抽提液后, 在真空浓缩仪中进行干燥。用 3 μL 50% ACN/5% TFA 重新溶解样品后, 将 0.5 μL 样品与 0.5 μL 基质液 CHCA 混合后点样于不锈钢点样板上, 置空气中自然风干。

1.7 蛋白质质谱分析

采用 Voyager DE pro 型质量飞行时间质谱仪 (西南大学蚕桑学重点实验室) 对处理好的样品进行分析。离子源加速电压为 20kV, 采用反射模式以提高质量精度, 离子延迟时间 100ns, 真空度为 4×10^{-7} Torr。收集质量范围在 800~2500 D 范围内的信号峰, 用胰蛋白酶自切峰作为内标校正。利用软件 Data explore 对所得到的峰图进行分析。

1.8 蛋白质肽质量指纹图谱的检索

采用标准的检索方法, 利用 MASCOT 在线进行检索, 用 NCBI nr. 2005.01.06 更新的数据库, miss cleavages 设置为 1, mass tolerance 设置为 0.5D。此外, 从

SilkDB/Gene_Annotation/Proteins/SW_ge2k_BGF.pep) 上下载家蚕基因组中预测的基因,构建本地家蚕蛋白质数据库,并利用 GPMW(General Protein/Mass Analysis for Windows)软件构建本地家蚕蛋白质的肽质量指纹图谱数据库。用 GPMW6.0 软件在本地蛋白质数据库中进行比较鉴定^[14]。

2 结果与分析

2.1 家蚕五龄 5 天脂肪体双向凝胶电泳图谱

图 1 为 7cm pH3~10 的胶条分离得到的脂肪体双向电泳图谱。可以看出,蛋白点的分布和聚焦效果比较理想,通过软件分析可以检测到超过 300 个较为明显的蛋白点。但是,由于胶条的长度较短,图中很多蛋白点过于紧凑,这会对蛋白质点的挖取和鉴定产生比较大的影响。因此,我们用 18cm pH3~10 胶条做了进一步展开分离,硝酸银染色后,发现扩展后所得到的图谱背景低,蛋白点的分布更为清晰。经过 3 次重复实验,发现胶之间具有较好重复性,能够满足 2D 分析的要求。通过图象扫描和计算机软件分析从胶中可以明显检测到 722 个蛋白点,它们绝大多数分布在 15~90kD,等电点 pH4~8 之间,其中分子量在 25~80kD,等电点 pH4~7 之间蛋白斑点最多,达 449 个,这为下一步的蛋白鉴定工作提供了有利的帮助。

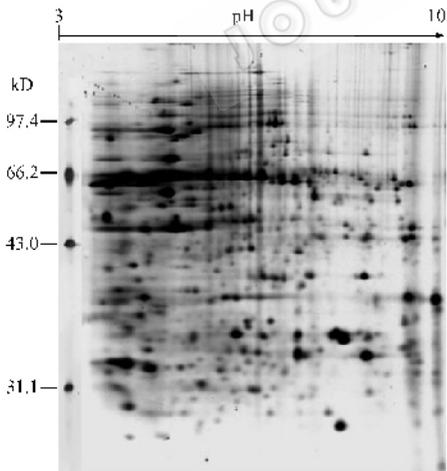


图 1 家蚕五龄 5 天脂肪体双向电泳图谱 (7cm pH3~10)

Fig. 1 Two-dimensional electrophoresis map of proteins extracted from fat of silkworm in 5th day of the fifth instar larvae

2.2 MALDI-TOF MS 质谱分析

将图 2 中较为明显的 41 个蛋白点利用 MALDI-TOF MS 进行了鉴定,结果发现,所得到的肽质量指纹图谱(PMF)的信号峰都较为明显,信噪比较低。将这些峰图利用 Data explore 软件进行了同位素峰

合并后,在数据库中进行检索,结果发现其中的 34 个蛋白点匹配到了较好的结果,占鉴定蛋白总数的 83%,它们得到的序列覆盖度均达到了 25% 以上。以点 9 为例,可以检测到 26 个明显的肽段峰(图 3),在数据检索的结果中它的序列覆盖度达到了 50%,得分为 82,预测到的等电点与分子量与图谱中均比较相符,表 1 列出了匹配峰值的氨基酸序列信息。

在成功鉴定的 34 个蛋白点当中,24 个已经有了相关基因序列的报道,同时通过 MASCOT 在线检索结果进一步得到了验证,其中包括大量与代谢相关的酶类,血液中的重要蛋白 30K protein,不同分子量的热激蛋白,核糖体蛋白和大量的细胞骨架蛋白。另外还有一些蛋白,它们的序列未曾报道,但已经被家蚕基因组数据所预测,例如 aldehyde dehydrogenase 醛氧化酶(点 8),aldo/keto reductase 醛酮还原酶(点 20)。表 2 列出了所有鉴定出的蛋白在 NCBI 和 silkDB 的序列号和预测的功能^[15]。

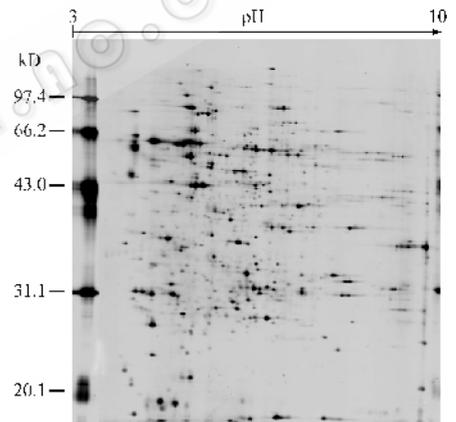


图 2 家蚕五龄 5 天脂肪体双向电泳图谱 (18cm pH3~10)

Fig. 2 Two-dimensional electrophoresis map gel of 18cm extracted from fat of silkworm in 5th day of the fifth instar larvae

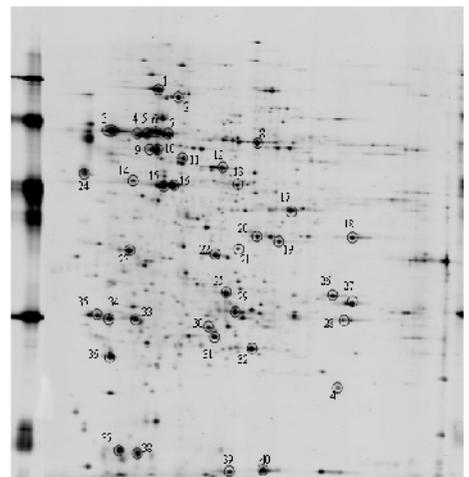


图 3 鉴定的主要蛋白点在双向电泳图中的分布

Fig. 3 Distribution of spots excised from the map of fat of silkworm
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

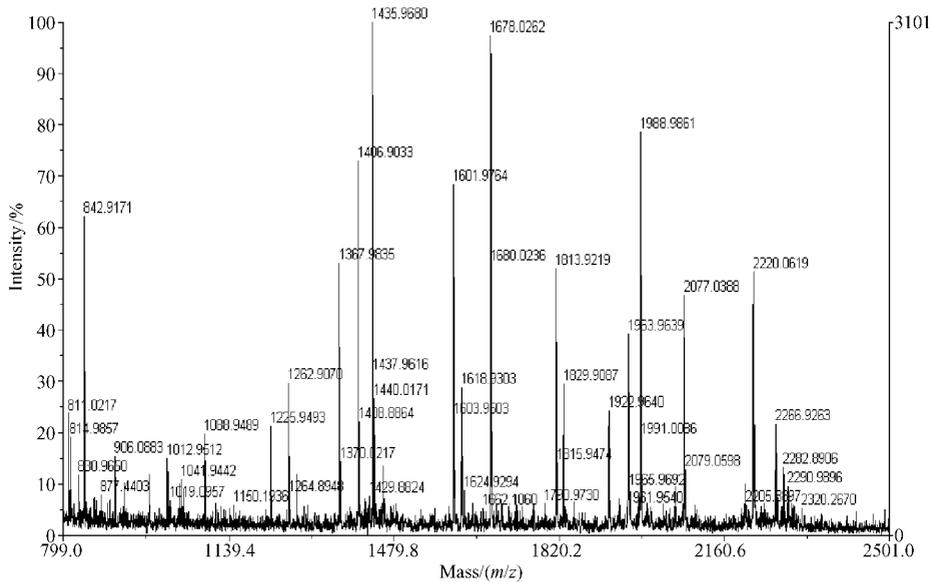


图 4 蛋白点 9 肽质量指纹图谱

Fig.4 PMF of peptides from trypsin digests of spot 9

表 1 蛋白点 9 的在本地检索中的结果

Table 1 Detailed results of spot 9 identification by local searching with software of GPMW

Amino acid residues	Observed	Calculated	Difference	Amino acid sequence
99 - 110	1262.907	1262.449	-0.46	TIAMDGTEGLVR
133 - 144	1367.984	1367.564	-0.42	IINVIGEPIDER
300 - 313	1435.968	1435.599	-0.37	FTQAGSEVSALLGR
271 - 283	1440.017	1439.674	-0.34	VALTGLTVAEYFR
202 - 214	1457.972	1457.797	-0.17	TVLIMELINNVAK
254 - 268	1601.976	1601.846	-0.13	VALVYQMNEPPGAR
84 - 98	1678.026	1677.921	-0.11	LVLEVAQHLGENTVR
396 - 411	1812.929	1813.067	0.14	IMDPNIAGAEHYNVAR
254 - 270	1828.911	1829.112	0.2	VALVYQMNEPPGARAR
284 - 299	1921.94	1922.124	0.18	DQEGQDVLFFIDNIFR
452 - 469	1962.967	1963.223	0.26	FLSQPFQVAEVFTGHACK
377 - 395	1987.993	1988.224	0.23	AIAELGIYPAVDPLDSTSR
133 - 151	2076.05	2076.376	0.33	IINVIGEPIDERGPIPTDK
111 - 132	2219.069	2219.526	0.46	GQPVLDSGPIRIPVGAETLGR

3 讨论

脂肪体是家蚕体内物质和能量代谢的中心,很多生物学反应包括磷脂代谢,碳水化合物代谢,氨基酸代谢等都在脂肪体内有所发生。在幼虫期脂肪体吸收来自血液中的大量的营养物质,除了用于能量消耗以外,将其余的转化为脂肪、蛋白质和糖类贮存,以供应眠期、蛹期和成虫期所需要的能量。早期的研究表明,在催眠期和眠中,脂肪体内含有大量的糖原,在蜕皮前新皮形成的过程中,糖原逐渐减少,这表明脂肪体在新皮形成过程中起到了重要的作用。在本次实验中,大量与代谢相关的酶类在脂肪体中被鉴定出来,如 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH 磷酸甘油醛脱氢还原酶),

Enolase(烯醇酶)等,它们都是在糖酵解过程中极为重要的酶类,例如,果糖-1,6-二磷酸在醛缩酶催化下裂解生成甘油醛-3-磷酸等物质以后,在 GAPDH (点 18)催化下生成 1,3-二磷酸甘油酸,同时使 NAD^+ 还原为 NADH。而 Enolase(点 21)负责将生成的 1,3-二磷酸甘油酸转化为磷酸烯醇丙酮酸进而转化为丙酮酸生成 ATP,从而为生命活动提供了能量,这些与代谢相关的重要的酶类在脂肪体中都显示了较高的表达量。

脂肪体做为重要的免疫反应器官,分泌合成了多种与分子免疫相关的蛋白,如抗菌肽 cecropins, defensins 等。同时,许多细胞内的分子机制包括氧化还原反应等,对于昆虫的免疫系统也起着极为重要的作用。本次实验所鉴定的谷胱甘肽硫解转移酶

(点 32) 是一类在众多物种体内都存在的氧化还原酶系。在昆虫体内, 它参与了许多分子的解毒机制, 在保护组织以抵御氧化侵害及氧化压力中起重要的作用^[16]。热激蛋白是生物体内相当保守的基因家族, 在正常条件下它帮助蛋白折叠运输, 参与降解多余的蛋白, 维持细胞正常生命活动。最近的研究表

明, 热激蛋白在免疫反应中起到了重要的作用, 在生物体受到外界环境压力时, 热激蛋白具有保护细胞的作用^[17,18]。Kyung Han Song 近期的研究表明, 用微生物感染家蚕后, 家蚕血液中热激蛋白含量有明显上调的趋势^[19]。

表 2 五龄 5 天脂肪体蛋白点鉴定表

Table 2 List of proteins identified from fat of *Bombyx mori* in 5th day of the fifth instar larvae

Spot No	Protein name	Cell Function	NCBI entry	SilkDB entry	M(kDa)	pI	Seq(%)
1	heat shock 70 kD protein cognate	Molecular chaperone	gi 3426021	Bmb011274	73	5.13	22
2	Heat shock protein cognate	Molecular chaperone	gi 20563125	Bmb009360	71	5.33	29
3	protein disulfide isomerase	Stress response	gi 12025459	Bmb022619	55	4.06	30
4	beta-tubulin	structural molecule activity	gi 3399724	Bmb008789	50	4.78	32
5	beta-tubulin	structural molecule activity	gi 3399724	Bmb008789	50	4.78	37
6	alpha-tubulin	structural molecule activity	gi 1608681	Bmb004930	50	4.96	33
7	disulfide-isomerase like protein ERp57	Stress response	gi 162241290	Bmb015185	55	5.26	25
8	similar to aldehyde dehydrogenase	Aldehyde dehydrogenase activity		Bmb024179	51	6.93	31
9	H+ transporting synthase beta subunit	ATP binding activity	gi 195102940	Bmb016644	54	5.32	42
10	H+ transporting synthase beta subunit	ATP binding activity	gi 195102940	Bmb016644	54	5.32	58
11	farnesoic acid o-methyltransferase	metabolism		Bmb025528	24	5.08	48
12	enolase	Carbohydrate metabolism		Bmb012059	62	4.89	37
13	Beta-ureidopropionase	Pyrimidine metabolism		Bmb017628	44	6.16	50
14	ribosomal protein	Structural protein	gi 54609281	Bmb028933	33	4.87	31
15	Actin 3	cytoskeleton	gi 5749	Bmb012212	42	5.1	38
16	Actin 3	cytoskeleton	gi 5749	Bmb012212	42	5.1	46
17	unknown						
18	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Carbohydrate metabolism	gi 190309026	Bmb006175	35	8.31	39
19	cytosolic malate dehydrogenase	Carbohydrate metabolism	gi 187248533	Bmb020504	35	6.85	35
20	aldo/keto reductase	Carbohydrate metabolism ,		Bmb021195	41	8.96	26
21	Ester hydrolase	Hydrolase activity		Bmb024989	38	6	38
22	ribosomal P0 protein	constituent of ribosome	gi 54609187	Bmb011134	34	5.61	34
23	unknown						
24	unknown						
25	30K protein	hemolymph protein	gi 110909		29	7.63	35
26	similar to porin	anion transport		Bmb013324	20	7.66	30
27	30K protein	hemolymph protein		Bmb021422	33	9.28	36
28	Enoyl-CoA hydratase 1	Fatty acid metabolism		Bmb033769	32	8.44	27
29	30K protein	hemolymph protein	gi 5740	Bmb019519	30	6.25	35
30	heat shock protein hsp21.4	Molecular chaperone	gi 56378321	Bmb018980	21	5.79	32
31	triosephosphate isomerase	Carbohydrate metabolism	gi 52222824	Bmb005513	27	5.67	35
32	Glutathione S-transferase 2	Stress response	gi 54013453	Bmb008291	23	5.98	36
33	unkown						
34	FK506-binding protein	chaperone activity	gi 122474506	Bmb001823	17	4.35	40
35	unknown						
36	translationally controlled tumor protein	translation factor activity		Bmb017358	20	4.51	62
37	unkown						
38	unkown						
39	30K protein	hemolymph protein	gi 184790	Bmb019518	30	6.4	25
40	30K protein	hemolymph protein	gi 184790	Bmb019518	30	6.4	30
41	peptidylprolyl isomerase B	protein folding	gi 195103068	Bmb033292	22	7.88	36

家蚕 30K 蛋白是家蚕所特有的一类低分子量脂蛋白, 它由脂肪体合成, 然后分泌到血液中, 成为家蚕生长发育过程中的重要的贮藏蛋白之一。在 5

龄初期, 在脂肪体内几乎检测不到 30K 蛋白基因 mRNA, 但在五龄 3 天其 mRNA 的活性急剧上升, 在五龄 4 天达到最大值, 之后逐渐下降, 在化蛹时完全

消失。家蚕 30K 家族的成员众多, Mori S 等曾从基因组中分离到了 3 条序列, 分别命名为 6G1, 19G1 和 21G1^[20]。Maki N 等用层析的方法分离了 5 种 30K 蛋白, 命名为 Lp1 ~ 5。家蚕基因组完成以后, 本实验室孙全等人利用信息分析和 RT-PCR 等实验, 得到了 10 条 30K 蛋白基因的序列, 分别命名为 Bmlp1 ~ Bmlp10^[21]。本实验利用蛋白质组学的手段在 5 龄 5 天的脂肪体中鉴定出了 Bmlp4 和 Bmlp7 蛋白的存在, 并且发现 Bmlp4 在分子量为 18kD 左右处出现, 这可能是在脂肪体中剩余的 30K 蛋白被体内的酶类消化降解的结果。它对人们认识家蚕 30K 在脂肪体中的合成、分泌及降解提供了新信息, 也为研究 30K 蛋白家族成员的功能差异提供了新的研究思路。

此外, 我们还鉴定出了一些重要的骨架蛋白, 如 alpha-tubulin, beta-tubulin, ribosomal protein, Actin 3, 它们对维持细胞正常的生命活动也起到了重要的作用。

目前, 家蚕蛋白质组的工作在国内外已经逐渐受到重视, 并取得了可喜的进展, 有理由相信, 家蚕蛋白质组学将在功能基因组研究中发挥越来越重要的重用。对于家蚕不同组织、器官和不同发育时期而言, 要获得高质量的蛋白质图谱和鉴定结果, 其针对具体样品的实验条件的建立是首先必须解决的关键问题。本次实验对脂肪体的双向电泳图谱的建立和蛋白点的鉴定工作将为后续的比较蛋白质组学工作提供重要参考。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Xia Q, Zhou Z, Lu C, et al. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science*, 2004, **306**: 1937 - 1940.
- [2] Cheng D, Xia Q, Zhao P, et al. EST-based profiling and comparison of gene expression in the silkworm fat body during metamorphosis. *Arch Insect Biochem Physiol*, 2006, **61**: 10 - 23.
- [3] Shen YH (沈以红), Cheng DJ (程道军), Zha XF (查幸福), et al. The gene expression profile of the fat-body of silkworm, *Bombyx mori* I. gene expression profile of the fat-body of the 5th instar *Bombyx mori* larvae. *Science of Sericulture (蚕业科学)*, 2004, **30** (1): 24 - 27.
- [4] Cheng TC, Zhao P, Liu C, et al. Structures, regulatory regions, and inductive expression patterns of antimicrobial peptide genes in the silkworm *Bombyx mori*. *Genomics*, 2006, **87** (3): 356 - 65.
- [5] Shen FY (沈飞英), Zhong BX (钟伯雄), Lou CR (楼程富), et al. A comparison of the protein composition of the middle silk gland cells of the fifth instar larvae of silkworm. *Scientia Agricultura Sinica (中国农业科学)*, 2005, **38** (5): 1053 - 1058.
- [6] Wu WC (吴卫成), Zhong BX (钟伯雄), Meng ZQ (孟智启), 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 (蚕业科学)*, 2005, **31** (3): 273 - 279.
- [7] Jin YX (靳远祥), Xu MK (徐孟奎), Chen YY (陈玉银), et al. Two-dimensional electrophoresis analysis of proteins from the colleterial gland of silkworm (*Bombyx mori* L.). *Chinese Journal of Biotechnology (生物工程学报)*, 2004, **20** (4): 590 - 593.
- [8] Jin YX (靳远祥), Xu MK (徐孟奎), Chen YY (陈玉银), et al. Extraction and two-dimensional electrophoresis analysis of proteins from the colleterial gland of silkworm, *Bombyx mori*. *Science of Sericulture (蚕业科学)*, 2005, **31** (1): 97 - 99.
- [9] Yan XP (颜新培), Zhong BX (钟伯雄), Cao JS (曹家树), et al. Establishment of 2D-page protein patterns of silkworm embryo during incubating stage. *Science of Sericulture (蚕业科学)*, 2004, **30** (1): 28 - 30.
- [10] Yan XP (颜新培), Zhong BX (钟伯雄), Cao JS (曹家树), et al. Analysis of protein patterns from embryo of silkworm *Bombyx mori* at later stages by two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Acta Entomologica Sinica (昆虫学报)*, 2005, **48** (2): 295 - 300.
- [11] Pingbo Z, Yoichi A, Kohji Y, et al. Proteomic analysis of silk gland proteins from the silkworm, *Bombyx mori*. *Proteomics*, 2006, **6** (8): 2586 - 2599.
- [12] 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.
- [13] Bradford MM. 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.
- [14] Peri S, Steen H, Pandey A. GPMW— a software tool for analyzing proteins and peptides. *Trends Biochem Sci*, 2001, **11**: 687 - 689.
- [15] Wang J, Xia QY, He XM, et al. Silk DB: a knowledge base for silkworm biology and genomics. *Nucleic Acids Res*, 2005, **33**: 399 - 402.
- [16] Enayati AA, Ranson H, Hemingway J. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Mol Biol*, 2005, **14** (1): 3 - 8.
- [17] Prohaszka Z, Fust G. Immunological aspects of heat-shock proteins — the optimum stress of life. *Molecular Immunology*, 2004, **41**: 29 - 44.
- [18] Kaufmann SH, Schoel B, Embden JD, et al. Heat-shock protein 60: implications for pathogenesis of and protection against bacterial infections. *Immunol Rev*, 1991, **121**: 67 - 90.
- [19] Kyung HS, Su JJ, Young RS, et al. Identification of up-regulated proteins in the hemolymph of immunized *Bombyx mori* larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D*, 2006, **1**: 260 - 266.
- [20] Mori S, Izumi S, Tomino S. Structures and organization of major plasma protein genes of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Molecular Biology*, 1991, **218**: 7 - 12.
- [21] Sun Q, Zhao P, Lin Y, et al. Analysis of the structure and expression of 30K protein genes of silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Science*, 2007, **14**: 5 - 13.